

(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2005-501011

(P2005-501011A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/496	A 6 1 K 31/496	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/573	A 6 1 K 31/573	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7036	A 6 1 K 31/7036	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 191 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-503163 (P2003-503163)	(71) 出願人	503450003
(86) (22) 出願日	平成14年6月7日 (2002.6.7)		ユタ ベンチャー ザ セカンド リミテッド パートナershipp
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月8日 (2003.12.8)		アメリカ合衆国 ユタ州 84121 ソルト レイク シティー イースト コットンウッド パークウェイ 2755 スイート 520
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/018185	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開番号	W02002/100336		弁理士 熊倉 禎男
(87) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)	(74) 代理人	100084009
(31) 優先権主張番号	60/297,021		弁理士 小川 信夫
(32) 優先日	平成13年6月8日 (2001.6.8)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 箱田 篤
(31) 優先権主張番号	60/305,117	(74) 代理人	100093300
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		弁理士 浅井 賢治
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 組織特異的内皮膜タンパク質

(57) 【要約】

組織特異的内皮膜タンパク質を用いた、医薬または他の治療物質を特異的な組織へ標的化するための方法および組成物が提供される。本組成物はリガンド、リンカー、および治療的部分からなる治療組成物を含み、前記治療的部分は細胞内に入ることができる。リガンドは特定の組織の内皮膜上の組織特異的タンパク質に結合する抗体または他の分子であってよい。リガンドはレセプターを活性化する必要はないが、エンドサイトーシスを活性化することがある。治療的部分は薬剤、遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、造影剤、タンパク質、毒素または特異的組織に作用するどのような型の分子であっても良い。リンカーはリポソームまたは切断可能若しくは非切断性の化学的分子であってよい。あるいは、リンカーは単にリガンドと治療的部分との間の結合であっても良い。あるいは、親油性プロドラッグが切断されて、そのプロドラッグが親油性特性のために細胞内に入っても良い。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織特異的な管腔発現タンパク質に結合するリガンド、治療的部分、および、前記治療的部分を前記リガンドに連結するリンカーを含む治療複合体の治療上有効な量を投与することを含む、治療物質を特異的な組織にデリバリーする方法。

【請求項 2】

リガンドがタンパク質、ペプチドおよび小分子からなる群より選ばれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質が抗体、抗体複合体、抗体断片および酵素からなる群より選ばれる請求項 2 記載の方法。 10

【請求項 4】

治療的部分が酵素、抗生物質、免疫調節物質、化学療法物質、抗ウイルス物質、抗真菌物質、造影物質、プロドラッグおよびホルモンからなる群より選ばれる請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

酵素が特異的にプロドラッグを切断して対応する医薬を生成する請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

リンカーが結合、ペプチド、リポソームおよび微小カプセルからなる群より選ばれる請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 7】

結合が酸または還元条件に感受性である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

治療複合体の投与後約 20 分～約 12 時間の間に酵素が投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

治療複合体の投与後約 48 時間以内にプロドラッグが投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

肺および/または心臓特異的な治療複合体を特異的組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 9 または 11 またはそれらの類似物に結合する前記リガンド； 30

リンカー；および、

治療的部分、

を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内細胞と相互作用する肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 11】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 12】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。 40

【請求項 13】

治療的部分が少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 14】

リンカーが pH 感受性である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 15】

pH 感受性リンカーがリガンドと治療的部分の間の酸感受性結合である、請求項 14 記載の 50

肺および/または心臓特異的治療複合体。

【請求項 16】

リンカーがリポソームである、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 17】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある、請求項 16 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 18】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 19】

リンカーが酵素によって切断可能である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 20】

治療的部分が抗生物質である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 21】

治療的部分が化学療法物質である、請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体。

【請求項 22】

請求項 10 記載の治療複合体を組織又は細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および結合した前記治療複合体を同定またはその量を定量することを含む、組織又は細胞における炭酸脱水素酵素 IV の存在または濃度を決定する方法。

【請求項 23】

請求項 10 記載の肺および/または心臓特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 24】

肺および/または腎臓特異的な治療複合体を特異的組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 4 若しくは 6 またはそれらの類似物に結合する前記リガンド；

リンカー；および、

治療的部分、

を含む、標的化された内皮細胞と相互作用する肺および/または腎臓特異的な治療複合体であって、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、前記治療複合体。

【請求項 25】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 26】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 27】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 28】

リンカーが pH 感受性である、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

pH感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項 28 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 30】

リンカーがリポソームである、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 31】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある請求項 30 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 32】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 33】

リンカーが酵素によって切断可能である、請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 34】

少なくとも一つの医薬が免疫抑制物質である、請求項 27 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 35】

少なくとも一つの医薬が抗血栓物質である、請求項 27 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 36】

請求項 24 記載の治療複合体を組織又は細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および、結合した前記治療複合体を同定またはその量を定量すること、を含む、組織又は細胞におけるジペプチジルペプチダーゼ IV の存在または濃度を決定する方法。

【請求項 37】

請求項 24 記載の肺および/または腎臓特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む、医薬組成物。

【請求項 38】

膵臓および/または消化管特異的な治療複合体を特異的な組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 14 若しくは 16 またはそれらの類似体に結合する前記リガンド；

リンカー；および、

治療的部分、

を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内皮細胞と相互作用する膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 39】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 38 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 40】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項 38 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 41】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 38 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 42】

リンカーが pH 感受性である、請求項 38 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複

10

20

30

40

50

合体。

【請求項 4 3】

pH感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項 4 2 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 4 4】

リンカーがリポソームである、請求項 3 8 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 4 5】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある、請求項 4 4 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

10

【請求項 4 6】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項 3 8 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 4 7】

リンカーが酵素によって切断可能である、請求項 3 8 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 4 8】

少なくとも一つの医薬が抗生物質又は抗ウイルス物質である、請求項 4 1 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 4 9】

少なくとも一つの医薬が抗血栓物質である、請求項 4 1 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

20

【請求項 5 0】

請求項 3 8 記載の治療複合体を組織又は細胞に *in vivo* または *in vitro* で投与すること、および、結合した前記複合体を同定またはその量を定量すること、を含む組織又は細胞における ZG16-p の存在又は濃度を決定する方法。

【請求項 5 1】

請求項 3 8 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 5 2】

前立腺特異的な治療複合体を特異的な組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 2 3 またはそれらの類似体に結合する前記リガンド；

30

リンカー；および、

治療的部分、

を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内皮細胞と相互作用する前立腺特異的な治療複合体。

【請求項 5 3】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 5 2 記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項 5 4】

リガンドがレセプターを活性化しない請求項 5 2 記載の前立腺特異的な治療複合体。

40

【請求項 5 5】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 5 2 記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項 5 6】

リンカーが pH 感受性である、請求項 5 2 記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項 5 7】

50

pH感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項56記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項58】

リンカーがリポソームである、請求項52記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項59】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある請求項58記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項60】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項52記載の前立腺特異的な治療複合体。

10

【請求項61】

リンカーが酵素によって切断可能である請求項52記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項62】

少なくとも一つの医薬が免疫抑制物質である、請求項55記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項63】

治療的部分が化学療法物質である、請求項52記載の前立腺特異的な治療複合体。

【請求項64】

請求項52記載の治療複合体を組織又は細胞にin vitroまたはin vivoで投与すること、および、結合した前記治療複合体を同定またはその量を定量することを含む、組織又は細胞におけるアルブミン断片の存在又はその濃度を決定する方法。

20

【請求項65】

請求項52記載の前立腺特異的な治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項66】

脳特異的な治療複合体を特異的な組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号26若しくは28またはそれらの類似体に結合する前記リガンド；リンカー；および、

治療的部分、

を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内皮細胞と相互作用する脳特異的な治療複合体。

30

【請求項67】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項66記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項68】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項66記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項69】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項66記載の脳特異的な治療複合体。

40

【請求項70】

リンカーがpH感受性である、請求項66記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項71】

pH感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項70記載の脳特異的な治療複合体。。

【請求項72】

リンカーがリポソームである、請求項66記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項73】

50

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある請求項 7 2 記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項 7 4】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項 6 6 記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項 7 5】

リンカーが酵素によって切断可能である、請求項 6 6 記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項 7 6】

少なくとも一つの医薬が免疫抑制物質である、請求項 6 9 記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項 7 7】

少なくとも一つの医薬が抗血栓物質である、請求項 6 9 記載の脳特異的な治療複合体。

【請求項 7 8】

請求項 6 6 記載の治療複合体を組織または細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および、結合した前記治療複合体を同定またはその量を決定することを含む、組織または細胞における CD71 (トランスフェリンレセプター) の存在又は濃度を決定する方法。

【請求項 7 9】

請求項 6 6 記載の脳特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 8 0】

膵臓および/または消化管特異的な治療複合体を特異的な組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 1 8 若しくは 2 0 またはそれらの類似体に結合する前記リガンド；

リンカー；および、

治療的部分、

を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内皮細胞と相互作用する膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 1】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 8 0 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 2】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項 8 0 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 3】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 8 0 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 4】

リンカーが pH 感受性である、請求項 8 0 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 5】

pH 感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項 8 4 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 6】

リンカーがリポソームである、請求項 8 0 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 8 7】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの外側にある請求項 8 6 記載の膵臓および/または消化管特異的な治療複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 88】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である請求項 80 記載の膵臓および / または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 89】

リンカーが酵素によって切断可能である請求項 80 記載の膵臓および / または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 90】

少なくとも一つの医薬が免疫抑制物質である請求項 83 記載の膵臓および / または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 91】

少なくとも一つの医薬が抗血栓物質である請求項 83 記載の膵臓および / または消化管特異的な治療複合体。

【請求項 92】

請求項 80 記載の治療複合体を組織又は細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および結合した前記治療複合体を同定またはその量を定量することを含む、組織または細胞における MAdCAM の存在または濃度を決定する方法。

【請求項 93】

請求項 80 記載の膵臓および / または消化管特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 94】

腎臓特異的な治療複合体を特異的な組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンドであって、配列番号 30 若しくは 32 またはそれらの類似体に結合する前記リガンド；リンカー；および、治療的部分、を含み、前記リンカーが前記リガンドを前記治療的部分に連結させている、標的化された内皮細胞と相互作用する腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 95】

リガンドが抗体または抗体の結合性部分である、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 96】

リガンドがレセプターを活性化しない、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 97】

治療的部分が、少なくとも一つの医薬、少なくとも一つの遺伝子、少なくとも一つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、少なくとも一つの化学療法物質、少なくとも一つの造影物質、少なくとも一つのタンパク質、少なくとも一つの毒性物質、少なくとも一つの放射性原子、およびそれらの混合物からなる群より選ばれる請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 98】

リンカーが pH 感受性である、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 99】

pH 感受性リンカーがリガンドと治療的部分との間の酸感受性結合である、請求項 98 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 100】

リンカーがリポソームである、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 101】

リガンドがリポソームの外側にあり、治療的部分が前記リポソームの内側にある請求項 100 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 102】

治療的部分がプロドラッグを切断する酵素である、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 103】

リンカーが酵素によって切断可能である、請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 104】

少なくとも一つの医薬が化学療法物質である請求項 97 記載の腎臓特異的な治療複合体。

【請求項 105】

請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体を組織又は細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および結合した前記治療複合体を同定またはその量を定量することを含む、組織または細胞における CD90 (Thy-1) の存在または濃度を決定する方法。

【請求項 106】

請求項 94 記載の腎臓特異的な治療複合体および 1 以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。 10

【請求項 107】

治療的部分が化学療法物質である請求項 52 記載の前立腺特異的複合体を、癌細胞の数を低下させるために効果的な量で投与することを含む、前立腺癌を治療する方法。

【請求項 108】

化学療法物質がアンチセンス RNA、アポトーシス誘導タンパク質、ヌクレオチド類似物、放射活性分子、毒性物質、および他のいずれかの化学療法物質である請求項 107 記載の方法。

【請求項 109】

治療的部分が化学療法物質である請求項 66 記載の脳特異的治療複合体を癌細胞の数を低下させるために効果的な量で投与することを含む、脳腫瘍を治療する方法。 20

【請求項 110】

化学療法物質がアンチセンス RNA、アポトーシス誘導タンパク質、ヌクレオチド類似物、放射活性分子、毒性物質、および他のいずれかの化学療法物質である請求項 109 記載の方法。

【請求項 111】

治療的部分が抗血栓物質である請求項 38 記載の膵臓および/または消化管特異的治療複合体を血栓の量を低下させるために十分な量で投与することを含む、膵臓癌を治療する方法。

【請求項 112】

治療的部分が抗血栓物質である請求項 80 記載の膵臓および/または消化管特異的治療複合体を血栓の量を低下させるために十分な量で投与することを含む、膵臓癌を治療する方法。 30

【請求項 113】

治療的部分が免疫抑制物質である請求項 94 記載の腎臓および/または肺特異的な治療複合体を腎臓移植の拒絶を低減するに十分な量で投与することを含む、腎臓移植拒絶を治療する方法。

【請求項 114】

免疫抑制物質がコルチコステロイドまたはシクロスポリンである、請求項 113 記載の方法。 40

【請求項 115】

治療複合体の治療上効果的な量を投与することを含む、特異的な組織へ治療剤をデリバリーする方法であって、前記治療複合体が組織特異的管腔発現タンパク質に結合するリガンド、治療的部分、および前記治療的部分を前記リガンドに連結するリンカーを含み、前記組織特異的管腔発現タンパク質が CD71、CD90、MAcCAM、アルブミン断片、炭酸脱水素酵素 IV、ZG16-p およびジペプチジルペプチダーゼ IV からなる群より選ばれる、前記方法。

【請求項 116】

物質を肺および/または心臓特異的に *in vivo* または *in vitro* デリバリーする方法であって、炭酸脱水素酵素 IV 結合因子を提供すること、および、前記炭酸脱水素酵素 IV 結合因子を *in vivo* または *in vitro* で投与することを含み、前記物質が前記炭酸脱水素酵素 IV 結合 50

因子の投与の結果として肺および/または心臓にデリバリーされる、前記方法。

【請求項 1 1 7】

炭酸脱水素酵素 IV 結合因子が抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 1 8】

物質が共有結合的にまたは非共有結合的に炭酸脱水素酵素 IV 結合因子に結合している、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 1 9】

物質が炭酸脱水素酵素 IV 結合因子とは別個に投与される、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 2 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 2 1】

物質が炭酸脱水素酵素 IV 結合因子である、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 2 2】

in vivo 投与が注射、経口投与、エアロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 2 3】

in vitro 投与が移植される肺および/または心臓、または、肺および/または心臓組織への投与である、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 2 4】

炭酸脱水素酵素 IV 結合因子を同定することを含む、肺および/または心臓特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 1 2 5】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1 - ハイブリッド技術、分子モデリング、および 2 - ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 2 4 記載の方法。

【請求項 1 2 6】

CD71 (トランスフェリンレセプター) 結合因子を提供すること、および、前記 CD71 結合因子を *in vivo* または *in vitro* で投与することを含む、物質を脳特異的に *in vivo* または *in vitro* デリバリーする方法であって、前記物質が前記 CD71 結合因子の投与の結果として脳または脳組織へデリバリーされる、前記方法。

【請求項 1 2 7】

CD71 結合因子が抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 2 8】

物質が共有結合的または非共有結合的に CD71 結合因子に結合している請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 2 9】

物質が CD71 結合因子と別個に投与される、請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 1】

物質が CD71 結合因子である請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 2】

in vivo 投与が注射、経口投与、エアロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 3】

in vitro 投与が移植される脳または脳組織への投与である、請求項 1 2 6 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3 4】

CD71結合因子を同定することを含む、脳特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 1 3 5】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1-ハイブリッド技術、分子モデリング、および2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

CD90(Thy-1)結合因子を提供すること、および、前記CD90結合因子をin vivoまたはin vitroで投与することを含む、物質を腎臓特異的にin vivoまたはin vitroデリバリーする方法であって、前記物質が前記CD90結合因子の投与の結果腎臓または腎臓組織へデリバリーされる、前記方法。

10

【請求項 1 3 7】

CD90結合因子が抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる請求項 1 3 6 記載の方法。

【請求項 1 3 8】

物質が共有結合的にまたは非共有結合的にCD90結合因子に結合している請求項 1 3 6 記載の方法。

【請求項 1 3 9】

物質がCD90結合因子とは別個に投与される、請求項 1 3 6 記載の方法。

【請求項 1 4 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 3 6 記載の方法。

20

【請求項 1 4 1】

物質がCD90結合因子である請求項 1 3 6 記載の方法。

【請求項 1 4 2】

in vivo投与が注射、経口投与、エアロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 3 6 記載の方法。

【請求項 1 4 3】

in vitro投与が移植される腎臓または腎臓組織への投与である、請求項 1 3 6 記載の方法。

30

【請求項 1 4 4】

CD90結合因子を同定することを含む、腎臓特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 1 4 5】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1-ハイブリッド技術、分子モデリング、および2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 4 4 記載の方法。

【請求項 1 4 6】

ジペプチジルペプチダーゼIV結合因子を提供すること、および前記ジペプチジルペプチダーゼ結合因子をin vivoまたはin vitroで投与することを含む、物質を肺および/または腎臓特異的にin vivoまたはin vitroデリバリーする用法であって、前記物質は前記ジペプチジルペプチダーゼIV結合因子の投与の結果として肺および/または腎臓へデリバリーされる、前記方法。

40

【請求項 1 4 7】

ジペプチジルペプチダーゼIV結合因子が抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 4 8】

物質が共有結合的にまたは非共有結合的にジペプチジルペプチダーゼIV結合因子に結合している請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 4 9】

物質がジペプチジルペプチダーゼIV結合因子と別個に投与される、請求項 1 4 6 記載の方

50

法。

【請求項 1 5 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 5 1】

物質がジペプチジルペプチダーゼ IV 結合因子である、請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 5 2】

in vivo 投与が注射、経口投与、エアロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 5 3】

in vitro 投与が移植される肺および/または腎臓、または、肺および/または腎臓組織への投与である、請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 5 4】

ジペプチジルペプチダーゼ IV 結合因子を同定することを含む、肺および/または腎臓特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 1 5 5】

同定が抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1 - ハイブリッド技術、分子モデリング、および 2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 5 4 記載の方法。

【請求項 1 5 6】

ZG16-p 結合因子を提供すること、および、前記 ZG16-p 結合因子を in vivo または in vitro で投与することを含む、物質を膵臓および/または消化管特異的に in vivo または in vitro デリバリーする方法であって、前記物質が前記 ZG16-p 結合因子の投与の結果として膵臓および/または消化管、または膵臓および/または消化管組織へデリバリーされる、前記方法。

【請求項 1 5 7】

ZG16-p 結合因子が抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 5 8】

物質が共有結合的にまたは非共有結合的に ZG16-p 結合因子に結合している請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 5 9】

物質が ZG16-p 結合因子と別個に投与される、請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 6 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 6 1】

物質が ZG16-p 結合因子である請求項 1 6 1 記載の方法。

【請求項 1 6 2】

in vivo 投与が注射、経口投与、エアロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 6 3】

in vitro 投与が移植される膵臓および/または消化管、または、膵臓および/または消化管組織への投与である、請求項 1 5 6 記載の方法。

【請求項 1 6 4】

ZG16-p 結合因子を同定することを含む、膵臓および/または消化管特異的離岸度を同定する方法。

【請求項 1 6 5】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1 - ハイブリッド技術、分子モデリング、および 2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行

10

20

30

40

50

われる、請求項 1 6 4 記載の方法。

【請求項 1 6 6】

MAdCAM結合因子を提供すること、および、*in vivo*または*in vitro*で前記MAdCAM結合因子を投与することを含む、物質を膵臓および/消化管特異的に*in vivo*または*in vitro*デリバリーする方法であって、前記物質が前記MAdCAM結合因子の投与の結果として膵臓および/または消化管へデリバリーされる、前記方法。

【請求項 1 6 7】

MAdCAM結合因子が、抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる、請求項 1 6 6 記載の方法。

【請求項 1 6 8】

物質が共有結合的にまたは非共有結合的にMAdCAM結合因子に結合している、請求項 1 6 6 記載の方法。

10

【請求項 1 6 9】

物質がMAdCAM結合因子と別個に投与される、請求項 1 6 6 記載の方法。

【請求項 1 7 0】

物質が治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 6 6 記載の方法。

【請求項 1 7 1】

物質がMAdCAM結合因子である、請求項 1 6 6 記載の方法。

【請求項 1 7 2】

*in vivo*投与が注射、経口投与、エーロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 6 6 記載の方法。

20

【請求項 1 7 3】

*in vitro*投与が移植される膵臓および/または消化管または膵臓および/または消化管組織への投与である、請求項 1 6 6 記載の方法。

【請求項 1 7 4】

MAdCAM結合因子を同定することを含む、膵臓および/または消化管特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 1 7 5】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1-ハイブリッド技術、分子モデリング、および2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 1 7 4 記載の方法。

30

【請求項 1 7 6】

アルブミン断片結合因子を提供すること、および、前記アルブミン断片結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含む、物質を前立腺特異的に*in vivo*または*in vitro*デリバリーする方法であって、前記物質が前記アルブミン断片結合因子の投与の結果前立腺または前立腺組織へデリバリーされる、前記方法。

【請求項 1 7 7】

アルブミン断片結合因子が、抗体、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、小分子および多糖からなる群より選ばれる請求項 1 7 6 記載の方法。

40

【請求項 1 7 8】

物質が共有結合的または非共有結合的にアルブミン断片結合因子に結合している、請求項 1 7 6 記載の方法。

【請求項 1 7 9】

物質がアルブミン断片結合因子と別個に投与される、請求項 1 7 8 記載の方法。

【請求項 1 8 0】

物質が、治療薬、造影物質、診断物質および毒性物質からなる群より選ばれる請求項 1 7 6 記載の方法。

【請求項 1 8 1】

物質がアルブミン断片結合因子である、請求項 1 7 6 記載の方法。

50

【請求項 182】

in vivo投与が注射、経口投与、エーロゾル投与、移植可能なポンプ、パッチおよびステントからなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 176 記載の方法。

【請求項 183】

in vitro投与が移植される前立腺または前立腺組織への投与である、請求項 176 記載の方法。

【請求項 184】

アルブミン断片結合因子を同定することを含む、前立腺特異的リガンドを同定する方法。

【請求項 185】

同定が、抗体産生、コンビナトリアルライブラリースクリーニング、1-ハイブリッド技術、分子モデリング、および2-ハイブリッド技術からなる群より選ばれる方法によって行われる、請求項 184 記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は一般に、組織特異的内皮膜タンパク質を用いて医薬または他の治療剤を特定の組織へ標的化することに関する。

【0002】

関連技術の記載

従来の医薬が患者にデリバリーされる時は、それらは患者の全身を循環し、全てではないにしろ身体の大部分の組織または細胞に対して作用する。これは治療のために高用量を必要とし、全身毒性および副作用を生じさせる。 20

医薬または診断試薬の特異的器官、組織または細胞への標的化デリバリーはそのような非特異的治療よりもかなり安全であり、より効果的である。なぜなら、必要とされる薬剤の量はより少なく、副作用または毒性の可能性はかなり低いからである。

医薬の標的化デリバリーのための従前の方法には、インプラント（例えば、Elise(1999) PNAS USA 96:3104-3107）、ステントまたはカテーテル（例えば、Murphy(1992)、Circulation 86:1596-1604）の使用、または器官の血管隔離(vascular isolation)（例えば、Vahrmeyer(1998) Semin. Surg. Oncol. 14:262-268）が含まれる。しかしながら、これらの技術は侵襲的で外傷性であり、広範な炎症性応答および繊維細胞増殖を引き起こし得る。 30

【0003】

組織特異的デリバリーの従前のほとんどの試みは脈管構造という天然の障壁のせいで化合物がアクセスできない組織内部の部位に依存していた。化合物の標的デリバリーのための別の方法は組織細胞自体というより脈管構造の管腔表面上に露出した器官または組織特異的分子を含む。これらの分子の利用により非常に特異的な反応が可能となるであろう。この特異性は、脈管構造はそれが埋め込まれている組織の必要性に適合するために複雑で動的な系を形成するので、血管はこれらの組織特異的タンパク質を発現しなければならないという事実のためである。

従来、脈管構造の管腔表面上に露出しアクセス可能であるこれらの器官または組織特異的分子を同定するための方法は、利用可能な分子の同定に至っていない。これは内皮膜がどの器官でもその組織量のごく一部分を占めるに過ぎないからである。従来の手段で器官を解析した場合、内皮膜は組織ホモゲネート全体に分散してしまう。このことは内皮膜およびそのタンパク質を分けて解析することを本質的に不可能にしてしまう。さらに、単離して培養したとしても、これらの膜はその組織特異的特性を失う傾向がある。そのような分子が有用な様式で単離されるならば、患者の疾病の治療に関するそれらの分子の利用を可能とする方法が考慮されるに違いない。 40

【0004】

発明の概要

本発明のいくつかの例示的態様が存在する。そのような態様の一つは、治療薬を特異的組織にデリバリーする方法であって、治療上効果的な量の治療複合体を投与することを含み 50

、前記治療複合体は組織特異的管腔発現タンパク質に結合するリガンド、治療的部分、および前記治療的部分を前記リガンドに連結させるリンカーを含む。

他の態様には、標的内皮細胞と相互作用する肺および/または心臓特異的治療複合体が含まれる。この複合体は、前記治療複合体を特定の組織の脈管内皮細胞膜管腔表面へ付着させるリガンド、リンカー、および治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号9若しくは11、またはそれらの類似体に結合するものであり、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させる。

別の態様には、組織または細胞中の炭酸脱水素酵素IV(CA-4)の存在又は濃度を決定する方法を含む。この方法は、上記肺および/または心臓特異的治療複合体を前記組織又は細胞に*in vitro*若しくは*in vivo*で投与すること、および、結合した治療複合体を同定またはその量を定量することを含む。

10

別の態様には、上述の肺および/または心臓特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体とを含む医薬組成物が含まれる。

【0005】

別の態様には、標的内皮細胞と相互作用する肺および/または腎臓特異的治療複合体が含まれ、この治療複合体は前記治療複合体を特定の組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンド、リンカー、および治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号4若しくは6またはそれらの類似体に結合し、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させるものである。

別の態様には、組織または細胞のジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-4)の存在または濃度を決定する方法が含まれ、その方法は上記肺および/または腎臓特異的治療複合体を前記組織または細胞に*in vitro*若しくは*in vivo*で投与すること、および結合する治療複合体を同定、またはその量を定量することを含む。

20

別の態様には、上記肺および/または腎臓特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

【0006】

別の態様には、標的内皮細胞と相互作用する膵臓および/または消化管(gut)特異的治療複合体が含まれ、この複合体は、前記治療複合体を特定の組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンド、リンカーおよび治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号14若しくは16またはそれらの類似体へ結合するものであり、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させるものである。

30

別の態様には、組織または細胞中のZG16-pの存在または濃度を決定する方法であって、上記膵臓および/または消化管特異的治療複合体を前記組織または細胞に*in vitro*若しくは*in vivo*で投与すること、および結合した治療複合体を同定またはその量を定量することを含む。

別の態様には前記膵臓および/または消化管特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

【0007】

別の態様には、標的内皮細胞と相互作用する前立腺特異的治療複合体が含まれ、この複合体は前記治療複合体を、配列番号23またはその類似体を含む特定の組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンド、リンカー、および治療的部分を含み、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させるものである。

40

別の態様には、組織または細胞中のアルブミン断片の存在または濃度を決定する方法が含まれ、その方法は上記前立腺特異的治療複合体を前記組織または細胞へ*in vivo*若しくは*in vitro*で投与すること、および結合した治療複合体を同定またはその量を定量することを含む。

別の態様には、前記前立腺特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

【0008】

別の態様には標的内皮細胞と相互作用する脳特異的治療複合体が含まれる。この複合体は

50

、前記治療複合体を特定の組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面に付着させるリガンド、リンカー、治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号26若しくは28またはそれらの類似体に結合するものであり、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させるものである。

別の態様には、組織または細胞におけるCD71(トランスフェリンレセプター)の存在または濃度を決定する方法が含まれ、その方法は上記脳特異的治療複合体を前記組織または細胞に *in vivo* または *in vitro* で投与すること、および結合した治療複合体を同定またはその量を定量することを含む。

別の態様には、前記脳特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

10

【0009】

別の態様には、標的内皮細胞と相互作用する膵臓および/または消化管特異的治療複合体が含まれ、この複合体は前記治療的部分を特異的組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面に付着させるリガンド、リンカー、および治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号18若しくは20またはそれらの類似体に結合し、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結させるものである。

別の態様には、組織または細胞におけるMAdCAM(MadCam-1)の存在または濃度を決定する方法が含まれ、その方法は上記膵臓および/または消化管特異的治療複合体を前記組織または細胞に *in vitro* または *in vivo* で投与すること、および結合した治療複合体を同定又はその量を定量することを含む。

20

別の態様には、上記膵臓および/または消化管特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

【0010】

別の態様には、標的内皮細胞と相互作用する腎臓特異的治療複合体が含まれ、その複合体は前記治療複合体を特異的組織の脈管内皮細胞膜の管腔表面へ付着させるリガンド、リンカー、および治療的部分を含み、前記リガンドは配列番号30若しくは32またはそれらの類似体へ結合し、前記リンカーは前記リガンドを前記治療的部分に連結するものである。

別の態様には、組織または細胞におけるCD90の存在または濃度を決定する方法が含まれ、その方法は腎臓特異的治療複合体を前記組織または細胞へ *in vitro* 若しくは *in vivo* で投与すること、および結合した治療複合体を同定またはその量を定量することを含む。

30

別の態様には上記腎臓特異的治療複合体および1以上の製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物が含まれる。

別の態様には、上記前立腺特異的治療複合体を癌細胞の数を低下させるために効果的な量で投与することを含む前立腺癌の治療方法が含まれ、前記方法において前記治療的部分は化学療法物質である。

別の態様には、上記脳特異的治療複合体を癌細胞の数を低下させるために効果的な量で投与することを含む脳腫瘍の治療方法が含まれ、前記方法において前記治療的部分は化学療法物質である。

【0011】

別の態様には、1以上の上記膵臓および/または消化管特異的治療複合体を血栓症を低下させために効果的な量で投与することを含む膵臓癌の治療方法が含まれ、前記方法において前記治療的部分は抗血栓症剤である。

40

別の態様には、腎臓移植拒絶を治療する方法が含まれ、前記方法は上記肺および/または腎臓特異的治療複合体を腎臓移植の拒絶を低下させるために効果的な量で投与することを含み、前記方法において前記治療的部分は免疫抑制剤である。

別の態様には特定の組織へ治療薬剤をデリバリーする方法が含まれ、前記方法は治療複合体の治療的効果量を投与することを含み、前記治療複合体は、組織特異的管腔発現タンパク質に結合するリガンド、治療的部分、および前記治療的部分を前記リガンドに連結するリンカーを含み、前記組織特異的管腔発現タンパク質はCD71、CD90、MAdCAM、アルブミン断片、炭酸脱水素酵素IV、ZG16-p、およびジペプチジルペプチダーゼIVからなる群より選

50

ばれる。

【0012】

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の肺および/または心臓特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法は、炭酸脱水素酵素IV-結合因子を提供すること、および前記炭酸脱水素酵素IV-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質は炭酸脱水素酵素IV-結合因子の投与の結果として肺および/または心臓、または肺および/または心臓組織へデリバリーされる。

別の態様には肺および/または心臓特異的リガンドを同定する方法が含まれ、前記方法は炭酸脱水素酵素IV-結合因子の同定を含む。

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の脳特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法は、CD71(トランスフェリンレセプター)結合因子を提供すること、および前記CD71-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はCD71-結合因子の投与の結果として脳または脳組織へデリバリーされる。 10

別の態様には、CD71-結合因子を同定することを含む、脳特異的リガンドを同定する方法が含まれる。

【0013】

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の腎臓特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法は、CD90(Thy-1)結合因子を提供すること、および前記CD90結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はCD90-結合因子の投与の結果として腎臓または腎臓組織へデリバリーされる。 20

別の態様には、CD90-結合因子を同定することを含む、腎臓特異的リガンドを同定する方法が含まれる。

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の肺および/または腎臓特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法はジペプチジルペプチダーゼIV-結合因子を提供すること、および前記ジペプチジルペプチダーゼIV-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はペプチジルペプチダーゼIV-結合因子の投与の結果として肺および/または腎臓、または肺および/または腎臓組織へデリバリーされる。

別の態様には、ジペプチジルペプチダーゼIV-結合因子を同定することを含む、肺および/または腎臓特異的リガンドを同定する方法が含まれる。

【0014】

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の膵臓および/または消化管特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法は、ZG16-p-結合因子を提供すること、および前記ZG16-p-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はZG16-p-結合因子の投与の結果として膵臓および/または消化管、または膵臓および/または消化管組織へデリバリーされる。 30

別の態様には、ZG16-p-結合因子を同定することを含む、膵臓および/または消化管特異的リガンドを同定する方法が含まれる。

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の膵臓および/または消化管特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法はMAdCAM-結合因子を提供すること、および前記MAdCAM-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はMAdCAM-結合因子の投与の結果として膵臓および/または消化管、または膵臓および/または消化管組織へデリバリーされる。 40

別の態様には、MAdCAM-結合因子を同定することを含む、膵臓および/または消化管特異的リガンドを同定する方法が含まれる。

別の態様には、*in vivo*または*in vitro*における物質の前立腺特異的デリバリーのための方法が含まれ、前記方法はアルブミン断片-結合因子を提供すること、前記アルブミン断片-結合因子を*in vivo*または*in vitro*で投与することを含み、前記物質はアルブミン断片-結合因子の投与の結果として前立腺または前立腺組織へデリバリーされる。

別の態様にはアルブミン断片-結合因子を同定することを含む、前立腺特異的リガンドを同定する方法が含まれる。 50

【0015】

好ましい実施態様の詳細な記載

本明細書において記載される一つの実施態様は特異的な組織（それが疾病状態にあるうがなかろうが）へデリバリーするための治療化合物の組成物または治療化合物の使用方法を提供する。具体的には、本発明は、組織特異的に管腔に露出されている内皮細胞上のタンパク質を使用し、その結果、本明細書に記載する組織特異的治療複合体は、それらの治療複合体が管腔露出内皮タンパク質へ結合することのために、特異的組織に局在する。この実施態様は医薬物質を特異的な組織へ局在化および濃縮することを可能とし、従ってその医薬物質の治療インデックスを増加させることができる。この局在性はその薬剤による副作用の可能性を減少させ、同じ効果を得るためにその薬剤を低濃度で使用することが可能になるであろう。管腔露出組織特異的内皮タンパク質への局在化はその組織が関与する種々の疾病の治療に単一のリガンドを使用することができるというさらなる利点を与える。言い換えると、組織の各疾病状態について疾病特異的リガンドを作製する必要がない；なぜなら、その組織または器官の管腔内皮細胞上に通常見られるタンパク質を発現している、影響を受けた組織に1以上の治療複合体の十分な量が結合するであろうから。この特徴により、単一のリガンドを使用してその組織と関連したいずれの疾病をも治療する治療複合体を作製することが可能になる。組織特異的分子は2000年3月20日出願の米国特許出願第09/528,742号の方法によって、または他のどんな同定方法によっても同定することができる。米国特許出願第09/528,742号に開示された方法は、種々の組織の血管の内表面上に露出した全てのタンパク質の *in vivo* 単離を可能にする。組織を形成する全ての他のタンパク質（これが大多数である）はこの方法においては破棄される。次に、得られる管腔露出脈管タンパク質の組を分離して生化学的に解析して各タンパク質を個々に同定することができる。各組織で発現されているタンパク質の組を比較することにより、与えられた組織に特異的であるタンパク質が同定される。注目するタンパク質を次にシーケンシングする。その標的タンパク質に特異的に結合するリガンドが得られる。これらのリガンドはその標的タンパク質、すなわち組織特異的に管腔で発現しているタンパク質に結合すると、好ましくはそれが結合する細胞の特異的シグナル伝達系路は活性化しないが、細胞輸送または飲作用の過程を活性化し得る。

10

20

【0016】

内皮細胞組織特異的タンパク質は血液にアクセス可能で、従って、それらは特定の組織へ治療複合体を局在化させるために使用する部位特異的標的において作用することができる。血管はこれらの組織特異的内皮タンパク質を発現している。なぜなら、脈管構造はそれが埋め込まれている組織の必要性に適合した複雑かつ動的な系を形成しているからである。これらのタンパク質の多くは構成的に発現しており、このことはそれらの発現レベルは種々の疾病状態で有意には変化しないことを意味し、その組織またはその組織を含む器官が疾病状態にあるか否かにかかわらず医薬のデリバリーのための理想的な標的となることを意味する。加えて、これらのタンパク質の多くはトランスサイトシス、すなわち血液内から組織への物質の輸送の過程、に関与している。

30

【0017】

定義

別に定義しない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は本発明の属する分野の当業者が一般的に理解する意味を有する。本明細書において、以下の用語は特に述べない限りそれらに割当てられた意味を有する。

40

本明細書において、「消化管」とは胃腸(GI)管と同義語である。

本明細書において用語「標的タンパク質」とは、組織特異的、管腔曝露脈管タンパク質である。

本明細書において、用語「リガンド」とは、標的タンパク質に特異的に結合する分子である。これらはペプチドであってもよく、抗体または抗体の一部であってもよく、非タンパク質性部分であってもよい。

本明細書において「リンカー」とは、リガンドおよび治療的部分を同じ領域、組織または

50

細胞へ標的化することを可能とするいっさいの結合、小分子、または他のビヒクルをいう。リンカーは、標的タンパク質への結合のためにリガンドおよび治療的部分を結合させる、またはそうでなくてもこれらを一緒に保持する。

本明細書において、「治療的部分」とは、ある種の結果を生じさせるために使用することのできるどんな種類の物質をもいう。この結果とは正でも負でもありえ、あるいは、結果とは単なる診断でもあり得る。結果とは細胞の分子発現を単に変化させるといようなより些細なものでもあり得る。治療的部分はプロドラッグを対応する医薬物質へ変換することを可能とする酵素であってもよい。

【0018】

用語「治療複合体」とは、標的タンパク質に特異的なリガンドおよび1以上の治療的部分およびリンカーを含むどのような種類の分子をも言う。しかしながら、治療複合体はプロドラッグを対応する医薬物質へ変換することを可能とする酵素または他の何かの切断誘導因子を含み得ることは言うまでもない。

本明細書において「組織特異的」とは、投与後に本治療複合体の相当な割合がその組織へ結合することを可能とする、特異的な組織または細胞型において優先的に発現している分子についていう。この分子は他の組織よりも1またはいくつかの組織においてかなり高濃度で見いだされるかもしれない。例えば、組織特異的分子は他の組織に比較して肺において高度にアップレギュレーションされているかもしれないが、脈管全体にわたる結合の統計的分布に基づいてより特異的に投与することができる。治療複合体の適切な投与（しばしば低用量）は、非標的組織においてランダムに現れる量が副作用をほとんど若しくは全く生じさせないように行われるであろう。

【0019】

一般的技術

本明細書に記載する実施態様は、この分野で知られた、および、学術文献および特許文献に記載された既知のどの方法またはプロトコルによっても実施することができる。本明細書に記載の実施態様で使用する種々の組成物（たとえば、天然または合成化合物、ポリペプチド、ペプチド、核酸、抗体、毒素その他）は、遺伝的に操作され、増幅され、およびまたは組換え的に発現されて、種々の起源から単離することができる。あるいは、これらの組成物は *in vitro* でよく知られた、例えば、Organic Synthesis, 総集巻、Gilmanら（編集）、John Wiley & Sons, Inc., NY; Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418; および Caruthersら、米国特許第4,458,066号、1984年7月3日に記載されたような化学合成技術によって合成することができる。

【0020】

治療複合体

本発明の治療複合体は標的タンパク質、例えば、脾臓、肺、筋肉、腸、前立腺、腎臓および脳の標的タンパク質に結合し、治療的部分を選択した組織又は器官へ特異的にデリバリーする。治療複合体は少なくとも一つのリガンド、リンカーおよび少なくとも一つの治療的部分からなっている（図1参照）。しかしながら、治療複合体の3種類の構成成分の連結は種々の態様を有することが想像できる。治療的部分は治療または診断方法において使用されるいかなる種類の分子の1以上でもあり得る。例えば、治療的部分は特異的組織によって取り込まれる必要のある抗生物質であり得る。治療複合体は抗生物質をそれを必要とする組織へ濃縮しかつ標的化し、それによりその抗生物質の治療インデックスを上昇させると考えることができる。あるいは、治療的部分は *in vivo* または *in vitro* 診断目的のものでもあり得る。本発明の特定の実施態様における治療複合体の使用のさらなる例は「治療複合体相互作用の型」と題した節中でより詳細に述べる。

【0021】

リガンド

リガンドは標的タンパク質（この場合は管腔発現組織特異的タンパク質）に特異的に結合する分子である。一つの実施態様では、リガンドは管腔発現している、組織特異的分子に特異的に結合するある種の抗体またはその一部分である。通常、リガンドは天然のリガ

ドの結合に関与しないエピトープを認識する。管腔発現組織特異的内皮タンパク質は当業者によられた技術、例えば、2-ハイブリッド技術、コンビナトリアルライブラリーを用いてまたは抗体分子の作製によって同定することができる。リガンドはタンパク質であっても、RNA、DNA、小分子または標的タンパク質に特異的に結合する他のどんな種類の分子であっても良い。

【0022】

標的タンパク質は内在性膜タンパク質（例えばレセプター）であってもリガンド自体であってもよい。組織特異的分子が管腔発現タンパク質に結合するリガンドであるならば、内腔および組織特異性を示すリガンドまたはその断片は本発明の治療複合体の構築に使用される。あるいは、管腔露出リガンド分子に対する、または、類似の結合特性を有する抗体

10

、抗体断片、抗体複合体を本発明の治療複合体の構築に使用することができる。組織特異的管腔露出タンパク質（標的タンパク質）がレセプターであるとする、天然のリガンドは沢山の種々の方法で当業者によって同定され得る。例えば、2-ハイブリッド技術を使用することができる。あるいは、ハイスループットスクリーニングを用いてリガンドとして作用することのできるペプチドを同定することができる。リガンドを同定するための他の方法は当業者に知られている。

【0023】

一つの実施態様において、治療複合体のリガンドはレセプター標的タンパク質の天然のリガンドと異なるエピトープを利用し、従って結合部位に関する競合は起こらない。

別の実施態様において、リガンドは抗体分子であり、好ましくはこの抗体分子は、組織特異的管腔曝露レセプター標的タンパク質に対してより高い特異性を有するか、または天然のリガンドと競合する必要が無いような様式で結合する。

20

抗体および断片は標準的な方法（例えば、E.Harlowら、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988を参照せよ）によって作製することができる。しかしながら、抗体の単離、同定、および分子構築はその選択がほとんど無尽蔵な程度に開発されている。従って、抗体部分および複合体の例は、何が利用可能であるかという見本を表すことができるに過ぎないという理解の下に提供される。

【0024】

一つの実施態様では、抗体は一本鎖Fv領域である。抗体分子は、重鎖および軽鎖のそれぞれにおいて、一般に認識される2つの領域を有している。これらの領域は、問題としている特異的抗原に結合することに関与するいわゆる「可変」領域、および、補体結合、好中球およびマクロファージ結合その他のような生物学的エフェクター応答に関与するいわゆる「定常」領域である。定常領域は抗原結合には必要ない。定常領域は抗体分子から分離され、可変結合領域が得られている。従って、抗体分子が本治療複合体のリガンド部分として作用する場合には、抗体分子の結合作用には明らかに定常領域は必要ない。

30

抗体の可変領域は軽鎖と重鎖からなっている。軽鎖および重鎖可変領域はクローン化され外来宿主において発現されており、一方、その結合能は維持されている。従って、多重鎖凝集物（抗体）から一本鎖構造体を作製し、その一本鎖構造が多重鎖凝集物の三次元構造を維持するようにすることが可能である。

40

【0025】

抗体分子の多重鎖可変領域の結合能特性を有する単一ポリペプチド鎖結合タンパク質であるFv断片は本発明のリガンドとして使用することができる。これらのリガンドは、例えば、Ladnerら、米国特許5,260,203号（1993年11月9日発行）に従って、コンピューターベースのシステムと化学構造を決定するための方法を用いて作製することが出来る。これらの化学構造物は、天然には凝集しているが化学的には別個である、抗体可変領域の軽および重ポリペプチド鎖を、この2つのポリペプチド鎖の元の構造に非常によく似た3次元構造へフォールディングする単一のポリペプチド鎖へ変換するために使用される。この2つの領域はアミノ酸配列を橋として使用して連結することができる。

次に、この方法によって得られる単一鎖ポリペプチドを使用してそれをコードする遺伝子

50

配列を調製することができる。次にその遺伝子配列を、更に制御領域に連結して、適切な宿主で複製し、発現宿主（そこで発現される）へ形質転換することができる。得られた単一ポリペプチド鎖結合性タンパク質は、リフォールディングすると、抗体の可変領域の元の2つの（軽および重鎖）ポリペプチド鎖凝集物の結合特性を有する。

【0026】

更なる実施態様においては、抗体は単一本鎖抗原結合タンパク質の多価形態である。単一鎖抗原結合タンパク質の多価形態は一価の単一鎖抗原結合タンパク質を越える重要な有用性を有している。多価抗原結合タンパク質は1以上の抗原結合部位を有しており、増強された結合アフィニティーを生じさせる。多価抗体はWhitlowら、米国特許第5,869,620号（1999年2月9日発行）に開示された方法を用いて作製することが出来る。この方法は、少なくとも2つの単一鎖分子を結合することによって多価抗原結合タンパク質を作製することを含む。ここで、各単一鎖分子は、単一鎖タンパク質へと連結された抗体重鎖または軽鎖可変領域の2つの結合性部分を有している。このようにして、抗体は抗原の異なる部分に対する結合部位を有することができ、または、複数の抗原に対する結合部位を有することができる。

10

【0027】

一つの実施態様において、抗体はオリゴマーである。このオリゴマーはPCT/EP97/05897（1997年10月24日）におけるように、初めにファージディスプレイライブラリーから特異的なリガンドを単離することによって作製される。オリゴマーは、低アフィニティーリガンドをオリゴマー化して高アフィニティーオリゴマーを作製することによって、これらのライブラリーからはほとんど低アフィニティーリガンドが単離されるという問題を克服する。オリゴマーは半剛性ヒンジおよび軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質（Cartilage Oligomeric Matrix Protein）（COMP）のコイル化コイル領域に融合したリガンドを有する融合タンパク質を作製することによって構築される。融合タンパク質は宿主細胞内で発現されると、自己アッセンブルしてオリゴマーとなる。

20

好ましくは、このオリゴマーはペプタボディー（peptabody）（Terskikhら、Biochemistry 94:1663-1668（1997））である。ペプタボディーは、各結合部位は低結合アフィニティーを有するが複合体としては高アフィニティーをもって結合できる、5量体であるIgMとして例示される。ペプタボディーはファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを用いて作製される。ライブラリーからの短いペプチドリガンドはCOMP（軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質）5量体化領域のN-末端において半剛性ヒンジを介して融合している。この融合タンパク質はバクテリアで発現され、バクテリア内でその標的に対して高アフィニティーを示す5量体抗体にアッセンブルされる。リガンドのアフィニティーに依存して、非常に高いアフィニティーを有する抗体が作製される。

30

【0028】

好ましくは、本発明の抗体、抗体部分または抗体複合体はヒトに由来するか、または組換え技術または他の技術によって「ヒト化」（即ち、ヒトにおいて非免疫原性）されたものである。そのような抗体は本明細書に開示されたモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の等価物であるが、より免疫原性が低く、より良好に患者に寛容される。

ヒト化抗体は、例えば、抗体の免疫原性部分に対応する部分であるが但し非免疫原性部分に置き換える（すなわち、キメラ抗体）ことによって作製される（例えば、Robinsonら、PCT出願No. PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi、欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号、Neubergerら、国際公開公報No. W086/01533；Cabillyら、欧州特許出願第125,023号；Betterら、Science 240:1041-1043（1988）；Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3433（1987）；Liuら、J. Immunol. 139:3521-3526（1987）；Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218（1987）；Nishimuraら、Canc. Res. 47:999-1005（1987）；Woodら、Nature 314:446-449（1985）；Shawら、J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559（1988）を参照せよ。）。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な総説はMorrison（Science, 229:1202-1207（1985））およびOira、BioTechniques 4:214（1986）によって与えられる。

40

50

【0029】

あるいは、適切な「ヒト化」抗体はCDRまたはCEA置換 (Jonesら、Nature 321:552-525 (1986); Verhoeyanら、Science 239:1534 (1988); Bsidlerら、J. Immunol. 141:4053-4060 (1988)) によっても作製することができる。

小分子とは、一切の非生体高分子性DNA、RNA、マクロ環、アルケンアイソマーのような有機若しくは無機分子、または製薬工業において薬剤として典型的に考えられる多くのものである。これらの分子はしばしばコンビナトリアル法を通じて同定される。特に、リガンドは「ドッキング」と呼ばれる方法を用いて同定することができる。この方法は、遊離のリガンドとレセプターの構造だけが与えられた場合にリガンド-レセプター複合体の構造および結合自由エネルギーを予測しようとする合理的薬剤設計へのアプローチである。典型的にはこれらの小分子は特異的なタンパク質に結合してある効果を生じさせるために使用される。しかしながら、これとの関連において、それらの小分子を単に特定のタンパク質に結合し、接続されている薬剤を要求される器官に局在化するために使用することも考慮される。

10

【0030】

リンカー

本明細書において「リンカー」とは、リガンドおよび治療的部分を同じ領域、組織または細胞に標的化することを可能とする一切の結合、小分子、または他のビヒクルをいう。好ましくは、リンカーは切断可能である。

一つの実施態様において、リンカーは1以上のリガンドと1以上の治療的部分との間の化学結合である。従って、この結合は共有結合でもイオン結合でもよい。リンカーが化学結合である治療複合体の例は融合タンパク質であろう。一つの実施態様において、この化学結合は酸感受性であり、pH感受性結合は血流 (pH7.5) から細胞輸送小胞または細胞内部 (pH約6.0) へ移行すると切断される。あるいは、この結合は酸感受性でないかもしれないが、続いて添加される、または標的部位の微小環境中に天然に見出される特異的な酵素または化学物質によって切断することができてもよい。あるいは、この結合は還元条件下で切断される結合、例えば、ジスルフィド結合であってもよい。あるいは、この結合は切断可能でなくともよい。

20

酸切断可能または酸感受性のいかなる種類のリンカーも使用できる。酸切断可能結合の例には以下が含まれるがこれらに限定されない: cis-ポリカルボキシルアルケンとして知られる有機酸クラス。このクラスの分子は少なくとも1つの二重結合を含む炭素鎖に結合した少なくとも3つのカルボキシル基(COOH)を含む。これらの分子、および、どのようにそれらを作製し使用するかはShenら、米国特許第4,631,190号に開示されている。あるいは、温和な酸性条件で切断されるアミノ-スルフィドリル架橋試薬のような分子を使用することができる。これらの分子はBlattlerら、米国特許第4,569,789号に開示されている。

30

【0031】

あるいは、酸切断可能リンカーは、生分解性、加水分解可能結合のような、徐放性結合であってもよい。典型的な生分解性担体結合にはエステル、アミドまたはウレタン結合が含まれ、従って典型的な担体は約5,000~1,000,000の分子量を有するポリエステル、ポリアミド、ポリウレタン、および他の縮合ポリマーである。これらの担体/結合の例はPetersonら、米国特許第4,356,166号に示されている。他の酸切断可能リンカーは米国特許第4,569,789号および第4,631,190号、またはBlattnerら、Biochemistry 24: 1517-1524 (1984)に見ることができる。リンカーは天然の酸性条件下で切断され、あるいは、Abramsら、米国特許第4,171,563号に説明されるように酸性条件を標的部位において誘導することができる。

40

切断可能ジスルフィド結合 (還元可能結合) を含むリンク試薬の例には、“DPDPB”、1,4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン; “SADP”、(N-スクシンイミジル(4-アジドフェニル)1,3'-ジチオプロピオネート); “スルフォ-SADP”、(スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニルジチオ)プロピオネート); “DSP” - ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート); “DTSSP” -3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジルブ

50

ロピオネート) ; “DTBP” - ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート-2HCl (これらは全てPierce Chemicals(Rockford, Illinois)から入手可能) が含まれるが、これらに限定されない。

酸化によって切断可能なリンク試薬の例は、“DST” - ジスクシンイミジルタルタレートおよび“スルホ-DST” - ジスクシンイミジルタルタレートである。これらのリンカーもPierce Chemicals(Rockford, Illinois)から入手可能である。

【0032】

非切断性リンカーの例は、“スルホ-LC-SMPT” - (スルホスクシンイミジル6-[-メチル - (2-ピリジルチオ)トルアミド]ヘキサノエート、“SMPT” ; “ABH” - アジドベンゾイルヒドラジド ; “NHS-ASA” - N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリサイクリック酸(N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid) ; “SASD” - スルホスクシンイミジル2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3-ジチオプロピオネート ; “APDP” - N-{4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル}-3'(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド ; “BASED” - ビス-[-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド ; “HSAB” - N-ヒドロキシスクシンイミジル-4 アジドベンゾエート ; “AGP” - p-アジドフェニルグリオキサール水和物 ; “SANPAH” - N-スクシンイミジル-6(4'-アジド-2'-ニトロフェニル-アミノ)ヘキサノエート ; “スルホ-SANPAH” - スルホスクシンイミジル6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート ; “ANB-NOS” - N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド ; “SAND” - スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)-エチル-1,3'-ジチオプロピオネート ; “PNP-DTP” - p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3,3,3-トリフルオロプロピオネート ; “SMCC” - スクシンイミジル4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート ; “スルホ-SMCC” - スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート ; “MBS” - m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル ; “スルホ-MBS” - m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル ; “SIAB” - N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート ; “スルホ-SIAB” - N-スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート ; “SMBP” - スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート ; “スルホ-SMPB” - スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート ; “DSS” - ジスクシンイミジルスベレート ; “BSSS” - ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート ; “BMH” - ビスマレイミドヘキサン ; “DFDNB” - 1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン ; “DMA” - ジメチルアジピミデート2HCl ; “DMP” - ジメチルピメリミデート-2HCl ; “DMS” - ジメチルスベレイミデート-2-HCl ; “SPDP” - N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート ; “スルホ-HSAB” - スルホスクシンイミジル4-(p-アジドフェニル)ブチレート ; “スルホ-SAPB” - スルホスクシンイミジル4-(p-アジドフェニル)ブチレート ; “ASBI” - 1-9p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン ; “ASBA” - 4-(p-アジドサリチルアミド)ブチルアミン。これらのリンカーは全てPierce Chemicalsから入手可能である。

【0033】

別の実施態様において、リンカーはペプチドリンカーのような小分子である。一つの実施態様において、ペプチドリンカーは切断可能ではない。さらなる実施態様において、ペプチドリンカーは塩基によって、または還元条件下で、または特異的酵素によって切断可能である。一つの実施態様において、酵素は自家性である(indigenous)。あるいは、小ペプチドは治療複体の投与の後、またはそれに加えて投与される非自家性酵素によって切断されても良い。あるいは、小ペプチドは、例えばペプチドがジスルフィド結合を有する場合、還元条件下で切断されてもよい。あるいは、小ペプチドはpH感受性でもよい。ペプチドリンカーの例には以下が含まれる：ポリ(L-Gly)、(ポリL-グリシンリンカー) ; ポリ(L-Glu)、(ポリL-グルタミンリンカー) ; ポリ(L-Lys)、(ポリL-リジンリンカー)。一つの実施態様において、ペプチドリンカーは式(アミノ酸)_n、(式中、nは2~100の整数)で表され、好ましくはペプチドは1以上のアミノ酸のポリマーを含む。

【0034】

10

20

30

40

50

さらなる実施態様において、ペプチドリンカーは、配列Gly-(D)Phe-Pro-Arg-Gly-Phe-Pro-Ala-Gly-Gly(配列番号1)(Suzukiら、1998, J. Biomed. Mater. Res. Oct; 42(1):112-6)のような、プロテイナーゼで切断され得るものである。この実施態様は、細菌感染、特にシュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)感染の治療に有利であることが示されている。ゲンタマイシン又は他の抗生物質は傷がPseudomonas aeruginosaに感染した場合にのみ切断される。なぜなら、そこには非感染組織に比べてトロンピン様プロテイナーゼのかなり高い活性が存在するからである。

更なる実施態様において、リンカーは酵素サーモリシンによって切断され得る、ポリ(エチレングリコール)(PEG)およびジペプチド、L-アラニル-L-バリン(Ala-Val)を含む切断可能リンカーである。サーモリシン様酵素は多くの腫瘍部位において発現されていると報告されているので、このリンカーは有利である。あるいは、プロテアーゼ、フリンの認識部位(Goyalら、Biochem. J. 2000 Jan 15:335 Pt 2:247-254)を含む12残基スペーサー-Thr-Arg-His-Arg-Gln-Pro-Arg-Gly-Trp-Glu-Gln-Leu(配列番号2)を使用することができる。

化学リンカーおよびペプチドリンカーは、結合体合成についてこの分野で知られた技術、すなわち遺伝子操作により、または化学的にリガンドと治療的部分の間を結合することができる。結合体合成は、適切な官能基におけるタンパク質の他の部分への古典的カップリング反応によって、適切な抗体を介して化学的に達成することができる。タンパク質中に存在し、通常化学カップリングに使用される官能基の例を以下に概説する。炭水化物構造はアルデヒド基に酸化することができ、次には H_2NNH-R (式中Rは化合物)を含む化合物と反応して $C=NH-NH-R$ 基を形成する。チオール基は(タンパク質中のシステイン)、チオール反応性基を含む化合物と反応してチオエーテル基またはジスルフィド基を形成し得る。アミノ酸残基中の遊離のアミノ基(タンパク質のアミノ末端またはリジン上)は活性化カルボキシル基のような親電子基を含む化合物と反応することができ、アミド基を形成することができる。アミノ酸残基中の遊離のカルボキシル基は活性化カルボキシル基に変換されて、次にアミノ基を含む化合物と反応してアミド基を形成することができる。

【0035】

あるいは、リンカーはリポソームであってもよい。リポソームを調製する多数の方法がこの分野で知られている。例えば、逆相エバポレーション法、凍結融解法、押出法、および、脱水-再水和法(Stormら、PSTT 1:19-31(1998)を参照せよ)。

リポソームは、重合の際に物質が被包化されるように治療的部分を含む溶液中で作製することができる。あるいは、リポソームは最初に重合化し、重合化したリポソームを生物学的に活性な物質の溶液中に再懸濁して音波処理して治療的部分を被包化することによって、生物学的に活性な物質を後で添加することもできる。リポソームはリガンドの存在下で重合化して、リガンドがリン脂質二重層の一部になるようにすることができる。一つの実施態様において、リポソームは治療的部分を内側に、リガンドを外側に含む。

本発明において考慮されるリポソームは種々の構造をとることができる。例えば、リポソームは大多重ラメラベシクル(MLV)、オリゴラメラベシクル(OLV)でも、単層ラメラベシクル(UV)でも、小単層ラメラベシクル(SUV)、中間サイズ単層ラメラベシクル(MUV)、大単層ラメラベシクル(LUV)、巨大単層ラメラベシクル(GUV)または多胞体ベシクル(MVV)でもありえる。これらのリポソーム構造のそれぞれはこの技術分野でよく知られている(Stormら、PSTT 1:19-31(1998)を参照せよ)。

【0036】

一つの実施態様において、リポソームは、例えば特定の周波数のラジオ派をかけることによって医薬品を引き抜く(evulse)「微小機械」である。別の実施態様では、リポソームは標的細胞内で治療的部分を放出するように分解され得る(例えば、リポソームは酸またはアルカリ感受性であってもよく、または低pHまたは高pH存在下で分解され、治療的部分が細胞内で遊離される)。あるいは、リポソームは無荷電にされ、その結果標的細胞に取り込まれるであろう。リポソームはpH感受性であっても還元条件に感受性であってもよい。本発明において有利なリポソームの一つの型はLangerら、米国特許第6,004,534(1999年1

10

20

30

40

50

2月21日発行)中で明らかにされているものである。この出願では、二重結合および三重結合含有モノマーリン脂質の重合によって調製される改変リポソームの作製方法が開示されている。これらのリポソームは消化管の過酷な環境に対して予想外に増強された安定性を有する。従って、それらは治療的部分の経口および/または粘膜デリバリーのために有用である。リポソームは全身性循環及びリンパ循環へ吸収され得ることが示されている。リポソームは一般に二重結合および三重結合含有モノマーリン脂質の重合(例えばラジカル開始または照射)によって調製される。

【0037】

本発明の別の実施態様において、リンカーは長い血液循環時間を有するリポソームであり得る。そのようなリポソームはこの技術分野でよく知られている(米国特許第5,013,556号、第5,225,212号、第5,213,804号、第5,356,633号、及び第5,843,473号を参照せよ)。長い血液循環時間を有するリポソームは、ポリエチレングリコール(PEG)または他の類似のポリマーで誘導体化されたリン脂質部分を有することによって特徴付けられる。ある実施態様において、リン脂質に遠位のPEG分子末端は化学的に反応性であるように活性化されていてよい。このような反応性PEG分子はリガンドをポリマーに連結するために使用することができる。反応性PEG分子の一つの例は、米国特許第5,527,528号に記載されたPEGのマレイミド誘導体である。

あるいは、リンカーはマイクロカプセル、ナノ粒子、磁性粒子その他であってよく(Kumar, J. Pharm. Sci., May-Aug 3(2) 234-258, 2000; およびGillら、Trends Biotechnol. Nov; 18 (11):469-79, 2000)、親油性治療的部分をコンテナ上または内部に有し、そのコンテナは治療複合体中でリンカーとして機能する。

【0038】

あるいは、リンカーは光切断可能リンカーであってもよい。例えば、1-2-(ニトロフェニル)-エチル部分は300~360nmの光によって切断することができる(Piereceカタログ番号21332ZZを参照せよ)。光切断可能リンカーがより特異的な領域、例えば器官の特定の部分における薬剤の活性化および作用を許すことも想定される。光は脈管内のカテーテルを用いて局在化させることができる。あるいは、光は消化管の特異的な部分の局所治療に使用することができる。光はその領域に対する天然の開口部を通して操作することもできる。あるいは、その領域へ外科的に光を操作することができる。

あるいは、リンカーは切断可能でないが、治療的部分又はリガンドが切断可能であってもよい。治療的部分がプロドラッグであって、そのプロドラッグを切断する酵素が治療複合体と共に投与される場合がこの例である。あるいは、酵素が治療複合体の一部、または自家性であって、プロドラッグは別個に投与される。好ましくは、別個に投与される酵素またはプロドラッグは最初の投与から約48時間以内に投与する。あるいは、別個に投与されるプロドラッグまたは酵素は約1分~24時間に投与してよく、あるいは約2分~8時間に投与してもよい。別個に投与されるプロドラッグまたは酵素はより遅い日に投与してもよく、その薬剤の効果が最早必要でなくなるか、全ての薬剤の酵素切断が行われるまで続けて投与してもよい。

【0039】

治療的部分

「治療的部分」は、所望の結果を生じさせるいかなる化学物質、分子または複合体であってもよい。その例には以下が含まれるが、これらに限定されない: 抗生物質、抗腫瘍剤、免疫抑制剤、ホルモンその他の伝統的医薬物質または、1以上の遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、造影物質、タンパク質、毒素、放射活性分子または原子、界面活性タンパク質、凝固タンパク質。治療的部分は親油性であってよく、その性質は標的細胞への進入を助けるであろう。

造影物質はこの分野で当業者に知られたどんな種類の造影物質であってもよい。最も一般的な造影物質は基本的には以下の4つのグループの一つに帰属する: X-線試薬、ラジオグラフィック試薬、磁気共鳴イメージング剤、および超音波試薬。X-線試薬にはイオン性、ヨード含有試薬およびオムニパック(Omnipaque)(Nycomed)およびウルトラヴィスト(Ultra

10

20

30

40

50

vist)(Schering)のような非イオン性試薬が含まれる。ラジオグラフィ試薬は以下に開示する放射性同位体が含まれる。磁気共鳴イメージング剤には、ガドリニウムおよび鉄-酸化物キレートのような磁性物質が含まれる。超音波試薬には、気体の微小気泡およびいくつかの気泡放出配合物が含まれる。

【0040】

放射性核種は診断用でも治療用でもよい。一般に医学的に有用な放射性核種の例には以下が含まれる： ^{90}Y 、 ^{111}Ln 、 ^{67}Cu 、 ^{77}Lu 、 ^{99}Tc その他のようなY、Ln、Cu、Lu、Tc、Re、Co、Feその他、好ましくは ^{90}Y および ^{111}Ln のような三価の陽イオン。

診断的シンチレーション測光による器官及び組織のin vivo画像化に適切な放射性核種には以下が含まれる：放射性核種： ^{111}Ln 、 $^{113\text{m}}\text{Ln}$ 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{197}Hg 、 ^{169}Yb 、 ^{85}Sr 、および ^{87}Sr 。Fab'断片による結合に適したキレート放射性核種は米国特許第4,658,839号(Nicolettiら)に教示されている。

MRIにおいてイメージング物質として適切な常磁性金属イオンには原子番号57~70のランタニド元素、または原子番号21~29、42または44の遷移金属が含まれる。米国特許第4,647,447号(Griesら)はキレート常磁性金属イオンによるMRIイメージングを教示する。

【0041】

治療的放射性核種の例は放射体である。適切な放射体には ^{67}Cu 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh 、 ^{189}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{90}Y および ^{111}Ln が含まれる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは正常な遺伝子の過剰発現または異常な遺伝子の発現によって生じたいかなる疾病の治療にも使用できる可能性を有する。アンチセンスオリゴヌクレオチドはその遺伝子の発現を低下させるまたは停止させるために使用することができる。アンチセンス技術で治療できる癌遺伝子および使用できる特異的なアンチセンス分子を開示した参考文献には以下が含まれる：c-Junおよびc-Fos(米国特許第5,985,558号)；HER-2(米国特許第5,968,748号)；E2F-1(Popoffら、米国特許第6,187,587号)、SMAD 1-7(米国特許第6,159,697号；第6,013,788号；第6,013,787号；第6,013,522号および第6,037,142号)およびFas(Deanら、米国特許第6,204,055号)。

【0042】

治療剤として使用できるタンパク質にはpRBおよびp53のような、細胞内に存在するとアポトーシスを誘導するアポトーシス誘導物質(Xuら、米国特許第5,912,236号)、および、エリスロポイエチン(Sytkowskiら、米国特許第6,048,971号)のような、疾病において欠損するまたは発現不足となるタンパク質が含まれる。

治療的部分は、アルキル化剤(窒素マスタード、エチレンイミン、アルキルスルホネート、ニトロソウレアおよびトリアゼン)、代謝物拮抗物質(メトトレキサートのような葉酸類似体、ピリミジン類似体、およびプリン類似体)、天然産物およびその誘導體(抗生物質、アルカロイド、酵素)、ホルモンおよびアンタゴニスト(アドレノコルチコステロイド、プロゲステロン、エストロゲン)その他のような、腫瘍性疾患のためのいかなる化学療法物質であってもよいことが考えられる。あるいは、治療的部分は抗腫瘍剤として作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよく、腫瘍細胞のアポトーシスを活性化するタンパク質であってもよい。

治療的部分はどんな型の神経エフェクターであってもよく、例えば神経伝達物質または神経伝達物質アンタゴニストを、その使用について一般に経験される種々の副作用を生じさせず、それが必要な領域に標的化することができる。

【0043】

治療的部分はオピオイドのような、痛みの領域に特異的に標的化できる麻酔剤であってもよい。吐き気のような副作用がオピオイド鎮痛剤を使用する患者に一般に経験される。本発明の方法は薬剤を、外科的な傷または関節炎の場合には関節のように、それが必要とされる領域への非常に特異的な局在化を可能とするので、副作用を低減することができる。治療的部分はヒスタミン、 H_1 -レセプターアンタゴニスト、およびブラジキニンのような抗炎症剤であり得る。あるいは、抗-炎症剤は、サリチル酸誘導體、インドールおよびインデン酢酸およびアルカノンのような非ステロイド抗炎症剤であってもよい。あるいは、抗

10

20

30

40

50

炎症剤は、コルチコステロイド、クロモリンナトリウムおよびネドクロミルのような喘息治療用抗炎症剤であってよい。抗炎症剤は B_2 -選択的アドレナリン作動薬およびテオフィリンのような気管支拡張剤と共にまたは伴わずに投与することができる。

治療的部分は、特異的に患者の血圧に影響する、利尿剤、パソプレシンアゴニストまたはアンタゴニスト、アンジオテンシンまたはレニンであってよい。

【0044】

治療的部分は心臓疾病の治療に使用されるどんな医薬剤であってよい。そのような医薬剤には有機ニトライト（亜硝酸アミル、ニトログリセリン、イソソルバイドジニトレート）、カルシウムチャンネル遮断薬、抗血小板剤および抗血栓薬、血管拡張剤、血管抑制薬、抗-ジギタリス抗体、および血栓遮断薬が含まれるが、これらに限定されない。

治療的部分は、テトラサイクリン、クリンダマイシン、キニン、クロロキニン、メフロキン、トリメトプリムスルファメトキサゾール、メトロニダゾール、およびオラミンのような、原生生物感染の治療に使用されるいかなる医薬剤であってよい。これらの抗生物医薬剤で経験される非常に一般的で重篤な副作用故に、原生生物感染領域に医薬剤または他の治療剤を標的化できることは特に価値がある。

治療的部分は、スルホンアミド、キノロン、ペニシリン、セファロsporin、アミノグリコシド、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、イソニアジドおよびリファンピンのようないかなる抗細菌薬であってよい。

治療的部分は、アンホテリシン、フルシトシン、ミコナゾールおよびフルコナゾールのような、真菌感染の治療に使用されるいかなる医薬剤であってよい。

【0045】

治療的部分は、アシクロビル、ピダラビン、インターフェロン、リバビリン、ジドブジン、ザルシタビン、逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤のような、ウイルス感染の治療に使用されるいかなる医薬剤であってよい。ウイルス感染した細胞は、毒素、放射活性原子、およびアポトーシス誘導物質のような他の治療的部分を用いて標的化および殺傷することもできることが考慮される。

治療的部分は多様な抗凝集剤、抗血栓溶解薬、および抗血小板薬から選択することができる。

ホルモンの過剰産生または産生不足によって生じる疾病はホルモン（成長ホルモン、アンドロゲン、エストロゲン、ゴナドトロピン-放出ホルモン、甲状腺ホルモン、副腎皮質ステロイド、インスリンおよびグルカゴン）のような治療的部分を用いて治療できることが想像される。あるいは、ホルモンが過剰産生される場合、そのホルモンのアンタゴニストまたは抗体を治療的部分として使用することができる。

他の可能性のある種々の治療的部分には、ビタミン、酵素、および他の産生不足細胞成分、およびジフテリア毒素またはボツリヌス毒素のような毒素が含まれる。

あるいは、治療的部分は *in vitro* 診断に典型的に使用されるものであってよい。従って、リガンドおよびリンカーを慣用される方法によって標識し、シグナル生成系の全体または一部を形成させることができる。リガンドおよびリンカーは、この分野でよく知られた方法により、トリチウム、炭素14、リン32、ヨード125、およびヨード131のような放射性同位体へ共有結合させることができる。

【0046】

例えば、 ^{125}I はクロラミン-T法のような方法、ラクトペルオキシダーゼ法によって酵素的に、または前標識ボルトン-ハンター技術によって導入することができる。これらの技術および他の技術がH. Van VunakisおよびJ.J. Langone編集、Methods in Enzymology, 第70巻、Part A、1980で論じられている。また、放射活性標識のさらなる例については、それぞれ、米国特許第3,646,346号（1972年2月29日発行）およびEdwardsら、米国特許第4,062,733号（1977年12月13日発行）を参照されたい。

治療的部分には、可視、紫外波長の光を吸収する化合物である、発色性標識も含まれる。そのような化合物は通常、染色剤であり、キノリン色素、トリアリールメタン色素、フタレイン、昆虫色素、アゾ色素、アントラキモイド色素、シアニン色素、およびフェナゾキソ

10

20

30

40

50

ニウム色素が含まれる。

蛍光原性化合物もこの治療的部分であってよく、それらには光照射に続いて紫外波長または可視波長の光を放射する化合物が含まれる。発蛍光団はそれ自体または消光分子と共に用いることができる。主要な発蛍光団はローダミン、フルオレセインおよびウンベリフェロンファミリーである。これらの発蛍光団及び他の発蛍光団の結合方法および使用についてはこの分野に見ることができる。例えば、J.J. Langone, H.Van Vunakisら、Methods in Enzymology, 第74巻、Part C、1981、特に第3～105頁を参照されたし。他の適切な発蛍光団の代表的な列挙については、Tomら、米国特許第4,366,241号(1982年、12月28日発行)、特に、第28欄、第29欄を参照されたし。更なる例については、米国特許第3,996,345号を参照せよ。

10

【0047】

これらの非酵素的シグナル系は本発明のために十分な治療的部分である。しかしながら、当業者は酵素触媒シグナル系は非酵素系よりも一般に感度がより高いことを認識するであろう。従って、本発明において、触媒性標識は、より感度の高い非放射活性標識である。触媒性標識にはこの技術分野で知られたものが含まれ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ(リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)その他のような単一または二成分(「チャンネル化」)酵素が含まれる。二成分(「チャンネル化」)触媒反応系の例には、初期基質としてグルコース-6-リン酸を用いたアルカリホスファターゼおよびグルコースオキシダーゼの系が含まれる。そのような二成分触媒反応系の第2の例は、グルコースオキシダーゼによるグルコースの過酸化水素への酸化(過酸化水素はロイコ塩基と反応してシグナル発生物質を生成する)によって例示される。触媒反応系に関するさらなる議論は、Tomら、米国特許第4,366,241号(1982年、12月28日発行)(特に第27欄～第40欄参照)に見られる。また、Wengら、米国特許第4,740,468号(1988年、4月26日発行)(特に、第2欄、第6、7および8欄)を参照されたし。

20

【0048】

酵素を本治療複合体へ取り込む方法はこの分野でよく知られている。この方法に使用する試薬には、グルタルアルデヒド、p-トルエンジイソシアネート、種々のカルボジイミド試薬、p-ベンゾキノンm-ペリオデート、N,N'-o-フェニレンジマレイミドその他(例えば、J.H.Kennedyら、Clin. Chim. Acta 70, 1 (1976)を参照せよ)が含まれる。本発明の別の

30

特徴として、上述したいずれのデバイスおよび様式も、組織特異的内皮タンパク質のアクセシビリティを使用するための所定の量の試薬と組み合わせることで梱包したキットとして供給することができる。

化学発光標識も治療的部分として適用可能である。例えば、C.L. Maier、米国特許第4,104,029号(1978年、8月1日発行)に列挙された標識を参照せよ。上述した触媒反応系のための基質には、パラニトロフェニルリン酸塩(PNPP)、 β -D-グルコース(おそらく適切な酸化還元色素と共に)、ホモバニリン酸、o-ジアニシジン、プロモクレゾール紫粉末、4-アルキル-ウンベリフェロン、ルミノール、パラ-ジメチルアミノロフィン、パラメトキシロフィン、AMPPDその他のような単純な発色原および発蛍光原が含まれる。

40

【0049】

標識及び触媒反応シグナル生成系の性質に依存して、光で照射し蛍光のレベルを観察すること；触媒反応系に色素、蛍光または化学発光を生じさせることであって、前記色素は視覚的または分光光度計によって観察できるものであり、前記蛍光は視覚的または蛍光分光計によって観察できるものであること；または化学発光の場合または放射活性標識の場合には、放射能計測器を使用すること、によってシグナルを観察できる。適切な機器が利用できない場合は、目に見える着色を生じさせる発色団を生成させることが通常望ましい。高性能の機器が利用できる場合は、いずれの技法も適用可能である。

あるいは、治療的部分は、化学的環境または酵素のような別個の分子試薬の作用によって対応する医薬物質に変換されるプロドラッグまたはプロ分子(promolecule)であってよい

50

。好ましくは、治療的部分はプロ分子の変換に必要な特異的な分子と共に投与される。あるいは、このプロ分子は標的組織の微小環境に見出される天然の分子によって切断されてもよい。あるいは、プロドラッグはpH感受性で血液から細胞または小胞への環境変化があると変換される (Grecoら、J. Cell. Physiol. 187:22-36, 2001)。

【0050】

治療複合体の使用

本治療複合体は組織特異的または器官特異的治療が効果的であるいかなる疾病の治療または診断にも使用することができる。そのような組織および疾病の例は以下の通りである：一つの実施態様において、本治療複合体は脳に影響を与える疾病の治療または症状を軽減するために使用することができる。そのような疾病には以下が含まれるが、それらには限定されない：細菌感染、ウイルス感染、真菌および寄生虫感染、てんかん、統合失調症、双極性障害、神経症、うつ病、脳腫瘍、パーキンソン病、アルツハイマー病および他の形態の痴呆疾患、プリオン関連病、卒中、偏頭痛、運動失調、多発性硬化症、髄膜炎、脳膿瘍およびウェルニッケ病または他の代謝疾病。

10

さらなる実施態様において、本治療複合体は肺に影響を与える疾病の治療に使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：細菌感染（すなわち、S.ニューモニアエ (S.pneumoniae)、結核菌 (M.tuberculosis)）、ウイルス感染（すなわち、ハンタウイルス (Hantavirus)）、真菌および寄生虫感染（すなわち、ニューモシスティス-カリニ (Pneumocystis carinii)）、喘息、肺癌、肺気腫、肺移植拒絶、嚢胞性繊維症、高血圧症、肺血栓塞栓症および肺浮腫。

20

【0051】

さらなる実施態様において、本治療複合体は脾臓に影響を与える疾病の治療または症状を軽減するために使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：寄生虫感染、脾臓癌、慢性脾臓炎、脾機能不全、内分泌腺腫瘍および糖尿病。

一つの実施態様において、本治療複合体は腎臓に影響を与える疾病の治療または症状を軽減するために使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：細菌感染、ウイルス感染、真菌および寄生虫感染、多発性嚢胞腎疾病、腎移植拒絶、浮腫、高血圧症、多血症、膀胱および腎臓癌および尿毒症症候群。

一つの実施態様において、本治療複合体は筋肉に影響を与える疾病の症状を治療または軽減するために使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：筋ジストロフィー、多発性筋炎、関節炎、横紋筋肉腫、グリコーゲン貯蔵異常、および軟組織肉腫。

30

【0052】

一つの実施態様において、本治療複合体は消化管または腸に影響を与える疾病の治療または症状を軽減するために使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：赤痢、胃腸炎、過敏性腸症候群、憩室症/憩室炎、消化性潰瘍、クリプトスポリジウム症、ジアルジア症、炎症性腸疾病、結直腸癌、および小腸腫瘍。

一つの実施態様において、本治療複合体は前立腺に影響を与える疾病の治療または症状を軽減するために使用することができる。そのような疾病の例には以下が含まれるが、これらに限定されない：前立腺過形成、前立腺癌、および前立腺感染症。

40

【0053】

さらなる実施態様において、本治療複合体は疾病または組織型の診断、または組織特異的管腔発現タンパク質を定量または同定するために使用することができる。

標的タンパク質を保持する細胞は2つの一般的な経路、トランスサイトosis (経細胞輸送) または受動拡散によって治療複合体と相互作用する。これらの相互作用により、治療複合体は標的タンパク質を保持する脈管内皮細胞と直接相互作用することができ、前記内皮細胞を含む内皮マトリックス内に絡みつく、または内皮マトリックスを通過して被包化された組織又は器官内に入ることができる。

50

内皮細胞上で複合体が標的タンパク質に付着した後、治療複合体が脈管を横断して内皮マトリックス組織または選択した内皮細胞へ経細胞輸送された場合にトランスサイトーシスが起こる。好ましくは、標的タンパク質へのリガンドの結合はトランスサイトーシス小胞内の内皮細胞を横断する治療複合体の輸送を刺激するであろう。トランスサイトーシスの際、ベシクルの微小環境内部の条件はより高度に酸性であり、治療的部分の選択的切断に利用することができる。これが起こるためには、好ましくはリンカーは、血流 (pH 7.5) からトランスサイトーシスベシクルまたは細胞内部 (pH6.0) へ移行したときのpH変化のせいで切断されるように、開示された酸感受性リンカーのようにpH感受性でなければならぬ。あるいは、リガンドと治療的部分との間の結合自体が酸感受性である場合は、別個のリンカーは必要でないかも知れない。

10

【0054】

受動拡散において、複合体中のリガンドは細胞膜の外側に付着することができ、続いて治療的部分が遊離され、内皮細胞または組織へ受動的な手段で横断するが、細胞内への治療複合体全体の侵入はない。好ましくは、治療薬は特異的標的組織内の内皮の直ぐ近傍で高濃度に遊離される。そのような高濃度は全身組織に比べてかなり高い濃度の薬剤が標的組織において生じさせることが期待される。

治療複合体は、細胞によって取り込まれ、細胞または細胞マトリックス内に停留し、または器官へと通過し、その器官内部で拡散し得る。

本発明の治療複合体は有利に特異的組織、器官または細胞上の標的タンパク質に結合し、所望の成果のために使用することができる。一つの実施態様において、治療複合体は毒性物質を特定の環境に維持するために使用され、それにより治療的部分の環境への標的化をより特異的なものとし、治療的部分の全身効果を防止することが可能となる。加えて、同じ効果のために必要な物質の量はより低濃度であろう。

20

さらなる実施態様において、治療複合体は物質が組織へ入らないようにするために使用することができる。治療的部分は、もし活性化されると周辺組織に更に害を与えるであろうレセプターを遮断するために使用することができるかもしれない。

更なる実施態様において、治療複合体は界面活性タンパク質またはホルモンのような、機能不全または特定の組織から欠損している物質を置換するために使用される。

【0055】

プロドラッグ

プロドラッグの概念はこの技術分野でよく知られており、本明細書でも同様な様式で使用する。プロドラッグは、プロドラッグから対応する医薬物質への変換の前後で異なる医薬的特徴を有している。本発明の治療複合体はプロドラッグの使用を2つのやり方で有利に取り込むことができる。本治療複合体は、非自家性酵素の続く注入または選択した組織に見出される酵素によって変換され得る治療的部分として接続されたプロドラッグを有してよい。あるいは、治療的部分はプロドラッグを変換するのに必要な酵素であってもよい。例えば、酵素 -ラクタマーゼは治療複合体の一部であってよく、プロドラッグ (例えばドキシシリン) が続いて添加され、そして -ラクタマーゼは標的組織のみに見出されるので、ドキシシリンはその領域においてのみ正体を現す。残念なことに、腫瘍組織は通常、正常組織と酵素レパートリーを共通にし、そのことは自家性酵素をあまり有望でなくする。しかしながら、疾病組織は、特に病原体による疾病の場合、組織に感染している病原体に特異的な酵素を生成していることがあり、そのことはその感染組織に非常に特異的で効果的なプロドラッグを設計するために利用することができることが分かる。例えば、ウイルス酵素 (例えばHBV) によって変換されるプロドラッグは非常に特異的な抗ウイルス効果を得るために肝臓特異的な抗ウイルス治療複合体と共に使用することができる。なぜなら、そのプロドラッグはウイルスを含む微小環境においてのみ変換されるであろうから。

30

40

【0056】

従って、一つの実施態様においては、「リガンド-酵素」治療複合体は非接続プロドラッグと組み合わせて使用される。プロドラッグは酵素によって切断され、細胞に入る。好ま

50

しくは、プロドラッグは親水性であり、内皮細胞への接近が遮断され、一方（切断された）薬剤は親油性で細胞への侵入能力が増強される。あるいは、「リガンド-プロドラッグ」は、接続されていない非自家性酵素の投与または自家性酵素と組み合わせて治療複合体として使用される。このプロドラッグは酵素によって切断され、治療剤から分離され、その親油性特性は細胞への侵入を可能とする。

プロドラッグアプローチの利点のうち2つは、傍観者殺作用および増幅である。癌の治療における抗体または免疫複合体の従前の使用の問題点の一つは、それらが細胞によってあまり取り込まれず、あまり局在化されないことである。しかしながら、プロドラッグ治療を利用する場合、単一の酵素分子が1以上のプロドラッグ分子を変換することができるので、取込の機会はかなり増加または増幅される。加えて、活性薬剤は腫瘍全体に拡散するので、傍観者効果を生じさせ、抗原-陰性、異常細胞に対する殺作用またはその他の治療作用を生じさせる。この傍観者効果は正常細胞にも作用するかも知れないが、それらの細胞は腫瘍器官または疾病器官の直接近傍にある細胞のみであろう。

【0057】

いくつかのプロドラッグは癌治療に広範に使用されており、以下に本発明において使用できるプロドラッグの例として提示する（Grecoら、*J. Cell. Phys.* 187:22-36, 2001；および、Konstantinosら、*Anticancer Research* 19:605-614, 1999）。しかしながら、それらは本発明の多数の例のいくつかであることは言うまでもない。

最もよく研究された酵素/プロドラッグ組合せはヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ（HSV TK）とヌクレオチド類似体GCVである。GCVおよび関連物質は哺乳動物ヌクレオシドリン酸キナーゼの不適当な基質であるが、HSV 1のTKによって効率的に（1000倍以上）モノホスフェートに変換され得る。細胞性酵素によって触媒される続く反応によりいくつかの毒性代謝物が生じる。最も活性なのはトリホスフェートである。GCV-トリホスフェートは細胞分裂の際にDNAの伸長取込についてデオキシグアノシン三リン酸と競合し、DNAポリメラーゼの阻害を生じさせ一本鎖中断を生じさせる。

シトシンデアミナーゼと5-フルオロシトシン（それぞれ、CDおよび5-FU）からなるシステムは同様に毒性ヌクレオチド類似体の産生に基づいている。酵素CDはある種のバクテリアおよび真菌に見出されるが哺乳動物細胞には見られず、シトシンからウラシルへの加水分解的脱アミノを触媒する。従って、この酵素は非毒性プロドラッグ5-FUを5-フルオロウラシル（5-FU）に変換し、次に細胞性酵素によって5-FUは強力なピリミジン抗代謝物質（5-FdUMP、5-FdUTP、および5-FUTP）に変換される。誘導細胞死において3つの経路が関与する：チミジレートシンターゼ阻害、（5-FU）RNAおよび（5-FU）DNA複合体の形成。

【0058】

マスタードプロドラッグCB1954[5-(アジリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド]は弱い一官能性アルキル化剤であるが、げっ歯類DTジアフォラーゼによって効果的に活性化され強力なDNA架橋剤となり得る。しかしながら、ヒトのDTジアフォラーゼ酵素はこのプロドラッグと低い反応性を示し、副作用を生じさせる。この問題は、大腸菌ニトロレダクターゼ酵素（NTR）がCB1954プロドラッグをげっ歯類DTジアフォラーゼよりも90倍速く還元することが見出されたときに克服された。このプロドラッグは、修復されにくいDNA架橋を形成するアルキル化剤へ変換された。

オキサザホフホリンプロドラッグであるシクロホスファミド（CP）は肝臓チトクロームP450代謝作用によって4-ヒドロキシ化反応を介して活性化される。4-ヒドロキシ中間体は分解して二官能性アルキル化毒素ホスホルアミドマスタードを形成し、これがDNA架橋を生じさせ、細胞周期依存性様式でG₂-M停止およびアポトーシスを生じさせる。

ここまでに記載してきた酵素/プロドラッグ系において、プロドラッグは中間体代謝物に変換され、活性薬剤を形成するために細胞性酵素によって更に触媒されることが要求される。標的細胞におけるこれらの酵素の発現減少または完全に発現を欠くことは腫瘍耐性を生じさせるであろう。バクテリア酵素、カルボキシペプチダーゼG2（CPG2）はヒト類似物が存在せず、プロドラッグ4-[2-クロロエチル-(2-メシロキシエチル)アミノ]安息香酸のグルタミン酸部分を更なる触媒反応を必要とせずに切断する。

10

20

30

40

50

【0059】

植物酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)と非毒性植物ホルモンインドール-3-酢酸(IAA)との反応は詳細に解析されているが、まだ完全には明らかになっていない。中性pHでは、IAAはHRP-化合物Iによってラジカル陽イオンに酸化され、これは環外炭素-炭素結合の切断を受け、炭素-中心スカトリルラジカルを生成する。酸素存在下では、スカトリルラジカルは迅速にペルオキシラジカルを形成し、次にこれは多数の生成物に分解する(主要なものは、インドール-3-カルビノール、オキシインドール-3-カルビノールおよび3-メチレン-2-オキシインドールである)。無酸素溶液中では、ラジカルカチオンの脱カルボキシルが生じ、炭素-中心ラジカルが優先的に水素供与体と反応する。

容易に分かるように、プロドラッグ/酵素系は特異性を生じさせるためにヒト細胞によって10
は産生されない酵素を有利に利用する。しかしながら、特定の器官または細胞型において特異的に産生されるヒト酵素もこの特異性を達成するために使用することができ、それが免疫原性でないという利点を有することは当業者には容易に理解されるであろう。

最後に、同じ酵素と種々の器官関連抗原または同じ抗原の種々の抗原決定部位に対する種々の抗体とで構築される複合体の「カクテル」の適用によって不均質性を回避し得る。

【0060】

治療複合体の投与

本発明の治療複合体は、それらを含む調製物がそれらの産物が通常および天然に一緒に見出される物質を実質的に含まない場合、「天然夾雑物を実質的に含まない」と称される。

治療複合体には、組織特異的管腔発現分子に結合し得る抗体(モノクローナルであろうが20
ポリクローナルであろうが)、および生物学的に活性なそれらの断片が含まれる。抗体は動物によって作製してもよく、組織培養、または組換えDNA手段によって作製してもよい。

患者に本治療複合体を与える場合、または、治療複合体を受容患者に与える場合、投与する物質の用量は患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態、以前の医学的履歴その他のような要因に依存して変動するであろう。加えて、その用量は治療複合体の治療的部分および所望の効果に依存して変動するであろう。以下で論じるように、治療上効果的な用量は、治療複合体が第2の治療または追加的治療複合体と組み合わせて投与されるならば減少させることができる。本明細書において、2つの化合物の投与が近接した時間内に行われ、その結果、両方の化合物が患者の血清中に同時に検出され得る場合に、一つ30
の化合物が第2の化合物と共に追加的に投与されると称される。

【0061】

治療複合体は動脈、静脈、毛細血管、血管洞(sinus)、リンパ管、上皮細胞灌流可能空間その他を通じて注入することができる。注射によって治療複合体を投与する場合は、連続インフュージョンによって投与しても、単一ボラスまたは複数ボラスによって投与してもよい。

治療複合体は、所望の治療効果に依存して、単独で投与しても、1以上の追加的免疫抑制剤(特に器官または組織移植の受容者に対して)、抗生物質、化学療法物質、または医薬物質、と組み合わせて投与してもよい。そのような化合物の投与は「予防」目的であっても「治療」目的であってもよい。40

化合物の投与が受容患者に寛容される場合に、その化合物を「製薬的に許容できる」と称する。そのような物質は、その物質の投与量が生理的に有意である場合に、「治療上効果的な量」で投与されると称する。典型的には患者の体重あたりの治療複合体は0.1 μg/kg ~ 500mg/kgである。治療複合体の1回投与または複数回投与を、状態が示唆するところにより、数時間、数日、数週間または数ヶ月にわたって行ってよい。薬剤は、その存在が受容患者の生理機能に検出可能な変化を生じさせる場合に、生理的に有意であると称する。用語「製薬上効果的な量」とは患者のIL-1媒介疾病を治療または軽減するために効果的な量を言う。用語「製薬的に許容できる担体、アジュバント、または賦形剤」とは、好ましい態様の化合物と共に患者に投与でき、その生理学的活性を破壊しない、非毒性の担体、アジュバント、または賦形剤をいう。用語「製薬的に許容できる誘導體」とは、好ましい50

実施態様の化合物若しくは受容者に投与すると好ましい実施態様の化合物を（直接又は間接的に）生じさせることのできる化合物の一切の製薬的に許容できる塩、エステル、またはそのようなエステルの塩をいう。本発明の医薬組成物は、本発明のどの化合物および製薬的に許容できるそれらの塩を、許容できる担体、アジュバント、賦形剤またはビヒクルのいずれと共に含んでいてもよい。

【0062】

本発明の治療複合体は既知の方法に従って製剤化して製薬的に有用な組成物を調製することができ、これらの物質またはそれらの機能的誘導体は製薬的に許容できる担体ビヒクルとの混合物として一緒にされる。適切なビヒクルおよびそれらの製剤は、他のヒトタンパク質、例えばヒト血清アルブミンを含めて、例えばレミントン製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) 第18版、Gennaro編集、Mack, Easton Pa. (1990)に記載されている。効果的な投与に適した製薬的に許容できる組成物を形成するためには、そのような組成物は治療複合体の効果的な量を適切な量の担体ビヒクルと共に含むであろう。

更なる製薬方法を使用して作用の持続性を制御することができる。徐放性調製物は治療複合体を複合体化または吸収するためにポリマーを使用することによって達成することができる。あるいは、治療複合体を、例えばコアセルベート技術または界面重合化によって調製した微小カプセル中、例えばそれぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-微小カプセル、およびポリ(メチルメタクリレート)微小カプセル、またはコロイド薬剤デリバリー系、例えばリポソーム、アルブミン微小球、微小エマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセルまたはマクロエマルジョン中に捕捉することができる。そのような技術は

Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)に開示されている。いくつかの実施態様を記載してきた。しかしながら、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく種々の改変を行うことができることは理解されるであろう。例えば、種々の切断可能な化学的部分、表面分子、および治療的部分を本方法に使用することができる。従って、他の実施態様も本発明の範囲内である。

一般的に本発明を記載してきたが、以下の実施例は請求項記載の発明を説明するために提供されるものであり、限定するために提供するものではない。

【0063】

実施例

Robenら、米国特許第09/528,742号(2000年3月20日出願)の方法を用いて以下の組織特異的分子を同定し、単離した。この方法では、化学反応を介して管腔分子に非特異的に結合する細胞膜非透過性試薬を使用した。この試薬は、*in vivo*条件では切断されないが、所定の条件下で切断され得る切断可能な化学的部分によって連結された、管腔における分子に非特異的に結合する第1の反応領域と第2のビオチン含有領域とを有している。結合試薬を動脈、静脈、毛細血管、脈管洞、リンパ管、上皮列灌流可能空間その他を介して注入した。試薬は管腔特異的分子に結合した。組織または器官をホモゲナイズして、細胞残渣を除去した。試薬に結合した全ての分子をビオチン含有領域に結合するアフィニティークロマトグラフィー(すなわちストレプトアビジンビーズ)を用いて器官から単離した。次に、試薬によって「タグ付け」された管腔露出分子を、試薬を「温和な条件」(温和な還元、非変性条件)下で切断することによって溶出した。このようにして、組織特異的分子を溶出し、PAGE上で精製した。器官特異的分子をそのようにして同定し、PAGEから単離し、その実体を明らかにするために部分シーケンシングした。次に、組織学、ウエスタンブロットおよび/または*in vivo*位置特定を行い、単離したポリペプチドの組織特異性を確認した。

実施例1では、内皮特異的タンパク質をそのように同定し、そのタンパク質に特異的な抗体を用いて、ラットの尾静脈に注射したときその抗体が脳に特異的に結合することを明らかにした。実施例1は組織特異的内皮タンパク質に対する抗体は特異的器官を標的化するために使用することができ、その抗体は治療的部分とカップリングさせてその治療的部分を特定の器官に向けて、そこでその効果を生じさせるであろうことを示す。

【0064】

10

20

30

40

50

実施例 1

脳特異的、管腔発現タンパク質CD71を用いた治療的部分の組織への局在化

CD71すなわちトランスフェリンレセプターはたった一つの組織、脳においてのみ内皮の管腔表面上に露出していることが知られている。この分子は、脳調製物においてのみ見出され、他のいかなる組織にも見出されないことが本方法を用いて分かり、このことにより本方法が組織特異的内皮タンパク質を同定できることが確認された。

薬剤を特定の組織へ選択的にデリバリーするためにタンパク質の組織特異的内皮発現を利用できることを証明するために、ラットCD71に対する抗体を用いた (BD Pharmingen, San Diego, CA, カタログ番号22191)。CD71は、脳に特異的な管腔露出内皮タンパク質である。ラットアミノ酸配列およびヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号AAA42273およびM58040 (配列番号26及び27) であり、ヒトアミノ酸配列およびヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号AAH01188およびBC001188である (配列番号28および29)。抗体はラットの尾静脈中に注射した。類似のアイソタイプを有するが異なる特異性を有する別の抗体を別のラットに対照として注射した。アイソタイプ対照として使用した抗体は、Target Protein Technologies社によって作製された抗アルブミン抗体 (IgG2) とした。30分後、ラットを犠牲にし、各ラットから組織切片をいくつかの器官から作製した。次に、各組織を免疫組織化学によって抗体の存在について解析した。図2(A)-(D)はCD71または対照抗体を注射されたラットの組織切片の免疫組織化学を示す。図2(A)はCD71を注射されたラットの脳であり、図2(B)は対照抗体を注射されたラットの脳であり、図2(C)はCD71を注射されたラットの肺であり、図2(D)は対照抗体を注射されたラットの肺である。これらの結果は、抗-CD71抗体は脳の毛細管に局在し、他の組織には局在しないことを明らかにしている。このことは、血液-脳障壁を越えることのできる治療剤を発見することはしばしば困難であるという点で特に有利である。

【0065】

追跡実験において、毒素を抗-CD71抗体にカップリングさせた。使用した毒素はリシンA鎖 (Sigma, カタログ番号L9514) である。ジスルフィド-含有リンカーを備えたピオチン (Pierce, カタログ番号21331) をリシン及び抗体の両方に添加することによりこの毒素を抗体にカップリングさせた。次に、この2つを、どちらのピオチンにも結合し、リシンと抗体の複合体を形成させるニュートラビジン (Nuetravidin) (Pierce, カタログ番号3100) を添加することによってカップリングさせた。in vivo局在性実験を毒素-抗体複合体を用いて繰り返した。この例では、抗体は毒素の脳の脈管への局在化を容易にただけでなく、おそらくはトランスサイトーシスによる組織への侵入をも容易にした。組織内にあれば、毒素は脳において、脳に導入されるいかなる毒素についても典型的に見られる反応である炎症性応答を生じさせた。他の組織切片には、炎症性応答は全く見られなかった。ヒトCD71-特異的抗体はBD Pharmingenから入手可能であり、ヒト治療複合体の作製に使用することができる。

実施例2~6において、いくつかの他の組織特異的管腔発現タンパク質が同定され、治療複合体を作製するために使用されている。

【0066】

実施例 2

ラットジペプチジルペプチダーゼIVの同定および配列決定

ラット全体の脈管の管腔タンパク質をピオチンで標識した。次に、器官を個別に取り出し、標識タンパク質をRobenら、米国特許第09/528,742 (2000年、3月20日出願) に記載されたように単離した。ホモゲナイズした肺から単離した標識タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、肺及び腎臓に特異的であるが (図3) 肺において優勢であるタンパク質 (DPP-4とラベル付け) を明らかにした。ペプチドをシーケンシングしたところ配列FRPAE (配列番号3) に対応することが分かり、タンパク質はラット肝臓ジペプチジルペプチダーゼIV、GenBankアクセッション番号P147470 (ヌクレオチド配列Genbank アクセッション番号NM_012789) として同定された。完全長タンパク質配列は配列番号4に対

10

20

30

40

50

応し、ヌクレオチド配列は配列番号 5 である。タンパク質配列はNM_012789のヌクレオチド89-2392によってコードされる。ヒトの配列は配列番号 6 および 7 に対応する。Genbank アクセション番号NM_001935は配列番号 6 であり、mRNAのコード領域はnt 76~2376 (配列番号 7) である。従前の研究により、ラット肝臓ジペプチジルペプチダーゼIVはそのアミノ末端からなる膜繫留領域を有していることが示唆されている (Ogataら、J. Biol Chem 264(6):3596-601 (1989))。ラットジペプチジルペプチダーゼIVに特異的なモノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, カタログ番号22811) をラットの尾静脈に注射した (約0.1~100mg/ml)。種々の器官からの組織を免疫組織化学を利用して処理し、DPP-4に対する抗体は肺及び腎臓に局在することが示された (図4参照)。図4中、パネル a . 腎臓、パネル b . 肝臓、パネル c . 肺、パネル d . 心臓、パネル e . 膵臓、およびパネル f . 結腸。

10

ヒトDPP-4に対する抗体は本発明の治療複合体作製に使用するために入手することができる (DB Pharmingen, San Diego, CA)。

【0067】

実施例 3

炭酸脱水素酵素IVの同定および配列決定

ラット全体の脈管の管腔タンパク質をビオチンで標識した。次に、器官を個別に取り出し、標識タンパク質をRobenら、米国特許第09/528,742 (2000年、3月20日出願) に記載されたように単離した。ホモゲナイズした肺から単離した標識タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、続いて肺及び心臓に特異的であるタンパク質 (CA-4とラベル付けしてある) を明らかにした (図5)。ペプチドをシーケンシングしたところ、配列DSHWCYEIQ (配列番号8) に対応し、ラット炭酸脱水素酵素IV、Genbankアクセション番号NM_019174であることが明らかにされた。完全長タンパク質配列は配列番号9に対応し、ヌクレオチド配列は配列番号10に対応する。ヒトの配列は配列番号11および12、Genbankアクセション番号NM_000717に対応する。従前の研究により炭酸脱水素酵素IVは発生的制御および血管内皮における細胞特異的発現を示すことが示唆されている (Flemingら、Am J. Physiol, (1993)265(6 Pt 1):L627-35)。

20

【0068】

実施例 4

チモーゲン顆粒16タンパク質 (ZG16-p) の同定および配列決定

ラット全体の脈管の管腔タンパク質をビオチンで標識した。次に、器官を個別に取り出し、標識タンパク質をRobenら、米国特許第09/528,742 (2000年、3月20日出願) に記載されたように単離した。ホモゲナイズした膵臓から単離した標識タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、その結果膵臓および消化管に特異的であるが、膵臓に優勢であるタンパク質 (ZG16pとラベル付けしてある) が明らかにされた (図6参照)。ペプチドをシーケンシングし、配列NSIQSRSSSY、配列番号13が得られ、ラットZG16-p、Genbankアクセション番号Z30584として同定された。完全長タンパク質配列は配列番号14に対応し、ヌクレオチド配列は配列番号15に対応する。ヒトの配列は配列番号16および17、Genbankアクセション番号AF264625に対応する。従前の研究により、ZG16-pはラット膵臓および消化管の杯状細胞のチモーゲン顆粒に局在することが示唆されている (Cr

30

40

【0069】

実施例 5

ラットMAdCAMの同定および配列決定

モノクローナル抗体をBD Pharmingen (カタログ番号22861) から購入し、約0.1~100mg/ml をラットの尾静脈に注射した。種々の器官からの組織を免疫組織化学を利用して処理し、MAdCAM (MadCam-1) に対する抗体は膵臓および結腸に局在することが示された (図7)。図7中、パネル a . 腎臓、パネル b . 肝臓、パネル c . 肺、パネル d . 心臓、パネル e . 膵臓、およびパネル f . 結腸。ラットMadCam-1、Genbankアクセション番号D87840はタンパク質配列、配列番号18に対応し、ヌクレオチド配列は配列番号19である。ヒトの

50

配列は配列番号20および21、Genbankアクセッション番号U82483に対応する。ヒトに使用する本発明の治療複合体を作製するためのヒトMadCam-1抗体はBD Pharmingen (San Diego, CA)から入手可能である。

【0070】

実施例6

CD90の同定

ラットCD90に対する抗体を購入し (BD Pharmingen, San Diego, CA, カタログ番号22211D)、約0.1~100mg/mlをラットの尾静脈に注射した。種々の器官からの組織を免疫組織化学を利用して処理し、Thy-1に対する抗体は腎臓に局在することが示された (図8)。図8中、パネルa. 腎臓、パネルb. 肝臓、パネルc. 肺、パネルd. 心臓、パネルe. 膵臓、およびパネルf. 結腸。ラットThy-1、Genbankアクセッション番号NP036805はタンパク質配列、配列番号30に対応し、Genbankアクセッション番号NM 012673はヌクレオチド配列、配列番号31に対応する。ヒトThy-1、Genbankアクセッション番号XP006076はタンパク質配列、配列番号32に対応し、Genbankアクセッション番号XM 006076はヌクレオチド配列、配列番号33に対応する (Genbankアクセッション番号AF 261093も参照せよ)。マウス抗-ラットThy-1抗体はPharmingen Intl.から入手可能であり、0.5~5 µg/mlの濃度で免疫組織化学に使用し、ヒトに使用するための好ましい実施態様の治療複合体を作製した。

10

【0071】

実施例7

アルブミン断片の同定および配列決定

ラット全体の脈管の管腔タンパク質をビオチンで標識した。次に、器官を個別に取り出し、標識タンパク質をRobenら、米国特許第09/528,742 (2000年、3月20日出願)に記載されたように単離した。ホモゲナイズした前立腺から単離した標識タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、その結果T436-608とラベル付けしてあるタンパク質 (図9)が明らかになった。このタンパク質を部分配列決定し、アルブミンの断片、TQKAPQVST (配列番号22)として同定した。加えて、配列決定により、前立腺特異的形態は翻訳が早期に終了した断片であり、完全長アルブミンタンパク質 (配列番号23)のアミノ酸436~608に対応することが示された。アルブミン断片は他者により血管作用性断片であることが示されている (ヒト血清アルブミンのタンパク質分解性消化によって誘導されるヒス

20

30

タミン放出: ペプシン処理による活性ペプチドの単離及び構造、Sugiyama K, Ogino T, Ogata K, Jpn J Pharmacol, 1989 Feb., 49 (2):165-71)。ラットタンパク質配列は配列番号24 (Genbankアクセッション番号P02770)である。ヒト対応物は配列番号25, Genbankアクセッション番号P02768、に示されている。

【0072】

実施例8

DPP-4、MadCam-1、CD90およびCA-4の生体内分布

以下の実施例は、これまでの実施例中で同定されたいくつかの管腔発現タンパク質の生体内分布を視覚化するための特異的標識抗体リガンドの使用を記載したものである。具体的には、DPP-4、MadCam-1、CD90またはCA-4に特異的な抗体 (1 µg/µl溶液)の50 µlをSprague-Dawleyラットの尾静脈に注射した。抗体を約30分間循環させ、その後動物を犠牲にし、器官を取り出した。脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、結腸および腎臓の小さな塊を切り出し、包埋培地中に置き、直ちに凍結した。凍結した塊は切片を作製するまでドライアイス上に保持した。クリオスタットを用いて組織を6 µm切片に切り出し、一晚風乾し、アセトン中で2分間固定した。固定した組織切片をCy3-標識二次抗体とインキュベーションし、リンスし、その後の画像取込のためにマウントした。少なくとも3つの独立な実験を各管腔発現標的タンパク質について行った。

40

上述した方法を用いて、管腔発現標的タンパク質DPP-4に特異的なマウスモノクローナル

50

抗体OX-61 (Pharmingen) を用いてDPP-4の生体内分布を確認した。図10(A)は強い蛍光染色を示しており、DPP-4が肺に存在していることを示す。さらに、弱い染色が腎臓の糸球体に観察された(図10(B)) ; しかしながら、DPP-4は調べた他のどの組織においても有意には見出されなかった(図10(C)-(D))。これらの結果はDPP-4は主として肺の内皮に局在することを示す。

【0073】

上述した方法を用いて、MadCam-1の生体内分布も確認した。具体的には、ラットMadCam-1を認識するマウスモノクローナル抗体、OST-2(Pharmingen)を使用した。図11(A)および11(D)は蛍光は膵臓および結腸の両方に観察されたことを示している。さらなる染色が小腸に観察された。対照的に、調べた他の組織においては非常にわずかな蛍光が観察されただけであった(例えば図11(B)-(C))。これらの結果は、MadCam-1は胃腸(GI)管を含むある種の組織に局在することを示す。

10

ラットCD90を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体OX-7 (Pharmingen) を投与することによりCD90の生体内分布を確認した。図12(A)は腎臓に観察された蛍光染色を示したものである。調べた他の組織のいずれにおいても染色は検出されなかった(図12(B)-(F))。これらの結果はCD90が腎臓にのみ局在することを示す。

CA-4の生体内分布を決定するため、ラットCA-4を認識するウサギポリクローナル抗体をこの分野でよく知られた方法を用いて作製した。上述した投与方法および組織学的方法を用いて、CA-4の局在性を決定するためにこのポリクローナル抗体を使用した。強い染色が心臓(図13(B))および肺(図13(E))の両方に観察されたが、これはCA-4の存在を示すものである。脳(図13(A))、腎臓(図13(C))、肝臓(図13(D))または膵臓(図13(F))には全く染色が見られなかった。CA-4に特異的なモノクローナル抗体も心臓および肺に特異的に結合するが他の組織には結合しないことが明らかにされた。これらの結果はCA-4が心臓および肺に特異的に局在することを示す。

20

実施例9~13において、標的組織における特異的な管腔発現タンパク質へのリガンド結合の特徴を記載した。

【0074】

実施例9

リガンド用量と標的組織への局在性の特異性との関係

以下の実施例において、投与した抗体の量との関係において標的組織への抗体リガンドの局在性の特異性を記載する。具体的には、DPP-4、MadCam-1またはCD90に特異的なマウスモノクローナル抗体をSprague-Dawleyラットへ尾静脈注射により投与した。各ラットに、5 μ g、20 μ g、50 μ gまたは100 μ gの上記のいずれかの抗体を与えた。注射に続いて、この抗体を30分間循環させ、その後動物を犠牲にし、その器官を取り出した。次にこれらの器官を免疫組織化学のために実施例8に記載したように処理した。

30

上述した方法を用いて、OX-61モノクローナル抗体を使用して投与した抗体リガンドの量と肺における管腔発現標的タンパク質DPP-4に対する特異性との関係を決定した。5~50 μ gの用量でラットに投与した場合、OX-61は肺に対して非常に高い特異性を示した。しかしながら、100 μ g以上を単一回で投与した場合、OX-61抗体は腎臓にも現れ始めた。これらの結果は実施例8に示したDPP-4に関する生体内分布データと一致する。

40

【0075】

モノクローナル抗体OST-2を同様な研究に使用して、MadCam-1について膵臓および他のGI器官における特異性に対する用量効果を決定した。5 μ g、20 μ g、50 μ gまたは100 μ gの用量で投与した場合、OST-2は膵臓およびGI管の他の組織に対して特異性を維持した。これらの結果は、MadCam-1特異性は投与する用量とは関係なくGI管に限定されることを示しているようである。

モノクローナル抗体OX-7を用いて腎臓におけるCD90に対するその特異性に対する用量の効果を決定した。5~50 μ gの用量において、OX-7は腎臓に対する完全な特異性を示した。しかしながら、100 μ gにおいては、少量のOX-7が肺及び肝臓に出現し始めた。高濃度の抗体では、ある程度のOX-7が肺および肝臓に検出可能であったが、肺及び肝臓に存在したOX-7

50

の量は腎臓に出現したOX-7の量よりも遙かに少なかった。

【0076】

実施例10

標的組織へのリガンド結合の経時的特徴

以下の実施例に、特異的な標的組織への抗体リガンドの経時的な結合を記載した。具体的には、DPP-4、MadCam-1またはCD90に特異的なマウスモノクローナル抗体をSprague-Dawleyラットに尾静脈注射により投与した。各ラットに50 μ g用量の単一の抗体を与え、5分間から48時間にわたって循環させた。抗体循環期間の後、動物を犠牲にし、その器官を免疫組織化学のために実施例8に記載したように処理した。

上述した方法を用い、肺の脈管におけるOX-61モノクローナル抗体のDPP-4への結合プロファイルを時間との関係で決定した。図14(A)-(E)は静脈注射後5分間~24時間にわたる時間の間に肺に局在したOX-61の量を示したものである。特に、OX-61は投与後わずか5分後肺に検出された(図14(A))。同様な量のこの抗体は投与後少なくとも8時間のあいだ肺に検出された(図14(B)-(D))。しかしながら、投与後24時間において、肺に検出できたOX-61の量は顕著に減少した(図14(E))。

【0077】

時間に関連したプロファイルを脾臓の脈管におけるOST-2モノクローナル抗体のMadCam-1への結合について明らかにした。図15(A)-(D)は5分間~48時間にわたる時間の間に脾臓に検出されたOST-2の量を示したものである。特にOST-2は投与後5分以内に脾臓に検出された(図15(A))。加えて、同様な量のこの抗体は注射後30分、24時間および48時間後においても脾臓に検出された(図15(A)-(D))。

時間に関連したプロファイルを腎臓の脈管におけるOX-7モノクローナル抗体の管腔発現標的タンパク質CD90への結合についても明らかにした。図16(A)-(F)は5分間~8時間にわたる時間の間に腎臓に局在したOX-7の量を示した図である。特に、OX-7は投与後わずか5分後に腎臓に検出された(図16(A))。同様な量のこの抗体は投与後少なくとも8時間の間腎臓に検出された(図16(B)-(F))。

【0078】

実施例11

時間分解蛍光による、標的組織へ結合した抗体リガンド分子の定量

以下の実施例には、種々の標的組織における管腔発現標的タンパク質に局在した抗体リガンド抗体の定量的解析を記載する。具体的には、DPP-4、MadCam-1またはCA-4に特異的な抗体を、ユーロピウム-DTPAラベリングキット(Perkin Elmer, カタログ番号AD0021)を用いて業者の指示に従って、それぞれ抗体分子あたりおよそ3分子のユーロピウムで標識した。加えて、インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体(IgG2aおよびIgG1アイソタイプ)もアイソタイプ対照として使用するために標識した。標識後、抗体/ユーロピウム複合体をSprague-Dawleyラットの尾静脈に5 μ g、20 μ gおよび50 μ gの用量で注射した。各用量レベルにおいて、抗体を30分間、6時間および24時間循環させた。少なくとも3つの独立した実験を各用量および時間の組合せについて行った。

【0079】

各時間の終わりにラットを犠牲にし、その器官を蛍光分析のために取り出した。調べた器官には典型的には、腎臓、肺、肝臓、脳、脾臓、小腸、大腸(結腸)、胃および心臓が含まれる。切り出した器官はまず10倍体積のエンハンス溶液(Perkin Elmer, カタログ番号400-0010)中でホモゲナイズし、次に、一晚4 $^{\circ}$ Cにてインキュベーションした。得られた溶液の1%を新鮮なエンハンス溶液中へ1:40に希釈し、室温にて30分間ローテーションし、1500gにて10分間遠心した。得られた溶液を蛍光計に置きシグナル強度を3回測定した。

上述した方法を用いて、特定の時点において各組織型に局在するOX-61(抗-DPP-4)抗体の量を投与した各抗体用量について決定した。IgG2aアイソタイプ抗-インフルエンザモノクローナル抗体をバックグラウンド蛍光の対照として使用した。図17(A)-(C)は各用量レベルについて調べた各時点における各組織に存在したOX-61の質量百分率を示した図であ

る。具体的には、図17Aは30分後に全5 μ gの投与量のおよそ15%が肺に局在したことを示している。6時間までに、このレベルは約7%にまで落ちたが、その後24時間の時点まで一定に維持された。ほとんどの部分において、他の組織に局在したOX-61の量は投与質量の0.75%に満たない量であり、これは各組織型に局在した抗-インフルエンザ対照抗体の最大レベルに対応する(図18(A)-(C)、および図17(A)点線)。一つの例外は、肝臓への僅かな局在性の増加であった。

【0080】

5 μ g用量について得られたのと同様な結果が20および50 μ g用量についても得られた(それぞれ図17(A)-(C))。肺におけるOX-61のレベルについて、初期用量を増加させると経時的な肺へのOX-61局在性のパーセンテージ損失は低下したことに注意すべきである(図17A-C)。これらを合わせると、これらの結果はOX-61の高いレベルが肺に特異的に局在し、長期間にわたって抗体のレベルが高いまま維持されることを示している。このような局在性の高いレベルにより、この抗体リガンドを用いてデリバリーされる肺作用性薬剤の治療インデックスがかなり改善されるであろう。

追加的実験において、各組織型に局在したOST-2(抗MadCam-1)抗体の量を、各抗体投与用量について特定の時点において決定した。IgGアイソタイプ抗-インフルエンザモノクローナル抗体をバックグラウンド蛍光の対照として使用した。図19(A)-(C)は各用量レベルについて調べた各時点における各組織に存在したOST-2の質量百分率を示した図である。特に、図19(A)は、6時間後に全5 μ g投与量の約3%が脾臓に局在したことを示している。投与量の5%を越える量が同じ時間後に小腸に観察された。非-GI組織に局在したOST-2の量は一般に投与質量の0.75%未満であったが、これは各組織型に局在した抗-インフルエンザ対照抗体の最大レベルに相当する(図19(A)、点線)。肺に比較して、脾臓はあまり脈管化されていないことに注意すべきである。従って、この狭い領域に結合する抗体用量の百分率は肺のようなより高度に脈管化された組織に結合する抗体リガンドよりも低いことが予想される。

【0081】

5 μ gについて得られたのと同様な結果が20および50 μ g用量についても得られた(それぞれ、図19(B)および19(C))。加えて、各組織に局在した抗インフルエンザIgG1アイソタイプ対照抗体も5 μ g用量レベルで局在した量と同様であった。5 μ g用量と2つの高用量との間で少なくとも一つの注目すべき相違点があった。5 μ g用量では、GI器官に局在したOST-2の量は6時間後にピークを示し(図19(A))24時間までに低下した。高投与量においては、脾臓および他のGI器官において生じた局在性は24時間にわたって蓄積した(図19(B)-(C))。これらをまとめると、これらの結果はOST-2の高レベルは脾臓のようなGI器官に特異的に局在し、この抗体の濃度は時間と共に増加することを示している。そのような高レベルの局在性はこの抗体リガンドを使用してデリバリーされるどの薬剤の治療インデックスも有意に改善するであろう。

【0082】

同様な実験において、20 μ gのユーロピウム標識抗-CA-4抗体リガンドをラットに静脈投与し、各組織型に局在したリガンドの量を特定の時点で決定した。アフィニティー精製した、CA-4に対するウサギポリクローナル抗体(抗-CA-4)(これは実施例8に記載したように調製した)を組織特異的リガンドとして用いた。図20は、全注射抗体のおよそ8.5%が最初の30分以内に肺に局在することを示している。抗体のおよそ2%が同じ時間後に心臓に見出された。心臓および肺における抗体の濃度は両方とも6時間後に僅かに減少し、24時間後に測定したときには低下し続けていた。抗CA-4は24時間の時間経過において他のどの組織においても有意に蓄積しなかった。

【0083】

実施例12

シンチグラフィによる管腔発現標的タンパク質へ結合した抗体リガンドの定量

以下の実施例には種々の標的組織における管腔発現標的タンパク質に局在した抗体リガンドを定量的に解析するための別の手段を記載した。DPP-4に対して特異的であるOX-61抗体

10

20

30

40

50

を¹²⁵Iで放射標識し、1 µgまたは5 µg用量をSprague-Dawleyラットの尾静脈に注射し、5分間、2時間または8時間循環させた。種々の組織及び体液をこの分野でよく知られたシンチグラフィによって解析した。シンチグラフィの結果は各器官において1グラムの組織あたりの抗体のナノグラム当量として表した。特定の器官に局在した、注射投与量に対する百分率はラット器官の既知の平均質量を用いて計算した。

上述した方法を用いて、OX-61は優先的に肺に局在することが見出された。どちらの用量においてもOX-61は最初の5分間以内に肺に局在した。2時間後、注射した総量である1 µgの22%がこの組織に局在することが分かった。8時間後、肺に見られる抗体の量は注射量の30%に増加した。OX-61は肝臓にも見出された。最初、高レベルのOX-61が肝臓に観察された；しかしながら、8時間後、注射量の僅かに7%が残存するのみであった。肝臓における初期の検出とそれに続く迅速な減少は血液中における抗体の循環のせいであったのだろう。

【0084】

5 µg用量を投与した場合も結果は同様であった。図21は、組織1グラムあたり0.4 µgを越えるOX-61(最初の抗体投与量の20%)が最初の5分間後に肺に局在したことを示している。8時間後、OX-61の量は、肺組織1グラムあたりおよそ0.7 µgに増加した。この時間経過の間、他のどの組織においてもOX-61の有意な増強はなかった。これらの結果は、高レベルのOX-61が肺に特異的に局在し、抗体のレベルは長期間高く維持されることを確認するものである。

【0085】

実施例13

管腔発現標的タンパク質による抗体リガンドのトランスサイトーシス

以下の実施例は、トランスサイトーシスを媒介する能力についてのトランスサイトーシス性管腔発現標的タンパク質の特徴を明らかにするために用いた方法を記載したものである。より具体的には、三色組織学を用いて、結合したリガンドを血管の管腔表面から周辺組織空間へ輸送することのできる管腔発現標的タンパク質の特徴を明らかにした。調べた標的タンパク質のうち、DPP-4およびCD90のみが内皮細胞層を通したトランスサイトーシス(細胞輸送)を媒介する能力を有するようであった。

特異的な抗体リガンドおよび細胞構造物に特異的な染色剤を用いて三色組織学を行った。前の実施例のように、DPP-4、MadCam-1、CD90またはCA-4に特異的な抗体を50 µgの用量でSprague-Dawleyラットの尾静脈に注射した。30分後、ラットを犠牲にし、その器官を実施例8に記載したように組織学のために調製した。次に、組織切片をCy3-標識二次抗体とインキュベーションし、結合した一次抗体を検出した。加えて、組織切片を4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール、ジヒドロクロリド(DAPI)およびフルオレセイン-標識グリフォニア・シンプリシフォリア(*Griffonia simplicifolia*)レクチン1-イソレクチンB4(GSL-1)で染色した。DAPIは細胞の核を青く染め、GSL-1は内皮を緑に染める。内皮を横切る抗体のトランスサイトーシスは、抗体は細胞層を通過して輸送されるのでCy-3の赤いシグナルと緑に染色された内皮との混合によって生じる黄色の領域の分布を決定することによって検出した。

【0086】

上述した方法を用いて、DPP-4によるOX-61のトランスサイトーシス輸送を検出した。図22は、OX-61は脈管を囲む肺組織へ浸透したことを示している。予想されるように毛細管の表面は緑に染色され、細胞核は青く染色された。肺の間質は黒い領域として提示された。内皮全体にわたる黄色の分布は抗体が内皮障壁を通して肺組織間腔へ輸送されたことを示す。

同様に、OX-7のCD90によるトランスサイトーシス輸送を検出した。図23はOX-7が腎臓の糸球体へ浸透したことを示している。浸透は結合した抗体と内皮との間に観察されたかなりの量の混合によって示された。抗体の内皮への分布は図23中で管腔表面に結合した赤く染色された抗体と緑に染色される内皮層との間に存在する黄色の拡散した領域として見ることができる。

10

20

30

40

50

OST-2は予想されるようにMadCam-1に結合したが、抗体は内皮を横切って膵臓へ輸送されなかった。図24は膵臓の切片を示しているが、内皮への抗体の目に見える浸透は全く見られない。抗体は血管の表面上に局在したが(赤)、内皮(緑)を通して周辺組織へ全く移動しなかった。図24において黄色の着色が全く存在しないことはトランスサイトーシスを欠くことを証明している。

【0087】

同様に、肺の脈管の管腔表面上のCA-4に結合した抗-CA-4抗体についてトランスサイトーシスは見られなかった。図25は肺の切片を示しているが、内皮への抗体の目に見える浸透は全く見られない。言い換えると、内皮表面に結合した抗体の赤い領域は内皮細胞層へ全く移動しなかった。この移動がないことは、図25において内皮細胞層において混合された黄色が存在しないことにより示される。心臓に局在した抗CA-4抗体についても同様な結果が記録された。

まとめると、上記結果は本明細書で同定した管腔発現標的タンパク質は、特定の組織の間質および脈管表面のどちらに薬剤をデリバリーするためにも有用である。

実施例14-16には、ゲンタマイシンおよびドキシソルピシンのような治療的部分に連結した標的タンパク質特異的抗体リガンドを含む治療複合体を記載する。

【0088】

実施例14

特異的標的タンパク質を用いた組織への選択的薬剤デリバリー

以下の実施例には、特異的標的組織への治療複合体のデリバリーが記載される。治療複合体は、DPP-4またはMadCam-1に特異的なマウスモノクローナル抗体をゲンタマイシンまたはドキシソルピシンのいずれかに非切断性リンカーを介してこの分野でよく知られた方法を用いてカップリングすることによって構築した。平均すると、各抗体に3分子の薬剤が共有結合的に結合した。およそ50 μ gの各治療複合体を尾静脈注射によりラットに投与し30分間循環させた。次にラットを犠牲にし、実施例8に記載した方法を用いて組織学のためにその器官を切片化した。ゲンタマイシンおよびドキシソルピシン治療複合体はゲンタマイシン特異的またはドキシソルピシン特異的抗体を必要に応じて添加し、Cy3結合二次抗体でシグナルを増幅することによって検出した。またある実験では、組織切片を4'6-ジアミジノ-2-フェニルインドール、ジヒドロクロリド(DAPI)およびフルオレセイン-標識グリフォニア・シンプリシフォリアレクチン1-イソレクチンB4(GSL-1)で染色してトランスサイ

【0089】

上述した方法を用いて、OX-61/ゲンタマイシンおよびOX-61ドキシソルピシン治療複合体が最初の注射後30分間以内に肺組織へ特異的に局在することが示された。図26(A)-(F)はOX-61/ゲンタマイシン治療複合体の特異的組織への結合を示した図である。特に、この治療複合体は注射後30分間以内に肺に観察された(図26(E))。しかしながら、調べた他の組織においてもこの治療複合体は存在しなかった(図26(A)-(D)および26(F))。同様な結果がOX-61/ドキシソルピシン治療複合体についても得られた(図27(A)-(D))。上述した三色組織学法を用いて、OX-61/ゲンタマイシンおよびOX-61/ドキシソルピシンの両方のDPP-4媒介トランスサイトーシス輸送も検出された。図28はOX-61/ゲンタマイシン治療複合体は内皮に浸透し、次に肺の間質に局在化されたことを示している。治療複合体は毛細管および内皮細胞層全体を裏打ちしていることが観察された。複合体は肺の間質組織全体にわたっても観察された。図28中の黄色の領域は治療複合体の内皮を横切る移動を示している。同様な結果がOX-61/ドキシソルピシン治療複合体についても見られた。図29は特にこの治療複合体の肺の間質における蓄積を示したものである。

OST-2/ゲンタマイシンおよびOST-2/ドキシソルピシン結合体の組織特異的局在性も評価した。図30(A)および30(F)はOST-2/ゲンタマイシン結合体は結腸および膵臓のどちらにおいても特異的にMadCAm-1に結合したことを示している。この結合体は調べた他のどの組織にも局在していなかった(図30(B)-(F))。同様な結果がOST-2/ドキシソルピシン治療複合体について観察された(図31(A)-(F))。

10

20

30

40

50

【0090】

実施例 15

DPP-4特異的抗体OX-61を用いたゲンタマイシンの標的化リポソーム製剤

以下の実施例にはリポソーム治療複合体の特異的な標的組織へのデリバリーが記載される。リポソーム（リンカー）を用いて、DPP-4（リガンド）に特異的なマウスモノクローナル抗体をゲンタマイシン（治療的部分）にカップリングすることによって治療複合体を構築した。卵ホスファチジルコリン（EPC）またはジステロイルホスファチジルコリン（DSPC）を主たるリン脂質成分（50モル%より大きい）として用いてリポソームを構築した。マレイミド-PEG化ジステロイルホスファチジルエタノールアミン（MPDSPE）を副次的脂質成分として約5モル%の濃度で添加した。MPDSPEは分子量約5000kDaのポリエチレングリコール（PEG）をジステロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）にカップリングすることによって合成した。接続したPEG基の遊離末端はこの分野でよく知られた方法を用いて反応性マレイミドに変換した。コレステロールを最初に使用したリン脂質の量に依存して0～50モル%の濃度で添加することによりリポソーム製剤化を完了させた。

10

【0091】

ゲンタマイシンおよびOX-61の両方をリポソームリンカーにカップリングさせることによって治療複合体を作製した。硫酸ゲンタマイシンはリポソーム形成の際にリポソーム内部に受動的に閉じこめることによりカップリングさせた。ゲンタマイシンはおよそ150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で捕捉された。治療的部分の捕捉に続いて、OX-61抗体をこのリポソームリンカーにカップリングさせた。このカップリングは最初にOX-61をトラウト試薬と反応させて一級アミンをチオールに変換することによって達成した。次に抗体を反応性MPDSPEにカップリングさせた。

20

DPP-4に標的化したEPCおよびDSPCリポソーム（それぞれ、EPC-DPPおよびDSPC-DPP治療複合体）として投与したゲンタマイシンの生体内分布を遊離のゲンタマイシンおよび非標的化リポソームとして投与したゲンタマイシンの生体内分布と比較した。具体的には、遊離のゲンタマイシンの溶液、または、治療複合体またはその表面に結合したリガンドを持たないリポソームを含む分散液Sprague-Dawleyラットの尾静脈にラットあたり150 μg ゲンタマイシンの用量で注射した。30分後または18時間後にラットを犠牲にし、その器官を取り出してホモゲナイズした。各器官ホモゲネート中のゲンタマイシンの量をTDX分析器（Abbot）を用いて測定した。少なくとも3つの独立の実験を各ゲンタマイシン製剤について各時点で行った。

30

【0092】

上述した方法を用いて、遊離のゲンタマイシンおよびDSPC-DPP治療複合体として投与したゲンタマイシンの両方について、投与後に肺および腎臓に局在したゲンタマイシンの量を決定した。特に、投与後30分以内に遊離のゲンタマイシンは腎臓に蓄積し始めた（図32(A)）。18時間後、腎臓に存在するゲンタマイシンの量は2倍以上になった（図32(B)）。対照的に、DSPC-DPP治療複合体として投与した場合、18時間後に非常に僅かなゲンタマイシンが腎臓に出現した（図32(A)-(B)）。ほとんど反対の効果が肺組織において観察された。図32(A)-(B)は、遊離形態で投与された場合、注射後30分または18時間後に非常にわずかなゲンタマイシンが肺に観察されたことを示している。しかしながら、DSPC-DPP治療複合体として投与された場合、ゲンタマイシンは30分後に肺組織1グラムあたり約20 μg で存在した（図32(A)）。18時間後、このレベルは約半分には落ちた（図32(B)）。これらの結果により、腎臓におけるゲンタマイシンの蓄積、従って、ゲンタマイシン媒介毒性は、この薬剤と適切な標的化リポソーム治療複合体を用いて感染部位に特異的にデリバリーすることによって防止できることが示された。

40

【0093】

遊離のゲンタマイシンの生体内分布をEPC-DPP治療複合体および非標的化EPCリポソームとしてデリバリーされたゲンタマイシンの生体内分布と比較した。遊離ゲンタマイシンの投与後30分間以内にはかなりの量のこの化合物が腎臓に出現した。18時間後、この量は2倍以上となった（図33(A)-(B)）。非標的化リポソームとしてデリバリーされたゲンタマイ

50

シンは30分後に血清中に優勢に出現したが、18時間後にはかなりの量が腎臓および脾臓の両方に検出された(図33(A)-(B))。対照的に、30分間以内に、EPC-DPP治療複合体としてデリバリーされたゲンタマイシンの大部分は肺、肝臓および脾臓に分布したが、非常に僅しか腎臓または血清中には観察されなかった。もっとも高いゲンタマイシンレベル、注射量の約15%が肺に検出された(図33(A))。同様な分布が18時間後に観察された(図33(B))。

上述の結果は、ゲンタマイシンはEPC-DPP治療複合体を用いて肺に標的化されたことを示している。肝臓および脾臓に出現したゲンタマイシンの量は有意であったが、これらの器官に蓄積する薬剤の量は低下させることができそうである。そのような結果は、抗体全体ではなく抗体断片を標的化リガンドとして使用することによって達成することができる。抗体のFc部分が肝臓および脾臓への取込を媒介することが明らかにされている。従って、抗体のこの部分を除去することによりこれらの器官における蓄積が低下するのはあり得ることである。腎臓におけるゲンタマイシンの蓄積は非標的化リポソームを用いると防止できなかったが、EPC-DPP治療複合体を用いることによりゲンタマイシンは腎臓から効果的に遮蔽することができた。従って、そのような複合体は標的化薬剤デリバリーおよび薬剤毒性の防止の両方に有用である。

【0094】

遊離のゲンタマイシンの生体内分布をDSPC-DPP治療複合体としておよび非標的化DSPCリポソームとしてデリバリーされたゲンタマイシンとも比較した。図34(A)-(B)はDSPC-DPP治療複合体としてデリバリーされたゲンタマイシンの生体内分布は30分後および18時間後のいずれにおいてもEPC-DPP治療複合体としてデリバリーされたゲンタマイシンの生体内分布とは一つの重要な相違点を除いて同様であったことを示している。どちらの時点においても、DSPC-DPP治療複合体は肺においてEPC-DPP複合体の2倍を超えるゲンタマイシン量を局在させた(図34(A)-(B)および33(A)-(B))。非標的化DSPCリポソームとしてデリバリーされたゲンタマイシンの生体内分布も、デリバリーにDSPCリポソームを用いた場合は18時間後に腎臓において遙かに少ないゲンタマイシンが見られたことを除いて非標的化EPCリポソームとしてデリバリーされたゲンタマイシンの生体内分布と同様であった(図34(A)-(B)および33(A)-(B))。

これらをまとめると、上述の結果は、DSPC-DPP治療複合体は高レベルのゲンタマイシンを肺に標的化することができることを示すものである。加えて、そのような治療複合体を使用することにより腎臓におけるゲンタマイシンの蓄積(毒性効果を有することが知られている)が防止できる。

【0095】

実施例16

ゲンタマイシンを含有する治療複合体の効力

以下の実施例はゲンタマイシン含有EPC-DPP治療複合体の肺炎治療における効力を記載したものである。15匹のラットについて、 1.5×10^7 の肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)の気管内注入によって感染させることにより各動物に肺炎を起こさせた。次に、ラットをそれぞれ5匹の動物を含む3つの群に分けた。24時間後、一つの群を動物あたり5mg/kgのゲンタマイシンを投与することにより処置した。第2の群にはEPC-DPP治療複合体として製剤化したゲンタマイシンを各動物あたり5mg/kg投与した。最後の群は対照群として未処置のままにした。次にラットを次の15日間の生存について監視した。

EPC-DPP治療複合体としてデリバリーしたゲンタマイシンは肺炎の治療について遊離のゲンタマイシンよりも優れていた。EPC-DPP処置群では5匹の動物のうち1匹が死亡しただけであった。死亡は第6日に起こった。他の4匹の動物は15日間を通して生存し、感染の徴候を示さなかった。さらに、生存した動物の1匹を犠牲にしたが、病原性バクテリアは肺に見られなかった。これらの結果はEPC-DPP治療複合体としてデリバリーされたゲンタマイシンは処置したラットの80%において完全に感染を治癒したことを示す。

対照的に未処置の動物の全てが死亡した。これらの動物のうち4匹は第3日までに死亡した。遊離のゲンタマイシンで処置した5匹の動物のうち4匹は第9日までに死亡した。し

10

20

30

40

50

かしながら 1 匹の動物は第 15 日まで生存した。従って、遊離のゲンタマイシンの効力は EPC-DPP 治療複合体として肺にデリバリーされたゲンタマイシンよりもずっと劣っていた (図 35)。

実施例 17-22 において、肺特異的管腔発現分子、ラットジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-4) を使用して、種々の肺特異的疾患または欠損症を治療するために使用されるいくつかの治療複合体を作製している。

【0096】

実施例 17

肺癌治療のための、酸感受性リンカーを有する DPP-4 ドキソルピシン治療複合体の使用

まず、実施例 7 におけるようなヒトドキソルピシン/DPP-4 複合体の治療レベルを患者に静脈注射する。複合体の効果的な量、好ましくは生理食塩水または静脈に許容されるデリバリービヒクル中の $1 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{Kg}$ 患者体重、をデリバリーする。DPP-4 $F(ab')_2$ は肺組織に特異的である。治療複合体が肺組織へトランスサイトーシスされると、酸感受性リンカーが切断されてドキソルピシンが遊離され DNA ヘインターカレートする。ドキソルピシンはサイクリングしている細胞の DNA へ取り込まれるので、サイクリング過程にある癌細胞に対する効果は顕著であるうし、通常の肺癌細胞に対する効果はかなり低下するであろう。従って、この処置は肺における癌細胞の数の減少をもたらす、副作用は最小限であろう。ドキソルピシンは一般に分裂細胞を標的にするため、かつ、この組織特異性のため、ドキソルピシンは肺の分裂細胞にのみ影響を与え、従って、この処置の副作用のために死ぬ細胞の数は最小限となることが想像される。

実施例 18 では肺癌の治療のための DPP-4/ドキソシリンプロドラッグの合成とその使用のための方法が記載される。

【0097】

実施例 18

プロドラッグを用いた肺癌治療のための DPP-4/ドキソシリン治療複合体の使用

治療複合体は、ポリペプチドリンカーまたは共有結合により β -ラクタマーゼに連結した DPP-4 に特異的な $F(ab')_2$ を含む DPP-4/ β -ラクタマーゼ結合体である。使用したリンカーは SMCC である。化学療法物質ドキソシリンはその構造中の多数の陰電荷のために内皮を通過せず、そのため全ての細胞に対して非毒性であり抗癌剤としては効果的でない。しかしながら、ドキソシリンは β -ラクタム環が切断されてドキソルピシンを生成すると活性になるプロドラッグとして考慮することができる。ドキソルピシンは内皮を通過しサイクリング細胞の DNA ヘインターカレーションし、効果的な化学療法剤となる。

初めに、治療量の DPP-4/ β -ラクタマーゼ複合体を患者に静脈投与する。DPP-4 $F(ab')_2$ を治療複合体中の β -ラクタマーゼプロドラッグに切断されないリンカーを用いて連結する。DPP-4 $F(ab')_2$ リガンドは肺組織に標的化されている。この治療複合体の治療レベルを約 $1 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{Kg}$ 患者体重にて患者に投与する。治療複合体の投与および局在化後、ドキソシリンの治療レベルを約 $1 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{Kg}$ 患者体重、好ましくは、 $10 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{Kg}$ 患者体重で患者に投与する。ドキソシリンは全身的に取り込まれるが、肺の微小環境においてのみドキソシリンは β -ラクタマーゼによって切断されてドキソルピシンを生成する。従って、このプロドラッグの真核生物細胞傷害性活性は β -ラクタマーゼの場所、すなわち肺、においてのみ現れる。ドキソルピシンは肺組織によって取り込まれ DNA ヘインターカレーションする。しかしながら、ドキソルピシンはサイクリング細胞の DNA へ取り込まれるので、サイクリング過程にある癌細胞に対する効果は顕著であり正常な肺癌細胞に対する効果はかなり低下する。この治療は肺における癌細胞数の減少を生じさせる。

実施例 19 において、DPP-4/セファレキシリンプロドラッグ治療複合体の合成および肺炎治療のためのその使用方法を記載する。

【0098】

実施例 19

肺感染の治療のための DPP-4 治療複合体の使用

10

20

30

40

50

最も一般的な細菌性肺炎は肺炎連鎖菌 (*Streptococcus pneumoniae*) によって引き起こされる肺炎球菌性肺炎である。他の細菌性肺炎はインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) およびマイコプラズマの種々の株によって引き起こされる。肺炎球菌性肺炎は一般にペニシリンで治療される。しかしながら、ペニシリン耐性株がより一般的になってきている。

本発明は以下のようにヒト (または他の哺乳動物) における肺炎連鎖菌肺炎の治療に使用される: 治療複合体はヒトDPP-4抗体のF(ab')₂断片をセファレキシンに連結することによって作製する。使用するリンカーはリポソームである。リポソームはF(ab')₂断片が膜内に取り込まれ、セファレキシンがリポソーム内部に保持されるように構築する。リポソームは、リガンドがリン脂質二重層の一部となるようにDPP-4/F(ab')₂リガンドの存在下でリポソームを重合させて作製し、薄フィルム水和技術およびそれに続く凍結乾燥サイクルを用いて調製する。しかしながら、リポソーム懸濁液は当業者に知られた方法に従って調製することもできる。0.1~10nmolの治療複合体を静脈注射する。セファレキシンを保持するリポソームはDPP-4特異的(Fab')₂断片によって肺に標的化される。内皮に結合すると、リポソームは取り込まれ、セファレキシンが肺組織に取り込まれる。次にセファレキシンは分裂している*S.pneumoniae* 生物の細胞壁に作用することができる。抗生物質を特異的な領域に標的化することの一つの利点は同じ結果を得るためにより少ない量の抗生物質しか必要とせず、副作用の可能性がより低く、微生物の薬剤耐性への寄与の可能性がかなり低減されることである。

実施例20では、DPP-4/リファンピンプロドラッグ治療複合体の合成および結核の治療におけるその使用を記載する。

【0099】

実施例20

結核の治療のためのDPP-4治療複合体の使用

細菌*M.tuberculosis* (結核菌) によって引き起こされる結核のような、リファンピンまたはイソニアジドを長期間用いてしばしば治療される疾病は本発明の治療剤を用いてより効果的に治療されるであろうことは容易に想像される。この疾病の発生率の高さおよびこの微生物における薬剤耐性の理由の多くは極度に長い治療期間に対してコンプライアンスがないことである。高濃度の抗生物質によって肺を直接的に標的化する方法を用いると実行の難しい長期治療に対する必要性を低減し、従ってノンコンプライアンスの発生率と薬剤耐性を低下させることが想像される。

ヒト (または他の哺乳動物) の結核治療に使用するための好ましい実施態様は以下の通りである: 治療複合体はヒトDPP-4抗体のF(ab')₂断片をリファンピンに連結することによって構築する。使用するリンカーはリポソームである。リポソームはF(ab')₂断片が膜に取り込まれてリファンピンがリポソーム内部に保持されるように構築する。リポソームは、リガンドがリン脂質二重層の一部となるようにDPP-4/F(ab')₂リガンドの存在下でリポソームを重合させて作製し、薄フィルム水和技術およびそれに続く凍結乾燥サイクルを用いて調製する。しかしながら、リポソーム懸濁液は当業者に知られた方法に従って調製することもできる。0.1~10nmolの治療複合体を静脈注射する。リファンピンを保持するリポソームはDPP-4特異的(Fab')₂断片によって肺に標的化される。内皮に結合すると、リポソームは取り込まれ、リファンピンが肺組織に取り込まれる。次に、リファンピンは*M.tuberculosis*生物に作用することができる。

実施例21において、DPP-4/界面活性タンパク質治療複合体の合成および界面活性タンパク質の生産不足によって生じる肺疾病治療のためのその使用を記載する。

【0100】

実施例21

界面活性欠損の治療のためのDPP-4治療複合体の使用

肺気腫を含むいくつかの肺疾病は疾病の原因の一部または結果の一部として界面活性タンパク質の欠損を含む。本発明は以下のように界面活性欠損の治療に使用される: DPP-4抗体のF(ab')₂断片をSP-A (界面活性タンパク質A) のような界面活性タンパク質に連結する

ことによって治療複合体を構築する。使用するリンカーはpH感受性結合である。この治療複合体を患者の静脈に注射し、DPP-4特異的F(ab')₂断片により肺を標的化する。内皮に結合すると治療複合体は肺組織によってトランスサイトシスされ、pH変化が結合を切断し、界面活性タンパク質が遊離される。

実施例22では、DPP-4/コルチコステロイド治療複合体の合成と移植肺組織の拒絶を治療するためのその使用を記載する。

【0101】

実施例22

肺移植拒絶の治療のためのDPP-4治療複合体

本発明は以下のように肺移植拒絶の治療のために使用される：DPP-4抗体のF(ab')₂断片をコルチコステロイドまたはシクロスポリンのような免疫抑制物質にpH感受性リンカーを用いて連結することによって治療複合体を構築する。この治療複合体を患者の静脈へ注射し、DPP-4特異的F(ab')₂断片により肺を標的化する。内皮に結合すると、この治療複合体は肺組織によってトランスサイトシスされ、または取り込まれ、pH変化により結合が切断され、肺の領域においてのみ免疫抑制物質が遊離される。そのような治療の利点は、患者は免疫抑制されず外科手術からの回復の間健全な活性免疫系を有することであることが容易にわかる。肺（または他の移植器官）は免疫抑制される唯一の器官であり、注意深く監視される。

10

【0102】

当業者はこれらの方法および組成物は、本明細書に内在するものと同様に、述べてきた目的を実行し結果および利益を得るために適合させることができることを理解するであろう。本明細書に記載した方法、手順、および組成物は好ましい実施態様を代表的に示した例示であり、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。本発明の精神の範囲内に包含され、開示の範囲によって規定される変更または他の使用は当業者には想像できるであろう。

20

当業者は記載した本発明の特徴および実施態様はそれぞれ別個に実施することも互いに組み合わせ使用することもできることを認識する。従って、別々の実施態様の組み合わせも開示したように本発明の範囲内である。

本明細書中で言及した全ての特許および刊行物は本発明が属する分野の当業者の水準を示したものである。

30

ここに例示的に記載した本発明は特に開示しなかった一切の要素または限定なしに適切に実行できるであろう。種々の改変が本発明の範囲内で可能であることが理解される。従って、本発明は好ましい実施態様および任意的な特徴によって具体的に開示してきたが、当業者は改変および開示した概念の変形を行うことができ、そのような改変または変形は開示によって規定される本発明の範囲内と考えられることは言うまでもない。

本発明の他の実施態様は請求の範囲の範囲内で考えることができる。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】内皮細胞表面、組織特異的分子と相互作用する典型的な治療複合体を描写したものである。

40

【図2】図2(A)-(D)はCD71または対照抗体を注射したラットの組織切片の免疫組織化学を示したものである。図2(A)はCD71を注射したラットの脳である。図2(B)は対照抗体を注射したラットの脳である。図2(C)は、CD71を注射したラットの肺である。図2(D)は対照抗体を注射したラットの肺である。

【図3】肺から単離した管腔タンパク質のポリアクリルアミドゲルを示す。ジペプチジルIVはDPP-4とラベル付けしてある。

【図4】図4(A)-(F)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、腎臓および肺における抗-ジペプチジルペプチダーゼ抗体の管腔組織への結合を示したものである。

【図5】肺から単離した管腔タンパク質の別の組のポリアクリルアミドゲルを示す。炭酸脱水素酵素IVはCA-4とラベル付けしてある。

50

【図6】膵臓から単離した管腔タンパク質のポリアクリルアミドゲルを示したものである。チモーゲン顆粒16タンパク質はZG16Pとラベル付けした。

【図7】図7(A)-(F)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、膵臓および結腸におけるMAdCAM抗体の管腔組織への結合が示されている。

【図8】図8(A)-(F)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、腎臓におけるThy-1 (CD90)抗体の管腔組織への結合が示されている。

【図9】前立腺から単離した管腔タンパク質のポリアクリルアミドゲルを示したものである。アルブミン断片はT406-608とラベル付けしてある。

【図10】図10(A)-(D)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、OX-61のジペプチジルペプチダーゼIV (肺の脈管の管腔表面上に発現されている)への結合が示されている。 10

【図11】図11(A)-(D)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、OST-2のMadCam-1 (膵臓および結腸の脈管の管腔表面上で発現している)への結合が示されている。

【図12】図12(A)-(F)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、OX-7のCD90 (腎臓の脈管の管腔表面上に発現している)への結合が示されている。

【図13】図13(A)-(F)は種々の組織の一連の免疫ヒストグラムであり、抗炭酸脱水素酵素IV抗体の炭酸脱水素酵素IV (心臓および肺の脈管の管腔表面上に発現している)への結合が示されている。

【図14】図14(A)-(E)は肺の一連の免疫ヒストグラムであり、24時間のOX-61のジペプチジルペプチダーゼIVへの経時的結合プロファイルを示したものである。 20

【図15】図15(A)-(D)は膵臓の一連の免疫ヒストグラムであり、48時間のOST-2のMadCam-1への結合の経時的プロファイルを示したものである。

【図16】図16(A)-(F)は腎臓の一連の免疫ヒストグラムであり、8時間のOX-7のCD90への結合の経時的プロファイルを示したものである。

【図17】図17(A)-(C)は24時間にわたるユーロピウム標識OX-61 (肺に局在した)の注射用量の割合を示したグラフである。点線はいずれかの時間に示した組織のいずれかに結合したアイソタイプ対照抗体の最大レベルを示す。

【図18】図18(A)-(C)は特定の組織に局在したユーロピウム標識抗インフルエンザIgG 2Aアイソタイプ対照抗体の24時間にわたる注射用量の割合を示したグラフである。

【図19】膵臓に局在した図19(A)-(C)はユーロピウム標識OST-2の24時間にわたる注射した用量の割合を示したグラフである。点線はいずれかの時間に示した組織のいずれかに結合したアイソタイプ対照抗体の最大レベルを示す。 30

【図20】心臓および肺に局在するユーロピウム標識抗炭酸脱水素酵素IV抗体の24時間にわたる注射した用量の割合を示したグラフである。

【図21】種々の組織および体液中に局在する、注射した¹²⁵I-標識OX-61の8時間にわたる量を示したグラフである。

【図22】ジペプチジルペプチダーゼIVによるOX-61のトランスサイトーシス輸送を示す肺の切片の免疫ヒストグラムである。

【図23】CD90によるOX-7のトランスサイトーシス輸送を示す腎臓の切片の免疫ヒストグラムである。 40

【図24】OST-2が脈管の管腔表面上のMadCam-1に結合するが内皮を横切って輸送はされないことを示した膵臓の切片の免疫ヒストグラムである。

【図25】抗-炭酸脱水素酵素IV抗体は脈管の管腔表面上の炭酸脱水素酵素IVに結合するが内皮を横切って輸送はされないことを示す、肺の切片の免疫ヒストグラムである。

【図26】図26(A)-(F)はOX-61/ゲンタマイシン治療複合体のジペプチジルペプチダーゼIV (肺の脈管の管腔表面上に発現している)への結合を示す種々の組織の一連の免疫ヒストグラムである。

【図27】図27(A)-(D)はOX-61/ドキシソルピシン治療複合体のジペプチジルペプチダーゼIV (肺の脈管の管腔表面上に発現している)への結合を示す種々の組織の一連の免疫ヒストグラムである。 50

【図28】ジペプチジルペプチダーゼIVによるOX-61/ゲンタマイシン治療複合体のトランスサイトーシス輸送を示す肺の切片の免疫ヒストグラムである。

【図29】ジペプチジルペプチダーゼIVによるOX-61/ドキシソルピシン治療複合体のトランスサイトーシス輸送を示す肺の切片の免疫ヒストグラムである。

【図30】図30(A)-(F)はMadCam-1(結腸および膵臓の脈管の管腔表面上に発現している)へのOST-2/ゲンタマイシン治療複合体の結合を示す種々の組織の一連の免疫ヒストグラムである。

【図31】図31(A)-(F)はMadCam-1(結腸および膵臓の脈管の管腔表面上に発現している)へのOST-2/ドキシソルピシン治療複合体の結合を示す種々の組織の一連の免疫ヒストグラムである。

【図32】図32(A)-(B)は、DSPC-DPP治療複合体として肺および腎臓にデリバリーされたゲンタマイシン量に比較した、肺および腎臓に18時間にわたって蓄積した遊離のゲンタマイシンの量を示したグラフである。

【図33】図33(A)-(B)はEPC-DPP治療複合体中で肺および腎臓にデリバリーされたゲンタマイシンの量に比較した、肺および腎臓に蓄積した遊離のゲンタマイシンの18時間にわたる量を示したグラフである。

【図34】図34(A)-(B)は、DSPC-DPP治療複合体および非標的化リポソームとして種々の組織へデリバリーされたゲンタマイシン量に比較した、種々の組織に18時間にわたって蓄積した遊離のゲンタマイシンの量を示したグラフである。

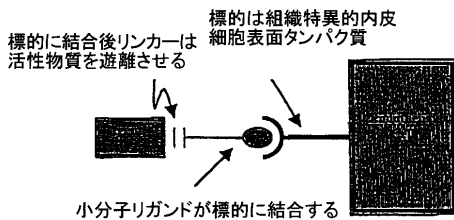
【図35】遊離のゲンタマイシンおよびEPC-DPP治療複合体中のゲンタマイシンの両方の、肺感染の治療における効力を示したものである。

10

20

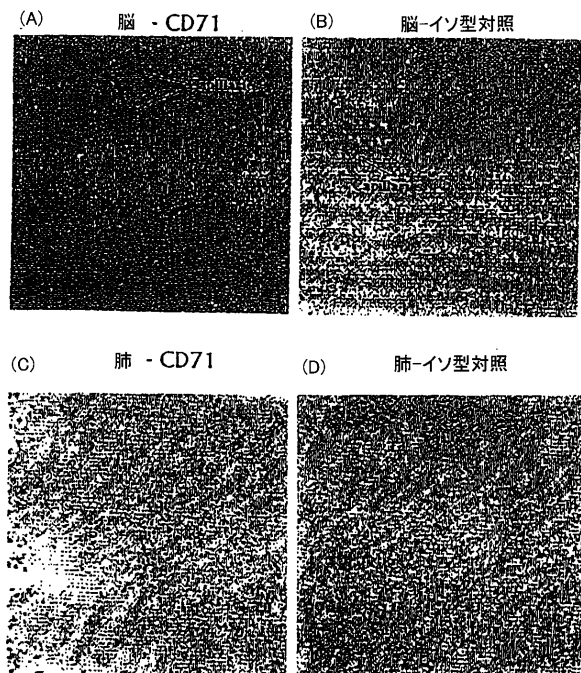
【図1】

FIGURE 1



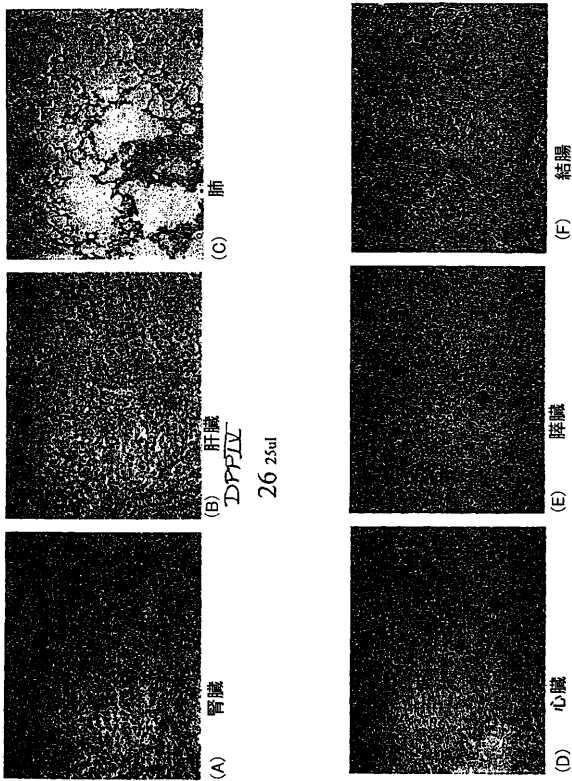
【図2】

FIGURE 2



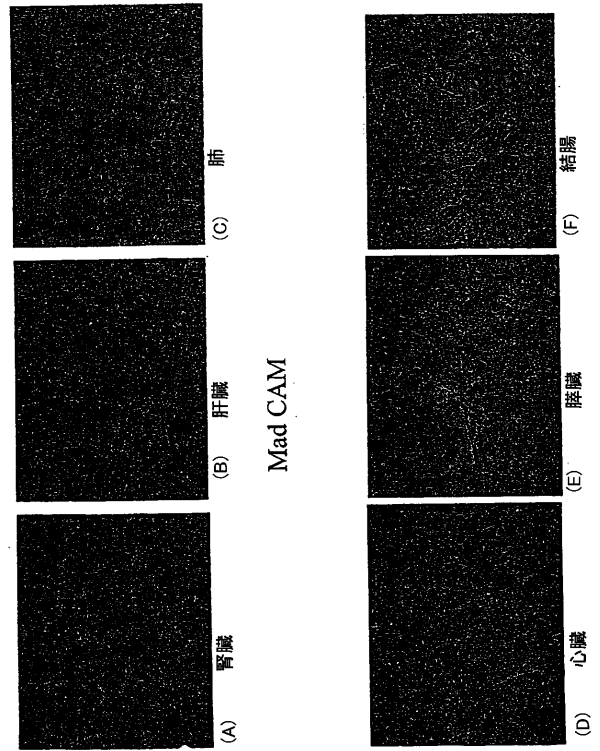
【 図 4 】

FIGURE 4



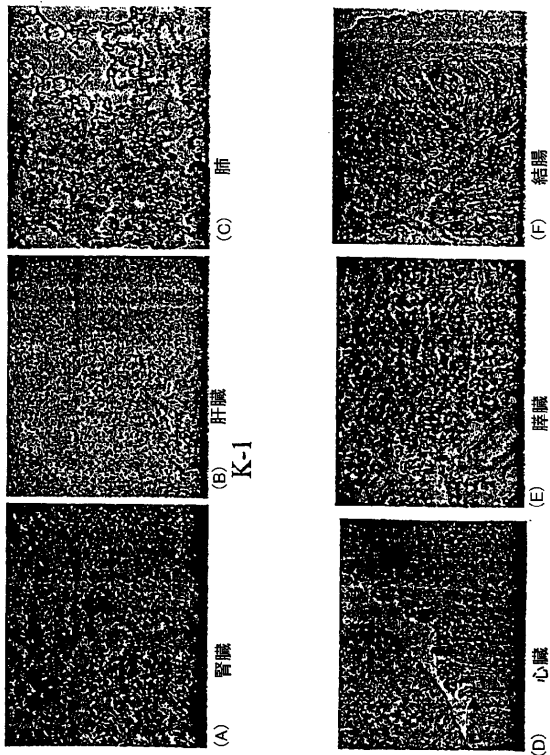
【 図 7 】

FIGURE 7



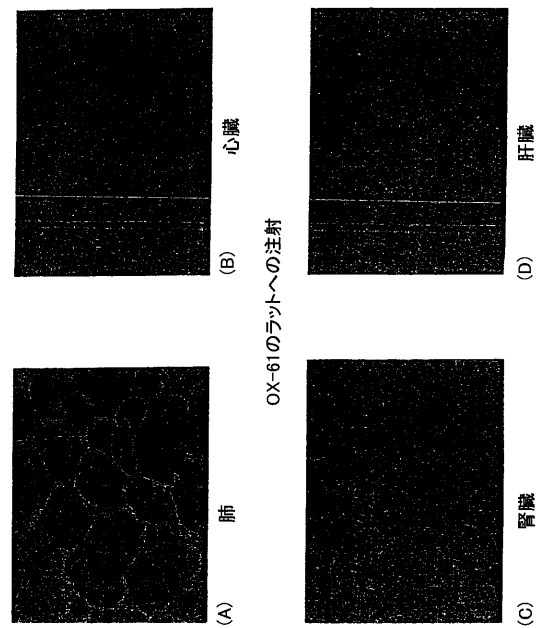
【 図 8 】

FIGURE 8



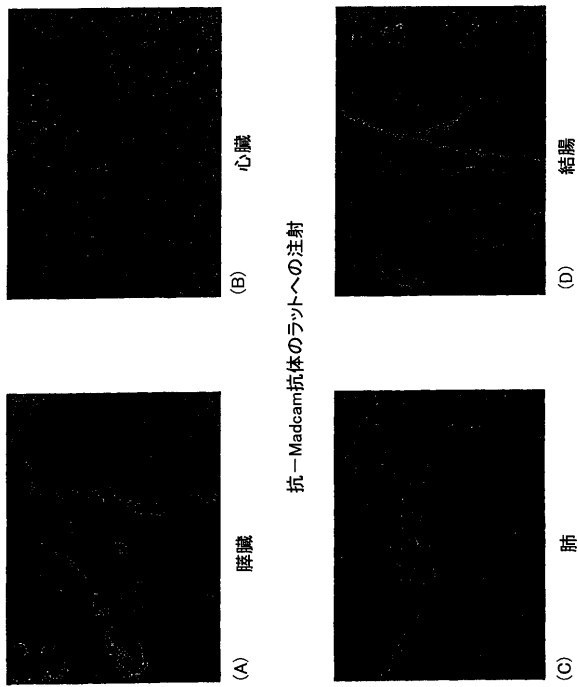
【 図 10 】

FIGURE 10



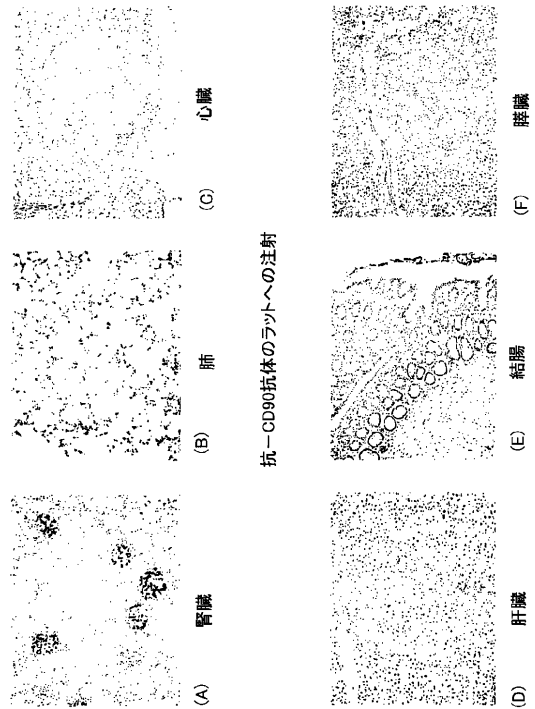
【 図 1 1 】

FIGURE 11



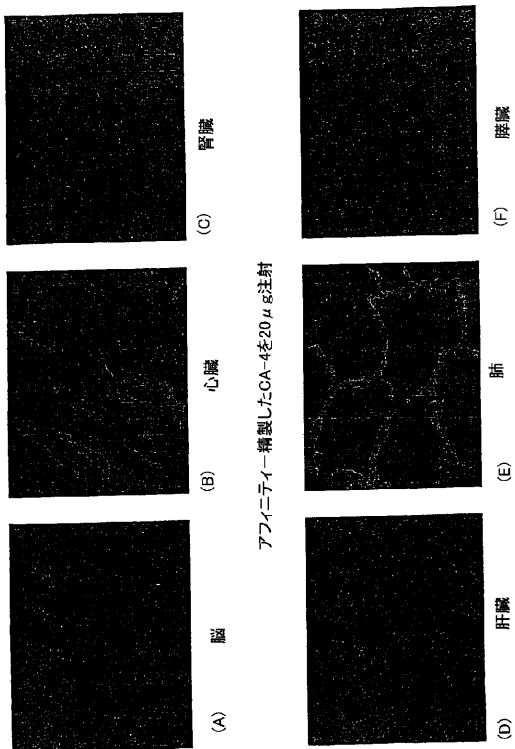
【 図 1 2 】

FIGURE 12



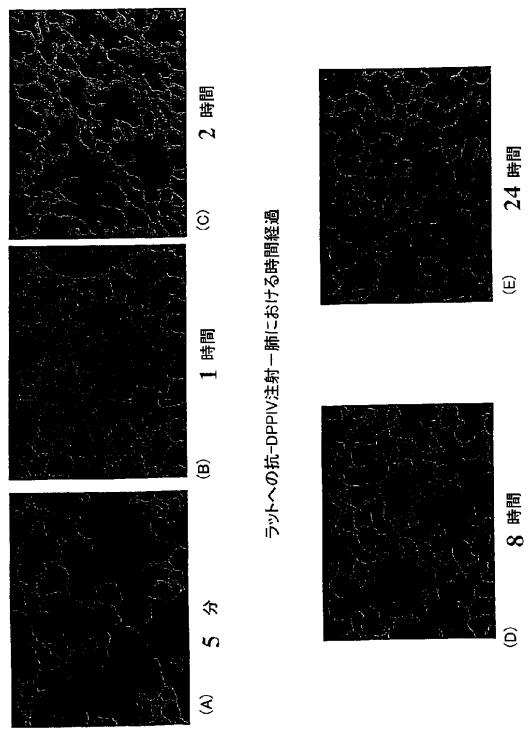
【 図 1 3 】

FIGURE 13



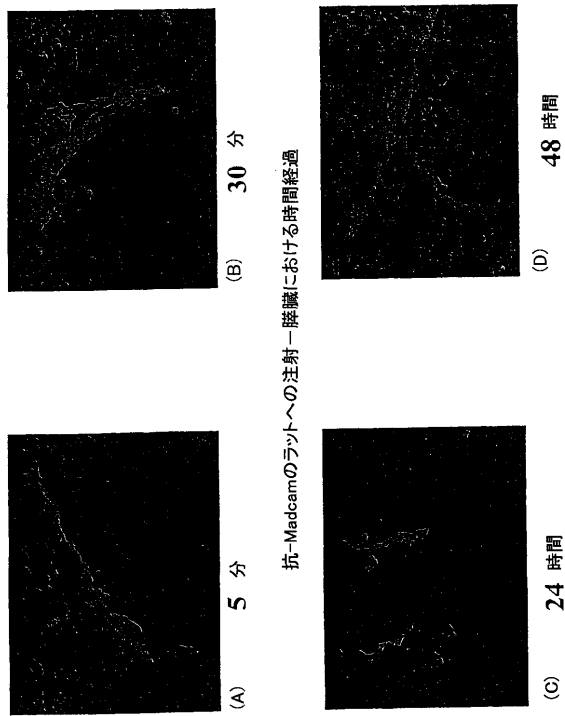
【 図 1 4 】

FIGURE 14



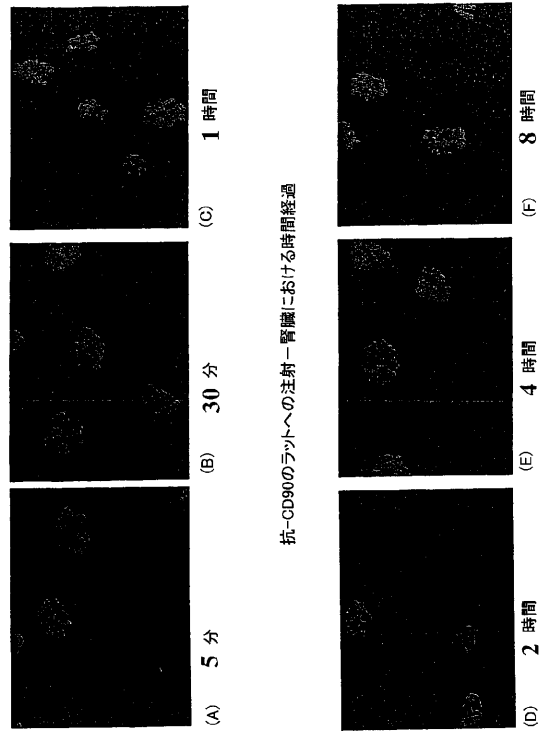
【 図 1 5 】

FIGURE 15



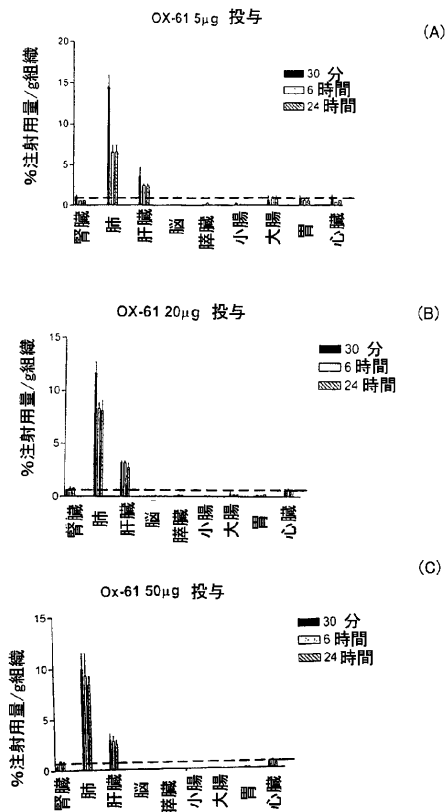
【 図 1 6 】

FIGURE 16



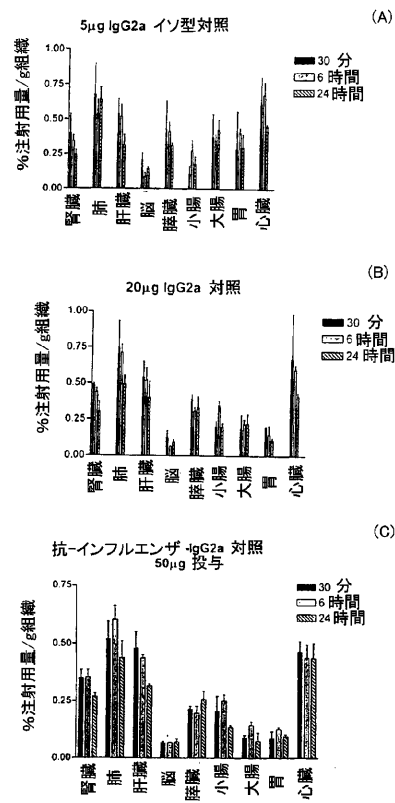
【 図 1 7 】

FIGURE 17



【 図 1 8 】

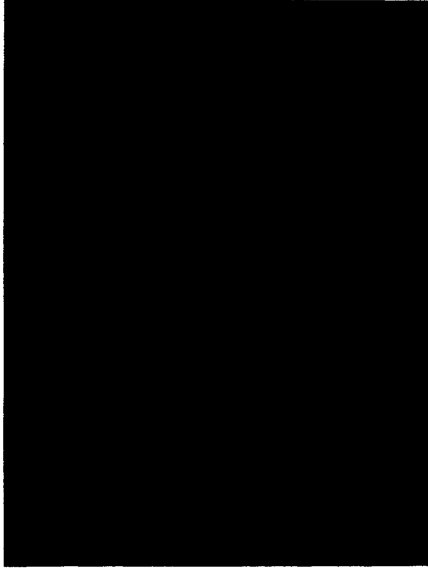
FIGURE 18



【 図 2 3 】

FIG. 23

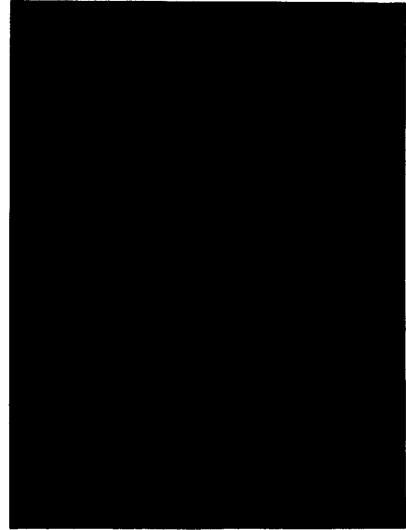
腎臓における抗-CD90抗体の浸透



【 図 2 4 】

FIG. 24

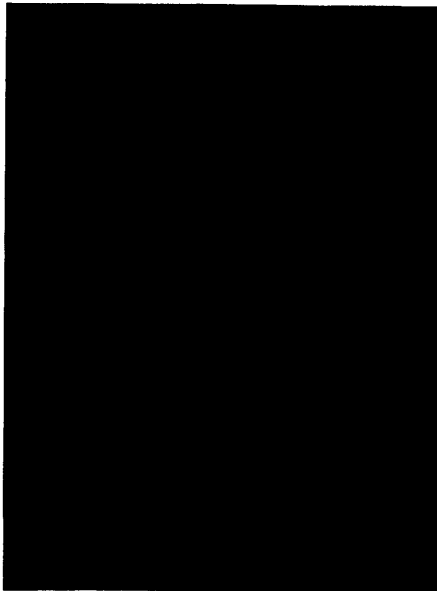
抗-Madcam-1抗体は脾臓組織へ浸透しない



【 図 2 5 】

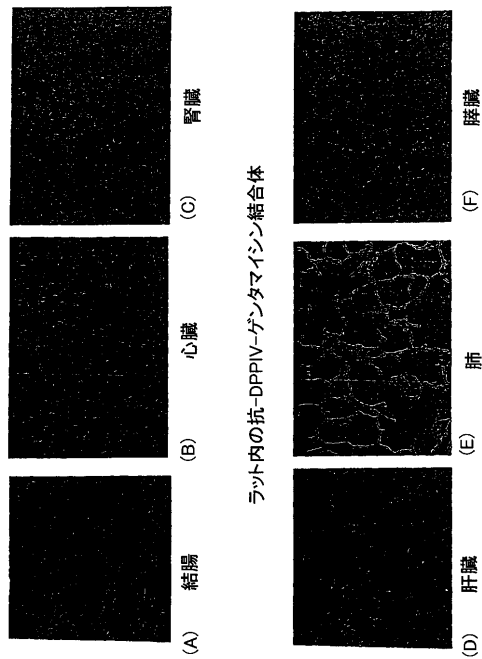
FIG. 25

抗-CAIV抗体は内皮を越えない



【 図 2 6 】

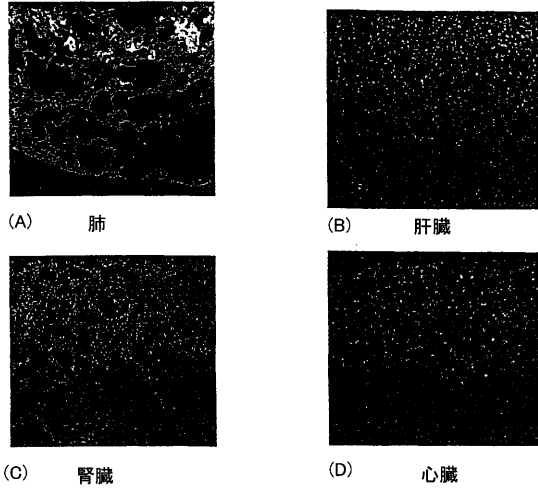
FIGURE 26



【 図 2 7 】

FIGURE 27

肺におけるドキシルピシンの位置決定



【 図 2 8 】

FIG. 28

抗-Madcam-1ガンタマイシン結合体の肺組織へのトランスサイトーシス

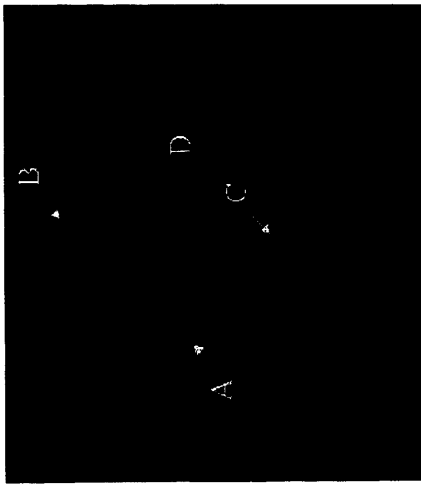


青-核; 赤-結合体; 緑-毛細管細胞マーカー

【 図 2 9 】

FIG. 29

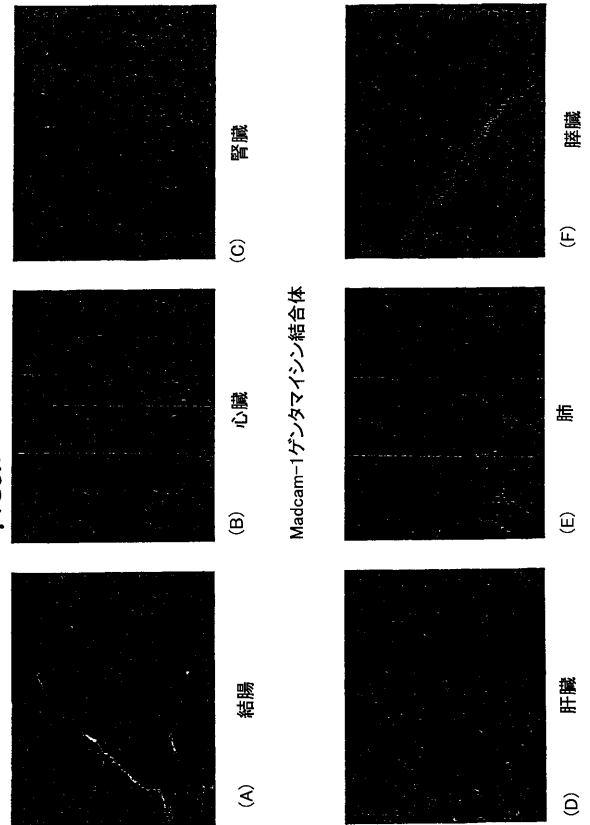
肺へのドキシルピシンの浸透



A: 細気管支中のドキシルピシンの浸透; B: 肺間質; C: 細気管支表面; D: 細気管支の間腔

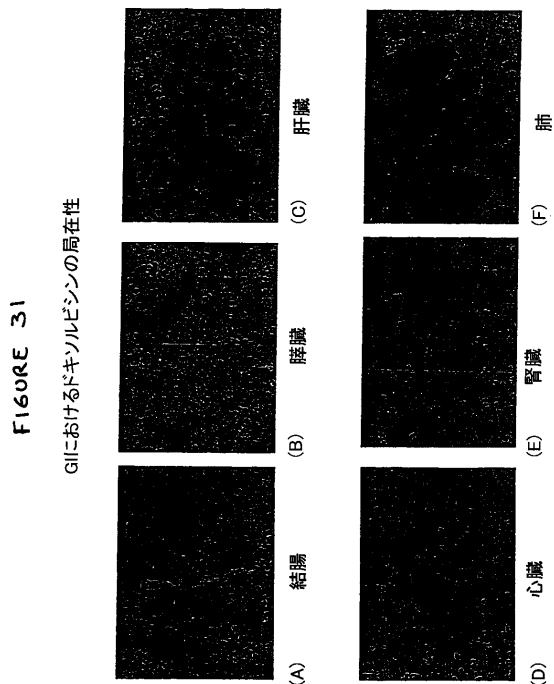
【 図 3 0 】

FIGURE 30

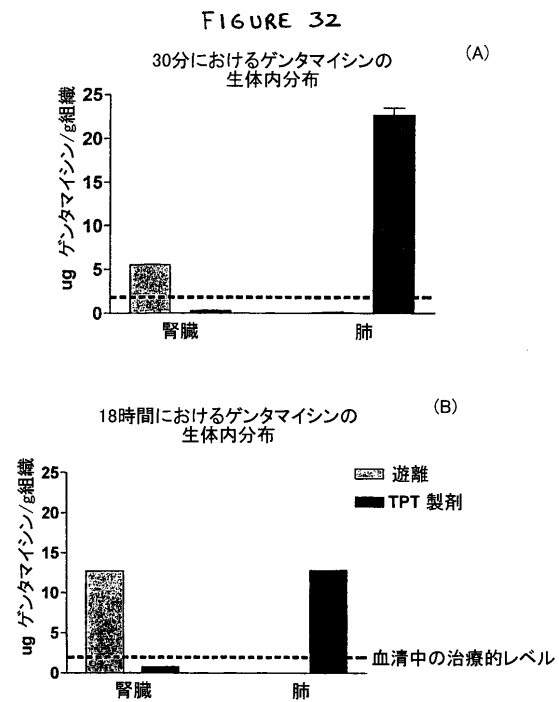


Madcam-1ガンタマイシン結合体

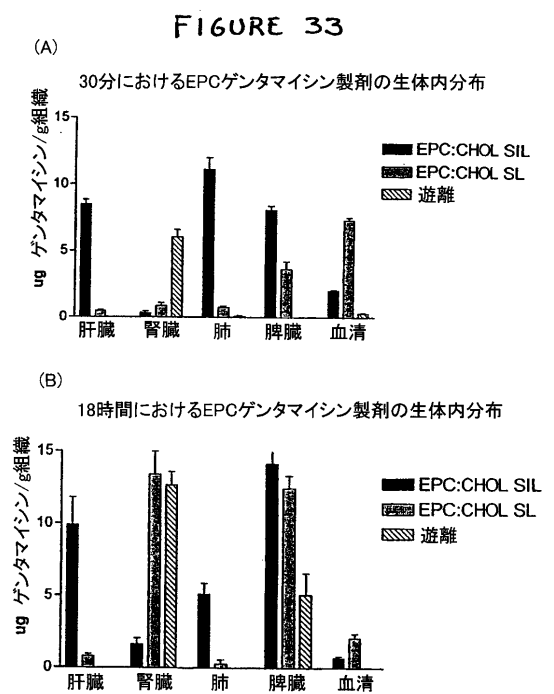
【 図 3 1 】



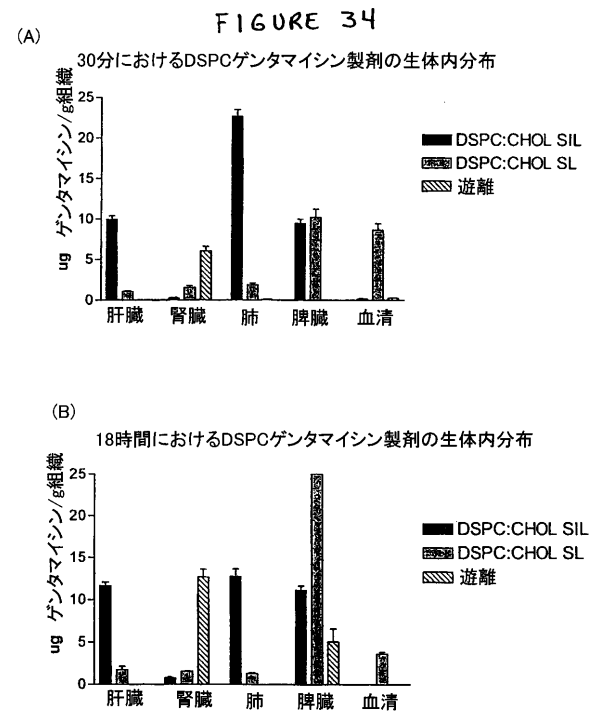
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

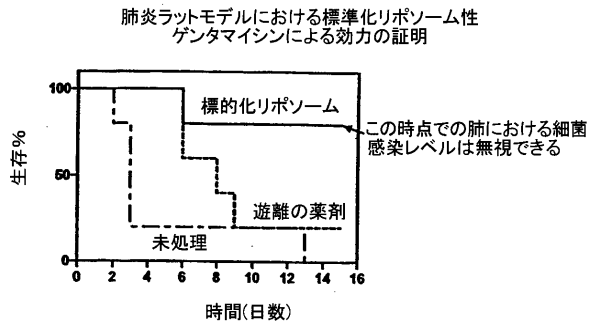


【 図 3 4 】



【 図 3 5 】

FIGURE 35



【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
19 December 2002 (19.12.2002)

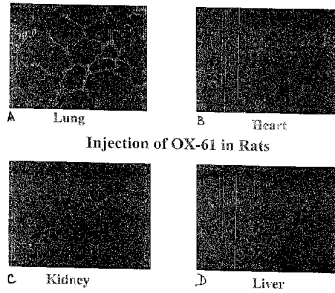
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/100336 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US02/18185
- (22) International Filing Date: 7 June 2002 (07.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/297,021 8 June 2001 (08.06.2001) US
60/305,117 12 July 2001 (12.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **TARGET PROTEIN TECHNOLOGIES, INC.** [US/US]; 6310 Nancy Ridge Drive, Suite 105, San Diego, CA 92121 (US).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **ROBEN, Paul, W.** [US/US]; 3150 East Fox Run Way, San Diego, CA 92111 (US). **STEVENS, Anthony, C.** [US/US]; 7276 Golferest, San Diego, CA 92119 (US).
- (74) Agent: **REISMAN, Joseph, M.**; Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP, 16th Floor, 620 Newport Center Drive, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EL (utility model), FI, IS, H (utility model), H, GB, GD, GH, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IL, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: TISSUE-SPECIFIC ENDOTHELIAL MEMBRANE PROTEINS



(57) Abstract: Methods and compositions for targeting of pharmaceuticals or other therapeutics to specific tissues using tissue-specific endothelial membrane proteins are provided. The compositions comprise a therapeutic complex composed of a ligand, a linker, and a therapeutic moiety, where the therapeutic moiety can enter the cell. The ligand can be an antibody or other molecule that binds to a tissue-specific protein on the endothelial membrane of a specific tissue. The ligand need not activate a receptor, but may activate endocytosis. The therapeutic moiety can be a drug, gene, antisense oligonucleotide, contrast agent, protein, toxin, or any type of molecule that acts on the specific tissue. The linker can be a liposome or a cleavable or noncleavable chemical molecule. Alternatively, the linker may simply be the bond between the ligand and the therapeutic moiety. Alternatively, a lipophilic prodrug may be cleaved and may enter the cell due to its lipophilic properties.



WO 02/100336 A2

WO 02/100556 A2 

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 02/100336

PCT/US02/18185

TISSUE-SPECIFIC ENDOTHELIAL MEMBRANE PROTEINSBackground of the InventionField of the Invention

This invention relates generally to targeting of pharmaceuticals or other therapeutics to specific tissues using tissue specific endothelial membrane proteins.

Description of the Related Art

When conventional pharmaceuticals are delivered to a patient they circulate throughout the entire body of the patient and act on most if not all tissues or cells of the body. This requires high doses for treatment and results in systemic toxicity and side effects.

Targeted delivery of therapeutic or diagnostic agents to specific organs, tissues or cells is much safer and more effective than such a non-specific treatment, because much smaller amounts of the drug are needed and there is considerably less chance for side-effects or toxicity.

Previous methods for the targeted delivery of pharmaceuticals include the use of implants (e.g., Elise (1999) PNAS USA 96:3104-3107), stents or catheters (e.g., Murphy (1992) Circulation 86:1596-1604), or vascular isolation of an organ (e.g., Vahrmeijer (1998) Semin. Surg. Oncol. 14:262-268). However, these techniques are invasive, traumatic and can cause extensive inflammatory responses and fibrocellular proliferation.

Most previous attempts at tissue-specific delivery depended on sites within the tissue that were inaccessible to the compounds due to the natural barrier of the vasculature. An alternative method for targeted delivery of compounds involves organ or tissue-specific molecules exposed on the luminal surface of the vasculature rather than on the tissue cells themselves. Use of these molecules would allow for a very specific reaction. The specificity is due to the fact that blood vessels must express these tissue-specific endothelial proteins because the vasculature forms a complex and dynamic system which adapts to the needs of the tissue in which it is immersed.

Previously, methods for identifying these organ or tissue-specific molecules, which were exposed and accessible on the luminal surface of the vasculature, did not result in the identification of usable molecules. This is because the endothelial membrane represents only a miniscule portion of the tissue mass of any organ. When organs are analyzed by conventional means, the endothelial membranes become dispersed throughout the entire tissue homogenate. This renders isolation of the endothelial membrane and its proteins for separate analysis essentially impossible. In addition, even if isolated and in culture, these membranes tend to lose their tissue-specific properties. In the event such molecules are isolated in a useful manner, methods must be conceived which allow for uses of these molecules related to the treatment of diseases in patients.

Summary of the Invention

There are several exemplary embodiments of the instant invention. One such embodiment includes a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising: administering a therapeutically effective amount of a therapeutic complex, said therapeutic complex comprising: a

WO 02/100336

PCT/US02/18185

ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety, and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand.

Another embodiment includes a lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic
5 complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ ID NO:9 or 11, or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand to the therapeutic moiety.

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of Carbonic anhydrase IV (CA-4) in a tissue or cell, comprising administering the above lung and/or
10 heart-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the above lung and/or heart-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

Another embodiment includes a lung and/or kidney-specific therapeutic complex which
15 interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein the ligand binds to SEQ ID NO:4 or 6, or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) in a tissue or cell, comprising administering the above lung and/or
20 kidney-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the above lung and/or kidney-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

Another embodiment includes a pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which
25 interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ ID NO:14 or 16, or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of ZG16-p in a tissue or cell, comprising administering the above pancreatic and/or gut-specific
30 therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the pancreatic
35 and/or gut-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

Another embodiment includes a prostate-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue comprising SEQ ID NO:23 or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of
5 Albumin fragment in a tissue or cell, comprising administering the above prostate-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the prostate-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

10 Another embodiment includes a brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue wherein said ligand binds to SEQ ID NO:26 or 28 or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

15 Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of CD71 (transferrin receptor) in a tissue or cell, comprising administering the above brain-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the above brain-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

20 Another embodiment includes a pancreas and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue wherein said ligand binds to SEQ ID NO:18 or 20, or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic
25 moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of MAdCAM (MadCam-1) in a tissue or cell, comprising administering the above pancreas and/or gut-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

30 Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the above pancreas and/or gut-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

Another embodiment includes a kidney-specific therapeutic complex which interacts with a
35 targeted endothelial cell, comprising: a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ ID NO:30 or 32, or a homolog thereof; a linker; and a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand to the therapeutic moiety.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Another embodiment includes a method of determining the presence or concentration of CD90 in a tissue or cell, comprising administering the above kidney-specific therapeutic complex to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.

5 Another embodiment includes a pharmaceutical composition comprising the above kidney-specific therapeutic complex and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

Another embodiment includes a method for the treatment of prostate cancer comprising administering the above prostate-specific therapeutic complex in an amount effective to reduce the number of cancer cells, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

10 Another embodiment includes a method for the treatment of brain tumors comprising administering the above brain-specific therapeutic complex in an amount effective to reduce the number of cancer cells, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

Another embodiment includes a method for the treatment of pancreatic cancer comprising administering one or more of the above pancreas and/or gut-specific therapeutic complexes in an amount effective to reduce the amount of thrombosis, wherein said therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

15 Another embodiment includes a method for the treatment of kidney transplant rejection comprising administering the above lung and/or kidney specific therapeutic complex in an amount sufficient to reduce the rejection of the kidney transplant, wherein said therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.

20 Another embodiment includes a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising: administering a therapeutically effective amount of a therapeutic complex, said therapeutic complex comprising: a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety, and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand, wherein said tissue-specific lumenally expressed protein is selected from the group consisting of CD71, CD90, MAcCAM, Albumin fragment, carbonic anhydrase IV, ZG16-p and dipeptidyl peptidase IV.

25 Another embodiment includes a method for lung and/or heart-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a carbonic anhydrase IV-binding agent, and administering said carbonic anhydrase IV-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the lung and/or heart or lung and/or heart tissue as a result of the administration of the carbonic anhydrase IV-binding agent.

Another embodiment includes a method of identifying a lung and/or heart-specific ligand, comprising identifying a carbonic anhydrase IV-binding agent.

35 Another embodiment includes a method for brain-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a CD71 (transferrin receptor)-binding agent, and administering said

WO 02/100336

PCT/US02/18185

CD71-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the brain or brain tissue as a result of the administration of the CD71-binding agent.

Another embodiment includes a method of identifying a brain-specific ligand, comprising identifying a CD71-binding agent.

5 Another embodiment includes a method for kidney-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a CD90 (Thy-1)-binding agent, and administering said CD90-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the kidney or kidney tissue as a result of the administration of the CD90-binding agent.

10 Another embodiment includes a method of identifying a kidney-specific ligand, comprising identifying a CD90-binding agent.

Another embodiment includes a method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a dipeptidyl peptidase IV-binding agent, and administering said dipeptidyl peptidase IV-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the lung and/or kidney or lung and/or kidney tissue as a result of the administration of the dipeptidyl peptidase IV-binding agent.

15 Another embodiment includes a method of identifying a lung and/or kidney-specific ligand, comprising identifying a dipeptidyl peptidase IV-binding agent.

Another embodiment includes a method for pancreas and/or gut-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a ZG16-p-binding agent, and administering said ZG16-p-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue as a result of the administration of the ZG16-p-binding agent.

20 Another embodiment includes a method of identifying a pancreas and/or gut-specific ligand, comprising identifying a ZG16-p-binding agent.

25 Another embodiment includes a method for pancreas and/or gut-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a MAdCAM-binding agent, and administering said MAdCAM-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue as a result of the administration of the MAdCAM-binding agent.

30 Another embodiment includes a method of identifying a pancreas and/or gut-specific ligand, comprising identifying a MAdCAM-binding agent.

Another embodiment includes a method for prostate-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising: providing a Albumin fragment-binding agent, and administering said Albumin fragment-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the prostate or prostate tissue as a result of the administration of the Albumin fragment-binding agent.

35 Another embodiment includes a method of identifying a prostate-specific ligand, comprising identifying an Albumin fragment-binding agent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a depiction of a typical therapeutic complex interacting with an endothelial cell surface, tissue-specific molecule.

5 Figures 2A-D show the immunohistochemistry of tissue sections from a rat which was injected with either CD71 or a control antibody. Figure 2A is Brain from a rat injected with CD71, Figure 2B is Brain from a rat injected with the control antibody, Figure 2C is lung from a rat injected with CD71, Figure 2D is lung from a rat injected with the control antibody.

Figure 3 shows a polyacrylamide gel of luminal proteins isolated from lung. Dipeptidyl peptidase IV is labeled DPP-4.

10 Figures 4A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an anti-dipeptidyl peptidase antibody to luminal tissue in kidney and lung.

Figure 5 shows a polyacrylamide gel of another set of luminal proteins isolated from lung. Carbonic Anhydrase IV is labeled CA-4.

15 Figure 6 shows a polyacrylamide gel of luminal proteins isolated from pancreas. Zymogen granule 16 protein is labeled ZG16P.

Figures 7A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of a MAdCAM antibody to luminal tissue in pancreas and colon.

Figures 8A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of a Thy-1 (CD90) antibody to luminal tissue in the kidney.

20 Figure 9 shows a polyacrylamide gel of luminal proteins isolated from prostate. The albumin fragment is labeled T406-608.

Figures 10A-D are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of OX-61 to dipeptidyl peptidase IV, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the lung.

25 Figures 11A-D are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of OST-2 to MadCam-1, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the pancreas and colon.

Figures 12A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of OX-7 to CD90, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the kidney.

30 Figures 13A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an anti-carbonic anhydrase IV antibody to carbonic anhydrase IV, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the heart and lung.

Figures 14A-E are a series of immunohistograms of lung showing a profile of the binding of OX-61 to dipeptidyl peptidase IV over a twenty-four hour timecourse.

35 Figures 15A-D are a series of immunohistograms of pancreas showing a profile of the binding of OST-2 to MadCam-1 over a forty-eight hour timecourse.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Figures 16A-F are a series of immunohistograms of kidney showing a profile of the binding of OX-7 to CD90 over an eight hour timecourse.

Figures 17A-C are graphs which show the fraction of the injected dose of Europium-labeled OX-61 that localized to lung over a twenty-four hour time period. The dashed line indicates the maximum level of isotype control antibody that bound to any of the indicated tissues at any time point.

Figures 18A-C are graphs which show the fraction of the injected dose of Europium-labeled anti-influenza IgG2A isotype control antibody that localized to specific tissues over a twenty-four hour time period.

Figures 19A-C are graphs which show the fraction of the injected dose of Europium-labeled OST-2 that localized to pancreas over a twenty-four hour time period. The dashed line indicates the maximum level of isotype control antibody that bound to any of the indicated tissues at any time point.

Figure 20 is a graph which shows the fraction of the injected dose of Europium-labeled anti-carbonic anhydrase IV antibody that localized to heart and lung over a twenty-four hour time period.

Figure 21 is a graph which shows the amount of injected ¹²⁵I-labeled OX-61 that localized to various tissues and fluids over an eight hour time period.

Figure 22 is an immunohistogram of a section of lung which shows the transcytotic transport of OX-61 by dipeptidyl peptidase IV.

Figure 23 is an immunohistogram of a section of kidney which shows the transcytotic transport of OX-7 by CD90.

Figure 24 is an immunohistogram of a section of pancreas which shows that OST-2 binds to MadCam-1 on the luminal surface of the vasculature but is not transported across the endothelium.

Figure 25 is an immunohistogram of a section of lung which shows that anti-carbonic anhydrase IV antibody binds to carbonic anhydrase IV on the luminal surface of the vasculature but is not transported across the endothelium.

Figures 26A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an OX-61/gentamicin therapeutic complex to dipeptidyl peptidase IV, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the lung.

Figures 27A-D are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an OX-61/doxorubicin therapeutic complex to dipeptidyl peptidase IV, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the lung.

Figure 28 is an immunohistogram of a section of lung which shows the transcytotic transport of an OX-61/gentamicin therapeutic complex by dipeptidyl peptidase IV.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Figure 29 is an immunohistogram of a section of lung which shows the transepytotic transport of an OX-61/doxorubicin therapeutic complex by dipeptidyl peptidase IV.

Figures 30A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an OST-2/gentamicin therapeutic complex to MadCam-1, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the colon and pancreas.

Figures 31A-F are a series of immunohistograms of various tissues showing binding of an OST-2/doxorubicin therapeutic complex to MadCam-1, which is expressed on the luminal surface of the vasculature of the colon and pancreas.

Figures 32A-B are graphs which show the amount of free gentamicin that accumulated in the lung and the kidney over an eighteen hour time period compared to the amount that was delivered to these tissue in DSPC-DPP therapeutic complexes.

Figures 33A-B are graphs which show the amount of free gentamicin that accumulated in various tissues over an eighteen hour time period compared to the amount that was delivered to these tissue in EPC-DPP therapeutic complexes and untargeted liposomes.

Figures 34A-B are graphs which show the amount of free gentamicin that accumulated in various tissues over an eighteen hour time period compared to the amount that was delivered to these tissue in DSPC-DPP therapeutic complexes and untargeted liposomes.

Figure 35 is a graph which shows the efficacy of both free gentamicin and gentamicin in EPC-DPP therapeutic complexes in the treatment of lung infections.

Detailed Description of the Preferred Embodiment

One embodiment described herein supplies both compositions and methods of use of therapeutic compounds for delivery to a specific tissue whether or not such tissue is in a diseased state. Specifically, the invention utilizes tissue-specific lumenally exposed proteins on endothelial cells so that the tissue-specific therapeutic complexes described herein will localize to a specific tissue due to binding of these complexes to lumenally-exposed endothelial proteins. This embodiment allows for localization and concentration of a pharmaceutical agent to a specific tissue, thus increasing the therapeutic index of that pharmaceutical agent. This localization decreases the chances of side effects due to the agent and may allow one to use a lower concentration of the agent to achieve the same effect. Localization to a lumenally-exposed tissue specific endothelial protein affords the added advantage that a single ligand can be used to treat a variety of diseases involving that tissue. In other words, a disease specific ligand for each disease state of a tissue need not be generated; as sufficient amounts of one or more therapeutic complexes will bind to the effected tissue which is expressing a protein normally found on the luminal endothelial cells of that tissue or organ. This feature allows the use of a single ligand to produce therapeutic complexes to treat any disease associated with the tissue. The tissue-specific molecule may be identified by the method of U.S. Patent Application No. 09/528,742, filed March 20, 2000, or any other method of identification. The method disclosed in U.S. patent application No. 09/528,742 permits the *in vivo*

WO 02/100336

PCT/US02/18185

isolation of all proteins that are exposed on the inner surface of blood vessels from different tissues. All other proteins that make up the tissues (which are the vast majority) are discarded in the process. The resulting set of lumenally exposed vascular proteins can then be separated and analyzed biochemically to identify each protein individually. By comparing the set of proteins expressed in each tissue, proteins are identified that are specific to a given tissue. Proteins of interest are then sequenced. Ligands are obtained that specifically bind to the target protein. These ligands, upon binding to the target protein, or the protein that is tissue-specifically lumenally expressed, preferably does not activate a specific signal transduction pathway in the cell it binds to, but may activate the process of transcytosis or pinocytosis.

10 Endothelial cell tissue-specific proteins are accessible to the blood, and thus, they can act at site-specific targets used to localize therapeutic complexes to a specific tissue. Blood vessels express these tissue-specific endothelial proteins because the vasculature forms a complex and dynamic system which adapts to the needs of the tissue in which it is immersed. Many of these proteins are constitutively expressed, meaning that their levels of expression are not significantly
15 changed in different disease states, making them ideal targets for the delivery of pharmaceuticals whether or not the tissue or organ containing the tissue is in the diseased state. In addition, many of these proteins are involved in transcytosis, the process of transporting materials from within the blood vessels into the tissue.

DEFINITIONS

20 Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by a person of skill in the art to which this invention belongs. As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them unless specified otherwise.

As used herein, the term "gut" is synonymous with gastrointestinal (GI) tract.

The term "target protein" as used herein is a tissue-specific, lumenally exposed vascular
25 protein.

The term "ligand" as used herein is a molecule that specifically binds to the target protein. These can be peptides, antibodies or parts of antibodies, as well as non-protein moieties.

The term "linker" as used herein is any bond, small molecule, or other vehicle which allows the ligand and the therapeutic moiety to be targeted to the same area, tissue, or cell. The linker
30 binds or otherwise holds together the ligand and the therapeutic moiety for binding to the target protein.

The term "therapeutic moiety" as used herein is any type of substance which can be used to effect a certain outcome. The outcome can be positive or negative, alternatively, the outcome can simply be diagnostic. The outcome may also be more subtle such as simply changing the molecular
35 expression in a cell. The therapeutic moiety may also be an enzyme which allows conversion of a prodrug into the corresponding pharmaceutical agent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

The term "therapeutic complex" is any type of molecule which includes a ligand specific for a target protein and one or more therapeutic moieties and a linker. However, it is to be understood that a therapeutic complex may also comprise an enzyme or some other inducer of cleavage which allows a prodrug to be converted into the corresponding pharmaceutical agent.

5 The term "tissue-specific" refers to a molecule that is preferentially expressed on a specific tissue or cell-type, allowing a substantial fraction of the therapeutic complex to bind to that tissue after administration. The molecule may be found at a considerably higher concentration in one or a few tissues than in the others. For example, a tissue-specific molecule may be highly upregulated in the lung compared to other tissues but can be dosed to be even more specific based on the
10 statistical distribution of binding throughout the vasculature. Proper, often lower, dosing of the therapeutic complex would be given such that the amounts that appear randomly at non-targeted tissue would render little or no side effects.

GENERAL TECHNIQUES

The embodiment described herein can be practiced in conjunction with any method or
15 protocol known in the art and described in the scientific and patent literature. The various compositions (e.g., natural or synthetic compounds, polypeptides, peptides, nucleic acids, antibodies, toxins, and the like) used in the embodiment described herein can be isolated from a variety of sources, genetically engineered, amplified, and/or expressed recombinantly. Alternatively, these compositions can be synthesized *in vitro* by well-known chemical synthesis
20 techniques, as described in, e.g., Organic Synthesis, collective volumes, Gilman *et al.* (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY; Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; and Caruthers *et al.* U.S. Patent No. 4,458,066, July 3, 1984.

THERAPEUTIC COMPLEXES

The therapeutic complexes of the invention bind to the target proteins, for example from the
25 pancreas, lung, muscle, intestine, prostate, kidney, and brain to specifically deliver a therapeutic moiety to the tissue or organ of choice. The therapeutic complexes are composed of at least one ligand, a linker, and at least one therapeutic moiety (see Figure 1). However, the attachment of the three types of components of the therapeutic complex can be envisioned to have a large number of different embodiments. The therapeutic moiety can be one or more of any type of molecule which
30 is used in a therapeutic or diagnostic way. For example, the therapeutic moiety can be an antibiotic which needs to be taken up by a specific tissue. The therapeutic complex can be envisioned to concentrate and target the antibiotic to the tissue where it is needed, thus increasing the therapeutic index of that antibiotic. Alternatively, the therapeutic moiety can be for *in vivo* or *in vitro* diagnostic purposes. Further examples of the use of therapeutic complexes in the specific
35 embodiments of the present invention will be outlined in more detail in the section entitled "Type of Therapeutic Complex Interactions".

WO 02/100336

PCT/US02/18185

LIGANDS

The ligand is a molecule which specifically binds to the target protein, in this case, the lumenally-expressed tissue-specific proteins. In one embodiment, the ligand is some type of antibody or part thereof which specifically binds to a lumenally expressed, tissue-specific molecule.

5 Usually, the ligand recognizes an epitope which does not participate in the binding of a natural ligand. The ligand of the lumenally-expressed tissue-specific endothelial protein can be identified by any technique known to one of skill in the art, for example, using a two-hybrid technique, a combinatorial library, or producing an antibody molecule. The ligand may be a protein, RNA, DNA, small molecule or any other type of molecule which specifically binds to target proteins.

10 The target protein may be an integral membrane protein (such as a receptor) or may be a ligand itself. Should the tissue-specific molecule be a ligand which binds to a lumenally expressed protein, the ligand, or a fragment thereof which exhibits the lumen and tissue-specificity, is used in the construction of the therapeutic complex of the invention. Alternatively, antibodies, antibody fragments, or antibody complexes specific to, or with similar binding characteristics to, the lumenally exposed ligand molecule may be used in the construction of the therapeutic complex of the invention.

15 Should the tissue-specific lumenally exposed protein (target protein) be a receptor, natural ligands can be identified by one of skill in the art in a number of different ways. For example, a two-hybrid technique can be used. Alternatively, high-throughput screening can be used to identify peptides which can act as ligands. Other methods of identifying ligand are known to one of skill in the art.

In one embodiment, the ligand of the therapeutic complex uses a different epitope than the natural ligand of the receptor target protein, so that there is no competition for binding sites.

25 In another embodiment, the ligand is an antibody molecule and preferably the antibody molecule has a higher specificity or binds to the tissue-specific lumenally exposed receptor target protein in such a way that it will not be necessary to compete with the natural ligand.

Antibodies and fragments can be made by standard methods (See, for example, E. Harlow *et al.*, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988). However, the isolation, identification, and molecular construction of antibodies has been developed to such an extent that the choices are almost inexhaustible. Therefore, examples of antibody parts, and complexes will be provided with the understanding that this can only represent a sampling of what is available.

30 In one embodiment, the antibody is a single chain Fv region. Antibody molecules have two generally recognized regions, in each of the heavy and light chains. These regions are the so-called "variable" region which is responsible for binding to the specific antigen in question, and the so-called "constant" region which is responsible for biological effector responses such as complement binding, binding to neutrophils and macrophages, etc. The constant regions are not necessary for

WO 02/100336

PCT/US02/18185

antigen binding. The constant regions have been separated from the antibody molecule, and variable binding regions have been obtained. Therefore, the constant regions are clearly not necessary for the binding action of the antibody molecule when it is acting as the ligand portion of the therapeutic complex.

5 The variable regions of an antibody are composed of a light chain and a heavy chain. Light and heavy chain variable regions have been cloned and expressed in foreign hosts, while maintaining their binding ability. Therefore, it is possible to generate a single chain structure from the multiple chain aggregate (the antibody), such that the single chain structure will retain the three-dimensional architecture of the multiple chain aggregate.

10 Fv fragments which are single polypeptide chain binding proteins having the characteristic binding ability of multi-chain variable regions of antibody molecules, can be used for the ligand of the present invention. These ligands are produced, for example, following the methods of Ladner *et al.*, US 5,260,203, issued November 9, 1993, using a computer based system and method to determine chemical structures. These chemical structures are used for converting two naturally
15 aggregated but chemically separated light and heavy polypeptide chains from an antibody variable region into a single polypeptide chain which will fold into a three dimensional structure very similar to the original structure of the two polypeptide chains. The two regions may be linked using an amino acid sequence as a bridge.

The single polypeptide chain obtained from this method can then be used to prepare a
20 genetic sequence coding therefor. The genetic sequence can then be replicated in appropriate hosts, further linked to control regions, and transformed into expression hosts, wherein it can be expressed. The resulting single polypeptide chain binding protein, upon refolding, has the binding characteristics of the aggregate of the original two (heavy and light) polypeptide chains of the variable region of the antibody.

25 In a further embodiment, the antibodies are multivalent forms of single-chain antigen-binding proteins. Multivalent forms of single-chain antigen-binding proteins have significant utility beyond that of the monovalent single-chain antigen-binding proteins. A multivalent antigen-binding protein has more than one antigen-binding site which results in an enhanced binding affinity. The multivalent antibodies can be produced using the method disclosed in Whitlow *et al.*,
30 U.S. Pat. No. 5,869,620, issued February 9, 1999. The method involves producing a multivalent antigen-binding protein by linking at least two single-chain molecules, each single chain molecule having two binding portions of the variable region of an antibody heavy or light chain linked into a single chain protein. In this way the antibodies can have binding sites for different parts of an antigen or have binding sites for multiple antigens.

35 In one embodiment, the antibody is an oligomer. The oligomer is produced as in PCT/EP97/05897, filed October 24, 1997, by first isolating a specific ligand from a phage-displayed library. Oligomers overcome the problem of the isolation of mostly low affinity ligands

WO 02/100336

PCT/US02/18185

from these libraries, by oligomerizing the low-affinity ligands to produce high affinity oligomers. The oligomers are constructed by producing a fusion protein with the ligand fused to a semi-rigid hinge and a coiled coil domain from Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). When the fusion protein is expressed in a host cell, it self assembles into oligomers.

5 Preferably, the oligomers are peptabodies (Terskikh *et al.*, *Biochemistry* 94:1663-1668 (1997)). Peptabodies can be exemplified as IgM antibodies which are pentameric with each binding site having low-affinity binding, but able to bind in a high affinity manner as a complex. Peptabodies are made using phage-displayed random peptide libraries. A short peptide ligand from the library is fused via a semi-rigid hinge at the N-terminus of the COMP (cartilage oligomeric
10 matrix protein) pentamerization domain. The fusion protein is expressed in bacteria where it assembles into a pentameric antibody which shows high affinity for its target. Depending on the affinity of the ligand, an antibody with very high affinity can be produced.

Preferably the antibody, antibody part or antibody complex of the present invention is derived from humans or is "humanized" (i.e. non-immunogenic in a human) by recombinant or
15 other technology. Such antibodies are the equivalents of the monoclonal and polyclonal antibodies disclosed herein, but are less immunogenic, and are better tolerated by the patient.

Humanized antibodies may be produced, for example, by replacing an immunogenic portion of an antibody with a corresponding, but non-immunogenic portion (i.e. chimeric antibodies) (See, for example, Robinson, *et al.*, PCT Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, European Patent Application No. 184,187; Taniguchi, European Patent Application No. 171,496; Morrison, *et al.*, European Patent Application No. 173,494; Neuberger, *et al.*, International Patent Publication No. WO86/01533; Cabilly, *et al.*, European Patent Application No. 125,023; Better, *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988); Liu, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3433 (1987); Liu, *et al.*, *J. Immunol.* 139:3521-3526 (1987); Sun, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Nishimura, *et al.*, *Canc. Res.* 47:999-1005 (1987); Wood, *et al.*,
25 *Nature* 314:446-449 (1985); Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559 (1988). General reviews of "humanized" chimeric antibodies are provided by Morrison, (*Science*, 229:1202-1207 (1985)) and by Oi, *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986).

Suitable "humanized" antibodies can be alternatively produced by CDR or CEA substitution (Jones, *et al.*, *Nature* 321:552-525 (1986); Verhoeyan *et al.*, *Science* 239:1534 (1988);
30 Bsidler, *et al.*, *J. Immunol.* 141:4053-4060 (1988).

Small molecules are any non-biopolymeric DNA, RNA, organic, or inorganic molecules such as macrocycles, alkene isomers, and many of what is typically thought of as drugs in the pharmaceutical industry. These molecules are often identified through combinatorial processes. In
35 particular, a ligand can be identified using a process called "docking", an approach to rational drug design which seeks to predict the structure and binding free energy of a ligand-receptor complex given only the structures of the free ligand and receptor. Typically, these small molecules are used

WO 02/100336

PCT/US02/18185

to bind to a specific protein and elicit an effect. However, it is envisioned in this context that they would simply be used to bind a specific protein and thus localize the attached drug to the required organs.

LINKERS

5 The "linker" as used herein is any bond, small molecule, or other vehicle which allows the ligand and the therapeutic moiety to be targeted to the same area, tissue, or cell. Preferably, the linker is cleavable.

In one embodiment the linker is a chemical bond between one or more ligands and one or more therapeutic moieties. Thus, the bond may be covalent or ionic. An example of a therapeutic
10 complex where the linker is a chemical bond would be a fusion protein. In one embodiment, the chemical bond is acid sensitive and the pH sensitive bond is cleaved upon going from the blood stream (pH 7.5) to the transcytotic vesicle or the interior of the cell (pH about 6.0). Alternatively, the bond may not be acid sensitive, but may be cleavable by a specific enzyme or chemical which is subsequently added or naturally found in the microenvironment of the targeted site. Alternatively,
15 the bond may be a bond that is cleaved under reducing conditions, for example a disulfide bond. Alternatively, the bond may not be cleavable.

Any kind of acid cleavable or acid sensitive linker may be used. Examples of acid cleavable bonds include, but are not limited to: a class of organic acids known as cis-poly-carboxylic alkenes. This class of molecule contains at least three carboxylic acid groups
20 (COOH) attached to a carbon chain that contains at least one double bond. These molecules as well as how they are made and used is disclosed in Shen, et al. U.S. Patent No. 4,631,190. Alternatively, molecules such as amino-sulfhydryl cross-linking reagents which are cleavable under mildly acidic conditions may be used. These molecules are disclosed in Blattler et al., U.S. Patent No. 4,569,789.

25 Alternatively, the acid cleavable linker may be a time-release bond, such as a biodegradable, hydrolyzable bond. Typical biodegradable carrier bonds include esters, amides or urethane bonds, so that typical carriers are polyesters, polyamides, polyurethanes and other condensation polymers having a molecular weight between about 5,000 and 1,000,000. Examples of these carriers/bonds are shown in Peterson, et al., U.S. Patent No. 4,356,166. Other acid
30 cleavable linkers may be found in U.S. patent Nos. 4,569,789 and 4,631,190 or Blattner et al. in Biochemistry 24: 1517-1524 (1984). The linkers are cleaved by natural acidic conditions, or alternatively, acid conditions can be induced at a target site as explained in Abrams et al., U.S. Patent No. 4,171,563.

Examples of linking reagents which contain cleavable disulfide bonds (reducible bonds)
35 include, but are not limited to "DPDPB", 1,4- di-[3'-(2'-pyridyl)dithio]propionamido]butane; "SADP", (N-succinimidyl(4-azidophenyl)1,3'-dithiopropionate); "Sulfo -SADP" (Sulfosuccinimidyl (4-azidophenyl)dithio)propionate; "DSP" - Dithio bis (succinimidylpropionate);

WO 02/100336

PCT/US02/18185

"DTSSP" - 3,3' - Dithio bis (sulfosuccinimidylpropionate); "DTBP" - dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate - 2 HCl, all available from Pierce Chemicals (Rockford, Illinois).

Examples of linking reagents cleavable by oxidation are "DST" - disuccinimidyl tartarate; and "Sulfo-DST" - disuccinimidyl tartarate. Again, these linkers are available from Pierce Chemicals.

Examples of non-cleavable linkers are "Sulfo-LC-SMPT" - (sulfosuccinimidyl 6-[alpha-methyl-alpha-(2-pyridylthio)toluamido]hexanoate); "SMPT"; "ABH" - Azidobenzoyl hydrazide; "NHS-ASA" - N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid; "SASD" - Sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)ethyl - 1,3-dithiopropionate; "APDP" - N-{4-(p-azidosalicylamido) butyl} - 3'(2'-pyridyl)thio propionamide; "BASED" - Bis-[beta - (4-azidosalicylamido)ethyl] disulfide; "HSAB" - N-hydroxysuccinimidyl - 4 azidobenzoate; "APG" - p-Azidophenyl glyoxal monohydrate; "SANPAH" - N-Succinimidyl - 6(4'-azido-2'-nitrophenyl -amino)hexanoate; "Sulfo - SANPAH" - Sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate; "ANB-NOS" - N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide; "SAND" - Sulfosuccinimidyl-2-(m-azido-o-mitrobenzamido)-ethyl-1,3'- dithiopropionate; "PNP-DTP" - p-nitrophenyl-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionate; "SMCC" - Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane - 1- carboxylate; "Sulfo-SMCC" - Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane - 1- carboxylate; "MBS" - m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester; "sulfo-MBS" - m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester; "SIAB" - N-Succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate; "Sulfo-SIAB" - N-Sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate; "SMPB" - Succinimidyl 4-(p-malenimidophenyl)butyrate; "Sulfo- SMPB" - Sulfosuccinimidyl 4-(p-malenimidophenyl)butyrate; "DSS" - Disuccinimidyl suberate; "BSSS" - bis(sulfosuccinimidyl) suberate; "BMH" - Bis maleimidohexane; "DFDNB" - 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene; "DMA" - dimethyl adipimidate 2 HCl; "DMP" - Dimethyl pimelimidate - 2HCl; "DMS" - dimethyl suberimidate - 2- HCl; "SPDP" - N-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionate; "Sulfo -HSAB" - Sulfosuccinimidyl 4-(p-azidophenyl)butyrate; "Sulfo- SAPB" - Sulfosuccinimidyl 4-(p-azidophenyl)butyrate; "ASIB" - 1-9p-azidosalicylamido)-4-(iodoacetamido)butane; "ASBA" - 4-(p-Azidosalicylamido)butylamine. All of these linkers are available from Pierce Chemicals.

In another embodiment the linker is a small molecule such as a peptide linker. In one embodiment the peptide linker is not cleavable. In a further embodiment the peptide linker is cleavable by base, under reducing conditions, or by a specific enzyme. In one embodiment, the enzyme is indigenous. Alternatively, the small peptide may be cleavable by a non-indigenous enzyme which is administered after or in addition to the therapeutic complex. Alternatively, the small peptide may be cleaved under reducing conditions, for example, when the peptide contains a disulfide bond. Alternatively, the small peptide may be pH sensitive. Examples of peptide linkers include: poly(L-Gly), (Poly L-Glycine linkers); poly(L-Glu), (Poly L-Glutamine linkers); poly(L-Lys), (Poly L-Lysine linkers). In one embodiment, the peptide linker has the formula (amino acid)_n,

WO 02/100336

PCT/US02/18185

where n is an integer between 2 and 100, preferably wherein the peptide comprises a polymer of one or more amino acids.

In a further embodiment, the peptide linker is cleavable by proteinase such as one having the sequence Gly-(D)Phe-Pro-Arg-Gly-Phe-Pro-Ala-Gly-Gly (SEQ ID NO: 1) (Suzuki, *et al.* 1998, J. Biomed. Mater. Res. Oct;42(1):112-6). This embodiment has been shown to be advantageous for the treatment of bacterial infections, particularly *Pseudomonas aeruginosa*. Gentamicin or an alternate antibiotic is cleaved only when the wounds are infected by *Pseudomonas aeruginosa* because there is significantly higher activity of thrombin-like proteinase enzymes than in non-infected tissue.

In a further embodiment the linker is a cleavable linker comprising, poly(ethylene glycol) (PEG) and a dipeptide, L-alanyl-L-valine (Ala-Val), cleavable by the enzyme thermolysin. This linker is advantageous because thermolysin-like enzyme has been reported to be expressed at the site of many tumors. Alternatively, a 12 residue spacer Thr-Arg-His-Arg-Gln-Pro-Arg-Gly-Trp-Glu-Gln-Leu (SEQ ID NO:2) may be used which contains the recognition site for the protease furin (Goyal, *et al.* Biochem. J. 2000 Jan 15;345 Pt 2:247-254).

The chemical and peptide linkers can be bonded between the ligand and the therapeutic moiety by techniques known in the art for conjugate synthesis, i.e. using genetic engineering, or chemically. The conjugate synthesis can be accomplished chemically via the appropriate antibody by classical coupling reactions of proteins to other moieties at appropriate functional groups. Examples of the functional groups present in proteins and utilized normally for chemical coupling reactions are outlined as follows. The carbohydrate structures may be oxidized to aldehyde groups that in turn are reacted with a compound containing the group H₂NNH-R (wherein R is the compound) to the formation of a C=NH-NH-R group. The thiol group (cysteines in proteins) may be reacted with a compound containing a thiol-reactive group to the formation of a thioether group or disulfide group. The free amino group (at the amino terminus of a protein or on a lysine) in amino acid residues may be reacted with a compound containing an electrophilic group, such as an activated carboxy group, to the formation of an amide group. Free carboxy groups in amino acid residues may be transformed to a reactive carboxy group and then reacted with a compound containing an amino group to the formation of an amide group.

The linker may alternatively be a liposome. Many methods for the preparation of liposomes are well known in the art. For example, the reverse phase evaporation method, freeze-thaw methods, extrusion methods, and dehydration-rehydration methods. (see Storm, *et al.* *PSTT* 1:19-31 (1998)).

The liposomes may be produced in a solution containing the therapeutic moiety so that the substance is encapsulated during polymerization. Alternatively, the liposomes can be polymerized first, and the biologically active substance can be added later by resuspending the polymerized liposomes in a solution of a biologically active substance and treating with sonication to affect

WO 02/100336

PCT/US02/18185

encapsulation of the therapeutic moiety. The liposomes can be polymerized in the presence of the ligand such that the ligand becomes a part of the phospholipid bilayer. In one embodiment, the liposome contains the therapeutic moiety on the inside and the ligand on the outside.

The liposomes contemplated in the present invention can comprise a variety of structures.

5 For example, the liposomes can be multilamellar large vesicles (MLV), oligolamellar vesicles (OLV), unilamellar vesicles (UV), small unilamellar vesicles (SUV), medium sized unilamellar vesicles (MUV), large unilamellar vesicles (LUV), giant unilamellar vesicles (GUV), or multivesicular vesicles (MVV). Each of these liposome structures are well known in the art (see Storm, et al. *PSTT* 1:19-31 (1998)).

10 In one embodiment, the liposome is a "micromachine" that evlues pharmaceuticals for example by the application of specific frequency radio waves. In another embodiment, the liposomes can be degraded such that they will release the therapeutic moiety in the targeted cell, for example, the liposomes may be acid or alkaline sensitive, or degraded in the presence of a low or high pH, such that the therapeutic moiety is released within the cell. Alternatively, the liposomes
15 may be uncharged so that they will be taken up by the targeted cell. The liposomes may also be pH sensitive or sensitive to reducing conditions.

One type of liposome which may be advantageously used in the present invention is that identified in Langer *et al.*, US Patent No. 6,004,534, issued December 21, 1999. In this application a method of producing modified liposomes which are prepared by polymerization of double and
20 triple bond-containing monomeric phospholipids is disclosed. These liposomes have surprisingly enhanced stability against the harsh environment of the gastrointestinal tract. Thus, they have utility for oral and/or mucosal delivery of the therapeutic moiety. It has also been shown that the liposomes may be absorbed into the systemic circulation and lymphatic circulation. The liposomes are generally prepared by polymerization (i.e., radical initiation or radiation) of double and triple
25 bond-containing monomeric phospholipids.

In other embodiments of the present invention, the linker can also be a liposome having a long blood circulation time. Such liposomes are well known in the art, (see United States Patent Numbers, 5,013,556; 5,225,212; 5,213,804; 5,356,633; and 5,843,473). Liposomes having long
30 blood circulation time are characterized by having a portion of their phospholipids derivatized with polyethylene glycol (PEG) or other similar polymer. In some embodiments, the end of the PEG molecule distal to the phospholipid may be activated so as to be chemically reactive. Such a reactive PEG molecule can be used to link a ligand to the liposome. One example of a reactive PEG molecule is the malcimide derivative of PEG described in United States Patent Number 5,527,528).

Alternatively, the linker may be a microcapsule, a nanoparticle, a magnetic particle, and the
35 like (Kumar, J. Pharm. Sci., May-Aug 3(2)234-258, 2000; and Gill *et al.*, Trends Biotechnol. Nov;18(11):469-79, 2000), with the lipophilic therapeutic moiety on or in the container, and the container functioning as the linker in the therapeutic complex.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Alternatively, the linker may be a photocleavable linker. For example, a 1-2-(nitrophenyl)-ethyl moiety can be cleaved using 300 to 360 nm light (see Pierce catalog no. 21332ZZ). It can be envisioned that the photocleavable linker would allow activation and action of the drug in an even more specific area, for example a particular part of the organ. The light could be localized using a catheter into the vessel. Alternatively, light may be used to localize treatment to a specific part of the digestive tract and the light may be manipulated through a natural orifice to the area. Alternatively, the light can be surgically manipulated to the area.

Alternatively, the linker may not be cleavable, but the therapeutic moiety or ligand is. An example of this is when the therapeutic moiety is a prodrug and the enzyme which cleaves the prodrug is administered with the therapeutic complex. Alternatively, the enzyme is part of the therapeutic complex or indigenous and the prodrug is administered separately. Preferably, the enzyme or prodrug which is administered separately is administered within about 48 hours of the first administration. Alternatively, the prodrug or enzyme which is administered separately may be administered between about 1 min and 24 hours, alternatively between about 2 min and 8 hours. The prodrug or enzyme which is administered separately, may be readministered at a later date and may continue to be administered until the effect of the drug is no longer needed or until the enzymatic cleavage of all of the drug is effected.

THERAPEUTIC MOIETIES

The "therapeutic moiety" could be any chemical, molecule, or complex which effects a desired result. Examples include but are not limited to: conventional pharmaceutical agents such as antibiotics, anti-neoplastic agents, immunosuppressive agents, hormones, and the like, one or more genes, antisense oligonucleotides, contrast agents, proteins, toxins, radioactive molecules or atoms, surfactant proteins, or clotting proteins. The therapeutic moiety may be lipophilic, a quality which will help it enter the targeted cell.

The contrast agents may be any type of contrast agent known to one of skill in the art. The most common contrast agents basically fall into one of four groups; X-ray reagents, radiography reagents, magnetic resonance imaging agents, and ultrasound agents. The X-ray reagents include ionic, iodine-containing reagents as well as non-ionic agents such as Omnipaque (Nycomed) and Ultravist (Schering). Radiographic agents include radioisotopes as disclosed below. Magnetic Resonance Imaging reagents include magnetic agents such as Gadolinium and iron-oxide chelates. Ultrasound agents include microbubbles of gas and a number of bubble-releasing formulations.

The radionuclides may be diagnostic or therapeutic. Examples of radionuclides that are generally medically useful include: Y, Ln, Cu, Lu, Tc, Re, Co, Fe and the like such as ⁸⁶Y, ¹¹¹Ln, ⁶⁷Cu, ⁷⁷Lu, ^{99m}Tc and the like, preferably trivalent cations, such as ⁹⁰Y and ¹¹¹Ln.

Radionuclides that are suitable for imaging organs and tissues *in vivo* via diagnostic gamma scintillation photometry include the following: γ -emitting radionuclides: ¹¹¹Ln, ^{113m}Ln, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga,

WO 02/100336

PCT/US02/18185

^{99m}Tc, ⁵¹Cr, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Hg, ¹⁶⁶Yb, ⁸⁵Sr, and ⁸⁷Sr. The preparation of chelated radionuclides that are suitable for binding by Fab' fragments is taught in U.S. Pat. No. 4,658,839 (Nicoletti *et al.*).

Paramagnetic metal ions, suitable for use as imaging agents in MRI include the lanthanide elements of atomic number 57-70, or the transition metals of atomic numbers 21-29, 42 or 44. U.S. Pat. No. 4,647,447 (Gries *et al.*) teaches MRI imaging via chelated paramagnetic metal ions.

Examples of therapeutic radionuclides are the β^- emitters. Suitable β^- emitters include ⁶⁷Cu, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh, ¹⁸⁹Rh, ¹⁵³Sm, ⁹⁰Y, and ¹¹¹Ln.

Antisense oligonucleotides have a potential use in the treatment of any disease caused by overexpression of a normal gene, or expression of an aberrant gene. Antisense oligonucleotides can be used to reduce or stop expression of that gene. Examples of oncogenes which can be treated with antisense technology and references which teach specific antisense molecules which can be used include: c-Jun and cFos (U.S. Patent No. 5,985,558); HER-2 (U.S. Patent No. 5,968,748) E2F-1 (Popoff, *et al.* U.S. Patent No. 6,187,587), SMAD 1-7 (U.S. Patent Nos. 6,159,697; 6,013,788; 6,013,787; 6,013,522; and 6,037,142), and Fas (Dean *et al.* U.S. Patent No. 6,204,055).

Proteins which may be used as therapeutic agents include apoptosis inducing agents such as pRB and p53 which induce apoptosis when present in a cell (Xu *et al.* U.S. Patent No. 5,912,236), and proteins which are deleted or underexpressed in disease such as erythropoietin (Sytkowski, *et al.* U.S. Patent No. 6,048,971).

It can be envisioned that the therapeutic moiety can be any chemotherapeutic agent for neoplastic diseases such as alkylating agents (nitrogen mustards, ethylenimines, alkyl sulfonates, nitrosoureas, and triazines), antimetabolites (folic acid analogs such as methotrexate, pyrimidine analogs, and purine analogs), natural products and their derivatives (antibiotics, alkaloids, enzymes), hormones and antagonists (adrenocorticosteroids, progestins, estrogens), and the like. Alternatively, the therapeutic moiety can be an antisense oligonucleotide which acts as an anti-neoplastic agent, or a protein which activates apoptosis in a neoplastic cell.

The therapeutic moiety can be any type of neuroeffector, for example, neurotransmitters or neurotransmitter antagonists may be targeted to an area where they are needed without the wide variety of side effects commonly experienced with their use.

The therapeutic moiety can be an anesthetic such as an opioid, which can be targeted specifically to the area of pain. Side effects, such as nausea, are commonly experienced by patients using opioid pain relievers. The method of the present invention would allow the very specific localization of the drug to the area where it is needed, such as a surgical wound or joints in the case of arthritis, which may reduce the side effects.

The therapeutic moiety can be an anti-inflammatory agent such as histamine, H₁-receptor antagonists, and bradykinin. Alternatively, the anti-inflammatory agent can be a non-steroidal anti-inflammatory such as salicylic acid derivatives, indole and indene acetic acids, and alkanones. Alternatively, the anti-inflammatory agent can be one for the treatment of asthma such as

WO 02/100336

PCT/US02/18185

corticosteroids, cromolyn sodium, and nedocromil. The anti-inflammatory agent can be administered with or without the bronchodilators such as B₂-selective adrenergic drugs and theophylline.

5 The therapeutic moiety can be a diuretic, a vasopressin agonist or antagonist, angiotensin, or renin which specifically effect a patient's blood pressure.

The therapeutic moiety can be any pharmaceutical used for the treatment of heart disease. Such pharmaceuticals include, but are not limited to, organic nitrites (amyl nitrites, nitroglycerin, isosorbide dinitrate), calcium channel blockers, antiplatelet and antithrombotic agents, vasodilators, vasoconstrictors, anti-digitalis antibodies, and nodal blockers.

10 The therapeutic moiety can be any pharmaceutical used for the treatment of protozoan infections such as tetracycline, clindamycin, quinines, chloroquine, mefloquine, trimethoprim-sulfamethoxazole, metronidazole, and oramin. The ability to target pharmaceuticals or other therapeutics to the area of the protozoal infection is of particular value due to the very common and severe side effects experienced with these antibiotic pharmaceuticals.

15 The therapeutic moiety can be any anti-bacterial such as sulfonamides, quinolones, penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, isoniazids and rifampin.

The therapeutic moiety can be any pharmaceutical agent used for the treatment of fungal infections such as amphotericins, flucytosine, miconazole, and fluconazole.

20 The therapeutic moiety can be any pharmaceutical agent used for the treatment of viral infections such as acyclovir, vidarabine, interferons, ribavirin, zidovudine, zalcitabine, reverse transcriptase inhibitors, and protease inhibitors. It can also be envisioned that virally infected cells can be targeted and killed using other therapeutic moieties, such as toxins, radioactive atoms, and apoptosis-inducing agents.

25 The therapeutic moiety can be chosen from a variety of anticoagulant, anti-thrombolytic, and anti-platelet pharmaceuticals.

It can be envisioned that diseases resulting from an over- or under-production of hormones can be treated using such therapeutic moieties as hormones (growth hormone, androgens, estrogens, gonadotropin-releasing hormone, thyroid hormones, adrenocortical steroids, insulin, and glucagon).

30 Alternatively, if the hormone is over-produced, antagonists or antibodies to the hormones may be used as the therapeutic moiety.

Various other possible therapeutic moieties include vitamins, enzymes, and other under-produced cellular components and toxins such as diphtheria toxin or botulism toxin.

35 Alternatively, the therapeutic moiety may be one that is typically used in *in vitro* diagnostics. Thus, the ligand and linker are labeled by conventional methods to form all or part of a signal generating system. The ligand and linker can be covalently bound to radioisotopes such as tritium, carbon 14, phosphorous 32, iodine 125 and iodine 131 by methods well known in the art.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

For example, ^{125}I can be introduced by procedures such as the chloramine-T procedure, enzymatically by the lactoperoxidase procedure or by the pre-labeled Bolton-Hunter technique. These techniques plus others are discussed in H. Van Vunakis and J.J. Langone, Editors, *Methods in Enzymology*, Vol. 70, Part A, 1980. See also U.S. Patent No. 3,646,346, issued February 29, 1972, and Edwards *et al.*, U.S. Patent No. 4,062,733, issued December 13, 1977, respectively, for further examples of radioactive labels.

Therapeutic moieties also include chromogenic labels, which are those compounds that absorb light in the visible ultraviolet wavelengths. Such compounds are usually dyestuffs and include quinoline dyes, triarylmethane dyes, phthaleins, insect dyes, azo dyes, anthraquinoid dyes, cyanine dyes, and phenazoxonium dyes.

Fluorogenic compounds can also be therapeutic moieties and include those which emit light in the ultraviolet or visible wavelength subsequent to irradiation by light. The fluorogens can be employed by themselves or with quencher molecules. The primary fluorogens are those of the rhodamine, fluorescein and umbelliferone families. The method of conjugation and use for these and other fluorogens can be found in the art. See, for example, J.J. Langone, H. Van Vunakis *et al.*, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, Part C, 1981, especially at page 3 through 105. For a representative listing of other suitable fluorogens, see Tom *et al.*, U.S. Patent No. 4,366,241, issued December 28, 1982, especially at column 28 and 29. For further examples, see also U.S. Patent No. 3,996,345.

These non-enzymatic signal systems are adequate therapeutic moieties for the present invention. However, those skilled in the art will recognize that an enzyme-catalyzed signal system is in general more sensitive than a non-enzymatic system. Thus, for the instant invention, catalytic labels are the more sensitive non-radioactive labels.

Catalytic labels include those known in the art and include single and dual ("channeled") enzymes such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, luciferase, β -galactosidase, glucose oxidase (lysozyme, malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase) and the like. Examples of dual ("channeled") catalytic systems include alkaline phosphatase and glucose oxidase using glucose-6-phosphate as the initial substrate. A second example of such a dual catalytic system is illustrated by the oxidation of glucose to hydrogen peroxide by glucose oxidase, which hydrogen peroxide would react with a leuco dye to produce a signal generator. (A further discussion of catalytic systems can be found in Tom *et al.*, U.S. Patent No. 4,366,241, issued December 28, 1982 (see especially columns 27 through 40). Also, see Weng *et al.*, U.S. Patent No. 4,740,468, issued April 26, 1988, especially at columns 2 and columns 6, 7 and 8.

The procedures for incorporating enzymes into the instant therapeutic complexes are well known in the art. Reagents used for this procedure include glutaraldehyde, p-toluene diisocyanate, various carbodiimide reagents, p-benzoquinone m-periodate, N,N'-o-phenylenedimaleimide and the like (see, for example, J.H. Kennedy *et al.*, *Clin. Chim Acta* 70, 1 (1976)). As another aspect of the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

invention, any of the above devices and formats may be provided in a kit in packaged combination with predetermined amounts of reagents for use in assaying for a tissue-specific endothelial protein.

Chemiluminescent labels are also applicable as therapeutic moieties. See, for example, the labels listed in C.L. Maier, U.S. Patent No. 4,104,029, issued August 1, 1978.

5 The substrates for the catalytic systems discussed above include simple chromogens and fluorogens such as para-nitrophenyl phosphate (PNPP), β -D-glucose (plus possibly a suitable redox dye), homovanillic acid, o-dianisidine, bromocresol purple powder, 4-alkyl-umbelliferone, luminol, para-dimethylaminolophine, paramethoxylophine, AMPPD, and the like.

10 Depending on the nature of the label and catalytic signal producing system, one would observe the signal by irradiating with light and observing the level of fluorescence; providing for a catalyst system to produce a dye, fluorescence, or chemiluminescence, where the dye could be observed visually or in a spectrophotometer and the fluorescence could be observed visually or in a fluorimeter; or in the case of chemiluminescence or a radioactive label, by employing a radiation counter. Where the appropriate equipment is not available, it will normally be desirable to have a chromophore produced which results in a visible color. Where sophisticated equipment is involved,
15 any of the techniques are applicable.

Alternatively, the therapeutic moiety can be a prodrug or a promolecule which is converted into the corresponding pharmaceutical agent by a change in the chemical environment or by the action of a discrete molecular agent, such as an enzyme. Preferably, the therapeutic moiety is
20 administered with the specific molecule needed for conversion of the promolecule. Alternatively, the promolecule can be cleaved by a natural molecule found in the microenvironment of the target tissue. Alternatively, the prodrug is pH sensitive and converted upon change in environment from the blood to the cell or vesicle (Greco *et al.*, J. Cell. Physiol. 187:22-36, 2001).

USES OF THE THERAPEUTIC COMPLEXES

25 The therapeutic complex may be used to treat or diagnose any disease for which a tissue- or organ-specific treatment would be efficacious. Examples of such tissues and diseases follow:

In one embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the brain. Examples of such diseases include but are not limited to: bacterial infections, viral infections, fungal and parasitic infections, epilepsy, schizophrenia, bipolar
30 disorder, neurosis, depression, brain cancer, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and other forms of dementia, prion-related diseases, stroke, migraine, ataxia, multiple sclerosis, meningitis, brain abscess, and Wernicke's disease or other metabolic disorders.

In a further embodiment, the therapeutic complex may be used to treat diseases which affect the lungs. Examples of such diseases include but are not limited to: bacterial infections (i.e. *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*), viral infections (i.e. Hantavirus), fungal and parasitic infections (i.e. *Pneumocystis carinii*), asthma, lung cancer, emphysema, lung transplant rejection, cystic fibrosis, pulmonary hypertension, pulmonary thromboembolism, and pulmonary edema.
35

WO 02/100336

PCT/US02/18185

In a further embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the pancreas. Examples of such diseases include but are not limited to: parasitic infections, pancreatic cancer, chronic pancreatitis, and pancreatic insufficiency, endocrine tumors, and diabetes.

5 In one embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the kidney. Examples of such diseases include but are not limited to: bacterial infections, viral infections, fungal and parasitic infections, polycystic kidney disease, kidney transplant rejection, edema, hypertension, hypervolemia, bladder and renal cell cancer and uremic syndrome.

10 In one embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the muscles. Examples of such diseases include but are not limited to: muscular dystrophy, polymyositis, arthritic diseases, rhabdomyosarcoma, polymyositis, disorders of glycogen storage, and soft tissue sarcomas.

15 In one embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the gut or intestine. Examples of such diseases include but are not limited to: dysentery, gastroenteritis, irritable bowel disease, diverticulosis/diverticulitis, peptic ulcer, cryptosporidiosis, giardiasis, inflammatory bowel disease, colorectal cancer, and tumors of the small intestine.

20 In one embodiment, the therapeutic complex may be used to treat or alleviate the symptoms of diseases which affect the prostate. Examples of such diseases include but are not limited to: hyperplasia of the prostate, prostate cancer, and infections of the prostate.

In a further embodiment, the therapeutic complex may be used as a diagnostic of disease or tissue type or to quantify or identify the tissue-specific lumenally expressed protein.

25 The cells bearing target proteins interact with the therapeutic complex in two general ways, by transcytosis or passive diffusion. These interactions allow the therapeutic complex to interact directly with the vascular endothelial cell bearing the target protein, become enmeshed in the endothelial matrix containing said endothelial cell, or cross through the endothelial matrix into the encapsulated tissue or organ.

30 Transcytosis occurs when, after attachment of the complex with the target protein on the endothelial cell, the therapeutic complex is transcytosed across the vasculature into the endothelial matrix tissue or endothelial cell of choice. Preferably, the binding of the ligand to the target protein will stimulate the transport of the therapeutic complex across the endothelium within a transcytotic vesicle. During transcytosis, the conditions within the microenvironment of the vesicle are more highly acidic and can be used to selectively cleave the therapeutic moiety. For this to happen, 35 preferably, the linker should be pH sensitive, so as to be cleaved due to the change in pH upon going from the blood stream (pH 7.5) to transcytotic vesicles or the interior of the cell (pH 6.0) such

WO 02/100336

PCT/US02/18185

as the acid sensitive linkers disclosed. Alternatively, a separate linker may not be necessary when the bond between the ligand and the therapeutic moiety is itself acid sensitive.

In passive diffusion, the ligand in the complex may attach to the exterior cell membrane, following which there is release of the therapeutic moiety which crosses into the endothelial cell or tissue by passive means, but there is no entry of the entire therapeutic complex into the cell. Preferably, the therapeutic agent is released in high concentrations in microproximity to the endothelium within the specific target tissue. These higher concentrations are expected to result in relatively greater concentrations of the drug reaching the target tissue versus systemic tissues.

The therapeutic complexes may be taken up by the cell and stay within the cell or cellular matrix or may cross into the organs and become diffuse within the organ.

The therapeutic complexes of the present invention advantageously bind to a target protein on a specific tissue, organ or cell and can be used for a number of desired outcomes. In one embodiment, the therapeutic complexes are used to keep toxic substances in a specific environment, allowing for a more specific targeting of a therapeutic moiety to that environment and preventing systemic effects of the therapeutic moiety. In addition, a lower concentration of the substance would be needed for the same effect.

In a further embodiment, the therapeutic complex is used to keep substances from getting into tissues. The therapeutic moiety might be used to block receptors, that if activated, would cause further harm to the surrounding tissue.

In a further embodiment the therapeutic complex is used to replace a substance, such as a surfactant protein, or a hormone which is in some way dysfunctional or absent from a specific tissue.

PRODRUGS

The concept of prodrugs are well known in the art and are used herein in a similar manner. The instant prodrugs possess different pharmaceutical characteristics before and after their conversion from prodrug to the corresponding pharmaceutical agent. The therapeutic complexes of the present invention may advantageously incorporate the use of a prodrug in two ways. The therapeutic complexes may have a prodrug attached as a therapeutic moiety which can be converted either by the subsequent injection of a non-indigenous enzyme, or by an enzyme found in the tissue of choice. Alternatively, the therapeutic moiety may be the enzyme which is needed to convert the prodrug. For example, the enzyme β -lactamase may be a part of the therapeutic complex and the prodrug (i.e., doxocillin) is subsequently added and, because the β -lactamase is only found in the targeted tissue, the doxocillin is only unmasked in that area. Unfortunately, neoplastic tissues usually share the enzyme repertoire of normal tissues, making the use of an indigenous enzyme less desirable. However, it can be envisioned that diseased tissues, particularly those diseased by pathogens, may be producing an enzyme specific to the pathogen which is infecting the tissue and this could be used to design an effective prodrug treatment which would be very specific to the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

infected tissue. For example, a prodrug which is converted by a viral enzyme (i.e., HBV) could be used with a liver-specific antiviral therapeutic complex to get very specific antiviral effect because the prodrug would only be converted in the microenvironment containing the virus.

Therefore, in one embodiment, a "ligand-enzyme" therapeutic complex is used in combination with the unattached prodrug. The prodrug is cleaved by an enzyme and enters the cell. Preferably, the prodrug is hydrophilic, blocking its access into endothelial cells, while the (cleaved) drug is lipophilic, enhancing its ability to enter cells. Alternatively, a "ligand-prodrug" is used as the therapeutic complex in combination with the administration of an unattached non-indigenous enzyme or an indigenous enzyme. The prodrug is cleaved by the enzyme, thus, separated from the therapeutic wherein its lipophilic qualities allow it to enter the cell.

Two of the advantages of the prodrug approach include bystander killing and amplification. One problem with the previous use of antibodies or immunoconjugates in the treatment of cancer was that they were inefficiently taken up by the cells and poorly localized. However, when using a prodrug treatment, because a single molecule of enzyme can convert more than one prodrug molecule the chance of uptake is increased or amplified considerably. In addition, as the active drug diffuses throughout the tumor, it provides a bystander effect, killing or otherwise effecting the therapeutic action on antigen-negative, abnormal cells. Although this bystander effect may also effect normal cells, they will only be those in the direct vicinity of the tumor or diseased organ.

A number of prodrugs have been widely used for cancer therapy and are presented below as examples of prodrugs which can be used in the present invention (Greco *et al.*, J. Cell. Phys. 187:22-36, 2001; and Konstantinos *et al.*, Anticancer Research 19:605-614, 1999). However, it is to be understood that these are some of many examples of this embodiment of the invention.

The most well-studied enzyme/prodrug combination is *Herpes simplex* virus thymidine kinase (HSV TK) with the nucleotide analog GCV. GCV and related agents are poor substrates for the mammalian nucleoside monophosphate kinase, but can be converted (1000 fold more) efficiently to the monophosphate by TK from HSV 1. Subsequent reactions catalyzed by cellular enzymes lead to a number of toxic metabolites, the most active ones being the triphosphates. GCV-triphosphate competes with deoxyguanosine triphosphate for incorporation into elongating DNA during cell division, causing inhibition of the DNA polymerase and single strand breaks.

The system consisting of cytosine deaminase and 5-fluorocytosine (CD and 5-FC respectively) is similarly based on the production of a toxic nucleotide analog. The enzyme CD, found in certain bacteria and fungi but not in mammalian cells, catalyses the hydrolytic deamination of cytosine to uracil. It can therefore convert the non-toxic prodrug 5-FC to 5-fluorouracil (5-FU), which is then transformed by cellular enzymes to potent pyrimidine antimetabolites (5-FdUMP, 5-FdUTP, and 5-FUTP). Three pathways are involved in the induced cell death: thymidylate synthase inhibition, formation of (5-FU) RNA and of (5-FU) DNA complexes.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

The mustard prodrug CB1954 [5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide] is a weak monofunctional alkylator, but it can be efficiently activated by the rodent enzyme DT diaphorase into a potent DNA cross-linking agent. However, the human enzyme DT diaphorase shows a low reactivity with the prodrug, causing side effects. This problem was overcome when the *E. coli* enzyme nitroreductase (NTR) was found to reduce the CB1954 prodrug 90 times faster than the rodent DT diaphorase. The prodrug was converted to an alkylating agent which forms poorly repairable DNA crosslinks.

The oxazaphosphorine prodrug cyclophosphamide (CP) is activated by liver cytochrome P450 metabolism via a 4-hydroxylation reaction. The 4-hydroxy intermediate breaks down to form the bifunctional alkylating toxin phosphoramidate mustard, which leads to DNA cross-links, G₂-M arrest and apoptosis in a cycle-independent fashion.

In the enzyme/prodrug systems described so far the prodrug is converted to an intermediate metabolite, which requires further catalysis by cellular enzymes to form the active drug. The decreased expression of or total lack of these enzymes in the target cells would lead to tumor resistance. The bacterial enzyme carboxypeptidase G2 (CPG2), which has no human analog, is able to cleave the glutamic acid moiety from the prodrug 4-[2-chloroethyl](2-mesyloxyethyl)amino]benzoic acid without further catalytic requirements.

The reaction between the plant enzyme horseradish peroxidase (HRP) and the non-toxic plant hormone indole-3-acetic acid (IAA) has been analyzed in depth, but not yet completely elucidated. At neutral pH, IAA is oxidized by HRP-compound I to a radical cation, which undergoes scission of the exocyclic carbon-carbon bond to yield the carbon-centered skatolyl radical. In the presence of oxygen, the skatolyl radical rapidly forms a peroxy radical, which then decays to a number of products, the major ones being indole-3-carbinol, oxindole-3-carbinol and 3-methylene-2-oxindole. In anoxic solution, decarboxylation of the radical cation can still take place and the carbon-centered radical preferentially reacts with hydrogen donors.

As can readily be seen, the prodrug/enzyme systems advantageously use an enzyme which is not produced by human cells to provide specificity. However, it can readily be seen by one of skill in the art that a human enzyme which is specifically produced in a particular organ or cell type could also be used to achieve this specificity, with the advantage that it would not be immunogenic.

Finally, heterogeneity could be circumvented by the application of a "cocktail" of conjugates constructed with the same enzyme and a variety of antibodies directed against different organ-associated antigens or different antigenic determinants of the same antigen.

ADMINISTRATION OF THE THERAPEUTIC COMPLEXES

The therapeutic complexes of the present invention are said to be "substantially free of natural contaminants" if preparations which contain them are substantially free of materials with which these products are normally and naturally found.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

The therapeutic complexes include antibodies, and biologically active fragments thereof, (whether polyclonal or monoclonal) which are capable of binding to tissue-specific lumenally-expressed molecules. Antibodies may be produced either by an animal, or by tissue culture, or recombinant DNA means.

5 In providing a patient with the therapeutic complex, or when providing the therapeutic complex to a recipient patient, the dosage of administered agent will vary depending upon such factors as the patient's age, weight, height, sex, general medical condition, previous medical history, and the like. In addition, the dosage will vary depending on the therapeutic moiety and the desired effect of the therapeutic complex. As discussed below, the therapeutically effective dose
10 can be lowered if the therapeutic complex is administered in combination with a second therapy or additional therapeutic complexes. As used herein, one compound is said to be additionally administered with a second compound when the administration of the two compounds is in such proximity of time that both compounds can be detected at the same time in the patient's serum.

The therapeutic complex may be injected via arteries, arterioles, capillaries, sinuses,
15 lymphatic ducts, epithelial cell perfusable spaces or the like. When administering the therapeutic complex by injection, the administration may be by continuous infusion, or by single or multiple boluses.

The therapeutic complex may be administered either alone or in combination with one or more additional immunosuppressive agents (especially to a recipient of an organ or tissue
20 transplant), antibiotic agents, chemotherapeutic agents, or other pharmaceutical agents, depending on the therapeutic result which is desired. The administration of such compound(s) may be for either a "prophylactic" or a "therapeutic" purpose.

A composition is said to be "pharmacologically acceptable" if its administration can be tolerated by a recipient patient. Such an agent is said to be administered in a "therapeutically
25 effective amount" if the amount administered is physiologically significant. A typical range is 0.1 µg to 500 mg/kg of therapeutic complex per the amount of the patients weight. One or multiple doses of the therapeutic complex may be given over a period of hours, days, weeks, or months as the conditions suggest. An agent is physiologically significant if its presence results in a detectable change in the physiology of a recipient patient. The term "pharmaceutically effective amount"
30 refers to an amount effective in treating or ameliorating an IL-1 mediated disease in a patient. The term "pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant, or excipient" refers to a non-toxic carrier, adjuvant, or excipient that may be administered to a patient, together with a compound of the preferred embodiment, and which does not destroy the pharmacological activity thereof. The term "pharmaceutically acceptable derivative" means any pharmaceutically acceptable salt, ester, or salt
35 of such ester, of a compound of the preferred embodiments or any other compound which, upon administration to a recipient, is capable of providing (directly or indirectly) a compound of the preferred embodiment. Pharmaceutical compositions of this invention comprise any of the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

compounds of the present invention, and pharmaceutically acceptable salts thereof, with any acceptable carrier, adjuvant, excipient, or vehicle.

The therapeutic complex of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby these materials, or their functional derivatives, are combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Suitable vehicles and their formulation, inclusive of other human proteins, e.g., human serum albumin, are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Gennaro, Ed., Mack, Easton Pa. (1990)). In order to form a pharmaceutically acceptable composition suitable for effective administration, such compositions will contain an effective amount of the therapeutic complex, together with a suitable amount of carrier vehicle.

Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action. Controlled release preparations may be achieved through the use of polymers to complex or absorb the therapeutic complex. Alternatively, it is possible to entrap the therapeutic complex in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, or in colloidal drug delivery systems, for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles, and nanocapsules or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences (1990).

A number of embodiments have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications may be made without departing from the spirit and scope of the invention. For example, a variety of cleavable chemical moieties, surface molecules, and therapeutic moieties can be used in the instant methods. Accordingly, other embodiments are within the scope of the invention.

Having now generally described the invention, the following examples are offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

EXAMPLES

The following tissue-specific molecules were identified and isolated using the method of Roben *et al.*, U.S. Patent No. 09/528,742, filed March 20, 2000. The method used a cell membrane impermeable reagent which nonspecifically binds to luminal molecules via a chemical reaction. The reagent comprised a first reactive domain which binds to the molecules in the lumen nonspecifically and a second biotin-comprising domain, linked by a cleavable chemical moiety that will not cleave under *in vivo* conditions, but can be induced to cleave under defined conditions. The binding reagent was injected via arteries, arterioles, capillaries, sinuses, lymphatic ducts, epithelial line perfusable spaces or the like. The reagent bound to the lumen specific molecules. The tissue or organ was homogenized, and cell debris removed. All of the molecules which bound the reagent were isolated from the organ using affinity chromatography which bound the biotin-comprising domain (i.e., a streptavidin bead). Then, the lumen-exposed molecules which were

WO 02/100336

PCT/US02/18185

"tagged" with the reagent were eluted by cleaving the reagent under "mild conditions" (mild reducing, non-denaturing conditions). Thus, the tissue-specific molecules were eluted and purified on PAGE. An organ specific molecule was identified as such and isolated from the PAGE and partially sequenced to determine its identity. Then histology, Western blots and/or *in vivo* localizations were performed to confirm the tissue specificity of the isolated polypeptide.

In Example 1, an endothelial specific protein was identified as such and an antibody specific to the protein was used to show that when injected into the tail vein of a rat, the antibody would specifically bind to brain. Example 1 shows that an antibody to a tissue-specific endothelial protein can be used to target a specific organ and that that antibody can be coupled to a therapeutic moiety and will direct that therapeutic moiety to the specific organ, where it can exert its effect.

EXAMPLE 1

Localization of the Therapeutic Moiety to TissueUsing a Brain-Specific, Luminally Expressed Protein, CD71

CD71, or transferrin receptor, is known to be exposed on the luminal surface of the endothelium in only one tissue: the brain. This molecule was found to exist only in the brain preparation and not in any other tissues using the instant methods, confirming the ability of the method to identify tissue specific endothelial proteins.

To demonstrate the ability to use the tissue-specific endothelial expression of a protein to selectively deliver an agent to a particular tissue, an antibody to the rat CD71 was used (BD Pharmingen, San Diego, CA, catalog number 22191). CD71 is a luminally exposed endothelial protein specific to the brain. The rat amino acid and nucleotide sequences are Genbank Accession Nos. AAA42273 and M58040 (SEQ ID NOs:26 and 27), the human amino acid and nucleotide sequences are Genbank Accession Nos. AAH01188 and BC001188 (SEQ ID NOs:28 and 29). The antibody was injected into the tail vein of a rat. Another antibody with a similar isotype but different specificity was injected into another rat as a control. The antibody used as an isotype control was an anti-albumin antibody (IgG2) that was produced by Target Protein Technologies. After 30 minutes, the rats were sacrificed and tissue sections were made from a number of organs from each rat. Each tissue was then analyzed by immunohistochemistry for the presence of the antibodies. Figures 2A-D show the immunohistochemistry of tissue sections from a rat which was injected with either CD71 or a control antibody. Figure 2A is brain from a rat injected with CD71, Figure 2B is brain from a rat injected with the control antibody, Figure 2C is lung from a rat injected with CD71, Figure 2D is lung from a rat injected with the control antibody. These results demonstrate that the anti-CD71 antibody localized to the capillaries of the brain, and to no other tissue. This is particularly advantageous in that it is often difficult to find therapeutics which can cross the blood-brain barrier.

In a follow-up experiment, a toxin was coupled to the anti-CD71 antibody. The toxin used was the Ricin A chain (Sigma, Catalog number L9514). This was coupled to the antibody by

WO 02/100336

PCT/US02/18185

adding a biotin with a disulfide-containing linker (Pierce, catalog number 21331) to both the ricin and the antibody. The two were then coupled by the addition of Nuetravidin (Pierce, catalog number 31000) which bound both biotins, thus forming a complex of the ricin and antibody. The *in vivo* localization experiment was repeated using the toxin-antibody complex. In this case, the antibody not only facilitated the localization of the toxin to the vasculature of the brain, but presumably also its entry into the tissue via transeytosis. Once in the tissue, the toxin elicited an inflammatory response in the brain, a reaction typically seen for any toxin introduced into the brain. No inflammatory response was seen in any other sectioned tissue.

A human CD71-specific antibody is available from BD Pharmingen and usable for the production of a human therapeutic complex.

In Examples 2-6, a number of other tissue-specific lumenally expressed proteins were identified and used to produce therapeutic complexes.

EXAMPLE 2

Identification and Sequencing of Rat Dipeptidyl peptidase IV

The luminal proteins of the vasculature of an entire rat were labeled with biotin. Then the organs were removed individually and the labeled proteins were isolated as described in Roben *et al.*, U.S. Patent No. 09/528,742, filed March 20, 2000. The labeled proteins that were isolated from the homogenized lung were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and a protein (labeled DPP-4) which was specific to lung and kidney (Figure 3), but predominately lung was identified. A peptide was sequenced corresponding to the sequence, FRPAE (SEQ ID NO:3) and the protein was identified as rat liver dipeptidyl peptidase IV, Genbank Accession Number P14740 (nucleotide sequence Genbank Accession Number NM_012789). The full-length protein sequence corresponds to SEQ ID NO:4 and the nucleotide sequence is SEQ ID NO:5. The protein sequence is encoded by nucleotides 89-2392 of NM_012789. The human sequences correspond to SEQ ID NOS:6 and 7. Genbank Accession Number NM_001935 is SEQ ID NO:6 and the coding region of the mRNA is from nt 76 to 2376 (SEQ ID NO:7). Previous studies suggest that the rat liver dipeptidyl peptidase IV has a membrane anchoring region consisting of its amino terminus. (Ogata *et al.*, *J. Biol Chem* 264(6):3596-601 (1989)). A monoclonal antibody specific to rat dipeptidyl peptidase IV (BD Pharmingen, San Diego, CA Catalog number 22811) was injected into the tail vein of a rat (about 0.1 to 100 mg/ml). The tissue from various organs was treated using immunohistochemistry and the antibody to DPP-4 was shown to localize to lung and kidney (see Figure 4). In Figure 4 panel a. kidney, panel b. liver, panel c. lung, panel d. heart, panel e. pancreas, and panel f. colon.

An antibody to human DPP-4 is available for use in producing the therapeutic complex of the invention (BD Pharmingen, San Diego, CA).

WO 02/100336

PCT/US02/18185

EXAMPLE 3

Identification and Sequencing of Carbonic Anhydrase IV

The luminal proteins of the vasculature of an entire rat were labeled with biotin. Then the organs were removed individually and the labeled proteins were isolated as described in Roben *et al.*, U.S. Patent No. 09/528,742, filed March 20, 2000. The labeled proteins that were isolated from the homogenized lung were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis showed a protein (labeled CA-4) which was subsequently shown to be specific to lung and heart (Figure 5). A peptide was sequenced corresponding to the sequence, DSHWCYEIQ (SEQ ID NO: 8) and identified as rat Carbonic Anhydrase IV, Genbank Accession Number NM_019174. The full-length protein sequence corresponds to SEQ ID NO: 9 and the nucleotide sequence is SEQ ID NO:10. The human sequence corresponds to SEQ ID NOS: 11 and 12, Genbank Accession Number NM_000717. Previous studies suggest that carbonic anhydrase IV shows developmental regulation and cell-specific expression in the capillary endothelium (Fleming *et al.*, *Am J. Physiol.*, (1993) 265 (6 Pt 1):L627-35).

15

EXAMPLE 4

Identification and Sequencing of Zymogen Granule 16 Protein (ZG16-p)

The luminal proteins of the vasculature of an entire rat were labeled with biotin. Then the organs were removed individually and the labeled proteins were isolated as described in Roben *et al.*, U.S. Patent No. 09/528,742, filed March 20, 2000. The labeled proteins that were isolated from the homogenized pancreas were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and a protein (labeled ZG16P) which was subsequently shown to be specific to pancreas and gut (see Figure 6), but predominately pancreas was identified. The peptide was sequenced and the sequence NSIQSRSSSY, SEQ ID NO:13 was obtained and identified as rat ZG16-p, Genbank Accession Number Z30584. The full-length protein sequence corresponds to SEQ ID NO:14 and the nucleotide sequence is SEQ ID NO:15. The human sequence corresponds to SEQ ID NOS:16 and 17, Genbank accession No. AF264625. Previous studies suggest that ZG16-p is located in zymogen granules of rat pancreas and goblet cells of the gut. (Cronshagen and Kern, *Eur J. Cell Biology* 65: 366-377, 1994).

20

25

EXAMPLE 5

Identification and Sequencing of Rat MAdCAM

A monoclonal antibody was purchased from BD Pharmingen (catalog number 22861) and about 0.1 to 100 mg/ml were injected into the tail vein of a rat. The tissue from various organs was treated using immunohistochemistry and the antibody to MAdCAM (MadCam-1) was shown to localize to pancreas and colon (Figure 7). In Figure 7 panel a. kidney, panel b. liver, panel c. lung, panel d. heart, panel e. pancreas, and panel f. colon. Rat MadCam-1, Genbank Accession Number D87840 corresponds to protein sequence, SEQ ID NO:18 and the nucleotide sequence is SEQ ID NO:19. The human sequence corresponds to SEQ ID NOS:20 and 21, Genbank Accession

30

35

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Number U82483. A human MadCam-1 antibody is available from BD Pharmingen (San Diego, CA) to produce the therapeutic complex of the invention for human use.

EXAMPLE 6

Identification of CD90

5 An antibody to the rat CD90 was purchased (BD Pharmingen, San Diego, CA, catalog number 22211D) and about 0.1 to 100 mg/ml was injected into the tail vein of a rat. The tissue from various organs was treated using immunohistochemistry and the antibody to Thy-1 was shown to localize to kidney (Figure 8). In Figure 8 panel a. kidney, panel b. liver, c. lung, d. heart, e. pancreas, and f. colon. Rat Thy-1, Genbank Accession Number NP036805 corresponds to protein
10 sequence SEQ ID NO:30 and Genbank Accession Number NM 012673 to nucleotide sequence SEQ ID NO:31. Human Thy-1, Genbank Accession Number XP006076 corresponds to protein sequence SEQ ID NO:32 and Genbank Accession Number XM 006076 to nucleotide sequence SEQ ID NO:33 (see also Genbank Accession Number AF 261093). A mouse anti-rat Thy-1
15 antibody is available from Pharmingen Intl. and was used for immunohistochemistry at a concentration of 0.5 to 5 µg/ml to produce the therapeutic complex of the preferred embodiment for human use.

EXAMPLE 7

Identification and Sequencing of an Albumin Fragment

The luminal proteins of the vasculature of an entire rat were labeled with biotin. Then the
20 organs were removed individually and the labeled proteins were isolated as described in Roben *et al.*, U.S. Patent No. 09/528,742, filed March 20, 2000. The labeled proteins that were isolated from the homogenized prostate were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis which identified a protein labeled T436-608 (Figure 9). The protein was partially sequenced and identified as a
25 fragment of Albumin TQKAPQVST (SEQ ID NO:22). In addition, sequencing showed that the prostate-specific form was a fragment in which translation was terminated early, corresponding to amino acids 436 to 608 of the full-length albumin protein (SEQ ID NO:23). The Albumin fragment has been identified by others as a vasoactive fragment (Histamine release induced by proteolytic
30 digests of human serum albumin: Isolation and structure of an active peptide from pepsin treatment, Sugiyama K, Ogino T, Ogata K, Jpn J Pharmacol, 1989 Feb., 49(2): 165-71). The rat protein sequence is SEQ ID NO: 24 (Genbank Accession No. P02770). The human counterpart is shown as SEQ ID NO:25, Genbank accession No. P02768.

In Example 8, the *in vivo* distribution of the lumenally expressed target proteins isolated and identified in the previous Examples is described.

EXAMPLE 8

Biodistribution of DPP-4, MadCam-1, CD90 and CA-4

35 The following example describes the use of specific labeled antibody ligands to visualize the biodistribution of several of the lumenally expressed target proteins that were identified in

WO 02/100336

PCT/US02/18185

previous Examples. Specifically, 50 μ l of a 1 μ g/ μ l solution of an antibody specific for DPP-4, MadCam-1, CD90 or CA-4 was injected into the tail veins of a group of Sprague-Dawley rats. The antibody was allowed to circulate for about thirty minutes after which time the animals were sacrificed and their organs removed. Small cubes of brain, heart, lungs, liver, pancreas, colon and kidneys were excised, placed in embedding medium and immediately frozen. The frozen cubes were kept on dry ice until they were sectioned. The tissues were sectioned in 6 μ m slices using a cryostat, air-dried overnight and fixed in acetone for two minutes. The fixed tissue sections were incubated with Cy3-labeled secondary antibodies, rinsed then mounted for subsequent image capture. At least three independent experiments were performed for each lumenally expressed target protein.

Using the above-described method, the biodistribution of DPP-4 was verified by using OX-61 (Pharmingen), a mouse monoclonal antibody that is specific for the lumenally expressed target protein DPP-4. Figure 10A shows strong fluorescent staining, which indicates that DPP-4 is present in the lung. Additional weak staining was observed in the glomeruli of the kidney (Figure 10B); however, DPP-4 was not significantly found in any of the other tissues that were examined (Figures 10C-D). These results indicate that DPP-4 is primarily localized to the endothelium of the lung.

The biodistribution of MadCam-1 was also verified by using the above methods. Specifically, OST-2 (Pharmingen), a mouse monoclonal antibody that recognizes rat MadCam-1, was used. Figures 11A and 11D show that fluorescence was observed in both pancreas and the colon. Additional staining was observed in the small intestine. In contrast, very little fluorescence was observed in the other tissues that were examined (e.g. Figures 11B-C). These results indicate that MadCam-1 is localized to certain tissues that comprise the gastrointestinal (GI) tract.

The biodistribution of CD90 was verified by administering OX-7 (Pharmingen), a mouse monoclonal antibody that specifically recognizes rat CD90. Figure 12A shows the fluorescent staining that was observed in the kidney. No staining was detected in any of the other tissues that were examined (Figures 12B-F). These results indicate that CD90 is localized only in the kidney.

To determine the biodistribution of CA-4, a rabbit polyclonal antibody that recognizes rat CA-4 was generated using methods well known in the art. Using the above-described administration and histology procedures, this polyclonal antibody was then used to determine the localization of CA-4. Strong staining was observed in both the heart (Figure 13B) and the lung (Figure 13E) indicating the presence of CA-4. No staining was observed in brain (Figure 13A), kidney (Figure 13C), liver (Figure 13D) or pancreas (Figure 13F). A monoclonal antibody that is specific for CA-4 was also found to bind specifically to the heart and lung but not to other tissues. These results indicate that CA-4 is specifically localized to the heart and lung.

In Examples 9-13, the characteristics of ligand binding to specific lumenally expressed proteins in target tissues is described.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

EXAMPLE 9

Relationship Between Ligand Dose and Specificity of Localization to Target Tissues

The following example describes the specificity of localization of antibody ligands to target tissues in relation to the amount of antibody that is administered. Specifically, mouse monoclonal antibodies specific to DPP-4, MadCam-1 or CD90 were administered to Sprague-Dawley rats via tail-vein injection. Each of the rats received either 5 µg, 20 µg, 50 µg or 100 µg of one of the above antibodies. Following the injection, the antibody was allowed to circulate for thirty minutes after which time the animals were sacrificed and their organs were removed. The organs were then processed for immunohistochemistry as described in Example 8.

Using the above-described method, the OX-61 monoclonal antibody was used to determine the relationship between the amount of antibody ligand administered and its specificity for the lumenally expressed target protein DPP-4 in the lung. When administered to rats in doses of 5 to 50 µg, OX-61 displayed a high degree of specificity to the lung. However, when 100 µg or more was injected in a single dose, the OX-61 antibody began to appear in the kidneys. These results are consistent with the bioavailability data for DPP-4 presented in Example 8.

The monoclonal antibody, OST-2, was used in similar studies to determine the effect of dosage on its specificity for MadCam-1 in the pancreas and other GI organs. When administered in 5 µg, 20 µg, 50 µg and 100µg doses, OST-2 remained specific for the pancreas and other tissues of the GI tract. These results seem to indicate that MadCam-1 specificity is limited to the GI tract irrespective of the dose that is administered.

The monoclonal antibody, OX-7, was used to determine the effect of dosage on its specificity for CD90 in the kidney. From doses of 5 to 50 µg, OX-7 displayed complete specificity for the kidney. However, at 100 µg, a small amount of OX-7 began to appear in the lung and liver. Although some OX-7 was detectable in lung and liver at high antibody concentrations, the amount of OX-7 present in the lung and liver was far less than the amount of OX-7 which appeared in the kidneys.

EXAMPLE 10

Characterization of Ligand Binding to Target Tissues Over Time

The following example describes the binding of antibody ligands to specific target tissues throughout time. Specifically, mouse monoclonal antibodies specific to DPP-4, MadCam-1 or CD90 were administered to Sprague-Dawley rats via tail-vein injection. Each of the rats received a 50 µg dose of a single antibody which was allowed to circulate for time periods ranging from 5 minutes to 48 hours. Following the period of antibody circulation, the animals were sacrificed and their organs were processed for immunohistochemistry as described in Example 8.

Using the above-described method, a profile of the binding of the OX-61 monoclonal antibody to DPP-4 in the vasculature of the lung was determined with respect to time. Figures 14A-E show the amount of OX-61 that localized to the lung during time periods ranging from 5 minutes

WO 02/100336

PCT/US02/18185

to 24 hours after intravenous injection. Specifically, OX-61 was detected in the lung in as little as 5 minutes subsequent to administration (Figure 14A). Similar amounts of this antibody were detected in the lung for at least eight hours after administration (Figures 14B-D). At 24 hours subsequent to the administration, however, the amount of OX-61 detectable in the lung had significantly decreased (Figure 14E).

A profile with respect to time was established for the binding of the OST-2 monoclonal antibody to MadCam-1 in the vasculature of the pancreas. Figures 15A-D show the amount of OST-2 that was detected in the pancreas during time periods ranging from 5 minutes to 48 hours. Specifically, OST-2 was detected in the pancreas within 5 minutes subsequent to administration (Figure 15A). In addition, similar amounts of this antibody were detected in the pancreas after 30 minutes, 24 hours and even 48 hours post injection (Figures 15A-D).

A profile with respect to time was also established for the binding of the OX-7 monoclonal antibody to the lumenally expressed target protein CD90 in the vasculature of the kidney. Figures 16A-F show the amount of OX-7 that had localized to the kidney during time periods ranging from 5 minutes to 8 hours. Specifically, OX-7 was detected in the kidney in as little as 5 minutes subsequent to administration (Figure 16A). Similar amounts of this antibody were detected in the kidney for at least eight hours after its administration (Figures 16B-F).

EXAMPLE 11

Quantification of Antibody Ligand Bound to TargetTissues by Time-Resolved Fluorescence

The following example describes quantitative analyses of antibody ligands localized to lumenally expressed target proteins in various target tissues. Specifically, antibodies specific for DPP-4, MadCam-1 or CA-4 were each labeled with approximately three molecules of Europium per antibody molecule using a europium-DTPA labeling kit (Perkin Elmer, Cat# AD0021) according to manufacturer's instructions. Additionally, monoclonal antibodies specific for influenza virus (IgG2a and IgG1 isotypes) were also labeled for use as isotype controls. After labeling, the antibody/Europium conjugates were injected into the tail veins of Sprague-Dawley rats at doses of 5 µg, 20 µg and 50 µg. For each dosage level, the antibodies were allowed to circulate for either 30 minutes, 6 hours or 24 hours. At least three independent experiments were performed for each dose and time point combination.

At the end of each time period, the rats were sacrificed and their organs were processed for fluorescence analysis. Organs that were examined typically included, kidney, lung, liver, brain, pancreas, small intestine, large intestine (colon), stomach and heart. Excised organs were first homogenized in ten volumes of enhance solution (Perkin Elmer, Cat# 400-0010) then incubated overnight at 4 °C. One percent of the resulting solution was then diluted 1:40 into fresh enhance solution, rotated for 30 minutes at room temperature and centrifuged at 1500 g for 10 minutes. The resulting solution was placed in a fluorimeter and the signal intensity was measured three times.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Using the above-described method, the amount of OX-61 (anti-DPP-4) antibody localized in each tissue type was determined at specific time points for each antibody dose that was administered. IgG2a isotype anti-influenza monoclonal antibodies were used as a control for background fluorescence. Figures 17A-C show the weight percent of OX-61 that was present in each tissue at each time point tested for each dosage level. Specifically, Figure 17A shows that approximately 15% of the total 5 µg dose localized in the lungs after 30 minutes. By 6 hours, the level had fallen to about 7% but then remained constant up to the 24 hour timepoint. For the most part, the amount of OX-61 localized to other tissues was less than 0.75% of the dose weight, which corresponds to the maximum levels of anti-influenza control antibody that localized to each tissue type (Figure 18A-C and Figure 17A, dashed line). One exception was the slightly increased localization to the liver.

Results similar to those obtained for the 5 µg doses were also obtained for the 20 and 50 µg doses (Figures 17A-C, respectively). With respect to levels of OX-61 in the lung, it should be noted that as the initial dose increased, the percentage loss of OX-61 localized to the lung over time was reduced (Figures 17A-C). Taken together, these results indicate that high levels of OX-61 localize specifically to the lung and the levels of antibody remain high over a long period of time. Such high levels of localization will likely result in a significant improvement in the therapeutic index of any lung-acting drug delivered using this antibody ligand.

In additional experiments, the amount of OST-2 (anti-MadCam-1) antibody localized in each tissue type was determined at specific time points for each antibody dose that was administered. IgG1 isotype anti-influenza monoclonal antibodies were used as a control for background fluorescence. Figures 19A-C show the weight percent of OST-2 that was present in each tissue at each time point tested for each dosage level. Specifically, Figure 19A shows that about 3% of the total 5 µg dose localized to the pancreas after 6 hours. Greater than 5% of the dose was observed in the small intestine after the same amount of time. The amount of OST-2 localized to non-GI tissues was generally less than 0.75% of the dose weight, which corresponds to the maximum levels of anti-influenza control antibody that localized to each tissue type (Figure 19A, dashed line). It should be noted, that compared to the lungs, the pancreas is poorly vascularized. Accordingly, the percentage of antibody dose that is bound to this small area would be expected to be lower than for an antibody ligand that binds to a highly vascularized tissue such as the lung.

Results similar to those obtained for the 5 µg doses were also obtained for the 20 and 50 µg doses (Figures 19B and 19C, respectively). Additionally, the amounts of anti-influenza IgG1 isotype control antibody localized to each tissue was also similar to the amounts localized at the 5 µg dose level. There was at least one notable difference between the 5 µg dose and the two higher doses, however. At the 5 µg dosage, the amount of OST-2 localized in the GI organs peaked after 6 hours (Figure 19A) and by 24 hours they began to fall. At higher doses, localization occurred in the pancreas and other GI organs cumulatively over the 24 hour time period. (Figures 19B-C). Taken

WO 02/100336

PCT/US02/18185

together, these results indicate that high levels of OST-2 localize specifically to the GI organs, such as the pancreas, and the levels of this antibody increase over time. Such high levels of localization will likely result in a significant improvement in the therapeutic index of any drug delivered using this antibody ligand.

5 In similar experiments, 20 µg of Europium-labeled anti-CA-4 antibody ligand was administered intravenously to rats and the amount of ligand that localized in each tissue type was determined at specific time points. The affinity-purified rabbit polyclonal antibody to CA-4 (anti-CA-4), which was prepared as described in Example 8, was used as the tissue specific ligand. Figure 20 shows that approximately 8.5% of the total injected antibody dose localized to the lung
10 within the first 30 minutes. Approximately 2% of the antibody was found in the heart after the same time period. Levels of antibody in both the heart and lung slightly decreased after 6 hours then continued to decline when measured again at 24 hours. Anti-CA-4 did not accumulate significantly in any other tissues during the 24 hour timecourse.

EXAMPLE 12

15 Quantification of Antibody Ligand Bound to Luminally Expressed Target Protein by Scintigraphy

The following example describes an alternative means for quantitatively analyzing antibody ligands localized to luminally expressed target proteins in various target tissues. OX-61 antibodies, which are specific for DPP-4, were radio-labeled with ¹²⁵I then either 1 µg or 5 µg doses were
20 injected into the tail veins of Sprague-Dawley rats and allowed to circulate for 5 minutes, 2 hours or 8 hours. Numerous tissues and fluids were analyzed by scintigraphic methods that are well known in the art. Results of the scintigraphy were expressed as nanogram equivalents of antibody per gram of tissue in each organ. The percentage of injected dose that localized to a particular organ was calculated using the known average weight of rat organs.

25 Using the above method, OX-61 was found to localize predominately to the lung. At both doses, OX-61 localized to the lung within the first five minutes. After two hours, 22% of the total injected 1 µg dose was found localized in this tissue. After 8 hours, the amount of antibody found in the lung increased to 30% of the injected dose. OX-61 was also found in the liver. Initially, a high level of OX-61 was observed in the liver; however, after 8 hours only 7% of the injected dose
30 remained. Initial detection in the liver followed by the rapid decrease was most likely due to antibody circulating in the blood.

The results were similar when a 5 µg dose was administered. Figure 21 shows that more than 0.4 µg of OX-61 per gram of tissue (20% of the initial antibody dose) localized to the lung after the first five minutes. After 8 hours, the amount of OX-61 increased to approximately 0.7 µg
35 of OX-61 per gram of lung tissue. Throughout the timecourse, there was no significant build-up of OX-61 in any other tissue. These results confirm that high levels of OX-61 localize specifically to the lung and the levels of antibody remain high over a long period of time.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

EXAMPLE 13

Transcytosis of Antibody Ligands by Luminally Expressed Target Proteins

The following example describes methods that were used to characterize transcytotic, luminally expressed target proteins in terms of their ability to mediate transcytosis. More specifically, three-color histology was used to characterize luminally expressed target proteins capable of transporting bound ligand from the luminal surface of the blood vessel to the surrounding tissue space. Of the target proteins examined, only DPP-4 and CD90 appeared to have the ability to mediate transcytosis across the endothelial cell layer.

Three-color histology was performed using specific antibody ligands and stains specific for cellular structures. As in previous examples, antibodies specific to DPP-4, MadCam-1, CD90 or CA-4 were injected into the tail veins of Sprague-Dawley rats in 50 µg doses. After 30 minutes, the rats were sacrificed and their organs were prepared for histology as previously described in Example 8. The tissue sections were then incubated with Cy3-labeled secondary antibodies in order to detect bound primary antibodies. Additionally, the tissue sections were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) and fluorescein-labeled *Griffonia simplicifolia* Lectin 1-isolectin B4 (GSL-1). DAPI stains the nuclei of the cells blue and GSL-1 stains the endothelium green. Transcytosis of antibody across the endothelium was detected by determining the distribution of yellow regions which were produced by the mixing of the red Cy-3 signal with the green-stained endothelium as antibody was transported across this cell layer.

Using the above-described method, the transcytotic transport of OX-61 by DPP-4 was detected. Figure 22 shows that OX-61 penetrated into the lung tissue surrounding the vasculature. As expected the surfaces of capillaries were stained green and cell nuclei were stained blue. Air-spaces in the lung were represented as black areas. The presence of yellow distributed throughout the endothelium indicated that the antibody was transported across the endothelial barrier and into the interstitial lung tissue.

Similarly, the transcytotic transport of OX-7 by CD90 was detected. Figure 23 shows that OX-7 penetrated into the glomerulus of the kidney. The penetration was indicated by the substantial amount of mixing that was observed between the bound antibody and the endothelium. This distribution of antibody into the endothelium can be seen in Figure 23 as a diffuse area of yellow located between the red staining antibody that is bound at the luminal surface and the green staining endothelial layer.

Although OST-2 bound to MadCam-1 as expected, the antibody was not transported across the endothelium into the pancreas. Figure 24 shows a section of the pancreas having no visible penetration of antibody into the endothelium. The antibody localized to the surface of the blood vessel (red) but never moved across the endothelium (green) and into the surrounding tissue. The absence of any yellow coloring in Figure 24 demonstrates this lack of transcytosis.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Similarly, no transcytosis was seen for anti-CA-4 antibody that was bound to CA-4 on the luminal surface of the vasculature of the lung. Figure 25 shows a section of the lung having no visible penetration of antibody into the endothelium. In other words, the red areas of antibody bound to the endothelial surface never moved into the endothelial layer. This lack of movement is noted in Figure 25 by the absence of yellow color intermixed in the endothelial cell layer. Similar results were noted for anti-CA-4 antibody that localized to the heart.

Taken together, the above results indicate that the lumenally expressed target proteins that are identified herein are useful for both the delivery of drugs to the interstitium of specific tissues as well as their vascular surfaces.

Examples 14-16 describe therapeutic complexes comprising target-protein-specific antibody ligands that are linked to therapeutic moieties such as gentamicin and doxorubicin.

EXAMPLE 14

Selective Drug Delivery to Tissues Using Specific Target Proteins

The following example describes the delivery of therapeutic complexes to specific target tissues. Therapeutic complexes were constructed by coupling mouse monoclonal antibodies specific to DPP-4 or MadCam-1 to either gentamicin or doxorubicin via a non-cleavable linker using methods well known in the art. On average, three molecules of drug were covalently conjugated to each antibody. Approximately, 50 µg of each therapeutic complex was administered to rats by tail vein injection and allowed to circulate for 30 minutes. The rats were then sacrificed and their organs were sectioned for histology using the method described in Example 8. Gentamicin and doxorubicin therapeutic complexes were detected by addition of either gentamicin- or doxorubicin-specific antibodies as appropriate, followed by signal amplification with Cy3 conjugated secondary antibodies. In some experiments, the tissue sections were also stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) and fluorescein-labeled *Griffonia simplicifolia* Lectin 1-isolectin B4 (GSL-1) to demonstrate transcytosis (Three-color histology methods as described in Example 13).

Using the above-described methods, OX-61/gentamicin and OX-61/doxorubicin therapeutic complexes were found to localize specifically to the lung tissue within 30 minutes after the initial injection. Figures 26A-F shows the binding of the OX-61/gentamicin therapeutic complex to specific tissues. Specifically, this therapeutic complex was observed in lung within thirty minutes following its injection (Figure 26E). It was not present, however, in any other of the tissues examined (Figures 26A-D and 26F). Similar results were obtained for the OX-61/doxorubicin therapeutic complex (Figures 27A-D).

Using the above-described three color histology methods, DPP-4-mediated transcytotic transport of both OX-61/gentamicin and OX-61/doxorubicin therapeutic complexes was detected. Figure 28 shows that the OX-61/gentamicin therapeutic complex penetrated the endothelium then localized into the interstitium of the lung. Therapeutic complexes were observed lining the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

capillaries and throughout the endothelial cell layer. Complexes were also observed throughout the interstitial tissues of the lung. The areas of yellow in Figure 28 show the movement of the therapeutic complex across the endothelium. Similar results were seen for the OX-61/doxorubicin therapeutic complex. Figure 29 specifically shows the accumulation of this therapeutic complex in the interstitium of the lung (Figure 29, arrow B).

The tissue specific localization of OST-2/gentamicin and OST-2/doxorubicin conjugates was also evaluated. Figures 30A and 30F show that the OST-2/gentamicin conjugate specifically bound to MadCam-1 in both the colon and the pancreas. This conjugate did not localize to any of the other tissues that were tested (Figure 30B-E). Similar results were observed for the OST-2/doxorubicin therapeutic complex (Figure 31A-F).

EXAMPLE 15

Targeted Liposomal Formulations of
Gentamicin Using the DPP-4-Specific Antibody OX-61

The following example describes the delivery of liposomal therapeutic complexes to specific target tissues. Therapeutic complexes were constructed by coupling mouse monoclonal antibodies specific to DPP-4 (ligand) to gentamicin (therapeutic moiety) using liposomes (linker). The liposomes were constructed using either egg phosphatidylcholine (EPC) or distearylphosphatidylcholine (DSPC) as the main phospholipid component (greater than 50 mole percent). Maleimido-pegylated distearylphosphatidylethanolamine (MPDSPE) was added as a minor lipid component in a concentration of about 5 mole percent. MPDSPE was synthesized by coupling polyethylene glycol (PEG) having a molecular weight of about 5000 kDa to distearylphosphatidylethanolamine (DSPE). The free end of the attached PEG group was then converted to a reactive maleimide using methods well known in the art. The liposome formulation was completed by adding cholesterol in a concentration ranging from 0 to 50 mole percent depending on the amount of phospholipid that was initially used.

Therapeutic complexes were generated by coupling both gentamicin and OX-61 to the liposome linkers. Gentamicin sulfate was coupled by passively entrapping it within the liposomes during their formation. Gentamicin was entrapped at a concentration of approximately 150 µg/ml. Following the entrapment of the therapeutic moiety, the OX-61 antibody was coupled to the liposome linker. This coupling was accomplished by first reacting OX-61 with Traut's reagent to convert primary amines to thiols. The antibody was then coupled to the reactive MPDSPE.

The biodistribution of gentamicin administered in EPC and DSPC liposomes targeted to DPP-4 (EPC-DPP and DSPC-DPP therapeutic complexes, respectively) was compared to that of free gentamicin and gentamicin that was administered in untargeted liposomes. Specifically, a solution of free gentamicin or a dispersion containing therapeutic complexes or liposomes having no ligand bound to their surface was injected into the tail veins of Sprague-Dawley rats at a dose of 150 µg gentamicin per rat. The rats were sacrificed after either 30 minutes or 18 hours and their

WO 02/100336

PCT/US02/18185

organs were removed and homogenized. The amount of gentamicin in each organ homogenate was measured using a TDX analyzer (Abbott). At least three independent experiments were performed for each gentamicin formulation at each time point.

Using the above methods, the amount of gentamicin that localized to the lungs and kidneys after administration was determined for both free gentamicin and gentamicin administered in DSPC-DPP therapeutic complexes. In particular, within 30 minutes after administration, free gentamicin began to accumulate in the kidney (Figure 32A). After 18 hours, the amount of gentamicin present in the kidneys more than doubled (Figure 32B). In contrast, even after 18 hours, very little gentamicin appeared in the kidneys when administered in DSPC-DPP therapeutic complexes (Figures 32A-B). Nearly opposite effects were seen in lung tissue. Figures 32A-B show that, when administered in its free form, very little gentamicin was observed in the lungs either 30 minutes or 18 hours after injection. However, when administered in a DSPC-DPP therapeutic complex, gentamicin was present at about 20 µg per gram of lung tissue after 30 minutes (Figure 32A). After 18 hours, the level fell by about half (Figure 32B). These results indicated that build up of gentamicin in the kidneys, and thus gentamicin-mediated toxicity, can be prevented by delivering this drug specifically to the site of infection using appropriately targeted liposomal therapeutic complexes.

The biodistribution of free gentamicin was compared with that of gentamicin delivered in EPC-DPP therapeutic complexes and untargeted EPC liposomes. Within 30 minutes after administration of free gentamicin, a substantial amount of this compound appeared in the kidneys. After 18 hours, this amount more than doubled (Figures 33A-B). Gentamicin delivered in untargeted liposomes, appeared predominately in the serum after 30 minutes, but substantial amounts were detected in both the kidney and the spleen after 18 hours (Figures 33A-B). In contrast, within 30 minutes, most of the gentamicin delivered in EPC-DPP therapeutic complexes was distributed between the lung, liver and spleen but very little was observed in the kidneys or serum. The highest level of gentamicin, about 15% of the injected dose, was detected in the lung (Figure 33A). Similar distributions were observed after 18 hours (Figure 33B).

The above results indicate that gentamicin was targeted to lungs using EPC-DPP therapeutic complexes. Although the amount of gentamicin appearing in the liver and the spleen was significant, it is likely that the amount of drug accumulating in these organs can be reduced. Such a result can be achieved by using antibody fragments rather than whole antibodies as the targeting ligand. It has been well established that the Fc portion of antibodies mediate uptake into the liver and spleen. Accordingly, removing this portion of the antibody would likely reduce accumulation in these organs. Although accumulation of gentamicin in the kidney could not be prevented using untargeted liposomes, gentamicin could be effectively shielded from the kidney using the EPC-DPP therapeutic complex. Accordingly, such complexes are useful for both targeted drug delivery and preventing drug toxicity.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

The biodistribution of free gentamicin was also compared with that of gentamicin delivered in DSPC-DPP therapeutic complexes and untargeted DSPC liposomes. Figures 34A-B show that the biodistribution of gentamicin delivered in DSPC-DDP therapeutic complexes both after 30 minutes and 18 hours was similar to that of gentamicin delivered in EPC-DPP therapeutic complexes with one significant difference. At both time points, DSPC-DPP therapeutic complexes localized over twice the amount of gentamicin in the lungs as EPC-DPP therapeutic complexes. (Figures 34A-B and 33A-B). The biodistribution of gentamicin delivered in untargeted DSPC liposomes was also similar to that of gentamicin delivered in untargeted EPC liposomes except far less gentamicin was found in the kidney after 18 hours when using DSPC liposomes for delivery (Figures 34A-B and 33A-B).

Taken together the above results indicate that DSPC-DPP therapeutic complexes were capable of targeting high levels of gentamicin to the lung. In addition, the use of such therapeutic complexes prevents the build up of gentamicin in the kidneys where it is known to have toxic effects.

EXAMPLE 16

Efficacy of Therapeutic Complexes Containing Gentamicin

The following example describes the efficacy of EPC-DPP therapeutic complexes containing gentamicin in the treatment of pneumonia. Pneumonia was established in fifteen rats by infecting each animal with 1.5×10^7 *Klebsiella pneumoniae* via intratracheal injection. The rats were then divided into three groups having five animals each. After 24 hours, one group was treated by administering 5 mg/kg of free gentamicin per animal. A second group was treated by administering 5 mg/kg of gentamicin formulated in EPC-DPP therapeutic complexes per animal. The final group was left untreated as a control group. The rats were then monitored for survival over the next fifteen days.

The gentamicin delivered in EPC-DPP therapeutic complexes was superior to free gentamicin for the treatment of pneumonia. Only one of the five animals died in the EPC-DPP-treated group. This death occurred on day six. Each of the other four animals survived through day fifteen and displayed no signs of infection. Additionally, one of the surviving animals was sacrificed and no pathogenic bacteria were found in the lung. These results indicated that the gentamicin delivered in the EPC-DPP therapeutic complexes had completely cured the infection in 80% of the rats treated.

In contrast, all of the untreated rats died. Four of these animals died by day three. Four of the five animals treated with free gentamicin died by day nine. However, one animal did survive to day 15. Accordingly, the efficacy of free gentamicin was much less than that of gentamicin delivered to the lung in EPC-DPP therapeutic complexes (Figure 35).

WO 02/100336

PCT/US02/18185

In Examples 17-22, the lung-specific lumenally expressed molecule rat dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) is used to produce a number of therapeutic complexes which are used to treat a variety of lung-specific diseases or deficiencies.

EXAMPLE 17

5 Use of DPP-4 Doxorubicin Therapeutic Complex
 with an Acid Sensitive Linker for the Treatment of Lung Cancer

Initially, a therapeutic level of a human doxorubicin/DPP-4 complex such as that from Example 7 is administered to a patient intravenously. An effective amount of the complex is delivered to the patient, preferably 1 μg to 100 mg/Kg of patient weight in saline or an intravenously acceptable delivery vehicle. The DPP-4 F(ab')₂ is specific for the lung tissue. As the therapeutic complex is transcytosed into the lung tissue, the acid sensitive linker is cleaved and the doxorubicin is free to intercalate into the DNA. Because the doxorubicin is incorporated into the DNA of cycling cells, the effect on the cancer cells which are in the process of cycling will be marked and the effect on the normal lung cancer cells much reduced. Therefore, the treatment results in a reduction of the number of cancer cells in the lung, with a minimum of side effects. Because doxorubicin generally targets dividing cells and, because of the tissue specificity, it will only affect the dividing cells of the lung, and therefore, it is envisioned that the number of cells killed due to side effects of the treatment will be minimal.

15 In Example 18 a method is set out for the synthesis and use of a DPP-4/doxorubicin prodrug
20 treatment for lung cancer.

EXAMPLE 18

Use of DPP-4/doxorubicin Therapeutic Complex for the
 Treatment of Lung Cancer Using a Prodrug

The therapeutic complex is a DPP-4/ β -lactamase conjugate which includes an F(ab')₂ specific for DPP-4 linked to β -lactamase via a polypeptide linker, or a covalent bond. The linker used was SMCC. The chemotherapeutic agent doxorubicin does not cross the endothelium due to a number of negative charges in the structure, which makes it nontoxic for all cells and ineffective as an anticancer drug. However, doxorubicin can be thought of as a pro-drug which becomes active upon cleavage of the β -lactam ring to produce doxorubicin. Doxorubicin does cross the endothelium and intercalates into the DNA of cycling cells, making it an effective chemotherapeutic agent.

25 Initially, a therapeutic amount of a DPP-4/ β -lactamase complex is administered to the patient intravenously. The DPP-4 F(ab')₂ is linked to the β -lactamase prodrug in the therapeutic complex using a linker which is not cleavable. The DPP-4 F(ab')₂ ligand is targeted to the lung tissue. A therapeutic level of the therapeutic complex is administered to the patient at between about 1 μg to 100 mg/Kg of patient weight. After administration and localization of the therapeutic complex, a therapeutic level of doxorubicin is administered to the patient at between about 1 μg to

WO 02/100336

PCT/US02/18185

100 mg/Kg of patient weight, preferably between 10 µg to 10 mg/Kg of patient weight. The doxocillin is taken up systemically, but only in the microenvironment of the lung, the doxocillin is cleaved by the β-lactamase to produce doxorubicin. Therefore, the eukaryotic cytotoxic activity of the prodrug is unmasked only at the location of the β-lactamase, that is, the
5 lungs. The doxorubicin is taken up by the lung tissue and intercalates into the DNA. However, because the doxorubicin is incorporated into the DNA of cycling cells, the effect on the cancer cells which are in the process of cycling will be marked and the effect on the normal lung cancer cells much reduced. The treatment results in a reduction in the number of cancer cells in the lung.

In Example 19 a method is set out for the synthesis and use of a DPP-4/cephalexin prodrug
10 therapeutic complex to treat pneumonia.

EXAMPLE 19

Use of DPP-4 Therapeutic Complex for the Treatment of Lung Infections

The most common bacterial pneumonia is pneumococcal pneumonia caused by
15 *Streptococcus pneumoniae*. Other bacterial pneumonias may be caused by *Haemophilus influenzae*, and various strains of mycoplasma. Pneumococcal pneumonia is generally treated with penicillin. However, penicillin-resistant strains are becoming more common.

The present invention is used for the treatment of pneumococcal pneumonia in humans (or other mammals) as follows: A therapeutic complex is constructed by linking the F(ab')₂ fragment of human DPP-4 antibodies to cephalexin. The linker used is a liposome. The liposomes are
20 constructed so that the F(ab')₂ fragment is incorporated into the membrane and the cephalexin is carried within the liposome. Liposomes are produced by polymerizing the liposome in the presence of the DPP-4/F(ab')₂ ligand such that the ligand becomes a part of the phospholipid bilayer and are prepared using the thin film hydration technique followed by a few freeze-thaw cycles. However, liposomal suspensions can also be prepared according to method known to those skilled in the art.
25 0.1 to 10 nmol of the therapeutic complex is injected intravenously. The liposomes carrying the cephalexin are targeted to the lung by the DPP-4 specific F(ab')₂ fragments. Upon binding to the endothelium, the liposomes are taken up and the cephalexin is taken into the lung tissue. The cephalexin can then act on the cell walls of the dividing *S. pneumonia* organisms. One advantage of the targeting of antibiotics to a specific region is that less antibiotic is needed for the same result,
30 there is less likelihood of side effects, and the likelihood of contributing to the drug resistance of the microorganism is considerably reduced.

In Example 20 a method is set out for the synthesis and use of a DPP-4/rifampin prodrug therapeutic complex to treat tuberculosis.

EXAMPLE 20

Use of DPP-4 Therapeutic Complex for the Treatment of Tuberculosis

35 It can readily be envisioned that diseases such as tuberculosis, caused by the bacterium *M. tuberculosis*, which is often treated using rifampin or isoniazid for a very long period of time,

WO 02/100336

PCT/US02/18185

would be more effectively treated using the therapeutic agent of the present invention. Much of the reason for the high incidence of disease and drug resistance in this microbe is the noncompliance with the extremely long course of treatment. It can be envisioned that using a method that directly targets the lungs with a high concentration of antibiotic would reduce the need for an unworkably long treatment and thus reduce the incidence of noncompliance and drug resistance.

The preferred embodiment is used for the treatment of tuberculosis in humans (or other mammals) as follows: A therapeutic complex is constructed by linking the F(ab)₂ fragment of human DPP-4 antibodies to rifampin. The linker used is a liposome. The liposomes are constructed so that the F(ab)₂ fragment is incorporated into the membrane and the rifampin is carried within the liposome. Liposomes are produced by polymerizing the liposome in the presence of the DPP-4/F(ab)₂ ligand such that the ligand becomes a part of the phospholipid bilayer and are prepared using the thin film hydration technique followed by a few freeze-thaw cycles. However, liposomal suspensions can also be prepared according to method known to those skilled in the art. 0.1 to 10 nmol of the therapeutic complex is injected intravenously. The liposomes carrying the rifampin are targeted to the lung by the DPP-4 specific F(ab)₂ fragments. Upon binding to the endothelium, the liposomes are taken up and the rifampin is taken into the lung tissue. The rifampin can then act on the *M. tuberculosis* organisms.

In Example 21, a method is set out for the synthesis and use of a DPP-4/surfactant protein therapeutic complex to treat lung diseases resulting from under-production of surfactant proteins.

20

EXAMPLE 21

Use of DPP-4 Therapeutic Complex for the Treatment of Surfactant Deficiencies

A number of lung diseases, including emphysema, include, as part of the cause or effect of the disease, deficiencies of surfactant proteins. The present invention is used for the treatment of surfactant deficiencies as follows: A therapeutic complex is constructed by linking the F(ab)₂ fragment of DPP-4 antibodies to a surfactant protein such as SP-A (surfactant protein A). The linker used is a pH sensitive bond. The therapeutic complex is injected intravenously into a patient's veins and is targeted to the lung by the DPP-4 specific F(ab)₂ fragments. Upon binding to the endothelium, the therapeutic complex is transcytosed by the lung tissue and the change in pH cleaves the bond, thus releasing the surfactant protein.

30

In Example 22, a method is set out for the synthesis and use of a DPP-4/corticosteroid therapeutic complex to treat rejection of transplanted lung tissue.

EXAMPLE 22

Use of DPP-4 Therapeutic Complex for the Treatment of Lung Transplantation Rejection

The present invention is used for the treatment of lung transplantation rejection as follows: a therapeutic complex is constructed by linking the F(ab)₂ fragment of DPP-4 antibodies to an immunosuppressant such as a corticosteroid or cyclosporin with a pH sensitive linker. The therapeutic complex is injected intravenously into a patient's veins and is targeted to the lung by the

WO 02/100336

PCT/US02/18185

DPP-4 specific F(ab')₂ fragments. Upon binding to the endothelium, the therapeutic complex is transcytosed or taken up by the lung tissue and the change in pH cleaves the bond, thus releasing the immunosuppressant only in the area of the lungs. It can readily be seen that the advantage of such a treatment is that the patient is not immunosuppressed and still has a healthy active immune system during recovery from the surgery. The lung (or other transplanted organ) is the only organ which is immunosuppressed and is carefully monitored.

One skilled in the art will appreciate that these methods and compositions are and may be adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. The methods, procedures, and compositions described herein are presently representative of preferred embodiments and are exemplary and are not intended as limitations on the scope of the invention. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention and are defined by the scope of the disclosure.

Those skilled in the art recognize that the aspects and embodiments of the invention set forth herein may be practiced separate from each other or in conjunction with each other. Therefore, combinations of separate embodiments are within the scope of the invention as disclosed herein.

All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of those skilled in the art to which the invention pertains.

The invention illustratively described herein suitably may be practiced in the absence of any element or elements, limitation or limitations which is not specifically disclosed herein. It is recognized that various modifications are possible within the scope of the invention disclosed. Thus, it should be understood that although the present invention has been specifically disclosed by preferred embodiments and optional features, modification and variation of the concepts herein disclosed may be resorted to by those skilled in the art, and that such modifications and variations are considered to be within the scope of this invention as defined by the disclosure.

Other embodiments of the invention can be envisioned within the scope of the following claims.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising:
administering a therapeutically effective amount of a therapeutic complex, said therapeutic complex
comprising: a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic
5 moiety, and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand.
2. The method of Claim 1 wherein said ligand is selected from the group consisting of
proteins, peptides, and small molecules.
3. The method of Claim 2, wherein said proteins are selected from the group
consisting of antibodies, antibody complexes, antibody fragments, and enzymes.
- 10 4. The method of Claim 1, wherein said therapeutic moiety is selected from the group
consisting of enzymes, antibiotics, immunomodulators, chemotherapeutic agents, antiviral agents,
antifungal agents, contrast agents, prodrugs and hormones.
5. The method of Claim 4, wherein said enzymes specifically cleave prodrugs to
produce the corresponding pharmaceutical agent.
- 15 6. The method of Claim 1, wherein said linker is selected from the group consisting of
a bond, a peptide, a liposome, and a microcapsule.
7. The method of Claim 6, wherein said bond is sensitive to acidic or reducing
conditions.
8. The method of Claim 1 wherein an enzyme is administered between about 20
20 minutes and about 12 hours after administration of the therapeutic complex.
9. The method of Claim 1 wherein a prodrug is administered within about 48 hours
after administration of the therapeutic complex.
10. A lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted
endothelial cell, comprising:
25 a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a
vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ
ID NO:9 or 11, or a homolog thereof;
a linker; and
a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand to the therapeutic moiety.
- 30 11. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said
ligand is an antibody or a binding part thereof.
12. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said
ligand does not activate a receptor.
13. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said
35 therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one
gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one

WO 02/100336

PCT/US02/18185

contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.

14. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said linker is pH sensitive.
- 5 15. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 14, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
16. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said linker is a liposome.
17. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 16, wherein said
10 ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
18. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
19. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said
15 linker is cleavable by an enzyme.
20. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said therapeutic moiety is an antibiotic.
21. The lung and/or heart-specific therapeutic complex of Claim 10, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.
- 20 22. A method of determining the presence or concentration of carbonic anhydrase IV in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 10 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
23. A pharmaceutical composition comprising the lung and/or heart-specific
25 therapeutic complex of Claim 10 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
24. A lung and/or kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:
- a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a
vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein the ligand binds to SEQ
30 ID NO:4 or 6, or a homolog thereof;
- a linker; and
- a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.
25. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said
35 ligand is an antibody or a binding part thereof.
26. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said ligand does not activate a receptor.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

27. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
28. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said linker is pH sensitive.
29. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 28, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
30. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said linker is a liposome.
31. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 30, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
32. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
33. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24, wherein said linker is cleavable by an enzyme.
34. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 27, wherein said at least one pharmaceutical is an immunosuppressant.
35. The lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 27, wherein said at least one pharmaceutical is an antithrombotic.
36. A method of determining the presence or concentration of dipeptidyl peptidase IV in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 24 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
37. A pharmaceutical composition comprising the lung and/or kidney-specific therapeutic complex of Claim 24 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
38. A pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:
- a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ ID NO:14 or 16, or a homolog thereof;
 - a linker; and
 - a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

39. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said ligand is an antibody or binding part thereof.
40. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said ligand does not activate a receptor.
- 5 41. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
- 10 42. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said linker is pH sensitive.
43. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 42, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
44. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said
15 linker is a liposome.
45. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 44, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
46. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said
20 therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
47. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38, wherein said linker is cleavable by an enzyme.
48. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 41 wherein said at least one pharmaceutical is an antibiotic or an antiviral.
- 25 49. The pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 41 wherein said at least one pharmaceutical is an antithrombotic.
50. A method of determining the presence or concentration of ZG16-p in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 38 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
- 30 51. A pharmaceutical composition comprising the pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
52. A prostate-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:
a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a
35 vascular endothelial cell membrane of the specific tissue comprising SEQ ID NO:23 or a homolog thereof;
a linker; and

WO 02/100336

PCT/US02/18185

- a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.
53. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said ligand is an antibody or a binding part thereof.
54. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said ligand does not activate a receptor.
55. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
56. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said linker is pH sensitive.
57. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 56, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
58. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said linker is a liposome.
59. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 58, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
60. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
61. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said linker is cleavable by an enzyme.
62. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 55, wherein said at least one pharmaceutical is an immunosuppressant.
63. The prostate-specific therapeutic complex of Claim 52, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic.
64. A method of determining the presence or concentration of Albumin fragment in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 52 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
65. A pharmaceutical composition comprising the prostate-specific therapeutic complex of Claim 52 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
66. A brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:
a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue wherein said ligand binds to SEQ ID NO:26 or 28 or a homolog thereof;
a linker; and

WO 02/100336

PCT/US02/18185

- a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.
67. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said ligand is an antibody or a binding part thereof.
- 5 68. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said ligand does not activate a receptor.
69. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent,
- 10 at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
70. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said linker is pH sensitive.
71. The brain-specific therapeutic complex of Claim 70, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
- 15 72. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said linker is a liposome.
73. The brain-specific therapeutic complex of Claim 72, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
74. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said therapeutic
- 20 moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
75. The brain-specific therapeutic complex of Claim 66, wherein said linker is cleavable by an enzyme.
76. The brain-specific therapeutic complex of Claim 69, wherein said at least one pharmaceutical is an immunosuppressant.
- 25 77. The brain-specific therapeutic complex of Claim 69, wherein said at least one pharmaceutical is an antithrombotic.
78. A method of determining the presence or concentration of CD71 (transferrin receptor) in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 66 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic
- 30 complex which bound.
79. A pharmaceutical composition comprising the brain-specific therapeutic complex of Claim 66 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
80. A pancreas and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:
- 35 a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue wherein said ligand binds to SEQ ID NO:18 or 20, or a homolog thereof;

WO 02/100336

PCT/US02/18185

- a linker; and
a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand with the therapeutic moiety.
81. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said ligand is an antibody or a binding part thereof.
82. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said ligand does not activate a receptor.
83. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
84. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said linker is pH sensitive.
85. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 84, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
86. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said linker is a liposome.
87. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 86, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
88. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
89. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80, wherein said linker is cleavable by an enzyme.
90. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 83, wherein said at least one pharmaceutical is an immunosuppressant.
91. The pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 83, wherein said at least one pharmaceutical is an antithrombotic.
92. A method of determining the presence or concentration of MAdCAM in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 80 to said tissue or cell *in vitro* or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
93. A pharmaceutical composition comprising the pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
94. A kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell, comprising:

WO 02/100336

PCT/US02/18185

- a ligand which attaches said therapeutic complex to the luminal surface of a vascular endothelial cell membrane of the specific tissue, wherein said ligand binds to SEQ ID NO:30 or 32, or a homolog thereof;
- a linker; and
- 5 a therapeutic moiety, wherein said linker links the ligand to the therapeutic moiety.
95. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said ligand is an antibody or a binding part thereof.
96. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said ligand does not activate a receptor.
- 10 97. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said therapeutic moiety is selected from the group consisting of at least one pharmaceutical, at least one gene, at least one antisense oligonucleotide, at least one chemotherapeutic agent, at least one contrast agent, at least one protein, at least one toxin, at least one radioactive atom, and a mixture thereof.
98. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said linker is pH
- 15 sensitive.
99. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 98, wherein said pH sensitive linker is an acid sensitive bond between the ligand and the therapeutic moiety.
100. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said linker is a liposome.
- 20 101. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 100, wherein said ligand is on the outside of the liposome and said therapeutic moiety is on the inside of said liposome.
102. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said therapeutic moiety is an enzyme which cleaves a prodrug.
103. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 94, wherein said linker is
- 25 cleavable by an enzyme.
104. The kidney-specific therapeutic complex of Claim 97, wherein said at least one pharmaceutical is a chemotherapeutic.
105. A method of determining the presence or concentration of CD90 (Thy-1) in a tissue or cell, comprising administering the therapeutic complex of Claim 94 to said tissue or cell *in vitro*
- 30 or *in vivo*, and identifying or quantitating the amount of the therapeutic complex which bound.
106. A pharmaceutical composition comprising the kidney-specific therapeutic complex of Claim 94 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.
107. A method for the treatment of prostate cancer comprising
- 35 administering a prostate-specific therapeutic complex of Claim 52 in an amount effective to reduce the number of cancer cells, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

108. The method of Claim 107 wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of an antisense RNA, an apoptosis-inducing protein, a nucleotide analog, a radioactive molecule, a toxin, and any other chemotherapeutic agent.
109. A method for the treatment of brain tumors comprising
5 administering a brain-specific therapeutic complex of Claim 66 in an amount effective to reduce the number of cancer cells, wherein said therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.
110. The method of Claim 109 wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of an antisense RNA, an apoptosis-inducing protein, a nucleotide analog, a
10 radioactive molecule, a toxin, and any other chemotherapeutic agent.
111. A method for the treatment of pancreatic cancer comprising
administering the pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 38 in an amount effective to reduce the amount of thrombosis, wherein said therapeutic moiety is an antithrombotic agent.
112. A method for the treatment of pancreatic cancer comprising
15 administering the pancreas and/or gut-specific therapeutic complex of Claim 80 in an amount effective to reduce the amount of thrombosis, wherein said therapeutic moiety is an antithrombotic agent.
113. A method for the treatment of kidney transplant rejection comprising
20 administering the kidney and/or lung specific therapeutic complex of Claim 94 in an amount sufficient to reduce the rejection of the kidney transplant, wherein said therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.
114. The method of Claim 113 wherein said immunosuppressant agent is a corticosteroid or a cyclosporin.
115. A method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising:
25 administering a therapeutically effective amount of a therapeutic complex, said therapeutic complex comprising: a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety, and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand, wherein said tissue-specific lumenally expressed protein is selected from the group consisting of CD71, CD90, MAdCAM,
30 Albumin fragment, carbonic anhydrase IV, ZG16-p and dipeptidyl peptidase IV.
116. A method for lung and/or heart-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
35 providing a carbonic anhydrase IV-binding agent, and
administering said carbonic anhydrase IV-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the lung and/or heart or lung and/or heart tissue as a result of the administration of the carbonic anhydrase IV-binding agent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

117. The method of Claim 116, wherein said carbonic anhydrase IV-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
118. The method of Claim 116, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said carbonic anhydrase IV-binding agent.
119. The method of Claim 116, wherein said substance is administered separately from said carbonic anhydrase IV-binding agent.
120. The method of Claim 116, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
121. The method of Claim 116, wherein said substance is said carbonic anhydrase IV-binding agent.
122. The method of Claim 116, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
123. The method of Claim 116, wherein said *in vitro* administration is to a lung and/or heart or lung and/or heart tissue to be transplanted.
124. A method of identifying a lung and/or heart-specific ligand, comprising:
identifying a carbonic anhydrase IV-binding agent.
125. The method of Claim 124 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.
126. A method for brain-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
providing a CD71 (transferrin receptor)-binding agent, and
administering said CD71-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the brain or brain tissue as a result of the administration of the CD71-binding agent.
127. The method of Claim 126, wherein said CD71-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
128. The method of Claim 126, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said CD71-binding agent.
129. The method of Claim 126, wherein said substance is administered separately from said CD71-binding agent.
130. The method of Claim 126, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
131. The method of Claim 126, wherein said substance is said CD71-binding agent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

132. The method of Claim 126, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
133. The method of Claim 126, wherein said *in vitro* administration is to a brain or brain tissue to be transplanted.
134. A method of identifying a brain-specific ligand, comprising:
identifying a CD71-binding agent.
135. The method of Claim 134 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.
136. A method for kidney-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
providing a CD90(Thy-1)-binding agent, and
administering said CD90-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the kidney or kidney tissue as a result of the administration of the CD90-binding agent.
137. The method of Claim 136, wherein said CD90-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
138. The method of Claim 136, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said CD90-binding agent.
139. The method of Claim 136, wherein said substance is administered separately from said CD90-binding agent.
140. The method of Claim 136, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
141. The method of Claim 136, wherein said substance is said CD90-binding agent.
142. The method of Claim 136, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
143. The method of Claim 136, wherein said *in vitro* administration is to a kidney or kidney tissue to be transplanted.
144. A method of identifying a kidney-specific ligand, comprising:
identifying a CD90-binding agent.
145. The method of Claim 144 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

146. A method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
- providing a dipeptidyl peptidase IV-binding agent, and
 - administering said dipeptidyl peptidase IV-binding agent *in vivo* or *in vitro*,
- 5 wherein said substance is delivered to the lung and/or kidney or lung and/or kidney tissue as a result of the administration of the dipeptidyl peptidase IV-binding agent.
147. The method of Claim 146, wherein said dipeptidyl peptidase IV-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
- 10 148. The method of Claim 146, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said dipeptidyl peptidase IV-binding agent.
149. The method of Claim 146, wherein said substance is administered separately from said dipeptidyl peptidase IV-binding agent.
150. The method of Claim 146, wherein said substance is selected from the group
- 15 consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
151. The method of Claim 146, wherein said substance is said dipeptidyl peptidase IV-binding agent.
152. The method of Claim 146, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
- 20 153. The method of Claim 146, wherein said *in vitro* administration is to a lung and/or kidney or lung and/or kidney tissue to be transplanted.
154. A method of identifying a lung and/or kidney-specific ligand, comprising:
- identifying a dipeptidyl peptidase IV-binding agent.
- 25 155. The method of Claim 154 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.
156. A method for pancreas and/or gut-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
- 30 providing a ZG16-p-binding agent, and
- administering said ZG16-p-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue as a result of the administration of the ZG16-p-binding agent.
- 35 157. The method of Claim 156, wherein said ZG16-p-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

158. The method of Claim 156, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said ZG16-p-binding agent.
159. The method of Claim 156, wherein said substance is administered separately from said ZG16-p-binding agent.
- 5 160. The method of Claim 156, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
161. The method of Claim 156, wherein said substance is said ZG16-p-binding agent.
162. The method of Claim 156, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
- 10 163. The method of Claim 156, wherein said *in vitro* administration is to a pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue to be transplanted.
164. A method of identifying a pancreas and/or gut-specific ligand, comprising:
identifying a ZG16-p-binding agent.
- 15 165. The method of Claim 164 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.
166. A method for pancreas and/or gut-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
20 providing a MAdCAM-binding agent, and
administering said MAdCAM-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue as a result of the administration of the MAdCAM-binding agent.
- 25 167. The method of Claim 166, wherein said MAdCAM-binding agent is selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
168. The method of Claim 166, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said MAdCAM-binding agent.
169. The method of Claim 166, wherein said substance is administered separately from
30 said MAdCAM-binding agent.
170. The method of Claim 166, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
171. The method of Claim 166, wherein said substance is said MAdCAM-binding agent.
- 35 172. The method of Claim 166, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.

WO 02/100336

PCT/US02/18185

173. The method of Claim 166, wherein said *in vitro* administration is to a pancreas and/or gut or pancreas and/or gut tissue to be transplanted.
174. A method of identifying a pancreas and/or gut-specific ligand, comprising:
identifying a MADCAM-binding agent.
- 5 175. The method of Claim 174 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.
176. A method for prostate-specific delivery of a substance *in vivo* or *in vitro*, comprising:
10 providing a Albumin fragment-binding agent, and
administering said Albumin fragment-binding agent *in vivo* or *in vitro*, wherein said substance is delivered to the prostate or prostate tissue as a result of the administration of the Albumin fragment-binding agent.
177. The method of Claim 176, wherein said Albumin fragment-binding agent is
15 selected from the group consisting of an antibody, a protein, a peptide, an oligonucleotide, a small molecule, and a polysaccharide.
178. The method of Claim 176, wherein said substance is covalently or non-covalently bound to said Albumin fragment-binding agent.
179. The method of Claim 176, wherein said substance is administered separately from
20 said Albumin fragment-binding agent.
180. The method of Claim 176, wherein said substance is selected from the group consisting of a therapeutic agent, a contrast agent, a diagnostic agent, and a toxic agent.
181. The method of Claim 176, wherein said substance is said Albumin fragment-binding agent.
- 25 182. The method of Claim 176, wherein said *in vivo* administration is by a method selected from the group consisting of injection, oral delivery, aerosolization, an implantable pump, a patch, and a stent.
183. The method of Claim 176, wherein said *in vitro* administration is to a prostate or prostate tissue to be transplanted.
- 30 184. A method of identifying a prostate-specific ligand, comprising:
identifying a Albumin fragment-binding agent.
185. The method of Claim 184 wherein said identification is by a method selected from the group consisting of antibody production, combinatorial library screening, one-hybrid technology, molecular modeling and two-hybrid technology.

FIGURE 1

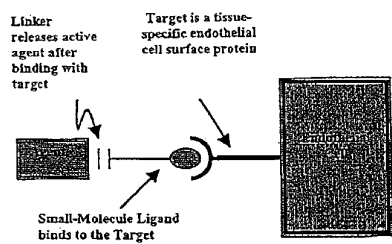


FIGURE 2

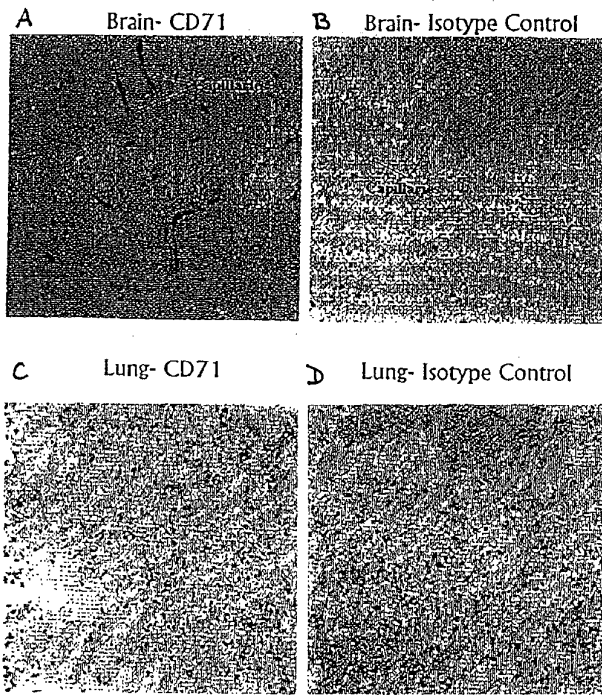


FIGURE 3

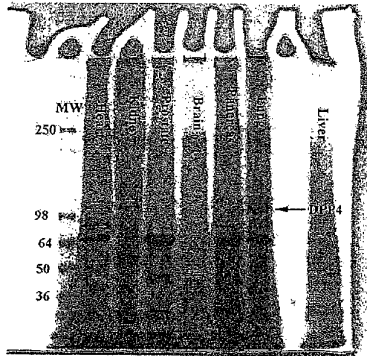


FIGURE 4

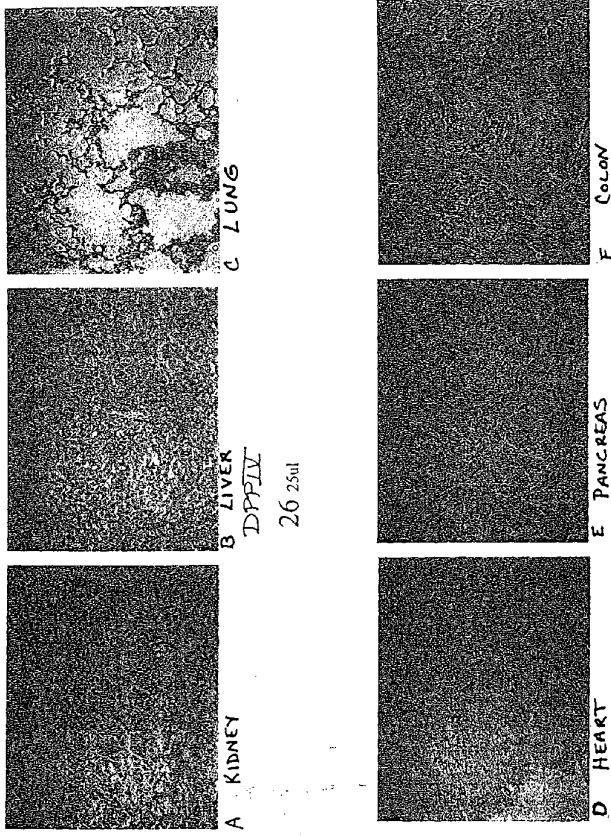


FIGURE 5

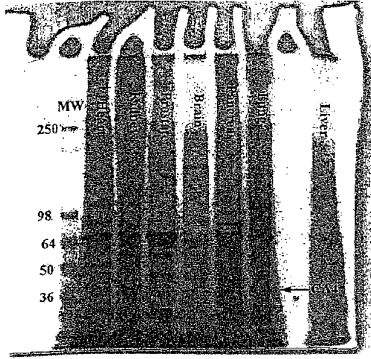


FIGURE 6

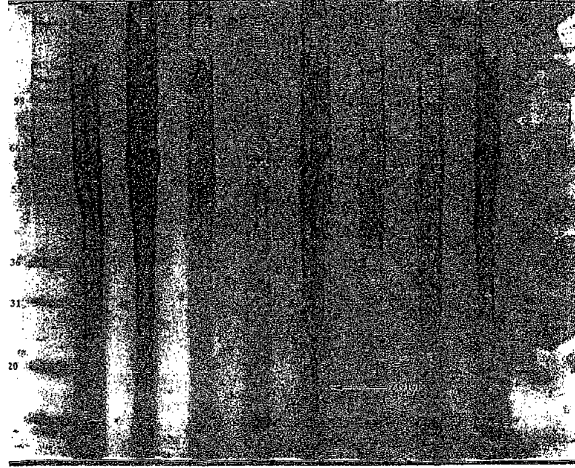


FIGURE 7

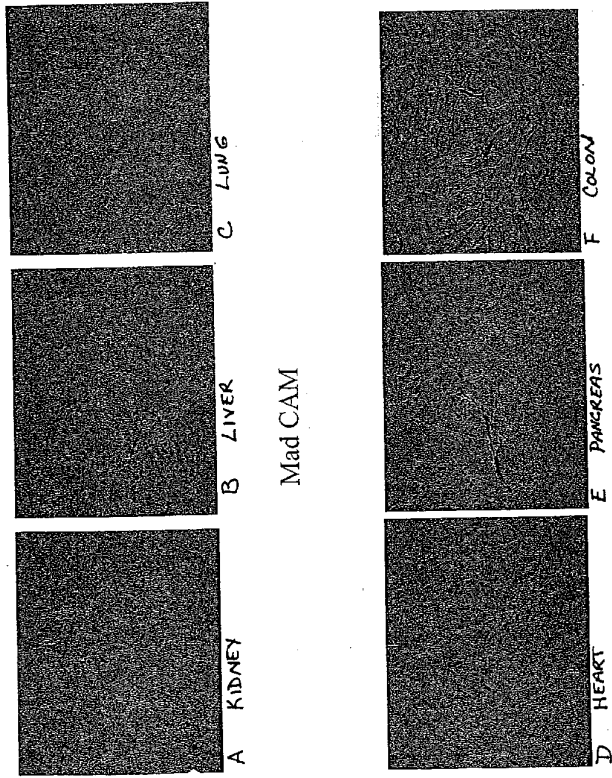


FIGURE 8

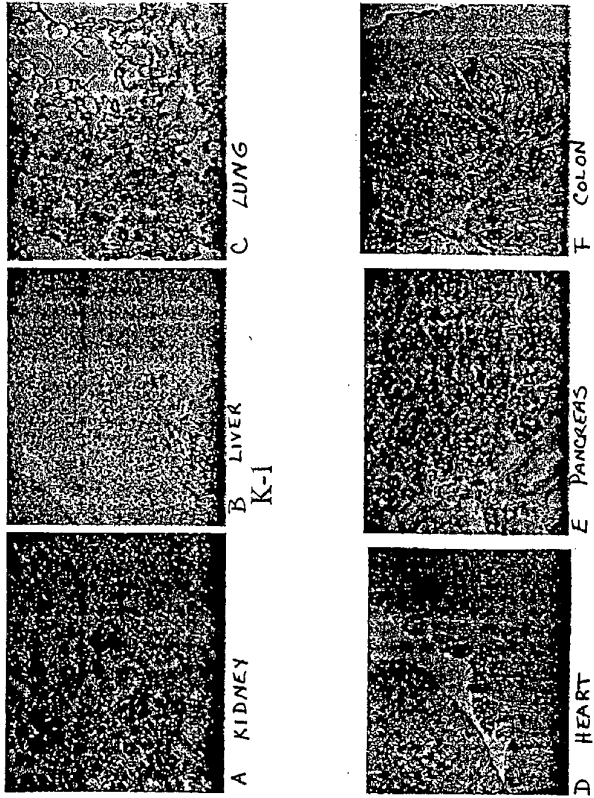


FIGURE 9

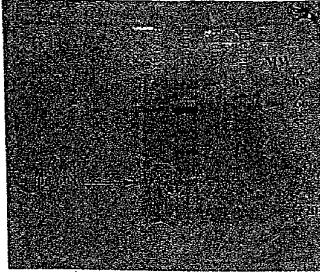


FIGURE 10

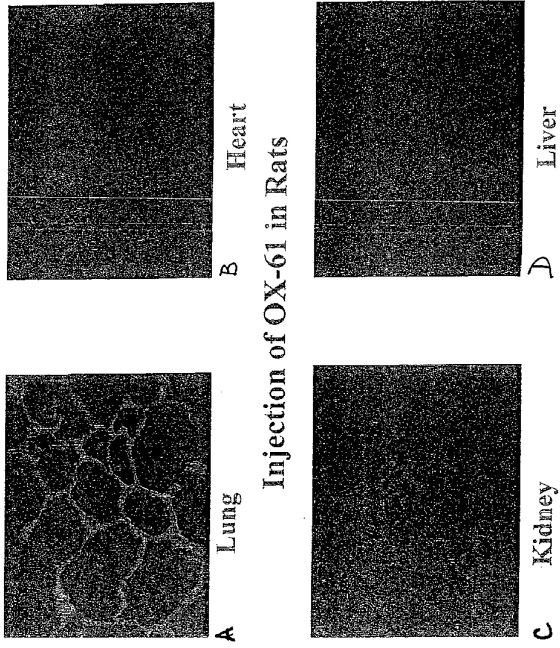


FIGURE 11

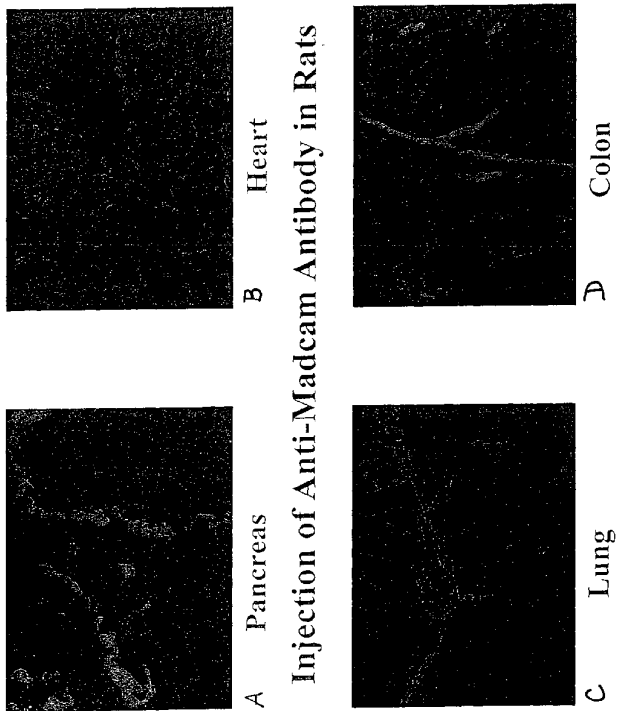


FIGURE 12

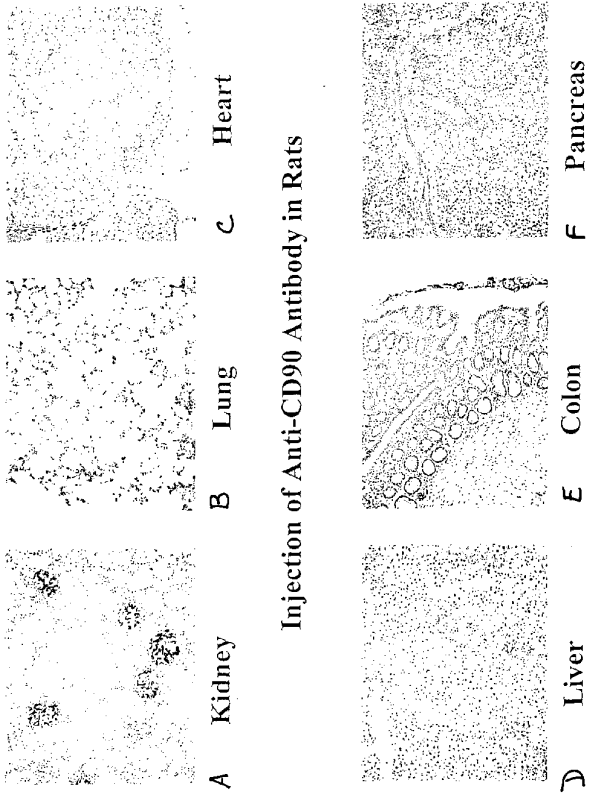


FIGURE 13

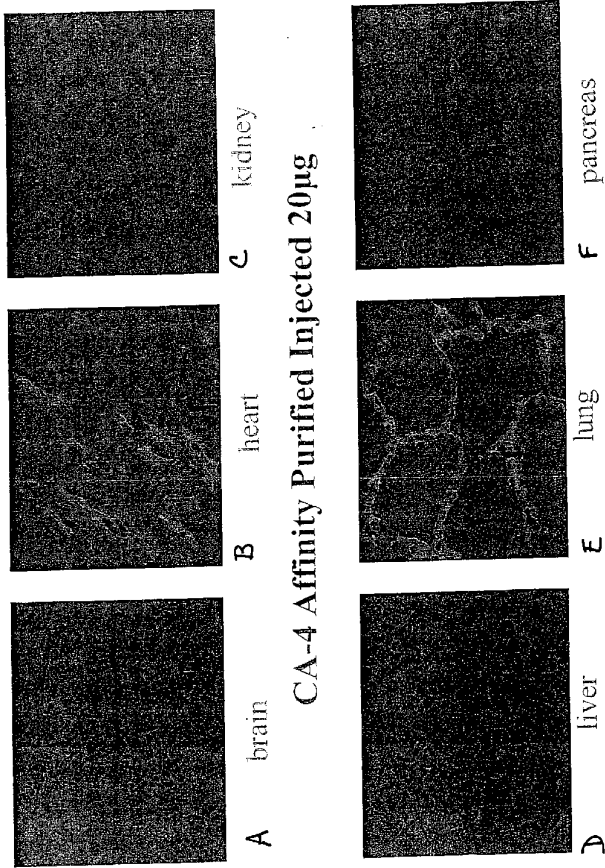


FIGURE 14

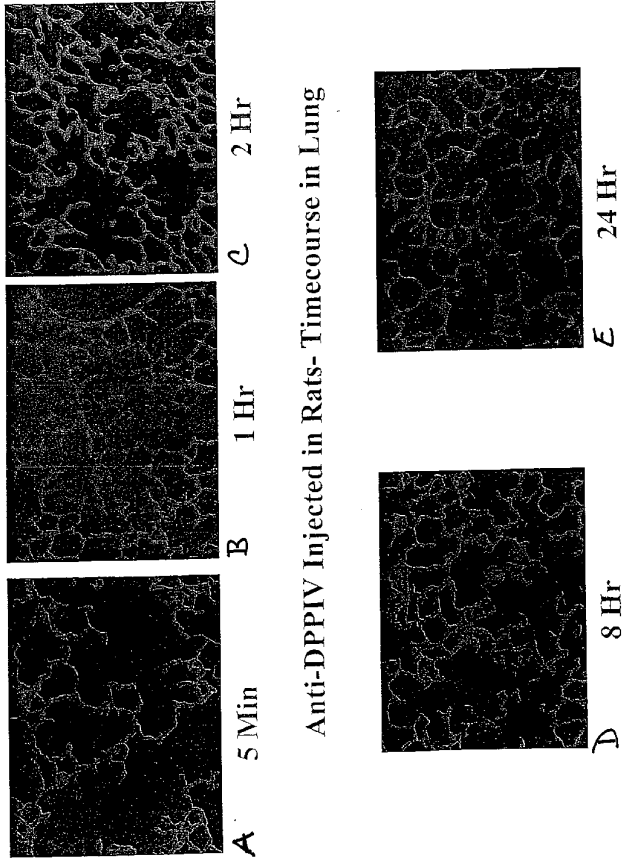


FIGURE 15

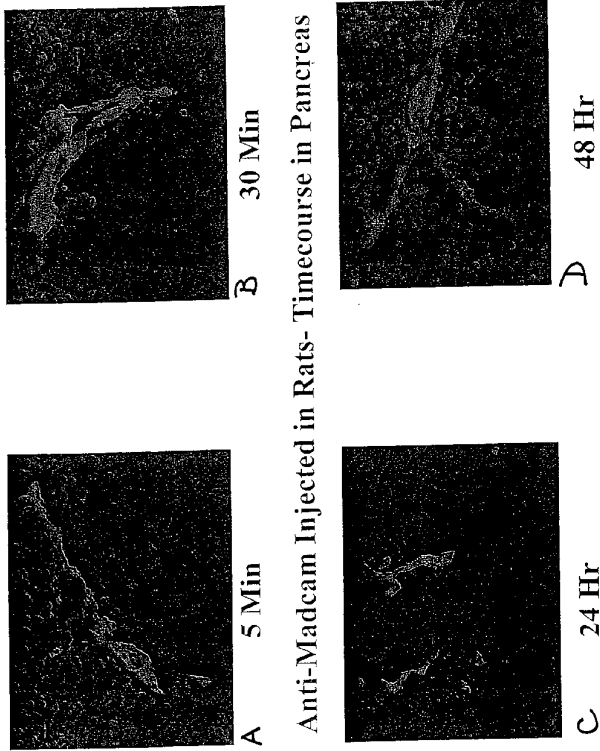


FIGURE 16

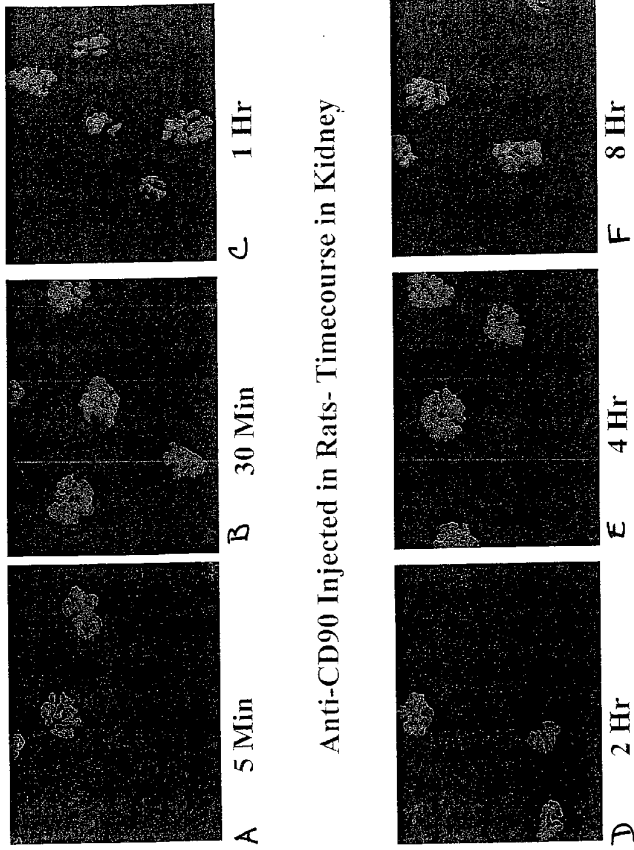


FIGURE 17

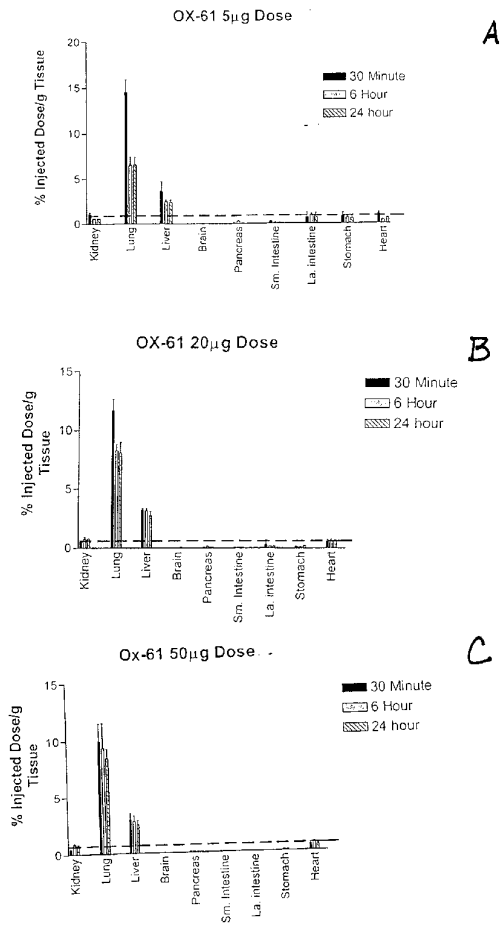


FIGURE 18

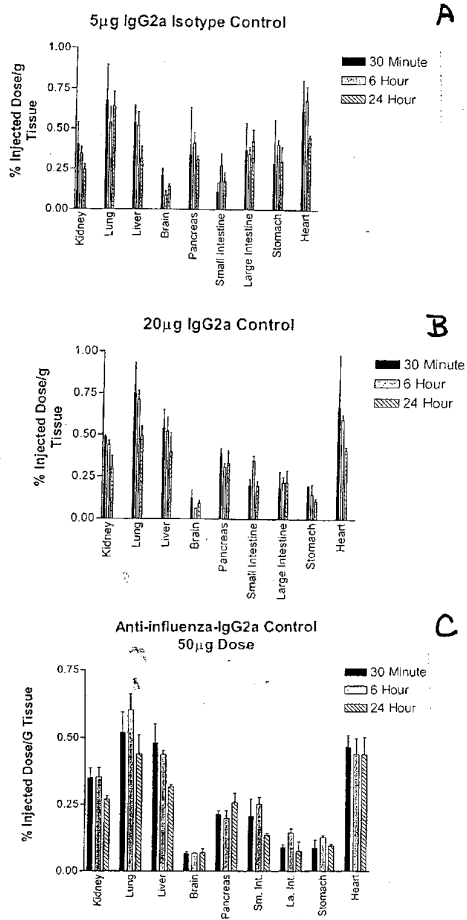


FIGURE 19

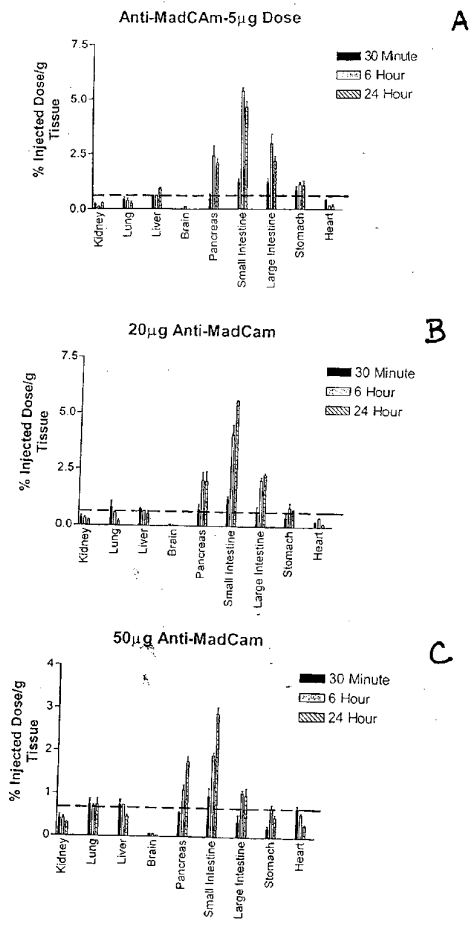


FIGURE 20

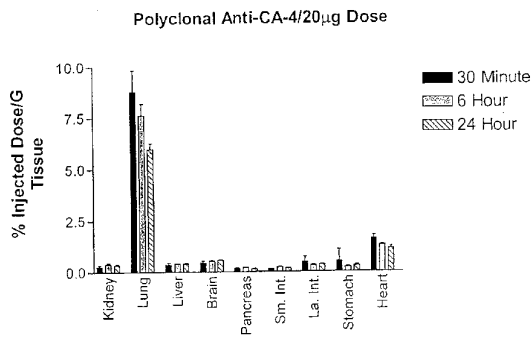


FIGURE 21
5 ug Injection

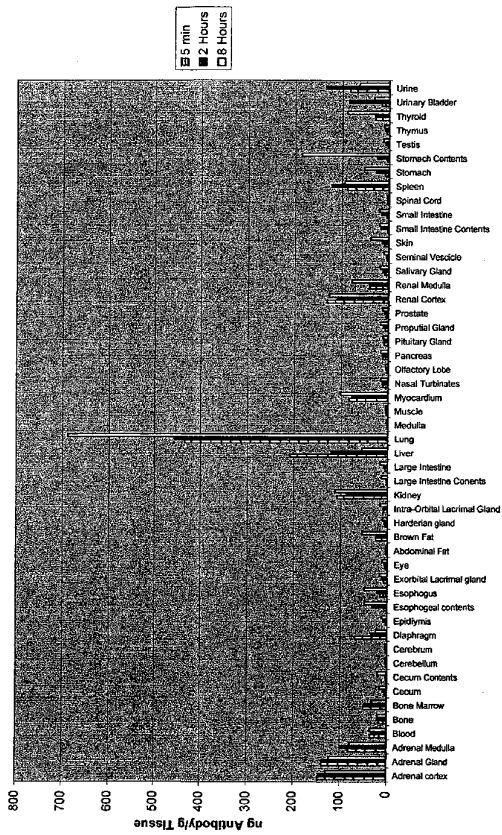


FIG. 22
Penetration of Anti-DPPIV Antibody in Lung

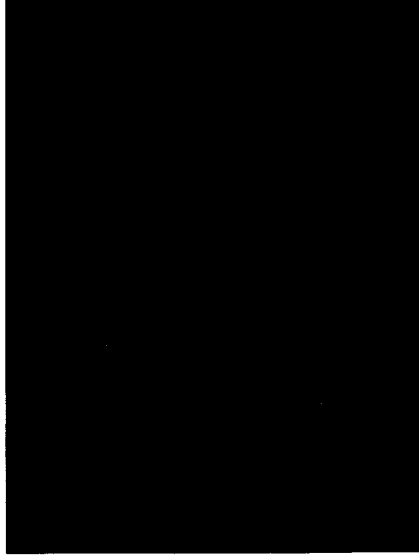


FIG. 23
Penetration of Anti-CD90
Antibody in the Kidney

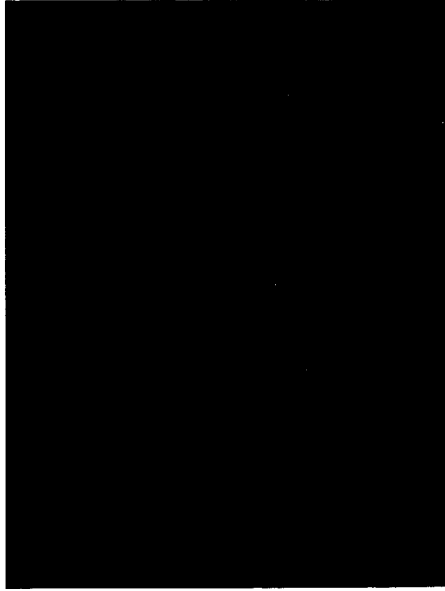


FIG. 24
**Anti-Madcam-1 Antibody does not
penetrate Pancreas Tissue**

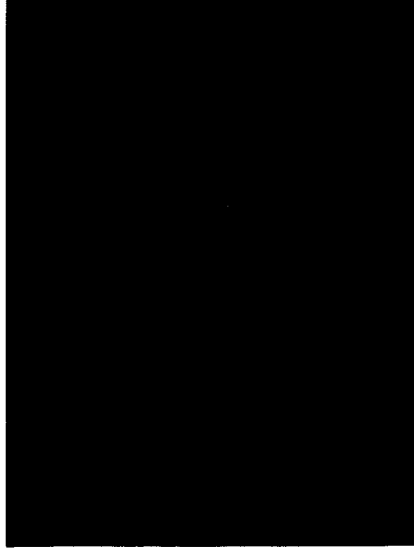


FIG. 25
Anti-CAIV Antibody does not
cross the Endothelium

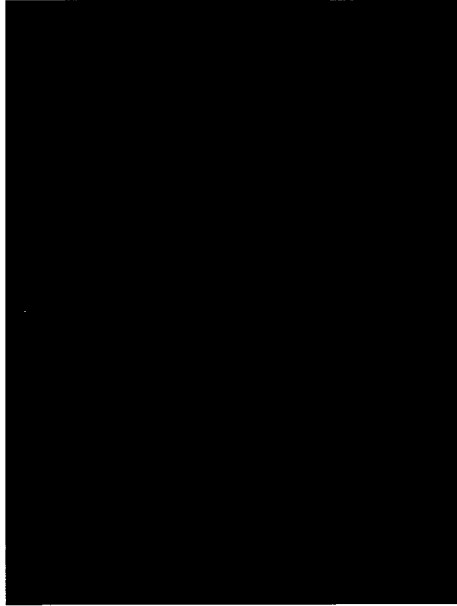
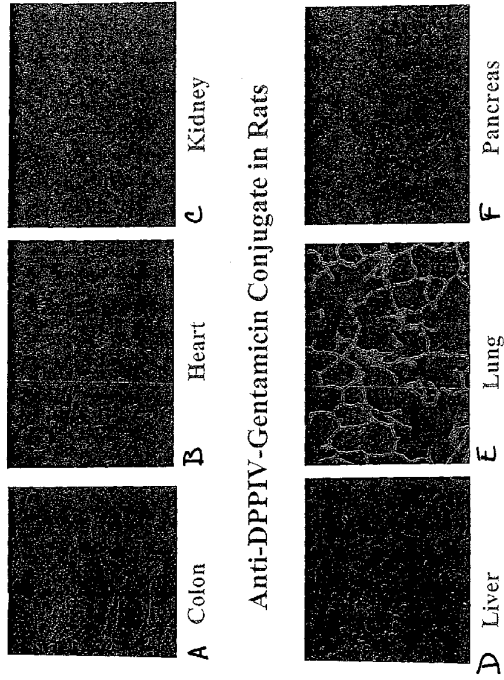


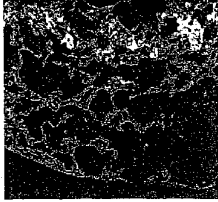
FIGURE 26



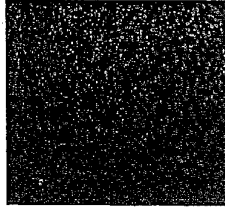
Anti-DPPIV-Gentamicin Conjugate in Rats

FIGURE 27

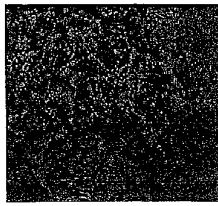
Doxorubicin Localization in the Lung



A Lung



B Liver

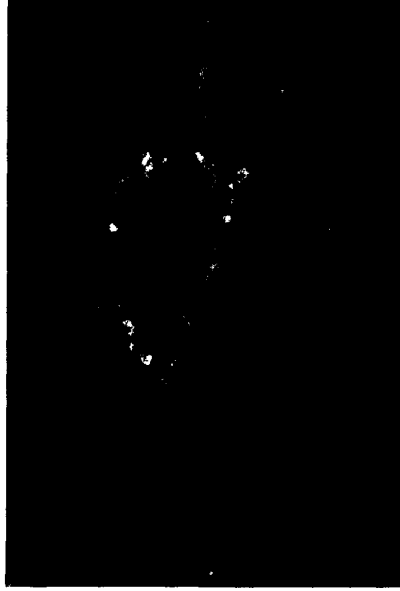


C Kidney



D Heart

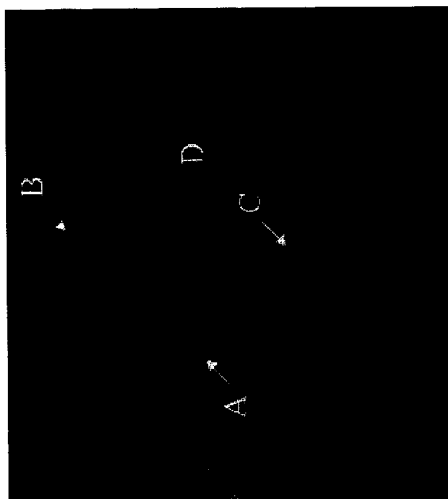
FIG. 28
Anti-Madcam-Gentamicin Conjugate
Transcytoses into Lung Tissue



Blue-Nuclei; Red-Conjugate; Green-Capillary cell marker

Penetration of Doxorubicin into the Lung

FIG. 29



A: Doxorubicin in bronchiole; B: Interstitial Lung Tissue;
C: Bronchiole surface; D: Lumen of Bronchiole

WO 02/100336

30/35

PCT/US02/18185

FIGURE 30

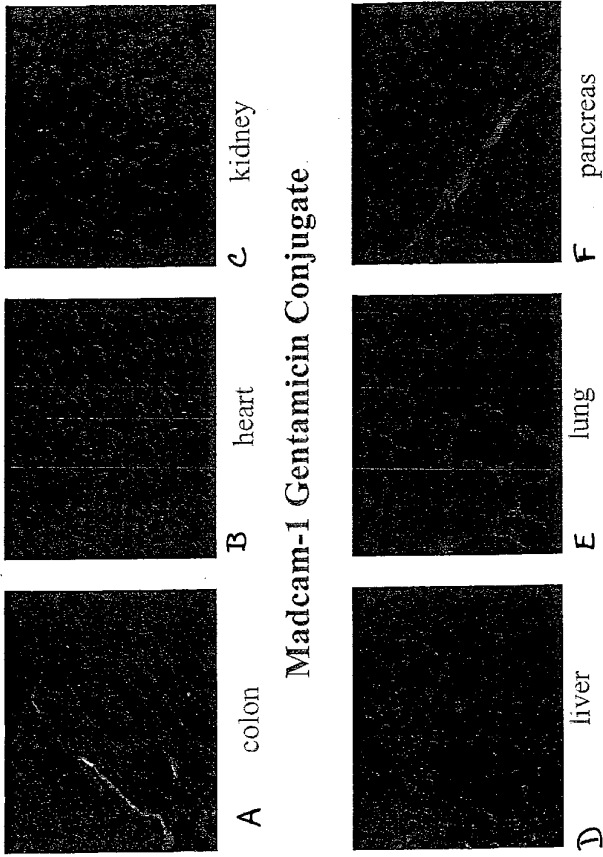
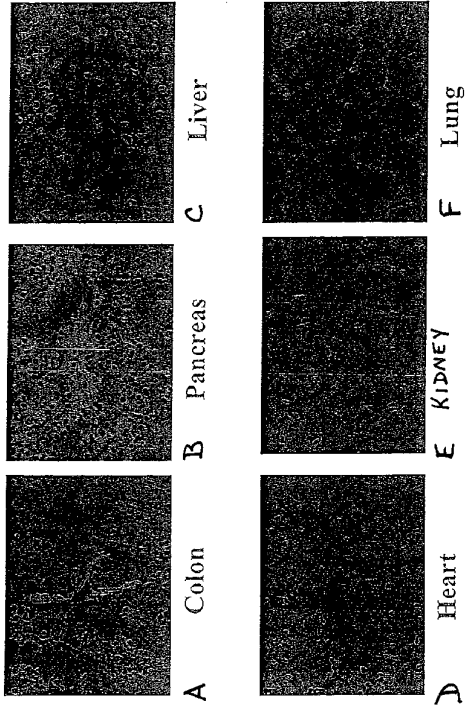


FIGURE 31
Doxorubicin Localization in the GI



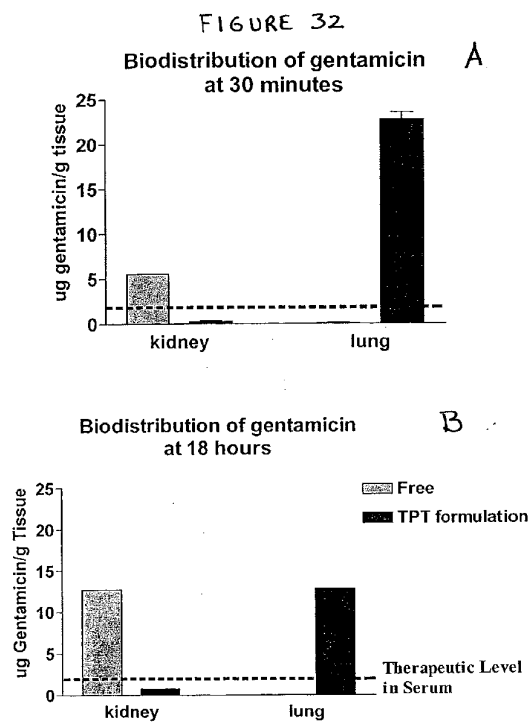
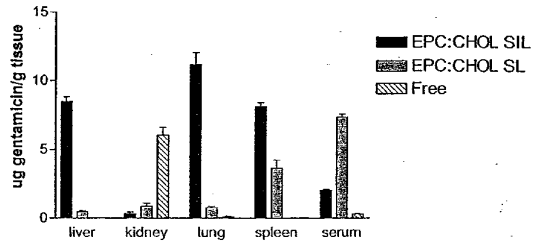


FIGURE 33

A

Biodistribution of EPC Gentamicin Formulations at 30 Minutes



B

Biodistribution of EPC Gentamicin Formulations at 18 Hours

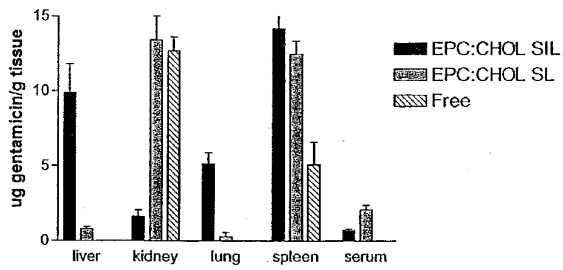
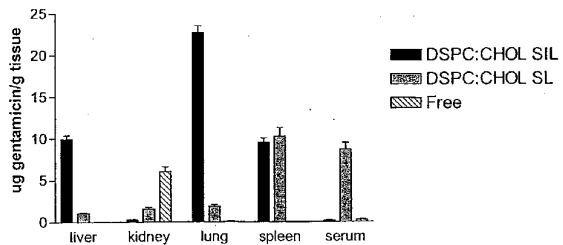


FIGURE 34

A
Biodistribution of DSPC Gentamicin Formulations at 30 Minutes



B
Biodistribution of DSPC Gentamicin Formulations at 18 Hours

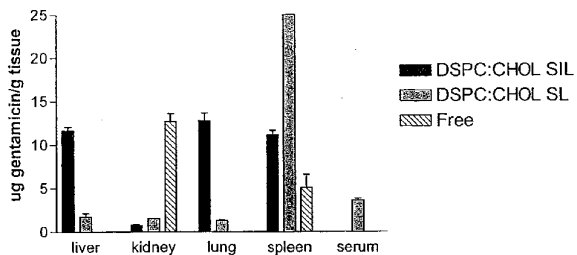
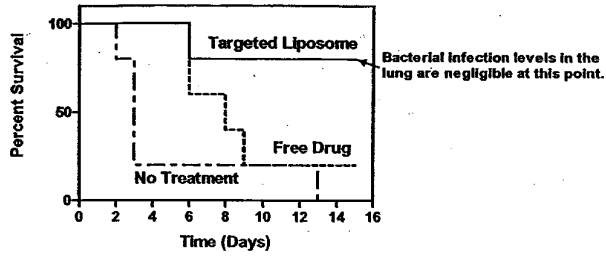


FIGURE 35

**Demonstration of Efficacy in a Rat Model of Pneumonia
With Targeted Liposomal Gentamicin**



WO 02/100336

PCT/US02/18185

SEQUENCE LISTING

<110> TARGET PROTEIN TECHNOLOGIES, INC.
ROBEN, Paul, W.
STEVENS, Anthony, C.

<120> TISSUE-SPECIFIC ENDOTHELIAL MEMBRANE
PROTEINS

<130> TPTECH.001VPC

<150> US 60/297,021
<151> 2001-06-08

<150> US 60/305,117
<151> 2001-07-12

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Proteinase cleavable peptide linker.

<221> SITE
<222> 2
<223> Phenylalanine in the number 2 position is a D-Phe.

<400> 1
Gly Phe Pro Arg Gly Phe Pro Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Turin protease cleavable peptide linker.

<400> 2
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide corresponding to rat DPP4.

<400> 3

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Phe Arg Pro Ala Glu
1 5

<210> 4
<211> 767
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4
Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10 15
Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Asp Glu
20 25 30
Ala Ala Ala Asp Ser Ala Arg Thr Tyr Thr Leu Ala Asp Tyr Leu Lys
35 40 45
Asn Thr Phe Arg Val Lys Ser Tyr Ser Leu Arg Trp Val Ser Asp Ser
50 55 60
Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Leu Phe Asn Ala Glu
65 70 75 80
His Gly Asn Ser Ser Ile Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Glu Ile Phe
85 90 95
Gly Asp Ser Ile Ser Asp Tyr Ser Val Ser Pro Asp Arg Leu Phe Val
100 105 110
Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr Thr Ala
115 120 125
Ser Tyr Ser Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr Glu Glu
130 135 140
Lys Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Ile Thr Trp Ser Gln Glu Gly His
145 150 155 160
Lys Leu Ala Tyr Val Trp Lys Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile Glu Pro
165 170 175
His Leu Pro Ser His Arg Ile Thr Ser Thr Gly Lys Glu Asn Val Ile
180 185 190
Phe Asn Gly Ile Asn Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Ile Phe Gly Ala
195 200 205
Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220
Gln Phe Asn Asp Thr Gly Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Ser
225 230 235 240
Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Trp Ile Pro Tyr Pro Lys
245 250 255
Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Ile Val Asn Thr Asp
260 265 270
Ser Leu Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ile Pro Met Gln Ile Thr Ala Pro
275 280 285
Ala Ser Val Thr Thr Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Ala Trp Val
290 295 300
Ser Glu Asp Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln Asn Tyr
305 310 315 320
Ser Val Met Ala Ile Cys Asp Tyr Asp Lys Thr Thr Leu Val Trp Asn
325 330 335
Cys Pro Thr Thr Gln Glu His Ile Glu Thr Ser Ala Thr Gly Trp Cys
340 345 350
Gly Arg Phe Arg Pro Ala Glu Pro His Phe Thr Ser Asp Gly Ser Ser
355 360 365
Phe Tyr Lys Ile Val Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile Cys Gln
370 375 380
Phe Gln Lys Asp Arg Lys Pro Glu Gln Val Cys Thr Phe Ile Thr Lys
385 390 395 400
Gly Ala Trp Glu Val Ile Ser Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

          405          410          415
Tyr Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Glu Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu
          420          425          430
Tyr Lys Ile Gln Leu Thr Asp His Thr Asn Lys Lys Cys Leu Ser Cys
          435          440          445
Asp Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Leu Ser Lys
          450          455          460
Glu Ala Lys Tyr Tyr Gly Leu Gly Cys Arg Gly Pro Gly Leu Pro Leu
          465          470          475
Tyr Thr Leu His Arg Ser Thr Asp Gln Lys Glu Leu Arg Val Leu Glu
          485          490          495
Asp Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asp Val Gln Met Pro Ser
          500          505          510
Lys Lys Leu Asp Phe Ile Val Leu Asn Glu Thr Arg Phe Trp Tyr Gln
          515          520          525
Met Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu
          530          535          540
Ile Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Ala Ala Phe
          545          550          555
Arg Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val
          565          570          575
Ala Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met
          580          585          590
His Ala Ile Asn Lys Arg Leu Gly Thr Leu Glu Val Glu Asp Gln Ile
          595          600          605
Glu Ala Ala Arg Gln Phe Leu Lys Met Gly Phe Val Asp Ser Lys Arg
          610          615          620
Val Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val
          625          630          635
Leu Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro
          645          650          655
Val Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met
          660          665          670
Gly Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr
          675          680          685
Val Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile
          690          695          700
His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile
          705          710          715
Ser Lys Ala Leu Val Asp Ala Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr
          725          730          735
Thr Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile
          740          745          750
Tyr Ser His Met Ser His Phe Leu Gln Gln Cys Phe Ser Leu Arg
          755          760          765

```

```

<210> 5
<211> 4835
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

```

```

<400> 5
gagcagaggc gcaggacgtc cgtctccgcy cgcgtgactt ctgectgcgc tcaagcttca 60
gagttcagtt tcaaggagcc gcccaacctt gaagacaccg tggaaagttc ttctgggact 120
gcttgggtgc gctgcgcttg tcaccatcat caccgtgccca gtggttctgc tgaacaaaga 180
tgaagcggcc gctgatagcg cgagaactta cacactagct gactatttaa agaatacctt 240
tcgggtcaag tctactcctt tgcggtgggt ttcagattct gaatacctct acaagcaaga 300
aaacaatac ttgctattca atgctgaaca cgggaacagc tccattttct tggagaacag 360
tacctttgag atctttggag attctataag tgattattca gtgtcacccg acagactggt 420
cgttctotta gaatacaatt atgtgaagca atggagacac tctacacggc cttcatacag 480

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

tattttgac ttgaataaaa gacagctgat cacagaagag aagattccaa ataatacaca 540
gtggatcaca tggtcacaag aaggltcacia attggcatat gtcctggaga atgatattta 600
tgtaaaattt gaaccacatt tgccctagta taggatcaca tcaacaggaa aagaaaattt 660
aaatatttaac ggaataaatg actgggttta tgaagaggaa acttctgggt cctactccgc 720
actgtgtggg tctccaaaag gcaactttct agcttatgcc cagtttaacg acaccggagt 780
gcctctcatt gaaatactct tctactctga tgagctactg cagtaccoca agacagtctg 840
gattccgtac ccaaggcag gactctgtaa tccaactgta aagttcttta tgttaaatac 900
agactctctc agctcaacta ctactaogat tcccatgcaa atcaaccgctc ctgcatctgt 960
gacaacaggg gatcaactat tgtgtgactg ggcctggggt tcaagaagaca gaattctggt 1020
gcagtgacct aggaggatc agaactatc cgtgatggcg atctgcgact atgataagac 1080
cacccctagta tggcaactgt caacagcgca ggagcatatt gaaacagggt ccacagcgtg 1140
gtcgggaaga tttaggcctg cagaacocca ctccactcc gacggaaagc gctctataa 1200
aatcgtcagt gacaagatg gctcaaaaac catctgccag tccagaaag ataggaaac 1260
cgaaacaggt gtacattta ttaaaaagg agcctgggaa gtcattagta tgaagctct 1320
gaccagcgtc tatctgact acattagtaa tgaataaaa gaaatgccag gaggagaaga 1380
tctttataaa attcaagctta ctgaccacac aaataagaag tgccttagtt gtgacctgaa 1440
tccagaaaga tgcagattt actcgggtgc acttagtaaa gaggcaagtt actacagct 1500
gggatgcccg ggcctggctc tgcctctcta cactctgat cgcagcactg tcaaaaaga 1560
gctggagagt ctggaggaca attctgcttt ggaataaagt ctgcaagatg tcaaatgctt 1620
tcaaaaaaaa ttggacttca ctgtctgtaa tgaataaaga ttttggatc aaatgctctt 1680
acctctctcat tttgataaat ccaagaataa cctctacta atagatgat aaatgctctt 1740
ctgtagtcaa aaagcagatg ctgctctcag actcaactgg ggttaccag gagataagt 1800
agaaaacatc atagtagcta gctttgatgg cagaggaact ggttaccag gagataagt 1860
catgcatgca atcaacaaaa gacttggaa actggaaagt gaagatcaa ttgaagcag 1920
caggcaattt taaaaaatgg gatttggaa cagcaagcga gttgcaattt gggctggct 1980
ataggagggt tacgtaacct caatggtctt gggatcgga agtggcgtgt tcaagtgtg 2040
aatagcctgt gcgcccgtt caggtggga gactactgac tcaatgata cagagctta 2100
catggctctc caactccag aggaacact tgaactatgac agaaactca cagctatgag 2160
cagagctgaa aaatttaagc aagttgagta cctccttatt cacggtacag cagatgata 2220
tgttcacltt cagcagctcag ctcatctc caaagcctg gtggatgctg gctgtgatt 2280
cgaagcaatg tggtaacagg angaagacca tgggatgccc agcagcaag ctaccagca 2340
catctattcc caatgagcc atttctcca gcagtgctc tcttaccgt agcatggca 2400
ggctctccgc agcttacta agagcaact tgtctcatt atctaaaac tgcattgta 2460
agatgagcat ttaataatg tgcctcag aaattccag ctacttcca gttttatcc 2520
tgaactctca actaaggatg octgtctca gaacagatta ttaacttaca gcaatttga 2580
tttcccctc tgtttgttt atcatttaa accatttcca catcagctg tgaacaaca 2640
aatataaatt atttttgcaa gagctatgca tagatttctt gacagaaat tcaattttt 2700
tccccctlac taggtgtgct caaatctgtt tcccttattt aaggggtgg caagcgtgg 2760
tcaatgatgt cattaggcca gcaacaagag aagcgggaac agagaatag gctagaacc 2820
caggtccaag catacaacc caaccaggct actgctagct cgcctcgaga agagctgctc 2880
actgccagac tggccccttt tctgagaaa gactattcaa acagtctcag gaaatcat 2940
atcgaaagca ctgacttcta agtaaaacca cagcagttga atagactca aagaatgca 3000
agggagcctg ccagcaatgt aaggcccaca ggtgccagtt atggctatag gtgctacata 3060
aacacagcaa gctctatggg aaagcatggt aaatgtgctt taaaaatta ccaagctctc 3120
tagtgagaag aggcagcttg gaacatagcg acttgcctcc ttaaaaagttg aaaaatttg 3180
gttcccaaat tcaaacatga aggaatctt cgtctagctc tccctactc cttctttga 3240
gcattttcat taaagcattt taacttcatt atctttctaa tggaaaactg tatgagaatg 3300
ttttgttata ttatttctat tctacacact ggaatgttgc ctggtcattt agcaagtatg 3360
cttccatttt tcaaaagta atgggttata tcttgaatca aacttaact gcattgacat 3420
atggacacat ttgttcaag gttctgttt aactgtgtg aaatccaaga ctgtcttga 3480
aacatggaaa gatttcaact ttaaaaaaa aatttagata cataaaactg tttaaagta 3540
tatgatctat aagatttat ctaatacccc cagaaatttc tactcactt tatcacatag 3600
cttggctatt tacatactat ggaactcata atattattta acttagggga gcagtgagg 3660
ttctgtggac gataggaat gctatcagca gactagacat gttttccag ggtctgttt 3720
ttgttttttg tttctgtgct ctctctgttt gggcggaggg taatataata gataatata 3780
ataatagaa acactctgat acctgactta gccgtgtttt gacaacttg aaacttgatt 3840
caattattta taaccacagct gaaaatttaa aatggactcc acacatttaa atgcatttc 3900
agggcaalLt tctaggtaca attaccacag acaggtgagc tacagcataa atccaaca 3960
tggcagaatg gaaaattacc tataaatata aatgagttta gatattgatg agcctgatc 4020
tatttcccgg gcactccaact gttcccctca ccttaaggaa ctctcaagtc ctgctctcc 4080
actcgaagca cagctggtcc ttaaatctac aggcctctgg ctacagtcg aattgaaaca 4140

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

cagttctgtc accgtgtgca gcagcagcag ccatgtgcaa agttctagat caaggaacaa 4200
aggtagcaca gtttctgtac agtggtgaaa cataaacata aatgcgaatt aaatagaaat 4260
tatccctctc gaattctttt tgttctcttc atttctaamt aggttgttcc tggagcctga 4320
attaataaaa agaacacagc acacattttt cagggcatga gggtttcaca tggtgataat 4380
gtgaatacat tcagttttta tttgattctc ataggtcaag ttttactggt cggtaagagt 4440
tgtaaatagc attaaaacc tgatgcataa gttgtaaaac aacttaattt aagagcaagt 4500
tgtaaaagca caagagctaa taacaccact gaggcatata gacaagtctc tttatgggcat 4560
atgcagctcc ctgaagcgca tggatcaagc taccgcctca gagcacacca gcaaccagggg 4620
cgcatgtcaa aggaagagct cccctcccac cccccatgc ttcacagatcc atgttgactt 4680
cagtcgtgtc cattctgggc atcatagttc tccttcagat tattagcagt tccacctctt 4740
ggcagctact acttttgctc taagttggag tgagagtact ggtttataag attactggat 4800
ttgtacaata ttttaagattc aataaattct aagtg 4835

```

```

<210> 6
<211> 3407
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (76)...(2376)

```

```

<400> 6
cgcgcgctct cgccgcccgc gtgacttctg cctgcgctcc ttctctgaac gctcacttcc 60
gaggagacgc cgacg atg aag aca ccg tgg aag att ctt ctg gga ctg ctg 111
Met Lys Thr Pro Trp Lys Ile Leu Leu Gly Leu Leu
1 5 10

```

```

ggt gct gct gcg ctt gtc acc atc atc acc gtg ccc gtg gtt ctg ctg 159
Gly Ala Ala Ala Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu
15 20 25

```

```

aac aaa gcc aca gat gat gct aca gct gac agt cgc aaa act tac act 207
Asn Lys Gly Thr Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr
30 35 40

```

```

cta act gat tac tta aaa aat act tat aga ctg aag tta tac tcc tta 255
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu
45 50 55 60

```

```

aga tgg att tca gat cat gaa tat ctc tac aaa caa gaa aat aat atc 303
Arg Trp Ile Ser Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile
65 70 75

```

```

ttg gta ttc aat gct gaa tat gga aac agc tca gtt ttc ttg gag aac 351
Leu Val Phe Asn Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn
80 85 90

```

```

agt aca ttt gat gag ttt gga cat tct atc aat gat tat tca ata tct 399
Ser Thr Phe Asp Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser
95 100 105

```

```

cct gat ggg cag ttt att ctc tta gaa tac aac tac gtg aag caa tgg 447
Pro Asp Gly Gln Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp
110 115 120

```

```

agg cat tcc tac aca gct tca tat gac att tat gat tta aat aaa agg 495
Arg His Ser Tyr Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg
125 130 135 140

```

```

cag ctg att aca gaa gag agg att cca aac aac aca cag tgg gtc aca 543

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Gln Leu Ile Thr Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr
145 150 155

tgg tca cca gtg ggt cat aaa ttg gca tat gtt tgg aac aat gac att 591
Trp Ser Pro Val Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile
160 165 170

tat gtt aaa att gaa cca aat tta cca agt tac aga atc aca tgg acg 639
Tyr Val Lys Ile Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr
175 180 185

ggg aaa gaa gat ata ata tat aat gga ata act gac tgg gtt tat gaa 687
Gly Lys Glu Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu
190 195 200

gag gaa gtc ttc agt gcc tac tct gct ctg tgg tgg tct cca aac ggc 735
Glu Glu Val Phe Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
205 210 215 220

act ttt tta gca tat gcc caa ttt aac gac aca gaa gtc cca ctt att 783
Thr Phe Leu Ala Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile
225 230 235

gaa tac tcc ttc tac tct gat gag tca ctg cag tac cca aag act gta 831
Glu Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val
240 245 250

cgg gtt cca tat cca aag gca gga gct gtg aat cca act gta aag ttc 879
Arg Val Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe
255 260 265

ttt gtt gta aat aca gac tct ctc agc tca gtc acc aat gca act tcc 927
Phe Val Val Asn Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser
270 275 280

ata caa atc act gct cct gct tct atg ttg ata ggg gat cac tac ttg 975
Ile Gln Ile Thr Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu
285 290 295 300

tgt gat gtg aca tgg gca aca caa gaa aga att tct ttg cag tgg ctc 1023
Cys Asp Val Thr Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu
305 310 315

agg agg att cag aac tat tcc gtc atg gat att tgt gac tat gat gaa 1071
Arg Arg Ile Gln Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu
320 325 330

tcc agt gga aga tgg aac tgc tta gtg gca cgg caa cac att gaa atg 1119
Ser Ser Gly Arg Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met
335 340 345

agt act act ggc tgg gtt gga aga ttt agg cct tca gaa cct cat ttt 1167
Ser Thr Thr Gly Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe
350 355 360

acc ctt gat ggt aat agc ttc tac aag atc atc agc aat gaa gaa ggt 1215
Thr Leu Asp Gly Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly
365 370 375 380

tac aga cac att tgc tat ttc caa ata gat aaa aaa gac tgc aca ttt 1263
Tyr Arg His Ile Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe

WO 02/100336

PCT/US02/18185

	385	390	395	
att aca aaa ggc acc tgg gaa gtc atc ggg ata gaa gct cta acc agt				1311
Ile Thr Lys Gly Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser				
	400	405	410	
gat tat cta tac tac att agt aat gaa tat aaa gga atg cca gga gga				1359
Asp Tyr Leu Tyr Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly				
	415	420	425	
agg aat ctt tat aaa atc caa ctt att gac tat aca aaa gtg aca tgc				1407
Arg Asn Leu Tyr Lys Ile Gln Leu Ile Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys				
	430	435	440	
ctc agt tgt gag ctg aat ccg gaa agg tgt cag tac tat tct gtg tca				1455
Leu Ser Cys Glu Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser				
	445	450	455	460
ttc agt aaa gag gcg aag tat tat cag ctg aga tgt tcc ggt cct ggt				1503
Phe Ser Lys Glu Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly				
	465	470	475	
ctg ccc ctc tat act cta cac agc agc gtg aat gat aaa ggg ctg aga				1551
Leu Pro Leu Tyr Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg				
	480	485	490	
gtc ctg gaa gac aat tca gct ttg gat aaa atg ctg cag aat gtc cag				1599
Val Leu Glu Asp Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln				
	495	500	505	
atg ccc tcc aaa aaa ctg gac ttc att att ttg aat gaa aca aaa ttt				1647
Met Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe				
	510	515	520	
tgg tat cag atg atc ttg cct cct cat ttt gat aaa tcc aag aaa tat				1695
Trp Tyr Gln Met Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr				
	525	530	535	540
cct cta cta tta gat gtg tat gca ggc cca tgt agt caa aaa gca gac				1743
Pro Leu Leu Leu Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp				
	545	550	555	
act gtc ttc aga ctg aac tgg gcc act tac ctt gca agc aca gaa aac				1791
Thr Val Phe Arg Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn				
	560	565	570	
att ata gta gct agc ttt gat ggc aga gga agt ggt tac caa gga gat				1839
Ile Ile Val Ala Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp				
	575	580	585	
aag atc atg cat gca atc aac aga aga ctg gga aca ttt gaa gtt gaa				1887
Lys Ile Met His Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu				
	590	595	600	
gat caa att gaa gca gcc aga caa ttt tca aaa atg gga ttt gtg gac				1935
Asp Gln Ile Glu Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp				
	605	610	615	620
aac aaa cga att gca att tgg ggc tgg tca tat gga ggg tac gta acc				1983
Asn Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr				
	625	630	635	

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

tca atg gtc ctg gga tgc gga agt ggc gtg ttc aag tgt gga ata gcc 2031
Ser Met Val Leu Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala
640 645 650

gtg gcg cct gta tcc cgg tgg gag tac tat gac tca gtg tac aca gaa 2079
Val Ala Pro Val Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu
655 660 665

cgt tac atg ggt ctc cca act cca gaa gac aac ctt gac cat tac aga 2127
Arg Tyr Met Gly Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg
670 675 680

aat tca aca gtc atg agc aga gct gaa aat ttt aaa caa gtt gag tac 2175
Asn Ser Thr Val Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr
685 690 695 700

ctc ctt att cat gga aca gca gat gat aac gtt cac ttt cag cag tca 2223
Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Ser
705 710 715

gct cag atc tcc aaa gcc ctg gtc gat gtt gga gtg gat ttc cag gca 2271
Ala Gln Ile Ser Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala
720 725 730

atg tgg tat act gat gaa gac cat gga ata gct agc agc aca gca cac 2319
Met Trp Tyr Thr Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His
735 740 745

caa cat ata tat acc cac atg agc cac ttc ata aaa caa tgt ttc tct 2367
Gln His Ile Tyr Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser
750 755 760

tta cct tag cacctcaaaa taccatgcca tttaaagctt attaaaactc 2416
Leu Pro *
765

atTTTTgttt toattatctc aaaactgcac tgtcaagatg atgatgatct ttaaaataca 2476
cactcaaatc aagaactta aggltacott tgttcccaaa ttcatacct atcatettaa 2536
gtagggactt ctgtctctac aacagattat tactctacag aagtttgaat latccggtcg 2596
ggttttattg tttaaaatca ttctctgcatc agctgctgaa acaacaaata ggaatgtttt 2656
ttatggaggc ttgcataga ttccctgagc aggattttaa tctttttota actggactgg 2716
ttcaaatggt gttctctctc ttaaagggat ggcaagatgt gggcagtgat gtcactaggg 2776
caggagcagg ataagaggga ttagggagag aagatagcag ggcagggctg ggaacccaag 2836
tccaagcata ccaacacagag caggctactg tcagctcccc tcggagaaga gctgtccacc 2896
acagactgg cacagtttcc tgagaaagac tattcaaaaca gtctcaggaa atcaaatatc 2956
gaaagcactg acttctaagt aaaccacagc agttgaaaga ctccaagaa atgtaaggga 3016
aactgccagc aacgcagccc ccaggtgcca gttatggcta taggtgctac aaaaacacag 3076
caagggtgat gggaaagcat tgtaaatgtg ctttataaaa aaatactga tgttccctagt 3136
gaaagaggca gcttgaact gagatgtgaa cacatcagct tgccctgta aaagatgaaa 3196
atatttgat cacaaatctt aacttgaagg agtccttgca tcaatttttc ttatttcatt 3256
tctttgagtg tcttaattaa aagaatattt taacttctct ggactcattt taaaaatgg 3316
aacataaaat acaatggtat gtattattat tcccattota catactatgg aatttctccc 3376
agtcatttaa taaatgtgcc ttcatttttt c 3407

<210> 7
<211> 766
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Met Lys Thr Pro Trp Lys Ile Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
 20 25 30
 Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
 35 40 45
 Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
 50 55 60
 Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
 65 70 75 80
 Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
 85 90 95
 Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln
 100 105 110
 Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr
 115 120 125
 Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr
 130 135 140
 Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile
 165 170 175
 Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp
 180 185 190
 Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Val Phe
 195 200 205
 Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe
 225 230 235 240
 Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr
 245 250 255
 Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn
 260 265 270
 Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr
 275 280 285
 Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr
 290 295 300
 Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln
 305 310 315 320
 Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg
 325 330 335
 Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly
 340 345 350
 Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly
 355 360 365
 Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
 370 375 380
 Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400
 Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
 405 410 415
 Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Leu Ile Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
 435 440 445
 Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
 450 455 460
 Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
 465 470 475 480
 Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln Met Pro Ser Lys
500 505 510
Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
515 520 525
Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
530 535 540
Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
545 550 555 560
Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
565 570 575
Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
580 585 590
Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
595 600 605
Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
610 615 620
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
625 630 635 640
Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
645 650 655
Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
660 665 670
Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
675 680 685
Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
690 695 700
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
705 710 715 720
Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr
725 730 735
Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
740 745 750
Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
755 760 765

```

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide corresponding to rat carbonic anhydrase

IV.

<400> 8

Asp Ser His Trp Cys Tyr Glu Ile Gln

1

5

<210> 9

<211> 309

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

Met Gln Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Tyr Val Ala Pro Ser

1

5

10

15

Thr Glu Asp Ser His Trp Cys Tyr Glu Ile Gln Ala Lys Glu Pro Asn

20

25

30

-10-

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Ser His Cys Ser Gly Pro Glu Gln Trp Thr Gly Asp Cys Lys Lys Asn
 35 40 45
 Gln Gln Ser Pro Ile Asn Ile Val Thr Ser Lys Thr Lys Leu Asn Pro
 50 55 60
 Ser Leu Thr Pro Phe Thr Phe Val Gly Tyr Asp Gln Lys Lys Lys Trp
 65 70 75 80
 Glu Val Lys Asn Asn Gln His Ser Val Glu Met Ser Leu Gly Glu Asp
 85 90 95
 Ile Tyr Ile Phe Gly Gly Asp Leu Pro Thr Gln Tyr Lys Ala Ile Gln
 100 105 110
 Leu His Leu His Trp Ser Glu Glu Ser Asn Lys Gly Ser Glu His Ser
 115 120 125
 Ile Asp Gly Lys His Phe Ala Met Glu Met His Val Val His Lys Lys
 130 135 140
 Met Thr Thr Gly Asp Lys Val Gln Asp Ser Asp Ser Lys Asp Lys Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Leu Ala Phe Met Val Glu Val Gly Asn Glu Val Asn Glu Gly
 165 170 175
 Phe Gln Pro Leu Val Glu Ala Leu Ser Arg Leu Ser Lys Pro Phe Thr
 180 185 190
 Asn Ser Thr Val Ser Glu Ser Cys Leu Gln Asp Met Leu Pro Glu Lys
 195 200 205
 Lys Lys Leu Ser Ala Tyr Phe Arg Tyr Gln Gly Ser Leu Thr Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Asp Glu Thr Val Ile Trp Thr Val Phe Glu Glu Pro Ile Lys
 225 230 235 240
 Ile His Lys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Lys Lys Leu Tyr Tyr Asp
 245 250 255
 Gln Glu Gln Lys Leu Asn Met Lys Asp Asn Val Arg Pro Leu Gln Pro
 260 265 270
 Leu Gly Asn Arg Gln Val Phe Arg Ser His Ala Ser Gly Arg Leu Leu
 275 280 285
 Ser Leu Pro Leu Pro Thr Leu Leu Val Pro Thr Leu Thr Cys Leu Val
 290 295 300
 Ala Ser Phe Leu His
 305

<210> 10
 <211> 1205
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 10
 ggcttcgttg gtgctggacc ccaggcctggg cagcgtctat gccctcaagc accatgcagc 60
 tctctcttgc tctactggcg ctggcttaag tggcccctc tactgaagat tcacactggt 120
 gctatgagat tcaagccaag gagcccaaca gccattgctc agggcctgaa caatggactg 180
 gagactgtaa gaagaaccag cagctctccta tcaatattgt cactagtaag acaagttga 240
 acccagctct gacacccttc actttcgttg gctatgacca aaagaagaag tgggaagtta 300
 agaacaacca acactcagtg gaaatgtcgc tgggggagga catctatatt tttggaggag 360
 atctgccaac ccagtacaag gccatacagt tacaccctga ctggtcagag gactggaaca 420
 agggttcaga gcacagtatt gatgggaaac attttccat ggagatgat gtcgtgcata 480
 agaagatgac aacaggcgat aaggtgcagg actcggactc caaggacaag attgcggtgc 540
 tggcattcat ggttgagggt ggaacagcgg taaacagagg ctccagccc ctggggagg 600
 cactgtccag gctctccaaa ccctttacaa actccacagt gagtgagagc tgcctgcagg 660
 atatgcttcc tgaaaaaga aaactgtctg cctacttccg ttaccagggc tcaactgacta 720
 caccaggctg tgatgagact gtcactctga ctgtgttcca ggaacctatt aagatccata 780
 aagaccagtt cctggaattc tcaaaaagc tctactatga ccaagaacag aagttgaaca 840
 tgaaggacaa tgtgaggccc ctgcaagccc tgggaaaccg ccaggtgttc aggtctcatg 900
 cctcaggagc actgctgtct ttgcccctgc ccactctatt ggtcccaca ctcaactgcc 960
 tgggtggccag ctctctccac tgatgggtcaa attctggata tctggcctct gacctcaacc 1020

WO 02/100336

PCT/US02/18185

tttagaggat atggtttctc tttctcaatc tttccagggt gaactttggg gactattaag 1080
 gtgtgctgtg gtggtgcaca cctttaatcc cagcctgga tggagagagc agagacccat 1140
 ggatctctga ccttccctca acccctgatt aaattaaata aatatggat atgtttttac 1200
 tctta 1205

<210> 11
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Arg Met Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Pro Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Glu Ser His Trp Cys Tyr Glu Val Gln Ala Glu Ser Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Pro Cys Leu Val Pro Val Lys Trp Gly Gly Asn Cys Gln Lys
 35 40 45
 Asp Arg Gln Ser Pro Ile Asn Ile Val Thr Thr Lys Ala Lys Val Asp
 50 55 60
 Lys Lys Leu Gly Arg Phe Phe Ser Gly Tyr Asp Lys Lys Gln Thr
 65 70 75 80
 Trp Thr Val Gln Asn Asn Gly His Ser Val Met Met Leu Leu Glu Asn
 85 90 95
 Lys Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Leu Pro Ala Pro Tyr Gln Ala Lys
 100 105 110
 Gln Leu His Leu His Trp Ser Asp Leu Pro Tyr Lys Gly Ser Glu His
 115 120 125
 Ser Leu Asp Gly Glu His Phe Ala Met Glu Met His Ile Val His Glu
 130 135 140
 Lys Glu Lys Gly Thr Ser Arg Asn Val Lys Glu Ala Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Asp Glu Ile Ala Val Leu Ala Phe Leu Val Glu Ala Gly Thr Gln Val
 165 170 175
 Asn Glu Gly Phe Gln Pro Leu Val Glu Ala Leu Ser Asn Ile Pro Lys
 180 185 190
 Pro Glu Met Ser Thr Thr Met Ala Glu Ser Ser Leu Leu Asp Leu Leu
 195 200 205
 Pro Lys Glu Glu Lys Leu Arg His Tyr Phe Arg Tyr Leu Gly Ser Leu
 210 215 220
 Thr Thr Pro Thr Cys Asp Glu Lys Val Val Trp Thr Val Phe Arg Glu
 225 230 235 240
 Pro Ile Gln Leu His Arg Glu Gln Ile Leu Ala Phe Ser Gln Lys Leu
 245 250 255
 Tyr Tyr Asp Lys Lys Glu Gln Thr Val Ser Met Lys Asp Asn Val Arg Pro
 260 265 270
 Leu Gln Gln Leu Gly Gln Arg Thr Val Ile Lys Ser Gly Ala Pro Gly
 275 280 285
 Arg Pro Leu Pro Trp Ala Leu Pro Ala Leu Leu Gly Pro Met Leu Ala
 290 295 300
 Cys Leu Leu Ala Gly Phe Leu Arg
 305 310

<210> 12
 <211> 1104
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ctcgggtgcgc gaccccgctc cagaggactc ttgtctgtcc cgcaagatgc ggatgctgct 60
 ggcgctcctg gccctctccg cggcgcggcc atcggcncagt gcagagtcac actggtgcta 120

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

cgaggttcaa gccgagtcct ccaactaccc ctgcttgggt ccaagcaagt ggggtggaaa 180
ctgccagaag gccgcccagt ccccatcaa catcgtcacc accaaggcaa aggtgggaaa 240
aaaactggga cgtttcttct tctctggcta cgataagaag caaacgtgga ctgtccaaaa 300
taacggggcac tcagtgatga tgttgcctgga gaacaaggcc agcatttctg gaggaggact 360
gcctgcccaca taccaggcca aacagttgca cctgcaactgg tccgacttgc catataaggg 420
ctcggagcac agcctcgatg gggagcactt tgccatggag atgcacatag tacatagaaa 480
agagaagggg acatcgagga atgtgaaaga gcccaggac cctgaagacg aaattgcggt 540
gctggccttt ctggtggagg ctggaaccca ggtgaacgag ggcttccagc cactgtggga 600
ggcactgtct aatatcccca aacctgagat gacactactc atggcagaga gcagcctgtt 660
ggacctctct cccaaggagg agaaactgag gcaactcttc cgtcactctg gctcactcac 720
cacaccgacc tgcgatgaga aggtcgtctg gactgtgttc cggagaccca ttcagettca 780
cagagaacag atcctggcat tctctcagaa gctgtactac gacaaggaa acacagtgag 840
catgaaggac aatgtcaggc ccttcagaga gctggggcag cgaacggtag taaagtccgg 900
ggccccgggt cggcccgctc cctggccctt gctgcccctg ctgggcccga tctgtggcctg 960
ctgtctggcc ggcttccctc gatgatggct caactctgca cgcagcctct ctgttgcctc 1020
agctctccaa gttccaggct tccggtcctt agccttccca ggtgggactt taggcacgat 1080
taaaatatgg acatattttt ggag 1104

```

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide corresponding to rat ZG16-p.

<400> 13
 Asn Ser Ile Gln Ser Arg Ser Ser Ser Tyr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 14
 Met Leu Ala Ile Ala Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Ser Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Asn Ser Ile Gln Ser Arg Ser Ser Tyr Ser Gly Glu Tyr Gly Gly
 20 25 30
 Lys Gly Gly Lys Arg Phe Ser His Ser Gly Asn Gln Leu Asp Gly Pro
 35 40 45
 Ile Thr Ala Ile Arg Ile Arg Val Asn Arg Tyr Tyr Ile Ile Gly Leu
 50 55 60
 Gln Val Arg Tyr Gly Thr Val Trp Ser Asp Tyr Val Gly Gly Asn Arg
 65 70 75 80
 Glu Thr Glu Glu Ile Phe Leu His Pro Gly Glu Ser Val Ile Gln Val
 85 90 95
 Ser Gly Lys Tyr Lys Ser Tyr Val Lys Gln Leu Ile Phe Val Thr Asp
 100 105 110
 Lys Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Gly Lys Asp Ser Gly Thr Ser Phe Asn
 115 120 125
 Ala Val Pro Leu His Pro Asn Thr Val Leu Arg Phe Ile Ser Gly Arg
 130 135 140
 Ser Gly Ser Ala
 145

<210> 15
 <211> 672

WO 02/100336

PCT/US02/18185

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 15

```

aattcctctt agtccttctc tgtgcctcgg catctgcaac tactagggga aagcctcagg 60
atgttgccca ttgccctctt agtccttctc tgtgcctcgg cgtctgctaa ttcoattcag 120
tccaggctct cctcttacag tggagatgat ggcggtaaa gaggaaagcg attctctcac 180
tctggcaacc agctggacgg ccccatcact gccatcogga tccgtgtcaa cagatactac 240
atnataggtc tccaggtgcy ctacggcaca gtgtggagtg actatgtagg tggcaacagg 300
gagactgagg agatctttct gcaccccggg gaatctgtga tccaggtgtc tggcaagtac 360
aaatctlatg tgaagcagct gatctctgtg acagacaaa gccgctacct gcccttttgg 420
aaagactcag gcacaagttt caacgctgtt ccctgcacc ccaacactgt cctccgttcc 480
attagtggcc gatctggctc tgcatagatg ctatcagcct gcactgggat acctacccta 540
gccactgcaa cacttgttga aaccacccat cctctgctgt ggtgggtatg agaactccct 600
tatcaacaag ccccaggaaa catgcaataa gcttaataaa aggatattgt taaaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aa 672

```

<210> 16

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

Ile Ala Leu Thr Leu Asn Gly Pro Lys Cys Leu Cys Gly Ser Asp Thr
  1      5      10     15
Ala Val Gln Cys Glu Leu Ser Pro Ile Pro Leu Ser Ile Cys Leu Arg
  20     25     30
Lys Lys Val Ile Ser Cys Leu Ile Leu His Thr Ala Phe Tyr Thr
  35     40     45

```

<210> 17

<211> 370

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

gattgccctt acactaaatg gtcccaagtg tttatgtggt tctgacactg cgtccagtg 60
tgagttgtcc ccgataccat tgtcaatatg cctgagaaaa aaagtaattt cctgccttat 120
tctacacaca gccatttata cctagtctga gcgagaatct gagagtgtc tttcctatag 180
tatagagtag ggtacatgga tcttttcaca ataagctgct gctcggaggc atttgtcact 240
tctgagtttg caactgtgtc agaggccccc agaagctgct ttcagtgaa gtgaggtatt 300
aacactgaat agatttggat atactctcgg tcacagctcg ttcctcctga gccagaatca 360
aaaaaaaaaa 370

```

<210> 18

<211> 394

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

```

Met Glu Pro Ile Leu Ala Leu Leu Ala Leu Gly Pro Phe Gln Leu
  1      5      10     15
Ser Arg Gly Gln Ser Phe Gln Val Asn Pro Pro Glu Pro Glu Val Ala
  20     25     30
Val Ala Met Gly Thr Ser Leu Gln Ile Asn Cys Ser Met Ser Cys Asp
  35     40     45
Lys Asp Ile Ala Arg Val His Trp His Gly Leu Asp Thr Asn Leu Gly
  50     55     60
Asn Val Gln Thr Leu Pro Gly Ser Arg Val Leu Ser Val Arg Gly Met
  65     70     75     80

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Leu Ser Asp Thr Gly Thr Arg Val Cys Val Gly Ser Cys Gly Ser Arg
85 90 95
Ser Phe Gln His Ser Val Lys Ile Leu Val Tyr Ala Phe Pro Asp Gln
100 105 110
Leu Glu Val Thr Pro Glu Phe Leu Val Pro Gly Arg Asp Gln Val Val
115 120 125
Ser Cys Thr Ala His Asn Ile Trp Pro Ala Gly Pro Asp Ser Leu Ser
130 135 140
Phe Ala Leu Leu Arg Gly Glu Gln Ser Leu Glu Gly Ala Gln Ala Leu
145 150 155 160
Glu Thr Glu Gln Glu Glu Met Gln Glu Thr Glu Gly Thr Pro Leu
165 170 175
Phe Gln Val Thr Gln Arg Trp Leu Leu Pro Ser Leu Gly Thr Pro Ala
180 185 190
Leu Pro Ala Leu Tyr Cys Gln Val Thr Met Gln Leu Pro Lys Leu Val
195 200 205
Leu Thr His Arg Arg Lys Ile Pro Val Leu Gln Ser Gln Thr Ser Pro
210 215 220
Glu Pro Pro Ser Thr Thr Ser Ala Lys Pro Tyr Ile Leu Thr Ser Ser
225 230 235 240
His Thr Thr Lys Ala Val Ser Thr Gly Leu Ser Ser Val Ala Leu Pro
245 250 255
Ser Thr Pro Leu Ser Ser Glu Gly Pro Cys Tyr Pro Glu Ile His Gln
260 265 270
Asn Pro Glu Ala Asp Trp Glu Leu Cys Glu Ala Ser Cys Gly Ser
275 280 285
Gly Val Thr Val His Trp Thr Leu Ala Pro Gly Asp Leu Ala Ala Tyr
290 295 300
His Lys Arg Glu Ala Gly Ala Gln Ala Trp Leu Ser Val Leu Pro Leu
305 310 315 320
Gly Pro Ile Pro Glu Gly Trp Phe Gln Cys Arg Met Asp Pro Gly Gly
325 330 335
Gln Val Thr Ser Leu Tyr Val Thr Gly Gln Val Ile Pro Asn Pro Ser
340 345 350
Ser Met Val Ala Leu Trp Ile Gly Ser Leu Val Leu Gly Leu Leu Ala
355 360 365
Leu Ala Phe Leu Ala Tyr Cys Leu Trp Lys Arg Tyr Arg Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Pro Asp Ser Ser Ser Cys Thr Leu Leu
385 390

<210> 19
<211> 1279
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 19
gacagagaaa ggcattggagc ccatcctggc cctcctgctg gccctgggac ccttcagct 60
cagcagagggc cagtccttcc aggtgaatcc tcctgagcct gaggtagctg tagccatggg 120
cacatccctc cagatcaact gcagcatgtc ctgtgacaag gatatagccccc gggctgactg 180
gcattggcctg gacaccaacc tgggcaatgt gcagaccctc ccaggcagca gggctccttc 240
cgtacggaggc atgctgtcag acacggggc acgtgtatgc gtgggttccct gggggagtgc 300
aagctttcag cactctgtga agatccttgc gtatgccttt ccagaccagc tggaggtaac 360
cccggagtcc ctgtacctg gacgggacca ggtagtgtcc tgcacagccc acaacatctg 420
gcctgcaggc cggacagtc tttcctttgc cttgtctcga ggagagcaga gcttgagggg 480
tgctcaggcc ctggaaacag agcaagagga ggagatgcaa gagactgagg gcactccact 540
cttccaagtg acacaacgct ggttctgccc ctcctggggg acccccgcc ttcccgcct 600
ttattggcag gtcaccatgc agctgcccac actggtgctg acacatagaa ggaagattcc 660
agtcctacag agccagacct caccagagcc ccccagcacc acctctgcta agccatacat 720
cctgacctca tcacatacta ctaaggcagt ctccactggg ctcagcagtg tagcctgccc 780

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

ttctaagcct ctgagctcgg agggccctgg ctaccaccgaa atccaccaga acccagaggc 840
agactgggaa ettcctctgg aagcctcctg tgggtctgga gtgacgggtg attggaccct 900
ggctcctggg gacctggcag cctaccacaa gagagaagct ggggcccagg catggctaag 960
cgtgctgccc ctgggcccga ttcttgaggg ctgggtccag tgcgcatgg acctggcggg 1020
gcaggtgacc agtcgtatg ttactggcca ggtgaccca aaccctcctt ccatggctgc 1080
cctgtggatt ggcagcttgg tgcctgggct gcttgcactc gccttccttg cctactgect 1140
gtggaaacgc taccggccgg gtccctcccc agactccacg tctgttaagc tctatgaag 1200
ttcattatg ccagactaag ggaggcaag gattaccaga tctaggtttg gggcatcaag 1260
atgatagtgt gggcccttt 1279

```

```

<210> 20
<211> 381
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 20
Met Asp Phe Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15
Leu Gly Gln Ser Leu Gln Val Lys Pro Leu Gln Val Glu Pro Pro Glu
20 25 30
Pro Val Val Ala Val Ala Leu Gly Ala Ser Arg Gln Leu Thr Cys Arg
35 40 45
Leu Ala Cys Ala Asp Arg Gly Ala Ser Val Gln Trp Arg Gly Leu Asp
50 55 60
Thr Ser Leu Gly Ala Val Gln Ser Asp Thr Gly Arg Ser Val Leu Thr
65 70 75 80
Val Arg Asn Ala Ser Leu Ser Ala Ala Gly Thr Arg Val Cys Val Gly
85 90 95
Ser Cys Gly Gly Thr Phe Gln His Thr Val Gln Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110
Phe Pro Asp Gln Leu Thr Val Ser Pro Ala Ala Leu Val Pro Gly Asp
115 120 125
Pro Glu Val Ala Cys Thr Ala His Lys Val Thr Pro Val Asp Pro Asn
130 135 140
Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Val Gly Gly Gln Glu Leu Glu Gly Ala
145 150 155 160
Gln Ala Leu Gly Pro Glu Val Gln Glu Glu Glu Glu Pro Gln Gly
165 170 175
Asp Glu Asp Val Leu Phe Arg Val Thr Glu Arg Trp Arg Leu Pro Pro
180 185 190
Leu Gly Thr Pro Val Pro Pro Ala Leu Tyr Cys Gln Ala Thr Met Arg
195 200 205
Leu Pro Gly Leu Glu Leu Ser His Arg Gln Ala Ile Pro Val Leu His
210 215 220
Ser Pro Thr Ser Pro Glu Pro Pro Asp Thr Thr Ser Pro Glu Ser Pro
225 230 235 240
Asp Thr Thr Ser Pro Glu Ser Pro Asp Thr Thr Ser Pro Glu Pro Pro
245 250 255
Asp Thr Thr Ser Pro Glu Pro Pro Asp Lys Thr Ser Pro Glu Pro Ala
260 265 270
Pro Gln Gln Gly Ser Thr His Thr Pro Arg Ser Pro Gly Ser Thr Arg
275 280 285
Thr Arg Arg Pro Glu Ile Ser Gln Ala Gly Pro Thr Gln Gly Glu Val
290 295 300
Ile Pro Thr Gly Ser Ser Lys Pro Ala Gly Asp Gln Leu Pro Ala Ala
305 310 315 320
Leu Trp Thr Ser Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Ala Leu Pro
325 330 335
Thr Tyr His Leu Trp Lys Arg Cys Arg His Leu Ala Glu Asp Asp Thr
340 345 350
His Pro Pro Ala Ser Leu Arg Leu Leu Pro Gln Val Ser Ala Trp Ala

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

	355				360					365
Gly	Leu	Arg	Gly	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Ile	Ser
	370				375					380

<210> 21
 <211> 1546
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 21
gggactgagc atggatttcg gactggccct cctgctggcg gggcttctgg ggctcctect 60
cggccagtcc ctccaggtga agcccttga ggtggagccc cgggagccgg tggtagccgt 120
ggccttgggc gcctcgccgc agctcacctg ccgcttggcc tgcgaggacc cgggggcctc 180
ggtgcagtgg cggggcctgg acaccagcct gggcgcggtg cagtccggaca cgggcccggg 240
cgtcctcacc gtgcgcaacg cctcgtctgc ggcggccggg acccggtgtg gcgtgggctc 300
ctcggggggc cgcaccttcc agcaacccgt gcagctcctt ggttacgctt tccggagcca 360
gctgaccgtc tcccacgacg ccctgggtgc tggtagcccg gaggtggcct gtaaggccca 420
caaatgcacg cccgtggacc ccaacgcgct ctcttctctc ctgctctctg ggggcccagg 480
actggagggg gcgcaagccc tgggcccggg ggtgcaggag gaggaggagg agccccaggg 540
ggacgaggac gtctgttca ggtgacaga ggcgtggcgg ctgcccctcc tggggagccc 600
tgtcccggcc ccctctact gccagccac gatgaggctg cctggcttgg agctcagcca 660
ccgacagccc atcccgttc tgcacagccc gacctccccg gagctctccc acaccacctc 720
cccggagtct cccgacacca cctcccggga gtctcccagc accacctccc cccagcaggg 780
cgacaccacc tcccggagc cctccgacaa gacctccccg gagctctccc cccagcaggg 840
cccacacacc acccccaggg gccccaggct cccagcaggc cggcggcctg agatccccca 900
ggtggggccc acgacaggag aagtgatccc aacaggctcg tccaaacctg cgggtgacca 960
gtgcccgcgc gctctgtgga ccagcagtgc ggtgctggga ctgctgtctc tggccttggc 1020
cacgtatcac ctctggaaac gctgcccgga cctggctggg gacgacaccc acccaccagg 1080
ttctctgagg ctctgcccc agtgtcggc ctgggtggg ttaaggggga cgggcaaggt 1140
cgggaccagc ccctcctgag tggcagcct ttcccctgtg gaaagcaaaa tagcttggac 1200
ccctcaagt tgagaactgg tcaaggcaaa cctgctctcc atttactca aagtcattcc 1260
ttgtttcaca gactggatg catgttctga ttgctctttt ggagaagtc atcagaact 1320
caaaaaggg ccaatgtttg tctcaactac ccatgacctg aagccccctc ctgagttgct 1380
cccaccttcc tggacggaac cactactttt ttacatacat tgattcaatg ctcacgtctc 1440
cctaaaaatg cgtaaagcca agctgtgcc tgaccacctt gggccccctg cgtcaggacc 1500
tcttgaggct ttggcaata aacctctaa aatgataaaa aaaaaa 1546

```

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide corresponding to rat albumin.

<400> 22	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr
1									5

<210> 23
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fragment of rat albumin.

<400> 23	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Ala
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

1           5           10           15
Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Ala
      20           25           30
Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
      35           40           45
Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val Thr Lys
      50           55           60
Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
      65           70           75           80
Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
      85           90           95
Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Lys Glu Lys Gln Ile
      100          105          110
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
      115          120          125
Thr Glu Asp Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala Gln Phe Val
      130          135          140
Asp Lys Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Asn Cys Phe Ala Thr Glu
      145          150          155          160
Gly Pro Asn Leu Val Ala Arg Ser Lys Glu Ala Leu Ala
      165          170

```

```

<210> 24
<211> 608
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

```

```

<400> 24
Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
1           5           10           15
Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20           25           30
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35           40           45
Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Ile
50           55           60
Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65           70           75           80
Glu Asn Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Ile His Thr Leu Phe Gly Asp
85           90           95
Lys Leu Cys Ala Ile Pro Lys Leu Arg Asp Asn Tyr Gly Glu Leu Ala
100          105          110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115          120          125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Pro Phe Gln Arg Pro Glu Ala
130          135          140
Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Gln Glu Asn Pro Thr Ser Phe Leu Gly
145          150          155          160
His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165          170          175
Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Lys Tyr Asn Glu Val Leu Thr Gln Cys
180          185          190
Cys Thr Glu Ser Asp Lys Ala Ala Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Ala
195          200          205
Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ala Ala Val Arg Gln Arg Met Lys Cys
210          215          220
Ser Ser Met Gln Arg Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225          230          235          240
Ala Arg Met Ser Gln Arg Phe Pro Asn Ala Glu Phe Ala Glu Ile Thr
245          250          255

```

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Lys Leu Ala Thr Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Ala Cys Cys Asp
 290 295 300
 Lys Pro Val Leu Gln Lys Ser Gln Cys Leu Ala Glu Thr Glu His Asp
 305 310 315 320
 Asn Ile Pro Ala Asp Leu Pro Ser Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335
 Lys Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Glu Gly Asp Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu
 385 390 395 400
 Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Val Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu
 450 455 460
 Pro Glu Ala Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile
 465 470 475 480
 Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Lys Glu
 530 535 540
 Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Glu Asp Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala
 565 570 575
 Gln Phe Val Asp Lys Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Asn Cys Phe
 580 585 590
 Ala Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Ala Arg Ser Lys Glu Ala Leu Ala
 595 600 605

<210> 25
 <211> 608
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Ile
 50 55 60
 Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

WO 02/100336

PCT/US02/18185

Pro Lys Ala Thr Glu Asp Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala
 563 570 575
 Gln Phe Val Asp Lys Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Asn Cys Phe
 580 585 590
 Ala Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Ala Arg Ser Lys Glu Ala Leu Ala
 595 600 605

<210> 26
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 26
 Ile Glu Phe Thr Asp Ile Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Tyr Tyr Ile
 20 25 30
 Glu Asn Leu Phe His Asp Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu
 35 40 45
 His Tyr Val Lys Ile Gln Val Lys Asn Ser Val Ser Gln Asn Leu Val
 50 55 60
 Thr Ile Asn Ser Gly Ser Asn Ile Asp Pro Val Glu Ala Pro Glu Gly
 65 70 75 80
 Tyr Val Ala Phe Ser Lys Ala Gly Glu Val Thr Gly Lys Leu Val His
 85 90 95
 Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Asn Tyr Ser Val
 100 105 110
 Asn Gly Ser Leu Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu
 115 120 125
 Lys Val Ala Asn Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr
 130 135 140
 Met Asp Arg Asn Thr Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Gln Phe Phe
 145 150 155 160
 Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro
 165 170 175
 Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro
 180 185 190
 Ser Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Pro Ala Glu Lys Leu Phe
 195 200 205
 Lys Asn Met Glu Gly Asn Cys Pro Pro Ser Trp Asn Ile Asp Ser Ser
 210 215 220
 Cys Lys Leu Glu Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Val Leu Lys Glu Thr Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys
 245 250 255
 Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Arg Tyr Ile Val Val Gly Ala Gln Arg Asp
 260 265 270
 Ala Trp Gly Pro Gly Val Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu
 275 280 285
 Leu Lys Leu Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe
 290 295 300
 Arg Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Tyr
 305 310 315 320
 Gly Ala Val Gly Pro Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu
 325 330 335
 His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly
 340 345 350
 Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Met
 355 360 365
 Gly Lys Ile Met Gln Asp Val Lys His Pro Ile Asp Gly Lys Tyr Leu

WO 02/100336

PCT/US02/18185

	370		375		380										
Tyr	Arg	Asn	Ser	Asn	Trp	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp
385				390					395						400
Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Ser
				405					410						415
Phe	Cys	Phe	Cys	Glu	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu
				420				425							430
Asp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Leu	Ile	Gln	Lys	Val	Pro	Gln	Leu	Asn	Gln	Met
				435				440							445
Val	Arg	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Phe	Ile	Ile	Lys	Leu	Thr
450											460				
His	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Tyr	Glu	Met	Tyr	Asn	Ser	Lys	Leu
465					470				475						480
Leu	Ser	Phe	Met	Lys	Asp	Leu	Asn	Gln	Phe	Lys	Ala	Asp	Ile	Lys	Asp
				485					490						495
Met	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Phe
				500					505						510
Arg	Ala	Thr	Ser	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp	Phe	His	Asn	Ala	Glu	Lys	Thr
				515					520						525
Asn	Arg	Phe	Val	Met	Arg	Glu	Ile	Asn	Asp	Arg	Ile	Met	Lys	Val	Glu
				530											540
Tyr	His	Phe	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Pro	Arg	Glu	Ser	Pro	Phe	Arg
545					550					555					560
His	Ile	Phe	Trp	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu
				565						570					575
Asn	Leu	Arg	Leu	Arg	Gln	Lys	Asn	Ile	Thr	Ala	Phe	Asn	Glu	Thr	Leu
				580											590
Phe	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly	Val	Ala
				595											605
Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Ile	Trp	Asn	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe		
				610											620

<210> 27
 <211> 3413
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 27
 catagattc actgacatca tcaagcagct gagccagaat acatatactc ctcgtgagcc 60
 tggatctcag aaagacgaga atcttgcccta ttatattgaa aatctgttcc atgactttaa 120
 atcaagcaaa gtctggcgag atgaacatta tctgaagatt caagtgaaaa acagtgtttc 180
 tcaaaaacttg gtgaccataa atcaggttag taacattgac ccagtgaggg ctccatgtgg 240
 ttatgtggca tttagttaaag ctggagaagt tactggttaa ctggtccatg ctaattttgg 300
 cactaaaaag gactttgaaq aattaaatta ttctgtgaat ggatcttttag tgattgttag 360
 agcagggaaa attacttttg cagaaaaggt tgcataatgcc caagcttta atgcaattgg 420
 tgcctctatc tacatggaca ggaatacgtt ccccggtgtt gaggcagacc ttcaattctt 480
 tggacatgct catctaggaa ctggggatcc atatacacc ggctttccct ctccaacca 540
 tactcagttt cogccatctc agtcatctgg attgcctctc atacctgtgc agacgatctc 600
 aagagctcct gcagaaaagc tattcaaaaa catggaagga aactgtctcc ctatgtggaa 660
 tatagattcc toatgtaagc tggaaacttc acagaatcaa aatgtgaagc tcaacttgaa 720
 caatgtactg aaagaaacaa gaatacttaa catctttggc gttattaaag gctatgagga 780
 accagaccgc tacatgttag taggagccca gagagacgct tggggccctg gtgttcgaa 840
 gtccagtggt ggaacaggtc ttctgttgaa acttgcccaa gtattctcag atatgatttc 900
 aaaagatgga tttagaccca gcaggagtat tatctttgcc agctggactg caggagacta 960
 tggagctggt ggtccgactg agtggtgga ggggtacctt tcacttttg atctaaagcc 1020
 tttacttac attaatctgg ataaagtctg cctgggtact agcaacttca aggtttctg 1080
 cagcccccta ttatatacac ttatggggaa gataatgac gactaaagc atccgattga 1140
 tggaaaatat ctatatcgaa acagtaattg gattagcaaa attgaggaac tttccttgga 1200
 caatgctgca ttccttttc ttgcataatc aggaatccca gcagtttctt tctgttttg 1260
 tgaggatgag gaactatcctt atttgggcac taaactagat acctatgaga tattaattca 1320

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

gaaagtctct cagctcaacc aaatggttcg tacagcagca gaggtggccg gtcagttcat 1380
tattaacctt acccatgaca ttgagttgac cctggactat gagatgtaca acagcaaac 1440
actgtcattt atgaaggatc tgaaccagtt caaagcagat ataaaagata tgggtctaag 1500
tctacaatgg ctgtattctg ctctgggaga ctaattccgt gctacttcta gactaacaac 1560
tgattttcat aatgctgaga aaacaaacag attcgtcatg agggaaatca atgactgat 1620
tatgaaagtg gagtataact tctctgcacc ctatgtatct ccaagagagt ctctttccg 1680
acacatcttc tggggctctg gctctcacac cctctcagct ttagtgagga acctgagact 1740
gtctcagaaa aatatacactg ctttcaatga aacgctcttc agaaaccagt tggcctggc 1800
taectggact attcaggagg ttgcaaatgc cctctctggt gacatttggg atattgacaa 1860
tcgtcagaaa aatatacactg ctttcaatga aacgctcttc agaaaccagt tggcctggc 1800
taectggact attcaggagg ttgcaaatgc cctctctggt gacatttggg atattgacaa 1860
tgagttttaa atgtaattgt cataattaag tgagagaggg tagtctgtht ctgacttga 1920
gctggttgtg ctaaaatttc attagagctc gaattaatgt taaaaattct acccaatcat 1980
ctaattgtgt taggcagcag cttttagtc aggttggac ccacaactca agttacagt 2040
gacaacactt tccatgttca tgataccctc ttgatattc tttagaattt tgagctcttt 2100
gtaataacct gctctttgct tcatggctat gaaaatgca gaaccagtta taagaacatt 2160
gctataagtc ctgagggcac tactagtatc ttgagtgagg aggaagaggg tgtatgtgag 2220
ggcagagagt ctgctgggtg gtgattcccc atctccact caccctcaat gggattctcc 2280
aattgagctg tatgctgaa ggatttagct ggctccatt cccctaaagt agacagttac 2340
ttttcagaag aggtgcaact tgtttcttg ccagcaaggt tgaactaggt cctctctgtg 2400
gataaaagaa aggaagttag tctgtttaca ggaataaggg cttattggtt taacctttgt 2460
gttatttagg atgagaccag aagccaaaga ctccaagttt tctctccact gtcactctacc 2520
cagtagtctt tagttctttg ggtgtttttg tttttgtttt gttttctttt tccaaactcc 2580
tctgaaaaag aacaggttta gactcagctc gtcagcagaa cacactgccc agctcgtgac 2640
ccgggagctc tctagagtgc acctgcagc atgcaagctt tccctatag- gactcgtgac 2700
agagcttggt gcaatgctgc agtctgactc tagaggatcc ccgggtaccg agctctggcc 2760
aaagtctggt tcttcaggga agctctgctc tttttggcac tgaagataat fatcggaagc 2820
tatcagtgac agagttcact ataaatagtg tttttttaat agaagataat atgtgtatt 2880
agtgctctcc ataatatga cagctatact gctgttttct tctaaaaaa gcagcactctg 2940
gtaatgagac ccacagatgc tggaaagtgt gcacttacgg tcaagcactg ccggctttag 3000
aaagagaaaa gccacaagcc aaacaaatgc ccatgagcta gaaagagatt tggtttaata 3060
agagattctc agttgagttg gaaaaaaatg atattctaa gtcagtgag tttgtggcna 3120
gttaaatgct atttaaggg catgatagta atattctaa gtcagtgag tttgtggcna 3180
caagatgtaa ctcaaatcca attttgcaaa ctbcacaaaa atctatagc tcaagttat 3240
cacattatcg ggagcaagtg attttgcaaa atttctatg atttctatg caagttat 3300
acagtgctca tctcggagac atgactctc atatgttaca ctaaggtgt acgtaattat 3360
cgggaacagt gtttccata atttcttca tggcagatca tcttcaaac 3413

```

```

<210> 28
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 28
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15
Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30
Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45
Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
50 55 60
Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80
Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95
Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
100 105 110
Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125
Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile
130 135 140
Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln

```


WO 02/100336

PCT/US02/18185

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
 645 650 655
 Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
 660 665 670
 Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
 675 680 685
 Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
 690 695 700
 Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
 705 710 715 720
 Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
 725 730 735
 Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
 740 745 750
 Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
 755 760

<210> 29
 <211> 5015
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 cgggtggcgg ctcgggacgg aggaacgcct agtgttcttc tgtgtggcag ttcagaatga 60
 tggatcaagc tagatcaagc ctctctaaact tgtttgtgtgg agaaccattg tcatataacc 120
 ggttcagcct ggctcggcaa gtatgtggcg ataacagtca tggggagatg aaacttggctg 180
 tagatgaaga agaaaatgct gacaataaca caaaggccaa tgtcacaana ccaaaaaggt 240
 gtatggaaag tatctgctat ggaactattg ctgtgactgt clttttcttg attggattta 300
 tgattggcta ctctggctat tgtaaaaggg tagaaccaaa aactgagtg gagagactgg 360
 cagaaaccga gtctccagtg agggagggcg caggagagga ctctcctgca gcaagctcgt 420
 tataattggga tgacctgaag agaaagtgtg cggagaacct ggacagcaaa gactccaccg 480
 gcaacctcaa gctgtggaat gaaaatctat atgtccctcg tgaggctgga tctcaaaaag 540
 atgaaaatct tgcgttgatg gttgaaaatc aattctctga atttaaacct agcaaaagct 600
 gggctgatca acattttggt aagattcaag tcaaaagacg cctcaaaaac tctgtgatca 660
 tagttgataa gaacggtaga ctgtttlaac tgggtggagaa tctgggggtg tatgtgctg 720
 atagtaagcg tgaacagctt acttgtaaac tggctccatgc taattttggt actaaaaaag 780
 atttgagga tttatacact cctgtgaatg gatctatagt gattgtcaga caggggaaaa 840
 tcacctttgc agaaaaggtt gcaaatgctg aaagcttaaa tgcaattggt gtgttgatg 900
 accatggacca gaactaaattt cccattgtta acgcagaact ttcattcttt ggacatgctc 960
 atctggggac aggtgacctt tacacacctg gattcccttc ctccaatcac actcagtttc 1020
 cacatctcgc gtcacacagga ttgcctaata taactgtcca gacaatctcc agagctgctg 1080
 cagaaaagct gtttgggaat atggaaggag actgtccctc tgactggaaa acagactcta 1140
 catgtaggat ggtaacctca gaaagcaaga atgtgaagct cactgtgagc aatgtgtga 1200
 aagagataaa aattcttaac atctttggag ttattaaggg cttttagaaa ccagatcact 1260
 atctgttagt tggggcccag agagatgcat ggggccctgg agctgcaaaa tccggttag 1320
 gcaacgctct cctattgaaa cttgcccaga tgttctcaga tatggcttta aaagatgggt 1380
 ttcagccaga cagaagcatt atctttgccg gttggagtg tggagacttt ggatcgggtg 1440
 gtgccactga atggctagag ggataccttt cgtccctgca tttaaaagct ttcacttata 1500
 ttaactcggg taaagcggtt cttggtacca gcaactcaa ggtttctgac agcccactgt 1560
 tgtatacgtt tattgagaaa acaatgcaaa atgtgaagca tccggttact gggcaatttc 1620
 tatacacgga cagcaactgg gccagcaaa ttgagaacct cactttagac aatgctgctt 1680
 tacccttctc tgcataattc ggaatcccag cagtttcttt ctgtttttgc gaggacacag 1740
 attatcctta tttgggtacc accatggaca cctataagga actgatttag aggatcctg 1800
 agttgaacaa agtggcaaga gcagctgcag aggtcgtggt tcagtctgtg attaaactaa 1860
 cccatgatgt tgaattgaac ctggactatg agaggtacaa cagcccaactg ctttcatttg 1920
 tgagggatct gaaccaatca agagcagaca taaaggaat gggcctgagt ttacagtggc 1980
 tgtattctgc tegtggagac ttctctccgt ctaactccag actaaacaaa gatttcggga 2040
 atgtcgagaa aacagacaga tttgtcatga agaaaactaa tgatcgtgct atgagatgg 2100
 agtatacact cctctctccc tacgtatctc caaaagagtc tcttttccga catgtcttct 2160
 ggggctccgg ctctcacacg ctgccagctt tactggagaa cttgaaaactg cgtaaacaaa 2220

WO 02/100336

PCT/US02/18185

```

ataacgggtgc ttttaaatgaa acgctgttca gaaaccagtt ggctctagct acttggacta 2280
ttcaggggagc tgc aaatgccc ctctctgggtg acgtttggga callgacaat gagttttaa 2340
tggatgaccc atagcttcca tgagaaacagc agggtagctt gttttctaga cttgtgctga 2400
tcgtgctaaa ttttcagtag ggctacaaaa cctgatgta aaatccatc ccatcctctt 2460
ggtaactacta gatgtcctta ggccagcagct ttaatacag ggtagataac ctgactctca 2520
agttaaagtg aataaccact taaaaaatgt ccatgatgga atattcccc atctctagaa 2580
ttttaagtgc ttgtaaatgg gaactgcctc ttctctgttg ttgtaataga aaatgtcaga 2640
aaccaagtat gtgaatgac tctctgaatc ctaagggctg gctctgtctg aaggttgtaa 2700
gtggtcgcct actttgagtg atcttccaac ttcatltagt gctaaatagg agataccagg 2760
ttgaaagacc ttctccaaat gagatctaaag cctttccata aggaatgtag ctggtttcc 2820
cattcctgaa agaaacagtt aactttcaga agagatgggc ttgtttctt gccaatgagg 2880
tctgaaatgg aggtccttct gctggataaa atgaggttca actgttgatt gcagaaata 2940
ggcctaataa tgttaacctc agtgtcattt atgaaaagag gggaccagaa gccaaagact 3000
tagtatattt tcttttctct tctctctccc cccataagcc tccatttagt tctttgttat 3060
ttttgtttct tccaaagcac attgaaagag aaccagtttc aggtgtttag ttgcagactc 3120
agtttgtcag actttaaaga ataatatgct gccaaathtt ggccaaagtg ttaactctag 3180
gggagagcct tctgtccttt tggcactgag atatttattg tttattatc agtgacagag 3240
ttcactataa atggtgtttt ttaaatagaa tataatttc ggaagcagtg ccttccataa 3300
ttatgacagt tatactgtcg gtttttttta aataaaagca gcactcgcct aataaaccaa 3360
acagatactg gaagttttgc atttatggtc aacacttaag ggttttagaa aacagccgtc 3420
agcnaaatgt aattgaataa agtgaagctc aagatttaga gatgaataa atttaattag 3480
gggtgtcctg gaagcagaca ctgaccagat aagaatgctg gtttctca atgcagtgaa 3540
ttgtgaccaa gttataaac aatgtcactt aaaggtctgt gtagtaactc tccagtaact 3600
latagctcag ttatccaag gtgtaactct aactccatt ttgcaaaatt tccagtaact 3660
ttgtcacaat cctaacacat tatcgggagc agtgtcttcc ataatgtata aagaacaagg 3720
tagtttttac ctaccacagt gtctgtatcg gagacagtg tetccatag ttacactaag 3780
gggtgaagta attatcggga acaggtgttc ccataaattt cttcatgcaa tgacactctt 3840
aaagcttgaa gatcgttagt atctaacatg ttaccacaat cctataatc cctatcttt 3900
agtttttagt gcagaaacat ttgtggctca ttaagcattg ggtgggtaaa ttcaaccact 3960
gtcaaaatgaa attactacaa aatttgaat tttagctgca gcatacattt ataatgttg cttattgaaa 4020
gtcattllaa cttatocaa ttatltgcat gttacctct ataaacttag tggcggacaag 4140
tttlaatcca gaattgacct ttgacttaa agcaggggga clttgtatag aaggtttgg 4200
ggcgtggggg aaggagctc cctggaaggt ctgacacgtc tgcctaccca tctcgttga 4260
tcaatlaaat gtaggfatga ataatgtga agctcgtga gtgaaccatc attataacg 4320
tgatgatcag ctgtttgtca tagggcagtt ggaaacggcc tcttagggaa aagttcatg 4380
ggtctcttca ggttcttagt gtcacttacc tagatttaca gctcacttg aatgtctac 4440
tactcaacgt ctcttaate ttcagtttta tctttaatc cctctttat cttggactga 4500
catttagcgt agctaagtg aaaggtcata gctgagattc ctggttcggg ttttacgac 4560
acgtacttaa atgaaagcat gtggcatgt catcgtataa cacaatatg atacaggaca 4620
tgcattttgc agcagtgagt ctctcagaa aaccctttc tacagttagg gttgagttac 4680
ttcctatcaa gccagtaagt gctaacagcc tcaatattc tgaatgaaat atcagactag 4740
tgacaagctc ctggtcttga gatgtctct cgttaaggag atgggccttt tggaggtaaa 4800
ggataaaatg aatgagttct gtcattgatc actattctag aacttgcag accttactg 4860
tgttagctct tgaatgttc ttgaaathtt agactttct ttgaaacaaa taatattgct 4920
ttatcattgt ataaaagctg ttatgtgcaa cagtggtggag attcctgtct tgatttaata 4980
aaactcttaa acactgaaaa aaaaaaaaa aaaaa 5015

```

【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
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/100336 A3

- (51) International Patent Classification: A61M 36/14, A61K 49/00, 49/00, 39/395, 39/00, A01N 63/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/18185
- (22) International Filing Date: 7 June 2002 (07.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/297,021 8 June 2001 (08.06.2001) US
60/305,117 12 July 2001 (12.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): TARGET PROTEIN TECHNOLOGIES, INC. [US/US]; 6310 Nancy Ridge Drive, Suite 105, San Diego, CA 92121 (US).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ROBEIN, Paul, W. [US/US]; 3150 East Fox Run Way, San Diego, CA 92111 (US). STEVENS, Anthony, C. [US/US]; 7276 Gollcrest, San Diego, CA 92119 (US).
- (74) Agent: REISMAN, Joseph, M.; Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP, 16th Floor, 620 Newport Center Drive, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DL, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE (utility model), EG, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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 (BE, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 1 May 2003
- 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 02/100336 A3

(54) Title: TISSUE-SPECIFIC ENDOTHELIAL MEMBRANE PROTEINS

(57) Abstract: Methods and compositions for targeting of pharmaceuticals or other therapeutics to specific tissues using tissue-specific endothelial membrane proteins are provided. The compositions comprise a therapeutic complex composed of a ligand, a linker, and a therapeutic moiety, where the therapeutic moiety can enter the cell. The ligand can be an antibody or other molecule that binds to a tissue-specific protein on the endothelial membrane of a specific tissue. The ligand need not activate a receptor, but may activate endocytosis. The therapeutic moiety can be a drug, gene, antisense oligonucleotide, contrast agent, protein, toxin, or any type of molecule that acts on the specific tissue. The linker can be a liposome or a cleavable or noncleavable chemical molecule. Alternatively, the linker may simply be the bond between the ligand and the therapeutic moiety. Alternatively, a lipophilic prodrug may be cleaved and may enter the cell due to its lipophilic properties.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
		PCT/US02/18185
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61M 36/14; A61K 49/00, 49/00, 39/395, 39/00; A01N 63/00		
US CL : 424/1.11, 1.49, 9.1, 9.2, 9.351, 178.1, 194.1, 93.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 424/1.11, 1.49, 9.1, 9.2, 9.351, 178.1, 194.1, 93.1		
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)		
Medline, WEST, STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,612,474 A (PATEL) 18 March 1997, (18.03.1997), Column 1, lines 5-10 and lines 42-43, column 10, lines 67-67, and column 48, lines 43-67.	1-7, 9
Y	FROESCH BA, et al. Preparation and functional evaluation of new doxorubicin immunocjugates containing an acid-sensitive linker on small-cell lung cancer cells. Cancer Immunol Immunother. January 1996, Vol.42, No.1, pages 55-63.	8
X	GREENFIELD et al. Evaluation in vitro of adriamycin immunocjugates synthesized using an acid-sensitive hydrazone linker. Cancer Research. 15 October 1990 (15.10.1990), Vol. 50, No. 20, pages 6600-6607, entire document.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family names.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 November 2002 (25.11.2002)	17 JAN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531	Authorized officer James M. Haddad	
Facsimile No.	Telephone No. 703 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/18185
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim 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"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation 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.: 1-9
Remark on Protest	<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

PCT/US02/18185

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This International Search Authority has found 64 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 inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

- I. Claims 1-9, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand.
- II. Claims 10-21 and 23, drawn to a lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:9 or a homolog thereof.
- III. Claims 10-21 and 23, drawn to a lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:11 or a homolog thereof.
- IV. Claim 22, drawn to a method of determining the presence or concentration of carbonic anhydrase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:9 or a homolog thereof.
- V. Claim 22, drawn to a method of determining the presence or concentration of carbonic anhydrase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:11 or a homolog thereof.
- VI. Claims 24-35 and 37, drawn to a lung and/or kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:4 or a homolog thereof.
- VII. Claims 24-35 and 37, drawn to a lung and/or kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:6 or a homolog thereof.
- VIII. Claim 36, drawn to a method of determining the presence or concentration of dipeptidyle peptidase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:4 or a homolog thereof.
- IX. Claim 36, drawn to a method of determining the presence or concentration of dipeptidyle peptidase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:6 or a homolog thereof.
- X. Claims 38-49 and 51, drawn to a pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof.
- XI. Claims 38-49 and 51, drawn to a pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof.
- XII. Claim 50, drawn to a method of determining the presence or concentration of ZG16-p IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof.
- XIII. Claim 50, drawn to a method of determining the presence or concentration of ZG16-p in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof.
- XIV. Claims 52-63 and 65, drawn to a prostate-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

- XV. Claim 64, drawn to a method of determining the presence or concentration of albumin fragment in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof.
- XVI. Claims 66-77 and 79, drawn to a brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof.
- XVII. Claims 66-77 and 79, drawn to a brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof.
- XVIII. Claim 78, drawn to a method of determining the presence or concentration of CD71 in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof.
- XIX. Claim 78, drawn to a method of determining the presence or concentration of CD71 in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof.
- XX. Claims 80-91 and 93, drawn to a pancreas and or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof.
- XXI. Claims 80-91 and 93, drawn to a pancreas and or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof.
- XXII. Claim 92, drawn to a method of determining the presence or concentration of MADCAM in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof.
- XXIII. Claim 92, drawn to a method of determining the presence or concentration of MADCAM in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof.
- XXIV. Claims 94-104 and 106, drawn to a kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof.
- XXV. Claims 94-104 and 106, drawn to a kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof.
- XXVI. Claim 105, drawn to a method of determining the presence or concentration of CD90 (Thy-1) in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof.
- XXVII. Claim 105, drawn to a method of determining the presence or concentration of CD90 (Thy-1) in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof.
- XXVIII. Claims 107-108, drawn to a method for the treatment of prostate cancer comprising administering a prostate-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.
- XXIX. Claims 109-110, drawn to a method for the treatment of brain tumor comprising administering a brain-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.
- XXX. Claims 109-110, drawn to a method for the treatment of brain tumor comprising administering a brain-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.
- XXXI. Claim 111, drawn to a method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.
- XXXII. Claim 111, drawn to a method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.
- XXXIII. Claim 112, drawn to a method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

XXXIV. Claim 112, drawn to a method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antifibrotic agent.

XXXV. Claims 113-114, drawn to a method for the treatment of kidney transplant comprising administering a kidney and/or lung-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.

XXXVI. Claims 113-114, drawn to a method for the treatment of kidney transplant comprising administering a kidney and/or lung-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.

XXXVII. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is CD71.

XXXVIII. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is CD790.

XXXIX. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is MA3CAM.

XI. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is Albumin Fragment.

XLI. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is carbonic anhydrase IV.

XLII. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is ZG16-p.

XLIII. Claim 115, drawn to a method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is dipeptidyle peptidase IV.

XLIV. Claims 116-122, drawn to a method for lung and/or heart-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a carbonic anhydrase IV-binding agent.

XLV. Claims 116-121 and 123, drawn to a method for lung and/or heart-specific delivery of a substance in vitro comprising providing a carbonic anhydrase IV-binding agent.

XLVI. Claims 124-125, drawn to a method for identifying a lung and/or heart-specific ligand, comprising identifying a carbonic anhydrase IV-binding agent.

XLVII. Claims 126-132, drawn to a method for brain-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a CD71-binding agent.

XLVIII. Claims 126-131 and 133, drawn to a method for brain-specific delivery of a substance in vitro comprising providing a CD71-binding agent.

XLIX. Claims 134-135, drawn to a method for identifying a brain-specific ligand, comprising identifying a CD71-binding agent.

L. Claims 136-142, drawn to a method for kidney-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a CD90-binding agent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

- LI. Claims 136-141 and 143, drawn to a method for kidney-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a CD90-binding agent.
- LII. Claims 144-145, drawn to a method for identifying a kidney-specific ligand, comprising identifying a CD90-binding agent.
- LIII. Claims 146-152, drawn to a method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a dipeptidase IV-binding agent.
- LIV. Claims 146-151 and 153, drawn to a method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a dipeptidase IV-binding agent.
- LV. Claims 154-155, drawn to a method for identifying a lung and/or kidney-specific ligand, comprising identifying a dipeptidase IV-binding agent.
- LVI. Claims 156-162, drawn to a method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a ZG16-p-binding agent.
- LVII. Claims 156-161 and 163, drawn to a method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a ZG16-p-binding agent.
- LVIII. Claims 164-165, drawn to a method for identifying a pancreatic and/or gut-specific ligand, comprising identifying a ZG16-p-binding agent.
- LIX. Claims 166-172, drawn to a method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a MAcCAM-binding agent.
- LX. Claims 166-171 and 173, drawn to a method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a MAcCAM-binding agent.
- LXI. Claims 174-175, drawn to a method for identifying a pancreatic and/or gut-specific ligand, comprising identifying a MAcCAM-binding agent.
- LXII. Claims 176-182, drawn to a method for prostate-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a Albumin fragment-binding agent.
- LXIII. Claims 176-181 and 183, drawn to a method for prostate-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a Albumin fragment-binding agent.
- LXIV. Claims 184-185, drawn to a method for identifying a prostate-specific ligand, comprising identifying a Albumin fragment-binding agent.

And it 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 Group I-LXIV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group

The specific technical feature of the Group I invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue, comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker which links said therapeutic moiety to said ligand claimed herein while the specific technical feature of the Group II invention is the particular lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that binds to SEQ ID NO:9 or a homolog thereof claimed herein.

The specific technical feature of the Group III invention is the specific lung and/or heart-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that binds to SEQ ID NO:11 or a homolog thereof

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

The specific technical feature of the Group IV invention is the specific method of determining the presence or concentration of carbonic anhydrase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:9 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group V invention is the specific method of determining the presence or concentration of carbonic anhydrase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:11 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group VI invention is the specific lung and/or kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:4 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group VII invention is the specific lung and/or kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:6 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group VIII invention is the specific method of determining the presence or concentration of dipeptidyle peptidase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:4 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group IX invention is the specific method of determining the presence or concentration of dipeptidyle peptidase IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:6 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group X invention is the specific a pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XI invention is the specific pancreatic and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XII invention is the specific method of determining the presence or concentration of ZG16-p IV in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XIII invention is the specific method of determining the presence or concentration of ZG16-p in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XIV invention is the specific prostate-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XV invention is the specific method of determining the presence or concentration of albumin fragment in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XVI invention is the specific brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XVII invention is the specific brain-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XVIII invention is the specific method of determining the presence or concentration of CD71 in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XIX invention is the specific method of determining the presence or concentration of CD71 in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XX invention is the specific pancreas and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

The specific technical feature of the Group XXI invention is the specific pancreas and/or gut-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXII invention is the specific method of determining the presence or concentration of MADCAM in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXIII invention is the specific method of determining the presence or concentration of MADCAM in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXIV invention is the specific kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXV invention is the specific kidney-specific therapeutic complex which interacts with a targeted endothelial cell comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXVI invention is the specific method of determining the presence or concentration of CD90 (Thy-1) in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXVII invention is the specific method of determining the presence or concentration of CD90 (Thy-1) in a tissue or cell comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof.

The specific technical feature of the Group XXVIII invention is the specific method for the treatment of prostate cancer comprising administering a prostate-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:23 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

The specific technical feature of the Group XXIX invention is the specific method for the treatment of brain tumor comprising administering a brain-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:26 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

The specific technical feature of the Group XXX invention is the specific method for the treatment of brain tumor comprising administering a brain-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:28 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is a chemotherapeutic agent.

The specific technical feature of the Group XXXI invention is the specific method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:14 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

The specific technical feature of the Group XXXII invention is the specific method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:16 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

The specific technical feature of the Group XXXIII invention is the specific method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:18 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

The specific technical feature of the Group XXXIV invention is the specific method for the treatment of pancreatic tumor comprising administering a pancreatic/or gut-specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:20 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an antithrombotic agent.

The specific technical feature of the Group XXXV invention is the specific method for the treatment of kidney transplant comprising administering a kidney and/or lung -specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:30 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.

The specific technical feature of the Group XXXVI invention is the specific method for the treatment of kidney transplant comprising administering a kidney and/or lung -specific therapeutic complex comprising a ligand that bind to SEQ ID NO:32 or a homolog thereof, wherein the therapeutic moiety is an immunosuppressant agent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

The specific technical feature of the Group XXXVII invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is CD71.

The specific technical feature of the Group XXXVIII invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is CD790.

The specific technical feature of the Group XXXIX invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is MadCAM.

The specific technical feature of the Group XL invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is Albumin Fragment.

The specific technical feature of the Group XLI invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is carbonic anhydrase IV.

The specific technical feature of the Group XLII invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is ZG16-p.

The specific technical feature of the Group XLIII invention is the specific method for delivering a therapeutic agent to a specific tissue comprising administering a therapeutic complex comprising a ligand which binds to a tissue-specific lumenally expressed protein, a therapeutic moiety and a linker wherein tissue specific lumenally expressed protein is dipeptidyle peptidase IV.

The specific technical feature of the Group XLIV invention is the specific method for lung and/or heart-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a carbonic anhydrase IV-binding agent.

The specific technical feature of the Group XLV invention is the specific method for lung and/or heart-specific delivery of a substance in vitro comprising providing a carbonic anhydrase IV-binding agent.

The specific technical feature of the Group XLVI invention is the specific method for identifying a lung and/or heart-specific ligand, comprising identifying a carbonic anhydrase IV-binding agent.

The specific technical feature of the Group XLVII invention is the specific method for brain-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a CD71-binding agent.

The specific technical feature of the Group XLVIII invention is the specific method for brain-specific delivery of a substance in vitro comprising providing a CD71-binding agent.

The specific technical feature of the Group XLIX invention is the specific method for identifying a brain-specific ligand, comprising identifying a CD71-binding agent.

The specific technical feature of the Group L invention is the specific method for kidney-specific delivery of a substance in vivo comprising providing a CD90-binding agent.

The specific technical feature of the Group LI invention is the specific method for kidney-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a CD90-binding agent.

The specific technical feature of the Group LII invention is the specific method for identifying a kidney-specific ligand, comprising identifying a CD90-binding agent.

The specific technical feature of the Group LIII invention is the specific method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a dipeptidase IV-binding agent.

The specific technical feature of the Group LIV invention is the specific method for lung and/or kidney-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a dipeptidase IV-binding agent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18185

The specific technical feature of the Group LV invention is the specific method for identifying a lung and/or kidney-specific ligand, comprising identifying a dipeptidase IV-binding agent.

The specific technical feature of the Group LVI invention is the specific method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a ZG16-p-binding agent.

The specific technical feature of the Group LVII invention is the specific method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a ZG16-p-binding agent.

The specific technical feature of the Group LVIII invention is the specific method for identifying a pancreatic and/or gut-specific ligand, comprising identifying a ZG16-p-binding agent.

The specific technical feature of the Group LIX invention is the specific method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing a MA&CAM-binding agent.

The specific technical feature of the Group LX invention is the specific method for pancreatic and/or gut-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing a MA&CAM-binding agent.

The specific technical feature of the Group LXI invention is the specific method for identifying a pancreatic and/or gut-specific ligand, comprising identifying a MA&CAM-binding agent.

The specific technical feature of the Group LXII invention is the specific method for prostate-specific delivery of a substance in vivo, comprising providing an Albumin fragment-binding agent.

The specific technical feature of the Group LXIII invention is the specific method for prostate-specific delivery of a substance in vitro, comprising providing an Albumin fragment-binding agent.

The specific technical feature of the Group LXIV invention is the specific method for identifying a prostate-specific ligand, comprising identifying an Albumin fragment-binding agent.

Since the special technical feature of the Group I invention is not present in the Groups II-LXIV claims and the special technical feature of the Group II-LXIII invention is not present in the Group I claims, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/715	A 6 1 K 31/715	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 P 37/06	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 43/00	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 ロベン ポール ダブリュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 1 1 サン ディエゴ イースト フォックス ラン
ウェイ 3 1 5 0

(72) 発明者 スティーヴンス アンソニー シー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 1 9 サン ディエゴ ゴルフクレスト 7 2 7 6

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB13 CC07 CC27 CC32 CC33 CC41 CC42 DD63A

DD70A EE06A EE41M EE59M FF05 FF31 FF43 FF68

4C084 AA02 AA03 AA12 AA13 AA17 BA25 BA35 BA41 BA42 CA59

DA25 MA24 MA66 NA13 ZA361 ZA591 ZA661 ZA811 ZB262 ZC032

4C085 AA13 BB11 DD62 EE01 GG02

4C086 AA01 AA02 CB25 CC13 DA10 EA16 EA20 MA24 MA66 NA13

ZA59 ZB08 ZB26 ZB35

专利名称(译)	组织特异性内皮细胞膜蛋白		
公开(公告)号	JP2005501011A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003503163	申请日	2002-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	犹他创业的第二个有限合伙		
申请(专利权)人(译)	犹他创业的第二个有限合伙		
[标]发明人	ロベンポールダブリュ ステイーヴンスアンソニーシー		
发明人	ロベン ポール ダブリュ ステイーヴンス アンソニー シー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/496 A61K31/573 A61K31/7036 A61K31/704 A61K31/715 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K51/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 C12N15/88 G01N33/566		
CPC分类号	A61K47/6835 A61K47/6875 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 C12N15/88		
FI分类号	A61K47/48 A61K31/496 A61K31/573 A61K31/7036 A61K31/704 A61K31/715 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/53.D G01N33/566 A61K37/02 A61K43/00		
F-TERM分类号	4C076/AA19 4C076/AA95 4C076/BB13 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/CC32 4C076/CC33 4C076 /CC41 4C076/CC42 4C076/DD63A 4C076/DD70A 4C076/EE06A 4C076/EE41M 4C076/EE59M 4C076 /FF05 4C076/FF31 4C076/FF43 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA12 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA25 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/CA59 4C084/DA25 4C084 /MA24 4C084/MA66 4C084/NA13 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA811 4C084 /ZB262 4C084/ZC032 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB25 4C086/CC13 4C086/DA10 4C086/EA16 4C086/EA20 4C086/MA24 4C086 /MA66 4C086/NA13 4C086/ZA59 4C086/ZB08 4C086/ZB26 4C086/ZB35		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/297021 2001-06-08 US 60/305117 2001-07-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了使用组织特异性内皮膜蛋白将药物或其他治疗物质靶向特定组织的方法和组合物。该组合物包含治疗组合物，其包含配体，接头和治疗部分，所述治疗部分能够进入细胞。配体可以是与特定组织的内皮膜上的组织特异性蛋白质结合的抗体或其他分子。配体不需要激活受体，但它可以激活内吞作用。治疗部分可以是作用于药物，基因，反义寡核苷酸，造影剂，蛋白质，毒素或特定组织的任何类型的分子。接头可以是脂质体或可切割或不可切割的化学分子。或者，接头可以简单地是配体和治疗部分之间的键。或者，可以裂解亲脂性前药，并且由于亲脂性，前药可以进入细胞。

標的は組織特異的内皮細胞表面タンパク質
標的に結合後リンカーは活性物質を遊離させる

