

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5077862号
(P5077862)

(45) 発行日 平成24年11月21日(2012.11.21)

(24) 登録日 平成24年9月7日(2012.9.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C O 7 K 7/06
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C O 7 K 7/08
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C O 7 K 14/00

請求項の数 30 (全 111 頁)

(21) 出願番号	特願2002-525776 (P2002-525776)	(73) 特許権者	500039463
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日(2001.9.7)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
(65) 公表番号	特表2004-508045 (P2004-508045A)		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(43) 公表日	平成16年3月18日(2004.3.18)		オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/027692	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02002/020769		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成14年3月14日(2002.3.14)	(72) 発明者	アラップ ワディ
審査請求日	平成20年9月5日(2008.9.5)		アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン パッファロー スピードウェイ #3
(31) 優先権主張番号	60/231, 266		28 7171
(32) 優先日	平成12年9月8日(2000.9.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/765, 101		
(32) 優先日	平成13年1月17日(2001.1.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フェージディスプレイにより同定されたヒト及びマウスのターゲティングペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：125、配列番号：126、配列番号：127、及び配列番号：252からなる群より選択されるペプチド配列を含む、アミノペプチダーゼAに選択的に結合する50アミノ酸以下の単離ペプチド。

【請求項2】

配列番号：125のペプチド配列を含む、請求項1記載の単離ペプチド。

【請求項3】

配列番号：126のペプチド配列を含む、請求項1記載の単離ペプチド。

【請求項4】

配列番号：127のペプチド配列を含む、請求項1記載の単離ペプチド。

【請求項5】

配列番号：252のペプチド配列を含む、請求項1記載の単離ペプチド。

【請求項6】

長さが40アミノ酸以下である、請求項1~5のいずれか一項記載の単離ペプチド。

【請求項7】

長さが30アミノ酸以下である、請求項3~5のいずれか一項記載の単離ペプチド。

【請求項8】

長さが20アミノ酸以下である、請求項3~5のいずれか一項記載の単離ペプチド。

【請求項9】

長さが10アミノ酸以下である、請求項5記載の単離ペプチド。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項記載の単離ペプチドと治療剤の結合物。

【請求項11】

治療剤が、薬物、化学療法剤、放射性同位体、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、細胞毒性剤、殺細胞タンパク質、細胞増殖抑制剤、ペプチド、タンパク質、抗生物質、抗体、抗体のFab断片、ホルモンアンタゴニスト、核酸、または抗原である、請求項10記載の結合物。

【請求項12】

抗血管新生剤が、トロンボスポンジン、アンジオスタチン5、色素上皮由来因子(pigment epithelium-driven factor)、アンジオテンシン、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン12、血小板因子4、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン(proliferin)関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット(Marimastat)、ペントサンポリスルフェート(pentosan polysulphate)、アンジオポエチン2、インターフェロン、ハービマイシン(herbimycin)A、PNU145156E、16Kプロラクチン断片、リノマイド(Linomide)、サリドマイド、ペントキシフィリン(pentoxifylline)、ゲニステイン(genistein)、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドセタキセル(Docetaxel)、ポリアミン、プロテアソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、シグナル伝達ペプチド、アキュチン(accutin)、シドフォビル(cidofovir)、ピンクリスチン、プレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4、及びミノサイクリン(minocycline)からなる群より選択される、請求項11記載の結合物。

【請求項13】

アポトーシス促進剤が、エトボシド、Bax、Bid、Bik、BadまたはアネキシンVからなる群より選択される、請求項11記載の結合物。

【請求項14】

サイトカインが、インターロイキン1(IL-1)、IL-2、IL-5、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18、インターフェロン- (IF-)、IF-、IF-、腫瘍壊死因子- (TNF-)、またはGM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)からなる群より選択される、請求項11記載の結合物。

【請求項15】

請求項1～9のいずれか一項記載の単離ペプチドと分子複合体の結合物。

【請求項16】

複合体が、ウイルス、バクテリオファージ、細菌、リポソーム、微粒子、磁性ビーズ、酵母細胞、哺乳動物細胞、または細胞である、請求項15記載の結合物。

【請求項17】

複合体がウイルスまたはバクテリオファージである、請求項16記載の結合物。

【請求項18】

ウイルスが、アデノウイルス、レトロウイルス、およびアデノ随伴ウイルスからなる群より選択される、請求項17記載の結合物。

【請求項19】

ウイルスが、遺伝子治療ベクターを含むものとしてさらに定義される、請求項18記載の結合物。

【請求項20】

請求項1～9のいずれか一項記載の単離ペプチドと真核生物発現ベクターの結合物。

【請求項21】

請求項1記載の単離ペプチドと診断薬の結合物。

【請求項22】

診断薬が造影剤である、請求項21記載の結合物。

【請求項23】

10

20

30

40

50

造影剤が、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、またはビスマス(III)を含む、請求項22記載の結合物。

【請求項24】

造影剤が放射性同位元素を含み、該放射性同位元素が、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²ユーロピウム、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレンウム、³⁵硫黄、テクネチウム^{99m}、またはイットリウム⁹⁰である、請求項22記載の結合物。

10

【請求項25】

疾患の処置のための、請求項10~20のいずれか一項記載の結合物。

【請求項26】

疾患の診断のための、請求項21から24のいずれか一項記載の結合物。

【請求項27】

疾患が、異常な血管新生に関連する疾患である、請求項25または26記載の結合物。

【請求項28】

疾患が癌である、請求項25または26記載の結合物。

【請求項29】

疾患が網膜新生血管形成である、請求項27記載の結合物。

20

【請求項30】

請求項1~9のいずれか一項記載の単離ペプチドをコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本出願は、2000年9月8日に提出された米国特許仮出願第60/231,266号および2001年1月17日に提出された米国特許出願第09/765,101号からの優先権を主張する。本発明は、米国陸軍の助成金DAMD 17-98-1-8041および17-98-1-8581ならびに米国国立衛生研究所の助成金1R01CA78512-01A1、1R1CA90810-01、および1R01CA82976-01により政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を保有する。

30

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、分子薬品および治療剤の標的化送達分野に関する。より具体的には、本発明は、インビボまたはインビトロにおいて、臓器、組織、または細胞型を選択的に標的にするペプチドの同定および使用のための組成物および方法に関する。

【0003】

2. 関連技術の説明

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

40

【0004】

最近、マウスモデル系において臓器、組織、または細胞型ターゲティングペプチドを同定するためのファージディスプレイライブラリを用いるインビボ選択系が開発された。バクテリオファージの表面上にトランスジェニックペプチドを発現するファージディスプレイライブラリは、当初、免疫グロブリンのエピトープ結合部位をマッピングするために開発された(SmithおよびScott, 1986, 1993)。そのようなライブラリは、ファージの表面

50

タンパク質をコードするcDNAにランダムオリゴヌクレオチドを挿入すること、独自のペプチドを10⁹個もの順列で示すファージ粒子のコレクションを作製することによって作製することができる (PasqualiniおよびRuoslahti、1996 ; Arapら、1998a ; Arapら、1998b)

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

いくつかの場合、従来のインビボのファージディスプレイスクリーニング法は、非特異的ファージ結合の比較的高いバックグラウンドをもたらした。これは、網膜内皮系に属する組織に特に当てはまった。ターゲティングペプチドと細胞受容体との特異的な相互作用を保持しつつ、非特異的なファージ結合を減少させる改良されたファージディスプレイ法が必要とされている。また、臓器、組織、又は細胞型の中の特異的な細胞集団に関する受容体をターゲティングする必要も存在する。多くの場合、組織又は臓器は、種々の細胞型の高度に異種性の集団を含む。ファージディスプレイスクリーニングを特異的な細胞集団へとターゲティングする能力が、必要とされている。

【0008】

同様に、臓器および組織における受容体-リガンド対を同定する必要性も存在する。標的化受容体および受容体に対するリガンド結合を同定するためのこれまでの試みは、試験するために一度に単一のリガンドを主にターゲティングしていた。これまで未知の受容体およびまだ特徴が調べられていないリガンドの同定は、非常に遅く、骨の折れるプロセスであった。そのような新規受容体およびリガンドは、真性糖尿病、炎症疾患、関節炎、アテローム性動脈硬化、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症、心臓血管疾患、または変性疾患のような多様な疾患状態に対する新規治療の基礎を提供する可能性がある。

【0009】

発明の概要

本発明は、臓器、組織、又は特定の細胞型に選択的なターゲティングペプチドを同定し、使用するための組成物及び方法を提供することにより、当技術分野における長年にわたる需要を満たす。いくつかの態様において、方法は、ファージと細胞受容体との選択的な結合を保持しつつ、非特異的なファージ結合のバックグラウンドを減少させる新規なファージディスプレイ法である、選択的相互作用リガンドのバイオパニング及び迅速な分析 (

Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands) (BRASIL) に関する。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、被験者をファージディスプレイライブラリへと曝露すること、1つ又は複数の臓器、組織、又は細胞型の試料を収集すること、水相に懸濁した単離細胞又は小さい細胞塊へと試料を分離させること、水相を有機相の上に重層すること、細胞が遠心分離チューブの底にペレット化されるよう二相を遠心分離すること、及びペレットからファージを収集することにより同定される。さらに好ましい態様において、有機相はジブチルフタレートである。

【0010】

他の態様において、標的の臓器、組織、又は細胞型、例えば胎盤と結合するファージは、その臓器、組織、又は細胞型を欠いている被験者に対してプレスクリーニング又はポストスクリーニングされうる。標的の臓器、組織、又は細胞型を欠いている被験者と結合するファージは、臓器、組織、又は細胞型を保有している被験者におけるスクリーニングの前にライブラリより除去される。好ましい態様において、臓器、組織、又は細胞型は、胎盤又は脂肪組織である。

10

【0011】

好ましい態様において、ターゲティングファージは、PALM (Positioning and Ablation with Laser Microbeams) による細胞型の選択の後、臓器又は組織に存在する特異的な細胞型又は亜型より回収されうる。PALMは、例えば臓器又は組織の薄片からの、特異的な細胞型の選択を可能にする。ファージは、選択された試料より回収されうる。

【0012】

もう一つの態様において、抗体の抗原結合部分を表示しているファージディスプレイライブラリが被験者より調製され、ライブラリが1つ又は複数の抗原に対してスクリーニングされ、抗原と結合するファージが収集される。より好ましい態様において、抗原はターゲティングペプチドである。

20

【0013】

特定の態様において、方法及び組成物は、ターゲティングペプチドの1つ又は複数の受容体を同定するために使用されうる。別の態様において、組成物及び方法は、既知の、又は新たに同定された受容体に対する天然に存在するリガンドを同定するために使用されうる。

【0014】

いくつかの態様において、本発明の方法は、関心対象の受容体を含む臓器、組織、または細胞にターゲティングペプチドを接触させる段階、ペプチドを受容体に結合させる段階、およびペプチドに対するその結合によって受容体を同定する段階を含んでもよい。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれかから選択される少なくとも3つの連続するアミノ酸を含む。他の好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、受容体に対する抗体の一部を含む。もう一つの態様において、ターゲティングペプチドは、ランダムアミノ酸配列を含んでもよい。当業者は、接触させる段階が臓器、組織、もしくは細胞を利用することができる、または臓器、組織、もしくは細胞のホモジネートもしくは洗浄剤抽出物を利用してもよいと認識するであろう。特定の態様において、接触させるべき細胞は、ターゲティングペプチドに関して疑われる受容体を発現するように遺伝子操作してもよい。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、受容体に対するその共有結合を可能にする反応部分によって改変される。より好ましい態様において、反応部分は、光によって活性化されると受容体に共有結合するようになる光反応基である。もう一つの好ましい態様において、ペプチドは、固体支持体に結合して受容体をアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。他の好ましい態様において、固体支持体は磁性ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、カラムクロマトグラフィーマトリクス、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) マトリクス、またはファストパフォーマンス (fast performance) 液体クロマトグラフィー (FPLC) マトリクスを含む。特定の態様において、タ

30

40

50

ーゲティングペプチドは、受容体に結合すると、受容体の活性を阻害する。当業者は、受容体の活性を、触媒活性および結合活性を含むがこれらに限定されない当技術分野で既知の多様な方法によってアッセイすることができることを認識するであろう。もう一つの好ましい態様において、受容体は、エンドスタチン受容体、メタロプロテアーゼまたはアミノペプチダーゼである。

【0015】

代替的態様において、関心対象の受容体の一つまたは複数のリガンドを、開示の方法および組成物によって同定してもよい。天然に存在するリガンドの一部または全てを模倣する一つまたは複数のターゲティングペプチドは、インビボまたはインビトロにおけるファージディスプレイおよびバイオパニング (biopanning) によって同定してもよい。天然に存在するリガンドは、受容体に結合する単一のターゲティングペプチド、または受容体に結合する配列のコンセンサスモチーフとの相同性によって同定してもよい。他のもう一つの態様において、関心対象の受容体に結合する一つまたは複数のターゲティングペプチドに対する抗体を調製してもよい。そのような抗体は、本来のリガンドの同定または免疫アフィニティ精製のために用いてもよい。

10

【0016】

特定の態様において、本発明のターゲティングペプチドは、遺伝子治療ベクターおよび融合タンパク質を含むがこれらに限定されない治療剤を、被験者における特定の臓器、組織、または細胞型に選択的に送達するために用いられる。当業者は、使用される、主張される方法の範囲には、所望の臓器、組織、または細胞型への治療剤の標的化送達によって治療することができる任意の疾患状態も含まれることを認識するであろう。そのような疾患状態には、疾患を有する細胞が、非転移性癌のような特定の臓器、組織、または細胞型に限定される疾患が含まれるが、他の疾患状態を臓器、組織、または細胞型ターゲティングアプローチによって治療してもよい。

20

【0017】

本発明の一つの態様は、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれかから選択されるターゲティングペプチド配列の少なくとも3つの連続するアミノ酸を含む、大きさがアミノ酸100個またはそれ未満の単離ペプチドに関する。

【0018】

好ましい態様において、単離ペプチドは、アミノ酸50個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸30個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸20個もしくはそれ未満、より好ましくはアミノ酸10個もしくはそれ未満、またはさらにより好ましくは大きさがアミノ酸5個もしくはそれ未満である。他の好ましい態様において、請求項1記載の単離ペプチドは、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれかから選択されるターゲティングペプチド配列の少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個の連続するアミノ酸を含む。

30

【0019】

特定の態様において、単離ペプチドは分子に結合する。好ましい態様において、結合は共有結合である。さらなる態様において、分子は、薬物、化学療法剤、放射性同位元素、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、細胞毒性剤、ペプチド、タンパク質、抗生物質、抗体、抗体のFab断片、生存因子、抗アポトーシス剤、ホルモンアンタゴニスト、造影剤、核酸または抗原である。それらの分子は、例示目的により挙げたに過ぎない。本発明の範囲に含まれる分子には、ターゲティングペプチドに結合して、被験者に投与してもよい実質的に任意の分子が含まれる。好ましい態様において、アポトーシス促進剤は、グラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、(KLAKLAK)₂ (配列番号：1)、(KLAKKLA)₂ (配列番号：2)、(KAACKAA)₂ (配列番号：3)、または(KLGKKLK)₃ (配列番号：4)である。他の好ましい態様において、抗血管新生剤は、アンジオスタチン5、色素上皮由来因子、アンジオテンシン、ラミニンペプチ

40

50

ド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン12、血小板因子4、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ペントサンポリサルフェート、アンジオポエチン2（レジェネロン）、インターフェロン-、ハービマイシンA、PNU145156E、16Kプロラクチン断片、リノマイド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、ドセタキセル、ポリアミン、プロテアソーム阻害剤、キナーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤（SU5416、SU6668、Sugen、South San Fransisco、CA）、アキュチン、シドフォビル、ピンクリスチン、プレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4またはミノサイクリンである。さらに好ましい態様において、サイトカインは、インターロイキン1（IL-1）、IL-2、IL-5、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18、インターフェロン-（IF-）、IF-、IF-、腫瘍壊死因子-（TNF-）、またはGM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）である。そのような例は、代表として示したに過ぎず、当技術分野で既知の他のアポトーシス促進剤、抗血管新生剤、またはサイトカインを除外すると解釈されない。

10

【0020】

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

20

【0021】

もう一つの態様において、単離ペプチドは、固体支持体、好ましくは磁性ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、カラムクロマトグラフィーマトリクス、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）マトリクス、またはファストパフォーマンス液体クロマトグラフィー（FPLC）に結合する。

【0022】

本発明のさらなる態様は、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれかから選択される配列の連続アミノ酸少なくとも3個を含む融合タンパク質に関する。

30

【0023】

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

【0024】

その他の態様は、所望の臓器、組織、または細胞型に対するターゲティングペプチドを選択する段階、上記のターゲティングペプチドを分子、高分子複合体、または遺伝子治療ベクターに結合させる段階、および上記の分子、複合体、またはベクターに結合した上記のペプチドを被験者に提供する段階を含む、標的化送達方法に関する。好ましくは、ターゲティングペプチドは、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれか由来の連続アミノ酸少なくとも3個を含むように選択される。特定の好ましい態様において、臓器、組織、または細胞型は、骨髄、リンパ節、前立腺癌、または骨髄に転移した前立腺癌である。他の好ましい態様において、ターゲティングペプチドに結合した分子は、化学療法剤、抗原、または造影剤である。当業者は、本明細書の範囲において、任意の臓器、組織、または細胞型が、任意の分子、高分子複合体、または遺伝子治療ベクターに結合したターゲティングペプチドを用いた送達のための標的となりうることを認識するであろう。

40

【0025】

50

本発明のその他の態様は、ターゲティングペプチドをコードする、大きさが300ヌクレオチドまたはそれ未満の単離核酸に関する。好ましい態様において、単離核酸は、大きさが250、225、200、175、150、125、100、75、50、40、30、20または10ヌクレオチドまたはそれ未満である。他の好ましい態様において、単離核酸は、真核または原核細胞発現ベクターに組み入れられる。さらにより好ましい態様において、ベクターは、プラスミド、コスミド、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、ウイルスまたはバクテリオファージである。他の好ましい態様において、単離核酸は、発現されたペプチドを宿主細胞の細胞外表面に局在させるリーダー配列に機能的に結合している。

【0026】

本発明のさらなる態様は、疾患状態に関連する細胞を標的とするターゲティングペプチドを選択する段階、疾患状態を治療するために有効な一つまたは複数の分子をペプチドに結合させる段階、および疾患状態を有する被験者にペプチドを投与する段階を含む、疾患状態を治療する方法に関する。好ましくは、ターゲティングペプチドには、配列番号：5～配列番号：45、配列番号：47～配列番号：121、配列番号：123、および配列番号：125～配列番号：251のいずれかから選択される連続アミノ酸少なくとも3個が含まれる。好ましい態様において、疾患状態は、真性糖尿病、炎症疾患、関節炎、アテローム性動脈硬化、癌、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症、心血管疾患、または変性疾患である。

10

【0027】

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

20

30

【0028】

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

【0029】

例示的な態様の説明

本明細書において使用されるように、「一つの」(「a」又は「an」)とは、1以上を意味しうる。本発明の特許請求の範囲において使用されるように、「を含む」という用語と関連して、「一つの」(「a」又は「an」)とは、1以上を意味しうる。本発明において使用されるように、「もう一つの(another)」とは、少なくとも第二又はそれ以上の項目を意味しうる。

40

【0030】

「ターゲティングペプチド」とは、ある臓器、組織、又は細胞型への選択的局在を特徴とする、連続的なアミノ酸の配列を含むペプチドである。選択的局在は、例えば、推定ターゲティングペプチド配列を、ファージの外表面上に表示されるタンパク質へと組み込む、後に開示される方法により、決定されうる。異なるアミノ酸配列のそのようなターゲティングペプチドを多数発現するよう遺伝学的に改変されたそのようなファージのライブラリを、被験者に投与した後、被験者から1つ又は複数の臓器、組織、又は細胞型を収集し、その臓器、組織、又は細胞型に見出されるファージを同定する。ターゲティングペプチ

50

ド配列を発現するファージは、対照の組織又は臓器と比較して、より多い結合を、その組織又は臓器において示す場合、その組織又は臓器に選択的に局在するものと見なされる。好ましくは、ターゲティングペプチドの選択的局在は、対照の臓器、組織、又は細胞型と比較して2倍以上大きいファージの濃縮を、標的の臓器、組織、又は細胞型においてもたらしめべきである。対照の臓器、組織、又は細胞型と比較して少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、又はそれ以上の濃縮を標的臓器においてもたらしめ選択的局在は、より好ましい。又は、選択的局在を示すターゲティングペプチド配列を発現するファージは、好ましくは、標的臓器から回収されたファージを、次のスクリーニングのため第二の宿主へと再注射した場合に、対照臓器と比較して増加した濃縮を標的臓器において示す。3回目のスクリーニングの後には、さらなる濃縮が示されうる。選択的局在を決定するためのもう一つの別の手段は、推定標的ペプチドを発現するファージが、非特異的ペプチドを発現するか、又は推定標的ペプチドを発現するよう遺伝学的に改変されていない対照ファージと比較して、好ましくは2倍、より好ましくは3倍、又はそれ以上の濃縮を標的臓器において示すことである。選択的局在を決定するためのもう一つの手段は、標的ペプチドを発現するファージの標的臓器への局在が、標的ペプチド配列を含む合成ペプチドの共投与により少なくとも部分的に阻止されることである。「ターゲティングペプチド」および「回帰ペプチド」とは、本明細書において同義に使用される。

10

【0031】

「ファージディスプレイライブラリ」とは、その外表面上に推定のターゲティングペプチドの組を発現するように遺伝子操作されているファージのコレクションを意味する。好ましい態様において、推定のターゲティングペプチドをコードするDNA配列は、ファージ莢膜タンパク質をコードする遺伝子にフレームが合うように挿入される。他の好ましい態様において、推定のターゲティングペプチド配列は、一部が20個全てのアミノ酸のランダム混合物であり、一部が非ランダム混合物である。特定の好ましい態様において、ファージディスプレイライブラリの推定のターゲティングペプチドは、ターゲティングペプチド配列内の固定位置で一つまたは複数のシステイン残基を示す。

20

【0032】

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

30

【0033】

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

40

【0034】

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

【0035】

ファージディスプレイ

ターゲティングペプチドを同定するための本明細書に記載の方法は、ファージディスプレイライブラリのインピット投与を含む。ファージディスプレイの様々な方法およびペプチドの多様な集団を作製する方法は当技術分野で周知である。例えば、そのそれぞれが参

50

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

10

【0036】

ある臓器、組織、又は細胞型に選択的なターゲティングアミノ酸配列は、「バイオパニング (biopanning)」により単離されうる (PasqualiniおよびRuoslahti、1996; Pasqualini、1999)。簡単に説明すると、推定ターゲティングペプチドを含むファージのライブラリを動物又はヒトに投与し、ファージを含む臓器、組織、又は細胞型の試料を回収する。繊維状ファージを利用した好ましい態様においては、バイオパニングとバイオパニングの間に、線毛陽性細菌においてインビトロでファージを繁殖させることができる。この細菌は、ファージによって溶解せず、特定の挿入物を表示するファージを、多コピー、分泌する。標的分子と結合するファージは、標的の臓器、組織、又は細胞型から溶出させ、次いで宿主細菌において増殖させることにより増幅することができる。所望により、増幅されたファージを宿主に投与し、臓器、組織、又は細胞型の試料を再び収集してもよい。選択的バインダーの集団が得られるまで、複数回のバイオパニングを実施することができる。ペプチドのアミノ酸配列を、ファージゲノム内のターゲティングペプチド挿入物に相当するDNAを配列決定することにより、決定する。次いで、同定されたターゲティングペプチドを、標準的なタンパク質化学技術 (Arapら、1998a、Smithら、1985) により合成ペプチドとして作製することができる。この手法は、標的の性質を予想することなく、バイアスのない機能アッセイにおいて、循環ターゲティングペプチドを検出することを可能にする。候補標的がターゲティングペプチドの受容体として同定された後は、標準的な生化学的方法 (Pasqualini、1999; RajotteおよびRuoslahti、1999) を使用することにより、それを単離、精製、クローニングすることが可能である。

20

30

【0037】

特定の態様において、バックグラウンドファージ結合をさらに減少させるため、サブトラクションプロトコルが使用される。サブトラクションの目的は、目的の細胞以外の細胞と結合するか、又は不活化された細胞と結合するファージをライブラリから除去することである。別の態様において、ファージライブラリは、ターゲティングされた細胞、組織、又は臓器を保有していない被験者に対してプレスクリーニングされうる。例えば、胎盤結合ペプチドは、男性又は非妊娠女性に対してライブラリをプレスクリーニングした後に同定されうる。サブトラクション後、ライブラリは、目的の細胞、組織、又は臓器に対してスクリーニングされうる。もう一つの別の態様において、刺激されていない休止期の細胞型、組織、又は臓器が、ライブラリに対してスクリーニングされ、結合するファージが除去される。次いで、細胞系、組織、又は臓器が、例えばホルモン、増殖因子、サイトカイン、又はケモカインの投与によって活性化され、活性化された細胞型、組織、又は臓器が、サブトラクトされたファージライブラリに対してスクリーニングされる。

40

【0038】

例えば、参照として本明細書に組み込まれる米国特許第5,840,841号、第5,705,610号、5,670,312号、及び第5,492,807号に開示されるように、他のサブトラクションプロトコルの方法も既知であり、本発明の実施において使用されうる。

50

【0039】

ファージディスプレイ系の選択

マウスにおいて行われたこれまでのインビボ選択研究は、fUSE5ベクターにおけるIII遺伝子**莢膜タンパク質**との融合タンパク質として発現されたランダムペプチドのライブラリを好んで用いた (PasqualiniおよびRuoslahti, 1996)。所定のライブラリに存在する個々のクローンの数および多様性は、インビボ選択の成否にとって重要な要因である。欠損ファージクローンの過剰発現を有する可能性が低い一次ライブラリを用いることが好ましい (Koivunenら, 1999)。ライブラリの調製は、 $10^8 \sim 10^9$ 形質導入単位 (T.U.) /mlのあいだで最適化しなければならない。特定の態様において、各選択ラウンドの間にバルク増幅戦略を適用する。

10

【0040】

直鎖、環状、または二環ペプチドを示すファージライブラリを、本発明の範囲内で用いてもよい。しかし、単環ペプチドは直鎖ペプチドより標的臓器に対して高い親和性を有する傾向があることから、環状挿入物 ($CX_{3-10}C$) において3~10個のランダム残基を表示するファージライブラリが好ましい。二環ペプチドを示すライブラリ ($CX_3C X_3CX_3C$ など; Rajotteら, 1998) も首尾よく用いられている。しかし、同源の合成ペプチドの産生は、可能ではあるが、異なるジスルフィド架橋配列を有する多数の配座異性体のために複雑となりうる。

【0041】

マウスにおけるインビボファージディスプレイによる回帰ペプチドおよび受容体の同定

20

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

30

【0042】

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

40

【0043】

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

50

った。

【 0 0 4 4 】

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

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

標的化送達

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

【 0 0 4 8 】

BRASIL

好ましい態様において、標的臓器、組織、または細胞型の細胞に結合したファージを未
結合のファージから分離することは、BRASIL技術を用いて行う（2000年9月8日に提出され
た米国特許仮出願第60/231,266号；参照として本明細書に組み入れられており、本明細書
と共に提出された、Arap、Pasqualini、およびGiordanoによる「選択的相互作用リガンド
のバイオパニングおよび迅速な分析（Biopanning and Rapid Analysis of Selective Int
eractive Ligands（BRASIL））」と題する米国特許）。BRASIL（可溶性相互作用リガンド
のバイオパニングおよび迅速な分析）では、臓器、組織、または細胞型を細胞または小さ
い細胞塊に穏やかに分離して、これを水相に懸濁する。水相を、適当な密度の有機相の上
に層にして、遠心分離する。結合したファージに接着した細胞は遠心管の底に沈殿して、
未結合のファージは水相に残ったままとなる。これによって、ファージと細胞との結合相
互作用を維持しながら、結合したファージを未結合のファージからより効率よく分離す
ることができる。臓器、組織、もしくは細胞型を静脈内投与によりファージディスプレイ
ライブラリに曝露する、インビボプロトコールにおいて、または、細胞を水相においてファ
ージライブラリに曝露してから遠心分離する、エクスピボプロトコールによって、BRASIL
を行ってもよい。

【 0 0 4 9 】

タンパク質とペプチド

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

【0050】

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

10

【0051】

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

20

【0052】

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

30

【0053】

【表1】

改変アミノ酸およびまれなアミノ酸

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

10

20

【0054】

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

30

【0055】

ペプチド模倣体

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

40

【0056】

融合タンパク質

50

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

10

20

【0057】

タンパク質の精製

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

30

【0058】

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

40

【0059】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量する様々な方法が、本開示に照らして当業者に既知である。これらには、例えば、活性な画分の比活性を決定する、またはSDS/PAGE分析によって画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評

50

価する好ましい方法は、画分の比活性を計算すること、それを最初の抽出物の比活性と比較すること、およびこのように、「～精製倍率」によって評価して、その純度を計算することである。活性の量を示すために用いられる実際の単位は、当然、精製を行うために選択される特定のアクセス技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存するであろう。

【0060】

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

10

【0061】

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

20

【0062】

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

30

【0063】

合成ペプチド

本発明のターゲティングペプチドは、その大きさが比較的小さいために、従来の技術に従って溶液または固体支持体上で合成することができる。様々な自動シンセサイザーが市販されており、既知のプロトコールに従って用いることができる。例えば、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、スチュワート（Stewart）およびヤング（Young）、1984；タム（Tam）ら、1983；メリフィールド（Merrifield）、1986；およびバラニー（Barany）およびメリフィールド（Merrifield）、1979を参照のこと。通常、アミノ酸約6個から約35～50個までの短いペプチド配列は、そのような方法によって容易に合成することができる。または、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現ベクターに挿入され、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトされ、発現に適した条件で培養される組み換え型DNA技術を用いてもよい。

40

【0064】

抗体

特定の態様において、同定されたターゲティングペプチドまたはその受容体に対する抗

50

体を作製することが望ましいかもしれない。適当なターゲティングペプチドまたは受容体、またはその一部をリンカー、ポリリンカー、または誘導体化アミノ酸によって一つまたは複数の物質にカップリング、結合 (bonded)、結合 (bound)、接合、または化学的に結合させてもよい。これは、二重特異的、または多価組成物またはワクチンが産生されるように行ってもよい。これらの組成物の調製において用いられる方法は、当業者に周知であり、ヒトに投与するために適していなければならない、すなわち薬学的に許容されなければならないとさらに想像される。好ましい物質は、担体であり、キーホールリンペットヘモシアン (KLH)、またはウシ血清アルブミン (BSA) である。

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

サイトカインとケモカイン

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

【 0 0 6 7 】

ケモカインは、一般的に、ケモカイン発現部位に免疫エフェクター細胞を動員するための化学誘引物質として作用する。例えば、他の免疫系成分の治療部位への動員を増強するために、サイトカイン遺伝子と併用して特定のケモカイン遺伝子を発現することが有利であろう。ケモカインには、RANTES、MCAF、MIP1-
 、MIP1-
 、およびIP-10が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、特定のサイトカインも同様に化学誘引作用を有することが知られており、それらも同様にケモカインという用語の下に分類されうることを認

10

20

30

40

50

識するであろう。

【0068】

造影剤と放射性同位元素

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

10

【0069】

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

【0070】

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

20

【0071】

本発明の放射活性標識タンパク質またはペプチドは、当技術分野で周知の方法に従って産生してもよい。例えば、それらは、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学酸化剤またはラクトペルオキシダーゼのような酵素的酸化剤と接触させることによってヨウ化することができる。本発明によるタンパク質またはペプチドは、リガンド交換プロセスによって、例えば、ペルテクネートをスズ溶液によって還元して、還元したテクネチウムをセファデックスカラム上でキレート化して、ペプチドをこのカラムに適用することによって、または直接標識技術によって、例えばペルテクネート、 SnCl_2 のような還元物質、フタル酸ナトリウムカリウム溶液のような緩衝液、およびペプチドをインキュベートすることによって、テクネチウム^{99m}によって標識してもよい。金属イオンとして存在する放射性同位元素に結合するために用いられることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DPTA)およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。ローダミン、フルオレセインイソチオシアネート、およびレノグラフィンを含む蛍光標識も同様に用いることが考慮される。

30

40

【0072】

特定の態様において、主張されるタンパク質またはペプチドは、色素産生基質に接触させると着色産物を生じる二次結合リガンドまたは酵素(酵素タグ)に結合してもよい。適した酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(ホースラディッシュ)水素ペルオキシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合リガンドはピオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン化合物である。そのような標識の利用は当業者に周知であり、例えば、それぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号に記載されている。

50

【0073】

架橋剤 (cross-linker)

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

10

【0074】

リガンドをリポソームに架橋させる例示的方法は、それぞれが特に参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,603,872号、および米国特許第5,401,511号に記載されている。様々なリガンドをアミン残基の架橋によってリポソーム表面に共有結合させることができる。リポソーム、特に、それぞれがホスファチジルエタノールアミン (PE) を含む微小乳化リポソーム (MEL) および大きい単層リポソーム (LUVET) のような多層小胞 (MLV) または単層小胞は、確立された技法によって調製されている。リポソームにPEを含め、架橋目的のためにリポソーム表面上に活性な官能残基、1級アミンを提供する。上皮細胞増殖因子 (EGF) のようなリガンドは、PE-リポソームに首尾よく結合されている。リガンドは、リポソーム表面上の明確な部位に共有結合している。これらの部位の数および表面密度は、リポソーム製剤およびリポソームタイプによって決まる。リポソーム表面はまた、非共有結合部位を有してもよい。リガンドとリポソームとの共有結合体を形成するために、架橋試薬を有効性および生体適合性に関して調べられている。架橋試薬には、グルタルアルデヒド (GAD)、二官能オキシラン (OXR)、エチレングリコールジグリシジルエーテル (EGDE)、および水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) が含まれる。架橋の複合体化学によって、認識物質のアミン残基とリポソームとの結合が確立される。

20

30

【0075】

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

【0076】

核酸

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

40

【0077】

本明細書において用いられる「核酸」には、一本鎖および二本鎖分子と共に、DNA、RNA、化学改変核酸および核酸類似体が含まれる。本発明の範囲内の核酸は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、

50

68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約275、約300、約325、約350、約375、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約625、約650、約675、約700、約725、約750、約775、約800、約825、約850、約875、約900、約925、約950、約975、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500個のヌクレオチド残基またはそれ以上の長さであってもよいと考えられる。

【0078】

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

10

【0079】

【表2】

アミノ酸			コドン	
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU	
システイン	Cys	C	UGC UGU	
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU	
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG	
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU	10
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU	
ヒスチジン	His	H	CAC CAU	
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU	
リジン	Lys	K	AAA AAG	
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU	
メチオニン	Met	M	AUG	20
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU	
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU	
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG	
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU	
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU	
トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACU	30
バリン	Val	V	GUA GUC GUG GUU	
トリプトファン	Trp	W	UGG	
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU	

【0080】

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

【0081】

クローニング、遺伝子移入、および発現のためのベクター

特定の態様において、発現ベクターを用いてターゲティングペプチドまたは融合タンパク質を発現して、次にこれを精製および用いることができる。他の態様において、発現ベクターは、遺伝子治療において用いられる。発現は、適当なシグナルがベクターにおいて

提供される必要があり、宿主細胞において関心対象の遺伝子の発現を促進するウイルスおよび哺乳動物起源の双方からのエンハンサー/プロモーターのような様々な調節要素が含まれる。宿主細胞においてメッセンジャーRNA安定性および翻訳可能性を最適にするように設計した要素も同様に既知である。

【0082】

調節要素

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

10

【0083】

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

20

【0084】

様々な態様において、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターを用いて、関心対象のコード配列の高レベル発現を得ることができる。関心対象のコード配列の発現を得るために、当技術分野で周知である他のウイルスもしくは哺乳動物の細胞プロモーターまたは細菌ファージプロモーターを用いることも同様に、発現レベルが所定の目的にとって十分である限り考慮される。

【0085】

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

30

【0086】

選択マーカー

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

40

【0087】

50

発現ベクターの送達

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

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

アデノウイルスは、そのゲノムの大きさが中等度であること、操作が容易であること、高力価、広い細胞範囲、および高い感染性のために、遺伝子移入ベクターとして用いるた

10

20

30

40

50

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

10

【0094】

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

【0095】

複製欠損であるアデノウイルスベクターの作製および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胎児腎細胞から形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する293と呼ばれる独自のヘルパー細胞株に依存する（Grahamら、1977）。E3領域は、アデノウイルスゲノムにとって重要ではないため（JonesおよびShenk、1978）、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の助けを借りて、E1、E3、または双方の領域のいずれかに外来DNAを有する（GrahamおよびPrevecら、1991）。本質的に、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約105%をパッケージングすることができ（Ghosh-Choudhuryら、1987）、約2kbの余分のDNAの容量を提供する。E1領域およびE3領域において置換可能な約5.5 kbのDNAと組み合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大容量は7.5 kb以下、またはベクターの全長の約15%である。アデノウイルスゲノムの80%以上がベクター骨格に残っており、ベクター媒介細胞毒性の原因となる。同様に、E1欠失ウイルスの複製欠損も不完全である。例えば、ウイルス遺伝子発現の漏出は、現在利用可能なベクターについて高い感染多重度（MOI）で認められる（Mulligan、1993）。

20

30

【0096】

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

【0097】

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

40

50

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

アデノウイルスは、増殖および操作が容易で、インビトロおよびインビボで広い宿主範囲を示す。このグループのウイルスは、高い力価、例えば、 $10^9 \sim 10^{11}$ プラーク形成単位/mlで得ることができ、それらは非常に感染性である。アデノウイルスの生活環は宿主細胞ゲノムに組み入れられる必要はない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子は、エピソームであり、したがって、宿主細胞に対する遺伝子毒性は低い。野生型アデノウイルスをワクチン接種した研究では副作用は報告されておらず (Couch, 1963; Topら、1971)、インビボ遺伝子移入ベクターとしてのその安全性および治療能を証明する。

【0101】

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

【0102】

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

【0103】

レトロウイルスベクターを構築するために、関心対象のタンパク質をコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損であるウイルスを作製する。ピリオンを産生するために、gag、pol、およびenv遺伝子を含むが、LTRおよび

10

20

30

40

50

パッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する (Mannら、1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共にcDNAを含む組み換え型プラスミドをこの細胞株に導入する場合 (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)、パッケージング配列によって、組み換え型プラスミドのRNA転写物をウイルス粒子にパッケージングすることが可能となり、次に、これを培養培地に分泌する (NicolasおよびRubenstein、1988 ; Temin、1986 ; Mannら、1983)。次に、組み換え型レトロウイルスを含む培地を回収して、任意に濃縮し、遺伝子移入のために用いる。レトロウイルスベクターは広く多様な細胞型に感染することができる。しかし、組み込みおよび安定な発現には宿主細胞の分裂を必要とする (Paskindら、1975)。

【 0 1 0 4 】

レトロウイルスベクターを用いることには特定の制限がある。例えば、レトロウイルスベクターは、通常、細胞ゲノムにおけるランダムな部位に組み入れられる。このため、宿主遺伝子の中断によって、または隣接遺伝子の機能を妨害することができるウイルス調節配列の挿入によって挿入変異誘発が起こりうる (Varmusら、1981)。欠損レトロウイルスベクターを用いる場合のもう一つの懸念は、パッケージング細胞において野生型複製コンピテントウイルスが出現する可能性である。これは、gag、pol、env配列から上流の組み換え型ウイルス挿入物からの無傷の配列が宿主細胞ゲノムに組み入れられる組み換え事象が原因である可能性がある。しかし、今では新しいパッケージング細胞株を利用することができ、それらは組み換えの可能性を大きく減少させるはずである (Markowitzら、1988 ; Hersdorfferら、1990)。

【 0 1 0 5 】

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

【 0 1 0 6 】

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

【 0 1 0 7 】

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

【 0 1 0 8 】

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

【 0 1 0 9 】

tk細胞、hgprt細胞、またはapart細胞においてそれぞれ、HSVチミジンキナーゼ、ヒポ

10

20

30

40

50

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

【0110】

薬学的組成物

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

10

【0111】

一般的に、送達ベクターを安定にして、標的細胞によって取り込まれることができるように、適当な塩および緩衝液を用いることが望まれるであろう。組み換え型細胞を患者に導入する場合には緩衝液も同様に用いる。本発明の水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性培地に溶解または分散させたタンパク質またはペプチドの有効量を含む。そのような組成物も同様に、接種物と呼ばれる。「薬学的または薬理的に許容される」という用語は、動物またはヒトに投与した場合に有害、アレルギー、またはその他の望ましくない反応を引き起こさない分子実体および組成物を意味する。本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散培地、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が含まれる。そのような培地および物質を薬学的活性物質のために用いることは当技術分野で周知である。従来の培地または物質が本発明のタンパク質またはペプチドと不適合である場合を除き、治療的組成物において用いることが考慮される。補助活性成分も同様に組成物に組み入れることができる。

20

【0112】

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

30

【0113】

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

40

【0114】

50

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

【 0 1 1 5 】

治療剤

特定の態様において、化学療法剤を、腫瘍に選択的に送達するためのターゲティングペプチドまたは融合タンパク質に結合してもよい。用いるために適した物質または因子には、細胞に適用した場合にDNA損傷を誘導する任意の化学化合物が含まれてもよい。化学療法剤には、5-フルオロウラシル、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン (CDDP)、シクロホスファミド、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エストロゲン受容体結合物質、エトポシド (VP16)、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ゲムシタピン、イフォスファミド、メクロレタミン、メルファラン、マイトマイシン、ナベルピン、ニトロソウレア、プリコマイシン、プロカルバジン、ラロキシフェン、タモキシフェン、タキソール、テマゾロミド (DTICの水溶性型)、トランスプラチナ、ピンプラスチンおよびメソトレキセート、ピンクリスチン、または上記の任意の類似体もしくは誘導體変種が含まれるがこれらに限定されない。ほとんどの化学療法剤は以下の分類に入る：アルキル化剤、抗代謝剤、抗腫瘍抗生物質、コルチコステロイドホルモン、有糸分裂阻害剤、およびニトロソウレア、ホルモン物質、雑多な物質、およびその任意の類似体または誘導體変種。

【 0 1 1 6 】

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

【 0 1 1 7 】

アルキル化剤

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

【 0 1 1 8 】

抗代謝剤

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

【0119】

天然物

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

【0120】

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

10

【0121】

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

【0122】

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

20

【0123】

抗腫瘍抗生物質

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

30

【0124】

ホルモン

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

【0125】

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

40

【0126】

雑多な物質

いくつかの化学療法剤は、その活性に基づくこれまでの範疇に入らない。それらには、白金配位複合体、アントラセンジオン、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、アムサクリン、L-アスパラギナーゼ、およびトレチノインが含まれるがこれらに

50

限定されない。それらは、本発明の組成物および方法において用いてもよいと考慮される。

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

プログラムされた細胞死の調節物質

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

【0130】

その発見後、Bcl-2は、様々な刺激によって誘発された細胞死を抑制するように作用することが示された。同様に、共通の構造および配列相同性を有するBcl-2細胞死調節タンパク質のファミリーが存在することが今では明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、Bcl-2と類似の機能（Bcl_{XL}、Bcl_w、Bcl_s、Mcl-1、A1、Bfl-1）を有するか、またはBcl-2機能を相殺して細胞死を促進するか（例えば、Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri）のいずれかであることが示されている。

【0131】

本発明の範囲内で考慮されるアポトーシス促進剤の非限定的な例には、グラミシジン、マガイニン、メリチン、デフェンシン、セクロピン、(KLAKLAK)₂（配列番号：1）、(KLAKKLA)₂（配列番号：2）、(KAAKAA)₂（配列番号：3）、または(KLGKLG)₃（配列番号：4）が含まれる。

【0132】

血管新生阻害剤

特定の態様において、本発明は、アンジオテンシン、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン12、血小板因子4、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキサミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ペントサンポリスルフェート、アンジオポエチン2（レジェネロン）、インターフェロン-、ハービマイシンA、PNU145156E、16Kプロラクチン断片、リノマイド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、アキューチン、アンジオスタチン、シドフォビル、ピンクリスチン、プレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4、またはミノサイクリンのような抗血管新生剤に結合したターゲティングペプチドを投与することに関してもよい。

【0133】

10

20

30

40

50

用量

当業者は、「レミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第15版、第33章、特に624頁～652頁に従う。治療すべき被験者の状態に応じて用量の何らかの変更が必然的に起こるのであろう。投与の責任者は、いずれにせよ、個々の被験者にとって適当な用量を決定するのであろう。その上、ヒトでの投与に関して、調製物は、FDAの生物医薬品標準局によって必要とされる滅菌性、発熱性、および全身的安全性および純度標準を満たさなければならない。

【0134】

実施例

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

【0135】

実施例1. 骨髄ターゲティングペプチド

ターゲティングペプチドに関して特に関心対象となる臓器の非限定的な例は骨髄である。骨は、前立腺癌を有する患者の大多数において転移の好ましい部位である (Fidler, 1999)。この顕著な選択性は、癌の進行にとって必須である部位特異的相互作用の例として見なされている (Rak, 1995; Zetter, 1998)。臨床での関連性にもかかわらず、骨に広がった前立腺癌を制御する機構に関してはほとんどわかっていない。さらに、転移性前立腺癌の治療のために治療剤をターゲティングするための有効な戦略はなかった (Brodtrら、1996)。

【0136】

体循環を通して骨髄に選択的に回帰することができるペプチドのサブセットは、骨転移形成の際に前立腺癌細胞の挙動を刺激する可能性がある。ファージディスプレイを用いることによってターゲティングされる血管マーカータンクも同様に、腫瘍細胞が転移するために利用される可能性がある。この考え方は既に、肺回帰ペプチドに関して当てはまることが証明されている。肺の血管に回帰するペプチドは、実験的転移を阻害する。これらの結果は、部位特異的転移の根本となっているのは、転移が選択的に起こる特定の組織の血管に回帰受容体が存在することであるという「改変された種子と土壌」モデルに適合する。そのような選択的血管マーカータンクを、転移カスケードの第一段階である接着の際に腫瘍細胞に曝露する。骨髄回帰ペプチドの単離は、転移プロセスの際に前立腺癌細胞回帰を媒介するこれらの血管マーカータンクを同定するために、および骨転移を阻止するために可能性がある治療的介入にとって、または骨に既に転移した癌を選択的に造影するおよび/または治療するために有用である。

【0137】

方法

マウスにおいて骨髄と結合するペプチドを単離するために、ファージライブラリのインピボスクリーニングを使用した。骨髄ターゲティングペプチドを、前立腺癌マウスモデルにおいて転移を阻害する能力に関して特徴決定した。骨髄結合ペプチドの受容体を同定するために、アフィニティークロマトグラフィ及び分子クローニングを使用した。ここに開示される組成物及び方法は、骨転移の予防及び治療に焦点を当てた、新たな抗前立腺癌治療戦略を開発するために有用であった。

【0138】

マウスにおける骨髄へと回帰するペプチドを単離するためのインピボスクリーニング

ファージライブラリを静脈注射した。後述の改良を施したSmithおよびScott (1985) のプロトコルに従い、ライブラリを調製した。これらのライブラリに含まれるファージは、5残基～11残基の範囲の挿入物を表示していた。ガラスチューブ内の1ml DMEM-PIへと移す

ことによりファージレスキューのため組織試料を処理し、グラインダーでホモジナイズした。骨髄は、ホモジナイゼーションを必要としないが、対照として使用された他の臓器は、効率的にホモジナイズされうる前に切り刻む必要があった。試料を、オートクレーブ処理された2mlエッペンドルフチューブへと移した。組織を、1%BSAを含む氷冷DMEM-PIで洗浄した。3回の洗浄後、ペレットを再懸濁させ、37℃にした後、細胞を添加した。ファージ粒子を回収するため、洗浄された組織試料の、1.5mlのコンピテントK91-kan細菌(1:10希釈率でOD₆₀₀ 0.2)との、室温における1時間のインキュベーションを使用した。

【0139】

複数のアリコート(40µg/mlのテトラサイクリン及び100µg/mlのカナマイシンを含むLB tet/kanプレート又はシャーレ)に播いた。播種は、広範囲の試料をカバーするいくつかの濃度、即ち、3ml、1ml、300µl、100µl、30µlで実施した。播種に使用されたビーズを、ビーズ表面に捕捉された可能性があるファージ感染細菌クローンを全て回収するため、2個の次の10cm LB tet/kanプレートへと継代した。シャーレを37℃で一晩インキュベートした。残りの2~3mlの感染培養物(ホモジナイズされた組織を含む)を、40µg/mlのテトラサイクリン及び100µg/mlのカナマイシンを含む10mlのLB培地(LB tet/kan)へと移し、37℃の振とう器内に2時間置いた。12mlの培養物を、1リットルのLB tet/kanへと拡張し、37℃の振とう器内で一晩増殖させた。12時間~16時間後、標準的なプロトコルに従い、バルク増幅された細菌培養物からファージをレスキューし、2回目の選択のため取り分けた。インキュベーター内のプレート/シャーレから、骨髄由来の十分分離したコロニーを配列決定した。配列決定のため、1ウェル当たり20µlのPBSを含む96ウェルプレートへ、コロニーを移した。

【0140】

抗M13抗体を用いた免疫組織化学的染色を、様々な組織におけるファージターゲティングを調査するために使用した(PasqualiniおよびRuoslahti, 1996; Arapら, 1998)。ファージをIV注射し、5分間又は24時間、循環させた。5分間の実験においては、循環系から未結合のファージを除去するため、ファージ注射の後、マウスにDMEMを灌流させた。24時間後には、循環ファージはほとんど存在しなかった(Arapら, 1998a, 1998b)。動物を屠殺し、組織を収集し、ブワン(Bouin)溶液で固定し、切片化し、ファージに対する抗体で染色した。

【0141】

結果

マウスにおけるインビボのマウス骨髄ターゲティング

ファージライブラリをマウスへと静脈注射し、骨髄よりファージを回収することにより、骨髄ターゲティング配列モチーフが同定された。ファージは、静脈注射され、骨髄より回収され、十分な濃縮が得られるまで反復的にインビトロで増幅され、再注射された。3回の選択の後、マウス骨髄へと回帰するファージ調製物が得られた。個々のファージは、静脈注射の後、プールされたファージと類似した臓器特異性を示した。いくつかのペプチドモチーフが同定され、特徴決定された。インビボで特異性を示す最も有望なモチーフを、表3に示す。

【0142】

【表3】

インビボでマウス骨髄をターゲティングするファージ内の配列

CX₃CX₃CX₃C ペプチドライブラリ

C V M T C A P R C F E H C (配列番号 :5)

C D G V C A P R C G E R C (配列番号 :6)

C T G G C V V D C L S I C (配列番号 :7)

C G V P C R P A C R G L C (配列番号 :8)

C A G F C V P G C H S K C (配列番号 :9)

C A G A C P V G C G T G C (配列番号 :10)

10

X6 ペプチドライブラリ

A E R L W R S (配列番号 :11)

S Q H V V S G (配列番号 :12)

I A W R L E H (配列番号 :13)

W Y T V M S W (配列番号 :14)

R L T Y K L Q (配列番号 :15)

W Q R L Y A W (配列番号 :16)

E F R L G S K (配列番号 :17)

L G S N S K A (配列番号 :18)

C G V V K F A (配列番号 :19)

20

【 0 1 4 3 】

30

当業者であれば、ここで同定された骨髄ターゲティングペプチド配列が、治療剤の標的化送達又は遺伝子治療、正常な又は罹患した臓器、組織、又は細胞型のインビボ画像化、臓器、組織、又は細胞型における受容体及び受容体リガンドの同定、並びに多数のヒト疾患、特に転移性前立腺癌の治療的処置を非限定的に含む、本発明の範囲内の多数の用途に有用であろうことを理解するであろう。

【 0 1 4 4 】

実施例2. 前立腺及び前立腺癌に対するターゲティングペプチド

ターゲティングのための特に重要な非限定的なもう一つの臓器は、前立腺である。前立腺は、成体期の間中、増殖を継続するため、通常とは異なる臓器である。結果として、良性前立腺肥大(BPH)は、大部分の高齢の男性に、ある程度の影響を与えている。さらに重大なことに、前立腺は悪性腫瘍の好発部位である。11人に1人の男性が、一生のうちに前立腺癌を発症するとされる。前立腺癌の血清マーカーが利用可能となったため、現在では、これらの悪性腫瘍の多くは、疾患の経過の初期に検出された。臨床的に進行するであろう者を予測するための信頼性の高い手段が存在しないため、多くは、失禁及び性交不能のような壊滅的な副作用を伴うことが多い、手術又は放射線療法により侵襲的に治療された(LaneおよびShah, 1999; Mikolajczykら, 2000)。ヒト前立腺癌の検出、診断、及び治療のための改良された方法が、明らかに必要とされている。

40

【 0 1 4 5 】

前立腺の多くの関心対象の遺伝子が、前立腺血管系のような限定された(しかし、おそらくは高度に特異的又は到達可能な)細胞位置に発現する可能性がある。従って、微小解

50

剖学的又は生理学的な環境に固有の分子の不均一性を考慮に入れずハイスループット配列決定法又は遺伝子アレイ法では、介入のための可能性のある標的が容易に見落とされる可能性がある。

【0146】

本発明の方法は、インビボで特異的な標的部位へと回帰するペプチドの同定を可能にする (Pasqualiniら、1996、1997、Koivunenら、1999; Pasqualini、1999)。ファージペプチドライブラリのインビボ選択は、循環系を介して標的組織の特異的受容体へと回帰することができるペプチドを与える。これらの研究は、様々な正常組織における驚くべき程の特殊化を明らかにした (Pasqualini、1999; Rajotteら、1998、1999)。本発明は、前立腺癌ターゲティングペプチドの組成物及び使用法に関する。

10

【0147】

方法

前立腺のインビボファージターゲティング

ファージディスプレイライブラリを静脈注射した。試料は、常に、氷上に維持した。前立腺組織試料を、以下のようにして処理した。第一の試料は、バックアップとして-80で保存した。第二の試料は、組織学/病理学、及びHE又は抗M13ファージ免疫染色のため処理した。第三の試料は、同じ重量の断片を3個得るため、清潔な条件下で分割した。

【0148】

第三の前立腺試料に由来する3通りの試料を、宿主細菌感染及びファージ回収のため処理した。前立腺試料をガラス組織グライNDER内の1mlのDMEMプロテアーゼ阻害剤 (PI) へと移し、ホモジナイズし、細胞懸濁物をオートクレーブ処理された2mlエッペンドルフチューブへと移した。次に、前立腺組織試料を、1%BSAを含む氷冷DMEM-PIで3回洗浄した。各洗浄後に、組織をDMEM-PIと混合し、30秒間ボルテックス処理した。4,000rpmで3分間スピント後、上清を注意深く廃棄した (組織ペレットには触れないようにした)。次に、1.5mlのDMEM-PI/BSAを添加した。3回目の洗浄の後、ペレットを再懸濁させるため短時間ボルテックス処理し、溶解したペレットを、短時間37 に加温した後、宿主細菌を添加した。次いで、混合物を1.5mlのコンピテントK91-kan細菌 ($OD_{600} = 2$) と共に室温で1時間インキュベートした。

20

【0149】

混合物を、10mlのLB培地+0.2 μ g/mlテトラサイクリンを含むファルコン (Falcon) チューブへ、RTで20分間、移した。複数のアリコート、40 μ g/mlのテトラサイクリン及び100 μ g/mlのカナマイシンを含むLB tet/kanプレート又はシャーレに播いた。最後に、シャーレを37 でインキュベートし、一晩のインキュベーションの後、ファージ形質導入単位数を決定した。

30

【0150】

前立腺癌ターゲティング

腫瘍血管は、漏出性であることが知られている。マウス被験者のファージディスプレイライブラリへの比較的長期間の曝露は、ファージの遊走及び前立腺癌細胞マーカーとの結合をもたらす。癌細胞マーカーをターゲティングするため、マウスを、ファージライブラリと共に24時間インキュベートした。

40

【0151】

雄ヌードマウス (4匹) に、 10^6 個のDU-145細胞を含むPBSを注射した。腫瘍増殖の後、マウスにいずれかのCX10Cファージディスプレイライブラリを注射した。ライブラリを24時間循環させた後、マウスを屠殺し、組織試料を収集した。試料をダウンス (Dounce) ホモジナイザーでホモジナイズし、ファージを回収するためK91細菌を添加した。一連の希釈度で、細菌を3通り、kan/tet LBプレートに播いた。細菌を含む残りの腫瘍ホモジネートを、10mlのLB/tet/kanと共にRTで1時間インキュベートした。大量のファージストックを得るため、さらに10mlのLK/tet/kanを添加し、37 で振とう器内でインキュベートした。2回目のスクリーニングのための、混和されたストックを作成するため、216個のコロニーをプレートから選出した。クローンを増幅した後、それらをプールし、ファージをPEG/

50

NaClで沈殿させた。1回目から回収されたプールされたファージを使用して、前立腺腫瘍を保持するヌードマウスを、前記と同様の2回目の選択に供した。3回目のスクリーニングを、前記と同様にして実施した。

【 0 1 5 2 】

結果

正常マウス前立腺

上に開示された方法により得られたマウス前立腺ターゲティングペプチドモチーフを、表4に示す。

【 0 1 5 3 】

【表 4】

インビボファージディスプレイにより得られたマウス前立腺ターゲティングペプチド

RVGTWGR	配列番号 :20	YICPGPC	配列番号 :30
GRGRWGS	配列番号 :21	SYQSPGP	配列番号 :31
VQGIGRL	配列番号 :22	AAAGSKH	配列番号 :32
VGSGRLS	配列番号 :23	GSRIRTP	配列番号 :33
GWTVRDG	配列番号 :24	SWGSRIR	配列番号 :34
GSRIRTP	配列番号 :25	GGGSRIS	配列番号 :35
GGGSRIS	配列番号 :26	RVVGSRS	配列番号 :36
VMGGVVS	配列番号 :27	DGSTNLS	配列番号 :37
YGNDRRN	配列番号 :28	VGSGRLS	配列番号 :38
SGKDRRS	配列番号 :29		

【 0 1 5 4 】

前立腺癌

3回目のインビボスクリーニングにより、対照正常腎組織と比較して高い腫瘍局在の選択性を示したファージが得られた（示していない）。ファージ挿入物をDNA配列決定することにより同定された前立腺癌ターゲティング配列を、表5に挙げる。

【 0 1 5 5 】

【表 5】

前立腺癌ターゲティングペプチド

10

20

30

CLSRLVTGDVIC (配列番号 :210)	
CGNMGGSLYYVC (配列番号 :211)	
CLHWEATFNPQC (配列番号 :212)	
CRTEVWRSNQRC (配列番号 :213)	
CHVRDEHHEQGC (配列番号 :214)	
CPMQATRNLWHC (配列番号 :215)	10
CRDDAKVMRYNC (配列番号 :216)	
CNNWGELLGFNC (配列番号 :217)	
CEGGYENLVKLC (配列番号 :218)	
CRNAWNKHGSRC (配列番号 :219)	
CKERMYREQRRC (配列番号 :220)	
CRTIDIENNELC (配列番号 :221)	20
CHRGINRSTTDC (配列番号 :222)	
CETGREIDRSDC (配列番号 :223)	
CCGRKTRGVAIC (配列番号 :224)	
CLASMLNMSTLC (配列番号 :225)	
CGQGFAPRNLVC (配列番号 :226)	
CLGKWKSSRGTC (配列番号 :227)	30
CGEGFGSEWPPC (配列番号 :228)	
CKPDYMDSNKMC (配列番号 :229)	
CTRNITKSRMMC (配列番号 :230)	
CVRNVDQNTNTC (配列番号 :231)	
CFWTRENRGWTC (配列番号 :232)	
CRIRGIQLRPAC (配列番号 :233)	40
CEVGLSAAMAYCC (配列番号 :234)	

【 0 1 5 6 】

当業者であれば、ここで同定された前立腺ターゲティングペプチド配列が、治療剤の標的化送達又は遺伝子治療、正常な又は罹患した臓器、組織、又は細胞型のインビボ画像化、臓器、組織、又は細胞型における受容体及び受容体リガンドの同定、並びに多数のヒト疾患、特に前立腺癌の治療的処置を非限定的に含む、本発明の範囲内の多数の用途に有用であろうことを理解するであろう。

【 0 1 5 7 】

実施例3. マウスの胎盤、脂肪、卵巣、及び尿管に対するターゲティングペプチドの同定 50

胎盤回帰ペプチドの同定

マウス胎盤へと回帰するペプチドを、ファージディスプレイライブラリを使用したポストクリアリング (post-clearing) プロトコルにより同定した。1回目のバイオパニングを、妊娠マウスにおいて実施した。胎盤の試料を摘出し、一つの修飾を含む前記の標準的なプロトコルに従いファージをレスキューした。典型的なバイオパニングプロトコルにおいては、単一の臓器、組織、又は細胞型から数千個のファージが回収されうる。典型的には、播種されたファージから200個～300個の独立のコロニーを選択し、これらを増幅し、プールして、2回目又は3回目のバイオパニングのためのファージディスプレイライブラリを形成させた。本実施例においては、1回目のバイオパニングからレスキューされたファージ全てを固体培地上でバルク増幅し、次いで2回目のバイオパニングのためのファージディスプレイライブラリを形成させるため、プールした。即ち、1回目のバイオパニングからレスキューされたファージの制限が存在しなかった。この制限なしのインビボバイオパニングを3回 (1回目～3回目) 実施し、次いでポストクリアリング法を使用した。

10

【0158】

ポストクリアリングプロトコル (4回目) においては、ファージを非妊娠マウスに投与した。胎盤以外の組織と結合したファージを、循環系から吸収した。残りのファージを非妊娠マウスの胎盤から回収した。このプロトコルは、胎盤と結合し、他のマウスの臓器、組織、又は細胞型とは結合しないファージを単離するために設計された。以下の胎盤ターゲティングペプチドが、それらの頻度と共に同定された。GenBankデータベースの検索は、以下に挙げた配列番号のうち、既知のペプチド配列と100% 相同なものは存在しないことを開示した。

20

TPKTSVT (配列番号 :39) 3回目において7.4%、4回目において8.5%

RMDGPVR (配列番号 :40) 3回目において3.1%、4回目において8.5%

RAPGGVR (配列番号 :41) 3回目において<1%、4回目において8.5%

VGLHARA (配列番号 :42) 3回目において4.2%、4回目において7.4%

YIRPFTL (配列番号 :43) 3回目において2.1%、4回目において5.3%

30

LGLRSVG (配列番号 :44) 3回目において<1%、4回目において5.3%

PSERSPS (配列番号 :45) (データ未入手)

【0159】

示されている通り、ポストクリアリング法の使用は、胎盤ターゲティングペプチドを保持するファージの実質的な濃縮をもたらした。この手法は胎盤に関して使用されたが、当業者であれば、その臓器、組織、又は細胞型を欠いている被験者へとファージライブラリが投与されうる場合には、任意の臓器、組織、又は細胞型に関してポストクリアランスが実施されうることを理解するであろう。例えば、前立腺又は精巣に対するターゲティングペプチドのためのポストクリアリング法は、雌被験者において実施されうるし、卵巣、膣、又は子宮に関しては、雄被験者において実施されうる。

40

【0160】

相同性検索によって、TCR α -1 (TPKTSVT、配列番号:39)、テネイシン (RMDGPVR、配列番号:40及びRAPGGVR、配列番号:41)、MHCクラスII (LGLRSVG、配列番号:44)、アンジオテンシンI (YIRPFTL、配列番号:43)、及びMHC H2-D-q 鎖 (VGLHARA、配列番号:42) を含むいくつかの候補タンパク質が、胎盤ターゲティングペプチドの内因性類似体として、同定された。

【0161】

胎盤回帰ペプチドの確認及び妊娠の阻害

妊娠マウスへの注射及び胎盤からの回収により、胎盤回帰ペプチドの確認をインビボで

50

行った。図1は、選択された胎盤回帰ファージに関する確認研究の結果を示している。ファージクローンは、PA- TPKTSVT (配列番号：39)、PC- RAPGGVR (配列番号：41)、PE- LGLRSVG (配列番号：44)、PF- YIRPFTL (配列番号：43)として同定される。PAクローンが、対照fd-tetファージで観察されたよりも1桁超大きい胎盤回帰を示したことが、示されている。PCクローンも、有意に高い胎盤局在を示したが、PEクローン及びPFクローンは、対照ファージと比較して、胎盤において実質的には濃縮されなかった。

【0162】

胎盤組織におけるPFクローンの明らかな濃縮の欠如にも関わらず、PAペプチド及びPFペプチドは、いずれも、抗胎盤活性を示した。表6は、妊娠マウスへ注射された、FITC (フルオレセインイソチオシアネート)、GST (グルタチオンS-トランスフェラーゼ)、又はファージに結合した胎盤ターゲティングペプチドPA及びPFの効果を示している。比較的低い用量 (計450 µg) において、FITCと接合したPA及びPFは、妊娠に対するわずかな効果を示した (表6)。比較的高い用量 (800 µg ~ 1000 µg タンパク質又は 4.5×10^{10} ファージ) においては、タンパク質と接合したペプチドPA及びPFも、ファージと接合したペプチドPA及びPFも、胎児発達を実質的に妨害し (表6)、大部分の場合に、明らかに胎児の死をもたらした。CARACペプチド (配列番号：46)、脂肪ターゲティングペプチド (FE、TREVHRS、配列番号：47)、又はfd-tetファージを、非胎盤ターゲティング対照として使用した。

【0163】

【表6】

胎盤ターゲティングペプチドの胎児発達に対する効果

10

20

FITC接合体による阻害-I

iv注射(主に)又は ip注射されたマウス、隔日、1日目~18日目、
9回、計450mM (~450µg)

注射されたペプチド	妊娠の結果	胚に対するペプチドの効果
CARAC-FITC (対照)	出産:18日目、正常仔5匹	効果なし
PA-FITC(胎盤ホーマー(placenta homer))	出産:19日目、正常仔8匹	効果なし
PF-FITC (胎盤ホーマー(placenta homer))	出産:21日目、死亡仔1匹	発育遅延、毒性

10

FITC接合体による阻害-II

sc注射(主に)又は iv注射されたマウス、隔日、4日目~17日目、
10回、計1M (~1mg)

注射されたペプチド	妊娠の結果	胚に対するペプチドの効果
CARAC-FITC (対照)	出産:20日目、新生仔5匹、死亡1匹	わずかな毒性?
PA-FITC(胎盤ホーマー(placenta homer))	21日後、体内に胎児なし	妊娠終結
PF-FITC (胎盤ホーマー(placenta homer))	21日後、体内に胎児なし	妊娠終結

20

ファージ接合体による阻害-I

iv注射(主に)又は ip注射されたマウス、隔日、1日目~18日目、
9回、計4.5x10¹⁰ TU

注射されたペプチド	妊娠の結果	胚に対するペプチドの効果
Fd-Tet (対照)	アベルチンOD=>死亡。胎児-OK	?
PA-ファージ(胎盤ホーマー(placenta homer))	出産:24日目、新生仔4匹、死亡1匹	発達遅延、毒性
PF-ファージ(胎盤ホーマー(placenta homer))	出産:25日目、新生仔8匹、全て死亡	発達遅延、毒性

30

GST接合体による阻害-I

sc注射(主に)又は iv注射されたマウス、隔日、4日目~17日目、
10回、計800µg

注射されたペプチド	妊娠の結果	胚に対するペプチドの効果
GST-FE (対照)	出産:20日目、新生仔2匹、OK	効果なし
GST-PA(胎盤ホーマー(placenta homer))	21日後、出産又は胎児なし	妊娠終結
GST-PF (胎盤ホーマー(placenta homer))	15日目:体内に胎児なし、子宮壊死	妊娠終結

40

【 0 1 6 4 】

これらの結果により、上で同定された胎盤ターゲティングペプチド配列が確認される。
さらに、ターゲティング配列を保持するファージの標的臓器への実質的な濃縮が欠如して

50

いる場合（例えば、ペプチドPF、図1）ですら、ターゲティングペプチドが、治療剤の標的臓器への標的化送達を提供しうることを証明している。この研究において、PAペプチドが何倍も高レベルにファージを胎盤へと局在させたという観察にも関わらず、比較的低い用量では、PFペプチドの方が、妊娠を妨害する効果がPAペプチドより高いようであった。

【0165】

当業者であれば、開示された方法及びペプチドが、胎盤を介した治療剤の胎児への標的化送達、及び妊娠を終結させるための新規手法に有用であり得ることを理解するであろう。

【0166】

脂肪ターゲティングペプチド

遺伝的に肥満のマウス（Zhangら、1994；Pelleycounterら、1995）より、脂質ターゲティングペプチドを単離するため、正常マウスにおいて実施されたポストクリアリングを含む、類似のプロトコルを使用した。単離された脂質ターゲティングペプチドには、TRNTGNI（配列番号：48）、FDGQDRS（配列番号：49）、WGPKRL（配列番号：50）、WGESRL（配列番号：51）、VMGSVTG（配列番号：52）、KGGRAKD（配列番号：53）、RGEVLWS（配列番号：54）、TREVHRS（配列番号：47）、及びHGQGVVP（配列番号：55）が含まれる。

【0167】

相同性検索によって、幹細胞増殖因子(SCGF)(KGGRAKD、配列番号：53)、アトラクチン(attractin)(マホガニー(mahogany))(RGEVLWS、配列番号：54)、アンジオポエチン関連脂肪因子(angiopoitin-related adipose factor)(FIAF)(TREVHRS、配列番号：47)、アジポフィリン(adipophilin)(ADRP)(VMGSVTG、配列番号：52)、Flt-1又はプロコラーゲンXVII型(TRNTGNI、配列番号：48)、及びフィブリリン2もしくはトランスフェリン様タンパク質p97(HGQGVVP、配列番号：55)を含むいくつかの候補タンパク質が、脂質ターゲティングペプチドの内因性類似体として同定された。

【0168】

脂肪ターゲティングペプチドの確認

図2に示されるように、脂質回帰ペプチドの確認を、インビボ回帰により行った。選択された脂質回帰クローンは、FA-KGGRAKD（配列番号：53）、FC-RGEVLWS（配列番号：54）、FE-TREVHRS（配列番号：47）、及びFX-VMGSVTG（配列番号：52）であった。図2に示されるように、これらのクローンは、全て、脂肪組織への回帰の上昇を示し、クローンFXは、対照fd-tetファージよりも数桁高い脂肪局在を示した。クローンFXは、他の選択された脂質回帰クローンよりも実質的に高い局在を示した。しかしながら、上に開示された胎盤回帰ペプチドからの類推により、当業者であれば、比較的lowレベルの脂肪組織局在を示す脂質回帰クローンであっても、治療剤の標的化送達に有用であり得ることを理解するであろう。

【0169】

当業者であれば、脂肪組織内の血管新生性血管系に選択的なターゲティングペプチドが、体重減少、又は体重増加の予防に有用であろうことを理解するであろう。抗血管新生性又は毒性の部分を脂肪ターゲティングペプチドに結合させることにより、新たな脂質組織へ栄養を供給する血管を選択的に阻害し、新たな脂質沈着物の成長を予防することが可能であり、既存の脂質沈着物を消滅させることも可能であるかもしれない。

【0170】

卵巣及び腹水に対するターゲティングペプチド

さらに、以下に挙げられる、マウスの卵巣及び腹水に対するターゲティングペプチド配列が同定された。

【0171】

マウス卵巣ターゲティングペプチドには、GLAKLIP（配列番号：56）、HLISDMS（配列番号：57）、LQHWLLS（配列番号：58）、ALVLQG（配列番号：59）、TGVALQS（配列番号：60）、YVQSREG（配列番号：61）、PLFWPYS（配列番号：62）、DGS（配列番号：63）、EGSG（配列番号：64）、SSPRPGV（配列番号：65）、DGYPAIA（配列番号：66）、GHAIE（配列

10

20

30

40

50

番号：67)、及びIWSTSER(配列番号：68)が含まれる。

【0172】

マウス腹水に対するターゲティングペプチドには、YRLRG(配列番号：69)、YRARG(配列番号：70)、SQLPG(配列番号：71)、SQPWG(配列番号：72)、QRLVTP(配列番号：73)、QVLVTP(配列番号：74)、QRLVHP(配列番号：75)、QVLVHP(配列番号：76)、ITRWRYL(配列番号：77)、SLGGMSG(配列番号：78)、SQLAAG(配列番号：79)、SLLAAG(配列番号：80)、SQLVAG(配列番号：81)、SLLAAG(配列番号：82)、GLPSGLL(配列番号：83)、HGGSANP(配列番号：84)、SLEAFFL(配列番号：85)、CVPELGHEC(配列番号：86)、CELGFEELGC(配列番号：87)、及びCFFLRDWFC(配列番号：88)が含まれる。

【0173】

子宮ターゲティングペプチド

表7に開示される、C57B1マウスにおける尿道ターゲティングペプチドを同定するため、類似のプロトコルを使用した。

【0174】

【表7】

尿道ターゲティングペプチド

モチーフ	ペプチド
LRXGN (配列番号：235)	GVMLRRG(配列番号：238) YSLRIGL(配列番号：239) LRDGNGE(配列番号：240) CLRGGNLR(配列番号：241)
RGAG (配列番号：236)	VRGLAAA(配列番号：242) ARGAGLA(配列番号：243) RGAGTGWT(配列番号：244) ARGVNGA(配列番号：245)
DLLR (配列番号：237)	DLLRARW(配列番号：246) DLLRTEW(配列番号：247) EFDLVRQ(配列番号：248)
なし	GCDEGGG(配列番号：249)
なし	GDSPVES(配列番号：250)

【0175】

実施例4：BRASILによる 脾臓抗体ライブラリのインビボスクリーニング

脾臓に対するターゲティングペプチドは、従来同定されていない。網膜内皮系の一部として、非特異的なファージの脾臓への局在の高いバックグラウンドのため、脾臓組織に対するバイオパニングは複雑である。BRASIL法によるバイオパニングにおいて観察される減少したバックグラウンドは、脾臓のような組織に対するターゲティングペプチドの同定にとって有利である。

【0176】

本実施例は、BRASIL法の例示的な態様を証明する。標識臓器(マウス脾臓)に対して得られた免疫グロブリンに基づくファージライブラリを開発し、次いでインビボバイオパニングに供した。免疫グロブリンライブラリを構築するため、マウス脾臓をニワトリに注射した。追加接種の後、ニワトリ脾臓を収集し、免疫グロブリン可変ドメイン配列を、ニワトリ脾臓mRNAのPCR(商標)増幅により得た。増幅された免疫グロブリン可変配列を、ファージディスプレイライブラリへと挿入し(-ライブラリ)、次いで、それをマウス脾臓に対するインビボバイオパニングに使用した。従って、インビボでマウス脾臓へと局在

10

20

30

40

50

したファージから得られた脾臓ターゲティングペプチドは、マウス脾臓抗原に应答してニワトリにおいて産生された抗体断片に由来していた。本実施例の成功は、さらに、BRASIL法の広範な利用可能性を示す。当業者であれば、本発明がここに開示された態様に限定されないこと、及びBRASIL方法論の多くのさらなる開発が本発明の範囲内に含まれることを理解するであろう。

【0177】

材料及び方法

ライブラリ構築

白色レグホン (white leghorn) ニワトリを、還流 (10ml MEM) されたBalb/cマウスに由来する脾臓ホモジネート (注射1回当たり約150mg) で免疫した。初回免疫後4週目及び8週目に、脾臓ホモジネートの追加接種をニワトリに与えた。FACS分析によるマウス脾臓に対する免疫応答は、ニワトリ免疫血清が、マウス細胞系 (TRAMP-C1) に対する抗体を含むことを示した。初回免疫後12週目に、ニワトリを屠殺し、その脾臓をTRI試薬 (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) へと抽出した。

【0178】

TRI試薬の製造業者のプロトコルを使用して、ニワトリ脾臓から全RNAを調製した。オリゴ (dT) プライマー及びスーパースクリプト (Superscript) 酵素 (Life Technologies) を使用して、全RNAからcDNAを調製した。ニワトリ脾臓免疫グロブリン可変領域をコードするcDNAを、標準的な技術に従い、CHyVHプライマー及びChyIgBプライマー (V_{heavy})、又はCSCVKプライマー及びCHyL-Bプライマー (V_{H}) により増幅した。軽鎖の可変領域及び定常領域は、CSC-Fプライマー及びlead-Bプライマー、並びにV_H 鋳型及びC_H 鋳型を使用して、共にPCR (商標) 増幅した。重鎖の可変領域及び定常領域は、dp-seqプライマー及びlead-Fプライマー、並びにV_{heavy} 鋳型及びC_{heavy} 鋳型を使用して、共にPCR (商標) 増幅した。重鎖断片及び軽鎖断片は、CSC-Fプライマー及びdp-Exプライマーを用いて、共にPCR (商標) 増幅した。PCRプライマーは、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー講座マニュアル「コンビナトリアル抗体ライブラリのファージディスプレイ (Phage Display of Combinatorial Antibody Libraries)」(Barbasら、2000) (この内容は、参照として本明細書に組み込まれる) に挙げられているプライマー配列を使用して、ジェノシス (Genosys) 又はゲンベース (GenBase) より購入した。

【0179】

SfiIで消化した後、ファージライブラリへの挿入のため、増幅産物をSfiI消化pComb3xと連結させた。連結したpComb3-123プラスミドをER2537大腸菌へとエレクトロポレーションし、その後のVCM13 (ヘルパーファージ) 感染によりファージ産生を開始させた。得られたライブラリサイズは、約 5×10^6 cfuであった。

【0180】

BRASILを使用した 脾臓ライブラリのインビボスクリーニング

ニワトリ 脾臓ライブラリを使用して、マウスにおける4回のインビボスクリーニングを実施した。約 $0.8 \sim 2.0 \times 10^{10}$ TUをBalb/cマウスに注射した。ライブラリを5分間循環させた。屠殺後、マウス脾臓を回収し、70 μ m細胞濾過ナイロンメッシュへと脾臓を通すことにより、単一細胞懸濁液を調製した。BRASIL技術を使用して、単一細胞懸濁液を油 (9 : 1ジブチルフタレート : シクロヘキサン) で遠心分離し、対数増殖期のER2537大腸菌200 μ lにペレットを感染させた。マウス脾臓から回収された増幅されたファージを、次のスクリーニングに使用した。BRASILの前に得られた脾臓片を使用した従来のバイオパニング法と比較して、脾臓及び脳へと回帰するファージの数に、スクリーニング中、明らかな濃縮は見られなかった。

【0181】

ニワトリFab挿入物の4回目のスクリーニングからのマウス脾臓に局在したファージを、PCR (商標) 増幅し、PCR産物をBstIで消化した。分析された90個のクローンのうちの半分が、類似の制限パターンを与えた。そのうち、20個のクローンを配列決定したところ、同一の制限パターンを有するものはわずか2個であった。抗体に基づくファージクローンの

10

20

30

40

50

うちの4個(2番、6番、10番、及び12番)を、結合アッセイ及び局在アッセイを使用したさらなる分析に供した。

【0182】

BRASILを使用したインビトロでのクローンの試験

単一細胞懸濁液を、2個のマウス脾臓より調製した。懸濁液を5個のチューブに分割し、 3×10^9 TUのFabクローン#2、#6、#10、#12、及び 2×10^9 TUのtetファージと共に、氷上でインキュベートした。マウス脾細胞と結合したファージをBRASILにより回収した。200 μ lの対数増殖期ER2537大腸菌にペレットを感染させ、ファージ結合の評価のため、段階希釈物をLB/カルベニシリンプレート及びLB/テトラサイクリンプレートに播いた。fd-tetを、全てのファージ回帰実験を規準化するための内部標準として使用した。

10

【0183】

BRASILによるインビボでのクローンの試験

Fabクローン#2、#6、#10、#12のファージ(3×10^9)、及び 2×10^9 TUのtetファージを、Balb/cマウスの尾静脈に注射し、5分間循環させた。脾臓を回収し、全脾臓から単一細胞懸濁液を氷上で調製した。細胞結合ファージをBRASILにより回収した。200 μ lの対数増殖期ER2537大腸菌にペレットを感染させ、ファージ回収の評価のため、段階希釈物をLB/カルベニシリンプレート及びLB/テトラサイクリンプレートに播いた。

【0184】

BRASILによるインビボでのクローン#10の試験(対照ファージNPC-3TTと比較)

Fabクローン#10及びNPC-3TT(対照Fabファージ)のファージ(3×10^9 TU)、並びに 1×10^9 TUのFd-tetファージをマウス(NPC-3TTについて2匹、クローン#10について2匹)に注射し、5分間循環させた。脾臓を回収し、単一細胞懸濁液を氷上で調製した。細胞結合ファージをBRASILにより回収した。200 μ lの対数増殖期ER2537大腸菌にペレットを感染させ、段階希釈物をLB/カルベニシリンプレート及びLB/テトラサイクリンプレートに播いた。NPC-3TTファージは、ヒト抗破傷風毒素Fab断片を表示しているファージである。

20

【0185】

脾臓へのFabクローン#10の回帰(骨髓と比較)

Fabクローン#10及びNPC-3tt対照のファージ(3×10^9 TU)、並びに 1×10^9 TUのFd-tet対照ファージをマウス(NPC-3TTについて2匹、クローン#10について2匹)に注射し、5分間循環させた。脾臓を回収し、単一細胞懸濁液を氷上で調製した。臓器特異的回帰の対照として、同じマウスから骨髓(両大腿骨)を回収した。細胞結合ファージをBRASILにより回収した。

30

【0186】

Fab断片の作製

ニワトリFab挿入物を含むプラスミドpComb3を、ER2537大腸菌へとエレクトロポレーションした。段階希釈物をLB/カルベニシリンプレートに播き、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。Fab産生培養物(100 μ g/mlのカルベニシリンを含むスーパーブロス(super broth)中)を、単一の播種されたコロニーから開始させた。1mM IPTGにより、30 $^{\circ}$ Cで7時間、Fab産生を誘導した。細菌上清、周辺質画分SN1及びSN2、並びに細菌溶解物の中のFab濃度のELISAによる決定の後、アフィニティ精製により、周辺質画分SN2からFab断片を精製した。標準的なプロトコル(HarlowおよびLane、1988)を使用して、Fab-プロテインGカラムに、ジメチルピメリミデート(DMP)をカップリングさせた(2mg/ml)。

40

【0187】

Fab断片を精製するため、以下の方法を使用した。2時間(スーパーloop)を用いて、50ml未満の容量を使用する場合)又は一晩(蠕動ポンプを使用して、50ml超の容量を用いる場合)かけて、SN2画分を1mlのHiTrap-プロテインG-Fabカラム(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)にロードした。カラムを10~20mlのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄した。Fab断片を10mlの20mMグリシン緩衝液、pH2.2、150mM NaClを用いて溶出させ、1ml画分を収集した。画分を、溶出直後に1Mトリスで中和した。タンパク質濃度は、 A_{280} により定量した。

50

【0188】

血管内染色

回収されたFab断片のインビボ分布を決定するため、50～60 µgのFab断片（Fab#10、NPC 3-tt、又はR#16）をBalb/cマウスの尾静脈に注射し、8分間循環させた。50 µgのトマト（*L. esculentum*）レクチン-FITCをマウスに注射し、2分間のレクチン循環の後、25～30mlの4%パラホルムアルデヒド/PBSの灌流によりマウス組織を固定した。組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで、1時間、後固定した。固定された組織を、溶液を少なくとも2回変えながら、4℃で一晩、30%ショ糖/PBS中でインキュベートした。組織を凍結培地で包埋し、ドライアイス上で凍結させた。

【0189】

固定された組織切片を、以下のようにしてFabに関して染色した。凍結組織切片（55 µm）をマイクロトーム上で切り分け、PBSで3回洗浄した。PBS/0.3% TritonX-100/5% ヤギ血清で、室温で1時間、薄片をブロッキングした。切片を、1：400のCy3と接合したヒト抗Fab抗体と共に、室温で一晩、インキュベートした。接合した切片を、PBS/0.3% TritonX-100で6回、PBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。固定後、切片をPBSで2回洗浄し、蒸留水で2回洗浄し、次いでベクターシールド（VectorShield）を用いてスライドガラス上に設置した。

【0190】

結果

ニワトリFab断片を発現するファージクローンのマウス脾細胞へのインビトロ局在を、BRASILにより調査した。図3に示されるように、BRASILにより単離されたFabファージクローンは、挿入物を含まないFd-tet対照ファージと比較して、ディファレンシャルなマウス脾細胞との結合を示した。クローン#6は、Fab断片を含むが、マウス脾臓から単離されたのではない対照ファージNPC-3TTと類似した、最も低い程度のディファレンシャル結合を示した。クローン#2、#10、及び#12は、全て、Fd-tet対照と比較して、マウス脾細胞との選択的な結合を示し、クローン#2及び#10については少なくとも2倍増加した結合が観察された。クローン挿入物について決定されたアミノ酸配列は、以下の通りである：

10

20

クローン#2:

CQPAMAAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFNSYPMGWVRQAPGKGLE
WVAVISSSGTTWYAPAVKGRATISRDNQSTVRLQLSNLRAED (配列番号 :89)

クローン#6:

CQPAMAAVTLDESGGGLQTPGGTSLVCKASGISIGYGMNWVRQAPGKGLE
VASISGDGNFAHYGAPVKGRATISRDDGQNTVTLQLNNLR (配列番号 :90)

10

クローン#10:

CQPAMAAVTLDESGGGLQTPGGTSLVCKGSGFIFSRYDMAWVRQAPGKGLE
WVAGIDDGGGYTTLYAPAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLR (配列番号 :91)

クローン#12:

ANQPWPPLTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTMSSYDMFWVRQAPGKGLE
FVAGISSSGSSTEYGAHAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAED (配列番号 :92)

20

【 0 1 9 1 】

NPC-3TTと比較されたFabクローンについてのインビトロファージ結合の直接比較を行った。図4に示されるように、クローン#2及び#10は、最高レベルの Maus 脾細胞との結合をインビトロで示した。クローン#6及び#12は、ファージNPC-3TTの結合よりも極わずかに高いレベルの Maus 脾臓との結合を示した。

30

【 0 1 9 2 】

ニワトリFabファージクローンの優先的な結合を、BRASILを使用したインビボ研究により確認した。図5に示されるように、 Maus 脾臓への選択的局在は、インビボでははるかに劇的であり、Fabクローン#2、#6、及び#10は、Fd-tetファージと比較して、何倍にも増加した脾臓との結合を示した。対照的に、Fabクローン#12は、Fd-tetファージと比較して有意に上昇した Maus 脾臓との結合を示さなかった。これらの結果は、脾臓ターゲティングファージを用いて得られたインビトロの結果が、インビボで確認されることを示している。

【 0 1 9 3 】

Fabクローン#10を、インビボの Maus 脾臓への局在によるさらなる特徴決定のため、選択した。図6に示されている結果は、Fabクローン#10が、Fd-tetと比較して3~10倍の脾臓における濃縮を示したことを確認している。Fab対照ファージNPC-3TTは、挿入物を含まないFd-tetファージと比較して選択的な脾臓局在を示さなかったため、この効果は、一般的なFab結合によるものではなかった。

40

【 0 1 9 4 】

図7において証明されるように、Fabクローン#10の結合は臓器特異的であった。Fabクローン#10及びNPC-3TT対照に由来するファージを、同一の注射された Maus の脾臓及び骨髓から回収した。図7より、Fabクローン#10は、脾臓への選択的局在を示すが、骨髓組織への選択的局在は示さなかったことが明らかである。対照ファージは、骨髓(図7)又は脾臓(示していない)への選択的局在を示さなかった。

50

【0195】

これらの結果は、Fabクローン#10が、インビトロにおいてもインビボにおいても結合に関してマウス脾臓組織を選択的にターゲティングすることを示している。これらの結果は、インビボファージ分布に関する血管染色によりさらに確認された。この研究に使用された対照ファージは、クローンNPC-3TT (Fab断片) 及びクローンR#16 (血管新生性網膜スクリーニングより単離) であった。

【0196】

蛍光染色により、Fabクローン#10は、インビボでマウス脾臓組織と結合することが観察された (示していない)。対照ファージNPC-3TT及びR#16は、同一条件下で脾臓組織を染色しなかった。クローン#10及びNPC-3TTのファージは、おそらくは系球体濾過のため、注射された動物の腎臓を強く染色することが観察された (示していない)。その他の対照臓器 (肺、脳、肝臓、心臓、及び骨格筋) は、クローン#10による染色を示さなかった (示していない)。

10

【0197】

これらの結果は、脾臓ターゲティングファージペプチドが、BRASIL法により同定されることを証明している。さらに、出発ファージライブラリを得るための、標的の臓器、組織、又は細胞型に対する抗体断片を使用したファージディスプレイ技術の実施可能性を示している。高い非特異的バックグラウンドのために、標準的なファージディスプレイプロトコルを使用したバイオパニングが適用できなかった組織である脾臓に対するターゲティングペプチドを得ることが可能であったことは、BRASIL法の利点を示している。

20

【0198】

実施例5: 血管新生性網膜における -カポジ肉腫ライブラリのインビボスクリーニング

血管新生性網膜系は、血管新生性腫瘍組織のモデルとして開発された。新生マウスにおける低酸素は、網膜における血管新生応答を引き起こす。血管新生性網膜組織受容体は、ファージディスプレイ結合に関して血管新生性腫瘍組織との類似性を示す。

【0199】

材料及び方法

血管新生性モデル系

1週齢C57BL/6Jマウスを、5日間、75%酸素雰囲気曝露し、次いでさらに5日間、大気中で維持した。6 μ m横断切片において網膜から硝子体領域へと伸長した新血管の核を数することにより、増殖性新生血管応答を定量した。このモデルを、マウスへ静脈注射されたファージディスプレイライブラリの、新たに形成された血管新生性血管への結合を評価するために使用した。血管新生のピークは、生後17~21日目に観察された。

30

【0200】

ファージディスプレイ

脾臓に関して既に開示したのと同じ方法を使用して、ウサギへと免疫されたカポジ肉腫腫瘍組織に対するFabファージライブラリ (-KS) を作製した。血管新生性網膜モデル系において、-KS ライブラリを使用して、3回のインビボスクリーニングを実施した。生後18~20日目に低酸素により誘導された網膜血管新生を有する2匹のC57BL/6Jマウスに、約3~10 \times 10¹⁰TUの -KSファージを注射した。ライブラリを5分間、循環させた。眼を摘出し、網膜を眼の残部から分離した。2枚のスライドガラスの間で破砕することにより、網膜から単一細胞懸濁液を調製した。単一細胞懸濁液を、前記のようなBRASILにより処理し、200 μ lの対数増殖期ER2537大腸菌にペレットを感染させた。一晚増幅したファージを網膜組織から回収し、次のスクリーニングに使用した。各選択後の回収は、3400~5000TUであった。

40

【0201】

3回の選択後、90個の選択されたクローンを、HUVEC細胞との結合能に関して試験した。マイクロタイターウェルに、HUVECを含む完全培地をコーティングした。細胞を固定し、ファージ感染細胞のIPTG誘導培養物からの上清と共に一晚インキュベートした。-Fab ELISAにより、Fab産生を検出した。FabのHUVECとの結合は、-Fab-AFOS ELISAにより検出

50

した。

【0202】

図8は、 α -KSファージライブラリを使用したFabクローンのHUVECとの結合の結果を示している。クローン#16は、インビトロでHUVECとよく結合するようであった。

【0203】

これらの結果は、ファージディスプレイライブラリの作製のため、Fab抗体断片を使用することの可能性を確認している。そのようなライブラリは、従来のバイオパニング法において使用されてきたランダム配列ファージディスプレイライブラリと比較して、宿主動物を免疫するために使用された特定の臓器、組織、又は細胞型に対してターゲティングされるペプチド配列に富んでいるはずである。結果は、ターゲティングペプチド配列を同定するためのBRASIL法の利用可能性も確認している。

10

【0204】

実施例6. 受容体/リガンド対の同定：インテグリン受容体に対するターゲティングペプチド

本発明のいくつかの態様は、様々な用途のための受容体/リガンド対の同定に関する。臓器、組織、又は細胞型に選択的なターゲティングペプチドは、通常は標的内の血管の内腔側表面上に位置している（前記定義のような）受容体と結合する。いくつかの態様において、ターゲティングペプチドは、直接的又は間接的に、そのような受容体を同定又は特徴決定するために使用されうる。遺伝子治療ベクター、その他の治療剤、又はインビボ画像化用の造影剤の送達のための標的としての使用に加え、そのような天然に存在する受容体は、受容体自体に対する新たな治療剤の開発、受容体に対するワクチンの開発、及び様々な疾患状態の基礎となっている分子機構の理解のための可能性のある標的として有用である。当然、ターゲティングペプチド自体は、受容体に対する新たな治療剤のための基礎として有益であり得る。

20

【0205】

ターゲティングペプチドは、ターゲティングされた受容体と結合する内因性リガンドのミメオトープ (mimeotopes) として作用する場合が多い。他の態様において、開示された方法を使用して、内因性リガンドが同定され、特徴決定されうる。そのようなリガンドも、新たな治療剤の開発等のための標的として潜在的に有用である。

【0206】

本実施例は、受容体（この場合にはインテグリン受容体）/リガンド対の同定に関する一つの態様を例示する。インテグリンに対するターゲティングペプチドの用途の例には、細胞の増殖及び走化性の制御、アポトーシス促進、並びに抗血管新生が非限定的に含まれる。この態様においては、固体基質に結合した精製されたインテグリンを、インテグリンに対するターゲティングペプチドを同定するため、ファージディスプレイライブラリをスクリーニングするために使用した。

30

【0207】

背景

インテグリンの機能は、多様な生物学的系においてサイトカイン及びその他の可溶性因子により制御されている。最も一般的には、そのような因子の曝露は、受容体の活性化状態の変化（即ち、特定のリガンドに対する親和性の増加もしくは減少、及び/又は原形質膜内での受容体クラスター形成）をもたらすコンフォメーションの改変へと至る。インテグリン依存性接着の変化は、最終的には、様々な複雑なシグナル伝達経路を活性化する。分子レベルにおいては、誘導された細胞骨格タンパク質のインテグリン細胞質ドメインとの共局在が、シグナル伝達を調節する。

40

【0208】

細胞質ドメインは、インテグリン機能の重要な制御因子である (Hynes、1992 ; Ruoslahti、1996の総説)。個々のサブユニット及びサブユニットの細胞質ドメインは、異なる種間で高度に保存されている (Hemlerら、1994)。様々なサブユニットの細胞質ドメインは、類似の一次構造を共有しているが、いくつかの機能的特徴に関しては異なってい

50

る。キメラインテグリンを用いた実験によって、鎖の細胞質ドメインが、受容体の分布及び限局性付着 (focal adhesion) 部位への動員の制御を担っていることが示されている (PasqualiniおよびHemler、1994)。従って、いくつかの細胞質ドメインは、インテグリンによって媒介される細胞へのシグナル伝達 (外から内へのシグナル伝達)、及びインテグリン-リガンド結合活性の活性化 (内から外へのシグナル伝達) にとって重要である (Hemlerら、1994)。

【0209】

インテグリン α_3 及び α_5 は、正常血管系には発現しておらず、血管新生性血管系に選択的に発現する (Brooksら、1994a、1994b; Pasqualiniら、1997; Arapら、1998)。さらに、 α_5 インテグリンアンタゴニストは、新生血管の成長を阻止することが示されている (Brooksら、1994a、1994b、1995; Hammesら、1996)。これらの実験において、内皮細胞のアポトーシスが、血管新生の阻害のための機構として同定された (Brooksら、1994a、1994b、1995)。bFGFにより開始する血管新生は、抗 α_3 阻止抗体によって阻害され、VEGFにより媒介される血管新生は、 α_5 に対する阻止抗体によって防止されうる。インテグリン α_3 及び α_5 は、異なる型の眼新生血管疾患において優先的に表示されることが報告されている (Friedlanderら、1995、1996)。従って、別個のサイトカインにより誘導される血管新生へと至る経路は、特異的な α_5 インテグリンに依存していると考えられる。

【0210】

インテグリン α_3 及び α_5 は、いずれも、ビトロネクチンと結合するが、おそらくは、異なるリガンド結合後事象を媒介する。例えば、外因性可溶性因子の非存在下では、インテグリン α_5 は、細胞の接着、拡散、遊走、及び血管新生を促進することができない。他方、 α_3 インテグリンは、サイトカインによる付加的な刺激なしに、そのような事象を誘導することができる (Klemkeら、1994; Lewisら、1996; Friedlanderら、1995)。

【0211】

サイトカインによる α_5 機能の制御に関する分子的基礎を研究するために設計された実験によって、固定化されたビトロネクチンとの結合時、不活化された α_5 は、アクチン、 α -アクチニン、テーリン、テンシン (tensin)、p130^{cas}、及びピンキュリンと会合して検出されることはほとんどないことが示されている。対照的に、 α_3 は、そのような分子の局所的な蓄積を誘導する。プロテインキナーゼC (PKC) の活性化により、 α_5 は、 α_3 と類似の挙動を示すようになるが、テーリンを動員することはできない (Lewisら、1996)。さらに、PKCの阻害剤であるカルホスチン (calphostin) Cは、 α_5 により媒介される血管新生を阻止するが、 α_3 により媒介されるものは阻止しないようである (Friedlanderら、1995)。これらの観察は、PKC活性化が、おそらく、 α_5 細胞質ドメインのコンフォメーション又はリン酸化状態に影響を与えることを示唆している。細胞質タンパク質においても、類似の変化が起こりうる (KolanusおよびSeed、1997)。サイトカインによる α_5 インテグリンの制御は、リガンド結合は不変であるが、リガンド結合後の事象が異なる点で、通常とは異なる (Lewisら、1996)。従って、 α_3 又は α_5 により媒介される細胞事象は、明らかに、異なる機構によって調節されている (FilardoおよびCheresh、1994b)。

【0212】

α_5 インテグリン会合分子の検索は、技術的な問題によって妨げられてきた。第一に、含まれている物理的会合が、細胞が完全でない場合にはもはや起こらない多量体リガンドの集合に頼っている可能性が高い。第二に、それらのインテグリンとの会合は、通常、低親和性である。最後に、会合タンパク質のコンフォメーション及びリン酸化状態の変化が、これらの一時的に調整される相互作用の複雑度をさらに増大させている可能性がある。これらの問題のため、インテグリン細胞質ドメインと結合するタンパク質は、限定された数しか同定されていない。パキシリン (paxillin) 及びICAP-1のようなこれらのタンパク質は、主に、 α_1 鎖と会合する (ShattilおよびGinsberg、1997)。サイトヘシン (cytohe

10

20

30

40

50

sin)-1及びフィラミンは、 2の細胞質ドメインと会合する。

【0213】

いくつかの他のタンパク質（テーリン、フィラミン、 β -アクチニン、限局性付着キナーゼ、セリン/トレオニンキナーゼILK、及びスケルミン（skelemin））は、インテグリン細胞質ドメイン全般と相互作用することが報告されている。テーリン、 β -アクチニン、及び限局性付着キナーゼは、 β 1細胞質ドメイン内の推定結合部位を欠失させた後には、もはや β 1インテグリンと共局在しない。類似の手法により、他の細胞骨格関連タンパク質及びシグナル伝達分子が、インテグリンと共局在することが示されている。

【0214】

インテグリンは、増殖因子シグナル伝達に関与している分子と会合する。 β v3と会合して見出されうる190kDaタンパク質及びIRS-1（VuoriおよびRuoslahti, 1994）に加え、 β v3インテグリンと、インスリン及びPDGFのシグナル伝達経路に関連している分子との会合の分析は、インスリン受容体及びPDGF受容体の両方が β v3と共免疫沈降することを明らかにした。インテグリンと会合した受容体分子は、そのような分子の高度にリン酸化され高度に活性化された垂画分を表している。これらの結果は、インテグリンにより媒介される細胞接着が、増殖因子に対する細胞応答と同調しているという見解を強化するため、重要である。インテグリン依存性シグナル伝達過程は、増殖シグナルと協同している（FrischおよびRuoslahti, 1997；ClarkおよびBrugge, 1995；LonghurstおよびJennings, 1998）。

【0215】

タンパク質リン酸化は、インテグリン刺激に対する応答において検出される最初期事象の一つである。チロシンキナーゼ阻害剤が、限局性付着の形成を抑制することができることから、インテグリン受容体と連結されているシグナル伝達経路におけるチロシンリン酸化の役割が示唆される（Defilippiら, 1994）。プロテインキナーゼC（PKC）及びマイトジェン活性化プロテイン（MAP）キナーゼのようなセリン/トレオニンキナーゼファミリーも、インテグリン刺激によって活性化され、PKCの阻害剤は、いくつかの細胞システムにおける細胞の接着及び拡散を阻止する（VuoriおよびRuoslahti, 1993）。インテグリンは、やはりチロシンリン酸化に依存している応答であるプログラム細胞死を制御することにより細胞生存に影響を与えられられる。インテグリンタンパク質複合体と会合するいくつかのタンパク質は、タンパク質-タンパク質カップリングを特異的に媒介するSrcホモロギー2（SH2）及び3（SH3）と呼ばれるモジュールドメインを含む。SH2ドメインは、ホスチロシンを含む特異的ペプチドモチーフとの相互作用を介してタンパク質と結合し、SH3ドメインは、タンパク質標的上の短いプロリンリッチなペプチドモチーフと結合する（ClarkおよびBrugge, 1995）。インテグリンにより媒介される細胞接着は、MAPキナーゼの活性化を引き起こし、限局性付着キナーゼ（FAK）のチロシンリン酸化を増加させる。FAKの自己リン酸化は、Srcファミリーキナーゼ及びGrb-2-Sos複合体を含むSH2ドメインタンパク質の結合へと至る。一つの妥当な仮説は、インテグリンにより媒介されるFAKのチロシンリン酸化が、Rasカスケードの活性化に至り、最終的にはMAPキナーゼ活性化へと至るというものである。しかしながら、インテグリンにより媒介されるMAPキナーゼ活性化は、FAKとは無関係であることが示されており、そのことは、（i）分裂促進シグナル及び生存シグナルにおいて役割を果たしうるMAPキナーゼ活性化、並びに（ii）細胞骨格組織化に明らかに関与しているFAKチロシンリン酸化、という少なくとも2個の別個のインテグリンシグナル伝達経路が存在することを示している（Linら, 1997）。

【0216】

ペプチド基質及び相同性に基づく分子モデルの以前の研究より、ペプチド基質の約9~13残基が、キナーゼドメインの活性部位間隙と接触することが示唆された（Bossemeyerら, 1993）。ファージディスプレイ技術は、多様なコンビナトリアルペプチドライブラリを生成させ、選択するための代替的な手法を提供する（Smith, 1991；WellsおよびLowman, 1992）。ファージディスプレイライブラリ内の化学的多様性は、複製され増幅されうるDNAによってコードされているため、ファージライブラリの選択は複数回実施することが可

10

20

30

40

50

能であり、従って稀少なモチーフですら同定することが可能である。合成化学ライブラリとは対照的に、ファージディスプレイは、プールされた種ではなく単一の種の分析を許容する。この技術の力は、大規模なコンビナトリアルライブラリからの稀少な抗体又はペプチドの選択によって主に証明されてきた。

【0217】

コンビナトリアルファージライブラリは、全てSrcファミリーの近縁メンバーである異なるプロテインチロシンキナーゼ (PTK) 及び1個の比較的遠縁のPTK、Sykの好ましい基質配列を決定するために使用された (Schmitzら、1996)。組換えPTKによるその後のリン酸化、及び抗ホスホチロシン抗体によるリン酸化されたファージの選択が、基質ペプチドを表示しているファージを濃縮するために使用された。数回の選択の後、試験された各PTK 10
について別個の基質配列が見出された。Srcファミリーと関連したPTKについては、これらの正準配列の重要な特質が、既知又は仮定のタンパク質基質において再利用された。最も注目すべきことは、不変のチロシン残基と直接隣接しているアミノ酸が、高度に保存されており、試験された各PTKに対して特異的であった点である。従って、同定されたモチーフは、PTKの触媒ドメインの小さい特異的な阻害剤を開発するための合理的基礎を提供し
うる (Schmitzら、1996)。

【0218】

さらなる研究は、SrcファミリーのプロテインキナーゼであるFynの基質特異性を検討するために、如何にしてペプチドライブラリが使用されうるかを示すことにより、ファージ
ディスプレイ技術の範囲を拡大した (Denteら、1997; Gramら、1997)。ファージによっ
て表示された修飾されたペプチドが、タンパク質Shcのホスホチロシン結合ドメイン (PTB
) のホスホチロシン特異性を決定するために使用された (Denteら、1997)。他の関連す
る実験は、ファージ上に確立されたランダムペプチドライブラリをスクリーニングするこ
とによる、アダプタータンパク質Grb2のSrcホモロジー2 (SH2) ドメインと相互作用する
ホスホペプチドリガンドの同定に焦点を当てた。ホスホチロシンキナーゼc-Src、Blk、及
びSykの混合物により、ファージの不変チロシン残基がインビトロでリン酸化された。グ
ルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現させたGrb2の組換え
SH2ドメインとのライブラリの相互作用により、結合モチーフが選択された。その後の数
回の選択によって、先にリン酸化された場合のみGST-Grb2 SH2ドメインと結合するファ
ージが濃縮された。配列分析によって、選択されたファージが、全て、コンセンサスモチ
ーフY^{*}M/NW (Y^{*}はホスホチロシンを意味する) を含むペプチドを表示していることが明ら
かとなった。1個のペプチドは、天然リガンドShcに由来するペプチドモチーフY^{*}VNV より
3倍高い親和性でGrb2 SH2ドメインと結合した。これらの所見は、ファージディスプレイ
が、SH2ドメインに対する高親和性リガンド及びシグナル伝達に参与しているその他の相
互作用タンパク質を迅速に同定するために使用されうることを示している。

【0219】

5の細胞質ドメインは、他のインテグリンサブユニットと較べて構造的及び機能的に
独特であり (表8)、わずか38%という 3の細胞質ドメインとの相同性を有している (He
mlerら、1994)。 vとの会合のための構造的要件が、 3と 5とのさらなる一次配列の
相違を防止しているが; 既存の差異が、 v 5のテーリンとの減少した相互作用の原因と
なっている可能性が高いことが提唱されている (Lewisら、1996)。 5の細胞質ドメイン
を、チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞において、 1の細胞外ドメインとのキメラ
として発現させた場合、キメラ受容体は 5と同様の挙動を示し、細胞遊走及び受容体の
限局性付着への局在の欠損を促進した (PasqualiniおよびHemler、1994)。しかしながら
、インテグリンサブユニット 1及び 3の細胞質ドメインは、機能的に相互に交換可能で
あることが示された (Solowskaら、1991)。他の研究によって、 v 3及び v 5が、限
局性付着への局在及び細胞遊走への寄与に関して異なっていると考えられることが示され
た (Delannetら、1994; Filardoら、1995)。しかしながら、これらは、機能的相違が、
特定のドメインにマッピングされていないことを報告した。

【0220】

10

20

30

40

50

【表 8】

類似のインテグリン サブユニット細胞質ドメインの整列化
3細胞質ドメインと 5細胞質ドメインとの主要な差異が強調されている。

B1 HDRREFAKFEKEKMNNAKWDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
B2 SDLREYRRFEKEKLSQWNN-DNPLFKSATTTVMNPKFAES
B3 HDRKEFAKFE~~EE~~RARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG
B5 HDRREFAKFQ~~SE~~RS~~RA~~RYEMASNPLYRKP~~ISTHTVDFTFN~~KSYNGTVD

10

【0221】

血管新生スイッチが誘発された後は、別個の分子が、3又は5のいずれかと会合する可能性が高い。さらに、v細胞質ドメインとの選択的会合も、各ヘテロダイマーの環境において可能性がある。例えば、インテグリン vサブユニットの細胞質テール内のターンは、v 3のコンフォメーション及びリガンド結合に影響を与えることが示されている (FilardoおよびCheresh, 1994)。選択的シグナル伝達特性の基礎は、それぞれの細胞質ドメインと会合する特異的分子の集合であるのかもしれない。本研究は、3及び5の細胞質ドメインに対するファージディスプレイライブラリのパニング、並びに細胞質ドメイン結合ペプチドの生物学的特性の決定という新規な戦略を活用することにより、v 3及び v 5に選択的な血管新生シグナル伝達に参与している分子を確定する。

20

【0222】

開示された方法は、従来の手法と比していくつかの利点を有している。(i) インテグリン細胞質ドメインと直接的又は間接的に相互作用する細胞内分子を特徴決定する能力；(ii) 極めて少量でインテグリン細胞質ドメインと結合する分子に対する抗体の開発；及び(iii) ファージディスプレイライブラリスクリーニングは、細胞質ドメイン結合タンパク質を模倣するペプチドの同定に至るであろう。

【0223】

方法

二次元細胞培養

3及び5インテグリンを発現する3個のヒト内皮細胞系：KS1767細胞 (Herndierら、1996)、HUVEC (ATCC)、及びBCE細胞 (Solowskaら、1991) を使用した。異なるタンパク質 (即ち、ビトロネクチン、フィブロネクチン、コラーゲン、又はラミニン) で覆われた無菌のガラス製カバーガラスを基質として使用した。細胞が接着し拡散した後、0.05%ウシ胎仔血清を含む培地中での12時間のインキュベーションにより、単層を休止状態にした。ペネトラチン (penetratin) 膜透過性タグ (下記参照) を使用して、ペプチドを細胞へと導入した。細胞を、接着及び拡散のため、ECMタンパク質へと播いた。単層を、bFGF、TNF、VEGF、及びTGFを含む、vにより媒介される血管新生に参与している各増殖因子で6時間刺激した。未処理の細胞が、陰性対照であった。

30

【0224】

三次元細胞培養：

24穴組織培養プレートのウェルに各150µlのマトリゲル (Matrigel) を添加し、37°Cで10分間ゲル化させた。2%FCSが補足されたM199培地中で24時間、HUVECを枯湯状態にした後、トリプシン処理したものを使用した。10⁴個の細胞を3通り、各ウェルに穏和に添加し、37°Cで30分間、ゲルコーティングへと接着させた。次いで、培地を、ペプチドを含む完全培地に交換した。24時間後、倒立顕微鏡 (Canon) を用いて、プレートをモニタリングし、写真撮影した。

40

【0225】

走化性アッセイ：

細胞遊走アッセイを、以下のようにして実施した。48ウェルマイクロケモタキシスチャンパーを使用した。8µm孔を有する、ポリビニルピロリドンを含まないポリカーボネート

50

フィルター (Nucleopore、Cambridge、MA) に、室温で10分間、1%ゼラチンをコーティングし、2%FCSが補足されたM199培地で平衡化した。ペプチドを含む2%FCS、20ng/ml VEGF-A (R&D System)、及び1U/mlヘパリンが補足されたM199を、ボイデン (Boyden) チャンバーの下室に置いた。一晚、枯渇状態にしたサブコンフルエントの培養物を迅速にトリプシン処理し、最終濃度 2×10^6 個/mlで、2%FCSが補足されたM199に再懸濁させた。フィルターを下チャンバーと上チャンバーの間に置いた後、50 μ lの細胞懸濁液を上室に蒔いた。5%CO₂を含む湿潤雰囲気中で37 °Cで5時間、細胞を遊走させた。次いで、フィルターを除去し、上側の細胞を、ゴムポリスマン (policeman) を用いて剥離した。遊走した細胞をメタノールで固定し、ギムザ溶液 (Diff-Quick、Baxter Diagnostics、Rome、Italy) で染色した。各ウェル内の5個のランダムな高倍率視野 (40倍) を計数した。

10

【0226】

増殖アッセイ：

細胞増殖は、記載されているようにして (PasqualiniおよびHemler、1994) 測定した。簡単に説明すると、 4×10^4 個のHUVECを24ウェルプレート内でインキュベートした。細胞を24時間枯渇状態にし、次いで培地を除去し、VEGF及び15 μ Mの各ペプチドの存在下で交換し、18時間インキュベートした。次いで、50 μ lの [³H]チミジン (1 μ Ci/ml) を含む培地をウェルに添加し、さらに6時間37 °Cでインキュベートした後、培地を除去し、細胞を10%TCAで4 °Cで30分間固定し、エタノールで洗浄し、0.5N NaOHで可溶化した。LS 6000SC ベックマン (Beckman) シンチレーションカウンターを用いて液体シンチレーションにより放射能を計数した。各実験を3通り3回実施し、結果を平均値 \pm SDで表した。

20

【0227】

アポトーシスアッセイ (ヨウ化プロピジウム染色サブジプロイド (subdiploid) 集団)

およそ 1×10^6 個の細胞を完全培地中に採集し、15 μ Mのペプチドを4時間、8時間、又は12時間添加した。次いで、細胞をPBSで洗浄し、0.5mlのヨウ化プロピジウム溶液 (50 μ g/ml PI、0.1% Triton X-100、0.1% クエン酸ナトリウム) に再懸濁させた。4 °Cで24時間のインキュベーションの後、細胞を、488nmレーザーを用いてXLコールター (Coulter) (Coulter Corporation) で計数し；各ヒストグラムについて12,000個の細胞を計数し、細胞周期分布をマルチサイクル (Multicycle) プログラムで分析した。

【0228】

ペプチド及び適切な対照の微小注入又はペネトラチン媒介取り込みの後、アポタグ (Apoptag) キットを使用して細胞アポトーシスをモニタリングした。実験は、カスパーゼ阻害剤及び特異的カスパーゼに対する抗体の存在下で実施した。

30

【0229】

サイトカイン及び腫瘍により誘導される血管新生のアッセイ

CAMへと移植された血管新生因子及び腫瘍細胞は、新たな毛細血管の成長を刺激する。10日ニワトリ胚に由来するCAMにおいて、以前には無血管であった領域に移植されたVEGF又はbFGFのフィルターにより、血管新生を誘導した。異なる処理 (ペネトラチンペプチド及び対照) を局所適用し、3日後、フィルター及び周囲のCAMを切除しホルマリンで固定した。立体顕微鏡を用いて、CAMの焦平面内で、ディスクに侵入した血管の数を定量した。各群8個のCAMからの血管数の平均値及び標準誤差を比較した。

40

【0230】

リン酸化及びリン酸化されたファージライブラリのパニング

srcファミリーのプロテインキナーゼ (Fyn、c- Src、Lyn、及びSyc)、並びにMAPキナーゼのようなセリン/トレオニンキナーゼによるペプチドライブラリのリン酸化を、以前に記載されたようにして実施した (Schmitzら、1996；Denteら、1997；Gramら、1997)。簡単に説明すると、20%ポリエチレングリコール8000を含む2.5M NaClによる二重沈殿により、培養上清からファージ粒子を収集した。粒子を 10^{12} 個/mlで溶解させた。精製されたファージ (10 μ l) を、50 μ lの反応緩衝液容量で、異なる濃度 (35~3,500単位) のプロテインキナーゼと共に、室温で3時間インキュベートした。リン酸化されたペプチドを表示しているファージを選択するため、反応混合物を、10 μ gのアガロースと接合した抗P-T

50

yr、抗P-Ser、又は抗P-Thrモノクローナル抗体を含むチューブに移した。結合したファージを、0.3mlの溶出緩衝液(0.1 M NaCl/グリシン/1mg/ml BSA、pH2.35)でカラムを洗浄することにより溶出させた。溶出液を2Mトリス塩基で中和し、2mlの対数増殖期中期(mid-log)の細菌培養物と共にインキュベートした。その一部20 μ lを播種のため取り出し、記載されているようにしてファージを採集した。リン酸化から選択までの工程を繰り返した。3及び5の細胞質ドメインと結合するリン酸化されたペプチドを、先のセクションに記載されたようにして分析した。

【0231】

3及び5の細胞質ドメイン上のリン酸化部位、並びに細胞質ドメイン結合ペプチドをインビトロでマッピングするため、マトリックス支援レーザーデソープション飛行時間型(Matrix-assisted laser desorption time-of-flight)(MALDI-TOF)質量分析計を使用した。融合タンパク質又はペプチドを記載されたようにしてインビトロでリン酸化し、RP-HPLC又はRPマイクロチップカラムにより精製した。リン酸化されたペプチドを、三つの方法により同定した。(1)キナーゼ反応後の80Daの質量シフト;(2)ホスファターゼ処理後の80Daの欠損;又は(3)チロシンリン酸化ペプチド又はセリン、トレオニンリン酸化ペプチドについての、リニア(linear)モードに対するリフレクター(reflector)モードでのそれぞれ80Da又は98Daの欠損。必要に応じて、ペプチドをRP-HPLCにより精製し、配列ラダーを作製するため、カルボキシペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼによる消化に供した。これは、1個のペプチドが2個またはそれ以上のリン酸化部位を内含している場合に特に有用であった。

【0232】

リン酸化されたGST-融合タンパク質に対するパニング

GST融合タンパク質を記載されたようにしてインビトロでリン酸化した(Schmitzら、1996;Denteら、1997;Gramら、1997)。簡単に説明すると、10 μ g/mlを、5.5単位のFynプロテインキナーゼを含む反応緩衝液(50 mM Tris、5mM MgCl₂、500 μ M Na₃VO₄、500 μ M ATP、全容量50 μ l)と共に室温で3時間インキュベートした。40%のTCAを添加することにより、反応を停止させた。キナーゼ基質タンパク質を沈殿させた後、それをPBSに再懸濁させ、マイクロタイターウェル上に10 μ g/ウェルでコーティングした。CX7Cライブラリの一部(2.5 \times 10¹¹形質導入単位)をGST融合タンパク質上でインキュベートした。ランダムに選択されたクローンから、ファージを配列決定した。

【0233】

質量分析研究

質量分析によるペプチド質量マッピングを、3及び/又は5の細胞質ドメインの新規リガンドを同定するために使用した。細胞質ドメイン結合ペプチドに対して産生させたポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を、標的タンパク質(細胞骨格分子又はシグナル伝達分子)を精製するために使用した。これらのタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、SDSゲルから切り出し、トリプシンでゲル内消化した。ペプチドの抽出後、ペプチド質量のリストを作製するためMALDI-TOF質量分析を実施した。このペプチド質量のリストは、プロテアーゼ特異性と組み合わせられ、配列データベースを検索するために使用されうる比較的特異的な「サイン」を与える。タンパク質配列がデータベース内に存在する場合には、この方法により、高い信頼性でタンパク質が同定されうる。この手法の検出下限は、現在のところ、N末端エドマン配列決定法よりも少なくとも10~20倍低い1pmolである。

【0234】

結果

3及び5の細胞質ドメインに対するファージペプチドライブラリのパニング

3及び5の細胞質ドメインと結合するタンパク質を、マイクロタイターウェルにコーティングされたGST-3cyto又はGST-5cytoのいずれかを含む組換えGST融合タンパク質を用いた複数のファージライブラリのスクリーニングにより単離した。固定化GSTを、各細胞質ドメインのパニングにおける濃縮についての陰性対照として使用した。他に開示されたようにして(Koivunenら、1995;Pasqualiniら、1995)、3回のパニングの後、ラン

ダムに選択されたクローンからファージを配列決定した。3又は5細胞質ドメインと特異的に相互作用する別個の配列が単離された(表9)。2回目及び3回目のパニングからランダムに選択されたクローンを配列決定した。ファージミドによりコードされたペプチドのアミノ酸配列を、ヌクレオチド配列から推定した。示されたライブラリを用いたパニングの後、最も高頻度に見出されたモチーフが、表9に示されている。比率は、3-GSTでコーティングされたウェルから回収されたコロニーの数を、GST又はBSAから回収されたもので割ることにより計算した。

【0235】

【表9】

3又は5の細胞質ドメインと結合するファージにより表示された配列

ペプチドモチーフ	配列番号	$\beta 3/GST$ 比	$\beta 3/BSA$ 比
<u>CX₉ライブラリ</u>			
CEQRQTQEGC	配列番号 :93	4.3	14
CARLEVLLPC	配列番号 :94	2.8	18.7
<u>X₄YX₄ライブラリ</u>			
YDWWYPWSW	配列番号 :95	5.6	163
GLD TYRGSP	配列番号 :96	4.1	48
SDNRYIGSW	配列番号 :97	3.3	32
YEWYWSWA	配列番号 :98	2.2	28.1
KVSWYLDNG	配列番号 :99	2.1	20
SDWYYPWSW	配列番号 :100	2.1	157
AGWLYMSWK	配列番号 :101	1.8	2.4
<u>プール環状ライブラリ</u>			
CFQNR	配列番号 :102	3.1	16
CNLSSEQC	配列番号 :103	2.7	62
CLRQSYSYNC	配列番号 :104	2.4	3.2
ペプチドモチーフ	配列番号	$\beta 5/GST$ 比	$\beta 5/BSA$ 比
<u>プール環状ライブラリ</u>			
CYIWPDSGLC	配列番号 :105	5.2	193
CEPYWDGWFC	配列番号 :106	3.1	400
CKEDGWLMT	配列番号 :107	2.3	836
CKLWQEDGY	配列番号 :108	1.8	665
CWDQNYLDDC	配列番号 :109	1.5	100
<u>X₄YX₄ライブラリ</u>			
DEEGYYMMR	配列番号 :110	11.5	29
KQFSYRYLL	配列番号 :111	4.5	8
VVISYSMPD	配列番号 :112	3.8	28
SDWYYPWSW	配列番号 :113	2.4	304
DWFSYYEL	配列番号 :114	1.7	153

10

20

30

40

【 0 2 3 6 】

3又は 5の細胞質ドメインとの相互作用の特異性を、細胞質ドメイン含有融合タンパ

50

ク質 (3又は 5) と結合したファージの数と、GST単独 (陰性対照) の数との比率を計算することにより決定した。図9は、GST- 3cyto結合ファージを用いて実施された結合アッセイからの結果を示している。2回目及び3回目のパニングにおいて最も高頻度に見出されたモチーフを表示していた6個のファージを試験した。各パネルは、示されたような 3細胞質ドメインと結合する異なるペプチドを表示していたファージについての結合アッセイからの結果を示している。挿入物非含有ファージ、又は未選択のライブラリが、陰性対照として使用され、それらは、バックグラウンドを超える結合を示さなかった。各アッセイについて二つの播種希釈率が示されている。

【 0 2 3 7 】

5細胞質ドメイン融合タンパク質を含むスクリーニングにおいて単離されたファージの特異性を決定するため、類似の戦略を使用した。結合アッセイは、図10に示される個々に増幅されたファージを用いて実施した。2回目及び3回目のパニングにおいて最も高頻度に見出されたモチーフを表示していた5個のファージを試験した。各パネルは、5細胞質ドメインと結合するペプチドを表示していたファージについての結合アッセイを示している。挿入物非含有ファージ、又は未選択のライブラリが、陰性対照として使用され、それらは、これらのアッセイにおいて、バックグラウンドを超える結合を示さなかった。

【 0 2 3 8 】

選択されたモチーフの結合が各細胞質ドメインに特異的であるか否かを決定するため、個々のファージモチーフの、 1、 3、又は 5細胞質ドメイン融合タンパク質との相互作用を比較する結合アッセイを実施した。抗GST抗体を用いたELISAは、3個のタンパク質が、等しい効率でプラスチックへとコーティングされうること、及び従って結合の差がコーティング濃度の差を反映するのではないことを示した (示していない) 。 3で選択されたファージ及び 5で選択されたファージの両方が、最初に選択されたタンパク質と選択的に相互作用し、 $3/1=3.9$ 、 $3/5=3.7$ 、 $5/1=4.8$ 、及び $5/3=6.9$ という平均結合選択性が観察された (示していない) 。 BSAに対するインテグリン細胞質ドメインへの平均選択性は、約1~2桁大きかった (示していない) 。 試験されたファージは、いずれも、 1細胞質ドメインとは強く結合しないようであった (示していない) 。

【 0 2 3 9 】

インテグリン細胞質ドメイン結合ファージにより表示された配列に相当する合成ペプチドの特徴決定

結合特性に基づき、さらなる研究のため、特定のファージを選択した。各ファージにより表示された配列に相当する合成ペプチドを、結合阻害研究を実施するために使用した。このアッセイにより、ファージ結合が各ファージにより表示されたターゲットペプチドにより完全に媒介されるのか、又は非特異的成分も含んでいるのか、が決定された。予想通り、合成ペプチドは、用量依存的に対応するファージの結合を阻害した (図11及び図12) 。 無関係のアミノ酸を含む対照ペプチドは、同一濃度で試験した場合、ファージ結合に対する効果を有していなかった。

【 0 2 4 0 】

リン酸化事象が、選択されたペプチドの細胞質ドメインとの相互作用を調整する

リン酸化を含む事象は、シグナル伝達の制御において重要である。ファージディスプレイ系を、二つのレベルでチロシンリン酸化の効果を評価するために使用した。第一に、3又は 5の細胞質ドメインを含む組換え融合タンパク質を、チロシン含有ペプチドを表示しているファージライブラリのパニングに使用した。第二に、細胞質ドメイン自体をリン酸化した後、ファージ選択を実施した。特定のチロシンキナーゼの、選択されたペプチドの細胞質ドメインとの相互作用を調整する能力を調査するための実験を、実施した。チロシン含有ペプチドを表示しているファージライブラリのパニングにおいて得られた結果は、表10に示されている。

【 0 2 4 1 】

3回目及び4回目からランダムに選択されたクローンを、Fynによりリン酸化されたX4YX4ライブラリから配列決定した。ファージミドによりコードされたペプチドのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を、ヌクレオチド配列から推定した。表10は、示されたライブラリを 3又は 5でパニングした後、最も高頻度に見出されたモチーフを示している。 3又は 5との結合の比率は、パニング後に見出された 3又は 5コロニーの数を、GST又はBSAコロニーの数で割ることにより計算した。 3又は 5のFynによりリン酸化されたファージとの結合の、未リン酸化ファージとの結合に対する比率を、パニング後に見出されたコロニーの数を割ることにより計算した。

【 0 2 4 2 】

【表 1 0】

インテグリン細胞質ドメインと結合するリン酸化されたファージにより表示された配列

ペプチドモチーフ		リン酸化/非リン酸化	$\beta 3$ 又は $\beta 5$ /GST	$\beta 3$ 又は $\beta 5$ /BSA
<u>$\beta 3$ 細胞質</u>				
GGGSYRHVE	配列番号:115	13.2	1.5	5.3
RAILYRLAN		2.8	1.3	20
MLLGYRFEK	配列番号:116	2.5	3.5	2.7
	配列番号:117			
<u>$\beta 5$ 細胞質</u>				
TMLRYTVRL	配列番号:118	14.3	3.4	2.2
TMLRYFMFP		4.2	2.3	3.8
TLRKYFHSS	配列番号:119	3.8	3.8	15.2
TLRKYFHSS	配列番号:120	1.8	5.6	7.3
	配列番号:121			

【 0 2 4 3 】

細胞質ドメイン結合の親和性及び特異性に対するリン酸化の効果を調査した。 3及び 5の細胞質ドメインと結合するペプチドを表示しているファージを、Fynキナーゼを使用して、以前に記載されたようにして (Schmitzら、1996 ; Denteら、1997 ; Gramら、1997) 、インビトロでリン酸化した。ファージ表面上のチロシン含有ペプチドの特異的リン酸化を、キナーゼ反応において ^{32}P - dATPを使用し、ファージp11タンパク質をSDS-PAGEで分離することにより確認した。

【 0 2 4 4 】

インビトロでリン酸化されたファージは、 3インテグリン細胞質ドメインとの結合の親和性及び特異性の増加を示した (図13)。TLRKYFHSS (配列番号:120) ファージを、特異性を決定するため、他のGST細胞質ドメイン融合タンパク質を含むアッセイにおいても試験した (図14)。

【 0 2 4 5 】

インテグリン結合ペプチドと既知の細胞骨格タンパク質及びシグナル伝達タンパク質との配列類似性

インテグリン細胞質ドメイン結合ファージにより表示されたペプチドは、細胞骨格タンパク質及びシグナル伝達に参与しているタンパク質に見出されるいくつかの領域と類似していた (表11)。単離ペプチドのいくつかと、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ5のある領域 (MAPK5、アミノ酸227 ~ 234) との類似性は、特に興味深かった。MAPKカスケード、細胞の接着、遊走、及び増殖を含む関連が提唱されている (Linら、1997)。

【 0 2 4 6 】

【表 1 1】

インテグリン結合ペプチドと、既知の細胞骨格タンパク質及びシグナル伝達タンパク質との配列類似性

単離モチーフ	候補タンパク質	領域(AA#)	相同性(%)	
<u>β3細胞質</u>				
GLD TYR GSP (配列番号 :96)	Ras関連タンパク質	124-133	75	10
	Ser/Thrキナーゼ(K-11)	18-25	75	
SDNRYIGSW (配列番号 :97)	PDGF受容体	985-992	85	20
	ホスファチジルイノシトール4 ホスファターゼ5	233-241	85	
	受容体プロテインキナーゼ	185-191	85	
	プロテインキナーゼ clk2	71-79	63	
CEQRQTQEGC (配列番号 :93)	MAPK5	227-234	75	
	ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ	494-503	78	
CLRQSYSYNC (配列番号 :104)	サイクリン依存性キナーゼ5 (cdk5)	230-239	75	
<u>β5細胞質</u>				
VVISYSMPD (配列番号 :112)	Ser/Thrキナーゼ	479-485	83	30
	IFN (β鎖)	27-35	70	
	アクチン	240-248	67	
	限局性付着キナーゼ	43-51	75	
DEEGYYMMR (配列番号 :110)	チューブリン	60-66	100	
	推定 Ser/Thrキナーゼ	292-299	86	

【 0 2 4 7 】

膜透過性ペプチド

ペネトラチンは、親水性化合物に原形質膜を通過させることができるペプチドである。浸透部分との融合は、明らかな崩壊なしに、オリゴペプチドを細胞質、核、又はその両方へと直接的にターゲティングすることを可能にする (Derossiら、1994)。この膜透過性ペプチドは、ショウジョウバエ (*Drosophila*) 転写因子 (Jolietら、1991a、1991b ; Le Rouxら、1993) であるアンテナペディアのホメオドメインのアミノ酸43~58に相当する16残基

(RQKIWFQNR RMKWKK、配列番号 :122)

からなる。ペネトラチンにより媒介される取り込みは、37 及び4 の両方で起こり、取り込まれたペプチドは細胞から完全な状態で回収される。

【 0 2 4 8 】

3又は 5の細胞質ドメインと結合することが見出されたモチーフの配列と融合したペネトラチン配列を含むペプチドを設計した。ペプチドは、p-ヒドロキシメチルフェノキシメチルポリスチレン (HMP) 樹脂及び標準的なFmoc化学を使用して、431アブライドバイオ

10

20

30

40

50

システムズ (Applied Biosystems) ペプチド合成機で合成した。ペプチドの取り込み及び可視化は、記載されているようにして (Derossiら、1994; Hallら、1996; Theodoreら、1995)、実施した。

【0249】

簡単に説明すると、10~50 µg/mlのビオチン化ペプチドを細胞培養物へ添加した。ペプチドを、播種された細胞と共にインキュベートした。2~4時間後、培養物を組織培養培地で3回洗浄し、固定し、エタノール：酢酸 (9:1) を使用して、-20 °Cで5分間、透過処理した。培養物を、10%ウシ胎仔血清 (FCS) 及び0.02% Tweenを含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) と共に30分間インキュベートすることにより、非特異的タンパク質結合部位をブロッキングした。培養物を、FITCと接合したストレプトアビジン (1:200希釈) を含む同緩衝液の中でインキュベートし、TBSで洗浄した後、共焦点顕微鏡検による視察のため設置した。ペネトラチンと連結されたペプチドは、極めて効率的に取り込まれた (データは示していない)。

【0250】

機能データは、3又は5に対して選択された細胞質ドメイン結合ペプチドが、インテグリンにより媒介されるシグナル伝達及びその後の細胞応答 (即ち、内皮細胞の接着、拡散、増殖、遊走) を妨害しうることを示した。ファージスクリーニングにより見出された合成モチーフ (SDNRYIGSW、配列番号: 97; 及びCEQRQTQEGC、配列番号: 93; 3結合ペプチド、並びにVVISYSMPD、配列番号: 112; 5結合ペプチド) の「取り込み可能」型の市販のパネルを得た。これらの複合キメラペプチドは、ペネトラチンとカップリングした、3又は5細胞質ドメイン結合ペプチドのうちの最も選択的なもの+完全細胞へと取り込まれた後のペプチドの追跡を可能にするためのビオチン部分からなる。これらの膜透過性型のペプチドは、取り込まれ、3及び5のリガンド結合後の細胞事象に影響を与え、多量のアポトーシスを誘導しうる (データは示していない)。

【0251】

内皮細胞の増殖、走化性、及びアポトーシス

3及び5インテグリン細胞質ドメイン結合モチーフの、内皮細胞増殖に対する効果を、内皮細胞を活性化する因子による刺激の後、評価した (図15)。細胞増殖は、パスカルリーニ (Pasqualini) およびエルマー (Hemler) (1994) に従い測定した。簡単に説明すると、 4×10^4 個のHUVECを24ウェルプレートでインキュベートし、24時間枯渇状態にし、その後、培地を除去し、VEGF及び15 µMの各ペプチドの存在下で交換した。さらに18時間のインキュベーションの後、50 µlの $[^3\text{H}]$ チミジン (1 µCi/ml) を含む培地をウェルに添加した。さらに6時間37 °Cでインキュベートした後、培地を除去し、細胞を10% TCAで45分間固定し、エタノールで洗浄し、0.5N NaOHで可溶化した。LS 6000SCベックマン (Beckman) シンチレーションカウンターを使用することにより、液体シンチレーションにより放射能を計数した。各実験を3通り3回実施し、結果を平均値 ± SDで表した。

【0252】

3及び5インテグリン細胞質ドメイン結合モチーフの、内皮細胞遊走に対する効果を、内皮細胞を活性化する因子による刺激の後、評価した。試験されたペプチドは、用量依存性的かつ特異的に細胞機能に影響を与えた。それらの特性は、3又は5細胞質ドメインに内在性のものと考えられる (図16)。

【0253】

走化性アッセイ

細胞遊走は、48ウェルマイクロケモタキシスチャンバーにおいてアッセイした。8 µm孔を有する、ポリビニルピロリドンを含まないポリカーボネートフィルターを、室温で10分間1%ゼラチンでコーティングし、2% FCSが補足されたM199培地で平衡化した。ペプチドを含む2% FCS、20ng/ml VEGF-A (R&D System)、及び1U/mlヘパリンが補足されたM199を、ポイデンチャンバーの下室に置いた。一晚、枯渇状態にしたサブコンフルエントの培養物を迅速にトリプシン処理し、最終濃度 2×10^6 個/mlで、2% FCSを含むM199培地に再懸濁させた。フィルターを下チャンバーと上チャンバーの間に置いた後、50 µlの細胞懸濁液

を上室に蒔いた。5%CO₂を含む湿潤雰囲気中で37℃で5時間、細胞を遊走させた。次いで、フィルターを除去し、上側の細胞を、ゴムポリスマンを用いて剥離した。遊走した細胞をメタノールで固定し、ギムザ溶液で染色した。各ウェル内の5個のランダムな高倍率視野(40倍)を計数した。結果は、両方の3インテグリン細胞質ドメイン結合ペプチドが細胞の遊走を増加させたが、ペネトラチンは細胞に影響を与えなかったことを示している。

【0254】

アポトーシスアッセイ(ヨウ化プロピジウム(PI)染色サブジプロイド集団)

およそ1×10⁶個の細胞を完全培地中に採集し、15μMのペプチドを4時間、8時間、又は12時間添加した。次いで、細胞をPBSで洗浄し、0.5mlのヨウ化プロピジウム溶液(50μg/ml PI、0.1%Triton X-100、0.1%クエン酸ナトリウム)に再懸濁させた。4℃での24時間のインキュベーションの後、細胞を、488nmレーザーを用いてXLコールター(Coulter Corporation)で計数し;各ヒストグラムについて12,000個の細胞を計数し、細胞周期分布をマルチサイクルプログラムで分析した。

【0255】

VISY-ペネトラチンキメラによる細胞の処理は、アポトーシスの誘導をもたらした(図17、パネルd)。細胞を他の増殖因子に曝露した場合には、アポトーシス促進効果は観察されなかった(示していない)。ペネトラチン単独及び他のペネトラチンキメラも、類似の効果を誘導することができなかった(図17、パネルc)。この所見は、血管新生を阻害するための新規な手法が、インテグリンターゲティングペプチドの使用に基づき開発されることを示している。

【0256】

細胞質ドメイン結合ペプチドによる免疫、及び得られた抗体の特徴決定

標準的な技術を使用して、v₃結合ペプチド及びv₅結合ペプチドを認識するポリクローナル抗体を、合成ペプチドを用いて作製されたKLH接合体を使用して生成させた。2個の異なる合成ペプチドに対する抗体を作製した(図18)。血清は、ウェスタンブロット分析により示されるように、固定化ペプチドを認識するだけでなく、全細胞抽出物中の特異的タンパク質も認識する(図19)。

【0257】

ウサギを、SDNRYIGSW(配列番号:97)-KLH接合体又はGLDITYRGSP(配列番号:96)-KLH接合体で免疫した。各ウサギに、200μgのKLHと接合したペプチドを含む完全フロイントアジュバントを注射した。20~60日後、ウサギに100μgの不完全フロイントアジュバントを注射した。3回目の免疫後、血清を収集した。最初の免疫の前に得られた免疫前血清を、実験において付加的な対照として使用した。

【0258】

ポリクローナル抗体をELISA、ウェスタンブロット、及び免疫沈降により試験した。ELISAアッセイにおいては、マイクロタイターウェルプレートに10μg/mlのペプチドをコーティングした。プレートを37℃で乾燥させ、PBS+3%BSAでブロッキングし、異なる血清希釈物を含むPBS+1%BSAと共にインキュベートした。洗浄及び二次抗体とのインキュベーションの後、アルカリホスファターゼ基質を添加し、抗体結合を405nmで比色検出した。マウスポリクローナル血清及びウサギポリクローナル血清の両方で観察された反応性は、高度に特異的であった。全ての場合に、抗体結合は、免疫に使用された対応するペプチドによるプレインキュベーションにより消失したが、対照ペプチドによっては消失しなかった(図18及び図19)。2個の3細胞質ドメイン結合ペプチドに対して産生された抗体は、³⁵S標識抽出物を使用した免疫沈降実験において、全細胞抽出物上の特異的バンドを認識する。ポリクローナル血清及び精製されたIgGで、類似の結果が得られた(示していない)。

【0259】

本実施例は、細胞受容体の特定のドメインに対するターゲティングペプチドが、ファージディスプレイにより同定されうることを示している。そのようなペプチドは、エンドスタチンのような細胞受容体の内因性リガンドを同定するために使用されうる。さらに、ペ

10

20

30

40

50

ペプチド自体が、治療効果を有する場合もあるし、又はより有効な治療剤の同定のための基礎として有益である場合もある。ここで同定されたエンドスタチンターゲットペプチドは、細胞へと導入した場合、細胞の増殖、走化性及びアポトーシスに対する効果を示した。当業者であれば、本発明が、開示されたペプチド又は治療効果に限定されないことを理解するであろう。その他の細胞受容体及びリガンド、並びにそれらの阻害剤及び活性化剤も、開示された方法により同定されうる。

【0260】

実施例7. インテグリン結合ペプチドによるアポトーシスの誘導（エンドタノス（Endothanos））

実施例9は、ペネトラチンへの結合により細胞へと輸入されたVISYペプチド（VVISYSMPD、配列番号：112）が、HUVEC細胞においてアポトーシスを誘導しうることを示した。ここでアネキシンVとして同定されたペプチドの内因性細胞類似体を同定するため、VISYペプチドに対して産生された抗体が使用された。結果は、アネキシンVが、新規アポトーシス経路に参与しているインテグリンの内因性リガンドであることを示している。

【0261】

方法

タンパク質精製

前記実施例9に記載の方法を使用して、VISYペプチド（VVISYSMPD、配列番号：112）に対するポリクローナル抗体を調製した。MDA-MB-435乳癌細胞を、内因性VISYペプチド類似体の精製のため使用した。細胞を氷冷PBSで3回洗浄し、冷水で20分間溶解させた。膜画分から細胞質画分を分離するため、細胞抽出物を100,000 × gで30分間遠心分離した。細胞質画分をゲル濾過カラム（10～50kDa）及び陰イオン交換カラム（monoQ）でのカラムクロマトグラフィに供した。陰イオン交換カラムを、50mM～1M NaClの塩勾配で溶出させた。1ml画分を収集し、SDS-PAGEを実行し、抗VISY抗体と反応性の内因性タンパク質の存在に関してウェスタンブロットングにより試験した。36kDaの抗体反応性バンドを含む目的の画分は、約300mM NaClで溶出した。

【0262】

36kDaは、抗VISY抗体との陽性の反応性を示す画分に必ず出現した。画分をSDS-PAGE及び2Dゲル電気泳動、続いてウェスタンブロットングにより分析した。カラムクロマトグラフィの後、36 kDaタンパク質の実質的な濃縮が見られた（示していない）。36 kDaペプチドをSDS-PAGEゲルから切り出し、その配列を得るため質量分析により分析した。質量分析により得られた5個のペプチド配列は、全て、報告されているアネキシンVの配列（GenBankアクセッション番号GI_468888）との100%の相同性を示した。435細胞における存在に加え、36 kDaバンドは、カボジ肉腫細胞、SKOV細胞、及びHUVEC細胞にも見られた（示していない）。

【0263】

市販のアネキシンVに対する抗体を入手した（Santa Cruz Biologics、Santa Cruz、CA）。抗VISY抗体及び抗アネキシンV抗体を使用して、競合ウェスタンブロットを実施した。両方の抗体が、36 kDaタンパク質との反応性を示した（示していない）。これらの結果は、VISYペプチドの内因性タンパク質類似体がアネキシンVであることを示している。

【0264】

アネキシンV及び 5細胞質ドメインによるタンパク質-タンパク質相互作用

アネキシンVの 5インテグリンとの結合、及びVISYペプチドの効果を調査するため、競合結合アッセイを実施した。プレートに様々なインテグリンの細胞質ドメインのGST融合タンパク質をコーティングし、アネキシンVをプレートに添加した。抗アネキシンV抗体を使用して、アネキシンVの結合を決定した。図20Aに示されるように、アネキシンVはGST-1インテグリンともGST-3インテグリンとも結合しなかった。アネキシンVは、GST-5インテグリンと強く結合したが、結合は使用された緩衝液に依存していた（図20A）。トリス緩衝生理食塩水（TBS）においては低い結合が観察され、カルシウム（2mM）が添加された、又は添加されていない「細胞質緩衝液」（100 mM KCl、3mM NaCl、3.5 mM MgCl₂、

10

20

30

40

50

10mM PIPES、3mM DTT)では高い結合が観察された(図20A)。カルシウムは、アネキシンV活性がカルシウムにより調整されることが報告されているため、使用した。アネキシンVのGST-5との結合は、VISYペプチドの添加により阻止された(図20A)。図20Bは、抗アネキシンV抗体の精製されたアネキシンV及びVISYペプチドとの結合の相対レベルを示している。

【0265】

プレートのコーティングにアネキシンVを使用し、インテグリン細胞質ドメインのGST融合タンパク質を添加する、逆の実験を実施した。抗GST融合タンパク質抗体を使用して結合を評価した。予想通り、GST-5のみがアネキシンVとの実質的な結合を示し、GST-1及びGST-3は、低レベルのアネキシンV結合を示した(示していない)。いくつかの実験において、カルシウムの存在下では減少した結合が観察され、カルシウムイオンは、GST-5とアネキシンVとの結合相互作用を妨害すると考えられた(示していない)。カルシウムの存在下(67%阻害)では、カルシウムの非存在下(45%)よりも大きい程度のVISYペプチドによるアネキシンVのGST-5との結合の阻害が観察された(図20A)。

【0266】

5細胞質ドメインと結合するペネトラチンペプチドキメラはプログラム細胞死を誘導する

実施例9において示されたVISYペプチドによるアポトーシスの誘導を確認した。10⁶個のHUVEC細胞を15µMのVISYアンテナペディア(ペネトラチン)キメラ、又は15µMのアンテナペディアペプチド(ペネトラチン(pentratin))単独で2~4時間処理し、アガロースゲル電気泳動によりクロマチン断片化を分析した。図21は、クロマチン断片化により示されるようなVISY-Ant(ペネトラチン)によるアポトーシスの誘導を示している。VISYも、ペネトラチンも、単独ではアポトーシスを誘導しなかった。アポトーシスの誘導は、カスパーゼ阻害剤(zVAD、カスパーゼインヒビター(caspase inhibitor)I、Calbiochem #627610、San Diego, CA)をVISYキメラペプチドと同時に培地へ添加した場合に、最大70%阻害された。

【0267】

VISYペプチドにより誘導された細胞死の機構と他のアポトーシス促進剤によるものとの相違点は、細胞培養物において評価された他のアポトーシス機構には、細胞死の前に基質からの細胞の脱離が含まれる点である。対照的に、VISYにより誘導される細胞死においては、細胞は細胞死前に基質から脱離しない。従って、エンドタノス(内からの死)は、アノイクス(anoikis)(ホームレスネス(homelessness))とは異なっていると考えられる。

【0268】

実施例9及び本実施例の結果は、VISYペプチドがインテグリン依存性アポトーシス経路を活性化することを示している。本実施例は、VISYペプチドの内因性類似体がアネキシンVであることを示している。これらの結果は、アネキシンVと5インテグリンとの間の相互作用により媒介され、かつカスパーゼ活性に依存している新規アポトーシス経路の存在を証明している。この新規アポトーシス機構は、エンドタノスと呼ばれる。当業者であれば、アポトーシスを誘導又は阻害するための新規機構が、癌療法のような多様な用途に有用であることを理解するであろう。

【0269】

実施例8. 受容体/リガンド対の同定: アミノペプチダーゼAは内皮細胞機能及び血管新生を制御する

腫瘍血管の内皮細胞は、特異的な血管新生マーカーを発現する。アミノペプチダーゼA(APA、EC 3.4.11.7)は、血管新生中の微小血管においてアップレギュレートされる。APAは、オリゴペプチドからN末端のグルタミル残基又はアスパルチル残基を加水分解するホモダイマーの膜結合型亜鉛メタロペプチダーゼである(Nanusら、1993)。インビボで、APAは、アンジオテンシンIIをアンジオテンシンIIIへと変換する。レニン-アンジオテンシン系は、いくつかの内分泌機能、心血管機能、及び行動的機能の制御において重要な役割

を果たしている (Ardailou, 1997; StrothおよびUnger, 1999)。最近の研究は、血管新生におけるアンジオテンシンの役割も示唆しているが (Andradeら, 1996)、血管新生過程におけるAPAの機能は、従来検討されていない。

【0270】

本実施例においては、APA発現細胞に対してファージライブラリをスクリーニングすることにより、APAと結合することができるターゲティングペプチドが同定された。モチーフCPRECESIC (配列番号: 123) を含むAPA結合ペプチドは、APA酵素活性を特異的に阻害した。可溶性CPRECESIC (配列番号: 123) ペプチドはインビトロで内皮細胞の遊走、増殖、及び形態形成を阻害し、ニワトリ胚絨毛尿膜 (CAM) アッセイにおいてインビボの血管新生を妨害した。さらに、APAヌルマウスは、未成熟マウスにおける低酸素により誘導される網膜症において、野生型 (wt) マウスと比較して減少した量の網膜血管新生を有していた。これらの結果は、血管新生におけるAPAの役割のよりよい理解、及び新たな抗腫瘍治療戦略の開発をもたらす。

10

【0271】

材料及び方法 細胞培養

腎癌細胞系SK-RC-49に、全長APA cDNA (Gengら, 1998) をコードする発現ベクターをトランスフェクトした。細胞を、2mMグルタミン、1%非必須アミノ酸、1%ビタミン (Gibco BRL)、100U/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリン (Irvine Scientific)、10mMピルビン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich)、及び10%ウシ胎仔血清 (FCS) (Tissue Culture Biological, Tulare, CA) が補足されたMEM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) の中で維持した。安定的にトランスフェクトされた細胞を、G418含有培地中で維持した。HUVECをコラゲナーゼ処理により単離し、1~4代の間で使用した。細胞を、ゼラチンでコーティングされたプラスチック上で、20%FCS、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (50 µg/ml)、ヘパリン (50 µg/ml)、ウシ脳抽出物 (100 µg/ml) が補足されたM199培地 (Sigma) の中で増殖させた。培地補助剤は、全て商業的に入手した (Life Technologies, Inc., Milan, Italy)。

20

【0272】

抗体及びペプチド

抗APA mAb RC38 (Schlingemannら, 1996) を、トランスフェクトされた細胞溶解物からAPAを免疫捕獲 (immunocapture) するために使用した。CPRECESIC (配列番号: 123) 及びGACVRLSACGA (配列番号: 124) 環状ペプチドを化学合成し、非還元条件下で自発的に環状化させ、質量分析 (AnaSpec San Jose, CA) により精製した。CPRECESIC (配列番号: 123) ペプチドの質量分析機分析は、おそらく異なるジスルフィド結合の位置及びダイマーの形成を反映している6個の異なるピークを明らかにした。異なる画分のAPA酵素活性に対する生化学的挙動は類似していたため、下記の全ての手順において、6個のピークの混合物を使用した。

30

【0273】

APA免疫捕獲

セミコンフルエントのプレートから、100 mM N-オクチル-β-D-グルコピラノシド (Calbiochem) を含む冷PBSへと細胞を剥離し、氷上で2時間溶解させ、13,000 × gで15分間遠心分離した。マイクロタイター丸底ウェル (Falcon) に、2 µgのRC38を室温で4時間コーティングし、室温で1時間、PBS/3%BSA (Intergen, Purchase, NY) でブロッキングし、その後、150 µlの細胞溶解物 (1mg/ml) をmAbでコーティングされたウェル上で4時間一晩インキュベートし、PBS/0.1%Tween-20 (Sigma) で5回洗浄し、PBSで2回洗浄した。

40

【0274】

APA酵素アッセイ

細胞及び免疫捕獲されたタンパク質を、リルン (Liln) ら (1998) に従い、特異的酵素活性について試験した。簡単に説明すると、接着細胞又はRC38で免疫捕獲された細胞の抽出物を、3mM β-L-グルタミル-p-ニトロアニリド (Fluka) 及び1 mM CaCl₂を含むPBSと共に

50

に、37 °Cで2時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices、Sunnyvale、CA) で405nmにおける吸光度 (O.D.) を読み取ることにより、酵素活性を決定した。

【 0 2 7 5 】

細胞パニング

CX₃CX₃CX₃C (Cはシステインであり、Xは任意のアミノ酸である) ライブラリを調製した (Rajotteら、1998)。ファージ粒子の増幅及び精製、並びにファージ表示された挿入物のDNA配列決定を、前記と同様にして実施した。2.5mM EDTAを含むPBSとのインキュベーションにより細胞を脱離させ、結合培地 (20mM HEPES及び2%FCSが補足されたDMEMハイグルコース) で1回洗浄し、 2×10^6 細胞/mlの濃度で同培地に再懸濁させた。10¹⁰TUのファージを500 µlの細胞懸濁液に添加し、混合物を穏和に回転させながら一晩 (1回目) 又は2時間 (後続回) 4 °Cでインキュベートした。細胞を室温で結合培地で5回洗浄し、100 µlの同培地に再懸濁させた。1mlの対数増殖期K91kan大腸菌を添加し、混合物を室温で1時間インキュベートすることにより、ファージをレスキューした。細菌を、10mlの0.2 µg/mlテトラサイクリンが補足されたLB培地で希釈し、室温でさらに20分間インキュベートした。段階希釈物を40 µg/mlテトラサイクリンを含むLBプレートに播き、プレートを37 °Cで一晩インキュベートした後、コロニーを計数した。

10

【 0 2 7 6 】

ファージ結合特異性アッセイ

細胞パニングについて記載したようにして、10⁹TUの入力量を用いて細胞結合アッセイを実施した。増加性の濃度でCPRECESIC (配列番号: 123) ペプチドを結合培地へ添加することにより、特異性を確認した。ファージを免疫捕獲されたAPAと結合させるため、ウェルをPBS/3%BSAで室温で1時間ブロッキングし、50 µlのPBS/3%BSA の中で10⁹TUと共に室温で1時間インキュベートした。PBS/1%BSA/0.01%Tween-20で8回洗浄し、PBSで2回洗浄した後、200 µlの対数増殖期K91kan大腸菌を添加することにより、ファージをレスキューした。各実験を少なくとも3回繰り返した。

20

【 0 2 7 7 】

APA結合ファージのインビボ腫瘍回帰

MDA-MB-435に由来する腫瘍異種移植片を、2ヶ月齢の雌ヌードマウス (Jackson Labs、Bar Harbor、Maine) で確立した。マウスにアバーチン (Avertin) 麻酔を施し、10⁹TUのファージを含む200 µl容量のDMEMを尾静脈から静脈注射した。ファージを5分間循環させ、5 mlのDMEMで心臓を通して動物を還流した。各マウスから腫瘍及び脳を切除し、計量し、等量の組織をホモジナイズした。組織ホモジネートを、プロテイナーゼ阻害剤カクテル及び0.1%BSAを含む氷冷DMEMで3回洗浄した。結合したファージをレスキューし、細胞パニングについて記載したようにして計数した。Fd-tetファージを、対照として同じ入力量で注射した。その実験を2回繰り返した。平行して、同組織試料の一部をブアン溶液で固定し、組織切片の調製のためパラフィン包埋した。M-13ファージに対する抗体 (Amersham-Pharmacia) を染色に使用した。

30

【 0 2 7 8 】

細胞増殖アッセイ

HUVECを含む完全M199培地を、48ウェルプレート (10⁴個/ウェル) に蒔き、24時間付着させた。次いで、2%FCSを含むM199培地中で24時間細胞を枯渇状態にした。CPRECESIC (配列番号: 123) ペプチド又は対照GACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチド (1 mM) を含む、2%FCS及び10ng/ml VEGF-A (R&D System、Abingdom、UK) を含む培地を、ウェルに添加した。示された時間インキュベートした後、細胞を2.5%グルタルアルデヒドで固定し、0.1%クリスタルバイオレットを含む20%メタノールで染色し、10%酢酸で可溶化した。全ての処理を3通り行った。細胞増殖は、マイクロプレートリーダー (Biorad、Hercules、CA) で590nmのO.D.を測定することにより評価した。較正曲線を確立し、O.D.と細胞数との直線的な相関が、10³~10⁵細胞で観察された。

40

【 0 2 7 9 】

50

走化性アッセイ

細胞遊走アッセイは、ブリッソーニ (Bussolini) ら (1995) に従い、48ウェルマイクロケモタキシスチャンバー (NeuroProbe, Gaithersburg, MD) において実施した。8 μ m孔を有する、ポリビニルピロリドンを含まないポリカーボネートフィルター (Nucleopore, Cambridge, MA) を、室温で10分間1%ゼラチンでコーティングし、2%FCSが補足されたM199培地で平衡化した。CPRECESIC (配列番号: 123) ペプチド又は対照GACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチド (1mM) を含む、2%FCS及び10ng/ml VEGF-A (R&D System) が補足されたM199培地を、ボイデンチャンバーの下室に置いた。一晩、枯渇状態にしたサブコンフルエントの培養物を、2.5mM EDTAを含むPBSに採集し、PBSで1回洗浄し、最終濃度 2×10^6 個/mlで2%FCSを含むM199培地に再懸濁させた。フィルターを下チャンバーと上チャンバーの間に置いた後、50 μ lの細胞懸濁液を上室に蒔き、5%CO₂を含む湿潤雰囲気中で37

10

【0280】

三次元細胞培養

48穴組織培養プレートのウェルに各100 μ lのマトリゲル (Matrigel) (Collaborative Research, Bedford, MA) を添加し、37 で10分間、固体化させた。2%FCSが補足されたM199培地中で24時間、HUVECを枯渇状態にした後、2.5mM EDTAを含むPBSに採集した。10⁴個の細胞を3通り各ウェルに穏和に添加し、37 で30分間、グルコーティングへと接着させた。次いで、培地を、示された濃度のCPRECESIC (配列番号: 123) ペプチド又はGACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチドを含む完全培地に交換した。24時間後、倒立顕微鏡 (Canon) を用いてプレートを写真撮影した。そのアッセイを3回繰り返した。

20

【0281】

CAMアッセイ

CAMアッセイ (Ribattiら、1994) によりインビボ血管新生を評価した。白色レグホンニワトリ由来の受精卵を一定の湿度で37 で維持した。インキュベーション3日目、卵殻に四角形の窓を開け、殻から発達中のCAMを脱離させるために2~3mlの卵白を取り出した。同サイズのガラスプレートで窓を密封し、卵をインキュベーターに戻した。8日目、1mm³の滅菌したゼラチンスポンジ (Gelfoam, Upjohn Co, Kalamazoo, Milan) に、VEGF-A (20 ng, R&D System) と、CPRECESIC (配列番号: 123) 又は対照GACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチド (1mM) のいずれかを含む3 μ lのPBSを吸収させ、無菌条件下で成長中のCAMの頂部に移植した。12日目まで毎日CAMを調査し、ライカ (Leica) 実体顕微鏡でインオボ (in ovo) で写真撮影した。スポンジから出現した毛細血管を計数した。そのアッセイを2回繰り返した。

30

【0282】

網膜血管新生の誘導

APAヌルマウスは記載されている (Linら、1998)。P7 (生後7日目) の仔マウスを授乳する母親と共に5日間75%酸素に曝露した。P12に正常酸素 (大気) へとマウスを戻した。組織学的分析のため、P17~P21にマウスを屠殺し、眼を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで+4 で一晩固定した。固定された眼をパラフィン包埋し、5 μ mの連続切片を切り出した。切片をヘマトキシリン/エオシン (h/e) 溶液で染色した。各眼について20個のh/e染色切片から、内境界膜の硝子体側の新生血管核を計数した。切片1個当たりの新生血管核数の平均値を計算し、スチューデントt検定を使用して動物群間で比較した。

40

【0283】

結果

ファージディスプレイによる細胞パニングによりAPA結合モチーフが選択される

APAと結合することができるペプチドを同定するため、細胞をランダムペプチドファージライブラリでスクリーニングした。まず、天然コンフォメーションでのAPA発現のモデ

50

ルを得るため、APAを発現していないSK-RC-49腎癌細胞に、全長APA cDNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの結果として発現されたAPAは、APA酵素アッセイにより立証されたように機能的に活性であったが（示していない）、親SK-RC-49細胞はAPAの発現も活性も示さなかった（示していない）。

【0284】

非特異的結合を減少させるため、CX₃CX₃CX₃Cファージライブラリ（10¹⁰形質導入単位 [TU]）を親SK-RC-49細胞に予備吸着させた。再懸濁させたSK-RC-49/APA細胞を、親細胞と結合しなかったファージでスクリーニングした。SK-RC-49/APA結合ファージを増幅し、2回の連続的な選択のため使用した。ファージのSK-RC-49親細胞との結合と較べたファージのSK-RC-49/APA細胞との結合の増加が、2回目及び3回目に観察された（示していない）。 10

【0285】

それに続くファージの配列決定により、一般ライブラリ配列CX₃CX₃CX₃Cのタンデム反復を含むペプチド挿入物

CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC (配列番号 :125)

の特異的な濃縮が明らかとなった。この配列は、2回目からランダムに選択され18個のファージ挿入物の50%を占め、3回目からのファージ挿入物の100%を占めていた。2回目から得られた4個のペプチド挿入物は、タンデムファージとの配列類似性を有していた（表12、太字フォント）。2回目ペプチドの中には、明らかに保存されているモチーフが他にもいくつか観察された（表12、下線又はイタリック体）。これらのうちの1個は、タンデムリピート配列と一部重複していた。選択されたペプチドのヒトデータベースに対する配列相同性の検索は、有意な一致を与えなかった。 20

【0286】

【表12】

APA結合ペプチド配列

ペプチド配列 ^(a)	2回目(%)	3回目(%)
CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC	50	
100		10
(配列番号 :125)		
CLGQCASICVNDC (配列番号 :126)	5	
-		
CPKVCPRECESNC (配列番号 :127)	5	
-		
CGTGCAVECEVVC (配列番号 :128)	5	
-		
CAVACWADCQLGC (配列番号 :129)	5	20
-		
CSSLCTVQCLEGC (配列番号 :130)	5	
-		
CSMMCLEGCDDWC (配列番号 :131)	5	
-		
その他	20	
-		
		30

【 0 2 8 7 】

選択されたファージ挿入物は、特異的なAPAリガンドである

ペプチド挿入物

CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC (配列番号 :125)、

CPKVCPRECESNC (配列番号 :127)又はCLGQCASICVNDC (配列番号 :126)

を表示しているファージを、個々にAPA結合に関して試験した。3個のファージは、全て、SK-RC-49親細胞に対して6倍濃縮された類似のパターンで、特異的にSK-RC-49/APA細胞の表面と結合した(示していない)。対照の挿入物非含有ファージは、結合優先性を示さなかった(示していない)。2回目に選択されたCGTGCAVECEVVC(配列番号:128)及びその他のファージは、SK-RC-49/APA細胞との選択的結合を示さなかった(データは示していない)。APA結合ファージ挿入物を再現するコンセンサス配列を含む可溶性ペプチドCPRECESIC(配列番号:123)を合成した。

【 0 2 8 8 】

CPRECESIC(配列番号:123)ペプチドの存在下で、CPKVCPRECESNC(配列番号:127)ファージを用いて結合アッセイを実施した。可溶性CPRECESIC(配列番号:123)ペプチドは、SK-RC-49/APA細胞との結合に関してCPKVCPRECESNC(配列番号:127)ファージと競合したが、SK-RC-49親細胞との非特異的結合に対する効果は有していなかった(示していない)。無関係の環状ペプチドGACVRLSACGA(配列番号:124)は競合活性を有していなかった

30

40

50

(示していない)。

CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC (配列番号 :125)

ファージの結合も、CPRECESIC (配列番号 :123) ペプチドによって置換されたが、CLGQCASICVNDC (配列番号 :126) ファージの結合は影響を受けなかった (データは示していない) 。

【 0 2 8 9 】

選択されたペプチド挿入物の基質特異性をさらに確認するため、mAB RC38を用いた免疫捕獲により、APAでトランスフェクトされた細胞の抽出物からAPAを部分精製した。RC38でコーティングされたマイクロウェルの上に固定化されたAPAタンパク質は、酵素アッセイにより確認されたように機能性であった (示していない) 。

10

CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC (配列番号 :125)、

CPKVCPRECESNC (配列番号 :127)、及び CLGQCASICVNDC (配列番号 :126)

ファージは、RC38免疫捕獲されたSK-RC-49親細胞由来細胞溶解物とのファージの結合と比較して10~12倍の濃縮で、免疫捕獲されたAPAと選択的に結合した (示していない) 。

【 0 2 9 0 】

APA結合ファージはインピボで腫瘍をターゲティングする

同定されたペプチドの、腫瘍へと回帰する能力を、ヒト乳房腫瘍異種移植片が移植されたヌードマウスをモデル系として使用して評価した。ファージを腫瘍保持マウスの尾静脈に注射し、組織ホモジネートからのファージ回収によりターゲティングを評価した。CPKVCPRECESNC (配列番号 :127) ファージは、対照として使用された脳組織と比較して腫瘍移植片において4倍濃縮されていた (図22) 。挿入物非含有ファージは、腫瘍をターゲティングしなかった (図22) 。CYNLCIRECESICGADGACWTWCADGCSRSC (配列番号 :125) ファージもCLGQCASICVNDC (配列番号 :126) ファージも、腫瘍回帰優先性を示さなかった (データは示していない) 。

20

【 0 2 9 1 】

CPKVCPRECESNC (配列番号 :127) の回帰は、組織切片上の抗M13免疫染色によって確認された (示していない) 。腫瘍血管系には強いファージ染色が見られたが、正常血管系には見られなかった (示していない) 。挿入物非含有ファージは、腫瘍血管と結合しなかった。

30

【 0 2 9 2 】

CPRECESIC (配列番号 :123) はAPA活性の特異的阻害剤である

APA酵素活性に対するCPRECESIC (配列番号 :123) の効果を検討するため、SK-RC-49/APA細胞を、増加性の濃度のCPRECESIC (配列番号 :123) ペプチド又は対照GACVRLSACGA (配列番号 :124) ペプチドの存在下で、APA特異的基質 -グルタミル-p-ニトロアニリドと共にインキュベートした。37 °Cでの2時間のインキュベーションの後、比色アッセイにより酵素活性を評価した。CPRECESIC (配列番号 :123) は、APA酵素活性を阻害し、試験された最高濃度では活性を60%減少させた (図23) 。酵素阻害に関するCPRECESIC (配列番号 :123) のIC₅₀は、800 μMと計算された。CPRECESIC (配列番号 :123) は、近縁のプロテアーゼであるアミノペプチダーゼNの活性には影響を与えなかった (データは示していない) 。

40

【 0 2 9 3 】

CPRECESIC (配列番号 :123) は内皮細胞の遊走及び増殖を阻害する

抗血管新生薬としてのCPRECESIC (配列番号 :123) ペプチドの可能性のある使用を決定した。まず、インピトロのCPRECESIC (配列番号 :123) ペプチドによるAPA阻害の、VEGF-A (10ng/ml) で刺激されたヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) の遊走及び増殖に対する効果を調査した。HUVEC上の機能性APAの存在を、酵素アッセイにより評価した (示していない) 。試験された最高濃度 (1mM) において、CPRECESIC (配列番号 :123) ペプチドは、ボイ

50

デンチャンパーアッセイにおいてHUVECの走化性を70%阻害した(図24)。同じペプチド濃度で、細胞増殖は50%阻害された(図25)。比較的低濃度のCPRECESIC(配列番号:123)ペプチド又はGACVRLSACGA(配列番号:124)対照ペプチドは、細胞の遊走及び増殖に対する有意な効果を有していなかった(示していない)。

【0294】

CPRECESIC(配列番号:123)はインビトロ及びインビボで血管新生を阻害する

異なるインビトロ及びインビボの血管新生モデルにおけるCPRECESIC(配列番号:123)ペプチドの阻害効果を調査した。三次元マトリックスゲル上に播かれたHUVECは、毛細血管様の構造へと分化し、インビトロ血管新生モデルを与える。増加性の濃度のCPRECESIC(配列番号:123)ペプチドは、このネットワークの形成の進行的な減損をもたらした(示していない)。1mMのペプチド濃度で、血管様枝分かれ構造は、有意に少なく、かつ短くなり、結果として細胞は完全なネットワーク組織を形成することができなかった(示していない)。対照ペプチドGACVRLSACGA(配列番号:124)は、HUVEC形態形成に影響を与えなかった(示していない)。

10

【0295】

一般的に使用されている単純化されたインビボ血管新生のモデルは、胚発生中に血管新生が刺激されうるニワトリ胚絨毛尿膜(CAM)である。ゼラチンスポンジに吸収された適切な刺激は、新たな毛細血管のリモデリング及び分枝により達成される微小血管のスポンジそのものへの動員を誘導する。8日齢のニワトリ卵CAMをVEGF-A単独(20ng)又はVEGF-A+CPRECESIC(配列番号:123)ペプチド又はGACVRLSACGA(配列番号:124)ペプチド(1mM)で刺激した。12日目にCAMの写真を撮影した。VEGF-Aにより誘導された血管新生は、スポンジから出現した毛細血管の数に基づき、CPRECESIC(配列番号:123)により40%阻害された(表13)。新生血管は、VEGF-A刺激後に典型的に見られた高度に枝分かれした毛細血管構造を示さなかった(示していない)。対照ペプチドGACVRLSACGA(配列番号:124)又は比較的低いペプチド濃度のCPRECESIC(配列番号:123)による処理は、成長血管の数に対する効果を有していなかった(示していない)。

20

【0296】

【表13】

血管新生に関するCAMアッセイ

処理	血管数
VEGF-Aなし	12.0 ± 2.82*
VEGF-A	57.0 ± 1.41*
VEGF-A + 対照	56.5 ± 2.12
VEGF-A + CPRECESIC(配列番号:123)	5.5 ± 1.41*

30

40

*スチューデント-ニューマン-ケールズ(Student-Newman-Keuls)検定によりp < 0.01。結果は、2回の独立の実験からの平均値及び標準誤差として表されている。

【0297】

APA欠損マウスは、減損した血管新生を示す

未成熟マウスにおける低酸素網膜症のモデルにおいて、APA^{+/+}マウス及びAPA^{-/-}ヌルマウスの血管新生能を調査した。相対的低酸素による網膜血管新生の誘導は、野生型マウスと比較してAPA^{+/+}マウスに既に存在していた(示していない)。APAヌルマウスにおいて、血管新生はほぼ検出不可能であった(示していない)。血管新生は、低酸素眼の切片20個から硝子体の突出している新生血管核を計数することにより定量した。P7~P12の75%

50

酸素処理の後、網膜血管新生の有意な誘導（眼切片1個当たり 16.17 ± 1.19 個の新生血管核）が生後17日目（P17）の野生型マウスにおいて見られた。P7～P12の75%酸素曝露の後、P17のAPA^{+/-}マウス（眼切片1個当たり 10.76 ± 1.03 個の新生血管核）及びAPAヌルマウス（眼切片1個当たり 4.25 ± 0.45 個の新生血管核）の網膜には、減少した量の新生血管核が見られた。

【0298】

考察

インビボで、APAは、腫瘍を含む活性化された微小血管により過剰発現されているが、休止期血管系にはほぼ検出不可能であり、従って血管指向腫瘍療法のための適当な標的である。本実施例は、APAの新規ターゲティングペプチドリガンドCPRECESIC（配列番号：123）を同定した。可溶性CPRECESIC（配列番号：123）ペプチドは、 $800 \mu\text{M}$ の IC_{50} でAPA酵素活性を阻害した。

【0299】

インビトロ血管新生モデルとして培養HUVECを使用した場合、可溶性CPRECESIC（配列番号：123）ペプチドは、VEGF-Aにより誘導されるHUVECの遊走及び増殖を阻害した。これらのデータは、血管新生中には内皮細胞の遊走及び増殖が必要であることと一致している。CPRECESIC（配列番号：123）は、マトリゲルモデルにおいても毛細血管様構造の形成を阻止し、VEGF-Aにより刺激されたCAMにおける血管新生を阻害した。

【0300】

APAヌルマウスは、野生型マウスと比較して有意に低い網膜血管新生を有していたため、APAが、相対的低酸素により誘導された血管新生において重要な役割を果たしていることが示された。これらの結果は、腫瘍血管新生の阻害のための特異的な標的としてAPAを使用することの可能性を増強する。

【0301】

要約すると、可溶性ペプチドCPRECESIC（配列番号：123）は、選択的なAPAリガンドであり阻害剤である。CPRECESIC（配列番号：123）によるAPAの阻害は、異なるインビトロ及びインビボのアッセイにおいて血管新生を阻害し、このことから、血管新生過程におけるAPAの顕著な役割が初めて証明された。さらに、APA結合ファージは、腫瘍血管へと回帰することができ、このことは、CPRECESIC（配列番号：123）を腫瘍血管新生の阻害剤として治療的に使用することの可能性を示唆している。CPRECESIC（配列番号：123）の内因性類似体は、上に開示されたものと類似した、抗体に基づく精製又は同定の方法により同定されうる。

【0302】

実施例9. PALMによるファージライブラリのスクリーニング

特定の態様において、臓器または組織の不均一な試料から特定の細胞型を選択することができる。そのような選択的サンプリングを行う一つの方法はPALM（レーザーマイクロビームによる位置決定と剥離）によることである。

【0303】

PALMロボットマイクロビームは、微量剥離のための正確なコンピューター誘導レーザーを用いる。パルス紫外線（UV）レーザーを顕微鏡にインターフェースで接続して、直径1マイクロメートル未満のビームスポットの大きさに対物鏡を通して焦点を合わせる。レーザー切断の原理は、加熱することなく局所的に制限された剥離的光分解プロセスである（Hendrix, 1999）。有効なレーザーエネルギーは、微小な焦点スポットのみに濃縮され、ほとんどの生物学的物体は、適用されたレーザーの波長に関して透過性である。このシステムは、その後のファージ回収のために、同種の細胞集団、または単一の細胞もしくは細胞下構造を回収するための選択ツールであるように思われる。組織試料は、被験者にファージを投与後に選択域または単細胞を切除することによって回収してもよい。選択域と非選択域との明確なギャップが典型的に得られる。単離された組織標本は、対物平面から放射して、全く接触しないように、一般的な微量遠心管のキャップに直接発射することができる。このいわゆるレーザー圧発射（LPC）方法の基礎は、正確に焦点を当てたレーザー

マイクロビームの極めて高い光子密度によって引き起こされた標本の下で生じたレーザー圧力であると考えられる。この組織採取技術によって、ファージは微小切除技法から生き残って、救済することができる。

【0304】

PALMは、本実施例において、下記のようにマウス膵臓組織に関するターゲティングファージを選択するために用いた。

【0305】

材料および方法

インビトロおよびインサイチューパニング

CX₇Cペプチドファージライブラリ (10⁹ TU) を、C57BL/6雄性マウスの尾静脈へ注射し、膵臓を採取して細菌感染によってファージを回収した。コロニー246個からのファージをLB/カナマイシン (100 μg/ml) /テトラサイクリン (40 μg/ml) 5ml中で37 °Cの暗所で攪拌しながら個々に増殖させた。一晚培養物をプールして、ファージを別のインビボパイオパニングラウンドのためにNaCl/PEG沈殿によって精製した。コロニー300個を2回目のパイオパニングラウンドから採取して、ファージを沈殿によって回収した。次に、2回目のパイオパニングラウンドからのファージをもう一回のパイオパニングラウンドのために用いて、同様に、一回のインサイチューパニングラウンドのために凍結融解したマウス膵臓切片と共にインキュベートした。

10

【0306】

3回目のインビボパイオパニングラウンドにおいて、第二のラウンドからのファージ10⁹ TUを第三のマウスに注射して、6分間循環させた後、FITC-レクチン (Vector Laboratories Inc.) 50 μlの静脈内注射を行った。2分間循環させた後、MEM Earle塩3mlによってマウスの左心室を還流した。膵臓を採取して、Tissue Tek (Sakura) において-80 °Cで凍結して、調製スライドガラス上で切片にした。

20

【0307】

第三のインサイチューラウンドに関して、第二のラウンドから単離した精製ファージを、融解したマウス膵臓切片4~14 μm切片と共に氷中で30分間インキュベートした。切片を氷冷PBS 100 μlによって室温 (RT) で8回すすいだ。結合したファージを、RTで30分間~60分間感染させるために、K91 Kan^R (OD₆₀₀ = 2.03) 100 μlを加えることによって各切片から回収した。感染したK91 Kan^Rをそれぞれの切片から回収して、LB/Kan/Tet (0.2 μg/ml) 10 mlにおいて暗所で20分間回復させた。各培養物からのアリコートにLB/Kan/Tet (40 μg/ml) プレートに播種して、37 °Cの暗所で一晚インキュベートした。各培養物の残りのテトラサイクリン濃度を40 μg/mlに増加して、ファージを増幅および精製するために培養物を37 °Cの暗所で攪拌しながら一晚インキュベートした。

30

【0308】

DNA増幅

ファージは、PALM (レーザーマイクロビームによる位置決定と剥離) コールドレーザー圧発射システムを用いて14 μm切片から微小切除した、凍結保存FITC-レクチン染色マウス膵島および周辺の腺房から回収した。膵島および対照切片をpH8の1mM EDTAに発射して、PCR増幅のために十分な材料が回収されるまで-20 °Cで凍結した。ファージDNAを、fUSE5プライマーを用いて増幅した。

40

フォワードプライマー 5' TAA

TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAG CTG ATA AAC CGA TAC AATT 3' (配列

番号:132)、リバープライマー 5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CGA TCT 3' (

配列番号 :133)

重なり合った組のプライマーを用いて、PCR産物に、もう1回のPCRラウンドを行った。第二のプライマーの組の3'末端に、配列決定目的のためにM13リバープライマーによってテールをつけた。用いた入れ子 (nested) プライマーセットは、

50

フォワード入れ子プライマー

5' CCTTTCTATTCTCACTCGGCCG 3' (配列番号 :134)、リバーズ入れ子プライマー 5' CAGGAAACAGCTATGACCGCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGC 3' (配列番号 :135)

であった。隣接するSfiI制限部位を含むペプチド挿入物配列を作製するために、さらに2つのプライマーを用いた。

フォワードライブラリプライマー 5'

CACTCGGCCGACGGGGC 3' (配列番号 :136)、リバーズプライマー 5' CAGTTTCGGCCCCAGCGGCC 3' (配列番号 :137)

入れ子プライマーから作製したPCR産物をゲル精製して (Qiagen)、自動配列決定によってM13リバーズプライマーを用いてCX₇Cペプチド挿入物が存在することを確認した。ライブラリプライマーから生じたPCR産物をゲル精製して (Qiagen)、CsCl₂精製fUSE5/SfiIにライゲーションして、エレクトロコンピテントMC1061細胞にエレクトロポレーションして、LB/ストレプトマイシン (100 μg/ml) /テトラサイクリン (40 μg/ml) 寒天プレート上に播種した。ゲル電気泳動によってCX₇C挿入物配列の存在を確認するために、単一のコロニーにfUSE5プライマーを用いてコロニーPCRを行った。陽性クローンをBig Dyeターミネーター (Perkin Elmer) を用いて配列決定した。

【0309】

ファージ感染

豚島および対照切片を1mM AEBSF、20 μg/ml アプロチニン、10 μg/ml ロイペプチン、1 mM エラスターゼ阻害剤I、0.1 mM TPCK、1nM ペプスタチンAのpH 7.4のPBS溶液に入れて、十分な材料が収集されるまで48時間またはそれ未満凍結させた。切片を氷中で融解して、容量をpH 7.4のPBSによって200 μlに調節した。試料をK91 Kan^R (OD = 0.22) 1mlと共にRTで巡回装置上で2時間インキュベートした。各培養物をLB/Kan/Tet (0.2 μg/ml) 1.2 mlに移して、RTの暗所で40分間インキュベートした。テトラサイクリンの濃度をそれぞれの培養物について40 μg/mlに増加して、培養物を攪拌しながら37 °Cで一晩インキュベートした。翌日、各培養物をLB/Kan/Tet寒天プレートに播種して、37 °Cの暗所で14時間インキュベートした。陽性クローンをコロニーPCRおよび自動配列決定のために採取した。

【0310】

結果

PALMを用いたインビボパニングの一般的スキームを、図26に示す。最初のインビボ選択ラウンド後、ファージをバルク増幅するか、または膵臓、腎臓、肺、および副腎からファージの単一のコロニーを増幅して、インビボスクリーニングのさらなるラウンドを行った。マウス膵臓からのバルク増幅およびコロニー増幅ファージはいずれも、選択ラウンドが増加するにつれて連続的な濃縮を示した (示していない)。3回の選択ラウンドの後、コロニー増幅したファージは、バルク増幅したファージよりほぼ1次数高い濃縮を示した (示していない)。

【0311】

表14は、膵臓スクリーニングによって同定された選択されたターゲティング配列およびコンセンサスモチーフを記載する。

【0312】

【表14】

膵臓のターゲティングペプチドとモチーフ

10

20

30

40

モチーフ	ペプチド配列
GGL (配列番号 :138)	CVPGLGGLC (配列番号 :139) CGGLDVRMC (配列番号 :140) CDGGLDWVC (配列番号 :141)
LGG (配列番号 :142)	CVPGLGGLC (配列番号 :139)) CTWLGGREC (配列番号 :143) CSRWGLGGC (配列番号 :144) CPPLGGSRC (配列番号 :251)
VRG (配列番号 :145)	CVGGVRGGC (配列番号 :146) CVGNDVRGC (配列番号 :147) CESRLVRGC (配列番号 :148) CGGRPVRGC (配列番号 :149)
AGG	CTPFIAGGC (配列番号 :151)

(配列番号 :150)	CREWMAGGC (配列番号 :152)	
	CAGGSLRVC (配列番号 :153)	
VVG	CEGVVGIVC (配列番号 :155)	
(配列番号 :154)	CDSVVGAWC (配列番号 :156)	
	CRTAVVGSC (配列番号 :157)	
VGG	CVGGARALC (配列番号 :159)	10
(配列番号 :158)	CVGGVRRGC (配列番号 :147)	
	CLAHRVGGC (配列番号 :160)	
GGL	CWALSGGLC (配列番号 :162)	
(配列番号 :161)	CGGLVAYGC (配列番号 :163)	
	CGGLATTTTC (配列番号 :164)	
GRV	CGRVNSVAC (配列番号 :166)	
(配列番号 :165)	CAGRVALRC (配列番号 :167)	20
GGA	CWNGGARAC (配列番号 :169)	
(配列番号 :168)	CLDRGGAHC (配列番号 :170)	
GVV	CELRGVVVC (配列番号 :172)	
(配列番号 :171)		
GGV	CIGGVHYAC (配列番号 :174)	
(配列番号 :173)	CGGVHALRC (配列番号 :175)	30
GMWG	CIREGMWGC (配列番号 :177)	
(配列番号 :176)	CIRKGMWGC (配列番号 :178)	
ALR	CGGVHALRC (配列番号 :175)	
(配列番号 :179)	CAGRVALRC (配列番号 :167)	
	CEALRLRAC (配列番号 :180)	

ALV (配列番号 :181)	CALVNVHLC (配列番号 :182) CALVMVGAC (配列番号 :183)
GGVH (配列番号 :184)	CGGVHALRC (配列番号 :175) CIGGVHYAC (配列番号 :174)
VSG (配列番号 :185)	CMVSGVLLC (配列番号 :186) CGLVSGPWC (配列番号 :187) CLYDVSGGC (配列番号 :188)
GPW (配列番号 :189)	CSKVGPPWC (配列番号 :190) CGLVSGPWC (配列番号 :191)
なし	CAHHALMEC (配列番号 :192) CERPPFLDC (配列番号 :193)

10

【 0 3 1 3 】

20

図27は、PALM選択薄切片材料からのファージ挿入物配列の回収の一般的プロトコールを示す。表記のように、ファージは、薄切片試料のプロテアーゼ消化後に大腸菌宿主細菌の直接感染によって回収してもよい。または、ファージ挿入物はPCR増幅によって回収してもよく、新しいベクターDNAにクローニングした後、クローニングするために宿主細菌にエレクトロポレーションするか、または形質転換してもよい。

【 0 3 1 4 】

ファージをPALM回収するいずれの方法も、隣ターゲティング配列の回収に成功した。直接細菌感染によって回収された隣配列には、

CVPRRWDVC (配列番号 :194)、CQHTSGRGC (配列番号 :195)、CRARGWLLC (配列番号 :196)、CVSNPRWKC (配列番号 :197)、CGGVHALRC (配列番号 :175)、CFNRTWIGC (配列番号 :198) 及び CSRGPWAGC (配列番号 :199)

30

が含まれた。ファージ挿入物の増幅およびファージへのクローニングによって回収された隣ターゲティング配列には、

CWSRGQGGC (配列番号 :200)、CHVLWSTRC (配列番号 :201)、CLGLLMAGC (配列番号 :202)、CMSSPGVAC (配列番号 :203)、CLASGMDAC (配列番号 :204)、CHDERTGRC (配列番号 :205)、CAHHALMEC (配列番号 :206)、CMQGAATSC (配列番号 :207)、CMQGARTSC (配列番号 :208)及びCVRDLLTGC (配列番号 :209)

40

が含まれる。

【 0 3 1 5 】

図28～図31は、選択された隣ターゲティング配列に関して同定された配列相同性を示す。隣組織に存在することが知られているいくつかのタンパク質を同定した。本実施例の結果は、組織薄切片から細胞型を選択するため、およびターゲティングファージ配列を回収するためにPALM法を用いてもよいことを示している。当業者は、この方法は、異種臓器または組織における細胞の特定のタイプに向けられたターゲティング配列を得るために、実

50

質的に任意の組織に用いることができることを認識するであろう。

【 0 3 1 6 】

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

10

【 0 3 1 7 】

参照

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

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

20

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

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

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

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

30

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

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

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

40

BERGELSON, J.M., CUNNINGHAM, J.A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E.A., KRITHIVAS, A., HONG, J.S., HORWITZ, M.S., CROWELL, R.L., and

- FINBERG, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275; 1320–1322.
- Bielenberg, D. R., M. F. McCarty, C. D. Bucana, S. H. Yuspa, D. Morgan, J. M. Arbeit, L. M. Ellis, K. R. Cleary, and I. J. Fidler. 1999. Expression of interferon-beta is associated with growth arrest of murine and human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 112:802-9.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, and O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390:404-407, 1997 10
- Boon, T. & Old, L. J. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 681-683 (1997).
- Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidophosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J.* 12:849-859, 1993. 20
- Brodt et. al, The role of marrow endothelium in the localization of metastatic cancer cells to bone. In *Bone Metastasis- mechanisms and pathophysiology*, pp17-23, 1996. (Orr and Singh, eds.)
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264:569-571, 1994a. 30
- Brooks PC, Stromblad S, Klemler R, Visscher D, Sarkar FH, and Cheresh DA. Anti-integrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 96:1815- 1822, 1995.
- Brooks, P.C. et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683-693, 1996.

- Brooks, P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh D.A. Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164, 1994b
- Brousset, P., S. Chittal, D. Schlaifer, J. Icart, C. Payen, F. Rigal-Huguet, J. J. Voigt, and G. Delsol. 1991. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMeX) sections. *Blood* 77:1781-6. 10
- Burg M, Pasqualini R, Arap W, Stallcup W, and Ruoslahti E. Identification of NG2 proteoglycan-binding peptides that home to tumor neovasculature. *Cancer Res* 58:2869-2874, 1999.
- Burg, M.A., Pasqualini, R., Arap, W., Ruoslahti, E. & Stallcup, W.B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59, 2869-2874, 1999. 20
- Campbell *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 158:25-32, 2001.
- Cao Y. O'Reilly MS. Marshall B. Flynn E. Ji RW and Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101:1055-1063, 1998.
- Carter, H. B., Piantadosi, S. & Isaacs, J. T. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* 143, 742-746 (1990). 30
- Chang, K. L., and L. M. Weiss. 1996. The association of the Epstein-Barr virus with malignant lymphoma. *Biomed Pharmacother* 50:459-67.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Chen *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 78:404-416, 2000.
- Chinni *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 3:1557-64, 1997. 40

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

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

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

10

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

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

40

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

DMITRIEV, I., KRASNYKH, V., MILLER, C.R., WANG, M., KASHENTSEV, A.E., MIKHEEVA, G., BELOUSOVA, N., and CURIEL, D.T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackie virus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* 72; 9706-9713. 10

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

Dunn, I.S. Mammalian cell binding and transfection mediated by surface-modified bacteriophage lambda. *Biochimie* 78, 856-861, 1996. 20

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

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

Ellerby HM, Arap W, Ellerby L, Kain R, Andrusiak R, Rio G, Krajewski S, Lombardo C, Rao R, Ruoslahti E, Bredeisen D, and Pasqualini R. Anti-cancer Activity of Targeted proapoptotic peptides. *Nature Med* 9:1032-1038, 1999 30

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

- Engelstädter M *et al.* Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum Gene Ther.* 2000; **11**: 293–303.
- Engerman, R.L. and Kern, T.S. (1986) Hyperglycemia as a cause of diabetic retinopathy. *Metabolism* 35(S1), 20-23.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18, 4-25. 10
- Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A β turn in the cytoplasmic tail of the integrin αv subunit influences conformation and ligand binding of $\alpha v\beta 3$. *J. Biol. Chem.* 269:4641-4647, 1994a.
- Filardo, E.J. and Cheresch, D.A. A structural basis for bidirectional integrin signalling. *Princess Takamatsu Symp.* 24:106-117, 1994b. 20
- Filardo, E.J., Brooks, P.C., Deming, S.L., Damsky, C. and Cheresch, D.A. Requirement of the NPXY motif in the integrin $\beta 3$ subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 130:441-450, 1995.
- Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nature Biotechnol.* 15: 510, 1997.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995 30
- Folkman, J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9064-9066, 1998.
- Friedlander M, Brooks PC, Sharffer RW, Kincaid CM, Varner JA, and Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science*, 270: 1500-1502, 1995.

- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA. Involvement of integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ in ocular neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9764-9769, 1996.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frisch SM. And Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Cur. Opin. in Cell Biol.* 9:701-706, 1997. 10
- Furuya *et al.*, *Cancer Res.* 54:6167-75, 1994.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM and Greenberg NM. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res.* 56:4096-4102, 1996.
- Girod A *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; 5: 1052–1056. 20
- Gold R. Differentiation between Cellular Apoptosis and Necrosis by the Combined Use of In Situ Tailing Translation Techniques. *Lab. Invest.* 71: 219, 1994
- Goldman CK *et al.* Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 1997; 57: 1447–1451.
- GOLDMAN, C.K., ROGERS, B.E., DOUGLAS, J.T., SOSNOWSKI, B.A., YING, W., SIEGAL, G.P., BAIRD, A., CAMPAIN, J.A., and CURIEL, D.T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* 57; 1447–1451. 30
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Grace, M. J., L. Xie, M. L. Musco, S. Cui, M. Gurnani, R. DiGiacomo, A. Chang, S. Indelicato, J. Syed, R. Johnson, and L. L. Nielsen. 1999. The use of laser scanning 40

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

Gunge, N., Takata, H., Fukuda, K., Iwao, S. & Miyakawa, I. Relocation of a cytoplasmic yeast linear plasmid to the nucleus is associated with circularization via nonhomologous recombination involving inverted terminal repeats. *Mol Gen Genet* 263, 846-853 (2000).

30

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

- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, and Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med.* 2: 529-533, 1996.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.
- Hansen, A.S., Norén, O., Sjöström, H. and Wedelin, O. (1993) A mouse aminopeptidase-N is a marker for antigen presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.*, 23, 2358-64. 10
- HARLOW, E., and LANE, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).
- Hart SL *et al.* Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly- Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.* 269, 12468-12474, 1994 20
- Hemler, M., Weitzman, J., Pasqualini, R., Kawaguchi, S., Kassner, P. and Berdichevsky, F. Structure, biochemical properties, and biological functions of integrin cytoplasmic domains. In: *Integrins: The Biological Problems* (ed. Yoshi Takada) CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA; pp.1-35, 1994.
- Hendrix RW. Evolution: the long evolutionary reach of viruses. *Current Biol.* 9:914-917, 1999.
- HENRY, L., XIA, D., WILKE, M., DEISENHOFER, J., and GERARD, R. (1994). Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *E. coli*. *J. Virol.* 68; 5239-5246. 30
- Herbst, H., E. Steinbrecher, G. Niedobitek, L. S. Young, L. Brooks, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1992. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 80:484-91.

Herbst, H., F. Dallenbach, M. Hummel, G. Niedobitek, S. Pileri, N. Muller-Lantzsch, and H. Stein. 1991. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4766-70.

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

Herndier BG, Werner A, Arnstein P, Abbey NW, Demartis F, Cohen RL, Shuman MA and Levy, JA Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals. *AIDS* 8:575-581, 1996. 10

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

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

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

HONG, S.S., GALAUP, A., PEYTAVI, R., CHAZAL, N., and BOULANGER, P.A. (1999). Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery by use of an oligopeptide with dual binding specificity. *Hum. Gene Ther.* 10; 2577-2586. 20

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

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

Hughes *et al.*, *Cancer Res.* 49:4452-54, 1989 30

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

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

- Ivanenkov, V.V., Felici, F. & Menon, A.G. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1448, 463-472, 1999b.
- J. Natl. Cancer Inst.* 90:273-286, 1998.
- Jarrett, A. F., A. A. Armstrong, and E. Alexander. 1996. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 7:5-10. 10
- Jarrett, R. F., and J. MacKenzie. 1999. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36:260-9.
- Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993).
- Joliot, A.H. Triller, A., Volovitch, M. Pernelle, C., and Prochiantz, A. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.*3:1121-1131, 1991a. 20
- Joliot, A.H., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. and Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1864-1868, 1991b.
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Kaplan, E. L. a. M., P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457-481 (1958). 30
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
- Kasono, K. et al. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5, 2571-2579, 1999.
- Kassner, P.D., Burg, M.A., Baird, A. & Larocca, D. Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 921-928, 1999. 40

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

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

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

10

Koivunen E, Gay DA and Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the $\alpha 5\beta 1$ integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210, 1993.

Koivunen E, Wang B, and Ruoslahti E. Phage display libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *BioTechnology* 13:265-270, 1995.

Koivunen, E. *et al.* Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. *Methods Mol Biol* 129, 3-17 (1999).

20

Kolanus, W. and Seed, B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:725-731, 1997.

Kolonin MG, Finley RL Jr. Targeting cyclin-dependent kinases in *Drosophila* with peptide aptamers. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci. USA.* 95:14266-71, 1998.

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

30

Kouzmitcheva G. A. *et al.* Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 150-60 (2001).

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

40

KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., MIKHEEV, A.G., MILLER, C.R., BELOUSOVA, N., and CURIEL, D.T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72; 1844–1852.

KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., and CURIEL, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70; 6839–6846.

10

Lane T. Shah J. Clinical features and management of benign prostatic hyperplasia. *Hospital Medicine.* 60(10):705-9, 1999.

Larocca D *et al.* Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J* 1999; 13:727–734.

Larocca, D., Witte, A., Johnson, W., Pierce, G.F. & Baird, A. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Hum Gene Ther* 9, 2393-2399, 1998.

20

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

Le Roux, I., Joliot, A.H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A. and Volovitch, M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:9120-9124, 1993

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

Lewis, J.M., Cheresh, D.A. and Schwartz, M.A. Protein kinase C regulates $\alpha v \beta 5$ -dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Cell Biol.* 134:1323-1332, 1996.

30

Lin, T.H., Aplin, A.E., Shen, Y., Chen Q., Schaller, M.D., Romer L., Aukhil, I. and Juliano, R.L. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signalling pathways in fibroblast. *J. Cell Biol.* 136:1385-1395, 1997.

40

Longhurst, C.M. and Jennings, L.K. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* 54:514-526, 1998.

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

LOUIS, N., FENDER, P., BARGE, A., KITS, P., and CHROBOCZEK, J. (1994). Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J. Virol.* 68; 4104–4106. 10

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

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

Lyons, S. F., and D. N. Liebowitz. 1998. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 25:461-75. 20

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

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

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

Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988. 30

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

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

Mennuni, C. *et al.* Selection of phage-displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. *J Autoimmun* 9, 431-436 (1996). 40

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

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

Mikolajczyk SD. Millar LS. Wang TJ. Rittenhouse HG. Marks LS. Song W. Wheeler TM. Slawin KM. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostatecancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Research.* 60(3):756-9, 2000. 10

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

Motti, C. *et al.* Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 146, 191-198 (1994). 20

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

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

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

Nicolas and Rubinstein, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988. 30

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

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

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

- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K. and Eriksson, U. (1996) Vascular Endothelial Growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2576-2581.
- Owens, G. P., R. A. Williamson, M. P. Burgoon, O. Ghausi, D. R. Burton, and D. H. Gildea. 2000. Cloning the antibody response in humans with chronic inflammatory disease: immunopanning of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brain sections with antibody phage libraries prepared from SSPE brain enriches for antibody recognizing measles virus antigens in situ. *J Virol* 74:1533-7. 10
- Pallesen, G., S. J. Hamilton-Dutoit, M. Rowe, and L. S. Young. 1991. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease [see comments]. *Lancet* 337:320-2.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975. 20
- Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 380:364-366, 1996.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196, 1995.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. α_v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997 30
- Pasqualini, R. and Hemler, M. E. Contrasting roles for integrin b1 and b5 cytoplasmic domains in subcellular localization, cell proliferation, and cell migration. *J. Cell Biol.* 125:447-60, 1994.
- Pasqualini, R. Vascular Targeting with Phage Display Peptide Libraries. *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162, 1999.

- Pasqualini, R., Arap W., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Shapiro, L., Sakamoto, M., Stryn, A. and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727, 2000.
- Pelleymounter et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543, 1994.
- Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, and G. E. Morris. 1998. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J Med Virol* 56:105-11. 10
- Pereboeva, L. A., A. V. Pereboev, L. F. Wang, and G. E. Morris. 2000. Hepatitis C epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a chimeric antigen. *J Med Virol* 60:144-51.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984. 20
- Poul, M.A. & Marks, J.D. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J Mol Biol* 288, 203-211, 1999.
- Prezzi, C. *et al.* Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156, 4504-4513 (1996).
- Prezzi, C., M. Nuzzo, A. Meola, P. Delmastro, G. Galfre, R. Cortese, A. Nicosia, and P. Monaci. 1996. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156:4504-13. 30
- PRICE, J.E., POLYZOS, A., ZHANG, R.D., and DANIELS, L.M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cells lines in nude mice. *Cancer Res.* 50; 717-721.
- Puntoriero, G. *et al.* Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* 17, 3521-3533 (1998). 40

- Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Rajotte D and Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. *J Biol Chem* 274:11593-11598, 1999
- Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest* 102:430-437, 1998 10
- Rak JW, St. Croix BD, and Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer. *Anticancer Drugs* 6:3-18, 1995.
- Razzaque, A., Y. Francillon, P. N. Jilly, and F. Varricchio. 1996. Detection of human herpesvirus 6 sequences in lymphoma tissues by immunohistochemistry and polymerase chain reactions. *Cancer Lett* 106:221-6.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580. 20
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Renata Pasqualini, W. A., Daniel Rajotte, and Erkki Ruoslahti. in *Phage Display: A Laboratory manual* (ed. Carlos F. Barbas III, D. R. B., Jamie K. Scott, and Gregg J. Silverman) 22.21-22.24 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988. 30
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- ROELVINK, P.W., LEE, G.M., EINFELD, D.A., KOVESDI, I., and WICKHAM, T.J. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286; 1568-1571.
- ROMANCZUK, H., GALER, C.E., ZABNER, J., BARSOMIAN, G., WADSWORTH, S.C., and O'RIORDAN, C.R. (1999). Modification of an adenoviral vector with 40

- biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum. Gene Ther.* 10; 2615-2626.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Rowley, M. J. *et al.* Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* **164**, 3413-3419 (2000). 10
- Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996
- Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11810-11813 (1995).
- Sahin, U., Tureci, O. & Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 709-716 (1997). 20
- Scala, G. *et al.* Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* **162**, 6155-6161 (1999).
- Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am. J. Pathol.* 136:1393-1405, 1990. 30
- Schmitz, R., Baumann, G. and Gram, H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinase Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display *J. Mol. Biol.* 260: 664-677, 1996.
- Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest.* 100:1-5, 1997.

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

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

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

Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993. 10

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

Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40. 20

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

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

Solowska J, Edelman JM, Albelda SM and Buck CA. (1991) Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* 114: 1079- 1088. 30

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

Sternberg, N. & Hoess, R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1609-1613, 1995. 40

- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stoeckle *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8:2675-80, 1988.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983. 10
- Tanaka T, Cao Y, Folkman J and Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* 58:3362-3369, 1998.
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llirbat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P., and Prochiantz, A. Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J. Neurosci.* 15:7158-7167, 1995. 20
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silvia, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. and Abraham, J. (1991) the human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 226, 11947-11954.
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971. 30
- Triantafilou *et al.*, *Hum. Immunol.* 62:764-770, 2001.
- Tureci, O., Sahin, U. & Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3, 342-349 (1997).
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- 米国特許第 3,817,837号

米国特許第 3,850,752 号

米国特許第 3,939,350 号

米国特許第 3,996,345 号

米国特許第 4,275,149 号

米国特許第 4,277,437 号

米国特許第 4,366,241 号

10

米国特許第 4,472,509 号

米国特許第 5,021,236 号

米国特許第 5,206,347 号

米国特許第 5,223,409 号

米国特許第 5,401,511 号

米国特許

20

米国特許第 5,622,699 号

米国特許第 5,889,155 号

米国特許第 6,068,829 号

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

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

30

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

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

- Vuori K. Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 266:1576-1578, 1994
- WATKINS, S.J., MESYANZHINOV, V.V., KUROCHKINA, L.P., and HAWKINS, R.E. (1997). The adenobody approach to viral targeting – specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther.* 4; 1004–1012.
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R and Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cell cultures. *Science* 268: 447-448, 1995. 10
- Weiss, L. M., J. G. Strickler, R. A. Warnke, D. T. Purtilo, and J. Sklar. 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 129:86-91
- Weiss, L. M., Y. Y. Chen, X. F. Liu, and D. Shibata. 1991. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 139:1259-65.
- Weitzman MD, Wilson JM and Eck SL. Adenovirus vectors in cancer gene therapy. In: *Gene Therapy and Vector Systems* 2: 17-25, 1997. 20
- Wells, J.A. and Lowman, H.B. Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:355-362, 1992.
- Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Kovesdi I. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* 45:149-151, 1997c.
- Wickham, T.J. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 7, 110-114, 2000. 30
- WICKHAM, T.J., CARRION, M.E., and KOVESDI, I. (1995). Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther.* 2; 750–756.
- WICKHAM, T.J., LEE, G., TITUS, J., SCONOCCHIA, G., BAKACS, T., KOVESDI, I., and SEGAL, D. (1997a). Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T-cells via CD3. *J. Virol.* 71; 7663–7669. 40

- WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A., and NEMEROW, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not attachment. *Cell* 73; 309–319.
- WICKHAM, T.J., ROELVINK, P.W., BROUGH, D.E., and KOVESDI, I. (1996b). Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnol.* 14; 1570–1573.
- WICKHAM, T.J., SEGAL, D.M., ROELVINK, P.W., CARRION, M.E., LIZONOVA, A., LEE, G.M., and KOVESDI, I. (1996a). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70; 6831–6838. 10
- WICKHAM, T.J., TZENG, E., SHEARS II, L.L., ROELVINK, P.E., LI, Y., LEE, G.M., BROUGH, D.E., LIZONOVA, A., and KOVESDI, I. (1997b). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* 71; 8221–8229. 20
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.
- Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 49:407-424, 1998
- Zhang *et al.*, *J. Nature* 372: 425, 1994.
- Zhang J and Russell S. Vectors for cancer gene therapy. *Cancer Met. Rev.* 3:385-401, 1996. 30
- ZHANG, W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 6; 113–138.
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B., Corvol, P. and Cortes-Llorens, C. (1996) Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11968-11973. 40

【図面の簡単な説明】

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

【図1】 胎盤回帰ファージの確認。実施例3で同定されたターゲティングペプチドを保持するファージを、妊娠マウスに注射し、胎盤からの回収率を、ターゲティング配列を含まない対照fd-tetファージと比較した。胎盤回帰ファージクローンは、PA-TPKTSVT（配列番号：39）、PC-RAPGGVR（配列番号：41）、PE-LGLRSVG（配列番号：44）、PF-YIRPFTL 50

(配列番号：43)であった。

【図2】 脂肪回帰ペプチドの確認。実施例4で同定されたターゲティングペプチドを保持するファージを、妊娠マウスに注射し、脂肪組織からの回収率を、ターゲティング配列を含まない対照fd-tetファージと比較した。

【図3】 BRASILを使用したインビトロの脾臓ターゲティング。Fabクローン#2、#6、#10、及び#12、並びに対照FabクローンNPC-3TTの結合を、対照Fd-tetファージと比較した。

【図4】 BRASILを使用したインビトロの脾臓ターゲティング。Fabクローン#2、#6、#10、及び#12、並びに対照FabクローンNPC-3TTの結合を、相互に直接比較した。

【図5】 BRASILを使用したインビボの脾臓ターゲティング。Fabクローン#2、#6、#10、及び#12の結合を、Fd-tetファージの結合と比較した。

【図6】 BRASILを使用したインビボの脾臓ターゲティング。Fabクローン#10の脾臓組織との結合を、Fab対照クローンNPC-3TT及びFd-tetファージの結合と比較した。

【図7】 Fd-tetファージと比較したFabクローン#10の、脾臓との結合（骨髄との比較）。

【図8】 抗カポジ肉腫ライブラリ由来のFabクローンの、血管新生網膜（angiogenic retina）との結合。

【図9】 3細胞質ドメインで選択されたファージの、固定化されたタンパク質との結合。GST融合タンパク質又はGST単独を、10 µg/mlでマイクロタイターウェルにコーティングし、エンドスタチンターゲティングペプチドを発現するファージを結合させるために使用した。表示されたペプチド配列によって、各ファージを同定した：GLDITYRGSP（配列番号：96）；YDWWYPWSW（配列番号：95）；CLRQSYSYNC（配列番号：104）；SDNRYIGSW（配列番号：97）；CEQRQTQEGC（配列番号：93）；CFQNRC（配列番号：102）。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

【図10】 5細胞質ドメインで選択されたファージの、固定化されたタンパク質との結合。GST融合タンパク質又はGST単独を、10 µg/mlでマイクロタイターウェルにコーティングし、エンドスタチンターゲティングペプチドを発現するファージを結合させるために使用した。表示されたペプチド配列によって、各ファージを同定した：(A) DEEGYMMR（配列番号：110）；(B) KQFSYRYLL（配列番号：111）；(C) CEPYWDGWFC（配列番号：106）；(D) VVISYMPD（配列番号：112）；及び(E) CYIWPDSGLC（配列番号：105）。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

【図11】 細胞質ドメイン結合ファージの、3固定化タンパク質との結合、及び合成ペプチドによる阻害。増加性の濃度の対応する合成ペプチド又は対照ペプチドの存在下で、GST-3cytoでコーティングされたウェル上でファージをインキュベートした。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

【図12】 細胞質ドメイン結合ファージの、5固定化タンパク質との結合、及び合成ペプチドによる阻害。増加性の濃度の対応する合成ペプチド又は対照ペプチドの存在下で、GST-5cytoでコーティングされたウェル上でファージをインキュベートした。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

【図13】 リン酸化後のファージの、固定化された3-GST及び5-GSTとの結合。ファージをFynキナーゼでリン酸化した。挿入物非含有ファージを、対照として使用した。GST-3cyto又はGST-5cytoでコーティングされたウェル上でファージをインキュベートした。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

【図14】 リン酸化後のファージの、固定化されたGST融合タンパク質との結合。ファージをFynキナーゼでリン酸化した。挿入物非含有ファージを、対照として使用した。GST細胞質ドメインでコーティングされたウェル上でファージをインキュベートした。データは、3通りのウェルからの平均コロニー数を、平均値の10%未満の標準誤差と共に表している。

10

20

30

40

50

【図15】 インテグリン細胞質ドメイン結合ペプチドの、細胞増殖に対する効果。血清枯渴細胞を24時間培養し、 $[^3\text{H}]$ チミジン ($1\mu\text{Ci/ml}$) 取り込み測定により増殖を判定した。陽性対照においては、血清枯渴細胞にVEGFを戻し添加した。各実験を3通り3回実施し、結果を平均値 \pm SDとして表した。

【図16】 ペネトラチンペプチドキメラの、内皮細胞遊走に対する効果。細胞遊走アッセイを、48ウェル微小走化性 (microchemotaxis) チャンバーで実施した。各ウェルにおいて、5個の無作為な高倍率視野 (40倍) を計数した。結果は、両方の 3インテグリン細胞質ドメイン結合ペプチド (Y-18及びTYR-11) が細胞遊走を増加させる一方で、ペネトラチンが細胞に影響を与えなかったことを示している。

【図17】 5細胞質ドメインと結合するペネトラチンペプチドキメラは、プログラム細胞死を誘導する。10⁶個のHUVEC細胞を完全培地中で採集し、15 μM のペネトラチンペプチドキメラを細胞へ添加した。4時間後、8時間後、及び12時間後に、細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、アポトーシス誘導を細胞数測定分析により分析した。a) 24時間後に枯渴細胞を用いて得られたプロファイル。b) 完全培地中のコンフルエント細胞。c) 4時間後の15 μM のペネトラチン。d) 4時間後の15 μM のVISY-ペネトラチンキメラ。8時間後及び12時間後に分析された細胞は、G₀/G₁比の類似したプロファイルを示した。

【図18】 3又は 5で選択されたファージに対して産生された抗体の特異性 (ELISA)。KLHと接合したGLDTYRGSP (配列番号: 96) 又はSDNRYIGSW (配列番号: 97) による3回の免疫後に得られた増加性の希釈率の血清を、10 μg のSDNRYIGSW (配列番号: 97、Y-18)、GLDTYRGSP (配列番号: 96、TYR-11)、又は対照ペプチドでコーティングされたマイクロタイターウェル上でインキュベートした。対照として免疫前血清を用いた。HRPヤギ抗ウサギ抗体とのインキュベーション後、ODを405nmで測定した。データは、3通りウェルからの平均値を、10%未満の標準誤差と共に表している。

【図19】 3又は 5で選択されたファージに対して産生された抗体の特異性 (ELISA)。KLHと接合したSDNRYIGSW (配列番号: 97、Y-18) 又はGLDTYRGSP (配列番号: 96、TYR-11) による3回の免疫後に得られた血清を、10 μg のTYR-11又はY-18でコーティングされたマイクロタイターウェルにおいてインキュベートした。GLDTYRGSP (配列番号: 96) 又はSDNRYIGSW (配列番号: 97) 及び対照ペプチドを溶液に添加した。HRPヤギ抗ウサギ抗体とのインキュベーションの後、ODを405nmで測定した。データは、3通りのウェルからの平均値を、10%未満の標準誤差と共に表している。溶液に添加されたペプチドは、固定化されたペプチドとの反応性を特異的に阻止する。

【図20】 図20Aは、VISYペプチドとの、アネキシンVの 5インテグリンへの競合的結合を示す。結合アッセイをELISAにより実施した。図20Bは、抗アネキシンV抗体の精製アネキシンVタンパク質及びVISYペプチドへの結合の相対レベルを示す。

【図21】 ペネトラチン (アンテナペディア) と連結されたVISYペプチドを含むキメラペプチドは、アポトーシスを誘導する。VISYにより誘導されたアポトーシスは、カスパーゼ阻害剤 (zVAD) の添加により阻害された。

【図22】 APA結合ファージは腫瘍と特異的に結合する。等量のファージをMDA-MB-435由来腫瘍を保持するマウスの尾静脈へ注射し、灌流後、ファージを回収した。3通りの播種からの、腫瘍又は対照組織 (脳) より回収されたファージの平均値及び標準誤差が、示されている。

【図23】 CPRECESIC (配列番号: 123) は、APA活性の特異的阻害剤である。増加性の濃度のGACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチド (対照) 又はCPRECESIC (配列番号: 123) ペプチドのいずれかの存在下で、APA酵素活性をアッセイした。CPRECESIC (配列番号: 123) によるAPA阻害に関するIC₅₀は、800 μM において推定された。エラーバーは、3通りのウェルの平均値の標準誤差である。実験は、3回繰り返され、類似の結果を示した。

【図24】 CPRECESIC (配列番号: 123) は、HUVEC遊走を阻害する。HUVECをVEGF-A (10 ng/ml) で刺激した。アッセイを、Boyden微小走化性チャンバーにおいて実施し、37 $^{\circ}\text{C}$ で5時間、8 μm 孔フィルターを介して細胞を遊走させた。GACVRLSACGA (配列番号: 124) ペプチド (対照) 及びCPRECESIC (配列番号: 123) ペプチドを、1mMという濃度で試験した。

10

20

30

40

50

遊走した細胞を染色し、各マイクロウェルについて5個の高倍率視野（100倍）を計数した。エラーバーは、3通りのマイクロウェルの平均値の標準誤差である。

【図25】 CPRECESIC（配列番号：123）は、HUVEC増殖を阻害する。細胞をVEGF-A（10ng/ml）で刺激し、表記の時点において、クリスタルバイオレット染色に基づく比色アッセイにより増殖を評価した。エラーバーは、3通りのウェルの平均値の標準誤差である。各実験は、少なくとも2回繰り返され、類似の結果を示した。

【図26】 マウス脾臓、腎臓、肝臓、肺、及び副腎内でターゲティングされるファージ用のインビボバイオパニングのプロトコル。

【図27】 大腸菌の感染によるファージの回収、又は増幅及びサブクロニングによるファージDNAの回収のプロトコル。

【図28】 脾臓ターゲティングペプチド及び相同タンパク質。標準的な相同性検索により同定される、以下の脾臓ターゲティングペプチドにより模倣された内因性タンパク質候補：CVSNPRWKC（配列番号：197）、CVPRRWDC（配列番号：194）、CQHTSGRGC（配列番号：195）、及びCRARGWLLC（配列番号：196）。

【図29】 脾臓ターゲティングペプチド及び相同タンパク質。標準的な相同性検索により同定される、以下の脾臓ターゲティングペプチドにより模倣された内因性タンパク質候補：CGGVHALRC（配列番号：175）、CFNRTWIGC（配列番号：198）、及びCWSRQGGC（配列番号：200）。

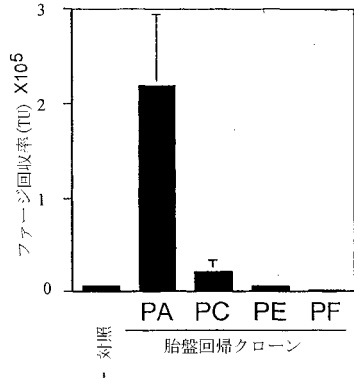
【図30】 脾臓ターゲティングペプチド及び相同タンパク質。標準的な相同性検索により同定される、以下の脾臓ターゲティングペプチドにより模倣された内因性タンパク質候補：CLASGMDAC（配列番号：204）、CHDERTGRC（配列番号：205）、CAHHALMEC（配列番号：206）、及びCMQGARTSC（配列番号：208）。

【図31】 脾臓ターゲティングペプチド及び相同タンパク質。標準的な相同性検索により同定される、以下の脾臓ターゲティングペプチドにより模倣された内因性タンパク質候補：CHVLWSTRC（配列番号：201）、CMSSPGVAC（配列番号：203）、及びCLGLLMAGC（配列番号：202）。

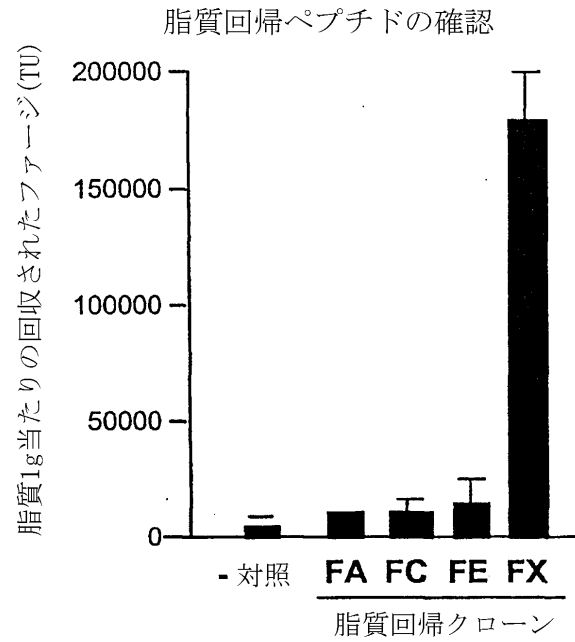
10

20

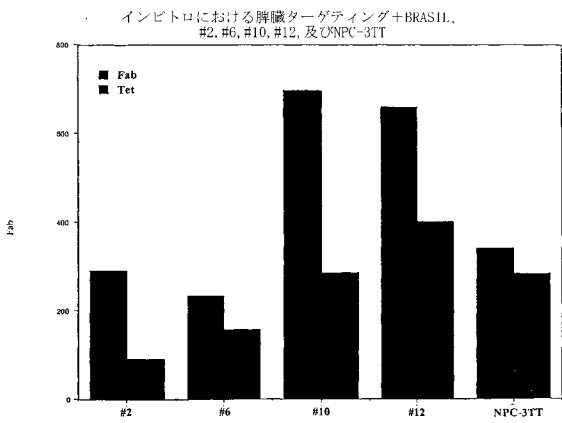
【 図 1 】



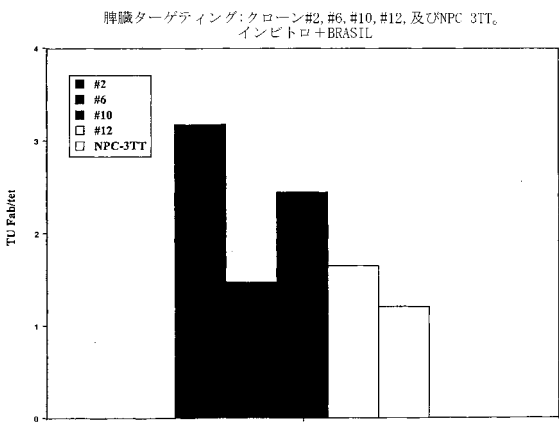
【 図 2 】



【 図 3 】

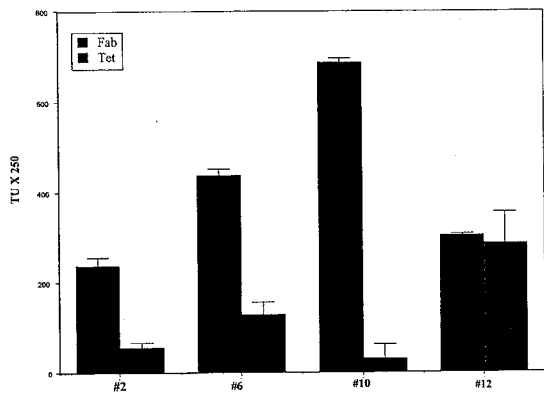


【 図 4 】



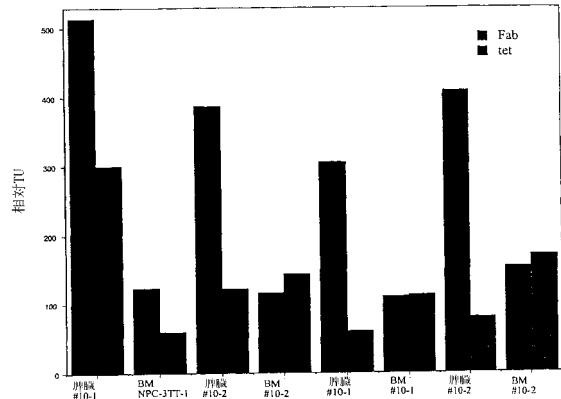
【 図 5 】

インビボにおける脾臓ターゲティング+BRASIL



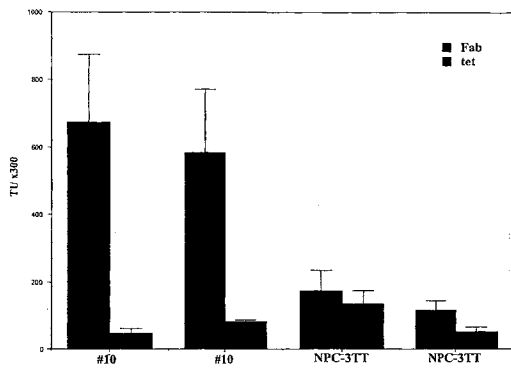
【 図 7 】

脾臓&骨髄への#10、インビボ+BRASIL



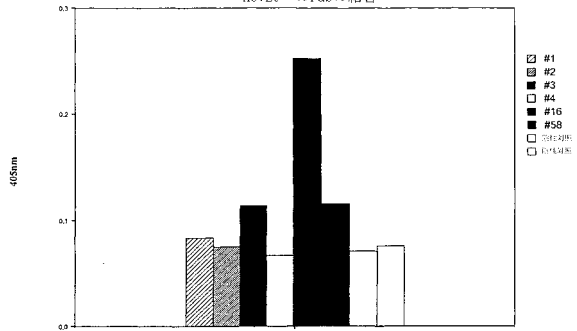
【 図 6 】

#10及びNPC 3TTの脾臓へのターゲティング、インビボ+BRASIL

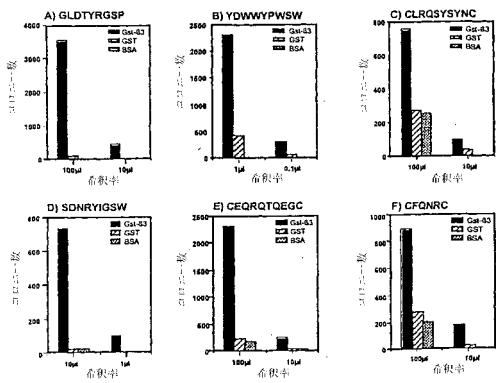


【 図 8 】

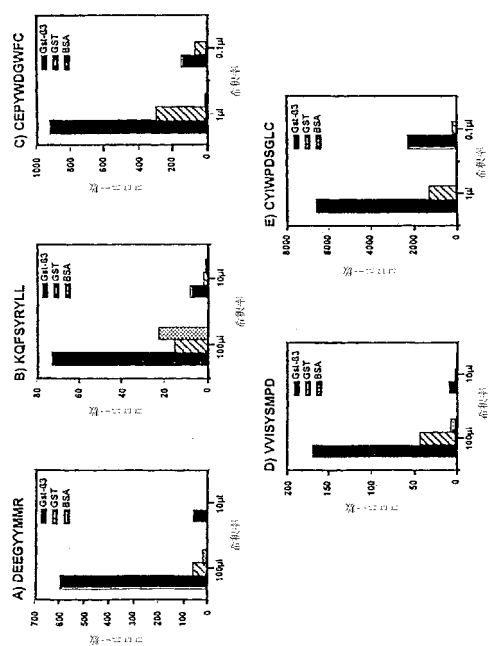
抗KSライブラリによる血管新生網膜のターゲティング、HUVECへのFabの結合



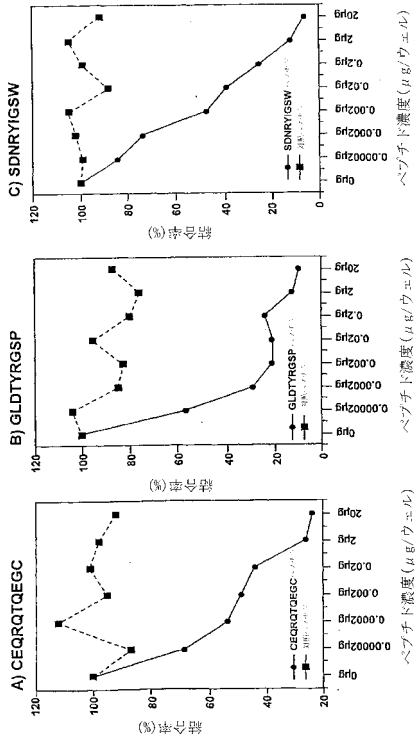
【 図 9 】



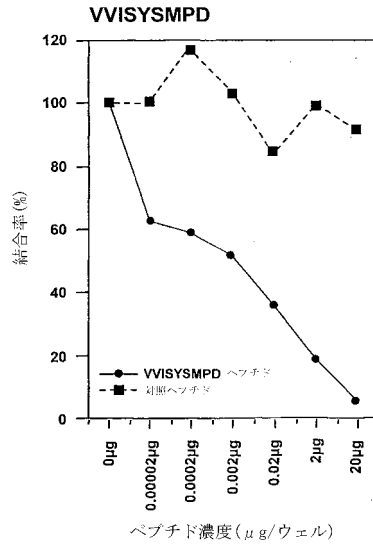
【 図 10 】



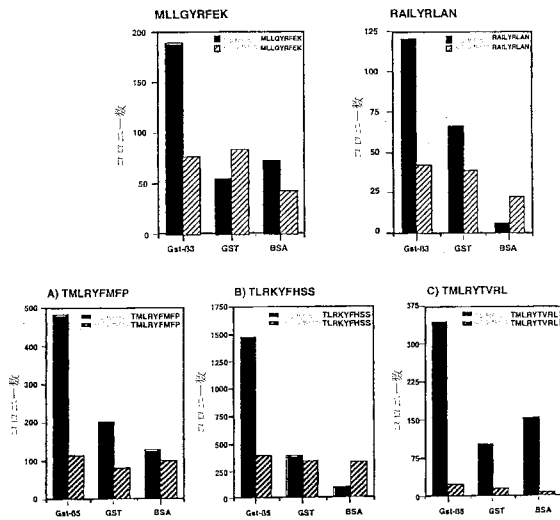
【 図 1 1 】



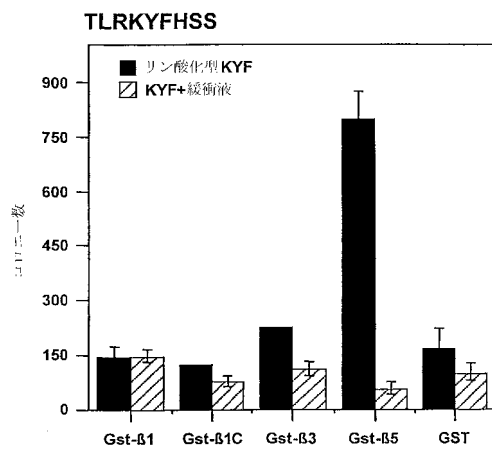
【 図 1 2 】



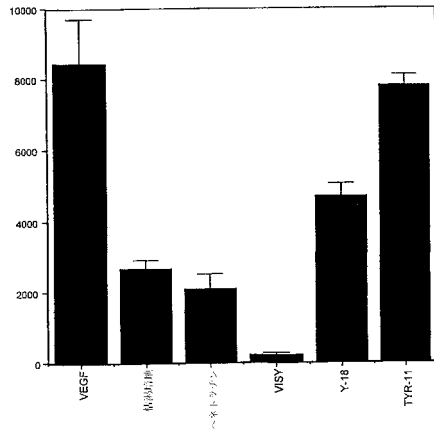
【 図 1 3 】



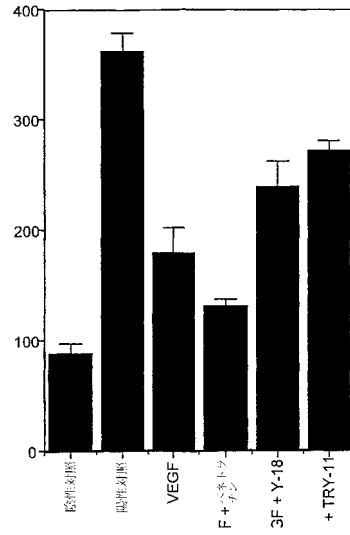
【 図 1 4 】



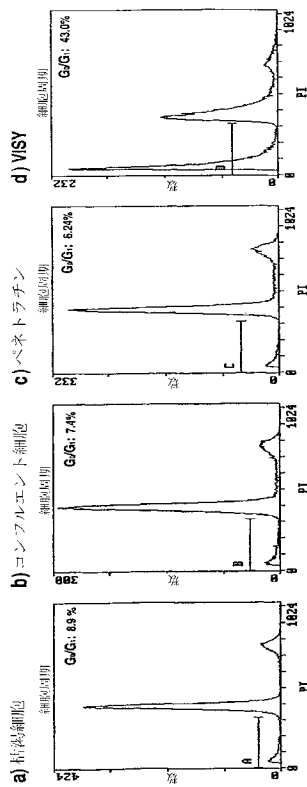
【 図 15 】



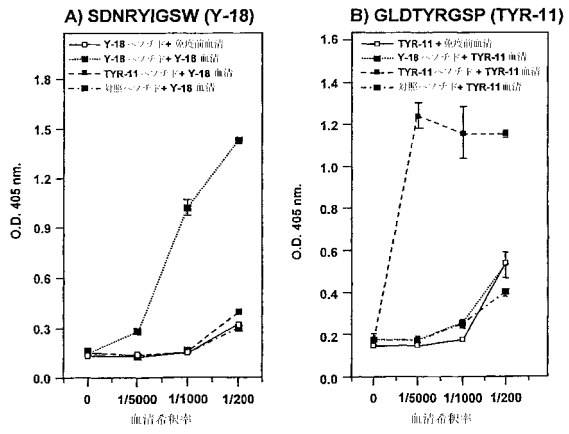
【 図 16 】



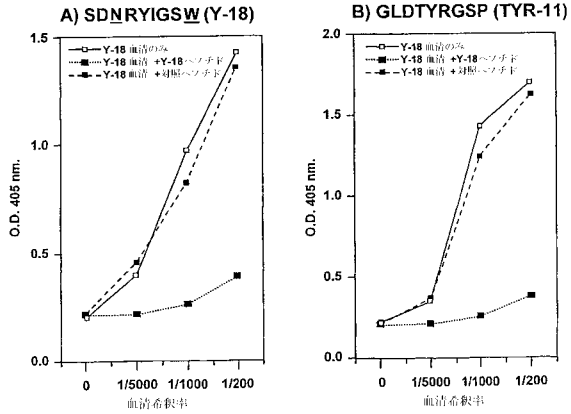
【 図 17 】



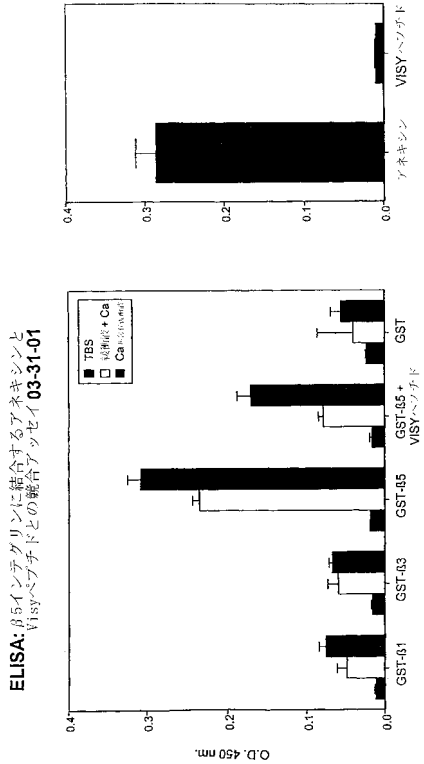
【 図 18 】



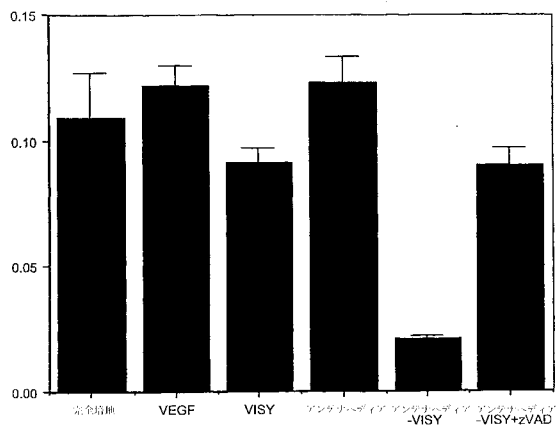
【 図 19 】



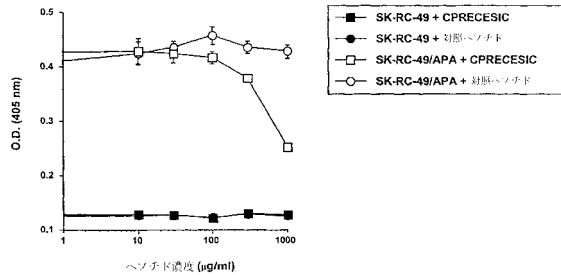
【 図 20 】



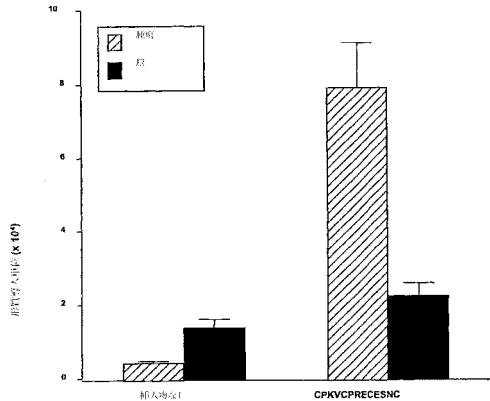
【 図 21 】



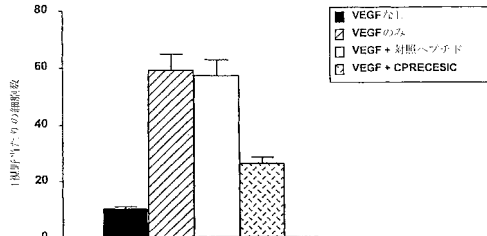
【 図 23 】



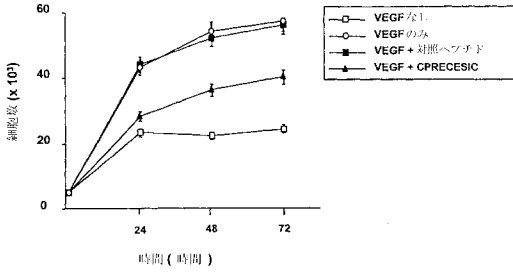
【 図 22 】



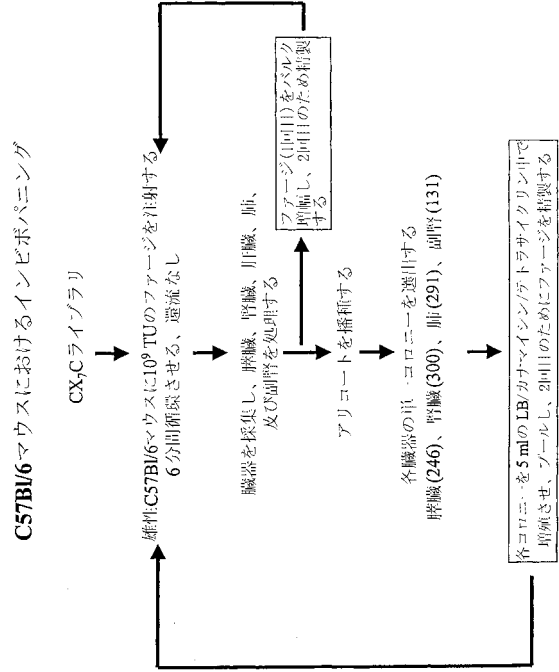
【 図 24 】



【図 25】



【図 26】



【図 27】

PALM 発射材料からのフューズおよびフューズ DNA の回収スキーム

DNA 増幅/サブクローニング

- 1) 90-120時間および別開封を48時間以内に行う。フューズを各管に PBS 溶液 30 μl に入れ、フューズを完全に溶解させる。フューズをフューズ回収液 (FBSF、フューズ回収液、ベントゲン、TPCK、エラスターゼ阻害剤、ベントゲン) に加える。
- 2) 融解した試料をプーリングして PBS によって最終容量を 200 μl に調製する。
- 3) K91 1 ml による RT で 2 時間の感染。
- 4) LB/カナマイシン/グロトラサイクリン 1 ml を、最終 LB/カナマイシン/グロトラサイクリン濃度を 0.2 μg/ml とする。試料を加える。試料を暗所で 40 分から 1 時間回復させる。
- 5) [グロトラサイクリン] を 40 μg/ml に増加して、増殖しながら 37°C で、遺伝子発現を促進する。
- 6) 翌日 LB/カナマイシン/グロトラサイクリンプレートの播種する。
- 7) 単一のコロニーを採取して配列決定するために fUSE5 プライマーによって PCR 増幅する。

DNA 増幅/サブクローニング

- 1) 90-120時間および別開封を48時間以内に行う。フューズを各管に PBS 溶液 30 μl に加える。
- 2) 融解した試料をプーリングして濃縮する。PCR1: fUSE5 プライマーによるベントゲンコード配列の PCR 増幅。
- 3) PCR2: 大腸菌ライナーによるベントゲンコード配列の PCR 増幅。
- 4) M13 リバースプライマーによる PCR2 産物の配列決定。
- 5) PCR3: SfiI 部位を含むライブラリプライマーによるベントゲンコード配列の PCR 増幅。

ゲル精製した PCR 産物を SfiI によって消化する。同様に、fUSE5 を SfiI/CIAP によって消化する。キアガキャンディキットおよびスクリーンアッセイキットを用いて産物を検出する。

ライゲーションして MCI061 にエレクトロポレーションして、LB/グロトラサイクリン/グロトラサイクリンプレートに播種する。単一のコロニーを採取して、配列決定するために fUSE5 プライマーによる PCR 増幅を行う。

【図 28】

高回帰ペプチド配列相同性

ペプチド配列	相同タンパク質	配列	アミノ酸残基	配列同 率	予測値
CYSNPRWK	増殖のマウスタンパク質 (高回帰のマウス遺伝子/自体外動/フラッシュドットからクローニング)	YSNPRW	123-128	100% (6/6)	6.7
	PB-キラー-p110 サブユニット	SNPRW	379-383	100% (5/5)	5.3
	タンパク質	PRWK	422-425	100% (4/4)	9.0
	TNF-α 受容体 p60 領域 1	YSNPRW	130-136	85% (6/7)	12.7
	グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) 結合ドメイン (GLT14 結合ドメイン) 膜結合領域 (121-121 kDa) タンパク質	NPRW	293-296	100% (4/4)	3.08
	Reg2 (分泌型) は、5 回以外 (分泌型) (有 6)	SNRRW	114-118	80% (4/5)	3.91
	ペプチド 10 回 (分泌型) (有 4)	SNPR	35-38	100 (4/4)	5.24
CYPRRWVC	ペプチド 10 回 (分泌型) (有 4)	PRRW	197-201	100 (5/5)	6.4
QHTSGRC	ペプチド 10 回 (分泌型) (有 4)	QHTSG	442-446	100 (5/5)	9.0
	ペプチド 10 回 (分泌型) (有 4)	TSGRG	1088-1092	100 (5/5)	21.8
CRARGWLLC	α3 インテグリン	RAPGWLL	10-16	85 (6/7)	1.2

【 図 2 9 】

高回帰ペプチド配列相同性

ペプチド配列	相同タンパク質	配列	アミノ酸変異	配列同一性	予測値
CGGVHALRC	Ret 受容体 推定マウスタンパク質	VHALR	53-57	100 (5/5)	309
		GGVHSL	432-437	99 (6/6)	556
		GVDALR	248-253	83 (5/6)	2416
		GVHAL	58-62	100 (5/5)	556
CFNRITWCC	細胞シヤンネルタンパク質	NRTWV	411-415	100 (5/5)	50
		FHRTW	711-715	100 (5/5)	67
CSRGFVWCC	動物細胞シヤンネルタンパク質 3B 動物細胞シヤンネルタンパク質 3B 動物細胞シヤンネルタンパク質 3B 動物細胞シヤンネルタンパク質 3B	RGPSW	32-36	100 (5/5)	121
		GPVW	13-16	100 (4/4)	218
		PAWV	45-48	100 (4/4)	218
CWSRGQGCC (25% 1 vs. 2.2 % C)	SOX1 SOX2 SOX3 SOX14	WSRGQ	61-65 53-57 79-83 3-7	100 (5/5) 100 (5/5) 100 (5/5) 83 (5/6)	21 21 21 90
	エンテログリン受容体	WSRVQ	92-97	83 (5/6)	90
	DAP12、チロシンキナーゼ結合 タンパク質	SRVQ	71-75	100 (5/5)	163
	細胞シヤンネルタンパク質	SRVGG	551-556	99 (6/6)	327

【 図 3 0 】

高回帰ペプチド配列相同性

ペプチド配列	相同タンパク質	配列	アミノ酸変異	配列同一性	予測値
CLASGMDAC (9.5%)	TNF-α	LANGMD	116-121	99 (6/6)	50
CHDERTGRC (8%)	SOX6	HDQRT	274-278	99 (6/6)	218
	PI3キナーゼ-p85サブユニット	HEERT	611-615	100 (5/5)	163
CARHALMEC (6%)	APC タンパク質	ALMEC	569-573	100 (5/5)	15
CMQARTSC (6%)	カクシリンW (チロシンキナーゼ)	ARTSC	365-369	100 (5/5)	67
	c2 アドレナリン受容体	QGART	326-330	100 (5/5)	121
	膀胱間葉タンパク質 Reg 3α	RTSC	37-40	100 (4/4)	393

【 図 3 1 】

高回帰ペプチド配列相同性

ペプチド配列	相同タンパク質	配列	アミノ酸変異	配列同一性	予測値
CHVLWSTRC (13% 1 vs. 2.2% C)	シヤンネルタンパク質結合タンパク質 キナーゼ	VLKVRDWSTR	220-230	60 (6/10)	122
	シヤンネルタンパク質結合タンパク質 6(LERK 6)	VLWS	202-205	100 (4/4)	220
	c3a インテグリン	VLWS	147-150	100 (4/4)	220
CMSSFGVAC (10.7% 1 vs. 3.2% C)	インスリン受容体残基1	MSPGVA	611-616	67 (4/4)	164
	タニニン c5 鎖	MASPG	467-471	100 (5/5)	220
	インスリン受容体残基2	MSSP	262-265	100 (4/4)	265
	SOX17	MSSP	1-4	100 (4/4)	396
	シヤンネルタンパク質結合タンパク質-GTPase	MNSPG	998-1002	100 (5/5)	396
	クルコルチロイド受容体	SSPSVA	45-50	83 (5/6)	396
	シヤンネルタンパク質結合タンパク質2	SSPG	402-405	100 (4/4)	1720
CLGLLMAGC (13% 1 vs. 4.3% C)	細胞シヤンネルタンパク質2	LGLLMA	105-110	100 (6/6)	87
	細胞シヤンネルタンパク質2	LGLLM	272-276	100 (5/5)	51
	チロシンキナーゼ結合タンパク質	LGLLVAG	21-27	99 (7/7)	51
	KE4	LGLLVAAMAG	15-25	63 (7/11)	68
	チロシンキナーゼ結合タンパク質	LGLLMGC	217-223	81 (7/8)	91
	チロシンキナーゼ結合タンパク質	LGLLPGC	12-16	82 (5/6)	82
	Wnt3 細胞シヤンネルタンパク質	LGLLISG	6-10	99 (7/7)	164

【配列表】

0005077862000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 パスカリニ レナタ
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン バッファロー スピードウェイ #328 717
1

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Q. J. Nucl. Med. , 1999年, vol.43, no.2, pp.159-162
Cancer Res. , 2000年 2月, vol.60, no.3, pp.722-727

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 7/00-7/66

C07K 14/00-14/825

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/

REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed