



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 285 762**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/22 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98904957 .2**

(86) Fecha de presentación : **18.02.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1007553**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

(54) Título: **Receptores para la toxina de zonula occludens.**

(30) Prioridad: **20.02.1997 US 803364**
17.02.1998 US 24198

(73) Titular/es: **University of Maryland Baltimore
Office of Research and Development
Suite 500, 515 West Lombard Street
Baltimore, Maryland 21201-1691, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

(72) Inventor/es: **Fasano, Alessio**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Receptores para la toxina de zonula occludens.

5 El desarrollo de la presente invención fue respaldado por la Universidad de Maryland, Baltimore, Maryland.

La invención descrita en esta memoria fue respaldada mediante financiación por el National Institutes of Health (NIH AI35740; NIH DK 48373; y NIH AI19716). El estado tiene algunos derechos.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a receptores para la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae*, así como a métodos que implican el uso de los mismos.

15 **Antecedentes de la invención**

I. *Función y regulación de las uniones de oclusión intestinales*

Las uniones de oclusión (en lo sucesivo “uo”) o zonula occludens (en lo sucesivo “ZO”) son una de las características distintivas de los epitelios absorbentes y segregadores (Madara, *J. Clin. Invest.*, 83:1089-1094 (1989); y Madara, *Textbook of Secretory Diarrhea* Eds. Lebenthal *et al.*, Chapter 11, pages 125-138 (1990)). Como barrera entre los compartimentos apical y basolateral, regulan selectivamente la difusión pasiva de iones y solutos solubles en agua a través de la ruta paracelular (Gumbiner, *Am. J. Physiol.*, 253 (*Cell Physiol.* 22):C749-C758 (1987)). Esta barrera mantiene cualquier gradiente generado por la actividad de las rutas asociadas con la ruta transcelular (Diamond, *Physiologist*, 20:10-18 (1977)).

Las variaciones en la conductancia transepitelial normalmente se pueden atribuir a cambios en la permeabilidad de la ruta paracelular, puesto que la resistencia de las membranas plasmáticas de los enterocitos son relativamente altas (Madara, véase antes). La ZO representa la barrera principal de esta ruta paracelular, y parece que la resistencia eléctrica de los tejidos epiteliales depende del número de cadenas de proteínas de transmembrana y de su complejidad en la ZO, como se observa por microscopía electrónica de criofractura (Madara *et al.*, *J. Cell Biol.*, 101:2124-2133 (1985)).

Hay abundantes pruebas de que las ZO, antes consideradas estructuras estáticas, de hecho son dinámicas y se adaptan fácilmente a una variedad de circunstancias de desarrollo (Magnuson *et al.*, *Dev. Biol.*, 67:214-224 (1978); Revel *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 40:443-455 (1976); y Schneeberger *et al.*, *J. Cell Sci.*, 32:307-324 (1978)), fisiológicas (Gilula *et al.*, *Dev. Biol.*, 50:142-168 (1976); Madara *et al.*, *J. Membr. Biol.*, 100:149-164 (1987); Mazariegos *et al.*, *J. Cell Biol.*, 98:1865-1877 (1984); y Sardet *et al.*, *J. Cell Biol.*, 80:96-117 (1979)), y patológicas (Milks *et al.*, *J. Cell Biol.*, 103:2729-2738 (1986); Nash *et al.*, *Lab. Invest.*, 59:531-537 (1988); y Shasby *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 255 (*Cell Physiol.* 24):C781-C788 (1988)). Los mecanismos reguladores que subyacen en esta adaptación todavía no se entienden completamente. Sin embargo, está claro que, en presencia de Ca^{2+} el montaje de ZO es el resultado de interacciones celulares que desencadenan una cascada compleja de sucesos bioquímicos que finalmente conducen a la formación y modulación de una red organizada de elementos de ZO, cuya composición sólo se ha caracterizado parcialmente (Diamond, *Physiologist*, 20:10-18 (1977)). Recientemente se ha identificado un candidato para las cadenas de proteínas de transmembrana, la ocludina (Furuse *et al.*, *J. Membr. Biol.*, 87:141-150 (1985)).

Se han identificado seis proteínas en una placa submembranosa citoplasmática debajo de los contactos de membrana, pero su función sigue sin esclarecerse (Diamond, véase antes). ZO-1 y ZO-2 existen como un heterodímero (Gumbiner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:3460-3464 (1991)) en un complejo estable frente a detergente con una proteína de 130 kD sin caracterizar (ZO-3). La mayoría de los estudios con microscopio inmunoelectrónico han localizado ZO-1 precisamente debajo de los contactos de membrana (Stevenson *et al.*, *Molec. Cell Biochem.*, 83:129-145 (1988)). Se han localizado otras dos proteínas, la cingulina (Citi *et al.*, *Nature* (London), 333:272-275 (1988)) y el antígeno 7H6 (Zhong *et al.*, *J. Cell Biol.*, 120:477-483 (1993)) más lejos de la membrana, y todavía no se han clonado. Rab 13, una proteína pequeña de unión a GTP también se ha localizado recientemente en la región de unión (Zahraoui *et al.*, *J. Cell Biol.*, 124:101-115 (1994)). Se sabe que otras proteínas pequeñas de unión a GTP regulan el citoesqueleto cortical, es decir, rho regula la unión actina-membrana en los contactos focales (Ridley *et al.*, *Cell*, 70:389-399 (1992)), y rac regula las ondulaciones de la membrana inducidas por el factor de crecimiento (Ridley *et al.*, *Cell*, 70:401-410 (1992)). Basándose en la analogía con las funciones conocidas de las proteínas de placa en las uniones celulares mejor caracterizadas, los contactos focales (Guan *et al.*, *Nature*, 358:690-692 (1992)), y las uniones adherentes (Tsukita *et al.*, *J. Cell Biol.*, 123:1049-1053 (1993)), se ha hecho la hipótesis de que las proteínas de placa asociadas a las uo están implicadas en la transducción de señales en ambas direcciones a través de la membrana celular, y en la regulación de las uniones al citoesqueleto de la actina cortical.

Para satisfacer los muy diversos estímulos fisiológicos y patológicos a los que están sometidos los epitelios, las ZO deben ser capaces de dar respuestas rápidas y coordinadas que requieren la presencia de un sistema regulador complejo. La caracterización precisa de los mecanismos implicados en el montaje y regulación de las ZO es un campo de investigación activa actual.

Ahora hay un conjunto de pruebas de que existen uniones uo estructurales y funcionales entre el citoesqueleto de la actina y el complejo de uo de las células absortivas (Gumbiner *et al.*, véase antes; Madara *et al.*, véase antes; y Drenchahn *et al.*, *J. Cell Biol.*, 107:1037-1048 (1988)). El citoesqueleto de actina está compuesto de una malla complicada de microfilamentos cuya geometría exacta es regulada por un gran grupo de proteínas que se unen a la actina. Un ejemplo de como el estado de fosforilación de una proteína que se une a la actina puede regular la unión del citoesqueleto a la membrana plasmática celular es la proteína miristilada rica en alanina sustrato de la quinasa C (en lo sucesivo "MARCKS"). MARCKS es un sustrato específico de la proteína quinasa C (en lo sucesivo "PKC") que se asocia con la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Aderem, *Elsevier Sci. Pub. (UK)*, pages 438-443 (1992)). En su forma no fosforilada, MARCKS cruza a la actina de la membrana. Por lo tanto, es probable que la malla de actina asociada con la membrana mediante MARCKS sea relativamente rígida (Hartwig *et al.*, *Nature*, 356:618-622 (1992)). La PKC activada fosforila MARCKS, el cual es liberado de la membrana (Rosen *et al.*, *J. Exp. Med.*, 172:1211-1215 (1990); y Thelen *et al.*, *Nature*, 351:320-322 (1991)). La actina unida a MARCKS es probable que se separe espacialmente de la membrana y sea más plástica. Cuando MARCKS se desfosforila, vuelve a la membrana donde una vez más cruza la actina (Hartwig *et al.*, véase antes; y Thelen *et al.*, véase antes). Estos datos sugieren que la red de actina F puede ser reorganizada por un proceso de fosforilación dependiente de la PKC que implica proteínas que se unen a la actina (siendo MARCKS una de ellas).

Se han mostrado una variedad de mediadores intracelulares que alteran la función y/o la estructura de las uo. Las uniones de oclusión de la vesícula biliar anfibio (Duffey *et al.*, *Nature*, 204:451-452 (1981)), y del intestino tanto de la carpa dorada (Bakker *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 246:G213-G217 (1984)) como del lenguado (Krasney *et al.*, *Fed. Proc.*, 42:1100 (1983)) presentan una mayor resistencia al flujo iónico pasivo cuando el AMPc intracelular es elevado. También, parece que la exposición de la vesícula biliar anfibio al ionóforo de Ca²⁺ potencia la resistencia de las uo, e induce alteraciones en la estructura de las uo (Palant *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 245:C203-C212 (1983)). Además, la activación de la PKC por ésteres de forbol aumenta la permeabilidad paracelular en las líneas celulares epiteliales tanto renales (Ellis *et al.*, *C. Am. J. Physiol.*, 263 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 32): F293-F300 (1992)), como intestinales (Stenson *et al.*, *C. Am. J. Physiol.*, 265 (*Gastrointest. Liver Physiol.*, 28):G955-G962 (1993)).

II. Toxina de zonula occludens

La mayoría de los candidatos de vacunas para *Vibrio cholerae* construidas por delección del gen *ctxA* que codifica la toxina del cólera (CT) son capaces de provocar respuestas de anticuerpos altas, pero más de la mitad de las vacunas todavía producen diarrea leve (Levine *et al.*, *Infect. Immun.*, 56(1): 161-167 (1988)). Dada la magnitud de la diarrea inducida en ausencia de CT, se estableció la hipótesis de que *V. cholerae* produce otros factores enterotoxigénicos, que todavía están presentes en cepas con delección de la secuencia *ctxA* (Leyine *et al.*, véase antes). Como resultado, se descubrió una segunda toxina, la toxina de zonula occludens (en lo sucesivo "ZOT") elaborada por *V. cholerae*, y que contribuye a la diarrea residual (Fasano *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246 (1991)). El gen *zot* está situado inmediatamente adyacente a los genes *ctx*. El alto porcentaje de simultaneidad del gen *zot* con los genes *ctx* entre las cepas de *V. cholerae* (Johnson *et al.*, *J. Clin. Microb.*, 31/3:732-733 (1993); y Karasawa *et al.*, *FEBS Microbiology Letters*, 106:143-146 (1993)) sugiere una posible función sinérgica de ZOT en la causa de la diarrea aguda deshidratante típica del cólera. Recientemente, también se ha identificado el gen *zot* en otros patógenos entéricos (Tschape, *2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salomellosis*, 47 (Abstr.) (1994)).

Previamente se había encontrado que cuando se ensayaba en la mucosa ileal de conejo, ZOT aumentaba la permeabilidad intestinal modulando la estructura de las uo intracelulares (Fasano *et al.*, véase antes). Se ha encontrado que como consecuencia de la modificación de la ruta paracelular, la mucosa intestinal se vuelve más permeable. También se ha encontrado que ZOT no afecta al transporte activo acoplado de Na⁺-glucosa, no es citotóxica, y no consigue abolir completamente la resistencia transepitelial (Fasano *et al.*, véase antes).

Más recientemente, se ha encontrado que ZOT puede abrir las uo de forma reversible en la mucosa intestinal, y por lo tanto cuando se coadministra ZOT con un agente terapéutico, puede afectar a la liberación intestinal del agente terapéutico, cuando se usa en una composición de dosificación oral para la liberación intestinal del fármaco (documento WO 96/37196; solicitud de patente de EE.UU. serie nº 8/443.864, presentada el 24 de Mayo, 1995 (ahora aceptada); y la solicitud de patente de EE.UU. serie 08/598.852, presentada el 9 de febrero, 1996 (ahora patente de EE.UU. 5.665.389). También se ha encontrado que ZOT es capaz de abrir las uo de forma reversible en la mucosa nasal, y por lo tanto cuando se coadministra ZOT con un agente terapéutico, puede potenciar la absorción nasal de un agente terapéutico (solicitud de patente de EE.UU. serie nº 08/781.057, presentada el 9 de enero, 1997).

En la presente invención se han identificado y aislado los receptores de ZOT del corazón, tejido intestinal y cerebral, así como de células CaCo2. El receptor de ZOT representa la primera etapa de una ruta implicada en la regulación de la permeabilidad epitelial.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es identificar el receptor de ZOT del tejido del corazón, intestinal y cerebral, así como de las células CaCo2.

Otro objetivo de la presente invención es usar los receptores de ZOT en un método para cribar análogos de ZOT (antagonistas o agonistas).

ES 2 285 762 T3

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar análogos de ZOT que puedan obtenerse por dicho método.

Se han cumplido estos y otros objetivos de la presente invención, que serán evidentes a partir de la descripción 5 detallada de la invención proporcionada en lo sucesivo, en una realización, mediante un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, en la que dicho receptor tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en las ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3, o en la que dicho receptor tiene un peso molecular de 10 aproximadamente 66 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales de ID SEC Nº: 10.

Todavía en otra realización, se han cumplido los objetivos de la presente invención descritos antes por un método para cribar un antagonista de ZOT de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:

15 (A) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3, como el ligando de captura, o usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro que tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por elec- 20 troforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales de ID SEC Nº: 10, como ligando de captura; y

(B) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT,

25 en el que cuando dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, pero no tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un antagonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.

Todavía en otra realización, los objetivos de la presente invención descritos antes se han cumplido por un método 30 para cribar un agonista de ZOT de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:

(A) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que 35 consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3, como el ligando de captura, o usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro que tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por elec- troforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales de ID SEC Nº: 10, como ligando de captura; y

40 (B) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT,

en el que cuando dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, 45 y tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un agonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto del inhibidor de PKC CGP41251, y su análogo inactivo CGP42700, en los cambios 50 en la resistencia tisular (Rt) inducida por el líquido sobrenadante pZ14 en íleon de conejo.

Las figuras 2A y 2B muestran el efecto de ZOT en la actividad de la PKC a lo largo del tiempo en las subfracciones 55 citosólica (Figura 2A) y membranosa (Figura 2B).

La figura 3 muestra una curva de respuesta a la dosis para ZOT purificada en la Rt en íleon de conejo.

La figura 4 muestra el efecto de MBP-ZOT purificada (Δ) comparado con ZOT purificada (\square), y testigo de MBP (\blacksquare) en la Rt en íleon de conejo.

Descripción detallada de la invención

Como se ha discutido antes, en una realización, la presente invención se refiere a un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, en la que dicho receptor tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis 60 en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3, o un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales de ID SEC Nº: 10.

El receptor de ZOT se puede usar para hacer anticuerpos, policlonales o monoclonales, usando técnicas bien conocidas en la técnica (Abrams, *Methods Enzymol.*, 121:107-119 (1986)).

Alternativamente, el receptor de ZOT se puede usar para purificar, por cromatografía de afinidad, ZOT y sus proteínas de fusión.

Además, el receptor de ZOT se puede usar para cribar análogos de ZOT que son antagonistas o agonistas.

5

Por lo tanto, en otra realización, se han cumplido los objetivos de la presente invención descritos antes mediante un método para cribar un antagonista de ZOT de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:

10 (A) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro como el ligando de captura; y

(B) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT,

15 en el que cuando dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, pero no tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un antagonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.

En otra realización, se han cumplido los objetivos de la presente invención descritos antes mediante un método para cribar un agonista de ZOT de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:

20

(A) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* sustancialmente puro como el ligando de captura; y

25 (B) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT,

en el que cuando dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, y tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un agonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.

30

Tal como se usa en esta memoria, "actividad biológica de ZOT" significa la capacidad de aumentar de forma reversible la permeabilidad epitelial modulando la estructura de las uo intercelulares.

35

El ensayo para determinar la actividad biológica de ZOT no es crítico para la presente invención. Por ejemplo, el ensayo puede implicar (1) ensayar una disminución de la resistencia tisular (Rt) del fíon montado en cámaras de Ussing como describen Fasano *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246 (1991); (2) ensayar una disminución de la resistencia tisular (Rt) de las monocapas de células epiteliales intestinales en cámaras de Ussing como se describe en el siguiente Ejemplo 3; o (3) ensayar la potenciación de la absorción intestinal o nasal de un agente terapéutico como se describe en documento WO 96/37196; solicitud de patente de EE.UU. serie nº 8/443.864, presentada el 24 de Mayo, 1995 (ahora aceptada); y solicitud de patente de EE.UU. serie 08/598,852, presentada el 9 de febrero, 1996 (ahora patente de EE.UU. 5.665.389).

40

Los antagonistas de ZOT se pueden usar como fármacos antiinflamatorios para el tratamiento de afecciones gástrico-intestinales en las que se ha descrito un aumento de la permeabilidad intestinal, p. ej., en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, enteropatía por pérdida de proteína, alergias alimentarias y enfermedad celiaca.

45

Los agonistas de ZOT abrirán rápidamente las uo de una forma reversible y reproducible, y por lo tanto, se pueden usar como potenciadores de la absorción intestinal o nasal de un agente terapéutico de la misma forma que ZOT se usa como potenciador de la absorción intestinal o nasal, como se describe en el documento WO 96/37196; solicitud de patente de EE.UU. serie nº 8/443.864, presentada el 24 de Mayo, 1995 (ahora aceptada); y solicitud de patente de EE.UU. serie 08/598,852, presentada el 9 de febrero, 1996 (ahora patente de EE.UU. 5.665.389).

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten de ninguna forma el alcance de la presente invención.

55

Ejemplo 1

Efecto de ZOT en el citoesqueleto de enterocitos

60

En el intestino delgado (Madara *et al.*, *J. Cell Biol.*, 97:125-136 (1983)) y en las células renales (Meza *et al.*, *J. Cell Biol.*, 87:746-754 (1980)), las alteraciones fisiopatológicas en la organización del citoesqueleto pueden producir alteraciones importantes ocluyendo la resistencia de las uo, en la selectividad de carga y en la estructura. La repuesta provocada por estas perturbaciones específicas consiste en la expansión de la oclusión de la estructura de las uo, y cambios en la selectividad paracelular de cationes. Estos datos sugieren que la ruta paracelular puede ser regulada por sucesos intracelulares que producen alteraciones fenotípicas en la estructura de la superficie celular que regula las ZO. Sin embargo, la cascada de sucesos intracelulares que conduce a dichas modificaciones de las uo todavía está poco definida.

ES 2 285 762 T3

A. El efecto de ZOT en la organización del citoesqueleto

Para evaluar si ZOT tiene un efecto en la organización del citoesqueleto, se ensayó la fracción de líquido sobrenadante de $M_r > 10.000$ obtenida después de cultivar la cepa de *V. cholerae* CVD110 transformada con el plásmido pZ14 (en lo sucesivo “líquido sobrenadante de pZ14”) en cultivos tisulares de células IEC6

CVD110 es una cepa de *V. cholerae* (biotipo E1 Tor) en la que se han eliminado todos los genes de toxinas conocidos (genes *ctxA*, *zot* y *ace*) (Michalski *et al.*, *Infect. Immun.*, G1: 4462-4468 (1993)).

El plásmido pZ14 contiene el gen *zot* transcrita por el promotor *tac* inducible. El plásmido pZ14 se construyó haciendo digerir pBB241 con *HindIII*. pBB241 se obtuvo por clonación de un fragmento *Clal-XbaI*, que contiene la secuencia de *zot* entera, en el plásmido pUC19 (Baudry *et al.*, *Infect. Immun.*, 60:428-434 (1992))). El extremo saliente 5' se completó con el fragmento Klenow y el plásmido linearizado se hizo digerir con *XbaI* dando un fragmento de *zot* de 1,5 kb. Este fragmento se clonó en el vector pTTQ181 (Amersham, Arlington Heights, IL) que se modificó por interrupción del gen Amp^R con la caja Kan^R encontrada en pHSG274 descrito por Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor (1989). Es decir, pTTQ181 se hizo digerir con *EcoRI*, se completó y se hizo digerir con *XbaI*. El fragmento *XbaI* de *zot* de 1,5 kb se ligó en el vector resultante con la orientación correcta, y se denominó “pZ14”.

Las células IEC6 se obtuvieron de células de la cripta del intestino delgado de rata sin gérmenes (Quaroni *et al.*, *In: Methods in Cell Biology*, Chapter 20, 21B:403-426 (1980)), y se hicieron crecer en medio completo en matraces de cultivo celular (Falcon) a 37°C en una atmósfera de O₂ al 95%/CO₂ al 5%. El medio completo comprendía medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glucosa 4,5 g/l y contenía suero bovino fetal al 5,0% (v/v) (irradiado), insulina 10 µg/ml, L-glutamina 4,0 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. El número de pases usados varió entre 15 y 20.

La fracción de líquido sobrenadante de $M_r > 10.000$ se preparó como sigue. CDV110 transformado con pZ14 se cultivó toda la noche a 37°C, en caldo de Luria Bertani (en lo sucesivo “LB”) que contenía kanamicina 50 µg/ml para seleccionar así las cepas resistentes a la kanamicina que alberguen el plásmido pZ14. Los cultivos después se diluyeron para obtener una DO₆₀₀ inicial de 0,4-0,5. Después, para inducir la expresión de ZOT a partir del promotor *tac*, se añadió a los cultivos isopropil-tio-β-D-galactopiranósido 2,0 mM (IPTG) (5'-3' Incorporation, Boulder, CO), y se incubaron a 37°C durante otras 2 h. Después, el medio de cultivo se recogió, se enfrió y se centrifugó a 5.000 x g durante 10 min a 4°C. El líquido resultante se recogió y se pasó por un filtro de 0,45 µm (Millipore). El líquido sobrenadante del cultivo resultante después se sometió a ultrafiltración a través de filtros Centricon (Vanguard International Corp., NJ) con un corte de exclusión de peso molecular de 10 kDa. La fracción de $M_r > 10$ kDa se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) (en lo sucesivo “PBS”), se reconstituyó al volumen original en PBS y se ensayó la actividad en la organización del citoesqueleto como se discute a continuación.

1. Microscopía fluorescente

Se sembraron 2,0 x 10⁴ células IEC6/ml en cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro, y se expusieron a 30 µl del líquido sobrenadante de pZ14 (dilución 1:33) o a 30 µl de PBS como testigo negativo, durante 24 h a 37°C. Después las células se fijaron en formaldehído al 3,7% (v/v) en PBS (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar en el mismo tampón, las células se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0,5% (v/v) en PBS (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células fijadas resultantes después se incubaron con fluoresceína-faloidina 5,0 µg/ml (Sigma) a 37°C durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS, los cubreobjetos se montaron con glicerol-PBS 1:1 (pH 8,0), y se analizaron 200 células para cada una de las condiciones por triplicado de forma ciega con un microscopio de fluorescencia Optiphot Nikon para visualizar así la red de citoesqueleto de actina F (definida como fibras de tensión) de las células.

Se observó la distribución normal de las fibras de tensión en las células incubadas con el testigo negativo de PBS. Sin embargo, cuando las células IEC6 se incubaron con el líquido sobrenadante de pZ14, se observó una reorganización completa del citoesqueleto (máximo a las 24 h de incubación), con las fibras de tensión redistribuidas a la periferia de la célula.

Después de 48 de exposición al líquido sobrenadante de pZ14, la organización de la actina F permanecía sin cambiar respecto de las células expuestas durante 24 h. La organización de la actina F en los testigos negativos permanecía sin cambio a lo largo de las 48 h del periodo de estudio.

2. Microscopía electrónica de barrido

En estudios paralelos, se analizaron las células IEC6 incubadas con líquido sobrenadante de pZ14 o testigo negativo de PBS por microscopía electrónica de barrido.

Más específicamente, se sembraron células IEC6 con 5,0 x 10⁹ células/pocillo en cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro insertados en los pocillos de placas de 24 pocillos. Después de 24 h de exposición a 30 µl de líquido sobrenadante de pZ14 o 30 µl de testigo negativo de PBS a 37°C, las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% (v/v) en tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación posterior

ES 2 285 762 T3

en OsO₄ al 1,0% (p/v) durante 30 min, las células se deshidrataron mediante etanoles degradados, se secaron al punto crítico con CO₂, y se recubrieron de oro por pulverización catódica. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido de Cambridge.

5 Se observaron modificaciones de la superficie de las células expuestas a ZOT cuando se compararon con el testigo negativo de PBS. Es decir, ZOT indujo principalmente una pérdida de microvellosidades alrededor de la periferia de la célula con escasez central. Estos cambios de la superficie están de acuerdo con la redistribución de actina F inducida por ZOT observada en la microscopía fluorescente anterior.

10 3. Estudios en íleon de conejo

Después se llevaron a cabo experimentos de la reorganización del citoesqueleto usando íleon de conejo montado en cámaras de Ussing como describen Fasano *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246 (1991).

15 Más específicamente, se sacrificaron por dislocación cervical conejos blancos de Nueva Zelanda adultos machos de 2-3 kg. Se sacó un segmento de 20 cm del íleon, se lavó del contenido intestinal, se abrió a lo largo del borde mesentérico, y se despojó de las capas muscular y serosa. Después 8 láminas de mucosa preparadas de esta forma se montaron en cámaras Ussing de Lucite (abertura de 1,12 cm²), se conectaron a un aparato de pinzas de voltaje (EVC 4000 WPI, Saratosa, FL), y se pusieron en un baño con solución de Ringer recién preparada que comprendía NaCl 20 53 mM, KCl 5,0 mM, manitol 30,5 mM, Na₂HPO₄, 1,69 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 1,25 mM, MgCl₂ 1,1 mM y NaHCO₃ 25 mM. La solución del baño se mantuvo a 37°C con depósitos con camisas de agua conectados a una bomba de circulación de temperatura constante, y se gaseó con O₂ al 95%/CO₂ al 5%.

25 Se añadieron 300 µl de líquido sobrenadante de pZ14 en el lado de la mucosa. También se añadieron 300 µl de líquido sobrenadante de pZ14 en el lado de la serosa para preservar el equilibrio osmótico. Se midió la diferencia de potencial (DP) cada 10 min, y la corriente de cortocircuito (Isc) y la resistencia tisular (Rt) se calcularon como describen Fasano *et al.*, véase antes. Debido a la variabilidad del tejido, los datos se calcularon como Rt (Rt en el tiempo x) - (Rt en el tiempo 0). Al final de cada experimento, se añadió glucosa 0,5 mM en el lado de la mucosa de cada cámara. Sólo se incluyeron en el análisis los tejidos que mostraron un aumento de la Isc como respuesta a la glucosa (indicando la viabilidad tisular).

30 Una vez obtenido el efecto máximo de ZOT en la Rt después de 60 min de incubación, los tejidos expuestos al líquido sobrenadante de pZ14 o al testigo negativo de PBS se fijaron, y se tiñeron para la actina F con fluoresceína-faloidina, como se ha descrito antes.

35 El íleon de conejo testigo se caracterizó por tinción fluorescente homogénea del borde en cepillo, y una distribución en forma de columna de los microfilamentos de actina entre enterocitos adyacentes. El íleon de conejo expuesto al líquido sobrenadante de pZ14 mostró una tinción irregular del borde en cepillo, asociado con una redistribución parcial de la actina F en el citoplasma subyacente. Estos cambios eran más evidentes en las células maduras del extremo de las vellosidades comparado con las células de la cripta menos diferenciadas.

4. Evaluación de los depósitos de actina

45 La actina es uno de los constituyentes principales de la red de citoesqueleto celular, y los desplazamientos entre el depósito de actina G monómera soluble y el depósito de actina F filamentosa reflejan los cambios en la organización de actina (Drenchahn *et al.*, *J. Cell Biol.*, 107:1037-1048). Así pues, se evaluó el efecto de ZOT en los depósitos de actina G y F.

50 Más específicamente, se hicieron crecer células del endotelio arterial pulmonar bovino (Goldblum *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 25 157:197-205 (1993)), obtenidas de American Type Culture Collection (Rockville, MD) ATCC nº 209CCL, a 37°C con O₂ al 95%/CO₂ al 5% en medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con suero ternero fetal al 20% (v/v) inactivado con calor (56°C, durante 30 min) (HyClone Laboratories, Logan UT), L-glutamina 4,0 mM, aminoácidos no esenciales y vitaminas en presencia de penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. Se determinó que los cultivos eran endoteliales por morfología uniforme y determinación cuantitativa de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina con sustrato ³H-bencil-Phe-Ala-Pro disponible en el comercio (Ventrex Laboratories, Inc., Portland, ME). Solo se usaron 3-7 pases de células.

60 La actina F endotelial se midió por la técnica fluorométrica descrita por Goldblum *et al.*, véase antes. Más específicamente, se sembraron 5,8 x 10⁵ células endoteliales en 2 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con suero ternero fetal al 20% (v/v) inactivado con calor (56°C, durante 30 min) (HyClone Laboratories, Logan UT), L-glutamina 4,0 mM, aminoácidos no esenciales y vitaminas en presencia de penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml, en los pocillos de placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 72 h a 37°C en O₂ al 95%/CO₂ al 5%. Las monocapas se expusieron a 30 µl de líquido sobrenadante de pZ14 (dilución 1:33) durante 24 h, después de lo cual se lavaron dos veces en un tampón que comprendía KCl 75 mM, MgSO₄ 3,0 mM, ácido etilenglicol-tetraacético 1,0 mM (EGTA), imidazol 10 mM, ditiotreitol 0,2 mM (DTT), aprotinina 10 µg/ml, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM (PMSF), y se fijaron con formaldehído al 3,7% (v/v) durante 15 min. Después las monocapas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% (v/v) en el tampón anterior durante 5 min a temperatura ambiente, se tiñeron con NBD-falicidina 1,65 x 10⁻⁷ M (Sigma) durante 20 min y se extrajeron con metanol helado toda la noche a -20°C. La tinción

ES 2 285 762 T3

y las extracciones se realizaron en la oscuridad. Los extractos se recogieron en cubetas y se midió la fluorescencia intraendotelial en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS30 a temperatura ambiente a 465 nm de excitación (rendija de 10 nm) y 535 nm de emisión (rendija de 10 nm), y se expresó en unidades fluorescentes arbitrarias por mg de proteína celular endotelial total.

5 La aplicación de NBD-falicidina a las monocapas endoteliales permeabilizadas y fijadas dio como resultado un 78,8% de penetración de la sonda en la célula, y se extrajo un 99,98% de sonda intracelular con un solo tratamiento de metanol, medido por fluorometría.

10 La reorganización de la actina puede implicar cambios recíprocos en el depósito de actina G monómera soluble y F filamentos, mientras que el depósito total de actina permanece sin cambios. Las metodologías descritas antes para determinar los depósitos de actina F y G implican procedimientos de fijación, permeabilización y extracción que imposibilitan las determinaciones de proteínas en las mismas monocapas de endotelio arterial pulmonar bovino. Por lo tanto, para la normalización de las mediciones de actina F y G, se cultivaron células adicionales en placa 15 simultáneamente para la determinación de las proteínas totales, en condiciones idénticas a las de las monocapas de los ensayos de los depósitos de actina F y G.

Más específicamente, las monocapas de endotelio arterial pulmonar bovino después de confluencia en los pocillos 20 de las placas de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4) y se desprendieron suavemente por exposición a tripsina 0,5 mg/ml durante 1-2 min con agitación suave, seguido inmediatamente de neutralización con el medio Dulbecco descrito antes que contiene PBS. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 10 min a 4°C, se lavaron otra vez dos veces con PBS (pH 7,4), y se lisaron en tampón de lisis que comprendía dodecil-sulfato sódico (SDS) 25 al 3,0% (p/v), DTT 1,0 mM, PMSF 10 mM, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA) y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Después se ensayó en los lisados la concentración de proteína usando el ensayo de proteína estándar de Bio-Rad DC (Bio-Rad Chemical Division, Richmond, CA).

Se midió la actina G endotelial usando el ensayo de inhibición de la ADNasa I como lo describen Goldblum *et al.*, véase antes. Más específicamente, se disolvió ADNasa I de páncreas bovino (Sigma) en Tris-HCl 0,125 M (pH 7,5), 30 MgCl₂ 5,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, NaN₃ 1,0 mM y PMSF 0,1 mM con una concentración de 10 mg/ml para aumentar así su estabilidad. La solución madre después se diluyó 100x con imidazol 20 mM (pH 7,5), NaCl₂ 30 mM y glicerol 35 al 15% (v/v). La enzima se preparó de nuevo cada 2 h y se mantuvo en hielo. Se usó ADN de timo de ternero (tipo 1, Sigma) como sustrato para la ADNasa I. La preparación fibrosa de ADN se cortó en trozos finos y se suspendió en Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5), MgSO₄ 4,0 mM, CaCl₂ 1,8 mM con una concentración de 80 mg de ADN/ml. El ADN se puso en solución por agitación lenta a 4°C durante 48 h, después de lo cual la solución se pasó secuencialmente por 40 filtros de 0,45 μm y 0,22 μm de tamaño de poros, y se almacenó a 4°C. La absorbancia del sustrato final a 260 nm variaba entre 1,05 y 1,15. Después la ADNasa I se mezcló con sustrato de ADN en la cubeta de un espectrofotómetro de respuesta Gilford (Ciba Corning Diagnostics), y se registró la pendiente de la parte lineal de la DO a 260 nm. Se usó actina de músculo esquelético bovino purificada (Sigma) disuelta en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), acetato Na 1,0 M, CaCl₃ 1,0 mM, trifosfato de adenosina (ATP) 1,0 mM, guanidina-HCl 0,75 mM como patrón de actina G para calibrar el ensayo.

Las monocapas de endotelio bovino hechas crecer en placas de 6 pocillos se expusieron a 30 μl de líquido sobrenadante de pZ14. Las monocapas se lavaron con PBS de Dulbecco sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, y se permeabilizaron con 45 0,5 ml/pocillo de tampón de lisis que comprende solución salina equilibrada de Hanks que contenía Triton X-100 al 1,0% (v/v), MgCl₂ 2,0 mM, EGTA 2,0 mM, ATP 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,1 mM durante 5 min. Después los líquidos sobrenadantes que contenían actina G se probaron en el ensayo de inhibición de la ADNasa I para generar las actividades inhibidoras que caen en la parte lineal de la curva patrón, es decir, 30-70% de inhibición. Las actividades inhibidoras se interpolaron a las concentraciones de actina G, que se usaron para calcular la actina G expresada en 50 μg/ml de proteína celular endotelial total.

Se usaron como testigos negativos monocapas expuestas a 30 μl de líquido sobrenadante de pZ14 hervido durante 15 min, para eliminar así el efecto de ZOT en la Rt, y 30 μl de líquido sobrenadante de la cepa de *V. cholerae* CVD110 (Michalski *et al.*, véase antes) transformada con pTTQ181 (Amersham, Arlington Heights, IL) (en lo sucesivo “líquido sobrenadante de pTTQ181”).

55 El líquido sobrenadante de pZ14 indujo una disminución significativa del depósito de actina G (-27%) y un aumento recíproco del depósito de actina F (+22%) comparado con el líquido sobrenadante de pTTQ181 o los líquidos sobrenadantes de pZ14 hervidos (véase la siguiente Tabla I). El desplazamiento de la actina G a F es compatible con la polimerización de la actina. Este efecto se eliminó completamente hirviendo el líquido sobrenadante de pZ14 durante 15 min.

TABLA I
Ensayos de la actina G y F y efecto del inhibidor de PKC CGP41251 en la polimerización de la actina

Cepa (N)*	Actina G (μg/mg de proteína)	valor p**	Actina F (U/mg de proteína)	valor p**
pTTQ181 (20)	106,1 (3,92)***	—	341,34 (5,28)***	—
pZ14 (38)	76,0 (4,16)	0,0001	415,73 (22,03)	0,0036
CGP41251 + pZ14 (30)	108,6 (7,2)	0,7803	335,67 (12,1)	0,673
CGP42700 + pZ14 (30)	84,8 (4,0)	0,0011	446,17 (18,5)	0,0001

*Número de experimentos

** Comparado con el testigo negativo de pTTQ181

*** Error típico (E.T.)

ES 2 285 762 T3

5. Efecto de ZOT en la actina F y distribución de la proteína ZO-1

Se llevaron a cabo estudios paralelos del efecto de ZOT en la actina F y la distribución de la proteína ZO-1 en células IEC6 seccionadas de forma apical para incluir el complejo de uo.

Más específicamente, se incubaron $2,0 \times 10^4$ células IEC6/ml cultivadas en cubreobjetos a 37°C durante 24 h con 30 μl de líquido sobrenadante de pZ14. Después de la incubación, las células se fijaron en formaldehído en PBS al 3,7% (v/v) (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar en el mismo tampón las células se permeabilizaron con Triton X-100 en PBS al 0,5% (v/v) (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Después las células se incubaron tanto con fluoresceína-faloidina 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como con anticuerpo anti-ZO-1 7445 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Zymed laboratory Inc, South San Francisco, CA) a 37°C durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS (pH 7,4), los cubreobjetos se montaron en glicerol-PB (dilución 1:1) (pH 8,0) y se analizaron 200 células para cada una de las condiciones por triplicado en un modelo ciego con un microscopio de fluorescencia Optiphot Nikon. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de células que muestran reorganización del citoesqueleto.

Como testigo negativo, se incubó la red compleja de filamentos de actina F de células IEC6 (teñidas con fluoresceína-faloidina) durante 24 h con 30 μl de líquido sobrenadante de pTTQ181.

La localización inmunofluorescente de ZO-1 dentro de las mismas células con sondas con anticuerpo anti-ZO-1 7445, que reconocen ambas isozimas de ZO-1, mostró una tinción continua uniforme de ZO-1 exclusivamente a lo largo de los límites célula-célula. Por el contrario, el líquido sobrenadante de pZ14 indujo pérdida de filamentos de actina transcitoplasmáticos situados de forma central, así como redistribución de ZO-1 de la interfase célula-célula. La redistribución de la proteína ZO-1 del complejo de uo no estaba asociada con la fosforilación de su tirosina.

Considerados juntos, estos resultados indican que la polimerización de la actina inducida por ZOT está mecanísticamente relacionada con la redistribución de la proteína ZO-1 desde el complejo de uo. Por lo tanto, ZO-1 puede ser un enlace entre la reorganización de la actina inducida por ZOT y la apertura de las uo.

Ejemplo 2

Mediador intracelular de ZOT

Varios mediadores intracelulares se han relacionado mecanísticamente con los cambios de la permeabilidad de las uo, incluidos AMPc, Ca⁺⁺ y PKC (Madara, véase antes; y Balda *et al.*, *J. Membrane Biol.*, 122:193-202 (1991)). Sin embargo, la observación de que la respuesta a la teofillina (un inhibidor de fosfodiesterasa) en ileón de conejo previamente expuesto a líquido sobrenadante de *V. cholerae* 395 (que contiene tanto CT como ZOT) inducía una respuesta máxima de Isc similar a la provocada en los tejidos expuestos al testigo negativo, sugiere que los cambios inducidos por ZOT en la permeabilidad del tejido no son mediados por el AMPc (Fasano *et al.*, véase antes). Se obtuvieron resultados similares cuando los líquidos sobrenadantes que contenían ZOT se ensayaron solos o combinados con CT purificada. Estos resultados sugieren que las cantidades totales del AMPc intracelular en tejidos testigo o expuestos a ZOT son comparables. Por lo tanto, para determinar si la PKC media la actividad de ZOT, se expusieron intestinos delgados de conejo y células IEC6 al inhibidor de la PKC estaurosporina (MacLeod *et al.*, *Amer. Physiol. Soc.*, 192:C950-C955 (1992)).

A. Intestinos delgados de conejos

Más específicamente, el ileón de conejo despojado de las capas muscular y serosa se montó en cámaras de Ussing y después se expuso a 300 μl (dilución 1:33) de líquido sobrenadante de pZ14, solo o combinado con estaurosporina 10 nM, añadida 10 min antes y a lo largo de la exposición al líquido sobrenadante de pZ14. Después se registraron los cambios de la Rt a intervalos de 10 min.

Se encontró que la estaurosporina 10 nM prevenía completamente la disminución de Rt inducida por el líquido sobrenadante de pZ14. Puesto que la estaurosporina es un inhibidor potente pero no selectivo de la actividad de la PKC (Meyer *et al.*, *Int. J. Cáncer*, 43:851-856 (1989)), después se ensayó un derivado de estaurosporina, es decir, CGP41251 que inhibe selectivamente la PKC (Meyer *et al.*, véase antes), en la reorganización de la actina inducida por ZOT y la permeabilidad tisular.

Más específicamente, el ileón de conejo despojado de las capas muscular y serosa se montó en cámaras de Ussing y después se expuso a 300 μl (dilución 1:33) de líquido sobrenadante de pZ14, solo o combinado con CGP41251 10 nM, añadido 10 min antes y a lo largo de la exposición al líquido sobrenadante de pZ14. Se usaron cámaras de Ussing previamente expuestas a un análogo de estaurosporina inactivo 10 mM, es decir CGP42700 (Meyer *et al.*, véase antes) durante 10 min y a lo largo de la exposición al líquido sobrenadante de pZ14 como testigos negativos. Después se registraron los cambios de la Rt a intervalos de 10 min. Los resultados se muestran en la figura 1.

Como se muestra en la figura 1, el tratamiento previo con CGP41251 10 nM, pero no con su análogo inactivo CGP42700, prevenía los cambios en la Rt inducidos por el líquido sobrenadante de pZ14. No se observaron cambios significativos cuando los tejidos se expusieron de una forma similar al líquido sobrenadante de pTTQ181.

ES 2 285 762 T3

Los ésteres de forbol son un activador de la PKC. Por lo tanto, se ensayó el éster de forbol el 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) para confirmar que ZOT actúa vía la PKC.

Más específicamente, el íleon de conejo despojado de las capas muscular y serosa se montó en cámaras de Ussing 5 y después se expuso a 300 ml (dilución 1:33) de líquido sobrenadante de pZ14, solo o combinado con TPA 10^{-8} M, añadido 10 min antes y a lo largo de la exposición al líquido sobrenadante de pZ14. Después se registraron los cambios de la Rt a intervalos de 10 min.

Se indujo una reducción significativa de la Rt con el líquido sobrenadante de pZ14 cuando se comparó con el 10 líquido sobrenadante de pTTQ181 (-7,33 a 2,55 frente a -2,57 a 1,51 mohms.cm²; $p<0,005$). Cuando se añadieron al mismo tejido, el TPA junto con el líquido sobrenadante de pZ14 produjeron una disminución de Rt (cambio total de Rt: -7,37 a 3,2 mohms.cm²) que no es diferente de la observada con el TPA solo. Estos resultados demuestran que el efecto de ZOT y TPA en la permeabilidad intestinal no son aditivos, lo que sugiere que ambos actúan por la PKC.

15 B. Células IEC6

Después se evaluó el efecto de ZOT en el citoesqueleto de actina de células IEC6 en presencia de inhibidores de PKC.

20 Más específicamente, se trataron previamente $2,0 \times 10^5$ células IEC con CGP41251 10 nM o CGP42700 10 nM durante 30 min antes y a lo largo de la exposición a 30 μ l de líquido sobrenadante de pZ14. Después de 24 h de incubación a 37°C, $2,0 \times 10^4$ células IEC6/ml, cultivadas en cubreobjetos, se fijaron en formaldehído en PBS al 3,7% (v/v) (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar en el mismo tampón, las células se permeabilizaron con Triton x-100 en PBS al 0,5% (v/v) (pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Después las 25 células se incubaron con fluoresceína-faloidina 5,0 μ g/ml a 37°C durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS (pH 7,4), los cubreobjetos se montaron con glicerol-PBS (dilución 1:1) (pH 8,0), y se analizaron 200 células para cada una de las condiciones por triplicado en un modelo ciego con un microscopio de fluorescencia Optiphot Nikon. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de células que muestran reorganización del citoesqueleto.

30 Cuando se añadió líquido sobrenadante de pZ14, el 62% de las células mostraron una reorganización del citoesqueleto, mientras que sólo se afectaron el 27% de las células expuestas a PBS y el 21% de las células expuestas a líquidos sobrenadantes de pTTQ181. El tratamiento previo con CGP41251 10 nM, pero no con su análogo inactivo CGP42700 10 nM, bloqueó los efectos de ZOT en el citoesqueleto (31% frente a 58% de las células afectadas, respectivamente).

35 Además, la polimerización de actina inducida por ZOT, es decir, una disminución de los depósitos de actina G y un aumento en los de actina F, se bloqueó significativamente cuando se ensayaron las células de endotelio arterial pulmonar bovino como se ha descrito antes, y se trataron previamente con CGP412512 10 nM, mientras que el tratamiento previo con CGP42700 10 nM no produjo dicho bloqueo (véase la Tabla I anterior)

40 Estos datos combinados indican que ZOT activa la PKC, y que esta activación se produce próxima tanto a la polimerización de la actina como a la apertura final de las uo.

C. Estado de la PKC

45 La PKC existe en dos estados en todas las células, es decir, un estado inactivo en el que la quinasa está asociada con el citoplasma, y un estado activo en el que la molécula se transloca del citoplasma a las membranas (Thomas *et al.*, *Methods Enzymol.*, 1410:399-435 (1987)). Por lo tanto, el estado de la PKC se midió directamente en células IEC6 expuestas al líquido sobrenadante de pZ14.

50 Más específicamente, las monocapas de IEC6 confluentes se trataron con 30 μ l de líquido sobrenadante de pZ14 (dilución 1:33) en intervalos de tiempo crecientes (0, 3 min, 10 min). Después de exposición a ZOT, las células IEC6 se lisaron por disruptión mecánica (pase forzado a través de una aguja de calibre 25, 3 veces), se separaron las fracciones citoplasmática y de membrana por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min a 4°C, y se ensayó la actividad de la PKC determinando la incorporación de 32 P de [γ - 32 P] ATP en histona 1 (Ellis *et al.*, *Am. J. Physiol.* 263:F293-F300 (1992)). Como testigo, también se determinó la actividad de la PKC usando un sistema de ensayo de la PKC (Gibco BRL, Grand Island, NJ) basado en la medición de la fosforilación de la proteína básica de mielina acetilada como describen Yasuda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166:1220 (1990). El valor neto de la actividad de la PKC refleja la diferencia entre la actividad de la PKC en presencia y ausencia de PKC 19-26, un inhibidor pseudosustrato de PKC (Yasuda *et al.*, véase *antes*). La actividad específica total de la PKC (pmol/min) se normalizó a la proteína 60 total. Los resultados se muestran en las figuras 2A-2B.

Como se muestra en las figuras 2A-2B, el líquido sobrenadante de pZ14 indujo un aumento significativo (1,72 veces) de la actividad de PKC de la membrana (figura 2B) y en menor medida de la citosólica (figura 2A). En una media de 3 experimentos, este aumento de actividad de la PKC inducido por ZOT tenía el máximo a los 3 min (134,0 pmol/min/mg de proteína frente al valor inicial de 77,6 pmol/min/mg de proteína) y volvía al valor inicial a los 10 min (65,4 pmol/min/mg de proteína). Estos datos demuestran directamente que el efecto de ZOT en la permeabilidad tisular es mediada por PKC.

ES 2 285 762 T3

D. Isozima de PKC

La clonación molecular y análisis de secuencia de la PKC ha demostrado la existencia de una familia de genes que codifica varias isozimas estrechamente relacionadas, pero diferentes, con diferentes propiedades fisiológicas (Azzai *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 208:547-557 (1992)). La estaurosporina y su derivado más específico CGP41251 inhiben preferentemente las isozimas de PKC del grupo A dependientes de Ca^{2+} comparado con las isozimas del grupo B independientes de Ca^{2+} (McGlynn *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 49:239-250 (1992); y Marte *et al.*, *Cell Growth and Differ.*, 5:239-247 (1994)). Como resultado, se llevaron a cabo experimentos centrados en la PKC- α , la única isozima de PKC dependiente de Ca^{2+} detectable descrita en enterocitos del ileón (Hyun *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C:171-178 (1994)).

Más específicamente, se separaron 15-30 μg de proteína/carril de las fracciones de membrana citosólica obtenidas como se ha descrito antes, por PAGE-SDS al 8,0% (p/v). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nailon (N-Immobilon, Millipore) en una celda de transferencia electroforética Trans-Blot (Bio-Rad). La membrana se aclaró en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v) (en lo sucesivo "PBS-T"), y se bloqueó en PBS-T que contenía leche desnatada al 5,0% (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-PKC y anti-PKC- α purificados por afinidad (Gibco BRL) se diluyeron para obtener las condiciones de saturación óptimas (dilución 1:500) en PBS-T que contenía leche desnatada al 0,83% (v/v), y se incubaron con la membrana durante 16 h a 4°C. Después de la incubación, la membrana primero se lavó con leche desnatada al 5,0% (v/v) en PBS-T (3x durante 15 min), después con PBS-T (1x durante 15 min), y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con una dilución de 1:30.000 de IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después del lavado exhaustivo con leche desnatada al 5,0% (v/v) en PBS-T, se revelaron las bandas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

Se usaron como testigos los péptidos sintéticos específicos de isoforma (Gibco BRL) que tienen las secuencias de aminoácidos para cada isoforma de PKC respectiva. Los péptidos sintéticos se basaron en secuencias únicas en la región V₃ de α -PKC:

(Ala-Gly-Asn-Lys-Val-Ile-Ser-Pro-Ser-Glu-Asp-Arg-Arg-Gln, ID SEC. N°: 4), y

región V₃ de ϵ -PKC:

(Lys-Gly-Phe-Ser-Tyr-Phe-Gly-Glu-Asp-Leu-Met-Pro, ID SEC N°: 5).

Como se determinó por inmunotransferencia, el tratamiento agudo (3 min) de células IEC6 con líquido sobrenadante de pZ14 indujo una translocación significativa de la isozima PKC- α del citosol a la membrana de las células. Esta reducción se invirtió parcialmente después de 10 min de incubación. El TPA 10⁻⁷ M indujo una reducción similar, pero más sostenida (de hasta 2 h) de la PKC- α citosólica, mientras que se observó reducción de esta isoforma después de 24 h de incubación. Se observó una acumulación continua, dependiente del tiempo, de la subunidad reguladora de PKC- α en el citosol celular. No se detectó un aumento significativo de PKC- α ni en las fracciones de membrana obtenidas de las células expuestas al líquido sobrenadante de pZ14 ni al testigo positivo de TPA.

Estos resultados proporcionan una prueba sólida de que PKC- α es el mediador intracelular de la reorganización de la actina inducida por ZOT y desmontaje de las uo.

E. Fosforilación de serina

También se llevaron a cabo experimentos en células IEC6 para determinar la fosforilación de la serina de la o las proteínas objetivo en las subfracciones tanto de membrana celular como citosólica con el fin de identificar el sustrato de fosforilación de la PKC.

Más específicamente, se expusieron 2,0 x 10⁵ células IEC6/pocillo a MBP-ZOT purificado 10⁻¹⁰ M (obtenido en el Ejemplo 5), con intervalos de tiempo crecientes (0, 15 min, 30 min, 45 min). La reacción se paró con PBS frío (pH 7,4) (lavado tres veces), y se rasparon las células y se lisaron como se ha descrito antes. Después se obtuvieron las subfracciones citosólica y de membrana como se ha descrito antes. Se separaron 20-30 μg de cada preparación por PAGE-SDS al 8,0% (p/v). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nailon (N-Immobilon, Millipore) en una celda de transferencia electroforética Trans-Blot (Bio-Rad). La membrana se aclaró y bloqueó en PBS-T que contenía leche desnatada al 5,0% (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-serina monoclonales (Sigma Immunochemicals) se diluyeron para obtener las condiciones de saturación óptimas (dilución 1:1000) en PBS-T que contenía leche desnatada al 0,83% (v/v), y se incubaron con la membrana durante 16 h a 4°C. Después de la incubación, la membrana primero se lavó con leche desnatada al 5,0% (v/v) en PBS-T (3x durante 15 min), después con PBS-T (1x durante 15 min), y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con una dilución de 1:30.000 de anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después del lavado exhaustivo con leche desnatada al 5,0% (v/v) en PBS-T, se revelaron las bandas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

Los resultados mostraron que MBT-ZOT purificado induce fosforilación de la serina dependiente del tiempo de una proteína citoplasmática de un PM aparente de 100-120 kDa. Esta proteína puede representar el objetivo de la

ES 2 285 762 T3

fosforilación por PKC inducida por ZOT, y puede estar implicada en la señalización intracelular que conduce a la apertura de las uo.

Ejemplo 3

5 *Selectividad de la acción de ZOT*

Para establecer un sistema *in vitro* óptimo para estudiar el efecto de ZOT en las uo, se cribaron varias líneas celulares para la sensibilidad frente a ZOT. Esto es porque aunque el ensayo con la cámara de Ussing es sensible, no 10 es adecuado para el cribado de un gran número de muestras. Buscando un sistema alternativo, se desarrolló un ensayo de cultivo tisular para ZOT.

A. Efecto específico de ZOT en líneas celulares diferentes

15 Para establecer si ZOT ejerce un efecto selectivo o amplio en la regulación de las uo, se ensayó la sensibilidad de ZOT en varias líneas celulares. Más específicamente, se hicieron crecer líneas celulares de carcinoma de colon humano HT-29 Cl 19A (Van Den Berghe *et al.*, *Biochem. J.*, 258:673-679 (1992)), y CaCo2 (Nath *et al.*, *J. Diarrhoeal Dis.*, 8:133-142 (1990)), en matraces de cultivo de células (Falcon) en una atmósfera húmeda de O₂ al 95%/CO₂ al 5% a 37°C en medio Eagle modificado por Dulbecco que contiene suero ternero fetal al 10% (v/v), penicilina 40 µg/l y estreptomicina 90 µg/l. Las células se subcultivaron con una relación superficial de 1:5 después de tratamiento con tripsina cada 5 días, cuando habían alcanzado 70-80% de confluencia. El número de pases de las células usadas en este estudio varió entre 15 y 30.

20 Las monocapas de HT-29 Cl 19A o CaCo2 se hicieron crecer hasta confluencia (12-14 días después de poner en placa con una relación superficial 1:2,5) en filtros de policarbonato tratados con cultivo tisular firmemente unidos a un anillo de poliestireno (6,4 mm de diámetro, Transwell Costar). Los filtros se pusieron en un inserto estrechamente ajustado separando el compartimento de serosa y mucosa de una cámara de Ussing modificada, y los experimentos se llevaron a cabo como se ha descrito antes para el intestino de conejo.

25 30 No se obtuvieron cambios significativos de la Rt en las monocapas de HT-29 Cl 19A (n = 4 para hasta 3 h de cada muestra ensayada) expuestas a 30 µl de líquido sobrenadante de pZ14 (dilución 1:33) cuando se compararon con las monocapas expuestas a 30 µl de líquido sobrenadante de pTTQ181 de testigo negativo. Por otra parte, cuando se ensayó en las monocapas de células CaCo2 30 µl de líquido sobrenadante de pZ14 indujeron una disminución significativa de la Rt, sugiriendo una susceptibilidad diferente a ZOT entre estas dos líneas celulares.

35 *B. Organización de la actina F*

40 Para estudiar el efecto de ZOT en la organización de la actina F, se ensayaron cultivos de células IEC6 y LLC-PK₁ (Hull *et al.*, *In Vitro*, 12:670-677 (1976)) de la misma forma.

45 Las células LLC-PK₁, es decir, de corteza renal de cerdo (Hull *et al.*, véase antes) se hicieron crecer en matraces de cultivo celular (Falcon) a 37°C en una atmósfera de O₂ al 95%/CO₂ al 5%. El medio de cultivo consistía en medio esencial modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal bovino al 10% (v/v). Las células que iban de los pases 185 a 200, se pasaron semanalmente por tripsinización con tripsina al 0,25% (p/v) en EDTA al 0,02% (p/v), cuando habían alcanzado el 70-80% de confluencia de las monocapas.

50 Las células IEC6 expuestas a 30 µl de líquido sobrenadante de pZ14 y posteriormente tratadas con sonda con fluoresceína-faloidina como se ha descrito antes, para la actina F mostraron una reorganización de la actina significativa, mientras que no se detectaron cambios significativos para las células LLC-PK₁.

55 La observación de que ZOT ejerce un efecto de permeabilización selectivo (probablemente por interacción con un receptor celular específico presente sólo en las células “sensibles”), combinado con su efecto en el citoesqueleto y la activación de PKC, indica que ZOT actúa por una ruta intracelular, más que directamente sobre las uo.

Ejemplo 4

Función de la fosfolipasa C en la actividad de ZOT

60 La fosfolipasa C (en lo sucesivo “PLC”) es una enzima que convierte el difosfato de fosfatidil-inositol (en lo sucesivo “PIP₂” en trifosfato de inositol (en lo sucesivo “IP₃” más diacilglicerol (en lo sucesivo “DAG”). La PLC puede participar en el montaje y sellado de las ZO, así como en su regulación. El efecto de la PKC en las ZO es secundario a la activación de la PKC inducida tanto por IP₃ (vía Ca²⁺) como DAG (Berridge *et al.*, *Nature*, 341:197-205 (1989)).

65 El efecto de ZOT en la reorganización del citoesqueleto, polimerización de la actina y cambios en la permeabilidad del tejido se ha mostrado antes para implicar la activación de la PKC. Para establecer si el objetivo principal de ZOT es la PKC o PLC, se repitieron los experimentos en células IEC6 y cámaras DE Ussing descritos en el ejemplo 1 anterior, pero las muestras se incubaron previamente durante 10 min con sulfato de neomicina 100 mM y a lo largo de

ES 2 285 762 T3

la exposición al líquido sobrenadante de pZ14. La neomicina es una sustancia que se une a PIP₂ y evita su conversión en IP₃ más DAG por la PLC.

Los cultivos de células IEC6 tratadas previamente con neomicina 100 mM y después expuestas al líquido sobre-
5 nadante de pZ14 mostraron un porcentaje menor de células que presentaban reorganización del citoesqueleto (12,0 a 5,17) comparado con las expuestas solo a ZOT (49,0 a 9,23; p<0,05). La exposición previa del íleon de conejo a sulfato de neomicina 100 mM previno el aumento de permeabilidad del tejido inducida por ZOT en tejidos no tratados.

10 Estos resultados indican que la PLC de transmembrana puede tener una función importante en la reorganización de la actina inducida por ZOT y la permeabilidad tisular.

Ejemplo 5

15 Purificación de ZOT

Se concentraron 5000 ml de líquido sobrenadante de pZ14 1000 veces usando un filtro de flujo laminar con un
20 corte de exclusión de PM de 10 kDa, y después se sometió a PAGE-SDS al 8,0% (p/v). Las bandas de proteínas se detectaron por tinción con azul Coomassie del gel de PAGE-SDS. Cuando se comparó con el testigo de líquido sobrenadante de pTTQ181 tratado de la misma forma, no había banda de proteína correspondiente a ZOT detectable. Por lo tanto, incluso aunque el gen *zot* estaba situado detrás del promotor *tac* fuerte y altamente inducible en pZ14, el nivel de proteína en el líquido sobrenadante de pZ14 concentrado 1000 veces todavía no era detectable por el gel de PAGE-SDS teñido con Coomassie.

25 A. MBP-ZOT

Para aumentar la cantidad de ZOT producida, el gen *zot* se fusionó en el marco con el gen de la proteína de unión a la maltosa (en lo sucesivo “MBP”) para crear una proteína de fusión MBP-ZOT.

30 Se usó el vector de MBP pMAL-c2 (Biolab) para expresar y purificar ZOT mediante fusión del gen *zot* con el gen *malE* de *E. coli*. Esta construcción usa el promotor *tac* fuerte e inducible, y las señales de inicio de la traducción de *malE* para dar un alto nivel de expresión del gen *zot* clonado. El vector pMAL-c2 tiene una delección exacta de la secuencia señal de *malE*, que conduce a la expresión citoplasmática de la proteína de fusión. Se usó la purificación por cromatografía de afinidad para MBP para facilitar el aislamiento de la proteína de fusión (Biolab).

35 Más específicamente, el vector pMAL-c2 se linearizó con *EcoRI* (que corta en el extremo 3' del gen *malE*), se completó con el fragmento Klenow, y se hizo digerir con *XbaI* (que tiene un solo sitio en el policonector pMAL-c2). El *orf* que codifica ZOT se subclonó del plásmido pBB241 (Baudry *et al.*, véase antes). El plásmido pBB241 se hizo digerir con *BssHII*, se completó con el fragmento Klenow y se hizo digerir con *XbaI*. Después el fragmento *XbaI* romo se subclonó en pMAL-c2 para dar el plásmido pLC10-c. Puesto que tanto el inserto como el vector tenían extremos romos y cohesivos, la orientación correcta se obtuvo con el extremo 3' de *malE* fusionado con el extremo 5' del inserto. Después pLC10-c se introdujo por electroporación en la cepa DH_a5 de *E. coli*. En pBB241, el sitio de restricción de *BssHII* está dentro del *orf* de *zot*. Así pues, los aminoácidos 1-8 de ZOT están ausentes en la proteína de fusión MBP-ZOT.

45 Con el fin de purificar la proteína de fusión MBP-ZOT, se inocularon 10 ml de caldo de Luria Bertani que contenía glucosa al 0,2% (p/v) y ampicilina 100 µg/ml con una sola colonia que contenía pLC10-c, y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se diluyó 1:100 en 1,0 ml del mismo medio reciente, y se hizo crecer a 37°C mientras se agitaba, hasta aproximadamente 1,0 x 10⁸ células/ml. Después se añadió IPTG 0,2 mM para inducir la expresión de MBP-ZOT, y el cultivo se incubó a 37°C durante 3 h adicionales. Después las bacterias se sedimentaron y se volvieron a suspender en 20 ml de “tampón de columna” helado que comprendía Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,2 M, EDTA 1,0 mM, 2-ME 10 mM, Na₃N, 1,0 mM. La suspensión bacteriana se lisó mediante tratamiento con prensa de French y se centrifugó durante 30 min a 13.000 x g a 4°C. El líquido sobrenadante se recogió, se diluyó 1:5 con tampón de columna y se cargó en una columna 1 x 10 de resina de amilosa (Biolabs, sistema de purificación de MBP-fusión), previamente equilibrada con tampón de columna. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de tampón de columna, la proteína de fusión MBP-ZOT se eluyó por carga de 10 ml de maltosa 10 mM en tampón de columna. El rendimiento típico a partir de 1,0 ml de cultivo era 2-3 mg de proteína.

50 La pareja de fusión de MBP de la proteína de fusión MBP-ZOT purificada después se escindió usando 1,0 µg de Factor Xa proteasa (Biolabs) por 20 µg de MBP-ZOT. La Factor Xa proteasa escinde justo antes del amino terminal de ZOT. La proteína ZOT así obtenida se llevó a un gel de PAGE-SDS al 8,0% (p/v) y se electroeluyó del gel usando una cámara de electroseparación (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

55 Cuando se ensayó en cámaras de Ussing, la ZOT purificada resultante indujo una disminución de la R_t dependiente de la dosis, con una DE₅₀ de 7,5 x 10⁻⁸ M (Figura 3).

ES 2 285 762 T3

B. 6xHis-ZOT

- El gen *zot* se amplificó por la PCR con polimerasa Deep Vent (New England Biolabs), usando el plásmido pBB241 (Baudry *et al.*, véase antes) de ADN como molde. Los cebadores directo e inverso usados eran: 5'-CGGGATCCCG 5 TATGAGTATCTT-3' (ID SEC Nº: 6); y 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (ID SEC Nº: 7), respectivamente. Las colas 5' de estos oligonucleótidos contienen un sitio de restricción *BamHI* y uno *HindIII*, respectivamente. El amplicón resultante (1,2 kb) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 8,0% (p/v), y se purificó de las sales y nucleótidos libres usando una columna de centrifugación Xtreme (Pierce). Después se usaron las dos enzimas de restricción indicadas antes para hacer digerir el amplicón purificado, y el amplicón digerido resultante después se insertó en el vector pQE30 (Quiagen), el cual se había hecho digerir previamente con *BamHI* y *HindIII*, para obtener así el plásmido pSU113. pQE30 es un vector de expresión que proporciona un alto nivel de expresión de una proteína recombinante con un marcador de poli-histidina 6 (6xHis). Por lo tanto, el producto de expresión del plásmido pSU113, es una proteína de fusión 6xHis-ZOT. Después se transformó pSU113 en *E. coli* DH5 α .
- Con el fin de purificar la proteína de fusión 6xHis-ZOT, la *E. coli* transformada resultante se hizo crecer toda la noche a 37°C en 150 ml de caldo de Luria Bertani que contenía glucosa al 2,0% (p/v), kanamicina 25 μ g/ml y ampicilina 200 μ g/ml hasta que la A₆₀₀ era aproximadamente 1,10. Después, se añadieron 75 ml de los cultivos de la noche a 1000 ml de caldo de Luria Bertani que contenía glucosa al 2,0% (p/v), kanamicina 25 μ g/ml y ampicilina 200 μ g/ml, se incubó durante aproximadamente 3 h a 37°C, con agitación vigorosa, hasta que la A₆₀₀ era aproximadamente 0,7-0,9. Después, se añadió IPTG hasta una concentración final 2,0 mM, y se dejó continuar el crecimiento durante 5 h a 37°C. Después las células se recogieron por centrifugación a 4000 x g durante 20 min, las células se volvieron a suspender en 5,0 ml/g de peso húmedo de tampón A que comprendía GuHCl 6,0 M, fosfato sódico 0,1 M, y Tris-HCl 0,01 M, y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4°C, y al líquido sobrenadante resultante se añadió 4,0-5,0 ml/g de peso húmedo de una suspensión al 50% de resina SUPERFLOW (QIAGEN), y la agitación se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. La resina resultante se cargó en una columna 1,6 x 8,0, que después se lavó secuencialmente con tampón A, tampón B que contenía urea 8,0 M, fosfato sódico 0,1 M y Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0) y tampón C que comprendía urea 8,0 M, fosfato sódico 0,1 M y Tris-HCl 0,01 M (pH 6,3). Se llevó a cabo cada lavado hasta que la A₆₀₀ del flujo era menor que 0,01. La proteína de fusión 6xHis-ZOT se eluyó de la columna usando 20 ml de tampón C que contenía imidazol 250 mM. Después, las fracciones que contenían la proteína de fusión 6xHis-ZOT se comprobaron por PAGE-SDS usando el procedimiento descrito por Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404 (1964), y el gel se tiñó con azul Coomassie. Las fracciones que contienen la proteína de fusión 6xHis-ZOT se dializaron contra urea 8,0 M, se combinaron y después se diluyeron 100 veces en PBS. Después, se añadieron 4,0 ml de una suspensión al 50% de resina SUPERFLOW, se llevó a cabo la agitación durante 2 h a temperatura ambiente, y la resina resultante se cargó en una columna de 1,6 x 8,0, que después se lavó con 50 ml de PBS. La proteína de fusión 6xHis-ZOT se eluyó de la columna con 10 ml de PBS que contenía imidazol 250 mM. El eluyente resultante se dializó contra PBS, y la proteína de fusión 6xHis-ZOT se comprobó por PAGE-SDS, como se ha descrito antes.

Ejemplo 6

Producción de antisuero anti-ZOT

Para obtener el antisuero específico, se expresó y purificó una proteína quimérica de glutatión S-transferasa (GST)-ZOT.

Más específicamente, se usaron cebadores oligonucleótidos para amplificar el orf de *zot* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el plásmido pBB241 (Baudry *et al.*, véase antes) como ADN molde. El cebador directo (TCATCACGGCGGCCAGG, ID SEC Nº: 8) correspondía a los nucleótidos 15-32 del orf de *zot*, y el cebador inverso (GGAGGTCTAGAACATCTGCCGAT, ID SEC Nº: 9) correspondía al extremo 5' del orf de *ctxA*. Por lo tanto, los aminoácidos 1-5 de ZOT estaban ausentes en la proteína de fusión resultante. El producto de amplificación se insertó en el policonector (sitio *SmaI*) situado en el extremo del gen de GST en pGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI). pGEX-2T es un vector de expresión de proteína de fusión que expresa un gen clonado como una proteína de fusión con GST de *Schistosoma japonicum*. El gen de fusión está controlado por el promotor *tac*. Por inducción con IPTG, se produce la desrepresión y se expresa la proteína de fusión de GST.

El plásmido recombinante resultante, en particular, pLC11, se introdujo por electroporación de DH5 α de *E. coli*. Con el fin de purificar la proteína de fusión GST-ZOT, se inocularon 10 ml de caldo de Luria Bertani que contenía ampicilina 100 μ g/ml con una sola colonia contenido pLC11, y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se diluyó 1:100 en 1,0 ml del mismo medio reciente y se hizo crecer a 37°C mientras se agitaba, hasta aproximadamente 1,0 x 10⁸ células/ml. Después se añadió IPTG 0,2 mM para inducir la expresión de GST-ZOT, y el cultivo se incubó a 37°C durante 3 h adicionales. Después las bacterias se sedimentaron, se volvieron a suspender en 20 ml de PBS helado (pH 7,4) y se lisaron por el método de la prensa de French. La proteína de fusión GST-ZOT no era soluble en estas condiciones ya que sedimentaba con la fracción de sedimento bacteriano. Por lo tanto, el sedimento se volvió a suspender en tampón de lisis de Laemli que comprendía Tris-HCl 0,00625 M (pH 6,8), 2-ME 0,2 M, SDS al 2,0% (p/v), azul bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v), y se sometió a electroforesis en un gel de PAGE-SDS al 8,0% (p/v), y se tiñó con azul brillante Coomassie. Una banda de aproximadamente 70 kDa (26 kDa de GST + 44 kDa de ZOT) que correspondía a la proteína de fusión, se electroeluyó del gel usando una cámara de electroseparación (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

ES 2 285 762 T3

Se inyectaron 10 µg de la proteína eluida resultante (10-20 µg) mezclados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, en un conejo. Se administraron dos dosis de refuerzo con adyuvante incompleto de Freund 4 y 8 semanas después. Un mes más tarde se desangró el conejo.

5 Para determinar la producción de anticuerpos específicos, se transfirieron ZOT 10⁻¹⁰ M junto con las dos proteínas de fusión MBP-ZOT y GST-ZOT a una membrana de nailon y se incubaron con una dilución de 1:5000 de antisero de conejo toda la noche a 4°C con agitación moderada. Después el filtro se lavó 15 min 4 veces con PBS-T, y se incubó con una dilución de 1:30.000 de IgG de anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante durante 2 h a temperatura ambiente. El filtro se lavó otra vez durante 15 min 4 veces con PBS que contenía Tween al 0,1% (v/v) y 10 las bandas inmunorreactivas se detectaron usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

Por inmunotransferencia se encontró que el antisero de conejo reconocía ZOT, así como las proteínas de fusión MBP-ZOT y GST-ZOT, pero no el testigo negativo de MBP.

15 Además, para confirmar la producción de los anticuerpos anti-ZOT adecuados, se llevaron a cabo experimentos de neutralización en cámaras de Ussing. Cuando se preincubó con líquido sobrenadante de pZ14 a 37°C durante 60 min, el antisero específico para ZOT (dilución 1:100), era capaz de neutralizar completamente la disminución de la Rt inducida por ZOT en el ileón de conejo motando en cámaras Ussing.

20 Ejemplo 7

Purificación de los receptores de ZOT

A. Estudios de unión

25 La proteína de fusión MBP-invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* es capaz de unirse al receptor de integrina de las células de mamífero, y confiere el fenotipo invasivo a *E. coli* no patógeno que alberga plásmidos que producen la proteína de fusión MBP-invasina (Leong *et al.*, *The EMBO J.*, 9(6):1979-1989 (1990)). Como resultado, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la proteína de fusión MBP-ZOT, obtenida en el ejemplo 5 anterior, reconoce un sitio de unión intestinal específico, así como para retener la capacidad de aumento de la permeabilidad tisular.

Más específicamente, el ileón de conejo se despojó de las capas muscular y serosa, se montó en cámaras de Ussing, y después se expuso a MBP-ZOT purificada o ZOT purificada 10⁻¹⁰ M, ambas añadidas en el lado de la mucosa del tejido. Se usó MBP 10⁻¹⁰ M como un testigo negativo. Después se registraron los cambios en la Rt a intervalos de 10 35 min. Los resultados se muestran en la figura 4.

Como se muestra en la figura 4, se encontró que la proteína de fusión MBP-ZOT (Δ) inducía una disminución de la Rt en el ileón de conejo comparable con la inducida por ZOT purificado (\square), pero significativamente diferente cuando se comparaba con los cambios inducidos por el testigo negativo de MBP (\blacksquare). Tanto los efectos de MBP-ZOT como de 40 ZOT purificados en la Rt eran fácilmente reversibles 24 h después de retirar los restos. Estos datos demuestran que el componente ZOT de la proteína de fusión MBP-ZOT todavía es capaz de reconocer y unirse al receptor de ZOT.

En estudios adicionales, se ha encontrado que ZOT ejerce su efecto de permeabilización sólo en el yeyuno y el 45 ileón, mientras que el colon permanece sin ser afectado. Para definir si el efecto regional de ZOT estaba relacionado con la distribución del receptor de ZOT sobre la superficie de los enterocitos intestinales, se fijaron diferentes segmentos intestinales, incluyendo yeyuno, ileón distal y colon, en paraformaldehído al 4,0% (v/v), y se seccionaron transversalmente. Después las secciones se incubaron durante 30 min con MBP-ZOT o testigo negativo de MBP. Las 50 muestras se lavaron tres veces con PBS, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1,0% (p/v) y después se incubaron durante 1 h con anticuerpos anti-MBP polyclonales de conejo (New England Biolabs) (dilución 1:500). Después las muestras se lavaron con PBS, y se incubaron con anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugados con FITC (Sigma) (dilución 1:100) durante 30 min, seguido de incubación con azul Evans (dilución 1:2000) durante 10 min. Las secciones finalmente se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY).

Los segmentos que mostraron una disminución de Rt, es decir, el yeyuno y el ileón distal, presentaron un número 55 significativo de partículas fluorescentes sobre la superficie del tejido, mientras que no se observó unión en los mismos tractos de intestino expuestos al testigo negativo. La tinción fluorescente era máxima en la punta de las vellosidades, y disminuía a lo largo del eje veloso. No se observó tinción significativa en los segmentos de colon expuestos a ZOT (Fiore *et al.*, *Gastroenterology*, 110:A323 (1996)).

Estos resultados demuestran que la distribución del receptor de ZOT varía dentro del intestino, estando más representado en el yeyuno y el ileón distal, y disminuye a lo largo del eje de vellosidad-cripta. Esta distribución coincide con el efecto regional de ZOT en la Rt, y con la redistribución de actina F preferencial inducida por ZOT en las células maduras de las vellosidades, lo que sugiere que la distribución regional del receptor de ZOT coincide con el diferente efecto de permeabilización de ZOT en los diferentes tractos del intestino ensayados. La escasez de receptores de ZOT 60 en el área de la cripta puede reflejar el hecho de que esta región ya es permeable comparada con el epitelio más maduro de la punta de las vellosidades (Marcial *et al.*, *J. Membr. Biol.*, 80:59-70 (1984)), y por lo tanto no necesita ser regulada.

Se han publicado recientemente los cambios ultraestructurales de la mucosa intestinal en los humanos adultos afectados por el cólera (Mathan *et al.*, *Gastroenterology*, 109:422-430 (1995)). Las biopsias de yeyuno obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad mostraron un ensanchamiento pronunciado de los espacios intercelulares laterales que estaba presente sólo en el tercio superior de las vellosidades, y era máximo en las puntas de las vellosidades, disminuyendo gradualmente hacia la mitad de la vellosidad. También se encontró una condensación concomitante de la actina alrededor de las conexiones alrededor de la zonula adherens. Todas estas modificaciones morfológicas eran más anómalas en los seres humanos con enfermedad clínica grave, comparado con los pacientes con enfermedad moderada (Mathan *et al.*, véase antes). Por lo tanto, en la presente invención se cree que los cambios que observaron Mathan *et al.*, véase antes, están asociados con el efecto preferencial de ZOT en los enterocitos maduros de las vellosidades, y por lo tanto, que la distribución del receptor de ZOT en seres humanos es similar a la descrita en conejos.

También se llevaron a cabo experimentos de unión con varias líneas celulares, incluidas las células IEC6, CaCo2, T84 (Nath *et al.*, véase antes), MDCK, y células endoteliales bovinas. Más específicamente, se incubaron $2,0 \times 10^5$ de cada una de estas células con diferentes intervalos de tiempo (5 min, 30 min, 60 min), y temperaturas (4°C o 37°C) con MBP-ZOT 5×10^{-9} M o testigo negativo de MBP $5,0 \times 10^{-9}$. Después las células se fijaron con metanol frío, se lavaron tres veces con PBS, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1,0% (p/v), y después se incubaron durante 1 h con anticuerpos anti-MBP policlonales de conejo (New England Biolabs) (dilución 1:500). Después las muestras se lavaron con PBS, y se incubaron con anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugados con FITC (Sigma) (dilución 1:100) durante 30 min, seguido de incubación con azul Evans (dilución 1:2000) durante 10 min. Las células finalmente se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY).

Cuando se expusieron a la proteína de fusión MBP-ZOT (a diferentes temperaturas e intervalos de tiempo ensayados) las monocapas de células IEC6, CaCo2 y de endotelio bovino, presentaron un aumento significativo del número de partículas fluorescentes, cuando se compararon con las células expuestas al testigo negativo de MBP. Por el contrario, no se observó tinción significativa en las células T84 y MDCK cuando se incubaron con MBP-ZOT. Estos resultados sugieren que ZOT interacciona con un receptor de superficie específico cuya distribución varía entre las diferentes líneas celulares.

Se repitieron los mismos tipos de experimentos usando las monocapas de IEC6 expuestas durante 60 min a 4°C a la proteína de fusión MBP-ZOT 10^{-10} M, y después incubadas con una dilución 1:500 del antisuero anti-ZOT (obtenido como se describe en el ejemplo 6 anterior). Las monocapas después se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugados con FITC (Sigma) (dilución 1:100) durante 30 min, seguido de incubación con azul Evans (dilución 1:2000) durante 10 min. Las células finalmente se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY).

Otra vez, las células expuestas a la proteína de fusión MBP-ZOT (con los mismos intervalos de tiempo y temperaturas descritos antes) mostraron un número significativo de partículas fluorescentes, comparado con el testigo negativo de MBP. Estos resultados confirman que el ligando consistía en la proteína de fusión MBP-ZOT, y no en un producto de degradación que contenía MBP, pero no ZOT.

Se obtuvieron resultados similares cuando se usó ZOT purificado, y las mismas líneas celulares y condiciones experimentales ensayadas antes, y se incubaron las monocapas celulares con antisuero anti-ZOT como se ha descrito antes.

Para caracterizar la naturaleza del receptor de ZOT, se trataron previamente las monocapas de células IEC6 con proteasas (proteasa K 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o pronasa E 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min a 37°C , y se determinó la afinidad de unión para ZOT como se ha descrito antes. Además se trató previamente ZOT 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 min a 37°C con sacarosa 1,0 mM o manosa 1,0 mM, antes de aplicar ZOT sobre la superficie de las monocapas de IEC6. La afinidad de unión para ZOT se determinó otra vez como se ha descrito antes. Se encontró que la unión de ZOT a las células IEC6 se bloqueaba por el tratamiento previo de las monocapas de células con cualquiera de las proteasas, y por el tratamiento previo de ZOT con sacarosa, pero no por el tratamiento previo con manosa (Fiore *et al.*, véase antes). Basándose en estos resultados, parece que el receptor de ZOT es una glicoproteína.

B. Purificación del receptor de ZOT usando MBP-ZOT

Se preparó una columna de afinidad con MBP-ZOT mediante inmovilización durante una noche a temperatura ambiente, de 1,0 mg de MBP-ZOT purificada (obtenida como se ha descrito antes en el ejemplo 5) en un gel preactivado (Aminolink, Pierce). La columna se lavó con PBS, y después se cargó con un lisato celular bruto obtenido usando células IEC6 10^6 (células de intestino delgado de rata) (Quaroni *et al.*, In: *Methods in Cell Biology*, Chapter 20, 21B:403-426 (1980)); o células CaCo2 (células intestinales humanas) (Nath *et al.*, *J. Diarrhoeal Dis.*, 8:133-142 (1990)). Los lisatos se prepararon pasando las células por una aguja de calibre 25 tres veces. Después de una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, la columna se lavó tres veces, cada una con 14 ml de PBS, y la proteína que se unía a la columna de MBP-ZOT se eluyó de la columna con 4,0 ml de una solución que comprendía glicina 50 mM (pH 2,5), NaCl 150 mM, y Triton X-1000 al 1% (v/v). El pH de las fracciones de 1,0 ml eluídas se neutralizó inmediatamente con NaOH 1,0 N. Después las fracciones se sometieron a PAGE-SDS al 8,0% (p/v) en condiciones reductoras. El PAGE-SDS se llevó a cabo como describen Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 111:404 (1964), y el gel se tiñó con azul Comassie.

ES 2 285 762 T3

Las fracciones eluídas de los lisatos tanto de las células IEC6 como de CaCo2 se cargaron en la columna de afinidad de MBP-ZOT, y se sometieron a PAGE-SDS, dando una banda de una sola proteína con un M_r de 66 kDa, en condiciones reductoras. La banda de una sola proteína de cada línea celular después se transfirió a un filtro de nitrocelulosa usando tampón CAPS que comprendía 100 ml de ácido (3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico 10x, 100 ml de metanol, 800 ml de agua destilada. Después la banda de una sola proteína de cada línea celular se cortó del filtro y se sometió a secuenciación N-terminal como describe Hunkapiller, en: *Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, Chapters 11-12, Humana Press, pages 315-334 (1985), usando un aparato Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 494, y se encontró que tenían las siguientes secuencias N-terminales:

10 células CaCo2 - receptor de ZOT humano:

Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gln Glu (ID SEC N°: 10);

células IEC6 - receptor ZOT de rata:

15 Ala His Lys Ser Glu Ile (ID SEC N°: 11).

Una comparación de las secuencias N-terminales del receptor de ZOT resultante de las células CaCo2 con la base de datos de secuencias NBCI usando BLAST puso de manifiesto similitudes con la región N-terminal de la albúmina de suero humana (85% de identidad, 85% de similitud) y con la región N-terminal de la α -1-quimerina humana (46% de identidad, 69% de similitud) (véase la siguiente Tabla II).

25 (Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA II

O indica identidad; + indica similitud

ES 2 285 762 T3

La α -1-quimerina es una proteína activadora de GTPasa específica de neuronas para p21 *rac*, un miembro de la subfamilia *rho* relacionada con *Ras* (Dong, *Eur. J. Biochem.*, 227:636-646 (1994)). Esta proteína pequeña de unión a GTP está implicada en la regulación de los filamentos de actina y la organización del citoesqueleto en células de mamífero como respuesta a varios estímulos (Ridley, *Cell*, 70:389-399 (1992)).⁵

B. Purificación del receptor ZOT usando 6xHis-ZOT

Se preparó una columna de afinidad con 6xHis-ZOT mediante inmovilización durante una noche a temperatura ambiente, de 1,0 mg de 6xHis-ZOT purificada (obtenida como se ha descrito antes en el ejemplo 5) en un gel preactivado (Aminolink, Pierce). La columna se lavó con PBS, y después se cargó con un lisato celular bruto obtenido usando 15 g de tejido de intestino, corazón o cerebro humanos. Los lisatos se prepararon pasando el tejido por una aguja de calibre 25 tres veces. Después de una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, la columna se lavó tres veces, cada una con 14 ml de PBS, y la proteína que se unía a la columna de 6xHis-ZOT se eluyó de la columna con 4,0 ml de una solución que comprendía glicina 50 mM (pH 2,5), NaCl 150 mM y Triton X-1000 al 1% (v/v). El pH de las fracciones de 1,0 ml eluídas se neutralizó inmediatamente con NaOH 1,0 N. Después las fracciones se sometieron a PAGE-SDS al 8,0% (p/v) en condiciones reductoras. El PAGE-SDS se llevó a cabo como describen Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 111:404 (1964), y el gel se tiñó con azul Comassie.

Las fracciones eluídas de los lisatos de los tejidos de intestino, corazón y cerebro se cargaron en la columna de afinidad de 6xHis-ZOT, y se sometieron a PAGE-SDS, y todas dieron una banda de una sola proteína con un M_r de 45 kDa, en condiciones reductoras. La banda de una sola proteína de cada tejido después se transfirió a una membrana de PVDF (Biorad) usando tampón CAPS que comprendía 100 ml de ácido (3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico 10x, 100 ml de metanol, 800 ml de agua destilada. Después la banda de una sola proteína de tejido se cortó del filtro y se sometió a secuenciación N-terminal como describe Hunkapiller, en: *Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, Chapters 11-12, Humana Press, páginas 315-334 (1985), usando un aparato Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 494, y se encontró que tenían las siguientes secuencias N-terminales:²⁰

Receptor de ZOT de cerebro humano:

30 Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Gly Val Gly His Lys Tyr (ID SEC N°: 1);

Receptor de ZOT de intestino humano

35 Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly (ID SEC N°: 2).

Receptor de ZOT de corazón humano:

40 Xaa Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg Arg Gln (ID SEC N°: 3)

Una comparación de la secuencia N-terminal del receptor de ZOT resultante del cerebro humano con la base de datos de secuencias NBCI usando BLAST puso de manifiesto similitudes con la región N-terminal de la Calprotectina (72% de identidad, 72% de similitud) (véase la siguiente Tabla III).⁴⁵

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA III

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Cerebro humano aminoácidos 2-19 (ID SEC N°: 15)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Val Gly His Lys Tyr
Calprotectina aminoácidos 2-19 (ID SEC N°: 16)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys O O O O O O Ile Ser Ile Ile Asp Val Tyr His Lys Tyr

O indica identidad; + indica similitud

ES 2 285 762 T3

La calprotectina es una proteína que tiene un peso molecular de 8-14 kDa y se une al calcio (Odink *et al.*, *Nature*, 330:80-82 (1987); Lemarchand *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:19379-19382 (1992); y Schafer *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 372:1-4 (1991)).

- 5 Una comparación de la secuencia N-terminal del receptor de ZOT resultante del intestino humano con la base de datos de secuencias NBCI usando BLAST puso de manifiesto similitudes con una región interna de la proteína de proteolípido (lipofilan) (92% de identidad, 92% de similitud) (véase la siguiente Tabla IV).

TABLA IV

Intestino humano aminoácidos 1-13	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly	(ID SEC Nº: 2)
Proteína de proteolípido aminoácidos 186-189	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly O O O O O O O O O O O O O O O O	(ID SEC Nº: 17)
O indica identidad; + indica similitud		

ES 2 285 762 T3

La proteína proteolípido (PLP) es una proteína que tiene un peso molecular de 30,5 kDa, y es una proteína integral de membrana que tiene una función importante en la formación o mantenimiento de la estructura multilaminar de la mielina (Diehl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:9807-9811 (1986)).

- 5 Una comparación de la secuencia N-terminal del receptor de ZOT resultante del corazón humano con la base de datos de secuencias NBCI usando BLAST puso de manifiesto similitudes con el dominio de unión a la cardilipina de la creatina quinasa (100% de identidad) (véase la siguiente Tabla V).

		Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala Asp Tyr (ID SEC Nº: 18)									
		Corazón humano aminoácidos 2-15	Creatina quinasa humana, sarcomérica mitocondrial	Creatina quinasa humana, sarcomérica mitocondrial	aminoácidos 41-54						
10						O	O	O	O	O	O
15						O	O	O	O	O	O
20						O	O	O	O	O	O
25						O	O	O	O	O	O
30						O	O	O	O	O	O
35						O	O	O	O	O	O
40						O	O	O	O	O	O
45						O	O	O	O	O	O
50						O	O	O	O	O	O
55						O	O	O	O	O	O
60						O	O	O	O	O	O

O indica identidad; + indica similitud

- 65 La proteína humana creatina quinasa sarcomérica mitocondrial es una proteína que tiene un peso molecular de 46 kDa, y tiene una función central en la transducción de energía en tejidos con demandas de energía grandes y que fluctúan.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae* purificada, que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3, o dicho receptor que tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y una secuencia de aminoácidos N-terminales del ID SEC Nº: 10.
- 10 2. Un receptor de la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae* purificada según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos terminales es el ID SEC Nº: 1.
- 15 3. Un receptor de la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae* purificada según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 2.
- 20 4. Un receptor de la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae* purificada según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 3.
- 25 5. Un receptor de la toxina de zonula occludens de *Vibrio cholerae* purificada según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 10.
- 30 6. Un método para cribar un antagonista de la toxina de zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:
- 35 (a) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando como ligando de captura o bien un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* purificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3,
- 40 o bien un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* purificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del ID SEC Nº: 10; y
- 45 (b) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT, en el que dicha actividad biológica de ZOT es la capacidad de aumentar de forma reversible la permeabilidad epitelial por modulación de la estructura de las uniones de oclusión intercelulares,
- 50 en el que dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, pero no tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un antagonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.
- 55 7. Un método para cribar un antagonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 1.
- 60 8. Un método para cribar un antagonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 2.
- 65 9. Un método para cribar un antagonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 3.
- 70 10. Un método para cribar un antagonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 10.
- 75 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que además comprende la etapa de elaborar dicho antagonista.
- 80 12. Un método para cribar un agonista de la toxina de zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae* que comprende las etapas de:
- 85 (a) llevar a cabo un ensayo de unión por afinidad en un compuesto de ensayo usando como ligando de captura o bien un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* purificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del grupo que consiste en ID SEC Nº: 1, ID SEC Nº 2 e ID SEC Nº 3,
- 90 o bien un receptor de ZOT de *Vibrio cholerae* purificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminales seleccionada del ID SEC Nº: 10; y

ES 2 285 762 T3

(b) llevar a cabo un ensayo en dicho compuesto de ensayo para así determinar si dicho compuesto de ensayo tiene actividad biológica de ZOT, en el que dicha actividad biológica de ZOT es la capacidad de aumentar de forma reversible la permeabilidad epitelial por modulación de la estructura de las uniones de oclusión intercelulares,

5 en el que cuando dicho compuesto de ensayo se une específicamente a dicho receptor de ZOT de *Vibrio cholerae*, y tiene actividad biológica de ZOT, dicho compuesto de ensayo es un agonista de ZOT de *Vibrio cholerae*.

13. Un método para cribar un agonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae*, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 1.

10 14. Un método para cribar un agonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae*, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 2.

15 15. Un método para cribar un agonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae*, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 3.

16. Un método para cribar un agonista de la toxina zonula occludens (ZOT) de *Vibrio cholerae*, en el que dicha secuencia de aminoácidos N-terminales es el ID SEC Nº: 10.

20 17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que además comprende la etapa de elaborar dicho agonista.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

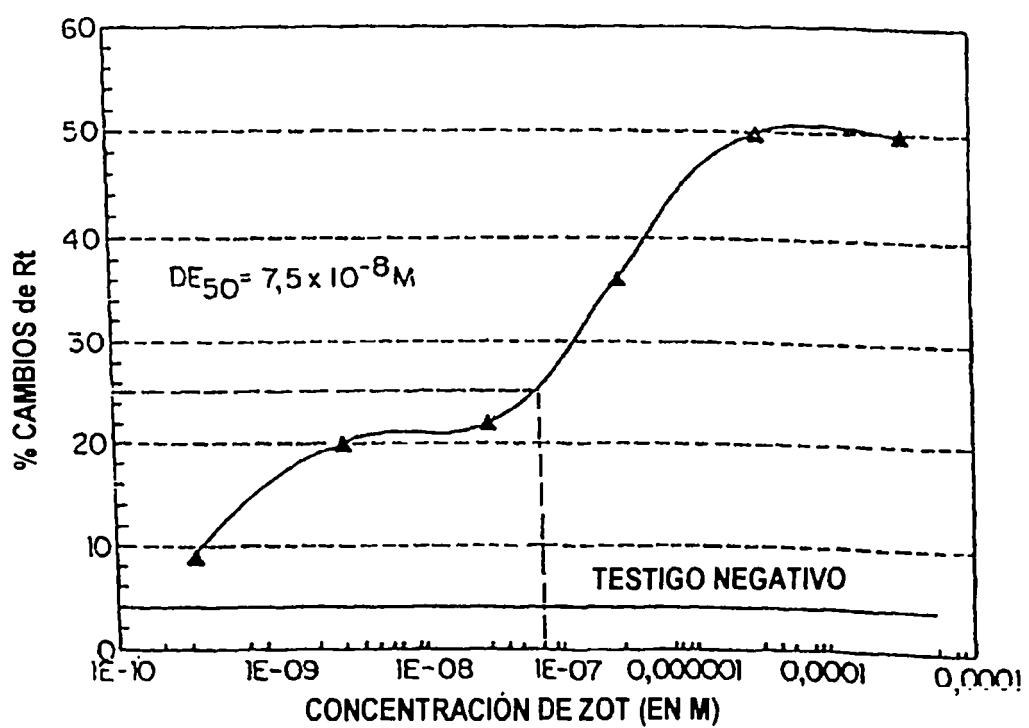
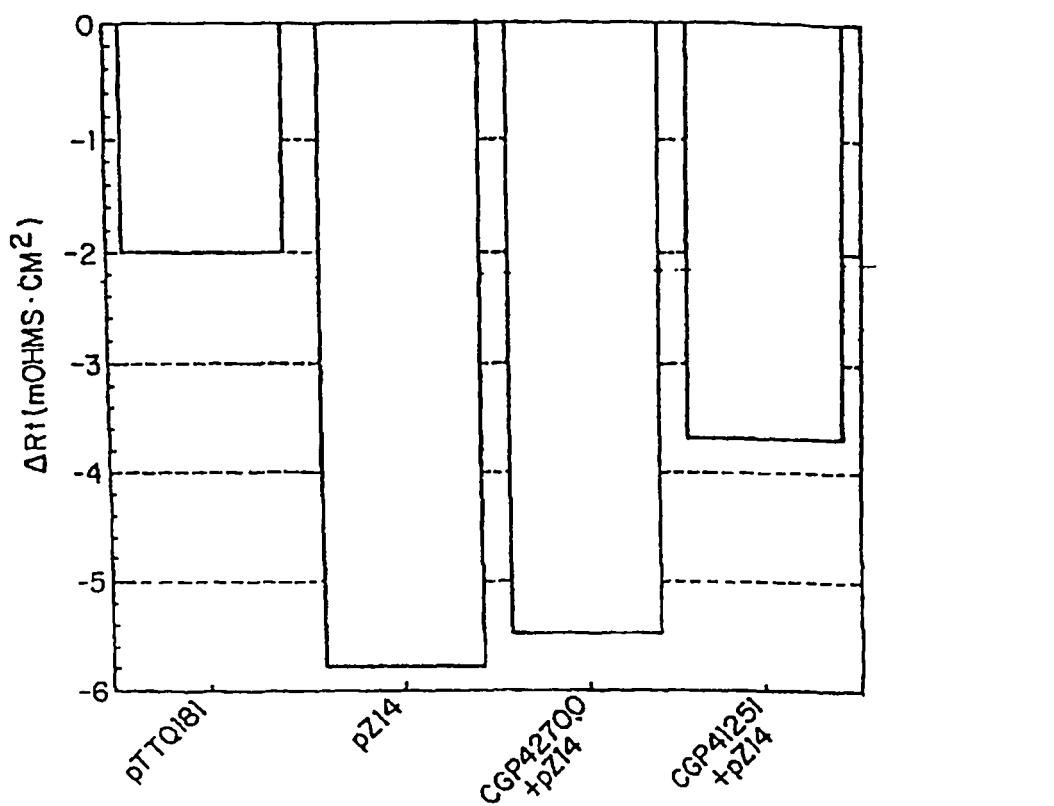


FIG. 3

FIG. 2A

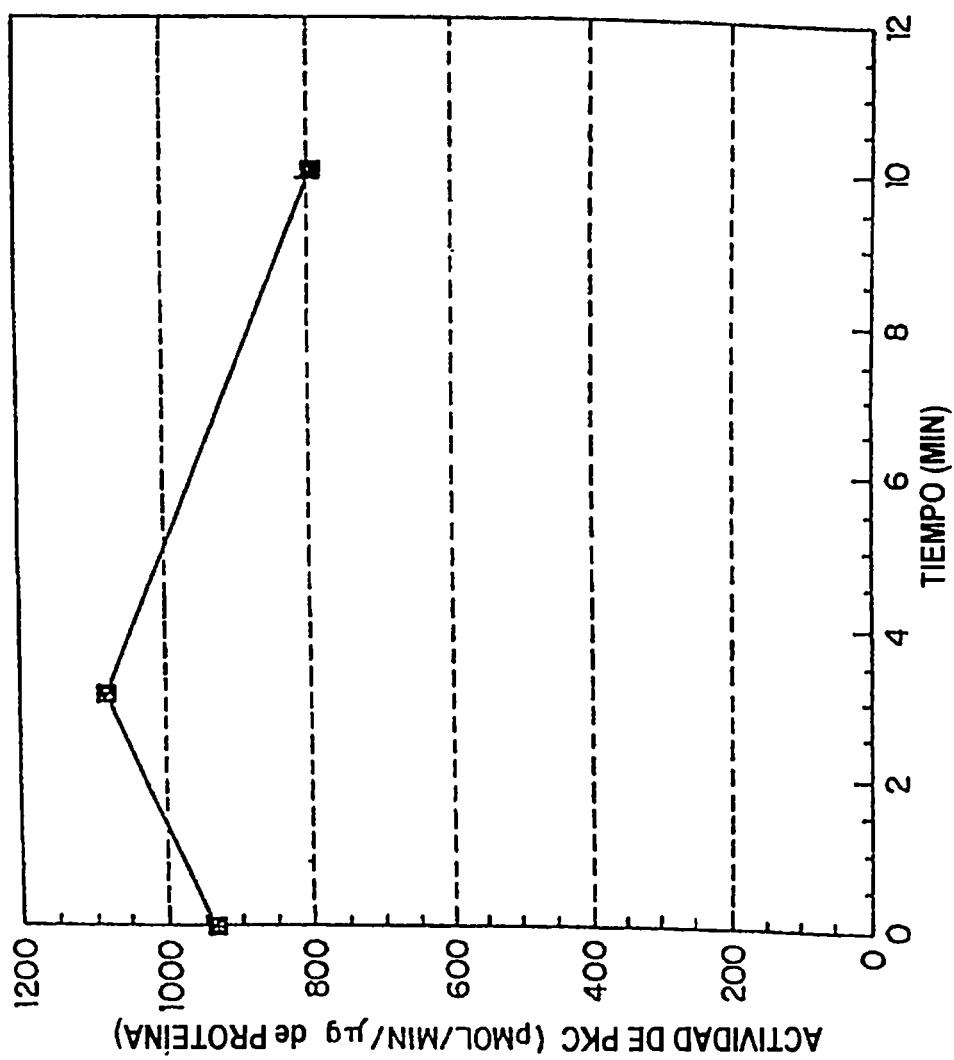


FIG. 2B

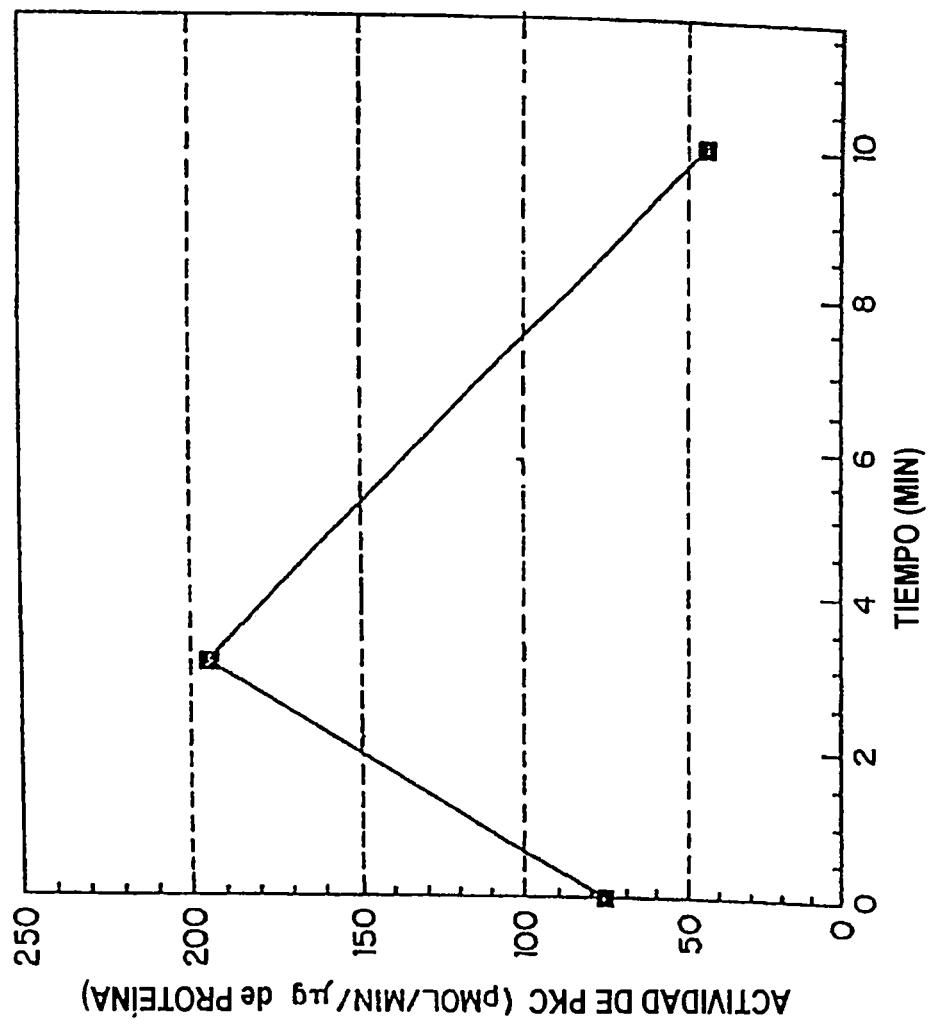
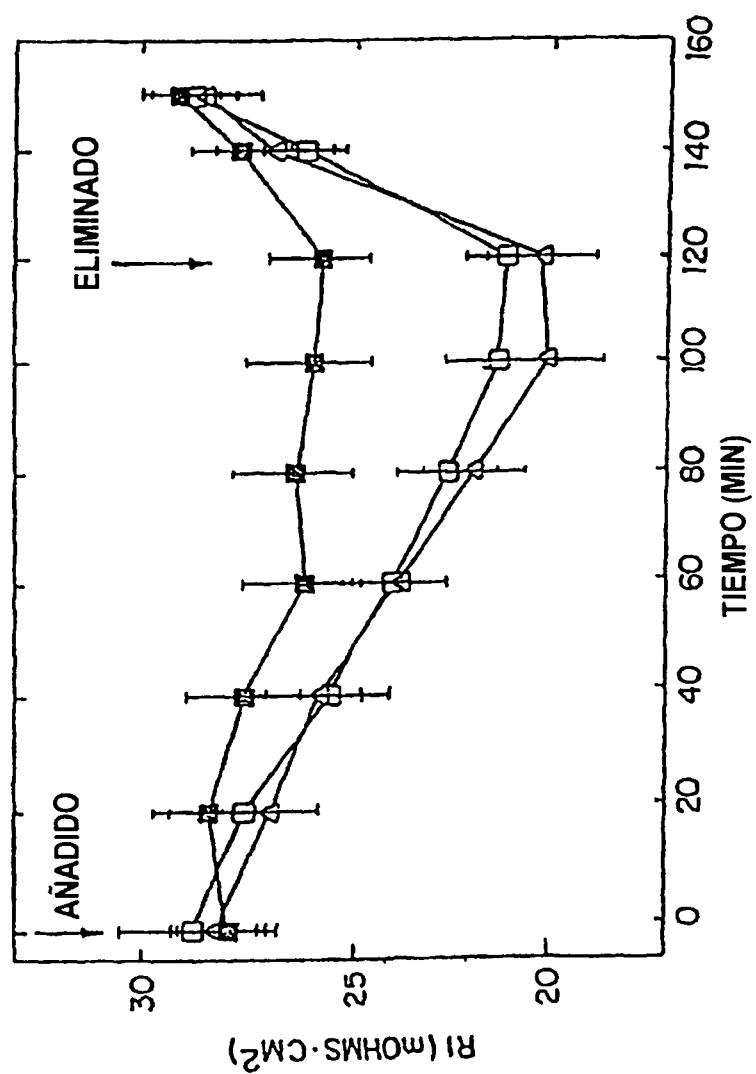


FIG. 4



ES 2 285 762 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE: FASANO, Alessio

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: RECEPTOR DE LA TOXINA ZONULA OCCLUDENS

10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 18

15 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:

(A) DIRECCIÓN: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS

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

20 (C) CUIDAD: Washington, D.C.

(D) ESTADO: D.C.

(E) PAÍS: EE.UU.

(F) ZIP: 20037

25 (v) FORMA DE LECTURA EN EL ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: disco flexible

(B) ORDENADOR: PC IBM compatible

30 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nº 1.0, Versión #1.25

35 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 18 FEB 1998

(C) CLASIFICACIÓN:

40 (vi) FECHA DE SOLICITUD PREVIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 09/024.198

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 17 FEB 1998

(C) CLASIFICACIÓN:

45 (vi) FECHA DE SOLICITUD PREVIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/803.364

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20 FEB 1998

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:

50 (A) NOMBRE: KIT, Gordon

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 30.764

(C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: F-121122

55 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (202) 293-7060

(B) TELEFAX: (202) 293-7860

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 1:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 285 762 T3

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 1:

5 Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly
1 5 10

Gly Gly Val Gly His Lys Tyr
15

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: №

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 2:

25 Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile
 1 5 10

Gly

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: No

(iii) HIPÓTEICA. No

45 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 3:
Xaa Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser

Ala Asp Tyr

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 4:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD 14 cm y 6 milímetros

(A) LONGITUD: 14 am

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOI ÉCU

(iii) HIPOTÉTICA: No

ES 2 285 762 T3

Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg
1 5 10

Arg Gln

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 5:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 12 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido sintético
(iii) HIPOTÉTICA: No

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 5:

Lys Gly Phe Ser Tyr Phe Gly Glu Asp Leu Met Pro
1 5 10

²⁵ (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 6:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: una
(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
(iii) HIPOTÉTICA: No
(iv) ANTISENTIDO: No

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 6:

CGGGATCCCC TATGAGTATC TTT

23

⁴⁵ (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 7:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 24 ácidos nucleicos
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: una
(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
(iii) HIPOTÉTICA: No
(iv) ANTISENTIDO: No
60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 7:

CCAAGCTTG GGTCAAAATA TACT

24

⁶⁵ (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 8;

- ### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 285 762 T3

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

10

(iii) HIPOTÉTICA: No

(iv) ANTISENTIDO: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 8:

15

TCATCACGGC GCGCCAGG

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 9:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: una

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

30

(iii) HIPOTÉTICA: No

(iv) ANTISENTIDO: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 9:

35

GGAGGTCTAG AATCTGCCGA AT

22

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 10:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: No

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 10:

Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys
1 5 10

55

Asp Leu Gln Glu
15

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 11:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 285 762 T3

- (iii) HIPOTÉTICA: No
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 11:

5 **Ala His Lys Ser Glu Ile**
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 12:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- (iii) HIPOTÉTICA: No

- 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 12:

Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp
 1 5 10

25 **Leu**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 13:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- (iii) HIPOTÉTICA: No

- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 13:

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
 1 5 10

45 **Leu**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 14:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- (iii) HIPOTÉTICA: No

- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 14:

Val His Lys Ser Lys Gln Glu Gly Arg Gln Gln Asp
 1 5 10

65 **Leu**

ES 2 285 762 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
5 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal
10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: No
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 15:

15 **Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly**
1 5 10
Gly Val Gly His Lys Tyr
20 **15**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
25 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal
30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: No
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 16:

35 **Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile**
1 5 10
Asp Val Tyr His Lys Tyr
40 **15**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
45 (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TOPOLOGÍA: lineal
50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: No
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 17:

55 **Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile**
1 5 10
Gly

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 18:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

ES 2 285 762 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 18:

10 Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala
 1 5 10

Asp Tyr

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65