(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-526940
(P2004-526940A)
(43)公表日　平成16年9月2日(2004.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/50	G01N 33/50	ZNAZ	2G045
A61K 9/127	A61K 9/127		4B063
A61K 45/00	A61K 45/00		4C076
A61K 47/34	A61K 47/34		4C084
A61P 35/00	A61P 35/00		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 120 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-536414(P2002-536414)
(86)(22)出願日　平成13年10月17日(2001.10.17)
(85)翻訳文提出日　平成15年4月18日(2003.4.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/032311
(87)国際公開番号　WO2002/033044
(87)国際公開日　平成14年4月25日(2002.4.25)
(31)優先権主張番号　60/241,279
(32)優先日　平成12年10月18日(2000.10.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500027932
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国　９４６０７－５２００
カリフォルニア州　オークランド　トウェルフス　フロア　フランクリン　ストリート　１１１１
(74)代理人　100079049
弁理士　中島　淳
(74)代理人　100084995
弁理士　加藤　和詳
(74)代理人　100085279
弁理士　西元　勝一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】内在化機能を有する抗体の高処理スクリーニングの方法

(57)【要約】
本発明は、細胞中に内在化されるリガンドを特定する方法を提供する。前記方法は典型的には以下の工程を含む：（ｉ）リガンドに非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；（ｉｉ）前記レポーターをリガンドから解離させ、前記解離させたレポーターを細胞表面から除去する工程；及び（ｉｉｉ）前記細胞内の前記レポーターを（レポーターが存在する場合は）検出する工程、ここで前記細胞内に前記レポーターが存在するということは、前記リガンドが内在化機能を有するレセプターと結合し、内在化されたことを示す。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記工程を含む、細胞に内在化されたリガンドを特定する方法：
ｉ）リガンドに非共有結合させたレポーターと、前記細胞とを接触させる工程；
ｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、さらに分離したレポーターを前記細胞の表面から取り除く工程；及び
ｉｉｉ）前記細胞内のレポーターの存在が、前記リガンドが前記細胞に内在化されたことを示す、前記細胞内の前記レポーターを検出する工程。
【請求項２】
前記接触工程が、エピトープタグを含むリガンドと前記細胞を接触させること、及び前記エピトープタグと結合する成分部分を含むレポーターと前記細胞を接触させることを含む請求項１の方法。
【請求項３】
前記リガンドが細胞表面レセプターと結合するリガンドである請求項１の方法。
【請求項４】
前記リガンドがペプチドである請求項１の方法。
【請求項５】
前記リガンドが、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆｂａ、モノクローナル抗体、サイトカインおよび増殖因子から成る群から選択される請求項１の方法。
【請求項６】
前記リガンドがファージディスプレーライブラリーで生成されるリガンドである請求項１の方法。
【請求項７】
前記ファージディスプレーライブラリーが繊維状ファージを用いる請求項６の方法。
【請求項８】
前記レポーターがエピトープタグによってリガンドと非共有結合されている請求項１の方法。
【請求項９】
前記レポーターが、Ｈｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグおよびＤＹＫＤＤＤＤＫエピトープから成る群から選択されるエピトープタグによって、リガンドと非共有結合されてある請求項１の方法。
【請求項１０】
前記レポーターが、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、ナノ粒子およびリポソームから成る群から選択されるレポーターである請求項１の方法。
【請求項１１】
前記エピトープタグがヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_{6}$）タグであり、前記レポーターがニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ）脂質を含有するリポソームである請求項１の方法。
【請求項１２】
前記リガンドが抗体であり、さらに前記エピトープタグが、プロテインＡとの共有結合を介して前記抗体と結合する請求項１の方法。
【請求項１３】
前記細胞が癌細胞である請求項１の方法。
【請求項１４】
前記細胞に内在化されたリガンドを単離する工程とをさらに含む請求項１の方法。
【請求項１５】
前記単離工程が、前記細胞によって内在化されたリガンドのアミノ酸配列を決定する工程または前記リガンドをコードする核酸の配列を決定する工程を含む請求項１４の方法。
【請求項１６】
下記工程を含む、リガンドを内在化させたレセプターについて細胞をスクリーニングする方法：

ｉ）リガンドに非共有結合させたエフェクターと、前記細胞とを接触させる工程；
ｉｉ）前記リガンドから前記エフェクターを分離する工程、及び分離したエフェクターを前記細胞の表面から取り除く工程；及び
ｉｉｉ）前記細胞内のエフェクターの存在は、前記細胞が前記リガンドを内在化させたことを示す、前記細胞内の前記エフェクターを検出する工程。
【請求項１７】
前記リガンドが、細胞によって内在化されることが判明しているリガンドである請求項１６の方法。
【請求項１８】
前記リガンドがリガンドライブラリーの構成要素である請求項１６の方法。
【請求項１９】
前記リガンドライブラリーが少なくとも１０００の異なる構成要素を含む請求項１８の方法。
【請求項２０】
前記リガンドがペプチドである請求項１６の方法。
【請求項２１】
前記リガンドが、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆｂａ、モノクローナル抗体、サイトカインおよび増殖因子から成る群から選択される請求項１６の方法。
【請求項２２】
前記リガンドがファージディスプレーライブラリーで生成されるリガンドである請求項１６の方法。
【請求項２３】
前記ファージディスプレーライブラリーが繊維状ファージを用いる請求項２２の方法。
【請求項２４】
前記エフェクターがエピトープタグによってリガンドと非共有結合されている請求項１６の方法。
【請求項２５】
前記エフェクターが、Ｈｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグおよびＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープから成る群から選択されるエピトープタグによって、リガンドと非共有結合されてある請求項１６の方法。
【請求項２６】
前記エフェクターが、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、ナノ粒子およびリポソームから成る群から選択されるレポーターである請求項１６の方法。
【請求項２７】
前記エピトープタグがヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_{6}$）タグであり、前記エフェクターがニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ）脂質またはイミノ二酢酸（ＩＤＡ）脂質を含有するリポソームである請求項１６の方法。
【請求項２８】
前記リガンドが抗体であり、前記エピトープタグが、プロテインＡまたはプロテインＧとの共有結合を介して前記抗体と結合される請求項１６の方法。
【請求項２９】
前記細胞が癌細胞である請求項１６の方法。
【請求項３０】
前記細胞がレセプターを過剰発現することが判明している請求項２９の方法。
【請求項３１】
前記リガンドを内在化させた細胞を単離することをさらに含む請求項１６の方法。
【請求項３２】
多数の構成要素を含むリガンドライブラリーであって、前記構成要素がリガンドおよびエピトープタグを含み、前記リガンドは構成要素間で多様に変化しており、前記エピトープタグは一定である前記リガンドライブラリー。

【請求項３３】
前記リガンドがエピトープタグを介してレポーターと非共有結合されている請求項３２のリガンドライブラリー。
【請求項３４】
少なくとも10^5の異なるリガンドを含む請求項３３のライブラリー。
【請求項３５】
前記リガンドがペプチドである請求項３３のライブラリー。
【請求項３６】
前記リガンドが、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、酵素、ホルモンおよび増殖因子から成る群から選択される請求項３３の方法。
【請求項３７】
前記リガンドがファージディスプレーライブラリーで生成されるリガンドである請求項３３の方法。
【請求項３８】
前記ファージディスプレーライブラリーが繊維状ファージを用いる請求項３７の方法。
【請求項３９】
前記レポーターが、Ｈｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグおよびＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープから成る群から選択されるエピトープタグによって、前記リガンドと非共有結合されている請求項３３のライブラリー。
【請求項４０】
前記レポーターが、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、ナノ粒子およびリポソームから成る群から選択されるレポーターである請求項３３のライブラリー。
【請求項４１】
前記エピトープタグがヘキサヒスチジン（His_6）タグであり、前記レポーターがニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ）脂質またはイミノ二酢酸（ＩＤＡ）脂質を含有するリポソームである請求項３３のライブラリー。
【請求項４２】
前記リガンドが抗体であり、前記エピトープタグが、プロテインＡまたはプロテインＧとの共有結合を介して前記抗体と結合される請求項３３のライブラリー。
【請求項４３】
前記ライブラリーの構成要素が前記リガンドに対して多価である請求項３３のライブラリー。
【請求項４４】
エピトープタグを介してエフェクターと非共有結合されたリガンドを含有することを特徴とする、内在化レセプターについて細胞をスクリーニングするための構築物。
【請求項４５】
前記リガンドがペプチドである請求項４４の構築物。
【請求項４６】
前記リガンドが、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、酵素、ホルモンおよび増殖因子から成る群から選択される請求項４４の構築物。
【請求項４７】
前記リガンドがファージディスプレーライブラリーで生成されるリガンドである請求項４４の構築物。
【請求項４８】
前記ファージディスプレーライブラリーが繊維状ファージを用いる請求項４７の方法。
【請求項４９】
前記レポーターが、Ｈｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグおよびＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープから成る群から選択されるエピトープタグによって、前記リガンドと非共有結合されている請求項４４の構築物。
【請求項５０】

前記レポーターが、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、ナノ粒子およびリポソームから成る群から選択されるレポーターである請求項４４の構築物。
【請求項５１】
前記エピトープタグがヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_{6}$）タグであり、前記レポーターがニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ）脂質またはイミノ二酢酸（ＩＤＡ）脂質を含有するリポソームである請求項４４の構築物。
【請求項５２】
前記リガンドが抗体であり、前記エピトープタグが、プロテインＡまたはプロテインＧとの共有結合を介して前記抗体と結合される請求項４４の構築物。
【請求項５３】
前記構築物が前記リガンドに対して多価である請求項４４の構築物。
【請求項５４】
内在化機能を有する細胞を特定するか、または細胞によって内在化されたリガンドをスクリーニングするためのキットであって、請求項３２～４３のいずれかに記載のリガンドライブラリーを収納する容器を含むことを特徴とする、前記特定またはスクリーニング用キット。
【請求項５５】
リガンドを内在化させる細胞を特定する目的、または細胞によって内在化されたリガンドを特定する目的で前記ライブラリーを使用することについて説明する指示物をさらに含む請求項５４のキット。
【請求項５６】
下記工程を含む、内在化機能を有するレセプターを特定する方法：
ｉ）リガンドに非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；
ｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、さらに分離したレポーターを前記細胞の表面から取り除く工程；
ｉｉｉ）前記細胞内のレポーターの存在が、前記リガンドが内在化機能を有するレセプターと結合して内在化されていることを示すことを特徴とする、前記レポーターが前記細胞内に存在する場合に前記細胞内のレポーターを検出する工程；
ｉｖ）前記細胞内において前記レポーターと結合しているリガンドを特定または回収する工程；及び
ｖ）前記リガンドと結合するレセプターを特定する工程。
【請求項５７】
前記レセプターの特定工程がアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫組織化学によって実施される請求項５６の方法。
【請求項５８】
内在化機能を有するレセプターのデータベースに前記レセプターの認証特性を入力することをさらに含む請求項５６の方法。
【請求項５９】
下記工程を含む、細胞内へのリガンドの内在化を調節する能力について薬剤をスクリーニングする方法：
ｉ）前記細胞によって内在化されることが判明しているリガンドに非共有結合させたレポーターと、前記細胞とを接触させる工程；
ｉｉ）前記細胞をテスト薬剤と接触させる工程；
ｉｉｉ）リガンドから前記レポーターを分離し、分離したレポーターを前記細胞表面から取り除く工程；及び
ｉｖ）低濃度の前記テスト薬剤と接触したときに前記細胞によって内在化されるレポーターの量と、前記テスト薬剤と接触した細胞によって内在化されたレポーターの量との間の差異が、前記テスト薬剤が前記細胞による前記リガンドの内在化を調節することを示すことを特徴とする、前記レポーターが細胞内に存在する場合に前記細胞内のレポーターを検出する工程。

【請求項６０】
前記低濃度が、前記テスト薬剤の非存在である請求項５９の方法。
【請求項６１】
下記工程を含む、細胞内へのリガンドの内在化を調節する能力について薬剤をスクリーニングする方法：
ｉ）前記細胞を第一の濃度の前記薬剤と接触させる工程；
ｉｉ）前記細胞に内在化することが判明しているリガンドに非共有結合させたレポーターと、前記細胞とを接触させる工程；
ｉｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、分離したレポーターを前記細胞表面から取り除く工程；
ｉｖ）前記細胞内のレポーターを検出して第一の測定値を得る工程；
ｖ）前記細胞を、前記第一の濃度よりも高い第二の濃度の前記薬剤と接触させる工程；
ｖｉ）工程ｉｉ）～ｉｖ）を繰り返して第二の測定値を得る工程；及び
ｖｉｉ）前記第一の測定値と前記第二の測定値が異なる場合は、前記薬剤が前記細胞内で前記リガンドの内在化を調節しているとする、前記第一の測定値と前記第二の測定値を比較する工程。
【請求項６２】
脂質、親水性ポリマーおよび前記親水性ポリマーと結合した金属キレート基を含む金属キレート脂質。
【請求項６３】
前記キレート基がＮＴＡである請求項６２の金属キレート脂質。
【請求項６４】
前記親水性ポリマーがポリヌクレオチド（エチレングリコール）を含む請求項６２の金属キレート脂質。
【請求項６５】
前記脂質がＤＳＰＥを含む請求項６２の金属キレート脂質。
【請求項６６】
前記細胞と、金属キレート脂質及びリガンドを接触させることを含む、細胞にエフェクターを配送する方法であって、
前記金属キレート脂質が、脂質、親水性ポリマー、およびキレート基を含有し、ここで前記キレート基は、前記親水性ポリマーと結合しており、かつ、エピトープタグ、及び前記金属キレート脂質と結合したエフェクターと、キレート結合を形成することができることを特徴とし、
前記リガンドが前記エピトープタグを含み、ここで前記細胞は特異的に前記リガンドと結合し、場合によって前記リガンドを内在化すること
を特徴とする、前記方法。
【請求項６７】
前記脂質がリポソームを含み、前記リポソームが前記エフェクターを含有するかまたは前記エフェクターと複合体を形成している請求項６６の方法。
【請求項６８】
前記細胞が癌細胞である請求項６６の方法。
【請求項６９】
脂質、親水性ポリマー、および、前記親水性ポリマーに結合し且つエピトープタグとキレート結合を形成することができるキレート基；
細胞と結合し、さらに場合によって細胞によって内在化されることを特徴とする、前記エピトープタグを含むリガンド；及び
前記脂質に結合しているエフェクター
を含むことを特徴とする組成物。
【請求項７０】
前記脂質がリポソームを含み、前記リポソームが前記フェクターを含有するか、または前

記エフェクターと複合体を形成する請求項６９の組成物。
【請求項７１】
前記親水性ポリマーがポリヌクレオチド（エチレングリコール）を含む請求項６９の組成物。
【請求項７２】
前記脂質がＤＳＰＥを含む請求項６９の組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
関連出願の相互引用
本出願は、ＵＳＳＮ６０／２４１２７９（２０００年１０月１８日出願）（前記文献は参照により本明細書に含まれる）の優先権を主張する。
連邦政府の研究開発補助により達成された発明の権利に関する記載
本研究は、米国国防省乳癌研究プログラム（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｄｅｆｅｎｓｅ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐｒｏｇｒａｍ）グラント番号ＤＡＭＤ１７－９４－Ｊ－４４３３およびＤＡＭＤ１７－９８－１－８１８９によって部分的に補助された。合衆国政府は本発明に関して一定の権利を有する。
【０００２】
【従来技術】
最初のヒトゲノム配列決定プロジェクトの実質的な完了とともに、多様なＤＮＡ配列の生物学的機能の決定に多大な関心が向けられてきた。本研究（しばしば“ゲノム機能学”と称される）はゲノム分析の新しい局面の典型である。特に、ゲノム機能学は、ゲノム構造学によって提供される情報および試薬を使用することによって、遺伝子の機能を評価するために包括的な（遺伝子全体のまたはシステム全体の）実験的アプローチを開発および応用することに関連する。本研究は、典型的には、得られた結果の統計分析およびコンピュータ解析を伴う高処理または大規模実験方法を特徴とする。
【０００３】
ゲノム機能学的アプローチにおける基本的戦略の１つは、生物学的研究の範囲を、単一遺伝子またはタンパク質を研究することから全ての遺伝子またはタンパク質を系統的態様で一度に研究することに拡張することである。コンピュータ生物学は、前記分野において重要で幅広い役割を果たすであろう。ゲノム構造学はデータ管理を特徴とするが、一方、ゲノム機能学は特に重要な情報を求めてデータセットを掘り出すことを特徴とする。ゲノム機能学は、配列と機能の間のギャップを急速に縮小し、生物学的システムの動態に対して新規な解釈を得るために、きわめて有望である。
【０００４】
遺伝子の重要なクラスの１つには、細胞表面分子およびレセプターをコードするものが含まれる。レセプターは典型的にはリガンドと結合し、シグナルを細胞内に伝達する（シグナリング）。これにより細胞の成長、細胞の複製、細胞の死などを含む（ただしこれらに限定されない）多数の生物学的機能がもたらされる。他のレセプターは特定の分子の細胞外から細胞質への移動（エンドサイトーシスまたは内在化（ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ））を仲介する。エンドサイトーシスはまた、レセプターシグナリングを仲介する重要なメカニズムである。種々の細胞タイプが、定量的および定性的に異なる表面レセプターを有し、レセプター発現パターンは、細胞および／または組織の発育および／または分化、および／または疾病の発生および／または進行とともに劇的に変化するであろう。
【０００５】
前記レセプターの特定および特異的なレセプターリガンドの開発は、レセプターの機能およびレセプター発現の時間的場所的パターンの決定に関する研究を可能にするであろう。例えば、前記のリガンドを用いて、薬剤曝露時または疾患の発生時における種々の細胞タイプのレセプター発現パターンを明らかにすることができる。さらに、細胞特異的レセプターリガンド、より好ましくは内在化機能を有する細胞に特異的なレセプターリガンドを用いて、例えば治療のために薬剤またはマーカーを細胞表面または細胞質内に誘導するこ

とができる。
【０００６】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、リガンドと結合し、これを内在化する細胞を特定する方法を提供する。さらに本発明は、リガンドを内在化させることができるレセプターを特定する方法およびリガンド内在化の調節物質をスクリーニングする方法を提供する。
ある実施態様において本発明は、細胞内に内在化されるリガンドを特定する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む。ｉ）リガンドに非共有結合させたエフェクター（例えばレポーター）と、前記細胞とを接触させる工程；ｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、さらに分離したレポーターを前記細胞の表面から取り除く工程；ｉｉｉ）レポーターが細胞内に存在する場合は、前記細胞内の前記レポーターを検出する工程。ここで細胞内のレポーターの存在は、リガンドが内在化機能を有するレセプターと結合し、内在化されたことを示す。ある実施態様では、前記接触工程は、エピトープタグを含むリガンドと細胞を接触させる工程、及び前記エピトープタグと結合する成分部分を含むレポーターと前記細胞を接触させる工程を含む。好ましい実施態様では、前記リガンドは、細胞表面レセプターと結合するリガンドである。好ましいリガンドには、ペプチド（例えばｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子など）、核酸、炭水化物、糖類などが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいペプチドリガンドは、コンビネーション化学合成（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）またはファージディスプレーライブラリーを用いて（例えば繊維状ファージを用いて）組換えによって生成される。
【０００７】
ある種の好ましい実施態様では、前記エフェクター（例えばレポーター）は、エピトープタグ（例えばＨｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグ、ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープなど）によってリガンドに非共有結合している。前記エフェクターがレポーターの場合、好ましいレポーターには、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、リポソーム、または標識含有リポソームが含まれるが、これらに限定されない。ある種の特に好ましい実施態様では、前記エピトープタグはヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_{6}$）タグで、前記リポーターは、脂質またはリポソームに結合されてある$Ｈｉｓ_{6}$タグと結合する試薬（例えばニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ））を含むリポソームである。ある種の特に好ましい実施態様では、前記脂質またはリポソームとの結合は典型的には金属キレート結合（例えばＮｉ（２＋）キレート結合）による。別の好ましい実施態様では、前記リガンドは抗体であり、前記エピトープタグは、プロテインＡとの共有結合を介して前記抗体と結合される。
【０００８】
本発明の方法で使用される好ましい細胞には、植物細胞、動物細胞および細菌細胞が含まれるが、これらに限定されない。特に好ましい細胞には哺乳類細胞、より好ましくは正常または病理学的ヒト細胞（例えば癌細胞）が含まれる。ある実施態様では、前記細胞は、１つまたは２つ以上のレセプターを過剰発現する細胞、および／または異種レセプターを発現または過剰発現する細胞である。
前記方法はさらに、前記細胞内に内在化されたリガンドを単離する工程を含む。ある実施態様では、前記“単離”工程は、細胞によって内在化されたリガンドのアミノ酸配列を決定する工程か、または前記リガンドをコードする核酸配列を決定する工程を含みうる。
【０００９】
別の実施態様では、本発明はリガンドの内在化について細胞をスクリーニングする方法を提供する。前記方法は好ましくは下記工程を含む：ｉ）内在化されることが判明しているリガンドと非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；ｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、分離したレポーターを前記細胞表面から取り除く工程；ｉｉｉ）前記細胞内のレポーターの存在が、前記リガンドが前記細胞に内在化されたことを示す、前記レポーターが前記細胞内に存在する場合に前記細胞内のレポーターを検出す

る工程。もっとも一般的には、細胞内にリガンドが内在化されるということは、細胞がリガンドに対するレセプターを表出し、前記レセプターが内在化機能を有するレセプターであることを示している。前記方法はさらに、リガンドを内在化させた細胞からリガンドを内在化させていない細胞を単離する工程を含むことができる。

【００１０】

特に好ましい実施態様では、リガンドは、リガンドライブラリーの構成要素（ｍｅｍｂｅｒ）である。好ましいライブラリーは少なくとも１０００、より好ましくは少なくとも１００００、もっとも好ましくは少なくとも１０００００の異なる構成要素を含む。好ましいリガンドには、ペプチド（例えばｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子など）、核酸、炭水化物、糖類などが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいペプチドリガンドは、コンビネーション化学合成またはファージディスプレーライブラリーを用いて（例えば繊維状ファージを用いて）遺伝子組換えによって生成される。

【００１１】

ある好ましい実施態様では、エフェクター（例えばレポーター）は、エピトープタグ（例えばＨｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグ、ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープなど）によってリガンドに非共有結合している。前記エフェクターがレポーターの場合、好ましいレポーターには、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、リポソーム、または標識含有リポソームが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいある実施態様では、前記エピトープタグはヘキサヒスチジン（Ｈｉｓ$_6$）タグで、前記リポーターは、脂質またはリポソームに結合されている、Ｈｉｓ$_6$タグと結合する試薬（例えばニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ））を含むリポソームである。別の好ましい実施態様では、前記リガンドは抗体であり、前記エピトープタグは、プロテインＡとの共有結合を介して前記抗体と結合される。特に好ましい細胞は茲に記載されている。

ある種の実施態様では、前記方法はさらに、前記細胞内に内在化されるリガンドを単離する工程を含む。前記リガンドの配列を決定するか、または前記リガンドをコードする核酸の配列を決定することができる。前記方法はさらに、再度内在化機能を有するレセプターに付せんを付ける（ｔａｇ）ために、またはこれを単離するために細胞を標識リガンドと接触させることを含む。

【００１２】

さらに別の実施態様では、本発明は内在化機能を有するレセプターを特定する方法を提供する。前記方法は下記工程を含む：ｉ）リガンドに非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；ｉｉ）前記リガンドから前記レポーターを分離し、分離したレポーターを前記細胞表面から取り除く工程；ｉｉｉ）前記細胞内のレポーターの存在が、前記リガンドが内在化機能を有するレセプターと結合し、内在化されたことを示すことを特徴とする、前記レポーターが前記細胞内に存在する場合に前記細胞内のレポーターを検出する工程；ｉｖ）レポーターと結合した前記細胞内リガンドを特定するか、または回収する工程；及びｖ）前記リガンドと結合したレセプターを特定する工程。特に好ましい実施態様では、前記レセプターは、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫組織化学を含む方法（ただしこれらに限定されない）によって特定される。前記方法は、さらに、前記内在化機能を有するレセプターの認証特性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）を内在化機能を有するレセプターのデータベースに入力することを含む。

【００１３】

さらに本発明は、細胞内へのリガンドの内在化を調節する能力について薬剤をスクリーニングする方法を提供する。前記方法は好ましくは下記工程を含む：ｉ）前記細胞によって内在化されることが判明しているリガンドに非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；ｉｉ）細胞をテスト薬剤と接触させる工程；ｉｉｉ）リガンドからレポーターを分離し、分離したレポーターを細胞表面から取り除く工程；及びｉｖ）低濃度の前記テスト薬剤と接触したときに前記細胞によって内在化されるレポーターの量と、前記テ

スト薬剤と接触した細胞によって内在化されたレポーターの量との間の差異が、前記テスト薬剤が前記細胞による前記リガンドの内在化を調節することを示すことを特徴とする、前記レポーターが細胞内に存在する場合に前記細胞内のレポーターを検出する工程。好ましい実施態様では、前記低濃度のテスト薬剤とは、テスト薬剤が存在しないものである。好ましいテスト薬剤には有機小分子が含まれる。ある種の実施態様では、前記テスト薬剤は抗体またはペプチドを含むが、一方、ある実施態様では前記テスト薬剤は核酸、抗体またはペプチドを含まない。

【００１４】

また別の実施態様では、前記方法は、細胞を第一の濃度のテスト薬剤と接触させる工程；ｉｉ）前記細胞に内在化することが判明しているリガンドに非共有結合させたレポーターと、細胞とを接触させる工程；ｉｉｉ）リガンドからレポーターを分離し、分離したレポーターを細胞表面から取り除く工程；ｉｖ）細胞内のレポーターを検出して、細胞によって内在化されたレポーター／リガンド構築物の量を表示する第一の測定値を得る工程；ｖ）前記細胞を、前記第一の濃度よりも高い第二の濃度の前記薬剤と接触させる工程；ｖｉ）工程ｉｉ）～ｉｖ）を繰り返して、第二のより高濃度の薬剤による影響を受けた細胞によって内在化されたレポーター／リガンド構築物の量を表示する第二の測定値を得る工程；及びｖｉｉ）前記第一の測定値と前記第二の測定値が異なる場合は、前記薬剤が前記細胞内で前記リガンドの内在化を調節しているとする、前記第一の測定値と前記第二の測定値を比較する工程。

【００１５】

ある種の好ましい実施態様では、第一の低濃度テスト薬剤の濃度はゼロである（すなわちテスト薬剤は存在しない）。好ましいテスト薬剤には有機小分子が含まれる。ある実施態様では、テスト薬剤は抗体またはペプチドを含むが、一方、ある実施態様では前記テスト薬剤は核酸、抗体またはペプチドを含まない。

さらに別の実施態様では、本発明は、本発明の方法（例えば内在化レセプターについて細胞をスクリーニングする方法）で使用される構築物を提供する。好ましい構築物は、エフェクター（例えばレポーター）とエピトープタグを介して非共有結合したリガンドを含む。好ましい構築物では、前記リガンドには、ペプチド（例えばｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子など）、核酸、炭水化物、糖類などが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいペプチドリガンドは、コンビネーション化学合成によってまたはファージディスプレーライブラリーを用いて（例えば繊維状ファージを用いて）組換えによって生成される。

【００１６】

ある好ましい構築物では、エフェクター（例えばレポーター）は、エピトープタグ（例えばＨｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグ、ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープなど）によってリガンドに非共有結合している。エフェクターがレポーターの場合、好ましいレポーターには、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、リポソーム、または標識含有リポソームが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいある種の実施態様では、前記エピトープタグはヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_{6}$）タグで、前記リポーターは、脂質またはリポソームに結合されている、$Ｈｉｓ_{6}$タグと結合する試薬（例えばニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ））を含むリポソームである。別の好ましい実施態様では、前記リガンドは抗体であり、前記エピトープタグは、プロテインＡとの共有結合を介して前記抗体と結合される。ある好ましい実施態様では、前記構築物はリガンドに対して多価である。

【００１７】

本発明はまた、本発明の方法で使用されるリガンドライブラリーを提供する。好ましいライブラリーは、本明細書に記載するような複数の構築物を含み、前記ライブラリーの構成要素は各々リガンドおよびエピトープタグを含み、前記リガンドはライブラリーの構成要素間で多様な変化を有し、さらに前記エピトープタグは前記ライブラリーの構成要素間で一定である。前記ライブラリー構成要素のリガンド／エフェクター（例えばレポーター）

成分は前もって組み立てられるか、またはそれらが（例えば細胞の存在下で）一緒に結合されるときに組み立てられる。好ましいライブラリーは少なくとも10^5の種々のリガンドを含む。

【００１８】

さらに別の実施態様では、本発明は、内在化機能を有するレセプターについて細胞をスクリーニングするキットを提供する。好ましいキットは本明細書に記載したような構築物または構築物ライブラリーを含む。好ましいキットはさらに、リガンドを内在化させる細胞を特定する目的、または細胞によって内在化されたリガンドを特定する目的で前記ライブラリーを使用することについて説明する指示物をさらに含む。

さらにまた別の実施態様では、本発明は、細胞によるリガンドの結合および内在化を検出する方法を提供する。前記方法は下記工程を含む：ｉ）リガンドに非共有結合させたエフェクター（例えばレポーター）と、細胞とを接触させる工程；ｉｉ）細胞と結合しないエフェクター部分を取り除く工程；ｉｉｉ）細胞表面と結合し前記細胞によって内在化されたリガンドの総量を示す第一の読みを得るために、細胞と結合したレポーターを検出する工程；ｉｖ）前記レポーターをリガンドから分離し、分離したレポーターを細胞表面から除去する工程；ｖ）内在化されたリガンド量を示す第二の読みを得るために、細胞に残存するレポーターを検出する工程；及びｖｉ）細胞表面に結合しているリガンド量を示す差を得るために、第二の読みを第一の読みから差し引く工程。いくつかの事例では、前記接触工程の後で、例えば細胞の温度を低下させる（典型的には４℃）ことによって、または細胞を有効量の代謝阻害剤（例えばアンヒドログルコースまたはアジ化ナトリウム）で処理することによって、内在化プロセスの進行を停止させることが有利である。

【００１９】

ある種の実施態様では、接触工程は、エピトープタグを含むリガンドと細胞を接触させ、さらに細胞をエピトープタグと結合する成分部分を含むレポーターと接触させることを含む。好ましい実施態様では、前記リガンドは、細胞表面レセプターと結合するリガンドである。好ましいリガンドには、ペプチド（例えばｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、モノクローナル抗体、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子など）、核酸、炭水化物、糖類などが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいペプチドリガンドは、コンビネーション化学合成またはファージディスプレーライブラリーを用いて（例えば繊維状ファージを用いて）遺伝子組換えによって生成される。

【００２０】

ある種の好ましい実施態様では、エフェクター（例えばレポーター）は、エピトープタグ（例えばＨｉｓ－タグ、Ｆｌａｇ－タグ、ＨＡ－タグ、ｍｙｃ－タグ、ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープなど）によってリガンドに非共有結合される。前記エフェクターがレポーターの場合、好ましいレポーターには、酵素、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、リポソーム、または標識含有リポソームが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましい実施態様の１つでは、前記エピトープタグはヘキサヒスチジン（$Ｈｉｓ_6$）タグで、前記リポーターは、例えば金属キレート結合（例えばＮｉ（＋２）キレート結合）を介して脂質またはリポソームに結合されている$Ｈｉｓ_6$タグ（例えばニトリロトリ酢酸（ＮＴＡ））と結合する試薬を含むリポソームである。別の好ましい実施態様では、前記リガンドは抗体であり、前記エピトープタグは、プロテインＡまたはプロテインＧとの共有結合を介して前記抗体と結合される。

【００２１】

本発明の方法で使用される好ましい細胞には、植物細胞、動物細胞および細菌細胞が含まれるが、これらに限定されない。特に好ましい細胞には哺乳類細胞、より好ましくは正常または病理学的ヒト細胞（例えば癌細胞）が含まれる。ある種の実施態様では、前記細胞は、１つまたは２つ以上のレセプターを過剰発現する細胞、および／または異種レセプターを発現または過剰発現する細胞である。

本発明はまた、ステロールを含み、エピトープタグ（好ましくはヘキサヒスチジンタグ）と金属キレート結合を形成することができる金属キレート脂質を提供する。より好ましく

は、コレステロール共役ＮＴＡ金属錯体を含む金属キレート脂質が提供される。
【００２２】
本発明はまた、脂質、親水性ポリマーおよび前記親水性ポリマーと結合したキレート基を含む金属キレート脂質を提供する。好ましくは、本発明は、末端に結合した金属キレート基を含むポリ（エチレングリコール）－脂質共役物を提供する。より好ましくは、ポリ（エチレングリコール）－脂質と、エピトープタグ（例えばオリゴヒスチジンタグ）とのキレート結合を形成することができる末端に付加された金属キレート基とを含む、前記共役物が提供される。特定の実施態様では、ポリ（エチレングリコール）－脂質はポリ（エチレングリコール）－共役ＤＳＰＥであり、キレート基はＮＴＡである。
【００２３】
本発明はまた、金属キレート脂質を含む組成物を提供し、ここで該金属キレート脂質は、脂質、親水性ポリマー、および、前記親水性ポリマーと結合されており、エピトープタグとキレート結合を形成することができるキレート基を含む。本発明はさらに前記細胞と、（ｉ）金属キレート脂質及び（ｉｉ）リガンドを接触させることを含む、細胞にエフェクターを配送する方法であって、前記金属キレート脂質（ｉ）が、脂質、親水性ポリマー、およびキレート基を含有し、ここで前記キレート基は、前記親水性ポリマーと結合しており、かつ、エピトープタグ、及び前記金属キレート脂質と結合したエフェクターと、キレート結合を形成することができることを特徴とし、前記リガンド（ｉｉ）が前記エピトープタグを含み、ここで前記細胞は特異的に前記リガンドと結合し、場合によって前記リガンドを内在化することを特徴とする、前記方法を提供する。前記組成物は、好ましくはリポソームを含み、前記リポソームは前記金属キレート脂質および前記エフェクターを含む。
【００２４】
【課題を解決する手段】
定義
“ポリペプチド”、“オリゴペプチド”、“ペプチド”および“タンパク質”という用語は、本明細書では互換的に用いられアミノ酸残基ポリマーを指す。前記用語は、１つまたは２つ以上のアミノ酸残基が天然に存在するアミノ酸の対応する人工的類似体であるアミノ酸ポリマーにも、天然に存在するアミノ酸ポリマーと同様に適用される。前記用語はまた、ポリペプチドを構成するアミノ酸を連結する従来のペプチド結合に関する変種も含む。タンパク質にはまた糖タンパク質（例えばヒスチジン富裕糖タンパク質（ＨＲＧ）、ルイスＹ抗原（Le^{Y}）など）も含まれる。
【００２５】
“核酸”または“オリゴヌクレオチド”という用語は、本明細書では共有結合によって一緒に連結された少なくとも２つのヌクレオチドを指す。本発明の核酸は一本鎖または二本鎖で、一般的にはホスホジエステル結合を含むが、いくつかの事例では下記に概略するように、また別の、例えば以下の骨格をもつ核酸類似体が含まれる：ホスホルアミド（Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ４９（１０）：１９２５およびその中の参考文献；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ（１９７０）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．３５：３８００；Ｓｐｒｉｎｚｌ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．８１：５７９；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：３４８７；Ｓａｗａｉ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．８０５；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１０：４４７０；Ｐａｕｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｃｈｅｍｉｃａ Ｓｃｒｉｐｔａ ２６：１４１９）、ホスホロチオエート（Ｍａｇ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎｕｖｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：１４３７；米国特許第５，６４４，０４８号）、ホスホロジチオエート（Ｂｒｉｕ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１１：２３２１）、Ｏ－メチルホスホロアミダイト結合（Ｅｃｋｓｔｅｉｎ，”Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ”，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉ

ｔｙ Ｐｒｅｓｓ）、並びにペプチド核酸骨格および結合（Ｅｇｈｏｌｍ（１９９２）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：１８９５；Ｍｅｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３１：１００８；Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ，３６５：５６６；Ｃａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ ３８０：２０７）。他の類似体核酸には以下が含まれる：陽イオン性骨格をもつもの（Ｄｅｎｃｙ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：６０９７）、非イオン性骨格をもつもの（米国特許第５，３８６，０２３号；同５，６３７，６８４号；同５，６０２，２４０号；同５，２１６，１４１号；同４，４６９，８６３号；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１０：４４７０；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ １３：１５９７；ＡＣＳ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ５８０，”Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ”（Ｃｈａｐｔｅｒ ２ ａｎｄ ３），Ｅｄ．Ｙ．Ｓ．Ｓａｎｇｈｕｉ ａｎｄ Ｐ．Ｄａｎ Ｃｏｏｋ；Ｍｅｓｍａｅｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍ．Ｌｅｅｔ．４：３９５；Ｊｅｆｆｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＮＭＲ ３４：１７；Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３７：７４３（１９９６））、および非リボース骨格（以下の文献に記載されたものを含む：米国特許第５，２３５，０３３号および同５，０３４，５０６号並びにＡＣＳ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ５８０，”Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ”（Ｃｈａｐｔｅｒ ６ ａｎｄ ７），Ｅｄ．Ｙ．Ｓ．Ｓａｎｇｈｕｉ ａｎｄ Ｐ．Ｄａｎ Ｃｏｏｋ）。１つまたは２つ以上の炭素環式糖を含む核酸もまた前記核酸の定義内に含まれる（例えば以下の文献を参照されたい：Ｊｅｎｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．ｐｐ１６９－１７６）。いくつかの核酸類似体が文献（Ｃ．Ｒａｗｌｓ ＆ Ｅ．Ｎｅｗｓ Ｊｕｎｅ ２，１９９７ ｐａｇｅｓ ３５）に記載されている。リボース－リン酸骨格の上述の改変は、また別の成分部分（例えば標識）の付加を促進するために、またはそのような分子の生理学的環境における安定性および半減期を高めるために実施することができる。

【００２６】

本明細書で用いられるように、“残基”という用語は、天然、合成または改変アミノ酸を指す。

本明細書で用いられるように、“抗体”という用語は、実質的に免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントによってコードされた１つまたは２つ以上のポリペプチドから成る。認定されている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子が、多数の免疫グロブリンの可変領域遺伝子とともに含まれる。軽鎖はカッパまたはラムダのどちらかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、前記は順次ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥ免疫グロブリンクラスをそれぞれ規定する。

典型的な免疫グロブリン（抗体）の構造ユニットは四量体を含むことが判明している。各四量体は同一な２対のポリペプチド鎖で構成され、各対は１つの“軽”鎖（約２５ｋＤ）および１つの“重”鎖（約５０－７０ｋＤ）を有する。各鎖のＮ－末端は、約１００から１１０またはそれ以上のアミノ酸であって主として抗原認識に必要な可変領域を規定する。可変軽鎖（V_L）および可変重鎖（V_H）という用語は、それぞれ前記の軽鎖および重鎖を指す。

【００２７】

抗体は完全な免疫グロブリンとして存在するか、または種々のペプチダーゼの消化によって生じた性状が明らかな多数のフラグメントとして存在する。したがって例えば、ペプシンは、ヒンジ領域内のジスルフィド結合の下部で抗体を消化して、Ｆ（ａｂ）′$_2$を生じる。Ｆ（ａｂ）′$_2$は、軽鎖がV_H－C_H１とジスルフィド結合によって結合されたＦａ

ｂの二量体である。Ｆ（ａｂ）′$_2$は穏やかな条件下で還元されてヒンジ領域内のジスルフィド結合が破壊され、それによって（Ｆａｂ）′$_2$二量体はＦａｂ′単量体に変換される。前記Ｆａｂ′単量体は本質的にはＦａｂでヒンジ領域の一部分を有する（他の抗体フラグメントについてのさらに詳細な記述は以下の文献を参照されたい：”Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ，ｅｄ．，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９９３））。

【００２８】

種々の抗体フラグメントが完全な抗体の消化という観点から定義されるが、前記のＦａｂ′フラグメントは、化学的にまたはリコンビナントＤＮＡ手法を用いてｄｅ ｎｏｖｏに合成できることは当業者には理解されよう。したがって、本明細書で用いられるように抗体という用語はまた、完全な抗体の改変によって製造されるか、またはリコンビナントＤＮＡ手法を用いてｄｅ ｎｏｖｏに合成された抗体フラグメントも含む。好ましい抗体には、単鎖抗体（単一のポリペプチド鎖として存在する抗体）、より好ましくは単鎖Ｆｖ抗体（ｓＦｖまたはｓｃＦｖ）が含まれる。後者では、可変重鎖および可変軽鎖が一緒に（直接またはペプチドリンカーを介して）結合され連続したポリペプチドが生成されている。前記単鎖Ｆｖ抗体は共有結合によって連結されたV_H－V_L異種二量体であり、V_HおよびV_Lコード配列（直接連結されてあるか、またはペプチドコードリンカーによって連結されてある）を含む核酸から発現させることができる（Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５：５８７９－５８８３）。V_HおよびV_Lは単鎖ポリペプチドとして互いに連結されているが、V_HドメインおよびV_Lドメインは非共有結合によって結合されてある。繊維状ファージの表面で発現された最初の機能性抗体分子は単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）であったが、また別の発現手法も成功した。例えば、Ｆａｂ分子は、鎖の一方（重鎖または軽鎖）がｇ３キャプシドタンパク質と融合され、相補鎖が可溶性分子としてペリプラズムに搬出される場合、ファージ上でディスプレーさせることができる。前記２つの鎖は同じレプリコンでコードされても、または異なるレプリコンでコードされてもよいが、重要な点は、各Ｆａｂ分子内の前記２つの抗体鎖は翻訳後に合体し、二量体は、前記鎖の一方と例えばｇ３ｐとの結合を介してファージ粒子内に取り込まれるということである（例えば米国特許第５，７３３，７４３号を参照されたい）。前記ｓｃＦｖ抗体および他の多くの構造物が当業者に知られているが、後者は、天然の状態では凝集しているが、化学的に分離させた抗体のＶ領域由来軽鎖および重鎖ポリペプチドを、抗原結合部位の構造と実質的に同様な三次元構造に折り畳まれた分子に変換されてある（例えば米国特許第５，０９１，５１３号、第５，１３２，４０５号および第４，９５６，７７８号を参照されたい）。特に好ましい抗体には、ファージ上でディスプレーされた全てが含まれるべきである（例えば、ｓｃＦｖ、Ｆａｂおよびジスルフィド結合により連結されたＦｖである（Ｒｅｉｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８：１３２３－１３３１））。

【００２９】

本明細書で用いられるように、“特異的に結合する”とは、生物学的分子（タンパク質、核酸、抗体など）についていう場合は、異種分子集団（例えばタンパク質および他の生物学的物質）内の生物学的分子の存在を決定することができる結合反応を指す。したがって、指定の条件下で（例えば抗体の場合のイムノアッセイ条件または核酸の場合のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で）、特定のリガンドまたは抗体はその固有の“標的”分子と結合し、サンプルに存在する他の分子と顕著な量では結合しない。

“リガンド”という用語は、別の分子と特異的に結合および／または搬送されるか、または可能な分子を指す。好ましいリガンドには、ペプチド、核酸、炭水化物、糖、ホルモンなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。リガンドとリガンドが結合する分子とは結合対を形成し、前記結合対において各構成要素は他方の構成要素に対してリガンドとみなされる。結合対の明白な例には、抗体／抗原、抗体／ハプテン、酵素／基質、酵素／インヒビター、酵素／補助因子、結合タンパク質／基質、担体タンパク質／基質、トランスポータータンパク質／基質、レクチン／炭水化物、レセプター／ホルモン、レセプター

／調節物質、ポリヌクレオチドの相補鎖、タンパク質／核酸リプレッサー（インダクター）、レセプター／ウイルスなどが含まれる。

【００３０】

本明細書における“ナノ粒子”とは、エフェクター（例えば検出可能なレベルの、薬剤、サイトトキシン、等）と複合可能またはエフェクターを含有可能な“担体“を指す。好ましいナノ粒子はリガンドとの（直接またはリンカーを介した）非共有結合または切断可能な共有結合を備える。

【００３１】

“エフェクター”とは、任意の分子または分子の組合せであって、その活性を細胞内に内在化させることが所望されるものを指す。エフェクターには標識、サイトカイン、酵素、増殖因子、転写因子、薬などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

“レポーター”とは、検出可能なシグナルを提供するエフェクターである（例えば検出可能な標識である）。ある種の実施態様では、前記レポーターは、それ自体は検出可能なシグナルを提供する必要はないが、その後すぐに検出可能な標識と結合することができる成分部分を単に提供するだけでよい。

“調節する”という用語は、リガンドの内在化の調節に関して用いられるときは、内在化されるリガンドの総量、および／または内在化速度のアッピレギュレーションまたはダウンレギュレーションを指す。ある種の実施態様では、特にリガンドの流出がアッセイされないか、または制御されない場合には、調節はリガンドの流出速度を変化させることによって発生し、細胞によるリガンド取込みの正味速度または正味量に影響を与えることができる。

【００３２】

“テスト薬剤”という用語は、所望の活性（例えば細胞によるリガンドの内在化を調節する能力または変化させる能力）についてスクリーニングされるべき任意の薬剤を指す。“テスト組成物”は、場合によって適切な担体中の任意の分子または分子混合物であろう。

“テスト細胞”という用語は、本発明の方法が適用される任意の細胞を指す。

“有機小分子”という用語は、一般的に製薬で用いられる有機分子に匹敵するサイズを有する分子を指す。前記用語では生物学的巨大分子（例えばタンパク質、核酸など）は除外される。好ましい有機小分子のサイズは約５０００Ｄａまで、より好ましくは２０００Ｄａまで、もっとも好ましくは約１０００Ｄａまでの範囲である。

【００３３】

“検出する”という用語は検出または定量を意味する。

“キレート結合”という用語は、エフェクターと電子対ドナーとの間の結合であって、前記電子対ドナーと金属イオンとの間で誘引力を生じる、前記電子対ドナーと前記金属イオンの配位部位との間の相互作用を伴うものを指す。

“リポソーム”という用語は、両親媒性脂質で構成された自己封入層（ｓｅｌｆ－ｅｎｃｌｏｓｅｄ　ｌａｙｅｒ）を含むナノ粒子を指す。典型的には、前記の層は、疎水性部分および親水性部分を含む分子によって形成された二重層で、疎水性部分は水性媒体中で結合して前記層の内側部分を形成し、一方、親水性部分は媒体と接触状態にある。前記層は内部を取囲んでこれを封入し、前記内部は、全体的にまたは部分的に水相、固体、ゲル、気相または非水性液を含むことができる。エフェクター、例えばレポーターはリポソームの前記内部、脂質層内に含まれているか、または前記脂質層の外側表面に結合されてあってもよい。

【００３４】

本発明は、細胞内に内在化されるリガンドを特定する方法、またはリガンドを細胞内に内在化させることができる内在化機能を有するレセプターを特定する方法を提供する。前記方法は、リガンドの精製を必要とすることなく、エフェクター（例えばレポーター分子など）を含有するナノ粒子に非共有結合的に（例えばエピトープタグを介して）リガンドを結合させることを含む。精製を必要としないので、ナノ粒子に結合させたリガンドにテスト細胞を曝露する前でも後でも、細胞結合および内在化を高処理態様で容易にアッセイす

ることができる。

【００３５】

一般的には、前記方法は、リガンド（例えばコンビネーションライブラリーで生成されたリガンド）と非共有結合させたエフェクター（例えばレポーター）を提供することを必要とする。前記エフェクター／リガンドを、“テスト”細胞“（例えばリガンドを内在化させる能力についてアッセイされるべき細胞）と接触させる。エフェクター／レポーターを前記リガンドから分離し、分離したレポーターを前記細胞の表面から除去する。好ましい実施態様では、前記レポーター／エフェクターは前記細胞内で検出され、前記レポーター／エフェクターが細胞内に存在するということは、前記リガンドが内在化されたことを示す。より一般的には、リガンドの内在化は、前記細胞が、前記リガンドと結合する内在化機能を有するレセプターをディスプレーしていることを意味する。前記方法はさらに、例えば診断または治療を目的として、リガンドを内在化させた細胞を特定および／または単離することを含むことができる。この場合、前記細胞は、患者の組織標本または体液標本、例えば血液、尿、唾液または組織生検にそのような細胞が存在するか否かを決定するための病理学的細胞（例えば癌細胞）である。別の例では、ＤＮＡのトランスフェクションの結果としてその表面に内在化機能を有するエピトープを発現する、遺伝子工学により操作された細胞が検出および単離されるであろう。表面に結合したエフェクターは、細胞の完全性を保護する細胞保全条件下で分離され除去されるので、単離された細胞の維持および増殖が可能で、安定なトランスフェクタントの有用なクローンを得ることができる。

【００３６】

別の実施態様では、本発明は、内在化機能を有するレセプターを特定する方法を提供する。好ましい実施態様では、前記方法は、内在化されたリガンドを例えば上記で述べた方法にしたがって特定することを必要とする。前記内在化されたリガンドを細胞から回収および／または特定する。続いて、前記回収および／または特定したリガンドを用いて、前記リガンドを内在化させたレセプターを、例えばｉｎ ｓｉｔｕで標識するか、またはアフィニティー精製することによって特定することができる。

さらに別の実施態様では、本発明の方法を用いて、リガンドを内在化させる細胞の能力を調節する薬剤をスクリーニングすることができる。好ましい実施態様では、前記方法は、本明細書に記載するようにリガンドの内在化についてスクリーニングすることを必要とする。この場合、細胞をエフェクター／リガンド構築物と接触させる前に、または接触させている間に、それら細胞をスクリーニングされるべき薬剤と接触させる。例えばテスト薬剤を低濃度で含むか、またはテスト薬剤を含まない陰性コントロールと比較したとき、テスト薬剤と接触させた細胞によるリガンド内在化の差異は、前記テスト薬剤が問題のリガンドの内在化を調節する（例えば増加または減少させる）ことを示す。

【００３７】

本発明はまた、細胞によるリガンドの結合および内在化を検出する方法を提供する。前記方法は以下のｉ）からｖｉ）の工程を含む：ｉ）リガンドと非共有結合させたエフェクター（例えばレポーター）と細胞を接触させ；ｉｉ）細胞と結合していないエフェクターの部分を取り除き；ｉｉｉ）細胞と結合したレポーターを検出し、細胞表面と結合し前記細胞によって内在化されたリガンドの総量を示す第一の測定値を得て；ｉｖ）前記レポーターをリガンドから分離し、分離したレポーターを細胞表面から除去し；ｖ）細胞内に残存するレポーターを検出し、内在化されたリガンド量を示す第二の測定値を得て；ｖｉ）第二の測定値を第一の測定値から差し引き、細胞表面に結合しているリガンド量を示す差を得る。

【００３８】

リガンドに非共有結合したエフェクターの提供

好ましい実施態様では、本発明の方法は、リガンドに非共有結合させた（典型的には“ナノ粒子”と複合体を形成させるか、またはナノ粒子内に局在化させる）エフェクターを利用する。ある種の実施態様では、エフェクターは切断可能な共有結合によってリガンドと結合させることができる。

エフェクターと共役させるためのリガンド

実質的にいずれのリガンドも本発明の方法で使用するために適している。特に好ましい実施態様では、本発明の方法はペプチドを利用するが、一方、核酸、糖、種々の炭水化物、脂質および任意の有機分子をリガンドとして用いることが可能である。

【００３９】

ある種の実施態様では、単リガンドを用いて、リガンドを内在化させることができる細胞および／またはレセプターを特定することができる。他の実施態様では、マルチリガンドを用いて、内在化機能を有するレセプターおよび／または特定の細胞によって内在化されるリガンドを特定することができる。特に好ましい実施態様では、前記リガンドは、多数の異なるリガンドを含むライブラリー（時にコンビネーションライブラリー（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ）と称される）の成分として提供される。多数の異なるリガンドを含む大きなリガンドライブラリーを使用することによって、特定の細胞によって内在化されるリガンドを特定できる可能性が高まる。

【００４０】

好ましいライブラリーは、少なくとも２個、好ましくは少なくとも５個、より好ましくは少なくとも１０個、もっとも好ましくは少なくとも１００個、または少なくとも１０００個の異なるリガンドを含む。さらに大きなライブラリーも可能であり、しばしば好ましい。そのような大きなライブラリーは少なくとも１００００個の異なるリガンド、好ましくは少なくとも１０００００個の異なるリガンド、または少なくとも約１０００００個もしくはそれ以上のリガンドすら含む。

コンビネーションペプチドライブラリーを製造する方法は当業者には周知である。前記ペプチドライブラリーは化学的に合成するか、または核酸発現ライブラリーによって製造することができる。コンビネーションライブラリーの構築における最初の研究は化学的なペプチド合成を中心とした（Ｆｕｒｋａ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．３７：４８７－４９３；Ｈｏｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：５１３１－５１３５；Ｇｅｙｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３９９８－４００２；Ｆｏｄｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７）。

【００４１】

しかしながら、リコンビナントＤＮＡ技術を用いてペプチドライブラリーを作製する方法が極めて一般的になりつつある。したがって、例えばファージディスプレーライブラリーなどの使用によって、単鎖抗体ライブラリーまたは他のペプチドリガンドライブラリーの作製が可能である。前記のような大きなライブラリーを発現させるために、ポリペプチドまたは抗体フラグメント遺伝子がファージの表面タンパク質（ｐＩＩＩ）をコードする遺伝子に挿入され、ポリペプチド－ｐＩＩＩ融合タンパク質が前記ファージの表面でディスプレーされる（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：４１３３－４１３７）。前記遺伝子は、ｐＩＩＩタンパク質から所望のように前記ペプチドを分離することを可能にする酵素切断部位を含むことができる。

【００４２】

タンパク質をコードする核酸は１つまたは２つ以上の領域で高度な縮退を有し、それによって文字通り数千のペプチドライブラリーを提供することができる（例えば米国特許第５，１９８，３４６号、第５，０９６，８１５号、第４，９４６，７７８号などを参照されたい）。１０００００個または１０００００００個すら越える異なる構成要素を含むライブラリーが構築された（例えば以下の文献を参照されたい：Ｙａｎｇ ＆ Ｃｒａｉｋ （１９９８） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７９：１００１－１０１１）。

ファージディスプレー法はペプチドライブラリーの唯一の作製方法ではない。ファージ以外のベクターを用いて大きなペプチドライブラリーを作製することが可能である。

【００４３】
ある種の実施態様では、本発明で利用されるリガンドは“ランダムに”作製されるが、別の実施態様ではリガンドはペプチド“リード”の周辺に多様性を構築することを含むことができる。このアプローチでは、特定のペプチド配列（リード）から開始される。前記リードは、上記で述べたような他のランダムペプチドアプローチによって選択されたもの（例えばファージアプローチによるもの）であってもよい。続いて、前記リードペプチドのコード配列をベースにしたオリゴヌクレオチド群をｉｎ ｖｉｔｒｏ（例えばＤＮＡ自動合成装置により）で合成する。前記オリゴヌクレオチド群の各構成要素はオリジナル配列から一定の度合いで変化する。リードの供給源には以下が含まれる：（１）例えばファージディスプレーライブラリーで作製された、準ランダムペプチド；（２）天然リガンド遺伝子に由来する小型ペプチドをコードするＤＮＡ；（３）多様性を導入するために小型ペプチドコードＤＮＡフラグメントをシャフリングしたもの（例えば米国特許第６，１３２，９７０号、第６，１１７，６７９号、第６，０９６，５４８号を参照されたい）；（４）ペプチド多様性の細胞間生成及び機能しうる転写トランスアクチベーターの再構築を通じたペプチド－タンパク質相互作用の検出に関する、他のペプチド多様性及び特徴の供給源に由来するペプチドリード（例えば以下を参照されたい：Ｆｉｅｌｄ ＆ Ｓｏｎｇ，（１９８９） Ｎａｔｕｒｅ ３４０（６２３０）：２４５－２４６）；および（６）構造的に拘束されている特定分子の骨格の周囲に構築された多様なペプチド（例えば以下の文献を参照されたい：Ｙａｎｇ ＆ Ｃｒａｉｋ （１９９８） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７９：１００１－１０１１）。

【００４４】
選択したランダムペプチドベクターを多様化させるためのさらに別のアプローチは、回収ベクタープールまたはサブセットの突然変異誘発を必要とする。スクリーニングによって特定した、ベクターで形質転換したリコンビナントホスト細胞をプールし単離する。細胞を例えば亜硝酸、ギ酸、ヒドラジンで処理することによって、またはミューテーター株（例えばｍｕｔＤ５）（例えば以下の文献を参照されたい：Ｓｃｈａａｐｅｒ （１９８８） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５：８１２６－８１３０）を使用することによって、ベクターＤＮＡまたはベクターＤＮＡの一部分に突然変異を誘発する。前記の処置によって多様な変異がベクターＤＮＡに生じる。前記可変性ペプチドをコードする配列を含むセグメントを、場合によって前記可変性領域に接する部位に特異的な制限ヌクレアーゼで切断して単離し、続いて無傷のベクターＤＮＡで再クローニングすることができる。また別には、前記のランダムペプチドコード配列を再クローニングすることなく前記突然変異誘発ベクターを用いてもよい。

【００４５】
さらにまた、低ストリンジェント条件下でポリメラーゼ連鎖反応を用い、選択したペプチドのコード配列に誤ったヌクレオチド変化を取り込ませることによって、選択ペプチドを多様化させることができる（ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）；米国特許第４，６８３，２０２号、第４，６８３，１９５号および第４，９６５，１８８号を参照されたい）。文献（Ｌｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ １：１１－１５）に記載されたプロトコルは、ヌクレオチド比率を変更し、さらにマンガンを添加して変異頻度を顕著に高めている。

【００４６】
さらにまた、強力な突然変異誘発を用い、（リードとはほとんどまたは全く相違をもたないペプチドを生成するとともに）前記リードとは極めて多数の相違を有する多数のペプチドを生成することができる。別のアプローチでは、ペプチド内のただ１つのアミノ酸置換が所望され、その目的は、結合を失わせるかまたは顕著に結合を改善する多数の単一アミノ酸変化を見つけることである。例えば、あるアプローチは４つのヌクレオチド混合物を合成することを含む。前記混合物の各々は、４つのヌクレオチドの１つを８５％で含み、他の３つのヌクレオチドはそれぞれ５％で含む。したがって、固相化学合成時に各位置で“正確な”ヌクレオチドが取り込まれる確率は８５％で、他の３つのヌクレオチドが取り

込まれる確率は１５％（各々については５％の確率）である。したがって、平均すれば１００塩基の長さのオリゴヌクレオチドを合成する場合、平均的分子でヌクレオチド配置の８５％が正確で（すなわちリード配列とマッチし）、配置の１５％が、オリジナル配列と比較して不正確なヌクレオチドを取り込んでいるであろう。選択した不正確取込み基準に対応して、生成された種々のオリゴヌクレオチド混合物は、例えば９７％１％１％１％不正確取込み様式に従うことによって出発コア配列に極めて類似し、また例えば５５％１５％１５％１５％不正確取込み様式に従うことによってリード配列から平均して顕著に異なるであろう。

【００４７】

上記に述べたアプローチは単なる例示である。他のペプチドライブラリーの作製も当業者にはよく知られている（例えば以下の文献を参照されたい：５，０１０，１７５；Ｆｕｒｋａ（１９９１）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．，３７：４８７－４９３；Ｈｏｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８８など）。

本発明の方法で使用されるリガンドはペプチドリガンドに限定されない。エフェクター／レポーターと非共有結合することができるかぎり、実質的にはいずれのリガンドも用いることができる。さらにまた、リガンドが特定のエフェクター／レポーターと非共有結合により結合することができるように、例えば特定のペプチドエピトープ用いてリガンドを誘導することができる。適切な非ペプチドリガンドには、核酸（ＲＮＡもしくはＤＮＡまたはその類似体）、糖、炭水化物、脂質、小型の有機分子などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【００４８】

コンビネーション化学合成ライブラリーの範囲はペプチド合成以外にも拡張されてきた。ポリカルバメートおよびＮ－置換グリシンライブラリーが合成され、構造的にペプチドに類似するが、強力なタンパク分解耐性、吸収および薬理学的動態特性を有する化学物質を含むライブラリーが作製された（Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３－１３０５；Ｓｉｍｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：９３６７－９３７１）。さらにまた、ベンゾジアゼピン、ピロリドンおよびジケトピペラジンライブラリーが合成され、コンビネーション化学の範囲が拡大され複素環物質も含まれるようになった（Ｂｕｎｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：１０９９７－１０９９８；Ｍｕｒｐｈｙ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１７：７０２９－７０３０；Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｂｉｏｒｇ．Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：４７－５０）。

化学的および／または生物学的合成方法（多数の化学的に作られた“ビルディングブロック”を組み合わせることによる）によって、極めて複雑で多様性を有するライブラリーを作製することができる。例えば、ある研究者は、１００個の互換性を有するビルディングブロックを系統的に組み合わせて混合することによって、理論的には１億個の四量体化合物または１００億個の五量体化合物が合成されることを観察した（Ｇａｌｌｏｐ ｅｔ ａｌ．（１９９４）３７（９）：１２３３－１２５０）。

【００４９】

既知のコンビネーション化学ライブラリーには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：ペプトイド（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／１９７３５、１９９１年１２月２６日）；ランダムバイオオリゴマー（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／００９１、１９９２年1月９日）；ベンゾジアゼピン（米国特許第５，２８８，５１４号）；ダイバーソマー（ｄｉｖｅｒｓｏｍｅｒ）、例えばヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド（Ｈｏｂｂｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６９０９－６９１３）；ビニローグポリペプチド（Ｈａｇｉｈａｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：６５６８）；ベーターＤ－グルコース骨格を有する非ペプチド性模造ペプチド（Ｈｉｒｓｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１

９９２）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：９２１７－９２１８）；小型化合物ライブラリーと同様な有機合成（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６：２６６１）；オリゴカルバメート（Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３）；および／またはペプチジルホスホネート（Ｃａｍｐｂｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５９：６５８）（概括的には以下の文献を参照されたい：Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１３８５）；核酸ライブラリー（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｏｒｐ．）；ペプチド核酸ライブラリー（例えば米国特許第５，５３９，０８３号を参照されたい）；抗体ライブラリー（例えば以下を参照されたい：Ｖａｕｇｈｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４（３）：３０９－３１４；ＰＣＴ／ＵＳ９６／１０２８７）；炭水化物ライブラリー（Ｌｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７４：１５２０－１５２２；米国特許第５，５９３，８５３号）；および小型有機分子ライブラリー［例えばベンゾジアゼピン（Ｂａｕｍ（１９９３）Ｃ＆ＥＮ，Ｊａｎ．１８，ｐ．３３）、イソプレノイド（米国特許第５，５６９，５８８号）、チアゾリジノンおよびメタチアザノン（米国特許第５，５４９，９７４号）、ピロリジン（米国特許第５，５２５，７３５号および第５，５１９，１３４号）、モルホリノ化合物（米国特許第５，５０６，３３７号）、ベンゾジアゼピン（米国特許第５，２８８，５１４号）、ピリミジンジオン（米国特許第６，０２５，３７１号）］など。

【００５０】

コンビネーションライブラリーを調製する装置は市販されている［例えば３５７ＭＰＳ、３９０ＭＰＳ（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍ Ｔｅｃｈ；Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ ＫＹ．）；Ｓｙｍｐｈｏｎｙ（Ｒａｉｎｉ；Ｗｏｂｕｎ，ＭＡ）；４３３Ａ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）；９０５０Ｐｌｕｓ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ；Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）］。

液相化学合成のために周知の多数の自動システムもまた開発されている。前記システムには以下のような自動化ワークステーションが含まれる（ただしこれらに限定されない）：武田薬品工業（株）（大阪）が開発した自動合成装置およびロボットアームを用いる自動システム（ザイメート（Ｚｙｍａｔｅ）ＩＩ（Ｚｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，Ｍａｓｓ）．；オルカ（Ｏｒｃａ）（ヒューレットパッカード；Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）、前記は研究者による手動合成操作に類似するものである）およびベンチャーＴＭプラットフォーム（初めから終わりまで５７６から９６００の同時反応を進行させることができる超高速処理合成装置（Ａｄｖａｎｃｅｄ ＣｈｅｍＴｅｃｈ，Ｉｎｃ．；Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ，ＫＹ））。上記の装置のいずれも本発明での使用に適している。本明細書で述べたように前記装置を操作することができるように、（必要な場合には）前記装置に加えるべき改変の特性およびその実施は当業者には明白であろう。さらに、コンビネーションライブラリー自体も多数市販されている（ＣｏｍＧｅｎｅｘ；Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．；Ａｓｉｎｅｘ；Ｍｏｓｃｏｗ，Ｒｕ；Ｔｒｉｐｏｓ，Ｉｎｃ．；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ；ＣｈｅｍＳｔａｒ，Ｌｔｄ；Ｍｏｓｃｏｗ，Ｒｕ；３Ｄ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ；Ｅｘｔｏｎ，ＰＡ；Ｍａｒｔｅｋ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃｏｌｕｍｂｉａ，ＭＤなど）。

【００５１】

エフェクター／ナノ粒子組合わせ

好ましい実施態様では、リガンドはエフェクターに非共有結合されている。前記結合は直接的結合であっても、エフェクターを“搬送する”担体（例えばナノ粒子）との結合であってもよい。本明細書で用いられるように、エフェクターとは、その活性を細胞内に内在化させることが所望される任意の分子または分子の組合せを指す。エフェクターには、例えば標識、サイトカイン、酵素、成長因子、転写因子、核酸、薬などの分子が含まれるが、ただしこれらに限定されない。エフェクターとして特に適切な薬は、細胞毒性抗癌剤である。細胞毒性抗癌剤の例は、アンタサイクリン（例えばドキソルビシン）、ツルニチニ

チソウのアルカロイド（例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン）、ホレート類似体（例えばメトトレキセート、エダトレキセート）、ヌクレオチド類似体（例えばアラビノシルシチジン、アザチミジン）、白金錯体（例えばシスプラチン、カルボプラチン）、およびアルキル化剤（例えばニトロソウレア、メルファラン、シクロホスファミド）である。

【００５２】

特に好ましい実施態様では、エフェクターは検出可能な標識を含む。本発明の使用に適した検出可能な標識には、分光測定的、光化学的、電気化学的、生化学的、免疫化学的、磁気的、電気的、光学的、または化学的手段によって検出できる任意の組成物が含まれる。本発明で有用な標識には、標識ストレプトアビジン共役物で染色されるビオチン、磁性ビーズ［例えばダイナビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）（登録商標）］、蛍光染料［例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など（Ｈａｕｇｌａｎｄ（１９９６）”Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ”，６^{ｔｈ} Ｅｄ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇｏｎ，ＵＳＡ）］、放射性標識（例えば^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃまたは^{32}Ｐ）、酵素（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびＥＬＩＳＡで一般的に使用されるその他の酵素）、および比色標識、例えば金コロイド（例えば直径サイズが４０－８０ｍｍの金粒子は高い効率で緑色光を散乱させる）または着色ガラスもしくはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズが含まれる。前記の標識の使用を開示する特許には、米国特許第３，８１７，８３７号、第３，８５０，７５２号、第３，９３９，３５０号、第３，９９６，３４５号、第４，２７７，４３７号、第４，２７５，１４９号および第４，３６６，２４１号が含まれる。

【００５３】

蛍光標識が好ましい。なぜならば、蛍光標識は非常に強いシグナルを提供し、バックグラウンドは低いからである。さらにまた、蛍光標識は迅速な走査方法により高い分解能および感度で光学的に検出することができる。望ましくは、蛍光標識は約３００ｎｍ、好ましくは約３５０ｎｍ、より好ましくは約４００ｎｍを越える光を吸収するべきで、通常は吸収した光の波長よりも約１０ｎｍ以上の波長を放出する。結合させた染料の吸収および放出特性は未結合染料とは異なることは特記されるべきである。したがって、染料の種々の波長レンジおよび特性をいうときは、任意の溶媒中の未結合染料についてではなく使用されている染料を示すことを意図している。

【００５４】

検出可能なシグナルはまた、化学発光源および生物発光源によっても提供される。化学発光源には、化学反応によって電子的に励起され、続いて検出可能なシグナルとして機能するか、または蛍光受容体にエネルギーを供与する光を放出することができる化合物が含まれる。また別には、ルシフェリンをルシフェラーゼまたはルシゲニンと一緒に用いて生物発光を提供することができる。

スピン標識は、不対電子対をもつレポーター分子によって提供され、前記は電子スピン共鳴（ＥＳＲ）分光法によって検出することができる。典型的なスピン標識には、遊離有機ラジカル、遷移金属錯体（特にバナジウム、銅、鉄およびマンガン）などが含まれる。典型的なスピン標識にはニトロオキシド遊離ラジカルが含まれる。

【００５５】

蛍光標識は、単一の有機分子種に限定されることは無く、無機分子、有機および／または無機分子の多分子混合物、結晶、ヘテロポリマーなども含まれることは理解されよう。したがって、例えば、シリカの殻に封入されたＣｄＳｅ－ＣｄＳの核－殻ナノクリスタルを生物学的分子との結合を目的として容易に製造することができる（Ｂｒｕｃｈｅｚ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：２０１３－２０１６）。同様に、強い蛍光を発する量子小片（硫化亜鉛キャップドセレン化カドミウム）を生物分子に共有結合させて、超高感度の生物学的検出のために用いられた（Ｗａｒｒｅｎ ａｎｄ Ｎｉｅ（１９

９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８１：２０１６－２０１８）。
他の好ましい標識には放射性標識が含まれる。放射性標識をナノ粒子に導入し、続いて前記ナノ粒子をエフェクターに非共有結合させる。例えば、同位元素^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎ、^{14}Ｃ、^{3}Ｈ、^{35}Ｓおよび^{14}Ｐが放射性標識として一般的に用いられる。例えば^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎのような放射性金属イオンを、ＩＤＡ、ＮＴＡなどとの混合キレート型としてエピトープタグに非共有結合させることができる。放射性標識の検出方法は当技術分野では周知である。
【００５６】
磁性ビーズもまた別の好ましい検出可能標識である。細胞と適合する多様な磁性ビーズが当技術分野で知られている。例えばＰＣＴ特許出願ＰＣＴＷＯ９０／０１，２９５号、米国特許第４，１０１，４３５号、第５，２６２，１７６号、第４，６９８，３０２号、第５，０６９，２１６号およびＷｅｉｓｓｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｒａｄｉｏｌｏｇｙ，１７５：４８９－４９３（１９９０）を参照されたい。磁力感度が強化されたサブミクロンサイズのポリマー被覆生物適合磁性ビーズが米国特許第５，４１１，７３０号（Ｋｉｒｐｏｔｉｎ，Ｃｈａｎ，Ｂｕｎｎ）に記載されている。前記ビーズは典型的には磁鉄鉱または超常磁性酸化鉄を含み、５ｎｍ（超磁性ビーズ）から数ミクロンのサイズを有する。１つまたは２つ以上のリガンドを非共有結合または切断可能な共有結合によって前記ビーズに結合させる。磁性ビーズをリガンド（例えば抗体）と結合させる技術は一般的に知られている（Ｗｅｉｓｓｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｒａｄｉｏｌｏｇｙ，１８２：３８１－３８５）。細胞とのインキュベーションの後で、内在化されなかったビーズ（表面結合ビーズを含む）を、例えば洗浄することによって細胞から分離し除去する。リガンドを内在化させることができる細胞、したがって前記リガンドと結合した磁性ビーズを内在化させた細胞は、磁力測定によって検出することができる。また別には、磁場を用いて（例えばハイグラディエント磁性分離（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＡＧ）によって）細胞を分離する。磁性ビーズの生体適合性により、分離されたリガンド内在化細胞は生命力を有し、その後の研究または医療的使用のために、例えば細胞培養として生かしておくことができる。
【００５７】
２種類以上のリガンドを非共有結合または切断可能な共有結合によりエフェクター（例えばレポーターまたはレポーターを搬送するナノ粒子）に結合させることができ、したがって同じ細胞バッチで多数のタイプのリガンドの内在化について細胞を同時に選別および検出することが可能なことは理解されよう。
ある種の実施態様では、エフェクター（例えばレポーター／エフェクター）はリガンドに非共有結合により直接連結され、一方、他の実施態様では、前記エフェクターはナノ粒子内に含まれるか、および／またはナノ粒子と複合体を形成し、前記ナノ粒子がリガンドと非共有結合で連結される。本明細書で用いられるように、ナノ粒子とは、エフェクターと複合体を形成するか、またはエフェクターを含有することができ、さらにリガンドに非共有結合を提供することができる任意の“担体”である。
【００５８】
“ナノ粒子”として広範囲の物質が適切で、これらには多孔性ミクロビーズ（例えば孔制御ガラス）、脂質とリポソーム、種々のポリマー、種々のデンドリマーなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。適切なリポソームには、小型の単層小胞、大型の単層小胞および多層小胞を含む（ただしこれらに限定されない）種々のリポソームが含まれる。リポソームを生成する種々の技術が文献に記載されている。前記技術には加圧押出し、洗剤透析、脱水－再水和、逆相蒸発、リモートローディング、超音波処理および他の方法が含まれるが、ただしこれらに限定されない（例えば以下の文献を参照されたい：Ｎｅｗ（１９９０）Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ．Ｉｎ：Ｒ．Ｒ．Ｃ．Ｎｅｗ（ｅｄ．）Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．Ｉ．Ｒ．Ｌ．Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，ｐｐ．３３－１０４１３）。また別には、エフェクター分子と脂質で単純に複合体を形成させることができる。

【００５９】
さらに別の実施態様では、エフェクターは、種々のポリマー（例えば薬剤の担体として用いられるもの）などと結合される。適切なポリマーの例にはポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピル－メタクリルアミド－フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシド－ポリリジンが含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記物質はまた、薬剤の制御放出の実施に有用な生物分解性ポリマーと結合させてもよい。適切なポリマーには、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリ酢酸とポリグリコール酸とのコポリマー、ポリエプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアシレートおよびヒドロゲルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーが含まれる。

【００６０】
さらに他の実施態様では、エフェクターは種々のデンドリマーと複合体を形成する。デンドリマーとは三次元の高度な秩序を有するオリゴマーおよび／またはポリマー化合物で、典型的にはコア分子またはイニシエーターと称されるものにオリゴマーおよび／またはポリマーを付加し、さらに陽性に荷電した外側表面を提供する反復連続反応によって形成される。前記デンドリマーは下記文献に記載されたように製造できる：ＰＣＴ／ＵＳ８３／０２０５２および米国特許第４，５０７，４６６号、第４，５５８，１２０号、第４，５６８，７３７号、第４，５８７，３２９号、第４，６３１，３３７号、第４，６９４，０６４号、第４，７１３，９７５号、第４，７３７，５５０号、第４，８７１，７７９号、第４，８５７，５９９号。

【００６１】
典型的には、デンドリマーのポリカチオンはコア分子を構成し、前記コア分子上にポリマーが付加される。前記ポリマーはオリゴマーでもポリマーでもよく、前記は典型的には電荷を獲得できる末端基を含む。適切なコア分子は少なくとも２つの反応残基を含み、前記はオリゴマーおよび／またはポリマーとコア分子の結合に利用することができる。前記反応性残基の例は、とりわけヒドロキシル、エステル、アミノ、イミノ、イミド、ハライド、カルボキシル、カルボキシハライド、マレイミド、ジチオピリジルおよびスルフヒドリルである。好ましいコア分子は、とりわけアンモニア、トリス－（２－アミノエチル）アミン、リジン、オルニチン、ペンタエリスリトールおよびエチレンジアミンである。前記残基の組合せもまた他の反応残基と同様に適切である。

【００６２】
エフェクター／ナノ粒子とリガンドとの非共有結合

好ましい実施態様では、リガンドはエフェクターおよび／またはエフェクターを含むナノ粒子に非共有結合される。前記非共有結合は、イオン性相互作用、配位結合（例えばキレート結合）および／または水素結合および／または疎水性相互作用などの手段による。特に好ましい実施態様では、前記非共有結合はエピトープタグの手段による。
本明細書で用いられるようにエピトープタグとは、抗体または他の結合パートナーによって特異的に認識される分子または分子の領域を指す。したがって、例えばエピトープ／抗体相互作用で認識されるエピトープの他に、エピトープタグはまた、他の結合分子によって認識される“エピトープ”（例えばレセプターと結合するリガンド）、他のリガンドと結合してヘテロダイマーまたはホモダイマーを形成するリガンド、２から８個のヒスチジン残基を有するオリゴヒスチジン配列（例えばＮｉ－ＮＴＡと結合したHis_6）などを含む。

【００６３】
エピトープタグは当業者には周知である。さらにまた、多様なエピトープタグに特異的な抗体が市販されている。前記には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号：１）エピトープに対する抗体、ｃ－ｍｙｃ抗体（シグマ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ）から入手できる）、ＨＮＫ－１炭水化物エピトープ、ＨＡエピトープ、ＨＳＶエピトープ、His_4、His_5およびHis_6エピトープ（Ｈｉｓ

エピトープ特異抗体（例えばＱｉａｇｅｎ）で認識される）など。さらに、エピトープ付随タンパク質のためのベクターも市販されている。したがって、例えばｐＣＭＶ－Ｔａｇ１ベクターは、哺乳類細胞で遺伝子を発現させるためにデザインされたエピトープ付随ベクターである。ｐＣＭＶ－Ｔａｇ１ベクターに挿入される標的遺伝子は、ＦＬＡＧ（登録商標）エピトープ（Ｎ－末端、Ｃ－末端または内部付せん用）、Ｃ－ｍｙｃエピトープまたはＦＬＡＧ（Ｎ－末端用）とｃ－ｍｙｃ（Ｃ－末端用）の両方を用いて付せんを付けることができる。

【００６４】

特に好ましい実施態様では、リガンドにはヒスチジンエピトープ（His_6）タグの付せんを付けることができる。前記タグは、キレーター基のＣｕ、Ｎｉ、ＺｎまたはＣｏ錯体と結合する。好ましいキレーター基には、イミノ二酢酸（ＩＤＡ）およびニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）誘導体が含まれる。His_6タグと結合する特に好ましい錯体はＮｉ－ＮＴＡで、前記はエフェクターおよび／またはエフェクターを含むナノ粒子と容易に結合される（例えば実施例１を参照されたい）。

エフェクター／ナノ粒子の重要な事例の１つはリポソームである。リポソームは数百または数千のエフェクター分子（例えばレポーター）を含むことができる。前記によって本発明の方法の感度を高めることができる。リポソームの作製方法および種々の物質（例えばエフェクター、特にレポーター）をロードする方法は、当分野では公知で、種々の文献に記載されている（例えば以下を参照されたい：Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｅｄ．Ｇ．Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ，ｖｏｌ．Ｉ－ＩＩＩ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ，１９９３；Ｄ．Ｌａｓｉｃ（１９９３）Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｐｈｙｓｉｃｓ ｔｏ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｅｌｓｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，５７５ｐｐ）。リガンドが結合したリポソームはある種の細胞と結合および／または内在化されることが判明している（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ａｄｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，４０：３９９－４３５）。本発明のエフェクター／リガンド構築物を生成するために、例えばＮＴＡ－およびＩＤＡ－共役脂質を含むリポソームを用いることができる。

【００６５】

脂質小胞に取り込ませることができる金属キレート脂質共役物は、以下の文献に概括的に記載されている：米国特許第４，７０７，４５３号（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．）。高い安定性を有する金属キレートと異なり、本発明は、好ましい実施態様では、中等度（または低い）安定性を有し、さらに典型的には例えばＮＴＡ－またはＩＤＡ－基の場合のように前記金属よりも配位部位が少ない金属錯体を生じるキレート脂質共役物を用い、それによって、錯体中の金属イオンの錯体配位圏が不完全となり、金属と前記リガンドのエピトープタグとの間で金属キレート結合の形成を可能にする。前記のようなキレート結合は、強い金属結合力を有する、一般的に使用される細胞保全性キレーター／金属結合薬剤、例えばジエチレントリアミンペンタアセテート（ＤＴＰＡ）のエチレンジアミンテトラアセテート（ＥＤＴＡ）の作用によって容易に分離させることができる。

【００６６】

好ましい実施態様では、前記脂質は、ヘキサヒスチジンエピトープとＮＴＡもしくはＩＤＡまたは他のキレート基との間で金属キレート結合を形成することができるように共役される。典型的には、これら共役物は、中間体、Ｎ－（５－アミノ－１－カルボキシアルキル）－イミノ二酢酸を用いて調製される（例えば米国特許第５，０４７，５１３号を参照されたい）。そのようなＮＴＡ脂質およびＩＤＡ脂質の例は、Ｎ－（５－（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－スクシニルアミド）－１－カルボキシペンチル）イミノ二酢酸（ＤＯＧＳ－ＮＴＡ）（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）、１－（Ｎ，Ｎ－ジカルボキシメチルアミノ）－３，６－ジオキサオクチル－２，３－ジステアリルグリセリルエーテル（ＩＤＡ－ＴＲＩＧ－ＤＳＧＥ）（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）、１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－（１′－（２′－（Ｒ）－ヒ

ドロキシ－３′－Ｎ－（５－アミノ－１－カルボキシペンチル）－イミノ二酢酸（ＤＨＧＮ）（Ｂａｒｋｌｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９９７） ＥＭＢＯ Ｊ．， １６：１１９９－１２１３）、Ｎα，Ｎα－ビス（カルボキシメチル）－Ｎε－（（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミド）－スクシニル）－Ｌ－リジン（ＮＴＡ－ＤＰＰＥ）、およびＮα，Ｎα－ビス（カルボキシメチル）－Ｎε－（Ｎ，Ｎ－ジオクタデシル）スクシニル）－Ｌ－リジン（ＮＴＡ－ＤＯＤＡ）（Ｓｃｈｍｉｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９４） Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１１６：８４８５－８４９１）であるが、ただしこれらに限定されない。エピトープタグ（例えばＨｉｓ－タグ）とキレート結合を形成できる金属キレート基と連結されたステロール（例えばコレステロール）を含む脂質が、本発明で提供される。

【００６７】

リポソームエフェクター／ナノ粒子を作製するために特に好ましい脂質は、疎水性脂質部分、前記脂質部分と結合した親水性ポリマー、および前記親水性ポリマーと結合したキレート基を含む金属キレート脂質である。前記疎水性脂質部分はリポソームの脂質層内に吸収されてあり、細胞と接触している間、金属キレート脂質とリポソームとの結合を維持することができる“固定装置”として機能する。前記のような疎水性部分の例は、一般にリポソームを生成するために用いられるタイプのもので、すなわち以下のものである：リン脂質、例えばホスファチジルエタノールアミン；ステロイド、例えばコレステロール；糖脂質；スフィンゴリピド；長鎖モノ－およびジアルキルアミン；長鎖ジアルキルカルボン酸またはエステル；ポリヒドロキシアルコール（例えばグリセロール）のエステルなど。キレート基は、好ましくはエピトープタグ（例えばヘキサヒスチジンタグ）と結合する基である。前記のような基の例は、ニトリロ三酢酸、イミノ二酢酸、およびそれらのＣ－置換誘導体で、遷移金属イオン（例えばＮｉ、Ｃｏ、ＣｕおよびＺｎの二価イオン）と錯体を形成してあるものである。親水性ポリマーは、典型的にはポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル、ポリオキサゾリンまたはその置換誘導体、ポリアクリル酸、アミド、Ｎ－置換アミドまたはそのエステル、ポリメタクリル酸、Ｎ－置換アミドアミドまたはそのエステル、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリ（オキシアルキレン）、ポリグリセロール、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、水溶性多糖類、ポリ（アンヒドログルコース）、ポリアスパルトアミド、または親水性ペプチド配列である。脂質－親水性ポリマー共役物はリポソーム成分として一般的に知られている（例えば、米国特許第５，６３１，０１８号、第５，３９５，６１９号、第５，０１３，５５６号、第４，５３４，８９９号を参照されたい）。

【００６８】

前記ポリマーは典型的には約４００から約２０００００ダルトンの分子量を有する。適切なポリマーの分子量の範囲は、前記ポリマーを構成するモノマー単位の分子量に左右され、前記ポリマーは４つ以上、好ましくは５つ以上、もっとも好ましくは少なくとも６つのモノマーユニットを含むことができる。特定の理論に拘束されないが、エピトープタグに向かってキレート基が自由に接近できるようなポリマー鎖の自由運動のためには、ポリマーの鎖の長さは典型的には、運動セグメントの長さと等しいかまたはそれを越えるであろうと考えられる。前記のセグメントは、可撓性親水性ポリマーの場合は典型的には４から６モノマーユニットまたはそれ以上を含む。

【００６９】

金属キレート基は、好ましくはエピトープタグ（好ましくはヘキサヒスチジンタグ）と結合する基である。前記のような基の例は、ニトリロ三酢酸、イミノ二酢酸、およびそれらのＣ－置換誘導体で、遷移金属イオン（例えばＮｉ、Ｃｏ、ＣｕおよびＺｎの二価イオン）と錯体を形成してあるものである。前記の脂質－ポリマー－キレート基共役物を調製するために、ポリマー鎖を形成する１つまたは２つ以上の結合物が反応性化学基を有する脂質－ポリマーから始めることができる。前記反応性化学基は、例えばカルボン酸、カルボン酸活性エステル（例えばＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）、混合無水物、イソチオシアネート、アミン、チオール、ハロイドアルキル、アルファ－ハロイドアルカノイ

ル、塩化シアヌル、Ｎ－マレイミジル、カルボニル、ヒドラジド、アジド、またはヒドロキシルアミノ基である。前記反応基は当業者には公知である（例えば以下の文献を参照されたい：Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ（１９９６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，７８５ｐｐ．）。

【００７０】

好ましい実施態様では、前記キレート基は、メチレン基の１つに官能化アルキル置換基を有するニトリロ三酢酸基を用いて結合されている（例えば米国特許第５，０４７，５１３号を参照されたい）。前記官能化置換基は典型的には（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{6}$）－アルキルであり、ポリマーの反応基と反応する官能基、例えばアミノ、チオールまたはヒドロキシ基を有する。ＮＴＡ－官能化ポリマーの製造方法は例えばＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９７／１８１０４（Ｓｅｅｄ ｅｔ ａ．）、ＷＯ９８／１５２９３を参照されたい。イミノ二酢酸基は、例えばニトリロ三酢酸のカルボキシル基の１つをポリマーのアミンまたはヒドロキシル基と共役させるか、またはポリマーのアミノ基とアルカリ性媒体中のブロモ酢酸との間の反応によって結合させる。ある実施態様では、本発明は、エピトープタグとキレート結合を形成することができる金属キレート基が末端に結合されてあるポリ（エチレングリコール）－脂質共役物を提供する。約３００から約５００００の分子量、好ましくは約５００から約２００００、もっとも好ましくは約１０００から約５０００の分子量を有するポリ（エチレングリコール）が適切である。

【００７１】

リポソームを生成するために一般的に使用される脂質、例えばジ（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{22}$）アルキル－（またはアルケニル－）ホスファチジルエタノールアミン、ジ（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{22}$）アルキル－（またはアルケニル－）ホスファチジン酸、ジ（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{22}$）アルキル－（またはアルケニル－）ホスファチジルグリセロール、ジ（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{22}$）アルキル－、アルケニル－、アルカノイルまたはアルケノイル、グリセロール、スフィンゴリピド、グリコホスホリピド、ステロール、それらの誘導体の他に、合成脂質“固定装置”、例えばジ（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{22}$）アルキル－（またはアルケニル－）アミン、もしくは同様なアルカノイルアミドが適している。脂質－ポリマー－キレーター共役物は、リポソーム形成の前または後で、リポソーム－脂質の０．１から５０モル％、好ましくは０．５から１０モル％、もっとも好ましくは０．５から５モル％の量で、（予め生成されてあるたリポソームと一緒にインキュベートすることによって）リポソームの脂質マトリックスに取り込まれる。特定の実施態様では、ポリ（エチレングリコール）－脂質はポリ（エチレングリコール）－共役ＤＳＰＥで、キレート基はＮＴＡである。

【００７２】

エフェクターリポソームにエピトープ結合基（例えば金属キレート基）を、脂質－ポリマー－エピトープ結合基共役物の形態で備えつけることによって、いくつかの新規で有利な利点が提供される。ポリマーに結合させたエピトープ結合基は、リポソームの表面から十分に離れてあり、さらにポリマー鎖の可撓性のために、巨大分子（例えばリコンビナントタンパク質）内のエピトープタグとアクセスし易く、それにより本発明の方法の感度が改善される。重要なことには、脂質－ポリマー－ＮＴＡ－Ｎｉ共役物はミセルとして水性媒体に溶解し、前記共役物とリポソームとを単に水性緩衝液中で一緒にインキュベートするだけでエフェクター（例えばサイトトキシンまたはレポーター）が未だロードされていない予備生成中のリポソームに“捕捉”させることができる。

【００７３】

エフェクターリポソームと一緒にインキュベートした後、リポソームに捕捉された脂質－ポリマー－ＮＴＡ－$Ｎｉ^{2+}$共役物のエピトープ（例えばヘキサヒスチジン）タグ結合活性は極めて良好に保存されていたということは、本発明の驚くべき発見であった。前記は、ヘキサヒスチジンエピトープタグを有する抗ＨＥＲ２ｓｃＦｖ抗体の存在下で、前記のリポソームに含まれるサイトトキシンがＨＥＲ２－レセプター含有細胞に選択的に内在化されることによって証明された（下記実施例４を参照されたい）。リポソームの表面から離れた位置で（例えばポリマーのスペーサーによって）エピトープ結合基が結合している

リポソームは、ポリマー誘導脂質の前記リポソームへの同時包含を可能にした。前記ポリマー誘導脂質は、リポソームの凝集を減少させ、リポソームの細胞へのバックグラウンド結合（非特異的結合）を減少させ、さらに身体に適用されたとき、血液循環内のリポソームの長期存続を延長し（米国特許第５，０１３，５５６号）、ｉｎ ｖｉｖｏで“テスト”細胞とエフェクター／リガンド構築物とのより良好な結合を提供する。典型的には、凝集を減少させるためには総脂質の０．１から０．９モル％の量の脂質－親水性ポリマー共役物で十分であり、一方、血液循環中での長期存続性の延長のためには総脂質の１から２０モル％の濃度が要求される（米国特許第５，０１３，５５６号）。ポリマースペーサーを介して結合させたエピトープ結合基（例えばＮＴＡ）を使用することによって、エフェクター（例えばサイトトキシン、ドキソルビシン）をリポソームにローディングしてエフェクターリポソームを得ることが顕著に改善されるという予期せぬ結果が得られた（実施例４を参照されたい）。

【００７４】

ある種の実施態様では、エフェクターはリガンドに共有結合によって結合させることができるが、ただし前記結合は容易におよび／または特異的に切断できることが条件である。好ましくは、前記切断は、細胞の構造的完全性が保存され、切断の過程でまたは切断の結果として内在化されたエフェクター（例えばレポーター）が細胞から離脱することがないような条件下で発生する。前記切断可能な結合は当業者には周知である。例えば、ある実施態様では、核酸制限部位またはプロテアーゼ認識部位を含むリンカーは、適切なエンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼを用いて容易に切断することができる。

【００７５】

他の切断可能なリンカーも当業者にはよく知られている（例えば米国特許第４，６１８，４９２号、第４，５４２，２２５号および第４，６２５０１４号を参照されたい）。前記リンカー基から薬剤を遊離させる方法には、例えば光感受性結合の照射および酸触媒加水分解が含まれる。切断可能なリンカーの例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：エナミン、ヒドラゾン、オキサゾリジン、ケタール、アセタール、炭酸のオルトエステル、チオエステル、２－アルキルもしくは２，３－ジアルキル置換マレイン酸の置換ヘミエステルおよびヘミアミド、およびｐＨ３から６の生理学的な水溶液中で加水分解により分離するビニルエーテル；ｐＨおよび塩濃度について生理学的条件下にある水溶液中でチオ開裂剤（システイン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、トリス－カルボキシメチルメチルホスフィンなど、典型的には０．１から１０ｍＭの濃度）の存在下で分離するジスルフィド結合；ｐＨ７から９の水性生理的緩衝液中で塩基触媒または酵素触媒加水分解によって切断されるエステル結合；および光分解反応によって切断される結合、例えば２－ニトロベンジル誘導体（Ｈａｕｇｌａｎｄ（１９９６）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ．６th Ｅｄ．）。

【００７６】

細胞とリガンド／エフェクターとの接触

好ましい実施態様では、１つまたは２つ以上の“テスト”細胞（例えばリガンドを内在化させる能力についてスクリーニングされるべき細胞）を、リガンドと非共有結合させたエフェクター（例えばレポーター）と接触させる。１つの細胞がしばしば多数の異なるリガンド／エフェクターの組合せと接触させられるであろう。接触は、典型的には、前記細胞がリガンドを内在化させることができる条件下で、すなわち内在化機能を有するレセプターが機能を発揮できる条件下で実施される。哺乳類細胞の場合には、わずかに高い温度で（３０から４０℃）生理的に均衡させた塩および細胞栄養物を含む水溶液中で接触させることが好ましい。典型的には、細胞を培養状態でリガンド／エフェクター構築物と接触（インキュベート）させるが、前記のような接触は急性／新鮮調製物に由来する細胞の場合である。

【００７７】

前記のような接触は典型的にはｅｘ ｖｉｖｏで達成されるが、ある種の実施態様では、接触はｉｎ ｖｉｖｏで実施してもよいことは理解されよう。特に、米国特許第６，０６８，８２９号は選択された器官にｉｎ ｖｉｖｏで帰巣する分子を特定する方法を開示している。前記方法は、生物にリガンドライブラリーをトランスフェクトし、特定の組織に局在するリガンドを特定することを含む。前記特許はしたがって不均質なリガンドと細胞をｉｎ ｖｉｖｏで接触することの実現可能性を示している。

特に好ましい実施態様では、リガンドおよびエフェクターはエピトープタグを介して結合される。前記のような実施態様では、（リガンドとエフェクター間の）非共有結合の形成および細胞とリガンド／エフェクター構築物との接触は、容易に単一の工程にまとめることができる。例示すれば、実施例１では、ＮＴＡ－リポソーム（すなわち表面結合Ｎｉ－ＮＴＡ基を有するリポソーム）（０．５から１ｍＭの総リン脂質）の接触は、$(His)_6$含有リガンド（約２０μｇ／ｍＬ）とともに細胞を１００μＬの組織培養液（１０％ＦＣＳ補充）中で３７℃で４時間インキュベートすることによって実施された。前記のような条件下では、リガンドはエフェクターと非共有結合を形成し細胞内に内在化された。

【００７８】

実質的に任意の細胞を本発明の方法で用いることができる。そのような細胞には真核細胞および原核細胞の両方が含まれる。細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞、植物細胞、動物細胞も全て本発明の方法に十分に適している。特に好ましい実施態様では、細胞は、脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳類細胞もっとも好ましくはヒトの細胞である。細胞はｅｘ ｖｉｖｏで培養されてあっても、新鮮な調製物から得られたものでも、組織培養のものでも、またはｉｎ ｖｉｖｏの組織のものでもよい。高処理スクリーニングで用いる場合は、培養細胞がもっとも好ましい。

【００７９】

リガンドからエフェクターの分離

好ましい方法では、リガンドを内在化させるために十分な時間、リガンド／エフェクター構築物を細胞と接触させた後、非共有結合を解離させることによって前記エフェクターをリガンドから分離させる。前記は、当業者に周知の多数の任意の方法によって実施される。前記のような非共有結合を破壊する方法には、解離因子および／または解離剤、例えば熱、酸、カオトロピズム誘発薬剤、高塩、キレート剤などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。特に好ましいものは細胞保全的方法で、この場合、細胞の完全性が保存され、分離後、内在化されたリガンドおよび／またはエフェクターは本質的に細胞内に残留する。エフェクターおよびリガンドが、（例えばＮｉ－ＮＴＡ基とHis_6－エピトープタグ間の）金属キレート結合によって連結されている場合、前記解離剤は、好ましくは二価遷移金属イオンと結合する試薬、例えばＥＤＴＡ（典型的には０．２から５ｍＭの低濃度）、弱い金属錯体形成試薬、例えばイミダゾール（高濃度、典型的には１００から３００ｍＭ）、またはジチオール化合物、例えば２，３－ジメルカプトスクシネート（典型的には０．２から１０ｍＭ）で、中性生理学的緩衝食塩水中で実施される。金属イオン（例えばNi^{2+}）の結合に対してリガンド－リポソームキレート結合と競合することによって、前記解離剤は金属イオンの結合を奪い、前記結合の崩壊をもたらす。ある好ましい実施態様では、実施例１に示したように細胞表面結合リポソーム／リガンド複合体を分離し、分離したリポソームは細胞を３から４回解離緩衝液で洗浄することによって除去した。解離緩衝液は、前記の場合は生理学的リン酸緩衝食塩水（２ｍＭの$MgCl_2$、２ｍＭの$CaCl_2$、および１ｍＭのＥＤＴＡを含む）または２５０ｍＭのリン酸緩衝イミダゾール（ｐＨ７．４）である。内在化リポソーム／リガンド複合体は解離緩衝液がアクセスすることができないので、内在化リポソームは細胞内に残留し、その存在および内在化されたリガンド／リポソーム構築物の量を示す検出可能なシグナルを提供する。

【００８０】

分離工程は、遊離させたエフェクターを細胞から洗い流すことができるように、ナノ粒子を破壊することによってエフェクター（例えばレポーター）をナノ粒子から遊離させることを含む。ナノ粒子がリポソームの場合、前記遊離緩衝液はリポソーム脱安定化因子を含

むことができる。化学的または物理的因子（例えばｐＨ４から６での短時間曝露、チオ開裂剤、中等度の温度（４２から４５℃）または光による）によってリポソームから被包化薬剤の遊離が開始されることについては当技術分野では公知である（例えば以下の文献を参照されたい：Ｇｅｒａｓｉｍｏｖ ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ｖｅｓｉｃｌｅｓ，Ｃｈ．１７，ｐ．６７９－７４６；Ｋｉｒｐｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６） ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，３８８：１１５－１１８）。ナノ粒子（例えばリポソーム）を破壊することによって、エフェクターがリガンドから分離されたとき、リガンドは両親媒性共役物（例えば脂質－または脂質－親水性ポリマー共役物）の形態で存在することができ、その場合リガンドとエフェクターとの間の非共有結合は疎水性相互作用によるものである。

【００８１】

リガンドとエフェクター間の切断可能な共有結合もまた細胞保全的態様で破壊することができる。例えば、カルボニルヒドラゾン結合は、レポーター（例えばリポソーム）または磁性ナノ粒子と結合したカルボキシ酸ヒドラジド基と、リコンビナントタンパク質／ペプチドリガンド中に創出されたＮ－末端のセリンまたはスレオニンの過ヨウ素酸酸化によって生成されるケトンまたはアルデヒド基との間に形成される。酸性水性環境下では（ｐＨ３から６）、前記結合は加水分解されてレポーターを遊離させる。

【００８２】

内在化されたリガンドの検出

内在化されたリガンドは、当業者に周知の方法に従って検出される。リガンドは直接（例えば種々の精製技術により）検出することができるが、好ましい実施態様では、リガンドはリガンドに結合した（または付随した）エフェクター分子を検出することによって検出される。エフェクターがレポーター（検出可能な標識）である場合は、エフェクターは同種の標識を検出するために典型的に用いられる方法によって検出される。したがって、エフェクターが放射性核種である場合は、検出は、例えばシンチログラフィーまたはオートラジオグラフィーの手段による。エフェクターが比色タグである場合には検出は光学手段による。エフェクターが蛍光タグである場合は、検出は、例えば蛍光測定法、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡による。エフェクターが磁性粒子のときは、検出は磁力測定による。

エフェクターがサイトトキシンであるときは、内在化の検出は細胞死亡率の測定を必要とする。逆に、エフェクターが増殖因子またはマイトジェンの場合は、検出は細胞の増殖または分裂の検出を必要とする。

【００８３】

リガンド内在化のためのアッセイは、好ましくは陰性コントロールと比較して、内在化されたエフェクター由来のシグナルを検出できる場合は典型的には陽性として記される。好ましい実施態様では、陽性の結果が記録されるためには、内在化の“テスト”アッセイと（通常は陰性の）コントロールとの間の相違は、提供されたデータに適した任意の統計検査［例えばｔ検定、自由度分析（ＡＮＯＶＡ）、セミパラメーター法、非パラメーター法（例えばＷｉｌｃｏｘｏｎ Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ Ｔｅｓｔ；Ｗｉｌｃｏｘｏｎ Ｓｉｇｎｅｄ Ｒａｎｋｓ Ｔｅｓｔ；Ｓｉｇｎ Ｔｅｓｔ；Ｋｒｕｓｋａｌ－Ｗａｌｌｉｓ Ｔｅｓｔなど）］を用いて調べたとき統計的に有意である（例えば８０％を越える、好ましくは約９０％を越える、より好ましくは約９８％を越える、もっとも好ましくは約９９％を越える信頼度レベルである）。もっとも好ましい“陽性”アッセイは、陰性コントロールとは少なくとも１．２倍、好ましくは少なくとも１．５倍、より好ましくは少なくとも２倍、もっとも好ましくは少なくとも４倍、または１０倍すら相違する。

【００８４】

種々のリガンドの内在化性能に関してそれらリガンド間のより正確な比較が実施できるように、検出には内在化リガンドの定量的測定（定量）を含むことができる。エフェクター分子（例えばサイトフェクチン、酵素、蛍光、光の吸収、放射能活性または磁性物質）の定量方法は当業者には公知である（例えば以下の文献を参照されたい：Ｓｐｅｃｔｏｒ ｅｔ ａｌ．”Ｃｅｌｌｓ．Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｖｏｌ．１－３

, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。

【００８５】

内在化機能を有するレセプターの特定

上記に述べたアッセイはまた、（例えば以前には知られていなかった）内在化機能を有するレセプターを特定するためにも用いることができる。好ましい実施態様では、そのような方法は、内在化されたリガンドを上述の方法にしたがって特定することを伴う。内在化されたリガンドは細胞から回収されおよび／または特定される。続いて、回収および／または特定されたリガンドを用いて、前記リガンドを内在化させたレセプターを特定することができる。

内在化されたリガンドを回収する方法は当業者には周知である。前記方法は、細胞を溶解し標準的な精製方法を実施して、標識された（エフェクター結合）リガンドを単離することを含む。細胞に由来する分子の精製方法は当業者には周知である。典型的な精製方法には、ゲル電気泳動、陰イオン交換クロマトグラフィー［例えばモノ－Ｑカラム（Pharmacia－LKB, Piscataway, New Jersey, USA）］、または逆相高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。標準的な技術に関する概論については以下を参照されたい：Methods in Enzymology, vol.182: Guide to Protein Purification, M. Deutscher, ed. (1990), p619－626。

【００８６】

また別には、細胞を溶解した後、リガンドをエフェクターから分離し、続いて前記リガンド上のエフェクターを用いてアフィニティークロマトグラフィーによりリガンドを回収することができる。したがって、例えばリガンドがHis_6タグを用いてアフィニティータグを付されている場合、前記リガンドは、Ｎｉ－ＮＴＡアフィニティーカラム、Ｎｉ－ＮＴＡゲル、またはＮｉ－ＮＴＡ共役磁性ビーズによって回収することができる（例えば以下を参照されたい：ＱＩＡ express（登録商標）Detection and Assay Handbook, Qiagen）。

【００８７】

リガンドを内在化させる細胞の検出

エフェクター（例えばレポーターまたはナノ粒子）をリガンドから分離させる工程の後で、本発明の方法を用いてリガンドを内在化させる細胞を検出するとき、細胞内のリガンドの存在は当業者に公知の任意の手段によって検出できる（上記の“内在化されたリガンドの検出”の項を参照されたい）。ある種の好ましい実施態様では、前記検出方法は、個々の細胞の検査を必要とする。そのような方法の例には以下が含まれる：蛍光性レポーターの場合はフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡法、放射性核種のレポーターの場合はオートラジオグラフィーなど。

【００８８】

細胞内に内在化されたリガンドの検出は、リガンドの内在化が検出できない細胞からリガンドを内在化させる機能を有する細胞を単離することを必要とする。エフェクター（例えばレポーターまたはナノ粒子）のリガンドからの分離に続いて、前記リガンドを内在化させる細胞は、例えば蛍光性レポーターの場合は蛍光活性化細胞分類（ＦＡＣＳ）によって、またはレポーターが磁性ビーズの場合はハイグラディエント磁性分離によって単離できる。続いて前記単離細胞を精査して、例えば研究、工業的または医療目的に利用する。

本方法の特に好ましいある実施態様は、患者から得た身体組織または液体サンプル中の悪性細胞の検出を含む。この場合には、悪性細胞に選択的に内在化されるリガンドが用いられる。本明細書および同時係属中の米国特許第０９／２４９，５２９号に記載されているように、例えば抗体（例えばｓｃＦｖ）を悪性細胞または他の病理学的細胞への特異的内在化のために選択し、本発明にしたがって患者の身体組織または液体サンプル中の病理学的細胞の検出および／または選別のために用いることができる。

【００８９】
細胞によるリガンドの結合および内在化の検出
本発明の方法はまた、細胞によるリガンドの表面結合および内在化の両方の検出に用いることができる。好ましい実施態様では、本方法は、細胞をリガンド／エフェクター（例えばリガンド／レポーター）構築物と接触させ、細胞と結合しなかった前記構築物部分（すなわち表面に結合せず細胞によって内在化もされなかった構築物）を除去し、さらに細胞と結合しているレポーターを検出し、細胞表面に結合したリガンドおよび細胞内に内在化されたリガンドの総量を示す第一の読みを得ることを含む。レポーターの細胞非結合部分の除去は、好ましくは、非解離条件下で細胞を除去することによって達成されるリガンド／レポーター構築物の除去による。前記非解離条件は、例えばリン酸緩衝食塩水、緩衝塩溶液（リンゲル、ハンクス溶液）、細胞培養液、または解離剤を含まない他の生理学的媒体を用いることによる。したがって、前記解離剤の非存在下では、細胞表面結合リガンド／エフェクター構築物は細胞上に完全なままで残留し、細胞に付随する全リガンドの第一の測定値を提供するエフェクターから検出されるシグナルに寄与するであろう。
【００９０】
続いて、表面結合リガンド／エフェクター構築物のエフェクターをリガンドから分離し、分離したエフェクターを細胞表面から、例えばＮＴＡ－Ｎｉ－Ｈｉｓ$_6$－結合リガンド／エフェクターの場合には本明細書に記載したように二価金属イオン結合剤を含む生理学的緩衝液で細胞を洗浄することによって除去する。続いて、細胞内に残留するレポーターを、内在化されたリガンド／エフェクター構築物量の第二の測定値を提供することによって検出する。第一の測定値と第二の測定値との間の差異は、細胞表面に結合したが内在化されなかったリガンドの量に一致する。いくつかの事例では、第一の測定値を得る前に、細胞を崩壊させることなく内在化プロセスを停止させることが好ましい。前記は、細胞を代謝抑制剤（例えばアンヒドログルコースまたはアジ化ナトリウム）で処理するか、または（１０℃未満、典型的には約０から４℃に）温度を下げる（氷上で冷却する）ことによって容易に実施できる。
【００９１】
内在化の調節因子のスクリーニング
本発明の方法はまた、リガンドの内在化を調節する薬剤のスクリーニングに用いることができる。好ましい実施態様では、前記方法は本明細書で述べたようにリガンドの内在化についてスクリーニングすることを含み、この場合、細胞をエフェクター／リガンド構築物と接触させる前、および／またはその間、および／またはその後で前記細胞をスクリーニングされるべきテスト薬剤と接触させる。例えば濃度の低いテスト薬剤を含むかまたはテスト薬剤を含まない陰性コントロールと比較したとき、テスト薬剤と接触した細胞によるリガンドの内在化における差異は、前記テスト薬剤が対象のリガンドの内在化を調節する（例えば増加または低下させる）ことを示す。内在化されるリガンドの増加は、テスト薬剤が内在化をアップレギュレートすることを示し、一方、内在化されるリガンドの減少は、テスト薬剤が内在化をダウンレギュレートすることを示す。
【００９２】
アッセイの持続時間にしたがって、前記の増減は、内在化されるリガンドの全リガンドにおける増減または内在化速度（すなわち単位時間当たりの内在化されるリガンド量）における増減を表す。さらに別の実施態様では、内在化のタイムコースを変化させる能力について、前記リガンドをスクリーニングすることができる。
調節物質の活性のアッセイは典型的には陽性のスコアとして記される。この場合、テスト薬剤が存在する場合に観察される活性とコントロール（通常は陰性コントロール）との間に差異が存在し、この場合、好ましくは前記差異は統計的に有意である（例えば８０％を越える、好ましくは約９０％を越える、より好ましくは約９８％を越える、もっとも好ましくは約９９％を越える信頼度レベルである）。もっとも好ましい“陽性”アッセイは、陰性コントロール（テスト薬剤が存在しないか、またはより低い濃度で存在するもの）とは少なくとも１．２倍、好ましくは少なくとも１．５倍、より好ましくは少なくとも２倍

、もっとも好ましくは少なくとも４倍、または１０倍すら相違する。
【００９３】
高処理スクリーニング
本発明の方法は高処理スクリーニングに極めて適切である。特にエピトープタグを用いてリガンドがエフェクターに連結される場合は、前記アッセイは本質的に、リガンドおよび／またはエフェクターの複雑な精製を必要としない“単工程”様式で実施される。実施例１に示すように、対象細胞をリガンドおよびエフェクターと適切な“インキュベーション”条件下で一緒にするだけで十分である。リガンドはエフェクターと結合し、細胞が対応する内在化機能を有するレセプターを有する場合は、前記リガンドは結合されているエフェクター（例えば標識）とともに細胞内に内在化される。
本発明の方法で用いられる細胞を、リガンドおよび／またはただ１つのテスト薬剤と一度に接触させる必要は無い。反対に、高処理スクリーニングを促進するために、ただ１つの細胞を少なくとも２つ、好ましくは少なくとも５つ、より好ましくは少なくとも１０、もっとも好ましくは少なくとも２０、少なくとも５０、または少なくとも１００個のリガンドまたはテスト薬剤と接触させることができる。細胞が陽性スコアを示したら、活性を有するテスト薬剤、または内在化リガンドが特定されるまで、続いてサブセットの前記リガンドまたはテスト薬剤を用いてテストすることができる。
【００９４】
種々のレポーター遺伝子生成物のための高処理アッセイは当業者には周知である。例えば、マルチウェルを有するフルオリメーターが市販されている（例えば、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）。他の高処理スクリーニングシステムも市販されている（例えば、Ｚｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐ．，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ；Ａｉｒ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｍｅｎｔｏｒ，ＯＨ；Ｂｅｃｋｍａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，ＣＡ；Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，Ｎａｔｉｃｋ，ＭＡなど）。前記システムは、典型的には、全サンプルおよび試薬のピペット操作、液体分注、設定時間でのインキュベーション、およびアッセイに適した検出装置でのマイクロプレートの最終的読み取りを含む全工程が自動化されている。前記の構成組み立てが可能なシステムは、高処理性能および迅速な開始とともに高度の融通性およびカスタマイズ性を提供する。前記システムの製造業者は、種々の高処理のための詳細なプロトコルを提供している。したがって、例えばザイマーク社（Ｚｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐ．）は、遺伝子転写、リガンド結合などの調節を検出するスクリーニングシステムを記載した技術広報誌を提供している。
高処理スクリーニングは、当業者に公知の多数の様式で実施することができる。好ましい実施態様では、高処理スクリーニングはマイクロタイタープレート様式を利用する（例えば９６ウェル様式、４８０ウェル様式、９６０ウェル様式など）
【００９５】
エフェクターの細胞内配送
ある種の実施態様では、本発明は、エフェクターを細胞内に配送する組成物を提供する。前記組成物は以下の（ｉ）および（ｉｉ）を含む：（ｉ）疎水性脂質部分、前記脂質部分と結合した親水性ポリマー、および前記親水性ポリマーと結合したキレート基（ここで前記キレート基は金属イオンと錯体を形成しエピトープタグと結合する）を含む金属キレート脂質、および（ｉｉ）前記エピトープタグを含むリガンド（ここで前記エピトープタグは少なくとも２つの隣り合うヒスチジン残基（ヒスチジンタグ）を含む）。さらに、前記組成物ではエフェクターは前記金属キレート脂質と結合している。前記タグは、好ましくは６つの隣接するヒスチジン残基を含む（ヘキサヒスチジンタグ）。好ましい組成物は、金属キレート脂質とエフェクターがリポソーム内に含まれるものである。本明細書に記載したいずれのエフェクターおよび／またはリガンドも適切である。前記エフェクターは、例えばレポーター、サイトトキシン、薬または核酸である。前記リガンドは典型的にはタンパク質、炭水化物、核酸、または小有機分子である。リガンドは天然でも合成でもよい。好ましいタンパク質リガンドは、抗体（例えば免疫グロブリンおよびそのフラグメント

）の抗原結合配列を含むもので、天然または組換えによって生成されたもので単鎖フラグメントを含む。前記リポソームはさらに脂質－ポリマー共役物、特に脂質－ポリ（エチレングリコール）共役物を含むことができる。前記リポソームでは、金属キレート脂質は典型的には０．１モル％から５０モル％、好ましくは０．２モル％から１０モル％を構成する。場合によって、前記脂質ポリマー共役物（金属キレート基を含まない）はリポソーム脂質の２０モル％まで含まれてあってもよい。

【００９６】

内在化機能を有するリガンドおよび／またはレセプターのデータベース

ある種の実施態様では、本発明の方法はさらに特定された内在化機能を有するレセプターを内在化レセプター特定データベースに収めること、および／またはそのようなデータベースにリガンド内在化の調節物質を収めることを含む。データベースという用語は情報を記録しさらに情報を取り出す手段を指す。好ましい実施態様では、前記データベースはまた、保存された情報の分類および／または検索のための手段を提供する。前記データベースは以下を含む（ただしこれらに限定されない）任意の都合のよい媒体を含むことができる：ペーパーシステム、カードシステム、機械システム、電子システム、光学システム、磁気システム、またはその組合せ。好ましいデータベースには電子（例えばコンピュータ支援）データベースが含まれる。データベースの保存および操作で使用されるコンピュータシステムは当業者には周知で、“パーソナルコンピュータシステム”、メーンフレームシステム、ネット間またはネット内連絡拠点（ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｅｄ ｎｏｄｅｓ ｏｎ ａｎ ｉｎｔｅｒ－ ｏｒ ｉｎｔｒａ－ｎｅｔ）、特殊化ハードウェアに保存されたデータまたはデータベースなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【００９７】

キット

別の実施態様では、本発明は、本明細書に記載した方法を実施するための材料を含むキットを提供する。ある好ましい実施態様では、前記キットは、エフェクター（例えばレポーター）とエピトープタグを介して非共有結合されたリガンドを収納する容器を含む。前記キットは、１つのタイプのリガンドを含む“単一”構築物、または多数の異なるリガンドを提供する構築物ライブラリーを含むことができる。また別には、エフェクター（例えばレポーターまたはナノ粒子）は、（別々の容器の）１つまたは２つ以上のリガンドと一緒に提供することができる。それによって提供された指示および特定の用途に合わせて、前記エフェクターおよびリガンドを使用者が混合したとき、エフェクター／リガンド構築物が生成されるであろう。

【００９８】

前記キットは場合によって、本発明の方法を実施するための他の装置および／または試薬を含むことができる。前記の試薬および装置には、マイクロタイタープレート、細胞、緩衝液、蛍光標識検出用フィルター、高処理ロボットシステムでアッセイを実施するために必要なソフトウェアなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

さらに、キットは、本発明の方法のための一般的な指示および／または固有のプロトコルを提供する指示物を含むことができる。前記指示物は典型的にはタイプまたは印刷されたものを含むが、ただしそのようなものに限定されない。前記の指示を保存し、さらに前記指示を最終使用者に伝達することができるいずれの媒体も本発明に包含される。前記媒体には、電子保存媒体（例えば磁性ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えばＣＤＲＯＭ）などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記媒体には、前記の指示物を提供するインターネットのサイトのアドレスを含むことができる。

【００９９】

【実施例】

実施例

以下の実施例は例示であって、本発明の請求の範囲を制限しようとするものではない。

実施例１

金属キレートリポソームを用いる抗体の内在化をモニターする新規なアッセイ

序
抗体および抗体フラグメントは、多様な薬剤（例えば薬、遺伝子、毒素または放射性核種）を抗原発現細胞に配送することができる。細胞内部への前記抗体フラグメントのエンドサイトーシスは多くの場合、前記治療薬の治療効果を高めることができる。薬のデリバリールートとしてのレセプター仲介エンドサイトーシスの主要な利点は、治療薬剤がレセプターを過剰発現している標的細胞に特異的に配送され、それによって効能が高められ、一方、全身的毒性は減少させることができるということである。例えば、抗ＥｒｂＢ２抗体を用いて、ドキソルビシン含有リポソーム（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９２：１３２７－１３３１）、またはシュードモナス外毒素（イムノトキシン）（Ｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９６） Ｓｅｍｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ ７：７９－８６）が腫瘍細胞の内部に誘導された。

【０１００】
免疫反応によって生成される抗体の大半は、エンドサイトーシスを惹起するような態様ではレセプターと結合しない（Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９２：３３５３－３３５７）。したがって、所望の反応を惹起させることができる抗体についてスクリーニングできることが所望される。リガンドおよび抗体の細胞内内在化をモニターするもっとも一般的な方法は、タンパク質の放射性標識を必要とし、さらに表面結合抗体を分離させるために低ｐＨ緩衝液（通常はグリシン－ＨＣｌ、ｐＨ２．８）を用いる。しかしながら、いくつかの研究室の報告は、いくつかの事例では前記緩衝液は抗原－抗体複合体を部分的に分離させるだけで、したがって内在化実験に多くの不正確さをもたらすことを示唆した（Ｍａｔｚｋｕ ｅｔ ａｌ．（１９９０） Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｐｐｌ．１０：１－５；Ｔｓａｌｔａｓ ａｎｄ Ｆｏｒｄ（１９９３） Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｎｖｅｓｔ．２２：１－１２）。

【０１０１】
また別には、抗体をＮＨＳ－ＳＳ－ビオチンによりビオチン付加し、生細胞とともにインキュベートすることができる。還元剤による細胞表面結合抗体のビオチン基の特異的還元後に、イムノブロッティングによって内在化を定量することができる（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（１９９８） Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：４０５５－４０６０）。しかしながら、前記方法の正確さもまた細胞表面結合抗体からビオチンを完全に除去できるか否かによって左右される。これらの方法のまた別の欠点は、これら方法は、内在化についてスクリーニングされるべき種々の抗体の数を制限させるような各リガンドタンパク質の困難な標識を必要とするということである。さらにまたタンパク質の直接標識は、しばしば抗体またはリガンドの結合活性の低下をもたらす。さらに、前記方法で細胞表面から物質を除去するために要求される厳しい条件は細胞の生存能力に影響を及ぼすであろう。

【０１０２】
本実施例では、“キレート化リガンド内在化アッセイ”（ＣＬＩＡ）（Ｃｈｅｌａｔｅｄ Ｌｉｇａｎｄ Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ）と称する新規な内在化アッセイを報告する。リポソームを（Ｈｉｓ）$_6$付せん付きタンパク質と結合できるNi^{2+}－ＮＴＡ－脂質を用いて製剤化した。ＮＴＡ含有リポソームに蛍光染料をロードし、多数の異なる（Ｈｉｓ）$_6$含有抗レセプター抗体フラグメントまたは（Ｈｉｓ）$_6$付せん付きプロテインＡと複合体を形成した完全な抗体と混合した。プロテインＡとは弱く結合する抗体の場合、代わって抗体Ｇを用いてもよい。ＥＤＴＡを用いて細胞表面結合複合体からリポソームを穏やかに除去してから、ｓｃＦｖ／リポソーム／レセプター複合体を蛍光顕微鏡または蛍光測定法によって検出した。前記複合体の細胞取込みは、ｓｃＦｖの特異性とともに抗体フラグメントの内在化誘発能力に依存し、検出には＜５００００レセプター／細胞を必要とする。本アッセイにはほんの微量の抗体フラグメントが必要なだけで、さらにまた、抗体フラグメントを発現している大腸菌の未精製の粗上清を用いて実施した。

【０１０３】

方法

リポソームの調製：リポソームは、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）およびコレステロール（６：４モル比）並びに種々の量のＮＴＡ－ＤＯＧＳ（Ａｖａｎｔｉ Ｌｉｐｉｄｓ）（０．５から５モル％のＰＯＰＣ）から、３５ｍＭの８－ヒドロキシピレン－１，３，５－トリスルホン酸ナトリウム塩（ＨＰＴＳ）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｉｎｃ．，Ｏｒｅｇｏｎ，ＵＳＡ）を含む溶液（ｐＨ７．０）（ＮａＣｌで浸透圧を２８０ｎｍｏｌ／ｋｇに調整）中で脂質フィルムの水和によって調製される。いくつかの事例では、前記リポソームは、１，２－ジステアロイル－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）をＰＯＰＣの代わりに用いて作製し、親油性蛍光標識$DiIC_{18}$（３）－ＤＳおよび$DiIC_{8}$（５）－ＤＳ（リポソームリン脂質の０．１－１モル％）をＨＰＴＳの代わりに用い、同じ結果を得た。前記の事例では、水和は、５から２０ｍＭの４－（Ｎ－２－ヒドロキシエチル－ピペラジノ）エチルスルホン酸ナトリウム塩（ＨＥＰＥＳ）でｐＨ７．２から７．４に緩衝させた１４０ｍＭのＮａＣｌ水溶液中で５５から６０℃で実施される。水和後、文献（Ｋｉｒｐｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：６６－７５）の記載にしたがって２つの０．１μｍのポリカーボネートメンブレン（Ｃｏｒｎｉｎｇ）から膜押出しによってリポソームを形成する。続いて非被包化ＨＰＴＳを架橋デキストランビーズ（セファデックスＧ－２５）（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，ＵＳＡ）上でのゲルろ過によって分子した。

【０１０４】

ＳｃＦｖの発現と精製：ｓｃＦｖ、Ｃ６．５（抗ＨＥＲ２）（Ｓｃｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １：７３－８１）およびＦ５（抗ＨＥＲ２）（ＰＣＴ／ＵＳ９９／０７３９５）を発現ベクターｐＵＣ１１９ｍｙｃＨｉｓ（Ｓｃｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １：７３－８１）でクローニングし、大腸菌ＴＧ１で発現させた。簡単に記せば、０．７５Ｌの培養液（１００μｇ／ｍＬのアンピシリンおよび０．１％のグルコースを含む２×ＴＹ）に一晩培養を１／１００で接種した。前記培養をA_{600}で０．９まで増殖させ、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を最終濃度０．５ｍＭとなるように添加して発現を誘発した。続いて前記培養を３０℃でさらに４時間インキュベートした。

【０１０５】

細胞を遠心分離（４０００×ｇ、２０分）によって採集し、ペレットを１００μｇ／ｍＬのデオキシヌクレアーゼを含むペリプラズム抽出緩衝液（ＰＰＢ）（３０ｍＭトリス、２ｍＭのＥＤＴＡ、２０％シュクロース、ｐＨ８）に再浮遊させ、氷上で３０分インキュベートした。細菌を５０００×ｇで２０分遠心分離してペレットにした。前記ペレットを浸透圧ショック緩衝液（５ｍＭの$MgSO_4$）に再浮遊し、さらに２０分氷上でインキュベートした。前記細菌を沈澱させ（７０００×ｇ、２０分）、さらにＰＢＢ分画および$MgSO_4$分画の上清を一まとめにし、１００００ｒｐｍで３０分４℃で遠心分離して清澄にした。得られた溶液をＰＢＳで透析した（４ＬのＰＢＳ（ｐＨ８）で２回液交換）。固定金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）（Ｑｉａｇｅｎ）で精製し、続いて架橋デキストランゲルエクスクルージョンＰＤ１０カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，ＵＳＡ）で脱塩して全分子を精製した。タンパク質濃度を分光光度法により２８０ｎｍでの吸収（A_{280}）から求めた（１ｃｍのキュベットで１ｍｇ／ｍＬのタンパク質溶液について１．４の吸収値を用いた）。

【０１０６】

マイクロタイタープレートで誘発する場合は、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンおよび０．１％のグルコースを含む２×ＴＹ、１５０μＬを有するウェルに、ｓｃＦｖを含むプラスミドをもつ大腸菌ＴＧ１の一晩培養を接種した。培養をA_{600}で約１まで増殖させ、ＩＰＴＧを最終濃度１ｍＭに添加してｓｃＦｖの発現を誘発した。細菌を３０℃で一晩増殖させ、遠心分離で細胞を除去し、ｓｃＦｖを含む上清３０μＬを内在化アッセイに直接用いた。

【０１０７】
プロテインＡ－（Ｈｉｓ）$_6$共役物の調製：二価性試薬、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（スルホ－ＭＢＳ；Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて、プロテインＡを（Ｈｉｓ）$_6$含有ペプチドＣＧＧＧＨＨＨＨＨＨ（配列番号：２）に共役させた。２ｍｇのプロテインＡをＰＢＳ中の０．２ｍｇのスルホ－ＭＢＳで室温で１時間処理した。未反応のスルホ－ＭＢＳをゲルろ過で除去し、続いて前記タンパク質をＰＢＳ中の２ｍｇの（Ｈｉｓ）$_6$含有ペプチドで室温で１時間処理し、未反応ペプチドをゲルろ過で除去した。
【０１０８】
アッセイ方法：ヒト乳癌細胞ＳＫＢＲ３、ＳＫＯＶ３、ＢＴ４７４、ＭＣＦ７、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８（米国菌培養収集所、ＡＴＣＣ）を、１０％のウシ胎児血清（ＦＣＳ）を補充したＡＴＣＣ推奨培養液タイプを用いて８０から９０％の融合密度まで増殖させ、標準的方法でトリプシン処理によって採集した。細胞を９６ウェルのプレートに１００００細胞／ウェルで播種し、３７℃で一晩インキュベートした。次の日、ＮＴＡリポソーム（総リン脂質０から１ｍＭ）を、１００μＬの組織培養液（１０％ＦＣＳ補充）中の（Ｈｉｓ）$_6$含有リガンド（別に指定しない場合は２０μｇ／ｍＬ）とともに細胞と４時間インキュベートした。誘発大腸菌の培養上清をアッセイに用いるときは、１０％血清を含む６５μＬの細胞培養液およびＮＴＡ－リポソームを３５μＬの上清と混合した。モノクローナル抗体（（Ｈｉｓ）$_6$－タグを含まない）の内在化をテストするために、１０μｇ／ｍＬのプロテインＡ－（Ｈｉｓ）$_6$を用いて、４０μｇ／ｍＬのヒト化リコンビナント抗ＨＥＲ２モノクローナルＩｇＧ、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）と複合体を形成した。非内在化リポソーム／リガンド複合体のリポソームを細胞表面から剥がすために、細胞を１７０μＬのＰＢＳ（２ｍＭの$MgCl_2$、２ｍＭの$CaCl_2$、および１ｍＭのＥＤＴＡを含む）または２５０ｍＭのリン酸緩衝イミダゾール（ｐＨ７．４）で３から４回洗浄した。４６０／５３０ｎｍでＲＣ４マイクロフルオリメーター（ＢＩＯＴＥＫ）で蛍光を読み取る前に、細胞を５０μＬの０．０１ＭのＮａＯＨで溶解した。
【０１０９】
細胞表面の結合の測定：細胞は標準的な技術を用いてトリプシン処理によって採集した。前記Ｆ５を３組ずつ、Ｖ字型のウェルを有する９６ウェルプレートで1×10^5細胞と表示の濃度で２時間インキュベートした。細胞との結合は室温で、総容積２００μＬのＰＢＳ（２％ＦＣＳおよび０．１％アジ化ナトリウムを含む）中で実施した。２００μＬのＰＢＳで２回洗浄した後、結合ｓｃＦｖを１００μＬ（１０μｇ／ｍＬ）のＦＩＴＣ標識抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体Ｍ１（Ｓｉｇｍａ）を添加して検出した。室温で３０分インキュベートした後、細胞を２回洗浄し、４％のパラホルムアルデヒドを含むＰＢＳに再懸濁した。蛍光は、ファックソート（ＦＡＣＳｏｒｔ；Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を用いフローサイトメトリーで測定し、平均蛍光（Ｆ）はセルケスト（Ｃｅｌｌｑｕｅｓｔ）ソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｓｏｎ）を用いて計算し、バックグラウンド蛍光を差し引いた。
【０１１０】
結果
リポソーム製剤：リポソームは０、０．５、２および５モル％のＮＴＡ－脂質を用いて製剤化し、Ｃ－末端（Ｈｉｓ）$_6$タグを含むように組換え操作を施した抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ抗体（Ｆ５）を用いＳＫＢＲ３腫瘍細胞への内在化についてテストした。４時間の内在化反応の後、細胞をＰＢＳ中の１ｍＭＥＤＴＡで洗浄し、さらに前記細胞を塩基中で溶解し、マイクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。シグナル強度は、調べた範囲では高ＮＴＡ－脂質組成物で劇的に増加した（図１）。内在化は、ｓｃＦｖがｈｉｓ－タグを含まないとき、またはリポソームをＮＴＡ含有脂質無しで製剤化したときには生じなかった（図２）。前記アッセイの有用性を完全長のモノクローナル抗体にまで広げるために、二価性試薬スルホ－ＭＢＳを用いてプロテインＡをペプチドＣＧＧＧＨＨＨＨＨＨ（配列番

号：２）と共役させた（前記試薬は前記ペプチド内のチオール基をプロテインＡの第一アミンと架橋させる）。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析で約１０ｋＤａの分子量の明瞭なシフトが示されたことによって明らかなように、プロテインＡ１分子につき多数のペプチドが共役できることが確認された（データは示されていない）。ＳＫＢＲ３細胞をプロテインＡ－$(Ｈｉｓ)_6$および抗ＥｒｂＢ２モノクローナル抗体ヘルセプチンと一緒にインキュベートしたとき、ＮＴＡ－リポソームは特異的にエンドサイトーシスにより内在化された（図２）。プロテインＡ－$(Ｈｉｓ)_6$またはヘルセプチン単独ではＮＴＡ－リポソームの取込みは増加せず、内在化はヘルセプチン／プロテインＡ－$(Ｈｉｓ)_6$複合体によって仲介されることを示した（図２）。

【０１１１】

アッセイの最適化：反応でリポソーム濃度を高めることの影響を、抗ＥｒＢ２ｓｃＦｖ抗体（Ｆ５）または無関係の抗体（ＳＫＢＲ３細胞で発現しない血管抗原と結合する）を用いて調べた。リポソームの細胞による取込みは反応中のリポソーム濃度に比例した。調べた０から８００μＭのリン脂質範囲では、非特異的な抗体はバックグラウンド以上にはリポソームを内在化させなかった（図４）。

アッセイの感度：アッセイの感度は、ＳＫＢＲ３細胞で異なるエピトープに対する種々の濃度の抗体を用いてテストした（図４）。Ｆ５ｓｃＦｖ抗体（抗ＥｒＢ２抗体）のみが複合体の内在化をもたらした。興味深いことには、無関係の抗体（４Ｇ７）および非内在化抗ＥｒｂＢ２抗体（Ｃ６．５）は、ＮＴＡ－リポソームの内在化を仲介しなかった（図５）。この結果は、Ｆ５およびＣ６．５の内在化について共焦点顕微鏡分析によって我々が得た以前の結果と一致する。ＳＫＢＲ３細胞でＦ５ｓｃＦｖを用いたアッセイの検出レベルは精製抗体１μｇ／ｍＬ以下であった。

【０１１２】

アッセイは抗体の精製を必要としない：$(Ｈｉｓ)_6$－タグとリポソーム上のＮＴＡとの特異的相互反応のゆえに、本アッセイは未精製ｓｃＦｖの使用を可能にし、多数のｓｃＦｖ分子を内在化についてアッセイできるはずである。これをテストするために、可溶性ｓｃＦｖの発現を９６ウェル培養プレートで大腸菌から誘発し、前記上清を５モル％ＮＴＡリポソームを用いてＳＫＢＲ３生細胞上で活性をテストした。以前の実験（結果は示されていない）によれば、ＳＫＢＲ３細胞は５０％の細菌培養上清でも２４時間まで耐えられることが示された。Ｆ５ｓｃＦｖを発現している大腸菌の上清を、１０％の血清および抗生物質を５００μＭのＮＴＡリポソームとともに含有する細胞培養液で１：３に混合し、ＳＫＢＲ３生細胞とインキュベートした。結果は、同様な特性を有する２０μｇ／ｍＬの精製ｓｃＦｖを用いて得られた結果と同様であった（図６）。

【０１１３】

腫瘍細胞の抗体内在化プロフィール：ＥＧＦＲに対するｓｃＦｖ抗体（Ｃ１０）を用いて乳癌細胞株群を分析した（図７）。細胞株ＭＤ－ＭＤＡ４６８およびＥＧＦＲをトランスフェクトしたＣＨＯ細胞のみが顕著な量のＮＴＡ－リポソームを内在化させた。本アッセイの特異性は、ＭＤ－ＭＤＡ４６８およびＥＧＦＲをトランスフェクトしたＣＨＯにＣ１０が内在化されることによって実証された。ＥＧＲＦトランスフェクトＣＨＯ細胞への蛍光ＮＴＡリポソームの取り込みは非トランスフェクト細胞のそれの１６５倍であった。

【０１１４】

Ｆ５内在化についてのプロフィールは、Ｆ５抗体を用いてＦＡＣＳで測定したとき、ＥｒｂＢ２の細胞表面発現とほぼ相関していた（図８）。しかしながら、細胞株ＳＫＯＶ３は、その細胞表面ＥｒｂＢ２発現レベルから期待されるようなリポソームの取込みを示さなかった。前記細胞株への貧弱なＥｒＢ２の内在化は以前にも報告された（Ｋｉｒｐｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：６６－７５）。同じ細胞株群への全取込みをＦ５－リポソーム（この場合、抗体は切断できない結合を介して脂質と共有結合されてある）を用いて決定したとき、ＦＡＣＳによるＦ５ｓｃＦｖ結合に関する矛盾の存在は不明瞭になった。これはおそらく細胞表面結合Ｆ５－リポソームによるものであり、したがって、切断できない共有結合がリガンドとエフェクターの間に存在する

とき、本アッセイは内在化を有効に測定することができない。

【０１１５】

実施例２

リポソームとリガンドのエピトープ仲介非共有結合共役のための脂質－ＮＴＡ共役物

６－（１，２－ジパルミトイルグリセロール－３－スクシニル）アミド－２－（Ｎ，Ｎ－ジカルボキシメチルアミノ）－ヘキサン酸ニッケル塩（ＤＰＧＳ－ＮＴＡ－Ｎｉ）

６－アミノ－２－（Ｎ，Ｎ－ビス－カルボキシメチルアミノ）ヘキサン酸（Ｉ）をＮ（イプシロン）－ＣＢＺ－リジンおよびブロム酢酸から文献（Ｓｃｈｍｉｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６：８４８５－８４９１）にしたがって合成した。ただし、カルボベンゾキシ保護基の除去は４ＭのＨＢｒ／氷酢酸混合物中で一晩実施し、ヒドロブロミドとして（Ｉ）を回収した。

１，２－ジパルミトイル－３－スクシニル－ｒａｃ－グリセロール（ＩＩ）は、１，２－ジパルミトイル－グリセロール、無水コハク酸、および４－ピロリジノピリジンから文献（Ｓｉｌｖｉｕｓ ＆ Ｌｅｖｅｎｔｉｓ（１９８７）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２６：３２９７）にしたがって調製した。

【０１１６】

ＤＰＧ－ＮＴＡ－Ｎｉ（ＩＩＩ）：３３５ｍｇ（０．５ｍｍｏｌ）の（ＩＩ）を２．５ｍＬのクロロホルム無水物および１．２５ｍＬのジメトキシエタン無水物に溶解した。攪拌しながら、６６ｍｇ（０．５７５ｍｍｏｌ）のＮ－ヒドロキシスクシンイミドを添加し、続いて０．６ｍＬのクロロホルム中の１０８ｍｇ（０．５２５ｍｍｏｌ）のジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）の溶液を添加した。室温で４時間攪拌した後、沈澱した尿素をろ過し、ロ液を減圧下で乾燥させた。前記乾燥残留物を１ｍＬのクロロホルムおよび３ｍＬのメタノール無水物の混合物に懸濁し、さらに２５０ｍｇの（Ｉ）のヒドロブロミドを添加し、続いて０．３５ｍＬ（５ｍｍｏｌ）のトリエチルアミンを加えた。前記混合物を５０℃にし、浮遊した固形物を溶解させ、さらに室温で一晩攪拌した。前記混合物を１０ｍＬのクロロホルムで希釈し、４０ｍＬの５０％メタノール水溶液（０．５ＭのＮａＣｌを含む）で３回洗浄した。クロロホルム層を０．２６％の硫酸第一ニッケル６水和物の水溶液とともに振盪し、硫安無水物上で乾燥させ、さらに真空下で乾燥させた。前記乾燥残留物を２ｍＬのヘキサンに溶解し、ＧＦ／Ｃガラス繊維フィルター（Ｗｈａｔｍａｎ）でろ過した。ヘキサンを蒸発させて０．３３４ｇ（理論的収量６６％）の生成物を灰色の固体として得た。前記はヘキサンおよびクロロホルムに容易に溶解する。ＴＬＣ：Ｒｆ０．１６（シリカ；$CHCl_3$－ＭｅＯＨ－H_2O＝６５：２５：４）。意図した構造であることはＰＭＲによって確認された。

【０１１７】

６－（コレステリル－スクシニル）アミド－２－（Ｎ，Ｎ－ビス－カルボキシメチルアミノ）－ヘキサン酸ニッケル塩（Ｃｈｏｌ－ＮＴＡ－Ｎｉ）（ＩＶ）

化合物（ＩＩＩ）について記載した方法と同じ方法で、２４４ｍｇのコレステリルヘミスクシネート（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，ＵＳＡ）をＮ－ヒドロキシスクシンイミドおよびＤＣＣと反応させ、さらに化合物（Ｉ）のヒドロブロミドと反応させた。硫酸第一ニッケルの添加に際して、緑色のペーストが生成された。前記ペーストを数回クロロホルム－メタノール混合物（容積で５：１）で抽出した。前記抽出物を硫安無水物上で乾燥させ、ＧＦ／Ｃガラス繊維フィルターでろ過し、真空中で乾燥させた。１１９．５ｍｇ（理論的収量３０％）の緑色の固形物が得られ、前記はクロロホルムに容易に溶解して青緑色の溶液を生じる。ＴＬＣ：Ｒｆ０．１２（シリカ；$CHCl_3$－ＭｅＯＨ－H_2O＝６５：２５：４）。意図した構造であることはＰＭＲによって確認された。

【０１１８】

６－（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロホスホリル－エタノールアミノカルボニル）ポリ（オキシエチレン）－（オキシカルボニル）アミノ－２－（Ｎ，Ｎ－ビス－カルボキシメチルアミノ）－ヘキサン酸ニッケル塩（ＤＳＰＥ－ＰＥＧ－ＮＴＡ－Ｎｉ）（Ｖ

)
分子量が３４００のポリ（エチレングリコール）から調製した１９８ｍｇ（０．０４４５ｍｍｏｌ）のジステアロイルホスファチジルエタノールアミノカルボニル－ポリ（エチレングリコール）－プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル（ＮＨＳ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ；Ｓｈｅａｒｗａｔｅｒ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）を、１ｍＬのエタノール無水物および０．５ｍＬのクロロホルム無水物の混合物に溶解し、さらに０．５ｍＬのエタノール無水物および０．１５ｍＬ（１．０８ｍｍｏｌ）のトリエチルアミンの混合物中の（Ｉ）のヒドロブロミド４０．８ｍｇ（０．１２０ｍｍｏｌ）の溶液と混合し、６０℃で２時間攪拌した。前記反応混合物を乾燥させ、０．１４ＭのＮａＣｌ水溶液の３ｍＬに溶解した。前記混合物を１５５００×ｇで５分遠心分離して清澄にし、さらに透明な上清を真空中で乾燥させた。残留物を２．５ｍＬの０．１４４ＭのＮａＣｌに溶解し、ｐＨを１ＮのＮａＯＨで６．８に調節し、０．１２ｍＬの１ＭのＮｉＳＯ$_4$を添加した。架橋デキストランビーズ（セファデックスＧ－７５；Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ａｍｅｒｓｈａｍ，ＵＳＡ）の１３ｍＬのカラムで０．１４４ＭのＮａＣｌを溶離液として用いて前記溶液でクロマトグラフィーを実施した。ボイド容積（合計４ｍＬ）で出現する分画を集め、一晩凍結乾燥して乾燥させた。前記凍結乾燥固形物を２ｍＬのエタノール無水物および０．２ｍＬのクロロホルムの混合物で抽出し、不溶物質を遠心分離で除去し、透明な溶液を真空中で乾燥させた。残留物を０．１ｍＬのクロロホルムを含む２ｍＬのエタノールに再度溶解し、前記溶液を遠心分離（１５．５×ｇ、５分）によって清澄にし、さらに真空中で乾燥させた。青色の固形物をクロロホルム－メタノール混合物（容積で６０：４０）に溶解した。水に溶解した場合淡青色の溶液を生じた。意図した構造であることはＰＭＲで確認した。

【０１１９】

リポソームへの製剤化：化合物ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖをリポソーム脂質の０．５モル％、１モル％、２モル％または５モル％の量で、ＰＯＰＣおよびコレステロール（３：２のモル比）から調製した、蛍光レポーターＨＰＴＳを含有する小さな単層のリポソームに製剤化し、ＨＥＲ２過剰発現ＳＫＢＲ－３細胞およびヘキサヒスチジンタグをもつリコンビナント抗ＨＥＲ２ｓｃＦｖ（Ｆ５）を用いて、上記実施例１で述べたようにＣＬＩＡアッセイでテストした。結果は、ＤＯＧＳ－ＮＴＡ－Ｎｉを用いた実施例１で述べた結果と同様であった。

【０１２０】

実施例３

Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥおよびＨｉｓ付せん付きｓｃＦｖ抗体を用いた細胞毒性リポソームの細胞内デリバリー

ＤＳＰＣ、コレステロール、メトキシポリ（エチレングリコール）－ＤＳＰＥ誘導体（ＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ、ＰＥＧ分子量２０００；Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）および化合物Ｖ（Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（モル比＝３：２：０．０５：０．０６）の脂質組成を有するリポソームを、脂質フィルム水和法（ｌｉｐｉｄ ｆｉｌｍ ｈｙｄｒａｔｉｏｎ）およびポリカーボネートトラックエッチング処理膜（ｐｏｌｙｃａｒｂｏｎａｔｅ ｔｒａｃｋ－ｅｔｃｈｅｄ ｍｅｍｂｒａｎｅ）（０．１μｍ、１０回）押出し法を０．２５Ｍの硫安水溶液中で５５℃で実施して調製した。架橋デキストランビーズ（セファデックスＧ－７５；Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，ＵＳＡ）を用いてゲルクロマトグラフィーを実施して、未被包化硫安を除去し、５％デキストロース、５ｍＭモルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液（ｐＨ５．５、ＮａＯＨで調節）に移した後、リポソームを１０ｍｇ／ｍＬの二酒石酸ビノレルビン溶液ＵＳＰ（Ｇｌａｘｏ Ｗｅｌｌｃｏｍｅ，ＵＳＡ）と混合してモル比５：１の薬剤／脂質とし、５５℃で３０分インキュベートした。非被包化ビノレルビンを上記のようにゲルークロマトグラフィーで除去した。典型的には＞８０％の薬剤が、前記のようにして得られたＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ含有リポソームに被包化されたままであった。コントロールリポソームは、Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥの代わりに

ＰＥＧ－ＤＳＰＥを用いて調製した。共有結合４Ｇ７含有リポソームは、ビノレルビン付加コントロールリポソームを両親媒性リンカーと共役させた４Ｇ７共役物、マレイミド－ＰＥＧ－ＤＳＰＥとともにインキュベートして調製した（米国特許第６，２１０，７０７号（Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．））。血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）レセプターを発現しているウシの内皮細胞（ＢＥＮＤ－３）を、遊離（すなわち非被包化）ビノレルビン０．０３から９０μｇ／ｍＬまたは、ヘキサヒスチジンタグおよび末端システイン基を有する内在化（機能を有する）抗ＶＥＧＦＲｓｃＦｖ抗体０．０２ｍｇ／ｍＬを含む、もしくは含まないＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソームに被包化したビノレルビンを含有する増殖培養液中でインキュベートした。前記細胞を前記薬剤を含まない増殖培養液でさらに７２時間ポストインキュベートし、細胞の生存度を通常のテトラゾリウム（ＭＴＴ）アッセイで決定した。細胞毒性中央値用量（IC_{50}）（すなわち、未処理コントロールの５０％まで細胞生存度を減少させる用量）は以下のとおりであった：遊離ビノレルビン、０．６７μｇ／ｍＬ；４Ｇ７ｓｃＦｖを含まないＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソーム中のビノレルビン、＞１００μｇ／ｍＬ（IC_{50}に達せず）；コントロールリポソーム＋４Ｇ７ｓｃＦｖ、＜１００μｇ／ｍＬ（IC_{50}に達せず）；共有結合４Ｇ７を含むリポソーム中のビノレルビン、２．５μｇ／ｍＬ；Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソーム＋４Ｇ７ｓｃＦｖ、１．４μｇ／ｍＬ。したがって、レセプター特異的ｓｃＦｖがヘキサヒスチジンタグを介して結合したＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ含有リポソームによって、血管上皮細胞にビノレルビンが特異的に配送されることが観察された。

【０１２１】

実施例４

Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソームおよびヘキサヒスチジン付せん付き抗体による癌細胞へのメトトレキセートの誘導配送

文献（Ｓｚｏｋａ ａｎｄ Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ（１９７８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７５：４１３４－４１７８）に記載された逆相蒸発法によって、ＤＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ（２０００）－ＤＳＰＥ（モル比、３：２：０．０２５）並びにＮ－４－ヒドロキシエチル－ピペラジノ－エチルスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）ナトリウム塩（ｐＨ７．２）の１０ｍＭ緩衝溶液中のメトトレキセートナトリウム溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）からメトトレキセート含有リポソームを調製した。溶離液として２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１４４ｍＭ塩化ナトリウム（ＨＢＳ緩衝液）を用いてゲル－クロマトグラフィーによって非被包化メトトレキセートを分離した。リポソームのリン脂質１ｍｍｏｌ当たり１５０±７ｍｇのメトトレキセートを含む生成されたリポソームを、ＨＢＳ緩衝液に溶解したＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥとともにリポソームのリン脂質の２モル％の量でインキュベートした（５５℃、３０分）。リポソームから薬剤の漏出は前記インキュベーション中には検出されなかった。４Ｇ７ｓｃＦｖ含有、非含有の前記リポソームおよび遊離メトトレキセートの毒性中央値用量（IC_{50}）は、実施例３に記載したようにＢＥＮＤ３細胞培養で決定し、以下のとおりであった：遊離メトトレキセート、＞９０μｇ／ｍＬ（IC_{50}に達せず）；抗体を含まないＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソーム中のメトトレキセート、＞９０μｇ／ｍＬ（IC_{50}に達せず）；ヘキサヒスチジン付せん付き４Ｇ７ｓｃＦｖ存在下でのＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥリポソーム中のメトトレキセート、９μｇ／ｍＬ。したがって予め生成したメトトレキセートリポソームへのＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥの取込みによって、ヒスチジン付せん付き抗体を含む内在化され得る構築物を形成するメトトレキセート含有リポソームが得られた。

【０１２２】

実施例５

種々のＮｉ－ＮＴＡ脂質を含むリポソームへの細胞毒性薬剤の付加

リポソーム中のＮｉ－ＮＴＡ脂質の性質は、トランスメンブレングラディエント法によるサイトトキシンノ被包化効率に予期せぬ影響を示した。０．２５Ｍの硫安を捕捉したリポ

ソームを以下の組成を有する脂質マトリックスを用いて調製した：ＤＳＰＣ、コレステロール（Ｃｈｏｌ）およびＰＥＧ－ＤＳＰＥ（モル比、３：２：０．０３）、調製物Ａ；ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、ＰＥＧ－ＤＳＰＥおよびＮｉ－ＮＴＡ－ＤＯＧＳ（モル比、３：２：０．０３：０．０６）、調製物Ｂ；およびＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、およびＮｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ（化合物Ｖ）（モル比、３：２：０．０３：０．０６）、調製物Ｃ。リポソームを５％デキストロース、５ｍＭのＭＥＳ－Ｎ緩衝液（ｐＨ５．５）（ＭＥＳ－デキストロース）に入れた後、ビノレルビン（ＶＮＲ）またはドキソルビシン（ＤＯＸ）を、リポソームのリン脂質１ｍｍｏｌ当たり１５０ｍｇの薬剤のインプット薬剤／脂質比で前記リポソームとインキュベートした（５５℃、３０分）。リポソームを氷上で冷却し、さらに、ＭＥＳ－デキストロース緩衝液を用いてゲル－クロマトグラフィーで非被包化薬剤を分離した。リポソームのリン脂質の濃度は、リポソームの酸性消化後にモリブデート－アスコルビン酸法によって分光光度法で決定した。リポソームの薬剤の濃度は、８０％メタノール水溶液（ビノレルビン、３７０ｎｍでの吸収）または７０％イソプロパノール－０．１Ｍ塩酸水溶液（ドキソルビシン、４８５ｎｍでの吸収）中にリポソームを溶解した後、標準曲線との比較によって分光光度法で決定した。ローディング効率はローディングのために添加した全薬剤に対する被包化薬剤の百分率として算出した。結果を表１に示す。

【０１２３】

【表１】

リポソームへの薬剤のローディング

調製物	薬剤	薬剤ローディング リン脂質のｍｇ／ｍｍｏｌ	ローディング効率 ％
調製物Ａ[1)]	ＶＮＲ	１５０．２±４．９	１００．２±３．４
調製物Ｂ[2)]	ＶＮＲ	１３．６±１．２	９±０．９
調製物Ｃ[3)]	ＶＮＲ	１４９．６±５．８	９９．８±４．０
調製物Ａ[1)]	ＤＯＸ	１５９．４±６．１	１０６．３±１４．４
調製物Ｂ[2)]	ＤＯＸ	４０．４±４．３	２６．９±３．０
調製物Ｃ[3)]	ＤＯＸ	１３８．２±１０．２	９２．２±８．０

[1)] ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＳＰＥ

[2)] ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＳＰＥ／Ｎｉ－ＮＴＡ－ＤＯＧＳ

[3)] ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＳＰＥ／Ｎｉ－ＮＴＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ

【０１２４】

Ｎｉ－ＮＴＡ－脂質の性質は、脂質水和媒体の直接除去による被包化（例えば逆相蒸発）にほとんど影響を及ぼさない（ＨＰＴＳ、ＭＴＸ）。しかしながら直接除去は、ほぼ定量的な被包化を提供するグラディエント法と比較して非効率的である（ＭＴＸローディング効率は２８．７から２９．５％）。したがって、予期に反して、ポリマー結合ＮＴＡ脂質のみが、有利なトランスメンブレングラディエント様式の方法によって薬剤の効率的なローディングを提供した。

本明細書に示した実施例および実施態様は単なる例示であって、種々の改変および変更が

当業者によって提唱されるであろうが、それらは本発明の範囲内に包含されることは理解されよう。本明細書に引用した全ての刊行物、特許および特許出願は参照により本明細書に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、$Ｈｉｓ_6$エピトープタグを有する細胞内在化リガンドの存在下におけるリポソームの細胞中への内在化に対する、前記リポソーム内Ｎｉ－ＮＴＡ－脂質の影響を示す。被包化蛍光マーカーを含む小さな単層リポソームを、０．５モル％（四角）、２モル％（ダイアモンド）または５モル％（丸）のＮＴＡ－脂質（ＤＯＧＳ－ＮＴＡ－Ｎｉ（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ））（リポソームリン脂質のモル％として測定）を含む脂質マトリックスを用いて調合し、Ｃ－末端（$Ｈｉｓ)_6$－タグを含むように人工操作を施した抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ抗体（Ｆ５）の２０μｇ／ｍＬを用いて、ＥｒｂＢ２発現腫瘍細胞への内在化についてテストした。４時間の内在化反応の後、細胞を１ｍＭのＥＤＴＡを含む生理食塩水で洗浄し、塩基中で溶解し、ミクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。

【図２】

図２はＣＬＩＡアッセイの特異性を示す。ＳＫＢＲ３腫瘍細胞をＮＴＡ－リポソーム（５モル％のＮｉ－ＮＴＡ－ＤＯＧＳ）および（$Ｈｉｓ)_6$－タグのない抗ＥｒｂＢ２抗体Ｆ５、または非内在化抗ＥｒｂＢ２抗体（Ｃ６．５）とともに、またはｓｃＦｖ非存在下でインキュベートした。また別に、ＮＴＡ－ＤＯＧＳ脂質無しで調製した蛍光標識リポソームとともに、（$Ｈｉｓ)_6$－タグを含むＦ５ｓｃＦｖを一緒にインキュベートした。４時間の内在化反応の後、細胞を１ｍＭのＥＤＴＡを含む生理的緩衝食塩水で洗浄し、塩基中で溶解し、ミクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。

【図３】

図３は、プロテイン－Ａ－（$Ｈｉｓ)_6$化学共役物を用いた、ＣＬＩＡによるモノクローナル抗体の内在化をモニターしたものである。ＳＫＢＲ３細胞を、（$Ｈｉｓ)_6$タグをもつ抗ＥｒｂＢ２抗体Ｆ５、抗ＥｒｂＢ２モノクローナル抗体ヘルセプチン（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）、プロテインＡ－（$Ｈｉｓ)_6$単独、またはヘルセプチンとプロテインＡ－（$Ｈｉｓ)_6$との混合物とともにインキュベートした。４時間の内在化反応の後で、細胞を塩基中で溶解し、ミクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。

【図４】

図４は、ＣＬＩＡアッセイでのリポソーム濃度の影響を示す。２０μｇ／ｍＬの抗ＥｒｂＢ２抗体Ｆ５とともに（四角）またはその非存在下で（丸）、被包化した蛍光マーカーを含む種々の濃度のＮｉ－ＮＴＡ－リポソームとともにＳＫＢＲ３細胞をインキュベートした。４時間の内在化反応の後で、細胞を１ｍＭのＥＤＴＡを含む生理的緩衝食塩水で洗浄し、塩基中で溶解し、細胞に結合したリポソーム脂質量をミクロフルオリメーターでの蛍光の読みから決定した。

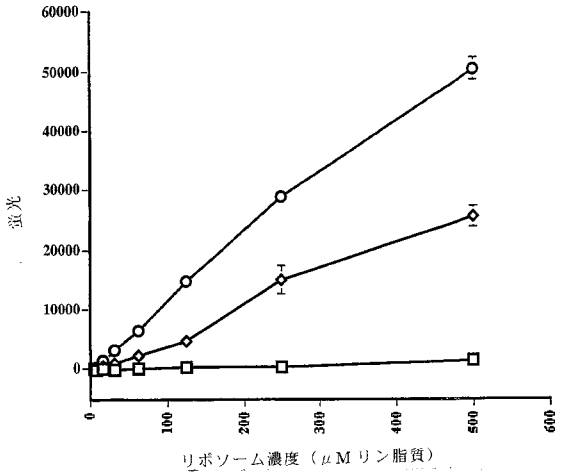
【図５】

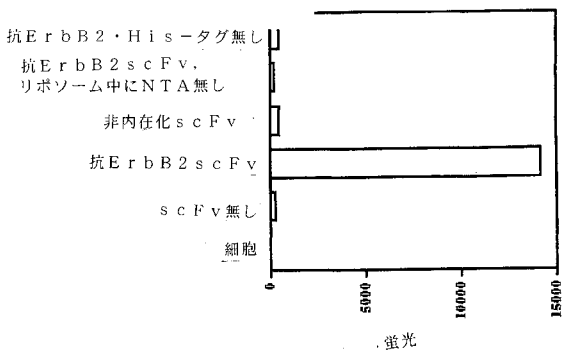
図５は、ＣＬＩＡアッセイにおける抗体濃度の影響を示す。種々の濃度の抗ＥｒｂＢ２抗体Ｆ５（実線と丸）、コントロール抗体（四角）、または無抗体（点線、丸）および２モル％のＮｉ－ＮＴＡ－ＤＯＧＳを含むＮＴＡ－リポソームとともにＳＫＢＲ３細胞を一緒にインキュベートした。４時間の内在化反応の後で、細胞を１ｍＭのＥＤＴＡを含む生理的食塩水で洗浄し、塩基中で溶解し、ミクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。

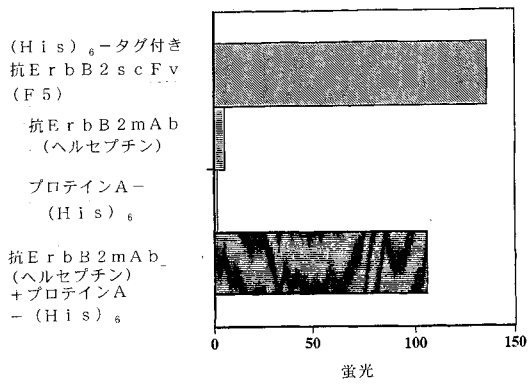
【図６】

図６は、ＣＬＩＡアッセイにおける培養上清の使用を示す。ｓｃＦｖ抗体Ｃ１０、非内在化ｓｃＦｖ抗体Ｃ６．５、抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ抗体Ｆ５を発現している大腸菌の培養上清、またはｓｃＦｖを発現していない大腸菌の培養上清をＮＴＡ－リポソームと一緒に用い、ＳＫＢＲ３細胞を同時にインキュベートした。４時間の内在化反応の後、細胞を１ｍＭのＥＤＴＡを含む生理的緩衝食塩水で洗浄し、塩基中で溶解し、ミクロフルオリメーターで蛍光の読みを得た。

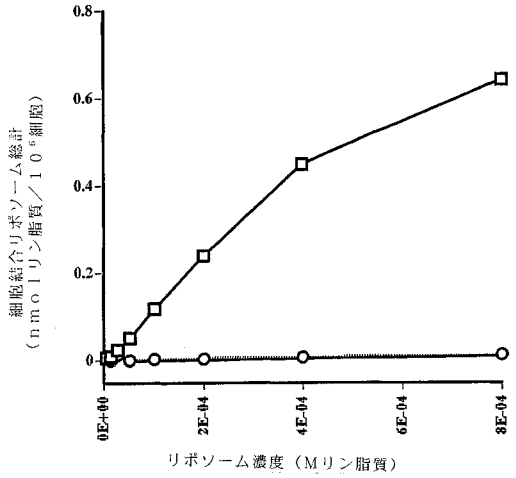
【図７】
図７は、抗ＥＧＦＲｓｃＦｖ抗体による腫瘍細胞の分析を示す。抗ＥＧＦＲ抗体Ｃ１０を蛍光標識ＮＴＡリポソームとともに、種々の量のＥＧＦＲ：ＳＫＢＲ３、ＳＫＯＶ３、ＢＴ４７４、ＭＣＦ７、ＭＤ－ＭＢＡ４５３、ＭＤ－ＭＤＡ４６８、ＣＨＯ－ＥＧＦＲ、またはＣＨＯを発現している細胞株上で一緒にインキュベートした。取り込みは全細胞タンパク質に対して標準化した。
【図８】
図８は、フローサイトメトリーによる抗ＥｒｂＢ２蛍光染色の比較、共有結合させたリポソームの取込み、およびＣＬＩＡアッセイを示す。腫瘍細胞を抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ抗体Ｆ５とインキュベートし、ＦＩＴＣ標識抗ＦＬＡＧ抗体で検出し、フローサイトメトリーで蛍光を定量した。また別には、被包化蛍光マーカーＨＰＴＳを含むリポソームに共有結合させたＦ５ｓｃＦｖを含むイムノリポソームと腫瘍生細胞をインキュベートした。ＣＬＩＡアッセイは、Ｆ５ｓｃＦｖおよびＮＴＡ－リポソームとの同時インキュベーションによって実施した。リポソームの蛍光はミクロフルオリメーターで読み取った。

【図１】


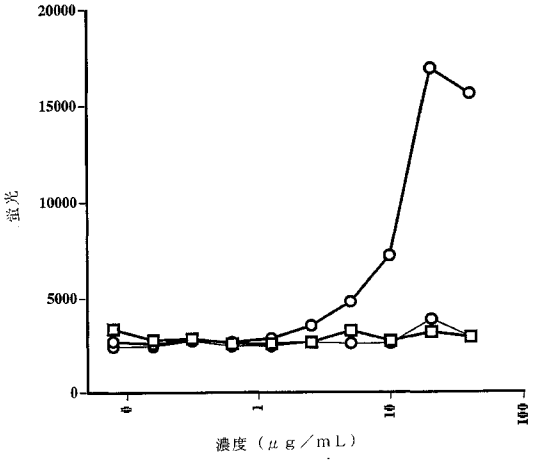
【図２】


【図３】


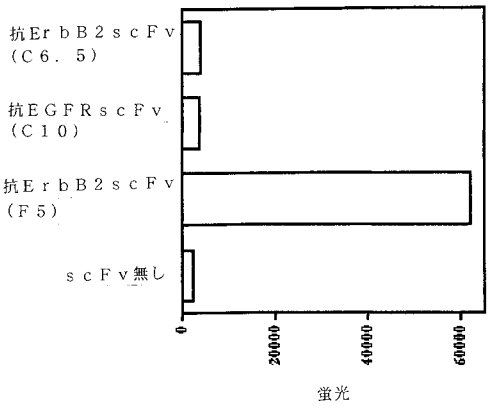
【図４】


細胞結合リポソーム総計
（ｎｍｏｌリン脂質／１０⁶細胞）
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0E+00
2E-04
4E-04
6E-04
8E-04
リポソーム濃度（Ｍリン脂質）

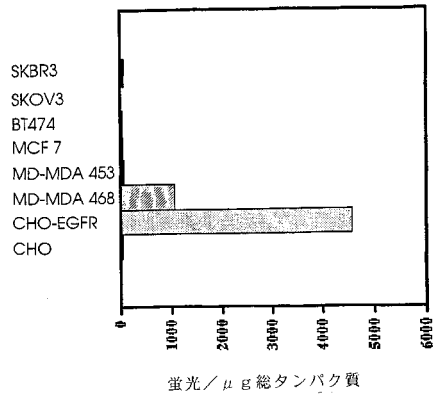
【図５】


蛍光
20000
15000
10000
5000
0
0
1
10
100
濃度（μｇ／ｍＬ）

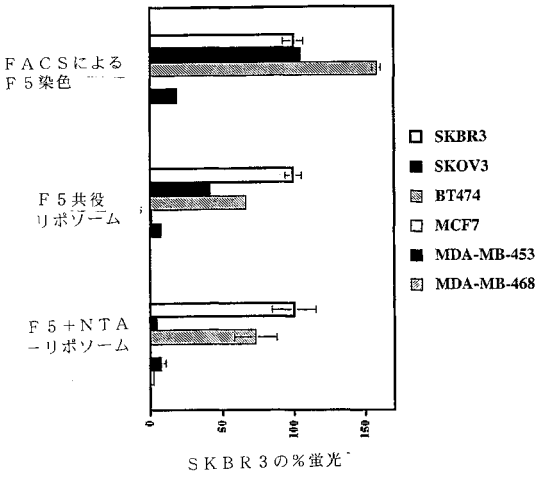
【図６】


抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ
（Ｃ６．５）
抗ＥＧＦＲｓｃＦｖ
（Ｃ１０）
抗ＥｒｂＢ２ｓｃＦｖ
（Ｆ５）
ｓｃＦｖ無し
0
20000
40000
60000
蛍光

【図７】


SKBR3
SKOV3
BT474
MCF 7
MD-MDA 453
MD-MDA 468
CHO-EGFR
CHO
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
蛍光／μｇ総タンパク質

【図８】


ＦＡＣＳによる
Ｆ５染色
Ｆ５共役
リポソーム
Ｆ５＋ＮＴＡ
－リポソーム
SKBR3
SKOV3
BT474
MCF7
MDA-MB-453
MDA-MB-468
0
50
100
150
ＳＫＢＲ３の％蛍光

【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
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/33044 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12N

(21) International Application Number: PCT/US01/32311

(22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/241,279 18 October 2000 (18.10.2000) US

(71) Applicant: **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA** [US/US]; 12th Floor, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-5200 (US).

(72) Inventors: **MARKS, James, D.**; 107 Ardmore Road, Kensington, CA 94707 (US). **NIELSEN, Ulrik, B.**; 143 Kent Street, Brookline, MA 82446 (US). **KIRPOTIN, Dmitri, B.**; 435 43rd Avenue, San Francisco, CA 94121 (US).

(74) Agent: **BERLINER, Robert**; Fulbright & Jaworski, L.L.P., 29th Floor, 865 S. Figueroa Street, Los Angeles, CA 90017-2571 (US).

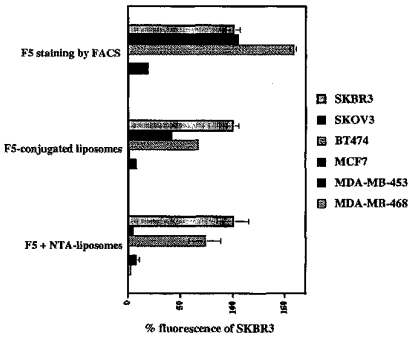
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF HIGH-THROUGHPUT SCREENING FOR INTERNALIZING ANTIBODIES



(57) Abstract: This invention provides methods of identifying ligands that are internalized into a cell. The methods typically involve (i) contacting the cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand; (ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; and (iii) detecting the reporter within said cell (if any is present) where the presence of the reporter within said cell indicates that the ligand binds to an internalizing receptor and is internalized.

WO 02/33044 A2

WO 02/33044 A2

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.

METHODS OF HIGH-THROUGHPUT SCREENING FOR INTERNALIZING ANTIBODIES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims benefit of and priority to USSN 60/241,279, filed on October 18, 2000, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT

[0002] This work was supported, in part, by Department of Defense Breast Cancer Research Program Grant Nos: DAMD17-94-J-4433 and DAMD17-98-1-8189. The Government of the United States of America may have certain rights in this invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] With substantial completion of the first human genome sequencing project, considerable attention has turned to a determination of the biologic function of various DNA sequences. This investigation, often termed "functional genomics" represents a new phase of genome analysis. Specifically, functional genomics refers to the development and application of global (genome-wide or system-wide) experimental approaches to assess gene function by making use of the information and reagents provided by structural genomics. It is typically characterized by high throughput or large-scale experimental methodologies combined with statistical and computational analysis of the results.

[0004] One fundamental strategy in a functional genomics approach is to expand the scope of biological investigation from studying single genes or proteins to studying all genes or proteins at once in a systematic fashion. Computational biology will perform a critical and expanding role in this area: whereas structural genomics has been characterized by data management, functional genomics will be characterized by mining the data sets for particularly valuable information. Functional genomics promises to rapidly narrow the gap between sequence and function and to yield new insights into the behavior of biological systems.

[0005] One important class of genes includes those genes that encode cell surface molecules and receptors. Receptors typically bind ligands resulting in the delivery of a

signal into the cell (signaling). This can lead to a number of biologic functions including, but not limited to cell growth, cell replication, cell death, *etc*. Other receptors mediate the specific transfer of molecules from outside the cell into the cytoplasm (endocytosis or internalization). Endocytosis is also an important mechanism by which receptor signaling is modulated. Different cell types have qualitatively and quantitatively different surface receptors and the pattern of receptor expression may change dramatically with the development and/or differentiation of a cell or tissue and/or the development and progression of a disease.

[0006] Identification of such receptors and the development of specific receptor ligands, allows the study of receptor function and the determination of the temporal-spatial pattern of receptor expression. For example, such ligands can be used to profile the pattern of receptor expression across different cell types upon exposure to a drug or during the development of a disease. In addition, cell-specific receptor ligand, more preferably internalizing cell specific receptor ligands can be used to target drugs or markers to the cell surface or into the cytoplasm (for internalizing receptors), *e.g.* for therapeutic effect.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] This invention provides methods for identifying cell binding and internalizing ligands. Also provided are methods of identifying receptors that are capable of internalizing ligands and methods of screening for modulators of ligand internalization.

[0008] In one embodiment this invention provides a method of identifying a ligand or ligands that are internalized into a cell. The method involves i) contacting the cell with an effector (*e.g.* a reporter) non-covalently coupled to a ligand; ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; and iii) detecting the reporter within the cell, if the reporter is present within the cell, where the presence of the reporter within the cell indicates that the ligand binds to an internalizing receptor and is internalized. In certain embodiment the contacting comprises contacting the cell with a ligand comprising an epitope tag and contacting the cell with a reporter comprising a moiety that binds the epitope tag. In a preferred embodiment the ligand is a ligand that binds to a cell surface receptor. Preferred ligands include, but are not limited to peptides (*e.g.* an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, a chemokine, a growth factor, *etc.*), nucleic acids, carbohydrates, sugars, and the like. Particularly preferred

peptide ligands are produced by combinatorial chemical synthesis or recombinantly using a phage display library (*e.g.* using a filamentous phage).

[0009] In certain preferred embodiments, the effector (*e.g.* reporter) is non-covalently coupled to the ligand by an epitope tag (*e.g.* a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope, *etc.*). Where the effector is a reporter, preferred reporters include, but are not limited to an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a liposome, or a liposome containing a label. In one particularly preferred embodiment the epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporter is a liposome comprising a reagent that binds a His_6 tag (*e.g.* nitrilotriacetic acid (NTA)) attached to a lipid or liposome. In certain particularly preferred embodiments, the attachment is typically via a metal chelation bond, e.g. a Ni(2+) chelation bond. In another preferred embodiment the ligand is an antibody and said epitope tag is attached to the antibody through a covalent linkage to protein A.

[0010] Preferred cells for use in the methods of this invention include, but are not limited to plant cells, animal cells, and bacterial cells. Particularly preferred cells include mammalian cells, more preferably normal or pathological human cells (*e.g.* a cancer cell). In certain embodiments the cells are cells that overexpress one or more receptors and/or that express or overexpress a heterologous receptor.

[0011] The method can further involve isolating a ligand that is internalized into the cell. In certain embodiments, the "isolating" can comprise determining the amino acid sequence of a ligand that is internalized by the cell or determining the sequence of a nucleic acid encoding the ligand.

[0012] In another embodiment, this invention provides methods of screening a cell for internalization of a ligand. These methods preferably involve i) contacting the cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand known to be internalizing; ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; iii) detecting the reporter within said cell, if said reporter is present within said cell, whereby the presence of the reporter within said cell indicates that said cell internalizes said ligand. Most frequently, internalization of a ligand into a cell signifies that the cell displays a receptor for the ligand that is an internalizing receptor. The method may further include isolation of the cell that internalized the ligand, *e.g.* from those cells that do not.

[0013] In a particularly preferred embodiment the ligand is a member of a library of ligands. Preferred libraries comprise at least 1000, more preferably at least 10,000, and most preferably at least 100,000 different members. Preferred ligands include, but are not limited to peptides (*e.g.* an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, a chemokine, a growth factor, *etc.*), nucleic acids, carbohydrates, sugars, and the like. Particularly preferred peptide ligands are produced by combinatorial chemical synthesis or recombinantly using a phage display library (*e.g.* using a filamentous phage).

[0014] In certain preferred embodiments, the effector (*e.g.* reporter) is non-covalently coupled to the ligand by an epitope tag (*e.g.* a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope, *etc.*). Where the effector is a reporter, preferred reporters include, but are not limited to an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a liposome, or a liposome containing a label. In one particularly preferred embodiment the epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporter is a liposome comprising a reagent that binds a His_6 tag (*e.g.* nitrilotriacetic acid (NTA)) attached to a lipid or liposome. In another preferred embodiment the ligand is an antibody and said epitope tag is attached to the antibody through a covalent linkage to protein A. Particularly preferred cells are described herein.

[0015] In certain embodiments, the method further comprises isolating a ligand that is internalized into the cell. The ligand can be sequenced or the sequence of a nucleic acid encoding the ligand is determined. The method may further comprise contacting a cell with a labeled ligand again to tag or isolate the internalizing receptor.

[0016] In yet another embodiment, this invention provides methods of identifying internalizing receptors. The methods involve i) contacting a cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand; ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of said cell; iii) detecting the reporter within said cell, if said reporter is present within said cell, whereby the presence of the reporter within said cell indicates that said ligand binds to an internalizing receptor and is internalized; iv) identifying or recovering the ligand bound to the reporter within said cell; and v) identifying a receptor that binds to the ligand. In particularly preferred embodiments, the receptor is identified by methods including, but not limited to affinity chromatography or

immunohistochemistry. The method can further comprise entering the identity of the internalizing receptor into a database of internalizing receptors.

[0017] Also provided are methods of method of screening an agent for the ability to modulate internalization of a ligand into a cell. The methods preferably involve i) contacting the cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand known to be internalized by said cell; ii) contacting the cell with a test agent; iii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; and iv) detecting the reporter within the cell, if the reporter is present within the cell, where a difference in the amount of reporter internalized by the cell contacted with said test agent as compared to the amount of reporter internalized by said cell when contacted with a lower concentration of the test agent indicates that said test agent modulates the internalization of said ligand by the cell. In preferred embodiments, the lower concentration of test agent is the absence of the test agent. Preferred test agents include small organic molecules. In certain embodiments, the test agents include antibodies or peptides while in certain embodiments, the test agents do not include nucleic acids, antibodies, or peptides.

[0018] In still another embodiment, the method involves contacting the cell with a first concentration of the test agent; ii) contacting the cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand known to internalize into the cell; iii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; iv) detecting the reporter within the cell to obtain a first measurement that signifies the amount of the reporter/ligand construct internalized by the cell; v) contacting said cell with a second concentration of the test agent wherein the second concentration is higher that the first concentration; vi) repeating the steps ii) - iv) to obtain a second measurement that signifies the amount of the reporter/ligand construct internalized by the cell influenced by a second, higher concentration of the agent; and vii) comparing the first and the second measurements wherein when the first and the second measurements are different, the test agent modulates internalization of said ligand in said cell.

[0019] In certain preferred embodiments, the first, lower concentration of test agent is zero, *i.e.* the absence of the test agent. Preferred test agents include small organic molecules. In certain embodiments, the test agents include antibodies or peptides while, in certain embodiments, the test agents do not include nucleic acids, antibodies, or peptides.

[0020] In still another embodiment, this invention provides a construct for use in the methods of this invention (*e.g.* for screening a cell for an internalizing receptor). Preferred constructs comprise a ligand non-covalently coupled to an effector (*e.g.* a reporter) through an epitope tag. In preferred constructs the ligands include, but are not limited to peptides (*e.g.* an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, a chemokine, a growth factor, *etc.*), nucleic acids, carbohydrates, sugars, and the like. Particularly preferred peptide ligands are produced by combinatorial chemical synthesis or recombinantly using a phage display library (*e.g.* using a filamentous phage).

[0021] In certain preferred constructs, the effector (*e.g.* reporter) is non-covalently coupled to the ligand by an epitope tag such as a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope, *etc.* Where the effector is a reporter, preferred reporters include, but are not limited to an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a liposome, or a liposome containing a label. In one particularly preferred embodiment the epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and the reporter is a liposome comprising a reagent that binds a His_6 tag (*e.g.* nitrilotriacetic acid (NTA)) attached to a lipid or liposome. In another preferred embodiment the ligand is an antibody and said epitope tag is attached to the antibody through a covalent linkage to protein A. In certain preferred embodiments, the construct is polyvalent for the ligand.

[0022] This invention also provides ligand libraries for use in the methods of this invention. Preferred libraries comprise a plurality of constructs as described herein where the members of the library each comprise a ligand and an epitope tag where the ligands vary between members of the library and the epitope tags are constant among members of the library. The ligand/effector (*e.g.* reporter) components of the library members may be pre-assembled or may assemble during when they are combined, *e.g.* in the presence of a cell. Preferred libraries comprise at least 10^5 different ligands.

[0023] In still another embodiment this invention provides a kit for screening a cell for an internalizing receptor. Preferred kits comprise a construct or a library of constructs as described herein. Preferred kits further comprise instructional materials teaching the use of said library to screen for internalizing ligands or to identify an internalizing receptor.

[0024] In yet another embodiment, the invention provides method of detecting binding and internalization of the ligands by cells. The method involves i) contacting the cell with an effector (*e.g.* a reporter) non-covalently coupled to a ligand; ii) removing a

portion of the effector which is not associated with the cell; iii) detecting the reporter associated with the cell to obtain a first reading indicating a total amount of the ligand which is bound to the cell surface and internalized by the cell; iv) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; v) detecting the reporter remaining in the cell to obtain a second reading indicating an amount of the ligand which is internalized; and vi) subtracting the second reading from the first reading to obtain a difference indicating an amount of the ligand bound to cell surface. In some cases, following the contacting step it is advantageous to arrest further internalization process, for example, by reducing temperature of the cells, typically to about 4°C, or by treatment of the cells with effective amounts of metabolic inhibitors, *e.g.* anhydroglucose or sodium azide. In certain embodiment the contacting comprises contacting the cell with a ligand comprising an epitope tag and contacting the cell with a reporter comprising a moiety that binds the epitope tag. In a preferred embodiment the ligand is a ligand that binds to a cell surface receptor. Preferred ligands include, but are not limited to peptides (*e.g.* an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, a chemokine, a growth factor, *etc.*), nucleic acids, carbohydrates, sugars, and the like. Particularly preferred peptide ligands are produced by combinatorial chemical synthesis or recombinantly using a phage display library (*e.g.* using a filamentous phage).

[0025] In certain preferred embodiments, the effector (*e.g.* reporter) is non-covalently coupled to the ligand by an epitope tag (*e.g.* a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope, *etc.*). Where the effector is a reporter, preferred reporters include, but are not limited to an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a liposome, or a liposome containing a label. In one particularly preferred embodiment the epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporter is a liposome comprising a reagent that binds a His_6 tag (*e.g.* nitrilotriacetic acid (NTA)) attached to a lipid or liposome, *e.g. via* a metal chelation bond, such as Ni(2+) chelation bond. In another preferred embodiment the ligand is an antibody and said epitope tag is attached to the antibody through a covalent linkage to protein A or protein G.

[0026] Preferred cells for use in the methods of this invention include, but are not limited to, plant cells, animal cells, and bacterial cells. Particularly preferred cells include mammalian cells, more preferably normal or pathological human cells (*e.g.* a cancer cell).

In certain embodiments the cells are cells that overexpress one or more receptors and/or that express or overexpress a heterologous receptor.

[0027] The invention also provides for metal-chelating lipids comprising sterols and capable of forming metal chelation bond with an epitope tag, preferably, with a hexahistidine tag. More preferably, metal-chelating lipids containing cholesterol-conjugated NTA metal complex are provided.

[0028] The invention also provides for metal-chelating lipids comprising a lipid, a hydrophilic polymer, and a chelation group attached to said hydrophilic polymer Preferably, the invention provides for the poly(ethylene glycol)-lipid conjugates containing a terminally attached metal chelation group. More preferably, the conjugates comprising a poly(ethylene glycol)-lipid and a terminally attached metal chelation group capable of forming a chelation bond with an epitope tag, such as an oligohistidine tag, are provided. In a particular embodiment, poly(ethylene glycol)-lipid is poly(ethylene glycol)-conjugated DSPE, and a chelation group is NTA.

[0029] The invention also provides for compositions comprising metal chelating lipids comprising a lipid, a hydrophilic polymer, and a chelation group attached to said hydrophilic polymer and capable of forming a chelation bond with an epitope tag. The invention further provides for the methods for delivery of an effector into a cell comprising contacting the cell with (i) a metal chelating lipid comprising a lipid, a hydrophilic polymer, and a chelation group attached to said hydrophilic polymer and capable of forming a chelation bond with an epitope tag, wherein said effector is associated with said metal chelating lipid, and (ii) a ligand comprising said epitope tag wherein said cell specifically binds, and optionally, internalizes, said ligand. The composition preferably includes a liposome, which comprises said metal chelating lipid and said effector.

Definitions.

[0030] The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical analogue of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers. The term also includes variants on the traditional peptide

linkage joining the amino acids making up the polypeptide. Proteins also include glycoproteins (*e.g.* histidine-rich glycoprotein (HRG), Lewis Y antigen (Le^Y), and the like.).

[0031] The terms "nucleic acid", or "oligonucleotide" or grammatical equivalents herein refer to at least two nucleotides covalently linked together. Nucleic acids of the present invention are single-stranded or double stranded and will generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, as outlined below, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, for example, phosphoramide (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) and references therein; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805, Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; and Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), phosphorothioate (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; and U.S. Patent No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 :2321, O-methylphophoroamidite linkages (*see* Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (*see* Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Other analog nucleic acids include those with positive backbones (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; non-ionic backbones (U.S. Patent Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Chapters 2 and 3, ACS Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Patent Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ACS Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within the definition of nucleic acids (*see* Jenkins *et al.* (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. These modifications of the ribose-phosphate backbone may be done to facilitate the addition of additional moieties such

as labels, or to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments.

[0032] The term "residue" as used herein refers to natural, synthetic, or modified amino acids.

[0033] As used herein, an "antibody" refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes or fragments of immunoglobulin genes. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon and mu constant region genes, as well as myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively.

[0034] A typical immunoglobulin (antibody) structural unit is known to comprise a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these light and heavy chains respectively.

[0035] Antibodies exist as intact immunoglobulins or as a number of well characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce $F(ab)'_2$, a dimer of Fab which itself is a light chain joined to V_H-C_H1 by a disulfide bond. The $F(ab)'_2$ may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region thereby converting the $(Fab')_2$ dimer into a Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially a Fab with part of the hinge region (*see, Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), for a more detailed description of other antibody fragments). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such Fab' fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by utilizing recombinant DNA methodology. Thus, the term antibody, as used herein also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies or synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies. Preferred antibodies include single chain antibodies (antibodies that exist as a single polypeptide chain), more preferably single chain Fv antibodies (sFv or scFv) in which a variable heavy

and a variable light chain are joined together (directly or through a peptide linker) to form a continuous polypeptide. The single chain Fv antibody is a covalently linked V_H-V_L heterodimer which may be expressed from a nucleic acid including V_H- and V_L- encoding sequences either joined directly or joined by a peptide-encoding linker. Huston, *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85*: 5879-5883. While the V_H and V_L are connected to each as a single polypeptide chain, the V_H and V_L domains associate non-covalently. The first functional antibody molecules to be expressed on the surface of filamentous phage were single-chain Fv's (scFv), however, alternative expression strategies have also been successful. For example Fab molecules can be displayed on phage if one of the chains (heavy or light) is fused to g3 capsid protein and the complementary chain exported to the periplasm as a soluble molecule. The two chains can be encoded on the same or on different replicons; the important point is that the two antibody chains in each Fab molecule assemble post-translationally and the dimer is incorporated into the phage particle via linkage of one of the chains to, *e.g.*, g3p (*see, e.g.*, U.S. Patent No: 5733743). The scFv antibodies and a number of other structures converting the naturally aggregated, but chemically separated light and heavy polypeptide chains from an antibody V region into a molecule that folds into a three dimensional structure substantially similar to the structure of an antigen-binding site are known to those of skill in the art (*see e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,091,513, 5,132,405, and 4,956,778). Particularly preferred antibodies should include all that have been displayed on phage (*e.g.*, scFv, Fv, Fab and disulfide linked Fv (Reiter *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8: 1323-1331).

[0036] The term "specifically binds", as used herein, when referring to a biomolecule (*e.g.*, protein, nucleic acid, antibody, etc.), refers to a binding reaction which is determinative of the presence biomolecule in heterogeneous population of molecules (e.g., proteins and other biologics). Thus, under designated conditions (e.g. immunoassay

ligand in respect to the other member. Specific examples of binding pairs include antibody/antigen, antibody/hapten, enzyme/substrate, enzyme/inhibitor, enzyme/cofactor, binding protein/substrate, carrier protein/substrate, transporter protein/substrate, lectin/carbohydtare, receptor/hormone, receptor/modulator, complementary strands of polynucleotides, protein/nucleic acid repressor(inductor), receptor/virus, *etc.*

[**0038**] The term "nanoparticle", as used herein refers to a "vehicle" capable of complexing with or containing an effector (*e.g.* a drug, a detectable label, a cytotoxin, *etc.*). A preferred nanoparticle also provides a non-covalent or cleavable covalent linkage to a ligand (direct or through a linker).

[**0039**] An "effector" refers to any molecule or combination of molecules whose activity it is desired to internalize into a cell. Effectors include, but are not limited to labels, cytotoxins, enzymes, growth factors, transcription factors, drugs, *etc.*).

[**0040**] A "reporter" is an effector that provides a detectable signal (*e.g.* is a detectable label). In certain embodiments, the reporter need not provide the detectable signal itself, but can simply provide a moiety that subsequently can bind to a detectable label.

[**0041**] The term "modulate" when used with reference to modulation of internalization of a ligand refers to an upregulation or downregulation of the total amount or ligand internalized and/or the rate of internalization. In certain embodiments, particularly where ligand efflux is not assayed or otherwise controlled for, modulation may occur by altering the rate of efflux of the ligand and reflect net rate or net amount of ligand incorporation by a cell.

[**0042**] The term "test agent" refers to any agent that is to be screened for a desired activity (*e.g.* the ability to modulate/alter internalization of a ligand by a cell). The "test composition" can be any molecule or mixture of molecules, optionally in a suitable carrier. The term "test cell" refers to any cell to which methods of the present invention are applied.

[**0043**] The term "small organic molecule" typically refers to molecules of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (e.g., proteins, nucleic acids, etc.). Preferred small

organic molecules range in size up to about 5000 Da, more preferably up to 2000 Da, and most preferably up to about 1000 Da.

[0044] The term"detect" refers to detection or quantitative determination.

[0045] The term "chelation bond" refers to a bond between an effector and a ligand which involves an interaction between an electron pair donor and a coordination site on a metal ion leading to an attractive force between the electron pair donor and the metal ion.

[0046] The term "liposome" refers to a nanoparticle that comprises a self-enclosed layer composed of an amphipathic lipid. The layer typically is a bilayer formed by molecules that comprise a hydrophobic portion and a hydrophilic portion wherein hydrophobic portions associate in an aqueous medium to form an internal part of the layer whereas hydrophilic portions remain in contact with the medium. The layer surrounds and encloses an interior, which may contain, wholly or partially, an aqueous phase, a solid, a gel, a gas phase, or a non-aqueous fluid. An effector, *e.g.* a reporter, may be contained within the interior of the liposome, in the lipid layer, or attached to the outer surface of the lipid layer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0047] Figure 1 illustrates the effect of Ni-NTA-lipid in the liposome on the liposome internalization into cells in the presence of a cell-internalizing ligand having a His_6 epitope tag. Small unilamellar liposomes containing encapsulated fluorescent marker were formulated with lipid matrix containing 0.5 mol. %, (squares), 2 mol.% (diamonds), or 5 mol.% (circles) of an NTA-lipid (DOGS-NTA-Ni, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL), (measured as mol.% of liposome phospholipid) and tested for internalization into ErbB2-expressing SKBR3 tumor cells using 20 μg/mL of an anti-ErbB2 scFv antibody (F5) engineered to contain a C-terminal $(His)_6$-tag. After four hours of internalization, cells were washed with physiological saline containing 1 mM EDTA, lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0048] Figure 2 illustrates the specificity of the CLIA assay. SKBR3 tumor cells were incubated with NTA-liposomes (5 mol. % Ni-NTA-DOGS) and the anti-ErbB2 antibody F5 without a $(His)_6$-tag, or a non-internalizing anti-ErbB2 antibody (C6.5), or no scFv. Alternatively, the F5 scFv containing the $(His)_6$-tag was co-incubated with

fluorescenly labeled liposomes formulated without the NTA-DOGS lipid. After four hours of internalization, cells were washed with physiological buffered saline containing 1 mM EDTA, lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0049] Figure 31 illustrates monitoring of internalization monoclonal antibodies by CLIA using a Protein A-$(His)_6$ chemical conjugate. SKBR3 cells were incubated the anti-ErbB2 antibody F5 with a $(His)_6$-tag , the anti-ErbB2monoclonal antibody Herceptin, Protein A-$(His)_6$ alone, or mixture of Herceptin and Protein A-$(His)_6$. After four hours of internalization, cells were lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0050] Figure 4 illustrates the effect of liposome concentration in the CLIA assay. SKBR3 cells were co-incubated with (squares) or without (circles) 20 micro-g/mL of the anti-ErbB2 antibody F5 and varying concentrations of Ni-NTA-liposomes with encapsulated fluorescent marker. After four hours of internalization, cells were washed with physiological saline buffer containing 1 mM EDTA, lysed in base and the amount of cell-associated liposome lipid was determined from the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0051] Figure 5 illustrates the effect of antibody concentration in the CLIA assay. SKBR3 cells were co-incubated with varying concentrations of the anti-ErbB2 antibody F5 (solid line-circles), a control antibody (squares), or no antibody (dotted line - circles) and NTA-liposomes containing 2 mol.% Ni-NTA-DOGS. After four hours of internalization, cells were washed with physiological saline buffer containing 1 mM EDTA, lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0052] Figure 6 shows the use of culture supernatants in the CLIA assay. SKBR3 cells were co-incubated with culture supernatants of *E. coli* expressing the anti-EGFR scFv antibody C10, the non-internalizing scFv antibody C6.5, the anti-ErbB2 scFv antibody F5, or no scFv along with NTA-liposomes. After four hours of internalization, cells were washed with physiological saline buffer containing 1 mM EDTA, lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter.

[0053] Figure 7 illustrates tumor cell profiling with the anti-EGFR scFv antibody. The anti-EGFR antibody C10 was co-incubated with fluorescent-labeled NTA-liposomes on cell lines expressing varying amounts of EGFR: SKBR3, SKOV3, BT474, MCF7, MD-MBA 453, MD-MDA 468, CHO-EGFR, or CHO. Uptake was normalized to total cellular protein.

[0054] Figure 8 shows a comparison of fluorescent anti-ErbB2 staining by flow cytometry, uptake of covalent liposomes, and the CLIA assay. Tumor cells were incubated with the anti-ErbB2 scFv F5, detected with FITC-labeled anti-FLAG antibody, and fluorescence quantified by flow cytometry. Alternatively, live tumor cells were incubated with immunoliposomes containing the F5 scFv covalently coupled to the liposome containing encapsulated fluorescent marker HPTS. The CLIA assay was performed by co-incubation of the F5 scFv and NTA-liposomes. Liposome fluorescence was read in a microfluorimeter.

DETAILED DESCRIPTION

[0055] This invention provides methods of identifying ligands that are internalized into cells or to identify internalizing receptors that are capable of internalizing ligands into cells. The methods involve coupling a ligand non-covalently (*e.g.* via an epitope tag) to a nanoparticle containing an effector (*e.g.* reporter molecules, *etc.*) without the need for ligand purification. Since purification is not required, either before or after exposure of a test cell to the ligand coupled to the "nanoparticle", cell binding and internalization can readily be assayed in a high throughput manner.

[0056] In general, the methods involve providing an effector (*e.g.* reporter) non-covalently coupled to a ligand (*e.g.* a ligand generated in a combinatorial library). The effector/ligand is contacted with a "test" cell, *e.g.* a cell that is to be assayed for the ability to internalize the ligand. The effector/reporter is dissociated from the ligand and the dissociated reporter is removed from the surface of the cell. In preferred embodiments, the reporter/effector is detected within the cell and the presence of the reporter/effector within the cell indicates that the ligand is internalized. Most frequently, the internalization of a ligand signifies that the cell displays an internalizing receptor that binds the ligand. The methods can further include identifying and/or isolating the cells that internalized the ligand (and hence, the effector), for example, for a diagnostic or therapeutic purpose, wherein the cells are pathological, *e.g.* cancer cells, to find out if these cells are present in a tissue or fluid specimen from a patient, such as blood urine, sputum, or tissue biopsy. In another example, genetically engineered cells that express an internalizing epitope on their surface as a result of DNA transfection, can be detected and isolated. Because the surface-attached effectors are dissociated and removed under cell-sparing conditions which preserve the cell

integrity, isolated cells can be maintained and propagated yielding useful clones of stable transfectants.

[0057] In another embodiment, this invention provides methods of identifying an internalizing receptor. In preferred embodiments, such methods involve identifying internalized ligands, *e.g.*, according to the methods described above. The internalized ligands are recovered from the cell and/or identified. The recovered and/or identified ligand can then be used to identify the receptor that internalized that ligand (*e.g.* by labeling the receptor *in situ*, by affinity purifying the receptor, *etc.*).

[0058] In still another embodiment, the methods of this invention can be used to screen for agents that modulate the ability of a cell to internalize a ligand. In preferred embodiments, these methods entail screening for ligand internalization as described herein where the cells are contacted before or during the time they are contacted with the effector/ligand construct and) with the test agent(s) to be screened. A difference in ligand internalization by cells contacted with the test agent(s), *e.g.* as compared to negative controls comprising the test agent(s) at a lower concentration or the absence of the test agent(s), indicates that the test agent(s) modulate (*e.g.* increase or decrease) internalization the subject ligand(s).

[0059] The invention also provides the methods of detecting binding and internalization of the ligands by cells. The methods involves i) contacting the cell with an effector (*e.g.* a reporter) non-covalently coupled to a ligand; ii) removing a portion of the effector which is not associated with the cell; iii) detecting the reporter associated with the cell to obtain a first measurement indicating a total amount of the ligand which is bound to the cell surface and internalized by the cell; iv) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; v) detecting the reporter remaining in the cell to obtain a second measurement indicating an amount of the ligand which is internalized; and vi) subtracting the second measurement from the first measurement to obtain a difference indicating an amount of the ligand bound to cell surface.

Providing an effector non-covalently coupled to a ligand.

[0060] In a preferred embodiment, the methods of this invention utilize an effector (typically complexed with or localized in a "nanoparticle") non-covalently attached to a

ligand. In certain embodiments, an effector can be attached to a ligand by a cleavable covalent bond.

Ligands for coupling to an effector.

[0061] Virtually any ligand is suitable for used in the methods of this invention. While, in particularly preferred embodiments, the methods of this invention utilize peptides, it is also possible to use nucleic acids, sugars, various carbohydrates, lipids, and any of a variety of organic molecules as ligands.

[0062] In certain embodiments, a single ligand can be used to identify cells and/or receptors capable of internalizing that ligand. In other embodiments, multiple ligands can be used to identify internalizing receptors and/or ligands that can be internalized by a particular cell. In particularly preferred embodiments, the ligands are provided as components of libraries comprising large numbers of different ligands, sometimes referred to as combinatorial libraries. Use of large ligand libraries comprising numerous different ligands increases the likelihood of identifying a ligand that is internalized by a particular cell.

[0063] Preferred libraries include at least 2, preferably at least 5, more preferably at least 10, and most preferably at least 100, or at least 1000 different ligands. Even larger libraries are possible and often preferred. Such larger libraries include at least 10,000 different ligands, preferably at least 100,000 different ligands, or even at least about 1,000,000 or more ligands.

[0064] Methods of producing combinatorial peptide libraries are well known to those of skill in the art. Such peptide libraries can be chemically synthesized or produced by expressing libraries of nucleic acids. The initial work in combinatorial library construction focused on chemical peptide synthesis. Furka *et al.* (1991) *Int. J. Peptide Protein Res.* 37:487-493; Houghton *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; and Fodor *et al.* (1991) *Science* 251:767.

[0065] Methods of generating peptide libraries using recombinant DNA techniques, however, are becoming quite common. Thus, for example, the use of phage display libraries and the like permit the generation of single chain antibody or other peptide ligand libraries. To express such large libraries a polypeptide or an antibody fragment gene is inserted into the gene encoding a phage surface protein (pIII) and the polypeptide-pIII fusion protein is displayed on the phage surface (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552-554;

Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137). The gene can include an enzyme cleavage site permitting separation of the peptide from the pIII protein as desired.

[0066] The nucleic acid(s) encoding the protein can be highly degenerate in one or more regions thereby providing a library of literally thousands of peptides. (*see, e.g.*, U.S. Patents 5,198,346, 5,096,815, 4,946,778, *etc.*). Libraries have been constructed comprising over 100,000 or even over 1,000,000 different members (*see, e.g.*, Yang and Craik (1998) *J. Mol. Biol.*, 279: 1001-1011).

[0067] Phage-display methods are not the only approach to the generation of peptide libraries. To the contrary, it is possible to generate large peptide libraries using vectors other than phage.

[0068] While in certain embodiments, the ligands utilized in this invention are "randomly" generated, in embodiments, can involve building variation around a peptide "lead." In this approach, one starts with a particular peptide sequence, the lead, which may have been selected by some other random peptide approach, such as the peptides on phage approach, discussed above. One then synthesizes *in vitro* (*e.g.*, with an automated DNA synthesizer) a family of oligonucleotides that is based on the coding sequence of the lead peptide. Each member of the family varies to a particular degree from the original sequence. Sources of leads include (1) quasi-random peptides generated, *e.g.* in phage display libraries (2) small peptide encoding DNAs derived from the genes for the natural ligands; (3) shuffling of small peptide-encoding fragments to introduce variation (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos: 6,132,970, 6,117,679, 3 6,096,548); (4) peptide leads from other sources of peptide diversity and characterization that involve the intracellular generation of peptide diversity and detection of peptide-protein interactions via the reconstitution of a viable transcriptional transactivator (*see,* Field and Song, (1989) *Nature* 340(6230): 245-246); and (6) diverse peptides built around a specific conformationally constrained molecular scaffold (*see, e.g.*, Yang and Craik (1998) *J. Mol. Biol.*, 279: 1001-1011.

[0069] Yet another approach for diversifying a selected random peptide vector involves the mutagenesis of a pool, or subset, of recovered vectors. Recombinant host cells transformed with vectors identified by screening are pooled and isolated. The vector DNA, or a portion of the vector DNA, is mutagenized by treating the cells with, *e.g.*, nitrous acid, formic acid, hydrazine, or by use of a mutator strain such as mutD5 (*see, e.g.*, Schaaper (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* 85: 8126-8130). These treatments produce a variety of

mutations in the vector DNA. The segment containing the sequence encoding the variable peptide can optionally be isolated by cutting with restriction nuclease(s) specific for sites flanking the variable region and then recloned into undamaged vector DNA. Alternatively, the mutagenized vectors can be used without recloning of the mutagenized random peptide coding sequence.

[0070] One can also diversify a selected peptide by misincorporation of nucleotide changes in the coding sequence for the peptide with the polymerase chain reaction (PCR; see U.S. Pat. Nos. 4,683,202; 4,683,195; and 4,965,188) under low fidelity conditions. A protocol described in Leung *et al.* (1989) *Technique* 1: 11-15, utilizes altered ratios of nucleotides and the addition of manganese ions to produce a significant mutation frequency.

[0071] One can also use extensive mutagenesis to generate a large number of peptides with a significant number of differences from the lead (as well as generating peptides with few or no differences from the lead). In another approach, single amino acid substitutions in the peptide are favored, and the goal is to find a number of single amino acid differences that either abolish or significantly improve binding. For example, one approach involves the synthesis of four mixtures of nucleotides--each containing one of the four nucleotides at 85%, and each of the other three nucleotides at 5% each. Thus, at each position during solid phase chemical synthesis there is an 85% chance that the "correct" nucleotide will be incorporated and a 15% chance that one of the other three nucleotides will be incorporated (a 5% chance for each). Thus, on average, if one synthesizes an oligonucleotide 100 bases long, then in an average molecule 85% of the nucleotide positions will be correct (that is, will match the lead sequence), and 15% of the positions will have incorporated an incorrect nucleotide compared to the original sequence. Depending on the misincorporation criteria that are selected, the resulting mixture of different oligonucleotides can be quite similar to the core starting sequence, for example by following a 97%1%/1%/1% misincorporation strategy, or quite diverged, on average, from the lead sequence, for example by following a 55%/15%/15%/15% strategy.

[0072] The approaches described above are merely illustrative. Other approaches to the generation of peptide libraries are well known to those of skill in the art (*see, e.g.* U.S. Patent 5,010,175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton *et al.* (1991) *Nature*, 354: 84-88, and the like).

[0073] The ligands used in the methods of this invention are not limited to peptide ligands. Virtually any ligand can be utilized as long as it is capable of non-covalently associating the effector/reporter. Moreover, it is possible to derivatize ligands, *e.g.* with a particular peptide epitope so that the ligand can non-covalently associate with a particular effector/reporter. Suitable non-peptide ligands include, but are not limited to nucleic acids (RNAs, or DNAs, or analogues thereof), sugars, carbohydrates, lipids, small organic molecules and the like.

[0074] The scope of combinatorial chemistry libraries has been expanded beyond peptide synthesis. Polycarbamate and N-substituted glycine libraries have been synthesized to produce libraries containing chemical entities that are similar to peptides in structure, but possess enhanced proteolytic stability, absorption and pharmacokinetic properties. Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303-1305; Simon *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* 89:9367-9371. Furthermore, benzodiazepine, pyrrolidine, and diketopiperazine libraries have been synthesized, expanding combinatorial chemistry to include heterocyclic entities. Bunin *et al.* (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10997-10998; Murphy *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7029-7030; and Gordon *et al.* (1995) *Biorg. Medicinal Chem. Lett.* 5:47-50.

[0075] Methods of chemical and/or biological synthesis, by combining a number of chemical "building blocks", as reagents can produce libraries of enormous complexity and diversity. For example, one commentator has observed that the systematic, combinatorial mixing of 100 interchangeable chemical building blocks results in the theoretical synthesis of 100 million tetrameric compounds or 10 billion pentameric compounds (Gallop *et al.* (1994) 37(9): 1233-1250).

[0076] Known combinatorial chemical libraries include, but are not limited to,: peptoids (PCT Publication No WO 91/19735, 26 Dec. 1991), , random bio-oligomers (PCT Publication WO 92/00091, 9 Jan. 1992), benzodiazepines (U.S. Pat. No. 5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs *et al.,* (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913), vinylogous polypeptides (Hagihara *et al.* (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568), nonpeptidal peptidomimetics with a Beta- D- Glucose scaffolding (Hirschmann *et al.*, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen *et al.* (1994) *J. Amer. Chem.* Soc. 116: 2661), oligocarbamates (Cho, et al., (1993) *Science* 261:1303), and/or peptidyl phosphonates (Campbell *et al.,* (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). *See, generally,* Gordon *et al.,* (1994) *J.*

Med. Chem. 37:1385, nucleic acid libraries (*see, e.g.,* Strategene, Corp.), peptide nucleic acid libraries (*see, e.g.,* U.S. Patent 5,539,083) antibody libraries (*see, e.g.,* Vaughn *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314), and PCT/US96/10287), carbohydrate libraries (*see, e.g.,* Liang *et al.* (1996) *Science*, 274: 1520-1522, and U.S. Patent 5,593,853), and small organic molecule libraries (*see, e.g.,* benzodiazepines, Baum (1993) C&EN, Jan 18, page 33, isoprenoids U.S. Patent 5,569,588, thiazolidinones and metathiazanones U.S. Patent 5,549,974, pyrrolidines U.S. Patents 5,525,735 and 5,519,134, morpholino compounds U.S. Patent 5,506,337, benzodiazepines 5,288,514, pyrimidinediones (*see, e.g.,* U.S. Patent 6,025,371), and the like.

[0077] Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available (*see, e.g.*, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

[0078] A number of well known robotic systems have also been developed for solution phase chemistries. These systems include, but are not limited to, automated workstations like the automated synthesis apparatus developed by Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) and many robotic systems utilizing robotic arms (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.) which mimic the manual synthetic operations performed by a chemist and the VentureTM platform, an ultra-high-throughput synthesizer that can run between 576 and 9,600 simultaneous reactions from start to finish (see Advanced ChemTech, Inc. Louisville, KY)). Any of the above devices are suitable for use with the present invention. The nature and implementation of modifications to these devices (if any) so that they can operate as discussed herein will be apparent to persons skilled in the relevant art. In addition, numerous combinatorial libraries are themselves commercially available (see, e.g., ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

Effector/nanoparticle combinations.

[0079] In preferred embodiments, the ligand is non-covalently coupled to an effector. The coupling can be direct or to a vehicle "carrying" the effector (*e.g.,* a

nanoparticle). As used herein an effector refers to any molecule or combination of molecules whose activity it is desired to internalize into a cell. Effectors include, but are not limited to molecules such as labels, cytotoxins, enzymes, growth factors, transcription factors, nucleic acids, drugs, *etc.*). The drugs particularly suitable as effectors are cytotoxic anticancer drugs. Examples of cytotoxic anticancer drugs are anthacyclines (*e.g.*, doxorubicin), vinca alkaloids (e.g., vincristine, vinblastin, vinorelbine), folate analogs (*e.g.*, methotrexate, edatrexate), nucleotide analogs (*e.g.* arabinosylcytidine, azathymidine), platinum complexes (*e.g.*, cisplatin, carboplatin), and alkylating agents (*e.g.*, nitrosourea, melphalan, cyclophosphamide).

[**0080**] In particularly preferred embodiments, the effector comprises a detectable label. Detectable labels suitable for use in the present invention include any composition detectable by spectroscopic, photochemical, electrochemical, biochemical, immunochemical, magnetic, electrical, optical or chemical means. Useful labels in the present invention include biotin for staining with labeled streptavidin conjugate, magnetic beads (*e.g.*, Dynabeads™), fluorescent dyes (*e.g.*, fluorescein, Texas Red, rhodamine, green fluorescent protein, and the like, *see, e.g.*, Haugland (1996), *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), radiolabels (*e.g.*, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, or ^{32}P), enzymes (*e.g.*, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase and others commonly used in an ELISA), and colorimetric labels such as colloidal gold (*e.g.*, gold particles in the 40 -80 nm diameter size range scatter green light with high efficiency) or colored glass or plastic (*e.g.*, polystyrene, polypropylene, latex, etc.) beads. Patents teaching the use of such labels include U.S. Patent Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241.

[**0081**] A fluorescent label is preferred because it provides a very strong signal with low background. It is also optically detectable at high resolution and sensitivity through a quick scanning procedure. Desirably, fluorescent labels should absorb light above about 300 nm, preferably about 350 nm, and more preferably above about 400 nm, usually emitting at wavelengths greater than about 10 nm higher than the wavelength of the light absorbed. It should be noted that the absorption and emission characteristics of the bound dye can differ from the unbound dye. Therefore, when referring to the various wavelength ranges and characteristics of the dyes, it is intended to indicate the dyes as employed and not the dye which is unconjugated and characterized in an arbitrary solvent.

[0082] Detectable signals can also be provided by chemiluminescent and bioluminescent sources. Chemiluminescent sources include a compound which becomes electronically excited by a chemical reaction and can then emit light which serves as the detectable signal or donates energy to a fluorescent acceptor. Alternatively, luciferins can be used in conjunction with luciferase or lucigenins to provide bioluminescence.

[0083] Spin labels are provided by reporter molecules with an unpaired electron spin which can be detected by electron spin resonance (ESR) spectroscopy. Exemplary spin labels include organic free radicals, transitional metal complexes, particularly vanadium, copper, iron, and manganese, and the like. Exemplary spin labels include nitroxide free radicals.

[0084] It will be recognized that fluorescent labels are not to be limited to single species organic molecules, but include inorganic molecules, multi-molecular mixtures of organic and/or inorganic molecules, crystals, heteropolymers, and the like. Thus, for example, CdSe-CdS core-shell nanocrystals enclosed in a silica shell can be easily derivatized for coupling to a biological molecule (Bruchez *et al.* (1998) *Science,* 281: 2013-2016). Similarly, highly fluorescent quantum dots (zinc sulfide-capped cadmium selenide) have been covalently coupled to biomolecules for use in ultrasensitive biological detection (Warren and Nie (1998) *Science*, 281: 2016-2018).

[0085] Other preferred labels include radioactive labels. Radioactive labels may be introduced into a nanoparticle which then is non-covalently linked to an effector. For example, the isotopes of ^{125}I, ^{131}I, ^{99m}Tc, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{14}C, ^{3}H, ^{35}C, and ^{14}P are commonly used as radioactive labels. Radioactive metal ions such as for example, ^{67}Ga, ^{11}In, can be non-covalently linked to epitope tag in the form of a mixed chelate with IDA , NTA, and the like. Methods for detecting or a radioactive label are well known in the art.

[0086] Magnetic beads are also another preferred detectable label. A variety of magnetic beads compatible with cells is known in the art. See for example PCT patent application PCT WO 90 01,295, US Pat. Nos. 4,101,435, 5,262,176, 4,698,302, 5,069,216, and Weissleder *et al. Radiology*, 175:489-493, 1990. Polymer-coated biocompatible magnetic beads with increased magnetic susceptibility and submicron size are described by Kirpotin, Chan, Bunn, US Pat. No. 5,411,730. The beads typically include magnetite or superparamagnetic iron oxide and have the size from 5 nm (superparamagnetic beads) to several micro-m. One or more ligands are attached to the beads by a non-covalent bond or

by a cleavable, covalent bond. The art generally recognizes that magnetic beads can be conjugated to ligands, *e.g.* antibodies (Weissleder et al. *Radiology*, 182:381-385, 1992). After incubation with the cells, the beads which are not internalized, including surface-bound beads, are dissociated from the cells and removed, *e.g.* by washing. The cells that are capable of internalizing the ligand, and thus, have internalized the magnetic beads attached thereto, can be detected by magnitometry. Alternatively, the cells are separated using magnetic field, e.g. by high gradient magnetic separation (Miltenyi Biotech AG). Because of the biocompatibility of the magnetic beads, the separated, ligand-internalizing cells are viable and can be maintained alive, *e.g.* in cell culture, for future research or medical use.

[**0087**] It is appreciated that more than one kind of ligand can be non-covalently or cleavably covalently attached to the effector, e.g. reporter or nanoparticle carrying thereof, thus, the simultaneous selection and detection of cells for internalization of multiple ligand types in the same batch of the cells is possible.

[**0088**] In certain embodiments, the effector (*e.g.* reporter/label) is noncovalently linked to the ligand directly, while, in other embodiments, the effector is contained within and/or complexed with a nanoparticle and the nanoparticle is non-covalently coupled to the ligand. As used herein a nanoparticle is any "vehicle" capable of complexing with or containing the effector and providing a non-covalent linkage to the ligand.

[**0089**] A wide variety of materials are suitable as "nanoparticles" including, but not limited to porous microbeads (*e.g.* controlled pore glass), lipids and liposomes, various polymers, various dendrimers, and the like. Suitable liposomes include, but are not limited to various liposomes including, but not limited to small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles, and multilamellar vesicles. Various techniques for forming liposomes have been described in the literature, including but not limited to, pressure extrusion, detergent dialysis, dehydration-rehydration, reverse-phase evaporation, remote loading, sonication and other methods (*see, e.g,* New (1990) *Preparation of liposomes. In: R.R.C. New (ed.) Liposomes: A Practical Approach.* I.R.L. Press, Oxford, pp. 33-10413).. Alternatively, the effector molecule(s) can simply be complexed with a lipid.

[**0090**] In still other embodiments, the effectors are combined with various polymers such as those used as drug carriers, and the like. Examples of suitable polymers include, but are not limited to polyvinylpyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropyl-methacrylamide-phenol, polyhydroxyethylaspartamidephenol, or polyethyleneoxide-

polylysine substituted with palmitoyl residues. The substances may also be coupled to biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug. Suitable polymers include polylactic acid, polyglycolic acid, copolymers of polylactic and polyglycolic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacylates, and crosslinked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

[0091] In still other embodiments, the effector(s) are complexed with various dendrimers. Dendrimers are three dimensional, highly ordered oligomeric and/or polymeric compounds typically formed on a core molecule or designated initiator by reiterative reaction sequences adding the oligomers and/or polymers and providing an outer surface that is positively changed. These dendrimers may be prepared as disclosed in PCT/US83/02052, and U.S. Pat. Nos. 4,507,466, 4,558,120, 4,568,737, 4,587,329, 4,631,337, 4,694,064, 4,713,975, 4,737,550, 4,871,779, 4,857,599.

[0092] Typically, the dendrimer polycations comprise a core molecule upon which polymers are added. The polymers may be oligomers or polymers which comprise terminal groups typically capable of acquiring a charge. Suitable core molecules comprise at least two reactive residues which can be utilized for the binding of the core molecule to the oligomers and/or polymers. Examples of the reactive residues are hydroxyl, ester, amino, imino, imido, halide, carboxyl, carboxyhalide maleimide, dithiopyridyl, and sulfhydryl, among others. Preferred core molecules are ammonia, tris-(2-aminoethyl)amine, lysine, ornithine, pentaerythritol and ethylenediamine, among others. Combinations of these residues are also suitable as are other reactive residues.

Non-covalently coupling the ligand to the effector/nanoparticle.

[0093] In preferred embodiments, the ligand is non-covalently coupled to the effector and/or to the nanoparticle comprising the effector. Such non- covalent coupling can be by means of ionic interactions, coordination bonds, such as chelation bond, and/or hydrogen bonding, and/or hydrophobic interactions, and the like. In particularly preferred embodiments, the non-covalent coupling is by means of an epitope tag.

[0094] An epitope tag, as used herein refers to a molecule or domain of a molecule that is specifically recognized by an antibody or other binding partner. Thus, for example, in addition to epitopes recognized in epitope/antibody interactions, epitope tags also

comprise "epitopes" recognized by other binding molecules (*e.g.* ligands bound by receptors), ligands bound by other ligands to form heterodimers or homodimers, oligo-histidine sequence having from 2 to 8 histidine residues, such as His_6 bound by Ni-NTA, and the like.

[0095] Epitope tags are well known to those of skill in the art. Moreover, antibodies specific to a wide variety of epitope tags are commercially available. These include but are not limited to antibodies against the DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope, c-myc antibodies (available from Sigma, St. Louis), the HNK-1 carbohydrate epitope, the HA epitope, the HSV epitope, the His_4, His_5, and His_6 epitopes that are recognized by the His epitope specific antibodies (*see, e.g.,* Qiagen), and the like. In addition, vectors for epitope tagging proteins are commercially available. Thus, for example, the pCMV-Tag1 vector is an epitope tagging vector designed for gene expression in mammalian cells. A target gene inserted into the pCMV-Tag1 vector can be tagged with the FLAG ® epitope (N-terminal, C-terminal or internal tagging), the c-myc epitope (C-terminal) or both the FLAG (N-terminal) and c-myc (C-terminal) epitopes.

[0096] In particularly preferred embodiments, the ligand is tagged with a hexahistidine (His_6) epitope tag which is bound by a Cu, Ni, Zn, or Co complex of a chelator group. Preferred chelator groups include iminodiacetic acid (IDA) and nitrilotriacetic acid (NTA) derivatives. One particularly preferred complex for binding His_6 tags is Ni-NTA which is readily coupled to an effector and/or to a nanoparticle comprising an effector (*see, e.g.,* Example 1).

[0097] One important instance of an effector/nanoparticle is a liposome. A liposome may contain several hundreds or thousands of molecules of an effector (*e.g.* reporter) which leads to increased sensitivity of the methods taught by the present invention. Methods of making liposomes and loading them with various substances, such as effectors and, in particular, reporters, are known to those skilled in the art and described in comprehensive sources (see, *e.g.*, *Liposome Technology*/Ed. by G.Gregoriadis, vol. I-III, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993; Lasic D. (1993). *Liposomes: From physics to applications*. Elsevier, Amsterdam, 575 pp). Liposomes with attached ligands are known to bind and/or to be internalized by certain cells (Park, *et al.* (1997) *Adv. Pharmacology*, 40:399-435). To form an effector/ligand construct of the present invention, one can use liposomes containing, for example, NTA- and IDA-conjugated lipids.

[0098] Metal chelating lipid conjugates capable of being incorporated into a lipid vesicle are generally described by Wagner, *et al.*, US Pat. No. 4,707,453. Unlike high-stability high stability metal chelates, the present invention, in preferred embodiments, uses chelating lipid conjugates that produce metal complexes of moderate (or low) stability, and typically having fewer coordination sites than the metal, *e.g.* as in NTA- or IDA groups, so that the complex coordination sphere of the metal ion in the complex is incomplete, affording formation of the metal chelation bond between the metal and the epitope tag of the ligand. Such chelation bonds can be readily dissociated by the action of a commonly used, cell-sparing chelator/metal-binding agent with higher metal-binding strength, such as ethylenediamine tetraacetate (EDTA) of tiethylenetriamine pentaatcetate (DTPA).

[0099] In preferred embodiments, the lipids are so conjugated as to allow formation of the metal chelation bond between hexahistidine epitope and the NTA or IDA or other chelating group. Typically, these conjugates are prepared using an intermediate, N-(5-amino-1-carboxyalkyl)-iminodiacetic acid (*see, e.g.,* US Pat. No. 5,047,513). Examples of such NTA lipids and IDA lipids, without limitation, are: N-(5-(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinylamido)-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (DOGS-NTA) (Avanti Polar Lipids, Inc.,Alabama, USA), 1-(N,N-dicarboxymethylamino)-3,6-dioxaoctyl-2,3-distearylglyceryl ether (IDA-TRIG-DSGE) (Northern Lipids, Inc., Vancouver, Canada), 1,2-di-O-hexadecyl-sn-glycero-3-(1'-(2'-(R)-hydroxy-3'-N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid (DHGN) (Barklis *et al., EMBO J.*, 16:1199-1213, 1997), N^{α},N^{α}-bis(carboxymethyl)-N^{ε}-((1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamido)-succinyl)-L-lysine (NTA-DPPE), and N^{α},N^{α}-bis(carboxymethyl)-N^{ε}-(N,N-dioctadecylamido)succinyl-L-lysine (NTA-DODA) ((Schmitt *et al., J. Amer. Chem. Soc.*, 116:8485-8491, 1994). Lipids comprising sterols, such as cholesterol linked to a metal chelation group capable of forming a chelation bond with an epitope tag, *e.g.* His-tag, are provided by the present invention.

[0100] Particularly preferred lipids for making liposome effectors/nanoparticles are metal-chelating lipids comprising a hydrophobic lipid portion, a hydrophilic polymer linked to said lipid portion, and a chelation group linked to said hydrophilic polymer. The hydrophobic lipid portion merges within a liposome lipid layer and acts as an "anchor" capable of keeping the metal-chelating lipid linked to the liposome during contact with a cell. Examples of such hydrophobic portion are those of the type generally employed to produce liposomes: phospholipids, such as phosphatidylethanolamine, steroids, such as

cholesterol, glycolipids, sphingolipids, lind chain mono- and dialkylamines, a long chain dialkylcarboxylic acid or ester, an ester of a polyhydroxyalcohol, such as glycerol, and the like. The chelation group is preferably a group that binds to an epitope tag such as hexahistidine tag. Examples of such groups are nitrilotriacetic acid, iminodiacetic acid, and their C-substituted derivatives, in the form of the complexes with transition metal ions, such as divalent ions of Ni, Co, Cu, and Zn. A hydrophilic polymer is typically polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, polyvinylmethylether, polyoxazoline or substituted derivative thereof, polyacrylic acid, amide, N-substituted amide, or ester thereof, polymetacrylic acid, N-substituted amide amide, or ester thereof, hydroxyalkylcellulose, poly(oxyalkylene), polyglycerol, polyglycolic acid, polylactic acid, water-soluble polysaccharide, poly(anhydroglucose), polyaspartamide, or hydrophilic peptide sequence. Lipid-hydrophilic polymer conjugates are generally known as liposome components (*see, e.g.,* US Pat. Nos. 5,631,018, 5,395,619, 5,013, 556, 4,534,899).

[**0101**] The polymer typically has molecular weight from about 400 to about 2,000,000 Dalton. The molecular weight range of the suitable polymer depends on the molecular weight of a monomeric unit that composes the polymer, so that the polymer would contain more than three, preferably more than four, and most preferably at least six monomeric units. Without being bound by a particular theory, we assume that for a free motion of the polymer chain, advantageous for the unhindered access of the chelation group for the epitope tag, the chain length of the polymer would typically be equal or exceeding the length of a kinematic segment which for a flexible hydrophilic polymer typically includes 4-6 monomeric units or more. The metal chelation group is preferably a group that binds to an epitope tag such as hexahistidine tag. Examples of such groups are nitrilotriacetic acid, iminodiacetic acid, and their C-substituted derivatives, in the form of the complexes with transition metal ions, such as divalent ions of Ni, Co, Cu, and Zn. To prepare such lipid-polymer-chelation group conjugates, one may start with a lipid-polymer wherein one or more links that forms the polymer chain bear reactive chemical groups, such as, for example, carboxylic acid, carboxylic acid active ester, e.g. N- hydroxysuccinimide ester, mixed anhydride, isothiocyanate, amine, thiol, haloid alkyl, alpha-haloidalkanoyl, cyanuric chloride, N-maleimidyl, carbonyl, hyrdazido, azido, or hydroxylamino group. Such reactive groups are known to those skilled in the art (see, *e.g.*, Hermanson (1996). *Bioconjugate Techniques.* Academic Press, New York, 785 pp.). In preferred embodiments,

the chelation group is be attached using a nitrilotriacetic group having a functionalized alkyl substitute at one of the methylene groups (*see, e.g.,* US Pat. No. 5,047,513). The functionalized substitute is typically (C_2-C_6)-alkyl, having a functional group that reacts with the reactive group of the polymer, such as amino, thiol, or hydroxy group. Methods of making NTA-functionalized polymers are disclosed *e.g.* by Seed, *et. al.*, PCT Appl. PCT/US97/18104, WO 98/15293. Iminodiacetic acid group is attached, *e.g.*, by conjugation of one of the carboxyl groups of a nitrilotriacetic acid to an amine or hydroxyl group in the polymer, or by the reaction between an amino group of the polymer and bromoacetic acid in an alkaline medium. In one embodiment the invention provides for the poly(ethylene glycol)-lipid conjugates containing a terminally attached metal chelation group capable of forming a chelation bond with an epitope tag. Poly(ethylene glycol) with molecular weight between about 300 and about 50,000, preferably between about 500 and about 20,000, most preferably between about 1,000 and about 5,000, is suitable.

[**0102**] *Lipids* commonly used to form liposomes, such as, di(C_{10}-C_{22}) alkyl-(or alkenyl-) phosphatidylethanolamines, di(C_{10}-C_{22}) alkyl-(or alkenyl-)phosphatidic acids, di(C_{10}-C_{22}) alkyl-(or alkenyl-)phosphatidyl glycerols, di(C_{10}-C_{22}) alkyl-, alkenyl-, alkanoyl, or alkenoyl, lglycerols, sphingolipids, glycophospholipids, sterols, their derivatives, as well as synthetic lipid "anchors" such as di(C_{10}-C_{22}) alkyl-(or alkenyl-)amines or similar alkanoyl amides are suitable. Lipid-polymer-chelator conjugates are incorporated into lipid matrix of the liposome either before, or after the liposome formation (by co-incubation with pre-formed liposomes), in the amount of 0.1-50 mol% of the liposome-lipid, preferably 0.5-10 mol.%, and most preferably at 0.5-5 mol.% of the liposome lipid. In a particular embodiment, poly(ethylene glycol)-lipid is poly(ethylene glycol)-conjugated DSPE, and a chelation group is NTA.

[**0103**] Equipping the effector liposome with an epitope-binding, *e.g.* metal chelation, group in the form of a lipid-polymer-epitope binding group conjugate provides several novel and advantageous features. The polymer-attached epitope-binding group, being situated well away from the liposome surface, and due to the polymer chain flexibility, has better access to the epitope tag within a macromolecule, e.g. a recombinant protein, thereby improving sensitivity of the methods of this invention. Significantly, the lipid-polymer-NTA-Ni conjugate, being micellarly soluble in aqueous medium, could be

"captured" into pre-formed liposomes pre-loaded with the effector, *e.g.* cytotoxin or reporter, by mere co-incubation of the liposomes and the conjugate in an aqueous buffer.

[0104] It was a surprising discovery of this invention that after co-incubation with the effector liposomes, the epitope (*e.g.* hexahistidine) tag-binding activity of the liposome-captured lipid-polymer-NTA-Ni^{2+} conjugate was surprisingly well preserved, as evidenced by the selective internalization of cytotoxin carried by such liposomes into the HER2-receptor-bearing cells in the presence of an anti-HER2 scFv antibody having a hexahistidine epitope tag (see Example 4 below). The liposome having an epitope-binding group attached away from its surface, *e.g. via* a polymer spacer, afforded co-inclusion into the liposome of a polymer-derivatized lipid which reduces liposome aggregation, reduces background (non-specific) binding of the liposomes to cells, and when applied into the body, increases the liposome longevity in circulation (US Pat. No. 5,013,556), providing for better binding of the effector/ligand constructs to the "test" cells *in vivo*. Typically, for reducing aggregation, the amounts of the lipid-hydrophilic polymer conjugate of 0.1-0.9 mol.% of total lipid are sufficient, while for increasing circulation longevity, the concentrations of 1-20 mol.% of total lipid are needed (US Pat. No. 5, 013,556). The use of epitope binding group, *e.g.* NTA, attached to the liposome via a polymer spacer, unexpectedly resulted in a remarkably better loading of the liposome with an effector, such as cytotoxin doxorubicin, into the effector liposome (see Example 4).

[0105] In certain embodiments, the effector can be covalently coupled to the ligand providing such coupling is readily and/or specifically cleaved. Preferably the cleavage occurs under the conditions which preserve the structural integrity of a cell such as not to allow the internalized effector, *e.g.* reporter, to leave the cell in the course of, or as a result of, the cleavage. Such cleavable couplings are well known to those of skill in the art. For example, in one embodiment, a linker comprising a nucleic acid restriction site or a protease recognition site is readily cleaved by application of the appropriate endonuclease or protease.

[0106] Other cleavable linkers are well known to those of skill in the art (*see, e.g.,* U.S. Pat. Nos. 4,618,492; 4,542,225, and 4,625,014). The mechanisms for release of an agent from these linker groups include, for example, irradiation of a photolabile bond and acid-catalyzed hydrolysis. Examples of cleavable linkers include, without limitation, enamine, hydrazone, oxazolidine, ketal, acetal, ortho-esters of carbonic acid, thioesters,

substituted hemiesters and hemiamides of 2-alkyl or 2,3-dialkyl substituted maleic acid, and vinyl ethers that dissociate by hydrolysis in physiological aqueous solutions at pH 3-6; disulfide bonds that dissociate in the presence of thiolytic agents (cysteine, mercaptoethanol, dithiotheitol, tris-carboxymethylphosphine, and the like, typically at 0.1-10 mM concentration) in aqueous solutions under physiological conditions of pH and salinity; ester bonds that are cleaved by base-catalyzed or enzymatic hydrolysis in aqueous physiological buffers at pH 7-9, and the bonds that are cleaved by photodissociation, such as 2-nitrobenzyl derivatives (Haugland (1996). *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. 6th Ed.).

Contacting a cell with the ligand/effector.

[**0107**] In preferred embodiments, one or more "test cells" (*e.g.*, cells that are to be screened for the ability to internalize a ligand) are contacted with the effector (*e.g.* reporter) non-covalently coupled to a ligand. Often a cell will be contacted with a number of different ligand/effector combinations. Contacting is typically under conditions in which the cell is capable of internalizing a ligand; that is, for example, under condition where an internalizing receptor is capable of functioning. In the case of mammalian cells, incubation at the slightly elevated temperature (30-40°C) in an aqueous solution with physiological balanced salts and cell nutrients is preferred. Typically the cell is contacted (*e.g.* incubated) with the ligand/effector construct in culture although such contacting can be with cells derived from an acute/fresh preparation.

[**0108**] While such contacting is typically accomplished *ex vivo* it is recognized that, in certain embodiments, the contacting can be accomplished *in vivo*. It is noted that U.S. Patent 6,068,829 discloses methods of identifying molecules that home to a selected organ *in vivo*. The methods involve transfecting a living organism with a library of ligands and identifying the ligands that localize to a particular tissue. This patent thus demonstrates the feasibility of contacting a cell *in vivo* with a heterologous ligand.

[**0109**] In particularly preferred embodiments, the ligand and the effector are joined through an epitope tag. In such embodiments, formation of the non-covalent linkage (between ligand and effector) and contacting of the cell with the ligand/effector construct can be easily combined into a single procedure. By way of illustration, Example 1 describes the incubation of NTA-liposomes, i.e. liposomes having surface-attached Ni-NTA groups,

(0.5 – 1 mM total phospholipid) were incubated for 4 hours with the cells along with a $(His)_6$-containing ligand (~20 micro-g/mL) in 100 micro-L tissue culture media supplemented with 10 % FCS at 37°C. Under such conditions, the ligands formed non-covalent linkages with the effector and were internalized by the cells.

[0110] Virtually any cell can be used with the methods of this invention. Such cells include both eukaryotic and prokaryotic cells. Bacterial cells, fungal cells, algal cells, plant cells, animal cells are all well suited to the methods of this invention. In particularly preferred embodiments, the cells are vertebrate cells, more preferably mammalian cells, and most preferably human cells. The cells can be cultured *ex vivo,* obtained from fresh preparations, present in a tissue culture, or in a tissue *in vivo*. In high-throughput screening applications, cultured cells are most preferred.

Dissociating the effector from the ligand.

[0111] In preferred methods, after the ligand/effector construct has been contacted to the cell for a time sufficient to allow ligand internalization, the effector is separated from the ligand by dissociating the non-covalent attachment. This is accomplished by any of a number of methods well known to those of skill in the art. Methods of disrupting such non-covalent attachments include but are not limited to the use of dissociating factors and/or agents, such as heat, acidity, chaotropic agents, high salt, chelating agents, and the like. Particularly preferred are cell-sparing methods where the integrity of the cell is preserved so that after the dissociation the internalized ligand and/or effector remain essentially within the cells. If an effector and a ligand are ;linked by a metal chelation bond such as between Ni-NTA group and a His_6-epitope tag, the dissociating agent is preferably a reagent that binds a divalent transition metal ions, for example, strong chelator such as EDTA typically at low concentration of 0.2-5 mM, a weak metal complex-forming agent, such as imidazole, at high concentration, typically 100-300 mM, or a dithiol compound such as 2,3-dimercaptosuccinate, typically at 0.2-10 mM in a neutral physiological saline buffer. By competing for binding of a metal ion, e.g. Ni2+, with the ligand-liposome chelation bond, these dissociating agents deprive the bond of the metal ion causing the bond to break down. In one preferred embodiment, as illustrated in Example 1, cell surface-attached liposome/ligand complexes were dissociated, and the dissociated liposomes were removed by washing the cells 3-4 times with a dissociating buffer, in this case phosphate-buffered

physiological saline containing 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, and 1 mM EDTA or with 250 mM phosphate buffered imidazole (pH 7.4). Because the internalized liposome/ligand complexes were inaccessible to the dissociating buffer, the internalized liposomes remained in the cells providing the detectable signal that indicated the presence and the amount of the internalized ligand/liposome construct.

[0112] Dissociating can involve releasing an effector, e.g. a reporter, from the nanoparticle by disrupting it, so that the released effector can be washed away from the cells. If the nanoparticle is a liposome, the releasing buffer can include a liposome-destabilizing factor. Liposomes with triggered release of encapsulated agents, induced by chemical of physical factors, for example, by briefly subjecting to pH 4-6, thiolytic agents, mild heating (42-45°C), or light, are known in the art (*see, e.g.,* Gerasimov *et al.* (1995) *Vesicles,* Ch. 17, p.679-746; Kirpotin, *et al.* (1996) , *FEBS Lett.*, 388:115-118). When the effector is dissociated from the ligand by disrupting a nanoparticle, *e.g.* a liposome, the ligand may be in the form of an amphipathic conjugate, such as lipid- or lipid-hydrophilic polymer conjugate, in which case a non-covalent bond between the ligand and the effector is by hydrophobic interactions.

[0113] Cleavable, covalent attachments between the ligand and the effector can be also destroyed in a cell-sparing matter. For example, carbonylhydrazone bonds are formed between a carboxy acid hydrazide group attached to a reporter, e.g., liposome, or a magnetic nanoparticle, and a ketone or aldehyde group produced by the periodate oxidation of a N-terminal serine or treonine engineered into a recombinant protein/peptide ligand. In the acidic aqueous environment (pH 3-6), the bond is hydrolyzed to release the reporter.

Detecting the internalized ligand.

[0114] The internalized ligand is detected according to methods well know to those of skill in the art. The ligand can be detected directly (*e.g.* through various purification techniques), however, in a preferred embodiment, the ligand is detected by detecting the effector molecule attached to (or associated with) the ligand. Where the effector is a reporter (detectable label), the effector is detected using methods typically used to detect a label of the same kind. Thus, where the effector is a radionuclide, detection is by methods such as scintillography, or autoradiography. Where the effector is a colorimetric tag, detection is by optical means. Where the effector is a fluorescent tag, detection is by

methods such as fluorimetry, flow cytometry, or fluorescent microscopy. When the effector is a magnetic bead, detection is by magnetometry.

[0115] Where the effector is a cytotoxin, detection of internalization can involve a measurement of cell mortality. Conversely, where the effector is a growth factor or a mitogen, detection can involve detection of cell growth or proliferation.

[0116] Assays for ligand internalization are typically scored as positive where there is a detectable signal from an internalized effector, preferably as compared to a negative control. In a preferred embodiment, to score a positive result the difference between the internalized "test" assay and the (usually negative) control is statistically significant (*e.g.* at greater than 80%, preferably greater than about 90%, more preferably greater than about 98%, and most preferably greater than about 99% confidence level), *e.g,* as determined using any statistical test suited for the data set provided (*e.g.* t-test, analysis of variance (ANOVA), semiparametric techniques, non-parametric techniques (*e.g.* Wilcoxon Mann-Whitney Test, Wilcoxon Signed Ranks Test, Sign Test, Kruskal-Wallis Test, etc.). Most preferred "positive" assays show at least a 1.2 fold, preferably at least a 1.5 fold, more preferably at least a 2 fold, and most preferably at least a 4 fold or even a 10-fold difference from the negative control.

[0117] Detecting can include quantitative determination (quantification) of the internalized ligand so that more precise comparison between various ligands as to their internalizing capacity can be made. Methods for quantification of the effector molecules such as cytofectins, enzymes, fluorescent, light-absorbing, radioactive, or magnetically susceptible substances, are known in the art (see *e.g.* Spector, *et al. Cells. A Laboratory Manual, vol. 1-3,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998).

Identifying the internalizing receptor(s).

[0118] The assays described above, can also be used to identify (*e.g.* previously unknown) internalizing receptors. In preferred embodiments, such methods involve identifying internalized ligands according to the methods described above. The internalized ligands are recovered from the cell and/or identified. The recovered and/or identified ligand can then be used to identify the receptor that internalized that ligand.

[0119] Methods or recovering internalized ligands are well known to those of skill in the art. This can involve lysing the cell and performing standard purification methods to

isolate the labeled (effector-bound) ligand. Methods of purifying molecules from cells are well known to those of skill in the art. Typical purification methods include, but are not limited to gel electrophoresis, anion exchange chromatography (*e.g.* Mono-Q column, Pharmacia-LKB, Piscataway, New Jersey, USA), or reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). For a review of standard techniques see, *Methods in Enzymology Volume 182: Guide to Protein Purification*, M. Deutscher, ed. (1990), pages 619-626.

[0120] Alternatively, after the cell is lysed, the ligand can be dissociated from the effector and the epitope tag on the ligand can then be used to recover the ligand by affinity chromatography. Thus, for example, where the ligand is affinity tagged with a His_6 tag, the ligand can be recovered *e.g.*, with an Ni-NTA affinity column, Ni-NTA gel, or Ni-NTA conjugated magnetic beads (*see, e.g.*, QIAexpress™ Detection and Assay Handbook, Qiagen).

Detecting the cells that internalize a ligand.

[0121] When the method of the invention is used to detect the cells that internalize a ligand, following the step of dissociating the effector, *e.g.* a reporter or nanoparticle, from the ligand, the presence of the effector in the cells is detected by any means known to those skilled in the art (see, *e.g.*, "Detecting the Internalized Ligand" above). In certain preferred embodiments, the detection methods involve examination of individual cells. Examples of such methods include, in the case of a fluorescent reporter, flow cytometry and fluorescent microscopy, and the like; in the case of a radionuclide reporter, autoradiography, and the like.

[0122] Detection of the ligand internalized in the cells can involve isolating the ligand-internalizing cells from those that do not detectably internalize the ligand. Following the dissociation of the effector, *e.g.* a reporter or nanoparticle, from the ligand, the ligand-internalizing cells can be isolated, for example, in the case of fluorescent reporter, by fluorescence-activated cell sorting (FACS), or in the case of the reporter being a magnetic bead, by high gradient magnetic separation. The isolated cells are then examined or utilized *e.g.*, for research, industrial, or medical purposes.

[0123] One particularly preferred embodiment of this method involves detection of malignant cells in the body tissue or fluid samples from a patient. In this case, ligands that are selectively internalized by malignant cells, are used. For example, antibodies, such as

scFv, can be selected for specific internalization into malignant or other pathological cells as described herein and in the co-pending, co-owned US Patent application No. 09/249,529, and used according to the present invention to detect and/or select the pathological cells in the samples of a patient body tissues or fluids.

Detecting binding and internalization of a ligand by the cells.

[0124] The methods of this invention also can be used for detecting both surface-binding and internalization of a ligand by a cell. In preferred embodiments, the methods can include contacting a cell with the ligand/effector (e.g. ligand/reporter) construct, removing a portion of the construct which is not associated with the cell, *i.e* that is neither surface-bound, nor internalized, by the cells, and detecting the reporter associated with the cell to obtain a first reading indicating a total amount of the ligand which is bound to the cell surface and internalized by the cell. The removal of the non-cell associated portion of the reporter is preferably by removal of the ligand/reporter construct achieved by washing the cell under non-dissociating conditions, such as using phosphate-buffered saline, buffered balanced salt solution (Ringer, Hanks), cell growth medium, or other physiological medium without a dissociating agent. Thus, in the absence of these agents, the cell surface-bound ligand/effector constructs will remain intact on the cell and contribute to the signal detected from the effector providing the first measurement of the total cell-associated ligand. Then the reporter is dissociated from the ligand in a surface-bound ligand/effector constructs, and dissociated effector is removed from the surface of the cell, for example, as in the case of NTA-Ni-His_6-linked ligand/effector, by washing the cell with a physiological buffer containing a divalent metal ion-binding agent as described herein. Then the reporter remaining in the cell is detected providing a second measurement of an amount of the ligand/effector construct that is internalized. The difference between the first measurement and the second measurement corresponds to the amount of the ligand bound to cell surface but not internalized. In some cases, before taking the first measurement it is advantageous to arrest the internalization process without disintegrating the cell. This is readily achieved by treatment of the cell with a metabolic inhibitor, such as anhydroglucose or sodium azide, or by decreasing the temperature (chilling on ice) typically to less than 10°C, typically to about 0-4°C

Screening for modulators of internalization.

[0125] The methods of this invention can also be used to screen for agents that modulate the internalization of a ligand or ligands. In preferred embodiments, these methods entail screening for ligand internalization as described herein where the cells are contacted before, and/or during, and/or after the time they are contacted with the effector/ligand construct with the test agent(s) to be screened. A difference in ligand internalization by cells contacted with the test agent(s), *e.g.* as compared to negative controls comprising the test agent(s) at a lower concentration or the absence of the test agent(s), indicates that the test agent(s) modulate (*e.g.* increase or decrease) internalization the subject ligand(s). An increase of internalized ligand indicates that the test agent(s) upregulate internalization, while a decrease in internalized ligand indicates that the test agent(s) downregulate internalization.

[0126] Depending on the duration of the assay, the increase or decrease can represent an increase or decrease in total ligand internalized or in rate of internalization (*i.e.* amount of ligand internalized per unit time). In still other embodiments, the ligand(s) can be screened for the ability to alter the time-course of internalization.

[0127] The assays for modulator activity are typically scored as positive where there is a difference between the activity (signal) seen with the test agent present and the (usually negative) control, preferably where the difference is statistically significant (*e.g.* at greater than 80%, preferably greater than about 90%, more preferably greater than about 98%, and most preferably greater than about 99% confidence level). Most preferred "positive" assays show at least a 1.2 fold, preferably at least a 1.5 fold, more preferably at least a 2 fold, and most preferably at least a 4 fold or even a 10-fold difference from the negative control (experiment where the test agent is absent or present at a lower concentration).

High throughput screening.

[0128] The methods of this invention are well suited for high throughput screening. Particularly where an epitope tag is used to link the ligand to the effector, the assays can essentially be run in a "single step" format without elaborate purification of the ligand and/or the effector. As shown in example 1 it is sufficient to combine the subject cell(s) with the ligand and the effector at once under appropriate "incubation" conditions. The ligand joins

to the effector and if the cell has a corresponding internalizing receptor the ligand is internalized into the cell along with the bound effector (*e.g.* label).

[0129] The cells utilized in the methods of this invention need not be contacted with a ligand and/or single test agent at a time. To the contrary, to facilitate high-throughput screening, a single cell may be contacted by at least two, preferably by at least 5, more preferably by at least 10, and most preferably by at least 20, at least 50 or even at least 100 ligands or test compounds. If the cell scores positive, it can be subsequently tested with a subset of the ligands or test agents until test agents having the activity or the internalized ligands are identified.

[0130] High throughput assays for various reporter gene products are well known to those of skill in the art. For example, multi-well fluorimeters are commercially available (*e.g.,* from Perkin-Elmer). Other high throughput screening systems are commercially available (*see, e.g.,* Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.). These systems typically automate entire procedures including all sample and reagent pipetting, liquid dispensing, timed incubations, and final readings of the microplate in detector(s) appropriate for the assay. These configurable systems provide high throughput and rapid start up as well as a high degree of flexibility and customization. The manufacturers of such systems provide detailed protocols the various high throughput. Thus, for example, Zymark Corp. provides technical bulletins describing screening systems for detecting the modulation of gene transcription, ligand binding, and the like.

[0131] High throughput screens can be performed in a number of formats known to those of skill in the art. In preferred embodiments, high throughput screens utilize a microtiter plate format (*e.g.* a 96 well format, a 480 well format , a 960 well format, *etc.*).

Delivery of effectors into cells.

[0132] In certain embodiments this invention provides a composition for delivery of an effector into a cell, which composition comprises (i) a metal-chelating lipid comprising a hydrophobic lipid portion, a hydrophilic polymer linked to said lipid portion, and a chelation group linked to said hydrophilic polymer wherein the chelation group is complexed to a metal ion and binds to an epitope tag, and (ii) a ligand comprising said epitope tag, where the epitope tag comprises a sequence of at least two neighboring histidine residues (a

histidine tag), and where effector is associated with said metal-chelating lipid. The tag preferably comprises six neighboring histidine residues (hexahistidine tag). A preferred composition is one where the metal-chelating lipid and the effector are comprised in a liposome. Any effectors and/or ligands described herein are suitable. The effector is for example, a reporter, a cytotoxin, a drug, or a nucleic acid. The ligand is typically a protein, a carbohydrate, a nucleic acid, of a small organic molecule. The ligand may be natural or synthetic. Preferred protein ligands are those that comprise the antigen-binding sequences of an antibody, such as immnoglobulins and fragments thereof, both naturally and recombinantly produced, including single-chain fragments. The liposome may further comprise a lipid-polymer conjugate, particularly, a lipid-poly(ethylene glycol) conjugate. In the liposome, the metal-chelating lipid typically constitutes between 0.1 mol% and 50 mol.% , preferably between 0.2 mol.% and 10 mol%. Optionally, the lipid-polymer conjugate (without the metal-chelating group) can be included to up to 20 mol% of the liposome lipid.

Databases of internalizing ligands and/or internalizing receptors.

[0133] In certain embodiments, the methods of this invention further comprise listing the identified internalizing receptors in a database identifying internalizing receptors and/or listing modulators of ligand internalization in such a database. The term database refers to a means for recording and retrieving information. In preferred embodiments the database also provides means for sorting and/or searching the stored information. The database can comprise any convenient media including, but not limited to, paper systems, card systems, mechanical systems, electronic systems, optical systems, magnetic systems or combinations thereof. Preferred databases include electronic (e.g. computer-based) databases. Computer systems for use in storage and manipulation of databases are well known to those of skill in the art and include, but are not limited to "personal computer systems", mainframe systems, distributed nodes on an inter- or intra-net, data or databases stored in specialized hardware (e.g. in microchips), and the like.

Kits.

[0134] In another embodiment, this invention provides kits comprising materials for the practice of the methods described herein. In one preferred embodiments the kits comprise a container containing a ligand non-covalently coupled to a effector (*e.g.* a

reporter) through an epitope tag. The kit may comprise a "single" construct having one type of ligand or a library of constructs providing a multiplicity of different ligands. Alternatively, an effector, e.g. a reporter or nanoparticle, can be provided, along with one or more ligands, in separate containers, so that the effector/ligand construct will be formed when the effector and the ligand are combined by a user according to the provided instructions and the needs of a particular application.

[0135] The kit can optionally include other instruments and/or reagents for practice of the methods of this invention. Such reagents and instruments include, but are not limited to microtiter plates, cells, buffers, filters for detection of fluorescent labels, software for running assays on high throughput robotic systems, and the like.

[0136] In addition, the kits can include instructional materials providing general directions and/or specific protocols for the methods of this invention. While the instructional materials typically comprise written or printed materials they are not limited to such. Any medium capable of storing such instructions and communicating them to an end user is contemplated by this invention. Such media include, but are not limited to electronic storage media (*e.g.*, magnetic discs, tapes, cartridges, chips), optical media (*e.g.*, CD ROM), and the like. Such media can include addresses to internet sites that provide such instructional materials.

EXAMPLES

[0137] The following examples are offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

Example 1

A novel assay for monitoring internalization of antibodies using metal-chelating liposomes.

Introduction

[0138] Antibodies and antibody fragments can deliver a variety of agents such as drugs, genes, toxins or radionuclides to target cells expressing the antigen. Endocytosis of the antibody fragment to the interior of the cell can in many cases increase the therapeutic effect of the therapeutic agent. A major advantage of receptor mediated endocytosis as a

drug delivery route is that therapeutic agents can be delivered specifically into target cells that overexpress the receptor and thereby increase efficacy while reducing systemic toxicity. For example, anti-ErbB2 antibodies have been used to target doxorubicin containing liposomes (Park *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 1327-1331) or Pseudomonas exotoxin (immunotoxin) into the interior of tumor cells (King *et al.* (1996) *Semin Cancer Biol* 7: 79-86).

[0139] The majority of antibodies generated by immunization do not bind to receptors in a manner that triggers endocytosis (Hurwitz *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 3353-3357). Thus it is desirable to be able to screen for antibodies that can elicit the desired response. The most common method for monitoring internalization of ligands and antibodies into cells involves radiolabeling of the protein and employs a low pH buffer (usually glycine-HCl pH 2.8) in order to dissociate surface bound antibody. However, reports from several laboratories indicate that this buffer in some cases only partially dissociates antigen-antibody complexes and therefore can introduce major inaccuracies in internalization experiments (Matzku *et al.* (1990) *Br. J. Cancer Suppl* 10: 1-5; Tsaltas and Ford (1993) *Immunol Invest*, 22: 1-12). Alternatively, antibodies can be biotinylated with NHS-SS-biotin and incubated with live cells. Following specific reduction of biotin groups on cell surface bound antibody with reducing agent, internalization may be quantified by immunoblotting (Liu *et al.* (1998) *Cancer Res* 58: 4055-4060). However, the accuracy of this method also relies on complete removal of biotin from the cell surface bound antibody. Another drawback of these methods is that they rely on laborious labeling of each ligand protein allowing only a limited number of different antibodies to be screened for internalization. The direct labeling of the protein often also results in loss of binding activity of the antibody or ligand. In addition, the stringent conditions that are required to strip the cell surface in these procedures may affect cell viability.

[0140] In this example we report a novel assay for internalization termed "Chelated Ligand Internalization Assay" (CLIA). Liposomes were formulated with Ni^{2+}-NTA-lipids capable of binding $(His)_6$-tagged proteins. The NTA containing liposomes were loaded with fluorescent dye and mixed with a number of different $(His)_6$ containing anti-receptor antibody fragments or intact antibody complexed to $(His)_6$-tagged Protein A. For those antibodies that bind weakly to protein A, protein G can be used instead. Internalization of the scFv/liposome/receptor complex was detected by fluorescence microscopy or

fluorimetry after gentle removal of the liposomes from cell surface bound complexes using EDTA. Cellular uptake of the complex was dependent on the specificity of the scFv as well as the ability of the antibody fragment to trigger internalization requiring <50,000 receptors/cell for detection. The assay requires only minute amounts of antibody fragment and was also performed using crude, unpurified supernatants of *E coli* expressing the antibody fragment.

Methods

Liposome preparation

[0141] Liposomes are prepared from 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) and cholesterol (6:4 molar ratio) and varying amounts of NTA-DOGS (Avanti Lipids; 0.5-5 mol. % of POPC amount) by lipid film hydration in solution containing 35 mM 8-hydroxypyrene-1,3,5-trisulfonic acid sodium salt (HPTS) (Molecular Probes Inc., Oregon, USA), pH 7.0, adjusted to the osmolality of 280 mmol/kg with NaCl. In some cases, the liposomes were made using 1,2-distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC) instead of POPC, and the lipophilic fluorescent labels $DiIC_{18}(3)$-DS and $DiIC1_8(5)$-DS (0.1-1 mol.% of the liposome phospholipid) were used instead of HPTS, with the same results. In these cases, hydration is at 55-60 °C in an aqueous 140 mM NaCl buffered with 5-20 mM 4-(N-2-hydroxyethyl-piperasino)ethylsulfonic acid sodium salt (HEPES) to pH 7.2-7.4. After hydration, liposomes are formed by membrane extrusion through two 0.1 μm polycarbonate membranes (Corning) as described (Kirpotin *et al.* (1997) *Biochemistry* 36: 66-75). Un-incapsulated HPTS was then separated by gel-filtration on a cross-linkled dextran beads (SEPHADEX G-25) (Pharmacia Amersham, New Jersey, USA) column.

ScFv expression and purification

[0142] The scFv's C6.5 (anti-HER2) (Schier *et al.* (1995) *Immunotechnology*, 1: 73-81), and F5 (anti-HER2) (PCT/US99/07395) were cloned into expression vector pUC119mycHis (Schier *et al.* (1995) *Immunotechnology*, 1: 73-81) and expressed in *E. coli* TG1. Briefly, 0.75 L of media (2xTY with 100 μg/mL ampicillin and 0.1% glucose) was inoculated 1/100 with an overnight culture. The culture was grown to an A_{600} of 0.9 and expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a

final concentration of 0.5 mM. The culture was then incubated at 30°C for an additional four hours.

[0143] Cells were harvested by centrifugation (4000 x g, 20 min.) and the pellets were resuspended in periplasmic extraction buffer (PPB) (30 mM Tris, 2 mM EDTA, 20% sucrose, pH=8) containing 100 µg/mL DNase and incubated on ice for 30 min. The bacteria were pelleted by centrifugation at 5000 x g for 20 min. The pellets were resuspended in osmotic shock buffer (5 mM MgSO4) and incubated for another 20 min on ice. The bacteria were pelleted (7000 x g, 20 min.) and supernatants from the PBB and $MgSO_4$ fractions were combined and cleared by centrifugation at 10000 rpm for 30 min at 4°C. The resulting solution was dialyzed in PBS (two changes, 4 L PBS pH 8). All molecules were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) (Qiagen) followed by desalting on a cross-linked dextran gel exclusion PD10 column (Pharmacia Amersham , New Jersey, USA). Protein concentrations were determined spectrophotometrically from the absorbance at 280 nm (A_{280} using the absorbance value of 1.4 for 1 mg/mL protein solution in a 1 cm cuvette.

[0144] For induction in microtitre plates, wells containing 150 µl of 2 x TY containing 100 µg/ml ampicillin and 0.1% glucose were inoculated with an overnight culture of *E coli* TG1 with the plasmid containing the scFv. Cultures were grown to an A_{600} ~ 1, and scFv expression induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM. Bacteria were grown overnight at 30°C, the cells removed by centrifugation, and 30 µL of the supernatant containing scFv used directly in the internalization assay.

Preparation of Protein A-$(His)_6$ conjugate

[0145] Protein A was conjugated to the $(His)_6$-containing peptide CGGGHHHHHH (SEQ ID NO:2) using the bifunctional reagent *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysulfosuccinimide ester (Sulfo-MBS; Pierce). 2 mg of Protein A was treated with 0.2 mg Sulfo-MBS in PBS for one hour at room temperature. Unreacted Sulfo-MBS was removed by gel filtration and the protein then reacted with 0.2 mg of the $(His)_6$-containing peptide in PBS for one hour at room temperature and unreacted peptide was removed by gel-filtration.

Assay procedure

[0146] Human breast cancer cells SKBR3, SKOV3, BT474, MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468 (American Type Culture Collection, ATCC) were grown to 80-90% confluence in the media type recommended by ATCC supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and harvested by trypsinization using standard techniques. Cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cells/well and incubated overnight at 37°C. The next day, NTA liposomes (0 – 1 mM total phospholipid) were incubated for 4 hours with the cells along with the $(His)_6$-containing ligand (20 μg/mL unless otherwise indicated) in 100 micro-L tissue culture media supplemented with 10 % FCS. When supernatants of induced *E. coli* cultures were used in the assay, 65 μL of cell culture media containing 10 % serum and NTA-liposomes were mixed with 35 μL of supernatants. To test the internalization of monoclonal antibodies, which do not contain a $(His)_6$–tag, 10 μg/mL of Protein A-$(His)_6$ was used to complex 40 μg/mL of a recombinant, humanized anti-HER2 monoclonal IgG HERCEPTIN (Genentech, Inc. California, USA).. To strip cell surface of the liposomes linked within un-internalized liposome/ligand complexes, cells were washed 3-4 times with 170 μL PBS containing 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, and 1 mM EDTA or with 250 mM phosphate buffered imidazole (pH 7.4). Cells were lysed in 50 μL 0.01 M NaOH before reading fluorescence at 460/530 nm in a RC4 microfluorimeter (BIOTEK).

Cell surface binding measurements

[0147] Cells were harvested by trypsinization using standard techniques. The F5 was incubated in triplicate with 1 x 10^5 cells in 96-well plates with V-shaped wells for two hours at concentrations indicated. Cell binding was performed at room temperature in PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide in a total volume of 200 μL. After two washes with 200 μL PBS, bound scFv was detected by the addition of 100 μL (10 μg/mL) of FITC labeled anti-FLAG MAb M1 (Sigma). After a 30 minute incubation at room temperature, the cells were washed twice and resuspended in PBS containing 4 % paraformaldehyde. Fluorescence was measured by flow cytometry in a FACSort (Becton-Dickinson) and median fluorescence (F) was calculated using Cellquest software (Becton-Dickinson) and the background fluorescence subtracted.

Results

Liposome formulation

[0148] Liposomes were formulated with 0, 0.5, 2 and 5 mol. % NTA-lipid and tested for internalization into SKBR3 tumor cells using an anti-ErbB2 scFv antibody (F5) engineered to contain a C-terminal $(His)_6$-tag. After four hours of internalization, cells were washed with 1 mM EDTA in PBS, lysed in base and the fluorescence read in a microfluorimeter. The intensity of the signal increased dramatically with increasing NTA-lipid composition for the range tested (Figure 1). The internalization was abolished when the scFv did not contain a his-tag or when liposomes were formulated without NTA containing lipid (Figure 2). To expand the utility of the assay to full-length monoclonal antibodies, Protein A was conjugated to the peptide CGGGHHHHHH (SEQ ID NO:3) using the bi-functional reagent sulfo-MBS which cross links the thiol group in the peptide to primary amines on Protein A. SDS-PAGE analysis confirmed successful conjugation of multiple peptides per Protein A molecule as demonstrated by an apparent shift in molecular weight of approximately 10 kDa (results not shown). When SKBR3 cells were co-incubated with Protein A-$(His)_6$ and the monoclonal anti-ErbB2 antibody Herceptin, NTA-liposomes were specifically endocytosed (Figure 2). Protein A-$(His)_6$ or Herceptin alone did not increase the uptake of NTA-liposomes, indicating that it is mediated by the Herceptin/Protein A-$(His)_6$ complex (Figure 2).

Assay optimization

[0149] The effect of increasing the liposome concentration in the reaction was investigated using the anti-ErbB2 scFv antibody (F5) or an irrelevant antibody binding a vascular antigen not expressed on SKBR3 cells. The cellular uptake of liposomes was proportional to the concentration of liposomes in the reaction. In the 0-800 μM phosholipid range tested, the non-specific antibody did not internalize liposomes above background (Figure 4).

Sensitivity of the assay

[0150] The sensitivity of the assay was tested with varying concentrations of several antibodies to different epitopes on SKBR3 cells, FIGURE 4. Only the F5 scFv antibody (anti-ErbB2) resulted in internalization of the complex. Interestingly, the irrelevant antibody

(4G7) and the non-internalizing anti-ErbB2 antibody (C6.5) did not mediate internalization of the NTA-liposomes (Figure 5). This s is consistent with previous results we obtained by confocal microscopy analysis of the internalization F5 and C6.5 The detection level of the assay with the F5 scFv on SKBR3 cells was below 1 μg/mL of purified antibody.

Assay does not require antibody purification

[0151] Because of the specific interaction of the $(His)_6$-tag with NTA on the liposome, the assay should permit the use of unpurified scFv, allowing a large number of scFv molecules to be assayed for internalization. To test this, soluble scFv expression was induced from *E. coli* in 96-well culture plates and the supernatant tested for activity on live SKBR3 cells using 5 mol.% NTA liposomes. Previous experiments (results not shown) had determined that SKBR3 cells tolerate as much as 50% bacterial culture supernatant for up to 24 hours. Supernatants of E coli expressing the F5 scFv were mixed 1:3 with cell culture media containing 10% serum and antibiotics as well as 500 μM NTA liposomes and incubated with live SKBR3 cells. Results were similar to results obtained with 20 μg/mL of purified scFv with similar specificity (Figure 6).

Profiling tumor cell lines for antibody internalization

[0152] The scFv antibody to EGFR (C10) was used to profile a panel of breast cancer cell lines and CHO transfectants (Figure 7). Only the cell line MD-MDA 468 and CHO cells transfected with EGFR internalized significant amounts of NTA-liposomes. The specificity of the assay is exemplified with C10 internalizing into CHO and CHO transfected with EGFR. Uptake of the fluorescent NTA liposomes into the EGFR transfected CHO cells was 165 times that of the untransfected.

The profile of F5 internalization largely correlated with cell surface expression of ErbB2 as determined by FACS with the F5 antibody (Figure 8). However, the cell line SKOV3 did not take up as much liposome as would be expected from its cell surface expression level of ErbB2. The poor internalization of ErbB2 into this cell line has been described previously (Kirpotin *et al.* (1997) *Biochemistry* 36: 66-75). When total uptake into the same panel of cell lines was determined using F5-liposomes (in which the antibody is covalently coupled to the lipid via non-cleavable bond) the discrepancy with F5 scFv binding by FACS was less pronounced. This is most likely due to cell surface bound

F5-liposomes, and thus when there is a covalent, non-cleavable bond between the ligand and the effector, this assay does not effectively measure internalization.

Example 2.

Lipid-NTA conjugates for epitope-mediated non-covalent conjugation of ligands to liposomes.

6-(1,2-Dipalmitoylglycerol-3-succinyl)amido-2-(N,N-dicarboxymethylamino)-hexanoic acid nickel salt (DPGS-NTA-Ni).

[0153] *6-amino-2-(N,N-bis-carboxymethylamno)hexanoic acid* (**I**) was synthesized from N(epsilon)-CBZ-lysine and bromoacetic acid according to Schmitt *et al.* (1994), *J. Amer. Chem. Soc.* 116:8485-8491, except that removal of carbobenzoxy protecting group was in 4 M HBr/glacial acetic mixture overnight, resulting in the recovery of **I** as a hydrobromide.

[0154] *1,2-dipalmitoyl-3 -succinyl-rac-glycerol* (**II**) was prepared from 1,2-dipalmitoyl-glycerol, succinic anhydride, and 4-pyrrolidinopyridine according to Silvius & Leventis (1987), *Biochemistry*, 26:3297.

[0155] *DPG-NTA-Ni* (**III**) : 335 mg (0.5 mmol) of **II** was dissolved in 2.5 mL of anhydrous chloroform and 1.25 ml of anhydrous dimethoxyethane. With stirring, 66 mg (0.575 mmol) of N-hydroxysuccinimide were added, followed by the solution of 108 mg (0.525 mmol) of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in 0.6 ml chloroform. After 4 hour stirring at room temperature, the precipitated urea was filtered out, and the filtrate was brought to dryness under reduced pressure. The dry residue was suspended in the mixture of 1 ml chloroform and 3 ml of anhydrous methanol, and 250 mg of **I** hydrobromide were added, followed by 0.35 ml (5 mmol) of triethylamine. The mixture was brought to 50°C to effect dissolution of the suspended solid, and stirred at room temperature overnight. The mixture was diluted with 10 ml chloroform and washed 3 times with 40 ml of the 50% aqueous methanol containing 0.5 M NaCl. The chloroform layer was shaken with 0.26% aqueous nickelous sulfate hexahydrate, dried over anhydrous sodium sulfate, and brought to dryness in vacuum. The dry residue was dissolved in 2 ml hexane, and filtered through GF/C grass fiber filter (Whatman). The hexane was evaporated in vacuum to yield 0.334 g (66% of theory) of the product as a greyish-blue solid, readily soluble in hexane and chloroform.

TLC: Rf 0.16 (silica; $CHCl_3$-MeOH-H_20 65:25:4). The intended structure was confirmed by PMR.

6-(Cholesteryl-succinyl)amino-2-(N,N-bis-carboxymethylamino)-hexanoic acid nickel salt (Chol-NTA-Ni) (IV).

[0156] 244 mg of cholesteryl hemisuccinate (Sigma Chemical Co., USA) were reacted with N-hydroxysuccinimide and DCC, and further with compound I hydrobromide by the same method as described for compound III. Upon addition or the nickelous sulfate solution, a greenish paste formed. The paste was extracted several times with the chloroform-methanol mixture.(5:1 by vol.). The extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered through GF/C glass fiber filter, and brought to dryness in vacuum. Yield 119.5 mg (30% of theory) of a greenish solid, readily soluble in chloroform giving greenish-blue solution. TLC: Rf 0.12 (silica; $CHCl_3$-MeOH-H_20 65:25:4). The intended structure was confirmed by PMR.

6-(1,2-Distearoyl-sn-glycerophosphoryl-ethanolaminocarbonyl)-poly(oxyethylene)-oxycarbonyl)amino-2-(N,N-bis-carboxymethylamino)-hexanoic acid nickel salt (DSPE-PEG-NTA-Ni) (V)

[0157] 198 mg (0.0445 mmol) of distearoylphosphatidylethanolaminocarbonyl-poly(ethylene glycol)-propionic acid N-hydroxysuccinimidyl ester (NHS-PEG-DSPE, Shearwater Polymers, Alabama, USA) prepared from poly(ethylene glycol) with mol. weight 3,400 were dissolved in the mixture of 1 mL of anhydrous ethanol and 0.5 ml of anhydrous chloroform, mixed with the solution of 40.8 mg (0.120 mmol) of I hyrdobromide in 0.5 mL of anhydrous ethanol and 0.15 mL (1.08 mmol) of triethylamine, and stirred 2 hours at 60°C. The reaction mixture was brought to dryness and dissolved in 3 ml of 0.14 M aqueous NaCl. The mixture was clarified by centrifugation at 15,500xg for 5 min., and clear supernatant was brought to dryness in vacuum. The residue was dissolved in 2.5 ml of 0.144 M NaCl, pH was adjusted to 6.8 with 1 N NaCl, and 0.12 mL of 1 M $NiSO_4$ were added. The solution was chromatographed on a 13-mL column with cross-linked dextran beads (Sephadex G-75, Pharmacia Amersham, USA) using 0.144 M NaCl as eluent. The fractions appearing at the void volume (total 4 mL) were collected, and dried by lyophilization overnight. The lyophilized cake was extracted with the mixture of 2 ml anhydrous ethanol and 0.2 ml chloroform; the insoluble matter was removed by centrifugation, and the clear

solution was brought to dryness in vacuum. The residue was redissolved in 2 ml of ethanol containing 0.1 ml of chloroform, the solution clarified by centrifugation (15.5xg, 5 min), and brought to dryness in vacuum. Yield 92 mg (46% of theory). The bluish solid was soluble in in chloroform-methanol mixture (60:40 by vol.) and in water, giving light-blue solutions. The intended structure was confirmed by PMR.

Formulation into liposomes.

[0158] Compounds **III**, **IV**, **V** in the amount of 0.5 mol.%, 1 mol.%, 2 mol.% or 5 mol.% of the liposome lipid were formulated into small unilamellar liposomes prepared from POPC and cholesterol (3:2 molar ratio), containing fluorescent reporter HPTS, and tested in a CLIA assay using HER2-overexpressing SKBR-3 cells and a recombinant anti-HER2 scFv F5 with a hexahistidine tag as described in the Example 1 above. The results were similar to those described in Example 1 using DOGS-NTA-Ni.

Example 3

Intracellular delivery of a cytotoxic liposome using Ni-NTA-PEG-DSPE and His-tagged scFv antibody.

[0159] Liposomes having lipid composition of DSPC, cholesterol, methoxy-poly(ethylene glycol)-DSPE derivative (PEG(2000)-DSPE, PEG mol. weight 2,000; Avanti Polar Lipids, Alabama, USA), and compound **V** (Ni-NTA-PEG-DSPE) in the molar ratio of 3:2:0.05:0.06 were prepared by lipid film hydration and polycarbonate track-etched membrane (0.1 μm, 10 times) extrusion at 55°C in 0.25M aqueous ammonium sulfate. After removal of unencapsulated ammonium sulfate and bringing the liposomes into 5% dextrose, 5 mM morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer, pH 5.5 (adjusted with sodium hydroxide) by gel-chromatography using cross-linked dextran beads (Sephadex G-75, Pharmacia, New Jersey, USA), the liposomes were mixed with 10 mg/ml vinorelbine bitartrate solution USP (GlaxoWellcome, USA) to achieve drug/lipid molar ratio of 5:1 and incubated at 55°C for 30 min. to achieve drug encapsulation. Unencapsulated vinorelbine was removed by gel-chromatography as above. Typically >80% of the drug remained encapsulated into so obtained Ni-NTA-PEG-DSPE-containing liposomes. Control liposomes were made substituting PEG-DSPE for Ni-NTA-PEG-DSPE,and were loaded with vinorelbine in a similar way. Liposomes containing covalently bound 4G7 were prepared by

incubating vinorelbine-loaded control liposomes with 4G7 conjugated to an amphipathic linker, maleimido-PEG-DSPE (Papahadjopoulos, *et al.* US Pat. No. 6,210,707). Bovine endothelial cells (BEND-3) expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor were incubated (37°C, 6 hours) in the growth medium containing 0.03-90 microgram/mL of the free (*i.e.* non-encapsulated) vinorelbine, or vinorelbine encapsulated in the Ni-NTA-PEG-DSPE liposomes with or without 0.02 mg/mL of the internalizing anti-VEGFR scFv antibody 4G7 having a hexahistidine tag and a terminal cysteine group.The cells were post-incubated in the growth medium without the drug for another 72 hours, and the viability of the cells was determined by a conventional tetrasolium (MTT) assay. The median cytotoxic dose, i.e. the dose that reduces the cell viability to 50% of non-treated control (IC_{50}), was as follows: free vinorelbine, 0.67 μg/mL; vinorelbine in Ni-NTA-PEG-DSPE liposomes without 4G7 scFv, >100 μg/mL (IC_{50} not reached); control liposomes + 4G7 scFv, >100 μg/mL (IC_{50} not reached); vinorelbine in liposomes with covalently bound 4G7, 2.5 μg/ml; Ni-NTA-PEG-DSPE liposomes + 4G7 scFv, 1.4 μg/mL. Thus, we observed specific delivery of vinorelbine into vascular epitelial cells by Ni-NTA-PEG-DSPE-containing liposomes coupled to a receptor-specific scFv via a hexahistidine tag.

Example 4.

Targeted delivery of methotrexate into cancer cells by Ni-NTA-PEG-DSPE liposomes and a hexahistidine-tagged antibody

[0160] Liposomes containing methotrexate were made from DSPC, cholesterol, and PEG(2000)-DSPE (molar ratio, 3:2:0.025) and 100 mg/mL solution of methotrexate sodium in 10 mM buffer solution of N-4-hydroxyethyl-piperazino-ethylsulfonic acid (HEPES) sodium salt, pH 7.2, by a reverse phase evaporation method of Szoka and Papahadjopoulos (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4134-4178, 1978). Unencapsulated methotrexate was separated by gel-chromatography using 20 mM HEPES, 144 mM NaCl (HBS buffer) as eluate. Resulting liposomes containing 150 ± 7 mg methotrexate per mmol of liposomal phospholipid, were incubated (55°C, 30 min) with Ni-NTA-PEG-DSPE, dissolved in HBS buffer, in the amount of 2 mol.% of the liposomal phospholipid. No drug leakage from the liposomes was detected during this incubation. Median cytotoxic dose (IC_{50}) of these liposomes, with or without 4G7 scFv, as well as of the free methotrexate, was determined in the culture of BEND3 cells as described in the Example 3, to be as follows: free

methotrexate, >90 μg/ml (not reached); methotrexate in Ni-NTA-PEG-DSPE-liposomes without antibody, >90 μg/ml (not reached); methotrexate in Ni-NTA-PEG-DSPE-liposomes in the presence of hexahistidine-tagged 4G7 scFv, 9 μg/ml. Thus, incorporation of Ni-NTA-PEG-DSPE into pre-formed methotrexate liposomes produced a methotrexate-carrying liposome that formed an internalizable construct with a His-tagged antibody.

Example 5.

Loading of cytotoxic drugs into liposomes containing various Ni-NTA lipids.

[0161] The nature of Ni-NTA lipid in the liposomes had an unexpected effect on the efficiency of cytotoxin encapsulation by a transmembrane gradient method. Liposomes with entrapped 0.25 M ammonium sulfate were prepared using the lipid matrix composed of DSPC, cholesterol (Chol), and PEG-DSPE in the molar ratio 3:2:0.03 (Preparation A), DSPC, Chol, PEG-DSPE, and Ni-NTA-DOGS in the molar ratio 3:2:0.03:0.06 (Preparation B), and DSPC, Chol, and Ni-NTA-PEG-DSPE (compound **V**) in the molar ratio 3:2:0.03:0.06 (Preparation C). After bringing the liposomes into 5 % dextrose, % mM MES-Na buffer pH 5.5 (MES-Dextrose), the liposomes were incubated (55°C, 30 min) with vinorelbine (VNR) or doxorubicin (DOX) at the input drug/lipid ratio of 150 mg of the drug per mmol of the liposome phospholipid. The liposome were chilled in ice, and separated from unencapsulated drug by gel-chromatography using MES-Dextrose buffer. The concentration of liposome phospholipid was determined spectrophotometrically by the molybdate-ascorbic acid method following acid digestion of the liposomes. The concentration of the liposome drug was determined spectrophotometrically after solubilization of the liposomes in 80% aqueous methanol (vinorelbine, absorbance at 370 nm), or 70% aqueous isopropanol- 0.1M HCl (doxorubicine, absorbance at 485 nm) by comparison to standard curves. The loading efficiency was calculated as percent encapsulated drug of total added for loading. The results are shown in Table 1.

Table 1. Results for drug loading in liposomes.

Preparation	Drug	Drug loading, mg/mmol of phospholipid	Loading efficiency, %
DSPC/Chol/PEG-DSPE (A)	VNR	150.2 ± 4.9	100.2 ± 3.4
DSPC/Chol/PEG-DSPE/Ni-NTA-DOGS (B)	VNR	13.6 ± 1.2	9.±0.9
DSPC/Chol/PEG-DSPE/Ni-NTA-PEG-DSPE (C)	VNR	149.6 ± 5.8	99.8 ± 4.0
DSPC/Chol/PEG-DSPE (A)	DOX	159.4 ± 6.1	106.3 ± 14.4
DSPC/Chol/PEG-DSPE/Ni-NTA-DOGS (B)	DOX	40.4 ± 4.3	26.9 ± 3.0
DSPC/Chol/PEG-DSPE/Ni-NTA-PEG-DSPE (C)	DOX	138.2 ± 10.2	92.2 ± 8.0

[0162] The nature of Ni-NTA-lipid had little effect on the encapsulation by direct sequestration of the lipid hydration medium (HPTS, MTX), such as reverse phase evaporation. Direct sequestration, however, is inefficient (MTX loading efficiency 28.7-29.5 %), compared to gradient methods that provide almost quantitative encapsulation. Thus, unexpectedly, only the polymer-linked NTA lipid provided for the efficient loading of the drugs by an advantageous, transmembrane-gradient-based method.

[0163] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of identifying ligands that are internalized into a cell, said method comprising:

i) contacting said cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand;

ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of said cell; and

iii) detecting the presence of the reporter within said cell, whereby the presence of the reporter within said cell indicates that said ligand is internalized into said cell.

2. The method of claim 1, wherein said contacting comprises contacting said cell with a ligand comprising an epitope tag and contacting said cell with a reporter comprising a moiety that binds said epitope tag.

3. The method of claim 1, wherein said ligand is a ligand that binds to a cell surface receptor.

4. The method of claim 1, wherein said ligand is a peptide.

5. The method of claim 1, wherein said ligand is selected from the group consisting of an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, and a growth factor.

6. The method of claim 1, wherein said ligand is a ligand produced in a phage display library.

7. The method of claim 6, wherein said phage display library uses a filamentous phage.

8. The method of claim 1, wherein said reporter is non-covalently coupled to a ligand by an epitope tag.

9. The method of claim 1, wherein said reporter is non-covalently coupled to a ligand by an epitope tag selected from the group consisting of a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, and a DYKDDDDK epitope.

10. The method of claim 1, wherein said reporter is a reporter selected from the group consisting of an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a nanoparticle, and a liposome.

11. The method of claim 1, wherein said epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporter is a liposome comprising a nitrilotriacetic acid (NTA) lipid.

12. The method of claim 1, wherein said ligand is an antibody and said epitope tag is attached to said antibody through a covalent linkage to protein A.

13. The method of claim 1, wherein said cell is a cancer cell.

14. The method of claim 1, further comprising isolating the ligand that is internalized into said cell.

15. The method of claim 14, wherein said isolating comprises determining the amino acid sequence of a ligand that is internalized by said cell or determining the sequence of a nucleic acid encoding said ligand.

16. A method of screening a cell for a receptor that internalizes a ligand, said method comprising:

i) contacting said cell with an effector non-covalently coupled to a ligand;

ii) dissociating the effector from the ligand and removing dissociated effector from the surface of said cell; and

iii) detecting the presence of the effector within said cell, whereby the presence of the effector within said cell indicates that said cell internalizes said ligand.

17. The method of claim 16, wherein said ligand is a ligand known to be internalized by a cell.

18. The method of claim 16, wherein said ligand is a member of a library of ligands.

19. The method of claim 18, wherein said library of ligands comprises at least 1000 different members.

20. The method of claim 16, wherein said ligand is a peptide.

21. The method of claim 16 wherein said ligand is selected from the group consisting of an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, and a growth factor.

22. The method of claim 16, wherein said ligand is a ligand produced in a phage display library.

23. The method of claim 22, wherein said phage display library uses a a filamentous phage.

24. The method of claim 16, wherein said effector is non-covalently coupled to a ligand by an epitope tag.

25. The method of claim 16, wherein said effector is non-covalently coupled to a ligand by an epitope tag selected from the group consisting of a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, and a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope.

26. The method of claim 16, wherein said effector is a reporter selected from the group consisting of an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a nanoparticle, and a liposome.

27. The method of claim 16, wherein said epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said effector is a liposome comprising a nitrilotriacetic acid (NTA) lipid or an iminodiacetic acid (IDA) lipid.

28. The method of claim 16, wherein said ligand is an antibody and said epitope tag is attached to said antibody through a covalent linkage to protein A or protein G.

29. The method of claim 16, wherein said cell is a cancer cell.

30. The method of claim 29, wherein said cell is a cell known to overexpress a receptor.

31. The method of claim 16, further comprising isolating the cell that internalizes said ligand..

32. A ligand library comprising a plurality of members said members comprising ligands and epitope tags where the ligands vary between members of the library and the epitope tags are constant.

33. The ligand library of claim 32, wherein said ligands are non-covalently coupled to reporters through the epitope tags.

34. The library of claim 33, comprising at least 10^5 different ligands.

35. The library of claim 33, wherein said ligands are peptides.

36. The method of claim 33, wherein said ligands are selected from the group consisting of an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, an enzyme, a hormone, and a growth factor.

37. The method of claim 33, wherein said ligands are ligands produced in a phage display library.

38. The method of claim 37, wherein said phage display library uses a filamentous phage.

39. The library of claim 33, wherein said reporters are non-covalently coupled to said ligands by an epitope tag selected from the group consisting of a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, and a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope.

40. The library of claim 33, wherein said reporters are reporters selected from the group consisting of an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a nanoparticle, and a liposome.

41. The library of claim 33, wherein said epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporters are liposomes comprising a nitrilotriacetic acid (NTA) lipid or an iminodiacetic acid (IDA) lipid.

42. The library of claim 33, wherein said ligands are antibodies and said epitope tags are attached to said antibodies through a covalent linkage to protein A or protein G.

43. The library of claim 33, wherein members of said library are polyvalent for said ligands.

44. A construct for screening a cell for an internalizing receptor, said construct comprising a ligand non-covalently coupled to an effector through an epitope tag.

45. The construct of claim 44, wherein said ligand is a peptide.

46. The construct of claim 44, wherein said ligand is selected from the group consisting of an scFv, an Fv, an Fab, monoclonal antibody, a cytokine, an enzyme, a hormone, and a growth factor.

47. The construct of claim 44, wherein said ligand is a ligand produced in a phage display library.

48. The method of claim 47, wherein said phage display library uses a filamentous phage.

49. The construct of claim 44, wherein said reporter is non-covalently coupled to said ligands by an epitope tag selected from the group consisting of a His-tag, a Flag-tag, an HA-tag, a myc-tag, and a DYKDDDDK (SEQ ID NO:1) epitope.

50. The construct of claim 44, wherein said reporter a reporter selected from the group consisting of an enzyme, a colorimetric label, a fluorescent label, a luminescent label, a radioactive label, a nanoparticle, and a liposome.

51. The construct of claim 44, wherein said epitope tag is a hexahistidine (His_6) tag and said reporter is a liposome comprising a nitrilotriacetic acid (NTA) lipid lipid or an iminodioacetic acid (IDA) lipid.

52. The construct of claim 44, wherein said ligand is an antibodies and said epitope tag is attached to said antibody through a covalent linkage to protein A or protein G.

53. The construct of claim 44, wherein said construct is polyvalent for said ligand.

54. A kit for identifying an internalizing cell or for screening a ligand that is internalized by a cell, said kit comprising a container containing a ligand library of any one of claims 32 through 43.

55. The kit of claim 54, further comprising instructional materials teaching the use of said library to identify a cell that internalizes a ligand or to identify a ligand that is internalized by a cell.

56. A method of identifying internalizing receptors, said method comprising:

i) contacting a cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand;

ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of said cell;

iii) detecting the reporter within said cell, if said reporter is present within said cell, whereby the presence of the reporter within said cell indicates that said ligand binds to an internalizing receptor and is internalized;

iv) identifying or recovering the ligand bound to the reporter within said cell; and

v) identifying a receptor that binds to said ligand.

57. The method of claim 56, wherein said identifying a receptor is by affinity chromatography or immunohistochemistry.

58. The method of claim 56, further comprising entering the identity of said receptor into a database of internalizing receptors.

59. A method of screening an agent for the ability to modulate internalization of a ligand into a cell, said method comprising:

i) contacting said cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand known to be internalized by said cell;

ii) contacting said cell with a test agent;

iii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of said cell; and

iv) detecting the reporter within said cell, if said reporter is present within said cell, whereby a difference in the amount of reporter internalized by the cell contacted with said test agent as compared to the amount of reporter internalized by said cell when contacted with a lower concentration of said test agent indicates that said test agent modulates the internalization of said ligand by said cell.

60. The method of claim 59, wherein said lower concentration is the absence of said test agent.

61. A method of screening an agent for the ability to modulate internalization of a ligand into a cell, said method comprising:

i) contacting said cell with a first concentration of said agent

ii) contacting said cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand known to internalize into said cell;

iii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of said cell; and

iv) detecting the reporter within said cell to obtain a first measurement;

v) contacting said cell with a second concentration of said agent wherein said second concentration is higher that said first concentration;

vi) repeating the steps ii) through iv) to obtain a second measurement; and

vii) comparing the first and the second measurements wherein when the first and the second measurements are different, the agent modulates internalization of said ligand in said cell.

62. A metal chelating lipid comprising a lipid, a hydrophilic polymer, and a metal chelation group attached to said hydrophilic polymer.

63. The metal chelating lipid of claim 62, wherein said chelation group is NTA.

64. The metal chelating lipid of claim 62, wherein said hydrophilic polymer comprises polynucleotide(ethylene glycol).

65. The metal chelating lipid of claim 62, wherein said lipid comprises DSPE.

66. A method of delivering an effector to a cell, said method comprising contacting said cell with:

a metal chelating lipid comprising a lipid, a hydrophilic polymer, and a chelation group attached to said hydrophilic polymer and capable of forming a chelation bond with an epitope tag, and an effector associated with said metal chelating lipid, and

a ligand comprising said epitope tag wherein said cell specifically binds and optionally, internalizes, said ligand.

67. The method of claim 66, wherein said lipid comprises a liposome and said liposome contains or is complexed with said effector.

68. The method of claim 66, wherein said cell is a cancer cell.

69. A composition comprising

a lipid, a hydrophilic polymer, and a chelation group attached to said hydrophilic polymer and capable of forming a chelation bond with an epitope tag;

a ligand comprising said epitope tag where said ligand binds and is optionally internalized by a cell; and

an effector associated with said lipid.

70. The composition of claim 69, wherein said lipid comprises a liposome and said liposome contains or is complexed with said effector.

71. The composition of claim 69, wherein said hydrophilic polymer comprised polynucleotide(ethylene glycol).

72. The composition of claim 69, wherein said lipid comprises DSPE.

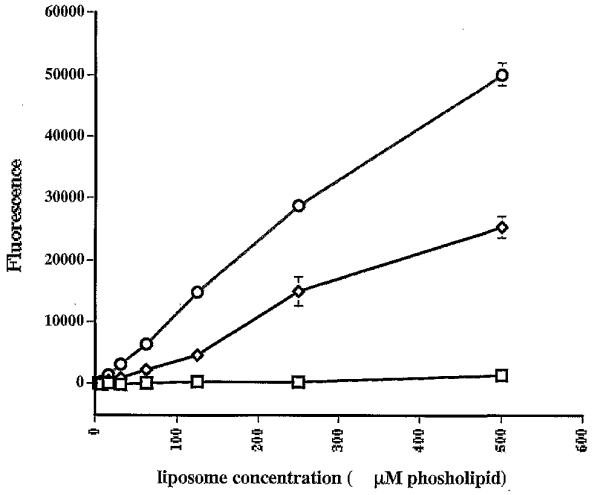

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fluorescence
0
100
200
300
400
500
600
liposome concentration (μM phosholipid)

Fig. 1

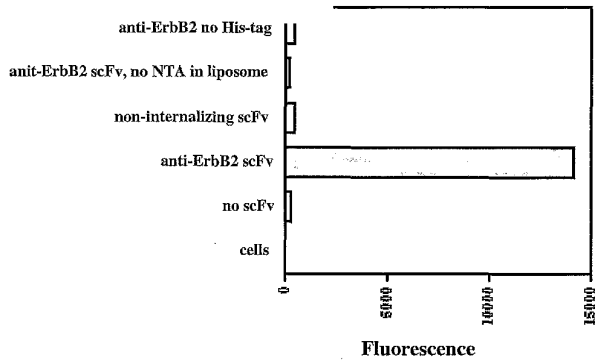

anti-ErbB2 no His-tag
anit-ErbB2 scFv, no NTA in liposome
non-internalizing scFv
anti-ErbB2 scFv
no scFv
cells
0
5000
10000
15000
Fluorescence

Fig. 2

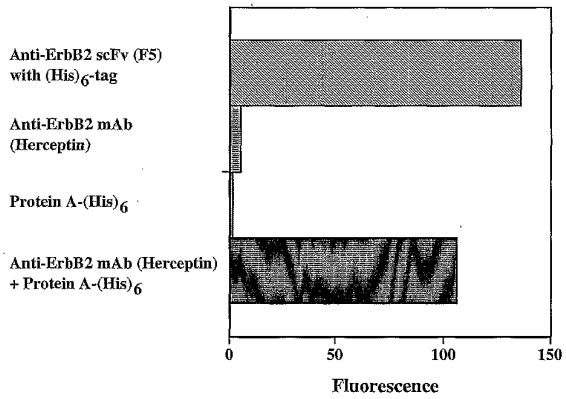

Anti-ErbB2 scFv (F5) with (His)6-tag
Anti-ErbB2 mAb (Herceptin)
Protein A-(His)6
Anti-ErbB2 mAb (Herceptin) + Protein A-(His)6
0
50
100
150
Fluorescence

Fig. 3

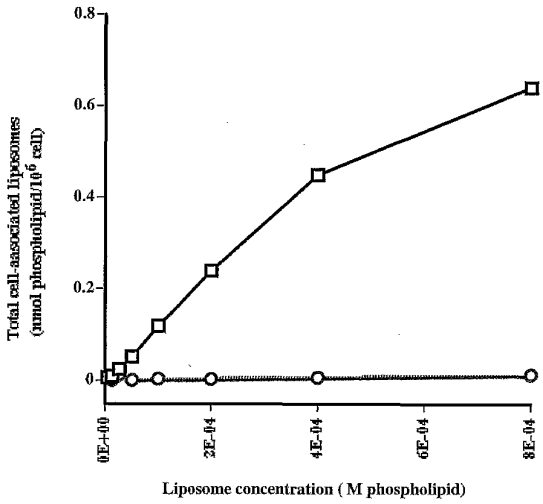

0.8
0.6
0.4
0.2
0
Total cell-associated liposomes (nmol phospholipid/10^6 cell)
0E+00
2E-04
4E-04
6E-04
8E-04
Liposome concentration (M phospholipid)

Fig. 4

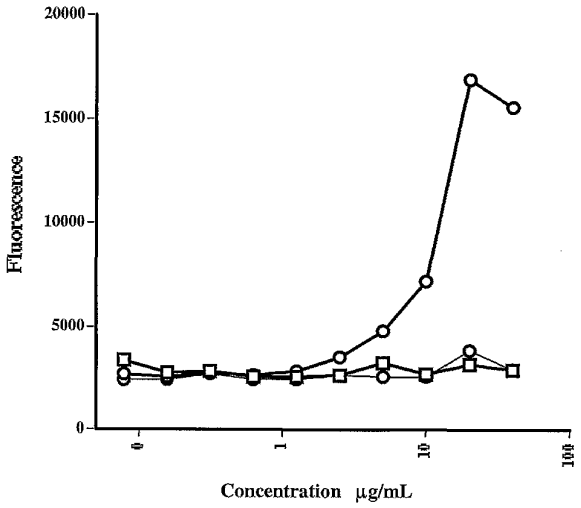

20000
15000
10000
5000
0
Fluorescence
0
1
10
100
Concentration μg/mL

Fig. 5

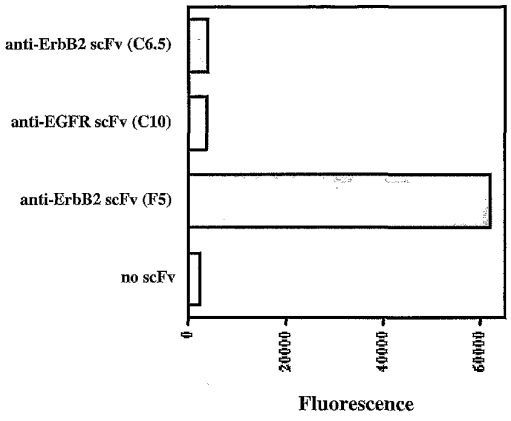

anti-ErbB2 scFv (C6.5)
anti-EGFR scFv (C10)
anti-ErbB2 scFv (F5)
no scFv
0
20000
40000
60000
Fluorescence

Fig. 6

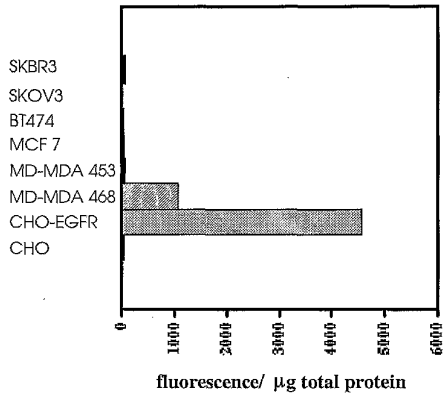

SKBR3
SKOV3
BT474
MCF 7
MD-MDA 453
MD-MDA 468
CHO-EGFR
CHO
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
fluorescence/ µg total protein

Fig. 7

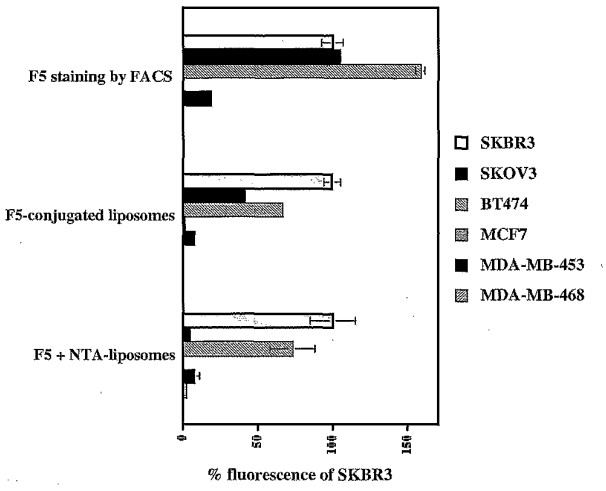

F5 staining by FACS
F5-conjugated liposomes
F5 + NTA-liposomes
SKBR3
SKOV3
BT474
MCF7
MDA-MB-453
MDA-MB-468
0
50
100
150
% fluorescence of SKBR3

Fig. 8

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1. Epitope tag.

DYKDDDDK

SEQ ID NO:2. Epitope tag

CGGGHHHHHH

SEQ ID NO: 3. Epitope tag

CGGGHHHHHH

【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
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/033044 A3

(51) International Patent Classification[7]: G01N 33/567

(21) International Application Number: PCT/US01/32311

(22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/241,279 18 October 2000 (18.10.2000) US

(71) Applicant: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 12th Floor, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-5200 (US).

(72) Inventors: MARKS, James, D.; 107 Ardmore Road, Kensington, CA 94707 (US). NIELSEN, Ulrik, B.; 143 Kent Street, Brookline, MA 82446 (US). KIRPOTIN, Dmitri, B.; 435 43rd Avenue, San Francisco, CA 94121 (US).

(74) Agent: BERLINER, Robert; Fulbright & Jaworski, L.L.P., 29th Floor, 865 S. Figueroa Street, Los Angeles, CA 90017-2571 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
16 January 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 02/033044 A3

(54) Title: METHODS OF HIGH-THROUGHPUT SCREENING FOR INTERNALIZING ANTIBODIES

(57) Abstract: This invention provides methods of identifying ligands that are internalized into a cell. The methods typically involve (i) contacting the cell with a reporter non-covalently coupled to a ligand; (ii) dissociating the reporter from the ligand and removing dissociated reporter from the surface of the cell; and (iii) detecting the reporter within said cell (if any is present) where the presence of the reporter within said cell indicates that the ligand binds to an internalizing receptor and is internalized.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/32311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : G 01 N 33/567
US CL : 435/7.21
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/4, 6, 7.1, 7.21, 174, 177;436/172, 546; 424/9.1, 9.34, 134.1, 143.1, 172.1, 174.1, 182.1; 530/387.1

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)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,251,392 B1 (HEIN ET AL) 26 June 2001 (26.06.2001), see col. 7, lines 35-62, cols. 11-12.	1, 3, 4, 5, 10, 16, 26, 44-46, 50
Y	US 2001/0008759 A1 (MARKS ET AL) 19 July 2001 (19.07.2001), see pp. 1-3, 5, 6-8, and 11.	1, 3-7, 10, 14, 15, 16-23, 31, 44-48, 50, 56-58.
Y	US 6,117,632 A (O'MAHONY) 12 September 2000 (12.09.2000), see column 5 lines 57-68, and columns. 6-7.	1, 2, 3, 4, 16, 20, 44, 45
E,A — E,Y	US 2002/0068272 A1 (LAROCCA ET AL) 6 June 2002 (06.06.2002), see abstract,and pages 2-4, 12, 13, and 18.	1, 3-7, 16,-23, 26, 44-47 ---------- 1,2, 3, 4-6, 13, 16, 17, 18-22, 29,30 31, 44-47, 50, 56. 58
E,Y	US 6,326,175 B1 (GUEGLER ET AL) 4 December 2001 (04.12.2001), see column 4, lines 14-34.	8,9, 12, 24, 25, 28, 44, 49, 52
Y	US 5,547,669 A (ROGERS ET AL) 20 August 1996 (20.08.1996), see column 19, lines 31-36.	11, 27, 51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 June 2002 (13.06.2002)	17 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Zachariah Lucas Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/32311

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. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claim Nos.: 36-38,48,54 and 55
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:
Please See Continuation Sheet

3. ☐ 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. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-15, 16-31, 44-47, 49-53, and 56-58.

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/32311

Continuation of Box I Reason 2:
Claims 36-38, and 48 are found unsearchable under Article 17(2)(a) because the claims are improperly dependant. Each of those four claims refers back to "the method of" a preceeding claim, but the claim referred to recites a product, not a method. Because these claims are improperly dependant, no meaningful search may be conducted. Claims 54 and 55 are also found to be unsearchable as depending, in part, from claims 36-38 above.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING
I. Claims 1-15, 16-31, 44-47, 49-53, and 56-58, drawn to a method of identifying ligands internalized by a cell, or method of screening a cell for or identifying a receptor that internalizes a ligand, or a ligand/effector construct used in the methods wherein the ligand in an antibody.

II. Claims 1-11, 13-15, 16-27, 29-31, 44-47, 49-51, 53, and 56-58, drawn to a method of identifying ligands internalized by a cell, or method of screening a cell for or identifying a receptor that internalizes a ligand, or a ligand/effector construct used in the methods where the ligand is a cytokine or a growth factor.

III. Claims 32-35 and 39-43 drawn to a ligand library wherein the ligand is an antibody.

IV. Claims 32-35 and 39- 41, and 43 drawn to a ligand library wherein the ligand is an enzyme.

V. Claims 32-35 and 39-41, and 43 drawn to a ligand library wherein the ligand is a cytokine, hormone, or growth factor.

VI. Claims 59-61, drawn to a method of screening an agent for the ability to modulate ligand internalization wherein the ligand is an antibody.

Vii. Claims 59-61, drawn to a method of screening an agent for the ability to modulate ligand internalization wherein the ligand is an enzyme.

VIII. Claims 59-61, drawn to a method of screening an agent for the ability to modulate ligand internalization wherein the ligand is a cytokine, hormone, or growth factor.

IX Claims 62-65, drawn to a metal chelating lipid.

X. Claims 69-72, drawn to a composition comprising a metal chelating lipid, a ligand, and an effector, and a method of using the composition.

These Groups lack unity for the reason listed in the PCT Invitation to Pay Additional Fees mailed May 10, 2002.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN-CAPLUS, DGENE, SCISEARCH, MEDLINE, CANCERLIT, BIOSIS
search terms- Ligand, hormone, chemokine, internalize, endocytosis, uptake, antigen, immunogen, tag, label, marker, reporter, effector, nanoparticle, liposome, covalent, noncovalent, bound, bind

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/48	Ｇ０１Ｎ 33/48	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｙ	
Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/58	Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｂ	
// Ａ６１Ｋ 31/519	Ｇ０１Ｎ 33/58	Ｚ	
	Ａ６１Ｋ 31/519		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 マークス、ジェームズ、ディー.
アメリカ合衆国 ９４７０７ カリフォルニア州 ケンジントン アドモア ロード １０７
(72)発明者 ニールセン、アルリク、ビー.
アメリカ合衆国 ８２４４６ マサチューセッツ州 ブルックリン ケント ストリート １４３
(72)発明者 カーポティン、ドミトリ、ビー.
アメリカ合衆国 ９４１２１ カリフォルニア州 サンフランシスコ フォーティーサード アベニュー ４３５

Ｆターム(参考) 2G045 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 FA37 FB03 FB07
4B063 QA18 QA20 QQ08 QQ79 QR48 QR54 QR66 QS15 QS33 QX02 QX07
4C076 AA19 BB11 CC27 EE17 EE51 EE59 FF11 FF68
4C084 AA02 AA03 AA17 AA27 BA31 BA42 BA44 CA59 MA05 MA66 NA10 NA13 ZB26
4C086 AA01 AA02 CB09 MA03 MA05 MA66 NA10 NA13 ZB26

专利名称(译)	高通量筛选具有内在化功能的抗体的方法		
公开(公告)号	JP2004526940A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002536414	申请日	2001-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	マークスジェームズディー ニールセンアルリクビー カーポティンドミトリビー		
发明人	マークス、ジェームズ、ディー. ニールセン、アルリク、ビー. カーポティン、ドミトリ、ビー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K9/127 A61K31/519 A61K45/00 A61K47/34 A61P35/00 C12Q1/02 C40B30/04 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5011 C40B30/04 G01N33/5008 G01N33/5432 G01N33/566 G01N33/6845 G01N33/6854 G01N33/6863		
FI分类号	G01N33/50.ZNA.Z A61K9/127 A61K45/00 A61K47/34 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/566 G01N33/577.B G01N33/58.Z A61K31/519		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB07 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR66 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QX02 4B063/QX07 4C076/AA19 4C076/BB11 4C076/CC27 4C076/EE17 4C076/EE51 4C076/EE59 4C076/FF11 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/AA27 4C084/BA31 4C084/BA42 4C084/BA44 4C084/CA59 4C084/MA05 4C084/MA66 4C084/NA10 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB09 4C086/MA03 4C086/MA05 4C086/MA66 4C086/NA10 4C086/NA13 4C086/ZB26		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	60/241279 2000-10-18 US		
其他公开文献	JP4208568B2 JP2004526940A		

摘要(译)

本发明提供了鉴定细胞内化配体的方法。该方法通常包括以下步骤：（ｉ）使细胞与非共价结合配体的报道基因接触;（ｉｉ）使报告基因与配体解离并使解离的报告基因与（ｉｉｉ）检测细胞中的报道分子（如果存在报道分子），其中细胞中报道分子的存在表明配体被内化它显示它与功能性受体结合并内化。