

(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2004-533803

(P2004-533803A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 35/12</b>	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 49/00	Z 4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 49/00</b>	A 6 1 P 3/10	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 366 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-525730 (P2002-525730)	(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/US2001/028044		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(87) 国際公開番号	W02002/020723		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】 ヒトにおいてインビボでペプチドをターゲティングするための組成物及び方法

## (57) 【要約】

本発明は、ヒトターゲティングペプチド配列を同定するための方法及び組成物に関する。好ましい態様において、一次ファージライブラリがインビボでヒトに投与され、ターゲティングペプチドを保持しているファージが、選択された臓器、組織、又は細胞型から収集される。より好ましい態様において、収集されたファージは増幅され、プールされ、次の選択のための第二のヒトに投与される。ペプチドは、遺伝子治療ベクターを含む治療剤の標的化送達に有用である。そのような標的化送達は、ヒト疾患の検出、診断、又は治療用に使用されうる。いくつかの態様において、ペプチドは、造影剤に付着し、画像を得るため又は疾患状態を診断するため、ヒトに投与されうる。また、本発明の方法により得られたヒトの臓器又は組織に選択的な多数のターゲティングペプチド配列及びコンセンサスモチーフも、開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ターゲティングペプチドを同定する方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) ファージディスプレイライブラリを得る段階；
- b) ファージディスプレイライブラリをヒトの循環系に注射する段階；
- c) ヒトから臓器、組織、又は細胞型の試料を得る段階；及び
- d) 臓器、組織、又は細胞型に存在するファージから一つ又は複数のターゲティングペプチドを同定する段階。

## 【請求項 2】

ヒトが、脳死状態である、又は終末離脱 (terminal wean) 患者である、請求項 1 記載の方法。 10

## 【請求項 3】

ライブラリが、約  $10^{14}$  形質導入単位 (TU) を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

ライブラリが一次ファージライブラリである、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

ライブラリが、少なくとも  $10^8$  個の異なるターゲティングペプチド配列を含む、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 6】

臓器、組織、又は細胞型からファージを回収する段階をさらに含む、請求項 1 記載の方法 20

## 【請求項 7】

ファージが、細菌を感染させることにより回収される、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

ファージが、ファージ挿入物を増幅することにより回収される、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 9】

挿入物がターゲティングペプチドをコードする、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

新しいファージを作製するため、増幅された挿入物をファージ DNA に連結させる段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。 30

## 【請求項 11】

- a) ターゲティングペプチド配列の統計分析を実施する段階；及び
  - b) 統計的に有意なペプチドモチーフを同定する段階
- をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

- a) アミノ酸残基配列計数を行う段階；
  - b) 未選択ライブラリにおける頻度と比較した、各トリペプチドモチーフの相対頻度を追跡する段階；及び
  - c) 各相対頻度が観察される確率を計算する段階
- をさらに含む、請求項 11 記載の方法。 40

## 【請求項 13】

請求項 1 記載の方法により同定されたターゲティングペプチド。

## 【請求項 14】

請求項 12 記載の方法により同定されたターゲティングペプチドモチーフ。

## 【請求項 15】

ターゲティングペプチドを同定する方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) ファージディスプレイライブラリをヒトの循環系に注射する段階；
- b) ヒトから、複数の臓器、組織、又は細胞型の試料を得る段階；
- c) 試料からファージを回収する段階；
- d) ファージを増幅する段階；

- e) 増幅されたファージをプールする段階；
- f) プールされたファージを第二のヒトの循環系に注射する段階；
- g) 第一のヒトから得られたのと同じ臓器、組織、又は細胞型の試料を得る段階；及び
- h) 試料からファージを回収する段階。

【請求項 16】

配列番号：5 から配列番号：325 のいずれかより選択される配列の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む、大きさが 100 アミノ酸以下の単離ペプチド。

【請求項 17】

大きさが 50 アミノ酸以下の、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 18】

大きさが 25 アミノ酸以下の、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 19】

大きさが 10 アミノ酸以下の、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 20】

大きさが 7 アミノ酸以下の、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 21】

大きさが 5 アミノ酸以下の、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 22】

分子に付着している、請求項 16 記載の単離ペプチド。

【請求項 23】

分子が、薬物、化学療法剤、放射性同位体、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞毒性剤、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、又はホルモンアンタゴニストである、請求項 22 記載の単離ペプチド。

【請求項 24】

アポトーシス促進剤が、グラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン (defensin)、セクロピン (cecropin)、(KLAKLAK)<sub>2</sub> (配列番号：1)、(KLAKKLA)<sub>2</sub> (配列番号：2)、(KAAKKAA)<sub>2</sub> (配列番号：3)、及び (KLGKKLG)<sub>3</sub> (配列番号：4) からなる群より選択される、請求項 23 記載の単離ペプチド。

【請求項 25】

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 (pigment epithelium-driven factor)、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、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、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、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン (proliferin) 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 (Marimastat)、ペントサンポリ硫酸 (pentosan polysulphate)、アンジオボエチン 2 (Regeneron)、インターフェロン-、ハービマイシン (herbimycin) A、PNU145156E、16K プロラクチン断片、リノマイド (Linomide)、サリドマイド (thalidomide)、ペントキシフィリン (pentoxifylline)、ゲニステイン (genistein)、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドセタキセル (Docetaxel)、ポリアミン、プロテオソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤、SU5416、SU6668、アキュチン (accutinin)、シドフォビル (cidofovir)、ピンクリスチン、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 (minocycline) からなる群より選択される、請求項 23 記載の単離ペプチド。

【請求項 26】

サイトカインが、インターロイキン 1 (IL-1)、IL-2、IL-5、IL-10、

10

20

30

40

50

I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 8、インターフェロン - ( I F - )、I F - 、I F - 、腫瘍壊死因子 - ( T N F - )、又は G M - C S F (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) からなる群より選択される、請求項 2 3 記載の単離ペプチド。

【請求項 2 7】

高分子複合体に付着している、請求項 1 6 記載の単離ペプチド。

【請求項 2 8】

高分子複合体が、ウイルス、バクテリオファージ、細菌、リボソーム、微粒子、磁性ビーズ、酵母細胞、哺乳類細胞、又は細胞である、請求項 2 7 記載の単離ペプチド。

【請求項 2 9】

真核生物発現ベクターに付着している、請求項 1 6 記載の単離ペプチド。

10

【請求項 3 0】

ベクターが遺伝子治療ベクターである、請求項 1 6 記載の単離ペプチド。

【請求項 3 1】

配列番号：5 から配列番号：3 2 5 のいずれかより選択される少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む融合タンパク質。

【請求項 3 2】

薬学的に許容される担体中に請求項 1 6 記載の単離ペプチドを含む、組成物。

【請求項 3 3】

ペプチドが、薬物、化学療法剤、放射性同位体、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞毒性剤、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、抗原、生存因子、抗アポトーシス剤、又はホルモンアンタゴニストに付着している、請求項 3 2 記載の組成物。

20

【請求項 3 4】

ペプチドが、ウイルス、バクテリオファージ、細菌、リボソーム、微粒子、磁性ビーズ、酵母細胞、哺乳類細胞、真核生物発現ベクター、又は細胞に付着している、請求項 3 2 記載の組成物。

【請求項 3 5】

a) 請求項 1 6 記載の単離ペプチド；及び

b) 対照ペプチド

を含む、キット。

30

【請求項 3 6】

配列番号：5 から配列番号：3 2 5 のいずれかより選択される配列の単離ペプチドと選択的に結合する抗体。

【請求項 3 7】

ターゲティングペプチドが配列番号：5 から配列番号：3 2 5 のいずれかより選択される少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む、表面タンパク質の一部としてターゲティングペプチド配列を発現する、遺伝子治療ベクター。

【請求項 3 8】

請求項 1 6 記載のペプチドをコードする、大きさが 3 0 0 ヌクレオチド以下の単離核酸。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 記載の単離核酸を含むベクター。

40

【請求項 4 0】

プラスミド、コスミド、酵母人工染色体 ( Y A C )、細菌人工染色体 ( B A C )、ウイルス、又はファージである、請求項 3 9 記載のベクター。

【請求項 4 1】

疾患状態を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

a) 疾患状態に関連する細胞へ標的化される、請求項 1 記載のペプチドを選択する段階；

b) 疾患状態を治療するために有効な一つ又は複数の分子をペプチドに付着させる段階；

及び

c) 疾患状態を有する対象へペプチドを投与する段階。

50

## 【請求項 4 2】

疾患状態が、糖尿病、炎症性疾患、関節炎、動脈硬化、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、心臓血管疾患、又は変性疾患からなる群より選択される、請求項 4 1 記載の方法。

## 【請求項 4 3】

配列が、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、又は配列番号：130より選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

## 【請求項 4 4】

配列が、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：45、又は配列番号：131より選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

10

## 【請求項 4 5】

配列が、配列番号：46から配列番号：65のいずれかより選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

## 【請求項 4 6】

配列が、配列番号：66から配列番号：83のいずれかより選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

20

## 【請求項 4 7】

配列が、配列番号：84から配列番号：129のいずれかより選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

## 【請求項 4 8】

配列が、配列番号：132から配列番号：148のいずれかより選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

## 【請求項 4 9】

配列が、配列番号：149から配列番号：173のいずれかより選択される、請求項 20 記載の単離ペプチド。

30

## 【請求項 5 0】

画像化の方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) 請求項 1 記載のペプチドを選択する段階；
- b) ペプチドを造影剤に付着させる段階；
- c) ペプチド及び薬剤をヒトに投与する段階；並びに
- d) ヒトの画像を得る段階。

## 【請求項 5 1】

疾患状態を診断する方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) 疾患状態に関連する細胞へ標的化される、請求項 1 記載のペプチドを選択する段階；
- b) ペプチドをヒトに投与する段階；及び
- c) ヒトにおけるペプチドの分布を決定する段階。

40

## 【請求項 5 2】

a) 約  $10^8$  個以上のターゲティングペプチドを含むファージディスプレイライブラリをヒトの循環系に注射する段階；  
 b) ファージがヒトと結合するような期間および条件下で、ヒト体内にライブラリを残留させる段階；ならびに  
 c) 結合したファージを含む試料をヒトから得る段階  
 を含む方法。

## 【請求項 5 3】

50

試料と結合したファージを単離する段階をさらに含む、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

ヒトが、脳死のヒトおよび終末離脱のヒト患者からなる群より選択される、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 5】

ライブラリが、約  $10^{14}$  形質導入単位 (TU) 以上を含む、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 6】

ライブラリが一次ファージライブラリである、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

ライブラリが、少なくとも  $10^9$  個の異なるターゲティングペプチド配列を含む、請求項 5 2 記載の方法。 10

【請求項 5 8】

試料からファージを回収する段階をさらに含む、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 9】

ファージが検出可能標識に付着している、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 6 0】

試料が、ヒトが死亡した後に、ヒトの罹患組織より得られる、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 6 1】

a) ライブラリは  $10^8$  個以上のターゲティングペプチド配列を含み、ファージは検出可能標識に付着しており、かつさらに、ヒトは末期疾患を有し心臓が拍動している、ファージディスプレイライブラリをヒトの循環系に注射する段階； 20

b) ライブラリのファージがヒトと結合するような期間および条件下で、ヒト体内にライブラリを残留させる段階；

c) 試料が結合したファージを含む、ヒトの心臓がもはや拍動しなくなった後で試料をヒトから得る段階；並びに

d) 試料からファージを単離する段階

を含む方法。

【請求項 6 2】

e) ターゲティングペプチド配列の統計分析を実施する段階；及び

f) 統計的に有意なペプチドモチーフを同定する段階 30

をさらに含む、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 6 3】

g) アミノ酸残基配列計数を行う段階；

h) 未選択ライブラリにおける頻度と比較した、各トリペプチドモチーフの相対頻度を追跡する段階；及び

i) 各相対頻度が観察される確率を計算する段階

をさらに含む、請求項 6 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景 40

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、1R1CA90810-01、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。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、分子医学及び治療剤の標的化送達分野に関する。より具体的には、本発明は、ヒト体内の臓器、組織、又は細胞型を選択的にターゲティングするペプチドの同定及び 50

使用のための組成物及び方法に関する。

【0003】

2. 関連技術の説明

多くのヒト疾患状態の治療的治療は、用いる治療剤の全身毒性のために制限される。癌治療剤は、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薬剤の濃度で影響を受ける。癌および他の臓器、組織、または細胞型限定疾患の治療は、所望の臓器、組織、または細胞型への治療剤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。

【0004】

最近、マウスモデル系において臓器、組織、または細胞型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、組織、または細胞型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、1994; Pasqualini、2000)。臓器、組織、または細胞型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剤が結合すれば、マウスモデル系において、作用物質は所望の臓器、組織、または細胞型へと選択的に送達される。化学療法剤およびアポトーシス促進ペプチドを、腫瘍新生血管に存在する受容体に標的送達すると、担癌マウスモデルにおいて治療有効性の著しい増加および全身毒性の減少が起こる (Arap ら、1998a、1998b; Ellerby ら、1999)。

【0007】

ファージディスプレイライブラリを用いた従来の研究は、ヒトターゲティングペプチドが相同であるという仮定の下で、ターゲティングペプチド及びそれらの受容体を同定するために、マウスモデル系に頼ってきた。しかしながら、ヒトの細胞表面受容体は、マウスとは極めて異なる分布及び機能を有し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に対するターゲティングペプチドを特徴決定するためにのみ活用されてきた。治療剤の標的化送達及びインビボ画像化のために臨床的に使用されうる、ヒ

10

20

30

40

50

トにおける臓器、組織、又は細胞型に選択的なターゲティング配列の同定のための方法及び組成物が、当技術分野においては必要とされている。

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本発明は、ヒトの臓器、組織、又は細胞型に選択的なターゲティングペプチドを同定し、使用するための組成物及び方法を提供することにより、当技術分野における長年にわたる需要を満たす。

【 0 0 0 9 】

本発明のいくつかの態様は、ファージディスプレイライブラリをヒトの循環系に注射する段階、ヒトから臓器、組織、又は細胞型の試料を得る段階、及び臓器、組織、又は細胞型に存在するファージから一つ又は複数のターゲティングペプチドを同定する段階を含む、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、ファージは第一のヒト対象の臓器、組織、又は細胞型より回収され、第二のヒトの循環系へと再注射した後、同じ臓器、組織、又は細胞型の試料を得、ターゲティングペプチドを同定する段階により、さらに選択される。十分に選択的なターゲティングファージを得るため、スクリーニングは複数回実施されうる。

10

【 0 0 1 0 】

もう一つの好ましい態様において、ヒトは、脳死状態であるか又は終末離脱 ( t e r m i n a l w e a n ) 患者である。より好ましくは、個体は臓器ドナーの候補でない。他の好ましい態様において、一つ又は複数の一次ファージライブラリは、ヒト対象への注射の前に、好ましくは  $10^{14}$  T U ( 形質導入単位 ) 以上、より好ましくは  $2 \times 10^8$  個以上の異なるクローンという多様度にまで、インビトロで増幅されうる。さらに好ましい態様において、ターゲティングペプチド配列は、統計的に有意なターゲティングペプチド配列を同定するため、下記の実施例に詳述されている特別に設計された統計分析に供される。

20

【 0 0 1 1 】

さらにもう一つの好ましい態様において、第一のヒトに由来する臓器、組織、又は細胞型より単離されたファージは、共に混合され、第二のヒトの循環系へと再注射された後、第二のヒトの同じ臓器、組織、又は細胞型からのファージの回収及び特徴決定がなされる。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、臓器、組織、又は細胞型より収集されたファージは、選択と選択の間に、臓器、組織のホモジネートを、大腸菌 K 9 1 k a n のような適切な宿主細胞と接触させること、及び宿主細胞においてファージを複製させることにより回収されうる。別の態様において、ファージは、ターゲティングペプチドをコードする配列の P C R ( 商標 ) のような直接的な増幅により回収されうる。

30

【 0 0 1 3 】

特定の態様において、本発明の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剤を、ヒト患者における特定の臓器、組織、または細胞型に選択的に送達するために用いられる。当業者は、使用される、主張される方法の範囲には、ヒト患者における所望の臓器、組織、または細胞型への治療剤の標的化送達によって治療することができる任意の疾患状態も含まれることを認識するであろう。そのような疾患状態には、疾患を有する細胞が、非転移性癌のような特定の臓器、組織、または細胞型に限定される疾患が含まれるが、他の疾患状態を臓器、組織、または細胞型ターゲティングアプローチによって治療してもよい。

40

【 0 0 1 4 】

本発明の一つの態様は、配列番号 : 5 から配列番号 : 3 2 5 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 1 0 0 個またはそれ未満の単離ペプチドに関する。

【 0 0 1 5 】

好ましい態様において、単離ペプチドは、アミノ酸 5 0 個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸 3 0 個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸 2 0 個もしくはそれ未満

50



、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：5 から配列番号：325 のいずれかから選択されるターゲット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、生存因子、抗アポトーシス剤、ホルモンアンタゴニスト、ウイルス、細菌、酵母細胞、哺乳類細胞、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、ターゲット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、アポトーシス促進剤は、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)<sub>2</sub>、(配列番号：1)、(KLAKKLAK)<sub>2</sub>、(配列番号：2)、(KAAKKKAA)<sub>2</sub>、(配列番号：3)、または (KLGKKLKG)<sub>3</sub>、(配列番号：4) である。他の好ましい態様において、抗血管新生剤は、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、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、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、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンジオポエチン 2 (レジェネロン)、インターフェロン-、ハービマイシン A、PNU145156E、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、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドキシタキセル、ポリアミン、プロテアソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤 (SU5416 または SU6668) (Sugen、South San Francisco、CA)、アキュチン、シドフォビル、ピンクリスチン、ブレオマイシン、AGM-1470、血小板因子 4 またはミノサイクリンである。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- (IF-)、IF-、IF-、腫瘍壊死因子- (TNF-)、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剤、抗血管新生剤、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、リボソーム、微粒子、磁気ビーズ、細胞、酵母細胞、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、ターゲットペプチドに結合しうり、かつヒト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。

#### 【0019】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる態様は、配列番号：5から配列番号：325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】

その他の態様は、所望の臓器、組織、または細胞型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ヒト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：5から配列番号：325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。特定の好ましい態様において、臓器、組織、または細胞型は、骨髄、皮膚、骨格筋、前立腺、または脂肪組織である。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、任意のヒトの臓器、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。

10

【0022】

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。

20

【0023】

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：5から配列番号：325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、関節炎、アテローム硬化症、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症、心血管疾患、変性疾患、又は筋肉変性である。

30

【0024】

本発明のもう一つの態様は、ヒト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ヒト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剤に結合させて、癌患者に投与してもよく、治療剤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剤には、化学療法剤、放射性同位元素、アポトーシス促進剤、細胞障害剤、細胞抑制剤、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。そのような治療剤のヒト腫瘍への標的化送達は、腫瘍に対する薬剤の送達を増加させながら、患者の正常な臓器および組織に対する薬剤の不適切な送達を減少させることに關して、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。

40

【0025】

50

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。

#### 【0026】

##### 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。

10

#### 【0027】

「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、ヒトの臓器、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。異なるアミノ酸配列のそのようなターゲティングペプチドを多数発現するよう遺伝学的に改変されたそのようなファージのライブラリを、ヒトに投与した後、ヒトから一つ又は複数の臓器、組織、又は細胞型を収集し、その臓器、組織、又は細胞型に見出されるファージを同定する。ターゲティングペプチド配列を発現するファージは、対照の組織又は臓器と比較して、より多い結合を、その組織又は臓器において示す場合、その組織又は臓器に選択的に移行するものと見なされる。好ましくは、ターゲティングペプチドの選択的移行は、対照の臓器、組織、又は細胞型と比較して2倍以上大きい濃縮を、標的の臓器、組織、又は細胞型においてもたらすであろう。又は、選択的移行を示すターゲティングペプチド配列を発現するファージは、好ましくは、標的臓器から回収されたファージを、次のスクリーニングのため第二の宿主へと再注射した場合に、対照臓器と比較して増加した濃縮を標的臓器において示す。3回目のスクリーニングの後には、さらなる濃縮が示されうる。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されていない対照ファージと比較して、標的臓器において2倍、より好ましくは3倍またはそれ以上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臓器への局在が、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。

20

30

#### 【0028】

「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。

40

#### 【0029】

「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、磁気ビーズ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。分子は同一であっても、または互いに異なってもよい。

#### 【0030】

50

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。受容体の非限定的な例には、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。

#### 【0031】

「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。

10

#### 【0032】

##### 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、小さい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ら、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る(Arapら、1998a)。

20

#### 【0033】

ある臓器、組織、又は細胞型をターゲティングするためのアミノ酸配列は、「バイオパニング(biopanning)」により単離されうる(PasqualiniおよびRuoslahti、1996; Pasqualini、1999)。簡単に説明すると、推定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又はヒトに投与し、ファージを含む臓器、組織、又は細胞型の試料を回収する。繊維状ファージを利用した好ましい態様においては、バイオパニングとバイオパニングの間に、線毛陽性細菌においてインビトロでファージを繁殖させることができる。この細菌は、ファージによって溶解せず、特定の挿入物をディスプレイするファージを、多コピー分泌する。標的分子と結合するファージは、標的の臓器、組織、又は細胞型から溶出させ、次いで宿主細菌において増殖させることにより増幅することができる。所望ならば増幅されたファージをヒト宿主に投与し、臓器、組織、又は細胞型の試料を再び収集してもよい。選択的バインダーの集団が得られるまで、複数回のバイオパニングを実施することができる。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挿入物に対応するDNAを配列決定することによって決定してもよい。次に、同定されたターゲティングペプチドを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(Arapら、1998a; Smithら、1985)。このアプローチによって、その標的の特性に関して如何なる概念も予め抱くことなく、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ると、これを、標準的な生化学的方法を用いて単離、精製、およびクローニングすることができる(Pasqualini、1999; RajotteおよびRuoslahti、1999)。

30

40

50

s l a h t i、1999)。

【0034】

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これまでのインビボ選択研究は、f U S E 5 ベクターにおける I I I 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 (P a s q u a l i n i および R u o s l a h t i、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一次ライブラリを用いることが好ましい (K o i v u n e n ら、1999)。ライブラリの調製は、 $10^8 \sim 10^9$  形質導入単位 (T . U . ) / m l のあいだで増幅されうる。好ましくは、ヒト被験者への注射用に、 $10^{14}$  T U 以上が一次ライブラリから調整される。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。

10

【0035】

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、本発明の範囲内で用いてもよい。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 (C X<sub>3</sub> - 10 C) 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 (C X<sub>3</sub> C X<sub>3</sub> C X<sub>3</sub> C など; R a j o t t e 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。

20

【0036】

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 (P a s q u a l i n i および R u o s l a h t i、1996; P a s q u a l i n i、1999; R a j o t t e 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 (P a s q u a l i n i および R u o s l a h t i、1996; R a j o t t e ら、1998)。腫瘍の新生血管に回帰するペプチドを同定する手段は、下記のように考案されている。  
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 (A r a p ら、1998a; P a s q u a l i n i、1999により概説)。これらのモチーフには、配列 R G D - 4 C、N G R、および G S L が含まれる。R G D - 4 C ペプチドはこれまで、選択的に結合する  $\alpha_v$  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 (A r a p ら、1998a、1998b; P a s q u a l i n i、1997)。

30

【0037】

腫瘍回帰 R G D 4 C ターゲティングペプチドの受容体は、 $\alpha_v$  インテグリンとして同定されている (P a s q u a l i n i ら、1997)。 $\alpha_v$  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 (B r o o k s ら、1994; H a m m e s s ら、1996)。アミノペプチダーゼ N / C D 13 は最近、N G R モチーフの血管新生受容体であると同定されている (B u r g ら、1999)。アミノペプチダーゼ N / C D 13 は、前立腺癌の新生血管および他の血管新生組織において強く発現されている。

40

【0038】

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 (A r a p 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 (P a s q u a l i n i 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

50

い陰性対照ファージ ( f d 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 H U V E C s 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。

#### 【 0 0 3 9 】

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。 v インテグリン、 C D 1 3 、アミノペプチダーゼ A 、 N G 2 、および腫瘍血管における既知の受容体である M M P - 2 / M M P - 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 ) 。

10

#### 【 0 0 4 0 】

新生血管内皮のマーカーには、 V E G F および塩基性 F G F 受容体の特異的サブタイプ、ならびに中でも v 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 ( M u s t o n e n および A l i t a l o 、 1 9 9 5 ) 。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 ( W a t s o n ら、 1 9 9 5 ) 。

#### 【 0 0 4 1 】

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。 v インテグリンは、アデノウイルスの受容体であり ( W i c k h a m ら、 1 9 9 7 c ) 、 C D 1 3 はコロナウイルスの受容体である ( L o o k ら、 1 9 8 9 ) 。 M M P - 2 および M M P - 9 は、エコーウイルスの受容体である ( K o i v u n e n ら、 1 9 9 9 ) 。アミノペプチダーゼ A も同様にウイルス受容体であると考えられる。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、インビボ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 ( i n t e r n a l i z a t i o n ) 能を有することを示唆している。

20

#### 【 0 0 4 2 】

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 ( A r a p ら、 1 9 9 8 a ; E l l e r b y ら、 1 9 9 9 ) 。 R G D - 4 C 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 ( A r a p ら、 1 9 9 8 b ) 。

30

#### 【 0 0 4 3 】

B R A S I L

好ましい態様において、標的臓器、組織、または細胞型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 ( 2 0 0 0 年 9 月 8 日に提出された米国特許仮出願第 6 0 / 2 3 1 , 2 6 6 号 ; 参照として本明細書に組み入れられており、本明細書と共に提出された、 A r a p 、 P a s q u a l i n i 、 および G i o r d a n o による「選択的相互作用リガンドのバイオパニングおよび迅速な分析 ( B i o p a n n i n g a n d R a p i d A n a l y s i s o f S e l e c t i v e I n t e r a c t i v e L i g a n d s ( B R A S I L ) ) 」と題する米国特許 ) 。 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および迅速な分析 ) では、水相に懸濁した、臓器、組織、または細胞型の細胞または小さい細胞塊に穏やかに分離する。水相を適当な密度の有機相の上に層にして、遠心分離する。結合したファージに接着した細胞は遠心管の底に沈殿して、未結合のファージは水相に残ったままとなる。これによって、フ

40

50

ファージと細胞との結合相互作用を維持しながら、結合したファージを未結合のファージからより効率よく分離することができる。臓器、組織、または細胞型を静脈内投与によりファージディスプレイライブラリに曝露するようなインビボプロトコルにおいて、または、遠心分離前に水相中で細胞がファージライブラリに曝露されるようなエクスビボプロトコルにより、BRASILを行ってもよい。

#### 【0044】

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または他のスクリーニングプロトコルと共にサブトラクションプロトコルを用いる。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。

10

#### 【0045】

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。

20

#### 【0046】

大規模一次ファージライブラリの調製

好ましい態様において、一次ファージライブラリは、ヒト対象への注射の前に増幅される。ファージライブラリは、ターゲティングペプチドコーディング配列を、fUSE5のようなファージベクターに連結することにより調製される。ベクターを、MC1061のような線毛陰性宿主大腸菌へと形質導入する。細菌を、一晚増殖させ、次いでその一部を凍結させ、ライブラリ作製のためのストックを得る。線毛陰性細菌の使用は、異なるターゲティングペプチド配列による線毛陽性細菌の差異のある(differential)感染から生じるライブラリのバイアスを回避する。

30

#### 【0047】

凍結のため、一次ライブラリ培養物(5リットル)の3分の2から、4000×gで10分間、細菌をペレット化する。細菌を再懸濁させ、500mlの10%グリセロール水溶液で2回洗浄し、次いでエタノール/ドライアイス浴中で凍結させ、-80で保存する。

#### 【0048】

増幅については、1.5mlの凍結細菌を、5リットルの20μg/mlテトラサイクリンを含むLB培地へと接種し、一晚増殖させる。接種から30分後に、培養物の生存率を確認するため、段階希釈物をLB/tetプレートに播く。生存細菌数がライブラリ中の個々のクローンの数(1~2×10<sup>8</sup>)の5倍~10倍より少ない場合には、培養物を廃棄する。

40

#### 【0049】

細菌培養物を一晚増殖させた後、ファージを沈殿させる。細菌培養物の約1/4~1/3を5リットルの新鮮培地中で一晚維持して増殖させ、そのサイクルを最大5回繰り返す。全てのサイクルからファージをプールし、ヒト対象への注射のため使用する。

#### 【0050】

ヒト

マウスモデル系におけるファージディスプレイバイオパニングに使用される方法は、ヒト

50

で使用するには実質的な改良を必要とする。これらの改良を開示している、ヒト患者で使用するファージディスプレイプロトコルの好ましい例は、下記の実施例 1 及び実施例 2 に詳細に記載される。

#### 【0051】

一般に、ファージディスプレイで使用するのに適したヒトは、脳死患者又は終末離脱患者である。投与に必要とされるファージライブラリ（好ましくは、一次ライブラリ）の量は、好ましくは  $10^{1-4}$  TU 以上へと大きく増加させなければならず、好ましくは約 200 ml のリンゲル乳酸溶液に入れられて約 10 分かけて静脈内に投与される。

#### 【0052】

ヒトにおける使用に必要とされるファージの量は、マウスプロトコルの改良を必要し、注射に利用可能なファージの量は 5 桁増加する。そのような大きなファージライブラリを作製するには、最大 500 個 ~ 1000 個の形質転換体から回収された形質導入された細菌ペレットを、細菌宿主において 10 倍にまで増幅し、各増幅からファージを回収し、さらなるファージの収集のため、LB Tett 培地を細菌ペレットに添加する。これらの条件下でファージ挿入物は安定なままであり、ファージは、ヒトにとって必要とされる大きなファージディスプレイライブラリを形成させるためにプールされうる。

10

#### 【0053】

ファージライブラリの注射後、約 15 分後から、様々な臓器及び組織の試料が収集される。試料は、下記のように処理され、ターゲティングペプチドのアミノ酸配列を決定するための DNA 配列決定のため、目的の各臓器、組織、又は細胞型からファージが収集される。

20

#### 【0054】

ヒトの場合、マウスモデル系と比較して、複数回のバイオパニングによる濃縮の機会が大きく制限されている。バイオパニング技術の実質的な改良は、多臓器ターゲティングを含む。

#### 【0055】

##### 多臓器ターゲティング

ファージディスプレイバイオパニングのための標準的なプロトコルにおいては、単一の臓器からファージが収集され、増幅され、次の宿主に注射され、ファージレスキュー及び新しいバイオパニングのため、同じ臓器から組織が収集される。このプロトコルは、動物対象においては実施可能である。しかしながら、ヒト由来の試料の入手可能性は限定されており、その処理には大きな費用がかかることから、プロトコルの改良が必要とされる。

30

#### 【0056】

好ましい態様において開示され、下記の実施例 3 に記載されるように、1 回目のバイオパニングの後、複数の臓器から収集されたファージをプールし、プールされた試料を新しい対象に注射し、再びファージレスキューのため複数の臓器を収集することが可能である。多臓器ターゲティングプロトコルは、所望の回数のバイオパニングのため繰り返されうる。この様式においては、臓器回帰ファージの実質的な濃縮を達成しつつ、複数の臓器に対するターゲティングペプチドの単離に必要な対象の数を有意に減少させることが可能である。

40

#### 【0057】

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ヒト対象への注射の後、ファージは、ヒトの臓器、組織、又は細胞型から回収される。ある種の態様において、ファージは、臓器、組織、又は細胞型の試料を、大腸菌 K91 のような線毛陽性細菌へと曝すことにより回収されうる。別の態様において、ファージは、ファージ挿入物を増幅し、挿入物をファージ DNA に連結し、そして連結した DNA から新しいファージを作製することにより回収されうる。

#### 【0058】

##### 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

50



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。

#### 【0059】

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。

#### 【0060】

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。

#### 【0061】

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。

#### 【0062】

【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	$\beta$ -アラニン、 $\beta$ -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	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

## 【0063】

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。

## 【0064】

## 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 and 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。

## 【 0 0 6 5 】

## 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、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、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。

10

20

## 【 0 0 6 6 】

## 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。

30

## 【 0 0 6 7 】

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。

40

## 【 0 0 6 8 】

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

50

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。

#### 【 0 0 6 9 】

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；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。

10

#### 【 0 0 7 0 】

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る用いて、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。

20

#### 【 0 0 7 1 】

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 - 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。

30

#### 【 0 0 7 2 】

##### 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。

40

#### 【 0 0 7 3 】

50

## 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しれない。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。

10

## 【0074】

「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')<sub>2</sub>、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、「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)。

## 【0075】

20

## サイトカインとケモカイン

特定の態様において、臓器、組織、または細胞型に標的化送達するために、特異的生物活性物質を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しれない。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 - および腫瘍壊死因子 - ；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 - のような神経生長因子；血小板増殖因子；TGF - およびTGF - 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 - 、 - 、および - 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-1、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。

30

40

## 【0076】

50

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 - 、M I P 1 - 、および I P - 1 0 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。

#### 【 0 0 7 7 】

##### 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、組織、または細胞型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, 0 2 1, 2 3 6 号および第 4, 4 7 2, 5 0 9 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。蛍光マーカールとの結合物は、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。

#### 【 0 0 7 8 】

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限定的な例には、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）、ネオジム（I I I）、サマリウム（I I I）、イッテルビウム（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。

#### 【 0 0 7 9 】

造影剤または治療剤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<sup>211</sup><sub>1</sub>、<sup>14</sup><sub>1</sub>炭素、<sup>51</sup><sub>1</sub>クロム、<sup>36</sup><sub>3</sub>塩素、<sup>57</sup><sub>5</sub>コバルト、<sup>58</sup><sub>5</sub>コバルト、銅<sup>67</sup><sub>6</sub>、<sup>152</sup><sub>1</sub>ユーロピウム、ガリウム<sup>67</sup><sub>6</sub>、<sup>3</sup><sub>3</sub>水素、ヨウ素<sup>123</sup><sub>1</sub>、ヨウ素<sup>125</sup><sub>1</sub>、ヨウ素<sup>131</sup><sub>1</sub>、インジウム<sup>111</sup><sub>1</sub>、<sup>59</sup><sub>5</sub>鉄、<sup>32</sup><sub>3</sub>リン、レニウム<sup>186</sup><sub>1</sub>、レニウム<sup>188</sup><sub>1</sub>、<sup>75</sup><sub>7</sub>セレンウム、<sup>35</sup><sub>3</sub>硫黄、テクネチウム<sup>99m</sup><sub>9</sub>、およびイットリウム<sup>90</sup><sub>9</sub>が含まれる。<sup>125</sup><sub>1</sub>I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<sup>99m</sup><sub>9</sub>およびインジウム<sup>111</sup><sub>1</sub>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。

#### 【 0 0 8 0 】

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。本発明による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 l<sub>2</sub>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<sup>99m</sup><sub>9</sub>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多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸（D P T A）およびエチレンジアミン四酢酸（E D T A）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。

#### 【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

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、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号に記載されている。

#### 【0082】

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。

#### 【0083】

リガンドをリボ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ボソーム表面に共有結合させることができる。リボソーム、特に、それぞれがホスファチジルエタノールアミン（PE）を含む微小乳化リボソーム（MEL）および大きい単層リボソーム（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。リボソームにPEを含めこと、架橋目的のためにリボ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-リボソームに首尾よく結合されている。リガンドは、リボ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、リボソーム製剤およびリボソームタイプによって決まる。リボソーム表面はまた、非共有結合部位を有してもよい。リガンドとリボ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に関して調べられている。架橋試薬には、グルタルアルデヒド（GAD）、二官能オキシラン（OXR）、エチレングリコールジグリシジルエーテル（EGDE）、および水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）が含まれる。架橋の複合体化学によって、認識物質のアミン残基とリボソームとの結合が確立される。

#### 【0084】

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て、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。

#### 【0085】

核酸

本発明による核酸は、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

10

20

30

40

50

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。

【0086】

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。

【0087】

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。

【0088】

【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		10
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				20
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
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		30
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

## 【 0 0 8 9 】

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。

40

## 【 0 0 9 0 】

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

50

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。

#### 【0091】

##### 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」とは、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。

10

#### 【0092】

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と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。

20

#### 【0093】

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。

#### 【0094】

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ダニル化を行うためにポリアダニル化シグナルを含むであろう。ポリアダ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ポリアダ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。

30

#### 【0095】

##### 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ビトロまたはインビ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と限り、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。

40

#### 【0096】

50

## 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。

### 【0097】

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。

### 【0098】

ウイルス送達系を用いる場合、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ビ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好ましい手段は、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。

### 【0099】

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。

### 【0100】

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」とは、(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または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がこれらに限定されない。

### 【0101】

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(Grunhaus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ようにごく軽度の疾患に関係していると考えられる。

### 【0102】

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

10

20

30

40

50

列 ( I T R ) 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。E 1 領域 ( E 1 A および E 1 B ) 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。E 2 領域 ( E 2 A および E 2 B ) 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 ( R e n a n 、 1 9 9 0 ) 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 ( M L P ) 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。M L P ( 1 6 . 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 ( t r i p a r t i t e ) リーダー ( T P L ) 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。

10

#### 【 0 1 0 3 】

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の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。

#### 【 0 1 0 4 】

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、A d 5 DNA 断片によってヒト胎児腎細胞から形質転換され、E 1 タンパク質を構成的に発現する 2 9 3 と呼ばれる独自のヘルパー細胞株に依存する ( G r a h a m ら、1 9 7 7 )。E 3 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 ( J o n e s および S h e n k 、 1 9 7 8 )、現在のアデノウイルスベクターは、2 9 3 細胞の助けを借りて、E 1、E 3、または双方の領域のいずれかに外来 DNA を有する ( G r a h a m および P r e v e c ら、1 9 9 1 )。本質的に、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約 1 0 5 % をパッケージングすることができ ( G h o s h - C h o u d h u r y ら、1 9 8 7 )、約 2 k b の余分の DNA の容量を提供する。E 1 領域および E 3 領域において置換可能な約 5 . 5 k b 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 k b 以下、またはベクターの全長の約 1 5 % である。アデノウイルスゲノムの 8 0 % 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、E 1 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 ( M O I ) で認められる ( M u l l i g a n 、 1 9 9 3 )。

20

30

#### 【 0 1 0 5 】

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、V e r o 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 2 9 3 である。

#### 【 0 1 0 6 】

レイチャー ( R a c h e r ) ら ( 1 9 9 5 ) は、2 9 3 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 1 0 0 m l ~ 2 0 0 m l を含む 1 L のシリコン処理スピナーフラスコ ( T e c h n e 、 C a m b r i d g e 、 U K ) に接種して天然の細胞凝集体を増殖させる。4 0 r p m 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 ) ( B i b b y S t a r l i n 、 S t o n e 、 U K ) を以下のように用いる。培地 5 m l に再懸濁させた細胞接種物を 2 5 0 m l アーレンマイヤーフラスコ中の担体 ( 5 0 m l ) 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 5 0 m l 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 8 0 % コンフルエントまで増殖させて、その後培地を交換して ( 最終容

40

50

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。

#### 【0107】

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。

10

#### 【0108】

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。

20

#### 【0109】

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(Couch、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。

#### 【0110】

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。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(Rosenfeld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。

30

40

#### 【0111】

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、およびenvを含む。gag遺伝子から上流に認められる配列は、ゲノムをピ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

50

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)。

#### 【0112】

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ら、1975)。

10

#### 【0113】

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(Markowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

20

#### 【0114】

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; Coupar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; Couparら、1988; Horwichら、1990)。

30

#### 【0115】

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-Kaspala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、インビボまたはエクスピボでの使用に首尾よく適合させてもよい。

40

#### 【0116】

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

50

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。

#### 【0117】

リボ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のリボ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ボソーム媒介遺伝子移入に成功した。

10

#### 【0118】

tk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。

#### 【0119】

薬学的組成物

20

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しれない。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。

#### 【0120】

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。

30

#### 【0121】

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。本発明による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を介する。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。

40

#### 【0122】

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

50

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。

10

#### 【0123】

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。

#### 【0124】

##### 治療剤

20

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、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、ピンブラスチンおよびメソトレキセート、ピンクリスチン、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。

30

#### 【0125】

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。

40

#### 【0126】

##### アルキル化剤

50



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。

#### 【0127】

##### 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。

10

#### 【0128】

##### 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。

20

#### 【0129】

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。

#### 【0130】

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（ピ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。

30

#### 【0131】

ピ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。

#### 【0132】

##### 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、プレオマイシン、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。

40

#### 【0133】

##### 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、コルチコステロイドホルモンの例である。

50

## 【0134】

カブ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。ジエ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。リユ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。

## 【0135】

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。

## 【0136】

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。

## 【0137】

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。

## 【0138】

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（Kerrら、1972）。Bcl-2タンパク質ファミリーおよびICE-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Bcl-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（Bakhshiら、1985；ClearyおよびSklar、1985；Clearyら、1986；Tsujimotoら、1985；TsujimotoおよびCroce、1986）。進化的に保存されたBcl-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。

## 【0139】

その発見後、Bcl-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Bcl-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、Bcl-2と類似の機能（Bcl<sub>xL</sub>、Bcl<sub>w</sub>、Bcl<sub>s</sub>、Mcl-1、A1、Bfl-1）を有するか、またはBcl-2機能を相殺して細胞死を促進するか（例えば、Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri）のいずれかであることが示されている。

## 【0140】

本発明の範囲内で考慮されるアポトーシス促進剤の非限定的な例には、グラミシジン、マ

10

20

30

40

50

ガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、(KLAKLAK)<sub>2</sub>、(配列番号：1)、(KLAKKLAK)<sub>2</sub>、(配列番号：2)、(KAAKKKAA)<sub>2</sub>、(配列番号：3)、または(KLGKKLKG)<sub>3</sub>、(配列番号：4)が含まれる。

#### 【0141】

##### 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、IP-10、Gro-、トロポスポンジン、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、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-、ハービマイシンA、PNU145156E、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、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドセタキセル(Docetaxel)(Taxotere)、ポリアミン、プロテアソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤(例えばSU5416またはSU6668、Sugen製、South San Francisco, CA)、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、AGM-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剤に結合したターゲティングペプチドを投与することに関してもよい。

10

#### 【0142】

##### 用量

当業者は、「レミントンの薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、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、FDA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。

20

#### 【0143】

##### 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、それらも本発明の精神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。

30

#### 【0144】

実施例1. ヒト患者を使用したファージディスプレイライブラリによるバイオパニング  
本発明の方法及び組成物のいくつかは、インビボバイオパニングによるヒトの臓器、組織、又は細胞型に対するターゲティングペプチドの同定に関する。一般的に、マウスのような動物対象において使用されるプロトコルは、ヒトには適していない。さらに、ヒトプロトコルにおいては、倫理に関する考慮が大きな役割を果たす。以下の新規な方法は、ヒトでの使用にとって好ましいが、当業者であれば、本明細書に開示された方法及び組成物の改変が、本発明の範囲内で使用されうること理解するであろう。

40

#### 【0145】

##### ヒト調製物

組み入れ基準及び除外基準に従い、プロトコルのための患者を選択した。組み入れ基準には、以下が含まれる：(1)法的に宣言された脳死患者又は終末離脱患者であること；(2)看護及び/又は治療を行っている医師の承認が得られていること；並びに(3)患者の法的責任を有する家族により署名されたインフォームドコンセント文書が得られていること。排除基準は以下であった：(1)責任を有する家族が存在しないこと；(2)HI

50

V陽性患者であること；(3)活動性結核感染を有する患者であること；(4)急性もしくは慢性のB型もしくはC型の肝炎に感染していること；又は(5)患者が臓器移植ドナーとしての可能性を有すること。好ましい態様において、ペプチド表示ライブラリのために使用されるファージを繁殖させるために使用される細菌宿主に対する有害な効果を回避するため、患者は、過去少なくとも6時間、好ましくは24時間、抗生物質を与えられていなかった。

#### 【0146】

インフォームドコンセントが得られた後、患者に手技のための準備を施す前に、患者の親族には、患者がいる部屋から退室するよう求めた。患者は、ファージライブラリの適用のチャンネルを通して生理食塩水のみが流動している、流動性の高いIVライン（好ましくは、中央）を有してした。手技のため必要とされる人員に通知した（即ち、介入放射線科医、内科医、外科医、看護婦、可能であれば神経科医又は神経放射線科医）。生検に必要な材料（骨髓吸入針、腰椎穿刺キット、皮膚生検キット、肝臓、脂質、及び腫瘍のような標的化ペプチド同定のために使用される任意の臓器、組織、又は細胞型の生検標本を採取するための材料、経腹前立腺生検のための材料、血液試料のための40mlの生理食塩水を含む50mlシリンジ、ヘパリンを含む10mlチューブ、並びに実験室試験用の血液試料を採取するための10ml血清収集チューブ）を収集した。注射の日からの試験結果が得られていない場合には、ファージライブラリ注射の前に、肝機能、重炭酸塩、電解質、及び血球数のルーチンのスクリーニングのため血液試料を採取した。

#### 【0147】

実験室において、LB-tet/kan寒天を含む120個の大シャーレ(dish)、及び200個の正規LB-tet/kanプレート(100mm)を調製した(テトラサイクリン濃度=40µg/ml、カナマイシン濃度=50µg/ml)。大腸菌K91kanを、各10mlのTB培地+補助剤を含む10個の独立したチューブで増殖させた。細菌の増殖は、生検開始の約15分~60分前に開始させた。約10<sup>14</sup> TUの（好ましくは一次）ファージライブラリを室温で200mlのリンゲル乳酸で希釈し、必ずしも無菌ではないが清潔な条件下で、4個の50mlシリンジへと吸引した。LB-tet/kanシャーレ又はプレートを37℃インキュベーター内で加温した。1リットルの0.2µg/ml tet及び100µg/ml kanを含むLB培地を37℃の水浴中で加温した。40µg/ml tet及び100µg/ml kanを含む1リットルのLB培地を37℃に加温し、さらに8リットルを室温で調製した。30個のAサイズ及びBサイズのガラスグライNDER及び適当なガラスチューブをオートクレーブ処理した。生検標本が採取される臓器1種類につき3個の50ml Falconチューブを調製した。チューブに10mlのDMEM-PI(PMSF(1mM)、アプロチニン(20µg/ml)、及びロイペプチン(1µg/ml)を含むDMEM)を充填し、組織収集の約15分前に氷上に置いた。組織試料が収集された後、実験室を引き継ぐ4つのチームのため、臓器試料を刈り込み、分割し、又は切り刻むためのオートクレーブ処理済み外科器具（すなわち、少なくとも1個の鉗子、並びに1対のハサミ及びメス）を、各1セット調製した。

#### 【0148】

ファージライブラリの注射

ファージライブラリ適用のためのポートを通して流動する全ての薬物を、ライブラリの注射の間は中止した。患者の血行力学的安定性が損なわれることなく可能であれば、異なるポートを通して流動する全てのIV薬物を、同様にライブラリの注射の間は中止した。流動生理食塩水注入は、注射の間、ライブラリ注射用のIVラインが開いており、流動し続けることを保証した。

#### 【0149】

呼吸（機械的に換気されていない場合）、心拍数、及び血圧のような患者の生命機能をモニタリングし、実験計画をたて(protocoling)、200mlのライブラリ溶液を10分かけて手動で注射した。ラインの閉塞を示す、流動生理食塩水注入の滴下の停止が起こった場合には、注射を停止させた。注射の開始後15分目、組織試料収集（生検

10

20

30

40

50

）を開始した。好ましい生検部位には、骨髓吸引物、肝臓、前立腺、皮膚、骨格筋、腫瘍（適用可能である場合）、脂肪組織、血液（陽性対照として）、血液（赤血球／白血球のため）、及び脳脊髄液（CSF）が含まれていた。

#### 【0150】

細菌の混入を減少させるため、無菌ではないにしても清潔な条件下で、試料を採取した。可能な限り、異なる試料を同時に採取した。小さい試料の場合には、3通りの生検が好ましかった。注射開始から特定の組織試料の収集までの経過時間を記録した。組織試料は、DMEM-PIを含む準備された50mlチューブに置き、氷上で保存した。骨髓については、血液と対立するものとして骨髓の吸引物を確認するため、40ml生理食塩水で希釈された試料に加えて、通常の診断用試料（ヘパリンを含むシリンジへ希釈されない）を採取した。必要に応じて、組織試料の除去後、抗生物質を含む全てのIV薬物を続行した。

10

#### 【0151】

3通り採取された臓器試料以外は、3個の異なる組織片を得るため、清潔な条件下で分割した。各臓器の3個の試料を、以下のようにして取り扱った。1個はバックアップとして-80℃で保存した。1個は、試料が目的の臓器を含むことを確認するため、凍結切片を切り出し（又は骨髓については塗沫を作成し）、HE染色（骨髓についてはパッペンハイム染色）及びファージ染色を実施するため、組織学／病理学の部門へと転送された。いくつかの場合には、組織学試料を、通常のHE染色用、及びLCM（レーザー捕獲顕微鏡（laser capture microscopy））又はLPC（レーザー圧力射出（laser pressure catapulting））用の2個へと分割した。最初の3個のうちの最後のものは、ファージを回収するための細菌感染用に処理した。

20

#### 【0152】

バックアップ組織を凍結させ、病理学用の材料を取り分けた後、ファージレスキューのための試料を計量した。試料は、常に氷上に維持した。試料をガラスチューブ内の1mlのDMEM-PIへと移し、グラインダーでホモジナイズした。骨髓、血液、又はCSFのようないくつかの臓器は、ホモジナイゼーションを必要としなかったが、筋肉のような他の臓器は、効率的にホモジナイズされる前に切り刻む必要があった。血液試料については赤血球の溶解が好ましかった。ホモジナイズされた試料を、オートクレーブ処理された2mlエッペンドルフチューブへと移した。

30

#### 【0153】

組織試料をDMEM-PIと混合し、30秒間ボルテックス処理することにより、組織試料を、1%BSAを含む氷冷DMEM-PIで3回洗浄した。4,000rpmで3分間遠心分離した後、組織ペレットには触れないように、上清を注意深く廃棄した。ペレットの表面には、少量の培地が残っていた。試料を30秒間再びボルテックス処理した後、組織の再懸濁を容易にするためさらなる培地を添加した。1.5mlのDMEM-PI+BSAを添加した後、試料を再び遠心分離した。複数の試料を処理する場合には、組織を、常に氷上に維持した。

#### 【0154】

3回の洗浄後、ペレットを短時間ボルテックス処理し、溶解したペレットを短時間37℃に加熱した後、細菌を添加した。洗浄された組織試料を1.5mlのコンピテントK91-kan細菌（1:10希釈率でOD<sub>600</sub> 0.2）と共に室温で1時間インキュベートし、次いで10mlの0.2µg/mlのテトラサイクリンを含むLB培地を含むファルコンチューブへと移した。RTで20分後、複数のアリコート（40µg/mlのテトラサイクリン及び100µg/mlのカナマイシンを含むLB tetr/kanプレート又はシャーレ）に播いた。以下の量（臓器試料1個当たり）を播いた：2個のシャーレには3ml；2個のシャーレには1ml；3個のシャーレには300µl；3個のシャーレには100µl；3個のシャーレには30µl。

40

#### 【0155】

ビーズ表面に捕捉された可能性があるファージ感染細菌クローンを全て回収するため、播

50

種に使用されたビーズを、続いて2個の10cm LB t e t / k a nプレートへと継代した。シャーレを37 で一晩インキュベートした。

【0156】

残りの2ml~3mlの感染培養物(ホモジナイズされた組織を含む)を、10mlの40μg/mlのテトラサイクリン及び100μg/mlのカナマイシンを含むLB培地(LB t e t / k a n)へと移し、37 で2時間振とうした。この約12mlの培養物を、1リットルのLB t e t / k a nへと移し、37 の振とう器で一晩増殖させた。

【0157】

翌日、標準的なプロトコルに従い、バルク増幅された細菌培養物からファージをレスキューし、可能性のある2回目のインビボ選択のため取り分けた。インキュベーター内のプレート/シャーレから、播種された各臓器につき1500個のよく分離しているコロニーを選出し、1ウェル当たり20μlのPBSを含む96穴プレートへ配列決定のため移した。これは、選出されたコロニーの約3分の2の読み取りから、1000個の配列が得られることを想定したものである。

10

【0158】

1500個のコロニーを選出した後、シャーレ/プレート上の残りのコロニーを、1000mlのLB t e t / k a n中で37 振とう器内で一晩増殖させた。次いで、ファージを、2回目の選択のため、前記と同様に採集した。又は、プレートを冷蔵庫に保存し、1000個~2000個の各コロニーを一度に増殖させた。又は、残りのコロニーをPBSへと移し、必要に応じて感染及び増幅を行うため凍結保存した。

20

【0159】

以下に開示されるように、本発明を使用したインビボバイオパニングにより、ヒトの臓器、組織、及び細胞型に選択的なターゲティングペプチドの多数の非限定的な例が同定された。本発明の方法を使用したヒトバイオパニングの非限定的な例は、本発明により同定されたターゲティングペプチド配列と共に、実施例3に開示される。

【0160】

実施例2. インビボファージディスプレイによるヒト血管系のマッピング

ヒト対象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、インビボ選択法を使用した。ヒトの骨髄、脂質、骨格筋、前立腺、又は皮膚へと移行したペプチドの内部の47,160個のトリペプチドモチーフを調査するため、パターン認識分析プログラムを使用した。この大規模なスクリーニングの結果は、異なる臓器への循環ペプチドモチーフの分布がランダムではないことを示した。各組織において濃縮されたペプチドモチーフのハイスループット分析は、差示的に発現した血管受容体への候補リガンドに存在する配列との類似性を明らかにした。

30

【0161】

これらのデータは、ヒト血管系のリガンド受容体マップの構築のための大きな前進であり、標的化療法の開発にとって広範な意義を有している可能性がある。多くの治療標的は、血管内皮の極めて限定された(しかし、高度に特異的かつ到達可能な)位置に発現する可能性がある。ハイスループットDNA配列決定又は遺伝子アレイにおいては、通常、細胞の位置、並びに解剖学的及び機能的環境が考慮に入れられないため、これらの手法では、介入のための可能性のある標的が見落とされる可能性がある。本発明に開示されたヒトインビボファージディスプレイスクリーニング法は、様々な疾患状態に対する高度に選択的な療法のための基礎を提供しうる、天然に存在するリガンド-受容体対の同定に、唯一、適している。

40

【0162】

材料及び方法

ヴァルデンストレームマクログロブリン血症(B細胞悪性疾患)を有すると診断された48歳の男性カフカス人(Caucasian)患者は、脾臓摘出、全身化学療法(フルダラビン(fludarabine)、ミトキサントロン、及びデキサメタゾン)、及び免疫療法(抗CD20モノクローナル抗体)による治療を以前に受けていた。承認前の数ヶ

50

月、疾患は難治性となり、腹膜後リンパ節腫脹、汎血球減少症、及び顕著な腫瘍細胞による骨髓浸潤を含む臨床的な進行が起こった。血小板減少症の二次性の大量の頭蓋内出血が認められた。迅速な開頭術及び頭血腫の外科的な排除に関わらず、患者は、独立した臨床神経科医により評価されるような、脳に基づく死亡の決定のための正式な基準を満たすまで、昏睡状態のままであり、脳幹機能の進行性の不可逆性の欠損が起こった。進行した癌のため、患者は移植臓器ドナーとしては拒絶された。代理のインフォームドコンセント文書を法的近親者より得た後、インビボファージディスプレイを実施した。

#### 【0163】

インビボファージディスプレイ

CX<sub>7</sub>C (Cはシステインであり、Xは任意のアミノ酸残基である)ファージディスプレイランダムペプチドライブラリの大規模調製を、可能な限り高い挿入物多様度が作出されるよう最適化した(Pasqualiniら、2000)。ライブラリの多様度は、約 $2 \times 10^8$ であり、その最終力価は約 $10^{12}$ 形質導入単位(TU)/mlであった。ファージライブラリ(100mlの生理食塩水に懸濁した全用量 $10^{14}$ TUのファージ)の患者への短時間静脈注入の後、複数の代表的な組織生検を行った。前立腺及び肝臓の試料は、超音波案内の下、針生検により得た。皮膚、脂質組織、及び骨格筋の試料は、外科的切開により得た。骨髓の針吸引物及びコア生検標本も得た。組織病理学的診断は、ベッドサイドで得られた組織から処理された凍結切片を検査することにより決定した。

10

#### 【0164】

宿主細菌感染、ファージ回収、及び組織病理学的分析のため、3通りの試料を処理した。簡単に説明すると、組織を計量し、ガラスのDounceホモジナイザーで磨碎し、1mlのプロテイナーゼ阻害剤含有ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(DMEM - prn; 1mM PMSF、20µg/mlアプロチニン、及び1µg/mlロイペプチン)に懸濁させ、ボルテックス処理し、DMEM - prnで3回洗浄した。ヒト組織ホモジネートを1mlの宿主細菌(対数増殖期の大腸菌K91kan; OD<sub>600</sub>が約2)と共にインキュベートした。細菌培養物の一部を、40µg/mlのテトラサイクリン及び100µg/mlのカナマイシンを含むルリア-ベルターニ(Luria-Bertani)寒天プレートに播いた。プレートを37℃で一晩インキュベートした。細菌コロニーを、各組織及び各未選択ファージライブラリから回収されたファージ挿入物の配列決定のため処理した。ヒト試料は、血液及び体液に関するユニバーサルプレコーションに従い

20

30

#### 【0165】

統計分析

ハイスループット特性パターン認識プログラム(M. D. Anderson Cancer Center、Biostatistics、Houston、TX)は、ファージスクリーニングから得られたペプチドモチーフの分析を自動化するために開発された。SAS(バージョン8、SAS Institute)及びPerl(バージョン5.0)を使用することにより、プログラムは、徹底的なアミノ酸残基配列計数を行い、両方向の全ての可能性のある $n_3$ 個の重複トリペプチドモチーフを表しているN個の別個のトリペプチドモチーフの相対頻度を追跡する( $N - n_3$ )。これは、各標的組織及び未選択CX<sub>7</sub>Cランダムファージディスプレイペプチドライブラリから回収されたファージに適用された。

40

#### 【0166】

「p」を完全無作為の下で特定のトリペプチドモチーフが観察される確率と定義し、 $q = 1 - p$ とすると、 $n_3$ 個の全トリペプチドモチーフ配列のうち特定のトリペプチドモチーフとして特徴決定されたK個の配列が観察される確率は二項確率である( $n_3$ , p)。その確率は、式; $p_K = \frac{[(k+1)/sqr t(n_3 - p q)] - [k/sqr t(n_3 - p q)]}{n_3}$ (式中、 $\frac{1}{n_3}$ は累積ガウス確率である)により近似されうる。 $p_K$ という値は、特定のトリペプチドモチーフの正確にK個の配列の観察の完全無作為性についての試験において、P値として処理されうる。しかしながら、この試験は、実際には得ること

50

が困難な、 $p$ の真の値の正確な知識を必要とする。

#### 【0167】

スクリーニングにおいて濃縮されたモチーフを同定するため、各組織内の各トリペプチドモチーフの計数を、未選択ライブラリ内のトリペプチドモチーフの計数と比較した。CX<sub>7</sub>Cペプチド挿入物から出発して、リフレクション(reflection)及びシングルボートイング(single-voting)の制限のみを受ける、全ての重複内部トリペプチドモチーフの計数を記録した。単一トリペプチドモチーフ(又は、反映されたトリペプチドモチーフ)には、ペプチドを2回以上寄与させなかった。各ペプチドは、5個のトリペプチドモチーフに寄与した。トリペプチドモチーフの計数を、組織内に固定化されている全てのモチーフの総数に対し調整した。ある計数の割り当ての連関の有意性は、フィッシャーの直接法(片側)により査定した。 $P < 0.05$ の場合に、結果を統計的に有意であると見なした。要約すると、分布の無作為性を試験するため、各標的からの特定のトリペプチドモチーフの相対頻度を、未選択ライブラリからのモチーフの頻度と比較した。この手法は、大規模な分割表連関試験である。

10

#### 【0168】

結果

ヒトファージディスプレイバイオパニングにおいて従った一般的な手法が、図1Aに図示されている。ヒト対象を用いたバイオパニングの場合には、マウス研究において使用される比較的小規模なライブラリと比較して、大規模なファージディスプレイライブラリ(約 $2 \times 10^8$ という多様度)の使用が、有利である。従ったプロトコルは、前記の通りであった。

20

#### 【0169】

極めて大規模にファージディスプレイランダムペプチドライブラリを作製すること、及び全身循環系を介してインビボで異なるヒト臓器へと回帰するファージクローンを選択することの実施可能性が、図1Bに示されている。脂質、皮膚、骨髄、骨格筋、前立腺、及び肝臓へと移行するファージを、ヒト対象から回収した(図2参照)。これは、ヒトにおけるインビボファージディスプレイの実施可能性の最初の証明である。

#### 【0170】

静脈投与後に特異的部位へと回帰するペプチド挿入物の分布を決定するため、各標的組織からの全てのトリペプチドモチーフの相対頻度を、未選択ライブラリからの頻度と比較した。5個の組織(骨髄、脂質、骨格筋、前立腺、及び皮膚)の代表的な試料、及び未選択ライブラリから回収された4,716個のファージ挿入物を分析した。3アミノ酸残基は、構造形成及びタンパク質-タンパク質相互作用のための最小の枠組みを提供すると考えられるため、ファージ挿入物分析にはトリペプチドモチーフを選択した(Vendruscoloら、2001)。生化学的認識単位及びトリペプチドリガンドモチーフの受容体との結合の例には、インテグリンに対するRGD(Ruoslahti、1996)、LDV(Ruoslahti、1996)、及びLLG(Koivunenら、2001)、アミノペプチダーゼN/C D13に対するNGR(Pasqualiniら、2000)、並びにメンブレンジペプチダーゼ(membrane dipeptidase)に対するGFE(RajotteおよびRuoslahti、1999)が含まれる。

30

40

#### 【0171】

分析された各ファージ挿入物は、7アミノ酸残基を含有しており、5個の可能性のあるトリペプチドモチーフに寄与した。反映を考慮に入れ、全部で47,160個のトリペプチドモチーフを調査した。ある臓器におけるモチーフ頻度の、未選択ライブラリにおける頻度との比較は、ペプチド分布の非ランダム性を示した(表3)。インビボスクリーニングは1回しか実施されなかったことから、これは、特に注目すべきことである。組織において濃縮されたトリペプチドモチーフの中には、単一の部位において濃縮されたものもあり、複数の部位において濃縮されたものもあった。データは、組織特異的に回帰するペプチドもあれば、いくつかの組織へとターゲティングされるペプチドもあることと一致している。

50



## 【 0 1 7 2 】

【表 3】 ヒトにおけるインビボファージディスプレイにより単離されたペプチドモチーフ

標的臓器/モチーフ	モチーフ頻度	P値	
未選択ライブラリ			
なし	N/A	N/A	
骨髄			
GFS*	1.1	0.0244	
LWS*	1.0	0.0453	10
ARL	1.0	0.0453	
FGG	1.0	0.0453	
GVL	1.1	0.0453	
SGT	2.3	0.0137	
GGG*	2.3	0.0350	
脂質			
EGG*	1.3	0.0400	
LLV*	1.0	0.0269	
LSP*	0.9	0.0402	
EGR	1.1	0.0180	20
FGV	0.9	0.0402	
筋肉			
LVS*	2.1	0.0036	
GER	0.9	0.0344	
前立腺			
AGG*	2.5	0.0340	
EGR	1.0	0.0185	
GER	0.9	0.0382	
GVL	2.3	0.0079	30
皮膚			
GRR*	2.9	0.0047	
GGH*	0.9	0.0341	
GTV*	0.8	0.0497	
ARL	0.8	0.0497	
FGG	1.3	0.0076	
FGV	1.0	0.0234	
SGT	1.0	0.0234	

## 【 0 1 7 3 】

40

表 3 には、標的臓器から単離され、未選択ファージライブラリからは単離されなかったペプチドに存在しているモチーフが挙げられている（フィッシャーの直接法、片側； $P < 0.05$ ）。臓器 1 個当たりの分析されたペプチド配列の数は、未選択ライブラリが 446 個；骨髄が 521 個；脂質が 901 個；筋肉が 850 個；前立腺が 1018 個；皮膚が 980 個であった。星型は、単一の組織においてのみ濃縮されたモチーフを示す。略号 N/A は適用不可を意味する。

## 【 0 1 7 4 】

骨髄（GGG、配列番号：5；GFS、配列番号：6；LWS、配列番号：130）、脂肪組織（EGG、配列番号：7；LSP、配列番号：8；LLV、配列番号：9）、骨格筋（LVS、配列番号：10）、前立腺（AGG、配列番号：11）、及び皮膚（GRR

50

、配列番号：12；GGH、配列番号：13；GTV、配列番号：14）を含むトリペプチドモチーフは、特異的なヒトの臓器、組織、又は細胞型にターゲティングされと考えられた（図2A、表3）。複数の臓器、組織、又は細胞型にターゲティングされと考えられたトリペプチドモチーフには、GVL（配列番号：15）、EGR（配列番号：16）、FGV（配列番号：17）、FGG（配列番号：18）、GER（配列番号：19）、SGT（配列番号：20）、及びARL（配列番号：21）が含まれる（図2B、表3）。これらの各モチーフは、未選択ファージディスプレイライブラリと比較して統計的に有意な、一つ又は複数の標的の臓器、組織、又は細胞型への移行を示した。

#### 【0175】

最初のトリペプチドモチーフを含む7アミノ酸残基の環状ファージペプチド挿入物を分析するため、Clustal Wプログラム（European Molecular Biology Laboratory；EMBL）を使用した。分析は、特定の臓器から単離された複数のペプチドに共有されている4～6残基モチーフを明らかにした（図2A、表4）。各モチーフを、National Center for Biotechnology Information（NCBI；[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html#protein\\_databases](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html#protein_databases)）を介して、オンラインデータベース（BLAST、SWISSPROT、PROSITE、PRODOM、及びBLOCKSを含む）に内で検索した。従来既知のヒトタンパク質内に出現したものもあったし、データベースには見出されなかったものもあった。これらのモチーフは、血管受容体へと回帰する循環リガンド（循環細胞の分泌タンパク質又は表面受容体のいずれか）内に存在している配列を表している可能性が高いため、選択されたペプチドモチーフにより模倣されている可能性のある候補ヒトタンパク質のパネルを編集した（表4）。

#### 【0176】

【表4】ペプチドモチーフにより模倣されている可能性のあるヒトタンパク質の例

拡張された モチーフ	ヒトタンパク質	タンパク質の説明	アクセッション 番号
<b>骨髄</b>			
<b>PGGG</b>	骨形成タンパク質3B	増殖因子、TGF- $\beta$ ファミリーメンバー	NP_004953
<b>PGGG</b>	フィブリン (Fibulin) 3	フィブリン様かつEGF様	Q12805
<b>GHHSFG</b>	ミクロシアリン (Microsialin)	マクロファージ抗原、 糖タンパク質	NP_001242
<b>脂質</b>			
<b>EGGT</b>	<b>LTBP-2</b>	フィブリン様かつEGF様、 TGF- $\beta$ 相互作用剤	CAA86030
<b>TGGE</b>	ソルチリン (Sortilin)	脂肪細胞分化誘導性受容体	CAA66904
<b>GPSLH</b>	プロトカドヘリン $\gamma$ C3	細胞接着	AAD43784
<b>筋肉</b>			
<b>GGSVL</b>	<b>ICAM-1</b>	細胞内接着分子	P05362
<b>LVSGY</b>	<b>Flt4</b>	内皮増殖因子受容体	CAA48290
<b>前立腺</b>			
<b>RRAGGS</b>	インターロイキン11	サイトカイン	NP_000632
<b>RRAGG</b>	<b>Smad6</b>	Smadファミリーメンバー	AAB94137
<b>皮膚</b>			
<b>GRRG</b>	TGF- $\beta$ 1	増殖因子、TGF- $\beta$ ファミリーメンバー	XP_008912
<b>HGG+G</b>	ニューロピリン (Neuropilin) 1	内皮増殖因子受容体	AAF44344
<b>+PHGG</b>	ペンタキシン (Pentaxin)	感染/外傷誘導性糖タンパク質	CAA45158
<b>PHGG</b>	マクロファージ阻害性 サイトカイン1	増殖因子、TGF- $\beta$ ファミリーメンバー	AAB88673
<b>+PHGG</b>	デスモグレイン2	内皮細胞間結合タンパク質	S38673
<b>VTG+SG</b>	デスモグレイン1	表皮細胞間結合タンパク質	AAC83817

10

20

30

## 複数の臓器

<b>EGRG</b>	<b>MMP-9</b>	ゲラチナーゼ	AAH06093
<b>GRGE</b>	<b>ESM-1</b>	内皮細胞特異的分子	XP_003781
<b>NFGVV</b>	<b>CDO</b>	表面糖タンパク質、 Ig様かつフィブロネクチン様	NP_058648
<b>GERIS</b>	<b>BPA1</b>	基底膜タンパク質	NP_001714
<b>SIREG</b>	<b>Wnt-16</b>	糖タンパク質	Q9UBV4
<b>+GVLW</b>	シアロアドヘシン (Sialoadhesin)	Ig様レクチン	AAK00757
<b>WLVG+</b>	<b>IL-5 受容体</b>	可溶性インターロイキン5受容体	CAA44081
<b>GGFR</b>	プレクチン1	内皮限局性接合部局在タンパク質	CA91196
<b>GGFF</b>	<b>TRANCE</b>	TNFファミリーメンバー	AAC51762
<b>+SGGF</b>	<b>MEGF8</b>	EGF様タンパク質	T00209
<b>PSGTS</b>	<b>ICAM-4</b>	細胞間接着糖タンパク質 血管修復ヘパランスルフェート	Q14773
<b>+TGSP</b>	ペールカン (Perlecan)	プロテオグリカン	XP_001825

10

20

40

50

## 【0177】

既知のタンパク質と相同な拡張されたターゲティングモチーフが、骨髄 (GHH SFG、配列番号: 22、PGGG、配列番号: 23)、脂質 (EGGT、配列番号: 24、TGE、配列番号: 25、GPSLH、配列番号: 26)、骨格筋 (GGSVL、配列番号: 27; LVSGY、配列番号: 28)、前立腺 (RRAGGS、配列番号: 29; RRAAGG、配列番号: 30)、皮膚 (GRRG、配列番号: 31; HGGXG、配列番号: 32; PHGG、配列番号: 33; VTGXSG、配列番号: 34)、及び複数の臓器 (GRGE、配列番号: 35; NFGVV、配列番号: 36; GERIS、配列番号: 37; SIREG、配列番号: 38; GVLW、配列番号: 39; WLVG、配列番号: 40; GGFR、配列番号: 41; GGFF、配列番号: 42、SGGF、配列番号: 43; PSGTS、配列番号: 44; TGSP、配列番号: 45、EGRG、配列番号: 131) より同定された。

## 【0178】

表4は、選択されたペプチドと候補タンパク質との配列同一性が100%の領域に相当する配列を示している。保存されたアミノ酸置換は、「+」により示されている。表3からのトリペプチドモチーフは、太字で示されている。

## 【0179】

このようにして同定された相同タンパク質は、ターゲティングファージと結合したヒト受容体に対する天然リガンドを表している可能性がある。例えば、骨形成タンパク質3B (BMP 3B) に含まれているペプチドが、骨髄へと移行したファージより回収された。BMP 3Bは、骨発生を制御することが既知の増殖因子である (Daluiskira、2001)。従って、このタンパク質は、骨髄組織へと回帰するペプチドにより模倣され

る候補リガンドである。また、インターロイキン 11 は、内皮及び前立腺上皮の受容体と相互作用することが示されている (Mahboubi ら、2000)。IL-11 は、前立腺より回収されたターゲティングペプチドにより模倣されうる (表 4)。分泌型リガンドに加え、脂質におけるソルチリンのような、標的組織において選択的に作用しうるいくつかの細胞外又は膜貫通型のタンパク質にも、モチーフが見出された (Lin ら、1997)。ある種のモチーフは、複数の臓器において濃縮されるようである。そのようなペプチドの一つは、血管ホメオスタシスを維持することが既知のタンパク質、パルカンの候補ミメオトープ (mimeotope) である (表 4)。

#### 【0180】

これらの結果を、IL-11 受容体 に対するポリクローナル抗体を使用したインサイチュー染色により確認した。IL-11 は、ヒト前立腺ターゲティングペプチドである、ペプチドモチーフ RRAGGS (配列番号: 29) により模倣されると考えられるサイトカインである。これは、IL-11 受容体 (IL-11R) が、前立腺血管に過剰発現することを示唆する。培養細胞を用いた研究より、IL-11 は、内皮及び前立腺上皮の受容体と相互作用することが示されている (Mahboubi ら、2001; Campbell ら、2001)。しかしながら、前立腺血管における IL-11R の発現は、今まで調査されていない。

#### 【0181】

IL-11R に対する抗体による前立腺薄片の免疫染色は、IL-11R が管腔側前立腺上皮及び前立腺血管に存在することを示した (示していない)。この結果は、ヒトバイオバニングの結果を確認し、ターゲティングペプチド結合により同定された細胞表面受容体の存在が、受容体タンパク質に対する抗体により確認されうることを示している。

#### 【0182】

ヒトにおけるインビボファージディスプレイは、個々の患者のレベルで不均一性を示しうる。例えば、試験された患者は、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症を有していたため、患者における悪性 B 細胞浸潤が、骨髄のスクリーニングの結果に影響を及ぼしたか否かは不明である。しかしながら、血管ターゲティングリガンドを臨床使用のため開発するには、それらは、インビボで罹患組織の標的血管をターゲティングするために十分な程度に、分解に対して抵抗性であり、頑強でなければならない。従って、本明細書に記載された方法の大きな利点は、選択されたターゲティングペプチドが、インビボで発現するため、天然の受容体へと結合するという点である。たとえリガンド-受容体相互作用が (直鎖エピトープではなく) 立体エピトープを介して媒介されるとしても、スクリーニングにおいてバインダーを選択することが可能である。(タンパク質アレイのような) 組み換え系により発現させた膜貫通タンパク質が、インビトロでの精製後、正確な構造及び折り畳みを維持することを保証することは困難であるため、インビボで選択されたペプチドは、天然受容体タンパク質の新規な阻害剤又は活性化剤の同定のような臨床適用に、より適している可能性が高い。

#### 【0183】

バクテリオファージは、抗生物質出現前の時代に、ヒトにおいて広範に使用されていたため、ファージが患者へ安全に投与されうることを示唆する先例が存在する。最終的には、肺癌、前立腺癌、乳癌、又は結腸直腸癌の切除の前に全身的に、又は四肢の肉腫の切除の前に局所的に、ファージライブラリを注入することにより、ヒト血管の分子プロファイルを決定することが可能になるかもしれない。本明細書に開示された方法は、各々のヒトの臓器、組織、又は疾患における血管多様性の概要を示す分子マップの構築を可能にするであろう。

#### 【0184】

前記方法により同定された、脂質、骨格筋、皮膚、骨髄、前立腺、又は複数の臓器に対するヒトターゲティングペプチド配列を、表 5 に挙げる。

#### 【0185】

【表 5】ヒトターゲティングペプチド配列

10

20

30

40

50

配列	配列番号	組織
AEEGGTS	配列番号 :46	脂質
EGGSFNW	配列番号 :47	脂質
IEGGQVG	配列番号 :48	脂質
EGGSVES	配列番号 :49	脂質
EGGIFWH	配列番号 :50	脂質
EGGLSGC	配列番号 :51	脂質
CAEGGAS	配列番号 :52	脂質
AEGGVRG	配列番号 :53	脂質
AEGGRVY	配列番号 :54	脂質
VVEGGVK	配列番号 :55	脂質
VLVGEGG	配列番号 :56	脂質
TKKLEGG	配列番号 :57	脂質
GGLSPNW	配列番号 :58	脂質
TGHLSPG	配列番号 :59	脂質
VLSPGLG	配列番号 :60	脂質
LSPGVKG	配列番号 :61	脂質
LSPWKKR	配列番号 :62	脂質
AWLSPAR	配列番号 :63	脂質
AWRRLSP	配列番号 :64	脂質

10

20

30

LSPDDAL	配列番号 :65	脂質
LVSGGMA	配列番号 :66	骨格筋
LVSGCNT	配列番号 :67	骨格筋
DLVSGYG	配列番号 :68	骨格筋
LVSTSAT	配列番号 :69	骨格筋
TALVSQT	配列番号 :70	骨格筋
WLVSGIG	配列番号 :71	骨格筋
LVSSVFP	配列番号 :72	骨格筋
PSLVSSV	配列番号 :73	骨格筋
GVSLVST	配列番号 :74	骨格筋
QLVSGEP	配列番号 :75	骨格筋
NLVSRRL	配列番号 :76	骨格筋
LVSWRGS	配列番号 :77	骨格筋
DHFLVSP	配列番号 :78	骨格筋
GRGLVSL	配列番号 :79	骨格筋
FPVALVS	配列番号 :80	骨格筋
RWSSLVS	配列番号 :81	骨格筋
WSKSLVS	配列番号 :82	骨格筋
PGRSLVS	配列番号 :83	骨格筋
GRRGSAG	配列番号 :84	皮膚
RPGRRGS	配列番号 :85	皮膚
SGRRGPR	配列番号 :86	皮膚
GLGRRNG	配列番号 :87	皮膚

10

20

30

40

GRRSQT	配列番号 :88	皮膚
LWDGRRH	配列番号 :89	皮膚
GRRSVLT	配列番号 :90	皮膚
FGRNLF	配列番号 :91	皮膚
GAGRRYW	配列番号 :92	皮膚
GRRLWAT	配列番号 :93	皮膚
GVGRRFG	配列番号 :94	皮膚
LEMVGRR	配列番号 :95	皮膚
LSSIGRR	配列番号 :96	皮膚
GRRWIDV	配列番号 :97	皮膚
GRREEGL	配列番号 :98	皮膚
GRRVLGR	配列番号 :99	皮膚
RGLMGRR	配列番号 :100	皮膚
RFLLGRR	配列番号 :101	皮膚
PGVGRRL	配列番号 :102	皮膚
GVIDGRR	配列番号 :103	皮膚
ADGRRLG	配列番号 :104	皮膚
AGRRAQI	配列番号 :105	皮膚
YGRRARE	配列番号 :106	皮膚
PGRRLRM	配列番号 :107	皮膚
GGRRVTL	配列番号 :108	皮膚
EQGGRRL	配列番号 :109	皮膚
SGRRLHP	配列番号 :110	皮膚

10

20

30

40



FDHSGRR	配列番号 :111	皮膚
GRRDVAI	配列番号 :112	皮膚
GGHPRLA	配列番号 :113	皮膚
GGHWRVN	配列番号 :114	皮膚
GGHILEV	配列番号 :115	皮膚
GGHRAQS	配列番号 :116	皮膚
GDGGHRP	配列番号 :117	皮膚
SCVGGHS	配列番号 :118	皮膚
GSGVGGH	配列番号 :119	皮膚
VRGWGGH	配列番号 :120	皮膚
WRGWGGH	配列番号 :121	皮膚
WGSKGTV	配列番号 :122	皮膚
TGSLGTV	配列番号 :123	皮膚
WGTVSDA	配列番号 :124	皮膚
ATGTVGP	配列番号 :125	皮膚
VVGTVAW	配列番号 :126	皮膚
WVVGTVT	配列番号 :127	皮膚
RVVHGTV	配列番号 :128	皮膚
GTVRFFS	配列番号 :129	皮膚
SGGGPGV	配列番号 :132	骨髓
RLGGGLA	配列番号 :133	骨髓
WWGGGVS	配列番号 :134	骨髓
GSARGGG	配列番号 :135	骨髓

10

20

30

40

ARGGGIR	配列番号 :136	骨髓
RAAGGGG	配列番号 :137	骨髓
GSSAGGG	配列番号 :138	骨髓
LGEAGGG	配列番号 :139	骨髓
GGLEGGG	配列番号 :140	骨髓
GNGGGES	配列番号 :141	骨髓
STGGGCS	配列番号 :142	骨髓
LGGGEEW	配列番号 :143	骨髓
HGFSHHG	配列番号 :144	骨髓
RRGFSLG	配列番号 :145	骨髓
GGFSPWL	配列番号 :146	骨髓
GRLVGFS	配列番号 :147	骨髓
TTGVGFS	配列番号 :148	骨髓
GRRAGGS	配列番号 :149	前立腺
TRRAGGG	配列番号 :150	前立腺
SRAGGLG	配列番号 :151	前立腺
SYAGGLG	配列番号 :152	前立腺
DVAGGLG	配列番号 :153	前立腺
GAGGLGA	配列番号 :154	前立腺
GAGGWGV	配列番号 :155	前立腺
AGGTFKP	配列番号 :156	前立腺
LGEVAGG	配列番号 :157	前立腺
GSNDAGG	配列番号 :158	前立腺

10

20

30

40

YRGIAGG	配列番号 :159	前立腺
AGGVAGG	配列番号 :160	前立腺
GGLAGGF	配列番号 :161	前立腺
LLAGGVL	配列番号 :162	前立腺
LVVSAGG	配列番号 :163	前立腺
RTQAGGV	配列番号 :164	前立腺
AGGFGEQ	配列番号 :165	前立腺
AGGLIDV	配列番号 :166	前立腺
AGGSTWT	配列番号 :167	前立腺
AGGDWWW	配列番号 :168	前立腺
AGGGLLM	配列番号 :169	前立腺
VAAGGGL	配列番号 :170	前立腺
LYGAGGS	配列番号 :171	前立腺
CALAGGC	配列番号 :172	前立腺
IGAGGVH	配列番号 :173	前立腺
PKHGVLW	配列番号 :174	複数の臓器
SGVLWYH	配列番号 :175	複数の臓器
GVLWAFG	配列番号 :176	複数の臓器
QARGVLW	配列番号 :177	複数の臓器
GVLVSRM	配列番号 :178	複数の臓器
GTVGVLV	配列番号 :179	複数の臓器
VGVLLPA	配列番号 :180	複数の臓器
GGVLLLS	配列番号 :181	複数の臓器

10

20

30

40

SGVLIHD	配列番号 :182	複数の臓器
PYFGVLA	配列番号 :183	複数の臓器
FFVSGVL	配列番号 :184	複数の臓器
LLAGGVL	配列番号 :185	複数の臓器
GEMGGVL	配列番号 :186	複数の臓器
GRAYGVL	配列番号 :187	複数の臓器
SGVLDGR	配列番号 :188	複数の臓器
WSGGVLH	配列番号 :189	複数の臓器
WSGGVLH	配列番号 :190	複数の臓器
SRQGVLR	配列番号 :191	複数の臓器
GVLTSYQ	配列番号 :192	複数の臓器
RGVLTSQ	配列番号 :193	複数の臓器
RVPGVLS	配列番号 :194	複数の臓器
LGVLSYR	配列番号 :195	複数の臓器
KRGVLGW	配列番号 :196	複数の臓器
GVLGLGF	配列番号 :197	複数の臓器
FLGVLGR	配列番号 :198	複数の臓器
EGVLETS	配列番号 :199	複数の臓器
WWGGVLG	配列番号 :200	複数の臓器
VWSRGVL	配列番号 :201	複数の臓器
GVLRGVS	配列番号 :202	複数の臓器
SFGVLRG	配列番号 :203	複数の臓器
KGSVGVL	配列番号 :204	複数の臓器

10

20

30

40

GGHFGVL	配列番号 :205	複数の臓器
WMDVGVL	配列番号 :206	複数の臓器
AFRVGVL	配列番号 :207	複数の臓器
GVGVLRK	配列番号 :208	複数の臓器
MEGRGAG	配列番号 :209	複数の臓器
SEGRGFM	配列番号 :210	複数の臓器
VEGRNSK	配列番号 :211	複数の臓器
VEGRYTP	配列番号 :212	複数の臓器
FNEGRQM	配列番号 :213	複数の臓器
FEGRSRS	配列番号 :214	複数の臓器
DHVVEGR	配列番号 :215	複数の臓器
WDGTEGR	配列番号 :216	複数の臓器
LDWREGR	配列番号 :217	複数の臓器
RGCEGRV	配列番号 :218	複数の臓器
MTPEGRV	配列番号 :219	複数の臓器
RLFEGRV	配列番号 :220	複数の臓器
REGRRMC	配列番号 :221	複数の臓器
TQFEGRR	配列番号 :222	複数の臓器
SMEGRMF	配列番号 :223	複数の臓器
PGSAEGR	配列番号 :224	複数の臓器
GEGRILA	配列番号 :225	複数の臓器
EGRFSAW	配列番号 :226	複数の臓器
EGRSDIW	配列番号 :227	複数の臓器

10

20

30

40

EGRARWL	配列番号 :228	複数の臓器
EGRERWR	配列番号 :229	複数の臓器
CQCGFGV	配列番号 :230	複数の臓器
RGGFGVR	配列番号 :231	複数の臓器
AVGFGVI	配列番号 :232	複数の臓器
AVGFGVI	配列番号 :233	複数の臓器
IVGFGVA	配列番号 :234	複数の臓器
GNFGVWV	配列番号 :235	複数の臓器
DEPFGVA	配列番号 :236	複数の臓器
VWFGVGS	配列番号 :237	複数の臓器
WFGVSL	配列番号 :238	複数の臓器
FGVGQWA	配列番号 :239	複数の臓器
SMRFGVS	配列番号 :240	複数の臓器
RFGVWTG	配列番号 :241	複数の臓器
RFGVGRV	配列番号 :242	複数の臓器
SGLFGVY	配列番号 :243	複数の臓器
MKGVFGV	配列番号 :244	複数の臓器
AFGVVSD	配列番号 :245	複数の臓器
LYAFGVV	配列番号 :246	複数の臓器
KVFGVVE	配列番号 :247	複数の臓器
FGVRTDL	配列番号 :248	複数の臓器
TIFGVRR	配列番号 :249	複数の臓器
VWPRFGG	配列番号 :250	複数の臓器

10

20

30

40

SRFGGRV	配列番号 :251	複数の臓器
MKFGGRL	配列番号 :252	複数の臓器
RFGGALR	配列番号 :253	複数の臓器
ERFGGDE	配列番号 :254	複数の臓器
FGGSVAP	配列番号 :255	複数の臓器
WFGGSVQ	配列番号 :256	複数の臓器
FGGSWSL	配列番号 :257	複数の臓器
LLFGGSA	配列番号 :258	複数の臓器
MRLFGGT	配列番号 :259	複数の臓器
FGGFFMY	配列番号 :260	複数の臓器
FGGFFMY	配列番号 :261	複数の臓器
EFGGQMN	配列番号 :262	複数の臓器
TFGGLIL	配列番号 :263	複数の臓器
GNSFGGW	配列番号 :264	複数の臓器
RTFGGAG	配列番号 :265	複数の臓器
WVFGGKS	配列番号 :266	複数の臓器
RGFGGLS	配列番号 :267	複数の臓器
LWPSFGG	配列番号 :268	複数の臓器
GERISGP	配列番号 :269	複数の臓器
GERLSSR	配列番号 :270	複数の臓器
TEGERAG	配列番号 :271	複数の臓器
WWLGERV	配列番号 :272	複数の臓器
WAWAGER	配列番号 :273	複数の臓器

10

20

30

40

GVISGER	配列番号 :274	複数の臓器
GPGGERG	配列番号 :275	複数の臓器
LGGGERD	配列番号 :276	複数の臓器
DIAGERV	配列番号 :277	複数の臓器
SRSKGER	配列番号 :278	複数の臓器
KRKGERV	配列番号 :279	複数の臓器
SRPGERQ	配列番号 :280	複数の臓器
CMRRGER	配列番号 :281	複数の臓器
TLRGERN	配列番号 :282	複数の臓器
FGERNRI	配列番号 :283	複数の臓器
RGERWDL	配列番号 :284	複数の臓器
GERTALL	配列番号 :285	複数の臓器
PSGTSSW	配列番号 :286	複数の臓器
SMSGTGM	配列番号 :287	複数の臓器
LFDVSGT	配列番号 :288	複数の臓器
VTGLSGT	配列番号 :289	複数の臓器
NMVISGT	配列番号 :290	複数の臓器
GVSGTLG	配列番号 :291	複数の臓器
RSGLPGK	配列番号 :292	複数の臓器
GRSGTSG	配列番号 :293	複数の臓器
IYSGTLW	配列番号 :294	複数の臓器
CSGTLFC	配列番号 :295	複数の臓器
RSGLQQT	配列番号 :296	複数の臓器

10

20

30

40



LGSGTWS	配列番号 :297	複数の臓器
ESGTATG	配列番号 :298	複数の臓器
FTERSGT	配列番号 :299	複数の臓器
RYLRSGT	配列番号 :300	複数の臓器
PLGSSGT	配列番号 :301	複数の臓器

## 【 0 1 8 6 】

表 3 に挙げられたトリペプチドモチーフは、片側 ( o n e - t a i l ) フィッシャー法を使用して同定された。統計的に有意なヒトターゲティングペプチドモチーフの同定は、部分的には、適用された統計分析の型に依存していた。両側 ( t w o - t a i l ) フィッシャー法を使用した場合、幾分異なるトリペプチドモチーフのセットが同定された。それを表 6 に示す。

## 【 0 1 8 7 】

【表 6】両側フィッシャー法を用いて同定されたヒトトリペプチドモチーフ

組織	モチーフ	標的臓器/ 他の臓器	標的臓器/ 未選択ライブラリ
脂肪組織	EVS ( 配列番号 :302)	0.0059	0.0297
	TAG ( 配列番号 :303)	0.0022	0.0018
	VTV ( 配列番号 :304)	0.0012	0.0073
	GEV ( 配列番号 :305)	0.0397	0.0147
	LPG ( 配列番号 :306)	0.0242	0.0297
	LSP ( 配列番号 :8)	0.0040	0.0147
	PGL ( 配列番号 :307)	0.0402	0.0297
	RGT ( 配列番号 :308)	0.0331	0.0367
	VLL ( 配列番号 :309)	0.0204	0.0297
骨格筋	PAV ( 配列番号 :310)	0.0317	0.0255
	AAV ( 配列番号 :311)	0.0100	0.0255
	LVS ( 配列番号 :10)	0.0042	0.0031
	RGP ( 配列番号 :312)	0.0488	0.0255
	VRM ( 配列番号 :313)	0.0015	0.0255
前立腺	LLL ( 配列番号 :314)	0.0056	0.0169
	RAV ( 配列番号 :315)	0.0040	0.0084
	RGE ( 配列番号 :316)	0.0433	0.0324
皮膚	ARL ( 配列番号 :21)	0.0444	0.0080
	KGG ( 配列番号 :317)	0.0225	0.0317
	GAR ( 配列番号 :318)	0.0016	0.0004

10

20

30

40

	GGR ( 配列番号 :319)	0.0001	0.0262
	GRR ( 配列番号 :12)	0.0284	0.0322
	WGG ( 配列番号 :320)	0.0172	0.0078
骨髄	GGG ( 配列番号 :5)	0.0469	0.0070
	GGM ( 配列番号 :321)	0.0404	0.0067
	GVD ( 配列番号 :322)	0.0182	0.0183
	LGF ( 配列番号 :323)	0.0062	0.0183
	SWV ( 配列番号 :324)	0.0388	0.0183
	SWR ( 配列番号 :325)	0.0388	0.0183

10

## 【0188】

いくつかのトリペプチドモチーフは、いずれの統計分析によっても有意と同定された（表6中、太字で示されている）。二つの統計分析は幾分異なるトリペプチドモチーフのセットを同定したが、いずれかの統計分析により同定されたトリペプチド配列は、本発明の範囲内でのターゲティング適用のため有用であろうと考えられる。

20

## 【0189】

当業者であれば、本実施例において同定された複数のターゲティングペプチド配列が、これらに限定されないが、治療剤の標的化送達又は遺伝子治療、正常及び罹患の臓器、組織、又は細胞型のインビボ画像化、臓器、組織、又は細胞型における受容体及び受容体リガンドの同定、並びに多数のヒト疾患の治療的処置を含む、本発明の範囲内の多数の適用にとって有用であろうことを理解するであろう。

## 【0190】

## 実施例3．多臓器ターゲティング

30

動物モデル系で開発された標準的なプロトコルにおいては、ターゲティングファージを単一の臓器、組織、又は細胞型より収集し、増幅し、第二の動物へと再注射し、次いで同じ臓器、組織、又は細胞型より再収集する。ヒトの場合、この方法は非効率的である。いくつかの別の態様において、ヒトの臓器、組織、又は細胞型のターゲティングの効率は、第一のヒトの複数の臓器、組織、又は細胞型よりファージを収集し、プールし、第二のヒトに注射する、多臓器ターゲティングにより改良されうる。

## 【0191】

各生検より回収されたファージを、プールとして再注射用に調製した場合、ヒトにおいて複数回の選択を実施することが可能である。このプロトコルは、以下の例示的な手順を使用して、マウスモデルにおいて良好に証明された。

40

## 【0192】

ファージライブラリ（C×7C）を、麻酔下のマウスへと静脈注射した。入力量は、約  $10^{10}$  形質導入単位であった。15分後および（ヒトプロトコルを模擬するために）灌流を行うことなく、脳、腎臓、脾臓、子宮、骨格筋、及び小腸を含む多様な臓器を摘出した。ダウンスガラスホモジナイザーで磨砕した後、組織試料を洗浄した。洗浄後、組織を枯渇状態のコンピテント大腸菌 K91 と共にインキュベートし、細菌の段階希釈物を  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  のテトラサイクリン及び  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含む LB t e t / k a n プレート又はシャーレに播いた。既に開示されたようにして、各臓器試料の異なる希釈物を播いた。次いで、シャーレを 37 で一晩インキュベートした。いくつかの臓器へのファージプールの所望の濃縮の後、最後の2回の選択からの約 50 個のファージクロ

50

ーンを配列決定した。コードされたペプチド配列を、濃縮されたペプチド又はペプチドモチーフを同定するため比較した。回帰を他の臓器と比較し、挿入物を含まないファージクローンの回帰とも比較することにより、選択されたクローンの選択性が、個々に確認された。

【0193】

残りの2 ml ~ 3 mlの感染培養物（ホモジナイズされた組織を含む）を、10 mlの40 µg / mlのテトラサイクリン及び100 µg / mlのカナマイシンを含むLB培地（LB t e t / k a n）へと移し、37 °Cで2時間振とうした。この約12 mlの培養物を1リットルのLB t e t / k a nへと移し、37 °Cの振とう器で一晩増殖させた。翌日、標準的なプロトコルに従い、バルク増幅された細菌培養物からファージをレスキューした。これらの試料をプールし、多臓器ターゲティングのため再注射した。

10

【0194】

2回目及び3回目の選択においては、各臓器より回収された全バルクファージ1 mlのうち50マイクロリットル ~ 100マイクロリットルをプールした。得られた混合物を、もう1匹のマウスへ再注射し、同じ臓器を10分後（灌流なし）に回収した。各臓器からのファージの播種によって、子宮を除く各部位についての濃縮が明らかとなり、このことから、多臓器プロトコルを用いた選択が可能であることが示された。多臓器ターゲティングの回数の関数としての、他の臓器におけるターゲティングファージの進行的な濃縮が示された（示していない）。

【0195】

多臓器ターゲティングによる、骨格筋及び腎臓をターゲティングするファージのペプチドモチーフを、下記表7に挙げる。

20

【0196】

【表7】マウスにおける多臓器ターゲティングにより同定されたコンセンサスペプチドモチーフ

VGX	配列番号 :326
VGVG	配列番号 :327
IGS	配列番号 :328
GGA	配列番号 :329
VGA	配列番号 :330
WHG	配列番号 :331
SGEA	配列番号 :332
SNEA	配列番号 :333
SLRD	配列番号 :334
SVRD	配列番号 :335
SARD	配列番号 :336
HVV	配列番号 :337
RTG	配列番号 422
RLG	配列番号 :423
RWG	配列番号 :338
LRWG	配列番号 :339

10

20

RNS	配列番号 :340	
RSG	配列番号 :341	
GRSG	配列番号 :342	
RSGL	配列番号 :343	
YGR	配列番号 :344	
ASL	配列番号 :345	10
SGA	配列番号 :346	
SGR	配列番号 :347	
DSG	配列番号 :348	
SSRV	配列番号 :349	
SSRI	配列番号 :350	
FGSR	配列番号 :351	20
FCSR	配列番号 :352	
FQS	配列番号 :353	
PPV	配列番号 :354	
LFQ	配列番号 :355	
VVA	配列番号 :356	
AVV	配列番号 :357	30
VAS	配列番号 :358	
EVSFSR	配列番号 :359	
EPSLFLR	配列番号 :360	
PGL	配列番号 :361	
PGI	配列番号 :362	
GLA	配列番号 :363	40

VGLAV	配列番号 :364	
VGPAV	配列番号 :365	
TRG	配列番号 :366	
GLS	配列番号 :367	
DWR	配列番号 :368	
RG	配列番号 :369	10
RGG	配列番号 :370	
ARGG	配列番号 :371	
NGR	配列番号 :372	
ALAKG	配列番号 :373	
ALARG	配列番号 :374	
TTQ	配列番号 :375	20
GYR	配列番号 :376	
GYL	配列番号 :377	
DRT	配列番号 :378	
IYS	配列番号 :379	
WLS	配列番号 :380	
IITTES	配列番号 :381	30
IFQTES	配列番号 :382	
IARP	配列番号 :383	
IVRP	配列番号 :384	
HRP	配列番号 :385	
LRPI	配列番号 :386	
KNWAHLR	配列番号 :387	40

ASLR	配列番号	:388	
AGLR	配列番号	:389	
AAV	配列番号	:390	
QLDRH	配列番号	:391	
QWDRH	配列番号	:392	
VEV	配列番号	:393	10
FRYL	配列番号	:394	
FRSL	配列番号	:395	
ARI	配列番号	:396	
ARL	配列番号	:397	
ARLG	配列番号	:398	
ARIG	配列番号	:399	20
RSA	配列番号	:400	
ADWF	配列番号	:401	
ADAF	配列番号	:402	
GWS	配列番号	:403	
TWM	配列番号	:404	
	腎臓		30
LPS	配列番号	:405	
GLP	配列番号	:406	
LLG	配列番号	:407	
LDS	配列番号	:408	
GLR	配列番号	:409	
TVS	配列番号	:410	40



GGGR	配列番号 :411
SGVR	配列番号 :412
VWG	配列番号 :413
VGG	配列番号 :414
LRVR	配列番号 :415
YVR	配列番号 :416
VFG	配列番号 :417
PQL	配列番号 :418
RAA	配列番号 :419
RWA	配列番号 :420
LGS	配列番号 :421

10

## 【 0 1 9 7 】

20

本実施例より、臓器ターゲティングファージの混合物をプールとして投与する、単一の対象における多臓器ターゲティングの実施可能性が示された。この方法は、ヒトにおける血管ターゲティングにとって特に適切である。可能性のある対象の不足、及び各対象の処理費用の高さのため、一回に、単一の臓器をターゲティングするために単一のファージ集団をヒトへ注射することは、現実的でない。

## 【 0 1 9 8 】

30

本明細書において開示および主張される組成物、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、精神、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。より具体的には、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基および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であると考えられる。

## 【 0 1 9 9 】

参照

以下の参照は、これらが、例示的手法又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。

Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS and Zetter B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 817-823, 1997

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

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

10

Arap, W., Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr Opin Oncol* 10, 560-565 (1998).

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

Baldwin, R. W. *et al.* Monoclonal antibody-defined antigens on tumor cells. *Biomembranes* 11, 285-312 (1983).

20

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

Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C. & Samulski, R.J. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific Fab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol* 17, 181-186, 1999.

BERGELSON, J.M., CUNNINGHAM, J.A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E.A., KRITHIVAS, A., HONG, J.S., HORWITZ, M.S., CROWELL, R.L., and FINBERG, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275; 1320-1322.

10

Bielenberg, D. R., M. F. McCarty, C. D. Bucana, S. H. Yuspa, D. Morgan, J. M. Arbeit, L. M. Ellis, K. R. Cleary, and I. J. Fidler. 1999. Expression of interferon-beta is associated with growth arrest of murine and human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 112:802-9.

Boehm T, Folkman J, Browder T, and O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390:404-407, 1997

20

Boon, T. & Old, L. J. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 681-683 (1997).

Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidophosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J.* 12:849-859, 1993.

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.)

30

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

Brooks PC, Stromblad S, Klemle R, Visscher D, Sarkar FH, and Chersesh DA. Anti-integrin  $\alpha v \beta 3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 96:1815- 1822, 1995.

Brooks, P.C. et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683-693, 1996.

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

10

Brousset, P., S. Chittal, D. Schlaifer, J. Icart, C. Payen, F. Rigal-Huguet, J. J. Voigt, and G. Delsol. 1991. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMeX) sections. *Blood* 77:1781-6.

20

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.

Campbell *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 158:25-32, 2001.

30

Cao Y. O'Reilly MS. Marshall B. Flynn E. Ji RW and Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101:1055-1063, 1998.

Carter, H. B., Piantadosi, S. & Isaacs, J. T. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* 143, 742-746 (1990).

Chinni *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 3:1557-64, 1997.

Clark, E.A. and Brugge, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-238, 1995.

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

Cortese, I. *et al.* Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11063-11067 (1996).

10

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

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

Cox, D. R. Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society* 74, 187-220 (1972).

Curiel, D.T. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* 886, 158-171, 1999.

20

Defilippi, P., Bozzo, C., Volpe, G., Romano, G., Venturino, M., Silengo, L. and Tarone, G. Integrin-mediated signal transduction in human endothelial cells: analysis of tyrosine phosphorylation events. *Cell Adh. Commun.* 87:75-86, 1994.

Delannet, M., Martin, F., Bossy, B., Cheresch, D.A., Reichardt, L.F. and Duband, J.L. Specific roles of the  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ , and  $\alpha v \beta 5$  integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. *Development*. 120:2687-702, 1994.

30

Delpino *et al.*, *Mol. Membr. Biol.* 15:21-26, 1998.

Dente, L., Vetriani, C., Zucconi, A., Pelicci, G., Lanfranccone, L., Pelicci, P.G. and Cesareni, G. Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J. Mol. Biol.* 269:694-703, 1997.

Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8:84-87, 1998.

10

Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. The third helix of Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269:10444-10450, 1994

DMITRIEV, I., KRASNYKH, V., MILLER, C.R., WANG, M., KASHENTSEV, A.E., MIKHEEVA, G., BELOUSOVA, N., and CURIEL, D.T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackie virus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* 72; 9706-9713.

20

DOUGLAS, J.T., ROGERS, B.E., ROSENFELD, M.E., MICHAEL, S.I., FENG, M., and CURIEL, D.T. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nature Biotechnol.* 14; 1574-1578.

Dunn, I.S. Mammalian cell binding and transfection mediated by surface-modified bacteriophage lambda. *Biochimie* 78, 856-861, 1996.

Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J. B. & Sioud, M. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol* 23, 3189-3193 (1993).

30

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

40

Enblad, G., K. Sandvej, E. Lennette, C. Sundstrom, G. Klein, B. Glimelius, and G. Pallesen. 1997. Lack of correlation between EBV serology and presence of EBV in the Hodgkin and Reed-Sternberg cells of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 72:394-7.

Engelstädter M *et al.* Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 293-303.

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.

Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A  $\beta$  turn in the cytoplasmic tail of the integrin  $\alpha v$  subunit influences conformation and ligand binding of  $\alpha v\beta 3$ . *J. Biol. Chem.* 269:4641-4647, 1994a.

Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A structural basis for bidirectional integrin signalling. *Princess Takamatsu Symp.* 24:106-117, 1994b.

Filardo, E.J., Brooks, P.C., Deming, S.L., Damsky, C. and Cheresch, D.A. Requirement of the NPXY motif in the integrin  $\beta 3$  subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 130:441-450, 1995.

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

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

Folkman, J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9064-9066, 1998.

Friedlander M, Brooks PC, Sharffer RW, Kincaid CM, Varner JA, and Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha v$  integrins. *Science*, 270: 1500-1502, 1995.

10

20

30

40

Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresch DA. Involvement of integrins  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  in ocular neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9764-9769, 1996.

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

Frisch SM. And Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Cur. Opin. in Cell Biol.* 9:701-706, 1997.

10

Furuya *et al.*, *Cancer Res.* 54:6167-75, 1994.

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

Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM and Greenberg NM. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res.* 56:4096-4102, 1996.

Girod A *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; 5: 1052-1056.

20

Gold R. Differentiation between Cellular Apoptosis and Necrosis by the Combined Use of In Situ Tailing Translation Techniques. *Lab. Invest.* 71: 219, 1994

Goldman CK *et al.* Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 1997; 57: 1447-1451.

GOLDMAN, C.K., ROGERS, B.E., DOUGLAS, J.T., SOSNOWSKI, B.A., YING, W., SIEGAL, G.P., BAIRD, A., CAMPAIN, J.A., and CURIEL, D.T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* 57; 1447-1451.

30

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

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

Grace, M. J., L. Xie, M. L. Musco, S. Cui, M. Gurnani, R. DiGiacomo, A. Chang, S. Indelicato, J. Syed, R. Johnson, and L. L. Nielsen. 1999. The use of laser scanning

40



cytometry to assess depth of penetration of adenovirus p53 gene therapy in human xenograft biopsies. *Am J Pathol* 155:1869-78.

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 and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

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

10

Gram, H., Schmitz, R., Zuber, J.F. and Baumann, G. Identification of phosphopeptide ligands for Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display. *Eur. J. Biochem.* 246:633-637, 1997.

Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ and Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3439-3443, 1995.

Griscelli F. Li H. Bennaceur-Griscelli A. Soria J. Opolon P. Soria C. Perricaudet M. Yeh P and Lu H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6367-72, 1998

20

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

Gunge *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 263:846-854, 2000.

Hall, H., Williams, EJ., Moore, SE., Walsh, FS., Prochiantz, A. and Doherty, P. Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neuron outgrowth by a cell -membrane permeable phosphopeptide. *Current Biology*, 6:580-587, 1996.

30

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). 10
- Hart SL *et al.* Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly- Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.* 269, 12468-12474, 1994
- Hemler, M., Weitzman, J., Pasqualini, R., Kawaguchi, S., Kassner, P. and Berdichevsky, F. Structure, biochemical properties, and biological functions of integrin cytoplasmic domains. In: *Integrins: The Biological Problems* (ed. Yoshi Takada) CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA; pp.1-35, 1994. 20
- Hendrix RW. Evolution: the long evolutionary reach of viruses. *Current Biol.* 9:914-917, 1999.
- HENRY, L., XIA, D., WILKE, M., DEISENHOFER, J., and GERARD, R. (1994). Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *E. coli*. *J. Virol.* 68; 5239-5246.
- Herbst, H., E. Steinbrecher, G. Niedobitek, L. S. Young, L. Brooks, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1992. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 80:484-91. 30
- Herbst, H., F. Dallenbach, M. Hummel, G. Niedobitek, S. Pileri, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1991. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4766-70.
- Hermonat and Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984. 40

Herndier BG, Werner A, Arnstein P, Abbey NW, Demartis F, Cohen RL, Shuman MA and Levy, JA Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals. AIDS 8:575-581, 1996.

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

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

HEYWOOD, S.P., and HOOPER, N.M. (1995). Development and application of a fluorometric assay for mammalian membrane dipeptidase. *Anal. Biochem.* 226; 10-14.

10

HONG, S.S., GALAUP, A., PEYTAVI, R., CHAZAL, N., and BOULANGER, P.A. (1999). Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery by use of an oligopeptide with dual binding specificity. *Hum. Gene Ther.* 10; 2577-2586.

HONG, S.S., KARYAN, L., TOURNIER, J., CURIEL, D.T., and BOULANGER, P.A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha-2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16; 2294-2306.

20

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

Hughes *et al.*, *Cancer Res.* 49:4452-54, 1989

Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992.

Ivanenkov, V., Felici, F. & Menon, A.G. Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1448, 450-462, 1999a.

30

Ivanenkov, V.V., Felici, F. & Menon, A.G. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1448, 463-472, 1999b.

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

Jarrett, A. F., A. A. Armstrong, and E. Alexander. 1996. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 7:5-10.

40

Jarrett, R. F., and J. MacKenzie. 1999. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36:260-9.

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

Joliot, A.H. Triller, A., Volovitch, M. Pernelle, C., and Prochiantz, A. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.*3:1121-1131, 1991a.

10

Joliot, A.H., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. and Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1864-1868, 1991b.

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

Kaplan, E. L. a. M., P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457-481 (1958).

20

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

Kasono, K. et al. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5, 2571-2579, 1999.

Kassner, P.D., Burg, M.A., Baird, A. & Larocca, D. Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 921-928, 1999.

30

Kiang *et al.*, *Chin. J. Physiol.* 40:213-219, 1997

Klemke, R.L., Yebra, M., Bayna, E.M. and Cheresh, D.A. Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin  $\alpha v \beta 5$  -directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol.* 127:859-866, 1994.

- Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Gahmberg CG, Salo T, Konttinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnol* 17:768-774, 1999
- Koivunen E, Gay DA and Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the  $\alpha 5\beta 1$  integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210, 1993.
- Koivunen E, Wang B, and Ruoslahti E. Phage display libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *BioTechnology* 13:265-270, 1995. 10
- Koivunen, E. *et al.* Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. *Methods Mol Biol* 129, 3-17 (1999).
- Kolanus, W. and Seed, B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:725-731, 1997.
- Kolonin MG, Finley RL Jr. Targeting cyclin-dependent kinases in *Drosophila* with peptide aptamers. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci. USA.* 95:14266-71, 1998. 20
- Kong HL and Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis.
- Kouzmitcheva G. A. *et al.* Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 150-60 (2001).
- 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. 30
- KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., MIKHEEV, A.G., MILLER, C.R., BELOUSOVA, N., and CUIEL, D.T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72; 1844-1852.

- KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., and CURIEL, D.T. (1996).  
Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70; 6839–6846.
- Lane T. Shah J. Clinical features and management of benign prostatic hyperplasia. *Hospital Medicine.* 60(10):705-9, 1999.
- Larocca D *et al.* Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J* 1999; 13:727–734. 10
- Larocca, D., Witte, A., Johnson, W., Pierce, G.F. & Baird, A. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Hum Gene Ther* 9, 2393–2399, 1998.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Le Roux, I., Joliot, A.H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A. and Volovitch, M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:9120-9124, 1993 20
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lewis, J.M., Cheresch, D.A. and Schwartz, M.A. Protein kinase C regulates  $\alpha\beta 5$ -dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Cell Biol.* 134:1323-1332, 1996.
- Lin, T.H., Aplin, A.E., Shen, Y., Chen Q., Schaller, M.D., Romer L., Aukhil, I. and Juliano, R.L. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signalling pathways in fibroblast. *J. Cell Biol.* 136:1385-1395, 1997. 30
- Longhurst, C.M. and Jennings, L.K. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* 54:514-526, 1998.

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.

LOUIS, N., FENDER, P., BARGE, A., KITS, P., and CHROBOCZEK, J. (1994). Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J. Virol.* 68; 4104-4106.

Lunardi, C. *et al.* Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells [In Process Citation]. *Nat Med* 6, 1183-1186 (2000).

10

Lynch, C.M. *et al.* Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 80, 497-505, 1997.

Lyons, S. F., and D. N. Liebowitz. 1998. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 25:461-75.

MacGregor, G.R. & Caskey, C.T. Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17, 2365, 1989.

20

Mahboubi *et al.* *J. Immunol.* 164:3837-3846, 2000.

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

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

Martin F *et al.* Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J Virol* 1999; 73: 6923-6929.

30

Martiny-Baron G, and Marme D. VEGF-mediated tumor angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:675-680, 1995.

Mennuni, C. *et al.* Selection of phage-displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. *J Autoimmun* 9, 431-436 (1996).

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

MICHAEL, S.I., HONG, J.S., CURIEL, D.T., and ENGLER, J.A. (1995). Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther.* 2; 660-668.

Mikolajczyk SD. Millar LS. Wang TJ. Rittenhouse HG. Marks LS. Song W. Wheeler TM. Slawin KM. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostatecancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Research.* 60(3):756-9, 2000.

Miller CR *et al.* Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor independent gene transfer. *Cancer Res* 1998; **58**: 5738-5748.

10

Motti, C. *et al.* Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* **146**, 191-198 (1994).

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.

20

Muzyczka N. Adeno-associated virus (AAV) vectors: will they work? *J. Clin. Invest.* 94:1351, 1994

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.

30

Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* **41**, 361-375 (1981).

Olofsson, B. Jeltsch, M., Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999) Current Biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Op Biotechnol*, 10, 528-535.

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

40



Growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2576-2581.

Owens, G. P., R. A. Williamson, M. P. Burgoon, O. Ghausi, D. R. Burton, and D. H. Gilden. 2000. Cloning the antibody response in humans with chronic inflammatory disease: immunopanning of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brain sections with antibody phage libraries prepared from SSPE brain enriches for antibody recognizing measles virus antigens in situ. *J Virol* 74:1533-7.

10

Pallesen, G., S. J. Hamilton-Dutoit, M. Rowe, and L. S. Young. 1991. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease [see comments]. *Lancet* 337:320-2.

Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.

Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 380:364-366, 1996.

20

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.  $\alpha_v$  integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997

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.

30

Pasqualini, R. Vascular Targeting with Phage Display Peptide Libraries. *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162, 1999.

tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727, 2000.

Pelleymounter et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543, 1994.

Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, and G. E. Morris. 1998. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J Med Virol* 56:105-11.

10

Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, L. F. Wang, and G. E. Morris. 2000. Hepatitis C epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a chimeric antigen. *J Med Virol* 60:144-51.

Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Poul, M.A. & Marks, J.D. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J Mol Biol* 288, 203-211, 1999.

20

Prezzi, C. *et al.* Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156, 4504-4513 (1996).

Prezzi, C., M. Nuzzo, A. Meola, P. Delmastro, G. Galfre, R. Cortese, A. Nicosia, and P. Monaci. 1996. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156:4504-13.

PRICE, J.E., POLYZOS, A., ZHANG, R.D., and DANIELS, L.M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cells lines in nude mice. *Cancer Res.* 50; 717-721.

30

Puntoriero, G. *et al.* Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* 17, 3521-3533 (1998).

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.

10

Razzaque, A., Y. Francillon, P. N. Jilly, and F. Varricchio. 1996. Detection of human herpesvirus 6 sequences in lymphoma tissues by immunohistochemistry and polymerase chain reactions. *Cancer Lett* 106:221-6.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.

Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.

20

Renata Pasqualini, W. A., Daniel Rajotte, and Erkki Ruoslahti. in *Phage Display: A Laboratory manual* (ed. Carlos F. Barbas III, D. R. B., Jamie K. Scott, and Gregg J. Silverman) 22.21-22.24 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).

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.

30

ROELVINK, P.W., LEE, G.M., EINFELD, D.A., KOVESDI, I., and WICKHAM, T.J. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286; 1568-1571.

ROMANCZUK, H., GALER, C.E., ZABNER, J., BARSOMIAN, G., WADSWORTH, S.C., and O'RIORDAN, C.R. (1999). Modification of an adenoviral vector with

biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice.  
*Hum. Gene Ther.* 10; 2615-2626.

Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.

Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.

Rowley, M. J. *et al.* Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* **164**, 3413-3419 (2000).

10

Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996

Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11810-11813 (1995).

Sahin, U., Tureci, O. & Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 709-716 (1997).

20

Scala, G. *et al.* Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* **162**, 6155-6161 (1999).

Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am. J. Pathol.* 136:1393-1405, 1990.

30

Schmitz, R., Baumann, G. and Gram, H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinase Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display *J. Mol. Biol.* 260: 664-677, 1996.

Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest.* 100:1-5, 1997.

Short S M, Talbott GA and Juliano RL. Integrin-mediated Signaling Events in Human Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 9: 1969-1980, 1998

Silverstein, *JCI* 74:1625-1633, 1984

Smith G. P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression system. *Curr Opin Biotechnol* 2, 668-73 (1991).

Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993.

10

Smith GP, and Scott JK. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228:1315-1317, 1985

Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.

Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-7.

20

Smith, G.P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:668-673, 1991.

Solowska J, Edelman JM, Albelda SM and Buck CA. (1991) Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin  $\beta 1$  and  $\beta 3$  subunits are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* 114: 1079- 1088.

30

Staratschek-Jox, A., S. Kotkowski, G. Belge, T. Rudiger, J. Bullerdiek, V. Diehl, and J. Wolf. 2000. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells : no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 156:209-16.

Sternberg, N. & Hoess, R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1609-1613, 1995.

40

Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.

Stoeckle *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8:2675-80, 1988.

Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaue *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.

Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.

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

10

Tanaka T, Cao Y, Folkman J and Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* 58:3362-3369, 1998.

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

Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llirbat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P., and Prochiantz, A. Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J. Neurosci.* 15:7158-7167, 1995.

20

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.

Triantafilou *et al.*, *Hum. Immunol.* 62:764-770, 2001.

30

Tureci, O., Sahin, U. & Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3, 342-349 (1997).

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

米国特許第 3,817,837 号

米国特許第 3,850,752 号

40

米国特許第 3,939,350 号

米国特許第 3,996,345 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 4,472,509 号

10

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 5,603,872 号

米国特許第 5,622,699 号

20

米国特許第 5,889,155 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. *Seminars in Cancer Biology*, 9, 211-220.

VIGNE, E., MAHFOUZ, I., DEDIEU, J.F., BRIE, A., PERRICAUDET, M., and YEH, P. (1999). RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J. Virol.* 73; 5156–5161.

30

Vu, T.H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422, 1998.

Vuori K. Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 266:1576-1578, 1994

40

WATKINS, S.J., MESYANZHINOV, V.V., KUROCHKINA, L.P., and HAWKINS, R.E. (1997). The adenobody approach to viral targeting – specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther.* 4; 1004–1012.

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

Weiss, L. M., J. G. Strickler, R. A. Warnke, D. T. Purtilo, and J. Sklar. 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 129:86-91

10

Weiss, L. M., Y. Y. Chen, X. F. Liu, and D. Shibata. 1991. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 139:1259-65.

Weitzman MD, Wilson JM and Eck SL. Adenovirus vectors in cancer gene therapy. In: *Gene Therapy and Vector Systems* 2: 17-25, 1997.

Wells, J.A. and Lowman, H.B. Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:355-362, 1992.

20

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.

Wickham, T.J. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 7, 110-114, 2000.

WICKHAM, T.J., CARRION, M.E., and KOVESDI, I. (1995). Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther.* 2; 750–756.

30

WICKHAM, T.J., LEE, G., TITUS, J., SCONOCCHIA, G., BAKACS, T., KOVESDI, I., and SEGAL, D. (1997a). Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T-cells via CD3. *J. Virol.* 71; 7663–7669.



WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A., and NEMEROW, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not attachment. *Cell* 73; 309-319.

WICKHAM, T.J., ROELVINK, P.W., BROUGH, D.E., and KOVESDI, I. (1996b). Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnol.* 14; 1570-1573.

WICKHAM, T.J., SEGAL, D.M., ROELVINK, P.W., CARRION, M.E., LIZONOVA, A., LEE, G.M., and KOVESDI, I. (1996a). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70; 6831-6838.

10

WICKHAM, T.J., TZENG, E., SHEARS II, L.L., ROELVINK, P.E., LI, Y., LEE, G.M., BROUGH, D.E., LIZONOVA, A., and KOVESDI, I. (1997b). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* 71; 8221-8229.

20

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.*, *J. Nature* 372: 425, 1994.

Zhang J and Russell S. Vectors for cancer gene therapy. *Cancer Met. Rev.* 3:385-401, 1996.

30

ZHANG, W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 6; 113-138.

Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B., Corvol, P. and Cortes-Llorens, C. (1996) Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11968-11973.

40

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 A は、全身循環系を介してヒト組織へと回帰するペプチドに関するインビボファージディスプレイスクリーニングを示す。研究の概略的なフローチャート。図 1 B は、インビボの様々なヒト組織からのファージ回収を示す。実施例 3 記載のように組織試料が処理され、ファージが回収された。各生検部位より得られた組織 1 グラム当たりのファージ形質導入単位 (TU) の平均値 ± 標準誤差が示されている。

【図 2 A】Clustal W プログラム (European Molecular Biology Laboratory; EMBL) を用いた、拡張回帰モチーフの同定。各単一組織中で濃縮された、選択されたトリペプチド (表 3) を含むペプチド配列を、各ク

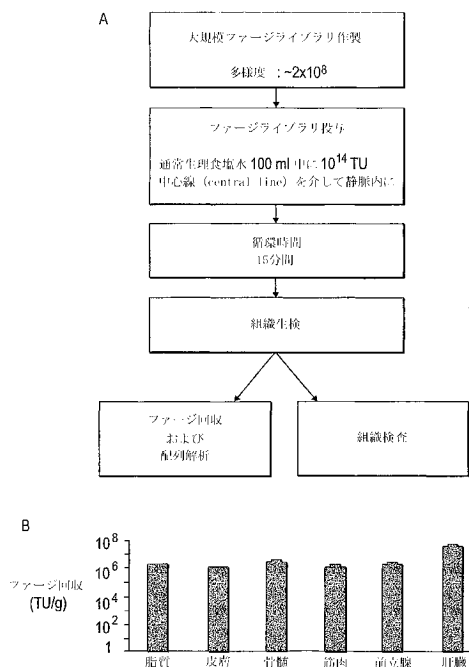
50

ラスター由来の異なるペプチドの間で共有されているより長いモチーフを得るため、クラスター内で整列化した。ソフトウェアは、複数のペプチド配列内での配列同一性及び配列類似性を登録し、最も同一性／類似性の高いペプチドを互いの隣に配置することにより、配列を整列化する。最初のペプチドモチーフ及び拡張されたペプチドモチーフは、太字で強調されている。

【図2B】Clustal Wプログラム(European Molecular Biology laboratory; EMBL)を用いた、拡張された回帰モチーフの同定。複数の組織中で濃縮された、選択されたトリペプチド(表3)を含むペプチド配列を、各クラスターからの異なるペプチドの間で共有されているより長いモチーフを得るため、クラスター内で整列化した。ソフトウェアは、複数のペプチド配列内での配列同一性及び配列類似性を登録し、最も同一性／類似性の高いペプチドを互いの隣に配置することにより、配列を整列化する。最初のペプチドモチーフ及び拡張されたペプチドモチーフは、太字で強調されている。

10

【図1】



【図2A】

骨髄	脂肪	骨格筋
SGGGPGV RLGGGLA WWGGGV GSARGGG ARGGGIR RAAGGGG GSSAGGG LGEAGGG GGLGGG GVGGES STGGCS LGGGEEW	HGFSHIG RRGFSLG GGFSPWL GRLVGFS TTGVGFS	AEEGGTS EGGSFNW IEGGQVG EGGSVES EGGIFWH EGGLSGC CAEGGAS AEGGVRG AEGGRVY VVEGGVK VLVGGG TKLEGG
	GGLSPNW TGHLSPG VLSPGLG LSPQVKG LSPWKKR AW--LSPAR AWRRLSP LSPDDAL	LVSGGMA LVSGCNT DLVSGYG LVTSAT TALVSQT WLVSIG LVSSVFP PSLVSVV GVLVSST QLVSSEP NLVSRRL LVSWRGS DHFLVSP GRGLVSL FPVALVS RWSSLV WSKSLVS PGRSLVS
前立腺	皮膚	
GRRAGGS TRRAGGG SRAGG-LG SYAGG-LG DVAGG-LG GAGG-LGA GAGG-WGV AGGTFKP LGEVAGG GSNDAGG YRGVAGG AGGVAGG GGLAGG-F LLAGG-VL LVVSAGG RTQAGG-V AGG-FGEQ AGG-LIDV AGGSTWT AGGDWWW AGGGLLM VAGGGL LYGAGGS CALAGG-C IGAGGVH	GRRGSAG GRRGSAG RPGRRGS SGRRGPR GLRRNG GRRRSQT LWDGRRH GRRSVLT FGRRLNF GAGRRYV GRRLWAT GVGRRFG LEMVGRR LSSIGRR GRRWIDV GRREEGL GRRVLGR RGLMGRR RFLGRR PGVGRRL GVIGRR ADGRRLG AGRRQI YGRRARE PGRRLRM GRRVTL EQGRRRL SGRRLHP FDHSGRR GRDDVAI	GGHPRLA GGHWRVN GGHILEV GGHRAQS GDGHRP SCVGGHS GSGVGGH VRGWGGH WRGWGGH
	WGSKGTV TGS LGTV WGTVSDA ATGTGVP VV-GTVW WVV-GTVT RVVHGTV GTVRFFS	

[illegible]

## 複数の臓器

## 【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 02/20723 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US01/28044
- (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 SYSTEM [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 Boulevard, 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 report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/20723 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETING PEPTIDES IN HUMANS *IN VIVO*

(57) Abstract: The present invention concerns methods and compositions for identifying human targeting peptides sequences. In preferred embodiments, a primary phage library is administered to a human *in vivo* and phage bearing targeting peptides are collected from selected organs, tissues or cells types. In more preferred embodiments, collected phage are amplified, pooled and administered to a second human for another round of selection. The peptides are of use for targeted delivery of therapeutic agents, including gene therapy vectors. Such targeted delivery may be used for detection, diagnosis or treatment of human diseases. In certain embodiments, the peptide may be attached to an imaging agent and administered to a human to obtain an image or to diagnose a disease state. Also disclosed are a large number of targeting peptide sequences and consensus motifs that are selective for human organs or tissues, obtained by the methods of the present invention.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

**COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETING****PEPTIDES IN HUMANS *IN VIVO*****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, 1R1CA90810-01 and 1R01CA82976-01 from the National Institutes of Health. The government has certain rights in this invention.

**1. Field of the Invention**

The present invention concerns the fields of molecular medicine and targeted delivery of therapeutic agents. More specifically, the present invention relates to compositions and methods for identification and use of peptides that selectively target organs, tissues or cell types in the human body.

**2. 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, tissue or cell type confined disease states would be greatly facilitated by the development of compositions and methods for targeted delivery to a desired organ, tissue or cell type of a therapeutic agent.

Recently, an *in vivo* selection system was developed using phage display libraries to identify organ, tissue or cell type 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

immunoglobulins (Smith and Scott, 1986, 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, tissues or cell types, 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., 1994; Pasqualini et al., 2000). In addition to identifying individual targeting peptides selective for an organ, tissue or cell type (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, tissue or cell type 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).

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 organ, tissue or cell type selective targeting sequences in humans that can be of clinical use for targeted delivery of therapeutic agents and *in vivo* imaging.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention solves a long-standing need in the art by providing compositions and methods for the identifying and using targeting peptides that are selective for human organs, tissues or cell types.

Certain embodiments of the present invention concern methods of identifying targeting peptides, comprising injecting a phage display library into the circulation of a human, obtaining a sample of one or more organs, tissues or cell types from said human and identifying one or more targeting peptides from phage present in said organ, tissue or cell type. In preferred embodiments, phage are recovered from an organ, tissue or cell type of a first human subject and further selected by reinjection into the circulation of a second human, followed by obtaining a sample of the same organ, tissue or cell type and identifying targeting peptides. Screening may be performed multiple times in order to obtain targeting phage of sufficient selectivity.

In another preferred embodiment, the human is brain dead or a terminal wean patient. More preferably, the individual is not a candidate organ donor. In other preferred embodiments, one or more primary phage libraries may be amplified *in vitro*, preferably to  $10^{14}$  TU (transforming units) or higher, more preferably with a diversity of  $2 \times 10^8$  or more different clones, prior to injection into a human subject. In an even more preferred embodiment, targeting peptide sequences are subjected to a custom designed statistical analysis, described in detail in the following Examples, to identify statistically significant targeting peptide sequences.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

In yet another preferred embodiment, phage isolated from multiple organs, tissues or cell types from a first human are mixed together and injected into the circulation of a second human, followed by recovery and characterization of phage from the same organs, tissues or cell types of the second human.

In some embodiments, phage collected from an organ, tissue or cell type may be recovered by contacting a homogenate of the organ, tissue with an appropriate host cell, such as *E. coli* K91 kan, and allowing the phage to multiply within the host cell in between rounds of selection. In alternative embodiments, phage may be recovered by direct amplification, such as by PCR™ of the targeting peptide encoding sequences.

In certain embodiments, the targeting peptides of the present invention are of use for the selective delivery of therapeutic agents, including but not limited to gene therapy vectors and fusion proteins, to specific organs, tissues or cell types in human patients. 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 in a human patient. Although such disease states include those where the diseased cells are confined to a specific organ, tissue or cell type, such as non-metastatic cancer, other disease states may be treated by an organ, tissue or cell type-targeting approach.

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 any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.

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 any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.



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 survival factor, an anti-apoptotic agent, a hormone antagonist, a virus, a bacterium, a yeast cell, a mammalian cell, 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 human. In preferred embodiments, the pro-apoptosis agent is gramicidin, magainin, melittin, defensin, cecropin, (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1), (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) or (KLGKKLG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:4). In other preferred embodiments, the anti-angiogenic agent is 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, 2-methoxyestradiol, proliferin-related protein, carboxamidotriazole, CM101, Marimastat, pentosan polysulphate, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon-α, herbimycin A, PNU145156E, 16K prolactin fragment, Linomide, thalidomide, pentoxifylline, genistein, TNP-470, endostatin, paclitaxel, Docetaxel, polyamines, a proteasome inhibitor, a kinase inhibitor, a signaling inhibitor (SU5416 or SU6668, Sugen, South San Francisco, CA), accutin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 or minocycline. 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.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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, a yeast 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 human. 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.

Additional embodiments of the present invention concern fusion proteins comprising at least 3 contiguous amino acids of a sequence selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.

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.

Other embodiments concern methods of targeted delivery comprising selecting a targeting peptide for a desired organ, tissue or cell type, 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 human. Preferably, the targeting peptide is selected to include at least 3 contiguous amino acids from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325. In certain preferred embodiments, the organ, tissue or cell type is bone marrow, skin, skeletal muscle, prostate or adipose tissue. In

WO 02/20723

PCT/US01/28044

other 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 human organ, tissue or cell type can be targeted for delivery, using targeting peptides attached to any molecule, macromolecular complex or gene therapy vector.

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 human with the disease state. Preferably, the targeting peptide includes at least three contiguous amino acids selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325. In preferred embodiments the disease state is diabetes mellitus, inflammatory disease, arthritis, atherosclerosis, cancer, autoimmune disease, bacterial infection, viral infection, cardiovascular disease, degenerative disease or macular degeneration.

Another embodiment of the present invention concerns compositions and methods of use of tumor targeting peptides against human cancers. Human 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 patient 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 human 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 patient. 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.

#### **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. 1A.** *In vivo* phage display screening for peptides that home to human tissues through the systemic circulation. Schematic flowchart of the study.

**FIG. 1B.** Phage recovery from various human tissues *in vivo*. Tissue samples were processed and phage recovered as described in Example 3. Shown are means  $\pm$  standard errors of the mean of phage transducing units (TU) per gram of tissue obtained from each biopsy site.

**FIG. 2A.** Identification of extended homing motifs with the ClustalW program (European Molecular Biology laboratory; EMBL). Peptide sequences containing selected tripeptides (Table 3) enriched in each single tissue were aligned in clusters to obtain longer motifs shared between different peptides from each cluster. The software registers sequence identities and similarities among multiple peptide sequences and aligns the sequences by placing peptides with the most identity/similarity next to one another. The original and extended peptide motifs are shown highlighted in bold.

**FIG. 2B.** Identification of extended homing motifs with the ClustalW program (European Molecular Biology laboratory; EMBL). Peptide sequences containing selected tripeptides (Table 3) enriched in multiple tissues were aligned in clusters to obtain longer motifs shared between different peptides from each cluster. The software registers sequence identities and similarities among multiple peptide sequences and aligns the sequences by placing peptides with the most identity/similarity next to one another. The original and extended peptide motifs are shown highlighted in bold.

#### **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 human organ, tissue or cell type. 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. Administration to a human of a library of such phage that have been genetically engineered to express a multitude of such targeting peptides of different amino acid sequence is followed collection of one or more organs, tissues or cell types from the human and identification of phage found in that organ, tissue or cell type. A phage expressing a targeting peptide sequence is considered to be selectively localized to a tissue or organ if it exhibits greater binding in that tissue or organ compared to a control tissue or organ. Preferably, selective localization of a targeting peptide will result in a two-fold or higher enrichment of the phage in the target organ, tissue or cell type, compared to a control organ, tissue or cell type. Alternatively, a phage expressing a targeting peptide sequence that exhibits selective localization preferably shows an increased enrichment in the target organ compared to a control organ when phage recovered from the target organ are reinjected

WO 02/20723

PCT/US01/28044

into a second host for another round of screening. Further enrichment may be exhibited following a third round of screening. Another alternative method to determine selective localization is that phage expressing the putative target peptide preferably exhibit a two-fold, more preferably a three-fold or higher enrichment in the target organ 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 organ 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, magnetic beads and microdevices. 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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, tissue or cell type.

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 vivo* 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, disclose 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 *et al.*, 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).

Amino acid sequences for a targeting given organ, tissue or cell type can be isolated by "biopanning" (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Pasqualini, 1999). In brief, a

WO 02/20723

PCT/US01/28044

library of phage containing putative targeting peptides is administered to an animal or human and samples of organs, tissues or cell types containing phage are collected. In preferred embodiments 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, tissue or cell type and then amplified by growing them in host bacteria. If desired, the amplified phage can be administered to a human host and samples of organs, tissues or cell types 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 peptide, it can be isolated, purified and cloned by using standard biochemical methods (Pasqualini, 1999; Rajotte and Ruoslahti, 1999).

*Choice of phage display system.*

Previous *in vivo* selection studies performed in mice preferentially employed libraries of random peptides expressed as fusion proteins with the gene III capsular 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. It is preferred to use primary libraries, which are less likely to have an over-representation of defective phage clones (Koivunen *et al.*, 1999). The preparation of a library may be amplified to between  $10^8$ - $10^9$  transducing units (T.U.)/ml. Preferably,  $10^{14}$  TU or more are prepared from a primary library for injection into human subjects. In certain embodiments, a bulk amplification strategy is applied between each round of selection.



WO 02/20723

PCT/US01/28044

Phage libraries displaying linear, cyclic, or double cyclic peptides may be used within the scope of the present invention. However, phage libraries displaying 3 to 10 random residues in a cyclic insert (CX<sub>3-10</sub>C) 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 CX<sub>3</sub>C X<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C; 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 means of identifying peptides that home to the angiogenic vasculature of tumors has been devised, as described below. 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 sequences RGD-4C, NGR, and GSL. The RGD-4C peptide has previously been identified as selectively binding  $\alpha_v$  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 has been identified as  $\alpha_v$  integrins (Pasqualini *et al.*, 1997). The  $\alpha_v$  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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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  $\alpha_v$  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).

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 *in vivo* 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 preferred embodiments, separation of phage bound to the cells of a target organ, tissue or cell type from unbound phage is achieved using the BRASIL technique (Provisional Patent Application No. 60/231,266 filed September 8, 2000; U.S. Patent Application entitled, "Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL)" by Arap, Pasqualini and Giordano, filed concurrently herewith, incorporated herein by reference in its entirety). In BRASIL (Biopanning and Rapid Analysis of Soluble Interactive Ligands), an organ, tissue or cell type is gently separated into cells or small clumps of cells that are suspended in an aqueous phase. The aqueous phase is layered over an organic 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 aqueous phase. This allows a more efficient separation of bound from unbound phage, while maintaining the binding interaction between phage

WO 02/20723

PCT/US01/28044

and cell. BRASIL may be performed in an *in vivo* protocol, in which organs, tissues or cell types are exposed to a phage display library by intravenous administration, or by an *ex vivo* protocol, where the cells are exposed to the phage library in the aqueous phase before centrifugation.

In certain embodiments, a subtraction protocol is used with BRASIL or other screening protocols 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.

*Preparation of large scale primary libraries*

In preferred embodiments, primary phage libraries are amplified before injection into a human subject. A phage library is prepared by ligating targeting peptide encoding sequences into a phage vector, such as fUSE5. The vector is transformed into pilus negative host *E. coli* such as strain MC1061. The bacteria are grown overnight and then aliquots are frozen to provide stock for library production. Use of pilus negative bacteria avoids the bias in libraries that arises from differential infection of pilus positive bacteria by different targeting peptide sequences.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

To freeze, bacteria are pelleted from two thirds of a primary library culture (5 liters) at 4000 x g for 10 min. Bacteria are resuspended and washed twice with 500 ml of 10% glycerol in water, then frozen in an ethanol/dry ice bath and stored at -80°C.

For amplification, 1.5 ml of frozen bacteria are inoculated into 5 liters of LB medium with 20 µg/ml tetracycline and grown overnight. Thirty minutes after inoculation, a serial dilution is plated on LB/tet plates to verify the viability of the culture. If the number of viable bacteria is less than 5-10 times the number of individual clones in the library ( $1-2 \times 10^8$ ) the culture is discarded.

After growing the bacterial culture overnight, phage are precipitated. About ¼ to 1/3 of the bacterial culture is kept growing overnight in 5 liters of fresh medium and the cycle is repeated up to 5 times. Phage are pooled from all cycles and used for injection into human subjects.

#### Humans

The methods used for phage display biopanning in the mouse model system require substantial improvements for use with humans. A preferred example of the phage display protocol used for human patients, disclosing these improvements, is described in detail in Examples 1 and 2 below.

In general, humans suitable for use with phage display are either brain dead or terminal wean patients. The amount of phage library (preferably primary library) required for administration must be significantly increased, preferably to  $10^{14}$  TU or higher, preferably administered intravenously in approximately 200 ml of Ringer lactate solution over about a 10 minute period.

The amount of phage required for use in humans has required improvement of the mouse protocol, increasing the amount of phage available for injection by five orders of magnitude. To produce such large phage libraries, the transformed bacterial pellets recovered from up to 500 to 1000 transformations are amplified up to 10 times in the bacterial host, recovering the phage from each round of amplification and adding LB Tet medium to the bacterial pellet for collection of additional phage. The phage

WO 02/20723

PCT/US01/28044

inserts remain stable under these conditions and phage may be pooled to form the large phage display library required for humans.

Samples of various organs and tissues are collected starting approximately 15 minutes after injection of the phage library. Samples are processed as described below and phage collected from each organ, tissue or cell type of interest for DNA sequencing to determine the amino acid sequences of targeting peptides.

With humans, the opportunities for enrichment by multiple rounds of biopanning are severely restricted, compared to the mouse model system. A substantial improvement in the biopanning technique involves polyorgan targeting.

*Polyorgan targeting*

In the standard protocol for phage display biopanning, phage from a single organ are collected, amplified and injected into a new host, where tissue from the same organ is collected for phage rescue and a new round of biopanning. This protocol is feasible in animal subjects. However, the limited availability and expense of processing samples from humans requires an improvement in the protocol.

As disclosed in a preferred embodiment, described in Example 3 below, it is possible to pool phage collected from multiple organs after a first round of biopanning and inject the pooled sample into a new subject, where each of the multiple organs may be collected again for phage rescue. The polyorgan targeting protocol may be repeated for as many rounds of biopanning as desired. In this manner, it is possible to significantly reduce the number of subjects required for isolation of targeting peptides for multiple organs, while still achieving substantial enrichment of the organ-homing phage.

In preferred embodiments, phage are recovered from human organs, tissues or cell types after injection of a phage display library into a human subject. In certain embodiments, phage may be recovered by exposing a sample of the organ, tissue or cell type to a pilus positive bacterium, such as *E. coli* K91. In alternative embodiments,

WO 02/20723

PCT/US01/28044

phage may be recovered by amplifying the phage inserts, ligating the inserts to phage DNA and producing new phage from the ligated DNA.

#### 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-

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 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- Amino adipic acid	Hyl	Hydroxylysine
Bala	$\beta$ -alanine, $\beta$ -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	Ide	Isodesmosine
Ahe	2-Aminoheptanoic acid	Ale	allo-Isoleucine
Aib	2-Aminoisobutyric acid	MeGly	N-Methylglycine, sarcosine
Baib	3-Aminoisobutyric acid	MeIle	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.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

*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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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.

#### *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 humans, *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')<sub>2</sub>, 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.*, 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, tissue or cell type. 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; prorelaxin; 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- $\alpha$  and - $\beta$ ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- $\beta$ ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$ ; 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 $\alpha$ , 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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-alpha, 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, tissues or cell types. 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,

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 astatine<sup>211</sup>, <sup>14</sup>carbon, <sup>51</sup>chromium, <sup>36</sup>chlorine, <sup>57</sup>cobalt, <sup>58</sup>cobalt, copper<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, gallium<sup>67</sup>, <sup>3</sup>hydrogen, iodine<sup>123</sup>, iodine<sup>125</sup>, iodine<sup>131</sup>, indium<sup>111</sup>, <sup>59</sup>iron, <sup>32</sup>phosphorus, rhenium<sup>186</sup>, rhenium<sup>188</sup>, <sup>75</sup>selenium, <sup>35</sup>sulphur, technetium<sup>99m</sup> and yttrium<sup>90</sup>. <sup>125</sup>I is often being preferred for use in certain embodiments, and technetium<sup>99m</sup> and indium<sup>111</sup> 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-<sup>99m</sup> by ligand exchange process, for example, by reducing pertechnetate 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  $\text{SnCl}_2$ , 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 diethylenetriaminedipentaacetic 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 malimide residue, allowing coupling in one example, of aldehydes to free thiols. The cross-linking reagent can be modified to cross-link various functional groups.

#### 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,

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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.

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 preferred means 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, but is not limited to, constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to express an antisense or a sense 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



WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 E3, 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 (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) and vaccine development (Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1991). Animal studies have 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 Muzycska, 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 *apri-* 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 may be 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 innocula. 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 may 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, nitrosourea, plicomycin, procarbazine, raloxifene, tamoxifen, taxol, temazolomide (an aqueous form of DTIC), transplatin, 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



WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 fall 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 may be used 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 (Bakhshi et al., 1985; 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<sub>XL</sub>, Bcl<sub>w</sub>, Bcl<sub>s</sub>, 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)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1), (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) or (KLGKKLG)<sub>3</sub> (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- $\beta$ , thrombospondin, 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 (Taxotere), polyamines, a proteasome inhibitor, a kinase inhibitor, a signaling inhibitor (e.g.,

WO 02/20723

PCT/US01/28044

SU5416 or SU6668 from Sugen, South San Francisco, CA), accutin, angiostatin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 or minocycline.

#### *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. Biopanning with Phage Display Libraries Using Human Patients**

Certain of the methods and compositions of the present invention concern identification of targeting peptides for human organs, tissues or cell types by *in vivo* biopanning. Generally, protocols used in animal subjects, such as mice, are not suited for humans. Further, ethical considerations play a large role in human protocols. The following novel methods are preferred for use with humans, although the skilled artisan

WO 02/20723

PCT/US01/28044

will realize that variations on the methods and compositions disclosed herein may be used within the scope of the present invention.

#### *Human preparation*

Patients were selected for the protocol according to inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria include: (1) patient legally declared brain dead or terminal wean patient; (2) approval of attending and/or treating physicians; and (3) approved written informed consent form signed by the patient's legally responsible family member. Exclusion criteria were: (1) the absence of a responsible family member; (2) HIV positive patient; (3) patient with active tuberculosis infection; (4) acute or chronic hepatitis B or C infections; or (5) patient was a potential organ transplant donor. In preferred embodiments, the patient was not on antibiotics for at least the previous 6 hrs, preferably the last 24 hrs, in order to avoid detrimental effects on the bacterial hosts used to propagate the phage used for the peptide display library.

After informed consent and before the patient was prepared for the procedure, relatives of the patient were asked to leave the room the patient was in. The patient had a well running IV line (preferably central) with nothing but saline running through the channel of application of the phage library. Personnel required for the procedure were notified (i.e., intervention radiologist, internist, surgeon, nurse, possibly neurologist or neuroradiologist). Materials needed for biopsies were collected: bone marrow aspiration needle, lumbar puncture kit, skin biopsy kit, materials for taking biopsies of any organ, tissue or cell type used for targeted peptide identification, such as liver, fat and tumor, materials for transabdominal prostate biopsy, 50 ml syringe with 40 ml saline for blood sample, 10 ml tube containing heparin and 10 ml serum collection tube to draw blood sample for lab tests. Before phage library injection, blood samples were drawn for routine screening of liver function, bicarbonate, electrolytes and blood count, unless test results from the day of the injection were available.

In the laboratory, 120 large dishes with LB-tet/kan agar as well as 200 regular LB tet/kan plates (100 mm) were prepared (tetracycline concentration = 40 µg/ml, kanamycin concentration = 50 µg/ml). *E. coli* K91 kan were grown in 10 independent

tubes, each containing 10 ml TB medium plus supplements. Growth of bacteria was started approx. 15-60 min prior to beginning the biopsies. About  $10^{14}$  TU of the (preferably primary) phage library were diluted in 200 ml ringer lactate at room temperature and aspirated under clean but not necessarily sterile conditions into four 50 ml syringes. LB-tet/kan dishes or plates were warmed in a 37°C incubator. One liter of LB medium containing 0.2 µg/ml tet and 100 µg/ml kan was warmed in the waterbath at 37°C. One liter LB medium containing 40 µg/ml tet and 100 µg/ml kan was warmed to 37°C and 8 more liters were prepared at room temperature. Thirty glass grinders A and B size as well as suitable glass tubes were autoclaved. Three 50 ml Falcon tubes were prepared for each of the organs for which biopsies were to be taken. Tubes were filled with 10 ml DMEM-PI - DMEM containing PMSF (1 mM), aprotinin (20µg/ml) and leupeptin (1µg/ml) - and put on ice approximately 15 minutes before tissue collection. For each of the 4 teams taking over in the lab after the tissue samples were collected, one autoclaved set of surgicals (i.e., at least one forceps and one pair of scissors and a scalpel) were prepared in order to trim, divide or mince organ samples.

#### *Phage library injection*

All drugs running through the intended port of application of the phage library were discontinued during library injection. If possible without compromising the patient's hemodynamic stability, all IV drugs running through different ports were discontinued during library injection as well. A running saline infusion ensured that the IV line for the library injection was open and was left running during the injection.

The 200 ml library solution was manually injected over a period of 10 minutes while monitoring and protocoling the patient's vital functions such as breathing (if not mechanically ventilated), heart rate and blood pressure. The injection was stopped any time the running saline infusion stopped dripping, indicating obstruction of the line. Fifteen minutes after beginning the injection, tissue sample collection (biopsies) was initiated. Preferred biopsy sites included bone marrow aspirate, liver, prostate, skin, skeletal muscle, tumor (if applicable), adipose tissue, blood (as positive control), blood (for red/white blood cells) and cerebral-spinal fluid (CSF).

The samples were taken under very clean if not sterile conditions to reduce contamination with bacteria. To the extent possible, the different samples were taken simultaneously. For small samples, triplicate biopsies were preferred. The time elapsed between beginning of injection and the collection of a particular tissue sample was recorded. Tissue samples were placed in the prepared 50 ml tubes containing DMEM-PI and stored on ice. For bone marrow, a regular diagnostic sample (undiluted into a syringe with heparin) was taken in addition to the samples diluted in 40 ml saline to confirm aspiration of bone marrow as opposed to blood. If needed, all IV drugs, including antibiotics, were continued after removal of tissue samples.

All organ samples that were not taken in triplicate were divided under clean conditions to obtain three different pieces of tissue. The three samples of each organ were handled as follows. One piece was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  as a backup. One piece was forwarded to the histology/pathology department to cut cryosections (or to make smears for bone marrow) and perform HE staining (Pappenheim staining for bone marrow) as well as phage staining to confirm that the samples contained the organ of interest. In some cases the histology sample was divided in two - one for regular HE staining and one for LCM (laser capture microscopy) or LPC (laser pressure catapulting). The last of the three original pieces was processed for bacterial infection to recover phage.

After freezing of backup tissue and saving material for pathology, samples for phage rescue were weighed. Samples were kept on ice at all times. Sample was transferred to 1ml DMEM-PI in a glass tube and homogenized with a grinder. Some organs such as bone marrow, blood, or CSF do not require homogenization, whereas other organs like muscle need to be minced before they can be efficiently homogenized. Lysis of erythrocytes for blood samples was preferred. Homogenized samples were transferred to autoclaved 2 ml Eppendorf tubes.

Tissue samples were washed 3 times with ice cold DMEM-PI containing 1% BSA by mixing the tissue with DMEM-PI and vortexing for 30 seconds. After centrifugation at 4,000 rpm for 3 min, supernatant was carefully discarded, leaving the tissue pellet undisturbed. A small amount of medium was left on the surface of the



WO 02/20723

PCT/US01/28044

pellet. Samples were vortexed again for 30 seconds before adding more medium to facilitate resuspension of the tissue. After adding 1.5 ml of DMEM-PI plus BSA the samples were centrifuged again. When processing multiple samples, the tissues were kept on ice at all times.

After 3 washes, the pellet was briefly vortexed and the dissolved pellet was warmed *briefly* to 37°C before adding bacteria. The washed tissue samples were incubated with 1.5 ml of competent K91-kan bacteria (OD<sub>600</sub> 0.2 in 1:10 dil.) for one hour at room temperature, then transferred to Falcon tubes containing 10 ml of LB medium with 0.2 µg/ml tetracycline. After 20 min at RT, multiple aliquots were plated on LB tet/kan plates or dishes containing 40 µg/ml of tetracycline and 100 µg/ml kanamycin. The following quantities (per organ sample) were plated: 2 dishes with 3 ml; 2 dishes with 1 ml; 3 dishes with 300 µl; 3 dishes with 100 µl; 3 dishes with 30 µl.

The beads that were used for plating were passed on to two subsequent 10 cm LB tet/kan plates to recover every potentially phage infected bacterial clone that might be trapped on the bead surface. Dishes were incubated overnight at 37°C.

The remaining 2-3 ml of infected culture (including the homogenized tissue) was transferred to 10 ml of LB medium containing 40µg/ml tetracycline and 100µg/ml kanamycin (LB tet/kan) and shaken at 37°C for 2 hr. This approximately 12 ml culture was transferred to 1 liter LB tet/kan and grown overnight in a 37°C shaker.

The next day, phage were rescued from the bulk amplified bacterial culture according to standard protocols and saved for a potential second round of *in vivo* selection. From the plates/dishes in the incubator, 1500 well separated colonies were picked for each organ plated and transferred to 96 well plates containing 20 µl PBS/well for sequencing. This assumed a readout of about 2 out of 3 picked colonies to obtain 1000 sequences.

After picking 1500 colonies, the remainder of colonies on the dishes/plates were grown in 1000 ml LB tet/kan overnight in the 37°C shaker. Then phage were harvested as before for a second round of selection. Alternatively, the plates were stored in the refrigerator and 1000-2000 individual colonies grown at a time. Alternatively, the

WO 02/20723

PCT/US01/28044

remainder of colonies were transferred to PBS and stored frozen to infect and amplify as needed.

Numerous non-limiting examples of human organ, tissue or cell type selective targeting peptides have been identified by *in vivo* biopanning using the present methods, as disclosed below. A non-limiting example of human biopanning using the methods of the present invention, along with targeting peptide sequences identified by the present methods, is disclosed in Example 3.

**Example 2. Mapping the Human Vasculature by *In vivo* Phage Display**

The *in vivo* selection method was used to screen a phage library in a human subject. A pattern recognition analysis program was used to survey 47,160 tripeptide motifs within peptides that localized to the human bone marrow, fat, skeletal muscle, prostate, or skin. The results of this large-scale screening indicated that the distribution of circulating peptide motifs to different organs is non-random. High-throughput analysis of peptide motifs enriched in individual tissues revealed similarities to sequences present in candidate ligands for differentially expressed vascular receptors.

These data represent a major step towards the construction of a ligand-receptor map of human vasculature and may have broad implications for the development of targeted therapies. Many therapeutic targets may be expressed in very restricted—but highly specific and accessible—locations in the vascular endothelium. Potential targets for intervention may be overlooked in high-throughput DNA sequencing or in gene arrays because these approaches do not usually take into account cellular location and anatomical, and functional context. The human *in vivo* phage display screening methods disclosed herein are uniquely suited to identification of naturally occurring ligand-receptor pairs that may provide the basis for highly selective therapies against various disease states.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

### Materials and Methods

A 48 year-old male Caucasian patient who had been diagnosed with Waldenström macroglobulinemia (a B cell malignancy) was previously treated by splenectomy, systemic chemotherapy (fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone), and immunotherapy (anti-CD20 monoclonal antibody). In the few months prior to his admission, the disease became refractory to treatment and clinical progression occurred with retroperitoneal lymphadenopathy, pancytopenia, and marked bone marrow infiltration by tumor cells. The patient was admitted with massive intracranial bleeding secondary to thrombocytopenia. Despite prompt craniotomy and surgical evacuation of a cerebral hematoma, the patient remained comatose with progressive and irreversible loss of brainstem function until the patient met the formal criteria for brain-based determination of death, as evaluated by an independent clinical neurologist. Because of his advanced cancer, the patient was rejected as transplant organ donor. After surrogate written informed consent was obtained from the legal next of kin, *in vivo* phage display was performed.

#### *In Vivo Phage Display*

A large-scale preparation of a CX<sub>7</sub>C (C, cysteine; X, any amino acid residue) phage display random peptide library was optimized to create the highest possible insert diversity (Pasqualini *et al.*, 2000). The diversity of the library was about  $2 \times 10^8$  and its final titer was about  $10^{12}$  transducing units (TU)/ml. Short-term intravenous infusion of the phage library (a total dose of  $10^{14}$  phage TU suspended in 100 ml of saline) into the patient was followed by multiple representative tissue biopsies. Prostate and liver samples were obtained by needle biopsy under ultrasonographic guidance. Skin, fat tissue, and skeletal muscle samples were obtained by surgical excision. Bone marrow needle aspirates and core biopsies were also obtained. Histopathological diagnosis was determined by examination of frozen sections processed from tissues obtained at the bedside.

Triplicate samples were processed for host bacterial infection, phage recovery, and histopathological analysis. In brief, tissues were weighed, ground with a glass

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Dounce homogenizer, suspended in 1 ml of Dulbecco Modified Eagle's medium (DMEM) containing proteinase inhibitors (DMEM-prin; 1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml aprotinin, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin), vortexed, and washed three times with DMEM-prin. The human tissue homogenates were incubated with 1 ml of host bacteria (log phase *E. coli* K91kan; OD<sub>600</sub> ~ 2). Aliquots of the bacterial culture were plated onto Luria-Bertani agar plates containing 40  $\mu$ g/ml tetracycline and 100  $\mu$ g/ml of kanamycin. Plates were incubated overnight at 37°C. Bacterial colonies were processed for sequencing of phage inserts recovered from each tissue and from unselected phage library. Human samples were handled with universal blood and body fluid precautions.

#### *Statistical Analysis*

A high-throughput character pattern recognition program (M.D. Anderson Cancer Center, Biostatistics, Houston, TX) was developed to automate the analysis of the peptide motifs derived from phage screenings. By using SAS (version 8, SAS Institute) and Perl (version 5.0), the program conducts an exhaustive amino acid residue sequence count and tracks the relative frequencies of N distinct tripeptide motifs representing all possible  $n_3$  overlapping tripeptide motifs in both directions ( $N \ll n_3$ ). This was applied for phage recovered from each target tissue and for the unselected CX<sub>7</sub>C random phage display peptide library.

With "p" defined as the probability of observing a particular tripeptide motif under total randomness, and  $q=1-p$ , the probability of observing K sequences characterized as a particular tripeptide motif out of  $n_3$  total tripeptide motif sequences is binomial ( $n_3, p$ ). That probability may be approximated by the formula:  $p_K = \Phi[(k+1)/\sqrt{n_3 pq}] - \Phi[k/\sqrt{n_3 pq}]$ , where  $\Phi$  is the cumulative Gaussian probability. The value  $p_K$  may be treated as a P-value in testing for total randomness of observing exactly K sequences of a particular tripeptide motif. However, this test requires exact knowledge of the true value of p, which it is difficult to obtain in practice.

In order to identify the motifs that were enriched in the screening, the count for each tripeptide motif within each tissue was compared with the count for that tripeptide

WO 02/20723

PCT/US01/28044

motif within the unselected library. Starting from a CX<sub>7</sub>C peptide insert, counts were recorded for all overlapping interior tripeptide motifs, subject only to reflection and single-voting restrictions. No peptide was allowed to contribute more than once for a single tripeptide motif (or a reflected tripeptide motif). Each peptide contributed five tripeptide motifs. Tripeptide motif counts were conditioned on the total number for all motifs being held fixed within a tissue. The significance of association of a given allocation of counts was assessed by Fisher's exact test (one-tailed). Results were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . In summary, to test for randomness of distribution, the relative frequencies of a particular tripeptide motif from each target was compared to the frequencies of the motifs from the unselected library. This approach is a large-scale contingency table association test.

### Results

The general procedure followed in human phage display biopanning is illustrated in FIG. 1A. For biopanning with human subjects, use of a large-scale phage display library (diversity about  $2 \times 10^8$ ) is advantageous compared to the smaller scale libraries used in mouse studies. The protocol followed was as described above.

The feasibility of producing phage display random peptide libraries in very large-scale and of selecting phage clones that home to different human organs *in vivo* through the systemic circulation is shown in FIG. 1B. Phage localizing to fat, skin, bone marrow, skeletal muscle, prostate and liver were recovered from a human subject (see FIG. 2). This is the first demonstration of the feasibility of *in vivo* phage display in humans.

To determine the distribution of the peptide inserts homing to specific sites after intravenous administration, the relative frequencies of every tripeptide motif from each target tissue were compared to the frequencies from the unselected library. The 4,716 phage inserts recovered from representative samples of five tissues (bone marrow, fat, skeletal muscle, prostate, and skin) and from the unselected library were analyzed. Tripeptide motifs were chosen for the phage insert analysis because three amino acid residues appear to provide the minimal framework for structural formation and protein-

WO 02/20723

PCT/US01/28044

protein interaction (Vendruscolo *et al.*, 2001). Examples of biochemical recognition units and binding of tripeptide ligand motifs to receptors include RGD (Ruoslahti, 1996), LDV (Ruoslahti, 1996), and LLG (Koivunen *et al.*, 2001) to integrins, NGR (Pasqualini *et al.*, 2000) to aminopeptidase N/CD13, and GFE (Rajotte and Ruoslahti, 1999) to membrane dipeptidase.

Each phage insert analyzed contained seven amino acid residues and contributed five potential tripeptide motifs. Taking reflection into account, a total of 47,160 tripeptide motifs were surveyed. Comparisons of the motif frequencies in a given organ relative to those frequencies in the unselected library showed the non-random nature of the peptide distribution (Table 3). This is particularly noteworthy given that only a single round of *in vivo* screening was performed. Of the tripeptide motifs enriched in tissues, some were enriched in a single site

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Table 3. Peptide motifs isolated by *in vivo* phage display in humans

Target organ/motif	Motif frequency	P-value
Unselected Library		
none	N/A	N/A
<u>Bone Marrow</u>		
GFS*	1.1	0.0244
LWS*	1.0	0.0453
ARL	1.0	0.0453
FGG	1.0	0.0453
GVL	1.1	0.0453
SGT	2.3	0.0137
GGG*	2.3	0.0350
<u>Fat</u>		
EGG*	1.3	0.0400
LLV*	1.0	0.0269
LSP*	0.9	0.0402
EGR	1.1	0.0180
FGV	0.9	0.0402
<u>Muscle</u>		
LVS*	2.1	0.0036
GER	0.9	0.0344
<u>Prostate</u>		
AGG*	2.5	0.0340
EGR	1.0	0.0185
GER	0.9	0.0382
GVL	2.3	0.0079
<u>Skin</u>		
GRR*	2.9	0.0047
GGH*	0.9	0.0341
GTV*	0.8	0.0497
ARL	0.8	0.0497
FGG	1.3	0.0076
FGV	1.0	0.0234
SGT	1.0	0.0234

WO 02/20723

PCT/US01/28044

whereas others were enriched in multiple sites. The data are consistent with some of the peptides homing in a tissue-specific manner while other peptides targeted several tissues.

Table 3 lists motifs occurring in peptides isolated from target organs, but not from the unselected phage library (Fisher's exact test, one-tailed;  $P < 0.05$ ). The number of peptide sequences analyzed per organ was: unselected library, 446; bone marrow, 521; fat, 901; muscle, 850; prostate, 1018; skin, 980. Asterisks indicate motifs that were enriched only in a single tissue. The abbreviation N/A means not applicable.

Tripeptide motifs appeared to be targeted to specific human organs, tissues or cell types including bone marrow (GGG, SEQ ID NO:5; GFS, SEQ ID NO:6; LWS, SEQ ID NO:130), adipose tissue (EGG, SEQ ID NO:7; LSP, SEQ ID NO:8; LLV, SEQ ID NO:9), skeletal muscle (LVS, SEQ ID NO:10), prostate (AGG, SEQ ID NO:11) and skin (GRR, SEQ ID NO:12; GGH, SEQ ID NO:13; GTV, SEQ ID NO:14) (FIG. 2A, Table 3). Tripeptide motifs that appeared to be targeted to multiple organs, tissues or cell types included GVL (SEQ ID NO:15), EGR (SEQ ID NO:16), FGV (SEQ ID NO:17), FGG (SEQ ID NO:18), GER (SEQ ID NO:19) SGT (SEQ ID NO:20) and ARL (SEQ ID NO:21) (FIG. 2B, Table 3). Each of these motifs showed a statistically significant localization to one or more target organs, tissues or cell types, compared to the unselected phage display library.

The ClustalW program (European Molecular Biology Laboratory; EMBL) was used to analyze the original cyclic phage peptide inserts of seven amino acid residues containing the tripeptide motifs. The analysis revealed four to six residue motifs that were shared among multiple peptides isolated from a given organ (FIG. 2A, Table 4). Each of the motifs was searched for in on-line databases (including BLAST, SWISSPROT, PROSITE, PRODOM, and BLOCKS) through the National Center for Biotechnology Information (NCBI; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html#protein\\_databases](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html#protein_databases)). Some appeared within previously known human proteins and others were not found in the databases. As these motifs are likely to represent sequences present in circulating



WO 02/20723

PCT/US01/28044

ligands (either secreted proteins or surface receptors in circulating cells) that home to vascular receptors, a panel of candidate human proteins potentially mimicked by selected peptide motifs was compiled (Table 4).

Table 4 Examples of human proteins potentially mimicked by peptide motifs

Extended motif	Human protein	Protein description	Accession number
<u>Bone</u>			
<u>Marrow</u>			
<b>PGGG</b>	Bone morphogenetic protein 3B	growth, factor, TGF-beta family member	NP_004953
<b>PGGG</b>	Fibulin 3	fibrillin- and EGF-like	Q12805
<b>GHHSFG</b>	Microsialin	macrophage antigen, glycoprotein	NP_001242
<u>Fat</u>			
<b>EGGT</b>	LTBP-2	fibrillin- and EGF-like, TGF-beta Interactor	CAA86030
<b>TGGE</b>	Sortilin	adipocyte differentiation-induced receptor	CAA66904
<b>GPSLH</b>	Protocadherin gamma C3	cell adhesion	AAD43784
<u>Muscle</u>			
<b>GGSVL</b>	ICAM-1	intercellular adhesion molecule	P05362
<b>LVSGY</b>	Flt4	endothelial growth factor receptor	CAA48290
<u>Prostate</u>			
<b>RRAGGS</b>	Interleukin 11	cytokine	NP_000632
<b>RRAGG</b>	Smad6	Smad family member	AAB94137
<u>Skin</u>			
<b>GRRG</b>	TGF-beta 1	growth factor, TGF-beta family member	XP_008912
<b>HGG+G</b>	Neuropilin-1	endothelial growth factor receptor	AAF44344
<b>+PHGG</b>	Pentaxin	infection/trauma-induced glycoprotein	CAA45158
<b>PHGG</b>	Macrophage inhibitory cytokine-1	growth, factor, TGF-beta family member	AAB88673
<b>+PHGG</b>	Desmoglein 2	epithelial cell junction protein	S38673
<b>VTG+SG</b>	Desmoglein 1	epidermal cell junction protein	AAC83817

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<u>Multiple</u>			
<u>Organs</u>			
<b>EGRG</b>	MMP-9	gelatinase	AAH06093
<b>GRGE</b>	ESM-1	endothelial cell-specific molecule	XP_003781
<b>NFGVV</b>	CDO	surface glycoprotein, Ig- and fibronectin-like	NP_058648
<b>GERIS</b>	BPA1	basement membrane protein	NP_001714
<b>SIREG</b>	Wnt-16	glycoprotein	Q9UBV4
<b>+GVLW</b>	Sialoadhesin	Ig-like lectin	AAK00757
<b>WLVG+</b>	IL-5 receptor	soluble interleukin 5 receptor	CAA44081
<b>GGFR</b>	Plectin 1	endothelial focal junction-localized protein	CA91196
<b>GGFF</b>	TRANCE	TNF family member	AAC51762
<b>+SGGF</b>	MEGF8	EGF-like protein	T00209
<b>PSGTS</b>	ICAM-4	intercellular adhesion glycoprotein	Q14773
<b>+TGSP</b>	Perlecan	vascular repair heparan sulfate proteoglycan	XP_001825

Extended targeting motifs homologous to known proteins were identified from bone marrow (GHHSFG, SEQ ID NO:22, PGGG, SEQ ID NO:23), fat (EGGT, SEQ ID NO:24, TGGE, SEQ ID NO:25, GPSLH, SEQ ID NO:26), skeletal muscle (GGSVL, SEQ ID NO:27; LVSGY, SEQ ID NO:28), prostate (RRAGGS, SEQ ID NO:29; RRAGG, SEQ ID NO:30), skin (GRRG, SEQ ID NO:31; HGGXG, SEQ ID NO:32; PHGG, SEQ ID NO:33; VTGXSG, SEQ ID NO:34) and from multiple organs (GRGE, SEQ ID NO:35; NFGVV, SEQ ID NO:36; GERIS, SEQ ID NO:37; SIREG, SEQ ID

WO 02/20723

PCT/US01/28044

NO:38; GVLW, SEQ ID NO:39; WLVG, SEQ ID NO:40; GGFR, SEQ ID NO:41; GGFF, SEQ ID NO:42; SGGF, SEQ ID NO:43; PSGTS, SEQ ID NO:44; TGSP, SEQ ID NO:45; EGRG, SEQ ID NO:131).

Table 4 shows sequences corresponding to regions of 100% sequence identity between the peptide selected and the candidate protein. Conserved amino acid substitutions are indicated as by a "+". Tripeptide motifs from Table 3 are shown in bold.

The homologous proteins thus identified may represent natural ligands for the human receptors that bound targeting phage. For example, a peptide contained within bone morphogenetic protein 3B (BMP 3B) was recovered from phage localized to bone marrow. BMP 3 B is a growth factor that is known to regulate bone development (Daluiski *et al.*, 2001). Thus, this protein is a candidate ligand mimicked by a peptide homing to bone marrow tissue. Also, interleukin 11 has been shown to interact with receptors within endothelium and prostate epithelium (Mahboubi *et al.*, 2000). IL-11 may be mimicked by a targeting peptide recovered from the prostate (Table 4). In addition to secreted ligands, motifs were also found in several extracellular or transmembrane proteins that may operate selectively in the target tissue, such as sortilin in fat (Lin *et al.*, 1997). Certain motifs appear to be enriched in multiple organs. One such peptide is a candidate mimeotope of perlecan (Table 4), which is a protein known to maintain vascular homeostasis.

These results were confirmed by *in situ* staining, using polyclonal antibodies against IL-11 receptor alpha. IL-11 is a cytokine that is apparently mimicked by the peptide motif RRAGGS (SEQ ID NO:29), a human prostate targeting peptide. This suggests that the IL-11 alpha receptor (IL-11R $\alpha$ ) should be overexpressed in prostate blood vessels. Studies with cultured cells have shown that IL-11 interacts with receptors in endothelium and prostate epithelium (Mahboubi *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001). However, expression of IL-11R $\alpha$  in prostate blood vessels has not previously been examined.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Immunostaining of prostate thin sections with antibodies against IL-11R $\alpha$  showed that IL-11R $\alpha$  is present in the luminal prostate epithelium and in prostate blood vessels (not shown). This result validates the human biopanning results and shows that the presence of cell surface receptors identified by targeting peptide binding can be confirmed by antibodies against the receptor protein.

*In vivo* phage display in humans may reveal heterogeneity at the level of individual patients. For example, it is unclear whether the malignant B cell infiltration in the tested patient influenced the outcome of the screening of the bone marrow, given that the patient had Waldenström macroglobulinemia. However, if vascular targeting ligands are to be developed for clinical use, they must resist degradation and be robust enough to target blood vessels in diseased tissue *in vivo*. Thus, a considerable advantage of the method described here is that the selected targeting peptides bind to native receptors, as they are expressed *in vivo*. Even if a ligand-receptor interaction is mediated through a conformational (rather than a linear) epitope, it is still possible to select binders in the screening. As it is difficult to ensure that transmembrane proteins expressed by recombinant systems (such as in protein arrays) maintain the correct structure and folding after purification *in vitro*, peptides selected *in vivo* is likely to be more suitable to clinical applications, such as identification of novel inhibitors or activators of native receptor proteins.

Precedent exists to suggest that phage can be safely administered to patients, as bacteriophage were widely used in humans during the pre-antibiotic era. Ultimately, it may be possible to determine molecular profiles of human blood vessels by infusing phage libraries systemically before resections of lung, prostate, breast, or colorectal carcinomas or even regionally before resection of limb sarcomas. The methods disclosed herein will allow the construction of a molecular map outlining vascular diversity in each human organ, tissue, or disease.

Human targeting peptide sequences identified by the methods described above and directed to fat, skeletal muscle, skin bone marrow, prostate or to multiple organs are listed in Table 5.

Table 5. Human Targeting Peptide Sequences

Sequence	SEQ ID	Tissue
AEEGGTS	SEQ ID NO:46	Fat
EGGSFNW	SEQ ID NO:47	Fat
IEGGQVG	SEQ ID NO:48	Fat
EGGSVES	SEQ ID NO:49	Fat
EGGIFWH	SEQ ID NO:50	Fat
EGGLSGC	SEQ ID NO:51	Fat
CAEGGAS	SEQ ID NO:52	Fat
AEGGVRG	SEQ ID NO:53	Fat
AEGGRVY	SEQ ID NO:54	Fat
VVEGGVK	SEQ ID NO:55	Fat
VLVGEGG	SEQ ID NO:56	Fat
TKKLEGG	SEQ ID NO:57	Fat
GGLSPNW	SEQ ID NO:58	Fat
TGHLSPG	SEQ ID NO:59	Fat
VLSPGLG	SEQ ID NO:60	Fat
LSPGVKG	SEQ ID NO:61	Fat
LSPWKKR	SEQ ID NO:62	Fat
AWLSPAR	SEQ ID NO:63	Fat
AWRRLSP	SEQ ID NO:64	Fat

WO 02/20723

PCT/US01/28044

LSPDDAL	SEQ ID NO:65	Fat
LVSGGMA	SEQ ID NO:66	Skeletal muscle
LVSGCNT	SEQ ID NO:67	Skeletal muscle
DLVSGYG	SEQ ID NO:68	Skeletal muscle
LVSTSAT	SEQ ID NO:69	Skeletal muscle
TALVSQT	SEQ ID NO:70	Skeletal muscle
WLVSGIG	SEQ ID NO:71	Skeletal muscle
LVSSVFP	SEQ ID NO:72	Skeletal muscle
PSLVSSV	SEQ ID NO:73	Skeletal muscle
GVSLVST	SEQ ID NO:74	Skeletal muscle
QLVSGEP	SEQ ID NO:75	Skeletal muscle
NLVSRRL	SEQ ID NO:76	Skeletal muscle
LVSWRGS	SEQ ID NO:77	Skeletal muscle
DHFLVSP	SEQ ID NO:78	Skeletal muscle
GRGLVSL	SEQ ID NO:79	Skeletal muscle
FPVALVS	SEQ ID NO:80	Skeletal muscle
RWSSLVS	SEQ ID NO:81	Skeletal muscle
WSKSLVS	SEQ ID NO:82	Skeletal muscle
PGRSLVS	SEQ ID NO:83	Skeletal muscle
GRRGSAG	SEQ ID NO:84	Skin
RPGRRGS	SEQ ID NO:85	Skin
SGRRGPR	SEQ ID NO:86	Skin
GLGRRNG	SEQ ID NO:87	Skin

WO 02/20723

PCT/US01/28044

GGRRSQT	SEQ ID NO:88	Skin
LWDGRRH	SEQ ID NO:89	Skin
GRRSVLT	SEQ ID NO:90	Skin
FGRRNLF	SEQ ID NO:91	Skin
GAGRRYW	SEQ ID NO:92	Skin
GRRLWAT	SEQ ID NO:93	Skin
GVGRRFG	SEQ ID NO:94	Skin
LEMVGRR	SEQ ID NO:95	Skin
LSSIGRR	SEQ ID NO:96	Skin
GRRWIDV	SEQ ID NO:97	Skin
GRREEGL	SEQ ID NO:98	Skin
GRRVLGR	SEQ ID NO:99	Skin
RGLMGRR	SEQ ID NO:100	Skin
RFLGRR	SEQ ID NO:101	Skin
PGVGRRRL	SEQ ID NO:102	Skin
GVIDGRR	SEQ ID NO:103	Skin
ADGRRLG	SEQ ID NO:104	Skin
AGRRAQI	SEQ ID NO:105	Skin
YGRRARE	SEQ ID NO:106	Skin
PGRRLRM	SEQ ID NO:107	Skin
GGRRVTL	SEQ ID NO:108	Skin
EQGGRRRL	SEQ ID NO:109	Skin
SGRRLHP	SEQ ID NO:110	Skin



WO 02/20723

PCT/US01/28044

FDHSGRR	SEQ ID NO:111	Skin
GRRDVAI	SEQ ID NO:112	Skin
GGHPRLA	SEQ ID NO:113	Skin
GGHWRVN	SEQ ID NO:114	Skin
GGHILEV	SEQ ID NO:115	Skin
GGHRAQS	SEQ ID NO:116	Skin
GDGGHRP	SEQ ID NO:117	Skin
SCVGGHS	SEQ ID NO:118	Skin
GSGVGGH	SEQ ID NO:119	Skin
VRGWGGH	SEQ ID NO:120	Skin
WRGWGGH	SEQ ID NO:121	Skin
WGSKGTV	SEQ ID NO:122	Skin
TGSLGTV	SEQ ID NO:123	Skin
WGTVSDA	SEQ ID NO:124	Skin
ATGTVGP	SEQ ID NO:125	Skin
VVGTVAW	SEQ ID NO:126	Skin
WVVGTVT	SEQ ID NO:127	Skin
RVVHGTV	SEQ ID NO:128	Skin
GTVRFFS	SEQ ID NO:129	Skin
SGGGPGV	SEQ ID NO:132	Bone Marrow
RLGGGLA	SEQ ID NO:133	Bone Marrow
WWGGGVS	SEQ ID NO:134	Bone Marrow
GSARGGG	SEQ ID NO:135	Bone Marrow

WO 02/20723

PCT/US01/28044

ARGGGIR	SEQ ID NO:136	Bone Marrow
RAAGGGG	SEQ ID NO:137	Bone Marrow
GSSAGGG	SEQ ID NO:138	Bone Marrow
LGEAGGG	SEQ ID NO:139	Bone Marrow
GGLEGGG	SEQ ID NO:140	Bone Marrow
GNGGGES	SEQ ID NO:141	Bone Marrow
STGGGCS	SEQ ID NO:142	Bone Marrow
LGGGEEW	SEQ ID NO:143	Bone Marrow
HGFSHHG	SEQ ID NO:144	Bone Marrow
RRGFSLG	SEQ ID NO:145	Bone Marrow
GGFSPWL	SEQ ID NO:146	Bone Marrow
GRLVGFS	SEQ ID NO:147	Bone Marrow
TTGVGFS	SEQ ID NO:148	Bone Marrow
GRRAGGS	SEQ ID NO:149	Prostate
TRRAGGG	SEQ ID NO:150	Prostate
SRAGGLG	SEQ ID NO:151	Prostate
SYAGGLG	SEQ ID NO:152	Prostate
DVAGGLG	SEQ ID NO:153	Prostate
GAGGLGA	SEQ ID NO:154	Prostate
GAGGWGV	SEQ ID NO:155	Prostate
AGGTFKP	SEQ ID NO:156	Prostate
LGEVAGG	SEQ ID NO:157	Prostate
GSNDAGG	SEQ ID NO:158	Prostate

WO 02/20723

PCT/US01/28044

YRGIAGG	SEQ ID NO:159	Prostate
AGGVAGG	SEQ ID NO:160	Prostate
GGLAGGF	SEQ ID NO:161	Prostate
LLAGGVL	SEQ ID NO:162	Prostate
LVVSAGG	SEQ ID NO:163	Prostate
RTQAGGV	SEQ ID NO:164	Prostate
AGGFGEQ	SEQ ID NO:165	Prostate
AGGLIDV	SEQ ID NO:166	Prostate
AGGSTWT	SEQ ID NO:167	Prostate
AGGDWWW	SEQ ID NO:168	Prostate
AGGGLLM	SEQ ID NO:169	Prostate
VAAGGGL	SEQ ID NO:170	Prostate
LYGAGGS	SEQ ID NO:171	Prostate
CALAGGC	SEQ ID NO:172	Prostate
IGAGGVH	SEQ ID NO:173	Prostate
PKHGV LW	SEQ ID NO:174	Multiple Organ
SGVLWYH	SEQ ID NO:175	Multiple Organ
GVLWAFG	SEQ ID NO:176	Multiple Organ
QARGVLW	SEQ ID NO:177	Multiple Organ
GVLVSRM	SEQ ID NO:178	Multiple Organ
GTVGVLV	SEQ ID NO:179	Multiple Organ
VGVL LPA	SEQ ID NO:180	Multiple Organ
GGVLLLS	SEQ ID NO:181	Multiple Organ

WO 02/20723

PCT/US01/28044

SGVLIHD	SEQ ID NO:182	Multiple Organ
PYFGVLA	SEQ ID NO:183	Multiple Organ
FFVSGVL	SEQ ID NO:184	Multiple Organ
LLAGGVL	SEQ ID NO:185	Multiple Organ
GEMGGVL	SEQ ID NO:186	Multiple Organ
GRAYGVL	SEQ ID NO:187	Multiple Organ
SGVLDGR	SEQ ID NO:188	Multiple Organ
WSGGVLH	SEQ ID NO:189	Multiple Organ
WSGGVLH	SEQ ID NO:190	Multiple Organ
SRQGVLR	SEQ ID NO:191	Multiple Organ
GVLTSYQ	SEQ ID NO:192	Multiple Organ
RGVLT SQ	SEQ ID NO:193	Multiple Organ
RVPGVLS	SEQ ID NO:194	Multiple Organ
LGVL SYR	SEQ ID NO:195	Multiple Organ
KRGVLGW	SEQ ID NO:196	Multiple Organ
GVLGLGF	SEQ ID NO:197	Multiple Organ
FLGVLGR	SEQ ID NO:198	Multiple Organ
EGVLETS	SEQ ID NO:199	Multiple Organ
WWGGVLG	SEQ ID NO:200	Multiple Organ
VWSRGVL	SEQ ID NO:201	Multiple Organ
GVLRGVS	SEQ ID NO:202	Multiple Organ
SFGVLRG	SEQ ID NO:203	Multiple Organ
KGSVGVL	SEQ ID NO:204	Multiple Organ

WO 02/20723

PCT/US01/28044

GGHFGVL	SEQ ID NO:205	Multiple Organ
WMDVGVL	SEQ ID NO:206	Multiple Organ
AFRVGVL	SEQ ID NO:207	Multiple Organ
GVGVLRK	SEQ ID NO:208	Multiple Organ
MEGRGAG	SEQ ID NO:209	Multiple Organ
SEGRGFM	SEQ ID NO:210	Multiple Organ
VEGRNSK	SEQ ID NO:211	Multiple Organ
VEGRYTP	SEQ ID NO:212	Multiple Organ
FNEGRQM	SEQ ID NO:213	Multiple Organ
FEGRSRS	SEQ ID NO:214	Multiple Organ
DHVVGR	SEQ ID NO:215	Multiple Organ
WDGTEGR	SEQ ID NO:216	Multiple Organ
LDWREGR	SEQ ID NO:217	Multiple Organ
RGCEGRV	SEQ ID NO:218	Multiple Organ
MTPEGRV	SEQ ID NO:219	Multiple Organ
RLFEGRV	SEQ ID NO:220	Multiple Organ
REGRRMC	SEQ ID NO:221	Multiple Organ
TQFEGRR	SEQ ID NO:222	Multiple Organ
SMEGRMF	SEQ ID NO:223	Multiple Organ
PGSAEGR	SEQ ID NO:224	Multiple Organ
GEGRILA	SEQ ID NO:225	Multiple Organ
EGRFSAW	SEQ ID NO:226	Multiple Organ
EGRSDIW	SEQ ID NO:227	Multiple Organ

WO 02/20723

PCT/US01/28044

EGRARWL	SEQ ID NO:228	Multiple Organ
EGRERWR	SEQ ID NO:229	Multiple Organ
CQCGFGV	SEQ ID NO:230	Multiple Organ
RGGFGVR	SEQ ID NO:231	Multiple Organ
AVGFGVI	SEQ ID NO:232	Multiple Organ
AVGFGVI	SEQ ID NO:233	Multiple Organ
IVGFGVA	SEQ ID NO:234	Multiple Organ
GNFGVVW	SEQ ID NO:235	Multiple Organ
DEPFGVA	SEQ ID NO:236	Multiple Organ
VWFGVGS	SEQ ID NO:237	Multiple Organ
WFGVSL	SEQ ID NO:238	Multiple Organ
FGVGQWA	SEQ ID NO:239	Multiple Organ
SMRFGVS	SEQ ID NO:240	Multiple Organ
RFGVWTG	SEQ ID NO:241	Multiple Organ
RFGVGRV	SEQ ID NO:242	Multiple Organ
SGLFGVY	SEQ ID NO:243	Multiple Organ
MKGVFGV	SEQ ID NO:244	Multiple Organ
AFGVVSD	SEQ ID NO:245	Multiple Organ
LYAFGVV	SEQ ID NO:246	Multiple Organ
KVFGVVE	SEQ ID NO:247	Multiple Organ
FGVRTDL	SEQ ID NO:248	Multiple Organ
TIFGVR	SEQ ID NO:249	Multiple Organ
VWPRFGG	SEQ ID NO:250	Multiple Organ

WO 02/20723

PCT/US01/28044

SRFGGRV	SEQ ID NO:251	Multiple Organ
MKFGGRL	SEQ ID NO:252	Multiple Organ
RFGGALR	SEQ ID NO:253	Multiple Organ
ERFGGDE	SEQ ID NO:254	Multiple Organ
FGGSVAP	SEQ ID NO:255	Multiple Organ
WFGGSVQ	SEQ ID NO:256	Multiple Organ
FGGSWSL	SEQ ID NO:257	Multiple Organ
LLFGGSA	SEQ ID NO:258	Multiple Organ
MRLFGGT	SEQ ID NO:259	Multiple Organ
FGGFFMY	SEQ ID NO:260	Multiple Organ
FGGFFMY	SEQ ID NO:261	Multiple Organ
EFGGQMN	SEQ ID NO:262	Multiple Organ
TFGGLIL	SEQ ID NO:263	Multiple Organ
GNSFGGW	SEQ ID NO:264	Multiple Organ
RTFGGAG	SEQ ID NO:265	Multiple Organ
WVFGGKS	SEQ ID NO:266	Multiple Organ
RGFGGLS	SEQ ID NO:267	Multiple Organ
LWPSFGG	SEQ ID NO:268	Multiple Organ
GERISGP	SEQ ID NO:269	Multiple Organ
GERLSSR	SEQ ID NO:270	Multiple Organ
TEGERAG	SEQ ID NO:271	Multiple Organ
WWLGERV	SEQ ID NO:272	Multiple Organ
WAWAGER	SEQ ID NO:273	Multiple Organ

WO 02/20723

PCT/US01/28044

GVISGER	SEQ ID NO:274	Multiple Organ
GPGGERG	SEQ ID NO:275	Multiple Organ
LGGGERD	SEQ ID NO:276	Multiple Organ
DIAGERV	SEQ ID NO:277	Multiple Organ
SRSKGER	SEQ ID NO:278	Multiple Organ
KRKGERV	SEQ ID NO:279	Multiple Organ
SRPGERQ	SEQ ID NO:280	Multiple Organ
CMRRGER	SEQ ID NO:281	Multiple Organ
TLRGERN	SEQ ID NO:282	Multiple Organ
FGERNRI	SEQ ID NO:283	Multiple Organ
RGERWDL	SEQ ID NO:284	Multiple Organ
GERTALL	SEQ ID NO:285	Multiple Organ
PSGTSSW	SEQ ID NO:286	Multiple Organ
SMSGTGM	SEQ ID NO:287	Multiple Organ
LFDVSGT	SEQ ID NO:288	Multiple Organ
VTGLSGT	SEQ ID NO:289	Multiple Organ
NMVISGT	SEQ ID NO:290	Multiple Organ
GVSGTLG	SEQ ID NO:291	Multiple Organ
RSGTPGK	SEQ ID NO:292	Multiple Organ
GRSGTSG	SEQ ID NO:293	Multiple Organ
IYSGTLW	SEQ ID NO:294	Multiple Organ
CSGTLFC	SEQ ID NO:295	Multiple Organ
RSGTLQT	SEQ ID NO:296	Multiple Organ



WO 02/20723

PCT/US01/28044

LGSGTWS	SEQ ID NO:297	Multiple Organ
ESGTATG	SEQ ID NO:298	Multiple Organ
FTERSGT	SEQ ID NO:299	Multiple Organ
RYLRSGT	SEQ ID NO:300	Multiple Organ
PLGSSGT	SEQ ID NO:301	Multiple Organ

The tripeptide motifs listed in Table 3 above were identified using a one-tail Fisher's test. The identification of statistically significant human targeting peptide motifs was dependent in part on the type of statistical analysis applied. Using a two-tail Fisher's test, a somewhat different set of tripeptide motifs was identified, shown in Table 6.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Table 6. Human tripeptide motifs identified using a two-tail Fisher's test

Tissues	Motifs	Target organ vs. other organs	Target organ vs. unselected library
Adipose tissue	EVS (SEQ ID NO:302)	0.0059	0.0297
	TAG (SEQ ID NO:303)	0.0022	0.0018
	VTV (SEQ ID NO:304)	0.0012	0.0073
	GEV (SEQ ID NO:305)	0.0397	0.0147
	LPG (SEQ ID NO:306)	0.0242	0.0297
	<b>LSP</b> (SEQ ID NO:8)	0.0040	0.0147
	PGL (SEQ ID NO:307)	0.0402	0.0297
	RGT (SEQ ID NO:308)	0.0331	0.0367
	VLL (SEQ ID NO:309)	0.0204	0.0297
Skeletal muscle	PAV (SEQ ID NO:310)	0.0317	0.0255
	AAV (SEQ ID NO:311)	0.0100	0.0255
	<b>LVS</b> (SEQ ID NO:10)	0.0042	0.0031
	RGP (SEQ ID NO:312)	0.0488	0.0255
	VRM (SEQ ID NO:313)	0.0015	0.0255
Prostate	LLL (SEQ ID NO:314)	0.0056	0.0169
	RAV (SEQ ID NO:315)	0.0040	0.0084
	RGE (SEQ ID NO:316)	0.0433	0.0324
Skin	<b>ARL</b> (SEQ ID NO:21)	0.0444	0.0080
	KGG (SEQ ID NO:317)	0.0225	0.0317
	GAR (SEQ ID NO:318)	0.0016	0.0004

WO 02/20723

PCT/US01/28044

	GGR (SEQ ID NO:319)	0.0001	0.0262
	<b>GRR</b> (SEQ ID NO:12)	0.0284	0.0322
	WGG (SEQ ID NO:320)	0.0172	0.0078
Bone marrow	<b>GGG</b> (SEQ ID NO:5)	0.0469	0.0070
	GGM (SEQ ID NO:321)	0.0404	0.0067
	GVD (SEQ ID NO:322)	0.0182	0.0183
	LGF (SEQ ID NO:323)	0.0062	0.0183
	SWV (SEQ ID NO:324)	0.0388	0.0183
	SWR (SEQ ID NO:325)	0.0388	0.0183

Several tripeptide motifs were identified as significant by either statistical analysis (indicated in bold in Table 6). While the two statistical analyses identified somewhat different sets of tripeptide motifs, it is considered that tripeptide sequences identified by either statistical analysis will be of use for targeting applications within the scope of the present invention.

The skilled artisan will realize that the multiple targeting peptide sequences identified in the present Example 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, tissues or cell types, identification of receptors and receptor ligands in organs, tissues or cell types, and therapeutic treatment of a number of human diseases.

### Example 3. Polyorgan Targeting

In standard protocols, developed with animal model systems, targeting phage are collected from a single organ, tissue or cell type, amplified and reinjected into a second animal, then recollected from the same organ, tissue or cell type. With humans this process is inefficient. In certain alternative embodiments, the efficiency of human organ, tissue or cell type targeting may be improved by polyorgan targeting, in which

WO 02/20723

PCT/US01/28044

phage may be collected from multiple organs, tissues or cell types of a first human, pooled and injected into a second human.

It is possible to perform multiple rounds of selection in humans if the phage recovered from each biopsy is prepared for reinjection as a pool. This protocol has been successfully demonstrated in the mouse model, using the following exemplary procedure.

A phage library (CX7C) was intravenously injected into anesthetized mice. The input was approximately  $10^{10}$  transducing units. After 15 minutes and no perfusion (to emulate the human protocol), a variety of organs were removed, including brain, kidney, pancreas, uterus, skeletal muscle, and intestine. After grinding with a Dounce glass homogenizer, tissue samples were washed. After washing, the tissues are incubated with starved competent *E. coli* K91 and serial dilutions of bacteria were plated on LB tet/kan plates or dishes containing 40  $\mu\text{g/ml}$  of tetracycline and 100  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin. Different dilutions for each organ sample were plated, as disclosed above. The dishes were then incubated overnight at 37°C. After the desired enrichment of the phage pool to a certain organ was obtained, about 50 phage clones from the last two rounds of selection were sequenced. Encoded peptide sequences were compared to identify enriched peptides or peptide motifs. The selectivity of selected clones was validated by individually comparing their homing to other organs and also to the homing of an insertless phage clone.

The remaining 2-3 ml of infected culture (including the homogenized tissue) were transferred to 10 ml of LB medium containing 40  $\mu\text{g/ml}$  tetracycline and 100  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin (LB tet/kan) and shaken at 37°C for 2 hr. This approximately 12 ml culture was transferred to 1 liter of LB tet/kan and grown overnight in the 37°C shaker. The next day, phage were rescued from the bulk amplified bacterial culture according to standard protocols. These samples were pooled and reinjected for the polyorgan targeting.

In the second and third rounds of selection, 50-100 microliters out of 1 ml of the total bulk phage recovered from each organ was pooled. The resulting mixture was

WO 02/20723

PCT/US01/28044

reinjecting in another mouse and the same organs were recovered after 10 minutes (no perfusion). Plating of the phage from each organ revealed enrichment for each site except uterus, showing that selection was possible with the polyorgan protocol. Progressive enrichment of targeting phage in other organs as a function of the number of rounds of polyorgan targeting (not shown).

Peptide motifs of phage targeting skeletal muscle and kidney by polyorgan targeting are listed in Table 7 below.

**Table 7. Consensus Peptide Motifs Identified by Polyorgan Targeting in Mice**

<u>Skeletal Muscle</u>	
VGX	SEQ ID NO:326
VGXG	SEQ ID NO:327
IGS	SEQ ID NO:328
GGA	SEQ ID NO:329
VGA	SEQ ID NO:330
WHG	SEQ ID NO:331
SSEA	SEQ ID NO:332
SNEA	SEQ ID NO:333
SLRD	SEQ ID NO:334
SVRD	SEQ ID NO:335
SARD	SEQ ID NO:336
HVV	SEQ ID NO:337
RTG	SEQ ID NO:422
RLG	SEQ ID NO:423
RWG	SEQ ID NO:338
LRWG	SEQ ID NO:339

WO 02/20723

PCT/US01/28044

RNS	SEQ ID NO:340
RSG	SEQ ID NO:341
GRSG	SEQ ID NO:342
RSGL	SEQ ID NO:343
YGR	SEQ ID NO:344
ASL	SEQ ID NO:345
SGA	SEQ ID NO:346
SGR	SEQ ID NO:347
DSG	SEQ ID NO:348
SSRV	SEQ ID NO:349
SSRI	SEQ ID NO:350
FGSR	SEQ ID NO:351
FCSR	SEQ ID NO:352
FQS	SEQ ID NO:353
PPV	SEQ ID NO:354
LFQ	SEQ ID NO:355
VVA	SEQ ID NO:356
AVV	SEQ ID NO:357
VAS	SEQ ID NO:358
EVSFSR	SEQ ID NO:359
EPSLFLR	SEQ ID NO:360
PGL	SEQ ID NO:361
PGI	SEQ ID NO:362
GLA	SEQ ID NO:363

WO 02/20723

PCT/US01/28044

VGLAV	SEQ ID NO:364
VGPAV	SEQ ID NO:365
TRG	SEQ ID NO:366
GLS	SEQ ID NO:367
DWR	SEQ ID NO:368
RGA	SEQ ID NO:369
RGG	SEQ ID NO:370
ARGG	SEQ ID NO:371
NGR	SEQ ID NO:372
ALAKG	SEQ ID NO:373
ALARG	SEQ ID NO:374
TTQ	SEQ ID NO:375
GYR	SEQ ID NO:376
GYL	SEQ ID NO:377
DRT	SEQ ID NO:378
IYS	SEQ ID NO:379
WLS	SEQ ID NO:380
IITTES	SEQ ID NO:381
IFQTES	SEQ ID NO:382
IARP	SEQ ID NO:383
IVRP	SEQ ID NO:384
HRP	SEQ ID NO:385
LRPI	SEQ ID NO:386
KNWAHLR	SEQ ID NO:387

WO 02/20723

PCT/US01/28044

ASLR	SEQ ID NO:388
AGLR	SEQ ID NO:389
AAV	SEQ ID NO:390
QLDRH	SEQ ID NO:391
QWDRH	SEQ ID NO:392
VEV	SEQ ID NO:393
FRYL	SEQ ID NO:394
FRSL	SEQ ID NO:395
ARI	SEQ ID NO:396
ARL	SEQ ID NO:397
ARLG	SEQ ID NO:398
ARIG	SEQ ID NO:399
RSA	SEQ ID NO:400
ADWF	SEQ ID NO:401
ADAF	SEQ ID NO:402
GWS	SEQ ID NO:403
TWM	SEQ ID NO:404

Kidney

LPS	SEQ ID NO:405
GLP	SEQ ID NO:406
LLG	SEQ ID NO:407
LDS	SEQ ID NO:408
GLR	SEQ ID NO:409
TVS	SEQ ID NO:410



WO 02/20723

PCT/US01/28044

GGGR	SEQ ID NO:411
SGVR	SEQ ID NO:412
VWG	SEQ ID NO:413
VGG	SEQ ID NO:414
LRVR	SEQ ID NO:415
YVR	SEQ ID NO:416
VFG	SEQ ID NO:417
PQL	SEQ ID NO:418
RAA	SEQ ID NO:419
RWA	SEQ ID NO:420
LGS	SEQ ID NO: 421

This example showed the feasibility of polyorgan targeting in a single subject to which a mixture of organ targeting phage was administered as a pool. This method is particularly relevant for vascular targeting in humans. Due to the shortage of potential subjects and the expense of processing each one, it is impractical to inject a human with a single phage population to target a single organ at a time.

\* \* \*

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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.

Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS and Zetter B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 817-823, 1997

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

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. & Ruoslahti, E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr Opin Oncol* 10, 560-565 (1998).

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

Baldwin, R. W. *et al.* Monoclonal antibody-defined antigens on tumor cells. *Biomembranes* 11, 285-312 (1983).

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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C. & Samulski, R.J. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific Fab'gamma2 antibody. *Nat Biotechnol* 17, 181-186, 1999.
- BERGELSON, J.M., CUNNINGHAM, J.A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E.A., KRITHIVAS, A., HONG, J.S., HORWITZ, M.S., CROWELL, R.L., and FINBERG, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275; 1320-1322.
- Bielenberg, D. R., M. F. McCarty, C. D. Bucana, S. H. Yuspa, D. Morgan, J. M. Arbeit, L. M. Ellis, K. R. Cleary, and I. J. Fidler. 1999. Expression of interferon-beta is associated with growth arrest of murine and human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 112:802-9.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, and O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390:404-407, 1997
- Boon, T. & Old, L. J. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 681-683 (1997).
- Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J.* 12:849-859, 1993.
- 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.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Brooks PC, Stromblad S, Klemle R, Visscher D, Sarkar FH, and Cheresch DA. Anti-integrin  $\alpha v \beta 3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 96:1815- 1822, 1995.
- Brooks, P.C. et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683-693, 1996.
- Brooks, P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresch D.A. Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164, 1994b
- Brousset, P., S. Chittal, D. Schlaifer, J. Icart, C. Payen, F. Rigal-Huguet, J. J. Voigt, and G. Delsol. 1991. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMeX) sections. *Blood* 77:1781-6.
- 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.
- Campbell *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 158:25-32, 2001.
- Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW and Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101:1055-1063, 1998.
- Carter, H. B., Piantadosi, S. & Isaacs, J. T. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* 143, 742-746 (1990).

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Chang, K. L., and L. M. Weiss. 1996. The association of the Epstein-Barr virus with malignant lymphoma. *Biomed Pharmacother* 50:459-67.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Chen *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 78:404-416, 2000.
- Chinni *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 3:1557-64, 1997.
- Clark, E.A. and Brugge, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-238, 1995.
- Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
- Cortese, I. *et al.* Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11063-11067 (1996).
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cox, D. R. Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society* 74, 187-220 (1972).
- Curiel, D.T. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* 886, 158-171, 1999.
- Defilippi, P., Bozzo, C., Volpe, G., Romano, G., Venturino, M., Silengo, L. and Tarone, G. Integrin-mediated signal transduction in human endothelial cells: analysis of tyrosine phosphorylation events. *Cell Adh. Commun.* 87:75-86, 1994.
- Delannet, M., Martin, F., Bossy, B., Cheresch, D.A., Reichardt, L.F. and Duband, J.L. Specific roles of the  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ , and  $\alpha v \beta 5$  integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. *Development*. 120:2687-702, 1994.
- Delpino *et al.*, *Mol. Membr. Biol.* 15:21-26, 1998.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Dente, L., Vetriani, C., Zucconi, A., Pelicci, G., Lanfranccone, L., Pelicci, P.G. and Cesareni, G. Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J. Mol. Biol.* 269:694-703, 1997.
- Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8:84-87, 1998.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. The third helix of Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269:10444-10450, 1994
- DMITRIEV, I., KRASNYKH, V., MILLER, C.R., WANG, M., KASHENTSEV, A.E., MIKHEEVA, G., BELOUSOVA, N., and CUIEL, D.T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackie virus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* 72; 9706-9713.
- DOUGLAS, J.T., ROGERS, B.E., ROSENFELD, M.E., MICHAEL, S.I., FENG, M., and CUIEL, D.T. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nature Biotechnol.* 14; 1574-1578.
- Dunn, I.S. Mammalian cell binding and transfection mediated by surface-modified bacteriophage lambda. *Biochimie* 78, 856-861, 1996.
- Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J. B. & Sioud, M. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol* 23, 3189-3193 (1993).
- 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Enblad, G., K. Sandvej, E. Lennette, C. Sundstrom, G. Klein, B. Glimelius, and G. Pallesen. 1997. Lack of correlation between EBV serology and presence of EBV in the Hodgkin and Reed-Sternberg cells of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 72:394-7.
- Engelstädter M *et al.* Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 293-303.
- 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.
- Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A  $\beta$  turn in the cytoplasmic tail of the integrin  $\alpha$  subunit influences conformation and ligand binding of  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* 269:4641-4647, 1994a.
- Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A structural basis for bidirectional integrin signalling. *Princess Takamatsu Symp.* 24:106-117, 1994b.
- Filardo, E.J., Brooks, P.C., Deming, S.L., Damsky, C. and Cheresch, D.A. Requirement of the NPXY motif in the integrin  $\beta$ 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 130:441-450, 1995.
- Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nature Biotechnol.* 15: 510, 1997.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995
- Folkman, J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9064-9066, 1998.
- Friedlander M, Brooks PC, Sharffer RW, Kincaid CM, Varner JA, and Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ v integrins. *Science*, 270: 1500-1502, 1995.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheres DA. Involvement of integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  in ocular neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9764-9769, 1996.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frisch SM. And Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Cur. Opin. in Cell Biol.* 9:701-706, 1997.
- Furuya *et al.*, *Cancer Res.* 54:6167-75, 1994.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM and Greenberg NM. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res.* 56:4096-4102, 1996.
- Girod A *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; 5: 1052-1056.
- Gold R. Differentiation between Cellular Apoptosis and Necrosis by the Combined Use of In Situ Tailing Translation Techniques. *Lab. Invest.* 71: 219, 1994
- Goldman CK *et al.* Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 1997; 57: 1447-1451.
- GOLDMAN, C.K., ROGERS, B.E., DOUGLAS, J.T., SOSNOWSKI, B.A., YING, W., SIEGAL, G.P., BAIRD, A., CAMPAIN, J.A., and CURIEL, D.T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* 57; 1447-1451.
- Gomez-Poix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Grace, M. J., L. Xie, M. L. Musco, S. Cui, M. Gurnani, R. DiGiacomo, A. Chang, S. Indelicato, J. Syed, R. Johnson, and L. L. Nielsen. 1999. The use of laser scanning



WO 02/20723

PCT/US01/28044

- cytometry to assess depth of penetration of adenovirus p53 gene therapy in human xenograft biopsies. *Am J Pathol* 155:1869-78.
- 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 and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- Gram, H., Schmitz, R., Zuber, J.F. and Baumann, G. Identification of phosphopeptide ligands for Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display. *Eur. J. Biochem.* 246:633-637, 1997.
- Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ and Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3439-3443, 1995.
- GrisCELLI F, Li H, Bennaceur-GrisCELLI A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P and Lu H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6367-72, 1998.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Gunge et al., *Mol. Gen. Genet.* 263:846-854, 2000.
- Hall, H., Williams, EJ., Moore, SE., Walsh, FS., Prochiantz, A. and Doherty, P. Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neuron outgrowth by a cell -membrane permeable phosphopeptide. *Current Biology*, 6:580-587, 1996.
- 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.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- 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).
- Hart SL *et al.* Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly- Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.* 269, 12468-12474, 1994
- Hemler, M., Weitzman, J., Pasqualini, R., Kawaguchi, S., Kassner, P. and Berdichevsky, F. Structure, biochemical properties, and biological functions of integrin cytoplasmic domains. In: *Integrins: The Biological Problems* (ed. Yoshi Takada) CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA; pp.1-35, 1994.
- Hendrix RW. Evolution: the long evolutionary reach of viruses. *Current Biol.* 9:914-917, 1999.
- HENRY, L., XIA, D., WILKE, M., DEISENHOFER, J., and GERARD, R. (1994). Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *E. coli*. *J. Virol.* 68; 5239-5246.
- Herbst, H., E. Steinbrecher, G. Niedobitek, L. S. Young, L. Brooks, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1992. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 80:484-91.
- Herbst, H., F. Dallenbach, M. Hummel, G. Niedobitek, S. Pileri, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1991. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4766-70.
- Hermonat and Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Herndier BG, Werner A, Arnstein P, Abbey NW, Demartis F, Cohen RL, Shuman MA and Levy, JA. Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals. *AIDS* 8:575-581, 1996.

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

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

HEYWOOD, S.P., and HOOPER, N.M. (1995). Development and application of a fluorometric assay for mammalian membrane dipeptidase. *Anal. Biochem.* 226; 10-14.

HONG, S.S., GALAUP, A., PEYTAVI, R., CHAZAL, N., and BOULANGER, P.A. (1999). Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery by use of an oligopeptide with dual binding specificity. *Hum. Gene Ther.* 10; 2577-2586.

HONG, S.S., KARYAN, L., TOURNIER, J., CURIEL, D.T., and BOULANGER, P.A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha-2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16; 2294-2306.

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

Hughes *et al.*, *Cancer Res.* 49:4452-54, 1989

Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992.

Ivanenkov, V., Felici, F. & Menon, A.G. Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1448, 450-462, 1999a.

Ivanenkov, V.V., Felici, F. & Menon, A.G. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1448, 463-472, 1999b.

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

Jarrett, A. F., A. A. Armstrong, and E. Alexander. 1996. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 7:5-10.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Jarrett, R. F., and J. MacKenzie. 1999. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36:260-9.
- Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993).
- Joliot, A.H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C., and Prochiantz, A. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol* 3:1121-1131, 1991a.
- Joliot, A.H., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. and Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1864-1868, 1991b.
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Kaplan, E. L. a. M., P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457-481 (1958).
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
- Kasono, K. et al. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5, 2571-2579, 1999.
- Kassner, P.D., Burg, M.A., Baird, A. & Larocca, D. Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 921-928, 1999.
- Kiang *et al.*, *Chin. J. Physiol.* 40:213-219, 1997
- Klemke, R.L., Yebra, M., Bayna, E.M. and Cheresch, D.A. Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin  $\alpha v \beta 5$  -directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol.* 127:859-866, 1994.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- 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
- Koivunen E, Gay DA and Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210, 1993.
- Koivunen E, Wang B, and Ruoslahti E. Phage display libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *BioTechnology* 13:265-270, 1995.
- Koivunen, E. *et al.* Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. *Methods Mol Biol* 129, 3-17 (1999).
- Kolanus, W. and Seed, B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:725-731, 1997.
- Kolonin MG, Finley RL Jr. Targeting cyclin-dependent kinases in Drosophila with peptide aptamers. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci. USA.* 95:14266-71, 1998.
- Kong HL and Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis.
- Kouzmitcheva G. A. *et al.* Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 150-60 (2001).
- 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.
- KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., MIKHEEV, A.G., MILLER, C.R., BELOUSOVA, N., and CURIEL, D.T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72; 1844-1852.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., and CUIEL, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70; 6839-6846.
- Lane T. Shah J. Clinical features and management of benign prostatic hyperplasia. *Hospital Medicine.* 60(10):705-9, 1999.
- Larocca D *et al.* Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J* 1999; 13:727-734.
- Larocca, D., Witte, A., Johnson, W., Pierce, G.F. & Baird, A. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Hum Gene Ther* 9, 2393-2399, 1998.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Le Roux, I., Joliot, A.H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A. and Volovitch, M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:9120-9124, 1993
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lewis, J.M., Cheres, D.A. and Schwartz, M.A. Protein kinase C regulates  $\alpha$ v $\beta$ 5-dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Cell Biol.* 134:1323-1332, 1996.
- Lin, T.H., Aplin, A.E., Shen, Y., Chen Q., Schaller, M.D., Romer L., Aukhil, I. and Juliano, R.L. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signalling pathways in fibroblast. *J. Cell Biol.* 136:1385-1395, 1997.
- Longhurst, C.M. and Jennings, L.K. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* 54:514-526, 1998.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- 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.
- LOUIS, N., FENDER, P., BARGE, A., KITS, P., and CHROBOCZEK, J. (1994). Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J. Virol.* 68; 4104-4106.
- Lunardi, C. *et al.* Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells [In Process Citation]. *Nat Med* 6, 1183-1186 (2000).
- Lynch, C.M. *et al.* Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 80, 497-505, 1997.
- Lyons, S. F., and D. N. Liebowitz. 1998. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 25:461-75.
- MacGregor, G.R. & Caskey, C.T. Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17, 2365, 1989.
- Mahboubi *et al.*, *J. Immunol.* 164:3837-3846, 2000.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- Martin F *et al.* Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J Virol* 1999; 73: 6923-6929.
- Martiny-Baron G, and Marme D. VEGF-mediated tumor angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:675-680, 1995.
- Mennuni, C. *et al.* Selection of phage-displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. *J Autoimmun* 9, 431-436 (1996).
- Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986

- MICHAEL, S.I., HONG, J.S., CUIEL, D.T., and ENGLER, J.A. (1995). Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther.* 2; 660-668.
- Mikolajczyk SD. Millar LS. Wang TJ. Rittenhouse HG. Marks LS. Song W. Wheeler TM. Slawin KM. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostatecancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Research.* 60(3):756-9, 2000.
- Miller CR *et al.* Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor independent gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58: 5738-5748.
- Motti, C. *et al.* Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 146, 191-198 (1994).
- 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.
- Muzyczka N. Adeno-associated virus (AAV) vectors: will they work? *J. Clin. Invest.* 94:1351, 1994
- 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.
- Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 41, 361-375 (1981).
- Olofsson, B. Jeltsch, M., Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999) Current Biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Op Biotechnol*, 10, 528-535.
- 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



WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2576-2581.
- Owens, G. P., R. A. Williamson, M. P. Burgoon, O. Ghausi, D. R. Burton, and D. H. Gilden. 2000. Cloning the antibody response in humans with chronic inflammatory disease: immunopanning of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brain sections with antibody phage libraries prepared from SSPE brain enriches for antibody recognizing measles virus antigens in situ. *J Virol* 74:1533-7.
- Pallesen, G., S. J. Hamilton-Dutoit, M. Rowe, and L. S. Young. 1991. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease [see comments]. *Lancet* 337:320-2.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- 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.  $\alpha_v$  integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997
- 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.
- 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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727, 2000.
- Pelleymounter et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543, 1994.
- Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, and G. E. Morris. 1998. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J Med Virol* 56:105-11.
- Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, L. F. Wang, and G. E. Morris. 2000. Hepatitis C epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a chimeric antigen. *J Med Virol* 60:144-51.
- Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Poul, M.A. & Marks, J.D. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J Mol Biol* 288, 203-211, 1999.
- Prezzi, C. et al. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156, 4504-4513 (1996).
- Prezzi, C., M. Nuzzo, A. Meola, P. Delmastro, G. Galfre, R. Cortese, A. Nicosia, and P. Monaci. 1996. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156:4504-13.
- PRICE, J.E., POLYZOS, A., ZHANG, R.D., and DANIELS, L.M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cells lines in nude mice. *Cancer Res.* 50; 717-721.
- Puntoriero, G. et al. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* 17, 3521-3533 (1998).
- Racher et al., *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- 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.
- Razzaque, A., Y. Francillon, P. N. Jilly, and F. Varricchio. 1996. Detection of human herpesvirus 6 sequences in lymphoma tissues by immunohistochemistry and polymerase chain reactions. *Cancer Lett* 106:221-6.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Renata Pasqualini, W. A., Daniel Rajotte, and Erkki Ruoslahti. in *Phage Display: A Laboratory manual* (ed. Carlos F. Barbas III, D. R. B., Jamie K. Scott, and Gregg J. Silverman) 22.21-22.24 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
- 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.
- ROELVINK, P.W., LEE, G.M., EINFELD, D.A., KOVESDI, I., and WICKHAM, T.J. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286; 1568-1571.
- ROMANCZUK, H., GALER, C.E., ZABNER, J., BARSOMIAN, G., WADSWORTH, S.C., and O'RIORDAN, C.R. (1999). Modification of an adenoviral vector with

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum. Gene Ther.* 10; 2615-2626.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Rowley, M. J. *et al.* Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* 164, 3413-3419 (2000).
- Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996
- Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11810-11813 (1995).
- Sahin, U., Tureci, O. & Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 709-716 (1997).
- Scala, G. *et al.* Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* 162, 6155-6161 (1999).
- Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am. J. Pathol.* 136:1393-1405, 1990.
- Schmitz, R., Baumann, G. and Gram, H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinase Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display *J. Mol. Biol.* 260: 664-677, 1996.
- Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest.* 100:1-5, 1997.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Short S M, Talbott GA and Juliano RL. Integrin-mediated Signaling Events in Human Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 9: 1969-1980, 1998
- Silverstein, *JCI* 74:1625-1633, 1984
- Smith G. P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression system. *Curr Opin Biotechnol* 2, 668-73 (1991).
- Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993.
- Smith GP, and Scott JK. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228:1315-1317, 1985
- Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-7.
- Smith, G.P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:668-673, 1991.
- Solowska J, Edelman JM, Albelda SM and Buck CA. (1991) Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin  $\beta 1$  and  $\beta 3$  subunits are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* 114: 1079- 1088.
- Staratschek-Jox, A., S. Kotkowski, G. Belge, T. Rudiger, J. Bullerdiek, V. Diehl, and J. Wolf. 2000. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells : no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 156:209-16.
- Sternberg, N. & Hoess, R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1609-1613, 1995.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stoeckle *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8:2675-80, 1988.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguener *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Tanaka T, Cao Y, Folkman J and Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* 58:3362-3369, 1998.
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llibat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P., and Prochiantz, A. Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J. Neurosci.* 15:7158-7167, 1995.
- 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.
- Triantafilou *et al.*, *Hum. Immunol.* 62:764-770, 2001.
- Tureci, O., Sahin, U. & Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3, 342-349 (1997).
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- U.S. Patent No. 3,817,837
- U.S. Patent No. 3,850,752

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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

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

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. 4,472,509

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

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

U.S. Patent No. 5,223,409

U.S. Patent No. 5,401,511

U.S. Patent No. 5,603,872

U.S. Patent No. 5,622,699

U.S. Patent No. 5,889,155

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 in Cancer Biology*, 9, 211-220.VIGNE, E., MAHFOUZ, I., DEDIEU, J.F., BRIE, A., PERRICAUDET, M., and YEH, P. (1999). RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J. Virol.* 73; 5156-5161.Vu, T.H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422, 1998.Vuori K. Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 266:1576-1578, 1994

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- WATKINS, S.J., MESYANZHINOV, V.V., KUROCHKINA, L.P., and HAWKINS, R.E. (1997). The adenobody approach to viral targeting – specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther.* 4; 1004–1012.
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R and Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cell cultures. *Science* 268: 447-448, 1995.
- Weiss, L. M., J. G. Strickler, R. A. Warnke, D. T. Purtilo, and J. Sklar. 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 129:86-91
- Weiss, L. M., Y. Y. Chen, X. F. Liu, and D. Shibata. 1991. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 139:1259-65.
- Weitzman MD, Wilson JM and Eck SL. Adenovirus vectors in cancer gene therapy. In: *Gene Therapy and Vector Systems* 2: 17-25, 1997.
- Wells, J.A. and Lowman, H.B. Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:355-362, 1992.
- Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Koveshi I. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* 45:149-151, 1997c.
- Wickham, T.J. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 7, 110-114, 2000.
- WICKHAM, T.J., CARRION, M.E., and KOVESDI, I. (1995). Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther.* 2; 750–756.
- WICKHAM, T.J., LEE, G., TITUS, J., SCONOCCHIA, G., BAKACS, T., KOVESDI, I., and SEGAL, D. (1997a). Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T-cells via CD3. *J. Virol.* 71; 7663–7669.



WO 02/20723

PCT/US01/28044

- WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A., and NEMEROW, G.R. (1993). Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not attachment. *Cell* 73; 309-319.
- WICKHAM, T.J., ROELVINK, P.W., BROUGH, D.E., and KOVESDI, I. (1996b). Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnol.* 14; 1570-1573.
- WICKHAM, T.J., SEGAL, D.M., ROELVINK, P.W., CARRION, M.E., LIZONOVA, A., LEE, G.M., and KOVESDI, I. (1996a). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70; 6831-6838.
- WICKHAM, T.J., TZENG, E., SHEARS II, L.L., ROELVINK, P.E., LI, Y., LEE, G.M., BROUGH, D.E., LIZONOVA, A., and KOVESDI, I. (1997b). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* 71; 8221-8229.
- 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.*, *J. Nature* 372: 425, 1994.
- Zhang I and Russell S. Vectors for cancer gene therapy. *Cancer Met. Rev.* 3:385-401, 1996.
- ZHANG, W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 6; 113-138.
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B., Corvol, P. and Cortes-Llorens, C. (1996) Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11968-11973.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A method of identifying a targeting peptide, comprising:
  - a) obtaining a phage display library;
  - b) injecting the phage display library into the circulation of a human;
  - c) obtaining a sample of an organ, tissue or cell type from said human; and
  - d) identifying one or more targeting peptides from phage present in said organ, tissue or cell type.
2. The method of claim 1, wherein said human is brain dead or a terminal wean patient.
3. The method of claim 1, wherein said library contains approximately  $10^{14}$  transforming units (TU).
4. The method of claim 3, wherein said library is a primary phage library.
5. The method of claim 3, wherein said library contains at least  $10^8$  different targeting peptide sequences.
6. The method of claim 1, further comprising recovering phage from said organ, tissue or cell type.
7. The method of claim 6, wherein phage are recovered by infecting bacteria.
8. The method of claim 6, wherein phage are recovered by amplifying phage inserts.
9. The method of claim 8, wherein the inserts encode targeting peptides.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

10. The method of claim 9, further comprising ligating the amplified inserts to phage DNA to produce new phage.
11. The method of claim 1, further comprising:
- a) performing a statistical analysis of the targeting peptide sequences; and
  - b) identifying statistically significant peptide motifs.
12. The method of claim 11, further comprising
- a) conducting an amino acid residue sequence count;
  - b) tracking the relative frequency of each tripeptide motif, compared to its frequency in the unselected library; and
  - c) calculating the probability of observing each relative frequency.
13. A targeting peptide identified by the method of claim 1.
14. A targeting peptide motif identified by the method of claim 12.
15. A method of identifying a targeting peptide, comprising:
- a) injecting a phage display library into the circulation of a human;
  - b) obtaining samples of multiple organs, tissues or cell types from said human;
  - c) recovering phage from said samples;
  - d) amplifying said phage;

WO 02/20723

PCT/US01/28044

- e) pooling the amplified phage;
  - f) injecting the pooled phage into the circulation of a second human;
  - h) obtaining samples of the same organs, tissues or cell types as were obtained from the first human; and
  - i) recovering phage from said samples.
16. An isolated peptide of 100 amino acids or less in size, comprising at least 3 contiguous amino acids of a sequence selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.
17. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is 50 amino acids or less in size.
18. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is 25 amino acids or less in size.
19. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is 10 amino acids or less in size.
20. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is 7 amino acids or less in size.
21. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is 5 amino acids or less in size.
22. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is attached to a molecule.
23. The isolated peptide of claim 22, wherein said molecule is a drug, a chemotherapeutic agent, a radioisotope, a pro-apoptosis agent, an anti-

WO 02/20723

PCT/US01/28044

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 or a hormone antagonist.

24. The isolated peptide of claim 23, wherein said pro-apoptosis agent is selected from the group consisting of gramicidin, magainin, mellitin, defensin, cecropin, (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1), (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:2), (KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) and (KLGKKLG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:4).
25. The isolated peptide of claim 23, wherein said 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, 2-methoxyoestradiol, proliferin-related protein, carboxiamidotriazole, CM101, Marimastat, pentosan polysulphate, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon-α, herbimycin A, PNU145156E, 16K prolactin fragment, Linomide, thalidomide, pentoxifylline, genistein, TNP-470, endostatin, paclitaxel, Docetaxel, polyamines, a proteasome inhibitor, a kinase inhibitor, a signaling inhibitor, SU5416, SU6668, accutin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 and minocycline.
26. The isolated peptide of claim 23, wherein said cytokine is selected from the group consisting of 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).
27. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is attached to a macromolecular complex.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

28. The isolated peptide of claim 27, wherein the macromolecular complex is a virus, a bacteriophage, a bacterium, a liposome, a microparticle, a magnetic bead, a yeast cell, a mamalian cell or a cell.
29. The isolated peptide of claim 16, wherein said peptide is attached to a eukaryotic expression vector.
30. The isolated peptide of claim 16, wherein said vector is a gene therapy vector.
31. A fusion protein, comprising at least 3 contiguous amino acids selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.
32. A composition comprising the isolated peptide of claim 16 in a pharmaceutically acceptable carrier.
33. The composition of claim 32, 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 or a hormone antagonist..
34. The composition of claim 32, wherein said peptide is attached to a virus, a bacteriophage, a bacterium, a liposome, a microparticle, a magnetic bead, a yeast cell, a mamalian cell, a eukaryotic expression vector or a cell
35. A kit comprising:
- a) the isolated peptide of claim 16; and
  - b) a control peptide.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

36. An antibody that selectively binds to an isolated peptide of a sequence selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.
37. A gene therapy vector, wherein the vector expresses a targeting peptide sequence as part of a surface protein, the targeting peptide comprising at least three contiguous amino acids selected from any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:325.
38. An isolated nucleic acid of 300 nucleotides or less in size, said nucleic acid encoding a peptide according to claim 16.
39. A vector comprising the isolated nucleic acid of claim 38.
40. The vector of claim 39, wherein said vector is a plasmid, a cosmid, a yeast artificial chromosome (YAC), a bacterial artificial chromosome (BAC), a virus or a phage.
41. A method of treating a disease state comprising:
- a) selecting a peptide according to claim 1, wherein said peptide is targeted to cells associated with said disease state;
  - b) attaching to said peptide one or more molecules effective to treat said disease state; and
  - c) administering said peptide to a subject with said disease state.
42. The method of claim 41, 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 or degenerative disease.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

43. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:130.

44. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45 or SEQ ID NO:131.

45. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from any of SEQ ID NO:46 through SEQ ID NO:65.

46. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from any of SEQ ID NO:66 through SEQ ID NO:83.

47. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from any of SEQ ID NO:84 through SEQ ID NO:129.

48. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from any of SEQ ID NO:132 through SEQ ID NO:148.

49. The isolated peptide of claim 20, wherein said sequence is selected from any of SEQ ID NO:149 through SEQ ID NO:173.

50. A method of imaging comprising:

- a) selecting a peptide according to claim 1,
- b) attaching said peptide to an imaging agent;
- c) administering said peptide and agent to a human; and



WO 02/20723

PCT/US01/28044

d) obtaining an image of the human.

51. A method of diagnosing a disease state comprising:

- a) selecting a peptide according to claim 1, wherein said peptide is targeted to cells associated with a disease state;
- b) administering said peptide to a human; and
- c) determining the distribution of said peptide in said human.

52. A method, comprising the steps of:

- a) injecting a phage display library comprising about  $10^8$  or more targeting peptides into the circulation of a human;
- b) allowing the library to remain in the human for a period of time and under conditions such that phage bind to the human; and
- c) obtaining a sample from said human which sample comprises bound phage.

53. The method of claim 52, further comprising isolating phage bound to the sample.

54. The method of claim 52, wherein the human is a human selected from the group consisting of a brain dead human and a terminal wean human patient.

55. The method of claim 52, wherein the library comprises about  $10^{14}$  or more transforming units (TU).

56. The method of claim 55, wherein the library is a primary phage library.

57. The method of claim 52, wherein the library comprises at least  $10^9$  different targeting peptide sequences.

58. The method of claim 52, further comprising recovering phage from the sample.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

59. The method of claim 52, wherein the phage are attached to a detectable label.
60. The method of claim 52, wherein the sample is obtained from diseased tissue of the human after the human has died.
61. A method, comprising the steps of:
- a) injecting a phage display library into the circulation of a human, wherein the library is comprised of  $10^8$  or more targeting peptides and the phage are attached to a detectable label and further wherein the human has a terminal disease and a beating heart;
  - b) allowing the library to remain in the human for a period of time and under conditions such that phage of library bind to the human;
  - c) obtaining a sample from the human after the heart of the human is no longer beating, wherein the sample comprises bound phage; and
  - d) isolating phage from the sample.
62. The method of claim 52, further comprising:
- e) performing a statistical analysis of the targeting peptide sequences; and
  - f) identifying statistically significant peptide motifs.
63. The method of claim 62, further comprising
- g) conducting an amino acid residue sequence count;
  - h) tracking the relative frequency of each tripeptide motif, compared to its frequency in the unselected library; and
  - i) calculating the probability of observing each relative frequency.

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1/3

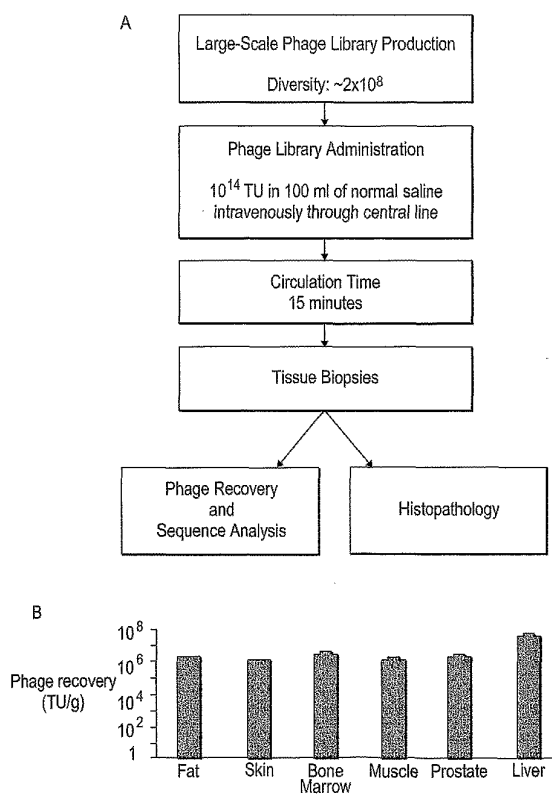


Fig. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20723

PCT/US01/28044

2/3

Bone Marrow	Fat	Skeletal Muscle
<div>SGGGPGV RLGGGLA WWGGGVs GSARGGG ARGGGIR RAAGGGG GSSAGGG LGEAGGG GGLEGGG GNGGGES STGGGCS LGGGEW</div>	<div>HGFSHHG RRGFS-LG GGFSPWL GRLVGFS TTGVGFS</div> <div>AEEGGTS EGGSFNW IEGGQVG EGGSVES EGGIFWH EGGLSGC CAEGGAS AEGGVRG AEGGRVY VVEGGVK VLVGEgg TKKLEGG</div>	<div>GGLSPNW TGHLSPG VLSPLG LSPGVKG LSPWKKR AW--LSPAR AWRRLSP LSPDDAL</div> <div>LVSGGMA LVSGCNT DLVSGYG LVSTSAT TALVSQT WLVSQIG LVSSVFP PSLVSVV GVSLVST QLVSGEP NLVSRL LVSWRGS DHFLVSP GRGLVSL FPVALVS RWSSLVS WSKSLVS PGRSLVS</div>
Prostate	Skin	
<div>GRRAGGS TRRAGGG SRAGG-LG SYAGG-LG DVAGG-LG GAGG-LGA GAGG-WGV AGGTFKP LGEVAGG GSNDAGG YRGIAGG AGGVAGG GGLAGG-F LLAGG-VL LVVSAGG RTQAGG-V AGG-FGEQ AGG-LIDV AGGSTWT AGGDWWW AGGGLLM VAAGGGL LYGAGGS CALAGG-C IGAGGVH</div>	<div>GRRGSAG GRRGSAG RPPRRGS SGRRGPR GLGRRNG GGRRSQT LWDGRRH GRRSVLT FGRRNLF GAGRRYW GRRLWAT GVGRRFG LEMVGRR LSSIGRR GRRWIDV GRREEGL GRRVLGR RGLMGRR RFLGRR PGVGRR GVIDGRR ADGRRLG AGRRQAI YGRRARE PGRRLRM GGRRVLT EQGGRR SGRRRLP FDHSGRR GRRDVAI</div> <div>GGHPRLA GGHWRVN GGHILEV GGHRAQS GDGGHRP SCVGGHS GSGVGGH VRGWGGH WRGWGGH</div>	<div>WGSKGTV TGSLGTV WGTVSDA ATGTGVP VV-GTAV WVV-GTIV RVVHGTV GTVRFFS</div>

Fig. 2A

Fig. 2A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20723

PCT/US01/28044

3/3

Fig. 2B

PKHGV/LW SGV/LWH GV/LWAFG QARGV/LW GV/LVSRM GT/VGV/LV VGV/LPA GGV/LLS SGV/LHD PYFGV/LA FFVSGV/L LLAGGV/L GEMGGV/L GRAYGV/L SGV/LDGR WSGGV/LH WSGGV/LH SRQGV/LR GV/LTSYQ GV/LTS-Q RVPGV/LS LV/LSVR KRGV/LGW GV/LGLGF FLGV/LGR EGV/LETS WVGGV/LG VWSRGV/L GV/LRGVS S-FGV/LRG KGSV/GVL GGHFGV/L WMDY/GVL AFRY/GVL GV/GVLRK	MEGRGAG SEGRGFM VEGRNSK VEGRVTP FN-EGRQNI FEGRSRS DHVTEGR WDGTEGR LDWREGR RGCEGRV MTPEGRV R-EGRRMC R-EGRRMC TQFEGRR SMEGRMF PGSAEGR GEGRILA EGRFSAW EGRSDIW EGRARWL EGRRWR	COQGFV RGGFVGR AVGFVGR AVGFVGR IVGFVGR GNFGVW DEFFVGR WVFGV-S WVFGV-S FGVQWA SMRFGVS RFGVMT-G RFGVGR-V SGV/LGV MKGV/LGV AFGVSD LYAGV KVEGV FGVTDL TFGVRR	VWPRFGG SPFGGRV MKFGGRV RFGGALR ERFGG-DE FSGSVAP WFGGSVQ FSGGSVSL LLFGGSA MRLFGGT FSGFFMY FSGFFMY FSGG-QMN TFGGIL GNSFGG-W RFGGAG WVFGGKS RFGGGLS LWPSFGG	GERISGP GERLSSR TEGERAG WVILGERV WANAGER GVISGER GPGERG LG-GGERD DIAGERV SRKGER KR-KGERV SR-PGERQ CMR-RGER TLRGERN F-GERNRI RGERWDL GERTALL	PSGTSSW SMRGTGM LFDVSGT VTGLSGT NMVSGT GVSGTLG RSGTIFGK GRSGTSG IYSGTLW CSGTLFC RSGTLQT LGSGTWS ESGTATG FTERSGT RYLRSGT PLGSSGT
---	--	---	---	---	--

Multiple Organs

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20723

PCT/US01/28044

## SEQUENCE LISTING

<110> Arap, Wadih  
Pasqualini, Renata

<120> Compositions and Methods for Targeting Peptide in Human In Vivo

<130> 005774.P002

<140> Unknown

<141> 2001-09-07

<160> 423

<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

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 3

Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 4

Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys Leu Gly  
20

&lt;210&gt; 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 5

Gly Gly Gly  
1

<210> 6  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 6

Gly Phe Ser  
1

<210> 7  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 7

Glu Gly Gly  
1



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 8  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 8

Leu Ser Pro  
1

<210> 9  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 9

Leu Leu Val  
1

<210> 10  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 10

Leu Val Ser  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 11  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 11

Ala Gly Gly  
1

<210> 12  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 12

Gly Arg Arg  
1

<210> 13  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 13

Gly Gly His  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 14  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 14

Gly Thr Val  
1

<210> 15  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 15

Gly Val Leu  
1

<210> 16  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 16

Glu Gly Arg

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 17

Phe Gly Val

1

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 18

Phe Gly Gly

1

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 19

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly Glu Arg  
1

<210> 20  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 20

Ser Gly Thr  
1

<210> 21  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 21

Ala Arg Leu  
1

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 22

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly His His Ser Phe Gly  
1 5

<210> 23  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 23

Pro Gly Gly Gly  
1

<210> 24  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 24

Glu Gly Gly Thr  
1

<210> 25  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 25

Thr Gly Gly Glu

1

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 26

Gly Pro Ser Leu His

1

5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 27

Gly Gly Ser Val Leu

1

5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 28

Leu Val Ser Gly Tyr

1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 29

Arg Arg Ala Gly Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 30

Arg Arg Ala Gly Gly

1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 31

Gly Arg Arg Gly  
1

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; Unidentified amino acid

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(38)

&lt;223&gt; Unidentified amino acid

&lt;400&gt; 32

His Gly Gly Xaa Gly  
1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 4

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 33

Pro His Gly Gly

1

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(38)

&lt;223&gt; Unidentified amino acid

&lt;400&gt; 34

Val Thr Gly Xaa Ser Gly

1

5

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 35

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly Arg Gly Glu  
1

<210> 36  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 36

Asn Phe Gly Val Val  
1 5

<210> 37  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 37

Gly Glu Arg Ile Ser  
1 5

<210> 38  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 38

Ser Ile Arg Glu Gly

1 5

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 39

Gly Val Leu Trp

1

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 40

Trp Leu Val Gly

1

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 41

Gly Gly Phe Arg  
1

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 42

Gly Gly Phe Phe  
1

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 43

Ser Gly Gly Phe  
1

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 44

Pro Ser Gly Thr Ser  
1 5

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 45

Thr Gly Ser Pro  
1

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 46

Ala Glu Glu Gly Gly Thr Ser  
1 5

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 47

Glu Gly Gly Ser Phe Asn Trp

1 5

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 48

Ile Glu Gly Gly Gln Val Gly

1 5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 49

Glu Gly Gly Ser Val Glu Ser

1 5

&lt;210&gt; 50

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 50

Glu Gly Gly Ile Phe Trp His

1 5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 51

Glu Gly Gly Leu Ser Gly Cys

1 5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 52

Cys Ala Glu Gly Gly Ala Ser

1 5



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 53  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 53

Ala Glu Gly Gly Val Arg Gly  
1 5

<210> 54  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 54

Ala Glu Gly Gly Arg Val Tyr  
1 5

<210> 55  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 55

Val Val Glu Gly Gly Val Lys  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 56

Val Leu Val Gly Glu Gly Gly  
1 5

<210> 57  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 57

Thr Lys Lys Leu Glu Gly Gly  
1 5

<210> 58  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 58

Gly Gly Leu Ser Pro Asn Trp  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 59  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 59

Thr Gly His Leu Ser Pro Gly  
1 5

<210> 60  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 60

Val Leu Ser Pro Gly Leu Gly  
1 5

<210> 61  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 61

Leu Ser Pro Gly Val Lys Gly

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 62

Leu Ser Pro Trp Lys Lys Arg

1 5

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 63

Ala Trp Leu Ser Pro Ala Arg

1 5

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 64

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Ala Trp Arg Arg Leu Ser Pro  
1 5

<210> 65  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 65

Leu Ser Pro Asp Asp Ala Leu  
1 5

<210> 66  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 66

Leu Val Ser Gly Gly Met Ala  
1 5

<210> 67  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 67

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Val Ser Gly Cys Asn Thr  
1 5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 68

Asp Leu Val Ser Gly Tyr Gly  
1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 69

Leu Val Ser Thr Ser Ala Thr  
1 5

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 70

Thr Ala Leu Val Ser Gln Thr  
1 5

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 71

Trp Leu Val Ser Gly Ile Gly  
1 5

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 72

Leu Val Ser Ser Val Phe Pro  
1 5

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 73

Pro Ser Leu Val Ser Ser Val

1 5

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 74

Gly Val Ser Leu Val Ser Thr

1 5

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 75

Gln Leu Val Ser Gly Glu Pro

1 5

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 76

Asn Leu Val Ser Arg Arg Leu  
1 5

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 77

Leu Val Ser Trp Arg Gly Ser  
1 5

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 78

Asp His Phe Leu Val Ser Pro  
1 5

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 79

Gly Arg Gly Leu Val Ser Leu

1 5

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 80

Phe Pro Val Ala Leu Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 81

Arg Trp Ser Ser Leu Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 82

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 82

Trp Ser Lys Ser Leu Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 83

Pro Gly Arg Ser Leu Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 84

Gly Arg Arg Gly Ser Ala Gly

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 85  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 85

Arg Pro Gly Arg Arg Gly Ser  
1 5

<210> 86  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 86

Ser Gly Arg Arg Gly Pro Arg  
1 5

<210> 87  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 87

Gly Leu Gly Arg Arg Asn Gly  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 88  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 88

Gly Gly Arg Arg Ser Gln Thr  
1 5

<210> 89  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 89

Leu Trp Asp Gly Arg Arg His  
1 5

<210> 90  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 90

Gly Arg Arg Ser Val Leu Thr  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 91  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 91

Phe Gly Arg Arg Asn Leu Phe  
1 5

<210> 92  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 92

Gly Ala Gly Arg Arg Tyr Trp  
1 5

<210> 93  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 93

Gly Arg Arg Leu Trp Ala Thr

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 94

Gly Val Gly Arg Arg Phe Gly

1 5

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 95

Leu Glu Met Val Gly Arg Arg

1 5

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 96

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Ser Ser Ile Gly Arg Arg  
1 5

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 97

Gly Arg Arg Trp Ile Asp Val  
1 5

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 98

Gly Arg Arg Glu Glu Gly Leu  
1 5

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 99



WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly Arg Arg Val Leu Gly Arg  
1 5

<210> 100  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 100

Arg Gly Leu Met Gly Arg Arg  
1 5

<210> 101  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 101

Arg Phe Leu Leu Gly Arg Arg  
1 5

<210> 102  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 102

Pro Gly Val Gly Arg Arg Leu  
1 5

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 103

Gly Val Ile Asp Gly Arg Arg  
1 5

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 104

Ala Asp Gly Arg Arg Leu Gly  
1 5

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 105

Ala Gly Arg Arg Ala Gln Ile  
1 5

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 106

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Glu  
1 5

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 107

Pro Gly Arg Arg Leu Arg Met  
1 5

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 108

Gly Gly Arg Arg Val Thr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 109

Glu Gln Gly Gly Arg Arg Leu  
1 5

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 110

Ser Gly Arg Arg Leu His Pro  
1 5

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 111

Phe Asp His Ser Gly Arg Arg

1 5

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 112

Gly Arg Arg Asp Val Ala Ile

1 5

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 113

Gly Gly His Pro Arg Leu Ala

1 5

&lt;210&gt; 114

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 114

Gly Gly His Trp Arg Val Asn

1 5

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 115

Gly Gly His Ile Leu Glu Val

1 5

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 116

Gly Gly His Arg Ala Gln Ser

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 117  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 117

Gly Asp Gly Gly His Arg Pro  
1 5

<210> 118  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 118

Ser Cys Val Gly Gly His Ser  
1 5

<210> 119  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 119

Gly Ser Gly Val Gly Gly His  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 120  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 120

Val Arg Gly Trp Gly Gly His  
1 5

<210> 121  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 121

Trp Arg Gly Trp Gly Gly His  
1 5

<210> 122  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 122

Trp Gly Ser Lys Gly Thr Val  
1 5



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 123  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 123

Thr Gly Ser Leu Gly Thr Val  
1 5

<210> 124  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 124

Trp Gly Thr Val Ser Asp Ala  
1 5

<210> 125  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 125

Ala Thr Gly Thr Val Gly Pro

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 126

Val Val Gly Thr Val Ala Trp

1 5

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 127

Trp Val Val Gly Thr Val Thr

1 5

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 128

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Arg Val Val His Gly Thr Val  
1 5

<210> 129  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 129

Gly Thr Val Arg Phe Phe Ser  
1 5

<210> 130  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 130

Leu Trp Ser  
1

<210> 131  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 131

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Glu Gly Arg Gly

1

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 132

Ser Gly Gly Gly Pro Gly Val

1

5

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 133

Arg Leu Gly Gly Gly Leu Ala

1

5

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 134

Trp Trp Gly Gly Gly Val Ser  
1 5

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 135

Gly Ser Ala Arg Gly Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 136

Ala Arg Gly Gly Gly Ile Arg  
1 5

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 137

Arg Ala Ala Gly Gly Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 138

Gly Ser Ser Ala Gly Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 139

Leu Gly Glu Ala Gly Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 140

Gly Gly Leu Glu Gly Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 141

Gly Asn Gly Gly Gly Glu Ser  
1 5

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 142

Ser Thr Gly Gly Gly Cys Ser  
1 5

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 143

Leu Gly Gly Gly Glu Glu Trp

1 5

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 144

His Gly Phe Ser His His Gly

1 5

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 145

Arg Arg Gly Phe Ser Leu Gly

1 5

&lt;210&gt; 146



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 146

Gly Gly Phe Ser Pro Trp Leu

1 5

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 147

Gly Arg Leu Val Gly Phe Ser

1 5

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 148

Thr Thr Gly Val Gly Phe Ser

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 149  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 149

Gly Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
1 5

<210> 150  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 150

Thr Arg Arg Ala Gly Gly Gly  
1 5

<210> 151  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 151

Ser Arg Ala Gly Gly Leu Gly  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 152  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 152

Ser Tyr Ala Gly Gly Leu Gly  
1 5

<210> 153  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 153

Asp Val Ala Gly Gly Leu Gly  
1 5

<210> 154  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 154

Gly Ala Gly Gly Leu Gly Ala  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 155  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 155

Gly Ala Gly Gly Trp Gly Val  
1 5

<210> 156  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 156

Ala Gly Gly Thr Phe Lys Pro  
1 5

<210> 157  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 157

Leu Gly Glu Val Ala Gly Gly

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 158

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 158

Gly Ser Asn Asp Ala Gly Gly

1 5

&lt;210&gt; 159

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 159

Tyr Arg Gly Ile Ala Gly Gly

1 5

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 160

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Ala Gly Gly Val Ala Gly Gly  
1 5

<210> 161  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 161

Gly Gly Leu Ala Gly Gly Phe  
1 5

<210> 162  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 162

Leu Leu Ala Gly Gly Val Leu  
1 5

<210> 163  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 163

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Val Val Ser Ala Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 164

Arg Thr Gln Ala Gly Gly Val  
1 5

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 165

Ala Gly Gly Phe Gly Glu Gln  
1 5

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 166

Ala Gly Gly Leu Ile Asp Val  
1 5

&lt;210&gt; 167

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 167

Ala Gly Gly Ser Thr Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 168

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 168

Ala Gly Gly Asp Trp Trp Trp  
1 5

&lt;210&gt; 169

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 169

Ala Gly Gly Gly Leu Leu Met

1 5

&lt;210&gt; 170

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 170

Val Ala Ala Gly Gly Gly Leu

1 5

&lt;210&gt; 171

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 171

Leu Tyr Gly Ala Gly Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 172

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 172

Cys Ala Leu Ala Gly Gly Cys  
1 5

&lt;210&gt; 173

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 173

Ile Gly Ala Gly Gly Val His  
1 5

&lt;210&gt; 174

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 174

Pro Lys His Gly Val Leu Trp  
1 5

&lt;210&gt; 175

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 175

Ser Gly Val Leu Trp Tyr His

1 5

&lt;210&gt; 176

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 176

Gly Val Leu Trp Ala Phe Gly

1 5

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 177

Gln Ala Arg Gly Val Leu Trp

1 5

&lt;210&gt; 178

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 178

Gly Val Leu Val Ser Arg Met

1 5

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 179

Gly Thr Val Gly Val Leu Val

1 5

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 180

Val Gly Val Leu Leu Pro Ala

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 181  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 181

Gly Gly Val Leu Leu Leu Ser  
1 5

<210> 182  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 182

Ser Gly Val Leu Ile His Asp  
1 5

<210> 183  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 183

Pro Tyr Phe Gly Val Leu Ala  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 184  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 184

Phe Phe Val Ser Gly Val Leu  
1 5

<210> 185  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 185

Leu Leu Ala Gly Gly Val Leu  
1 5

<210> 186  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 186

Gly Glu Met Gly Gly Val Leu  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 187  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 187

Gly Arg Ala Tyr Gly Val Leu  
1 5

<210> 188  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 188

Ser Gly Val Leu Asp Gly Arg  
1 5

<210> 189  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 189

Trp Ser Gly Gly Val Leu His

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 190

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 190

Trp Ser Gly Gly Val Leu His

1 5

&lt;210&gt; 191

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 191

Ser Arg Gln Gly Val Leu Arg

1 5

&lt;210&gt; 192

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 192



WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly Val Leu Thr Ser Tyr Gln  
1 5

<210> 193  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 193

Arg Gly Val Leu Thr Ser Gln  
1 5

<210> 194  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 194

Arg Val Pro Gly Val Leu Ser  
1 5

<210> 195  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 195

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Gly Val Leu Ser Tyr Arg  
1 5

<210> 196  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 196

Lys Arg Gly Val Leu Gly Trp  
1 5

<210> 197  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 197

Gly Val Leu Gly Leu Gly Phe  
1 5

<210> 198  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 198

Phe Leu Gly Val Leu Gly Arg  
1 5

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 199

Glu Gly Val Leu Glu Thr Ser  
1 5

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 200

Trp Trp Gly Gly Val Leu Gly  
1 5

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 201

Val Trp Ser Arg Gly Val Leu

1 5

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 202

Gly Val Leu Arg Gly Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 203

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 203

Ser Phe Gly Val Leu Arg Gly

1 5

&lt;210&gt; 204

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 204

Lys Gly Ser Val Gly Val Leu  
1 5

&lt;210&gt; 205

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 205

Gly Gly His Phe Gly Val Leu  
1 5

&lt;210&gt; 206

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 206

Trp Met Asp Val Gly Val Leu  
1 5

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 207

Ala Phe Arg Val Gly Val Leu

1 5

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 208

Gly Val Gly Val Leu Arg Lys

1 5

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 209

Met Glu Gly Arg Gly Ala Gly

1 5

&lt;210&gt; 210

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 210

Ser Glu Gly Arg Gly Phe Met

1 5

&lt;210&gt; 211

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 211

Val Glu Gly Arg Asn Ser Lys

1 5

&lt;210&gt; 212

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 212

Val Glu Gly Arg Tyr Thr Pro

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 213  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 213

Phe Asn Glu Gly Arg Gln Met  
1 5

<210> 214  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 214

Phe Glu Gly Arg Ser Arg Ser  
1 5

<210> 215  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 215

Asp His Val Val Glu Gly Arg  
1 5



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 216  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 216

Trp Asp Gly Thr Glu Gly Arg  
1 5

<210> 217  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 217

Leu Asp Trp Arg Glu Gly Arg  
1 5

<210> 218  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 218

Arg Gly Cys Glu Gly Arg Val  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 219  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 219

Met Thr Pro Glu Gly Arg Val  
1 5

<210> 220  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 220

Arg Leu Phe Glu Gly Arg Val  
1 5

<210> 221  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 221

Arg Glu Gly Arg Arg Met Cys

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 222

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 222

Thr Gln Phe Glu Gly Arg Arg

1 5

&lt;210&gt; 223

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 223

Ser Met Glu Gly Arg Met Phe

1 5

&lt;210&gt; 224

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 224

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Pro Gly Ser Ala Glu Gly Arg  
1 5

<210> 225  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 225

Gly Glu Gly Arg Ile Leu Ala  
1 5

<210> 226  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 226

Glu Gly Arg Phe Ser Ala Trp  
1 5

<210> 227  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 227

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Glu Gly Arg Ser Asp Ile Trp  
1 5

<210> 228  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 228

Glu Gly Arg Ala Arg Trp Leu  
1 5

<210> 229  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 229

Glu Gly Arg Glu Arg Trp Arg  
1 5

<210> 230  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 230

Cys Gln Cys Gly Phe Gly Val  
1 5

&lt;210&gt; 231

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 231

Arg Gly Gly Phe Gly Val Arg  
1 5

&lt;210&gt; 232

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 232

Ala Val Gly Phe Gly Val Ile  
1 5

&lt;210&gt; 233

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 233

Ala Val Gly Phe Gly Val Ile

1 5

&lt;210&gt; 234

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 234

Ile Val Gly Phe Gly Val Ala

1 5

&lt;210&gt; 235

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 235

Gly Asn Phe Gly Val Val Trp

1 5

&lt;210&gt; 236

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 236

Asp Glu Pro Phe Gly Val Ala  
1 5

&lt;210&gt; 237

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 237

Val Trp Phe Gly Val Gly Ser  
1 5

&lt;210&gt; 238

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 238

Trp Phe Gly Val Ser Leu Ser  
1 5

&lt;210&gt; 239

&lt;211&gt; 7



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 239

Phe Gly Val Gly Gln Trp Ala

1 5

&lt;210&gt; 240

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 240

Ser Met Arg Phe Gly Val Ser

1 5

&lt;210&gt; 241

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 241

Arg Phe Gly Val Trp Thr Gly

1 5

&lt;210&gt; 242

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 242

Arg Phe Gly Val Gly Arg Val

1 5

&lt;210&gt; 243

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 243

Ser Gly Leu Phe Gly Val Tyr

1 5

&lt;210&gt; 244

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 244

Met Lys Gly Val Phe Gly Val

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 245  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 245

Ala Phe Gly Val Val Ser Asp  
1 5

<210> 246  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 246

Leu Tyr Ala Phe Gly Val Val  
1 5

<210> 247  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 247

Lys Val Phe Gly Val Val Glu  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 248  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 248

Phe Gly Val Arg Thr Asp Leu  
1 5

<210> 249  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 249

Thr Ile Phe Gly Val Arg Arg  
1 5

<210> 250  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 250

Val Trp Pro Arg Phe Gly Gly  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 251  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 251

Ser Arg Phe Gly Gly Arg Val  
1 5

<210> 252  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 252

Met Lys Phe Gly Gly Arg Leu  
1 5

<210> 253  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 253

Arg Phe Gly Gly Ala Leu Arg

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 254

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 254

Glu Arg Phe Gly Gly Asp Glu

1 5

&lt;210&gt; 255

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 255

Phe Gly Gly Ser Val Ala Pro

1 5

&lt;210&gt; 256

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 256

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Trp Phe Gly Gly Ser Val Gln  
1 5

<210> 257  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 257

Phe Gly Gly Ser Trp Ser Leu  
1 5

<210> 258  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 258

Leu Leu Phe Gly Gly Ser Ala  
1 5

<210> 259  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 259

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Met Arg Leu Phe Gly Gly Thr  
1 5

&lt;210&gt; 260

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 260

Phe Gly Gly Phe Phe Met Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 261

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 261

Phe Gly Gly Phe Phe Met Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 262

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 262

Glu Phe Gly Gly Gln Met Asn

1 5

&lt;210&gt; 263

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 263

Thr Phe Gly Gly Leu Ile Leu

1 5

&lt;210&gt; 264

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 264

Gly Asn Ser Phe Gly Gly Trp

1 5

&lt;210&gt; 265

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 265

Arg Thr Phe Gly Gly Ala Gly  
1 5

&lt;210&gt; 266

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 266

Trp Val Phe Gly Gly Lys Ser  
1 5

&lt;210&gt; 267

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 267

Arg Gly Phe Gly Gly Leu Ser  
1 5

&lt;210&gt; 268

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 268

Leu Trp Pro Ser Phe Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 269

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 269

Gly Glu Arg Ile Ser Gly Pro  
1 5

&lt;210&gt; 270

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 270

Gly Glu Arg Leu Ser Ser Arg  
1 5

&lt;210&gt; 271

&lt;211&gt; 7

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 271

Thr Glu Gly Glu Arg Ala Gly

1 5

&lt;210&gt; 272

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 272

Trp Trp Leu Gly Glu Arg Val

1 5

&lt;210&gt; 273

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 273

Trp Ala Trp Ala Gly Glu Arg

1 5

&lt;210&gt; 274

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 274

Gly Val Ile Ser Gly Glu Arg

1 5

&lt;210&gt; 275

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 275

Gly Pro Gly Gly Glu Arg Gly

1 5

&lt;210&gt; 276

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 276

Leu Gly Gly Gly Glu Arg Asp

1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 277  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 277

Asp Ile Ala Gly Glu Arg Val  
1 5

<210> 278  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 278

Ser Arg Ser Lys Gly Glu Arg  
1 5

<210> 279  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 279

Lys Arg Lys Gly Glu Arg Val  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 280  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 280

Ser Arg Pro Gly Glu Arg Gln  
1 5

<210> 281  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 281

Cys Met Arg Arg Gly Glu Arg  
1 5

<210> 282  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 282

Thr Leu Arg Gly Glu Arg Asn  
1 5

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 283  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 283

Phe Gly Glu Arg Asn Arg Ile  
1 5

<210> 284  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 284

Arg Gly Glu Arg Trp Asp Leu  
1 5

<210> 285  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 285

Gly Glu Arg Thr Ala Leu Leu



WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

<210> 286  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 286

Pro Ser Gly Thr Ser Ser Trp  
1 5

<210> 287  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 287

Ser Met Ser Gly Thr Gly Met  
1 5

<210> 288  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 288

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Phe Asp Val Ser Gly Thr  
1 5

<210> 289  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 289

Val Thr Gly Leu Ser Gly Thr  
1 5

<210> 290  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 290

Asn Met Val Ile Ser Gly Thr  
1 5

<210> 291  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 291

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Gly Val Ser Gly Thr Leu Gly  
1 5

&lt;210&gt; 292

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 292

Arg Ser Gly Thr Pro Gly Lys  
1 5

&lt;210&gt; 293

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 293

Gly Arg Ser Gly Thr Ser Gly  
1 5

&lt;210&gt; 294

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 294

Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Trp  
1 5

&lt;210&gt; 295

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 295

Cys Ser Gly Thr Leu Phe Cys  
1 5

&lt;210&gt; 296

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 296

Arg Ser Gly Thr Leu Gln Thr  
1 5

&lt;210&gt; 297

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 297

Leu Gly Ser Gly Thr Trp Ser  
1 5

&lt;210&gt; 298

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 298

Glu Ser Gly Thr Ala Thr Gly  
1 5

&lt;210&gt; 299

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 299

Phe Thr Glu Arg Ser Gly Thr  
1 5

&lt;210&gt; 300

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 300

Arg Tyr Leu Arg Ser Gly Thr  
1 5

&lt;210&gt; 301

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 301

Pro Leu Gly Ser Ser Gly Thr  
1 5

&lt;210&gt; 302

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 302

Glu Val Ser  
1

&lt;210&gt; 303

&lt;211&gt; 3

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 303

Thr Ala Gly  
1

<210> 304  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 304

Val Thr Val  
1

<210> 305  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 305

Gly Glu Val  
1

<210> 306

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 306

Leu Pro Gly  
1

<210> 307  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 307

Pro Gly Leu  
1

<210> 308  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 308

Arg Gly Thr  
1



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 309  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 309

Val Leu Leu  
1

<210> 310  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 310

Pro Ala Val  
1

<210> 311  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 311

Ala Ala Val  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 312  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 312

Arg Gly Pro  
1

<210> 313  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 313

Val Arg Met  
1

<210> 314  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 314

Leu Leu Leu  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 315  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 315

Arg Ala Val  
1

<210> 316  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 316

Arg Gly Glu  
1

<210> 317  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 317

Lys Gly Gly

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1

<210> 318  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 318

Gly Ala Arg  
1

<210> 319  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 319

Gly Gly Arg  
1

<210> 320  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 320

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Trp Gly Gly  
1

<210> 321  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 321

Gly Gly Met  
1

<210> 322  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 322

Gly Val Asp  
1

<210> 323  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 323

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Gly Phe  
1

<210> 324  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 324

Ser Trp Val  
1

<210> 325  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 325

Ser Trp Arg  
1

<210> 326  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 326

Val Gly Val

1

&lt;210&gt; 327

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 327

Val Gly Val Gly

1

&lt;210&gt; 328

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 328

Ile Gly Ser

1

&lt;210&gt; 329

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 329

Gly Gly Ala  
1

&lt;210&gt; 330

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 330

Val Gly Ala  
1

&lt;210&gt; 331

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 331

Trp His Gly  
1

&lt;210&gt; 332

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT



WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 332

Ser Gly Glu Ala

1

&lt;210&gt; 333

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 333

Ser Asn Glu Ala

1

&lt;210&gt; 334

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 334

Ser Leu Arg Asp

1

&lt;210&gt; 335

&lt;211&gt; 4

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 335

Ser Val Arg Asp

1

&lt;210&gt; 336

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 336

Ser Ala Arg Asp

1

&lt;210&gt; 337

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 337

His Val Val

1

&lt;210&gt; 338

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 338

Arg Trp Gly  
1

<210> 339  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 339

Leu Arg Trp Gly  
1

<210> 340  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 340

Arg Asn Ser  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 341  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 341

Arg Ser Gly  
1

<210> 342  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 342

Gly Arg Ser Gly  
1

<210> 343  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 343

Arg Ser Gly Leu  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 344  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 344

Tyr Gly Arg  
1

<210> 345  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 345

Ala Ser Leu  
1

<210> 346  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 346

Ser Gly Ala  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 347  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 347

Ser Gly Arg  
1

<210> 348  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 348

Asp Ser Gly  
1

<210> 349  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 349

Ser Ser Arg Val

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1

<210> 350  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 350

Ser Ser Arg Ile  
1

<210> 351  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 351

Phe Gly Ser Arg  
1

<210> 352  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 352

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Phe Cys Ser Arg

1

&lt;210&gt; 353

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 353

Phe Gln Ser

1

&lt;210&gt; 354

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 354

Pro Pro Val

1

&lt;210&gt; 355

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 355



WO 02/20723

PCT/US01/28044

Leu Phe Gln

1

&lt;210&gt; 356

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 356

Val Val Ala

1

&lt;210&gt; 357

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 357

Ala Val Val

1

&lt;210&gt; 358

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 358

Val Ala Ser  
1

&lt;210&gt; 359

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 359

Glu Val Ser Phe Ser Arg  
1 5

&lt;210&gt; 360

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 360

Glu Pro Ser Leu Phe Leu Arg  
1 5

&lt;210&gt; 361

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 361

Pro Gly Leu  
1

&lt;210&gt; 362

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 362

Pro Gly Ile  
1

&lt;210&gt; 363

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 363

Gly Leu Ala  
1

&lt;210&gt; 364

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 364

Val Gly Leu Ala Val

1 5

&lt;210&gt; 365

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 365

Val Gly Pro Ala Val

1 5

&lt;210&gt; 366

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 366

Thr Arg Gly

1

&lt;210&gt; 367

&lt;211&gt; 3

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 367

Gly Leu Ser  
1

<210> 368  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 368

Asp Trp Arg  
1

<210> 369  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 369

Arg Gly Ala  
1

&lt;210&gt; 370

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 370

Arg Gly Gly  
1

<210> 371  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 371

Ala Arg Gly Gly  
1

<210> 372  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 372

Asn Gly Arg  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 373  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 373

Ala Leu Ala Lys Gly  
1 5

<210> 374  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 374

Ala Leu Ala Arg Gly  
1 5

<210> 375  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;400&gt; 375

Thr Thr Gln  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 376  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 376

Gly Tyr Arg  
1

<210> 377  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 377

Gly Tyr Leu  
1

<210> 378  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 378

Asp Arg Thr  
1



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 379  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 379

Ile Tyr Ser  
1

<210> 380  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 380

Trp Leu Ser  
1

<210> 381  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 381

Ile Ile Thr Thr Glu Ser

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1 5

&lt;210&gt; 382

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 382

Ile Phe Gln Thr Glu Ser

1 5

&lt;210&gt; 383

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 383

Ile Ala Arg Pro

1

&lt;210&gt; 384

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 384

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Ile Val Arg Pro

1

&lt;210&gt; 385

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 385

His Arg Pro

1

&lt;210&gt; 386

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 386

Leu Arg Pro Ile

1

&lt;210&gt; 387

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 387

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Lys Asn Trp Ala His Leu Arg  
1 5

<210> 388  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 388

Ala Ser Leu Arg  
1

<210> 389  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 389

Ala Gly Leu Arg  
1

<210> 390  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 390

Ala Ala Val  
1

&lt;210&gt; 391

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 391

Gln Leu Asp Arg His  
1 5

&lt;210&gt; 392

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 392

Gln Trp Asp Arg His  
1 5

&lt;210&gt; 393

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 393

Val Glu Val

1

&lt;210&gt; 394

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 394

Phe Arg Tyr Leu

1

&lt;210&gt; 395

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 395

Phe Arg Ser Leu

1

&lt;210&gt; 396

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 396

Ala Arg Ile

1

&lt;210&gt; 397

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 397

Ala Arg Leu

1

&lt;210&gt; 398

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 398

Ala Arg Leu Gly

1

&lt;210&gt; 399

&lt;211&gt; 4

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 399

Ala Arg Ile Gly  
1

<210> 400  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 400

Arg Ser Ala  
1

<210> 401  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 401

Ala Asp Trp Phe  
1

<210> 402



WO 02/20723

PCT/US01/28044

<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 402

Ala Asp Ala Phe  
1

<210> 403  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 403

Gly Trp Ser  
1

<210> 404  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 404

Thr Trp Met  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 405  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 405

Leu Pro Ser  
1

<210> 406  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 406

Gly Leu Pro  
1

<210> 407  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 407

Leu Leu Gly  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 408  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 408

Leu Asp Ser  
1

<210> 409  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 409

Gly Leu Arg  
1

<210> 410  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 410

Thr Val Ser  
1

WO 02/20723

PCT/US01/28044

<210> 411  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 411

Gly Gly Gly Arg  
1

<210> 412  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 412

Ser Gly Val Arg  
1

<210> 413  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 413

Val Trp Gly

WO 02/20723

PCT/US01/28044

1

&lt;210&gt; 414

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 414

Val Gly Gly

1

&lt;210&gt; 415

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 415

Leu Arg Val Arg

1

&lt;210&gt; 416

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 416

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Tyr Val Arg  
1

<210> 417  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 417

Val Phe Gly  
1

<210> 418  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 418

Pro Gln Leu  
1

<210> 419  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 419

WO 02/20723

PCT/US01/28044

Arg Ala Ala

1

&lt;210&gt; 420

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 420

Arg Trp Ala

1

&lt;210&gt; 421

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 421

Leu Gly Ser

1

&lt;210&gt; 422

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20723

PCT/US01/28044

&lt;400&gt; 422

Arg Thr Gly

1

&lt;210&gt; 423

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 423

Arg Leu Gly

1



## 【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 02/020723 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/02, 1/24,  
1/70, C12P 21/00, C12N 5/00, 5/08, 7/02, 15/07, 15/09,  
A61K 49/00, 49/14, 38/03, 38/08(74) Agents: MALLIE, Michael, J. et al.; Blakely, Sokoloff,  
Taylor & Zisman LLP, 7th floor, 12400 Wilshire Boule-  
vard, Los Angeles, CA 90025 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/28044

(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, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.(22) International Filing Date:  
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 8 September 2000 (08.09.2000) US  
60/231,266 17 January 2001 (17.01.2001) US  
09/765,101(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KL, 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, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).(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).Published:  
— with international search report

(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).(88) Date of publication of the international search report:  
29 August 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 02/020723 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETING PEPTIDES IN HUMANS *IN VIVO*(57) Abstract: The present invention concerns methods and compositions for identifying human targeting peptide sequences. In preferred embodiments, a primary phage library is administered to a human *in vivo* and phage bearing targeting peptides are collected from selected organs, tissues or cells types. In more preferred embodiments, collected phage are amplified, pooled and administered to a second human for another round of selection. The peptides are of use for targeted delivery of therapeutic agents, including gene therapy vectors. Such targeted delivery may be used for detection, diagnosis or treatment of human diseases. In certain embodiments, the peptide may be attached to an imaging agent and administered to a human to obtain an image or to diagnose a disease state. Also disclosed are a large number of targeting peptide sequences and consensus motifs that are selective for human organs or tissues, obtained by the methods of the present invention.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/26044												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(Cl.) Please See Extra Sheet. US CL 555/5, 601, 711; 554/91, 9541; 580/300, 350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 455/5, 601, 711; 424/91, 9541; 580/300, 350 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) STN: CAPLUS, MDLINE, BIOSIS														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <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>PASQUALINI, R. et al. Organ Targeting in Vivo Using Phage Display Peptide Libraries. Nature. March 1996, Vol. 380, pages 364-366, see entire document.</td> <td>1-14 and 61-63</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ROJOTTE, D. et al. Molecular Heterogeneity of the Vascular Endothelium Revealed by in Vivo Phage Display. J. Clin. Invest. July 1998, Vol. 102, pages 430-437, see entire document.</td> <td>1-14 and 61-63</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ARAP, P. et al. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. Science. January 1998, Vol. 279, pages 377-380, see entire document.</td> <td>1-14 and 61-63</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	PASQUALINI, R. et al. Organ Targeting in Vivo Using Phage Display Peptide Libraries. Nature. March 1996, Vol. 380, pages 364-366, see entire document.	1-14 and 61-63	Y	ROJOTTE, D. et al. Molecular Heterogeneity of the Vascular Endothelium Revealed by in Vivo Phage Display. J. Clin. Invest. July 1998, Vol. 102, pages 430-437, see entire document.	1-14 and 61-63	Y	ARAP, P. et al. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. Science. January 1998, Vol. 279, pages 377-380, see entire document.	1-14 and 61-63
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	PASQUALINI, R. et al. Organ Targeting in Vivo Using Phage Display Peptide Libraries. Nature. March 1996, Vol. 380, pages 364-366, see entire document.	1-14 and 61-63												
Y	ROJOTTE, D. et al. Molecular Heterogeneity of the Vascular Endothelium Revealed by in Vivo Phage Display. J. Clin. Invest. July 1998, Vol. 102, pages 430-437, see entire document.	1-14 and 61-63												
Y	ARAP, P. et al. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. Science. January 1998, Vol. 279, pages 377-380, see entire document.	1-14 and 61-63												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="1"> <tbody> <tr> <td>* Special categories of cited documents</td> <td>*P 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>*E* 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></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>*S* Document member of the same patent family</td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents	*P 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	*E* 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)		*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	*S* Document member of the same patent family
* Special categories of cited documents	*P 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													
*E* 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)														
*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	*S* Document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 15 MARCH 2002		Date of mailing of the international search report 04 JUN 2002												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20251 Facsimile No. (703) 505-5850		Authorized officer <i>Arthur Lawrence</i> SAC QUN Telephone No. (703) 806-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/98044
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAJOTTE, D. et al. Membrane Diptidase Is The Receptor for a Lung-targeting Peptide Identified by in Vivo Phage Display. J. Biol. Chem. April 1999, Vol. 274, pages 11593-11598, see entire document.	1-14 and 61-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US01/08044
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  Please See Extra Sheet.	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> 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. 1-14 and 61-68.
<b>Remark on Protest</b> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/28044A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC (7):

CISQ 1/02, 1/24, 1/70; C12P 21/00, C12N 5/00, 5/08, 7/05, 15/07, 15/09; A61K 49/00, 49/14, 38/03, 38/08

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This International Search Authority has found 577 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-14, 61-83, drawn to a method for identifying a targeting peptide.

Group II, claim(s) 15, drawn to another method for identifying a targeting peptide.

Group III, claim(s) 16-39, drawn to an isolated peptide, a fusion peptide, a composition, a kit comprising the peptide and antibody against the peptide (There are 24 subgroups of inventions within this group because each SEQ ID NO: 5-395 represents a structural and functional different peptide, which constitutes a separate distinctive invention. Please select one peptide encoded by one sequence to be examined on the merits).

Group IV, claim(s) 37-40, drawn to a gene therapy vector expressing a surface protein comprising peptide (There are 24 subgroups of inventions within this group because each vector carrying a structural and functional distinctive peptide encoding a SEQ ID NO from SEQ ID NOs: 5-395, which constitutes a separate and distinctive inventions. Please select one peptide encoded by one sequence to be examined on the merits).

Group V, claim(s) 41-42, drawn to a method for treating a disease.

Group VI, claim(s) 43-49, drawn to an isolated peptide (There are 243 subgroups of inventions because each SEQ ID NO from SEQ ID NOs: 5-395 represents a structural and functional different peptide, which constitutes a separate distinctive invention. Please select one peptide encoded by one sequence to be examined on the merits).

Group VII, claim(s) 50, drawn to an imaging method.

Group VIII, claim(s) 51-60, drawn to a method for diagnosis.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fee must be paid. The species are as follows:

1) a plasmid, 2) a cosmid, 3) a yeast, 4) artificial chromosome (YAC), 5) bacterial artificial chromosome (BAC), 6) a virus and 7) a phage.

The following claim(s) are generic: 80. If the group VII is elected, please further select one of the vectors listed in claim 40 to be examined on the merits.

1. This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I-VIII and subgroups of the inventions in groups III, IV and VI do not relate to a single general 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 for studying organ-selective targeting based on in vivo screening of random peptide phage libraries sequence are already known in the art as evidenced by Pasqualini et al. (Nature 1996, Vol. 380, pp.364-366. See entire document). Therefore, the unity is lacking among the different groups of the invention.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: different species are directed to the structural and functional different vectors, e.g. the viral vector is very different from the artificial bacterial chromosome in term of the replication property and multiple cloning site as well as insertion capacity. Therefore, they are not so related as a single inventive concept.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	C 0 7 K 5/08	
C 0 7 K 5/08	C 0 7 K 5/10	
C 0 7 K 5/10	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 14/005	
C 0 7 K 14/005	C 0 7 K 16/08	
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	A 6 1 K 37/02	

(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,RO,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 CA04 CA05 DA06 EA02 EA03 EA04 EA06  
EA10 GA11 GA18 GA19 HA11 HA17  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR32 QR41 QR59 QR66  
QR69 QR75 QR79 QR83 QS10 QS12 QS36 QX01 QX07  
4C084 AA02 AA07 AA12 AA14 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA20  
BA23 BA41 BA42 CA53 CA56 CA59 DA01 DA32 DB01 DB52  
DB70 MA05 MA66 NA13 NA14 ZA022 ZA362 ZA452 ZA962 ZB072  
ZB112 ZB262 ZB322 ZB332 ZC352  
4C085 HH01 JJ01 KA26 KB82  
4C087 AA01 AA02 BB63 BB70 BC11 BC83 CA04 CA08 CA12 MA05  
MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA36 ZA45 ZA96 ZB07 ZB11 ZB26  
ZB32 ZB33 ZC35  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17  
BA18 BA19 BA20 BA21 BA41 CA01 DA50 DA75 DA86 EA20  
EA22 EA23 EA27 EA28 EA29 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	用于在人体内靶向肽的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004533803A</a>	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002525730	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 A61P13/02 A61P15/18 A61P19/02 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 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 A61K35/12 A61K35/76 A61K49/00.Z A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 C07K5/08 C07K5/10 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/005 C07K16/08 C07K19/00 C12Q1/70 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/EA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR59 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR75 4B063/QR79 4B063/QR83 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA12 4C084/AA14 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DA01 4C084/DA32 4C084/DB01 4C084/DB52 4C084/DB70 4C084/MA05 4C084/MA66 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C084/ZC352 4C085/HH01 4C085/JJ01 4C085/KA26 4C085/KB82 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BB70 4C087/BC11 4C087/BC83 4C087/CA04 4C087/CA08 4C087/CA12 4C087/MA05 4C087/MA66 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA36 4C087/ZA45 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4C087/ZB32 4C087/ZB33 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA21 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 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	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

(P2004-533803)			
(43) 公表日 平成16年11月11日 (2004.11.11)			
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12		4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76		4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 49/00	Z	4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 P 3/10		4 C 0 8 7
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 366 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-525730 (P2002-525730)	500039463	
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日 (2001.9.7)	ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニ ンシティ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国、テキサス・78701、 オースティン、ウェスト・セブンス・ス リート・201	
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月10日 (2003.3.10)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028044		
(87) 国際公開番号	W02002/020723		
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		
(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 一彦
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001.1.17)	(72) 発明者	アラップ ウディ
(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 ン パッパフォード スピードウェイ #. 28 7171
最終頁に続く			