

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200510007712.7

[51] Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100348266C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/08 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

[22] 申请日 1999.7.28

[21] 申请号 200510007712.7

分案原申请号 99810031.5

[30] 优先权

[32] 1998. 8. 3 [33] US [31] 09/127,815

[73] 专利权人 巴尔的摩马里兰大学

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 A·法萨诺

[56] 参考文献

WO9733909A2 1997.9.18

WO9411509 1997.9.18

cloning of a gene (zot) encoding a new toxin
produced by *Vibrio cholerae*. Baudry et al. infection
and immunity, Vol. 2 No. 2. 1992

审查员 邹 凯

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 1 页 说明书 45 页 附图 10 页

[54] 发明名称

小带素的肽拮抗剂及其用途

[57] 摘要

本发明公开了 zonulin 的肽拮抗剂及其使用方法。肽拮抗剂与闭锁小带受体结合,但在生理上不调节哺乳动物紧密连接的开放。

- 1.小带素的肽拮抗剂, 由 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列组成。
- 2.肽拮抗剂在制备用于拮抗小带素的药剂中的用途, 其中所述的肽拮抗剂由 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列组成。
- 3.小带素的肽拮抗剂, 由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。
- 4.肽拮抗剂在制备用于拮抗小带素的药剂中的用途, 其中所述的肽拮抗剂由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

小带素的肽拮抗剂及其用途

本申请为分案申请，原申请的申请号是 99810031.5 (PCT/US99/16683)，申请日是 1999 年 7 月 28 日，发明名称为“zonulin 的肽拮抗剂及其使用方法”。

本发明的进行受马里兰州巴尔的摩的马里兰大学支持。在此描述的发明是受国家卫生研究所的基金(NIH DK-48373)资助的。政府具有一定的权利。

发明领域

本发明涉及小带素(zonulin)的肽拮抗剂，以及其使用方法。所说的肽拮抗剂可与闭锁小带受体结合，但在生理上不调节哺乳动物紧密连接的开放。

发明背景

I. 肠紧密连接的功能和调节

紧密连接(“tj”)或闭锁小带(此后称为“ZO”)是吸收和分泌性上皮的标志物之一(Madara, J.Clin. Invest., 83:1089-1094(1989); 和 Madara, Textbook of Secretory Diarrhea Eds. Lebenthal 等, 第 11 章, 125-138 页(1990))。作为顶部和基底侧部分之间的屏障，它们选择性地调节离子和水溶性溶质通过细胞旁通路的被动扩散(Gumbiner, Am.J.Physiol., 253(Cell Physiol.22): C749-C758(1987))。这个屏障维持着由跨细胞途径的通路活性产生的任何梯度(Diamond, Physiologist, 20:10-18(1977))。

跨上皮传导的变化通常引起细胞旁通路通透性的改变，因为肠细胞浆膜的阻力相对较高(Madara, 见前)。ZO 代表着在这种细胞旁通路中的主要屏障，上皮组织的电阻似乎依赖于跨膜蛋白链的数量及其在 ZO 内的复杂性，如用冷冻蚀刻电镜所观察到的那样(Madara 等, J. Cell Biol., 101:2124-2133(1985))。

具有充足证据的是 ZO，曾被认为是稳定的结构，实际上是动态的，很容易地适应各种发育的(Magnuson 等, Dev. Biol., 67:214-224(1978); Revel 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Boil., 40:443-455(1976); 和 Schneeberger 等, J.Cell Sci., 32:307-324(1978))、生理的(Gilula 等, Dev. Biol., 50:142-168(1976); Madara 等, J.Membr. Biol., 100:149-164(1987); Mazariegos 等, J.Cell Biol., 98:1865-1877(1984); 和 Sardet 等, J.Cell

Biol.,80:96-117(1979))、和病理的(Milks 等, J.Cell Biol.,103:2729-2738 (1986); Nash 等, Lab. Invest., 59:531-537(1988); 和 Shasby 等, Am.J.Physiol., 255(Cell Physiol.,24):C781-C788(1988))环境。构成这种适应的调节机制仍不完全清楚。但是,可以明确的是,在 Ca^{2+} 的存在下, ZO 的集合是细胞相互作用的结果,这种相互作用触发了一个复杂的生化过程级联反应,最终导致了一个有组织的 ZO 元件网络的形成和调节,这些元件的组成仅部分地被阐明(Diamond, Physiologist, 20:10-18(1977))。一个跨膜蛋白链的候选物,闭合素(occludin),最近已经被鉴定(Furuse 等, J.Membr. Biol.,87:141-150(1985))。

在构成膜接触基础的细胞浆膜下斑块中已经鉴定了 6 种蛋白,但他们的功能仍有待确定(Diamond,见前)。ZO-1 和 ZO-2 作为一个杂二聚体(Gumbiner 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3460-3464(1991))与一个未确定的 130kD 蛋白质(ZO-3)一起存在于一个对去垢剂稳定的复合体中。大多数免疫电镜研究已经将 ZO-1 精确定位于膜接触点之下(Stevenson 等, Molec. Cell Biochem., 83:129-145(1988))。两个其他的蛋白质, cingulin (Citi 等, Nature(London), 333:272-275(1988))和 7H6 抗原(Zhong 等, J.Cell Biol.,120: 477-483(1993))则位于距膜更远的位置,但尚未被克隆。Rab13, 一个小的 GTP 结合蛋白最近也被定位在连接区(Zahraoui 等, J.Cell Biol., 124:101-115(1994))。其他小的 GTP 结合蛋白已知可调节皮质细胞骨架,也就是, rho 可调节肌动蛋白-膜在局灶接触点的附着(Ridley 等, Cell,70:389-399(1992)), rac 可调节生长因子诱导的膜皱褶(Ridley 等, Cell,70:401-410(1992))。根据对已经较好定性的细胞连接、局灶接触点(Guan 等, Nature,358:690-692(1992))和粘附连接(Tsukita 等, J.Cell Biol., 123:1049-1053(1993))中斑块蛋白已知功能的推理,可以假设与 tj 相关的斑块蛋白在跨越细胞膜的两个方向和在调节与皮质肌动蛋白细胞骨架的连接中,参与信号的转导。

为适应上皮所受到的许多不同的生理和病理刺激, ZO 必须能发生迅速和协调的反应,因此需要一个复杂的调节系统的存在。涉及 ZO 集合和调节的机制的精确特性是目前一个活跃的研究领域。

现在有大量的证据表明,在肌动蛋白细胞骨架和吸收性细胞的 tj 复合体之间存在 tj 结构和功能的联系(Gumbiner 等, 见前; Madara 等,

见前；和 Drenchahn 等, *J.Cell boil.*,107:1037- 1048(1988))。肌动蛋白细胞骨架是由一个微丝的复杂网络组成，微丝的精确几何构型是由大量的肌动蛋白结合蛋白骨架调节的。一个肌动蛋白结合蛋白的磷酸化状态如何调节细胞骨架与细胞浆膜结合的实例是肉豆蔻酸盐的、富含丙氨酸的激酶 C 底物(此后称为“MARCKS”)。MARCKS 是一个特殊的蛋白激酶 C(此后称为“PKC”)底物，伴随于浆膜的胞浆面(Aderem, Elsevier Sci. Pub.(UK),438-443 页(1992))。以其非磷酸化形式, MARCKS 与膜肌动蛋白相互交联。因此，很可能肌动蛋白网络经 MARCKS 与膜相联系是相对刚硬的(Hartwig 等, *Nature*,356: 618-622(1992))。活化的 PKC 使 MARCKS 磷酸化并从膜上释放 (Rosen 等, *J.Exp.Med.*, 172:1211-1215(1990); 和 Thelen 等, *Nature*,351:320-322(1991))。与 MARCKS 相连的肌动蛋白很可能在空间上与膜分离并变得更有弹性。当 MARCKS 去磷酸化时，它重新回到膜上并在此再与肌动蛋白交联(Hartwig 等, 见前; 和 Thelen 等, 见前)。这些数据表明纤维肌动蛋白(F-actin)网络可能通过一个涉及肌动蛋白结合蛋白(MARCKS 是其中之一)的 PKC 依赖的磷酸化过程进行重排。

多种的细胞内调节因子已显示改变 t_j 功能和/或结构。两栖动物胆囊 (Duffey 等, *Nature*,204:451-452(1981))，和金鱼(Bakker 等, *Am.J.Physiol.*,246:G213-G217(1984)) 及比目鱼(Krasney 等, *Fed.Proc.*,42:1100(1983))肠的紧密连接，当细胞内 cAMP 升高时，均显示了对被动离子流的阻力增强。而且，将两栖动物胆囊暴露于钙离子载体似乎可增加 t_j 的阻力，并导致 t_j 结构的改变(Palant 等, *Am.J.Physiol.*, 245:C203-C212(1983))。此外，用佛波醇酯激活 PKC 可增加肾(Ellis 等, *C.Am.J.Physiol.*,263(Renal Fluid Electrolyte Physiol.32):F293-F300 (1992)) 和 肠 (Stenson 等, *C.Am.J.Physiol.*,265(Gastrointest.Liver Physiol.,28):G955-G962(1993))上皮细胞系的细胞旁通透性。

II. 血—脑屏障

血—脑屏障(BBB)是一个极薄的膜屏障，对溶质的自由扩散有高度地阻力，并将血液和脑分隔开。药物或溶质以分子大小通过此膜的移动几乎为零，除非该化合物具有包含在 BBB 膜中的几个特异类酶样转

运机制之一的通路。BBB 由多种细胞组成,而不是单一的上皮细胞层。在组成 BBB 的四种不同的细胞类型(内皮细胞、外膜细胞、星形胶质细胞和神经细胞)中,毛细血管的内皮细胞成分代表了 BBB 通透性的限制因素。在脊椎动物脑和脊髓中的毛细血管内皮具有 t_j , 关闭了内皮细胞之间的孔, 该孔正常存在于外周组织的微血管内皮细胞屏障中。最后, 内皮的 t_j 在 BBB 有限的通透性中起作用。

III. 闭锁小带毒素

大多数通过删除编码霍乱毒素(CT)的 *ctxA* 基因而构建的霍乱弧菌疫苗候选物, 能够引起高度的抗体反应, 但超过一半的疫苗接受者仍然发生轻度的腹泻(Levine 等, *Infect.Immun.*, 56(1):161-167 (1988))。根据在缺乏 CT 的条件下所引起的腹泻程度, 可以假设霍乱弧菌可以产生其他的产肠毒的因子, 这些因子仍然存在于去除了 *ctxA* 序列的菌株中(Levine 等, 见前)。结果, 发现了由霍乱弧菌产生的第二个毒素, 闭锁小带毒素(此后称为“ZOT”), 它可以解释残余的腹泻现象(Fasano 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.,USA.*, 8:5242-5246(1991))。zot 基因直接位于 *ctx* 基因旁边。在霍乱弧菌菌株中 zot 基因和 *ctx* 基因共同出现的高百分比(Johnson 等, *J.Clin.Microb.*, 31/3:732-733(1993); 和 Karasawa 等, *FEBS Microbiology Letters*, 106:143-146(1993))表明 ZOT 在导致霍乱典型的急性脱水性腹泻中可能有协同作用。最近, zot 基因也已在其他肠病原体中得到鉴定(Tschape, 2nd 伤寒热和其他沙门氏菌病亚洲-太平洋研论会, 47(摘要)(1994))。

以前曾发现, 当在兔回肠粘膜上进行试验时, ZOT 通过调节细胞间 t_j 的结构增加肠通透性(Fasano 等, 见前述)。发现作为细胞旁通路调节的结果, 肠粘膜变得更易通透。还发现 ZOT 并不影响 Na^+ -葡萄糖偶联的活性转运, 是非细胞毒性的, 且不能完全消除跨上皮的阻力(Fasano 等, 见前述)。

最近, 已发现 ZOT 能可逆性地开放肠粘膜的 t_j , 因此当用作口服药处方以肠道药物输送, 与治疗药物共同使用时, ZOT 能够影响治疗药物的肠道输送(WO 96/37196; 1995 年 5 月 24 日提交的美国专利申请序列号第 08/443,864 申请; 和美国专利 5,665,389; 和 Fasano 等,

J.Clin.Invest.,99:1158-1164(1997); 其中每一个均在此整体引用作为参考)。也已发现 ZOT 能够可逆性地开放鼻粘膜中的 tj, 因此当 ZOT 与一个治疗药物共同使用时, 能够增强治疗药物的鼻粘膜吸收(1997 年 1 月 9 日提交的美国专利申请序列号第 08/781,057 申请,; 在此整体引用作为参考)。

在此整体引用作为参考的、1997 年 2 月 20 日提交的美国专利申请 08/803,364 中, 一个 ZOT 受体从一个肠细胞系, 即 CaCo2 细胞中被鉴定并纯化。进一步, 在此整体引用作为参考的、1998 年 2 月 17 日提交的美国专利申请 09/024,198 中, ZOT 受体从人肠、心和脑组织中已被得到鉴定和纯化。ZOT 受体代表了涉及肠和鼻通透性调节的细胞旁通路的第一个步骤。

IV.Zonulin

在未授权的于 1997 年 5 月 21 日提交的美国专利申请 098/859,931 中, 在此整体引用作为参考, 免疫学和功能上与 ZOT 相关的哺乳动物蛋白, 作为哺乳动物紧密连接的生理调节物, 已被鉴定和纯化。这些哺乳动物蛋白, 称为“zonulin”, 可用于增强治疗药物通过肠和鼻粘膜 tj、以及通过血脑屏障 tj 的吸收。

在本发明中, zonulin 的肽拮抗剂首次被鉴定。所述的肽拮抗剂与 ZOT 受体结合, 但并不在生理上调节哺乳动物紧密连接的开放。肽拮抗剂竞争性地抑制 ZOT 和 zonulin 与 ZOT 受体的结合, 因此抑制 ZOT 和 zonulin 生理性调节哺乳动物紧密连接开放的能力。

发明概述

本发明的一个目的是鉴定 zonulin 的肽拮抗剂。

本发明的另一个目的是合成和纯化所述的肽拮抗剂。

本发明的另一个目的是应用所述的肽拮抗剂作为在胃肠道炎症治疗中的抗炎剂。

本发明的另一个目的是应用所述的肽拮抗剂抑制血脑屏障的破坏。

本发明的这些和那些目的, 将很明显地表现在下面提供的本发明详细描述中, 在一个实施方案中是通过 zonulin 的肽拮抗剂实现的, 该

zonulin 的肽拮抗剂包括选自如下序列的氨基酸序列: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, 和 SEQ ID NO:35, 其中所述的肽拮抗剂与一个 ZOT 受体结合, 但并不在生理上调节哺乳动物紧密连接的开放。

图表的简要描述

图 1 显示了从兔肠中纯化的 zonulin(■)与各种阴性对照相比(从 Q-琼脂糖柱中得到的片断 2(◇); 片断 3(●); 片断 4(▲); 和片断 5(□)), 对 CaCo2 单层细胞的组织阻力(Rt)的作用。

图 2 显示了从兔肠中纯化的 zonulin(■)与阴性对照(□)相比, 对置于 Ussing 室中的兔回肠的组织阻力(Rt)的作用。

图 3 显示了从兔肠中纯化的 zonulin(■)与阴性对照(zonulin+抗 ZOT 抗体(□); zonulin+抗 tau 抗体(△); 和 tau(▲))相比, 对置于 Ussing 室中的兔回肠的组织阻力(Rt) 的作用。

图 4A 和 4B 显示了从人脑(▲)、人肠(●)、或人心脏(○)中纯化的 zonulin 与阴性对照(□)相比, 对置于 Ussing 室中的恒河猴空肠(图 4A)和恒河猴回肠(图 4B)的组织阻力(Rt)的作用。

图 5A 和图 5B 显示了从人心脏(▲)或人脑(□)中纯化的 zonulin 与阴性对照(■)相比, 对置于 Ussing 室中的兔空肠(图 5A)和兔回肠(图 5B)的组织阻力(Rt)的作用。

图 6 显示了从兔和人不同组织中纯化的 zonulin N 末端序列的比较。

图 7 显示了从人不同组织中纯化的 zonulin 和 IgM 重链的 N 末端序列与 ZOT 生物活性片断 (氨基酸 288-399) 的 N 末端序列的比较。

图 8 显示了 ZOT、zonulin_i、zonulin_h, 单独(实心条)、或与肽拮抗剂 FZI/0(空白条)或 FZI/1(阴影条)合用, 与阴性对照相比, 对置于 Ussing 室中的兔回肠的组织阻力(Rt)的作用。N 等于 3-5; *为 P<0.01。

发明的详细描述

如上所述, 在一个实施方案中, 上述的本发明的目的是通过 zonulin 的肽拮抗剂实现的, 该肽拮抗剂包括选自如下序列的氨基酸序列: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, 和 SEQ ID NO:35, 其中所述的肽拮抗剂与 ZOT 受体结合, 但并不在生理上调节哺乳动物紧密连接的开放。

肽拮抗剂的大小在本发明中不是关键的。一般来说, 肽拮抗剂的大小应在 8 到 110 个氨基酸的范围内, 优选地从 8 到 40 个氨基酸, 更优选地为 8 个氨基酸。

肽拮抗剂可采用已知的技术化学合成和纯化, 如在 $\leq$ 肽和蛋白质的高效液相色谱: 分离分析和构象 $\geq$, Mant 等编辑, C.R.C.印刷(1991)中所描述的, 和一个肽合成仪, 如 Symphony (Protein Technologies, Inc.); 或通过重组 DNA 技术, 即将编码肽的核苷酸序列插入到合适的表达载体中, 如一个大肠杆菌或酵母表达载体, 在各自的宿主细胞中表达, 并采用已知的技术从中纯化。

肽拮抗剂可被用作抗炎剂以治疗引起肠道通透性增加的胃肠道炎症。因此, 本发明的肽拮抗剂可用于治疗, 如导致蛋白丢失性肠病的肠道疾病。蛋白丢失性肠病可由以下原因引起:

感染, 如 C.顽固性感染、小肠结肠炎、志贺氏菌病、病毒性胃肠炎、寄生虫感染、细菌过度增生、Whipple's 病;

具有粘膜糜烂或溃疡的疾病, 如胃炎、胃癌、, 胶原性结肠炎、炎性肠病;

以淋巴管阻塞为特征的疾病, 如, 先天性肠淋巴管扩张、伯克氏淋巴瘤、肠系膜结核, 和用 Fontan 氏手术矫正先天性心脏病术后。

不发生溃疡的粘膜疾病, 如, Ménétrier's 病、乳糜泻、嗜酸粒细胞性胃肠炎; 和

免疫疾病, 如全身性红斑狼疮或食物过敏, 主要是对牛奶过敏(也

见 $\leq$ 小儿胃肠道疾病病理生理学诊断措施 $\geq$ 中的表 40-2, Wyllie 等编辑, Saunder Co.(1993), 536-543 页; 在此整体引用作为参考)。

因此, 在其他的实施方案中, 本发明涉及一个治疗胃肠道炎症的方法, 该法包括给予需要此种治疗的患者有药效剂量的 zonulin 的肽拮抗剂, 其中所述的肽拮抗剂包括选自如下序列的氨基酸序列: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24, 其中所述的肽拮抗剂与所述患者肠内的 ZOT 受体结合, 但并不在生理上调节所述肠道中紧密连接的开放。

为此, 肽拮抗剂可以作为口服药剂组合物为小肠输送给药。这种为小肠输送的口服药剂组合物在本领域中为人熟知, 一般包括胃不吸收的片剂或胶囊(Remington's 药物科学, 16th 版, Oso 1 编辑, Mack Publishing Co., 89 章(1980); Digenis 等, J.Pharm.,Sci.,83:915-921(1994); Vantini 等, Clinica Terapeutica,145:445-451(1993); Yoshitomi 等, Chem.Pharm.Bull.,40:1902-1905 (1992); Thoma 等, Pharmazie, 46:331-336(1991); Morishita 等, 药物设计和输送, 7:309-319 (1991); 和 Lin 等, Pharmaceutical Res.,8:919-924(1991); 其中每一篇均在此整体引用作为参考)。

片剂通过添加, 如醋酸纤维素邻苯二甲酸酯或醋酸纤维素对苯二甲酸酯, 以制成胃不吸收的制剂。

胶囊是固体的药剂形式, 其中肽拮抗剂包被在一个硬的或软的, 可溶性容器或明胶外壳中。在制备胶囊中使用的明胶是通过水解成胶物质获得的。有两种类型的明胶。A 型, 来源于经酸处理的猪皮, B 型, 从碱处理的骨和动物皮肤中获得。硬明胶胶囊的使用允许根据每个患者的最佳考虑选择单一肽拮抗剂的处方或以准确的剂量水平进行合用。硬明胶胶囊由两个部分组成, 一部分套在另一部分上, 因此完全地包绕肽拮抗剂。在这些胶囊的较长端填入肽拮抗剂或含有肽拮抗剂的胃不吸收小珠, 然后盖上盖。硬明胶胶囊主要由明胶、FD&C 着色

剂，有时需要遮光剂如二氧化钛制成。USP 允许用于此目的的明胶中含有 0.15%(w/v)的二氧化硫以在生产过程中防止分解。

在本发明的内容中，为小肠输送的口服药剂也包括液体组合物，其中含有水性缓冲剂以防止肽拮抗剂被胃中的胃液明显地灭活，从而使肽拮抗剂以活性的形式到达小肠。可在本发明中使用的这种水性缓冲剂的实例包括碳酸氢盐缓冲剂(pH5.5 到 8.7，最好是大约 pH7.4)。

当口服药剂是一个液体组合物时，最好在服药前配制这种药剂以减少稳定性问题。在这种情况下，液体组分可通过在水性缓冲剂中溶解冻干的肽拮抗剂进行制备。

肽拮抗剂可被用于抑制血脑屏障的破坏。因此，本发明的肽拮抗剂可用于治疗，如伴有血脑屏障破坏的疾病状态。这些疾病状态的实例包括渗透性损伤，如脑缺血、中风或脑水肿；高血压；二氧化碳；痉挛发作；化学毒素；尿毒症(肾功能不全)；脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎，如感染性(病毒(SRV、HIV 等)、或细菌性(结核、溶血性流行性感冒、脑膜炎球菌等)、或过敏性；肿瘤；创伤性脑损伤；放射性脑损伤；未成熟和核黄疸；脱髓鞘疾病，如多发性硬化症或 Guillian-Barre 综合征。

因此，在另一个实施方案中，本发明涉及伴有血脑屏障破坏的疾病状态的治疗方法，包括给予需要这种治疗的患者药效学上有效剂量的 zonulin 的肽拮抗剂，其中所述的肽拮抗剂是由氨基酸序列 SEQ ID NO:35 组成，其中所述的肽拮抗剂与所述患者脑中的 ZOT 受体结合，但并不在生理上调节所述脑中紧密连接的开放。

为此，肽拮抗剂可以静脉内药剂配方给药以输送至脑。这种配方在本领域中为人熟知，通常包括一种生理性稀释剂，如蒸馏水、或 0.9%(w/v)氯化钠。

所应用的肽拮抗剂的药效学有效剂量在本发明中并不是严格的，并将根据要治疗的疾病或状态、以及要接受治疗的患者的年龄、体重和性别而改变。一般来说，为抑制胃肠道炎症或抑制血脑屏障的破坏，如抑制 zonulin 的生物学活性，在本发明中使用的肽拮抗剂的剂量在大约 $7.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 到 $7.5 \times 10^{-3} \text{M}$ 范围内，优选地大约 $7.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 到 $7.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 。为在如肠或血液中达到这样的终浓度，在本发明的单一口服药剂中肽拮抗剂的量一般为大约 $1.0 \mu\text{g}$ 到 $1000 \mu\text{g}$ ，最好是 $1.0 \mu\text{g}$ 到 100

μg。

肽拮抗剂也可采用本领域熟知的技术(Abrams, Methods Enzymol., 121:107-119(1986)), 用作免疫原以产生可与 zonulin 特异结合的多克隆或单克隆抗体。这些抗体反过来可被用于在机体组织或液体中、或在 zonulin 的亲和一纯化中检测 zonulin, 或选择性的, 用以与 zonulin 结合, 因而抑制 zonulin 活性, 如, 抑制胃肠道炎症或抑制血脑屏障的破坏。

下面提供的实例仅仅是为了举例说明的目的, 并不限制本发明的范围。

实例 1

ZOT 的纯化

采用分子量限制为 10kDa 的薄层流式滤器, 将培养以质粒 pZ14 转化的 V.霍乱菌株 CVD110(Michalski 等, Infect.Immu., G1:4462-4468 (1993))后获得的 5000ml 上清部分, 浓缩 1000 倍。含有霍乱弧菌 zot 基因的 pZ14 的构建在 inter alia, WO96/37196 中详细描述。得到的上清然后经过 8.0%(w/v)SDS-PAGE。通过对 SDS-PAGE 胶进行考马思亮兰染色检测蛋白带。当与采用相同方式处理的、转化了质粒 pTTQ181(Amersham, Arlington Heights, IL)的菌株 CVD110 中获得的上清相比时, 没有检测到与 ZOT 相对应的蛋白带。因此, 尽管在 pZ14 中 zot 基因放在高度可诱导性和强的 tac 启动子之后, 1000 倍浓缩的 pZ14 上清中的蛋白的水平仍然在采用考马思亮兰染色 SDS-PAGE 胶上检测不到。

A. MBP-ZOT

为增加 ZOT 产生的量, zot 基因与麦芽糖结合蛋白(此后称为“MBP”)基因在构架中融合以产生一个 MBP-ZOT 融合蛋白。

MBP 载体 pMAL-c2(Biolab)通过将 ZOT 基因融合到大肠杆菌的 malE 基因而被用于表达和纯化 ZOT。这种结构采用强的、诱导型 tac 启动子, 和 malE 翻译初始信号以得到克隆 zot 基因的高水平表达。载体 pMAL-c2 完全去掉了 malE 信号序列, 此序列可导致融合蛋白在胞浆中的表达。MBP 的亲合色谱纯化被用来促进融合蛋白的分离(Biolab)。

更为特殊的是,载体 pMAL-c2 用 EcoRI(在 malE 基因的 3'末端切割)线性化,插入 kelnow 片断,并用 XbaI(在 pMAL-c2 多接头上有单一位点)消化。编码 ZOT 的 orf 从质粒 pBB241 亚克隆(Baudry 等, Infect. Immun.,60:428-434(1992))。质粒 pBB241 用 BssHII 消化,插入 Kelnow 片断,用 XbaI 消化。然后平端 XbaI 片断亚克隆进 pMAL-c2 以产生质粒 pLC10-c。由于插入体和载体均有平端和粘端,正确的方向是通过 malE3'末端与插入体的 5'末端相融合获得的。然后 pLC10-c 电导入大肠杆菌 DH5 α 菌株中。在 pBB241 中, BssHII 限制性位点位于 zot orf 中。因此, ZOT 的 1-8 氨基酸在 MBP-ZOT 融合蛋白中是缺失的。

为了纯化 MBP-ZOT 融合蛋白,将含 pLC10-c 的单一克隆接种于含有 0.2%(w/v)葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 10ml Luria Bertani 肉汤中,并在 37°C 振荡孵育过夜。培养物以 1: 100 稀释于 1.0ml 同样的新鲜培养基中,在 37°C 下振荡生长,直至大约 1.0×10^8 细胞/ml。然后加入 0.2mM IPTG 以诱导 MBP-ZOT 表达,培养物在 37°C 下再孵育 3 小时。然后将细菌沉淀,并重新悬浮于 20ml 冰冷的“柱缓冲液”中,该缓冲液含 20mM Tris-HCL、0.2M NaCl、1.0mM EDTA、10mM 2-ME、1.0mM NaN₃。细菌悬液通过拍(french)压处理和 4°C 下以 $13,000 \times g$ 离心 30min 进行溶解。收集上清,用柱缓冲液 1: 5 稀释,并装入以柱缓冲液预平衡的 1×10 直链淀粉树脂(Biolabs, MBP-融合纯化系统)柱中。用 5 倍体积的柱缓冲液冲洗柱后,通过在柱缓冲液中加入 10ml 的 10mM 麦芽糖洗脱 MBP-ZOT 融合蛋白。一般从 1.0ml 培养物中获得的产量是 2-3mg 蛋白。

纯化的 MBP-ZOT 融合蛋白的 MBP 融合部分然后通过每 20 μ g MBP-ZOT 应用 1.0 μ g Xa 因子蛋白酶(Biolabs)而切除。Xa 因子蛋白酶正好在 ZOT 的氨基末端前进行切除。这样获得的 ZOT 蛋白在 8.0%(w/v) SDS-PAGE 胶上电泳,再用电分离室(Schleicher & Schuell, Keene,NH)将其从胶上电洗脱。

当在 Ussing 室中检测时,所得到的纯化 ZOT 剂量依赖性地引起 Rt 下降,其 ED₅₀ 为 7.5×10^{-8} M。

B. 6xHis-ZOT

zot 基因采用 pBB241 质粒(Baudry 等,见前)DNA 作为模板,用 Deep

Vent 聚合酶(New England Biolabs)通过 PCR 进行扩增。所用的顺向和反向引物分别为：5'-CGGGATCCCGTATGAGTATCTTT-3' (SEQ ID NO:39)；和 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (SEQ ID NO:40)。这些寡核苷酸的 5'尾端分别含一个 BamHI 和一个 HindIII 限制性位点。得到的扩增子(1.2kb)用 8.0%(w/v)琼脂糖凝胶电泳进行分析，并采用一个 Xtreme 旋转柱(Pierce)从盐和游离核苷酸中纯化。上面提到的两种限制性酶然后用来消化纯化的扩增子，得到的消化的扩增子然后被插入到载体 pQE30(Quiagen)中，该载体之前已经用 BamHI 和 HindIII 消化，这样获得质粒 pSU113。PQE30 是一个表达载体，可使有 6 聚-组氨酸标记(6xHis)的重组蛋白高水平的表达。因此质粒 pSU113 的表达产物是一个 6xHis-ZOT 融合蛋白。然后 pSU113 转化进大肠杆菌 DH5 α 中。

为了纯化 6xHis-ZOT 融合蛋白，得到的转化大肠杆菌在 150ml 含有 2.0%(w/v) 葡萄糖、25 μ g/ml 卡那霉素和 200 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria Bertani 肉汤中 37°C 生长过夜，直至 A_{600} 为大约 1.10。下一步，75ml 过夜的培养物加入到 1000ml 含有 2.0%(w/v) 葡萄糖、25 μ g/ml 卡那霉素和 200 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria Bertani 肉汤中，在 37°C 孵育大约 3 小时，同时剧烈震荡，直至 A_{600} 为大约 0.7-0.9。然后，加入 IPTG 至终浓度为 2.0mM，并继续在 37°C 生长 5 小时。接着，通过 4000 $\times$ g 离心 20 分钟收获细胞，重新悬浮在 5.0ml/g 湿重的缓冲液 A 中，缓冲液 A 含 6.0M GuHCl、0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl(pH8.0)，并在室温搅拌 1 小时。然后，混合物在 4°C 以 10,000 $\times$ g 离心 30 分钟，在所得到的上清中加入 4.0-5.0ml/g 湿重的 50% SUPERFLOW 树脂浆(QIAGEN)，并在室温进行搅拌 1 小时。得到的树脂加入到 1.6 $\times$ 8.0 柱中，然后顺序地以缓冲液 A、缓冲液 B 和缓冲液 C 冲洗柱子，缓冲液 B 含 8.0M 尿素、0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl(pH8.0)，缓冲液 C 含 8.0M 尿素、0.1M 磷酸钠和 0.01M Tris-HCl (pH6.3)。每次冲洗均至流经液的 A_{600} 小于 0.01 时止。用含有 250mM 咪唑的 20ml 缓冲液 C 将 6xHis-ZOT 融合蛋白从柱中洗脱。然后，含有 6xHis-ZOT 融合蛋白的馏分采用 Davis, Ann.N.Y.Acad.Sci., 121:404(1964)所描述的方法用 SDS-PAGE 进行检查，并用考马思亮兰对胶进行染色。含有 6xHis-ZOT

融合蛋白的馏分经 8.0M 尿素透析，集合，再用 PBS 稀释 100 倍。随后，加入 50%SUPERFLOW 树脂浆 4.0ml，在室温下进行搅拌 2 小时，得到的树脂装入 1.6×8.0 柱中，然后用 50ml PBS 冲洗柱子。用含有 250mM 咪唑的 10ml PBS 从柱中洗脱出 6xHis-ZOT 融合蛋白。得到的洗脱物经 PBS 透析，并以上述的方法用 SDS-PAGE 检查 6xHis-ZOT 融合蛋白。

实例 2

亲和性一纯化抗 ZOT 抗体的生产

为获得特异的抗血清，表达和纯化了一个奇特的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)-ZOT 蛋白。

更为特殊的是，以质粒 pBB241(Baudry 等，见前)作为模板 DNA，寡核苷酸引物被用来通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 zot orf。顺式引物(TCATCACGGC GCGCCAGG, SEQ ID NO:25)对应着 zot orf 的 15-32 核苷酸，反向引物(GGAGGTCTAG AATCTGCCCCG AT, SEQ ID NO:26)对应着 ctxA orf 的 5'末端。因此，ZOT 的 1-5 氨基酸在得到的融合蛋白中是缺失的。扩增产物被插入到位于 pGEX-2T(Pharmacia, Milwaukee, WI) 中 GST 基因末端的多接头(SmaI 位点)内。PGEX-2T 是一个融合蛋白表达载体，可将一个克隆基因表达为带有日本血吸虫 GST 的融合蛋白。融合基因在 tac 启动子的控制之下。在 IPTG 的诱导下，发生去阻遏并表达 GST 融合蛋白。

得到的重组质粒，称为 pLC11，被电导入大肠杆菌 DH5 α 中。为了纯化 GST-ZOT 融合蛋白，在 10ml 含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria Bertani 肉汤中接种一个含有 pLC11 的单一克隆，37℃振荡孵育，过夜。培养物以 1: 100 稀释于 1.0ml 同样的新鲜培养基中，在 37℃下振荡生长，直至 1.0×10^8 细胞/ml。然后加入 0.2mM IPTG 以诱导 GST-ZOT 表达，培养物继续在 37℃孵育 3 小时。然后将细菌沉淀，重新悬浮于 20ml 冰冷的 PBS(pH7.4)中，并用拍压的方法溶解。在这些条件下 GST-ZOT 融合蛋白是不溶的，于是与细菌沉淀部分一起沉积。因此，沉淀重新悬浮在 Laemli 溶解缓冲液中，该缓冲液含 0.00625M Tris-HCl(pH6.8)、0.2M 2-ME、2.0%(w/v) SDS、0.025%(w/v)溴酚兰和 10%(v/v)甘油，并

在 8.0%(w/v) PAGE-SDS 胶上进行电泳,用考马思亮兰染色。采用电分离室(Schleicher & Schuell, Keene, NH)将对应融合蛋白的大约 70kDa 的带(26kDa 的 GST+44kDa 的 ZOT)从胶中电洗脱出来。

所得到的洗脱蛋白 10 μ g (10-20 μ g)与等量的福氏完全佐剂混合,注入兔体内。4 周和 8 周后与福氏不完全佐剂一起给予两次激发剂量。1 月后给兔放血。

为确定特异抗体的产生, 10^{-10} M ZOT 与两个融合蛋白 MBP-ZOT 和 GST-ZOT 一起转移到尼龙膜上,并与 1: 5000 稀释的兔抗血清一起在 4°C 孵育过夜,同时中度振荡。然后用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS(以后称为“PBS-T”)冲洗滤膜 15 分钟 4 次,并与 1: 30,000 的结合了辣根过氧化物酶的羊抗兔 IgG 稀释液室温孵育 2 小时。用含有 0.1%(v/v)吐温的 PBS 再次冲洗滤膜 15 分钟 4 次,采用增强化学发光法(Amersham)检测免疫反应带。

在免疫印迹上,发现兔抗血清识别 ZOT,还有 MBP-ZOT 和 GST-ZOT 融合蛋白,但不识别 MBP 阴性对照。

此外,为了证实合适抗 ZOT 抗体的产生,在 Ussing 室中进行了中和实验。当与 pZ14 上清在 37°C 预孵育 60 分钟时, ZOT 特异抗血清(1:100 稀释)能够完全抵销放置在 Ussing 室中的兔回肠上 ZOT 诱导的 Rt 下降。

其次,采用 MBP-ZOT 亲和柱亲和纯化了抗 ZOT 抗体。更特殊的是, MBP-ZOT 亲和柱是通过将如上述实例 1 描述的方法获得的 1.0mg 纯化 MBP-ZOT 固定到一个预先活化的胶(Aminolink, Pierce)上,室温过夜而制备的。该柱用 PBS 冲洗,然后载入 2.0ml 抗 ZOT 兔抗血清。室温孵育 90 分钟后,柱用 14ml PBS 冲洗,用 4.0ml 含有 50mM 甘氨酸(pH 2.5)、150mM NaCl 和 0.1%(v/v)曲拉通 X-100 的溶液将特异性抗 ZOT 抗体从柱中洗脱出来。1.0ml 洗脱馏分的 pH 立即用 1.0N NaOH 进行中和。

实例 3

Zonulin 的纯化

基于 1997 年 2 月 20 日提交的美国专利申请 08/803,364 的观察, ZOT 与特异的上皮表面受体相互作用,随后激活一个复杂的细胞内级联反

应以调节 t_j 通透性, 在本发明中可以假定 ZOT 可以模仿哺乳动物 t_j 的生理性调节剂的效应。在 1997 年 5 月 21 日提交的美国专利申请 08/859,931 中推测, ZOT 和其生理性类似物(zonulin)在功能上和免疫学上可能是相关的。因此, 如这里所描述的, 亲和纯化的抗 ZOT 抗体和 Ussing 室实验可联合用来探索在不同的兔和人组织中的 zonulin。

A. 兔组织

最初, zonulin 是从兔肠纯化的。组织在 PBS 中匀浆破碎。得到的细胞标本然后以 40,000rpm 离心 30 分钟, 收集上清并冻干。得到的冻干产物然后在 PBS(10:1(v/v))中重新溶解, 通过一个 0.45mm 的滤膜过滤, 装入一个 Sephadex G-50 色谱柱上, 并用 PBS 洗脱。然后从柱中获得的 2.0ml 馏分采用如上实例 2 中所述获得的亲和纯化的抗 ZOT 抗体进行标准的 Western 免疫印迹。

阳性馏分, 也就是那些与抗 ZOT 抗体结合的, 合在一起, 冻干, 在(1:1(v/v))PBS 中重新溶解, 并通过一个 Q-Sepharose 柱进行盐梯度色谱层析。盐梯度为 50mM Tris 缓冲液(pH 8.0)中的 0-100%(w/v)NaCl。收集 5 个 20ml 馏分, 采用如上实例 2 中所述获得的亲和纯化的抗 ZOT 抗体进行标准的 Western 免疫印迹。馏分 1(20%(w/v)NaCl)是 Western 免疫印迹试验中唯一的阳性馏分。

从 Q-Sepharose 柱中获得的馏分然后在 CaCo2 单层和在 Ussing 室中的兔小肠上被检测其组织阻力效应。

更特殊的是, CaCo2 细胞生长于细胞培养瓶(Falcon)内, 在 95% O_2 /5% CO_2 的湿化气体中、在 37°C 的 DMEM 培养基里生长, 该培养基中含有 10%(v/v)胎牛血清、40 μ g/l 青霉素和 90 μ g/l 链霉素。每 5 天, 当细胞达到 70-80%汇合时, 经胰蛋白酶处理后, 细胞以表面比例 1:5 进行传代。在本研究中使用的细胞代数为 15 到 30。

CaCo2 单层在组织培养处理的聚碳酸酯滤膜上生长至汇合(在以 1:2.5 的表面比例接种后 12-14 天), 该滤膜与一个聚苯乙烯环(6.4mm 直径, Transwell Costar)紧密贴附。将膜紧密地恰当插入, 使改良 Ussing 室的浆膜室和粘膜室得以分开, 实验按照 Fasano 等, Proc. Natl. Acad.Sci.,USA,8:5242-5246(1991)描述的方法在 Ussing 室中的兔肠上进行。实验结果在图 1 中显示。

如图 1 中显示, 含有 Zonulin 的馏分与 Zonulin 阴性馏分相比, 引起 CaCo2 单层阻力的显著下降。

下一步, Ussing 室实验采用来自 2-3kg 的成年雄性新西兰大白兔的回肠进行, 该兔采用颈部脱臼处死。取出一段 20cm 的回肠片断, 洗净肠内容物, 沿肠系膜边缘剖开, 剥除肌肉和浆膜层。8 个这样制备的粘膜片然后放置在有机玻璃的 Ussing 室中(1.12cm² 开放), 与一个电压钳装置(EVC 4000 WPI, Sarasota, FL)相连, 浸于新鲜配制的林格氏溶液中, 该液含 53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mM 甘露醇、1.69mM Na₂HPO₄、0.3mM NaH₂PO₄、1.25mM CaCl₂、1.1mM MgCl₂ 和 25mM NaHCO₃。浸液用一个与恒温循环泵相连的水套蓄水池维持温度在 37 °C, 并充以 95% O₂/5% CO₂。

100 μl 从兔肠中纯化的 zonulin 加入到粘膜侧。每 10 分钟测量电压差(PD), 采用 Fasano 等前面的描述的方法计算短路电流(Isc)和组织阻力(Rt)。因为组织不同, 数据以 ΔRt (在时间 X 的 Rt)-(在时间 0 的 Rt)计算。结果在图 2 中显示。

如图 2 所示, 含有 zonulin 的馏分与 zonulin 阴性馏分相比, 导致兔小肠阻力显著降低。一旦将 zonulin 从蓄水池中去除, 这种效应完全逆转。

Zonulin 阳性的馏分也进行了 8.0%(w/v) SDS-PAGE 电泳, 随后采用抗 ZOT 抗体进行 Western 免疫印迹。然后, 经 SDS-PAGE 分离的蛋白带用 CAPS 缓冲液转移到 PVDF 滤膜(Millipore)上, 该缓冲液含 100ml (3-[环己胺]-1-丙烷磺酸) 10x、100ml 甲醇和 800ml 蒸馏水。通过 Western 免疫印迹检测到的排列于单一条带的蛋白具有明显的大约为 47kDa 的分子量。此条带从 PVDF 滤膜上切下, 根据 Hunkapiller 在: 蛋白质微量定性方法, Shibley 编辑, 11-12 章, Humana Press, 第 315-334 页(1985)中所述的方法, 采用 Perkin-Elmer 应用生物系统仪, 型号 494 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus Model 494), 进行 N-末端序列分析。从兔肠中纯化的 zonulin N-末端序列在 SEQ ID NO:27 中显示。

兔 zonulin N-末端序列通过 BLAST 搜索分析与其他蛋白序列相比较。这种分析的结果显示兔 zonulin 的 N-末端序列与人类 tau 蛋白的

N-末端序列 85%等同, 100%相似。

其结果, 为了确定是否兔 zonulin 和 tau 是同样物质, 在 Ussing 室中进行了交叉中和实验。更特殊的是, 10 μ l/ml 兔 zonulin 加入到未处理或与抗 tau 抗体(1:10 稀释)(Sigma)在 37°C 预孵育 60 分钟的兔回肠的粘膜面。与抗 ZOT 抗体(1:10 稀释) (实例 2) 预孵育的 10 μ l/ml 兔 zonulin; 和 0.4 μ g/ml 纯化的 tau(Sigma)均被用作对照。结果在图 3 显示。

如图 3 中显示, 兔 zonulin 引起典型的组织阻力下降, 而在将蛋白从 Ussing 室中去除时轻易地逆转。这种活性被与抗 ZOT 抗体预处理完全中和, 但不被与抗 tau 抗体预处理而中和。另一方面, 组织暴露于 tau 蛋白的组织阻力无明显效应出现。

兔 zonulin 也在兔的其他不同组织中检测到, 即, 兔心脏、脑、肌肉、胃、脾、肺、肾, 和兔肠的不同部分, 即, 远端空肠、近端空肠、回肠、盲肠和结肠。也就是说, 当这些兔组织以与上述兔肠同样的方式进行处理, 并在进行 8.0%(w/v) SDS-PAGE 电泳后, 采用如上面实例 2 所述获得的亲和纯化的抗 ZOT 抗体进行 Western 免疫印迹时, 在所有被试验的组织中检测到大小在近似 47kDa 的一个单一条带。

B. 人组织

zonulin 也从几种人的组织中纯化, 包括肠、心脏和脑。胎儿和成人组织均被使用。组织通过在 PBS 中匀浆破坏。然后得到的细胞标本在 40,000rpm 下离心 30 分钟, 收集上清并冻干。得到的冻干产物然后在 PBS(10:1(v/v))中重新溶解, 通过一个 0.45mm 的滤膜进行过滤, 装入一个 Sephadex G-50 色谱柱上, 并用 PBS 洗脱。然后从柱中获得的 2.0ml 馏分采用如上实例 2 中所述获得的亲和纯化的抗 ZOT 抗体进行标准的 Western 免疫印迹。

阳性馏分, 也就是那些与抗 ZOT 抗体结合的, 合在一起, 冻干, 在(1:1(v/v))PBS 中重新溶解, 并通过一个 Q-Sepharose 柱进行盐梯度色谱层析。盐梯度为 50mM Tris 缓冲液(pH 7.4)中的 0-100%(w/v)NaCl。收集 5 个 20ml 馏分, 采用如上实例 2 中所述获得的亲和纯化的抗 ZOT 抗体进行标准的 Western 免疫印迹。馏分 1(20%(w/v)NaCl)在 Western 免疫印迹实验中显示为 47kDa 大小的单一条带。馏分 2(40%(w/v) NaCl)

在 Western 免疫印迹实验中显示有两个 35kDa 和 15kDa 大小的附加条带。馏分 3(60%(w/v) NaCl)和馏分 4(80%(w/v) NaCl)仅显示为 35kDa 和 15kDa 条带。这些结果表明 zonulin 可被可能存在于所用的人组织中的蛋白酶降解, 降解的产物同完整蛋白相比, 以较高的盐浓度从柱中洗脱。

然后, 从 Q-Sepharose 柱中获得的馏分 1(来自人心脏、肠和脑组织)和馏分 4(来自心脏组织), 在 Ussing 室中的兔肠和恒河猴肠上检测了它们的组织阻力效应。

Ussing 室实验采用不同的肠道进行, 包括来自 2-3kg 成年雄性新西兰大白兔或 5-6kg 成年雄性恒河猴的空肠、回肠或结肠。在动物处死后, 取出肠的不同部分, 包括空肠、回肠和结肠, 洗净肠内容物, 沿肠系膜边缘剖开, 剥除肌肉和浆膜层。8 个这样制备的粘膜片(3 个空肠、3 个回肠和 2 个结肠)然后放置在有机玻璃的 Ussing 室中(1.12cm² 开放), 与一个电压钳装置(EVC 4000 WPI, Sarasota, FL)相连, 浸于新鲜配制的林格氏溶液中, 该液含 53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mM 甘露醇、1.69mM Na₂HPO₄、0.3mM NaH₂PO₄、1.25mM CaCl₂、1.1mM MgCl₂ 和 25mM NaHCO₃。浸液用一个与恒温循环泵相连的水套蓄水池维持温度在 37°C, 并充以 95% O₂/5% CO₂。

100 μl 从人心脏纯化的 zonulin 馏分 1、或从人脑中纯化的 zonulin 馏分 1、或从人肠中纯化的 zonulin 馏分 1、或从人心脏纯化的馏分 4, 加入到粘膜侧。每 10 分钟测量电压差(PD), 采用 Fasano 等前面的描述的方法计算短路电流(Isc)和组织阻力(Rt)。以 Rt 计算的数据见图 4A 和图 4B, 但因为组织不同, 数据如图 5A 和图 5B 所示以 ΔRt (在时间 X 的 Rt)-(在时间 0 的 Rt)计算。结果在图 4A 和 4B(猴肠)及图 5A 和图 5B(兔肠) 中显示。

如图 4A 和图 4B 显示, 从人心脏和肠纯化的 zonulin(馏分 1) 与 PBS 阴性对照相比, 引起猴肠阻力(空肠(图 4A)和回肠(图 4B))的显著降低。当从人心脏或人肠中纯化的 zonulin 在结肠中检测时未观察到显著的变化。图 4A 和图 4B 也显示了当检测从人脑中纯化的 zonulin(馏分 1)时, 未观察到对猴空肠(图 4A)和猴回肠(图 4B)的显著效应。从人心脏纯化的 zonulin 的馏分 4 也导致猴小肠组织阻力的显著下降。

如图 5A 和图 5B 中显示, 当使用兔肠时, 获得了相似的结果。即, 从人心脏纯化的 zonulin(馏分 1)显示了对兔空肠(图 5A)和兔回肠(图 5B)组织阻力的显著作用, 而对结肠则没有。图 5A 和图 5B 也显示了当对人脑中纯化的 zonulin(馏分 1)进行检测时, 对兔空肠(图 5A)和兔回肠(图 5B)未观察到明显的效应。

为确定 zonulin 是否可增加胰岛素的口服输送, 采用兔肠进行了的体外模型实验。简言之, 成年雄性新西兰大白兔(2-3kg)颈部脱臼处死。取出兔小肠(空肠或回肠)的片断, 清洗肠内容物, 沿肠系膜边缘剖开, 剥除肌肉和浆膜层。8 个这样制备的粘膜片然后放置在有机玻璃的 Ussing 室中(1.12cm^2 开放), 与一个电压钳装置(EVC 4000 WPI, Sarasota, FL)相连, 浸于新鲜配制的林格氏溶液中, 该液含 53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mM 甘露醇、1.69mM Na_2HPO_4 、0.3mM NaH_2PO_4 、1.25mM CaCl_2 、1.1mM MgCl_2 和 25mM NaHCO_3 。浸液用一个与恒温循环泵相连的水套蓄水池维持温度在 37°C , 并充以 95% O_2 /5% CO_2 。测量电压差(PD), 计算短路电流(I_{sc})和组织阻力(R_t)。一旦组织达到稳定状态的条件, 按其阻力基数将组织配对, 单独或在 $100\text{ }\mu\text{l}$ 来自馏分 1 的心脏 zonulin 存在下, 腔内暴露于 10^{-11}M ^{125}I -胰岛素(Amersham, Arlington Heights, IL; $2.0\text{ }\mu\text{Ci}=10^{-12}\text{M}$)。立即从浆膜侧获取 1.0ml 试样和从粘膜侧获取 $50\text{ }\mu\text{l}$ 试样, 以确定基线值。然后在随后的 100 分钟内, 以 20 分钟的间隔收集浆膜侧的样品。

发现心脏 zonulin 以时间依赖的方式增加胰岛素在空肠(未处理的对 zonulin 处理的组织分别是 $0.058 \pm 0.003\text{fmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ 对 $0.12 \pm 0.005\text{fmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$, $p=0.001$)、和在回肠(未处理的对 zonulin 处理的组织分别是 $0.006 \pm 0.0002\text{fmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ 对 $0.018 \pm 0.005\text{fmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$, $p=0.05$)的肠吸收。

从人心脏纯化 zonulin 馏分 1、从人肠中纯化的 zonulin 馏分 1 和从人脑中纯化的 zonulin 馏分 1, 也在进行 8.0%(w/v) SDS-PAGE 电泳后, 采用上述实例 2 所述获得的抗 ZOT 抗体进行 Western 免疫印迹。然后, 经 SDS-PAGE 分离的蛋白带用 CAPS 缓冲液转移到 PVDF 滤膜(Millipore)上, 该缓冲液含 100ml (3-[环己胺]-1-丙烷磺酸) 10x、100ml 甲醇和 800ml 蒸馏水。通过 Western 免疫印迹检测到的排列于单一条带

的蛋白具有明显的大约为 47kDa 的分子量。此条带从 PVDF 滤膜上切下, 根据 Hunkapiller 在: 蛋白质微量定性方法, Shibley 编辑, 11-12 章, Humana Press, 第 315-334 页(1985)中所述的方法, 采用 Perkin-Elmer 应用生物系统仪, 型号 494, 进行 N-末端序列分析。从成人心脏中纯化的 zonulin N-末端序列在 SEQ ID NO:28 中显示, 从成人脑中纯化的 zonulin N-末端序列在 SEQ ID NO:29 中显示, 从胎儿脑中纯化的 zonulin N-末端序列在 SEQ ID NO:36 中显示。

从成人肠(SEQ ID NO:31)中纯化的 zonulin 的 N-末端前 9 个氨基酸也被测序, 发现与 SEQ ID NO:28 显示的、从人心中纯化的 zonulin 的 N-末端前 9 个氨基酸是等同的(见图 6)。从胎儿肠中纯化的 zonulin 的 N-末端序列的前 20 个氨基酸也被测序: Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu(SEQ ID NO:30), 并发现与 SEQ ID NO:28 显示的人心中纯化的 zonulin 的氨基酸序列几乎是等同的(见图 6)。

从成人脑和胎儿脑中纯化的 zonulin 的 N-末端序列(SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:36)与从每个心脏、胎儿肠和成人肠中纯化的 zonulin 的 N-末端序列(SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31)完全不同(见图 6-7)。这种不同相信可以解释 zonulin 在决定组织通透性中的组织特异性, 如上面所举例的肠。

从心脏、肠和脑中纯化的人 zonulin 的 N-末端序列都与从兔肠中纯化的 zonulin 的 N-末端序列不同(图 6)。为确定是否这些蛋白代表着 tau 相关的蛋白家族的不同亚型, 从兔和人来源的组织在进行 8.0%(w/v) SDS-PAGE 电泳后, 采用抗 ZOT 抗体或抗 tau 抗体进行 Western 免疫印迹。从兔和人组织(包括脑、肠、和心脏)纯化的、被发现可被抗 ZOT 抗体识别的 47 kDa zonulin 带, 也发现与抗 tau 抗体有交叉反应。通过盐层析获得的从人脑纯化的 zonulin 的不同馏分也采用抗 ZOT 抗体或抗 tau 抗体进行了 Western 免疫印迹。抗 ZOT 抗体可以识别完整的 47 kDa 蛋白及 35 kDa 和 15 kDa 分解片断, 抗 tau 抗体则仅能识别完整的 47 kDa 蛋白和 35 kDa 片断, 而抗 tau 抗体不能识别 15 kDa 片断。为确定是否 35 kDa 片断包括 zonulin 的 N-末端或 C-末端, 获取了 35 kDa 带的 N-末端, 发现是: Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp

Leu(SEQ ID NO:32)。这个序列与完整的人脑 zonulin(SEQ ID NO:29)的 N-末端序列不同。这些结果表明 15 kDa 片断代表着 zonulin 的 N-末端部分, 而 35 kDa 片断代表着 zonulin 的 C-末端部分。

综合起来, 这些结果表明被抗 tau 抗体识别的 zonulin 区朝向 zonulin 的 C-末端, 对于从人或兔组织来源的 zonulin 不同亚型是共同的(而 N-末端部分可能不同), 可能参与蛋白的通透效应(基于以下的观察, tau 与 β -微管蛋白结合, 随后发生细胞骨架的重排; 和馏分 4 对猴小肠组织阻力的效应)。

从心脏和肠中纯化的人 zonulin 的 N-末端序列通过 BLAST 搜索分析与其他蛋白序列进行了比较。分析结果显示, 人 zonulin 的 N-末端序列与人类 IgM 重链可变区(SEQ ID NO:37)的 N-末端序列 95%等同。

其结果, 为了确定是否从心脏中纯化的人 zonulin 和人 IgM 是同一物质, 对人 zonulin 进行部分消化以获得一个内部片断, 然后将其测序。

更特殊的是, 含有从人心中纯化的 zonulin 的 1.0mm PVDF 滤膜放置于预先用 0.1%(w/v)三氟乙酸(TFA)冲洗过的塑料管中, 并用甲醇冲洗。加入含 100mM Tris(pH 8.2)、10%(v/v)CH₃CN 和 1.0%(v/v)脱氢曲拉通 X-100 的缓冲溶液 75 μ l, 与膜在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。然后加入 150ng 胰蛋白酶, 再在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时。得到的溶液超声处理 10 分钟, 轻轻移除上清。然后加入 0.1%(w/v)TFA 75 μ l, 溶液再超声处理 10 分钟, 并倾去上清。两份试样均装载在 5.0 μ m 微粒大小、300Å 孔径的 0.5mm $\times$ 250mm C₁₈ 柱上。在 2 小时 15 分钟时间内形成从 0.1%(w/v)TFA 到 45%CH₃CN 水+0.1%(w/v)TFA 的梯度。最后收集各峰并测序。

从成人心中纯化的人 zonulin 的内部序列发现是: Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly(SEQ ID NO:33)。

人 zonulin 的内部序列通过 BLAST 搜索分析与其他蛋白序列进行了比较。此分析的结果显示人 zonulin 的内部序列与人类 IgM 重链可变区的任何内部序列的等同性为 0%。

上面实例 3 的结果表明: (1)zonulin 代表了细胞旁通路的生理性调节剂; (2)兔 zonulin 的 N-末端序列与 tau 蛋白的 N-末端序列高度同源; (3)zonulin 和 tau 是两个在免疫学上相关但功能上不同的截然不同物质; (4)从人心中和肠中获得的人 zonulin 的 N-末端序列与 IgM 重链可变区

的 N-末端序列高度同源；(5)人 zonulin 和 IgM 是两个在结构上相关但功能上不同的截然不同的物质；和(6)zonulin 代表着一个具有共同的、活性 C-末端序列和可变的 N-末端序列的 tau 相关蛋白家族。

实例 4

zonulin 的肽拮抗剂

已知 ZOT、人肠 zonulin(zonulin_i)和人心脏 zonulin(zonulin_h)均作用于肠 (Fasano 等, Gastroenterology, 112:839(1997); Fasano 等, J.Clin.Invest.,96:710(1995); 和图 1-5)和内皮细胞 tj, 且三者均具有相似的、与 ZOT 受体在肠内分布一致(Fasano 等(1997), 见前; 和 Fasano 等(1995), 见前)的区域效应(Fasano 等(1997), 见前; 和图 1-5), 在本发明中推测, 这三个分子与同样的受体结合位点相互作用。因此, 对 ZOT 和人 zonulin 的基本氨基酸结构进行了比较, 以了解参与肠 tj 调节的受体-配体相互作用所需要的绝对结构。对这些分子 N-末端序列的分析发现了下列共同的序列(框在图 7 中的氨基酸残基 8-15): 非极性(肠为 Gly, 脑为 Val)、可变的、非极性、可变的、非极性、极性、可变的、极性(Gly)。Gly 在位置 8、Val 在位置 12 和 Gln 在位置 13, 所有均在 ZOT、zonulin_i 和 zonulin_h 中高度保守(见图 7), 相信对于在肠内的受体结合功能是关键性的。为了证实这些, 化学合成了合成的八肽 Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly(SEQ ID NO:15)(称为 FZI/0, 并对应于人胎儿 zonulin_i 的氨基酸残基 8-15)。

下一步, 兔回肠如上所述置于 Ussing 室中, 单独暴露于 100μg FZI/0(SEQ ID NO:15)、100μg FZI/1(SEQ ID NO:34)、1.0μg 6xHis-ZOT(如实例 1 所述获得)、1.0μg zonulin_i(如实例 3 所述获得)、或 1.0μg zonulin_h(如实例 3 所述获得); 或预先暴露于 100μg FZI/0 或 FZI/1 20 分钟, 此时加入 1.0μg 6xHis-ZOT、1.0μg zonulin_i、或 1.0μg zonulin_h。然后如上所述计算ΔRt。结果见图 8。

如图 8 中显示, FZI/0 不能诱导 Rt 的任何显著性改变(与阴性对照相比 0.5%)(见实心条)。相反, 用 FZI/0 预先处理 20 分钟分别减少了 ZOT、zonulin_i、zonulin_h 对 Rt 效应的 75%、97%和 100%(见空心条)。在图 8 中也显示, 当采用第二个合成肽(FZI/1)时, 这种抑制效应可被完全去

除(见阴影条), FZI/1 是通过改变在位置 8 的 Gly、位置 12 的 Val 和在位置 13 的 Gln(指 zonulin_i)并对应于 zonulin_b 的氨基酸残基(分别是 Val, Gly,和 Arg)而化学合成的。

上述的结果证实在 ZOT 和 zonulin 家族的 N-末端的残基 8 和 15 之间有一个区域跨度, 对与靶受体的结合是十分重要的, 且在位置 8、12 和 13 的氨基酸残基决定着这种结合的组织特异性。

尽管已详细描述了本发明, 并引用了它们特定实施例作为参考, 但很明显对于本领域的一个普通的技术人员来说, 在不背离其精神和范围的情况下, 各种改变和调整均是可行的。

序列表

(1)一般信息:

(i) 申请者: FASANO, Alessio

(ii) 发明名称: zonulin 的肽拮抗剂及其使用方法

(iii) 序列数目: 40

(iv) 通讯地址:

(A)收信人: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS,
PLLC

(B)街道: 2100 Pennsylvania Avenue, N.W., Suite 800

(C)城市: 华盛顿州

(D)州: D.C.

(E) 国家: 美国

(F) 邮编: 20037

(V) 计算机可读形式:

(A)介质类型: 软盘

(B)计算机: IBM PC 兼容

(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软件: PatentIn Release #1.0, 版本#1.25

(vi) 目前申请的数据:

(A)申请号:

(B)申请日: 1998 年 8 月 3 日

(C)分类:

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 名称: KIT, Gordon

(B) 登记号: 30,764

(C) 参考/摘要号: A-7242

(ix) 电信信息:

(A) 电话: (202) 293-7060

(B) 传真: (202) 293-7869

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:3:

Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：8 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:2:

Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：8 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:5:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：8 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:6:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:8 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:9 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:11 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:12 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:13 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:17 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:18 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:19 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:20 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:20:

Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:21 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:21:

Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:22 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:22:

Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:23 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:23:

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5

(2)SEQ ID NO:24 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:24:

Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:25 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 成股性: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 合成的 DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:25:

TCATCACGGC GCGCCAGG

(2)SEQ ID NO:26 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 成股性: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 合成的 DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:26:

GGAGGTCTAG AATCTGCCCCG AT

(2)SEQ ID NO:27 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:27:

Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln
1 5 10 15

(2)SEQ ID NO:28 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：20 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:28:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
1 5 10 15 20

(2)SEQ ID NO:29 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：9 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述： SEQ ID NO:29:

Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
1 5

(2)SEQ ID NO:30 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：20 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：肽

(iii) 假设：无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:30:

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

(2)SEQ ID NO:31 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:31:

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

(2)SEQ ID NO:32 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:32:

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

(2)SEQ ID NO:33 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 13 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:33:

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

1

5

10

(2)SEQ ID NO:34 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:34:

Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:35 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:35:

Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly

1

5

(2)SEQ ID NO:36 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:36:

Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile
1 5 10 15 20

(2)SEQ ID NO:37 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:37:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
1 5 10 15 20

(2)SEQ ID NO:38 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:38:

Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly Phe Val Thr
1 5 10

(2)SEQ ID NO:39 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 成股性: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 合成的 DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:39:
CGGGATCCCG TATGAGTATC TTT

(2)SEQ ID NO:40 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 成股性: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 合成的 DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:40:
CCCAAGCTTG GGTCAAATA TACT

序列表

<110> 巴尔的摩马里兰大学 (University of Maryland, Baltimore)

<120> 小带素的肽拮抗剂及其用途

<130> CGUSZ50186

<140> PCT/US99/16683

<141> 1999-07-28

<150> US09/127,815

<151> 1998-08-03

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 1

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 2

Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 3

Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 4

Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly

1	5
---	---

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 5
Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 6
Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 7
Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 8
Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 9
Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 10

Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 11

Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 12

Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 13

Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 14

Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 合成的八肽

<400> 15

Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 16

Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 17

Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 18

Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 19

Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 20

Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 21

Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 22

Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly

1

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 23

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 24

Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly

1

5

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 合成的构建物

<400> 25

tcatcacggc gcgccagg

18

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> 合成的构建物

<400> 26

ggaggtctag aatctgcccc at

22

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> 兔肠

<400> 27

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

1

5

10

15

Ile Gln

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> 人心脏

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu
20

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人脑

<400> 29
Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
1 5

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> 人胎儿肠

<220>
<221> 不能确定 (UNSURE)
<222> (16)
<223> 在位置 16 处的 Xaa 为氨基酸

<400> 30
Met Leu Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa
1 5 10 15

Ser Asn Arg Leu
20

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人肠

<220>
<221> 不能确定 (UNSURE)
<222> (10)
<223> 在位置 10 处的 Xaa 为氨基酸

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人脑

<220>
<221> 不能确定 (UNSURE)
<222> (1).. (2)
<223> 在位置 1 和 2 处的 Xaa 为氨基酸

<400> 32
Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Leu Val Gly Asp Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 成人心脏

<400> 33
Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly
1 5 10

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 合成的八肽

<400> 34
Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 小带素肽拮抗剂

<400> 35
Val Asp Gly Phe Gly Arg Ile Gly
1 5

<210> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> 人胎儿脑

<220>
<221> 不能确定 (UNSURE)

<222> (1)

<223> 在位置 1 处的 Xaa 为氨基酸

<400> 36

Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg
1 5 10 15

Ile Gly Arg Leu Val Ile
20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu
20

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> 闭锁小带毒素 (Zonulin Occludes Toxin)

<400> 38

Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly Phe Val Thr
1 5 10

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成的构建物

<400> 39

cgggateccg tatgagtatc ttt

23

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> 合成的构建物

<400> 40

cccaagcttg ggtcaaaata tact

24

图 1

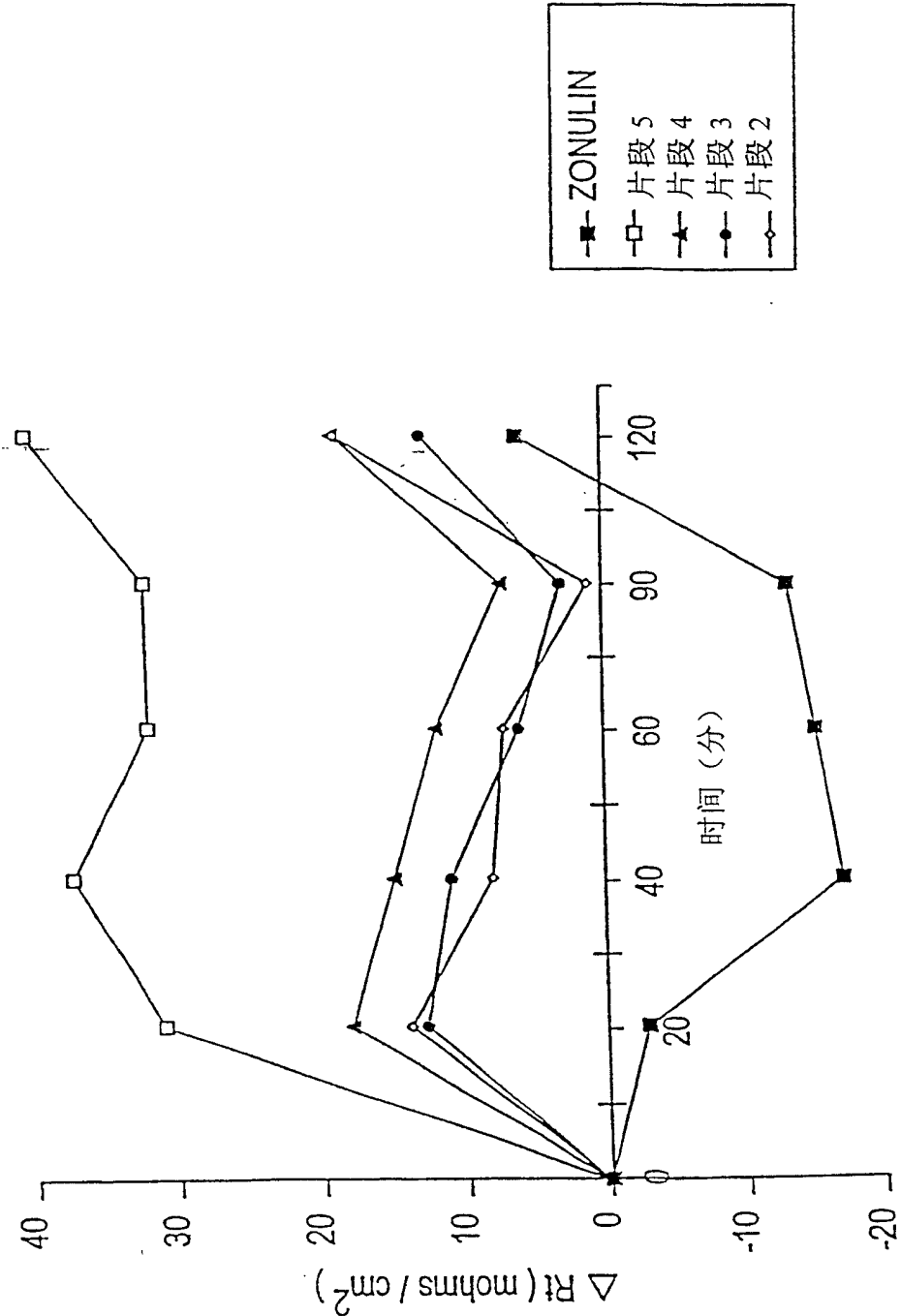


图 2

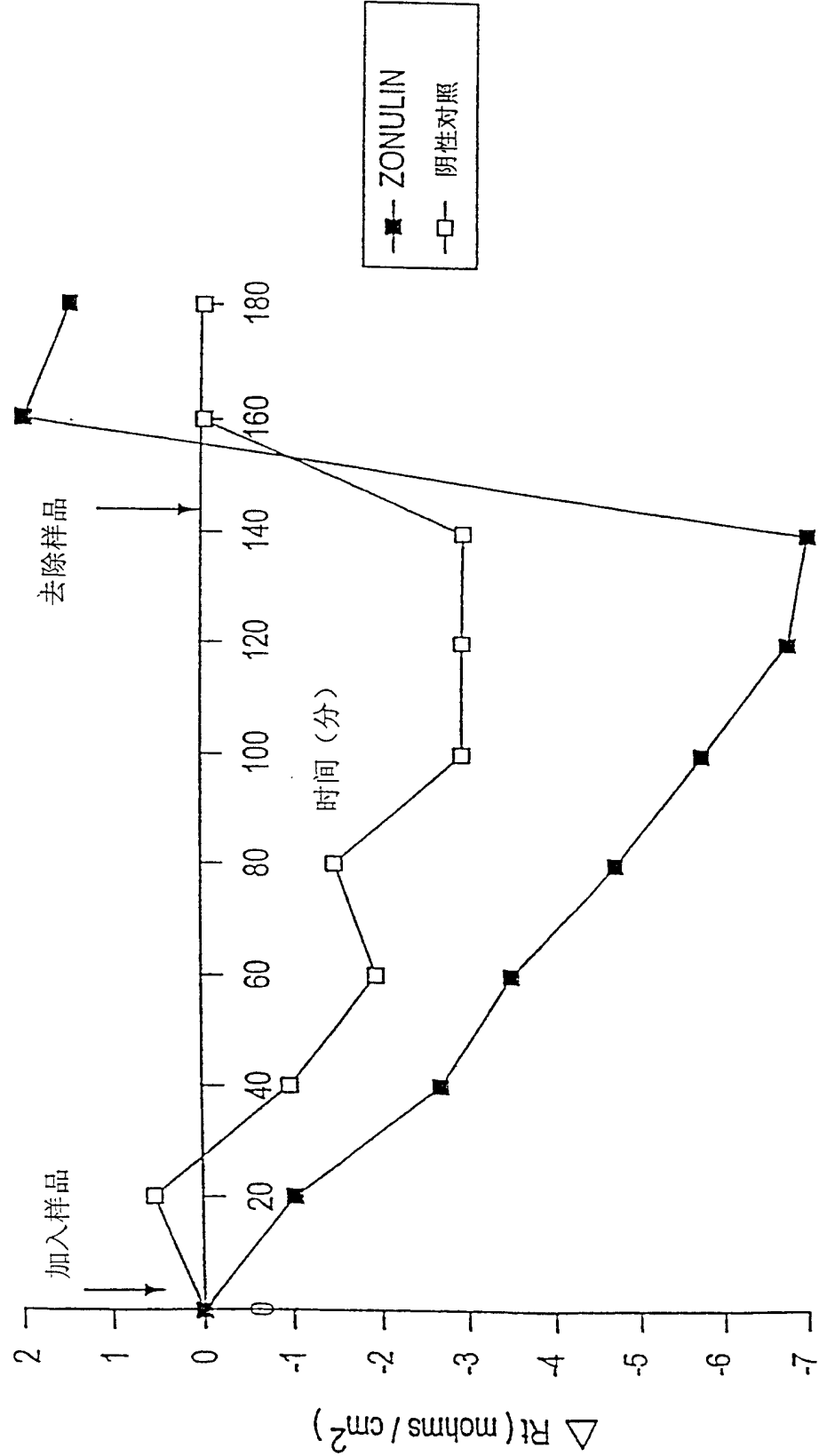


图 3

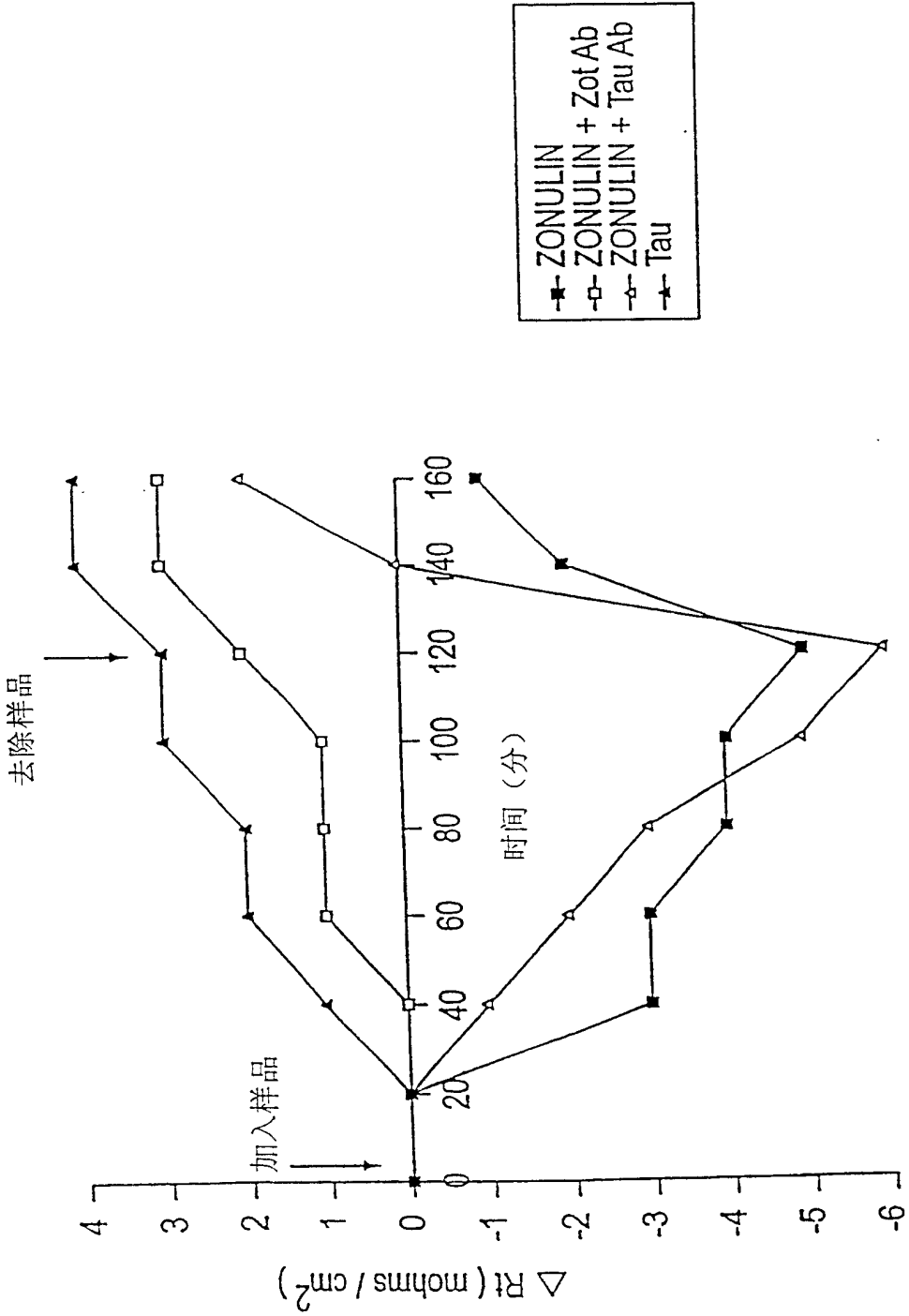


图 4A

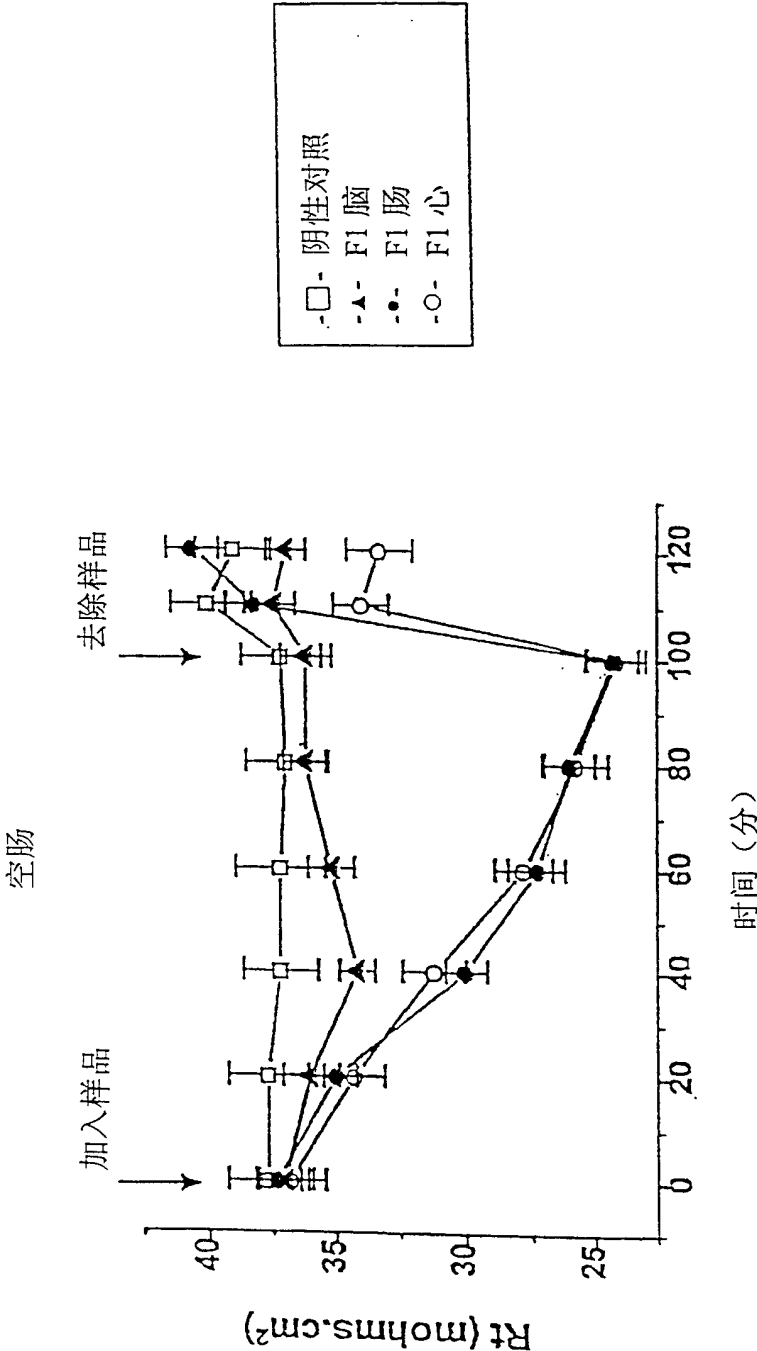


图 4B

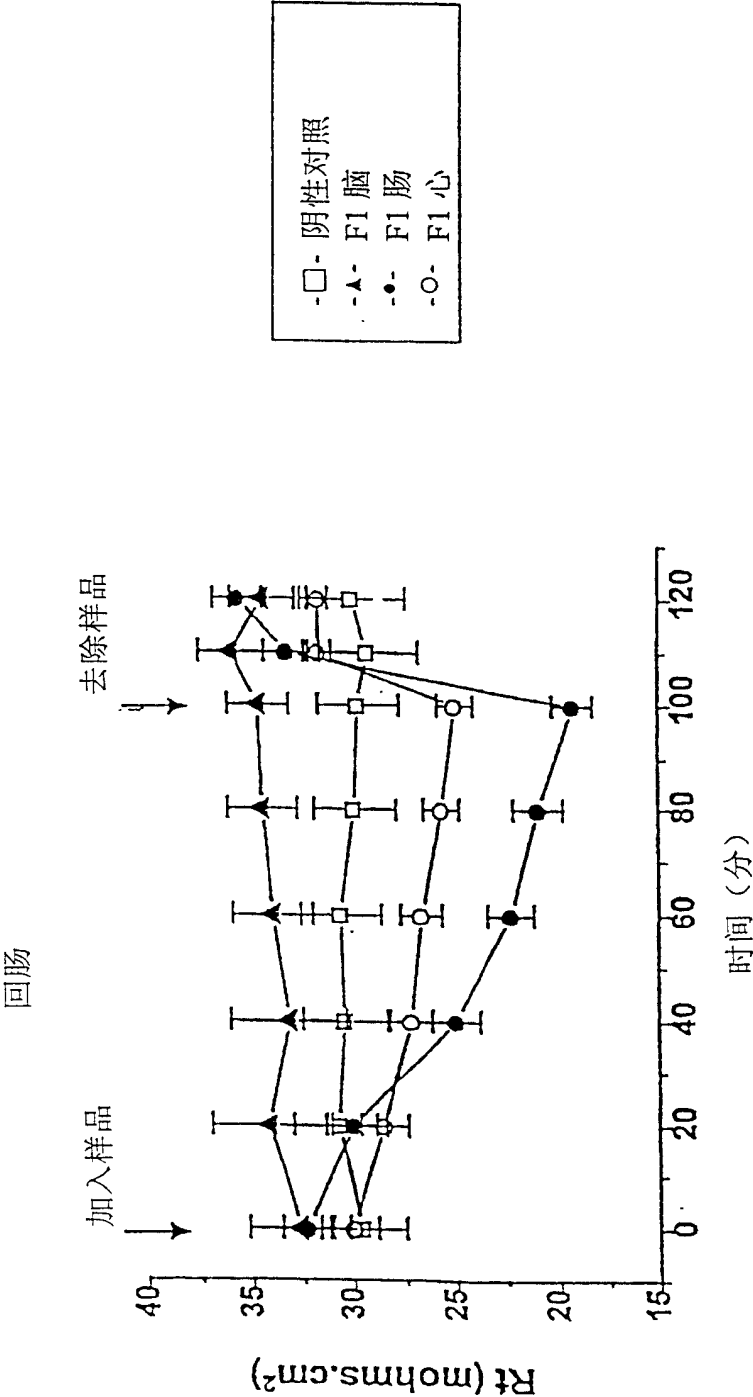


图 5A

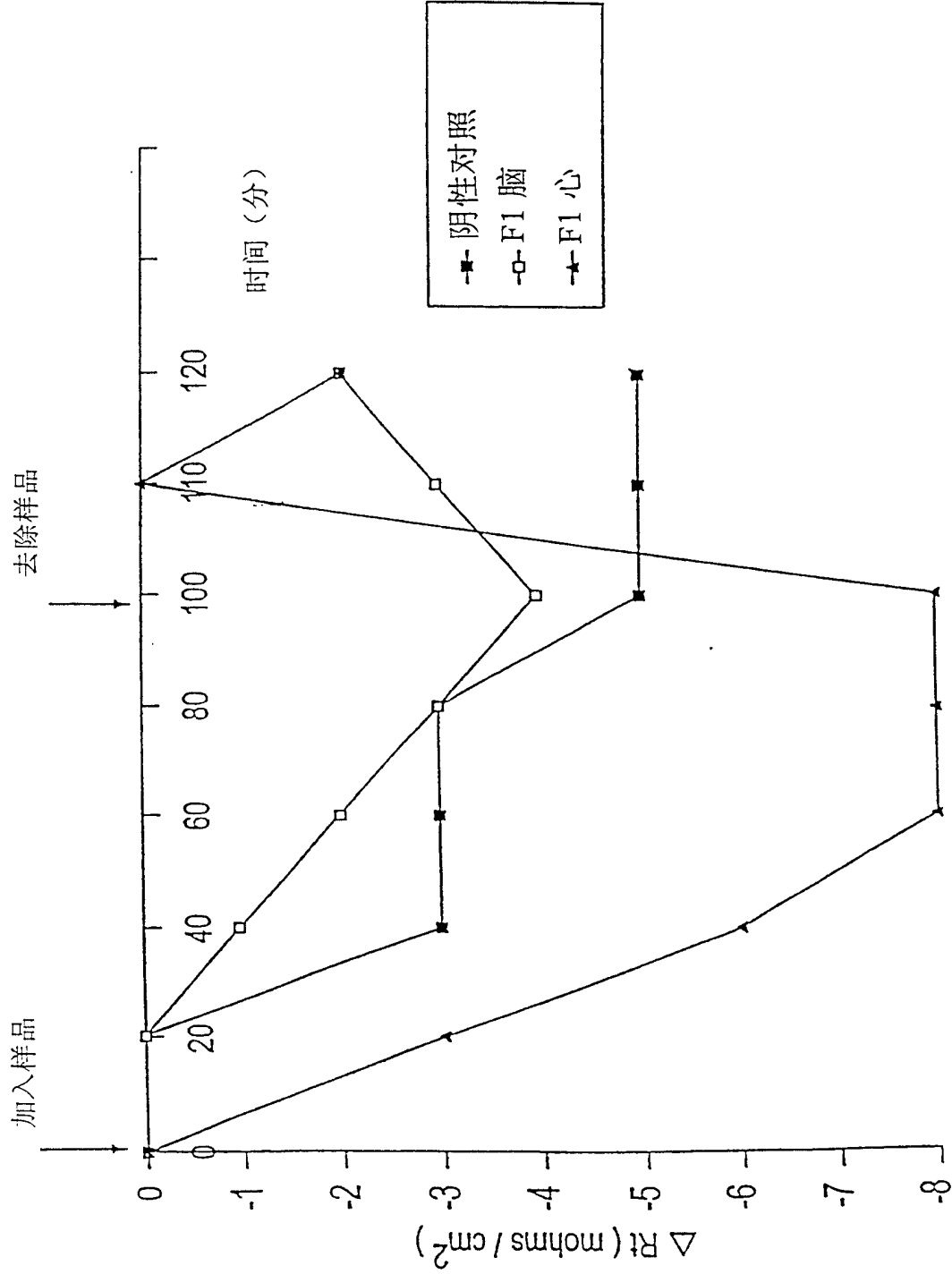


图 5B

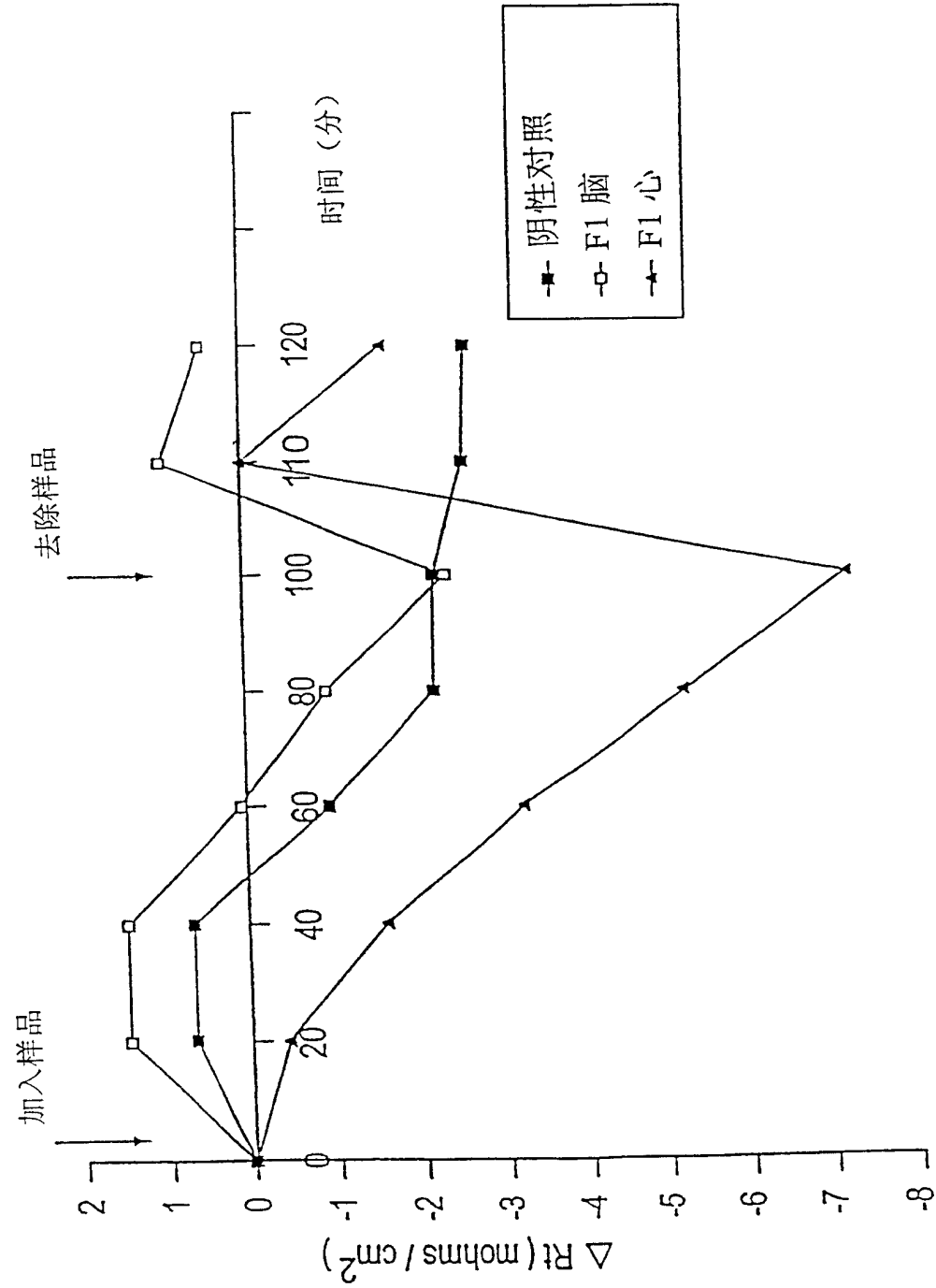


图 6

兔肠 (SEQ ID NO:27)	- Asn Gln Arg Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln
成人肠 (SEQ ID NO:31)	- Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu
胎儿肠 (SEQ ID NO:30)	- Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
成人脑 (SEQ ID NO:28)	- Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu
成人脑 (SEQ ID NO:29)	- Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
内部序列成人脑 (SEQ ID NO:33)	- Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly
成人脑 片段 (SEQ ID NO:32)	- 35 kDa Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu

图 7

霍乱弧菌 ZOT [*] (SEQ ID NO:38)	Phe Cys Ile	Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp.Gly	Phe Val Thr
成人肠 (SEQ ID NO:31)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Xaa Leu	
胎儿肠 (SEQ ID NO:30)	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser	Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	Xaa Ser Asn Arg Leu
成人肠 (SEQ ID NO:28)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Gly Ser Leu Arg Leu
FZI/0 (SEQ ID NO:15)		Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	
FZI/1 (SEQ ID NO:34)		Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly	
胎儿肠 (SEQ ID NO:36)	Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly	Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly	Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile
成人肠 (SEQ ID NO:29)	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala	Val Ser	
人 IGM 重链 (SEQ ID NO:37)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Arg Ser Leu Arg Leu

* 生物活性片段 (氨基酸残基 288-399) 是霍乱弧菌处理后产生的。第一个 Gly 对应整个 ZOT 分子的第 291 个残基 (Fasano 等, Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A 88:5242(1991); and Baudry 等, Infect. Immun., 60(2), 428(1992)) .

图 8

