



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 20 671 T2** 2004.09.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 028 715 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 20 671.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/00019**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 902 381.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/030211**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.12.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.09.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 9/72**

A61K 39/00, A61K 9/00, A61K 47/42

(30) Unionspriorität:

781057 09.01.1997 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(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, Ellicott City, US; DeMAGISTRIS,
Teresa, I-53100 Siena, IT; UZZAU, Sergio, I-07100
Sassari, IT; RAPPUOLI, Rino, I-53100
Querciegrossa, IT**

(54) Bezeichnung: **ZUBEREITUNG ZUR NASALEN VERABREICHUNG ENTHALTEND VIBRIO CHOLERA ZONULA
OCCLUDENS TOXIN ALS ABSORPTIONSVERMITTLER**

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 durch die University of Maryland, Baltimore, Maryland, unterstützt.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft eine nasale Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung umfassend (A) ein therapeutisches Mittel; und (B) eine nasale absorptionsverstärkende wirksame Menge von Zonula Occludens Toxin, ebenso wie ein Verfahren für die Verwendung derselben.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

I. Nasale Übertragungssysteme

[0003] Bis vor kurzer Zeit wurden Antibiotika, antientzündliche Steroide und Abschwellungsmittel intranasal nur für deren lokale Wirkung verabreicht, z. B. nasale Abschwellung und Bronchodilation. Die Beobachtung, daß systemische Nebenwirkungen in einigen Fällen auftreten, führten zum Schluß, daß die nasale Mukosa die systemische Erhältlichkeit einiger Medikamente erlaubt. Die nasale Übertragung eröffnet eine vielversprechende Alternative zur parenteralen Verabreichung von therapeutischen Mitteln, die die rigorose gastrointestinale Umgebung nach der oralen Verabreichung nicht tolerieren können. Die nasale Verabreichung kann daher als eine der möglichen Alternativen, um Peptide und Proteinmedikamente zu übergeben, in Erwägung gezogen werden.

[0004] Die primäre Funktion der Nase ist die Geruchswahrnehmung, aber sie filtert ebenso Partikel aus der Luft ebenso wie Hitze und feuchte eingeatmete Luft. In adulten Menschen sind die nasalen Höhlen durch eine 2,0 bis zu 4,0 mm dicke Mukosa bedeckt (Mygind, Nasal Allergy, Blackwell Scientific, Oxford (1979)). Das Volumen der nasalen Höhle beträgt etwa 20 ml, dessen gesamte Oberflächenfläche beträgt etwa 180 cm² (Schreider, Toxicology of the Nasal Passage, Hemisphere, Washington, D. C., Seiten 1–23 (1986)). Die Absorption von therapeutischen Mitteln durch die nasale Mukosa resultiert in einer direkten systemischen Aussetzung, und vermeidet so den zunächst erfolgenden hepatischen Metabolismus, der mit der oralen Verabreichung verbunden ist. Jedoch wird eine alternative erste Durchlaufswirkung durch die metabolische Aktivität innerhalb der nasalen Mukosa generiert (Sarkar, Pharmacol. Res., 9 : 1–9 (1992)).

[0005] Auch wenn die Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen aus der nasalen Mukosa im wesentlichen, verglichen mit dem oralen Weg, verbessert ist, ist sie noch weit entfernt von optimal, wenn sie mit dem intravenösen Weg verglichen wird. Diese Limitierung kann der Resistenz zugeschrieben werden, die angetroffen wird, wenn Makromoleküle versuchen, die nasale Mukosa auf dem parazellulären Weg zu durchtreten (Sackar, supra).

[0006] Studien bezüglich der Verwendung des parazellulären Weges wurden nicht gründlich untersucht, hauptsächlich wegen des Mangels an Information über die Tight Junction(tj)-Struktur und -Funktion. Das heißt, der Eintritt der Moleküle auf dem parazellulären Weg wird im wesentlichen begrenzt durch die tj (Gumbiner, Am. J. Physiol., 253: C749–C758 (1987); und Madara, J. Clin. Invest., 83: 1089–1094 (1989)).

[0007] Bei der Transmissionselektronenmikroskopie erscheinen tj als eine ungefähr 80 nm lange Region an der Grenze der benachbarten Zellen, in welchem die Plasmamembranen der benachbarten Zellen in enge Gegenüberstellung gebracht werden (Farquhar et al, J. Cell Biol., 17: 375–412 (1963)). Diese Struktur umgibt Epithelialzellen direkt unterhalb der apischen Domäne und bildet eine Versiegelung zwischen den Epithelialzellen und deren Nachbarn. Diese Versiegelung begrenzt die Diffusion von kleinen Molekülen in einer ladungsabhängigen Art und Weise (Rappenheimer et al, J. Membrane Biol., 102: 2125–2136 (1986); Madara et al, J. Cell Biol., 102: 2125–2136 (1986); Claude et al, J. Cell Biol., 58: 390–400 (1973); and Bakker et al, J. Membrane Biol., 11: 25–35 (1989)), und schließt Moleküle mit einem molekularen Radius, der größer ist als 11 Å, vollständig aus (Madara et al, J. Cell Biol., 98: 1209–1221 (1985)). Daher wurde bemerkenswerte Aufmerksamkeit darauf gerichtet, Wege zu finden, um den parazellulären Transport durch das "Lockern" der tj zu finden.

[0008] Um die schwache Aufnahme aus der nasalen Mukosa zu überwinden, werden Absorptionsverbesserer in Versuchen verwendet, um das Ausmaß der Peptidabsorption zu erhöhen. Beispiele dieser Verstärker beinhalten Gallensalze (Duchateau et al, Int. J. Pharm. 31: 193–196 (1986)), chelatbildende Mittel (Lee, In: Delivery Systems for Peptide Drugs, Plenum, New York, Seiten 87–104 (1986)), und oberflächenaktive Stoffe (Hirai et al, Int. J. Pharm. 9: 165–169 (1981)). Da die oben aufgelisteten Einbringungsverstärker die Peptid- und Proteinabsorption durch das Stören der Membranintegrität fördern, ist es unvermeidlich, daß verschiedenen Ausmaße von Verletzungen an den mukosalen Geweben auftreten werden, die in Kontakt mit dem Verstärker sind (Lee, supra). Die Veränderung der Membranintegrität kann permanent die nasale Membran zerstören (Hirai et al, supra) und macht konsequenterweise daher die Verwendung dieser Substanzen für chronische Behandlungen

in Menschen unakzeptabel:

Daher gab es ein Verlangen im Stand der Technik, um nasale Absorptionsverstärker zu entwickeln, welche die oben diskutierten Limitierungen nicht haben.

II Funktion und Regulation der Tight Junctions

[0009] Die tj oder Zonula Occludens (hiernach "ZO") sind eines der Merkmale der Absorptions- und Sekretionsepithelien (Madara, J. Clin. Invest., 83: 1089-1094 (1989); und Madara, Textbook of Secretory Diarrhea Eds. Lebenthal et al, Kapitel 11, Seiten 125-138 (1990). Als eine Barriere zwischen apischen und basolateralen Abschnitten regulieren sie selektiv die passive Diffusion von Ionen und von wasserlöslichen löslichen Stoffen durch den parazellulären Weg (Gumbiner, Am. J. Physiol., 253 (Cell Physiol. 22): C749-C758 (1987)). Diese Barriere erhält jeglichen Gradient, der durch die Aktivität von Transportwegen gebildet wurde, die mit dem transzellulären Weg in Verbindung stehen (Diamond, Physiologist, 20: 10-18 (1977)).

[0010] Variationen bei der transepithelialen Leitung können normalerweise Veränderungen bei der Permeabilität des parazellulären Weges zugeschrieben werden, da die Widerstände der Zellplasmamembranen relativ hoch sind (Madara, supra). Die ZO stellt die Hauptbarriere auf diesem parazellulären Weg dar, und die elektrische Widerstandskraft der epithelialen Gewebe scheint von der Anzahl der Transmembranproteinstränge und deren Komplexität in der ZO abzuhängen, wie beobachtet durch Gefrierfraktionselektronenmikroskopie (Madara et al., J. Cell. Biol., 101: 2124-2133 (1985)).

[0011] Es gibt viele Hinweise darauf, daß ZO, die früher als statische Strukturen betrachtet wurden, tatsächlich dynamische Strukturen sind und sich an eine Vielzahl von entwicklungsbedingten (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)), physiologischen (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 pathologischen (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)) Umständen anpassen. Die Regulationsmechanismen, die dieser Anpassung zugrunde liegen, sind bis jetzt nicht vollständig verstanden. Jedoch ist es klar, daß in der Gegenwart von Ca^{2+} die Ansammlung der ZO das Ergebnis von zellulären Wechselwirkungen sind, die eine komplexe Kaskade von biochemischen Ereignissen auslösen, die ultimativ zu der Bildung und der Modulierung eines organisierten Netzwerkes von ZO-Elementen führen, deren Zusammensetzung nur teilweise charakterisiert wurde (Diamond, Physiologist, 20: 10-18 (1977)). Ein Kandidat für die Transmembranproteinstränge, Occludin, wurde identifiziert (Furuse et al, J. Membr. Biol., 87: 141-150 (1985)).

[0012] Sechs Proteine wurden in einem zytoplasmatischen Submembranplaque identifiziert, die Membrankontakten unterliegen, aber deren Funktion muß noch etabliert werden (Diamond, supra). ZO-1 und ZO-2 existieren als Heterodimer (Gumbiner et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 3460-3464 (1991)) in einem detergentstabilen Komplex mit einem uncharakterisierten 130 kD-Protein (ZO-3). Die meisten immunoelektronenmikroskopischen Studien haben ZO-1-präzise neben Membrankontakten 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)) befinden sich weiter entfernt von der Membran und wurden bis jetzt noch nicht kloniert. Rab 13, ein kleines GTP-bindendes Protein wurde ebenso kürzlich an der Junction-Region lokalisiert (Zahraoui et al, J. Cell Biol., 124: 101-115 (1994)). Andere kleine GTP-bindende Proteine sind dafür bekannt, daß sie das kortikale Zytoskelett regulieren, d. h. rho reguliert Aktinmembrananhaftung in fokalen Kontakten (Ridley et al, Cell, 70: 389-399 (1992)), und rac reguliert wachstumsfaktorinduziertes Membransträuben (Ridley et al, Cell, 70: 401-410 (1992)). Basierend auf der Analogie mit den bekannten Funktionen von Plaqueproteinen in den besser charakterisierten Zell-Junctions, fokale Kontakte (Guan et al, Nature, 358: 690-692 (1992)) und Adhärenz-Junctions (Tsukita et al, J. Cell Biol., 123: 1049-1053 (1993)), wurde die Hypothese aufgestellt, daß tj-assoziierte Plaqueproteine beim Übertragen von Signalen in beiden Richtungen über die Zellmembran und in der Regulation von Verbindungen mit dem kortikalen Aktinzytoskelett involviert sind.

[0013] Um den vielen verschiedenen physiologischen und pathologischen Herausforderungen, denen Epithelia ausgesetzt sind, zu entsprechen, muß ZO in der Lage sein, schnelle und koordinierte Antworten auszuführen, die die Gegenwart eines komplexen Regulationssystems erfordern. Die präzise Charakterisierung der Mechanismen, die bei der Ansammlung und der Regulation der ZO involviert sind, ist ein Gebiet der gegenwärtigen aktiven Untersuchung.

[0014] Es gibt nun einen Beweiskörper, daß strukturelle und funktionelle Verbindungen des tj zwischen dem Aktinzytoskelett und dem tj-Komplex der absorptiven Zellen existieren (Gumbiner et al, supra; Madara et al, supra; und Denchahn et al, J. Cell Biol., 107: 1037-1048 (1988)). Das Aktinzytoskelett ist aus einem komplizierten Maschenwerk von Mikrofilamenten zusammengesetzt, deren präzise Geometrie durch einen großen Kader von aktinbindenden Proteinen reguliert wird. Ein Beispiel davon, wie der Status der Phosphorylierung

eines aktinbindenden Proteins die zytoskelettale Verbindung mit der Zellplasmamembran regulieren könnte, ist das myristolierte alaninreiche C-Kinasesubstrat (hiernach "MARCKS"). MARCKS ist ein spezifisches Proteinkinase-(hiernach "PKC")-Substrat, das mit dem zytoplasmatischen Gesicht der Plasmamembran in Verbindung steht (Aderem, Elsevier Sci. Pub (UK), Seiten 438–443 (1992)). In seiner nicht phosphorylierten Form quervernetzt sich MARCKS mit dem Membranaktin. Daher ist es wahrscheinlich, daß das Aktinmaschenwerk, das mit der Membran über MARCKS in Verbindung steht, relativ fest ist (Hartwig et al, Nature, 356: 618–622 (1992)). Aktiviertes PKC phosphoryliert MARCKS, welches 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 Aktin, das mit MARCKS verbunden ist, wird wahrscheinlich räumlich von der Membran getrennt und ist plastischer. Wenn MARCKS desphosphoryliert wird, kehrt es zu der Membran zurück, wo es wiederum mit Aktin quervernetzt (Hartwig et al, supra; und Thelen et al, supra). Diese Daten suggerieren, daß das F-Aktin-Netzwerk durch einen PKC-abhängigen Phosphorylierungsprozeß, der aktinbindende Proteine beinhaltet (von denen MARCKS eines ist), umgeordnet werden könnte.

[0015] Von einer Vielzahl von intrazellulären Mediatoren wurde gezeigt, daß sie die tj-Funktion und/oder -Struktur ändern. Enge Junctions von der amphibischen Gallenblase (Duffey et al, Nature, 204: 451–452 (1981)), und von sowohl Goldfisch- (Bakker et al, Am. J. Physiol., 246: G213–G217 (1984)) als auch Flunder- (Krasney et al, Fed. Proc., 42: 1100 (1983)) Darm, zeigten verstärkten Widerstand gegen den passiven Ionenfluß, wenn intrazelluläre cAMP erhöht wurde. Ebenso schien die Aussetzung der amphibischen Gallenblase gegenüber einem Ca^{2+} -Ionophor die tj-Resistenz zu erhöhen und Veränderungen in der tj-Struktur zu induzieren (Palant et al, Am. J. Physiol., 245: C203–C212 (1983)). Weiterhin erhöht die Aktivierung von PKC durch Phorbol ester parazelluläre Durchlässigkeit sowohl in nieren- (Ellis et al, C. Am. J. Physiol., 263 (Renal Fluid Elektrolyte Physiol. 32): F293–F300 (1992)) und darm- (Stenson et al, C. Am. J. Physiol., 265 (Gastrointest. Liver Physiol. 28): G955–G962 (1993)) epithelialen Zelllinien.

III. Zonula Occludens Toxin

[0016] Die meisten Vibrio-Cholerae-Vakzin-Kandidaten, die konstruiert wurden durch das deletieren des *ctxA*-Gens, das für Cholera toxin (CT) codiert, sind in der Lage, hohe Antikörperantworten herauszufordern, aber mehr als die Hälfte der Vakzine entwickelt immer noch eine milde Diarrhö (Levine et al, Infect. Immun., 56(1): 161–167 (1988)). Unter Berücksichtigung der Stärke der Diarrhö, die in der Abwesenheit von CT induziert wurde, wurde hypothesiert, daß V. Cholerae andere enterotoxigene Faktoren produziert, welche immer noch in Strängen vorhanden sind, von denen die *ctxA*-Sequenz deletiert wurde (Levine et al, supra). Als ein Ergebnis wurde ein zweites Toxin, Zonula Occludens Toxin (hiernach "ZOT"), hergestellt durch V. Cholerae, und welches zu verbleibenden Diarrhö beiträgt, entdeckt (Fasano et al, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 8: 5242–5246 (1991)). Das *zot*-Gen ist direkt benachbart zu den *ctx*-Genen angeordnet. Die hohe Prozentzahl des Auftretens des *zot*-Gens mit den *ctx*-Genen unter V. Cholerae-Strängen (Johnson et al, J. Clin. Microb., 31/3: 732–733 (1993); und Karasawa et al, FEBS Microbiology Letters, 106: 143–146 (1993)) suggeriert eine mögliche synergistische Rolle des ZOT bei der Verursachung der akuten dehydrierenden Diarrhö, die für Cholera typisch ist. Kürzlich wurde das *zot*-Gen ebenso identifiziert in anderen enterischen Pathogenen (Tschape, 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis, 47 (Abstr.) (1994)).

[0017] Es wurde vorher herausgefunden, daß ZOT, wenn es mit der ilealen Mukosa eines Kaninchens getestet wird, die intestinale Durchlässigkeit durch Modulieren der Struktur der intrazellulären tj erhöht (Fasano et al, supra). Es wurde herausgefunden, daß als eine Konsequenz der Modifizierung des parazellulären Weges die intestinale Mukosa durchlässiger wird. Es wurde ebenso herausgefunden, daß ZOT nicht den Na^+ -Glukosegekoppelten aktiven Transport beeinflusst, es ist nicht cytotoxisch und schafft es nicht, die transepitheliale Widerstandskraft vollständig auszuschalten (Fasano et al, supra).

[0018] Vor kürzerer Zeit wurde gefunden, daß ZOT in der Lage ist, die tj in der intestinalen Mukosa reversibel zu öffnen, und daher ist ZOT, wenn es gemeinsam mit einem therapeutischen Mittel verabreicht wird, in der Lage, die intestinale Übertragung des therapeutischen Mittels zu bewirken, wenn es in einer oralen Dosierungszusammensetzung für die intestinale Medikamentenübertragung verwendet wird (WO 96/37196; U.S. Patent Application Serial Nr. 08/443.864, eingereicht am 24. Mai 1995; und U.S. Patent Application Serial 08/598.852, eingereicht am 9. Februar 1996; wobei auf jede von denen hiermit voll inhaltlich Bezug genommen wird).

[0019] In der vorliegenden Erfindung wurde zum ersten Mal demonstriert, daß ZOT, wenn es mit einem therapeutischen Mittel gemeinsam verabreicht wird, in der Lage ist, die nasale Absorption eines therapeutischen Mittels zu verstärken. Diese Erkenntnis war aus den folgenden Gründen unerwartet:

- (1) Vibrio Cholera infiziert natürlicherweise die intestinale Mukosa, nicht die nasale Mukosa;
- (2) Die Wirkung von ZOT auf die intestinale Mukosa ist nicht uniform, d. h. ZOT zeigt seinen durchlässigmachenden Effekt nur im Dünndarm, nicht im Dickdarm; und
- (3) Die regionale Wirkung von ZOT scheint mit der Verteilung von dessen Rezeptor innerhalb des Darms in

Bezug zu stehen, d. h., der Rezeptor wird nur durch die reifen Zellen an der Spitze der Villi in dem Jejunum und in dem Ileum expremiert. Er ist nicht vorhanden auf der Oberfläche der Colonocyten (Fiore et al, Gastroenterology, 110: A323 (1995)). Bis jetzt war es nicht bekannt, ob der ZOT-Rezeptor auf der Oberfläche der nasalen Mukosa expremiert wird.

[0020] Daher gab es keine vernünftige Erwartung, daß ein Vibrio-Choleratoxin, z. B. ZOT, irgendeine Wirkung auf die tj der nasalen Epithelia haben würde.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0021] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, nasale Absorptionsverstärker zur Verfügung zu stellen, welche die tj auf eine reversible und reproduzierbare Art und Weise schnell öffnen.

[0022] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, nasale Absorptionsverstärker zur Verfügung zu stellen, welche sicher verwendet werden können, ohne das nasale Epithelium zu schädigen.

[0023] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine nasale Dosierungszusammensetzung zur Verfügung zu stellen, welche die systemische Übertragung von therapeutischen Mitteln erlaubt.

[0024] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren für die nasale Übertragung von therapeutischen Mitteln so zur Verfügung zu stellen, daß sie durch die nasale Mukosa absorbiert werden.

[0025] Diese und andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung, welche aus der detaillierten Beschreibung der Erfindung, die hiernach zur Verfügung gestellt wird, ersichtlich sind, wurde in einer Ausführungsform durch eine nasale Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung gelöst, welche umfaßt:

(A) ein therapeutisches Mittel; und

(B) eine nasale, absorptionsverstärkende wirksame Menge von Zonula Occludens Toxin.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform werden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren für die nasale Übertragung eines therapeutischen Mittels gelöst, umfassend das nasale Verabreichen einer Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung umfassend:

(A) ein therapeutisches Mittel; und

(B) eine nasale, absorptionsverstärkende wirksame Menge des Zonula Occludens Toxins.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0027] **Fig. 1** zeigt die serumgeometrischen Titer von anti-Ova Antikörpern in Mäusen, die mit Ova alleine (offene Balken), LT-R72 + Ova (schattierte Balken) und TOT + Ova (geschlossene Balken) behandelt wurden.

[0028] **Fig. 2A–2B** zeigen die Serum anti-Ova Ige₁ (**Fig. 2A**) und IgG_{2a} (**Fig. 2B**) Antikörperunterklassen in Mäusen, behandelt Ova alleine (offene Balken), LT-R72 + Ova (schattierte Balken) und mit ZOT + Ova (geschlossene Balken).

[0029] **Fig. 3** zeigt die anti-Ova Sekretions-IgA-Antikörper bei der nasalen Waschung von Mäusen, behandelt mit Ova alleine (geschlossen Balken), LT – R72 + Ova (schattierte Balken) und ZOT + Ova (offene Balken).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Wie oben diskutiert, betrifft die vorliegende Erfindung in einer Ausführungsform eine nasale Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung umfassend:

(A) ein therapeutisches Mittel; und

(B) eine nasale absorptionsverstärkende wirksame Menge des Zonula Occludens Toxins.

[0031] Nasale Dosierungszusammensetzungen für die nasale Übertragung sind gut bekannt im Stand der Technik. Solche nasale Dosierungszusammensetzungen umfassen im allgemeinen wasserlösliche Polymere, die ausführlich verwendet wurden, um pharmazeutische Dosierungsformen herzustellen (Martin et al., In: Physical Chemical Principles of Pharmaceutical Sciences; 3. Ausgabe, Seiten 592–638 (1983)), die als Träger für Peptide für die nasale Verabreichung dienen können (Davis, In: Delivery Systems for Peptide Drugs, 125: 1–21 (1986)). Von der nasalen Absorption von Peptiden, die in Polymermatritzen eingebettet sind, wurde gezeigt, daß sie durch die Zurückhaltung der nasalen Mucociliärreinigung verstärkt wird (Illum et al, Int. J. Pharm., 46: 261–265 (1988)). Andere mögliche Verstärkungsmechanismen beinhalten einen erhöhten Konzentrationsgradienten oder einen abgesenkten Diffusionsweg für die Peptidabsorption (Ting et al, Pharm. Res., 9: 1330–1335 (1992)). Jedoch wurde von der Reduktion einer mukociliären Reinigungsgeschwindigkeit vorausgesagt, daß sie eine gute Herangehensweise in Richtung der Erreichung oder der Reproduzierbarkeit von Bioverfügbarkeit von nasal verabreichten systemischen Medikamenten sein würde (Gonda et al, Pharm. Res., 7: 69–75 (1990)). Von Mikropartikeln mit einem Durchmesser von etwa 50 µm wird erwartet, daß sie sich in der nasalen Höhle

ablageren (Bjork et al, Int. J. Pharm , 62: 187–192 (1990)); und Illum et al, Int. J. Pharm , 39: 189–199 (1987), während Mikropartikel mit einem Durchmesser von unter 10 µm dem Filtersystem der Nase entrinnen können und sich in den unteren Luftwegen ablagern können. Mikropartikel mit einem Durchmesser von über 200 µm werden nicht in der Nase nach nasaler Verabreichung behalten (Lewis et al, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 17: 280–290 (1990)).

[0032] Das bestimmte verwendete wasserlösliche Polymer ist nicht kritisch für die vorliegende Erfindung und kann ausgewählt werden aus jeglichen der gut bekannten wasserlöslichen Polymere, die für nasale Dosierungsformen verwendet werden. Ein typisches Beispiel eines wasserlöslichen Polymers, das nützlich für die nasale Übertragung ist, ist Polyvinylalkohol (PVA). Dieses Material ist ein schwellbares hydrophiles Polymer, dessen physikalische Eigenschaften von dessen Molekulargewicht, dessen Grad der Hydrolyse, dessen Quervernetzungsdichte und dessen Kristallinität abhängen (Peppas et al, In: Hydrogels in Medicine and Pharmacy, 3: 109–131 (1987)). PVA kann bei der Beschichtung von dispergierten Materialien durch Phasentrennung, Spraytrocknen, Sprayeinbetten und Sprayverdichtung (Ting et al, supra) verwendet werden.

[0033] Eine "nasale" Übertragungszusammensetzung unterscheidet sich von einer "intestinalen" Übertragungszusammensetzung dadurch, daß die letztere gastroresistente Eigenschaften haben muß, um dem acidischen Abbau der aktiven Mittel (z. B. ZOT und das therapeutische Mittel) im Magen vorzubeugen, während das erstere im allgemeinen wasserlösliche Polymere mit einem Durchmesser von etwa 50 µm umfaßt, um die mukocilliläre Reinigung zu reduzieren, und um eine reproduzierbare Bioverfügbarkeit der nasal verabreichten Mittel zu erreichen.

[0034] Das bestimmte therapeutische Mittel, das verwendet wird, ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch, und kann zum Beispiel jede Medikamentenverbindung sein, jedes biologisch aktive Peptid, Vakzin oder jeder andere Rest, der ansonsten durch den transzellulären Weg nicht absorbiert wird, unbeachtlich deren Größe und deren Ladung.

[0035] Beispiele von Medikamentenverbindungen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Medikamente, welche auf das Cardiovasculärsystem einwirken, Medikamente, welche auf das zentrale Nervensystem einwirken, antineoplastische Medikamente und Antibiotika.

[0036] Beispiele von Medikamenten, welche auf das Cardiovasculärsystem einwirken, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Lidocain, Adenosin, Dobutamin, Dopamin, Epinephrin, Norepinephrin und Phentolamin.

[0037] Beispiele von Medikamenten, welche auf das zentrale Nervensystem einwirken, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Doxapram, Alfentanil, Dezocin, Nalbuphin, Buprenorphin, Naloxon, Keterolac, Midazolam, Propofol, Metacurin, Mivacurium und Succinylcholin.

[0038] Beispiele von antineoplastischen Medikamenten, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können beinhalten Cytarabin, Mitomycin, Doxorubicin, Vincristin und Vinblastin.

[0039] Beispiele von Antibiotika, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Methicillin, Mezlocillin, Piperacillin, Cefoxitin, Cefonicid, Defmetazol und Aztreonam.

[0040] Beispiele von biologisch aktiven Peptiden, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Hormone, Lymphokine, Globuline und Albumine.

[0041] Beispiele von Hormone, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Testosteron, Nandrolon, Menotropine, Progesteron, Insulin und Urofolltropin.

[0042] Beispiele von Lymphokinen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Interferon-###, Interferon-###, Interferon-### Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-8.

[0043] Beispiele von Globulinen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten ###-Globuline, ###-Globuline und ###-Globuline (Immunoglobulin).

[0044] Beispiele von Immunoglobulinen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten polyvalentes IgG oder spezifisches IgG, IgA und IgM, z. B. Antitetanusantikörper.

[0045] Ein Beispiel eines Albumins, welches bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist humanes Serum Albumin und Ovalbumin.

[0046] Beispiele von Vakzinen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten Peptidantigen und beschädigte Mikroorganismen und Viren.

[0047] Beispiele von Peptidantigenen, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten die ###-Untereinheit von hitzelabilem Enterotoxin von enterotoxischen E. coli, der ###-Untereinheit des Cholera-toxins, kapsuläre Antigene von enterischen Pathogenen, Fimbriae oder Pili von enterischen Pathogenen, HIV-Oberflächenantigene, Stauballergene und Acariallergene.

[0048] Beispiele von geschädigten Mikroorganismen und Viren, welche bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beinhalten diejenigen von enterotoxischen Escherichia coli, enteropathogenen Escherichia coli, Vibrio Cholerae, Shigella Flexneri, Salmonella Typhi, Helicobacter Pylori und Rotavirus (Fasano et al, In: Le Vaccinazioni in Pediatria, Eds. Vierucci et al, CSH, Milan, Seiten 109–121 (1991); Guandalini et al, In: Management of Digestive and Liver Disorders in Infants and Children, Elsevier, Eds. Butz et al, Ams-

terdam; Kapitel 25 (1993); Levine et al, Sem. Ped. Infect. Dis., 5: 243–250 (1994); Kaper et al, Clin. Microbiol. Rev., 8: 48–86 (1995), wobei auf jede von denen hiermit vollinhaltlich Bezug genommen wird).

[0049] Wenn das therapeutische Mittel Insulin ist, ist die nasale Dosierungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung nützlich bei der Behandlung von Diabetes.

[0050] Die Menge des therapeutischen Mittels, das verwendet wird, ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch und wird von dem bestimmten Mittel, das ausgewählt ist, der Krankheit oder dem Zustand, der behandelt wird, ebenso wie dem Alter, dem Gewicht und dem Geschlecht des Subjektes, das behandelt wird, abhängen.

[0051] Die Menge des Zonula Occludens Toxins (hiernach "ZOT"), die verwendet wird, ist ebenso nicht kritisch für die vorliegende Erfindung und wird variieren abhängig vom Alter, dem Gewicht und dem Geschlecht des Subjektes, das behandelt wird. Im allgemeinen ist die finale Konzentration des ZOTs, das bei der vorliegenden Erfindung verwendet wird, um die Absorption des therapeutischen Mittels durch die Nase zu verstärken, im Bereich von etwa 10^{-5} M bis 10^{-10} M, vorzugsweise etwa 10^{-6} M bis zu $5,0 \times 10^{-8}$ M. Um solch eine finale Konzentration in der Nase zu erreichen, wird die Menge des ZOTs in einer einzelnen nasalen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung im allgemeinen etwa 40 ng bis zu 1000 ng, vorzugsweise etwa 400 ng bis zu 800 ng betragen.

[0052] Das Verhältnis des therapeutischen Mittels zum ZOT, das verwendet wird, ist nicht kritisch für die vorliegende Erfindung und wird variieren abhängig von der Menge des therapeutischen Mittels, das innerhalb der ausgewählten Zeitperiode übertragen werden soll. Im allgemeinen befindet sich das Gewichtsverhältnis des therapeutischen Mittels zum ZOT, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, im Bereich von etwa 1 : 10 bis zu 3 : 1, vorzugsweise etwa 1 : 5 bis zu etwa 2 : 1.

[0053] ZOT wird produziert durch V. Cholerae. Der bestimmte Strang von V. Cholerae, aus welchem ZOT abgeleitet wurde, ist nicht kritisch für die vorliegende Erfindung. Beispiele solche V. Cholerae-Stränge beinhalten Strang 569B, 395 und E7946 (Levine et al, supra, Johnson et al, supra; und Karasawa et al, supra).

[0054] Wie hierin verwendet, bezieht sich "ZOT" auf das reife Protein mit 399 Aminosäuren, ebenso wie auf Mutanten davon, welche die Fähigkeit behalten, tj zu regulieren. Beispielsweise eine N-terminale Deletion von Aminosäuren 1–8 kann gemacht werden, ohne die ZOT-Aktivität zu beeinträchtigen, und N-terminale Fusionsproteine des ZOTs können hergestellt werden, ohne die ZOT-Aktivität zu beeinträchtigen. Solche Mutanten können leicht durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt werden, und es kann für ZOT-Aktivität gescreent werden, wie hierin beschrieben.

[0055] ZOT kann erhalten und aufgereinigt werden, z. B. durch genetisch veränderte E. coli-Stränge, die das ZOT-Gen überexpressieren (Baudry et al, Infect. Immun., 60: 428–434 (1992)), alleine oder fusioniert mit anderen Genen, so wie Maltosebindprotein (siehe Beispiel 1 hierunter) oder Glutathion-S-Transferase (siehe Beispiel 2 hierunter).

[0056] Die folgenden Beispiele werden lediglich zu illustrativen Zwecken zur Verfügung gestellt und sind nicht dafür vorgesehen, den Umfang der vorliegenden Erfindung zu limitieren.

BEISPIEL 1

Herstellung und Aufreinigung von ZOT und MBP-ZOT und GST-ZOT

A. Herstellung und Aufreinigung von ZOT

[0057] Eine $M_r > 10.000$ Überstandfraktion enthaltend ZOT wurde erhalten nach dem Kultivieren eines V. Cholerae-Stranges CVD110-transformiert mit dem Plasmid pZ14 (hiernach "pZ14-Überstand").

[0058] CVD110 ist ein V. Cholerae (E1 Tor Biotype)-Strang, in welchem alle bekannten Toxingene (ctxA-, zot- und ace-Gene) deletiert worden sind (Michalski et al, Infect. Immun., G1: 4462–4468 (1993)).

[0059] Plasmid pZ14 enthält das zot-Gen, das durch den induzierbaren tac-Promoter transkribiert wird. Plasmid pZ14 wurde konstruiert durch Verdauen von pBB241 mit HindIII. pBB241 wurde erhalten durch Klonieren eines ClaI-XbaI-Fragmentes, enthaltend die gesamte zot-Sequenz in den Plasmid-pUC19 (Baudry et al, supra). Der 5'-Überhang wurde mit Klenow-Fragmenten aufgefüllt und der linearisierte Plasmid wurde mit XbaI verdaut, was ein zot-Fragment mit 1,5 kb erhab. Dieses Fragment wurde in den Vektor pTTQ181 kloniert (Amersham, Arlington Heights, IL), welcher modifiziert wurde durch die Unterbrechung des Amp^R-Gens mit der Kan^R-Kassette, die in pHSG274 gefunden wurde, beschrieben durch Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989). Das heißt, pTTQ181 wurde verdaut mit EcoRI, eingefüllt und verdaut mit XbaI. Das 1,5 kb XbaI zot-Fragment wurde in den resultierenden Vektor in der korrekten Orientierung ligiert und wurde mit "pZ14" bezeichnet.

[0060] Die $M_r > 10.000$ überständige Fraktion wurde hergestellt wie folgt. CVD110, transformiert mit pZ14, wurde über Nacht bei 37°C in Luria Bertani (hiernach "LB")-Nährlösung kultiviert, enthaltend 50 µg/ml Kanamycin, um so die kanamycinresistenten Stränge zu selektieren, die den pZ14-Plasmid enthalten. Die Kulturen wurden dann verdünnt, um einen initialen OD 600 nm von 0,4–0,5 zu erhalten. Als nächstes, um die Expression

von ZOT aus dem tac-Promoter zu induzieren, wurden 2,0 mM von Isopropyl-Thio-~~####~~-D-Galactopyranosid (IPTG) (5'-3' Einbeziehung, Boulder, CO) zu den Kulturen hinzugegeben, welche bei 37°C für weitere zwei Stunden inkubiert wurden. Als nächstes wurde das Kulturmedium gesammelt, abgekühlt und zentrifugiert bei $5.000 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C. Die resultierende Flüssigkeit wurde gesammelt und durch einen 0,45 µm Filter (Millipore) durchgeführt. Der resultierende Kulturüberstand wurde dann der Ultrafiltration durch Centricon-Filter (Vanguard International Corp., NJ) mit einer 10 kDa M cut-off-Größe ausgesetzt. Die $M_R > 10$ kDa-Fraktion wurde zweimal mit phosphatgepuffertem Salin (pH 7,4) (hiernach "PBS"), gewaschen und auf das ursprüngliche Volumen in PBS rekonstituiert.

[0061] 5000 ml des resultierenden pZ14-Überstandes wurde dann 1000fach konzentriert unter Verwendung eines Laminafußfilters mit einem MW Cutoff von 10 kDa und wurde dann 8,0% (w/v) SDS-PAGE ausgesetzt. Proteinbanden wurden durch Coomassie-Blaufärben des SDS-PAGE-Gels detektiert. Keine Proteinbande, die ZOT entsprach, war detektierbar, wenn mit dem Kontroll-pTTQ181-Überstand verglichen wurde, der auf dieselbe Art und Weise behandelt wurde. Daher, sogar wenn das zot-Gen hinter dem hochinduzierbaren und starken tac-Promoter in pZ14 angeordnet war, war der Spiegel des Proteins in dem tausendfach konzentrierten pZ14-Überstand noch nicht detektierbar durch ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel.

B. Herstellung und Aufreinigung von MBP-ZOT

[0062] Um die Menge des hergestellten ZOTs zu erhöhen, wurde das zot-Gen in frame mit dem maltosebindenden Protein (hiernach "MBP")-Gen fusioniert, um ein MBP-ZOT-Fusionsprotein herzustellen.

[0063] Der MBP-Vektor pMAL-c2 (Biolab) wurde verwendet, um ZOT durch Fusionieren des zot-Gens an das malE-Gen aus E. coli zu exprimieren und aufzureinigen. Dieses Konstrukt verwendet den starken induzierbaren tac-Promoter und die malE-Translationsinitiationssignale, um eine Expression des klonierten zot-Gens auf hohem Niveau zu ergeben. Der Vektor pMAL-c2 besitzt eine genaue Deletion der malE-Signalsequenz, welche zur zytoplasmatischen Expression des Fusionsproteins führt. Affinitätschromatographieaufreinigung für MBP wurde verwendet, um die Isolierung des Fusionspeptids zu vereinfachen (Biolab).

[0064] Insbesondere wurde der Vektor pMAL-c2 linearisiert mit EcoRI (das am 3'-Ende des malE-Gens schneidet), eingefüllt mit Klenow-Fragment, und verdaut mit XbaI (das eine einzige Site im pMAL-c2 Polylinker hat). Der für ZOT codierende orf wurde aus dem Plasmid pBB241 subkloniert (Baudry et al, supra). Das Plasmid pBB241 wurde mit BssHII verdaut, eingefüllt mit Klenow-Fragment und verdaut mit XbaI. Dann wurde das Blunt-XbaI-Fragment in pMAL-c2 kloniert, um das Plasmid pLC10-c zu ergeben. Da sowohl das Insert als auch der Vektor Blunt- und Sticky-Enden hat, wurde die korrekte Orientierung mit dem 3'-Ende des malE fusioniert mit dem 5'-Ende des Inserts erreicht. pLC10-c wurde dann in den E. coli-Strang DH5~~####~~ elektroporiert. In pBB241 befindet sich die BssHII-Restriktions-Site innerhalb des zot orf. Daher fehlen die Aminosäuren 1-2 des ZOTs in dem MBP-ZOT-Fusionsprotein.

[0065] Um das MBP-ZOT-Fusionsprotein aufzureinigen, wurden 10 ml von Luria Bertani Nährlösung enthaltend 0,2% (w/v) Glukose und 100 µg/ml Ampicillin inokuliert mit einer einzelnen Kolonie, enthaltend pLC10-c und über Nacht inkubiert bei 37°C mit Schütteln. Die Kultur wurde 1 : 100 in einem 1 desselben frischen Mediums verdünnt und bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen, bis zu etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml. 0,2 mM IPTG wurde dann hinzugefügt, um die MBP-ZOT-Expression zu induzieren, und die Kultur wurde bei 37°C für weitere drei Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und in 20 ml eiskaltem "Säulenpuffer" resuspendiert, umfassend 20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1,0 mM EDTA, 10 mM 2-ME, 1,0 mM NaN₃. Die bakterielle Suspension wurde durch Behandlung mit einer French Press lysiert und 30 Minuten bei 13.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, 1 : 5 verdünnt mit Säulenpuffer und auf eine 1×10 Säule mit Amyloseharz (Biolabs, MBP-Fusionsaufreinigungssystem) geladen, vorequilibriert mit Säulenpuffer. Nach dem Waschen der Säule mit 5 Volumen des Säulenpuffers wurde das MBP-ZOT-Fusionsprotein durch Zufügen von 10 ml 10 mM Maltose in den Säulenpuffer eluiert. Die typische Ausbeute von 1,0 l Kultur war 2-3 mg Protein.

[0066] Der MBP-Fusionspartner des aufgereinigten MBP-ZOT-Fusionsproteins wurde dann abgespalten unter Verwendung von 1,0 µg Faktor Xa-Protease (Biolabs) pro 10 µg MBP-ZOT. Faktor Xa-Protease schneidet direkt vor dem Aminoterminus von ZOT. Das ZOT-Protein, das so erhalten wurde, wurde auf einem 8,0%igen (w/v) SDS-PAGE-Gel laufengelassen und unter Verwendung einer Elektroseparationskammer (Schleicher & Schuell, Keene, NH) aus dem Gel elektroeluiert.

[0067] Bei Tests in Ussing-Kammern induzierte das resultierende aufgereinigte ZOT eine Dosis abhängiger Absenkung von R_t mit einem ED_{50} von $7,5 \times 10^{-8}$ M (siehe **Fig. 3** von U.S. Patentanmeldung Seriennummer 08/598,852, eingereicht am 9. Februar 1996).

C. Herstellung und Aufreinigung von GST-ZOT

[0068] Als ein zweites ZOT-Fusionsprotein wurde eine chimere Glutathion S-Transferase (GST)-ZOT-Protein exprimiert und aufgereinigt.

[0069] Insbesondere wurden Oligonucleotidprimer verwendet, um den zot orf durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des Plasmids pBB241 (Baudry et al, supra) als Template-DNA zu amplifizieren. Der Vorwärtsprimer (TCATCACGGC GCGCCAGG, SEQ ID NO: 1) entsprach den Nukleotiden 15–32 des zot orfs und der Rückwärtsprimer (GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT, SEQ ID NO: 2) entsprach dem 5'-Ende des ctxA orf. Daher fehlten die Aminosäuren 1–5 des ZOTs in dem resultierenden Fusionsprotein. Das Amplifizierungsprodukt wurde in den Polylinker (SmaI Site) eingeführt, die sich am Ende des GST-Gens in pGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI) befindet. pGEX-2T ist ein Fusionsprotein-Expressionsvektor, der ein kloniertes Gen als Fusionsprotein mit GST von *Schistosoma japonicum* expremiert. Das Fusionsgen befindet sich unter der Kontrolle des tac-Promoters. Nach der Induktion mit IPTG tritt die Derepression auf und das GST-Fusionsprotein wird expremiert.

[0070] Der resultierende rekombinante Plasmid, benannt pLC11, wurde elektroporiert in *E. coli* DH5###. Um das GST-ZOT-Fusionsprotein aufzureinigen, wurden 10 ml Luria Bertani Nährlösung, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin inokuliert mit einer einzelnen Kolonie enthaltend pLC11 und inkubiert über Nacht bei 37°C mit Schütteln. Die Kultur wurde verdünnt auf 1 : 100 in 1,0 l desselben frischen Mediums und wurde bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen, bis zu einer Zelldichte von etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml. 0,2 mM IPTG wurde dann hinzugegeben, um die GST-ZOT-Expression zu induzieren, und die Kultur wurde bei 37°C für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletiert, resuspendiert in 20 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) und durch das French Press-Verfahren lysiert. Das GST-ZOT-Fusionsprotein war unter diesen Bedingungen nicht löslich, da es mit der bakteriellen Pellet-Fraktion sedimentierte. Daher wurde das Pellet in Lämmli Lysis-Puffer, umfassend 0,00625 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 M 2-ME, 2,0% (w/v) SDS, 0,025 (w/v) Bromphenol blau und 10% (v/v) Glycerin suspendiert und der Elektrophorese auf einem 8,0%igem (w/v) SDS-PAGE-Gel ausgesetzt und gefärbt mit Coomassie brilliant-blau. Eine Bande von etwa 70 kDa (26 kDa GST + 44 kDa ZOT) entsprechend dem Fusionsprotein wurde aus dem Gel unter Verwendung einer Elektrotrennkammer elektroeluiert (Schleicher & Schnell, Keene, NH).

BEISPIEL 2

ZOT als nasaler Absorptionsverstärker

[0071] Hinsichtlich der Beobachtung, daß tj universelle Strukturen repräsentiert, die benachbarte Epithelialzellen verbinden, wurde bei der vorliegenden Erfindung postuliert, daß die Durchlässigkeit der Epithelia auf der nasalen Mukosa durch ZOT moduliert werden könnte. Dieses wurde durch die folgenden in vivo-Studien bestätigt.

A. Tiere und Reagenzien

- [0072] Weibliche Balb/c-Mäuse, 6–8 Wochen alt, wurden von Charles River (Calco, Como, Italien) erhalten.
 [0073] LT-R72 ist ein Mutant eines *Escherichia coli* hitzelablen Enterotoxins (LT), enthaltend die einzige Mutation Ala_n-Arg. Diese Mutante wurde als ein Kontrollübertragungsverstärker verwendet.
 [0074] Ovalbumin (Ova) wurde erhalten von Sigma (st. Louis, MO).
 [0075] MBP-ZOT wurde erhalten, wie beschrieben in Beispiel 1 oben.

B. Immunisierungsplan

- [0076] Gruppen von fünf Mäusen wurden fünfmal (Tage 0, 14, 21, 28, 35) mit entweder:
 (i) 5,0 µg Ova alleine,
 (ii) 1,0 µg von LT-R72, mit und ohne 5,0 µg Ova, oder
 (iii) 0,1 µg oder 1,0 µg MBP-ZOT mit und ohne 5,0 µg Ova immunisiert.

[0077] Antigen (Ova) und Adjuvanz (LT oder ZOT) wurden entsprechend in PBS verdünnt, direkt vor den Immunisierungen zusammengemischt und mit einer Gilson Pipette (15 µl/Nasenloch) an teilweise anästhetisierte Mäuse übergeben. Das Anästhetikum war eine Mischung aus 0,2 mg/ml Xilazin und 5,0 mg/ml Ketamin und wurde intraperitoneal (0,1 ml der Mischung/10 g Körpergewicht) verabreicht.

C. Sammlung von Serumproben

[0078] Serumproben wurden 24 Stunden vor der Immunisierung und jede Woche nach der letzten Immunisierung entnommen.

D. Sammlungen von Nasalwaschungen

[0079] Nasale Waschungen wurden 14 Tage nach der fünften Immunisierung gesammelt. Spülungen wurden an dem geopferten Tier durch wiederholtes Ausspülen und Aufnehmen von 1,0 ml PBS enthaltend 0,1% (w/v) bovines Serum Albumin (BSA) und 1,0 mM PMSF (Fluka, Buchs, Schweiz) als Protease-Inhibitor ausgeführt. Die Waschungen wurden bei -20°C gelagert.

E. ELISA Assay

[0080] Um den Titer der Ova-spezifischen Antikörper einzuschätzen, wurden 96 Wellplatten mit 0,1 ml Ova (45 µg/ml) beschichtet. Die Platten wurden dann mit PBS, enthaltend 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen und eine Stunde lang bei 37°C mit 0,2 ml PBS enthaltend 1,0% (w/v) BSA blockiert.

[0081] Serumproben aus individuellen Mäusen oder gepoolte Seren wurden seriell verdünnt, ausgehend von einer 1 : 50-Verdünnung, in PBS. Nasale Waschungen (aus individuellen Mäusen oder gepoolten Tieren) wurden seriell verdünnt, ausgehend von einer 1 : 10-Verdünnung in PBS. Die verdünnten Proben wurden dann zu den Platten hinzugegeben (0,1 ml/well) und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Als nächstes wurden die Platten mit PBS, enthaltend 0,05 (v/v) Tween 20 gewaschen.

[0082] Platten, die Serumproben enthielten, wurden mit 0,1 ml von Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Myeloperoxidase (HRP) – Konjugaten (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnt 1 : 2000 in PBS enthaltend 0,1% (w/v) BSA und 0,025 (v/v) Tween 20 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

[0083] Platten enthaltend nasale Waschungen wurden inkubiert mit 0,1 ml eines ###-Ketten-spezifischen Biotinkonjugiertem Ziegen-Anti-Maus-Serums (Sigma) verdünnt 1 : 1000 in PBS enthaltend 0,1% (w/v) BSA und 0,025% (v/v) Tween 20, 2 Stunden bei 37°C. Diese Platten wurden dann mit PBS enthaltend 0,05 (v/v) Tween 20 gewaschen und 0,1 ml von HRP-konjugiertem Streptavidin (Dako, Verdünnung 1 : 2000) wurde 2 Stunden bei 37°C hinzugefügt.

[0084] Antigen-gebundene Antikörper für sowohl die Platten enthaltend Serumproben als auch die Platten enthaltend nasale Waschungen wurden visualisiert durch Hinzufügen von o-Phenylendiaminsubstrat (Sigma) und Auslesen der Absorption bei 450 nm. Die Titer wurden arbiträr als der Kehrwert der Probenverdünnung entsprechend zu $OD_{450} = 0,3$ bestimmt. Serumproben und nasale Waschungen mit Absorptionswerten von geringer als 0,3 oberhalb des Rauschens wurden als negativ angesehen.

F. Wirkungen von ZOT- und LT-Mutanten auf die Systemische Antwort auf Ova

[0085] Vorhergehende Studien haben demonstriert, daß die intranasale Immunisierung mit der nichttoxischen LT-Mutante LT-K63 eine systemische Antwort auf Ova induziert (Di Tommaso et al, Infect. Immun. 64: 974–979 (1996)). Von LT-R72, einer zweite LT-Mutante, wurde herausgefunden, daß sie sogar noch immunogener als LT-K63 ist. Jedoch wurde herausgefunden, daß LT-R72 immer noch reaktogen ist, wenn es in Tiermodellen getestet wurde. Der Mechanismus, nachdem sowohl LT-K63 als auch LT-R72 diese Antwort induzieren, wurde nicht vollständig definiert. Jedoch scheinen die Moleküle als mukosale Adjuvanz zu wirken.

[0086] Dementsprechend wurde die Antwort auf Ova in Tieren, die intranasal mit ZOT + Ova immunisiert wurden, mit denen verglichen, die in Tieren erhalten wurden, die mit entweder LT-R72 + Ova oder mit Ova alleine immunisiert wurden. Die Resultate des ELISA Assays, die die Serumproben miteinbezogen, die in **Fig. 1** gezeigt sind, demonstrieren, daß die Tiere, mit ZOT-Ova immunisiert sind, eine systemische Antwort auf Ova entwickelten, die vergleichbar zu LT-R72 war und deutlich höher war verglichen mit Tieren, die mit Ova alleine herausgefordert wurden.

[0087] Die Evaluierung der Anti-Ova-IgG-Unterklassen in den Serumproben durch einen ELISA ergab, daß LT-R72 sowohl einen Anstieg der IgG_1 (**Fig. 2A**) als auch der IgG_{2a} (**Fig. 2B**) Antikörper induzierte, während ZOT-behandelte Tiere lediglich einen Anstieg der IgG_1 -Unterklassen (**Fig. 2A und 2B**) induzierte. Diese Resultate suggerieren, daß die Mechanismen der ZOT-Antigenübertragung und der LT-R72-Antigenübertragung unterschiedlich sind, während deren Wirksamkeit vergleichbar ist. Eine plausible Hypothese ist es, daß LT-R72 Antigene durch den transzellulären Weg übergibt (wo die Antigene teilweise durch intrazelluläre Enzyme modifiziert werden können), während ZOT Antigene durch den parazellulären Weg übergibt.

[0088] Es wurde ebenso herausgefunden, daß ZOT und LT – R72 eine mukosale Immunoantwort induzieren, wie bestimmt durch die erhöhten Sekretions-IgA-Titer, die in dem ELISA Assay der nasalen Waschungen der Mäuse, die mit entweder ZOT + Ova oder mit LT – R72 + Ova (siehe **Fig. 3**) behandelt wurden, detektiert wurden.

[0089] Die obigen Resultate demonstrieren, daß ZOT die nasale Übertragung von Proteinen als ein Prototyp eines therapeutischen Mittels verstärken kann.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: FASANO, Alessio
DE MAGISTRIS, Teresa
UZZAU, Sergio
RAPPUOLI, Rino

(ii) TITEL DER ERFINDUNG:

DOSIERUNGSZUSAMMENSETZUNG FÜR
DIE NASALE ÜBERTRAGUNG UND VER-
FAHREN FÜR DIE VERWENDUNG DER-
SELBEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS
(B) STRAßE: 2100 Pennsylvania Avenue, N.W., Suite
(C) STADT: Washington, D.C.
(D) STAAT: D.C.
(E) LAND: U.S.A.
(F) POSTLEITZAHL: 20037

(v) COMPUTERLESBARES FORMAT:

(A) MEDIUMART: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BEARBEITUNGSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(viii) ANWALT-/AGENTINFORMATION:

(A) NAME: KIT, Gordon
(B) REGISTRATIONSNUMMER: 30,764

(C) REFERENZ-/DOCKETNUMMER: A-6874

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: (202) 293-7060

(B) TELEFAX: (202) 293-7860

(2) INFORMATIONEN FÜR DIE SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID No:1:

TCATCACGGC GCGCCAGG

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

GGAGGTCTAG AATCTGCCCCG AT

Patentansprüche

1. Eine nasale Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung umfassend:

(A) ein therapeutisches Mittel; und

(B) eine nasale absorptionsverstärkende wirksame Menge aufgereinigtes Vibrio Cholera Zonula Occludens Toxin.

2. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das therapeutische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer medikamentösen Verbindung, einem biologisch aktiven Peptid und einem Vaccin.

3. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die medikamentöse Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Medikament, welches auf das Kardiovaskulärsystem wirkt, einem Medikament, welches auf das zentrale Nervensystem wirkt, einem antineoplastischen Medikament und einem Antibiotikum.

4. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Medikament, welches auf das Kardiovaskulärsystem wirkt, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Lidocain, Adenosin, Dobutamin, Dopamin, Epinephrin, Norepinephrin und Phentolamin.

5. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Medikament, das auf das zentrale Nervensystem wirkt, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Doxapram, Alfentanil, Dezocin, Nalbuphin, Buprenorphin, Naloxon, Ketorolac, Midazolam, Propofol, Metacurin, Mivacurium und Succinylcholin.

6. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das antineoplastische Medikament ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cytarabin, Mitomycin, Doxorubicin, Vincristin und Vinblastin.

7. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Antibiotikum ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methicillin, Mezlocillin, Piperacillin, Cefoxitin, Cefonicid, Cefmetazol und Aztreonam.

8. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das biologisch aktive Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hormon, Lymphokin, Globulin und Albumin.

9. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Hormon ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Testosteron, Nandrolen, Menotropins, Progesteron, Insulin und Urofolltropin.

10. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Lymphokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Interferon- α , Interferon- β , Interferon- γ , Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-8.

11. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Globulin ein Immunglobulin ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus polyvalentem IgG und spezifischem IgG, IgA oder IgM.

12. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Verhältnis des therapeutischen Mittels zum Zonula Occludens Toxin im Bereich von 1 : 10 bis zu 3 : 1 liegt.

13. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das Verhältnis des therapeutischen Mittels zum Zonula Occludens Toxin im Bereich von etwa 1 : 5 bis zu 2 : 1 liegt.

14. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 13, wobei das Zonula Occludens Toxin in der Zusammensetzung in einer Menge von etwa 40 ng bis 1000 ng vorhanden ist.

15. Die nasale Dosierungszusammensetzung nach Anspruch 14, wobei das Zonula Occludens Toxin in der Zusammensetzung in einer Menge von etwa 400 ng bis 800 ng vorhanden ist.

16. Die Verwendung einer nasalen Dosierungszusammensetzung für die nasale Übertragung eines therapeutischen Mittels, umfassend:

(A) ein therapeutisches Mittel; und

(B) eine nasale absorptionsverstärkende wirksame Menge an auf gereinigtem Vibrio Cholera Zonula Occludens Toxin für die Herstellung eines Medikaments für die nasale Übertragung eines biologischen Inhaltsstoffes.

17. Die Verwendung nach Anspruch 16, wobei das therapeutische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, wie definiert in einem der Ansprüche 2 bis 11.

18. Die Verwendung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, wobei das Verhältnis des therapeutischen Mittels zum Zonula Occludens Toxin ist, wie definiert in Anspruch 12 oder Anspruch 13.

19. Die Verwendung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, wobei das Zonula Occludens Toxin in der Zusammensetzung in einer Menge vorhanden ist, wie definiert in Anspruch 14 oder Anspruch 15.

20. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei das Zonula Occludens Toxin in einer Menge verabreicht wird, so daß die finale Konzentration in der Nase im Bereich von etwa 10^{-5} M bis zu 10^{-10} M liegt.

21. Die Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Zonula Occludens Toxin in einer Menge verabreicht wird, so daß die finale Konzentration in der Nase im Bereich von etwa 10^{-6} M bis zu $5,0 \times 10^{-8}$ M liegt.

22. Eine Zusammensetzung, welche umfaßt:

(A) ein therapeutisches Mittel;

(B) eine nasale absorptionsverstärkende wirksame Menge an aufgereinigtem Vibrio Cholera Zonula Occludens Toxin; und

(C) ein oder mehrere wasserlösliche Polymere.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

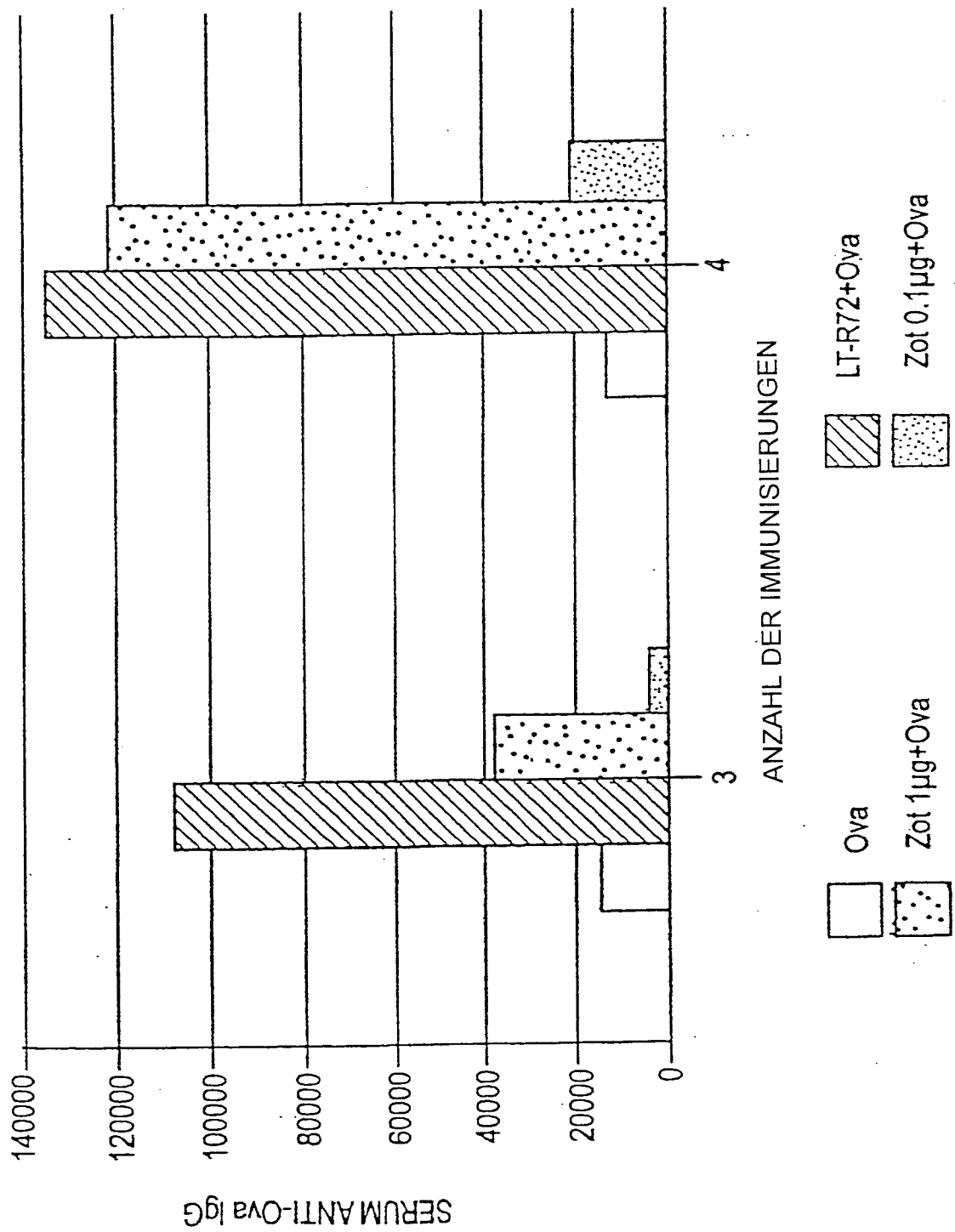


FIG. 2(a)

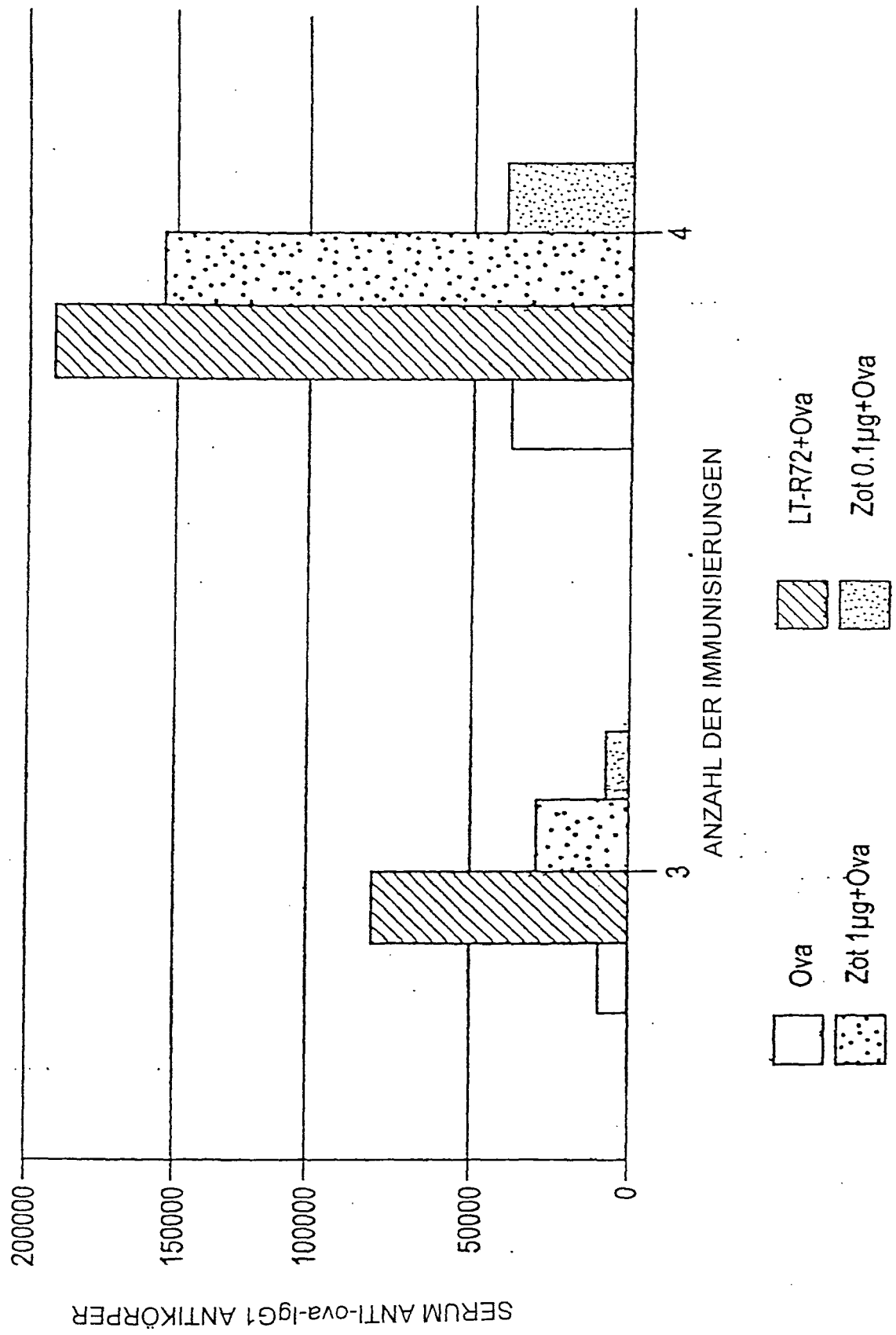


FIG. 2(b)

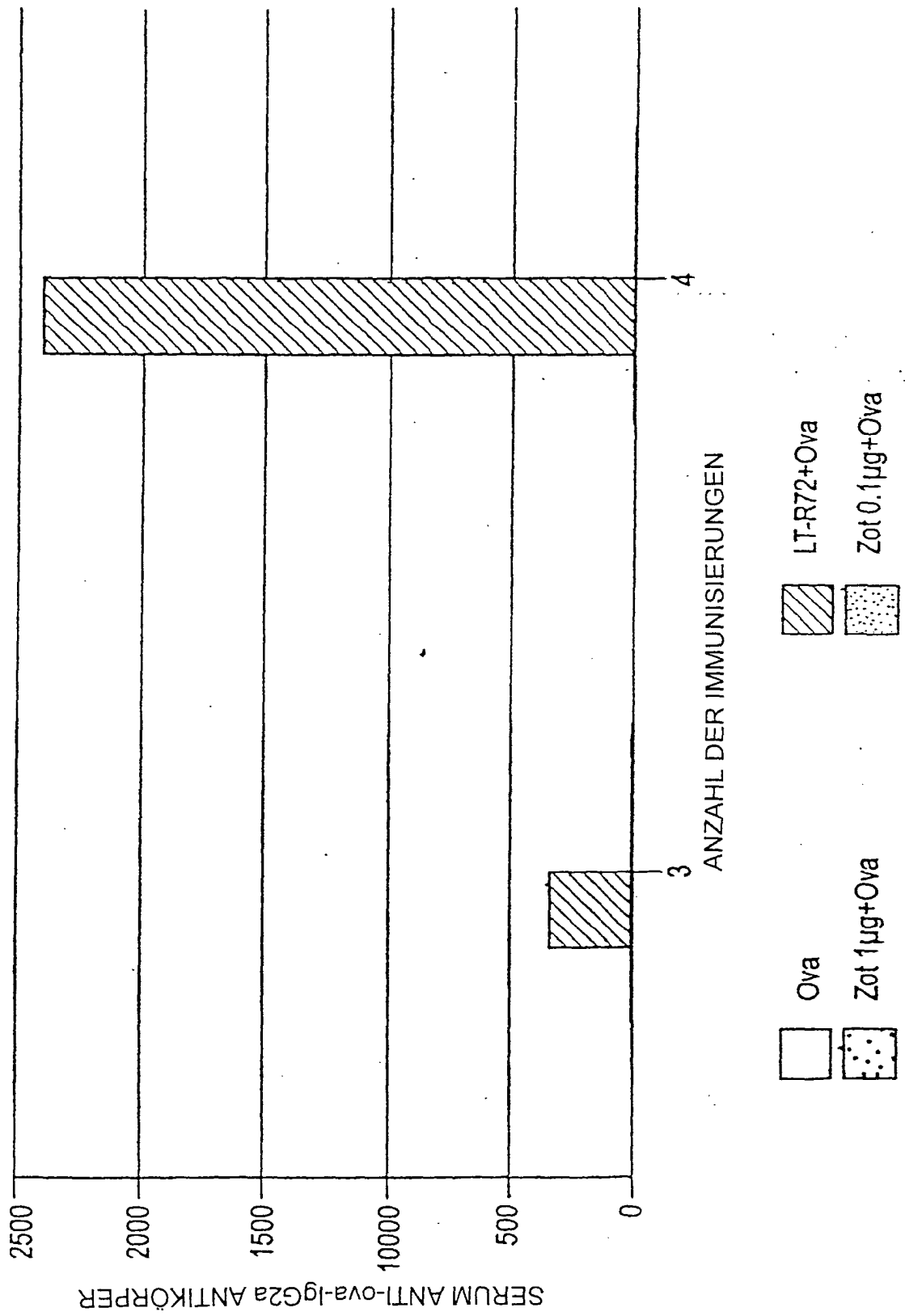


FIG. 3

