

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/17

A61P 35/00 A61P 15/16

A61P 29/00 A61P 19/02

A61P 15/00 A61P 7/04

A61L 33/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03104316. X

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1478543A

[22] 申请日 1994. 3. 11 [21] 申请号 03104316. X
分案原申请号 94191892. 0

[30] 优先权

[32] 1993. 3. 12 [33] US [31] 08/030644

[32] 1993. 7. 15 [33] US [31] 08/093202

[71] 申请人 爱克索马技术有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 R · G · 李特尔

H · 伽扎奴 - 杉图茹

J · B · 佩仁特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 51 页 附图 18 页

[54] 发明名称 杀菌/增强通透性蛋白质产物的治疗
用途

[57] 摘要

本发明涉及用于症状治疗的治疗学方法, 包括施用杀菌/增强通透性(BPI)蛋白质产物来中和肝素的抗凝血活性, 抑制血管形成、肿瘤和内皮细胞增生, 治疗慢性发炎性疾病。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种 BPI 蛋白质产物，用作肝素结合药物。
2. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用于中和肝素的抗凝
5 血效力。
3. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用于抑制血管形成。
4. 根据权利要求 3 的产物，其中抑制的血管形成与视网膜病有
关。
5. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用于抑制内皮细胞增
10 生。
6. 根据权利要求 3 的产物，其中的内皮细胞增生与子宫内膜异位相联系。
7. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用作一种避孕药。
8. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用于抑制恶性肿瘤细
15 胞增生。
9. 一种根据权利要求 8 的产物，其中的恶性肿瘤是卡波济肉瘤。
10. 一种用于肝素结合的 BPI 蛋白质产物，用于治疗慢性发炎
疾病症状。
11. 根据权利要求 10 的产物，其中的慢性发炎疾病是关节炎。
- 20 12. 一种根据权利要求 11 的产物，其中的关节炎发炎疾病是类风湿性关节炎。
13. 一种根据权利要求 11 的产物，其中的关节炎发炎疾病是反应性关节炎。
14. 一种根据权利要求 1, 2, 3, 5, 7, 8 和 10 中任意一项的
25 产物，它是一种 23-25KD 的杀菌/增强通透性蛋白质氨基末端片段。
15. 一种中和肝素的抗凝血效力的方法，包括给受试验者施用有效量的肝素结合 BPI 蛋白质产物。
16. 一种抑制血管形成的方法，包括给受试验者施用一定量的

对抑制血管形成有效的 BPI 蛋白质产物。

17. 权利要求 16 的方法，其中所抑制的血管形成与视网膜病有关。

5 18. 一种抑制内皮细胞增生的方法，包括给受试验者施用一定量的对抑制增生有效的 BPI 蛋白质产物。

19. 一种治疗子宫内膜异位的方法，包括在给子宫内膜施用一定量的对抑制内皮细胞增生有效的 BPI。

20. 一种避孕方法，包括给受试验者的子宫内壁施用一定量的，对阻止与受精卵植入相联系的内皮细胞增生有效的 BPI 蛋白质产物。

10 21. 一种抑制恶性肿瘤细胞增生的方法，包括给受试验者施用一定量的对抑制增生有效的 BPI 蛋白质产物。

22. 一种权利要求 21 的方法，其中的恶性肿瘤是卡波济肉瘤。

23. 一种治疗慢性发炎疾病症状的方法，包括给受试验者施用一定量的对减轻炎症有效的 BPI 蛋白质产物。

15 24. 权利要求 23 的方法，其中的慢性发炎疾病是关节炎。

25. 权利要求 24 的方法，其中的关节炎发炎疾病症状是类风湿性关节炎。

26. 权利要求 24 的方法，其中治疗的关节炎发炎疾病症状是反应性关节炎。

20 27. 权利要求 15, 16, 18, 19, 20, 21 和 23 的方法，其中的 BPI 蛋白质产物是 23-25KD 的杀菌/增强通透性蛋白质氨基末端片段。

杀菌/增强通透性蛋白质产物 的治疗用途

本申请系1994年3月11日提交的申请号为94191892.0
发明名称与本申请相同的申请的分案申请,而后者是申请日
为1993年3月12日的美国专利申请08/030,644的部分继续申请。

本发明涉及杀菌/增强通透性(*BPI*)蛋白质产物的治疗用途,
它们用于治疗与革兰氏阴性细菌感染有关的病情及与革兰氏阴性
细菌感染不直接相联系的病情,包括中和肝素的抗凝血特性,抑制
血管形成,肿瘤及内皮细胞增生和治疗慢性发炎疾病状态(如关节
炎)。

肝素结合

肝素是一组不均一的直链阴离子粘多糖,称为葡糖氨基葡聚糖,
具有抗凝血特性。在肝素中出现的主要糖类有:(1) α -L-艾杜糖醛
酸2-硫酸盐,(2)2-脱氧-2-磺氨基- α -D-葡萄糖6-硫酸
盐,(3) β -D-葡萄糖醛酸,(4)2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-葡
萄糖,和(5) α -L-艾杜糖醛酸,尽管可能存在其他的糖类。这些糖
类通常按(2)>(1)>(4)>(3)>(5)的顺序含量递减,并以糖苷键
连结,形成大小不同的多聚体。肝素具有强酸性,因为它含有共价相
连的硫酸和羧酸基团。肝素在肥大细胞颗粒中发现并经脱颗粒而释
放。肝素的一种细胞相关性形式称为硫酸乙酰肝素。硫酸乙酰肝素

是一个广义的术语,用于描述各种在哺乳动物细胞膜表面和胞外基质中发现几乎随机分布的硫酸化蛋白聚糖(*HSPG's*)。*HSPG* 含有可变百分比的五聚体肝素样序列,其功能与可溶肝素相似。*HSPG's* 作为抗凝血酶 III(*ATIII*)和肝素结合生长因子(如成纤维细胞生长因子(*FGF*)1-5,*IL-8*,*GM-CSF* 和 *IL-3*)的仓库。*Folkman et al., Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates 2d Ed. Chapter 40, PP821-839 (1992)*。事实上,用遗传方法制备的 *HSPG's* 缺乏性细胞需要外源性肝素用于生长。

在外科手术过程中(如心肺旁路,心脏导管插入和血液透析程序),为阻止该过程中的血液凝固,通常以达到 400U/Kg 的剂量施用肝素。肝素在血液中的抗凝血效力是肝素与 *ATIII* 相互作用的结果。肝素/*ATIII* 复合物是凝血级联过程中的许多凝血因子的有效抑制剂。对激活的因子 *IXa*, *Xa*, *XIa*, *XIIIa* 和凝血酶的特异性抑制已被证实。肝素/*ATIII* 复合物对因子 *Xa* 和凝血酶具有最高亲和力,因子 *Xa* 和凝血酶是内部和外部凝血途径共有的,作为导致纤维蛋白原转化为纤维蛋白的凝血级联的最后两步牵涉到这两个途径。

当在手术过程中施用肝素以产生抗凝血效力时,手术后治疗的一个重要方面是立即中和肝素的效力以便恢复正常的凝血功能。通常用鱼精蛋白中和肝素。鱼精蛋白是一种通常从鲑鱼精子中分离出的低分子量的简单蛋白质。它们富含精氨酸残基并具有强碱性。单独用药时,鱼精蛋白(通常以鱼精蛋白硫酸盐的形式)具有抗凝血效力。当在存在肝素的条件下用药时,形成一种稳定的复合物,并且两种药物的抗凝血活性丧失。鱼精蛋白明显的降低血压和类过敏性效

力限制了其临床使用。

报道的其他具有肝素中和活性的化合物包括血小板因子 4 (PF_4)和主要的碱性蛋白质,见美国专利 5,086,164。主要的碱性蛋白质证实具有肝素中和活性,但也具有高毒性。

血管形成

血管形成与内皮细胞增生密切相关并构成新毛细血管的发育。因此,它是哺乳动物发育和生长的重要过程。在月经过程中,血管形成生长因子(如成纤维细胞生长因子 1—5)的释放经一种肝素依赖性受体结合机制诱导内皮细胞的增生。见 Yayon *et al.*, *Cell*, 64: 841—848(1991)。这些肝素结合生长因子能由血管创伤(伤口愈合),免疫刺激(自身免疫疾病),发炎介质(前列腺素)和从肿瘤细胞释放。

血管形成还与一些希望抑制该新血管发育的病理状态相关。作为一个例子,血管形成对各种肿瘤的生长,增生和转移是关键的。其他与血管形成相关的病理状态包括糖尿病的视网膜病,晶状体后的纤维组织形成,新血管青光眼,牛皮癣,血管纤维瘤,免疫和非免疫性发炎(包括类风湿性关节炎)、动脉粥样硬化斑内的毛细血管增生,血管瘤,子宫内膜异位和卡波济肉瘤。

Folkman 等(出处同上)公开了皮肤牛皮癣损害受上皮增生,新血管形成,和发炎细胞浸润的支配。然而,血管形成是牛皮癣的发病机理中的一步还是一种继发性现象尚不清楚。

一些物质已知具有血管形成抑制剂的功能,并已报道了抑制肿瘤血管形成,防止关节炎的发作以及抑制在胶原蛋白诱导的关节炎模型中建立的关节炎, Peacock *et al. J. Exp. Med.* 175, 1135—1138 (1992)。作为一个例子,鱼精蛋白已知抑制肿瘤血管形成及随后的

肿瘤生长。根据 *Taylor et al., Nature*, 297: 307–312(1982), 鱼精蛋白的抗血管形成活性由其结合肝素的能力所引起。已知 PF_4 也表现出抗血管形成活性。本发明感兴趣的是美国专利 5,112,946 公开的具有抗血管形成活性但缺乏结合肝素能力的被修饰的 PF_4 及其类似物。 PF_4 已被证明至少具有两种功能特征。尽管肝素结合已被最广泛地研究, 但 PF_4 最初被描述为具有胶原酶抑制特性。胶原酶抑制剂是第一个发现的血管形成抑制剂。见 *Folkman* 1973, (出处同上)。 PF_4 肝素结合区中的突变对胶原酶抑制活性的影响检查不到。令人感兴趣的是, 凝血酶敏感蛋白也是一种血管形成抑制剂并以丝氨酸/色氨酸区域代替碱性氨基酸区域与肝素结合。因此, 没有明显的肝素结合或血管形成抑制的单个一致性序列。

公开的 PCT 专利申请 WO 92/01003 公开了葡糖氨基葡聚糖(肝素)衍生物的用途及其用于抑制肿瘤的侵袭力。公开的肝素衍生物被描述为基本上没有抗凝血活性, 并能阻止宿主中肿瘤细胞转移瘤的形成。

慢性炎症

慢性炎症通常伴随着血管形成。关节炎是一种慢性综合症, 其特征为外周关节发炎并伴随着滑膜增厚和免疫因子及细胞(如多形核白细胞(PMN))的流入。在类风湿性关节炎中, 炎症是免疫驱动的, 而在反应性关节炎中, 炎症与滑膜组织受化脓性细菌或其它感染物的感染相关。*Folkman* 等(1973. 出处同上)还提出许多种类的关节炎从一个关节的发炎浸润占优势的时期到后期新血管血管翳侵入关节并开始破坏软骨。但在关节炎中是否血管形成是疾病的起因而不是一种表面现象尚不清楚。在类风湿性关节炎中, 有证据表明

血管形成是维持滑膜炎所必需的。尽管非类固醇抗炎药物 (NSAIDs), 皮质类固醇和其它疗法在减轻关节炎的治疗方面提供了改进, 但在本领域仍需要对关节炎和其他发炎疾病的更有效的疗法。

现在了解到炎症和血管形成是可分开的但并不互相排斥的过程。已发现特异性血管形成蛋白刺激血管形成而不引起炎症, 另外血管抑制类固醇能抑制血管形成而不减轻急性炎症。见 *Folkman*, 1973 出处同上。令人感兴趣的是, 已鉴定内毒素通过其对巨噬细胞细胞素和生长因子的刺激作为一种最有效的外源性血管形成刺激因子。

杀菌/增强通透性蛋白质

杀菌/增强通透性蛋白质 (BPI) 是一种从哺乳动物 PMNs 颗粒中分离出的蛋白质, PMNs 是抵抗微生物侵入所必需的血细胞。经酸提取并结合离子交换色谱 [*Elsbach, J. Biol. Chem.*, 254: 11000 (1979)] 或 *E. Coli* 亲和色谱 [*Weiss. et al., Blood*, 69: 652 (1987)] 从多形核嗜中性的细胞中分离出了人 BPI 蛋白质, 此处称为天然 BPI, 它对广谱革兰氏阴性细菌具有有效的杀菌活性。人 BPI 分子量大约为 55, 000 道尔顿 (55KD)。人 BPI 全蛋白的氨基酸序列以及编码该蛋白质的 DNA 已在 *Gray et al., J. Bio. Chem.*, 264: 9505 (1989) 的图 1 中给出。此处引用以供参考。

BPI 的杀菌效力对敏感性革兰氏阴性种类表现出高度特异性, 而对其他微生物和真核细胞无毒性。BPI 杀死细菌的确切机理还不知道, 但知道 BPI 必须首先附着到感受态革兰氏阴性细菌的表面。这种 BPI 对细菌的最初的结合涉及碱性 BPI 蛋白质与脂多糖 (

LPS)上带负电荷的位点之间的静电相互作用。LPS 由于可刺激强烈的发炎反应,已被称为“内毒素”。LPS 经宿主发炎细胞诱导介质的释放,可能最终导致不可逆的内毒素攻击。BPI 与脂 A 结合,脂 A 是 LPS 中最具毒性的最具生物学活性的成份。

在感受态细菌中,认为 BPI 的结合破坏了 LPS 的结构,导致降解磷脂和肽葡聚糖的细菌酶激活,改变细胞外膜的通透性,启动最终导致细菌死亡的发生。Elsbach and Weiss, *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*. eds. Gallin et al., Chapter 30, Review Press, Ltd. (1992)。认为 BPI 分两阶段发挥作用。第一为亚致死阶段,其特征为生长立即停滞,外膜穿透和水解磷脂和肽葡聚糖的细菌酶选择性激活。在这一阶段的细菌可经在含血清白蛋白的培养基上涂布来挽救。第二阶段的特征为:生长抑制不能用血清白蛋白来逆转,在细菌长期接触 BPI 后出现,其特征为广泛的生理学和结构改变,包括细胞质膜的穿透。

BPI 也能中和其所结合的 LPS 之内毒素的特性。由于其革兰氏阴性杀菌特性和其中和 LPS 的能力, BPI 能用于治疗哺乳动物由革兰氏阴性细菌所引起的疾病,如败血症或脓毒症。

与人 BPI 全蛋白 N-端部分相对应的蛋白水解片段具有天然产生的 55KD 人全蛋白的脂 A 结合和抗菌活性。与 N-端部分相反,分离的人 BPI 蛋白质 C-端区域仅表现出微弱的可检测的抗菌活性。Ooi. et al., *J. Exp. Med.*, 174:649(1991)。含有人 BPI 全蛋白和大约开始 199 个氨基酸残基的 BPI N-端片段称为“rBPI₂₃”,已用重组方法以 23KD 蛋白质的形式生产出来。Gazzano—Santoro et al., *Infect. Immun.* 60:4754—4761(1992)。

本申请感兴趣的是在公开号为 WO 92/035 35 的 PCT 国际申请 PCT/US 91/05758 说明书中涉及的含有一种 BPI 蛋白质和一种阴离子化合物的组合物,所说的组合物表现出:(1)无杀菌活性,和(2)内毒素中和活性。阴离子化合物优选一种蛋白质,如血清白蛋白,但也可以是一种蛋白多糖,如肝素。另外,Weiss et al., *J. Clin. Invest.* 55: 33—42 (1975) 公开了肝素硫酸盐与 LPS 结合阻断 BPI 增强通透性活性的表达。然而,没有文献公开用与 BPI 组合来进行肝素中和。

本领域对用于肝素中和,肿瘤,血管形成和内皮细胞增生的抑制以及慢性炎症的治疗的新产品和方法的需要仍然存在。

根据本发明的一个方面,提供了中和肝素的抗凝血活性的方法,包括给受实验者的体内或体外含肝素的液体样品中施用有效量的 BPI 蛋白质产物。

根据本发明的另一个方面,给受实验者施用一种 BPI 蛋白质产物以抑制内皮细胞增生,包括但不限于与血管形成相关的内皮细胞增生。本发明提供抑制与各种临床症状相联系的血管形成的方法。本发明特别提供以抑制与恶性肿瘤增生,卡波济肉瘤损害和相似疾病相联系的血管形成来治疗癌症的方法。对施用 BPI 蛋白质产物的治疗敏感的肿瘤包括黑素瘤、肉瘤、和癌,包括但不限于乳房、结肠、肺、和前列腺癌。能施用 BPI 蛋白质产物来抑制血管形成的其他症状包括眼视网膜病,晶状体后纤维组织形成,牛皮癣,血管纤维瘤,子宫内膜异位,血管瘤和相似症状。本发明还期望提供避孕方法,包括供给有效量的 BPI 蛋白质产物以阻止受精卵的植入。

本发明还提供治疗慢性发炎疾病症状(如:关节炎、牛皮癣、发炎

性的疾病,节段性回肠炎,溃疡性结肠炎,戏斑狼疮,自身免疫眼色素层炎,*Lyme* 疾病,和气喘病的方法,包括给感染发炎疾病症状的病人施用有效量的 *BPI* 蛋白质产物。

本发明还提供制备用于中和肝素的抗凝血特性,抑制肿瘤和内皮细胞增生,抑制血管形成和治疗慢性发炎疾病症状的药物之方法。

该药物可制备成口服,注射或其他肠胃外方式的剂型并优选包含本领域的技术人员已知的常用的药物上可接受的载体和佐剂。药物优选以单位剂量的固体,半固体和液体形式的剂型如:片剂、丸剂、粉末、液体溶液或悬液,以及可注射的和可浸入的溶液。预期的有效剂量范围从大约 $100\mu\text{g/kg}$ 到大约 10mg/kg 的体重。

此处所用的“*BPI* 蛋白产物”包括天然的和重组产生的杀菌/增强通透性蛋白质,天然的,重组的具生物学活性的杀菌/增强通透性蛋白质的多肽片段,以及生物学活性多肽或类似物,包括杀菌/增强通透性蛋白质或具生物学活性片段的杂种融合蛋白质。

附图的简要描述:

图 1 描绘了 $rBPI_{23}$ 和 $rBPI$ 的肝素结合试验图;

图 2 显示了肝素对 $rBPI_{23}$ 结合 *E. coli* J_5 脂 A 与结合各种 *LPS* 和磷壁酸质样品相比较的影响;

图 3 显示了 $rBPI_{23}$ 对凝血酶的 *ATIII*/肝素抑制的影响;

图 4 显示了 $rBPI_{23}$ 对因子 *Xa* 的 *ATIII*/肝素抑制的影响;

图 5 显示了 $rBPI_{23}$ 对人血浆中肝素介导的延长凝血酶时间的影响。

图 6 显示了 $rBPI_{23}$ 对部分凝血致活酶时间的影响;

图 7 显示了 $rBPI_{23}$ 和 *thauumatin* 对照蛋白质对具轻度关节炎的胶原诱导性关节炎模型之关节炎程度的影响;

图 8 显示了 $rBPI_{23}$ 和鱼精蛋白对具严重关节炎的胶原蛋白诱导性关节炎模型的关节炎程度之影响;

图 9 显示了 $rBPI_{23}$ 对耶尔辛诱导性关节炎模型的关节炎发病率的影响;

图 10 显示了 $rBPI_{23}$ 对 LAL 的 *Borrelia burgdorferi* LPS 样刺激的抑制试验之影响;

图 11 显示了在小鼠肿瘤转移模型中以 BPI 或缓冲液处理后小鼠的存活率;

图 12 显示了 $rBPI_{23}$ 对 II 型鼠毛细血管内皮细胞增生的影响;

图 13 图示了 BPI 对上皮细胞的结合;

图 14 描绘的是合成的 BPI 肽肝素结合试验图;

图 15 描绘的是鲎属变形细胞溶胞产物 (LAL) 对合成的 BPI 肽抑制试验图;

图 16 描绘的是合成的 BPI 肽放射状扩散杀菌试验的图;

图 17 描绘的是合成的 BPI 肽在肝素结合试验中的影响;

图 18a 和 18b 显示的是合成的 BPI 肽对凝血酶 ATIII/肝素抑制的影响;

图 19a 和 19b 显示的是合成的 BPI 肽在 LAL 抑制试验中的影响;

图 20a, 20b, 20c 和 20d 显示的是合成的 BPI 肽在放射状扩散的杀菌试验中的影响;

图 20e 和 20f 描写的是合成的 BPI 肽在 *E. coli* 培养试验中的

影响;

图 21a 和 21b 显示的是 $rBPI_{23}$ 蛋白质水解片段的 *HPLC* 吸收结果;

图 22 显示的是 $rBPI_{23}$ 蛋白质水解片段的 *LAL* 抑制试验结果;

图 23 描绘的是 $rBPI_{23}$ 功能区。

本发明涉及用于治疗各种与细菌感染不直接相关的治疗症状之杀菌/增强通透性蛋白质(*BPI*)蛋白产物的用法。

虽然此处所述的 *BPI* 蛋白质可用作革兰氏阴性细菌的有效细胞毒素和用于中和革兰氏阴性细菌细胞壁相联系的脂多糖的有害影响,但是已发现了 *BPI* 蛋白质产物与革兰氏阴性细菌感染不直接相关的各种治疗效力。具体地说,本发明提供了治疗与革兰氏阴性感染不直接相关的症状之方法,包括中和肝素的抗凝血活性、抑制肿瘤和内皮细胞增生(包括与血管形成相关的细胞增生)以及慢性发炎疾病症状(如关节炎)的治疗。

根据本发明的方法用药的包括 *BPI* 全蛋白生物活性片段的 *BPI* 蛋白质产物可用本领域已知的任何方法生产和/或分离出来。此外引用共同拥有,共同未决的美国专利申请 07/885,501 及其部分继续申请—申请日为 1993 年 5 月 19 日的美国专利申请 08/072,063 以供参考,它们公开了从遗传转化的哺乳动物宿主细胞培养物中表达和分泌的重组 *BPI* 蛋白质产物之新的纯化方法,并公开了如何生产大量的适于配制成稳定的,均质的药物制剂的重组 *BPI* 产物。

BPI 的生物学活性片段包括含有与 *BPI* 全蛋白相同氨基酸顺

序的生物学活性分子,不同的是该分子缺失全蛋白的氨基末端氨基酸,内部氨基酸和/或羧基末端氨基酸。该片段在非限制性例子包括此处所述和以前提到的天然的 25KD 片段和称为 $rBPI_{23}$ 的重组 23KD、人 BPI 全蛋白 199 个氨基酸残基的氨基末端片段,见. *Gazzano—Santoro et al. , Infect. Immun.* 60 : 4754—4761(1992)。在该文献中,一个表达载体用作编码重组表达产物($rBPI_{23}$)的 DNA 来源, $rBPI_{23}$ 具有 31 个残基的信号序列和成熟的人 BPI 前 199 个 N—端氨基酸,同 Gray 等人(出处同上)的 SEQ ID NOs : 1 和 2 所列出的一样,不同之处在于 151 位的缬氨酸由 GTG 编码而不是 GTC 编码,185 位的残基是谷氨酸(由 GAG 编码)而不是赖氨酸(由 AAG 编码)。此处称为 $rBPI$ 或 $rBPI_{50}$ 的重组全蛋白也已被生产出来,它具有来自 Gray 等(出处同上)SEQ ID NOs : 1 和 2 所列出的序列,该序列已在对 $rBPI_{23}$ 的描述中提及。

其他 BPI 生物学活性片段的非限制性例子包括例如 BPI 全蛋白或将该蛋白质以试剂(如溴化氰 $CNBr$)进行化学裂解或以试剂(如蛋白内切酶 $Asp-N$)进行酶消化产生的 $rBPI_{23}$ 的片段。 BPI 蛋白质片段还可以用含有 BPI 全蛋白内、尤其是该蛋白一半的氨基末端内大约 5 个到大约 50 个连续的氨基酸复制物的线型或环状的合成肽的形式提供。提供的该肽可以为单体的形式,二聚体或多聚体(其中的肽复制一具有半胱氨酸残基的 BPI 区域)的形式,以及“线型”二聚体或多聚体的形式,其中的一段 BPI 序列在肽中重复出现,具备或不具备为允许所选择的构象显示的“间隔”氨基酸所分开。

BPI 的生物学活性类似物包括但不限于重组杂种融合蛋白质,它包含 BPI 全蛋白或其生物学活性片段,以及至少其他一种其它多

肽的至少一部分。该蛋白质在 *Theofan* 等共同拥有,共同未决的美国专利申请 07/885,911 及其部分继续申请—申请日为 1993 年 5 月 19 日的美国专利申请 08/064,693[代理人备案号为 27129/31429] 中进行了描述,此处引用其全文以供参考,其中包括的杂种融合蛋白质在其氨基末端包含一 *BPI* 蛋白质或其生物活性片段,在其羧基末端包含一免疫球蛋白重链的至少一个恒定区或其等位变异体。

BPI 生物活性类似物也包括但不限于 *BPI* 蛋白质产物,其中的一个或多个氨基酸残基被一不同的氨基酸或被非典型的氨基酸所取代。例如:在申请日为 1993 年 2 月 2 日共同拥有,共同未决的美国专利申请 08/013,801 (*Theofan* 等,“稳定的杀菌/增强通透性蛋白质产物和含有该产物的药物组合物”)(此处引用以供参考)中公开了 *BPI* 和 *BPI* 片段的多肽类似物,其中 132 位或 135 位的半胱氨酸残基被一不同的氨基酸所取代。一个命名为 *rBPI*₂₃△*Cys* 的优选的蛋白质产物含有 *BPI* 全蛋白的前 199 个氨基酸残基,但其中 132 位的半胱氨酸残基被丙氨酸取代。

BPI 蛋白质产物的投药优选含有 *BPI* 蛋白质产物和药物上可接受的稀释剂,佐剂或载体的药物组合物来实现。该 *BPI* 蛋白质产物组合物可与已知的抗生素、表面活性剂、或其他化学治疗试剂联用或不联用进行投药。一种优选的含 *BPI* 蛋白质产物的药物组合物包含: *BPI* 浓度为 1mg/ml 的柠檬酸缓冲盐水(0.02M 柠檬酸, 0.15M *NaCl*, pH5.0),它含有 0.1%(重量)的 *Poloxamer* 188 (*Pluronic F-68*, *BASF Wyandotte, Parsippany, NJ*)和 0.002%(重量)的 *Polysorbate* 80 (*Tween 80*, *ICI Americas Inc., Wilmington DE*)。该优选的组合物在申请日为 1993 年 2 月 2 日的共同拥

有,共同未决的美国专利申请 08/012. 360(McGregor *et al.*, “改进的药物组合物”) 中进行了描述,此处引用该说明书以供参考。

用于部分或完全中和肝素的抗凝血活性及此处所述的其他效力的 *BPI* 和 *BPI* 蛋白质产物的有效剂量可被本领域的技术人员根据常用参数(包括受试验者的大小,给受试验者施用的肝素量及肝素施用后的时间)很容易检测出来。

本发明的其他方面和优势将以下面列出的实施例来理解。实施例 1 论述了用 *BPI* 蛋白质产物进行肝素结合的定量之试验系统;实施例 2 描述了肝素阻断细菌 *LPS* 结合 *BPI* 蛋白质产物的相对能力;实施例 3 和 4 分别提供了 *BPI* 蛋白质产物抑制抗凝血酶 III/肝素复合物对凝血酶或因子 *Xa* 的激活能力的试验结果;实施例 5 涉及 *BPI* 蛋白质产物对肝素介导的凝血酶时间延长的影响;实施例 6 涉及 *BPI* 蛋白质产物对肝素介导的部分凝血致活酶时间延长的影响。实施例 7—9 涉及在胶原蛋白和细菌诱导的关节炎动物模型系统中 *BPI* 蛋白产物的投药倒证对慢性发炎性疾病症状的治疗。实施例 10—11 说明了在小鼠恶性黑素瘤转移模型系统中 *BPI* 蛋白质产物的血管抑制效力试验。实施例 12 论述了 *BPI* 蛋白质产物对于内皮细胞增生和可能涉及的结合机理的影响。实施例 13 涉及合成的 *BPI* 肽的制备。实施例 14—16 说明了实施例 13 合成的 *BPI* 肽的肝素结合, *LPS* 结合和杀菌活性。实施例 17 涉及其他的合成 *BPI* 肽的制备。实施例 18—21 论述了实施例 17 肽的特征。实施例 22 揭示了 *BPI* 蛋白水解片段肽的制备。实施例 23 揭示了 *BPI* 蛋白水解片段的杀菌效力。实施例 24 揭示了 *BPI* 蛋白水解片段的肝素结合特征。实施例 25 揭示了 *BPI* 蛋白水解片段对 *LAL* 试验的影响。

实施例 1

BPI 蛋白质产物与肝素的结合

使用与膜结合的天然和重组 *BPI* 分子和放射标记的肝素进行肝素结合试验。简单地说,在孔底安置有 *Imobilon—P* (*Millipore, Bedford. M A*) 膜的 96—孔微滴定板的孔中加入 *rBPI*₂₃ 和命名为 *rBPI* 或 *rBPI*₅₀ 的全蛋白质。每孔加入 5 μ g 蛋白质。孔经干燥随后以 0.1% 牛血清白蛋白 (*BSA*) 的磷酸盐缓冲盐水 pH7.4 (封闭缓冲液) 封闭。³H—肝素 (*Dupont, NEN, Wilmington, DE*) 在封闭

缓冲液中稀释并在含 *BPI* 的孔中 4℃ 保温 1 小时。吸出未结合的肝素,孔用封闭缓冲液洗三次,干燥并取出在液闪计数器中定量。图 1 以图形提供了典型的试验结果。*BSA* 在封闭缓冲液中确实对肝素具有较低的亲合力和结合能力,这被认为是在生理上不相关的,因此按常规从试验总信号中减去背景。放射标记的肝素结合被过量 100 倍的未标记肝素 完全抑制数据未显示)。

以 *thau-matin* 对照蛋白(所带电荷和大小与 *rBPI*₂₃ 相似)或以洗涤缓冲液(1% *BSA*)对照进行相同试验比较 *rBPI*₂₃, *rBPI*₅₀ 和天然全蛋白(*BPI*)的肝素结合。在这些试验中,观察到天然和重组 *BPI* 全蛋白质的肝素结合较少。*rBPI* 和 *nBPI* 结合的减少程度可能是在蛋白制品中存在碳水化合物污染的结果。

另外,使用 *Grafit* 软件(*Erithicus softward Ltd., staines, UK*) 的非线型功能最小化测定了 *rBPI*₂₃, *rBPI*, 鱼精蛋白硫酸盐(*Sigma Chemical Co.*) 和 *thau-matin* 的以 ³H—肝素作配体的结合常数,结果如下表 1 所示:

表 1

以³H-肝素作配体的结合常数

蛋白质	K _d	能力	肝素柱 NaCl 洗脱
rBPI ₂₃	79 nM	2.63 μg	0.84 M
rBPI ₅₀	173 nM	1.30 μg	0.81 M
鱼精蛋白	8.1 nM	2.66 μg	1.33 M
Thaumatococcus	无结合		0.15 M

实 施 例 2

BPI 蛋白质产物结合的肝素竞争

试验了肝素,可溶脂 A, LPS 和磷壁酸质与固相 *E. Coli* J₅脂 A 竞争结合可溶 rBPI₂₃的能力。具体地说,用 *E. coli* J₅脂 A 以 0.5μg/ml 浓度的甲醇溶液(50μl 体积)覆盖 Immulon 2(Dynatech, Chintilly, VA)微滴定孔。然后孔用含 0.1%BSA 的 PBS 37℃ 封闭 4 小时。对照孔只用 50μl 的甲醇处理再按上述方法封闭。吸出被封闭的孔内溶液并用 PBS/0.05% Tween-20 洗 2 次。各种浓度的推断抑制剂以 25μl 体积的 PBS 溶液形式加入孔中,接着加入 25μl 含 0.1% Tween-20 的 200,000cpm 放射碘标记的 rBPI₂₃ PBS 溶液。试验溶液包括 200μg/ml 的明尾苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*) R₆₀ 之 Ra LPS, 200μg/ml 来自 *E. coli* 0113 的光滑型 LPS(RIBI Immunochem, Hamilton, MT, #R318); 400μg/ml 来自粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)的脂磷壁酸质(Sigma, St. Louis, MO, #L-4015) 400μg/ml 来自金黄色葡萄球菌(*staphylo-*

coccus Aureus)的脂磷壁酸质(*Sigma* #L-2525);和 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 的肝素钠 USP 注射液(*Lypho-Med. Rosemont, IL*, #9155-01)。轻轻摇动 4°C 过夜进行结合,然后吸出孔内溶液,用 *PBS*/ 0.05% *Tween-20* 洗涤 3 次并计数,结果在图 2 中列出,表明 $rBPI_{23}$ 对肝素具有高亲合力而且肝素也阻断脂 A 对 *BPI* 的结合。

实施例 3

用 *BPI* 蛋白质产物进行肝素中和:

BPI 对以 *ATIII*/肝素复合物导致的凝血酶

失活的影响

使用产色试验鉴定 rBP_{23} 对 *ATIII*/肝素复合物的凝血酶灭活之影响。具体地说,使用一种“*Chromostate^{TX}*”抗凝血酶试验试剂盒 (*Organon Teknika Corp. Durham. NC*)检测在血浆中以 *ATII-I*/肝素复合物进行的纯化凝血酶的抑制作用。

在 96 孔微滴定板中以每孔 $200\mu\text{l}$ 的终体积一式三份进行试验。试验组分的加入次序如下:

1) $50\mu\text{l}$ 终浓度为 100, 50, 25, 10 和 $1\mu\text{g}/\text{孔}$ 的样品($rBPI_{23}$ 或用作对照蛋白的 *thaumatin*)*PBS* 溶液;2) $50\mu\text{l}$ 血浆的 1:100 缓冲液;3) $50\mu\text{l}$ $1\text{nkcat}/\text{ml}$ 的凝血酶缓冲液;和 4) $50\mu\text{l}$ $1\mu\text{mol}/\text{ml}$ 的生色底物水溶液。 37°C 下进行反应 10 分钟,以 $50\mu\text{l}$ 0.1M 的柠檬酸终止反应,颜色反应在微板阅读器上定量。试验结果如图 3 所示,表明 $rBPI_{23}$ 在含肝素的人血浆中能以剂量依赖的方式有效地中和 *ATIII*/肝素复

合物。随着血浆的滴定,凝血酶活性的总量增加。这由加入的血浆中的抑制性 *ATIII*/肝素复合物的减少而引起。对照蛋白质(*thau-matin*) 无相同的中和效力,其在各种蛋白质浓度下的试验结果基本上与缓冲液对照一样。

实施例 4

以 *BPI* 蛋白质产物进行肝素中和

BPI 对以 *ATIII*/肝素复合物导致的因子 *Xa*

失活的影响

使用产色试验鉴定 *rBPI*₂₃ 对由 *ATIII*/肝素复合物导致的因子 *Xa* 中和之影响。具体地说,使用一种 *Chromostrate* 肝素抗因子 *Xa* 试验试剂盒(*Organon Teknika Corp.*)进行试验,试验在因子 *Xa* 和 *ATIII* 的浓度固定的条件下进行。肝素浓度以在 *PBS* 中按浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002 和 0 单位/*ml* 变化,以便产生肝素的标准曲线。本试验以从合成底物中释放的产色的化合物来测定功能性因子 *Xa* 活性。*ATIII*/肝素复合物中和因子 *Xa* 的活性,因此,在试验样品中释放的发色团量与肝素的抗因子 *Xa* 活性的量反相关。

在 96 孔微滴定板中以每孔 200 μ l 的终浓度一式三份进行试验。试验组分加入微滴定孔的顺序为: 1) 50 μ l 终浓度为 100, 50, 25, 10, 和 1 μ g/孔的样品(*rBPI*₂₃或作为对照蛋白的 *thau-matin*) *PBS* 溶液; 2) 50 μ l 0.14nKat. *ml* 的因子 *Xa* 水溶液; 3) 25 μ l 0.5u/*ml* 的 *ATIII* 水溶液; 4) 24 μ l 0.25u/*ml* 的肝素缓冲液; 5) 50 μ l 底物(3 μ moles/*ml*)。37 $^{\circ}$ C 下进行反应 10 分钟,以 50 μ l 0.1M 柠檬酸终止反应,然

后在一微板阅读器上对颜色反应进行定量。试验结果如图 4 所示,表明了 $rBPI_{23}$ 能在因子 Xa 的 $ATIII$ /肝素抑制作用中有效地中和肝素。随着肝素的浓度增高,中和肝素所需的 $rBPI_{23}$ 量也增加。对照蛋白 *thaumatin* 无相似的中和效力并在所有蛋白质浓度下都与缓冲液对照基本等同。

实施例 5

以 BPI 蛋白质产物进行肝素中和

BPI 对肝素介导的凝血酶时间延长的影响

我们检查了 BPI 蛋白质产物对肝素介导的凝血酶时间(即凝血酶和血浆混合物凝固所需时间)延长的影响。凝血酶时间由于由源性或外源性凝血酶形成抑制剂(如治疗上施用的肝素)的存在而延长。中和肝素的抗凝血效力的试剂将减少试验测定的凝血酶时间。人柠檬酸盐血浆($200\mu l$)与 $15\mu l$ 稀释剂($0.15M NaCl, 0.1M Tris, pH7.4$)或 $15\mu l$ 含 $25\mu g/ml$ 肝素(187 单位/ mg)的该稀释剂一起 $37^{\circ}C$ 保温 1 分钟。加入 $15\mu l$ 体积的各种浓度的 $rBPI_{23}$ (从 0.0 到 $56\mu g/ml$),接着立即加入 $100\mu l$ 的凝血酶试剂(*Sigma Chemical Co., No. 845-4*)。用 *BBL Fibrometer (Becton Dickenson Microbiology Systems . Co ckeysvine MD)*测定凝血时间(凝血酶时间)。结果如图 5 所示,表明 $rBPI_{23}$ 抑制肝素介导的凝血酶时间延长。当不存在肝素时,即使 $rBPI_{23}$ 浓度高达 $56\mu g/ml$,对该试验也无影响。

实施例 6

以 BPI 蛋白质产物进行的肝素中和

BPI 对部分促凝血酶原激酶时间的影响

在施用肝素的大鼠中检测了 $rBPI_{23}$ 或鱼精蛋白硫酸盐对部分促凝血酶原激酶时间 (PTT) 的影响。由于内源性或外源性凝血酶形成抑制剂(如治疗上施用的肝素)的存在, PTT 被延长。中和肝素的抗凝血效力的试剂将减少试验测定的 PTT 值。按 *NIH* 标准的室内由 *Sprague-Dawley* 大鼠经动物尾静脉的静脉内注射施用 100U/kg 肝素, 接着施用 5mg/kg $rBPI_{23}$, 5mg/kg 鱼精蛋白硫酸盐或缓冲液。从预先麻醉的动物腹主动脉收集的血液样品测定 PTT 。也测定了未处理动物的 PTT 。结果如图 6 所示, 表明 $rBPI_{23}$ 和鱼精蛋白对处理过的动物的 PTT 立即产生影响。这些动物资料证实了实施例 2—5 所示的 *BPI* 蛋白质产物的肝素中和效力。

从实施例 1 到实施例 6 收集的结果表明: 在直接结合试验中 $rBPI_{23}$ 结合肝素并有效地中和凝血蛋白酶的肝素抑制作用。根据这些特征, 设计 *BPI* 蛋白质产物, 一般以在功能上与鱼精硫酸盐所推荐的剂量相对应的剂量用于肝素抗凝血效力的临床中和, 但它们不具有鱼精蛋白严重的降血压和类过敏性效力。

实施例 7

***BPI* 蛋白质产物对慢性发炎疾病**

胶原蛋白诱导的关节炎模型的疗效

本发明的另一方面涉及 *BPI* 对治疗和预防慢性发炎疾病症状的影响之用途, 慢性炎症包括类风湿性和反应性关节炎, 牛皮癣, 发炎性肠疾病, 节段性回肠炎, 溃疡性结肠炎, 红斑狼疮, 自身免疫眼色素层炎, *Lyme* 疾病, 和哮喘。提供了治疗关节炎患者的例证方法, 包括施用有效量的 *BPI* 蛋白质产物以预防或治疗关节炎。*BPI* 蛋白质

产物可局部投药,或经注射(如关节内,静脉内,肌肉内或皮下注射)或经肠胃外和非肠胃外方式用药。

在胶原蛋白诱导的关节炎模型中研究了施用 *BPI* 蛋白质产物的效果。具体地说,小鼠关节炎的诱导按照 *Stuat et al. , J. Clin Invest . , 69 : 673—683 (1982)* 的方法在鼠尾基部进行牛 II 型胶原蛋白的皮内免疫。一般来说,小鼠在胶原蛋白免疫后的第 21 天开始形成关节炎综合症。然后以盲目的方式评价所治疗的小鼠关节炎程度,在 120 天的期间内,每隔 21—25 天,以一定剂量的 *rBPI₂₃*, *thau-matin* 对照蛋白,或缓冲液经尾静脉注射治疗小鼠。

具体地说,在第 0 天在尾巴基部经皮内注射施用牛 II 型胶原蛋白 (*Southern Biotechnolgy Associate Inc. , Birmingham AL*) (0.1mg/小鼠),试验在 10 只雄性小鼠的各组中进行,每只小鼠重约 20—25g。 *rBPI₂₃* 溶于 0.5M *NaCl*, 20mM 乙酸钠, pH6.0 中,用 *PBS* 缓冲液稀释 (1mg/ml), 以 0.125 mg/小鼠用药。 *Thaumat*in 蛋白质的 *PBS* 溶液 (0.121mg/小鼠) 或仅用 *PBS* 缓冲液 (0.1ml) 进行投药作为对照。

结果如图 7 所示,表明 *rBPI₂₃* 与 *PBS* 缓冲液和 *thau-matin* 蛋白质对照相比,对减轻所治疗的小鼠关节炎程度具有统计学上显著的效力。

实施例 8

BPI 蛋白质产物与鱼精蛋白硫酸盐对慢性发

炎疾病胶原蛋白诱导的关节炎模型治疗效果的比较

使用 *thau-matin* 蛋白质和缓冲液作为对照,用实施例 7 的胶原

诱导性 关节炎模型评价 *BPI* 蛋白质产物的效果与鱼精蛋白硫酸盐的比较。具体地说, *rBPI*₂₃ 溶于 0.5M *NaCl*, 20mM 乙酸钠 pH6.0 中, 以 *PBS* 缓冲液稀释(1mg/ml) 并以 0.125mg/小鼠用药。其他试验物质按下面剂量用药: 鱼精蛋白硫酸盐(*Sigma Chemical Co*) (0.13mg/小鼠), *thau*matin (0.121mg/小鼠), *PBS* 缓冲液 (0.1ml)。每隔 28 天到 32 天, 在其尾静脉处通过静脉注射对四组 10 只小鼠的每只中施用试验或对照物质。图 8 揭示了在 28—80 天测定的各种治疗和对照方案的关节炎程度的结果。图 8 中的星号(*) 代表 *rBPI*₂₃ 和缓冲液间统计学上 $P < 0.01$ 的显著差别, 而加号(+) 代表 *rBPI*₂₃ 和缓冲液间统计学上 $P < 0.05$ 的显著差别。这些结果表明在模型系统中对于所治疗的小鼠 *rBPI*₂₃ 明显减轻关节炎程度。

实施例 9

革兰氏阴性诱导的反应性关节炎模型

根据 *Yong. et al. , Microbial Pathogenesis , 4 : 305 — 310 (1988)* 的方法在一种小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 反应性关节炎 模型中研究了施用 *BPI* 蛋白质产物治疗反应性关节炎的效果。具体地说, 预先通过尾静脉用小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) CWA 0 : 8T_z (即, 缺失根据 *Yong et al. ,* 出处同上的毒性质粒) 以计算的 4×10^8 个细菌的剂量进行静脉内注射诱导 *DBA/2J* 雄性小鼠非脓毒性关节炎, 再对这种小鼠施用 *BPI* 蛋白质产物。3 组 15 只小鼠的每只在尾静脉处通过静脉内注射接受试验或对照物质。小鼠接受以剂量为 大约 5.0mg/kg, 溶于 20mM 柠檬酸钠, 150mM 氯化钠, 0.1% *poloxamer 188*, 0.002%

Polysorbate 80, pH 5.0 的缓冲液中的 *rBPI₂₃*; 以剂量为大约 5.0mg/kg, 溶于 20mM 柠檬酸钠, 150mM 氯化钠, 0.1% *poloxamer 188*, 0.002% *polysorbate 80* pH 5.0 的缓冲液中的 *thaumatin* 蛋白质; 或仅有缓冲液。结果如图 9 所示, 表明 *BPI* 蛋白质产物与缓冲液或 *thaumatin* 对照蛋白相比明显降低反应性关节炎的发病率。

Borrelia burgdorferi 是引起 *Lyme* 疾病和相关的关节炎的病原体, 在其细胞壁上具有一 *LPS* 类复合物, 其细胞壁与 *E. coli* 不同但在结构上有关。在鲎属(*Limulus*)变形细胞溶胞产物(*LAL*)抑制试验中测定了施用 *BPI* 蛋白质产物对 *Borrelia burgdorferi* *LPS* 抑制作用的影响。具体地说, 根据实施例 15 的方法进行 *LAL* 试验, 施用 2.5μg/ml 的 *rBPI₂₃* 和 2ng/ml 的 *E. coli* 0113*LPS* 测定 *rBPI₂₃* 对 *Borrelia burgdorferi* *LPS* 的影响。结果如图 10 所示, 表明在 *LAL* 试验中, *rBPI₂₃* 中和 *Borrelia burgdorferi* *LPS* 和 *E. coli* 0113 *LPS* 的效力。

实施例 10

BPI 在小鼠恶性黑色素瘤模型中的效力

根据本实施例, 在小鼠恶性黑色素瘤转移模型中试验了 *BPI* 蛋白质产物, 鱼精蛋白, 和 *thaumatin* 蛋白质及缓冲液对照的效力。具体地说, 在第 0 天经尾静脉的静脉注射以 10^5 B16F10 恶性黑色素瘤细胞接种 4 组 9 只 C57BL/6J 小鼠。在第 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17 和 19 天将 *rBPI₂₃* (0.13 mg/小鼠), 鱼精蛋白硫酸盐 (0.13mg/小鼠), *thaumatin* (0.13mg/小鼠) 或 *PBS* 缓冲液 (0.1ml/小鼠) 静脉注射到小鼠尾静脉中。在第 20 天经折颈处死动物观察肺组织。灌注每个

肺的肺叶,从气管往肺里注入 3ml 水使其膨胀。借助于解剖显微镜计数表面的肿瘤结,每组发现的肿瘤数用于分析统计学上显著的差异。尽管数据在统计学上是不显著的,但用 *BPI*₂₃处理过的动物具有最低肿瘤负荷,随后是那些用鱼精蛋白,*thaumatin* 蛋白质对照和缓冲液对照处理过的动物。统计学显著性的缺乏(肿瘤数不是以反应肿瘤的大小)表明需要更特异性的试验方法学来鉴定肿瘤负荷。

实施例 11

BPI 在小鼠恶性黑素瘤模型中的效力

在实施例 10 的小鼠恶性黑素瘤转移模型中再次试验 *BPI* 蛋白质产物,鱼精蛋白,和 *thaumatin* 蛋白质和缓冲液对照的效力。具体地说,在第 0 天用 10⁵*B16.F10* 恶性黑素瘤细胞经静脉内注射到尾静脉中接种 6 组 *C57 BL/6J* 小鼠。在第 1,2,5,7,9,12,14,16,和 19 天 *rBPI*₂₃ (0. 125mg/小鼠),鱼精蛋白硫酸盐 (0. 125mg/小鼠),*thaumatin* (0. 125mg/小鼠)或 *PBS* 缓冲液(在下面表 2 中列出)经静脉内注射到小鼠尾静脉中。在第 20 天 *A—D* 组的所有动物以折颈处死观察其肺组织。取出肺并放入烧杯内的冷水中。然后灌注每个肺的肺叶,经气管注射 3ml 水到肺内使其膨胀。然后分析表面肿瘤结中的黑色素含量。

表 2

组	对照/试验项目	动物数
A	缓冲液	10
B	鱼精蛋白	10

C	<i>Thaumatococcus</i>	10
D	<i>rBPT</i> ₂₃	10
E	缓冲液	5
F	<i>rBPT</i> ₂₃	5

E 和 *F* 组包含的分别以缓冲液或 *rBPT*₂₃ 处理的动物不处死, 但每天观察一次其死亡率。图 11 显示了这两组动物的存活资料。尽管这 10 只动物在 43 天内全部死亡, 但 *PBI* 处理过的小鼠一般比未处理的小鼠存活时间明显延长, 这表明 *BPI* 具有抗血管形成效力并能减慢黑素瘤肿瘤的转移。

除了上面部分, 根据本发明的其他方面, *BPI* 蛋白质产物可在 *Miles et al.*, VII International Conference on AID, Florence Italy; Paper 41(8), 1991 的模型系统中用于抑制卡波济肉瘤。

实施例 12

BPI 对内皮细胞增生的影响

如 *Bauer, Microvascular Research* 37 : 148—161 (1989) 所述的鼠大脑毛细血管内皮细胞 (EC) 在含 Earle 氏盐, L-谷氨酰胺和 2.2g/l 碳酸氢钠 (*Gibco Grand Island, NY*, #400—100EB), 加上 10% 加热灭活的胎牛血清 (*Irvine Scientific, Irvine, CA*) 和 1% 青霉素/链霉素 (*Gibco*, #600—5140AG) 的 199 培养基中传代。以胰酶—EPTA (*Gibco* #610—5300PG) 消化 3 分钟收获汇合的细胞。经加入 10ml 培养基到培养瓶中来终止胰酶消化。在标准平底 96 孔微滴定板中对新收获的 EC 进行增生试验。试验中每孔的终体积

保持 200 μ l/孔。每孔共加入含各种浓度的 *rBPT*₂₃, *thau*matin 对照蛋白或缓冲液对照的 4×10^4 EC。在 5% CO₂培养箱中培养 48 小时后, 每孔加入 10 μ l 含 1 μ Ci [甲基-³H] 胸苷的 199 培养基。脉冲 24 小时后, 经胰酶消化玻璃微纤维滤器过滤收集 EC 细胞, 用一气相固相成比例的 β -计数器定量掺入的 [³H] 胸苷。

*rBPT*₂₃对 EC 细胞增生的浓度依赖性抑制作用见图 12。当孔中加入相同浓度的 *thau*matin 或等体积的缓冲液时观察不到效果。最先观察到的增生抑制作用为 12.4 μ g/ml *rBPT*₂₃, 效力最大时为 50 μ g/ml。已知 EC 细胞的生长依赖于小牛血清中的 FGF-2 (*bFGF*), 而 FGF-2 需要细胞表面的乙酰肝素用于受体激活 (Yayon *et al.*, *Cell* 64 : 841—848, 1991)。在不打算受本发明的理论束缚的情况下, 认为 *rBPT*₂₃与 EC 细胞表面的乙酰肝素结合干扰了细胞被 FGF-2 激活。

从汇合的培养瓶中收获传代 10 次的细胞, 用胰酶消化的细胞重悬于 12.5ml 培养基中进行 *rBPT*₂₃ 对 EC 细胞的直接结合试验。在标准 24 孔组织培养板的每孔中加入 0.5ml 悬液并培养过夜。用 0.1% 牛血清白蛋白的钙镁磷酸盐缓冲液 (*Gibco*) 洗涤平板。洗涤后, 每孔加入 0.5ml 的 BSA/PBS。初步实验表明: 每孔加入 50ng/ml 的 ¹²⁵I — 标记的 *rBPT*₂₃, 4℃ 培养 3 小时, 以 PBS 洗涤 3 次, 再用 1M NaOH 溶胞后, 由溶胞产物的 γ 射线计数得到大约 30,000 比 cpm。

50ng/ml 的 ¹²⁵I — 标记的“热”*rBPT*₂₃ 与 EC 细胞特异性的结合可经加入 20 μ g/ml 肝素 (*Sigma Grade I*) 进行竞争。往结合培养物中加入未标记的(“冷”) *rBPT*₂₃可观察到相似的竞争。未标记的

rBPT₂₃与肝素的混合物(同时加入或预先混合后加入)不能使结合减少到低于仅用肝素竞争(图13)。这些资料表明:rBPT₂₃经肝素样分子与内皮细胞结合,并且该结合似乎干扰对肝素结合生长因子(FGF-2)的EC细胞增生。

实施例13

BPI 15 残基合成肽的制备

为了试验BPI蛋白质产物肽片段的生物学活性,制备了以BPI 23KD氨基末端片段为基础的15个氨基酸残基的合成肽,并评价其肝素结合活性,在鲎属(*Limulus*)变形细胞溶胞产物抑制(LAL)试验中的活性和杀菌活性。具体地说,以上述rBPT₂₃序列为基础,以副本的形式制备了47种合成肽,每种含15个氨基酸,并且相邻肽有11个氨基酸重叠。

根据Maeji *et al.*, *mmunol. Methods*, 134: 23—33(1990)和Gammon *et al.*, *J. Exp. Med.*, 173: 609—617 (1991)的方法,在Coselco Mimotopes Pty Ltd的许可下使用Cambridge Research Biochemicals Ltd的固相技术同时合成肽。简单地说,将rBPT₂₃(1—199)序列分成47个不同的15残基肽,每到第15个氨基酸便出现下一个肽,这47个肽沿rBPT₂₃的线型序列延伸。该肽的合成在技术上允许在96-孔板上安置的分开的栓上对多个肽以小批量同时进行合成。因此,94个单独的栓用于该合成,剩余的栓(B,B)不加活化的FMOC氨基酸与其他栓进行相同的步骤。使用含水碱性缓冲液(碳酸钠,pH 8.3)从固相栓支持物上进行15残基肽的最终裂解。在这些产生裂解肽(在每个肽羧基末端具有环(赖氨酰脯氨酰)部分)

的条件下,与栓的单一连接经历了一个定量的环缩二氨酸的环化过程。氨基末端不乙酰化,以便使自由氨基具有产生阴离子结合反应的潜力。从每孔中回收的 15 残基肽平均大约各为 15 μ g。

实施例 14

BPI 15 残基合成肽的肝素结合

根据实施例 1 所述的方法将上述合成的 *BPI* 蛋白质产物肽用于肝素结合试验。结果如图 14 所示,表明存在 3 个分开的功能区具有肝素结合活性;第一个大约从氨基酸 21 延伸到 55,第二个大约从氨基酸 65 延伸到 107;第 3 个从氨基酸 137 延伸到 171。来自空白对照栓上的物质无肝素结合效力。

实施例 15

BPI 15 残基合成肽对 LCL 试验的影响

合成的 *BPI* 蛋白质产物肽用于进行鲎属(*Limulus*)变形细胞溶胞产物(LAL)抑制试验以鉴定 LPS 结合特征。具体地说,合成的 *BPI* 肽在 Eppendorf 管中与固定浓度的 *E. Coli* 0113 LPS (4ng/ml 终浓度)混合 37℃ 保温 3 小时并不时摇动。也试验了含 0.05 μ g/ml 的加入量对照。保温后,每管加入 360 μ l D-PBS 以得到 200pg/ml 的 LPS 浓度用于 LAL 试验。然后样品以每孔 50 μ l 体积转移到 Immulon II 带(Dynatech,Chantilly,VA)上。

每孔加入 50 μ l 鲎属(*Limulus*)变形细胞溶胞产物(定量产色 LAL 试剂盒,Whitaker Bioproduct,Inc.,Walkersville,MD),室温培养 25 分钟。然后每孔加入 100 μ l 体积的产色底物并混匀。室

温培养 20 到 30 分钟后,加入 100 μ l 乙酸终止反应。然后在多板阅读器(*Vmax*, *Molecular Dynamics*, *Menlo Park, CA*)上测量 405nm 下的光密度,图 15 所示的是在 LPS 抑制百分数方面的结果。图 15 的资料表明至少 3 个主要区域具有明显的 LAL 抑制作用:第 1 个从氨基酸 17 延伸到 55;第 2 个大约从氨基酸 73 延伸到 99,第 3 个大约从氨基酸 137 延伸到 163。其他个别肽也表现出 LAL 抑制作用。作为对照,来自空白对照栓上的物质用 LAL 试验测量不表现出 LPS 中和效力。

实施例 16

BPI 15 残基合成肽的杀菌效力

在一放射扩散试验中试验了合成的 BPI 蛋白质产物肽对粗糙型突变 *E. Coli* J₅ 细菌的杀菌效力。具体地说, *E. coli* J₅ 的过夜培养物用新鲜的胰蛋白酶大豆培养基按 1:50 稀释,37℃ 培养 3 小时达到对数期。然后在 *Sorvall* RT6000B 中以 3000rpm 离心 5 分钟沉淀细菌,加入 5ml 10mM 磷酸钠缓冲液(pH7.4),制品再次离心。弃去上清液,加入 5ml 新鲜缓冲液重悬细菌,经在 590nm 下测量吸光率测定其浓度。1.25 $\times 10^9$ CFU/ml 的悬液吸光率等于 1.00。细菌在 100ml 熔化的铺底琼脂糖(大约 45℃)中稀释成 4 $\times 10^6$ CFU/ml 并以用于该用途的 15ml 聚丙烯管反复倒转混合。

管内的全部内容物倒入完全水平的方形培养皿中,经敲击培养皿各侧面使分布均匀。琼脂糖不超过 30 秒变硬,并且有相同的厚度约为 1mm。然后用一无菌的与真空装置相连的 3mm 打孔器在变硬的琼脂糖上打一系孔的孔。打孔器用 100%乙醇灭菌并空气干燥。

10 μ l 合成的 *BPI* 肽小心吸移到每孔中,作为对照,在一单独的孔中加入 pH 8.3 的缓冲液,作为阳性对照,也加入 5 μ g/ml 和 1 μ g/ml 浓度的 *rBPT*₂₃。另外,试验来自空白栓 *B* 和 *B* 的产物作为对照。平板 37 $^{\circ}$ C 培养 3 小时,然后往水平培养皿中加入 10ml 的熔化覆盖琼脂糖(大约 45 $^{\circ}$ C),使其变硬并 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。与菌苔相反,在那些具有杀菌活性的孔中以菌苔为背景看到一清晰的环带。为了提高这些环带的可见性,往琼脂上注入稀的考马斯溶液(0.002% 考马斯亮兰, 27% 甲醇, 15% 甲醛(37% 贮液)和水)染色 24 小时。用 Mitutoyo 测微尺测量细菌环带。

试验结果如图 16 所示,其中所示唯一具有杀菌活性的合成 *BPI* 肽是与氨基酸 85—99 相对应的片段。阳性 *rBPT*₂₃对照也具有杀菌效力,而缓冲液和空白栓对照无杀菌效力。

实施例 17

BPI 肽片段的制备

根据实施例 13 到 16 重叠肽的试验结果,按照 Merrifield . J. *Am Chem. Soc.* 85 : 2149(1963) 和 Merrifield *et al.* , *Anal, Chem* 38 : 1905—1914(1966) 的方法,使用 *Applied Biosystems . Inc.* *Model 432* 合成仪,经固相肽合成制备 *BPI* 蛋白质产物肽片段。制备的 9 种 *BPI* 蛋白质产物肽命名的 *BPI*—2 到 *BPI*—10,它们具有如下表 3 所列出的 *rBPT*₂₃1—199 氨基酸残基中的部分氨基酸序列。例如 *BPI*—7, *BPI*—9 和 *BPI*—10 肽代表部分或甚至多次重复的序列。具体地说,*BPI*—7 含有 20 个残基,由氨基酸残基 90—99 在单一线型链上重复两次组成。*BPI*—10 含有 30 个残基,由氨基酸残

基 90—99 在单一线型链上重复 3 次组成。*BPI*—9 含有 16 个残基，在单一线型链上含有氨基酸残基 94—99，随后是残基 90—99。

表 3
蛋白质产物肽

多肽号	氨基酸区域	氨基酸残基数	MW (道尔顿)
BPI-2	85-99	15	1828.16
BPI-3	73-99	27	3072.77
BPI-4	25-46	22	2696.51
BPI-5	142-163	22	2621.52
BPI-6	112-127	16	1569.82
BPI-7	90-99, 90-99	20	2644.66
BPI-8	90-99	10	1316.8
BPI-9	94-99, 90-99	16	2131.34
BPI-10	90-99, 90-99, 90,99	30	3958.45

实施例 18

用 *BPI* 蛋白质产物肽进行肝素结合

在本实施例中,根据实施例 1 所示的方法对 *BPI* 蛋白质产物肽 *BPI*-2、*BPI*-3、*BPI*-4、*BPI*-6、*BPI*-7、*BPI*-8 以及 *BPI* cys 进行肝素结合试验。结果如图 17 所示,表明 *BPI*-7 和 *BPI*-8 具有极高的肝素结合能力,而 *BPI*-2 和 *BPI*-3 具有中等偏高的肝素结合能力,*BPI*-4 和 *BPI*-6 具有很小或无肝素结合能力。

实施例 19

用 *BPI* 蛋白质产物肽进行肝素中和

在本实施例中,根据实施例 3 的方法,对 *BPI* 蛋白质产物肽 *BPI*-2、*BPI*-3、*BPI*-4、*BPI*-5、*BPI*-6、*BPI*-7 和 *BPI*-8 以及 *rBPI*₂₃进行试验以测定它们对 *ATIII*/肝素复合物引起的凝血酶失活的影响。施用范围为 1.0 μ g/ml 到 100 μ g/ml 的各种浓度的 *BPI* 蛋白质产物以测定其影响。*BPI* 蛋白质肽 *BPI*-7、*BPI*-3 和 *BPI*-5 分别具有最显著的肝素中和效力,如图 18a 和 18b 所示,其中所描绘的样品浓度分别为重量或摩尔浓度。

实施例 20

BPI 蛋白质产物肽对 *LAL* 试验的影响

在本实施例中,根据实施例 15 的方法,对 *BPI* 蛋白质产物肽 *BPI*-2、*BPI*-3、*BPI*-4、*BPI*-6、*BPI*-7 和 *BPI*-8 以及 *rBPI*₂₃进行 *LAL* 试验以测定其 *LPS* 结合和抑制特性。结果表明:*BPI*-7

和 *BPI*-3 具有显著的 *LPS* 抑制特性, *BPI*-2 和 *BPI*-8 具有中等程度的 *LPS* 抑制特性, *BPI*-4 和 *BPI*-6 无显著的 *LPS* 抑制活性, 如图 19a 和 19b 所示, 其中所描述绘的样品浓度分别为重量或摩尔浓度。

实施例 21

BPI 蛋白质产物肽的杀菌试验

在本实施例中, 根据实施例 16 的方法, 试验了 *BPI* 蛋白质产物肽 *BPI*-2, *BPI*-3, *BPI*-4, *BPI*-5, *BPI*-6, *BPI*-7, *BPI*-8, *BPI*-9 和 *BPI*-10 以及 *rBPI*₂₃ 在放射扩散试验中对突变型 *E. coli* *J*₅ (粗糙型) 和 *E. coli* 0111 : *B*₄ (光滑型) 细菌的杀菌效力。结果在图 20a 至 20d 中描绘出, 显示出 *BPI*-2, *BPI*-3, *BPI*-5, *BPI*-7, *BPI*-8, *BPI*-9 和 *BPI*-10 各自具有或大或小程度的杀菌活性, 而 *BPI*-4 和 *BPI*-6 不表现出杀菌活性。每个杀菌肽倾向于对粗糙型比对光滑型 *E. coli* 菌株更有效。

本实施例的另一方面, 进行培养抗菌试验以测定某些 *BPI* 肽的杀菌活性。具体地说, 从琼脂平板的单个菌落中挑选 *E. coli* *J*₅ (粗糙型) 和 *E. coli* 0111 : *B*₄ (光滑型) 细菌, 并用于接种到加有一系列 10 倍稀释的 *BPI* 蛋白质产物肽的培养平板上。平板培养过夜并在 *ELISA* 板面阅读器上读数以测定存活的菌落形成单位。该试验的结果在图 20e (*E. coli* *J*₅) 和 20f (*E. coli* 0111 : *B*₄) 中描绘出, 显示了 *BPI* 蛋白质产物肽 *BPI*-3, *BPI*-7, *BPI*-9 和 *BPI*-10 具有显著的抗菌活性。

这些杀菌试验以及肝素结合和 *LAL* 试验的结果表明: 存在具

有一种或多种杀菌、肝素结合和 *LPS* 中和效力的小型合成的 *BPI* 肽,并且在 23KD 氨基末端片段中至少存在 3 个明显分离的功能区。一个功能区位于氨基酸残基 17 和 45 之间,第二个功能区在 3 个试验的活性鉴定中活性最强,位于氨基酸 71 和 99 之间。一个特异性的肽 86—99 在所有 3 个试验中均证实具有活力。第三个功能区由残基 142—169 组成。

实施例 22

BPI 蛋白水解片段肽的制备

在本实施例中,对 *rBPI*₂₃ 运用化学裂解和酶消化过程,根据 *Gazzano—Santoro et al* (出处同上)的程序生产,以形成各种大小的重组蛋白质的蛋白水解片段。

*rBPI*₂₃ 在用溴化氰(*CNBr*)或蛋白内切酶 *ASP—N* 进行蛋白水解前先被还原和烷基化。蛋白质以冷(4℃)丙酮沉淀法(1:1V/V)脱盐过夜,并经离心(5000×*g*)10 分钟沉淀。*rBPI*₂₃ 沉淀用冷丙酮洗涤 2 次并在氮气流下干燥。然后 *rBPI*₂₃ 在 8M 尿素/0.1M *Tris*, *pH*8.1 中重新配成 1mg/ml 的溶液,经加入 3.4mM 二硫苏糖醇(*Calbiochem, San Diego. CA*)37℃ 处理 90 分钟来还原。经加入碘乙酰胺(*Sigma Chemical Co., St, louis, MO*)至终浓度为 5.3 微摩尔在室温黑暗中处理 30 分钟进行烷基化。还原和烷基化的蛋白质按上面所述进行丙酮沉淀,离心和洗涤,沉淀再熔解以备 *CNBr* 或 *Asp—N* 消化。

在加入 *CNBr* 前,洗过的沉淀溶于 70% 的三氟乙酸(*TFA*)(蛋白质测序级, *Sigma*)中使最终蛋白质浓度为 5mg/ml。加入溶于

70% TFA 中的溴化氰 (*Baker Analyzed Reagent, VWR Scientific, San Francisco*) (A) 使最终 CNBr 与蛋白质之比(W/W) 为 2 : 1 。这样 CNBr 大约比蛋白质中甲硫氨酸残基摩尔数过量 75 倍。用氮净化反应,并在室温、黑暗中进行 24 小时。经加入 9 体积的蒸馏水终止反应,随后冷冻(-70°C)并冻干。

还原和烷基化的 rBPI₂₃ 以 510mg/ml 溶于 8M 尿素/0.1M Tris, pH 8.1 中。加入等体积 0.1M Tris, pH 8.1, 使最终状态为 2.5mg/ml 蛋白质存在于 5M 尿素/0.1M Tris, pH 8.1 中。来自莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) 的蛋白质内切酶 Asp-N (*Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN*) 按酶:底物比为 1 : 1000(W/W)加入,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 6 小时。经加入 TFA 至终浓度为 0.1% 来终止反应,然后样品以反相 HPLC 分馏。

在 Zorbax 蛋白质加 C₃ 柱 ($4.6 \times 250\text{mm}$, 300A 孔径, *MAC-MOD Analytical Inc. Chadsford, PA*) 上纯化 CNBr 和 Asp-N 片段混合物。在 2 小时内以 1.0ml/分 的流速用梯度从 5% 乙腈的 0.1% TFA 溶液到 80% 乙腈的 0.1% TFA 溶液进行洗脱。用 *Beekman System Gold HPLC* 在 220nm 下监测片段的洗脱。使柱的加热室维持在 35 $^{\circ}\text{C}$ 并手工收集馏分, -70°C 冷冻并在 *Speed Vac* 浓缩器中干燥。用前片段再溶于 20mM 乙酸钠, pH 4.0/0.5M NaCl 中。

由 Francis Bitsch 博士和 John Kim 先生在儿童医院—澳克兰研究所, Cedric Shackleton 博士实验室中使用 VG Bio-Q 质谱仪进行电喷射电离质谱测量。经过数据的数学转移得到分子质量。

尽管 rBPI₂₃ DNA 序列编码成熟蛋白质的 1—199 氨基酸残基,

但以电喷射电离质谱测量(*ESI-MS*)鉴定出大部分该蛋白质,它是在 *Leu*-193 和 *Val* 195 截断而产生的。经过分离被测序并以 *ESI-MS* 分析过的 *C* 端胰蛋白酶水解肽,证实了这些 *C* 端截短物。在 56, 70, 100, 111, 170, 和 196 位有 6 个甲硫氨酸残基,预计用溴化氰进行化学裂解产生 6 个主要肽片段。*CNBr* 裂解实验的结果在表 4 中进行了小结。用反相(*C₃*)*HPLC* (图 21A) 分离出这些片段并用 *Edman* 降解法测定了其 *N*-端序列。以 *C₃* *HPLC* 柱未能解析出两个最大的片段(*C₁* 和 *C₅*),而且进一步用离子交换色谱解析它们的尝试也已失败,假设的原因为它们的长度和等电点相似。用 *ESI-MS* 鉴定了混合物中 *C₁*, *C₅* 片段的一致性。考虑到在 *CNBr* 的裂解反应中 *C* 端甲硫氨酸转化为高丝氨酸引起 30a. m. u 的丧失,预计 *G* 的质量为 6269(表 4)。观察到的质量为 6251.51 ± 0.34 ,它与高丝氨酸内酯中间体中丧失了一个水分子(18a. m. u)是一致的,由于 *C₁* 片段 *C*-端氨基酸的疏水性,该中间体可能比高丝氨酸的形成更有利。*C₅* 片段预计的质量为 6487,观察到的质量是 6385.84 ± 0.39 (表 1)。对于 *C₅* 片段,由于 *C* 端氨基酸是亲水的,所以高丝氨酸内酯中间体的水解可能更有利。从 *N* 端测序和质谱数据来看,*C₅* 组分代表了 *C₁*/*C₅* 混合物中大约 10—25% 的物质。

用蛋白质内切酶对包含在 *CNBr* *C₁*/*C₅* 混合物内的区域进行蛋白水解的裂解以提供更多的片段。在 *rBPI₂₃* 序列内有 6 个天冬氨酸残基,位于 15, 36, 39, 57, 105 和 116 位。以 *C₃* *HPLC* (图 21B) 分离的 6 个主要 *Asp-N* 片段被测序并以 *ESI-MS* (表 4) 测定了其质量。用酶:底物为 1:1000(*W/W*) 进行短期消化以消除潜在的非特异性断裂,尤其是在谷氨酸位点。由于分离到一个 *Asp* 残基(氨基

酸 15 和 35) 未被裂解的片段(1—38),它证明了消化一旦完成就不再继续。*Asp—N* 片段的质谱与预测的各个片段的质量一致。不象 *CNBr* 裂解,其中的 *C* 端片段很难分辨,*Asp—N* 片段从氨基酸 116 到 *C* 末端能很好地从所有其他 *Asp—N* 片段中分辨出。

表 4

r B P I₂₃ 裂解片段分析的小结

C N B r 裂解片段				
峰	序列	I.D.	质量	
			测量的	预测的
I	101-110	C4(101-111)	未测	1169
II	57-67	C2(57-70)	未测	1651
III	71-99	C3(71-100)	未测	3404
IV	171-194	C6(171-196)	未测	2929
V	1-25, 112-124	C1(1-56),	6251.51 $\pm$ 0.34	6299
		C5(112-170)	6485.84 $\pm$ 0.39	6403

A s p - N 蛋白水解片段				
峰	序列	I.D.	质量	
			测量的	预测的
A	1-14	A1(1-14)	1465.5	1464
I	39-56	A3(39-56)	2145.2	2145
II	15-38	A2(15-38)	2723.6	2724
III	57-76	A4(57-104)	5442.5	5442
IV	1-38	A1 A2(1-38)	4171.4	4172
VI	116-134	A6a(116-193)	8800.3	8800
VII	116-128	A6b(116-195)	8997.1	8996

实施例 23

BPI 蛋白水解片段的杀菌效力

筛选根据实施例 22 形成的 *BPI* 蛋白水解片段在基本上根据实施例 16 程序的放射扩散试验中对粗糙型突变 *E. coli* J₅ 细菌的杀菌效力。当试验量高达 25 pmol/孔时,由 CNBr 或 Asp—N 消化产生的 *rEPT*₂₃ 片段证实无杀菌活性。在本试验中用每孔含量小到 0.75 pmol 的 *rBPT*₂₃ 仍检测到可测量的杀菌活性。还原的并烷基化的 *rBPT*₂₃ (高达 100 pmol/孔) 也不能杀菌,而烷基化的 *rBPT*₂₃ 保持与 *rBPT*₂₃ 相等的杀菌活性。

实施例 24

用 *BPI* 蛋白水解片段进行肝素结合

根据实施例 22 形成的 *rBPT*₂₃ 和 *BPI* 蛋白水解片段基本上按照实施例 1 的程序用于肝素结合试验。

CNBr 的片段的肝素结合在含饱和浓度的 ³H—肝素 (20 μg/ml) 的每孔中使用 100 微微摩尔的各片段进行测量。结果如表 5 所示 (两份孔的平均值加上或减去两值之差), 表明含有氨基酸 71—100 (C₃) 和 1—56 及 112—170 (C_{1.5}) 的 CNBr 片段结合肝素的程度相似。CNBr 片段 171—193 也结合比对照蛋白质 (*thaumatin*, 一种与 *rBPT*₂₃ 分子量和电荷相似的蛋白质) 更多的肝素。

Asp—N 片段也证实在 *rBPT*₂₃ 中有多个肝素结合区。见表 5, 57—104 Asp—N 片段结合最高量的肝素, 随后是 1—38 和 116—

193 片段。这些资料与 *CNBr* 片段资料一起表明：在 *rBPT*₂₃ 中至少有 3 个分离的肝素结合区，其中结合能力最高的是在残基 71—100 内。

表 5

r B P I₂₃ 片段的肝素结合

片段	区域	CPm ³ H- 肝素结合
C N B r 消化		
C1,C5	1-56,112-170	82,918 ± 4,462
C2	57-70	6,262 ± 182
C3	71-100	81,655 ± 3,163
C4	101-111	4,686 ± 4
C6	171-196	26,204 ± 844
A s p - N 消化		
A1	1-38	17,002 ± 479
A2	15-38	3,042 ± 162
A3	39-56	8,664 ± 128
A4	57-104	33,159 ± 1,095
A6a	116-193	13,419 ± 309
rBPI ₂₃	1-193	51,222 ± 1,808
Thaumatoin		7,432 ± 83
洗涤缓冲液		6,366 ± 46

实施例 25

BPI 蛋白水解片段对 *LAL* 试验的影响

根据实施例 22 形成的 *BPI* 蛋白水解片段用于基本上根据实施例 15 的 *LAL* 抑制试验,结果如图 22 所示,其中:实心三角代表 *rBPT*₂₃;空心圈代表 *Asp-N* 片段 *A*₃;实心圈代表 *Asp-N* 片段 *A*₂,空心方框代表 *Asp-N* 片段 *A*₃;实心方框代表 *Asp-N* 片段 *A*₁*A*₂;空心三角代表 *Asp-N* 片段 *A*_{6b};小空心三角代表 *CNBr* 片段 *C*₃;小实心方框代表 *CNBr* 片段 *C*₁/*C*₅。

含有氨基酸片段 1—56 和 112—170 的 *CNBr* 消化片段以 *IC*₅₀ 为大约 100nM 抑制 *LPS* 诱导的 *LAL* 反应。在相同试验中,该 *IC*₅₀ 大约比 *rBPT*₂₃ 的 *IC*₅₀ (9nm) 高 10 倍。其他 *CNBr* 消化片段无抑制活性。

对 *Asp-N* 消化产生的片段观察到的结果略有不同,其中发现 3 个片段在 *LAL* 试验中具有抑制力。与氨基酸 116—193 相应的片段表现出与完整 *rBPT*₂₃ 相似的 *LAL* 抑制活性,在 15nM 下能完全抑制 *LPS* 诱导的 *LAL* 反应。与氨基酸 57—104 和 1—38 相应的片段也抑制 *LAL* 试验,但所需量高 10 倍。这些结果与 *CNBr* 消化结果一起表明:在 *rBPT*₂₃ 分子中至少 3 个区域具有中和 *LAL* 反应中 *LPS* 激活的能力,其中具有最高效力的区域看来存在于 116—193 氨基酸片段内。

在实施例 22 的蛋白水解片段的有关试验中,涉及使用能封闭 *rBPT*₂₃ 杀菌和 *LAL* 抑制特性的兔多克隆抗-*rBPT*₂₃ 抗体和两种

不同的无封闭性的小鼠抗 $rBPT_{23}$ 单克隆抗体的 *ELISA* 试验。发现多克隆抗体能与 116—193 和 57—104 *Asp*—*N* 片段以及 1—56 和 112—170 *CNBr* 片段发生免疫反应,而鼠单克隆抗体仅与代表 $rBPT_{23}$ 残基 1—4 的 *Asp*—*N* 片段发生反应。

总之,该结果表明: $rBPT_{23}$ 含有 3 个有助于该分子全部生物学活性的功能区。第一个功能区在氨基酸 17—45 序列中并被 36 位残基的 *Asp*—*N* 裂解破坏。这一功能区在对 *LPS* 诱导的 *LAL* 活性及肝素结合试验的抑制作用中均具有中等程度的活性。第二个活性功能区在氨基酸 65—99 区域中,它对 *LPS* 诱导的 *LAL* 活性的抑制作用被 70 位残基的 *CNBr* 裂解消除。这一功能区也表现出最高肝素结合能力并含有杀菌肽 85—99。第 3 个活性功能区在氨基酸 142—169 之间,在 *LPS* 诱导的 *LAL* 刺激试验中具有抑制活性并在 3 个功能区中表现出最低的肝素结合能力。

其他杀菌蛋白质,如 *Cecropins* 和 *magainins*,其特征为含有为其活性所必需的一连续的亲水脂的 α —螺旋区。在 *LPS* 结合/杀菌分子的阳离子/疏水部位和肝素结合蛋白的同感序列间观察到高度结构相似性。在结合肝素的合成 $rBPT_{23}$ 肽与那些抑制 *LPS* 诱导的 *LAL* 反应的分子间存在极好的相关性($r=0.75$, $p=0.0001$, $n=47$)(图 14 至 16)。这些资料表明:*LPS* 和肝素对于与其相互作用的蛋白质而言可能呈现相似的电荷排列。因此,其他与 *LPS* 以高亲和力结合的蛋白质,也可能与肝素紧密结合。

根据本发明提供的优选实施例,以本发明的方法产生各种修饰型和变异体对本领域的技术人员而言是可预料到的。根据本发明的一个方面,设计了治疗革兰氏阴性细菌感染及其后遗症的方法,包括

施用具有革兰氏阴性杀菌活性的 *BPI* 蛋白质产物肽。因此,在本发明范围上出现的唯一限制是所附权利要求中的内容。

~EV~0360138.030903.6.SEQLIST.TXT

CPCH0360138D

序列表

<110> XOMA CORPORATION

<120> 杀菌/增强通透性蛋白质产物的治疗应用

<130> 31580

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1813

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(1491)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (124)..(1491)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<223> rBPI

<400> 1

caggccttga ggttttggca gctctggagg atg aga gag aac atg gcc agg ggc	54
Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly	
-30 -25	

cct tgc aac gcg ccg aga tgg gtg tcc ctg atg gtg ctc gtc gcc ata	102
Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile	
-20 -15 -10	

ggc acc gcc gtg aca gcg gcc gtc aac cct ggc gtc gtg gtc agg atc	150
Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile	
-5 -1 1 5	

tcc cag aag ggc ctg gac tac gcc agc cag cag ggg acg gcc gct ctg	198
---	-----

~EV~0360138. 030903. 6. SEQLIST. TXT

```

Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu
10                      15                      20                      25

cag aag gag ctg aag agg atc aag att cct gac tac tca gac agc ttt      246
Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe
                      30                      35                      40

aag atc aag cat ctt ggg aag ggg cat tat agc ttc tac agc atg gac      294
Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp
                      45                      50                      55

atc cgt gaa ttc cag ctt ccc agt tcc cag ata agc atg gtg ccc aat      342
Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn
                      60                      65                      70

gtg ggc ctt aag ttc tcc atc agc aac gcc aat atc aag atc agc ggg      390
Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly
                      75                      80                      85

aaa tgg aag gca caa aag aga ttc tta aaa atg agc ggc aat ttt gac      438
Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp
90                      95                      100                      105

ctg agc ata gaa ggc atg tcc att tcg gct gat ctg aag ctg ggc agt      486
Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser
                      110                      115                      120

aac ccc acg tca ggc aag ccc acc atc acc tgc tcc agc tgc agc agc      534
Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser
                      125                      130                      135

cac atc aac agt gtc cac gtg cac atc tca aag agc aaa gtc ggg tgg      582
His Ile Asn Ser Val His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp
                      140                      145                      150

ctg atc caa ctc ttc cac aaa aaa att gag tct gcg ctt cga aac aag      630
Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys
                      155                      160                      165

atg aac agc cag gtc tgc gag aaa gtg acc aat tct gta tcc tcc aag      678
Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Lys
170                      175                      180                      185

ctg caa cct tat ttc cag act ctg cca gta atg acc aaa ata gat tct      726
Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser
                      190                      195                      200

gtg gct gga atc aac tat ggt ctg gtg gca cct cca gca acc acg gct      774
Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala

```

~EV~0360138.030903.5.SEQLIST.TXT

205	210	215	
gag acc ctg gat gta cag atg aag ggg gag ttt tac agt gag aac cac			822
Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His			
220	225	230	
cac aat cca cct ccc ttt gct cca cca gtg atg gag ttt ccc gct gcc			870
His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala			
235	240	245	
cat gac cgc atg gta tac ctg ggc ctc tca gac tac ttc ttc aac aca			918
His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr			
250	255	260	265
gcc ggg ctt gta tac caa gag gct ggg gtc ttg aag atg acc ctt aga			966
Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg			
270	275	280	
gat gac atg att cca aag gag tcc aaa ttt cga ctg aca acc aag ttc			1014
Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe			
285	290	295	
ttt gga acc ttc cta cct gag gtg gcc aag aag ttt ccc aac atg aag			1062
Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys			
300	305	310	
ata cag atc cat gtc tca gcc tcc acc ccg cca cac ctg tct gtg cag			1110
Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln			
315	320	325	
ccc acc ggc ctt acc ttc tac cct gcc gtg gat gtc cag gcc ttt gcc			1158
Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala			
330	335	340	345
gtc ctc ccc aac tcc tcc ctg gct tcc ctc ttc ctg att ggc atg cac			1206
Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His			
350	355	360	
aca act ggt tcc atg gag gtc agc gcc gag tcc aac agg ctt gtt gga			1254
Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly			
365	370	375	
gag ctc aag ctg gat agg ctg ctc ctg gaa ctg aag cac tca aat att			1302
Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile			
380	385	390	
ggc ccc ttc ccg gtt gaa ttg ctg cag gat atc atg aac tac att gta			1350
Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val			
395	400	405	

~EV~0360138.030902.6.SEQLIST.TXT

```

ccc att ctt gtg ctg ccc agg gtt aac gag aaa cta cag aaa ggc ttc      1398
Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe
410                      415                      420                      425

cct ctc ccg acg ccg gcc aga gtc cag ctc tac aac gta gtg ctt cag      1446
Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln
                      430                      435                      440

cct cac cag aac ttc ctg ctg ttc ggt gca gac gtt gtc tat aaa      1491
Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
                      445                      450                      455

tgaaggcacc aggggtgccg ggggctgtca gccgcacctg ttctgatgg gctgtggggc      1551

accggtgcc tttccccagg gaatcctctc cagatcttaa ccaagagccc cttgcaaact      1611

tcttcgactc agattcagaa atgatctaaa cacgaggaaa cattattcat tggaaaagtg      1671

catggtgtgt attttaggga ttatgagctt ctttcaaggg ctaaggctgc agagatatatt      1731

cctccaggaa tcgtgtttca attgtaacca agaaatttcc atttgtgctt catgaaaaaa      1791

aacttctggt ttttttcatg tg                                          1813

```

<210> 2
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <223> rBPI

<400> 2

```

Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val
  -30                      -25                      -20

```

```

Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val
-15                      -10                      -5                      -1  1

```

```

Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala
      5                      10                      15

```

~EV~0360138.030903.6. SEQLIST. TXT

Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys
 20 25 30

Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly
 35 40 45

His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser
 50 55 60 65

Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser
 70 75 80

Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe
 85 90 95

Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile
 100 105 110

Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr
 115 120 125

Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser His Ile Asn Ser Val His Val His
 130 135 140 145

Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys
 150 155 160

Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys
 165 170 175

Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Lys Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu
 180 185 190

Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu
 195 200 205

Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys

~EV~0360138. 030903. 6. SEQLIST. TXT

210	215	220	225
Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro	230	235	240
Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly	245	250	255
Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala	260	265	270
Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser	275	280	285
Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val	290	295	300
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser	310	315	320
Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro	325	330	335
Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala	340	345	350
Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser	355	360	365
Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu	370	375	380
Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu	390	395	400
Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val	405	410	415

~EV~0360138. 030903. G. SEQLIST. TXT

Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val
420 425 430

Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe
435 440 445

Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
450 455

1

1

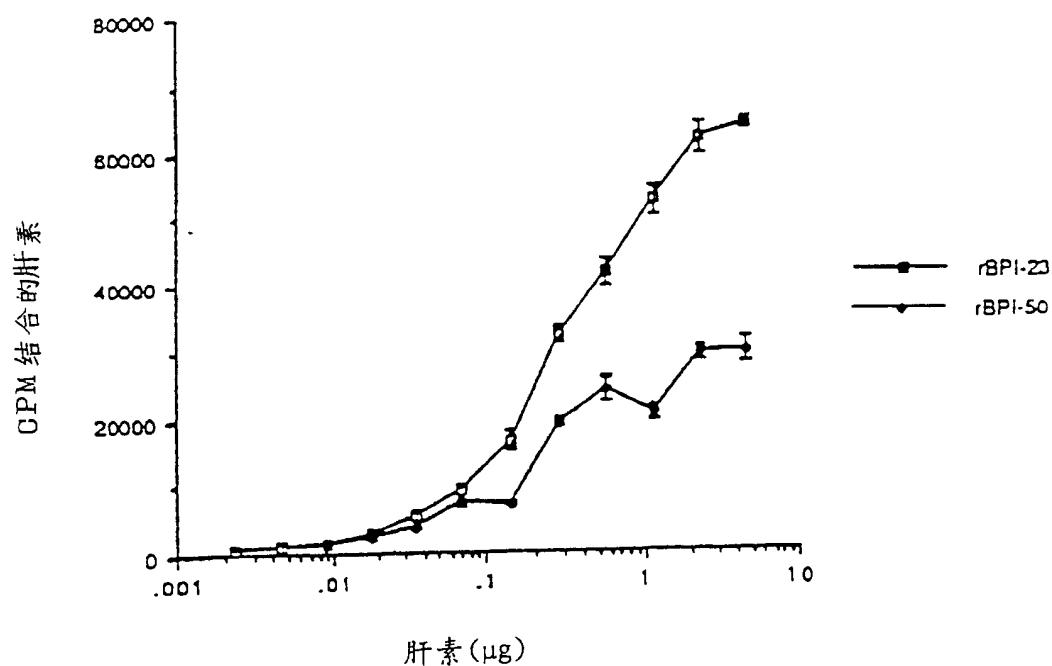


图 1

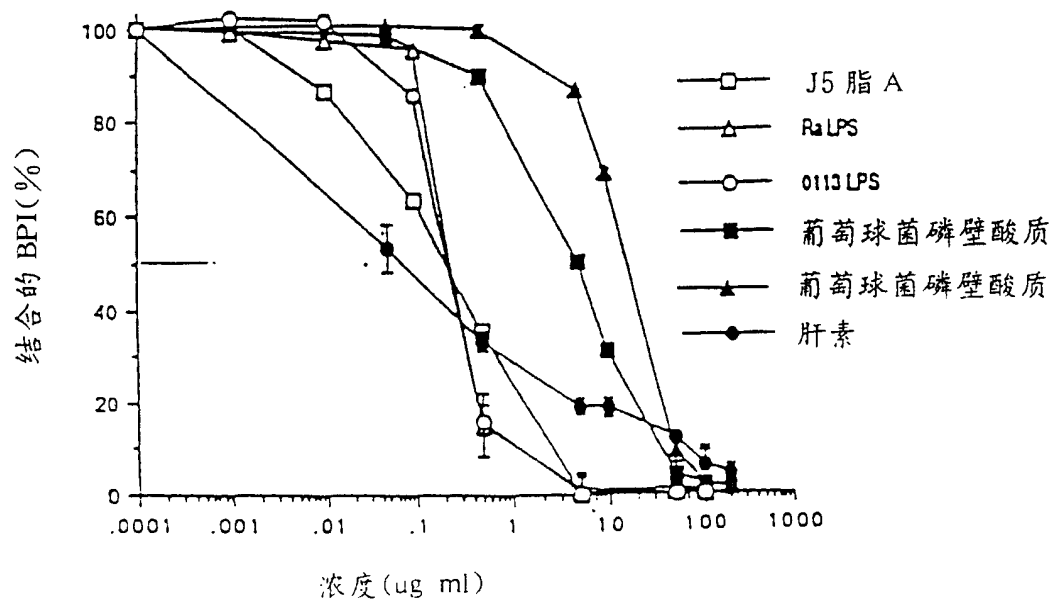


图 2

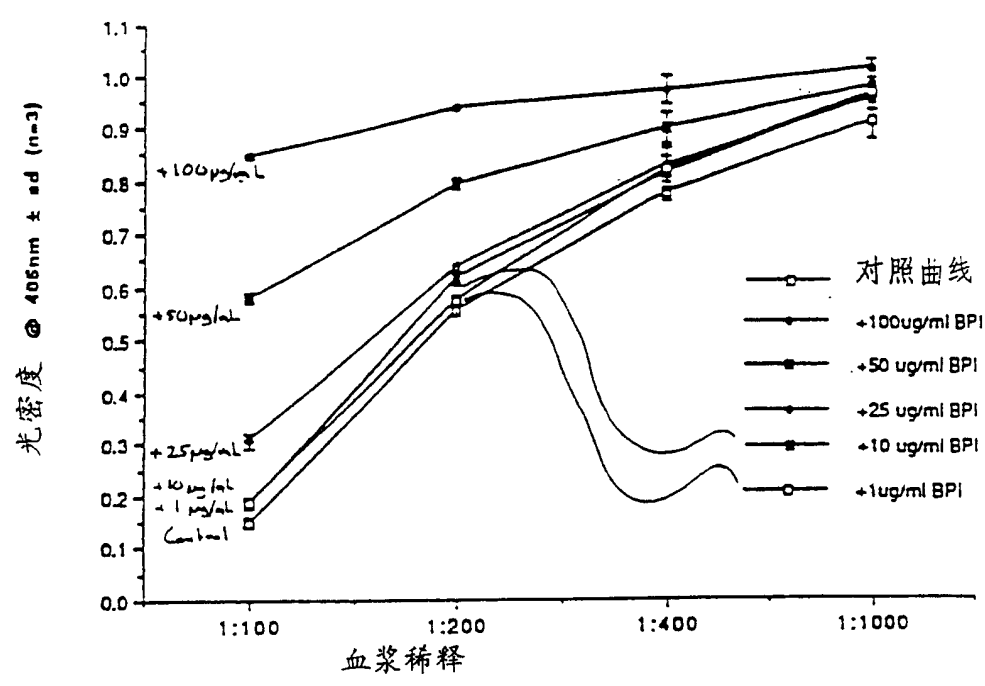


图 3

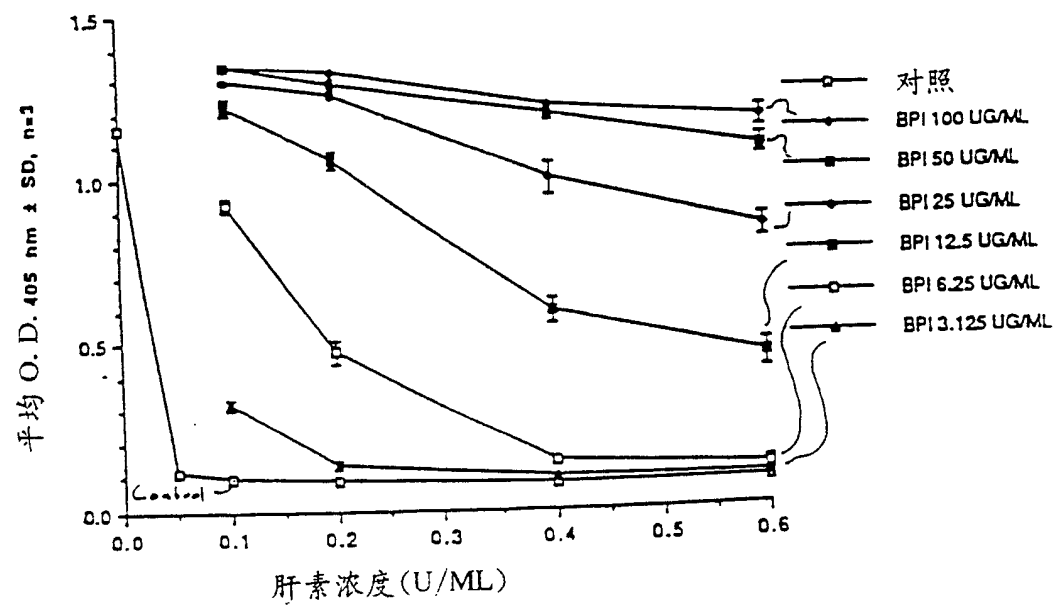


图 4

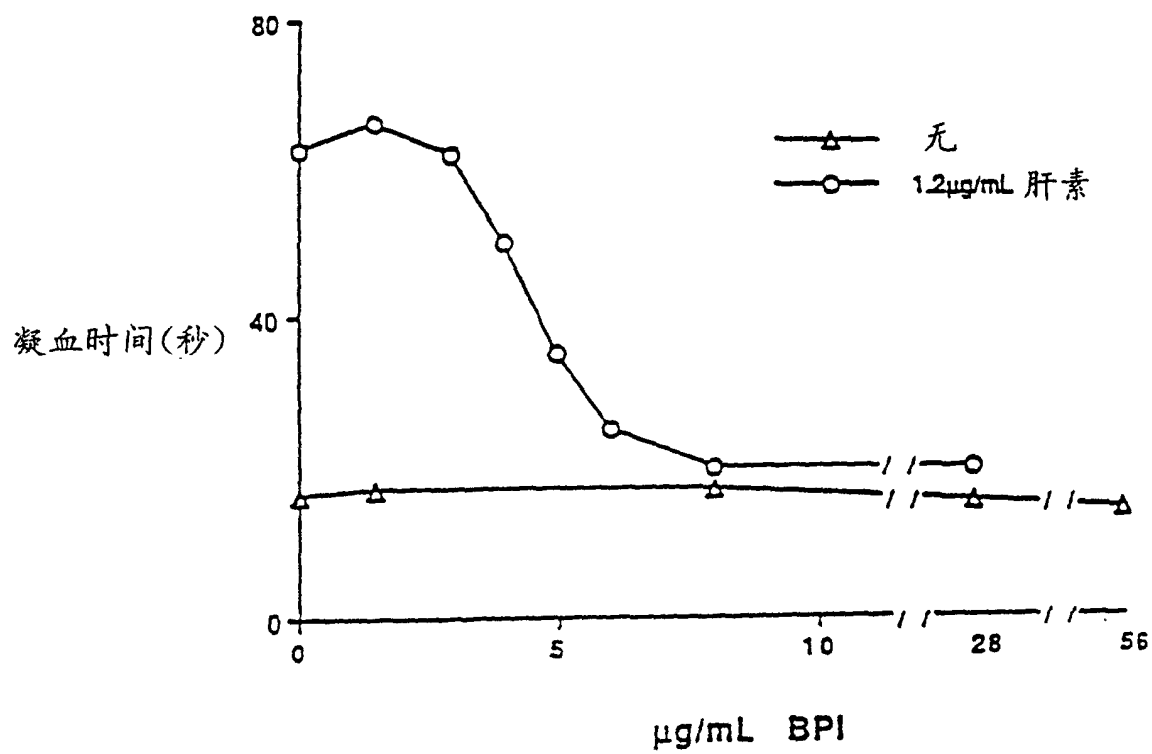
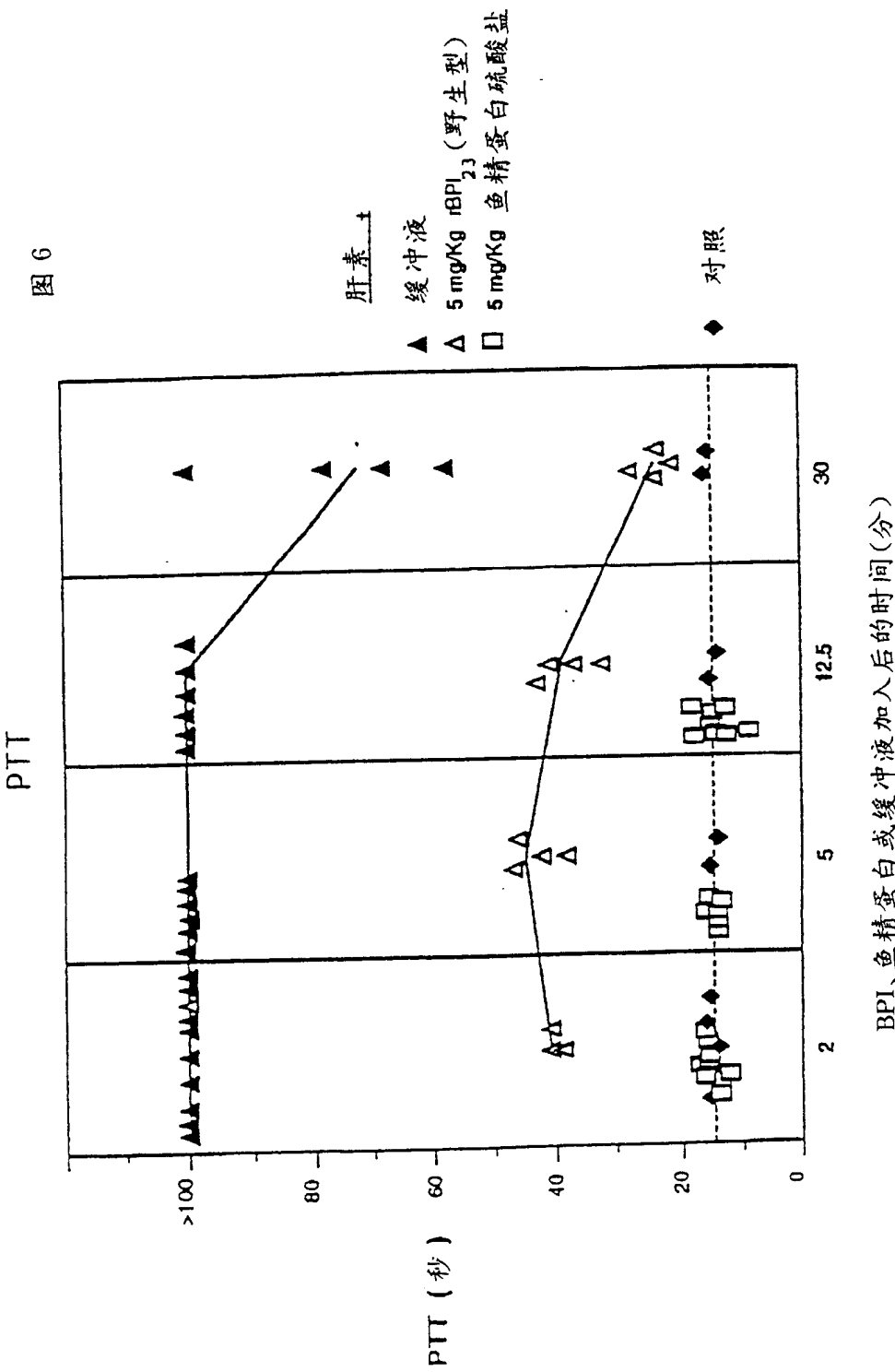


图 5

rBPI₂₃ 和鱼精蛋白硫酸盐对以肝素(100U/kg)处理过的大鼠的影响



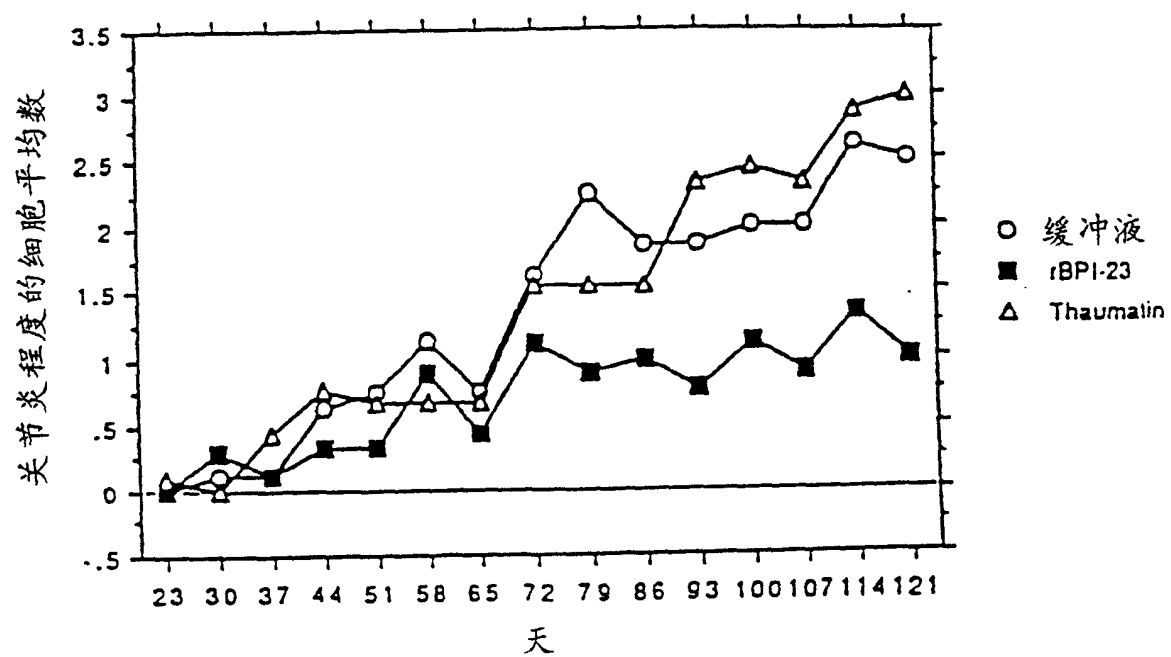


图 7

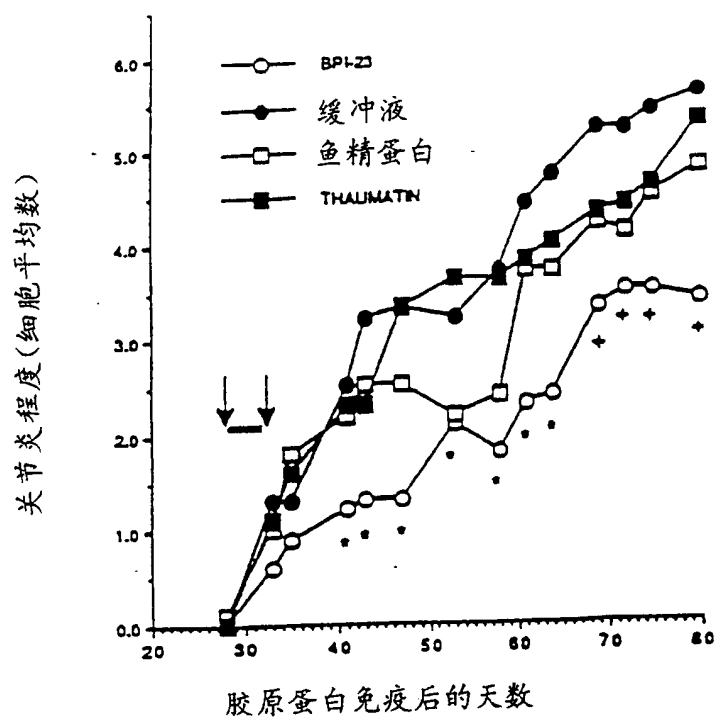


图 8

rBPI-23 在 Yersinia 诱导的关节炎

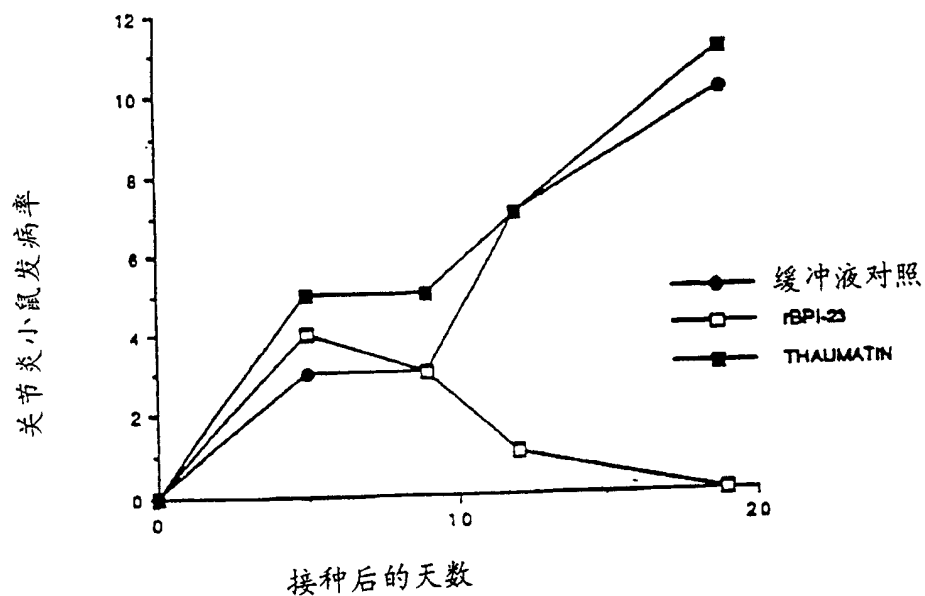


图 9

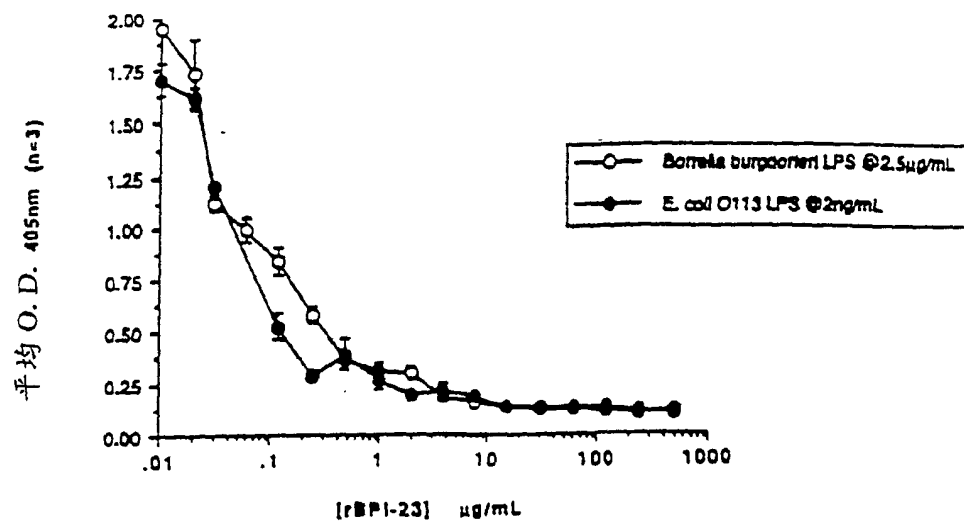
LAL试验,以 rBPI₂₃ 对 *Borrelia burgdorferi* LPS 的抑制

图 10

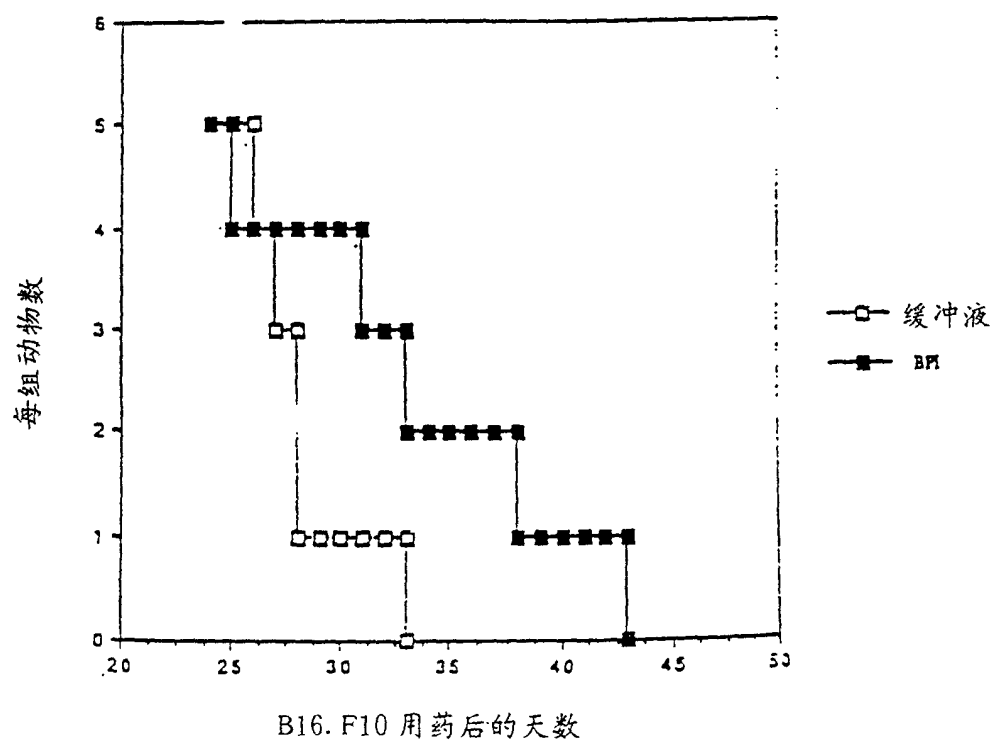


图 11

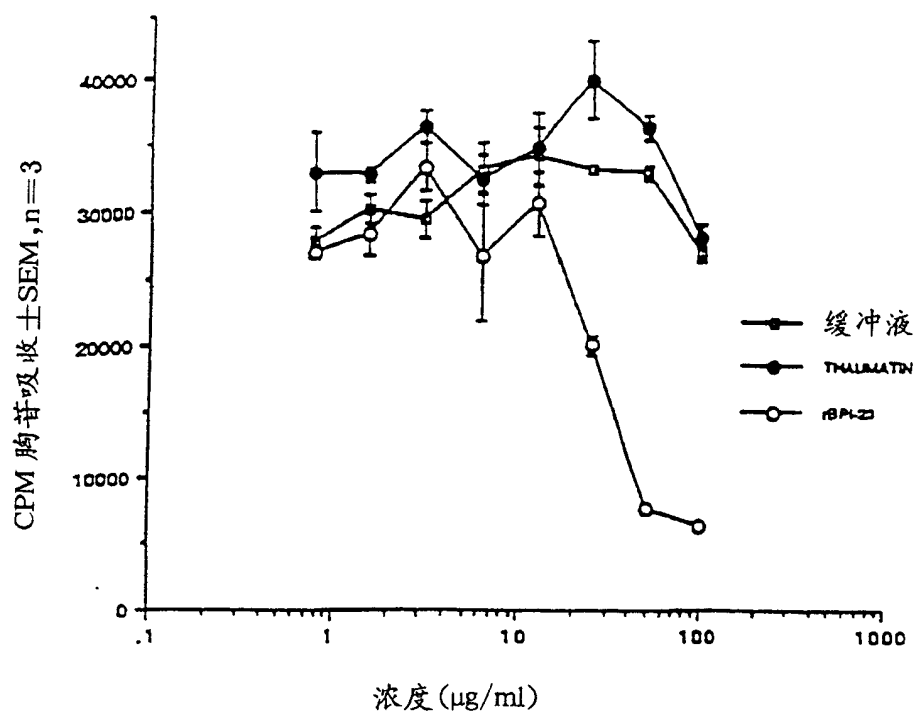


图 12

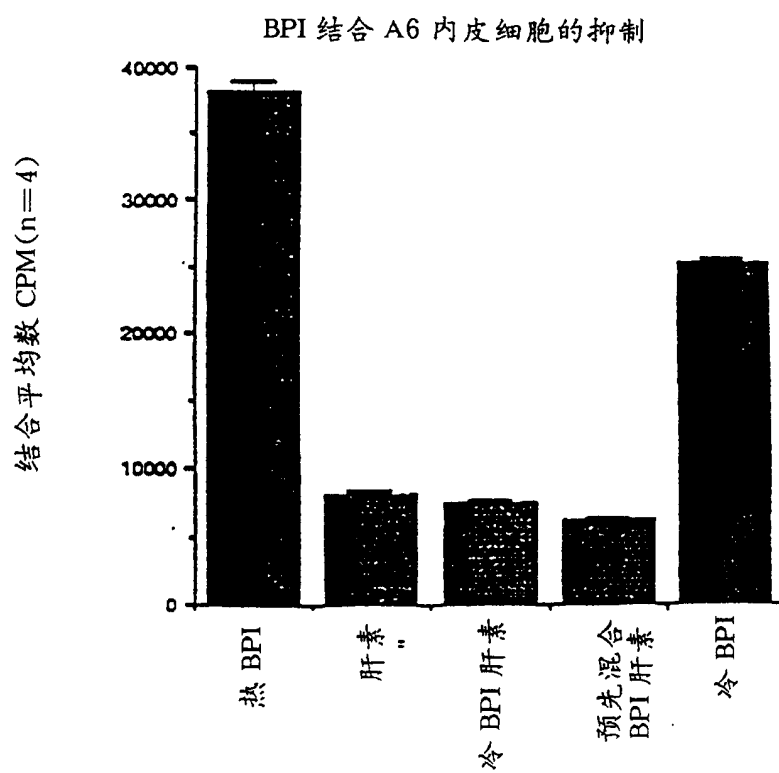


图 13

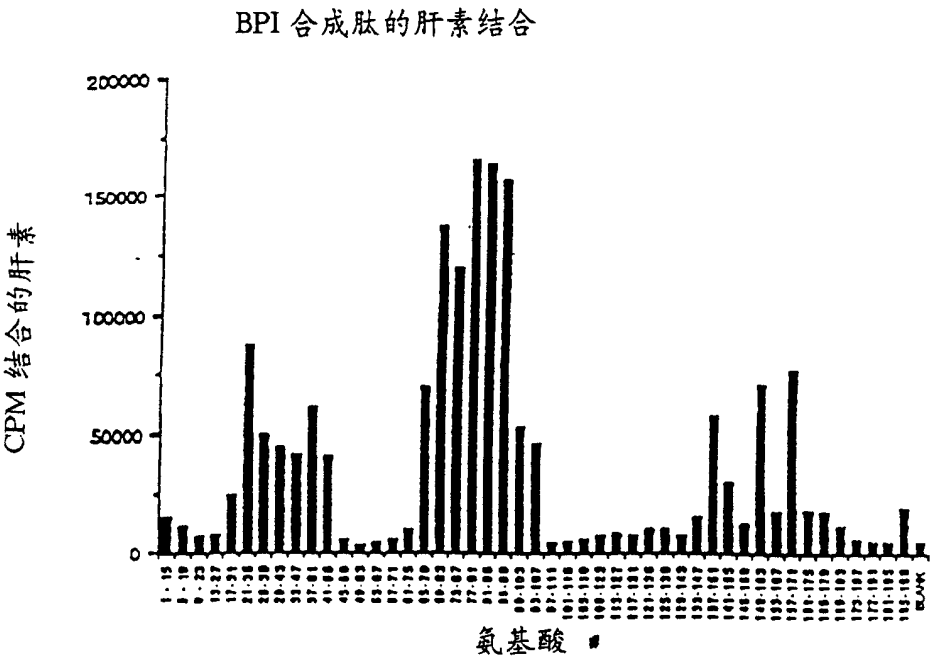


图 14

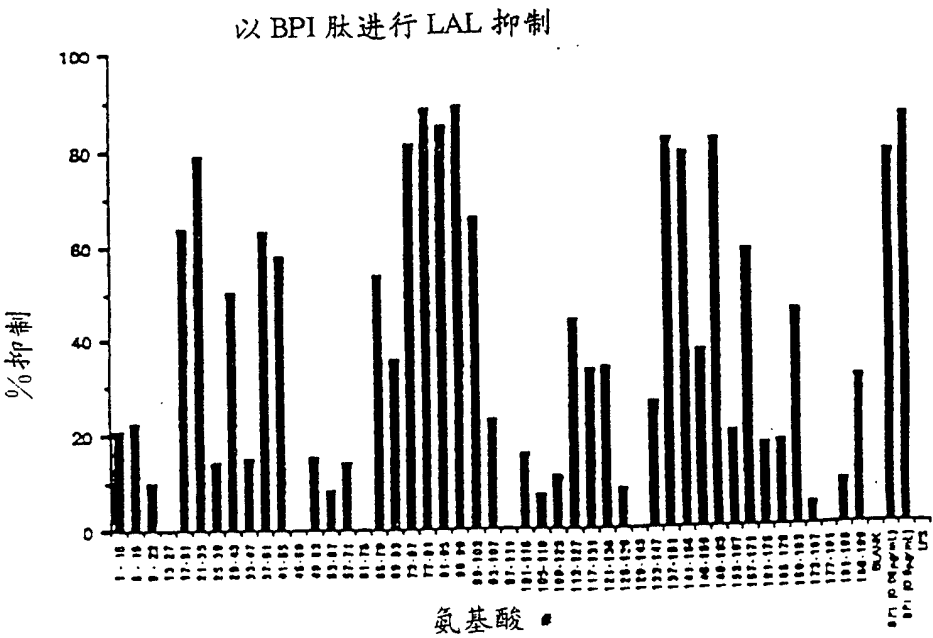


图 15

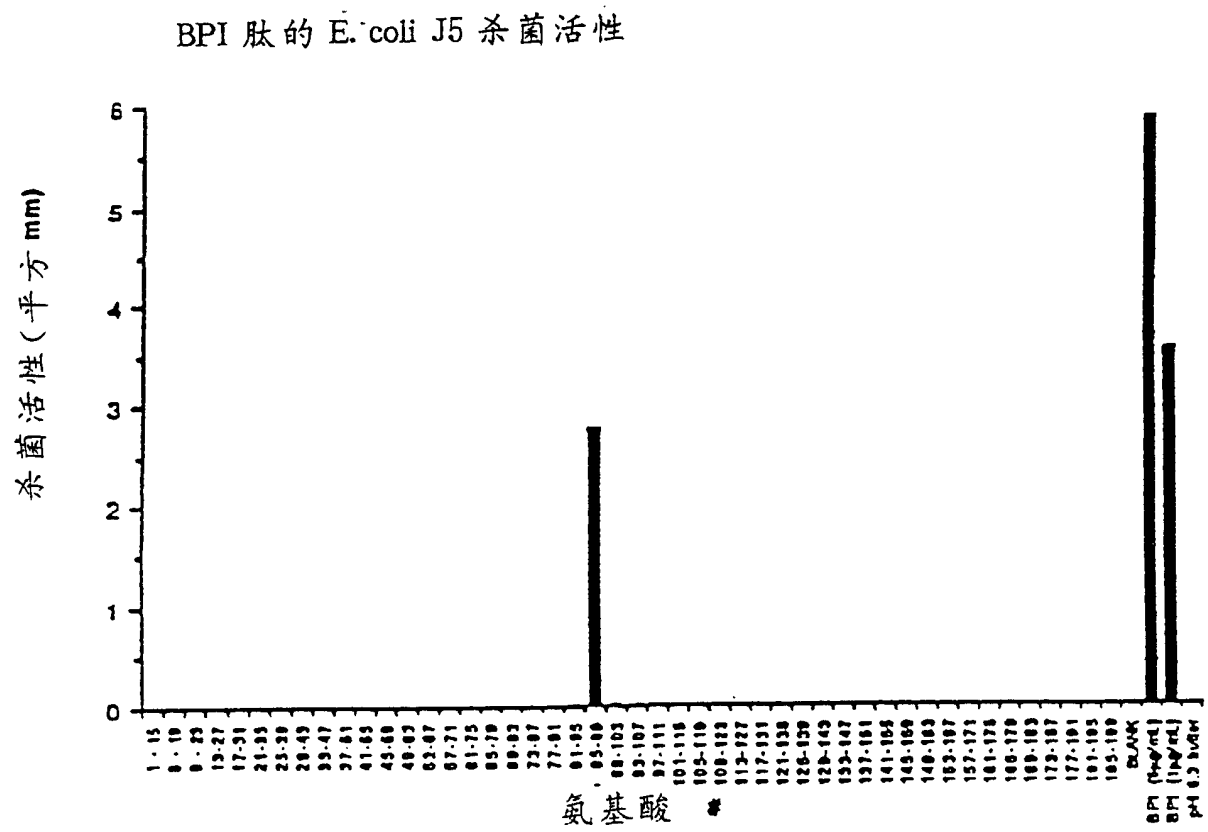


图 16

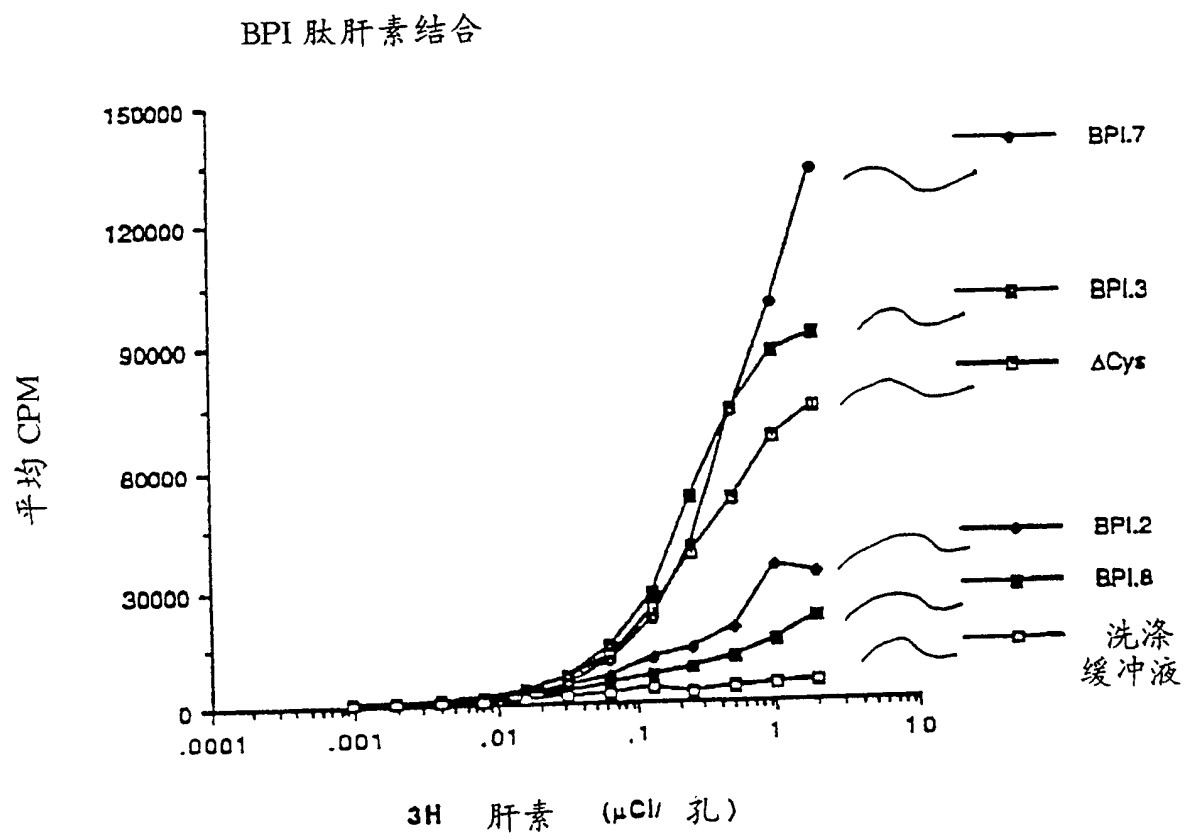


图 17

以凝血酶活性的 ATIII 抑制测定肝素中和

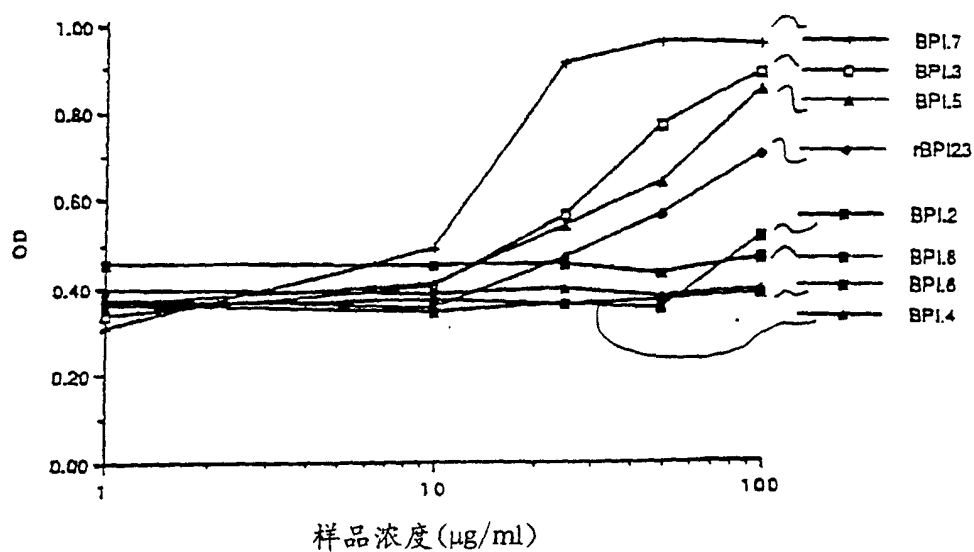


图 18a

以凝血酶活性的 ATIII 抑制测定肝素中和

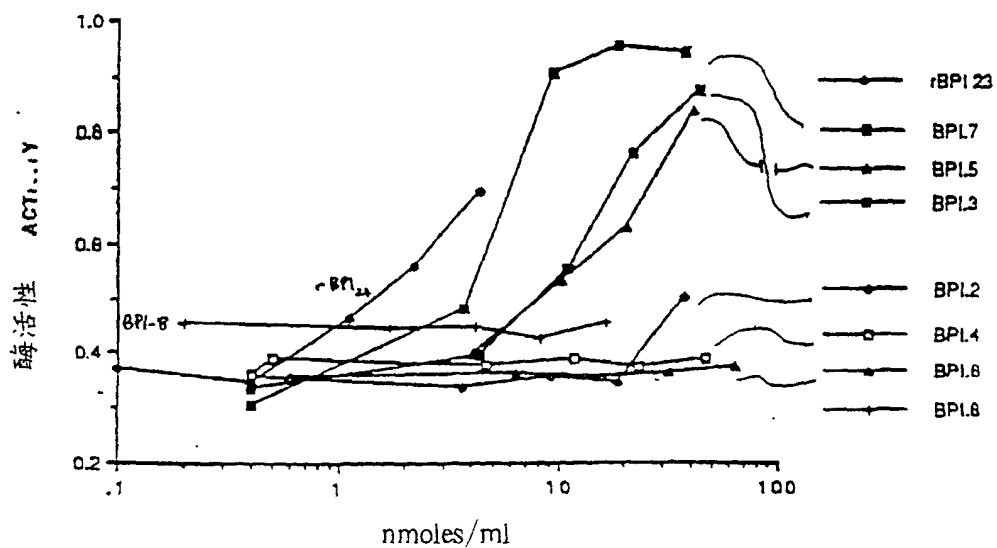


图 18b

LAL 抑制试验:BPI 肽的效力

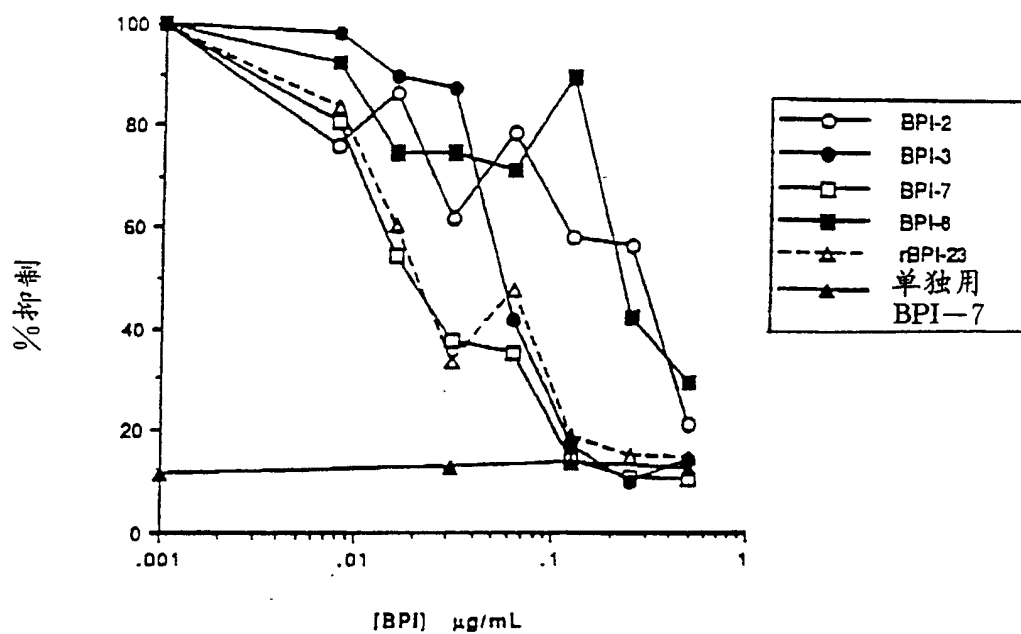


图 19a

LAL 抑制试验:BPI 肽

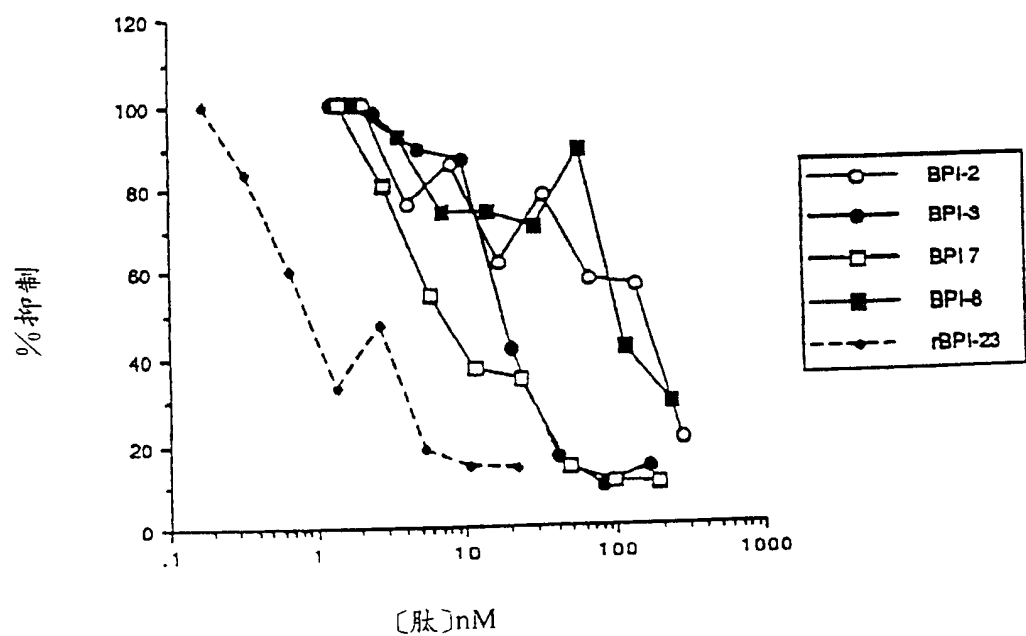


图 19.b

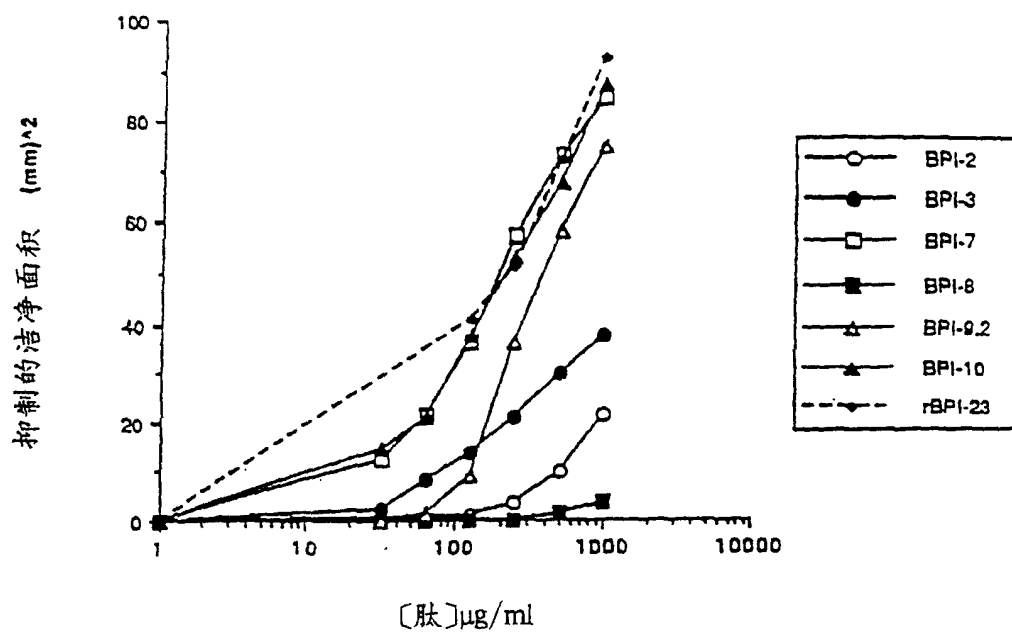
扩散式实验: BPI 肽对 $10^6/\text{mL}$ E. coli J5 的影响

图 20a

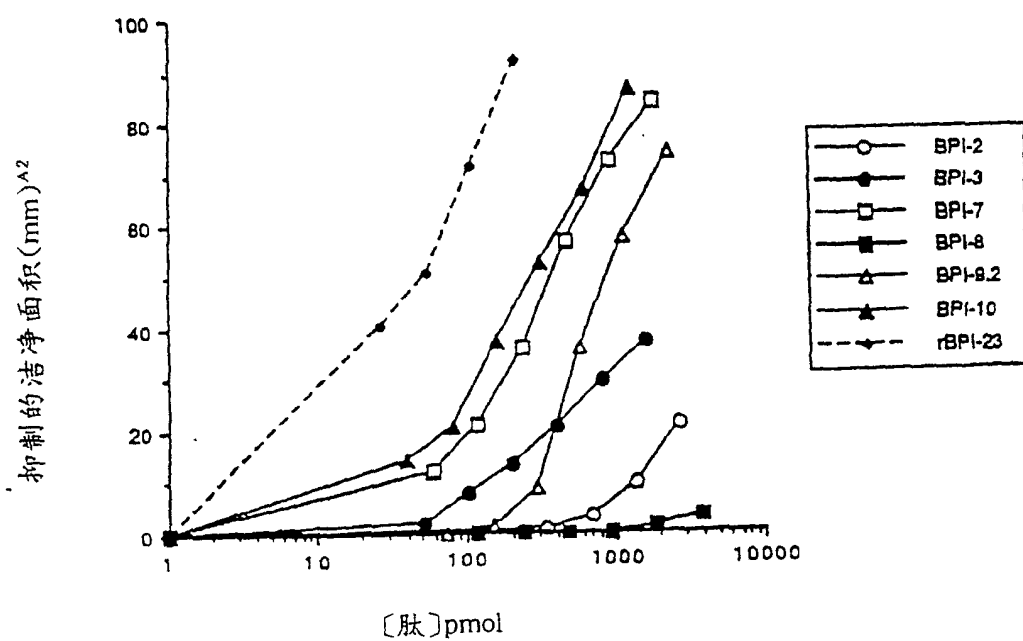
扩散试验: BPI 肽对 $10^6/\text{mL}$ E. coli J5 的影响

图 20b

扩散试验:BPI肽对 $10^6/\text{ml}$ E. coli 0111:B4 的影响

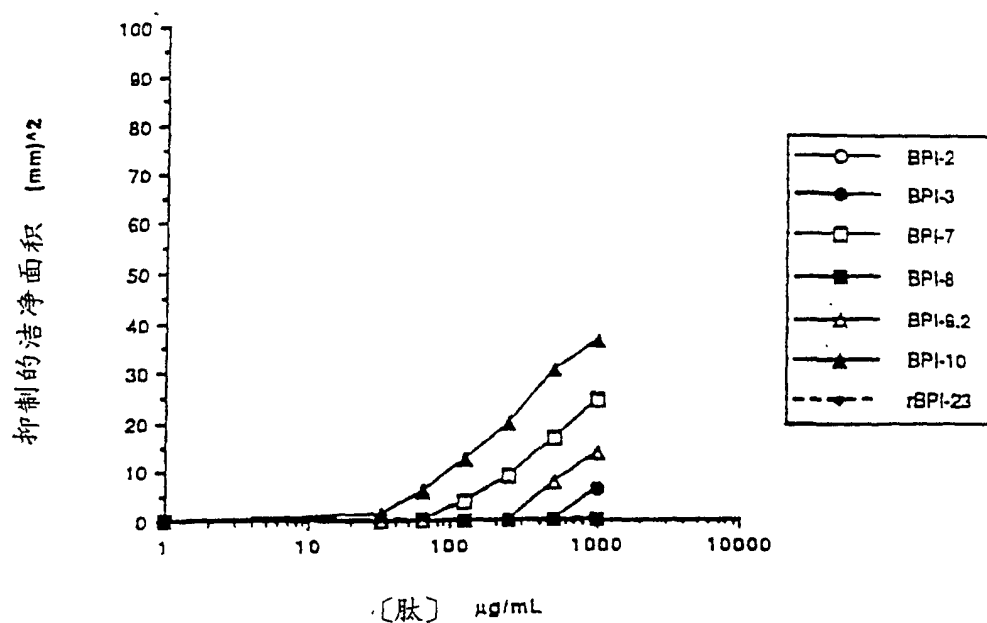


图 20C

扩散试验:BPI肽对 $10^6/\text{ml}$ E. coli 0111:B4 的影响

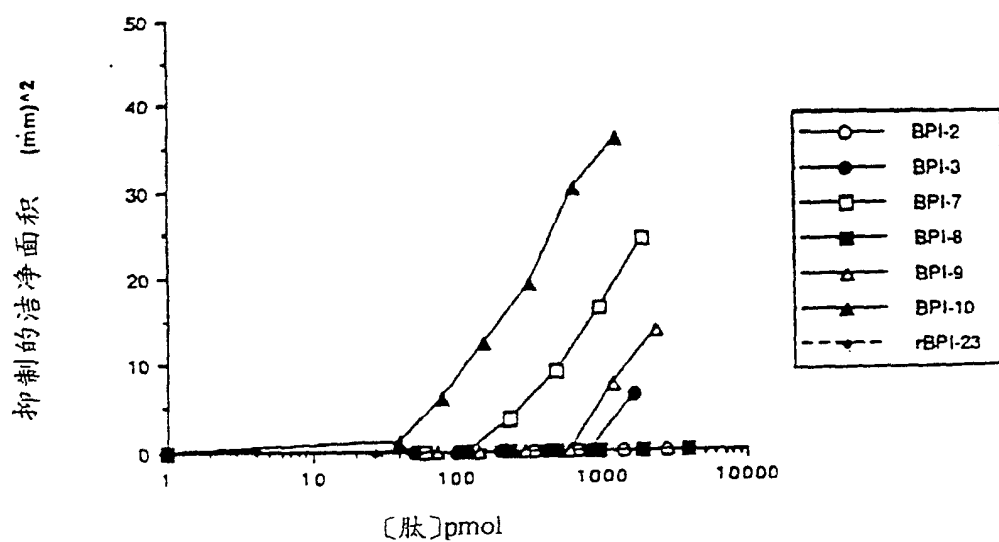


图 20d

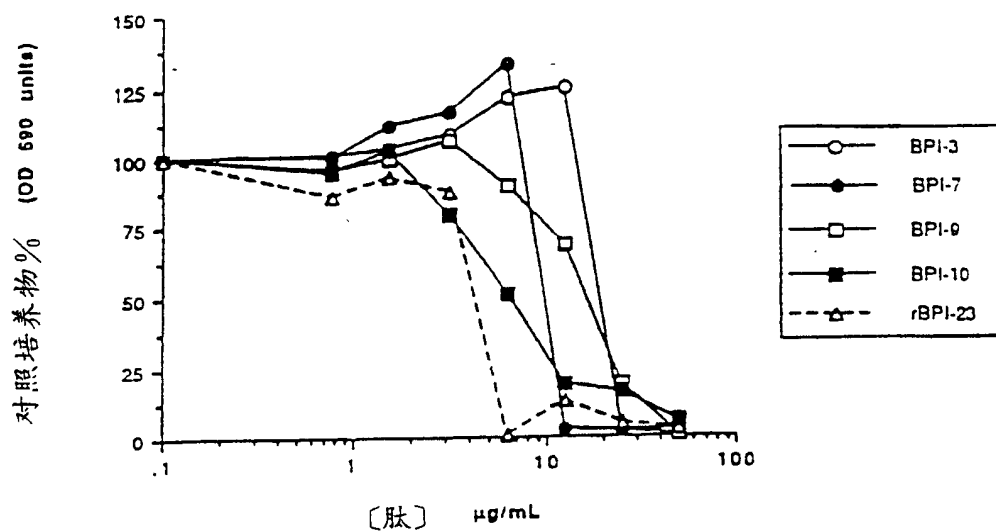
培养试验:BPI肽对 10^6 /ml E. coli (t:5hr)的影响

图 20e

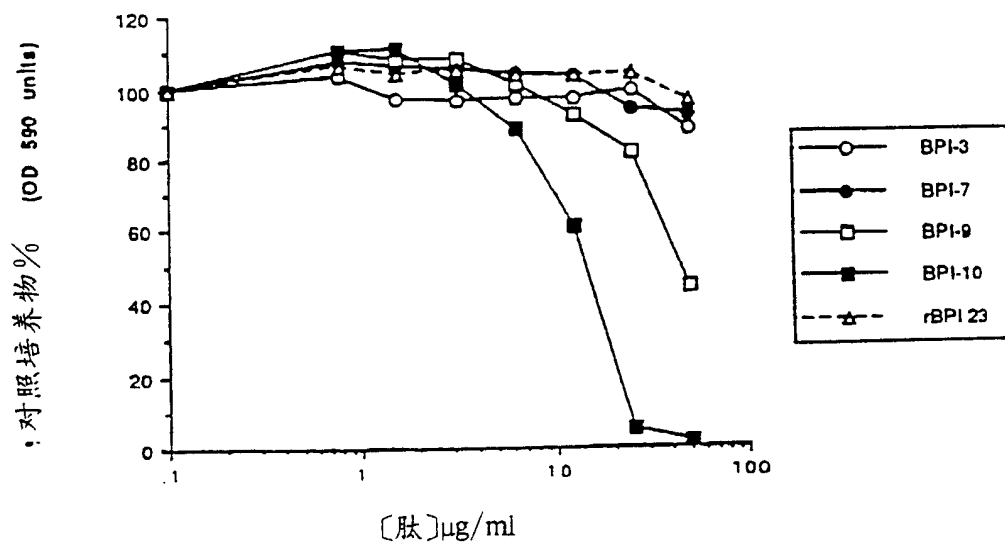
培养试验:BPI肽对 10^6 /ml E. coli 0111:B4(t=5hr)的影响

图 20f

图 21a

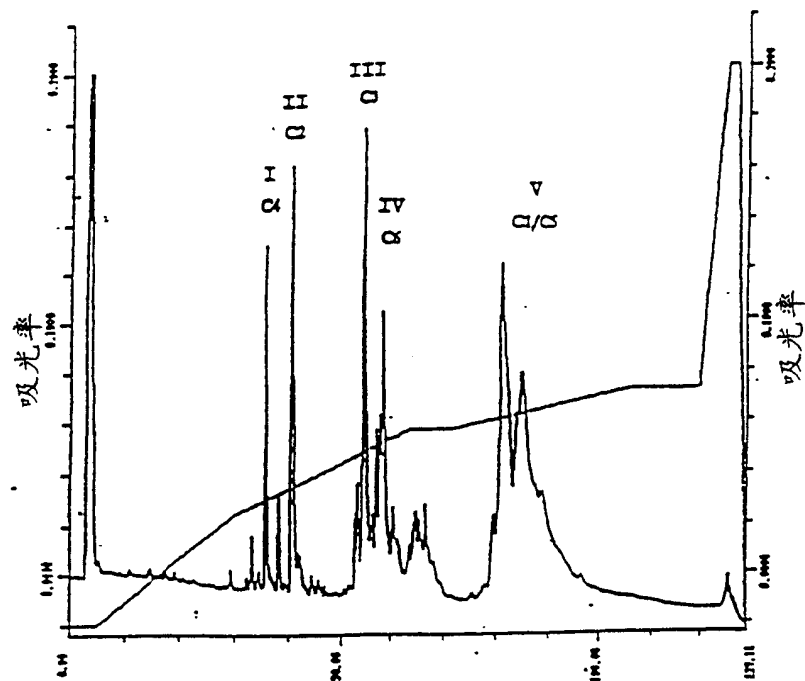
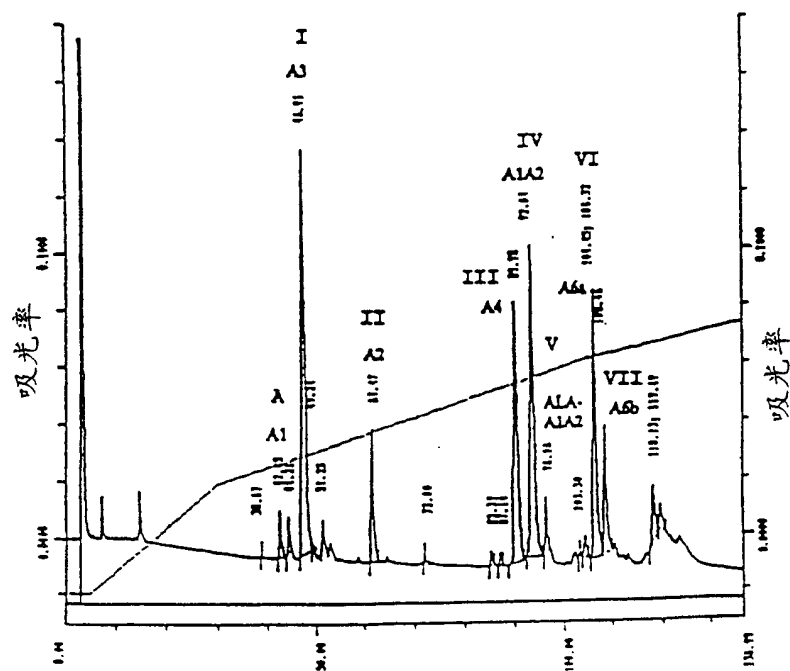
rBPI₂₃ CNBr 消化物的 HPLC 色谱rBPI₂₃ Asp-N 消化物的 HPLC 色谱

图 21b

LPS 诱导的 LAL 刺激之 BPI 片段抑制

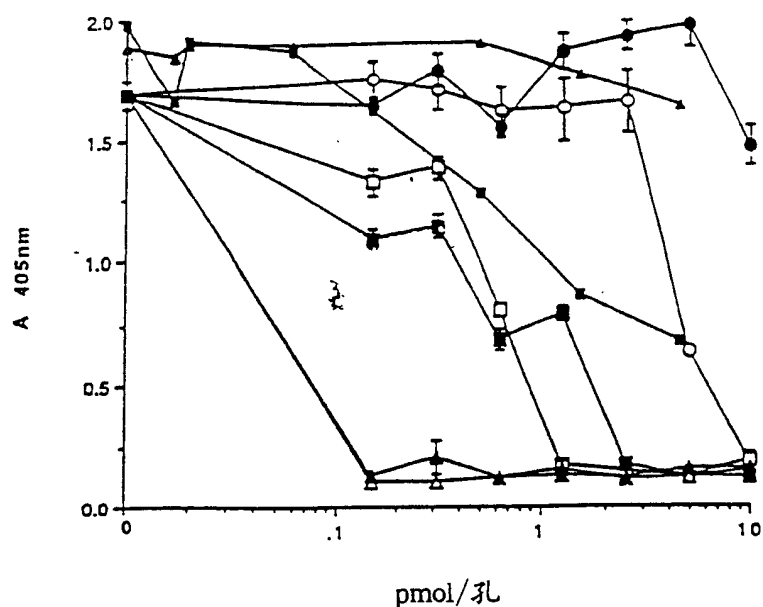


图 22

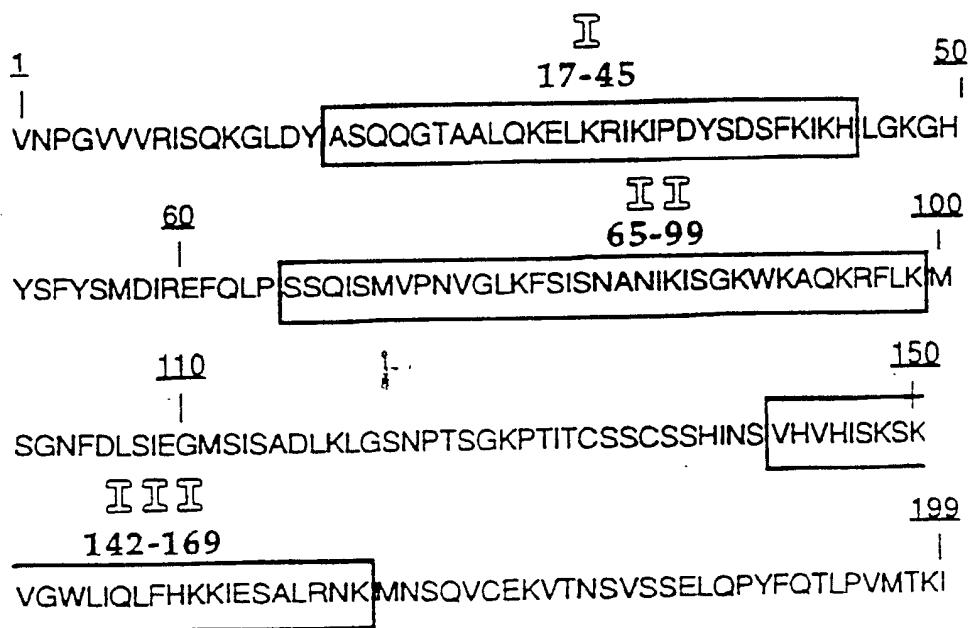
rBPI₂₃ 功能区

图 23