

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530404

(P2004-530404A)

(43) 公表日 平成16年10月7日(2004.10.7)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 B O 6 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	A 4 C O 7 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 246 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-525828 (P2002-525828)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバ
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月10日 (2003.3.10)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028124		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(87) 国際公開番号	W02002/020822		オースティン、ウエスト・セブンス・スト
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		リート・201
(31) 優先権主張番号	60/231,266	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	09/765,101		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001.1.17)	(72) 発明者	アラップ ワディ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 テキサス州 ヒュースト
			ン バッファロー スピードウェイ #3
			28 7171
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法 (BRASIL)

(57) 【要約】

本発明は、標的に選択的に結合するペプチド配列を同定する新規方法に関する。もう一つの態様において、標的は、細胞もしくは細胞塊、化学物質、化合物、分子、もしくは集合体に結合した粒子、または寄生体を含んでもよい。好ましい態様において、標的細胞は、ファージライブラリに曝露する前にソーティングされる。一般的な方法である選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法 (BRASIL) は、未結合のファージを保存しながら標的に結合するファージの、迅速かつ効率的な分離を提供する。BRASILは、第一の標的に非特異的に結合するファージを差し引いてから、差し引いたライブラリを第二の標的に曝露する前選択法において用いてもよい。特定の態様は、BRASILによって同定されたターゲットペプチド、および治療物質もしくは造影剤の標的化輸送、または疾患の診断もしくは治療のために、そのようなペプチドを用いる方法に関する。第一の相、第二の相、標的およびファージライブラリを含む新規組成物も同様に開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的の密度が第二の相の密度より大きく、第二の相の密度が第一の相の密度より大きい、以下を含む組成物：

- a) ファージ結合のための標的；
- b) ファージディスプレイライブラリ；
- c) 第一の相；および
- d) 第二の相。

【請求項 2】

標的が単離された細胞または小さな細胞塊を含む、請求項 1 記載の組成物。

10

【請求項 3】

細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】

細胞が、細菌、単細胞生物、酵母、カビ、真菌、アメーバ、ジアルジア (*Giardia*)、レジオネラ (*Legionella*)、大腸菌 (*E. coli*)、サルモネラ (*Salmonella*)、白血病細胞、癌細胞、幹細胞、胚細胞、骨髄細胞、脾細胞、赤血球、リンパ球、肝細胞、リンパ節細胞、脈管形成細胞、尿路上皮細胞、哺乳類細胞、動物細胞、植物細胞、ヒト細胞、およびマウス細胞からなる群より選択される、請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】

標的が寄生虫である、請求項 1 記載の組成物。

20

【請求項 6】

標的が、プラスモジウム・ファルシパルム (*Plasmodium falciparum*)、トリパノソーマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、またはリーシュマニア (*Leishmania*) である、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

標的が、化学物質、化合物、分子、または分子集合体に結合した粒子を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 8】

粒子が、ガラスビーズ、プラスチックビーズ、セラミックビーズ、または磁気ビーズである、請求項 7 記載の組成物。

30

【請求項 9】

第一の相が水相である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 10】

第二の相が第一の相と不混和性である、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

第二の相が有機相である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

第二の相の密度が約 1.02 から 1.04 g/m³ である、請求項 1 記載の組成物。

40

【請求項 13】

第一の相の密度が約 1.00 g/m³ である、請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 9 に対してシクロヘキサン 1 からなる、請求項 11 記載の組成物。

【請求項 15】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 4 に対してジイソコチルフタレート 6 からなる、請求項 11 記載の組成物。

【請求項 16】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 3 に対してビス [2-エチルヘキシル

50

」フタレート 2 からなる、請求項 1 1 記載の組成物。

【請求項 1 7】

細胞が臓器または組織から得られる、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 1 8】

細胞が培養細胞である、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 1 9】

第二の相が水相である、請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 2 0】

第二の相が、糖、塩、またはポリマーを含む、請求項 1 9 記載の組成物。

【請求項 2 1】

ポリマーがポリエチレングリコール、フィコール、またはパーコールである、請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 2】

結合したファージが第二の相に入り、未結合のファージが第一の相に残る、以下を含む方法：

a) 第一の相において標的をファージディスプレイライブラリに曝露する段階；b) 第一の相を第二の相に曝露する段階；および

c) 標的に結合したファージを未結合のファージから分離する段階。

【請求項 2 3】

第一の相が水相である、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

第二の相が有機相である、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

沈殿物を形成するために、有機相を通して標的に結合したファージを遠心分離する段階をさらに含む、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

標的が単離された細胞または小さな細胞塊を含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 7】

細胞が、細菌、単細胞生物、酵母、カビ、真菌、アメーバ、ジアルジア (*Giardia*)、レジオネラ (*Legionella*)、大腸菌 (*E. coli*)、サルモネラ (*Salmonella*)、白血病細胞、癌細胞、幹細胞、胚細胞、骨髄細胞、脾細胞、赤血球、リンパ球、肝細胞、リンパ節細胞、脈管形成細胞、尿路上皮細胞、哺乳類細胞、動物細胞、植物細胞、ヒト細胞、およびマウス細胞からなる群より選択される、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

標的が寄生虫である、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 9】

標的が、プラスモジウム・ファルシパルム (*Plasmodium falciparum*)、トリパノソーマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、またはリーシュマニア (*Leishmania*) である、請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

標的が、化学物質、化合物、分子、または分子集合体に結合した粒子を含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 1】

粒子が、ガラスビーズ、プラスチックビーズ、セラミックビーズ、または磁気ビーズである、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

第一の相の密度が約 1.00 g m / m l であって、第二の相の密度が約 1.02 から 1.04 g m / m l である、請求項 2 2 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 9 に対してシクロヘキサン 1 からなる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 34】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 4 に対してジイソコチルフタレート 6 からなる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 35】

第二の相が、本質的に容量でジブチルフタレート約 3 に対してビス [2-エチルヘキシル] フタレート 2 からなる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 36】

結合したファージを沈殿物から回収する段階をさらに含む、請求項 25 記載の方法。

10

【請求項 37】

結合したファージを回収する段階が、ファージインサートを増幅する段階を含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

ファージインサートがターゲティングペプチド配列をコードする、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

インサートを配列決定する段階をさらに含む、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

結合したファージを回収する段階が細菌にファージを感染させる段階を含む、請求項 36 記載の方法。

20

【請求項 41】

以下をさらに含む、請求項 22 記載の方法：

i) 第一の標的に対してライブラリを予めスクリーニングする段階；

i i) 未結合のファージを回収する段階；および

i i i) 第二の標的に対して未結合のファージをスクリーニングする段階。

【請求項 42】

第一の標的が正常細胞を含み、第二の標的が疾患細胞を含む、請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

疾患が、癌、白血病、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、皮膚癌、転移性癌、糖尿病、関節炎、自己免疫疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ホジキン病、カポジ肉腫、AIDS、ウイルス感染症、HIV 感染症、細菌感染症、心血管疾患、または変性疾患である、請求項 42 記載の方法。

30

【請求項 44】

第一の標的が非病原性生物であって、第二の標的が病原性生物である、請求項 41 記載の方法。

【請求項 45】

第一の標的が、プラスモジウム・ビバックス (*Plasmodium vivax*) またはプラスモジウム・ガリナセウム (*Plasmodium gallinaceum*) であって、第二の標的がプラスモジウム・ファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) である、請求項 44 記載の方法。

40

【請求項 46】

生物が細菌、単細胞生物、または寄生虫である、請求項 44 記載の方法。

【請求項 47】

第一の標的が静止状態の細胞を含み、第二の標的が活性化細胞を含む、請求項 41 記載の方法。

【請求項 48】

細胞がホルモン、増殖因子、神経伝達物質、サイトカイン、ケモカイン、薬剤、麻薬、血管新生剤、 β アゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、殺虫剤、毒素または薬物によっ

50

て活性化される、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

所望の程度の選択性または親和性を有するターゲティングペプチドが得られるまで、スクリーニング技法を繰り返す段階をさらに含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 50】

B R A S I L（選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法）によって調製される、ターゲティングペプチド。

【請求項 51】

請求項 50 記載のターゲティングペプチドをコードする核酸を含む発現ベクター。

【請求項 52】

治療タンパク質またはペプチドをコードする核酸をさらに含む、請求項 51 記載の発現ベクター。

【請求項 53】

治療タンパク質またはペプチドが、前アポトーシス剤、抗血管新生剤、血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、細胞毒性剤、抗生物質、生存因子、抗アポトーシス剤、ホルモン拮抗剤、抗体、または抗体の F a b 断片である、請求項 52 記載の発現ベクター。

【請求項 54】

前アポトーシス剤がグラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、(KLAKLAK)₂ (配列番号 :1),

(KLAKKLA)₂ (配列番号 :2), (KAAKKAA)₂ (配列番号 :3)または(KLGKKLG)₃ (配列

番号 :4)

である、請求項 53 記載の発現ベクター。

【請求項 55】

抗血管新生剤が、トロンボスポンジン、アンジオスタチン 5、色素上皮由来因子、アンジオテンシン、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲン活性化因子阻害剤、組織メタロプロテナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン 12、I P-10、G r o-β、プロリフェリン関連タンパク質、アンジオポエチン 2 (レジェネロン)、インターフェロン-α、16K プロラクチン断片、エンドスタチン、および血小板因子 4 からなる群より選択される、請求項 43 記載の発現ベクター。

【請求項 56】

サイトカインが、インターロイキン 1 (I L-1)、I L-2、I L-5、I L-10、I L-11、I L-12、I L-18、インターフェロン-γ (I F N-γ)、I F-α、I F-β、腫瘍壊死因子-α (T N F-α)、または G M-C S F (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)である、請求項 43 記載の発現ベクター。

【請求項 57】

ターゲティングペプチドが B R A S I L によって同定される、治療物質に結合したターゲティングペプチドを含む組成物。

【請求項 58】

治療物質が、薬物、化学療法剤、放射性同位元素、前アポトーシス剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞障害剤、ペプチド、タンパク質、抗生物質、抗体、抗体の F a b 断片、造影剤、核酸、抗原、生存因子、抗アポトーシス剤、ホルモン拮抗剤、ウイルス、細胞、細菌、酵母、または哺乳類細胞である、請求項 57 記載の組成物。

【請求項 59】

配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13 から配列番号：124 の任意の配列、または配列番号：128 から配列番号：289 の如何なるものから選択される配列の少なくとも 3 つの連続アミノ酸を含む、大きさがアミノ酸 100 個またはそれ未満の、単離ペプチド。

【請求項 60】

10

20

30

40

50

大きさがアミノ酸 25 個またはそれ未満である、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 61】

大きさがアミノ酸 10 個またはそれ未満である、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 62】

大きさがアミノ酸 5 個またはそれ未満である、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 63】

ペプチドが、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13 から配列番号：124 の任意の配列、または配列番号：128 から配列番号：289 の任意の配列から選択される配列の、少なくとも 5 つの連続アミノ酸を含む、請求項 59 記載の単離ペプチド。

10

【請求項 64】

ペプチドが、薬物、化学療法剤、放射性同位元素、前アポトーシス剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞障害剤、ペプチド、タンパク質、抗生物質、抗体、抗体の Fab 断片、造影剤、抗原、生存因子、抗アポトーシス剤、ホルモン拮抗剤、ウイルス、細胞、細菌、酵母細胞、または哺乳類細胞に結合している、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 65】

抗血管新生剤が、トロンボスポンジン、アンジオスタチン 5、色素上皮由来因子、アンジオテンシン、ラミニンペプチド、フィブロンネクチンペプチド、プラスミノゲン活性化因子阻害剤、組織メタロプロテナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン 12、血小板因子 4、IP-10、Gro-β、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ペントサンポリスルフェート、アンジオポエチン 2 (レジェネロン)、インターフェロン-α、ハービマイシン A、PNU 145156 E、16K プロラクチン断片、リノミド、タリドミド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNF-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドセタキセル、ポリアミン、プロテオソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、SU シグナル伝達阻害剤、アキュチン (accutin)、シドフォビル (cidofovir)、ビンクリスチン、ブレオマイシン、AGM-1470、血小板因子 4 およびミノサイクリンからなる群より選択される抗血管新生剤から選択される、請求項 64 記載の単離ペプチド。

20

30

【請求項 66】

ウイルス、バクテリオファージ、細菌、酵母細胞、リポソーム、微粒子、磁気ビーズ、細胞、または微小装置 (microdevice) に結合している、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 67】

真核細胞発現ベクターに結合している、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 68】

以下を含む標的化輸送のための方法：

- a) BRASIL によってペプチドを選択する段階；
- b) 該ペプチドを治療物質に結合させる段階；および
- c) 該ペプチドと該物質とを被験者に提供する段階。

40

【請求項 69】

以下を含む造影方法：

- a) BRASIL によってペプチドを選択する段階；
- b) 該ペプチドを造影剤に結合させる段階；
- c) 該ペプチドと該物質とを被験者に提供する段階；および
- d) 被験者の像を得る段階。

【請求項 70】

以下を含む、疾患状態を診断する方法：

- a) ペプチドが疾患状態に関連した細胞にターゲティングされる、BRASIL によって

50

ペプチドを選択する段階；

b) 被験者に該ペプチドを投与する段階；および

c) 該被験者における該ペプチドの分布を決定する段階。

【請求項 7 1】

疾患状態が、糖尿病、炎症疾患、関節炎、アテローム性動脈硬化症、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症、心血管疾患および変性疾患からなる群より選択される、請求項 7 0 記載の方法。

【請求項 7 2】

以下を含む、疾患状態を治療する方法：

a) ペプチドが疾患状態に関連した細胞にターゲティングされる、BRASILによってペプチドを選択する段階； 10

b) 該疾患状態を治療するために有効な、一つまたは複数の分子を該ペプチドに結合させる段階；および

c) 疾患状態を有する被験者に該ペプチドを投与する段階。

【請求項 7 3】

疾患状態が、糖尿病、炎症疾患、関節炎、アテローム性動脈硬化症、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症、心血管疾患および変性疾患からなる群より選択される、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

細胞をファージライブラリに曝露する前に細胞をソーティングする段階をさらに含む、請求項 2 6 記載の方法。 20

【請求項 7 5】

細胞がFACS（蛍光活性化細胞ソーティング）によってソーティングされる、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

細胞が白血病患者と共に被験者から得られ、白血病細胞がファージライブラリに曝露するために選択される、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

ライブラリが同じ被験者からの正常細胞に対して予め差し引かれる、請求項 7 6 記載の方法。 30

【請求項 7 8】

配列が

配列番号:6 (CPQPRPLC), 配列番号 :41 (CVPMRLQC), 配列番号 :42 (CLGKGSVC), 配列番号 :45 (CIIGSYVC), 配列番号 :47 (CWRSVEVC), 配列番号 :48 (CSIRRESC), 配列番号 :52 (CIRREKRC), 配列番号 :59 (CMRGKGLC), 配列番号 :62: (CGRDSKQC)または配列番号 :132 (CRGGGRLC)

から選択される、請求項 5 9 記載の単離ペプチド。

【請求項 7 9】 40

配列が

配列番号:7 (CSVWFGC), 配列番号 :8 (CMVYFGC), 配列番号 :182 (CSVWWGC), 配列番号 :185 (CNVWYGC), 配列番号 :187 (CPTMTEC), 配列番号 :188 (CSVWFGC), 配列番号 :189 (CSVWYGC), 配列番号 :198 (CGNHQKC), 配列番号 :200 (CQGTWIC) または 配列番号 :201 (CXVWXGC)

から選択される、請求項 5 9 記載の単離ペプチド。

【請求項 8 0】

配列が

配列番号 :13 (CGQEISGLC), 配列番号 :20 (CWGGGLSGLC), 配列番号 25
(VHALES), 配列番号 :27 (CRIRMSAGC), 配列番号 :32 (DRVTLG), 配列番
号 :35 (ISGL) 配列番号 :36 (GGLS), 配列番号 :37 (HALE), 配列番号 :38
(MSAG) または 配列番号 39 (RVTXG)

から選択される、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 81】

配列が

配列番号 :63 (CLGRLTVLC), 配列番号 :67 (CVGVGRSRC), 配列番号 :72
(CESLSHVDC), 配列番号 :76 (CYPGYDSYC), 配列番号 :79 (CVKKGGFWC),
配列番号 :87 (CPWYWLGWC) 配列番号 :94 (CWWPWGWGC), 配列番号 :89
(CARDRIAC), 配列番号 :104 (CWKGFGWWC) または 配列番号 :114
(CRVDFSKGC)

10

から選択される、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 82】

配列が

配列番号 :207 (CFGGVGSWC), 配列番号 :223 (CSVIKRGAC), 配列番号 :235
(CTFSGHRCL), 配列番号 :239 (CIVMLGWRC), 配列番号 :249 (CLGKCLSSC),
配列番号 :253 (CSSELRAAC), 配列番号 :259 (CLGWRAAAC), 配列番号 :277
(CVGNAKLMC), 配列番号 :280 (CQLGRAHGC) または 配列番号 :285
(CQWWLGPLC)

20

から選択される、請求項 59 記載の単離ペプチド。

【請求項 83】

因子によって刺激される、請求項 26 記載の方法。

【請求項 84】

因子がホルモン、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、または神経伝達物質である、請求項 83 記載の方法。

30

【請求項 85】

細胞がトランスジェニックタンパク質を発現するようにトランスフェクトされている、請求項 26 記載の方法。

【請求項 86】

細胞がトランスジェニックタンパク質を発現するように遺伝子操作されている、請求項 26 記載の方法。

【請求項 87】

細胞がトランスジェニックタンパク質を発現するように後成的に操作されている、請求項 26 記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本出願は、2000年9月8日に提出された米国特許仮出願第60/231,266号および2001年1月17日に提出された米国特許出願第09/765,101号の恩典を主張する。本発明は、米国陸軍の助成金DAMD 17-98-1-8041および17-98-1-8581ならびに米国国立衛生研究所の助成金1R01CA78512-01A1、1R01CA90810-01、および1R01CA82976-01により政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を保有する。

50

【0002】

発明の分野

本発明は、分子薬品および治療物質の標的化送達に関する。より詳しく述べると、本発明は、臓器または細胞を選択的に標的にするペプチドを同定し使用するための、組成物および方法に関する。特に、この方法および組成物は選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法（BRASIL）に関する。

【0003】

関連技術の説明

多くのヒトの疾患状態の治療的治療は、用いる治療物質の全身毒性のために制限される。癌治療物質は、特に非常に低い治療指数を示し、皮膚および骨髄のような急速に増殖する正常組織は、腫瘍細胞を殺すために用いる濃度ほど高くない物質の濃度で影響を受ける。癌および他の臓器、または組織限定疾患の治療は、所望の臓器または組織への治療物質の標的化送達のための組成物および方法を開発することによって大きく促進されるであろう。診断上の造影法も、所望の臓器、組織、または疾患細胞への造影剤の送達によって促進されるであろう。

【0004】

最近、マウスモデル系において臓器または組織ターゲティングペプチドを同定するためのファージディスプレイライブラリを用いるインビボ選択系が開発された。バクテリオファージの表面上にトランスジェニックペプチドを発現するファージディスプレイライブラリは、当初、免疫グロブリンのエピトープ結合部位をマッピングするために開発された（SmithおよびScott、1986、1993）。そのようなライブラリは、ファージの表面タンパク質をコードするcDNAにランダムオリゴヌクレオチドを挿入すること、独自のペプチドを 10^9 個もの順列で示すファージ粒子のコレクションを作製することによって作製することができる（PasqualiniおよびRuoslahti、1996；Arapら、1998a；Arapら、1998b）。

【0005】

ファージディスプレイライブラリをマウスに静脈内投与した後に、個々の臓器からのファージの回収を行った（PasqualiniおよびRuoslahti、1996）。ファージの外部表面上に発現された特異的ターゲティングペプチド配列に基づいて、異なるマウス臓器または組織の血管床に選択的に回帰することができるファージを回収した（PasqualiniおよびRuoslahti、1996）。多様な臓器および腫瘍回帰ペプチドがこの方法によって同定されている（Rajotteら、1998、1999；Koivunenら、1999；Burgら、1999；Pasqualini、1999）。それらのターゲティングペプチドはそれぞれ、マウス標的組織の血管上に選択的に発現される異なる受容体に結合した（Pasqualini、1999；Pasqualiniら、2000；Folkman、1995；Folkman、1997）。腫瘍回帰ペプチドはマウスの腫瘍新生血管において上方制御されている受容体に結合した（Brooksら、1994b；Pasqualini、2000）。臓器または組織に対して選択的な個々のターゲティングペプチドを同定する他に、（PasqualiniおよびRuoslahti、1996；Arapら、1998a；Koivunenら、1999）、このシステムは、インビボでマウスに発現される内皮細胞表面マーカーを同定するために用いられている（RajotteおよびRuoslahti、1999）。

【0006】

ターゲティングペプチドに治療物質を結合させると、マウスモデル系において所望の臓器または組織への物質の選択的輸送が得られた。腫瘍の新生血管に存在する受容体に化学療法剤および前アポトーシスペプチドを標的化輸送すると、担癌マウスモデルにおいて治療有効性の顕著な増加および全身毒性の減少が得られた（アラプ（Arap）ら、1998a、1998b；エラビー（Ellerby）ら、1999）。

【0007】

この相対的成功にもかかわらず、ファージライブラリの細胞表面選択は、技術的問題を伴

った。ファージライブラリを細胞懸濁液または単層と共にインキュベートすると、多数の非結合および非特異的結合クローンが回収される。このバックグラウンドファージ結合を繰り返し洗浄によって除去することは、労力を要し、しかも非効率的である。細胞および可能性のあるリガンドは、必要な多くの洗浄段階のさいにしばしば失われる。このように、非特異的バックグラウンドを減少させながら、インビボ法の選択性および特異性を保持するインビトロバイオパニングの迅速かつ有効な方法が必要である。

【0008】

ファージディスプレイライブラリによるこれまでの研究は、ヒトターゲティングペプチドが相同であると仮定して、ターゲティングペプチドおよびその受容体を同定するためにマウスモデル系を信頼していた。しかし、細胞表面受容体のヒトにおける分布および機能は、マウスとは大きく異なっている可能性がある。さらに、マウスモデル系は、ほんの一握りの特異的臓器のためのターゲティングペプチドを特徴を調べるために利用されているに過ぎない。当技術分野において、治療物質を標的化輸送するために臨床的に有用となりうるヒト臓器、組織、または細胞型に対して選択的なターゲティングペプチドを同定するための方法および組成物が必要である。

10

【0009】

発明の概要

本発明は、臓器、組織、または細胞型に対して選択的なターゲティングペプチドを同定するための組成物およびインビトロ方法を提供することによって、当技術分野における長いあいだの必要性を解決する。好ましい態様において、そのようなターゲティングペプチドは、一つまたは複数の臓器、組織、または細胞型の試料を採取すること、試料を単離細胞または小さな細胞塊に分離すること、細胞または塊を第一の相に懸濁させること、細胞または細胞塊をファージディスプレイライブラリに曝露すること、第一の相を第二の相の上に載せること、および細胞が遠心管の底に沈降するように二つの相を遠心分離することによって同定される。より好ましい態様において、第一の相は水相であり、第二の相は有機相である。さらにより好ましい態様において、細胞はヒト細胞である。特定の態様において、ファージは細菌に曝露することによって沈殿物から回収して、ファージクローンを播種、単離、およびバルク培養において増殖させてもよい。もう一つの態様において、ファージインサートは、PCR（商標）または他の増幅技術によって沈殿物から回収して、インサートを配列決定してターゲティングペプチドを同定してもよい。特定の態様において、有機相はジブチルフタレートまたはジブチルフタレートとシクロヘキサンとの混合物を含む。本明細書に開示の方法は、本明細書において一般的に、選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法（BRASIL）と呼ぶ。

20

30

【0010】

もう一つの態様において、BRASIL法を用いて、実質的に如何なる化学、分子、または分子複合体に対するターゲティングペプチドを同定してもよい。結合ファージと未結合ファージとの分離は、好ましくは、結合ファージを水相から有機相に分配することによって行われる。これには、ファージが結合する標的が、ファージより密度が大きい、ファージより大きい、または好ましくはその双方である必要がある。好ましい態様において、標的は水相に不溶性である。この要件を満足するために、化学、化合物、または分子を、大きい不溶性の粒子、例えば、ガラス、プラスチック、セラミックまたは磁気ビーズに結合させてもよい。当業者は、本発明が、ビーズに限定されず、如何なる大きいおよび／または密度の大きい粒子を用いてもよいことを認識するであろう。標的を結合した粒子を、水相においてファージライブラリを曝露して、標的に結合したファージを有機相に分配してもよい。本明細書に示した例は、結合したファージを有機相に分配するために遠心分離を用いることを説明するが、当業者は、他のタイプの分配を用いてもよく、それらも本発明の範囲内であることを認識するであろう。例えば、磁気ビーズに結合した標的の場合、ビーズに結合したファージを有機相に引き寄せるために磁場を課すことができるであろう。

40

【0011】

細胞が標的である態様において、細胞は哺乳類細胞、ヒト細胞、マウス細胞、または動物

50

細胞であってもよい。または、細胞には、細菌または多細胞微生物のような如何なるタイプの原核細胞または真核細胞が含まれてもよい。好ましい態様において、BRASILに用いるために特定の細胞集団を調製してもよい。例えば、白血病患者からの細胞をFACS（蛍光活性化セルソーター、ベクトン・ディッキンソン社）を用いて非癌細胞から癌細胞をソーティングしてもよい。ファージライブラリを、同じ患者の正常細胞に対して予め選択するサブトラクションを行って、または行わずに癌様細胞のみに対してスクリーニングしてもよい。当業者は、細胞のソーティングが白血病試料に限定されず、如何なる不均一な細胞集団によって実践してもよいことを認識するであろう。

【0012】

特定の態様において、BRASILによって同定されたターゲティングペプチドは、遺伝子治療ベクターおよび融合タンパク質を含むがこれらに限定されない治療物質を被験者における特定の臓器、組織、または細胞型に選択的に輸送するために有用である。当業者は、用いられる請求の方法の範囲には、所望の臓器、組織、または細胞型への治療物質の標的化輸送によって治療することができる如何なる疾患状態も含まれることを認識するであろう。

【0013】

当業者は、本明細書に開示のターゲティングペプチドがヒト被験者において用いるために特に適しているが、それらは、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、豚、または他の如何なる哺乳類のような他の被験者においても有用となる可能性があることが考慮されることを理解するであろう。

【0014】

本発明の特定の態様は、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124のいずれか、または配列番号：128～配列番号：289のいずれかから選択されるターゲティングペプチド配列の少なくとも3つの連続するアミノ酸を含む、大きさがアミノ酸100個またはそれ未満の単離ペプチドに関する。

【0015】

好ましい態様において、単離ペプチドは、アミノ酸50個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸30個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸20個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸10個もしくはそれ未満、またはさらにより好ましくは大きさがアミノ酸5個もしくはそれ未満である。他の好ましい態様において、請求項1記載の単離ペプチドは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124のいずれか、または配列番号：128～配列番号：289のいずれかから選択されるターゲティングペプチド配列の少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個の連続するアミノ酸を含む。

【0016】

特定の態様において、単離ペプチドは分子に結合する。好ましい態様において、結合は共有結合である。さらなる態様において、分子は、薬物、化学療法剤、放射性同位元素、アポトーシス促進物質、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞障害物質、ペプチド、タンパク質、抗生物質、抗体、抗体のFab断片、造影剤、生存因子、抗アポトーシス物質、ホルモンアンタゴニスト、核酸または抗原である。それらの分子は、例示目的により挙げたに過ぎない。本発明の範囲に含まれる分子には、ターゲティングペプチドに結合して、被験者に投与してもよい実質的に任意の分子が含まれる。好ましい態様において、アポトーシス促進物質は、グラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、

(KLAKLAK)₂ (配列

番号 :1), (KLAKKLA)₂ (配列番号 :2), (KAAKKAA)₂ (配列番号 :3)または

(KLGKKLG)₃ (配列番号 :4)

である。他の好ましい態様において、抗血管新生物質は、トロンボスポンジン、アンジオスタチン、エンドスタチン、または色素上皮由来因子である。さらに好ましい態様において、サイトカインは、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、IL-5、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18、インターフェロン- γ (IF- γ)、IF- α 、IF- β 、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、またはGM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) である。そのような例は、代表として示したに過ぎず、当技術分野で既知の他のアポトーシス促進物質、抗血管新生物質、またはサイトカインを除外すると解釈されない。

【0017】

他の態様において、単離ペプチドは高分子複合体に結合する。好ましい態様において、結合は共有結合である。他の好ましい態様において、高分子複合体はウイルス、バクテリオファージ、細菌、リポソーム、微粒子、磁気ビーズ、細胞、または微小装置である。これらは例示目的で示したに過ぎない。本発明の範囲に含まれる高分子複合体には、ターゲティングペプチドに結合して、被験者に投与してもよい実質的に任意の高分子複合体が含まれる。他の好ましい態様において、単離ペプチドは、真核細胞発現ベクター、より好ましくは遺伝子治療ベクターに結合する。

【0018】

もう一つの態様において、単離ペプチドは、固体支持体、好ましくは磁気ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、カラムクロマトグラフィーマトリクス、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) マトリクス、またはファストパフォーマンス液体クロマトグラフィー (FPLC) に結合する。このような結合ペプチドは、例えば抗体、タンパク質、ペプチド、またはターゲティングペプチドに結合する他のリガンドを精製または単離するのに役立つ。特定の態様において、この結合はターゲティングペプチドにより模倣される、内因性受容体、リガンド、または受容体：リガンド対を同定するのに使用できる。

【0019】

本発明のさらなる態様は、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124のいずれか、または配列番号：128～配列番号：289のいずれかから選択される配列の連続アミノ酸少なくとも3個を含む、融合タンパク質に関する。

【0020】

その他の特定の態様は、薬学的に許容される担体において主張される単離ペプチドまたは融合タンパク質を含む組成物に関する。さらなる態様は、一つまたは複数の容器において主張される単離ペプチドまたは融合タンパク質を含むキットに関する。

【0021】

さらなる態様は、BRASILを実施するための組成物および装置を含む、キットに関する。キットの構成要素は、溶液、緩衝液、培地、有機層、細菌、ファージライブラリ、遠心チューブなどの、BRASILの実施に役立ちうる任意の組成物または装置を含むが、これらに限定されない。

【0022】

その他の態様は、所望の臓器または組織に対するターゲティングペプチドを選択する段階、上記のターゲティングペプチドを分子、高分子複合体、または遺伝子治療ベクターに結合させる段階、および上記の分子、複合体、またはベクターに結合した上記のペプチドを被験者に提供する段階を含む、標的化送達方法に関する。好ましくは、ターゲティングペプチドは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124のいずれか、または配列番号：128～配列番号：289のいずれか由来の、連続アミノ酸少なくとも3個を含むように選択される。他の好ましい態様において、ターゲティングペプチドに結合した分子は、化学療法剤、抗原、または造影剤である。当業者は、本明細書の範囲において、任意の臓器、組織、または細胞型が、任意の分子、高分子複合体、または遺伝子治療ベクターに結合したターゲティングペプチドを用い

た送達のための標的となりうることを認識するであろう。

【0023】

本発明の特定の態様は、臓器または組織にターゲティングされるペプチドを選択する段階、造影剤をペプチドに結合させる段階、ペプチドを被験者に投与する段階、および像を得る段階を含む、臓器、組織、または細胞型を造影する方法に関する。好ましい態様において、標的細胞は、疾患または他の病態に関連している。他の好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124の如何なるもの、または配列番号：128～配列番号：289の如何なるものから選択される少なくとも3つの連続アミノ酸を含む。

【0024】

他の態様において、本発明は、そのような疾患状態に関連した細胞にターゲティングされるペプチドを選択する段階、上記のペプチドに造影剤を結合させる段階、疾患を有することが疑われる被験者に上記のペプチドと造影剤とを投与する段階、および上記の被験者における上記のペプチドと造影剤との分布に基づいて疾患の有無を診断する段階を含む、疾患状態を診断する方法に関する。好ましくは、ターゲティングペプチドは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124の如何なるもの、または配列番号：128～配列番号：289の如何なるものから選択される少なくとも3つの連続アミノ酸を含む。好ましい態様において、疾患状態は、真性糖尿病、炎症疾患、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、またはウイルス感染症である。より好ましい態様において、疾患状態は転移性癌である。

【0025】

さらなる態様は、上記の受容体を含む臓器、組織、または細胞にペプチドを接触させる段階、上記のペプチドを上記の受容体に結合させる段階、および上記のペプチドとのその結合によって上記の受容体を同定する段階を含む、ターゲティングペプチドに対する受容体を同定する方法に関する。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124の如何なるもの、または配列番号：128～配列番号：289の如何なるものから選択される少なくとも3つの連続アミノ酸を含む。当業者は、接触段階が、臓器、組織、もしくは細胞の試料を利用できること、または臓器、組織、もしくは細胞のホモジネートもしくは洗浄剤抽出物を利用してもよいことを認識するであろう。特定の態様において、接触すべき細胞は、ターゲティングペプチドの疑われる受容体を発現するように遺伝子操作してもよい。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、上記の受容体にそれを共有結合させる反応性部分によって改変される。より好ましい態様において、反応性部分は、光によって活性化されると受容体に共有結合するようになる光反応基である。もう一つの好ましい態様において、ペプチドは固相支持体に結合して、受容体は、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。他の好ましい態様において、固相支持体は磁気ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、カラムクロマトグラフィーマトリクス、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）マトリクス、またはファストパフォーマンス液体クロマトグラフィー（FPLC）マトリクスを含む。特定の態様において、ターゲティングペプチドは、受容体に結合すると受容体の活性を阻害する。当業者は受容体活性が、触媒活性および結合活性を含むがこれらに限定されない当技術分野で既知の多様な方法によってアッセイすることができることを認識するであろう。もう一つの好ましい態様において、受容体は、エンドスタチン受容体、メタロプロテアーゼ、またはアミノペプチダーゼである。

【0026】

本発明のその他の態様は、ターゲティングペプチドをコードする、大きさが300ヌクレオチドまたはそれ未満の単離核酸に関する。好ましい態様において、単離核酸は、大きさが250、225、200、175、150、125、100、75、50、40、30、20または10ヌクレオチドまたはそれ未満である。他の好ましい態様において、単離

10

20

30

40

50

核酸は、真核または原核細胞発現ベクターに組み入れられる。さらにより好ましい態様において、ベクターは、プラスミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、ウイルスまたはバクテリオファージである。他の好ましい態様において、単離核酸は、発現されたペプチドを宿主細胞の細胞外表面に局在させるリーダー配列に機能的に結合している。

【0027】

本発明のさらなる態様は、疾患状態に関連する細胞を標的とするターゲティングペプチドを選択する段階、疾患状態を治療するために有効な一つまたは複数の分子をペプチドに結合させる段階、および疾患状態を有する被験者にペプチドを投与する段階を含む、疾患状態を治療する方法に関する。好ましくは、ターゲティングペプチドには、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：13～配列番号：124のいずれか、または配列番号：128～配列番号：289のいずれかから選択される連続アミノ酸少なくとも3個が含まれる。好ましい態様において、疾患状態は、真性糖尿病、炎症疾患、リウマチ様関節炎、アテローム硬化症、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、およびウイルス感染症である。

10

【0028】

本発明のもう一つの態様は、標的化遺伝子治療の分子アダプタに関する。好ましい態様において、分子アダプタは、所望の臓器または組織に対して選択的なターゲティングを提供するターゲティングペプチド配列に共有結合した、遺伝子治療ベクターに特異的な抗体のFab断片を含む。当業者は、本発明には、当技術分野で既知の如何なる遺伝子治療ベクターも含まれてもよいことを認識するであろう。分子アダプタのベクター結合部分は、抗体のFab断片に限定されないが、遺伝子治療ベクターにターゲティングペプチドを結合させるために用いることができる如何なる他の分子も含まれてもよい。唯一の要件は、遺伝子治療ベクターが分子アダプタの存在下で所望の臓器、または組織に選択的にターゲティングされなければならないことである。

20

【0029】

本発明のもう一つの態様は、癌に対する腫瘍ターゲティングペプチドを用いる組成物および方法に関する。本出願に開示の方法によって同定された腫瘍ターゲティングペプチドは、分子または高分子群を含むがこれらに限定されない治療用物質に結合させて、癌罹患被験者に投与してもよく、治療用物質の有効性の増加および全身毒性の減少を提供する。本発明の範囲に含まれる治療用物質には、化学療法剤、放射性同位元素、アポトーシス促進物質、細胞障害物質、細胞抑制物質、および遺伝子治療ベクターが含まれるがこれらに限定されない。そのような治療用物質の腫瘍への標的化送達は、腫瘍に対する物質の送達を増加させながら、被験者の正常な臓器および組織に対する物質の不適切な送達を減少させることに関して、先行技術に対する有意な改善を提供する。好ましい態様において、腫瘍ターゲティングペプチドは、ファージの送達を腫瘍血管の血管新生内皮細胞にターゲティングするためにファージ遺伝子治療ベクターのカプセルに組み入れられる。

30

【0030】

本発明のさらなる態様は、レポーター遺伝子を組み入れるファージディスプレイライブラリを用いて、新規腫瘍ターゲティングペプチドを同定する方法に関する。レポーター遺伝子ファージライブラリを腫瘍を有する被験者に投与した後、腫瘍からファージを回収して、ターゲティングペプチドをコードする核酸配列を含むファージゲノムの選択した一部を配列決定することによって腫瘍ターゲティングペプチドの同定を行う。本発明のこれらの態様は腫瘍に関するが、当業者は、特定の臓器または組織に存在する他の疾患状態も同様に、本明細書に開示の方法および組成物を用いて治療すると、治療効率が增強して、全身毒性が減少する可能性があり、それらも本発明の範囲に含まれることを認識するであろう。

40

【0031】

本発明のさらにもう一つの態様は、個体から血清試料を得る段階、試料から抗体を得る段階、抗体にファージディスプレイライブラリを加える段階、および抗体に結合したファージ

50

ジを回収する段階を含む、疾患状態の被験者から抗体に対するターゲティングペプチドを同定する方法に関する。好ましい態様において、抗体は、固体支持体に結合させる、より好ましくはビーズに結合したGタンパク質に結合させる。もう一つの好ましい態様において、疾患状態を有さない被験者からの抗体に対して、ファージディスプレイライブラリをまずスクリーニングするサブトラクション段階を加える。これらの対照抗体に結合しないファージのみを用いて、疾患を有する個体の抗体に結合するファージを得る。

【0032】

他の態様において、標的臓器または組織、例えば胎盤に結合するファージは、その臓器または組織を欠く被験者に対して、プレスクリーニングまたはポストスクリーニングすることができる。その臓器または組織を欠く被験者に結合するファージは、ライブラリから除去する。 10

【0033】

他の態様は、抗原に対する抗体を得る方法に関する。好ましい態様において、抗原は、一つまたは複数のターゲティングペプチドを含む。ターゲティングペプチドを調製して、固体支持体に固定して、抗体を含む血清を加えて、ターゲティングペプチドに結合する抗体を回収する。

【0034】

他の好ましい態様において、被験者由来の抗体の抗原結合部分を示すファージディスプレイライブラリを調製して、ライブラリを一つまたは複数の抗原に対してスクリーニングして、抗原に結合するファージを回収する。より好ましい態様において、抗原はターゲティングペプチドである。 20

【0035】

例示的態様の説明

本明細書において用いられるように、「一つ(a)」、または「一つ(an)」とは、一つまたは複数を意味してもよい。本明細書の特許請求の範囲において用いられるように、「含む」という用語と組み合わせて用いる場合、「一つ(a)」または「一つ(an)」とは、一つまたは複数を意味してもよい。本明細書において用いられるように、「もう一つ」とは、項目の少なくとも二番目またはそれ以上を意味してもよい。

【0036】

「ターゲティングペプチド」とは、連続するアミノ酸配列を含むペプチドであり、好ましくはヒト由来の標的の臓器、組織、または細胞型への選択的局在を特徴とする。選択的局在は例えば、推定のターゲティングペプチド配列が、ファージの外表面上に表示されるタンパク質に組み入れられる、下記に開示する方法によって決定してもよい。特定の態様において、BRASILによって同定されたターゲティングファージは被験者に投与され、続いて一つまたは複数の臓器、組織、または細胞型が被験者から回収され、標的の臓器、組織、または細胞型において見出されたファージが同定される。ターゲティングペプチド配列を発現するファージは、そのファージが対照組織、臓器、または細胞型と比較して、標的においてより大きな結合を示す場合、選択的に局在すると見なされる。選択的局在を決定するもう一つの方法は、推定の標的ペプチドを発現するファージが好ましくは、非特異的ペプチドを発現する、または任意の推定の標的ペプチドを発現するように遺伝子操作 30 40
されていらない対照ファージと比較して、標的において少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍の濃縮を示すことである。選択的局在を決定するもう一つの方法は、標的ペプチドを発現するファージの標的への局在が、標的ペプチド配列を含む合成ペプチドの同時投与によって、少なくとも部分的に阻害されることである。「ターゲティングペプチド」および「回帰ペプチド」とは、本明細書において同義に用いられる。

【0037】

「ファージディスプレイライブラリ」とは、その外表面上に推定のターゲティングペプチドの組を発現するように遺伝子操作されているファージのコレクションを意味する。好ましい態様において、推定のターゲティングペプチドをコードするDNA配列は、ファージ被膜タンパク質をコードする遺伝子にフレームが合うように挿入される。他の好ましい態 50

様において、推定のターゲティングペプチド配列は、一部が20個全てのアミノ酸のランダム混合物であり、一部が非ランダム混合物である。特定の好ましい態様において、ファージディスプレイライブラリの推定のターゲティングペプチドは、ターゲティングペプチド配列内の固定位置で一つまたは複数のシステイン残基を示す。

【0038】

「高分子複合体」とは、その配列がランダム、規則正しい、または部分的に規則正しくてもよい分子のコレクションを意味する。この用語は、バクテリオファージ、ウイルス、細菌、単細胞病原性生物、多細胞病原性生物、および原核または真核細胞のような生物を含む。この用語はまた、リボソーム、微小カプセル、微粒子および微小装置のような非生存分子群を含む。唯一の要件は、複合体が一つ以上の分子を含むことである。分子は同一であつても、または互いに異なつていてもよい。

10

【0039】

ターゲティングペプチドのための「受容体」には、ターゲティングペプチドに結合する任意の分子または分子の複合体が含まれるがこれらに限定されない。受容体の非制限的な例には、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、エピトープ、脂質、糖質、多分子構造、一つまたは複数の分子の特異的コンフォメーションおよび形態解剖学的実体が含まれる。好ましい態様において、「受容体」とは、標的臓器、組織、または細胞型内の血管を形成する細胞の管腔表面上に存在する天然に存在する分子または分子の複合体である。

【0040】

20

「被験者」とは、一般的に哺乳類を意味する。特定の好ましい態様において、被験者は、マウスまたはウサギである。さらにより好ましい態様において、被験者はヒトである。

【0041】

ファージディスプレイ

ターゲティングペプチドを同定するための本明細書に記載の方法は、ファージディスプレイライブラリのインビトロ投与を含む。ファージディスプレイの様々な方法およびペプチドの多様な集団を作製する方法は当技術分野で周知である。例えば、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,223,409号、第5,622,699号、および第6,068,829号は、ファージライブラリを調製する方法を開示する。ファージディスプレイ技術は、小さなペプチドがその表面上に発現されうるようにバクテリオファージを遺伝子操作することを含む（SmithおよびScott、1985、1993）。この技術を適用できる可能性がある範囲はかなり広く、過去10年の間に、ファージによって表示されたペプチドライブラリの構築、およびライブラリを用いてペプチドリガンドを単離するスクリーニング方法の開発にはかなりの進歩が認められている。例えば、ペプチドライブラリを用いることによって、相互作用部位、および炎症反応に関与する抗体または細胞接着を媒介するインテグリンのような多くのタンパク質における受容体-リガンド結合モチーフの特徴を調べることが可能となった。この方法は同様に、ペプチド模倣薬または造影剤を開発するためのリードとして役立つ新規ペプチドリガンドを同定するためにも用いられている（Arapら、1998a）。ペプチドの他に、一本鎖抗体のようなより大きいタンパク質ドメインもまた、ファージ粒子の表面上に表示されう（Arapら、1998a）。

30

40

【0042】

これまで、所定の臓器または組織をターゲティングするためのアミノ酸配列は、インビボ「バイオパニング」によって単離されていた（パスカリーニおよびルオスラーティ（PasqualiniおよびRuoslahti）、1996；パスカリーニ（Pasqualini）、1999）。簡単に説明すると、推定のターゲティングペプチドを含むファージのライブラリを動物またはヒト被験者に投与して、ファージを含む臓器または組織の試料を採取する。線維様ファージを利用する例において、ファージは、線毛陽性細菌におけるバイオパニングラウンドのあいだにインビトロで増殖させてもよい。細菌はファージによって溶解されないが、特定のインサートを表示するファージの多数のコピーを分泌す

50

る。標的分子に結合するファージを標的臓器または組織から溶出させて、次に、宿主細菌においてそれらを増殖させることによって増幅することができる。増幅したファージを第二の被験者に投与して、臓器または組織の試料を再度採取してもよい。選択的結合体の集団が得られるまで、多数のバイオパニングラウンドを行ってもよい。ペプチドのアミノ酸配列は、ファージゲノムにおけるターゲティングペプチドインサートに対応するDNAを配列決定することによって決定する。同定されたターゲティングペプチドは、標準的なタンパク質化学技術によって合成ペプチドとして産生することができる（アラプ（Arap）ら、1998a；スミス（Smith）ら、1985）。このアプローチによって、その標的の特性に関する先入観なく、循環中のターゲティングペプチドを偏りのない機能的アッセイにおいて検出することができる。候補標的がターゲティングペプチドの受容体として同定されれば、標準的な生化学方法によってそれを単離、精製、そしてクローニングすることができる（パスカリーニ（Pasqualini）、1999；ラジョッテおよびルオスラーティ（RajotteおよびRuoslahti）、1999）。

10

【0043】

本明細書に開示のインビトロ方法も同様に、ファージディスプレイライブラリを利用する。しかし、ライブラリを生きた宿主に注入するのではなく、標的臓器、組織、または細胞型の試料をインビトロでファージディスプレイライブラリに曝露する。

【0044】

ファージディスプレイ系の選択

マウスにおいて行われたインビボ選択研究は、fUSE5ベクターにおけるIII遺伝子被膜タンパク質との融合タンパク質として発現されたランダムペプチドのライブラリを好んで用いた（PasqualiniおよびRuoslahti、1996）。所定のライブラリに存在する個々のクローンの数および多様性は、インビボ選択の成否にとって重要な要因である。欠損ファージクローンの過剰発現を有する可能性が低い、第一のライブラリが好ましい（Koivunenら、1999）。ライブラリの調製は、 $10^8 \sim 10^9$ 形質導入単位（T.U.）/mlのあいだで最適化する。特定の態様において、各選択ラウンドの間にバルク増幅戦略を適用する。

20

【0045】

直鎖、環状、または二環ペプチドを示すファージライブラリを用いてもよい。しかし、単環ペプチドは直鎖ペプチドより標的臓器に対して高い親和性を有する傾向があることから、環状挿入物（ $CX_3 - 10C$ ）において3～10個のランダム残基を表示するファージライブラリが好ましい。二環ペプチドを示すライブラリ（ $CX_3CX_3CX_3C$ など；Rajotteら、1998）も首尾よく用いられている。しかし、同源の合成ペプチドの産生は、可能ではあるが、異なるジスルフィド架橋配列を有する多数の配座異性体のために複雑となりうる。

30

【0046】

マウスにおけるインビボファージディスプレイによる回帰ペプチドおよび受容体の同定
マウスに投与されたファージディスプレイペプチドライブラリ由来のペプチドのインビボ選択を用いて、正常なマウス脳、腎臓、肺、皮膚、脾臓、網膜、腸、小腸、子宮、前立腺、および副腎に関して選択的なターゲティングペプチドを同定した（PasqualiniおよびRuoslahti、1996；Pasqualini、1999；Rajotteら、1998）。これらの結果は、正常な臓器の血管内皮が、ペプチドプローブによる異なるターゲティングを可能にするために十分に不均一であることを示している（PasqualiniおよびRuoslahti、1996；Rajotteら、1998）。ヌードマウスにおける腫瘍異種移植片の血管を標的とするペプチドモチーフのパネルが構築されている（Arapら、1998a；Pasqualini、1999により概説）。これらのモチーフには、配列RGD-4C、NGR、およびGSLペプチドが含まれる。RGD-4Cペプチドはこれまで、選択的に結合する αv インテグリンとして同定されており、ヌードマウスにおける腫瘍異種移植片の血管に回帰することが示されている（Arapら、1998a、1998b；Pasqualini、1997）。

40

50

【0047】

腫瘍回帰RGD4Cターゲティングペプチドの受容体は、 αv インテグリンとして同定されている(Pasqualiniら、1997)。 αv インテグリンは、血管新生において重要な役割を果たす。 $\alpha v \beta 3$ および $\alpha v \beta 5$ インテグリンは、正常な内皮細胞には存在しないか、または発現されても低レベルであるが、腫瘍の新生血管では誘導される(Brooksら、1994; Hammesら、1996)。アミノペプチダーゼN/CD13は最近、NGRモチーフの血管新生受容体であると同定されている(Burgら、1999)。アミノペプチダーゼN/CD13は、TRAMPマウス中の前立腺癌の新生血管だけでなく、正常上皮前立腺組織中においても強く発現されている。

【0048】

腫瘍回帰ファージは、腫瘍の新生血管においてその受容体と同時局在するが、正常組織の非新生血管には存在しない(Arapら、1998b)。免疫組織化学的証拠から、血管ターゲティングファージが、組織切片においてヒト腫瘍血管に結合するが(Pasqualiniら、2000)、正常血管には結合しないことが示されている。挿入物を有さない陰性対照ファージ(fdファージ)は、正常または腫瘍組織切片に結合しなかった。血管新生受容体の発現を、細胞株、非増殖血管、および腫瘍の活性化血管、ならびに黄体のような他の血管新生組織において評価した。フローサイトメトリーおよび免疫組織化学から、これらの受容体が多く腫瘍細胞および活性化HUVECsにおいて発現されていることが示された(データは示さない)。血管新生受容体は、マウスまたはヒト組織の正常臓器の血管において検出されなかった。

【0049】

これらの受容体の分布を、腫瘍細胞、腫瘍血管、および正常血管において免疫組織化学によって分析した。 αv インテグリン、CD13、アミノペプチダーゼA、NG2、および腫瘍血管における既知の受容体であるMMP-2/MMP-9は、ヒトおよびマウス起源の双方の新生血管の内皮細胞および周皮細胞において特異的に発現される。新生血管は、非増殖性の内皮細胞では非常に低レベルで発現されるか、または全く発現されないマーカーを発現する(示していない)。

【0050】

新生血管内皮のマーカーには、VEGFおよび塩基性FGF受容体の特異的サブタイプ、ならびに中でも αv インテグリンのような血管増殖因子の受容体が含まれる(MustonenおよびAlitalo、1995)。これまで、新生血管の特徴である新規分子の同定および単離は、主に内皮細胞を培養で増殖させると表現型が劇的に変化するために遅れている(Watsonら、1995)。

【0051】

これらの腫瘍血管マーカーの多くはプロテアーゼであり、マーカーのいくつかは、ウイルス受容体として作用する。 αv インテグリンは、アデノウイルスの受容体であり(Wickhamら、1997c)、CD13はコロナウイルスの受容体である(Lookら、1989)。MMP-2およびMMP-9は、エコーウイルスの受容体である(Koivunenら、1999)。アミノペプチダーゼAも同様にウイルス受容体であるように思われる。バクテリオファージは真核細胞ウイルスと同じ細胞受容体を利用する可能性がある。これらの知見は、ファージディスプレイによって単離された受容体が、同定されたペプチドモチーフを標的遺伝子治療担体として利用するための重要な特徴である、細胞内部移行(internalization)能を有することを示唆している。

【0052】

標的化送達

腫瘍血管に回帰するペプチドを細胞障害薬またはアポトーシス促進ペプチドにカップリングさせると、腫瘍異種移植片を有する実験的マウスモデルにおいて親化合物より有効でより毒性の低い化合物が得られている(Arapら、1998a; Ellerybyら、1999)。RGD-4Cペプチドをアデノウイルスの表面タンパク質に挿入すると、腫瘍標的化遺伝子治療のために用いてもよいアデノウイルスベクターが得られる(Arapら、

10

20

30

40

50

1998b)。

【0053】

B R A S I L

特定の態様において、標的臓器または組織の細胞に結合したファージを未結合のファージから分離することは、B R A S I L技術を用いて行う。B R A S I L（選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法）において、臓器または組織を、第一の相に懸濁させた細胞または小さな細胞塊に穏やかに分離する。第一の相を、適当な密度の第二の相の上に重ねて、遠心分離する。結合ファージに結合した細胞は遠心管の底に沈殿するが、未結合のファージは第一の相に残っている。これによって、ファージと細胞のあいだの結合相互作用を維持しながら、未結合のファージから結合ファージをより効率よく分離することができる。B R A S I Lは、ファージライブラリを水相において曝露してから遠心分離するインビトロプロトコールによって行ってもよい。好ましい態様において、第一の相は水相であり、第二の相は有機相である。本発明の範囲内で用いてもよい有機相の特異的な非制限的を下記に開示する。

10

【0054】

下記の実施例に示した細胞は、主にヒト細胞であるが、本発明は、用いてもよい細胞のタイプに限定されない。ヒト、マウス、哺乳類、動物、または植物細胞、細菌、およびアメーバ、孢子、酵母、カビ、藻類、ジアルジア（*G i a r d i a*）、または渦鞭毛藻類のような単細胞生物を含むがこれらに限定されない、実質的に如何なるタイプの原核または真核細胞もB R A S I Lに用いてもよい。特定の態様において、B R A S I Lによってスクリーニングされる細胞は、不均一な細胞集団を均一な細胞集団に分離するために、例えばF A C S装置（ベクトン・ディッキンソン社）を用いてまずソーティングしてもよい。

20

【0055】

もう一つの態様において、ファージライブラリをスクリーニングするために用いる標的には、化学物質、化合物、分子、または分子集合体のような非細胞標的が含まれてもよい。B R A S I Lにおいて用いられる可能性がある標的分子には、タンパク質、プロテオグリカン、糖質、脂質、糖脂質、スフィンゴリピッド、およびリポタンパク質が含まれるがこれらに限定されない。好ましい態様において、そのような非細胞標的は、ガラス、プラスチック、セラミック、または磁気ビーズのようなより大きい粒子に、共有結合によってまたは非共有結合によって結合してもよい。ファージターゲティングペプチドに対する標的の近づき易さを増加するために結合のためのリンカーを用いてもよい。そのような態様において、当業者は、遠心分離以外に、結合したファージを有機相に分離する他の方法を用いてもよいことを認識するであろう。例えば、磁気粒子を用いる場合、磁場をかけることによって粒子を有機相に分配してもよい。粒子が十分に大きい、または密度が大きい場合には、重力の影響下での粒子の沈殿を用いて結合ファージを有機相に分配してもよい。本発明は、結合ファージを有機相に分配する方法に限定されず、粒子または細胞に結合したファージを有機相または他の第二の相に分離するために当技術分野で既知の如何なる方法も用いてもよく、それらも本発明の範囲内である。

30

【0056】

本発明は、沈殿させる細胞が第二の相の密度より高い密度を有し、第二の相が第一の相より高い密度を有する限り、第一および第二の相の正確な組成に関して制限的ではない。

40

【0057】

好ましい態様において、第二の相の密度は、約1.02～1.04であり、第一の相の密度は約1.00である。B R A S I Lのために用いられる細胞または細胞塊の密度は、好ましくは1.04 g m / m l 以上である。当業者は、特定の細胞型は、密度が異なってもよいこと、そして相の密度の調節によるB R A S I Lの最適化は適当であってもよいことを認識するであろう。好ましい態様において、混合および希釈を防止するために、第一および第二の相は不混和性である。しかし、混和性の相を用いる勾配遠心分離段階が当技術分野において既知であり、これを例えば、適当な密度の塩化セシウム、ショ糖、P E G（ポリエチレングリコール）、フィコール、またはパーコール溶液を用いて、本発明の実

50

践において用いてもよい。

【0058】

既知の密度の多様な有機溶媒を用いることができる。報告された密度1.02～1.04のあいだの有機溶媒の非制限的な例には、ジイソアミルフタレート(1.021)、フェニルブチレート(1.038)、トリブチリン(1.035)、9-エチルアントラセン(1.041)、メチル-ジフェニルアミン(1.048)、1-2-ジメトキシ-4-(2-プロピル)-ベンゼン(1.039)、 α -フェニル-ベンゼンエタノール(1.036)、3-メチル-ベンゼンチオール(1.041)、アセトアルデヒドセミカルバゾン(1.030)、フェニルアセトアルデヒド(1.027)、およびジベンジルアミン(1.026)が含まれる。他の有機化合物およびその密度は、例えば、「化学物理ハンドブック(Handbook of Chemistry and Physics)」、第50版、C-75～C541頁、ケミカルラバー社、クリーブランド、オハイオ州1969年に認められる。当然のこととして、有機相は単一の有機溶媒で構成される必要はなく、適当な密度の有機相は、下記の実施例に開示のように異なる密度の有機溶媒を混合することによって得てもよく、それらも本発明の範囲内であると考慮される。さらなる混合物を、当技術分野で既知の一般的な技術を用いて設計してもよい。当業者は、密度がしばしば温度依存性であり、細胞を沈殿させるために用いられる遠心分離温度で適当な密度が得られることを認識するであろう。様々な態様において、その温度は室温から約4℃であってもよい。遠心分離の目的のために、用いられる如何なる有機相も、用いる温度で液体でなければならない。

10

20

【0059】

当業者はさらに、第二の相の密度の最適化が異なる細胞型にとって必要であるかも知れないことをさらに認識するであろう。例えば、ラット肝細胞(1.07～1.10)、クッパー細胞(1.05～1.06)、ヒト血小板(1.04～1.06)、リンパ球(1.06～1.08)、顆粒球(1.08～1.09)、赤血球(1.09～1.10)および大腸菌(*E. coli*)(1.13)について異なる密度が認められる。これらの細胞型は全て、密度約1.03の第二の有機相の中を沈殿すると予想されるであろう。第一(水性)の相の浸透圧は、細胞、特に堅固な細胞壁によって囲まれていない細胞の密度に影響を及ぼす可能性があるとともにさらに認識される。好ましい態様において、培地の浸透圧はインサイチューでの細胞の浸透圧にほぼ等しい(約150 mM塩濃度)。リン酸またはトリス緩衝生理食塩液(PBSまたはTBS)のような生理的浸透圧の多様な培地が当技術分野で既知である。

30

【0060】

当業者はまた、高い毒性の有機相を避けるべきであることを認識するであろう。例えば、タンパク質の変性が起こるフェノールまたはホルムアルデヒドのような有機溶媒は、第二の相として用いるには望ましくない。有機溶媒の毒性特性は当技術分野で周知である。

【0061】

特定の態様において、バックグラウンドのファージ結合をさらに減少させるために、BRASILと共にサブトラクションプロトコルを用いてもよい。サブトラクションの目的は、関心対象の細胞以外の細胞に結合する、または非活性化細胞に結合するファージをライブラリから除去することである。もう一つの態様において、ファージライブラリは、標的細胞、組織、または臓器ではない対照細胞株、組織、または臓器に対してスクリーニングしてもよい。サブトラクションの後、ライブラリを関心対象の細胞、組織、または臓器に対してスクリーニングしてもよい。もう一つの代わりの態様において、刺激していない休止期の細胞株、組織、または臓器を、ライブラリに対してスクリーニングして、結合したファージを除去してもよい。細胞株、組織、または臓器は、例えば、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、またはケモカインを投与することによって活性化して、活性化細胞株を差し引いたファージディスプレイに対してスクリーニングする。

40

【0062】

その他のサブトラクションプロトコル法が既知であり、例えば、参照として本明細書に

50

組み入れられる、米国特許第5,840,841号、第5,705,610号、第5,670,312号、および第5,492,807号に開示されるように本発明の実践において用いてもよい。

【0063】

タンパク質とペプチド

特定の態様において、本発明は、少なくとも一つのタンパク質またはペプチドを含む新規組成物に関する。本明細書において用いられるように、タンパク質またはペプチドは一般的に、アミノ酸200個以上で遺伝子から翻訳された完全長の配列までのタンパク質；アミノ酸100個以上のポリペプチド；および／またはアミノ酸約3～約100個のペプチドを意味するがこれらに限定されない。便宜上、「タンパク質」、「ポリペプチド、および「ペプチド」という用語は、本明細書において互換的に用いられる。

【0064】

特定の態様において、少なくとも一つのタンパク質またはペプチドの大きさは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約275、約300、約325、約350、約375、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約625、約650、約675、約700、約725、約750、約775、約800、約825、約850、約875、約900、約925、約950、約975、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500個のアミノ酸残基またはそれ以上を含んでもよいがこれらに限定されない。

【0065】

本明細書において用いられるように、「アミノ酸残基」とは、当技術分野で既知の任意の天然のアミノ酸、任意のアミノ酸誘導体、または任意のアミノ酸模倣体を意味する。特定の態様において、タンパク質またはペプチドの残基は連続的であって、アミノ酸残基の配列を中断する任意の非アミノ酸は存在しない。他の態様において、配列は一つまたは複数の非アミノ酸部分を含んでもよい。特定の態様において、タンパク質またはペプチドの残基の配列は、一つまたは複数のアミノ酸部分によって中断されてもよい。特定の態様において、タンパク質またはペプチドの残基配列は、一つまたは複数のアミノ酸部分によって中断されてもよい。

【0066】

したがって、「タンパク質またはペプチド」という用語は、天然に存在するタンパク質において認められる一般的なアミノ酸20個の少なくとも一つ、または下記の表1に示すアミノ酸を含むがこれらに限定しない少なくとも一つの改変もしくはまれな(unusual)アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。

【0067】

【表1】改変アミノ酸およびまれなアミノ酸

略称	アミノ酸	略称	アミノ酸
Aad	2-アミノアジピン酸	EtAsn	N-エチルアスパラギン
Baad	3-アミノアジピン酸	Hyl	ヒドロキシリジン
Bala	β -アラニン, β -アミノ-プロピオン酸	AHyl	アロヒドロキシリジン
Abu	2-アミノ酪酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Abu	4-アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカプロン酸	Ide	イソデスモシン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アロイソロイシン
Aib	2-アミノイソ酪酸	MeGly	N-メチルグリシン、サルコシン
Baib	3-アミノイソ酪酸	Melle	N-メチルイソロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	MeLys	6-N-メチルリジン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスモシン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメリン酸	Nle	ノルロイシン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸	Orn	オルニチン
EtGly	N-エチルグリシン		

10

20

30

40

50

【0068】

タンパク質またはペプチドは、標準的な分子生物学的技術を用いたタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、タンパク質もしくはペプチドの天然資源からの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に既知の任意の技術によって作製してもよい。様々な遺伝子に対応するヌクレオチドならびにタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド配列がこれまでに開示されており、当業者に既知のコンピューターデータベースにおいて認められるであろう。そのような一つのデータベースは、国立バイオテクノロジー情報センターのGenBankおよびGenPeptデータベースである (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。既知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示の技術を用いて、または当業者に既知であるように増幅および／または発現してもよい。または、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの様々な市販の調製物が、当業者に既知である。

【0069】

ペプチド模倣体

本発明に従ってポリペプチドを調製するためのもう一つの態様は、ペプチド模倣体を用いることである。模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。例えば、参照として本明細書に組み入れられる、「バイオテクノロジーと薬学 (BiotechnologyおよびPharmacy)」、ペズット (Pezzuto) ら編、Chapman and Hall、ニューヨーク (1993) 内、ジョンソン (Johnson) ら、「ペプチド折り返し模倣体 (Peptide Turn Mimetics)」を参照のこと。ペプチド模倣体を用いる背景の基礎となる根本的理由は、タンパク質のペプチド骨格が、抗体と抗原の相互作用のような分子間相互作用を促進するようにアミノ酸側鎖を主に向けるように存在する点である。ペプチド模倣体は、天然の分子と類似の分子間相互作用を可能にすると予想される。これらの原理を用いて、本明細書に開示のターゲティングペプチドの天然の特性の多くを有するが、改変および改善された特徴を有する第二世代の分子を操作してもよい。

【0070】

融合タンパク質

本発明の他の態様は、融合タンパク質に関する。これらの分子は一般的に、ターゲティングペプチドの全てまたは実質的な部分が、N末端またはC末端で第二のポリペプチドまたはタンパク質の全てまたは実質的な部分に結合している。例えば、融合体は、異種宿主においてタンパク質の組み換え型を発現させるように他の種からのリーダー配列を用いてもよい。もう一つの有用な融合には、融合タンパク質の精製を促進するために、抗体のエピトープのような免疫学的に活性なドメインを付加することが含まれる。融合部またはその近傍に切断部位を含めると、精製後のさらなるポリペプチドの除去が促進されるであろう。他の有用な融合には、酵素からの活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞ターゲティングシグナル、または膜貫通領域のような機能的ドメインの連結が含まれる。好ましい態様において、本発明の融合タンパク質は、治療タンパク質またはペプチドに結合したターゲティングペプチドを含む。融合タンパク質に組み入れてもよいタンパク質またはペプチドの例には、細胞抑制タンパク質、殺細胞タンパク質、アポトーシス促進物質、抗血管新生物質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、ペプチド薬、抗体、Fab断片抗体、抗原、受容体タンパク質、酵素、レクチン、MHCタンパク質、細胞接着タンパク質、および結合タンパク質が含まれる。これらの例は、制限することを意味しておらず、実質的に本発明の範囲内において、タンパク質またはペプチドはターゲティングペプチドを含む融合タンパク質に組み入れることができることを意図している。融合タンパク質を作製する方法は、当業者に周知である。そのようなタンパク質は、例えば二官能架橋剤を用いる化学的結合によって、完全な融合タンパク質の新規合成によって、またはターゲティングペプチドをコードするDNA配列を第二のペプチドまたはタンパク質をコードするDNA配列に結合させた後、無傷の融合タンパク質を発現させることによって、産生することができる。

【0071】

タンパク質の精製

特定の態様において、タンパク質またはペプチドは単離または精製してもよい。タンパク質精製技術は当業者に周知である。これらの技術は、一つのレベルで細胞、組織、または臓器のポリペプチドおよび非ポリペプチド画分へのホモジナイゼーションならびに粗分画化を含む。関心対象のタンパク質またはポリペプチドは、部分的または完全な精製を得るために（または均一になるまで精製）、クロマトグラフィーおよび電気泳動技術を用いてさらに精製してもよい。純粋なペプチドの調製に特に適した分析法は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティクロマトグラフィー、免疫アフィニティクロマトグラフィー、および等電点電気泳動である。アフィニティクロマトグラフィーによる受容体タンパク質精製の例は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,206,347号に開示されている。ペプチドを精製する特に効率のよい方法は、速いタンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）またはHPLCである。

【0072】

精製タンパク質またはペプチドは、タンパク質またはペプチドが、その天然に得られる状態と比較して任意の程度にも精製されている、他の成分から単離可能な組成物を意味すると解釈される。したがって、単離または精製タンパク質またはペプチドも同様に、天然に存在する可能性がある環境を含まないタンパク質またはペプチドを意味する。一般的に、「精製された」とは、様々な他の成分を除去するために分画化が行われている、および組成物がその発現された生物活性を実質的に保持しているタンパク質またはペプチド組成物を意味するであろう。「実質的に精製された」という用語を用いる場合、この用語は、タンパク質またはペプチドが、組成物におけるタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ以上を構成するような、組成物の主成分を形成する組成物を意味する。

【0073】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量する様々な方法が、本開示に照らして当業者に既知である。これらには、例えば、活性な画分の比活性を決定する、または SDS / PAGE 分析によって画分内でのポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価する好ましい方法は、画分の比活性を計算すること、それを最初の抽出物の比活性と比較すること、およびこのように、「～精製倍率」によって評価して、その純度を計算することである。活性の量を示すために用いられる実際の単位は、当然、精製を行うために選択される特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存するであろう。

【0074】

タンパク質精製に用いるために適した様々な技術は、当業者に周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体等による沈殿、または熱変性の後に遠心分離；イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシアパタイト、およびアフィニティクロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー段階；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびにこれらおよび他の技術の組み合わせが含まれる。当技術分野で一般的に既知であるように、様々な精製段階を行う順序は、変更してもよく、または特定の段階を省略してもよいと考えられ、なおも実質的に精製されたタンパク質またはペプチドを調製するための適した方法が得られる。

【0075】

タンパク質またはペプチドは常にその最も精製された状態で提供すべきであるという一般要件はない。実際に、実質的にあまり精製されていない産物は、特定の態様において有用であると考えられる。部分精製は、より少ない精製段階を組み合わせ用いて、または同じ一般的精製スキームの異なる型を用いて行ってもよい。例えば、HPLC 装置を用いて行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般的に低圧クロマトグラフィーシステムを用いる同じ技術より大きい精製「倍率」が得られるであろうと認識される。相対的なより低い程度の精製を示す方法は、タンパク質産物の全体的な回収、または発現されたタンパク質の活性を維持するために長所を有する可能性がある。

【0076】

アフィニティクロマトグラフィーは、単離される物質と、それが特異的に結合する分子との特異的親和性に依存するクロマトグラフィー技法である。これは、受容体ーリガンドタイプの相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの一つを不溶性のマトリクスに共有カップリングさせることによって合成される。次に、カラム材料は溶液から物質を特異的に吸収することができる。条件を結合が起こらない条件に変更すると（例えば、pH、イオン強度、温度等の変化）、溶出が起こる。マトリクスは、如何なる有意な程度にもそれ自身が分子を吸収せず、しかも広い範囲の化学、物理、および熱安定性を有する物質でなければならない。リガンドはその結合特性に影響を及ぼさないようにカップリングしなければならない。リガンドは、比較的堅固な結合を提供しなければならない。そして、試料またはリガンドを破壊することなく、物質を溶出することができなければならない。様々な態様においてアフィニティクロマトグラフィーは、ターゲティングペプチドに対する抗体、抗体に結合する抗原、ターゲティングペプチドの内在性受容体、またはターゲティングペプチドのリガンドを精製するために実施できる。

【0077】

合成ペプチド

本発明のターゲティングペプチドは、その大きさが比較的小さいために、従来の技術に従って溶液または固体支持体上で合成することができる。様々な自動シンセサイザーが市販されており、既知のプロトコールに従って用いることができる。例えば、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、スチュワート (Stewart) およびヤング (Young)、1984；タム (Tam) ら、1983；メリフィールド (Merrifield)、1986；およびバラニー (Barany) およびメリフィールド (Merrifield)、1979を参照のこと。通常、アミノ酸約6個から約35～50個までの短いペプチド配列は、そのような方法によって容易に合成することができる。または

、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現ベクターに挿入され、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトされ、発現に適した条件で培養される組み換え型DNA技術を用いてもよい。

【0078】

抗体

特定の態様において、同定されたターゲティングペプチドまたはその受容体に対する抗体を作製することが望ましいかも知れない。適当なターゲティングペプチドまたは受容体、またはその一部をリンカー、ポリリンカー、または誘導体化アミノ酸によって一つまたは複数の物質にカップリング、結合 (bonded)、結合 (bound)、共役、または化学的に結合させてもよい。これは、双特異的、または多価組成物またはワクチンが産生されるように行ってもよい。これらの組成物の調製において用いられる方法は、当業者に周知であり、ヒト被験者に投与するために適していなければならない、すなわち薬学的に許容されなければならないとさらに想像される。好ましい物質は、担体であり、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、またはウシ血清アルブミン (BSA) である。

【0079】

「抗体」という用語は、抗原決定領域を有する任意の抗体様分子を意味するために用いられ、Fab'、Fab、F(ab')₂、一本鎖ドメイン抗体 (DABs)、Fv、scFv (一本鎖Fv) 等のような抗体断片が含まれる。様々な抗体に基づく構築物および断片を調製および用いる技術は、当技術分野で周知である。抗体を調製および特徴付けする手段も同様に、当技術分野で周知である (例えば、HarlowおよびLane、「抗体：実験マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと；参照として本明細書に組み入れられる)。

【0080】

サイトカインとケモカイン

特定の態様において、臓器または組織に標的化送達するために、特異的生物活性物質の一つまたは複数のターゲティングペプチドにカップリングさせることが望ましいかも知れない。そのような物質には、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス促進因子、および抗血管新生因子が含まれるがこれらに限定されない。「サイトカイン」という用語は、細胞間メディエータとしてもう一つの細胞に作用する、一つの細胞集団によって放出されたタンパク質の総称である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、増殖因子、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンのような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、および黄体形成ホルモン (LH) のような糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン；胎盤ラクトゲン、OBタンパク質；腫瘍壊死因子-αおよび腫瘍壊死因子-β；ムレリアン阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン (TPO)；NGF-βのような神経生長因子；血小板増殖因子；TGF-αおよびTGF-βのようなトランスフォーミング増殖因子 (TGF)；インスリン様増殖因子-Iおよびインスリン様増殖因子-II；エリスロポエチン (EPO)；骨誘導因子；インターフェロン-α、-β、および-γのようなインターフェロン；マクロファージ-CSF (M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF (GM-CSF)、および顆粒球-CSF (G-CSF) のようなコロニー刺激因子 (CSF)；IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18のようなインターロイキン (IL)、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、キット-リガンドまたはFLT-3、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、腫瘍壊死因子ならびにLTが含まれる。本明細書において用

いられるように、サイトカインという用語には、天然起源からのタンパク質または組み換え型細胞培養からのタンパク質、および本来の配列サイトカインの生物活性同等物が含まれる。

【0081】

ケモカインは、一般的に、ケモカイン発現部位に免疫エフェクター細胞を動員するための化学誘引物質として作用する。例えば、他の免疫系成分の治療部位への動員を増強するために、サイトカイン遺伝子と併用して特定のケモカイン遺伝子を発現することが有利であろう。ケモカインには、R A N T E S、M C A F、M I P 1- α 、M I P 1- β 、および I P-10が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、特定のサイトカインも同様に化学誘引作用を有することが知られており、それらも同様にケモカインという用語の下に分類されうることを認識するであろう。

10

【0082】

造影剤と放射性同位元素

特定の態様において、本発明で主張されるペプチドまたはタンパク質は、様々な疾患を有する臓器または組織を造影および診断するために用いられる造影剤に結合してもよい。多くの適当な造影剤が、それらをタンパク質またはペプチドに結合させる方法と共に当技術分野で既知である（例えば、いずれも参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,021,236号および第4,472,509号を参照のこと）。タンパク質またはペプチドはまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のようなカップリング剤の存在下で酵素と反応させてもよい。蛍光マーカースとの結合物は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって調製する。

20

【0083】

造影剤として用いられる可能性がある常磁性イオンの非制限的な例には、クロム（I I I）、マンガン（I I）、鉄（I I I）、鉄（I I）、コバルト（I I）、ニッケル（I I）、銅（I I）、ネオジウム（I I I）、サマリウム（I I I）、イットルビウム（I I I）、ガドリニウム（I I I）、バナジウム（I I）、テルビウム（I I I）、ジスプロシウム（I I I）、ホルミウム（I I I）、およびエルビウム（I I I）が含まれ、ガドリニウムが特に好ましい。X線造影のような他の状況において有用なイオンには、ランタン（I I I）、金（I I I）、鉛（I I）および特にビスマス（I I）が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0084】

造影剤または治療用物質として用いられる可能性がある放射性同位元素には、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²ユーロピウム、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレンウム、³⁵硫黄、テクネチウム^{99m}、およびイットリウム⁹⁰が含まれる。¹²⁵Iは、特定の態様における使用に好ましいことが多く、テクネチウム^{99m}およびインジウム¹¹¹も同様に、低エネルギーであって、長い範囲の検出に適しているため、好ましいことが多い。

【0085】

本発明の放射活性標識タンパク質またはペプチドは、当技術分野で周知の方法に従って産生してもよい。例えば、それらは、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学酸化剤またはラクトペルオキシダーゼのような酵素的酸化剤と接触させることによってヨウ化することができる。本発明に従うタンパク質またはペプチドは、リガンド交換プロセスによって、例えば、ペルテクネートをスズ溶液によって還元して、還元したテクネチウムをセファデックスカラム上でキレート化して、ペプチドをこのカラムに適用することによって、または直接標識技術によって、例えばペルテクネート、S N C l₂のような還元物質、フタル酸ナトリウムカリウム溶液のような緩衝液、およびペプチドをインキュベートすることによって、テクネチウム^{99m}によって標識してもよい。金属イオンとして存在する放射性同位元素に結合するために用いられることが

40

50

多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸（DPTA）およびエチレンジアミン四酢酸（EDTA）である。ローダミン、フルオレセインイソチオシアネート、およびレノグラフィンを含む蛍光標識も同様に用いることが考慮される。

【0086】

特定の態様において、主張されるタンパク質またはペプチドは、色素産生基質に接触させると着色産物を生じる二次結合リガンドまたは酵素（酵素タグ）に結合してもよい。適した酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（ホースラディッシュ）水素ペルオキシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合リガンドはビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン化合物である。そのような標識の利用は当業者に周知であり、例えば、それぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米

10

【0087】

架橋剤（cross-linker）

二官能架橋試薬は、アフィニティマトリクスの調製、多様な構造の改変および安定化、リガンドおよび受容体結合部位の同定、ならびに構造研究を含む多様な目的のために広く用いられている。二つの同一の官能基を有するホモ二官能試薬は、同一および異なる高分子または高分子サブユニット間の架橋を誘導するために、ならびにペプチドリガンドをその特異的結合部位に結合させるために非常に効率がよいことが判明した。ヘテロ二官能試薬は、異なる二つの官能基を含む。異なる二つの官能基の異なる反応性を利用することによって、架橋は、選択的および連続的に制御することができる。二官能架橋試薬はその官能基の特異性に従って、例えばアミノ、スルフヒドリル、グアニジノ、インドール、カルボキシル特異的置換基に分類することができる。これらの中で、遊離のアミノ基に対する試薬は、それらが市販されているため、合成が容易であるため、およびそれらを適用できる緩和な反応条件のために特に一般的となった。ヘテロ二官能架橋試薬の大部分は、一級アミン反応基とチオール反応基とを含む。

20

【0088】

リガンドをリポソームに架橋させる例示的方法は、それぞれが特に参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,603,872号、および米国特許第5,401,511号に記載されている。様々なリガンドをアミン残基の架橋によってリポソーム表面に共有結合させることができる。リポソーム、特に、それぞれがホスファチジルエタノールアミン（PE）を含む微小乳化リポソーム（MEL）および大きい単層リポソーム（LUVET）のような多層小胞（MLV）または単層小胞は、確立された技法によって調製されている。リポソームにPEを含めこと、架橋目的のためにリポソーム表面上に活性な官能残基、1級アミンを提供する。上皮細胞増殖因子（EGF）のようなリガンドは、PE-リポソームに首尾よく結合されている。リガンドは、リポソーム表面上の明確な部位に共有結合している。これらの部位の数および表面密度は、リポソーム製剤およびリポソームタイプによって決まる。リポソーム表面はまた、非共有結合部位を有してもよい。リガンドとリポソームとの共有結合体を形成するために、架橋試薬を有効性および生体適合性

30

40

【0089】

もう一つの例において、ヘテロ二官能架橋試薬および架橋試薬を用いる方法を記載する（特にその全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,889,155号）。架橋試薬は、求核性のヒドラジド残基を求電子性のマレイミド残基と組み合わせ、それによって一つの例においてアルデヒドを遊離のチオールにカップリングさせることが

50

できる。架橋試薬は、様々な官能基を架橋するように改変することができる。

【0090】

架橋剤も同様に、BRASILスクリーニングにおいて用いるためにより大きい粒子に化学物質、化合物、分子、または分子集合体を結合するために有用となる可能性がある。

【0091】

磁気ビーズ

本発明において用いられる粒子は、多様な大きさになる可能性があると思われ。大きい磁気粒子（溶液中での平均直径は10 μmを超える）は、弱い磁場および磁場勾配に反応することができるが、それらは急速に沈殿する傾向があり、均一な条件を必要とする反応ではその有用性は限られている。大きい粒子はまた、小さな粒子より表面積が限られており、そのためより少ない材料をそれらにカップリングさせることができる。好ましい態様において、磁気ビーズは直径10 μm未満である。

【0092】

磁気ビーズに適用可能な様々なシランカップリングが、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第3,652,761号において考察されている。当技術分野で既知のシラン化技法は一般的に、シランの重合化および反応性表面上でのその沈着のために選択される培地によって互いに異なる。トルエン（ウィータル（Weetall）、1976）、メタノール（米国特許第3,933,997号）、およびクロロホルム（米国特許第3,652,761号）のような有機溶媒が用いられている。水性アルコールおよび水性溶液からの酸によるシラン沈着も同様に用いられている。

【0093】

強磁性材料は一般的に、磁場に反応して永久磁石化する。「超常磁性」と呼ばれる材料は、磁場勾配における力を受けるが、永久磁石化しない。磁性酸化鉄の結晶は、結晶の大きさに応じて、強磁性または超常磁性のいずれかとなる可能性がある。超常磁性鉄酸化物は、一般的に結晶の直径が約300オングストローム（Å）未満である場合に生じ、より大きい結晶は一般的に強磁性特徴を有する。

【0094】

分散可能な磁気酸化鉄粒子は、直径が300 Åであると報告されており、表面アミン基は、米国特許第4,267,234号に従ってポリエチレンイミンの存在下で塩化第一鉄および塩化第二鉄（ $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+} = 1$ ）の塩基沈殿によって調製される。これらの粒子は、調製の際に磁場に3回曝露して、再分散可能であると記述される。磁性粒子を、グルタルアルデヒド懸濁液重合化システムと混合して、磁性ポリグルタルアルデヒドミクロスフェアを形成し、これは直径が0.1 μmであると報告されている。ポリグルタルアルデヒドミクロスフェアは、タンパク質のようなアミノ含有分子と結合を形成することができる結合アルデヒド基をその表面に有する。

【0095】

多様な粒子の大きさは、好ましい態様において開示の方法において適用可能であると予想されるが、粒子は直径が約0.1～約1.5 μmのあいだである。この範囲内の平均直径を有し、約100～150 m²/gmもの高い表面積を有する粒子が産生され、これは高いバイオアフィニティ吸着カップリング能を提供する。この大きさの磁性粒子は、より大きい粒子が急速に沈殿する問題を克服するが、より小さな粒子を分離するために必要な磁場および磁場勾配の作製に大きい磁石を必要としない。本発明の磁性粒子を分離するために用いられる磁石は、約100～約1000エルステッドのあいだの磁場を産生する必要があるに過ぎない。そのような磁場は、好ましくは磁性粒子の分散を保持する容器より小さく、このように、ベンチ上で用いるために適している可能性がある永久磁石によって得ることができる。強磁性粒子は、本発明の特定の応用において有用となる可能性があるが、超常磁性粒子は強磁性粒子に関連した磁石の集合を示さず、再分散および再利用できることから、超常磁性挙動が通常好ましい。

【0096】

磁気粒子を調製する方法は、塩基中で金属塩を沈殿させて、細かい磁性金属酸化物の結晶

を形成させること、結晶を水および電解質中で再分散させて洗浄することを含んでもよい。結晶が超常磁性である場合には、磁性分離を用いて、洗浄間に結晶を採取してもよい。次に結晶を、金属酸化物と吸着または共有結合することができ、および様々な標的分子とカップリングするための官能基を有する材料によってコーティングしてもよい。

【0097】

非磁性ビーズ、フローサイトメトリー、およびFACS

もう一つの態様において、関係する標的は、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリスチレンまたはラテックスのような非磁性ビーズに、非共有結合または共有結合してもよい。標的は、磁気ビーズに関して先の記述と同じ技術によってそのようなビーズに結合してもよい。ビーズをファージライブラリに曝露後、ビーズに結合したそれらのファージを、例えば遠心分離によって未結合のファージから分離してもよい。

10

【0098】

特定の態様において、BRASILによってスクリーニングされる細胞は、何らかの形のフローサイトメトリーを用いて予めソーティングしてもよい。フローサイトメトリー法の非制限的な例は、それぞれが参照として本明細書にその全文が組み入れられる、ベッツら(Betz、1984)、ウィルソンら(Wilson、1988)、シリアンら(Scillian、1989)、フレンゲンら(Frengen、1994)、グリフィスら(Griffith、1996)、スチュアートら(Stuart、1998)、ならびに米国特許第5,853,984号および第5,948,627号に開示されている。参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,727,020号、第4,704,891号、および第4,599,307号は、フローサイトメーターを含む成分の配置およびその利用の一般的原理について記述している。

20

【0099】

フローサイトメーターでは、ビーズ、細胞、または他の粒子を、それぞれの粒子がエネルギー源に曝露される、検出器の中を実質的に一度に通過させる。エネルギー源は一般的に、単一の波長の励起性の光を提供する。検出器は、光電子増倍管または電荷カップリング装置のような光収集単位を含み、これをコンピューターのようなデータ分析装置に接続してもよい。ビーズ、細胞、または粒子は、例えば、励起光に反応して放出された蛍光の量を検出および/または定量することによって、励起光に対するその反応を特徴としうる。特定の特徴を示すビーズまたは細胞は、ベクトンディッキンソンイムノサイトメトリーシステムズ社(サンノゼ、カリフォルニア州)が販売しているFACSバンテッジ(商標)セルソータのような付属のセルソータを用いてソーティングすることができる。

30

【0100】

核酸

本発明に従う核酸は、ターゲティングペプチド、受容体タンパク質、または融合タンパク質をコードしてもよい。核酸は、ゲノムDNA、相補的DNA(cDNA)、または合成DNAに由来してもよい。発現ベクターに組み入れることが望ましい場合、核酸はまた、天然のイントロンまたはもう一つの遺伝子に由来するイントロンを含んでもよい。そのような操作された分子は時に、「ミニ遺伝子」と呼ばれる。

【0101】

本明細書において用いられる「核酸」には、一本鎖および二本鎖分子と共に、DNA、RNA、化学改変核酸および核酸類似体が含まれる。本発明の範囲内の核酸は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約1

40

50

80、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約275、約300、約325、約350、約375、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約625、約650、約675、約700、約725、約750、約775、約800、約825、約850、約875、約900、約925、約950、約975、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500個のヌクレオチド残基またはそれ以上の長さであってもよいと考えられる。

【0102】

ターゲティングペプチド、融合タンパク質、および受容体は、適当なアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列によってコードされうると考えられる。所望のアミノ酸配列をコードする核酸の設計および産生は、標準化コドン表を用いて当業者に周知である（下記の表2を参照のこと）。好ましい態様において、それぞれのアミノ酸をコードするために選択されたコドンは、関心対象の宿主細胞において核酸の発現を最適にするように改変してもよい。宿主細胞の様々な種のコドン選択性は当技術分野で周知である。

10

【0103】

【表2】

アミノ酸			コドン
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
システイン	Cys	C	UGC UGU
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
ヒスチジン	His	H	CAC CAU
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU
リジン	Lys	K	AAA AAG
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU

20

30

40

トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
バリン	Val	V	GUA GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU

【0104】

所望のターゲティングペプチド、融合タンパク質または受容体アミノ酸配列をコードする核酸の他に、本発明は、そのようなコードする核酸配列と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズする相補的核酸を含む。核酸ハイブリダイゼーションのための高ストリンジェンシー条件は当技術分野で周知である。例えば、条件は、温度約50℃～約70℃で約0.02 M～約0.15 M NaClによって提供される条件のように、低い塩および／または高い温度条件を含んでもよい。所望のストリンジェンシーの温度およびイオン強度は特定の核酸、標的配列の長さおよびヌクレオチド含有量、核酸の荷電組成物、およびハイブリダイゼーション混合物中のホルムアミド、塩化テトラメチルアンモニウム、または他の溶媒の存在または濃度によって部分的に決定される。

【0105】

クローニング、遺伝子移入、および発現のためのベクター
特定の態様において、発現ベクターを用いてターゲティングペプチドまたは融合タンパク質を発現して、次にこれを精製および用いることができる。他の態様において、発現ベクターは、遺伝子治療において用いられる。発現は、適当なシグナルがベクターにおいて提供される必要があり、宿主細胞において関心対象の遺伝子の発現を促進するウイルスおよび哺乳類起源の双方からのエンハンサー／プロモーターのような様々な調節要素が含まれる。宿主細胞においてメッセンジャーRNA安定性および翻訳可能性を最適にするように設計した要素も同様に既知である。

【0106】

調節要素
「発現構築物」または「発現ベクター」という用語は、核酸コード配列の一部または全てが転写されることが可能である遺伝子産物をコードする核酸を含む任意の種類の遺伝子構築物が含まれることを意味する。好ましい態様において、遺伝子産物をコードする核酸は、プロモーターの転写制御下である。「プロモーター」は、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識され、遺伝子の特異的転写を開始するために必要なDNA配列を意味する。「転写制御下」という用語は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現を制御するために、核酸に対して正しい位置および方向に存在することを意味する。

【0107】

関心対象の核酸配列の発現を制御するために用いられる特定のプロモーターは、標的細胞において核酸の発現を指示することができる限り、重要ではないと考えられている。このように、ヒト細胞が標的となる場合、ヒト細胞において発現されることができるプロモーターに隣接してその制御下にあるように核酸コード領域を配置することが好ましい。一般的に、そのようなプロモーターには、ヒトまたはウイルスプロモーターのいずれかが含まれてもよい。

【0108】

様々な態様において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターを用いて、関心対象のコード配列の高レベル発現を得ることができる。関心対象のコード配列の発現を得るために、当技術分野で周知である他のウイルスもしくは哺乳類の細胞プロモーターまた

は細菌ファージプロモーターを用いることも同様に、発現レベルが所定の目的にとって十分である限り考慮される。

【0109】

cDNA挿入物を用いる場合、典型的にこれは遺伝子転写物の適切なポリアデニル化を行うためにポリアデニル化シグナルを含むであろう。ポリアデニル化シグナルの特性は、本発明の実践の成功にとって重要ではないと考えられ、ヒト成長ホルモン、およびSV40ポリアデニル化シグナルのようなそのような任意の配列を用いてもよい。同様に、ターミネータも発現構築物の要素として同様に考慮される。これらの要素は、メッセージレベルを増強して構築物からの他の配列への読み過ぎしを最小限にするように作用しうる。

【0110】

選択マーカー

本発明の特定の態様において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、発現構築物にマーカーを含めることによってインピトロまたはインピボで同定してもよい。そのようなマーカーは、細胞に対して同定可能な変化を付与して、発現構築物を含む細胞を容易に同定できるようにするであろう。通常、薬物選択マーカーを含めると、形質転換体のクローニングおよび選択に役立つ。例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対して抵抗性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。または、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (tk) のような酵素、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) のような酵素を用いてもよい。免疫学的マーカーも同様に用いることができる。用いられる選択マーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることができる限り、重要ではないと考えられる。選択マーカーのさらなる例は当業者に周知である。

【0111】

発現ベクターの送達

発現ベクターを細胞に導入する多くの方法がある。本発明の特定の態様において、発現構築物は、ウイルス、またはウイルスゲノムに由来する操作された構築物を含む。特定のウイルスは受容体媒介エンドサイトーシスによって細胞内に入ることができること、宿主細胞ゲノムに組み入れられうること、およびウイルス遺伝子を安定かつ効率よく発現できることによって、それらは、哺乳類細胞に外来遺伝子を移入するための魅力的な候補物質となる (Ridgeway、1988; NicolasおよびRubenstein、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Temin、1986)。一般的に、好ましい遺伝子治療ベクターはウイルスベクターである。

【0112】

外来の遺伝子材料を許容することができるいくつかのウイルスは、それらが順応することができるヌクレオチドの数およびそれらが感染する細胞の範囲が制限されるが、これらのウイルスは遺伝子発現を首尾よく行うことができることが証明されている。しかし、アデノウイルスは、宿主ゲノムにその遺伝子材料を組み入れず、したがって、遺伝子発現のために宿主複製を必要とせず、そのためそれらは迅速で、効率のよい、異種遺伝子発現にとって理想的に適している。複製欠損ウイルスを調製する技術は当技術分野で周知である。

【0113】

ウイルス送達系を用いる場合はもちろん、それがベクター構築物を受け入れる細胞、動物または個体において望ましくない反応を引き起こさないように、欠損干渉ウイルス粒子またはエンドトキシンおよび他の発熱物質のような望ましくない混入物を本質的に含まないようにするために十分にピリオンを精製することが望ましいであろう。ベクターを精製する非制限的な手段は、塩化セシウム勾配遠心のような懸濁密度勾配を用いることを含む。

【0114】

遺伝子ベクターとして用いられるDNAウイルスは、パポバウイルス (例えば、シミアンウイルス40、ウシ乳頭腫ウイルス、およびポリオーマ) (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986) およびアデノウイルス (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0115】

インビボ送達のための好ましい方法の一つは、アデノウイルス発現ベクターを用いることを含む。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAに対する組み込み能が低いことが知られているが、この特徴は、これらのベクターによって得られる遺伝子移入効率が高いことによって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a) 構築物のパッケージングを支持するため、および(b) その中にクローニングされているアンチセンスポリヌクレオチドを発現するために十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。

【0116】

発現ベクターは、アデノウイルスの遺伝子操作型を含む。アデノウイルスの遺伝子構築が、36 kbの直線状の二本鎖DNAウイルスであることを理解すれば、アデノウイルスDNAの大きい断片を7 kbまでの外来配列に置換することが可能である(Grunha usおよびHorwitz、1992)。レトロウイルス感染症とは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染症は、アデノウイルスDNAがエピソームにおいて複製できることから、染色体組み込みが起こらず、可能性がある遺伝子毒性を示さない。同様に、アデノウイルスは構造的に安定であり、十分に増幅させた後もゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、その細胞周期段階によらず、実質的に全ての上皮細胞に感染することができる。これまで、アデノウイルス感染症は、ヒトにおける急性呼吸器疾患のごく軽度の疾患に関係しているように思われる。

【0117】

アデノウイルスは、そのゲノムの大きさが中等度であること、操作が容易であること、高力価、広い細胞範囲、および高い感染性のために、遺伝子移入ベクターとして用いるために特に適している。ウイルスゲノムの両端は100塩基対～200塩基対の逆方向反復配列(ITR)を含み、これはウイルスDNA複製およびパッケージングにとって必要なシス要素である。ゲノムの初期(E)および後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写単位を含む。E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよびいくつかの細胞遺伝子の転写の調節に関与するタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現によって、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成が起こる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞の遮断(Renan、1990)に関係している。ウイルスカプシドタンパク質の大多数を含む後期遺伝子の産物は、主要な後期プロモーター(MLP)によって生じた単一の主転写物の有意なプロセシングの後に限って発現される。MLP(16.8 m.u.に存在)は、感染の後期段階において特に効率的であり、このプロモーターに由来する全てのmRNAは、5'-3'連(tripartite)リーダー(TPL)配列を有し、それによってそれらは翻訳にとって好ましいmRNAとなる。

【0118】

現在用いられている系において、組み換え型アデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの相同的組み換えによって生じる。二つのプロウイルスベクターのあいだの可能性がある組み換えにより、野生型アデノウイルスがこのプロセスから生じる可能性がある。したがって、個々のプラークからウイルスの単一のクローンを単離して、そのゲノム構造を調べることが重要である。

【0119】

複製欠損であるアデノウイルスベクターの作製および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胎児腎細胞から形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する293と呼ばれる独自のヘルパー細胞株に依存する(Grahamら、1977)。E3領域は、アデノウイルスゲノムにとって重要ではないため(JonesおよびShenk、1978)、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の助けを借りて、E1、E3、または双方の領域のいずれかに外来DNAを有する(GrahamおよびPrevecら、1991)。本質的に、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約105%をパッケージングすることができ(Ghosh-Choudhuryら、1987)、約2 kbの余分のDNAの容

量を提供する。E1領域およびE3領域において置換可能な約5.5 kbのDNAと組み合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大容量は7.5 kb以下、またはベクターの全長の約15%である。アデノウイルスゲノムの80%以上がベクター骨格に残っており、ベクター媒介細胞障害性の原因となる。同様に、E1欠失ウイルスの複製欠損も不完全である。例えば、ウイルス遺伝子発現の漏出は、現在利用可能なベクターについて高い感染多重度(MOI)で認められる(Mulligan、1993)。

【0120】

ヘルパー細胞株は、ヒト胎児腎細胞、筋細胞、造血細胞、または他のヒト胎児間葉細胞または上皮細胞のようなヒト細胞に由来してもよい。または、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスにとって許容される他の哺乳類種の細胞に由来してもよい。そのような細胞には、例えば、Vero細胞、または他のサル胎児間葉もしくは上皮細胞が含まれる。考察したように、好ましいヘルパー細胞株は293である。

10

【0121】

レイチャー(Racher)ら(1995)は、293細胞を培養して、アデノウイルスを増殖させる改善された方法を開示した。一つの形式において、個々の細胞を培地100 ml~200 mlを含む1Lのシリコン処理スピナーフラスコ(Techne、Cambridge、UK)に接種して天然の細胞凝集体を増殖させる。40 rpmで攪拌した後、細胞生存率をトリパンブルーによって推定する。もう一つの形式において、フィブラセル微小担体(5 g/l)(Bibby Starlin、Stone、UK)を以下のように用いる。培地5 mlに再懸濁させた細胞接種物を250 mlアーレンマイヤーフラスコ中の担体(50 ml)に加えて、時折攪拌しながら1時間~4時間静置した。次に、培地を新鮮な培地50 mlに交換して振とうを開始する。ウイルスを産生するために、細胞を約80%コンフルエンスまで増殖させて、その後培地を交換して(最終容積の25%)、アデノウイルスをMOI 0.05で加える。培養物を一晩静置して、その後容積を100%まで増加させて、振とうをさらに72時間行う。

20

【0122】

アデノウイルスベクターが複製欠損である、または少なくとも条件的に欠損であるという要件以外に、アデノウイルスベクターの特性は、本発明の実施の成功にとって重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、既知の異なる血清型42個またはサブグループA~Fのいずれかであってもよい。サブグループCのアデノウイルス5型は、本発明において用いられる条件的複製欠損アデノウイルスベクターを得るために好ましい開始材料である。これは、5型アデノウイルスが、それに関する膨大な生化学および遺伝子情報が既知であるヒトアデノウイルスであるためであり、このためこのアデノウイルスは、歴史的にアデノウイルスをベクターとして用いるほとんどの構築物について用いられている。

30

【0123】

本発明を実践するために適用可能な典型的なベクターは、複製欠損であり、アデノウイルスE1領域を有さないであろう。このように、E1コード配列が除去されている位置で遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入することが最も簡便である。しかし、アデノウイルス配列内の構築物の挿入位置は重要ではない。関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドも同様に、カールソン(Karlsson)ら、1986によって記載されるようにE3置換ベクターにおいて欠失されたE3領域の代わりに、またはヘルパー細胞株もしくはヘルパーウイルスがE4欠損を補う場合にはE4領域の代わりに挿入してもよい。

40

【0124】

アデノウイルスは、増殖および操作が容易で、インビトロおよびインビボで広い宿主範囲を示す。このグループのウイルスは、高い力価、例えば、 $10^9 \sim 10^{11}$ プラーク形成単位/mlで得ることができ、それらは非常に感染性である。アデノウイルスの生活環は宿主細胞ゲノムに組み入れられる必要はない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子は、エピソームであり、したがって、宿主細胞に対する遺伝子毒性は低い。野生型アデノウイルスをワクチン接種した研究では副作用は報告されておらず(Couc

50

h、1963; Topら、1971)、インビボ遺伝子移入ベクターとしてのその安全性および治療能を証明する。

【0125】

アデノウイルスベクターは、真核細胞遺伝子発現 (Levreroら、1991; Gomez-Foixら、1992) およびワクチン開発 (GrunhausおよびHorwitz、1992; GrahamおよびPrevec、1991) に用いられている。最近、動物試験から、組み換え型アデノウイルスが遺伝子治療に用いられ得ることが示唆された (Stratford-PerricaudetおよびPerricaudet、1991; Stratford-Perricaudetら、1990; Richら、1993)。異なる組織に組み換え型アデノウイルスを投与する研究には、気管注入 (Rose 10
nfeldら、1991; Rosenfeldら、1992)、筋肉注射 (Ragotら、1993)、末梢静脈注射 (HerzおよびGerard、1993)、および脳への定位注射 (Le Gal La Salleら、1993) が含まれる。

【0126】

他の遺伝子移入ベクターは、レトロウイルスから構築してもよい。レトロウイルスは、逆転写のプロセスによって感染細胞においてそのRNAを二本鎖DNAに変換できることを特徴とする一本鎖RNAウイルスの群である (Coffin、1990)。次に、得られたDNAは、プロウイルスとして細胞の染色体に安定に組み入れられ、ウイルスタンパク質の合成を指示する。組み込みによって、レシピエント細胞およびその子孫においてウイルス遺伝子配列が保持される。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする3つの遺伝子、gag、pol 20
、およびenvを含む。gag遺伝子から上流に認められる配列は、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルを含む。二つの長末端反復 (LTR) 配列は、ウイルスゲノムの5'および3'末端に存在する。これらは、強いプロモーターおよびエンハンサー配列を含み、同様に、宿主細胞ゲノムへの組み込みにとって必要である (Coffin、1990)。

【0127】

レトロウイルスベクターを構築するために、関心対象のタンパク質をコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損であるウイルスを複製する。ビリオンを産生するために、gag、pol、およびenv遺伝子を含むが、LTRおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する (Mann 30
ら、1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共にcDNAを含む組み換え型プラスミドをこの細胞株に導入する場合 (例えば、リン酸カルシウムによって)、パッケージング配列によって、組み換え型プラスミドのRNA転写物をウイルス粒子にパッケージングすることが可能となり、次に、これを培養培地に分泌する (NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次に、組み換え型レトロウイルスを含む培地を回収して、選択的に濃縮し、遺伝子移入のために用いる。レトロウイルスベクターは広く多様な細胞型に感染することができる。しかし、組み込みおよび安定な発現には宿主細胞の分割を必要とする (Paskind 40
ら、1975)。

【0128】

レトロウイルスベクターを用いることには特定の制限がある。例えば、レトロウイルスベクターは、通常、細胞ゲノムにおけるランダムな部位に組み入れられる。このため、宿主遺伝子の中断によって、または隣接遺伝子の機能を妨害することができるウイルス調節配列の挿入によって挿入変異誘発が起こりうる (Varmusら、1981)。欠損レトロウイルスベクターを用いる場合のもう一つの懸念は、パッケージング細胞において野生型複製コンピテントウイルスが出現する可能性である。これは、gag、pol、env配列から上流の組み換え型ウイルス挿入物からの無傷の配列が宿主細胞ゲノムに組み入れられる組み換え事象が原因である可能性がある。しかし、今では新しいパッケージング細胞株を利用することができ、それらは組み換えの可能性を大きく減少させるはずである (M 50

arkowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

【0129】

他のウイルスベクターを発現構築物として用いてもよい。ワクシニアウイルス (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparrら、1988)、アデノ随伴ウイルス (AAV) (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; HermonatおよびMuzycska、1984)、およびヘルペスウイルスのようなウイルスに由来するベクターを用いてもよい。それらは様々な哺乳類細胞にとっていくつかの魅力的な特徴を提供する (Friedmann、1989; Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparrら、1988; Horwichら、1990)。

10

【0130】

発現構築物を培養哺乳類細胞に移入するためのいくつかの非ウイルス法もまた、本発明によって考慮される。これらには、リン酸カルシウム沈殿 (GrahamおよびVan Der Eb、1973; ChenおよびOkayama、1987; Rippeら、1990)、DEAEデキストラン (Gopal、1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kasparら、1986; Potterら、1984)、直接マイクロインジェクション、DNA負荷リポソーム、およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞の超音波処理、高速微小弾丸を用いた遺伝子衝突、および受容体媒介トランスフェクション (WuおよびWu、1987; WuおよびWu、1988) が含まれる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはエキソビボでの使用に首尾よく適合させてもよい。

20

【0131】

本発明のさらなる態様において、発現構築物はリポソームに封入してもよい。リポソームはリン脂質二重膜と内側の水性媒体とを特徴とする小胞構造である。多層リポソームは水性媒体で分かれた多数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰量の水溶液に懸濁されると自然に形成する。脂質成分は閉鎖構造を形成する前に自己再配列を受けて、脂質二重層の間に水と溶存溶質とを捕獲する。同様に、リポフェクタミン-DNA複合体も考慮される。

【0132】

リポソーム媒介核酸送達および外来DNAのインビトロでの発現は非常に成功している。ウォン (Wong) ら、(1980) は、培養ニワトリ胚、HeLa、および肝腫細胞において外来DNAのリポソーム媒介送達および発現の実現可能性を証明した。ニコラウ (Nicolaou) ら、(1987) は、静脈内注射後のラットにおいてリポソーム媒介遺伝子移入に成功した。

30

【0133】

t k細胞、hgprt細胞、またはapart細胞においてそれぞれ、HSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含むがこれらに限定されない多くの選択系を用いてもよい。同様に、抗代謝物抵抗性を、メソトレキセートに対する抵抗性を付与するdhfr、ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与するgpt、アミノグリコシドG418に対する抵抗性を付与するneo、およびハイグロマイシンに対する抵抗性を付与するhygroを選択するための基礎として用いることができる。

40

【0134】

薬学的組成物

臨床応用を考慮する場合、薬学的組成物発現ベクター、ウイルス保存液、タンパク質、抗体、および薬剤を意図する適用にとって適当な形で調製する必要があるかも知れない。一般的に、これは、ヒトまたは動物に対して有害となりうる不純物を本質的に含まない組成物を調製することを含むであろう。

【0135】

一般的に、送達ベクターを安定にして、標的細胞によって取り込まれることができるように、適当な塩および緩衝液を用いることが望まれるであろう。組み換え型細胞を患者に導

50

入する場合には緩衝液も同様に用いる。本発明の水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性培地に溶解または分散させたタンパク質またはペプチドの有効量を含む。そのような組成物も同様に、接種物と呼ばれる。「薬学的または薬理学的に許容される」という用語は、動物またはヒトに投与した場合に有害、アレルギー、またはその他の望ましくない反応を引き起こさない分子実体および組成物を意味する。本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散培地、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が含まれる。そのような培地および物質を薬学的活性物質のために用いることは当技術分野で周知である。従来の培地または物質が本発明のタンパク質またはペプチドと不適合である場合を除き、治療的組成物において用いることが考慮される。補助活性成分も同様に組成物に組み入れることができる。 10

【0136】

本発明の活性組成物には、古典的な薬学的調製物が含まれてもよい。本発明に従うこれらの組成物の投与は、標的組織がその経路によって利用可能である限り、任意の一般的な経路によってなされる。これには、経口、鼻腔内、口腔内、直腸内、膈内、または局所投与が含まれる。または、投与は、正所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、または静脈内注射であってもよい。そのような組成物は通常、上記の薬学的に許容される組成物として投与されるであろう。

【0137】

注射によって用いるために適した薬学的剤形は、滅菌水溶液または分散液、および注射可能滅菌溶液または分散液の即時調合製剤のための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、製剤は滅菌でなければならず、容易なシリンジ操作性が存在する程度に流動性でなければならない。これは、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、その適した混合物、および植物油を含む溶媒または分散培地となりうる。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持することができる。微生物の作用の予防は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって 20 30 得ることができる。多くの場合、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射可能な組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において用いることによって得ることができる。

【0138】

注射可能滅菌溶液は、必要な量の活性化合物を、先に列挙した様々な他の成分と共に適当な溶媒において組み入れて、必要であれば濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散剤は、様々な滅菌活性成分を滅菌媒体に組み入れることによって調製される。注射可能滅菌溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分および先に濾過滅菌したその溶液からの任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥技術である。 40

【0139】

治療用物質

特定の態様において、化学療法剤を、腫瘍に選択的に送達するためのターゲティングペプチドまたは融合タンパク質に結合してもよい。用いるために適した物質または因子には、細胞に適用した場合にDNA損傷を誘導する任意の化学化合物が含まれてもよい。化学療法剤には、5-フルオロウラシル、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン（CDDP）、シクロホスファミド、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エストロゲン受容体結合物質、エトポシド（VP16）、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ゲムシタビン 50

、イフォスファミド、メクロレタミン、メルファラン、マイトマイシン、ナベルピン、ニトロソウレア、プリコマイシン、プロカルバジン、ラロキシフェン、タモキシフェン、タキソール、テマゾロミド（DTICの水溶性型）、トランスプラチナ、ビンブラスチンおよびメソトレキセート、ビンクリスチン、または上記の任意の類似体もしくは誘導体変種が含まれるがこれらに限定されない。ほとんどの化学療法剤は以下の分類に入る：アルキル化剤、抗代謝剤、抗腫瘍抗生物質、コルチコステロイドホルモン、分裂阻害剤、およびニトロソウレア、ホルモン物質、雑多な物質、およびその任意の類似体または誘導体変種。

【0140】

化学療法剤および投与方法、用量等は、当業者に周知であり（例えば、関連部分が参照として本明細書に組み入れられる、「医師用添付文書集」、GoodmanおよびGilmanの「治療の薬理学的基礎（The Pharmacological Basis of Therapeutics）」、および「レミントンの薬化学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」、を参照のこと）、本明細書に開示に照らして本発明と組み合わせてもよい。用量の何らかの変更は、治療すべき被験者の状態に応じて必要に応じて起こるであろう。投与の責任者は、いずれにせよ、個々の被験者に関して適当な用量を決定するであろう。特定の化学療法剤および用量レジメの例も同様に本明細書に記載する。当然、これらの用量および物質および投与レジメは全て、制限するためではなく一例であって、特定の患者または適用に関して当業者は他の用量または物質を用いてもよい。これらの点のあいだの任意の用量、またはそこから誘導される範囲も同様に、本発明において用いられると予想される。

10

20

【0141】

アルキル化剤

アルキル化剤は、ゲノムDNAと直接相互作用して癌細胞の増殖を防止する薬剤である。この範疇の化学療法剤は、細胞周期の全ての相に影響を及ぼす、すなわちそれらは相特異的ではない物質を表す。アルキル化剤には、ニトロジェンマスタード、エチレニメン、メチルメラミン、アルキルスルホネート、ニトロソウレア、またはトリアジンが含まれてもよいがこれらに限定されない。それらには、ブスルファン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド（シトキサン）、ダカルバジン、イフォスファミド、メクロレタミン（マスタージェン）、およびメルファランが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0142】

抗代謝剤

抗代謝剤はDNAおよびRNA合成を破壊する。アルキル化剤とは異なり、それらは細胞周期のS期に特異的に影響を及ぼす。抗代謝剤は、葉酸類似体、ピリミジン類似体およびプリン類似体ならびに関連阻害化合物のような様々な範疇に分類することができる。抗代謝剤には、5-フルオロウラシル（5-FU）、シタラビン（Ara-C）、フルダラビン、ゲミシタビンおよびメソトレキセートが含まれるがこれらに限定されない。

【0143】

天然物

天然物は一般的に、最初に天然資源から単離された化合物を意味する。そのような化合物、その類似体および誘導体は天然起源から単離してもよく、当業者に既知の任意の技術によって化学合成または組み換えによって産生してもよい。天然物には、分裂阻害剤、抗腫瘍抗生物質、酵素および生物反応修飾剤のような分類が含まれる。

40

【0144】

分裂阻害剤には、細胞分裂または分裂に必要ないずれかのタンパク質合成を阻害することができる植物アルカロイドおよび他の天然物が含まれる。それらは、細胞周期の特定の期において作用する。分裂阻害剤には、例えば、ドセタキセル、エトポシド（VP16）、テニポシド、パクリタキセル、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびビンORELビンが含まれる。

【0145】

50

タキソイドは、トネリコ (ash) の木であるタクサス・ブレビフォリア (Taxus brevifolia) の樹皮から単離された関連化合物の一種である。タキソイドにはドセタキセルおよびパクリタキセルのような化合物が含まれるがこれらに限定されない。パクリタキセルはチューブリンに結合して (ビンカアルカロイドによって用いられるものとは異なる部位で)、微小管の集合を促進する。

【0146】

ビンカアルカロイドは、薬学的活性を有すると同定された植物アルカロイドのタイプである。それらには、ビンブラスチン (VLB) およびビンクリスチンのような化合物が含まれる。

【0147】

抗腫瘍抗生物質

抗腫瘍抗生物質は、抗菌および細胞障害活性の双方を有する。これらの薬剤はまた、酵素および分裂を化学的に阻害することによって、または細胞膜を変化させることによって、DNAを妨害する。これらの物質は、それらが細胞周期の全ての期において作用するため細胞周期特異的ではない。抗腫瘍抗生物質の例には、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、プリカマイシン (ミスラマイシン)、およびイダルビシンが含まれるがこれらに限定されない。

【0148】

ホルモン

コルチコステロイドホルモンは、それらが癌細胞を殺すまたは増殖を遅らせる場合に、化学療法剤と見なされる。コルチコステロイドホルモンは、他の化学療法剤の有効性を増加させるため、併用治療において用いられることが多い。プレドニゾンおよびデキサメタゾンは、コルチコステロイドホルモンの例である。

【0149】

カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロールのようなプロゲステンは、子宮内膜および乳房の癌において用いられてきた。ジェチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオールのようなエストロゲンは、乳房および前立腺のような癌に用いられている。タモキシフェンのような抗エストロゲン剤は、乳癌のような癌に用いられてきた。プロピオン酸テストステロンおよびフルオキシメステロンのようなアンドロゲンも同様に、乳癌の治療に用いられてきた。フルタミドのような抗アンドロゲンは、前立腺癌の治療に用いられている。リュープロリドのようなゴナドトロピン放出ホルモン類似体は、前立腺癌の治療に用いられている。

【0150】

雑多な物質

いくつかの化学療法剤は、その活性に基づくこれまでの範疇に入らない。それらには、白金配位複合体、アントラセンジオン、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、アムサクリン、L-アスパラギナーゼ、およびトレチノインが含まれるがこれらに限定されない。それらは、本発明の組成物および方法において用いてもよいと考慮される。

【0151】

白金配位複合体には、カルボプラチンおよびシスプラチン (シス-DDP) のような化合物が含まれる。

【0152】

ミトキサントロンのようなアントラセンジオンは、急性顆粒球白血病および乳癌の治療に用いられている。ヒドロキシウレアのような置換ウレアは、慢性顆粒球白血病、真性赤血球増加症、本態性血小板増加症、および悪性黒色腫を治療するために用いられている。プロカルバジン (N-メチルヒドラジン、MIH) のようなメチルヒドラジン誘導体は、ホジキン病の治療に用いられている。ミトタンのような副腎皮質抑制剤は、副腎皮質癌を治療するために用いられており、アミノグルテチミドは、ホジキン病を治療するために用いられている。

10

20

30

40

50

【0153】

プログラムされた細胞死の調節物質

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、正常な胚発達の際に、成人組織において恒常性を維持し、および発癌を抑制するための本質的なプロセスである（K e r r ら、1972）。B c l - 2 タンパク質ファミリーおよび I C E - 様プロテアーゼが、他の系においてアポトーシスの重要な調節物質およびエフェクターであることが証明されている。濾胞性リンパ腫に関連して発見された B c l - 2 タンパク質は、アポトーシスの制御および多様なアポトーシス刺激に反応した細胞の生存を増強するために顕著な役割を果たしている（C l e a r y および S k l a r、1985；C l e a r y ら、1986；T s u j i m o t o ら、1985；T s u j i m o t o および C r o c c e、1986）。進化的に保存された B c l - 2 タンパク質は今では、関連タンパク質ファミリーのメンバーであると認識され、これらは死のアゴニストまたは死のアンタゴニストとして分類することができる。

【0154】

その発見後、B c l - 2 は、様々な刺激によって誘発された細胞死を抑制するように作用することが示された。同様に、共通の構造および配列相同性を有する B c l - 2 細胞死調節タンパク質のファミリーが存在することが今では明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、B c l - 2 と類似の機能（B c l_{xL}、B c l_w、B c l_s、M c l - 1、A 1、B f l - 1）を有するか、または B c l - 2 機能を相殺して細胞死を促進するか（例えば、B a x、B a k、B i k、B i m、B i d、B a d、H a r a k i r i）のいずれかであることが示されている。

【0155】

本発明の範囲内で考慮されるアポトーシス促進物質の非制限的な例には、グラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、

(KLAKLAK)₂ (配列番号 :1), (KLAKKLA)₂ (配列番号 :2), (KAAKKAA)₂ (配列番号 :3)または(KLGKKLG)₃ (配列番号 :4)

が含まれる。

【0156】

血管新生阻害剤

特定の態様において、本発明は、アンジオテンシン、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲン活性化因子阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン12、血小板因子4、I P - 10、G r o - β、トロンスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキサミドトリアゾール、C M 101、マリマスタット、ペントサンポリスルフェート、アンジオポエチン2（レジェネロン）、インターフェロン-α、ハービマイシンA、P N U 145156E、16Kプロラクチン断片、リノマイド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、T N P - 470、エンドスタチン、パクリタキセル、アキュチン、アンジオスタチン、シドフォビル、ピンクリスチン、ブレオマイシン、A G M - 1470、血小板因子4、またはミノサイクリンのような抗血管新生物質に結合したターゲットイングペプチドを投与することに関してもよい。

【0157】

用量

当業者は、「レミントンの薬科学（R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s）」、第15版、第33章、特に624頁～652頁に従う。治療すべき被験者の状態に応じて用量の何らかの変更が必然的に起こるであろう。投与の責任者は、いずれにせよ、個々の被験者にとって適当な用量を決定するであろう。その上、ヒトでの投与に関して、調製物は、F D A の生物医薬品標準局によって必要とされる滅菌性、発熱性、および全身的安全性および純度標準を満たさなければならない。

【0158】

実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を示すために含められる。以下の実施例に開示した技術は、本発明の実践において十分に機能するように本発明者らによって発見された技術を表し、このように、その実践のために好ましい様式を構成すると見なされうると、当業者によって認識されなければならない。しかし、当業者は、開示の特定の態様に多くの変更を行うことができ、それらも本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果をなおも得ることができることを、本開示に照らして認識すべきである。

【0159】

実施例1. BRASIL

細胞表面レベルでの分子の多様性を探索することは、ターゲティングペプチドを同定するため、そして標的化治療を開発するために重要である。精製受容体とは反対に、膜結合タンパク質は、その機能的配座を保存する可能性が高い。多くの細胞表面受容体はホモまたはヘテロ二量体相互作用を必要とするが、これは細胞膜環境に限って起こる。組み合わせアプローチによって、細胞受容体の特性に関して如何なる先入観も抱かずに、偏りのない機能的アッセイにおいて細胞膜リガンドを選択することができる。このように、未知受容体を標的とすることができる。これらの長所にもかかわらず、所定の細胞集団において同時に発現される標的の複雑度が高いために、特異的リガンドを単離することはしばしば難しい。

【0160】

これらの問題に対処するために、単一の細胞または小さな細胞塊のレベルでファージの選択を改善するために、新しいインビトロアプローチが開発されている。この方法、すなわち選択的相互作用リガンドのバイオパニング迅速分析法 (BRASIL) は、1回の分別遠心段階で、細胞-ファージ複合体を残っている未結合のファージから分離することができる技法に基づいている (図1)。本明細書に記載するように、BRASILは、様々な細胞系においてファージを単離するために用いて成功している。

【0161】

BRASILは、下記のように、第二の (好ましくは有機) 相の上に重ねた第一の (好ましくは水) 相を含む遠心管に細胞を加えることを含む。遠心分離すると、細胞と如何なる未結合のファージも第二の相の底に沈殿するが、結合していないファージは上部の第一の相に残っている。この緩やかな分離技術は、受容体に強く結合していないターゲティングペプチドのファージ-受容体相互作用を保存するために役立つ。

【0162】

好ましい態様において、第一の相は水相であり、第二の相は有機相である。有機相は一般的に水相と不混和性であり、これによって相の成分の混合および希釈、そしてその後の密度の変化が防止される。ファージを細胞に結合させるために水相を用いることは、それがタンパク質相互作用が通常起こるインビボ環境を模倣することから好ましい。第二の有機相も同様に、それがイオン性相互作用または水素結合の強度を増加させることによって特異的に結合したファージを保持しながら、非特異的疎水性相互作用を妨害することによってバックグラウンドを減少させる可能性があることから、好ましい。

【0163】

BRASILは、選択した如何なる臓器、組織、または細胞型からの異なる細胞亜集団の特異的マーカーに結合するペプチド配列を表示するファージを単離するために用いてもよい。細胞の亜集団は、BRASIL法を行う前にフィコール勾配によってエキソビボで精製してもよく、および/または蛍光活性化細胞分析 (FACS) によって同定してもよい。この改善されたインビボ選別法は、特定の細胞亜集団に限って認められるマーカーに結合するファージを採取するために用いてもよい。臓器の細針吸引 (FNA) は、BRASILによるバイオパニングを行うための優れた細胞供給源である。当業者は、BRASIL技術が、幅広い範囲の臓器、細胞、および細胞型に対して向けられるターゲティングペプチドを同定するために適用可能であることを認識するであろう。

【0164】

材料および方法

試薬と細胞

構造 CX_6C (C 、システイン； X 、任意のアミノ酸残基) ランダムな環状ペプチドを表示するファージライブラリをスクリーニングのために用いた。ファージライブラリおよびクローンは、既知の方法 (スミス (Smith)、1985；スミスおよびスコット (Smith および Scott)、1993) を用いて、コイブネン (Koivunen、1999) に従って作製した。カポジ肉腫細胞 (KS1767 細胞株) は、10% 仔ウシ胎児血清 (ギブコー BRL、ロックビル、メリーランド) を添加した最小基本培地 (MEM) において維持した。ジブチルフタレートおよびシクロヘキサン (シグマーアルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州) は購入した。用いたペプチドは、95% を超える純度で合成、環状化して、HPLC および質量分析 (アナスペック社、サンノゼ、カリフォルニア州) によって分析した。

10

【0165】

エキソビボ技法

例としてのインビトロ技法において、前立腺細胞を採取して、洗浄し、1% BSA を含む培地 ($100 \sim 300 \mu l$) に再懸濁させた。ファージライブラリ (ファージ 10^9 個) を加えて、水中で4時間放置した。ジブチルフタレート (シグマ社) $200 \mu l$ を含む $400 \mu l$ エッペンドルフチューブに移した後、混合物を $10,000 g$ で10分間遠心分離した。上部の水相の未結合ファージとの交叉汚染を防止するために、チューブの底 (細胞-ファージ複合体を含む) を液体窒素中で瞬間凍結した。凍結したチューブを鋭利なかみそりの刃で注意深く切断して、新鮮なファルコンチューブに移した。PBS ($100 \sim 200 \mu l$) を加えて、繰り返しピペッティングによって沈殿物をホモジナイズした。大腸菌 (*E. coli*) K91 kan 細菌 $1 ml$ を加えて、1時間インキュベートした後、テトラサイクリンを含む LB を加えて、混合物を $37^\circ C$ のシェーカーにおいて一晩増殖させた。沈殿した細胞に結合したファージを細菌プラークとして回収した。バイオパニングの結果を歪めうる如何なる凝集物も入らないように注意深く行った。BSA 含有培地を $0.22 \mu m$ の滅菌メッシュを通して濾過して、細胞に加える直前にファージを $16,000 g$ で5分間溶液中で遠心分離した。本研究は、結合したファージが BRASIL 法を用いて前立腺細胞から採取できることを示した (示していない)。

20

30

【0166】

BRASIL 法の最適化

細胞をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) および $5 mM$ EDTA によって採取して、MEM によって洗浄し、1% BSA を含む MEM に 10^6 個/ ml で再懸濁させて、 $1.5 ml$ エッペンドルフチューブにおいてファージと共にインキュベートした。4時間後、細胞-ファージ懸濁液 $100 \mu l$ を不混和性の下部有機相 ($400 \mu l$ のエッペンドルフチューブに $200 \mu l$) の上部に静かに移して、 $10,000 g$ で10分間遠心分離した。好ましい有機相の組み合わせは、ジブチルフタレート：シクロヘキサン ($9:1 [v/v]$ ； $\rho = 1.03 g/ml$) からなった。BRASIL は、適当な密度で他のフタレート混合物 (例えば、ジブチルフタレート：ジイソオクチルフタレート； $4:6 [v/v]$) について試みたが類似の結果を得た。チューブを液体窒素中で瞬間凍結して、チューブの底を切断し、細胞-ファージ沈殿物を新しいチューブに移した。結合したファージを対数増殖期の大腸菌 (*E. coli*) K91 kan 宿主細菌 $200 \mu l$ による感染によって救出した。結合の特異性を評価するために、ファージと細胞とを同源または対照合成ペプチドと共に競合アッセイのためにインキュベートした。

40

【0167】

ファージクローンによる結合アッセイ

KS1767 細胞を冷 EDTA によって剥離させ、1% BSA を含む MEM において再懸濁させた。RGD-4C ファージ (パスカリーニ (Pasqualini) ら、1997) を、特異的 αv インテグリン結合モチーフを示す既定のリガンドとして用いた。細胞懸

50

濁液をRGD-4Cファージまたはペプチドインサートを含まない対照（fd-tetファージ）と共にインキュベートした。いずれかのファージの増加量を細胞懸濁液に加えて、細胞-ファージ混合物を氷中で4時間インキュベートした。標的細胞によるリガンド-受容体内部移行のような結合後事象を最小限にするために、BRASILを氷中で実施した。細胞を上記のように有機相を通しての遠心分離によって分離した。結合ファージを回収して、ファージTUを計数した。BRASILを、さらなる洗浄段階を必要とする従来の細胞選別法と比較するため、細胞懸濁液200 μ lをファージと共に氷中で4時間インキュベートした。100 μ lアリコートからの未結合ファージを有機相上で遠心分離するか、または0.3%BSAを含むPBS1mlによって細胞を3回洗浄することによって除去した。それぞれの条件を少なくとも3回繰り返した。競合的阻害は、標的配列CDCRGDCFC（配列番号 :9）

10

を含む合成RGD-4Cペプチドについて行い、これを、同じモル比で用いた対照ペプチドCARAC（配列番号 :5）またはGRGESP（配列番号 :10）

と比較した。

【0168】

結果

BRASIL技術は、 α -vインテグリン（パスカリーニ（Pasqualini）ら、1997）および α -vインテグリンの高レベルを発現するKS1767細胞株に結合するRGD4Cファージを用いて調べた。油混合物が感染率を妨害するか否かをまず決定した。油の増加量を細菌培養物に加えて、ファージをそれらに加えた。1時間感染後、細胞を播種して、テトラサイクリン抵抗性コロニー（ファージによる感染）数を計数した。対照（油を加えない）と油混合物との有意差を検出できず（データは示していない）、このことは、油混合物が感染率およびファージの回収を妨害しないことを示唆している。

20

【0169】

細胞が存在しない場合、ファージがチューブの底に沈殿するか否かを決定した。Fd（インサートを有しない）ファージ10⁹ TUを培地に加えて、遠心分離した。Fdファージはチューブまたは油相の底には検出できなかった。次に、ファージが細胞によって油相に特異的に運ばれるか否かを調べた後、細菌による感染によって回収した。このため、RGD4CファージまたはFdファージの増加量をKS1767細胞懸濁液に加えて、氷中で4時間インキュベートした後油相の上で遠心分離した。図2Aに示すように、細胞から回収したファージの数は、加えたファージの数と共に増加した。回収された（濃縮）Fdファージに対するRGD4Cの数の比は、一貫して100～500倍のあいだであった。KS1767細胞に対するRGD4Cファージの結合は特異的であって、対応する可溶性のペプチドによる競合実験がKS1767細胞に対するRGD4Cファージの結合を完全に阻害して、結合したファージの数はFdファージの数（バックグラウンド）に近くなったことから、pIIIタンパク質において発現されるペプチドによって媒介された（図2B）。陰性対照ペプチド

30

40

（CARAC, 配列番号 :5またはGRGESP, 配列番号 :10）

は、KS1767細胞に対するRGD4Cファージの結合に影響を及ぼさなかった（示していない）。瞬間凍結段階を行った、または行わない場合のファージの回収を比較した。回収された試験ファージの量に実質的な減少を認めなかった（データは示していない）。

【0170】

BRASILによるファージの回収を、洗浄段階を必要とする標準的なバイオパニング法と比較した。BRASILによって回収されたRGD-4Cファージの数は、洗浄を含む従来のファージ-細胞結合戦略を用いた場合に回収された同じファージの数より有意に高かった（t検定、 $P < 0.01$ ）（示していない）。逆に、陰性対照ファージによる有意

50

に低いバックグラウンド（ t 検定、 $P < 0.01$ ）を認めた（示していない）。特異的ファージの回収における有意な増加とバックグラウンドにおける実質的な減少を仮定すると、BRASILを用いた場合、全体的な精度は従来の細胞選別法と比較して1次数以上一貫して改善した。

【0171】

実施例2. BRASILによって同定されたVEGFターゲティングペプチド

糖尿病性網膜症は、高血糖症によって引き起こされた網膜および隔膜における新しい血管の形成（血管新生）である。網膜の血管新生プロセスは完全には理解されていないが、増殖因子、特に血管内皮増殖因子（VEGF）がこのプロセスにおいて重要な役割を有する。

10

【0172】

眼内血管新生は、多くの眼科疾患の病理的合併症であり、世界における失明原因の第一位である。高血糖症そのものは、糖尿病性網膜症の主因であるように思われるが（エンゲルマンおよびカーン（EngermanおよびKern）、1986）、血管新生プロセスを開始するのは増殖因子の誘導である。いくつかの可能性がある候補体の中で、血管内皮増殖因子（VEGF）は、いくつかの抗VEGF治療が動物モデルにおいて眼の血管新生を防止することから、虚血誘導血管新生の最も重要なメディエータであるように思われる。VEGFは、いくつかの網膜細胞型（神経節細胞、RPE、周細胞、内皮細胞、星状細胞、およびミュラー細胞）によって産生される。その発現は低酸素症によってアップレギュレートされて、これは眼を通して自由に拡散する。

20

【0173】

血管新生は複雑なプロセスであり、これは活性化剤と阻害剤の存在によってバランスを保っているように思われる（ハナハンおよびフォークマン（HanahanおよびFolkman）、1996）。VEGFは、生理的および病理的血管新生の主要な活性化因子および調節因子である（フェララおよびデービス・スミス（FerraraおよびDavis-Smyth）による総説、1997）。これは、血管内皮細胞にとって比較的特異的な分裂促進因子であり、多様なインビボモデルにおいて十分な血管新生反応を誘発する。VEGFは、これまで記述された5つのメンバーと共に多遺伝子ファミリーに属する：VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGFおよびオルフウイルスVEGF（VEGF-Eとも呼ばれる）。遺伝子のもう一つのエキソンスプライシングによって、生物作用が異なる多数の種のmRNAが得られる（ティッシャー（Tischer）ら、1991；ベッコラおよびアリタロ（VeikkolaおよびAlitalo）、1999）。VEGFsはまた、ホモおよびヘテロダイマーとして産生されるが、VEGFヘテロダイマーの機能に関してはほとんどわかっていない。

30

【0174】

材料および方法

細胞と試薬

組み換え型ヒトVEGF₁₆₅（ファーマーゲン社、サンジエゴ、カリフォルニア州）、組み換え型ヒトVEGF-1（オンコジーンリサーチプロダクツ、ボストン、マサチューセッツ州）、組み換え型ラットNRP-1/Fc、ラットNRP-2/Fc、ヒトVEH-2/Fc（3つ全ての受容体/ヒトIgG₁のFc領域を有するキメラ）、PDGF-BB、抗VEGFR-1（ポリクローナル抗Flt1）、および抗ヒトVEGFポリクローナル抗体（R&Dシステムズ、ミネアポリス、ミネソタ州）は、全て購入した。HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）は、クロネティクス社から購入して、製造元の説明書に従って培養した。抗マウスCD13抗体R3-63および2M-7は、記述のように産生して特徴を調べた（ハンセン（Hansen）ら、1993）。抗M13ポリクローナル抗体（アマシャムファルマシア社）は購入した。抗CD31抗体はファーマーゲン社（カリフォルニア州）から購入して、Cy3またはFITCに結合した抗平滑筋アクチンは、シグマ社から購入した。抗デスミンポリクローナル血清は、ダイコ社から購入した。アミノペプチダーゼ-N（ロイシンアミノペプチダーゼ）はシグマ社から購入した。HUV

40

50

ECを培養して、製造元のプロトコール（クロネティクス社、サンジエゴ、カリフォルニア州）に従って継代回数2～8回のあいだで用いた。受容体媒介内部移行を最小限にするために、細胞と培地は特に明記していない限り氷中で維持した。

【0175】

B R A S I L

細胞をPBS、5 mM EDTA（5分間）によって回収して、PBSによって洗浄し、1 % BSAを含むMEM（MEM 1 % BSA）に 10^6 個/mlで再懸濁させた。ファージを細胞懸濁液に加えて氷中でインキュベートした。4時間後、細胞懸濁液100 μ lをジブチルフタレート：シクロヘキサン混合物（9：1）200 μ lを含む400 μ lエッペンドルフチューブに移して、10,000 gで10分間遠心分離した。結合したファージを有する細胞は油相の中をチューブの底へと移動して、未結合のファージは油の上部の水相に残った。チューブを液体窒素中で瞬間凍結して、沈殿物を切断し、新しいエッペンドルフに移して、対数増殖期の大腸菌（E. coli）K91kan細胞200 μ lによる感染によってファージを救出した後、希釈してテトラサイクリンを添加したLBプレート上に播種した。

【0176】

B R A S I L ファージディスプレイによるHUVECバイオパニング

二段階バイオパニング戦略を設計して、血管新生内皮細胞に結合するファージを単離した。非特異的結合を減少させるために、ファージライブラリを、飢えさせたHUVEC細胞上で予め浄化してから、VEGF₁₆₅によって刺激した同じ細胞株上で選別した。有機相を通して遠心分離した後、VEGF₁₆₅刺激HUVEC沈殿物に結合したファージを細菌感染によって回収して、増幅し、さらに二回の選択ラウンドを行った。

【0177】

ファージペプチドライブラリは、記述のように得て、増殖させ、操作した（パスカリーニ（Pasqualini）ら、1999）。添加剤を加えない内皮基礎培地（EBM-2；クロネティクス社）において80 %コンフルエンスまで24時間培養したHUVEC細胞を「飢えさせたHUVEC」と定義した。次に、培地を20 ng/ml VEGF₁₆₅を添加したEBM-2に交換して、これらの条件でさらに18時間培養した細胞を「VEGF₁₆₅ - 刺激HUVEC」と定義した。飢えさせたおよびVEGF₁₆₅ - 刺激HUVECをいずれも、氷冷PBSおよび5 mM EDTAによって回収して、1 % BSAを含むEBM-2によって1回洗浄し、同じ培地に 10^7 個/mlで再懸濁させた。予め浄化する段階において、飢えさせたHUVEC（細胞 10^6 個）を非選択CX₆Cファージライブラリ 10^9 TUと共に氷中で2時間インキュベートした；次に、混合物を有機相を通して遠心分離した。スクリーニング段階において、上部水相（上清）の上に残っていた未結合のファージを新しいチューブに移して、VEGF₁₆₅刺激HUVEC（細胞 10^6 個）と共にインキュベートした。氷中で4時間後、細胞-ファージ複合体を下部有機相を通して遠心によって分離した。細胞沈殿物におけるファージ集団を対数増殖期の大腸菌（E. coli）K91kan宿主細菌200 μ lの感染によって回収した。この技法は、前回のラウンドから得たファージを用いて3回繰り返した。3回目のバイオパニングラウンドの後、ファージ32個を無作為に選択して分析のために配列決定した。

【0178】

精製受容体上での結合アッセイ

ヒトVEGF-1、ヒトVEGF-2、ラットNRP-1、およびラットNRP-2（PBS 50 μ l中に1 μ g）を、マイクロタイタープレートに4℃で一晩固定した。ウェルをPBSによって2回洗浄して、3 % BSAを含むPBSによって室温で2時間ブロッキングした後、CPQPRPLC（配列番号：6）ファージ、CNIRRG C（配列番号：11）ファージ、またはfd-tetファージのいずれかの 10^9 TUと共にPBS/1.5 % BSA 50 μ l中でインキュベートした。室温で1時間後、ウェルをPBSによって9回洗浄して、ファージを細菌感染によって回収した。連続希釈液を、テトラサイクリンを添加したルリアベルタニ（LB）培地上に播種した。VEGF₁₆₅、PD

G F-B B、または合成ペプチドを表示の濃度で用いて、固定したタンパク質と共にプレインキュベートしてファージ結合の競合的阻害を評価した。ポリクローナル抗 V E G F R-1 血清または抗ヒト I g G (V E G F R-2、N R P-1、および N R P-2) のいずれかによる E L I S A によって、マイクロタイタプレート上の固定受容体の有無および濃縮を確認した。V E G F 受容体が機能的に活性であることを示すために、V E G F₁₆₅ (50 ng/ml) を固定受容体と共に室温で2時間インキュベートした。3回洗浄後、V E G F₁₆₅ 結合を抗 V E G F 特異的抗体を用いて E L I S A によって評価した (データは示していない)。

【0179】

結果

10

V E G F 刺激 H U V E C 上でのバイオパニング

B R A S I L の長所は、上部水相に残っている未結合のファージを、わずかな減損で新しい選別ラウンドのために用いることができる点である。このアプローチを用いて、飢えさせた H U V E C によるファージディスプレイライブラリをまず予め浄化してから、V E G F₁₆₅-活性化 H U V E C によるバイオパニングを行った (図3)。次に、V E G F₁₆₅ 活性化細胞を B R A S I L によって回収して、それらに結合したファージを増幅してもう一つの選択ラウンドに供した。

【0180】

選択法を調べるために、無作為に選択したファージクローン21個を飢えさせた H U V E C および V E G F-刺激 H U V E C に対する結合に関して調べた。クローン21個中14個 (67%) は、対照のインサートを有しないファージに対して標準化すると、V E G F 刺激に基づく細胞結合の比が150%より多く (範囲、1.5~8.7倍; 中央値、2.2倍) 増強した (データは示していない)。V E G F₁₆₅ 活性化細胞上での3回の B R A S I L 選択ラウンド後、ファージ34個を配列決定のために無作為に選択した。インサート配列34個のアラインメント分析によって、B R A S I L によって回収したファージの24クローン (70%) が V E G F ファミリーメンバーに存在する配列にマッピングされうるペプチドモチーフを示すことが判明した (示していない)。V E G F ファミリーに対して相同なペプチドを下記の表3に示す。

20

【0181】

ペプチド配列 C P Q P R P L C (配列番号: 6、以降「クローン19」と呼ぶ) を示すファージクローンは、V E G F-B イソ型167タンパク質の一部と配列が非常に類似であった。異なるペプチド3個はモチーフ I R R^E / Q を含んだ。モチーフ I R R^E / Q は、既知のタンパク質配列と実質的な相同性を示さず、さらなる実験は C P Q P R P L C (配列番号: 6) に重点を置いた。

30

【0182】

【表3】 V E G F ファミリーメンバーとの相同性を示すターゲティングペプチド

クローン番号	配列	配列番号	相同性	
ペプチド #1	CEGESASC	:40	VEGF-D	
ペプチド #3	CVPMRLQC	:41	VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, PlGF-1, PlGF-2	
ペプチド #4	CLGKGSVC	:42	VEGF-A, VEGF-D	
ペプチド #6	CLSPIGEC	:43	VEGF-A	10
ペプチド #7	CNLSVPAC	:44	VEGF-A, VEGF-D	
ペプチド #9	CHGSYVC	:45	PlGF-1, PlGF-2	
ペプチド #11	CADVLRPC	:46	VEGF-D	
ペプチド #12	CWRSVEVC	:47	VEGF-B, VEGF-C	
ペプチド #13	CSIRRESC	:48	VEGF-C, VEGF-D	
ペプチド #17	CAVVSQC	:49	VEGF-B	20
ペプチド #18	CLANLQTC	:50	VEGF-A, VEGF-C	
ペプチド #19	CPQPRPLC	:6	VEGF-B, PlGF-1, PlGF-2	
ペプチド #21	CNIRRQGC	:51	VEGF-C, VEGF-D	
ペプチド #23	CIRREKRC	:52	VEGF-C, VEGF-D, PlGF-1, PlGF-2	
ペプチド #24	CAGKSSNC	:53	VEGF-D	
ペプチド #25	CRECGERC	:54	PlGF-1	30
ペプチド #26	CMARQARC	:55	VEGF-A	
ペプチド #28	CLPISSSC	:56	VEGF-D	
ペプチド #29	CGRAKVRC	:57	PlGF-1, PlGF-2	
ペプチド #30	CASGSENC	:58	VEGF-D	
ペプチド #31	CMRGKGLC	:59	VEGF-A, PlGF-2	40
ペプチド #32	CAGGGAYC	:60	VEGF-A, VEGF-B	
ペプチド #33	CAAAPIRC	:61	VEGF-B, VEGF-C	
ペプチド #36	CGRDSKQC	:62	VEGF-D	

【 0 1 8 3 】

VEGFと相同ではない他のHUVEC結合ペプチドには、

CVFAILAC (配列番号 :128), CGVQYVNC (配列番号 :129), CSYKANSC (配列番号:130), CYQSSSGC (配列番号 :131), CRGGGRLC (配列番号 :132), CGSDRWLC (配列番号 :133), CLVYNPAC (配列番号 :134), CIPGTSLC (配列番号 :135), CATEAVGC (配列番号 :136)およびCWGGNQAC (配列番号 :137)

が含まれた。

【0184】

クローン19ペプチドが一つまたは複数のVEGF受容体に結合するか否かを決定するために、異なる組み換え型VEGF受容体についてインビトロファージディスプレイを用いた。図4に示すように、クローン19はラットニューロピリン-1 (NRP-1) のみならずヒトVEGF-R1に結合したが、ヒトVEGF-R2には結合しなかった。この結果は、VEGF-Bの結合プロフィールと一致する (オロフソン (Olofsson) ら、1999)。VEGF-R2には結合しなかったが、3つ全ての固定受容体が類似のVEGF₁₆₅結合活性を示したために、結合しなかったのは活性がないためではなかった (データは示していない)。クローン19ファージは、fd-tetファージと比較してVEGF-R1に対して1000倍を超える強い結合を示した (示していない)。クローン19ファージは、ニューロピリン-2 (NRP-2) 受容体には結合しなかった (示していない)。

10

【0185】

VEGF₁₆₅ およびVEGF-Bイソ型は、VEGF-R1 (オロフソン (Olofsson) ら、1999) に対する結合に関して競合することが知られている。クローン19とVEGF-R1およびNRP-1との相互作用は、VEGF₁₆₅ との競合によって遮断されるが (図4A)、PDGF-BBでは200 ng/mlまでの濃度での遮断されなかった。VEGF₁₆₅ との競合は、濃度依存的であり、100%阻害は、VEGF₁₆₅ の10 ng/mlもの低い濃度で得られた (図4B)。クローン19ファージの結合は同源のペプチドCPQPRPLC (配列番号:6) によっても遮断されるが、その作用は異なる (示していない)。CPQPRPLC (配列番号:6) ペプチドは、NRP-1に対する場合よりVEGF-R1に対するファージ結合の遮断において約100倍有効であった (示していない)。

20

30

【0186】

これらの結果は、CPQPRPLC (配列番号:6) が、VEGF-R1およびNRP-1と特異的に相互作用するキメラVEGF-Bファミリー模倣体であることを示している。VEGF-B₁₆₇ はおそらくHUVEC細胞の分裂促進因子である (オロフソン (Olofsson) ら、1996)。図5に示すように、ファージクローン19の10¹⁰ T.U. は、非刺激細胞と比較して、またはHUVEC細胞にも結合するRGD4Cファージと比較してHUVECの増殖を有意に誘導した。

【0187】

VEGF-Bは二つのmRNAスプライス変種を有し、これらは、そのカルボキシ末端において配列が開散するエキソン6 (イソ型167および186) の異なるが重なり合う読みとり枠を用いることによって作製された (オロフソン (Olofsson) ら、1999)。ペンタペプチド配列PRPLCは、エキソン5と6Bのあいだの境界後の二番目の残基で始まるエキソン6BによってコードされるVEGF-B₁₆₇ カルボキシ末端領域に認められる。PRPLCはニューロピリン-1 (NRP-1) 結合ドメイン (マキネン (Makinen) ら、1999) である。一方、PRPLCと重なり合い、クローン19ペプチドとも重なり合うテトラペプチド配列PQPRは、VEGF-B₁₈₆ のカルボキシ末端に認められ、これはエキソン6Aによってコードされる。PQPRは、12残基の既知のNRP-1結合部位内に埋もれている (マキネン (Makinen) ら、1999)。

40

【0188】

50

H U V E C 細胞も同様に、C X 7 C フェージライブラリに対して選別した。同定されたターゲットイングフェージペプチド配列を下記の表 4 に示す。

【 0 1 8 9 】

【表 4】 H U V E C 細胞に対する C X 7 C ペプチド結合

CTSWFWSC	配列番号 :138	CEWWPEWLC	配列番号 :142
		CARYLWSWC	配列番号 :143
CEWSGIWAC	配列番号 :139	CAWWRFGLC	配列番号 :144
		CRGEWGMMC	配列番号 :145
CNPLFWWWC	配列番号 :140	CFWPFESWC	配列番号 :146
		CSNAWVHAC	配列番号 :147
CGGWLFPFC	配列番号 :141	CSWYWWLGC	配列番号 :148
		CGGWLFPFC	配列番号 :149
CIEWGSRDC	配列番号 :150	CGGWLFPFC	配列番号 :157
		CTRVGPKRC	配列番号 :158
CVRSSVVAC	配列番号 :151	CKSGQIASC	配列番号 :159
		CWWPWGGWC	配列番号 :160
CEDSSRANC	配列番号 :152	CDWGLWWLC	配列番号 :161
		CRGWADRKC	配列番号 :162
CGGWLFPFC	配列番号 :153	CGGWLFPFC	配列番号 :163
		CTQVRFSGC	配列番号 :164
CLLVGQVRC	配列番号 :154	CPWWWFGECC	配列番号 :165
		CGGWLFPFC	配列番号 :166
CPRYLFWLC	配列番号 :155		
CYRSAGAGC	配列番号 :156		

10

20

30

40

【 0 1 9 0 】

考察

モチーフ P R P L C (V E G F - B₁₆₇ に認められる N R P - 1 結合部位) およびモチーフ P Q P R (V E G F - B₁₈₆ の 1 2 残基 N R P - 1 結合エピトープ内に埋もれている) に類似する配列 C P Q P R P L C (配列番号: 6) によって V E G F 受容体リガンドを同定した (マキネン (M a k i n e n) ら、1999)。このように、V E G F - B 模倣体 C P Q P R P L C (配列番号: 6) は、異なる V E G F - B イソ型における結合部位間のキメラであるように思われる。これらの結果は、双方の V E G F - B イソ型のカルボキシ末端領域が V E G F - R 1 および N R P - 1 に結合してこれを活性化する可能性があることを示唆している。それらはまた、ペプチド C P Q P R P L C (配列番号: 6) が、

50

V E G F - R 1 および N R P - 1 受容体とのその相互作用において双方の V E G F - B イソ型の作用を模倣する可能性があることも示唆している。合成ペプチド C P Q P R P L C (配列番号: 6) を用いた場合に、ファージ結合との競合において V E G F - R 1 および N R P - 1 に関して異なる作用が認められたことは、ペプチドキメラモチーフが V E G F 受容体と異なるように相互作用することを示唆している。これは、それぞれの受容体における結合部位の数またはキメラペプチドに対する結合部位の親和性による可能性がある。

【0191】

これらの結果は、B R A S I L が患者の試料に由来する細胞集団を標的とするために有用となることを示している。方法は、例えば、固形腫瘍の細針吸引または白血病患者からの白血球の蛍光活性化細胞ソーティングに関連して容易に用いることができる。上部水相に存在する未結合のファージはわずかな減損で回収される可能性があるため、予め浄化する戦略は B R A S I L によって容易となる。これによって、例えば、疾患を有する細胞に結合するファージを単離する前に、正常被験者からの細胞に結合するファージを差し引くことによって、ファージディスプレイによってターゲティングペプチドを同定するための改善されたプロトコルが可能となる。B R A S I L 法によってまた、ファージ結合の非特異的バックグラウンドも減少させることができる。

10

【0192】

多数の試料および予め浄化および選択するいくつかのラウンドは、数時間で行うことができ、方法を自動化して、高処理能のスクリーニングを促進することができる。データ (下記に示す) は、現在利用可能なインビボファージディスプレイ技術によって実現可能でない脾臓、肝臓、および骨髄のような有意な網内内皮成分を有する臓器のターゲティングが、B R A S I L によって可能となるかも知れないことを示唆している (パスカリーニ (P a s q u a l i n i) ら、2000)。方法はまた、酵素または抗体のようなより大きいポリペプチドまたは折り畳まれたタンパク質を示すファージについて用いてもよく (示していない)、天然に存在する酵素、受容体、または他のタンパク質の新規阻害剤または活性化剤の高処理能スクリーニングを行うためのファージディスプレイに基づくアプローチを提供する。データは、B R A S I L が、ターゲティングリガンド-受容体対を同定するための従来のプロトコルより、そして細胞表面の分子多様性の探索より優れていることを示している。

20

【0193】

実施例 3. 白血病細胞株による B R A S I L

上記の方法を用いて、M o l t - 4 白血病細胞株および C X 5 C ライブラリについても B R A S I L プロトコルを行った。ライブラリを正常な M o l t - 4 細胞株に対して予め差し引いた後、C D - 1 3 タンパク質をコードする遺伝子によって形質転換した M o l t - 4 細胞株に対してスクリーニングした。M o l t - 4 白血病ターゲティングペプチドを下記の表 5 に記載する。

30

【0194】

【表 5】 M o l t - 4 白血病細胞株に対するターゲティングペプチド

CEKRWGC	配列番号 :167	CSVWFGC	配列番号 :7
CKQRGVC	配列番号 :168	CQVRLSC	配列番号 :169
CTWDKRC	配列番号 :170	CRSPMKC	配列番号 :186
CTLFRNC	配列番号 :171	CPTMTEC	配列番号 :187
CRGSAVC	配列番号 :172	CSVWFGC	配列番号 :188
CAISVGC	配列番号 :173	CSVWYGC	配列番号 :189
CTNPQRC	配列番号 :174	CSVWYGC	配列番号 :190
CDSWPLC	配列番号 :175	CWILEQC	配列番号 :191
CENGSRG	配列番号 :176	CMATLRC	配列番号 :192
CGGSSQC	配列番号 :177	CRKLGGC	配列番号 :193
CGREGPC	配列番号 :178	CRAREMC	配列番号 :194
CSGRSGC	配列番号 :179	CQAWQRC	配列番号 :195
CQQGRYC	配列番号 :180	CKDRWGC	配列番号 :196
CVKQMRC	配列番号 :181	CYSDKKC	配列番号 :197
CSVWWGC	配列番号 :182	CGNHQKC	配列番号 :198
CSGPC	配列番号 :183	CPNDSLC	配列番号 :199
CEGHQSC	配列番号 :184	CQGTWIC	配列番号 :200
CNVWYGC	配列番号 :185	CMVYFGC	配列番号 :8

10

20

30

【0195】

白血病細胞株ターゲティングペプチドに関して同定されたコンセンサス配列はC X V W X G C（配列番号：201）であった。

【0196】

実施例4．BRASILによる尿路上皮組織のターゲティングペプチドの同定
尿路上皮組織のターゲティングペプチドは、これまでファージディスプレイによって同定されていなかった。本実施例は、新規ターゲティングペプチドを同定する場合のBRASIL法の有用性をさらに証明して、方法および組成物のさらなる態様を説明する。

【0197】

材料および方法

材料

ヒト細胞株T24、RT4、MDA-MB-435S、およびMOLT-4は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（マナッサス、バージニア州）から得た。組織培養培地は全て、ライフテクノロジーズ社（ニューヨーク州）から得た。細胞は、10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、100IU/mlペニシリン、および100mg/mlストレプトマイシンを添加したDMEMにおいて、37℃で5%CO₂の標準的な条件で増殖させた。ヒト尿路上皮細胞は新鮮な尿管標本から単離して、添加ケラチノサイトSFM培地を用いて培養した。ブタ膀胱は、ライト博士（K. Wright, M. D. アンダーソン癌センター獣医学部、ハウストン、テキサス州

40

50

）から得た。ファージディスプレイライブラリを調製して、上記のようにK91kan大腸菌（E. coli）株によって増幅した。合成ペプチドはアナスペック社（サンノゼ、カリフォルニア州）から得た。

【0198】

ファージのパニング

尿路上皮細胞は、腎細胞癌のために腎切除を受けた患者の新鮮な尿路標本から単離した。滅菌条件で、尿管から結合組織および脂肪組織を除去して、切開し、粘膜をPBS中に丁寧に剥離した。次に、細胞を沈殿させて、RPMI/10%BSAに再懸濁させた。次に、細胞約 1×10^7 個をRPMI/10%BSA 200 μ lにおいて、環状CX7Cファージライブラリ、直鎖状のX₆-ライブラリ、または先のバイオパニングラウンドから得られた増幅ファージの 1×10^7 cfuと共に氷中で4時間インキュベートした。二つの異なる実験において、ライブラリまたは先のラウンドから得た増幅ファージを 1×10^7 MOI-4細胞上で氷中で30分間予め浄化してから、正常な尿路上皮細胞に加えた。インキュベーション後、上記のBRASSIL法を用いて選別を継続した。簡単に説明すると、400 μ lエッペンドルフチューブにおいて90%ジブチルフタレートおよび10%シクロヘキサン（シグマ社、セントルイス、ミズーリ州）からなる油のクッションに細胞を載せて、エッペンドルフ遠心分離機において10,000 rpmで10分間沈殿させた。チューブを液体窒素において凍結して、細胞沈殿物を含むチューブの下部を切断した。過剰量の油を除去した後、沈殿物に対数増殖期K91細菌1mlを1時間再感染させて、一晚増幅した。少量を播種して単一のコロニーを採取して配列決定した。3回のラウンドまでを行った。

【0199】

配列決定およびアラインメント

各ラウンド後、無作為に選択したファージクローン94個のペプチドインサートを、プライマー

5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3' (配列番号 :12)

およびビッグダイターミネーターサイクルシークエンシングキット（パーキンエルマー社、ノーウォーク、コネチカット州）を用いてDNA配列決定によって配列決定した。ペプチド配列はClustalWアラインメントプログラム（ヨーロッパ生物情報学研究所のホームページ、<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>）を用いて並置した。国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラム（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）を用いて、濃縮したペプチド配列をタンパク質データベースと並置した。類似性はプログラムによって並置された領域における陽性マッチの百分率として定義した。

【0200】

ファージの結合と競合実験

選択したファージの結合は、ヒト接着性初代尿路上皮細胞、乳癌細胞株MDA-MB-435、および移行性癌細胞株RT4およびT24について調べた。細胞は全て、48ウェルプレートにおいてサブコンフルエンスまで増殖させ、遊離の結合部位を30%FCS/DMEM（ブロッキング培地）800 μ lによって37℃で1時間ブロッキングした。次に、ブロッキング溶液を、各ファージ 1×10^8 cfu/ウェルを含む10%FCS/DMEM（洗浄培地）200 μ lに交換した。非特異的エンドサイトーシスを防止するために4℃で2時間インキュベートした後、未結合のファージを洗浄培地500 μ lによって7回洗浄することによって除去した。競合実験の場合、対応するペプチドまたは対照ペプチド（CARAC、配列番号：5）の漸増濃度をインキュベーションのあいだに加えた。結合したファージを、対数増殖期のK91培養物500 μ lによる感染、および連続希釈液の播種によって決定した。値は1試料あたり3個ずつのウェルの連続希釈液の平均値を表し、インサートを有しないfd-tetファージの結合と比較して示す。

【0201】

無傷の粘膜に対する結合を決定するために、新規ドットブロットチャンバーアッセイを開発して、ドットブロットチャンバー（バイオラド、ハーキュルズ、カリフォルニア州）に膀胱または尿路上皮標本を置いて、粘膜面を上にして、このように、等しく大きい粘膜片 96 個までを作製した。ドットブロットチャンバーにおけるブロッキングおよび洗浄は上記のように行ったが、対応する培地は 400 μ l で行い、感染は、対数増殖期の K91 kan 培養物 400 μ l / ウェルによって行った。

ウェル 3 個を一つのウェルとしてプールした。

【0202】

無傷の粘膜試料上でのグルコサミノグリカン（GAG）層の除去を、ドットブロットチャンバーアッセイとして行った。ウェルの半数を 0.1 M HCl 200 μ l と共に 2 分間インキュベートして、ブロッキング溶液によって十分にすすぎ、双方の部分を先に記載したようにブロックした。結果は、1 に設定した無処置の粘膜に対する f d - t e t ファージと比較して示す。

【0203】

結果

ヒト膀胱壁と相互作用するペプチドモチーフを同定するために、外科尿路上皮標本から新しく単離した尿路上皮細胞上での連続アフィニティ選別ラウンドによって、ファージディスプレイペプチドライブラリからクロンを選択した。四つの実験において、異なる二つのライブラリ、環状 7 量体および直鎖状の 6 量体ライブラリを、BRASIL 法を用いて MO L T - 4 白血病細胞に対して予め差し引いて、または差し引かずにヒト尿路上皮細胞上で選別した。4 回までの選択ラウンドを行い、毎回のラウンド後クロン 94 個を配列決定した。C l u s t a l W プログラムによって得られた全ての配列を並置することによって、ペプチドモチーフ 5 個を同定した（表 6）。

【0204】

【表 6】ヒト尿路上皮細胞に結合したペプチドの選択

ペプチド配列	共有モチーフ	認められたラウンド
CGQEISGLC* (配列番号 :13)	ISGL	2
EVISGL (配列番号 :14)	(配列番号 :35)	1
LISGVL (配列番号 :15)		1
ELLSGL (配列番号 :16)		1
GRLSGSL (配列番号 :17)		2
CLRSGGLTC (配列番号 :18)	GGLS	2
LGGLSA (配列番号 :19)	(配列番号 :36)	2
CWGGLSGLC* (配列番号 :20)		1
CGLSLK (配列番号 :21)		1
GLSARH (配列番号 :22)		1 [#] (2x)
CEFGLSEVC (配列番号 :23)		1
SKHALE (配列番号 :24)	HALE	1 [#]
VHALES* (配列番号 :25)	(配列番号 :37)	3
VFALEG (配列番号 :26)		2

10

20

30

40

CRIRMSAGC* (配列番号 :27)	MSAG	1 [#]
AMSAGV (配列番号 :28)	(配列番号 :38)	2
CMIAGLGRC (配列番号 :29)		1 [#]
CRVIVGPC (配列番号 :30)	RVTXG	1 [#]
CRVFAGKRC (配列番号 :31)	(配列番号 :39)	1
DRVTLG* (配列番号 :32)		3
CRVTRGHGC (配列番号 :33)		1 [#]
CIRVEAGSC (配列番号 :34)		1 [#]

10

MOLT-4細胞に対して差し引いてから選択したファージを#で示す。結合アッセイのために選択したファージは*で示す。

【0205】

ペプチドモチーフ5個を含むファージを増幅して、注意深く滴定して、培養ヒト尿路上皮細胞に対するその結合をサブコンフルエント層において調べた。インサートを有しないfd-tetファージを陰性対照として用いた。コンセンサスモチーフを含むファージは、インサートを有しないfd-tetファージと比較して培養尿路上皮細胞に最大12.7倍の結合を示した(図6)。転移性の乳管癌に由来するヒト乳癌細胞株MDA-MB-435Sには結合しないことによって決定されるように、結合は尿路上皮細胞に対して特異的であった(図7)。

20

【0206】

分化が進んでいない再発性の移行性細胞癌に由来する尿路上皮腫瘍細胞株T24および移行性細胞乳頭腫に由来するRT4に対する結合も同様に調べた。RT4にはCWGGLSGLC(配列番号:20)を除く全てのファージが結合したが、T24腫瘍細胞に結合したのはCGQEISGLC(配列番号:13)ファージのみであった(図7)。VHALES(配列番号:25)ファージは明らかにRT4腫瘍細胞のみに結合した。VHALES(配列番号:25)の結合特異性は、競合的ファージ結合阻害によって確認した(図8)。結合はfd-tetファージより5.4倍高く、結合は可溶性のVHALES(配列番号:25)ペプチドによって用量依存的に減少したが、残りは、等量の対照ペプチドCARAC(配列番号:5)によって不変であった(図8)。

30

【0207】

無傷の膀胱粘膜に対するモチーフの結合を、膀胱または尿路粘膜の96個までの等しい部分においてファージ結合を同時に調べることができる新規ドットブロットチャンバー結合アッセイを用いて調べた。無傷のブタ膀胱およびヒト尿路粘膜に対する結合をこのアッセイによって決定した。コンセンサスモチーフを示す選択したファージは、fd-tetファージよりブタ膀胱粘膜に対して3.8~11.7倍高い結合を示した(図9)。

【0208】

同じアッセイ法を用いて、無傷の粘膜に対するいくつかのファージの結合に及ぼすグルコサミノグリカン(GAG)層の影響を調べた。GAG層を上記のように除去した。ヒト尿路およびブタ膀胱標本の粘膜の半分を、ドットブロットチャンバーにおいて0.1M HClによって2分間処理して、十分に洗浄し、結合アッセイ法を先の記述のように行った。

40

【0209】

GAG除去後のファージの結合を、1に設定した無処置粘膜の結合と比較した。対照ファージfd-tetおよびCRIRMSAGC(配列番号:27)ファージの結合は、処置を行っても不変のままであったが、CWGGLSGLC(配列番号:20)ファージ結合は4.2倍増加した。VHALES(配列番号:25)ファージ結合は50%減少した(

50

図10)。ヒト尿路試料に関して調べたところ、GAG除去によってCWGGLSGLCファージ結合は3.4倍増加した（データは示していない）。このことは、CWGGLSGLC（配列番号：20）ファージの結合にGAG層が負の影響を及ぼすこと示唆している。

【0210】

これらの結果は、尿路上皮組織を標的とする多くの新規ターゲティングペプチド配列および保存モチーフを示している。BRASILプロトコルのさらなる改変を、それらの新規同定方法の有用性およびターゲティングペプチド配列の特徴と共に本明細書において示す。当業者は、開示の方法および組成物が尿路上皮細胞または組織に限定されず、ヒトにおいて認められる多様な臓器、組織、および細胞型に対して広い適用を有することを認識するであろう。

10

【0211】

実施例5. BRASILおよび幹細胞スクリーニング

BRASILによってターゲティングペプチド配列に関してスクリーニングしてもよい細胞型のもう一つの非制限的な実施例には、幹細胞が含まれる。下記に考察するように、幹細胞は骨髄から得る。しかし、当業者は開示の方法が幹細胞全般に適用可能であることを認識するであろう。

【0212】

細胞供給源と培養

間葉細胞は、ヒト骨髄吸引液をプラスチックフラスコに播種することによって得られる骨髄由来の一次幹細胞である。フラスコに結合した細胞は間葉細胞である。間葉細胞は、20%仔ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地において37℃（5%CO₂）で培養して、4～5日毎に継代培養した。KS1767細胞は、10%仔ウシ胎児血清を添加したMEM培地において増殖させ、3～5日毎に継代培養した。

20

【0213】

間葉細胞上でのバイオパニング

ファージライブラリをKS1767細胞に対して最初に予めスクリーニングするサブトラクション戦略を行って、KS1767非幹細胞株に対するファージ結合を除去した。予めスクリーニングしたライブラリをBRASIL法を用いて間葉細胞に対してスクリーニングした。

30

【0214】

技法は全て4℃で行った。バイオパニングのために用いた全ての培地および溶液は、0.22 μmミリポアフィルターを通して濾過した。間葉細胞およびKS1767細胞をPBSによって洗浄して、プラスチックからの細胞の剥離を促進するためにPBSプラス5mM EDTAと共に氷中で10分間インキュベートした。培地を吸引して細胞を回収し、RPMI1640培地と共に遠心分離して洗浄し、0.5%BSA（ウシ血清アルブミン）を添加したRPMI1640培地において細胞10⁶個/mlで再懸濁させた。CX7Cファージディスプレイライブラリ（または前回のバイオパニングラウンドから得たファージ）をKS細胞（細胞10⁵個あたりファージ10⁹ T.U.）に加えて、氷中で1～2時間インキュベートした。KS1767細胞をファージに曝露して、ジブチルフタレート：シクロヘキサン（6：1）上で4℃で遠心分離した後、未結合のファージをBRASILによって選択した。これらの条件において、結合したファージを有する細胞はチューブの底に沈殿する。未結合のファージは上部（水相）相に留まっている。上部相を注意深く、間葉細胞10⁵個を含む新しいチューブに移して、氷中でさらに4時間インキュベートした。次に、間葉細胞に結合した結合ファージをBRASILによって選択した。ファージを有する間葉細胞懸濁液をジブチルフタレート：シクロヘキサン（6：1）上で4℃で遠心分離した。結合ファージを有する間葉細胞はチューブの底に沈殿する。チューブを-80℃で10分間瞬間凍結して、結合ファージを有する細胞の沈殿物を含むチューブの底を切断して、新しいチューブに移して、ファージを回収するために、沈殿物を対数増殖期大腸菌（E. coli）K91培養物200 μlに注意深く再懸濁させた。20

40

50

分間感染後、LB（ルリアーベルタニ）培地 20 ml を加えて、ファージを増幅するために細胞を 37℃ で攪拌しながら 16～18 時間培養した。初回選択後、先のラウンドから得たファージを次の選択ラウンドに用いた。

【0215】

3 回のバイオパニングラウンド後、個々のコロニーを配列決定のために選択した。幹細胞結合ペプチドを下記の表 7 に記載する。

【0216】

【表 7】 幹細胞（間葉細胞）ターゲティングペプチド

CLGRLTVLC (配列番号 :63)	CERSIGFAC (配列番号 :74)	10
	CSVSVSSSC (配列番号 :75):	
CTAWFIESC (配列番号 :64)	CYPGYDSYC (配列番号 :76)	
	CPWYWFGTC (配列番号 :77)	
CSYGRASLC (配列番号 :65)	CECRGDCYC (配列番号 :78)	
	CVKKGGFWC (配列番号 :79)	
CDAGPWTAC (配列番号 :66)	CSMTKLGAC (配列番号 :80)	20
	CGVLKPILC (配列番号 :81)	
CVGVGRSRC (配列番号 :67)	CWWPWGWGC (配列番号 :94)	
CTNPWSPVC (配列番号 :68)	CSWWTFGFC (配列番号 :95)	
	CNSRAGSVC (配列番号 :96)	
CGGSYDEVIC (配列番号 :69)	CLRLSMSAC (配列番号 :97)	
	CNSRAGSVC (配列番号 :98)	30
CAPMEWSVC (配列番号 :70)	CMSGNTERC (配列番号 :99)	
	CGHLGSVYC (配列番号 :100)	
CTRVHGLAC (配列番号 :71)	CVLADPTGC (配列番号 :101)	
	CECRGDCYC (配列番号 :102)	
CESLSHVDC (配列番号 :72)	CWWGWGWGC (配列番号 :103)	
CLWTQSSGC (配列番号 :73)	CWKGFGWWC (配列番号 :104)	40

CKRSATILC (配列番号 :105)	CSERIARVC (配列番号 :86)	
	CPWYWLGWC (配列番号 :87)	
CIEGRRGLC (配列番号 :106)	CGRKNEWAC (配列番号 :88)	
	CARDRIAC (配列番号 :89)	
CPWYWLGWC (配列番号 :107)	CGQMNREVC (配列番号 :90)	
	CDAYPLFFC (配列番号 :91)	10
CVRQGEDAC (配列番号 :108)	CWKGFGWWC (配列番号 :92)	
	CLGSGSGSC (配列番号 :93)	
CSLAVPLAC (配列番号 :109)	CGWFSWFGC (配列番号 :113)	
	CRVDFSKGC (配列番号 :114)	
CMMHGLAAC (配列番号 :110)	CSSLATVVC (配列番号 :115)	
CDWWTTAWC (配列番号 :111)	CMYRTSLAC (配列番号 :116)	20
	CLAAVYQSC (配列番号 :117)	
CGWWGLWPC (配列番号 :112)	CSRRVIGAC (配列番号 :118)	
	CSWWNWFGC (配列番号 :119)	
CPWYWFGTC (配列番号 :82)	CSRRPEVVC (配列番号 :120)	
	CVTGNRGC (配列番号 :121)	
CWVADGYRC (配列番号 :83)	CVSWWFWGC (配列番号 :122)	30
	CGWFSWWGC (配列番号 :123)	
CECRGDCYC (配列番号 :84)	CSWWRFGYC (配列番号 :124)	
CSHAVMPWC (配列番号 :85)		

【0217】

受容体の同定

ペプチド配列CRVDFSKGC (配列番号:114)を含むファージ「D5」は、レプ
チンホルモンと有意な相同性を示した(表8)。レプチンのこの領域は、いくつかの種 (40
アカゲザル(Macaca mulatta)、ヒト(Homo sapiens)、汎類
人猿(Pan troglodytes)、ゴリラ(Gorilla gorilla)、
オランウータン(Pongo pymaeus)、ハツカネズミ(Mus musculus)、
クマネズミ(Rattus norvegicus))において保存されている。

【0218】

【表8】ファージD5とレプチン配列との相同性

ファージ

CRV-DFSKGC (配列番号 :114)

ヒトレプチン

RDLLHVLAFSKSCHLP (配列番号 :125)

マウスレプチン

RDLLHLLAFSKSCSLP (配列番号 :126)

【0219】

保存されたペプチドはタンパク質におけるアミノ酸90～96個のあいだのループにマッピングされる（ザング（Zhang）ら、1997）。レプチン分子のこの領域は、レプチン活性にとって重要であることが示されている。合成ペプチド

DLLHLLAFSKSCSLP (配列番号 :127)

10

は、インビボでレプチン活性を遮断することが報告されている（グラッソ（Grasso）ら、1997）（太字のアミノ酸はクロンD5

(CRVDFSKGC, 配列番号 :114)

と類似性を有するアミノ酸を示す）。

【0220】

本実施例は、幹細胞に対するターゲティングペプチドを同定するために用いることができることを示している。同定されたペプチド配列の一つと内因性ホルモンとが相同であることによって、同定された配列がさらに確認される。当業者は、方法および本明細書において同定されたターゲティングペプチドが、幹細胞を同定および精製するため（例えば、アフィニティクロマトグラフィーによって）、ならびに幹細胞に存在する受容体：リガンド対を同定するためにおそらく有用となることを認識するであろう。

20

【0221】

実施例6．BRASILによる骨髄のスクリーニング

ターゲティングペプチドに関して特に関心がある臓器の非制限的な実施例は骨髄である。骨は、前立腺癌患者の大多数において転移に好まれる部位である（フィドラー（Fidler）ら、1999）。この顕著な選択性は、癌の進行にとって必須である部位特異的相互作用の例として見なされている（ラク（Rak）ら、1995；ゼッター（Zetter）ら、1998）。臨床的関連性にもかかわらず、前立腺癌の骨への転移を制御するメカニズムに関してはほとんどわかっていない。さらに、転移性前立腺癌の治療のために治療物質をターゲティングする有効な戦略はなかった（ブロード（Broadt）ら、1996）。

30

【0222】

循環を通して骨髄に選択的に回帰することができるペプチドのサブセットは、骨転移形成の際に前立腺癌細胞の挙動を刺激する可能性がある。ファージディスプレイを用いてターゲティングされる血管マーカーも同様に、腫瘍細胞が転移するために利用される可能性がある。この考え方はすでに肺回帰ペプチドに関して当てはまることが証明されている。肺血管に回帰するペプチドは実験的転移を阻害する。これらの結果は、部位特異的転移の基本となるのは、それに対して転移が選択的に起こる特定の組織の血管における回帰受容体の存在であるという「改変型種子と土壌」モデルに適合する。そのような選択的血管マーカーは、転移カスケードの第一段階である接着の際に腫瘍細胞に曝露される。骨髄回帰ペプチドを単離することは、転移プロセスの際に前立腺癌細胞の回帰を媒介するそれらの血管マーカーを同定するために、そして骨への転移を防止するための、または既に骨に転移している癌を選択的に造影および／または治療するための可能性がある治療的介入を行うために有用である。

40

【0223】

ヒト骨髄上でのファージディスプレイライブラリのスクリーニング

その下に存在する腫瘍に近づくために手術の際に摘出した新鮮なヒト肋骨を切断して骨髄表面を露出した。骨髄に対する有意な損傷は組織に認められず、その形態は技法後十分に保存されていた。骨髄試料を氷冷DMEM／0.15％BSA（濾過滅菌済み）によって

50

5回（丁寧に）洗浄した。骨から細胞を丁寧に剥離することによって骨髓を採取した。破片および脂肪を除去するために細胞を遠心分離してDMEM／BSAに再懸濁させることによって2回洗浄した。細胞をDMEM／BSA（細胞約 10^7 個／ml）に再懸濁させて、上記のように調製したファージディスプレイライブラリ（ 10^9 TU）と共にインキュベートした。氷中で3時間インキュベートした後、細胞を、ジブチルフタレート：シクロヘキサンの9：1混合物からなる有機相を通して遠心分離した。遠心分離は、 $10,000 \times g$ で10分間行った。遠心管の底を -80°C で瞬間的に凍結して、ファージを上記のように細菌感染によって回収した。選択は、3回より多くのBRASILラウンドによって繰り返して、クローン90個を配列決定した。骨髓ターゲティング配列を下記の表9に記載する。

10

【0224】

【表9】BRASILによって同定された骨髓ターゲティングペプチド

CPEVMGSSC	配列番号 :202	CREQASTGC	配列番号 :211
		CVVKLRNRC	配列番号 :212
CSSVVRLGC	配列番号 :203	CVGLRAPLC	配列番号 :213
		CQKVARPGC	配列番号 :214
CVGAGLHIC	配列番号 :204	CQKFARPGC	配列番号 :215
		CMWGLSYLC	配列番号 :216
CHLEPDWVC	配列番号 :205	CREQRHNLC	配列番号 :217
		CLVLSASAC	配列番号 :218
CALGRWDRC	配列番号 :206	CLLSGLMGC	配列番号 :219
		CRGDTKALC	配列番号 :220
CFGGVGSWC	配列番号 :207	CVSQLGRVC	配列番号 :221
		CFVFEAMGC	配列番号 :222
CGRRTVDC	配列番号 :208	CSVIKRGAC	配列番号 :223
		CGGWVDHRC	配列番号 :224
CLVLGGYGC	配列番号 :209	CAVVRNQEC	配列番号 :225
		CDSPRRPVC	配列番号 :226
CWENRGQFC	配列番号 :210	CTFSGHRLC	配列番号 :227

20

30

40

CHTWGGRNC	配列番号 :228	CERGRGAAC	配列番号 :241	
		CAAGEGWWC	配列番号 :242	
CEGAGLVAC	配列番号 :229	CALSAYRVC	配列番号 :243	
		CLWPWAGEC	配列番号 :244	
CFPRVWSRC	配列番号 :230	CTHATWLVC	配列番号 :245	
		CSGVSTVRC	配列番号 :246	10
CYWLGGALC	配列番号 :231	CLVSYMNGC	配列番号 :247	
		CVRTSSQWC	配列番号 :248	
CDTNQRVVC	配列番号 :232	CLGKGLSSC	配列番号 :249	
		CFTAVEQGC	配列番号 :250	
CMRVTKTHC	配列番号 :233	CGGIGPRFC	配列番号 :251	
		CVATWCEKC	配列番号 :252	20
CDQNWLVHC	配列番号 :234	CSSELRAAC	配列番号 :253	
		CKGSLDEIC	配列番号 :254	
CTFSGHRLC	配列番号 :235	CSSVURLGC	配列番号 :255	
		CLKTEFTAC	配列番号 :256	
CALSAYRVC	配列番号 :236	CPGRLWRAC	配列番号 :257	
		CSELGGAGC	配列番号 :258	30
CGGEEGRRC	配列番号 :237	CLGWRAAAC	配列番号 :259	
		CGAMWGMGC	配列番号 :260	
CAEAGGPDC	配列番号 :238	CIGLSGIEC	配列番号 :261	
		CQKLGWRV	配列番号 :262	
CIVMLGWRC	配列番号 :239	CLEWLQQVC	配列番号 :263	
		CLVLGEKPC	配列番号 :264	40
CGHGV TGRC	配列番号 :240			

CAAGKGLLC	配列番号 :265	CQKLARAGC	配列番号 :278	
		CGGRAILLC	配列番号 :279	
CAAGKDLLC	配列番号 :266	CQLGRAHGC	配列番号 :280	
		CGLVITATC	配列番号 :281	
CGAQSPRC	配列番号 :267	CVGATYSRC	配列番号 :282	
		CSAFSVAYC	配列番号 :283	10
CLSSVRGWC	配列番号 :268	CLAWEVYLC	配列番号 :284	
		CQWWLGPLC	配列番号 :285	
CSESQLAWC	配列番号 :269	CSLGSMGMC	配列番号 :286	
		CVLGEISWC	配列番号 :287	
CSRNSVREC	配列番号 :270	CSGGSGARC	配列番号 :288	
		CPWWMMERC	配列番号 :289	20
CGLVITATC	配列番号 :271			
CPGSRVQVC	配列番号 :272			
CRGDTKALC	配列番号 :273			
CACVRSRNC	配列番号 :274			
				30
CRADSEGVC	配列番号 :275			
CNVEASVRC	配列番号 :276			
CVGNAKLMC	配列番号 :277			

40

【0225】

ペプチドモチーフの統計分析

システムは、ペプチドライブラリスクリーニングから得られたデータを分析するために、SASパッケージから改変して設計した。システムは、M. D. アンダーソン癌センターからの要請に基づいて利用できる。表9に記載したファージ配列の統計分析に基づくと、LGモチーフ（ロイシン-グリシン）が骨髄ターゲティングファージに認められる。このモチーフを有する選択したクローンは、陰性対照（インサートを有しない f d - t e t ファージ）と比較してヒト骨髄細胞に対して非常に高い結合を示した。陽性対照は、骨髄に結合することが知られている RGD-4C インサートを含むファージであった。最も高い親和性ペプチド（CLGWRAAAC、配列番号：259）は、陽性対照の2倍より高い

50

結合を示した。結合アッセイは、ファージライブラリの代わりに単一のファージクローンを用いたことを除き、上記のようにBRASILを用いて行った。

【0226】

当業者は、本明細書において同定した骨髄ターゲティングペプチド配列が、治療物質または遺伝子治療の標的化輸送、正常または疾患臓器もしくは組織のインビボ造影、臓器または組織における受容体および受容体リガンドの同定、ならびに多くのヒト疾患、特に転移性前立腺癌の治療的治療を含むがこれらに限定されない、本発明の範囲内の多数の応用のために有用となることを認識するであろう。

【0227】

本明細書において開示および主張した組成物、方法、および装置は全て、本開示に照らして不適当な実験を行うことなく作製され、実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい態様に関して説明してきたが、組成物、方法、および装置、ならびに本明細書に開示の段階または段階の順序に変更を行ってもよく、それらも本発明の概念、趣旨、および範囲に含まれることは、当業者には明らかであろう。より詳しく述べると、化学的および生理的に関連する特定の物質は、同じまたは類似の結果が得られれば、本明細書に記載の物質に置換してもよいことは明らかである。当業者に明らかであるそのような類似の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲、および概念の範囲内であるように思われる。

【0228】

参照

以下の参照は、これらが、例示的手法または本明細書に記載されたもののその他の詳細を提供するという程度まで、本明細書において特に参照として組み入れられる。

Arap, W., Pasqualini R., and Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature. *Science* 279:377-380, 1998a.

Arap W, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.*, 1998b.

Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.

Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.

Brodt et. al, The role of marrow endothelium in the localization of metastatic cancer cells to bone. In *Bone Metastasis- mechanisms and pathophysiology*, pp17-23, 1996. (Orr and Singh, eds.)

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264:569-571, 1994a.

Brooks, P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh D.A. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164, 1994b

Burg M, Pasqualini R, Arap W, Stallcup W, and Ruoslahti E. Identification of NG2 proteoglycan-binding peptides that home to tumor neovasculature. *Cancer Res* 58:2869-2874, 1999.

Burg, M.A., Pasqualini, R., Arap, W., Ruoslahti, E. & Stallcup, W.B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59, 2869-2874, 1999.

Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

10

Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.

Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.

Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.

Eisen, T. et al. Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 82, 812-817, 2000.

Ellerby HM, Arap W, Ellerby L, Kain R, Andrusiak R, Rio G, Krajewski S, Lombardo C, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen D, and Pasqualini R. Anti-cancer Activity of Targeted proapoptotic peptides. *Nature Med* 9:1032-1038, 1999

20

Engerman, R.L. and Kern, T.S. (1986) Hyperglycemia as a cause of diabetic retinopathy. *Metabolism* 35(S1), 20-23.

Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18, 4-25.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995

30

Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nature Biotechnol.* 15: 510, 1997.

Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.

Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.

Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.

Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.

Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

Grasso, P., Leinung, M. C., Ingher, S. P. and Lee, D.W. (1997) *Endocrinology*, **138**(4), 1413-18.

Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.

10

Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, and Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med.* 2: 529-533, 1996.

Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.

Hansen, A.S., Norén, O., Sjöström, H. and Wedelin, O. (1993) A mouse aminopeptidase-N is a marker for antigen presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.*, 23, 2358-64.

20

HARLOW, E., and LANE, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).

Hermonat and Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.

Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.

Herz and Gerard, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.

Horwich, *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.

30

Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993).

Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.

Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.

Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnol* 17:768-774, 1999

Kong HL and Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis.

J. Natl. Cancer Inst. 90:273-286, 1998.

KOZARSKY, K., JOOSS, K., DUNAHEE, M., STRAUSS, J.F., and WILSON, J.M. (1996). Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat. Genet.* 13; 54–62.

10

Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.

Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH and Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83:1299-1307, 1989.

20

Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.

Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.

Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986

Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.

Mustonen T and Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.* 129:895-898, 1995.

Nicolas and Rubinstein, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.

30

Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K. and Eriksson, U. (1996) Vascular Endothelial

- Growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2576-2581.
- Olofsson, B. Jeltsch, M., Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999) Current Biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Op Biotechnol*, 10, 528-535.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasqualini, R. and Hemler, M. E. Contrasting roles for integrin $\beta 1$ and $\beta 5$ cytoplasmic domains in subcellular localization, cell proliferation, and cell migration. *J. Cell Biol.* 125:447-60, 1994. 10
- Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 380:364-366, 1996.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196, 1995.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. αv integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997 20
- Pasqualini, R. Vascular Targeting with Phage Display Peptide Libraries. *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162, 1999.
- Pasqualini, R., Arap W., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Shapiro, L., Sakamoto, M., Stryn, A. and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727, 2000.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984. 30
- Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Rajotte D and Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by *in vivo* phage display. *J Biol Chem* 274:11593-11598, 1999

- Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest* 102:430-437, 1998
- Rak JW, St. Croix BD, and Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer. *Anticancer Drugs* 6:3-18, 1995.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-7.
- Smith GP, and Scott JK. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228:1315-1317, 1985
- Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993.
- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.

10

20

30

Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.

Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silvia, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. and Abraham, J. (1991) the human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 226, 11947-11954.

Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.

10

Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

米国特許 第 3,652,761 号

米国特許 第 3,817,837 号

米国特許 第 3,850,752 号

米国特許 第 3,939,350 号

米国特許 第 3,933,997 号

20

米国特許 第 3,996,345 号

米国特許 第 4,267,234 号

米国特許 第 4,275,149 号

米国特許 第 4,277,437 号

米国特許 第 4,366,241 号

米国特許 第 4,599,307 号

米国特許 第 4,472,509 号

30

米国特許 第 4,704,891 号

米国特許 第 4,727,020 号

米国特許 第 5,021,236 号

米国特許 第 5,206,347 号

米国特許 第 5,223,409 号

米国特許 第 5,401,511 号

米国特許 第 5,492,807 号

米国特許 第 5,603,872 号

米国特許 第 5,622,699 号

米国特許 第 5,670,312 号

米国特許 第 5,705,610 号

米国特許 第 5,840,841 号

米国特許 第 5,853,984 号

米国特許 第 5,889,155 号

米国特許 第 5,948,627 号

米国特許 第 6,068,829 号

Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.

Veikkola, T. and Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminar Cancer Biol.* 9, 211-220.

Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R and Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cell cultures. *Science* 268: 447-448, 1995.

Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Kovesdi I. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* 45:149-151, 1997c.

Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.

Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 49:407-424, 1998

Zhang *et al.*, *Nature* 387:206-9, 1997.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

添付の図面は、本明細書の一部であり、本発明の特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書に示す特定の態様の詳細説明と共にこれらの図面の一つまたは複数を参照することによってよりよく理解されるであろう。

【図 1】BRASILの原理。上部の第一の相においてファージ（ライブラリまたは単一のクローン）と共にインキュベートした単細胞または小さな細胞塊の懸濁液を、好ましくは不混和性の下部の第二の油相の上で遠心分離する。第二の相は中間的な比密度を有するため、最適な遠心分離条件では、細胞は下層に入り、試験管の底で沈殿し、特異的に結合したファージのみをそれらと共に運ぶ。残りの未結合のファージは、上部の相に残っている。細胞沈殿物を注意深く回収する。ターゲティングペプチド配列は、宿主大腸菌（E.

c o l i) の感染によってファージを回収してまたは回収せずに、ファージインサートの増幅および配列決定によって同定してもよい。

【図 2 A】B R A S I L 法の最適化。カポジ肉腫由来細胞 (K S 1 7 6 7) の単細胞懸濁液を、 α v インテグリン結合モチーフ (R G D-4 C ファージ) またはペプチドインサートを有しない対照ファージ (F d ファージ) を示すファージの漸増力価と共にインキュベートした。K S 1 7 6 7 細胞は、それらが高レベルの α v インテグリンを発現することから選択した。細胞とファージとは、水中で 4 時間インキュベートして (ファージの内部移行を防止するため)、10,000 g で 10 分間遠心分離した。K S 1 7 6 7 細胞に結合したファージを宿主大腸菌 (E. c o l i) の感染によって回収して、L B / T e t 寒天プレートに 37°C で一晚播種した。最後に、ファージ形質導入単位を計数した。極めて低いバックグラウンドが認められた。非飽和条件では、F d ファージに関連して R G D-4 C ファージの濃縮の保存的平均値は 500~1000 である。この実験を 3 回繰り返したが、類似の結果を生じた。平均値および標準偏差を示す。 10

【図 2 B】溶液中で合成 R G D-4 C ペプチドは、K S 1 7 6 7 細胞に対する R G D-4 C ファージの結合を 99.99% 阻害したが、R G E 対照ペプチドは阻害しなかった。

【図 3】ファージディスプレイライブラリからファージを選択的に除去するための B R A S I L を用いる予め浄化するプロトコール。

【図 4 A】固定した V E G F 受容体に対するファージクローン-19 の結合。クローン-19 (黒い棒) は、V E G F-R1 および N R P-1 に結合するが、V E G F-R2 または B S A には結合しない。インサートを有しない F d ファージの結合は検出できなかった (斜線の棒)。 20

【図 4 B】V E G F-R1 (黒丸) および N R P-1 (白四角) に対する結合は、V E G F₁₆₅ 10~20 ng/ml によって完全に阻害することができた。

【図 5】H U V E C 細胞を 24 ウェルプレートにおいて培養して、如何なる血清および添加剤も含まない基礎培地によって 24 時間飢えさせた。ファージクローン-19 または R G D-4 C (H U V E C に結合する) を、 10^{10} T. U. / ウェルで加えた。V E G F₁₆₅ (20 ng/ml) または基礎 (枯渇) 培地を陽性および陰性対照として加えた。細胞増殖を M M T 法によって測定した。クローン-19 は、陽性対照と同等の細胞増殖を促進した (V E G F-165)。同様に H U V E C に結合する R G D-4 C ペプチドは、陰性対照よりごくわずかに上の細胞増殖速度を示した。 30

【図 6 A~6 C】サブコンフルエントヒト尿路上皮細胞単層に対する選択したファージクローンの結合。インサートを有しない f d-t e t ファージを陰性対照として含めた。結果は、1 に設定した f d-t e t ファージの結合と比較したウェル 3 個の平均値である。ファージの添加量は 1×10^8 T. U. / ウェルであった。結合したファージは、十分に洗浄した後、対数増殖期 K 91 細菌に感染させて、連続希釈液を播種することによって検出した。

【図 7】ヒト乳癌細胞株 M D A-M B-435 (白い棒) と共に尿路上皮腫瘍細胞株 T 24 (明るい灰色の棒) および R T 4 (暗い灰色の棒) に対する選択したファージクローンの結合。インサートを有しない f d-t e t ファージを対照として含めた。結果を、1 に設定した f d-t e t ファージの結合に対するウェル 3 個の平均値として示す。ファージの添加量は 1×10^8 T. U. / ウェルであった。結合したファージは、十分に洗浄した後、対数増殖期 K 91 細菌に感染させて、連続希釈液を播種することによって検出した。 40

【図 8】R T 4 腫瘍細胞に対する V H A L E S (配列番号: 25) ファージ結合の阻害は、合成 V H A L E (配列番号: 25) (黒四角) によって阻害されたが、対照ペプチド C A R A C (配列番号: 5) (白い四角) によっては阻害されなかった。V H A L E S (配列番号: 25) ファージの結合は、インサートを有しない f d-t e t ファージより 5.4 倍高かった。R T 4 腫瘍細胞のサブコンフルエント単層を、V H A L E S (配列番号: 25) および対照ペプチドの増加量の存在下で、V H A L E S (配列番号: 25) ファージ 1×10^8 T. U. / ウェルと共にインキュベートした。結果をウェル 3 個ずつの平 50

均値として示す。結合したファージを十分に洗浄した後に、対数増殖期 K 9 1 細菌に感染させて、連続希釈液を播種することによって検出した。

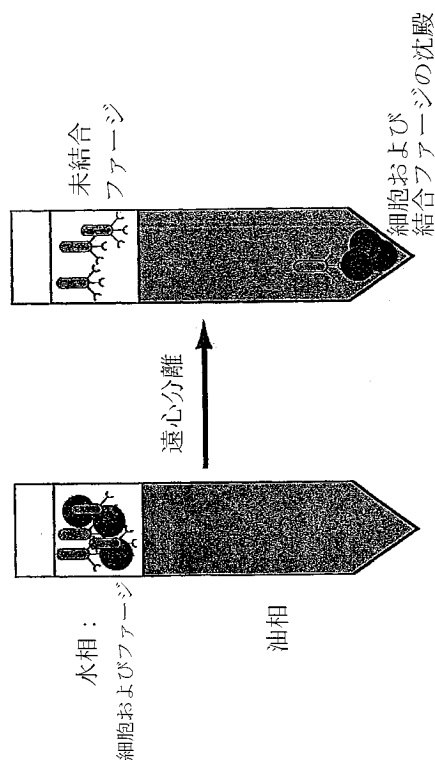
【図 9】ドットブロットチャンバーアッセイにおけるブタ尿路上皮に対する選択したファージクローンの結合。ウェル 3 個を一つの粘膜片としてプールして、1 と設定したインサートを有しない f d - t e t ファージの結合に対する 1 試料あたり 3 個ずつの粘膜片の平均値で結果を表す。ファージの添加量は 1×10^8 T. U. / ウェルであった。結合したファージを、十分に洗浄した後、対数増殖期 K 9 1 細菌に感染させ、連続希釈液を播種することによって検出した。

【図 10】ファージの結合に及ぼす G A G 層の影響。ドットブロットチャンバーアッセイにおいて、ブタ膀胱粘膜の一部を 0.1 M H C l によって 2 分間処理してから、G A G 層を除去した。処置した表面に対する結合を、1 に設定した無処置表面と比較して示した。結合したファージを十分に洗浄した後に、対数増殖期 K 9 1 細菌に感染させ、連続希釈液を播種することによって検出した。

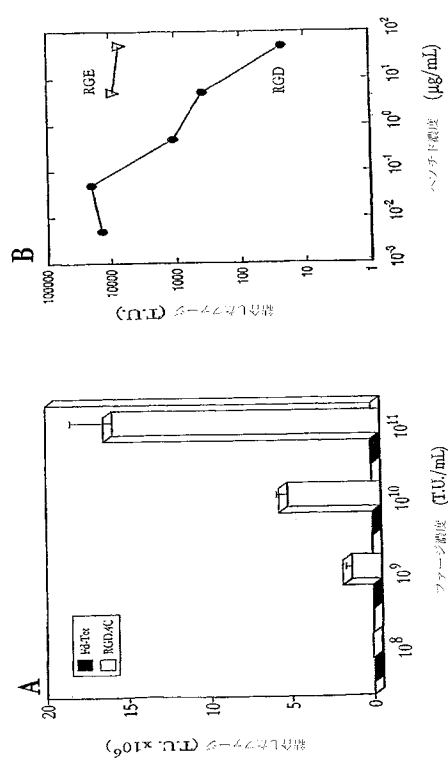
10

【図 11】B R A S I L によるヒト骨髓細胞に対する選択したクローンの結合。

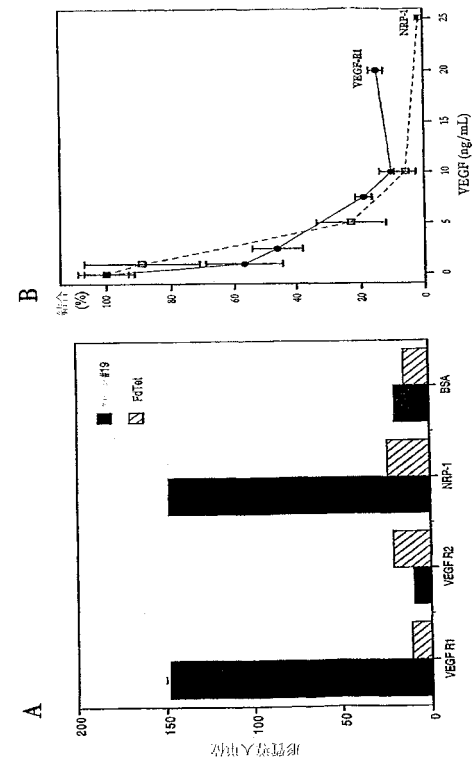
【図 1】



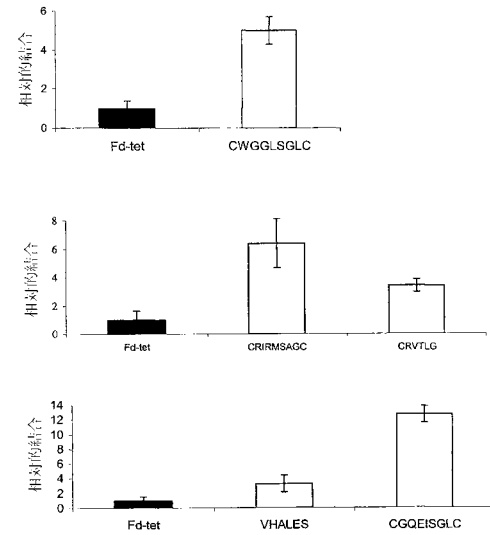
【図 2】



【図 4】

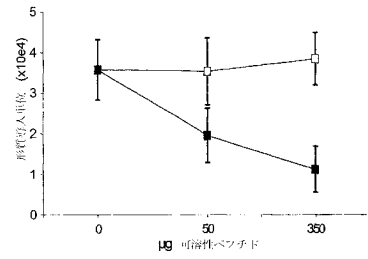


【図 6】

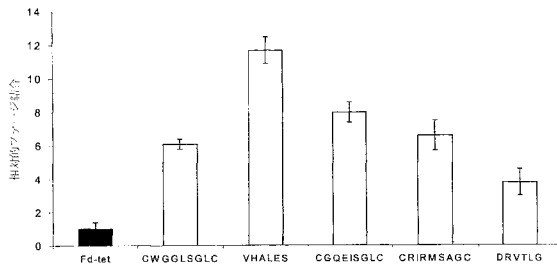


Motif	Stippled Bar (Approx.)	Solid Bar (Approx.)
Fd-tet	1.0	1.0
CWGGLSLGLC	0.3	0.3
VHALES	3.1	0.5
CQGEISLGLC	2.8	3.2
CIRMSAGG	4.3	1.4
DRVTLG	3.3	0.8

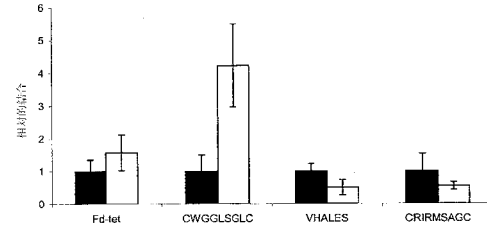
【図 8】



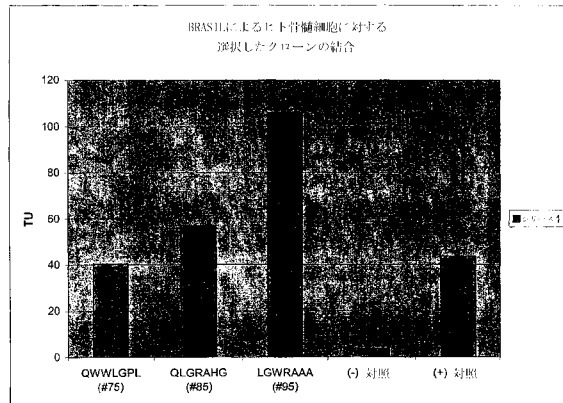
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20822 A2

(51) International Patent Classification: C12Q

(21) International Application Number: PCT/US01/28124

(22) International Filing Date:
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,266 8 September 2000 (08.09.2000) US
09/765,101 17 January 2001 (17.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD
OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYS-
TEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701
(US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ARAP, Wadiah
[BR/US]; 7171 Buffalo Speedway #328, Houston, TX
77025 (US). PASQUALINI, Renata [BR/US]; 7171
Buffalo Speedway #328, Houston, TX 77025 (US).(74) Agents: MALLIE, Michael, J. et al.; Blakely, Sokoloff,
Taylor & Zafman LLP, 7th floor, 12400 Wilshire Boule-
vard, Los Angeles, CA 90025 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/20822 A2

(54) Title: BIOPANNING AND RAPID ANALYSIS OF SELECTIVE INTERACTIVE LIGANDS (BRASIL)

(57) Abstract: The present invention concerns novel methods of identifying peptide sequences that selectively bind to targets. In alternative embodiments, targets may comprise cells or clumps of cells, particles attached to chemicals compounds, molecules or aggregates, or parasites. In preferred embodiments, target cells are sorted before exposure to the phage library. The general method, Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL) provides for rapid and efficient separation of phage that bind to targets, while preserving unbound phage. BRASIL may be used in preselection procedure to subtract phage that bind non-specifically to a first target before exposing the subtracted library to a second target. Certain embodiments concern targeting peptides identified by BRASIL and methods of use of such peptides for targeted delivery of therapeutic agents or imaging agents or diagnosis or treatment of diseases. Novel compositions comprising a first phase, second phase, target and a phage library are also disclosed.

**BIOPANNING AND RAPID ANALYSIS OF
SELECTIVE INTERACTIVE LIGANDS (BRASIL)**

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 60/231,266 filed September 8, 2000, and U.S. Patent Application No. 09/765,101, filed January 17, 2001. This invention was made with government support under grants DAMD 17-98-1-8041 and 17-98-1-8581 from the U.S. Army and grants 1R01CA78512-01A1, 1R01CA90810-01 and 1R01CA82976-01 from the National Institutes of Health. The government has certain rights in this invention.

Field of the Invention

The present invention concerns the fields of molecular medicine and targeted delivery. More specifically, the present invention relates to compositions and methods for identification and use of peptides that selectively target organs or tissues. In particular, the methods and compositions concern biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL).

Description of Related Art

Therapeutic treatment of many human disease states is limited by the systemic toxicity of the therapeutic agents used. Cancer therapeutic agents in particular exhibit a very low therapeutic index, with rapidly growing normal tissues such as skin and bone marrow affected at concentrations of agent that are not much higher than the concentrations used to kill tumor cells. Treatment of cancer and other organ or tissue confined disease states would be greatly facilitated by the development of compositions and methods for targeted delivery to a desired organ or tissue of a therapeutic agent. Diagnostic imaging would also be facilitated by the targeted delivery of imaging agents to desired organs, tissues or diseased cells.

Recently, an *in vivo* selection system was developed using phage display libraries to identify organ or tissue targeting peptides in a mouse model system. Phage display

libraries expressing transgenic peptides on the surface of bacteriophage were initially developed to map epitope binding sites of immunoglobulins (Smith and Scott, 1985, 1993). Such libraries can be generated by inserting random oligonucleotides into cDNAs encoding a phage surface protein, generating collections of phage particles displaying unique peptides in as many as 10^9 permutations. (Pasqualini and Ruoslahti, 1996, Arap et al, 1998a; Arap et al 1998b).

Intravenous administration of phage display libraries to mice was followed by the recovery of phage from individual organs (Pasqualini and Ruoslahti, 1996). Phage were recovered that were capable of selective homing to the vascular beds of different mouse organs or tissues, based on the specific targeting peptide sequences expressed on the outer surface of the phage (Pasqualini and Ruoslahti, 1996). A variety of organ and tumor-homing peptides have been identified by this method (Rajotte et al., 1998, 1999; Koivunen et al., 1999; Burg et al., 1999; Pasqualini, 1999). Each of those targeting peptides bound to different receptors that were selectively expressed on the vasculature of the mouse target tissue (Pasqualini, 1999; Pasqualini et al., 2000; Folkman, 1995; Folkman 1997). Tumor-homing peptides bound to receptors that were upregulated in the tumor angiogenic vasculature of mice (Brooks et al., 1994b; Pasqualini et al., 2000). In addition to identifying individual targeting peptides selective for an organ or tissue (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Arap et al, 1998a; Koivunen et al., 1999), this system has been used to identify endothelial cell surface markers that are expressed in mice *in vivo* (Rajotte and Ruoslahti, 1999).

Attachment of therapeutic agents to targeting peptides resulted in the selective delivery of the agent to a desired organ or tissue in the mouse model system. Targeted delivery of chemotherapeutic agents and proapoptotic peptides to receptors located in tumor angiogenic vasculature resulted in a marked increase in therapeutic efficacy and a decrease in systemic toxicity in tumor-bearing mouse models (Arap et al., 1998a, 1998b; Ellerby et al., 1999).

This relative success notwithstanding, cell surface selection of phage libraries has been plagued by technical difficulties. A high number of non-binder and non-specific

binder clones are recovered when phage libraries are incubated with cell suspensions or monolayers. Removal of this background phage binding by repeated washes is both labor-intensive and inefficient. Cells and potential ligands are frequently lost during the many washing steps required. Thus, there is a need for a rapid and efficient method for *in vitro* biopanning that retains the selectivity and specificity of *in vivo* methods, while providing decreased non-specific background.

Previous studies with phage display libraries have relied on a mouse model system to identify targeting peptides and their receptors, under the assumption that human targeting peptides are homologous. However, cell surface receptors may have a very different distribution and function in humans than in mice. Further, the mouse model system has been exploited to characterize targeting peptides for only a handful of specific organs. A need exists in the art for methods and compositions for identification of targeting sequences selective for human organs, tissues or cell types that can be of clinical use for targeted delivery of therapeutic agents

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention solves a long-standing need in the art by providing compositions and *in vitro* methods for identifying targeting peptides that are selective for organs, tissues or cell types. In a preferred embodiment, such targeting peptides are identified by collecting samples of one or more organs, tissues, or cell types, separating the samples into isolated cells or small clumps of cells, suspending the cells or clumps in a first phase, exposing the cells or clumps of cells to a phage display library, layering the first phase over a second phase, and centrifuging the two phases so that the cells are pelleted at the bottom of a centrifuge tube. In a more preferred embodiment, the first phase is aqueous and the second phase is organic. In even more preferred embodiments, the cells are human cells. In certain embodiments, phage may be collected from the pellet by exposure to bacteria and phage clones may be plated, isolated and grown up in bulk culture. In alternative embodiments, phage inserts may be recovered from the pellet by PCR™ or other amplification techniques and the inserts sequenced to identify the targeting peptides. In certain embodiments, the organic phase comprises dibutylphthalate or a mixture of

dibutylphthalate and cyclohexane. The methods disclosed herein are generally referred to herein as Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL).

In alternative embodiments, the BRASIL method may be used to identify targeting peptides against virtually any chemical, molecule or complex of molecules. The separation of bound and unbound phage is preferably accomplished by partitioning bound phage from an aqueous phase into an organic phase. This requires that the target to which the phage bind be either denser than phage, larger than phage or preferably both. In preferred embodiments, the target is insoluble in the aqueous phase. In order to satisfy this requirement, chemicals, compounds, or molecules may be attached to a large insoluble particle, for example a glass, plastic, ceramic or magnetic bead. The skilled article will realize that the invention is not limited to beads and any large and/or dense particle may be used. The particle attached target may be exposed to a phage library in an aqueous phase and phage binding to the target partitioned into an organic phase. Although the examples shown herein illustrate the use of centrifugation to partition bound phage into the organic phase, the skilled artisan will realize that other types of partitioning may be used within the scope of the invention. For example, for targets attached to magnetic beads, a magnetic field could be imposed to pull the phage bound to beads into an organic phase.

In embodiments where cells are the targets, the cells may be mammalian cells, human cells, mouse cells or animal cells. Alternatively, cells may include any type of prokaryotic or eukaryotic cell, such as bacteria or unicellular microorganisms. In preferred embodiments, specific populations of cells may be prepared for use in BRASIL. For example, cells from leukemic patients may be sorted using a FACS (fluorescent activated cell sorter, Becton-Dickinson) to sort cancer cells from non-cancer cells. A phage library may be screened against cancerous cells only, either with or without a preselection subtraction against normal cells from the same patient. The skilled artisan will realize that cell sorting is not limited to leukemic samples, but rather may be practiced with any heterogeneous population of cells.

In certain embodiments, targeting peptides identified by BRASIL are of use for the selective delivery of therapeutic agents, including but not limited to gene therapy vectors

WO 02/20822

PCT/US01/28124

and fusion proteins, to specific organs, tissues or cell types in subjects. The skilled artisan will realize that the scope of the claimed methods of use include any disease state that can be treated by targeted delivery of a therapeutic agent to a desired organ, tissue or cell type.

The skilled artisan will understand that although the targeting peptides disclosed herein are particularly suited for use in human subjects, it is contemplated that they may be of use in other subjects such as mice, dogs, cats, horses, cows, sheep, pigs or any other mammal.

Certain embodiments concern targeting peptides identified by the BRASIL method. One embodiment of the present invention concerns isolated peptides of 100 amino acids or less in size, comprising at least 3 contiguous amino acids of a targeting peptide sequence, selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

In a preferred embodiment, the isolated peptide is 50 amino acids or less, more preferably 30 amino acids or less, more preferably 20 amino acids or less, more preferably 10 amino acids or less, or even more preferably 5 amino acids or less in size. In other preferred embodiments, the isolated peptide of claim 1 comprises at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25 contiguous amino acids of a targeting peptide sequence, selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

In certain embodiments, the isolated peptide is attached to a molecule. In preferred embodiments, the attachment is a covalent attachment. In additional embodiments, the molecule is a drug, a chemotherapeutic agent, a radioisotope, a pro-apoptosis agent, an anti-angiogenic agent, a hormone, a cytokine, a growth factor, a cytotoxic agent, a peptide, a protein, an antibiotic, an antibody, a Fab fragment of an antibody, an imaging agent, a nucleic acid or an antigen. Those molecules are representative only. Molecules within the scope of the present invention include virtually any molecule that may be attached to a targeting peptide and administered to a subject. In preferred embodiments, the pro-apoptosis agent is gramicidin, magainin, melittin, defensin, cecropin, (KLAKLAK)₂ (SEQ

WO 02/20822

PCT/US01/28124

ID NO:1), (KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)₂ (SEQ ID NO:3) or (KLGKKLG)₃ (SEQ ID NO:4). In other preferred embodiments, the anti-angiogenic agent is thrombospondin, angiostatin, endostatin or pigment epithelium-derived factor. In further preferred embodiments, the cytokine is interleukin 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferon- γ (IF- γ), IF- α , IF- β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), or GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor). Such examples are representative only and are not intended to exclude other pro-apoptosis agents, anti-angiogenic agents or cytokines known in the art.

In other embodiments, the isolated peptide is attached to a macromolecular complex. In preferred embodiments, the attachment is a covalent attachment. In other preferred embodiments, the macromolecular complex is a virus, a bacteriophage, a bacterium, a liposome, a microparticle, a magnetic bead, a cell or a microdevice. These are representative examples only. Macromolecular complexes within the scope of the present invention include virtually any macromolecular complex that may be attached to a targeting peptide and administered to a subject. In other preferred embodiments, the isolated peptide is attached to a eukaryotic expression vector, more preferably a gene therapy vector.

In another embodiment, the isolated peptide is attached to a solid support, preferably magnetic beads, Sepharose beads, agarose beads, a nitrocellulose membrane, a nylon membrane, a column chromatography matrix, a high performance liquid chromatography (HPLC) matrix or a fast performance liquid chromatography (FPLC) matrix. Such attached peptides may be of use, for example, to purify or isolate an antibody, protein, peptide or other ligand that binds to the targeting peptide. In certain embodiments, this binding may be used to identify endogenous receptors, ligands or receptor:ligand pairs that are mimicked by the targeting peptide.

Additional embodiments of the present invention concern fusion proteins comprising at least 3 contiguous amino acids of a sequence selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Certain other embodiments concern compositions comprising the claimed isolated peptides or fusion proteins in a pharmaceutically acceptable carrier. Further embodiments concern kits comprising the claimed isolated peptides or fusion proteins in one or more containers.

Additional embodiments concern kits comprising compositions and apparatus for performing BRASIL. Kit components may include, but are not limited to, any composition or apparatus that may be of use in performing BRASIL, such as solutions, buffers, media, organic phase, bacteria, phage libraries, control phage, centrifugation tubes, *etc.*

Other embodiments concern methods of targeted delivery comprising selecting a targeting peptide for a desired organ or tissue, attaching said targeting peptide to a molecule, macromolecular complex or gene therapy vector, and providing said peptide attached to said molecule, complex or vector to a subject. Preferably, the targeting peptide is selected to include at least 3 contiguous amino acids from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289. In certain preferred embodiments, the molecule attached to the targeting peptide is a chemotherapeutic agent, an antigen or an imaging agent. The skilled artisan will realize that within the scope of the present invention any organ, tissue or cell type can be targeted for delivery, using targeting peptides attached to any molecule, macromolecular complex or gene therapy vector.

Certain embodiments of the present invention concern methods for imaging an organ, tissue, or cell type comprising selecting a peptide targeted to said organ or tissue, attaching an imaging agent to said peptide, administering said peptide to a subject and obtaining an image. In preferred embodiments, the targeted cells are associated with a disease or other condition. In other preferred embodiments, the targeting peptide comprises at least three contiguous amino acids selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

In other embodiments, the present invention concerns methods of diagnosing a disease state, comprising selecting a peptide targeted to cells associated with such disease

WO 02/20822

PCT/US01/28124

state, attaching an imaging agent to said peptide, administering said peptide and imaging agent to a subject suspected of having the disease, and diagnosing the presence or absence of the disease based on the distribution of said peptide and imaging agent within said subject. Preferably, the targeting peptide contains at least 3 contiguous amino acids selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289. In preferred embodiments, the disease state is diabetes mellitus, inflammatory disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cancer, autoimmune disease, bacterial infection or viral infection. In a more preferred embodiment, the disease state is metastatic cancer.

Additional embodiments concern methods for identifying a receptor for a targeting peptide, comprising contacting said peptide to an organ, tissue or cell containing said receptor, allowing said peptide to bind to said receptor, and identifying said receptor by its binding to said peptide. In preferred embodiments, the targeting peptide contains at least three contiguous amino acids selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289. The skilled artisan will realize that the contacting step can utilize samples of organs, tissues or cells, or may alternatively utilize homogenates or detergent extracts of the organs, tissues or cells. In certain embodiments, the cells to be contacted may be genetically engineered to express a suspected receptor for the targeting peptide. In a preferred embodiment, the targeting peptide is modified with a reactive moiety that allows its covalent attachment to said receptor. In a more preferred embodiment, the reactive moiety is a photoreactive group that becomes covalently attached to the receptor when activated by light. In another preferred embodiment, the peptide is attached to a solid support and the receptor is purified by affinity chromatography. In other preferred embodiments, the solid support comprises magnetic beads, Sepharose beads, agarose beads, a nitrocellulose membrane, a nylon membrane, a column chromatography matrix, a high performance liquid chromatography (HPLC) matrix or a fast performance liquid chromatography (FPLC) matrix. In certain embodiments, the targeting peptide inhibits the activity of the receptor upon binding to the receptor. The skilled artisan will realize that receptor activity can be assayed by a variety of methods known in the art,

including but not limited to catalytic activity and binding activity. In another preferred embodiment, the receptor is an endostatin receptor, a metalloprotease or an aminopeptidase.

Other embodiments of the present invention concern isolated nucleic acids of 300 nucleotides or less in size, encoding a targeting peptide. In preferred embodiments, the isolated nucleic acid is 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20 or even 10 nucleotides or less in size. In other preferred embodiments, the isolated nucleic acid is incorporated into a eukaryotic or a prokaryotic expression vector. In even more preferred embodiments, the vector is a plasmid, a cosmid, a yeast artificial chromosome (YAC), a bacterial artificial chromosome (BAC), a virus or a bacteriophage. In other preferred embodiments, the isolated nucleic acid is operatively linked to a leader sequence that localizes the expressed peptide to the extracellular surface of a host cell.

Additional embodiments of the present invention concern methods of treating a disease state comprising selecting a targeting peptide that targets cells associated with the disease state, attaching one or more molecules effective to treat the disease state to the peptide, and administering the peptide to a subject with the disease state. Preferably, the targeting peptide includes at least three contiguous amino acids selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289. In preferred embodiments the disease state is diabetes mellitus, inflammatory disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cancer, autoimmune disease, bacterial infection and viral infection.

Another embodiment of the present invention concerns molecular adaptors for targeted gene therapy. In a preferred embodiment, the molecular adaptor comprises a Fab fragment of an antibody that is specific for a gene therapy vector, covalently attached to a targeting peptide sequence that provides selective targeting to a desired organ or tissue. The skilled artisan will realize that the present invention may include any gene therapy vector that is known in the art. The vector binding portion of the molecular adaptor is not limited to Fab fragments of antibodies, but may include any other molecule that can be used to attach a targeting peptide to a gene therapy vector. The only requirement is that the

WO 02/20822

PCT/US01/28124

gene therapy vector should be selectively targeted to a desired organ or tissue in the presence of the molecular adaptor.

Another embodiment of the present invention concerns compositions and methods of use of tumor targeting peptides against cancers. Tumor targeting peptides identified by the methods disclosed in the instant application may be attached to therapeutic agents, including but not limited to molecules or macromolecular assemblages and administered to a subject with cancer, providing for increased efficacy and decreased systemic toxicity of the therapeutic agent. Therapeutic agents within the scope of the present invention include but are not limited to chemotherapeutic agents, radioisotopes, pro-apoptosis agents, cytotoxic agents, cytostatic agents and gene therapy vectors. Targeted delivery of such therapeutic agents to tumors provides a significant improvement over the prior art for increasing the delivery of the agent to the tumor, while decreasing the inadvertent delivery of the agent to normal organs and tissues of the subject. In a preferred embodiment, the tumor targeting peptide is incorporated into the capsule of a phage gene therapy vector to target delivery of the phage to angiogenic endothelial cells in tumor blood vessels.

A further embodiment of the present invention concerns methods for identifying new tumor targeting peptides, using phage display libraries that incorporate reporter genes. Administration of the reporter gene phage library to a subject with a tumor is followed by recovery of phage from the tumor and identification of tumor targeting peptides by sequencing selected portions of the phage genome that contain the nucleic acid sequence encoding the targeting peptide. While these embodiments of the present invention concern tumors, the skilled artisan will realize that within the scope of the present invention other disease states that are localized to specific organs or tissues may also be treated with enhanced therapeutic efficacy and decreased systemic toxicity using the methods and compositions disclosed herein.

Yet another embodiment of the present invention concerns methods of identifying targeting peptides against antibodies from a subject with a disease state, comprising obtaining a sample of serum from the subject, obtaining antibodies from the sample, adding a phage display library to the antibodies and collecting phage bound to the

WO 02/20822

PCT/US01/28124

antibodies. In preferred embodiments, the antibodies are attached to a solid support, more preferably attached to protein G attached to beads. In another preferred embodiment, a subtraction step is added where the phage display library is first screened against antibodies from a subject who does not have the disease state. Only phage that do not bind to these control antibodies are used to obtain phage binding to the diseased subject's antibodies.

In other preferred embodiments, phage that bind to a target organ or tissue, for example to placenta, may be pre-screened or post-screened against a subject lacking that organ or tissue. Phage that bind to the subject lacking the target organ or tissue are removed from the library.

Other embodiments concern methods of obtaining antibodies against an antigen. In preferred embodiments, the antigen comprises one or more targeting peptides. The targeting peptides are prepared and immobilized on a solid support, a sample containing antibodies is added and antibodies that bind to the targeting peptides are collected.

In other preferred embodiments, a phage display library displaying the antigen binding portions of antibodies from a subject is prepared, the library is screened against one or more antigens and phage that bind to the antigens are collected. In more preferred embodiments, the antigen is a targeting peptide.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1. BRASIL principle. A suspension of single cells or small clumps of cells that has been incubated with phage (library or single clones) in an upper first phase is centrifuged over a preferably non-miscible oil lower second phase. Because the second phase has an intermediate specific density, upon optimized centrifugation conditions, the cells will enter the lower phase and pellet at the bottom of the tube, carrying with them only the specifically bound phage. The remaining unbound phage stay in the upper phase. The cell pellet is then carefully recovered. Targeting peptide sequences may be identified

WO 02/20822

PCT/US01/28124

by amplification and sequencing of the phage inserts, either with or without recovery of the phage by infection of a host *E. coli*.

FIG. 2A. BRASIL method optimization. A single-cell suspension of Kaposi sarcoma-derived cells (KS1767) was incubated with increasing titers of a phage displaying an alpha v integrin-binding motif (RGD-4C phage) or a control phage with no peptide insert (Fd phage). KS1767 cells were chosen because they express high levels of alpha v integrins. Cells and phage were incubated for 4 hours on ice (to prevent phage internalization) and centrifuged for 10 minutes at 10,000 g. The phage bound to the KS1767 cells were recovered by infection of a host *E. coli*, and plated in LB/tet agar plates at 37° C overnight. Finally, the phage transducing units were counted. Extremely low backgrounds were observed. Under non-saturated conditions, a conservative mean estimate of the enrichment of RGD-4C phage in relation to Fd phage is 500-1000. This experiment was repeated three times with similar results. Mean and standard deviation are shown.

FIG. 2B. The synthetic RGD-4C peptide—but not the RGE control peptide—in solution inhibited 99.99% of the RGD-4C phage binding to KS1767 cells

FIG. 3. Pre-clearing protocol using BRASIL to selectively remove phage from a phage display library.

FIG. 4A. Binding of phage clone-19 to immobilized VEGF receptors. Clone-19 (*black bars*) binds to VEGF-R1 and NRP-1 but not VEGF-R2 or BSA.. No binding of insertless Fd phage could be detected (*hash bars*).

FIG. 4B. The binding to the VEGF-R1 (*black circle*) and NRP-1 (*open square*) could be completely blocked by 10-20 ng/ml of VEGF₁₆₅.

FIG. 5. HUVEC cells were cultured in 24-well plates and starved for 24 with basal medium without any sera and supplements. Phage clone-19 or RGD.4C (which binds to HUVEC) were added at 10¹⁰ T.U. per well. VEGF₁₆₅ (20 ng/ml) or basal (starved) medium were added as positive and negative controls. Cell proliferation was measured by the MMT method. Clone-19 promoted cell proliferation comparably to the positive control (VEGF-

WO 02/20822

PCT/US01/28124

165). The RGD.4C peptide, which also binds to HUVEC, resulted in a cell proliferation rate only slightly above the negative control.

FIG. 6A-6C. Binding of selected phage clones to a subconfluent human urothelial cell monolayer. Insertless fd-tet phage were included as negative control. Results are means of triplicate wells relative to binding of fd-tet phage, that was set as 1. Input of phage was 1×10^8 T.U. per well. Bound phage were detected after intensive washing by infection with log phase K91 bacteria and plating of serial dilutions.

FIG. 7. Binding of selected phage clones to the human breast cancer cell line MDA-MBA-435 (white bars) as well as the urothelial tumor cell lines T24 (light grey bars) and RT4 (dark grey bars). Insertless fd-tet phage were included as controls. Results are given as mean of triplicate wells relative to binding of fd-tet phage, that was set as 1. Input of phage was 1×10^8 T.U. per well. Bound phage were detected after intensive washing by infection with log phase K91 bacteria and plating of serial dilutions.

FIG. 8. Inhibition of VHALES (SEQ ID NO:25) phage binding to RT4 tumor cells was inhibited by synthetic VHALE (SEQ ID NO:25) (black squares) but not by the control peptide CARAC (SEQ ID NO:5) (white squares). Binding of VHALES (SEQ ID NO:25) phage was 5.4 fold higher than insertless fd-tet phage. A subconfluent monolayer of RT4 tumor cells was incubated with 1×10^8 T.U. of VHALES (SEQ ID NO:25) phage per well in presence of increasing amounts of VHALES (SEQ ID NO:25) and control peptide. Results are given as mean of triplicate wells. Bound phage were detected after intensive washing by infection with log phase K91 bacteria and plating of serial dilutions.

FIG. 9. Binding of selected phage clones to porcine urothelium in a dot blot chamber assay. Three wells were pooled as one field, and results represent the mean of triplicate fields relative to binding of insertless fd-tet phage, that was set as 1. Input of phage was 1×10^8 T.U. per well. Bound phage were detected after intensive washing by infection with log phase K91 bacteria and plating of serial dilutions.

FIG. 10. Influence of the GAG-layer on phage binding. In the dot blot chamber assay portions of a porcine bladder mucosa were treated with 0.1M HCl for 2 min prior to remove the GAG-layer. Binding to treated surface is given relative to untreated surface,

that was set as 1. Bound phage were detected after intensive washing by infection with log phase K91 bacteria and plating of serial dilutions.

FIG. 11. Binding of selected clones to human bone marrow cells by BRASIL.

DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

As used herein in the specification, "a" or "an" may mean one or more. As used herein in the claim(s) in conjunction with the word "comprising" the words "a" or "an" may mean one or more than one. As used herein "another" may mean at least a second or more of an item.

A "targeting peptide" is a peptide comprising a contiguous sequence of amino acids that is characterized by selective localization to a target organ, tissue or cell type, preferably of human origin. Selective localization may be determined, for example, by methods disclosed below, wherein the putative targeting peptide sequence is incorporated into a protein that is displayed on the outer surface of a phage. In certain embodiments, targeting phage that have been identified by BRASIL are administered to a subject followed by collection of one or more organs, tissues or cell types from the subject and identification of phage found in the target organ, tissue or cell type. A phage expressing a targeting peptide sequence is considered to be selectively localized if it exhibits greater binding in the target compared to a control tissue, organ or cell type. Another alternative method of determining selective localization is that phage expressing the putative target peptide exhibit at least a two-fold, more preferably at least a three-fold enrichment in the target compared to control phage that express a non-specific peptide or that have not been genetically engineered to express any putative target peptides. Another method to determine selective localization is that localization to the target of phage expressing the target peptide is at least partially blocked by the co-administration of a synthetic peptide containing the target peptide sequence. "Targeting peptide" and "homing peptide" are used synonymously herein.

A "phage display library" means a collection of phage that have been genetically engineered to express a set of putative targeting peptides on their outer surface. In

preferred embodiments, DNA sequences encoding the putative targeting peptides are inserted in frame into a gene encoding a phage capsule protein. In other preferred embodiments, the putative targeting peptide sequences are in part random mixtures of all twenty amino acids and in part non-random. In certain preferred embodiments the putative targeting peptides of the phage display library exhibit one or more cysteine residues at fixed locations within the targeting peptide sequence.

A "macromolecular complex" refers to a collection of molecules that may be random, ordered or partially ordered in their arrangement. The term encompasses biological organisms such as bacteriophage, viruses, bacteria, unicellular pathogenic organisms, multicellular pathogenic organisms and prokaryotic or eukaryotic cells. The term also encompasses non-living assemblages of molecules, such as liposomes, microcapsules, microparticles, microdevices and magnetic beads. The only requirement is that the complex contains more than one molecule. The molecules may be identical, or may differ from each other.

A "receptor" for a targeting peptide includes but is not limited to any molecule or complex of molecules that binds to a targeting peptide. Non-limiting examples of receptors include peptides, proteins, glycoproteins, lipoproteins, epitopes, lipids, carbohydrates, multi-molecular structures, a specific conformation of one or more molecules and a morphoanatomic entity. In preferred embodiments, a "receptor" is a naturally occurring molecule or complex of molecules that is present on the luminal surface of cells forming blood vessels within a target organ or tissue.

A "subject" refers generally to a mammal. In certain preferred embodiments, the subject is a mouse or rabbit. In even more preferred embodiments, the subject is a human.

Phage Display

The methods described herein for identification of targeting peptides involve the *in vitro* administration of phage display libraries. Various methods of phage display and methods for producing diverse populations of peptides are well known in the art. For example, U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,622,699 and 6,068,829, each of which is incorporated herein by reference, describe methods for preparing a phage library. The phage display

technique involves genetically manipulating bacteriophage so that small peptides can be expressed on their surface (Smith and Scott, 1985, 1993). The potential range of applications for this technique is quite broad, and the past decade has seen considerable progress in the construction of phage-displayed peptide libraries and in the development of screening methods in which the libraries are used to isolate peptide ligands. For example, the use of peptide libraries has made it possible to characterize interacting sites and receptor-ligand binding motifs within many proteins, such as antibodies involved in inflammatory reactions or integrins that mediate cellular adherence. This method has also been used to identify novel peptide ligands that serve as leads to the development of peptidomimetic drugs or imaging agents (Arap *et al.*, 1998a). In addition to peptides, larger protein domains such as single-chain antibodies can also be displayed on the surface of phage particles (Arap *et al.*, 1998a).

Previously, amino acid sequences for targeting a given organ or tissue have been isolated by *in vivo* "biopanning" (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Pasqualini, 1999). In brief, a library of phage containing putative targeting peptides is administered to an animal or human subject and samples of organs or tissues containing phage are collected. In examples utilizing filamentous phage, the phage may be propagated *in vitro* between rounds of biopanning in pilus-positive bacteria. The bacteria are not lysed by the phage but rather secrete multiple copies of phage that display a particular insert. Phage that bind to a target molecule can be eluted from the target organ or tissue and then amplified by growing them in host bacteria. The amplified phage may be administered to a second subject and samples of organs or tissues again collected. Multiple rounds of biopanning may be performed until a population of selective binders is obtained. The amino acid sequence of the peptides is determined by sequencing the DNA corresponding to the targeting peptide insert in the phage genome. The identified targeting peptide can then be produced as a synthetic peptide by standard protein chemistry techniques (Arap *et al.*, 1998a, Smith *et al.*, 1985). This approach allows circulating targeting peptides to be detected in an unbiased functional assay, without any preconceived notions about the nature of their target. Once a candidate target is identified as the receptor of a targeting

WO 02/20822

PCT/US01/28124

peptide, it can be isolated, purified and cloned by using standard biochemical methods (Pasqualini, 1999; Rajotte and Ruoslahti, 1999).

The *in vitro* methods disclosed herein also use phage display libraries. However, rather than injecting the library into a live host, samples of target organs, tissues or cell types are exposed to the phage display library *in vitro*.

Choice of phage display system.

In vivo selection studies performed in mice preferentially employed libraries of random peptides expressed as fusion proteins with the gene III capsid protein in the fUSE5 vector (Pasqualini and Ruoslahti, 1996). The number and diversity of individual clones present in a given library is a significant factor for the success of *in vivo* selection. Primary libraries are preferred, which are less likely to have an over-representation of defective phage clones (Koivunen *et al.*, 1999). The preparation of a library may be optimized to between 10^8 - 10^9 transducing units (T.U.)/ml. A bulk amplification strategy may be applied between rounds of selection.

Phage libraries displaying linear, cyclic, or double cyclic peptides may be used. However, phage libraries displaying 3 to 10 random residues in a cyclic insert (CX₃₋₁₀C) are preferred, since single cyclic peptides tend to have a higher affinity for the target organ than linear peptides. Libraries displaying double-cyclic peptides (such as CX₃C X₃C X₃C; Rajotte *et al.*, 1998) have been successfully used. However, the production of the cognate synthetic peptides, although possible, can be complex due to the multiple conformers with different disulfide bridge arrangements.

Identification of homing peptides and receptors by in vivo phage display in mice.

In vivo selection of peptides from phage-display peptide libraries administered to mice has been used to identify targeting peptides selective for normal mouse brain, kidney, lung, skin, pancreas, retina, intestine, uterus, prostate, and adrenal gland (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Pasqualini, 1999; Rajotte *et al.*, 1998). These results show that the vascular endothelium of normal organs is sufficiently heterogeneous to allow differential targeting with peptide probes (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Rajotte *et al.*, 1998). A panel of peptide motifs that target the blood vessels of tumor xenografts in nude mice has

been assembled (Arap *et al.*, 1998a; reviewed in Pasqualini, 1999). These motifs include the RGD-4C, NGR, and GSL peptides. The RGD-4C peptide has previously been identified as selectively binding α_v integrins and has been shown to home to the vasculature of tumor xenografts in nude mice (Arap *et al.*, 1998a, 1998b; Pasqualini *et al.*, 1997).

The receptors for the tumor homing RGD4C targeting peptide have been identified as α_v integrins (Pasqualini *et al.*, 1997). The α_v integrins play an important role in angiogenesis. The $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins are absent or expressed at low levels in normal endothelial cells but are induced in angiogenic vasculature of tumors (Brooks *et al.*, 1994; Hammes *et al.*, 1996). Aminopeptidase N/CD13 has recently been identified as an angiogenic receptor for the NGR motif (Burg *et al.*, 1999). Aminopeptidase N/CD13 is strongly expressed not only in the angiogenic blood vessels of prostate cancer in TRAMP mice but also in the normal epithelial prostate tissue.

Tumor-homing phage co-localize with their receptors in the angiogenic vasculature of tumors but not in non-angiogenic blood vessels in normal tissues (Arap *et al.*, 1998b). Immunohistochemical evidence shows that vascular targeting phage bind to human tumor blood vessels in tissue sections (Pasqualini *et al.*, 2000) but not to normal blood vessels. A negative control phage with no insert (fd phage) did not bind to normal or tumor tissue sections. The expression of the angiogenic receptors was evaluated in cell lines, in non-proliferating blood vessels and in activated blood vessels of tumors and other angiogenic tissues such as corpus luteum. Flow cytometry and immunohistochemistry showed that these receptors are expressed in a number of tumor cells and in activated HUVECs (data not shown). The angiogenic receptors were not detected in the vasculature of normal organs of mouse or human tissues.

The distribution of these receptors was analyzed by immunohistochemistry in tumor cells, tumor vasculature, and normal vasculature. Alpha v integrins, CD13, aminopeptidase A, NG2, and MMP-2/MMP-9 - the known receptors in tumor blood vessels - are specifically expressed in angiogenic endothelial cells and pericytes of both

human and murine origin. Angiogenic neovasculature expresses markers that are either expressed at very low levels or not at all in non-proliferating endothelial cells (not shown).

The markers of angiogenic endothelium include receptors for vascular growth factors, such as specific subtypes of VEGF and basic FGF receptors, and α_v integrins, among many others (Mustonen and Alitalo, 1995). Thus far, identification and isolation of novel molecules characteristic of angiogenic vasculature has been slow, mainly because endothelial cells undergo dramatic phenotypic changes when grown in culture (Watson *et al.*, 1995).

Many of these tumor vascular markers are proteases and some of the markers also serve as viral receptors. Alpha v integrins are receptors for adenoviruses (Wickham *et al.*, 1997c) and CD13 is a receptor for coronaviruses (Look *et al.*, 1989). MMP-2 and MMP-9 are receptors for echoviruses (Koivunen *et al.*, 1999). Aminopeptidase A also appears to be a viral receptor. Bacteriophage may use the same cellular receptors as eukaryotic viruses. These findings suggest that receptors isolated by phage display will have cell internalization capability, a key feature for utilizing the identified peptide motifs as targeted gene therapy carriers.

Targeted delivery

Peptides that home to tumor vasculature have been coupled to cytotoxic drugs or proapoptotic peptides to yield compounds that were more effective and less toxic than the parental compounds in experimental models of mice bearing tumor xenografts (Arap *et al.*, 1998a; Ellerby *et al.*, 1999). The insertion of the RGD-4C peptide into a surface protein of an adenovirus has produced an adenoviral vector that may be used for tumor targeted gene therapy (Arap *et al.*, 1998b).

BRASIL

In certain embodiments, separation of phage bound to the cells of a target organ or tissue from unbound phage is achieved using the BRASIL technique. In BRASIL (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands), an organ or tissue is gently separated into cells or small clumps of cells that are suspended in a first phase. The first phase is layered over a second phase of appropriate density and centrifuged. Cells

attached to bound phage are pelleted at the bottom of the centrifuge tube, while unbound phage remain in the first phase. This allows a more efficient separation of bound from unbound phage, while maintaining the binding interaction between phage and cell. BRASIL may be performed by an *in vitro* protocol, where the cells are exposed to the phage library in the aqueous phase before centrifugation. In preferred embodiments, the first phase is aqueous and the second phase is organic. Specific non-limiting examples of organic phases that may be employed within the scope of the present invention are disclosed below.

Although the cells shown in the Examples below are primarily human cells, the invention is not limiting for the type of cell that may be used. Virtually any type of prokaryotic or eukaryotic cell may be used with BRASIL, including but not limited to human, mouse, mammalian, animal or plant cells, bacteria and unicellular organisms such as amoeba, spores, yeast, molds, algae, *Giardia* or dinoflagellates. In certain embodiments, the cells to be screened by BRASIL may first be sorted, for example using an FACS apparatus (Becton Dickinson) to separate heterogenous populations of cells into homogenous populations of cells.

In alternative embodiments, the target used to screen the phage library may include non-cellular targets, such as chemicals, compounds, molecules or aggregates of molecules. Target molecules of potential use in BRASIL include but are not limited to proteins, proteoglycans, carbohydrates, lipids, glycolipids, sphingolipids and lipoproteins. In preferred embodiments, such non-cellular targets may be attached either covalently or non-covalently to a larger particle, such as a glass, plastic, ceramic or magnetic bead. Linkers may be used for the attachment to increase the accessibility of the target to the phage targeting peptides. In such embodiments, the skilled artisan will realize that other methods of separating bound phage into an organic phase may be used besides centrifugation. For example, where magnetic particles are used, the particles may be partitioned into the organic phase by imposition of a magnetic field. If the particle is sufficiently large or dense, settling of the particle under the influence of gravity may be used to partition the bound phage into the organic phase. The invention is not limiting to the method of partitioning bound phage into an organic phase and any method known in the art for

WO 02/20822

PCT/US01/28124

separating phase bound to particles or cells into an organic or other second phase may be used within the scope of the invention.

The invention is not limiting as to the exact composition of the first and second phases, as long as the cells to be pelleted have a density that is higher than that of the second phase, and the second phase has a density that is higher than the first phase.

In preferred embodiments, the second phase has a density of about 1.02 to 1.04, while the first phase has a density of about 1.00. The cells or clumps of cells used for BRASIL preferably have a density of greater than 1.04 gm/ml. The skilled artisan will realize that specific cell types may vary in density and that optimization of BRASIL by adjustment of phase density may be appropriate. In preferred embodiments, in order to prevent mixing and dilution, the first and second phases are immiscible. However, step gradient centrifugation using miscible phases is known in the art and may be used in the practice of the present invention, for example using cesium chloride, sucrose, PEG (polyethylene glycol), Ficoll or Percoll solutions of appropriate density.

A variety of organic solvents of known density are available for use. Non-limiting examples of organic solvents with reported densities between 1.02 and 1.04 include diisooamyl phthalate (1.021), phenyl butyrate (1.038), tributyrin (1.035), 9-ethylanthracene (1.041), methyl-diphenylamine (1.048), 1-2-dimethoxy-4-(2-propyl)-benzene (1.039), alpha-phenyl-benzenethanol (1.036), 3-methyl-benzenthionol (1.041), acetaldehyde semicarbazone (1.030), phenylacetaldehyde (1.027) and dibenzylamine (1.026). Other organic compounds and their densities may be found, for example, in the Handbook of Chemistry and Physics, 50th Edition, pp. C-75 to C-541, the Chemical Rubber Co., Cleveland, OH 1969. Of course, it is not necessary that the organic phase be comprised of a single organic solvent and it is contemplated within the scope of the invention that an organic phase of appropriate density may be produced by mixing organic solvents of different densities, as disclosed in the Examples below. Additional mixtures may be designed using routine techniques known in the art. The skilled artisan will realize that densities often are temperature dependent and that the appropriate densities are obtained at the temperature of the centrifuge used to pellet the cells. In various embodiments, that

temperature may range from room temperature to about 4°C. For purposes of centrifugation, any organic phase utilized should be a liquid at the temperature used.

The artisan will further realize that optimization of second phase density may be required for different cell types. For example, different densities are observed for rat hepatocytes (1.07-1.10), Kupffer cells (1.05-1.06), human thrombocytes (1.04-1.06), lymphocytes (1.06-1.08), granulocytes (1.08-1.09), erythrocytes (1.09-1.10) and *E. coli* (1.13). All of these cell types would be expected to pellet through a second organic phase of about 1.03 density. It is further realized that the osmolarity of the first (aqueous) phase may affect the density of cells, particularly cells that are not bound by a rigid cell wall. In preferred embodiments, the osmolarity of the medium is approximately equal to the osmolarity of cells *in situ* (approximately 150 mM salt concentration). A wide variety of media of physiological osmolarity are known in the art, such as phosphate or Tris buffered saline (PBS or TBS).

The skilled artisan will also realize that organic phases of high toxicity are to be avoided. For example, organic solvents such as phenol or formaldehyde that result in denaturation of proteins are undesirable for use as a second phase. The toxicity properties of organic solvents are well known in the art.

In certain embodiments, a subtraction protocol is used with BRASIL to further reduce background phage binding. The purpose of subtraction is to remove phage from the library that bind to cells other than the cell of interest, or that bind to inactivated cells. In alternative embodiments, the phage library may be screened against a control cell line, tissue or organ sample that is not the targeted cell, tissue or organ. After subtraction the library may be screened against the cell, tissue or organ of interest. In another alternative embodiment, an unstimulated, quiescent cell line, tissue or organ may be screened against the library and binding phage removed. The cell line, tissue or organ is then activated, for example by administration of a hormone, growth factor, cytokine or chemokine and the activated cell line screened against the subtracted phage library.

Other methods of subtraction protocols are known and may be used in the practice of the present invention, for example as disclosed in U.S Patent Nos. 5,840,841, 5,705,610, 5,670,312 and 5,492,807, incorporated herein by reference.

Proteins and Peptides

In certain embodiments, the present invention concerns novel compositions comprising at least one protein or peptide. As used herein, a protein or peptide generally refers, but is not limited to, a protein of greater than about 200 amino acids, up to a full length sequence translated from a gene; a polypeptide of greater than about 100 amino acids; and/or a peptide of from about 3 to about 100 amino acids. For convenience, the terms "protein," "polypeptide" and "peptide" are used interchangeably herein.

In certain embodiments the size of the at least one protein or peptide may comprise, but is not limited to, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, about 110, about 120, about 130, about 140, about 150, about 160, about 170, about 180, about 190, about 200, about 210, about 220, about 230, about 240, about 250, about 275, about 300, about 325, about 350, about 375, about 400, about 425, about 450, about 475, about 500, about 525, about 550, about 575, about 600, about 625, about 650, about 675, about 700, about 725, about 750, about 775, about 800, about 825, about 850, about 875, about 900, about 925, about 950, about 975, about 1000, about 1100, about 1200, about 1300, about 1400, about 1500, about 1750, about 2000, about 2250, about 2500 or greater amino acid residues.

As used herein, an "amino acid residue" refers to any naturally occurring amino acid, any amino acid derivative or any amino acid mimic known in the art. In certain embodiments, the residues of the protein or peptide are sequential, without any non-amino acid interrupting the sequence of amino acid residues. In other embodiments, the sequence may comprise one or more non-amino acid moieties. In particular embodiments, the

WO 02/20822

PCT/US01/28124

sequence of residues of the protein or peptide may be interrupted by one or more non-amino acid moieties.

Accordingly, the term "protein or peptide" encompasses amino acid sequences comprising at least one of the 20 common amino acids found in naturally occurring proteins, or at least one modified or unusual amino acid, including but not limited to those shown on Table 1 below.

TABLE 1			
Modified and Unusual Amino Acids			
Abbr.	Amino Acid	Abbr.	Amino Acid
Aad	2-Aminoadipic acid	EtAsn	N-Ethylasparagine
Baad	3-Aminoadipic acid	Hyl	Hydroxylysine
Bala	β -alanine, β -Amino-propionic acid	AHyl	allo-Hydroxylysine
Abu	2-Aminobutyric acid	3Hyp	3-Hydroxyproline
4Abu	4-Aminobutyric acid, piperidinic acid	4Hyp	4-Hydroxyproline
Acp	6-Aminocaproic acid	Idc	Isodesmosine
Ahe	2-Aminoheptanoic acid	Alle	allo-Isoleucine
Aib	2-Aminoisobutyric acid	MeGly	N-Methylglycine, sarcosine
Baib	3-Aminoisobutyric acid	Melle	N-Methylisoleucine
Apm	2-Aminopimelic acid	MeLys	6-N-Methyllysine
Dbu	2,4-Diaminobutyric acid	MeVal	N-Methylvaline
Des	Desmosine	Nva	Norvaline
Dpm	2,2'-Diaminopimelic acid	Nle	Norleucine
Dpr	2,3-Diaminopropionic acid	Orn	Ornithine
EtGly	N-Ethylglycine		

Proteins or peptides may be made by any technique known to those of skill in the art, including the expression of proteins, polypeptides or peptides through standard molecular biological techniques, the isolation of proteins or peptides from natural sources, or the chemical synthesis of proteins or peptides. The nucleotide and protein, polypeptide and peptide sequences corresponding to various genes have been previously disclosed, and may be found at computerized databases known to those of ordinary skill in the art. One such database is the National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The coding regions for known genes may be amplified and/or expressed using the techniques disclosed herein or as would be known to those of ordinary skill in the art. Alternatively, various commercial preparations of proteins, polypeptides and peptides are known to those of skill in the art.

Peptide mimetics

Another embodiment for the preparation of polypeptides according to the invention is the use of peptide mimetics. Mimetics are peptide-containing molecules that mimic elements of protein secondary structure. See, for example, Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993), incorporated herein by reference. The underlying rationale behind the use of peptide mimetics is that the peptide backbone of proteins exists chiefly to orient amino acid side chains in such a way as to facilitate molecular interactions, such as those of antibody and antigen. A peptide mimetic is expected to permit molecular interactions similar to the natural molecule. These principles may be used to engineer second generation molecules having many of the natural properties of the targeting peptides disclosed herein, but with altered and even improved characteristics.

Fusion proteins

Other embodiments of the present invention concern fusion proteins. These molecules generally have all or a substantial portion of a targeting peptide, linked at the N- or C-terminus, to all or a portion of a second polypeptide or protein. For example, fusions may employ leader sequences from other species to permit the recombinant expression of a

protein in a heterologous host. Another useful fusion includes the addition of an immunologically active domain, such as an antibody epitope, to facilitate purification of the fusion protein. Inclusion of a cleavage site at or near the fusion junction will facilitate removal of the extraneous polypeptide after purification. Other useful fusions include linking of functional domains, such as active sites from enzymes, glycosylation domains, cellular targeting signals or transmembrane regions. In preferred embodiments, the fusion proteins of the instant invention comprise a targeting peptide linked to a therapeutic protein or peptide. Examples of proteins or peptides that may be incorporated into a fusion protein include cytostatic proteins, cytotoxic proteins, pro-apoptosis agents, anti-angiogenic agents, hormones, cytokines, growth factors, peptide drugs, antibodies, Fab fragments antibodies, antigens, receptor proteins, enzymes, lectins, MHC proteins, cell adhesion proteins and binding proteins. These examples are not meant to be limiting and it is contemplated that within the scope of the present invention virtually any protein or peptide could be incorporated into a fusion protein comprising a targeting peptide. Methods of generating fusion proteins are well known to those of skill in the art. Such proteins can be produced, for example, by chemical attachment using bifunctional cross-linking reagents, by *de novo* synthesis of the complete fusion protein, or by attachment of a DNA sequence encoding the targeting peptide to a DNA sequence encoding the second peptide or protein, followed by expression of the intact fusion protein.

Protein purification

In certain embodiments a protein or peptide may be isolated or purified. Protein purification techniques are well known to those of skill in the art. These techniques involve, at one level, the homogenization and crude fractionation of the cells, tissue or organ to polypeptide and non-polypeptide fractions. The protein or polypeptide of interest may be further purified using chromatographic and electrophoretic techniques to achieve partial or complete purification (or purification to homogeneity). Analytical methods particularly suited to the preparation of a pure peptide are ion-exchange chromatography, gel exclusion chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography and isoelectric focusing. An example of receptor protein purification by affinity chromatography is disclosed in U.S. Patent No.

5,206,347, the entire text of which is incorporated herein by reference. A particularly efficient method of purifying peptides is fast protein liquid chromatography (FPLC) or even HPLC.

A purified protein or peptide is intended to refer to a composition, isolatable from other components, wherein the protein or peptide is purified to any degree relative to its naturally-obtainable state. An isolated or purified protein or peptide, therefore, also refers to a protein or peptide free from the environment in which it may naturally occur. Generally, "purified" will refer to a protein or peptide composition that has been subjected to fractionation to remove various other components, and which composition substantially retains its expressed biological activity. Where the term "substantially purified" is used, this designation will refer to a composition in which the protein or peptide forms the major component of the composition, such as constituting about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95%, or more of the proteins in the composition.

Various methods for quantifying the degree of purification of the protein or peptide are known to those of skill in the art in light of the present disclosure. These include, for example, determining the specific activity of an active fraction, or assessing the amount of polypeptides within a fraction by SDS/PAGE analysis. A preferred method for assessing the purity of a fraction is to calculate the specific activity of the fraction, to compare it to the specific activity of the initial extract, and to thus calculate the degree of purity therein, assessed by a "-fold purification number." The actual units used to represent the amount of activity will, of course, be dependent upon the particular assay technique chosen to follow the purification, and whether or not the expressed protein or peptide exhibits a detectable activity.

Various techniques suitable for use in protein purification are well known to those of skill in the art. These include, for example, precipitation with ammonium sulphate, PEG, antibodies and the like, or by heat denaturation, followed by: centrifugation; chromatography steps such as ion exchange, gel filtration, reverse phase, hydroxylapatite and affinity chromatography; isoelectric focusing; gel electrophoresis; and combinations of these and other techniques. As is generally known in the art, it is believed that the order of

conducting the various purification steps may be changed, or that certain steps may be omitted, and still result in a suitable method for the preparation of a substantially purified protein or peptide.

There is no general requirement that the protein or peptide always be provided in their most purified state. Indeed, it is contemplated that less substantially purified products will have utility in certain embodiments. Partial purification may be accomplished by using fewer purification steps in combination, or by utilizing different forms of the same general purification scheme. For example, it is appreciated that a cation-exchange column chromatography performed utilizing an HPLC apparatus will generally result in a greater "fold" purification than the same technique utilizing a low pressure chromatography system. Methods exhibiting a lower degree of relative purification may have advantages in total recovery of protein product, or in maintaining the activity of an expressed protein.

Affinity chromatography is a chromatographic procedure that relies on the specific affinity between a substance to be isolated and a molecule to which it can specifically bind to. This is a receptor-ligand type of interaction. The column material is synthesized by covalently coupling one of the binding partners to an insoluble matrix. The column material is then able to specifically adsorb the substance from the solution. Elution occurs by changing the conditions to those in which binding will not occur (*e.g.*, altered pH, ionic strength, temperature, *etc.*). The matrix should be a substance that itself does not adsorb molecules to any significant extent and that has a broad range of chemical, physical and thermal stability. The ligand should be coupled in such a way as to not affect its binding properties. The ligand should also provide relatively tight binding. And it should be possible to elute the substance without destroying the sample or the ligand. In various embodiments, affinity chromatography may be performed to purify a targeting peptide, an antibody against a targeting peptide, an antigen that binds to an antibody, an endogenous receptor for a targeting peptide, or a ligand for a targeting peptide.

Synthetic Peptides

Because of their relatively small size, the targeting peptides of the invention can be synthesized in solution or on a solid support in accordance with conventional techniques.

Various automatic synthesizers are commercially available and can be used in accordance with known protocols. See, for example, Stewart and Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); and Barany and Merrifield (1979), each incorporated herein by reference. Short peptide sequences, usually from about 6 up to about 35 to 50 amino acids, can be readily synthesized by such methods. Alternatively, recombinant DNA technology may be employed wherein a nucleotide sequence which encodes a peptide of the invention is inserted into an expression vector, transformed or transfected into an appropriate host cell, and cultivated under conditions suitable for expression.

Antibodies

In certain embodiments, it may be desirable to make antibodies against the identified targeting peptides or their receptors. The appropriate targeting peptide or receptor, or portions thereof, may be coupled, bonded, bound, conjugated, or chemically-linked to one or more agents via linkers, polylinkers, or derivatized amino acids. This may be performed such that a bispecific or multivalent composition or vaccine is produced. It is further envisioned that the methods used in the preparation of these compositions are familiar to those of skill in the art and should be suitable for administration to human subjects, *i.e.*, pharmaceutically acceptable. Preferred agents are the carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) or bovine serum albumin (BSA).

The term "antibody" is used to refer to any antibody-like molecule that has an antigen binding region, and includes antibody fragments such as Fab', Fab, F(ab')₂, single domain antibodies (DABs), Fv, scFv (single chain Fv), and the like. Techniques for preparing and using various antibody-based constructs and fragments are well known in the art. Means for preparing and characterizing antibodies are also well known in the art (See, *e.g.*, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporated herein by reference).

Cytokines and chemokines

In certain embodiments, it may be desirable to couple specific bioactive agents to one or more targeting peptides for targeted delivery to an organ or tissue. Such agents include, but are not limited to, cytokines, chemokines, pro-apoptosis factors and anti-

angiogenic factors. The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, growth factors and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormones such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prolaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; prostaglandin, fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen, OB protein; tumor necrosis factor- α and - β ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, kit-ligand or FLT-3, angiostatin, thrombospondin, endostatin, tumor necrosis factor and LT. As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

Chemokines generally act as chemoattractants to recruit immune effector cells to the site of chemokine expression. It may be advantageous to express a particular chemokine gene in combination with, for example, a cytokine gene, to enhance the recruitment of other immune system components to the site of treatment. Chemokines include, but are not limited to, RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1-Beta, and IP-10. The skilled artisan will recognize that certain cytokines are also known to have chemoattractant effects and could also be classified under the term chemokines.

Imaging agents and radioisotopes

In certain embodiments, the claimed peptides or proteins of the present invention may be attached to imaging agents of use for imaging and diagnosis of various diseased organs or tissues. Many appropriate imaging agents are known in the art, as are methods for their attachment to proteins or peptides (see, e.g., U.S. patents 5,021,236 and 4,472,509, both incorporated herein by reference). Certain attachment methods involve the use of a metal chelate complex employing, for example, an organic chelating agent such as DTPA attached to the protein or peptide (U.S. Patent 4,472,509). Proteins or peptides also may be reacted with an enzyme in the presence of a coupling agent such as glutaraldehyde or periodate. Conjugates with fluorescein markers are prepared in the presence of these coupling agents or by reaction with an isothiocyanate.

Non-limiting examples of paramagnetic ions of potential use as imaging agents include chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II), copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium (III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) and erbium (III), with gadolinium being particularly preferred. Ions useful in other contexts, such as X-ray imaging, include but are not limited to lanthanum (III), gold (III), lead (II), and especially bismuth (III).

Radioisotopes of potential use as imaging or therapeutic agents include astatine²¹¹, ¹⁴carbon, ⁵¹chromium, ³⁶chlorine, ⁵⁷cobalt, ⁵⁸cobalt, copper⁶⁷, ¹⁵²Eu, gallium⁶⁷, ³hydrogen, iodine¹²³, iodine¹²⁵, iodine¹³¹, indium¹¹¹, ⁵⁹iron, ³²phosphorus, rhenium¹⁸⁶, rhenium¹⁸⁸, ⁷⁵selenium, ³⁵sulphur, technetium^{99m} and yttrium⁹⁰. ¹²⁵I is often being preferred for use in certain embodiments, and technetium^{99m} and indium¹¹¹ are also often preferred due to their low energy and suitability for long range detection.

Radioactively labeled proteins or peptides of the present invention may be produced according to well-known methods in the art. For instance, they can be iodinated by contact with sodium or potassium iodide and a chemical oxidizing agent such as sodium hypochlorite, or an enzymatic oxidizing agent, such as lactoperoxidase. Proteins or peptides according to the invention may be labeled with technetium-^{99m} by ligand exchange process, for example, by reducing pertechnate with stannous solution, chelating the

reduced technetium onto a Sephadex column and applying the peptide to this column or by direct labeling techniques, *e.g.*, by incubating pertechnetate, a reducing agent such as SnCl_2 , a buffer solution such as sodium-potassium phthalate solution, and the peptide. Intermediary functional groups which are often used to bind radioisotopes which exist as metallic ions to peptides are diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and ethylene diaminetetracetic acid (EDTA). Also contemplated for use are fluorescent labels, including rhodamine, fluorescein isothiocyanate and renographin.

In certain embodiments, the claimed proteins or peptides may be linked to a secondary binding ligand or to an enzyme (an enzyme tag) that will generate a colored product upon contact with a chromogenic substrate. Examples of suitable enzymes include urease, alkaline phosphatase, (horseradish) hydrogen peroxidase and glucose oxidase. Preferred secondary binding ligands are biotin and avidin or streptavidin compounds. The use of such labels is well known to those of skill in the art in light and is described, for example, in U.S. Patents 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241; each incorporated herein by reference.

Cross-linkers

Bifunctional cross-linking reagents have been extensively used for a variety of purposes including preparation of affinity matrices, modification and stabilization of diverse structures, identification of ligand and receptor binding sites, and structural studies. Homobifunctional reagents that carry two identical functional groups proved to be highly efficient in inducing cross-linking between identical and different macromolecules or subunits of a macromolecule, and linking of polypeptide ligands to their specific binding sites. Heterobifunctional reagents contain two different functional groups. By taking advantage of the differential reactivities of the two different functional groups, cross-linking can be controlled both selectively and sequentially. The bifunctional cross-linking reagents can be divided according to the specificity of their functional groups, *e.g.*, amino, sulfhydryl, guanidino, indole, carboxyl specific groups. Of these, reagents directed to free amino groups have become especially popular because of their commercial availability, ease of synthesis and the mild reaction conditions under which they can be applied. A

majority of heterobifunctional cross-linking reagents contains a primary amine-reactive group and a thiol-reactive group.

Exemplary methods for cross-linking ligands to liposomes are described in U.S. Patent 5,603,872 and U.S. Patent 5,401,511, each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Various ligands can be covalently bound to liposomal surfaces through the cross-linking of amine residues. Liposomes, in particular, multilamellar vesicles (MLV) or unilamellar vesicles such as microemulsified liposomes (MEL) and large unilamellar liposomes (LUVET), each containing phosphatidylethanolamine (PE), have been prepared by established procedures. The inclusion of PE in the liposome provides an active functional residue, a primary amine, on the liposomal surface for cross-linking purposes. Ligands such as epidermal growth factor (EGF) have been successfully linked with PE-liposomes. Ligands are bound covalently to discrete sites on the liposome surfaces. The number and surface density of these sites are dictated by the liposome formulation and the liposome type. The liposomal surfaces may also have sites for non-covalent association. To form covalent conjugates of ligands and liposomes, cross-linking reagents have been studied for effectiveness and biocompatibility. Cross-linking reagents include glutaraldehyde (GAD), bifunctional oxirane (OXR), ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE), and a water soluble carbodiimide, preferably 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Through the complex chemistry of cross-linking, linkage of the amine residues of the recognizing substance and liposomes is established.

In another example, heterobifunctional cross-linking reagents and methods of using the cross-linking reagents are described (U.S. Patent 5,889,155, specifically incorporated herein by reference in its entirety). The cross-linking reagents combine a nucleophilic hydrazide residue with an electrophilic maleimide residue, allowing coupling in one example, of aldehydes to free thiols. The cross-linking reagent can be modified to cross-link various functional groups.

Cross-linking agents may also be of use to attach chemicals, compounds, molecules or aggregates of molecules to larger particles for use in BRASIL screening.

Magnetic Beads

It is envisioned that particles employed in the instant invention may come in a variety of sizes. While large magnetic particles (mean diameter in solution greater than 10 μm) can respond to weak magnetic fields and magnetic field gradients, they tend to settle rapidly, limiting their usefulness for reactions requiring homogeneous conditions. Large particles also have a more limited surface area per weight than smaller particles, so that less material can be coupled to them. In preferred embodiments, the magnetic beads are less than 10 μm in diameter.

Various silane couplings applicable to magnetic beads are discussed in U.S. Pat. No. 3,652,761, incorporated herein by reference. Procedures for silanization known in the art generally differ from each other in the media chosen for the polymerization of silane and its deposition on reactive surfaces. Organic solvents such as toluene (Weetall, 1976), methanol, (U.S. Pat. No. 3,933,997) and chloroform (U.S. Pat. No. 3,652,761) have been used. Silane deposition from aqueous alcohol and aqueous solutions with acid have also been used.

Ferromagnetic materials in general become permanently magnetized in response to magnetic fields. Materials termed "superparamagnetic" experience a force in a magnetic field gradient, but do not become permanently magnetized. Crystals of magnetic iron oxides may be either ferromagnetic or superparamagnetic, depending on the size of the crystals. Superparamagnetic oxides of iron generally result when the crystal is less than about 300 angstroms ($\text{\AA}$) in diameter; larger crystals generally have a ferromagnetic character.

Dispersible magnetic iron oxide particles reportedly having 300 $\text{\AA}$ diameters and surface amine groups are prepared by base precipitation of ferrous chloride and ferric chloride ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$) in the presence of polyethylene imine, according to U.S. Pat. No. 4,267,234. These particles are exposed to a magnetic field three times during preparation and are described as redispersible. The magnetic particles are mixed with a glutaraldehyde suspension polymerization system to form magnetic polyglutaraldehyde microspheres with

reported diameters of 0.1 μm . Polyglutaraldehyde microspheres have conjugated aldehyde groups on the surface which can form bonds to amino containing molecules such as proteins.

While a variety of particle sizes are envisioned to be applicable in the disclosed method, in a preferred embodiment, particles are between about 0.1 and about 1.5 μm diameter. Particles with mean diameters in this range can be produced with a surface area as high as about 100 to 150 m^2/gm , which provides a high capacity for bioaffinity adsorbent coupling. Magnetic particles of this size range overcome the rapid settling problems of larger particles, but obviate the need for large magnets to generate the magnetic fields and magnetic field gradients required to separate smaller particles. Magnets used to effect separations of the magnetic particles of this invention need only generate magnetic fields between about 100 and about 1000 Oersteds. Such fields can be obtained with permanent magnets which are preferably smaller than the container which holds the dispersion of magnetic particles and thus, may be suitable for benchtop use. Although ferromagnetic particles may be useful in certain applications of the invention, particles with superparamagnetic behavior are usually preferred since superparamagnetic particles do not exhibit the magnetic aggregation associated with ferromagnetic particles and permit redispersion and reuse.

The method for preparing the magnetic particles may comprise precipitating metal salts in base to form fine magnetic metal oxide crystals, redispersing and washing the crystals in water and in an electrolyte. Magnetic separations may be used to collect the crystals between washes if the crystals are superparamagnetic. The crystals may then be coated with a material capable of adsorptively or covalently bonding to the metal oxide and bearing functional groups for coupling with various target molecules.

Non-magnetic beads, flow cytometry and FACS

In another embodiment, the target of interest may be non-covalently or covalently attached to non-magnetic beads, such as glass, polyacrylamide, polystyrene or latex. Targets may be attached to such beads by the same techniques discussed above for

magnetic beads. After exposure of bead to phage library, those phage bound to beads may be separated from unbound phage by, for example, centrifugation.

In certain embodiments, cells to be screened by BRASIL may be presorted using some form of flow cytometry. Non-limiting examples of flow cytometry methods are disclosed in Betz *et al.* (1984), Wilson *et al.* (1988), Scillian *et al.* (1989), Frengen *et al.* (1994), Griffith *et al.* (1996), Stuart *et al.* (1998) and U.S. Patent Nos. 5,853,984 and 5,948,627, each incorporated herein by reference in its entirety. U.S. Patent Nos. 4,727,020, 4,704,891 and 4,599,307, incorporated herein by reference, describe the arrangement of the components comprising a flow cytometer and the general principles of its use.

In the flow cytometer, beads, cells or other particles are passed substantially one at a time through a detector, where each particle is exposed to an energy source. The energy source generally provides excitatory light of a single wavelength. The detector comprises a light collection unit, such as photomultiplier tubes or a charge coupled device, which may be attached to a data analyzer such as a computer. The beads, cells or particles can be characterized by their response to excitatory light, for example by detecting and/or quantifying the amount of fluorescent light emitted in response to the excitatory light. Beads or cells exhibiting a particular characteristic can be sorted using an attached cell sorter, such as the FACS Vantage™ cell sorter sold by Becton Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA).

Nucleic Acids

Nucleic acids according to the present invention may encode a targeting peptide, a receptor protein or a fusion protein. The nucleic acid may be derived from genomic DNA, complementary DNA (cDNA) or synthetic DNA. Where incorporation into an expression vector is desired, the nucleic acid may also comprise a natural intron or an intron derived from another gene. Such engineered molecules are sometime referred to as "mini-genes."

A "nucleic acid" as used herein includes single-stranded and double-stranded molecules, as well as DNA, RNA, chemically modified nucleic acids and nucleic acid analogs. It is contemplated that a nucleic acid within the scope of the present invention

may be of 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, about 110, about 120, about 130, about 140, about 150, about 160, about 170, about 180, about 190, about 200, about 210, about 220, about 230, about 240, about 250, about 275, about 300, about 325, about 350, about 375, about 400, about 425, about 450, about 475, about 500, about 525, about 550, about 575, about 600, about 625, about 650, about 675, about 700, about 725, about 750, about 775, about 800, about 825, about 850, about 875, about 900, about 925, about 950, about 975, about 1000, about 1100, about 1200, about 1300, about 1400, about 1500, about 1750, about 2000, about 2250, about 2500 or greater nucleotide residues in length.

It is contemplated that targeting peptides, fusion proteins and receptors may be encoded by any nucleic acid sequence that encodes the appropriate amino acid sequence. The design and production of nucleic acids encoding a desired amino acid sequence is well known to those of skill in the art, using standardized codon tables (see Table 2 below). In preferred embodiments, the codons selected for encoding each amino acid may be modified to optimize expression of the nucleic acid in the host cell of interest. Codon preferences for various species of host cell are well known in the art.

TABLE 2

Amino Acid			Codons
Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cysteine	Cys	C	UGC UGU
Aspartic acid	Asp	D	GAC GAU
Glutamic acid	Glu	E	GAA GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUC UUU
Glycine	Gly	G	GGA GGC GGG GGU

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Histidine	His	H	CAC CAU
Isoleucine	Ile	I	AUA AUC AUU
Lysine	Lys	K	AAA AAG
Leucine	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAC AAU
Proline	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamine	Gln	Q	CAA CAG
Arginine	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serine	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonine	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valine	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAC UAU

In addition to nucleic acids encoding the desired targeting peptide, fusion protein or receptor amino acid sequence, the present invention encompasses complementary nucleic acids that hybridize under high stringency conditions with such coding nucleic acid sequences. High stringency conditions for nucleic acid hybridization are well known in the art. For example, conditions may comprise low salt and/or high temperature conditions, such as provided by about 0.02 M to about 0.15 M NaCl at temperatures of about 50°C to about 70°C. It is understood that the temperature and ionic strength of a desired stringency are determined in part by the length of the particular nucleic acid(s), the length and nucleotide content of the target sequence(s), the charge composition of the nucleic acid(s), and to the presence or concentration of formamide, tetramethylammonium chloride or other solvent(s) in a hybridization mixture.

Vectors for Cloning, Gene Transfer and Expression

In certain embodiments expression vectors are employed to express the targeting peptide or fusion protein, which can then be purified and used. In other embodiments, the expression vectors are used in gene therapy. Expression requires that appropriate signals be provided in the vectors, and which include various regulatory elements, such as enhancers/promoters from both viral and mammalian sources that drive expression of the genes of interest in host cells. Elements designed to optimize messenger RNA stability and translatability in host cells also are known.

Regulatory Elements

The terms "expression construct" or "expression vector" are meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for a gene product in which part or all of the nucleic acid coding sequence is capable of being transcribed. In preferred embodiments, the nucleic acid encoding a gene product is under transcriptional control of a promoter. A "promoter" refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a gene. The phrase "under transcriptional control" means that the promoter is in the correct location and orientation in relation to the nucleic acid to control RNA polymerase initiation and expression of the gene.

The particular promoter employed to control the expression of a nucleic acid sequence of interest is not believed to be important, so long as it is capable of directing the expression of the nucleic acid in the targeted cell. Thus, where a human cell is targeted, it is preferable to position the nucleic acid coding region adjacent and under the control of a promoter that is capable of being expressed in a human cell. Generally speaking, such a promoter might include either a human or viral promoter.

In various embodiments, the human cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter, the SV40 early promoter, the Rous sarcoma virus long terminal repeat, rat insulin promoter, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter can be used to obtain high-level expression of the coding sequence of interest. The use of other viral or mammalian cellular or bacterial phage promoters which are well-known in the art to

achieve expression of a coding sequence of interest is contemplated as well, provided that the levels of expression are sufficient for a given purpose.

Where a cDNA insert is employed, typically one will typically include a polyadenylation signal to effect proper polyadenylation of the gene transcript. The nature of the polyadenylation signal is not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and any such sequence may be employed, such as human growth hormone and SV40 polyadenylation signals. Also contemplated as an element of the expression construct is a terminator. These elements can serve to enhance message levels and to minimize read through from the construct into other sequences.

Selectable Markers

In certain embodiments of the invention, the cells containing nucleic acid constructs of the present invention may be identified *in vitro* or *in vivo* by including a marker in the expression construct. Such markers would confer an identifiable change to the cell permitting easy identification of cells containing the expression construct. Usually the inclusion of a drug selection marker aids in cloning and in the selection of transformants. For example, genes that confer resistance to neomycin, puromycin, hygromycin, DHFR, GPT, zeocin, and histidinol are useful selectable markers. Alternatively, enzymes such as herpes simplex virus thymidine kinase (*tk*) or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) may be employed. Immunologic markers also can be employed. The selectable marker employed is not believed to be important, so long as it is capable of being expressed simultaneously with the nucleic acid encoding a gene product. Further examples of selectable markers are well known to one of skill in the art.

Delivery of Expression Vectors

There are a number of ways in which expression vectors may introduced into cells. In certain embodiments of the invention, the expression construct comprises a virus or engineered construct derived from a viral genome. The ability of certain viruses to enter cells via receptor-mediated endocytosis, to integrate into host cell genome, and express viral genes stably and efficiently have made them attractive candidates for the transfer of foreign genes into mammalian cells (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988;

Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986). Preferred gene therapy vectors are generally viral vectors.

Although some viruses that can accept foreign genetic material are limited in the number of nucleotides they can accommodate and in the range of cells they infect, these viruses have been demonstrated to successfully effect gene expression. However, adenoviruses do not integrate their genetic material into the host genome and therefore do not require host replication for gene expression making them ideally suited for rapid, efficient, heterologous gene expression. techniques for preparing replication infective viruses are well known in the art.

Of course in using viral delivery systems, one will desire to purify the virion sufficiently to render it essentially free of undesirable contaminants, such as defective interfering viral particles or endotoxins and other pyrogens such that it will not cause any untoward reactions in the cell, animal or individual receiving the vector construct. A non-limiting method of purifying the vector involves the use of buoyant density gradients, such as cesium chloride gradient centrifugation.

DNA viruses used as gene vectors include the papovaviruses (*e.g.*, simian virus 40, bovine papilloma virus, and polyoma) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) and adenoviruses (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986).

One of the preferred methods for *in vivo* delivery involves the use of an adenovirus expression vector. Although adenovirus vectors are known to have a low capacity for integration into genomic DNA, this feature is counterbalanced by the high efficiency of gene transfer afforded by these vectors. "Adenovirus expression vector" is meant to include those constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to express an antisense polynucleotide that has been cloned therein.

The expression vector comprises a genetically engineered form of adenovirus. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kb, linear, double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7 kb (Grunhaus and Horwitz, 1992). In contrast to retroviral infection, the adenoviral

infection of host cells does not result in chromosomal integration because adenoviral DNA can replicate in an episomal manner without potential genotoxicity. Also, adenoviruses are structurally stable, and no genome rearrangement has been detected after extensive amplification. Adenovirus can infect virtually all epithelial cells regardless of their cell cycle stage. So far, adenoviral infection appears to be linked only to mild disease such as acute respiratory disease in humans.

Adenovirus is particularly suitable for use as a gene transfer vector because of its mid-sized genome, ease of manipulation, high titer, wide target cell range and high infectivity. Both ends of the viral genome contain 100-200 base pair inverted repeats (ITRs), which are *cis* elements necessary for viral DNA replication and packaging. The early (E) and late (L) regions of the genome contain different transcription units that are divided by the onset of viral DNA replication. The E1 region (E1A and E1B) encodes proteins responsible for the regulation of transcription of the viral genome and a few cellular genes. The expression of the E2 region (E2A and E2B) results in the synthesis of the proteins for viral DNA replication. These proteins are involved in DNA replication, late gene expression and host cell shut-off (Renan, 1990). The products of the late genes, including the majority of the viral capsid proteins, are expressed only after significant processing of a single primary transcript issued by the major late promoter (MLP). The MLP, (located at 16.8 m.u.) is particularly efficient during the late phase of infection, and all the mRNAs issued from this promoter possess a 5'-tripartite leader (TPL) sequence which makes them preferred mRNAs for translation.

In currently used systems, recombinant adenovirus is generated from homologous recombination between shuttle vector and provirus vector. Due to the possible recombination between two proviral vectors, wild-type adenovirus may be generated from this process. Therefore, it is critical to isolate a single clone of virus from an individual plaque and examine its genomic structure.

Generation and propagation of adenovirus vectors which are replication deficient depend on a unique helper cell line, designated 293, which is transformed from human embryonic kidney cells by Ad5 DNA fragments and constitutively expresses E1 proteins

(Graham *et al.*, 1977). Since the E3 region is dispensable from the adenovirus genome (Jones and Shenk, 1978), the current adenovirus vectors, with the help of 293 cells, carry foreign DNA in either the E1, the D3, or both regions (Graham and Prevec, 1991). In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987), providing capacity for about 2 extra kb of DNA. Combined with the approximately 5.5 kb of DNA that is replaceable in the E1 and E3 regions, the maximum capacity of the current adenovirus vector is under 7.5 kb, or about 15% of the total length of the vector. More than 80% of the adenovirus viral genome remains in the vector backbone and is the source of vector-borne cytotoxicity. Also, the replication deficiency of the E1-deleted virus is incomplete. For example, leakage of viral gene expression has been observed with the currently available vectors at high multiplicities of infection (MOI) (Mulligan, 1993).

Helper cell lines may be derived from human cells such as human embryonic kidney cells, muscle cells, hematopoietic cells or other human embryonic mesenchymal or epithelial cells. Alternatively, the helper cells, may be derived from the cells of other mammalian species that are permissive for human adenovirus. Such cells include, *e.g.*, Vero cells or other monkey embryonic mesenchymal or epithelial cells. As discussed, the preferred helper cell line is 293.

Racher *et al.*, (1995) disclosed improved methods for culturing 293 cells and propagating adenovirus. In one format, natural cell aggregates are grown by inoculating individual cells into 1 liter siliconized spinner flasks (Techne, Cambridge, UK) containing 100-200 ml of medium. Following stirring at 40 rpm, the cell viability is estimated with trypan blue. In another format, Fibra-Cel microcarriers (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5 g/l) are employed as follows. A cell inoculum, resuspended in 5 ml of medium, is added to the carrier (50 ml) in a 250 ml Erlenmeyer flask and left stationary, with occasional agitation, for 1 to 4 h. The medium is then replaced with 50 ml of fresh medium and shaking is initiated. For virus production, cells are allowed to grow to about 80% confluence, after which time the medium is replaced (to 25% of the final volume) and adenovirus added at an MOI of 0.05. Cultures are left stationary overnight, following which the volume is increased to 100% and shaking is commenced for another 72 hr.

Other than the requirement that the adenovirus vector be replication defective, or at least conditionally defective, the nature of the adenovirus vector is not believed to be crucial to the successful practice of the invention. The adenovirus may be of any of the 42 different known serotypes or subgroups A-F. Adenovirus type 5 of subgroup C is the preferred starting material in order to obtain the conditional replication-defective adenovirus vector for use in the present invention. This is because Adenovirus type 5 is a human adenovirus about which a great deal of biochemical and genetic information is known, and it has historically been used for most constructions employing adenovirus as a vector.

A typical vector applicable to practicing the present invention is replication defective and will not have an adenovirus E1 region. Thus, it is most convenient to introduce the polynucleotide encoding the gene at the position from which the E1-coding sequences have been removed. However, the position of insertion of the construct within the adenovirus sequences is not critical. The polynucleotide encoding the gene of interest may also be inserted in lieu of the deleted E3 region in E3 replacement vectors as described by Karlsson *et al.*, (1986) or in the E4 region where a helper cell line or helper virus complements the E4 defect.

Adenovirus is easy to grow and manipulate and exhibits broad host range *in vitro* and *in vivo*. This group of viruses can be obtained in high titers, *e.g.*, 10^9 - 10^{11} plaque-forming units per ml, and they are highly infective. The life cycle of adenovirus does not require integration into the host cell genome. The foreign genes delivered by adenovirus vectors are episomal and, therefore, have low genotoxicity to host cells. No side effects have been reported in studies of vaccination with wild-type adenovirus (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), demonstrating their safety and therapeutic potential as *in vivo* gene transfer vectors.

Adenovirus vectors have been used in eukaryotic gene expression (Levero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) and vaccine development (Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1991). Recently, animal studies suggested that recombinant adenovirus could be used for gene therapy (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991;

Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Studies in administering recombinant adenovirus to different tissues include trachea instillation (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), muscle injection (Ragot *et al.*, 1993), peripheral intravenous injections (Herz and Gerard, 1993) and stereotactic inoculation into the brain (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

Other gene transfer vectors may be constructed from retroviruses. The retroviruses are a group of single-stranded RNA viruses characterized by an ability to convert their RNA to double-stranded DNA in infected cells by a process of reverse-transcription (Coffin, 1990). The resulting DNA then stably integrates into cellular chromosomes as a provirus and directs synthesis of viral proteins. The integration results in the retention of the viral gene sequences in the recipient cell and its descendants. The retroviral genome contains three genes, *gag*, *pol*, and *env*, that code for capsid proteins, polymerase enzyme, and envelope components, respectively. A sequence found upstream from the *gag* gene contains a signal for packaging of the genome into virions. Two long terminal repeat (LTR) sequences are present at the 5' and 3' ends of the viral genome. These contain strong promoter and enhancer sequences, and also are required for integration in the host cell genome (Coffin, 1990).

In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding protein of interest is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a packaging cell line containing the *gag*, *pol*, and *env* genes, but without the LTR and packaging components, is constructed (Mann *et al.*, 1983). When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation for example), the packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are capable of infecting a broad variety of cell types. However, integration and stable expression require the division of host cells (Paskind *et al.*, 1975).

There are certain limitations to the use of retrovirus vectors. For example, retrovirus vectors usually integrate into random sites in the cell genome. This can lead to insertional mutagenesis through the interruption of host genes or through the insertion of viral regulatory sequences that can interfere with the function of flanking genes (Varmus *et al.*, 1981). Another concern with the use of defective retrovirus vectors is the potential appearance of wild-type replication-competent virus in the packaging cells. This may result from recombination events in which the intact sequence from the recombinant virus inserts upstream from the *gag*, *pol*, *env* sequence integrated in the host cell genome. However, new packaging cell lines are now available that should greatly decrease the likelihood of recombination (Markowitz *et al.*, 1988; Hersdorffer *et al.*, 1990).

Other viral vectors may be employed as expression constructs. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), adeno-associated virus (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzyczka, 1984), and herpes viruses may be employed. They offer several attractive features for various mammalian cells (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

Several non-viral methods for the transfer of expression constructs into cultured mammalian cells also are contemplated by the present invention. These include calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990), DEAE-dextran (Gopal, 1985), electroporation (Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984), direct microinjection, DNA-loaded liposomes and lipofectamine-DNA complexes, cell sonication, gene bombardment using high velocity microprojectiles, and receptor-mediated transfection (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988). Some of these techniques may be successfully adapted for *in vivo* or *ex vivo* use.

In a further embodiment of the invention, the expression construct may be entrapped in a liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components

undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers. Also contemplated are lipofectamine-DNA complexes.

Liposome-mediated nucleic acid delivery and expression of foreign DNA *in vitro* has been very successful. Wong *et al.*, (1980) demonstrated the feasibility of liposome-mediated delivery and expression of foreign DNA in cultured chick embryo, HeLa, and hepatoma cells. Nicolau *et al.*, (1987) accomplished successful liposome-mediated gene transfer in rats after intravenous injection.

A number of selection systems may be used including, but not limited to, HSV thymidine kinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase genes, in *tk-*, *hgpri-* or *aprt-* cells, respectively. Also, anti-metabolite resistance can be used as the basis of selection for *dhfr-* that confers resistance to methotrexate; *gpt*, that confers resistance to mycophenolic acid; *neo*, that confers resistance to the aminoglycoside G418; and *hygro*, that confers resistance to hygromycin.

Pharmaceutical compositions

Where clinical applications are contemplated, it is necessary to prepare pharmaceutical compositions - expression vectors, virus stocks, proteins, antibodies and drugs - in a form appropriate for the intended application. Generally, this will entail preparing compositions that are essentially free of impurities that could be harmful to humans or animals.

One generally will desire to employ appropriate salts and buffers to render delivery vectors stable and allow for uptake by target cells. Buffers also are employed when recombinant cells are introduced into a patient. Aqueous compositions of the present invention comprise an effective amount of the protein or peptide, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium. Such compositions also are referred to as inocula. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce adverse, allergic, or other untoward reactions when administered to an animal or a human. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media,

coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the proteins or peptides of the present invention, its use in therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

The active compositions of the present invention may include classic pharmaceutical preparations. Administration of these compositions according to the present invention are via any common route so long as the target tissue is available via that route. This includes oral, nasal, buccal, rectal, vaginal or topical. Alternatively, administration may be by orthotopic, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial or intravenous injection. Such compositions normally would be administered as pharmaceutically acceptable compositions, described *supra*.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Therapeutic agents

In certain embodiments, chemotherapeutic agents may be attached to a targeting peptide or fusion protein for selective delivery to a tumor. Agents or factors suitable for use include any chemical compound that induces DNA damage when applied to a cell. Chemotherapeutic agents include, but are not limited to, 5-fluorouracil, bleomycin, busulfan, camptothecin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin (CDDP), cyclophosphamide, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, estrogen receptor binding agents, etoposide (VP16), farnesyl-protein transferase inhibitors, gemcitabine, ifosfamide, mechlorethamine, melphalan, mitomycin, navelbine, nitrosurea, plicomycin, procarbazine, raloxifene, tamoxifen, taxol, temazolomide (an aqueous form of DTIC), transplatinum, vinblastine and methotrexate, vincristine, or any analog or derivative variant of the foregoing. Most chemotherapeutic agents fall into the following categories: alkylating agents, antimetabolites, antitumor antibiotics, corticosteroid hormones, mitotic inhibitors, and nitrosoureas, hormone agents, miscellaneous agents, and any analog or derivative variant thereof.

Chemotherapeutic agents and methods of administration, dosages, etc. are well known to those of skill in the art (see for example, the "Physicians Desk Reference", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" and in "Remington's Pharmaceutical Sciences", incorporated herein by reference in relevant parts), and may be combined with the invention in light of the disclosures herein. Some variation in dosage

will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Examples of specific chemotherapeutic agents and dose regimes are also described herein. Of course, all of these dosages and agents described herein are exemplary rather than limiting, and other doses or agents may be used by a skilled artisan for a specific patient or application. Any dosage in-between these points, or range derivable therein is also expected to be of use in the invention.

Alkylating agents

Alkylating agents are drugs that directly interact with genomic DNA to prevent the cancer cell from proliferating. This category of chemotherapeutic drugs represents agents that affect all phases of the cell cycle, that is, they are not phase-specific. An alkylating agent, may include, but is not limited to, a nitrogen mustard, an ethylenimine, a methylmelamine, an alkyl sulfonate, a nitrosourea or a triazines. They include but are not limited to: busulfan, chlorambucil, cisplatin, cyclophosphamide (cytoxan), dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine (mustargen), and melphalan.

Antimetabolites

Antimetabolites disrupt DNA and RNA synthesis. Unlike alkylating agents, they specifically influence the cell cycle during S phase. Antimetabolites can be differentiated into various categories, such as folic acid analogs, pyrimidine analogs and purine analogs and related inhibitory compounds. Antimetabolites include but are not limited to, 5-fluorouracil (5-FU), cytarabine (Ara-C), fludarabine, gemcitabine, and methotrexate.

Natural Products

Natural products generally refer to compounds originally isolated from a natural source, and identified as having a pharmacological activity. Such compounds, analogs and derivatives thereof may be, isolated from a natural source, chemically synthesized or recombinantly produced by any technique known to those of skill in the art. Natural products include such categories as mitotic inhibitors, antitumor antibiotics, enzymes and biological response modifiers.

Mitotic inhibitors include plant alkaloids and other natural agents that can inhibit either protein synthesis required for cell division or mitosis. They operate during a specific phase during the cell cycle. Mitotic inhibitors include, for example, docetaxel, etoposide (VP16), teniposide, paclitaxel, taxol, vinblastine, vincristine, and vinorelbine.

Taxoids are a class of related compounds isolated from the bark of the ash tree, *Taxus brevifolia*. Taxoids include but are not limited to compounds such as docetaxel and paclitaxel. Paclitaxel binds to tubulin (at a site distinct from that used by the vinca alkaloids) and promotes the assembly of microtubules.

Vinca alkaloids are a type of plant alkaloid identified to have pharmaceutical activity. They include such compounds as vinblastine (VLB) and vincristine.

Antitumor Antibiotics

Antitumor antibiotics have both antimicrobial and cytotoxic activity. These drugs also interfere with DNA by chemically inhibiting enzymes and mitosis or altering cellular membranes. These agents are not phase specific so they work in all phases of the cell cycle. Examples of antitumor antibiotics include, but are not limited to, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin (Adriamycin), plicamycin (mithramycin) and idarubicin.

Hormones

Corticosteroid hormones are considered chemotherapy drugs when they are implemented to kill or slow the growth of cancer cells. Corticosteroid hormones can increase the effectiveness of other chemotherapy agents, and consequently, they are

frequently used in combination treatments. Prednisone and dexamethasone are examples of corticosteroid hormones.

Progestins such as hydroxyprogesterone caproate, medroxyprogesterone acetate, and megestrol acetate have been used in cancers of the endometrium and breast. Estrogens such as diethylstilbestrol and ethinyl estradiol have been used in cancers such as breast and prostate. Antiestrogens such as tamoxifen have been used in cancers such as breast. Androgens such as testosterone propionate and fluoxymesterone have also been used in treating breast cancer. Antiandrogens such as flutamide have been used in the treatment of prostate cancer. Gonadotropin-releasing hormone analogs such as leuprolide have been used in treating prostate cancer.

Miscellaneous Agents

Some chemotherapy agents do not qualify into the previous categories based on their activities. They include, but are not limited to, platinum coordination complexes, anthracenedione, substituted urea, methyl hydrazine derivative, adrenalcortical suppressant, amsacrine, L-asparaginase, and tretinoin. It is contemplated that they are included within the compositions and methods of the present invention.

Platinum coordination complexes include such compounds as carboplatin and cisplatin (*cis*-DDP).

An anthracenedione such as mitoxantrone has been used for treating acute granulocytic leukemia and breast cancer. A substituted urea such as hydroxyurea has been used in treating chronic granulocytic leukemia, polycythemia vera, essential thrombocytosis and malignant melanoma. A methyl hydrazine derivative such as procarbazine (N-methylhydrazine, MIH) has been used in the treatment of Hodgkin's disease. An adrenocortical suppressant such as mitotane has been used to treat adrenal cortex cancer, while aminoglutethimide has been used to treat Hodgkin's disease.

Regulators of Programmed Cell Death

Apoptosis, or programmed cell death, is an essential process for normal embryonic development, maintaining homeostasis in adult tissues, and suppressing carcinogenesis

(Kerr et al., 1972). The Bcl-2 family of proteins and ICE-like proteases have been demonstrated to be important regulators and effectors of apoptosis in other systems. The Bcl-2 protein, discovered in association with follicular lymphoma, plays a prominent role in controlling apoptosis and enhancing cell survival in response to diverse apoptotic stimuli (Cleary and Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto and Croce, 1986). The evolutionarily conserved Bcl-2 protein now is recognized to be a member of a family of related proteins, which can be categorized as death agonists or death antagonists.

Subsequent to its discovery, it was shown that Bcl-2 acts to suppress cell death triggered by a variety of stimuli. Also, it now is apparent that there is a family of Bcl-2 cell death regulatory proteins which share in common structural and sequence homologies. These different family members have been shown to either possess similar functions to Bcl-2 (e.g., Bcl_{XL}, Bcl_L, Bcl_S, Mcl-1, A1, Bfl-1) or counteract Bcl-2 function and promote cell death (e.g., Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

Non-limiting examples of pro-apoptosis agents contemplated within the scope of the present invention include gramicidin, magainin, mellitin, defensin, cecropin, (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO:1), (KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)₂ (SEQ ID NO:3) or (KLGKKLG)₃ (SEQ ID NO:4).

Angiogenic inhibitors

In certain embodiments the present invention may concern administration of targeting peptides attached to anti-angiogenic agents, such as angiotensin, laminin peptides, fibronectin peptides, plasminogen activator inhibitors, tissue metalloproteinase inhibitors, interferons, interleukin 12, platelet factor 4, IP-10, Gro-β, thrombospondin, 2-methoxyestradiol, proliferin-related protein, carboxamidotriazole, CM101, Marimastat, pentosan polysulphate, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon-alpha, herbimycin A, PNU145156E, 16K prolactin fragment, Linomide, thalidomide, pentoxifylline, genistein, TNP-470, endostatin, paclitaxel, accutin, angiostatin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 or minocycline.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Dosages

The skilled artisan is directed to "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33, and in particular to pages 624-652. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, and general safety and purity standards as required by the FDA Office of Biologics standards.

EXAMPLES

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

Example 1. BRASIL

Probing molecular diversity at the cell surface level is important for the identification of targeting peptides and the development of targeted therapies. As opposed to purified receptors, membrane-bound proteins are more likely to preserve their functional conformation. Many cell surface receptors require homo- or hetero-dimeric interactions that occur only within the cell membrane environment. Combinatorial approaches allow the selection of cell membrane ligands in an unbiased functional assay, without any preconceived notions about the nature of the cellular receptors. Thus, unknown receptors can be targeted. Despite these advantages, it is often difficult to isolate specific ligands due to the high complexity of targets expressed simultaneously on a given cell population.

To address these problems, a new *in vitro* approach has been developed to improve the selection of phage at the level of single cells or small clumps of cells. This method,

Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL), is based on a procedure that allows cell-phage complexes to be separated from the remaining unbound phage in a single differential centrifugation step (FIG. 1). As described herein, BRASIL has been successfully used to isolate phage in various cell systems.

BRASIL involves the addition of cells to centrifuge tubes containing an first (preferably aqueous) phase layered over a second (preferably organic) phase, as described below. Upon centrifugation, the cells and any bound phage end up in a pellet at the bottom of the second phase, while non-bound phage remain in the upper first phase. This gentle separation technique helps to preserve the phage-receptor interaction for targeting peptides that are not tightly bound to receptor.

In preferred embodiments, the first phase is aqueous and the second phase is organic. As organic phases are generally immiscible with aqueous phases, this prevents mixing and dilution of the phase components and consequent changes in density. Use of an aqueous phase for binding of phage to cells is preferred, as it mimicks the *in vivo* environment in which protein interactions normally occur. An organic second phase is also preferred since it is likely to reduce background by interfering with non-specific hydrophobic interactions, while retaining specifically bound phage by increasing the strength of ionic interactions or hydrogen bonding.

BRASIL may be used to isolate phage displaying peptide sequences that bind to specific markers of different cell subpopulations from any selected organ, tissue or cell type. Cell subpopulations may be purified *ex-vivo* by Ficol gradient and/or identified by Fluorescent Activated Cell Analysis (FACS) before the BRASIL method is implemented. This improved *in vitro* panning method may be used to retrieve phage that bind to markers found only in certain cell subpopulations. Fine Needle Aspirations (FNAs) of organs are excellent sources of cells to perform biopanning with BRASIL. The skilled artisan will realize that the BRASIL technique is applicable for identifying targeting peptides directed against a wide range of organs, tissues and cell types.

Materials and Methods

Reagents and cells

A phage library displaying random cyclic peptides with the structure CX₆C (C, cysteine; X, any amino acid residue) was used for the screenings. Phage libraries and clones were produced according to Koivunen *et al.* (1999), using known methods (Smith, 1985; Smith and Scott 1993). Kaposi's sarcoma cells (KS1767 cell line) were maintained in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco-BRL, Rockville, Maryland). Dibutyl phthalate, and cyclohexane (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) were obtained commercially. Peptides used were synthesized to greater than 95% purity, cyclized, and analyzed by HPLC and mass spectrometry (AnaSpec, San Jose, California).

Ex-vivo procedure

In an exemplary *in vitro* procedure, prostate cells were harvested, washed and re-suspended in medium containing 1% BSA (100-300 μ l). A phage library (10⁹ phage) was added and left on ice for 4 h. After transfer to a 400 μ l eppendorf tube containing 200 μ l of dibutylphthalate (Sigma), the mixture was centrifuged for 10 min at 10,000 g. The tube bottom (containing the cell-phage complexes) was snap-frozen in liquid nitrogen to prevent cross-contamination with unbound phage in the upper aqueous phase. The frozen tube was carefully cut with a sharp razor blade and the pellet was transferred to a fresh Falcon tube. PBS (100-200 μ l) was added and the pellet homogenized by repeated pipeting. After adding 1 ml of *E. coli* K91kan bacteria and incubation for 1 hr, LB containing tetracycline was added and the admixture was grown overnight in a 37°C shaker. Phage bound to pelleted cells were recovered as bacterial plaques. Careful steps were taken to prevent any aggregates that could bias the biopanning results. The BSA-containing media was filtered through a 0.22 micron sterile mesh and the phage centrifuged in solution for 5 min at 16,000 g immediately prior to addition to the cells. This study showed that bound phage could be harvested from prostate cells using the BRASIL method (not shown).

BRASIL method optimization

Cells were harvested with phosphate-buffered saline (PBS) and 5 mM EDTA, washed with MEM, and re-suspended in MEM containing 1% BSA at 10⁶ cells/ml and incubated with phage in 1.5 ml Eppendorf tubes. After 4 h, 100 μ l of the cell-phage suspension was gently transferred to the top of a non-miscible organic lower phase (200 μ l

in a 400 µl-Eppendorf tube) and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes. The preferred organic phase combination consisted of a mixture of dibutyl phthalate:cyclohexane (9:1 [v/v]; $\rho = 1.03 \text{ g/ml}$). BRASIL has been attempted with other phthalate admixtures with the appropriate density (for example, dibutyl phthalate:diisooctyl phthalate; 4:6 [v/v]) with similar results. The tube was snap frozen in liquid nitrogen, the bottom of the tube sliced off, and the cell-phage pellet transferred to a new tube. Bound phage were rescued by infection with 200 µl of *E. coli* K91kan host bacteria in log phase. To evaluate binding specificity, phage and cells were incubated with the cognate or control synthetic peptides for competition assays.

Binding assays with phage clones

KS1767 cells were detached with cold EDTA and re-suspended in MEM containing 1% BSA. RGD-4C phage (Pasqualini *et al.*, 1997) were used as a defined ligand that displays a specific α_v integrin-binding motif. The cell suspension was incubated with RGD-4C phage or a control phage with no peptide insert (fd-tet phage). Increasing amounts of either phage were added to the cells in suspension and the cell-phage admixture was incubated for 4 hr on ice. BRASIL was performed on ice to minimize post-binding events such as ligand-receptor internalization by the target cells. The cells were separated by centrifugation through the organic phase as described above. Bound phage were recovered and phage TU were counted. To compare BRASIL to conventional cell panning methods that require an additional washing step, 200 µl of the cell suspension were incubated with phage for 4 hr on ice. Unbound phage from 100 µl aliquots were removed either by centrifuging over the organic phase or by washing the cells three times with 1 ml of PBS containing 0.3% BSA. Each condition was repeated at least three times. Competitive inhibition was tested with the synthetic RGD-4C peptide, containing the targeting sequence CDCRGDCFC (SEQ ID NO:9) were compared to control peptides CARAC (SEQ ID NO:5) or GRGESF (SEQ ID NO:10) used at the same molar ratios.

Results

The BRASIL technique was tested using RGD4C phage that bind to α_v -integrins (Pasqualini *et al.*, 1997) and the KS1767 cell line, which expresses high levels of α_v -integrins. It was first determined if the oil mixture would interfere with the

infection rate. Increasing amounts of oil were added to a bacterial culture and phage added to them. After 1hr infection, the cells were plated and the number of tetracycline resistant colonies (infected by phage) counted. No significant difference between the control (no oil added) and the oil mixtures could be detected (data not shown) suggesting that the oil mixture does not interfere with the infection rate and recovery of phage.

It was determined whether phage would pellet at the bottom of the tube if no cells were present. 10^9 TU of Fd (insertless) phage were added to the medium and centrifuged. No Fd phage could be detected at the bottom of the tube or in the oil phase. Next, it was tested if phage could be carried specifically by the cells to the oil phase and then recovered by infection with bacteria. For this, increasing amounts of RGD4C phage or Fd phage were added to KS1767 cells in suspension, incubated for 4 hr on ice and then centrifuged over the oil. As shown in FIG. 2A, the number of phage recovered from the cells increased with the number of phage added. The ratio between the number of RGD4C to Fd phage recovered (enrichment) varied consistently from 100 to 500-fold. The binding of the RGD4C phage to the KS1767 cells was specific and was mediated by the peptide expressed in the pIII protein, since a competition experiment with the corresponding soluble peptide completely inhibited the binding of the RGD4C phage binding to KS1767 cells, bringing the number of phage bound close to the number of Fd phage (background) (FIG. 2B). Negative control peptides (CARAC, SEQ ID NO:5 or GRGESP, SEQ ID NO:10) had no effect on RGD4C phage binding to KS1767 cells (not shown). The recovery of phage with or without the snap-freeze step was compared. No substantial decrease was noted in the amounts of test phage recovered (data not shown).

The recovery of phage with BRASIL was compared to standard biopanning methods requiring a washing step. The number of RGD-4C phage recovered by BRASIL was significantly higher (t test, $P<0.01$) than the number of the same phage recovered when a conventional phage-cell binding strategy involving washing was used (not shown). Conversely, significantly lower background (t test, $P<0.01$) with the negative control phage was observed (not shown). Given the significant increase in recovery of specific phage and the substantial decrease in background, the overall accuracy improved consistently by more

than one order of magnitude when BRASIL was used relative to conventional cell panning methods.

Example 2. VEGF targeting peptide identified by BRASIL

Diabetic retinopathy is the formation of new blood vessels (angiogenesis) in the retina and cornea, induced by hyperglycemia. Although the neovascularization process of the retina is not fully understood, growth factors, especially vascular endothelial growth factors (VEGFs) play an important role in this process.

Intraocular neovascularization is a pathological complication of many eye diseases and is the leading cause of blindness in the world. Although hyperglycemia *per se* seems to be the main cause of diabetic retinopathy (Engerman and Kern, 1986), it is the induction of growth factors that start the angiogenic process. Among several possible candidates, vascular endothelial growth factor (VEGF) seems to be most important mediator of the ischemia-induce neovascularization since several anti-VEGF therapies prevent ocular angiogenesis in animal models. VEGF is produced by several retinal cell types (ganglion cells, RPE, pericytes, endothelial cells, astrocytes and Müller cells). Its expression is upregulated by hypoxia and it diffuses freely through the eye.

Angiogenesis is a complex process, which seems to be balanced by the presence of activators and inhibitors (Hanahan and Folkman, 1996). VEGF is a major activator and regulator of both physiological and pathological neovascularization (reviewed by Ferrara and Davis-Smyth, 1997). It is a relative specific mitogen for vascular endothelial cells and elicits a pronounced angiogenic response in a variety of *in vivo* models. VEGF belongs to a multigene family with 5 members described so far: VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF and the orf virus VEGF (also called VEGF-E). Alternative exon splicing of the genes produces multiple species of mRNA with distinct biological effects (Tischer et al., 1991; Veikkola and Alitalo, 1999). VEGFs are also produced as homo- and heterodimers, although very little is known about the function of the VEGF heterodimers.

Materials and Methods

Cells and Reagents

Recombinant human VEGF₁₆₅ (Pharmingen, San Diego, California), recombinant human VEGFR-1 (Oncogene Research Products, Boston, Massachusetts), recombinant rat NRP-1/Fc, rat NRP-2/Fc, human VEGFR-2/Fc (all three receptor/chimeras with the Fc region of human IgG₁), PDGF-BB, anti-VEGFR-1 (polyclonal anti-Flt1), and anti-human VEGF polyclonal antibody (R&D Systems Minneapolis, Minnesota) were all obtained commercially. HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) were purchased from Clonetics and cultured according to the manufacturer's instructions. Anti-mouse CD13 antibodies R3-63 and 2M-7 were produced and characterized as described (Hansen et al., 1993). The anti-M13 polyclonal antibody (Amersham-Pharmacia) was obtained commercially. Anti-CD31 antibody was purchased from Pharmingen (CA), anti-smooth muscle actin conjugated to Cy3 or FITC was purchased from Sigma. Anti-desmin polyclonal serum was purchased from Daiko. Aminopeptidase-N (leucine aminopeptidase) was purchased from Sigma. HUVEC were cultured and used between passages 2 and 8, according to the manufacturer's protocol (Clonetics, San Diego, California). In order to minimize receptor-mediated internalization, cells and media were kept on ice unless otherwise stated.

BRASIL

Cells were harvested with PBS, 5 mM EDTA (5 minutes), washed with PBS and resuspended in MEM containing 1% BSA (MEM 1% BSA) at 10^6 cells/ml. Phage was added to the cell suspension and incubated on ice. After 4 hr, 100 μ l of the cell suspension was transferred to 400 μ l eppendorf tubes containing 200 μ l of dibutyl phthalate:cyclohexane mixture (9:1) and centrifuged at 10,000g for 10 minutes. Cells with bound phage migrated to the bottom of the tube within the oil phase and the unbound phage remained at the top of the oil in the soluble phase. The tubes were snap-frozen in liquid N₂, the pellet cut off, transferred to a new eppendorf and phage rescued by infection with 200 μ L of *E.coli* K91kan cells in log-phase, then diluted and plated onto LB plates supplemented with tetracycline.

HUVEC biopanning by BRASIL phage display

A two-step biopanning strategy was designed to isolate phage that bind to angiogenic endothelial cells. To decrease non-specific binding, the phage library was pre-cleared on starved HUVEC cells before panning on the same cell line stimulated with VEGF₁₆₅. After centrifugation through the organic phase, phage bound to the VEGF₁₆₅-stimulated HUVEC pellet were recovered by bacterial infection, amplified, and subjected to two more rounds of selection.

Phage peptide libraries were obtained, expanded and manipulated as described (Pasqualini et al., 1999). HUVEC at 80% confluence cultured in endothelial basal medium (EBM-2; Clonetics) without supplements for 24 hr were defined as "starved HUVEC." The medium was then replaced by EBM-2 supplemented with 20 ng/ml VEGF₁₆₅ and the cells cultured under these conditions for another 18 hr were defined as "VEGF₁₆₅-stimulated HUVEC." Both, starved and VEGF₁₆₅-stimulated HUVEC were harvested with ice-cold PBS and 5 mM EDTA, washed once with EBM-2 plus 1% BSA, and re-suspended in the same medium at 10⁷ cells/ml. In the pre-clearing step, starved HUVEC (10⁶ cells) were incubated with 10⁹ TU of unselected CX₆C phage library for 2 hr on ice; the mixture was then centrifuged through the organic phase. In a screening step, the unbound phage left over in the aqueous upper phase (supernatant) was transferred to a fresh tube and incubated with VEGF₁₆₅-stimulated HUVEC (10⁶ cells). After 4 hr on ice, the cell-phage complexes were separated by centrifugation through the organic lower phase. The phage population in the cell pellet was recovered by infection of 200 µl of *E. coli* K91kan host bacteria growing in log phase. This procedure was repeated 3 times using the phage obtained from the previous round. After the third round of biopanning, 32 phage were randomly selected and sequenced for analysis.

Binding assays on purified receptors.

Human VEGFR-1, human VEGFR-2, rat NRP-1, and rat NRP-2 (1 µg in 50 µl of PBS) were immobilized on microtiter well plates overnight at 4°C. The wells were washed twice with PBS, blocked with PBS containing 3% BSA for 2 h at room temperature, and then incubated with 10⁹ TU of either CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) phage, CNIRRGQC

(SEQ ID NO:11) phage, or fd-tet phage in 50 μ l of PBS/1.5% BSA. After 1 hr at room temperature, wells were washed nine times with PBS and phage were recovered by bacterial infection. Serial dilutions were plated onto Luria-Bertani (LB) medium supplemented with tetracycline. VEGF₁₆₅, PDGF-BB, or synthetic peptides were used at the indicated concentrations and pre-incubated with the immobilized proteins to evaluate competitive inhibition of phage binding. ELISA with either polyclonal anti-VEGFR-1 serum or anti-human IgG (VEGFR-2, NRP-1, and NRP-2) confirmed the presence and concentration of the immobilized receptors on the microtiter plates. To show that the VEGF receptors were functionally active, VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) was incubated with the immobilized receptors for 2 hr at room temperature. Following three washes, VEGF₁₆₅ binding was evaluated by ELISA by using anti-VEGF specific antibodies (data not shown).

Results

Biopanning on VEGF stimulated HUVEC

An advantage of BRASIL is that the unbound phage left in the upper aqueous phase can be used for a new round of panning with minimal loss. This approach was used to first pre-clear the phage display library with starved HUVEC before biopanning with VEGF₁₆₅-activated HUVEC (FIG. 3). The VEGF₁₆₅-activated cells were then collected by BRASIL and the phage bound to them amplified and submitted to another round of selection.

To test the selection method, 21 phage randomly chosen clones were examined for binding to starved HUVEC and to VEGF-stimulated HUVEC. Fourteen out of 21 clones (67%) had a greater than 150% enhancement (range, 1.5 to 8.7-fold; median, 2.2-fold) in the ratio of cell binding upon VEGF stimulation normalized to control insertless phage (data not shown). After three rounds of BRASIL selection on VEGF₁₆₅-activated cells, 34 phage were randomly selected for sequencing. Alignment analysis of the 34 insert sequences revealed that 24 clones (70%) of the phage recovered by BRASIL displayed peptide motifs that could be mapped to sequences present in VEGF family members (not shown). Peptides with homology to the VEGF family are shown in Table 3 below.

A phage clone displaying a peptide sequence CPQPRPLC (SEQ ID NO:6, referred to hereafter as "clone 19") was very similar in sequence to a portion of the VEGF-B

WO 02/20822

PCT/US01/28124

isoform 167 protein. Three different peptides contained the motif $IRR^{E/Q}$. The motif $IRR^{E/Q}$ did not show substantial homology with known protein sequences and further experiments focussed on CPQPRPLC (SEQ ID NO:6).

Table 3. Targeting peptides with homology to VEGF family members

<u>Clone #</u>	<u>Sequence</u>	<u>Homologies</u>
Peptide #1	CEGESASC SEQ ID NO:40	VEGF-D
Peptide #3	CVPMRLQC SEQ ID NO:41	VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, PIGF-1, PIGF-2
Peptide #4	CLGKGSVC SEQ ID NO:42	VEGF-A, VEGF-D
Peptide #6	CLSPIGEC SEQ ID NO:43	VEGF-A
Peptide #7	CNLSVPAC SEQ ID NO:44	VEGF-A, VEGF-D
Peptide #9	CIIGSYVC SEQ ID NO:45	PIGF-1, PIGF-2
Peptide #11	CADVLRPC SEQ ID NO:46	VEGF-D
Peptide #12	CWRSVEVC SEQ ID NO:47	VEGF-B, VEGF-C
Peptide #13	CSIRRESC SEQ ID NO:48	VEGF-C, VEGF-D
Peptide #17	CAVVSQC SEQ ID NO:49	VEGF-B
Peptide #18	CLANLQTC SEQ ID NO:50	VEGF-A, VEGF-C
Peptide #19	CPQPRPLC SEQ ID NO:6	VEGF-B, PIGF-1, PIGF-2
Peptide #21	CNIRRGQC SEQ ID NO:51	VEGF-C, VEGF-D
Peptide #23	CIRREKRC SEQ ID NO:52	VEGF-C, VEGF-D, PIGF-1, PIGF-2
Peptide #24	CAGKSSNC SEQ ID NO:53	VEGF-D
Peptide #25	CRECGERC SEQ ID NO:54	PIGF-1
Peptide #26	CMARQARC SEQ ID NO:55	VEGF-A
Peptide #28	CLPISSSC SEQ ID NO:56	VEGF-D

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Peptide #29	CGRAKVRC SEQ ID NO:57	PIGF-1, PIGF-2
Peptide #30	CASGSENC SEQ ID NO:58	VEGF-D
Peptide #31	CMRGKGLC SEQ ID NO:59	VEGF-A, PIGF-2
Peptide #32	CAGGGAYC SEQ ID NO:60	VEGF-A, VEGF-B
Peptide #33	CAAAPIRC SEQ ID NO:61	VEGF-B, VEGF-C
Peptide #36	CGRDSKQC SEQ ID NO:62	VEGF-D

Other HUVEC binding peptides that were not homologous to VEGF included CVFAILAC (SEQ ID NO:128), CGVQYVNC (SEQ ID NO:129), CSYKANSC (SEQ ID NO:130), CYQSSSGC (SEQ ID NO:131), CRGGGRLC (SEQ ID NO:132), CGSDRWLC (SEQ ID NO:133), CLVYNPAC (SEQ ID NO:134), CIPGTS LC (SEQ ID NO:135), CATEAVGC (SEQ ID NO:136) and CWGQNQAC (SEQ ID NO:137).

In vitro phage display was used with different recombinant VEGF receptors to determine if the clone 19 peptide bound to one or more of the VEGF receptors. As shown in FIG. 4, clone-19 bound to human VEGF-R1 as well as to rat Neuropilin-1 (NRP-1) but not to the human VEGF-R2. This result is consistent with the binding profile of VEGF-B (Olofsson et al., 1999). The lack of binding to VEGF-R2 was not due to absence of activity, since all three immobilized receptors showed similar VEGF₁₆₅ binding activity (data not shown). The clone 19 phage exhibited over a 1,000-fold enrichment of binding to VEGF-R1 over fd-tet phage (not shown). Clone 19 phage did not bind to the neuropilin-2 (NRP-2) receptor (not shown).

The VEGF₁₆₅ and VEGF-B isoforms are known to compete for binding to VEGF-R1 (Olofsson et al., 1999). The interaction of clone-19 with VEGF-R1 and NRP-1 could be blocked by competition with VEGF₁₆₅ (FIG. 4A) but not by up to 200 ng/ml of PDGF-BB (data not shown). The competition with VEGF₁₆₅ was concentration dependent and 100% inhibition was obtained with as low as 10ng/ml of VEGF₁₆₅ (FIG. 4B). Binding of clone 19 phage could also be blocked by the cognate peptide CPQPRPLC (SEQ ID NO:6), but with differential effects (not shown). The CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) peptide was

WO 02/20822

PCT/US01/28124

approximately 100-fold more efficient in blocking phage binding to VEGF-R1 than to NRP-1 (not shown).

These results show that CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) is a chimeric VEGF-B-family mimotope that interacts specifically with VEGFR-1 and NRP-1. VEGF-B₁₆₇ is a possible mitogen for HUVEC cells (Olofsson *et al.*, 1996). As shown in FIG. 5, 10^{10} T.U. of phage clone-19 significantly induced proliferation of HUVEC compared to unstimulated cells or the RGD4C phage, which also binds to HUVEC.

VEGF-B has two mRNA splice variants generated by the use of different, but overlapping, reading frames of exon 6 (isoforms 167 and 186), which diverge in sequence in their carboxy termini (Olofsson *et al.*, 1999). The pentapeptide sequence PRPLC is found in the VEGF-B₁₆₇ carboxy terminus region encoded by exon 6B, starting at the second residue after the boundary between exons 5 and 6B. PRPLC is a neuropilin-1 (NRP-1) binding domain (Makinen *et al.*, 1999). On the other hand, the tetrapeptide sequence PQPR, which overlaps with PRPLC and also with the clone 19 peptide, is found in the carboxy terminal of VEGF-B₁₈₆, and is encoded by exon 6A. PQPR is embedded within a 12-residue known NRP-1 binding site (Makinen *et al.*, 1999).

HUVEC cells were also panned against a CX7C phage library. The targeting phage peptide sequences identified are shown in Table 4 below.

Table 4. CX7C Peptides binding to HUVEC cells.

CTSWWFWSC	SEQ	ID	CEWWPEWLC	SEQ ID NO:142
NO:138			CARYLWSWC	SEQ ID NO:143
CEWSGIWAC	SEQ	ID	CAWWRFGLC	SEQ ID NO:144
NO:139			CRGEWGMMC	SEQ ID NO:145
CNPLFWWWC	SEQ	ID	CFWPFESWC	SEQ ID NO:146
NO:140			CSNAVWHAC	SEQ ID NO:147
CGGWLFPFC	SEQ	ID	CSWYWWLGC	SEQ ID NO:148
NO:141			CGGWLFPFC	SEQ ID NO:149

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CIEWGSRDC NO:150	SEQ	ID	CGGWLFPFC	SEQ ID NO:157
			CTRVGPKRC	SEQ ID NO:158
CVRSSVVAC NO:151	SEQ	ID	CKSGQIAC	SEQ ID NO:159
			CWWPWGGWC	SEQ ID NO:160
CEDSSRANC NO:152	SEQ	ID	CDWGLWWLC	SEQ ID NO:161
			CRGWADRKC	SEQ ID NO:162
CGGWLFPFC NO:153	SEQ	ID	CGGWLFPFC	SEQ ID NO:163
			CTQVRFSGC	SEQ ID NO:164
CLLVGQVRC NO:154	SEQ	ID	CPWWWFGEK	SEQ ID NO:165
			CGGWLFPFC	SEQ ID NO:166
CPRYLFWLC NO:155	SEQ	ID		
CYRSAGAGC NO:156	SEQ	ID		

Discussion

A VEGF receptor ligand was identified with the sequence CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) that resembles the motif PRPLC (an NRP-1 binding site found in VEGF-B₁₆₇) and the motif PQPR (embedded within a 12-residue NRP-1-binding epitope of VEGF-B₁₈₆) (Makinen *et al.*, 1999). Thus, the VEGF-B mimotope CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) appears to be a chimera between binding sites in different VEGF-B isoforms. These results suggest that the carboxy terminal regions of both VEGF-B isoforms may bind to and activate VEGF-R1 and NRP-1. They also suggest that the peptide CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) may mimic the effects of both VEGF-B isoforms in its interactions with the VEGF-R1 and NRP-1 receptors. The observed differential effects on VEGF-R1 and NRP-1 using the synthetic peptide CPQPRPLC (SEQ ID NO:6) to compete with phage binding suggests that the peptide chimeric motif interacts with VEGF receptors differentially. This may be due to the number of binding sites in each receptor or the affinity of the binding sites for the chimeric peptide.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

These results show that BRASIL will be of use to target cell populations derived from patient samples. The method can easily be used, for example, in tandem with fine needle aspirates of solid tumors or fluorescence activated cell sorting of white blood cells from patients with leukemia. Because unbound phage in the upper aqueous phase may be recovered with minimal losses, pre-clearing strategies are facilitated by BRASIL. This allows improved protocols for targeting peptide identification by phage display, for example by subtracting phage binding to cells from normal individuals before isolation of phage binding to diseased cells. The BRASIL method allows a decrease in non-specific background of phage binding.

Multiple samples and several rounds of pre-clearing and selection can be performed in a few hours, allowing method automation and facilitating high-throughput screening. Data (shown below) suggest that BRASIL may enable targeting of organs with a significant reticuloendothelial component such as spleen, liver, and bone marrow which has not been feasible with currently available *in vivo* phage display technology (Pasqualini *et al.*, 2000). The method may also be used with phage displaying larger polypeptides or folded proteins such as enzymes or antibodies (not shown), providing a phage display based approach to high throughput screening for novel inhibitors or activators of naturally occurring enzymes, receptors or other proteins. The data show that BRASIL is superior to conventional protocols for identifying targeting ligand-receptor pairs and to probing the molecular diversity of cell surfaces.

Example 3: BRASIL with a leukemia cell line

The BRASIL protocol has also been performed with the Molt-4 leukemia cell line and a CX5C library, using the methods described above. The library was presubtracted against a normal Molt-4 cell line and then screened against a Molt-4 cell line transformed with a gene encoding the CD-13 protein. Molt-4 leukemia targeting peptides are listed in Table 5 below.

Table 5. Targeting peptides against the Molt-4 leukemia cell line

CEKRWGC	SEQ ID NO:167	CSVWFGC	SEQ ID NO:7
CKQRGVC	SEQ ID NO:168	CQVRLSC	SEQ ID NO:169

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CTWDKRC	SEQ ID NO:170	CRSPMKC	SEQ ID NO:186
CTLFRNC	SEQ ID NO:171	CPTMTEC	SEQ ID NO:187
CRGSAYC	SEQ ID NO:172	CSVWFGC	SEQ ID NO:188
CAISVGC	SEQ ID NO:173	CSVWYGC	SEQ ID NO:189
CTNPQRC	SEQ ID NO:174	CSVWYGC	SEQ ID NO:190
CDSWPLC	SEQ ID NO:175	CWILEQC	SEQ ID NO:191
CENGSRG	SEQ ID NO:176	CMATLRC	SEQ ID NO:192
CGGSSQC	SEQ ID NO:177	CRKLGGC	SEQ ID NO:193
CGREGPC	SEQ ID NO:178	CRAREMC	SEQ ID NO:194
CSGRSGC	SEQ ID NO:179	CQAWQRC	SEQ ID NO:195
CQQGRYC	SEQ ID NO:180	CKDRWGC	SEQ ID NO:196
CVKQMRC	SEQ ID NO:181	CYSDKKC	SEQ ID NO:197
CSVVWGC	SEQ ID NO:182	CGNHQKC	SEQ ID NO:198
CSGPC	SEQ ID NO:183	CPNDSLC	SEQ ID NO:199
CEGHQSC	SEQ ID NO:184	CQGTWIC	SEQ ID NO:200
CNVVYGC	SEQ ID NO:185	CMVYFGC	SEQ ID NO:8

A consensus sequence identified for the leukemic cell line targeting peptides was CXVWXGC (SEQ ID NO:201).

Example 4: Identification of targeting peptides for urothelial tissue by BRASIL

Targeting peptides for urothelial tissue have not previously been identified by phage display. The present example further demonstrates the utility of the BRASIL method for identifying novel targeting peptides and illustrates additional embodiments of the methods and compositions.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Materials and Methods

Materials

The human cell lines T24, RT4, MDA-MB-435S, and MOLT-4 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). All tissue culture media were from Life Technologies (NY). Cells were grown under standard conditions at 37°C with 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Human urothelial cells were isolated from fresh ureter specimens and cultured using supplemented Keratinocyte SFM Medium. Pig bladders were obtained from Dr. K. Wright (Department of Veterinary Medicine, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). Phage display libraries were prepared and amplified with the K91kan *E. coli* strain as described above. Synthetic peptides were from Anaspec (San Jose, CA).

Panning of phage

Urothelial cells were isolated from fresh ureter specimens of patients undergoing nephrectomy for renal cell carcinoma. Ureters were freed of connective and fat tissue, slit open and the mucosa gently scraped into PBS under sterile conditions. Cells were then pelleted and resuspended in RPMI/ 10%BSA. Approximately 1×10^7 cells in 200 μ l RPMI/ 10% BSA were then incubated with 1×10^7 cfu of a cyclic CX₇C-phage library, a linear X₆-library or amplified phage from a previous round of biopanning for 4 hours on ice. In two separate experiments the library or amplified phage from previous rounds were precleared on 1×10^7 MOLT-4 cells for 30 min on ice prior to adding to the normal urothelial cells. After incubation, panning was continued using the BRASIL method described above. In brief, cells were placed on an oil cushion consisting of 90% dibutylphthalate and 10% cyclohexan (Sigma, St.Louis, MO), in a 400 μ l Eppendorf tube and pelleted for 10 min at 10,000 rpm in an Eppendorf centrifuge. The tubes were then frozen in liquid nitrogen and the lower part of the tube containing the cell pellet cut off. The pellet was reinfected with 1 ml of log-phase K91 bacteria for 1 hour after removal of excess oil and amplified over night. Small aliquots were plated out for single colony picking and sequencing. Up to 3 rounds were performed.

Sequencing and alignments

After each round the peptide inserts of 94 randomly selected phage clones were sequenced by DNA sequencing using the primer 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3' (SEQ ID NO:12) and the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Peptide sequences were aligned using the ClustalW alignment program (European Bioinformatics Institute homepage, (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>)). Enriched peptide sequences were aligned to protein databases using the BLAST program of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Similarity was defined as percentage of positive matches in the area aligned by the program.

Phage attachment and competition experiments

Binding of selected phage was examined with human adherent primary urothelial cells, the breast cancer cell line MDA-MB-435 and the transitional carcinoma cell lines RT4 and T24. All cells were grown to subconfluency in 48 well plates and free binding sites were blocked with 800 μ l 30% FCS/ DMEM (blocking medium) for 1hour at 37°C. The blocking solution was then replaced by 200 μ l 10% FCS/DMEM (washing medium) containing 1×10^8 cfu of each phage per well. After incubation for 2 hours at 4°C to prevent unspecific endocytosis, unbound phage were removed by washing 7 times with 500 μ l washing medium. For competition experiments increasing concentrations of the corresponding peptide or a control peptide (CARAC, SEQ ID NO:5) were added during the incubation. Bound phage were determined by infection with 500 μ l log phase K91 culture and plating of serial dilutions. Values represent means of serial dilutions of triplicates wells and are given relative to binding of insertless fd-tet phage.

To determine binding to intact mucosa a novel dot blot chamber assay was developed, placing the bladder or ureter specimen into a dot blot chamber (Biorad, Hercules, CA), with the mucosa facing upwards, thus generating up to 96 equally large fields of mucosa. Blocking and washing in the dot blot chamber was performed as above but with 400 μ l of the corresponding medium and infection was performed with 400 μ l of log-phase K91kan culture per well. Three wells were pooled as one well.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Removal of the glucosaminoglycan- (GAG-) layer on intact mucosa samples was performed as a dot blot chamber assay. Half of the wells were incubated with 200 μ l 0.1M HCl per well for 2 min, intensely rinsed with blocking solution and both parts blocked as before. Results are given relative to fd-tet phage to untreated mucosa, that was set to 1.

Results

To identify peptide motifs that interact with the human bladder wall, clones were selected from phage display peptide libraries by successive rounds of affinity panning on freshly isolated urothelial cells from surgical ureter specimens. In four experiments two different libraries, a cyclic 7mer and a linear 6mer library, were panned on human urothelial cells, with or without prior subtraction against MOLT-4 leukemia cells using the BRASIL method. Up to four rounds of selection were performed and 94 clones sequenced after every round. Five peptide motifs were identified by aligning all obtained sequences with the ClustalW program (Table 6).

Table 6. Selection of Peptides Binding to Human Urothelial Cells

Peptide Sequence	Shared Motif	Found in Round
CGQEISGLC* (SEQ ID NO:13)	ISGL (SEQ ID NO:35)	2
EVISGL (SEQ ID NO:14)		1
LISGVL (SEQ ID NO:15)		1
ELLSGL (SEQ ID NO:16)		1
GRLSGSL (SEQ ID NO:17)		2
CLRSGLTC (SEQ ID NO:18)	GGLS (SEQ ID NO:36)	2
LGGLSA (SEQ ID NO:19)		2
CWGGLSGLC* (SEQ ID NO:20)		1
CGLSLK (SEQ ID NO:21)		1
GLSARH (SEQ ID NO:22)		1 [#] (2x)
CEFGLSEVC (SEQ ID NO:23)		1
SKHALE (SEQ ID NO:24)	HALE (SEQ ID NO:37)	1 [#]
VHALES* (SEQ ID NO:25)		3
VFALEG (SEQ ID NO:26)		2

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CRIRMSAGC* (SEQ ID NO:27)	MSAG	1 [#]
AMSAGV (SEQ ID NO:28)	(SEQ ID NO:38)	2
CMIAGLGRC (SEQ ID NO:29)		1 [#]
CRVIVGPRC (SEQ ID NO:30)	RVTXG	1 [#]
CRVFAGKRC (SEQ ID NO:31)	(SEQ ID NO:39)	1
DRVTLG* (SEQ ID NO:32)		3
CRVTRGHGC (SEQ ID NO:33)		1 [#]
CIRVEAGSC (SEQ ID NO:34)		1 [#]

Phage selected after subtraction to MOLT-4 cells are indicated by a [#]. Phage chosen for binding assays are indicated by *.

Phage containing the five peptide motifs were amplified, carefully titered and their binding to cultured human urothelial cells tested in a subconfluent monolayer. Insertless fd-tet phage were used as a negative control. Phage containing the consensus motifs bound up to 12.7 times higher to cultured urothelial cells than insertless fd-tet phage (FIG. 6). Binding was specific for urothelial cells as determined by a lack of binding to the human breast cancer cell line MDA-MB-435S, derived from a metastatic, ductal mammary carcinoma (FIG. 7).

Binding to the urothelial tumor cell lines T24, derived from a poorly differentiated recurrent transitional cell carcinoma and RT4, derived from a transitional cell papilloma was also examined. All phage, except CWGGLSGLC (SEQ ID NO:20) bound to RT4, while only CGQEISGLC (SEQ ID NO:13) phage bound to T24 tumor cells (FIG. 7). VHALES (SEQ ID NO:25) phage apparently bound only to RT4 tumor cells. Binding specificity of VHALES (SEQ ID NO:25) was verified by competitive phage binding inhibition (FIG. 8). Binding was 5.4 fold higher than fd-tet phage and binding was reduced by soluble VHALES (SEQ ID NO:25) peptide in a dose-dependent manner, while remaining unchanged by equal amounts of the control peptide CARAC (SEQ ID NO:5) (FIG. 8).

Binding of the motifs to intact bladder mucosa was examined using a novel dot blot chamber binding assay that allows the simultaneous testing of phage binding in up to 96

equal parts of bladder or ureter mucosa. Binding to intact porcine bladder and human ureter mucosa was determined with this assay. Selected phage displaying a consensus motif bound 3.8 to 11.7 times higher to porcine bladder mucosa than fd-tet phage (FIG. 9).

Using the same assay the influence of the glucosaminoglycan (GAG) layer on binding of several phage to intact mucosa was examined. The GAG-layer was removed as described above. Half of the mucosa of human ureter and porcine bladder specimens were treated inside the dot blot chamber with 0.1M HCl for 2min, extensively washed and the binding assay performed as before.

Binding of phage after GAG-removal was compared relative to that of untreated mucosa, which was set to 1. The binding of the control phage fd-tet and CRIRMSAGC (SEQ ID NO:27) phage remained unchanged by the treatment, while CWGGLSGLC (SEQ ID NO:20) phage binding increased 4.2 fold. VHALES (SEQ ID NO:25) phage binding was reduced by 50% (FIG. 10). When tested on a human ureter sample GAG-removal increased CWGGLSGLC phage binding 3.4 fold (data not shown). This suggests a negative influence of the GAG-layer on binding of CWGGLSGLC (SEQ ID NO:20) phage.

These results show a number of new targeting peptide sequences and conserved motifs targeted to urothelial tissues. Further modifications of the BRASIL protocol are demonstrated herein, along with the utility of those novel methods for identification and characterization of targeting peptide sequences. The skilled artisan will realize that the disclosed methods and compositions are not limited to urothelial cells or tissues, but rather have broad applicability to a variety of organs, tissues and cell types found in humans.

Example 5. BRASIL and stem cell screening

Another non-limiting example of cell types that may be screened for targeting peptide sequences by BRASIL includes stem cells. In the discussion below, the stem cells are obtained from bone marrow. However, the skilled artisan will realize that the disclosed methods are applicable for stem cells in general.

Source of cells and culture

Mesenchymal cells are primary stem cells derived from bone marrow, obtained by seeding human bone marrow aspirate onto plastic flasks. Cells that attach to the flask are

the mesenchymal cells. Mesenchymal cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum at 37°C (5% CO₂) and sub-cultured every 4-5 days. KS1767 cells were grown in MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and sub-cultured every 3-5 days.

Biopanning on mesenchymal cells

A subtraction strategy was performed in which the phage library was first prescreened against KS1767 cells and phage binding to the KS1767 non-stem cell line were removed. The pre-screened library was then screened against mesenchymal cells using the BRAZIL method.

All procedures were performed at 4°C. All media and solutions used for the biopanning were filtered through a .22 µm Millipore filter. The mesenchymal and KS1767 cells were washed with PBS and incubated with PBS plus 5mM EDTA for 10 minutes on ice to promote detachment of the cells from the plastic. Cells were collected by aspirating the medium, washed by centrifugation with RPMI 1640 medium and re-suspended at 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% BSA (bovine serum albumin). A CX7C phage display library (or phage obtained from the previous round of biopanning) was added to the KS cells (10⁹ T.U. of phage per 10⁵ cells) and incubated for 1-2h on ice. **Unbound** phage were selected by BRASIL after KS1767 cells were exposed to phage and centrifuged over dibutyl phthalate:cyclohexane (6:1) at 4°C. Under these conditions, cells carrying bound phage pellet at the bottom of the tube. Unbound phage remain in the upper (aqueous) phase. The upper phase was carefully transferred to a new tube containing 10⁵ mesenchymal cells and further incubated for 4 h on ice. **Bound** phage attached to mesenchymal cells were then selected by BRASIL. The mesenchymal cell suspension with phage was centrifuged over dibutyl phthalate:cyclohexane (6:1) at 4°C. Mesenchymal cells carrying the bound phage pelleted at the bottom of the tube. The tube was snap frozen at -80°C for 10 minutes and the bottom of the tube containing the pellet of cells with bound phage was cut off, transferred to a new tube and the pellet carefully resuspended with 200 µl of a log-phase *E.coli* K91 culture to recover the phage. After 20 minutes of infection, 20 ml of LB medium (Luria-Bertani) was added and the cells cultured for 16-18 h at 37°C

WO 02/20822

PCT/US01/28124

with agitation for phage amplification. After the initial selection, phage obtained from a previous round was used for the next round of selection.

After 3 rounds of biopanning, individual colonies were selected for sequencing. The stem cell binding peptides are listed in Table 7 below.

Table 7. Stem cell (mesenchymal) targeting peptides

CLGRLTVLC NO:63)	(SEQ	ID	CERSIGFAC (SEQ ID NO:74)
			CSVPVSSSC (SEQ ID NO:75):
CTAWFIESC NO:64)	(SEQ	ID	CYPGYDSYC (SEQ ID NO:76)
			CPWYWFGTC (SEQ ID NO:77)
CSYGRASLC NO:65)	(SEQ	ID	CECRGDCYC (SEQ ID NO:78)
			CVKKGFWC (SEQ ID NO:79)
CDAGPWTAC NO:66)	(SEQ	ID	CSMTKLGAC (SEQ ID NO:80)
			CGVLKPYLC (SEQ ID NO:81)
CVGVGRSRC NO:67)	(SEQ	ID	CWWPWGWGC (SEQ ID NO:94)
			CSWWTPGFC (SEQ ID NO:95)
CTNPWSPVC NO:68)	(SEQ	ID	CNSRAGSVC (SEQ ID NO:96)
			CLRLSMSAC (SEQ ID NO:97)
CGGSYDEV NO:69)	(SEQ	ID	CNSRAGSVC (SEQ ID NO:98)
			CMSGNTERC (SEQ ID NO:99)
CAPMEWSVC NO:70)	(SEQ	ID	CGHLGSVYC (SEQ ID NO:100)
			CVLADPTGC (SEQ ID NO:101)
CTRVHGLAC NO:71)	(SEQ	ID	CECRGDCYC (SEQ ID NO:102)
			CWWGWGWTG (SEQ ID NO:103)
CESLSHVDC NO:72)	(SEQ	ID	CWKGFWWC (SEQ ID NO:104)
CLWTQSSGC NO:73)	(SEQ	ID	

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CKRSATILC NO:105)	(SEQ ID	CSERIARVC (SEQ ID NO:86)
CIEGRRGLC NO:106)	(SEQ ID	CPWYWLGWC (SEQ ID NO:87)
CPWYWLGWC NO:107)	(SEQ ID	CGRKNEWAC (SEQ ID NO:88)
CVRQGEDAC NO:108)	(SEQ ID	CARDRIAC (SEQ ID NO:89)
CSLAVPLAC NO:109)	(SEQ ID	CGQMNREVC (SEQ ID NO:90)
CMMHGLAAC NO:110)	(SEQ ID	CDAYPLFFC (SEQ ID NO:91)
CDWWTAWC NO:111)	(SEQ ID	CWKGFGWWC (SEQ ID NO:92)
CGWWGLWPC NO:112)	(SEQ ID	CLGSGSGSC (SEQ ID NO:93)
CPWYWFGTC NO:82)	(SEQ ID	CGWFSWFGC (SEQ ID NO:113)
CWVADGYRC NO:83)	(SEQ ID	CRVDFSKGC (SEQ ID NO:114)
CECRGDCYC NO:84)	(SEQ ID	CSSLATVVC (SEQ ID NO:115)
CSHAVMPWC NO:85)	(SEQ ID	CMYRTSLAC (SEQ ID NO:116)
		CLAAVYQSC (SEQ ID NO:117)
		CSRRVIGAC (SEQ ID NO:118)
		CSWWNWFGC (SEQ ID NO:119)
		CSRRPEVVC (SEQ ID NO:120)
		CVTGNRGC (SEQ ID NO:121)
		CVSWWFWGC (SEQ ID NO:122)
		CGWFSWWGC (SEQ ID NO:123)
		CSWWRFGYC (SEQ ID NO:124)

Receptor identification

The phage "D5" containing the peptide sequence CRVDFSKGC (SEQ ID NO:114) showed significant homology with the leptin hormone (Table 8). This region of leptin is conserved in several species (*Macaca mulatta*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*).

Table 8. Homology between phage D5 and leptin sequences

Phage	CRVDFSKGC (SEQ ID NO:114)
Human leptin	RDLLHMLAFSKSCHLP (SEQ ID NO:125)
Mouse leptin	RDLLHLLAFSKCSLP (SEQ ID NO:126)

The conserved peptide maps to a loop in between amino acids 90-96 in the protein (Zhang et al, 1997). This region of the leptin molecule has been indicated as important for leptin activity. A synthetic peptide DLLHLLAFSKCSLLP (SEQ ID NO:127) has been reported to block leptin activity *in vivo* (Grasso et al., 1997) (amino acids in bold indicate those with similarity to clone D5 (CRVDFSKGC, SEQ ID NO:114).

The present example shows that BRASIL can be used to identify targeting peptides against stem cells. The homology between one of the identified peptide sequences and an endogenous hormone further validates the identified sequences. The skilled artisan will realize that the methods and targeting peptide sequences identified herein are of potential use for identification and purification of stem cells (for example, by affinity chromatography) and for identification of receptor:ligand pairs present in stem cells.

Example 6. Bone Marrow screening by BRASIL

A non-limiting example of an organ of specific interest for targeting peptides is bone marrow. Bone is the preferred site of metastasis in the large majority of patients with prostate cancer (Fidler, 1999). This striking selectivity has been viewed as an example of site-specific interactions that were essential to cancer progression (Rak, 1995; Zetter, 1998). Despite the clinical relevance, little is known about the mechanisms that control prostate cancer spread to bone. In addition, there were no effective strategies for targeting therapeutic agents for the treatment of metastatic prostate cancer (Brodt et. al, 1996).

A subset of peptides capable of selective homing to bone marrow through the circulation is likely to simulate the behavior of prostate cancer cells during bone metastasis formation. The vascular markers targeted by using phage display might also be utilized by tumor cells to metastasize. This concept has already been proven to be true for lung-homing peptides. Peptides that home to lung blood vessels inhibit experimental metastasis. These results fit a "modified seed and soil" model, in which the basis for site-specific metastasis is the presence of homing receptors in blood vessels of certain tissues to which metastasis preferentially occurs. Such selective vascular markers are exposed to tumor cells during adhesion, the first step of the metastatic cascade. Isolation of bone marrow-homing peptides is of utility for identifying those vascular markers that mediate prostate cancer cell homing during the metastatic process, and for potential therapeutic intervention in preventing metastases to bone, or in selectively imaging and/or treating cancer that has already metastasized to bone.

Screening of phage display libraries on human bone marrow:

Fresh human ribs removed during surgery for access to underlying tumors were sectioned to expose the bone marrow surface. No significant damage to the bone marrow was inflicted to the tissue and the morphology was well preserved during after the procedure. The bone samples were washed (gently) 5 times with ice cold DMEM/0.15% BSA (sterile filtered). The marrow was removed by gently scraping cells from the bone. Cells were washed twice by centrifugation and resuspension in DMEM/BSA to remove debris and fat. Cells were resuspended in DMEM/BSA (about 10^7 cells per ml) and

WO 02/20822

PCT/US01/28124

incubated with a phage display library (10^8 TU) prepared as described above. After incubation for 3 hours on ice, the cells were centrifuged through an organic phase consisting of a 9:1 mixture of dibutylphthalate:cyclohexane. Centrifugation occurred for 10 min at 10,000 x g. The bottom of the centrifuge tube was snap frozen at -80°C and phage were recovered by bacterial infection as described above. The selection was repeated for 3 more rounds of BRASIL and 90 clones were sequenced. The bone marrow targeting sequences are listed in Table 9 below.

Table 9. Bone Marrow Targeting Peptides Identified by BRASIL

CPEVMGSSC	SEQ	ID	CREQASTGC	SEQ ID NO:211
NO:202			CVVKLRNRC	SEQ ID NO:212
CSSVVRGCG	SEQ	ID	CVGLRAPLC	SEQ ID NO:213
NO:203			CQKVARPGC	SEQ ID NO:214
CVGAGLHIC	SEQ	ID	CQKFARPGC	SEQ ID NO:215
NO:204			CMWGLSYLC	SEQ ID NO:216
CHLEPDWVC	SEQ	ID	CREQRHNL	SEQ ID NO:217
NO:205			CLVLSASAC	SEQ ID NO:218
CALGRWDRC	SEQ	ID	CLLSGLMGC	SEQ ID NO:219
NO:206			CRGDTKALC	SEQ ID NO:220
CFGVGGSWC	SEQ	ID	CVSQLGRVC	SEQ ID NO:221
NO:207			CFVFEAMGC	SEQ ID NO:222
CGRDRTVDC	SEQ	ID	CSVIKRGAC	SEQ ID NO:223
NO:208			CGGWVDHRC	SEQ ID NO:224
CLVLGGYGC	SEQ	ID	CAVVRNQEC	SEQ ID NO:225
NO:209			CDSPPRPVC	SEQ ID NO:226
CWENRGQFC	SEQ	ID	CTFSGHRLC	SEQ ID NO:227
NO:210				

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CHTWGGRNC NO:228	SEQ	ID	CERGRGAAC	SEQ ID NO:241
			CAAGEGWWC	SEQ ID NO:242
CEGAGLVAC NO:229	SEQ	ID	CALSAYRVC	SEQ ID NO:243
			CLWPWAGEC	SEQ ID NO:244
CFPRVWSRC NO:230	SEQ	ID	CTHATWLVC	SEQ ID NO:245
			CSGVSTVRC	SEQ ID NO:246
CYWLGGALC NO:231	SEQ	ID	CLVSYMNGC	SEQ ID NO:247
			CVRTSSQWC	SEQ ID NO:248
CDTNQRVVC NO:232	SEQ	ID	CLGKGLSSC	SEQ ID NO:249
			CFTAVEQGC	SEQ ID NO:250
CMRVTKTHC NO:233	SEQ	ID	CGGIGPRFC	SEQ ID NO:251
			CVATWCEKC	SEQ ID NO:252
CDQNWLVHC NO:234	SEQ	ID	CSSELRAAC	SEQ ID NO:253
			CKGSLDEIC	SEQ ID NO:254
CTFSGHRLC NO:235	SEQ	ID	CSSVVRGCG	SEQ ID NO:255
			CLKTEFTAC	SEQ ID NO:256
CALSAYRVC NO:236	SEQ	ID	CPGRLWRAC	SEQ ID NO:257
			CSELGGAGC	SEQ ID NO:258
CGGEEGRRC NO:237	SEQ	ID	CLGWRAAAC	SEQ ID NO:259
			CGAMWGMGC	SEQ ID NO:260
CAEAGGPDC NO:238	SEQ	ID	CIGLSGIEC	SEQ ID NO:261
			CQKLGWRV	SEQ ID NO:262
CIVMLGWRC NO:239	SEQ	ID	CLEWLQQVC	SEQ ID NO:263
			CLVLGEKPC	SEQ ID NO:264
CGHGV TGRC NO:240	SEQ	ID		

WO 02/20822

PCT/US01/28124

CAAGKGLLC NO:265	SEQ	ID	CQKLARAGC	SEQ ID NO:278
CAAGKDLLC NO:266	SEQ	ID	CGGRAILLC	SEQ ID NO:279
CGAQSPRC NO:267	SEQ	ID	CQLGRAHGC	SEQ ID NO:280
CLSSVRGWC NO:268	SEQ	ID	CGLVITATC	SEQ ID NO:281
CESQLAWC NO:269	SEQ	ID	CVGATYSRC	SEQ ID NO:282
CSRNSVREC NO:270	SEQ	ID	CSAFSVAYC	SEQ ID NO:283
CGLVITATC NO:271	SEQ	ID	CLAWEVYLC	SEQ ID NO:284
CPGSVRVQC NO:272	SEQ	ID	CQWWLGPLC	SEQ ID NO:285
CRGDTKALC NO:273	SEQ	ID	CSLGSPMGC	SEQ ID NO:286
CACVRSRNC NO:274	SEQ	ID	CVLGEISWC	SEQ ID NO:287
CRADSEGVC NO:275	SEQ	ID	CSGSGGARC	SEQ ID NO:288
CNVEASVRC NO:276	SEQ	ID	CPWWMERC	SEQ ID NO:289
CVGNAKLMC NO:277	SEQ	ID		

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Statistical Analysis of the Peptide Motifs

A system has been designed to analyze the data resulting from peptide library screenings, adapted from the SAS package. The system is available upon request from the M.D. Anderson Cancer Center. Based on a statistical analysis of the phage sequences listed in Table 9, an LG motif (Leu-Gly) was observed in bone marrow targeting phage. Selected clones with the motif showed very high binding to human bone marrow cells compared to the negative control (insertless fd-tet phage). The positive control was phage containing an RGD-4C insert, which is known to bind to bone marrow. The highest affinity peptide (CLGWRAAAC, SEQ ID NO:259) exhibited binding that was over twice as high as the positive control. Binding assays were performed using BRASIL as described above, except that a single phage clone was used in place of the phage library.

The skilled artisan will realize that the bone marrow targeting peptide sequences identified herein will be of use for numerous applications within the scope of the present invention, including but not limited to targeted delivery of therapeutic agents or gene therapy, *in vivo* imaging of normal or diseased organs or tissues, identification of receptors and receptor ligands in organs or tissues, and therapeutic treatment of a number of human diseases, particularly metastatic prostate cancer.

* * *

All of the COMPOSITIONS, METHODS and APPARATUS disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it is apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the COMPOSITIONS, METHODS and APPARATUS and in the steps or in the sequence of steps of the methods described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it is apparent that certain agents that are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the

art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

Arap, W., Pasqualini R., and Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature. *Science* 279:377-380, 1998a.

Arap W, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.*, 1998b.

Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.

Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.

Brodt et. al, The role of marrow endothelium in the localization of metastatic cancer cells to bone. In *Bone Metastasis- mechanisms and pathophysiology*, pp17-23, 1996. (Orr and Singh, eds.)

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264:569-571, 1994a.

Brooks, P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh D.A. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164, 1994b

- Burg M, Pasqualini R, Arap W, Stallcup W, and Ruoslahti E. Identification of NG2 proteoglycan-binding peptides that home to tumor neovasculature. *Cancer Res* 58:2869-2874, 1999.
- Burg, M.A., Pasqualini, R., Arap, W., Ruoslahti, E. & Stallcup, W.B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59, 2869-2874, 1999.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Eisen, T. et al. Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 82, 812-817, 2000.
- Ellerby HM, Arap W, Ellerby L, Kain R, Andrusiak R, Rio G, Krajewski S, Lombardo C, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen D, and Pasqualini R. Anti-cancer Activity of Targeted proapoptotic peptides. *Nature Med* 9:1032-1038, 1999
- Engerman, R.L. and Kern, T.S. (1986) Hyperglycemia as a cause of diabetic retinopathy. *Metabolism* 35(S1), 20-23.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18, 4-25.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995
- Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nature Biotechnol.* 15: 510, 1997.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Grasso, P., Leinung, M. C., Ingher, S. P. and Lee, D.W. (1997) *Endocrinology*, 138(4), 1413-18.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, and Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med.* 2: 529-533, 1996.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.
- Hansen, A.S., Norén, O., Sjöström, H. and Wedelin, O. (1993) A mouse aminopeptidase-N is a marker for antigen presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.*, 23, 2358-64.
- HARLOW, E., and LANE, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).
- Hermonat and Muzyska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- Herz and Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- Horwich, *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993).
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.

- Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnol* 17:768-774, 1999
- Kong HL and Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:273-286, 1998.
- KOZARSKY, K., JOOSS, K., DUNAHEE, M., STRAUSS, J.F., and WILSON, J.M. (1996). Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat. Genet.* 13; 54-62.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH and Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83:1299-1307, 1989.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986
- Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
- Mustonen T and Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.* 129:895-898, 1995.
- Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K. and Eriksson, U. (1996) Vascular Endothelial

- Growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2576-2581.
- Olofsson, B. Jeltsch, M., Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999) Current Biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Op Biotechnol*, 10, 528-535.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasqualini, R. and Hemler, M. E. Contrasting roles for integrin b1 and b5 cytoplasmic domains in subcellular localization, cell proliferation, and cell migration. *J. Cell Biol.* 125:447-60, 1994.
- Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 380:364-366, 1996.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196, 1995.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. αv integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997
- Pasqualini, R. Vascular Targeting with Phage Display Peptide Libraries. *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162, 1999.
- Pasqualini, R., Arap W., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Shapiro, L., Sakamoto, M., Stryn, A. and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727, 2000.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Rajotte D and Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by *in vivo* phage display. *J Biol Chem* 274:11593-11598, 1999

- Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest* 102:430-437, 1998.
- Rak JW, St. Croix BD, and Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer. *Anticancer Drugs* 6:3-18, 1995.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-7.
- Smith GP, and Scott JK. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228:1315-1317, 1985.
- Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993.
- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1:241-256, 1990.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.

Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silvia, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. and Abraham, J. (1991) the human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 226, 11947-11954.

Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.

Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

U.S. Patent No. 3,652,761

U.S. Patent No. 3,817,837

U.S. Patent No. 3,850,752

U.S. Patent No. 3,939,350

U.S. Patent No. 3,933,997

U.S. Patent No. 3,996,345

U. S. Patent No. 4,267,234

U.S. Patent No. 4,275,149

U.S. Patent No. 4,277,437

U.S. Patent No. 4,366,241

U.S. Patent No. 4,599,307

U.S. Patent No. 4,472,509

U.S. Patent No. 4,704,891

U.S. Patent No. 4,727,020

U.S. Patent No. 5,021,236

U.S. Patent No. 5,206,347

WO 02/20822

PCT/US01/28124

- U.S. Patent No. 5,223,409
- U.S. Patent No. 5,401,511
- U.S. Patent No. 5,492,807
- U.S. Patent No. 5,603,872
- U.S. Patent No. 5,622,699
- U.S. Patent No. 5,670,312
- U.S. Patent No. 5,705,610
- U.S. Patent No. 5,840,841
- U.S. Patent No. 5,853,984
- U.S. Patent No. 5,889,155
- U.S. Patent No. 5,948,627
- U.S. Patent No. 6,068,829
- Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.
- Veikkola, T. and Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars Cancer Biol.*, 9, 211-220.
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R and Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cell cultures. *Science* 268: 447-448, 1995.
- Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Kovesdi I. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* 45:149-151, 1997c.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.
- Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 49:407-424, 1998

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Zhang *et al.*, *Nature* 387:206-9, 1997.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising:

- a) a target for phage binding;
- b) a phage display library;
- c) a first phase; and
- d) a second phase;

wherein the density of the target is greater than the density of the second phase and the density of the second phase is greater than the density of the first phase.

2. The composition of claim 1, wherein the target comprises isolated cells or small clumps of cells.

3. The composition of claim 2, wherein the cells are prokaryotic cells or eukaryotic cells.

4. The composition of claim 3, wherein the cells are selected from the group consisting of bacteria, unicellular organisms, yeast, mold, fungus, amoeba, *Giardia*, *Legionella*, *E. coli*, *Salmonella*, leukemia cells, cancer cells, stem cells, embryonic cells, bone marrow cells, spleen cells, red blood cells, lymphocytes, liver cells, lymph node cells, angiogenic cells, urothelial cells, mammalian cells, animal cells, plant cells, human cells and mouse cells.

5. The composition of claim 1, wherein the target is a parasite.

6. The composition of claim 5, wherein the target is *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, or *Leishmania*.

7. The composition of claim 1, wherein the target comprises a particle attached to a chemical, a compound, a molecule or an aggregate of molecules.

8. The composition of claim 7, wherein the particle is a glass bead, plastic bead, ceramic bead or a magnetic bead.

9. The composition of claim 1, wherein the first phase is an aqueous phase.

10. The composition of claim 9, wherein the second phase is immiscible with the first phase.
11. The composition of claim 1, wherein the second phase is an organic phase.
12. The composition of claim 1, wherein the density of the second phase is about 1.02 to 1.04 gm/ml.
13. The composition of claim 12, wherein the density of the first phase is about 1.00 gm/ml.
14. The composition of claim 11, wherein the second phase consists essentially of about 9 parts dibutyl phthalate to 1 part cyclohexane by volume.
15. The composition of claim 11, wherein the second phase consists essentially of about 4 parts dibutyl phthalate to 6 parts diisocetyl phthalate by volume.
16. The composition of claim 11, wherein the second phase consists essentially of about 3 parts dibutyl phthalate to 2 parts bis[2-ethylhexyl] phthalate by volume.
17. The composition of claim 2, wherein the cells are obtained from an organ or tissue.
18. The composition of claim 2, wherein the cells are cultured cells.
19. The composition of claim 12, wherein the second phase is aqueous.
20. The composition of claim 19, wherein second phase comprises a sugar, a salt or a polymer.
21. The composition of claim 20, wherein the polymer is polyethylene glycol, Ficoll or Percoll.
22. A method comprising:
 - a) exposing a target to a phage display library in an first phase;
 - b) exposing the first phase to a second phase; and
 - c) separating phage bound to the target from unbound phage;

wherein bound phage enter the second phase and unbound phage remain in the first phase.

23. The method of claim 22, wherein the first phase is an aqueous phase.
24. The method of claim 23, wherein the second phase is an organic phase.
25. The method of claim 24, further comprising centrifuging the phage bound to the target through the organic phase to form a pellet.
26. The method of claim 22, wherein the target comprises isolated cells or small clumps of cells.
27. The method of claim 26, wherein the cells are selected from the group consisting of bacteria, unicellular organisms, yeast, mold, fungus, amoeba, *Giardia*, *Legionella*, *E. coli*, *Salmonella*, leukemia cells, cancer cells, stem cells, embryonic cells, bone marrow cells, spleen cells, red blood cells, lymphocytes, liver cells, lymph node cells, angiogenic cells, urothelial cells, mammalian cells, animal cells, plant cells, human cells and mouse cells.
28. The method of claim 22, wherein the target is a parasite.
29. The method of claim 28, wherein the target is *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, or *Leishmania*.
30. The method of claim 22, wherein the target comprises a particle attached to a chemical, a compound, a molecule or an aggregate of molecules.
31. The method of claim 30, wherein the particle is a glass bead, plastic bead, ceramic bead or a magnetic bead.
32. The method of claim 22, wherein the density of the first phase is about 1.00 gm/ml and the density of the second phase is about 1.02 to 1.04 gm/ml.
33. The method of claim 24, wherein the second phase consists essentially of about 9 parts dibutyl phthalate to 1 part cyclohexane by volume.
34. The method of claim 24, wherein the second phase consists essentially of about 4 parts dibutyl phthalate to 6 parts diisocetyl phthalate by volume.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

35. The method of claim 24, wherein the second phase consists essentially of about 3 parts dibutyl phthalate to 2 parts bis[2-ethylhexyl] phthalate by volume.
36. The method of claim 25, further comprising recovering bound phage from the pellet.
37. The method of claim 36, wherein recovering bound phage comprises amplifying the phage inserts.
38. The method of claim 37, wherein the phage inserts encode targeting peptide sequences.
39. The method of claim 38, further comprising sequencing the inserts.
40. The method of claim 36, wherein recovering bound phage comprises infecting bacteria with the phage.
41. The method of claim 22, further comprising
- i) prescreening the library against a first target;
 - ii) collecting unbound phage; and
 - iii) screening the unbound phage against a second target.
42. The method of claim 41, wherein the first target comprises normal cells and the second target comprises diseased cells.
43. The method of claim 42, wherein the disease is cancer, leukemia, prostate cancer, ovarian cancer, breast cancer, lung cancer, skin cancer, metastatic cancer, diabetes, arthritis, autoimmune disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Hodgkins disease, Kaposi's sarcoma, AIDS, viral infection, HIV infection, bacterial infection, cardiovascular disease or degenerative disease.
44. The method of claim 41, wherein the first target is a non-pathogenic organism and the second target is a pathogenic organism.
45. The method of claim 44, wherein the first target is *Plasmodium vivax* or *Plasmodium gallinaceum* and the second target is *Plasmodium falciparum*.

46. The method of claim 44, wherein the organism is a bacterium, a unicellular organism or a parasite.
47. The method of claim 41, wherein the first target comprises quiescent cells and the second target comprises activated cells.
48. The method of claim 47, wherein the cells are activated by a hormone, growth factor, neurotransmitter, cytokine, chemokine, pharmaceutical, narcotic, angiogenic agent, beta agonist, phosphodiesterase inhibitor, insecticide, toxin or drug.
49. The method of claim 36, further comprising repeating the screening procedure until a targeting peptide of a desired degree of selectivity or affinity is obtained.
50. A targeting peptide prepared by BRASIL (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands).
51. An expression vector comprising a nucleic acid encoding a targeting peptide according to claim 50.
52. The expression vector of claim 51, further comprising a nucleic acid encoding a therapeutic protein or peptide.
53. The expression vector of claim 52, wherein the therapeutic protein or peptide is a pro-apoptosis agent, an anti-angiogenic agent, an angiogenic agent, a hormone, a cytokine, a chemokine, a growth factor, a cytotoxic agent, an antibiotic, a survival factor, an anti-apoptotic agent, a hormone antagonist, an antibody or a Fab fragment of an antibody.
54. The expression vector of claim 53, wherein the pro-apoptosis agent is gramicidin, magainin, mellitin, defensin, cecropin, (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO:1), (KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)₂ (SEQ ID NO:3) or (KLGKKLG)₃ (SEQ ID NO:4).
55. The expression vector of claim 43, wherein the anti-angiogenic agent is selected from the group consisting of thrombospondin, angiostatin, pigment epithelium-derived factor, angiotensin, laminin peptides, fibronectin peptides, plasminogen activator

inhibitors, tissue metalloproteinase inhibitors, interferons, interleukin 12, platelet factor 4, IP-10, Gro- β , thrombospondin, proliferin-related protein, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon- α , 16K prolactin fragment, endostatin, and platelet factor 4.

56. The expression vector of claim 43, wherein the cytokine is interleukin 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferon- γ (IF- γ), IF- α , IF- β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), or GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor).

57. A composition comprising a targeting peptide attached to a therapeutic agent, wherein said targeting peptide is identified by BRASIL.

58. The composition of claim 57, wherein said therapeutic agent is a drug, a chemotherapeutic agent, a radioisotope, a pro-apoptosis agent, an anti-angiogenic agent, a hormone, a cytokine, a growth factor, a cytotoxic agent, a peptide, a protein, an antibiotic, an antibody, a Fab fragment of an antibody, an imaging agent, a nucleic acid, an antigen, a survival factor, an anti-apoptotic agent, a hormone antagonist, a virus, a cell, a bacterium, a yeast or a mammalian cell.

59. An isolated peptide of 100 amino acids or less in size, comprising at least 3 contiguous amino acids of a sequence selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

60. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is 25 amino acids or less in size.

61. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is 10 amino acids or less in size.

62. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is 5 amino acids or less in size.

63. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide comprises at least 5 contiguous amino acids of a sequence selected from SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, any of SEQ ID NO:13 through SEQ ID NO:124 or any of SEQ ID NO:128 through SEQ ID NO:289.

64. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is attached to a drug, a chemotherapeutic agent, a radioisotope, a pro-apoptosis agent, an anti-angiogenic agent, a hormone, a cytokine, a growth factor, a cytotoxic agent, a peptide, a protein, an antibiotic, an antibody, a Fab fragment of an antibody, an imaging agent, an antigen, a survival factor, an anti-apoptotic agent, a hormone antagonist, a virus, a cell, a bacterium, a yeast cell or a mammalian cell.

65. The isolated peptide of claim 64, wherein said anti-angiogenic agent is selected from anti-angiogenic agent is selected from the group consisting of thrombospondin, angiotensin5, pigment epithelium-derived factor, angiotensin, laminin peptides, fibronectin peptides, plasminogen activator inhibitors, tissue metalloproteinase inhibitors, interferons, interleukin 12, platelet factor 4, IP-10, Gro-β, 2-methoxyoestradiol, proliferin-related protein, carboxiamidotriazole, CM101, Marimastat, pentosan polysulphate, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon-alpha, herbimycin A, PNU145156E, 16K prolactin fragment, Linomide, thalidomide, pentoxifylline, genistein, TNP-470, endostatin, paclitaxel, Docetaxel, polyamines, a proteasome inhibitor, a kinase inhibitor, an SU signaling inhibitor, accutin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 and minocycline.

66. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is attached to a virus, a bacteriophage, a bacterium, a yeast cell, a liposome, a microparticle, a magnetic bead, a cell or a microdevice.

67. The isolated peptide of claim 59, wherein said peptide is attached to a eukaryotic expression vector.

68. A method of targeted delivery comprising:

- a) selecting a peptide by BRASIL;
- b) attaching said peptide to a therapeutic agent; and
- c) providing said peptide and said agent to a subject.

69. A method of imaging comprising:
- selecting a peptide by BRASIL,
 - attaching said peptide to an imaging agent;
 - administering said peptide and agent to a subject; and
 - obtaining an image of the subject.
70. A method of diagnosing a disease state comprising:
- selecting a peptide by BRASIL, wherein said peptide is targeted to cells associated with a disease state;
 - administering said peptide to a subject ; and
 - determining the distribution of said peptide in said subject.
71. The method of claim 70, wherein said disease state is selected from the group consisting of diabetes, inflammatory disease, arthritis, atherosclerosis, cancer, autoimmune disease, bacterial infection, viral infection, cardiovascular disease and degenerative disease.
72. A method of treating a disease state comprising:
- selecting a peptide by BRASIL, wherein said peptide is targeted to cells associated with said disease state;
 - attaching to said peptide one or more molecules effective to treat said disease state; and
 - administering said peptide to a subject with said disease state.
73. The method of claim 72, wherein said disease state is selected from the group consisting of diabetes, inflammatory disease, arthritis, atherosclerosis, cancer, autoimmune disease, bacterial infection, viral infection, cardiovascular disease and degenerative disease.
74. The method of claim 26, further comprising sorting the cells before they are exposed to the phage library.

WO 02/20822

PCT/US01/28124

75. The method of claim 74, wherein the cells are sorted by FACS (fluorescent activated cell sorting).

76. The method of claim 75, wherein the cells are obtained from a subject with leukemia patient and leukemia cells are selected for exposure to the phage library.

77. The method of claim 76, wherein the library is presubtracted against normal cells from the same subject.

78. The isolated peptide of claim 59, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:6 (CPQPRPLC), SEQ ID NO:41 (CVPMLQIC), SEQ ID NO:42 (CLGKGSVC), SEQ ID NO:45 (CIIGSYVC), SEQ ID NO:47 (CWRSVEVC), SEQ ID NO:48 (CSIRRESC), SEQ ID NO:52 (CIRREKRC), SEQ ID NO 59 (CMRGKGLC), SEQ ID NO 62: (CGRDSKQC) or SEQ ID NO:132 (CRGGGRLC).

79. The isolated peptide of claim 59, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:7 (CSVWFGC), SEQ ID NO:8 (CMVYFGC), SEQ ID NO:182 (CSVWWGC), SEQ ID NO:185 (CNVWYGC), SEQ ID NO:187 (CPTMTEC), SEQ ID NO:188 (CSVWFGC), SEQ ID NO:189 (CSVWYGC), SEQ ID NO:198 (CGNHQKC), SEQ ID NO:200 (CQGTWIC) or SEQ ID NO:201 (CXVWXGC).

80. The isolated peptide of claim 59, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:13 (CGQEISGLC), SEQ ID NO:20 (CWGGGLSGLC), SEQ ID NO 25 (VHALES), SEQ ID NO:27 (CRIRMSAGC), SEQ ID NO:32 (DRVTLG), SEQ ID NO:35 (ISGL) SEQ ID NO:36 (GGLS), SEQ ID NO:37 (HALE), SEQ ID NO:38 (MSAG) or SEQ ID NO 39 (RVTXG).

81. The isolated peptide of claim 59, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:63 (CLGRLTVLC), SEQ ID NO:67 (CVGVGRSRC), SEQ ID NO:72 (CESLSHVDIC), SEQ ID NO:76 (CYPGYDSYC), SEQ ID NO:79 (CVKEGGFWC), SEQ ID NO:87 (CPWYWLWGC) SEQ ID NO:94 (CWWPWGWGC), SEQ ID NO:89 (CARDRIAC), SEQ ID NO:104 (CWKGFGWWC) or SEQ ID NO:114 (CRVDFSKGC).

82. The isolated peptide of claim 59, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:207 (CFGGVGSGWC), SEQ ID NO:223 (CSVIKRGAC), SEQ ID NO:235 (CTFSGHRLC), SEQ ID NO:239 (CIVMLGWRC), SEQ ID NO:249 (CLGKCLSSC), SEQ ID NO:253 (CSSELRAAC), SEQ ID NO:259 (CLGWRAAAC), SEQ ID NO:277 (CVGNAKLMC), SEQ ID NO:280 (CQLGRAHGC) or SEQ ID NO:285 (CQWWLGPLC).

83. The method of claim 26, wherein the have been stimulated with a factor.

84. The method of claim 83, wherein the factor is a hormone, growth factor, cytokine, chemokine or neurotransmitter.

85. The method of claim 26, wherein the cells have been transfected to express a transgenic protein.

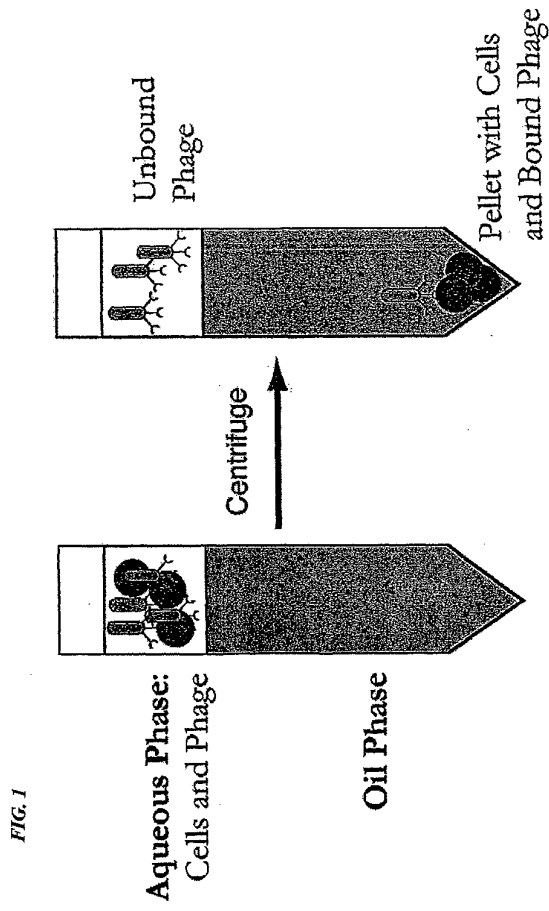
86. The method of claim 26, wherein the cells have been genetically manipulated to express a transgenic protein.

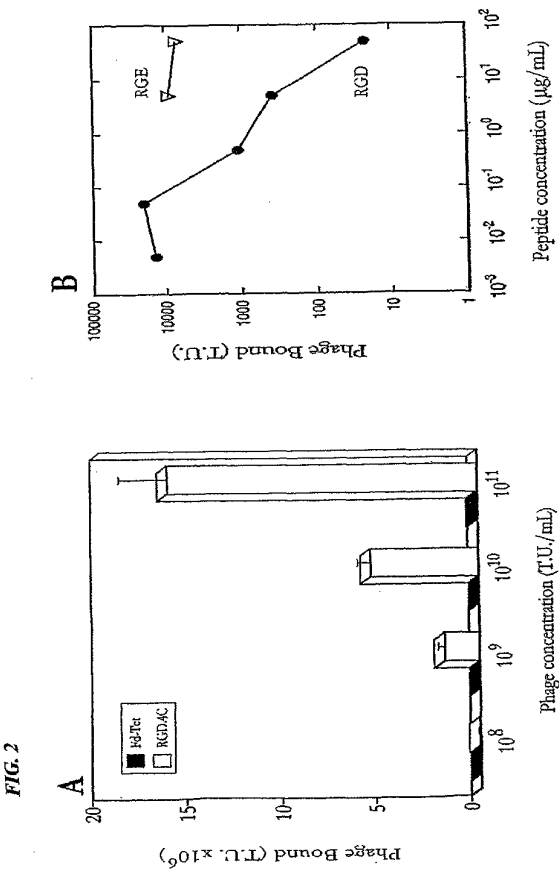
87. The method of claim 26, wherein the cells have been epigenetically manipulated to express a transgenic protein.

WO 02/20822

1/11

PCT/US01/28124





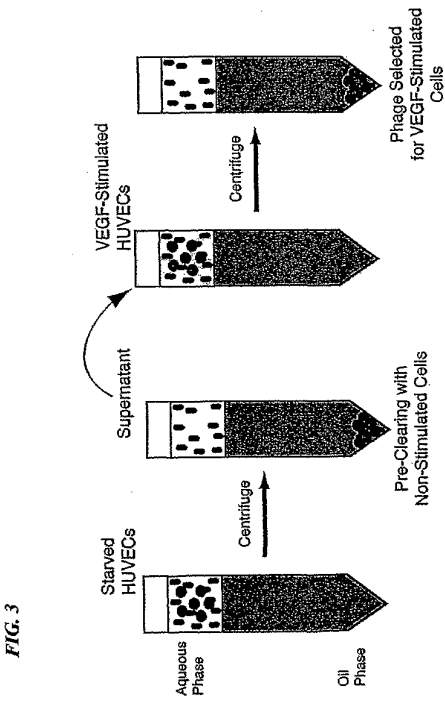
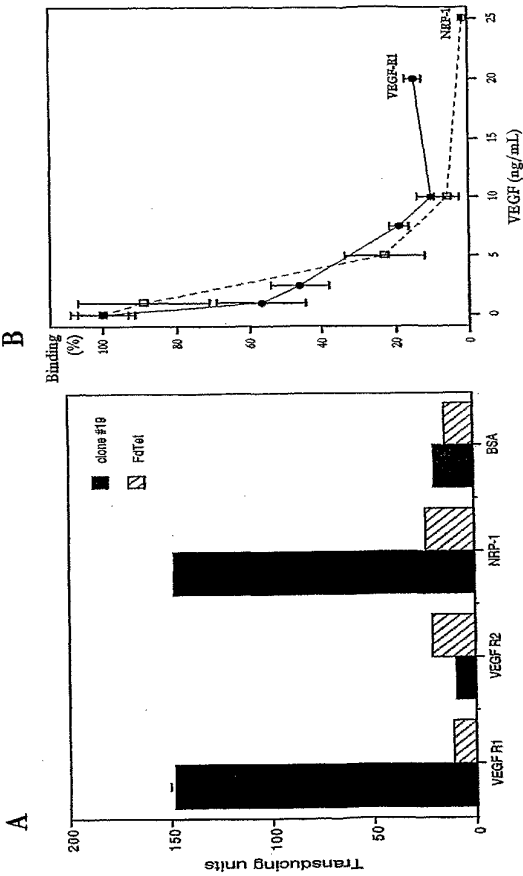


FIG. 4

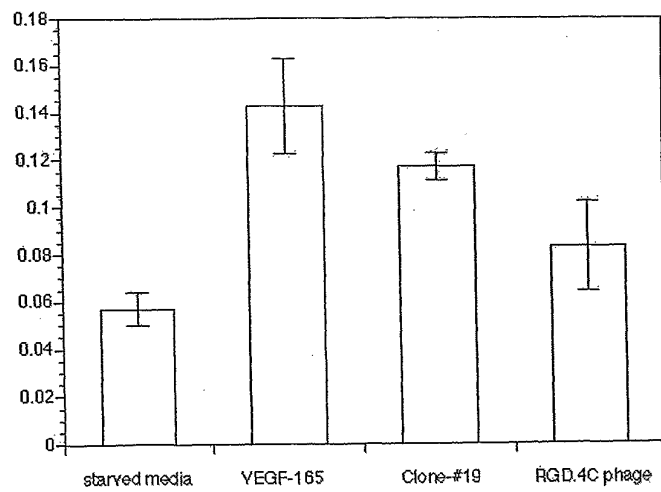


WO 02/20822

5/11

PCT/US01/28124

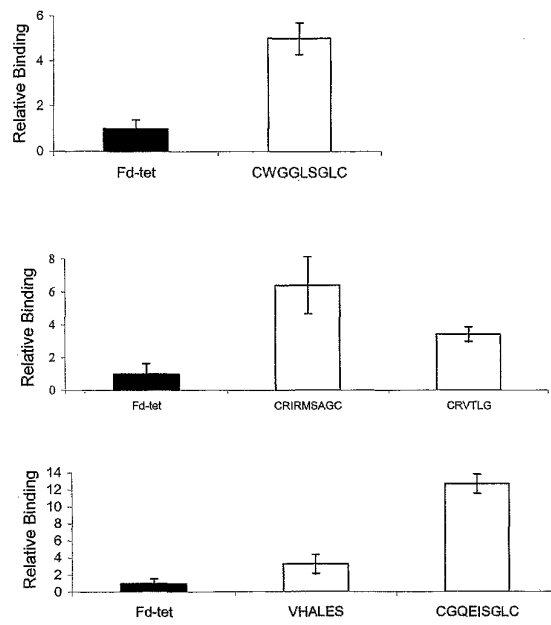
FIG. 5



WO 02/20822

6/11

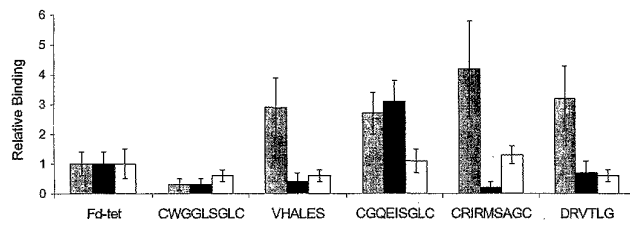
PCT/US01/28124

**FIG. 6**

WO 02/20822

7/11

PCT/US01/28124

**FIG. 7**

WO 02/20822

8/11

PCT/US01/28124

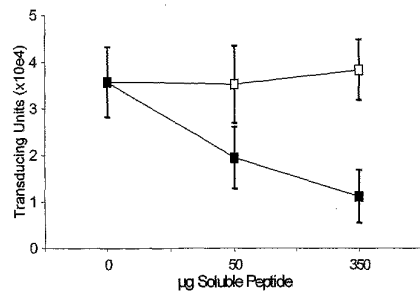
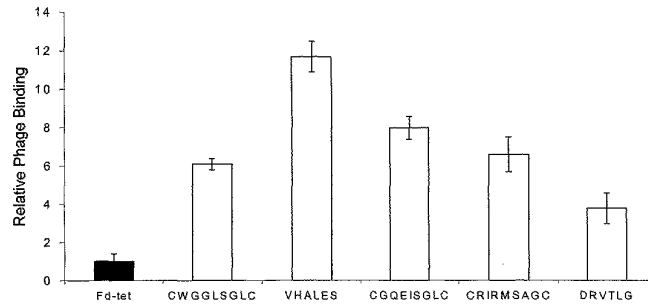


FIG. 8

WO 02/20822

9/11

PCT/US01/28124

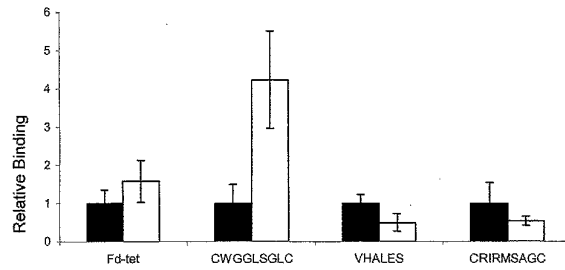
FIG. 9

WO 02/20822

10/11

PCT/US01/28124

FIG. 10

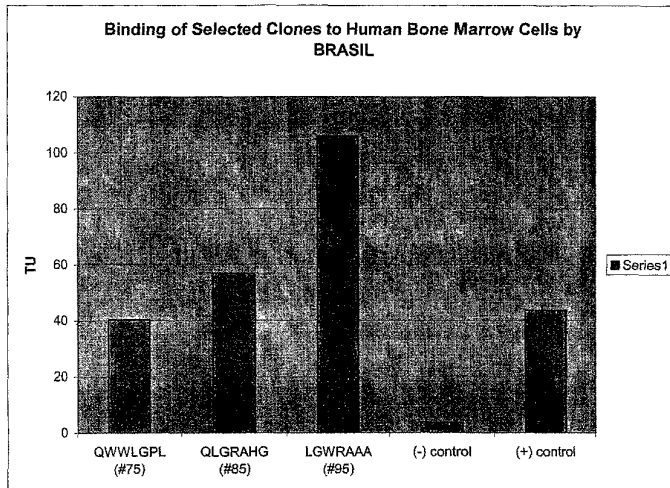


WO 02/20822

11/11

PCT/US01/28124

FIG. 11



WO 02/20822

PCT/US01/28124

SEQUENCE LISTING

<110> Arap, Wadih
 Pasqualini, Renata
 Giordano, Ricardo

<120> Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands
 (BRASIL)

<130> 005774.P004

<140> Unknown
 <141> 2001-09-07

<160> 289

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 1

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 1 5 10

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 2

Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala
 1 5 10

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 3

Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala
 1 5 10

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 4

Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu
 1 5 10 15

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Gly Lys Lys Leu Gly
20

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 5

Cys Ala Arg Ala Cys
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 6

Cys Pro Gln Pro Arg Pro Leu Cys
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 7

Cys Ser Val Trp Phe Gly Cys
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 8

Cys Met Val Tyr Phe Gly Cys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 9

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 10

Gly Arg Gly Glu Ser Pro
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 11

Cys Asn Ile Arg Arg Gln Gly Cys
1 5

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 12
ccctcatagt tagcgtaacg atct
24

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 13

Cys Gly Gln Glu Ile Ser Gly Leu Cys
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 14

Glu Val Ile Ser Gly Leu
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 15

Leu Ile Ser Gly Val Leu
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 16

Glu Leu Leu Ser Gly Leu
1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 17

Gly Arg Leu Ser Gly Ser Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 18

Cys Leu Arg Ser Gly Gly Leu Thr Cys
1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 19

Leu Gly Gly Leu Ser Ala
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 20

Cys Trp Gly Gly Leu Ser Gly Leu Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 21

Cys Gly Leu Ser Leu Lys
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 22

Gly Leu Ser Ala Arg His
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 23

Cys Glu Phe Gly Leu Ser Glu Val Cys
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 24

Ser Lys His Ala Leu Glu
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 25

Val His Ala Leu Glu Ser
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

```
<400> 26
Val Phe Ala Leu Glu Gly
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 27
Cys Arg Ile Arg Met Ser Ala Gly Cys
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 28
Ala Met Ser Ala Gly Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 29
Cys Met Ile Ala Gly Leu Gly Arg Cys
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 30
Cys Arg Val Ile Val Gly Pro Arg Cys
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 31
Cys Arg Val Phe Ala Gly Lys Arg Cys
1 5
```

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 32

Asp Arg Val Thr Leu Gly
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 33

Cys Arg Val Thr Arg Gly His Gly Cys
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 34

Cys Ile Arg Val Glu Ala Gly Ser Cys
1 5

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 35

Ile Ser Gly Leu
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 36

Gly Gly Leu Ser
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<213> Artificial

<400> 37

His Ala Leu Glu

1

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 38

Met Ser Ala Gly

1

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Unidentified amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(5)

<223> Unidentified amino acid

<400> 39

Arg Val Thr Xaa Gly

1

5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 40

Cys Glu Gly Glu Ser Ala Ser Cys

1

5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 41

Cys Val Pro Met Arg Leu Gln Cys

8

WO 02/20822

PCT/US01/28124

1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 42

Cys Leu Gly Lys Gly Ser Val Cys
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 43

Cys Leu Ser Pro Ile Gly Glu Cys
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 44

Cys Asn Leu Ser Val Pro Ala Cys
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 45

Cys Ile Ile Gly Ser Tyr Val Cys
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 46

Cys Ala Asp Val Leu Arg Pro Cys
1 5

<210> 47
<211> 8

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<212> PRT
<213> Artificial
<400> 47
Cys Trp Arg Ser Val Glu Val Cys
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 48
Cys Ser Ile Arg Arg Glu Ser Cys
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 49
Cys Ala Val Val Phe Ser Gln Cys
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 50
Cys Leu Ala Asn Leu Gln Thr Cys
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 51
Cys Asn Ile Arg Arg Gln Gly Cys
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 52

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Ile Arg Arg Glu Lys Arg Cys
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 53

Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Cys
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 54

Cys Arg Glu Cys Gly Glu Arg Cys
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 55

Cys Met Ala Arg Gln Ala Arg Cys
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 56

Cys Leu Pro Ile Ser Ser Ser Cys
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 57

Cys Gly Arg Ala Lys Val Arg Cys
1 5

<210> 58

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<211> 8
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 58
Cys Ala Ser Gly Ser Glu Asn Cys
1 5

<210> 59
<211> 8
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 59
Cys Met Arg Gly Lys Gly Leu Cys
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 60
Cys Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Cys
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 61
Cys Ala Ala Ala Pro Ile Arg Cys
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 62
Cys Gly Arg Asp Ser Lys Gln Cys
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 63

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Leu Gly Arg Leu Thr Val Leu Cys
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 64

Cys Thr Ala Trp Phe Ile Glu Ser Cys
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 65

Cys Ser Tyr Gly Arg Ala Ser Leu Cys
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 66

Cys Asp Ala Gly Pro Trp Thr Ala Cys
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 67

Cys Val Gly Val Gly Arg Ser Arg Cys
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 68

Cys Thr Asn Pro Trp Ser Pro Val Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 69

Cys Gly Gly Ser Tyr Asp Glu Val Cys
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 70

Cys Ala Pro Met Glu Trp Ser Val Cys
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 71

Cys Thr Arg Val His Gly Leu Ala Cys
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 72

Cys Glu Ser Leu Ser His Val Asp Cys
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 73

Cys Leu Trp Thr Gln Ser Ser Gly Cys
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 74

Cys Glu Arg Ser Ile Gly Phe Ala Cys
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 75

Cys Ser Val Pro Val Ser Ser Ser Cys
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 76

Cys Tyr Pro Gly Tyr Asp Ser Tyr Cys
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 77

Cys Pro Trp Tyr Trp Phe Gly Thr Cys
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 78

Cys Glu Cys Arg Gly Asp Cys Tyr Cys
1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 79

Cys Val Lys Lys Gly Gly Phe Trp Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 80
Cys Ser Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 81
Cys Gly Val Leu Lys Pro Tyr Leu Cys
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 82
Cys Pro Trp Tyr Trp Phe Gly Thr Cys
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 83
Cys Trp Val Ala Asp Gly Tyr Arg Cys
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 84
Cys Glu Cys Arg Gly Asp Cys Tyr Cys
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 85

Cys Ser His Ala Val Met Pro Trp Cys
1 5

<210> 86

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 86

Cys Ser Glu Arg Ile Ala Arg Val Cys
1 5

<210> 87

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 87

Cys Pro Trp Tyr Trp Leu Gly Trp Cys
1 5

<210> 88

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 88

Cys Gly Arg Lys Asn Glu Trp Ala Cys
1 5

<210> 89

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 89

Cys Ala Arg Asp Arg Ile Ile Ala Cys
1 5

<210> 90

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 90

Cys Gly Gln Met Asn Arg Glu Val Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 91

Cys Asp Ala Tyr Pro Leu Phe Phe Cys
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 92

Cys Trp Lys Gly Phe Gly Trp Trp Cys
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 93

Cys Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Cys
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 94

Cys Trp Trp Pro Trp Gly Trp Gly Cys
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 95

Cys Ser Trp Trp Thr Phe Gly Phe Cys
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<213> Artificial
<400> 96
Cys Asn Ser Arg Ala Gly Ser Val Cys
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 97
Cys Leu Arg Leu Ser Met Ser Ala Cys
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 98
Cys Asn Ser Arg Ala Gly Ser Val Cys
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 99
Cys Met Ser Gly Asn Thr Glu Arg Cys
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 100
Cys Gly His Leu Gly Ser Val Tyr Cys
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 101
Cys Val Leu Ala Asp Pro Thr Gly Cys

WO 02/20822

PCT/US01/28124

1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 102

Cys Glu Cys Arg Gly Asp Cys Tyr Cys
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 103

Cys Trp Trp Gly Trp Trp Gly Thr Cys
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 104

Cys Trp Lys Gly Phe Gly Trp Trp Cys
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 105

Cys Lys Arg Ser Ala Thr Ile Leu Cys
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 106

Cys Ile Glu Gly Arg Arg Gly Leu Cys
1 5

<210> 107
<211> 9

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<212> PRT
<213> Artificial
<400> 107
Cys Pro Trp Tyr Trp Leu Gly Trp Cys
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 108
Cys Val Arg Gln Gly Glu Asp Ala Cys
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 109
Cys Ser Leu Ala Val Pro Leu Ala Cys
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 110
Cys Met Met His Gly Leu Ala Ala Cys
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 111
Cys Asp Trp Trp Thr Thr Ala Trp Cys
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 112

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Gly Trp Trp Gly Leu Trp Pro Cys
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 113

Cys Gly Trp Phe Ser Trp Phe Gly Cys
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 114

Cys Arg Val Asp Phe Ser Lys Gly Cys
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 115

Cys Ser Ser Leu Ala Thr Val Val Cys
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 116

Cys Met Tyr Arg Thr Ser Leu Ala Cys
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 117

Cys Leu Ala Ala Val Tyr Gln Ser Cys
1 5

<210> 118

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 118

Cys Ser Arg Arg Val Ile Gly Ala Cys
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 119

Cys Ser Trp Trp Asn Trp Phe Gly Cys
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 120

Cys Ser Arg Arg Pro Glu Val Val Cys
1 5

<210> 121
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 121

Cys Val Thr Gly Asn Arg Gly Cys
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 122

Cys Val Ser Trp Trp Phe Trp Gly Cys
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 123

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Gly Trp Phe Ser Trp Trp Gly Cys
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 124

Cys Ser Trp Trp Arg Phe Gly Tyr Cys
1 5

<210> 125
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 125

Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro
1 5 10 15

<210> 126
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 126

Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro
1 5 10 15

<210> 127
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 127

Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Leu Pro
1 5 10 15

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 128

Cys Val Phe Ala Ile Leu Ala Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 129
Cys Gly Val Gln Tyr Val Asn Cys
1 5

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 130
Cys Ser Tyr Lys Ala Asn Ser Cys
1 5

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 131
Cys Tyr Gln Ser Ser Ser Gly Cys
1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 132
Cys Arg Gly Gly Gly Arg Leu Cys
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 133
Cys Gly Ser Asp Arg Trp Leu Cys
1 5

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 134

Cys Leu Val Tyr Asn Pro Ala Cys
1 5

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 135

Cys Ile Pro Gly Thr Ser Leu Cys
1 5

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 136

Cys Ala Thr Glu Ala Val Gly Cys
1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 137

Cys Trp Gly Gly Asn Gln Ala Cys
1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 138

Cys Thr Ser Trp Trp Phe Trp Ser Cys
1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 139

Cys Glu Trp Ser Gly Ile Trp Ala Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 140

Cys Asn Pro Leu Phe Trp Trp Trp Cys
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 141

Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 142

Cys Glu Trp Trp Pro Glu Trp Leu Cys
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 143

Cys Ala Arg Tyr Leu Trp Ser Trp Cys
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 144

Cys Ala Trp Trp Arg Phe Gly Leu Cys
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 145

Cys Arg Gly Glu Trp Gly Met Met Cys
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 146

Cys Phe Trp Pro Phe Glu Ser Trp Cys
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 147

Cys Ser Asn Ala Trp Val His Ala Cys
1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 148

Cys Ser Trp Tyr Trp Trp Leu Gly Cys
1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 149

Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 150

Cys Ile Glu Trp Gly Ser Arg Asp Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 151

Cys Val Arg Ser Ser Val Val Ala Cys
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 152

Cys Glu Asp Ser Ser Arg Ala Asn Cys
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 153

Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 154

Cys Leu Leu Val Gly Gln Val Arg Cys
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 155

Cys Pro Arg Tyr Leu Phe Trp Leu Cys
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<213> Artificial
<400> 156
Cys Tyr Arg Ser Ala Gly Ala Gly Cys
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 157
Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 158
Cys Thr Arg Val Gly Pro Lys Arg Cys
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 159
Cys Lys Ser Gly Gln Ile Ala Val Cys
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 160
Cys Trp Trp Pro Trp Gly Gly Trp Cys
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 161
Cys Asp Trp Gly Leu Trp Trp Leu Cys
30

WO 02/20822

PCT/US01/28124

1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 162
Cys Arg Gly Trp Ala Asp Arg Lys Cys
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 163
Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 164
Cys Thr Gln Val Arg Phe Ser Gly Cys
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 165
Cys Pro Trp Trp Trp Phe Gly Glu Cys
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 166
Cys Gly Gly Trp Leu Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 167
<211> 7

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<212> PRT
<213> Artificial
<400> 167
Cys Glu Lys Arg Trp Gly Cys
1 5

<210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 168
Cys Lys Gln Arg Gly Val Cys
1 5

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 169
Cys Gln Val Arg Leu Ser Cys
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 170
Cys Thr Trp Asp Lys Arg Cys
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 171
Cys Thr Leu Phe Arg Asn Cys
1 5

<210> 172
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 172

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Arg Gly Ser Ala Val Cys
1 5

<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 173

Cys Ala Ile Ser Val Gly Cys
1 5

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 174

Cys Thr Asn Pro Gln Arg Cys
1 5

<210> 175
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 175

Cys Asp Ser Trp Pro Leu Cys
1 5

<210> 176
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 176

Cys Glu Asn Gly Ser Arg Cys
1 5

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 177

Cys Gly Gly Ser Ser Gln Cys
1 5

<210> 178

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 178
Cys Gly Arg Glu Gly Pro Cys
1 5

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 179
Cys Ser Gly Arg Ser Gly Cys
1 5

<210> 180
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 180
Cys Gln Gln Gly Arg Tyr Cys
1 5

<210> 181
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 181
Cys Val Lys Gln Met Arg Cys
1 5

<210> 182
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 182
Cys Ser Val Trp Trp Gly Cys
1 5

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 183

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Ser Gly Pro Cys
1 5

<210> 184
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 184

Cys Glu Gly His Gln Ser Cys
1 5

<210> 185
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 185

Cys Asn Val Trp Tyr Gly Cys
1 5

<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 186

Cys Arg Ser Pro Met Lys Cys
1 5

<210> 187
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 187

Cys Pro Thr Met Thr Glu Cys
1 5

<210> 188
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 188

Cys Ser Val Trp Phe Gly Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 189
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 189

Cys Ser Val Trp Tyr Gly Cys
1 5

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 190

Cys Ser Val Trp Tyr Gly Cys
1 5

<210> 191
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 191

Cys Trp Ile Leu Glu Gln Cys
1 5

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 192

Cys Met Ala Thr Leu Arg Cys
1 5

<210> 193
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 193

Cys Arg Lys Leu Gly Gly Cys
1 5

<210> 194
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 194
Cys Arg Ala Arg Glu Met Cys
1 5

<210> 195
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 195
Cys Gln Ala Trp Gln Arg Cys
1 5

<210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 196
Cys Lys Asp Arg Trp Gly Cys
1 5

<210> 197
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 197
Cys Tyr Ser Asp Lys Lys Cys
1 5

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 198
Cys Gly Asn His Gln Lys Cys
1 5

<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 199
Cys Pro Asn Asp Ser Leu Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 200
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 200

Cys Gln Gly Thr Trp Ile Cys
1 5

<210> 201
<211> 7
<212> PRT
<213> Unknown amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Unidentified amino acid

<400> 201

Cys Xaa Val Trp Xaa Gly Cys
1 5

<210> 202
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 202

Cys Pro Glu Val Met Gly Ser Ser Cys
1 5

<210> 203
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 203

Cys Ser Ser Val Val Arg Leu Gly Cys
1 5

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 204

Cys Val Gly Ala Gly Leu His Ile Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 205
Cys His Leu Glu Pro Asp Trp Val Cys
1 5

<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 206
Cys Ala Leu Gly Arg Trp Asp Arg Cys
1 5

<210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 207
Cys Phe Gly Gly Val Gly Ser Trp Cys
1 5

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 208
Cys Gly Arg Arg Asp Thr Val Asp Cys
1 5

<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 209
Cys Leu Val Leu Gly Gly Tyr Gly Cys
1 5

<210> 210
<211> 9
<212> PRT

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<213> Artificial
<400> 210
Cys Trp Glu Asn Arg Gly Gln Phe Cys
1 5

<210> 211
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 211
Cys Arg Glu Gln Ala Ser Thr Gly Cys
1 5

<210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 212
Cys Val Val Lys Leu Arg Asn Arg Cys
1 5

<210> 213
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 213
Cys Val Gly Leu Arg Ala Pro Leu Cys
1 5

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 214
Cys Gln Lys Phe Ala Arg Pro Gly Cys
1 5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 215
Cys Gln Lys Val Ala Arg Pro Gly Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

1 5

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 216

Cys Met Trp Gly Leu Ser Tyr Leu Cys
1 5

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 217

Cys Arg Glu Gln Arg His Asn Leu Cys
1 5

<210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 218

Cys Leu Val Leu Ser Ala Ser Ala Cys
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 219

Cys Leu Leu Ser Gly Leu Met Gly Cys
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 220

Cys Arg Gly Asp Thr Lys Ala Leu Cys
1 5

<210> 221
<211> 9

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<212> PRT
<213> Artificial
<400> 221
Cys Val Ser Gln Leu Gly Arg Val Cys
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 222
Cys Phe Val Phe Glu Ala Met Gly Cys
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 223
Cys Ser Val Ile Lys Arg Gly Ala Cys
1 5

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 224
Cys Gly Gly Trp Val Asp His Arg Cys
1 5

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 225
Cys Ala Val Val Arg Asn Gln Glu Cys
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 226

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Asp Ser Pro Arg Arg Pro Val Cys
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 227

Cys Thr Phe Ser Gly His Arg Leu Cys
1 5

<210> 228
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 228

Cys His Thr Trp Gly Gly Arg Asn Cys
1 5

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 229

Cys Glu Gly Ala Gly Leu Val Ala Cys
1 5

<210> 230
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 230

Cys Phe Pro Arg Val Trp Ser Arg Cys
1 5

<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 231

Cys Tyr Trp Leu Gly Gly Ala Leu Cys
1 5

<210> 232

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 232
Cys Asp Thr Asn Gln Arg Val Val Cys
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 233
Cys Met Arg Val Thr Lys Thr His Cys
1 5

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 234
Cys Asp Gln Asn Trp Leu Val His Cys
1 5

<210> 235
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 235
Cys Thr Phe Ser Gly His Arg Leu Cys
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 236
Cys Ala Leu Ser Ala Tyr Arg Val Cys
1 5

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 237

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Gly Gly Glu Glu Gly Arg Arg Cys
1 5

<210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 238

Cys Ala Glu Ala Gly Gly Pro Asp Cys
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 239

Cys Ile Val Met Leu Gly Trp Arg Cys
1 5

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 240

Cys Gly His Gly Val Thr Gly Arg Cys
1 5

<210> 241
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 241

Cys Glu Arg Gly Arg Gly Ala Ala Cys
1 5

<210> 242
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 242

Cys Ala Ala Gly Glu Gly Trp Trp Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 243
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 243

Cys Ala Leu Ser Ala Tyr Arg Val Cys
1 5

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 244

Cys Leu Trp Pro Trp Ala Gly Glu Cys
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 245

Cys Thr His Ala Thr Trp Leu Val Cys
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 246

Cys Ser Gly Val Ser Thr Val Arg Cys
1 5

<210> 247
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 247

Cys Leu Val Ser Tyr Met Asn Gly Cys
1 5

<210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 248

Cys Val Arg Thr Ser Ser Gln Trp Cys
1 5

<210> 249

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 249

Cys Leu Gly Lys Gly Leu Ser Ser Cys
1 5

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 250

Cys Phe Thr Ala Val Glu Gln Gly Cys
1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 251

Cys Gly Gly Ile Gly Pro Arg Phe Cys
1 5

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 252

Cys Val Ala Thr Trp Cys Glu Lys Cys
1 5

<210> 253

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 253

Cys Ser Ser Glu Leu Arg Ala Ala Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 254
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 254

Cys Lys Gly Ser Leu Asp Glu Ile Cys
1 5

<210> 255
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 255

Cys Ser Ser Val Val Arg Leu Gly Cys
1 5

<210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 256

Cys Leu Lys Thr Glu Phe Thr Ala Cys
1 5

<210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 257

Cys Pro Gly Arg Leu Trp Arg Ala Cys
1 5

<210> 258
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 258

Cys Ser Glu Leu Gly Gly Ala Gly Cys
1 5

<210> 259
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<400> 259
Cys Leu Gly Trp Arg Ala Ala Ala Cys
1 5

<210> 260
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 260
Cys Gly Ala Met Trp Gly Met Gly Cys
1 5

<210> 261
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 261
Cys Ile Gly Leu Ser Gly Ile Glu Cys
1 5

<210> 262
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 262
Cys Gln Lys Leu Gly Trp Arg Val
1 5

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 263
Cys Leu Glu Trp Leu Gln Gln Val Cys
1 5

<210> 264
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 264
Cys Leu Val Leu Gly Glu Lys Pro Cys
1 5

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<210> 265
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 265

Cys Ala Ala Gly Lys Gly Leu Leu Cys
1 5

<210> 266
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 266

Cys Ala Ala Gly Lys Asp Leu Leu Cys
1 5

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 267

Cys Gly Ala Gln Ser Pro Arg Cys
1 5

<210> 268
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 268

Cys Leu Ser Ser Val Arg Gly Trp Cys
1 5

<210> 269
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 269

Cys Ser Glu Ser Gln Leu Ala Trp Cys
1 5

<210> 270
<211> 9
<212> PRT

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<213> Artificial

<400> 270

Cys Ser Arg Asn Ser Val Arg Glu Cys
1 5

<210> 271

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 271

Cys Gly Leu Val Ile Thr Ala Thr Cys
1 5

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 272

Cys Pro Gly Ser Val Arg Val Gln Cys
1 5

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 273

Cys Arg Gly Asp Thr Lys Ala Leu Cys
1 5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 274

Cys Ala Cys Val Arg Ser Arg Asn Cys
1 5

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 275

Cys Arg Ala Asp Ser Glu Gly Val Cys

WO 02/20822

PCT/US01/28124

1 5

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 276

Cys Asn Val Glu Ala Ser Val Arg Cys
1 5

<210> 277
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 277

Cys Val Gly Asn Ala Lys Leu Met Cys
1 5

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 278

Cys Gln Lys Leu Ala Arg Ala Gly Cys
1 5

<210> 279
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 279

Cys Gly Gly Arg Ala Ile Leu Leu Cys
1 5

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 280

Cys Gln Leu Gly Arg Ala His Gly Cys
1 5

<210> 281
<211> 9

WO 02/20822

PCT/US01/28124

<212> PPT
<213> Artificial

<400> 281
Cys Gly Leu Val Ile Thr Ala Thr Cys
1 5

<210> 282
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 282
Cys Val Gly Ala Thr Tyr Ser Arg Cys
1 5

<210> 283
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 283
Cys Ser Ala Phe Ser Val Ala Tyr Cys
1 5

<210> 284
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 284
Cys Leu Ala Trp Glu Val Tyr Leu Cys
1 5

<210> 285
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 285
Cys Gln Trp Trp Leu Gly Pro Leu Cys
1 5

<210> 286
<211> 9
<212> PPT
<213> Artificial

<400> 286

WO 02/20822

PCT/US01/28124

Cys Ser Leu Gly Ser Phe Met Gly Cys
1 5

<210> 287
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 287

Cys Val Leu Gly Glu Ile Ser Trp Cys
1 5

<210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 288

Cys Ser Gly Gly Ser Gly Ala Arg Cys
1 5

<210> 289
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 289

Cys Pro Trp Trp Met Met Glu Arg Cys
1 5

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20822 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/70.
G01N 1/18, 33/53, 33/554, 33/566, 33/567

(21) International Application Number: PCT/US01/28124

(22) International Filing Date:
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,266 8 September 2000 (08.09.2000) US
09/765,101 17 January 2001 (17.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD
OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYS-
TEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARAP, Wadib
[BR/US]; 7171 Buffalo Speedway #328, Houston, TX
77025 (US). PASQUALINI, Renata [BR/US]; 7171
Buffalo Speedway #328, Houston, TX 77025 (US).(74) Agents: MALLIE, Michael, J. et al.; Blakely, Sokoloff,
Taylor & Zafman LLP, 7th floor, 12400 Wilshire Boul-
levard, Los Angeles, CA 90025 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
27 June 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/20822 A3

(54) Title: BIOPANNING AND RAPID ANALYSIS OF SELECTIVE INTERACTIVE LIGANDS (BRASIL)

(57) Abstract: The present invention concerns novel methods of identifying peptide sequences that selectively bind to targets. In alternative embodiments, targets may comprise cells or clumps of cells, particles attached to chemicals compounds, molecules or aggregates, or parasites. In preferred embodiments, target cells are sorted before exposure to the phage library. The general method, Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL) provides for rapid and efficient separation of phage that bind to targets, while preserving unbound phage. BRASIL may be used in preselection procedure to subtract phage that bind non-specifically to a first target before exposing the subtracted library to a second target. Certain embodiments concern targeting peptides identified by BRASIL and methods of use of such peptides for targeted delivery of therapeutic agents or imaging agents or diagnosis or treatment of diseases. Novel compositions comprising a first phase, second phase, target and a phage library are also disclosed.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28124												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Int.): C12Q 1/70; G01N 1/19, 33/53, 33/554, 33/568, 33/567 US CL.: 435/5, 7.1, 7.2, 7.21, 7.32, 235.1; 436/501, 177, 178 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S.: 435/5, 7.1, 7.2, 7.21, 7.32, 235.1; 436/501, 177, 178 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPAT, US-PGPUB, EPO, JPO, DERWENT, IBM TDB, MEDLINE search terms: phage, library, organic, inorganic, aqueous, solvent, biopan, phase														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>MANDECKI, et al. A mathematical Model for Biopanning (Affinity Selection) Using Peptide Libraries on Filamentous Phage. J Theor. Biol. 1995, Vol. 176, pages 523-530.</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ASAKO, et al. Organic Solvent Tolerance and Antibiotic Resistance Increased by Overexpression of marA in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology. April 1997, Vol. 63, No. 4, pages 1428-1433.</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>McCONNEL, et al. J. Biopanning Phage Display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates. Biotechniques. February 1999, Vol. 26, No. 2, pages 208-214.</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	MANDECKI, et al. A mathematical Model for Biopanning (Affinity Selection) Using Peptide Libraries on Filamentous Phage. J Theor. Biol. 1995, Vol. 176, pages 523-530.	1-21	Y	ASAKO, et al. Organic Solvent Tolerance and Antibiotic Resistance Increased by Overexpression of marA in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology. April 1997, Vol. 63, No. 4, pages 1428-1433.	1-21	Y	McCONNEL, et al. J. Biopanning Phage Display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates. Biotechniques. February 1999, Vol. 26, No. 2, pages 208-214.	8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	MANDECKI, et al. A mathematical Model for Biopanning (Affinity Selection) Using Peptide Libraries on Filamentous Phage. J Theor. Biol. 1995, Vol. 176, pages 523-530.	1-21												
Y	ASAKO, et al. Organic Solvent Tolerance and Antibiotic Resistance Increased by Overexpression of marA in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology. April 1997, Vol. 63, No. 4, pages 1428-1433.	1-21												
Y	McCONNEL, et al. J. Biopanning Phage Display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates. Biotechniques. February 1999, Vol. 26, No. 2, pages 208-214.	8												
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"M" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"B" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"M" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"B" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"M" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 08 FEBRUARY 2002		Date of mailing of the international search report 02 MAY 2002												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-5830		Authorized officer: <i>Janice Ford</i> SHANON A. FOLEY Telephone No. (703) 308-0198												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28124
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WHALLEY, et al. Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. Nature. June 2000, Vol. 405, pages 665-668.	1-21
Y	OLOFSSON, et al. Phage viability in organic media: insights into phage stability. J Mol. Recognit Winter. 1998, Vol. 11, No. 1-6, pages 91-3, abstract only.	1-21
A	GIORDANO, et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. Nature Medicine. November 2001, Vol. 7, pages 1249-1253.	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/88194
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:		
1. ☐	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. ☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(4).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Please See Extra Sheet.		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-21	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/08194

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Invention 1, claim(s) 1-21, drawn to a composition comprising a target for phage binding, a phage library, and two phases.

Invention 2, claim(s) 22-49, 55, 56, 74-77, and 85-87, drawn to a method of separating a phage-target complex from unbound phage.

Invention 3, claim(s) 50, 57, and 58, drawn to a targeting peptide.

Invention 4, claim(s) 51-54, drawn to an expression vector.

Inventions 5-271, claim(s) 59-67 and 78-82, drawn to isolated peptides. Each invention corresponds to the 266 individual SEQ ID NOs as they appear sequentially in claim 59.

Invention 272, claim(s) 68, 72, and 75, drawn to a method of targeted delivery.

Invention 273, claim(s) 69, drawn to a method of imaging.

Group 274, claim(s) 70 and 71, drawn to a method of diagnosing a disease state.

The inventions listed as inventions 1-274 do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature is the composition in claim 1, which comprises four elements: a target for phage binding, a phage display library, and two phases. Further inventions that are related to the first method of using the composition and the first method of making the composition are grouped with this invention because the special technical feature is shared. Any invention that does not share the first method of making and the first method of using the composition does not share the special technical feature and lacks unity of invention.

Invention 2 is drawn to a first method. However, this invention does not share the special technical feature of invention 1 because the method does not require the composition of invention 1. The steps recited in invention 2 can be practiced in separate composition environments.

Invention 3 is a second composition that does not share the necessary elements that comprise the special technical feature of invention 1.

Invention 4 is a third composition that does not share any element that makes up the special technical feature of invention 1.

Inventions 5-271 comprise compositions 4-275, which are structurally and functionally unrelated to invention 1.

Invention 272 is a second method that does not require the special technical feature of invention 1 and is not a method of making or using invention 1.

Invention 273 is a third method that does not share the special technical feature of invention 1, nor is this third method a first method of making or a first method of using invention 1.

Invention 274 is a fourth method that does not share a special technical feature with invention 1 and is not a first method of making or a first method of using invention 1.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 7/06	A 6 1 P 43/00 1 2 3	
C 1 2 N 7/02	C 0 7 K 7/06	
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 N 7/02	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/53 M	
	G 0 1 N 33/566	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 パスカリニ レナタ

アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン バッファロー スピードウェイ # 3 2 8 7 1 7
1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 DA02 EA03 GA11 HA01
4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QQ08 QQ79 QR32 QR59 QR79 QR80
QS38
4B065 AA93X AA93Y AA98X AB01 BA02 CA44 CA46
4C076 AA95 CC04 CC07 CC11 CC17 CC26 CC27 CC29 CC30 CC31
CC35 CC41 EE41 EE59 FF02 FF31 FF34 FF68
4C084 AA17 MA01 MA05 NA12 NA13 NA15 ZA361 ZA511 ZA811 ZA961
ZB071 ZB111 ZB261 ZB271 ZB331 ZB351 ZC351
4C085 HH20 KA26 KB82 LL18
4H045 AA10 AA30 BA14 BA15 EA20 EA50 FA10 FA74

专利名称(译)	Biopanning快速分析选择性相互作用配体 (BRASIL)		
公开(公告)号	JP2004530404A	公开(公告)日	2004-10-07
申请号	JP2002525828	申请日	2001-09-07
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	アラップワディ パスカリニレナタ		
发明人	アラップ ワディ パスカリニ レナタ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/225 A61K31/23 A61K31/56 A61K31/683 A61K31/685 A61K31/688 A61K31/713 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/42 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/02 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/04 C07K5/08 C07K5/10 C07K7/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/005 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/08 C07K16/18 C07K19/00 C12N7/02 C12N15/10 C12N15/861 C12N15/864 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/5256 A61P3/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/02 A61P15/18 A61P19/02 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/047 C07K7/06 C07K14/52 C12N15/1037 C12N2810/40 Y02A50/41 Y02A50/412 Y02A50/414 Y02A50/478		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61K47/48 A61K49/00.A A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P13/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00.123 C07K7/06 C12N7/02 C12Q1/70 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR59 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS38 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC11 4C076/CC17 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/CC29 4C076/CC30 4C076/CC31 4C076/CC35 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF31 4C076/FF34 4C076/FF68 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/MA05 4C084/NA12 4C084/NA13 4C084/NA15 4C084/ZA361 4C084/ZA511 4C084/ZA811 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC351 4C085/HH20 4C085/KA26 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/231266 2000-09-08 US 09/765101 2001-01-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定选择性结合靶标的肽序列的新方法。在另一个实施方案中，靶标可包含与细胞或细胞团，化学品，化合物，分子或聚集体结合的颗粒或寄生虫。在优选的实施方案中，在暴露于噬菌体文库之前对靶细胞进行分选。选择性相互作用配体生物淘选快速分析 (BRASIL) 的一般方法提供了与靶标结合的噬菌体的快速和有效分离，同时保留了未结合的噬菌体。可以在预选方法中使用BRASIL，减去非特异性结合第一靶标的噬菌体，然后将减去的文库暴露于第二靶标。某些实施方案涉及靶向由BRASIL鉴定的肽和使用此类肽用于靶向转运治疗剂或造影剂，或用于疾病的诊断或治疗的方法。还公开了包含第一相，第二相，靶和噬菌体文库的新型组合物。

略称	アミノ酸	略称	アミノ酸
Aad	2-アミノアジピン酸	EtAsn	N-エチルアスパラギン
Baad	3-アミノアジピン酸	Hyl	L-ヒドロキシリジン
Bala	β -アラニン, β -アミノ- γ -プロピオン酸	AHyl	アロヒドロキシリジン
Abu	2-アミノ酪酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Abu	4-アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカプロン酸	Ide	イソデスフェシン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アロイソロイシン
Aib	2-アミノイソ酪酸	MeGly	N-メチルグリシン、サルコシン
Baib	3-アミノイソ酪酸	MeIle	N-メチルイソロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	MeLys	6-N-メチルリジン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスマシン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメリン酸	Nle	ノルロイシン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸	Orn	オルニチン
EtGly	N-エチルグリシン		