



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 08 749 T2 2005.03.10**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 196 440 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 08 749.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/17358**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 943 110.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/00655**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 14/47**
A61K 38/17, A61P 9/00

(30) Unionspriorität:

344219	25.06.1999	US
344827	25.06.1999	US

(73) Patentinhaber:

Xoma Technology Ltd., Berkeley, Calif., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LITTLE, G., Roger, Benicia, US; LIN, Jong-Jye,
Hercules, US; GIKONYO, G., J., Berkeley, US**

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHE PEPTIDE AUS UNTERSEQUENZEN VON BPI**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen Konstrukte auf der Grundlage von kleinen Peptiden, die 8-15 Aminosäuregruppen haben, einschließlich derivatisierter Konstrukte. Die Sequenzen dieser Konstrukte sind darauf angelegt und auf der Grundlage einer reversen Teilsequenz (99-85) von Aminosäuren hergestellt, die aus der Domäne II von bakterizidem/permeabilitätserhöhendem Protein (BPI) identifiziert und ausgewählt sind. Die Erfindung betrifft weiterhin therapeutische Verwendungen von solchen Konstrukten auf ihrer Heparin-verwandten Eigenschaften der Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation und/oder Inhibition der Angiogenese, z. B. Inhibition der in-vivo-Neovaskularisierung, einschließlich in Modellen von chronisch entzündlichen Krankheitszuständen und metastatischen Tumoren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Bakterizides/permeabilitätserhöhendes Protein (BPI) ist ein Protein, das aus den Granula von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) aus Säugetieren isoliert ist, die Blutzellen sind, die bei der Verteidigung eines Säugetiers gegen eindringende Mikroorganismen essentiell sind. Menschliches BPI ist aus PMNs mittels Säureextraktion in Kombination mit entweder Ionenaustauschchromatographie (Elsbach, 1979, J. Biol. Chem. 254: 11000) oder E. coli-Affinitätschromatographie (Weiss et al., 1987, Blood 69: 652) isoliert worden und hat bakterizide Aktivität gegen gram-negative Bakterien. Das Molekulargewicht von menschlichem BPI ist näherungsweise 55.000 Daltons (55 kd). Die Aminosäuresequenz des gesamten menschlichen BPI-Proteins und die Nukleinsäuresequenz der DNA, die für BPI kodiert, sind von Gray et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 9505 berichtet worden (siehe **Fig. 1** in Gray et al.). Die DNA- und Aminosäuresequenzen aus Gray et al. werden in SEQ ID NO: 27 und 28 hier dargestellt.

[0003] Ursprünglich war berichtet worden, daß der bakterizide Effekt von BPI hochspezifisch auf empfindliche gram-negative Spezies ist. Der genaue Mechanismus, mit dem BPI gramnegative Bakterien tötet, ist noch nicht bekannt, aber es ist bekannt, daß sich BPI zuerst an die Oberfläche von empfindlichen gram-negativen Bakterien anhängen muß. Diese anfängliche Bindung von BPI an die Bakterien beinhaltet elektrostatische Interaktionen zwischen BPI, das ein basisches (d. h. positiv geladenes) Protein ist, und negativ geladenen Stellen auf Lipopolysacchariden (LPS). LPS ist ebenso als "Endotoxin" bekannt wegen der potenten entzündlichen Antwort, die es hervorruft. LPS induziert die Freisetzung von Mediatoren durch Entzündungszellen aus dem Wirt, die letztendlich zu einem irreversiblen Endotoxinstock führen kann. BPI bindet an Lipid A, den toxischsten und biologisch aktivsten Bestandteil von LPS.

[0004] BPI ist ebenso in der Lage, die Endotoxineigenschaften von LPS, an welches es bindet, zu neutralisieren. Wegen seiner gram-negativen bakteriziden Eigenschaften und seiner Fähigkeit, an LPS zu binden und es zu neutralisieren, kann BPI zur Behandlung von Säugetieren verwendet werden, die an Krankheiten und Zuständen leiden, welche durch die Infektion mit gram-negativen Bakterien ausgelöst werden, sei es, daß die Bakterien den Wirt von außen infizieren oder sei es, daß die Bakterien den Wirt von innen infizieren (d. h. aus dem Darm stammend), einschließlich Zuständen der Bakteriämie, Endotoxinämie und Sepsis. Diese Eigenschaften von BPI machen BPI besonders nützlich und vorteilhaft für solche therapeutischen Verabreichungen.

[0005] Ein proteolytisches Fragment, entsprechend dem amino-terminalen Teil von menschlichem BPI, besitzt die LPS-Bindungs- und Neutralisierungsaktivitäten und die antibakterielle Aktivität von BPI-Holoprotein. Im Gegensatz zu dem amino-terminalen Teil weist die carboxyterminale Region von isoliertem menschlichem BPI nur geringfügig nachweisbare antibakterielle Aktivität und eine gewisse Endotoxin-neutralisierende Aktivität auf (Ooi et al., 1991, J. Exp. Med. 174: 649). Ein amino-terminales BPI-Fragment, bezeichnet als "rBPI₂₃" (siehe Gazzano-Santoro et al., 1992, Infect. Immun: 60: 4754-4761), ist mittels rekombinanter Mittel als ein 23 kD-Protein hergestellt worden und umfaßt ein Expressionsprodukt von DNA, kodierend für die ersten 199 Aminosäurereste des menschlichen BPI-Holoproteins, genommen von Gray et al., oben, außer daß Valin an Position 151 durch GTG statt durch GTC spezifiziert ist und daß Rest 185 Glutaminsäure (spezifiziert durch GAG) statt Lysin (spezifiziert durch AAG) ist. Rekombinantes Holoprotein, auch als rBPI bezeichnet, ist ebenso mit der in SEQ ID NO: 27 und 28 dargestellten Sequenz erzeugt worden, entnommen aus Gray et al., supra, mit den für rBPI₂₃ festgestellten Ausnahmen, wie ebenso in U. S. Patent Nr. 5,198,541 gezeigt. Ein N-terminales Fragment-Analog, bezeichnet als rBPI₂₁ oder rBPI₂₁Δcys oder rBPI (1-193) ala¹³², ist in U. S. Patent Nr. 5,420,019 mit gemeinsamer Inhaberschaft und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungsnr. WO 94/18323 (PCT/LTS94/01235) beschrieben worden. Dieses Analog umfaßt die ersten 193 Aminosäuren von BPI-Holoprotein, wie in SEQ ID NO: 27 und 28 dargestellt, worin aber Cystein am Rest Nummer 132 durch

Alanin substituiert ist und mit den für rBPI₂₃ festgestellten Ausnahmen. rBPI₂₃, ebenso wie das Cysteinsubstitutionsanalog, bezeichnet als rBPI₂₁, sind in menschliche klinische Versuche eingeführt worden. Pro-inflammatorische Antworten auf Endotoxin wurden signifikant verbessert, wenn rBPI₂₃ an Menschen verabreicht wurde, die mit Endotoxin belastet waren. (Siehe z. B. U. S. Patente No. 5,643,875 und 5,753,620 mit gemeinsamer Inhaberschaft und die entsprechende internationale Veröffentlichungsnr. WO 95/19784 (PCT/US95/01151). Zusätzlich wurde rBPI₂₁ an Menschen mit Meningokokkämie und Blutungen aufgrund von Trauma verabreicht. (Siehe z. B. U. S. Patent Nr. 5,888,977 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungsnr. WO 97/42966 (PCT/US97/08016) und U. S. Patent Nr. 5,756,464 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungsnr. WO 97/44056 (PCT/US97/08941).

[0006] Andere Endotoxin-Bindungs- und Neutralisierungsproteine und -Peptide sind auf dem Gebiet bekannt. Ein Beispiel ist der Limulus Antilipopolsaccharid-Faktor (LALF) aus Amöbocyten des Pfeilschwanzkrebses (Warren et al., 1992, *Infect. Immunol.* 60: 2506–2513). Ein weiteres Beispiel ist ein zyklisches, kationisches Lipopeptid aus *Bacillus polymyxa*, bezeichnet als Polymyxin B₁. Polymyxin B₁ ist aus sechs α,γ -Diaminobuttersäureresten, einem D-Phenylalanin, einem Leucin, einem Threonin und einer 6-Methyloctanoyleinheit zusammengesetzt (Morrison und Jacobs, 1976, *Immunochem.* 13: 813–818) und ist ebenso bakterizid. Polymyxin-Analoga, denen die Fettsäuregruppe fehlt, sind ebenso bekannt, wobei diese Analoga die LPS-Bindungs-kapazität beibehalten, aber ohne merkbare bakterizide Aktivität sind (Danner et al., 1989, *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1428–1434). Ähnliche Eigenschaften sind ebenso bei synthetischen zyklisierten Polymyxin-Analogen gefunden worden (Rustici et al., 1993, *Science* 259: 361–365).

[0007] Bekannte antibakterielle Peptide schließen Cecropine und Magainine ein. Die Cecropine sind eine Familie von antibakteriellen Peptiden, die in der Hämolymphe von Lepidoptera-Insekten gefunden werden (Wade et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4761–4765), und die Magainine sind eine Familie von antibakteriellen Peptiden, die in der Haut und Magenschleimhaut von *Xenopus* gefunden werden (Zasloff et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 910–913). Diese Peptide sind linear und haben eine Länge im Bereich von ungefähr 20 bis ungefähr 40 Aminosäuren. Über ein weniger aktives Cecropin aus Säugetieren aus der Schweine-Darmschleimhaut ist berichtet worden, Cecropin P1 (Boman et al., 1993, *Infect. Immun.* 61: 2978–2984). Es wird im allgemeinen berichtet, daß die Cecropine potenter als die Magainine hinsichtlich der bakteriziden Aktivität sind und weniger Cytotoxizität gegenüber Säugetierzellen zu haben scheinen. Die Cecropine und Magainine sind durch eine kontinuierliche, amphipathische α -helikale Region charakterisiert, die für die bakterizide Aktivität notwendig ist. Das potenteste der Cecropine, das bis heute identifiziert worden ist, ist Cecropin A. Die Sequenz der ersten zehn Aminosäuren des Cecropins A hat eine gewisse Homologie mit der BPI-Aminosäuresequenz 90–99, teilt aber nicht das Motiv der geladenen und ungeladenen Aminosäuren, die durch die BPI-Aminosäuresequenzen 90–99 spezifiziert ist. Zusätzlich sind die anderen 27 Aminosäuren von Cecropin A für eine maximale bakterizide Aktivität notwendig, und es gibt keine Homologie mit BPI für diese 27 Aminosäuren. Die Magainine haben eine minimale Homologie mit der BPI-Aminosäuresequenz 90–99.

[0008] Von Interesse für die vorliegende Anmeldung sind die Offenbarungen in der Internationalen PCT-Anmeldung PCT/US91/05758 [WO 92/03535], betreffend Zusammensetzungen, umfassend BPI und eine anionische Verbindung, wobei die Zusammensetzungen (1) keine bakterizide Aktivität und (2) eine Endotoxin-neutralisierende Aktivität aufweisen sollen. Die anionischen Verbindungen sind bevorzugt ein Protein, wie etwa Serumalbumin, können aber ebenso ein Polysaccharid, wie etwa Heparin sein. Zusätzlich offenbaren Weiss et al., 1975, *R Clin. Invest.* 55: 33–42, daß Heparinsulfat und LPS die Expression der permeabilitätserhöhenden Aktivität von BPI blockieren. Jedoch offenbart keine der beiden Literaturstellen, daß BPI tatsächlich an die biologischen Aktivitäten von Heparin bindet und/oder diese neutralisiert. Die Heparinbindung impliziert nicht notwendigerweise die Heparinneutralisierung. Zum Beispiel erfordert eine Familie von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (HBGF) Heparin als einen Cofaktor, um eine biologische Antwort auszulösen. Beispiele für HBGFs schließen ein: Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF-1, FGF-2) und Endothelzellwachstumsfaktoren (ECGF-1, ECGF-2). Antithrombin-III-Inhibition der Gerinnungskaskadenproteasen ist ein weiteres Beispiel für ein Heparin-bindendes Protein, das Heparin für seine Aktivität benötigt und eindeutig Heparin nicht neutralisiert. Die Heparin-bindenden Proteine, die Heparin nicht neutralisieren (z. B. Blutplättchenfaktor IV, Protamin und Thrombospondin) sind im allgemeinen inhibitorisch für die Aktivitäten, die durch Heparin-bindende Proteine induziert werden, die Heparin als einen Cofaktor verwenden.

[0009] Von besonderem Interesse für die vorliegende Anmeldung sind die Heparin-verwandten Aktivitäten von BPI-Proteinprodukten. Insbesondere ist gezeigt worden, daß BPI-Proteinprodukte Heparinbindungs- und Heparin-Neutralisierungsaktivitäten haben, in gemeinsam übertragenen U. S. Patenten Nr. 5,348,942, 5,639,727, 5,807,818, 5,837,678, 5,854,214 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungsnr. WO 94/20128 (PCT/US94/02401). Zum Beispiel wurde gezeigt, daß rBPI₂₃ eine hohe Affinität für Heparin hat (siehe

ebenso Little et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 1865–1872), und ist an Menschen verabreicht worden, um Heparin zu neutralisieren (siehe z. B. U. S. Patent Nr. 5,348,942). Diese Heparinbindungs- und Neutralisierungsaktivitäten von BPI-Proteinprodukten sind aufgrund der Wichtigkeit von gegenwärtigen klinischen Verwendungen von Heparin signifikant. Heparin wird im allgemeinen in Dosen von bis zu 400 U/kg während chirurgischen Prozeduren verabreicht, wie kardiopulmonalem Bypass, Herzkatheterisierung und Hämodialyse-Prozeduren, um eine Blutkoagulation während solcher Prozeduren zu verhindern. Wenn Heparin während einer Operation aufgrund seiner anti-coagulierenden Effekte verabreicht wird, ist es ein wichtiger Aspekt der postoperativen Therapie, daß die Effekte von Heparin in rascher Weise neutralisiert werden, so daß die normale Coagulationsfunktion wiederhergestellt werden kann. Gegenwärtig wird Protamin verwendet, um Heparin zu neutralisieren. Protamine sind eine Klasse von einfachen, Arginin-reichen, stark basischen, niedrigmolekulargewichtigen Proteinen. Bei alleiniger Verabreichung haben Protamine (gewöhnlich in der Form von Protaminsulfat) anti-coagulierende Effekte. Bei Verabreichung in der Anwesenheit von Heparin wird ein stabiler Komplex gebildet, und die anti-coagulierende Aktivität von beiden Arzneien wird verloren. Jedoch haben signifikante hypotensive und anaphylaktoide Effekte von Protamin seine klinische Nützlichkeit beschränkt. Daher haben BPI-Proteinprodukte aufgrund seiner Heparinbindungs- und Neutralisierungsaktivitäten eine potentielle Nützlichkeit als ein Ersatz für Protamin bei der Neutralisierung von Heparin in einem klinischen Kontext ohne die nachteiligen Nebenwirkungen, die die Nützlichkeit der Protamine beschränkt haben. Die zusätzlichen antibakteriellen und anti-Endotoxineffekte von solchen BPI-Proteinprodukten wären ebenso bei der postoperativen Heparinneutralisierung nützlich und vorteilhaft im Vergleich mit Protamin.

[0010] Zusätzlich ist von besonderem Interesse die Aktivität von BPI-Proteinprodukten, die Angiogenese teilweise aufgrund ihrer Heparinbindungs- und Neutralisierungsaktivitäten zu inhibieren. (Siehe z. B. U. S. Patent Nr. 5,807,818 und 5,837,678 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungsnr. WO 94/20128 (PCT/US94/02401) mit gemeinsamer Inhaberschaft.

[0011] Die Angiogenese, das Wachstum von neuen Blutgefäßen (Neovaskularisierung), ist ein komplexes Phänomen, das Wachstumsfaktoren beinhaltet, von denen die meisten Heparin als einen Cofaktor haben. Bei Erwachsenen werden angiogene Wachstumsfaktoren als ein Ergebnis von Gefäßtrauma (Wundheilung), Immunstimuli (Autoimmunkrankheit), entzündliche Mediatoren (Prostaglandin) oder aus Tumorzellen freigesetzt. Diese Faktoren induzieren die Proliferation von Endothelzellen (was für die Angiogenese notwendig ist) über einen Heparinabhängigen Rezeptorbindungsmechanismus (siehe Yayon et al., 1991, Cell 64: 841–848). Angiogenese ist ebenso mit einer Anzahl von anderen pathologischen Zuständen assoziiert, einschließlich dem Wachstum, der Proliferation und der Metastase von verschiedenen Tumoren, diabetische Retinopathie, Makuladegeneration, retrolentale Fibroplasie, neovaskuläres Glaukom, Psoriasis, Angiofibrome, Immun- und nicht-Immun-Entzündung, einschließlich rheumatoider Arthritis, Kapillarproliferation innerhalb von arteriosklerotischen Plaques, Hämangiomen, Endometriose und Kaposi-Sarkom. Daher wäre es wünschenswert, in diesen und anderen Fällen die Angiogenese zu inhibieren, und die Heparinbindungs- und Neutralisierungsaktivitäten von BPI-Proteinprodukten, einschließlich daraus abgeleiteten oder auf BPIbasierenden Peptiden, sind zu diesem Zwecke nützlich.

[0012] Heparin-bindende Proteine fallen in wenigstens zwei Klassen. Die erste Klasse besteht aus denjenigen Proteinen, die Heparin als einen Cofaktor beim Auslösen einer spezifischen Antwort verwenden. Diese Proteine schließen Heparin-abhängige Wachstumsfaktoren (z. B. basischer Fibroblastenwachstumsfaktor, saurer Fibroblastenwachstumsfaktor und Gefäßendothelzellwachstumsfaktor) ein, die eine Hauptrolle bei der Angiogenese spielen. Die zweite Klasse schließt Proteine ein, die die Heparin-abhängige Antwort neutralisieren. BPI-Proteinprodukte, einschließlich Peptiden, abgeleitet aus BPI, sind als Heparin-neutralisierende und antiangiogene Mittel identifiziert worden. Es ist ebenso bekannt, daß mehrere andere Heparinneutralisierende Proteine die Angiogenese inhibieren. Zum Beispiel ist bekannt, daß Protamin Tumor-assoziierte Angiogenese und darauffolgendes Tumorwachstum inhibiert [siehe Folkman et al., 1992, Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates, 2d ed., (Galín et al., Herausg., Review Press, N. Y.), Kap. 40, S. 821–839]. Ein zweites Heparin-neutralisierendes Protein, Blutplättchenfaktor IV, inhibiert ebenso die Angiogenese (d. h. ist angiostatisch). Ein anderer bekannter Angiogeneseinhibitor, Thrombospondin, bindet an Heparin mit einem sich wiederholenden Serin/Tryptophan-Motiv anstelle eines basischen Aminosäuremotivs (siehe Guo et al., 1992, J Biol. Chem. 267: 19349–19355). Es wird ebenso berichtet, daß murines Endostatin an Heparin bindet und die Angiogenese inhibiert (siehe z. B. Hohenester et al., 1998, Embo J. 17: 1656–1664; O'Reilly et al., 1997, Cell 88: 277–285).

[0013] Eine andere Nützlichkeit von BPI-Proteinprodukten beinhaltet pathologische Zustände, die mit chronischer Entzündung assoziiert sind, die gewöhnlich von einer Angiogenese begleitet wird (siehe z. B. U. S. Patent Nr. 5,639,727 mit gemeinsamer Inhaberschaft). Ein Beispiel für eine menschliche Krankheit, die mit chro-

nischer Entzündung in Zusammenhang steht, ist Arthritis, die die Entzündung der peripheren Gelenke beinhaltet. Bei rheumatoider Arthritis ist die Entzündung autoimmun, während bei reaktiver Arthritis die Hypothese existiert, daß die Entzündung mit einer anfänglichen Infektion des Gelenkgewebes mit pyogenen Bakterien oder anderen infektiösen Mitteln assoziiert ist, gefolgt von einer aseptischen chronischen Entzündung in empfindlichen Individuen. Folkman et al., 1992, supra, haben ebenso festgestellt, daß viele Typen von Arthritis von einem Stadium, das durch ein entzündliches Infiltrat in dem Gelenk dominiert ist, zu einem späteren Stadium fortschreiten, bei dem ein neovaskulärer Pannus in das Gelenk eindringt und den Knorpel zu zerstören beginnt. Während es unklar ist, ob die Angiogenese in Arthritis eine ursächliche Komponente der Krankheit oder ein Epiphänomen ist, gibt es Hinweise darauf, daß die Angiogenese für das Aufrechterhalten von Synovitis bei rheumatoider Arthritis notwendig ist. Es ist gezeigt worden, daß ein bekannter Angiogeneseinhibitor AGM 1470, den Ausbruch von Arthritis verhindert und eine etablierte Arthritis bei Kollagen-induzierten Arthritismodellen inhibiert (Peacock et al., 1992, J. Exp. Med. 175: 1135–1138). Während nicht-steroidale anti-entzündliche Arzneien, Corticosteroide und andere Therapien Behandlungsverbesserungen für eine Erleichterung der Arthritis bereitgestellt haben, besteht ein Bedarf auf dem Gebiet für effektivere Therapien für Arthritis und andere entzündliche Krankheiten.

[0014] Viele zusätzliche Nützlichkeiten von BPI-Proteinprodukten, einschließlich rBPI₂₃ und rBPI₂₁, sind aufgrund der großen Vielzahl von biologischen Aktivitäten dieser Produkte beschrieben worden. Zum Beispiel sind BPI-Proteinprodukte für gram-negative Bakterien bakterizid, wie in U. S. Patent Nr. 5,198,541 und 5,523,288 beschrieben. Die Internationale Veröffentlichungsnr. WO 94/20130 schlägt Verfahren zum Behandeln von Patienten vor, die an einer Infektion (z. B. gastrointestinal) mit einer Spezies von dem gram-negativen Bakterien-genus *Helicobacter* leiden, mit BPI-Proteinprodukten vor. BPI-Proteinprodukte verbessern ebenso die Wirksamkeit einer Antibiotikumtherapie bei gram-negativen bakteriellen Infektionen, wie in U. S. Patent Nr. 5,523,288 und Internationaler Veröffentlichungsnr. WO 95/08344 (PCT/US94/11255) beschrieben. BPI-Proteinprodukte sind ebenso für gram-positive Bakterien und Mycoplasmen bakterizid und verbessern die Wirksamkeit von Antibiotika bei grampositiven bakteriellen Infektionen, wie in U. S. Patenten Nr. 5,578,572; 5,783,561 und 6,054,431 und Internationaler Veröffentlichungsnr. WO 95/19180 (PCT/US95/00656) beschrieben. BPI-Proteinprodukte weisen eine Anti-Pilzaktivität auf und verbessern die Aktivität von anderen Anti-Pilzmitteln, wie beschrieben in US-Patent Nr. 5,627,153 und Internationaler Veröffentlichungsnr. WO 95/19179 (PCT/US95/00498), und weiter wie beschrieben für Anti-Pilz-Peptide in U. S. Patent Nr. 5,858,974, das wiederum eine Continuation-in-Part von U. S. Anmeldung Nr. 08/504,841 und den entsprechenden Internationalen Veröffentlichungsnr. WO 96/08509 (PCT/US95/09262) und WO 97/04008 (PCT/US96/03845) ist. BPI-Proteinprodukte weisen eine Anti-Protozoen-Aktivität auf, wie beschrieben in U. S. Patenten Nr. 5,646,114 und 6,013,629 und Internationaler Veröffentlichungsnr. WO 96/01647 (PCT/US95/08624). BPI-Proteinprodukte weisen eine Anti-Chlamydien-Aktivität auf, wie beschrieben in U. S. Patent Nr. 5,888,973 mit gemeinsamer Inhaberschaft und WO 98/06415 (PCT/US97/13810). Schließlich weisen BPI-Proteinprodukte eine Anti-Mykobakterien-Aktivität auf, wie beschrieben in zeitgleich anhängiger U. S. Anmeldung 08/626,646 mit gemeinsamer Inhaberschaft, die wiederum eine Continuation von U. S. Anmeldung Nr. 08/285,803 ist, die wiederum eine Continuation-in-Part von U. S. Anmeldung Nr. 08/031,145 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungsnr. WO 94/20129 (PCT/US94/02463) ist.

[0015] Die Effekte von BPI-Proteinprodukten in Menschen mit Endotoxin im Kreislauf, einschließlich der Effekte von TNF, IL-6 und Endotoxin, werden in US-Patenten Nr. 5,643,875, 5,573,620 und 5,952,302 und der entsprechenden internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 95/19784 (PCT/US95/01151) beschrieben.

[0016] BPI-Proteinprodukte sind ebenso zur Behandlung von spezifischen Krankheitszuständen nützlich, wie etwa Meningokokkämie bei Menschen (wie beschrieben in US-Anmeldung Nr. 08/644,287 und US-Patente Nr. 5,888,977 und 5,990,086 mit gemeinsamer Inhaberschaft und internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 97/42966 (PCT/US97/08016)), hämorrhagischem Trauma im Menschen (wie beschrieben in US-Patenten Nr. 5,756,464 und 5,945,399 und US-Anmeldung Nr. 09/293,107 und entsprechender internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 97/44056 (PCT/US97/08941), Verbrennungsverletzungen (wie beschrieben in US-Patent Nr. 5,494,896), Ischämie/Reperfusionverletzung (wie beschrieben in US-Patenten Nr. 5,578,568 und 6,017,881 und US-Anmeldung Nr. 09/416,828), und in Leber-Resektion (wie beschrieben in zeitgleich anhängiger US-Anmeldung Nr. 09/466,412 mit gemeinsamer Inhaberschaft, die eine Continuation von US-Anmeldung Nr. 08/582,230 ist, die wiederum eine Continuation der US-Anmeldung Nr. 08/318,357 ist, die wiederum eine Continuation-in-Part von US-Anmeldung Nr. 08/132,510 ist, und der entsprechenden internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 95/10297 (PCT/US94/11404).

[0017] BPI-Proteinprodukte sind ebenso bei Antithrombose-Verfahren nützlich, wie beschrieben in US-Patenten Nr. 5,741,779 und 5,935,930 und US-Anmeldung Nr. 09/299,319 und der entsprechenden internationalen

Veröffentlichungs-Nr. WO 97/42967 (PCT/US7/08017).

[0018] WO-A-9906640 (Universität von Amsterdam) offenbart Peptide mit Aminosäure-Zusammensetzungen, so daß die Peptide amphipatisch, kationisch sind und eine stabile α -Helix bilden und die darin offenbarten Strukturen haben.

[0019] WO-A-9505393 (Morphosis) offenbart LPS-bindende Peptide, umfassend eine LPS-bindende Domäne, die zur Verhinderung oder Behandlung von z. B. Gram-positiver und Gramnegativer bakterieller Sepsis nützlich sind.

[0020] Es besteht nach wie vor ein Bedarf auf dem Gebiet für neue Produkte, die eine oder mehrere der biologischen Aktivitäten von BPI-Proteinprodukten haben, insbesondere Produkte zur Verwendung als heparin-bindende und -neutralisierende Mittel und zur Inhibition von Endothelzellproliferation ebenso wie zur Inhibition der Angiogenese (normal oder pathologisch). Vorteilhafte therapeutische Produkte, die auf Peptid-Basis sind, würden Idealerweise kleine aktive Sequenzen umfassen, die serumstabil sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0021] Diese Erfindung betrifft Verbindungen und Zusammensetzungen von Konstrukten auf kleiner Peptid-Basis, die fakultativ mit einer hydrophoben Gruppe derivatisiert sind und die 8–15 Aminosäuren lang sind, mit einer Sequenz, die aus reversen Teilsequenzen abgeleitet oder darauf basiert sind, welche anhand der funktionellen Domäne II (Aminosäuren 65–99) von BPI identifiziert und daraus ausgewählt sind und die wenigstens eine der Heparin-verwandten biologischen Aktivitäten von BPI haben, wie etwa Heparin-Bindung, Heparin-Neutralisierung, Inhibition der Endothelzell-Proliferation und/oder Inhibition der Angiogenese. Eine reverse (oder retro)-Sequenz ist von der Originalsequenz invertiert (z. B. wenn eine ursprüngliche Sequenz A-B-C ist, ist die invertierte Sequenz C-B-A). Die Sequenzen hierin sind auf herkömmliche Weise geschrieben, d. h. vom N-Terminus zum C-Terminus (von links nach rechts). Solche Konstrukte auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, entsprechend einem bevorzugten Aspekt, haben reverse Teilsequenzen, die aus einer minimalen Kernsequenz bestehen, basierend auf einem Aminosäuremotiv, abgeleitet von Aminosäuren 99–92 von BPI. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die reverse Teilsequenz eine substituierte Teilsequenz (z. B. Aminosäuren 99-92, 99-91, 99-90, 99-89, 99-88, 99-87, 99-86 oder 99-85, wobei die Substitutionen bei 95 und 91 liegen). Zusätzlich bevorzugt ist eine 8-15 Aminosäuresequenz, die eine oder mehrere D-Aminosäuregruppen hat. In einer bevorzugtesten Sequenz sind jede oder alle der Aminosäuregruppen D-Isomere.

[0022] Konstrukte (oder Zusammensetzungen), die hierin offenbart sind, bestehen aus denjenigen, die 8-15 Gruppen lang sind, mit wenigstens einer der Heparin-verwandten biologischen Aktivitäten von BPI, wie etwa Heparin-Bindung, Heparin-Neutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation oder antiangiogene Eigenschaften und umfassen:

(i) Eine Sequenz mit der Formel $KLFR(\text{naph-A})QAR_3$ oder

(ii) eine derivatisierte Sequenz der Formel $R_1KLFR(\text{naph-A})QAR_3$, wobei

R_1 eine Gruppe ist aus R_2-CH_2- , R_2-CH_2-CO- , R_2-CO- , R_2-SO_y- oder R_2-PO_2 ,

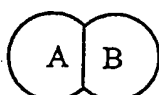
wobei

$y = 0-3$

$z = 1-4$,

R_2 eine hydrophobe Gruppe ist, die ein zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen, ein heterozyklisches Molekül mit wenigstens 3 Atomen, ein funktionalisiertes zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen oder ein funktionalisiertes heterozyklisches Molekül mit wenigstens drei Atomen ist.

[0023] Wie hierin verwendet, ist R_2 eine hydrophobe Gruppe, die eine Gruppe ist aus (a) einem fakultativ substituierten carbozyklischen Ring, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt, enthaltend 3 bis 8, bevorzugt 5 oder 6 Kohlenstoffatome; (b) ein fakultativ substituierter heterozyklischer Ring, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt, enthaltend 3 bis 8, bevorzugt 5 oder 6 Atome, wobei wenigstens ein Atom ein Heteroatom ist, das eines ist von Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel, oder (c) ein fakultativ substituierter bicyklischer Ring



wobei die kondensierten Ringe A und B unabhängig voneinander ein 5- oder 6-gliedriger Ring sind, gesättigt

oder teilweise oder vollständig ungesättigt, und Kohlenstoffatome und fakultativ ein bis drei Heteroatome umfassen, ausgewählt aus Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff; wobei, wenn mehr als ein Heteroatom vorhanden ist, alle dieselben oder unterschiedlich sein können.

[0024] Wie hierin verwendet kann der Substituent R_2 ein monozyklischer oder bicyklischer Ring sein, entweder ein Kohlenstoffring oder ein Heteroring. Bicyklische R_2 -Gruppen können zwei aliphatische Ring, zwei aromatische Ringe oder einen aliphatischen und einen aromatischen Ring enthalten. Heterozyklen enthalten wenigstens eines und bis zu drei Atome, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel; wenn mehr als ein Heteroatom vorhanden ist, können alle Heteroatome dieselben oder unterschiedlich sein. Ein R_2 -Substituent kann aliphatisch, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt (d. h. Cycloalkyl, Cycloalkenyl, Heterocycloalkyl oder Heterocycloalkylenyl) sein oder kann aromatisch sein (d. h. Aryl oder Heteroaryl). Der R_2 -Substituent ist fakultativ mit einer bis drei Gruppen substituiert, z. B. C_{1-6} -Alkyl, Halogen, C_{1-6} -Alkoxy, Acetyl, Hydroxy oder ähnliches; wenn mehr als ein Heteroatom vorhanden ist, können alle Heteroatome dieselben oder unterschiedlich sein.

[0025] Wie hierin verwendet und wie gewöhnlich auf dem Gebiet verwendet, ist der Begriff "Aryl" als eine monozyklische oder bicyklische aromatische Gruppe definiert, z. B. Phenyl oder Naphthyl, die nicht-substituiert oder substituiert sein kann. In ähnlicher Weise ist der Begriff "Heteroaryl" hierin als ein monozyklisches oder bicyklisches Ringsystem definiert, enthaltend ein oder zwei aromatische Ringe und wenigstens ein Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatom. Wenn es mehr als ein Heteroatom gibt, können alle Heteroatome dieselben oder unterschiedlich sein. Das Heteroaryl kann nicht-substituiert oder substituiert, z. B. mit einem oder mehreren, insbesondere ein bis drei Substituenten, sein. Wenn mehr als ein Heteroatom vorhanden ist, können alle Heteroatome dieselben oder unterschiedlich sein. Beispiele für Heteroarylgruppen schließen Thienyl, Furyl, Pyridyl, Oxazolyl, Chinolyl, Isochinolyl, Indolyl, Triazolyl, Isothiazolyl, Isoxazolyl, Imidazolyl, Benzothiazolyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Thiazolyl oder Thiadiazolyl ein.

[0026] Wie hierin verwendet und wie gewöhnlich auf dem Gebiet verwendet, ist der Begriff "Cycloalkyl" als eine zyklische C_3 - C_8 -Kohlenwasserstoffgruppe definiert, z. B. Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclohexyl oder Cyclopentyl. Der Begriff "Heterocycloalkyl" ist in ähnlicher Weise definiert, außer daß der Ring wenigstens ein, bevorzugt ein bis drei Heteroatome enthält. Wenn es mehr als ein Heteroatom gibt, können alle Heteroatome dieselben oder unterschiedlich sein. Nicht beschränkende Beispiele für Heterocycloalkylringe schließen 1,3-Dioxolan, 2-Pyrazolin, Pyrazolidin, Pyrrolidin, ein Pyrrolin, 2H-Pyran, 4H-Pyran, Morpholin, Thiomorpholin, Piperidin, 1,4-Dithian und 1,4-Dioxan ein. Die Begriffe "Cycloalkenyl" und "Heterocycloalkenyl" werden in ähnlicher Weise definiert, außer daß der Ring nicht gesättigt ist.

[0027] In beispielhaften Ausführungsformen kann R_2 eine hydrophobe Gruppe sein, die eine ist von Biotin, 2-Biphenylen, 2-Anthrachinon, 2-Benzofuran, 2-Indol, 1-Isochinolin, Hydroxyphenyl, 2-Chinolin, 1-[3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexyl], 1-(3,5-dichlor-2-hydroxyphenyl), 1-(3,5-diiod-2-hydroxyphenyl), 1-(3,5-dinitro-2-hydroxyphenyl), 1-(4-azido-2-hydroxyphenyl), 4-biphenyl, 2-biphenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 3-amino-2-naphthyl, 3-chlor-2-nitrophenyl, 3,4-dihydroxyphenyl, 3,4,5-trihydroxyphenyl, 2-chlor-3-nitrophenyl, 5-azido-2-nitrophenyl, 3-amino-2-pyrazyl, 2-benzyloxycarbonyl-ethyl, 2-thienyl, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylen, 5-Brom-3-indolmethyl-ethyl, 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethylen, 2-(3-chlorphenyl)ethylen, 2-pyrazyl, 4-imidazolyl, 2-imino-1-imidazolidyl, Pyridyl, 3-piperidyl, 4-piperidyl, Fluorescein, 2-(4-amino-3,5,6-trichlorpyridyl), 3-(2-chlor-6-fluorphenyl)-5-methylisoxazolyl oder 4-azido-phenyl.

[0028] R_3 ist eines aus K, K(naph-A), K(naph-A)K, K(naph-A)KG, K(naph-A)KGS, K(naph-A)KGSi, K(naph-A)KGSiK oder K(naph-A)KGSiKi; wobei die carboxy-terminale Gruppe amidiert oder nicht-amidiert ist, und fakultativ, umfassend wenigstens eine konservative Substitution von Aminosäuregruppen; wobei die Zusammensetzung nicht k-1-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k-i ist. Bevorzugt umfaßt die Zusammensetzung zwei oder mehrere konservative Substitutionen von Aminosäuregruppen.

[0029] Die Konstrukte oder Zusammensetzungen der Erfindung, einschließlich derivatisierter Konstrukte oder Zusammensetzungen umfassen bevorzugt Konstrukte oder Zusammensetzungen, bei denen die ersten beiden amino-terminalen Aminosäuregruppen D-Aminosäuregruppen sind und die letzten beiden carboxy-terminalen Aminosäuregruppen D-Aminosäuregruppen sind.

[0030] Ebenso offenbart sind Verfahren zur Herstellung von Medikamenten zum Neutralisieren von Heparin in einem Säugetier, dem eine exogene Heparinverbindung verabreicht worden ist (einschließlich Heparin oder heparinoider Substanzen, wie etwa niedrigmolekulargewichtiger Heparine), umfassend den Schritt der Verab-

reichung an besagtes Säugetier einer Menge der Zusammensetzung der Erfindung, die wirksam ist, um den Anti-Coagulans-Effekt der exogenen Heparinverbindung zu neutralisieren, bevorzugt in einer Menge; die wirksam ist, um die Gerinnungszeit des Säugetiers auf einen normalen Wert zurückzubringen; Verfahren der Zubereitung von Medikamenten zum Inhibieren von Endothelzellproliferation in einem dafür bedürftigen Säugetier durch Verabreichen an besagtes Säugetier von einer Menge der Zusammensetzungen der Erfindung, die effektiv sind, um die Endothelzellproliferation zu inhibieren; Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren der Angiogenese in einem dafür bedürftigen Säugetier durch Verabreichen an besagtes Säugetier einer Menge von solchen Zusammensetzungen, die effektiv sind, um die Angiogenese zu inhibieren, einschließlich der Angiogenese im Auge; Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Säugetiers, das an einer Störung leidet, die Angiogenese beinhaltet, einschließlich einer chronischen entzündlichen Krankheit wie etwa rheumatoider oder reaktiver Arthritis, und einschließlich des Wachstums, der Proliferation oder der Metastase von Tumorzellen.

[0031] Zusätzliche Eigenschaften oder Aktivitäten von solchen Konstrukten oder Zusammensetzungen, einschließlich denjenigen, die gemäß der Erfindung derivatisiert worden sind, können LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung und/oder antimikrobielle Aktivität und/oder irgendeine der anderen zuvor bekannten Aktivitäten und Eigenschaften von BPI-Proteinprodukten einschließen. Obwohl über drei funktionelle Domänen von BPI zuvor berichtet worden ist und diese einschließen: Domäne I, umfassend die Aminosäuresequenz von BPI von ungefähr Aminosäure 17 bis ungefähr Aminosäure 45; Domäne II, umfassend die Aminosäuresequenz von BPI von ungefähr Aminosäure 65 bis ungefähr Aminosäure 99; und Domäne III, umfassend die Aminosäuresequenz von BPI von ungefähr Aminosäure 142 bis ungefähr Aminosäure 169, ist über biologisch aktive reverse (oder retro)-Sequenzen nicht zuvor berichtet worden, basierend auf den Teilsequenzen von Domäne II. Daher sind solche Peptid-basierenden reversen (retro)-Sequenzkonstrukte gemäß der Erfindung, die bevorzugt ausgewählte D-Aminosäuregruppen umfassen, besonders nützlich als therapeutische Mittel.

[0032] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt Verfahren zum Identifizieren einer derivatisierten Peptidsequenz bereit, abgeleitet von oder basierend auf der Sequenz, die anhand der Domäne II des bakteriziden/permeabilitätserhöhenden Proteins (BPI) identifiziert und ausgewählt ist, mit der biologischen Aktivität und Epithelabsorption von wenigstens 0,001%, umfassend die Schritte:

- (a) Derivatisieren einer Peptidsequenz, basierend auf einer Sequenz, Teilsequenz, umgekehrten Sequenz oder umgekehrten Teilsequenz von Domäne II von BPI, durch kovalente Verknüpfung einer hydrophoben Gruppe oder Gruppen am N-Terminus, C-Terminus oder innerhalb der besagten Peptidsequenz;
- (b) Messen der Aktivität besagter derivatisierter Peptidsequenz, die in Schritt (a) erhalten worden ist, wobei die Aktivität eine Eigenschaft oder mehrere Eigenschaften sind von: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, antiangiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft; und
- (c) Messen der Epithelabsorption der besagten derivatisierten Peptidsequenz, erhalten in Schritt (a).

[0033] Peptidsequenzen, die besonders geeignet zur Derivatisierung in Schritt (a) sind, sind Peptide mit einer minimalen Länge, die notwendig ist, um die biologische Aktivität beizubehalten (z. B. 8 bis 15 Aminosäuregruppen).

[0034] Solche Verfahren schließen ein Verfahren zum Design und Identifizieren einer biologisch aktiven derivatisierten Peptid-basierenden Sequenz, eines prophylaktischen oder therapeutischen Medikaments ein, das von der Peptidsequenz abgeleitet oder auf ihr basierend ist, die von BPI oder einem Fragment davon identifiziert und ausgewählt ist, mit einer Epithelabsorption von wenigstens 0,001%, wobei besagtes Verfahren die Schritte umfaßt:

- (a) Identifizieren einer Zielpeptidsequenz, abgeleitet von oder basierend auf der Polypeptidsequenz von BPI oder einem Fragment davon, das die Aktivität in vitro oder in vivo aufweist, wobei die Aktivität eine oder mehrere Eigenschaften sind von: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, antiangiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft;
- (b) Konstruieren einer Bibliothek von aktivitätsbeibehaltenden Peptid-Sequenzen minimaler Länge (MinLARPS) durch Substituieren oder Deletieren von Aminosäuregruppen innerhalb besagter Zielpeptidsequenz;
- (c) Messen der Aktivität besagter MinLARPS, um die minimale Anzahl an Resten zu bestimmen, die notwendig sind, um die Aktivität von wenigstens 1% von derjenigen besagter Zielpolypeptidsequenz beizubehalten, wobei die Aktivität eine Eigenschaft oder mehrere Eigenschaften sind von: Heparin-Bindung, Heparin-Neutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, antiangiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft,
- (d) Messen der Epithelabsorption besagter MinLARPS in in-vivo- oder in-vitro-Assays, um zu identifizieren,

- welche der besagten MinLARPS eine Epithelabsorption von wenigstens 0,001% beibehält;
- (e) Synthetisieren von derivatisierten MinLARPS durch chemisches Modifizieren besagter MinLARPS durch kovalente Verknüpfung einer hydrophoben Gruppe oder Gruppen, die an dem N-Terminus, C-Terminus oder innerhalb der Sequenz besagter MinLARPS angehängt wird;
- (f) Wiederholen der Schritte (c) und (d) mit besagten derivatisierten MinLARPS.

[0035] Weitere Aspekte der Erfindung schließen ein Konstrukt oder eine Zusammensetzung der Erfindung ein (einschließlich derjenigen, die gemäß der Erfindung derivatisiert sind), zur Verwendung bei der Therapie, ebenso wie die Verwendung eines solchen Konstrukts und Zusammensetzung zur Herstellung eines Medikaments zum Binden und/oder Neutralisieren einer exogenen oder therapeutisch verabreichten Heparinverbindung oder zum Binden und/oder Neutralisieren von Heparin, oder zum Behandeln einer Heparin-verwandten oder Heparinvermittelten Störung, Zustands oder Krankheit, oder zur Herstellung eines Medikaments zur antimikrobiellen Aktivität zum Binden und/oder Neutralisieren von LPS oder zum Behandeln einer Infektion oder einer Störung, die mit einem Endotoxin assoziiert ist.

[0036] Ebenso in Erwägung gezogen von der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Konstrukt oder Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung und ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans, Verdünnungsmittel oder Träger.

[0037] Ebenso bereitgestellt wird ein in-vitro-Verfahren zum Neutralisieren des antikoagulierenden Effekts von Heparin, umfassend das In-Kontakt-Bringen des Heparins mit einem Konstrukt oder einer Zusammensetzung der Erfindung.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0038] Die vorliegende Erfindung betrifft biologisch aktive neue Verbindungen (oder Zusammensetzungen) die 8-15 Aminosäuregruppen lang sind, mit einer Sequenz, die von einer reversen Teilsequenz abgeleitet oder auf dieser basierend sind, identifiziert und ausgewählt aus der funktionellen Domäne II von BPI. Konstrukte schließen nicht derivatisierte Sequenzen ebenso wie Sequenzen ein, die durch kovalente Verknüpfung einer hydrophoben Gruppe derivatisiert sind. Bevorzugt sind Konstrukte mit Sequenzen, die D-Aminosäuregruppen enthalten. Besonders bevorzugt sind Konstrukte mit Sequenzen, bei denen die D-Aminosäuregruppen als die ersten beiden amino-terminalen und die letzten beiden carboxy-terminalen Gruppen der Sequenz positioniert sind. Solche Konstrukte sind besonders zur Behandlung von Heparinverwandten oder Heparin-vermittelten Störungen, Krankheiten oder Zuständen nützlich. "Behandlung", wie hierin verwendet, umfaßt sowohl prophylaktische als auch therapeutische Behandlung. Die Behandlung von Säugetieren, einschließlich Menschen, wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0039] Wie hierin verwendet, schließt "Aminosäuregruppe" typische und atypische Aminosäureverbindungen ein (einschließlich derivatisierter Aminosäuren und Aminosäureanaloge). "Konservative" Substitutionen von einer Aminosäure durch eine andere sind Substitutionen von Aminosäuren mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften und beruhen im allgemeinen auf Ähnlichkeiten hinsichtlich der Polarität, Ladung, Hydrophobizität, Hydrophilie und/oder der amphipathischen Natur der beteiligten Reste. Polare saure Aminosäuren schließen Asparaginsäure und Glutaminsäure ein. Als eine allgemeine Regel gilt: während die Ähnlichkeit zwischen den ausgetauschten Aminosäuren abnimmt, nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß die Substitution die Aktivität beeinflussen wird.

[0040] Für die Zwecke dieser Erfindung soll der Begriff "funktionelle Domäne" eine Region der Aminosäuresequenz von BPI bezeichnen, die eine oder mehrere der biologischen Aktivitäten von BPI aufweist. Diese funktionellen Domänen von BPI wurden durch die Aktivitäten von proteolytischen Spaltungsfragmente, überlappenden 15-mer-Peptiden und anderen synthetischen Peptiden definiert. Domäne I ist als die Aminosäuresequenz von BPI definiert worden, umfassend ungefähr Aminosäure 17 bis ungefähr Aminosäure 45. Anfängliche Peptide, basierend auf dieser Domäne, waren mäßig aktiv bei sowohl der Inhibition von LPS-induzierter LAL-Aktivität und bei Heparinbindungsassays und wiesen keine signifikante antibakterielle Aktivität auf. Die Domäne II ist als die Aminosäuresequenz von BPI definiert worden, umfassend ungefähr Aminosäure 65 bis ungefähr Aminosäure 99. Anfängliche Peptide, basierend auf dieser Domäne, wiesen hohe LPS- und Heparinbindungskapazität auf und wiesen signifikante antibakterielle Aktivität auf. Die Domäne III ist als die Aminosäuresequenz von BPI definiert worden, umfassend ungefähr Aminosäure 142 bis ungefähr Aminosäure 169. Anfängliche Peptide, basierend auf dieser Domäne, wiesen hohe LPS- und Heparinbindungsaktivität auf und wiesen überraschende antimikrobielle Aktivität, einschließlich Anti-Pilz- und antibakterieller (einschließlich z. B. anti-gram-positiver und anti-gram-negativer) Aktivität auf.

[0041] Für die Zwecke dieser Erfindung soll der Begriff "biologische Aktivität von BPI" einschließen, ist aber nicht beschränkt auf eine oder mehrere der biologischen Aktivitäten oder Eigenschaften eines menschlichen bakteriziden/permeabilitätserhöhenden (BPI) Proteinprodukts, einschließlich zum Beispiel eines rekombinanten BPI-Holoproteins, wie etwa rBPI (SEQ ID NO: 28), eines amino-terminalen Fragments von BPI, wie etwa rBPI₂₃, und Analoge, die mutierte amino-terminale Fragmente von BPI sind, wie etwa rBPI₂₁Δcys oder rBPI (10–193) C132A (ebenso bezeichnet als rBPI (10–193) ala¹³²) und einschließlich einer oder mehreren der bekannten Aktivitäten der oben diskutierten BPI-Proteinprodukte. Spezifisch eingeschlossen ist eine biologische Aktivität von einem Peptid-basierenden Konstrukt dieser Erfindung, die zwischen 0,1- und 10-mal der Aktivität von BPI oder einem entsprechenden Peptid ist, umfassend eine entsprechende funktionelle Domäne von BPI. Der Begriff "biologische Aktivität von BPI" soll einschließen, ist aber nicht beschränkt auf eine Aktivität der Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation oder Inhibition der Angiogenese (z. B. Inhibition der in-vivo-Neovaskularisierung, wie etwa diejenige, die mit metastatischen Tumoren und chronisch entzündlichen Krankheitszuständen assoziiert ist). Ebenso eingeschlossen in dieser Definition von "biologischer Aktivität von BPI" ist eine Aktivität von LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobieller Aktivität. Ebenso ausdrücklich eingeschlossen in dieser Definition der "biologischen Aktivität von BPI" ist eine biologische Aktivität, zum Beispiel antimikrobielle Aktivität, die qualitativ unterschiedlich zu der Aktivität von BPI oder dem entsprechenden Peptid ist, umfassend die gesamte entsprechende Domäne von BPI. Zum Beispiel schließen solche qualitativen Unterschiede die Unterschiede im Spektrum der Bakterien oder anderen Mikroorganismen ein, gegen die das Peptid effektiv ist, relativ zu der Aminosäuresequenz der entsprechenden funktionellen Domäne von BPI. Diese Definition umfaßt daher antimikrobielle Aktivitäten, wie etwa antibakterielle Aktivität (z. B. gegen gram-negative Bakterien, gram-positive Bakterien, Mycobakterien und Chlamydien) und Anti-Pilzaktivität (z. B. gegen Spezies von Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces, Basidiobolus, Conidiobolus, Rhizopus, Rhizomucor, Mucor, Absidia, Mortierella, Cunninghamella, Saksenaea, Fusarium, Trichophyton, Trichosporon, Microsporium, Epidermophyton, Scytalidium, Malassezia, Actinomyces, Sporothrix und Penicillium), ebenso wie anti-Protozonaktivität.

[0042] Für die Zwecke dieser Erfindung bezieht sich der Begriff "derivatisiert" in Kontext eines "derivatisierten Konstrukts" oder "derivatisierten Zusammensetzung" auf ein Peptid-basierendes Konstrukt oder Zusammensetzung, umfassend Sequenzen, die kovalent an eine hydrophobe Gruppe geknüpft sind. Bevorzugt ist die hydrophobe Gruppe kovalent an den N-Terminus der Sequenz geknüpft. Bevorzugt ist die hydrophobe Gruppe R₂, wie hierin definiert.

[0043] Peptid-basierende Konstrukte, einschließlich denjenigen, die für die Derivatisierung geeignet sind, schließen Sequenzen ein, die von umgekehrten substituierten Teilsequenzen von der funktionellen Domäne II von menschlichem BPI abgeleitet oder darauf basierend sind (z. B. Aminosäure 99-92, 99-91, 99-90, 99-89, 99-88, 99-87, 99-86 oder 99-85, wobei die Substitutionen bei 75 und 91 sind), bevorzugt D-Aminosäuregruppen-Sequenzen. Ausführungsformen von solchen Konstrukten gemäß der Erfindung schließen die folgenden beispielhaften Konstrukte ein [Einbuchstaben-Abkürzung für Aminosäuren können in G. Zubay, Biochemistry (2. Aufl.), 1988 (MacMillan Publishing: N. Y.), S. 33 gefunden werden]:

XMP. 624 (2) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k (SEQ ID NO: 2)
 XMP. 625 (3) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i (SEQ ID NO: 3)
 XMP. 626 (4) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s (SEQ ID NO: 4)
 XMP. 627 (5) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g (SEQ ID NO: 5)
 XMP. 628 (6) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k (SEQ ID NO: 6)
 XMP. 629 (7) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 7)
 XMP. 630 (8) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 8)
 XMP. 656 (9) k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-i-k-i (SEQ ID NO: 9)
 XMP. 679 (10) k-l-f-k-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g (SEQ ID NO: 10)
 XMP. 684 (11) (Biphenyl-A)-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 11)
 XMP. 685 (12) k-l-f-r-(Biphenyl-A)-q-a-k (SEQ ID NO: 12)
 XMP. 725 (13) k-l-f-r-(Biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 13)
 XMP. 728 (14) k-l-f-k-(Biphenyl-a)-q-a-k-(biphenyl-a)-k-G (SEQ ID NO: 14)
 XMP. 760 (15) k-a-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 15)
 XMP. 764 (16) k-a-f-k-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-G (SEQ ID NO: 16)
 XMP. 776 (17) k-l-f-k-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 17)
 XMP. 778 (18) k-(Aminoisobuttersäure)-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 18)

[0044] Exemplarische derivatisierte Peptid-basierende Konstrukte schließen ein:
 XMP. 661 (19) 2-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 19)

XMP. 664 (20) 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 20)
 XMP. 666 (21) 2-Naphthylacetyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 21)
 XMP. 671 (22) 1-Naphthylacetyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 22)
 XMP. 699 (23) 2-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 23)
 XMP. 767 (24) 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-k-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 24)
 XMP. 768 (25) 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 25)
 XMP. 769 (26) 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-k-(biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 26)

[0045] Wie hierin verwendet, schließt "BPI-Proteinprodukt" natürlich und rekombinant produziertes BPI-Protein, natürliche, synthetische und rekombinante biologisch aktive Polypeptidfragmente von BPI-Protein, biologisch aktive Peptidvarianten von BPI-Protein oder Fragmenten davon, einschließlich Hybridfusionsproteinen und Dimeren, biologisch aktive Polypeptidanalogue von BPI-Protein oder Fragmenten oder Varianten davon, einschließlich Cysteinsubstituierten Analogon, und BPI-abgeleitete Peptide, ein. BPI-Proteinprodukte können mit jedem auf dem Gebiet bekannten Mittel erzeugt und/oder isoliert werden. U. S. Patent Nr. 5,198,541 offenbart rekombinante Gene, die für BPI-Proteine kodieren, einschließlich rekombinantem BPI-Holoprotein, bezeichnet als rBPI, und rekombinante Fragmente von BPI sowie Verfahren zu deren Expression. U. S. Patent Nr. 5,439,807 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungs-Nr. WO 93/23540 (PCT/LTS93/04752) offenbart neue Verfahren zur Aufreinigung von rekombinanten BPI-Proteinprodukten, exprimiert in und sezerniert aus genetisch transformierten Säugetierwirtszellen in Kultur, und offenbart, wie man große Mengen an rekombinanten BPI-Produkten produzieren kann, die zum Einbau in stabile, homogene pharmazeutische Zubereitungen geeignet sind.

[0046] Biologisch aktive Fragmente von BPI (BPI-Fragmente) schließen biologisch aktive Moleküle ein, die dieselbe oder eine ähnliche Aminosäuresequenz wie ein natürliches humanes BPI-Holoprotein haben, außer daß dem Fragmentmolekül amino-terminale Aminosäuren, interne Aminosäure und/oder carboxy-terminale Aminosäuren des Holoprotein ohne Verlust von einem oder mehreren der biologischen Aktivitäten oder immunologischen Eigenschaften von BPI fehlen. Nicht-beschränkende Beispiele für solche Fragmente schließen ein N-terminales Fragment von natürlichem menschlichen BPI von näherungsweise 25 kD ein, beschrieben in Ooi et al., 1991, J. Exp. Med., 174: 649 und das rekombinante Expressionsprodukt der DNA, die für N-terminale Aminosäuren von 1 bis ungefähr 193 bis 199 des natürlichen menschlichen BPI kodieren, beschrieben in Gazzano-Santoro et al., 1992, Infect. Immun. 60: 4754-4761, und das als rBPI₂₃ bezeichnet wird. In dieser Veröffentlichung wurde ein Expressionsvektor als eine Quelle von DNA verwendet, die für ein rekombinantes Expressionsprodukt (rBPI₂₃) kodiert, mit der 31-Rest-Signalsequenz und den ersten 199 Aminosäuren des N-Terminus des reifen menschlichen BPI, wie in Fig. 1 von Gray et al., supra, dargestellt, außer daß Valin an Position 151 durch GTG statt durch GTC spezifiziert ist und daß Rest 185 Glutaminsäure (spezifiziert durch GAG) statt Lysin (spezifiziert durch AAG) ist. Rekombinantes Holoprotein (rBPI) ist ebenso mit der Sequenz (SEQ ID NO: 27 und 28) erzeugt worden, wie in Fig. 1 von Gray et al., supra, dargestellt, mit den Ausnahmen, die für rBPI₂₃ festgestellt sind, und mit der Ausnahme, daß Rest 417 Alanin (spezifiziert durch GCT) statt Valin (spezifiziert durch GTT) ist. Ein Analog eines N-terminalen Fragments, bestehend aus Resten 10-193 von BPI, ist in U. S. Patent Nr. 6,013,631 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 99/66044 (PCT/US99/13860) beschrieben worden. Andere Beispiele schließen dimere Formen von BPI-Fragmenten ein, wie beschrieben in U. S. Patent Nr. 5,447,913 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 95/24209 (PCT/US95/03125).

[0047] Biologisch aktive Varianten von BPI (BPI-Varianten) schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf rekombinante Hybridfusionsproteine, umfassend BPI-Holoprotein oder biologisch aktives Fragment davon und wenigstens einen Teil von wenigstens einem anderen Polypeptid und dimere Formen von BPI-Varianten. Beispiele für solche Hybridfusionsproteine und dimere Formen werden in U. S. Patent Nr. 5,643,570 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 93/23434 (PCT/US93/04754) beschrieben, schließen Hybridfusionsproteine ein, umfassend, am amino-terminalen Ende, ein BPI-Protein oder ein biologisch aktives Fragment davon und, am carboxy-terminalen Ende, wenigstens eine konstante Domäne einer schweren Immunglobulinkette oder einer allelischen Variante davon.

[0048] Biologisch aktive Analoge von BPI (BPI-Analogue) schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf BPI-Produkte, bei denen eine oder mehrere Aminosäurereste durch eine unterschiedliche Aminosäure ohne Verlust von einer oder mehreren der biologischen Aktivitäten oder immunologischen Eigenschaft von BPI ersetzt sind. Zum Beispiel offenbart U. S. Patent Nr. 5,420,019 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungs-Nr. WO 94/18323 (PCT/US94/01235), Polypeptidanalogue von BPI und BPI-Fragmenten, bei denen ein Cysteinrest durch eine unterschiedliche Aminosäure ersetzt ist. Ein stabiles BPI-Proteinprodukt, das durch diese Anwendung beschrieben ist, ist das Expressionsprodukt der DNA, die von Aminosäure 1 bis näherungs-

weise 193 oder 199 der N-terminalen Aminosäuren von BPI-Holoprotein kodieren, bei denen aber das Cystein am Rest Nummer 132 durch Alanin substituiert ist und als rBPI₂₁Δcys oder rBPI₂₁ bezeichnet ist. Die Herstellung dieses N-terminalen Analogs von BPI, rBPI₂₁, ist in Horwitz et al., 1996, Protein Expression Purification, 8: 28–40 beschrieben worden. In ähnlicher Weise ist ein Fragment, bestehend aus den Resten 10-193 von BPI, bei denen das Cystein an Position 132 durch ein Alanin ersetzt ist (bezeichnet als "rBPI (10-193) C132 A" oder "rBPI (10-193) ala¹³²ⁿ") in U. S. Patent Nr. 6,013,631 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 99/66044 (PCT/US99/13860) beschrieben worden. Andere Beispiele schließen dimere Formen von BPI-Analogen, z. B. U. S. Patent Nr. 5,447,913 und die entsprechende Internationale Veröffentlichungs-Nr. WO 95/24209 (PCT/US95/03125) ein.

[0049] Andere BPI-Proteinprodukte sind Peptide, die von BPI abgeleitet oder darauf basierend sind, das mittels synthetischer oder rekombinanter Mittel hergestellt worden ist (BPI-abgeleitete Peptide), etwa wie diejenigen, die in Internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 97/04008 (PCT/US96/03845) beschrieben sind, die U. S. Patent Nr. 5,858,974 und Internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 96/08509 (PCT/US95/09262) entspricht, die U. S. Patent-Anmeldung Nr. 09/365,539, und Internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 95/19372 (PCT/US94/10427) entspricht, die U. S. Patenten Nr. 5,652,332 und 5,856,438, und Internationaler Veröffentlichungs-Nr. WO 94/20532 (PCT/US94/02465) entspricht, die U. S. Patent Nr. 5,763,567 entspricht, die eine Continuation von U. S. Patent Nr. 5,733,872 ist, die eine Continuation-in-Part von U. S.-Anmeldung Nr. 08/183,222 ist, die eine Continuation-in-Part von U. S.-Anmeldung Nr. 08/093,202 (entsprechend der Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 94/20128 (PCT/US94/02401)) ist, die eine Continuation-in-Part von U. S. Patent Nr. 5,348,942 ist, ebenso wie Internationale Veröffentlichungs-Nr. WO 97/35009 (PCT/US97/05287), die U. S. Patent Nr. 5,851,802 entspricht.

[0050] Die vorliegende Erfindung definiert neue Konstrukte auf Peptid-Basis, einschließlich Derivatkonstrukte, die in der Definition von BPI-Proteinprodukten umfaßt sein können.

[0051] Die Verabreichung von BPI-Proteinprodukten wird bevorzugt durch eine pharmazeutische Zusammensetzung erzielt, umfassend ein BPI-Proteinprodukt und ein pharmazeutisch annehmbares Verdünnungsmittel, Adjuvans oder Träger. Das BPI-Proteinprodukt kann ohne oder zusammen mit bekannten oberflächenaktiven Mitteln oder anderen therapeutischen Mitteln verabreicht werden. Eine stabile pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend BPI-Proteinprodukte (z. B. rBPI₂₃), umfaßt das BPI-Proteinprodukt bei einer Konzentration von 1 mg/ml in Citrat-gepufferter Salzlösung (5 oder 20 mM Citrat, 150 mM NaCl, pH 5,0), umfassend 0,1 Gew.-% Poloxamer 188 (PLURONIC F-68, BASF Wyandotte, Parsippany, NJ) und 0,002 Gew.-% Polysorbat 80 (TWEEN 80, ICI Americas Inc., Wilmington, DE). Eine andere stabile pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend BPI-Proteinprodukte (z. B. rBPI₂₁) umfaßt das BPI-Proteinprodukt bei einer Konzentration von 2 mg/ml in 5 mM Citrat, 150 mM NaCl, 0,2% Poloxamer 188 und 0,002% Polysorbat 80. Solche bevorzugten Kombinationen werden in U. S. Patenten Nr. 5,488,034, 5,696,090, 5,932,544, 5,955,427, 6,066,620, und 6,057,293 und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 94/17819 (PCT/US94/01239) beschrieben. Wie in U. S. Patent Nr. 5,912,228 beschrieben, die wiederum eine Continuation-in-Part von U. S.-Anmeldung Nr. 08/530,599 ist, die wiederum eine Continuation-in-Part von U. S.-Anmeldung Nr. 08/372,104 ist, und der entsprechenden Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO 96/21436 (PCT/US96/01095) ist, können andere Poloxamerformulierungen von BPI-Proteinprodukten mit verstärkter Aktivität verwendet werden.

[0052] Konstrukte auf Peptid-Basis können wie andere BPI-Proteinprodukte formuliert werden oder können in Salzlösung oder physiologischem Puffer formuliert werden.

[0053] Therapeutische Zusammensetzungen, umfassend BPI-Proteinprodukt (einschließlich den Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, oder Zusammensetzungen, umfassend solche Konstrukte der Erfindung) können systemisch oder topisch verabreicht werden. Systemische Routen der Verabreichung schließen orale, intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion (einschließlich in ein Depot für langfristige Freisetzung), intraokulare und retrobulbäre, intrathekale, intraperitoneale (z. B. durch intraperitoneale Waschung), intrapulmonale (unter Verwendung von pulverisierter Arznei oder einer aerosolisuierten oder vernebelten Arzneilösung) oder transdermale Verabreichung ein. Topische Routen schließen die Verabreichung in der Form von Salben, Augentropfen, Ohrentropfen oder Spülflüssigkeiten (zum Beispiel zum Spülen von Wunden) ein.

[0054] Bei parenteraler Gabe werden BPI-Proteinproduktzusammensetzungen im allgemeinen in Dosen im Bereich von 1 µg/kg bis 100 mg/kg pro Tag, bevorzugt in Dosen im Bereich von 0,1 mg/kg bis 20 mg/kg pro Tag injiziert. Die Behandlung kann durch kontinuierliche Infusion oder intermittierende Injektion oder Infusion bei derselben, verringerten oder erhöhten Dosis pro Tag für zum Beispiel 1 bis 3 Tage und zusätzlich nach Be-

stimmung durch den behandelnden Arzt fortgesetzt werden.

[0055] Fachleute auf dem Gebiet können in leichter Weise effektive Dosierungen und Verabreichungsschemata für die therapeutischen Zusammensetzungen, umfassend BPI-Proteinprodukt, optimieren (einschließlich der Konstrukte oder Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung), wie durch gute medizinische Praxis und den klinischen Zustand des einzelnen Patienten bestimmt.

[0056] Die Konstrukte, einschließlich derivatisierter Konstrukte, oder Zusammensetzungen, umfassend solche Konstrukte der Erfindung, können in jeder der therapeutischen Verwendungen verwendet werden, von denen bekannt ist, daß BPI-Proteinprodukte hierbei wirksam sind, einschließlich denjenigen, die oben beschrieben sind, und von denen erwartet wird, daß sie eine Epithelzellabsorption von wenigstens ungefähr 0,001% oder bevorzugter wenigstens ungefähr 0,01%, 0,1%, 1%, 10% oder 20% oder mehr haben. Konstrukte und Zusammensetzungen der Erfindungen, insbesondere diejenigen, die derivatisiert sind, können fakultativ auf ihre Epithelabsorptionseigenschaften durch jeden auf dem Gebiet bekannten Assay getestet werden, einschließlich den Oralabsorptions- oder Transport-Screening-Assays, die in den Beispielen 6, 7 oder 8 beschrieben sind. Die Konstrukte sind besonders bei Verfahren zum Binden und Neutralisieren von exogenem Heparin, Verfahren zum Inhibieren der Endothelzellproliferation, der Behandlung von Störungen, die mit der Endothelzellproliferation assoziiert sind, Verfahren zum Inhibieren der Angiogenese und zur Behandlung von Störungen nützlich, die mit Angiogenese assoziiert sind oder diese beinhalten, können aber ebenso für andere Krankheiten oder Zustände nützlich sein, die aufgrund anderer biologischer Aktivitäten von BPI behandelbar sind, einschließlich Infektionen oder Störungen, die mit Endotoxin assoziiert sind, und die spezifisch eine der Krankheiten oder hierin beschriebenen Zustände einschließen oder die auf dem Gebiet bezüglich BPI-Proteinprodukten bekannt sind.

[0057] Exogene Heparin-Verbindungen werden üblicherweise während Operationsprozeduren, die Anti-Coagulation erfordern, wie etwa kardiopulmonaler Bypass, Herzkatheterisierung oder Angioplastie und Hämodialyse verabreicht. Exogene Heparin-Verbindungen werden ebenso an Patienten verabreicht, die ein Risiko von Thrombose haben oder die daran leiden, z. B. Patienten, die an einer tiefen Venenthrombose, einem akuten Myocardinfarkt, Hirnschlag oder einer Lungenembolie leiden.

[0058] Angiogenese-assoziierte Störungen sind Störungen, bei denen die Angiogenese eine Rolle bei der Initiation oder dem Fortschreiten der Krankheit spielt. Angiogenese ist beteiligt in einer Vielzahl von Zuständen, die unten dargestellt sind, und es wird erwartet, daß die Inhibition der Angiogenese für die Behandlung von jeder dieser Zustände wirksam ist (einschließlich dem Inhibieren des Fortschreitens der Krankheit und des Verbesserns von Zeichen und Symptomen der Krankheit).

[0059] Die Verwendung der Konstrukte oder Zusammensetzungen der Erfindung, einschließlich denjenigen, die gemäß der Erfindung derivatisiert worden sind, zur Herstellung eines Medikaments für jede dieser therapeutischen Verwendung wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0060] Angiogenese ist von besonderer Wichtigkeit bei Krebszuständen, weil die Erzeugung von neuen Gefäßen erforderlich ist, um das rasche Wachstum von Krebszellen zu unterstützen. Die Inhibition der Angiogenese kann daher die Tumorregression in der Erwachsenen- und pädiatrischen Onkologie fördern, einschließlich der Verringerung des Wachstums von festen Tumoren bösartigen Geschwulsten, lokal fortgeschrittenen Tumoren, metastatischem Krebs, menschlichen Weichgewebesarkomen, Krebsmetastasen, einschließlich lymphatischer Metastasen, bösartige Blutkörperchenerkrankungen, Effusionslymphomen (Körperhöhlungbasierenden Lymphomen), Lungenkrebs, einschließlich kleinzelligem Carcinom, nicht kleinzelligen Krebsen, Brustkrebs, einschließlich kleinzelligem Carcinom und Ductuscarcinom, Gastrointestinalkrebsen, einschließlich Magenkrebs, Dickdarmkrebs, Colorektalkrebs, Polypen, die mit colorektaler Neoplasie assoziiert sind, Pankreaskrebs, Leberkrebs, urologische Krebse, einschließlich Blasenkrebs, Prostatakrebs, maligne Erkrankungen des weiblichen Genitaltraktes, einschließlich Ovarialcarcinom, Uterus-Endometrium-Krebse und feste Tumore im Ovarialfollikel, Nierenkrebs, einschließlich Nierencarcinom, Gehirnkrebs, einschließlich intrinsischer Hirntumore, Neuroblastom, Astrocyteun-Hirntumore, Gliome, metastatische Tumorzellinvasion im zentralen Nervensystem, Knochenkrebs, einschließlich Osteome, Hautkrebs, einschließlich malignem Melanom, Tumorfortschritt von menschlichen Hautkeratinocyten und Plattenepithelcarcinom, Hämangiopericytom oder Kaposi-Sarcom.

[0061] Angiogenese spielt ebenso eine Rolle bei der chronischen Entzündung, einschließlich chronischer Pankreatitis, Dermatose, die mit chronischer Entzündung assoziiert ist, einschließlich Psoriasis, Zirrhose, Asthma, multiple Sklerose, Arthritis, einschließlich rheumatoider Arthritis, reaktiver Arthritis und chronischer

entzündlicher Arthritis, Autoimmunkrankheiten, einschließlich Vaskulitis, Glomerulonephritis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), Lupus, Myasthenia gravis, ulzerative Colitis, Crohnsche Krankheit, entzündliche Darmkrankheit, chronische Entzündung, assoziiert mit Hämodialyse, Granulocytentransfusions-assoziiertes Syndrom, Abstoßungsreaktionen nach Allograft- und Xenograft-Transplantation, einschließlich Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion, und andere chronische entzündliche Störungen.

[0062] Die Angiogenese im Auge ist bei der Augen-Neovaskularisierung, der proliferativen Retinopathie, re-trolentaler Fibroplasie, Makuladegeneration, neovaskulärem Glaukom und Diabetes-Augenkrankheit, insbesondere Diabetes-Iris-Neovaskularisierung und Retinopathie, beteiligt.

[0063] Koronare Atherome sind durch ein zerbrechliches Kapillaren-Netzwerk stark vaskularisiert, und ein Zerreißen dieser neu gebildeten Kapillaren, wenn sie hohen intravaskulären Drücken ausgesetzt sind, kann zu einer Blutung in arteriosklerotischen Plaques und Coronarverschluß führen. Die Inhibition der Angiogenese kann daher das Wachstum von arteriosklerotischen Plaques reduzieren und kann bei der Behandlung von Arteriosklerose, ischämischer Herzkrankheit, Myokardinfarkt, koronarer Herzkrankheit, Restenose, insbesondere nach Ballonangiographie, neointimaler Hyperplasie, Zerstörung der interzellulären Verbindungen im Gefäßendothel, Bluthochdruck, Gefäßverletzung, Arterienischämie, Arterienstenose, periphere Gefäßkrankheit, Hirschlag nützlich sein.

[0064] Angiogenese tritt ebenso während des weiblichen Reproduktionszyklus auf und ist bei Endometriose, Uterus-Fibroiden, anderen Zuständen, die mit einer dysfunktionellen Gefäßproliferation assoziiert sind (einschließlich endometrialen Mikrogefäßwachstums) während des weiblichen Reproduktionszyklus beteiligt.

[0065] Angiogenese ist ebenso bei abnormem Gefäßwachstum, einschließlich zerebralen arteriovenösen Mißbildungen (AVMs), Angiofibromen und Hämangiomen beteiligt.

[0066] Die Verabreichung zusammen mit anderen therapeutischen Mitteln, die für den zu behandelnden Zustand geeignet sind (z. B. andere Mittel, die Angiogenese inhibieren, oder therapeutische Krebsmittel, sofern angezeigt), wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0067] "Verabreichung zusammen mit" oder "Co-Verabreichung", wie hierin verwendet, schließt die Verabreichung der Mittel, in Verbindung oder Kombination, zusammen oder vor- oder nacheinander ein. Das BPI-Proteinprodukt und das (die) zweite(n) Mittel kann (können) auf verschiedenen Wege verabreicht werden. Zum Beispiel kann das BPI-Proteinprodukt intravenös verabreicht werden, während das zweite Mittel (die zweiten Mittel) intravenös, intramuskulär, subkutan, oral oder intraperitoneal verabreicht wird (werden). Das BPI-Proteinprodukt und das (die) zweite(n) Mittel kann (können) sequentiell in dieselbe intravenöse Leitung gegeben werden oder können auf verschiedenen intravenösen Leitungen gegeben werden. Alternativ kann das BPI-Proteinprodukt in einer speziellen Form zur Abgabe im Magen verabreicht werden, während das zweite Mittel (die zweiten Mittel) z. B. oral verabreicht wird (werden). Das formulierte BPI-Proteinprodukt und das (die) zweite(n) Mittel kann (können) simultan oder sequentiell verabreicht werden, solange sie auf eine Weise gegeben werden, die ausreicht, um es allen Mitteln zu ermöglichen, effektive Konzentrationen an der Wirkungsstelle zu erzielen.

[0068] Andere Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden bei Betrachtung der vorliegenden erläuternden Beispiele verstanden werden, wobei: Beispiel 1 die Herstellung und Aufreinigung von Konstrukten auf Peptid-Basis behandelt, einschließlich derivatisierter Konstrukte; Beispiel 2 die in-vitro-Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis behandelt, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in einem Endothelzellproliferationsassay; Beispiel 3 die in-vivo-Testung der anti-angiogenen Aktivitäten von Konstrukten auf Peptid-Basis behandelt, einschließlich derivatisierter Konstrukte; Beispiel 5 die in-vivo-Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in Modellen von chronischen entzündlichen Krankheitszuständen behandelt; Beispiel 5 die Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in einem malignen Melanom-Metastasenmodell behandelt; Beispiel 6 die in-vitro-Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in oralen Absorptions-Screening-Assays behandelt; Beispiel 7 die in-vivo-Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, für die orale Absorption behandelt, Beispiel 8 die in-vivo-Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, für die orale Aktivität behandelt; Beispiel 9 die in-vitro- und die in-vivo-Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in retinalen Neovaskularisationsmodellen behandelt; Beispiel 10 die Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, zur Heparin-Neutralisierung behandelt; und Beispiel 11 die Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in zusätzlichen Aktivitätsassays für BPI-Proteinprodukte behandelt.

HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON KONSTRUKTEN AUF PEPTIDBASIS

[0069] Dieses Beispiel betrifft die Herstellung und Aufreinigung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte.

[0070] Konstrukte auf Peptid-Basis können gemäß einer Vielzahl von synthetischen Prozeduren hergestellt werden. Zum Beispiel sind BPI-abgeleitete Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt worden, wie beschrieben in zusammen übertragener US-Patentanmeldung Nr. 08/183,222 und US-Patent Nr. 5,733,872, gemäß den Verfahren von Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 und Merrifield et. al., 1966, Anal. Chem., 38: 1905–1914, unter Verwendung eines Peptidsynthesizer, Modell 432, von Applied Biosystems, Inc.

[0071] Alternativ sind BPI-abgeleitete Peptide auf einem größeren Maßstab unter Verwendung einer Festphasen-Peptidsynthese auf einem Advanced Chemtech-Synthesizer (ACT-Model 357 MPS), unter Verwendung einer 1-Fluorenylmethyl-oxycarbonyl (Fmoc)-Schutzstrategie mit einer Doppelkopplungsprozedur synthetisiert worden, die N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC oder DIPCDI)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)/HOBt/diisopropylethylamin (DIEA) verwendet, wie in US-Patent Nr. 5,858,974 beschrieben.

[0072] Der feste Träger, der bei der Synthese von Konstrukten auf Peptid-Basis der vorliegenden Erfindung verwendet wurde, war ein Polystyrolharz mit einer 1% Divinylbenzol (DVB)-Quervernetzung und einem 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy (Fmoc-Rink-amid)-Linker mit einer Substitutionsrate von 0,56 mmol/Gramm. Ein Maßstab zwischen 0,1 Gramm und 5 Gramm an Ausgangsharz kann verwendet werden und betrug im allgemeinen 0,25 Gramm für die hierin beschriebenen synthetischen Konstrukte auf Peptid-Basis.

[0073] Für solche Synthesen war Dimethylformamid (DMF) das primäre Lösungsmittel mit einer 50/50-Lösung von Piperidin/DMF, verwendet für die Fmoc-Deprotektion in drei aufeinanderfolgenden Behandlungen von 1, 5 bzw. 10 Minuten. Eine doppelte Kopplungsprozedur wurde in jedem Zyklus mit einem 4 : 1-Aminosäure-zu-Peptid-Verhältnis verwendet, die in jeder Kopplung verwendet wurde. Die Aminosäuren wurden in einer 0,5 M HOBt-Lösung in N-Methylpyrrolidinon (NMP) bei einer Konzentration von ebenso 0,5 M aufgelöst. Für die erste Kopplung wurde eine äquimolare Menge (zur Aminosäure) einer 0,5 M Lösung Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI) in NMP verwendet und für 45 Minuten reagieren gelassen. Die zweite Kupplung verwendete ein äquimolares Volumen (zur Aminosäure) einer 0,5 M HBTU-Lösung in DMF mit einem gleichen Volumen einer 1 M DIEA-Lösung in NMP (2 : 1, DIEA : Aminosäure) für eine Periode von 30 Minuten.

[0074] Bei Abschluß der Synthese wurde das Harz mit MeOH behandelt, unter verringertem Druck getrocknet und dann unter Verwendung eines Cocktail gespalten, zusammengesetzt aus Trifluoressigsäure (TFA) : Thioanisol : Ethandithiol (EDT) : Wasser, in einem Verhältnis von 36 : 2 : 1 : 1 (mit wobei das Volumen abhängig von der Menge an Harz ist) für zwei Stunden (ein Minimum von 2 Stunden wurde mit zusätzlichen 30 Minuten für jedes Arginin verwendet, aber nicht drei Stunden überschreitend) wobei die ersten 15 Minuten in einem nassen Eisbad stattfanden. Die Lösungen wurden dann in 10% TFA in wäßriger Lösung aufgelöst, 3 mal mit Methyl-t-butylether (MTBE) gewaschen und lyophilisiert.

[0075] Die Amino-Termini von ausgewählten Konstrukten auf Peptid-Basis können mit Essigsäure-Anhydrid oder einer anderen organischen Carbonsäure nach der Synthese auf der Festphase unter Verwendung einer N-terminalen Fmoc-Schutzstrategie, wie oben beschrieben, derivatisiert werden. Im Anschluß an die Entfernung von Fmoc mit Piperidin und vor der Peptidspaltung mit TFA konnte das Peptid auf dem Harz mit einem 10-fachen molaren Überschuß an Essigsäure-Anhydrid oder einem 4-fachen molaren Überschuß einer anderen organischen Carbonsäure mit einem 2-fachen molaren Überschuß an Diisopropylethylamin in Dimethylformamid für eine Stunde oder einer doppelten Kopplungsprozedur unter Verwendung von N, N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder CIPCDI/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1.1.3.3-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat (HBTU)/HOBt/diisopropylethylamin (DIEA) derivatisiert werden, und einer aus einer Vielzahl von Bausteinen könnte zur Derivatisierung verwendet werden. Das Peptid wurde dann von dem Harz mit dem TFA-Spaltungscocktail abgespalten, wie oben beschrieben, und aufgereinigt, wie unten beschrieben. Die Derivatisierung, einschließlich einer N-terminalen Acetylierung, des aufgereinigten Peptids wurde mittels Massenspektrometrie verifiziert.

[0076] Die Ausbeuten der in Tabelle I beschriebenen Konstrukte auf Peptid-Basis reichten von 4,8 bis 57,8%.

Alle HPLC-Reinheiten waren im allgemeinen größer als 90%, und die Masse wurde mittels Massenspektrometrie ermittelt.

[0077] Für die Reinheitsanalyse von jedem neu synthetisierten Konstrukt auf Peptid-Basis wurden verdünnte Lösungen von Konstrukten auf der Basis von lyophilisierten Peptiden hergestellt und auf einem Michrom Ultrafast Microprotein Analyzer analysiert, ausgestattet mit einer 150 mm X 1 mm, 5 µ Partikel, 300 Å Poren C-8-Zorbax-Säule. Der Säulenofen wurde auf 40°C eingestellt, die Durchflußrate betrug 100 µl/Minute, und die Injektionsvolumina waren typischerweise 5–10 µl. Die HPLC wurde unter Verwendung von 5% Acetonitril/0,1% TFA in Wasser als eine mobile Phase A durchgeführt, und 80% Acetonitril/0,065% TFA als mobile Phase B. Das Eluat wurde spektrophotometrisch bei 214 nm überwacht. Die prozentuale Reinheit wurde anhand der Peakfläche der einzelnen Peptidkonstrukte berechnet.

[0078] Ausgewählte Konstrukte wurden mittels Flüssighochleistungs-Chromatographie (HPLC) unter Verwendung einer Waters Prep LC 2000 präparativen Chromatographie Systems (Water Corp., Milford, MA) aufgereinigt, ausgestattet mit einer Delta Pak C-18, 15 µm, 300 Å Patronensäule, bestehend aus einer 40 X 10 mm Schutzpatrone und einer 40 X 100 mm Prep Pak-Patrone. Die Säule wurde in 25% Puffer B äquilibriert, wobei A=5% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure und B = 80% Acetonitril/0,065% Trifluoressigsäure. Solche Konstrukte auf Peptid-Basis wurden auf ~ 20 mg/ml in Puffer A aufgelöst, und 200–800 mg wurden auf die Säule durch die LC-Pumpe aufgetragen, die bei einer Durchflußrate von 8–17 ml/min betrieben wurde. Das gebundene Material wurde mit einem empirisch bestimmten Gradienten an Puffer B, zum Beispiel einem Gradienten von 25–35% Puffer B pro 30 Minuten, aufgetragen bei 8–17 ml/min, eluiert. (Einige Konstrukte wurden mit einem Gradienten von 23–43% Puffer B/30 min aufgereinigt; andere Konstrukte wurden mit einer Vielzahl von Gradienten, wie etwa 25–45%, 0–60%, 30–70%, 25–75% aufgereinigt). Das Eluat wurde bei 220 und/oder 280 und 300 nm mit einem Waters 490 E Programmable Multiwavelength Detector überwacht. Die Fraktionen wurden gesammelt und auf das interessierende Konstrukt auf einem Ultrafast Microprotein Analyzer getestet (Michrom BioResources, Inc., Pleasanton, CA), ausgestattet mit einer Zorbax C-8, 150 X 1 mm, 5 µm, 300 Å, bei 40°C gehalten. Fraktionen, die das interessierende Konstrukt bei > 90% Reinheit enthielten, wurden vereinigt und bis zur Trockene lyophilisiert. Die Reinheit des erhaltenen Materials wurde mit analytischer Umkehrphasen-HPLC bestimmt.

TABELLE

Peptidkonstrukt (SEQ ID NO:)	Sequenz ^(a)	Molekulargewicht
XMP.394 (1)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly-ser-ile-lys-ile	1910.4
XMP.624 (2)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly-ser-ile-lys	1797.3
XMP.625 (3)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly-ser-ile	1669.0
XMP.626 (4)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly-ser	1555.8
XMP.627 (5)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly	1468.7
XMP.628 (6)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys	1411.6

XMP.629 (7)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)	1283.3
XMP.630 (8)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1086.4
XMP.656 (9)	lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly-ile-lys-ile	1823.5
XMP.679 (10)	lys-leu-phe-lys-(D-naph-ala)-gln-ala-lys-(D-naph-ala)-lys-gly	1440.2
XMP.684 (11)	(biphenyl-ALA)-lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1309.1
XMP.685 (12)	lys-leu-phe-arg-(biphenyl-ala)-gln-ala-lys	1111.8
XMP.725 (13)	lys-leu-phe-arg-(biphenyl-ala)-gln-ala-lys	1111.9
XMP.728 (14)	lys-leu-phe-lys-(biphenyl-ala)-gln-ala-lys-(biphenyl-ala)-lys-gly	1492.8
XMP.760 (15)	lys-ala-phe-arg-(naph-ala)-gln-ala-lys-(naph-ala)	1242.6
XMP.764 (16)	lys-ala-phe-lys-(naph-ala)-gln-ala-lys-(naph-ala)-lys-gly	1399.4
XMP.776 (17)	lys-leu-phe-lys-(naph-ala)-gln-ala-lys-(naph-ala)	1255.6
XMP.778 (18)	lys-(aminoisobuttersäure)-phe-arg-(naph-ala)-gln-ala-lys-(naph-ala)	1255.5
XMP.661 (19)	2-biphenylcarbonyl-lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1266.6
XMP.664 (20)	4-biphenylcarbonyl-lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1265.7
XMP.666 (21)	2-naphthylacetyl-lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1253.1
XMP.671 (22)	1-naphthylacetyl-lys-leu-phe-arg-(D-naph-ala)-gln-ala-lys	1254.0
XMP.699 (23)	2-biphenylenecarbonyl-lys-leu-phe-arg-(naph-ala)-gln-ala-lys	1264.6
XMP.767 (24)	4-biphenylcarbonyl-lys-leu-phe-lys-(naph-ala)-gln-ala-lys	1238.6
XMP.768 (25)	4-biphenylcarbonyl-lys-leu-phe-arg-(biphenyl-ala)-gln-ala-lys	1292.6
XMP.769 (26)	4-biphenylcarbonyl-lys-leu-phe-lys-(biphenyl-a)-gln-ala-lys	1264.6

^(a)entsprechend allgemeinem Brauch stellen Aminosäuregruppen, die mit kleinem Buchstaben geschrieben sind (z. B. lys) D-Aminosäuregruppen dar, und in Großbuchstaben (z. B. LYS) stellen sie L-Aminosäuregruppen dar; es gibt nur eine Form von Glycin (keine D,L) und diese kann als GLY oder G oder als gly oder g dargestellt werden.

BEISPIEL 2

IN-VITRO-HUVEC-ASSAY

[0079] Dieses Beispiel behandelt die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in einem in-vitro-Assay der Endothelzellproliferation.

[0080] Kurz gesagt wurden menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) in EGM-2-Medium (Clonetics Corp., San Diego, CA) kultiviert, geerntet und auf eine 96-Napikulturplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden Ruhe wurden die Zellen zusammen mit verschiedenen Konstrukten auf Peptid-Basis in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren für 72 Stunden kultiviert, um ihre Aktivität zu testen. Die Zellproliferation wurde mittels tritiiertem Thymidin-Einbau in die DNA quantifiziert und wurde in Zählwerten pro Minute (cpm) ausgedrückt.

[0081] Details der experimentellen Prozeduren waren wie folgt: HUVEC-Zellen wurden in EGM-2-Medium von Clonetics Corp., kultiviert, einer Tochter von BioWhittaker, Inc., San Diego, CA [EGM-2 ist Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2), supplementiert mit Wachstumsfaktoren (hFGF-B, VEGF, IGF-1, hEGF), Ascorbinsäure, Heparin, GA-1000 und 2% FBS), in T75-Kolben bis zur Konfluenz (~ 4–7 Tage). Die Zellen wurden mittels Trypsinisierung der Zellen unter Verwendung von 0,025% Trypsin/EDTA für 5 Minuten geerntet. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 2–5% FBS zugegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert und 3 mal unter Verwendung von ausgeglichener Hank'scher Salzlösung (HBSS) oder Dulbecco Phosphatgepufferter Salzlösung D-PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in EBM-2 resuspendiert, das mit 0,1% FBS supplementiert war, und GA-1000 wurde verwendet. Die Zellen wurden gezählt, und eine Zellsuspension wurde bei 2×10^5 /ml in EBM-2 mit 0,1% FBS hergestellt; die Zellen wurden in eine Kulturplatte mit 96 Näpfen mit flachem Boden in 0,1 ml/Napf (Gesamt: ~ 20.000 Zellen/Napf in 0,1% FBS-EBM-2) abgegeben. Die Inkubation wurde bei 37°C in 5% CO₂ für 20–24 Stunden fortgesetzt. Am nächsten Tag wurden Konstrukte auf Peptid-Basis zum Testen in einer 96-Napf-Platte hergestellt. Der Überstand wurde von dem Zellnapf aspiriert, mit EBM-2 oder dem Testreagenz in 20 µl/Napf ersetzt. Dann wurden 180 µl/Napf 1,12% FBS-GFS zugegeben, um eine Endkonzentration von 1% FBS-GFS in EBM-2 zu ergeben. Diese Aspiration und Zugabe wurde Napf für Napf gemacht. ³H-Thymidin (100 µCi/ml) wurde in 10 µl/Napf (1 µCi/Napf am Ende) zugegeben. Die Inkubation wurde bei 37°C, 5% CO₂ für 72 Stunden fortgesetzt. Um die Platte zu ernten, wurde der Überstand von dem Zellnapf aspiriert, und dann wurden 75 µl-100 µl/Napf an 0,025% Trypsin-EDTA zugegeben. Nach Inkubation für 8–10 Minuten bei Zimmertemperatur unter dem Abzug wurden die Zellen überprüft, und 100 µl/Napf an 2–5% FBS-PBS wurde zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Platte wurde dann geerntet, getrocknet und unter Verwendung eines Inotech-Zell-Erntesystems ("Harvester") (Inotech Biosystems, INB-384, Sample Processing and Filter Counting System, Lansing, MI) gezählt.

[0082] Die Ergebnisse von solchen HUVEC-Proliferations-Assays werden in Tabelle II gezeigt. In roher Form (Reinheit > 73%) oder aufgereinigt getestet, inhibierten Konstrukte auf Peptid-Basis gemäß der Erfindung die HUVEC-Proliferation.

TABELLE II

Peptidkonstrukt (SEQ ID NO:)	Gruppen Nr. (Aminosäuren)	Reinheit	IC ₅₀ (µg/ml)
XMP.394 (1)	15	95.2%*	4.3 ± 0.5
XMP.624 (2)	14	81.5%	5.3 ± 0.3
XMP.625 (3)	13	95.4%	3.1 ± 0.2
XMP.626 (4)	12	92.2%	9.1 ± 0.7
XMP.627 (5)	11	88.4%	5.8 ± 0.7
XMP.628 (6)	10	86.0%	6.7 ± 0.7
XMP.629 (7)	9	86.4%	5.4 ± 1.2
XMP.630 (8)	8	73.7%	>25
XMP.656 (9)	14	94.1%*	2.6 ± 0.8
XMP.679 (10)	11	92.8%*	6.3 ± 0.9
XMP.684 (11)	9	97.8%*	10 < x < 30
XMP.685 (12)	8	99.9%	ND
XMP.725 (13)	8	87.2%	ND
XMP.728 (14)	11	95.6%	1 < x < 3
XMP.760 (15)	9	98.0%	10 < x < 30
XMP.764 (16)	11	90.0%	10 < x < 30
XMP.776 (17)	9	96.4%	ND
XMP.778 (18)	8	79.7%	ND
XMP.661 (19)	8	90.5%	>30
XMP.664 (20)	7	99.0%	3 < x < 10
XMP.666 (21)	8	82.9%	b
XMP.671 (22)	8	91.0%	10 < x < 30
XMP.699 (23)	8	75.5%	b
XMP.767 (24)	8	96.0%	10 < x < 30
XMP.768 (25)	8	97.2%	3 < x < 10
XMP.769 (26)	8	98.9%	3 < x < 10

NDnicht bestimmt
^bausgefällt in 1 mg/ml Stammlösung
*aufgereinigt

[0083] Die inhibitorische Aktivität mit einem 9-Aminosäurenkonstrukt (XMP.629) war ähnlich derjenigen des 15-Aminosäuren-Elternkonstrukts (XMP.394). In wiederholten Experimenten (8 insgesamt) wies XMP.679 IC₅₀-Werte konsistent im Bereich zwischen 3 und 10 (3 < x < 10) auf. In zusätzlichen Assays unter Verwendung von aufgereinigtem XMP.624, XMP.625, XMP.626, XMP.627, XMP.629 und XMP.630 waren die IC₅₀-Werte vergleichbar denjenigen, die in Tabelle II gezeigt sind (4,9 ± 0,5, 1 < x < 3 (7 Experimente), 3 < x < 10 (2 Ex-

perimente), $3 < x < 10$ (3 Experimente), $3 < x < 10$ bzw. > 50).

BEISPIEL 3

IN-VIVO-MATRIGEL®-ANGIOGENESE-ASSAYS

[0084] Dieses Beispiel behandelt die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in in-vivo-Assays für Angiogenese unter Verwendung von Matrigel®.

[0085] Für diese Experimente wurden Konstrukte auf Peptid-Basis gemäß der Erfindung auf ihre Fähigkeit getestet, Heparin-induzierte Angiogenese in vivo in Mäusen zu inhibieren. Eine Grundmembranmatrix ("Basement membrane matrix") (Matrigel®, Becton Dickinson Labware, Mountain View, CA) wurde aufgetaut und bei 4°C gehalten, und angiogene Faktoren wurden zu dem Gel im flüssigen Zustand zugegeben, im allgemeinen wie in Passaniti et al., 1992, Lab. Invest. 67: 519–528 beschrieben. Heparinnatrium (Sigma, St. Louis, MO) wurde in steriler PBS auf verschiedene Konzentrationen im Bereich von 1.250 – 10.000 U/ml aufgelöst und in diesen Experimenten bei 8.000 U/ml verwendet. Menschlicher rekombinanter basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF; Sigma) wurde in 1% BSA in PBS auf 25 µg/ml rekonstituiert. Ein Volumen von 2,5 µl aufgelöster Heparinlösung und 4,0 µl rekombinanter bFGF wurde zu 0,5 ml Matrigel®-Mischung pro Mausinjektion zugegeben. Konstrukte auf Peptid-Basis wurden zu dieser Matrigel®-Mischung in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 50 µg/ml (Endkonzentration) in 10 µl/0,5 ml Matrigel®-Aliquot pro Versuchstier zugegeben. Zehn µl sterile PBS wurden für Konstrukte auf Peptid-Basis in Matrigel®-Aliquot substituiert, die in Kontrolltiere injiziert wurden.

[0086] Weiblichen C57BL/6J-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) im Alter von 6–8 Wochen (gehalten gemäß NIH-Richtlinien) wurde subkutan entlang der Rückenmittellinie 0,5 ml Aliquots Matrigel® injiziert, das wie oben beschrieben hergestellt worden war. Zehn Tage nach der Injektion wurden die Matrigel®-Gele ausgeschnitten und in Drabkin-Reagenz plaziert (Sigma). Der Gesamtprotein- und Hämoglobin-Gehalt kann für die in Drabkin-Reagenz gelagerten Gele nach mechanischer Homogenisierung der Gele bestimmt werden. Die Hämoglobinkonzentration wurde unter Verwendung von Sigma-Prozedur #525 und Reagenzien gemessen, die von Sigma geliefert wurden (St. Louis, MO), um mit dieser Prozedur verwendet zu werden. Wenn erwünscht, werden Gesamtprotein-Konzentrationen unter Verwendung eines Mikroplattenassay bestimmt, der kommerziell in einem Kit verkörpert ist (DC Protein Assay, Bio-Rad, Richmond, CA).

[0087] Gele, die für histologische Färbung verwendet werden sollen, werden unmittelbar nach dem Ausschneiden von den Tieren Formalin-fixiert, anstatt in Drabkin-Reagenz plaziert zu werden. Formalin-fixierte Gele werden in Tissue-Tek O.C.T-Verbindung (Miles, Inc., Elkhart, IN) für eine Tiefkühlsektionierung eingebettet. Objektträger mit gefrorenen Schnitten werden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (wie beschrieben von Humason, 1979, Animal Tissue Techniques, 4th Ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, Kap. 9, Seiten 111–131). Der Effekt der Peptide wird mittels mikroskopischer Untersuchung der gefrorenen gefärbten Schnitte auf die Inhibition der Angiogenese relativ zu den Matrigel®-Gel-Schnitten ohne zugegebene Peptide nachgewiesen. Das Ausmaß an Inhibition der Angiogenese wird unter Verwendung der normalisierten Mengen an Hämoglobin quantifiziert, die in BPI-Peptidhaltenden Gelschnitten gefunden werden.

[0088] Die Ergebnisse der Matrigel®-Assays mit 10 µg Peptid-Konstrukt pro Gel werden in Tabelle III gezeigt. Die Daten werden als der Mittelwert von dreifachen Bestimmungen der Hämoglobinkonzentrationen aus dem ausgeschnittenen Gel (ISEM) mit zehn Mäusen pro Gruppe dargestellt.

TABELLE III

Peptidkonstrukt (SEQ ID NO:)	% Inhibition	p-Wert
XMP. 394 (1)	54,6	0,03
XMP. 624 (2)	ND	ND
XMP. 624 (3)	51,9	0,04
XMP. 626 (4)	ND	ND
XMP. 627 (5)	77,6	0,003
XMP. 628 (6)	ND	ND
XMP. 629 (7)	30,8	0,22
XMP. 630 (8)	49,6	0,05

ND – Nicht bestimmt

[0089] Konstrukte auf Peptid-Basis inhibierten die bFGF-induzierte Angiogenese. Matrigel[®]-Assay-Ergebnisse verfestigten die HUVEC-Assay-Resultate, die in Beispiel 2 beschrieben sind.

[0090] In zusätzlichen Experimenten wurde ein in-vivo-Angiogenese-Assay unter Verwendung von Matrigel[®] und Melanomzellen entwickelt ("mel-gel"-Assay). Weibliche C57B1/6J-Mäuse, wie oben beschrieben, wurden in einem Alter von 6–8 Wochen verwendet und gemäß NIH-Richtlinien gehalten. Grundmembranmatrix (Matrigel[®]), wie oben beschrieben, wurde bei 4°C vor der Zugabe von B 16.F 10-malignen Melanomzellen bei 50 µl pro 0,5 ml Matrigel[®] aufgetaut. Die Endkonzentration an B 16.F 10-Melanomzellen wurde von 10.000 bis 100.000 Zellen/0,5 ml Matrigel[®] variiert. Für diesen Assay werden Konstrukte auf Peptid-Basis bei 50 µl (Endkonzentration variiert von 1,0 bis 50,0 µg/0,5 ml an Matrigel[®]) mit B16.F10-Melanomzellen vorgemischt und direkt zu dem Matrigel[®] vor der subkutanen Injektion nahe der abdominalen Mittellinie zugegeben. Fünfundzwanzig (50) ml sterile PBS wird für die Konstrukte in Matrigel[®] Aliquots ausgetauscht, die in Kontrolltiere injiziert werden. Zehn Tage nach den Injektionen werden die Gele ausgeschnitten und in Drabkin-Reagenz (Sigma) plaziert, wie oben beschrieben. Der Gesamt-Hämoglobingehalt wird für die in Drabkin-Reagenz gelagerten Gele nach mechanischer Homogenisierung der Gele, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Hämoglobinkonzentration wird gemessen, wie oben beschrieben, unter Verwendung von Sigma-Prozedur #525 und den Reagenzien, die von Sigma (St. Louis, MO) geliefert werden, um in dieser Prozedur verwendet zu werden. Die Daten von mel-gel-Assays werden als der Mittelwert von dreifachen Bestimmungen der Hämoglobinkonzentrationen aus dem ausgeschnittenen Gel (ISEM) mit zehn Mäusen pro Gruppe dargestellt.

BEISPIEL 4

CHRONISCHE ENTZÜNDLICHE KRANKHEITZUSTANDSMODELLE.

KOLLAGEN-INDUZIERTE ARTHRITIS ODER REAKTIVE ARTHRITIS

[0091] Dieses Beispiel betrifft die in-vivo-Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, wenn sie auf ihre Effekte hinsichtlich chronischer entzündlicher Krankheitszustände, wie etwa Arthritis, verabreicht werden.

[0092] Für das Collagen-induzierte Arthritismodell wird die Arthritis in Mäusen durch intradermale Immunisierung von bovinem Collagen vom Typ II an der Basis des Schwanzes gemäß dem Verfahren von Stuart et al., 1982, J. Clin. Invest. 69: 673–683 induziert. Im allgemeinen beginnen Mäuse, arthritische Symptome am Tag 21 nach der Collagenimmunisierung zu entwickeln. Die arthritischen Werte der behandelten Mäuse werden dann in einer geblindeten Weise über eine Periode von 120 Tagen für Mäuse bewertet, die an jedem der Tage 21–25 mit intravenöser Injektion über die Schwanzvene von Konstrukten auf Peptid-Basis, die in Übereinstimmung mit Beispiel 1 hergestellt worden sind, oder eines Puffers als eine Kontrolle behandelt wurden.

[0093] Insbesondere wird bovines Collagen vom Typ II (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham AL) über eine intradermale Injektion (0,1 mg/Maus) an der Basis des Schwanzes am Tag 0 an Gruppen von männlichen Mäusen verabreicht (Maus/DBA/1J), wobei jede näherungsweise 20–25 g wog. Konstrukte auf Peptid-Basis werden in einem Puffer, umfassend 0,5 M NaCl, 20 mM Natriumacetat (pH 6,0), aufgelöst und mit PBS-Puffer zur Verabreichung in verschiedenen Konzentrationen verdünnt. PBS-Puffer alleine (0,1 ml) wird als eine Kontrolle verabreicht.

[0094] Das Collagen-induzierte Arthritismodell wird ebenso verwendet, um die Leistung von Peptiden im Vergleich mit Protaminsulfat zu bewerten. Insbesondere werden Konstrukte auf Peptid-Basis in PBS, wie oben beschrieben, aufgelöst und in verschiedenen Konzentrationen verabreicht. Die anderen Testmaterialien werden in den folgenden Dosierungen verabreicht: Protaminsulfat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (0,13 mg/Maus), Thaumatin-Kontrollprotein (0,12 mg/Maus), and PBS-Puffer (0,1 ml). Die Gruppen von Mäusen erhalten Test- oder Kontrollmaterialien durch intravenöse Injektion über die Schwanzvene an jedem der Tage 28 bis 32 nach der Injektion mit Collagen.

[0095] Für das reaktive Arthritis-Modell werden Konstrukte auf Peptid-Basis verabreicht, um reaktive Arthritis in einem *Yersinia enterocolitica*-Modell für reaktive Arthritis gemäß dem Verfahren von Yong et al., 1988, *Microbial Pathogenesis* 4: 305–310 zu behandeln. Insbesondere werden Konstrukte auf Peptid-Basis an DBA/2J-Mäuse verabreicht, denen zuvor intravenös *Yersinia enterocolitica* cWA 0 : 8 T2 injiziert worden ist (d. h. dem das Virulenzplasmid gemäß Yong et al., supra, fehlt), in einer Dosierung von 4×10^8 Bakterien, die so berechnet worden ist, daß sie eine nicht-septische Arthritis in den Mäusen induziert. Jede Gruppe von Mäusen erhält Test- oder Kontrollmaterialien durch intravenöse Injektion über die Schwanzvene.

[0096] *Borrelia burgdorferi* ist das Pathogen, das für Lyme-Borreliose und assoziierte Arthritis verantwortlich ist, und es besitzt einen LPS-artigen Komplex an seinen Zellwänden, der sich von dem von *E. coli* unterscheidet, aber strukturell verwandt ist. Der Effekt der Verabreichung der Konstrukte auf Peptid-Basis auf die Inhibition von *B. burgdorferi*-LPS in einem *Limulus*-Amoebocyten-Lysate (LAL)-Inhibitionsassay wird bestimmt. Insbesondere wird ein LAL-Assay durchgeführt unter Messung des Effekts von Konstrukten auf Peptid-Basis auf *B. burgdorferi*-LPS, das zum Beispiel bei 2,5 µg/ml verabreicht wird, und auf *E. coli* 0113-LPS, das zum Beispiel bei 2 ng/ml verabreicht wird.

BEISPIEL 5

MALIGNES MELANOM-METASTASEN-MODELL

[0097] Dieses Beispiel betrifft die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in einem malignen Melanom-Metastasenmodell in vivo.

[0098] Für diese Experimente werden Konstrukte auf Peptid-Basis, Protamin oder Pufferkontrollen verabreicht, um ihre Wirksamkeit in einem malignen Melanom-Metastasen-Mausmodell zu testen. Insbesondere werden Gruppen von C57BL/6J-Mäusen mit 10^5 B16.F10-malignen Melanomzellen über eine intravenöse Injektion in der Schwanzvene am Tag 0 geimpft. Konstrukte auf Peptid-Basis, die in Übereinstimmung mit Beispiel 1 in verschiedenen Konzentrationen hergestellt worden sind, werden in die Schwanzvene von Testmäusen an den Tagen 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, und 19 verabreicht. Protaminsulfat (0,13 mg/Maus) als eine positive Kontrolle oder PBS-Puffer (0,1 ml/Maus) als eine negative Kontrolle werden in ähnlicher Weise an zusätzliche Gruppen von Mäusen verabreicht. Die Tiere werden entweder mittels Genickbruch am Tag 20 zur Beobachtung der Lungengewebe geopfert oder auf ihre Sterblichkeit bis zum Tag 40 beobachtet. Die Lappen von jeder Lunge werden perfundiert und durch Injektion von 3 ml Wasser in die Lunge über die Trachea aufgeblasen. Oberflächliche Tumorknötchen werden dann mit Hilfe eines Seziernmikroskop gezählt und die Anzahl an Tumoren, die pro Gruppe gefunden werden auf statistisch signifikante Unterschiede analysiert. Solche Analysen identifizieren diejenigen Konstrukte mit Wirksamkeit, die die Anzahl an Tumoren signifikant reduzieren und signifikant das Leben verlängern.

BEISPIEL 6

IN-VITRO ORALES ABSORPTIONSSCREENING

[0099] Dieses Beispiel betrifft die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, in in-vitro-Transport-Screeningassays.

[0100] Für dieses Experiment werden Konstrukte auf Peptid-Basis auf potentielle orale Absorption in in-vitro-Screening-Assays unter Verwendung von MDCK- und/oder CACO-2-Zellen gescreent. In Kürze gesagt, die kultivierten Monoschichten von Madin-Derby-Hundenieren-Epithelzellen (MDCK) (ATCC Hinterlegungs-Nr. CCL-34) und/oder CACO-2 (menschliches Dickdarmcarcinom)-Zellen (Audus, K. L., et al., 1990, *Phar. Res.*, 7: 435–451) werden auf Collagen-beschichteten, permeablen Filterträgern wachsgelassen (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Die Zellen werden bis zur Konfluenz wachsen und sich differenzieren gelassen (z. B. ungefähr 3 Tage für MDCK-Zellen oder ungefähr 21 Tage für CACO-2-Zellen). Die Unversehrtheit der Monoschichten wird durch Messen des Transepithelwiderstands bestimmt. Die Zellen werden mit einem Konstrukt auf Peptid-Basis an der apikalen Seite für 2,5 Stunden in MDCK- oder CACO-2-Screening inkubiert. Der Transepitheltransport des Konstruktes wird mittels quantitativer HPLC-Analyse der Inkubationsmedien auf der basolateralen Seite der Zellen gemessen (Vorwärtstransport). Radioaktiv markiertes Mannitol und/oder Cortison werden als Positivkontrollen verwendet. Zusätzlich wird der Ausfluß des Konstruktes mittels quantitativer HPLC-Analyse der Inkubationsmedien an der Apikal-Seite der Zellen gemessen. Dies folgt einer Inkubation der Zellen mit einem Konstrukt auf der basolateralen Seite für 2,5 Stunden.

[0101] Details der experimentellen Prozeduren waren wie folgt: MDCK- oder CACO-2-Zellen werden auf ~ 90% Konfluenz in T75-Gewebekulturkolben in Zellwachstumsmedium wachsgelassen (für MDCK-Zellen, minimales essentielles Medium (Eagle) GIBCO (Grand Island, NY) #11095–080, oder für CACO-2-Zellen, DMEM, GIBCO #11965–050, hoher Glucosegehalt-500 ml; FBS 10% (Hyclone) hitzebehandelt-50 ml; L-Glutamine (200 mM) GIBCO #25030–016-5 ml; für CACO-2-Zellen, nicht-essentielle Aminosäuren, GIBCO 11140–050 (200 mM, 100x)-5,5 ml; und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) GIBCO #15140–015-5 ml, das gefiltert und bei 4°C gelagert wird). Die Zellen werden trypsinisiert (~ 20 Minuten für MDCK-Zellen zum Passagieren aufgrund ihrer starken Anheftung) und auf 24,5 mm trans-Vertiefungen ("transwells") (Transwell-COL, #3245, Corning CoStar Corp., Cambridge, MA) in einer Konzentration von ~ 3×10^6 MDCK-Zellen/Napf oder ~ 3×10^5 CACO-2-Zellen/Napf ausgesät. Für die MDCK-Zellen wird das Medium einen Tag nach dem Aussäen gewechselt, und man läßt die MDCK-Zellen für zusätzliche 2 Tage wachsen. Für die CACO-2-Zellen wird das Medium alle 2 Tage nach dem Aussäen gewechselt, und man läßt die CACO-2-Zellen für insgesamt bis zu 21 Tagen wachsen.

[0102] Nach den Tagen nach dem Aussäen sind die Zellen für Transportexperimente bereit. Die Zellen werden mit frischem Medium 2 Stunden vor dem Start des Transportexperiments gefüttert. Die Zellen werden dann mit Transportmedium gewaschen (TM: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) GIBCO #14025–027, ohne Phenolrot; 10 mM HEPES (aus 1 M HEPES) GIBCO #15630–015, pH-ausgeglichen mit NaOH auf 7,4) und in neue 6-Napf-Platten gebracht. Donorlösungen von Konstrukten auf Peptid-Basis für den Assay werden in 1,5 ml TM bei einer Konzentration von ~ 100 µg/ml hergestellt. Für Vorwärtstransportstudien werden diese 1,5 ml-Konstruktlösungen zu der apikalen Kammer der Transnäpfe zugegeben. Näherungsweise 2,6 ml Akzeptorlösung (nur TM, kein Konstrukt) wird zu der basolateralen Kammer zugegeben. Für Efflux-Studien wird die Donor-Lösung mit dem Konstrukt zu der basolateralen Kammer zugegeben, und die Akzeptorlösung (nur TM, kein Konstrukt) wird zu der apikalen Kammer zugegeben. Jedes Konstrukt wird wenigstens dreifach getestet.

[0103] Die Trans-Näpfe werden in den 37°C Gewebekulturrinkubator für 2,5 Stunden zurückgebracht. Am Ende der 2,5 Stunden werden die apikalen und basolateralen Lösungen unter Hochvakuum in konischen 15 ml-Röhrchen getrennt gefriergetrocknet (lyophilisiert). Die Proben werden dann in 200 µl HPLC-A resuspendiert (5% Acetonitril: 95% Wasser: 0,1% Tetrafluoressigsäure (TFA)), und 50 µl der resuspendierten Probe wird für HPLC-Analyse verwendet.

[0104] Apikale Kontrollnäpfe, enthaltend 1,5 ml TM mit tritiiertem Mannitol (^3H -Mannitol, 1 µCi/ml; Dupont NEN Research Products, #NET-101, Boston, MA) werden separat auf Zählwerte pro Minute (cpm) von Tritium analysiert, um die Unversehrtheit der MDCK-Zell-Monoschichten zu testen.

[0105] Der Vorwärtstransport wird als der prozentuale Anteil an Konstrukt auf Peptid-Basis in der basolateralen Kammer (bestimmt anhand der Fläche unter dem HPLC-Peak) von der anfänglichen Konzentration der apikalen Lösung (anfängliche Donorkonzentration von ungefähr 100 µg/ml) berechnet. Für Efflux-Experimente wird die umgekehrte Berechnung angestellt (prozentualer Anteil an Konstrukt auf Peptid-Basis in der apikalen Kammer von der anfänglichen Konstruktkonzentration in der basolateralen Lösung). Ein solches intestinales Absorptionsscreening identifiziert Konstrukte, die potentielle, oral verfügbare Verbindungen sind.

BEISPIEL 7

ORALES ABSORPTIONSSCREENING IN-VIVO

[0106] Dieses Beispiel behandelt die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, für die orale Absorption in einem in-vivo-Screeningassay, in dem die Konstrukte durch orale Verabreichung an Mäuse verabreicht werden.

[0107] Kurz gesagt, die Serumkonzentration der Konstrukte werden zu verschiedenen Zeitintervallen nach der Verabreichung mittels HPLC gemessen. Zum Beispiel können Konstrukte an Mäuse in verschiedenen Dosierungen verabreicht werden (z. B. 10 mg/kg Körpergewicht oder 20 mg/kg Körpergewicht), und Serumpeptidkonzentrationen werden zu verschiedenen Zeitintervallen gemessen (z. B. eine Stunde, 4 Stunden und/oder 24 Stunden) nach der Verabreichung an die Mäuse. Eine HPLC-Analyse identifiziert Konstrukte, die nach der oralen Verabreichung absorbiert werden. Solche Konstrukte, die eine erhöhte orale Verfügbarkeit zeigen, können therapeutisch wirksame Serumkonzentrationen nach oraler Verabreichung erzielen.

BEISPIEL 8

ORALE AKTIVITÄT

[0108] Dieses Beispiel behandelt die Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, für die Aktivität nach oraler Verabreichung (orale Aktivität) in einem in-vivo-Tiermodell.

[0109] Tiermodelle, die zum Testen von oraler Aktivität nützlich sind, schließen diejenigen ein, die in Beispielen 4 und 5 oben beschrieben sind. Die Behandlung wird durch orale Gabe (~ 400 µl) von entweder 0,5% Dextrose oder dem Konstrukt auf Testpeptid-Basis in 0,5% Dextrose in verschiedenen Dosierungskonzentrationen initiiert (z. B. 10 mg/kg oder 20 mg/kg gemäß dem Dosierungsschema). Tägliche Überwachung auf Wirksamkeit wird durchgeführt. Die mit Konstrukten auf Basis von oral aktiven Peptiden behandelten Tiere zeigen eine Verbesserung im Vergleich mit Dextrose-behandelten Kontrollen.

BEISPIEL 9

RETINALES NEOVASKULARISATIONSMODELL

[0110] Dieses Beispiel behandelt die in-vivo-Aktivität von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, wenn sie aufgrund ihrer Effekte in einem retinalen Neovaskularisationsmodell verabreicht werden.

[0111] In diesen Experimenten werden Konstrukte auf Peptid-Basis auf ihre Aktivität auf die Wirkung von VEGF, bFGF, IGF-1 und konditionierte Medien (Hypoxie und Hyperglykämie) auf das in-vitro-Wachstum und die Wanderung von retinalen pigmentierten Epithelzellen (RPE), retinalen Mikrogefäß-Pericyten und retinalen Endothelzellen getestet. Die Effekte werden anhand der Genexpression unter hypoxischen und hyperglykämischen Bedingungen bewertet.

[0112] In zusätzlichen Experimenten werden die Effekte von solchen Konstrukten in-vivo auf die neovaskulären Antworten auf Hyperoxie in der Retina der neugeborenen Maus charakterisiert.

[0113] Für die in-vitro-Kultur-Experimente werden retinale Mikrogefäß-Pericyten, retinale Endothelzellen und retinale pigmentierte Epithelzellen (RPE) aus der bovinen Retina kultiviert. Die Dosisantworten und der Zeitverlauf für das Wachstum und die Wanderung, stimuliert durch VEGF, bFGF und IGF-1, werden ermittelt. Zum Beispiel wurde das retinale Endothelzellwachstum, stimuliert durch VEGF, mit 5 µg/ml und 15 µg/ml XMP.679 inhibiert, gemessen anhand des DNA-Gehalts (ng/Zellnapf). Das Zellwachstum, gemessen anhand des DNA-Gehalts in den XMP.679-behandelten, VEGF-stimulierten Zellen war mit denjenigen von Zellen vergleichbar, die nicht durch VEGF stimuliert wurden. Zusätzlich werden konditionierte Medien, gesammelt von kultivierten RPE, Pericyten und Endothelzellen, die hypoxischen oder hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt waren, in serumfreiem Medium gesammelt. Wenn die Dosisantworten dieser Wachstumsfaktoren und der konditionierten Medien bestimmt werden, wird der Effekt von Konstrukten auf Peptid-Basis unabhängig und in Kombination mit den oben beschriebenen Wachstumsfaktoren bei Wachstums- und Migrationsassays getestet.

[0114] Für die in-vivo-Experimente werden Studien durchgeführt, um den Effekt von Konstrukten auf Peptid-Basis auf die retinale Neovaskularisation zu bewerten. Neugeborene Mäuse werden 100% O₂ für eine ausgedehnte Zeitperiode exponiert und dann wieder daraus entfernt. Diese erhöhte Oxygenierung verzögert die Entwicklung der retinalen Gefäße, so daß, wenn sie wieder in Umgebungsluft gebracht werden, die Retinas stark hypoxisch sind, und die Freisetzung von vielen Cytokinen stattfindet, einschließlich VEGF, bFGF, IGF-1 und anderen. Eine retinale Neovaskularisation findet in 100% der Tiere statt. Die Heftigkeit der retinalen Neovaskularisation wird durch Zählen von Endothelzellkernen quantifiziert, die im Inneren der inneren begrenzenden Membran in retinalen Schnitten sind. Die VEGF- und KDR-Expressionen werden durch in-situ-Hybridisierung, Northern- und Western-Blot-Analyse bewertet. Das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der gesamten Retina wird ebenso durch Western-Blot-Analyse bewertet. Konstrukte auf Peptid-Basis werden identifiziert, die die retinale Neovaskularisation inhibieren oder verringern.

BEISPIEL 10

HEPARINBINDUNG UND NEUTRALISIERUNG

[0115] Dieses Beispiel betrifft die Heparinbindungs- und Heparin-Neutralisierungsaktivitäten von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte.

[0116] Ein ChromostratTM-Assay wurde verwendet, um den Effekt von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, und den Effekt von Protaminsulfat (als eine positive Kontrolle) auf die Faktor Xa-Neutralisierung durch ATIII/Heparin-Komplexe zu bestimmen. Der Assay wurde unter Verwendung eines ChromostratTM-Heparin-anti-Faktor-Xa-Assay-Kit durchgeführt (Organon Teknika Corp., Durham, N.C.). Die Heparinkonzentration wurde variiert, so daß eine Heparin-Standardkurve erzeugt wurde. Der Assay maß den potenzierenden Effekt von Heparin auf anti-Xa-Aktivität in vitro. Die Lösung, enthaltend Heparin wird in der Anwesenheit von ATIII mit einem Überschuß an Faktor Xa inkubiert, was einen ATIII-Heparin-Xa-Komplex bildet. Der verbleibende Xa katalysiert die Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat. Die Freisetzung von p-Nitroanilin wird bei 405 nm gemessen. Die erhaltene Absorption ist umgekehrt proportional zur Konzentration von Heparin in der Probe.

[0117] Die Reagenzien für den Assay werden wie folgt hergestellt. Heparin, Konstrukte auf Peptid-Basis und Protaminsulfat-Stammlösungen werden in Salzlösung hergestellt. Die Stammlösungen sind näherungsweise 1 mg/ml = 1 µg/µl. Das Faktor Xa-Reagenz und Substratreagenz werden mit 2,0 ml aufgereinigtem Wasser rekonstituiert. Das Antithrombin-III (ATIII)-Reagenz wird mit 1,0 ml aufgereinigtem Wasser rekonstituiert. Der Assay wird in 96-Napf-Mikrotiter-Platten durchgeführt. Die Assay-Bestandteile werden zu den Mikrotiter-Näpfen, wie folgt, zugegeben: 12,5 µl Heparin (von 0 bis 10 U/ml), 25 µl des Konstrukts oder Protaminsulfat, 12,5 µl ATIII (0,5 PEU/ml), 25 µl boviner Faktor Xa (14 nKat/ml), 25 µl Substrat (3 µmole/ml). Die Reaktion läßt man für 20 Minuten ablaufen, und dann werden 25 µl 0,1 M Essigsäure zugegeben. Die Farbreaktion wird auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405 nm quantifiziert. Konstrukte, die Heparin neutralisieren, zeigen ein Anwachsen der Absorption bei 405 nm. Protamin wird als eine positive Kontrolle verwendet, und seine Aktivität wird als 100% bezeichnet. Die prozentuale (%) Heparin-Neutralisierung für jedes Peptid-Konstrukt wird relativ zu der Neutralisierung durch Protamin (100%) berechnet und in Tabelle IV gezeigt.

TABELLE IV

Peptidkonstrukt (SEQ ID NO:)	% Assay A ^a	% Assay B ^a
XMP.394 (1)	143%	133%
XMP.624 (2)	131%	94%
XMP.625 (3)	79%	125%
XMP.626 (4)	99%	80%
XMP.627 (5)	98%	62%
XMP.628 (6)	107%	68%
XMP.629 (7)	69%	49%
XMP.630 (8)	2.3%	0.5%
XMP.656 (9)	74%	65%
XMP.679 (10)	96%	94%
XMP.684 (11)	ND	ND
XMP.685 (12)	3.4%	0.2%
XMP.725 (13)	3.8%	1.0%
XMP.728 (14)	106%	87%
XMP.760 (15)	53%	44%
XMP.764 (16)	75%	60%
XMP.776 (17)	74%	75%
XMP.778 (18)	54%	49%
XMP.661 (19)	30%	9%
XMP.664 (20)	50%	16%
XMP.666 (21)	39%	18%
XMP.671 (22)	32%	15%
XMP.699 (23)	45%	23%
XMP.767 (24)	63%*	58%
XMP.768 (25)	34%	10%
XMP.769 (26)	64%	46%

^aProtaminkontrolle betrug 100%

*von einem Wiederholungsexperiment

NDNicht Bestimmt

BEISPIEL 11

ZUSÄTZLICHE AKTIVITÄTSASSAYS

[0118] Dieses Beispiel betrifft die Testung von Konstrukten auf Peptid-Basis, einschließlich derivatisierter Konstrukte, auf ihrer Aktivität in einer Vielzahl von auf dem Gebiet bekannten Assays für die Aktivitäten von BPI-Proteinprodukten.

[0119] Assays, die für die Testung einer Vielzahl von biologischen Aktivitäten von BPI-Proteinprodukten, einschließlich BPI-abgeleiteter Peptide, nützlich sind, werden in US-Patenten Nr. 5,733,872, 5,763,567, 5,652,332 und 5,856,438 in gemeinsamer Inhaberschaft und den entsprechenden PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 94/20532 (PCT/US94/02465) und WO 95/19372 (PCT/US94/10427) und US-Patent-Nr. 5,858,974 und den entsprechenden PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 96/08509 (PCT/US95/09262) und WO 97/04008 (PCT/US96/03845) beschrieben, die hierin durch Bezugnahme eingebaut werden. Diese Aktivitäten schließen antimikrobielle (einschließlich antibakterieller und Anti-Pilz-) Eigenschaften, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung und zusätzliche Assays der Heparin-Bindung ebenso wie der Heparin-Neutralisierung ein. Wenn die Konstrukte auf Peptid-Basis, einschließlich der derivatisierten Konstrukte, gezeigt in Tabelle I, in Nähredium und/oder radialen Diffusionsassays (im wesentlichen in Übereinstimmung mit z. B. Beispiel 2 von US-Patent Nr. 5,858,974, außer daß für die Nährmediums-Assays mit Candida die Zellen auf 5×10^3 Zellen/ml anstelle von 2×10^6 Zellen/ml in Nährmedium verdünnt wurden, und mit Beispielen 2 und 13 von US-Patent Nr. 5,652,332 außer daß für die Nährmediumsassays mit den Bakterien, tryptisches Sojamedium anstelle von Muller-Hinton-Medium verwendet wurde) auf ihren antimikrobiellen Effekt auf E. coli (J5 und 0111B4), Staphylococcus aureus und Candida albicans getestet wurden, zeigte jedes Konstrukt eine antimikrobielle Aktivität gegen einen oder mehrere bakterielle Stämme und/oder gegen Candida. Die nicht-derivatisierten Konstrukte mit den höchsten antimikrobiellen Aktivitäten, wie getestet, schlossen XMP.627, XMP.628, XMP.629, XMP.656, XMP.679, XMP.760, XMP.764, XMP.776 und XMP.778 ein. Die derivatisierten Konstrukte mit den höchsten Aktivitäten, wie getestet, schlossen XMP.664 und XMP.767 ein.

[0120] In anderen Assays der LPS-Neutralisierung zeigten beispielhafte Konstrukte der Erfindung, wie etwa XMP.624, XMP.625, XMP.626, XMP.628 und XMP.629 eine Aktivität in einem RAW-Zellassay (im wesentlichen Übereinstimmung mit z. B. Beispiel 7 von US-Patent Nr. 5,858,974 und Beispiel 20D von US-Patent Nr. 5,652,332; andere LPS-Assays schließen Beispiel 4, 20A, B, C, E, F und G, 25 und 26 von US-Patent Nr. 5,652,332 ein).

[0121] Zusätzliche Heparin-Bindungs- und Heparin-Neutralisierungs-Assays, sowohl in vitro als auch in vivo (einschließlich z. B. Beispiele 6, 11, 17 und 21 von US-Patent Nr. 5,652,332), sind für BPI-Proteinprodukte beschrieben worden und sind zum Testen von Konstrukten auf Peptid-Basis der Erfindung nützlich.

[0122] Andere Konstrukte auf Peptid-Basis werden in US-Anmeldung Nr. 09/344,541 und der zeitgleich eingereichten entsprechenden PCT-Anmeldung Nr. PCT/US00/17383 (WO 01/00671) beschrieben.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> XOMA Technology Ltd. c/o XOMA (US) LLC
Little, II, Roger G.
Lin, Jong J.
Gikonyo, J. G. Kinyua

<120> Therapeutische Konstrukte auf Peptidbasis

<130> 11044WO01

<140>
<141>

<150> 09/344,219
<151> 1999-06-25

<150> 09/344,827
<151> 1999-06-25

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.394

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(15)
<223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-15 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (15)
<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is Amidated

<400> 1
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly Ser Ile Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.624

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> /label=substituted-Ala note=position 5 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> /label=substituted-Ala note=position 9 is 1-
 naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(14)
 <223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-14 are
 D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (14)
 <223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
 Amidated

<400> 2
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly Ser Ile Lys
 1 5 10

<210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.625

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE

<222> (9)
 <223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(13)
 <223> /Label=D Amino Acid/note=Positions 1-13 are
 D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (13)
 <223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
 Amidated

<400> 3
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly Ser Ile
 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.626

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(12)
 <223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-12 are
 D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (12)
 <223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
 Amidated

<400> 4
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.627

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> /label=Substituted Ala note=position 5 is
 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> /label=Substituted Ala note=position 9 is 1-
 naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(11)
 <223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-11 are
 D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (11)
 <223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
 Amidated

<400> 5
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.628

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-
 naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (6)
 <223> /label-Substituted-Ala note=position 9 is
 1-naph-ala

<220>

```

<221> SITE
<222> (1)..(10)
<223> /Label=D Amino Acid/note=Positions 1-10 are
      D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (10)
<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
      Amidated

<400> 6
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys
  1             5             10

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.629

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-
      naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is 1-
      naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(9)
<223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-9 are
      D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
      Amidated

<400> 7
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala
  1             5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<220>

<223> XMP.630

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-naph-ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(8)

<223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-8 are D-amino acids

<220>

<221> SITE

<222> (8)

<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is Amidated

<400> 8

Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys

1

5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> XMP.656

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-naph-ala

<220>

<221> SITE

<222> (9)

<223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is 1-naph-ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(14)

<223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-14 are D-amino acids

<220>

<221> SITE

<222> (14)

<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is Amidated

<400> 9

Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly Ile Lys Ile
 1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> XMP.679

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> /label=Substituted-Ala note=position 5 is 1-naph-ala

<220>

<221> SITE

<222> (9)

<223> /label=Substituted-Ala note=position 9 is 1-naph-ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(11)

<223> /Label=D Amino Acids/note=Positions 1-11 are D-Amino Acids

<220>

<221> SITE

<222> (11)

<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is Amidated

<400> 10

Lys Leu Phe Lys Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly
 1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> XMP.684

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> /label=Substituted Ala note=position 1 is 4-biphenyl-Ala

<220>

<221> SITE

<222> (6)
<223> /label=Substituted Ala note=position 6 is
1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is an L-amino acid

<220>
<221> SITE
<222> (2)..(9)
<223> /Label-D Amino Acids/note=Positions 2-9 are
D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> AMIDATION /label=Amidation note=The C-terminus is
Amidated

<400> 11
Ala Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.685

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(8)
<223> Positions 1-4 and 6-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is an L-amino acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 4-biphenyl-Ala

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 12
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.725

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(8)
<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 4-biphenyl-ala

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 13
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.728

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(11)
<223> Positions 1-11 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 4-biphenyl-ala

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> Position 9 is substituted with 4-biphenyl-ala

<220>
<221> SITE
<222> (11)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 14

Lys Leu Phe Lys Ala Gln Ala Lys Ala Lys Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.760

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(9)
 <223> Positions 1-9 are D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> Position 9 is substituted with 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 15
 Lys Ala Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.764

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(11)
 <223> Positions 1-11 are D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Position 2 is aminoisobutyric acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> Position 9 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 18
Lys Xaa Phe Arg Ala Gln Ala Lys Ala
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.661

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(8)
<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 2-biphenyl carbonyl

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 19
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.664

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(8)
 <223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> Position 5 is substituted with 1- naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
 with 4-biphenyl carbonyl

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)
 <223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 20
 Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> XMP.666

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(8)
 <223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)
 <223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
 with 2-(2-naphthyl) acetyl

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 21
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.671

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(8)
<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 2-(1-naphthyl) acetyl

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 22
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.699

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 2-biphenylene carbonyl

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 23
Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> XMP.767

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(8)
<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Position 5 is substituted with 1-naph-ala

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 4-biphenyl carbonyl

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 24
Lys Leu Phe Lys Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> XMP.768

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(8)

<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Position 5 is substituted with 4-biphenyl-ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 4-biphenyl carbonyl

<220>

<221> SITE

<222> (8)

<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 25

Lys Leu Phe Arg Ala Gln Ala Lys

1

5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> XMP.769

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(8)

<223> Positions 1-8 are D-amino acids

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Position 5 is substituted with 4-biphenyl-ala

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Position 1 is derivatized at the alpha-amino group
with 4-biphenyl carbonyl

<220>

<221> SITE

<222> (8)

<223> AMIDATION=The C-terminus is Amidated

<400> 26

Lys Leu Phe Lys Ala Gln Ala Lys
1 5

<210> 27

<211> 1813

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(1491)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (124)..(1491)

<220>

<223> rBPI

<400> 27

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
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	
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 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

 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
 accggctgcc tttcccaggg gaatcctctc cagatcttaa ccaagagccc cttgcaaact 1611
 tcttcgactc agattcagaa atgatctaaa caccaggaaa cattattcat tggaaaagtg 1671
 catgggtgtgt attttaggga ttatgagctt ctttcaaggg ctaaggctgc agagatattt 1731
 cctccaggaa tcgtgtttca attgtaacca agaaatttcc atttgtgctt catgaaaaaa 1791
 aacttctggt ttttttcatg tg 1813

<210> 28
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> rBPI

<400> 28
 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

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
 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
 290 295 300 305
 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
 370 375 380 385
 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
 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

Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung aus 8–15 Aminosäureeinheiten, die aufeinanderfolgend über Peptidbindungen verknüpft sind, wobei die Zusammensetzung wenigstens eine oder mehrere Eigenschaften hat aus: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, anti-angiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaften, und eine Sequenz der Formel umfaßt:

KLFR(naph-A)QAR₃

, wobei die Symbole sich sowohl auf D- oder L-Aminosäurereste beziehen können, wobei R₃ eines ist aus K, K(naph-A), K(naph-A)K, K(naph-A)KG, K(naph-A)KGS, K(naph-A)KGSi, K(naph-A)KGSiK oder K(naph-A)KGSiKi; oder wobei die carboxy-terminale Gruppe amidiert oder nicht-amidiert ist, und fakultativ wenigstens eine konservative Substitution der Aminosäureeinheiten umfaßt; wobei die Zusammensetzung nicht k-l-f-r (naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k-i ist (SEQ ID NO: 1).

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, umfassend zwei oder mehrere konservative Substitutionen von Aminosäureeinheiten.

3. Ein Konstrukt auf Peptid-Basis oder eine Zusammensetzung von Aminosäureeinheiten, die aufeinanderfolgend durch Peptidbindungen verknüpft sind, ausgewählt aus:

k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k (SEQ ID NO: 2);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i (SEQ ID NO: 3);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s (SEQ ID NO: 4);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g (SEQ ID NO: 5);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k (SEQ ID NO: 6);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 7);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 8);
 k-l-f-r(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-i-k-i (SEQ ID NO: 9);

k-l-f-k(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g (SEQ ID NO: 10);
 (Biphenyl-A)-k-1-f-r(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 11);
 k-l-f-r-(biphenyl-A)-q-a-k (SEQ ID NO: 12);
 k-l-f-r-(biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 13);
 k-l-f-k-(biphenyl-a)-q-a-k-(biphenyl-a)-k-G (SEQ ID NO: 14);
 k-a-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 15);
 k-a-f-k-(naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-G (SEQ ID NO: 16);
 k-l-f-k-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 17); oder
 k-(Aminoisobuttersäure)-f-r-(naph-a)-q-a-k-(naph-a) (SEQ ID NO: 18).

4. Eine Zusammensetzung aus 8–15 Aminosäureeinheiten, die aufeinanderfolgend durch Peptidbindungen verknüpft sind, wobei die Zusammensetzung wenigstens eine Eigenschaft hat aus: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, anti-angiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaften, und eine Sequenz der Formel umfaßt:

$$R_1 \text{ KLFR(naph-A)QAR}_3$$

, wobei R_1 eines ist von $R_2\text{-CH}_2\text{-}$, $R_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $R_2\text{-CO-}$, $R_2\text{-SO}_y\text{-}$ oder $R_2\text{-PO}_z\text{-}$;

wobei

$y = 0\text{--}3$,

$z = 1\text{--}4$;

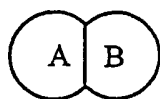
R_2 eine hydrophobe Gruppe ist, die irgendein beliebiges Molekül ist aus: ein zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen, ein heterozyklisches Molekül mit wenigstens 3 Atomen, ein funktionalisiertes zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen oder ein funktionalisiertes heterozyklisches Molekül mit wenigstens 3 Atomen; wobei R_3 ein beliebiges ist aus: K, K(naph-A), K(naph-A)K, K(naph-A)KG, K(naph-A)KGS, K(naph-A)KGSi, K(naph-A)KGSiK oder K(naph-A)KGSiKi;

wobei die carboxy-terminale Gruppe amidiert oder nicht-amidiert ist; und fakultativ wenigstens eine konservative Substitution der Aminosäureeinheiten umfaßt;

wobei die Zusammensetzung nicht k-l-f-r (naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k-i ist (SEQ ID NO: 1).

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, umfassend zwei oder mehrere konservative Substitutionen von Aminosäureeinheiten.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei R_2 eine hydrophobe Einheit ist, die ein beliebiges ist von: (a) ein fakultativ substituierter Kohlenstoff-zyklischer Ring, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt, enthaltend 3 bis 8, bevorzugt 5 oder 6 Kohlenstoffatome; (b) ein fakultativ substituierter heterozyklischer Ring, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt, enthaltend 3 bis 8, bevorzugt 5 oder 6 Atome, wobei wenigstens ein Atom ein Heteroatom ist, das eines ist aus Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel; oder (c) ein fakultativ substituierter bityklischer Ring



wobei die kondensierten Ringe A und B unabhängig voneinander ein 5- oder 6-gliedriger Ring sind, gesättigt oder teilweise oder vollständig ungesättigt, und Kohlenstoffatome und fakultativ ein bis drei Heteroatome umfassen, ausgewählt aus Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff;

wobei, wenn mehr als ein Heteroatom vorhanden ist, alle dieselben oder unterschiedlich sein können.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei R_2 eine hydrophobe Einheit ist, die eine beliebige ist aus: Biotin, 2-Biphenylen, 2-Anthrachinon, 2-Benzofuran, 2-Indol, 1-Isochinolin, Hydroxyphenyl, 2-Chinolin, 1-[3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexyl], 1-(3,5-Dichlor-2-hydroxyphenyl), 1-(3,5-Diod-2-hydroxyphenyl), 1-(3,5-Dinitro-2-hydroxyphenyl), 1-(4-Azido-2-hydroxyphenyl), 4-Biphenyl, 2-Biphenyl, 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, 3-Amino-2-naphthyl, 3-Chlor-2-Nitrophenyl, 3,4-Dihydroxyphenyl, 3,4,5-Trihydroxyphenyl, 2-Chlor-3-nitrophenyl, 5-Azido-2-nitrophenyl, 3-Amino-2-pyrazyl, 2-Benzoyloxycarbonyl-ethyl, 2-Thienyl, 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylen, 5-Brom-3-indolmethylen, 2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)ethylen, 2-(3-Chlorphenyl)ethylen, 2-Pyrazyl, 4-Imidazolyl, 2-Imino-1imidazolidyl, Pyridyl, 3-Piperidyl, 4-Piperidyl, Fluorescein, 2-(4-Amino-3,5,6-trichlorpyridyl), 3-(2-Chlor-6-fluorphenyl)-5-methylisoxazolyl oder 4-Azido-phenyl.

8. Ein Konstrukt auf Peptid-Basis oder eine Zusammensetzung von Aminosäureeinheiten, die aufeinanderfolgend durch Peptidbindungen verknüpft sind, ausgewählt aus:

2-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 19);
 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 20);
 2-Naphthylacetyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 21);
 1-Naphthylacetyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 22);
 2-Biphenylencarbonyl-k-l-f-r-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 23);
 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-k-(naph-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 24);
 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 25); oder
 4-Biphenylcarbonyl-k-l-f-r-(biphenyl-a)-q-a-k (SEQ ID NO: 26).

9. Ein Konstrukt auf Peptid-Basis oder eine Zusammensetzung von 8–15 Aminosäureeinheiten mit einer Sequenz, die eine Teilsequenz der funktionellen Domäne II (Aminosäuren 65-99) von bakterizidem/permeabilitätserhöhendem Protein (BPI) in umgekehrter Reihenfolge ist, wobei das Konstrukt auf Peptid-Basis oder die Zusammensetzung nicht k-l-f-r (naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k-i ist (SEQ ID NO: 1) ist.

10. Ein derivatisiertes Konstrukt auf Peptid-Basis oder eine Zusammensetzung von 8-15 Aminosäureeinheiten mit einer Sequenz, die eine Teilsequenz einer funktionellen Domäne II (Aminosäuren 65-99) des bakteriziden/permeabilitätserhöhenden Proteins (BPI) in umgekehrter Reihenfolge ist, wobei die Sequenz kovalent an eine hydrophobe Gruppe geknüpft ist, wobei das Konstrukt auf Peptid-Basis oder die Zusammensetzung nicht k-l-f-r (naph-a)-q-a-k-(naph-a)-k-g-s-i-k-i ist (SEQ ID NO: 1) ist.

11. Konstrukt oder Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die hydrophobe Einheit kovalent an den N-Terminus der Sequenz geknüpft ist.

12. Konstrukt oder Zusammensetzung nach Anspruch 10 oder 11, wobei die hydrophobe Einheit R_2 ist, wobei R_2 ein beliebiges ist von: ein zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen, ein heterozyklisches Molekül mit wenigstens 3 Atomen, ein funktionalisiertes zyklisches Molekül mit wenigstens 3 Kohlenstoffatomen oder ein funktionalisiertes heterozyklisches Molekül mit wenigstens 3 Atomen.

13. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die umgekehrte Untersequenz die Aminosäuren 99-92, 99-91, 99-90, 99-89, 99-88, 99-87, 99-86 oder 99-85 von BPI-Protein ist, und wobei die umgekehrte Untersequenz an den Positionen 95 und 91 substituiert ist.

14. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 mit Heparinneutralisierenden Eigenschaften.

15. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 mit Endothelzellproliferations-inhibierenden Eigenschaften.

16. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 mit antiangiogenen Eigenschaften.

17. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Sequenz D-Aminosäureeinheiten enthält.

18. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die ersten beiden amino-terminalen Aminosäureeinheiten D-Aminosäureeinheiten sind und die letzten beiden carboxy-terminalen Aminosäureeinheiten D-Aminosäureeinheiten sind.

19. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Konstrukt oder eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18 und ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans, Verdünnungsmittel oder Träger.

20. Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Verwendung bei der Therapie.

21. Verwendung eines Konstruktes oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Herstellung eines Medikaments zum Binden und/oder Neutralisieren einer exogenen oder therapeutisch verabreichten Heparinverbindung, zum Binden und/oder Neutralisieren von Heparin oder zum Behandeln einer mit Heparin in Bezug stehender oder durch Heparin vermittelter Störung, eines Zustands oder einer Krankheit oder zur Herstellung eines Medikaments für eine antimikrobielle Aktivität, zum Binden und/oder Neutralisieren

von LPS oder zum Behandeln einer Infektion oder einer Störung, die mit Endotoxin in Bezug steht.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Medikament zur Verabreichung zusammen mit einem anderen therapeutischen Mittel dient.

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das Medikament zur Verabreichung vor oder nach dem anderen therapeutischen Mittel dient.

24. Verwendung eines Konstruktes oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 19 in Kombination mit einem anderen therapeutischen Mittel zur Herstellung eines Medikaments zum Binden und/oder Neutralisieren einer exogenen oder therapeutisch verabreichten Heparinverbindung, zum Binden und/oder Neutralisieren von Heparin oder zum Behandeln einer mit Heparin in Bezug stehender oder durch Heparin vermittelter Störung, eines Zustands oder einer Krankheit oder zur Herstellung eines Medikaments für eine antimikrobielle Aktivität, zum Binden und/oder Neutralisieren von LPS oder zum Behandeln einer Infektion oder einer Störung, die mit Endotoxin in Bezug steht.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das Medikament zum Neutralisieren des gerinnungshemmenden Effekts einer exogenen, an ein Säugetier verabreichten Heparinverbindung dient.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die Gerinnungszeit des Säugetieres auf einen normalen Zustand gebracht wird.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, wobei die exogene Heparinverbindung während einer kardiopulmonalen Bypass-Operation, einer Herzkatheterisierung oder einer Angioplastie, Hämodialyse oder an einen Patienten verabreicht worden ist, bei dem das Risiko einer Thrombose, einschließlich einer tiefen Venenthrombose, eines akuten Myocardinfarkts, eines Hirnschlags oder einer Lungenembolie besteht, oder der daran leidet.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das Medikament zum Behandeln einer Störung dient, die mit Endothelzellproliferation assoziiert ist.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das Medikament zum Inhibieren der Endothelzellproliferation bei einem Säugetier dient.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das Medikament zum Inhibieren von Angiogenese in einem Säugetier dient.

31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei die Angiogenese im Auge ist.

32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die Angiogenese im Auge bei der Augen-Neovaskularisierung, proliferativer Retinopathie, retrolentaler Fibroplasie, Makuladegeneration, neovaskulärem Glaukom, oder Diabetes-Augenkrankheit beteiligt ist, einschließlich Diabetes-Iris-Neovaskularisierung oder Retinopathie.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das Medikament zum Behandeln eines Säugetieres dient, das an einer Störung, Zustand oder Krankheit leidet, die mit Angiogenese assoziiert ist oder diese beinhaltet.

34. Verwendung nach Anspruch 33, wobei das Medikament zum Inhibieren eines Fortschreitens der Störung, des Zustands oder der Krankheit oder zum Verbessern der Anzeichen und Symptome der Störung, des Zustands oder der Krankheit dient.

35. Verwendung nach Anspruch 33, wobei besagte Störung, die Angiogenese beinhaltet, eine chronische entzündliche Krankheit ist.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei besagte chronische entzündliche Krankheit chronische Pankreatitis, Dermatoze, die mit chronischer Entzündung assoziiert ist, einschließlich Psoriasis, Zirrhose, Asthma, multiple Sklerose, Arthritis, einschließlich rheumatoider Arthritis, reaktiver Arthritis oder chronischer entzündlicher Arthritis, Autoimmunkrankheiten, einschließlich Vaskulitis, Glomerulonephritis, experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE), Lupus, Myasthenia gravis, ulzerative Colitis, Crohnsche Krankheit, entzündliche Darmkrankheit, chronische Entzündung, die mit Hämodialyse assoziiert ist, Granulocytentransfusion-as-

soziiertes Syndrom; Abstoßungsreaktionen nach Allograft oder Xenograft-Transplantation, einschließlich Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion; oder andere chronische entzündliche Störungen ist.

37. Verwendung nach Anspruch 33, wobei besagte Störung, die Angiogenese beinhaltet, das Wachstum, die Proliferation oder die Metastase von Tumorzellen ist.

38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei das Medikament zum Fördern einer Tumor-Regression bei Erwachsenen- oder Kinderonkologie dient, einschließlich dem Reduzieren des Wachstums von festen Tumoren, malignen Wucherungen, lokal fortgeschrittenen Tumoren, metastasierendem Krebs, menschlichen Weichteil-Sarcomen, Krebsmetastasen, einschließlich Lymph-Metastasen, malignen Blutzuckerkrankheiten, Effusionslymphomen (Lymphomen auf Grundlage von Körperhöhlungen), Lungenkrebs einschließlich kleinzelliges Carcinom, Krebsarten, die nicht kleinzelliges Carcinom sind, Brustkrebs, einschließlich kleinzelligem Carcinom oder Ductus-Carcinom, Gastrointestinalkrebs, einschließlich Magenkrebs, Dickdarmkrebs, Colorectalkrebs, Polypen, die mit colorectaler Neoplasie assoziiert sind, Pankreaskrebs, Leberkrebs, urologische Krebse, einschließlich Blasenkrebs, Prostatakrebs, maligne Erkrankungen des weiblichen Genitaltrakts, einschließlich Ovarialcarcinom, Uterus-Endometrium-Krebse oder feste Tumore im Ovarialfollikel, Nierenkrebs, einschließlich Nierencarcinom, Gehirnkrebs, einschließlich intrinsischer Hirntumore, Neuroblastom, Astrocyten-Hirntumore, Gliome, metastatische Tumorzellinvasion im zentralen Nervensystem, Knochenkrebs, einschließlich Osteome, Hautkrebs, einschließlich malignem Melanom, Tumorfortschritt von menschlichen Hautkeratinocyten oder Plattenepithelcarcinom, Hämangiopericytom oder Kaposi-Sarcom.

39. Verwendung nach Anspruch 33, wobei das Medikament zur Behandlung von Arteriosklerose, ischämischer Herzkrankheit, Myocardinfarkt, koronarer Herzkrankheit, Restenose, einschließlich Restenose nach Balloonangiographie, neointimaler Hyperplasie, Zerstörung von interzellulären Verbindungen im Gefäßendothel, Bluthochdruck, Gefäßverletzung, Arterienischämie, Arterienstenose, peripherer Gefäßkrankheit oder Hirn-schlag dient.

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 39, wobei das Medikament zur systemischen oder topischen Verabreichung dient.

41. Verwendung nach Anspruch 40, wobei das Medikament zur oralen, intravenösen, intramuskulären oder subkutanen, intraokularen und retrobulbären, intrathekalen, intraperitonealen, intrapulmonalen oder transdermalen Verabreichung dient.

42. Verwendung nach Anspruch 40, wobei das Medikament zur Verabreichung in der Form von Salben, Augentropfen, Ohrentropfen oder Spülflüssigkeiten dient.

43. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, wobei das Medikament zur parenteralen Verabreichung in einer Dosis im Bereich von 1 µg/kg bis 100 mg/kg pro Tag dient.

44. In-vitro-Verfahren zum Neutralisieren des gerinnungshemmenden Effekts von Heparin, umfassend das In-Kontakt-Bringen des Heparins mit einem Konstrukt oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18.

45. Verfahren zum Identifizieren einer derivatisierten Peptidsequenz, die aus der Sequenz abgeleitet ist oder auf dieser beruht, welche aus der Domäne II von bakterizidem/permeabilitätserhöhendem Protein (BPI) identifiziert und ausgewählt worden ist mit biologischer Aktivität und einer Epithelabsorption von wenigstens 0,001%, umfassend die Schritte:

(a) Derivatisieren einer Peptidsequenz, basierend auf einer Sequenz, Teilsequenz, umgekehrten Sequenz oder umgekehrten Teilsequenz der Domäne II von BPI, durch kovalente Verknüpfung einer hydrophoben Gruppe oder Gruppen am N-Terminus, C-Terminus oder innerhalb der besagten Peptidsequenz;

(b) Messen der Aktivität besagter derivatisierter Peptidsequenz, die in Schritt (a) erhalten worden ist, wobei die Aktivität eine Eigenschaft oder mehrere Eigenschaften sind von: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, anti-angiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft, und

(c) Messen der Epithelabsorption der besagten derivatisierten Peptidsequenz, die in Schritt (a) erhalten worden ist.

46. Verfahren zum Designen und Identifizieren einer biologisch aktiven Sequenz auf derivatisierter Peptid-Basis, prophylaktisches oder therapeutisches Medikament, das aus der Peptidsequenz abgeleitet ist oder

auf ihr basiert, die aus BPI oder einem Fragment davon identifiziert und ausgewählt worden ist, mit einer Epithelabsorption von wenigstens 0,001%, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:

(a) Identifizieren einer Zielpeptidsequenz, die von der Polypeptidsequenz von BPI oder eines Fragments davon abgeleitet ist, oder auf ihr basiert, welche eine in-vitro-Aktivität oder eine in-vivo-Aktivität aufweist, wobei die Aktivität eine oder mehrere Eigenschaften ist von: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, anti-angiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft, und

(b) Konstruieren einer Bibliothek von die Aktivität beibehaltenden Peptidsequenzen minimaler Länge (MinLARPS) durch Substituieren oder Deletieren von Aminosäureeinheiten innerhalb besagter Target-Peptidsequenz;

(c) Messen der Aktivität der besagten MinLARPS, um die minimale Anzahl an Resten zu bestimmen, die notwendig ist, um wenigstens 1% der Aktivität von besagter Zielpolypeptidsequenz beizubehalten, bei der die Aktivität eine oder mehrere Eigenschaften ist von: Heparinbindung, Heparinneutralisierung, Inhibition der Endothelzellproliferation, anti-angiogene Eigenschaft, LPS-Bindung, LPS-Neutralisierung oder antimikrobielle Eigenschaft,

(d) Messen der Epithelabsorption von besagter MinLARPS in in-vituro-Assays, um zu identifizieren, welche der besagten MinLARPS eine Epithelabsorption von wenigstens 0,001% beibehält;

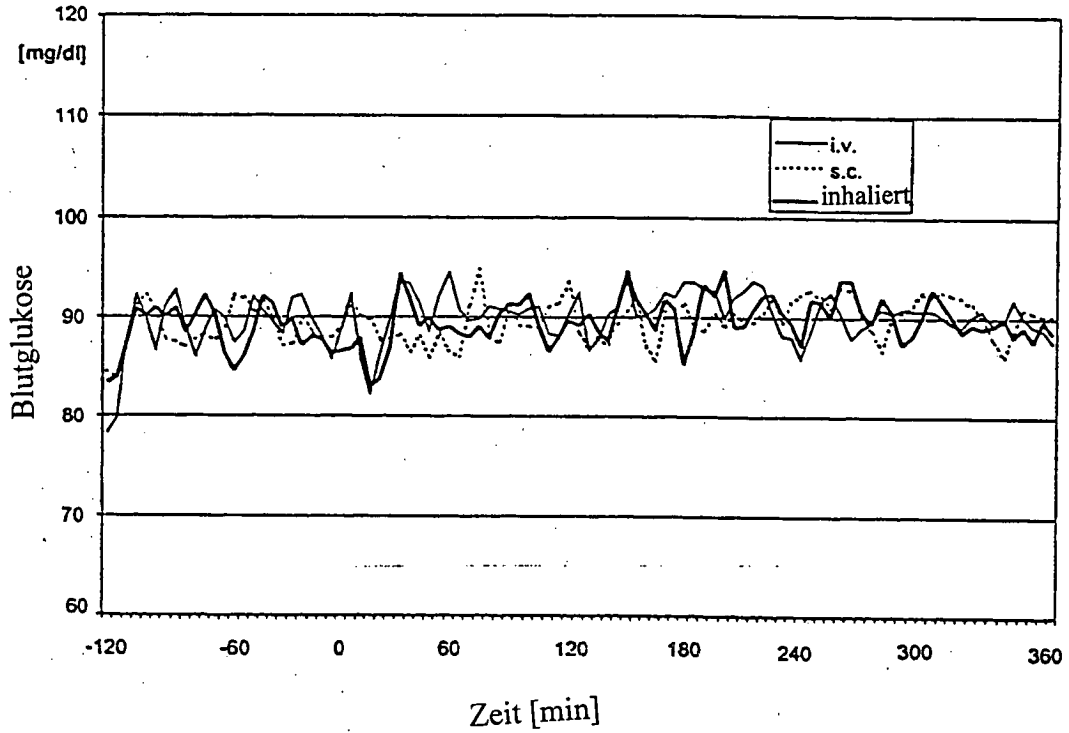
(e) Synthetisieren von derivatisierten MinLARPS durch chemisches Modifizieren besagter MinLARPS durch kovalente Verknüpfung einer hydrophoben Gruppe oder Gruppen, die an dem N-Terminus, C-Terminus oder innerhalb dieser Sequenz besagter MinLARPS angehängt wird;

(f) Wiederholen der Schritte c) und d) mit besagter derivatisierter MinLARPS.

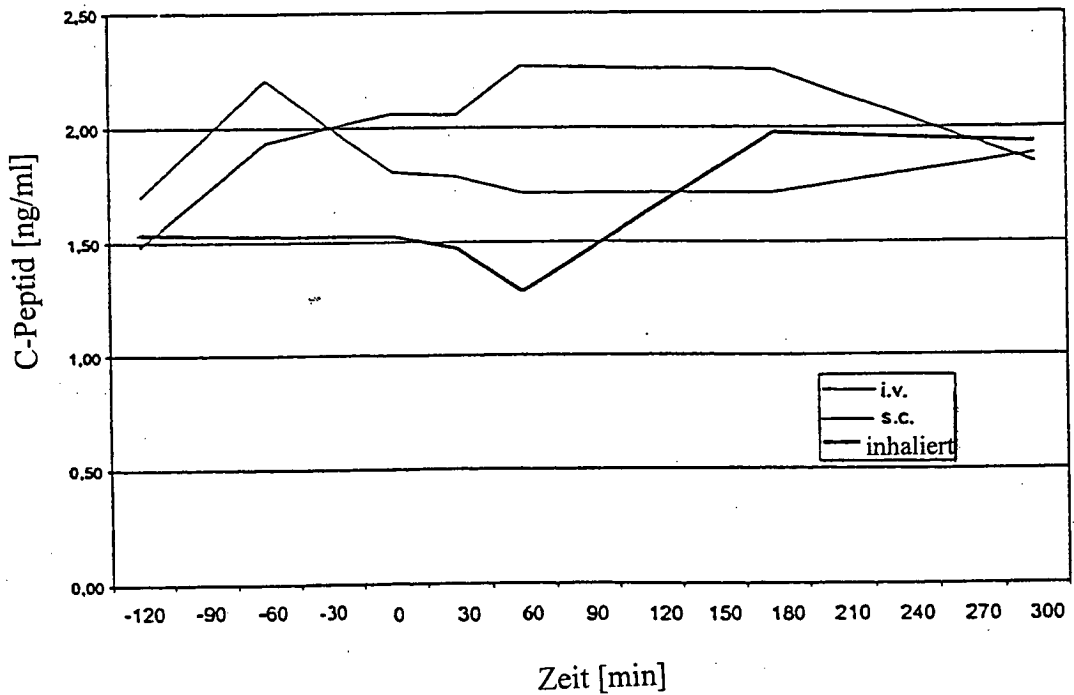
Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

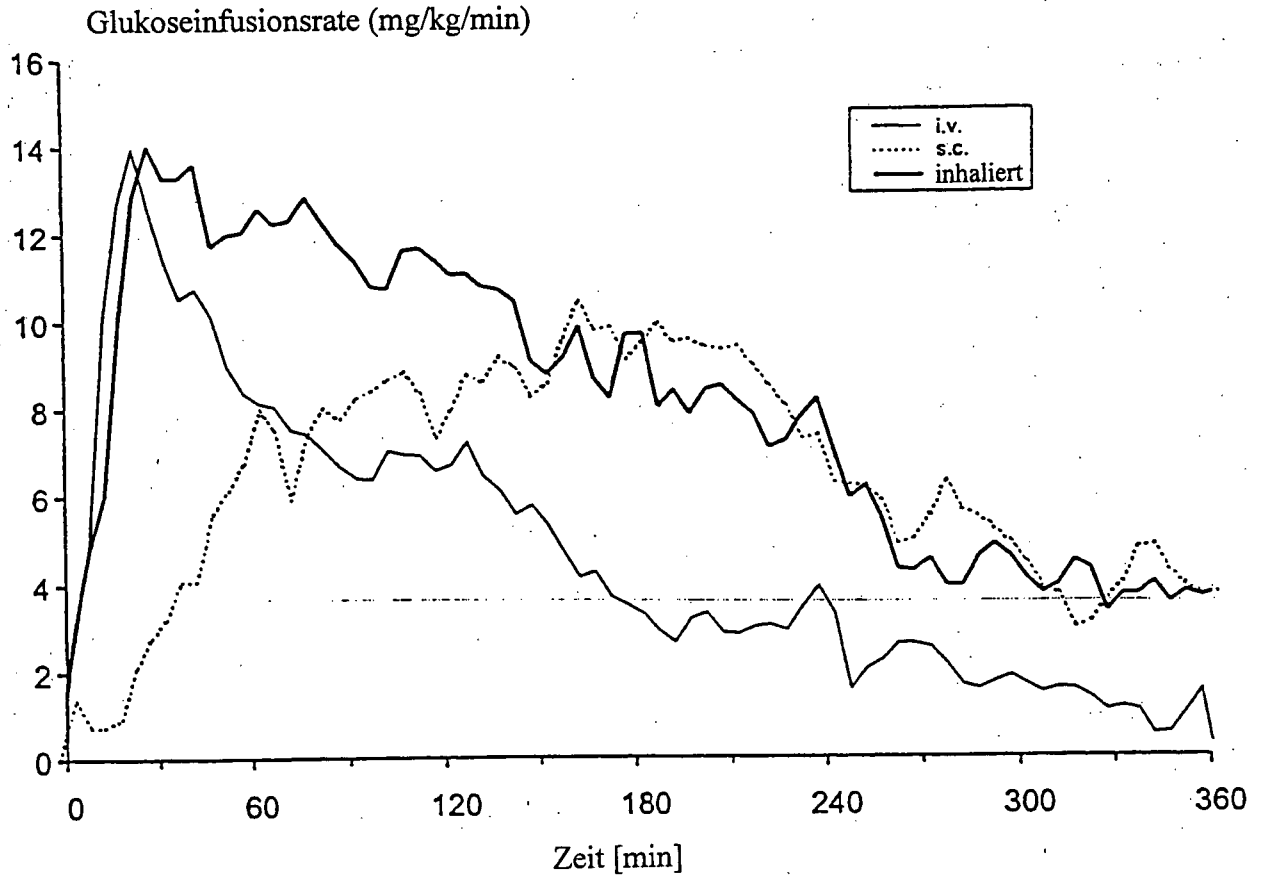
FIGUR 1a



FIGUR 1b



FIGUR 2a



FIGUR 2b

