



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 267 282**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99940809 .9**

(86) Fecha de presentación : **28.07.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1102596**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2001**

(54) Título: **Antagonistas de péptido de zonulina y métodos para usarlos.**

(30) Prioridad: **03.08.1998 US 127815**

(73) Titular/es: **University of Maryland, Baltimore
Suite 500, 515 West Lombard Street
Baltimore, Maryland 21201-1602, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

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

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

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

ES 2 267 282 T3

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

Antagonista de péptido de zonulina y métodos para usarlos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a antagonistas de péptido de zonulina, así como a métodos para el uso de los mismos. Dichos antagonistas de péptido se unen al receptor de zonula occludens, aunque no modulan fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos.

10 Antecedentes de la invención

I. Función y Regulación de las Zonas de Oclusión Intestinales

15 Las zonas de oclusión (“tj” del inglés “tight junction”) o zonula occludens (a partir de aquí “ZO”) son uno de los sellos de los epitelios absorvente y secretor (Madara, *J. Clin. Invest.*, 83: 1089-1094 (1989); y Madara, *Textbook of Secretory Diarrhea* Eds. Lebenthal y col., Capítulo 11, páginas 125-138 (1990). Como barrera entre los comportamientos apical y basolateral, regulan de forma selectiva la difusión pasiva de iones y de 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 a la ruta transcelular (Diamond, *Physiologist*, 20: 10-18 (1977)).

20 Las variaciones de la conductancia transepitelial se pueden atribuir habitualmente a cambios en la permeabilidad de la ruta paracelular, ya que las resistencias de las membranas de plasma del enterocito son relativamente elevadas (Madara, ver anteriormente). La ZO representa la principal barrera de esta ruta paracelular, y la resistencia eléctrica de los tejidos epiteliales parece depender del número de cadenas de proteína de transmembrana, y de su complejidad en la ZO, según se ha observado mediante microscopía electrónica de fractura por congelación (Madara y col., *J. Cell Biol.*, 101: 2124-2133 (1985)).

25 30 Existen abundantes evidencias de que las ZO, consideradas antes estructuras estáticas, son en realidad dinámicas y se adaptan fácilmente a una variedad de circunstancias del desarrollo (Magnuson y col., *Dev. Biol.*, 67: 214-224 (1978); Revel y col., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 40: 443-455 (1976); y Schneeberger y col., *J. Cell Sci.*, 32: 307-324 (1978)), fisiológicas (Gilula y col., *Dev. Biol.*, 50: 142-168 (1976); Madara y col., *J. Membr. Biol.*, 100: 149-164 (1987); Mazariegos y col., *J. Cell. Biol.*, 98: 1865-1877 (1984); y Sardet y col., *J. Cell Biol.*, 80: 96-117 (1979)), y patológicas (Milks y col., *J. Cell Biol.*, 103: 2729-2738 (1986); Nash y col., *Lab. Invest.*, 59: 531-537 (1988); y Shasby y col., *Am. J. Physiol.*, 255 (*Cell Physiol.*, 24): C781-C788 (1988)). Los mecanismos reguladores que apoyan esta adaptación todavía no se comprenden completamente. Sin embargo, es evidente que, en presencia de Ca^{2+} , la formación de la ZO es el resultado de interacciones celulares que activan una cascada compleja de sucesos bioquímicos que finalmente conducen a la formación y modulación de un entramado organizado de elementos de ZO, 35 40 cuya composición ha sido caracterizada sólo parcialmente (Diamond, *Physiologist*, 20: 10-18 (1977)). Un candidato de las membranas de proteína de transmembrana, la ocludina, ha sido identificada recientemente (Furuse y col., *J. Membr. Biol.*, 87: 141-150 (1985)).

45 Se han identificado seis proteínas en una placa submembranosa citoplasmática por debajo de los contactos de membrana, pero su función aún no se ha establecido (Diamond, ver anteriormente). ZO-1 y ZO-2 existen como un heterodímero (Gumbiner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 3460-3464 (1991)) en un complejo estable en detergentes con una proteína de 130 kD sin caracterizar (ZO-3). La mayoría de los estudios de microscopía inmunoelectrónica han localizado la ZO-1 precisamente debajo de los contactos de membrana (Stevenson y col., *Molec. Cell Biochem.*, 83: 129-145 (1988)). Otras dos proteínas, la cingulina (Citi y col., *Nature* (Londres), 333: 272-275 (1988)) y el antígeno 50 7H6 (Zhong y col., *J. Cell Biol.*, 120: 477-483 (1993)) se localizan más lejos de la membrana y todavía no han sido clonadas. La Rab 13, una proteína de unión de GTP pequeña también ha sido localizada recientemente en la región de oclusión (Zahraoui y col., *J. Cell Biol.*, 124: 101-115 (1994)). Se sabe que otras proteínas pequeñas de unión de GTP regulan el citoesqueleto cortical, es decir, rho regula la unión actina-membrana en los contactos focales (Ridley y col., *Cell*, 70: 389-399 (1992)), y rac regula la alteración de membrana inducida por factor de crecimiento (Ridley y col., *Cell*, 70: 401-410 (1992)). En base a la analogía con las funciones conocidas de las proteínas de placa en zonas mejor 55 60 caracterizadas, los contactos focales (Guan y col., *Nature*, 358: 690-692 (1992)), y las zonas de adherencia (Tsukita y col., *J. Cell Biol.*, 123: 1049-1053 (1993)), se ha propuesto la hipótesis de que las proteínas de placa asociadas a “tj” están involucradas en la transducción de señales en ambas direcciones a lo largo de la membrana celular, y en la regulación de los enlaces con el citoesqueleto de actina cortical.

60 Para abordar los muy diversos retos fisiológicos y patológicos a los que se someten los epitelios, la ZO debe ser capaz de respuestas rápidas y coordinadas que requieren la presencia de un sistema regulador complejo. La caracterización precisa de los mecanismos involucrados en la formación y en la regulación de ZO es actualmente un área de investigación activa.

65 Ahora se tiene una clara evidencia de que existen enlaces tj funcionales y estructurales entre el citoesqueleto de actina y el complejo tj de las células absorbentes (Gumbiner y col., ver anteriormente; Madara y col., ver anteriormente; y Drenchahn y col., *J. Cell Biol.*, 107: 1037-1048 (1988)). El citoesqueleto de actina está compuesto por una estructura

complicada de microfilamentos cuya geometría exacta está regulada por un amplio plantel de proteínas de unión de actina. Un ejemplo de cómo el estado de fosforilación de una proteína de unión de actina puede regular la unión de citoesqueleto con la membrana plasmática celular es el sustrato de quinasa C rico en alanina miristoilada (a partir de aquí "MARCKS", del inglés "myristoylated alanine-rich C kinase substrate"). MARCKS es un sustrato específico de

- 5 proteína quinasa C (a partir de aquí "PKC") que está asociado con la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Aderem, *Elsevier Sci. Pub. (UK)*, páginas 438-443 (1992)). En su forma no fosforilada, el MARCKS se entrecruza con la actina de la membrana. De este modo, es probable que la estructura de actina asociada a la membrana a través del MARCKS sea relativamente rígida (Hartwig y col., *Nature*, 356: 618-622 (1992)). La PKC activada fosforila al MARCKS, que es liberado desde la membrana (Rosen y col., *J. Exp. Med.*, 172: 1211-1215 (1990); y Thelen y col., *Nature*, 351: 320-322 (1991)). Probablemente la actina unida a MARCKS se encuentra separada espacialmente de la membrana y es más plástica. Cuando el MARCKS es desfosforilado, vuelve a la membrana donde se vuelve a entrecruzar de nuevo con actina (Hartwig y col., ver anteriormente; y Thelen y col., ver anteriormente). Estos datos sugieren que la red de F-actina puede reestructurarse mediante un proceso de fosforilación dependiente de PKC que incluye proteínas de unión a actina (siendo el MARCKS una de ellas).

- 15 Se ha demostrado que una serie de mediadores intracelulares alteran la función y/o la estructura tj. Las zonas de oclusión de vesícula biliar de anfibio (Duffey y col., *Nature*, 204: 451-452 (1981)), y de intestino de pez de colores (Bakker y col., *Am. J. Physiol.*, 246: G213-G217) y de platija (Krasney y col., *Fed. Proc.*, 42: 1100 (1983)), muestran una resistencia incrementada al flujo pasivo de iones al aumentar el cAMP intracelular. Asimismo, la exposición de 20 vesícula biliar de anfibio a ionóforo de Ca²⁺ parece aumentar la resistencia de tj, e induce alteraciones en la estructura de tj (Palant y col., *Am. J. Physiol.*, 245: C203-C212 (1983)). Además, la activación de PKC por ésteres de forbol aumenta la permeabilidad paracelular en líneas celulares epiteliales tanto de riñón (Ellis y col., *C. Am. J. Physiol.*, 263 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 32): F293-F300 (1992)) como de intestino (Stenson y col., *C. Am. J. Physiol.*, 265 (*Gastrointest. Liver Physiol.*, 28): G955-G962 (1993)).

25 II. La Barrera Sangre-Cerebro

La barrera sangre-cerebro (BBB, del inglés "blood-brain barrier") es una barrera membranosa extremadamente delgada que es altamente resistente a la difusión libre de soluto, y que separa la sangre y el cerebro. A nivel molecular, 30 el movimiento de fármacos o de solutos a través de esta membrana es prácticamente nulo, a menos que el compuesto tenga acceso a uno de los varios mecanismos de transporte de tipo enzimático especializados que se encuentran en la membrana BBB. La BBB está compuesta de múltiples células más que de una capa única de células epiteliales. De los cuatro tipos diferentes de células que componen la BBB (células endoteliales, pericitos, astrositos y neuronas), el componente celular endotelial de los capilares representa el factor limitante para la permeabilidad de la BBB. El 35 endotelio capilar del cerebro y de la médula espinal de vertebrados está dotado de tj, que cierra los poros interendoteliales que existen normalmente en las barreras endoteliales microvasculares de los tejidos periféricos. En definitiva, el tj endotelial es el responsable de la limitada permeabilidad de la BBB.

40 III. Toxina de Zonula Occludens

La mayoría de los candidatos de vacuna de *Vibrio cholerae* elaborados mediante la eliminación del gen ctxA que codifica la toxina del cólera (CT) son capaces de provocar respuestas elevadas de anticuerpos, pero más de la mitad de las vacunas todavía desarrollan diarreas moderadas (Levine y col., *Infect. Immun.*, 56(1): 161-167 (1988)). Dada la magnitud de la diarrea inducida en ausencia de CT, se propuso la hipótesis de que la *V. cholerae* produce otros factores 45 enterotoxigénicos, que todavía se encuentran presentes en las cepas eliminadas de la secuencia de ctxA (Levine y col., ver anteriormente). Como resultado, se descubrió una segunda toxina, la toxina de zonula occludens (denominada a partir de aquí "ZOT") elaborada mediante *V. cholerae* y que contribuye a la diarrea residual (Fasano y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8: 5242-5246 (1991)). El gen zot se encuentra inmediatamente adyacente a los genes ctx. El elevado porcentaje de coincidencia del gen zot con los genes ctx entre las cepas de *V. cholerae* (Jonson y col., *J. Clin. Microb.*, 31/3: 732-733 (1993); y Karasawa y col., *FEBS Microbiology Letters*, 106: 143-146 (1993)) sugiere un posible papel sinérgico de la ZOT en la generación de la diarrea deshidratante aguda 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 (Resumen) (1994)).

55 Previamente se ha descubierto que, cuando se ensaya sobre mucosa ileal de conejo, la ZOT aumenta la permeabilidad intestinal modulando la estructura del tj intercelular (Fasano y col., ver anteriormente). Se ha descubierto que como consecuencia de la modificación de la ruta paracelular, la mucosa intestinal se vuelve más permeable. También se descubrió que la ZOT no afecta al transporte activo acoplado de Na⁺-glucosa, que no es citotóxica y que no puede eliminar por completo la resistencia transepitelial (Fasano y col., ver anteriormente).

60 Más recientemente, se ha descubierto que la ZOT es capaz de abrir tj de forma reversible en la mucosa intestinal, y por tanto la ZOT, cuando es administrada conjuntamente con un agente terapéutico, es capaz de efectuar la administración intestinal del agente terapéutico, cuando se emplea en una composición de dosis oral para la administración de fármacos intestinales (WO 96/37196; Solicitud de Patente de los EE.UU. con N° de Serie 08/443.864, presentada el 24 de mayo de 1995; y Patente de EE.UU. 5.665.389; y Fasano y col., *J. Clin. Invest.*, 99: 1158-1164 (1997)). También se ha descubierto que la ZOT es capaz de abrir tj de forma reversible en la mucosa nasal, y por tanto la ZOT, cuando es administrada junto con un agente terapéutico, es capaz de potenciar la absorción nasal de un agente terapéutico (Solicitud de Patente de EE.UU. con N° de Serie 08/781.057, presentada el 9 de enero de 1997).

ES 2 267 282 T3

En la Solicitud de Patente de EE.UU. con N° de Serie 08/803.364, presentada el 20 de febrero de 1997, se identifica un receptor de ZOT y es purificado a partir de una línea celular intestinal, esto es, de células CaCo2. Además, en la Solicitud de Patente de EE.UU. con N° de Serie 09/024.198, presentada el 17 de febrero de 1998, se identifican y purifican receptores de ZOT procedentes de tejidos humanos intestinales, del corazón y del cerebro. Los receptores de ZOT representan la primera etapa de la ruta paracelular implicada en la regulación de la permeabilidad intestinal y nasal.

IV. *Zonulina*

En la Solicitud de Patente de EE.UU. pendiente con N° de Serie 098/859.931, presentada el 21 de mayo de 1997, se identifican y purifican proteínas de mamífero que están relacionadas inmunológica y funcionalmente con ZOT, y que funcionan como modulador fisiológico de zonas de oclusión en mamíferos. Estas proteínas de mamífero, denominadas "zonulina", son útiles para potenciar la absorción de agentes terapéuticos a través de tj de la mucosa intestinal o nasal, así como a través de tj de la barrera sangre-cerebro.

En la presente invención, se han identificado por vez primera antagonistas de péptido de zonulina. Dichos antagonistas de péptido se unen a receptor de ZOT, pero sin funcionar como moduladores fisiológicos de la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos. Los antagonistas de péptido inhiben de forma competitiva la unión de ZOT y zonulina con el receptor de ZOT, inhibiendo con ello la capacidad de la ZOT y de la zonulina para modular fisiológicamente la abertura de zonas de oclusión de mamíferos.

Resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención es identificar antagonistas de péptido de zonulina.

Otro objetivo de la presente invención es sintetizar y purificar dichos antagonistas de péptido.

Otro objetivo adicional de la presente invención es usar dichos antagonistas de péptido como agentes antiinflamatorios en el tratamiento de la inflamación gastrointestinal.

Otro objetivo adicional de la presente invención es usar dichos antagonistas de péptidos para inhibir la caída de la barrera sangre-cerebro.

Estos y otros objetivos de la presente invención, que serán evidentes en vista de la descripción detallada de la invención proporcionada a continuación, se han alcanzado, en una realización, mediante un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de ZOT, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de la zonulina purificada a partir de intestino de conejo (■), en comparación con diversos controles negativos (Fracción 2 (◊); Fracción 3 (●); Fracción 4 (▲); y Fracción 5 (□) de una columna de Q-Sepharose), sobre la resistencia del tejido (Rt) de monocapas de células CaCo2.

La Figura 2 muestra el efecto de la zonulina purificada a partir de intestino de conejo (■), en comparación con el control negativo (□), sobre la resistencia del tejido (Rt) de fíleo de conejo montado en cámaras de Ussing.

La Figura 3 muestra el efecto de la zonulina purificada a partir de intestino de conejo (■), en comparación con los controles negativos (zonulina + anticuerpo anti-ZOT (□); zonulina + anticuerpo anti-tau (Δ); y tau (▲)), sobre la resistencia del tejido (Rt) de fíleo de conejo montado en cámaras de Ussing.

Las Figuras 4A y 4B muestran el efecto de la zonulina purificada a partir de cerebro humano (▲), de intestino humano (●) o de corazón humano (○), en comparación con el control negativo (□), sobre la resistencia del tejido (Rt) de yeyuno de mono Rhesus (Figura 4A) y de fíleo de mono Rhesus (Figura 4B) montado en cámaras de Ussing.

Las Figuras 5A y 5B muestran el efecto de la zonulina purificada a partir de corazón humano (▲) o de cerebro humano (□), en comparación con el control negativo (■), sobre la resistencia del tejido (Rt) de yeyuno de conejo (Figura 5A) y de fíleo de conejo (Figura 5B) montado en cámaras de Ussing.

La Figura 6 muestra una comparación de la secuencia N-terminal de la zonulina purificada a partir de conejo y de diversos tejidos humanos.

La Figura 7 muestra una comparación de las secuencias N-terminales de la zonulina purificada a partir de varios tejidos humanos y de la cadena pesada de IgM con la secuencia N-terminal del fragmento biológicamente activo de la ZOT (aminoácidos 288-399).

ES 2 267 282 T3

La Figura 8 muestra el efecto de ZOT, zonulina_i, zonulina_h, tanto solas (barras cerradas) como en combinación con el antagonista de péptido FZI/0 (barras abiertas), o en combinación con FZI/1 (barras sombreadas), en comparación con el control negativo, sobre la resistencia del tejido (Rt) de fleo de conejo montado en cámaras de Ussing. N equivale a 3-5; y * equivale a p<0,01.

5

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha discutido anteriormente, en una realización, los objetivos de la invención antes descritos se han logrado con un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de ZOT, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos.

15

El tamaño del antagonista de péptido es de 8 aminoácidos.

Los antagonistas de péptidos pueden sintetizarse químicamente y purificarse usando técnicas bien conocidas, tales como las descritas en *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation Analysis and Conformation*, Eds. Mant y col., C.R.C. Press (1991), y un sintetizador de péptidos, tal como el Symphony (Protein Technologies, Inc), o usando técnicas recombinantes de ADN, es decir, en las que la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido se inserta en un vector de expresión apropiado, por ejemplo, un vector de expresión de *E. coli* o de levadura, se expresa en la célula hospedante respectiva, y se purifica a partir de ella usando técnicas bien conocidas.

25 Los antagonistas de péptido se pueden usar como agentes antiinflamatorios para el tratamiento de la inflamación gastrointestinal que de lugar a una permeabilidad intestinal aumentada. Por tanto, los antagonistas de péptido de la presente invención son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de condiciones intestinales que pueden provocar que enteropatía por pérdida de proteínas. La enteropatía por pérdida de proteínas puede aparecer como consecuencia de:

30 Infección, por ejemplo infección de *C. difficile*, enterocolitis, shigelosis, gasterenteritis viral, infestación parasitaria, sobrecrecimiento bacteriano, enfermedad de Whipple;

35 Enfermedades con erosión o ulceración mucosal, por ejemplo, gastritis, cáncer gástrico, colitis colagenosa, enfermedad inflamatoria del intestino;

40 Enfermedades marcadas por la obstrucción linfática, por ejemplo, linfangiectasia intestinal congénita, linfoma sarcoidosis, tuberculosis mesentérica, y tras la corrección quirúrgica de enfermedad del corazón congénita con la operación de Fontan;

45 Enfermedades mucosas sin ulceración, por ejemplo, enfermedad de Menetrier, enfermedad celiaca, gasterenteritis eosinofílica; y

Enfermedades inmunes, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico o alergias a las comidas, principalmente a la leche (véase también la Tabla 40-2 de *Pediatric Gastrointestinal Disease Pathophysiology Diagnosis Management*, Eds. Wyllie y col., Saunders Co. (1993), páginas 536-543).

Por tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de la inflamación gastrointestinal que comprende la administración a un sujeto que necesite dicho tratamiento, de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de péptido de zonulina, en el que dicho antagonista consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de ZOT, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos.

Con este fin, los antagonistas de péptido se pueden administrar como composiciones de dosis oral para una administración en el intestino delgado. Dichas composiciones de dosis oral para administración en el intestino delgado son bien conocidas en la técnica, y generalmente comprenden comprimidos o cápsulas gastrorresistentes (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a Ed., Eds. Osol, Mack Publishing Co., Capítulo 89 (1980); Digenis y col., *J. Pharm. Sci.*, 83: 915-921 (1994); Vantini y col., *Clinica Terapéutica*, 145: 445-451 (1993); Yoshitomi y col., *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 1902-1905 (1992); Thoma y col., *Pharmazie*, 46: 331-336 (1991); Morishita y col., *Drug Design and Delivery*, 7: 309-319 (1991); y Lin y col., *Pharmaceutical Res.*, 8: 919-924 (1991)).

65 Los comprimidos se hacen gastrorresistentes mediante la adición de, por ejemplo, acetato ftalato de celulosa o acetato tereftalato de celulosa.

Las cápsulas son formas de dosis sólidas en las que el(los) antagonista(s) de péptido se encierra en un contenedor o cubierta de gelatina, dura o blanda. La gelatina usada en la fabricación de cápsulas se obtiene a partir de material colágeno por hidrólisis. Existen dos tipos de gelatina. El Tipo A, derivado de pieles de cerdo mediante procesado con ácidos, y el Tipo B, obtenida a partir de huesos y pieles de animales mediante procesado alcalino. El uso de cápsulas de gelatina duras permite la posibilidad de prescribir un único antagonista de péptido o una combinación del mismo con el nivel de dosis exacto que se considere como el mejor para el sujeto individual. La cápsula de gelatina dura consiste en dos secciones, una que se desliza sobre la otra, rodeando de este modo por completo al antagonista de péptido. Estas cápsulas se rellenan introduciendo el antagonista de péptido, o gotas gastrorresistentes que contienen el antagonista de péptido, en el extremo más largo de la cápsula, y a continuación se desliza la tapa. Las cápsulas de gelatina dura se hacen principalmente con gelatina, colorantes FD&C, y algunas veces con un agente de opacidad, tal como el dióxido de titanio. EL USP permite que la gelatina destinada a este propósito contenga un 0,15% (p/v) de dióxido de azufre para evitar la descomposición durante la fabricación.

En el contexto de la presente invención, las composiciones de dosis oral para la administración al intestino delgado también incluyen composiciones líquidas que contienen agentes de tamponamiento acuosos que evitan que el antagonista de péptido sea desactivado de forma significativa por los fluidos gástricos del estómago, permitiendo con ello que el antagonista de péptido alcance el intestino delgado en forma activa. Los ejemplos de dichos agentes de tamponamiento acuosos que se pueden emplear en la presente invención incluyen el tampón de bicarbonato (pH 5,5 a 8,7, preferiblemente pH de aproximadamente 7,4).

Cuando la composición de dosis oral es una composición líquida, es preferible que la composición sea preparada justo antes de la administración para minimizar los problemas de estabilidad. En dicho caso, la composición líquida se puede preparar disolviendo el antagonista de péptido liofilizado en el agente de tamponamiento acuoso.

Los antagonistas de péptido se pueden usar para inhibir la interrupción de la barrera sangre-cerebro. De este modo, los antagonistas de péptido de la presente invención son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de condiciones asociadas a la interrupción de la barrera sangre-cerebro. Los ejemplos de dichas condiciones incluyen heridas osmóticas, por ejemplo, isquemia cerebral, ataque de apoplejía o edema cerebral; hipertensión; dióxido de carbono; ataque convulsivo; toxinas químicas; uremia (insuficiencia renal); meningitis, encefalitis, encefalomielitis, por ejemplo, infecciosas vírica (VSR, VIH, etc.), o bacteriana (TB, *H. influenzae*, *meningococcus*, etc.) o alérgica; tumores; lesiones traumáticas del cerebro; lesiones del cerebro por radiación; inmadurez y kernicterus; enfermedades desmielinizantes, por ejemplo, esclerosis múltiple o síndrome de Guillain-Barre.

Con este fin, los antagonistas de péptido se pueden administrar como composiciones de dosis intravenosa para la administración al cerebro. Dichas composiciones son bien conocidas en la técnica, y las composiciones generalmente comprenden un diluente fisiológico, por ejemplo, agua destilada, o NaCl al 0,9% (p/v).

La cantidad farmacéuticamente eficaz de antagonista de péptido empleada no es crítica en la presente invención, y variará dependiendo de la enfermedad o afección que se esté tratando, así como de la edad, peso y sexo del sujeto que se esté tratando. Generalmente, la cantidad de antagonista de péptido empleada en la presente invención para inhibir la inflamación gastrointestinal o para inhibir la interrupción de la barrera sangre-cerebro, por ejemplo, para inhibir la actividad biológica de la zonulina, se encuentra en el intervalo aproximado de $7,5 \times 10^{-6}$ M a $7,5 \times 10^{-3}$ M, preferiblemente en el intervalo aproximado de $7,5 \times 10^{-6}$ M a $7,5 \times 10^{-4}$ M. Para alcanzar dicha concentración final en, por ejemplo, los intestinos o la sangre, la cantidad de antagonista de péptido en una composición de dosis oral sencilla de la presente invención normalmente será de aproximadamente 1,0 µg a 1000 µg, preferiblemente de aproximadamente 1,0 µg a 100 µg.

Los antagonistas de péptido también se pueden usar como inmunógeno para obtener anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, que presenten especificidad de unión por la zonulina, usando procedimientos bien conocidas en la técnica (Abrams, *Methods Enzymol.*, 121: 107-119 (1986)). Estos anticuerpos se pueden usar a su vez para determinar zonulina en tejidos o fluidos corporales, o para purificar por afinidad zonulina, o alternativamente, para ligar zonulina e inhibir así la actividad de la zonulina, por ejemplo, para inhibir la inflamación gastrointestinal o para inhibir la interrupción de la barrera sangre-cerebro.

Los siguientes ejemplos se presentan únicamente con fines ilustrativos, y en modo alguno pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

60 Purificación de ZOT

Se concentraron 5000 mL de la fracción sobrenadante obtenida tras cultivar la cepa CVD110 de *V. cholerae* (Michalski y col., *Infect. Immun.*, G1: 4462-4468 (1993)), que había sido transformada con plásmido pZ14, en un factor de mil usando un filtro de flujo laminar con un corte de PM de 10 kDa. La construcción de pZ14, que contiene el gen *zot* de *Vibrio cholerae*, se describe en detalle en el documento WO 96/37196, entre otros. A continuación, el sobrenadante resultante fue sometido a SDS-PAGE al 8,0% (p/v). Se detectaron bandas correspondientes a proteínas mediante tinción con azul Coomassie del gel SDS-PAGE. No se detectó ninguna banda de proteína correspondiente a ZOT cuando se comparó con el sobrenadante de control procedente de la cepa CVD110 transformada con el plásmido

ES 2 267 282 T3

pTTQ181 (Amersham, Arlington Heights, IL), y tratada del mismo modo. Por tanto, incluso aunque se colocó el gen *zot* detrás del fuerte y altamente inducible promotor *tac* en el pZ14, el nivel de la proteína en el sobrenadante pZ14 concentrado mil veces seguía sin ser detectable mediante gel SDS-PAGE teñido con Coomassie.

5 A. MBP-ZOT

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

10 El vector de MBP pMAL-c2 (Biolab) se usó para expresar y purificar ZOT mediante la fusión del gen *zot* con el gen *maIE* de la *E. coli*. Este constructo usa el promotor fuerte e inducible *tac*, y las señales de inicio de la traducción de *maIE* para proporcionar un alto nivel de expresión del gen *zot* clonado. El vector pMAL-c2 presenta una eliminación exacta de la secuencia de señal de *maIE*, que conduce a la expresión citoplasmática de la proteína de fusión. Se usó purificación de cromatografía de afinidad para el MBP para facilitar el aislamiento de la proteína de fusión (Biolab).

15 Más específicamente, el vector pMAL-c2 fue linealizado con *EcoRI* (que corta en el extremo 3' del gen *maIE*), rellenado con fragmento Klenow, y digerido con *XbaI* (que presenta una posición única en el poliligando pMAL-c2). El ORF (marco de lectura abierto, del inglés “Open Reading Frame”) que codifica la ZOT fue subclonado a partir del plásmido pBB241 (Baudry y col., *Infect. Immun.*, 60: 428-434 (1992)). El plásmido pBB241 fue digerido con *BssHII*, rellenado con fragmento Klenow y digerido con *XbaI*. A continuación, el fragmento tratado con *XbaI* fue subclonado en pMAL-c2 para proporcionar el plásmido pLC10-c. Puesto que el injerto y el vector poseen ambos extremos romos y pegajosos, la orientación correcta se obtuvo con el extremo 3' de *maIE* fusionado con el extremo 5' del injerto. A continuación se sometió a electroforesis el pLC10-c en la cepa DH5 α de *E. coli*. En el pBB241, la posición de restricción *BssHII* se encuentra dentro del ORF *zot*. De este modo, los aminoácidos 1 a 8 de la ZOT desaparecen en la 20 proteína de fusión MBP-ZOT.

25 Con el fin de purificar la proteína de fusión MBP-ZOT, se inocularon 10 mL de cultivo de Luria Bertani que contenían un 0,2% (p/v) de glucosa y 100 μ g/mL de ampicilina con una única colonia que contenía pLC10-c, y fueron incubados toda la noche a 37°C con agitación moderada. El cultivo fue diluido 1:100 en 1,0 mL del mismo medio fresco, y fue cultivado a 37°C con agitación, hasta alcanzar aproximadamente 1,0 x 10⁸ células/mL. A continuación se añadió IPTG 0,2 mM para inducir la expresión de MBP-ZOT, y el cultivo fue incubado a 37°C durante otras 3 h. A continuación se fabricaron partículas con las bacterias y fueron resuspendidas en 20 mL de “tampón de columna” enfriado en hielo que comprende Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,2 M, EDTA 1,0 mM, 2-ME 10 mM y NaN₃ 1,0 mM. La suspensión bacteriana fue sometida a lisis mediante tratamiento en prensa francesa y fue centrifugada durante 30 minutos a 13.000 x g a 4°C. Se recogió el sobrenadante, fue diluido 1:5 con tampón de columna y fue cargado en una columna 1 x 10 de resina de amilasa (Biolabs, sistema de purificación de fusión de MBP), equilibrada previamente con tampón de columna. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de tampón de columna, la proteína de fusión MBP-ZOT fue eluida cargando 10 mL de maltosa 10 mM en el tampón de columna. El rendimiento típico para 1,0 mL de cultivo fue de 2-3 mg de proteína.

30 40 A continuación, se separó el compañero de fusión de MBP en la proteína de fusión MBP-ZOT purificada usando 1,0 μ g de Factor Xa proteasa (Biolabs) por cada 20 μ g de MBP-ZOT. La Factor Xa proteasa actúa justo antes del extremo amino de la ZOT. La proteína ZOT obtenida de este modo se llevó a un gel SDS-PAGE al 8,0% (p/v), y fue electroeluida del gel usando una cámara de electroseparación (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

45 45 Cuando se probó en cámaras de Ussing, la ZOT purificada resultante indujo una disminución dependiente de la dosis, con una DE₅₀ de 7,5 x 10⁻⁸ M.

B. 6xHis-ZOT

50 El gen *zot* fue amplificado mediante PCR con polimerasa Deep Vent (New England Biolabs), usando como molde ADN de plásmido pBB241 (Baudry y col., ver anteriormente). Los primeros directo e inverso usados fueron: 5'-CGGGATCCCGTATGAGTATCTT-3' (SEQ ID NO: 39); y 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (SEQ ID NO: 40), respectivamente. Las colas 5' de estos oligonucleótidos contienen una posición de restricción *BamHI* e 55 *HindIII*, respectivamente. El amplicón resultante (de 1,2 kb) fue analizado mediante electroforesis de gel de azarosa al 8,0% (p/v), y fue purificado a partir de sales y nucleótidos libres usando una columna Xtreme spin (Pierce). Las dos anteriores enzimas de restricción se usaron a continuación para digerir el amplicón purificado, y el amplicón digerido resultante fue insertado a continuación en el vector pQE30 (Qiagen), que había sido digerido previamente con *BamHI* y con *Hindi*, para obtener el plásmido pSU113. El pQE30 es un vector de expresión que proporciona 60 un nivel elevado de expresión de una proteína recombinante con una marca de 6 poli-histidina (6xHis). Por tanto, el producto de expresión del plásmido pSU113 es una proteína de fusión 6xHis-ZOT. A continuación, el pSU113 fue transformado en DH5 α de *E. coli*.

65 Con el fin de purificar la proteína de fusión 6xHis-ZOT, la *E. coli* resultante fue cultivada toda la noche a 37°C en 150 mL de caldo Luria Bertani que contenía un 2,0% (p/v) de glucosa, 25 μ g/mL de canamicina y 200 μ g/mL de ampicilina hasta que la A₆₀₀ fue aproximadamente de 1,10. A continuación, se añadieron 75 mL de los cultivos de una noche a 1000 mL de caldo Luria Bertani que contenía un 2,0% (p/v) de glucosa, 25 μ g/mL de canamicina y 200 μ g/mL de ampicilina, se incubó durante aproximadamente 3 horas a 37°C, con agitación vigorosa, hasta que el A₆₀₀

ES 2 267 282 T3

fue de aproximadamente 0,7-0,9. Entonces se añadió IPTG hasta una concentración final de 2,0 mM, y se dejó que el crecimiento continuara durante 5 horas a 37°C. A continuación, se cosecharon las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 20 minutos, las células fueron resuspendidas en 5,0 mL/g de peso húmedo de tampón A que comprende GuHCl 6,0 M, fosfato sódico 0,1 M y Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0), y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente.

5 A continuación se centrifugó la mezcla a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C, y al sobrenadante resultante se le añadieron 4,0-5,0 mL/g de peso húmedo de una mezcla al 50% de resina SUPERFLOW (QIAGEN), y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La resina resultante fue cargada en una columna 1,6 x 8,0, que a continuación fue lavada secuencialmente con tampón A, con tampón B que comprende urea 8,0 M, fosfato sódico 0,1 M y Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0) y tampón C que comprende urea 8,0 M, fosfato sódico 0,1 M y Tris-HCl 0,01 M (pH 6,3). Cada 10 lavado se llevó a cabo hasta que la A_{600} del flujo fue inferior a 0,01. La proteína de fusión 6xHis-ZOT fue eluida en una columna usando 20 mL de tampón C que contenía imidazol 250 mM. A continuación, las fracciones que contenían la proteína de fusión 6xHis-ZOT fueron comprobadas mediante SDS-PAGE usando el procedimiento descrito por Davis, 15 *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 404 (1964), y el gel fue teñido con azul Comassie. Las fracciones que contenían la proteína de fusión 6xHis-ZOT fueron dializadas frente a urea 8,0 M, fueron combinadas y a continuación fueron diluidas 100 veces en PBS. A continuación, se añadieron 4,0 mL de una mezcla al 50% de resina SUPERFLOW, se agitó durante 2 20 h a temperatura ambiente y la resina resultante fue cargada en una columna 1,6 x 8,0, que a continuación fue lavada con 50 mL de PBS. La proteína de fusión 6xHis-ZOT fue eluida de la columna con 10 mL de PBS que contenían imidazol 250 mM. El eluente resultante fue dializado frente a PBS, y la proteína de fusión 6xHis-ZOT fue comprobada mediante SDS-PAGE, tal como se ha descrito anteriormente.

20 Ejemplo 2

Producción de Anticuerpos Anti-ZOT Purificados por Afinidad

25 Para obtener un antisero específico, se expresó y purificó una proteína (GST)-ZOT S-transferasa glutationa químérica.

Más específicamente, se usaron primeros de oligonucleótidos para amplificar el ORF zot mediante reacción en 30 cadena de polimerasa (PCR) usando el plásmido pBB241 (Baudry y col., ver anteriormente) como molde de ADN. El primero directo (TCATCACGGC GCGCCAGG, SEQ ID NO: 25) correspondió a los nucleótidos 15-32 del ORF zot, y el primero inverso (GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT, SEQ ID NO: 26) correspondió al extremo 5' del ORF ctxA. Por lo tanto, los aminoácidos 1-5 de ZOT desaparecieron en la proteína de fusión. El producto de amplificación fue insertado en el polilíngido (posición *Sma*I) localizado en el extremo del gen GST en pGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI). El pGEX-2T es un vector de expresión de proteína de fusión que expresa un gen clonado como 45 proteína de fusión con GST de *Schistosoma japonicum*. El gen de fusión está bajo el control del promotor tac. Mediante inducción con IPTG se produce la depresión y la proteína de fusión GST es expresada.

El plásmido recombinante resultante, denominado pLC11, fue sometido a electroforesis en DH5 α *E. coli*. Con el fin de purificar la proteína de fusión GST-ZOT, se inocularon 10 mL de caldo Luria Bertani que contenían 100 μ g/mL 40 de ampicilina con una única colonia que contenía pLC11, y fueron incubadas toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo fue diluido 1:100 en 1,0 mL del mismo medio fresco y fue cultivado a 37°C con agitación, hasta aproximadamente 1,0 x 10⁸ células/mL. A continuación se añadió IPTG 0,2 mM para inducir la expresión GST-ZOT, y el cultivo fue incubado a 37°C durante otras 3 h. A continuación las bacterias fueron transformadas en partículas, resuspendidas en 20 mL de PBS enfriado en hielo (pH 7,4), y fueron sometidas a lisis mediante el método de prensa francesa. La 45 proteína de fusión GST-ZOT no era soluble en estas condiciones, ya que sedimentó con la fracción de partículas de bacterias. Por tanto, la partícula fue resuspendida en tampón de lisis Laemli que comprende Tris-HCl 0,00625 M (pH 6,8), 2-ME 0,2 M, SDS al 2,0% (p/v), azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v), y fue sometida a electroforesis en un gel PAGE-SDS al 8,0% (p/v) y teñida con azul brillante de Coomassie. Se electroeluyó del gel una banda a aproximadamente 70 kDa (26 kDa de GST + 44 kDa de ZOT), correspondiente a la proteína de fusión, 50 usando una cámara de electroseparación (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

Se inyectaron 10 μ g de la proteína resultante eluida (10-20 μ g) en un conejo, mezclados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Se administraron de dosis de activación con adyuvante incompleto de Freund cuatro y ocho semanas después. Un mes después del conejo fue desangrado.

55 Para determinar la producción de anticuerpos específicos, se transfirieron 10⁻¹⁰ M de ZOT, junto con las dos proteínas de fusión MBP-ZOT y GST-ZOT, a una membrana de nylon y fueron incubados con una dilución 1:5000 del antisero de conejo a lo largo de la noche a 4°C con una agitación moderada. A continuación se lavó el filtro 15 minutos 4 veces con PBS que contenía un 0,05% (v/v) de Tween 20 (a partir de aquí "PBS-T"), y fue incubado con una 60 dilución 1:30.000 de IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 2 h a temperatura ambiente. El filtro fue lavado de nuevo durante 15 minutos 4 veces con PBS que contenía un 0,1% (v/v) de Tween, y se detectaron bandas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

Con la inmunoafinidad se descubrió que el antisero de conejo reconocía ZOT, así como las proteínas de fusión MBP-ZOT y GST-ZOT, pero no el control negativo MBP.

Además, para confirmar la producción de los anticuerpos apropiados anti-ZOT, se llevaron a cabo experimentos de neutralización en cámaras de Ussing. Al ser pre-incubados con sobrenadante pZ14 a 37°C durante 60 minutos, el

ES 2 267 282 T3

antisuero específico de ZOT (dilución 1:100), fue capaz de neutralizar por completo la disminución en Rt inducida por ZOT sobre el íleo de conejo montado en cámaras de Ussing.

- A continuación, los anticuerpos anti-ZOT fueron purificados por afinidad usando una columna de afinidad de MBP-ZOT. Más específicamente, se preparó una columna de afinidad de MBP-ZOT inmovilizando, a lo largo de la noche a temperatura ambiente, 1,0 mg de MBP-ZOT purificado, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior, en un gel pre-activado (Aminolink, Pierce). La columna fue lavada con PBS, y a continuación fue cargada con 2,0 mL de antisuero de conejo anti-ZOT. Tras una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, la columna fue lavada con 14 mL de PBS, y los anticuerpos anti-ZOT específicos fueron eluidos de la columna con 4,0 mL de una disolución que comprende glicina 50 mM (pH 2,5), NaCl 150 mM y Triton X-100 0,1% (v/v). El pH de las fracciones de 1,0 mL eluidas fue neutralizado inmediatamente con NaOH 1,0 N.

Ejemplo 3

15 *Purificación de Zonulina*

En base a la observación de la Solicitud de Patente de EE.UU. con Nº de Serie 08/803.364, presentada el 20 de febrero de 1997, de que la ZOT interacciona con un receptor superficial epitelial específico, con la posterior activación de una cascada intracelular compleja de eventos que regulan la permeabilidad de tj, se ha postulado en la presente invención que la ZOT puede emular el efecto de un modulador fisiológico de tj de mamífero. Se ha postulado en la Solicitud de Patente de EE.UU. con Nº de Serie 08/859.931, presentada el 21 de mayo de 1997, que la ZOT, y su análogo fisiológico (la zonulina), estarían funcional e inmunológicamente relacionadas. Por tanto, tal como se ha descrito en el presente documento, se usaron los anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad y el ensayo de cámara de Ussing en combinación para buscar zonulina en diversos tejidos de conejo y de humano.

25 A. *Tejidos de Conejo*

Inicialmente, se purificó zonulina a partir de intestino de conejo. El tejido fue interrumpido mediante homogeneización en PBS. Las preparaciones celulares resultantes fueron centrifugadas a 40.000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue recogido y liofilizado. El producto liofilizado resultante fue reconstituido posteriormente en PBS (10:1 (v/v)), filtrado a través de un filtro de membrana de 0,45 mm, cargado en una columna cromatográfica Sephadex G-50 y eluido con PBS. A continuación, se sometieron fracciones de 2,0 mL obtenidas de la columna a una inmuno-25 tinción Western estándar usando los anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad obtenidos tal como se describe en el Ejemplo 2 anterior.

35 Las fracciones positivas, es decir, aquellas a las que se unieron los anticuerpos anti-ZOT, fueron combinadas, liofilizadas, reconstituidas en PBS (1:1 (v/v)) y sometidas a cromatografía de gradiente salino a través de una columna Q-Sepharose. El gradiente salino fue NaCl al 0-100% (p/v) en tampón Tris 50 mM (pH 8,0). Se recogieron fracciones de 20 mL, que fueron sometidas a inmuno-35 tinción Western usando los anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior. La fracción 1 (NaCl al 20% (p/v)) fue la única fracción que dio positivo en el ensayo de inmuno-35 tinción de Western.

Las fracciones obtenidas en la columna Q-Sepharose fueron evaluadas a continuación para determinar los efectos de resistencia del tejido sobre ambas monocapas de CaCo2, y sobre intestino delgado de conejo en cámaras de Ussing.

45 Más específicamente, las células CaCo2 fueron cultivadas en matraces de cultivo celular (Falcon) en una atmósfera humidificada de 95% O₂ / 5% CO₂ a 37°C en medio Eagle's modificado de Dulbecco que contenía un 10% (v/v) de suero fetal de ternero, 40 µg/L de penicilina y 90 µg/L de estreptomicina. Las células fueron subcultivadas con una relación superficial de 1 a 5 tras tratamiento con tripsina cada 5 días, cuando habían alcanzado una confluencia del 70-80%. El número de pasaje de las células usadas en este estudio varió entre 15 y 30.

55 Las monocapas de CaCo2 fueron cultivadas para confluir (12-14 días después de ser colocadas en placa con una relación superficial de 1:2,5) sobre filtros de policarbonato tratados con cultivo de tejido unidos firmemente a un anillo de poliestireno (de 6,4 mm de diámetro, Transwell Costar). Los filtros fueron colocados en un injerto ajustado fuertemente que separaba los compartimientos serosal y mucosal de una cámara de Ussing modificada, y los experimentos fueron llevados a cabo tal como se describe en Fasano y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8: 5242-5246 (1991), para intestinos de conejo en cámaras de Ussing. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Tal como se muestra en la Figura 1, la fracción que contiene zonulina indujo una reducción significativa de la resistencia de las monocapas de CaCo2 en comparación con las fracciones negativas en zonulina.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de cámara de Ussing usando íleo procedente de conejos blancos de Nueva Zelanda adultos macho de 2-3 kg, que fueron sacrificados por dislocación cervical. Se retiró un segmento de 20 cm de íleo, se lavó el contenido intestinal, se abrió a lo largo del límite mesentérico y se eliminaron las capas muscular y serosal. A continuación se montaron ocho láminas de mucosa preparadas de este modo en cámaras de Ussing de lucite (con una abertura de 1,12 cm²), conectadas a un aparato de pinzas de voltaje (EVC 4000 WPI, Saratosa, FL), y se bañaron con disolución de Ringer recién preparada que comprendía NaCl 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 disolución de baño se

mantuvo a 37°C con reservorios con camisas de agua conectados a una bomba de circulación de temperatura constante y se pasó una corriente gaseosa con un 95% de O₂ y un 5% de CO₂.

Se añadieron 100 µL de zonulina purificada a partir de intestino de conejo al lado mucosal. Se midió la diferencia de potencial (DP) cada 10 minutos, y se calculó la corriente de cortocircuito (Isc) y la resistencia del tejido (Rt) tal como se describe en Fasano y col., ver anteriormente. Debido a la variabilidad del tejido, los datos se calcularon como ΔRt (Rt a tiempo x) - (Rt a tiempo 0). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Tal como se muestra en la Figura 2, la fracción que contenía zonulina indujo una significativa reducción en la resistencia del intestino delgado de conejo, en comparación con una fracción negativa en zonulina. Este efecto fue completamente reversible una vez que se retiró la zonulina del reservorio.

La fracción positiva en zonulina también fue sometida a SDS-PAGE al 8,0% (p/v), seguido de inmunotinción Western usando anticuerpos anti-ZOT. Las bandas de proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a continuación a un filtro PVDF (Millipore) usando tampón CAPS que comprendía 100 mL de 10x (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico), 100 mL de metanol, 800 mL de agua destilada. La proteína que se alineó con una única banda que fue detectada mediante inmunotinción Western presentó un peso molecular aparente de aproximadamente 47 kDa. Esta banda fue cortada del filtro PVDF y sometida a secuenciamiento N-terminal tal como se describe en Hunkapiller en *Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, Capítulos 11-12, Humana Press, páginas 315-334 (1985), usando un aparato Modelo 494 de Perkin-Elmer Applied Biosystems. La secuencia N-terminal de zonulina purificada a partir de intestino de conejo se muestra en la SEQ ID NO: 27.

La secuencia N-terminal de zonulina de conejo se comparó con otras secuencias de proteínas mediante análisis de búsqueda BLAST. El resultado de este análisis reveló que la secuencia N-terminal de la zonulina de conejo es idéntica al 85%, y similar al 100%, a la secuencia N-terminal de proteína tau de *Homo sapiens*.

Como resultado, para determinar si la zonulina de conejo y la tau son el mismo resto, se llevaron a cabo experimentos de neutralización cruzada en cámaras de Ussing. Más específicamente, se añadieron 10 µL/mL de zonulina de conejo al lado mucosal del íleo de conejo sin tratar o pre-incubado durante 60 minutos a 37°C con anticuerpos anti-tau (dilución 1:10) (Sigma). Los 10 µL/mL de zonulina de conejo pre-incubados con anticuerpos anti-ZOT (dilución 1:10) (Ejemplo 2); y los 0,4 µg/mL de tau purificada (Sigma), fueron usados como controles. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Tal como se muestra en la Figura 3, la zonulina de conejo indujo la típica disminución de la resistencia del tejido fácilmente reversible una vez que la proteína es retirada de las cámaras de Ussing. Esta actividad fue neutralizada completamente mediante el pre-tratamiento con anticuerpos anti-ZOT, pero no mediante el pre-tratamiento con anticuerpos anti-tau. Por otro lado, no se produjo ningún efecto significativo sobre la resistencia del tejido en los tejidos expuestos a la proteína tau.

También se detectó zonulina de conejo en otros tejidos de conejo, es decir, corazón, cerebro, músculo, estómago, bazo, pulmón, riñón de conejo, así como en varias porciones de intestinos de conejo, es decir, yeyuno distal, yeyuno próximo, íleo, ciego y colon. Es decir, cuando estos tejidos de conejo fueron procesados del mismo modo que el intestino de conejo, discutido anteriormente, y sometidos a SDS-PAGE al 8,0% (p/v), seguido de inmunotinción Western usando anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior, se detecta una única banda de aproximadamente 47 kDa de tamaño en todos los tejidos evaluados.

B. Tejidos Humanos

También se purificó zonulina a partir de varios tejidos humanos, incluyendo intestino, corazón y cerebro. Se usaron tejidos tanto fetales como de adulto. Los tejidos fueron interrumpidos mediante homogeneización en PBS. Las preparaciones celulares resultantes fueron centrifugadas a 40.000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue recogido y liofilizado. El producto liofilizado resultante fue reconstituido posteriormente en PBS (10:1 (v/v)), filtrado a través de un filtro de membrana de 0,45 mm, cargado en una columna cromatográfica Sephadex G-50, y eluido con PBS. A continuación, se sometieron a inmunotinción Western estándar fracciones de 2,0 mL obtenidas de la columna usando anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad obtenidos como se describe en el Ejemplo 2 anterior.

Las fracciones positivas, es decir, aquellas que a las que se unieron los anticuerpos anti-ZOT, fueron combinadas, liofilizadas, reconstituidas en PBS (1:1 (v/v)), y sometidas a cromatografía de gradiente salino a través de una columna Q-Sepharose. El gradiente salino fue de NaCl 0-100% (p/v) en tampón Tris 50 mM (pH 7,4). Se recogieron cinco fracciones de 20 mL, que fueron sometidas a inmunotinción estándar Western usando los anticuerpos anti-ZOT purificados por afinidad obtenidos tal como se describe en el Ejemplo 2 anterior. La Fracción 1 (NaCl al 20% (p/v)) mostró una única banda de 47 kDa de tamaño en el ensayo de inmunotinción Western. La Fracción 2 (NaCl al 40% (p/v)) mostró dos bandas adicionales de 35 kDa y de 15 kDa de tamaño en el ensayo de inmunotinción Western. La Fracción 3 (NaCl al 60% (p/v)) y la Fracción 4 (NaCl al 80% (p/v)) mostraron las bandas de 35 kDa y de 15 kDa. Estos resultados sugieren que la zonulina puede estar sometida a degradación por acción de proteasas, probablemente presentes en los tejidos humados usados, y que los productos de degradación eluyen de la columna a mayores concentraciones salinas que la holoproteína.

ES 2 267 282 T3

La Fracción 1 (procedente de tejidos de corazón, intestino y cerebro humanos) y la Fracción 4 (procedente de tejido de corazón) obtenidas en la columna Q-Sepharose fueron evaluadas a continuación para determinar sus efectos de resistencia de tejido sobre intestino de conejo y sobre intestino de mono Rhesus en cámaras de Ussing.

5 Los ensayos de cámara de Ussing se llevaron a cabo usando diferentes tractos intestinales, incluyendo yeyuno, íleo o colon de conejos blancos de Nueva Zelanda machos adultos de 2-3 kg, o de monos Rhesus machos adultos de 5-6 kg. Después de que los animales fueran sacrificados se extrajeron diferentes segmentos de intestino, incluyendo yeyuno, íleo y colon, fueron lavados de contenidos intestinales y abiertos a lo largo del límite mesentérico, y fueron desprovistos de las capas muscular y serosal. Ocho láminas de mucosa preparadas de este modo (tres de yeyuno, tres de íleo y dos de colon) fueron montadas a continuación en cámaras de Ussing de lucite (con una abertura de 1,12 cm²), fueron conectadas a un aparato de pinzas de voltaje (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL), y fueron bañadas en disolución de Ringer recién preparada que comprendía NaCl 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 disolución de baño se mantuvo a 37°C con reservorios con camisas de agua conectados a una bomba de circulación a temperatura constante, y con un gas al 95% en O₂ y al 15 5% en CO₂.

20 Al lado mucosal se añadieron 100 µL de Fracción 1 de zonulina purificada a partir de corazón humano o de Fracción 1 de zonulina purificada a partir de cerebro humano, o de Fracción 1 de zonulina purificada a partir de intestino humano, o de Fracción 4 purificada a partir de corazón humano. La diferencia de potencial (DP) se midió cada 10 minutos, y la corriente de cortocircuito (Isc) y la resistencia de tejido (Rt) fueron calculadas tal como se describe en Fasano y col., ver anteriormente. Los datos fueron calculados como Rt para las Figuras 4A y 4B; pero debido a la variabilidad de tejido, para las Figuras 5A y 5B los datos fueron calculados como ΔRt (Rt a tiempo x) - (Rt a tiempo 0). Los resultados se muestran en las Figuras 4A y 4B (intestino de mono) y en las Figuras 5A y 5B (intestino de conejo).

25 Tal como se muestra en las Figuras 4A y 4B, la zonulina purificada a partir de corazón y de intestino humanos (Fracción 1) indujo una reducción significativa en la resistencia intestinal en el mono (tanto en yeyuno (Figura 4A) como en íleo (Figura 4B)), en comparación con el control negativo de PBS. No se observaron cambios significativos cuando se evaluó la zonulina purificada a partir de corazón humano o de intestino humano en el colon. Las Figuras 4A y 4B también muestran que no se observó ningún efecto significativo en el yeyuno de mono (Figura 4A) y en el íleo de mono (Figura 4B) cuando se evaluó la zonulina purificada a partir de cerebro humano (Fracción 1). La Fracción 4 de zonulina purificada a partir de corazón humano también indujo una disminución significativa en la resistencia del tejido de intestino delgado de mono.

35 Tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B, se obtuvieron resultados similares cuando se usó intestino de conejo. Es decir, la zonulina purificada a partir de corazón humano (Fracción 1) mostró un efecto significativo sobre la resistencia del tejido en el yeyuno de conejo (Figura 5A) y en el íleo de conejo (Figura 5B), pero no en el colon. Las Figuras 5A y 5B también muestran que no se observa ningún efecto significativo en el yeyuno de conejo (Figura 5A) y en íleo de conejo (Figura 5B) cuando se evaluó la zonulina purificada a partir de cerebro humano (Fracción 1).

40 Para establecer si la zonulina incrementa la administración oral de la insulina, se llevaron a cabo experimentos modelo *in vitro* usando intestino de conejo. En resumen, se sacrificaron conejos blancos de Nueva Zelanda machos adultos (2-3 kg) mediante dislocación cervical. Se extrajeron segmentos de intestino delgado de conejo (yeyuno o íleo), se lavaron los contenidos intestinales, se abrieron a lo largo del límite mesentérico y se extirparon las capas muscular y serosal. A continuación se montaron ocho láminas de mucosa preparadas de este modo en cámaras de Ussing de lucite (con una abertura de 1,12 cm²), fueron conectadas a un aparato de pinza de voltaje (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL), y bañadas en tampón recién preparado que contenía NaCl 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. Se mantuvo la disolución de baño a 37°C con reservorios con camisas de agua conectados a una bomba de circulación de temperatura constante, y con un gas del 95% en O₂ y del 5% en CO₂. Se midió la diferencia de potencial (DP), y se calcularon la corriente de cortocircuito (Isc) y la resistencia del tejido (Rt). Una vez que los tejidos alcanzaron una condición de estado estacionario, se expusieron luminalmente tejidos emparejados, acoplados en base a su resistencia, a ¹²⁵I-insulina 10⁻¹¹ M (Amersham, Arlington Heights, IL; 2,0 µCi = 10⁻¹² M), solos o en presencia de 100 µL de zonulina de corazón de la Fracción 1. Inmediatamente se obtuvieron alícuotas de 1,0 mL del lado serosal y de 50 µL del lado mucosal para establecer los valores de línea base. A continuación se tomaron muestras del lado serosal a intervalos de 20 minutos durante los siguientes 100 minutos.

55 Se descubrió que la zonulina de corazón incrementaba la absorción intestinal de insulina tanto en el yeyuno (0,058 ± 0,003 fmol/cm²·min frente a 0,12 ± 0,005 fmol/cm²·min, tejidos no tratados frente a tratados con zonulina, respectivamente, p = 0,001) como en el íleo (0,006 ± 0,0002 fmol/cm²·min frente a 0,018 ± 0,005 fmol/cm²·min, tejidos no tratados frente a tratados con zonulina, respectivamente, p = 0,05) de un modo dependiente del tiempo.

60 La Fracción 1 de zonulina purificada a partir de corazón humano, la Fracción 1 de zonulina purificada a partir de intestino humano y la Fracción 1 de zonulina purificada a partir de cerebro humano también fueron sometidas a SDS-PAGE al 8,0% (p/v), seguido de inmunotinción Western usando los anticuerpos anti-ZOT obtenidos tal como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Las bandas de proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a continuación a filtros PVDF usando tampón CAPS que comprende 100 mL de 10x (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico), 100 mL de metanol, 800 mL de agua destilada. La proteína que se alineó con una única banda que

ES 2 267 282 T3

se detectó mediante inmunotinción Western presentó un peso molecular aparente de aproximadamente 47 kDa. Esta banda fue cortada del filtro PVDF, y fue sometida a secuenciamiento N-terminal tal como se describe en Hunkapiller en *Methods of Protein Microcharacterization*, Ed. Shibley, Capítulos 11-12, Humana Press, páginas 315-334 (1985), usando un Aparato Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 494. La secuencia N-terminal de la zonulina purificada

- 5 a partir de corazón humano adulto se muestra en la SEQ ID NO: 28, la secuencia N-terminal de la zonulina purificada a partir de cerebro humano adulto se muestra en la SEQ ID NO: 29, y la secuencia N-terminal de zonulina purificada a partir de cerebro fetal adulto se muestra en la SEQ ID NO: 36.

Los primeros nueve aminoácidos de la secuencia N-terminal de la zonulina purificada a partir de intestino humano
10 (SEQ ID NO: 31) también fueron secuenciados, y se descubrió que eran idénticos a los primeros nueve aminoácidos de la zonulina purificada a partir de corazón humano mostrada en la SEQ ID NO: 28 (véase la Figura 6). Los primeros veinte aminoácidos de la secuencia N-terminal de zonulina purificada a partir de intestino fetal humano también fueron
15 secuenciados: Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO: 30), y se descubrió que eran casi idénticos a la secuencia de aminoácidos de la zonulina purificada a partir de corazón humano mostrada en la SEQ ID NO: 28 (véase la Figura 6).

La secuencia N-terminal de la zonulina purificada a partir de cerebro humano adulto (SEQ ID NO: 29) y de cerebro humano fetal (SEQ ID NO: 36) era completamente diferente a la N-terminal de zonulina purificada a partir de corazón (SEQ ID NO: 28), de intestino fetal (SEQ ID NO: 30) y de intestino adulto (SEQ ID NO: 31) (véanse las Figuras 6-7).
20 Se cree que esta diferencia explica la especificidad de tejido de la zonulina en la determinación de la permeabilidad de tejidos, tales como el intestino, demostrada anteriormente.

Las secuencias N-terminales de zonulina humana purificada a partir de corazón, intestino y cerebro, difieren todas de la secuencia N-terminal de la zonulina procedente de intestino de conejo (Figura 6). Para establecer si estas proteínas
25 representan diferentes isoformas de una familia de proteínas relacionadas con la familia tau, se sometieron tejidos de conejo y de humano a SDS-PAGE al 8,0% (p/v), seguido de inmunotinción Western usando anticuerpos anti-ZOT o anti-tau. Las bandas de zonulina de 47 kDa purificada a partir de tejidos de conejo y de humano (incluyendo cerebro, intestino y corazón) que eran reconocidas por los anticuerpos anti-ZOT, también se observó que daban lugar a reacción cruzada con anticuerpos anti-tau. Las diferentes fracciones de zonulina purificada a partir de cerebro humano
30 obtenidas mediante cromatografía salina también fueron sometidas a inmunotinción Western usando anticuerpos anti-ZOT o anticuerpos anti-tau. Mientras que los anticuerpos anti-ZOT reconocieron la proteína de 47 kDa intacta y los fragmentos de degradación de 35 kDa y de 15 kDa, los anticuerpos anti-tau sólo reconocieron la proteína de 47 kDa intacta y el fragmento de 35 kDa, los anticuerpos anti-tau no reconocieron el fragmento de 15 kDa. Para establecer si el fragmento de 35 kDa incluye el extremo N o el extremo C de la zonulina, se obtuvo la secuencia N-terminal
35 de la banda de 35 kDa y se descubrió que era: Xaa Xaa Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu (SEQ ID NO: 32). Esta secuencia es diferente a la secuencia N-terminal de la zonulina de cerebro humano intacta (SEQ ID NO: 29). Estos resultados sugieren que el fragmento de 15 kDa representa la porción N-terminal de la zonulina, mientras que el fragmento de 35 kDa representa la porción C-terminal de la zonulina.

40 Combinados en conjunto, estos resultados sugieren que el dominio de zonulina reconocido por los anticuerpos anti-tau se encuentra hacia el extremo C de la proteína, es común en las diferentes isoformas de la zonulina procedente de tejidos tanto humanos como de conejo (mientras que la porción N-terminal puede variar), y probablemente se encuentra involucrada en el efecto permeabilizante de la proteína (en base a la observación de que la tau se une a β -tubulina con el posterior reordenamiento del citoesqueleto celular, y el efecto de la Fracción 4 sobre la resistencia del tejido de intestino delgado de mono).

La secuencia N-terminal de zonulina humana purificada a partir de corazón y de intestino se comparó con otras secuencias de proteína mediante análisis de búsqueda BLAST. El resultado de este análisis reveló que la secuencia N-terminal de la zonulina humana es idéntica en un 95% a la secuencia N-terminal de la cadena pesada variable de la IgM de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 37).
50

Como resultado, para determinar si la zonulina humana purificada a partir de corazón y de IgM humana son el mismo resto, se realizó una digestión parcial de la zonulina humana para obtener un fragmento interno, que a continuación fue secuenciado.

55 Más específicamente, se colocó 1,0 mm del filtro PVDF que contenía la zonulina purificada a partir de corazón humano en un tubo de plástico previamente lavado con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (p/v), y aclarado con metanol. Se añadieron 75 μ L de una disolución tampón que comprendía Tris 100 mM (pH 8,2), CH₃CH al 10% (v/v) y Triton X-100 deshidrogenado al 1,0% (v/v), y se incubó con la membrana a 37°C durante 60 minutos. A continuación se añadieron 150 ng de tripsina y se llevó a cabo otro periodo adicional de incubación de 24 h a 37°C. La disolución resultante fue sometida a sonicación durante 10 minutos, y el sobrenadante fue decantado. A continuación se añadieron 75 μ L de TFA al 0,1% (p/v), la disolución se sometió a sonicación durante otros 10 minutos adicionales y el sobrenadante fue decantado. Ambas alícuotas fueron cargadas en una columna C₁₈ de 0,5 mm x 250 mm, con un tamaño de partícula de 5,0 μ m, y con un tamaño de poro de 300 Å. Se desarrolló un gradiente desde TFA al 0,1% (p/v)
60 hasta CH₃CH agua al 45% + TFA al 0,1% (p/v) durante 2 horas y 15 minutos. Finalmente se recogieron y secuenciaron los picos.

ES 2 267 282 T3

Se descubrió que la secuencia interna de zonulina humana purificada a partir de corazón humano adulto era: Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ ID NO: 33).

La secuencia interna de zonulina humana se comparó con otras secuencias de proteína mediante análisis de búsqueda BLAST. El resultado de este análisis reveló que la secuencia interna de la zonulina humana tiene un 0% de identidad con cualquier secuencia interna de la cadena pesada variable de IgM de *Homo sapiens*.

Los resultados del Ejemplo 3 anteriores demuestran que (1) la zonulina constituye el modulador fisiológico de la ruta paracelular; (2) la secuencia N-terminal de zonulina de conejo es altamente homóloga a la secuencia N-terminal de proteína tau; (3) la zonulina y la tau son dos restos distintos que están relacionados inmunológicamente, y aún así son funcionalmente diferentes; (4) la secuencia N-terminal de la zonulina humana obtenida a partir de corazón y de intestino es altamente homóloga a la secuencia N-terminal de la cadena pesada de la región variable de IgM; (5) la zonulina humana y la IgM son dos restos distintos que están relacionados estructuralmente, y aún así son funcionalmente diferentes; y (6) la zonulina representa una familia de proteínas relacionadas con tau con secuencias C-terminales comunes activas, y con secuencias N-terminales variables.

Ejemplo 4

Antagonistas de Péptido de Zonulina

Dado que la ZOT, la zonulina intestinal humana (zonulina_i) y la zonulina de corazón humano (zonulina_h) actúan todas sobre tj intestinal (Fasano y col., *Gastroenterology*, **112**: 839 (1997); Fasano y col., *J. Clin. Invest.*, **96**: 710 (1995); y Figuras 1-5) y endotelial, y que las tres presentan un efecto regional similar (Fasano y col. (1997), ver anteriormente; y Figuras 1-5) que coincide con la distribución de receptor de ZOT dentro del intestino (Fasano y col. (1997), ver anteriormente; y Fasano y col. (1995), ver anteriormente), se postuló en la presente invención que estas tres moléculas interaccionan con la misma posición de unión de receptor. Por tanto, se llevó a cabo una comparación de la estructura de aminoácidos primaria de la ZOT y de las zonulinas humanas para arrojar luz sobre los requerimientos estructurales absolutos de la interacción receptor-ligando involucrada en la regulación de tj intestinal. El análisis de los extremos N de estas moléculas reveló la siguiente estructura común (residuos de aminoácido 8-15 recuadrados en la Figura 7): no polar (Gly para intestino, Val para cerebro), variable, no polar, variable, no polar, polar, variable, polar (Gly). La Gly de la posición 8, la Val de la posición 12 y la Gln de la posición 13, son todas altamente conservadas en la ZOT, la zonulina_i y la zonulina_h y la zonulina_h (véase la Figura 7), lo cual se cree que es crítico para la función de unión de receptor dentro del intestino. Para verificarlo, se sintetizó químicamente el octapéptido sintético Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly (SEQ ID NO: 15) (denominado FZI/0, y correspondiente a los residuos de aminoácido 8-15 de la zonulina_i fetal humana).

A continuación, se montó fíleo de conejo en cámaras de Ussing tal como se ha descrito anteriormente, se expuso a 100 µg de FZI/0 (SEQ ID NO: 15), a 100 µg de FZI/1 (SEQ ID NO: 34), a 1,0 µg de 6xHis-ZOT (obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 1), a 1,0 µg de zonulina_i (obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 3), o a 1,0 µg de zonulina_h (obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 3) por separado; o se pre-expuso durante 20 minutos a 100 µg de FZI/0 ó de FZI/1, momento en el cual se añadieron 1,0 µg de 6xHis-ZOT, 1,0 µg de zonulina_i o 1,0 µg de zonulina_h. A continuación se calculó el ΔRt tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Tal como se muestra en la Figura 8, el FZI/0 no indujo ningún cambio significativo en Rt (0,5% en comparación con el control negativo) (véase la barra cerrada). Por el contrario, el pre-tratamiento durante 20 minutos con FZI/0 disminuyó el efecto de ZOT, zonulina_i y zonulina_h sobre Rt en un 75%, 97% y 100%, respectivamente (véase la barra abierta). Asimismo, como se muestra en la Figura 8, este efecto inhibidor fue eliminado por completo cuando se sintetizó químicamente un segundo péptido sintético (FZI/1) cambiando Gly de la posición 8, Val de la posición 12 y Gln de la posición 13 (en referencia a la zonulina_i) por los correspondientes residuos de aminoácido de la zonulina_h (Val, Gly y Arg, respectivamente) (véase la barra sombreada).

Los anteriores resultados demuestran que existe una región que se extiende entre el residuo 8 y el 15 del extremo N-terminal de ZOT y de la familia de zonulinas que es crucial para la unión del receptor objetivo, y que los residuos de aminoácido de las posiciones 8, 12 y 13 determinan la especificidad de tejido de esta unión.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de toxina de zonula occludens, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos.
- 10 2. Un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de toxina de zonula occludens, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos para su uso como medicamento.
- 15 3. Un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dichos antagonistas de péptido se unen a un receptor de toxina de zonula occludens en el intestino de dicho sujeto, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos en dicho intestino para su uso en el tratamiento de la inflamación gastrointestinal.
- 20 4. Un antagonista de péptido como el definido en la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la infección de *C. difficile*, enterocolitis shigelosis, gastroenteritis viral, infestación parasitaria, sobrecrecimiento bacteriano, enfermedad de Whipple, gastritis, cáncer gástrico, colitis colagenosa, enfermedad inflamatoria del intestino, linfangiectasia intestinal congénita, linfoma sarcoidosis, tuberculosis mesentérica, tras la corrección quirúrgica de enfermedad del corazón congénita con la operación de Montan, enfermedad de Menetrier, enfermedad celiaca, gastroenteritis eosinofílica, lupus sistémico eritematoso o alergia a la leche.
- 25 5. El uso de un antagonista de péptido de zonulina que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO: 24, en las que dicho antagonista de péptido se une a un receptor de toxina de zonula occludens en el intestino de dicho sujeto, pero que no modula fisiológicamente la abertura de las zonas de oclusión de mamíferos en dicho intestino para la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación gastrointestinal.
- 30 6. El uso de un antagonista de péptido como el definido en la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección de *C. difficile*, enterocolitis shigelosis, gastroenteritis viral, infestación parasitaria, sobrecrecimiento bacteriano, enfermedad de Whipple, gastritis, cáncer gástrico, colitis colagenosa, enfermedad inflamatoria del intestino, linfangiectasia intestinal congénita, linfoma sarcoidosis, tuberculosis mesentérica, tras la corrección quirúrgica de enfermedad del corazón congénita con la operación de Montan, enfermedad de Menetrier, enfermedad celiaca, gastroenteritis eosinofílica, lupus sistémico eritematoso o alergia a la leche.
- 35 50

55

60

65

FIG. 1

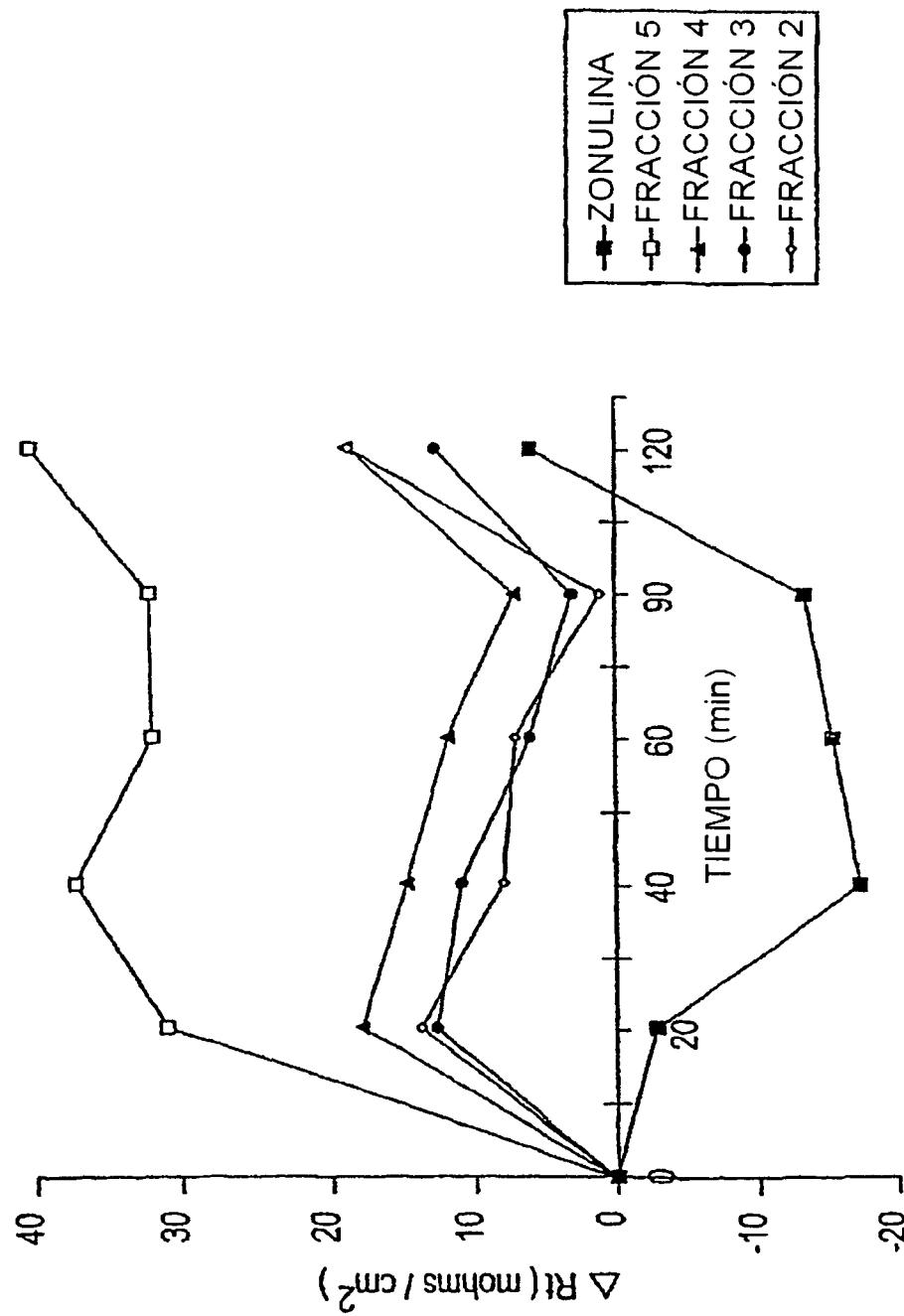


FIG. 2

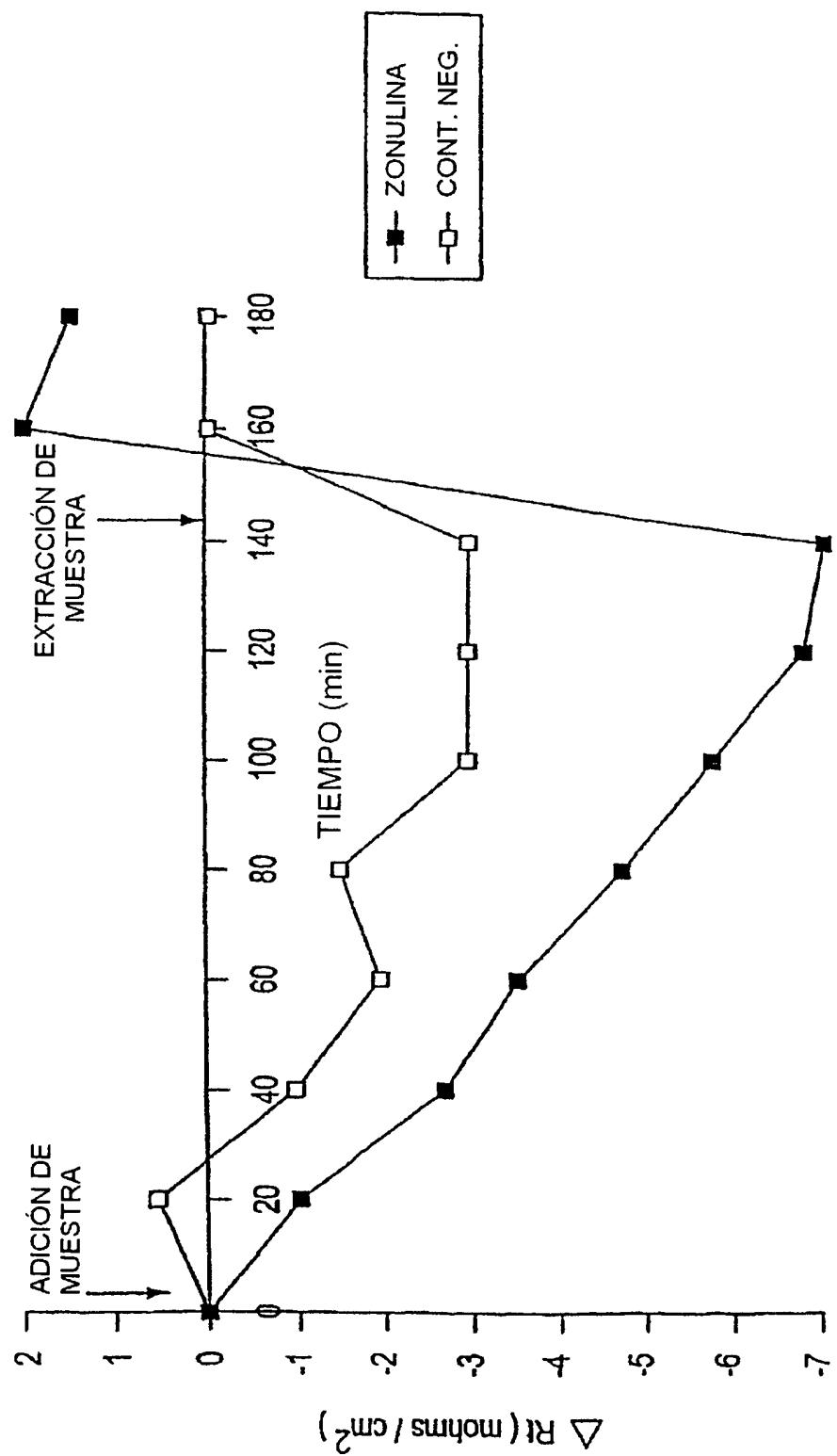


FIG. 3

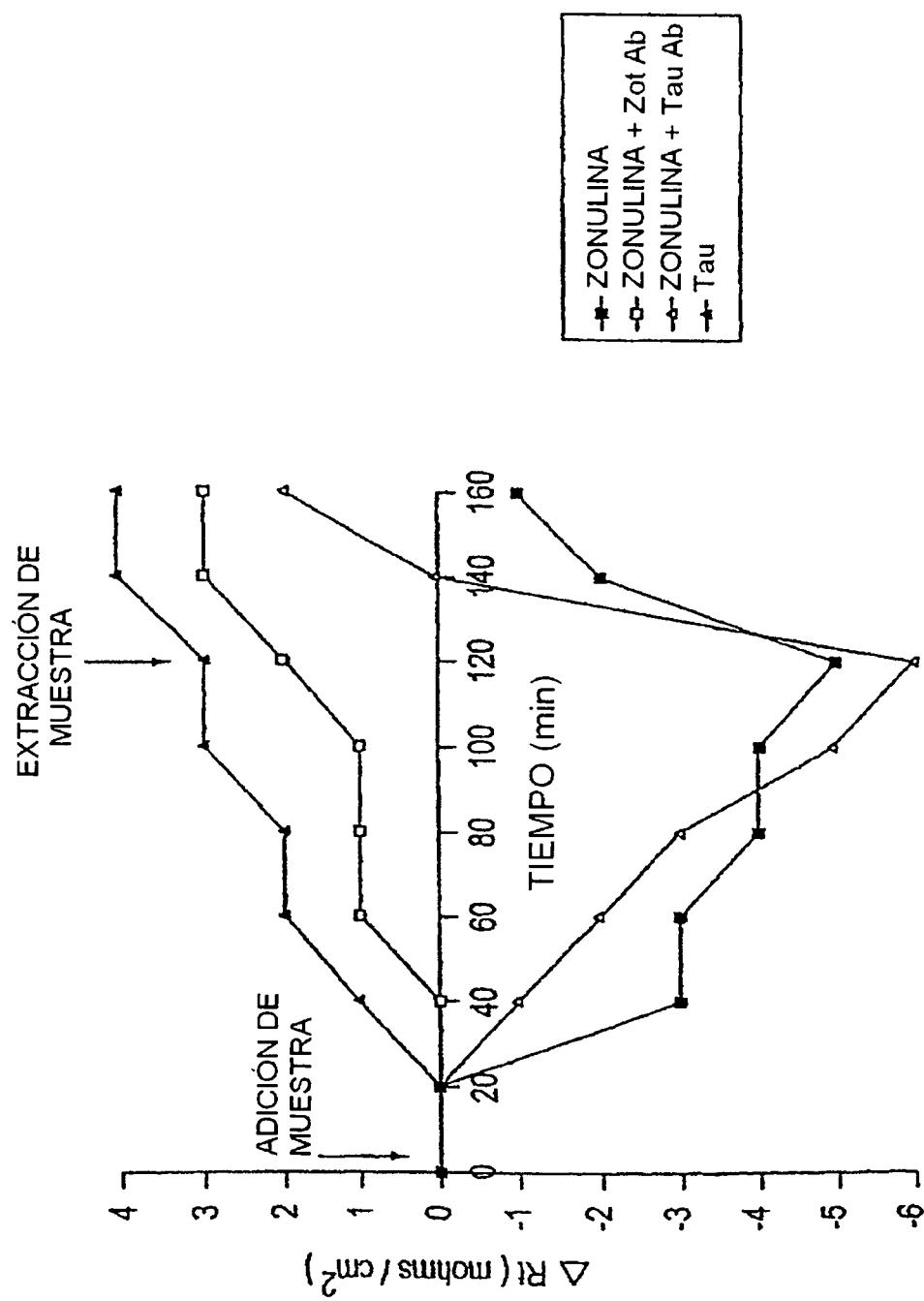


FIG. 4A

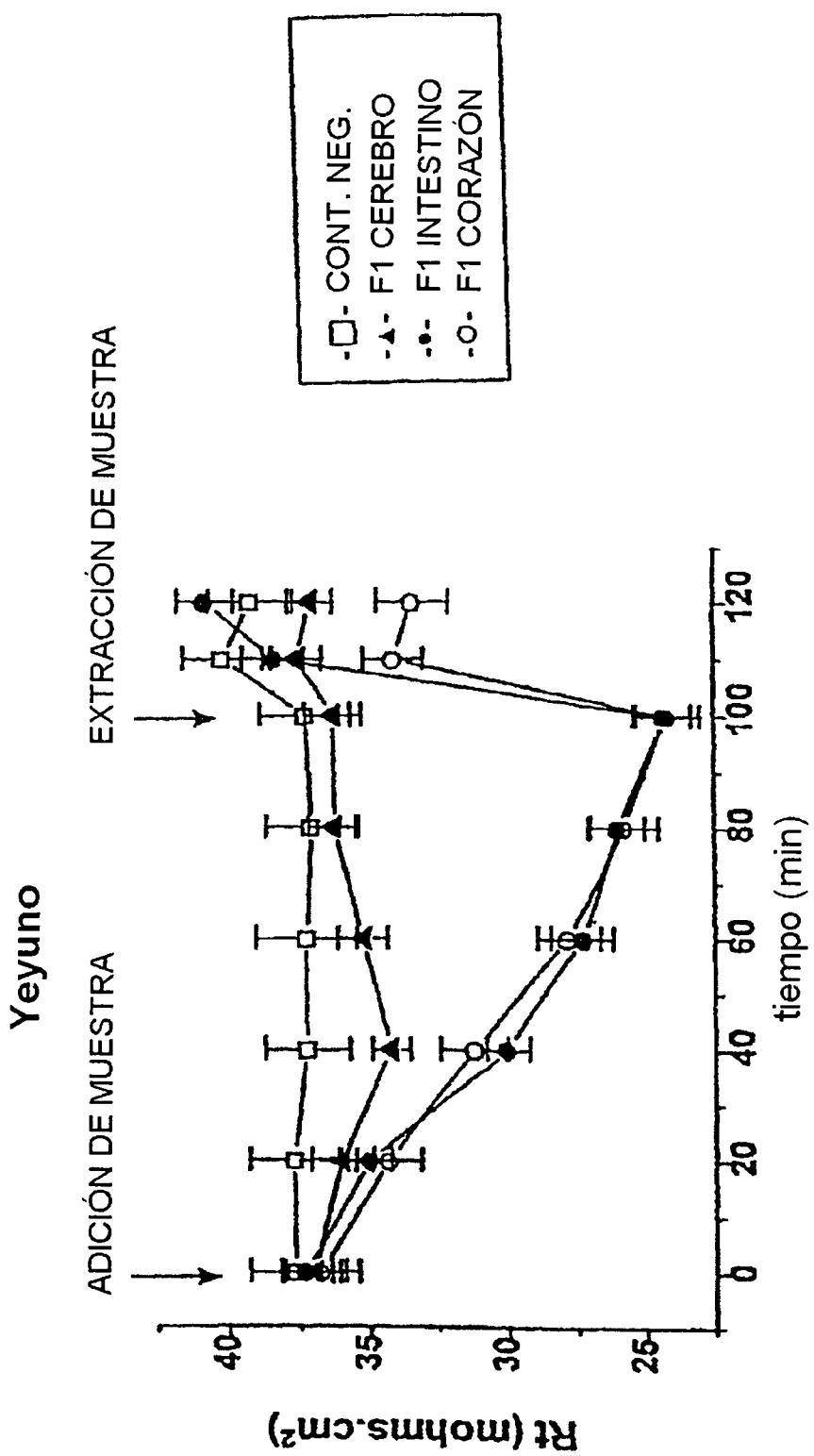


FIG. 4B

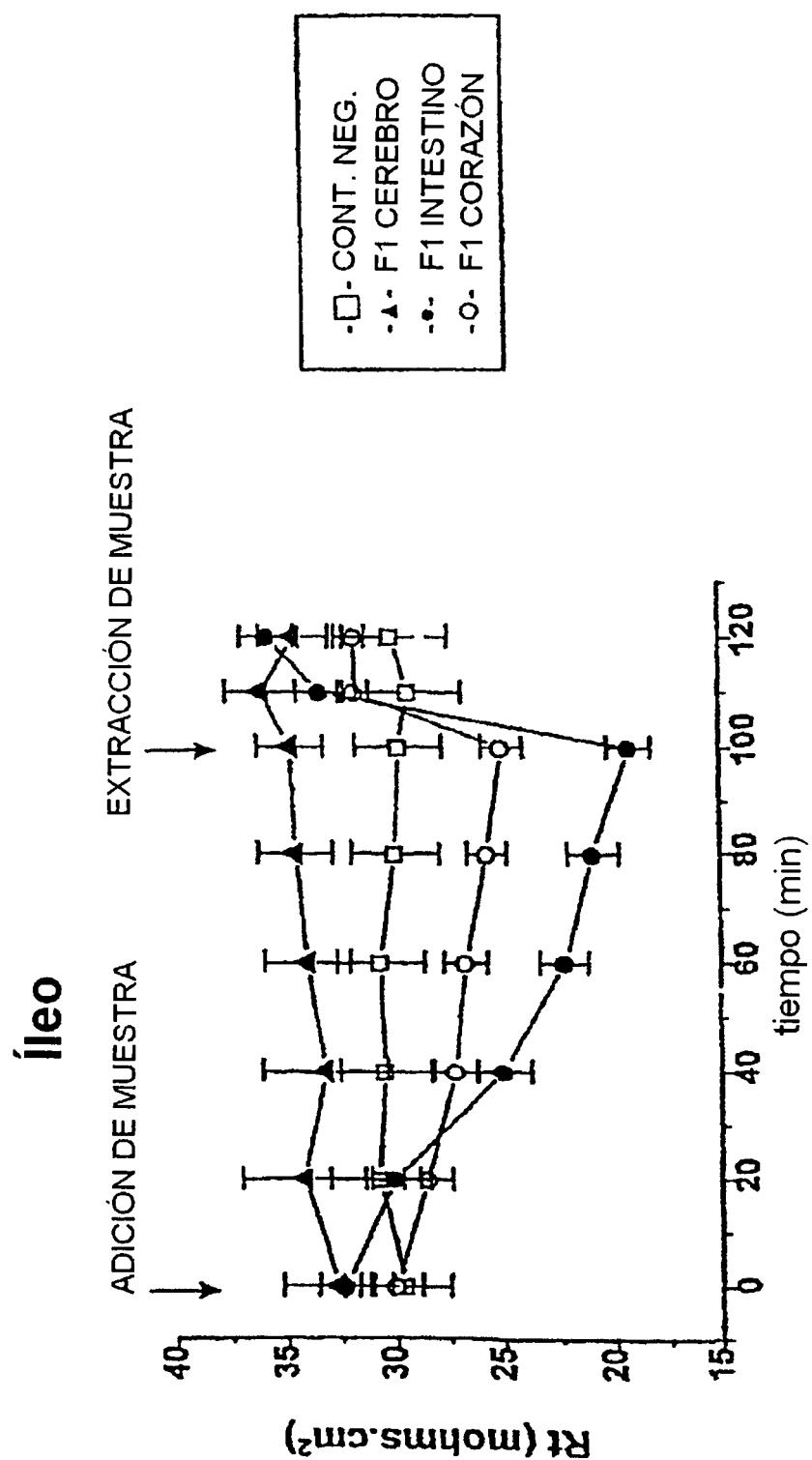


FIG. 5A

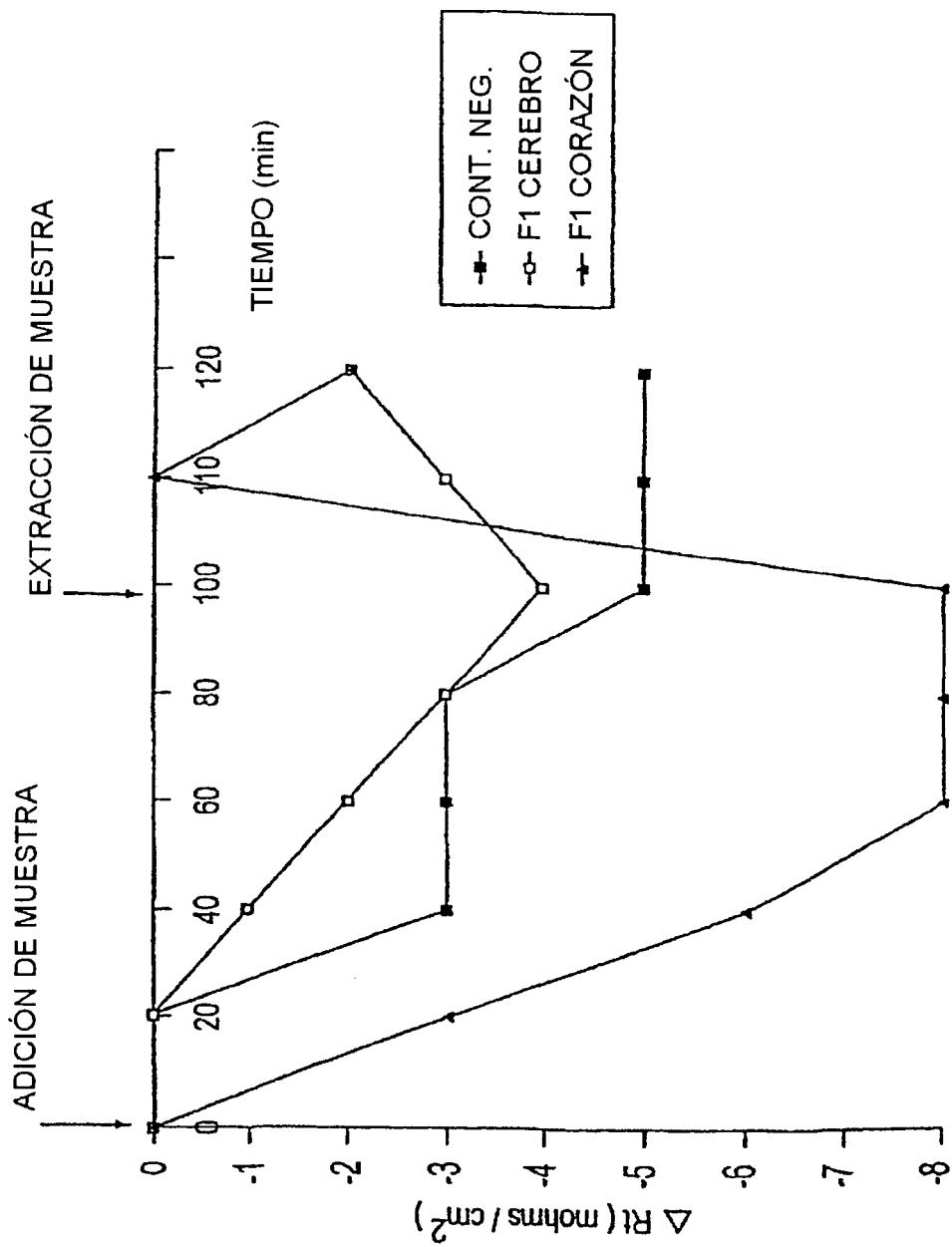


FIG. 5B

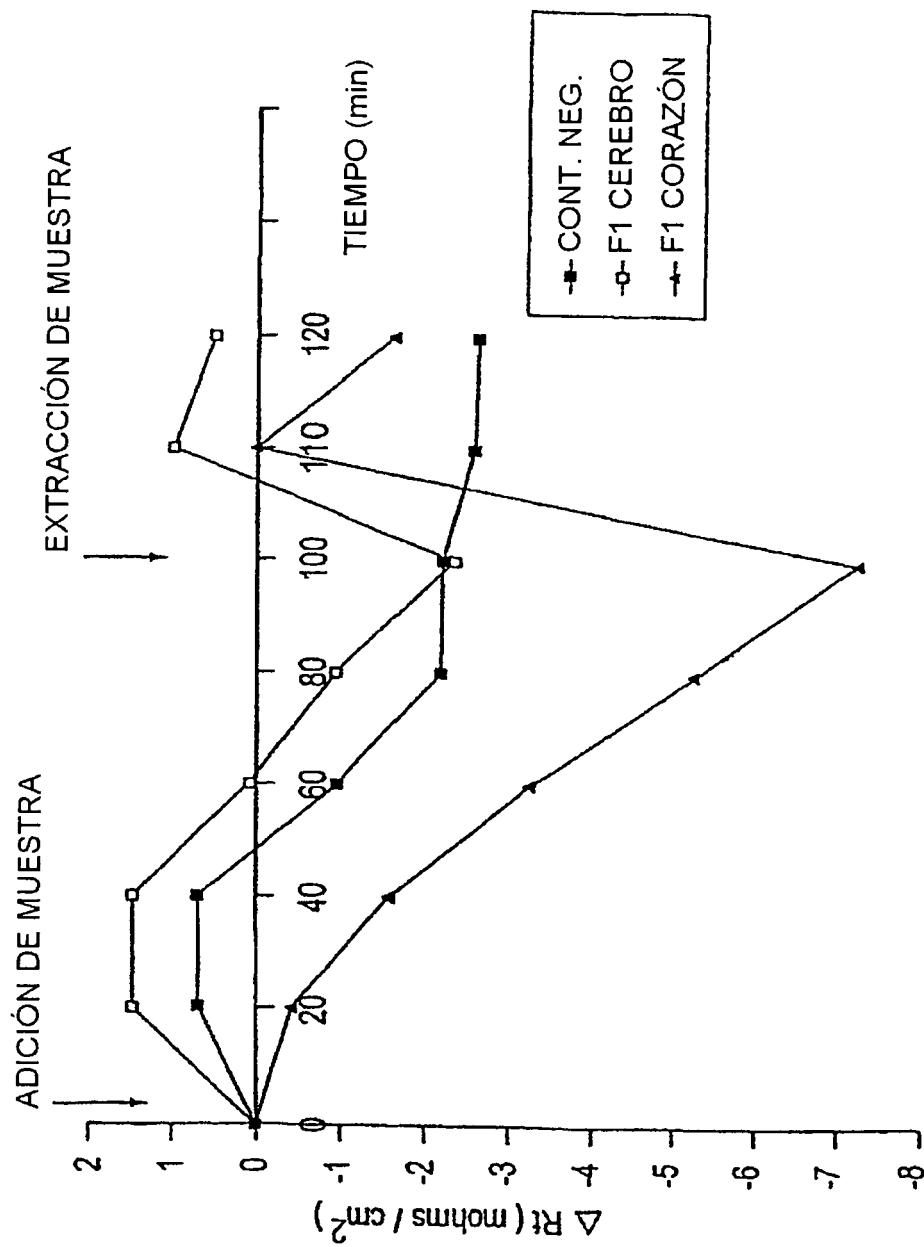


FIGURA 6

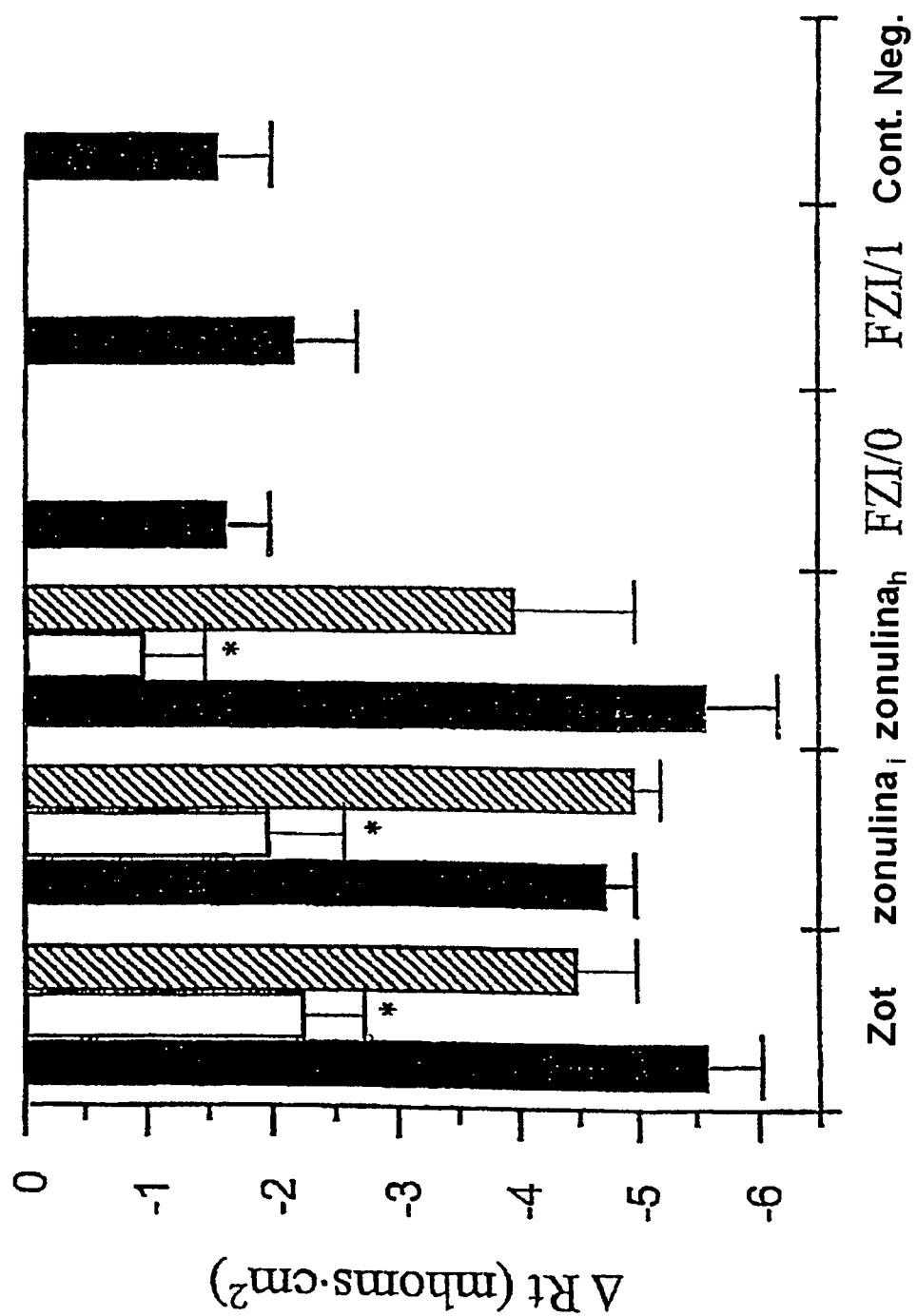
Conejo	-	
Intestino	-	Asn Gln Arg Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gln (SEQ ID NO:27)
Humano adulto	-	
Intestino	-	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu (SEQ ID NO:31)
Humano fetal	-	
Intestino	-	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu (SEQ ID NO:30)
Humano adulto	-	
Corazón	-	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu (SEQ ID NO:28)
Humano adulto	-	
Cerebro	-	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser (SEQ ID NO:29)
Secuencia		
Interna		
Humano adulto	-	
Corazón	-	Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly (SEQ ID NO:33)
Humano adulto	-	
Cerebro Fragn. 35 kDa	-	Xaa Xaa Asp GLY Thr GLY Lys Val GLY Asp Leu (SEQ ID NO:32)

FIGURA 7

<i>Vibrio cholerae</i> ZOT (SEQ ID NO:38)	-	Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly Phe Val Thr
Humano Adulto Intestino -	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Xaa Leu
Humano Fetal Intestino -	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser	Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
Humano Adulto Corazón -	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
FZI/0 (SEQ ID NO:15)	-	Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
FZI/1 (SEQ ID NO:34)	-	Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly
Humano Fetal Cerebro -	Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly	Arg Ile Gly Arg Ile Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile
Humano Adulto Cerebro -	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser	
Cadena Pessada IgM Humana -	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
(SEQ ID NO:37)		

* Fragmento biológicamente activo (residuos de aminoácido 288-399) producido por *V. cholerae* tras procesamiento. La primera Gly corresponde al residuo 291 de la molécula ZOT completa (Fasano y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 5242 (1991); y Baudry y col., Infect. Immun. 60(2): 428 (1992)).

FIG. 8



ES 2 267 282 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FASANO, Alessio

5 <120> ANTAGONISTAS DE PÉPTIDO DE ZONULINA Y MÉTODOS PARA USO DE LOS MISMOS

<130> F131422

10 <140> PCT/US99/16683

<141> 1999-07-28

15 <150> 09/127.815

<151> 1998-08-03

<160> 40

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

30 <400> 1

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly
1 5

35 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

40 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 2

Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly
45 1 5

<210> 3

<211> 8

50 <212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 3

55 Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly
1 5

60 <210> 4

<211> 8

<212> PRT

65 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

ES 2 267 282 T3

<400> 4

5 Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5

5

<210> 5

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 5

15 Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5

20 <210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

25 <400> 6

30 Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 7

40 Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 8

45 <211> 8

<212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

50 <400> 8

55 Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

60 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 9

65 Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

ES 2 267 282 T3

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 10
10 Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 11
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

20 <400> 11
Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5

25 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
30 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 12
35 Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 13
40 <211> 8
<212> PRT
<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

45 <400> 13
Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly
1 5

50 <210> 14
<211> 8
<212> PRT
55 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 14
60 Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 15
65 <211> 8
<212> PRT
<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

ES 2 267 282 T3

<400> 15

Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
1 5

5

<210> 16

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 16

15 Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 17

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

25 <400> 17

Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly
1 5

30

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 18

40 Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly
1 5

<210> 19

45 <211> 8

<212> PRT

<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

50 <400> 19

Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly
1 5

55

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

60 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 20

65 Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly
1 5

ES 2 267 282 T3

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 21
10 Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 22
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

20 <400> 22
Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly
1 5

25 <210> 23
<211> 8
<212> PRT
30 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

<400> 23
35 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5

<210> 24
40 <211> 8
<212> PRT
<213> Antagonista de Péptido de Zonulina

45 <400> 24
Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly
1 5

50 <210> 25
<211> 18
<212> ADN
55 <213> constructo sintético
<400> 25

60 tcatcacggc gcgcagg
<210> 26
<211> 22
<212> ADN
65 <213> constructo sintético

18

ES 2 267 282 T3

<400> 26

ggaggtctag aatctgcccc at

22

5 <210> 27

<211> 18
<212> PRT
<213> Intestino de Conejo

<400> 27

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

<210> 28

20 <211> 20
<212> PRT
<213> Corazón humano

25 <400> 28

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

<210> 29

<211> 9

35 <212> PRT
<213> Cerebro humano

<400> 29

40 Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val S
1 5

45 <210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Intestino fetal humano

50

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (16)

55 <223> Xaa de la posición 16 es un aminoácido

<400> 30

65

<210> 31

ES 2 267 282 T3

<212> PRT

<213> Intestino humano

5 <220>

<221> POCO SEGURO

<222> (10)

10 <223> Xaa de la posición 10 es un aminoácido

<400> 31

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

15

<210> 32

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Cerebro humano

<220>

25 <221> POCO SEGURO

<222> (1)..(2)

<223> Xaa de las posiciones 1 y 2 son aminoácidos

30 <400> 32

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

35

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

40 <213> Corazón Adulto Humano

<400> 33

45 Leu Ser Glu Val Thr Ala Val Pro Ser Leu Asn Gly Gly
1 5 10

<210> 34

50 <211> 8

<212> PRT

<213> Octapéptido Sintético

55 <400> 34

Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly
1 5

60 <210> 35

<211> 8

<212> PRT

65 <213> Antagonista de Péptido de Zonulina

ES 2 267 282 T3

<400> 35

Val Asp Gly Phe Gly Arg Ile Gly
1 5

5

<210> 36

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Cerebro Fetal Humano

<220>

15 <221> POCO SEGURO

<222> (1)

<223> Xaa en la posición 1 es un aminoácido

20 <400> 36

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

25 Arg Leu Val Ile
20

<210> 37

<211> 20

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 37

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

40 Arg Leu
20

<210> 38

<211> 14

45 <212> PRT

<213> Toxina de Zonula Occludens

50 <400> 38

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

55 <210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> constructo sintético

60 <400> 39

cgggatcccg tatgagtatc ttt

23

65 <210> 40

<211> 24

ES 2 267 282 T3

<212> ADN

<213> constructo sintético

5 <400> 40

cccaagcttg ggtcaaaata tact

24

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65