

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4139863号  
(P4139863)

(45) 発行日 平成20年8月27日 (2008. 8. 27)

(24) 登録日 平成20年6月20日 (2008. 6. 20)

(51) Int.Cl.		F I
<b>C07K 14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/47 Z N A
<b>A61K 9/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 9/12
<b>C07K 7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 7/06
<b>C07K 7/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 7/08

請求項の数 5 (全 120 頁)

(21) 出願番号	特願平6-520251	(73) 特許権者	500570793
(86) (22) 出願日	平成6年3月11日 (1994. 3. 11)		ゾーマ テクノロジー リミテッド
(65) 公表番号	特表平8-508248		アメリカ合衆国 カリフォルニア 947
(43) 公表日	平成8年9月3日 (1996. 9. 3)		10, バークレー, セブンス ストリート 2910
(86) 国際出願番号	PCT/US1994/002465	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W01994/020532		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成6年9月15日 (1994. 9. 15)	(74) 代理人	100062409
審査請求日	平成13年3月9日 (2001. 3. 9)		弁理士 安村 高明
審査番号	不服2005-6945 (P2005-6945/J1)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成17年4月18日 (2005. 4. 18)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	08/030, 644	(72) 発明者	リトル, ロジャー, ジー., ザ セカンド
(32) 優先日	平成5年3月12日 (1993. 3. 12)		アメリカ合衆国 94510 カリフォル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ニア ベニシア ローズ ドライブ 620
(31) 優先権主張番号	08/093, 202		
(32) 優先日	平成5年7月15日 (1993. 7. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 殺菌性/透過性が向上したタンパク質の機能領域に由来する生物学的に活性なペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の (a) または (b) :

(a) ヒトの殺菌性/透過性が向上したタンパク質 (BPI) の17位から45位のアミノ酸配列によってそのアミノ酸配列が示される、ペプチド;

(b) (a) のペプチドから誘導される、以下のアミノ酸配列

【化1】

ASQQGTAALQKELKRIKIPDYSDFSFKIKH	(配列番号 1);
GTAALQKELKRIKIPDYSDFSFKIKHLGKGH	(配列番号 2);
LQKELKRIKIPDYSDFSFKIKHL	(配列番号 3);

10

続き

GTAALQKELKRIKIP (配列番号 5)。

を有する、ペプチド;

のペプチドであって、該 (a) および (b) は、BPIの生物学的活性、すなわち、ヘパリン結合活性またはヘパリン中和活性のうち少なくとも1つを有する、ペプチド。

20

**【請求項2】**

以下の(a)または(b)：

(a) ヒトの殺菌性/透過性が向上したタンパク質(BPI)の65位から99位のアミノ酸配列によってそのアミノ酸配列が示される、ペプチド；

(b) (a)のペプチドから誘導される、以下のアミノ酸配列

【化2】

SSQISMVPNVGLKFSISNANIKISGKWKAQKRFLK (配列番号 6);  
 IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 7);  
 KWKAQKRFLK (配列番号 8);  
 CIKISGKWKAQKRFLK (配列番号 9);  
 CIKISGKWKAQKRFLKC (配列番号 10);  
 NVGLKFSISNANIKISGKWKAQKRFLK (配列番号 11);  
 AKISGKWKAQKRFLK (配列番号 16);

IAISGKWKAQKRFLK (配列番号 17);  
 IKASGKWKAQKRFLK (配列番号 18);  
 IKIAGKWKAQKRFLK (配列番号 19);  
 IKISAKWKAQKRFLK (配列番号 20);  
 IKISGAWKAQKRFLK (配列番号 21);  
 IKISGKAKAQKRFLK (配列番号 22);  
 IKISGKWAAQKRFLK (配列番号 23);  
 IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 24);  
 IKISGKWKAQARFLK (配列番号 25);  
 IKISGKWKAQKAFK (配列番号 26);  
 IKISGKWKAQKRALK (配列番号 27);  
 IKISGKWKAQKRFAK (配列番号 28);  
 IKISGKWKAQKRFLA (配列番号 29);  
 IKISGAWAAQKRFLK (配列番号 30);  
 IKISGKWKAARFLK (配列番号 31);  
 IAISGKWKAQKRFLA (配列番号 32);  
 IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 47);  
 IKISGKWKAQWRFLK (配列番号 72);  
 IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 73);  
 IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 75);  
 IKISGKFAQKRFLK (配列番号 48);  
 IKISGKW<sub>D</sub>KAQKRFLK (配列番号 49);  
 IKISGKWKAFFRFLK (配列番号 82);  
 IKISGKWKAQFRFLK (配列番号 62);  
 IKISGKA<sub>B-(3-ピリジル)</sub>KAQKRFLK (配列番号 63);  
 IKISGKWKAQKRA<sub>B-(3-ピリジル)</sub>LK (配列番号 64);  
 A<sub>D</sub>A<sub>D</sub>IKISGKWKAQKRFLK (配列番号 66);  
 IKISGKWKAQF<sub>D</sub>RFLK (配列番号 71);  
 IKISGKWKAQA<sub>B-(1-ナフチル)</sub>RFLK (配列番号 74);  
 IKISGKA<sub>B-(1-ナフチル)</sub>KAQFRFLK (配列番号 78);  
 IKISGKA<sub>B-(1-ナフチル)</sub>KAFKRFLK (配列番号 84);  
 IKISGKA<sub>B-(1-ナフチル)</sub>KAFFRFLK (配列番号 85);

または

IKISGKA<sub>B-(1-ナフチル)</sub>KAQKRFLK (配列番号 50)

を有するペプチド；  
 のペプチドであって、

10

20

30

40

50

(a) および (b) は、BPI の生物学的活性、すなわち、ヘパリン結合活性、ヘパリン中和活性、もしくはグラム陽性細菌殺菌活性のうちの少なくとも1つを有するかまたは殺真菌活性を有する、ペプチド。

【請求項3】

以下の (a) または (b) :

(a) ヒトの殺菌性 / 透過性が向上したタンパク質 (BPI) の 142 位から 169 位のアミノ酸配列によってそのアミノ酸配列が示される、ペプチド ;

(b) (a) のペプチドから誘導される、以下のアミノ酸配列

【化3】

VHVHISKSKVGWLIQLFHKKIESALRNK	(配列番号 12);	10
KSKVWLIQLFHKK	(配列番号 13)	
VHVHISKSKVGWLIQLFHKKIE	(配列番号 67);	
SVHVHISKSKVGWLIQLFHKKIFSALRNK	(配列番号 14);	
KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 15);	
ASKVGWLIQLFHKK	(配列番号 33);	
KAKVGWLIQLFHKK	(配列番号 34);	
KSAVGWLIQLFHKK	(配列番号 35);	
KSKAGWLIQLFHKK	(配列番号 36);	
KSKVAWLIQLFHKK	(配列番号 37);	20
KSKVGALIQLFHKK	(配列番号 38);	
KSKVGWAIQLFHKK	(配列番号 39);	
KSKVGWLAQLFHKK	(配列番号 40);	
KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 41);	
KSKVGWLIQAFHKK	(配列番号 42);	
KSKVGWLIQLAHKK	(配列番号 43);	
KSKVGWLIQLFAKK	(配列番号 44);	
KSKVGWLIQLFHA	(配列番号 45);	
GWLIQLFHKKIESALRNKMNS	(配列番号 61);	
KSKVGWLIQLWHKK	(配列番号 76);	30
KSKVLWLIQLFHKK	(配列番号 79);	
KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 80);	
KSKVGWLIQLFLKK	(配列番号 81);	
KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 86);	
KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 87);	
KSKVGWLIQLFFKK	(配列番号 89);	
KSKVFWLIQLFHKK	(配列番号 90);	
KSKVGWLIQLFHKF	(配列番号 91);	
KSKVKWLIQLFHKK	(配列番号 92);	40
KSKVKWLIKLFHKK	(配列番号 94);	
KSKVGA <sub><math>\beta</math>-(1-ナフチル)</sub> LIQLFHKK	(配列番号 77);	

または

KSKVGWLIQLFHA

(配列番号 46)。

を有する、ペプチド ;

のペプチドであって、

(a) および (b) は、BPI の生物学的活性、すなわち、ヘパリン結合活性、ヘパリン中和活性、もしくはグラム陽性細菌殺菌活性のうちの少なくとも1つを有するかまたは殺真菌活性を有する、ペプチド。

## 【請求項4】

ペプチドであって、該ペプチドにおいて、二つまたは三つの同一であるかまたは異なる請求項1、2または3に記載のペプチドと一緒に直接共有結合している、ペプチド。

## 【請求項5】

以下のアミノ酸配列を有する、請求項4に記載のペプチド：

## 【化4】

<b>KRFLKKWKAQKRFLK</b>	(配列番号 51);	
<b>KWKAQKRFLKKWKAQKRFLK</b>	(配列番号 54);	
<b>KRFLKKWKAQKRFLKKWKAQKRFLK</b>	(配列番号 55);	
<b>KWKAARFLKKWKAQKRFLK</b>	(配列番号 57);	10
<b>KWKAQKRFLKKWKAARFLK</b>	(配列番号 58);	
<b>KWKAARFLKKWKAARFLK</b>	(配列番号 59);	
<b>KWKAQWRFLKKWKAQWRFLKKWKAQWRFLK</b>	(配列番号 93);	
<b>KWKAARFLKKWKAARFLKKWKAARFLK</b>	(配列番号 60);	
<b>QKRFLKKWKAQKRFLKKWKAQKRFLK</b>	(配列番号 65);	
<b>KSKVKWLIKLFKFKSKVKWLIKLFKFK</b>	(配列番号 95);	20
<b>KSKVGWLIQLFHKKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 56);	
<b>KWKAQKRFLKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 52);	
<b>IKISGKWKAQKRFLKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 53);	
<b>KSKVGWLIQLFHKKKWKKAQKRFLK</b>	(配列番号 70);	
<b>IKISGKA<sub>β-(1-ナフチル)</sub>KAQFRFLKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 88);	30
<b>IKISGKA<sub>β-(1-ナフチル)</sub>KAQFRFLKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 83);	
または		
<b>KWKAQFRFLKKSKVGWLIQLFHKK</b>	(配列番号 96);	

## 【発明の詳細な説明】

本願出願は、1993年3月12日に出願された米国特許出願No. 08/030,644の一部継続出願である、1993年7月15日に出願された米国特許出願No. 08/093,202の一部継続出願である、1994年1月14日に出願された米国特許出願No. 08/183,222の一部継続出願である。 40

## 発明の背景

本発明は、殺菌性/透過性が向上したタンパク質由来あるいは当該タンパク質に基づいたペプチドならびにかようなペプチドの治療的用途に関する。

殺菌性/透過性が向上したタンパク質(BPI)は、微生物の侵入から哺乳類を保護する上で必須の血液細胞である、哺乳類多形核好中球(PMNs)の顆粒から単離したタンパク質である。ヒトBPIは、イオン交換クロマトグラフィー(Elsbach, 1979, J. Biol. Chem, 254: 11000)あるいはE. coli親和性クロマトグラフィー(Weiss et al., 1987, Blood, 69: 652)のいずれかと酸抽出を組み合わせるとPMNsから単離され、多様なグラム陰性細菌に 50

対して強い殺菌性を示す。ヒトBPIの分子量は、約55,000ダルトン(55kD)である。ヒトBPIの完全なアミノ酸配列ならびにBPIをコードするDNAのヌクレオチド配列は、本願にて参考までに採用した、Gray et al., 1989, J. Biol. Chem. 264, 9505によって解明されている(Gray et alの図1を参照のこと)。

BPIの殺菌効果は、感受性のグラム陰性細菌に対して高い特異性が認められる。BPIがグラム陰性細菌を殺傷する正確な機構は未だ定かではないが、BPIが感受性のグラム陰性細菌の表面にまず接触することが知られている。細菌へのBPIによるこの最初の結合は、塩基性(すなわち、正に帯電した)タンパク質であるBPIとリポ多糖(LPS)の負に帯電した部位との間での静電気作用も関与している。LPSは、炎症性応答を刺激することから、「内毒素」として知られている。LPSは、不可逆的な内毒素ショックをもたらす宿主炎症性細胞による媒介体の遊離を促す。BPIは、LPSの最大の毒性要素であり、また最大の生物学的活性要素であるリピドAに結合する。

BPIは、BPIに結合するLPSの内毒素要素を中和することもできる。グラム陰性細菌に対する殺菌力ならびにLPSに結合して中和する能力がために、菌血症、内毒素血症および敗血症を含めた、グラム陰性細菌による疾患にかかった哺乳類の治療にBPIを利用することができる。BPIに関するこれら二面的特徴は、BPIの治療用途への応用を、特に有益かつ有利にする。

ヒトBPIのアミノ末端部分に対応するタンパク質分解断片は、LPS結合活性ならびに中和活性、および自然に得られた55kDのヒトのホロタンパク質の抗菌活性を有している。アミノ末端部分と対照的に、単離したヒトBPIのカルボキシ末端部分は、かすかに検出可能な抗菌活性を示すに過ぎない(Ooi et al., 1991, J. Exp. Med. 174: 649)。ヒトBPIホロタンパク質の最初の約199子のアミノ酸残基を含む、「rBPI<sub>23</sub>」と称する、あるBPIアミノ末端断片(Gazzano-Santoro et al., 1992, Infect. Immun, 60: 4754-4761を参照のこと)は、組換え手法によって、23kDのタンパク質として生成される。rBPI<sub>23</sub>は、ヒトに対する臨床応用の段階にある。内毒素に対する前炎症応答は、rBPI<sub>23</sub>とLPSを同時に投与した場合に、顕著に改善された。

内毒素に結合および中和する他のペプチドも、当該技術分野では知られている。一例として、カプトガニ変形細胞に由来するLimulus抗リポ多糖因子(LALF)がある(Waren et al., 1992, Infect. Immunol. 60: 2506-2513)。他の例として、ポリミキシンB<sub>1</sub>と命名された、Bacillus polymyxaに由来する環状のカチオン性リポペプチドがある。ポリミキシンB<sub>1</sub>は、六つの、 $\alpha$ -ジアミノ酪酸残基、一つのD-フェニルアラニン、一つのロイシン、一つのスレオニン、および6-メチルオクタノイル部分から構成されており(Morrison and Jacobs, 1976, Immunochem. 13: 813-818)、殺菌性も備えている。LPSへの結合力は保持しているものの、明確な殺菌活性を有していない、脂肪酸部分が欠如したポリミキシン類似体も知られている(Danner et al., 1989, Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1428-1434)。同様の特性が、合成した環状ポリミキシン類似体にも認められている(Rustici et al., 1993, Science. 259: 361-365)。

公知の抗菌性ペプチドとして、セクロピンとマガイニンがある。セクロピンは、鱗翅目の昆虫の血リンパにて認められる抗菌性ペプチドの科であり(Wade et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4761-4765)、マガイニンは、Xenopus科の皮膚および胃粘膜にて認められる抗菌性ペプチドの科である(Zaslloff et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 910-913)。これらペプチドは線状であり、約20から約40個のアミノ酸の長さを有している。ブタの腸粘膜に由来する、やや活性の小さな哺乳類セクロピン、セクロピンP1が報告されている(Boman et al., 1993, Infect. Immun. 61: 2978-2984)。殺菌性に関して、セクロピンは、一般にマガイニンより勝っているが、哺乳類細胞の細胞毒性については劣る旨が報告されている。セクロピンとマガイニンは、殺菌性のためには必須の連続した両親媒性の $\alpha$ -フェリックス領域によって特徴付けられる。今日までに同定された最も強力なセクロピンは、セクロピンAである。セクロピンAの最初の10個のアミノ酸の配列は、BPIアミノ酸配列90-99とある程度の相同性がある。しかしながら、セクロピンAの他の27個のアミノ酸は、その殺菌性のためには必須のものであり、これら27

10

20

30

40

50

個のアミノ酸に関してBPIとはほとんど相同性が認められない。マガイニンは、BPI配列とはほとんど相同性が認められない。

本願と関連性があると思われるものに、(1)殺菌性と(2)内毒素中和活性を示さないと言われる、BPIとアニオン性化合物を含む組成物に関する、PCT国際出願No. PCT/US91/05758による開示がある。アニオン性化合物として、好ましくは、血清アルブミンのようなタンパク質であるが、ヘパリンのような多糖類も使用できる。加えて、Weiss et al. (1975, J. Clin. Invest. 55:33-42)は、ヘパリン硫酸とLPSが、BPIの浸透性増大活性の発現をブロックすることを開示している。しかしながら、いずれの先行技術も、BPIがヘパリンの生物学的活性を中和することは開示していない。ヘパリン中和においてヘパリンによる結合は必ずしも必要ではない。例えば、ヘパリン結合増大因子(HBFG)の科は、生物学的応答を引き出すための共因子としてヘパリンを必要とする。HBFGの例として、繊維芽細胞成長因子(FGF-1, FGF-2)と、内川細胞成長因子(ECGF-1, ECGF-2)がある。カスケードプロテアーゼの凝固を阻害する抗トロンピンIIIは、活性のためにヘパリンを必要とし、明らかにヘパリンを中和しない、ヘパリン結合タンパク質の他の例である。ヘパリンを正に中和するヘパリン結合タンパク質(例えば、血小板因子IV、プロタミン、およびトロンボスポンディン)は、一般的に、ヘパリンを共因子として用いるヘパリン結合タンパク質によって誘発した活性を阻害する。

BPI(そのアミノ末端を含む)、多くの他の重要な生物学的活性を有する。例えば、本明細書に参考までに採用した、係属中で共同所有に係る、1993年3月12日に出願された米国特許出願No. 08/030,644および1993年7月15日に出願された一部継続の米国特許出願No. 08/093,202にあるように、BPIはヘパリン結合活性とヘパリン中和活性を有している。これら、BPIによるヘパリン結合活性とヘパリン中和活性は、ヘパリンの現在の臨床上の重要性からして非常に意味がある。ヘパリンは、心肺バイパス、心臓カテーテル法、および血液透析などの外科的処置を行う間の血液凝固を防ぐために、通常、400単位/Kgまでの用量が投与される。手術中に抗凝固薬としてヘパリンを投与した場合、通常の凝固作用を回復せしめるために、ヘパリンの効果を迅速に解消することは、術後処置において重要である。現在のところ、ヘパリンを中和するために、プロタミンが使用されている。プロタミンは、薬剤に分類された、富アルギニン、強塩基性および低分子量のタンパク質である。単独投与することで、プロタミン(通常はプロタミン硫酸の形態)は、抗凝固効果を呈する。ヘパリンの存在下でこれを投与すれば、安定な複合体が形成され、双方の薬剤の抗凝固活性は消失する。しかしながら、プロタミンの顕著な降圧ならびにアナフィラキシー効果は、臨床用途では限界がある。よって、そのヘパリン結合活性ならびにヘパリン中和活性が故に、プロタミンの有用性を制限する臨床上的有害な副作用を呈さずに、ヘパリン中和のためのプロタミンの代用物としてBPIは有用である。BPIの抗菌効果ならびに抗内毒素効果も、プロタミンと比較した場合、術後のヘパリン中和におけるBPIの有用性と利便性を後押ししている。

さらに、BPIは、そのヘパリン結合活性ならびにヘパリン中和活性が部分的に作用して、血管形成を阻害する上で有用である。成人の場合、血管成長因子は、血管の損傷(傷の治癒)、免疫刺激(自己免疫疾患)、炎症媒体(プロストグランジン)の結果、あるいは腫瘍細胞から放出される。これら因子は、ヘパリン依存性レセプター結合の機構を介して、(血管形成において必須の)内皮細胞の増殖を誘発する(Yayon et al., 1991, Cell 64:841-848を参照のこと)。血管形成は、様々な腫瘍の成長、増殖および転移;糖尿病性網膜症、水晶体後繊維増殖症、新血管新生性緑内障、乾癬、血管線維腫;リュウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症プラークでの毛細血管増殖、血管腫、子宮内膜症、およびカポジ肉腫を含む免疫性ならびに非免疫性炎症を含めた他の多くの病理学的条件とも関連している。このように、これら症例ならびに他の症例での血管形成を阻害することが望ましく、また、その上でBPIのヘパリン結合活性ならびにヘパリン中和活性が有用である。

血管形成を阻害するために、いくつかの他のヘパリン中和タンパク質が知られている。例えば、プロタミンは、腫瘍が関連している血管形成とその後の腫瘍の成長を阻害することが知られている〔Folkman et al., 1992, Inflammation: Basic Principles and Clinica

10

20

30

40

50

I Correlates, 2d ed., (Galín et al., eds., Review Press, N.Y.), Ch. 40, pp. 821-839を参照のこと)。第二のヘパリン中和タンパク質である血小板IVも、血管形成を阻害する(すなわち、血管の成長を止める)。コラゲナーゼ阻害剤も、血管形成を阻害することが知られている(前出のFolkman et al., 1992の文献を参照のこと)。他の公知の血管形成阻害剤であるトロンボスポンディンは、元のアミノ酸部分と代えた、セリン/トリプトファンの繰り返し部分でヘパリンに結合する(Guo et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 19349-19355を参照のこと)。

BPIの他の有用性は、通常、血管形成によって引き起こされる慢性炎症に関連する病理学的条件にも関与する。慢性炎症に関連したヒトの疾患の一例として、末梢関節の炎症を含んだ関節炎がある。リュウマチ性関節炎において、炎症は免疫が関与するが、反応性関節炎では、化膿性細菌あるいは他の感染症因子による滑液組織の感染と炎症は関連している。上掲のFolkman et al., 1992の文献も、関節部の炎症侵潤物によって支配された段階から、新生血管のパンヌスが関節部に侵入して軟骨を破壊し始める段階までの、関節炎の様々な進行の態様を記している。関節炎において血管形成が疾患あるいは付帯徴候の原因要素であるかどうかは不明であるが、リュウマチ性関節炎での滑膜炎の維持において、血管形成が必須であるとの根拠はある。公知の血管形成阻害剤の一つである、AGM1470は、関節炎の進行を防止し、コラーゲン誘発した関節炎のモデルにて関節炎を阻害することを立証している(Peacock et al., 1992, J. Exp. Med. 175: 1135-1138)。非ステロイド系の抗炎症薬、コルチコステロイド、および他の治療薬が、関節炎の治療効果を改善するために提供されてきたが、当該技術分野では依然として、関節炎ならびに他の炎症性疾患のより効果的治療が要望されているのである。

当該技術分野では、殺菌薬ならびに内毒素中和薬として使用でき、また、(正常あるいは病理的な)血管形成でのヘパリン中和およびヘパリン阻害のための、新規の物質と方法が待望されている。この要望を満たすための研究の指針の一つは、これら生物学的活性のそれぞれを特定するBPIタンパク質の機能部位を決定することにある。それ故、好適な治療態様では、BPIの活性の一つ以上を備えた、BPI機能領域を有するペプチドを含むことになる。

#### 発明の概要

本願発明は、ヘパリンへの結合、ヘパリンの中和、LPSへの結合、LPSの中和、あるいは殺菌活性のようなBPIの生物学的活性の少なくとも一つを有する、BPIの機能領域のアミノ酸配列、あるいはそのサブ配列、それらアミノ酸配列あるいはサブ配列の変異配列のであるアミノ酸配列を備えた、小さな容易に生成できるペプチドを提供する。発見され、そして本明細書に記載したBPIの機能領域は、約17位から約45位のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列を含んだドメインI; 約65位から約99位のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列を含んだドメインII; および、約142位から約169位のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列を含んだドメインIIIを含んでいた。このように、BPI機能領域ペプチドは、ヒトBPIのアミノ末端部分に基づいている。

本発明のペプチドには線状および環状ペプチドと、特定のBPIの機能領域アミノ酸配列あるいはそのサブ配列、およびそれらアミノ酸配列あるいはサブ配列の変異配列であるアミノ酸配列が、直鎖状、環状および分枝状の配列の組み合わせからなるペプチドを含む。このような組み合わせによるペプチドは、共有結合したBPIの同一あるいは異なる機能領域の配列あるいはサブ配列、およびそれら配列あるいはサブ配列の変異配列を有するペプチドを含む。特定の配列あるいはそのサブ配列、およびそれら配列あるいはサブ配列の変異配列の二つから約10個のペプチドの組み合わせが、特に包含される。本発明は、限定するものではないが、改変した標的細胞種への特異性を有した殺菌活性を有する、公知のBPIの生物学的活性とは異なる生物学的活性を備えたペプチドも提供する。BPIの生物学的活性と比較して、改善あるいは減退したBPIの特定の生物学的活性を備えたペプチドも提供される。

本発明のペプチドには線状および環状ペプチドと、特定のBPIの機能領域アミノ酸配列あるいはそのサブ配列の、線状、環状および分枝状アミノ酸での置換、および他の変異配列

10

20

30

40

50

からなるペプチドが含まれる。置換変異配列のために、各ペプチドの一つ以上のアミノ酸残基は、特異的なペプチドが由来するBPI機能領域の位置に対応して認められる（不定のアミノ酸残基を含む）異なるアミノ酸残基と交換される。他の変異配列のために、本明細書にて記載したBPI機能領域のペプチドアミノ末端あるいはカルボキシ末端のいずれか、あるいは双方に共有結合した約10個までのアミノ酸をさらに含む。かようなアミノ酸は、機能領域に隣接するBPIでのアミノ酸と重複し、あるいはBPIのアミノ酸と関連が無く、そして、不定のアミノ酸を含む。アミノ酸置換および変異ペプチドの線状、環状および分枝状ペプチドの組み合わせにて、上述したBPI機能領域ペプチドのそれぞれの環状ペプチドとして、本発明のペプチドが提供できる。他の変異配列には、アミン、カルボン酸、アルキルおよびフェニル基のようなアミノ酸側鎖の官能基の誘導体ならびに修飾体が含まれる

10

。本発明は、内毒素を中和し、グラム陰性ならびにグラム陽性細菌および真菌を殺菌し、ヘパリンの抗凝固性を中和し、血管形成を阻害し、腫瘍ならびに内皮細胞の増殖を阻害し、そして慢性炎症疾患状態を治療するための、哺乳類の治療において用いられる薬剤組成物を提供する。この薬剤組成物は、錠剤、丸剤、粉体、薬液あるいは懸濁液などの固形、半固形および液体の形態、および注射ならびに浸出可能な溶液の形態で、本発明のBPIペプチドの単位用量を含む。

機能領域 I を含む約17位から約45位のアミノ酸に至るヒトBPIのアミノ酸配列；

**ドメイン I : ASQQGTAALQKELKRIKIPDYSDFKIKH (配列番号 : 1)**

ならびにそのサブ配列であって、限定するものではないが、例えば、殺菌活性、LPSへの結合性、LPSの中和、ヘパリンへの結合性あるいはヘパリンの中和などのBPIの活性の一つ以上を備えたペプチドを、本発明は提供する。本発明のこの態様にて、約17から約45のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列とそのサブ配列を有する機能領域 I ペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有するペプチドも提供される。さらに、本発明は、同一あるいは異なるドメイン I ペプチドもしくは共有結合したサブ配列ペプチドの一つ以上を含むペプチドも提供する。

20

機能領域 II を含む約65位から約99位のアミノ酸に至るヒトBPIのアミノ酸配列；

**ドメイン II : SSQISMVNPVGLKFSISNANIKISGKWKAKRFLK**

**(配列番号 : 6)**

ならびにそのサブ配列であって、限定するものではないが、例えば、殺菌活性、LPSへの結合性、LPSの中和、ヘパリンへの結合性あるいはヘパリンの中和などのBPIの活性の一つ以上を備えたペプチドを、本発明は提供する。本発明のこの態様にて、約65から約99のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列とそのサブ配列を有する機能領域 II ペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有するペプチドも提供される。さらに、本発明は、同一あるいは異なるドメイン II ペプチドもしくは共有結合したサブ配列ペプチドの一つ以上を含むペプチドも提供する。

30

機能領域 III を含む約142位から約169位のアミノ酸に至るヒトBPIのアミノ酸配列；

**ドメイン III : VHVHISKSKVGWLIQLFHKKIESALRNK (配列番号 : 12)**

ならびにそのサブ配列であって、限定するものではないが、例えば、殺菌活性、LPSへの結合性、LPSの中和、ヘパリンへの結合性あるいはヘパリンの中和などのBPIの活性の一つ以上を備えたペプチドを、本発明は提供する。本発明のこの態様にて、約142から約169のアミノ酸に至るBPIのアミノ酸配列とそのサブ配列を有する機能領域 III ペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有するペプチドも提供される。さらに、本発明は、同一あるいは異なるドメイン III ペプチドもしくは共有結合したサブ配列ペプチドの一つ以上を含むペプチドも提供する。

40

さらに、異なる機能領域あるいはサブ配列およびその変異配列の一つ以上のペプチドが共有結合しているドメインを組み合わせたペプチドが、本発明によって提供される。これらドメインの組み合わせの態様には、線状、環状および分枝状ペプチドの組み合わせがある

。本発明のペプチドは、その有用性の一態様として、LPSへの結合性、LPSの中和、ヘパリン

50

への結合性、ヘパリンの中和、およびグラム陰性細菌に対する殺菌活性を含めた、少なくとも一つの公知のBPIの活性を備えている。さらに驚くべきことに、本発明のペプチドの中には、グラム陽性細菌に対する殺菌剤としての有用性を備えたものがある。本発明のペプチドは、グラム陰性細菌によって引き起こされた疾患あるいは病状を伴う哺乳類の治療に有用な、内毒素を中和し、内毒素産生細菌を殺菌するという二つの特性を備えた抗菌物質の新規のクラスを提供する。この二つの活性に加えて、本発明のペプチドは、向上した抗菌スペクトラムを有しており、抗菌薬剤の新規のクラスに属していることを意味する。さらに、本発明のペプチドは、通常の抗生物質には耐性があるが、本発明のペプチドの浸透性が向上した抗菌活性には感受的な微生物株による感染の処置において有用な抗菌薬剤の新たなクラスを提供する。

10

本発明は、ペプチド、あるいは薬学的に許容可能な担体あるいは希釈剤とペプチドからなる組成物を含む、病理学的状態あるいは疾患状態を処置するための方法での使用、あるいは他の適切な治療用途で使用するための、本発明のペプチドを含んだ薬剤組成物も提供する。ヒトを含む哺乳類での病理学的状態あるいは疾患状態を処置するためにこれら薬剤組成物を使用する方法も、本発明によって提供される。さらに、本発明によって、様々な治療用途のための薬剤を製造するために、BPI機能領域ペプチドの用途も提供される。本発明の好適な態様は、以下の実施例と請求の範囲に関する詳細な説明によって明らかになるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

図1aと1bは、臭化シアンとrBPI<sub>23</sub>のタンパク質分解断片のHPLC吸収スペクトルを示しており；

20

図2は、rBPI<sub>23</sub>のタンパク質分解断片のLAL阻害活性の結果を示すグラフであり；

図3は、15 - マーのBPIペプチドを用いたヘパリン結合分析の結果を示すグラフであり；

図4は、15 - マーのBPIペプチドを用いたLimulus遊走細胞溶解（LAL）阻害分析の結果を示すグラフであり；

図5は、15 - マーのBPIペプチドを用いた放射拡散殺菌性分析の結果を示すグラフであり；

図6は、ヘパリン結合性分析でのBPI機能領域ペプチドの効果を示すグラフであり；

図7aと7bは、トロンビンのAT111/ヘパリン阻害に関するBPI機能領域ペプチドの効果を示すグラフであり；

30

図8aと8bは、LAL阻害分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図9a、9b、9cおよび9dは、放射拡散殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図9eと9fは、E. coli培地分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図10a、10b、10c、10dおよび10eは、放射拡散殺菌性分析でのBPI機能領域を結合したペプチドの結果を示すグラフであり；

図11a、11b、11c、11d、11e、11f、11g、11hおよび11iは、放射拡散殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図11jと11kは、培養培地で成長した細菌細胞に関する殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

40

図11lは、ヒトの血清で行った殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドBPI.30の結果を示すグラフであり；

図11mと11nは、グラム陽性細胞を用いた放射拡散殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図11oは、S. aureus細胞を用いた、ゲンタマイシンとバンコマイシンとの比較における、放射拡散殺菌性分析でのBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図11pと11qは、培養培地で成長したC. albicans細胞を用いた細胞毒性分析におけるBPI機能領域ペプチドの結果を示すグラフであり；

図12a、12b、12c、12d、12e、12fおよび12gは、BPI機能領域ペプチドを用いたヘパリン中和分析の結果を示すグラフであり；

50

図13は、BPIドメインIIペプチドBPI.2 (BPI配列のアミノ酸配列85 - 99 ; 配列番号 : 7) の構造を示す概略図であり ;

図14は、BPIドメインIIIペプチドBPI.11 (BPI配列のアミノ酸配列148 - 161 ; 配列番号 : 13) の構造を示す概略図であり ;

図15a、15b、15c、15dおよび15eは、BPI機能領域置換ペプチドを用いたヘパリン結合分析の結果を示すグラフであり ;

図16は、様々なBPI機能領域ペプチドを用いたヘパリン結合実験の結果を示すグラフであり ;

図17aと17bは、合成BPI機能領域ペプチドと放射標識したrBPI<sub>23</sub>との間でのリピドA結合拮抗活性の結果を示すグラフであり ;

図18は、血液あるいは燐酸緩衝化生理食塩水での合成BPI.10ペプチドと放射標識したrBPI<sub>23</sub>との間でのリピドA結合拮抗活性の結果を示すグラフであり ;

図19は、合成BPIペプチドであるBPI.7、BPI.29およびBPI.30と放射標識したrBPI<sub>23</sub>との間でのリピドA結合拮抗活性の結果を示すグラフであり ;

図20aと20bは、BPI機能領域ペプチドと放射標識したrBPI<sub>23</sub>との間でのリピドA結合拮抗活性の結果を示すグラフであり ;

図21は、HUVEC細胞に予め結合したBPI機能領域ペプチドを用いたリピドA結合拮抗活性分析の結果を示すグラフであり ;

図22a、22b、22c、22d、22e、22f、22gおよび22hは、BPIのLPS中和活性を測定する細胞性TNFの細胞毒性分析に対して様々なパラメーターが影響することを示すグラフであり ;

図23a、23bおよび23cは、 $\gamma$ -インターフェロンの存在下での一酸化窒素ならびにLPS刺激したRAW264.7細胞でのLBPの生成依存性、およびrBPI<sub>23</sub>を用いた一酸化窒素の生成阻害を示すグラフであり ;

図24a、24b、24c、24d、24eおよび24fは、チモサンあるいはLPSで刺激したRAW264.7細胞による一酸化窒素の生成阻害能力が反映されたBPI機能領域ペプチドによるLPS中和を示すグラフであり ;

図24gは、RAW264.7細胞によるチモサンあるいはLPSで刺激した一酸化窒素の生成阻害における合成BPIペプチドのIC<sub>50</sub>値を示すグラフであり ;

図25は、三つの機能領域を示すrBPI<sub>23</sub>の概要であり ;

図26aは、rLBPの存在に関して、RAW264.7細胞の増殖のLPS-介在した阻害の依存性を示すグラフであり ;

図26bと26cは、実施例20Dの分析にて用いたBPI機能領域ペプチドのパターンを示すグラフであり ;

図27は、実施例20Eの分析にて用いた様々なBPI機能領域ペプチドによる全血でのTNF阻害の比較を示すグラフであり ; および

図28は、様々なBPI機能領域ペプチドを用いた実施例20Gに記載のトロンビン凝固時間分析の結果を示すグラフである。

#### 好適な態様の詳細な説明

本発明は、BPIの機能領域あるいはそのサブ配列およびその配列あるいはサブ配列の変異配列の少なくとも一つのアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。本発明の目的のために、「機能領域」なる語彙は、タンパク質の生物学的活性に寄与するBPIのアミノ酸配列の領域を意図するものである。BPIのこれら機能部位は、15 - マーのペプチドと他の合成ペプチドとが重複しているタンパク質開裂断片の活性によって定義される。

ドメインIは、約17位から約45位のアミノ酸を含むBPIのアミノ酸配列であると定義される。このドメインに基づいたペプチドは、LPS誘発したLAL活性の阻害ならびにヘパリンへの結合分析の双方にて緩やかな活性があるが、顕著な殺菌活性は認められなかった。ドメインIIは、約65位から約99位のアミノ酸を含むBPIのアミノ酸配列であると定義される。このドメインに基づいたペプチドは、LPSとヘパリンへの強い結合能力が認められ、また殺菌性であった。ドメインIIIは、約142位から約169位のアミノ酸を含むBPIのアミノ酸配列であると定義される。このドメインに基づいたペプチドは、LPSとヘパリンへの強い結

10

20

30

40

50

合能力が認められ、また殺菌性であった。

本明細書で定義した機能部位は、連続したドメインI、IIおよびIII、すなわち、BPIアミノ酸配列の連続部分を有するドメインを含む。しかしながら、本発明は、不連続のBPIのタンパク質、すなわち、BPI配列が分離されたタンパク質を含むペプチドも意図する。隣接あるいは近接するアミノ酸領域を調製するために、不連続領域のペプチドを共有結合することで本発明のペプチドと同様の構造をとるタンパク質のアミノ酸配列の不連続部分は、本来のタンパク質に折り畳まれることが知られている。

BPIアミノ酸配列の不連続領域を含むペプチドは、本発明によって提供したペプチドの組み合わせの一例である。本発明の目的のために、ペプチドの組み合わせには、同一あるいは異なるBPIの機能領域およびそのサブ配列に由来するアミノ酸配列を有する二つ以上のペプチドを含む線状、環状あるいは分枝状ペプチドが含まれる。2から約10個の機能領域ペプチドあるいはそのサブ配列を含む組み合わせ、好ましくは、二つまたは三つの機能領域ペプチド（例えば、ホモ二量体、ホモ三量体、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体）の組み合わせが、この定義に特に包含されている。かような組み合わせを含む構成ペプチドのそれぞれは、特定のBPI機能領域アミノ酸配列あるいはそのサブ配列からのアミノ酸配列を有している。

本発明の目的のために、「BPIの生物学的活性」なる語彙は、限定するものではないが、rBPI（配列番号：69）、rBPI<sub>23</sub>のようなBPIのアミノ末端断片、および（本明細書に参考までに採り入れた、係属中で共同所有に係る、1993年2月2日に出願した米国特許出願No. 08/013,801にて、rBPI（1-193）<sup>132</sup>と命名された）rBPI<sub>21</sub> cysのようなBPIの成熟したアミノ末端断片を含んだヒトの殺菌性/浸透性が向上したタンパク質（BPI）の生物学的活性を意図するものである。本明細書に参考までに採り入れた、係属中で共同所有に係る、米国特許出願No. 08/093,202に開示されているように、151位のバリンがGTCではなくGTGで規定され、185位の（AAGで規定された）リジンが（GAGで規定された）グルタミン酸であることを除けば、Gray et al.（前掲）に開示された、配列番号：69に記載の配列を有するrBPIが生成されている。加えて、前述したGray et al.（前掲）の配列との相違点と、31残基のシグナル配列およびrBPIの配列の最初の199個のアミノ酸を含む発現ベクターを用いて、rBPI<sub>23</sub>（Gazzano-Santro et al., 1992, Infect. Immun. 60 : 4754-4761も参照のこと）が生成した。かような生物学的活性は、LPSへの結合性、LPSの中和、ヘパリンへの結合性、ヘパリンの中和および殺菌活性を含む。本発明のペプチドの生物学的活性とは、BPIあるいはBPIの機能領域に対応する対応ペプチドの活性の0.1から10倍の活性を含む。「BPIの生物学的活性」の定義には、例えば、BPIあるいはBPIの全対応ドメインを含む対応ペプチドの活性とは質的に異なる殺菌活性などの生物学的活性を含む。例えば、質的相違としては、BPIの対応する機能領域のアミノ酸配列に効果的に関連のあるペプチドに対して、細菌あるいは他の微生物のスペクトルにおける相違を含む。このように、この定義は、BPIに関して報告されていない、グラム陽性細菌に対する殺菌活性および殺真菌活性のようなペプチド活性を含む。

本発明は、ヒトBPIの機能領域の一つのアミノ酸配列あるいはそのサブ配列を有したペプチドを提供する。かようなペプチドには、以下の例示的なドメインIペプチド〔一文字表記のアミノ酸は、G. Zubay, Biochemistry (2d. ed.), 1988 (MacMillen Publishing : N.Y.), p.33に紹介されている〕：

BPI. 1	QQGTAALQKELKRIK	(配列番号：4)
BPI. 4	LQKELKRIKIPDYSDFKIKHL	(配列番号：3)
BPI. 14	GTAALQKELKRIKIPDYSDFKIKHLGKGH	(配列番号：2)
および		
BPI. 54	GTAALQKELKRIKIP	(配列番号：5)

以下の例示的なドメインIIペプチド：

10

20

30

40

BPI.2 IKISGKWKAKRFLK (配列番号：7)  
 BPI.3 NVGLKFSISNANIKISGKWKAKRFLK (配列番号：11)  
 および  
 BPI.8 KWKAQKRFLK (配列番号：8)

そして、以下の例示的なドメインIIIペプチド：

BPI.5 VHVHISKSKVGWLIQLFHKKIE (配列番号：67)  
 BPI.11 KSKVWLIQLFHKK (配列番号：13)  
 BPI.12 SVHVHISKSKVGWLIQLFHKKIESALRNK (配列番号：14)  
 BPI.13 KSKVGWLIQLFHKK (配列番号：15)  
 および  
 BPI.55 GWLIQLFHKKIESALRNKMNS (配列番号：61)

10

が挙げられる。BPI.14、BPI.12およびBPI.55が、付加変異体の例であると認められる。本発明は、ヒトBPIの機能領域の一つのアミノ酸配列あるいはそのサブ配列を有するペプチドの組み合わせである、同一あるいは異なる線状および分枝状ペプチドの組み合わせを提供する。かようなペプチドの態様には、以下に例示するドメインIIペプチド：

BPI.9 KRFLKKWKAQKRFLK (配列番号：51)  
 BPI.7 KWKAQKRFLKKWKAQKRFLK (配列番号：54)  
 BPI.10.1 KRFLKKWKAQKRFLKKWKAQKRFLK (配列番号：55)  
 および  
 BPI.10.2 QKRFLKKWKAQKRFLKKWKAQKRFLK (配列番号：65)

20

および、以下に例示するドメインII分枝状ペプチド：

MAP.1 ( -アラニル - N 、 N -置換 - [ N 、 N (BPI.2)リシル ] リシン  
 および、以下に例示する組み合わせドメインIIIペプチド：  
 BPI.29 KSKVGWLIQLFHKKKSKVGWLIQLFHKK (配列番号：56)

および、以下に例示する分枝状ドメインIIIペプチド：

MAP.2 ( -アラニル - N 、 N -置換 - [ N 、 N (BPI.13)リシル ] リシン  
 および、以下に例示するドメインII - ドメインIII間の組み合わせペプチド：  
 BPI.30 KWKAQKRFLKKSKVGWLIQLFHKK (配列番号：52)  
 BPI.63 IKISGKWKAKRFLKKSKVGWLIQLFHKK (配列番号：53)  
 および、  
 BPI.74 KSKVGWLIQLFHKKKWKAQKRFLK (配列番号：70)

30

などが挙げられる。

各ペプチドの一つ以上の位置でのアミノ酸残基が、特異的なペプチドが誘導されるBPI機能領域の対応する位置にて認められるアミノ酸とは異なる残基である、アミノ酸置換変異体も提供される。例えば、本発明の一態様では、ペプチドのある位置は、BPIアミノ酸配列での対応する位置のアミノ酸であるアラニン残基で置換する。他の態様では、ペプチドのある位置は、BPIアミノ酸配列での対応する位置のアミノ酸である、例えば、フェニルアラニン、ロイシン、リシン、あるいはトリプトファン残基で置換する。これらペプチドの態様には、以下に例示する置換ドメインIIペプチド：

40

BPI. 15	AKISGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 16)	
BPI. 16	IAISGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 17)	
BPI. 17	IKASGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 18)	
BPI. 18	IKIAGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 19)	
BPI. 19	IKISAKWKQAQRFLK	(配列番号 : 20)	
BPI. 20	IKISGAWKQAQRFLK	(配列番号 : 21)	
BPI. 21	IKISGKAKQAQRFLK	(配列番号 : 22)	
BPI. 22	IKISGKWAAQRFLK	(配列番号 : 23)	
BPI. 23	IKISGKWKAAQRFLK	(配列番号 : 24)	
BPI. 24	IKISGKWKQAARFLK	(配列番号 : 25)	10
BPI. 25	IKISGKWKQAQAFK	(配列番号 : 26)	
BPI. 26	IKISGKWKQAQRALK	(配列番号 : 27)	
BPI. 27	IKISGKWKQAQRFAK	(配列番号 : 28)	
BPI. 28	IKISGKWKQAQRFLA	(配列番号 : 29)	
BPI. 61	IKISGKFKQAQRFLK	(配列番号 : 48)	
BPI. 73	IKISGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 62)	
BPI. 77	IKISGKWKQAQRFLK	(配列番号 : 72)	
BPI. 79	IKISGKWKAKQRFLK	(配列番号 : 73)	
および、			
BPI. 81	IKISGKWKAFQRFLK	(配列番号 : 75)	20
および、以下に例示する置換ドメインIIIペプチド :			
BPI. 31	ASKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 33)	
BPI. 32	KAKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 34)	
BPI. 33	KSAVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 35)	
BPI. 34	KSKAGWLIQLFHKK	(配列番号 : 36)	
BPI. 35	KSKVAWLIQLFHKK	(配列番号 : 37)	
BPI. 36	KSKVGALIQLFHKK	(配列番号 : 38)	
BPI. 37	KSKVGWAIQLFHKK	(配列番号 : 39)	
BPI. 38	KSKVGWLAQLFHKK	(配列番号 : 40)	
BPI. 39	KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 41)	30
BPI. 40	KSKVGWLIQAFHKK	(配列番号 : 42)	
BPI. 41	KSKVGWLIQLAHKK	(配列番号 : 43)	
BPI. 42	KSKVGWLIQLFAKK	(配列番号 : 44)	
BPI. 43	KSKVGWLIQLFHAK	(配列番号 : 45)	
BPI. 44	KSKVGWLIQLFHKA	(配列番号 : 46)	
BPI. 82	KSKVGWLIQLWHKK	(配列番号 : 76)	
BPI. 85	KSKVLWLIQLFHKK	(配列番号 : 79)	
BPI. 86	KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 80)	
BPI. 87	KSKVGWLIQLFLKK	(配列番号 : 81)	
BPI. 91	KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 86)	40
BPI. 92	KSKVGWLIKLFHKK	(配列番号 : 87)	
BPI. 94	KSKVGWLIQLFPKK	(配列番号 : 89)	
BPI. 95	KSKVFWLIQLFHKK	(配列番号 : 90)	
BPI. 96	KSKVGWLIQLFHKK	(配列番号 : 91)	
および、			
BPI. 97	KSKVKWLIQLFHKK	(配列番号 : 92)	

などが挙げられる。本発明によって提供されるかのような単一アミノ酸置換BPI機能領域の有用性は、ペプチド配列における重要な残基を同定することにより、これにより、アミノ酸配列における特定位置の置換が、ペプチドの生物学的活性の少なくとも一つに関する効果が確認できるようになる。本発明に包含されるもので、特筆すべきは、得られた置換ペ

プチドが本明細書で定義したような生物学的活性を有している自然発生もしくは不定型のアミノ酸を用いて、同定された重要な残基が置換されている本発明のペプチドの態様である。

複数の置換、すなわち、機能領域アミノ酸配列の二つ以上の異なるアミノ酸残基がそれぞれ、他のアミノ酸で置換されている置換ペプチドも提供される。例えば、二箇所が置換されたペプチドの場合、ペプチド中の双方の位置が、例えば、BPIアミノ酸配列での対応する位置にあるアミノ酸を、アラニン、フェニルアラニン、あるいはリシン残基で置換される。これらペプチドの例には、複数の置換を含むドメインIIペプチド：

BPI.45 IKISGKWKAAARFLK (配列番号：31)  
 BPI.56 IKISGKWKAKQRFLK (配列番号：47)  
 BPI.59 IKISGAWAAQKRFLK (配列番号：30)  
 BPI.60 IAISGKWKAKQRFLA (配列番号：32)

および、

BPI.88 IKISGKWKAPFRFLK (配列番号：82)

および、複数の置換を含む例示のドメインIIIペプチド：

BPI.100 KSKVKWLKLFHKK (配列番号：94)

および、以下の複数の置換を含む例示の置換ドメインIIの混合ペプチド：

BPI.101 KSKVKWLKLFKFKSKVKWLKLFKFK (配列番号：95)

および、以下の複数の置換を含む例示の置換ドメインII - ドメインIII間の混合置換ペプチド：

BPI.102 KWKAQFRFLKKSCKVGWLILFLHKK (配列番号：96)

が挙げられる。

かようなアミノ酸置換変異体の他の態様には、不定型アミノ酸でアミノ酸残基を置換したものがあ。本発明のペプチドのこの態様には、向上した安定性、強度、あるいは生物学的利用性をペプチドに付与されるように、D-アミノ酸、修飾あるいは非自然発生型アミノ酸、および改変アミノ酸を含めたペプチドが包含される。これらペプチドの例には、不定型アミノ酸を含む以下の例示的なドメインIIペプチド：

BPI.66 IKISGKW<sub>D</sub> KAQKRFLK (配列番号：49)  
 BPI.67 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQKRFLK (配列番号：50)  
 BPI.70 IKISGKA $\beta$ -(3-ピリジル)KAQKRFLK (配列番号：63)  
 BPI.71 A<sub>D</sub> A<sub>D</sub> IKISGKWKAKQRFLK (配列番号：66)  
 BPI.72 IKISGKWKAKQRA $\beta$ -(3-ピリジル)LK (配列番号：64)  
 BPI.76 IKISGKWKAKQF<sub>D</sub> RFLK (配列番号：71)  
 BPI.80 IKISGKWKAKQA $\beta$ -(1-ナフチル)RFLK (配列番号：74)  
 BPI.84 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLK (配列番号：78)  
 BPI.89 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAFKRFLK (配列番号：84)

および、

BPI.90 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAPFRFLK (配列番号：85)

および、不定型アミノ酸を含む例示のドメインIIIペプチド：

BPI.83 KSKVGA $\beta$ -(1-ナフチル)LIQLFHKK (配列番号：77)

および、不定型アミノ酸を含む例示の置換ドメインII - ドメインIII間の混合ペプチド：

BPI.93 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLKKSCKVGWLIQLFHKK (配列番号：88)

および、

BPI.98 IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLKKSCKVGWLIQLFHKK (配列番号：83)

などが挙げられる。複数のドメインで複数の置換をもたらすアミノ酸置換変異ペプチドの線状および分枝状ペプチドの組み合わせも、本発明の態様である。これらペプチドの態様としては、以下の例示的な混合/置換ドメインIIペプチド：

10

20

30

40

BPI. 46 KWKAAARFLKKWKAQRFLK (配列番号 : 57)  
 BPI. 47 KWKAQKRFLKKWKAARFLK (配列番号 : 58)  
 BPI. 48 KWKAAARFLKKWAAAKRFLK (配列番号 : 59)  
 BPI. 69 KWKAAARFLKKWKAARFLKKWKAARLK (配列番号 : 60)

および、

BPI. 99 KWKAQWRFLKKWKAQWRFLKKWKAQWRFLK (配列番号 : 93)

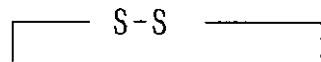
などが挙げられる。

上記したBPI機能領域ペプチドそれぞれの二量体および環状体も、本発明によって提供される。これらペプチドの態様として、以下の例示的なシステイン修飾したドメインIIペプチド :

BPI. 58 CIKISGKWKAQKRFLK (配列番号 : 9)

BPI. 65(red) CIKISGKWKAQKRFLKC (配列番号 : 68)

および、



BPI. 65(ox.) CIKISGKWKAQKRFLKC (配列番号 : 10)

などが挙げられる。

本明細書に記載したBPI機能領域ペプチドは、グラム陰性細菌に対する抗菌薬として、また、グラム陰性細菌の細胞膜に関連するLPSの作用を中和する上で有用である。本発明のペプチドは、様々な量にて、ヘパリン結合性ならびにヘパリン中和などのグラム陰性細菌感染に直接関連しない活性を含めた他のBPIの活性も呈する。本発明によって提供されたペプチドも、BPIの公知の生物学的活性とは異なる生物学的活性を呈する。例えば、本発明のペプチドのある態様によれば、生物学的活性が及ぶ生物学的対象がBPIより広範であり、グラム陰性細菌同様に、グラム陽性細菌にもその生物学的活性が及ぶのである。本発明のある態様では、驚くべきことに、殺真菌活性も得られている。このように、本発明は、異なる抗微生物活性を有するBPIの生物学的機能領域のアミノ酸配列を備えたペプチドを効果的に提供するのである。BPIの抗菌活性ならびに抗内毒素活性を有し、また向上した抗生物質スペクトルを備えた本発明のペプチドは、抗生物質の新規のクラスを構成するものである。

本発明のBPI機能領域ペプチドは、BPIタンパク質生成物を認識する生物学的治療用途において有用である。例えば、共同所有に係る、係属中の、1994年1月24日に出願された米国特許出願No. 08/188,221は、ヒトの治療において、循環器系にあるグラム陰性細菌内毒素に、BPIタンパク質生成物をさらすことを述べている。共同所有に係る、係属中の、1993年3月12日に出願された米国特許出願No. 08/031,145は、マイコバクテリウム疾患の治療のために、BPIタンパク質生成物を投与することを述べている。共同所有に係る、係属中の、1993年10月5日に出願された米国特許出願No. 08/132,510は、抑制された細網内皮系機能条件の改善のために、BPIタンパク質生成物を使用することを述べている。共同所有に係る、係属中の、1993年9月22日に出願された米国特許出願No. 08/125,651は、BPIタンパク質生成物と抗生物質との相乗的組み合わせを述べている。共同所有に係る、係属中の、1993年7月14日に出願された米国特許出願No. 08/093,201は、LBPタンパク質生成物の投与による、BPIタンパク質生成物の殺菌活性を強化する方法を述べている。共同所有に係る、係属中の、1993年3月12日に出願された米国特許出願No. 08/031,144は、Helicobacter infectionの感染の治療のためのBPIタンパク質生成物の投与を述べている。上記した出願の開示は、本発明のBPI機能領域ペプチドの治療用途での使用のために、本明細書に参考までに採り入れた。本発明のBPI機能領域ペプチドは、上記した米国特許出願Nos. 08/030,644、08/093,202、および08/183,222に開示されている通り、病理的状态ならびに疾患状態の治療においても有用である。

このように、本発明のBPI機能領域ペプチドは、ヘパリンの抗凝固効果の中和 ; 血管形成 (特に、網膜症に関連する血管形成) の阻害 ; 内皮細胞増殖 (特に、肥大した卵子の移植

10

20

30

40

50

に関連した子宮内膜症および増殖)の阻害；悪性腫瘍細胞の増殖（特に、カポジ肉腫の増殖）の阻害；慢性炎症疾患（関節炎、特に、反応性のリウマチ性関節炎）の治療；グラム陰性細菌感染およびその後遺症の治療；循環血液中のグラム陰性内毒素の作用（増大したサイトカイン生成）の処置；グラム陰性細菌の殺菌；抑制された細網内皮系機能（特に、肝臓の物理的、化学的および生物学的損傷の結果としての、抑制された肝臓のクッパー細胞機能を含む）に関連した生理学的効果の改善；（ゲンタマイシン、ポリミキシンBおよびセファマンドールナフタのような）抗生物質との相乗的組み合わせによるグラム陰性細菌感染およびその後遺症の治療；抗生物質との相乗的組み合わせによるグラム陰性細菌の殺菌；LBPタンパク質生成物との組み合わせによるグラム陰性細菌感染およびその後遺症の治療；LBPタンパク質生成物との組み合わせによるグラム陰性細菌の殺菌；抗生物質および/またはピスマス単独あるいは組み合わせによるMycobacteria感染（特に、Mycobacteria tuberculosis、Mycobacteria leprae、およびMycobacteria aviumによる感染）の治療；循環血液中のリポアラビノマンナンの生理学的効果（増大したサイトカイン生成）の改善；リポアラビノマンナンを含んだ流体（血液、血漿、血清および骨髄）の除染；およびHelicobacter属の細菌による感染に関連した疾患状態（胃炎および消化器官、胃および十二指腸潰瘍など）の治療、において有用である。本発明は、上記した用途での使用において効果的な量のBPI機能領域ペプチドを含んだ、経口用、非経口用、局所用および噴霧投与の薬剤組成物、および薬学的に許容される希釈剤、補助剤あるいは担体をさらに含んだ薬剤組成物を提供する。

10

LBPタンパク質生成物との組み合わせたBPI機能領域ペプチドの使用に関して、本明細書にて以後使用する、「LBPタンパク質生成物」には、天然および組換え生成したりポ多糖結合タンパク質；リポ多糖結合タンパク質の生物学的に活性な天然および組換えポリペプチド断片ならびに誘導體；および、LBPあるいは生物学的に活性なその断片のいずれかの、ハイブリッド融合タンパク質を含む、生物学的に活性なポリペプチド類似体が含まれる。本発明の方法に有用なLBPタンパク質生成物は、共同所有に係る、係属中の、1993年7月17日に出願された米国特許出願No. 08/079,510に記載された形質転換した真核宿主細胞での、rLBPと命名された組換え遺伝子の発現によって生成できるLBPホロタンパク質を含む。その米国特許出願には、CD14が介在した炎症特性と、CD14レセプターを介してLPS活性を伝播する能力を欠いた、好ましいLBPタンパク質誘導體も記載されている。CD14が介在した免疫刺激が一般に好ましくないと考えられ、感染した対象においては特にその傾向が

20

30

顕著であるため、本発明に従って、かようなLBPタンパク質を用いることは好ましい。好ましいLBPタンパク質誘導體は、約25kDの分子量を有したアミノ末端断片によって特徴付けられている。rLBP<sub>25</sub>と命名された、配列番号：97と98に記載されたLBPのアミノ末端の最初の197個のアミノ酸によって特徴付けられたLBPアミノ末端断片が最も好ましく、その生成物は、先に述べた、共同所有に係る、係属中の、米国特許出願No. 08/079,510に記載されている。25kDよりかなり小さく、またホロLBP分子のアミノ末端の最初の197個のアミノ酸より実質的に小さい末端を含んだLBPタンパク質誘導體は、LPSへの結合能力を保持しているのであれば、本発明での使用に適している。さらに、配列番号：97と98に記載されたrLBPの最初の197個のアミノ酸のカルボキシ末端側のアミノ酸を含むホロLBP分子の最初の197個のアミノ酸残基より大きな断片を含むLBPタンパク質誘導體は、CD14が介在した、免疫刺激活性を促進する要素が欠如しておれば、本発明の方法において有用であることが立証されるであろう。また、当業者であれば、そのタンパク質分子の所望の生物学的活性を損失することなく、配列番号：97と98に記載のアミノ酸残基の付加、削除および置換を行いうるものとする。さらに、LBPタンパク質生成物がLPS結合活性を維持し、またCD14介在した免疫刺激活性を欠くように、LBPホロタンパク質をコードするDNA配列を、削除、置換、付加あるいは部位特異的変異を含む変異することで、LBPタンパク質生成物を得ることができる。細菌に対するLBPの親和性の改善および/またはin vivoでの改善された安定性の結果として得られるLBPハイブリッド分子と二量体分子も、本発明で特に意図されている。これらには、LBP/BPIハイブリッドタンパク質とLBP-Ig融合タンパク質が含まれる。かようなハイブリッドタンパク質には、二量体の形成を許容するために、ヒトガン

40

50

マ1あるいはガンマ3ヒンジ領域をさらに用いることを含む。二量体の他の形態として、改善した血清の安定性ならびにCH<sub>2</sub>ドメインを欠いたFcを用いた融合体を含む結合親和性、あるいはロイシンまたはヘリックス束を用いたハイブリッドを備えることを意図している。

本発明のBPI機能領域ペプチドは、組換え手法を含む、当該技術分野で公知の手段によって、生成および/または単離することができる。本明細書の参考までに採り入れた、共同所有に係る、1991年7月2日に発効した米国特許No. 5,028,530、共同所有に係る、1993年4月27日に発効した米国特許No. 5,206,154、および共同所有に係る、係属中の1993年1月28日に出願された米国特許出願No. 08/010,676は、抗微生物ペプチドを含めたポリペプチドの新規の組換え生成法を開示している。細菌における抗微生物ペプチドの他の組換え生成法が、Piers et al., 1993, Gene 134:7-13に記載されている。本明細書の参考までに採り入れた、共同所有に係る、係属中の1992年5月19日に出願された米国特許出願No. 07/885,501および1993年5月19日に出願されたその一部継続出願である米国特許出願No. 08/072,063は、培地中の遺伝子的に形質転換した哺乳類宿主細胞にて発現し、分泌された組換えBPIの精製のための新規の方法が開示している。

BPI機能領域ペプチドは、かような方法を用いることで効率良く得ることができる。当業者であれば、本発明の各ペプチドをコードする核酸を単離し、あるいは化学的に合成することができる。このような核酸は、転写および/または翻訳制御要素に核酸が結合している組換え発現体の要素として有用であり、これにより、その組換え発現体によって形質転換した原核細胞、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳類細胞での培養にて、組換え発現体が本発明のペプチドを発現できるようになる。

本発明のペプチドは、当該技術分野で公知の化学合成法、特に、例えば、購入可能な自動ペプチド合成機を用いた固相合成法によって効率良く合成することができる。このペプチドは、ペプチドが互いに線状に結合され、そして、選択した配座様式となるように、「スパーサー」アミノ酸による分離の有無にかかわらずにペプチド内にてBPI配列が繰り返されているペプチドとして提供される。さらに、構成ペプチドが、ペプチドを含むアミノ酸のアミノ酸側鎖にて機能的に共有結合されている分枝状鎖としても提供される。

本発明の機能領域ペプチドは、BPI機能領域ペプチドと少なくとも一つの他のポリペプチドの一部を含む組換えハイブリッド融合タンパク質として提供される。このようなペプチドは、例えば、本明細書の参考までに採り入れた、Theofan et al.による共同所有に係る、係属中の1992年5月19日に出願された米国特許出願No. 07/885,911および1993年5月19日に出願されたその一部継続出願である米国特許出願No. 08/064,693に記載されている。一般に、当業者であれば、本明細書に記載したペプチドを、非修飾のペプチドと同等の活性、必要であれば他の所望の特性を備えた化合物を生成するために様々な化学的手法で修飾するであろう。例えば、ペプチドのカルボン酸官能基は、カルボキシ末端あるいは側鎖であれ、薬学的に許容されるカチオンの塩として提供され、またはC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>エステルを形成するように制限され、あるいは式NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、式中、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>は互いに異なるものであり水素もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキルであるのアミドに転化され、あるいは5員環あるいは6員環のような複素環を形成するように結合される。ペプチドのアミノ基は、アミノ末端あるいは側鎖であれ、塩酸、臭化水素、酢酸、安息香酸、硫化トルエン、マレイン酸、酒石酸および他の有機塩のような薬学的に許容される酸の塩の形態にて、あるいはC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキルあるいはジアルキルアミノにまで修飾され、あるいはアミドになるまでさらに転化される。ペプチド側鎖の水酸基は、周知の方法を用いて、C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルコキシあるいはC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>エステルまで転化される。ペプチド側鎖のフェニルあるいはフェノール環は、フッ素、塩素、臭素あるいはヨウ素などの一つ以上のハロゲン原子、あるいはC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルコキシ、カルボン酸およびそのエステル、あるいはカルボン酸のようなアミドで置換される。ペプチド側鎖のメチレン基は、相同なC<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>アルキレンまで伸長される。チオールは、アセトアミド基のような周知の保護基の一つで保護できる。当業者であれば、改善された結合性および/または安定性をもたらす構造に見合う立体配座を選択および提供するために、本発明のペプチドに環状構造を導入する方法も想到するであろう。例えば、カルボキシ

10

20

30

40

50

末端あるいはアミノ末端システイン残基をペプチドに付加でき、よって酸化したペプチドがジスルフィド結合を含んだ場合には、環状ペプチドが生成することになる。他のペプチドの環状化方法として、チオエーテル、およびカルボキシならびにアミノ末端アミドとエステルの形成がある。

仮想ペプチドならびに仮想有機体も本発明の範疇に属し、かような仮想ペプチドならびに仮想有機体の化学構造の三次元構造は、ペプチドの三次元構造とペプチドの構成アミノ酸側鎖を真似ているものであり、これにより、本発明のペプチドの仮想ペプチドならびに仮想有機体は、実質的な生物学的活性を備えることになる。BPIの活性の各々に関する薬作用発生団の存在も示唆されている。薬作用発生団は、生物学的活性のために求められる構造の理想的な三次元構造を採る。仮想ペプチドならびに仮想有機体は、コンピューター設計用ソフトウェア（薬剤設計のためのコンピューター）を用いて、薬作用発生団に適合するように設計することができる。薬作用発生団の特異的な活性相互の重複の程度を、決定する必要がある。

BPI機能領域ペプチドは、好ましくは、BPI機能領域ペプチドならびに薬学的に許容される希釈剤、補助剤あるいは担体を含む薬剤組成物として投与される。BPI機能領域ペプチド組成物は、公知の抗生物質、界面活性剤、あるいは他の化学療法薬を必要に応じて併用して投与される。かような組み合わせの例は、本明細書の参考までに採り入れた、共同所有に係る、係属中の1993年2月2日に出願された米国特許出願No. 08/012,360および1994年2月2日に出願されたその一部継続出願である米国特許出願No. 08/190,869に記載されている。

殺菌活性、ヘパリンの抗凝固活性の一部あるいは全部中和、LPSの一部あるいは全部中和、および本明細書に開示した他の効果を得るためのBPI機能領域ペプチドの有効用量は、当業者であれば、例えば、被投与体の大きさ、細菌感染の程度と性質、内毒素ショックの程度と性質、および被投与体に投与されたヘパリンの量ならびにヘパリンが投与されてから経過した時間を含めた、生物学的活性に関連する公知のパラメーターから、容易に決定できる。当業者であれば、本明細書にて言及する治療用途に本発明のペプチドに用いるにあたって、同様の決定を行い得るものと思われる。

本発明の薬剤は、経口投与用、注射用、あるいは他の非経口的の方法に適合するように調製でき、好ましくは、当業者に公知の薬学的に許容される担体、補助剤および対抗イオンを含むようにする。この薬剤は、錠剤、丸剤、粉体、薬液あるいは懸濁液などの、固形、半固形および液体、および注射ならびに浸出可能な溶液の形態とするのが好ましい。約100  $\mu$ g/体重kgから約100mg/体重kgの有効用量範囲が、意図されている。

以下の実施例には、本発明の態様とその用途についての記載がなされている。実施例1には、BPIのタンパク質分解断片の調製方法が記載されており；実施例2には、実施例1のタンパク質分解断片の殺菌性の検定結果が記載されており；実施例3には、実施例1のタンパク質分解断片を用いたヘパリン結合性検定の結果が記載されており；実施例4には、実施例1のタンパク質分解断片のLPS結合活性を検定するための、Limulus遊走細胞溶解物を用いた実験の結果が記載されており；実施例5には、BPIの15マー・ペプチドの調製が記載されており；実施例6には、実施例5の15マー・ペプチドを用いたヘパリン結合性検定の結果が記載されており；実施例7には、実施例5の15マー・ペプチドを用いたLimulus遊走細胞溶解物の検定の結果が記載されており；実施例8には、実施例5の15マー・ペプチドを用いた殺菌性検定の結果が記載されており；実施例9には、別個のBPI機能領域ペプチドの調製が記載されており；実施例10には、実施例9の別個のBPI機能領域ペプチドを用いたヘパリン結合性検定の結果が記載されており；実施例11には、実施例9の別個のBPI機能領域ペプチドを用いたヘパリン中和検定の結果が記載されており；実施例12には、実施例9の別個のBPI機能領域ペプチドを用いたLPS中和活性のLimulus遊走細胞溶解物分析の結果が記載されており；実施例13には、実施例9の別個のBPI機能領域ペプチドを用いた殺菌性分析の結果が記載されており；実施例14には、混合BPI機能領域ペプチドの調製が記載されており；実施例15には、実施例14の混合BPI機能領域ペプチドの殺菌性分析の結果が記載されており；実施例16には、実施例14の混合BPI機能領域ペプチドの他

10

20

30

40

50

の殺菌性分析の結果が記載されており；実施例17には、実施例14の混合BPI機能領域ペプチドを用いたin vivoおよびin vitroへパリン中和分析の結果が記載されており；実施例18には、BPI置換変異機能領域ペプチドの調製ならびに殺菌活性、ヘパリン結合活性、およびLPS中和活性分析の機能性分析が記載されており；実施例19には、代表的なBPI機能領域ペプチドを用いた殺菌性ならびにヘパリン結合分析の結果の要旨が記載されており；実施例20には、様々な結合性ならびに中和検定におけるBPI機能領域ペプチドの分析が記載されており；実施例21には、ヘパリン中和分析が記載されており；実施例22には、コラーゲンのモデル系および慢性炎症疾患状態を示す細菌で誘発した関節炎動物モデル系へのBPI機能領域ペプチドの投与が記載されており；実施例23には、マウスの悪性腫瘍転移のモデル系での血管静止効果に関するBPI機能領域ペプチドの試験が記載されており；実施例24には、内皮細胞増殖に関するBPI機能領域ペプチドの効果が記載されており；実施例25には、動物モデル系でのBPI機能領域ペプチドの分析が記載されており；そして、実施例26には、ヒトにおける本発明のBPI機能領域ペプチドの抗内毒素効果をin vivoで試験するためのプロトコールが記載されている。

10

#### 実施例 1

##### BPIタンパク質分解断片の調製

組換えBPIタンパク質の様々な大きさのタンパク質分解断片を生成するために、rBPI<sub>23</sub>に化学開裂ならびに酵素消化の処理を施した。

rBPI<sub>23</sub>タンパク質は、臭化シアン(CNBr)あるいはエンドプロテイナーゼAsp-Nによるタンパク分解に先駆けて、還元およびアルキル化処理した。タンパク質を、冷(4℃)アセトン(1:1v/v)を添加して一晚沈殿させて脱塩し、沈殿したタンパク質を10分間(5000×g)で遠心分離してペレット化することで還元せしめた。rBPI<sub>23</sub>タンパク質ペレットを、冷アセトンで2回洗浄し、窒素の流れる下で乾燥した。rBPI<sub>23</sub>溶液は、8M尿素/0.1M Tris-塩酸(pH8.1)中の1mgタンパク質/mlの最終濃度にまで再調整され、そして、3.4mMジチオスレイトール(Calbiochem社、サンディエゴ、カリフォルニア州)を、37℃で、90分間かけて添加することで還元した。最終濃度が5.3ミリモラーになるまでイオドアセタミド(Sigma Chemical社、セントルイス、モンタナ州)を添加し、室温で、暗黒下で30分間インキュベートすることで、アルキル化を行った。還元およびアルキル化したタンパク質を、アセトンで沈殿させ、遠心分離し、上記したようにして洗浄し、そして、ペレットを臭化シアンあるいはAsp-N消化のいずれかのために、下記したようにして再溶解せしめた。

20

30

臭化シアン触媒したタンパク質の断片化のために、最終タンパク質濃度が5mg/mlになるまで、70%トリフルオロ酢酸(TFA)(タンパク質配列決定用、Sigma Chemical社、セントルイス、モンタナ州)でまず溶解した。70%TFAに溶解した臭化シアン(ベーカー分析した試薬、VWR Scientific社、サンフランシスコ、カリフォルニア州)を、タンパク質に対して臭化シアンが2:1(w/w)の最終比率になるように添加した。反応物を窒素で清浄し、室温で、暗黒下で、24時間反応を進行せしめた。9倍量の蒸留水を加えて反応を停止し、凍結して(-70℃)、凍結乾燥した。

エンドプロテイナーゼ消化のために、還元およびアルキル化したrBPI<sub>23</sub>を、8M尿素/0.1M Tris-塩酸(pH8.1)中の5.0mg/mlの濃度で可溶化した。5M尿素/0.1M Tris-塩酸(pH8.1)中の最終条件が2.5mg/mlになるように、等量の0.1M Tris-塩酸(pH8.1)を添加した。Pseudomonas fragi(Boehringer-Mannheim社、インディアナポリス、インディアナ州)からのエンドプロテイナーゼAsp-Nを、1:1000(w/w、酵素:基質)の比率で加え、37℃で、6時間、反応を進行せしめた。TFAの最終濃度が0.1%になるまで添加することで反応を停止し、そして試料を逆相HPLCで分画化した。

40

臭化シアンおよびAsp-N断片混合物を、ZorbaxプロテインプラスC<sub>3</sub>カラム(4.6×250mm、300μm孔径、MACMOD Analytical社、チャストフォード、ペシルバニア州)で精製した。0.1%TFA中の5%アセトニトリルから0.1%TFA中の80%アセトニトリルまでの勾配を、1.0ml/分の流速で、2時間の溶出時間にわたってこのカラムに適用した。断片溶出液を、Beckman System Gold HPLC(Beckman Scientific Instruments社、サンラモン、カリフォルニ

50

ア州)を用いて、220nmでモニターした。カラム加熱装置を35℃に維持し、そして、画分を手で回収し、-70℃で凍結し、次いでSpeed Vac濃縮装置で乾燥した。使用に先駆けて、20mM酢酸ナトリウム(pH4.0)/0.5M塩化ナトリウムの溶液にて可溶化した。

小児科病院 - オークランド研究所のCedric Shackleton博士の研究室に所属しているFrancis Bitsch博士ならびにJohn Kim氏によって、VG Bio-Q質量スペクトル分析器にて、電子噴射イオン化質量スペクトル(ESI-MS)が行われた。データの数学的換算によって分子質量が得られた。

rBPI<sub>23</sub>のDNA配列は成熟したタンパク質の1-199アミノ酸残基をコードするものの、生成したタンパク質の重要な部分は、ESI-MSで決定されたように、Leu-193およびVal-195にて切断されていた。これらカルボキシ末端の切断部の存在は、ESI-MSで配列決定ならびに解析されたカルボキシ末端のトリプシンによって生じたペプチドを単離することで証明された。

rBPI<sub>23</sub>には、第56、70、100、111、170および196位に、6つのメチオニン残基があり、臭化シアン<sup>-</sup>の化学的開裂で予想された6つの腫瘍なペプチド断片が生成した。臭化シアン開裂実験の結果を、表1にまとめた。その断片を、逆相(C<sub>3</sub>)HPLC(図1a)によって単離し、そのアミノ末端配列をEdman消化によって決定した。最も大きな二つの断片(C1とC5)は、C<sub>3</sub>HPLCカラムでは分解せず、イオン交換クロマトグラフィーを試みたが結果は芳しくなく、これは両者が長さと同電点が同様であることによるものと考えられる。混合物中のC1とC5の同定を、ESI-MSで決定した。臭化シアン開裂反応におけるカルボキシ末端メチオニンのホモセリンへの転換の結果から、30a.m.u.の損失を考慮して、C1の推定質量は6269(表1)とされた。観察された6251.51±0.34の質量は、ホモセリンラクトン中間体での水分子の損失(18a.m.u.)と符合しており、C1断片C-末端アミノ酸の疎水性からして、ホモセリンの形成に有利である。C5断片の推定質量は6487であり、観察された質量は6285.84±0.39であった(表1)。C5断片に関して、C-末端アミノ酸は疎水性であり、ホモセリンラクトン中間体の加水分解に有利である。アミノ末端配列決定と質量スペクトルの双方のデータから、C1/C5混合体の約10から25%はC5の成分であることが認められた。

臭化シアンC1/C5混合体に含まれる領域の他の断片を得るために、エンドプロテイナーゼA sp-Nを用いたタンパク質開裂を行った。rBPI<sub>23</sub>には、第15、36、39、57、105および116位に、6つのアスパラギン酸残基があった。C<sub>3</sub>HPLCによって単離した6つの主要Asp-N断片(図1b)を配列決定し、その質量をESI-MSで決定した(表1)。非特異性の開裂、特に、グルタミン酸残基を解消するために、1:1000(w/w、酵素:基質)の比率で短時間消化を行った。Asp残基(15位と35位のアミノ酸)が開裂しているところで、ある断片(1-38)が単離したので、消化が完全に進行していなかった。Asp-N断片の質量スペクトルは、各断片の推定した質量と符合していた。臭化シアン開裂とは異なり、カルボキシ末端断片がわずかに分解しているところでは、第116位のアミノ酸からカルボキシ末端までのAsp-N断片は、他のAsp-N断片のすべてからも十分に回収されていた。

10

20

30

表 1  
rBPI<sub>23</sub>開裂断片の分析の概要

臭化シアン開裂断片

ピーク	配列	カラム番号	質 量	
			測定値	推定値
I	101-110	C4(101-111)	検出されず	1169
II	57- 67	C2(57-70)	検出されず	1651
III	71- 99	C3(71-100)	検出されず	3404
IV	171-194	C6(171-196)	検出されず	2929
V	1-25, 112-124	C1(1-56)	6251	6269
		C5(112-170)	6486	6487

Asp-N タンパク質分解断片

ピーク	配列	カラム番号	質 量	
			測定値	推定値
A	1-14	A1(1-14)	1465.5	1464
I	39-56	A3(39-56)	2145.2	2145
II	15-38	A2(15-38)	2723.6	2724
III	57-76	A4(57-104)	5442.5	5442
IV	1-38	A1 A2(1-38)	4171.4	4172
VI	116-134	A6a(116-193)	8800.3	8800
VII	116-128	A6b(116-195)	8997.1	8996

実施例 2

BPIタンパク質分解断片の殺菌効果

実施例 1 に従って生成したBPIタンパク質分解断片を、変異E. coli J5細菌を用いて、放射拡散分析にて殺菌効果についてスクリーニングした。具体的には、E. coli J5細菌を終夜培養したものを、新鮮なトリプシン処理した大豆培地で1:50にまで希釈し、培養細菌が対数増殖期に至るまで、37 °Cで、3時間培養した。そして、Sorvall RT6000B遠心分離 (Sorvall Instruments社、ニュートン、コネチカット州)を用いて、細菌を、3,000rpmで、5分間、遠心分離してペレットとした。10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) の5mlを添加し、そして調製物を再度ペレット化した。上清を移して、5mlの新鮮な緩衝液を添加し、細菌を再懸濁し、そして、その濃度を590nmでの吸光度の測定 (この波長での吸光度値1.0は、懸濁液中の $1.25 \times 10^9$ CFU/mlの濃度に等しい) により決定した。10mlの溶解した下層のアガロース (約45 °C) で細菌を $4 \times 10^6$ CFU/mlにまで希釈し、常套手段である、15mlのポリプロピレン製チューブの反転を繰り返すことでこれを混合した。

そして、そのチューブの中身すべてを、平底ペトリ皿に注ぎ、皿を万遍なく均等に振ることで均質に分布させた。30秒もしない内に固まったアガロースは、約1mmの均質厚みになった。真空装置に接続された滅菌済の3mmパンチを用いて、固まったアガロースの一連のウェルを設けた。パンチは100%アルコールで滅菌処理しており、細菌の培地を汚染しないように、使用時の直前に乾燥させた。

BPI断片の5もしくは10 $\mu$ lを、各ウェルにピペットで移した。負の対照として、希釈緩衝液 (pH8.3) を分離したウェルに添加し、5 $\mu$ g/mlおよび1 $\mu$ g/mlの濃度のrBPI<sub>23</sub>も正の対照として添加された。各プレートを、37 °Cで、3時間インキュベートし、そして、10mlの溶解した上層のアガロース (約45 °C) を平底ペトリ皿に添加し、固化せしめて、次いで、37 °Cで、終夜インキュベートした。翌日、殺菌活性を有する細菌を置いたウェルには清澄な部分が認められた。この部分を視覚的により確認しやすくするために、(0.002%クーマシーブリリアントブルー、27%メタノール、15%ホルムアルデヒド (37%倍液) およ

び水からなる)希釈したクーマシー溶液を寒天上に注ぎ、染色するために24時間置いた。マイクロメーターを用いて、細菌部分を測定した。

25pmol / ウェルにまで増量して試験した場合でも、臭化シアンあるいはAsp-N消化して生成したrBPI<sub>23</sub>断片に関しては殺菌活性は認められなかった。これに対して、この分析では、0.75pmol / ウェルという低い量でも、rBPI<sub>23</sub>を用いることで測定可能な殺菌活性が検出された。一方、アルキル化rBPI<sub>23</sub>がrBPI<sub>23</sub>と同等の殺菌活性を保持しているにもかかわらず、還元およびアルキル化したrBPI<sub>23</sub>でも100pmol / ウェルにまで増量しても殺菌性は認められなかった。

### 実施例 3

#### BPIタンパク質分解断片によるヘパリン結合

実施例 1 にて生成したrBPI<sub>23</sub>とBPIタンパク質分解断片を、本明細書にて参考までに採り入れた、1993年7月15日に出願した係属中の米国特許出願No. 08/093,202の実施例 1 に記載の方法に従ったヘパリン結合性分析にて評価した。要約すれば、各断片を、底にジフッ化ポリビニリデン膜 (Immobilon-P、ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を備えた、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに添加した。臭化シアン断片のヘパリン結合を、<sup>3</sup>H-ヘパリン (20 μg/ml) の飽和濃度で、ウェル当たり100pmolの各断片を用いて計測した。正の対照のウェルには、様々な量のrBPI<sub>23</sub>を入れた。ウェルを乾燥し、次いで、燐酸緩衝化生理食塩水、pH7.4 (ブロッキング緩衝液) 中の0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) でブロックした。ブロッキング緩衝液で<sup>3</sup>H-ヘパリン (0.30-20 μCi/ml、平均分子量15,000: DuPont-NEN、ウィルミントン、デラウエア州) の希釈液を作り、BP Iペプチドを含むウェルにて、4 で、1時間インキュベートした。液体シンチレーション計測 (Model 1217、LKB社、ガイザーバーグ、メリーランド州) での定量のために、未結合のヘパリンを吸引し、ウェルをブロッキング緩衝液で3回洗浄し、乾燥し、そして除去した。ブロッキング緩衝液中のBSAは、小さな親和性とヘパリンへの小さな結合力を示したが、これは生理学的要因によるものではなく、その背景は試験化合物シグナルが減じたものと考えられる。断片-ヘパリン結合の特異性は、放射標識したヘパリンが、100倍の過剰の放射標識していないヘパリンにより完全に阻害されたということ (データ示さず) から明らかである。

表 2 (二つのウェルの平均値 ± は、二つの値の値域を示す) の結果は、アミノ酸71-100 (C3) と1-56ならびに112-170 (C1,C5) を含んだヘパリンに結合した臭化シアン断片は、同程度の結果を示した。臭化シアン断片171-196も、対照タンパク質 (同様の分子量のタンパク質であるrBPI<sub>23</sub>に作用する、タウマチン) よりも、ヘパリンに顕著に結合した。Asp-N断片も、rBPI<sub>23</sub>にて複数のヘパリン結合領域が認められた。表 2 にあるように、57-104 Asp-N断片が最も多量のヘパリンと結合し、1-38ならびに116-193断片がこれに続いている。臭化シアン断片データとつきあわせて、これらデータは、化学的あるいは酵素的に生成したrBPI<sub>23</sub>の断片によって実証されたように、残基71-100での最高のヘパリン結合力をはじめとして、rBPI<sub>23</sub>には少なくとも三つの独立したヘパリン結合領域があることを示している。

10

20

30

表 2  
rBPI<sub>23</sub>断片のヘパリン結合

臭化シアン消化断片	領域	ヘパリン結合した cpm <sup>3</sup> H
C1, C5	1-56, 112-170	82,918 ± 4,462
C2	57-70	6,262 ± 182
C3	71-100	81,655 ± 3,163
C4	101-111	4,686 ± 4
C6	171-196	26,204 ± 844

10

Asp-N 消化断片

A1	1-38	17,002 ± 479
A2	15-38	3,042 ± 162
A3	39-56	8,664 ± 128
A4	57-104	33,159 ± 1,095
A6a	116-193	13,419 ± 309

rBPI <sub>23</sub>	1-193	51,222 ± 1,808
タウマチン		7,432 ± 83
洗浄用緩衝液		6,366 ± 46

20

実施例 4

LAL分析に関するBPIタンパク質分解断片の効果

実施例 1 に従って生成したBPIタンパク質分解断片を、これら断片のLPS結合特性を決定するために、Limulus遊走細胞溶解 (LAL) 阻害検定に適用した。具体的には、各断片を、所定濃度のE. coli 0113 LPS (最終濃度、4 ng/ml) と共にエッペンドルフ管にて混合し、そして、時々振盪しながら、37 °C で、3 時間インキュベートした。0.05 µg/ml のrBPI<sub>23</sub> を含む対照についても試験した。インキュベーションに続いて、LAL分析のために200pg/ml のLPS濃度を得るために、360 µl のダルベッコの燐酸緩衝化生理食塩水 (D-PBS: Grand Island Biological社 (GIBCO)、ロングアイランド、ニューヨーク州) をチューブごとに添加した。各試料を、ウェル当たり50 µl の量のイムロンIIストリップ (Dynatech社、チャティリー、バージニア州) に移した。

30

Limulus遊走細胞溶解物 (発色定量LALキット、Whitaker Bioproducts社、ウォーカーズビル、メリーランド州) を、ウェル当たり50 µl 添加し、そのウェルを、室温にて、25分間インキュベートした。発色体を、ウェル当たり100 µl 添加し、そして、ウェルを混合した。室温での20から30分間のインキュベーション後、100 µl の25% (v/v) 酢酸を添加して反応を停止した。405nmでの光学密度を、マルチプレート計測器 (Model Vmax、Molecular Dynamics社、メンロパーク、カリフォルニア州) で測定し、LPS阻害率としてその結果を図 2 に示した。この図において、黒丸はrBPI<sub>23</sub> を；白丸はAsp-N断片A3を；×はAsp-N断片A2を；黒四角はAsp-N断片A4を；黒三角はAsp-N断片A1A2を；白四角はAsp-N断片A6aを；小さな白三角は臭化シアン断片C3を；そして、小さな黒四角は臭化シアン断片C1/C5を示している。

40

アミノ三断片1-56と112-170を含む臭化シアン消化画分は、約100nMのIC<sub>50</sub>で、LPS誘発したLAL反応を阻害した。このIC<sub>50</sub>は、同じ検定における無傷のrBPI<sub>23</sub> (9nM) のIC<sub>50</sub>よりも、約10倍高い値である。他の臭化シアン消化画分は、非阻害性であることが判明した。Asp-N消化により生成した断片に、LAL分析において三つの断片が阻害的であるとする若干異なる結果が得られた。アミノ酸116-193に対応する断片は、15nMにてLPS誘発したLAL反応を完全に阻害するなど、無傷のrBPI<sub>23</sub>と同様のLAL阻害活性を示した。アミノ酸57-104ならびに1-38に対応する断片も、LAL検定にて阻害を呈したが、約10倍の量を必要とした

50

。臭化シアン消化によるデータとつきあわせて、これらデータは、116-193のアミノ酸断片での最高の中和活性をはじめとして、rBPI<sub>23</sub>分子の少なくとも三つの領域には、LAL反応でのLPS活性の中和力があると、前述した実験結果をさらに支持するものである。実施例1に記載のrBPI<sub>23</sub>のタンパク質分解断片での免疫反応性の研究を、ELISA検定を用いて行った。この検定にて、rBPI<sub>23</sub>タンパク質分解断片を得るために、rBPI<sub>23</sub>殺菌活性とLAL阻害活性をブロックすることができるウサギポリクローナル抗rBPI<sub>23</sub>抗体を用いた。このポリクローナル抗体は、116-193ならびに57-104 Asp-N断片および1-56ならびに112-170臭化シアン断片とは免疫反応性があったが、マウスモノクローナル抗体は、rBPI<sub>23</sub>の1-14残基に対応するAsp-N断片としか反応しなかった。

#### 実施例 5

##### BPIの15-merペプチドの調製

実施例1-4に記載のBPI断片分析にて検出された生物学的活性のドメインをさらに研究するために、BPIの23kDアミノ末端断片のアミノ酸配列から誘導した15個のアミノ酸を含む15-merの合成ペプチドを調製し、ヘパリン結合活性、Limulus遊走細胞溶解(LAL)検定、および殺菌活性について評価した。具体的には、一組47個の合成ペプチドを二つずつ調製するものであり、各ペプチドは15個のアミノ酸を含み、また、前述した係属中の、1993年7月15日に出版された米国特許出願No. 08/093,202にある配列に基づいた、隣接するペプチドの11個の連続したアミノ酸と重複するアミノ酸を備えるようにペプチドを合成した。

ペプチドを、Coselco Mimotopes社のライセンス下にあるCambridge Research Biochemicals社の固相法を利用して、Maeji et al., (1990, Immunol. Methods 134: 23-33) ならびにGammon et al., (1991, J. Exp. Med. 173: 609-617) の方法に従って同時に合成した。すなわち、rBPI<sub>23</sub>(1-199)の配列を、rBPI<sub>23</sub>の線状配列に沿って5個ずつアミノ酸をずらして分割を開始することで、47個の15-merペプチドを得た。このペプチド合成法は、96ウェル板での分離したペプチドの端断片に関する、複数のペプチドの小規模合成も同時に行える。このようにして、94個の端断片が合成され、残りの二つの端断片(B,B)は、活性化したFMOcアミノ酸の添加をせずに、他の端断片と同じ工程に適用した。固相の端断片支持体からの15-merペプチドの最終開裂では、基本緩衝液(炭酸ナトリウム、pH8.3)を使用した。端断片への独特な結合は、これら条件下でジケトピペラジン環化を進行せしめ、開裂したペプチドにカルボキシ末端にてシクロ(リシルプロピル)部分をもたらすことになる。アミノ末端はアセチル化されず、よって、遊離アミノ基はアニオン結合反応に寄与することになる。ウェル当たりで、各15-merペプチドの平均約15µgが得られた。

#### 実施例 6

##### BPIの15-merペプチドによるヘパリン結合

実施例5に記載のBPI 15-merペプチドを、実施例3に記載の方法に従ったヘパリン結合検定に適用した。

その結果を図3に示し、図において、結合したcpmの総数から、ブロッキング緩衝液のみを使用した対照ウェルに結合したcpmを差し引いた値を示している。これら結果は、rBPI<sub>23</sub>配列における個別のヘパリン結合性機能領域を示す、三つの異なるヘパリン結合性ペプチドの存在を示唆するものである。BPI配列において、最初のドメインは約21位のアミノ酸から約55位のアミノ酸にまで至り：二番目のドメインは約65位のアミノ酸から約107位のアミノ酸にまで至り：そして、三番目のドメインは約137位のアミノ酸から約171位のアミノ酸にまで至っている。ブランク対照での端断片からの物質には、ヘパリン結合効果が認められなかった。

#### 実施例 7

##### Limulus遊走細胞溶解(LAL)検定でのBPIの15-merペプチドの効果

実施例5に記載の15-merペプチドを、実施例4に記載のLAL検定を用いて、そのLPS結合活性について分析を行った。

これら実験の結果を、図4に示した。図4の結果は、顕著なLAL阻害に至るLPS結合活性を有するrBPI<sub>23</sub>タンパク質の三つの異なるドメインの存在を示唆する、少なくとも三つの主

10

20

30

40

50

要な領域を示している。最初のドメインは約17位のアミノ酸から約55位のアミノ酸にまで至り：二番目のドメインは約73位のアミノ酸から約99位のアミノ酸にまで至り：そして、三番目のドメインは約137位のアミノ酸から約163位のアミノ酸にまで至っている。加えて、図に示したように、他のペプチドでもLAL阻害が認められた。これに対して、ブランク対照での端断片からの物質では、LAL検定にて測定されるLPS中和効果は認められなかった。

#### 実施例 8

##### BPIの15-merペプチドの殺菌効果

実施例 5 に記載の15-merペプチドを、実施例 2 に記載の放射拡散分析にてE. coli細菌 (J 5) に対する殺菌効果について試験した。ブランク端断片 (B,B) からの生成物を、負の対照として試験した。

分析の結果を図 5 に示した。殺菌活性が認められた15-merペプチドは、BPIタンパク質のアミノ酸85-99に対するペプチドのみであった。図 5 に見られるように、様々な量のrBPI<sub>2</sub><sub>3</sub>を含む正の対照ウェルでも殺菌活性が認められたが、緩衝液ならびにブランク対照端断片においてはかような活性は認められなかった。

上記実施例に記載したヘパリン結合性ならびにLAL分析になった、これら殺菌活性検定の結果は、BPIタンパク質には三つの異なる機能領域があることを示している。

実施例 1 - 8 にて得られた結果は、rBPI<sub>2</sub><sub>3</sub>は、分子の全生物学的活性に寄与する少なくとも三つの機能領域を含んでいることを示している。最初のドメインは、約17位と約45位の間のアミノ酸の配列中にあり、38位の残基でのAsp-N開裂により破壊される。このドメインは、LPS誘発したLAL活性ならびにヘパリン結合活性の双方において緩慢な活性を呈する。二番目の機能性ドメインは、約65位と約99位の間のアミノ酸の領域中にあり、LPS誘発したLAL活性の阻害力は、70位の残基での臭化シアン開裂により消失する。このドメインは、最大のヘパリン結合活性を示し、殺菌性ペプチド、85-99を含んでいる。約142位と約169位のアミノ酸の間にある、三番目の機能性ドメインは、LPS誘発したLAL刺激検定での阻害において活性であり、また、ヘパリン結合力は三つの領域の中で最も小さかった。

#### 実施例 9

##### BPI機能領域ペプチドの調製

実施例 5 - 8 に記載の一連の重複したペプチドの試験結果に基づいて、BPIタンパク質の機能的に定義された各領域に由来するBPI機能領域ペプチドを、Applied Biosystems社のModel 432ペプチド合成機を用いて、Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149ならびにMerrifield et al., 1966, Anal. Chem. 38 : 1905-1914の方法に従って、固相ペプチド合成によって調製した。BPI機能領域ペプチドは、以下の表 3 に記載したように、BPIのアミノ酸残基1-199の一部のアミノ酸を有するように調製され、BPI. 2 からBPI. 5 およびBPI. 8 と命名した。

表 3  
BPI 機能領域ペプチド

ペプチド番号	ドメイン	アミノ酸領域	アミノ酸残基	分子量(ダルトン)
BPI. 2	II	85-99	15	1828.16
BPI. 3	II	73-99	27	3072.77
BPI. 4	I	25-46	22	2696.51
BPI. 5	III	142-163	22	2621.52
BPI. 8	II	90-99	10	1316.8

#### 実施例10

##### BPI機能領域ペプチドによるヘパリン結合活性

実施例 3 に記載の方法に従って、BPI機能領域ペプチドBPI. 2、BPI. 3、BPI. 8 およびrBPI<sub>1</sub><sub>21</sub> cysのヘパリン結合活性について検定した。図 6 に示した結果から、BPI. 3 とrBPI<sub>1</sub><sub>21</sub> cysでは緩慢なヘパリン結合活性が認められたが、BPI. 2 とBPI. 8 では、ほとんどある

いは全くヘパリン結合活性は認められなかった。

#### 実施例11

##### BPI機能領域ペプチドによるヘパリン中和活性

BPI機能領域ペプチドBPI. 2、BPI. 3、BPI. 4、BPI. 5、BPI. 6および正の対照としてのrBPI<sub>23</sub>を、本明細書に参考までに採り入れた、1993年7月15日に出願された、係属中の、共同所有に係る米国特許出願No. 08/093,202の実施例3に記載の方法に従って、ATIII/ヘパリン複合体によるトロンピン不活性化に関するそれらの効果について検定を行った。具体的には、血漿中のATIII/ヘパリン複合体による精製したトロンピンの阻害を見るために、Chromostate（登録商標）抗トロンピン分析キット（Organon Teknica社、ダーラム、ノースカロライナ州）を用いた。

すなわち、分析は、ウェル当たりの最終容量が200  $\mu$ lになるように調製した96ウェルマイクロタイタープレートで、三度実施した。1.0  $\mu$ g/mlから100  $\mu$ g/mlの範囲でBPI機能領域ペプチドの濃度を変更して分析を進め、予め調製していたATIII/ヘパリン複合体の存在下でトロンピンの阻害効果を決定した。分析のための試薬の添加順序は以下の通りである。

1) 最終容量が50  $\mu$ lになるようにPBSで希釈し、最終濃度が100、50、25、10および1  $\mu$ g/ウェルに調製した、rBPI<sub>23</sub>、あるいはBPI機能領域ペプチド、あるいはタウマチンの一連の希釈液、2) 製造業者によって調製された緩衝液で、1:1000に希釈した50  $\mu$ l血漿水、3) 製造業者によって調製された緩衝液中にある1 nKat/mlの濃度にある50  $\mu$ lトロンピン、および4) 水中で1  $\mu$ mol/mlの濃度にある50  $\mu$ l発色基質、である。反応を37  $^{\circ}$ Cで10分間進行せしめ、50  $\mu$ lの0.1Mクエン酸を添加して停止した。実施例3に記載のマイクロプレート計測器で、発色反応を定量した。

これら分析の結果を、試料濃度を重量あるいはモル濃度で記した図7aと7bに示した。BPI機能領域ペプチドBPI. 3とBPI. 5が、最大のヘパリン中和活性を示した。これら分析にて、対照タンパク質であるタウマチンは中和活性を示さず、いずれのタンパク質濃度においても緩衝液対照と等価の活性を示したに過ぎなかった。

#### 実施例12

##### BPI機能領域ペプチドによるLAL分析でのLPS中和活性

BPI機能領域ペプチドBPI. 2、BPI. 3、BPI. 8および正の対照としてのrBPI<sub>23</sub>を、実施例4に記載の方法に従って、これらペプチドのLPS結合性ならびにLPS阻害性を決定するために、LAL分析にて評価した。実施例3に記載の方法にならって実験を進め、その結果を、試料濃度を重量あるいはモル濃度で記した図8aと8bに示した。得られた結果から、BPI. 3は緩慢なLPS阻害活性を有しているのに対し、BPI. 2とBPI. 8では目立ったLPS阻害活性は認められなかった。

#### 実施例13

##### BPI機能領域ペプチドの殺菌活性

BPI機能領域ペプチドBPI. 2、BPI. 3、BPI. 8および正の対照としてのrBPI<sub>23</sub>を、実施例2の方法に従って、放射拡散分析にて、E. coli J5（ラフ）およびE. coli 0111:B4（スムーズ）細菌に対する殺菌効果を試験した。その結果を、図9a-9dに記した。これら結果は、BPI機能領域ペプチドBPI. 2とBPI. 3は、殺菌活性を示したものの、BPI. 8ではほとんどあるいは全く殺菌活性が認められない結果を示した。殺菌活性を示した各殺菌性ペプチドは、スムーズE. coli株よりむしろラフ株に対して効果的であった。

ある種のBPIペプチドの殺菌活性をさらに決定するために、他の実験にて、培地抗細菌分析を実施した。具体的には、寒天プレートでの単一コロニーから、E. coli J5（ラフ）あるいはE. coli 0111:B4（スムーズ）細菌のいずれかを選択し、5mlのMueller Hinton肉汁を接種し、振とうしながら、37  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。終夜培養したものを、5mlの新しい肉汁で希釈し（ $\sim$ 1:50）、対数増殖期まで37  $^{\circ}$ Cでインキュベート（ $\sim$ 3時間）した。5分間、3000rpmで遠心分離して、細菌をペレット化した。細菌ペレットを5mlのPBSで再懸濁し、Mueller Hinton肉汁で、 $2 \times 10^6$ 細胞/mlにまで希釈した（ $10D_{570}$ 単位は、 $1.25 \times 10^9$ CFU/mlに相当する）。試験を行うBPI機能領域ペプチドを、肉汁で200  $\mu$ g/mlにまで希釈し、96ウェル培養プレート（100  $\mu$ l容量）で2倍まで連続的に希釈した。い

10

20

30

40

50

ずれの試料も2倍の最終濃度とし、実験を3回実施した。細菌を100 µl/ウェルになるまで添加し、振とう機中にて、37 °Cで、20時間インキュベートした。そして、プレートを、ELISAプレートマルチプル計測器にて、590nmで測定した。各ペプチド濃度での3つのウェルの一つを、コロニー形成単位(CFU)決定のために選択した。270 µlのPBSに30 µlの部分試料を加え、さらに、10倍の連続希釈を実施した。そして、50 µlの部分試料をトリプシン処理した大豆寒天上に置き、一晚インキュベートした。コロニーを計測し、最終細菌濃度を決定した。これらの分析の結果を、図9e (E. coli J5)と図9f (E. coli 0111 : B4)に示した。これら図に見られる通り、BPI機能領域ペプチドBPI. 3は、E. coli J5細菌に対して強い抗菌活性を示したのに対して、E. coli 0111 : B4に対してはほとんど活性が認められなかった。

10

#### 実施例14

##### BPI機能領域混合ペプチドの調製

実施例9に記載の固相化学法を用いて混合ペプチドを調製した。これらペプチドの配列を、以下の表4に示した。

BPI. 7、BPI. 9、BPI. 10と命名したペプチドは、あるBPI配列の一部あるいは偶数個の反復を表していることが伺える。具体的には、アミノ酸90-99を含む20-merを含むBPI. 7は、一つの線状ペプチド鎖に二つが含まれている。BPI. 10は、一つの線状ペプチド鎖に、アミノ酸残基94-99、90-99、90-99ならびに93-99、90-99、90-99それぞれを含む (BPI. 10.1と命名した、配列番号 : 55の) 25-merと (BPI. 10.2と命名した、配列番号 : 65の) 26-merの約50 : 50の混合物を含む。BPI. 9は、一つの線状ペプチド鎖に、アミノ酸残基94-99に

20

続いて残基90-99を含んだ16-merを含む。これらペプチドを、上記した実施例10-13に記載したBPI活性検定に適用した。実施例10ならびに図6に記載したヘパリン結合検定にて、BPI. 7は非常に高いヘパリン結合力を示した。実施例11ならびに図7aと7bに記載したヘパリン中和検定にて、BPI. 7は、rBPI<sub>23</sub>と比較して、非常に高いヘパリン中和効果を示した。実施例12ならびに図8aと8bに記載したLAL検定にて、BPI. 7は高いLPS阻害特性を示した。実施例13ならびに図9a-9dに記載した放射拡散プレートを用いた殺菌性検定にて、BPI. 7、BPI. 9、BPI. 10.1およびBPI. 10.2は殺菌活性を示し、そして、培地検定におけるE. coliのラフならびにスムーズ双方の様々な株に対して、BPI. 7、BPI. 9、BPI. 10.1およびBPI. 10.2は強い殺菌活性を示した。BPI. 10ペプチドは、いずれの細菌株に対しても、最も強い殺菌活性を示した。

30

ペプチドBPI. 7とBPI. 10で認められたこれら殺菌活性の結果は、BPIドメインIIペプチドKWKAQRRFLK (すなわち、BPI. 8、配列番号 : 8) の線状マルチマー (BPI. 10.1およびBPI. 10.2) の混合物と線状二量体 (BPI. 7) は、E. coli株J5に対して殺菌活性を有したのに対し、単量体 (BPI. 8) は実質的に殺菌活性が無かったことを示している。さらに、アミノ酸94-99、90-99を含むBPI. 9の二量体ペプチドならびに多量体ペプチドは、より強い殺菌活性を示した。これら結果に基づいて、実施例9に記載の方法を用いて、表4に示した他のペプチドを合成した。

表 4  
BPI 機能領域混合ペプチド

BPI ペプチド番号	アミノ酸領域	アミノ酸残基	分子量(ダルトン)
BPI. 7	90-99, 90-99	20	2644.66
BPI. 8	90-99	10	1316.8
BPI. 9	94-99, 90-99	16	2131.34
BPI. 10.1	94-99, 90-99 90-99	25	3319.19
BPI. 10.2	93-99, 90-99 90-99	26	3447.32
BPI. 13	148-161	14	1710.05
BPI. 29	148-161, 148-161	28	3403.1
BPI. 30	90-99, 148-161	24	3023.86
BPI. 63	85-99, 148-161	29	3524.4

#### 実施例15

##### 機能領域混合ペプチドの殺菌活性

実施例14に記載のBPI機能領域混合ペプチドを、前記実施例2ならびに13に記載の放射拡散分析に用いた。その結果を、図10a-10eに示した。図10aに示した結果は、ドメインIIペプチド(アミノ酸90-99)の一つのコピーを含むBPI. 8は、1000 µg/mlの濃度で、E. coli J5細胞に対して検出可能な殺菌活性は有していなかった。これとは対照的に、ドメインIIペプチド(アミノ酸148-161)の一つのコピーを含むBPI. 13は、30 µg/mlを超える濃度で、相当の殺菌活性を示した。ドメインIII単量体BPI. 13の二つのコピーを含むBPI. 29は、より大きな殺菌活性をし、また、ドメインIIペプチドBPI. 8とドメインIIIペプチドBPI. 13の混合線状ペプチドは、J5細胞に対して、BPIとほぼ同等の最も高い殺菌活性を示した。

図10bには、BPI. 8、BPI. 7およびBPI. 10を含むドメインIIペプチドを用いた実験の結果を示している。(表8の要約も参照のこと。) BPI. 8は、1000 µg/mlの濃度で、E. coli J5細胞に対して殺菌活性は有していなかったが、BPI. 7とBPI. 10の混合ペプチドは、高レベルの殺菌活性を示した。

これらBPI機能領域ペプチドの殺菌性範囲を研究するために、標的細胞として様々な他の細菌を用いて、他の実験を行った。図10cは、E. coli株07-K1を用いた放射拡散実験の結果を示すものである。これら実験にて、rBPI<sub>23</sub>は、100 µg/mlの濃度で殺菌活性は認められず、1000 µg/mlの濃度でも低い殺菌活性しか認められなかった。同様に、ドメインII(DII)単量体を含むペプチドBPI. 8ならびにドメインIII(DIII)単量体を含むペプチドBPI. 13は、BPI. 13の活性の量ががrBPI<sub>23</sub>のそれより大きいにもかかわらず、低レベルの殺菌活性しか認められなかった。驚くべきことに、ドメインII(DII)二量体BPI. 7とドメインII-ドメインIII(DII-DIII)ヘテロ二量体BPI. 30は高い殺菌活性を示し、そして、ドメインIII二量体BPI. 29は緩慢な殺菌活性を示した。これら結果は、ここで同定されたBPI機能領域のペプチドが、BPI分子の殺菌活性とは質的に異なる殺菌活性を有していることを実証している。

図10dと10eは、本明細書に記載したホモ-ならびにヘテロ二量体が、感受性細菌とは質的にも量的にも異なる殺菌活性スペクトルを有していることをさらに実証している。図10dは、Klebsiella pneumoniae細菌を用いた放射拡散分析の結果を示している。DII-IIIヘテロ二量体BPI. 30は、この細菌に対して最高の殺菌活性を示し、DIIIホモ二量体BPI. 29は、緩慢な活性レベルを示し、また、DII二量体(BPI. 7)とDIII単量体(BPI. 13)は低レベルの活性を示した。DII単量体を含むBPI. 8は、800 µg/mlの濃度でも殺菌活性を示さず、このことは試験したE. coli株で見られたこのペプチドの殺菌活性の欠如と符合するものである。

10

20

30

40

50

図10eは、グラム陽性細菌であるStaphylococcus aureusを用いた放射拡散実験で認められた殺菌活性のレベルを示している。DII-DIIIヘテロ二量体BPI.30は、この細菌に対して最高の殺菌活性を示し、DIIIホモ二量体BPI.29は、緩慢な活性レベルを示し、また、DII二量体（BPI.7）とDIII単量体（BPI.13）は低レベルの活性を示した。DII単量体を含むBPI.8は、800 µg/mlの濃度でも殺菌活性を示さず、このことは試験した他の細菌で見られたこのペプチドの殺菌活性の欠如と符合するものである。

これら結果は、本明細書で開示したホモ - ならびにヘテロ二量体が、殺菌活性が検出されるために必要なペプチドの活性量ならびに最小有効濃度の双方に関して変化する、様々な程度の殺菌活性を呈することを示している。また、これら結果は、BPIの殺菌活性とは量的に、そして驚くべきことに質的にも相違する活性であることを示している。

10

#### 実施例16

##### BPI機能領域混合ペプチドの他の殺菌活性

実施例15に開示した実験結果を考慮し、他の細菌ならびに微生物に対するドメインII - ドメインIII混合ペプチドの殺菌活性を、BPIドメインIIペプチドならびにBPIドメインIIIペプチドの殺菌活性と比較した。上述した以下のBPI機能領域ペプチドを、放射拡散殺菌活性（実施例2）および上記実施例15にも記載した培地殺菌活性（実施例13）に用いた。これら結果を、図11a-11qに記載した。これら図面には、以下の細菌株を用いた殺菌性検定の結果を記されている。

##### グラム陰性細菌

##### 試験したペプチド

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BPI.8, BPI.13, BPI.30
<i>E. coli</i> O18:K1:H7	BPI.8, BPI.13, BPI.30
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BPI.8, BPI.13, BPI.30
<i>E. coli</i> O75	BPI.8, BPI.13, BPI.30
<i>Serratia marcescens</i>	BPI.8, BPI.13, BPI.30
<i>Proteus mirabilis</i>	BPI.2, BPI.13, BPI.30
<i>Salmonella typhurium</i>	BPI.23, BPI.30
<i>E. coli</i> O86a:K61	BPI.23, BPI.30
<i>E. coli</i> O4:K12	BPI.30

20

##### グラム陽性細菌

<i>Streptococcus pneumonia</i>	BPI.29, BPI.30, BPI.48, BPI.55, BPI.13, BPI.69
<i>Bacillus megaterium</i>	BPI.2, BPI.7, BPI.45, BPI.46, BPI.47, BPI.48
<i>Staphylococcus aureus</i>	BPI.7, BPI.8, BPI.10, BPI.13, BPI.30

30

##### 真菌

<i>Candida albicans</i>	BPI.30, BPI.13, BPI.29 BPI.48, BPI.2
-------------------------	---

40

これら実験の結果を、以下にまとめた。試験したBPIペプチドのいずれにも、*Serratia marcescens*（図11f）あるいは*Proteus mirabilis*（図11g）に対する殺菌活性は認められなかった。BPI.8は、約2000pmolにまで濃度を上げて、試験した生物に対する殺菌活性は認められなかった。BPI.13とBPI.30では、*Pseudomonas aeruginosa*（図11a）、*E. coli* O18:K1:H7（図11b）、*Klebsiella pneumoniae*（図11c）および*E. coli* O75（図11d）に対する殺菌活性は認められなかった。さらに、BPI.30は、*Salmonella typhurium*（図11h）、そして培地検定にて*E. coli* O86a:K51（図11j）と*E. coli* O4:K12（図11k）に対して殺菌活性を呈した。BPI.23は、放射拡散分析にて、*E. coli* O86a:K61（図11i）に対し

50

て殺菌活性を呈した。また、BPI.30は、ヒトの血清にて、E. coli O86a : K61 ( 図11l ) に対して殺菌活性を呈した。

本発明によって提供されたBPIペプチドの殺菌力を、グラム陽性細菌に対しても試験した。驚くべきことに、試験したBPIペプチドは、約20から約2000pmolの範囲の量にて、Staphylococcus aureus ( 図11e )、Streptococcus pneumonia ( 図11m )、Bacillus megaterium ( 図11n ) を用いた放射拡散分析にてある程度の殺菌活性を示した。これら結果は、抗生物質ゲンタマイシンならびにバンコマイシン ( 図11o ) の殺菌活性と匹敵していた。

最も驚くべきことに、あるペプチドBPI.13は、Candida albicans ( 図11pと11q ) を用いた培地検定にて、殺菌活性を示した。これら図面にあるように、BPI.13の活性は、BPI.2、BPI.29、BPI.30およびBPI.48よりもさらに低いレベルと明確に識別できる。これら結果は、本発明のBPI機能領域ペプチドが、天然BPIに関して先に報告された活性とは、質的に異なる抗微生物活性を有することを実証している。

#### 実施例17

##### BPI機能領域混合ペプチドのヘパリン中和活性

実施例14で調製したBPI機能領域混合ペプチドのin vitroならびにin vivoでのヘパリン中和力を、ヘパリン処置した血液および血漿の凝固時間に関するヘパリンの阻害効果を中和するこれらペプチドの性能を検定することにより決定した。

In vitroにて、BPI機能領域混合ペプチドの効果を、活性化局部トロンビン活性化時間 ( APTT ) のヘパリン介在による伸長に関して決定した。APTTは、治療のために投与したヘパリンのような、トロンビン形成の内因性あるいは外因性阻害体の存在によって長くなる。このように、ヘパリンの抗凝固効果を中和する薬剤は、試験によって測定したAPTTを短縮するであろう。クエン酸化したヒトの血漿 ( 200ml ) を、15  $\mu$  l の希釈剤 ( 0.15M塩化ナトリウム、0.1M Tris-HCl、pH7.4 ) あるいは25  $\mu$  g/mlのヘパリン ( 187単位/mg ) も含む15  $\mu$  l の希釈剤のいずれかと共に、37  $^{\circ}$  Cで、1分間インキュベートした。15  $\mu$  l の様々な濃度 ( 0.0から56  $\mu$  g/ml ) のrBPI<sub>23</sub>、rBPI<sub>21</sub> cys、あるいはBPI混合ペプチドBPI.29 ( DIIIホモ二量体 ) およびBPI.30 ( ヘテロ二量体DII+DIII ) を添加し、即座に、トロンビン試薬 ( カタログNo.845-4、Sigma Chemical社、セントルイス、ミズーリ州 ) の100  $\mu$  l を添加した。BBL Fibrometer ( Becton Dickenson Microbiology System社、コッキースビル、メリーランド州 ) を用いて凝固時間 ( トロンビン時間 ) を測定した。その結果を、図12a、12b および12eに示した。図12aは、ヘパリンにより伸長したAPTTに、rBPI<sub>23</sub>あるいはrBPI<sub>21</sub> cysの様々な量を添加して生じた相対減少を示している。これら結果は、これらBPI-関連タンパク質のそれぞれが、APTTのヘパリン介在による伸長を支持するものである。図12bは、BPI混合ペプチドBPI.29とBPI.30も、APTTのヘパリン介在による伸長を阻害することを示している。図12eは、非対数目盛でのBPI.30によって得られた結果を示す。図12gは、この検定におけるヘパリン処置した血液の凝固時間に関して、BPI.29、BPI.30およびBPI.7が最大の効果を呈することを示している。この検定におけるヘパリン処置した血液の凝固時間の減少に関して、BPI.3とrBPI<sub>23</sub>ではわずかなに、また、BPI.14、BPI.2、BPI.4、BPI.5、BPI.7、rBPI<sub>25</sub>、rBPIおよびrBPI<sub>21</sub> cysのすべてでは、ほとんど効果が認められなかった。

ヘパリン処置したラットでのAPTTに関する例示したBPI混合ペプチドのin vivo効果を決定し、rBPI<sub>23</sub>でのin vivo効果と比較した。APTTは、治療のために投与したヘパリンのような、トロンビン形成の内因性あるいは外因性阻害体の存在によって長くなる。ヘパリンの抗凝固効果を中和する薬剤は、この試験によって測定したAPTTを短縮するであろう。NIHのガイドラインに沿って飼育したSprague-Dawleyラットに、尾の静脈から丸薬の点滴静注によって100単位/kgのヘパリンを投与し、rBPI<sub>23</sub>と比較して量を変化させた試験タンパク質あるいは対照タンパク質を5分後に投与した。試験タンパク質あるいは対照タンパク質を投与して2分後に、腹部大動脈から採取した血液試料からAPTTを決定した。未処置動物ならびにBPIペプチドでのみ処置した動物のAPTTも決定した。図12cでは、局部トロンボプラスチン時間のヘパリン介在により伸長のrBPI<sub>23</sub>阻害の用量依存性を示し、約5 mg/kgの投与によれば、ヘパリン処置とBPI-処置した動物のAPTTは、未処置対照動物のそれとほと

10

20

30

40

50

んど同等であることを示している。BPI.10ペプチドの投与は、ヘパリン処置した動物でのAPTTが、BPI.10のみで処置した対照動物でのAPTTと実質的に同等であった。BPI.30を用いて同様の結果が得られた(図12f)。

これら結果は、BPI機能領域混合ペプチド(例えば、BPI.10とBPI.30)およびrBPI<sub>23</sub>が、凝固プロテアーゼのヘパリン阻害を効率良く中和することを示している。これら特徴に基づいて、本発明のBPI機能領域混合ペプチドは、プロタミン硫酸に関して推薦された一般的な用量にて、ヘパリン抗凝固効果を臨床的に中和する上で有用であると考えられるが、その物質が、降圧効果ならびにアナフィラキシー様効果までも備えることは期待できない。

#### 実施例18

##### BPI機能領域置換変異ペプチドの調製ならびに機能活性分析

機能領域IIおよびIIIから得たペプチドに関して得られた結果は、これらペプチドでの機能的に重要なアミノ酸をさらに決定する動機付けとなった。従って、ドメインIIおよびIのアミノ酸配列を含む一連のペプチドを、アラニン残基で置換した。置換実験に用いたドメインペプチドの詳細を、図13(ドメインII: IKISGKWKAKRFLK、配列番号: 7)と図14(ドメインIII: KSKVGWLIQLFHKK、配列番号: 13)に示した。これら一連のペプチドを、先の実施例ですでに述べた、Limulus遊走細胞溶解検定(LAL)にて、ヘパリン結合親和性(K<sub>d</sub>)、ヘパリン結合性(Hep-CAP)およびLPS中和活性を、そして、同じく先の実施例ですでに述べた、放射拡散分析(RAD)を用いたE. coli J5に対する殺菌活性を決定するために試験を行った。

表5(ドメインII)ならびに表6(ドメインIII)に示した結果は、BPI機能領域IIならびに機能領域IIIペプチドとそのアラニン置換変異ペプチドとの間での、これら分析(相対的相違としているLAL分析を除く)での活性の倍数単位の相違に関して表現してある。

ドメインIIペプチドでは、ほとんどのアラニン置換ペプチドで、放射拡散分析での殺菌活性が、約2から10倍減少した。この総合的なパターンの例外として、BPI.19(Gly<sub>89</sub> Ala<sub>89</sub>)、BPI.22(LyS<sub>92</sub> Ala<sub>92</sub>)、BPI.23(Gln<sub>94</sub> Ala<sub>94</sub>)、およびBPI.24(LyS<sub>95</sub> Ala<sub>95</sub>)がある。これとは対照的に、LAL分析では、ほとんどのアラニン置換ペプチドでは大差はなかったが、BPI.17(Ile<sub>87</sub> Ala<sub>87</sub>)、およびBPI.21(Trp<sub>91</sub> Ala<sub>91</sub>)では、この分析にて、活性の緩やかな減少と大幅な減少が認められた。BPI.21では、これら結果は、このペプチドの殺菌活性が10倍以上減少したと符合するものであり、また、91位のアミノ酸(自然配列でのトリプトファン残基)が、ペプチドの生物学的活性において特に重要であることを示すものである。

たいていの場合、ヘパリン結合性と結合力に関するアラニン置換の効果は、未置換ペプチドの2倍程度に満たないものである。一つの例外として、未置換ペプチドよりも4倍もの減少を示したBPI.21のヘパリン結合能力がある。このことは、これらペプチドの様々な活性の一つであるTrp<sub>91</sub>での置換に対する感受性に係る初期の結果を支持するものである。

たいていの場合、ヘパリン結合性ならびにヘパリン結合力双方のK<sub>d</sub>に関する効果は同様であり、また同じ大きさであった。ある事例では、K<sub>d</sub>がわずかに増大したり(BPI.18; Ser<sub>88</sub> Ala<sub>88</sub>)、あるいはわずかに減少したり(BPI.24)したものの、置換ペプチドのヘパリン結合力は減少した。K<sub>d</sub>が増大したり(BPI.20; Lys<sub>90</sub> Ala<sub>90</sub>)あるいは減少したり(BPI.19)しても、その結合力に変化が無かった事例もある。ある事例では、親和性が何らの影響も受けずに残存し、結合力がほぼ2倍減少したものがあつた(BPI.25; Arg<sub>96</sub> Ala<sub>96</sub>)。

これら結果は、ドメインII配列(Trp<sub>91</sub>)に少なくとも一つの重要な残基があり、ドメインIIペプチドの活性が、他のドメインIIアミノ酸残基のアラニン置換によって、ほとんどの部分が、最小限の影響しか受けていないことを示している。

ドメインIIIペプチドでは、ほとんどのアラニン置換ペプチドで、放射拡散分析での殺菌活性が、約2から5倍減少した。この総合的なパターンの例外として、BPI.35(Gly<sub>152</sub> Ala<sub>152</sub>)、BPI.39(Gln<sub>156</sub> Ala<sub>156</sub>)、BPI.42(His<sub>159</sub> Ala<sub>159</sub>)、およびBPI.44(Lys<sub>161</sub> Ala<sub>161</sub>)がある。LAL分析では、ほとんどのアラニン置換ペプチドでは大差はなかつ

10

20

30

40

50

たが、BPI.31 (Lys<sub>148</sub> Ala<sub>148</sub>)、BPI.32 (Trp<sub>149</sub> Ala<sub>149</sub>)、BPI.33 (Lys<sub>150</sub> Ala<sub>150</sub>)、およびBPI.34 (Val<sub>151</sub> Ala<sub>151</sub>)では、この分析にて緩やかなLPS結合活性が、また、BPI.36 (Trp<sub>133</sub> Ala<sub>133</sub>)およびBPI.40 (Leu<sub>157</sub> Ala<sub>157</sub>)では、この分析にて大きなLPS結合活性が認められた。BPI.36とBPI.40双方では、これら結果は、これらペプチドの殺菌活性が5倍以上減少したと符合するものであり、また、自然配列での疎水性のTrp<sub>153</sub>とLeu<sub>157</sub>が、ペプチドの生物学的活性において特に重要であることを示すものである。

ヘパリン結合性と結合力に関するアラニン置換の効果は、未置換ペプチドの5倍程度に満たない大きさである。ドメインIIアラニン置換ペプチドでの知見とは異なり、たいていの場合、ヘパリン結合性ならびにヘパリン結合力双方のK<sub>d</sub>に関するアラニン置換による効果のタイプは同様であり、また同じ大きさであった。ある事例 (BPI.42; His<sub>159</sub> Ala<sub>159</sub>) では、K<sub>d</sub>がわずかに減少しても (1.2倍)、ヘパリン結合力に変化が無かった。ある一つの事例のみで、ヘパリン結合性ならびにヘパリン結合力双方のK<sub>d</sub>はわずかに増大し (BPI.35; Gly<sub>152</sub> Ala<sub>153</sub>)、その増加率はわずか10%であった。

ドメインIIアラニン置換ペプチドでの結果と同様、ドメインIII配列に少なくとも一つの重要な残基 (Trp<sub>153</sub>) があり、また他に少なくとも一つの残基 (Leu<sub>157</sub>) の重要性が残されている。ドメインIIアラニン置換ペプチドとは異なり、この結果は、置換したもののほぼ半分が、試験で得られた活性において少なくとも2倍の差異があることを示している。6つの事例において、試験した4つの活性がすべて減少しており、また、10個の殺菌活性での事例において、ヘパリン結合性ならびにヘパリン結合力のK<sub>d</sub>が減少した。一つの事例 (BPI.35; Gly<sub>152</sub> Ala<sub>152</sub>) のみに、殺菌力、ヘパリン結合性K<sub>d</sub>、およびヘパリン結合力において、わずかではあるが、その活性の増大が認められた。

これら結果は、疎水性アミノ酸残基Trp<sub>91</sub>、Trp<sub>153</sub>およびLeu<sub>157</sub>のアラニン置換が、これらBPI機能領域置換ペプチドの活性に大きな効果を付与することを示すものである。この結果は、rBPI<sub>23</sub>のカチオン特性からして、予期できないものである。実際のところ、リシンがアラニンもしくはフェニルアラニンで置換されたドメインIIアラニン置換ペプチド (例えば、BPI.24、BPI.73) は、劇的な活性の向上を呈している。

表 5

## BPI ドメインIIアラニン置換ペプチド

		活性の倍数変化			
		RAD	LAL	HEPKd	HEPCAP
BPI.2	I K I S G K W K A Q K R F L K				
BPI.15	A	↓2.2	=	↓1.1	↓1.4
BPI.16	A	↓1.8	=	↓1.5	↓1.6
BPI.17	A	↓4.5	↓	↓1.3	↓1.8
BPI.18	A	↓1.6	=	↑1.1	↓1.3
BPI.19	A	↑1.4	=	↓1.3	=1.0
BPI.20	A	↓1.1	=	↑1.4	=1.0
BPI.21	A	↓10.4	↓ ↓	↓1.5	↓4.0
BPI.22	A	= 1.0	=	↓1.1	↓1.5
BPI.23	A	↑2.2	=	↑2.0	↑1.4
BPI.24	A	↑3.8	=	↓2.1	↑2.1
BPI.25	A	↓3.8	=	=1.0	↓1.9
BPI.26	A	↓4.0	=	↓1.5	↓1.8
BPI.27	A	↓2.5	=	↓1.7	↓1.7
BPI.28	A	↓2.4	=	↓1.3	↓1.3

表 6  
BPI ドメインIIアラニン置換ペプチド

		活性の倍数変化				
		RAD	LAL	HEPKd	HEPCAP	
BPI. 13	K S K V G W L I Q L F H K K					
BPI. 31	A	↓2.3	↓	↓3.9	↓1.8	
BPI. 32	A	↓1.5	↓	↓2.9	↓1.7	
BPI. 33	A	↓1.4	↓	↓2.0	↓1.6	
BPI. 34	A	↓2.2	↓	↑1.9	↓1.8	10
BPI. 35	A	↑1.5	=	↑1.1	↑1.1	
BPI. 36	A	↓4.9	↓ ↓	↓2.6	↓4.6	
BPI. 37	A	↓3.8	=	↓5.2	↓2.7	
BPI. 38	A	↓5.0	=	↓1.7	↓1.9	
BPI. 39	A	↑1.1	=	↓1.3	↓1.1	
BPI. 40	A	↑5.2	↓ ↓	↓1.8	↓2.3	
BPI. 41	A	↓4.3	=	↓2.1	↓3.1	
BPI. 42	A	↑2.2	=	↓1.2	= 1.0	
BPI. 43	A	↓1.3	=	↓2.0	↓1.3	
BPI. 44		↑1.2	=	↓1.7	↓1.1	20

実施例19

BPI機能領域ペプチドの生物学的活性の要旨

ペプチドの構成種類別の分布を、以下の表7に記した。

本発明のBPI機能領域ペプチドあるいはその典型的なサブペプチドを、以下の生物学的活性、すなわち、グラム陰性ならびにグラム陽性細菌、および他の特定の微生物に対する殺菌活性、LPS結合性ならびにLPS中和活性、およびヘパリン結合性ならびにヘパリン中和活性について分析した。

BPI機能領域ペプチドを、実施例8および6のそれぞれに記載したE. coli J5細菌に関する殺菌活性ならびにヘパリン中和活性について分析した。グラム陰性細菌E. coli J5(ラフ)ならびにE. coli 0113(スムーズ)およびグラム陽性細菌S. aureusに対する、本発明の例示的に示したペプチドに関する分析の結果を表8に示した。殺菌活性は、30mm<sup>2</sup>の殺菌面積を生成するのに必要なペプチドの量(pmol/ウェルおよびμg/ウェル)として表現した。

表 7

<u>BPI ペプチド</u>	<u>配列番号</u>	<u>ペプチド配列</u>	
I. BPI 機能領域ペプチド			
<u>ドメイン I ペプチド</u>			
BPI. 1	4	QQGTAALQKELKRIK	
BPI. 4	3	LQKELKRIKIPDYSDSPFKIKHL	10
BPI. 14	2	GTAALQKELKRIKIPDYSDSPFKIKHLGKGH	
BPI. 54	5	GTAALQKELKRIKIP	
<u>ドメイン II ペプチド</u>			
BPI. 2	7	IKISGKWKAKQRFLK	
BPI. 3	11	NVGLKFSISNANIKISGKWKAKQRRLK	
BPI. 8	8	KWKAQRFLK	
<u>ドメイン III ペプチド</u>			
BPI. 5	67	VHVHISKSKVGWLIQLFHKKIE	
BPI. 11	13	KSKVWLIQLFHKK	
BPI. 12	14	SVHVHISKSKVGWLIQLFHKKIESALRNK	20
BPI. 13	15	KSKVGWLIQLFHKK	
BPI. 55	61	GWLIQLFHKKIESALRNKMNS	
II. 線状および分枝状混合ペプチド			
<u>ドメイン II ペプチド</u>			
BPI. 7	54	KWKAQRFLKKWKAQRFLK	
BPI. 9	51	KRFLKKWKAQRFLK	
BPI. 10. 1	55	KRFLKKWKAQRFLKKWKAQRFLK	
BPI. 10. 2	65	QKRFLKKWKAQRFLKKWKAQRFLK	
MAP. 1		$\beta$ -Ala-N $\alpha$ , Ne-[N $\alpha$ -Ne(BPI. 2)Lys]Lys	30

表 7 (続き)

BPI ペプチド	配列番号	ペプチド配列	
II. 線状および分枝状混合ペプチド (続き)			
ドメインIIIペプチド			
BPI. 29	56	KSKVGWLIQLFHKKKSKVGWLIQLFHKK	
MAP. 2		$\beta$ -Ala-N $\alpha$ , Ne-[N $\alpha$ -Ne(BPI. 13)Lys]Lys	10
III. アミノ酸置換ペプチド			
ドメインIIペプチド			
BPI. 15	16	AKISGKWKQAQRFLK	
BPI. 16	17	IAISGKWKQAQRFLK	
BPI. 17	18	IKASGKWKQAQRFLK	
BPI. 18	19	IKIAGKWKQAQRFLK	
BPI. 19	20	IKISAKWKQAQRFLK	
BPI. 20	21	IKISGAWKQAQRFLK	
BPI. 21	22	IKISGKAKAQRFLK	20
BPI. 22	23	IKISGKWAAQRFLK	
BPI. 23	24	IKISGKWKAQRFLK	
BPI. 24	25	IKISGKWKAQARFLK	
BPI. 25	26	IKISGKWKAQKAFK	
BPI. 26	27	IKISGKWKAQKRALK	
BPI. 27	28	IKISGKWKAQKRFAK	
BPI. 28	29	IKISGKWKAQKRFLA	
BPI. 61	48	IKISGKFKAQKRFLK	
BPI. 73	62	IKISGKWKAQFRFLK	
BPI. 77	72	IKISGKWKAQWRFLK	30
BPI. 79	73	IKISGKWKAQRFLK	
BPI. 81	75	IKISGKWKAQKRFLK	

表 7 (続き)

<u>BPI ペプチド</u>	配列番号	ペプチド配列	
Ⅲ. 一アミノ酸置換ペプチド (続き)			
<u>ドメインⅢペプチド</u>			
BPI. 31	33	ASKVGWLIQLFHKK	
BPI. 32	34	KAKVGWLIQLFHKK	10
BPI. 33	35	KSAVGWLIQLFHKK	
BPI. 34	36	KSKAGWLIQLFHKK	
BPI. 35	37	KSKVAWLIQLFHKK	
BPI. 36	38	KSKVGALIQLFHKK	
BPI. 37	39	KSKVGWAIQLFHKK	
BPI. 38	40	KSKVGWLAQLFHKK	
BPI. 39	41	KSKVGWLIALFHKK	
BPI. 40	42	KSKVGWLIQAFHKK	
BPI. 41	43	KSKVGWLIQLAHKK	
BPI. 42	44	KSKVGWLIQLFAKK	20
BPI. 43	45	KSKVGWLIQLFHAK	
BPI. 44	46	KSKVGWLIQLFHKA	
BPI. 82	76	KSKVGWLIQLWHKK	
BPI. 85	79	KSKVLWLIQLFHKK	
BPI. 86	80	KSKVGWLIILFHKK	
BPI. 87	81	KSKVGWLIQLFLKK	
BPI. 91	86	KSKVGWLIQLFHKK	
BPI. 92	87	KSKVGWLIKLFHKK	
BPI. 94	89	KSKVGWLIQLFFKK	
BPI. 95	90	KSKVFWLIQLFHKK	30
BPI. 96	91	KSKVGWLIQLFHKF	
BPI. 97	92	KSKVKWLIQLFHKK	

表 7 (続き)

<u>BPI ペプチド</u>	<u>配列番号</u>	<u>ペプチド配列</u>	
IV. ニアミノ酸置換ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 45	31	IKISGKWKAAARFLK	
BPI. 56	47	IKISGKWKAKQRFLK	10
BPI. 59	30	IKISGAWAAQKRFLK	
BPI. 60	32	IAISGKWKAKQRFLA	
BPI. 88	82	IKISGKWKAFRRFLK	
<u>ドメインIIIペプチド</u>			
BPI. 100	94	KSKVKWLIKLFHKK	
Va. ニアミノ酸置換／混合ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 46	57	KWKAAARFLKKWKAQKRFLK	20
BPI. 47	58	KWKAQKRFLKKWKAARFLK	
BPI. 48	59	KWKAAARFLKKWKAARFLK	
Vb. 多重アミノ酸置換／混合ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 69	60	KWKAAARFLKKWKAARFLKKWKAARFLK	
BPI. 99	93	KWKAQWRFLKKWKAQWRFLKKWKAQWRFLK	
BPI. 101	95	KSKVKWLIKLFKFKSKVKWLIKLFKFK	
VIa. 不定型アミノ酸置換ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 66	49	IKSGKWDKAQKRFLK	
BPI. 67	50	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQKRFLK	
BPI. 70	63	IKISGKWA $\beta$ -(3-ピリジル)QKRFLK	30

表 7 (続き)

<u>BPI ペプチド</u>	<u>配列番号</u>	<u>ペプチド配列</u>	
VIa. 不定型アミノ酸置換ペプチド (続き)			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 71	66	ADADIKISGKWKQAQKRFLK	
BPI. 72	64	IKISGKWKQAQKRA $\beta$ -(3-ピリジル)	10
BPI. 76	71	IKISGKWKQAQFDRFLK	
BPI. 80	74	IKISGKWKQAQA $\beta$ -(1-ナフチル)RFLK	
<u>ドメインIIIペプチド</u>			
BPI. 83	77	KSKVGA $\beta$ -(1-ナフチル)LIQLFHKK	
VIb. 不定型アミノ酸二置換ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 84	78	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLK	
BPI. 89	84	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAFKRFLK	20
VIc. 不定型アミノ酸多重置換ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 90	85	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAFPRFLK	
VII. 環状ペプチド			
<u>ドメインIIペプチド</u>			
BPI. 58	9	CIKISGKWKQAQKRFLK	
BPI. 65 (酸化)10		CIKISGKWKQAQKRFLKC	

表 7 (続き)

BPI ペプチド	配列番号	ペプチド配列	
VII. 環状ペプチド			
ドメインIIペプチド			
BPI. 65 (還元)	10	CIKISGKWKAKRFLKC	10
VIIIa. ドメイン間混合ペプチド			
ドメインII-ドメインIIIペプチド			
BPI. 30	52	KWKAQKRFLKSKVWLIQLFHKK	
BPI. 63	53	IKISGKWKAKRFLKSKVWLIQLFHKK	
BPI. 74	70	KSKVWLIQLFHKKWKAKRFLK	
VIIIb. ドメイン間混合多重置換ペプチド			
ドメインII-ドメインIIIペプチド			
BPI. 102	96	KWKAQFRFLKSKVWLIQLFHKK	20
VIIIc. 不定型アミノ酸二置換/ドメイン間混合ペプチド			
ドメインII-ドメインIIIペプチド			
BPI. 93	88	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLKSKVWLIQLFHKK	
BPI. 98	83	IKISGKA $\beta$ -(1-ナフチル)KAQFRFLKSKVWLIQLFHKK	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ペプチド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 1	— <sup>b</sup>	—	—	—	—	—	10
BPI. 2	>2733.5	>5	—	—	—	—	
BPI. 3	696	2.14	—	—	N. T. <sup>c</sup>	N. T.	
BPI. 4	—	—	—	—	—	—	
BPI. 5	398	1.05	>1904	>5	N. T.	N. T.	
BPI. 6	—	—	—	—	—	—	
BPI. 7	175	0.46	>1890.6	>5	>1890.6	>5	20
BPI. 8	>3797.1	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 9	479	1.02	>2345.9	>5	N. T.	N. T.	
BPI. 10	102	0.41	697	2.76	N. T.	N. T.	
BPI. 11	638	1.06	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 12	525	1.78	—	—	N. T.	N. T.	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

<u>BPI ベナド</u>	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 13	441	0.75	>2923.9	>5	>2923.9	>5	10
BPI. 14	—	—	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 15	>2797.8	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 16	>2821.5	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 17	>2807.2	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 18	>2757.6	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 19	>2712.8	>5	—	—	N. T.	N. T.	20
BPI. 20	>2821.5	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 21	>2917	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 22	>2821.50	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 23	1330	2.36	>2821.15	>5	N. T.	N. T.	
BPI. 24	655	1.16	>2821.50	>5	N. T.	N. T.	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ペナシド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 25	>2866.8	>5	—	—	N. T.	N. T.	10
BPI. 26	>2852.1	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 27	>2797.8	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 28	>2821.5	>5	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 29	442	1.5	>1469.2	>5	>1469.2	>5	
BPI. 30	76	0.23	608	1.84	1216	3.68	
BPI. 31	938	1.55	—	—	N. T.	N. T.	20
BPI. 32	614	1.04	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 33	575	0.95	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 34	916	1.54	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 35	263	0.45	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 36	1652	2.64	—	—	N. T.	N. T.	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ベナチド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>			
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)		
BPI. 37	1284	2.14	—	—	N. T.	N. T.	10	
BPI. 38	1698	2.83	—	—	N. T.	N. T.		
BPI. 39	316	0.52	—	—	N. T.	N. T.		
BPI. 40	1760	2.94	—	—	N. T.	N. T.		
BPI. 41	2465	4.03	—	—	N. T.	N. T.		
BPI. 42	265	0.44	>3041.3	>5	N. T.	N. T.		
BPI. 43	729	1.21	>3024.8	>5	N. T.	N. T.		20
BPI. 44	481	0.8	2983	4.93	N. T.	N. T.		
BPI. 45	1302	2.23	>1696.7	>5	>1696.7	>5		
BPI. 46	186	0.47	>1811.2	>5	>1811.2	>5		
BPI. 47	98	0.25	577	1.46	>2461.9	>5		
BPI. 48	42	0.1	254	0.61	>1390.4	>5		

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ベチド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> 0111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 49	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	10
BPI. 50	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 51	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 52	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 53	—	—	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 54	—	—	—	—	N. T.	N. T.	
BPI. 55	299	0.75	>1592.2	>5	>1592.2	>5	20
BPI. 56	1387	2.54	—	—	—	—	
BPI. 57	514	1.05	—	—	—	—	
BPI. 58	1050	2.03	—	—	—	—	
BPI. 59	>2312.3	>5	—	—	—	—	
BPI. 60	>2136.5	>5	—	—	—	—	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ベクター	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 61	>2093.5	>5	—	—	—	—	10
BPI. 62	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 63	87	0.31	512	1.8	>1006.3	>5	
BPI. 64	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 65 酸化	895	1.82	—	—	>3118	>5	
BPI. 65 還元	1362	2.77	—	—	—	—	
BPI. 66	>3496.7	>5	—	—	—	—	20
BPI. 67	>1901.8	>5	—	—	—	—	
BPI. 68	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 69	57	0.21	244	0.88	1058	3.83	
BPI. 70	—	—	—	—	—	—	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ペナド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 71	2297	4.53	—	—	—	—	10
BPI. 72	>1911.2	>5	—	—	—	—	
BPI. 73	57	0.11	>1810.9	>5	>1810.9	>5	
BPI. 74	732	2.21	>2148.2	>5	>2148.2	>5	
BPI. 75	2030.8	4.96	—	—	>2030.8	>5	
BPI. 76	>3906.5	>5	—	—	—	—	
BPI. 77	455	0.85	—	—	1684.5	3.15	20
BPI. 78	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	
BPI. 79	>2282.9	>5	—	—	—	—	
BPI. 80	655	1.24	—	—	>1975.4	>5	
BPI. 81	284	0.52	>2344.9	>5	>2344.9	>5	
BPI. 82	171	0.32	>1197.8	>5	>1197.8	>5	

表 8  
殺菌活性\*

BPI ベナチド	<u><i>E. coli</i> J5</u>		<u><i>E. coli</i> O111:B4</u>		<u><i>S. aureus</i></u>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 83	155	0.27	>2033.5	>5	>2033.5	>5	10
BPI. 84	12	0.02	>2016.9	>5	>2016.9	>5	
BPI. 85	227	0.4	>1881.2	>5	>1881.2	>5	
BPI. 86	1520	2.58	—	—	>2048.5	>5	
BPI. 87	189	0.32	>1535.8	>5	>1535.8	>5	
BPI. 88	70.32	0.13	540.15	1	>2380.0	>5	
BPI. 89	229.09	0.43	>1882.4	>5	>1882.4	>5	20
BPI. 90	83.11	0.16	1763	3.32	>1863.3	>5	
BPI. 91	>3843.5	>5	—	—	—	—	
BPI. 92	331.8	0.57	—	—	—	—	
BPI. 93	212.87	0.76	>980.3	>5	—	—	
BPI. 94	922.54	1.59	>922.5	>5	>922.5	>5	

表 8  
殺菌活性<sup>a</sup>

BPI ペプチド	<i>E. coli</i> J5		<i>E. coli</i> O111:B4		<i>S. aureus</i>		
	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	(pmol/ウェル)	( $\mu$ g/ウェル)	
BPI. 95	330.88	0.6	>1397.6	>5	—	—	10
BPI. 96	378.33	0.65	>2048.5	>5	>2048.5	>5	
BPI. 97	296.58	0.53	—	—	—	—	
BPI. 98	>1626.1	>5	>1626.1	>5	>1626.1	>5	
BPI. 99	722.9	2.99	>1064.1	>5	>1064.1	>5	
BPI. 100	407.74	0.73	>2655	>5	—	—	
BPI. 101	1329.3	4.79	>1329.3	>5	>1329.3	>5	20
BPI. 102	>2635.6	>5	>2635.6	>5	—	—	
MAP. 1	106	0.82	552.79	4.27	>647.5	>5	
MAP. 2	>690.9	>5	>690.9	>5	>690.5	>5	

a 実施例15および16に記載のプロビット分析によって決定した30mm<sup>2</sup>の大きさに至るまでウェルに添加した量。

b 5  $\mu$ g/ウェルの濃度で検出可能な活性は得られなかった。

c N.T. = 試験せず。

rBPI<sub>23</sub>と等モルのBPI.84が、*E. coli* J5細菌に対する殺菌活性を呈することが認められた。

本発明のBPI機能領域ペプチドのヘパリン結合性実験の結果を、図15a-15eならびに図16に示し、また、ヘパリン結合データが親和性(nM)と結合能力(ng)で表現した表9に示した。ヘパリン濃度の上昇に対して結合したヘパリンの量を記入し、非直線最小二乗法(Gr aFit, v.2.0, Erithacus Software, ロンドン、英国)による標準化方程式にデータを当てはめることで、結合定数(K<sub>d</sub>)と結合力を算出した。

表 9

BPI ペプチド	ヘパリン親和性	ヘパリン結合性	
	(nM)	(ng)	
BPI.1	結合せず	結合せず	
BPI.2	346.5	203.6	10
BPI.3	780.8	264.5	
BPI.4	335.6	80.8	
BPI.5	193.4	177.6	
BPI.7	908.0	405.6	
BPI.8	573.8	92.2	
BPI.9	1141.4	212.5	
BPI.10	915.7	548.9	
BPI.11	743.9	290.5	
BPI.12	284.6	231.5	
BPI.13	984.5	369.1	20
BPI.14	396.4	119.3	
BPI.15	315.0	145.4	
BPI.16	231.0	127.25	
BPI.17	266.5	113.1	
BPI.18	381.2	156.6	
BPI.19	266.5	203.6	
BPI.20	485.1	203.6	
BPI.21	231.0	50.9	
BPI.22	315.0	135.7	
BPI.23	693.0	285.0	30
BPI.24	165.0	427.6	
BPI.25	346.5	107.2	
BPI.26	231.0	113.1	

表 9 (続き)

BPI ペプチド	ヘパリン親和性	ヘパリン結合性	
	(nM)	(ng)	
BPI. 27	203.8	119.8	
BPI. 28	266.5	156.6	10
BPI. 29	427.4	463.7	
BPI. 30	592.2	499.4	
BPI. 31	252.4	205.1	
BPI. 32	339.5	217.1	
BPI. 33	492.2	230.7	
BPI. 34	518.2	205.1	
BPI. 35	1083.0	406.0	
BPI. 36	378.7	80.2	
BPI. 37	189.3	136.7	
BPI. 38	579.1	194.3	20
BPI. 39	757.3	335.6	
BPI. 40	546.9	160.5	
BPI. 41	468.8	119.1	
BPI. 42	820.4	369.1	
BPI. 43	492.3	283.9	
BPI. 44	579.1	335.6	
BPI. 45	152.6	160.7	
BPI. 46	1067.0	321.1	
BPI. 47	1911.0	576.4	
BPI. 48	1415.0	442.3	
BPI. 54	237.4	64.3	30
BPI. 55	367.6	166.1	
BPI. 56	114.6	135.5	

表 9 (続き)

BPI ペプチド	ヘパリン親和性	ヘパリン結合性	
	(nM)	(ng)	
BPI.58	194.0	231.2	
BPI.59	174.9	106.7	10
BPI.60	64.8	120.3	
BPI.61	58.3	85.2	
BPI.63	599.8	305.1	
BPI.65 (酸化)	159.5	190.6	
BPI.65 (還元)	216.0	279.6	
BPI.66	295.7	111.6	
BPI.67	107.8	250.4	
BPI.69	967.1	450.8	
BPI.70	145.2	59.2	
BPI.71	75.6	158.9	20
BPI.72	145.2	102.8	
BPI.73	227.2	413.4	
BPI.74	218.1	207.3	
BPI.75	96.0	119.8	
BPI.76	127.9	144.4	
BPI.77	301.9	581.7	
BPI.79	199.4	110.2	
BPI.80	135.6	210.3	
BPI.81	334.7	318.4	
BPI.82	427.2	163.1	
BPI.83	409.9	253.3	30
BPI.84	1003.2	329.2	
BPI.85	682.4	233.1	

表 9 (続き)

BPI ペプチド	ヘパリン親和性	ヘパリン結合性	
	(nM)	(ng)	
BPI. 86	383.1	208.4	
BPI. 87	575.0	280.0	10
BPI. 88	1629.0	352.8	
BPI. 89	1199.4	252.8	
BPI. 90	1231.7	274.8	
BPI. 91	288.1	181.2	
BPI. 92	667.1	227.3	
BPI. 93	386.7	291.5	
BPI. 94	406.9	216.1	
BPI. 95	551.2	224.5	
BPI. 96	468.8	203.8	
BPI. 97	765.4	252.2	20
BPI. 98	683.3	1678.4	
BPI. 99	9097.7	971.4	
BPI. 100	2928.9	314.0	
BPI. 101	1905.0	210.9	
BPI. 102	4607.8	535.2	
MAP. 1	936.8	459.1	
MAP. 2	785.5	391.2	
セクロピン	395.3	242.0	
マガイニン	3174.6	453.7	30
PMB ペプチド	309.42	58.01	
LALF	1294.1	195.3	

既定変数としての殺菌活性および予定変数としてのヘパリン結合力と親和性 ( $K_d$ ) を用いて多重回帰解析を行って、代表的なBPI機能領域ペプチド間の関連性を研究した。この解析にて、ヘパリン結合力のみが、殺菌活性と顕著に関連していること (ヘパリン結合力、 $p = 0.0001$ 、およびヘパリン親和性、 $p = 0.6007$ ) が示された。換言すれば、ペプチドが最大量結合するヘパリンの量 (すなわち、結合力) は、殺菌活性と密接な関連性を有しており、また、ヘパリン滴定 (すなわち、親和性) にて50%飽和に達するまでの時間と関連しないのである。LPS結合拮抗性ならびに中和活性に関するデータから、ヘパリン結合力から殺菌活性が最も容易に予測できることも明らかとなった。例えば、BPI. 7、BPI. 29、

BPI. 30、BPI. 46、BPI. 47、BPI. 48、BPI. 63、BPI. 65 (還元)、BPI. 69、BPI. 73、BPI. 58、MAP. 1 およびMAP. 2 は、非常に大きなヘパリン結合力を呈するだけでなく、高い殺菌活性も有していた。多重抗原性ペプチド (MAPペプチド) は、Posnett and Tam, 1989, *Methods in Enzymology* 178, 739-746に記載された分枝リシン核に関する多重結合のペプチドである。これとは逆に、BPI. 2、BPI. 4、BPI. 8、BPI. 14、BPI. 53およびBPI. 54のヘパリン結合力は小さく、よって、殺菌活性はほとんどあるいは全く認められない。BPI機能領域混合ペプチドBPI. 30 (ドメインII - ドメインIIIペプチドを含む) ならびにBPI. 74 (ドメインIII-ドメインIIペプチドを含む) を、グラム陰性ならびにグラム陽性細菌に対する殺菌活性、およびヘパリン結合性ならびに中和活性に関して比較を行った。これらの結果は、混合ペプチドの構成順序を変えることで、相対活性レベルの変化が確認され

40

50

た。例えば、BPI.74は、BPI.30と比較して、殺菌活性が大きく減少していた。具体的には、BPI.74はE. coli J5細菌に対する殺菌活性が10倍も低く、E. coli O111 : B4細菌に対する殺菌活性では50倍の低さ、そして、S. aureusに対する殺菌活性は3.5倍の低さであった。ヘパリン結合力が2倍低下したこと、ならびにヘパリン親和性が2倍増大したことも観察された。

他の殺菌性ならびに内毒素結合性タンパク質も、ヘパリン結合力について試験した。セクロピンA、マガイニンIIアミド、ポリミキシンBペプチド、およびLimulus抗-LPS因子(LALF)を、実施例3に記載の直接ヘパリン結合検定法にて分析した。マガイニンIIアミド(Sigma社、セントルイス、ミズーリ州)は、セクロピンA(Sigma社、242ng/2 $\mu$ g,  $K_d$ =395nM)、LALF(Assoc. of Cape Cod、ウッズホール、マサチューセッツ州、195.3ng/2 $\mu$ gペプチド,  $K_d$ =1.29 $\mu$ M)、およびPMBペプチド(Bachem Biosciences社、フィラデルフィア、ペンシルベニア州、58.0ng/2 $\mu$ gペプチド,  $K_d$ =309mM)と比較して、極めて高いヘパリン結合力を示した(437.7ngヘパリン/2 $\mu$ gペプチド,  $K_d$ =3.17 $\mu$ M)。マガイニンIIアミドは、第8、13および15位がアラニンで置換された、マガイニン天然配列の置換変異体である。マガイニンIIアミドは、その天然配列よりも、小さな溶血活性を有していると報告されている。

上記した結果は、BPIペプチドのデータにより実証されたヘパリン結合性、LPS結合性、および殺菌活性との間の関連性を示唆するものであり、他のLPS結合性タンパク質もヘパリンに結合することを示唆するものである。より活性な殺菌性タンパク質である、セクロピンAとマガイニンIIアミドは相応じて、他の一連のLPS結合性タンパク質の中でも最高のヘパリン結合力を有している。

BPI機能領域ペプチドの付加変異体のあるタイプは、BPI機能領域ペプチドのアミノあるいはカルボキシ末端のいずれかに、D-アラニン-D-アラニンを組み込んだものである。この方法によれば、D-アラニンを付加することで、グラム陽性細菌に大きな殺菌活性を付与できる。グラム陽性細菌での細胞壁の生合成は、D-アラニン-D-アラニンに特異的に結合し、利用するトランスペプチド反応を含む。ペニシリンのような $\beta$ -ラクタム抗生物質は、効率良くこれと同じ反応を阻害する。活性殺菌性ペプチドへのD-アラニン-D-アラニン組み込みは、グラム陽性細菌の活発の成長している細胞壁をペプチドの目標とすべきである。

BPI機能領域ペプチドのドメインII置換において、Ly<sub>95</sub>をアラニンで置換することにより(BPI.24)、予想もしない改善が認められた。引き続き第95位のフェニルアラニンを置換することで(BPI.73)、アラニン置換体と比較して改善された活性が認められた。驚くべきことに、D-Pheで95位を置換したもの(BPI.76)は、出発ペプチド(BPI.2)よりも低レベルの活性にまで、劇的に減少した。この異性体効果は、このペプチドの相互作用が立体特異的であり、BPI.73がBPI.76と比較してより活性な立体配座に適合できることを示すものである。かような立体特異性、特に、他の残基でこの現象が研究された後でのこの立体特異性は、薬作用発生団の開発のための重要な決定を促す。

本明細書で定義したBPIの機能領域から誘導したペプチドは、疎水性アミノ酸(特に、トリプトファン)が至適活性を得る上で最も重要であると決定するための利用されてきた。この知見は、BPIのカチオン性からして予想できないものである。実際のところ、ドメインIIでは、リシンがアラニンあるいはフェニルアラニンで置換された場合、その活性は劇的に増大する(BPI.24、BPI.73)。機能領域ペプチドを組み合わせることで、最も活性のある置換ペプチドを三つのドメインから選択したものの組み合わせを含めて、各ペプチドの活性強度は増大される。

新たに合成したペプチドそれぞれの純度を、VVDAC C-18カラム(25cm $\times$ 4.6mm、5 $\mu$ m粒径、30nm孔径、Separation Group社、ヘスペリア、カリフォルニア州)を用いた分析用逆相HPLCによって決定した。水中の5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を移動相Aとし、また、80%アセトニトリル/0.065%TFAを移動相Bとして、HPLCを実施した。溶出物を、分光光度計を用いて、220nmにて測定した。流速は、1.0ml/分であった。勾配溶出条件は、各ペプチドが好適に分解されるように選択した。純度を、全ピーク面積に

10

20

30

40

50

占める主要ピークの面積の割合で表現した（表10参照）。新たに合成したペプチドの純度と同定を、VG Biotech Bio-Q質量分析計を用いて電子噴射イオン化質量分析によって決定した。表10には、質量分析ならびにHPLCによる、例示的に示した本発明のペプチドの純度解析の結果のまとめを示した。

表 10

ペプチド番号	タンパク質 アミノ酸部分	MS% 純度	HPLC% 純度	
BPI. 1	19-33	—	—	10
BPI. 2	85-99	57	37.2	
BPI. 3	73-99	—	—	
BPI. 4	25-46	—	—	
BPI. 5	42-163	—	—	
BPI. 6	112-127	—	—	
BPI. 7	(90-99)x2	69	40.9	
BPI. 8	90-99	79	—	
BPI. 9	95-99, 90-99	—	—	
BPI. 10	94-99, 90-99, 90-99 と 93-99, 90-99, 90-99	—	—	
BPI. 11	148-151, 153-161	—	—	
BPI. 12	141-169	—	—	30
BPI. 13	148-161	78	69	
BPI. 13P	148-161	100	98	
BPI. 14	21-50	—	13, 3	
BPI. 15	85-99, A@85(I)	66	57.6	
BPI. 16	85-99, A@86(K)	—	84.1	
BPI. 17	85-99, A@87(I)	86	77, 67	
BPI. 18	85-99, A@88(S)	66	70	
BPI. 19	85-99, A@88(G)	—	69	
BPI. 20	85-99, A@90(K)	—	66	
BPI. 21	85-99, A@91(W)	68	65.8	

表 10 (続き)

ペプチド番号	タンパク質 アミノ酸部分	MS% 純度	HPLC% 純度	
BPI. 23	85-99, A@94(Q)	—	69	
BPI. 24	85-99, A@95(K)	—	67	10
BPI. 25	85-99, A@96(R)	—	73	
BPI. 26	85-99, A@97(F)	—	73	
BPI. 27	85-99, A@98(L)	—	65	
BPI. 28	85-99, A@99(K)	—	80	
BPI. 29	(148-161)x2	—	—	
BPI. 30	90-99, 148-161	—	21	
BPI. 30-P	90-99, 148-161	95	98	
BPI. 31	148-161, A@148(K)	—	68	
BPI. 32	148-161, A@149(S)	—	70	
BPI. 33	148-161, A@150(K)	—	58	20
BPI. 34	148-161, A@151(V)	—	51	
BPI. 35	148-161, A@152(G)	—	72	
BPI. 36	148-161, A@153(W)	—	64	
BPI. 37	148-161, A@154(L)	—	51	
BPI. 38	148-161, A@155(I)	—	70	
BPI. 39	148-161, A@156(Q)	—	53	
BPI. 40	148-161, A@157(L)	—	53	
BPI. 41	148-161, A@158(F)	—	63	
BPI. 42	148-161, A@159(H)	—	59	
BPI. 43	148-161, A@160(K)	—	53	
BPI. 44	148-161, A@161(K)	—	70	30
BPI. 45	85-99, A@94(Q)&95K	71	46	
BPI. 46	(99-90)x2, A@1st94(Q)&95(K)	67	47	

表 10 (続き)

ペプチド番号	タンパク質 アミノ酸部分	MS% 純度	HPLC% 純度	
BPI.47	(90-99)x2, A @ 2d 94(Q)&95(K)	57	34	
BPI.48	(90-99)x2, A @ both 94(Q)&95(K)	68	33	10
BPI.54	21-35	—	—	
BPI.55	152-172	—	—	
BPI.56	85-99, K @ 94(Q)& Q @ 95(K)	—	55	
BPI.58	Cys-85-99	49	25.7	
BPI.59	85-99, A @ 90(K)&92(K)	56	30.3	
BPI.60	85-99, A @ 86(K)&99(K)	57	78.3	
BPI.61	85-99, F @ 91(W)	60	59.8	
BPI.63	85-99, 148-161	38	31.3	
BPI.65	還元 Cys-85-99-Cys	41	22, 34	20
BPI.65	酸化 Cys-85-99-Cys	—	—	
BPI.66	85-99, WD @ 91(W)	—	—	
BPI.67	85-99, $\beta$ -(1-naphthyl)-A @ 91	65	52	
BPI.69	[90-99, A @ 94(Q)& 95(K)]x3	44	54, 40	
BPI.70	85-99, $\beta$ -(3-pyridyl)-A @ 91	66	54	
BPI.71	AD-AD-85-99	—	60	
BPI.72	85-99, $\beta$ -(3-pyridyl)-A @ 97(F)	—	52	30
BPI.73	85-99, F @ 95(K)	—	44, 39	
BPI.74	148-161, 90-99	—	29	
BPI.75	KKRAISFLGKKWQK	—	32	
BPI.76	85-99, FD @ 95(K)	—	39	

表 10 (続き)

ペプチド番号	タンパク質 アミノ酸部分	MS% 純度	HPLC% 純度	
BPI.77	85-99, W @ 95(K)	—	38	
BPI.79	85-99, K @ 94(Q)	—	48	10
BPI.80	85-99, $\beta$ -(1-naphthyl)-A @ 95(K)	—	44	
BPI.81	85-99, F @ 94(Q)	—	33, 35	
BPI.82	148-161, W @ 158(F)	—	58	
BPI.83	148-161, $\beta$ -(1-naphthyl)-A @ 153(W)	—	63	
BPI.84	85-99, $\beta$ -(1-naphthyl)A @ 91(W) & F @ 95(K)	—	50	
BPI.85	148-161, L @ 152(G)	—	74	
BPI.86	148-161, L @ 156(Q)	—	51	20
BPI.87	148-161, L @ 159(H)	—	63	
BPI.88	85-99, F @ 94(Q) & 95(K)	—	50	
BPI.89	85-99, $\beta$ -(1-naphthyl)A @ 91(W) & F @ 94(Q)	—	50	
BPI.90	85-99, $\beta$ -(1-naphthyl)A @ 91(W), F @ 94(Q) & 95(K)	—	63	
BPI.91	148-161, F @ 156 (Q)	—	31	
BPI.92	148-161, K @ 156(Q)	—	50	
BPI.93	85-99 148-161 $\beta$ -(1-naphthyl)A @ 91(W), F @ 95(K)	—	38	30
BPI.94	148-161, F @ 159(H)	—	59	
BPI.95	148-161, F @ 152 (G)	—	57	
BPI.96	148-161, F @ 161 (K)	—	60	

表 10 (続き)

ペプチド番号	タンパク質 アミノ酸部分	MS% 純度	HPLC% 純度	
BPI.97	148-161, K @ 161 (G)	—	67	
BPI.98	90-99, β-(1-naphthyl)A @ 91 (W), F @ 95 (K)+91	—	31	10
BPI.99	[90-99, W @ 95 (K)]x3	—	—	
BPI.100	148-161, K @ 152(G) & 156(Q)	—	—	
MAP.1	βAla-N α, N ε -[N α, N ε (BPI.2)1Lys]Lys	54	多重 ピーク	
MAP.2	βAla-N α, N ε -[N α, N ε (BPI.13)1Lys]Lys	49	多重 ピーク	20

BPI.13ならびに他の選択したペプチドを、半調製逆相VYDAC C-18カラム (25cm x 10mm、10 μm粒径、30nm孔径) を用いて精製した。BPIを精製するために、以下の勾配を用いた。すなわち、流速2.0ml/分にて、26.7% B から33% B。BPI.13を移動相 A に8.8mg/mlの濃度で溶解し、0.5mlの量を注入した。注射を3回実施し、各注射での主要ピークを回収した。回収物をまとめ、SpeedVacを用いて蒸発乾燥した。

得られた物質 (精製したものをBPI.13と称する) の純度を、解析用逆相システムと上述した勾配溶出条件を用いて決定した。この解析にて、BPI.13は98%の純度であった。BPI.13の純度と同定を、VG Biotech Bio-Q質量分析計を用いて電子噴射イオン化質量分析によって決定した。見かけの分子量は、1711.0 (推定分子量は、1711.1) であった。質量分析にて、不純物は検出されなかった。BPI.13の復元率は55%であり、出発物質の69%が所望のペプチドであったものと考えられる。

上述したようにして、本発明のペプチドをさらに精製した場合、ペプチド、例えば、BPI.13PとBPI.30Pの生物学的活性の大きさは、化学純度が増大した時に、増大することが認められた。このことは、観察された生物学的活性がペプチドそれ自体によるものであることを示すものである。特に、ペプチド調製物の純度が98%にまで増大することで、約69%の純度のBPI.13によるCandida albicansの完全に新規で予想だにできなかった抗真菌活性はさらに改善された。

実施例20

結合性分析ならびに中和分析を用いたBPI機能領域ペプチドの解析

A . LPS結合性分析

BPI機能領域ペプチドをLPS結合性分析に適用した。

まず、これら分析を、Gazzano-Santro et al., 前出に記載されているようにして行った。すなわち、E. coli株J5リピドAの懸濁液を超音波処理し、0.2 μg/mlの濃度になるまでメタノールで希釈し、その50 μlをウェル (Immulon 2 Removawell Strips、Dynatech社) に吸収させた。37 °Cでの一晩のインキュベーションに続いて、37 °Cで、3時間、D-PBS/0.1%BSAの溶液215 μlでウェルをブロッキングした。その後、ブロッキング緩衝液を廃棄し、ウェルをD-PBS (D-PBS/T) 中の0.05% Tween-20の溶液で洗浄し、D-PBS/T中の [<sup>125</sup>I]-rBPI<sub>23</sub>の溶液50 μlを用いて、4 °Cで、一晩インキュベーションし (9.9 μCi/μgの比活性で、234,000cpmの総数)、そして、BPI機能領域ペプチドの濃度を増大した。このインキュベーションの後、D-PBS/Tでウェルを3回洗浄し、結合した放射能をガンマカウンターを用いて計測

10

20

30

40

50

した。D-PBS/BSAで処置したウエルへの結合は、非特異的なバックグラウンドの結合と考えられ、これは特異的に結合した放射能を生成するために各ウエルに結合した全放射能から差し引かれる。

これら実験の結果を、図17a(各ペプチドの濃度をnMで示した)と図17b(各ペプチドの濃度を $\mu\text{g/ml}$ で示した)に示した。未標識rBPI<sub>23</sub>を用いた拮抗実験を、比較のために示した。これらの結果は、試験したペプチドのすべてが、rBPI<sub>23</sub>により、程度は異なるものの、LPS結合性を拮抗することを示した。

二倍量の[<sup>125</sup>I]-rBPI<sub>23</sub>(10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の比活性で、454,000cpmの総数)を用いて、全血の有無の下で、rBPI<sub>23</sub>によるBPI.10のLPS結合親和性と比較しながら、この実験を繰り返した。図18に示した結果にあるように、モル基準にて、BPI.10が、この分析で放射標識した

rBPI<sub>23</sub>で拮抗したrBPI<sub>23</sub>と同等の強度である2の因子に属することが実証された。総数225,000cpmの[<sup>125</sup>I]-rBPI<sub>23</sub>が用いられたこと、リピドAが0.5mg/mlの濃度で使用されたことを除いて、上述した実験と同様にして、ペプチドBPI.7、BPI.29およびBPI.30を用いて実験を繰り返した。図19に示した結果にあるように、モル基準にて、これらペプチドが、リピドAに結合した未標識のrBPI<sub>23</sub>よりも、6から10倍劣った強度しか有していないことが実証された。

BPI機能領域ペプチドBPI.2、BPI.3、BPI.4、BPI.5、BPI.7、BPI.13、BPI.14、BPI.29、BPI.30およびBPI.48、ならびにこれら分析での対照としてのrBPI、rBPI<sub>21</sub>cysおよびrLBP<sub>25</sub>を用いた拮抗試験にて、放射標識した組換えLPS結合タンパク質([<sup>125</sup>I]-rLBP)を放射標識したrBPI<sub>23</sub>に代えて使用したことで、第二の結合検定を実施した。これら実験にて、リピドAを、メタノール中で0.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でウエルに吸収させた。放射標識したrLBP(3.45 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の比活性で、650,000cpmの総数)のインキュベーションを、連続的に増大せしめた濃度のBPIペプチドの存在下で、37 $^{\circ}\text{C}$ で、2.5時間実施した。これらの結果を、図20aと図20bに示した。IC<sub>50</sub>値(すなわち、放射標識したrLBP<sub>25</sub>のリピドA結合が、ペプチドが無い場合に達成した値の半分にまで阻害される濃度)を、表11に示した。

表 11

ペプチド	IC50:	
	nM	$\mu\text{g/mL}$
rBPI	13	0.65
rBPI <sub>21</sub> $\Delta$ cys	30	0.69
BPI.7	100	0.26
BPI.29	130	0.44
BPI.48	200	0.48
BPI.30	250	0.75
BPI.3	250	0.75
rLBP <sub>25</sub>	600	15
BPI.13	1000	1.7
BPI.2	1300	2.36
BPI.5	1700	4.42

三番目の結合分析にて、ヒトの内皮細胞(HUVEC)でインキュベーションした、放射標識したLPSへ結合するBPI機能領域ペプチドの能力を試験した。この検定では、HUVEC細胞にBPIペプチドが一旦結合したLPSへの結合力を測定した。HUVEC細胞を、D-PBS/BSAの500 $\mu\text{l}$ の溶液にて、1 $\mu\text{g/ml}$ あるいは3 $\mu\text{g/ml}$ のいずれかの濃度の様々なBPIペプチドの存在下、4 $^{\circ}\text{C}$ で、3時間インキュベートした。このインキュベーションに続いて、細胞を氷冷したD-PBS/BSAで二回洗浄し、D-PBS/BSA中の[<sup>125</sup>I]-RaLPS(4.6 $\times 10^6$ cpm/ $\mu\text{g}$ の比活性で、340,000cpmの総数)の500 $\mu\text{l}$ の溶液にて、4 $^{\circ}\text{C}$ で、さらに2.5時間インキュベートした。ウエルをD-PBS/BSAで三回洗浄し、1Mの水酸化ナトリウムの500 $\mu\text{l}$ で可溶化し、そして溶

解物をガンマーカウンターで計測した。図21に示したこれら結果は、BPI<sub>1</sub>.29とBPI<sub>1</sub>.30がHUVEC細胞に結合する一方で、LPSへの結合力を保持していることを示している。

#### B. TNF細胞毒性を用いたBPI機能領域ペプチドのLPS中和活性スクリーニング分析

腫瘍壊死因子 (TNF) 細胞毒性分析を用いて、LPS中和活性のためのスクリーニング検定を行った。ビタミンDを補充した培地で成長したヒト単球細胞系 (THP-1; 受託No. TIB202、American Type Culture Collection、ロックヴィル、メリーランド州) は、LPSで刺激することで、TNFを用量依存性で生成する。マウス繊維芽細胞 (L929細胞; ATCC No. CCL1) は、TNF-媒介した細胞の殺傷に感受性があり、この細胞殺傷性も用量依存性である。このように、L929細胞の細胞殺傷性の程度は、THP-1細胞と接触する遊離LPSの量の感受性の指標でもある、THP-1細胞でのTNF誘発の程度に関する感受性分析を提供するものである。BPI機能領域ペプチドあるいはrBPI<sub>23</sub>によるLPS結合性および中和は、標準化した分析にてL929細胞の量を減らすのみならず、生成したTNFの量も減らすTHP-1細胞に接触した遊離LPSの量を減少せしめる。このように、以下の分析は、本発明のBPI機能領域ペプチドのLPS結合性および中和能力を評価するための鋭敏な方法を提供する。

10%FCSとビタミンDを補充したRPMI培地 (GIBCO、ロングアイランド、ニューヨーク州) にてTHP-1細胞を、約150,000細胞/mlの密度になるまで、3日間、攪拌培養した。そして、細胞を、150,000細胞/mlの密度で丸底96ウェルカルチャープレートに置き、5ng/mlのE. coli 01113 LPSと共に、FCSとビタミンDのいずれかを欠いたRPMI培地で、37°Cで、6時間インキュベートした。対照ウェルにも、濃度を約0.1µg/mlから約100µg/mlに変化させて、rBPI<sub>23</sub>あるいはBPI機能領域ペプチドを置いた。このインキュベーションの後、細胞をペレット化するために約600×gで遠心分離し、50µl RPMI/10%FCS中のウェル当たり50,000のL929細胞を並列的に調製した96ウェル平底培養皿に、50µlの上清を添加した。皿当たり約100万個の密度になるまで、L929細胞をRPMI/10%FCS培地にて単相増殖させ、実験前日に1:2に分割し、そして実験当日に約70%の集密になるよう一晩成長させる。96ウェルプレートに置く20分前に、この70%集密にアクチノマイシンDを、最終濃度が1µg/mlになるよう添加する。L929細胞プレートを、哺乳類細胞成長のための標準的条件下で、THP-1上清と共に、37°Cで、16時間 (一晩) インキュベートした。3-[ (4,5-ジメチル)-チオゾール-2-イル]-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルフォニル)-2H-テトラゾリウム (分子内塩) を含む2mlのCellTitre 96 (登録商標) AQueous溶液 (Promega社、マジソン、ウィスコンシン州) 中の100µlのフェナジンメチルスルホン酸を希釈することで調製した20µlの溶液を各ウェルに添加した。培養基を、37°Cで、2-4時間インキュベートし、そして、490nm (A490) での吸光度を決定するために、分光測光的に解析した。実験結果を、約10ng/mlから約10mg/mlにまでTNFの量を変化させて作成した半対数標準曲線と相関させて評価した。

これら実験の結果を、図22a-22hに示した。図22aには、5ng/ml LPSの有無によるL929細胞の培養におけるA490とTNF濃度との間の関連を示している。これら結果は、分析用培地中のLPSの有無にかかわらず、A490とTNF濃度との間にはほぼ同じ直線の関係が認められた。図22bには、TNFを増量したヘパリンの存在下でL929細胞と共にインキュベートした実験を示している。これら結果は、1ng/mlと0.1ng/mlの濃度のTNFについて、一定で特徴的なA490を示しており、このことはTNFによるL929細胞の死滅にヘパリンが影響していないことを示すものである。図22cは、5ng/ml LPSの存在下にてTHP-1培養を表示した濃度でインキュベートした場合、rBPI<sub>21</sub> cysが、死滅したTNF-媒介L929細胞の量を減少せしめたことを示す対照実験を表している。図22dは、L929細胞の死滅分析により測定した、THP-1細胞によるLPS刺激したTNF生成でのBPIが媒介した阻害を阻害することで、ヘパリンがrBPI<sub>21</sub> cysと結合するために、LPSと拮抗することを示している。

図22eは、TNFが媒介したL929細胞の死滅分析の測定での、A490とTNFとの標準曲線であり、図22gは、約3つの対数 (約1000倍) のTNF濃度範囲にわたる半対数記録での、標準曲線の直線性を示している。図22fは、約100,000 THP-1細胞と少なくとも5ng/mlの濃度のLPSを用いることで、TNFの検出可能な量が最も容易に作りだせる分析でのTHP-1細胞の依存性を示している。最後に、図22hは、この分析がLPS刺激に应答したTNFのTHP-1細胞の生成に

10

20

30

40

50

依存していること、そして、ヒト組織球リンパ腫細胞 (U937 : ATCC No. : CRL1593) が、THP-1細胞のための分析で用いても、検出可能なTNFを生成しなかったことを示している。この分析は、本発明のBPI機能領域ペプチドのLPS結合性ならびに中和能力を分析するために用いた。これら結果を、図12に示し、そこでは、試験したペプチドが、TNF媒介したL929細胞の死滅による測定から、THP-1細胞でのLPS刺激したTNFの生成を阻害する能力があることを示すものである。

表 12

ペプチド	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
rBPI <sub>21</sub> $\Delta$ cys	0.2
BPI.7	30
BPI.13	20
BPI.29	2-3
BPI.30	6-7
BPI.48	1

10

### C. 細胞性一酸化窒素生成を用いたBPI機能領域ペプチドのLPS中和活性スクリーニング分析

BPI機能領域ペプチドの他のLPS中和活性スクリーニング分析を、LPSで処置したマウス細胞での一酸化窒素生成に関する分析を用いて実施した (Lorsbach et al., 1993, J. Biol. Chem. 268, 1908-1913を参照のこと)。この分析にて、マウスのRAW264.7細胞 (ATCC受託No. TIB71) を、細菌性LPSで処置した。その細胞を、96ウェルプレートでインキュベートし、そして、 $\gamma$ -インターフェロン、rLBP、胎児ウシ血清 (FBS) または清浄ヒト血清 (NHS)、あるいはrBPI<sub>21</sub> cysの有無の下で、E. coli O113 LPSあるいはチモサンで、2時間にわたって刺激した。このインキュベーションの後、細胞を新鮮な培地で洗浄し、10% FCSを含んだ培地で一晚インキュベートした。一酸化窒素は、培地に蓄積した細胞から放出され、そして自然に窒素に変換される。その窒素は、添加したスルファニルアミドの一級アミンと反応し、ジゾアニウム塩を形成する。そして、この塩は添加したナフチルエチレンジアミンと反応し、赤系アゾ染料を形成する。グリース反応を、室温にて、約10分

20

30

間実施した。生成した一酸化窒素の量を、550nmの波長での分光測光による吸光度で決定したグリース反応の標準曲線から見積もった。この分析の結果を、図23aから23cに示した。図23aは、 $\gamma$ -インターフェロンの存在下での一酸化窒素生成の依存性を示している。このインターフェロン効果は、100単位/mlの濃度で飽和することで認められた。図23bは、精製組換えタンパク質として、あるいは細胞インキュベーション培地のFBSあるいはNHS補充物の成分のいずれかとして添加したLBPの存在に関するLPS刺激した一酸化窒素の依存性を示している。図23cは、30-100ng/mlのIC<sub>50</sub>を有する、LPS刺激した一酸化窒素の、rBPI<sub>23</sub>が媒介した阻害を示している。これら結果は、この分析が、BPIおよび本明細書に開示したBPI機能領域ペプチドのLPS中和活性を測定するための簡便で、安価で、生理学的精度の高い分析システムであることを実証して

40

いる。BPI機能領域ペプチドを用いて行った分析の結果を、刺激していない細胞による一酸化窒素のバックグラウンドの生成を「NO LPS」と称した図24a-24gに示した。図24aと24bには、チモサンおよびLPSそれぞれで刺激した一酸化窒素生成のrBPI、rBPI<sub>21</sub> cysおよびrBPI<sub>25</sub>による阻害を示している。チモサン刺激した一酸化窒素生成の阻害は、いずれのBPIタンパク質濃度でも認められなかった (図24a)。これとは対照的に、LPS刺激した一酸化窒素の生成は、これらrBPI関連タンパク質とのインキュベーションによる濃度依存的方法にて阻害された (図24b)。図24c (チモサン) および図24d (LPS) は、BPI.2、BPI.3、BPI.4、BPI.7およびBPI.14、そして比較のためのrBPI<sub>21</sub> cysとのRAW264.7細胞のインキュベーションによる一酸化窒素の生成効果を示している。天然BPIにて認められるように、

50

チモサン刺激による一酸化窒素の生成は、いずれのBPI機能領域ペプチドのとのインキュベーションによっても阻害されなかった（高濃度のBPI.7によるわずかな阻害の可能性を除く；図24c）。一方で、LPS刺激した一酸化窒素生成は、rBPI<sub>21</sub> cysによって効果的に阻害されたが、BPI.3とBPI.7ではわずかにしか阻害されなかった（図24d）。

BPI.5、BPI.13、BPI.29およびBPI.30、そして並行して比較するためのrBPI<sub>21</sub> cysを用いて実験を繰り返した。RAW264.7細胞によるチモサン刺激した一酸化窒素生成は、高濃度（～100 μg/ml）のBPI.30で阻害されたが、他のBPI機能領域ペプチドならびにrBPI<sub>21</sub> cysによる一酸化窒素の生成阻害は認められなかった（図24e）。LPS刺激した一酸化窒素の生成はrBPI<sub>21</sub> cysによって効率良く阻害され、また本実験にて試験したすべての機能領域ペプチドにより、様々な、小さな阻害が認められた（図24f）。

BPIタンパク質およびペプチドに関するIC<sub>50</sub>（すなわち、RAW264.7細胞によるチモサンあるいはLPS刺激した一酸化窒素の生成が、阻害剤を使用しない場合の半分にまで低減した時の阻害剤の濃度）を、これら実験結果から算出し、図24gに示した。BPI.30の場合を除いて、これら実験でのBPI機能領域ペプチドあるいはrBPI<sub>21</sub> cys、rBPIあるいはrLBPのいずれについてもチモサン媒介した一酸化窒素の生成の阻害は認められず、チモサン刺激した一酸化窒素の生成の阻害に関するBPI.30のIC<sub>50</sub>は、10から100 μg/mlの間であった。この分析にて、BPI.3、BPI.5、BPI.13、BPI.29およびBPI.30は、検出可能なLPS中和レベルを示し、これらペプチドのIC<sub>50</sub>相対値を図24gに示した。

#### D. 細胞増殖分析を用いたBPI機能領域ペプチドのLPS中和活性スクリーニング分析

BPI機能領域ペプチドの評価のために、他のLPS中和活性スクリーニング分析を行った。LPSで処置したマウス細胞での細胞増殖の阻害のためのこの感受性試験は、標準曲線との併用でヒト血漿中のLPSレベルの定量にも利用できる。

この分析にて、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）、2mMのL-グルタミン酸、ペニシリン（100単位/ml）、ストレプトマイシン（100 μg/ml）、0.075%重炭酸ナトリウム、0.15M 2-メルカプトエタノール、および10%胎児ウシ血清（Hyclone社、ローガン、ユタ州）を補充したRPMI 1640培地（GIBCO社）にて維持したRAW264.7細胞（ATCC受託No. TIB71）を、まず、分析の24時間前に、50単位/ml組換えマウス-インターフェロン（Genzyme社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）の存在下でのインキュベーションにより誘発した。そして、誘発した細胞を機械的に回収し、500×gで、4で遠心分離し、50mlのRPMI 1640培地（補充物を含まない）に再懸濁し、さらに、遠心分離とRPMI 1640培地（補充物を含まない）への懸濁を行った。これら細胞の数を計測し、2×10<sup>5</sup>細胞/mlの濃度に調整し、その100 μl分画を96ウェルマイクロ滴定プレートの各ウェルに添加した。血清を含まないRPMI 1640培地での1 ng/mlの濃度（この濃度は、LPS濃度を50pg/mlから100ng/mlに変化させた滴定実験による結果から得たものである）である100 μl/ウェル分画に添加されたE. coli O113 LPS（対照標準、Assoc. of Cape Cod、ウッズホール、マサチューセッツ州）と共に、これら細胞を約15時間インキュベートした。このインキュベーションは、25ng/mlから50 μg/mlに濃度を变化させたBPI機能領域ペプチドの有無を含めて実施した。組換えヒトBPIを、1 μg/mlの濃度での正の対照として用いた。この分析を開始して5時間後に、1 μCi/ウェル [<sup>3</sup>H]-チミジンの添加により細胞の増殖を定量的に測定した。15時間のインキュベーションの後、細胞用ハーベスター（Inotech Biosystems社、INB-384、試料加工ならびにフィルター計測システム、ランシン、ミシガン州）を用いて、標識した細胞をガラス繊維フィルターに回収した。

この分析の結果を、図26a-26cに示した。図26aには、血清成分として、あるいは組換えLBPとして（1 μg/mlの濃度で）反応混合物に添加したLBPの存在下での、RAW264.7細胞増殖のLPS媒介した阻害の依存性を示している。図26bと26cは、上記分析にて認められたBPI機能領域ペプチドの挙動パターンを示している。BPI.5は、5.3±0.6 μg/mlのEC<sub>50</sub>（すなわち、LPSの成長阻害効率が50%に転じる時のペプチド濃度）を示した。BPI.81は、RAW264.7細胞に関するLPSの成長阻害効率を好転することはできなかったが、14±0.2 μg/mlのIC<sub>50</sub>（すなわち、ペプチドを添加せずとも、RAW細胞成長が50%以上阻害する時のペプチド濃度）の成長阻害を示した。BPI.98は、0.16±0.08 μg/mlのEC<sub>50</sub>と、16.5±1.9 μg/mlのIC<sub>50</sub>

10

20

30

40

50

を<sub>0</sub>を示した。そして、BPI.86は、 $0.13 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ の $EC_{50}$ と、 $37.5 \pm 12.5 \mu\text{g/ml}$ の $IC_{50}$ を示した。この分析で試験したすべてのペプチドの結果を、表13に示した。

表 13

BPI ペプチド	配 列	$EC_{50}$	$IC_{50}$	
BPI. 2	IKISGKWKAAQKRFLK	—	—	10
BPI. 5	HBHISKSKVGWLIQLFHKKIE	$5.3 \pm 0.6$	—	
BPI. 7	KWKAQKRFLKKWKAQKRFLK	>50	$37.5 \pm 12.5$	
BPI. 10	QKRFLKKWKAQKRFLKKWKAQKRFLK	>50	17.25	
BPI. 13	KSKVGWLIQLFHKK	$1.9 \pm 0.4$	$37.5 \pm 12.5$	
BPI. 13p	KSKVGWLIQLFHKK	$2.0 \pm 0.3$	>50	
BPI. 29	KSKVGWLIQLFHKKKSKVGWLIQLFHKK	$0.1 \pm 0.02$	$13.6 \pm 0.4$	20
BPI. 30	KWKAQKRFLKKSKVGWLIQLFHKK	$1.2 \pm 1.1$	$10.5 \pm 1.2$	
BPI. 46	KWKAAAKRFLKKWKAQKRFLK	$1.9 \pm 1.9$	$18.8 \pm 0.8$	
BPI. 47	KWKAQKRFLKKWAAAKRFLK	$0.9 \pm 0.3$	$9.8 \pm 0.1$	
BPI. 48	KWKAAAKRFLKKWAAAKRFL	$1.3 \pm 0.9$	$5.0 \pm 0.1$	
BPI. 63	IKISGKWKAAQKRFLKKSKVGWLIQLFHKK	$0.08 \pm 0.02$	$7.1 \pm 0.02$	
BPI. 69	KWKAAARFLKKWAAARFLKKWAAARFLK	$0.11 \pm 0.07$	$2.4 \pm 0.3$	
BPI. 73	IKISGKWKAAQFRFLK	$22 \pm 10$	—	30
BPI. 74	KSKVGWLIQLFHKKWKAQKRFLK	$2.7 \pm 0.3$	$18.8 \pm 0.8$	
BPI. 76	IKISGKWKAAQFDRFLK	>50	—	
BPI. 77	IKISGKWKAAQWRFLK	$10 \pm 32$	>50	
BPI. 80	IKISGKWKAAQA $\beta$ -(1-ナフチル)RFLK	$35 \pm 36$	>50	
BPI. 81	IKISGKWKAFKRFLK	—	$14.0 \pm 0.2$	

表 13 (続き)

BPI ペプチド	配 列	EC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	
BPI. 82	KSKVGWLIQLWHKK	0.8±0.1	18.8±0.8	
BPI. 83	KSKVGWLIQLA β-(1-ナフチル)HKK	1.2±0.1	37.5±12.5	10
BPI. 84	IKISGKA β-(1-ナフチル)KAQFRFLK	57±28	—	
BPI. 85	KSKVLWLIQLFHKK	1.3±0.1	17±15	
BPI. 86	KSKVGWLIILLFHKK	0.13±0.04	37.5±12.5	
BPI. 87	KSKVGWKAFPRFLK	1.3±0.4	11.4±1.3	
BPI. 88	IKISGKWKAFPRFLK	>50	6.2±7.5	
BPI. 89	IKISGKA β-(1-ナフチル)KAFKRFLK	>50	11±0.3	20
BPI. 90	IKISGKA β-(1-ナフチル)KAFFRFLK	>50	6.3±0.7	
BPI. 91	KSKVGWLIPLFHKK	0.7±0.1	—	
BPI. 92	KSKVGWLIKLFHKK	1.9±0.1	37.5±12.5	
BPI. 93	IKISGKA β-(1-ナフチル)KAQFRFLKKSKVGWLIQLFHKK	0.9±0.25	9.7±0.1	
BPI. 94	KSKVGWLIQLFFKK	1.3±0.02	23±2	
BPI. 95	KSKVFWLIQLFHKK	1.0±0.01	37.5±12.5	
BPI. 96	KSKVGWLIQLFHKK	1.6±0.2	18.8±0.8	30
BPI. 97	KSKVKWLIQLFHKK	2.8±0.3	37.5±12.5	
BPI. 98	IKISGKA β-(1-ナフチル)KAQFRFLKKSKVGWLIPLFHKK	0.16±0.08	16.5±1.9	
MAP. 1	(β-アラニル-N α, N ε 置換-[N α, N ε (BPI. 2)リシル] リシン	0.45±0.1	37.5±12.5	

rBPI<sub>21</sub>Δcys

50 μg/mlの濃度まで、増殖の低下は認められなかった。

E . 全血でのLPS誘発したTNF生成の阻害に基づくLPS中和活性スクリーニング分析

本発明のBPI機能領域ペプチドのLPS中和活性を、全血に関して以下のようにして分析した。健康なヒトから採取した新鮮な血液を、吸引チューブ(ACD社、ラザフォード、ニュージャージー州)に回収した。血液の分画(170 μl)を、2.5ng/mlのE. coli 0113 LPSを含んだ10 μlのカルシウムイオンとマグネシウムイオンを欠いたPBSと共に混合し、そして、0.5から50 μg/mlの範囲で濃度を变化させた本発明によるBPIペプチドの20 μlと共に混合した。これら混合物を、37 °Cで、4時間インキュベートし、55 μlの氷冷したカルシウムイオンとマグネシウムイオンを欠いたPBSを添加して反応を停止し、次いで、500 × gで、7分間遠心分離を行った。そして、その上清を汎用のELISAキット(Biokine(登録商標) ELISA Test、T-cell Sciences社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を用いて、TNFレベルに関して分析を行った。

0.08±0.05

—

40

50

二つの異なる採取源から得た全血試料を用いた代表的なペプチドに係るこれら実験の結果を、図27と表14に示した。図27は、BPI機能領域ペプチドBPI.7、BPI.13およびBPI.29によるTNF阻害の比較と、参照のためのrBPI<sub>21</sub>cysを用いた結果を示している。これら結果を、IC<sub>50</sub>として定量して表14に記載し、また上記C節で記載したRAW264.7細胞による一酸化窒素生成を用いた分析によるLPS中和活性との比較を行った。

表 14

BPI ペプチド	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		
	TNF分析	一酸化窒素分析	
rBPI <sub>21</sub> △cys	0.65	0.4	10
BPI.29	5.0	2.4	
BPI.13	42	16	
BPI.7	阻害されず	阻害されず	

F. トリプトファン蛍光消失を用いたLPSおよびヘパリン結合分析

約280nmから290nm、好ましくは、285nmの波長の光で励起すれば、天然のアミノ酸トリプトファンは、300nmから400nmの波長の光(すなわち、蛍光)を発する。かような蛍光により生じた発光量は、pHおよび緩衝液条件、ならびにタンパク質と他の分子との間の相互結合作用を含めた条件によって作用されることが知られている。ドメインIIとIIIから誘導したあるBPI機能領域ペプチドはトリプトファン残基を含んでおり、トリプトファン蛍光は、本発明のBPI機能領域ペプチドとLPSあるいはヘパリンとの間の相互結合作用を検定するために用いた。

本発明のBPI機能領域ペプチドのトリプトファン蛍光を、LPSあるいはヘパリンの有無によって、SPEX Fluorolog蛍光計を用いて決定した。0.25nmのスリット幅で285nmの光で、試料を励起させた。1.25nmのスリット幅を用いて300nmから400nmの間にて放出波長を走査した。約5分間隔で3回にわたって実施した決定値の平均としてデータを蓄積した。循環式ウォーターバスを用いて、実験中の試料の温度を25 あるいは37 に保った。LPSに結合することでトリプトファン残基固有の蛍光が影響を受けるタンパク質である、カニ内毒素結合タンパク質(CEBP)を正の対照として用いた。(Wainwright et al., 1990, Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions. Nowotny et al., eds., Elsevier Science Publishing B.V., The Netherlands. pp.315-325を参照のこと)

これら実験の結果を、表15に示した。K<sub>d</sub>値は、消失データのスキヤットカードタイプのスターン-フォルマー・プロットにおけるプロット勾配の逆関数として決定した。BPI.10、BPI.46およびBPI.47に関するデータを比較することで、K<sub>d</sub>の減少(LPSへの親和力の増大を示している)と、蛍光消失率の増大が認められた。これらペプチドの間での相違は、BPI.10と比較して、BPI.48にて非極性残基での塩基性および極性アミノ酸の置換があることを意味する。これとは対照的に、ヘパリン結合性のK<sub>d</sub>が増大しているの、対応して増大している蛍光消失率は検出されなかった。この結果は、LPS結合と比較して、ヘパリン結合の部位あるいは性質が根本的に相違するものであることを示唆するものである。

10

20

30

40

表 15

<u>BPI ペプチド</u>	<u>Trp の数</u>	<u>K<sub>d</sub> LPS (nM)</u>	<u>消失した LPS(%)</u>	<u>K<sub>d</sub> ヘパリン (μM)</u>	<u>消失した ヘパリン(%)</u>
BPI.10	2	124	26	1.2	67
BPI.47	2	115	41	2.2	47
BPI.48	2	83	62	0.8	41
BPI.69	3	58	72	0.4	42
BPI.73	1	66	47	0.7	19
CEBP <sup>a</sup>	5	19	56	0.8	54

<sup>a</sup> CEBP(LALF)実験は、25℃で行った。

#### F. ヘパリンが媒介したトロンビン時間の伸長の中和分析

ヘパリンが媒介したトロンビン時間の伸長、すなわち、トロンビンと血漿の混合物の凝固に要する時間に関する、BPI機能領域ペプチドの効果を研究した。治療的に投与されたヘパリンのような、トロンビン形成の内因性あるいは外因性阻害剤の存在によりトロンビン時間は長くなる。ヘパリンの抗凝固効果を中和する薬剤は、この試験で測定されるトロンビン時間を短くするであろう。

これら実験にて、MLA Elextra 800凝固計時器を用いてトロンビン凝固時間を決定した。再調製した血漿(200 μl、Sigma Chemical社、No. 855-10)を、反应用キュベットにて、37℃で2分間インキュベートした。トロンビン凝固用試薬(100 μl、Baxter Diagnostics社、B4233-50)を、インキュベーションの後に反应用キュベットに添加し、そして凝固時間を測定した。血漿の添加に先行して、ヘパリンナトリウム(13 μl、PBS中の40 μg/ml、Sigma Chemical社、H3393)と、例示的なBPI機能領域ペプチド(約0.05 μg/mlから約10 μg/mlまでの様々な希釈液の10 μl)を反应用キュベットに添加し、トロンビン凝固時間に関するこれらペプチドの効果を試験した。TCT凝固時間(トロンビン時間)を、表示したBPIペプチドを用いて測定し、その結果を図28と表16に示した。図28と以下の表16に示したこれら結果は、トロンビン時間の伸長をもたらすヘパリンが媒介した阻害によって、試験したBPI機能領域ペプチドがヘパリンを中和したことを実証するものである。この阻害のIC<sub>50</sub>を定量し、以下の表16に示した。

10

20

30

表 16

BPI ペプチド	IC <sub>50</sub> (μg/ml) ± SE
BPI.10	0.115 ± 0.014
BPI.47	0.347 ± 0.041
BPI.63	0.362 ± 0.034
BPI.69	0.200 ± 0.025
BPI.73	0.910 ± 0.821
BPI.82	0.200 ± 0.073
BPI.84	0.225 ± 0.029
BPI.87	0.262 ± 0.009
BPI.88	0.691 ± 0.180
BPI.90	0.753 ± 0.210
BPI.98	0.242 ± 0.038
BPI.99	0.273 ± 0.011
BPI.100	0.353 ± 0.050
BPI.101	0.285 ± 0.088
BPI.102	0.135 ± 0.024

10

20

## 実施例21

Martigel (登録商標) 膜基質でのin vivoでのヘパリン/FGF誘発した血管形成の阻害に基づくヘパリン中和分析

本発明のBPI機能領域ペプチドを、マウスにおけるin vivoでの、ヘパリン誘発した血管形成を阻害する能力について分析した。液体Martigel (登録商標) (Collaborative Biomedical Products社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を4 で維持し、Passaniti et al. (1992, Lab. Invest. 67: 519-528) に記載されているようにして、液体状態のゲルに血管形成因子を添加した。ヘパリン (Sigma社、セントルイス、ミズーリー州) を、1,250~10,000単位/mlの範囲の様々な濃度になるように滅菌したPBSに溶解した。組換え繊維芽細胞成長因子 (bhFGF; BACHEM Bioscience社、フィラデルフィア、ペンシルベニア州) を、滅菌したPBSで200ng/mlにまで希釈した。2.5 μlの希釈したヘパリン溶液と、2.5 μlの組換えbhFGFを、マウス注射単位用量当たり0.5mlのMartigel (登録商標) に添加した。BPI機能領域ペプチドを、実験用動物当たり10 μl/0.5mlのMartigel (登録商標) 画分中の0.5~50 μg/ml (最終濃度) の範囲の様々な濃度になるように、このMartigel (登録商標) 混合物に添加した。10 μlの滅菌したPBSを、対照動物に注射したMartigel (登録商標) 画分中のBPI機能領域ペプチドと交換した。

30

6~8週齢のオスのC57BL/6Jマウス (Jackson Laboratory、バーハーバー、メイン州) に、上述したようにして調製したMartigel (登録商標) の0.5mlの画分を、背中の中線に向けて皮下注射した。注射して7日後、Martigel (登録商標) ゲルを切り出し、500 μlのドラブキンの試薬 (Sigma社) 中に置いた。全タンパク質ならびにヘモグロビン含有量を、ゲルを機械的に均質化した後にドラブキンの試薬に蓄えられているゲルについて決定した。全タンパク質レベルを、汎用されているキット (DC Protein Assay、Bio-Rad社、リッチモンド、カリフォルニア州) に組み込まれている、マイクロプレート分析を用いて決定した。ヘモグロビン濃度は、Sigma Procedure #525と、この分析に用いるSigma社 (セントルイス、ミズーリー州) から供給された試薬を用いて測定した。ヘモグロビンレベルは、全タンパク質濃度との相関が認められた。

40

組織染色のために用いるゲルは、ドラブキンの試薬中に置くよりもむしろ、動物から切除して直ちにホルマリン固定した。ホルマリン固定したゲルは、凍結切片のために、Tissue-Tek O.C.T.化合物 (Miles社、エルクハート、インディアナ州) に埋設した。凍結切片の薄片を、(Humason, 1979, Animal Tissue Techniques, 4th Ed. W.H. feeman社、サンフ

50

ランシスコ、カリフォルニア州、Ch.9, pp.111-131に記載されているようにして)ヘマトキシリンとエオシンで染色した。

本発明のBPI機能領域ペプチドの効果を、BPIペプチドを用いずに調製したMartigel(登録商標)ゲル薄片での血管形成の阻害に関して、凍結染色した切片について顕微鏡的に観察した。血管形成の阻害の程度を、BPI機能領域ペプチドを含むゲル薄片にて認められる標準的な量のヘモグロビンをを用いて定量した。

#### 実施例22

##### 慢性炎症疾患：コラーゲン誘発あるいはコラーゲン反応性モデルでのBPI機能領域ペプチドの解析

コラーゲン誘発した関節炎モデルでの効果をみるために、BPI機能領域ペプチドを投与した。具体的には、Stuart et al. (1982, J. Clin. Invest. 69:673-683)の方法に従って、尾の付け根にウシ・タイプIIコラーゲンの皮内免疫処置することで、マウスに関節炎を誘発した。一般に、マウスは、コラーゲンで免疫処置してから21日後に関節炎症状を呈した。処置したマウスの関節炎スコアを、21-25日目のそれぞれに、BPI機能領域ペプチド、対照rBPI<sub>23</sub>あるいはrBPI、あるいは緩衝液のいずれかの用量を尾の静脈から静脈注射して処置したマウスを、120日の期間にわたって盲目的に評価した。

具体的には、ウシ・タイプIIコラーゲン(Southern Biotechnology Associates社、バーミングハム、イリノイ州)を、約20-25gの体重のグループに属するオスのマウス(Mouse/DBA/1J)に対して、0日目に、尾の付け根に皮内注射(0.1mg/マウス)して投与した。BPI機能領域ペプチド、rBPI<sub>23</sub>およびrBPIを、0.5M塩化ナトリウムと20mM酢酸ナトリウム(pH6.0)を含む緩衝液に溶解し、そして、様々な濃度で投与するためにPBS緩衝液で希釈した。対照には、PBS緩衝液のみ(0.1ml)を投与した。

コラーゲン誘発した関節炎モデルは、プロタミン硫酸との比較において、BPI機能領域ペプチドの挙動を評価するためにも用いた。具体的には、上述したようにしてBPIペプチドをPBSに溶解し、そして、様々な濃度で投与した。他の試験物質も以下の用量で投与した。すなわち、プロタミン硫酸(Sigma Chemical社、セントルイス、ミズーリー州)(0.13mg/マウス)、タウマチン(0.12mg/マウス)、およびPBS緩衝液(0.1ml)である。コラーゲンを投与して28から32日目の各日に、尾の静脈に静脈注射することで、試験物質あるいは対照物質をマウスの集団に投与した。

BPI機能領域ペプチドも、Yong et al., (1988, Microbial Pathogenesis 4:305-310)の方法に従って、*Yersinia enterocolitica*反応性関節炎モデルにおける反応性関節炎を処置するためにも投与した。具体的には、マウスに非敗血症性の関節炎を誘発するように計算した $4 \times 10^8$ の細菌の用量で予め*Yersinia enterocolitica* cWA 0:8 T2(すなわち、Yong et al., 前出による有毒プラスミドを欠いている)を静脈注射したDBA/2JマウスにBPIペプチドを投与した。マウスの集団には、尾の静脈に静脈注射することで、試験物質あるいは対照物質を投与した。

*Borrelia burgdorferi*はライム疾患の病原であり、関節炎に関連し、そして、*E. Coli*の細胞壁とは異なるが、構造的には共通性があるその細胞壁にLPS-様複合体を有している。Limulus遊走細胞溶解物(LAL)阻害検定での*B. burgdorferi* LPSの阻害における、BPI機能領域ペプチドを投与することによる効果を決定した。具体的には、実施例4に記載の方法に従ったLAL分析を実施し、2.5 $\mu$ g/mlの*B. burgdorferi* LPSおよび2ng/mlの*E. coli* 0113 LPS投与した場合のBPIペプチドの効果を測定した。

#### 実施例23

##### マウス悪性黒色腫細胞転移モデルでのBPI機能領域ペプチドの解析

BPI機能領域ペプチド、プロタミン、あるいは対照用緩衝液を、マウス悪性黒色腫細胞転移モデルでの効果を試験するために投与した。具体的には、C57BL/6Jマウスの集団に、0日目に、尾の静脈に $10^5$ のB16.F10悪性黒色腫細胞を静脈注射した。様々な濃度のBPI機能領域ペプチドを、第1、3、6、8、10、13、15、17および19日目に、尾の静脈から投与した。正の対照としてプロタミン硫酸(0.13mg/マウス)あるいは負の対照としてPBS緩衝液(0.1ml/マウス)を、対照マウスの集団に対して同様に投与した。実験動物を、20日

10

20

30

40

50

目に頸部脱臼によって屠殺し、肺組織を観察した。各肺葉に、気管から3mlの水を注入して灌流させて膨らませた。表面上の腫瘍小結節を顕微鏡で計測し、マウスの集団当たりで見つかった腫瘍の数を、統計学上の有意差について解析した。

#### 実施例24

##### マウス脳毛細血管の内皮細胞増殖分析でのBPI機能領域ペプチドの解析

BPI機能領域ペプチドを、すべての内皮細胞増殖検定での効果について試験した。これらの実験のために、Bauer (1989, Microvascular Reserch 37:148-161) に記載されたマウスの脳の毛細血管細胞 (EC) を、イーグルの塩、L-グルタミン酸、および2.2g/lの重炭酸ナトリウム (GIBCO、グランドアイランド、ニューヨーク州) を含み、加熱して不活性化した10%胎児ウシ血清 (FCS: Irvine Scientific社、イルビン、カリフォルニア州) と1%ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO) を足した培地199に移した。融合細胞の回収を、トリプシン-EDTA (GIBCO) を用いた3分間のトリプシン処理によって実施した。増殖分析を、標準平板96ウェル・マイクロタイタープレートに、新たに回収したECを置いて行った。この分析での各ウェルについて、最終体積を200 $\mu$ l/ウェルに維持した。各ウェルに、総計4 $\times$ 10<sup>4</sup>個のEC細胞と、様々な濃度のBPIペプチドあるいは対照用緩衝液が添加された。5%二酸化炭素のインキュベーター内での48時間の培養の後、10 $\mu$ lの培地199中の1 $\mu$ Ciの[<sup>3</sup>H]チミジンを、各ウェルに添加した。24時間放射物質を適用させた後、トリプシン処理によってEC細胞をガラス微小繊維フィルターに回収し、そして、取り込まれた[<sup>3</sup>H]チミジンをガス比例式固相ベータ計測器で定量した。

EC細胞に関するBPIペプチドの直接的な結合の研究を、集密フラスコから10倍量の細胞を回収し、そして、トリプシン処理した細胞を12.5mlの培養培地で再懸濁することで実施した。次いで、細胞懸濁液の0.5mlを、標準24ウェル組織培養プレートの各ウェルに添加し、一晚インキュベートした。カルシウムとマグネシウムを含む燐酸緩衝化生理食塩水 (GIBCO) 中の0.1%ウシ血清アルブミンで、そのプレートを洗浄した。洗浄した後、各ウェルに0.5mlのBSA/PBSを添加した。EC細胞増殖の濃度依存性阻害を、[<sup>3</sup>H]チミジンの取り込みの減少に関して測定した。

#### 実施例25

##### 動物モデルでのBPI機能領域ペプチドの解析

###### A. マウス内毒素血症モデルでの解析

BPI機能領域ペプチドを、マウス内毒素血症モデルでの効果について試験した。少なくとも15匹のマウスからなる集団に、LD<sub>50</sub>の用量 (例えば、40mg/kg) で内毒素 (例えば、E. coli 0111: B4, Sigma Chemical社、セントルイス、ミズーリー州) の静脈注射によって投与した。これに続いて、約0.1mg/kgから約100mg/kg、好ましくは、約1から50mg/kgの範囲の濃度のペプチドの二回目の静脈注射を行った。ペプチドを含まない緩衝液の注射を、負の対照マウスに対して行った。7日間にわたって実験動物を観察し、死亡率を記録した。本発明のペプチドの効果は、ペプチド投与したマウスと対照マウスとの比較において、内毒素血症に関連する死亡率の減少によって測定した。

###### B. マウス腹膜炎モデルでの解析

BPI機能領域ペプチドを、マウス急性腹膜炎モデルでの効果について試験した。少なくとも15匹のマウスからなる集団に、10<sup>7</sup>個の活性E. coli細菌株07: K1を含んだ0.5mlを与え、そして、約0.1mg/kgから約100mg/kgの範囲の濃度のBPI機能領域ペプチドの1.0mlの溶液で処置した。ペプチドを含まない緩衝液の注射を、負の対照マウスに対して行った。7日間にわたって実験動物を観察し、死亡率を記録した。効果的なBPI機能領域ペプチドによれば、対照マウスとの比較において、試験区マウスの死亡率の減少をもたらした。

#### 実施例26

##### ヒト内毒素中和モデルでのin vivoでのBPI機能領域ペプチドの治療的使用

細菌性内毒素の静脈注入により内毒素血症にしたヒトにおけるBPI機能領域ペプチドの効果調査のために、1994年1月24日に出願された、共同所有に係る、係属中の米国特許出願No. 08/188,221に記載されているようにして、二重盲検法を立案し、そして実施した。

これまでの開示は、本発明の特定の態様を説明するものであり、そのすべての変更と同等の改良は、添付の請求の範囲の記載した本発明の趣旨と範疇に属するものであることを理解されたい。

#### 配列表

##### (1) 一般情報

##### (i) 出願人：

(A) 名宛人：ゾーマ コーポレーション

(B) 番地：2910セベンス ストリート

(C) 都市名：パークレイ

(D) 州名：カリフォルニア州

(E) 国名：米国

(F) 郵便番号：94710

(G) 電話番号：(510) 644-1170

(H) F A X：(510) 469-7571

(ii) 発明の名称：殺菌性/透過性が向上したタンパク質の機能領域に由来する生物学的に活性なペプチドおよびその使用

(iii) 配列の数：98

##### (iv) 連絡先住所：

(A) 名宛人：アレグレッティ アンド ウィトコフ リミテッド

(B) 番地：10サウス ワッカー ドライブ、スイート 3000

(C) 都市名：シカゴ

(D) 州名：イリノイ

(E) 国名：米国

(F) 郵便番号：60606

##### (v) コンピューター読取形式：

(A) 媒体：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換機

(C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテント イン リリース #1.0、バージョン #1.25

##### (vi) 現出願データ：

(A) 出願番号：US

(B) 出願日：11-3月-1994

(C) 分類：

##### (viii) 弁護士/弁理士情報：

(A) 氏名：ヌーナン、ケビン イー

(B) 登録番号：35,303

(C) 参照/事件番号：93,1133

##### (ix) 通信情報：

(A) 電話：(312) 715-1000

(B) ファックス：(312) 715-1234

(C) テレックス：910-221-5317

(2) 配列番号：1の情報

##### (i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：29アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

##### (ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「ドメインI」

10

20

30

40

50

(xi) 配列：配列番号：1

Ala Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile

1 5 10 15

Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His

20 25

(2) 配列番号：2 の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：30アミノ酸

10

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.14」

(xi) 配列：配列番号：2

Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp

1 5 10 15

20

Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly His

20 25 30

(2) 配列番号：3 の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：22アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

30

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.4」

(xi) 配列：配列番号：3

Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser

1 5 10 15

Phe Lys Ile Lys His Leu

20

(2) 配列番号：4 の情報

40

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.1」

(xi) 配列：配列番号：4

Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 5 の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

10

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.54」

(xi) 配列 : 配列番号 : 5

Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 6 の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 35アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

20

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「ドメインII」

(xi) 配列 : 配列番号 : 6

Ser Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile

1 5 10 15

Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Lys Arg

30

20

25

30

Phe Leu Lys

35

(2) 配列番号 : 7 の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.2」

(xi) 配列 : 配列番号 : 7

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 8 の情報

(i) 配列特徴 :

50

- (A) 配列の長さ：10アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.8」
- (xi) 配列：配列番号：8

Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1                      5                      10

10

- (2) 配列番号：9の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：16アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.58」
- (xi) 配列：配列番号：9

Cys Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu

1                      5                      10                      15

20

Lys

- (2) 配列番号：10の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：17アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「酸化したBPI.65」
- (xi) 配列：配列番号：10

Cys Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu

1                      5                      10                      15

30

Lys Cys

- (2) 配列番号：11の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：27アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.3」
- (xi) 配列：配列番号：11

40

50

Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys  
 20 25

(2) 配列番号：12の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：28アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「ドメインIII」

(xi) 配列：配列番号：12

Val His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu  
 1 5 10 15

Phe His Lys Lys Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys

20

20

25

(2) 配列番号：13の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：13アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

30

(D) 他の情報：「BPI.11」

(xi) 配列：配列番号：13

Lys Ser Lys Val Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1

5

10

(2) 配列番号：14の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：21アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

40

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.12」

(xi) 配列：配列番号：14

Ser Val His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln  
 1 5 10 15

Leu Phe His Lys Lys

20

(2) 配列番号 : 15の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 14アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.13」

(xi) 配列 : 配列番号 : 15

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号 : 16の情報

20

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.15」

(xi) 配列 : 配列番号 : 16

Ala Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

30

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 17の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

40

(D) 他の情報 : 「BPI.16」

(xi) 配列 : 配列番号 : 17

Ile Ala Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 18の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

50

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.17」

(xi) 配列：配列番号：18

Ile Lys Ala Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：19の情報

(i) 配列特徴：

10

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.18」

(xi) 配列：配列番号：19

Ile Lys Ile Ala Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

20

(2) 配列番号：20の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.19」

30

(xi) 配列：配列番号：20

Ile Lys Ile Ser Ala Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：21の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

40

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.20」

(xi) 配列：配列番号：21

Ile Lys Ile Ser Gly Ala Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：22の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

50

- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.21」
- (xi) 配列：配列番号：22

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1                    5                    10                    15                    10

- (2) 配列番号：23の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.22」
- (xi) 配列：配列番号：23

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Ala Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1                    5                    10                    15

- (2) 配列番号：24の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.23」
- (xi) 配列：配列番号：24

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Ala Lys Arg Phe Leu Lys

1                    5                    10                    15

- (2) 配列番号：25の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.24」
- (xi) 配列：配列番号：25

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Ala Arg Phe Leu Lys

1                    5                    10                    15

- (2) 配列番号：26の情報

- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.25」
- (xi) 配列：配列番号：26

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Ala Phe Leu Lys 10

1 5 10 15

- (2) 配列番号：27の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature 20
- (D) 他の情報：「BPI.26」
- (xi) 配列：配列番号：27

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Ala Leu Lys

1 5 10 15

- (2) 配列番号：28の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状 30
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.27」
- (xi) 配列：配列番号：28

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Ala Lys

1 5 10 15

- (2) 配列番号：29の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature 40
- (D) 他の情報：「BPI.28」
- (xi) 配列：配列番号：29

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Ala

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 30の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.59」

(xi) 配列 : 配列番号 : 30

10

Ile Lys Ile Ser Gly Ala Trp Ala Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 31の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.45」

(xi) 配列 : 配列番号 : 31

20

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Ala Ala Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 32の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.60」

(xi) 配列 : 配列番号 : 32

30

Ile Ala Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Ala

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 33の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 14アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

40

50

(D) 他の情報：「BPI.31」

(xi) 配列：配列番号：33

Ala Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：34の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.32」

(xi) 配列：配列番号：34

Lys Ala Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：35の情報

(i) 配列特徴：

20

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.33」

(xi) 配列：配列番号：35

Lys Ser Ala Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

30

(2) 配列番号：36の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.34」

40

(xi) 配列：配列番号：36

Lys Ser Lys Ala Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：37の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

50

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.35」

(xi) 配列：配列番号：37

Lys Ser Lys Val Ala Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：38の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

10

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.36」

(xi) 配列：配列番号：38

Lys Ser Lys Val Gly Ala Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

20

(2) 配列番号：39の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.37」

(xi) 配列：配列番号：39

30

Lys Ser Lys Val Gly Trp Ala Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：40の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

40

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.38」

(xi) 配列：配列番号：40

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ala Gln Leu Phe His Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：41の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.39」  
(xi) 配列：配列番号：41  
Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Ala Leu Phe His Lys Lys  
1 5 10

(2) 配列番号：42の情報 10  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：14アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.40」  
(xi) 配列：配列番号：42  
Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Ala Phe His Lys Lys 20  
1 5 10

(2) 配列番号：43の情報  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：14アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature 30  
(D) 他の情報：「BPI.41」  
(xi) 配列：配列番号：43  
Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Ala His Lys Lys  
1 5 10

(2) 配列番号：44の情報  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：14アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状 40  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.42」  
(xi) 配列：配列番号：44  
Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe Ala Lys Lys  
1 5 10

(2) 配列番号：45の情報  
(i) 配列特徴： 50

- (A) 配列の長さ：14アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.43」
- (xi) 配列：配列番号：45

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Ala Lys

1                      5                      10

10

- (2) 配列番号：46の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：14アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.44」
- (xi) 配列：配列番号：46

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Ala

1                      5                      10

20

- (2) 配列番号：47の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.56」
- (xi) 配列：配列番号：47

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Lys Gln Arg Phe Leu Lys

1                      5                      10                      15

30

- (2) 配列番号：48の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.61」
- (xi) 配列：配列番号：48

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Phe Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1                      5                      10                      15

50

(2) 配列番号：49の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.66」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：5..7

(D) 他の情報：/ 標識 = D-Trp / 注記 = 「6位のアミノ酸は、D-トリプトファンである」

(xi) 配列：配列番号：49

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：50の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.67」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：6..8

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「7位のアラニンは、-1-ナフチルで置換されている」

(xi) 配列：配列番号：50

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：51の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：16アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.9」

(xi) 配列：配列番号：51

Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：52の情報

(i) 配列特徴：

10

20

30

40

50

(A) 配列の長さ：24アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.30」

(xi) 配列：配列番号：52

Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys Ser Lys Val Gly Trp

1

5

10

15

10

Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

20

(2) 配列番号：53の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：29アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

20

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.63」

(xi) 配列：配列番号：53

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys

1

5

10

15

Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

20

25

30

(2) 配列番号：54の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.7」

(xi) 配列：配列番号：54

40

Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Leu Trp Lys Ala Gln Lys

1

5

10

15

Arg Phe Leu Lys

20

(2) 配列番号：55の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：25アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

- (D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.10.1」  
(xi) 配列：配列番号：55  
Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys  
1 5 10 15  
Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys 10  
20 25
- (2) 配列番号：56の情報  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：28アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature 20  
(D) 他の情報：「BPI.29」  
(xi) 配列：配列番号：56  
Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys Lys Ser  
1 5 10 15  
Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys  
20 25
- (2) 配列番号：57の情報  
(i) 配列特徴： 30  
(A) 配列の長さ：21アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.46」  
(xi) 配列：配列番号：57  
Lys Trp Lys Ala Ala Ala Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln  
1 5 10 15 40  
Lys Arg Phe Leu Lys  
20
- (2) 配列番号：58の情報  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：21アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド 50

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.47」

(xi) 配列：配列番号：58

Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Ala Ala

1

5

10

15

Lys Arg Phe Leu Lys

20

10

(2) 配列番号：59の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：21アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.49」

(xi) 配列：配列番号：59

Lys Trp Lys Ala Ala Ala Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Ala

1

5

10

15

20

Ala Lys Arg Phe Leu

20

(2) 配列番号：60の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：30アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.69」

(xi) 配列：配列番号：60

Lys Trp Lys Ala Ala Ala Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Ala Ala

1

5

10

15

Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Ala Ala Arg Phe Leu Lys

20

25

30

40

(2) 配列番号：61の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

50

(D) 他の情報：「BPI.55」

(xi) 配列：配列番号：61

Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys Ile Glu Met Asn Ser

1 5 10 15

(2) 配列番号：62の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.73」

(xi) 配列：配列番号：62

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Phe Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：63の情報

(i) 配列特徴：

20

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.70」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：8..10

30

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「9位のアラニンは、-3-ピリジルで置換されている」

(xi) 配列：配列番号：63

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号：64の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：17アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

40

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.72」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：1..3

(D) 他の情報：/ 標識 = D-アラニン / 注記 = 「1位および2位のアラニン残基は、共にD-アラニンである」

50

(xi) 配列：配列番号：64

Ala Ala Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu

1 5 10 15

Lys

(2) 配列番号：65の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：26アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.10.2」

(xi) 配列：配列番号：65

Gln Lys Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

20

20 25

(2) 配列番号：66の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

30

(D) 他の情報：「BPI.71」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：13..15

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「13位のアラニンは、-3-ピリジルで置換されている」

(xi) 配列：配列番号：66

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Ala Leu Lys

1 5 10 15

40

(2) 配列番号：67の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：21アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.5」

(xi) 配列：配列番号：67

50

His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe  
 1 5 10 15

His Lys Lys Ile Glu

20

(2) 配列番号 : 68の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 17アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「還元BPI.65」

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : Disulfide-bond

(B) 存在位置 : 1..17

(xi) 配列 : 配列番号 : 68

Cys Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

20

1

5

10

15

Cys

(2) 配列番号 : 69の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 487アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

30

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「rBPI」

(xi) 配列 : 配列番号 : 69

Met	Arg	Glu	Asn	Met	Ala	Arg	Gly	Pro	Cys	Asn	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	
-31	-30					-25					-20					
Ser	Leu	Met	Val	Leu	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Val	
-15				-10						-5					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	10
		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	20
				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	30
		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	10
	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	20
	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	30
	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	40
	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



Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 72の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.77」

(xi) 配列 : 配列番号 : 72

10

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Trp Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 73の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.79」

(xi) 配列 : 配列番号 : 73

20

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Lys Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 74の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「BPI.80」

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : Modified-site

(B) 存在位置 : 10..12

(D) 他の情報 : / 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「11位のアラニンは、 -1-ナフチル置換されている」

(xi) 配列 : 配列番号 : 74

30

40

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Ala Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号 : 75の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 15アミノ酸

50

- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc#feature
- (D) 他の情報：「BPI.81」
- (xi) 配列：配列番号：75

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Phe Lys Arg Phe Leu Lys

1                      5                      10                      15                      10

- (2) 配列番号：76の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：14アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc#feature
- (D) 他の情報：「BPI.82」
- (xi) 配列：配列番号：76

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Trp His Lys Lys

1                      5                      10

- (2) 配列番号：77の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：14アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.83」
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：Modified-site
- (B) 存在位置：10..12
- (D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「6位のアラニンは、-1-ナフチル置換されている」
- (xi) 配列：配列番号：77

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Ala His Lys Lys

1                      5                      10

- (2) 配列番号：78の情報
- (i) 配列特徴：
- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 配列を表す記号：misc-feature
- (D) 他の情報：「BPI.84」

10

20

30

40

50



(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.88」

(xi) 配列：配列番号：82

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Phe Phe Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

10

(2) 配列番号：83の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：29アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.98」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：6..8

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「7位のアラニンは、-1-ナフチル置換されている」

(xi) 配列：配列番号：83

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Phe Lys Arg Phe Leu Lys Lys

1 5 10 15

20

Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Phe

20 25

30

(2) 配列番号：84の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.89」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：6..8

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「7位のアラニンは、-1-ナフチル置換されている」

(xi) 配列：配列番号：84

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Phe Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

40

50

(2) 配列番号：85の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.90」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：6..8

(D) 他の情報：/ 標識 = 置換アラニン / 注記 = 「7位のアラニンは、-1-ナフチル置換されている」

(xi) 配列：配列番号：85

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Phe Phe Arg Phe Leu Lys

1

5

10

15

(2) 配列番号：86の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.91」

(xi) 配列：配列番号：86

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Phe Leu Phe His Lys Lys

1

5

10

(2) 配列番号：87の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.92」

(xi) 配列：配列番号：87

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Lys Leu Phe His Lys Lys

1

5

10

(2) 配列番号：88の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：29アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

10

20

30

40

50

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.93」

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：Modified-site

(B) 存在位置：6..8

(D) 他の情報：ノ標識 = 置換アラニン / 注記 = 「7位のアラニンは、-1-ナフチル置換されている」

(xi) 配列：配列番号：88

Ile Lys Ile Ser Gly Lys Ala Lys Ala Gln Phe Arg Phe Leu Lys Lys 10

1 5 10 15

Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys

20 25

(2) 配列番号：89の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状 20

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.94」

(xi) 配列：配列番号：89

Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe Phe Lys Lys

1 5 10

(2) 配列番号：90の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸 30

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.95」

(xi) 配列：配列番号：90

Lys Ser Lys Val Phe Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys 40

1 5 10

(2) 配列番号：91の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.96」 50

(xi) 配列：配列番号：91  
 Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Phe  
 1 5 10

(2) 配列番号：92の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

10

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.97」

(xi) 配列：配列番号：92

Lys Ser Lys Val Lys Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys  
 1 5 10

(2) 配列番号：93の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：30アミノ酸

20

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.99」

(xi) 配列：配列番号：93

Lys Trp Lys Ala Gln Trp Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln Trp  
 1 5 10 15 30

Arg Phe Leu Lys Lys Trp Lys Ala Gln Trp Arg Phe Leu Lys  
 20 25 30

(2) 配列番号：94の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

40

(A) 配列を表す記号：misc-feature

(D) 他の情報：「BPI.100」

(xi) 配列：配列番号：94

Lys Ser Lys Val Lys Trp Leu Ile Lys Leu Phe His Lys Lys  
 1 5 10

(2) 配列番号：95の情報

(i) 配列特徴：

(A) 配列の長さ：28アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

- (D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「BPI.101」  
(xi) 配列：配列番号：95  
Lys Ser Lys Val Lys Trp Leu Ile Lys Leu Phe Phe Lys Phe Lys Ser  
1 5 10 15  
Lys Val Lys Trp Leu Ile Lys Leu Phe Phe Lys Phe 10  
20 25
- (2) 配列番号：96の情報  
(i) 配列特徴：  
(A) 配列の長さ：24アミノ酸  
(B) 配列の型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：ペプチド  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature 20  
(D) 他の情報：「BPI.102」  
(xi) 配列：配列番号：96  
Lys Trp Lys Ala Gln Phe Arg Phe Leu Lys Lys Ser Lys Val Sly Trp  
1 5 10 15  
Leu Ile Leu Leu Phe His Lys Lys  
20
- (2) 配列番号：97の情報  
(i) 配列特徴： 30  
(A) 配列の長さ：1443塩基対  
(B) 配列の型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：DNA  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：CDS  
(B) 存在位置：1..1443  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：mat-peptide 40  
(B) 存在位置：76..1443  
(ix) 配列の特徴：  
(A) 配列を表す記号：misc-feature  
(D) 他の情報：「rLBP」  
(xi) 配列：配列番号：97

ATG GGG GCC TTG GCC AGA GCC CTG CCG TCC ATA CTG CTG GCA TTG CTG	48	
Met Gly Ala Leu Ala Arg Ala Leu Pro Ser Ile Leu Leu Ala Leu Leu		
-25 -20 -15 -10		
CTT ACG TCC ACC CCA GAG GCT CTG GGT GCC AAC CCC GGC TTG GTC GCC	96	
Leu Thr Ser Thr Pro Glu Ala Leu Gly Ala Asn Pro Gly Leu Val Ala		
-5 1 5		
AGG ATC ACC GAC AAG GGA CTG CAG TAT GCG GCC CAG GAG GGG CTA TTG	144	
Arg Ile Thr Asp Lys Gly Leu Gln Tyr Ala Ala Gln Glu Gly Leu Leu		
10 15 20		
GCT CTG CAG AGT GAG CTG CTC AGG ATC ACG CTG CCT GAC TTC ACC GGG	192	10
Ala Leu Gln Ser Glu Leu Leu Arg Ile Thr Leu Pro Asp Phe Thr Gly		
25 30 35		
GAC TTG AGG ATC CCC CAC GTC GGC CGT GGG CGC TAT GAG TTC CAC AGC	240	
Asp Leu Arg Ile Pro His Val Gly Arg Gly Arg Tyr Glu Phe His Ser		
40 45 50 55		
CTG AAC ATC CAC AGC TGT GAG CTG CTT CAC TCT GCG CTG AGG CCT GTC	288	
Leu Asn Ile His Ser Cys Glu Leu Leu His Ser Ala Leu Arg Pro Val		
60 65 70		
CCT GGC CAG GGC CTG AGT CTC AGC ATC TCC GAC TCC TCC ATC CGG GTC	336	20
Pro Gly Gln Gly Leu Ser Leu Ser Ile Ser Asp Ser Ser Ile Arg Val		
75 80 85		

CAG GGC AGG TGG AAG GTG CGC AAG TCA TTC TTC AAA CTA CAG GGC TCC Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser Phe Phe Lys Leu Gln Gly Ser 90 95 100	384	
TTT GAT GTC AGT GTC AAG GGC ATC AGC ATT TCG GTC AAC CTC CTG TTG Phe Asp Val Ser Val Lys Gly Ile Ser Ile Ser Val Asn Leu Leu Leu 105 110 115	432	
GGC AGC GAG TCC TCC GGG AGG CCC ACA GTT ACT GCC TCC AGC TGC AGC Gly Ser Glu Ser Ser Gly Arg Pro Thr Val Thr Ala Ser Ser Cys Ser 120 125 130 135	480	
AGT GAC ATC GCT GAC GTG GAG GTG GAC ATG TCG GGA GAC TTG GGG TGG Ser Asp Ile Ala Asp Val Glu Val Asp Met Ser Gly Asp Leu Gly Trp 140 145 150	528	10
CTG TTG AAC CTC TTC CAC AAC CAG ATT GAG TCC AAG TTC CAG AAA GTA Leu Leu Asn Leu Phe His Asn Gln Ile Glu Ser Lys Phe Gln Lys Val 155 160 165	576	
CTG GAG AGC AGG ATT TGC GAA ATG ATC CAG AAA TCG GTG TCC TCC GAT Leu Glu Ser Arg Ile Cys Glu Met Ile Gln Lys Ser Val Ser Ser Asp 170 175 180	624	
CTA CAG CCT TAT CTC CAA ACT CTG CCA GTT ACA ACA GAG ATT GAC AGT Leu Gln Pro Tyr Leu Gln Thr Leu Pro Val Thr Thr Glu Ile Asp Ser 185 190 195	672	20
TTC GCC GAC ATT GAT TAT AGC TTA GTG GAA GCC CCT CGG GCA ACA GCC Phe Ala Asp Ile Asp Tyr Ser Leu Val Glu Ala Pro Arg Ala Thr Ala 200 205 210 215	720	
CAG ATG CTG GAG GTG ATG TTT AAG GGT GAA ATC TTT CAT CGT AAC CAC Gln Met Leu Glu Val Met Phe Lys Gly Glu Ile Phe His Arg Asn His 220 225 230	768	
CGT TCT CCA GTT ACC CTC CTT GCT GCA GTC ATG AGC CTT CCT GAG GAA Arg Ser Pro Val Thr Leu Leu Ala Ala Val Met Ser Leu Pro Glu Glu 235 240 245	816	30
CAC AAC AAA ATG GTC TAC TTT GCC ATC TCG GAT TAT GTC TTC AAC ACG His Asn Lys Met Val Tyr Phe Ala Ile Ser Asp Tyr Val Phe Asn Thr 250 255 260	864	
GCC AGC CTG GTT TAT CAT GAG GAA GGA TAT CTG AAC TTC TCC ATC ACA Ala Ser Leu Val Tyr His Glu Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Ser Ile Thr 265 270 275	912	
GAT GAG ATG ATA CCG CCT GAC TCT AAT ATC CGA CTG ACC ACC AAG TCC Asp Glu Met Ile Pro Pro Asp Ser Asn Ile Arg Leu Thr Thr Lys Ser 280 285 290 295	960	40
TTC CGA CCC TTC GTC CCA CGG TTA GCC AGG CTC TAC CCC AAC ATG AAC Phe Arg Pro Phe Val Pro Arg Leu Ala Arg Leu Tyr Pro Asn Met Asn 300 305 310	1008	

CTG GAA CTC CAG GGA TCA GTG CCC TCT GCT CCG CTC CTG AAC TTC AGC	1056	
Leu Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Ser Ala Pro Leu Leu Asn Phe Ser		
315 320 325		
CCT GGG AAT CTG TCT GTG GAC CCC TAT ATG GAG ATA GAT GCC TTT GTG	1104	
Pro Gly Asn Leu Ser Val Asp Pro Tyr Met Glu Ile Asp Ala Phe Val		
330 335 340		
CTC CTG CCC AGC TCC AGC AAG GAG CCT GTC TTC CGG CTC AGT GTG GCC	1152	
Leu Leu Pro Ser Ser Ser Lys Glu Pro Val Phe Arg Leu Ser Val Ala		
345 350 355		
ACT AAT GTG TCC GCC ACC TTG ACC TTC AAT ACC AGC AAG ATC ACT GGG	1200	10
Thr Asn Val Ser Ala Thr Leu Thr Phe Asn Thr Ser Lys Ile Thr Gly		
360 365 370 375		
TTC CTG AAG CCA GGA AAG GTA AAA GTG GAA CTG AAA GAA TCC AAA GTT	1248	
Phe Leu Lys Pro Gly Lys Val Lys Val Glu Leu Lys Glu Ser Lys Val		
380 385 390		
GGA CTA TTC AAT GCA GAG CTG TTG GAA GCG CTC CTC AAC TAT TAC ATC	1296	
Gly Leu Phe Asn Ala Glu Leu Leu Glu Ala Leu Leu Asn Tyr Tyr Ile		
395 400 405		
CTT AAC ACC TTC TAC CCC AAG TTC AAT GAT AAG TTG GCC GAA GGC TTC	1344	20
Leu Asn Thr Phe Tyr Pro Lys Phe Asn Asp Lys Leu Ala Glu Gly Phe		
410 415 420		
CCC CTT CCT CTG CTG AAG CGT GTT CAG CTC TAC GAC CTT GGG CTG CAG	1392	
Pro Leu Pro Leu Leu Lys Arg Val Gln Leu Tyr Asp Leu Gly Leu Gln		
425 430 435		
ATC CAT AAG GAC TTC CTG TTC TTG GGT GCC AAT GTC CAA TAC ATG AGA	1440	
Ile His Lys Asp Phe Leu Phe Leu Gly Ala Asn Val Gln Tyr Met Arg		
440 445 450 455		
GTT	1443	30
Val		

(2) 配列番号 : 98の情報

(i) 配列特徴 :

(A) 配列の長さ : 481アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(ix) 配列の特徴 :

(A) 配列を表す記号 : misc-feature

(D) 他の情報 : 「rLBP」

(xi) 配列 : 配列番号 : 98

40



Leu Glu Ser Arg Ile Cys Glu Met Ile Gln Lys Ser Val Ser Ser Asp  
170 175 180

Leu Gln Pro Tyr Leu Gln Thr Leu Pro Val Thr Thr Glu Ile Asp Ser  
185 190 195

Phe Ala Asp Ile Asp Tyr Ser Leu Val Glu Ala Pro Arg Ala Thr Ala  
200 205 210 215

Gln Met Leu Glu Val Met Phe Lys Gly Glu Ile Phe His Arg Asn His  
220 225 230

Arg Ser Pro Val Thr Leu Leu Ala Ala Val Met Ser Leu Pro Glu Glu  
235 240 245

His Asn Lys Met Val Tyr Phe Ala Ile Ser Asp Tyr Val Phe Asn Thr  
250 255 260

Ala Ser Leu Val Tyr His Glu Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Ser Ile Thr  
265 270 275

Asp Glu Met Ile Pro Pro Asp Ser Asn Ile Arg Leu Thr Thr Lys Ser  
280 285 290 295

Phe Arg Pro Phe Val Pro Arg Leu Ala Arg Leu Tyr Pro Asn Met Asn  
300 305 310

Leu Glu Leu Gln Gly Ser Val Pro Ser Ala Pro Leu Leu Asn Phe Ser  
315 320 325

Pro Gly Asn Leu Ser Val Asp Pro Tyr Met Glu Ile Asp Ala Phe Val  
330 335 340

Leu Leu Pro Ser Ser Ser Lys Glu Pro Val Phe Arg Leu Ser Val Ala  
345 350 355

Thr Asn Val Ser Ala Thr Leu Thr Phe Asn Thr Ser Lys Ile Thr Gly  
360 365 370 375

Phe Leu Lys Pro Gly Lys Val Lys Val Glu Leu Lys Glu Ser Lys Val  
380 385 390

Gly Leu Phe Asn Ala Glu Leu Leu Glu Ala Leu Leu Asn Tyr Tyr Ile  
395 400 405

Leu Asn Thr Phe Tyr Pro Lys Phe Asn Asp Lys Leu Ala Glu Gly Phe  
410 415 420

Pro Leu Pro Leu Leu Lys Arg Val Gln Leu Tyr Asp Leu Gly Leu Gln  
425 430 435

Ile His Lys Asp Phe Leu Phe Leu Gly Ala Asn Val Gln Tyr Met Arg  
440 445 450 455

Val

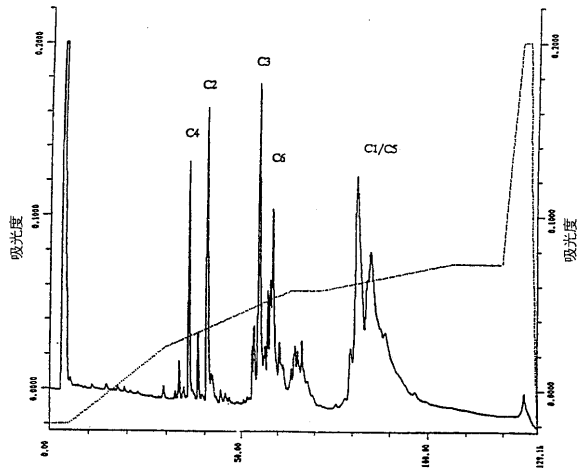
10

20

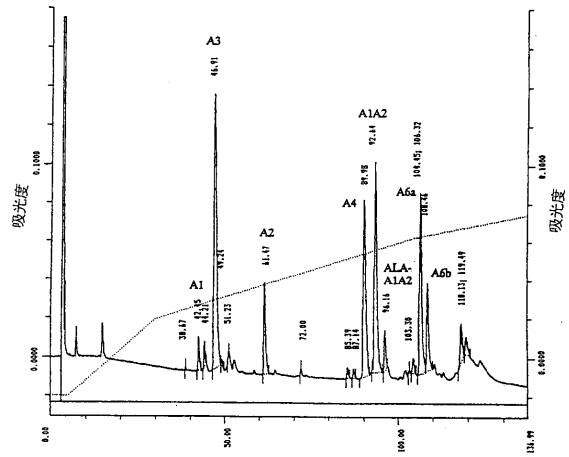
30

40

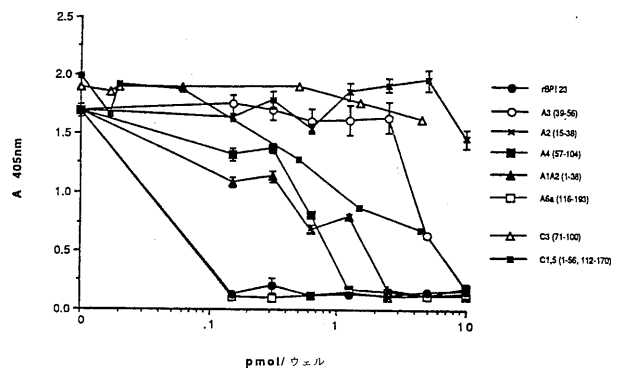
【図 1 a】



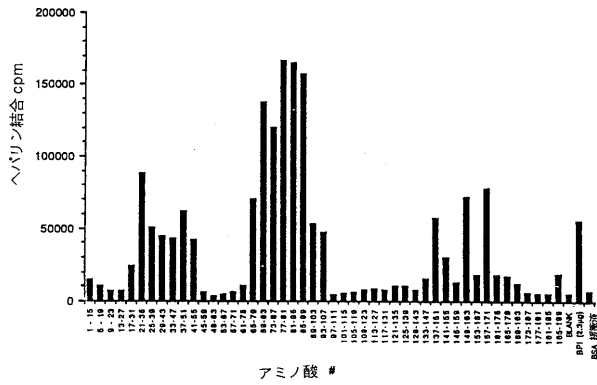
【図 1 b】



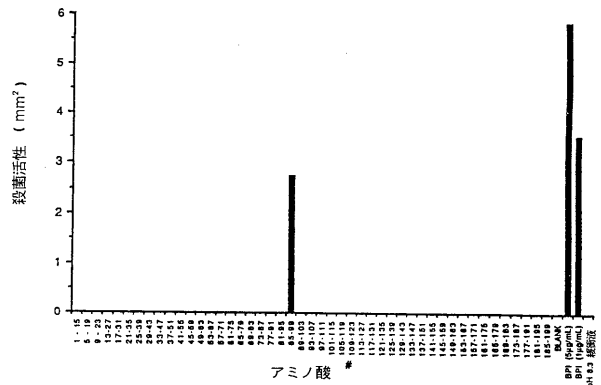
【図 2】



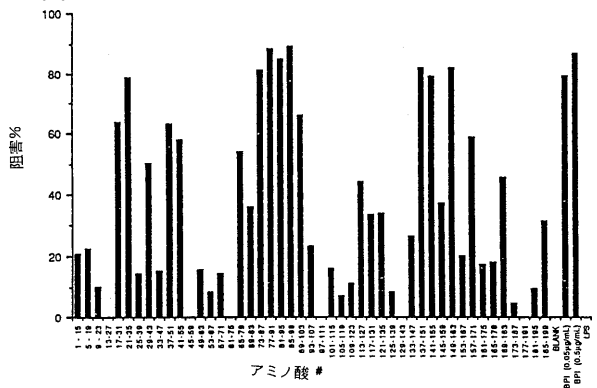
【図 3】



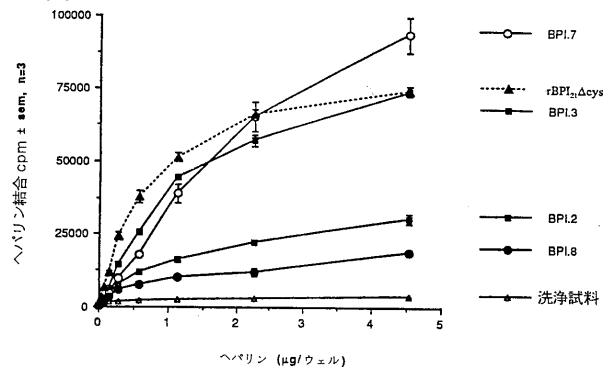
【図 5】

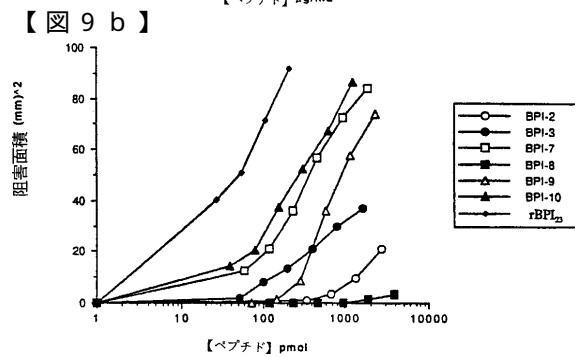
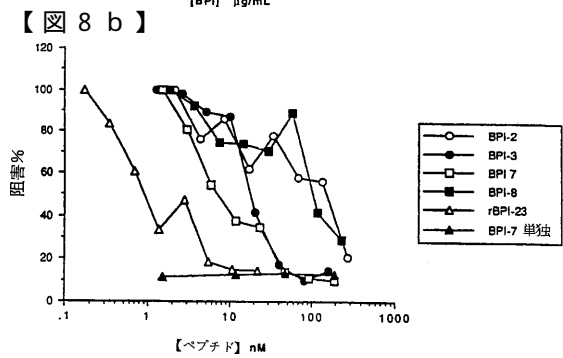
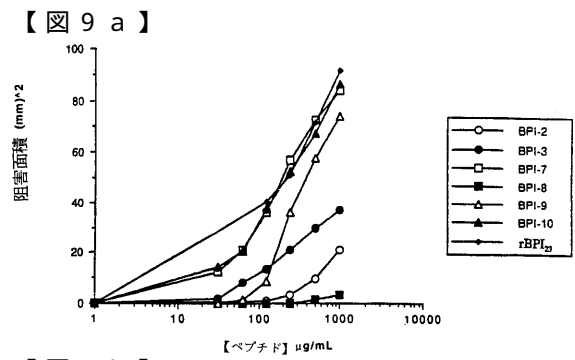
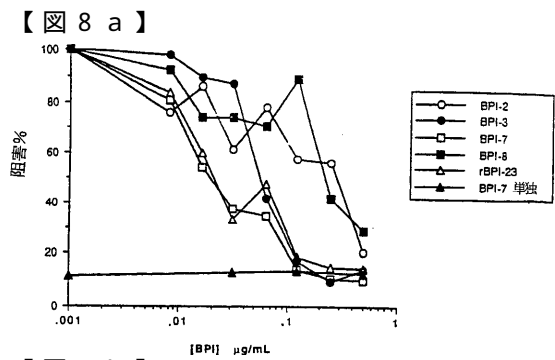
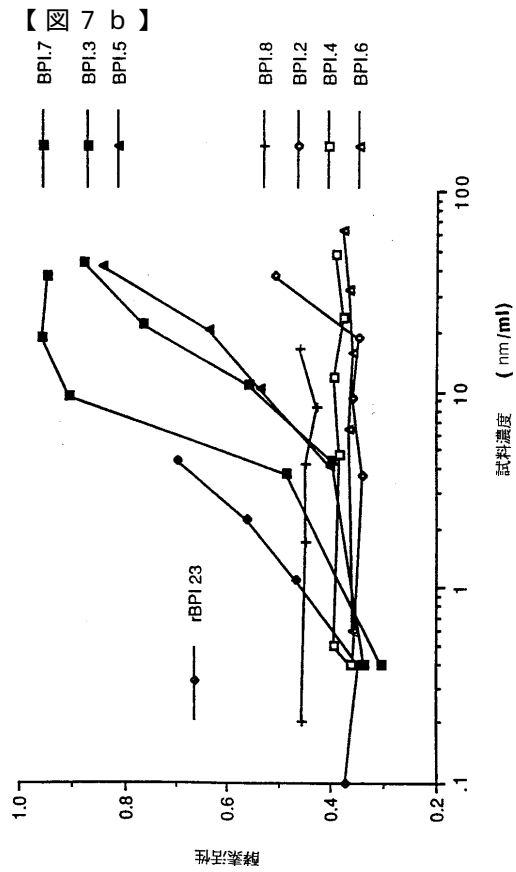
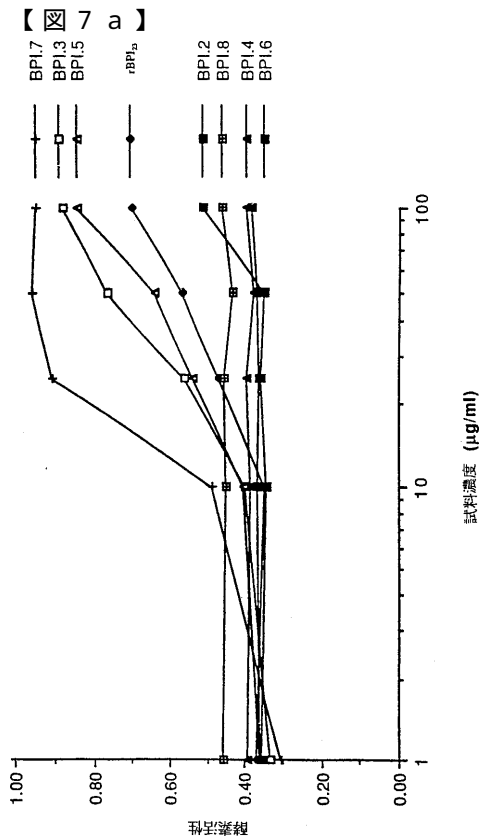


【図 4】

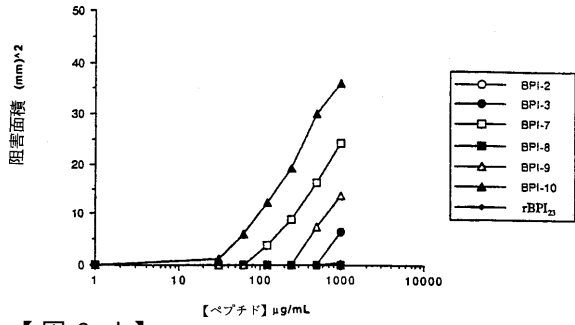


【図 6】

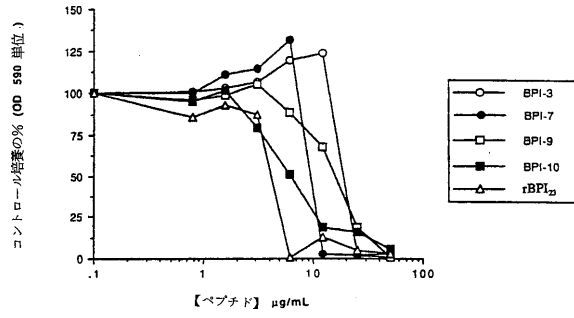




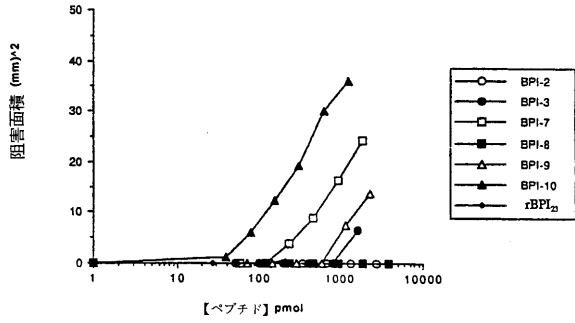
【 9 c 】



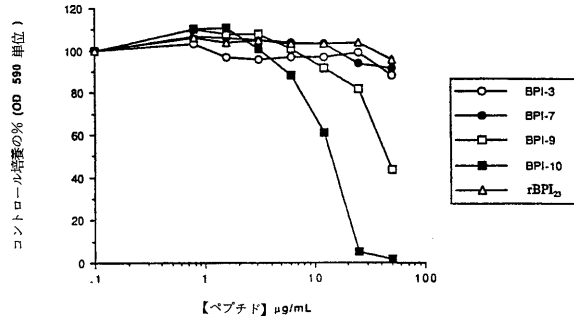
【 9 e 】



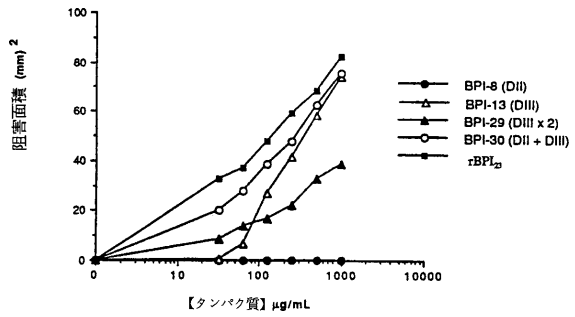
【 9 d 】



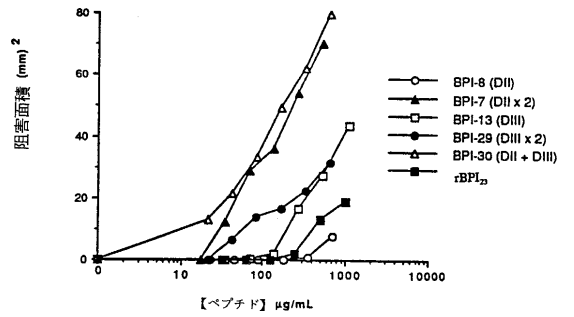
【 9 f 】



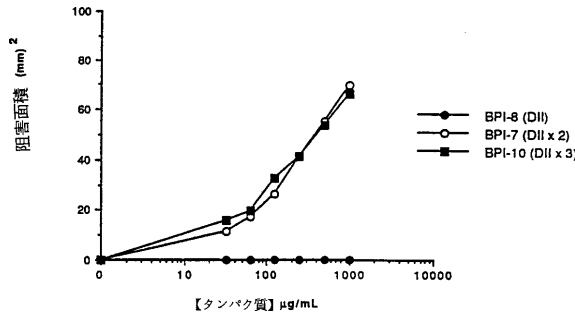
【 10 a 】



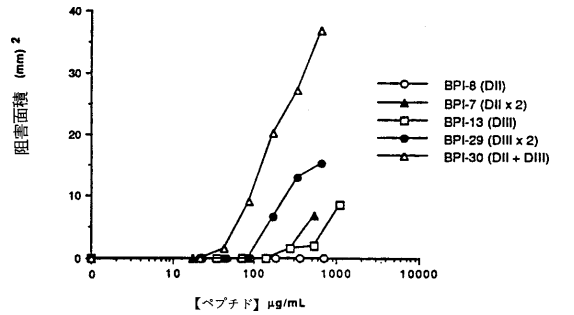
【 10 c 】



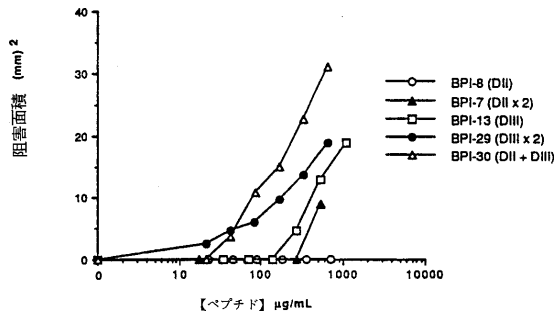
【 10 b 】



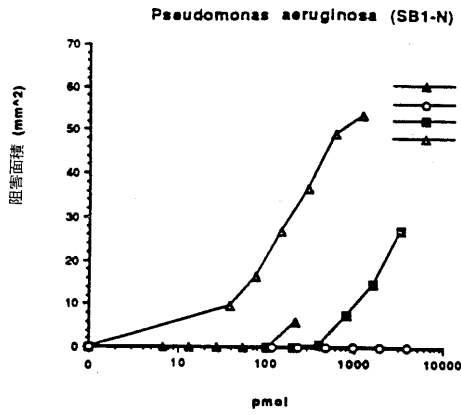
【 10 d 】



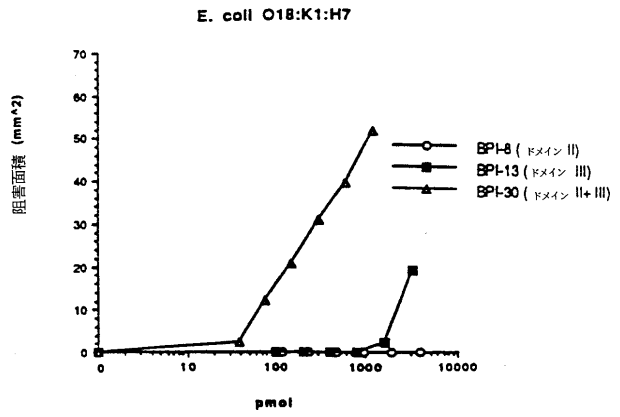
【 10 e】



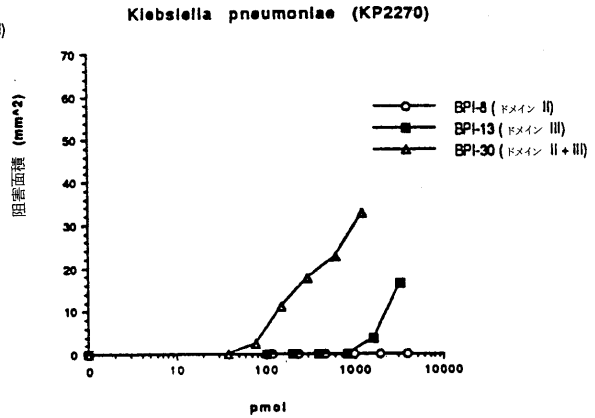
【 11 a】



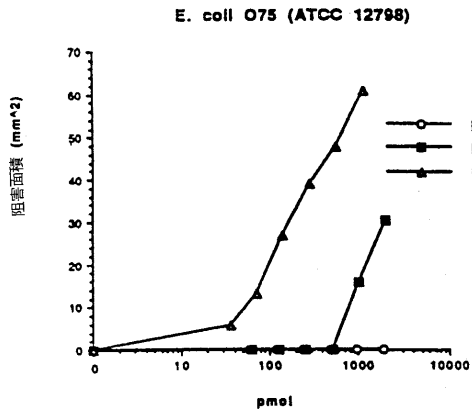
【 11 b】



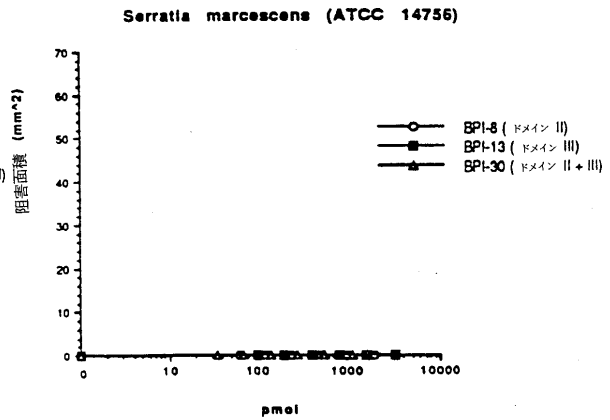
【 11 c】



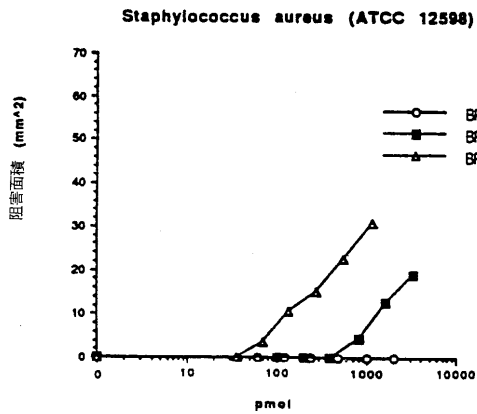
【 11 d】



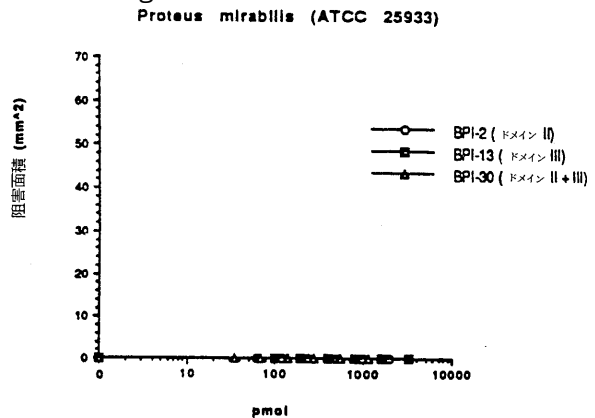
【 11 f】



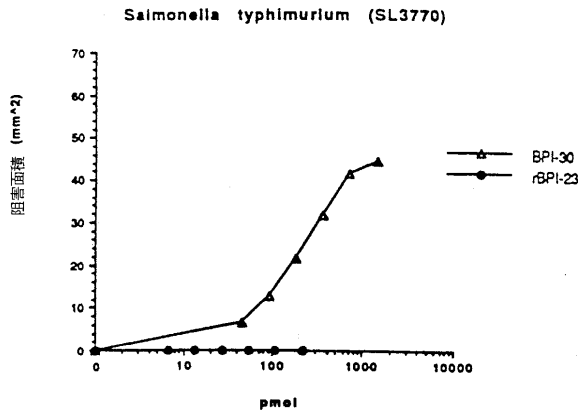
【 11 e】



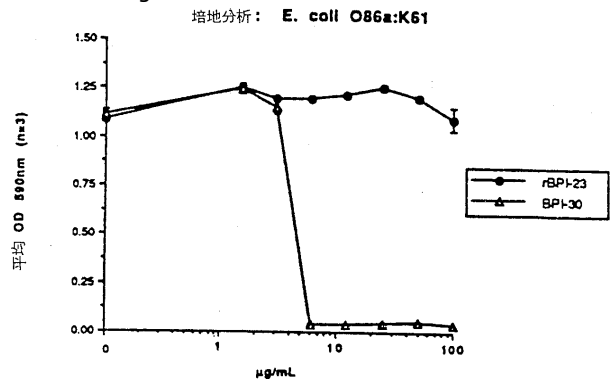
【 11 g】



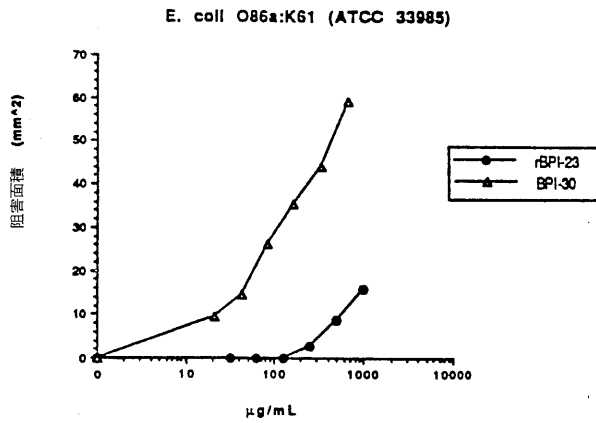
【 11 h 】



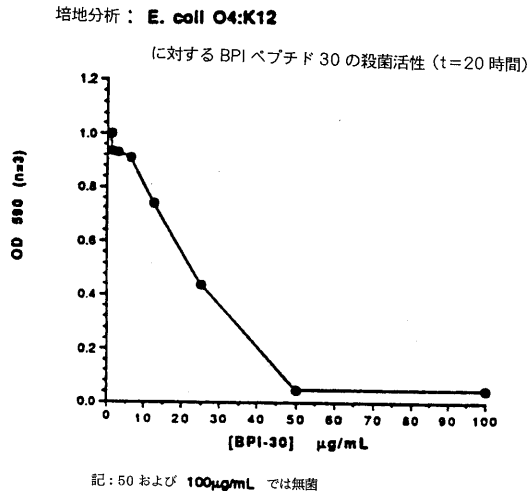
【 11 j 】



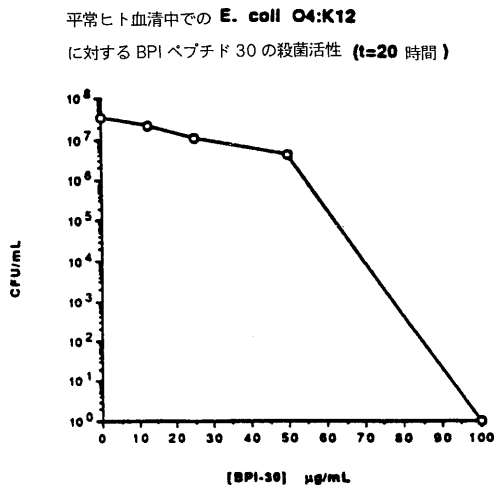
【 11 i 】



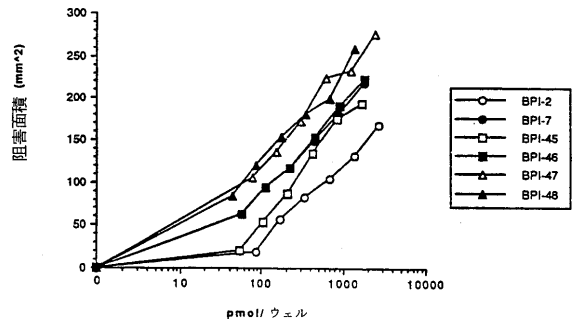
【 11 k 】



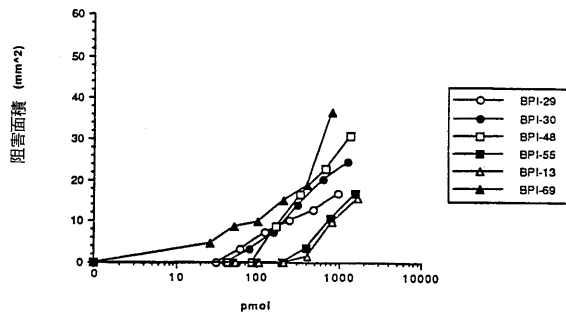
【 11 l 】



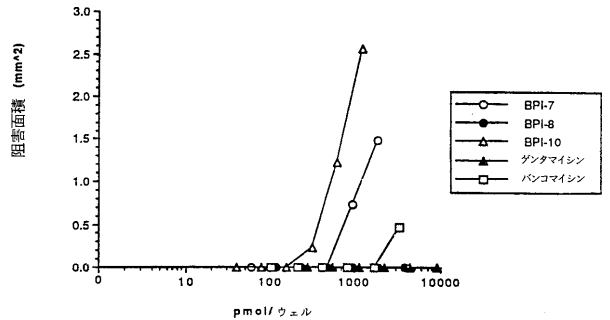
【 11 n 】

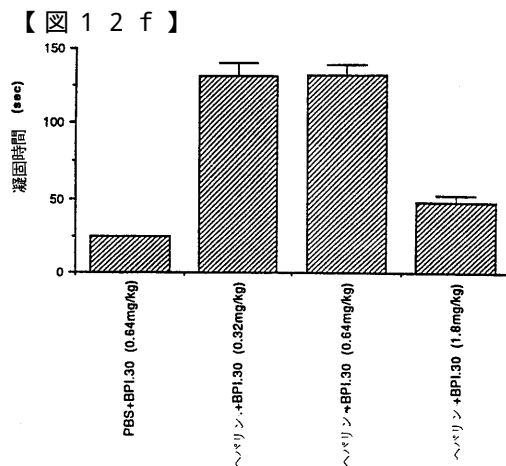
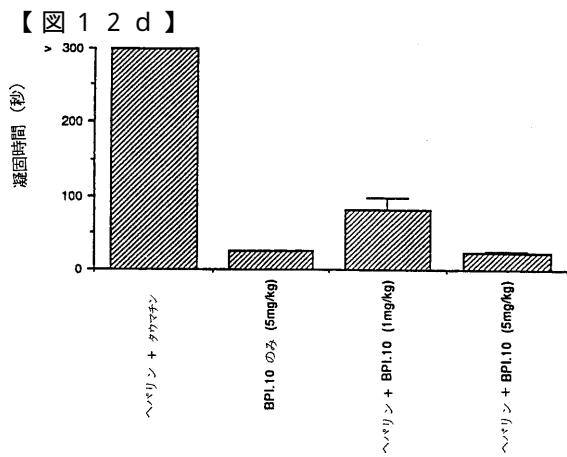
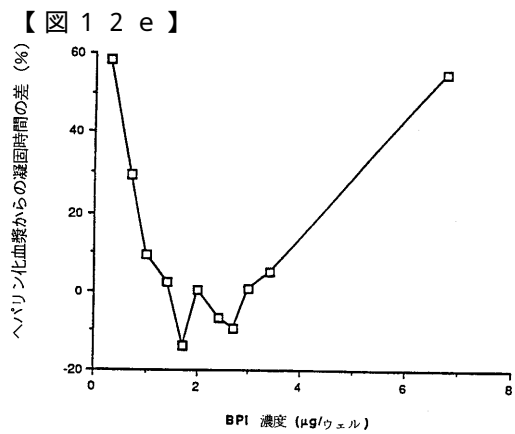
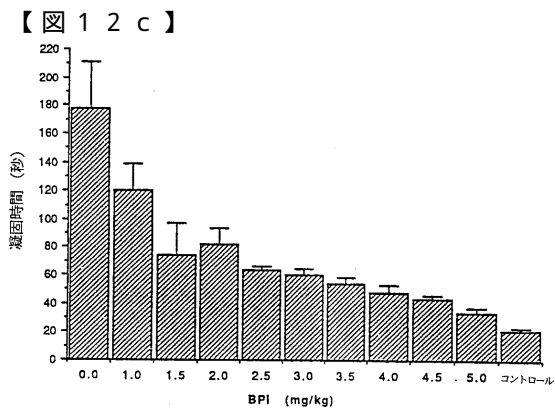
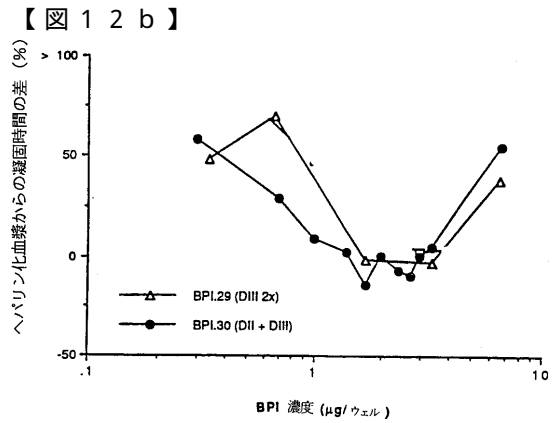
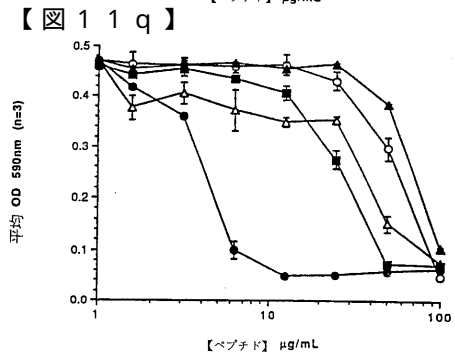
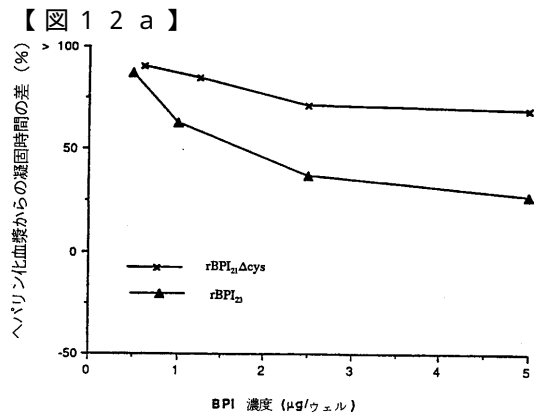
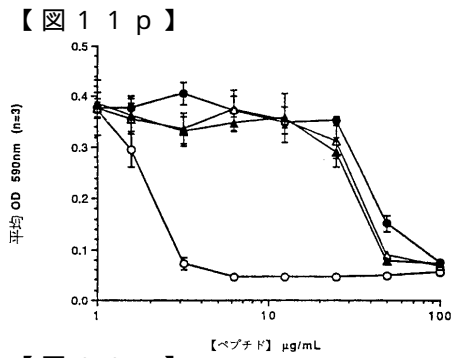


【 11 m 】



【 11 o 】





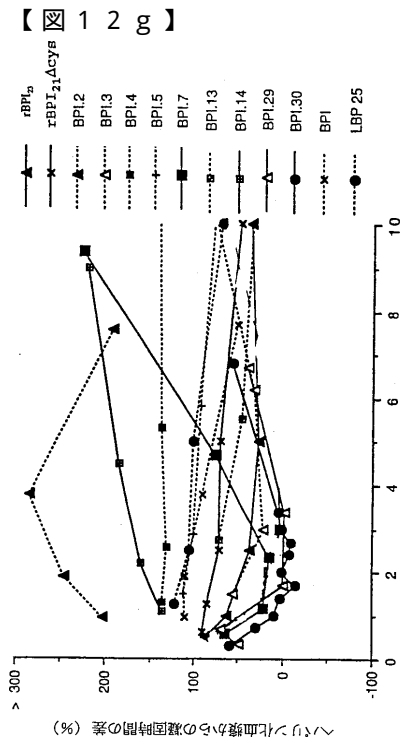


FIGURE 13

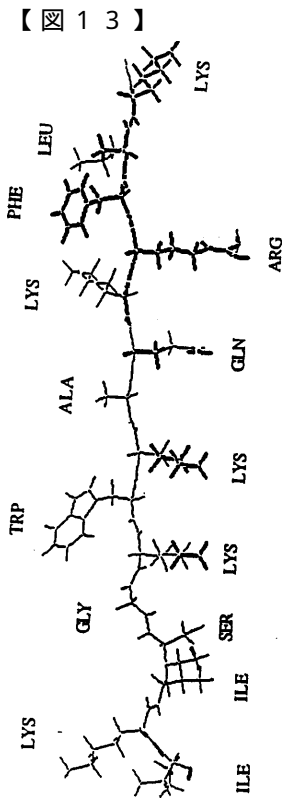


FIGURE 14

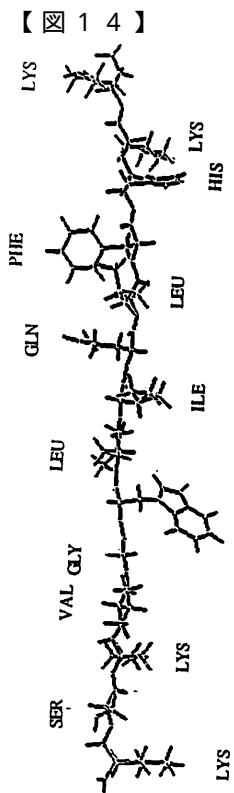
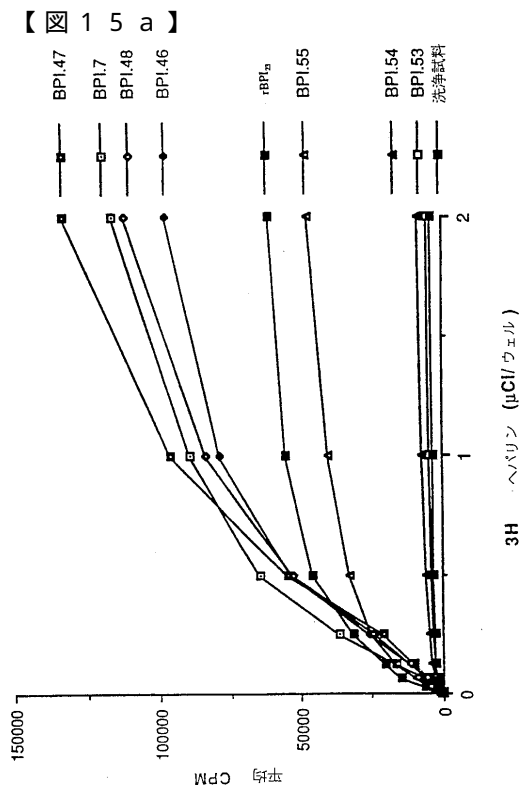
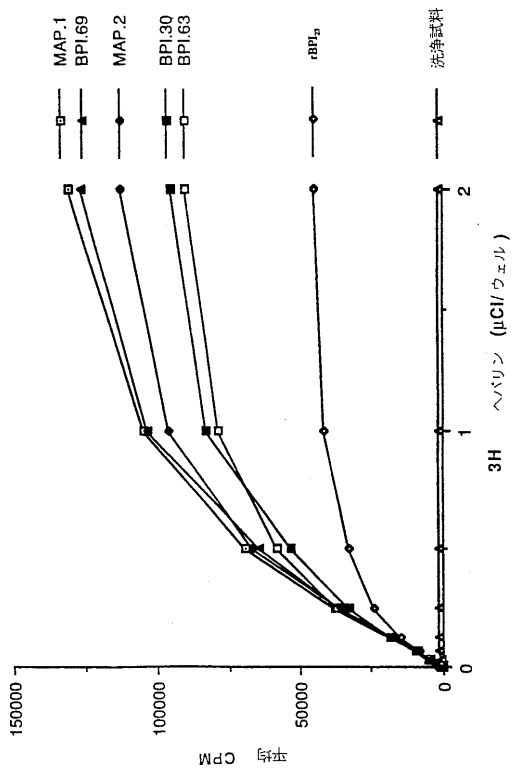


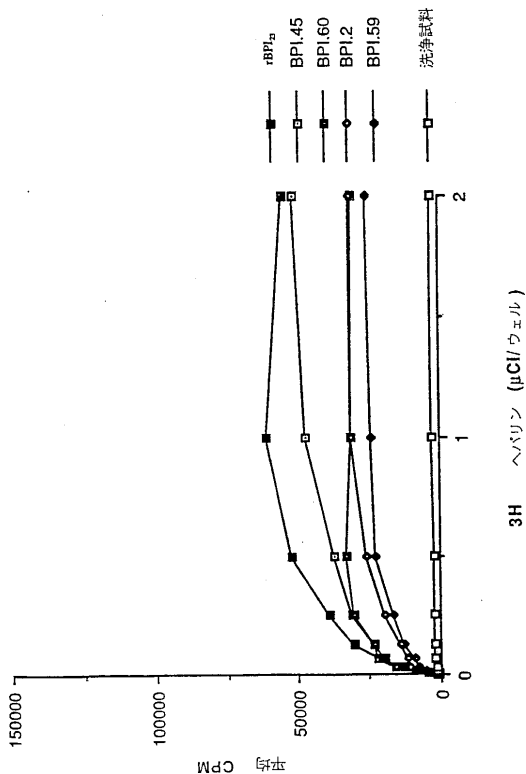
FIGURE 15a



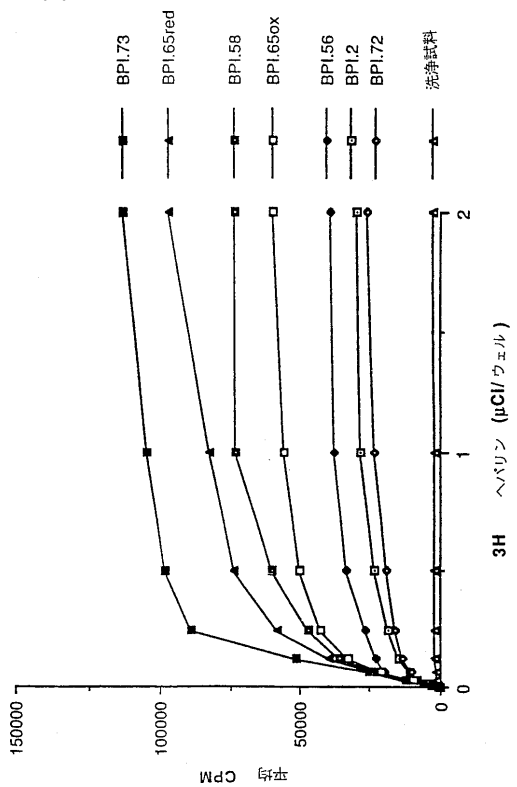
【 15 b】



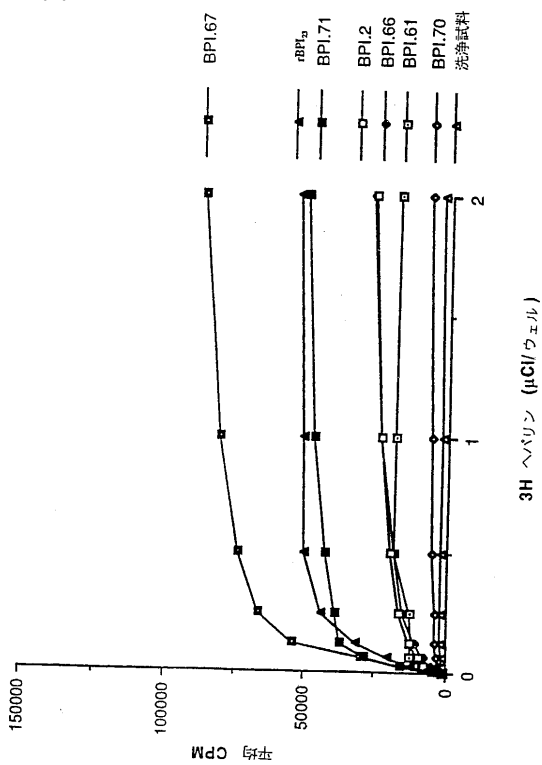
【 15 c】



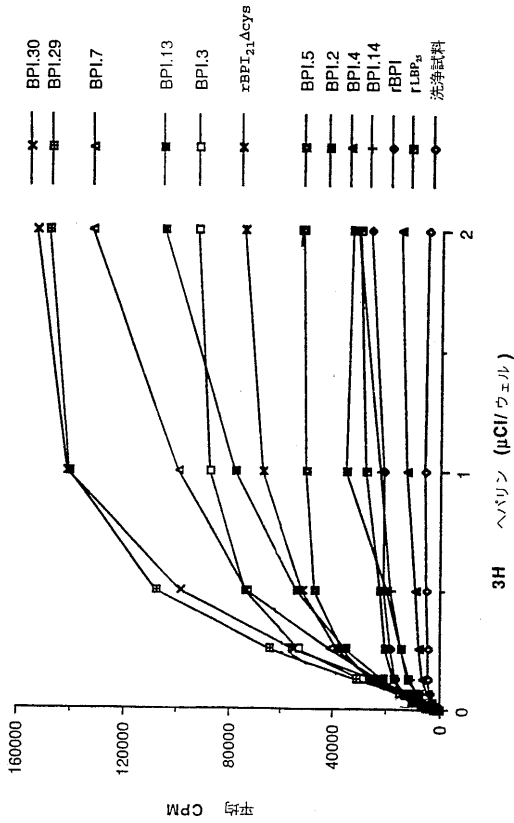
【 15 d】



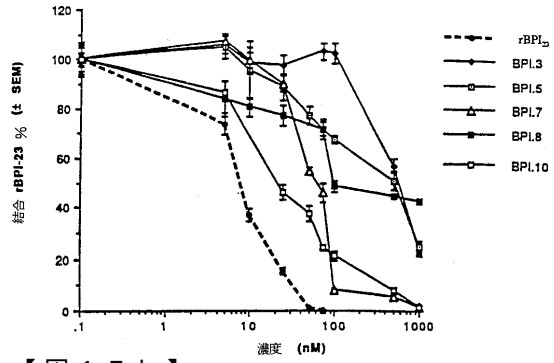
【 15 e】



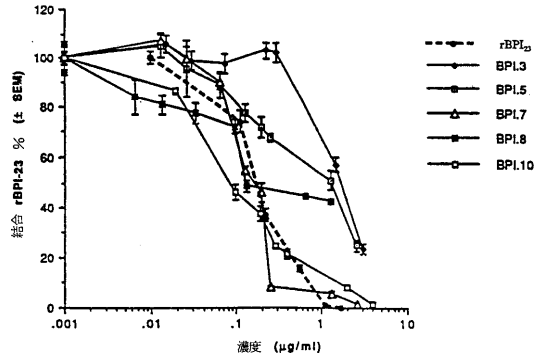
【 16】



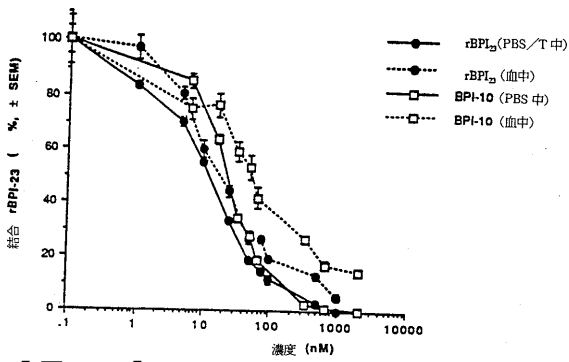
【 17 a】



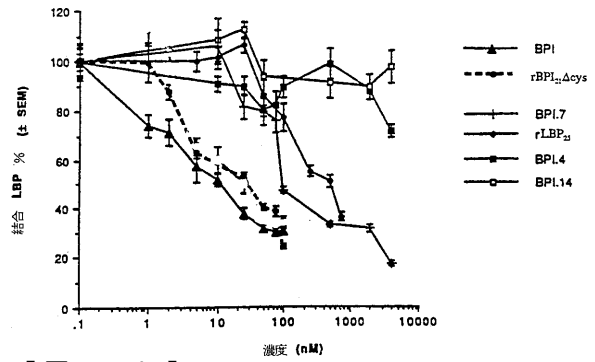
【 17 b】



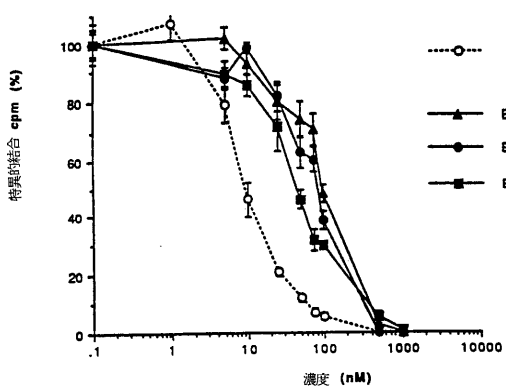
【 18】



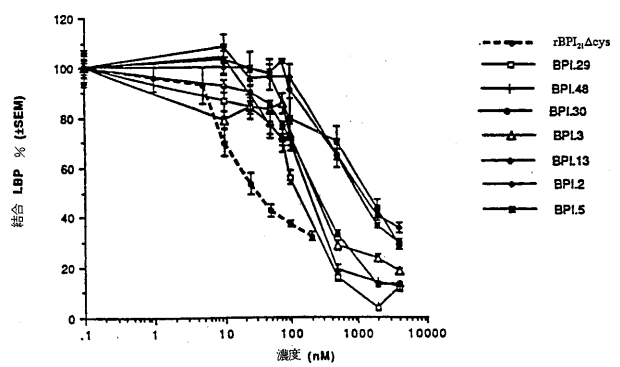
【 20 a】



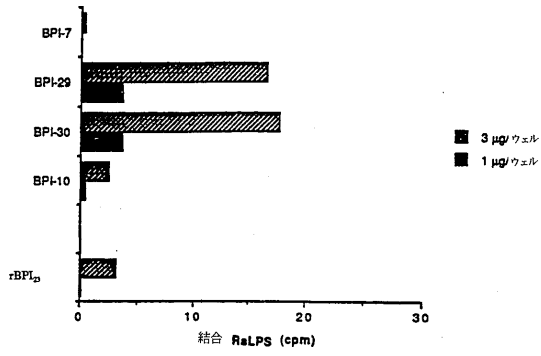
【 19】



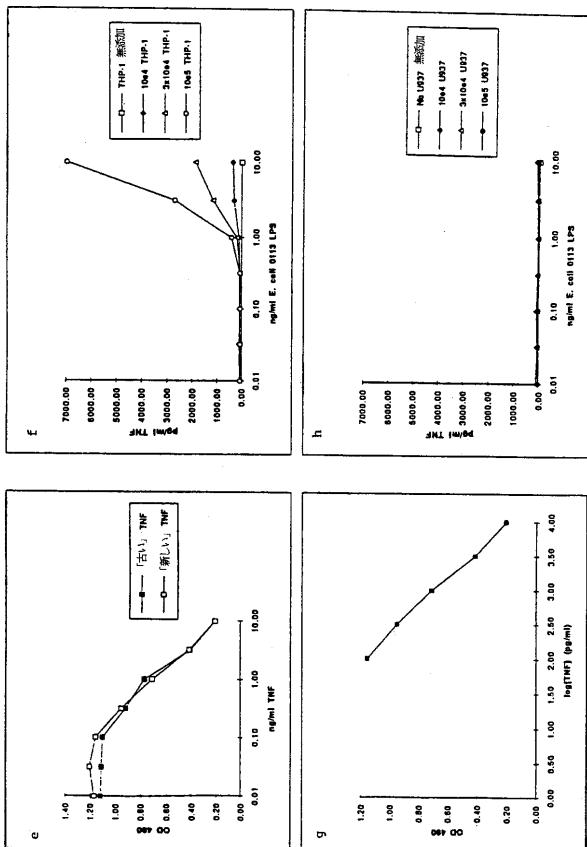
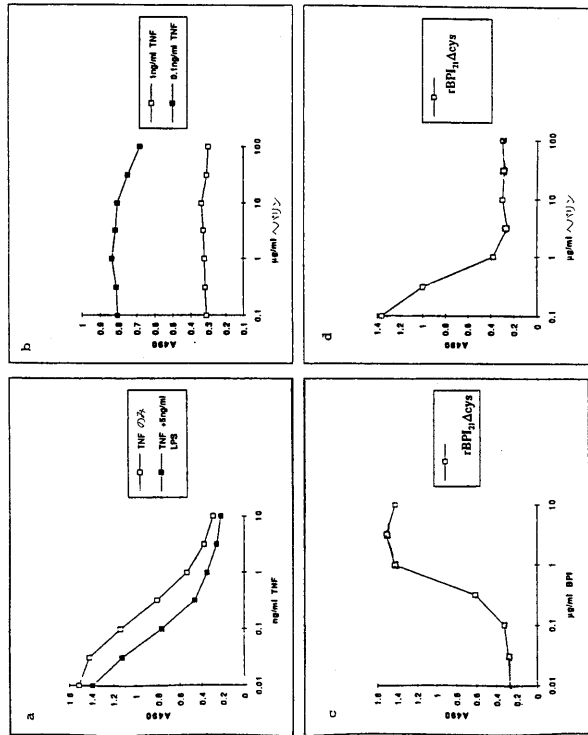
【 20 b】



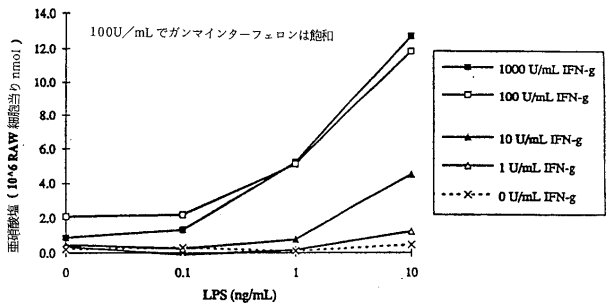
【 2 1 】



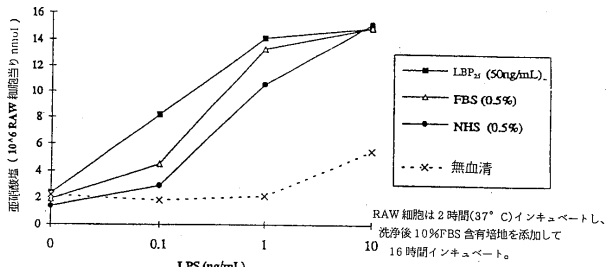
【 2 2 】

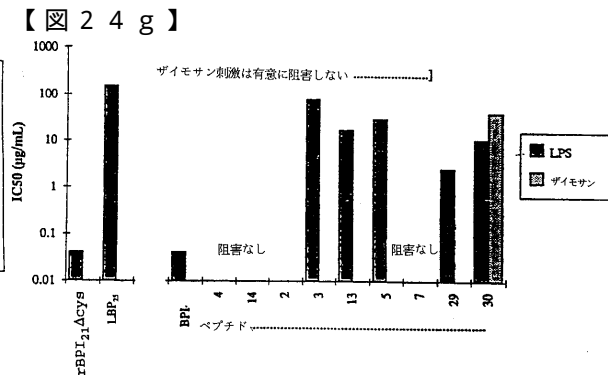
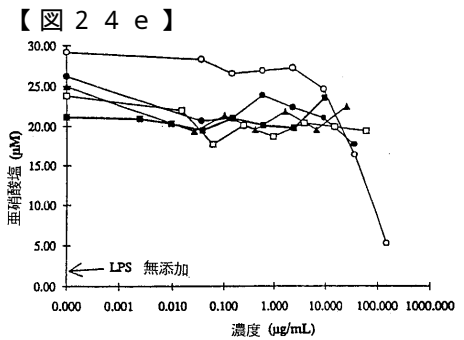
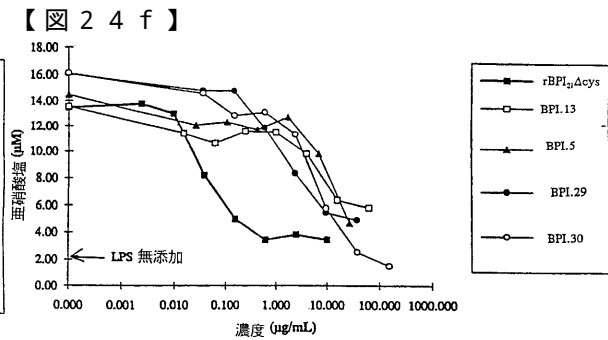
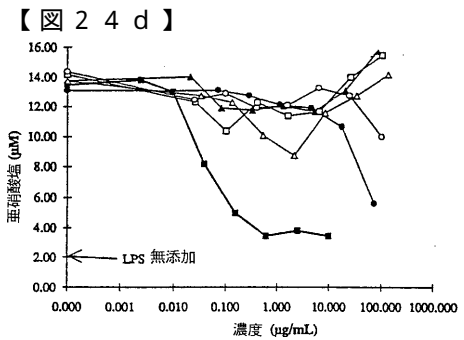
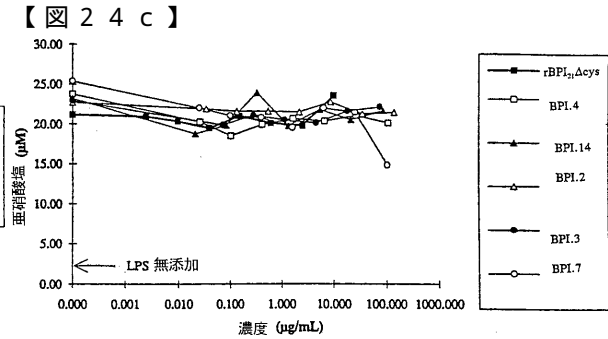
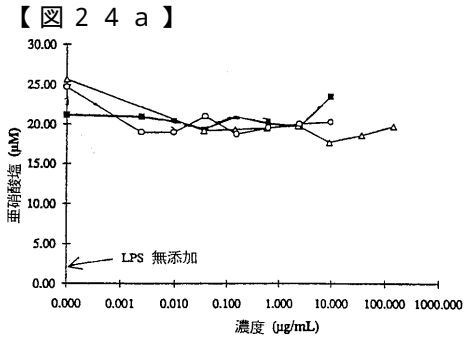
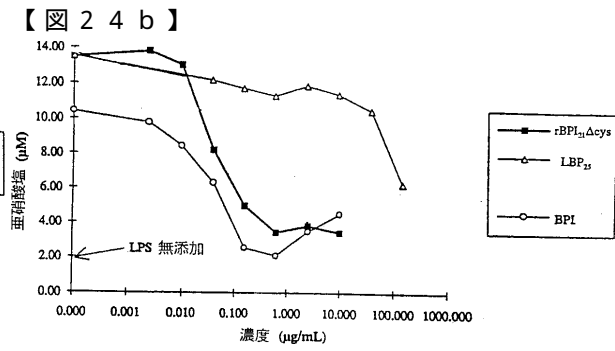
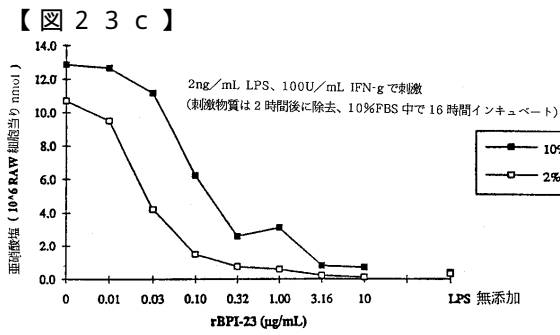


【 2 3 a 】



【 2 3 b 】





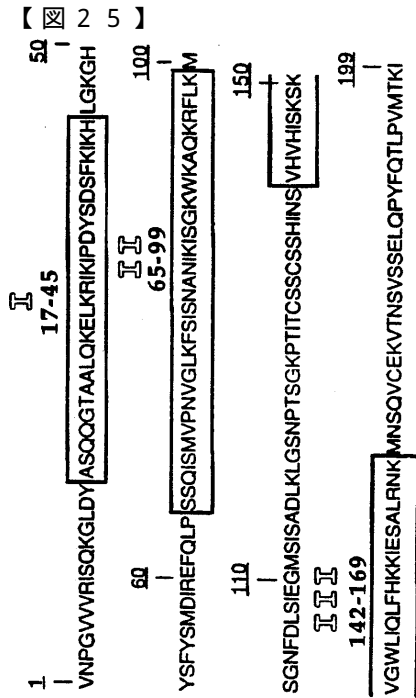
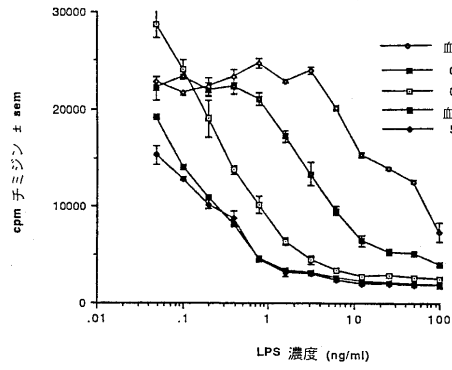


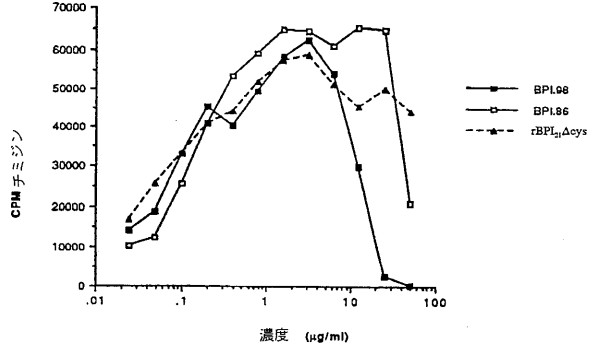
FIGURE 25

【 26 a 】

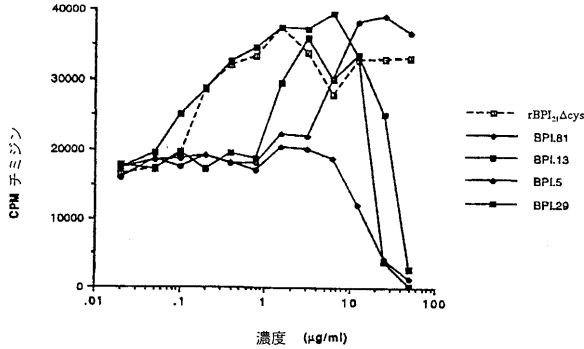
LPS に対する RAW 細胞応答の血清/LBP 依存性



【 26 b 】

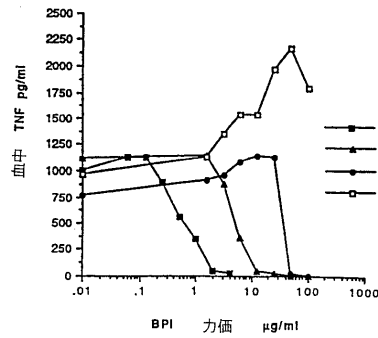


【 26 c 】



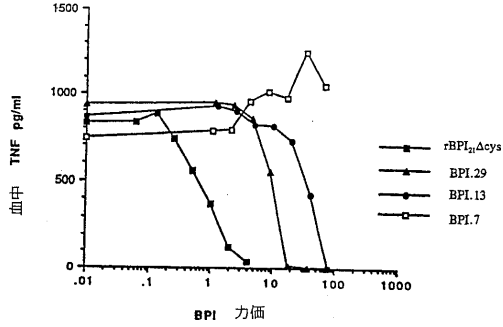
【 27 b 】

全血における LPS による TNF 生産の BPI 阻害



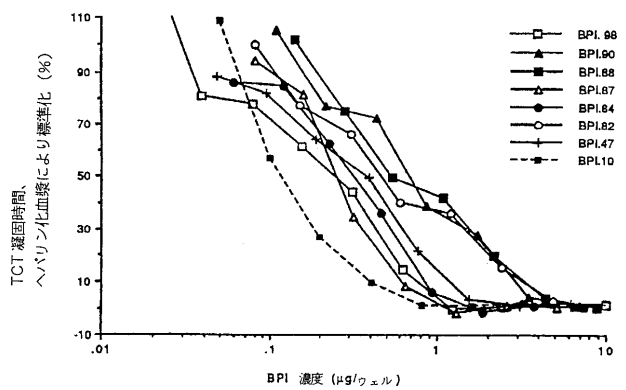
【 27 a 】

全血における LPS による TNF 生産の BPI 阻害



【 28 】

ヘパリン化血漿の TCT 凝固時間に対する BPI ペプチドの効果



---

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 08/183,222  
(32)優先日 平成6年1月14日(1994.1.14)  
(33)優先権主張国 米国(US)

合議体

審判長 平田 和男  
審判官 種村 慈樹  
審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第92/9621(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K14/47  
A61K38/00  
MEDLINE(STN)  
BIOSIS(DIALOG)