

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536020

(P2004-536020A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/00	A 4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 31/225</b>	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 31/23</b>	A 6 1 K 39/00	K 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 31/56</b>	A 6 1 K 31/225	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 31/683</b>	A 6 1 K 31/23	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 141 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-525731 (P2002-525731)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバ
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月10日 (2003.3.10)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028045		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(87) 国際公開番号	W02002/020724		オースティン、ウエスト・セブンス・スト
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		リート・201
(31) 優先権主張番号	60/231,266	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	09/765,101		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001.1.17)	(72) 発明者	アラップ ワディ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 テキサス州 ヒュースト
			ン バッファロー スピードウェイ #3
			28 7171
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ターゲティングペプチドを使用したアデノウイルスターゲティング及び免疫系応答の操作方法

## (57) 【要約】

本発明は、ターゲティングペプチドの同定及び使用に関連した組成物及び方法に関する。そのようなターゲティングペプチドは、インビボにおいて特異的な臓器又は組織へと選択的に回帰する。本明細書において開示される新規なターゲティング配列は、標的化臓器又は組織への、様々な治療剤の標的化送達に有用である。特定の態様において、本発明は、遺伝子治療ベクター又はその他の治療剤と結合する、Fab断片のような分子に付着した臓器ターゲティングペプチドを含む、二重特異性ターゲティング試薬に関する。別の態様において、臓器ターゲティング部分および、遺伝子治療又は治療的物質ターゲティング部分を含む二重特異性ターゲティングペプチドが得られ、標的化送達に使用することもできる。その他の態様は、抗原又はその他の分子のリンパ節への標的化送達を介した、宿主免疫系機能の調整に関する。アデノウイルス又はリンパ節組織に対するターゲティングペプチド配列の多数の例が、本発明において開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫系応答を調整するための方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) リンパ節ターゲティングペプチドを得る段階；
- b) ターゲティングペプチドを免疫原に付着させる段階；ならびに
- c) ターゲティングペプチド及び免疫原を個体へ投与する段階。

## 【請求項 2】

免疫原が、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、プリオン、ウイルス、細菌、ファージ、孢子、カビ、酵母、藻類、アメーバ、ジアルジア、渦鞭毛藻類、単細胞生物、病原体、細胞、又は感染物質である、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

ターゲティングペプチドが、免疫原の表面タンパク質の一部として発現する、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

ターゲティングペプチドが、免疫原と結合する Fab 断片に付着する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

ターゲティングペプチドが二重特異性 (bispecific) である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

ターゲティングペプチドが、免疫原と結合する部分を含む、請求項 5 記載の方法。

20

## 【請求項 7】

ターゲティングペプチドが、アミノ酸配列 CAY (システイン - アラニン - チロシン) 又は SCAR (セリン - システイン - アラニン - アルギニン) を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

ターゲティングペプチドが、配列番号：7 又は配列番号：8 を含む、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

投与段階が、ターゲティングペプチドの非存在下での免疫応答と比較して、免疫原に対する個体の免疫応答を増加させるのに有効である、請求項 1 記載の方法。

30

## 【請求項 10】

免疫原に対して個体を予防接種する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

免疫原が癌細胞である、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 12】

免疫原が HIV (ヒト免疫不全ウイルス) である、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 13】

第二の部分に付着したアミノ酸配列 CAY 又は SCAR を含む、二重特異性化合物。

## 【請求項 14】

第二の部分が抗体又は抗体断片である、請求項 13 記載の化合物。

40

## 【請求項 15】

抗体又は抗体断片が免疫原と結合する、請求項 14 記載の化合物。

## 【請求項 16】

第二の部分が免疫原と結合するペプチドである、請求項 13 記載の化合物。

## 【請求項 17】

ベクター結合部分に付着したターゲティングペプチドを含む、二重特異性化合物。

## 【請求項 18】

ベクターがアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス (AAV) である、請求項 17 記載の化合物。

50

## 【請求項 19】

ベクター結合部分が抗体又は抗体の F a b 断片を含む、請求項 17 記載の化合物。

## 【請求項 20】

抗体が I C 5 I I E 1 1 又は 3 B 2 I D 1 0 である、請求項 19 記載の化合物。

## 【請求項 21】

ターゲティングペプチドが配列番号：5 を含む、請求項 17 記載の化合物。

## 【請求項 22】

配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、又は配列番号：24 を含む、請求項 17 記載の化合物。 10

## 【請求項 23】

アミノ酸配列 E L R ( グルタミン酸 - ロイシン - アルギニン ) を含む、請求項 17 記載の化合物。

## 【請求項 24】

アミノ酸配列 G R ( グリシン - アルギニン ) を含む、請求項 17 記載の化合物。

## 【請求項 25】

ベクターを臓器又は組織へとターゲティングする方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) 臓器又は組織に対するターゲティングペプチドを得る段階；
- b) ベクターに対する結合部分を得る段階； 20
- c) ターゲティングペプチドを結合部分に付着させ、複合体を形成させる段階；並びに
- d) 複合体及びベクターを被験者へ投与する段階。

## 【請求項 26】

ベクターがアデノウイルス又は A A V である、請求項 25 記載の方法。

## 【請求項 27】

結合部分が抗体又は抗体の F a b 断片である、請求項 25 記載の方法。

## 【請求項 28】

抗体が I C 5 I I E 1 1 又は 3 B 2 I D 1 0 である、請求項 27 記載の方法。

## 【請求項 29】

ターゲティングペプチド及び結合部分が、二重特異性化合物の一部である、請求項 25 記載の方法。 30

## 【請求項 30】

二重特異性化合物が単一ペプチドである、請求項 29 記載の方法。

## 【請求項 31】

個体が哺乳類である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 32】

個体がマウス又はヒトである、請求項 31 記載の方法。

## 【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 D A M D 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 1 R 0 1 C A 7 8 5 1 2 - 0 1 A 1、1 R 1 C A 9 0 8 1 0 - 0 1、および 1 R 0 1 C A 8 2 9 7 6 - 0 1 により政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を保有する。

## 【0002】

## 1. 発明の分野

本発明は、分子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、二重特異性ターゲティング試薬を用いた、治療用ベクター、特にアデノウイルスベク 50

10

20

30

40

50

ターのターゲティングのための組成物および方法、ならびに、リンパ節ターゲティングペプチドを用いた免疫系応答の調整に関する。

#### 【0003】

#### 2. 関連技術の説明

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

#### 【0004】

最近、マウスモデル系において臓器または組織ターゲティングペプチドを同定するためのファージディスプレイライブラリを用いるインビボ選択系が開発された。バクテリオファージの表面上にトランスジェニックペプチドを発現するファージディスプレイライブラリは、当初、免疫グロブリンのエピトープ結合部位をマッピングするために開発された (Smith, 1985; Smith および Scott, 1985, 1993)。そのようなライブラリは、ファージの表面タンパク質をコードする cDNA にランダムオリゴヌクレオチドを挿入すること、独自のペプチドを  $10^9$  個もの順列で示すファージ粒子のコレクションを作製することによって作製することができる (Pasqualini および Ruoslahti, 1996; Arap ら, 1998a; Arap ら, 1998b)。

#### 【0005】

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

#### 【0006】

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

#### 【0007】

遺伝子治療ベクターの送達を特定の臓器または組織にターゲティングする試みが行われている。そのようなベクターを関心対象の部位に向ければ、治療効果を増強し、有害な全身免疫反応を減少させるであろう。アデノウイルス 5 型 (Ad5) に基づくベクターは、遺伝子移入研究に一般的に用いられている (Weitzman ら, 1997; Zhang, 1999)。標的細胞に対する Ad5 の結合は、カプシド繊維のこぶ領域によって媒介され、これは、コクサッキーアデノウイルス受容体 (CAR) を含む細胞表面受容体と、そしておそらく MHC クラス I と相互作用する (Bergelson ら, 1997; Hon

10

20

30

40

50

gら、1997)。インビボで全身投与すると、CARに対するウイルスの結合によって、標的ではないがCARを発現する組織においてベクターの意図していない濃縮が起こりうる。逆に、CARをほとんどまたは全く発現しない標的細胞の形質導入は効率が悪い。より選択的な遺伝子治療の送達を行うためには、Ad5ベクターを再ターゲティングする必要がある。

#### 【0008】

アデノウイルスの再ターゲティングを達成するための従来の努力においては、二重特異性接合体又は遺伝学的に修飾されたカプシドが使用されてきた。二重特異性接合体は、腫瘍発生又は炎症の際に上方制御される増殖因子受容体へとAd5をターゲティングするために使用された(Douglasら、1996; Goldmanら、1997; Watkinsら、1997; Millerら、1998)。CD3、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1インテグリン、又はヘパラン硫酸受容体に対するリガンドを使用したAd5再ターゲティングも、試みられた(Wickhamら、1995; 1996a、1996b; 1997a、1997b; Vigneら、1999)。他の試みにおいては、アデノウイルスを再ターゲティングすることを試み、異種リガンドがファイバーノブのHIループに取り込まれた(Dmitrievら、1998; Krasnykhら、1998)。異種リガンドを、レトロウイルスのエンベロープ、又はアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスのカプシドへと取り込ませ、それにより、これらのベクターを、インテグリン(Dmitrievら、1998; Vigneら、1999; Girodら、1999)、T細胞受容体(Engelstadterら、2000)、又は黒色腫関連抗原(Martinら、1999)へとターゲティングすることも行われている。これらの手法には、二つの主要な限界がある。(1)ターゲティングされた受容体の特異的組織に限定されていなかった;又は(2)ターゲティングされた受容体が、静脈投与療法にとっての要件である、血管を裏打ちしている内皮細胞の内腔表面上に選択的に発現されていなかった。目的の臓器又は組織への選択的な静脈送達を可能にするために有効な、アデノウイルスベクター及びその他の遺伝子治療ベクターの再ターゲティング手段が、当技術分野においては必要とされている。

#### 【0009】

免疫系応答を調整するため、脾臓及びリンパ節のような宿主免疫系の一部への免疫原性剤の標的化送達が、試みられている。そのような手法は、リンパ節又は脾臓への抗原の直接接種(Sigelら、1983; Nilssonら、1987)、並びに樹状細胞及びその他の抗原提示細胞の上に位置している受容体のターゲティング(Wangら、2000; Heijnenら、1996)を含んでいた。現在までの結果は、ごくわずかにしか成功していない。免疫原性剤の免疫系ターゲティングの効率的かつ効果的な方法が、必要とされている。

#### 【0010】

##### 発明の概要

本発明は、インビボにおける特異的な臓器又は組織への、遺伝子治療ベクター(アデノウイルスベクターを含むが、これに限定されるわけではない)の選択的送達の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。他の態様において、組成物及び方法は、様々な抗原の送達のためリンパ節組織をターゲティングし、それにより、抗原に対する宿主の免疫系応答を調整することを可能にする。当業者であれば、特許請求の範囲に記載された使用法の範囲が、ターゲティングされうる抗原の型に関して制限されず、単一の精製された分子から、ウイルス、細菌、又は罹患宿主細胞のような病原性因子にまで及ぶ任意の免疫原性化合物を含むことを理解するであろう。さらなる態様において、リンパ節へとターゲティングされる化合物は、1個以上の免疫系機能の制御分子(サイトカイン又はケモカインを含むが、これらに限定されるわけではない)を含みうる。いくつかの態様において、治療を受ける罹患細胞又は病原性生物は、ターゲティングされた臓器又は組織から遠位の体内部位に位置していてもよい。そのような使用法の非限定的な例は、腫瘍関連抗原に対する全身性体液性免疫応答を惹起し、腫瘍に対する宿主免疫応答を増幅することによる転移性癌の治療であろう。

## 【 0 0 1 1 】

本発明のいくつかの態様は、所望の臓器又は組織に対するターゲティングペプチドを選択する段階、ターゲティングペプチドを、分子、高分子複合体、又は遺伝子治療ベクターに付着させる段階、及び、分子、複合体、又はベクターに付着したペプチドを被験者へと供給する段階を含む、標的化送達の方法に関する。いくつかの好ましい態様において、臓器又は組織はリンパ節である。リンパ節ターゲティングペプチドの好ましい例は、下記の実施例 2 に開示される。

## 【 0 0 1 2 】

本発明のもう一つの態様は、標的化遺伝子治療のための分子アダプターに関する。好ましい態様において、分子アダプターは、所望の臓器又は組織への選択的ターゲティングを提供するターゲティングペプチド配列に、共有結合により付着した、遺伝子治療ベクターに特異的な抗体の F a b 断片を含む。より好ましい態様において、遺伝子治療ベクターは、アデノウイルス、特に 5 型アデノウイルスである。当業者であれば、本発明がアデノウイルスベクターに限定されず、当技術分野において既知の任意の遺伝子治療ベクターを含みうることを認識するであろう。同様に、分子アダプターのベクター結合部分は、抗体の F a b 断片に限定されず、ターゲティングペプチドを遺伝子治療ベクターに付着させるために使用されうる他の分子を含みうる。唯一の要件は、遺伝子治療ベクターが、分子アダプターの存在下で、所望の臓器又は組織へと選択的にターゲティングされることである。そのような F a b 断片及びアデノウイルスターゲティングペプチドの好ましい例は、下記の実施例 1 に提供される。

## 【 0 0 1 3 】

さらなる態様は、抗原をリンパ節へとターゲティングすることによる体液性免疫応答の調整のための組成物及び方法に関する。リンパ節ターゲティングペプチドは、抗原に付着し、被験者へと投与されうる。ターゲティングペプチドの存在は、抗原のリンパ節への選択的送達を提供し、抗原は、リンパ節で、被験者の体液性免疫応答を調整する。好ましい態様において、ターゲティングペプチドは、共有結合により抗原に付着している。本発明の範囲に含まれる抗原には、これらに限定されるわけではないが、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ウイルス、細菌、病原性微生物、及び罹患細胞を含む、被験者における体液性免疫応答を惹起することができる任意の分子又は高分子集合体が含まれうる。

## 【 0 0 1 4 】

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。

## 【 0 0 1 5 】

例示的態様の説明

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

## 【 0 0 1 6 】

「ターゲティングペプチド」とは、連続するアミノ酸配列を含むペプチドであり、臓器または組織への選択的局在を特徴とする。選択的局在は例えば、推定のターゲティングペプチド配列が、ファージの外表面上に表示されるタンパク質に組み入れられる、下記に開示する方法によって決定してもよい。異なるアミノ酸配列のそのようなターゲティングペプチドを多数発現するよう遺伝学的に改変されたそのようなファージのライブラリを、被験者へと投与した後、被験者から 1 個以上の臓器又は組織を収集し、その臓器又は組織に見出されるファージを同定する。ターゲティングペプチド配列を発現しているファージは、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、

10

20

30

40

50

その組織又は臓器に選択的に移行するものと見なされる。又は、選択的移行を示すターゲティングペプチド配列を発現しているファージは、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はずである。3回目のスクリーニングの後には、さらなる濃縮が示されうる。選択的局在を決定するもう一つの手段は、推定の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、または任意の推定の標的ペプチドを発現するように遺伝子操作されていない対照ファージと比較して、標的臓器において少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍の濃縮を示すことである。選択的局在を決定するもう一つの方法は、標的ペプチドを発現するファージの標的臓器への局在が、標的ペプチド配列を含む合成ペプチドの同時投与によって少なくとも部分的に阻害されることである。「ターゲティングペプチド」および「回帰ペプチド」とは、本明細書において同義に用いられる。

10

#### 【0017】

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

20

#### 【0018】

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

#### 【0019】

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、標的臓器または組織内の血管を裏打ちする(line)内皮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。

30

#### 【0020】

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, 1985; SmithおよびScott, 1985, 1993)。この技術を適用できる可能性がある範囲はかなり広く、過去10年の間に、ファージによって表示されたペプチドライブラリの構築、およびライブラリを用いてペプチドリガンドを単離するスクリーニング方法の開発にはかなりの進歩が認められている。例えば、ペプチドライブラリを用いることによって、相互作用部位、および炎症反応に関与する抗体または細胞接着を媒介するインテグリンのような多

40

50

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)。

#### 【0021】

ある臓器又は組織をターゲティングするための最も効率的なアミノ酸配列は、「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被験者へと投与し、ファージを含む臓器又は組織の試料を回収する。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、標的の臓器又は組織から溶出させ、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へと投与し、臓器又は組織の試料を再び収集してもよい。選択的バインダーの集団が得られるまで、複数回のバイオパニングを実施することができる。ペプチドのアミノ酸配列は、ファージゲノムにおけるターゲティングペプチド挿入物に対応するDNAを配列決定することによって決定される。次に、同定されたターゲティングペプチドを標準的なタンパク質化学技術によって合成ペプチドとして産生することができる (Arapら、1998a; SmithおよびScott、1985)。このアプローチによって、その標的の特性に関して如何なる概念も予め抱くことなく、循環中のターゲティングペプチドを偏りのない機能的アッセイにおいて検出することができる。候補標的がターゲティングペプチドの受容体として同定されると、これを、標準的な生化学的方法を用いて単離、精製、およびクローニングすることができる (Pasqualini、1999; RajotteおよびRuoslahti、1999)。

#### 【0022】

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II遺伝子被膜タンパク質との融合タンパク質として発現されたランダムペプチドのライブラリを好んで用いた (PasqualiniおよびRuoslahti、1996)。所定のライブラリに存在する個々のクローンの数および多様性は、インビボ選択の成否にとって重要な要因である。欠損ファージクローンの過剰発現を有する可能性が低い第一のライブラリ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。

#### 【0023】

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 ( $CX_3 - 10C$ ) において3~10個のランダム残基を表示するファージライブラリが好ましい。二環ペプチドを示すライブラリ ( $CX_3CX_3CX_3C$  など; Rajotteら、1998) も首尾よく用いられている。しかし、同源の合成ペプチドの産生は、可能ではあるが、異なるジスルフィド架橋配列を有する多数の配座異性体のために複雑となりうる。

#### 【0024】

マウスにおけるインビボファージディスプレイによる回帰ペプチドおよび受容体の同定  
マウスに投与されたファージディスプレイペプチドライブラリ由来のペプチドのインビボ選択を用いて、正常なマウス脳、腎臓、肺、皮膚、脾臓、網膜、腸、小腸、子宮、前立腺、および副腎に関して選択的なターゲティングペプチドを同定した (PasqualiniおよびRuoslahti、1996; Pasqualini、1999; Rajot



te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CDCRGDCFC(配列番号:25)(RGD-4Cと名付ける)、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 $\alpha$ 5 $\beta$ 1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)。

10

#### 【0025】

腫瘍回帰RGD4Cターゲティングペプチドの受容体は、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1インテグリンとして同定されている(Pasqualiniら、1997)。 $\alpha$ 5 $\beta$ 1インテグリンは、血管新生において重要な役割を果たす。 $\alpha$ 3および $\alpha$ 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、1994a、1994b; 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、マウス前立腺癌の新生血管だけでなく、正常前立腺内皮組織においても強く発現されている。表1は、マウスにおけるインビボファージディスプレイによる、腫瘍ターゲティングのための代表的なリガンド-受容体対を示す。

20

#### 【0026】

細胞表面受容体、及びインビボファージディスプレイにより単離された回帰モチーフ

#### 【表1】

受容体		担体?	局在	回帰モチーフ
$\alpha$ vインテグリン	細胞接着	有	EC, 腫瘍細胞	RGD4C
CD13	プロテアーゼ	有	EC, 周皮細胞, 腫瘍	CNGRC
アミノペプチダーゼA	プロテアーゼ	N/D	周皮細胞	CPRECES
NG2/HMWMAA	プロテオグリカン	N/D	周皮細胞, 腫瘍細胞	GSL
MMP-2/MMP-9	プロテアーゼ	有	EC, 腫瘍細胞	CTTHWGFTLC
MDP	プロテアーゼ	N/D	EC	CGFEC

30

HMWMAA、高分子量黒色腫関連抗原; MMP、マトリックスメタロプロテイナーゼ; EC、内皮細胞; N/D、未決定; R、アルギニン; G、グリシン; C、システイン; N、アスパラギン; P、プロリン; S、セリン; L、ロイシン; T、トレオニン、H、ヒスチジン; W、トリプトファン、F、フェニルアラニン; MDP、メンブレンジペプチダーゼ(membrane dipeptidase)

40

#### 【0027】

腫瘍回帰ファージは、腫瘍の新生血管においてその受容体と同時局在するが、正常組織の非新生血管には存在しない(Arapら、1998b)。免疫組織化学的証拠から、血管ターゲティングファージが、組織切片においてヒト腫瘍血管に結合するが(Pasqualiniら、2000b)、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。

50

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。血管新生受容体は、正常臓器の血管において検出されなかった。

#### 【0028】

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、新生血管の内皮細胞および周皮細胞において特異的に発現される。新生血管は、非増殖性の内皮細胞では非常に低レベルで発現されるか、または全く発現されないマーカーを発現する（示していない）。

10

#### 【0029】

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Alitalo、1995）。これまで、新生血管の特徴である新規分子の同定および単離は、主に内皮細胞を培養で増殖させると表現型が劇的に変化するために遅れている（Watsonら、1995）。

#### 【0030】

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（Wickhamら、1997c）、CD13はコロナウイルスの受容体である（Lookら、1989）。MMP-2およびMMP-9は、エコーウイルスの受容体である（Koivunenら、1999）。アミノペプチダーゼAも同様にウイルス受容体であると考えられる。バクテリオファージは真核細胞ウイルスと同じ細胞受容体を利用する可能性がある。これらの知見は、インビボファージディスプレイによって単離された受容体が、同定されたペプチドモチーフを標的遺伝子治療担体として利用するための重要な特徴である、細胞内部移行（internalization）能を有することを示唆している。

20

#### 【0031】

標的化送達

腫瘍血管に回帰するペプチドを細胞障害薬またはアポトーシス促進ペプチドにカップリングさせると、腫瘍異種移植片を有する実験的マウスモデルにおいて親化合物より有効であ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）。他の態様において、様々な治療用のタンパク質又はペプチドと連結されたターゲティングペプチドを含む融合タンパク質又はキメラタンパク質を作製し、本発明の方法により投与することもできる。開示された方法による送達のためターゲティングされうる治療用のタンパク質又はペプチドの非限定的な例を、以下に挙げる。

30

#### 【0032】

プログラム細胞死の制御因子

アポトーシス又はプログラム細胞死は、正常な胚発生、成体組織におけるホメオスタシスの維持、及び発癌の抑制にとって不可欠の過程である（Kerrら、1972）。タンパク質のBcl-2ファミリー及びICE様プロテアーゼは、他の系においてアポトーシスの重要な制御因子及びエフェクターであることが証明されている。ろ胞性リンパ腫に関連して発見されたBcl-2タンパク質は、多様なアポトーシス刺激に対する応答の際、アポトーシスの調節及び細胞生存の増強において顕著な役割を果たしている（ClearyおよびSklar、1985；Clearyら、1986；Tsujimotoら、1985；TsujimotoおよびCroce、1986）。進化上保存されてきたBcl-2タンパク質は、現在では、細胞死アゴニスト（death agonists）又は細胞死アンタゴニスト（death antagonists）として分類されうる関連

40

50

タンパク質のファミリーのメンバーであることが認識されている。

#### 【0033】

その発見に続き、Bcl-2は多様な刺激により誘発される細胞死を抑制するよう作用することが示された。また、現在では、構造上及び配列上の相同性を共有しているBcl-2細胞死制御タンパク質のファミリーが存在することが明らかである。これらの種々のファミリーメンバーは、Bcl-2と類似の機能を保有しているか（例えば、Bcl<sub>xL</sub>、Bcl<sub>w</sub>、Bcl<sub>s</sub>、Mcl-1、A1、Bfl-1）、又はBcl-2機能に対抗し、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。

#### 【0034】

本発明の範囲内で意図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、マガニン、メリチン、デフェンシン（defensin）、セクロピン（cecropin）、（KLAKLAK）<sub>2</sub>（配列番号：1）、（KLAKKLA）<sub>2</sub>（配列番号：2）、（KAAKKA）<sub>2</sub>（配列番号：3）、又は（KLGKKLG）<sub>3</sub>（配列番号：4）が含まれる。

#### 【0035】

血管新生阻害剤

いくつかの態様において、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（proliferin）関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット（Marimastat）、ペントサンポリ硫酸（pentosan polysulphate）、アンジオポエチン2（Regeneron）、インターフェロン、ハービマイシン（herbimycin）A、PNU145156E、16Kプロラクチン断片、リノマイド、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、アキュチン（accutin）、アンジオスタチン、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、又はミノサイクリン（minocycline）のような抗血管新生剤に付着したターゲットイ  
ングペプチドの投与に関しうる。

#### 【0036】

タンパク質とペプチド

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

#### 【0037】

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2

10

20

30

40

50

50、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。

#### 【0038】

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

10

#### 【0039】

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2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。

20

#### 【0040】

改変アミノ酸およびまれなアミノ酸

#### 【表2】

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

30

40

#### 【0041】

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

50

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。

#### 【0042】

##### 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。

#### 【0043】

##### 融合タンパク質

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

#### 【0044】

##### 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

10

20

30

40

50

化を含む。関心対象のタンパク質またはペプチドは、部分的または完全な精製を得るために（または均一になるまで精製）、クロマトグラフィーおよび電気泳動技術を用いてさらに精製してもよい。純粋なペプチドの調製に特に適した分析法は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティクロマトグラフィー、免疫アフィニティクロマトグラフィー、および等電点電気泳動である。アフィニティクロマトグラフィーによる受容体タンパク質精製の例は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,206,347号に開示されている。ペプチドを精製する特に効率のよい方法は、速いタンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）またはHPLCである。

#### 【0045】

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。

#### 【0046】

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

#### 【0047】

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

#### 【0048】

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

#### 【0049】

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

10

20

30

40

50

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

#### 【0050】

##### 合成ペプチド

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

10

20

#### 【0051】

##### 抗体

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

30

#### 【0052】

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

40

#### 【0053】

##### サイトカインとケモカイン

特定の態様において、臓器、組織、または細胞型に標的化送達するために、特異的生物活性物質を一つまたは複数のターゲティングペプチドにカップリングさせることが望ましいかもしれない。そのような物質には、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス促進因子、および抗血管新生因子が含まれるがこれらに限定されない。「サイトカイン」という用語は、細胞間メディエータとしてもう一つの細胞に作用する、一つの細胞集団によって放出されたタンパク質の総称である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、増殖因子、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、ヒ

50

ト成長ホルモン、N-メチオニル成長ホルモン；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。

10

20

#### 【0054】

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識するであろう。

#### 【0055】

架橋剤（cross-linker）

30

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

40

#### 【0056】

リガンドをリボソームに架橋させる例示的方法は、それぞれが特に参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,603,872号、および米国特許第5,401,511号に記載されている。様々なリガンドをアミン残基の架橋によってリボソーム表面に共有結合させることができる。リボソーム、特に、それぞれがホスファチジルエタノールアミン（PE）を含む微小乳化リボソーム（MEL）および大きい単層リボソーム（LUVET）のような多層小胞（MLV）または単層小胞は、確立された技法によって調製されている。リボソームにPEを含めこと、架橋目的のためにリボソーム表面上に活性な官能

50



残基、1級アミンを提供する。上皮細胞増殖因子（EGF）のようなリガンドは、PE-リボソームに首尾よく結合されている。リガンドは、リボソーム表面上の明確な部位に共有結合している。これらの部位の数および表面密度は、リボソーム製剤およびリボソームタイプによって決まる。リボソーム表面はまた、非共有結合部位を有してもよい。リガンドとリボソームとの共有結合体を形成するために、架橋試薬を有効性および生体適合性に関して調べられている。架橋試薬には、グルタルアルデヒド（GAD）、二官能オキシラン（OXR）、エチレングリコールジグリシジルエーテル（EGDE）、および水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）が含まれる。架橋の複合体化学によって、認識物質のアミン残基とリボソームとの結合が確立される。

10

#### 【0057】

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（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。

#### 【0058】

#### 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。

20

#### 【0059】

本明細書において用いられる「核酸」には、一本鎖および二本鎖分子と共に、DNA、RNA、化学改変核酸および核酸類似体が含まれる。本発明の範囲内の核酸は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約275、約300、約325、約350、約375、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約625、約650、約675、約700、約725、約750、約775、約800、約825、約850、約875、約900、約925、約950、約975、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500個のヌクレオチド残基またはそれ以上の長さであってもよいと考えられる。

30

40

#### 【0060】

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3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。

#### 【0061】

#### 【表3】

50

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	20
メチオニン	Met	M	AUG						
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU					
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG					
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	30
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
トリプトファン	Trp	W	UGG						
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU					40

## 【 0 0 6 2 】

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

ハイブリダイゼーション混合物中のホルムアミド、塩化テトラメチルアンモニウム、または他の溶媒の存在または濃度によって部分的に決定される。

#### 【 0 0 6 3 】

クローニング、遺伝子移入、および発現のためのベクター

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

10

#### 【 0 0 6 4 】

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。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。

20

#### 【 0 0 6 5 】

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

30

#### 【 0 0 6 6 】

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、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を最小限にするように作用しうる。

#### 【 0 0 6 7 】

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

40

50

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。

【0068】

発現ベクターの送達

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

10

【0069】

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

【0070】

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、組織、または無傷の臓器において望ましくない反応を引き起こさないように、欠損干渉ウイルス粒子またはエンドトキシンおよび他の発熱物質のような望ましくない混入物を本質的に含まないようにするために十分にビリオンを精製することが望ましいであろう。ベクターを精製する好ましい手段は、塩化セシウム勾配遠心のような懸濁密度勾配を用いることを含む。

20

【0071】

遺伝子ベクターとして用いられるウイルスはDNAウイルスであり、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)を含みうる。

30

【0072】

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。

【0073】

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

40

【0074】

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

50

力価、広い細胞範囲、および高い感染性のために、遺伝子移入ベクターとして用いるために特に適している。ウイルスゲノムの両端は100塩基対～200塩基対の逆方向反復配列( I T R )を含み、これはウイルスDNA複製およびパッケージングにとって必要なシス要素である。ゲノムの初期( E )および後期( L )領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写単位を含む。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關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 )に關係している。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

#### 【0075】

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

20

#### 【0076】

複製欠損であるアデノウイルスベクターの作製および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胎児腎細胞から形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する293と呼ばれる独自のヘルパー細胞株に依存する( Grahamら、1977 )。E3領域は、アデノウイルスゲノムにとって重要ではないため( JonesおよびShenk、1978 )、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の助けを借りて、E1、E3、または双方の領域のいずれかに外来DNAを有する( GrahamおよびPrevecら、1991 )。本質的に、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約105%をパッケージングすることができ( Ghosh - Choudhuryら、1987 )、約2 kbの余分のDNAの容量を提供する。E1領域およびE3領域において置換可能な約5 . 5 kbのDNAと組み合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大容量は7 . 5 kb以下、またはベクターの全長の約15%である。アデノウイルスゲノムの80%以上がベクター骨格に残っており、ベクター媒介細胞障害性の原因となる。同様に、E1欠失ウイルスの複製欠損も不完全である。例えば、ウイルス遺伝子発現の漏出は、現在利用可能なベクターについて高い感染多重度( MOI )で認められる( Mulligan、1993 )。

30

#### 【0077】

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1 Lのシリコン処理スピナーフラスコ( Techne、Cambridge、UK )に接種して天然の細胞凝集体を増殖させる。40 rpmで攪拌した後、細胞生存率をトリパンブルーによって推定する。もう一つの形式において、フィブラ - セル微小担体( 5 g / l ) ( Bibby Starlin、Stone、UK )を以下のように用いる。培地5 mlに再懸濁させた細胞接種物を250 mlアーレンマイヤーフラスコ中の担体( 50 ml )に加えて、時折攪拌しながら1時間 ~ 4時間静置した。次に、培地を新鮮な培地50 mlに交換して振とうを開始する。ウイルスを産生するために、細胞を約80%コンフルエントまで増殖させて、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

#### 【0078】

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

50

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。

#### 【0079】

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

10

#### 【0080】

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。

20

#### 【0081】

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

30

#### 【0082】

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、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルを含む。二つの長末端反復 (LTR) 配列は、ウイルスゲノムの 5' および 3' 末端に存在する。これらは、強いプロモーターおよびエンハンサー配列を含み、同様に、宿主細胞ゲノムへの組み込みにとって必要である (Coffin、1990)。

40

#### 【0083】

50

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

10

#### 【0084】

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、パッケージング細胞株を利用することができ、それらは組み換えの可能性を大きく減少させるはずである(Markowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

20

#### 【0085】

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

30

#### 【0086】

発現構築物を培養哺乳類細胞に移入するためのいくつかの非ウイルス法もまた、本発明によって考慮される。これらには、リン酸カルシウム沈殿(GrahamおよびVan Der Eb、1973; ChenおよびOkayama、1987; Rippeら、1990)、DEAEデキストラン(Gopal、1985)、エレクトロポレーション(Tur-Kaspala、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、インビボまたはエクスピボでの使用に首尾よく適合させてもよい。

40

#### 【0087】

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。

50

## 【0088】

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

## 【0089】

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

10

## 【0090】

薬学的組成物

臨床応用を考慮する場合、薬学的組成物発現ベクター、ウイルス保存液、タンパク質、抗体、および薬剤を意図する適用にとって適当な形で調製する必要があるかもしれない。一般的にこれは、被験者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。

20

## 【0091】

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

30

## 【0092】

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。これらの組成物は、標的組織がその経路を介し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、または静脈内注射であってもよい。そのような組成物は通常、上記の薬学的に許容される組成物として投与されるであろう。

40

## 【0093】

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

50



、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。

#### 【0094】

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

10

#### 【0095】

##### 用量

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

20

#### 【0096】

##### 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、それらも本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果をなおも得ることができることを、本開示に照らして認識すべきである。

30

#### 【0097】

##### 実施例1：二機能性接合体を使用した遺伝子治療ベクターの再ターゲティング

この実施例は、いくつかの臓器の内皮に特異的に発現している受容体へ、アデノウイルスベクター又はその他のベクターをターゲティングするために、臓器回帰ペプチドを使用することが可能であることを証明する。Ad5ファージと結合する部分と、特異的な臓器又は組織に選択的なターゲティングペプチドである部分とからなる二重特異性接合体を設計した。回帰ペプチドのウイルスカプシドへの直接的な化学的接合によって、Ad5ベクターの感染性が減弱したため（データは示していない）、二重特異性アダプターを選択した。さらに、ターゲティングペプチドのカプシドゲノムへのクローニングは、ペプチド構造のコンフォメーション変化により、リガンドの特異性を変化させる可能性があった。さらに、ウイルスカプシドを遺伝学的に修飾する以前の試みは、CAR相互作用を媒介するファイバーノブタンパク質のアミノ酸配列を欠失又は変異させることができないため、天然の向性を減弱させなかった（Michaelら、1995；Wickhamら、1995；Wickhamら、1997B；Dmitrievら、1998；Vigneら、1999）。

40

#### 【0098】

この実施例において、GFE-1肺回帰ペプチド（Rajotteら、1998；RajotteおよびRuoslahti、1999）と接合体された抗Ad5抗体のFab断片が、Ad5ベクターを良好に再ターゲティングするために使用されうることが証明された。通常はAd5感染に対して感受性でないが、GFE-1ペプチドの受容体を発現して

50

いる細胞型が、二重特異性アダプター接合体の存在下では、効率的に形質導入された。これは、機能性Fab-ターゲティングペプチド接合体の最初の証明であった。そのような分子アダプターは、腫瘍組織のようなある種の臓器又は組織の血管系に特異的に発現している受容体への、Ad5遺伝子治療ベクターの全身送達に有用であり得る。本実施例において開示された好ましい態様は、アデノウイルスベクターを利用したが、当業者であれば、開示された方法が、事実上任意の遺伝子治療ベクターを用いて使用されうることを理解するであろう。

#### 【0099】

##### 材料及び方法

免疫蛍光又は免疫沈降のためのウイルスの作製及び感染

HeLa子宮頸癌細胞及び293胎児腎細胞を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)より得、10%ウシ胎仔血清(FBS)及びペニシリン/ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)の中で増殖させた。野生型Ad5、及びマーカー遺伝子としてエクオレア・ビクトリア(Aequorea victoria)緑色蛍光タンパク質(Ad5-GFP)又は大腸菌LacZ遺伝子(Ad5-LacZ)をCMVプロモーターの調節下で発現しているE1欠失組換えウイルスを、293細胞において繁殖させた。細胞ペレットからウイルスを採集し、当技術分野において既知の標準的なプロトコルに従い、連続的なCsCl勾配超遠心分離により収集した。ウイルス濃度を、 $A_{260}$ における吸光度(1吸光度単位は約 $10^{12}$ ビリオンに相当する)を測定することにより推定し、感染力価をプラークアッセイにより決定した。免疫蛍光又は免疫沈降の前の感染のため、2%FBSを含むDMEMの中で、MOI 10 PFU/細胞又は50 PFU/細胞において、細胞をAd5と共にインキュベートした。5時間後、新鮮なFBSを10%添加し、感染を24時間進行させた。

#### 【0100】

##### モノクローナル抗体の作製

雌2ヶ月齢Balb/Cマウス(Harlan Sprague Dawley)に、2ヶ月間、2週間間隔で、 $10^9$ 粒子の野生型Ad5を腹腔内(i.p.)注射した。3回目及び4回目の免疫の後、免疫された各マウスの血清を、ELISAにより分析した。最も高い抗Ad5抗体力価を有するマウスから脾臓を摘出し、脾細胞を単離し、1:5という比率で、Sp20AG14マウス骨髄腫細胞(ATCC)と融合させた。融合した細胞を、フィーダー層細胞を含まない96ウェルプレートに播いた。ハイブリドーマクローンを選択し、増大させ、10%CPSR(controlled process serum replacement)、1xHAT、10%Hybrimaxハイブリドーマ培地補助剤、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM(全て、Sigma製)の中でサブクロニングした。限界希釈により、単クローンを得た。抗体産生は、ハイブリドーマ上清を使用したAd5抗原に対するELISA技術によりモニタリングした。

#### 【0101】

より大量の抗体を得るため、雌3ヶ月齢Balb/Cヌードマウス(Harlan Sprague Dawley)を、腹水作製のためプリスタンで初回刺激し、1匹当たり $2 \times 10^6$ 個のハイブリドーマ細胞を腹腔内注射した(HarlowおよびLane、1988、この全文が参照として本明細書に完全に組入れられる)。14日~29日後、腹水を採集した。製造業者の指示に従い、プロテインG-セファロース(GammaBind、PHARMACIA)を用いて腹水から抗体を精製した。この実施例に記載されたモノクローナル抗体は、二つの別々の免疫及び融合の実験より得られた。

#### 【0102】

##### ELISA

野生型Ad5ビリオン、又は組換えファイバーノブタンパク質(Krasnykhら、1996)を、PBS内、High Binding Assay Plate(Costar)上に固定化した( $10^9$ 粒子又は5µg/ウェル)。対照ウェルは、2mgのウシ血

10

20

30

40

50

清アルブミン ( B S A ) を含む P B S により 4 晩で一晩コーティングされた。次いで、一次抗体又は対照マウス I g G ポリクローナル抗体 ( S i g m a ) を室温で 1 時間一定濃度範囲でインキュベートした。二次抗体 ( 抗マウス F a b アルカリホスファターゼ接合体、S i g m a 、 3 % B S A 中 1 : 3 0 0 0 ) を添加し、1 時間インキュベートした。E L I S A を p - ニトロフェニルリン酸 ( S i g m a ) で発色させ、1 時間 ~ 4 時間後、4 0 5 n m で読み取りを行った ( R e a d e r 5 2 0 、 O r g a n o n T e k n i k a ) 。

#### 【 0 1 0 3 】

##### 免疫蛍光染色

カバーガラス上で増殖させた H e L a 細胞に、M O I 5 0 P F U / 細胞において感染させた。感染から 2 4 時間後、細胞を P B S で洗浄し、3 . 7 % ホルムアルデヒドで固定し、P B S で洗浄し、0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 を含む P B S で透過処理し、再び P B S で洗浄し、3 % B S A を含む P B S で 2 0 分間ブロッキングした。マウスモノクローナル抗体を含む 3 % B S A を、1 0 μ g / m l 、室温で 1 時間スライドガラスに添加し、ウサギ抗 A d 5 ポリクローナル抗体 ( K o z a r s k y ら、1 9 9 6 ) を 1 : 1 0 0 0 の希釈率で使用した。細胞を洗浄し、フルオレセイン結合二次抗体 ( 1 : 2 0 0 、 J a c k s o n L a b o r a t o r i e s ) と共に 1 時間インキュベートした。試料を P B S で洗浄し、1 μ g / m l の 4 , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール ( D A P I ) を含む P B S の中で 5 分間インキュベートした。F l u o r o m o u n t - G ( S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e s ) を用いてカバーガラスを取り付け、C C D カメラ ( C o o k e S e n s i c a m ) につながれた N i k o n 顕微鏡を使用してエピフルオレセンスにより染色を可視化した。画像を二重励起モードで得て、S l i d e B o o k 及び A d o b e P h o t o s h o p を用いて加工した。

#### 【 0 1 0 4 】

##### 免疫沈降及びウェスタンブロット分析

プロテアーゼ阻害剤の存在下で、5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 6 、1 % N P - 4 0 、1 5 0 m M N a C l 、及び 0 . 1 m M Z n O A c の中で、細胞を溶解させた。タンパク質濃度をローリー ( L o w r y ) 法 ( B i o - R a d ) により決定した。プロテイン G - セファロース ( P h a r m a c i a ) 及び 5 μ g / m l のモノクローナル抗体を用いて、1 m g の細胞抽出物からタンパク質を免疫沈降させた。又は、3 μ g の C s C l 精製 A d 5 を使用することにより、精製されたウイルスストックから免疫沈降を実施した。免疫沈降したタンパク質を S D S - P A G E により分離し、ニトロセルロース膜へ転写し、ウサギポリ抗 A d 5 クローナル抗体 ( K o z a r s k y ら、1 9 9 6 ) 及び抗ウサギ I g G H R P ( J a c k s o n L a b o r a t o r i e s ) を用いてブロッティングし、増強化学発光 ( R e n a i s s a n c e 、 N E N ) により可視化した。

#### 【 0 1 0 5 】

##### A d 5 中和アッセイ

H e L a 細胞を、使用する 2 4 時間前に、9 6 ウェルプレートに 2 0 , 0 0 0 個 / ウェルの細胞密度で播いた。抗体を D M E M で希釈し、 $2 \times 10^7$  P F U / m l の濃度の A d 5 - L a c Z と共に 3 7 °C で 1 時間インキュベートした。続いて、抗体 - A d 5 - L a c Z 複合体を、M O I 5 0 P F U / 細胞において H e L a 細胞上で 9 0 分間インキュベートした後、1 . 8 容量の 1 0 % F B S 含有 D M E M を添加した。2 4 時間後、細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、- ガラクトシダーゼ発現に関して染色した ( インサイチュ - ガラクトシダーゼ染色キット、S t r a t a g e n e ) 。1 ウェル当たり少なくとも 1 5 0 個の細胞を計数し、- ガラクトシダーゼ陽性細胞の割合を計算するために使用した。

#### 【 0 1 0 6 】

##### 細胞へのファージ結合アッセイ

R D ヒト横紋筋肉腫細胞 ( A T C C ) 及び M D A - M B - 4 3 5 ヒト乳癌細胞 ( P r i c e ら、1 9 9 0 ) を、1 0 % F B S 及び 1 % ストレプトマイシン / ペニシリンを含む D M E M の中で、標準的な手法に従い増殖させた。配列 C G F E C V R Q C P E R C ( 配列番

号：5)を表示するfUSE5に基づくファージクローンであるGFE-1ファージを用いてファージ結合アッセイを実施した。挿入物を含まないfd-tetファージを対照として使用した。RD細胞又はMDA-MB-435細胞を24ウェルプレートで300,000個/ウェルの密度にまで増殖させた。培地を除去し、 $2 \times 10^8$  形質導入単位のGFE-1ファージ又はfd-tetファージのいずれかを含む完全培地と交換した。細胞をファージ粒子と共に4で3時間インキュベートし、次いで1mlの10%FBS含有DMEMで4回洗浄した。結合したファージを、1mlのK91 Kanテリフィックブロス(terrific broth)培養物を添加することによりレスキューした。この培養物の複数の希釈物を、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天プレートに播き、37で16時間増殖させた後、コロニー(形質導入単位)を計数した。

10

#### 【0107】

##### 抗体ペプチド接合体の作製

0.05%Tween 20を含むパパイン消化緩衝液(どちらもPierce製)中で、固定化パパインを用いて9時間、精製された1C5IE11抗Ad5 IgGを消化した。次いで、0.05%Tween 20を含むホウ砂緩衝液で平衡化されたGammaBindプロテインGカラム(Pharmacia)に消化混合物を通した。カラム素通り物(flow-through)を $5 \text{ mg}/\text{ml}$ にまで徐々に濃縮した(Centriconチューブ、Amicon、分子量カットオフ値10,000)。得られたFab断片の純度を、SDS-PAGE及びクーマシーブルー染色により確認した。

20

#### 【0108】

GFE-1ペプチド(CGFE CVRQC PERC、配列番号：5)及び環状対照ペプチド(CARAC、配列番号：6)は、アナスペック(Anaspec)により合成され、精製された。精製されたFabを、20倍過剰モルのいずれかのペプチド及びホモ二機能性架橋剤であるビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(bis(sulfosuccinimidylyl)suberate)(BS<sup>3</sup>、Pierce)へと添加した。室温での2時間のインキュベーションの後、架橋反応の生成物を、1000容量の0.05%Tween 20含有ホウ砂緩衝液pH 8.5に対する透析により精製した。溶液から界面活性剤を完全に除去すると、試料の沈降及び濃度減少が起こった。数回の試みにも関わらず、この反応は、MALDI-TOF質量分析による接合体の質量の測定を妨害した。その代わり、接合の成功は、4%~20%勾配Tris-グリシンゲル(Novex)を用いたSDS-PAGE及びクーマシーブルー染色により決定された。Fab及びその接合体の抗原結合活性は、前述のELISAにより確認した。

30

#### 【0109】

##### メンブレンジペプチダーゼアッセイ

Fab-GFEアダプターの存在下及び非存在下で、細胞溶解物中のD-Pheの蛍光検出によりメンブレンジペプチダーゼ活性の評価を実施した。プロテアーゼ阻害剤を含まない100 $\mu\text{l}$ のTBS/100mMオクチルグリコシドの中で $10^6$ 個のRD細胞を溶解させた。溶解物のタンパク質濃度を、ローリー法(Bio-Rad)により決定した。10 $\mu\text{g}$ タンパク質に対し規準化された溶解物を、まず、それぞれ、一定濃度範囲のFab-GFEアダプター又は媒体を含む0.1M Tris-HCl pH 8の中で37で15分間インキュベートした。次いで、開示(HeywoodおよびHooper、1995)のように、酵素活性を検出した。簡単に説明すると、試料を3通り調製し、1mMのMDP基質Gly-D-Pheと共に37で3時間インキュベートした。次いで、放出されたD-Pheを、それをD-アミノ酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼ(全て、Sigma製)の存在下で蛍光色素6,6'-ジヒドロキシ-(1,1'-ビフェニル)3,3'-二酢酸へと変換することにより、間接的に検出した。励起波長317nm、放出波長414nm、スリット幅=5nm、積分時間=1秒を使用して、 $f_{max}$  蛍光マイクロプレートリーダー(Molecular Devices、CA)を使用して蛍光を検出した。

40

#### 【0110】

50

### Ad 5 再ターゲティングアッセイ

感染の24時間前に、RD細胞又はMDA-MB-435細胞を20,000個/ウェルの密度で96ウェルプレートに播いた。Fab断片又はFabペプチド接合体をDMEMで希釈し、 $6 \times 10^7$  粒子/mlのAd 5-LacZと共に37℃で1時間インキュベートした。次いで、Fab-Ad 5-LacZ複合体をMOI 150 PFU/細胞においてHeLa細胞と共に90分間インキュベートした。90分後、上清を除去し、10% FBSを含むDMEMと交換した。24時間後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、β-ガラクトシダーゼ発現に関して染色した(インサイチュー β-ガラクトシダーゼ染色キット、Stratagene)。1ウェル当たり少なくとも150個の細胞を計数し、β-ガラクトシダーゼ陽性細胞の割合を計算するために使用した。Ad 5-GFPベクターのターゲティングの手法は、GFP発現細胞を、染色ではなく、SPOTイメージングシステム(Imaging System)とつながれたNikon Eclipse TE300顕微鏡を用いたエピフルオレスセンスにより可視化したことを除き、Ad 5-LacZベクターの場合と同様であった。さらに、24ウェルプレート上のAd 5-GFP感染細胞を、感染から24時間後に2.5 mM EDTAを用いて脱離させ、蛍光細胞をFACSORTフローサイトメーター(Becton Dickinson、Germany)で計数した。データは、Cell Questを用いて分析した。

10

### 【0111】

#### 結果

抗Ad 5モノクローナル抗体の生成及び特徴決定

20

抗Ad 5モノクローナル抗体を、マウス脾細胞より生成させた。まず、抗Ad 5モノクローナルIgGを安定的に発現しているハイブリドマクローンを、完全Ad 5ウイルス粒子を使用したELISAにより特徴決定した(データは示していない)。Ad 5感染細胞の間接免疫蛍光により、抗体がアデノウイルスタンパク質を認識したことが確認された。従って、感染多重度(MOI)50プラーク形成単位(PFU)/細胞においてHeLa細胞にAd 5を感染させ、6個のモノクローナル抗体を染色に使用した。Ad 5に対するウサギポリクローナル抗体血清が、対照として使用され、感染細胞に関する強いシグナルを生じさせた(示していない)。1C5IIE11抗体及び3B2ID10抗体は、感染細胞の核内に類似の蛍光シグナルを生じさせた。未感染細胞又は二次抗体単独ではシグナルが検出されなかった。

30

### 【0112】

感染293細胞からアデノウイルスタンパク質を沈降させる能力に関しても、抗体を試験した。未感染細胞抽出物に由来する免疫沈降物は陰性であった。感染細胞において、約60 kDaの最も顕著なバンドは、ファイバータンパク質を表していた。約70 kDaのもう一つの顕著なバンドは、ペントンベース(base)を表していた。1個の抗体は、ウイルスヘキソントンパク質に相当する120 kDaの第三のバンドも沈降させた(データは示していない)。これら3個のタンパク質は、Ad 5感染293細胞由来の抽出物のウェスタンブロットにおいて対照ポリクローナル抗体によっても検出された(データは示していない)。精製されたAd 5粒子に由来する免疫沈降物は、類似の結果を示し(データは示していない)、このことから、抗体が、完全に集合した精製されたアデノウイルスカプシドを認識することが確認された。

40

### 【0113】

Ad 5カプシド中の3個の主要タンパク質(即ち、ヘキソン、ペントンベース、及びシャフトとノブとから構成されるファイバー)のうち、ファイバーノブ領域は、ウイルスの標的細胞への付着を媒介するため(Henryら、1994; Louisら、1994)、その領域は、再ターゲティングアダプターの適当な結合部位である。従って、ファイバーノブと結合したアダプターは、Ad 5に基づくベクターの内因性の向性も中和するかもしれない。固定化された組換えファイバーノブタンパク質のELISAは、抗体クローンのうちの2個、3B2ID10及び1C5IIE11が、Ad 5カプシドのファイバーノブタンパク質と結合することを示した。

50

## 【 0 1 1 4 】

## A d 5 感染の中和

ウイルスの天然の向性の消失は、再ターゲティング戦略にとって望ましいため、抗 A d 5 抗体及び A d 5 結合性ペプチドの、組換え A d 5 感染を中和する能力を試験した。抗体の存在下及び非存在下で、H e L a 細胞に、組換え A d 5 - L a c Z ベクターを感染させた。1 C 5 I I E 1 1 及び 3 B 2 I D 1 0 抗体は、有意な中和活性を示し、他の 4 個の抗体は、弱い再現性のある A d 5 感染の中和を示した（図 1）。

## 【 0 1 1 5 】

## A d 5 形質導入の再ターゲティングに適した細胞系の特徴決定

インビトロのベクターターゲティングの適当なモデルを決定するため、二つのパラメータに基づき細胞系を特徴決定した。（1）A d 5 感染に対する許容性の欠如；及び（2）G F E - 1 ターゲティングペプチドの受容体の発現。2 個の細胞系、R D 及び M D A - M B - 4 3 5 を、2 5、5 0、1 0 0、及び 2 M O I 5 0 P F U / 細胞において、組換え A d 5 - L a c Z と共にインキュベートすることにより、A d 5 感受性に関して試験し、- ガラクトシダーゼ発現を感染から 2 4 時間後に決定した。いずれの細胞系も、M O I 1 0 0 以下ではこのマーカーを発現しなかった。M O I 2 0 0 では、細胞のごく一部（R D については 2 % ~ 6 %、M D A - M B - 4 3 5 については 0 % ~ 3 %）が、青色染色を示した（データは示していない）。

## 【 0 1 1 6 】

次に、これらの細胞が、肺ターゲティングペプチド G F E - 1 の受容体であるメンブレンジペプチダーゼ（M D P）（R a j o t t e ら、1 9 9 8；R a j o t t e および R u o s l a h t i、1 9 9 9）を発現しているか否かを決定した。ヒト M D P に対する抗体は入手されていないため、G F E - 1 を表示するファージクローンの細胞結合を、野生型の挿入物を含まない f d - t e t ファージの結合と比較した。G F E - 1 ファージは、f d - t e t ファージよりも 2 0 倍強く両細胞系と結合した（図 2）。これらの所見は、R D 細胞及び M D A - M B - 4 3 5 細胞が、G F E - 1 受容体を発現しており、ターゲティング部分として G F E - 1 を含むアダプターを用いた A d 5 の再ターゲティングに適していることを示唆している。

## 【 0 1 1 7 】

## G F E に基づく分子アダプターの生成

A d 5 感染を中和することができたモノクローナル抗体のうちの 1 個を、G F E 受容体を介した A d 5 送達のための分子アダプターを生成させるために使用した。前記の 6 個の抗 A d 5 抗体のうち、1 C 5 I I E 1 1 が、最も高い結合強度及び特異性を示したため、最も適当と見なした。

## 【 0 1 1 8 】

ヘテロ二機能性架橋剤 S P D P（N - スクシンイミジル [ ピリジルジチオ ] プロピオネート）又はカルボジイミド誘導体を用いたもののような、二重特異性接合体を生成させるための標準的な技術は、それが、ペプチド内のジスルフィド架橋を破壊するであろう化学的還元を必要とするため、又は架橋剤が、比較的小さい機能性部分を F a b 断片と連結させるために必要なスペーサーアームを提供しないため、環状ペプチドを F a b 断片と連結させるためには適していない。環状オリゴペプチドをマウスモノクローナル抗体の F a b 断片と連結させるために適当であることが立証されたホモ二機能性架橋剤であるビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（B S<sup>3</sup>）を含む接合プロトコルを確立した。

## 【 0 1 1 9 】

パイン消化により 1 C 5 I I E 1 1 抗体の F a b 断片を生成させ、G F E - 1 ペプチド又は対照ペプチド（C A R A C、配列番号：6）のいずれかと架橋した。接合反応の生成物を、S D S - P A G E 及びクーマシーブルー染色により分析した。接合していない F a b は、約 5 0 k D a の明瞭なバンドを示し、接合体（F a b - G F E 及び F a b - C A R A C）は 5 0 k D a ~ 6 5 k D a の「スメア」を示し、このことから、多コピー（約 5 ~ 1 0）のペプチドが各 F a b 断片に接合したことが示唆された（データは示していない）

。

#### 【0120】

二重特異性 F a b - G F E 接合体の 2 個の結合部分の機能性を調査した。E L I S A によって、接合していない F a b 及び F a b ペプチドアダプターが、同等に、A d 5 と結合したことが確認された（データは示していない）。完全 1 C 5 I I E 1 1 抗体、1 C 5 I I E 1 1 由来の F a b、及び F a b - G F E を使用した中和アッセイにより、消化及び接合は、抗体の中和能に影響を与えないことが立証された（図 3）。

#### 【0121】

機能性 G F E - 1 ペプチドがメンブレンジペプチダーゼ（M D P）機能を阻害する観察に基づき（R a j o t t e および R u o s l a h t i、1999）、アダプターの G F E ペプチド部分の特性を評価した。F a b - G F E アダプターは、M D P の酵素活性を用量依存的に特異的に阻害し（図 4）、このことから、F a b - G F E アダプターが G F E - 1 ペプチドの受容体である M D P と結合することが示された。

10

#### 【0122】

F A B - G F E ターゲティングアダプターによる R D 細胞及び M D A - M B - 4 3 5 細胞の A d 5 感染への感作

生成した接合体の、A d 5 に基づくベクターを G F E - 1 受容体へとターゲティングする能力を、評価した。A d 5 - L a c Z を添加し、ベクター単独、又はベクター + アダプター（1 C 5 I I E 1 1 の F a b 断片（F a b）、C A R A C（配列番号：6）と接合したその断片（F a b - C A R A C）、もしくは G F E - 1 ペプチドと接合したその断片（F a b - G F E）のいずれか）による感染から 24 時間後に、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ染色陽性細胞を計数した。単独の、又は F a b もしくは F a b - C A R A C と組み合わせられた A d 5 - L a c Z の R D 細胞への感染は、0.2% ~ 3.3% の陽性染色細胞を与えた。しかしながら、F a b - G F E 接合体の感染は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ陽性 R D 細胞を濃度依存的に増加させ、M O I 150 P F U / 細胞において F a b - G F E アダプターの推定 E C<sub>50</sub> 値は、6  $\mu$ g / ml であった（図 5）。飽和には 50  $\mu$ g / ml で達し、そのとき、95% ~ 98% の陽性細胞が生じた。類似の結果が M D A - M B - 4 3 5 細胞でも得られたが、この細胞系における形質導入効率はやや低かった（最大約 80% の陽性細胞、推定 E C<sub>50</sub> 値は 10  $\mu$ g / ml；図 5）。

20

#### 【0123】

異なるレポーター遺伝子、緑色蛍光タンパク質を保持している A d 5 ベクター（A d 5 - G F P）を使用して、F a b - G F E アダプターを評価した。結果は、A d 5 - L a c Z で得られたものと量的に類似していた（示していない）。分子アダプターを添加した場合、及び添加しない場合の、A d 5 - G F P 感染細胞の数のフローサイトメトリーによる測定は、蛍光顕微鏡及び  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ染色で得られたものと類似していた（データは示していない）。

30

#### 【0124】

考察

A d 5 に基づくベクターは、インビトロ及びインビボの遺伝子移入の極めて効率的な手段である。アデノウイルスベクター及びその他の遺伝子治療ベクターの主要な限界は、目的の細胞、組織、又は臓器に特異的に形質導入することができない点である。本実施例は、A d 5 に基づく遺伝子移入ベクターが、A d 5 ファイバータンパク質特異的部分に付着したターゲティングペプチド部分を含む二重特異性アダプターを使用することにより、C A R 非依存性の経路を介して、特異的細胞表面受容体へと再ターゲティングされうることを示している。マウス抗 A d 5 モノクローナル抗体の F a b 断片と G F E - 1 肺回帰ペプチドとからなるアダプターを生成させるため、新規な接合プロトコルを使用した。このアダプターは、アデノウイルスを G F E - 1 ペプチド受容体陽性細胞へと再ターゲティングした。この効果は、抗 A d 5 F a b 単独、又は対照ペプチドと接合した F a b では観察されなかった。

40

#### 【0125】

50

従来の遺伝子治療ターゲティング戦略とは対照的に、本発明の方法は、二重特異性接合体のターゲティング部分として臓器回帰ペプチドを利用した。ペプチドに基づくアデノウイルスの再ターゲティングは、最近、報告されたが（H o n g ら、1999；R o m a n c z u k ら、1999）、本発明の手法は二つの点で新規である。（1）初めて、受容体特異的ターゲティングペプチドを、F a b 抗体断片と接合体させた。（2）ターゲティングペプチドを、インビボファージディスプレイにより選択した。

#### 【0126】

インビボスクリーニングにより単離されたペプチドによりターゲティングされる受容体は、特定の臓器の血管系に特異的であるのみならず、循環血中リガンドへの到達可能性に関しても選択された。これらの特徴は、全身投与される化合物のターゲティングにとって不可欠である。本実施例は、これらの受容体が、A d 5 に基づく遺伝子治療ベクターの向性を再方向付けするための標的として機能しうることを示している。当業者であれば理解するであろうように、本発明の方法は、ベクターと結合する F a b 抗体断片又はその他の結合部分が、適切なターゲティングペプチドと連結されうるのであれば、事実上任意の遺伝子治療ベクターで利用されうる。当結果は、標的化インビボ遺伝子治療にとって有用であり得る。

#### 【0127】

G F E - 1 ペプチドのメンブレンジペプチダーゼ（M D P）受容体（R a j o t t e および R u o s l a h t i、1999）をターゲティングした。M D P は、肺血管内皮細胞上に発現している。G F E ファージを使用したインビボ回帰及び抗 M D P 抗体を用いた免疫染色に基づく広範な研究により、この血管プロテアーゼは他の臓器内の循環血中リガンドには到達不可能であることが明白に証明されている（R a j o t t e および R u o s l a h t i、1999に概説されている）。しかしながら、M D P は、ある種の腫瘍細胞系の表面上に発現していた（R a j o t t e および R u o s l a h t i、1999）。従って、本発明の方法は、G F E に基づくアダプターを使用した腫瘍細胞のターゲティング、及び選択的ターゲティングペプチドが同定されている他の組織又は臓器の標的化治療を可能にするはずである。

#### 【0128】

実施例 2 . アデノウイルスターゲティングモチーフ

アデノウイルス結合性ペプチド内に、いくつかの新規モチーフが同定された。A d 5 アデノウイルスと結合するターゲティングペプチドを、前記の方法により、C X<sub>8</sub> C ファージディスプレイライブラリより調製した。以下のアデノウイルスターゲティングペプチドが同定された。明らかな保存モチーフには下線が施されている。

**CELRLNSILC** ( 配列番号 :21) ファージ 52-7

**CELREQVGRC** ( 配列番号 :22) ファージ 52-1

**CWYTEGRMIC** ( 配列番号 :23) ファージ 52-40

**CHSLLEKGC** ( 配列番号 :24) ファージ 52-31

#### 【0129】

同定されたアデノウイルスターゲティングペプチドを保持しているファージは、図 6 に示されるように、実質的に増加した A d 5 との結合を示した。52-7 ファージが、最も低い親和性で A d と結合した。52-1、52-31、及び 52-40 ファージは、はるかに高い A d 5 結合親和性を示した。当業者であれば、本明細書に開示されたアデノウイルスターゲティングペプチドが、アデノウイルス遺伝子治療ベクターの所望の臓器又は組織への選択的送達のための、臓器又は組織に対するターゲティングペプチドと併せて使用されうる実施例 1 に開示されたようなキメラアダプターの調製にとって有用であるとうことを理解するであろう。

10

20

30

40

50



## 【0130】

実施例3. アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、及び腫瘍に対する二重特異性ターゲティングペプチドの構築

実施例1は、二重特異性アダプターが、アデノウイルスを、肺のような特異的な臓器又は組織へとターゲティングするために使用されうること証明した。その例においては、二重特異性アダプターは、肺ターゲティングペプチドと連結された抗アデノウイルス抗体のFab断片より構成されていた。遺伝子治療ベクターのような治療剤へと方向付けられたペプチドの部分と、特異的な臓器又は組織へとターゲティングされた部分とを含む二重特異性ターゲティングペプチドを開発することも可能である。二重の特異性を有するアダプターペプチド(腫瘍血管系回帰部分とアデノウイルス又はAAVと結合する部分とを含有するキメラペプチド)を単離するため、ファージが、ランダム化された6アミノ酸挿入物と連結されたCNGRC腫瘍血管系回帰ペプチドを表示するキメラランダムライブラリを設計し、スクリーニングした。ライブラリ構造は、CNGRCX。(式中、Cはシステインであり、Xは任意のアミノ酸である)として表されう。これらのライブラリにおいては、血管新生性血管系回帰配列が、複数の折り畳み配置を可能にする、種々の環境で表示されうランダムペプチド挿入物と共に表されている。環状ペプチドでは、より高い結合親和性が達成されるため、ライブラリは腫瘍回帰ペプチドを環状型で呈示していた(Koivunenら、1995; Pasqualiniら、1995)。

10

## 【0131】

2.  $5 \times 10^{12}$  形質導入単位(TU)を含むライブラリのアリコート、1回目のパニングにおいて使用した。スクリーニングは、マイクロタイタープレート上にコーティングされたアデノウイルス粒子を用いて実施された。ファージの濃縮のため、3回のパニングが行われた。アデノウイルスと結合したファージをレスキューするため、ウェルに直接細菌を感染させた。記載されたようにして(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回収されたファージを配列決定した。アデノウイルスと相互作用するいくつかの別個なCNGRC含有配列が回収された(表4)。

20

## 【0132】

アデノウイルスに対し選択されたCNGRC含有ペプチドのうちの2個、CNGRCRLASSA(配列番号:9)及びCNGRCTMGVRA(配列番号:12)は、スクリーニング中に分析されたクローンの中に比較的高頻度に出現したため、特に興味深い。あるクローンの優勢は、その特異性を示している場合が多い。

30

## 【0133】

CNGRC-X。ライブラリより選択されたアデノウイルスと結合するファージにより表示された配列

## 【表4】

ペプチドモチーフ

配列決定されたファージ(%)

CNGRCRLASSA ( 配列番号 :9) 15%

CNGRCRLDYRF ( 配列番号 :10) 8%

CNGRCRSRSGPA ( 配列番号 :11) 6%

10

その他の出現頻度の高いモチーフ

CNGRCTMGVRA ( 配列番号 :12)

CNGRCTSGRVG ( 配列番号 :13)

CNGRCTSGPGW ( 配列番号 :14)

20

#### 【 0 1 3 4 】

C N G R C ペプチドが、ウイルス結合性ペプチドと共に表示された場合にも腫瘍へと回帰しうることを証明するため、最も有望な C N G R C - アデノウイルス結合性ペプチドアダプターを、腫瘍保持マウスへと注射した。C N G R C R L A S S A ( 配列番号 : 9 ) ファージ及び腫瘍スクリーニングにおいて回収された最初の C N G R C 含有ファージを用いて得られた腫瘍回帰率には、検出可能な減少は存在しなかった(示していない)。

#### 【 0 1 3 5 】

これらの結果は、アデノウイルスベクター又はその他の遺伝子治療ベクターのような治療剤と結合する部分と、臓器又は組織に局在している受容体と結合する部分とを含む二重特異性回帰ペプチドを得ることが可能であることを証明している。これは、単一のターゲティングペプチドを使用した、特異的な臓器又は組織への治療剤の標的化送達を可能にする。この手法は、治療剤へとターゲティングされる F a b 断片又はその他の分子を分離する必要、及び F a b 断片を臓器ターゲティングペプチドと架橋させる必要が排除されるため、有利である。当業者であれば、この手法が、アデノウイルス、又はさらには遺伝子治療ベクター一般の標的化送達に限定されず、臓器、組織、又は細胞型への送達が望まれる任意の治療剤に利用されうることを理解するであろう。

30

#### 【 0 1 3 6 】

実施例 4 . アデノウイルス ( A d 5 ) におけるランダムファージディスプレイペプチドライブラリのパニング

40

アデノウイルス送達ベクター又は A A V 送達ベクターとの結合において有用なさらなるターゲティングペプチドを単離した。下記表 5 に列挙されるような多様なファージライブラリを、固定化されたウイルス粒子を用いてスクリーニングした。固定化された B S A、カゼイン、又は グロブリンを、陰性対照として使用した。3 回のパニングの後、アデノウイルス又は A A V と優先的に結合するファージを、対照タンパク質に対する著しい濃縮 ( 約 2 0 倍 ) に基づき、ライブラリより選択した。3 回の選択の後、アデノウイルスにおいて選択された個々のファージに由来する挿入物を配列決定することにより、多数のペプチドモチーフが明らかとなった。

#### 【 0 1 3 7 】

記載されたようにして ( K o i v u n e n ら、1995 ; P a s q u a l i n i ら、19

50

95)、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。アデノウイルスと特異的に相互作用するペプチドを表示するファージが、多数のライブラリより単離された(表5)。各ファージの特異性を、個々に増幅されたファージを使用した結合アッセイにおいて査定した(Koivunenら、1995)。簡単に説明すると、マイクロタイタープレートに、 $10^{10}$  pfuのアデノウイルス(血清型5 = Ad5)、又は1.5 mgのカゼイン(対照タンパク質)をコーティングした。ファージを1時間結合させた後、十分に洗浄した。次いで、結合したファージを、K91 kan細菌と共に1時間直接インキュベートすることによりレスキューした。様々な濃度で感染細菌をtetプレートに播き、一晚の増殖の後、コロニーを計数することにより、濃縮を査定した。

10

## 【0138】

アデノウイルスと結合するファージにより表示された配列

## 【表5】

ペプチドモチーフ	ライブラリ
SWYSQF (配列番号 :15)	X <sub>6</sub>
AVSECF (配列番号 :16)	X <sub>6</sub>
KECQSRLSCP (配列番号 :17)	X <sub>2</sub> XC <sub>5</sub> CX
CEFRLNSILC (配列番号 :18)	CX <sub>9</sub>
CHSLLEKGCW (配列番号 :19)	CX <sub>9</sub>
CTRSFARKEC (配列番号 :20)	CX <sub>9</sub>

20

## 【0139】

上で同定されたアデノウイルスターゲティングペプチドは、治療用アデノウイルスを特異的な臓器又は組織へとターゲティングすることができる二重特異性分子を生成させるために使用される。前記実施例4に記された方法を使用して、例えば、ランダムペプチド挿入物と組み合わせられたウイルス結合性ペプチドを含むキメラライブラリを、腫瘍保持マウスへのインビボの結合に関してスクリーニングすることが可能である。腫瘍より単離されたファージは、腫瘍ターゲティング特性及びアデノウイルス結合特性の両方を有するペプチド挿入物を含むはずである。又は、標準的な架橋法を使用して、ウイルス結合性配列、及び任意の臓器又は組織に対する既知のターゲティングペプチドの両方を含む二重特異性ターゲティングペプチドを構築することが可能である。

30

## 【0140】

アデノ随伴ウイルス(AAV)におけるランダムファージディスプレイペプチドライブラリのパニング

40

AAVを使用した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。マイクロタイタープレートに、 $5 \times 10^9$  単位のAAV又は1.5 mgの対照タンパク質(1回目はBSA、2回目はカゼイン、3回目はグロブリン、4回目はBSA、5回目はカゼイン)をコーティングした。ライブラリを1時間結合させ、続いて十分に洗浄した。次いで、タンパク質と結合したファージを、K91 kan細菌と1時間直接インキュベートすることによりレスキューした。様々な濃度でファージ感染細菌をtetプレートに播き、一晚の増殖の後、コロニーを計数することにより、濃縮を査定した。レスキューされたファージを一晚バルク増幅し、精製した。その後の選択は、コーティングされたマイクロタイタープレート1枚当たり $10^9$  形質導入単位を使用し

50

て実施した。この手法は、A A Vと選択的に結合するターゲティングペプチドを単離するために良好に使用された。

#### 【0141】

実施例5：リンパ節ターゲティングによる体液性免疫応答の調整

免疫原性ウイルスに対する免疫系応答の調整を、宿主生物のリンパ節へとウイルスを方向付けるターゲティングペプチドを使用して実施した。

#### 【0142】

材料及び方法

インビボファージディスプレイ

マウスのリンパ節の血管内皮へと回帰するターゲティングペプチドを選択するため、インビボファージディスプレイを使用した。全部で $10^7$ 形質導入単位の、一般的なペプチド挿入物 $X_2CX_4CX$ ( $C$ =システイン、 $X$ =任意の残基)を有するランダムファージディスプレイライブラリを、深い麻酔下の2ヶ月齢B a l b / cヌードマウスの尾静脈へと注射した。注射から5分後に、5 mlのD M E Mを心臓に還流することにより、マウスを安楽死させた。

#### 【0143】

結合したファージを回収するため、腋窩リンパ節及び対照臓器(脳及び脾臓)を外科的に摘出し、計量し、1 mlのD M E M + プロテアーゼ阻害剤(1 mM P M S F、 $20 \mu g / ml$  アプロチニン、 $1 \mu g / mol$  ロイペプチン)の中で、ガラス製のダウンス(D o u n c e)ホモジナイザーにより磨砕した。1 mlの氷冷洗浄培地(D M E M - P I + 1 % B S A)で3回組織を洗浄した。3回の洗浄の後、組織を1 mlの飢餓状態コンピテント大腸菌K 9 1 k a nと共にインキュベートし、細菌培養物の段階希釈物を、 $40 \mu g / ml$ のテトラサイクリン及び $100 \mu g / ml$ のカナマイシンを含むL B寒天プレートへと拡げた。標準的なファージの増幅、精製、及び個々のクローンの選択を実施した(P a s s q u a l i n iら、2000a)。簡単に説明すると、1回目の選択より得られた $10^3$ 個の個々のコロニーをプールして、3回の選択を実施した。単一のコロニーを、 $40 \mu g / ml$ のテトラサイクリンを含むN Z Y培地5 mlの中で、12時間、別々に増殖させた。細菌培養物をプールし、ファージ調製物を精製し、 $10^9$  T . U .をマウスへと再注射した。

#### 【0144】

リンパ節ターゲティングの確認

連続的な選択において複数回単離されたモチーフ及び/又はペプチドを表示するファージを、リンパ節に対する選択性を決定するためのさらなる分析に使用した。リンパ節より回収された選択された配列を保持しているファージの数T . U .を、対照臓器である脳及び脾臓より回収されたファージの数T . U .と比較した(質量により規準化)。リンパ節回帰ファージT . U .値を、挿入物を含まない対照ファージ又は未選択の $X_2CX_4CX$ ファージライブラリのいずれかとも比較した。

#### 【0145】

ペプチドP T C A Y G W C A (配列番号：7)及びW S C A R P L C G (配列番号：8)を表示する2個のファージクローンが、最も高いリンパ節/対照比を与えた。モチーフC A Y及びS C A Rを含むペプチドを表示するその他のファージ(データは示していない)も、複数回のインビボ選択においてリンパ節より回収された。

#### 【0146】

配列P T C A Y G W C A (配列番号：7)及びW S C A R P L C G (配列番号：8)を表示するファージクローンを、陰性対照としての未選択ファージライブラリ又は挿入物を含まないファージと、リンパ節回帰に関して比較した。個々のファージクローンを、前記のようにして、雌2ヶ月齢B a l b / cヌードマウスへと静脈注射し、ファージを回収した。特異性を確認し、表示されたペプチドがリンパ節への回帰を媒介したことを確認するため、同族の可溶性ペプチドP T C A Y G W C A (配列番号：7)及びW S C A R P L C G (配列番号：8)を合成し、精製し、環化し(A n a s p e c、C A)、ファージ回帰を

阻害する能力に関して試験した。インビボでの同族ペプチドによるファージ回帰の競合は、1回の実験につき1mgの各合成ペプチドを共投与することにより実施した。

#### 【0147】

リンパ節ターゲティングペプチドを使用した免疫原応答の調整

リンパ節回帰ペプチドPTCAYGWCA（配列番号：7）又はWSCARPLCG（配列番号：8）を表示するファージに対する宿主免疫応答を、挿入物を含まない対照ファージ（fd-tetファージ）に应答して生じるものと比較した。ファージ（ $10^6$  T.U. ~  $10^8$  T.U.）を雌2ヶ月齢Balb/cイムノコンピテントマウスの尾静脈へと注射した。同時にファージバッチを調製し、予防接種の前に調製物から内毒素を除去した。各実験を、リンパ節回帰ファージクローン及び陰性対照ファージ（fd-tet）の独立の各調製物を使用して実施した。ファージ試料1個当たり2匹のマウスに注射し、2週間の間隔で、追加接種をおこなった。免疫応答を査定するため、最初の予防接種の6日後、並びに2回目及び3回目の予防接種の3日目に、マウスから採血した。3つの独立したコホート（cohort）で、78匹のBalb/cマウスに全部で234回の予防接種を実施した。抗ファージ抗体血清の力価を、固定化ファージ粒子（fd-tet、96ウェルプレート1枚当たり $10^5$  T.U.）を使用することによりELISAにより決定した。血清の希釈率は1：500であり、プレートのコーティングは4で一晩行った。データは、2回の免疫後のp-ニトロフェニルリン酸基質の光学密度値（OD<sub>450</sub>）を表している。PTCAYGWCA（配列番号：7）ファージ又はWSCARPLCG（配列番号：8）ファージのいずれかを予防接種されたマウスのさらなるセットには、ファージ予防接種の前に1mgの同族ペプチドを注射した。

10

20

#### 【0148】

結果

全身投与時にファージのリンパ節への回帰を媒介する2個のペプチドが、単離された。これらのペプチドの配列は、PTCAYGWCA（配列番号：7）及びWSCARPLCG（配列番号：8）であり、リンパ節組織をターゲティングするその他のファージクローンには、CAY及びSCARを表すモチーフも存在した。ペプチド挿入物を欠いたファージ（fd-tetファージ）とは対照的に、ペプチドPTCAYGWCA（配列番号：7）及びWSCARPLCG（配列番号：8）を表示するファージは、対照臓器として使用された脳と比較して、リンパ節への優先的な回帰を示した（データは示していない）。

30

#### 【0149】

リンパ節ターゲティングペプチドPTCAYGWCA（配列番号：7）又はWSCARPLCG（配列番号：8）を表示するファージの免疫原性を、挿入物を含まないファージ（fd-tetファージ）のものと比較した。リンパ節回帰ファージで免疫されたマウスは、fd-tetファージで免疫されたマウスよりも顕著に高力価の抗ファージ抗体を示した（図7）。リンパ節回帰ファージで免疫されたマウスに、同族合成ペプチド（PTCAYGWCA、配列番号：7；WSCARPLCG、配列番号：8；又は対照としての媒体）を前注射した。リンパ節回帰ファージ単独で予防接種されたマウスにおける抗ファージ抗体血清の力価は、この場合にも、fd-tetファージで予防接種されたマウスで見られたものよりも高かった。しかしながら、同族合成ペプチドで前処理され、次いでリンパ節回帰ファージで予防接種されたマウスは、fd-tet免疫マウスと類似の力価を有していた（図8）。この実施例の結果は、この効果が、受容体により媒介された回帰による、リンパ節へのファージの蓄積により媒介されていることを示している。

40

#### 【0150】

リンパ節の内皮へとターゲティングされた抗原は、予防接種後、体液性免疫応答を増強した。当業者であれば、抗原のリンパ節ターゲティングペプチドへの付着による、この新規な体液性免疫応答の調整法が、多様な病原性因子又は罹患細胞に対するワクチンの効率を増強するために一般的に利用可能でありうることを理解するであろう。例えば、リンパ節ターゲティングペプチドの腫瘍関連抗原（TAA）への付着は、ヒト腫瘍に対する全身性体液性応答を増強するために使用されうる。細菌、ウイルス、レトロウイルス、HIV、

50

単細胞生物、又は多細胞病原性生物のような極めて多様な不活化病原体への、リンパ節ターゲティングペプチドの付着は、病原性攻撃に対する免疫系応答を増強するために有用でありうる。この手法は、さらに、単独の、又は特異的抗原の標的化送達と組み合わせられた、サイトカイン又はケモカインのような免疫系制御分子のリンパ節への標的化送達により修飾されうる。最近、ファージカプシド内にウイルスペプチドエピトープを表示することにより、HIV-1に対する驚くべき細胞溶解応答が観察された (De Bernardinis ら、2000)。この手法を免疫系調整と組み合わせることにより、ワクチンの効力、並びに感染性疾患及び悪性疾患の宿主に対する免疫療法が改善されうる。

#### 【0151】

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

#### 【0152】

#### 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。

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7439-43, 1985.

Cleary *et al.*, *Cell* 47:19-28, 1986.

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

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

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

De Berardinis *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18:873-76, 2000.

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.

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.

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

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.

10

20

30

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

20

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

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.

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

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

30

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

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

Heijnen *et al.*, *J. Clin. Invest.* 97:331-338, 1996.



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.

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.

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.

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

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

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

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

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

Kerr Iet al., *Br. J. Cancer* 26:239-257, 1972.

30

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

Miller CR *et al.* Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor

10

20

30

achieves fiber receptor independent gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58: 5738–5748.

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

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

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

10

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

Nilsson *et al.*, *J. Immunol. Methods* 99:67-75 (1987).

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

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

Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196, 1995.

20

Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E.  $\alpha_v$  integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997

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

Pasqualini *et al.*, *In vivo phage display*. In: *Phage Display: A Laboratory Manual*, (eds. Barbas *et al.*), Ch. 22, pp. 1-24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000a.

30

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, 2000b.

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

40

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.

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

10

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

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 624-652, 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985.

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

Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.

20

Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.

Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

ROMANCZUK, H., GALER, C.E., ZABNER, J., BARSOMIAN, G., WADSWORTH, S.C., and O'RIORDAN, C.R. (1999). Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum. Gene Ther.* 10; 2615-2626.

30

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

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

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

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.
- Sigel *et al.*, *Meth. Enzymol.* 93:3-12 (1983).
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-7.
- Smith GP, and Scott JK. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228:1315-1317, 1985. 10
- Smith GP, and Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 21:228-257, 1993.
- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990. 20
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Tsujimoto *et al.*, *Science* 228:1440-43, 1985.
- Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5214-18, 1986.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986. 30
- 米国特許第 5,206,347 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.

VIGNE, E., MAHFOUZ, I., DEDIEU, J.F., BRIE, A., PERRICAUDET, M., and YE, 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.

10

Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:847-852, 2000.

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.

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

20

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., 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.

30

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., 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., 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.

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

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

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

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

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

10

#### 【図面の簡単な説明】

20

【図 1】モノクローナル抗体は、HeLa細胞のAd5感染を中和した。Ad5感染中和アッセイを、HeLa細胞において実施した。Ad5-LacZ単独を感染させたウェル（抗体なし）において観察された陽性細胞の数を、100%に設定した。データは、2回の独立した実験における4つの異なるデータセットの平均値である。標準偏差は、平均値の10%未満であった。

【図 2】GFE-1ペプチドを表示するファージは、RD細胞及びMDA-MB-435細胞と結合した。RD細胞及びMDA-MB-435細胞を増殖させ、等量のGFE-1ファージ又は挿入物を含まないfd-tetファージと共にインキュベートした。細菌感染によりファージを回収し、形質導入単位(TU)の数を、コロニー計数により決定した。

30

【図 3】Fab-GFEアダプター接合体の特徴決定。Fab-GFEアダプターは、HeLa細胞のAd5感染を中和した。Ad5感染中和アッセイを、HeLa細胞において実施した。Ad5-LacZ単独を感染させたウェル（抗体なし）において観察された陽性細胞の数を、100%に設定した。データポイントは、2個の独立した実験の平均値である。

【図 4】Fab-GFEアダプター接合体は、メンブレンジペプチダーゼ機能を阻害した。RD細胞を増殖させ、溶解させた。10µgのタンパク質と等価な細胞溶解物を、Fab-GFEアダプターと共に15分間インキュベートした後、MDP基質Gly-D-Pheを添加した。発色剤の添加後の様々な時点で、蛍光測定により酵素活性を検出した。データポイントは、1回の代表的な実験の3通りの平均値を示す。

40

【図 5】1C5IIE11に基づくFab-GFEアダプターを用いた、Ad5ベクターのRD細胞及びMDA-MB-435細胞へのターゲティング。1C5IIE11に基づくFab単独、Fab-GFE接合体、又はFab-CARAC接合体の存在下又は非存在下で、RD細胞及びMDA-MB-435細胞に、Ad5-LacZ又はAd5-GFPを1MOI 50PFU/細胞において感染させた。アダプター又はFabの濃度は12.5µg/mlであった。RD細胞又はMDA-MB-435細胞に対するFab-GFEアダプターのEC<sub>50</sub>を推定するため、一定濃度範囲のFabに基づくアダプターの存在下又は非存在下で、細胞をAd5-LacZと共にインキュベートした。24時間後、-ガラクトシダーゼ発現に関して細胞を染色し、顕微鏡観察により陽性細胞を計数した。データポイントは、類似の結果を示す4回のうちの1回の独立した実験からの2通り

50

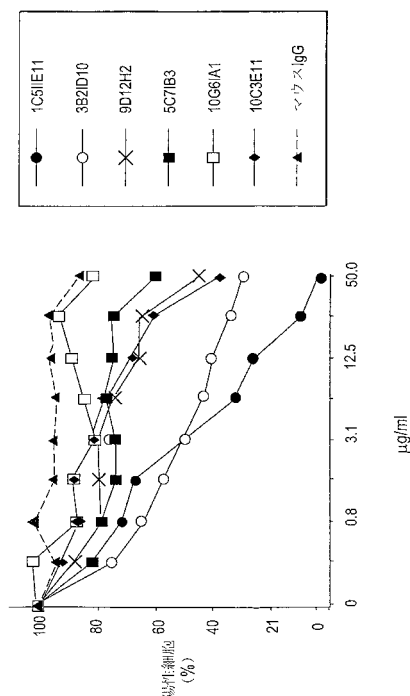
の平均値である。

【図 6】アデノウイルスターゲティングペプチドを表示するファージの A d 5 との結合の効率。

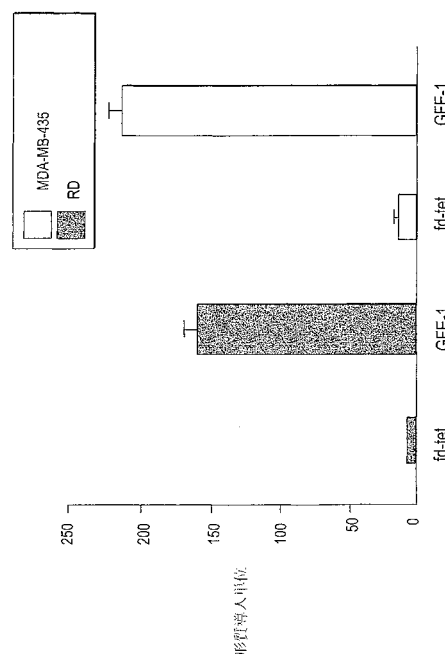
【図 7】P T C A Y G W C A (配列番号：7) ペプチド又はW S C A R P L C G (配列番号：8) ペプチドを表示するファージは、非標的化(挿入物を含まない) f d - t e t 対照ファージよりも強い免疫応答を誘発した。ファージを、雌 2 ヶ月齢 B a l b / C マウスへ静脈注射し(注射するファージ 1 種類当たり 2 匹のマウスを使用した)、予防接種後 3 日目に、血清収集、及び固定化 f d - t e t ファージに対する E L I S A により、抗ファージ抗体力価を決定した。データは、2 回の免疫後の E L I S A における p - ニトロフェニルリン酸基質の 4 0 5 n m における光学密度値 (O D) を表している。血清希釈率は 1 : 5 0 0 であった。 10

【図 8】リンパ節ターゲティングによる体液性免疫応答の増強は特異的であり、同族合成ペプチドにより阻止されうる。マウスに、P T C A Y G W C A (配列番号：7) ファージ、W S C A R P L C G (配列番号：8) ファージ、又は挿入物を含まない f d - t e t 対照ファージを予防接種した。P T C A Y G W C A (配列番号：7) ファージ又はW S C A R P L C G (配列番号：8) ファージのいずれかを予防接種されたマウスのさらなるセットには、予防接種の 5 分前に 1 m g の同族ペプチド (A n a s p e c , I n c . 、C A により合成) を注射した。抗ファージ抗体力価を決定した。O D 値は、3 回の予防接種の後、5 匹のマウスに由来する血清を用いて実施された E L I S A における 3 通りの平均値 + S E M を表している。血清希釈率は 1 : 5 0 0 であり、免疫前対照マウス血清 (N M S) を対照とした。\* p = 0 . 0 0 4 ; \* \* p = 0 . 0 0 1 (スチューデント t 検定)。 20

【図 1】

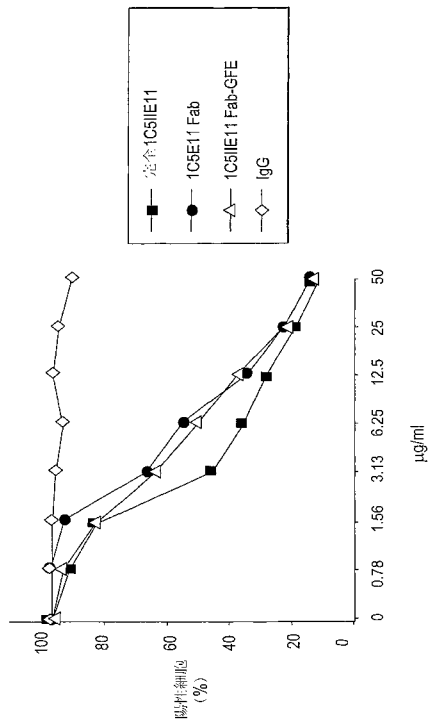


【図 2】

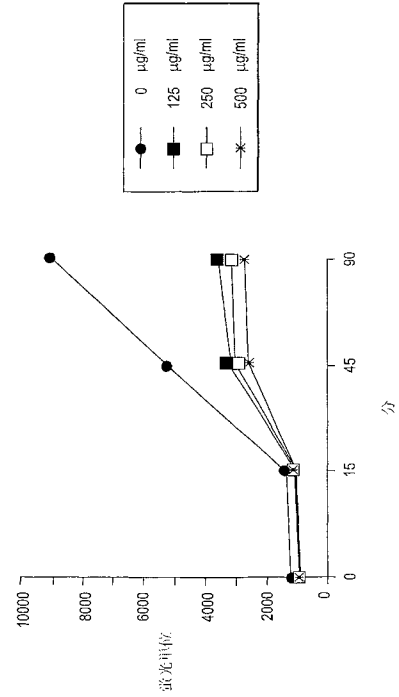




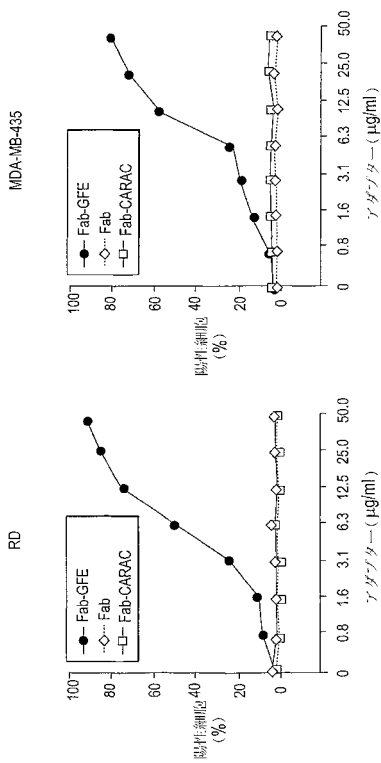
【図 3】



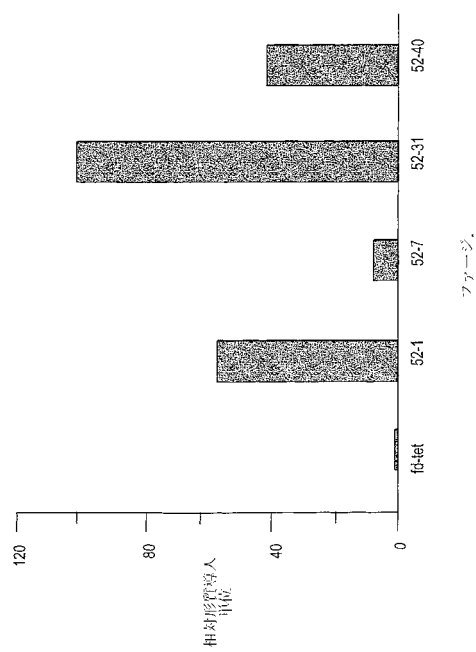
【図 4】



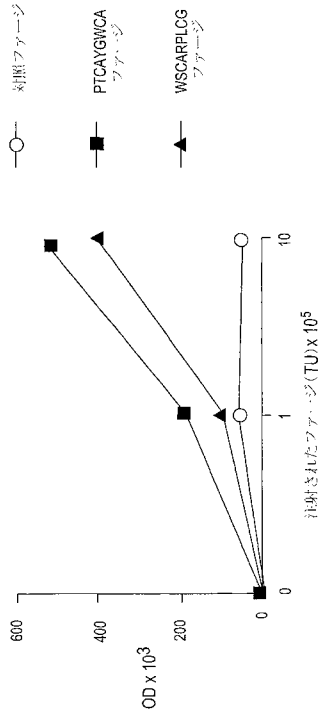
【図 5】



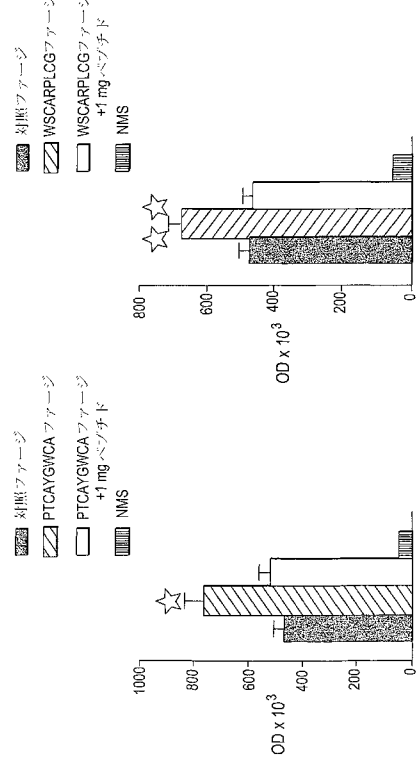
【図 6】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/20724 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number: PCT/US01/28045

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/231,266 8 September 2000 (08.09.2000) US  
09/765,101 17 January 2001 (17.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD  
OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYS-  
TEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701  
(US).

(72) Inventors; and

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

Published:

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

WO 02/20724 A2

(54) Title: ADENOVIRAL TARGETING AND MANIPULATION OF IMMUNE SYSTEM RESPONSE USING TARGETING  
PEPTIDES(57) Abstract: The present invention concerns compositions and methods relating to the identification and use of targeting peptides.  
Such targeting peptides selectively home to specific organs or tissues *in vivo*. The novel targeting sequences disclosed herein are  
of use for the targeted delivery of various therapeutic agents to the targeted organ or tissue. In particular embodiments, the present  
invention concerns bispecific targeting reagents comprising an organ targeting peptide attached to a molecule, such as a Fab fragment,  
that binds to a gene therapy vector or other therapeutic agent. In alternative embodiments, bispecific targeting peptides containing an  
organ targeting moiety and a gene therapy or therapeutic agent targeting moiety may be obtained and used for targeted delivery. Other  
embodiments concern modulation of host immune system function through the targeted delivery of antigens or other molecules to  
lymph nodes. Numerous examples of targeting peptide sequences against adenovirus or lymph node tissue are disclosed herein.

ADENOVIRAL TARGETING AND MANIPULATION OF IMMUNE SYSTEM  
RESPONSE USING TARGETING PEPTIDES

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

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

**1. Field of the Invention**

The present invention concerns the fields of molecular medicine and targeted delivery of therapeutic agents. More specifically, the present invention relates to compositions and methods for targeting of therapeutic vectors, particularly adenoviral vectors, using bispecific targeting reagents and to modulation of immune system response using lymph node targeting peptides.

**2. Description of Related Art**

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

Recently, an *in vivo* selection system was developed using phage display libraries to identify organ or tissue targeting peptides in a mouse model system. Phage display libraries expressing transgenic peptides on the surface of bacteriophage were initially developed to map epitope binding sites of immunoglobulins (Smith, 1985; Smith and Scott, 1985, 1993). Such libraries can be generated by inserting random

oligonucleotides into cDNAs encoding a phage surface protein, generating collections of phage particles displaying unique peptides in as many as  $10^9$  permutations. (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Arap et al, 1998a; Arap et al 1998b).

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

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

Attempts have been made to target delivery of gene therapy vectors to specific organs or tissues. Directing such vectors to the site of interest would enhance therapeutic effects and diminish adverse systemic immunologic responses. Adenovirus type 5 (Ad5)-based vectors have been commonly used for gene transfer studies (Weitzman et al., 1997; Zhang, 1999). The attachment of Ad5 to the target cell is

mediated by the capsid's fiber knob region, which interacts with cell surface receptors, including the coxsackie adenovirus receptor (CAR) and possibly with MHC class I (Bergelson *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 1997). Upon systemic administration *in vivo*, binding of virus to CAR can result in unintended enrichment of vectors in non-targeted but CAR-expressing tissues. Conversely, target cells that express little or no CAR are inefficiently transduced. A need exists to retarget Ad5 vectors to allow more selective delivery of gene therapy.

Previous efforts to accomplish adenoviral retargeting have used bispecific conjugates or genetically modified capsids. Bispecific conjugates were used to target Ad5 to growth factor receptors that are up-regulated during tumor development or inflammation (Douglas *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 1997; Watkins *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998). Ad5 re-targeting was also attempted using ligands for CD3,  $\alpha_v$  integrins or heparan sulfate receptors (Wickham *et al.*, 1995; 1996a, 1996b; 1997a, 1997b; Vigne *et al.*, 1999). In other attempts, heterologous ligands were incorporated into the HI loop of the fiber knob to attempt to retarget adenovirus (Dmitriev *et al.*, 1998; Krasnykh *et al.*, 1998). Heterologous ligands also have been incorporated into the envelopes of retroviruses or the capsids of adenoviruses and adeno-associated viruses, thereby targeting these vectors to integrins (Dmitriev *et al.*, 1998; Vigne *et al.*, 1999; Girod *et al.*, 1999), T-cell receptors (Engelstadter *et al.*, 2000) or melanoma-associated antigens (Martin *et al.*, 1999). These approaches suffered from two major limitations: (i) the targeted receptors were not restricted to specific tissues; or (ii) the targeted receptors were not selectively expressed on the luminal surface of endothelial cells lining blood vessels, a requirement for intravenously administered therapies. A need exists in the art for an effective means of retargeting adenoviral and other gene therapy vectors to allow selective intravenous delivery to organs or tissues of interest.

The targeted delivery of immunogenic agents to portions of the host immune system, such as spleen and lymph node, to modulate immune system response has been attempted. Such approaches have included direct inoculation of antigens into lymph nodes or spleen (Sigel *et al.*, 1983; Nilsson *et al.*, 1987) and targeting of receptors located on dendritic and other antigen-presenting cells (Wang *et al.*, 2000; Heijnen *et*

WO 02/20724

PCT/US01/28045

*al.*, 1996). Results to date have been only marginally successful. A need exists for an efficient and effective method of immune system targeting of immunogenic agents.

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

The present invention solves a long-standing need in the art by providing compositions and methods for the selective delivery of gene therapy vectors, including but not limited to adenoviral vectors, to specific organs or tissues *in vivo*. In other embodiments, the compositions and methods allow the targeting of lymph node tissues for delivery of various antigens, thereby modulating the host's immune system response to the antigen. The skilled artisan will realize that the scope of the claimed methods of use is not limited as to the type of antigen that could be targeted, but rather includes any immunogenic compound ranging from a single purified molecule to a pathogenic agent such as a virus, bacterium, or a diseased host cell. In additional embodiments, the lymph node targeted compound may include one or more regulatory molecules for immune system function, including but not limited to cytokines or chemokines. In certain embodiments, the diseased cells or pathogenic organisms to be treated may be located at a distant site in the body from the targeted organ or tissue. A non-limiting example of such a method of use would be to treat metastatic cancer by provoking a systemic humoral immune response to a tumor-associated antigen, amplifying the host immune response to the tumor.

Certain embodiments of the invention concern methods of targeted delivery comprising selecting a targeting peptide for a desired organ or tissue, attaching said targeting peptide to a molecule, macromolecular complex or gene therapy vector, and providing said peptide attached to said molecule, complex or vector to a subject. In certain preferred embodiments, the organ or tissue is lymph node. Preferred examples of lymph node targeting peptides are disclosed in Example 2 below.

Another embodiment of the present invention concerns molecular adaptors for targeted gene therapy. In a preferred embodiment, the molecular adaptor comprises a Fab fragment of an antibody that is specific for a gene therapy vector, covalently attached to a targeting peptide sequence that provides selective targeting to a desired

organ or tissue. In a more preferred embodiment, the gene therapy vector is an adenovirus, particularly a type 5 adenovirus. The skilled artisan will realize that the present invention is not limited to adenovirus vectors, but may include any gene therapy vector that is known in the art. Similarly, the vector binding portion of the molecular adaptor is not limited to Fab fragments of antibodies, but may include other molecules that can be used to attach a targeting peptide to a gene therapy vector. The only requirement is that the gene therapy vector should be selectively targeted to a desired organ or tissue in the presence of the molecular adaptor. Preferred examples of such Fab fragments and adenoviral targeting peptides are provided in Example 1 below.

A further embodiment concerns compositions and methods for modulation of the humoral immune response by targeting antigens to lymph nodes. Lymph node targeting peptides may be attached to antigens and administered to a subject. The presence of the targeting peptides provides for selective delivery of the antigen to the lymph node, where it modulates the humoral immune response of the subject. In preferred embodiments, the targeting peptide is covalently attached to the antigen. Antigens within the scope of the invention may include any molecule or macromolecular assemblage that is capable of provoking a humoral immune response in a subject, including but not limited to peptides, proteins, glycoproteins, lipoproteins, viruses, bacteria, pathogenic microorganisms and diseased cells.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

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

**FIG. 1.** Monoclonal antibodies neutralized Ad5 infection of HeLa cells. Ad5-infection neutralization assays were performed on HeLa cells. The number of positive cells observed in wells infected with Ad5-LacZ alone (no antibody) was set as 100%. Data are means of four different data sets in two independent experiments. Standard deviations were <10% of the mean.



WO 02/20724

PCT/US01/28045

FIG. 2. A phage displaying the GFE-1 peptide bound to RD and MDA-MB-435 cells. RD and MDA-MB-435 cells were grown and incubated with equal amounts of GFE-1 phage or the insertless fd-tet phage. Phage were recovered by bacterial infection and the number of transducing units (TU) was determined by colony counting.

FIG. 3. Characterization of the Fab-GFE adaptor conjugate. The Fab-GFE adaptor neutralized Ad5 infection of HeLa cells. Ad5-infection neutralization assays were performed on HeLa cells. The number of positive cells observed in wells infected with Ad5-LacZ alone (no antibody) was set as 100%. Data points are means of two independent experiments.

FIG. 4. The Fab-GFE adaptor conjugate inhibited membrane dipeptidase function. RD cells were grown and lysed. Cell lysate equivalent to 10  $\mu$ g protein was incubated with the Fab-GFE adaptor for 15 min followed by addition of the MDP substrate Gly-D-Phe. Enzyme activity was detected fluorometrically at various time points after addition of the developer. Data points represent means of triplicates of one representative experiment.

FIG. 5. Targeting of Ad5 vectors to RD cells and MDA-MB-435 cells with a 1C5H11-based Fab-GFE adaptor. RD and MDA-MB-435 cells were infected with Ad5-LacZ or Ad5-GFP at an MOI of 150 PFU/cell in the presence or absence of 1C5H11-based Fab alone, Fab-GFE, or Fab-CARAC conjugates. Adaptor or Fab concentrations were 12.5  $\mu$ g/ml. To estimate an  $EC_{50}$  for the Fab-GFE adaptor on RD or MDA-MB-435 cells, cells were incubated with Ad5-LacZ in presence or absence of Fab-based adaptors in a range of concentrations. Cells were stained after 24 h for  $\beta$ -galactosidase expression and positive cells were counted upon microscopic observation. Data points represent means of duplicates from one of four independent experiments revealing similar results.

FIG. 6. Efficiency of binding to Ad5 of phage displaying adenovirus targeting peptides.

WO 02/20724

PCT/US01/28045

**FIG. 7.** Phage displaying PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) or WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) peptides elicited a stronger immune response than an untargeted (insertless) fd-tet control phage. Phage were injected intravenously into female 2-month old Balb/C mice (2 mice were used per amount of phage to be injected) and the anti-phage antibody titer was determined by serum collection and ELISA on immobilized fd-tet phage 3 days after vaccination. Data represent optical density values (ODs) of the p-nitrophenyl phosphate substrate at 405 nm in ELISAs after two immunizations. The serum dilution was 1:500.

**FIG. 8.** Enhancement of the humoral immune response by lymph node targeting is specific and can be blocked by the cognate synthetic peptides. Mice were vaccinated with PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) phage, WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) phage, or insertless fd-tet control phage. An additional set of mice vaccinated with either PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) phage or WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) phage was injected with 1 mg of the cognate peptide (synthesized by Anaspec, Inc., CA) 5 min prior to vaccination. Anti-phage antibody titer was determined. OD values represent means of triplicates + SEM in ELISAs performed with sera from five mice after three vaccinations. Serum dilution was 1:500; pre-immune normal mouse serum (NMS) served as control. \*  $p = 0.004$ ; \*\*  $p = 0.001$  (Student *t*-test)

#### **DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS**

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

A "targeting peptide" is a peptide comprising a contiguous sequence of amino acids that is characterized by selective localization to an organ or tissue. Selective localization may be determined, for example, by methods disclosed below, wherein the putative targeting peptide sequence is incorporated into a protein that is displayed on the outer surface of a phage. Administration to a subject of a library of such phage that have been genetically engineered to express a multitude of such targeting peptides of

different amino acid sequence is followed by collection of one or more organs or tissues from the subject and identification of phage found in that organ or tissue. A phage expressing a targeting peptide sequence is considered to be selectively localized to a tissue or organ if it exhibits greater binding in that tissue or organ compared to a control tissue or organ. Alternatively, a phage expressing a targeting peptide sequence that exhibits selective localization should show an increased enrichment in the target organ compared to a control organ when phage recovered from the target organ are reinjected into a second host for another round of screening. Further enrichment may be exhibited following a third round of screening. Another alternative means to determine selective localization is that phage expressing the putative target peptide exhibit at least a two-fold, more preferably at least a three-fold enrichment in the target organ compared to control phage that express a non-specific peptide or that have not been genetically engineered to express any putative target peptides. Another means to determine selective localization is that localization to the target organ of phage expressing the target peptide is at least partially blocked by the co-administration of a synthetic peptide containing the target peptide sequence. "Targeting peptide" and "homing peptide" are used synonymously herein.

A "phage display library" means a collection of phage that have been genetically engineered to express a set of putative targeting peptides on their outer surface. In preferred embodiments, DNA sequences encoding the putative targeting peptides are inserted in frame into a gene encoding a phage capsule protein. In other preferred embodiments, the putative targeting peptide sequences are in part random mixtures of all twenty amino acids and in part non-random. In certain preferred embodiments the putative targeting peptides of the phage display library exhibit one or more cysteine residues at fixed locations within the targeting peptide sequence.

A "macromolecular complex" refers to a collection of molecules that may be random, ordered or partially ordered in their arrangement. The term encompasses biological organisms such as bacteriophage, viruses, bacteria, unicellular pathogenic organisms, multicellular pathogenic organisms and prokaryotic or eukaryotic cells. The term also encompasses non-living assemblages of molecules, such as liposomes,

microcapsules, microparticles and magnetic beads. The only requirement is that the complex contains more than one molecule. The molecules may be identical, or may differ from each other.

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

#### **Phage Display**

The methods described herein for identification of targeting peptides involve the *in vivo* administration of phage display libraries. Various methods of phage display and methods for producing diverse populations of peptides are well known in the art. For example, U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,622,699 and 6,068,829, each of which is incorporated herein by reference, disclose methods for preparing a phage library. The phage display technique involves genetically manipulating bacteriophage so that small peptides can be expressed on their surface (Smith, 1985; Smith and Scott, 1985, 1993). The potential range of applications for this technique is quite broad, and the past decade has seen considerable progress in the construction of phage-displayed peptide libraries and in the development of screening methods in which the libraries are used to isolate peptide ligands. For example, the use of peptide libraries has made it possible to characterize interacting sites and receptor-ligand binding motifs within many proteins, such as antibodies involved in inflammatory reactions or integrins that mediate cellular adherence. This method has also been used to identify novel peptide ligands that serve as leads to the development of peptidomimetic drugs or imaging agents (Arap *et al.*, 1998a). In addition to peptides, larger protein domains such as single-chain antibodies can also be displayed on the surface of phage particles (Arap *et al.*, 1998a).

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

*Choice of phage display system.*

Previous *in vivo* selection studies performed in mice preferentially employed libraries of random peptides expressed as fusion proteins with the gene III capsule protein in the fUSE5 vector (Pasqualini and Ruoslahti, 1996). The number and diversity of individual clones present in a given library is a significant factor for the success of *in vivo* selection. It is preferred to use primary libraries, which are less likely to have an over-representation of defective phage clones (Koivunen *et al.*, 1999). The preparation of a library should be optimized to between  $10^6$ - $10^9$  transducing units (T.U.)/ml. In certain embodiments, a bulk amplification strategy is applied between each round of selection.

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

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

*In vivo* selection of peptides from phage-display peptide libraries administered to mice has been used to identify targeting peptides selective for normal mouse brain, kidney, lung, skin, pancreas, retina, intestine, uterus, prostate, and adrenal gland (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Pasqualini, 1999; Rajotte *et al.*, 1998). These results show that the vascular endothelium of normal organs is sufficiently heterogeneous to allow differential targeting with peptide probes (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Rajotte *et al.*, 1998). A means of identifying peptides that home to the angiogenic vasculature of tumors has been devised, as described below. A panel of peptide motifs that target the blood vessels of tumor xenografts in nude mice has been assembled (Arap *et al.*, 1998a; reviewed in Pasqualini, 1999). These motifs include the sequences CDCRGDCFC (SEQ ID NO:25) (termed RGD-4C), NGR, and GSL. The RGD-4C peptide has previously been identified as selectively binding  $\alpha_v$  integrins and has been shown to home to the vasculature of tumor xenografts in nude mice (Arap *et al.*, 1998a, 1998b; Pasqualini *et al.*, 1997).

The receptors for the tumor homing RGD4C targeting peptide has been identified as  $\alpha_v$  integrins (Pasqualini *et al.*, 1997). The  $\alpha_v$  integrins play an important role in angiogenesis. The  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins are absent or expressed at low levels in normal endothelial cells but are induced in angiogenic vasculature of tumors (Brooks *et al.*, 1994a, 1994b; Hammes *et al.*, 1996). Aminopeptidase N/CD13 has

recently been identified as an angiogenic receptor for the NGR motif (Burg *et al.*, 1999). Aminopeptidase N/CD13 is strongly expressed not only in the angiogenic blood vessels of prostate cancer in mice but also in the normal epithelial prostate tissue. Table 1 shows representative ligand-receptor pairs for tumor targeting by *in vivo* phage display in mice.

**Table 1.** Cell surface receptors and homing motifs isolated by *in vivo* phage display

Receptor		Carrier ?	Localization	Homing motif
$\alpha_v$ integrins	Cell Adhesion	Yes	EC, tumor cells	RGD4C
CD13	Protease	Yes	EC, pericytes, tumor	CNGRC
Aminopeptidase A	Protease	N/D	Pericytes	CPRECES
NG2/HMWMAA	Proteo-Glycan	N/D	Pericytes, tumor cells	GSL
MMP-2/MMP-9	Protease	Yes	EC, tumor cells	CTTHWGFTLC
MDP	Protease	N/D	EC	CGFEC

HMWMAA, high molecular weight melanoma-associated antigen; MMP, matrix metalloproteinase; EC, endothelial cells; N/D, not determined; R, arginine; G, glycine; C, cysteine; N, asparagine; P, proline; S, serine; L, leucine; T, threonine; H, histidine; W, tryptophan; F, phenylalanine; MDP, membrane dipeptidase.

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

The distribution of these receptors was analyzed by immunohistochemistry in tumor cells, tumor vasculature, and normal vasculature. Alpha v integrins, CD13, aminopeptidase A, NG2, and MMP-2/MMP-9 - the known receptors in tumor blood vessels - are specifically expressed in angiogenic endothelial cells and pericytes. Angiogenic neovasculature expresses markers that are either expressed at very low levels or not at all in non-proliferating endothelial cells (not shown).

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

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

#### *Targeted delivery*

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



methods of the present invention. Non-limiting examples of therapeutic proteins or peptides that may be targeted for delivery by the disclosed methods are listed below.

*Regulators of Programmed Cell Death*

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

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

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

*Angiogenic inhibitors*

In certain embodiments the present invention may concern administration of targeting peptides attached to anti-angiogenic agents, such as angiotensin, laminin peptides, fibronectin peptides, plasminogen activator inhibitors, tissue metalloproteinase inhibitors, interferons, interleukin 12, platelet factor 4, IP-10, Gro-β,

thrombospondin, 2-methoxyoestradiol, proliferin-related protein, carboxamidotriazole, CM101, Marimastat, pentosan polysulphate, angiopoietin 2 (Regeneron), interferon-alpha, herbimycin A, PNU145156E, 16K prolactin fragment, Linomide, thalidomide, pentoxifylline, genistein, TNP-470, endostatin, paclitaxel, accutin, angiostatin, cidofovir, vincristine, bleomycin, AGM-1470, platelet factor 4 or minocycline.

#### Proteins and Peptides

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

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

As used herein, an "amino acid residue" refers to any naturally occurring amino acid, any amino acid derivative or any amino acid mimic known in the art. In certain

embodiments, the residues of the protein or peptide are sequential, without any non-amino acid interrupting the sequence of amino acid residues. In other embodiments, the sequence may comprise one or more non-amino acid moieties. In particular embodiments, the sequence of residues of the protein or peptide may be interrupted by one or more non-amino acid moieties.

Accordingly, the term "protein or peptide" encompasses amino acid sequences comprising at least one of the 20 common amino acids found in naturally occurring proteins, or at least one modified or unusual amino acid, including but not limited to, those shown on Table 2 below.

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

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

#### *Peptide mimetics*

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

#### *Fusion proteins*

Other embodiments of the present invention concern fusion proteins. These molecules generally have all or a substantial portion of a targeting peptide, linked at the N- or C-terminus, to all or a portion of a second polypeptide or protein. For example,

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

#### *Protein purification*

In certain embodiments a protein or peptide may be isolated or purified. Protein purification techniques are well known to those of skill in the art. These techniques involve, at one level, the homogenization and crude fractionation of the cells, tissue or organ to polypeptide and non-polypeptide fractions. The protein or polypeptide of interest may be further purified using chromatographic and electrophoretic techniques to achieve partial or complete purification (or purification to homogeneity). Analytical methods particularly suited to the preparation of a pure peptide are ion-exchange chromatography, gel exclusion chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis,

affinity chromatography, immunoaffinity chromatography and isoelectric focusing. An example of receptor protein purification by affinity chromatography is disclosed in U.S. Patent No. 5,206,347, the entire text of which is incorporated herein by reference. A particularly efficient method of purifying peptides is fast protein liquid chromatography (FPLC) or even HPLC.

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

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

Various techniques suitable for use in protein purification are well known to those of skill in the art. These include, for example, precipitation with ammonium sulphate, PEG, antibodies and the like, or by heat denaturation, followed by:

centrifugation; chromatography steps such as ion exchange, gel filtration, reverse phase, hydroxylapatite and affinity chromatography; isoelectric focusing, gel electrophoresis; and combinations of these and other techniques. As is generally known in the art, it is believed that the order of conducting the various purification steps may be changed, or that certain steps may be omitted, and still result in a suitable method for the preparation of a substantially purified protein or peptide.

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

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

WO 02/20724

PCT/US01/28045

*Synthetic Peptides*

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

*Antibodies*

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

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



*Cytokines and chemokines*

In certain embodiments, it may be desirable to couple specific bioactive agents to one or more targeting peptides for targeted delivery to an organ or tissue. Such agents include, but are not limited to, cytokines, chemokines, pro-apoptosis factors and anti-angiogenic factors. The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, growth factors and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormones such as growth hormone, N-methionyl growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prorelaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; prostaglandin, fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen, OB protein; tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$ ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- $\beta$ ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, kit-ligand or FLT-3, angiostatin, thrombospondin, endostatin, tumor necrosis factor and LT. As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

Chemokines generally act as chemoattractants to recruit immune effector cells to the site of chemokine expression. It may be advantageous to express a particular chemokine gene in combination with, for example, a cytokine gene, to enhance the recruitment of other immune system components to the site of treatment. Chemokines include, but are not limited to, RANTES, MCAF, MIP1- $\alpha$ , MIP1-Beta, and IP-10.

The skilled artisan will recognize that certain cytokines are also known to have chemoattractant effects and could also be classified under the term chemokines.

#### *Cross-linkers*

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

Exemplary methods for cross-linking ligands to liposomes are described in U.S. Patent 5,603,872 and U.S. Patent 5,401,511, each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Various ligands can be covalently bound to liposomal surfaces through the cross-linking of amine residues. Liposomes, in particular, multilamellar vesicles (MLV) or unilamellar vesicles such as microemulsified liposomes (MEL) and large unilamellar liposomes (LUVET), each containing phosphatidylethanolamine (PE), have been prepared by established procedures. The inclusion of PE in the liposome provides an active functional residue, a primary amine, on the liposomal surface for cross-linking purposes. Ligands such as epidermal growth factor (EGF) have been successfully linked with PE-liposomes. Ligands are bound covalently to discrete sites on the liposome surfaces. The number and surface density

of these sites are dictated by the liposome formulation and the liposome type. The liposomal surfaces may also have sites for non-covalent association. To form covalent conjugates of ligands and liposomes, cross-linking reagents have been studied for effectiveness and biocompatibility. Cross-linking reagents include glutaraldehyde (GAD), bifunctional oxirane (OXR), ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE), and a water soluble carbodiimide, preferably 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Through the complex chemistry of cross-linking, linkage of the amine residues of the recognizing substance and liposomes is established.

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

#### Nucleic Acids

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

A "nucleic acid" as used herein includes single-stranded and double-stranded molecules, as well as DNA, RNA, chemically modified nucleic acids and nucleic acid analogs. It is contemplated that a nucleic acid within the scope of the present invention may be of 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, about 110, about 120, about 130, about 140, about 150, about

160, about 170, about 180, about 190, about 200, about 210, about 220, about 230, about 240, about 250, about 275, about 300, about 325, about 350, about 375, about 400, about 425, about 450, about 475, about 500, about 525, about 550, about 575, about 600, about 625, about 650, about 675, about 700, about 725, about 750, about 775, about 800, about 825, about 850, about 875, about 900, about 925, about 950, about 975, about 1000, about 1100, about 1200, about 1300, about 1400, about 1500, about 1750, about 2000, about 2250, about 2500 or greater nucleotide residues in length.

It is contemplated that targeting peptides, fusion proteins and receptors may be encoded by any nucleic acid sequence that encodes the appropriate amino acid sequence. The design and production of nucleic acids encoding a desired amino acid sequence is well known to those of skill in the art, using standardized codon tables (see Table 3 below). In preferred embodiments, the codons selected for encoding each amino acid may be modified to optimize expression of the nucleic acid in the host cell of interest. Codon preferences for various species of host cell are well known in the art.

Table 3

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

WO 02/20724

PCT/US01/28045

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

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

formamide, tetramethylammonium chloride or other solvent(s) in a hybridization mixture.

#### Vectors for Cloning, Gene Transfer and Expression

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

#### *Regulatory Elements*

The terms "expression construct" or "expression vector" are meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for a gene product in which part or all of the nucleic acid coding sequence is capable of being transcribed. In preferred embodiments, the nucleic acid encoding a gene product is under transcriptional control of a promoter. A "promoter" refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a gene. The phrase "under transcriptional control" means that the promoter is in the correct location and orientation in relation to the nucleic acid to control RNA polymerase initiation and expression of the gene. The particular promoter employed to control the expression of a nucleic acid sequence of interest is not believed to be important, so long as it is capable of directing the expression of the nucleic acid in the targeted cell.

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

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

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

#### *Selectable Markers*

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

#### *Delivery of Expression Vectors*

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

candidates for the transfer of foreign genes into mammalian cells (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986). Preferred gene therapy vectors are generally viral vectors.

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

In using viral delivery systems, one will desire to purify the virion sufficiently to render it essentially free of undesirable contaminants, such as defective interfering viral particles or endotoxins and other pyrogens such that it will not cause any untoward reactions in the cell, tissue or intact organism receiving the vector construct. A preferred means of purifying the vector involves the use of buoyant density gradients, such as cesium chloride gradient centrifugation.

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

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



The expression vector comprises a genetically engineered form of adenovirus. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kb, linear, double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7 kb (Grunhaus and Horwitz, 1992). In contrast to retroviral infection, the adenoviral infection of host cells does not result in chromosomal integration because adenoviral DNA can replicate in an episomal manner without potential genotoxicity. Also, adenoviruses are structurally stable, and no genome rearrangement has been detected after extensive amplification. Adenovirus can infect virtually all epithelial cells regardless of their cell cycle stage.

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

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

Generation and propagation of adenovirus vectors, which are replication deficient, depend on a unique helper cell line, designated 293, which was transformed from human embryonic kidney cells by Ad5 DNA fragments and constitutively expresses E1 proteins (Graham *et al.*, 1977). Since the E3 region is dispensable from the adenovirus genome (Jones and Shenk, 1978), the current adenovirus vectors, with the help of 293 cells, carry foreign DNA in either the E1, the E3, or both regions (Graham and Prevec, 1991). In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987), providing capacity for about 2 extra kb of DNA. Combined with the approximately 5.5 kb of DNA that is replaceable in the E1 and E3 regions, the maximum capacity of the current adenovirus vector is under 7.5 kb, or about 15% of the total length of the vector. More than 80% of the adenovirus viral genome remains in the vector backbone and is the source of vector-borne cytotoxicity. Also, the replication deficiency of the E1-deleted virus is incomplete. For example, leakage of viral gene expression has been observed with the currently available vectors at high multiplicities of infection (MOI) (Mulligan, 1993).

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

Other than the requirement that the adenovirus vector be replication defective, or at least conditionally defective, the nature of the adenovirus vector is not believed to

be crucial to the successful practice of the invention. The adenovirus may be of any of the 42 different known serotypes or subgroups A-F. Adenovirus type 5 of subgroup C is the preferred starting material in order to obtain the conditional replication-defective adenovirus vector for use in the present invention. This is because Adenovirus type 5 is a human adenovirus about which a great deal of biochemical and genetic information is known, and it has historically been used for most constructions employing adenovirus as a vector.

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

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

Adenovirus vectors have been used in eukaryotic gene expression (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) and vaccine development (Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1991). Animal studies suggested that recombinant adenovirus could be used for gene therapy (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Studies in administering recombinant adenovirus to different tissues include trachea instillation (Rosenfeld *et*

*et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), muscle injection (Ragot *et al.*, 1993), peripheral intravenous injections (Hérz and Gerard, 1993) and stereotactic inoculation into the brain (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

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

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

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

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

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

In a further embodiment of the invention, the expression construct may be entrapped in a liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar

liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers. Also contemplated are lipofectamine-DNA complexes.

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

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

#### **Pharmaceutical compositions**

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

One generally will desire to employ appropriate salts and buffers to render delivery vectors stable and allow for uptake by target cells. Buffers also are employed when recombinant cells are introduced into a patient. Aqueous compositions of the present invention may comprise an effective amount of a protein or peptide, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium. Such

compositions also are referred to as innocula. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce adverse, allergic, or other untoward reactions when administered to a subject. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the proteins or peptides of the present invention, its use in therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

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

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

WO 02/20724

PCT/US01/28045

thimerosal, and the like. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

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

#### *Dosages*

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

#### **EXAMPLES**

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific



embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

#### **Example 1: Re-targeting of Gene Therapy Vectors Using Bifunctional Conjugates**

This example demonstrates the feasibility of using organ-homing peptides to target adenoviral or other vectors to receptors specifically expressed in the endothelia of certain organs. A bispecific conjugate was designed, consisting of one part that bound to the Ad5 phage and another part that was a targeting peptide selective for a specific organ or tissue. A bispecific adaptor was chosen because direct chemical conjugation of homing peptides onto the virus capsid abolished the infectivity of Ad5 vectors (data not shown). Further, cloning targeting peptides into the capsid genome could possibly change the specificity of the ligand through conformational changes of the peptide structure. Moreover, previous attempts to genetically modify the virus capsid did not abolish natural tropism because the amino acid sequence of the fiber knob protein that mediates the CAR interaction could not be deleted or mutated (Michael *et al.*, 1995; Wickham *et al.*, 1995; Wickham *et al.* 1997b; Dmitriev *et al.*, 1998; Vigne *et al.*, 1999).

In this example, it was demonstrated that Fab fragments of an anti-Ad5 antibody conjugated to the GFE-1 lung-homing peptide (Rajotte *et al.*, 1998; Rajotte and Ruoslahti, 1999) could be used to successfully re-target Ad5 vectors. Cell types that were not normally susceptible to Ad5 infection but that expressed the receptor for the GFE-1 peptide were efficiently transduced in the presence of the bispecific adaptor conjugate. This was the first demonstration of a functional Fab-targeting peptide conjugate. Such molecular adaptors may be of use for systemic delivery of Ad5 gene-therapy vectors to receptors specifically expressed in the vasculature of certain organs or tissues, such as tumor tissue. Although the preferred embodiment disclosed in the present example utilized an adenoviral vector, the skilled artisan will realize that the disclosed methods could be used with virtually any gene therapy vector.

#### **Materials and Methods**

*Virus production and infection for immunofluorescence or immunoprecipitation*

HeLa cervical carcinoma cells and 293 embryonic kidney cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. Wild-type Ad5 and EI-deleted recombinant viruses expressing as maker genes either the *Aequorea victoria* green fluorescent protein (Ad5-GFP) or the *Escherichia coli* LacZ gene (Ad5-LacZ) under the control of the CMV promoter were propagated in 293 cells. Viruses were harvested from cell pellets and purified by sequential rounds of ultracentrifugation in CsCl gradients according to standard protocols known in the art. Virus concentrations were estimated by measuring absorbance at A<sub>260</sub> (1 absorbance unit corresponds to approximately 10<sup>12</sup> virions), and infectious titers were determined by plaque assays. For infections preceding immunofluorescence or immunoprecipitation, cells were incubated with Ad5 at an MOI of 10 or 50 PFU/cell in DMEM containing 2% FBS. After 5 h, fresh FBS was added to 10% and infections were allowed to proceed for 24 h.

#### *Monoclonal antibody production*

Female 2-month-old Balb/C mice (Harlan Sprague Dawley) were given intraperitoneal (i.p.) injections of 10<sup>9</sup> particles of wild-type Ad5 at 2-week intervals over a period of 2 months. After the third and fourth immunization, the serum of each immunized mouse was analyzed by ELISA. The spleen from the mouse with the highest anti-Ad5 antibody titer was removed, and splenocytes were isolated and fused in a 1:5 ratio with Sp2OAG14 mouse myeloma cells (ATCC). Fused cells were plated in 96-well plates without feeder layer cells. Hybridoma clones were selected, expanded, and subcloned in DMEM containing 10% CPSR (controlled process serum replacement), 1x HAT, 10% Hybrimax hybridoma medium supplement, and 1% penicillin/streptomycin (all from Sigma). Single clones were obtained by limiting dilution. Antibody production was monitored by the ELISA technique on Ad5 antigen using hybridoma supernatants.

To obtain larger amounts of antibodies, female 3-month-old Balb/C nude mice (Harlan Sprague Dawley) were primed with pristane for ascites production and injected

i.p. with  $2 \times 10^6$  hybridoma cells per mouse (Harlow and Lane, 1988, the entire text of which is incorporated herein by reference). Ascites fluid was harvested after 14–29 days. Antibodies were purified from ascites with protein G-sepharose (GammaBind, Pharmacia) according to the manufacturer's instructions. The monoclonal antibodies described in this example were derived from two separate immunization and fusion experiments.

#### ELISA

Wild-type Ad5 virions or recombinant fiber knob protein (Krasnykh *et al.*, 1996) were immobilized in PBS ( $10^9$  particles or  $5 \mu\text{g}/\text{well}$ ) on High Binding Assay Plates (Costar). Control wells were coated with 2 mg bovine serum albumin (BSA) in PBS overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Primary antibodies or control polyclonal mouse IgG (Sigma) were then incubated at a range of concentrations for 1 h at room temperature. The secondary antibody (anti-mouse-Fab alkaline phosphatase-conjugate, Sigma, 1:3000 in 3% BSA) was added and incubated for 1 h. The ELISA was developed with p-nitrophenyl phosphate (Sigma), and readings were taken 1–4 h later at 405 nm (Reader 520, Organon Teknika).

#### Immunofluorescence staining

HeLa cells grown on coverslips were infected at an MOI of 50 PFU/cell. At 24 h after infection, cells were washed in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde, washed with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, washed again with PBS, and blocked with 3% BSA in PBS for 20 min. The mouse monoclonal antibodies were added to slides at  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 h at room temperature in 3% BSA, and a rabbit anti-Ad5 polyclonal antibody (Kozarsky *et al.*, 1996) was used at a dilution of 1:1000. Cells were washed and incubated for 1 h with a fluorescein-coupled secondary antibody (1:200, Jackson Laboratories). Samples were washed in PBS and incubated for 5 min in  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS. Coverslips were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) and staining was visualized by epifluorescence using a Nikon microscope in conjunction with a CCD camera (Cooke

Sensicam). Images were obtained in double excitation mode and processed with SlideBook and Adobe Photoshop.

*Immunoprecipitation and Western blot analysis*

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% NP-40, 150 mM NaCl, and 0.1 mM ZnOAc in the presence of protease inhibitors. Protein concentration was determined by the Lowry method (Bio-Rad). Proteins were immunoprecipitated from 1 mg of cell extracts with protein G-sepharose (Pharmacia) and 5 µg/ml of monoclonal antibodies. Alternatively, immunoprecipitations were performed from purified virus stocks by using 3 µg of CsCl-purified Ad5. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, blotted with a rabbit polyclonal anti-Ad5 antibody (Kozarsky *et al.*, 1996) and anti-rabbit IgG HRP (Jackson Laboratories), and visualized by enhanced chemiluminescence (Renaissance, NEN).

*Ad5 neutralization assay*

HeLa cells were plated at a density of 20,000 cells/well in a 96-well plate 24 h before use. Antibodies were diluted in DMEM and incubated for 1 h at 37 °C with Ad5-LacZ at a concentration of  $2 \times 10^7$  PFU/ml. Subsequently, the antibody-Ad5-LacZ complexes were incubated for 90 min on HeLa cells at an MOI of 50 PFU/cell, followed by the addition of 1.8 volumes of DMEM containing 10% FBS. After 24 h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for β-galactosidase expression (In-Situ-β-Galactosidase Staining Kit, Stratagene). At least 150 cells per well were counted and used to calculate the percentage of β-galactosidase-positive cells.

*Phage binding assays on cells*

RD human rhabdomyosarcoma cells (ATCC) and MDA-MB-435 human breast cancer cells (Price *et al.*, 1990) were grown according to standard procedures in DMEM containing 10% FBS, and 1% streptomycin/penicillin. Phage binding assays to cells were performed with the GFE-1 phage, a fUSE5-based phage clone that displayed the

sequence CGFECVRQCPERC (SEQ ID NO:5). The insertless fd-tet phage was used as a control. RD or MDA-MB-435 cells were grown in 24-well plates to a density of 300,000 cells per well. Medium was removed and replaced with complete medium containing  $2 \times 10^8$  transducing units of either GFE-1 or fd-tet phage. Cells were incubated with the phage particles for 3 h at 4 °C and then washed four times with 1 ml DMEM containing 10% FBS. Bound phages were rescued by adding 1 ml of a K91Kan terrific broth culture. Multiple dilutions from this culture were plated on LB agar plates containing 20 µg/ml tetracycline and grown at 37 °C for 16 h before colonies (transducing units) were counted.

*Production of antibody-peptide conjugates*

Purified 1C5IE11 anti-Ad5 IgG was digested for 9 h with immobilized papain in papain digestion buffer (both from Pierce) containing 0.05% Tween20. The digestion mix was then passed over a GammaBind protein G column (Pharmacia) equilibrated with borax buffer pH 8.0 containing 0.05% Tween20. The column flow-through was slowly concentrated to 5 mg/ml (Centricon tubes, Amicon, molecular weight cut-off 10,000). The purity of the obtained Fab fragments was verified by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

The GFE-1 peptide (CGFECVRQCPERC, SEQ ID NO:5) and a cyclic control peptide (CARAC, SEQ ID NO:6) were synthesized and purified by Anaspec. The purified Fab was added to a 20-fold molar excess of either peptide and the homobifunctional crosslinker bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>, Pierce). After 2 h of incubation at room temperature, the products of the crosslinking reaction were purified by dialysis against 1000 volumes of borax buffer pH 8.5 containing 0.05% Tween20. Complete removal of the detergent from the solution resulted in precipitation and concentration loss of the sample. Despite several attempts, this reaction prevented measurement of mass of the conjugate by MALDI-TOF mass spectrometry. Successful conjugation was determined instead by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining with a 4–20% gradient Tris-glycine gel (Novex). The antigen binding activity of Fab and its conjugates was verified by ELISA as described above.

WO 02/20724

PCT/US01/28045

*Membrane dipeptidase assay*

Evaluation of membrane dipeptidase activity was performed by fluorometric detection of D-Phe in cell lysates in presence and absence of the Fab-GFE adaptor.  $10^6$  RD cells were lysed in 100  $\mu$ l of TBS/100 mM octyl glycoside without protease inhibitors. Protein concentration of the lysates was determined by the Lowry method (Bio-Rad). Lysates normalized to 10  $\mu$ g protein were first incubated for 15 min at 37°C in 0.1 M Tris-HCl pH 8 containing a range of concentrations of the Fab-GFE adaptor or vehicle, respectively. Enzyme activity was then detected as disclosed (Heywood and Hooper, 1995). Briefly, samples were prepared in triplicate and incubated at 37°C for 3 h with the MDP substrate Gly-D-Phe at 1 mM. The released D-Phe was then detected indirectly by converting it to the fluorescent dye 6,6'-dihydroxy-(1,1'-biphenyl)3,3'-diacetic acid in the presence of D-amino acid oxidase and peroxidase (all from Sigma). Fluorescence was detected using an  $f_{max}$  fluorescence microplate reader (Molecular Devices, CA), using excitation wave length 317 nm, emission wave length 414 nm, slit width = 5 nm, integration time = 1 s.

*Ad5 re-targeting assay*

RD or MDA-MB-435 cells were seeded at a density of 20,000 cells/well in a 96-well plate 24 h before infection. Fab fragments or Fab-peptide conjugates were diluted in DMEM and incubated for 1 h at 37°C with  $6 \times 10^7$  particles/ml Ad5-LacZ. The Fab-Ad5-LacZ complexes were then incubated for 90 min with HeLa cells at an MOI of 150 PFU/cell. After 90 min, the supernatant was removed and replaced with DMEM containing 10% FBS. After 24 h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for  $\beta$ -galactosidase expression (In-Situ  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit, Stratagene). At least 150 cells per well were counted and used to calculate the percentage of  $\beta$ -galactosidase-positive cells. The procedure for targeting Ad5-GFP vectors was the same as that for the Ad5-LacZ vectors except that GFP-expressing cells were visualized not by staining but rather by epifluorescence with a Nikon Eclipse TE300 microscope in conjunction with a SPOT Imaging System. In addition, cells infected with Ad5-GFP on 24-well plates were detached with 2.5 mM EDTA 24 h after infection and fluorescent

cells were counted in a FACSORT flow cytometer (Becton Dickinson, Germany). Data were analyzed with Cell Quest.

## Results

### *Generation and characterization of anti-Ad5 monoclonal antibodies*

Anti-Ad5 monoclonal antibodies were generated from mouse splenocytes. Hybridoma clones that stably expressed anti-Ad5 monoclonal IgGs were initially characterized by ELISA using intact Ad5 virus particles (data not shown). Indirect immunofluorescence of Ad5-infected cells confirmed that the antibodies recognized adenovirus proteins. Therefore, HeLa cells were infected with Ad5 at a multiplicity of infection (MOI) of 50 plaque-forming units (PFU)/cell, and the six monoclonal antibodies were used for staining. A rabbit polyclonal antibody serum against Ad5 was used as a control, and produced a strong signal for infected cells (not shown). The 1C5HIE11 and 3B2ID10 antibodies produced a similar fluorescent signal in the nucleus of infected cells. No signal was detected in uninfected cells or with secondary antibody alone.

Antibodies were also tested for their ability to precipitate adenoviral proteins from infected 293 cells. Immunoprecipitates from uninfected cell extracts were negative. In infected cells, the most prominent band, at approximately 60 kDa, represented the fiber protein. Another prominent band at approximately 70 kDa represented the penton base. One antibody also precipitated a third band at 120 kDa, corresponding to the viral hexon protein (data not shown). These 3 proteins were also detected by the control polyclonal antibody in western blots of extracts from Ad5-infected 293 cells (data not shown). Immunoprecipitations from purified Ad5 particles revealed similar results (data not shown), verifying that the antibodies recognize fully assembled, purified adenoviral capsids.

Of the three major proteins in the Ad5 capsid (i.e., the hexon, penton base, and fiber, the latter composed of the shaft and knob), the fiber knob region is a suitable binding site for a re-targeting adaptor because that region mediates attachment of the

virus to the target cell (Henry *et al.*, 1994; Louis *et al.*, 1994). Thus, an adaptor bound to the fiber knob could also neutralize the endogenous tropism of Ad5-based vectors. ELISA of immobilized recombinant fiber knob protein showed that two of the antibody clones, 3B2D10 and 1C5IIE11, bound the fiber knob protein of the Ad5 capsid.

#### *Neutralization of Ad5 infection*

Because ablation of the natural tropism of the virus is desirable for re-targeting strategies, the ability of the anti-Ad5 antibodies and Ad5-binding peptides to neutralize recombinant Ad5 infection was tested. HeLa cells were infected with recombinant Ad5-LacZ vectors in the presence and absence of antibodies. The 1C5IIE11 and the 3B2D10 antibodies showed significant neutralization activity, with the other four antibodies showing weaker but reproducible neutralization of Ad5 infection (FIG. 1).

#### *Characterizing cell lines suitable for re-targeting Ad5 transduction*

To define suitable models for vector targeting in vitro, cell lines were characterized based on two parameters: (1) the lack of permissivity to Ad5 infection; and (2) expression of the receptor for the GFE-1 targeting peptide. Two cell lines, RD and MDA-MB-435, were tested for Ad5 susceptibility by incubating with recombinant Ad5-LacZ at MOIs of 25, 50, 100, and 200 PFU/cell, and  $\beta$ -galactosidase expression was determined 24 h after infection. Neither cell line expressed this marker at MOIs of 100 or less. At an MOI of 200, a small fraction of cells (2-6% RD, 0-3% MDA-MB-435) showed blue staining (data not shown).

Next, it was determined whether these cells express membrane dipeptidase (MDP), the receptor for the lung-targeting peptide GFE-1 (Rajotte *et al.*, 1998; Rajotte and Ruoslahti, 1999). Because antibodies against human MDP are not available, cell binding of a phage clone displaying GFE-1 was compared with that of the wild-type, insertless fd-tet phage. The GFE-1 phage bound both cell lines more than 20 times more strongly than did the fd-tet phage (FIG. 2). These findings suggest that RD and



MDA-MB-435 cells express the GFE-1 receptor and are suitable for re-targeting Ad5 vectors with adaptors containing GFE-1 as the targeting moiety.

*Generation of GFE-based molecular adaptors*

One of the monoclonal antibodies that could neutralize Ad5 infection was used to generate a molecular adaptor for Ad5 delivery via the GFE-1 receptor. Of the six anti-Ad5 antibodies described above, 1C5IIE11 was deemed the most suitable, as it showed the greatest binding strength and specificity.

Standard techniques for generating bispecific conjugates, such as those with the heterobifunctional crosslinker SPDP (N-succinimidyl[pyridylidithio]propionate) or carbodiimide derivatives, are unsuitable for linking cyclic peptides to Fab fragments, either because they require chemical reduction, which would destroy disulfide bridges within the peptides, or because the crosslinker does not provide the spacer arm necessary for linking relatively small functional moieties to Fab fragments. A conjugation protocol was established involving the homobifunctional crosslinker bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>), which proved to be suitable for linking cyclic oligopeptides to Fab fragments of mouse monoclonal antibodies.

Fab fragments of the 1C5IIE11 antibody were generated by papain digestion and crosslinked to either the GFE-1 peptide or a control peptide (CARAC, SEQ ID NO:6). The products of the conjugation reaction were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The unconjugated Fab showed a clear-cut band at approximately 50 kDa, and the conjugates (Fab-GFE and Fab-CARAC) showed a "smear" reaching from 50 to about 65 kDa, suggesting that multiple copies (approx. 5-10) of a given peptide were conjugated to each Fab fragment (data not shown).

The functionality of the two binding moieties of the bispecific Fab-GFE conjugate was examined. ELISA verified that the unconjugated Fab and the Fab-peptide adaptors bound Ad5 equally well (data not shown). Neutralization assays using the intact 1C5IIE11 antibody, 1C5IIE11 derived Fab and Fab-GFE proved that the digestion and conjugation did not affect the antibody's neutralization capacity (FIG. 3).

The properties of the adaptor's GFE peptide moiety were evaluated, based on the observation that the functional GFE-1 peptide inhibited membrane dipeptidase (MDP) function (Rajotte and Ruoslahti, 1999). The Fab-GFE adaptor specifically inhibited the enzymatic activity of MDP in a dose-dependent manner (FIG. 4), showing that the Fab-GFE adaptor bound to MDP, the GFE-1 peptide's receptor.

*Sensitization of RD and MDA-MB-435 cells to Ad5 infection by the Fab-GFE targeting adaptor*

The ability of the generated conjugates to target Ad5-based vectors to the GFE-1 receptor was evaluated. Ad5-LacZ was added and the cells staining positive for  $\beta$ -galactosidase were counted 24 h after infection with the vector alone or the vector plus one of the following adaptors: a Fab fragment of 1C5HIE11 (Fab), that fragment conjugated to CARAC (SEQ ID NO:6) (Fab-CARAC), or that fragment conjugated to the GFE-1 peptide (Fab-GFE). Infection of RD cells with Ad5-LacZ alone or in combination with Fab or Fab-CARAC produced 0.2%–3.3% positive-staining cells. However, infection with the Fab-GFE conjugate produced a concentration-dependent increase in  $\beta$ -galactosidase-positive RD cells, with an estimated EC<sub>50</sub> value of 6  $\mu$ g/ml of the Fab-GFE adaptor at an MOI of 150 PFU/cell (FIG. 5). Saturation was reached at about 50  $\mu$ g/ml, which produced 95%–98% positive cells. Similar results were obtained with MDA-MB-435 cells, but transduction efficiency was somewhat lower in this cell line (maximum approximately 80% positive cells, estimated EC<sub>50</sub> of 10  $\mu$ g/ml; FIG. 5).

The Fab-GFE adaptor was evaluated using an Ad5 vector that carried a different reporter gene, the green fluorescent protein (Ad5-GFP). The results were qualitatively similar to those obtained with Ad5-LacZ (not shown). Flow cytometric measurements of the numbers of Ad5-GFP-infected cells with and without addition of the molecular adaptor were similar to those obtained with fluorescent microscopy and  $\beta$ -galactosidase staining (data not shown).

### Discussion

Ad5-based vectors are a very efficient means of transferring genes *in vitro* and *in vivo*. A major limitation of adenoviral and other gene therapy vectors is their inability to specifically transduce the cells, tissues or organs of interest. The present example shows that Ad5-based gene-transfer vectors can be re-targeted to specific cell surface receptors via CAR-independent pathways by using bispecific adaptors that contain a targeting peptide moiety attached to an AD5 fiber protein specific moiety. A novel conjugation protocol was used to generate adaptors consisting of Fab fragments of a mouse monoclonal anti-Ad5 antibody and the GFE-1 lung-homing peptide. This adaptor re-targeted adenovirus to GFE-1-peptide receptor-positive cells. This effect was not observed with anti-Ad5 Fab alone or Fab conjugated to a control peptide.

In contrast to previous gene therapy targeting strategies, the present methods utilized an organ-homing peptide as the targeting moiety of a bispecific conjugate. Although peptide-based re-targeting of adenoviruses has been reported recently (Hong *et al.*, 1999; Romanczuk *et al.*, 1999) the present approach is novel in two aspects. (1) For the first time, a receptor-specific targeting peptide was conjugated to Fab antibody fragments. (2) The targeting peptide was selected by *in vivo* phage display.

The receptors targeted by peptides that were isolated by *in vivo* screenings are not only specific to the vasculature of a particular organ, but were also selected for their accessibility to circulating ligands. These characteristics are essential for targeting systemically administered compounds. The present example shows that these receptors can serve as a target to re-direct the tropism of Ad5-based gene therapy vectors. As the skilled artisan will realize, the present methods can be utilized with virtually any gene therapy vector where a Fab antibody fragment or other binding moiety that binds to the vector can be linked to an appropriate targeting peptide. The present results may be of use for targeted gene therapy *in vivo*.

The membrane dipeptidase (MDP) receptor for the GFE-1 peptide was targeted (Rajotte and Ruoslahti, 1999). MDP is expressed on lung vascular endothelial cells. Extensive studies based on *in vivo* homing using the GFE phage as well as

immunostaining with anti-MDP antibodies clearly demonstrated that this vascular protease is not accessible to circulating ligands in other organs (reviewed in Rajotte and Ruoslahti, 1999). However, MDP was expressed on the surface of certain tumor cell lines (Rajotte and Ruoslahti, 1999). Thus, the present methods should allow targeting of tumor cells using a GFE-based adaptor, as well as targeted therapy of other tissues or organs for which selective targeting peptides are identified.

#### Example 2. Adenoviral targeting motifs

Several novel motifs were identified in adenoviral binding peptides. Targeting peptides binding to the Ad5 adenovirus were prepared from a CX<sub>3</sub>C phage display library by the methods described above. The following adenoviral targeting peptides were identified. Apparent conserved motifs are underlined.

<b>CE<u>LR</u>LSILC</b>	(SEQ ID NO:21)	phage 52-7
<b>CE<u>LR</u>EQV<u>GR</u>C</b>	(SEQ ID NO:22)	phage 52-1
<b>CWYTE<u>GR</u>MIC</b>	(SEQ ID NO:23)	phage 52-40
<b>CHSLL<u>LE</u>KGWC</b>	(SEQ ID NO:24)	phage 52-31

Phage bearing the identified adenoviral targeting peptides exhibited substantially elevated binding to Ad5, as shown in FIG. 6. The 52-7 phage bound to Ad with the lowest affinity. The 52-1, 52-31 and 52-40 phage exhibited much higher affinity for Ad5 binding. The skilled artisan will realize that the adenoviral targeting peptides disclosed herein will be of use for the preparation of chimeric adaptors, as disclosed in Example 1, that can be used in conjunction with organ or tissue targeting peptides for the selective delivery of adenoviral gene therapy vectors to desired organs or tissues.

#### Example 3. Construction of bispecific targeting peptides against adenovirus, adeno-associated virus (AAV) and tumor

Example 1 demonstrated that bispecific adaptors can be used to target adenovirus to specific organs or tissues, such as the lung. In that instance, the bispecific adaptor comprised a Fab fragment of an anti-adenovirus antibody linked to a lung targeting peptide. It is also possible to develop bispecific targeting peptides, with one portion of the peptide directed against a therapeutic agent such as a gene therapy vector and the other portion targeted against a specific organ or tissue. In order to isolate adaptor peptides with dual specificities (chimeric peptides containing a tumor vasculature-homing moiety and an adenovirus or AAV-binding moiety), a chimeric random library was designed and screened in which phage displayed the CNGRC tumor vasculature-homing peptide linked to a randomized six amino acid insert. The library structure can be represented as  $\text{CNGRCX}_6$ , where C is a cysteine and X is any amino acid. In these libraries, angiogenic vasculature-homing sequences are represented along with a random peptide insert that can be displayed in different contexts, which allows multiple folding arrangements. The libraries featured the tumor-homing peptide in a cyclic configuration, because higher binding affinities are achieved with cyclic peptides (Koivunen et al., 1995; Pasqualini et al., 1995).

An aliquot of the library containing  $2.5 \times 10^{12}$  transducing units (TU) was used in the first round of panning. The screening was performed with adenovirus particles coated on microtiter wells. Three rounds of panning were used for phage enrichment. To rescue phage bound to adenovirus, the wells were directly infected with bacteria. Recovered phage were sequenced from randomly selected clones after three rounds of panning as described (Koivunen et al., 1995; Pasqualini et al., 1995). Several distinct CNGRC-containing sequences that interact with adenovirus were recovered (Table 4).

Two of the CNGRC-containing peptides selected on adenovirus, CNGRCRLASSA (SEQ ID NO:9) and CNGRCTMGVRA (SEQ ID NO:12), are of particular interest because they appeared more frequently among the clones analyzed during the screening. The preponderance of a given clone often indicates its specificity.

**Table 4. Sequences displayed by phage binding to adenovirus selected from the CNGRC-X<sub>6</sub> library.**

Peptide Motif	% Phage Sequenced
CNGRCRLASSA (SEQ ID NO:9)	15%
CNGRCRLDYRF (SEQ ID NO:10)	8%
CNGRCRSRGPA (SEQ ID NO:11)	6%
Other frequently appearing motifs	
CNGRCTMGVRA (SEQ ID NO:12)	
CNGRCTSGRVG (SEQ ID NO:13)	
CNGRCTSGPGW (SEQ ID NO:14)	

The most promising CNGRC-adenovirus binding peptide adaptors were injected in tumor-bearing mice to demonstrate that the CNGRC peptide, when displayed in the context of the virus binding peptide, could still home into tumors. There was no detectable decrease in the tumor-homing ratios obtained with CNGRCRLASSA (SEQ ID NO:9) phage and the original CNGRC-containing phage recovered in tumor screenings (not shown).

These results demonstrate that it is possible to derive bispecific homing peptides, containing one moiety that binds to a therapeutic agent such as an adenovirus or other gene therapy vector and another moiety that binds to an organ or tissue localized receptor. This allows the targeted delivery of therapeutic agents to specific organs or tissues using a single targeting peptide. This approach is advantageous in that

it eliminates the need to obtain a separate Fab fragment or other molecule targeted against the therapeutic agent, as well as the need to cross-link the a Fab fragment to an organ targeting peptide. The skilled artisan will realize that this approach is not limited to targeted delivery of adenovirus or even of gene therapy vectors in general, but rather may be utilized for any therapeutic agent that it is desired to deliver to an organ, tissue or cell type.

**Example 4. Panning of random phage display peptide libraries on adenovirus (Ad5)**

Additional targeting peptides of use in binding to adenoviral or AAV delivery vectors were isolated. A variety of phage libraries, listed in Table 5 below, were screened with immobilized viral particles. Immobilized BSA, casein, or gamma globulin were used as negative controls. After three rounds of panning, phage binding preferentially to adenovirus or to AAV were selected from the libraries based on a marked enrichment (approximately 20-fold) relative to the control proteins. Following the third round of selection, sequencing of the inserts from the individual phage selected on adenovirus revealed a number of peptide motifs.

Phage were sequenced from randomly selected clones after three rounds of panning as described (Koivunen et al., 1995; Pasqualini et al., 1995). Phage displaying peptides that interacted specifically with adenovirus were isolated from multiple libraries (Table 5). The specificity of each phage was assessed in binding assays that used individually amplified phage (Koivunen et al., 1995). Briefly, microtiter plate wells were coated with  $10^{10}$  pfu of adenovirus (serotype 5 = Ad5) or 1.5 mg casein (control protein). Phage were allowed to bind for 1h, followed by vigorous washing procedures. Bound phage were then rescued by direct incubation with K91 kan bacteria for 1 hr. Enrichment was assessed by plating the infected bacteria at various concentrations on tet-plates and counting colonies after overnight growth.

Table 5. Sequences displayed by phage binding to adenovirus.

Peptide Motif	Library
SWYSQF (SEQ ID NO:15)	X <sub>6</sub>
AVSECF (SEQ ID NO:16)	X <sub>6</sub>
KECQSRLSCP (SEQ ID NO:17)	X <sub>2</sub> XC <sub>3</sub> CX
CEFRLNSILC (SEQ ID NO:18)	CX <sub>9</sub>
CHSLLEKGWC (SEQ ID NO:19)	CX <sub>9</sub>
CTRSFARKEC (SEQ ID NO:20)	CX <sub>9</sub>

The adenoviral targeting peptides identified above may be used to generate bispecific molecules that can target a therapeutic adenovirus to specific organs or tissues. Using the methods discussed in Example 4 above it is possible, for example, to screen chimeric libraries comprising the virus-binding peptides in combination with a random peptide insert for binding *in vivo* to tumor-bearing mice. Phage isolated from the tumors should contain peptide inserts with both tumor-targeting and adenoviral binding properties. Alternatively, using standard cross-linking methods, it is possible to construct bispecific targeting peptides containing both a viral binding sequence and a known targeting peptide against any organ or tissue.

*Panning of random phage display peptide libraries on Adeno-associated virus (AAV)*

A similar strategy was used to determine the specificity of phage isolated in screenings using AAV. Microtiter plate wells were coated with  $5 \times 10^7$  units AAV or 1.5 mg control protein (for round I BSA, round II casein, round III gamma-globulins, round IV BSA, round V casein). The library was allowed to bind for 1 hr, followed by vigorous washing procedures. Protein bound phage were then rescued by direct incubation with K91 kan bacteria for 1 hr. Enrichment was assessed by plating the



phage infected bacteria at various concentrations on tet-plates and counting colonies after overnight growth. Rescued phage were bulk amplified overnight and purified. The following round of selection was performed using  $10^9$  transducing units per coated microtiter well. This approach has been successfully used to isolate targeting peptides selectively binding AAV.

**Example 5: Modulation of the Humoral Immune Response by Lymph Node Targeting**

Modulation of the immune system response to an immunogenic virus was performed using targeting peptides that directed the virus to lymph nodes of the host organism.

**Materials and Methods**

*In vivo phage display*

*In vivo* phage display was used to select targeting peptides that home to the vascular endothelium of lymph nodes in mice. A total of  $10^7$  transducing units of a random phage display library with the general peptide insert  $X_2CX_4CX$  (C = cysteine, X = any residue) were injected into the tail vein of female 2-month old nude Balb/c mice under deep anesthesia. Five minutes after injection, the mice were euthanized by perfusion of 5 ml of DMEM through the heart.

To recover bound phage, the axillary lymph nodes and control organs (brains and pancreas) were surgically removed, weighed and ground with a glass Dounce homogenizer in one ml of DMEM plus protease inhibitors (1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/mol leupeptin). The tissues were washed three times with 1 ml of ice-cold washing media (DMEM-Pi plus 1% BSA). After 3 washes, the tissues were incubated with 1 ml of starved competent *E. coli* K91kan and serial dilutions of the bacterial cultures were spread onto LB agar plates containing 40  $\mu$ g/ml of tetracycline and 100  $\mu$ g/ml of kanamycin. Standard phage amplification, purification, and selection of individual clones were performed (Pasqualini *et al.*, 2000a). In brief, three rounds of selection were performed pooling  $10^3$  individual colonies obtained from the first round. Single colonies were grown separately for 12 hours in 5 ml of NZY medium containing

WO 02/20724

PCT/US01/28045

40 µg/ml of tetracycline. Bacterial cultures were pooled, the phage preparations were purified, and  $10^9$  T.U. were re-injected into mice.

*Validation of lymph node targeting.*

Phage displaying motifs and/or peptides that were isolated multiple times in successive rounds were used for further analysis to determine their selectivity for lymph node. The number of phage T.U. bearing the selected sequence recovered from lymph node was compared to the number of phage T.U. recovered from brain and pancreas control organs (normalized by mass). Lymph node-homing phage T.U. counts were also compared to either insertless control phage or unselected X<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>CX phage library. To evaluate homing, four axillary lymph nodes were harvested in each experiment.

Two phage clones displaying the peptides PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) and WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) yielded the best lymph node/control ratios. Other phage displaying peptides with the motifs CAY and SCAR (data not shown) were also recovered from the lymph nodes during multiple rounds of *in vivo* selection.

Phage clones displaying the PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) and WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) sequences were compared for lymph node homing to unselected phage library or insertless phage as negative controls. Individual phage clones were injected intravenously into female 2-month old nude Balb/c mice and phage were recovered as described above. To confirm specificity and to show that the displayed peptides mediated homing to lymph nodes, the cognate soluble peptides PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) and WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) were synthesized, purified, cyclized (Anaspec, CA), and tested for the ability to inhibit phage homing. Competition of phage homing with the cognate peptide *in vivo* was performed by co-administration of 1 mg of each of the synthetic peptides per experiment.

*Modulation of immunogenic response using lymph node targeting peptides*

The host immune response to phage displaying the lymph node-homing peptides PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) or WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) was compared to that produced in response to insertless control phage (fd-tet phage). Phage (from  $10^6$  to  $10^8$  T.U.) were injected into the tail veins of female 2-month old Balb/c immunocompetent mice. The phage batches were prepared simultaneously and endotoxins were removed from the preparations prior to vaccination. Each experiment

was performed using an independent preparation of each of the lymph node-homing phage clones and the negative control phage (fd-tet). Two mice were injected per phage sample, with boosting at two-week intervals. The mice were bled six days after the first vaccination and three days after the second and third vaccinations to assess immune response. A total of 234 vaccinations were performed in 78 Balb/c mice in three independent cohorts. Anti-phage antibody serum titers were determined by ELISA by using immobilized phage particles (fd-tet,  $10^5$  T.U. per 96-microtiter well). Serum dilutions were 1:500 and plates were coated overnight at 4°C. Data represent optical density values ( $OD_{450}$ ) of the p-nitrophenyl phosphate substrate after two immunizations. Additional sets of mice vaccinated with either PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) or WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) phage were injected with 1 mg of the cognate peptide prior to phage vaccination.

#### Results

Two peptides that mediated homing of phage to lymph nodes upon systemic administration were isolated. The sequences of these peptides were PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) and WSCARPLCG (SEQ ID NO:8), with CAY and SCAR representing motifs that also occurred in other phage clones targeting lymph node tissue. In contrast to a phage lacking a peptide insert (fd-tet phage), phage displaying the peptides PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) and WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) showed preferential homing to the lymph nodes compared to brain, which was used as a control organ (data not shown).

The immunogenicity of phage displaying lymph node targeting peptides PTCAYGWCA (SEQ ID NO:7) or WSCARPLCG (SEQ ID NO:8) was compared to that of the insertless control phage (fd-tet phage). Mice immunized with lymph node homing phage consistently exhibited a markedly higher titer of anti-phage antibodies than mice immunized with fd-tet phage (FIG. 7). Mice immunized with lymph node-homing phage were pre-injected with the cognate synthetic peptides (PTCAYGWCA, SEQ ID NO:7; WSCARPLCG, SEQ ID NO:8; or vehicle as control). Anti-phage antibody serum titers in mice vaccinated with lymph node homing phage alone were again higher than those seen in mice vaccinated with fd-tet phage. However, mice pre-

treated with cognate synthetic peptides and then vaccinated with lymph node-homing phage had a titer similar to fd-tet-immunized mice (FIG. 8). The results of this example show that this effect is mediated by accumulation of phage in the lymph node due to receptor mediated homing.

Antigens targeted to the endothelium of lymph nodes enhanced the humoral immune response after vaccination. The skilled artisan will realize that this novel method of modulating humoral immune response by attachment of an antigen to a lymph node targeting peptide may be of general utility for enhancing the efficacy of vaccines against a variety of pathogenic agents or diseased cells. For example, attachment of lymph node targeting peptides to tumor associated antigens (TAA) might be used to enhance the systemic humoral response to human tumors. Attachment of lymph node targeting peptides to a wide range of inactivated pathogens, such as bacteria, viruses, retroviruses, HIV, unicellular organisms, or multicellular pathogenic organisms might be of use for enhancing the immune system response to pathogenic challenge. This approach may be further modified by the targeted delivery to lymph nodes of immune system regulatory molecules, such as cytokines or chemokines, either alone or in combination with targeted delivery of specific antigens. Recently, striking cytolytic responses against HIV-1 were observed by displaying viral peptide epitopes within the phage capsid (De Berardinis *et al.*, 2000). Combining this approach with immune system modulation may improve vaccine efficacy and immunotherapy against a host of infectious and malignant diseases.

\* \* \*

All of the COMPOSITIONS, METHODS and APPARATUS disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it is apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the COMPOSITIONS, METHODS and APPARATUS and in the steps or in the sequence of steps of the methods described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it are

WO 02/20724

PCT/US01/28045

apparent that certain agents that are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

#### REFERENCES

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

- Arap, W., Pasqualini R., and Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature. *Science* 279:377-380, 1998a.
- Arap W, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.*, 1998b.
- Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.
- Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.
- 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.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science* 264:569-571, 1994a.
- Brooks, P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh D.A. Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79; 1157-1164, 1994b

WO 02/20724

PCT/US01/28045

- Burg M, Pasqualini R, Arap W, Stalkup 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. & Stalkup, W.B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59, 2869-2874, 1999.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7439-43, 1985.
- Cleary *et al.*, *Cell* 47:19-28, 1986.
- Coffin, *In: Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- De Berardinis *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18:873-76, 2000.
- 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.
- 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.
- Ellerby HM, Arap W, Ellerby L, Kain R, Andrusiak R, Rio G, Krajewski S, Lombardo C, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen D, and Pasqualini R. Anti-cancer Activity of Targeted proapoptotic peptides. *Nature Med* 9:1032-1038, 1999
- 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.

WO 02/20724

PCT/US01/28045

- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995.
- Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nature Biotechnol.* 15: 510, 1997.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Girod A *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; 5: 1052-1056, 1999.
- Goldman CK *et al.* Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 1997; 57: 1447-1451.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- GOLDMAN, C.K., ROGERS, B.E., DOUGLAS, J.T., SOSNOWSKI, B.A., YING, W., SIEGAL, G.P., BAIRD, A., CAMPAIN, J.A., and CUIEL, D.T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* 57; 1447-1451.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, and Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med.* 2: 529-533, 1996.
- HARLOW, E., and LANE, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).
- Heijnen *et al.*, *J. Clin. Invest.* 97:331-338, 1996.

- 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.
- Hermonat and Muzyczka, *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.
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- Herz and Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- 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.
- 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.
- Horwich, *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York (1993).
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer* 26:239-257, 1972.
- 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, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnol* 17:768-774, 1999.



- KOZARSKY, K., JOOSS, K., DUNAHEE, M., STRAUSS, J.F., and WILSON, J.M. (1996). Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat. Genet.* 13; 54-62.
- KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., and CUIEL, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70; 6839-6846.
- KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., MIKHEEV, A.G., MILLER, C.R., BELOUSOVA, N., and CUIEL, D.T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72; 1844-1852.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH and Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83:1299-1307, 1989.
- 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.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- Martin F *et al.* Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J Virol* 1999; 73: 6923-6929.
- Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986
- MICHAEL, S.I., HONG, J.S., CUIEL, D.T., and ENGLER, J.A. (1995). Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther.* 2; 660-668.
- Miller CR *et al.* Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor

WO 02/20724

PCT/US01/28045

- achieves fiber receptor independent gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58: 5738-5748.
- Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
- Mustonen T and Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.* 129:895-898, 1995.
- Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nilsson *et al.*, *J. Immunol. Methods* 99:67-75 (1987).
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 380:364-366, 1996.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196, 1995.
- Pasqualini R, Koivunen E, and Ruoslahti E.  $\alpha_v$  integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol* 15:542-546, 1997.
- Pasqualini, R. Vascular Targeting with Phage Display Peptide Libraries. *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162, 1999.
- Pasqualini *et al.*, *In vivo phage display*. In: *Phage Display: A Laboratory Manual*, (eds. Barbas *et al.*), Ch. 22, pp. 1-24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000a.
- 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, 2000b.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

- 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.
- 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
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 624-652, 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- ROMANCZUK, H., GALER, C.E., ZABNER, J., BARSOMIAN, G., WADSWORTH, S.C., and O'RIORDAN, C.R. (1999). Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum. Gene Ther.* 10; 2615-2626.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Ruoslahti E. RGD and other sequence recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996
- Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during

WO 02/20724

PCT/US01/28045

angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am. J. Pathol.* 136:1393-1405, 1990.

Sigel *et al.*, *Meth. Enzymol.* 93:3-12 (1983).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tsujimoto *et al.*, *Science* 228:1440-43, 1985.

Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5214-18, 1986.

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

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

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

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

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

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

WO 02/20724

PCT/US01/28045

- U.S. Patent No. 5,889,155
- U.S. Patent No. 6,068,829
- Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.
- 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.
- Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:847-852, 2000.
- 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.
- Weitzman MD, Wilson JM and Eck SL. Adenovirus vectors in cancer gene therapy. In: *Gene Therapy and Vector Systems* 2: 17-25, 1997.
- 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., SEGAL, D.M., ROELVINK, P.W., CARRION, M.E., LIZONOVA, A., LEE, G.M., and KOVESDI, I. (1996a). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70; 6831-6838.
- WICKHAM, T.J., 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., LEE, G., TITUS, J., SCONOCCHIA, G., BAKACS, T., KOVESDI, I., and SEGAL, D. (1997a). Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T-cells via CD3. *J. Virol.* 71; 7663-7669.

WO 02/20724

PCT/US01/28045

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.

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

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

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

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

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

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for modulating immune system response comprising:
  - a) obtaining a lymph node targeting peptide;
  - b) attaching the targeting peptide to an immunogen; and
  - c) administering the targeting peptide and immunogen to an individual.
2. The method of claim 1, wherein the immunogen is a peptide, protein, glycoprotein, lipid, carbohydrate, nucleic acid, prion, virus, bacterium, phage, spore, mold, yeast, algae, amoebae, *Giardia*, dinoflagellate, unicellular organism, pathogen, cell or infectious agent.
3. The method of claim 2, wherein the targeting peptide is expressed as part of a surface protein of the immunogen.
4. The method of claim 1, wherein the targeting peptide is attached to a Fab fragment that binds to the immunogen.
5. The method of claim 1, wherein the targeting peptide is bispecific.
6. The method of claim 5, wherein the targeting peptide contains a moiety that binds to the immunogen.
7. The method of claim 1, wherein the targeting peptide comprises the amino acid sequences CAY (cysteine-alanine-tyrosine) or SCAR (serine-cysteine-alanine-arginine).
8. The method of claim 7, wherein the targeting peptide comprises SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8.
9. The method of claim 1, wherein said administering is effective to increase the individual's immune response to the immunogen, compared to the immune response in the absence of the targeting peptide.
10. The method of claim 9, further comprising vaccinating the individual against the immunogen.
11. The method of claim 9, wherein the immunogen is a cancer cell.

WO 02/20724

PCT/US01/28045

12. The method of claim 9, wherein the immunogen is HIV (human immunodeficiency virus).
13. A bispecific compound comprising the amino acid sequences CAY or SCAR, attached to a second moiety.
14. The compound of claim 13, wherein the second moiety is an antibody or a fragment of an antibody.
15. The compound of claim 14, wherein the antibody or fragment of an antibody binds to an immunogen.
16. The compound of claim 13, wherein the second moiety is a peptide that binds to an immunogen.
17. A bispecific compound comprising a targeting peptide attached to a vector binding moiety.
18. The compound of claim 17, wherein the vector is an adenovirus or an adeno-associated virus (AAV).
19. The compound of claim 17, wherein the vector binding moiety comprises an antibody or Fab fragment of an antibody.
20. The compound of claim 19, wherein the antibody is IC5IE11 or 3B2ID10.
21. The compound of claim 17, wherein the targeting peptide comprises SEQ ID NO:5.
22. The compound of claim 17, wherein the compound comprises SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 or SEQ ID NO:24.
23. The compound of claim 17, wherein the compound comprises the amino acid sequence ELR (glutamate-leucine-arginine).
24. The compound of claim 17, wherein the compound comprises the amino acid sequence GR (glycine-arginine).



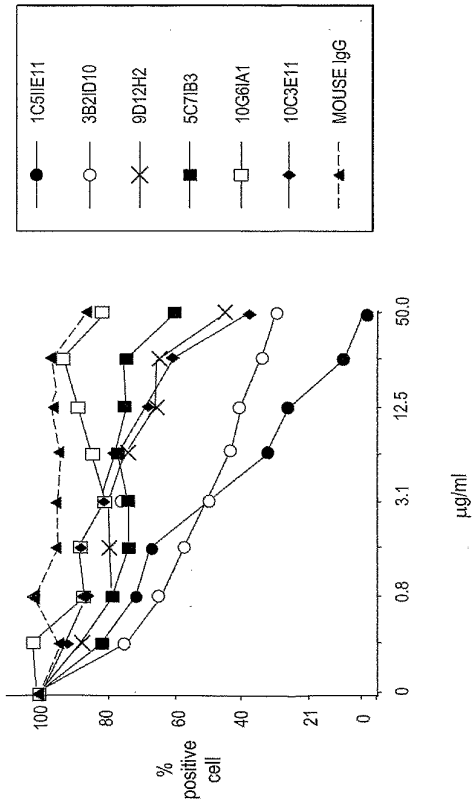
WO 02/20724

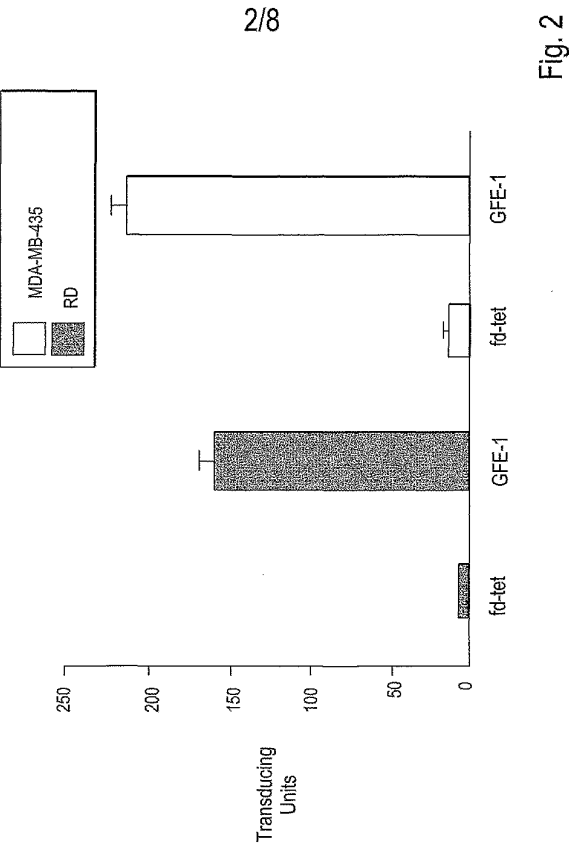
PCT/US01/28045

25. A method of targeting a vector to an organ or tissue comprising:
  - a) obtaining a targeting peptide against the organ or tissue;
  - b) obtaining a binding moiety against the vector;
  - c) attaching the targeting peptide to the binding moiety to form a complex;  
and
  - d) administering the complex and the vector to a subject.
26. The method of claim 25, wherein the vector is an adenovirus or AAV.
27. The method of claim 25, wherein the binding moiety is an antibody or Fab fragment of an antibody.
28. The method of claim 27, wherein the antibody is IC51IE11 or 3B2ID10.
29. The method of claim 25, wherein the targeting peptide and the binding moiety are part of a bispecific compound.
30. The method of claim 29, wherein the bispecific compound is a single peptide.
31. The method of claim 1, wherein the individual is a mammal.
32. The method of claim 31, wherein the individual is a mouse or a human.

1/8

Fig. 1





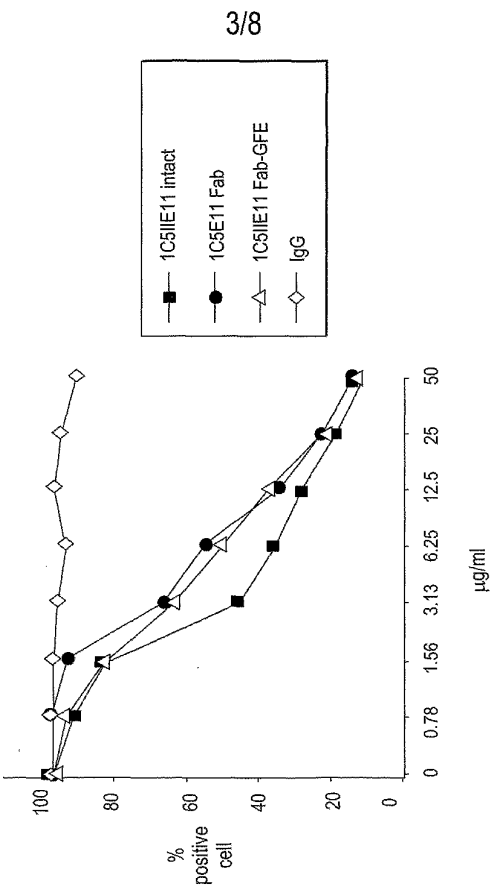


Fig. 3

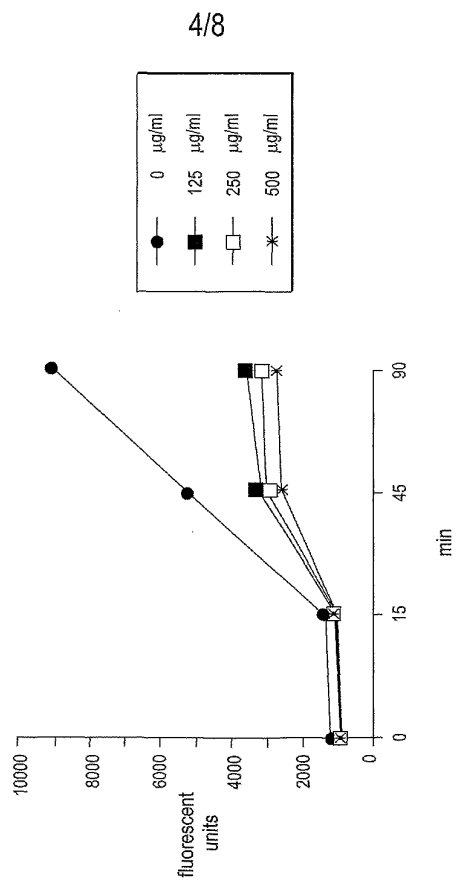


Fig. 4

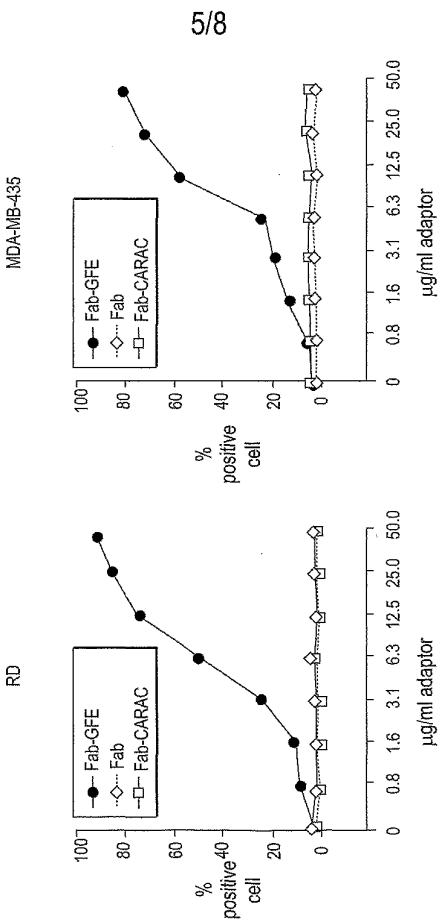
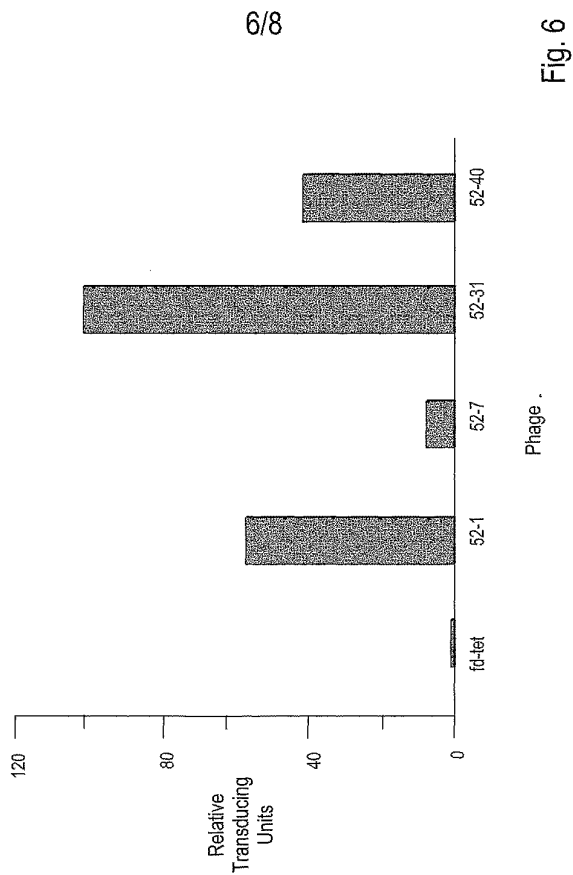


Fig. 5

WO 02/20724

PCT/US01/28045



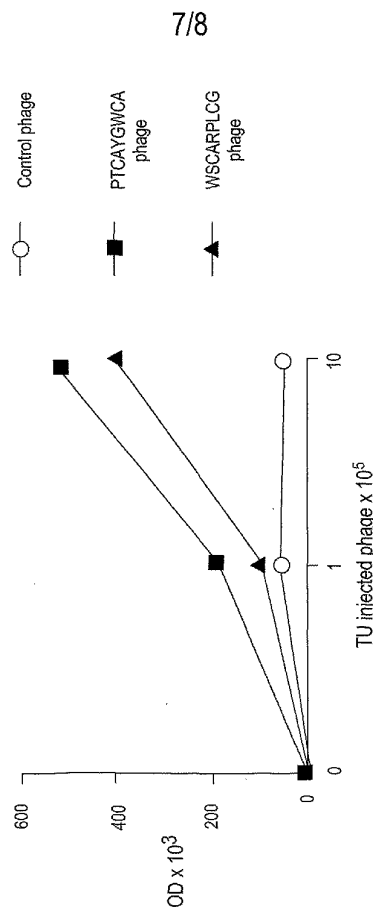


Fig. 7



WO 02/20724

PCT/US01/28045

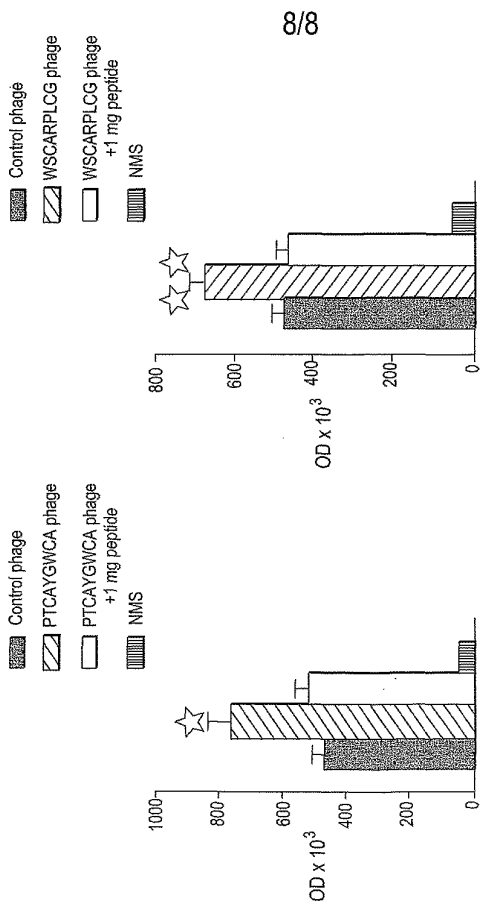


Fig. 8

WO 02/20724

PCT/US01/28045

SEQUENCE LISTING

SEQUENCE LISTING

<110> Arap, Wadih  
Pasqualini, Renata

<120> Adenoviral Targeting and Manipulation of Immune System Response  
Using Targeting Peptides

<130> 005774.P001PCT

<140> Unknown

<141> 2001-09-07

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

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

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 2

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

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 4

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

Gly Lys Lys Leu Gly  
20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 5

Cys Gly Phe Glu Cys Val Arg Gln Cys Pro Glu Arg Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;400&gt; 6

Cys Ala Arg Ala Cys  
1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 7

Pro Thr Cys Ala Tyr Gly Trp Cys Ala  
1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 8

Trp Ser Cys Ala Arg Pro Leu Cys Gly  
1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 9

Cys Asn Gly Arg Cys Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;400&gt; 10

Cys Asn Gly Arg Cys Arg Leu Asp Tyr Arg Phe  
1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 11

Cys Asn Gly Arg Cys Ser Arg Ser Gly Pro Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 12

Cys Asn Gly Arg Cys Thr Met Gly Val Arg Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 13

Cys Asn Gly Arg Cys Thr Ser Gly Arg Val Gly  
1 5 10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 14

Cys Asn Gly Arg Cys Thr Ser Gly Pro Gly Trp  
1 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 15

Ser Trp Tyr Ser Gln Phe  
1 5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 16

Ala Val Ser Glu Cys Phe  
1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 17

Lys Glu Cys Gln Ser Arg Leu Ser Cys Pro  
1 5 10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 10

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 18

Cys Glu Phe Arg Leu Asn Ser Ile Leu Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 19

Cys His Ser Leu Leu Glu Lys Gly Trp Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 20

Cys Thr Arg Ser Phe Ala Arg Lys Glu Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 21

Cys Glu Leu Arg Leu Asn Ser Ile Leu Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 22

WO 02/20724

PCT/US01/28045

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 22

Cys Glu Leu Arg Glu Gln Val Gly Arg Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 23

Cys Trp Tyr Thr Glu Gly Arg Met Ile Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 24

Cys His Ser Leu Leu Glu Lys Gly Trp Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 25

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

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

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/020724 A3(51) International Patent Classification\*: A61K 38/00,  
39/00, 39/21, C12P 21/08, C07K 16/28, 16/46, 16/42

(21) International Application Number: PCT/US01/28045

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/231,266 8 September 2000 (08.09.2000) US  
09/765,101 17 January 2001 (17.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD  
OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYS-  
TEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701  
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARAP, Wadiah  
[BR/US]; 7171 Buffalo Speedway #328, Houston, TX  
77025 (US). PASQUALINI, Renata [BR/US]; 7171  
Buffalo Speedway #328, Houston, TX 77025 (US).(74) Agents: MALLIE, Michael, J. et al.; Blakely, Sokoloff,  
Taylor & Zafman LLP, 7th Floor, 12400 Wilshire Boul-  
vard, Los Angeles, CA 90025 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,  
CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

## Published:

with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments(88) Date of publication of the international search report:  
11 July 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/020724 A3

(54) Title: ADENOVIRAL TARGETING AND MANIPULATION OF IMMUNE SYSTEM RESPONSE USING TARGETING  
PEPTIDES(57) Abstract: The present invention concerns compositions and methods relating to the identification and use of targeting peptides. Such targeting peptides selectively home to specific organs or tissues *in vivo*. The novel targeting sequences disclosed herein are of use for the targeted delivery of various therapeutic agents to the targeted organ or tissue. In particular embodiments, the present invention concerns bispecific targeting reagents comprising an organ targeting peptide attached to a molecule, such as a Fab fragment, that binds to a gene therapy vector or other therapeutic agent. In alternative embodiments, bispecific targeting peptides containing an organ targeting moiety and a gene therapy or therapeutic agent targeting moiety may be obtained and used for targeted delivery. Other embodiments concern modulation of host immune system function through the targeted delivery of antigens or other molecules to lymph nodes. Numerous examples of targeting peptide sequences against adenovirus or lymph node tissue are disclosed herein.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28045
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) A61K 38/00, 39/00, 39/21; C12P 21/08; C07K 16/28, 16/46, 16/42 US CL Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/158.1, 277.1, 520/357.3, 387.7, 387.9, 388.1, 388.2, 388.2a, 388.3, 388.7 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/46284 A2 (RAJOTTE et al) 16 September 1999, claims 78-81 and sequences 320 and 326 on page 153.	1-11
Y	DEO et al. Bispecific molecules directed to the Fc Receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. Journal of Immunology. 1998, Vol. 160, pages 1677-1686.	1-11
A	VERMA et al. Gene Therapy-promises, problems, and prospects. Nature. September 1997, Vol. 389, pages 239-242.	12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "A" document member of the same patent family "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
Date of the actual completion of the international search 06 MARCH 2002		Date of mailing of the international search report 09 MAY 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3930		Authorized officer Valerie Bell-Harris for SHANON FOLEY Telephone No. (703) 305-0198

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28045
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: -	
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  Please See Extra Sheet.		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-12	
<b>Remark on Protest</b>		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/28045

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

424/168.1, 277.1; 530/387.3, 387.7, 387.9, 388.1, 388.2, 388.22, 388.3, 388.7

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

USPAT, USPGPub, EPO, JPO, Derwent, medline, embase, biosis

search terms: peptide, target, antibod, immunogen, bispecific, vaccin, HIV, cancer, lymph node, target, home, deliver, antigen

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-12, drawn to a method of modulating an immune response.

Groups II-XX, claim(s) 13-24, drawn to a bispecific compound. Each group corresponds to the distinct amino acid sequences in claims 22-24 in the order that they appear.

Group XXI, claim(s) 25-32, drawn to a method of targeting a vector.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-12, drawn to a method of modulating an immune response.

Groups II-XX, claim(s) 13-24, drawn to a bispecific compound. Each group corresponds to the individual amino acid sequences in claims 22-24 in the order that they appear.

Group XXI, claim(s) 25-32, drawn to a method of targeting a vector.

The inventions listed as Groups I-XXI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature in the method of group I is a lymphnode targeting peptide attached to an immunogen. Therefore, any claim that is related to the first method of making and the first method of using the method of group I is included in the grouping. Any claim that does not share the special technical feature of group I lacks unity of invention. Groups II-XX are drawn to products 1-19. The products do not share the special technical feature with group I because the bispecific compounds do not require a lymphnode targeting peptide or an immunogen. Furthermore, each of the bispecific compounds are unique because they do not share functional or structural similarities with each other based on the number of different sequences listed in claims 22-24.

Group XXI is drawn to a second method that is unrelated to the first method comprising the special technical feature. The second method does not require a lymphnode targeting peptide or an immunogen, and is not related to a first method of making or a first method of using the method of group I comprising the special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/685	A 6 1 K 31/56	4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/688	A 6 1 K 31/683	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/713	A 6 1 K 31/685	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 31/688	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 39/395	P
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 K 48/00	Z N A
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 31/18	
C 0 7 K 7/04	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 19/00	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 7/04	
	C 0 7 K 19/00	
	C 1 2 N 15/00	A
	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 パスカリニ レナタ

アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン バッファロー スピードウェイ # 3 2 8 7 1 7  
1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA04 DA02 EA02 GA11 HA17  
4C076 AA12 AA29 BB01 BB11 BB21 BB31 BB36 CC27 CC35 EE41  
EE59 FF01 FF11 FF12 FF15 FF16 FF39 GG43  
4C084 AA01 AA02 AA13 BA03 BA34 MA05 MA16 MA43 MA51 NA13  
NA14 ZB261 ZB331  
4C085 AA14 BA69 BB01 CC03 CC05 EE01 EE05 GG01 GG08  
4C086 AA01 AA02 BC42 BC43 CB07 DA08 DA34 DA38 DA41 DA42  
EA17 EA18 MA02 MA05 MA51 NA13 NA14 ZB26 ZB33  
4C087 AA01 AA02 BC83 MA05 MA17 MA43 MA51 NA13 NA14 ZB26  
ZB33  
4C206 DB06 DB27 MA02 MA05 MA37 MA63 NA13 NA14 ZB26 ZB33  
4H045 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 BA54 CA01 DA76 EA22 FA74

专利名称(译)	使用靶向肽靶向腺病毒和操纵免疫系统反应的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004536020A</a>	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2002525731	申请日	2001-09-07
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	アラップワディ パスカリニレナタ		
发明人	アラップ ワディ パスカリニ レナタ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/225 A61K31/23 A61K31/56 A61K31/683 A61K31/685 A61K31/688 A61K31/713 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/42 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/02 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/04 C07K5/08 C07K5/10 C07K7/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/005 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/08 C07K16/18 C07K19/00 C12N7/02 C12N15/10 C12N15/861 C12N15/864 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/5256 A61P3/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/02 A61P15/18 A61P19/02 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/047 C07K7/06 C07K14/52 C12N15/1037 C12N2810/40 Y02A50/41 Y02A50/412 Y02A50/414 Y02A50/478		
FI分类号	A61K39/00.A A61K39/00.H A61K39/00.K A61K31/225 A61K31/23 A61K31/56 A61K31/683 A61K31/685 A61K31/688 A61K31/713 A61K35/76 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/395.N A61K39/395.P A61K45/00 A61K47/42 A61K48/00.ZNA A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/04 C07K7/04 C07K19/00 C12N15/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4C076/AA12 4C076/AA29 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/BB21 4C076/BB31 4C076/BB36 4C076/CC27 4C076/CC35 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF01 4C076/FF11 4C076/FF12 4C076/FF15 4C076/FF16 4C076/FF39 4C076/GG43 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA03 4C084/BA34 4C084/MA05 4C084/MA16 4C084/MA43 4C084/MA51 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C085/AA14 4C085/BA69 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC42 4C086/BC43 4C086/CB07 4C086/DA08 4C086/DA34 4C086/DA38 4C086/DA41 4C086/DA42 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA51 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/MA05 4C087/MA17 4C087/MA43 4C087/MA51 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C206/DB06 4C206/DB27 4C206/MA02 4C206/MA05 4C206/MA37 4C206/MA63 4C206/NA13 4C206/NA14 4C206/ZB26 4C206/ZB33 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA54 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/231266 2000-09-08 US 09/765101 2001-01-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及与靶向肽的鉴定和使用有关的组合物和方法。这种靶向肽在体内选择性地回归到特定器官或组织。本文公开的新型靶向序列可用于将各种治疗剂靶向递送至靶器官或组织。在一个具体实施方案中，本发明涉及双特异性靶向试剂，其包含附着于分子的器官靶向肽，所述分子例如Fab片段，其结合基因治疗载体或其他治疗剂。在另一个实施方案中，获得包含器官靶向部分和基因治疗

法或治疗物质靶向部分的双特异性靶向肽，并且还可以用于靶向递送。另一方面涉及通过将抗原或其他分子靶向递送至淋巴结来调节宿主免疫系统功能。本发明公开了许多腺病毒或淋巴结组织靶向肽序列的实例。

受容体		担体?	局在	回帰モチーフ
$\alpha$ Vインテグリン	細胞接着	有	EC, 腫瘍細胞	RGD4C
CD13	プロテアーゼ	有	EC, 周皮細胞, 腫瘍	CNGRC
アミノペプチダーゼA	プロテアーゼ	N/D	周皮細胞	CPRECES
NG2/HMWMAA	プロテオグリカン	N/D	周皮細胞, 腫瘍細胞	GSL
MMP-2/MMP-9	プロテアーゼ	有	EC, 腫瘍細胞	CTTHWGFILC
MDP	プロテアーゼ	N/D	EC	CGFEC