

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4822585号  
(P4822585)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>A61K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 37/02
<b>A61P 1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 P 1/00
<b>A61P 1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 P 1/04
<b>C12N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 12 N 15/00 Z N A A

請求項の数 4 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2000-563294 (P2000-563294)
(86) (22) 出願日	平成11年7月28日 (1999.7.28)
(65) 公表番号	特表2002-524393 (P2002-524393A)
(43) 公表日	平成14年8月6日 (2002.8.6)
(86) 國際出願番号	PCT/US1999/016683
(87) 國際公開番号	W02000/007609
(87) 國際公開日	平成12年2月17日 (2000.2.17)
審査請求日	平成18年7月27日 (2006.7.27)
(31) 優先権主張番号	09/127,815
(32) 優先日	平成10年8月3日 (1998.8.3)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	500362693 ユニバーシティ・オブ・メリーランド・ボルチモア
	アメリカ合衆国メリーランド州21201 ・ボルチモア・ウエストロンバードストリート520
(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(72) 発明者	フアサノ, アレツシオ アメリカ合衆国メリーランド州21042 エリコットシティ・シャーリルコート3504

審査官 宮坂 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ゾヌリンのペプチドアンタゴニストおよびその使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号15に示されるアミノ酸配列よりなるペプチド。

## 【請求項 2】

請求項1に記載のペプチドの薬剤的有効量を含んでなる胃腸炎症の処置用製薬学的組成物

。

## 【請求項 3】

請求項1に記載のペプチドの薬剤的有効量を含んでなる炎症性腸疾患の処置用製薬学的組成物。

## 【請求項 4】

請求項1に記載のペプチドの薬剤的有効量を含んでなる腹腔疾患の処置用製薬学的組成物

。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明の進展は、メリーランド州ボルチモアのメリーランド大学(University of Maryland, Baltimore, Maryland)により支援された。本明細書に記載する本発明は、国立衛生研究所(National Institute of Health)からの資金により支援された (N I H、D K - 48373)。政府は一定の権利を保有する。

## 【0002】

発明の分野

本発明は、ゾヌリン(zonulin) のペプチドアンタゴニスト、ならびにその使用方法に関する。該ペプチドアンタゴニストは、閉鎖帶受容体に結合するが、しかしヒト密着結合の開放(open)を生理学的に調整はしない。

### 【0003】

#### 発明の背景

##### 1. 腸密着結合の機能および調節

密着結合(“t j”)または閉鎖帯(以後「ZO」と呼ぶ)は、吸収および分泌上皮の顕著な特徴の一つである〔マダラ(Madara, J. Clin. Invest., 83:1089-1094 (1989));およびマダラ「分泌性下痢の教科書」レベンタールら編集、第11章(Madara, Textbook of Secretory Diarrhea, Eds. Lebenthal et al., Chapter 11, p125-138 (1990))〕。頂端部と側底部との間のバリアーとして、これらはイオンおよび水溶性溶質の細胞外(paracellular)経路を通じる受動拡散を選択的に調節する〔グンビナー(Gumbiner, Am. J. Physiol. 253(Cell Physiol. 22): C749-C758 (1987))〕。このバリアーは、細胞通過経路に関連する経路の活動により発生するあらゆる勾配を維持する〔ダイアモンド(Diamond, Physiologist, 20: 10-18 (1977))〕。

### 【0004】

腸細胞原形質膜の抵抗が比較的高いので、上皮通過コンダクタンスの変動は、通常、細胞外経路の透過性の変化に帰せられる(マダラ、上記)。閉鎖帯は、この細胞外経路内の主要なバリヤーであり、上皮組織の電気抵抗は、閉鎖帯中の膜通過タンパク質ひも状体(strand)の数およびその複雑度に依存するよう見え、これは冷凍割断電子顕微鏡により観察される〔マダラら(Madara et al., J. Cell. Biol., 101:2124-2133 (1985))〕。

### 【0005】

閉鎖帯は、以前は静的構造と考えられていたが、実際には動的であり、各種の発生的〔マグヌソンら(Magnuson et al., Dev. Biol., 67:214-224 (1978)); レヴェルら(Revel et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 40:443-455 (1976)); およびシュネーバーガーら(Schneeberger et al., J. Cell Sci., 32:307-324 (1978))〕、生理学的〔ジルラら(Gilula et al., Dev. Biol. 50:142-168 (1976)); マダラら(Madara et al., J. Membr. Biol., 100:149-164 (1987)); マザリエゴスら(Mazariegos et al., J. Cell. Biol., 98:1865-1877 (1984)); およびサルデットら(Sardet et al., J. Cell. Biol., 80:96-117 (1979))〕、および病理学的〔ミルクスら(Milks et al., J. Cell. Biol., 103:2729-2738 (1986)); ナッシュら(Nash et al., Lab. Invest., 59:531-537 (1988)); およびシャズビーら(Shasby et al., Am. J. Physiol., 255(Cell Physiol., 24):C781-C788 (1988))〕環境に直ちに適応するという多くの証拠が存在する。この適応の基礎となる調節機構はまだ完全には理解されていない。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ が存在すると、生化学的事象の複雑なカスケードを開始させ、それは最終的には、その組成はまだ部分的にしか特性解明されていない閉鎖帯要素の組織化されたネットワークの形成および調整に導く閉鎖帯のアセンブリーは細胞相互作用の結果であることは明らかである〔ダイアモンド(Diamond, Physiologist, 20:10-18 (1977))〕。膜浸透タンパク質ひも状体の候補であるオクルディンが最近同定された〔フルセラ(Furuse et al., J. Membr. Biol., 87:141-150 (1985))〕。

### 【0006】

6種のタンパク質が、膜接觸部の下にある細胞質亞膜性ブラーク内で同定されたが、しかしこれらの機能はまだ確立されていない(ダイアモンド、上記)。ZO-1およびZO-2は、特性不明の130kDタンパク質(ZO-3)との界面活性剤安定性複合体内でヘテロダイマーとして存在する〔ガンビナーら(Gumbiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3460-3464 (1991))〕。大部分の免疫電子顕微鏡研究では、ZO-1を膜接觸部の直下に位置づけている〔スチーブンソンら(Stevenson et al., Molec. Cell. Biochem., 83:129-145 (1988))〕。2種の他のタンパク質、シングulin(cingulin)〔シティら(Citi et al., Nature (London), 333:272-275 (1988))〕および7H6抗原〔ツォングラ(Chong et al., J. Cell Biol., 120:477-483 (1993))〕は、膜からさらに離れて位置づけられ、まだクローニングされていない。小さいGTP結合タンパク質であるRab13も

10

20

30

40

50

、最近接合領域に位置づけられた〔ザラウイら(Zahraoui et al., J. Cell Biol., 124:101-115 (1994))〕。その他の小さいGTP結合タンパク質は、皮質細胞骨格を調節することが知られており、すなわちr h oはフォーカルコンタクト内のアクチン膜付着を調節し〔リドレーら(Ridley et al., Cell, 70:389-399 (1992))〕、またr a cは成長因子誘導の膜の波うち運動を調節する〔リドレーら(Ridley et al., Cell, 70:401-410 (1992))〕。より良く特徴が解明されている細胞接合部のフォーカルコンタクト〔グアンら(Guan et al., Nature, 358:690-692 (1992))〕、および接着結合部〔ツキタラ(Tsukita et al., J. Cell Biol., 123:1049-1053 (1993))〕中のプレークタンパク質の既知の機能との類推に基づいて、t j -関連プレークタンパク質は、細胞膜を貫通する両方向へのシグナルの伝達、および皮質アクチン細胞骨格への連結の調節に関与しているとの仮説が立てられている。10

#### 【0007】

上皮がさらされる多数の生理学的および病理学的な誘導に対処するために、閉鎖帯は、複雑な調節系の存在を必要とする迅速で協調的な応答が可能でなければならない。閉鎖帯の構築および調節に関与する機構の正確な特徴解明は、最近の活発な研究の領域である。

#### 【0008】

現在、t j の構造的および機能的連結が、吸収細胞のアクチン細胞骨格とt j 複合体間に存在するという一連の証拠がある〔ガンビナーら、上記；マダラら、上記；およびドレンチャーンら(Drenchahn et al., J. Cell Biol., 107:1037-1048 (1988))〕。アクチン細胞骨格は、微細フィラメントの複雑な網目から構成されており、その正確な構成はアクチン結合タンパク質の大きい構造により調節されている。アクチン結合タンパク質のリン酸化の状態が、細胞形質膜への細胞骨格の連結をどのようにして調節するかの一例は、ミリストイル化されたアラニンリッチなCキナーゼ基質である（以後「M A R C K S」と呼ぶ）。M A R C K Sは、形質膜の細胞質面と連合される特異性タンパク質キナーゼC（以後「P K C」と呼ぶ）基質である〔アデレム(Aderem, Elsevier Sci. Pub. (UK), 438-443 (1992))〕。その非リン酸化形で、M A R C K Sは膜アクチンに架橋する。従って、M A R C K Sを介して膜と連合するアクチン網目は、比較的剛直であるらしい〔ハートヴィッグら(Hartwig et al., Nature, 356:618-622 (1992))〕。活性化したP K CはM A R C K Sをリン酸化し、これは膜から解放される〔ローゼンら(Rosen et al., J. Exp. Med., 172:1211-1215 (1990)); およびテレンら(Thelen et al., Nature, 351:320-322 (1991))〕。M A R C K Sに連結されたアクチンは、膜から空間的に分離され、より可塑性であるらしい。M A R C K Sが脱リン酸化された場合に、これは膜に戻り、そこで再びアクチンと架橋する〔ハートヴィッグら、上記；およびテレンら、上記〕。これらのデータは、F -アクチンのネットワークが、アクチン結合タンパク質（M A R C K Sはその一つである）を含むP K C依存リン酸化プロセスにより再配列されることを示唆している。30

#### 【0009】

種々の細胞内媒介体が、t j の機能および/または構造を改変することが証明されている。両生類胆のう〔デュフェイら(Duffey et al., Nature, 204:451-452 (1981))〕、および金魚〔バッカーラ(Bakker et al., Am. J. Physiol., 246:G213-G217 (1984))〕およびカレイ〔クラスネイら(Krasney et al., Fed. Proc., 42:1100 (1983))〕の両者の腸の密着結合は、細胞内cAMPが上昇すると、受動イオン流への抵抗増大を示す。また、Ca<sup>2+</sup>イオノホアへの両生類胆のうの暴露は、t j 抵抗を増大させ、そしてt j 構造中の改変を誘導するように見える〔パラントラ(Palant et al., Am. J. Physiol., 245:C203-C212 (1983))〕。さらに、フォルボールエステルによるP K Cの活性化は、腎臓〔エリスら(Ellis et al., C. Am. J. Physiol., 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32):F293-F300 (1992))〕および腸〔ステンソンら(Stenson et al., C. Am. J. Physiol., 265 (Gastrointest. Liver Physiol., 28):G955-G962 (1993))〕の両者の上皮細胞株内において、細胞外透過性を上昇させる。40

#### I I . 血液脳関門

血液脳関門（B B B）は、溶質自由拡散(Solute free diffusion)に対して高く抵抗する50

極めて薄い膜性閑門であり、血液と脳とを分離している。分子的尺度において、この膜を通る薬剤または溶質の動きは、B B B 膜内に埋め込まれている特殊化した酵素様の数個の輸送機構の一つに化合物が接近しない限り、本質的にゼロである。B B B は、上皮細胞の単層ではなくて複層の細胞から成っている。B B B を構成する細胞の4種の異なる形（上皮細胞、周細胞、星状細胞、および神経細胞）の中で、毛細血管の上皮細胞成分は、B B B の透過性の限定因子となっている。脊椎動物の脳および脊髄中の毛細血管内皮は、正常では末梢組織中の微小血管内皮閑門内に存在する内皮間細孔を閉止するt jを備えている。最終的に、内皮t jは、B B B の限定された浸透性をもたらす。

#### I I I . 閉鎖帶毒素

コレラ毒素（C T）をコードするc t x A遺伝子を欠失させて構築された大部分のコレラ菌（*Vibrio cholerae*）ワクチン候補は、高い抗体反応を導出することができるが、しかしワクチンの半数を越えるものはまだ軽度の下痢を発症させる〔レヴィンら（Levin et al., Infect. Immun., 56(1):161-167 (1988)）〕。C Tが存在しないで誘発された下痢の程度を考えると、コレラ菌は、c t x A配列の欠如した株内にまだ存在する他の腸毒素源性因子を産生すると仮定された（レヴィンら、上記）。その結果、コレラ菌により産生され、残留下痢に関与する第二の毒素である閉鎖帶毒素（以後「Z O T」と呼ぶ）が発見された〔ファサノら（Fasano et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5242-5246 (1991)）〕。z o t 遺伝子は、c t x 遺伝子に直ちに隣接して位置している。コレラ菌株の間でc t x 遺伝子を有するz o t 遺伝子の高率の同時産生〔ジョンソンら（Johnson et al., J. Clin. Microbiol., 31/3:732-733 (1993)）；およびカラサワら（Karasawa et al., FEBS Microbiology Letters, 106:143-146 (1993)）〕は、コレラの典型である急性脱水性下痢の因果関係における可能なZ O Tの共同的役割の可能性を示唆する。最近、z o t 遺伝子は、また他の腸内病原体内で同定されている〔チャペ（Tschape, 2nd. Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salomellosis, 47(Abstr.)(1994)）〕。

#### 【0010】

ラビット回腸粘膜上で試験した場合に、Z O Tは、細胞間t jの構造を調整して腸透過性を上昇させることができが以前に発見されている（ファサノら、上記）。細胞外経路の改変の結果、腸内粘膜はさらに透過性が上昇することが発見されている。Z O Tは、N a<sup>+</sup>-グルコース共役能動輸送に影響を及ぼさず、細胞毒性ではなく、また内皮通過抵抗を完全に消失させないことも発見された（ファサノら、上記）。

#### 【0011】

さらに最近では、Z O Tが腸内粘膜内のt jの可逆的開放が可能であり、従って、Z O Tは、治療医薬と同時投与された場合には、腸内ドラッグデリバリーのための経口投与組成物内に使用された場合に、治療薬剤の腸内デリバリーを行うことが可能であることが発見された〔WO 96 / 37196；米国特許（U S）出願番号08 / 443,864、出願1995年5月24日；および米国特許（U S）第5,665,389号；およびファサノら（Fasano et al., J. Clin. Invest., 99:1158-1164 (1997)）、いずれもその全体をここに引用文献として編入する〕。Z O Tは、鼻粘膜中のt jを可逆的に開放することができ、従って、Z O Tは、治療薬剤と同時投与された場合に、治療薬剤の鼻吸収を増大させることができることが発見された〔米国特許（U S）出願番号08 / 781,057、出願1997年1月9日、いずれもその全体をここに引用文献として編入する〕。

#### 【0012】

全体をここに引用文献として編入する米国特許（U S）出願番号08 / 803,364、出願1997年2月20日、の中で、腸内細胞株、すなわちC a C o 2細胞から、Z O T受容体が同定および精製されている。さらに、全体をここに引用文献として編入する米国特許（U S）出願番号09 / 024,198、出願1998年2月17日の中で、ヒト腸、心臓および脳組織からのZ O T受容体が同定および精製されている。Z O T受容体は、腸および鼻透過性の制御に関与する細胞外経路の第一段階である。

#### I V . ゾヌリン

全体をここに引用文献として編入する未決定の米国特許（U S）出願番号098 / 859

10

20

20

30

40

50

, 931、出願 1997 年 5 月 21 日の中で、ZOT と免疫学的および機能的に関連し、またヒト密着結合の生理学的モジュレーターとして機能するヒトタンパク質が、同定および精製されている。「ゾヌリン」と呼ぶこれらのヒトタンパク質は、腸および鼻粘膜の  $\text{t}_j$  を貫通して、ならびに血液脳関門の  $\text{t}_j$  を貫通して治療薬剤の吸収を増大させるために役立つ。

#### 【0013】

本発明において、ゾヌリンのペプチドアンタゴニストが初めて同定された。上記のペプチドアンタゴニストは、ZOT 受容体に結合するが、ヒト密着結合の開放を生理学的に調整するために機能はしない。ペプチドアンタゴニストは、ZOT およびゾヌリンの ZOT 受容体への結合を競合的に抑制し、これにより、ヒト密着結合の開放を生理学的に調整するための ZOT およびゾヌリンの能力を抑制する。

#### 【0014】

##### 発明の要約

本発明の目的はゾヌリンのペプチドアンタゴニストを同定することである。

#### 【0015】

本発明の他の目的は、該ペプチドアンタゴニストを合成および精製することである。

#### 【0016】

本発明のさらに別の目的は、上記のペプチドアンタゴニストを胃腸炎症の処置における抗炎症剤として使用することである。

#### 【0017】

本発明のさらに別の目的は、血液脳関門の損傷を抑制するための上記のペプチドアンタゴニストの使用である。

#### 【0018】

以下の本明細書に記載する本発明の詳細な説明から明らかになるこれらおよびその他の本発明の目的は、一つの態様において、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 および配列番号 35 からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、ZOT 受容体に結合するが、しかしヒト密着結合の開放を生理学的に調整はしないペプチドアンタゴニストにより達成される。

#### 【0019】

##### 発明の詳細な説明

以上に考察したように、一つの態様では、本発明の上記の目的は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 および配列番号 35 からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、ZOT 受容体に結合するが、しかしヒト密着結合の開放を生理学的に調整はしないペプチドアンタゴニストにより達成される。

#### 【0020】

ペプチドアンタゴニストの大きさは、本発明に重要ではない。一般に、ペプチドアンタゴニストの大きさは、アミノ酸 8 ~ 110 個、好ましくはアミノ酸 8 ~ 40 個の範囲内、さらに好ましくはアミノ酸 8 個である。

#### 【0021】

ペプチドアンタゴニストは、周知の技術、例えば「ペプチドおよびタンパク質の高速液体クロマトグラフィー：分離、分析およびコンフォーメーション」マントラ編集 [High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation Analysis and Conformation, Eds. Mant et al., C.R.C. Press (1991)] に記載の技術、およびペプチド

10

20

30

40

50

合成装置、例えばシンフォニー〔Symphony (プロテイン・テクノロジー社(Protein Technologies, Inc.))〕を用いて；または組み替えDNA技術、すなわちペプチドをコードするヌクレオチド配列を適合する発現ベクター、例えば大腸菌(*E. coli*) または酵母発現ベクター中に挿入し、それぞれの宿主細胞中に発現させ、そしてこれから周知の技術を用いて精製する技術を用いて化学的に合成および精製できる。

## 【0022】

ペプチドアンタゴニストは、増大した腸透過性を起こさせる胃腸炎症の処置のための抗炎症剤として使用できる。従って、本発明のペプチドアンタゴニストは、例えばタンパク質損失腸症を起こす腸内状態の処置に有用である。タンパク質損失腸症は、

感染、例えば*C. difficile*感染、全腸炎、細菌性赤痢、ウイルス性胃腸炎、寄生虫発生、細菌異常増殖、ホイップル病、

粘液腐食または潰瘍を伴う疾患、例えば胃炎、胃ガン、膠原性大腸炎、炎症性腸疾患、リンパ管閉塞を特徴とする疾患、例えば先天性腸リンパ管拡張症、リンパサルコイドーシス、腸間結核、およびフォンタン手術を用いた先天性心臓疾患の外科矯正後、

潰瘍を伴わない粘膜疾患、例えばメネトリエ病、腹腔疾患、好酸性胃腸炎、および免疫疾患、例えば前進紅斑性エリテマトーデスまたは食品、主として牛乳アレルギー〔また「小児科胃腸疾患病態生理学診断マネージメント」ワイリーら編集(Pediatric Gastrointestinal Disease Pathophysiology Diagnosis Management, Eds. Wyllie et al., Saunders Co. (1993) 536-543, 表40-2)これは引用することによってその全体が本明細書に

編入される〕

から起きる。

## 【0023】

従って、別の態様では、本発明は、胃腸炎症の処置の方法であって、このような処置を必要とする患者に対する薬剤的有効量のゾヌリンのペプチドアンタゴニストを投与することを含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23および配列番号24からなる群から選ばれるアミノ酸配列番号を含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、該患者の腸内の閉鎖帶毒素受容体に結合するが、しかし該腸内の密着結合の開放を生理学的に調整はしない方法に関する。

## 【0024】

この目的には、ペプチドアンタゴニストは、小腸デリバリーのための経口投与組成物として投与できる。このような小腸デリバリーのための経口投与組成物は、当該技術分野では周知であり、一般に耐胃酸性錠剤またはカプセルを含んでなる〔レミントンの薬剤科学、第16版、オソル編集(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th. Ed. Eds. Osol, Mack Publishing Co., Chapter 89 (1980)); ディジエニスら(Digenis et al., J. Pharm. Sci., 83:915-921 (1994)); ヴァンティニら(Vantini et al., Clinica Terapeutica, 145:445-451 (1993)); ヨシトミら(Yoshitomi et al., Chem. Pharm. Bull., 40:1902-1905 (1992)); トーマラ(Thoma et al., Pharmazie, 46:331-336 (1991)); モリシタ(Morishita et al., Drug Design and Delivery, 7:309-319 (1991)); およびリン(Lin et al., Pharmaceutical Res., 8:919-924 (1991)),いずれも引用することにより、それらの全体が本明細書に編入される〕。

## 【0025】

錠剤は、例えば酢酸フタル酸セルロースまたは酢酸テレフタル酸セルロースのいずれかの添加により耐胃液性としている。

## 【0026】

カプセルは、ペプチドアンタゴニストをゼラチンの硬質または軟質のいずれかの可溶性容器または殻内に包み込んだ固体投与剤型である。カプセル製造に用いられるゼラチンは、コラーゲン様物質から加水分解により得られる。ゼラチンには2種類ある。酸処理により

10

20

30

40

50

ブタ皮膚から得られるタイプA、およびアルカリ処理により骨および動物皮膚から得られるタイプBである。硬質ゼラチンカプセルの使用は、個別の患者に対して最善と考えられる正確な投与レベルにおける単回のペプチドアンタゴニストまたはその組合せの処方の選択を可能とする。硬質ゼラチンカプセルは、一方が他方の上に滑ってはめ込む2部分からなり、これにより完全にペプチドアンタゴニストを包み込んでいる。これらのカプセルには、ペプチドアンタゴニスト、またはペプチドアンタゴニストを含む体胃液性ビーズをカプセルの長い方の端部に入れ、次いでキャップを被せて充填する。硬質ゼラチンカプセルは、主としてゼラチン、F D & C (食品、医薬品および化粧品用) 着色料、および場合により不透明剤、例えば二酸化チタンからなっている。U S P (アメリカ薬局方) は、この目的のゼラチンが、製造の間の分解を防止するために二酸化硫黄0.15% (w/v) を含むことを認めている。

#### 【0027】

本発明の範囲内で、小腸デリバリーのための経口投与組成物は、またペプチドアンタゴニストが胃内で胃液により著しく不活性化されることを防ぎ、これによりペプチドアンタゴニストを小腸内に活性形で到達させるための水性緩衝剤を含む液状組成物も含む。本発明で使用できるこのような水性緩衝液の例には、炭酸水素塩緩衝液 (pH 5.5 ~ 8.7、好ましくは約7.4) が含まれる。

#### 【0028】

経口投与組成物が液状組成物である場合には、組成物を投与の直前に調製して、安定性の問題を最小化することが好ましい。この場合に、液状組成物は、凍結乾燥したペプチドアンタゴニストを水性緩衝液中に溶解させて調製できる。

#### 【0029】

ペプチドアンタゴニストは、血液脳関門の損傷を抑制するために使用できる。従って、本発明のペプチドアンタゴニストは、例えば血液脳関門の損傷に関連する状態の処置に有用である。このような状態の例には、浸透性損傷、例えば脳虚血、卒中または脳水腫、高血圧、二酸化炭素、けいれん発作、化学毒素、尿毒症(腎不全)、髄膜炎、脳炎、脳脊髄炎、例えば感染性(ウイルス性(SRV、HIV、など)、または細菌性(TB、インフルエンザ菌(H. influenzae)、髄膜炎菌、など)またはアレルギー性、腫瘍、外傷性脳損傷、放射線脳損傷、未熟症および核黄疸、脱髄疾患、例えば多発性硬化症またはギラン・パレー症候群が含まれる。

#### 【0030】

従って、別の態様では、本発明は、血液脳関門の損傷に関連する状態の処置であって、このような処置を必要とする患者に対して、ゾヌリンのペプチドアンタゴニストの薬剤的に有効量を投与することを含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、アミノ酸配列番号35を含んでなり、該ペプチドアンタゴニストが、該患者の脳内の閉鎖帯毒素受容体に結合するが、しかし該脳内の密着結合の開放を生理学的に調整はしない方法に関する。

#### 【0031】

この目的には、ペプチドアンタゴニストは、脳へのデリバリーのために、静脈内投与組成物として投与できる。このような組成物は、当該技術分野では周知であり、組成物は、一般に生理学的希釈剤、例えば蒸留水または0.9% (w/v) NaClを含んでなる。

#### 【0032】

使用されるペプチドアンタゴニストの薬剤的有効量は、本発明には重要ではなく、処置される疾患または状態、ならびに処置される患者の年齢、体重および性別に応じて変化する。一般に、胃腸炎症の抑制または血液脳関門の損傷の抑制、例えばゾヌリン生理活性の抑制のために本発明に使用されるペプチドアンタゴニストの量は、約 $7.5 \times 10^{-6}$ M ~  $7.5 \times 10^{-3}$ M、好ましくは約 $7.5 \times 10^{-6}$ M ~  $7.5 \times 10^{-4}$ Mの範囲内である。例えば腸内または血液内でこの最終濃度に達するために、本発明の単回経口投与組成物中のペプチドアンタゴニストの量は、一般に約1.0 μg ~ 1000 μg、好ましくは約1.0 μg ~ 100 μgである。

#### 【0033】

10

20

30

40

50

ペプチドアンタゴニストは、また当該技術分野で周知の技術を用いてゾヌリンに対して特異的に結合したポリクローナルまたはモノクローナル抗体のアンタゴニストを得るための免疫源としても使用できる〔アブラムズ(Abrams, Methods Enzymol., 121:107-119 (1986))〕。これらの抗体は、他方では体組織または液内のゾヌリンのアッセイ、またはゾヌリンのアフィニティー精製、あるいは、ゾヌリンを結合するために、そしてこれによりゾヌリン活性を抑制、例えば胃腸炎症の抑制のためまたは血管脳関門の損傷を抑制するために使用できる。

#### 【0034】

下記の実施例は、説明の目的のためのみに提供するものであり、いかなる意味でも本発明の範囲の限定を意図するものではない。

10

#### 【0035】

##### 実施例 1

###### ZOTの精製

プラスミド p Z 1 4 を用いて形質転換したコレラ菌株 C V 1 1 0 [ミハルスキーラ(Michałski et al., Infect. Immun., G1:4462-4468 (1993))] を培養して得られた上清画分 5 0 0 0 m l を、10 kDa の分子量カットオフを有する層流(Lamina flow) フィルターを用いて 1 0 0 0 倍濃縮した。コレラ菌 z o t 遺伝子を含む p Z 1 4 の構造は、なかでも W O 9 6 / 3 7 1 9 6 中に詳細に記載されている。得られた上清を次いで 8 . 0 % (w/v) SDS - PAGE で処理する。タンパク質バンドは、SDS - PAGE ゲルのクーマシーブルー染色により検出された。プラスミド p T T Q 181 を用いて形質転換した株 S V D 1 1 0 [アマーシャム(Amersham, Arlington Hights, IL)] からの対照上清を同様の処理したものと比較すると、ZOT に相当するタンパク質バンドは検出できなかった。従って、z o t 遺伝子が p Z 1 4 内で高度に誘導可能で強力な tac プロモーターの後に位置していたとしても、1 0 0 0 倍濃縮した p Z 1 4 上清中のタンパク質のレベルは、クーマシーブルー染色 SDS - PAGE ゲルによってはまだ検出できなかった。

20

#### 【0036】

###### A . M B P - Z O T

産生される ZOT の量を増加させるために、z o t 遺伝子をマルトース結合タンパク質(以後「MBP」と呼ぶ)遺伝子を有するフレーム内に融合させて、MBP - ZOT タンパク質を創成した。

30

#### 【0037】

z o t 遺伝子を大腸菌の m a l E 遺伝子に融合させて ZOT を発現および精製するために、MBP ベクター p M A L - c 2 [バイオラブ(Biolab)] を使用した。この構築物は、強力で誘導可能な tac プロモーター、および m a l E 翻訳開始シグナルを用いてクローニングされた z o t 遺伝子の高レベル発現をもたらした。ベクター p M A L - c 2 は、m a l E シグナル配列の正確な欠失を有し、これは融合タンパク質の細胞質発現に導く。融合タンパク質の単離を容易にするために、MBP に対するアフィニティクロマトグラフィー精製を用いた(バイオラブ)。

#### 【0038】

さらに具体的には、ベクター p M A L - c 2 を、( m a l E 遺伝子の 3' 末端で切断する ) E c o R I を用いて線状化し、クレノウ断片を用いて充填(fill in) し、( p M A L - c 2 ポリリンカー中に单一部位を有する) X b a I を用いて消化した。ZOT をコードする o r f を、プラスミド p B B 2 4 1 [ボードリーら(Baudry et al., Infect. Immun., 60:428-434 (1992))] からサブクローニングした。プラスミド p B B 2 4 1 を B s s H I I を用いて消化し、クレノウ断片を用いて充填し、そして X b a I を用いて消化した。次いで、平滑 X b a I 断片を p M A L - c 2 内にサブクローニングしてプラスミド p L C 1 0 - c が得られた。両方の挿入物、およびベクターは平滑で粘着性の末端を有しているので、正しい配向が、挿入物の 5' 末端と融合させた m a l E の 3' 末端を伴って得られた。次いで p L C 1 0 - c を大腸菌株 D H 5 内にエレクトロポレーションした。p B B 2 4 1 内で、B s s H I I 制限部位は z o t o r f 内にある。従って、ZOT のアミノ酸

40

50

1 - 8 は、 M B P - Z O T 融合タンパク質中では欠失している。

【 0 0 3 9 】

M B P - Z O T 融合タンパク質を精製するために、グルコース 0 . 2 % ( w / v ) およびアンピシリン 1 0 0  $\mu$  g / m l を含むルリア・ベルタニ(Luria Bertani) プロス 1 0 m l に、 p C L 1 0 - c を含む單一コロニーを接種し、そして 3 7 で振とうしながら一晩インキュベーションした。カルチャーと同じ新しい培地 1 . 0 m l 中で 1 : 1 0 0 に薄め、そして 3 7 で振とうしながら、約 1 . 0  $\times$  1 0 <sup>8</sup> 個(細胞) / m l まで増殖させた。次いで、 0 . 2 mM IPTG を加えて M B P - Z O T 発現を誘導させ、そしてカルチャーを 3 7 でさらに 3 時間インキュベーションした。次いで細菌をペレット化し、 2 0 mM トリス - H C l 、 0 . 2 M N a C l 、 1 . 0 mM E D T A 、 1 0 mM 2 - M E 、 1 . 0 mM N a N <sub>3</sub> を含んでなる氷冷「カラム緩衝液」 2 0 m l 中に再懸濁させた。細菌懸濁液をフレンチ・プレス処理により溶菌させ、 3 0 分間、 1 3 , 0 0 0 g で 4 において回転させた。上清を集め、カラム緩衝液を用いて 1 : 5 に薄め、カラム緩衝液を用いてあらかじめ平衡化してあったアミロース樹脂(バイオラブズ、 M B P 融合精製系)の 1  $\times$  1 0 カラム内に負荷した。カラム緩衝液 5 容積を用いてカラムを洗浄した後に、カラム緩衝液中の 1 0 mM マルトース 1 0 m l を負荷して、 M B P - Z O T 融合タンパク質を溶出させた。カルチャー 1 . 0 m l からの代表的な収率は、タンパク質 2 ~ 3 m g であった。

【 0 0 4 0 】

次いで、精製した M B P - Z O T 融合タンパク質の M B P 融合相手を、 M B P - Z O T 2 0  $\mu$  gあたりに X a 因子プロテアーゼ(バイオラブズ) 1 . 0  $\mu$  g を用いて切断した。 X a 因子プロテアーゼは、 Z O T のアミノ末端の直前で切断する。このようにして得られた Z O T タンパク質を 8 . 0 % ( w / v ) S D S - P A G E ゲル上に通し、電気分離室〔シユライヒヤー・アンド・シュル(Schleicher & Schuell, Keene, NH) 〕を用いてゲルから電気溶出させた。

【 0 0 4 1 】

ユシング室を用いて試験すると、得られた精製 Z O T は R t の投与量依存性低下を誘導し、その E D <sub>50</sub> は 7 . 5  $\times$  1 0 <sup>-8</sup> M であった。

【 0 0 4 2 】

B . 6 x H i s - Z O T

ディープ・ヴェント・ポリメラーゼ(ニュー・イングランド・バイオラブズ)(Deep Vent Polymerase(New England Biolabs)) を用いて、 p B B 2 4 1 プラスミド(ボードリーら、上記) D N A を鋳型として、 P C R により z o t 遺伝子を增幅した。使用した正方向および逆方向プライマーは、それぞれ 5 ' - C G G G A T C C C G T A T G A G T A T C T T T - 3 ' (配列番号 3 9 ) および 5 ' - C C C A A G C T T G G G T C A A A A T A T A C T - 3 ' (配列番号 4 0 ) であった。これらのオリゴヌクレオチドの 5 ' テイルは、 B a m H I および H i n d I I I 制限部位をそれぞれ含んでいた。得られたアンプリコン( 1 . 2 k b )を 8 . 0 % ( w / v ) アガロースゲル電気泳動により分析し、エキストリーム・スピinn・カラム(ピアス)(Xtreme spin column (Pierce)) を用いて塩および遊離ヌクレオチドから精製した。次いで、上記の 2 個の制限酵素を、精製アンプリコンを消化するために使用し、次いで、得られた消化アンプリコンを、あらかじめ B a m H I および H i n d I I I を用いて消化したベクター p Q E 3 0 [キアゲン(Qiagen) ] 中に挿入してプラスミド p S U 1 1 3 が得られた。 p Q E 3 0 は、 6 個のポリ - ヒスチジン・タグ( 6 x H i s ) を有する組み替えタンパク質の高レベル発現を与える発現ベクターである。従って、プラスミド p S U 1 1 3 の発現産生物は、 6 x H i s - Z O T 融合タンパク質である。次いで、 p S U 1 1 3 を大腸菌 D H 5 に入れて形質転換した。

【 0 0 4 3 】

6 x H i s - Z O T 融合タンパク質を精製するために、得られた形質転換大腸菌を一晩、 3 7 で、グルコース 2 . 0 % ( w / v ) 、カナマイシン 2 5  $\mu$  g / m l およびアンピシリン 2 0 0  $\mu$  g / m l を含むルリア・ベルタニ・プロス 1 5 0 m l 中で、 A <sub>600</sub> が約 1 . 1 0 となるまで増殖させた。次いで、一晩経過した培地を、グルコース 2 . 0 % ( w / v )

)、カナマイシン 25 μg / ml およびアンピシリン 200 μg / ml を含むルリア・ベルタニ・プロス 1000 ml 中に加え、約 3 時間、37 度で強く攪拌して、A<sub>600</sub> が約 0.7 ~ 0.9 となるまでインキュベーションした。次いで、IPTG を最終濃度 2.0 mM となるように加え、5 時間、37 度で増殖を続けさせた。次いで、4000 × g で 20 分間遠心分離して細胞を収穫し、細胞を 6.0 M GuHCl、0.1 M リン酸ナトリウム、および 0.01 M トリス-HCl (pH 8.0) を含む緩衝液 A の 5.0 ml / g (湿潤重量) 中に再懸濁し、そして 1 時間、室温で攪拌した。次いで、混合物を 10,000 × g で 30 分間、4 度で遠心分離し、そして得られた上清にスーパークローラー (SUPERFLOW) 樹脂 (キアゲン) の 50% スラリー 4.0 ~ 5.0 ml / g (湿潤重量) を加え、攪拌を 1 時間、室温で続けた。得られた樹脂を 1.6 × 8.0 カラム内に負荷し、次いでこれを順番に緩衝液 A、8.0 M 尿素、0.1 M リン酸ナトリウム、および 0.01 M トリス-HCl (pH 8.0) を含む緩衝液 B および 8.0 M 尿素、0.1 M リン酸ナトリウム、およびおよび 0.01 M トリス-HCl (pH 6.3) を含む緩衝液 C を用いて洗浄した。  
10 それぞれの洗浄は、流出物の A<sub>600</sub> が 0.01 未満となるまで行った。6 × His-ZOT 融合タンパク質を、250 mM イミダゾールを含む緩衝液 C 20 ml を用いてカラムから溶出させた。次いで、6 × His-ZOT 融合タンパク質を含む画分を、デーヴィス (Davis, Ann, N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964)) により記載された方法を用いて、SDS-PAGE により検査し、クーマシープルーを用いてゲルを染色した。6 × His-ZOT 融合タンパク質を含む画分を 8.0 M 尿素に対して透析し、一緒にし、次いで PBS 中で 100 倍に薄めた。次いで、スーパークローラー 樹脂の 50% スラリー 4.0 ml を加え、2 時間、室温で攪拌し、得られた樹脂を 1.6 × 8.0 カラム内に負荷し、これを次いで PBS 50 ml を用いて洗浄した。6 × His-ZOT 融合タンパク質をカラムから 250 mM イミダゾールを含む PBS 10 ml を用いて溶出させた。得られた溶出物を PBS に対して透析し、そして 6 × His-ZOT 融合タンパク質を上記のようにして SDS-PAGE により検査した。  
20

## 【0044】

## 実施例 2

アフィニティー精製した抗 ZOT 抗体の產生

特異性抗血清を得るために、キメラ性グルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) - ZOT タンパク質を発現させ、精製した。  
30

## 【0045】

さらに具体的には、プラスミド pBB241 (ボーンドリー、上記) を鋳型 DNA として用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により zot orf を增幅するために、オリゴヌクレオチドプライマーを使用した。正方向プライマー (TCATCACGGC GC GCCCAGG、配列番号 25) は zot orf のヌクレオチド 15 - 32 に相当しており、そして逆方向プライマー (GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT、配列番号 26) は cta orf の 5' 末端に相当していた。従って、ZOT のアミノ酸 1 - 5 は、得られた融合タンパク質中に欠失していた。増幅産生物を、pGEX-2T (ファルマシア (Pharmacia, Milwaukee, WI)) 中の GST 遺伝子の末端に位置するポリリンカー (Sma I 部位) 内に挿入した。pGEX-2T は、二ホンジュウケツキュウチュウ (Schistosoma japonicum) の GST との融合タンパク質としてクローニングした遺伝子を発現する融合タンパク質発現ベクターである。融合遺伝子は、tac プロモーターの制御下にある。IPTG により誘導されると、脱抑制が起き、そして GST タンパク質が発現される。  
40

## 【0046】

pLC11 と名付けられた得られた組み替えプラスミドを大腸菌 DH5 中でエレクトロポレーションした。GST-ZOT 融合タンパク質を精製するために、アンピシリン 100 μg / ml を含むルリア・ベルタニ・プロス 10 ml に pLC11 を含む単一コロニーを接種し、一晩、37 度で振とうしながらインキュベーションした。カルチャーパーと同じ新しい培地を用いて 1 : 100 に薄め、37 度で振とうしながら約 1.0 × 10<sup>8</sup> 個 (細胞  
50

) / m lまで増殖させた。次いで、0.2 mM IPTGを加えてGST-ZOT発現を誘導させ、そしてカルチャーを37でさらに3時間インキュベーションした。次いで細菌をペレット化し、氷冷PBS(pH 7.4)20モル中に再懸濁し、フレンチプレス法を用いて溶菌させた。GST-ZOT融合タンパク質は、細菌ペレット画分と一緒に沈降したので、これらの条件下で可溶性ではない。従って、ペレットを、0.00625トリス-HCl(pH 6.8)、0.2M 2-ME、2.0%(w/v)SDS、0.025%(w/v)プロモフェノール・ブルーおよび10%(w/v)グリセロールを含むラエムリ(Laemli)溶菌緩衝液中に再懸濁し、そして8.0%(w/v)PAGE-SDSゲル上で電気泳動を行い、クーマシー・ブリリアント・ブルーを用いて染色した。融合タンパク質に相当する約70kDa(GSTの26kDa+ZOTの44kDa)のバンドが、電気分離室(シュライヒャー・アンド・シュル(Keene, NH))を用いてゲルから電気溶出された。  
10

#### 【0047】

得られた溶出タンパク質(10~20μg)の10μgを等容積のフロイント完全アジュバント(Freund's complete adjuvant)と混合させてラビットに注射した。4および8週間後に、2回のブースター投与をフロイント完全アジュバントを用いて投与した。1カ月後に、ラビットを放血した。

#### 【0048】

特異性抗体の産生を測定するために、ZOT  $10^{-10}$ Mを、2種の融合タンパク質MBP-ZOTおよびGST-ZOTと一緒に、ナイロン膜上に転移させ、ラビット抗血清の1:5000希釈液と一緒にして、一晩、4で、温かく振とうしてインキュベーションした。次いでフィルターを15分間、4回、0.05%(v/v)ツイーン(Tween)20を含むPBS(以後「PBS-T」と呼ぶ)を用いて洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させたヤギ抗ラビットIgGの1:30,000希釈液と一緒に、2時間、室温でインキュベーションした。フィルターを再び15分間、4回、0.1%(v/v)ツイーンを含むPBSを用いて洗浄し、免疫反応性バンドを強化化学蛍光(enriched chemiluminescence)〔アマーシャム(Amersham)〕を用いて検出した。  
20

#### 【0049】

免疫プロット上で、ラビット抗血清は、ZOT、ならびにMBP-ZOTおよびGST-ZOT融合タンパク質を認識するが、しかしMBP陰性対照体は認識しないことが見いだされた。  
30

#### 【0050】

さらに、適合する抗ZOT抗体の産生を確認するために、ユシング室内で中和実験を行った。pZ14上清を用いて37で60分間プレインキュベーションをすると、ZOT特異性抗血清(1:100希釈)は、ユシング室内に取り付けられたラビット回腸に対してZOTにより誘導されたRtの低下を完全に中和できた。

#### 【0051】

次いで、抗ZOT抗体を、MBP-ZOTアフィニティカラムを用いてアフィニティー精製した。さらに具体的には、MBP-ZOTアフィニティカラムは、一晩、室温で上記の実施例1に記載のようにして得られた精製MBP-ZOT 1.0mgを前活性化したゲル(pre-activated gel)〔アミノリンク(Aminolink)、ピアス〕に不動体化して調製された。カラムをPBSを用いて洗浄し、次いで抗ZOTラビット抗血清2.0mlを負荷した。90分間、室温で90分間インキュベーションした後に、カラムをPBS 14mlを用いて洗浄し、そして特異性抗ZOT抗体を50mMグリシン(pH 2.5)、150mM NaCl、および0.1%(v/v)トリトンX-100を含む溶液4.0mlを用いてカラムから溶出させた。溶出画分1.0mlのpHを1.0N NaOHを用いて直ちに中和した。  
40

#### 【0052】

実施例3

ゾヌリンの精製

ZOTは、特異性外皮表面受容体と相互作用し、引き続いて、 $t_j$ 透過性を調節する事象の複雑な細胞内力スケードの活性化を起こすという、米国特許(US)出願番号08/803,364、出願1997年2月20日における観察に基づいて、本発明では、ZOTがヒト $t_j$ の生理学的モジュレーターの効果を模倣することを前提とした。米国特許(US)出願番号08/859,931、出願1997年5月21日では、ZOTおよびその生理学的類似体(ゾヌリン)は、機能的および免疫学的に関連することを前提とした。従って、本明細書中に記載のように、アフィニティー精製抗ZOT抗体およびユシング室アッセーを組み合わせて、種々のラビットおよびヒト組織中のゾヌリンの探索に使用した。

#### 【0053】

##### B. ラビット組織

10

最初に、ラビット腸からゾヌリンを精製した。組織をPBS中のホモジナイゼーションにより分断した。次いで、得られた細胞調製物を40,000 rpmで30分間遠心分離し、上清を集めて冷凍乾燥した。得られた冷凍乾燥産物を引き続いてPBS(10:1(v/v))中で再構築し、0.45mm膜フィルターを通して濾過し、セファデックス(Sephadex)G-50クロマトグラフィーカラム上に負荷し、PBSを用いて溶出させた。次いで、カラムから得られた画分2.0mlを、上記の実施例2に記載のようにして得られたアフィニティー精製抗ZOT抗体を用いて標準ウエスタン免疫プロット試験を行った。

#### 【0054】

陽性画分、すなわち、抗ZOT抗体が結合した画分を一緒にし、冷凍乾燥し、BS(1:1(v/v))中で再構築し、Q-セファロースカラムを通す塩勾配クロマトグラフィーを行った。塩勾配は、50mMトリス緩衝液(pH8.0)中の0~100%(w/v)NaClであった。20ml画分5個を採取し、上記の実施例2に記載のようにして得られたアフィニティー精製抗ZOT抗体を用いて標準ウエスタン免疫プロット試験を行った。画分1(20%(w/v)NaCl)が、ウエスタン免疫プロット試験で陽性と認められた唯一の画分であった。

20

#### 【0055】

Q-セファロースカラムから得られた画分を、次いで、CaCO<sub>2</sub>単層、およびラビット小腸上におけるこれらの組織抵抗効果についてユシング室内で試験した。

#### 【0056】

さらに具体的には、CaCO<sub>2</sub>細胞を、10%(v/v)ウシ胎児血清、ペニシリソ40μg/1およびストレプトマイシン90μg/1を含むダルベッコ(Dulbecco)の変性イーグル培地(modified Eagle's medium)中、37℃で95%O<sub>2</sub>/5%C O<sub>2</sub>の加湿雰囲気下、細胞培養フラスコ(ファルコン(Falcon))内で増殖させた。細胞は、集密度70~80%に達すると、5日毎にトリプシン処置の後、1:5の表面比で継代培養した。この試験に使用した細胞の継代数は、15から30の間に変動した。

30

#### 【0057】

CaCO<sub>2</sub>単層は、ポリスチレン環(直径6.4mm、トランスクエル・コスター(Transwell Coster))にしっかりと固定してある組織-カルチャー-処理ポリカーボネット・フィルター上に集密化するまで(表面比1:12.5でプレート適用後12~14日)増殖させた。フィルターは、改造ユシング室のしょう膜および粘膜コンパートメントを分離しているしっかりと固定した挿入物中に設置され、そして実験は、ユシング室中のラビット腸に対するファサノらの記載(Fasano et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5242-5246(1991))のようにして行った。結果を図1に示す。

40

#### 【0058】

図1に記載のように、ゾヌリン陰性画分と比較して、ゾヌリン含有画分は、CaCO<sub>2</sub>単層抵抗の著しい減少を誘導した。

#### 【0059】

次いで、頸部脱臼により屠殺した2~3kgの成体雄ニュージーランド白色ラビットからの回腸を用いて、ユシング室アッセーを行った。回腸の20cm断片を取り出し、腸内容物がなくなるまでリーンスし、腸間膜境界に沿って開き、筋肉およびしょう膜層を外した。

50

このようにして調製した粘膜シート8枚をルーサイト(lucite)ユシング室(開口1.12cm<sup>2</sup>)内に取り付け、電圧クランプ装置(EVC 4000WPI、サラトサ(Sarata, FL))に接続し、53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mMマンニトル、1.69mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.25mM CaCl<sub>2</sub>、1.1mM MgCl<sub>2</sub>、および25mM NaHCO<sub>3</sub>を含む新しく調製したリングル液に浸漬した。定温循環ポンプに接続した水ジャケット容器を用いて浸漬溶液を37℃に保持し、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>を通気した。

#### 【0060】

ラビット腸から精製したゾヌリン100μlを粘膜側に加えた。電圧差(PD)を10分毎に測定し、短絡電流(Isc)および組織抵抗(Rt)をファサノら(上記)の記載の10ようにして算出した。組織の変動性のために、データは、Rt = (時間×におけるRt) - (時間0におけるRt)として算出した。その結果を図2に示す。

#### 【0061】

図2に記載のように、ゾヌリン陰性画分と比較して、ゾヌリン含有画分は、ラビット小腸抵抗の著しい減少を誘導した。この効果は、ゾヌリンが容器から取り出されると完全に逆転できる。

#### 【0062】

ゾヌリン陽性画分も8.0%(w/v)SDS-PAGEで処理し、次いで抗ZOT抗体を用いてウエスタン免疫プロット試験を行った。SDS-PAGEにより分離されたタンパク質バンドを、次いで、(3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパンスルホン酸)10×の100ml、メタノール100ml、蒸留水800mlを含むCAPS緩衝液を用いてPVDFフィルター(ミリポア(Millipore))上に移行させた。ウエスタン免疫プロット試験により検出された単一バンドに配置したタンパク質は、約47kDaのみかけ分子量を有する。このバンドをPVDFフィルターから切り取り、フンカピラー:「タンパク質ミクロ特性試験方法」(Hunkapiller, in: Methods of Protein Microcharacterization, Ed. Shibley, Chapters 11-12, Humana Press, 315-334 (1985))に記載のようにして、パーキン・エルマーの応用生物システム装置(Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus)モデル494を用いてN末端配列決定した。ラビット腸から精製したゾヌリンのN末端配列を配列番号27に記載してある。

#### 【0063】

ラビットゾヌリンN末端配列を他のタンパク質配列とFASTサーチ分析により比較した。この分析の結果は、ラビットゾヌリンのN末端配列が、ヒト(Homosapiens)からのtauタンパク質のN末端配列に対して、85%が一致、また100%が類似であることを明らかにした。

#### 【0064】

その結果、ラビットゾヌリンおよびtauが同じ部分であるか否かを決定するために、ユシング室で交差中和(cross neutralization)実験を行った。さらに具体的には、非処理または抗tau抗体(希釈1:10)(シグマ(Sigma))と一緒に37℃で60分間ブレインキュベーションしたいずれかのラビットゾヌリン10μl/mlをラビット回腸の粘膜側に、加えた。抗ZOT抗体(希釈1:10)(実施例2)と一緒にブレインキュベーションしたラビットゾヌリン10μl/mlおよび精製tau(シグマ)0.4μl/mlの両方を対照として使用した。結果を図3に示す。

#### 【0065】

図3に記載のように、ラビットゾヌリンは組織抵抗の典型的な低下を誘導し、これはタンパク質をユシング室から取り出すと直ちに回復できる。この活性は、抗ZOT抗体を用いて前処理すると完全に中和されるが、抗tau抗体を用いて前処理すると中和されない。一方、tauタンパク質に暴露された組織中では組織抵抗に対して著しい効果はない。

#### 【0066】

ラビットゾヌリンはまた、種々のその他のラビット組織、すなわちラビットの心臓、脳、筋肉、胃、脾臓、肺、腎臓、ならびに種々のラビットの腸の部分、例えば遠位空腸(distal

10

20

30

40

50

I jejunum)、近位空腸(Proximal jejunum)、回腸、盲腸および結腸内でも検出された。すなわち、これらのラビット組織を上記のようにラビット腸と同様の方法で処理し、8.0% (w/v) SDS-PAGEで処理し、次いで上記の実施例2に記載のようにして得られたアフィニティー精製抗ZOT抗体を用いるウエスタンプロット試験により、大きさが約47kDaの単一バンドが、試験したこれらのすべての組織中で検出された。

#### 【0067】

##### B. ヒト組織

ゾヌリンはまた、腸、心臓、および脳を含む数種のヒト組織からも精製された。胎児および成人の組織の両方を使用した。組織をPBS中でホモジナイズして分断した。得られた細胞調製物を次いで40,000rpmで30分間遠心分離し、上清を集めて冷凍乾燥した。得られた冷凍乾燥産物を引き続いてPBS(10:1(v/v))中で再構築し、0.45mm膜フィルターを通して濾過し、セファデックスG-50クロマトグラフィーカラム上に負荷し、そしてPBSを用いて溶出させた。次いで、カラムから得られた2.0mL画分を、上記の実施例2に記載のようにして得られたアフィニティー精製抗ZOT抗体を用いて標準ウエスタン・プロット試験を行った。

#### 【0068】

陽性画分、すなわち抗ZOT抗体が結合しているものを一緒にし、冷凍乾燥し、PBS(1:1(v/v))中で再構築し、Q-セファロースカラムを通す塩勾配クロマトグラフィーで分析した。塩勾配は、50mMトリス緩衝液(pH7.4)中で0~100%(w/v)NaClであった。20mL画分5個を採取し、上記の実施例2に記載のようにして得られたアフィニティー精製抗ZOT抗体を用いて標準ウエスタン・プロット試験を行った。画分1(20%(w/v)NaCl)は、大きさ47kDaの単一バンドをウエスタン・プロット試験で示した。画分2(40%(w/v)NaCl)は、追加して大きさ35kDaおよび15kDaの2バンドをウエスタン・プロット試験で示した。画分3(60%(w/v)NaCl)および画分4(80%(w/v)NaCl)は、35kDaおよび15kDaのバンドのみを示した。これらの結果は、ゾヌリンが、多分使用したヒト組織中に存在するプロテアーゼにより分解を受け、また分解生成物は、完全タンパク質(holoprotein)と比較して、より高い塩濃度においてカラムから溶出することを示唆している。

#### 【0069】

Q-セファロースカラムから得られた画分1(ヒト心臓、腸および脳組織から)および画分4(心臓組織から)を、次いでユシング室中におけるラビット腸およびアカゲザル腸の両方に対するこれらの組織抵抗効果について試験した。

#### 【0070】

ユシング室試験は、ニュージーランド白色ラビットの2~3kg成体雄、またはアカゲザルの5~6kg成体雄のいずれかからの空腸、回腸または結腸を含む種々の腸管を用いて行った。動物を屠殺した後、空腸、回腸、および結腸を含む腸の種々の断片を取り出し、腸内容物がなくなるようにリソスし、腸間膜境界に沿って開き、そして筋肉および粘膜層を除いた。このように調製した粘膜シート8枚(空腸3枚、回腸3枚、および結腸2枚)を次いでルーサイトユシング室(開口1.12cm<sup>2</sup>)内に取り付け、電圧クランプ装置(EVC4000WPI、サラトサ、FL)に接続し、53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mMマンニトール、1.69mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.25mM CaCl<sub>2</sub>、1.1mM MgCl<sub>2</sub>、および2.5mM NaHCO<sub>3</sub>を含む新しく調製したリングル液に浸漬した。定温循環ポンプに接続した水ジャケット容器を用いて、浸漬溶液を37℃に保持し、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>を通気した。

#### 【0071】

ヒト心臓から精製したゾヌリンの画分1またはヒト脳から精製したゾヌリンの画分1、またはヒト腸から精製したゾヌリンの画分1またはヒト心臓から精製したゾヌリンの画分4の100μlを粘膜側に加えた。電圧差(PD)を10分ごとに測定し、そして短絡電流

10

20

30

40

50

(S C) および組織抵抗 (R t) をファサノら (上記) の記載のようにして算出した。データは、図 4 A および 4 B に対して R t として算出したが、しかし組織の変動性のために、データは、図 5 A および 5 B に対しては  $R t = (時間 x における R t) - (時間 0 における R t)$  として算出した。結果を図 4 A および 4 B (サル腸) および図 5 A および 5 B (ラビット腸) に示す。

#### 【0072】

図 4 A および 4 B に示すように、ヒト心臓および腸から精製したゾヌリン (画分 1) は、P B S 隅性対照と比較して、サル腸抵抗内に著しい低下を誘導した (空腸 (図 4 A) および回腸 (図 4 B) の両方)。ヒト心臓またはヒト腸から精製されたゾヌリンを結腸内で試験すると、著しい変化は観察されなかった。図 4 A および 4 B は、またヒト脳から精製されたゾヌリン (画分 1) を試験すると、サル空腸 (図 4 A) および回腸 (図 4 B) の両方に対して著しい効果は観察されなかったことを示している。ヒト心臓から精製されたゾヌリンの画分 4 も、サル小腸組織抵抗に著しい低下を誘導した。

10

#### 【0073】

図 5 A および 5 B に示すように、ラビット腸を用いると、同様の結果が得られた。すなわち、ヒト心臓から精製したゾヌリン (画分 1) は、ラビット空腸 (図 5 A) およびラビット回腸 (図 5 B) の両方の組織抵抗に著しい効果を示したが、結腸に対しては示さなかった。図 5 A および 5 B は、またヒト脳から精製されたゾヌリン (画分 1) を試験すると、ラビット空腸 (図 5 A) およびラビット回腸 (図 5 B) の両方に対して、著しい効果は観察されなかったことを示している。

20

#### 【0074】

ゾヌリンがインスリンの経口デリバリーを増加させるか否かを確定するために、ラビット腸を用いるインビトロモデル試験を行った。要約すると、成体雄ニュージーランド白色ラビット (2 ~ 3 kg) を頸部脱臼により屠殺した。ラビット小腸 (空腸または回腸のいずれか) の断片を取り出し、腸内容物がなくなるまでリーンスし、腸間膜境界に沿って開き、そして筋肉およびしょう膜層を外した。このように調製した粘膜のシート 8 枚を次いでルーサイトユシング室 (開口  $1.12 \text{ cm}^2$ ) 内に取り付け、電圧クランプ装置 (EVC 4000 WPI、サラトサ、FL) に接続し、 $5.3 \text{ mM NaCl}$ 、 $5.0 \text{ mM KC1}$ 、 $30.5 \text{ mM マンニトール}$ 、 $1.69 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $1.25 \text{ mM CaCl}_2$ 、 $1.1 \text{ mM MgCl}_2$ 、および  $2.5 \text{ mM NaHCO}_3$  を含む、新しく調製したリングル液に浸漬した。定温循環ポンプに接続した水ジャケット容器を用いて、浸漬溶液を 37 度に保持し、 $95\% O_2 / 5\% CO_2$  を通気した。電圧差 (PD) を測定し、短絡電流 (I sc) および組織抵抗 (R t) を算出した。一旦組織が定常状態に達すると、その抵抗に基づいて組み合わせた対となった組織を  $10^{-11} \text{ M}^{1/25} \text{ I}$  - インスリン (アマーシャム(Amersham, Arlington Hights, IL);  $2.0 \mu\text{Ci} = 10^{-12} \text{ M}$ ) を単独または画分 1 からの心臓ゾヌリン  $100 \mu\text{l}$  の存在下で管腔に(luminally) 暴露した。基線値を確定するために、しょう膜側から  $1.0 \text{ ml}$  試料、粘膜側から  $50 \mu\text{l}$  試料が直ちに得られた。しょう膜側からの試料を、次いで 20 分間隔で以後 100 分間にわたって採取した。

30

#### 【0075】

心臓ゾヌリンが、空腸内 ( $0.058 \pm 0.003 \text{ fmol/cm}^2 \cdot \text{分}$  対  $0.12 \pm 0.005 \text{ fmol/cm}^2 \cdot \text{分}$ 、それぞれ非処理 対 ゾヌリン処理組織、 $p = 0.001$ ) および回腸内 ( $0.006 \pm 0.0002 \text{ fmol/cm}^2 \cdot \text{分}$  対 ゾヌリン処理組織、 $p = 0.05$ ) の両者で、時間依存的にインスリンの腸吸収を増加させることができた。

40

#### 【0076】

ヒト心臓から精製されたゾヌリンの画分 1、ヒト腸から精製されたゾヌリンの画分 1 およびヒト脳から精製されたゾヌリンの画分 1 も、 $8.0\% (w/v)$  SDS-PAGE 処理を行い、次いで上記の実施例 2 に記載のようにして抗 ZOT 抗体を用いてウエスタン免疫プロット試験を行った。SDS-PAGE により分離されたタンパク質バンドを、次いで、

50

(3-[シクロヘキシリアミノ]-1-プロパンスルホン酸)10×の100ml、メタノール100ml、蒸留水800mlを含むCAPS緩衝液を用いてPVDFフィルター上に移行させた。ウエスタン免疫プロット試験により検出された単一バンドに配列するタンパク質は、約47kDaのみかけ分子量を有していた。このバンドをPVDFフィルターから切り取り、フンカピラー：「タンパク質ミクロ特性試験」中(Hunkapiller, in:Methods of Protein Microcharacterization, Ed. Shibley, Chapters 11-12, Humana Press, 315-334 (1985))に記載のようにして、パーキン・エルマーの応用生物系装置モデル494を用いてN末端配列決定した。成人心臓から精製したゾヌリンのN末端配列を配列番号28に記載しており、成人脳から精製したゾヌリンのN末端配列を配列番号29に記載しており、成人胎児脳から精製したゾヌリンのN末端配列を配列番号36に記載してある。

10

#### 【0077】

成人腸から精製したゾヌリンのN末端配列からの最初の9個のアミノ酸も配列決定し(配列番号31)、そして配列番号28に記載した成人心臓から精製したゾヌリンの最初の9個のアミノ酸と一致することを見いだした(図6参照)。ヒト胎児腸から精製したゾヌリンのN末端配列の最初の20個のアミノ酸も配列決定し: Met Leu Glu Ly  
s Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Glu Pro  
Gly Xaa Ser Asn Arg Leu(配列番号30)であり、配列番号28に示したヒト心臓から精製したゾヌリンのアミノ酸配列とほとんど等しいことを見いだした(図6参照)。

20

#### 【0078】

成人脳から精製したゾヌリンのN末端配列(配列番号29)およびヒト胎児脳からのもの(配列番号36)は、心臓(配列番号28)、胎児腸(配列番号30)および成人腸(配列番号31)のいずれから精製したゾヌリンのN末端とも完全に異なっていた(図6、7参照)。この差異は、上記のように、組織、例えば腸の透過性を決定する際のゾヌリンの組織特異性を説明すると考えられる。

#### 【0079】

心臓、腸、および脳から精製したヒトゾヌリンのN末端配列は、すべてラビット腸から精製したゾヌリンのN末端配列と異なっている(図6)。これらのタンパク質が、タンパク質のtau関連ファミリーの異なるイソ形を表しているか否かを確定するために、ラビットおよびヒトの両者からの組織を8.0%(w/v)SDS-PAGE、次いで抗ZOTまたは抗ZOT抗体を用いるウエスタン免疫プロット試験を行った。抗ZOT抗体により認識されることを見いだされたラビットおよびヒトの両者の組織(脳、腸、および心臓を含む)から精製された47kDaゾヌリンバンドも、抗tau抗体と交差反応することが見いだされた。塩クロマトグラフィーにより得られたヒト脳から精製したゾヌリンの種々の画分も、抗ZOT抗体または抗tau抗体のいずれかを用いてウエスタン免疫プロット試験を行った。抗ZOT抗体は不变46kDaタンパク質および35kDaおよび15kDa断片タンパク質の両者を認識したけれども、抗tau抗体は不变46kDaタンパク質および35kDa断片のみを認識し、抗tau抗体は15kDa断片を認識しなかった。35kDa断片がゾヌリンのN末端またはC末端を含んでいるか否かを確定するために、35kDaバンドのN末端配列を決定し、以下のように見いだした: Xaa Xaa  
Asp Gly Thr Gly Lys Val Gly Asp Leu(配列番号32)。この配列は、不变のヒト脳ゾヌリンのN末端配列(配列番号29)とは異なる。これらの結果は、15kDa断片がゾヌリンのN末端部分であり、一方35kDa断片はゾヌリンのC末端部分であることを示唆している。

30

#### 【0080】

これらを総合すると、これらの結果は、抗tau抗体により認識されるゾヌリンドメインは、タンパク質のC末端に向かっており、ヒトまたはラビットのいずれかの組織からのゾヌリンの種々のイソ形に共通しており(一方、N末端部分は変動することがある)、またタンパク質の透過化作用に多分関係している(tauが引き続く細胞骨格の再配列を伴つ

40

50

て - チューブリンに結合するという観察、およびサル小腸組織抵抗に対する画分 4 の影響に基づいて ) ことを示唆している。

#### 【 0 0 8 1 】

心臓と腸の両方から精製したヒトゾヌリンの N 末端配列を、他のタンパク質配列と B L A S T サーチ分析により比較した。この分析の結果は、ヒトゾヌリンの N 末端配列が、ヒトからの Ig M の変動重鎖(Heavy variable chain)の N 末端配列(配列番号 3 7 )に 9 5 % が一致することを明らかにした。

#### 【 0 0 8 2 】

その結果、心臓から精製したヒトゾヌリンおよびヒト Ig M が、同じ部分であることを決定するために、ヒトゾヌリンの部分消化を行って内部断片入手し、これを次いで配列決定した。

10

#### 【 0 0 8 3 】

さらに具体的には、ヒト心臓から精製したゾヌリンを含む P V D F フィルター 1 . 0 mm を、あらかじめ 0 . 1 % ( w / v ) トルフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いて洗浄し、メタノールを用いてリーンしたプラスチック管内に配置した。 1 0 0 mM トリス ( p H 8 . 2 ) 、 1 0 % ( v / v ) C H<sub>3</sub> C N 、および 1 . 0 % ( v / v ) 脱水素トリトン X - 1 0 0 を含む緩衝溶液 7 5 μ l を加え、そして膜と一緒に 3 7 で 6 0 分間インキュベーションした。次いでトリプシン 1 5 0 n g を加え、さらに 2 4 時間のインキュベーション期間を 3 7 において行った。得られた溶液を 1 0 分間音波処理し、上清をデカンテーションした。次いで 0 . 1 % ( w / v ) T F A 7 5 μ l を加え、溶液をさらに 1 0 分間音波処理し、上清をデカンテーションした。両方の試料を 0 . 5 mm × 2 5 0 m m C<sub>18</sub> カラム、粒径 5 . 0 μ m 、孔サイズ 3 0 0 上に負荷した。 0 . 1 % ( w / v ) T F A から 4 5 % C H<sub>3</sub> C N 水 + 0 . 1 % ( w / v ) T F A の勾配を 2 時間 1 5 分間展開した。ピークを最後に集め、配列決定した。

20

#### 【 0 0 8 4 】

成人心臓から精製したヒトゾヌリンの内部配列は下記であった : L e u   S e r   G l u  
V a l   T h r   A l a   V a l   P r o   S e r   L e u   A s n   G l y   G l y  
( 配列番号 3 3 ) 。

#### 【 0 0 8 5 】

ヒトゾヌリン内部配列を他のタンパク質配列と B L A S T サーチ分析により比較した。この分析の結果は、ヒトゾヌリンの内部配列は、ヒトからの Ig M の変動重鎖のいずれの内部配列とも 0 % の一致であることが明らかになった。

30

#### 【 0 0 8 6 】

上記の実施例 3 の結果は、( 1 ) ゾヌリンが細胞外経路の生理学的モジュレーターであり、( 2 ) ラビットゾヌリンの N 末端配列は、 t a u タンパク質の N 末端配列に高度に相同であり、( 3 ) ゾヌリンおよび t a u は、免疫学的に関連するが機能的には異なる 2 種の明確な部分であり、( 4 ) 心臓および腸から得られたヒトゾヌリンの N 末端配列は、 Ig M の変動領域の重鎖の N 末端配列に高度に相同性であり、( 5 ) ヒトゾヌリンおよび Ig M は、構造的に関連しているがしかし機能的には異なる 2 種の明確な部分であり、そして( 6 ) ゾヌリンは、共通の活性 C 末端配列、および変動する N 末端配列を有する t a u 関連タンパク質のファミリーであることを証明している。

40

#### 【 0 0 8 7 】

#### 実施例 4

##### ゾヌリンのペプチドアンタゴニスト

Z O T 、ヒト腸ゾヌリン(ゾヌリン<sub>i</sub>)およびヒト心臓ゾヌリン(ゾヌリン<sub>h</sub>)がすべて腸〔ファサノら(Fasano et al., Gastroenterology, 112:839 (1997)); ファサノら(Fasan o et al., J. Clin. Invest., 96:710 (1995)) ; および図 1 ~ 5 ] および内皮 t j 上に作用し、またこれらすべての 3 種が、腸内の Z O T 受容体分布と一致する〔ファサノら(1995)上記 ; およびファサノら(1997)上記〕同じ領域効果〔ファサノら(1997)上記 ; および図 1 ~ 5 〕を有する場合には、本発明において、これらの 3 分子が同じ受容体結合部位と相

50

互作用することを前提とした。従って、ZOTおよびヒトゾヌリンの一次アミノ酸構造の比較を、腸tjの調節に関する受容体・リガンド相互作用の絶対的な構造要件に関する洞察を得るために実施した。これらの分子のN末端の分析は、以下の共通モチーフ（図7中で囲んだアミノ酸残基8～15）：非極性（腸に対してはGly、脳に対してはVal）、変動、非極性、変動、非極性、極性、変動、極性（Gly）を明らかにした。8位のGly、12位のVal、13位のGlnのすべては、ZOT、ゾヌリン<sub>i</sub>、ゾヌリン<sub>h</sub>中で高度に保存され（図7参照）、これは腸内の受容体結合機能に対して重要と考えられる。これを確認するために、合成オクタペプチド Gly Gly Val Leu Val Gly Pro Gly（配列番号15）（FZI/0と呼ばれ、またヒト胎児ゾヌリン<sub>i</sub>のアミノ酸残基8～15に相当）を化学的に合成した。

10

#### 【0088】

次いで、上記のようにしてユシング室内に取り付けたラビット回腸を、FZI/0（配列番号15）100μg、FZI/1（配列番号34）100μg、6xHis-ZOT（実施例1に記載のようにして得られたもの）1.0μg、ゾヌリン<sub>i</sub>（実施例3に記載のようにして得られたもの）1.0μgまたはゾヌリン<sub>h</sub>（実施例3に記載のようにして得られたもの）1.0μgの単独に暴露；またはFZI/0またはFZI/1の100μgに20分間事前暴露し、その時点で6xHis-ZOT 1.0μg、ゾヌリン<sub>i</sub> 1.0μg、またはゾヌリン<sub>h</sub> 1.0μgを加えた。Rtは上記の用にして算出した。その結果を図8に示す。

20

#### 【0089】

図8に示すように、FZI/0は、Rtにいかなる著しい変化も誘導しなかった（陰性対照と比較して0.5%）（黒棒参照）。反対に、FZI/0を用いる20分間の前処理は、ZOT、ゾヌリン<sub>i</sub>、ゾヌリン<sub>h</sub>のRtへの効果をそれぞれ75%、97%および100%低下させた（白棒参照）。また、図8に示すように、第二の合成ペプチド（FZI/1）を、8位のGly、12位のVal、および13位のGlnに相当（ゾヌリン<sub>i</sub>と呼ぶ）をゾヌリン<sub>h</sub>の相応するアミノ酸残基（それぞれVal、GlyおよびArg）に変化させて化学合成して使用すると、この抑制効果は完全に除去される（斜線棒参照）。

20

#### 【0090】

上記の結果は、標的受容体に結合するために重要であり、そして、位置8、12、および13のアミノ酸残基がこの結合の組織特異性を決定するようなZOTおよびゾヌリンファミリーのN末端の残基8と15との間に存在する領域があることを証明している。

30

#### 【0091】

本発明は以上に詳細に、また特定の態様を引用して記載されているけれども、種々の変更および改質を本発明の精神および目的から逸脱することなく行うことができるることは、当該業界の通常の熟練者には明らかである。

#### 【0092】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 CaCO<sub>2</sub>細胞単層の組織抵抗（Rt）に対するラビット腸（）から精製されたゾヌリンの効果を、各種の陰性対照〔Q-セファロース・カラムからの画分2（）；画分3（）；画分4（）；および画分5（）〕と比較して示す。

40

【図2】 ユシング室内に取り付けられたラビット回腸の組織抵抗（Rt）に対するラビット腸（）から精製されたゾヌリンの効果を、各種の陰性対照（）と比較して示す。

【図3】 ユシング室内に取り付けられたラビット回腸の組織抵抗（Rt）に対するラビット腸（）から精製されたゾヌリンの効果を、陰性対照〔ゾヌリン+抗ZOT抗体（）；ゾヌリン+抗tau抗体（）；およびtau（）〕と比較して示す。

【図4】 図4Aおよび4Bは、ユシング室内に取り付けられたアカゲザル空腸（図4A）およびアカゲザル回腸（図4B）の組織抵抗（Rt）に対する、ヒト脳（）、ヒト腸（）、または心臓（）のいずれかから精製されたゾヌリンの効果を、陰性対照（）と比較して示す。

【図5】 図5Aおよび5Bは、ユシング室内に取り付けられたラビット空腸（図5A）

50

およびラビット回腸(図5B)の組織抵抗(Rt)に対する、ヒト心臓( )またはヒト脳( )のいずれかから精製されたゾヌリンの効果を、陰性対照( )と比較して示す。

【図6】 ラビットおよび各種のヒト組織から精製されたゾヌリンのN末端配列の比較を示す。

【図7】 各種のヒト組織およびIgM重鎖から精製されたゾヌリンのN末端配列とZOTの生物学的に活性の断片(アミノ酸288-399)のN末端配列との比較を示す。

【図8】 ユシング室内に取り付けられたラビット回腸の組織抵抗(Rt)に対する、ZOT、ゾヌリン<sub>i</sub>、ゾヌリン<sub>h</sub>を単独(黒棒)、またはペプチドアンタゴニストFZI/0と組合せ(白棒)またはFZI/1と組合せ(斜線棒)た場合の効果を陰性対照と比較して示す。Nは3~5に等しく、\*はp<0.01に等しい。  
10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: FASANO, Alessio

(ii) TITLE OF INVENTION: PEPTIDE ANTAGONISTS OF ZONULIN  
AND METHODS FOR USE OF THE SAME

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 40

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS, PLLC  
(B) STREET: 2100 Pennsylvania Avenue, N.W., Suite 800  
(C) CITY: Washington, D.C.  
(D) STATE: D.C.  
(E) COUNTRY: U.S.A.  
(F) ZIP: 20037

20

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE: 3-AUGUST-1998  
(C) CLASSIFICATION:

30

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: KIT, Gordon  
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,764  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: A-7242

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (202) 293-7060  
(B) TELEFAX: (202) 293-7860

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 8 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear

40

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Gly Arg Val Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Gly Arg Val Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Gly Arg Val Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Gly Arg Leu Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Gly Arg Gly Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Gly Arg Gly Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

10

20

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Gly Gly Val Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

Gly Gly Val Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

Gly Gly Val Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Gly Gly Leu Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

Gly Gly Leu Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

Gly Gly Leu Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

Gly Gly Leu Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Gly Gly Gly Cys Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

Gly Gly Gly Cys Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: synthetic DNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:  
TCATCACGGC GCGCCAGG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: synthetic DNA  
(iii) HYPOTHETICAL: NO  
(iv) ANTI-SENSE: NO  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:  
GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT

22

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear  
(ii) MOLECULE TYPE: peptide  
(iii) HYPOTHETICAL: NO  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:  
Asn Gln Arg Pro Pro Pro Ala Gly Val Thr Ala Tyr Asp Tyr Leu Val Ile  
1 5 10 15  
Gln

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

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

Leu Arg Leu  
20

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:**

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 9 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser  
1 5

20

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:**

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

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

30

Asn Arg Leu  
20

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 11 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

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

10

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 11 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

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

20

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 13 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

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

30

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 8 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly  
1 5

10

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 8 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly  
1 5

20

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:**

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 22 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

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

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 20 amino acids
    - (B) TYPE: amino acid
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  - (iii) HYPOTHETICAL: NO
  - (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 14 amino acids
    - (B) TYPE: amino acid
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  - (iii) HYPOTHETICAL: NO
  - (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 23 base pairs
    - (B) TYPE: nucleic acid
    - (C) STRANDEDNESS: single
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: synthetic DNA
  - (iii) HYPOTHETICAL: NO
  - (iv) ANTI-SENSE: NO
  - (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

www.IBM.com/ibm 111 23

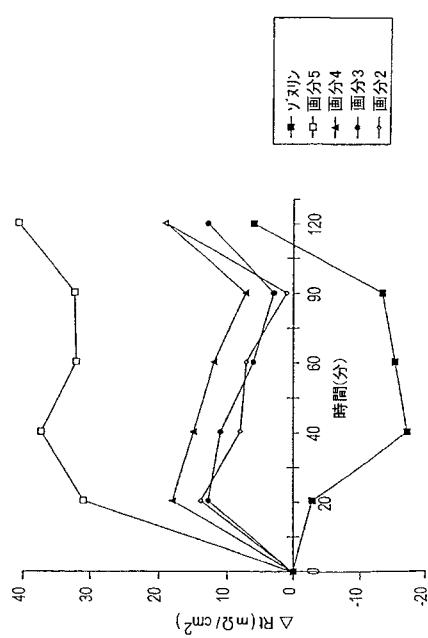
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 24 base pairs
    - (B) TYPE: nucleic acid
    - (C) STRANDEDNESS: single
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: synthetic DNA
  - (iii) HYPOTHETICAL: NO
  - (iv) ANTI-SENSE: NO
  - (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

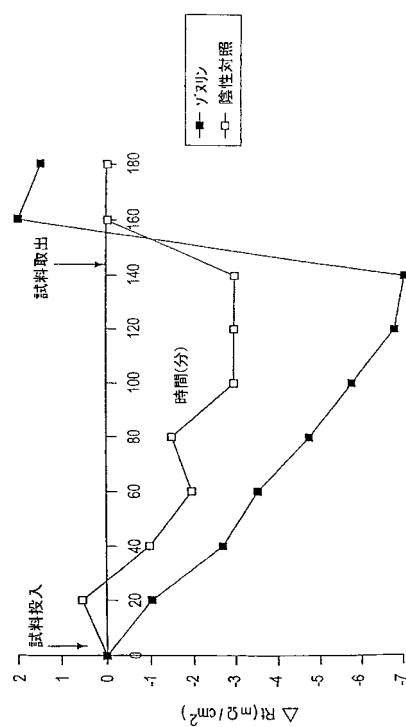
CCCAAGCTTG GGTCAAAATA TACT 24

【図1】

FIG.1

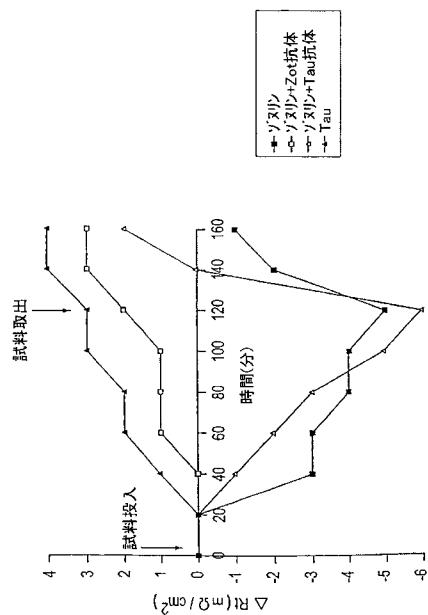


【図2】



【図3】

FIG.3



【図4A】

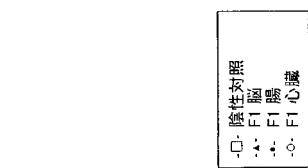
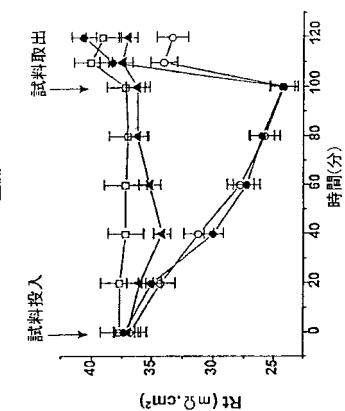
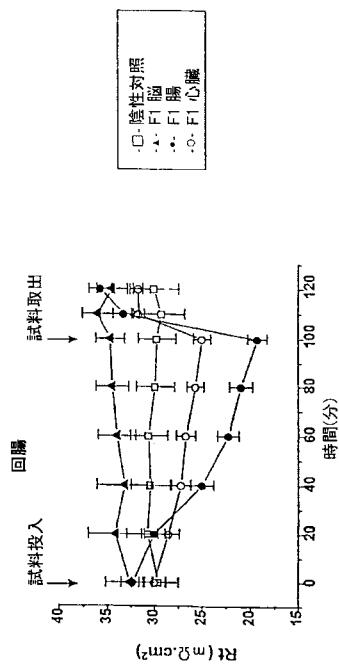


FIG.4A

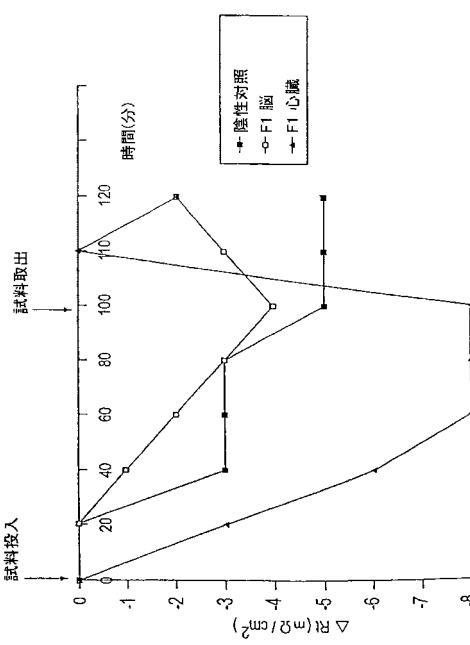


【図 4 B】

FIG. 4B

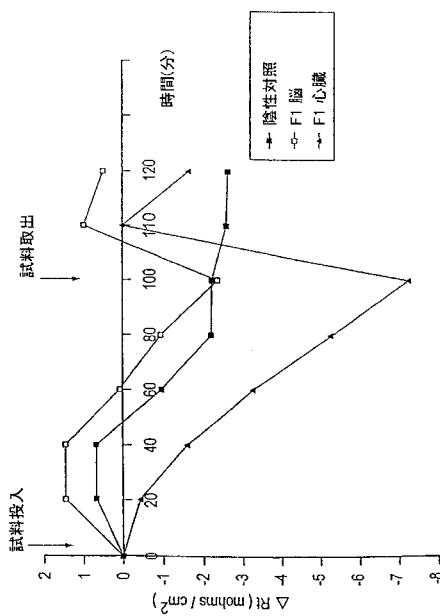


【図 5 A】

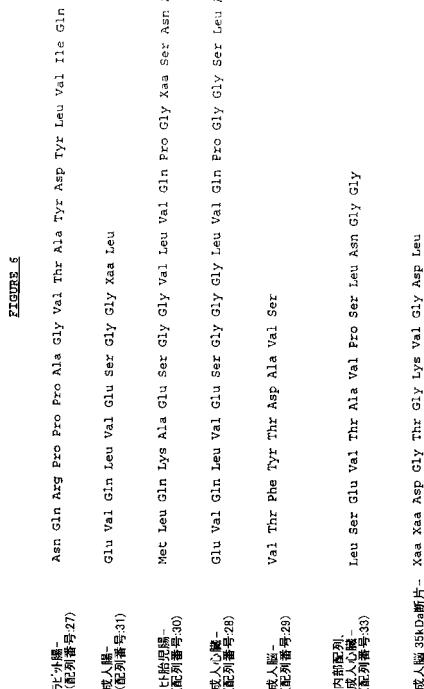


【図 5 B】

FIG. 5B



【図 6】



【図7】

Figure 7	
ヒトZOT <sup>-</sup> (配列番号:38)	Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Glu Asp Gly Phe Val Thr
成人胰島 (配列番号:31)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu
ヒト胎兒胰島 (配列番号:30)	Met Leu Gln Lys Ala Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Pro Gly Xaa Ser Asn Arg Leu
成人心臓 (配列番号:28)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
FZL0 (配列番号:15)	Gly Gly Val Leu Val Glu Pro Gly
FZL1 (配列番号:34)	Val Gly Val Leu Gly Arg Pro Gly
ヒト胎兒脳 (配列番号:36)	Xaa Gly Lys Val Lys Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val Ile
成人膵 (配列番号:29)	Val Thr Phe Tyr Thr Asp Ala Val Ser
ヒトM車掌 (配列番号:27)	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu

・処理後ヒコウ酸二シリ酸生合成する生物学的活性断片(断片番号288-399)最初のGluは、全ZOT分子のGlu290に相当する。  
[アザラシ (Reano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 86, p. 5242 (1991)) およびドリーラ (Baudry et al., Infect. Immun., 50, 121, p. 426 (1992)).]

【図8】

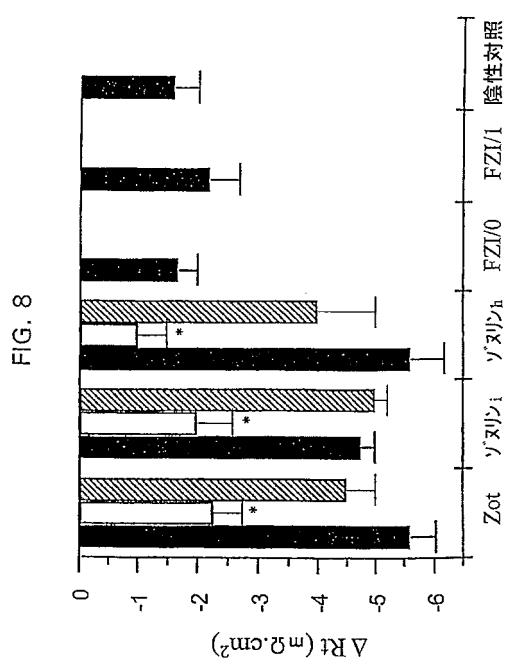


FIG. 8

---

フロントページの続き

(56)参考文献 欧州特許出願公開第0675199(EP, A2)  
国際公開第94/11509(WO, A2)  
Infection and Immunity, 1992年, Vol.60, pp.428-34

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00  
A61P 1/00  
A61P 1/04  
C12N 15/09  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)