



HU000228079B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 079**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 01 03321**(22) A bejelentés napja: **1999. 07. 28.**(40) A közzététel napja: **2001. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 10. 29.**(51) Int. Cl.: **A61K 38/00** (2006.01)**A61K 38/16** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**C07K 5/00** (2006.01)**C07K 7/00** (2006.01)**C07K 14/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 99/16683

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0007609

(30) Elsőbbségi adatok:

09/127,815**1998. 08. 03.****US**

(72) Feltaláló(k):

Fasano, Alessio, Ellicott City, Maryland (US)

(73) Jogosult(ak):

**University of Maryland, Baltimore, Baltimore,
Maryland (US)**

(74) Képviselő:

**Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54)

Zonulin peptid-antagonistái és eljárások alkalmazásukra

(57) Kivonat

A találmány tárgya gyógyászati készítmény, amely a 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciával azonos aminosav-szekvenciájú peptid hatásos mennyiségét tartalmazza, továbbá a 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciájú, tisztított peptid és alkalmazása gyomor-bélrendszeri gyulladás kezelésére vagy gátlására szolgáló gyógyszer előállításában. A peptid a zonulin peptid-antagonistája, amely a zonula occludens receptorokhoz kötődik, és csökkenti a zonulin szöveti rezisztenciára gyakorolt hatását.

A találmány szerinti peptid-antagonisták előnyösen alkalmazhatók vér-agy gát károsodásával járó állapot kezelésére és gyomor-bélgyulladás kezelésére.

ZONULIN PEPTID-ANTAGONISTÁI ÉS ELJÁRÁSOK ALKALMAZÁSUKRA

A találmány tárgya gyógyászati készítmény, amely a 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciával azonos aminosav-szekvenciájú peptid hatásos mennyiségét tartalmazza, továbbá a 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciájú, tisztított peptid és alkalmazása gyomor-bélrendszeri gyulladás kezelésére vagy gátlására szolgáló gyógyszer előállításában. A peptid a zonulin peptid-antagonistája, amely a zonula occludens receptorokhoz kötődik, és csökkenti a zonulin szöveti rezisztenciára gyakorolt hatását.

A találmány szerinti peptid-antagonisták előnyösen alkalmazhatók vér-agy gát károsodásával járó állapot kezelésére és gyomor-bélgyulladás kezelésére.

I. A bélben található tight junction-ok működése és szabályozása

A tight junction-ok (szoros illeszkedés, „ij”) vagy zonula occludens-ek (továbbiakban „ZO”) (a hámsejtek összeolvadó plazmamembrán-területeiből keletkező, a sejtek közli rést többnyire a felszín felé szorosan lezáró „berendezés”) jelenléte az abszorpció és szekréció hámsejtekre jellemző [Madara: J. Clin. Invest. 83, 1089-1094 (1989); és Madara: „Textbook of Secretory Diarrhea”, szerk.: Lebenthal és mtsai., 11. fejezet, 125-138 (1990)]. A tj-ok az apicalis és basolaterális kompartmentumok közötti gátként szelektíven szabályozzák az ionok és oldott anyagok paracellularis passzív diffúzióját [Gumbiner: Am. J. Physiol. 253 (Cell. Physiol. 22.), C749-C758 (1987)]. Ez a gát fenntart bármely, a transcellularis reakciók eredményeként kialakult koncentrációkülönbséget [Diamond: Physiologist 20, 10-18 (1977)].

A transepithelialis elektromos vezetőképesség változásai általában a paracellularis útvonal átteresztőképességében történt változásoknak tulajdoníthatók, mivel a bélhámsejtek plazmamembránjai viszonylag nagy ellenálló képességgel rendelkeznek (Madara, ld. fentebb). A paracellularis útvonal fő gátja a ZO, a hámsejtek elektronos ellenállása pedig - a fagyasztva töréssel készült elektronmikroszkópos metszetekben megfigyelték szerint - a transzmembránprotein-szálak számától, és ezek ZO-beli komplexitásától függ [Madara és mtsai.: J. Cell. Biol. 101, 2124-2133 (1985)].

Bizonyított, hogy a statikus szerkezetnek tekintett ZO valójában dinamikus, és alkalmazkodni képes különböző fejlődési [Magnuson és mtsai.: Dev. Biol. 67, 214-224 (1987); Revel és mtsai.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 40, 443-455 (1976); és Schneeberger és mtsai.: J. Cell Sci. 32, 307-324 (1978)] életani [Gihula és mtsai.: Dev. Biol. 50, 142-168 (1976); Madara és mtsai.: J. Membr. Biol. 100, 149-164 (1987); Mazariegos és mtsai.: J. Cell Biol. 98, 1865-1877 (1984); és Sardet és mtsai.: J. Cell Biol. 80, 96-117 (1979)] és kóros [Milks és mtsai.: J. Cell Biol. 103, 2729-2738 (1986); Nash és mtsai.: Lab. Invest. 59, 531-537 (1988); és Shasby és mtsai.: Am. J. Physiol. 255 (Cell Physiol. 24), C781-C788 (1988)] körülményekhez. Az ezt az alkalmazkodást szolgáló szabályozó mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Az azonban ismert, hogy a ZO Ca^{2+} -ionok jelenlétében történő felépülése egymást követő biokémiai események teljes sorozatát előidéző sejt kölcsönhatások eredménye, ami végül a ZO elemek - eddig még csak részben meghatározott összetételű - szervezett hálózatának képződéséhez és módosulásához vezet [Diamond: Physiologist 20, 10-18 (1977)]. A transzmembránprotein-szálak felitélezett összetevőjét, az occludint a közelmúltban azonosították [Furuse és mtsai.: J. Membr. Biol. 87, 141-150 (1985)].

Az érintkező membránterületek alatt a citoplazmában elhelyezkedő membrán alatti plakkokban hat

proteint azonosítottak, amelyek funkcióját még nem határozták meg (Diamond, ld. fentebb). A ZO-1 és ZO-2 [Gumbiner és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3460-3464 (1991)] egy nem azonosított 130 kDa molekulatömegű proteinnel (ZO-3) detergensálló komplexben, heterodimerként található. Az elektromikroszkópos vizsgálatok során a ZO-1 elhelyezkedését legtöbbször pontosan az érintkező membrán-területek alatt határozták meg [Stevenson és mtsai.: *Molec. Cell Biochem.* 83, 129-145 (1988)]. Két további, még nem klónozott protein, a cingulin [Citi és mtsai.: *Nature (London)* 333, 272-275 (1988)] és a 7H6-antigén [Zhong és mtsai.: *J. Cell Biol.* 120, 477-483 (1993)] a membrántól távolabb helyezkednek el. Egy Rab13 elnevezésű kis méretű GTP-kötő területet szintén a közelmúltban azonosítottak a kapcsolódási régióban [Zahraoui és mtsai.: *J. Cell Biol.* 124, 101-115 (1994)]. Más kisméretű GTP-kötő proteinekről ismert, hogy a kérgi citoskeleton szabályozásában játszanak szerepet, például a rho fokális kapcsolódásokban az aktin-membrán kölcsönhatást [Ridley és mtsai.: *Cell* 70, 389-399 (1992)], a rac pedig növekedési faktor által indukált membránygyűrődést („ruffling”) szabályoz [Ridley és mtsai.: *Cell* 70, 401-410 (1992)]. A részletesebben leírt sejtkapcsolódásokban, pl. fokális érintkezésekben [Guan és mtsai.: *Nature* 358, 690-692 (1992)] és adherens kapcsolódásokban [Tsukita és mtsai.: *J. Cell Biol.* 123, 1049-1053 (1993)] található plakkproteinek ismert működése alapján feltételezik, hogy a sejtmembránon keresztül mindkét irányú jelátvitelben és a kérgi aktin citoskeletonhoz történő kapcsolódások szabályozásában új-vel társult plakk-proteinek vesznek részt.

A hámat érő különféle élettani és kóros hatások miatt a ZO gyors és összehangolt reakcióképességére van szükség, ami komplex szabályozó rendszer jelenlétét feltételezi. A ZO kialakulásában és szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok pontos meghatározására irányuló kutatások jelenleg is folyamatban vannak.

Bizonyított, hogy új-típusú szerkezeti és funkcionális összeköttetések találhatók az aktin citoskeleton és a felszívó sejtek új-komplexe között [Gumbiner és mtsai.: ld. fentebb; Madara és mtsai.: ld. fentebb; és Drenth és mtsai.: *J. Cell Biol.* 107, 1037-1048 (1988)]. Az aktin citoskeletont mikrofílamentumok bonyolult hálózata alkotja, amelyek pontos szerkezetét aktinkötő proteinek nagy váza szabályozza. Egy aktinkötő protein foszforilációs állapotának a sejtplazmamembránhoz történő citoskeletonális kapcsolódás szabályozásában játszott szerepére példa a alaninben gazdag mirisztáls C-kináz-szubsztát (továbbiakban „MARCKS”). A MARCKS egy specifikus, a plazmamembrán citoplazmái felületéhez kapcsolódó C-protein-kináz (a továbbiakban „PKC”)-szubsztát [Aderem: *Elsevier Sci. Pub. (UK)* 438-443 (1992)]. A MARCKS nem foszforilált állapotában keresztükötéssel kapcsolódik a membrán aktinjához. Ennek alapján valószínű, hogy a membránhoz MARCKS-on keresztül kapcsolódó aktinhálózat viszonylag merev [Hartwig és mtsai.: *Nature* 356, 618-622 (1992)]. Az aktivált PKC foszforilálja a MARCKS-ot, amely elválk a membrántól [Rosen és mtsai.: *J. Exp. Med.* 172, 1211-1215 (1990); és Thelen és mtsai.: *Nature* 351, 320-322 (1991)]. A MARCKS-hoz kapcsolt aktin valószínűleg térben elválk a membrántól és képlekenyebb lesz. A MARCKS defoszforilálódása esetén visszatér a membránhoz, ahol ismét keresztükötéseket képez az aktinnal (Hartwig és mtsai.: ld. fentebb; és Thelen és mtsai.: ld. fentebb). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az F-aktin-hálózat aktinkötő proteinek (a MARCKS ezek egyike) magában foglaló, PKC-függő defoszforilációs folyamat során visszarendeződhet.

Különböző sejten belüli közveető anyagokról kimutatták, hogy megváltoztatják a új-ok működését

vagy szerkezetét. Kételtük epehólyagjában [Duffey és mtsai.: *Nature* 204, 451-542 (1981)], valamint aranyhal [Bakker és mtsai.: *Am. J. Physiol.* 246, G213-G217 (1984)] és lepényhal [Krasney és mtsai.: *Fed. Proc.* 42, 1100 (1983)] belében található tight junction-ok megnövekedett sejten belüli cAMP-szint esetén fokozott rezisztenciát mutatnak a passzív ionáramlással szemben. Kételtű epehólyagban Ca^{2+} ionofórok hatására fokozódik a t_j ellenálló képessége és szerkezetében változás következik be [Palant és mtsai.: *Am. J. Physiol.* 245, C203-C212 (1983)]. A PCK forbol-észterekkel történő aktiválása vese- [Ellis és mtsai.: *C. Am. J. Physiol.* 263, (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32), F293-F300 (1992)] és bélhámsejt vonalakban [Stenson és mtsai.: *C. Am. J. Physiol.* 265 (Gastrointest. Liver Physiol. 28) G955-G962 (1993)] egyaránt megnövekedett paracellularis áteresztő képességet idézett elő.

II. A vér-agy gát

A vér-agy gát („blood-brain barrier”, BBB) egy rendkívül vékony, oldott anyagoktól mentes diffúzióval szemben nagymértékben ellenálló, a vért és az agyat elválasztó membrángát. Molekuláris méretekben, ezen a membránon gyógyszerek és oldott anyagok alapvetően nem jutnak át, kivéve, ha a vegyület valamely, a BBB membránon belül elhelyezkedő különböző speciális enzimszerű szállítómechanizmus-hoz kapcsolódni képes. A BBB-t egyrétegű hámsejtek helyett többféle sejt alkotja. A BBB-t alkotó négy különböző típusú sejt közül (endothelsejtek, periciták, astrociták és neuronok) a kapillárisok endothelsejtjei határozzák meg a BBB áteresztőképességét. A gerincesek agyában és gerincvelőjében a kapilláris endothel olyan, interendothelialis pórusokat elzáró t_j -nal rendelkezik, amely a perifériás szövetekben a mikrovaskuláris endothelialis gátakban található. A BBB korlátozott áteresztő képességéért tehát az endothelialis t_j -k felelősek.

III. Zonula occludens toxin

A legutóbb, a koleratoxint (CT) kódoló *ctxA* gén deléciójával készített, potenciális *Vibrio cholerae* vakcina határozott ellenanyagválasz kiváltására képes, ennek ellenére a vakcinázottak több, mint fele enyhe hasmenésben betegszik meg [Levine és mtsai.: *Infect. Immun* 56(1), 161-167 (1988)]. A CT hiányában kialakuló hasmenés mértéke alapján feltételezték, hogy a *V. cholerae* egyéb, a *ctxA* szekvencia deléciójával létrehozott törzsekben továbbra is jelen levő enterotoxikus faktort is termel (Levine és mtsai., ld. fentebb). Ennek eredményeként egy másik, a reziduális hasmenés kialakításában szerepet játszó, *V. cholerae* által kiválasztott toxint találtunk (zonula occludens toxin, továbbiakban „ZOT”) [Fasano és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8, 5242-5246 (1991)]. A *zot* gén közvetlenül a *ctx* gének mellett helyeződik. A *zot* gén és a *ctx* gének *V. cholerae* törzsekben tapasztalt nagyarányú együttes előfordulása [Johnson és mtsai.: *J. Clin. Microb.* 31/3, 732-733 (1993); és Karasawa és mtsai.: *FEBS Microbiology Letters* 106, 143-146 (1993)] a ZOT-nak a kolerára jellemző akut dehidrációval járó hasmenés előidézésében játszott lehetséges szinergista szerepére utal. A közelmúltban a *zot* gént más enterális kórokozókban is azonosították [Tschape: 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis 47, (Absr.) (1994)].

Előzetesen nyúl ileuma nyálkahártyájának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a ZOT a sejten belüli t_j szerkezetének módosításával fokozta a bélfal áteresztő képességét (Fasano és mtsai.: ld. fentebb). A paracellularis út vonal módosulásának következményeként a bélfal nyálkahártyájának áteresztőképessége fokozódott. Azt is tapasztaltuk, hogy a ZOT nem befolyásolja a Na^{+} -glükóz kapcsolt aktiv transzpor-

tot, nem citotoxikus és nem szűnietti meg teljes mértékben a transzepitheliális ellenállást (Fasano és mtsai., ld. fentebb).

Újabb vizsgálatok során kiderült, hogy a ZOT képes a bélfal nyálkahártyájában található tj reverzibilis nyitására, és ezáltal szájon át adható készítményben terápiás hatóanyaggal együtt beadva befolyásolja a terápiás hatóanyag bélbeli célba juttatását [96/37196 számú nemzetközi közzétételi irat; 5827535 számú, 1995 május 24-én benyújtott amerikai egyesült államokbeli szabadalom; 5665389 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; és Fasano és mtsai.: J. Clin. Invest. 99, 1158-1164 (1997); amelyek mindegyike teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi]. Az is tapasztaltuk, hogy a ZOT képes az orr nyálkahártyában található tj reverzibilis megnyitására is, ezáltal terápiás hatóanyaggal együtt beadva fokozza a hatóanyag orrnyálkahártyán történő abszorpcióját (1997 január 9-én benyújtott, 5908825 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi).

A teljes terjedelmében a kitanítás részét képező, 1997 február 20-án benyújtott 5864014 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban ZOT receptor béleredetű sejtvonalból, CaCo2 sejtekből történő azonosítása és tisztítása olvasható. A teljes terjedelmében a kitanítás részét képező, az 1998 február 17-én benyújtott 5912323 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban továbbá, emberi bél-, szív- és agyszövetből azonosított és tisztított ZOT receptorok leírása szerepel. A bélfal és az orr átteresztőképességének szabályozásában részi vevő paracellularis útvonal első lépését a ZOT receptorok képviselik.

IV. Zonulin

A teljes egészében a kitanítás részét képező, 1997 május 21-én benyújtott, 5945510 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban a ZOT-tal immunológiai és funkcionális szempontból kapcsolatban álló és emlős tj-ok élettani modulátoraként működő emlős proteinek azonosítását és tisztítását írtuk le. Ezek a „zonulin”-nak nevezett emlős proteinek terápiás hatóanyagok – bélfal és orrnyálkahártya tj-jain, továbbá a vér-agy gát tj-jain keresztül történő – felszívódásának fokozására alkalmasak.

A találmány szerinti megoldásban első alkalommal azonosítottunk zonulin peptid-antagonistákat. Ezek a peptid-antagonisták ZOT receptorokhoz kötődnek, de az emlős tj-k nyitását élettanilag nem módosítják. A peptid-antagonisták kompetitív módon gátolják a ZOT és a zonulin ZOT receptorhoz kötődését, ezáltal az emlős tj-ok nyitásának élettani módosítására gyakorolt hatásukat.

A találmány tárgyát képezi zonulin peptid-antagonisták azonosítása.

A találmány tárgyát képezi továbbá a peptid-antagonisták színéztése és tisztítása.

A találmány tárgyát képezi továbbá a peptid-antagonisták gyulladásellenes hatóanyagként gyomor-bélrendszeri gyulladások kezelésére történő alkalmazása.

A találmány tárgyát képezi továbbá a peptid-antagonisták alkalmazása vér-agy gát károsodásának megakadályozása érdekében.

A találmány fentebb leírt és más, az alábbi részletes leírásból nyilvánvalóvá váló tárgyának egyik megvalósulási módja a következő aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazó zonulin peptid-antagonista: a szekvencialistában a 15. azonosítószámú szekvencia. A peptid-antagonisták ZOT receptorhoz kötődnek, de nem módosítják élettanilag az emlős tj-ok nyitását.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírásai közöljük.

Az 1. ábra nyúl bélből nyert tisztított zonulin (■) egyrétegű CaCo2 sejtenyészeten szöveti reziszen-

ciájára (Rt) kifejtett hatását mutatja, különböző negatív kontrollokkal összehasonlítva (2. frakció (○); 3. frakció (●); 4. frakció (▲) és 5. frakció (□) Q-Sepharose oszlopról).

A 2. ábra Ussing-kamrára erősített nyúlébélből származó tisztított zonulin (●) nyúl ileum szöveti rezisztenciájára (Rt) kifejtett hatását mutatja, a negatív kontroll mintával összehasonlítva (○).

A 3. ábra Ussing-kamrára erősített nyúlébélből származó tisztított zonulin (●) nyúl ileum szöveti rezisztenciájára (Rt) kifejtett hatását mutatja, a negatív kontrollokkal összehasonlítva (zonulin + zonulin elleni ellenanyag (○); zonulin + tau elleni ellenanyag (Δ); és tau (▲)).

A 4A és 4B ábra emberi agyból (▲), bélből (●) vagy szívből (○) származó tisztított zonulin hatását mutatja Ussing-kamrára erősített Rhesus majom jejunum (4A ábra) és ileum (4B ábra) szöveti rezisztenciájára (Rt), a negatív kontrollal (□) összehasonlítva.

Az 5A és 5B ábra emberi szívből (▲) vagy agyból (○) származó tisztított zonulin hatását mutatja Ussing-kamrára erősített nyúl jejunum (5A ábra) és ileum (5B ábra) szöveti rezisztenciájára (Rt), a negatív kontrollal (●) összehasonlítva.

A 6. ábra nyúlból és különböző emberi szövetekből származó tisztított zonulin N-terminális szekvenciájának összehasonlítását mutatja be.

A 7. ábra különböző emberi szövetekből nyert tisztított zonulin N-terminális szekvencia és IgM nehézlánc összehasonlítását mutatja a ZOT biológiailag aktív fragmensének N-terminális szekvenciájával (288-399. aminosav).

A 8. ábra ZOT, zonulin és zonulinh Ussing-kamrára erősített nyúl ileum szöveti rezisztenciájára (Rt) kifejtett hatását mutatja önmagában (tele oszlopok) vagy az FZ1/0 (üres oszlopok) vagy az FZ1/1 (sávozott oszlopok) peptid-antagonistával kombinációban, negatív kontrollal összehasonlítva. $N = 3-5$; és * egyenlő $p < 0,01$.

A következőkben részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány fentebb leírt tárgyának egyik megvalósulási módja a következő aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazó zonulin peptid-antagonista: a szekvencialistában a 15. azonosítószámú szekvencia. A peptid-antagonisták ZOT receptorhoz kötődnek, de nem módosítják élettanilag az emésztés-tűrését.

A peptid-antagonista mérete nem kritikus a találmány szempontjából. A peptid-antagonista általában 8-110, előnyösen 8-40, még előnyösebben 8 aminosav hosszúságú.

A peptid-antagonisták jól ismert technikák, pl. a High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation Analysis and Conformation [Szerk.: Mant és mtsai., C. R. C. Press (1991)] című könyvben leírtak szerint, és peptid szintetizáló berendezés, pl. Symphony (Protein Technologies, Inc.) alkalmazásával kémiai módszerekkel szintetizálhatók és tisztíthatók, vagy rekombináns-DNS-módszerekkel állíthatók elő, amely során a megfelelő, pl. E. coli- vagy élesztő expressziós vektorba inszertált, peptidet kódoló nukleotid szekvencia a megfelelő gazdaszövetben expresszálódik, majd abból jól ismert módszerekkel kitisztítható.

A peptid-antagonisták a bél átteresztőképességének fokozódását eredményező gyomor-bélrendszeri gyulladások kezelésére, gyulladáscsökkentő hatóanyagként alkalmazhatók. A találmány szerinti peptid-antagonisták pl. a proteinvesztéses enteropathiát okozó állapotok esetén alkalmazhatók. Proteinvesztéses enteropathiát okozhatnak:

- a fertőzések, pl. a *C. difficile*-fertőzés, az enterocolitis, a shigellosis, a vírusos gyomor-bélgyulladás, a parazitás fertőzések, a baktérium túlszaporodás, a Whipple-kór;
- a nyálkahártya-kimaróddással vagy fekélyképződéssel járó betegségek, pl. a gyomorgyulladás, a gyomorrák, a kollagén képződéssel járó vastagbélgyulladás, a gyulladásos bélbetegségek;
- a nyirokér elzáródással járó betegségek, pl. az öröklött bél lymphangiectasia, a sarcoidosis, a lymphoma, a mesenterialis tuberculosos, és a vesézületett szívbetegség sebészeti korrekciójaként végzett Fontan-műtét mellékhatása;
- a fekélyképződés nélküli nyálkahártya megbetegedések, pl. a Ménétrier-kór, coeliakia betegség, az eozinofil sejtes gyomor-bélgyulladás; és
- az immunrendszer megbetegedései, pl. a szisztémás lupus erythematosus vagy a táplálékallergia (elsősorban a tejallergia) [ld. még a teljes terjedelmében a kitanítás részét képező *Pediatric Gastrointestinal Disease Pathophysiology Diagnosis Management*, pp. 536-543. 40-2. táblázat, szerk.: Wyllie és mtsai., kiad.: Saunders Co. (1993)].

Egy másik megvalósítási módban, a tálmány tárgyát gyomor-bélrendszeri gyulladások kezelésére alkalmas, ilyen kezelést igénylő egyének zomulin peptid-antagonista gyógyászati szempontból hatékony mennyiségének beadását magában foglaló eljárás képezi, amely peptid-antagonista az alábbi csoportba tartozó aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazza: a szekvencialistában az 15. azonosítószámú szekvencia. A peptid-antagonista ZOT receptorhoz kötődik, de az emlős tj-ok nyitását életlenül nem módosítja.

Ebből a célból, a peptid-antagonista vékonybélben történő célba juttatáshoz szájon át alkalmazható készítményként adható be. Ilyen, szakember számára jól ismert, vékonybélben történő célba juttatásra alkalmas szájon át adható készítmények általában gyomorsaválló tabletták vagy kapszulák [Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16. kiadás, 89. fejezet, szerk.: Osol, kiad.: Mack Publishing Co., (1980); Digenis és mtsai.: *J. Pharm. Sci.* 83, 915-921 (1994); Vantini és mtsai.: *Clinica Terapeutica* 145, 445-451 (1993); Yoshitomi és mtsai.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1902-1905 (1992); Thoma és mtsai.: *Pharmazie* 46, 331-336 (1991); Morishita és mtsai.: *Drug Design and Delivery* 7, 309-319 (1991); és Lin és mtsai.: *Pharmaceutical Res.* 8, 919-924 (1991); a felsoroltak mindegyike teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi].

A tabletták gyomorsavállóságát pl. cellulóz-acetát-ftalát vagy cellulóz-acetát-tereftalát hozzáadásával biztosítják.

A kapszulák szilárd gyógyszerformák, amelyekben a peptid-antagonistá(ka)t kemény vagy lágy, oldható zselatintok vagy -burok tartalmazza. A kapszulagyártáshoz használt zselatint kollagén-tartalmú anyagból hidrolízissel nyerik. A zselatin két típusa ismert. Az A típusú sertésbőrrel savas, a B típusú pedig csontokból és állati bőrből lúgos feldolgozással nyerik. A kemény zselatinkapszula alkalmazása az egyéni igényeknek leginkább megfelelő adagolás biztosítása mellett lehetővé teszi egy vagy több, különböző peptid-antagonista kombinációjának felírását. A kemény zselatinkapszula két, egymásba csúsztatott részből áll, így teljesen körülvéve a peptid-antagonistát. A kapszulák töltése során a peptid-antagonistát, vagy az azt tartalmazó gyomorsaválló gyöngyöket a kapszula hosszabb végébe töltik, majd ráhúzzák a másik részt. A kemény zselatinkapszulákat főleg zselatinból, FD&C színezőanyagok, csetenként zavarosítósanyag, pl. titán-dioxid hozzáadásával készítik. Az USP engedélye alapján a zselatin a

gyártás során történő bomlás megakadályozása céljából 0,15 vegyes% kén-dioxidot tartalmazhat.

A találmány szempontjából a vékonybélben történő célba juttatásra alkalmas szájon át adható készítmények vizes pufferelő anyagokat tartalmazó folyékony készítmények is lehetnek, amelyek puffer-összetevője megakadályozza a peptid-antagonisták gyomornedv általi lényeges mértékű inaktiválását, ezáltal lehetővé teszi a peptid-antagonista aktivált formában a vékonybélbe kerülését. Ilyen, a találmány szerinti megoldás során alkalmazható vizes alapú pufferhatású anyag többek között a bikarbonát-puffer ($\text{pH} = 5,5-8,7$, előnyösen pedig kb. 7,4).

A szájon át beadható folyékony készítményt - a stabilitási problémák csökkentése érdekében - közvetlenül a beadás előtt előnyös elkészíteni. Ilyenkor a liofilizált peptid-antagonistái vizes pufferoldatban lehet feloldani.

A peptid-antagonisták alkalmasak a vér-agy gát károsodásának megakadályozására. A találmány szerinti peptid-antagonisták tehát például a vér-agy gát károsodásával járó állapotok kezelésére is alkalmazhatók. Ilyenek többek között az ozmotikus károsodások, pl. a cerebális ischaemia, a stroke vagy az agydémia; a magas vérnyomás; a szén-dioxid mérgezés; a görcsrohamok; a kémiai toxikózisok; az urémia (veseelégtelenség); az agyburok-, az agyvelő- ill. az agy- és gerincvelő fertőző (vírusos, pl. SRV, HIV stb.), bakteriális (TB, H. influenzae, meningococcus) vagy allergiás eredetű gyulladása; a dagadatok; a traumás agysérülések; a sugárzás okozta sérülések; az éretlenség és a Kern-icterus; a demielinizációs betegségek, mint a sclerosis multiplex vagy a Guillaine-Barre-szindróma.

Egy további megvalósulási módban, a találmány tárgyát a vér-agy gát károsodásával járó állapotok kezelésére alkalmas, ilyen kezelést igénylő egyénnek a szekvencialistában a 35. azonosítószámú aminosavszekvenciát tartalmazó zonulin peptid-antagonista gyógyászati szempontból hatékony mennyiségének beadását magában foglaló eljárás képezi, amely peptid-antagonista a páciens agyában ZOT receptorhoz kötődik, de nem módosítja élettanilag az agy tíz-jainak nyitását.

Ebből a célból, a peptid-antagonista az agyba történő célba juttatás céljából intravénás beadásra alkalmas készítményben adható be. Az ilyen készítmények szakember számára jól ismertek, és általában élettani hígítószer, pl. desztillált vizet vagy 0,9 vegyes%-os NaCl-oldatot tartalmaznak.

Az alkalmazott peptid-antagonista gyógyászati szempontból hatékony mennyisége nem kritikus a találmány szempontjából, és a kezelt betegség vagy állapot, valamint a kezelt páciens kora, testtömege és neme szerint változhat. Általában, a gyomor-bélgyulladások vagy a vér-agy gát károsodások megakadályozása, azaz a zonulin biológiai aktivitásának gátlása céljából alkalmazott találmány szerinti peptid-antagonisták mennyisége kb. $7,5 \times 10^{-6}$ és $7,5 \times 10^{-3}$ M, előnyösen kb. $7,5 \times 10^{-6}$ és $7,5 \times 10^{-4}$ M. Ilyen végső bélbeli valamint vérbeli koncentráció elérése érdekében a találmány szerinti peptid-antagonista egyszeri szájon át beadott dózisa általában 1,0-1000 μg , előnyösen pedig kb. 1,0-100 μg .

A peptid-antagonisták zonulinhoz specifikusan kötődni képes, poliklonális vagy monoklonális ellenanyagok indukálása céljából immunogénként is alkalmazhatók, a technika állása szerint jól ismert eljárások alkalmazásával [Abrams: Methods Enzymol. 121, 107-119 (1986)]. Ezek az ellenanyagok a zonulin szövetekben vagy testfolyadékokban történő meghatározására, illetve affinitás-tisztítására, vagy a zonulinhoz kötődve aktivitásának gátlására, pl. gyomor-bélrendszeri gyulladások vagy a vér-agy gát károsodásának megakadályozására alkalmazhatók.

A következő példák kizárólag a találmány szemléltetését szolgálják, és nem céljuk a találmány ol-

talma körének korlátozása.

1. példa

ZOT tisztítás

5000 ml, pZ14 plazmida transzformált CVD110 V. cholerae törzs [Michalski és mtsai.: Infect. Immun. 61, 4462-4468 (1993)] tenyésztésével nyert felülúszó frakciót rétegáramlásos szűrő alkalmazásával 10 kDa küszöbértéknél 1000-szeresére koncentráltuk. A *Vibrio cholerae* zot génjét magában foglaló pZ14 felépítésének részletes leírása megtalálható többek között a 96/37196 számú nemzetközi közzétételi iratban. A kapott felülúszóval ezután 8,0 tömeg%-os SDS-poli(akril-amid)-gélén elektroforézist végeztünk. A proteinsávokat az SDS-poli(akril-amid)-gél Comassie-kékkel végzett festésével mutattuk ki. A pTTQ181 plazmida (Amersham, Arlington Heights, IL) transzformált és azonos módon kezelt CVD110 törzs tenyésztése során nyert kontroll felülúszóval összehasonlítva ZOT-nak megfelelő proteinsáv nem volt kimutatható. Tehát annak ellenére, hogy a zot gén a pZ14-ben a nagymértékben indukálható és erős tac promotor mögött helyeződött, a protein pZ14-felülúszóban még ezerszeres koncentráció esetén sem volt kimutatható a Comassie-kékkel festett SDS-poli(akril-amid) gélén.

A. MBP-ZOT

A termelt ZOT mennyiségének növelése érdekében a zot gént MBP-ZOT fúziós protein előállítására céljából a maltóz kötő protein („maltose binding protein”, a továbbiakban MBP) génjével egy leolvasási keretben egyesítettük.

A ZOT expresszióhoz és tisztításához a pMAL-c2 MBP vektort (Biolab) alkalmaztuk, a zot gén E. coli malE génjéhez történő fúziójával. Ez a szerkezet a klónozott zot gén nagymértékű expressziójának érdekében erős, indukálható tac promotert és malE transzlációs kezdőjelet alkalmaz. A pMAL-c2 vektor a malE jelzőszekvencia fúziós protein citoplazmabeli expresszióját előidéző deléciójával rendelkezik. A fúziós protein izolálása céljából affinitás-kromatográfiás MBP tisztítást (Biolab) alkalmaztunk.

Közelebbről, pMAL-c2 vektort (a malE génnel hasító) EcoRI-gyel linearizáltunk, végeit Klenow-fragmenssel töltöttük, és (a pMAL-c2 többszörös kötő molekulában egy hellyel rendelkező) XbaI-gyel emésztettük. A ZOT-t kódoló nyitott leolvasási keretet pBB241 plazmidból [Baudry és mtsai.: Infect. Immun. 60, 428-434 (1992)] szubklónoztuk. A pBB241 plazmidot BssHII-vel emésztettük, végeit Klenow-fragmenssel töltöttük, és XbaI-gyel emésztettük. Ezután a tompa XbaI fragmenst pMAL-c2-be szubklónozva a pLC10-c plazmidot kaptuk. Mivel az inszert és a vektor tompa és ragadós végekkel egyaránt rendelkezett, a helyes elhelyezkedést az inszert 5' végét a malE 3' végével összekapcsolva nyertük. A pLC10-c-t ezután elektroporációval DH5α E. coli törzsbe juttattuk. A pBB241-ben a BssHII restrikciós hely a zot nyitott leolvasási kereten belül található, így a ZOT 1-8. aminosavait a MBP-ZOT fúziós protein nem tartalmazza.

Az MBP-ZOT fúziós protein tisztítása céljából 0,2 vegyes% glükózt és 100 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Bertani tápközeget egy pLC10-c teleppel oltottuk be és egy éjszakán át 37°C-on, rázás mellett inkubáltuk. A tenyészetet 1:100 arányban 1,0 ml friss tápközeggel hígítottuk és rázás mellett 37°C-on kb. $1,0 \times 10^8$ sejt/ml sűrűségig tenyésztettük. Ezután az MBP-ZOT expresszió indukálása céljából 0,2 ml IPTG-t adtunk hozzá, majd a tenyészetet további 3 órán át 37°C-on inkubáltuk. A baktériumokat ezután pelletáltuk (centrifugával leüleptítettük), majd 20 mM Tris-HCl-t, 0,2 M NaCl-t, 1,0 mM EDTA-t, 10 mM 2-ME-t és 1,0 mM Na₂S₂O₃-t tartalmazó jéghideg „oszlop pufferben” feloldottuk. A

baktériumszuszpenziót francia prés alkalmazásával roncsoltuk és 13000 x g-nél 4°C-on 30 percen át centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük, az oszlop pufferrel 1:5 arányban hígítottuk, majd az oszlop pufferrel előzetesen ekvilibrált 1 x 10-es amilózgyanta oszlopra (Biolabs, „MBP-fusion purification system”) vittük. Az oszlop ötszörös mennyiségű oszlop pufferrel történő mosása után az MBP-ZOT proteint 10 ml 10 mM maltóz-oldattal eluáltnak. 1 ml mennyiségű tenyészetből általában 2-3 mg proteint nyertünk ki.

Az MBP fúziós partnert a tisztított MBP-ZOT fúziós proteinnél 20 µg MBP-ZOT mennyiségenként 1,0 µg „Factor Xa” proteáz (Biolabs) alkalmazásával hasítottuk le. A „Factor Xa” proteáz éppen a ZOT N-terminális vége előtt hasít. Az így nyert ZOT proteint ezután 8,0 vegyes%-os SDS-poli(akrilamid)-gélen futtattuk, majd a gélről elektroseparatorációs kamra (Schleicher and Schuell, Keene, NH) alkalmazásával elektroelutáltuk.

A kapott tisztított ZOT Ussing-kamrában vizsgálva a szöveti rezisztencia (Rt) dózisfüggő csökkenését okozta, $7,5 \times 10^{-8}$ M ED50 mellett.

B. 6xHis-ZOT

A zot gént polimeráz láncreakcióval, Deep Vent polimeráz (New England Biolabs), DNS-templákként pedig pBB241 plazmid (Baudry és mtsai., ld. fentebb) alkalmazásával amplifikáltuk. A következő 5' és 3' lánccindítókat alkalmazzuk: 5'-CGGGATCCCGTATGAGTATCTTT-3' (a szekvencialistában a 39. azonosítószámú szekvencia); illetve 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (a szekvencialistában a 40. azonosítószámú szekvencia). A fenti oligonukleotidok 5' vége BamHI illetve HindIII restrikciós helyet tartalmaz. A kapott (1200 bázis méretű) amplikont 8,0 vegyes%-os agaróz gélen végzett elektroforézissel vizsgáltuk, majd a sómaradványoktól és a szabad nukleotidoktól „Xtreme” forgó oszlop (Pierce) alkalmazásával megtisztítottuk. A tisztított amplikont ezután a fent említett két restrikciós enzimmel emésztettük, majd az így nyert emésztett amplikont az előzetesen BamHI-gyel és HindIII-mal emésztett pQE30 vektorba (Quiagen) inszertálva a pSU113 plazmidot nyertük. A pQE30 expressziós vektor egy 6 poli-hisztidin toldalékot tartalmazó rekombináns protein nagymértékű expresszióját idézi elő. A pSU113 plazmid expressziós terméke tehát egy 6xHis-ZOT fúziós protein. A pSU113-mal ezután DH5α E. coli-t transzformáltunk.

A 6xHis-ZOT fúziós protein tisztítása céljából a transzformált E. coli-t 37°C-on egy éjszakán keresztül 150 ml 2,0 vegyes% glükózi, 25 µg/ml kanamicint és 200 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Bertani tápközegben kb. 1,10 A600 eléréséig tenyésztettük. Ezt követően az egy éjszakán át inkubált tenyészet 75 ml-ét 1000 ml 2,0 vegyes% glükózi, 25 µg/ml kanamicint és 200 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Bertani tápközeghez adtuk, és 37°C-on, erőteljes rázás mellett kb. 3 órán keresztül, kb. 0,7-0,9 A600 eléréséig inkubáltuk. Ezután 2,0 mM végső koncentráció eléréséig IPTG-t adtunk hozzá, és 37°C-on 5 órán át folytattuk a tenyésztést. A sejteket 20 percen át 4000 x g-vel végzett centrifugálással kinyertük, a 5,0 ml/g nedves tömegben 6,0 M GuHCl-t, 0,1 M nátrium-foszfátot és 0,01 M Tris-HCl (pH = 8,0) puffert tartalmazó A-pufferben feloldottuk és 1 órán át szobahőmérsékleten kevertük. A keveréket ezután 30 percig 4°C-on 10000 x g-nél centrifugáltuk, a kapott felülúszóhoz 4,0-5,0 ml/g nedves tömegben 50%-os „SUPERFLOW” gyantát (Qiagen) adtunk, és szobahőmérsékleten 1 órán keresztül kevertük. A gyantát 1,6 x 8,0 oszlopra vittük, amelyet egymást követően A pufferrel, 8,0 M karbamidot, 0,1 M nátrium-foszfátot és 0,01 M Tris-HCl-t (pH = 8,0) tartalmazó B pufferrel valamint 8,0 M karbamidot, 0,1 M nátrium-foszfátot és 0,01 M Tris-HCl-t (pH 6,3) tartalmazó C pufferrel mostuk. Mindegyik mosást addig

végeztük, amíg az átfolyó anyag A600-értéke 0,01 alatti nem lett. Az oszlopról a 6xHis-ZOT fúziós proteint 20 ml 250 mM imidazolt tartalmazó C pufferrel eluáltuk. Ezután a 6xHis-ZOT fúziós proteint tartalmazó frakciókat SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel, a Davis által leírt eljárás [Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)] szerint ellenőriztük, és a gélt Comassie-kékkel festettük. A 6xHis-ZOT fúziós proteint tartalmazó frakciókat 8,0 M karbamid ellenében dializáltuk, összekevertük, majd PBS-sel 100-szoros hígítást készítettünk. Ezt követően 4,0 ml 50%-os „SUPERFLOW” gyantát adtunk hozzá, 2 órán át szobahőmérsékleten kevertük, majd a kapott gyantát 1,6 x 8,0 oszlopra vittük, amit ezután 50 ml PBS-sel mostunk. Az oszlopról a 6xHis-ZOT fúziós proteint 10 ml 250 mM imidazolt tartalmazó PBS-sel eluáltuk. A kapott eluátumot PBS ellenében dializáltuk és a 6xHis-ZOT fúziós proteint a fentiekben leírtak szerint SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel ellenőriztük.

2.példa

Affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagok termelése

Specifikus antiszérum előállítása céljából glutation S-transzferáz (GST)-ZOT kiméra proteint expresszáltunk és tisztítottunk.

Részletesebben, a zot nyitott leolvasási keret polimeráz láncreakcióival (PCR) történő amplifikálásához oligonukleotid-láncindítókat alkalmaztunk, templát DNS-ként pBB241-plazmid (Baudry és mtsai.: ld. fentebb) felhasználásával. Az 5'-láncindító (TCATCACGGC GCGCCAGG, a szekvencialistában a 25. azonosítószerű szekvencia) a zot nyitott leolvasási keret 15-32., a 3'-láncindító (GGAGGCTAG AATCTGCCCG AT, a szekvencialistában a 26. azonosítószerű szekvencia) pedig a ctxA nyitott leolvasási keret 5' végének felelt meg. A ZOT 1-5. aminosavai tehát hiányoztak a kapott fúziós proteinből. Az amplifikációs terméket a pGEX-2T-ben (Pharmacia, Milwaukee, WI) a GST-gén végénél található többszörös kapcsolódási helyre (SmaI hely) inszertáltuk. A pGEX-2T egy fúziósprotein-expresszálnó vektor, amely a klónozott gént *Schistosoma japonicum* GST-vel fúziós proteinként expresszálna. A fúziós gén a tac promotor ellenőrzése alatt áll. IPTG-vel végzett indukció során felszabadul a gátlás alól és GST fúziós protein expresszálódik.

A kapott, pLC11-nek nevezett rekombináns plazmidot DH5α *E. coli* törzsbe elektroporáltuk. GST-ZOT fúziós protein tisztítása céljából 10 ml 100 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Bertani tápközeget egy pLC11-et tartalmazó teleppel oltottunk be, és 37°C-on, rázás mellett egy éjszakán át inkubáltuk. A tenyészetet ezután 1:100 arányban 1,0 ml friss tápközzel hígítottunk, és 37°C-on, rázás mellett kb. $1,0 \times 10^8$ sejt/ml sűrűségig tenyésztettük. A GST-ZOT expresszió indukciója céljából 0,2 mM IPTG-t adtunk hozzá, és a tenyészetet 37°C-on további 3 órán át inkubáltuk. A baktériumokat ezután pelletáltuk, 20 ml jéghideg PBS-ben (pH = 7,4) feloldottuk és francia présrel ronsoltuk. A GST-ZOT protein ilyen körülmények között nem oldódott, hanem a baktériumpellet-frakcióval leülepedett. A pelletet ezért 0,00625 M Tris-HCl-t (pH = 6,8), 0,2 M 2-ME-t, 2,0 vegyes% SDS-t, 0,025 vegyes% brómfenol-kéket és 10 tff% glicerolt tartalmazó Laemli lizispufferben feloldottuk, 8,0 vegyes%-os poli(akril-amid)-SDS gélen elektroforézizáltuk, és Comassie briliáns-kékkel festettük. A gélről elektroseparatorációs kamra (Schleicher & Schuell, Keene, NH) alkalmazásával egy kb. 70 kDa-os (26 kDa GST + 44 kDa ZOT), a fúziós proteinnek megfelelő sávot eluáltunk.

Az eluált (10-20 µg) protein 10 µg-ját azonos mennyiségű Freund-féle komplett adjuvánssal nyúlba injektáltuk. Négy és nyolc héttel később Freund-féle inkomplett adjuvánssal két megerősítő dózist

adtunk be. Egy hónap múlva a nyúlból vért vettünk.

A specifikus ellenanyagok termelésének meghatározásához 10-10 M ZOT valamint MBP-ZOT és GST-ZOT fúziós proteinekkel nylon membránra vittünk és a nyúl antiszérum 1:5000 arányú hígításával 4°C-on, mérsékelt rázás mellett egy éjszakán át inkubáltunk. A szűrőt ezután 4-szer 15 percig 0,05 t% Tween 20-at tartalmazó PBS-sel (a továbbiakban PBS-T) mostuk, és torra-peroxidázzal konjugált nyúl elleni kecske IgG 1:30000 arányú hígításával szobahőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáltuk. A szűrőt ezután 0,1 t% Tween-t tartalmazó PBS-sel ismételtén 4-szer 15 percig mostuk, és az immunreaktív sávokat fokozott kemilumineszcencia (Amersham) alkalmazásával mutattuk ki.

Az immunoblot-vizsgálatban a nyúl antiszérum a ZOT-ot, és a MBP-ZOT és GST-ZOT fúziós proteinekkel egyaránt felismerte, a MBP negatív kontrollt viszont nem.

A megfelelő ZOT elleni ellenanyagok termelésének igazolása céljából Ussing-kamra alkalmazásával neutralizációs kísérletet végeztünk. A pZ14 felülszóval 37°C-on 60 percig végzett inkubáció után a ZOT-specifikus antiszérum (1:1000 hígításban) az Ussing-kamrára erősített nyúl ileumon teljesen megakadályozta a szöveti rezisztencia (Rt) ZOT által indukált csökkenését.

Ezután a ZOT elleni ellenanyagokat MBP-ZOT affinitás oszlop alkalmazásával affinitástisztítottuk.

Részletesebben, az 1. példában leírt módon nyert, tisztított MBP-ZOT 1,0 mg-ját szobahőmérsékleten egy éjszakán át előzetesen aktivált gélhez (Aminolink, Pierce) kötve MBP-ZOT affinitás oszlopot készítettünk. Az oszlopra PBS-sel végzett mosás után 2,0 ml ZOT elleni nyúl antiszérumot vittünk. Szobahőmérsékleten 90 percig végzett inkubálást követően az oszlopot 14 ml PBS-sel mostuk, és a specifikus ZOT elleni ellenanyagokat 4,0 ml 50 mM glicint (pH = 2,5), 150 mM NaCl-t és 0,1 t% Triton X-100-at tartalmazó oldattal eluáltuk. Az eluált 1,0 ml-es frakciók pH-ját 1,0 N NaOH-val azonnal semlegesítettük.

3. példa

Zonulin tisztítása

Az 1997. február 20-án benyújtott 08/803364 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben leírt megfigyelés alapján, miszerint a ZOT specifikus felületi receptorokkal lép kölcsönhatásba, majd a tj áteresztőképességet szabályozó sejten belüli események komplex folyamatát aktiválja, a találmányban elfogadottnak tekintettük, hogy a ZOT utánozni képes az emlős tj élettani modulátorának hatását. Az 1997. május 21-én benyújtott 08/859931. sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés elfogadottnak tekintette, hogy a ZOT és élettani analógja (zonulin) funkcionális és immunológiai szempontból összefügg. Ezért, a zonulin különféle nyúl és emberi szövetekben végzett kutatásához affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagokat és az Ussing-kamrás vizsgálat kombinációját alkalmaztuk.

A. Nyúl szövetek

Nyúl beléből zonulint tisztítottunk. A szövetet PBS-ben homogenizálva roncsoltuk. A kapott sejt-készítményeket 40000 rpm-nél 30 percig centrifugáltuk, majd a felülszót összegyűjtöttük és liofilizáltuk. A kapott liofilizált terméket ezután PBS-ben [10:1 (t/t)] oldottuk, 0,45 mm-es membránszűrőn átszűr-
tük, Sephadex G-50 kromatográfiás oszlopra vittük és PBS-sel eluáltuk. Ezután az oszlopról nyert 2,0 ml-es frakciókat a 2. példában leírt módon előállított, affinitástisztított ZOT elleni ellenanyagok alkalmazá-

sával standard Western-immunoblot eljárással vizsgáltuk.

A pozitív frakciókat (amelyekhez a ZOT elleni ellenanyagok kötődtek), összekevertük, liofilizáltuk, PBS-ben (1:1 t%) oldottuk majd „Q-Sepharose” oszlopon sógradiens kromatográfiát végeztünk. A sógradiens 50 mM Tris pufferben (pH = 8,0) 0-100 vegyes%-os volt. Öt 20 ml-es frakciót gyűjtöttünk, majd azokat a 2. példában leírt módon nyert affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával standard Western-immunoblot eljárással vizsgáltuk. A Western-immunoblot vizsgálat során egyedül az 1. frakció (20 vegyes% NaCl) bizonyult pozitívnak.

Ezután a Q-Sepharose oszlopról nyert frakciók szöveti rezisztenciára gyakorolt hatását egyrétegű CaCo2 sejtenyészeten és nyúl vékonybélben, Ussing-kamrákban vizsgáltuk.

Részletesen, sejtenyészeti palackokban (Falcon) párasított 95% O₂/5% CO₂ légkörben 37°C-on 10 t% magzati borjúsavót, 40 µg/l penicillint és 90 µg/l sztreptomícint tartalmazó Dulbecco szerinti módosított Eagle-féle tápközegben CaCo2-sejteket tenyésztettünk. A sejteket 1:5 felületi aránynál 5 naponként tripsinnel végzett kezelés után, 70-80% konfluens állapot eléréséig tovább tenyésztettük. A kísérletben használt sejtek passzázsszáma 15-30 között változott.

Az egyrétegű CaCo2 sejtenyészeteiket polisztirol gyűrűre (6,4 mm átmérőjű, Transwell Costar) szorosan illesztett szövetenyészettel kezelt polikarbonát szűrőn konfluens állapot eléréséig (12-14 nappal az 1:2,5 felületi aránynál történő kioltás után) tenyésztettük. A szűrőket egy módosított Ussing-kamra savóshártyai és nyálkahártyai kompartmentjeit elkülönítő, szorosan illeszkedő betétre helyeztük fel. A kísérletet az Ussing-kamra alkalmazásának nyúlbéltre vonatkozó, Fasano és mtsai. általi leírása [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8, 5242-5246 (1991)] szerint végeztük. Az eredmények az 1. ábrán láthatók.

Amin az az 1. ábrán megfigyelhető, a zonulintartalmú frakció a zonulinmentes frakcióhoz képest az egyrétegű CaCo2 sejtenyészeten ellenállásának jelentős csökkenését eredményezte.

Ezt követően 2-3 kg-os, hím, Új-Zélandi fehér fajtájú, cervicális dislocatio-val elpusztított nyuliból származó ileummal Ussing-kamrás vizsgálatot végeztünk. Az ileum egy 20 cm-es részletét eltávolítottunk, a bétartalomtól megtisztítottuk, mesenterialisan felnyitottuk és eltávolítottuk izom- és savóshártya rétegét. Nyolc, ily módon előkészített nyálkahártyaréteget ezután lucit Ussing-kamrára erősítettünk (1,12 cm² nyitás), feszültséget előállító, toldókötéses berendezéshez („voltage clamp apparatus”, EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) kapcsoltuk, és frissen készített, 53 mM NaCl-t, 5,0 mM KCl-t, 30,5 mM mannitolt, 1,69 mM Na₂HPO₄-ot, 0,3 mM NaH₂PO₄-ot, 1,25 mM CaCl₂-t, 1,1 mM MgCl₂-t és 25 mM NaHCO₃-ot tartalmazó Ringer-oldatba helyeztük. Az oldat hőmérsékletét egy állandó hőmérsékletű keringtető pumpához kapcsolt és 95% O₂/5% CO₂-vel áramoltatott vízköpenyes tartállyal 37°C-on tartottuk.

A nyálkahártya felőli oldalra 100 µl nyulibélből tisztított zonulint juttattunk. A potenciálkülönbséget 10 percnként mértük, a zárlati áram (I_{sc}) és a szöveti rezisztencia (R_t) értékét a Fasano és mtsai. által leírtak (ld. fentebb) szerint számoltuk. A szöveti változatosság miatt az adatokat a következő képlettel számoltuk: $\Delta R_t (x \text{ időponthán mért } R_t) - (a \text{ 0. időponthán mért } R_t)$. Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be.

Mint a 2. ábrán látható, a zonulintartalmú frakció a zonulinmentes frakcióhoz képest a nyúl vékonybél ellenállásának jelentős csökkenését okozta. Ez a hatás a zonulin tartályból történő eltávolításával teljes mértékben visszafordítható volt.

A zonulintartalmú frakciót 8,0 vegyes%-os SDS-poli(akril-amid)-gélben végzett elektroforézissel,

majd ezt követően a ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával Western-immunoblot eljárással is vizsgáltuk. Az SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel elkülönített proteinsávokat 100 ml (3-[ciklohexil-amino]-1-propánszulfonsav) 10x-et, 100 ml metanol, és 800 ml desztillált vizet tartalmazó CAPS puffer alkalmazásával PVDF szűrőre (Millipore) vittük. A Western-immunoblot vizsgálattal kimutatott egy sávban elhelyezkedő protein látszólagos molekulatömege kb. 47 kDa volt. Ezt a sávot a PVDF szűrőről kivágtuk, és a Hunkapiller által leírtak [Methods of Protein Microcharacterization 11-12. fejezet, szerk.: Shibley, kiad.: Humana Press 315-334 (1985)] szerint 494-es „Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus” alkalmazásával N-terminális szekvencia meghatározást végeztünk. A nyúléből tisztított zonulin N-terminális szekvenciája a szekvencialistában a 27. azonosítószámon található.

A nyúl zonulin N-terminális szekvenciáját BLAST adatbázis lekérdezéssel más protein szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A vizsgálat eredménye szerint a nyúl zonulin N-terminális szekvenciája 85%-ban azonos, 100%-ban pedig hasonló a Homo sapiens tau proteinjének N-terminális szekvenciájához.

Annak meghatározása céljából, hogy a nyúl zonulin és a tau azonos gyök-e, Ussing-kamrában keresztneutalizációs vizsgálatot végeztünk. Részletesebben, kezeletlen vagy előzetesen 37°C-on 60 percig (1:10 hígításban) tau elleni ellenanyagokkal (Sigma) inkubált nyúl ileum nyálkahártyára 10 µl/ml nyúl zonulint juttattunk. Kontrollként 10 µl/ml ZOT elleni ellenanyagokkal (1:10 hígításai) előzetesen inkubált nyúl zonulint (2. példa); és 0,4 µl/ml tisztított tau-t (Sigma) alkalmaztunk. Az eredményeket a 3. ábrán mutatjuk be.

Mint a 3. ábrán látható, a nyúl zonulin a szöveti rezisztencia jellegzetes esökkenését okozta, ami a protein Ussing-kamrából történő eltávolításával azonnal visszafordítható volt. Ezt az aktivitást a ZOT elleni ellenanyagokkal végzett előzetes kezelés teljesen, a tau elleni ellenanyaggal végzett kezelés azonban nem semlegesítette. A tau protein ezzel szemben nem volt lényeges hatással a szöveti rezisztenciára.

A nyúl zonulin különféle egyéb nyúliszövetekben, pl. a szívben, az agyban, az izomban, a gyomorban, a lépben, a tüdőben, a vesében, továbbá a nyúl bélesatorna különböző részeiben, pl. a jejunum diszális és proximális részében, az ileumban, a vakbélben és a vastagbélben is kimutatható. Ezeket a nyúliszöveteket a fentiekben a nyúlélre vonatkozóan leírtak szerint kezelve, és 8,0 vegyes%-os SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel, majd azt követően a 2. példában leírt módon nyert affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával Western-immunoblot eljárással vizsgálva, mindegyik vizsgált szövet esetében egy kb. 47 kDa méretű egyszeres sáv volt kimutatható.

B. Emberi szövetek

Zonulint különböző emberi szövetekből, többek között bélből, szívből és agyból is tisztítottunk. Magzati és felnőtt szöveteket egyaránt alkalmazzuk. A szöveteket PBS-ben homogenizálva roncsoltuk. A kapott sejtészítményt ezután 30 percig 40000 rpm-nél centrifugáltuk, a felhúszót összegyűjtöttük és liofilizáltuk. A kapott liofilizált terméket ezután PBS-ben [10:1 (tf/tf)] oldottuk, 0,45 mm-es membránszűrőn átszűrtük, Sephadex G-50 kromatográfiás oszlopra vittük, majd PBS-sel eluáltuk. Ezután az oszlopról nyert 2,0 ml-es frakciókat a 2. példában leírt módon nyert affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával standard Western-immunoblot eljárással vizsgáltuk.

A pozitív frakciókat, amelyekhez a ZOT elleni ellenanyagok kötődtek, összekevertük, liofilizáltuk, PBS-ben (1:1 1%) oldottuk és „Q-Sepharose” oszlopon sógradiens kromatográfiát végeztünk. A sógradiens 50 mM Tris pufferben (pH = 8,0) 0-100 vegyes%-os volt. Öt 20 ml-es frakciót gyűjtöttünk,

amelyeket a 2. példában leírt módon nyert affinitás-tisztított ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával standard Western-immunoblot eljárással vizsgáltuk.

Az 1. frakció (20 vegyes% NaCl) a Western-immunoblot vizsgálatával egy 47 kDa méretű sávot mutattunk ki. A 2. frakció (40 vegyes% NaCl) vizsgálata során két további, 35 és 15 kDa méretű sávot sikerült kimutatni. A 3. (60 vegyes% NaCl) és a 4. frakció (80 vegyes% NaCl) vizsgálata során csak a 35 és 15 kDa méretű sávokat sikerült kimutatni. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a zonulint valószínűleg az alkalmazott szövetekben található proteázok lebontják, és a bomlási termékek az oszlopról a holoproteinhez képest magasabb sókoncentrációnál eluálódnak.

Ezután a „Q-Sepharose” oszlopról nyert 1. (emberi szív-, bél- és agyszövetekből származó) és 4. (szív szövetből származó) frakció nyúl és Rhesus majom bélszöveti rezisztenciára gyakorolt hatásait vizsgáltuk Ussing-kamrában.

Az Ussing-kamrában végzett vizsgálatokhoz 2-3 kg-os, felnőtt, him Új-Zélandi fehér típusú nyúl vagy 5-6 kg-os, felnőtt, him Rhesus-majom különböző bélszakaszait, többek között jejunumot, ileumot vagy colont használtunk fel. Az állatok leölése után a bél - a jejunum, az ileum és a colon - különböző szakaszait eltávolítottuk, megtisztítottuk a beltartalomtól, mesenterialisan felnyitottuk és eltávolítottuk az izom- és savóshártya rétegét. Nyolc, így módon előkészített nyálkahártyaréteget [három jejunum, három ileum és két colon (vastagbél)] ezután lucit Ussing-kamrára erősítettünk (1,12 cm² nyitás), feszültséget előállító, toldókötiéses berendezéshez (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) kapcsoltuk, és frissen készített, 53 mM NaCl-t, 5,0 mM KCl-t, 30,5 mM mannitolt, 1,69 mM Na₂HPO₄-ot, 0,3 mM NaH₂PO₄-ot, 1,25 mM CaCl₂-t, 1,1 mM MgCl₂-t és 25 mM NaHCO₃-ot tartalmazó Ringer-oldatba helyeztük. Az oldat hőmérsékletét egy állandó hőmérsékletű keringtető pumpához kapcsolt és 95% O₂/5% CO₂-vel átáramoltatott vízköpenyes tartállyal 37°C-on tartottuk.

100-100 µl emberi szívből, emberi agyból vagy emberi bélből nyert tisztított 1. frakcióbeli zonulint vagy emberi szívből nyert tisztított 4. frakcióbeli zonulint juttattunk a nyálkahártyára. A potenciálkülönbséget 10 percnként mértük, a zárlati áram (I_{sc}) és a szöveti rezisztencia (R_t) értékét a Fasano és mtsai. által leírtak (ld. fentebb) szerint számoltuk. Az adatokat a 4A és 4B ábránál R_t-ként, az 5A és 5B ábránál pedig, a szöveti változatosság miatt ΔR_t-ként [(x időpontban mért R_t) - (a 0. időpontban mért R_t)] számoltuk. Az eredményeket a 4A és 4B (majombél) illetve az 5A és 5B ábrán (nyúlbel) mutatjuk be.

Mint a 4A és 4B ábrán látható, az emberi szívből és bélből nyert tisztított zonulin (1. frakció) a negatív PBS-kontrollhoz képest a majombél ellenállásának lényeges mértékű csökkenését idézte elő, a jejunumban (4A ábra) és az ileumban (4B ábra) egyaránt. Emberi szívből vagy bélből nyert tisztított zonulin colontól származó mintán történő vizsgálata során nem tapasztaltunk jelentős változást. A 4A és 4B ábrán az is látható, hogy az emberi agyból nyert tisztított zonulin (1. frakció) sem a majom jejunumra (4A ábra) sem az ileumra (4B ábra) nem gyakorolt lényeges hatást. Az emberi szívből nyert tisztított zonulin (4. frakció) lényeges mértékben csökkentette a majom vékonybél szöveti rezisztenciáját is.

Mint az 5A és 5B ábrán látható, nyúlbel alkalmazásával hasonló eredményeket tapasztaltunk. Eszerint, az emberi szívből nyert tisztított zonulin (1. frakció) a nyúl jejunum (5A ábra) és ileum (5B ábra) szöveti rezisztenciájára egyaránt jelentős hatást gyakorolt, a colontól származó minta esetében viszont ilyen hatást nem mutatott. Az 5A és 5B ábrán az is látható, hogy az emberi agyból nyert tisztított zonulin (1. frakció) sem a nyúl jejunumra (5A ábra) sem az ileumra (5B ábra) nem gyakorolt lényeges

hatást.

Annak meghatározására, hogy a zonulin fokozza-e a szájon át adott inzulin célba juttatását, nyálbél alkalmazásával *in vitro* kísérleteket végeztünk. Röviden, 2-3 kg-os, felnőtt, hím Új-Zélandi fehér fajtájú nyulakat cervicalis dislocatio-val leöltünk. A nyálból vékonybél-részeket (jejunumot vagy ileumot) távolítottunk el, azokat megtisztítottuk a béltartalomtól, mesenterialisan felnyitottuk és eltávolítottuk izom- és savóshártya rétegüket. Nyolc, így módon előkészített nyálkahártyaréteget ezután lucit Ussing-kamrára erősítettünk (1,12 cm² nyitás), feszültséget előállító, tördőkötéses berendezéssel (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) kapcsoltuk össze, és frissen készített, 53 mM NaCl-t, 5,0 mM KCl-t, 30,5 mM mannitolt, 1,69 mM Na₂HPO₄-ot, 0,3 mM NaH₂PO₄-ot, 1,25 mM CaCl₂-t, 1,1 mM MgCl₂-t és 25 mM NaHCO₃-ot tartalmazó Ringer-oldatba helyeztük. Az oldat hőmérsékletét egy állandó hőmérsékletű keringtető pumpához kapcsolt és 95% O₂/5% CO₂-vel áramoltatott vízköpenyes tartállyal 37°C-on tartottuk. Megmértük a feszültségkülönbséget (PD), és kiszámoltuk a zárlati áram (I_{sc}) valamint a szöveti rezisztencia (R_t) értékét. Amikor a szövetek nyugalmi állapotba kerültek, az ellenállásuk alapján egymáshoz párosított szövetek lumen felőli oldalára önmagában, vagy 100 µl 1. frakcióbéli szívből származó zonulin jelenlétében 10-11 M 125I-inzulint (Amersham, Arlington Heights, IL; 2,0 µCi = 10-12 M) juttattunk. Egyidejűleg az alapértékek meghatározása céljából a savóshártya oldaláról 1 ml-es, a nyálkahártya felőli oldalról pedig 50 µl-es mintaadagokat nyertünk. A következő 100 percben a savóshártya felőli oldalról 20 percenként mintákat gyűjtöttünk.

Az tapasztaltuk, hogy a szívből származó zonulin, időtartamtól függően a jejunumban ($0,058 \pm 0,003$ fmol/cm².min valamint $0,12 \pm 0,005$ fmol/cm².min, kezeletlen valamint zonulinnal kezelt szövetek, $p = 0,001$) és az ileumban ($0,006 \pm 0,0002$ fmol/cm².min valamint $0,018 \pm 0,005$ fmol/cm².min, kezeletlen valamint zonulinnal kezelt szövetek, $p = 0,05$) egyaránt fokozta az inzulin bélbeli felszívódását.

Emberi szívből, bélből, és agyból nyert tisztított 1. frakcióbéli zonulint 8,0 vegyes%-os SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel, majd ezt követően a 2. példában leírt módon nyert ZOT elleni ellenanyagok alkalmazásával Western-immunoblot eljárással szintén vizsgáltuk. Az SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézissel elkülönített proteinsávokat ezután 100 ml (3-[ciklohexil-amiono]-1 propánszulfonsav) 10x-et, 100 ml metanol, 800 ml desztillált vizet tartalmazó CAPS puffer alkalmazásával PVDF szűrőre vittük. A Western-immunoblot vizsgálattal kimutatott egy sávban elhelyezkedő protein látszólagos molekulatömege kb. 47 kDa volt. Ezt a sávot a PVDF szűrőről kivágtuk, és a Hunkapiller által leírtak [Methods of Protein Microcharacterization 11-12. fejezet, szerk.: Shibley, kiad.: Humana Press 315-334 (1985)] szerint 494-es „Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus” alkalmazásával N-terminális szekvencia meghatározást végeztünk. A felnőtt emberi szívből, a felnőtt emberi agyból és a magzati emberi agyból nyert tisztított zonulin N-terminális szekvenciája a szekvencialistában a 28., a 29. valamint a 36. azonosítószámon található.

A felnőtt emberi bélből nyert tisztított zonulin (a szekvencialistában a 31. azonosítószámú szekvencia) első kilenc aminosavának szekvenciáját szintén meghatároztuk, és az emberi szívből nyert tisztított (a szekvencialistában a 28. azonosítószámon bemutatott) zonulin első kilenc aminosavával azonosnak találtuk (ld. 6. ábra). A magzati emberi bélből nyert tisztított zonulin N-terminális szekvenciájának első 20 aminosavát szintén meghatároztuk: Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly

Xaa Ser Asn Arg Leu (a szekvencialistában a 30. azonosítószámú szekvencia), és a szekvencialistában a 28. azonosítószámon bemutatott, emberi szívből nyert tisztított zonulin aminosavszekvenciájával majdnem azonosnak találtuk (ld. 6. ábra).

A felnőtt és a magzati agyból tisztított zonulin N-terminális aminosavszekvenciája (a szekvencialistában a 29. illetve a 36. azonosítószámú szekvencia) teljes mértékben különbözött a szívből, magzati és felnőtt bélből nyert tisztított zonulin N-terminális szekvenciájától (a szekvencialistában a 28., a 30. valamint a 31. azonosítószámú szekvencia) (ld. 6-7. ábra). Valószínűleg ez a különbség magyarázza a zonulin szöveti speciticitását a fent leírt (pl. bélfal esetében tapasztalt) szöveti áteresztő képesség meghatározásában.

Az emberi szívből, bélből és agyból tisztított zonulin N-terminális szekvenciái egyaránt különböznek a nyúlbélből tisztított zonulin N-terminális szekvenciájától (6. ábra). Annak megállapítása céljából, hogy ezek a proteinek egy tau-val rokonságban álló proteincsoport különböző izoformáit képviselik-e, nyúl és emberi szövetekkel 0,8 vegyes% SDS-poli(akril-amid)-gélelektroforézist, majd ezt követően ZOT elleni vagy tau elleni ellenanyagok alkalmazásával Western-immunoblot vizsgálatot végeztünk. A nyúl és emberi szövetekből (agyból, bélből és szívből) tisztított, a ZOT elleni ellenanyagokkal reakcióba lépett 47 kDa molekulatömegű zonulin sávok a tau elleni ellenanyagokkal is keresztreakciót mutattak. Az emberi agyból sókrómográfiával tisztított, különböző zonulin-frakciókat ZOT elleni vagy tau elleni ellenanyagok alkalmazásával Western-immunoblot eljárással vizsgáltunk. Míg a ZOT elleni ellenanyagok az eredeti 47 kDa-os proteint és mindkét, 35 kDa-os és 15 kDa-os lebomlási terméket felismerték, a tau elleni ellenanyagok csak az eredeti 47 kDa-os proteint és a 35 kDa-os fragmenst ismerték fel, a 15 kDa-os fragmenst viszont nem. Annak megállapítása céljából, hogy a 35 kDa-os fragmens tartalmazza-e a zonulin N-terminális vagy C-terminális végét, meghatároztuk a 35 kDa-os sáv N-terminális szekvenciáját, amely a következő: Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu (a szekvencialistában a 32. azonosítószámú szekvencia). Ez a szekvencia különbözik az eredeti, emberi agyból nyert zonulin N-terminális szekvenciájától (a szekvencialistában a 29. azonosítószámú szekvencia). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 15 kDa-os fragmens a zonulin N-terminális, a 35 kDa-os fragmens pedig a C-terminális részét képviseli.

Míndezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a tau elleni ellenanyagok által felismert, a protein C-terminális részének irányában elhelyezkedő zonulin-domén a zonulin különböző - emberi vagy nyúl szövetből származó - izoformáiban közös (míg az N-terminális különböző lehet), és valószínűleg szerepe van a protein áteresztőképességet befolyásoló hatásában (azon megfigyelés alapján, hogy a tau β -tubulinhoz kötődését követően a sejt-citoskeleton átrendeződik, valamint a 4. frakció majom vékonybél szöveti rezisztenciájára kifejtett hatása miatt).

Emberi szívből és bélből nyert tisztított zonulin N-terminális szekvenciáját BLAST adatbázis lekérdezéssel összehasonlítottuk más proteinszekvenciákkal. Ennek eredménye szerint az emberi zonulin N-terminális szekvenciája 95%-ban megegyezik a Homo sapiens IgM variábilis nehéz láncának N-terminális szekvenciájával (a szekvencialistában a 37. azonosítószámú szekvencia).

Végül az emberi szívből tisztított zonulin- és az emberi IgM azonosságának meghatározása céljából az emberi zonulint részlegesen emésztettük, majd meghatároztuk az így nyert belső fragmens szekvenciáját.

Közelebbről, emberi szívből nyert tisztított zonulint tartalmazó PVDF szűrő 1,00 mm-ét egy előzetesen 0,1 vegyes%-os trifluor-ecetsavval (TFA) mosott és metanollal öblített műanyag csőbe helyeztük. 75 µl 100 mM Tris-t (pH = 8,2), 10 w% CH₃CN-t és 1 t% dehidrogenált Triton X-100-at tartalmazó pufferoldat hozzáadása után a membránt 37°C-on 60 percig inkubáltuk. Ezt követően 150 ng tripszint adtunk hozzá, és 37°C-on további 24 órán át inkubáltuk. A kapott oldatot 10 percig ultrahanggal kezeltük, majd a felülúszót dekantáltuk. Ezután 75 µl 1 vegyes%-os TFA-t adtunk hozzá, az oldatot további 10 percig ultrahanggal kezeltük és a felülúszót dekantáltuk. Mindkét adagot 5 µm részecske- és 300 Å pórus méretű 0,5 mm x 250 mm-es C18-oszlopra vittük. 0,1 vegyes% TFA 45% CH₃CN víz + 0,1 vegyes% TFA grádiens alakítottunk ki 2óra 15 percre. A csúcsokat végtől összegyűjtöttük és szekvencia meghatározást végeztünk.

A felnőtt emberi szívből nyert tisztított zonulin belső szekvenciája a következő: Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly (a szekvencialistában a 33. azonosítószámú szekvencia).

Az emberi zonulin belső szekvenciáját BLAST adatbázis lekérdezéssel más proteinszekvenciákkal hasonlítottuk össze. Az analízis eredménye szerint az emberi zonulin belső szekvenciája a Homo sapiens IgM változó nehéz láncának bármely belső szekvenciájával 0%-ban azonos.

A 3. példa eredményei szerint 1) a paracelluláris útvonal élettani modulátora a zonulin; 2) a nyúl zonulin N-terminális szekvenciája a tau protein N-terminális szekvenciájával nagyfokú homológiát mutat; 3) a zonulin és a tau immunológiai szempontból rokon, de funkcionálisan különböző; 4) a szívből és a bélből nyert emberi zonulin N-terminális szekvenciája nagyfokú homológiát mutat az IgM változó régiója nehéz láncának N-terminális szekvenciájával; 5) az emberi zonulin és IgM két különböző, szerkezetiileg rokonságban álló, de funkcionális szempontból különböző gyököt képvisel; és 6) a zonulin a közös, aktív C-terminális és különböző N-terminális szekvenciával rendelkező tau-rokon proteinek családját képviseli.

4. példa

Zonulin peptid-antagonistái

Az alapján, hogy a ZOT, az emberi bélből nyert zonulin (zonulini) és az emberi szívből nyert zonulin (zonulinh) mindegyike bélben található [Fasano és mtsai.: Gastroenterology 112, 839 (1997); Fasano és mtsai.: J. Clin. Invest. 96, 710 (1995); és 1-5. ábra] és endothelialis tj-re hat, és mindhárom hasonló, a ZOT receptorok bélbeli megoszlásának megfelelő [Fasano és mtsai. (1997), ld. fentebb; és Fasano és mtsai. (1995) ld. fentebb] regionális hatással rendelkezik [Fasano és mtsai. (1997), ld. fentebb], a találmányban feltételeztük, hogy mindhárom molekula azonos receptorkötő-hellyel lép kölcsönhatásba. Ezért, a bélben található tj-k szabályozásában részt vevő receptor-ligandum kölcsönhatáshoz szükséges abszolút szerkezeti feltételek tisztázása érdekében összehasonlítottuk a ZOT és az emberi zonulinok elsődleges aminosav szerkezetét. A molekulák N-terminális végének vizsgálata során a következő közös mintázatot találtuk (a 8-15. aminosav, a 7. ábrán bekeretezve): nem poláris (Gly a bélben, Val az agyban), változó, nem poláris, változó, nem poláris, poláris, változó, poláris (Gly). A 8., a 12. és a 13. helyen található Gly, Val valamint Gln a ZOT-ban, a zonulini-ben és a zonulinh-ban nagymértékben konzervált (ld. 7. ábra), ami feltételezésünk szerint a receptor bélbeli kötőfunkciója szempontjából döntő jelentőségű. Ennek igazolása céljából a Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly (a szekvencialistában a 15. azonosítószámon található; FZJ/0 elnevezésű és az emberi magzati zonulin 8-15. aminosavának megfelelő) aminosavszekvenciájú szintetikus oktapeptid kémiai szintézisét végeztük el.

Ezt követően nyúlbelet a fentiekben leírt módon Ussing-kamrákra erősítettünk, és 100 µg FZI/0-t (a szekvencialistában a 15. azonosítószámú szekvencia), 100 µg FZI/1-et (a szekvencialistában a 34. azonosítószámú szekvencia), 1,0 µg (az 1. példában leírt módon nyert) 6xHis-ZOT-t, 1,0 µg (a 3. példában leírt módon nyert) zonulini-t, vagy 1,0 µg (a 3. példában leírtak szerint nyert) zonulinh-t, vagy 100 µg FZI/0-val vagy FZI/1-gyel 20 percen át végzett előzetes kezelés után, 1,0 µg 6xHis-ZOT-t, 1,0 µg zonulini-t vagy 1,0 µg zonulinh-t adtunk hozzá. Az eredményeket a 8. ábrán mutatjuk be.

Mint a 8. ábrán látható, az FZI/0 nem okozott jelentős változást a Rt-ban (0,5% a negatív kontrollhoz képest) (ld. tele oszlopok). Ezzel szemben az FZI/0-val 20 percen át végzett előkezelés a ZOT, a zonulini és zonulinh szöveti rezisztenciára gyakorolt hatását 75, 97 illetve 100%-kal csökkentette (ld. üres oszlopok). A 8. ábrán az is látható, hogy ez a gátló hatás egy másik szintetikus, (a zonulinh-nak megfelelően) a 8. helyen a Gly, a 12. helyen a Val és a 13. helyen a Gln a zonulinh-nek megfelelően (Val, Gly illetve Arg) megváltoztatott, kémiaiilag szintetizált peptid alkalmazásával teljesen megszűnt (ld. sávozott oszlopok).

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a ZOT és a zonulin-családba tartozó molekulák N-terminális végén a 8-15. aminosavak között található régió a célreceptorhoz kötődés szempontjából döntő jelentőségű, és a kötődés szöveti specifitását a 8., 12. és 13. helyen található aminosavak határozzák meg.

A találmány és a kitanítás részét képező specifikus megvalósítási módok részletes leírása alapján szakember számára egyértelművé válik, hogy az elvégezhető különböző változtatások és módosítások a találmány szellemét és oltalmi körét nem korlátozzák.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly

1 5

A 2. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly

1 5
A 3. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem

A 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly

1 5
A 4. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem

A 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly

1 5
A 5. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem

A 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly

1 5
A 6. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem

A 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly

1 5

A 7. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 7. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly

1 5

A 8. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 8. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly

1 5

A 9. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 9. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly

1 5

A 10. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 10. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly

1 5

A 11. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 11. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5

A 12. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 12. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly

1 5

A 13. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 13. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly

1 5

A 14. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 14. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly

1 5

A 15. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 15. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
1 5
A 16. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 16. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5
A 17. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 17. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5
A 18. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLÓGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 18. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5
A 19. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 19. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5
A 20. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 20. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5
A 21. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 21. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5
A 22. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 22. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly
1 5
A 23. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 6 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 23. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5
A 24. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 8 aminosav
TÍPUSA: aminosav
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: peptid
HIPOTETIKUS: nem
A 24. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly
1 5
A 25. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 18 bázispár
TÍPUSA: nukleinsav
HÁNY SZÁLÓ: egy
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: szintetikus DNS
HIPOTETIKUS: nem
ANTISZENZ: nem
A 25. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
TCATCACGGC GCGCCAGG 18
A 26. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 22 bázispár
TÍPUSA: nukleinsav
HÁNY SZÁLÓ: egy
TOPOLOGIÁJA: lineáris
MOLEKULATÍPUS: szintetikus DNS
HIPOTETIKUS: nem
ANTISZENZ: nem
A 26. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
GGAGGTCTAG AATCTGCCCCG AT 22
A 27. azonosítószámú szekvencia adatai:
A szekvencia jellemzői:
HOSSZA: 18 aminosav
TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 27. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

1 5 10 15

Val Ile Gln

A 28. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 20 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 28. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu

20

A 29. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 9 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 29. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser

1 5

A 30. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 20 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 30. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10

Xaa Ser Asn Arg Leu

15 20

A 31. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 11 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 31. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gl Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu

1 5 10

A 32. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 11 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 32. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu

1 5 10

A 33. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 33. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

1 5 10

A 34. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 34. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly

1 5

A 35. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 35. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly

1 5

A 36. azonosítószaámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 22 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 36. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly

1 5 10

Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile

15 20

A 37. azonosítószaámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 20 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 37. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

1 5 10

Arg Ser Leu Arg Leu

15 20

A 38. azonosítószaámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 14 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 38. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 39. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 23 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÓ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: szintetikus DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 39. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGGGATCCCG TATGAGTATC TTT

23

A 40. azonosítószámú szekvencia adatai:

A szekvencia jellemzői:

HOSSZA: 24 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÓ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: szintetikus DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 40. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCCAAGCTTG GGTCAAATA TACT

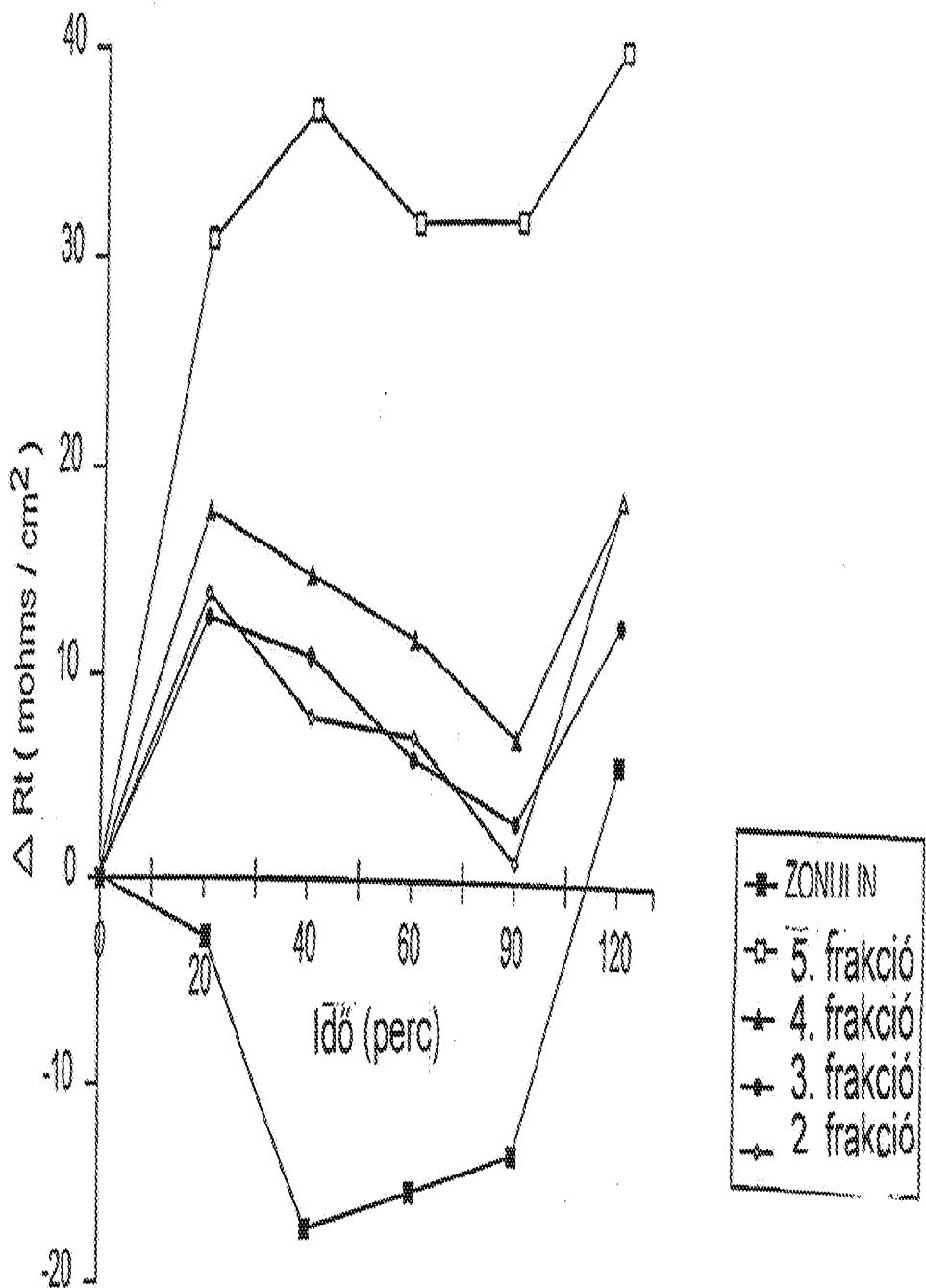
24

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

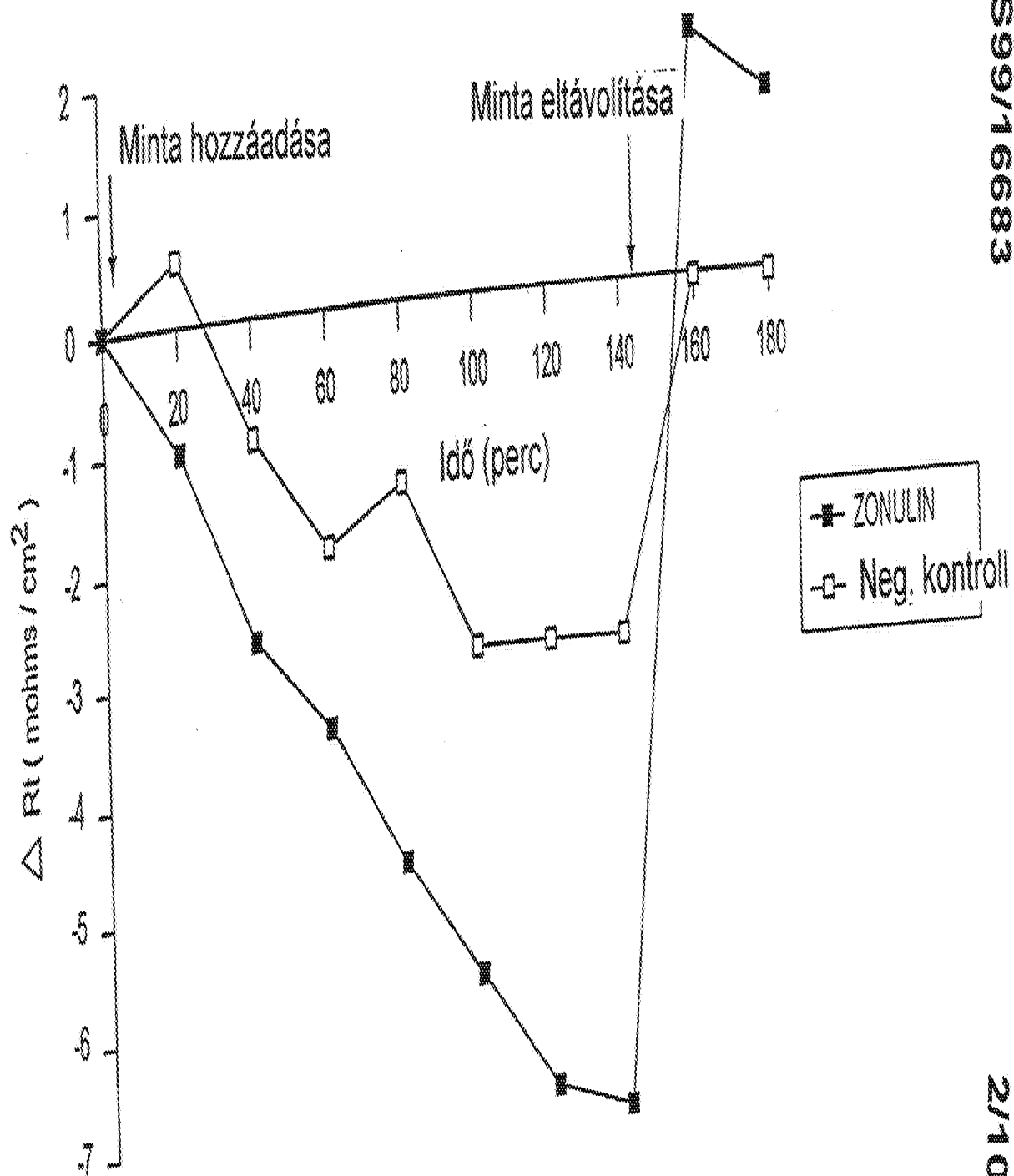
1. Gyógyászati készítmény, amely a 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciával azonos aminosav-szekvenciájú peptid hatásos mennyiségét tartalmazza.
2. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely szíjon át adható dózisokat tartalmazó készítmény.
3. A 2. igénypont szerinti készítmény, ahol az orális dózisokat tartalmazó készítmény a vékonybélbe történő eljuttatásra kiszereft.
4. A 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely gyógyászati készítmény tabletta.
5. A 4. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a tabletta gyomorsaválló.
6. A 4. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely gyógyászati készítmény kapszula.
7. A 6. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a kapszula gyomorsaválló.
8. A 7. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a kapszula legalább egy, a peptidet hordozó gyöngyöt tartalmaz.
9. A 8. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a gyöngy gyomorsaválló.
10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti gyógyászati készítmény gyomor-bélrendszeri gyulladás kezelésében való alkalmazásra.
11. A 10. igénypont szerinti gyógyászati készítmény coeliakiában való alkalmazásra.
12. A 10. igénypont szerinti gyógyászati készítmény gyulladásos bélbetegségben való alkalmazásra.
13. A 15. azonosítószámú aminosav-szekvenciájú, tisztított peptid.
14. A 13. igénypont szerinti peptid alkalmazása gyomor-bélrendszeri gyulladás kezelésére vagy gátlására szolgáló gyógyszer előállításában.
15. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyomor-bélrendszeri gyulladás coeliakia.
16. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyomor-bélrendszeri gyulladás gyulladásos bélbetegség.


DANUBIA
Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.
dr. Svingor Ádám
szabadalmi ügyvivő

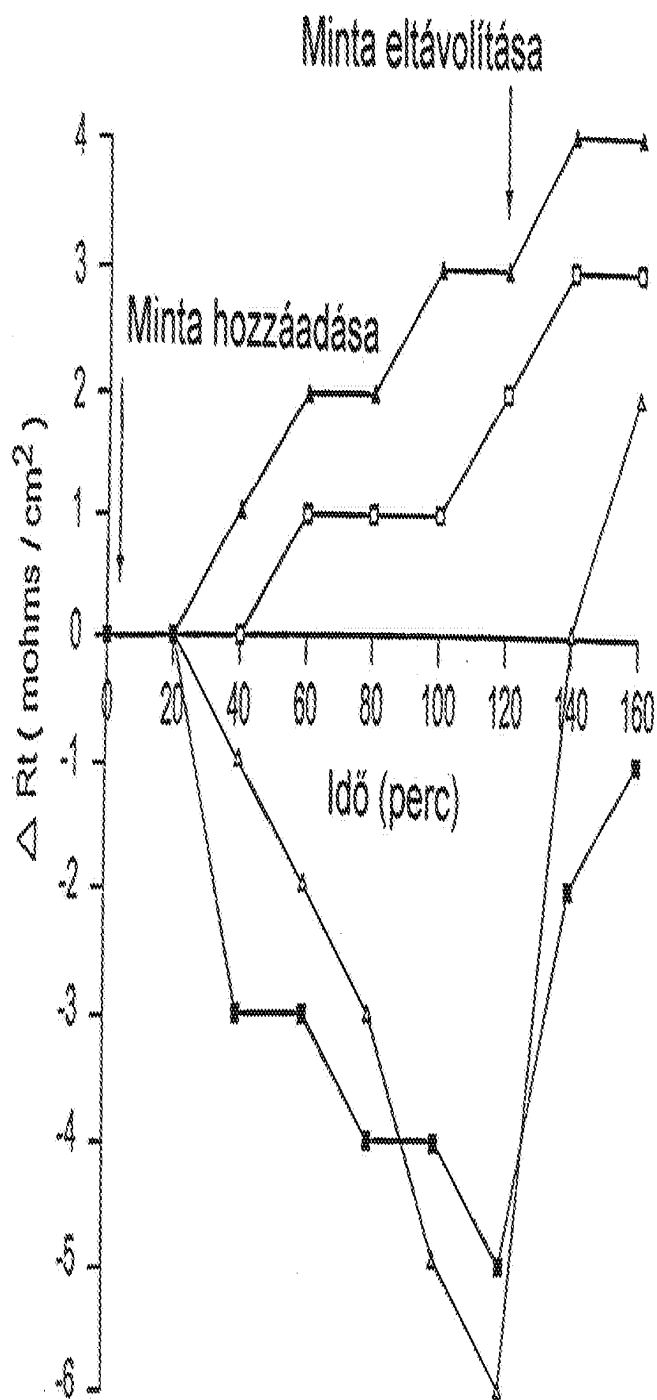
1. ábra



2. ábra



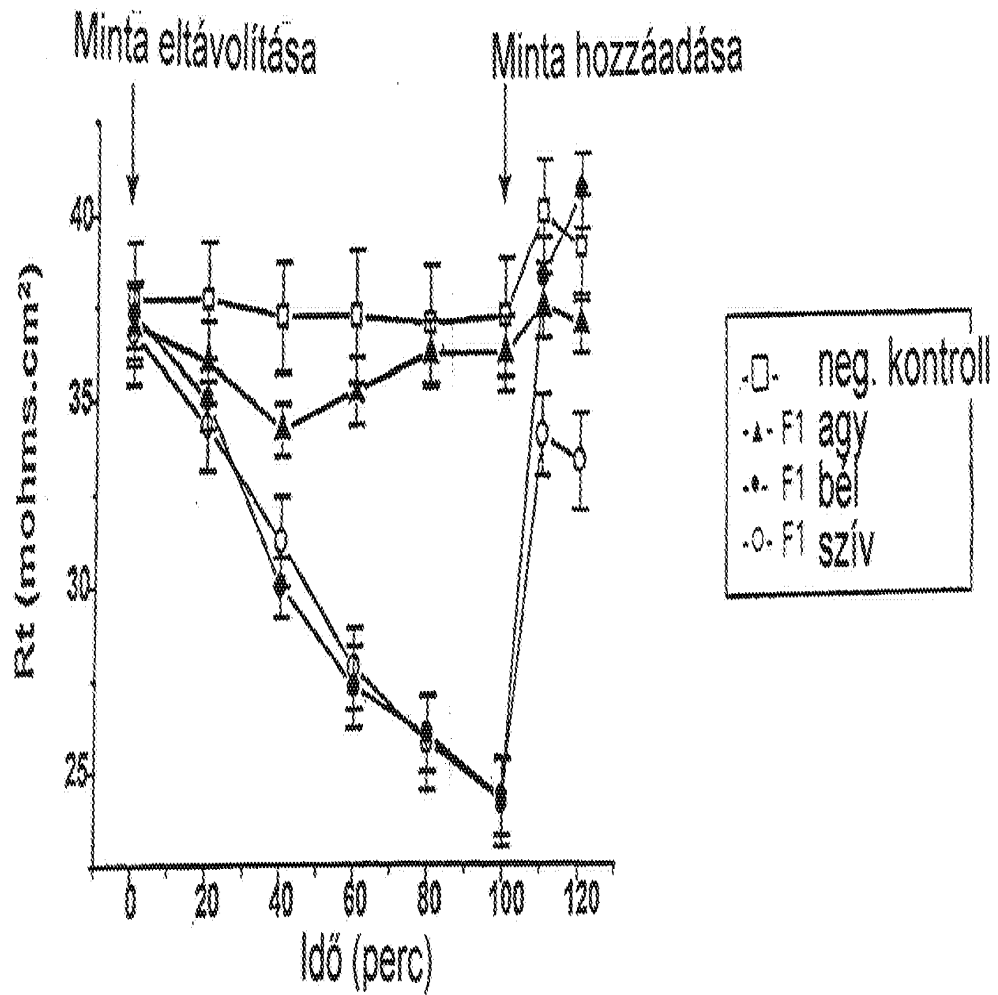
3. ábra



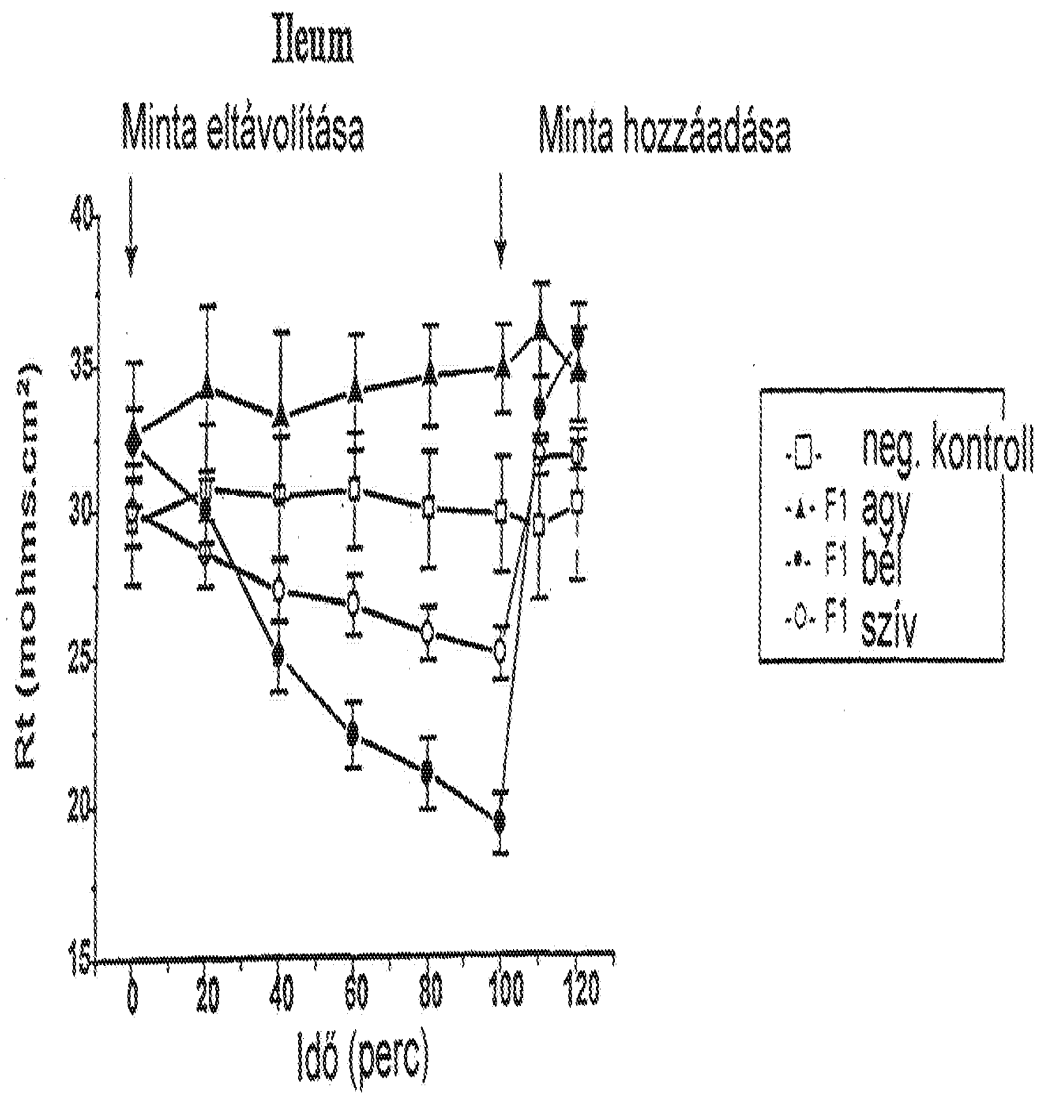
- ZONULIN
- ZONULIN + ZotEllenanyag
- ZONULIN + TauEllenanyag
- Tau

4A ábra

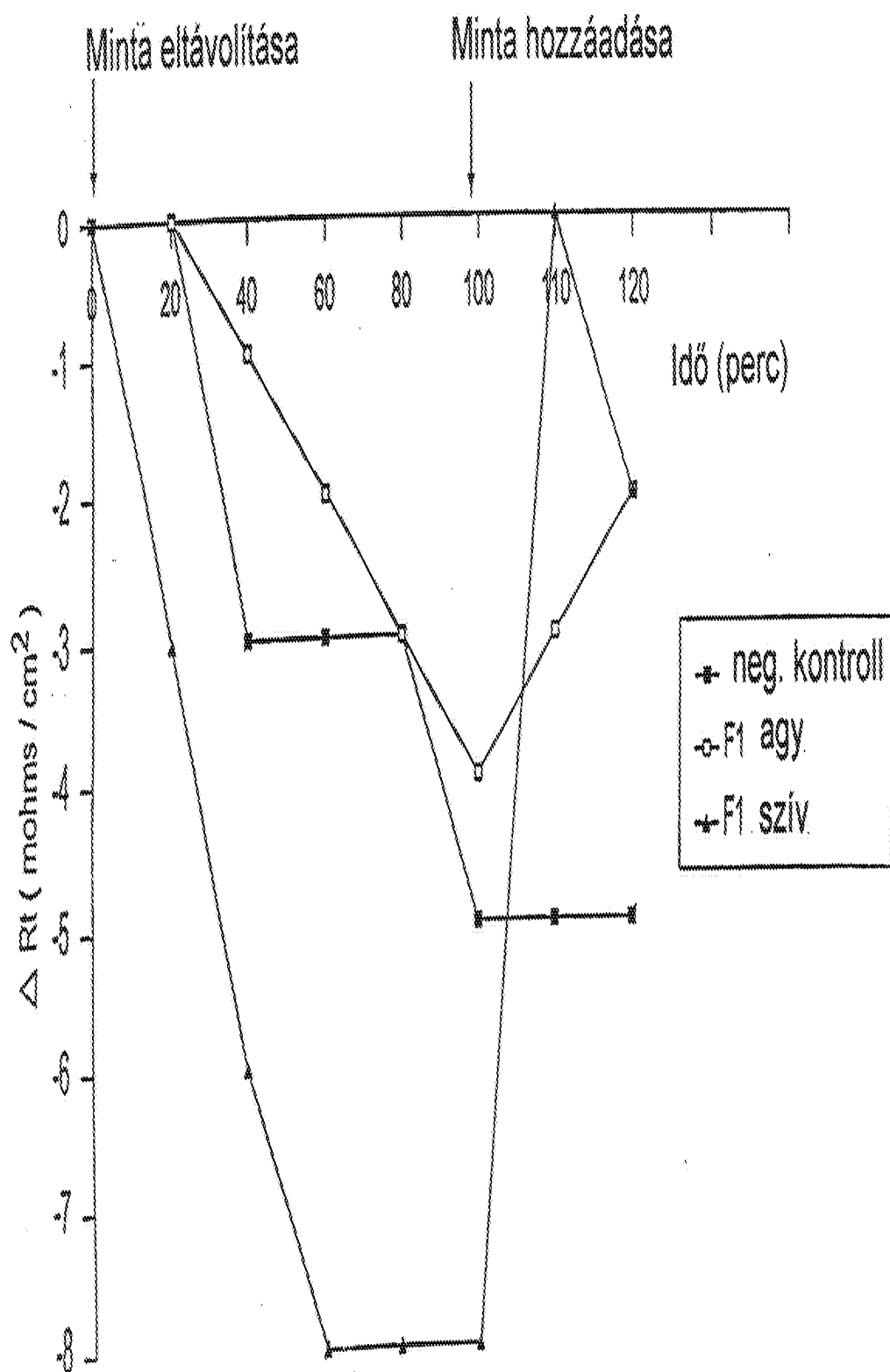
Jejunum



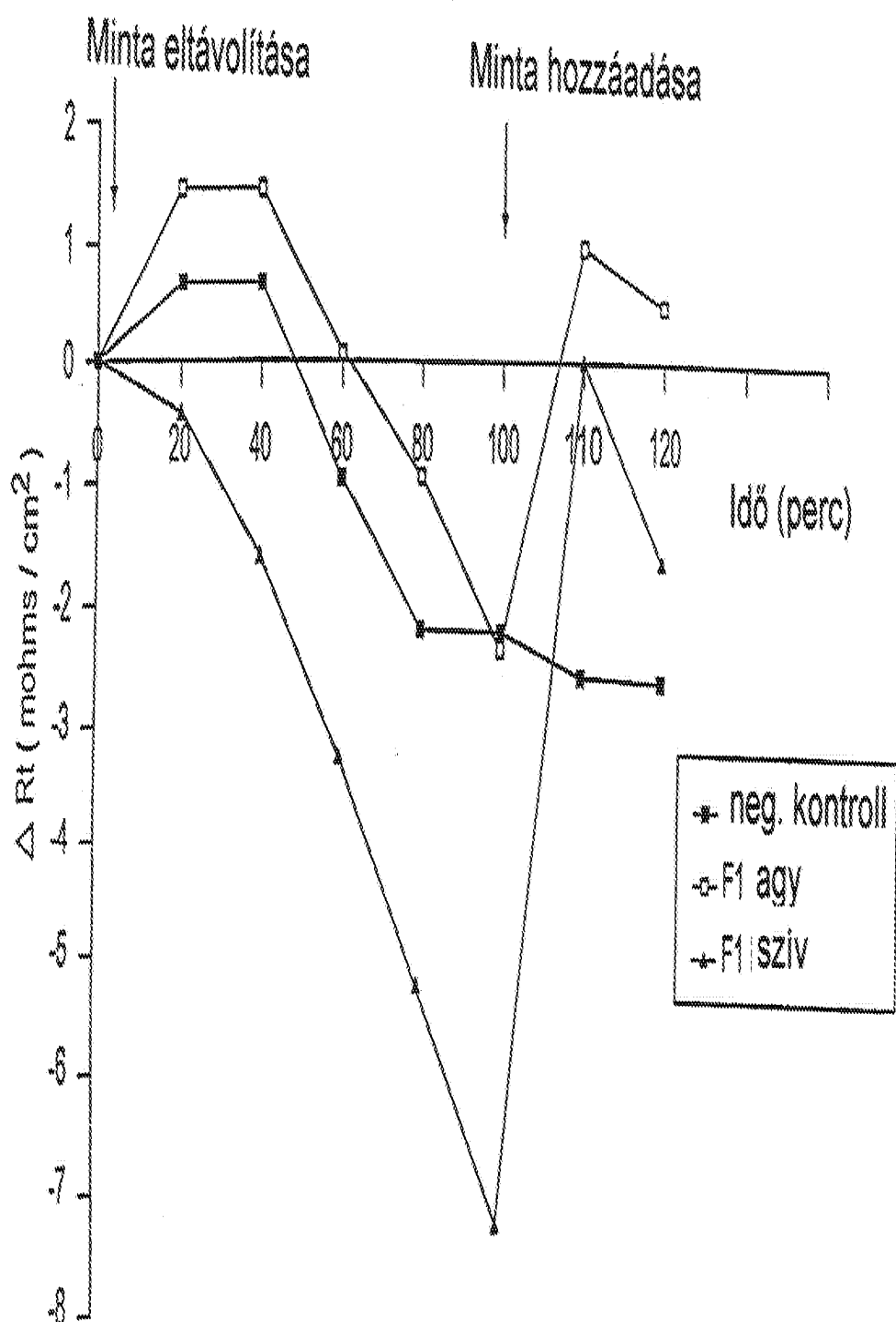
4B ábra



5A ábra



5B ábra



6. ábra

Nyúl,

bél Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln
(Azonosító sz.: 27)

Emberi bél,

fejnött Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu
(Azonosító sz.: 31)

Emberi bél,

magzat Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
(Azonosító sz.: 30)

Emberi szív,

fejnött Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
(Azonosító sz.: 28)

Emberi agy,

fejnött Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
(Azonosító sz.: 29)

Emberi szív,

fejnött
belső szekvencia Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly
(Azonosító sz.: 33)

Emberi agy,

fejnött,
35 kDa-os fragmens Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu
(Azonosító sz.: 32)

7. ábra

<i>Vibrio cholerae</i> ZOT [*] - (Azonosító sz.: 38)	Phe Cys Ile	Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly	Phe Val Thr
Emberi bél, fejnött (Azonosító sz.: 31)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Xaa Leu	
Emberi bél, magzat (Azonosító sz.: 30)	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser	Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	Xaa Ser Asn Arg Leu
Emberi szív, fejnött (Azonosító sz.: 28)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Gly Ser Leu Arg Leu
FZI/0 - (Azonosító sz.: 15)		Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly	
FZI/1 - (Azonosító sz.: 34)		Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly	
Emberi agy, magzat (Azonosító sz.: 36)	Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly	Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly	Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile
Emberi agy, fejnött (Azonosító sz.: 29)	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala	Val Ser	
Emberi IgM, nehéz lánc (Azonosító sz.: 37)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	Arg Ser Leu Arg Leu

A nagy *V. cholerae* által termelt biológiailag aktív fragmens (288-399. aminosavak) a processzió után. Az első Gly megfelel a teljes ZOT-molekula 291. aminosavának [Fasano és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 5242 (1991); és Baudry és mtsai., Infect. Immun., 60(2), 428 (1992)]

8. ábra

