

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 7/06 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년08월09일 10-0610389 2006년08월01일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2001-7001503	(65) 공개번호	10-2001-0072245
(22) 출원일자	2001년02월03일	(43) 공개일자	2001년07월31일
번역문 제출일자	2001년02월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/016683	(87) 국제공개번호	WO 2000/07609
국제출원일자	1999년07월28일	국제공개일자	2000년02월17일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 남아프리카, 아랍에미리트, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도, 그라나다, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 인도네시아, 시에라리온,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장	09/127,815	1998년08월03일	미국(US)
------------	------------	-------------	--------

(73) 특허권자	유니버시티 오브 메릴랜드, 볼티모어 미국 메릴랜드 21201 볼티모어 웨스트 롬바드 스트리트 520
-----------	--

(72) 발명자	파사노알레시오 미국메릴랜드21042엘리코트시티차릴코트3504
----------	--------------------------------------

(74) 대리인	리앤목특허법인
----------	---------

심사관 : 정의준

(54) 조놀린의 펩타이드 길항제와 그 사용 방법

요약

조놀린의 펩타이드 길항제 뿐 아니라, 그것의 사용방법이 밝혀졌다. 상기 펩타이드 길항제는 조놀라 오클루덴 수용체에 결합하나, 생리학적으로 포유류의 긴밀접합(tight junctions)의 개방을 조절하지는 않는다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명의 개발은 메릴랜드 볼티모어의 마릴랜드 대학에 의해 지지되었다. 여기서 기술된 발명은 국가 건강 연구소(NIH DK-48373)에서 재정적으로 뒷받침 하였다. 정부는 일정한 권리가 있다.

발명의 분야

본 발명은 조놀린의 펩타이드 길항제 뿐 아니라, 그것의 사용방법에 관한 것이다. 상기 펩타이드 길항제는 조놀라 오클루덴 수용체에 결합하나, 생리학적으로 포유류의 긴밀접합(tight junctions)의 개방을 조절하지는 않는다.

배경기술

발명의 배경

I. 소장(intestinal) 긴밀접합의 기능과 조절

긴밀접합("tj")이나 조놀라 오클루덴(zonula occluden)(여기서는 "ZO")은 흡수나 분비를 하는 상피의 특징중의 하나이다. (Madara, *J. Clin. Invest.*, 83:1089-1094 (1989); 및 Madara, *Textbook of Secretory Diarrhea* Eds. Lebenthal et al, 11장, 125-138쪽 (1990)). 정점부분과 바닥가쪽부분 사이의 장벽(barrier)으로서, 그것들은 이온과 수용성 용질의 수동 확산을 파라셀룰러 경로(paracellular pathway)를 통해서 선택적으로 조절한다. (Gumbiner, *Am. J. Physiol.*, 253 (Cell Physiol. 22): C749-C758 (1987)). 이러한 장벽은 세포간 통로와 연관된 경로의 활성화에 의해 생성되는 어떠한 구배(gradient)도 유지한다(Diamond, *Physiologist*, 20:10-18(1997)).

소장세포 원형질막의 저항이 상대적으로 높기 때문에, 경상피(transepithelial) 전도도의 변화는 대개 파라셀룰러 경로의 투과성의 변화 때문이다(상기, Madara). 프리즈-프랙처 전자 현미경에서 보여지는 것같이, ZO는 파라셀룰러 경로의 주요 장벽을 나타내고, 상피 조직의 전기적 저항은 ZO에서의 경막(transmembrane) 단백질 가닥의 숫자와 복잡정도에 따른다(Madara et al, *J. Cell Biol.*, 101:2124-2133 (1985)).

한때 정적 구조로 여겨졌던 ZO는 사실 동적이고, 다양한 발생환경(Magnuson et al, *Dev. Biol.*, 67:214-224 (1978); Revel et al, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 40:443-455 (1976); 과 Schneeber et al, *J. Cell Sci.*, 32:307-324(1978)), 생리학적 환경(Gilula et al, *Dev. Biol.*, 50:142-168 (1976); Madara et al, *J. Membr. Biol.*, 98:1865-1877(1984); 그리고 Sardet et al, *J. Cell Biol.*, 80:96-117 (1979)), 병리학적 환경(Milks et al, *J. Cell Biol.*, 103:2729-2738 (1986); Nash et al, *Lab. Invest.*, 59:531-537 (1988); 그리고 Shasby et al, *Am. J. Physiol.*, 255 (Cell Physiol., 24):C781-C788 (1988))에 쉽게 적응한다는 많은 증거들이 있다. 이러한 적응에 근거가 되는 조절 기전은 여전히 완전하게 알려지지 않았다. 그러나, Ca^{2+} 의 존재하에서, 궁극적으로 ZO요소의 조직화된 네트워크의 형성과 조절로 이르게 되는 생화학적 사건의 복잡한 단계(cascade)를 일으키는 세포 상호작용의 결과가 ZO의 회합(assembly)이라는 것이 명백하며, 그것의 조성은 단지 부분적으로 특징이 밝혀졌다(Diamond, *Physiologist*, 20:10-18 (1977)). 경막 단백질 가닥의 후보물질인 오클루덴(occludin)은 최근 동정되었다(Furuse et al, *J. Member. Biol.*, 87:141-150 (1985)).

여섯 개의 단백질이 막 접촉 부위의 아래에 있는 세포질 하막 플라이크에서 동정되었으나, 그것들의 기능은 아직 동정되어 있지 않았다(상기 Diamond). ZO-1과 ZO-2는 특징화되지 않은 130KD 단백질(ZO-3)을 갖는 세정제-안정한 복합체에서 헤테로다이머로서 존재한다(Gumbiner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**:3460-3464 (1991)). 대부분의 면역전자 현미경 연구로부터 ZO-1이 정확히 막 접촉부의 밑에 위치한다는 것이 밝혀졌다(Steven 등, *Molec. Cell Biochem.*, **83**:129-145 (1988)). 두개의 다른 단백질, 신굴린(cingulin)(Citi 등, *Nature (London)*, **333**:272-275 (1988))과 7H6항원(7H6antigen)(Zhong 등, *J. Cell Biol.*, **120**:477-483 (1993))은 막으로부터 멀리 위치해 있고, 아직 클로닝되지 않았다. 작은 GTP결합 단백질인 Rab 13는 최근에 결합 부위에 위치하는 것으로 밝혀졌다(Zahraoui 등, *J. Cell Biol.*, **124**:101-115 (1994)). 다른 작은 GTP결합 단백질들은 피질의 세포골격을 조절한다고 알려져 있다. 즉 *rho*는 국소적 접촉(focal contacts)에서 액틴막 접촉을 조절하고(Ridely 등, *Cell*, **70**:389-3399 (1992)), *rac*는 성장인자에 의해 유도된 막 파상(membrane ruffling)을 조절한다(Ridely 등, *Cell*, **70**:401-410(1992)). 보다 특징화된 세포 접합, 국소 접촉부(Guan 등, *Nature*, **358**:690-692 (1992)), 밀착 접합(adherens junctions)(Tsukita 등, *J. Cell Biol.*, **123**:1049-1053 (1993))에 있는 플라이크 단백질의 알려진 기능과의 상사성에 기초하여, tj-관련 플라이크 단백질은 세포막을 관통하여 양 방향으로 신호를 전달(transduce)하고 피질의 액틴세포골격과의 연결을 조절하는데 연루되는 것으로 보인다.

상피세포들이 연루된 많은 다양한 생리학적 병리학적인 도전을 만족하기 위해, ZO는 복잡한 조절 체계의 존재를 요구하는 빠르고 협동적(coordinated)인 반응을 할 수 있어야 한다. ZO의 회합과 조절에 관련된 기전의 정확한 규명은 현재의 활발한 연구 분야이다.

tj의 구조적 기능적 연결이 액틴 세포골격과 흡수세포의 tj복합체 사이에 존재한다는 증거가 현재 존재한다(상기 Gumbiner 등, 상기 Madara 등, 그리고 Drenchahn 등, *J. Cell Biol.*, **107**:1037-1048 (1988)). 액틴 세포골격은 그 정확한 기하학이 큰 골조의 액틴-결합 단백질에 의해 조절되는 복잡한 미세 필라멘트 그물(meshwork)로 이루어져 있다. 액틴 결합 단백질의 인산화 상태가 어떻게 원형질막의 세포골격의 결합을 조절하는지의 예가 미리스토일화된(myristoylated) 알라닌-풍부한 C 키네이즈 기질(이하 "MARCKS"라고 한다.)이다. MARCKS는 원형질막의 세포질표면과 연관된 특이적 단백질 키네이즈 C(이하 "PKC"라고 한다.)기질이다(Aderm, *Elsevier Sci. Pub. (UK)*, 438-443쪽 (1992)). 비인산화된 형태에서, MARCKS는 그 원형질막의 액틴과 교차결합한다. 그래서, MARCKS를 통해 그 막과 연관된 액틴 그물은 상대적으로 경직되어 있다(Hartwig 등, *Nature*, **356**:618-622 (1992)). 활성화된 PKC는 MARCKS를 인산화 한다. 그런데 그것은 원형질막으로부터 유리된다(Rosen 등, *J. Exp. Med.*, **172**:1211-1215 (1990); 및 Thelen 등, *Nature*, **351**:320-322 (1991)). MARCKS와 연결된 액틴은 공간적으로 원형질막과 분리되어 있고, 더 유연하다. MARCKS가 탈인산화될 때, 그것이 다시 액틴과 교차결합하는 원형질막으로 돌아간다(상기 Hartwig 등 그리고 상기 Thelen 등). 이러한 자료들은 F-액틴 네트워크가 액틴-결합 단백질(MARCKS가 그중의 하나이다)을 포함하는 PKC-의 존성 인산화과정에 의해 재배열될 수도 있다는 것을 제안한다.

다양한 세포내 매개인자들은 tj의 기능 및/또는 구조를 변화시키는 것으로 보여진다. 양서류의 담낭(Duffey 등, *Nature*, **204**:451-452 (1981)), 그리고 금붕어(Bakker 등, *Am. J. Physiol.*, **246**:G213-217 (1984)), 그리고 가자미과의 물고기(Krasney 등, *Fed. Proc.*, **42**:1100 (1983))의 장(intestine)의 긴밀접합은 세포내 cAMP가 활성화(elevated)됨에 따라 수동적 이온 흐름에 고조된 저항을 나타낸다. 또한, 양서류 담낭의 Ca^{2+} 이온노포어에의 노출은 tj의 저항을 증가시키고, tj 구조의 변화를 유도하는 것 같다(Palant 등, *Am. J. Physiol.*, **245**:C203-C212 (1983)). 더욱이, 포르볼 에스터(phorbol ester)에 의한 PKC의 활성화는 신장(Ellis 등, *C. Am. J. Physiol.*, **263** (*Renal Fluid Electrocyte Physiol.* **32**):F293-F300 (1992))과 장(Stenson 등, *C. Am. J. Physiol.*, **265** (*Gastrointest. Liver Physiol.*, **28**):G955-G962 (1993)) 모두의 상피세포주의 파라셀룰러(paracellular)투과도를 높인다.

II. 혈액-뇌 관문

혈액-뇌 관문(BBB)은 용질이 없는 확산에 매우 저항이 심한 막 장벽이고, 혈액과 뇌를 분리한다. 분자차원에서, 화합물이 BBB에 내포된(embbeded) 수개의 특이적인 효소-같은 수송 메카니즘의 하나로 접근하지 않는다면, 이 막을 통한 약물이나 용질의 이동은 필연적으로 제로이다. BBB는 한 층의 내피세포들이라기 보다는 수 겹의 세포들로 구성되어 있다. BBB를 구성하는 4개의 다른 유형의 세포들(내피세포, 외막세포, 성상세포, 신경세포) 중에서, 모세혈관의 상피세포 부분이 BBB의 투과도의 제한요소를 나타낸다. 척추동물 뇌(vertebrate brain)와 척수의 모세혈관 내피는 말초조직에 있는 미세혈관 내피 장벽에 정상적으로 존재하는 내부내피세포의 공극을 둘러싸는 tj를 갖는다. 궁극적으로 BBB의 제한된 투과도는 내피의 tj 때문이다.

III. 조눌라 오쿨루덴 (zonula occluden) 독소

콜레라 독소(CT)를 암호화 하는 *ctxA* gene을 제거함으로써 제조되는 대부분의 *Vibrio cholerae* 백신 후보물질들은 고도의 항체 반응을 유발할 수 있으나 백신들의 반 이상이 가벼운 설사를 일으킨다(Levine 등, *Infect. Immun.*, 56(1):161-167 (1988)). CT가 없는 상태에서 유도된 설사의 정도로 볼 때, *V. cholerae*는 *ctxA* 서열(sequence)이 제거된 균주들에 여전히 존재하는 다른 장독소 인자를 생성한다는 것을 가정할 수 있다(상기 Levine 등). 결과적으로, *V. cholerae*에 의해 만들어 지고, 잔여의 설사를 유발하는 두번째 독소인 조눌라 오쿨루텐 독소(이하 "ZOT")가 발견되었다(Fasano 등, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246 (1991)). ZOT유전자는 *ctx*유전자의 바로 옆에 위치해 있다. *V. cholerae* 균주들에서 *zot*유전자와 *ctx*유전자의 동시발생이 높은 비율로 일어나는 것(Johnson 등, *J. Clin. Microb.*, 31/3:732-733 (1993); 그리고 Karasawa 등, *FEBS Microbiology Letters*, 106:143-146 (1993))은 콜레라의 급성 탈수 설사의 원인이 ZOT의 상승작용일 수 있다는 것을 제안한다. 최근에 *zot*유전자가 다른 장 병원체에서 또한 동정되었다(Tschape, *2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis*, 47(Abstr.) (1994)).

토끼 회장 점막을 가지고 실험시, ZOT는 세포내 *tj*의 구조를 조절함으로써 소장 투과도를 높인다는 것이 이미 밝혀졌다(상기 Fasano 등). 파라셀룰러 경로의 조절의 결과로서 소장 점막이 보다 투과성이 되어 진다는 것이 알려졌다. 또한 ZOT는 Na^+ -포도당 공역 능동 수송에 영향을 주지 않고, 세포독성이 없으며, 경상피 저항성을 완전히 제거할 수는 없다고 알려졌다(상기 Fasano 등).

보다 최근에, ZOT는 소장 점막의 *tj*를 가역적으로 개방시킬 수 있고, 그리하여 ZOT는 치료제와 함께 소장 약물 송달을 위한 경구 투여 조성물로 투여했을때, 치료제의 소장으로의 이송에 영향을 줄 수 있다고 알려졌다(WO 96/37196; 1995년 5월 24일에 출원된 U.S. Patent Application Serial No. 08/443,864, 그리고 U.S. Patent 5,665,389; 그리고 Fasano 등, *J. Clin. Invest.*, 99:1158-1164 (1997); 각각이 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합된다). 또한 ZOT는 코 점막에 있는 *tj*를 가역적으로 개방시킬 수 있어서, ZOT는 치료제와 함께 투여시 치료제의 코 흡수를 증진시킬 수 있다고 알려졌다(1997년 1월 9일 출원된 U.S. Patent Application Serial No. 08/781,057 ; 그것은 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합된다).

인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합되는, 1997년 2월 20일에 출원된 미국 특허 출원번호 08/803,364에 소장의 ZOT 수용체가, 소장 세포주, 즉 CaCo2세포들에서 동정되고 정제되었다. 더우기, 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합되는, 1998년 2월 17일에 출원된 미국 특허 출원번호 09/024,198에 인체의 소장, 심장, 그리고 뇌조직의 ZOT수용체는 동정되었고 정제되었다. ZOT수용체는 소장과 코의 투과도의 조절에 연루되는 파라셀룰러 경로의 첫 단계를 나타낸다.

IV. 조눌린

인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합되는, 계류중인 1997년 5월 21일 출원된 미국 특허 출원번호 098/859,931에서, 면역학적으로 그리고 기능적으로 ZOT와 관련되고, 포유류의 긴밀접합의 생리학적 조절기로서 기능을 하는 포유류의 단백질들이 동정되고 정제되었다. zonulin이라고 불리는 포유류 단백질들은 뇌-혈액 관문의 *tj*뿐 아니라 소장과 코 점막의 *tj*를 통한 치료제의 흡수를 증진시키는데 유용하다.

본 발명에서는, 조눌린의 펩타이드 길항제가 최초로 동정되었다. 상기 펩타이드 길항제는 ZOT수용체에 결합하지만, 생리학적으로 포유류의 긴밀접합의 개방을 조절하는 기능은 수행하지 않는다. 펩타이드 길항제는, ZOT와 조눌린의 포유류의 긴밀접합의 개방을 조절하는 능력을 억제함으로써 ZOT와 조눌린의 ZOT수용체로의 결합을 경쟁적으로 억제한다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명의 목적은 조눌린의 펩타이드 길항제를 동정하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드 길항제를 합성하고 정제하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 위장관계 염증의 치료에 있어, 항염제로서 상기 펩타이드 길항제를 사용하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드 길항제를 뇌-혈액 관문의 붕괴를 억제하는데 사용하는 것이다.

본 발명의 이러한 그리고 다른 목적들은 이하에 제공되는 발명의 상세한 설명으로부터 명백해 질 것이며, 다음의 서열들로 이루어진 그룹들로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 조놀린의 펩타이드 길항제에 의한, 하나의 구체예에서 달성된다. 다음의 서열들에는 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 그리고 SEQ ID NO:35가 있다. 여기에서 상기 펩타이드 길항제는 ZOT수용체에 결합하지만, 포유류의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는다.

위에서 논의한 바와 같이, 본 발명의 위에서 언급한 목적들은 다음의 서열들로 구성되는 그룹들로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 조놀린의 펩타이드 길항제에 의한, 하나의 구체예에서 달성된다. 다음의 서열들에는 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 그리고 SEQ ID NO:35가 있다. 여기에서 상기 펩타이드 길항제는 ZOT수용체에 결합하지만, 포유류의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는다.

펩타이드 길항제의 크기는 본 발명에 중요하지 않다. 일반적으로, 펩타이드 길항제의 크기는 8에서 110개의 아미노산의 범위이며, 바람직하게는 8에서 40개의 아미노산이고, 보다 바람직하게는 8개의 아미노산의 범위일 것이다.

펩타이드 길항제는 *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation Analysis and Conformation*, Eds. Mant 등, C.R.C. Press (1991)에서 기술된 것과 같은 잘 알려진 기술, 그리고 Symphony (Protein Technologies, Inc)와 같은 펩타이드 합성기를 이용하여 화학적으로 합성되고 정제될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 기술에 의해 즉, 펩타이드를 암호화 하는 뉴클레오타이드 서열이 적절한 발현 벡터, 예를 들어 E. coli나 효모 발현벡터에 삽입되어, 각각의 숙주 세포에서 발현되고, 잘 알려진 기술로 정제될 수 있다.

펩타이드 길항제는 증진된 장의 투과도를 일으키는 위장관계의 염증의 치료에 항-염증제로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩타이드 길항제는 예를 들어, 단백질을 손실시키는 장병증을 유발하는 장의 상태의 치료에 유용하다. 단백질을 손실시키는 장병증은 다음의 결과로 일어날 수 있다.

예를 들어, *C. difficile* 감염, 소장결장염, 이질, 바이러스성 위장염, 기생충 감염, 세균의 과다증식, 회플병과 같은 감염;

예를 들어, 위염, 위암, 교원성 대장염, 염증성 대장질환과 같은 점막의 미란이나 궤양을 갖는 질환;

예를 들어, 선천성 장림프관 확장증, 유육종증 림프종, 장간막 결핵, 그리고 포탄(Fotan's)의 수술법에 의한 선천성 심장병의 외과적 치료 후와 같은 림프관 폐색의 특징을 갖는 질환;

예를 들어, 메네트리에 병, 복강질환, 호산구성 위장염과 같은 궤양이 없는 점막질환;

예를 들어, 전신성 홍반성 루푸스 혹은 일차적으로 우유에 대한 음식 알레르기(*Pediatric Gastrointestinal Disease Pathophysiology Diagnosis Management*, Eds. Wille 등, Saunders Co. (1993), 536-543쪽의 표 40-2 를 참조하라. 그것은 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합된다.)같은 면역질환.

따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 그러한 치료, 즉 약학적으로 유효한 용량의 조놀린의 펩타이드 길항제를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 위장관 치료의 방법에 관한 것이다. 여기서 상기 펩타이드 길항제는 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 로 구성되는 그룹에서 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 여기에서 상기 펩타이드 길항제는 상기 개체의 장에 있는 ZOT 수용체에 결합하지만, 상기 소장의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는다.

마지막으로, 펩타이드 길항제는 소장으로의 수송을 위하여 경구 투여 조성물로 투여될 수 있다. 그러한 소장으로의 운반을 위한 경구 투여 조성물은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있고, 일반적으로 위 저항성 정제나 캡슐들로 이루어져 있다 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., Eds. Osol, Mack Publishing Co., Chapter 89 (1980); Digenis 등,

J. Pharm. Sci., 83:915-921 (1994); Vantini 등, *Clicica Terapeutica*, 145:445-451 (1993); Yoshitomi 등, *Chem. Pharm. Bull.*, 40:1902-1905 (1992); Thoma 등, *Pharmazie*, 46:331-336 (1991); Morishita 등, *Drug Design and Delivery*, 7:309-319 (1991); and Lin 등, *Pharmaceutical Res.*, 8:919-924 (1991); 이것들의 각각은 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 통합된다.).

정제는 예를 들어, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 혹은 셀룰로오스 아세테이트 테레프탈레이트 같은 물질의 첨가로 위저항성 있게 제조된다.

캡셀은 고형제제인데, 여기서 펩타이드 길항제는 경질의 혹은 연질의 젤라틴의 가용성 용기나 쉘에 봉합된다. 캡셀의 제조에 사용되는 젤라틴은 콜라겐 물질로부터 가수분해에 의해 얻어진다. 두 가지 유형의 젤라틴이 있다. 유형 A는 돼지 가죽을 산처리 함으로써 유도되고, 유형 B는 동물의 뼈나 가죽을 알칼리처리 함으로써 얻어진다. 경질의 젤라틴 캡셀의 사용은 단독의 펩타이드 길항제를 처방하거나 개개의 주체를 위한 최상의 정확한 용량을 투여시 그것들의 조합을 처방시 선택된다. 경질의 젤라틴 캡셀은 한 부분이 다른 한 부분의 위를 미끄러지듯이 덮는 형태의 두 부분으로 이루어져서, 완전히 펩타이드 길항제를 감싸게 된다. 이러한 캡셀은 펩타이드 길항제 혹은 펩타이드를 함유하는 위 저항성 비드에 의해 캡셀의 더 긴쪽 부분에 채워지고, 그리고 나서 캡에 미끄러진다. 경질 젤라틴 캡셀은 대개 젤라틴, FD&C 착색제, 그리고 때로는 이산화 티타늄과 같은 불투명화제(opacifying agent)로 만들어진다. 미국약전(USP)은 제조시의 분해를 막기 위해 젤라틴이 이산화황을 0.15%(W/V)함유하는 것을 허용한다.

본 발명의 상황에서, 소장으로의 약물 수송을 위한 경구투여 조성물은 또한 위에 있는 위액에 의해 펩타이드 길항제가 현저히 불활성화되는 것을 막고, 그럼으로써 펩타이드 길항제가 활성형으로 소장에 도달하도록 허용하는 액체 완충제를 함유하는 액체 조성물을 포함한다. 본 발명에 이용될 수 있는 그러한 액체 완충제의 예로는 중탄산 완충제가 포함된다(pH 5.5에서 8.7, 바람직하게는 약 pH 7.4).

경구 투여 조성물이 액체 조성물일 때, 안정성 문제를 최소화하기 위해서 투여 직전에 제조되는 것이 바람직하다. 이런 경우, 그 액체 조성물은 동결건조된 펩타이드 길항제를 액체의 완충제에 용해시킴으로써 제조될 수 있다.

펩타이드 길항제는 뇌-혈액 관문의 붕괴를 막는데 이용될 수 있다. 그래서, 본 발명의 펩타이드 길항제는 예를 들어, 뇌-혈액 관문의 붕괴와 연관된 상태의 치료에 유용하다. 그러한 상태의 예에는 삼투성 손상, 예를 들어 뇌경색, 뇌졸중, 혹은 뇌 부종; 고혈압; 이산화탄소; 경련성 발작; 화학적 독소; 요독증 (신기능 부전); 뇌막염, 뇌염, 뇌척수염, 예를 들어 감염(바이러스성(SRV, HIV, 등) 혹은 세균성(결핵균, 인플루엔자 간균, 수막간균, 등))이나 알레르기성; 종양; 외상성 뇌 손상; 방사선 뇌 손상; 미숙(immaturity) 그리고 핵황달; 탈수조성 질환, 예를 들어 다발성 경화증 이나 길리안-바레 증후군이 있다.

따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 뇌-혈액 관문의 붕괴와 연관된 상태의 치료를 위해 조놀린의 펩타이드 길항제의 약학적으로 유효한 용량을 투여하는 것으로 이루어지는 치료방법에 관한 것이다. 여기서 상기 펩타이드 길항제는 아미노산 서열 SEQ ID NO:35로 구성되고, 상기 펩타이드 길항제는 상기 주체의 뇌에 있는 ZOT수용체와 결합하나 상기 뇌의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는다.

마지막으로, 펩타이드 길항제는 혈액으로의 수송을 위해 정맥투여 조성물으로써 투여될 수 있다. 그러한 조성물은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있고, 조성물은 일반적으로 생리학적 희석제, 예를 들어 증류수, 혹은 0.9%(W/V) NaCl을 포함한다.

펩타이드 길항제의 약학적으로 유효한 용량은 본 발명에 중요하지 않고 치료받는 주체의 나이, 체중 그리고 성별 뿐만 아니라 질병이나 치료되어지고 있는 상태에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 위장관계 염증을 막기 위해, 혹은 뇌-혈액 관문의 붕괴를 막기 위해, 예를 들면 조놀린의 생물학적 활성을 억제하기 위해 본 발명에서 쓰이는 펩타이드 길항제의 용량은 약 7.5×10^{-6} M 에서 7.5×10^{-3} M 이고, 바람직하게는 약 7.5×10^{-6} M 에서 7.5×10^{-4} M의 범위이다. 예를 들어 장이나 혈액에서 그러한 최종 농도를 이루기 위해, 본 발명의 단일 경구 투여 조성물에서의 펩타이드 길항제의 용량은 일반적으로 약 1.0 μ g 에서 1000 μ g 이고 바람직하게는 약 1.0 μ g 에서 100 μ g이다.

펩타이드 길항제는 또한 당해 기술분야에 잘 알려진 기술을 이용하여 다클론성 이나 단클론성의 항체를 얻을 수 있는 면역원으로서 이용될 수 있다(Abrams, *Methods Enzymol.*, 121:107-119 (1986)). 이러한 항체들은 반대로 신체 조직이나 체액에 있는 조놀린의 분석이나, 조놀린의 친화도-정제 혹은 선택적으로 조놀린에 결합하여 조놀린의 활성을 억제하는 것, 예를 들어 위장관계의 염증이나 뇌-혈액 관문의 붕괴를 억제하는데 사용되어질 수 있다.

다음의 실시예들은 예시적 목적만을 위해 제공되는 것이며, 결코 본 발명의 범위를 제한하기 위해 의도된 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 CaCo2 세포의 단일층의 조직 저항(Rt)에 대한 토끼의 장으로부터 정제된 조눌린의 효과(■)를 다양한 음의 대조군 (Q-세파로오스로부터의 분획 2 (◇); 분획 3 (●); 분획 4 (▲); 그리고 분획 5 (□))과 비교하면서 보여준다.

도 2는 우상 챔버에 탑재된 토끼 회장의 조직 저항(Rt)에 대한 토끼의 장으로부터 정제된 조눌린의 효과(■)를 음의 대조군 (□)과 비교하면서 보여준다.

도 3은 우상 챔버에 탑재된 토끼 회장의 조직 저항(Rt)에 대한 토끼의 장으로부터 정제된 조눌린의 효과(■)를 음의 대조군 (조눌린+ 항-ZOT 항체 (□); 조눌린+ 항-tau 항체 (△); 그리고 tau (▲))과 비교하면서 보여준다.

도 4a와 도 4b는 우상 챔버에 탑재된 레수스 원숭이(Rhesus monkey)의 공장(도 4a)과 회장(도 4b)의 조직 저항성에 대한 인간의 뇌(▲), 인간의 장(●) 또는 인간의 심장(○)중 어느 하나로 부터 정제된 조눌린의 효과를 음의 대조군(□)과 비교하면서 보여준다.

도 5a와 5b는 우상 챔버에 탑재된 토끼의 공장(도 5a)과 토끼의 회장(도 5b)의 조직 저항(Rt)에 대한 인간의 심장(▲), 인간의 뇌(□)로부터 정제된 조눌린의 효과를 음의 대조군(■)과 비교하면서 보여준다.

도 6은 토끼와 다양한 인체조직으로부터 정제된 조눌린의 N-말단 서열의 비교를 보여준다.

도 7은 다양한 인체조직과 IgM 중사슬로부터 정제된 조눌린의 N-말단 서열과 ZOT의 생물학적으로 활성이 있는 단편(아미노산 288-399)의 N-말단 서열의 비교를 보여준다.

도 8은 ZOT, 조눌린_i, 조눌린_h를 각각 단독으로(검정 막대), 또는 펩타이드 길항제 FZI/0과 조합하여(흰 막대), 또는 FZI/1과 조합하여(빛금친 막대), 우상 챔버에 탑재된 토끼회장의 조직저항에 대한 각각의 효과를 음의 대조군과 비교하여 나타낸다. N은 3-5와 같고, *는 $p < 0.01$ 와 같다.

실시예

(실시예 1)

ZOT의 정제

플라스미드 pZ14로 형질전환된, *V. cholerae*균주 CVD(Michalski 등, *Infect. Immun.*, G1:4462-4468 (1993)를 배양한 후에 얻어지는 상층액 5000ml를 10KDa미만의 분자량을 거르는 라미나 플라우 필터를 사용하여 1000배 농축하였다.

Vibrio cholerae zot유전자를 함유하는 pZ14의 구조는 상기 WO 96/37196에 자세히 기술되어 있다. 그리고 나서, 결과 상층액은 8.0%(W/V) SDS-PAGE처리를 하였다. 단백질 밴드는 SDS-PAGE 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색함으로써 검출할 수 있다. ZOT에 해당하는 단백질 밴드는 플라스미드 pTTQ181(Amersham, Arlington Heights, IL)로 형질전환되고 같은 방식으로 처리된 CVD110균주로부터의 대조 상층액과 비교할 때 검출할 수 없었다. 그러므로 zot유전자가 pZ14에서 매우 유도적이고 강한 *tac* 프로모터(promoter)뒤에 위치해 있더라도 100배 농축된 pZ14 상층액에 있는 단백질의 정도는 쿠마시로 염색한 SDS-PAGE겔에 의해서 여전히 검색할 수 없었다.

A. MBP - ZOT

생성되는 ZOT의 양을 늘리기 위해, zot유전자는 프레임상에서(in frame) 말토오스 결합 단백질(이하 "MBP")유전자와 융합되어 MBP-ZOT융합 단백질을 생성시킨다.

MBP 벡터 pMAL-c2 (Biolab)는 zot유전자를 *E. coli*의 *malE* 유전자에 융합함으로써 ZOT를 발현하고 정제하는데 사용된다. 이런 구조물은 강력하고 유도가능한 *tac* 프로모터와 클론된 zot유전자의 고도의 발현을 주는 *malE* 번역 개시 신호를 사용한다. 벡터 pMAL-c2는 *malE*시그널 서열이 제거되어 있다. 시그널 서열은 융합단백질의 세포질 발현에 이르게 한다. MBP의 친화크로마토그래피는 융합단백질의 분리를 촉진시키기 위해 사용된다.

보다 상세하게는, 벡터 pMAL-c2는 *EcoRI*(*malE* 유전자의 3'말단을 자른다.)로 선형화 되고, 클레노우 프래그먼트(Klenow fragment)로 채워지고 *Xba* I (pMAL-c2 폴리링커에 단독 부위를 갖는다)으로 분해된다. ZOT를 암호화하는 *orf*는 플라스미드 pBB241로부터 서브클론된다.(Baudry 등, *Infect. Immun.*, 60:428-434 (1992)). 플라스미드 pBB241은 *Bss*III로 분해되었고, 클레노우 프래그먼트로 채워졌고, *Xba*I으로 분해되었다. 그리고 나서, 블런트(blunt)-*Xba*I조각은 pMAL-c2로 서브클론되어서 플라스미드 pLC10-c가 되었다. 두개의 삽입물과 벡터는 블런트 말단과 스틱키 말단을 갖기 때문에 삽입물의 5'말단과 융합된 *malE*의 3'말단으로 정확한 방향이 얻어질 수 있었다. pLC10-c는 그리고 나서 *E. coli* 균주 DH5α로 일렉트로포레이트되었다. pBB242에서 *Bss*III의 제한 부위는 *zot orf*내에 있다. 따라서, ZOT의 아미노산 1-8은 MBP-ZOT 융합 단백질에서 빠져있다.

MBP-ZOT 융합 단백질을 정제하기 위해서, 0.2%(W/V)의 포도당과 100μg의 앰피실린을 함유하는 루리아 베르타니 브로스 10ml에 pLC10-c를 함유하는 단일 콜로니를 접종하고, 밤새 37°C에서 진탕 배양하였다. 그 배양물은 같은 신선한 배지 1.0ml에서 1:100으로 희석한 뒤 37°C에서 진탕하면서 배양하여 약 1.0×10^8 cells/ml가 되었다. 0.2mM IPTG가 MBP-ZOT 발현을 유도하도록 첨가되었고, 그 배양물은 3시간을 추가하여 37°C에서 배양되었다. 세균은 펠렛화 되었고 20mM Tris-HCl, 0.2M의 NaCl, 1.0mM의 EDTA, 10mM의 2-ME, 1.0mM NaN_3 을 포함하는 20ml의 빙냉 칼럼완충액에 재현탁되었다. 그 세균 현탁액은 프렌치 프레스 처리로 분해되었고, 4°C, 13,000 x g 에서 30분 동안 회전시켰다. 상층액을 취해서 칼럼 완충액으로 1:5로 희석하고, 미리 평형을 맞춘 아밀로오스 레진(Biolabs, MBP-fusion purification system)의 1 x 10칼럼에 로딩하였다. 칼럼을 5배의 칼럼 완충액으로 세척한 후, MBP-ZOT 융합 단백질은 칼럼 완충액의 10mM 말토오스 10ml를 로딩함으로써 용출되었다. 배양물 1.0ml의 전형적인 수득은 2-3mg의 단백질이었다.

정제된 MBP-ZOT 융합 단백질의 MBP 융합 부분은 MBP-ZOT 20μg당 인자 Xa 프로테아제(Biolabs) 1.0μg을 사용하여 분리되었다. 인자 Xa 프로테아제는 ZOT의 아미노 말단 바로 앞을 절단한다. 그리하여 얻어진 ZOT 단백질은 8.0%(W/V)의 SDS-PAGE 겔로 처리되었고, 전기분리 챔버(Schleicher & Schuell, Keene, NH)를 사용하여 겔로부터 전기용출되었다.

우성 챔버에서 시험시, 결과물 정제된 ZOT는 7.5×10^{-8} M의 ED_{50} 을 갖고, 용량에 의존하는 R_t 의 감소를 유도했다.

B. 6 xHis - ZOT

zot 유전자는 pBB241 플라스미드(상기 Baudry 등) DNA를 주형으로 해서 Deep Vent 폴리머레이즈(New England Biolabs)로 PCR에 의하여 증폭되었다. 사용된 정프라이머와 역프라이머들은 각각 5'-CGGGATCCCGTATGAGTATCTTT-3' (SEQ ID NO:39); 그리고 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (SEQ ID NO:40)이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 5'꼬리는 *Bam*HI와 *Hind*III 제한 부위를 각각 갖는다. 그 결과물인 앰플리콘(1.2kb)는 8.0%(w/v) 아가로오스 겔 전기영동에 의해 분석되었고, Xtreme 스피ن 칼럼(Pierce)을 이용하여 염형태와 유리상태의 뉴클레오타이드로부터 정제되었다. 위에서 언급한 두 개의 제한효소는 정제된 앰플리콘을 분해하는데 사용되었고, 그 결과물인 분해된 앰플리콘은, 플라스미드 pSU113을 얻기 위해 미리 *Bam*HI와 *Hind*III로 분해된 벡터 pQE30(QuiaGen)에 삽입되었다. pQE30은 6 폴리-히스티딘 꼬리(6xHis)를 갖는 재조합 단백질의 고도의 발현을 제공하는 발현 벡터이다. 플라스미드 pSU113의 발현 생산물은 따라서 6xHis-ZOT 융합 단백질이다. pSU113은 그리고 나서 *E. coli* DH5α로 형질전환 되었다.

6xHis-ZOT 융합 단백질을 정제하기 위해, 결과물인 형질전환된 *E. coli*는 37°C, 2.0%(w/v) 포도당, 25μg/ml의 가나마이신 그리고 200μg/ml의 앰피실린을 포함하는 루리아 베르타니 브로스(Luria Bertani broth) 150ml에서 A_{600} 이 약 1.10이 될 때까지 밤새 배양되었다. 다음은, 75ml의 오버나이트 배양물이 1000ml의 2.0%(w/v) 포도당, 가나마이신 25μg/ml 그리고 앰피실린 200μg/ml를 포함하는 루리아 베르타니 브로스 1000ml에 첨가되어 A_{600} 이 약 0.7-0.9가 될 때까지 격렬하게 진탕하면서 37°C에서 약 3시간 동안 배양되었다. 그리고 나서, IPTG를 최종 농도가 2.0mM이 되게 첨가한 후, 37°C에서 약 5시간 동안 배양하였다. 다음, 세포들을 4000 x ddg 에서 20분 동안 원심분리에 의해 거둬들였고, 세포들은 6.0M GuHCl, 0.1M 인산 나트륨, 그리고 0.01M Tris-HCl(pH 8.0)을 포함하는 완충액 A 5.0ml/g 에 재현탁하고, 한시간 동안 실온에서 교반하였다. 그리고 나서 그 혼합물을 10,000 x g, 4°C 에서 30분 동안 원심분리 하였고, 그 결과물인 상층액에 SUPERFLOW 레진(QIAGEN)의 50% 슬러리 4.0-5.0ml/g 를 넣고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 결과물인 레진을 1.6 x 8.0 칼럼에 로딩하였다. 그리고 나서 그 칼럼을 완충액 A와 8.0M 유레아, 0.1M 인산 나트륨, 그리고 0.01M

Tris-HCl(pH8.0)을 포함하는 완충액 B, 그리고 8.0M 유레아, 0.1M 인산 나트륨, 그리고 0.01M Tris-HCl(pH6.3)을 포함하는 완충액 C로 연속적으로 세척하였다. 각각의 세척은 A_{600} 이 0.01보다 작아질 때까지 행하였다. 6xHis-ZOT 융합 단백질은 250mM의 이미다졸을 함유하는 완충액 C 20ml를 사용하여 칼럼으로부터 용출하였다. 그리고 나서, 6xHis-ZOT 융합 단백질을 포함하는 부분은 Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**:404 (1964)에 기술된 과정을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 표시하였고, 코마시 블루로 염색 했다. 6xHis-ZOT 융합 단백질을 포함하는 부분은 8.0M 유레아로 투석하였고, PBS에서 100배로 희석하였다. 다음으로, SUPERFLOW 레진 50% 슬러리 4.0ml가 첨가 하였고, 실온에서 2시간 동안 교반하였고, 그 결과물인 레진은 1.6 x 8.0 칼럼에 로딩하였다. 그리고 나서, 그 칼럼을 PBS 50ml로 세척 하였다. 6xHis-ZOT 융합 단백질은 250mM의 이미다졸을 함유하는 PBS 10ml로 칼럼으로부터 용출하였다. 그 결과물인 용출물은 PBS에 대해 투석하였고 6xHis-ZOT 융합 단백질은 SDS-PAGE 겔로 표시하였다.

(실시예 2)

친화도-정제된 안티 - ZOT 항체의 생산

특정한 항혈청을 얻기 위해, 키메라 글루타치온 S-transferase (GST)-ZOT 단백질이 발현되고 정제되었다.

더 자세히 말하면, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 플라스미드 pBB241(상기 Baudry 등)을 주형로 사용하여 폴리머레이즈 체인 반응(PCR)에 의해 zot orf를 증폭하는데 사용되었다. 정방향의 프라이머(TCATCACGGC, GCGCCAGG, SEQ ID NO:25)는 zot orf의 15-32 뉴클레오타이드에 해당하고, 역방향의 프라이머(GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT, SEQ ID NO:26)은 ctxA orf의 5'말단에 해당한다. 그러므로, ZOT의 아미노산 1-5는 결과물인 융합 단백질에서 빠져 있다. 그 증폭 생산물을 pGEX-2T(Pharmacia, Milwaukee, WI)의 GST유전자 말단에 위치한 폴리링크(*Sma*I site)에 삽입시켰다. pGEX-2T는 *Schistosoma japonicum*의 GST로 융합 단백질로서 증식된 유전자를 발현하는 융합 단백질 발현 벡터이다. 융합 유전자는 tac 프로모터의 견제하에 있다. IPTG의 유도하에 디레프레션(derepression)이 일어나고, GST 융합 단백질이 발현된다.

결과물인 재조합 플라스미드, 즉 pLC11은 E.coli DH5a에 일렉트로포레이트 되었다. GST-ZOT 융합 단백질을 정제하기 위해 100µg/ml의 암피실린을 함유하는 루리아 베를타르니 브로쓰 10ml에 pLC11을 함유하는 단일 콜로니를 접종하였고, 37°C에서 교반하면서 밤새 배양하였다. 그 배양물은 같은 신선한 배지 1.0ml에 1:100으로 희석하였고, 37°C에서 교반하면서 약 1.0×10^8 cells/ml가 되도록 배양하였다. 0.2mM의 IPTG가 첨가되어 GST-ZOT 발현을 유도하였고, 배양물은 37°C에서 추가로 3시간 동안 더 배양하였다. 세균은 그때 펠렛화 되었고, 얼음처럼 차가운 PBS (pH 7.4) 20ml에 다시 현탁하였고, 프렌치 프레스 방법으로 분해하였다. GST-ZOT 융합 단백질은 세균 펠렛 부분과 같이 침전하기 때문에 이러한 상태에서 불용성이다. 그러므로, 펠렛을 0.00625M Tris-HCl(pH 6.8), 0.2M 2-ME, 2.0% (w/v) 브로모페놀 블루, 10% (v/v) 글리세롤을 포함하는 Laemli lysis 완충액에 다시 현탁시켰고, 8.0%(w/v) PAGE-SDS 겔에 전기영동 하였고, 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. 융합 단백질에 해당하는 약 70kDa의 밴드(GST 26kDa + ZOT 44kDa)는 전기분리 챔버를 사용하여 겔로부터 전기용출되었다(Schleicher & Schuell, Keene, NH).

10µg의 결과물인 용출된 단백질(10-20µg)을 같은 부피의 Freund의 완전한 보조약과 함께 혼합하여 토끼에게 주사하였다. 두개의 효능 촉진제를 Freund의 불완전한 보조제와 같이 4주와 8주 후에 투여하였다. 한 달 후에, 토끼는 출혈을 일으켰다.

특정 항체의 생산을 결정하기 위해, 10^{-10} M의 ZOT 를 두개의 융합 단백질 MBP-ZOT와 GST-ZOT와 함께 나일론막으로 옮기고, 토끼의 항혈청으로 1:5000 으로 희석하여 4°C에서 가벼운 교반을 행하면서 밤새 배양하였다. 필터를 15분 동안 4번 0.05%(v/v)의 Tween 20 (이하 "PBS-T")를 포함하는 PBS로 세척하였고, 서양고추냉이 퍼옥시다제에 접합된 염소 항-토끼 IgG의 1:30,000 희석으로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 필터를 15분 동안 4번 0.1%(v/v) Tween을 함유한 PBS로 세척하였고, 면역반응성의 밴드는 증진된 케미루미네센스(chemiluminescence)(Amersham)를 사용하여 검출하였다.

면역 블롯에서 토끼의 항혈청은 MBP-ZOT, GST-ZOT 뿐 아니라 ZOT를 인식한다고 밝혀졌다. 그러나 MBP 음의 대조군에서는 그렇지 않다.

게다가, 적절한 항-ZOT 항체의 생산을 확실히 하기 위해서, 중화 실험이 우싱 챔버상에서 행해졌다. pZ14 상층액으로 37°C에서 60분 동안 미리 배양했을 때, ZOT-특정 항혈청(1:100 희석)은 우싱 챔버상에 탑재된 토끼 회장에 ZOT에 의해 유도된 Rt의 감소를 완전히 중화할 수 있었다.

다음으로, 항-ZOT 항체는 MBP-ZOT 친화 칼럼을 사용하여 친화도-정제를 하였다. 보다 상세하게는, 실시예 1에서 기술한 것 같이 얻어진, 정제된 MBP-ZOT를 실온에서 밤새 미리 활성화된 겔에 고정시킴으로써 MBP-ZOT 친화 칼럼을 제조한다. (Aminolink, Pierce). 칼럼은 PBS 로 세척되었고, 그리고 나서 항-ZOT 토끼 항혈청 2.0ml로 로딩되었다. 실온에서 90분 배양한 후에, 칼럼을 PBS 14 ml로 세척하였고, 특정 항-ZOT항체를 50mM 글리세린(pH 2.5), 150mM NaCl 그리고, 0.1%(v/v) 트리톤을 함유하는 용액 4.0ml로 칼럼으로부터 용출하였다. 1.0ml의 용출된 부분의 pH는 즉시 1.0N NaOH로 중화하였다.

(실시예 3)

조눌린의 정제

1997년 2월 20일에 출원한 미국 특허출원 번호 08/803,364의 관찰, 즉 ZOT는 특정 상피 표면 수용체와 반응하며, tj의 투과도를 조절하는 복잡한 세포내의 일련의 사건들의 활성화가 뒤따른다는 것에 근거하여, ZOT가 포유류의 tj의 생리학적 조절자의 효과를 모방할 수도 있다는 것을 본 발명에서 가정하였다. 1997년 5월 21일에 출원된 미국 특허출원 번호 08/859,931에서는 ZOT와 그것의 생리학적 아날로그(조눌린)은 기능적으로, 면역학적으로 관련이 있다고 가정하였다. 그러므로, 거기에서 기술한 바와 같이, 친화도-정제된 항-ZOT 항체와 우싱 챔버 분석이 조합되어 다양한 토끼와 인간의 조직의 조눌린을 검색하는데 사용되었다.

A. 토끼 조직

우선적으로, 조눌린이 토끼의 장으로부터 정제되었다. 조직을 PBS에서 파쇄하여 붕괴시켰다. 결과물인 세포물을 30분 동안 40,000rpm에서 원심분리 하였고, 상층액을 수거하여 동결건조 시켰다. 결과물인 동결건조물을 바로 PBS(10:1 (v/v))으로 원상태로 돌렸고, 0.45mm 막 필터로 거른 후, Sephadex G-50 크로마토그래피 칼럼에 로딩하였고, PBS로 용출하였다. 그리고 나서 칼럼으로부터 얻어진 2.0ml부분을 위의 실시예 2에서 기술된 것 같이 하여 얻어진 친화도-정제된 항-ZOT 항체를 사용하여 표준 Western immunoblotting을 행하였다.

항-ZOT 항체가 결합하는 부분인, 양성 부분을 합하여 동결건조 하였고, PBS(1:1 (v/v))에서 재구성 하였다. 그리고 Q-Sepharose칼럼을 통하여 염 구배 크로마토그래피를 행하였다. 염 구배는 50mM Tris완충액(pH 8.0)에서 0-100%(w/v) NaCl이었다. 다섯 개의 20ml부분이 수집되었고 위의 실시예 2에서 기술한 바와 같이 얻어진 친화도-정제된 항-ZOT 항체를 사용하여 표준 Western immunoblotting을 행하였다. 분획 1(20%(w/v) NaCl)이 Western immunoblotting 분석에서 양성으로 나타난 유일한 분획이었다.

Q-Sepharose칼럼에서 얻어진 분획을 우싱 챔버에서 CaCo2 단일층과 토끼의 소장 모두에 대한 조직 저항 효과를 위해 시험하였다.

더 자세하게는, CaCo2세포들을 95% O₂/5% CO₂의 습기찬 공기와 37°C하에서, 10% (v/v) 우태아혈청, 40µg/l 페니실린 그리고 90µg/l 스트렙토마이신을 함유하는 Dulbecco의 변형된 Eagle's medium 에서 배양하였다. 세포들이 70-80%의 함류에 도달했을 때, 세포들을 매 5일 마다 트립신 처리를 한 후, 1:5의 표면 비율로 계대배양 하였다. 이 연구에서 사용되는 세포의 계대 번호는 15에서 30사이로 다양하다.

CaCo2단일층은 폴리스티렌 고리(6.4mm지름, Transwell Coaster)에 견고하게 부착된 조직 배양 처리된 폴리카보네이트 필터에 함류하여 배양되었다(1:2.5 표면 비율로 평판배양한 후 12-14일). 필터는 변형된 우싱 챔버의 세로살(serosal)부분과 점막 부분을 가르는 꼭 맞는 삽입체에 놓여졌고, 실험은 우싱 챔버에서 토끼의 장에 대하여 Fasano 등, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246(1991)에 기술된 바와 같이 행해졌다. 결과는 도 1과 같다.

도 1에서 보여지는 바와 같이, 조눌린-함유 부분은 조눌린이 없는 부분에 비하여 CaCo2단일층의 저항의 현저한 감소를 유도했다.

다음으로, 경추탈골법으로 죽인 2-3kg되는 뉴질랜드 흰 토끼 수컷 성체의 회장을 사용하여 우성 챔버 분석법을 실행하였다. 회장의 20cm부분을 절단하여 장 내용물을 씻어 내고 장간막 면을 따라 열고서, 근육층과 세로살(serosal)층을 벗겨낸다. 그리하여 제조된 8층의 점막을 루사이트 우성 챔버(1.12cm 구멍)에 탑재하고, 전압 클램프 장치(EVC 4000WPI, Sarasota, FL)에 연결하고 53mM NaCl, 5.0mM KCl, 30.5mM 만니톨, 1.69mM Na₂HPO₄, 0.3mM NaH₂PO₄, 1.25mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂, 그리고 25mM NaHCO₃를 포함하는 새로 제조된 링거 용액에 담겼다. 담근 용액은 항온 순환 펌프에 연결된 물-도포 저장소(water-jacketed reservoir)로 37°C를 유지하였고 95% O₂/5% CO₂로 유지하였다.

토끼의 장으로부터 정제된 조놀린 100μl를 점막쪽에 넣었다. 현저한 차이가 매 10분마다 측정되었고, 단락 전류(Isc)과 조직 저항(Rt)이 상기 Fasano 등에서 기술한 바와 같이 계산되었다. 조직 다양성 때문에, ΔRt (시간 x에서의 Rt)-(시간 0에서의 Rt)를 계산 하였다. 결과는 도 2에서와 같다.

도 2에서 보여지는 바와 같이, 조놀린 함유 부분은 조놀린이 없는 부분에 비할 때, 토끼 작은 창자의 저항성의 현저한 감소를 유도했다. 이런 효과는 일단 조놀린이 저장소에서 제거되면 완전히 가역적이었다.

조놀린-양성 부분을 8.0%(w/v) SDS-PAGE를 행한 뒤, 항-ZOT 항체를 사용하여 Western immunoblotting을 행하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질 밴드를 100ml의 (3-[cyclohexylamino]-1 propansulfonic acid) 10x, 메탄올 100ml, 증류수 800ml를 포함하는 CAPS 완충용액을 사용하여 PVDF 필터를 통과시켰다. Western immunoblotting에 의해 검출된 단일 밴드로 정렬된 단백질은 명백하게 약 47kDa의 분자량을 갖는다. 이 밴드를 PVDF필터로 분리한 후, Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus Model 494를 이용하여, Hunkapiller, *In: Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, 11-12장, Human Press, 315-334쪽 (1985)에 기술된 바와 같이 N-말단 시퀀싱을 행하였다. 토끼 장으로부터 정제된 조놀린의 N-말단 서열은 SEQ ID NO:27 와 같다.

토끼 조놀린 N-말단 서열은 BLAST 연구 분석에 의해 다른 단백질 서열과 비교하였다. 이런 분석 결과는 토끼의 N-말단 서열이 Homo-sapiens의 타우(tau) 단백질의 N-말단과 85% 동일하고 100% 비슷하다는 것을 보여줬다.

결론적으로, 토끼의 조놀린과 tau가 같은 모양인지를 결정하기 위해 교차-중화 실험을 우성 챔버에서 행하였다. 보다 상세하게는, 10μl/ml의 토끼 조놀린을 항-tau 항체(희석 1:10)(sigma)로 37°C에서 60분 동안 미리 배양하였거나 미처리된 토끼 회장의 점막 쪽에 첨가하였다. 항-ZOT 항체로 미리 배양된 토끼 조놀린 10μl/ml와 정제된 tau (Sigma) 0.4μg/ml를 대조군으로 사용하였다. 결과는 도 3에서와 같다.

도 3에서 보여지는 바와 같이, 일단 단백질이 우성 챔버에서 제거되면, 쉽게 가역적으로 되는 전형적인 조직 저항의 감소를 유도했다. 이러한 활성은 항-ZOT 항체의 전처리로 완전히 중화되었지만, 항-tau 항체의 전처리로는 그렇지 않았다. 반면에, tau단백질에 노출된 조직에서의 저항성에는 현저한 효과가 없었다.

토끼 조놀린은 또한 다양한 토끼의 장, 즉 원위 공장, 몸쪽 공장, 회장, 맹장, 그리고 결장 뿐 아니라, 다양한 다른 토끼 조직, 즉 토끼 심장, 뇌, 근육, 위, 비장, 폐, 신장에서도 검출되었다. 즉 이러한 토끼 조직들을 위에서 토의한 바와 같이 토끼의 장과 같은 방법으로 처리하고, 8.0% (w/v) SDS-PAGE를 행하고, 위의 실시예 2에서 기술한 바와 같이 하여 얻어진 친화도-정제된 항-ZOT 항체를 사용하여 Western immunoblotting을 행하였을 때, 약 47kDa 크기의 단일 밴드가 시험된 모든 조직에서 얻어졌다.

B. 인간 조직

조놀린을 또한 장, 심장, 그리고 뇌를 포함하는 여러 인간 조직으로부터 또한 정제하였다. 태아와 성인의 조직 모두를 사용하였다. 조직들은 BPS에서 분쇄하여 붕괴시켰다. 결과물인 세포 제조물을 40,000rpm에서 30분 동안 원심분리 하고, 상층액을 수거하여 동결건조 하였다. 결과물인 동결건조된 산물을 PBS(10:1(v/v))에서 원상대로 돌렸고, 0.45mm 막 필터를 통해 여과하고, Sephadex크로마토그래피 칼럼에 로딩하고, PBS로 용출하였다. 그리고 나서, 칼럼으로부터 얻어진 2.0ml분획을 위의 실시예 2에서 기술한 바와 같이 하여 얻어진 친화도-정제된 항-ZOT 항체를 이용하여 표준 Western immunoblotting 하였다.

양성 분획, 즉 항-ZOT 항체가 결합한 분획을 모아, 동결건조하고, PBS(1:1(v/v))에서 원상대로 돌리고, Q-Sepharose 칼럼을 통해서 염 구배 크로마토그래피를 실시하였다. 염 구배는 50mM Tris 완충용액(pH 7.4)에서 0-100%(v/v)NaCl

이었다. 5개의 20ml분획을 모아서 위의 실시예 2에서 기술한 바와 같이 하여 얻어진 친화도-정제된 항-ZOT 항체를 이용하여 표준 Western immunoblotting을 실시하였다. 분획 1(20% (w/v) NaCl)은 Western immunoblot 분석에서 47kDa 크기의 단일 밴드를 보여 주었다. 분획 2(40% (w/v) NaCl)은 Western immunoblot 분석에서 35kDa와 15kDa 크기의 두 개의 밴드를 보여 주었다. 분획 3(60% (w/v) NaCl)과 분획 4(80% (w/v) NaCl)는 단지 35kDa와 15kDa의 밴드를 보였다. 이런 결과는 조놀린이 아마도 사용된 인체 조직에 존재하는 프로테아제에 의해 분해되어 전단백질에 비해 분해산물이 보다 높은 염 농도의 칼럼에서 용출된다는 것을 암시한다.

Q-Sepharose 칼럼에서 얻어진 분획 1(인간의 심장, 장 그리고 뇌 조직에서 유래한)과 분획 4(심장 조직에서 유래한)를 우싱 챔버를 이용하여 토끼의 장과 리서스 원숭이의 장 모두에 대한 조직 저항 효과에 대해 시험하였다.

2-3Kg의 성체 수컷 뉴질랜드 흰 토끼, 또는 5-6Kg의 성체 수컷 리서스 원숭이로부터 공장, 회장, 혹은 결장을 포함한 장의 다른 부분을 사용하여 우싱 챔버 분석을 하였다. 동물들을 희생시킨 후에, 공장, 회장 그리고 결장을 포함한 장의 다른 부분을 제거하고, 세척하여 장내용물이 없도록 하고, 장간막 판을 따라 열고, 근육층과 세로살층을 벗겨냈다. 그리하여 제조된 8장의 점막(3개의 공장, 3개의 회장 그리고 2개의 결장)을 루사이트 우싱 챔버(1.12cm² 구멍)에 탑재하고, 전압 클램프 장치(EVC 4000 WPI, Sarasota, FL)에 연결하고, 53mM NaCl, 5.0mM KCl, 30.5mM 만니톨, 1.69mM Na₂HPO₄, 0.3mM NaH₂PO₄, 1.25mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂, 그리고 25mM NaHCO₃를 포함하는 새로 제조된 링거 용액에 담겼다. 담군 용액은 항온 순환 펌프에 연결된 물-도포 저장소(water-jacketed reservoir)로 37°C를 유지하였고 95% O₂/5% CO₂로 유지하였다.

인간 심장에서 정제한 조놀린의 분획 1, 또는 인간 뇌에서 정제한 조놀린의 분획 1, 또는 인간 장에서 정제한 분획 1, 인간 심장에서 정제한 분획 4, 100μl를 점막 쪽에 첨가하였다. 매 10분 마다 전위차(PD)를 관찰하였고, 단락 전류(Isc)와 조직 저항(Rt)을 상기 Fasano 등에서 기술한 바와 같이 계산하였다. 데이터를 도 4a와 도 4b에 Rt로 계산하였다; 그러나 조직 다양성 때문에, ΔRt (시간 x에서의 Rt)-(시간 0에서의 Rt)를 도 5a와 5b에 계산 하였다. 결과는 도 4a와 4b(원숭이 장) 그리고 도 5a와 5b와 같다.

도 4a와 4b에서 보여지는 바와 같이, PBS 음성 대조군과 비교해 볼 때, 인간 심장과 장(분획 1)에서 정제한 조놀린은 원숭이의 장(공장(도 4a)과 회장(도 4b) 모두에)의 저항의 현저한 감소를 유도하였다. 인간의 심장과 장에서 정제한 조놀린을 결장에 시험할 때는 유의있는 변화가 관찰되지 않았다. 도 4a와 도 4b는 또한 인간 뇌(분획 1)에서 정제한 조놀린을 시험했을 때, 원숭이 공장(도 4a)과 회장(도 4b)에 어떠한 유의 있는 효과도 관찰되는 않는다는 것을 보여 준다. 인간의 심장에서 정제한 조놀린의 분획 4는 또한 원숭이의 소장 조직저항의 유의 있는 감소를 유도했다.

도 5a와 도 5b에서 보여지듯이, 토끼의 장을 사용시 비슷한 결과가 보여졌다. 즉, 인간 심장에서 정제한 조놀린(분획 1)은 토끼의 공장(도 5a)과 회장(도 5b) 모두의 조직저항에 유의있는 효과를 보였지만, 결장에는 그렇지 않았다. 도 5a와 도 5b는 또한 인간 뇌에서 정제한 조놀린(분획 1)으로 시험시 토끼의 공장(도 5a)과 토끼의 회장(도 5b)에 유의있는 효과를 관찰할 수 없었음을 보여 준다.

조놀린이 인슐린의 경구 수송을 증가시키는가를 확립하기 위해서, 토끼의 장을 이용한 in vitro 모델 실험을 행하였다. 간략하게는, 성체 수컷 뉴질랜드 흰 토끼(2-3Kg)를 경추탈골법으로 희생시켰다. 토끼의 소장 부분(공장이나 회장)을 제거하고 세척하여 장 내용물을 제거하고, 장간막 판을 따라 열어서, 근육층과 세로살층을 벗겨냈다. 그리하여 제조된 8장의 점막(3개의 공장, 3개의 회장 그리고 2개의 결장)을 루사이트 우싱 챔버(1.12cm² 구멍)에 탑재하고, 전압 클램프 장치(EVC 4000 WPI, Sarasota, FL)에 연결하고, 53mM NaCl, 5.0mM KCl, 30.5mM 만니톨, 1.69mM Na₂HPO₄, 0.3mM NaH₂PO₄, 1.25mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂, 그리고 25mM NaHCO₃를 포함하는 새로 제조된 링거 용액에 담겼다. 담군 용액은 항온 순환 펌프에 연결된 물-도포 저장소(water-jacketed reservoir)로 37°C를 유지하였고 95% O₂/5% CO₂로 유지하였다. 전위차(PD)가 관찰되었고, 단락 전류(Isc)와 조직저항(Rt)을 계산하였다. 일단 조직이 정상상태에 도달하면, 저항에 근거하여 매치한 짝조직을 관강내로 10⁻¹¹M ¹²⁵I-인슐린(Amersham, Arlington Heights, IL; 2.0 μCi=10-12M)에 분획 1의 심장 조놀린 100μl의 존재하에, 또는 단독으로 노출시켰다. 세로살 면의 1.0ml부분과 점막면의 50μl부분을 기준값을 측정하기 위해 즉시 취했다. 세로살 면으로부터의 표본은 100분 동안 20분 간격으로 취했다.

심장 조눌린은 시간-의존적인 방식으로 공장($0.058 \pm 0.003 \text{ fmol/cm}^2 \cdot \text{min}$ vs. $0.12 \pm 0.005 \text{ fmol/cm}^2 \cdot \text{min}$, 각각 조눌린으로 처리된 것 vs 조눌린으로 처리되지 않은 것, $p=0.05$)과 회장 모두에서 인슐린의 장 흡수를 증진시킨다는 것을 알아냈다.

인간의 심장에서 정제된 조눌린의 분획 1, 인간의 장에서 정제된 조눌린의 분획 1, 그리고 인간의 뇌에서 정제된 조눌린의 분획 1을 8.0% (w/v) SDS-PAGE를 행한 후, 위의 실시예 2에서 기술한 바와 같이 하여 얻어진 항-ZOT 항체를 사용하여 Western immunoblotting을 행하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질 밴드를 100ml의 (3-[cyclohexylamino]-1-propansulfonic acid) 10x, 메탄올 100ml, 증류수 800ml를 포함하는 CAPS 완충용액을 사용하여 PVDF 필터를 통과시켰다. Western immunoblotting에 의해 검출된 단일 밴드로 정렬된 단백질은 명백하게 약 47kDa의 분자량을 갖는다. 이 밴드를 PVDF 필터로 분리한 후, Perkin Elmer Applied Biosystems Apparatus Model 494를 이용하여, Hunkapiller, *In: Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, 11-12장, Human Press, 315-334쪽 (1985)에 기술된 바와 같이 N-말단 시퀀싱을 행하였다. 인간의 심장에서 정제된 조눌린의 N-말단 서열은 SEQ ID NO:28 과 같고, 인간의 뇌로부터 정제된 조눌린의 N-말단 서열은 SEQ ID NO:29 와 같고, 인간의 태아의 뇌로부터 정제된 조눌린의 N-말단 서열은 SEQ ID NO:36 과 같다.

성인의 장에서 정제한 조눌린(SEQ ID NO:31)의 N-말단 서열상의 첫 9개의 아미노산 또한 시퀀싱되었고, SEQ ID NO:28에서 보여지는 인간 심장에서 정제한 조눌린의 첫 9개의 아미노산과 일치한다는 것을 알았다(도 6을 보라). 인간 태아 소장에서 정제한 조눌린의 N-말단 서열의 첫 20개의 아미노산 또한 시퀀싱되었다: Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO:30), 그리고 SEQ ID NO:28에서 보여지는 인간 심장에서 정제한 조눌린의 아미노산 서열과 거의 동일하다(도 6을 보라).

성인의 뇌(SEQ ID NO:29)와 인간 태아의 뇌(SEQ ID NO:36)에서 정제한 조눌린의 N-말단 서열은 심장(SEQ ID NO:28), 태아의 장(SEQ ID NO:30), 그리고 성인의 장(SEQ ID NO:31)에서 정제한 각각의 조눌린의 N-말단과 완전히 달랐다(도 6-7을 보라). 이러한 차이는 위에서 가정한 바와 같이, 장과 같은 조직의 투과도를 결정하는 것에 있어 조눌린의 조직특이성을 설명하는 것이라고 믿어진다.

인간의 심장, 장, 그리고 뇌에서 정제한 조눌린의 N-말단 서열은 토끼의 장에서 정제한 조눌린의 N-말단 서열과 모두 다르다(도 6). 이러한 단백질들이 tau-관계된 단백질군의 다른 아이소폼을 나타내는지를 확립하기 위해, 토끼와 인간 모두의 조직을 8.0%(w/v) SDS-PAGE를 행한 후, 항-ZOT나 항-tau 항체를 이용하여 Western immunoblotting을 실시하였다. 항-ZOT 항체에 의해 인식되는 것으로 알려진 토끼와 인간조직(뇌, 장 그리고 심장을 포함하는)으로부터 정제한 47kDa 조눌린 밴드는 항-tau 항체와 교차반응한다는 것을 알았다. 염 크로마토그래피로 얻어낸 인간의 뇌에서 정제한 조눌린의 다른 분획들을 항-ZOT 항체와 항-tau 항체를 이용하여 Western immunoblotting을 행하였다. 항-ZOT 항체는 완전한 47kDa 단백질과 35kDa, 15kDa 붕괴 조각들 모두를 인식한 반면에, 항-tau 항체는 단지 완전한 47kDa 단백질과 35kDa 조각을 인식하고 15kDa조각은 인식하지 못했다. 35kDa 조각이 조눌린의 N-말단이나 C-말단을 포함하는가를 확립하기 위해, 35kDa 밴드의 N-말단 서열을 얻어내서 알아냈다: Xaa Xaa Asp Gly Lys Val Gly Asp Leu (SEQ ID NO: 32). 이 서열은 완전한 인간의 조눌린(SEQ ID NO:29)의 N-말단 서열과 다르다. 이러한 결과들은 35kDa 조각은 조눌린의 C-말단 부분을 나타내는 반면에, 15kDa 조각은 조눌린의 N-말단 부분을 나타낸다는 것을 암시한다.

종합적으로 이러한 결과들은 항-tau 항체에 의해 인식되는 조눌린 영역이 단백질의 C-말단을 향하고, 인간과 토끼 조직(N-말단 부분은 다양한 반면)에서의 조눌린의 다른 아이소폼에 공통이고, 아마도 단백질의 투과 증진 효과와 관련된 다(tau가 세포골격의 순서적 서열을 갖는 β -튜불린에 결합하는 것의 관찰과 원숭이의 소장 조직 저항에의 분획 4의 효과에 기초하여)는 것을 암시한다.

심장과 장 모두로부터 정제한 인간 조눌린의 N-말단 서열을 BLAST 연구 분석에 의해 다른 단백질 서열과 비교하였다. 이런 분석의 결과로 인간 조눌린의 N-말단 서열이 Homo sapiens의 IgM H 체인(SEQ ID NO:37)의 N-말단 서열과 95% 일치한다는 것을 알았다.

결과적으로 심장과 인간 IgM에서 정제한 인간 조눌린은 같은 모양인가를 결정하기 위해, 인간 조눌린의 부분적 분해를 행하여 내부 조각을 얻고 시퀀싱하였다.

보다 상세하게는, 인간의 심장에서 정제된 조눌린을 포함하는 PVDF 필터 1.0mm를 미리 0.1%(w/v) 트리플루오로아세트산(TFA)로 세척하고 메탄올로 헹군 플라스틱 튜브에 놓았다. 100mM Tris (pH 8.2), 10% (v/v) CH_3CN , 그리고 1.0%(v/v)

v) 탈수된 Triton X-100을 포함하는 완충 용액 75 μ l를 첨가하고, 60분 동안, 37°C에서 막과 함께 배양하였다. 트립신 150ng을 첨가하고, 37°C에서 24시간 동안 추가로 배양을 실시하였다. 결과물인 용액을 10분동안 소니케이션 시키고, 상층액을 가만히 따랐다. 두 부분 모두를 0.5mm x 250mm C₁₈ 칼럼, 5.0 μ m 입자 크기, 300Å 포어 크기에 로딩하였다. 0.1% (w/v) TFA부터 45% CH₃CN 물 + 0.1%(w/v)TFA까지의 구배는 2시간 15분 동안 이루어 졌다. 피크는 최종적으로 수집되어서, 시퀀싱되었다.

성인 심장으로부터 정제된 인간 조눌린의 내부 서열을 알아냈다: Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ ID NO:33).

인간의 조눌린의 내부 서열을 BLAST 연구 분석에 의해 다른 단백질과 비교하였다. 분석의 결과로 인간 조눌린의 내부 서열은 Homo sapiens의 IgM의 H 체인의 어떤 내부 서열과도 0%의 동일성을 갖는다는 것을 알아 냈다.

위의 실시예 3에서의 결과는 (1)조눌린이 파라셀룰러 경로의 생리학적 조절자를 나타낸다; (2)토끼 조눌린의 N-말단 서열이 tau 단백질의 N-말단 서열에 매우 상동적이다; (3)조눌린과 tau는 면역학적으로 연관되어 있지만 기능적으로는 다른 두개의 다른 부분(moieties)을 갖는다; (4)심장과 장에서 얻어진 인간 조눌린의 N-말단의 서열은 IgM의 다양한 부위의 H 체인의 N-말단 서열과 매우 동일하다; (5)인간 조눌린과 IgM은 구조적으로는 연관되어 있으나 기능적으로는 다른 두 개의 다른 부분이다; 그리고 (6)조눌린은 공통된 활성이 있는 C-말단 서열과 다양한 N-말단 서열을 갖는 tau-관련된 단백질 군을 나타낸다.

(실시예 4)

조눌린의 펩타이드 길항제

ZOT, 인간의 장 조눌린(조눌린_l), 인간의 심장 조눌린(조눌린_h) 모두가 장(Fasano et al, *Gastroenterology*, 112:839 (1997); Fasano et al, *J. Clin. Invest.*, 96:710 (1995); 그리고 도 1-5)과 상피세포의 tj에 작용하고, 세 개 모두가 장내의 ZOT수용체 분포와 일치하는 비슷한 국소 효과를 갖는다는 것으로 볼 때, 본 발명에서 이런 세 개의 분자들이 같은 수용체 결합 부위를 가지고 작용한다는 것을 가정하였다. 장의 tj의 조절에 연루되는 수용체-리간드 상호작용의 절대적인 구조적 필요조건에 관해 알기 위해 ZOT와 인간 조눌린의 1차 아미노산 구조의 비교를 행하였다. 이런 분자들의 N-말단의 분석을 통해 다음의 공통적 모티프를 밝혀 냈다(도 7에서 박스로 한 아미노산 잔기 8-15): 비극성(소장에는 Gly, 뇌에는 Val), 다양, 비극성, 다양, 비극성, 극성, 다양, 극성 (Gly). 위치8의 Gly, 위치 12의 Val, 위치 13의 Gln 모두가 ZOT, 조눌린_l, 조눌린_h에 고도로 보존되어 있고(도 7을 보라), 장내의 수용체 결합 기능에 매우 중요하다고 믿어진다. 같은 것을 증명하기 위해, 합성 옥타펩타이드 Gly Gly Leu Gln Pro Gly (SEQ ID NO:15) (FZI/0으로 명명, 인간 태아 조눌린_l의 아미노산 잔기 8-15와 일치한다.)가 화학적으로 합성되었다.

다음으로, 위에서 기술한 바와 같이, 우성 챔버에 탑재된 토끼 회장을 FZI/0 (SEQ ID NO:15) 100 μ g, ofFZI/1(SEQ ID NO:34) 100 μ g, 6xHis-ZOT (실시예 1에서 기술한 바와 같이 얻어진) 1.0 μ g, 조눌린_l 1.0 μ g(실시예 3에서 기술한 바와 같이 얻어진), 혹은 조눌린_h (실시예 3에서 기술한 바와 같이 얻어진) 1.0 μ g에 노출시키거나; FZI/0 혹은 FZI/1 100 μ g에 20분 동안 미리 노출시키고 6xHis-ZOT 1.0 μ g, 조눌린 1.0 μ g, 혹은 조눌린_h 1.0 μ g을 첨가하였다. 그리고나서 ARt를 위에서 기술한 바와 같이 계산하였다. 결과는 도 8과 같다.

도 8에서 보여지는 바와 같이, FZI/0은 Rt 에서 어떤 중요한 변화를 유도하지 못했다(음의 대조군과 비교하여 0.5%)(검정 막대기를 보라). 반대로, FZI/0으로 20분 동안 전처리한 것은 ZOT, 조눌린_l, 그리고 조눌린_h의 효과를 Rt상 각각 75%, 97%, 그리고 100% 감소시켰다(흰색 막대기를 보라). 또한 도 8에서 보여지듯이, 이러한 억제 효과는 두번째 합성 펩타이드(FZI/1)가 위치 8의 Gly, 위치 12의 Val, 그리고 위치 13의 Gln (조눌린_l로 칭하는 것 처럼)를 조눌린_b의 대응하는 아미노산 잔기(각각 Val, Gly, 그리고 Arg)로 교환함으로써 화학적으로 합성되었을 때, 완전히 제거 되었다.

위의 결과는 ZOT와 조눌린군의 N-말단의 잔기 8과 15사이에 걸치는, 표적 수용체에 결합하는 중요한 부위가 있으며, 위치 8, 12 그리고 13의 아미노산 잔기가 이러한 결합의 조직 특이성을 결정한다는 것을 증명한다.

산업상 이용 가능성

발명을 자세하게 그리고 그것의 특정한 구체예를 참고로 하여 기술하였기 때문에, 발명의 정신과 영역을 넘지 않고서 다양한 변화와 수정을 가할 수 있다는 것은 그 기술분야의 통상의 기술을 갖고 있는 사람에게 발명이 명백할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

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: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:24 그리고 SEQ ID NO:35로 이루어진 그룹에서 선택한 아미노산 시퀀스를 포함하거나 또는 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23으로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 시퀀스로 구성되고, 조놀라 오쿨루텐 독소 수용체에 결합하지만, 포유류의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는 조놀린의 펩타이드 길항제.

청구항 2.

약학적으로 유효한 양의 조놀린의 펩타이드 길항제를 포함하는 위장관 염증 치료용 조성물로서, 상기 조놀린의 펩타이드 길항제는 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, 및 SEQ ID NO:35로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 펩타이드 길항제는 소장내 조놀라 오쿨루텐 독소 수용체에 결합하지만 상기 소장내 포유류 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는 위장관 염증 치료용 조성물.

청구항 3.

약학적으로 유효한 양의 조놀린의 펩타이드 길항제를 포함하는 위장관 염증 치료용 조성물로서, 상기 조놀린의 펩타이드 길항제는 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, 및 SEQ ID NO:35로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열로 구성되고, 상기 펩타이드 길항제는 소장내 조놀라 오쿨루텐 독소 수용체에 결합하지만 상기 소장내 포유류 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는 위장관 염증 치료용 조성물.

청구항 4.

약학적으로 유효한 양의 조놀린의 펩타이드 길항제를 포함하는 뇌-혈액 관문 붕괴와 관련된 질환 치료용 조성물로서, 상기 조놀린의 펩타이드 길항제는 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, 및 SEQ ID NO:35로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 펩타이드 길항제는 뇌에 있는 조놀라 오쿨루텐 독소 수용체에 결합하지만, 상기 뇌의 긴밀접합의 개방을 생리학적으로 조절하지는 않는 뇌-혈액 관문 붕괴와 관련된 질환 치료용 조성물.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 뇌경색인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 뇌졸중 또는 뇌부종인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 고혈압인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 경련성 발작인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 요독증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 뇌막염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 뇌염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 뇌척수염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 외상성 뇌손상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14.

제 4 항에 있어서, 상기 질환은 방사선 뇌손상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15.

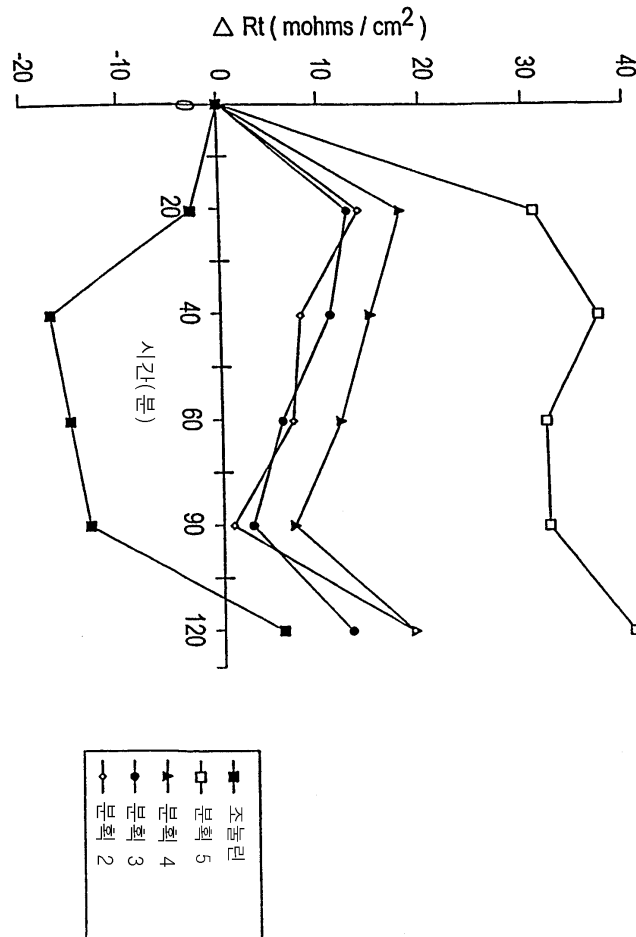
제 4 항에 있어서, 상기 질환은 다발성 경화증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.

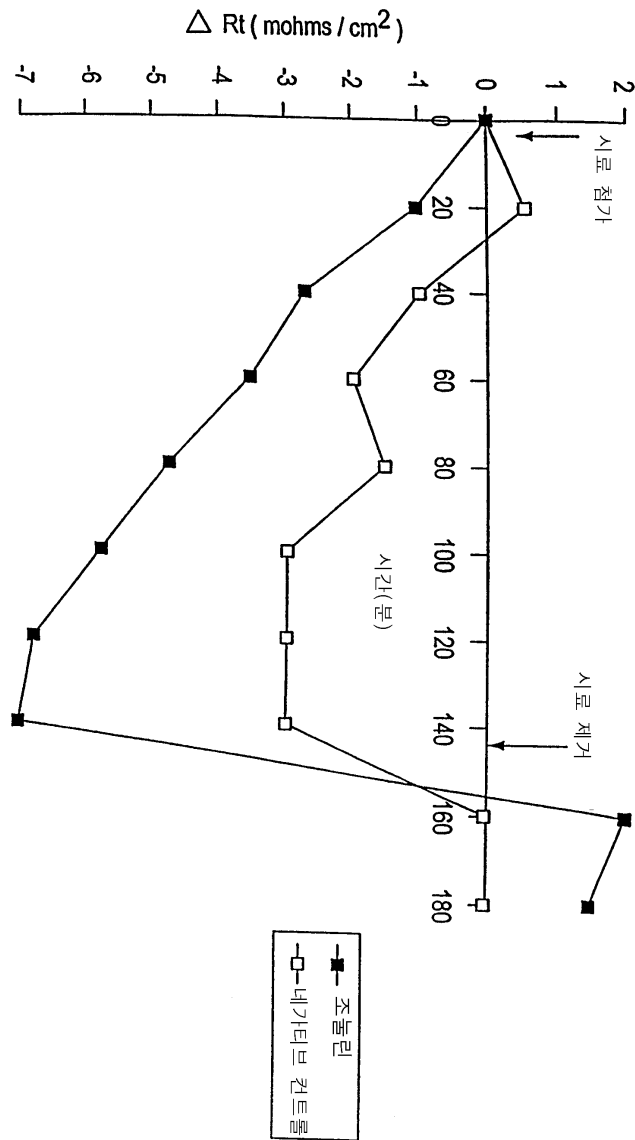
제 4 항에 있어서, 상기 질환은 길리안-바레 증후군인 것을 특징으로 하는 조성물.

도면

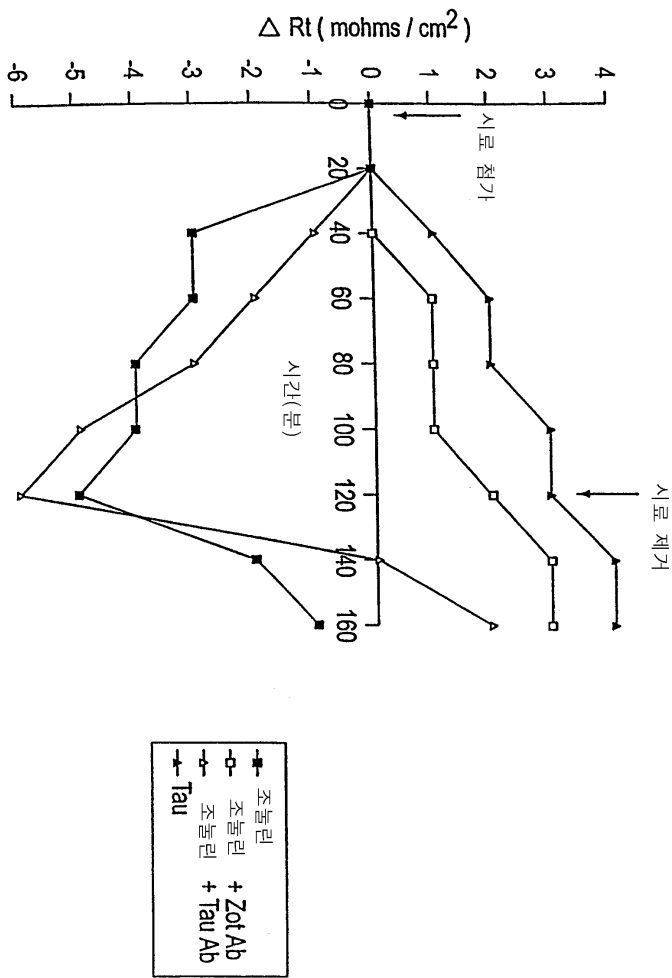
도면1



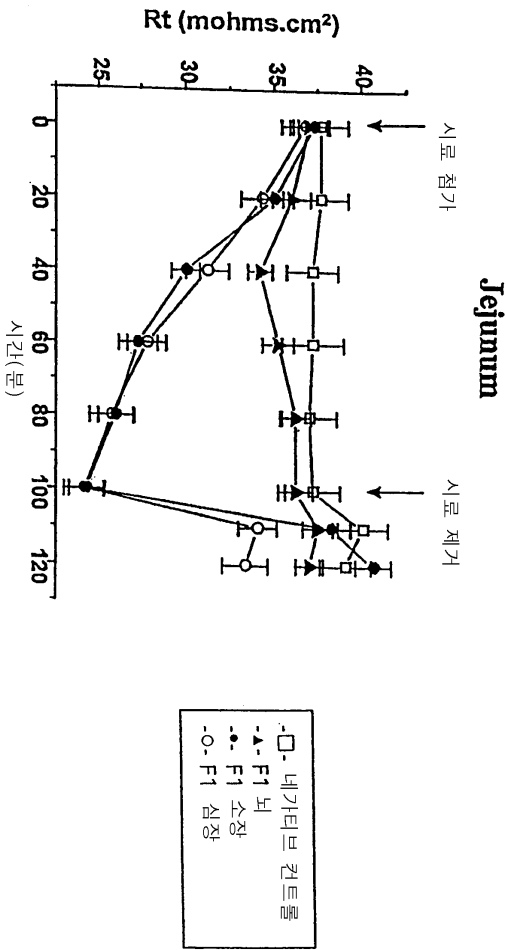
도면2



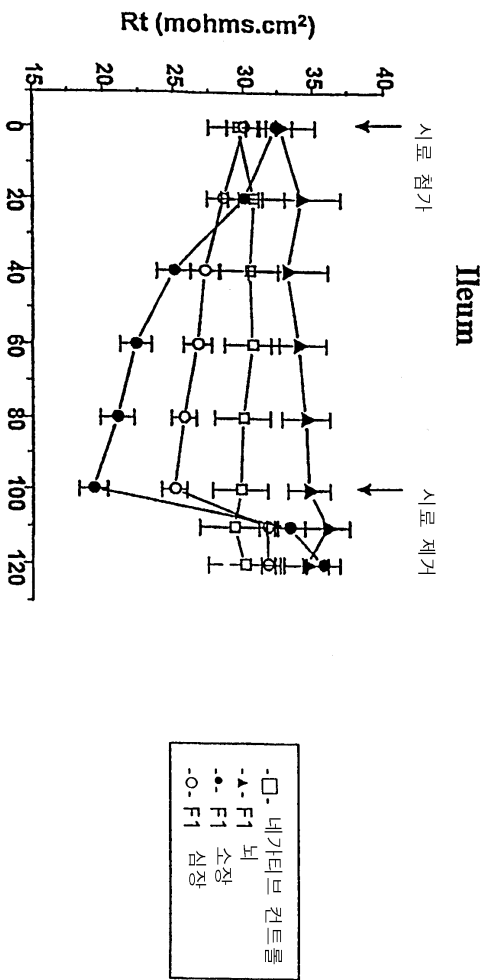
도면3



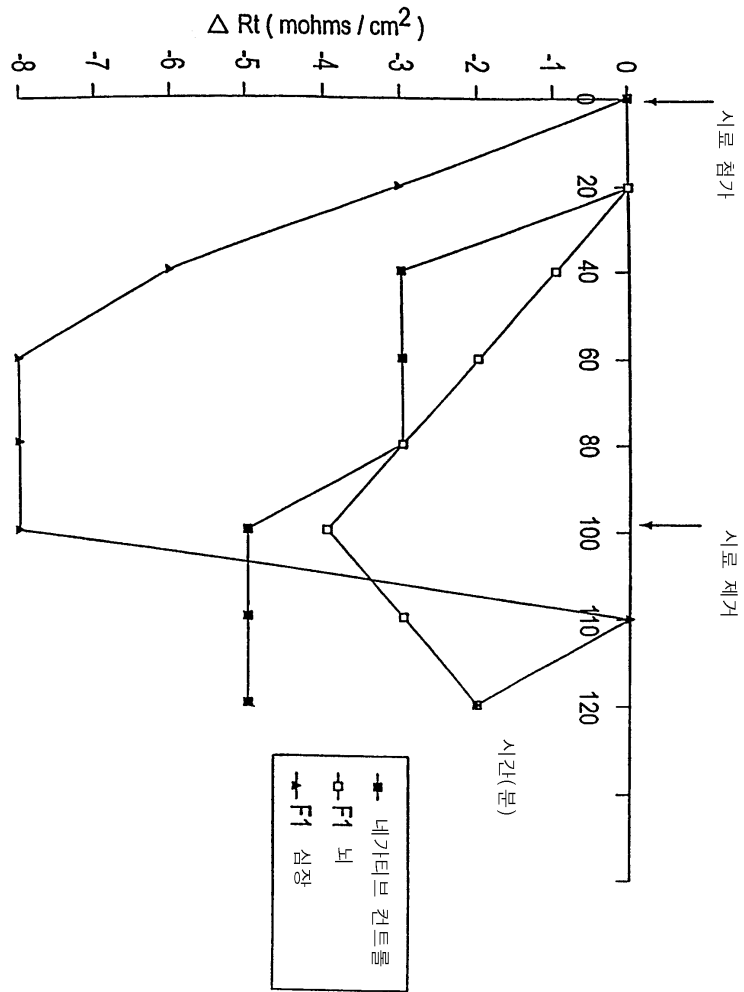
도면4a



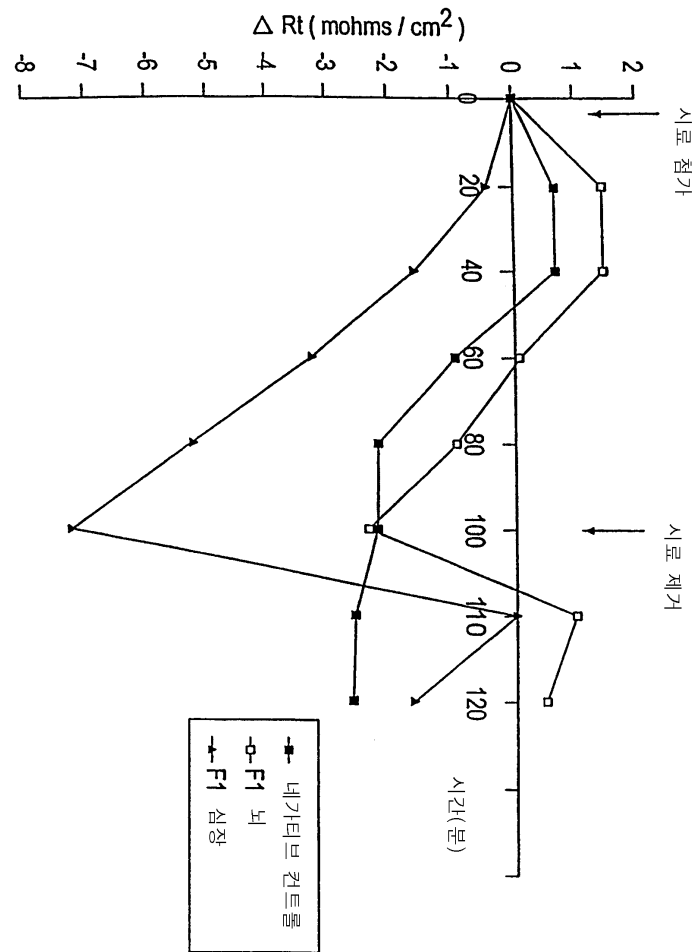
도면4b



도면5a



도면5b



6판도

레빗 소장 - Asn Gln Arg Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln
(SEQ ID NO:27)

인간성인 소장 - Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu
(SEQ ID NO:31)

인간테아 소장 - Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
(SEQ ID NO:30)

인간성인 소장 - Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
(SEQ ID NO:28)

인간성인 보 - Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
(SEQ ID NO:29)

내부 시퀀스
인간성인 소장 - Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly
(SEQ ID NO:33)

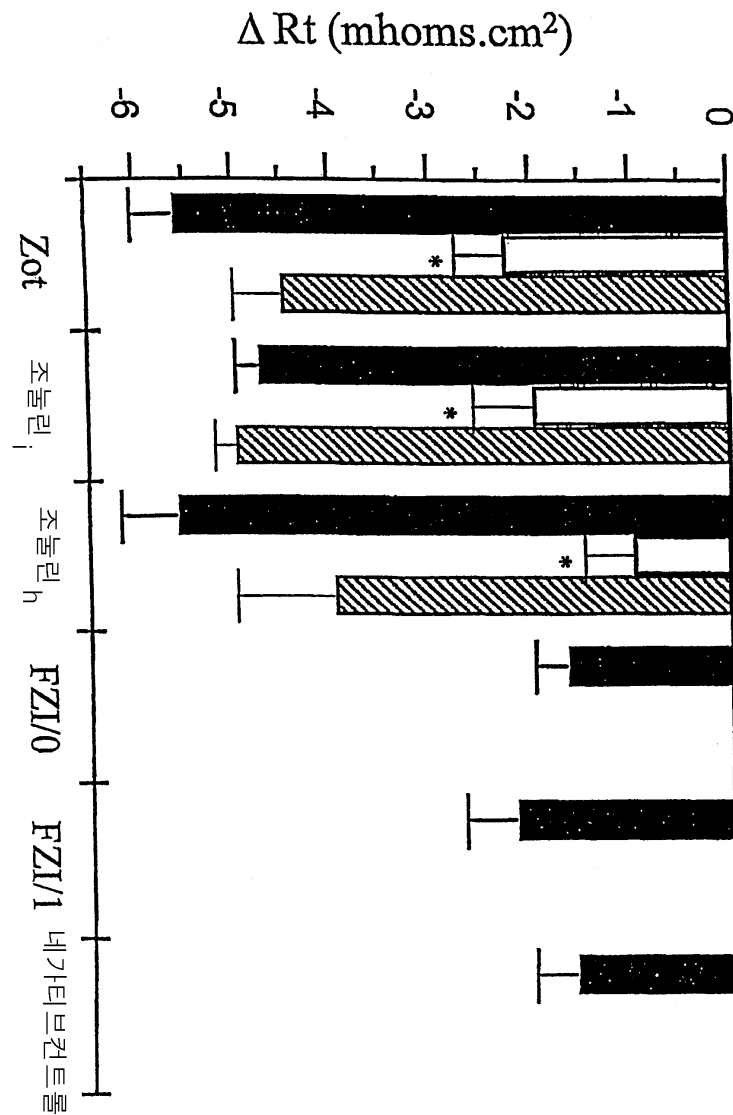
인간성인
보 35kDa 단편 - Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu
(SEQ ID NO:32)

도면7

<i>Vibrio cholerae</i> ZOT (SEQ ID NO:38)	Phe Cys Ile	Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly	Phe Val Thr
인간 성인 소장 - (SEQ ID NO:31)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Xaa Leu	
인간 태아 소장 - (SEQ ID NO:30)	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser	Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	Xaa Ser Asn Arg Leu
인간 성인 심장 - (SEQ ID NO:28)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Gly Ser Leu Arg Leu
F21/0 (SEQ ID NO:15)		Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	
F21/1 (SEQ ID NO:34)		Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly	
인간 태아 뇌 - (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
인간 성인 뇌 - (SEQ ID NO:29)	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala	Val Ser	
인간 뇌 중사슬 - (SEQ ID NO:37)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Arg Ser Leu Arg Leu

프로세싱 후 V. cholerae에 의해 생성되는 생물학적-활성 단편(아미노산 잔기 288-399). 제1 Gly는 전체 ZOT 분자의 잔기 291에 해당한다(Fasano et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:5242(1991); 및 Baudry et al, Infect. Immun., 60(2), 428(1992)).

도면8



서열목록

<110> FASANO, Alessio
 <120> PEPTIDE ANTAGONISTS OF ZONULIN AND METHODS FOR USE OF
 THE SAME
 <130> F131422
 <140> PCT/US99/16683
 <141> 1999-07-28
 <150> 09/127,815
 <151> 1998-08-03
 <160> 40
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 1

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly
1 5
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 2
Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly
1 5
<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 3
Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly
1 5
<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 4
Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5
<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 5
Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 6
Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 7
Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 8
Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5
<210> 9

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 9
 Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly
 1 5
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 10
 Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly
 1 5
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 11
 Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 12
 Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 13
 Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly
 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 14
 Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly
 1 5
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Synthetic Octapeptide
 <400> 15
 Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
 1 5
 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist

```

<400> 16
Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly
  1             5
<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 17
Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly
  1             5
<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 18
Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly
  1             5
<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 19
Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly
  1             5
<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 20
Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly
  1             5
<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 21
Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly
  1             5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 22
Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly
  1             5
<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Zonulin Peptide Antagonist
<400> 23
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
  1             5

```

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 24
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly
 1 5
 <210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> synthetic construct
 <400> 25
 tcatcacggc gcgccagg 18
 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> synthetic construct
 <400> 26
 ggaggtctag aatctgcccg at 22
 <210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Rabbit Intestine
 <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> Human Heart
 <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> Human Brain
 <400> 29
 Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
 1 5
 <210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human Fetal Intestine
 <220>
 <221> UNSURE
 <222> (16)
 <223> Xaa at position 16 is an amino acid
 <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> Human Intestine
 <220>
 <221> UNSURE
 <222> (10)
 <223> Xaa at position 10 is an amino acid
 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human Brain
 <220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa at positions 1 and 2 is an amino acid
 <400> 32
 Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Leu Val Gly Asp Leu
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Human Adult Heart
 <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> Synthetic Octapeptide
 <400> 34
 Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly
 1 5
 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Zonulin Peptide Antagonist
 <400> 35
 Val Asp Gly Phe Gly Arg Ile Gly
 1 5
 <210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Human Fetal Brain
 <220>

```

<221> UNSURE
<222> (1)
<223> Xaa at position 1 is an amino acid
<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> 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> 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> synthetic construct
<400> 39
cgggatcccg tatgagtatc ttt
<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> synthetic construct
<400> 40
cccaagcttg ggtcaaaata tact

```

23

24