



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 18 450 T2** 2004.07.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 982 988 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 18 450.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/07636**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 919 778.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/052415**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **24.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 1/00**

**C07K 14/00, C07K 17/00, C07K 14/47,
A61K 47/48**

(30) Unionspriorität:

859931 21.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

**University of Maryland, Baltimore, Baltimore, Md.,
US**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

FASANO, Alessio, West Friendship, US

(54) Bezeichnung: **IM WESENTLICHEN REINES ZONULIN ALS PHYSIOLOGISCHER MODULATOR VON "TIGHT
JUNCTIONS" BEI SÄUGERN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Entwicklung der vorliegenden Erfindung wurde von der University of Maryland, Baltimore, Maryland, unterstützt.

[0002] Die hierin beschriebene Erfindung wurde mit Geldern von den National Institutes of Health (NIH 1-RO1-DK 48373-01A2) unterstützt. Die Regierung hat gewisse Rechte.

GEBTET DER ERFINDUNG

[0003] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein im Wesentlichen reines Säugetierprotein, im Folgenden "Zonulin", das ein physiologischer Modulator der Säugetier-Tight Junctions ist, als auch auf Verfahren zur Verwendung desselben.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

I. Funktion und Regulierung von intestinalen Tight Junctions

[0004] Die tj oder die Zonula occludens (im Folgenden "ZO") sind eines der Kennzeichen absorptiver und sekretorischer Epithelia (Madara, J. Clin. Invest., 83: 1089–1094 (1989); und Madara, Textbook of Secretory Diarrhea, Hrsg. Lebenthal et al., Kapitel 11, Seiten 125–138 (1990)). Als Barriere zwischen apikalen und basolateralen Kompartments regulieren sie selektiv die passive Diffusion von Ionen und wasserlöslichen gelösten Stoffen über den parazellulären Weg (Gumbiner, Am. J. Physiol., 253 (Cell Physiol. 22): C749–C758 (1987)). Diese Barriere hält einen Gradienten aufrecht, der durch die Aktivität von Stoffwechselwegen, die mit der transzellulären Route assoziiert sind, erzeugt wird (Diamond, Physiologist, 20: 10–18 (1977)).

[0005] Variationen in der transepithelialen Leitfähigkeit können üblicherweise Änderungen in der Permeabilität der parazellulären Bahn zugeschrieben werden, da die Widerstände von Enterozyten-Plasmamembranen relativ hoch sind (Madara, oben). Die ZO stellt in dieser parazellulären Bahn die Hauptbarriere dar und der elektrische Widerstand von Epithelialgeweben scheint von der Anzahl der Transmembran-Proteinstränge und ihrer Komplexität in der ZO abzuhängen, wie es durch Elektronenmikroskopie an Gefrierbruch beobachtet wurde (Madara et al., J. Cell Biol., 101: 2124–2133 (1985)). Es gibt reichlich Beweise, dass ZO, die einmal als statische Strukturen angesehen wurden, in Wirklichkeit dynamisch sind und sich an eine Vielzahl entwicklungsbedingter Umstände (Magnuson et al., Dev. Biol., 67: 214–224 (1978); Revel et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 40: 443–455 (1976); und Schneeberger et al., J. Cell Sci., 32: 307–324 (1978)), physiologischer Umstände (Gilula et al., Dev. Biol., 50: 142–168 (1976); Madara et al., J. Membr. Biol., 100: 149–164 (1987); Mazariegos et al., J. Cell Biol., 98: 1865–1877 (1984); und Sardet et al., J. Cell Biol., 80: 96–117 (1979)), und pathologischer Umstände (Milks et al., J. Cell Biol., 103: 2729–2738 (1986); Nash et al., Lab. Invest., 59: 531–537 (1988); und Shasby et al., Am. J. Physiol., 255 (Cell Physiol., 24): C781–C788 (1988)) anpassen. Die regulatorischen Mechanismen, die dieser Anpassung zu Grunde liegen, sind noch vollständig ungeklärt. Allerdings ist klar, dass die Anordnung der ZO in Gegenwart von Ca^{2+} das Resultat zellulärer Wechselwirkungen ist, die eine komplexe Kaskade chemischer Events auslösen, die letztlich zur Bildung und Modulierung eines organisierten Netzwerks aus ZO-Elementen führt, dessen Zusammensetzung nur teilweise charakterisiert wurde (Diamond, Physiologist, 20: 10–18 (1977)). Kürzlich wurde ein Kandidat für die Transmembran-Proteinstränge, Occludin, identifiziert (Furuse et al., J. Membr. Biol., 87: 141–150 (1985)).

[0006] Sechs Proteine wurden in einer zytoplasmischen submembranösen Plaque identifiziert, welche Membrankontakten zu Grunde liegt, allerdings bleiben ihre Funktionen noch zu klären (Diamond, oben). ZO-1 und ZO-2 existieren als Heterodimer (Gumbiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 3460–3464 (1991)) in einem Detergens-stabilen Komplex mit einem nicht-charakterisierten 130 kD-Protein (ZO-3). Die meisten immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen haben ZO-1 genau unterhalb der Membrankontakte lokalisiert (Stevenson et al., Molec. Cell Biochem., 83: 129–145 (1988)). Zwei andere Proteine, Cingulin (Citi et al., Nature (London), 333: 272–275 (1988)) und das 7H6-Antigen (Zhong et al., J. Cell Biol., 120: 477–483 (1993)) sind weiter von der Membran lokalisiert und wurden noch nicht geklont. Rab 13, ein kleines GTP-bindendes Protein wurde kürzlich in der Junction-Region lokalisiert (Zahraoui et al., J. Cell Biol., 124: 101–115 (1994)). Von anderen kleinen GTP-bindenden Proteinen ist bekannt, dass sie das kortikale Zytoskelett regulieren, d. h. rho reguliert eine Aktin-Membrananheftung in fokalen Kontakten (Ridley et al., Cell, 70: 389–399 (1992)) und rac reguliert eine durch Wachstumsfaktor induzierte Membran-Kräuselung (Ridley et al., Cell, 70: 401–410 (1992)). Basierend auf der Analogie mit den bekannten Funktionen von Plaque-Proteinen in den besser charakterisierten Zell-Junctions, fokalen Kontakten (Guan et al., Nature, 358: 690–692 (1992)) und adhärenenten Junctions (Tsukita et al., J. Cell Biol., 123: 1049–1053 (1993)) wurde die Hypothese aufgestellt, dass tj-assoziierte Plaque-Proteine bei der Umwandlung von Signalen in beiden Richtungen durch die Zellmembran und bei regulierenden Verknüpfungen zum kortikalen Aktin-Zytoskelett involviert sind.

[0007] Um den vielen unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Angriffen, denen Epithelia unterworfen sind, zu begegnen, muss die ZO zu schnellen und koordinierten Reaktionen fähig sein, die das Vorliegen eines komplexen regulatorischen Systems erfordern. Die genaue Charakterisierung der Mechanismen, die bei der Anordnung und Regulierung der ZO involviert sind, stellt einen Bereich gegenwärtiger aktiver Untersuchungen dar.

[0008] Es liegt nun eine Reihe von Beweisen vor, dass strukturelle und funktionelle tj-Verknüpfungen zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dem tj-Komplex absorbierender Zellen existieren (Gumbiner et al., oben; Madara et al., oben; und Drenchahn et al., J. Cell Biol., 107: 1037–1048 (1988)). Das Aktin-Zytoskelett besteht aus einem komplizierten Maschenwerk aus Mikrofilamenten, dessen genaue Geometrie durch einen großen Stamm Aktin-bindender Proteine reguliert wird. Ein Beispiel dafür, wie der Phosphorylierungszustand eines Aktin-bindenden Proteins eine Zytoskelettbindung an die Zellplasmamembran regulieren könnte, ist das myristylierte, Alanin-reiche C-Kinase-Substrat (nachfolgend als "MARCKS" bezeichnet). MARCKS ist ein spezifisches Protein-Kinase C-Substrat (nachfolgend als "PKC" bezeichnet), das mit der zytoplasmatischen Oberseite der Plasmamembran assoziiert ist (Aderem, Elsevier Sci. Pub. (UK), Seiten 438–443 (1992)). In seiner nicht-phosphorylierten Form vernetzt MARCKS mit dem Membran-Aktin. Somit ist es wahrscheinlich, dass das Aktin-Maschenwerk, das über MARCKS mit der Membran assoziiert ist, relativ starr ist (Hartwig et al., Nature, 356: 618–622 (1992)). Aktivierte PKC phosphoryliert MARCKS, das von der Membran freigesetzt wird (Rosen et al., J. Exp. Med., 172: 1211–1215 (1990); und Thelen et al., Nature, 351: 320–322 (1991)). Das an MARCKS gebundene Aktin ist wahrscheinlich von der Membran räumlich getrennt und plastischer. Wenn MARCKS dephosphoryliert wird, kehrt es zu der Membran zurück, wo es erneut mit Aktin vernetzt (Hartwig et al., oben; und Thelen et al., oben). Diese Daten legen nahe, dass das F-Aktin-Netzwerk durch einen PKC-abhängigen Phosphorylierungsprozess, der Aktin-bindende Proteine involviert (MARCKS ist eines von ihnen), neu geordnet werden kann.

[0009] Von einer Vielzahl intrazellulärer Mediatoren wurde gezeigt, dass sie die tj-Funktion und/oder -Struktur verändern. Tight Junctions aus der Amphibiengallenblase (Duffey et al., Nature, 204: 451–452 (1981)), aus Goldfischdünndarm (Bakker et al., Am. J. Physiol., 246: G213–G217 (1984)) wie auch aus Flunderdünndarm (Krasney et al., Fed. Proc., 42 : 1100 (1983)) zeigen eine verstärkte Resistenz gegenüber einem passiven Ionenstrom, wenn intrazelluläres cAMP erhöht ist. Die Behandlung von Amphibiengallenblase mit Ca^{2+} -Ionophor scheint auch die tj-Resistenz zu erhöhen und Veränderungen in der tj-Struktur zu induzieren (Palant et al., Am. J. Physiol., 245: C203–C212 (1983)). Ferner erhöht eine Aktivierung von PKC durch Phorbol ester die parazelluläre Permeabilität sowohl in Nieren- (Ellis et al., C. Am. J. Physiol., 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol., 32): F293–F300 (1992)) als auch in intestinalen (Stenson et al., C. Am. J. Physiol., 265 (Gastrointest. Liver Physiol., 28): G955–G962 (1993)) Epithelialzelllinien.

II. Zonula Occludens-Toxin

[0010] Die meisten *Vibrio cholerae*-Vakzinkandidaten, die durch Deletieren des *ctxA*-Gens, das für Cholera-toxin (CT) kodiert, entwickelt wurden, sind fähig, hohe Antikörperreaktionen zu zeigen, allerdings entwickelt noch mehr als die Hälfte der Impfstoffe (bzw. Vakzine) milde Diarrhoe (Levine et al., Infect. Immun., 56(1): 161–167 (1988)). Bei dem gegebenen Ausmaß der Diarrhoe, die bei Fehlen von CT induziert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass *V. cholerae* andere enterotoxigene Faktoren produziert, die noch in den Stämmen vorhanden sind, bei denen die *ctxA*-Sequenz deletiert wurde (Levine et al., oben). Das Ergebnis war, dass ein zweites Toxin, Zonula occludens-Toxin (nachfolgend als "ZOT" bezeichnet), das von *V. cholerae* entwickelt wird und das zur restlichen Diarrhoe beiträgt, entdeckt wurde (Fasano et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 8: 5242–5246 (1991)). Das *zot*-Gen befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den *ctx*-Genen. Der hohe Prozentsatz des gleichzeitigen Auftretens des *zot*-Gens mit den *ctx*-Genen unter den *V. cholerae*-Stämmen (Johnson et al., J. Clin. Microb., 31/3: 732–733 (1993) und Karasawa et al., FEBS Microbiology Letters, 106: 143–146 (1993)) legt eine mögliche synergistische Rolle von ZOT bei der Verursachung einer akuten dehydrierenden Diarrhoe, die für Cholera typisch ist, nahe. In jüngerer Zeit wurde das *zot*-Gen auch in anderen enteralen Pathogenen (Tschape, 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis, 47 (Abstr.) (1994)) identifiziert.

[0011] Es wurde bereits früher gefunden, dass ZOT, wenn es an ilealer Mucosa von Kaninchen getestet wurde, die intestinale Permeabilität erhöht, indem die Struktur der intrazellulären tj moduliert wird (Fasano et al., oben). Es wurde festgestellt, dass die intestinale Mucosa als Folge der Modifizierung des parazellulären Weges permeabler wird. Ferner wurde festgestellt, dass ZOT den an Na^+ -Glukose gekoppelten aktiven Transport nicht beeinträchtigt, nicht zytotoxisch ist, und auch den transepithelialen Widerstand nicht vollständig eliminiert (Fasano et al., oben).

[0012] In jüngster Zeit wurde herausgefunden, dass ZOT fähig ist, tj in der intestinalen Mucosa reversibel zu öffnen; somit ist ZOT, wenn es zusammen mit einem therapeutischen Agens verabreicht wird, fähig, eine intestinale Abgabe des therapeutischen Agens zu bewirken, wenn es in einer oralen Dosierungszusammensetzung

zung für eine intestinale Arzneimittelabgabe verwendet wird (WO 96/37196) und Fasano et al., J. Clin. Invest., 99: 1158–1164 (1997)). Es wurde auch herausgefunden, dass ZOT fähig ist, tj in der Nasenschleimhaut reversibel zu öffnen; somit ist ZOT, wenn es gemeinsam mit einem therapeutischen Agens verabreicht wird, fähig, die nasale Absorption eines therapeutischen Agens zu erhöhen.

[0013] Ein ZOT-Rezeptor wurde aus einer intestinalen Zelllinie identifiziert und gereinigt. Der ZOT-Rezeptor stellt einen ersten Schritt des parazellulären Weges dar, der bei der Regulierung der intestinalen und nasalen Permeabilität involviert ist.

III. Die Blut-Hirn-Schranke

[0014] Die Blut-Hirn-Schranke (BBB = blood-brain barrier) ist eine extrem dünne Membranbarriere, die gegenüber einer freien Diffusion von gelösten Stoffen hoch-resistent ist und Blut und Gehirn trennt. In molekularen Dimensionen ist die Bewegung von Arzneimitteln oder gelösten Stoffen durch diese Membran im Wesentlichen Null, es sei denn, die Verbindung hat zu einem der verschiedenen spezialisierten Enzym-artigen Transportmechanismen Zugang, die in die BBB-Membran eingebettet sind. Die BBB besteht eher aus vielen Zellen als aus einer Einzelschicht aus Epithelzellen. Von den vier verschiedenen Zelltypen, die die BBB bilden (Endothelialzellen, Peryzyten, Astrozyten und Neuronen) stellt die Endothelialzellkomponente der Kapillaren den limitierenden Faktor für die Permeabilität der BBB dar. Das Kapillarendothelium im Vertebratengehirn und Rückenmark ist mit tj ausgestattet, die die interendothelialen Poren schließen, die normalerweise in den mikrovaskulären Endothelialbarrieren (bzw. -sperrern) in peripheren Geweben vorliegen. Schließlich sind Endothelial-tj für die begrenzte Permeabilität der BBB verantwortlich.

[0015] Bisher waren noch keine effizienten Systeme verfügbar, um in effizienter Weise Verbindungen durch die BBB abzugeben, es sei denn, sie gehören zu einer der folgenden Kategorien:

- (1) Lipidlösliche Arzneimittel mit einem Molekulargewicht von weniger als 600 Dalton, zum Beispiel Progesteron, Aldosteron oder Cortisol;
- (2) Arzneimittel, die Plasmaproteine binden, z. B. Propranolol, Bupivacain, Imipramin, Diazepam oder Cyclosporin;
- (3) Nährstoffe, die an spezielle trägervermittelte Transportsysteme binden, die sowohl in den lumenalen als auch antilumenalen Membranen der BBB eingebettet sind, z. B. Glukose, Glutamat oder Phenylalanin; oder
- (4) Peptide, die an spezifische Rezeptoren binden, welche die Peptidtranszytose durch die BBB vermitteln, z. B. Insulin und Transferrin.

[0016] In der vorliegenden Erfindung wurden Säugetierproteine, die immunologisch und funktionell mit ZOT verwandt sind und die als physiologischer Modulator von Säugetier-Tight Junctions fungieren, identifiziert und gereinigt. Diese Säugetierproteine, die als "Zonulin" bezeichnet werden, sind zur Erhöhung der Absorption von therapeutischen Agenzien durch tj von intestinaler und nasaler Mucosa, wie auch durch tj der BBB, nützlich.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Identifizierung eines Säugetierproteins, das immunologisch und funktionell mit ZOT verwandt ist und das als physiologischer Modulator von Säugetier-Tight Junctions fungiert.

[0018] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Reinigung und Charakterisierung dieses Säugetierproteins.

[0019] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung des Säugetierproteins als Enhancer für die Abgabe eines therapeutischen Agens durch Säugetier-Tight Junctions.

[0020] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung dieses Säugetierproteins als Enhancer für die intestinale Abgabe eines therapeutischen Agens.

[0021] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung dieses Säugetierproteins als Enhancer für eine nasale Abgabe eines therapeutischen Agens.

[0022] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung dieses Säugetierproteins als Enhancer für die Abgabe eines therapeutischen Agens durch die Blut-Hirn-Schranke.

[0023] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen, die zur Abgabe eines therapeutischen Agens wirksam sind.

[0024] Diese und andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung, die aus der nachfolgend angeführten detaillierten Beschreibung der Erfindung ersichtlich werden, wurden in einer Ausführungsform durch im Wesentlichen reines Zonulin gelöst, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird und das fähig ist, Säugetier-Tight Junctions reversibel zu öffnen.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch im Wesentlichen reines Zonulin gelöst, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat und eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr
Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln (SEQ ID NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
(SEQ ID NO:2);
- (3) Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
(SEQ ID NO:3); und
- (4) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val
Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
(SEQ ID NO:4),

ausgewählt ist, oder eine interne Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp
Leu (SEQ ID NO:8); und
- (2) Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu
Asn Gly Gly (SEQ ID NO:9).

ausgewählt ist.

[0026] In einer anderen Ausführungsform werden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Abgabe eines therapeutischen Agens gelöst, welche umfasst:

(A) ein therapeutisches Agens; und

(B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge an gereinigtem Zonulin, wobei das Zonulin ein scheinbares Molekulargewicht von 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird, und das fähig ist, Säugetier-Tight Junctions reversibel zu öffnen, und das vorzugsweise eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala
Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr
Leu Val Ile Gln (SEQ ID NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu (SEQ ID NO:2);
- (3) Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala
Val Ser (SEQ ID NO:3); und
- (4) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser
Gly Gly Val Leu Val Gln Pro
Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO:4),

ausgewählt ist, oder eine interne Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys
Val Gly Asp Leu (SEQ ID
NO:8); und
- (2) Leu Ser Glu Val Thr Ala Val
Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ
ID NO:9).

ausgewählt ist.

[0027] In einer noch anderen Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren zur Abgabe eines therapeutischen Agens gelöst, das Verabreichung an ein Subjekt, das einen Bedarf dafür hat, einer Zusammensetzung umfasst, welche umfasst:

- (A) ein therapeutisches Agens, und
- (B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge Zonulin, wobei das Zonulin ein scheinbares Molekulargewicht von 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird, und das fähig ist, Säugetier-Tight Junctions reversibel zu öffnen, und das vorzugsweise eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala
Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr
Leu Val Ile Gln (SEQ ID
NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu (SEQ
ID NO:2);
- (3) Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala
Val Ser (SEQ ID NO:3); und
- (4) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser
Gly Gly Val Leu Val Gln Pro
Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ
ID NO:4).

ausgewählt ist, oder eine interne Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus

- (1) Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys
Val Gly Asp Leu (SEQ ID
NO:8); und
- (2) Leu Ser Glu Val Thr Ala Val
Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ
ID NO:9).

ausgewählt ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0028] **Fig. 1** zeigt die Wirkung von gereinigtem Zonulin aus Kaninchendarm (■) im Vergleich zu verschiedenen negativen Kontrollen (Fraktion 2 (◇); Fraktion 3 (•); Fraktion 4 (▲); und Fraktion 5 (□) aus einer Q-Sepha-

rosensäule, auf den Gewebewiderstand (Rt) von CaCo₂-Zellmonolayer.

[0029] **Fig. 2** zeigt den Effekt von gereinigtem Zonulin aus Kaninchendarm (■) im Vergleich zu der negativen Kontrolle (□) auf den Gewebewiderstand (Rt) von Kaninchen-Ileum, das in Ussing-Kammern eingebaut war.

[0030] **Fig. 3** zeigt den Effekt von gereinigtem Zonulin aus Kaninchendarm (■) im Vergleich zu den negativen Kontrollen (Zonulin + anti-ZOT-Antikörper (□); Zonulin + anti-tau-Antikörper (Δ); und tau (▲)) auf den Gewebewiderstand (Rt) von Kaninchen-Ileum, das in Ussing-Kammern eingebaut war.

[0031] Die **Fig. 4A** und **4B** zeigen den Effekt von gereinigtem Zonulin entweder aus Menschenherz (▲) oder Menschengehirn (□) im Vergleich zu der negativen Kontrolle (■) auf den Gewebewiderstand (Rt) von Affen-Rhesus-Jejunum (**Fig. 4A**) und Affen-Rhesus-Ileum (**Fig. 4B**), die in Ussing-Kammern montiert sind.

[0032] Die **Fig. 5A** und **5B** zeigen den Effekt von gereinigtem Zonulin entweder aus Menschenherz (▲) oder Menschengehirn (□) im Vergleich zu der negativen Kontrolle (■) auf den Gewebewiderstand (Rt) von Kaninchen-Jejunum (**Fig. 5A**) und Kaninchen-Ileum (**Fig. 5B**), die in Ussing-Kammern montiert sind.

[0033] **Fig. 6** zeigt einen Vergleich der N-terminalen Sequenz von Zonulin, das aus Kaninchen und humanen Geweben gereinigt wurde.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] Wie oben diskutiert wurde, wurde in einer Ausführungsform die oben beschriebene Aufgabe der vorliegenden Erfindung durch im Wesentlichen reines Zonulin gelöst, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird, und das fähig ist, Säugetier-Tight Junctions reversibel zu öffnen, und das vorzugsweise eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr
Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln (SEQ ID NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
(SEQ ID NO:2);
- (3) Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
(SEQ ID NO:3); und
- (4) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val
Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Agr Leu
(SEQ ID NO:4),

ausgewählt ist, oder eine interne Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe, bestehend aus:

- (1) Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp
Leu (SEQ ID NO:8); und
- (2) Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu
Asn Gly Gly (SEQ ID NO:9).

ausgewählt ist.

[0035] Zonulin wird in verschiedenen Säugetierzellen und -geweben produziert oder gefunden, z. B. Kaninchen- oder Menschenzellen/-gewebe. Für die vorliegende Erfindung ist der besondere Säugetier-Zell/Gewebe-Typ, aus dem Zonulin stammt, nicht kritisch. Beispiele für solche Säugetiergewebetypen umfassen Herz, Lunge, Darm, Leber, Gehirn, Niere, Milz und Pankreas.

[0036] Zonulin kann zum Beispiel durch Affinitäts-Reinigungs-Chromatographie unter Verwendung von anti-ZOT-Antikörpern erhalten und gereinigt werden, wie es im folgenden Beispiel 3 beschrieben wird.

[0037] Der Ausdruck "biologische Zonulin-Aktivität", wie er hier verwendet wird, bezeichnet die Fähigkeit, die Permeabilität reversibel zu erhöhen, indem die Struktur von interzellulären tj moduliert wird.

[0038] In einer anderen Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Abgabe eines therapeutischen Agenses gelöst, wobei diese umfasst:

- (A) ein therapeutisches Agens, und
- (B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge an gereinigtem Zonulin.

[0039] Die pharmazeutische Zusammensetzung ist vorzugsweise eine orale Dosierungszusammensetzung zur intestinalen Abgabe, eine nasale Dosierungszusammensetzung zur nasalen Abgabe oder eine intravenöse Dosierungszusammensetzung zur Abgabe durch die Blut-Hirn-Schranke.

[0040] Die orale Dosierungszusammensetzung zur intestinalen Abgabe eines therapeutischen Agens umfasst:

- (A) ein therapeutisches Agens und
- (B) eine die intestinale Absorption verstärkende wirksame Menge an gereinigtem Zonulin. Orale Dosierungszusammensetzungen zur Abgabe in den Dünndarm, z. B. zur Abgabe in den Dünndarm, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Solche orale Dosierungszusammensetzungen umfassen im Allgemeinen magensaft-resistente Tabletten oder Kapseln (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Ausgabe, Hrsg. Osol, Mack Publishing Co., Kapitel 89 (1980); Digenis et al., J. Pharm. Sci., 83: 915–921 (1994); Vantini et al., Clinica Terapeutica, 145: 445–451 (1993); Yoshitomi et al., Chem. Pharm. Bull., 40: 1902–1905 (1992); Thoma et al., Pharmazie, 46: 331–336 (1991); Marishita et al., Drug Design and Delivery, 7: 309–319 (1991); und Lin et al., Pharmaceutical Res., 8: 919–924 (1991)).

[0041] Tabletten werden durch Zusatz von zum Beispiel entweder Celluloseacetatphthalat oder Celluloseacetaterephthalat magensaft-resistent gemacht.

[0042] Kapseln sind feste Dosierungsformen, in die das therapeutische Agens (die therapeutischen Agenzien) in entweder einem harten oder weichen, löslichen Behälter oder einer harten oder weichen löslichen Schale aus Gelatine eingeschlossen sind. Die bei der Herstellung von Kapseln verwendete Gelatine wird aus Kollagenmaterial durch Hydrolyse erhalten. Es gibt zwei Gelatinetypen. Typ A, der aus Schweinehäuten durch Säurebehandlung stammt, und Typ B, der aus Knochen und Tierhäuten durch alkalische Verarbeitung erhalten wird. Die Verwendung von harten Gelatinekapseln ermöglicht eine Auswahl bei der Verordnung eines einzelnen therapeutischen Agens oder einer Kombination davon im genauen Dosierungslevel, der für den einzelnen als am besten angesehen wird. Die harte Gelatinekapsel besteht aus zwei Teilen, wobei einer über den anderen gleitet; somit wird das therapeutische Agens vollständig umhüllt. Diese Kapseln werden gefüllt, indem das therapeutische Agens oder gastro-resistente Perlen, die das therapeutische Agens enthalten, in das längere Ende der Kapsel eingefüllt werden, und dann die Kappe darüber geschoben wird. Harte Gelatinekapseln werden in großem Umfang aus Gelatine, FD&C-Farbmitteln und manchmal einem Trübungsmittel, wie Titandioxid, hergestellt. Die USP erlaubt, dass Gelatine zu diesem Zweck 0,15% (Gew./Vol.) Schwefeldioxid enthält, um eine Zersetzung während der Herstellung zu verhindern.

[0043] Im Kontext der vorliegenden Erfindung umfassen orale Dosierungszusammensetzungen für eine Abgabe in den Dünndarm auch Flüssigkeitszusammensetzungen, die wässrige Puffermittel enthalten, die verhindern, dass das therapeutische Agens und Zonulin durch Magenflüssigkeit deutlich inaktiviert werden, wodurch es möglich ist, dass therapeutisches Agens und Zonulin den Dünndarm in aktiver Form erreichen. Beispiele für solche wässrigen Puffermittel, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Bicarbonatpuffer (pH 5,5 bis 8,7, vorzugsweise etwa pH 7,4).

[0044] Wenn die orale Dosierungszusammensetzung eine flüssige Zusammensetzung ist, ist es vorteilhaft, dass die Zusammensetzung unmittelbar vor der Verabreichung hergestellt wird, so dass Stabilitätsprobleme auf ein Minimum beschränkt werden. In diesem Fall kann die flüssige Zusammensetzung durch Lösen des lyophilisierten therapeutischen Agens und Zonulin im wässrigen Puffermittel hergestellt werden.

[0045] Die nasale Dosierungszusammensetzung zur Verabreichung eines therapeutischen Agens in die Nase umfasst:

- (A) ein therapeutisches Agens, und
- (B) eine die nasale Absorption verstärkende wirksame Menge an gereinigtem Zonulin.

[0046] Nasale Dosierungszusammensetzungen zur Abgabe in die Nase sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Solche nasalen Dosierungszusammensetzungen umfassen im Allgemeinen wasserlösliche Polymere, die in großem Umfang zur Herstellung pharmazeutischer Dosierungsformen verwendet wurden (Martin et al., in: Physical Chemical Principles of Pharmaceutical Sciences, 3. Ausgabe, Seiten 592–638 (1983)). Diese können als Träger für Peptide zur nasalen Verabreichung dienen (Davis, in: Delivery Systems for Peptide Drugs, 125: 1–21 (1986)). Es wurde gezeigt, dass die nasale Absorption von Peptiden, die in Polymermatrices eingebettet sind, durch Retardierung der nasalen mucoziliären Clearance verstärkt wird (Illum et al., Int. J. Pharm., 46: 261–265 (1988)). Andere mögliche Verstärkungsmechanismen umfassen einen erhöhten Konzentrationsgradienten oder einen verringerten Diffusionsweg für die Peptidabsorption (Ting et al., Pharm. Res., 9: 1330–1335 (1992)). Es wurde vorausgesagt, dass eine Verringerung bei der mucoziliären Clearance-Rate ein guter Ansatz zur Erreichung einer reproduzierbaren Bioverfügbarkeit von nasal verabreichten systemischen

Arzneimitteln darstellt (Gonda et al., Pharm. Res., 7: 69–75 (1990)). Es wird erwartet, dass sich Mikropartikel mit einem Durchmesser von etwa 50 µm in der Nasenhöhle abscheiden (Bjork et al., Int. J. Pharm., 62: 187–192 (1990); und Illum et al., Int. J. Pharm., 39: 189–199 (1987)), während Mikropartikeln mit einem Durchmesser unter 10 µm dem Filtrationssystem der Nase entkommen können und sich in den unteren Atemwegen abscheiden. Mikropartikeln mit einem Durchmesser von über 200 µm werden nach nasaler Verabreichung nicht in der Nase zurückgehalten (Lewis et al., Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 17: 280–290 (1990)).

[0047] Das besondere wasserlösliche Polymer, das verwendet wird, ist in der vorliegenden Erfindung nicht kritisch und kann aus beliebigen der gut bekannten wasserlöslichen Polymere ausgewählt werden, die für nasale Dosierungsformen eingesetzt werden. Ein typisches Beispiel eines wasserlöslichen Polymers, das für die nasale Verabreichung einsetzbar ist, ist Polyvinylalkohol (PVA). Dieses Material ist ein quellbares hydrophiles Polymer, dessen physikalische Eigenschaften vom Molekulargewicht, dem Hydrolysegrad, der Vernetzungsdichte und der Kristallinität abhängen (Peppas et al., in: Hydrogels in Medicine and Pharmacy, 3: 109–131 (1987)). PVA kann in der Beschichtung dispergierter Materialien durch Phasentrennung, Sprühtrocknung, Sprüheinbettung und Sprühverdichtung verwendet werden (Ting et al., oben).

[0048] Die intravenöse Dosierungszusammensetzung zur Abgabe eines therapeutischen Agens durch die Blut-Hirn-Schranke umfasst:

(A) ein therapeutisches Agens, und

(B) eine die Blut-Hirn-Schrankenabsorption verstärkende wirksame Menge an gereinigtem Zonulin.

[0049] Intravenöse Dosierungszusammensetzungen zur Abgabe an das Gehirn sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Solche intravenösen Dosierungszusammensetzungen umfassen im Allgemeinen ein physiologisches Verdünnungsmittel, z. B. destilliertes Wasser oder 0,9% (Gew./Vol.) NaCl.

[0050] Eine "nasale" Abgabezusammensetzung unterscheidet sich von einer "intestinalen" Abgabezusammensetzung dadurch, dass die letztgenannte magensaft-resistente Eigenschaften haben muss, um einen Säureabbau der aktiven Agenzien (z. B. Zonulin und das therapeutische Agens) im Magen zu verhindern, wohingegen die erstgenannte im Allgemeinen wasserlösliche Polymere mit einem Durchmesser von etwa 50 µm umfasst, um die mucoziliäre Clearance zu reduzieren und eine reproduzierbare Bioverfügbarkeit der nasal verabreichten Agenzien zu erreichen. Eine Zusammensetzung zur "intravenösen" Abgabe unterscheidet sich sowohl von Zusammensetzungen für die "nasale" Abgabe wie auch von Zusammensetzungen zur "intestinalen" Abgabe dadurch, dass keine Notwendigkeit für magensaft-resistente oder wasserlösliche Polymere in der Zusammensetzung für die "intravenöse" Abgabe besteht.

[0051] In einer noch weiteren Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren zur Abgabe eines therapeutischen Agens gelöst, das eine Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Subjekt, das sie benötigt, umfasst.

[0052] Der Verabreichungsmodus ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch. Obgleich es vorteilhaft ist, dass der Verabreichungsmodus für die intestinale Abgabezusammensetzung oral ist, für die nasale Abgabezusammensetzung intranasal ist, und für die Abgabe durch die Blut-Hirn-Schranke intravenös ist.

[0053] Das besondere therapeutische Agens ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch und kann zum Beispiel irgendeine Arzneimittelverbindung, ein biologisch aktives Peptid, ein Vakzin oder irgend ein anderes Mittel, das in anderer Weise durch den transzellulären Weg nicht absorbiert wird, ungeachtet der Größe und Ladung, sein.

[0054] Beispiele für Arzneimittelverbindungen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Arzneimittel, die auf das kardiovaskuläre System wirken können, Arzneimittel, die auf das Zentralnervensystem wirken, antineoplastische Arzneimittel und Antibiotika.

[0055] Beispiele für Arzneimittel, die auf das kardiovaskuläre System wirken und die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Lidocain, Adenosin, Dobutamin, Dopamin, Epinephrin, Norepinephrin und Phentolamin.

[0056] Beispiele für Arzneimittel, die auf das Zentralnervensystem wirken und die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Doxapram, Alfentanil, Dezocin, Nalbuphin, Buprenorphin, Naloxon, Ketorolac, Midazolam, Propofol, Metacurin, Mivacurium und Succinylcholin.

[0057] Beispiele für antineoplastische Arzneimittel, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Cytarabin, Mitomycin, Doxorubicin, Vincristin und Vinblastin.

[0058] Beispiele für Antibiotika, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, umfassen Methicillin, Mezlocillin, Piperacillin, Cefoxitin, Cefonicid, Cefmetazol und Aztreonam. Beispiele für biologisch aktive Peptide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Hormone, Lymphokine, Globuline und Albumine.

[0059] Beispiele für Hormone, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Testosteron, Nandrolon, Menotropine, Progesteron, Insulin und Urofolltropin.

[0060] Beispiele für Lymphokine, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, umfassen In-

terferon- α , Interferon- β , Interferon- γ , Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-8.

[0061] Beispiele für Globuline, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen α -Globuline, β -Globuline und γ -Globuline (Immunglobulin).

[0062] Beispiele für Immunglobuline, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen polyvalentes IgG oder spezifisches IgG, IgA und IgM, d.. anti-Tetanus-Antikörper.

[0063] Ein Beispiel für Albumin, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist humanes Serumalbumin und Ovalbumin.

[0064] Beispiele für Vakzine, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Peptidantigene und abgeschwächte Mikroorganismen und Viren.

[0065] Beispiele für Peptidantigene, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen die B-Untereinheit des wärmelabilen Enterotoxins von enterotoxischem E. coli, die B-Untereinheit von Cholera-toxin, kapsuläre Antigene von enteralen Pathogenen, Fimbriae oder Pili von enteralen Pathogenen, HIV-Oberflächen-Antigene, Stauballergene und Zecken- bzw. Milbenallergene.

[0066] Beispiele für abgeschwächte Mikroorganismen und Viren, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen die von enterotoxischem Escherichia coli, enteropathogenem Escherichia coli, Vibrio cholerae, Sigella flexneri, Salmonella typhi, Helicobacter pylori und Rotavirus (Fasano et al., in: Le Vaccinazioni in Pediatria, Hrsg. Vierucci et al., CSH, Mailand, Seiten 109–121 (1991); Guandalini et al., in: Management of Digestive and Liver Disorders in Infants and Children, Elsevier, Hrsg. Butz et al., Amsterdam, Kapitel 25 (1993); Levine et al., Sem. Ped. Infect. Dis., 5: 243–250 (1994); Kaper et al., Clin. Microbiol. Rev., 8: 48–86 (1995); und MacArthur et al., JAMA, 273: 729–734 (1995).

[0067] Wenn das therapeutische Agens Insulin ist, ist die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung für die Behandlung von Diabetes einsetzbar.

[0068] Die Menge an therapeutischem Agens, die verwendet wird, ist in der vorliegenden Erfindung nicht kritisch und wird in Abhängigkeit von dem besonderen ausgewählten Agens, der Krankheit oder dem Zustand, die behandelt werden, wie auch dem Alter, Gewicht und Geschlecht des Subjekts, das behandelt wird, variieren.

[0069] Auch die verwendete Menge an Zonulin ist in der vorliegenden Erfindung nicht kritisch und wird in Abhängigkeit vom Alter, Gewicht und Geschlecht des Subjekts, das behandelt wird, variieren. Im Allgemeinen liegt die Endkonzentration an Zonulin, das in der vorliegenden Erfindung zur Verstärkung der Absorption des therapeutischen Agens verwendet wird, im Bereich von etwa 10^{-5} M bis 10^{-14} M, vorzugsweise etwa 10^{-6} M bis $5,0 \times 10^{-8}$ M. Um eine solche Endkonzentration, z. B. im Darm, in der Nase oder im Blut, zu erreichen, wird die Menge an Zonulin in einer einzigen pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung im Allgemeinen etwa 40 nm bis 1000 ng, vorzugsweise etwa 400 ng bis 800 ng sein.

[0070] Das Verhältnis von therapeutischem Agens zu Zonulin, das verwendet wird, ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch und wird in Abhängigkeit von der Menge an therapeutischem Agens, die innerhalb des ausgewählten Zeitraums abgegeben werden soll, variieren. Im Allgemeinen wird das Gewichtsverhältnis des therapeutischen Agens zu Zonulin, das in der vorliegenden Erfindung angewendet wird, im Bereich von etwa 1 : 10 bis 3 : 1, vorzugsweise etwa 1 : 5 bis 2 : 1, liegen.

[0071] Zonulin kann auch als Immunogen unter Erhalt von Antikörpern, entweder polyklonalen oder monoklonalen, die Bindungsspezifität für Zonulin haben, verwendet werden, wobei Techniken eingesetzt werden, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind (Abrams, Methods Enzymol., 121: 107–119 (1986)). Diese Antikörper können wiederum zur Untersuchung von Körpergewebe oder -flüssigkeiten auf Zonulin oder in der Affinitätsreinigung von Zonulin eingesetzt werden.

[0072] Die folgenden Beispiele werden nur zu erläuternden Zwecken bereitgestellt und sollen in keiner Weise den Rahmen der Erfindung beschränken.

BEISPIEL 1

Reinigung von ZOT

[0073] 5000 ml der überstehenden Fraktion, die nach Kultivierung von V. cholerae-Stamm CVDI 10 (Michalski et al., Infect. Immun., G1: 4462–4468 (1993), der mit Plasmid pZ14 transformiert worden war, erhalten wurde, wurden unter Verwendung eines Plättchen-Strömungsfilters mit einem MG-Cutoff von 10 kDa 1000-fach konzentriert. Der Aufbau von pZ14, das das Vibrio cholera-zot-Gen enthält, ist unter anderen detailliert in WO 96/37196 beschrieben. Der resultierende Überstand wurde dann einer 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE unterworfen. Proteinbanden wurden durch Coomassieblau-Färbung des SDS-PAGE-Gels detektiert. Beim Vergleich mit Kontrollüberstand vom Stamm CVDI 10, der mit Plasmid pTTQ181 (Amersham, Arlington Heights, IL) transformiert worden war und in der gleichen Weise behandelt worden war, war keine Proteinbande, die ZOT entspricht, detektierbar. Obwohl das zot-Gen hinter den hoch-induzierbaren und starken tac-Promotor in pZ14 platziert worden war, war der Level des Proteins im 1000-fach konzentrierten pZ14-Überstand durch das Co-

massie-gefärbte SDS-PAGE-Gel noch detektierbar.

[0074] Um die Menge an produziertem ZOT zu erhöhen, wurde daher das zot-Gen im Raster mit dem Malto-se-Bindungsprotein-Gen (nachfolgend "MBP" bezeichnet) fusioniert, um ein MBP-ZOT-Fusionsprotein zu bilden.

[0075] Der MBP-Vektor pMAL-c2 (Biolab) wurde verwendet, um ZOT durch Fusion des zot-Gens mit dem MaIE-Gen von *E. coli* zu exprimieren und zu reinigen. Dieses Konstrukt verwendet den starken, induzierbaren tac-Promotor und die malE-Translations-Initiationssignale, um hohe Expressionslevel des klonierten zot-Gens zu erreichen. Der Vektor pMAL-c2 hat eine exakte Deletion der malE-Signalsequenz, die zur zytoplasmischen Expression des Fusionsproteins führt. Eine Affinitätschromatographiereinigung für MBP wurde verwendet, um eine Isolierung des Fusionsproteins zu erleichtern (Biolab).

[0076] Spezifischer ausgedrückt, der Vektor pMAL-c2 wurde mit EcoRI (das am 3'-Ende des malE-Gens schneidet) linearisiert, mit Klenow-Fragment aufgefüllt und mit XbaI (das eine einzelne Stelle im pMAL-c2-Polylinker hat) verdaut. Das orf, das für ZOT kodiert, wurde aus Plasmid pBB241 subkloniert (Baudry et al., Infect. Immun., 60: 428-434 (1992)). Plasmid pBB241 wurde mit BssHII verdaut, mit Klenow-Fragment aufgefüllt und mit XbaI verdaut. Dann wurde das geglättete XbaI-Fragment in pMAL-c2 subkloniert, wodurch Plasmid pLC 10-c erhalten wurde. Da sowohl das Insert als auch der Vektor glatte und klebrige Enden hatten, wurde die korrekte Orientierung mit dem 3'-Ende von malE, fusioniert an das 5'-Ende des Inserts, erhalten. pLC 10-c wurde dann in *E. coli* Stamm DH5 α elektroporiert. In pBB241 liegt die BssHII-Restriktionsstelle innerhalb des zot orf. Somit fehlen die Aminosäuren 1-8 von ZOT im MBP-ZOT-Fusionsprotein.

[0077] Um das MBP-ZOT-Fusionsprotein zu reinigen, wurden 10 ml Luria Bertani-Brühe, die 0,2% (Gew./Vol.) Glukose und 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, mit einer einzelnen Kolonie, die pLC10-c enthielt, beimpft und über Nacht bei Schütteln und bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde in 1,0 ml desselben frischen Mediums 1 : 100 verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bis etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml wachsen gelassen. 0,2 mM IPTG wurde zugesetzt, um die MBP-ZOT-Expression zu induzieren, und die Kultur wurde für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletisiert und in 20 ml eiskaltem "Säulenpuffer" resuspendiert, welcher 20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1,0 mM EDTA, 10 mM 2-ME, 1,0 mM NaN₃ umfasste. Die Bakteriensuspension wurde durch Behandlung mit einer "French Press" lysiert und für 30 Minuten mit $13\,000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, 1 : 5 mit Säulenpuffer verdünnt und in eine 1×10 Amyloseharzsäule (Biolabs, MBP-Fusionsreinigungssystem), die mit Säulenpuffer voräquilibriert worden war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit 5 Volumina Säulenpuffer wurde das MBP-ZOT-Fusionsprotein durch Beschickung mit 10 ml 10 mM Maltose in Säulenpuffer eluiert. Die typische Ausbeute aus 1,0 ml Kultur war 2-3 mg Protein.

[0078] Der MBP-Fusionspartner des gereinigten MBP-ZOT-Fusionsproteins wurde unter Verwendung von 1,0 μ g Faktor Xa-Protease (Biolabs) pro 20 μ g MBP-ZOT abgespalten. Faktor Xa-Protease spaltet genau vor dem Amino-Terminus von ZOT. Das so erhaltene ZOT-Protein wurde an 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE-Gel laufen gelassen und unter Verwendung einer Elektroseparationskammer (Schleicher & Schuell, Keene, NH) aus dem Gel elektroeluiert.

[0079] Beim Testen in Ussing-Kammern induzierte das resultierende gereinigte ZOT eine Dosisabhängige Abnahme von Rt bei einer ED₅₀ von $7,5 \times 10^{-8}$ M.

BEISPIEL 2

Herstellung von affinitätsgereinigten anti-ZOT-Antikörpern

[0080] Um ein spezifisches Antiserum zu erhalten, wurde ein chimäres Glutathion S-Transferaseprotein (GST)-ZOT exprimiert und gereinigt.

[0081] Spezifischer ausgedrückt, Oligonukleotid-Primer wurden verwendet, um das zot orf durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren, wobei Plasmid pBB241 (Baudry et al., oben) als Matrizen-DNA verwendet wurde. Der Vorwärts-Primer (TCATCACGGC GCGCCAGG, SEQ ID NO:5) entsprach den Nukleotiden 15-32 von zot orf, und der Rückwärts-Primer (GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT, SEQ ID NO:6) entsprach dem 5'-Ende von ctxA orf. Daher fehlten die Aminosäuren 1-5 von ZOT im resultierenden Fusionsprotein. Das Amplifikationsprodukt wurde in den Polylinker (SmaI-Stelle) inseriert, der sich am Ende des GSTGens in pGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI) befand. pGEX-2T ist ein Fusionsprotein-Expressionsvektor, der ein kloniertes Gen als Fusionsprotein mit GST von *Schistosoma japonicum* exprimiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle des tac-Promotors. Nach Induktion mit IPTG erfolgt eine Derepression und das GST-Fusionsprotein wird exprimiert.

[0082] Das resultierende rekombinante Plasmid, als pLC11 bezeichnet, wurde in *E. coli* DH5 α elektroporiert. Um GST-ZOT-Fusionsprotein zu reinigen, wurden 10 ml Luria Bertani-Brühe, die 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, mit einer einzelnen Kolonie, die pLC 11 enthielt, beimpft und es wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in 1,0 ml desselben frischen Mediums 1 : 100 verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml wachsen gelassen. Dann wurden 0,2 mM IPTG zugesetzt, um die GST-ZOT-Ex-

pression zu induzieren, und die Kultur wurde für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletisiert, in 20 ml eiskalter PBS (pH 7,4) resuspendiert, und durch das "French Press"-Verfahren lysiert. Das GST-ZOT-Fusionsprotein war unter diesen Bedingungen nicht löslich, es sedimentierte mit der Bakterienpelletfraktion. Daher wurde das Pellet in Laemli-Lysepuffer, der 0,00625 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 M 2-ME, 2,0% (Gew./Vol.) SDS, 0,025% (Gew./Vol.) Bromphenolblau und 10% (Vol./Vol.) Glycerin umfasste, resuspendiert und einer Elektrophorese an einem 8,0% (Gew./Vol.) PAGE-SDS-Gel unterworfen und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Eine Bande mit etwa 70 kDa (26 kDa von GST + 44 kDa von ZOT), die dem Fusionsprotein entsprach, wurde unter Verwendung einer Elektrophorese-Kammer (Schleicher & Schuell, Keene, NH) aus dem Gel elektroeluiert.

[0083] 10 µg des resultierenden eluierten Proteins (10–20 µg) wurden gemischt mit dem gleichen Volumen an Freund's vollständigem Adjuvans einem Kaninchen injiziert. Vier und acht Wochen später wurden Booster-Dosen mit Freund's unvollständigem Adjuvans verabreicht. Einen Monat später wurde das Kaninchen ausbluten gelassen.

[0084] Um die Produktion von spezifischen Antikörpern zu bestimmen, wurde 10^{-10} M ZOT zusammen mit den zwei Fusionsproteinen MBP-ZOT und GST-ZOT auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer 1 : 5000-Verdünnung des Kaninchen-Antiserums über Nacht bei 4°C untermäßigem Schütteln inkubiert. Der Filter wurde dann viermal für 15 Minuten mit PBS, enthaltend 0,05% (Vol./Vol.) Tween 20 (nachfolgend "PBS-T" bezeichnet) gewaschen und mit einer 1 : 30000-Verdünnung von Ziege-anti-Kaninchen-IgG, konjugiert an Meerrettichperoxidase, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Filter wurde erneut viermal für 15 Minuten mit PBS, enthaltend 0,1 % (Vol./Vol.) Tween, gewaschen, und immunreaktive Banden wurden unter Verwendung verstärkter Chemilumineszenz (Amersham) detektiert.

[0085] Beim Immunoblotting wurde festgestellt, dass das Kaninchen-Antiserum ZOT wie auch die Fusionsproteine MBP-ZOT und GST-ZOT, nicht aber die MBP-Negativkontrolle erkennt.

[0086] Um die Produktion von geeigneten anti-ZOT-Antikörpern zu bestätigen, wurden darüber hinaus Neutralisierungsexperimente in Ussing-Kammern durchgeführt. Wenn das ZOT-spezifische Antiserum (1 : 100-Verdünnung) mit pZ14-Überstand bei 37°C für 60 Minuten vorinkubiert wurde, war es fähig, die Abnahme bei Rt, die durch ZOT an Kaninchen-Ileum, das in Ussing-Kammern montiert war, induziert wurde, vollständig zu neutralisieren.

[0087] Als nächstes wurden die anti-ZOT-Antikörper unter Verwendung einer MBP-ZOT-Affinitätssäule affinitätsgeklärt. Spezifischer ausgedrückt, es wurde eine MBP-ZOT-Affinitätssäule hergestellt, indem 1,0 mg gereinigtes MBP-ZOT, erhalten wie oben in Beispiel 1 beschrieben, über Nacht bei Raumtemperatur an einem voraktivierten Gel (Aminolink, Pierce) immobilisiert wurde. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und dann mit 2,0 ml anti-ZOT-Kaninchen-Antiserum beladen. Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule mit 14 ml PBS gewaschen und die spezifischen anti-ZOT-Antikörper wurden mit 4,0 ml einer Lösung, die 50 mM Glycin (pH 2,5), 150 mM NaCl, und 0,1% (Vol./Vol.) Triton X-100 umfasste, eluiert. Der pH der eluierten 1,0 ml-Fractionen wurde unverzüglich mit 1,0 N NaOH neutralisiert.

BEISPIEL 3

Reinigung von Zonulin

[0088] Basierend auf der Beobachtung, dass ZOT mit einem spezifischen Epithelialoberflächenrezeptor mit nachfolgender Aktivierung einer komplexen intrazellulären Kaskade von Events, die die *tj*-Permeabilität reguliert, wechselwirkt, wurde in der vorliegenden Erfindung postuliert, dass ZOT die Wirkung eines physiologischen Modulators von Säugetier-*tj* nachahmen kann. In der vorliegenden Erfindung wurde postuliert, dass ZOT und sein physiologisches Analogon (Zonulin) funktionell und immunologisch verwandt sind. Daher wurden affinitätsgeklärte anti-ZOT-Antikörper und der Ussing-Kammer-Assay in Kombination verwendet, um in verschiedenen Kaninchengeweben und humanen Geweben nach Zonulin zu suchen.

A. Kaninchen-Gewebe

[0089] Zunächst wurde Zonulin aus Kaninchen-Darm gereinigt. Das Gewebe wurde durch Homogenisierung in PBS aufgebrochen. Die resultierenden Zellpräparationen wurden dann bei 40000 UpM für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde gesammelt und lyophilisiert. Das resultierende lyophilisierte Produkt wurde anschließend in PBS (10 : 1 (Vo1.No1.)) rekonstituiert, durch ein 0,45 µm Membranfilter filtriert, auf eine chromatographische Sephadex G-50-Säule aufgebracht und mit PBS eluiert. Dann wurden 2,0 ml-Fractionen, die aus der Säule erhalten wurden, einem Standard-Western-Immunoblotting unterzogen, wobei die affinitätsgeklärten anti-ZOT-Antikörper verwendet wurden, welche wie oben in Beispiel 2 beschrieben, erhalten worden waren.

[0090] Positive Fractionen, d. h. solche, an die die anti-ZOT-Antikörper gebunden sind, wurden kombiniert,

lyophilisiert, in PBS (1 : 1 (Vol./Vol.)) rekonstituiert und einer Salzgradientenchromatographie durch eine Q-Sepharosesäule unterworfen. Der Salzgradient war 0 bis 100% (Gew./Vol.) NaCl in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0). Fünf 20 ml-Fractionen wurden gesammelt und einem Standard-Western-Immunoblotting unterzogen, wobei die affinitätsgereinigten anti-ZOT-Antikörper verwendet wurden, welche erhalten worden waren, wie oben in Beispiel 2 beschrieben. Fraktion 1 (20% (Gew./Vol.) NaCl) war die einzige Fraktion, die im Western-Immunoblot-Assay als positiv festgestellt wurde.

[0091] Die aus der Q-Sepharosesäule erhaltenen Fraktionen wurden dann an CaCo2-Monolayern und Kaninchendünndarm in Ussing-Kammern auf ihre Gewebewiderstandseffekte getestet.

[0092] Spezifischer ausgedrückt, CaCo2-Zellen wurden in Zellkulturkolben (Falcon) unter angefeuchteter Atmosphäre aus 95% O₂/5% Co₂ bei 37°C in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium, das 10% (Vol./Vol.) fötales Kälberserum, 40 µg/l Penicillin und 90 µg/l Streptomycin enthielt, wachsen gelassen. Die Zellen wurden in einem Oberflächenverhältnis von 1 : 5 nach Trypsinbehandlung alle 5 Tage subkultiviert, wenn sie eine 70–80% Konfluenz erreicht hatten. Die Passagenzahl der Zellen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, variierte zwischen 15 und 30.

[0093] Die CaCo₂-Monolayer wurden an mit Gewebekultur behandelten Polycarbonatfiltern, die fest an einem Polystyrolring (6,4 mm Durchmesser, Transwell Costar) befestigt waren, zur Konfluenz (12– 14 Tage nach Plattierung in einem Oberflächenverhältnis von 1 : 2,5) wachsen gelassen. Die Filter wurden in einen dicht eingesetzten Einsatz gelegt, der das serosale und mucosale Kompartiment einer modifizierten Ussing-Kanvner trennte; dann wurden die Experimente für Kaninchendarm in Ussing-Kammern durchgeführt, wie es von Fasano et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 8: 5242–5246 (1991), beschrieben wurde. Die Ergebnisse sind in **Fig. 1** gezeigt.

[0094] Wie in **Fig. 1** gezeigt ist, induzierte die Zonulin enthaltende Fraktion im Vergleich zu Zonulin-negativen Fraktionen eine deutliche Reduktion des CaCo2-Monolayerwiderstands.

[0095] Als nächstes wurden Assays unter Verwendung von Ileum aus männlichen erwachsenen weißen Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht von 2–3 kg, die durch zervikale Dislocation getötet worden waren, unter Verwendung einer Ussing-Kammer durchgeführt. Ein 20 cm-Segment des Ileums wurde entfernt, vom Darminhalt freigespült, entlang des mesenterialen Rands geöffnet und von muskulären und serosalen Schichten befreit (diese wurden abgestreift). Acht auf diese Weise hergestellte Mucosa-Folien wurden in klare Ussing-Kammern (Öffnung 1,12 cm²) montiert, an eine Spannungsklemmapparatur (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) angeschlossen und mit frisch hergestellter Ringer-Lösung, die 53 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 30,5 mM Mannit, 1,69 mM Na₂HPO₄, 0,3 mM NaHP₂O₄, 1,25 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl und 25 mM NaHCO₃ umfasste, gebadet. Die Badlösung wurde mit Wasserummantelungsbehältern, die an eine Umwälzpumpe mit Thermostat angeschlossen war, bei 37°C gehalten und mit 95% O₂/5% Co₂ begast.

[0096] Auf die Mucosa-Seiten wurden 100 µl Zonulin, das aus Kaninchendarm gereinigt worden war, gegeben. Die Potentialdifferenz (PD) wurde alle 10 Minuten gemessen und der Kwzschlussstrom (Isc) und der Gewebewiderstand (Rt) wurden berechnet, wie es von Fasano et al., oben, beschrieben wird. Wegen der Gewebewarvariabilität wurden die Daten als ΔRt (Rt zur Zeit x) – (Rt zur Zeit 0) berechnet. Die Resultate sind in **Fig. 2** dargestellt.

[0097] Wie aus **Fig. 2** zu ersehen ist, induzierte die Zonulin enthaltende Fraktion im Vergleich zu einer Zonulin-negativen Fraktion eine signifikante Verringerung beim Widerstand im Kaninchendünndarm. Dieser Effekt war vollständig umkehrbar, sobald Zonulin aus dem Reservoir abgezogen wurde.

[0098] Die Zonulin-positive Fraktion wurde auch einer 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE, gefolgt von einem Western-Immunoblotting unter Verwendung der anti-ZoT-Antikörper unterzogen. Die Proteinbanden, die durch SDS-PAGE getrennt wurden, wurden dann auf PVDF-Filter (Milipore) transferiert, wobei CAPS-Puffer, umfassend 100 ml (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure) 10 ×, 100 ml Methanol, 800 ml destilliertes Wasser, umfasste, verwendet wurde. Das Protein, das zu einer Bande ausgerichtet war, das durch Western-Immunoblotting detektiert wurde, hatte ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa. Diese Bande wurde aus dem PVDF-Filter herausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzierung unterzogen, wie sie von Hunkapiller, in: Methods of Protein Microcharacterization, Hrsg. Shibley, Kapitel 11–12, Humana Press, Seiten 315–334 (1985), beschrieben wird, wobei eine Perkin-Elmer Applied Biosystems-Apparatur, Modell 494, verwendet wurde. Die N-terminale Sequenz von Zonulin, das aus Kaninchendarm gereinigt worden war, ist in SEQ ID NO:1 gezeigt.

[0099] Die N-terminale Sequenz von Kaninchen-Zonulin wurde mit anderen Proteinsequenzen durch BLAST-Suchanalyse verglichen. Das Resultat dieser Analyse zeigte, dass die N-terminale Sequenz von Kaninchen-Zonulin mit der N-terminalen Sequenz des tau-Proteins aus Homo sapiens zu 85% identisch und zu 100% ähnlich ist.

[0100] Um zu bestimmen, ob Kaninchen-Zonulin und tau dieselbe Gruppierung sind, wurden folglich Kreuz-Neutralisierungs-Experimente unter Verwendung von Ussing-Kammern durchgeführt. Spezifischer beschrieben, 10 µl/ml Kaninchen-Zonulin wurden auf die mucosale Seite von Kaninchen-Ileum, das entweder unbehandelt war oder für 60 Minuten bei 37°C mit anti-tau-Antikörpern (Verdünnung 1 : 10) (Sigma) vorinkubiert

worden war, gegeben. Als Kontrollen wurden 10 µl/ml Kaninchen-Zonulin, vorinkubiert mit anti-ZOT-Antikörpern (Verdünnung 1 : 10) (Beispiel 2) und 0,4 µg/ml gereinigtes tau (Sigma) verwendet. Die Resultate sind in **Fig. 3** dargestellt.

[0101] Wie in **Fig. 3** gezeigt wird, induzierte Kaninchen-Zonulin die typische Abnahme des Gewebewiderstands, was leicht umkehrbar war, sobald das Protein aus den Ussing-Kammern abgezogen wurde. Diese Aktivität wurde durch Vorbehandlung mit anti-ZOT-Antikörpern vollständig neutralisiert, nicht aber durch Vorbehandlung mit anti-tau-Antikörpern. Andererseits gab es keine signifikante Wirkung auf den Gewebewiderstand in Geweben, die tau-Protein ausgesetzt waren.

[0102] Kaninchen-Zonulin wurde auch in verschiedenen anderen Kaninchengeweben detektiert, d. h. in Herz, Gehirn, Muskeln, Magen, Milz, Lunge, Nieren vom Kaninchen, wie auch in verschiedenen Teilen von Kaninchendarm, d. h. im distalen Jejunum, proximalen Jejunum, Ileum, Caecum und Colon. Das heißt, wenn diese Kaninchengewebe in der gleichen Weise wie der Kaninchendarm, was oben diskutiert wurde, verarbeitet wurden und einer 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE, gefolgt von einem Western-Immunoblotting unter Verwendung von affinitätsgereinigten anti-ZOT-Antikörpern, die wie oben in Beispiel 2 beschrieben erhalten worden waren, verarbeitet wurden, wurde in allen untersuchten Geweben eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 47 kDa detektiert.

B. Humane Gewebe

[0103] Zonulin wurde auch aus verschiedenen humanen Geweben, einschließlich Darm, Herz und Gehirn, gereinigt. Es wurden sowohl in fötalem wie auch mit Gewebe von Erwachsenen verwendet. Die Gewebe wurden durch Homogenisierung in PBS zerkleinert bzw. zerbrochen. Die resultierenden Zellpräparationen wurden dann mit 40000 UpM für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde gesammelt und lyophilisiert. Das resultierende lyophilisierte Produkt wurde anschließend in PBS (10 : 1 (Vol./Vol.)) rekonstituiert, durch ein 0,45 mm Membranfilter filtriert, auf eine Sephadex G-50-Chromatographiesäule aufgebracht und mit PBS isoliert. Dann wurden 2,0 ml-Fractionen, die aus der Säule erhalten wurden, einem Standard-Western-Immunoblotting unter Verwendung der affinitätsgereinigten anti-ZOT-Antikörper, die wie in Beispiel 2 oben beschrieben erhalten worden waren, unterworfen.

[0104] Positive Fractionen, d. h. solche, an die die anti-ZOT-Antikörper gebunden waren, wurden kombiniert, lyophilisiert, in PBS (1 : 1 (Vol./Vol.)) rekonstituiert, und einer Salzgradientenchromatographie durch eine Q-Sepharosesäule unterworfen. Der Salzgradient war 0 – 100% (Gew./Vol.) NaCl in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4). Fünf 20 ml-Fractionen wurden gesammelt und einem Standard-Western-Immunoblotting unter Verwendung der affinitätsgereinigten anti-ZOT-Antikörper, die wie in Beispiel 2 oben beschrieben erhalten worden waren, unterworfen. Fraktion 1 (20% (Gew./Vol.) NaCl) zeigte im Western-Immunoblot-Assay eine einzelne Bande mit einer Größe von 47 kDa. Fraktion 2 (40% (Gew./Vol.) NaCl) zeigte im Western-Immunoblot-Assay zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 35 kDa und 15 kDa. Fraktion 3 (60% (Gew./Vol.) NaCl) und Fraktion 4 (80% (Gew./Vol.) zeigten nur die 35 kDa- und 15 kDa-Banden. Diese Resultate legen nahe, dass Zonulin einem Abbau durch Proteasen, die vermutlich in den verwendeten humanen Geweben vorliegen, unterliegen können und dass die Abbauprodukte im Vergleich zum Holoprotein bei höheren Salzkonzentrationen aus der Säule eluiert werden.

[0105] Fraktion 1 (sowohl aus humanem Herz- als auch Gehirngeweben) und Fraktion 4 (aus Herzgewebe), die aus der Q-Sepharosesäule erhalten worden waren, wurden auf ihre Wirkungen auf den Gewebewiderstand sowohl im Kaninchendarm als auch im Rhesus-Affendarm in Ussing-Kammern untersucht.

[0106] Die Assays mit der Ussing-Kammer wurden unter Verwendung verschiedener Trakte des Darms, einschließlich Jejunum, Ileum oder Colon, aus männlichen erwachsenen weißen Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht von 2–3 kg oder männlichen erwachsenen Rhesus-Affen mit einem Gewicht von 5–6 kg durchgeführt. Nachdem die Tiere getötet worden waren, wurden verschiedene Darmsegmente einschließlich Jejunum, Ileum und Colon, entfernt, vom Darminhalt freigespült, entlang dem mesenterialen Rand geöffnet und die muskulären und serosalen Schichten wurden entfernt. Acht Mucosa-Folien, die auf diese Weise hergestellt worden waren (drei Jejunum, drei Ileum und zwei Colon) wurden dann in klare Ussing-Kammern (Öffnung 1,12 cm²) montiert, mit einer Spannungsklemmapparatur (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) verbunden und mit frisch hergestellter Ringer-Lösung, umfassend 53 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 30,5 mM Mannit, 1,69 mM Na₂HPO₄, 0,3 mM NaH₂PO₄, 1,25 mM CaCl₂ und 25 mM NaHCO₃, gebadet. Die Badlösung wurde mit Wasserummantelungstanks, die an eine Umwälzpumpe mit konstanter Temperatur angeschlossen waren, bei 37°C gehalten und mit 95% O₂/5% CO₂ begast.

[0107] 100 µl Fraktion 1 von Zonulin, das aus humanem Herz gereinigt worden war, oder Fraktion 1 von Zonulin, die aus humanem Gehirn gereinigt worden war, oder Fraktion 4, die aus humanem Herz gereinigt worden war, wurden auf die Mucosa-Seite gegeben. Die Potentialdifferenz (PD) wurde alle 10 Minuten gemessen und der Kurzschlussstrom (Isc) und der Gewebewiderstand (Rt) wurden wie von Fasano et al., oben, beschrieben, berechnet. Wegen der Gewebevariabilität wurden die Daten als ΔRt (Rt zur Zeit x) – (Rt zur Zeit 0) berechnet.

Die Resultate sind in den **Fig. 4A** und **4B** (Affendarm) und den **Fig. 5A** und **5B** (Kaninchendarm) gezeigt.

[0108] Wie in den **Fig. 4A** und **4B** gezeigt ist, induzierte Zonulin, das aus humanem Herz gereinigt worden war (Fraktion 1) im Vergleich zu der negativen PBS-Kontrolle eine signifikante Reduzierung beim Affendarmwiderstand (sowohl Jejunum (**Fig. 4A**) als auch Ileum (**Fig. 4B**)). Es wurden keine signifikanten Änderungen beobachtet, wenn Zonulin, das aus humanem Herz gereinigt worden war, im Colon getestet wurde. Die **Fig. 4A** und **4B** zeigen auch, dass keine signifikante Wirkung sowohl auf Affen-Jejunum (**Fig. 4A**) als auch Affen-Ileum (**Fig. 4B**) beobachtet wurde, wenn aus humanem Gehirn gereinigtes Zonulin (Fraktion 1) untersucht wurde. Fraktion 4 von Zonulin, das aus humanem Herz gereinigt worden war, induzierte auch eine signifikante Abnahme beim Gewebewiderstand in Affendünndarm. Wie in den **Fig. 5A** und **5B** gezeigt wird, wurden ähnliche Resultate erhalten, als Kaninchendarm verwendet wurde. Das heißt, aus humanem Herz gereinigtes Zonulin (Fraktion 1) zeigte sowohl im Kaninchen-Jejunum (**Fig. 5A**) als auch im Kaninchen-Ileum (**Fig. 5B**), nicht aber im Colon, eine signifikante Wirkung auf den Gewebewiderstand. Die **Fig. 5A** und **5B** zeigen auch, dass keine signifikante Wirkung auf das Kaninchen-Jejunum (**Fig. 5A**) und das Kaninchen-Ileum (**Fig. 5B**) beobachtet wurde, wenn Zonulin, das aus humanem Gehirn gereinigt worden war (Fraktion 1), getestet wurde.

[0109] Um abzuleiten, ob Zonulin die orale Abgabe von Insulin verstärkt, wurden in vitro-Modellexperimente unter Verwendung von Kaninchendarm durchgeführt. Kurz ausgedrückt, männliche erwachsene weiße Neuseeland-Kaninchen (2–3 kg) wurden durch zervikale Dislokation getötet. Segmente des Kaninchendünndarms (entweder Jejunum oder Ileum) wurden entfernt, von Darminhalten freigespült, entlang der mesenterialen Grenze geöffnet und von muskulären und serosalen Schichten befreit. Acht Mucosa-Folien, die so hergestellt wurden, wurden dann in klare Ussing-Kammern (Öffnung 1,12 cm²) montiert, an eine Spannungsklemmapparatur (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) angeschlossen und mit frisch hergestelltem Puffer, enthaltend 53 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 30,5 mM Mannit, 1,69 mM Na₂HPO₄, 0,3 mM NaH₂PO₄, 1,25 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂ und 25 mM NaHCO₃, gebadet. Die Badlösung wurde mit Wasserummantelungstanks, die an eine Umwälzpumpe mit Thermostat angeschlossen waren, bei 37°C gehalten und mit 95% O₂/5% CO₂ begast. Die Potentialdifferenz (PD) wurde gemessen und der Kurzschlussstrom (Isc) und der Gewebewiderstand (Rt) wurden errechnet. Sobald die Gewebe einen konstanten Zustand erreichten, wurden die Gewebe paarweise, auf der Basis ihres Widerstands zusammenpassend, luminal 10⁻¹¹ M ¹²⁵I-Insulin (Amersham, Arlington Heights, IL; 2,0 µCi = 10⁻¹² M), allein oder in Gegenwart von 100 µl Herz-Zonulin aus Fraktion 1, ausgesetzt. Ein 1,0 ml-Aliquot von der serosalen Seite und ein 50 µl Aliquot von der Mucosa-Seite wurden unverzüglich erhalten, um Basislinienwerte zu entwickeln. Proben von der serosalen Seite wurden dann in 20 Minuten-Intervallen während der folgenden 100 Minuten gesammelt.

[0110] Es wurde festgestellt, dass Herz-Zonulin die intestinale Absorption von Insulin sowohl im Jejunum (0,058 ± 0,003 fmol/cm².min gegenüber 0,12 ± 0,005 fmol/cm².min, unbehandeltes gegenüber Zonulin-behandeltem Gewebe, p = 0,001) als auch im Ileum (0,006 ± 0,0002 fmol/cm².min gegenüber 0,018 ± 0,005 fmol/cm².min, unbehandeltes gegenüber Zonulin-behandeltem Gewebe, p = 0,05) in zeitabhängiger Weise erhöht.

[0111] Fraktion 1 des Zonulins, das aus humanem Herz gereinigt worden war, und Fraktion 1 des Zonulins, das aus humanem Gehirn gereinigt worden war, wurden einer 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE, gefolgt von Western-Immunoblotting unter Verwendung der anti-ZOT-Antikörper, die wie in Beispiel 2 oben beschrieben erhalten worden waren, unterworfen. Die durch SDS-PAGE getrennten Proteinbanden wurden dann auf PVDF-Filter übertragen, wobei ein CAPS-Puffer verwendet wurde, der 100 ml (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure) 10 ×, 100 ml Methanol, 800 ml destilliertes Wasser umfasste. Das Protein, das in einer einzelnen Bande angeordnet war, welche durch Western-Immunoblotting detektiert wurde, hatte ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa. Diese Bande wurde aus dem PDVF-Filter herausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen, wie es von Hunkapiller, in: Methods of Protein Microcharacterization, Hrsg. Shibley, Kapitel 11–12, Humana Press, Seiten 315–334 (1985), beschrieben wird, wobei eine Perkin-Elmer Applied Biosystems-Apparatur, Modell 494, verwendet wurde. Die N-terminale Sequenz von Zonulin, das aus humanem Erwachsenen-Herz gereinigt worden war, ist in SEQ ID NO:2 dargestellt, und die N-terminale Sequenz von Zonulin, das aus humanem Erwachsenen-Gehirn gereinigt worden war, ist in SEQ ID NO:3 dargestellt.

[0112] Die ersten neun Aminosäuren aus der N-terminalen Sequenz von Zonulin, das aus humanem Erwachsenen-Darm gereinigt worden war (SEQ ID NO:7), wurden auch sequenziert und es wurde gefunden, dass sie mit den ersten neun Aminosäuren von Zonulin, das aus Menschenherz gereinigt worden war, die in SEQ ID NO:2 dargestellt sind (siehe **Fig. 6**), identisch sind. Die ersten zwanzig Aminosäuren aus der N-terminalen Sequenz von Zonulin, das aus humanem fötalem Darm gereinigt worden war, wurden ebenfalls sequenziert: Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO:4), und es wurde festgestellt, dass sie fast mit der Aminosäuresequenz von Zonulin, das aus humanem Herz gereinigt wurde, die in SEQ ID NO:2 gezeigt ist (siehe **Fig. 6**), identisch ist.

[0113] Die N-terminale Sequenz von Zonulin, das aus humanem Erwachsenen-Gehirn gereinigt worden war (SEQ ID NO:3), unterschied sich vollständig von der N-terminalen Sequenz von Zonulin, das aus Herz bzw. Darm isoliert worden war (SEQ ID NO:2) (siehe **Fig. 6**). Es wird angenommen, dass dieser Unterschied durch

die Gewebespezifität von Zonulin bei der Bestimmung der Permeabilität von Geweben, zum Beispiel Darm, wie oben demonstriert wurde, erläutert wird.

[0114] Die N-terminalen Sequenzen von humanem Zonulin, das aus Herz, Darm und Gehirn gereinigt wurde, unterscheiden sich alle von der N-terminalen Sequenz von Zonulin, das aus Kaninchendarm gereinigt worden war (**Fig. 6**). Um zu bestimmen, ob diese Proteine verschiedene Isoformen einer mit tau verwandten Proteinfamilie darstellen, wurden Gewebe sowohl vom Kaninchen als auch vom Menschen einer 8,0% (Gew./Vol.) SDS-PAGE und anschließend einem Western-Immunoblotting unter Verwendung von anti-ZOT- oder anti-tau-Antikörpern unterworfen. Die 47 kDa-Zonulin-Banden, die sowohl aus Kaninchen- als auch Menschengeweben (einschließlich Gehirn, Darm und Herz) gereinigt worden waren, und von denen festgestellt wurde, dass sie durch die anti-ZOT-Antikörper erkannt werden, führten eine Kreuzreaktion mit anti-tau-Antikörpern durch. Die verschiedenen Zonulin-Fraktionen, die aus humanem Gehirn gereinigt worden waren und durch Salzchromatographie erhalten worden waren, wurden einem Western-Immunoblotting entweder unter Verwendung der anti-ZOT-Antikörper oder der anti-tau-Antikörper unterworfen. Während anti-ZOT-Antikörper das intakte 47 kDa-Protein und auch die beiden Abbaufragmente mit 35 kDa und 15 kDa erkannten, erkannten die anti-tau-Antikörper nur das intakte 47 kDa-Protein und das 35 kDa-Fragment, während die anti-tau-Antikörper das 15 kDa-Fragment nicht erkannten. Um zu bestimmen, ob das 35 kDa-Fragment den N-Terminus oder den C-Terminus von Zonulin enthält, wurde die N-terminale Sequenz der 35 kDa-Bande erhalten und als: Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu (SEQ ID NO:8) bestimmt. Diese Sequenz unterscheidet sich von der N-terminalen Sequenz des intakten Menschengehirn-Zonulin (SEQ ID NO:3). Diese Resultate legen nahe, dass das 15 kDa-Fragment den N-terminalen Teil von Zonulin darstellt, während das 35 kDa-Fragment den C-terminalen Teil von Zonulin darstellt.

[0115] In Kombination betrachtet, legen diese Resultate nahe, dass die Zonulin-Domäne, die durch die anti-tau-Antikörper erkannt wird, in Richtung des C-Terminus des Proteins liegt, den verschiedenen Isoformen von Zonulin entweder aus Menschen- oder Kaninchen Geweben gemeinsam ist (während der N-terminale Teil variieren kann), und wahrscheinlich bei der permeabilisierenden Wirkung des Proteins involviert ist (basierend auf der Beobachtung, dass tau an β -Tubulin mit anschließender Umlagerung des Zell-Zytoskeletts bindet, und der Wirkung der Fraktion 4 auf den Affendünndarmgewebewiderstand).

[0116] Die N-terminale Sequenz von humanem Zonulin, das sowohl aus Herz als auch Darm gereinigt worden war, wurde mit anderen Proteinsequenzen durch BLAST-Suchanalyse verglichen. Das Resultat dieser Analyse zeigte, dass die N-terminale Sequenz von humanem Zonulin zu 95% mit der N-terminalen Sequenz der variablen schweren Kette des IgM von Homo sapiens identisch ist.

[0117] Folglich wurde zur Bestimmung, ob humanes Zonulin, das aus Herz gereinigt worden war, und humanes IgM dieselbe Gruppierung sind, eine partielle Verdauung des humanen Zonulin durchgeführt, um ein internes Fragment zu erhalten, das dann sequenziert wurde.

[0118] Spezifischer ausgedrückt, 1,0 mm des PVDF-Filters, das Zonulin enthielt, welches aus Menschenherz gereinigt worden war, wurde in ein Kunststoffröhrchen gegeben, welches mit 0,1% (Gew./Vol.) Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen worden war, und es wurde mit Methanol gespült. 75 μ l einer Pufferlösung, die 100 mM Tris (pH 8,2), 10% (Vol./Vol.) CH_3CN und 1,0% (Vol./Vol.) dehydriertes Triton X-100 umfasste, wurde zugesetzt und mit der Membran bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Dann wurden 150 ng Trypsin zugegeben und es wurde eine zusätzliche Inkubation über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C durchgeführt. Die resultierende Lösung wurde für 10 Minuten einer Ultraschallbehandlung unterzogen und der Überstand wurde dekantiert. Dann wurden 75 μ l 0,1% (Gew./Vol.) TFA zugesetzt, die Lösung wurde für weitere 10 Minuten mit Ultraschall behandelt und der Überstand wurde dekantiert. Beide Aliquots wurden auf eine 0,5 mm $\times$ 250 mm C_{18} -Säule, 5,0 μ m Partikelgröße, 300 Å Porengröße, aufgebracht. Es wurde mit einem Gradienten von 0,1% (Gew./Vol.) TFA bis 45% CH_3CN Wasser + 0,1% (Gew./Vol.) TFA über 2 Stunden und 15 Minuten entwickelt. Die Peaks wurden schließlich gesammelt und sequenziert.

[0119] Die interne Sequenz von humanem Zonulin, das aus humanem Erwachsenen-Herz gereinigt worden war, wurde als: Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ ID NO:9) gefunden.

[0120] Die interne Sequenz von humanem Zonulin wurde mit anderen Proteinsequenzen durch BLAST-Suchanalyse verglichen. Das Resultat dieser Analyse zeigte, dass die interne Sequenz von humanem Zonulin 0% Identität zu irgendeiner internen Sequenz der variablen schweren Kette von IgM aus Homo sapiens hat.

[0121] Die Resultate in Beispiel 3 oben beweisen, dass (1) Zonulin den physiologischen Modulator des parazellulären Wegs darstellt; (2) die N-terminale Sequenz von Kaninchen-Zonulin in hohem Maße mit der N-terminalen Sequenz des tau-Proteins homolog ist; (3) Zonulin und tau zwei verschiedene Gruppierungen sind, die immunologisch verwandt sind, jedoch funktionell unterschiedlich sind; (4) die N-terminale Sequenz von humanem Zonulin, das aus Herz und Darm erhalten wird, in hohem Maße zu der N-terminalen Sequenz der schweren Kette der variablen Region von IgM homolog ist; (5) humanes Zonulin und IgM zwei verschiedene Gruppierungen sind, die strukturell verwandt sind, jedoch funktionell unterschiedlich sind; und (6) Zonulin eine Familie von mit tau verwandten Proteinen darstellt, die gemeinsame aktive C-terminale Sequenzen und variable N-terminale Sequenzen haben.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

- (i) ANMELDER: FASANO, Alessio
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:
Im Wesentlichen reines Zonulin, ein physiologischer Modulator von Säugetier-Tight Junctions
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9
- (iv) KORRESPONDENZ-ADRESSE:
 - (A) ORT: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS
 - (B) STRASSE: 2100 Pennsylvania Avenue, N.W., Suite 800
 - (C) STADT: Washington, D.C.
 - (D) BUNDESLAND: D.C.
 - (E) LAND: U.S.A.
 - (F) POSTLEITZAHL: 20037
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Relase #1.0, Version #1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) ANMELDETAG: 21. Mai 1997
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANWALT/AGENT-INFORMATION
 - (A) NAME: KIT, Gordon
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30,764
 - (C) REFERENZ/GERICHTS-NR. A-6901
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION
 - (A) TELEFON: (202) 293-7060
 - (B) TELEFAX (202)293-7860

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Gln | Arg | Pro | Pro | Pro | Ala | Gly | Val | Thr | Ala | Tyr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
| Asp | Tyr | Leu | Val | Ile | Gln | | | | | | |
| | | 15 | | | | | | | | | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
| Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | | | | |
| | | 15 | | | | 20 | | | | | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:
- | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Thr | Phe | Tyr | Thr | Asp | Ala | Val | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

Met	Leu	Gln	Lys	Ala	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Val
1				5					10		
	Gln	Pro	Gly	Xaa	Ser	Asn	Arg	Leu			
			15					20			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

TCATCACGGC GCGCCAGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Xaa	Leu
1				5					10	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

Xaa	Xaa	Asp	Gly	Thr	Gly	Lys	Val	Gly	Asp	Leu
1				5					10	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

Leu	Ser	Glu	Val	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly
1				5					10			

Patentansprüche

1. Zonulin, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird und das fähig ist, Säugetier-tight junctions reversibel zu öffnen, wobei Zonulin eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe bestehend aus:

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr
Asp Tyr Leu Val Ile Gln (SEQ ID NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu (SEQ ID NO:2);
- (3) Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser (SEQ ID NO:3);
- (4) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val
Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO:4); und
- (5) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu (SEQ ID NO:7).

ausgewählt ist.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung zur intestinalen Abgabe eines therapeutischen Agenses, umfassend:

(A) ein therapeutisches Agens und

(B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge Zonulin, wobei das Zonulin ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird und das fähig ist, Säugetier-tight junctions reversibel zu öffnen, wobei das Zonulin eine N-terminale Aminosäuresequenz hat, die aus der Gruppe, bestehend aus

- (1) Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val
Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln
(SEQ ID NO:1);
- (2) Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
Xaa Leu (SEQ ID NO:7); und
- (3) Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly
Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn
Arg Leu (SEQ ID NO:4).

ausgewählt ist.

3. Therapeutische Zusammensetzung zur Abgabe eines therapeutischen Agenses, umfassend:

(A) ein therapeutisches Agens und

(B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge Zonulin, wobei das Zonulin ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird und fähig ist, Säugetier-tight junctions reversibel zu öffnen, wobei das Zonulin die N-terminale Aminosäuresequenz Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu (SEQ ID NO: 2) hat.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Abgabe eines therapeutischen Agenses, umfassend:

(A) ein therapeutisches Agens und

(B) eine die Absorption verstärkende wirksame Menge Zonulin, wobei das Zonulin ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 47 kDa, wie es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wird, hat, das sowohl durch den polyklonalen anti-tau-Antikörper als auch durch den polyklonalen anti-ZOT-Antikörper erkannt wird und das fähig ist, Säugetier-tight junctions reversibel zu öffnen, wobei das Zonulin die N-terminale Aminosäuresequenz

resequenz Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser (SEQ ID NO: 3) hat.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die Zusammensetzung eine orale Dosierungszusammensetzung zur intestinalen Abgabe des therapeutischen Agens ist.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das therapeutische Agens ein Arzneimittel ist, das auf das kardiovaskuläre System wirkt.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Arzneimittel, das auf das kardiovaskuläre System wirkt, aus der Gruppe bestehend aus Lidocain, Adenosin, Dobutamin, Dopamin, Epinephrin, Norepinephrin und Phentolamin ausgewählt ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das therapeutische Agens ein Arzneimittel ist, das auf das Zentralnervensystem wirkt.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Arzneimittel, das auf das Zentralnervensystem wirkt, aus der Gruppe bestehend aus Doxapram, Alfentanil, Dezocin, Nalbuphin, Buprenorphin, Naloxon, Ketorolac, Midazolam, Propofol, Metacurin, Mivacurium und Succinylcholin ausgewählt ist.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung eine Zusammensetzung zur intravenösen Dosierung für die Abgabe des therapeutischen Agens durch die Blut-Hirn-Schranke ist.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das therapeutische Agens aus der Gruppe, bestehend aus einer Arzneimittelverbindung, einem biologisch aktiven Peptid und einem Vakzin, ausgewählt ist.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die Arzneimittelverbindung aus der Gruppe, bestehend aus einem anti-neoplastischen Arzneimittel und Antibiotika, ausgewählt ist.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das anti-neoplastische Arzneimittel aus der Gruppe, bestehend aus Cytarabin, Mitomycin, Doxorubicin, Vincristin und Vinblastin, ausgewählt ist.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das Antibiotika aus der Gruppe, bestehend aus Methicillin, Mezlocillin, Piperacillin, Cefotaxim, Cefonicid, Cefmetazol und Aztreonam, ausgewählt ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das biologisch aktive Peptid aus der Gruppe, bestehend aus einem Hormon, Lymphokin, Globulin und Albumin, ausgewählt ist.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei das Hormon aus der Gruppe bestehend aus Testosteron, Nandrolon, Menotropinen, Insulin und Urofolltropin, ausgewählt ist.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei das Lymphokin aus der Gruppe, bestehend aus Interferon- α , Interferon- β , Interferon- γ , Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-8, ausgewählt ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei das Globulin ein Immunglobulin ist, das aus der Gruppe, bestehend aus polyvalentem IgG und spezifischem IgG, IgA und IgM, ausgewählt ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 18, wobei das Verhältnis von therapeutischem Agens zu Zonulin im Bereich von etwa 1 : 10 bis 3 : 1 liegt.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei das Verhältnis von therapeutischem Agens zu Zonulin im Bereich von etwa 1 : 5 bis 2 : 1 liegt.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 20, wobei Zonulin in der Zusammensetzung in einer Menge von etwa 40 ng bis 1000 ng vorliegt.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, wobei Zonulin in der Zusammensetzung in einer Menge von etwa 400 ng bis 800 ng vorliegt.

23. Verwendung von Zonulin und einem therapeutischen Agens, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Abgabe des therapeutischen Agenses an ein Subjekt, das Bedarf dafür hat.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Zusammensetzung wie in Anspruch 5 definiert ist und in einer Form vorliegt, die zur oralen Verabreichung geeignet ist.

25. Verwendung nach Anspruch 23 oder 24, wobei das Zonulin in einer solchen Menge verwendet wird, dass die Endkonzentration im Bereich von etwa 10^5 M bis 10^{-5} M liegt.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei das Zonulin in einer solchen Menge verwendet wird, dass die Endkonzentration im Bereich von etwa 10^{-6} M bis $5,0 \times 10^{-8}$ M liegt.

27. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Zusammensetzung wie in Anspruch 10 definiert ist und in einer Form vorliegt, die zur intravenösen Verabreichung geeignet ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

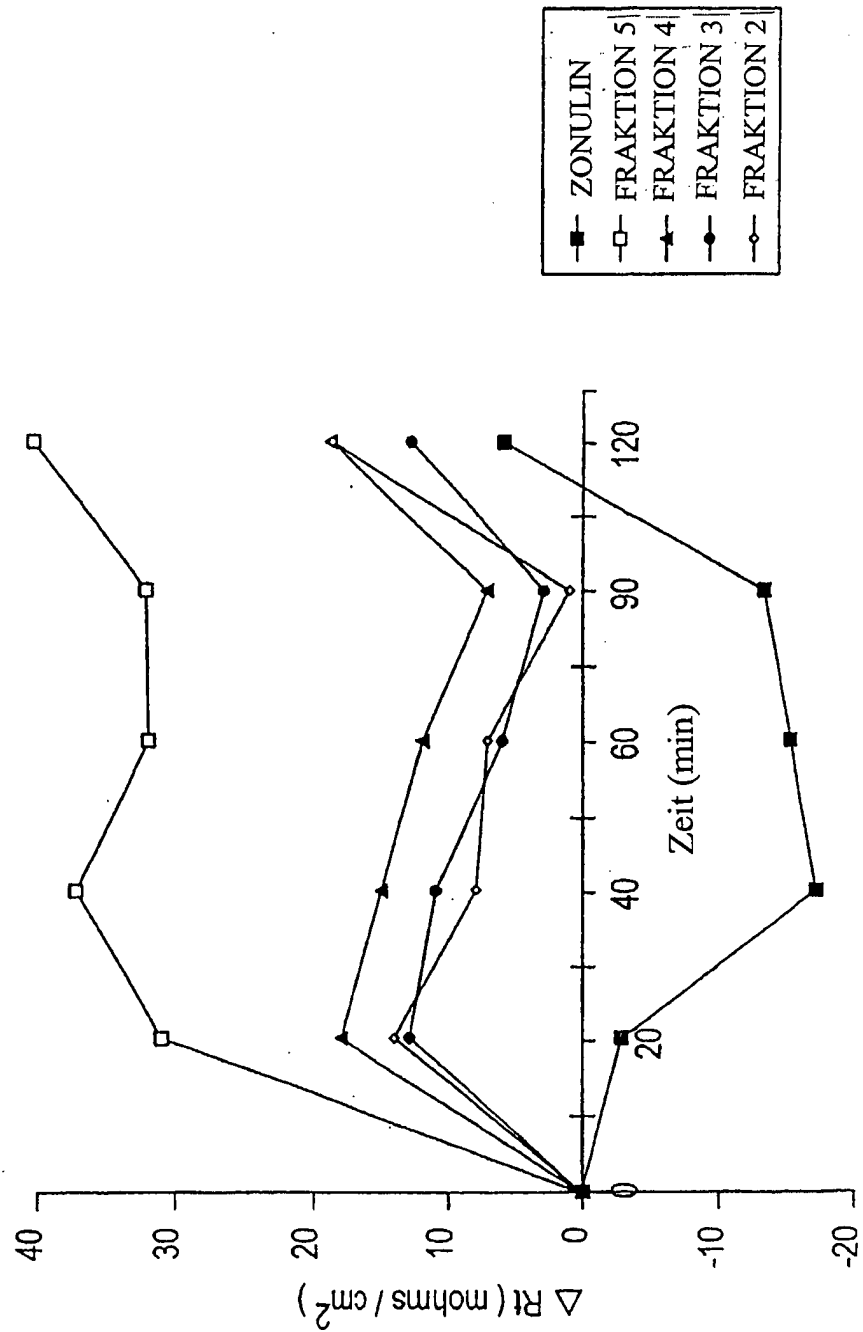


FIG. 2

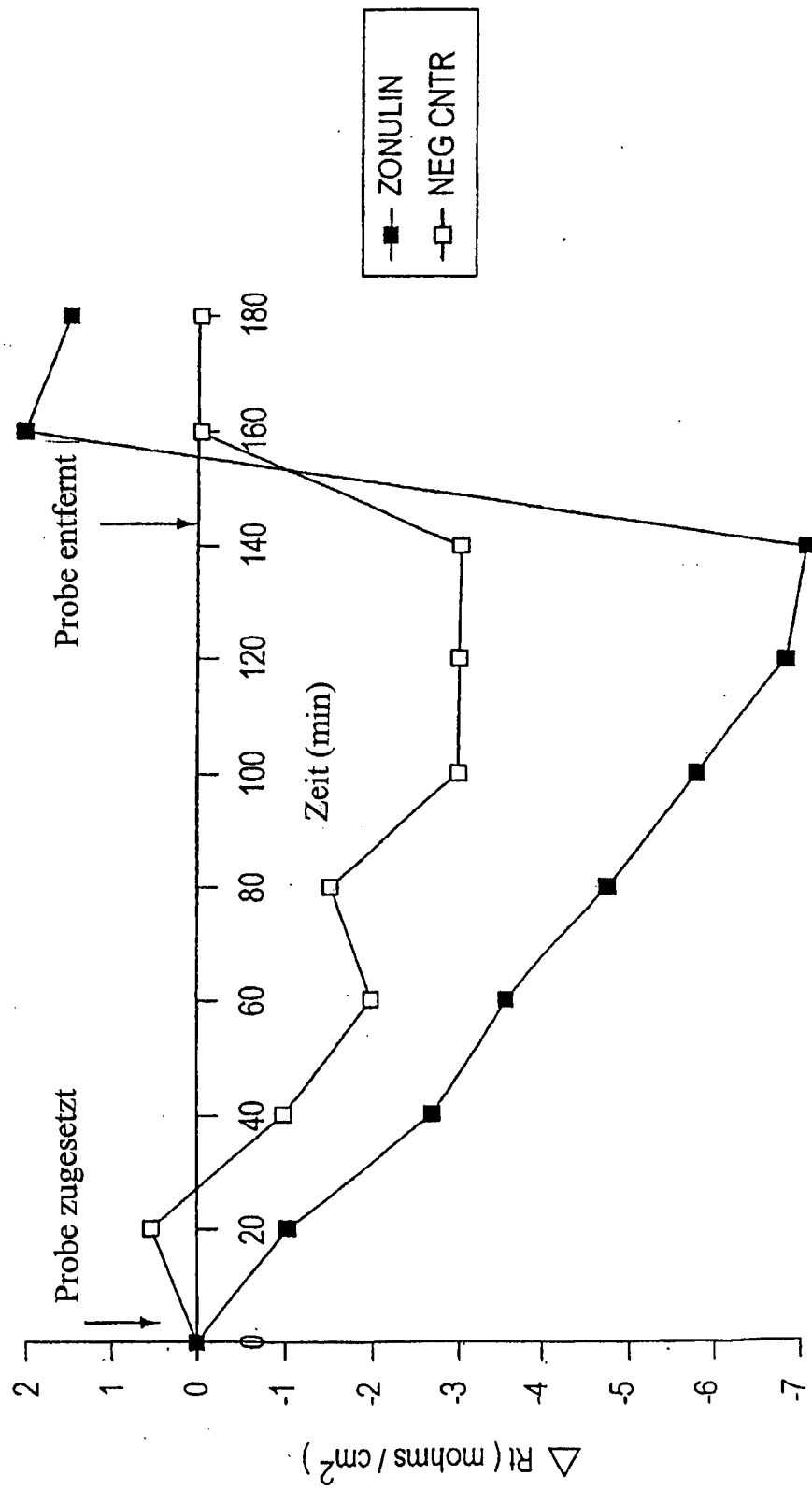


FIG. 3

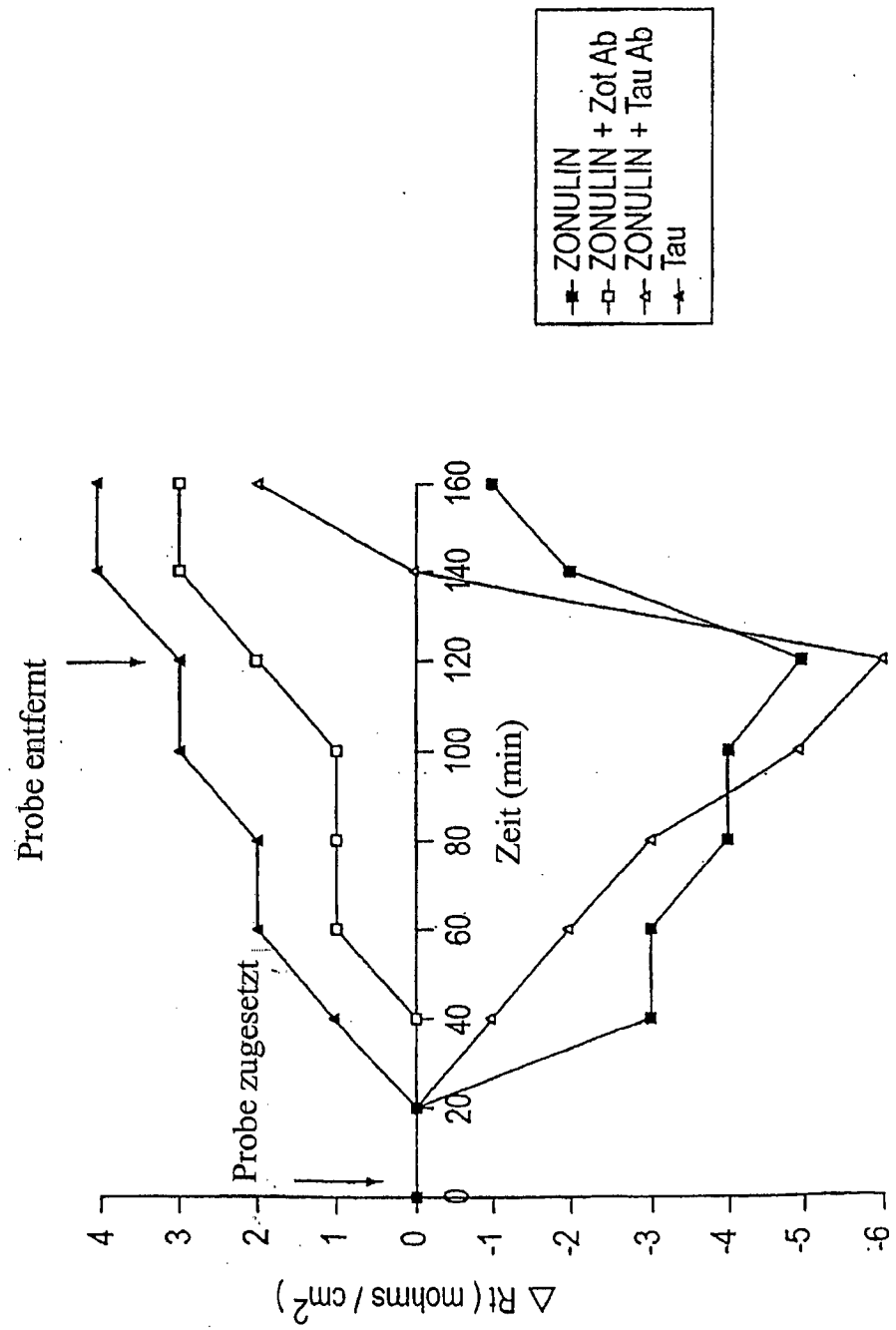


FIG. 4A

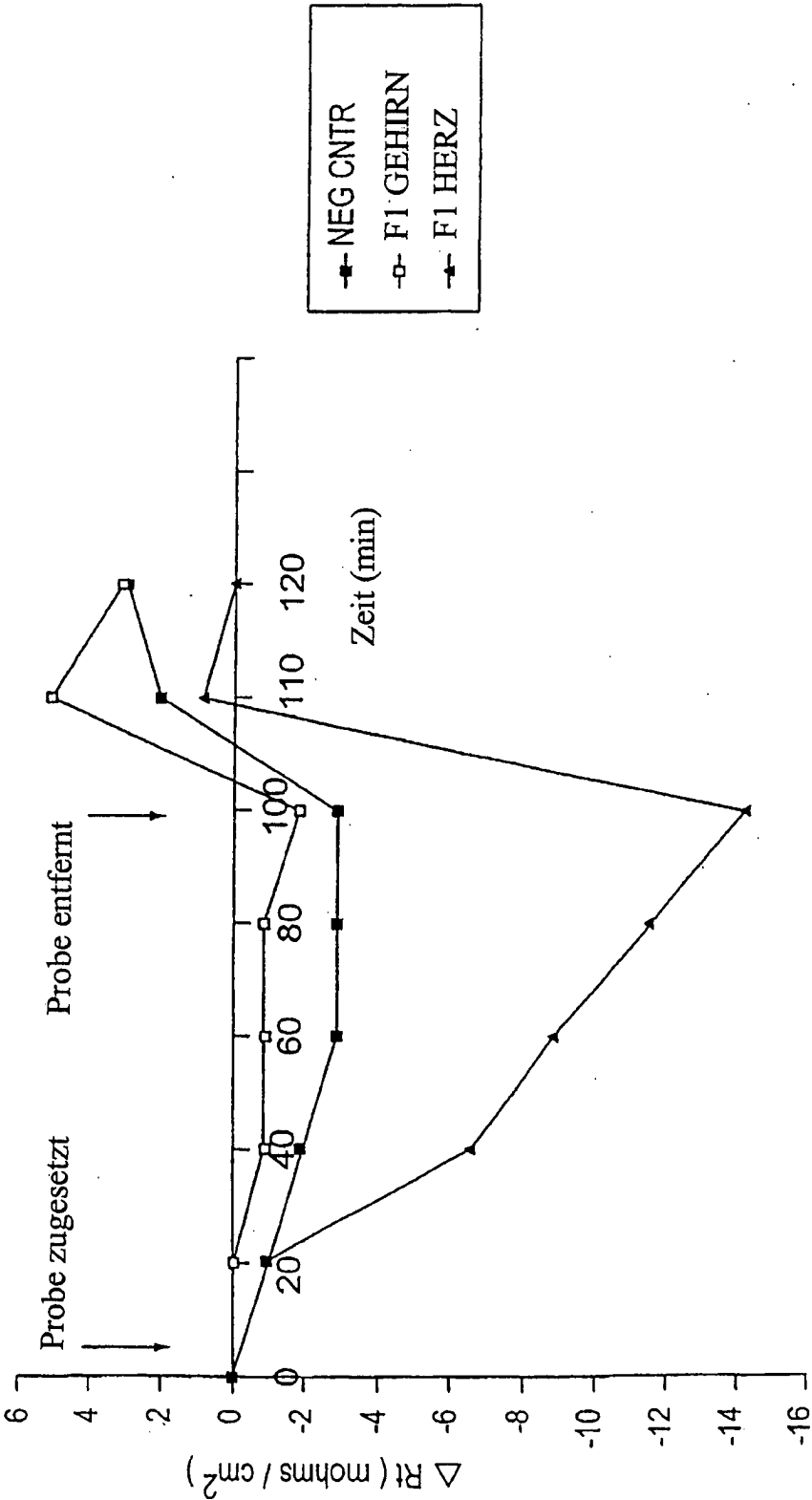


FIG. 4B

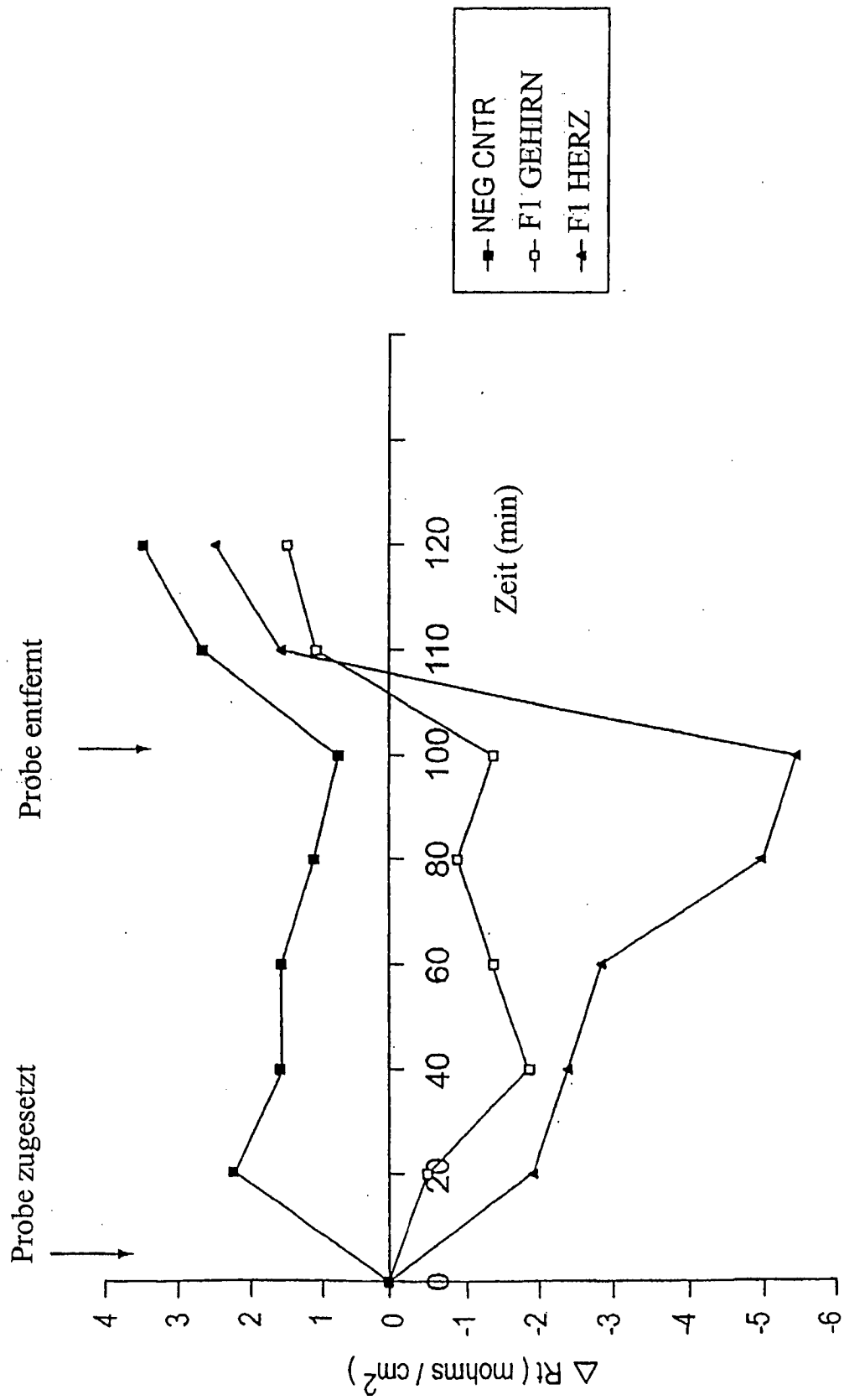


FIG. 5A

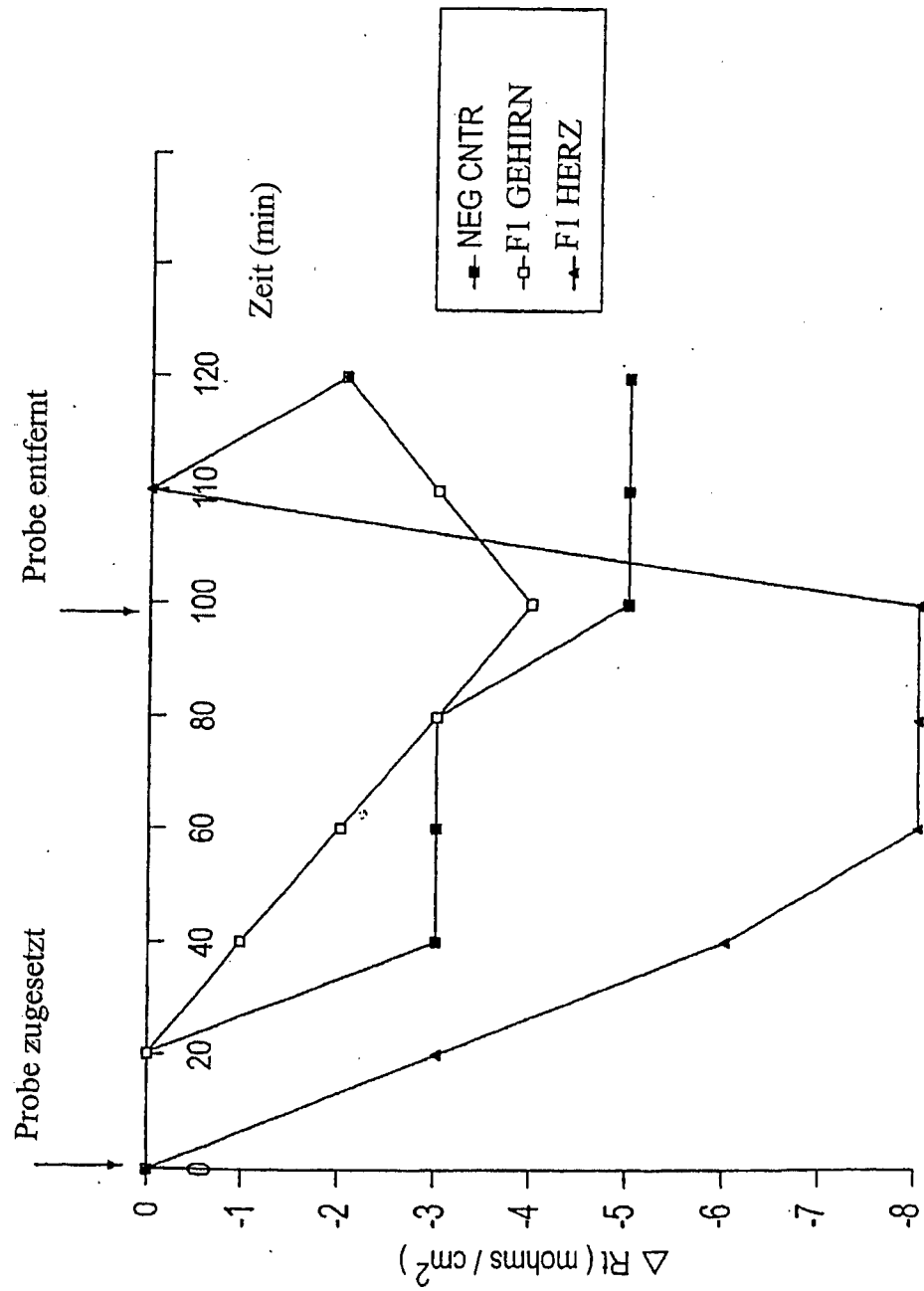


FIG. 5B

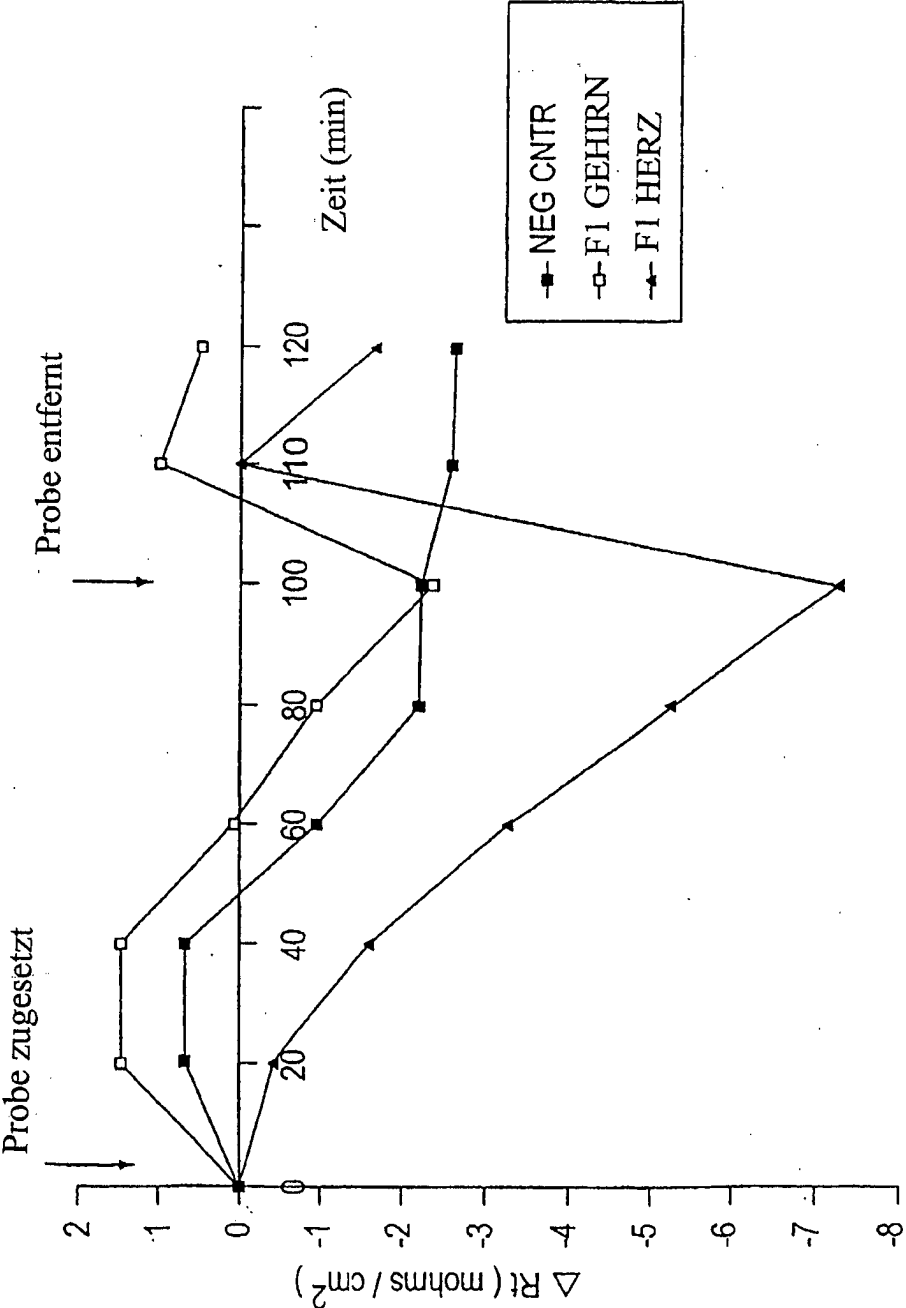


FIG. 6

Kaninchendarm

(SEQ ID NO:1):

Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln

menschlicher Erwachsenenendarm

(SEQ ID NO:7):

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu

menschlicher fetaler Darm

(SEQ ID NO:4):

Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu

menschliches Erwachsenenherz

(SEQ ID NO:2):

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

menschliches Erwachsenenengehirn

(SEQ ID NO:3):

Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser

interne Sequenz

menschliches Erwachsenenherz

(SEQ ID NO:9):

Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly

menschliches Erwachsenenengehirn 35 kDa-Fragment

(SEQ ID NO:8)

Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu