

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4603157号
(P4603157)

(45) 発行日 平成22年12月22日 (2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日 (2010.10.8)

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

請求項の数 9 (全 85 頁)

(21) 出願番号	特願2000-535660 (P2000-535660)	(73) 特許権者	500114586
(86) (22) 出願日	平成11年3月10日 (1999.3.10)		ザ バーナム インスティテュート
(65) 公表番号	特表2002-506079 (P2002-506079A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
(43) 公表日	平成14年2月26日 (2002.2.26)		37, ラ ホヤ, ノース トリー パ
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/005284		インズ ロード 10901
(87) 国際公開番号	W01999/046284	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成11年9月16日 (1999.9.16)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成18年3月7日 (2006.3.7)	(72) 発明者	ラジョット, ダニエル
(31) 優先権主張番号	09/042, 107		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(32) 優先日	平成10年3月13日 (1998.3.13)		04, デルマー, 1/2 ストラット
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フォード コート 517
(31) 優先権主張番号	09/258, 754	(72) 発明者	パスカリニ, レナタ
(32) 優先日	平成11年2月26日 (1999.2.26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
(33) 優先権主張国	米国 (US)		75, ソラナ ビーチ, ナンバー29
			, サウス シエラ アベニュー 707
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 種々の選択された器官または組織にホーミングする分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

S M S I A R L (配列番号21)、V S F L E Y R (配列番号22) および R G R W L A L (配列番号279) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、7～100アミノ酸からなり、前立腺の血管系に選択的にホーミングするペプチド。

【請求項2】

前記ペプチドが20～50アミノ酸からなる、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

前記ペプチドが7～13アミノ酸からなる、請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

部分に連結された請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドを含む、結合体。

【請求項5】

前記部分が、治療的薬剤である、請求項4に記載の結合体。

【請求項6】

前記部分が、検出可能な薬剤である、請求項4に記載の結合体。

【請求項7】

前記部分が、タグである、請求項4に記載の結合体。

【請求項8】

前立腺を同定するインビトロでの方法であって、該方法が以下の工程：

a) 組織または器官を、請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドと接触する工程

10

20

；および

b) 該ペプチドの該器官または該組織への結合を検出する工程であって、それにより、該器官または該組織を前立腺として同定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項 9】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のペプチドに結合された標的分子を同定する方法であって、該方法が、請求項 8 に記載の インビトロでの方法 を包含し、さらに、以下の工程：

c) 前記前立腺から収集されたサンプルを提供する工程；および

d) 該ペプチドにより結合される該標的分子を同定する工程、
を包含する、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、1998年3月13日に出願された米国出願番号第09/042,107号の一部継続出願であり、この内容の全体を本明細書中に参考として援用する。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所によって与えられる助成金番号CA 74238およびCA 30199のもとで政府支援が行われた。

【0003】

(発明の背景)

20

(発明の分野)

本発明は、一般に、分子医学および薬物送達の分野に、そしてより詳細には特定の器官または組織にホーミングする分子に関する。

【0004】

(背景情報)

特定の病理学の効果はしばしば、罹患した人の身体全体に現れるが、一般に、基礎になる病理は、単一の器官または組織のみに影響を与え得る。しかし、薬物または他の処置が、罹病器官または罹病組織のみを標的化することは稀である。より一般的には、処置は、例えば、患者の身体全体での全身毒性効果に起因して、望ましくない副作用をもたらす。例えば、標的器官または標的組織に関連した疾患の処置のために器官または組織を選択的に標的化することが望ましい。詳細には、器官または組織の標的化は、遺伝子の発現を、特定の器官または組織に指向させるために有用であり得る。なぜなら、非標的細胞への外来遺伝子の取り込みは、望ましくない副作用（例えば、悪性トランスフォーメーション）を生じ得るからである。

30

【0005】

大部分の治療物質は、標的器官または標的組織に循環を介して送達される。血管の内部表面の内側を覆う内皮は、標的器官または標的組織における循環治療物質が遭遇する最初の細胞型である。これらの細胞は、治療を器官または組織へと選択的に指向するための標的を提供する。

【0006】

40

内皮は、独特の形態および生化学的マーカーを種々の組織において有し得る。リンパ系の血管は、例えば、リンパ球のホーミングを導くように作用する種々の接着タンパク質を発現する。例えば、リンパ節に存在する内皮細胞は、L-セレクトリンについてのリガンドである細胞表面マーカーを発現し、そしてパイアー斑細静脈における内皮細胞は、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンについてのリガンドを発現する。これらのリガンドは、それらのそれぞれのリンパ系器官への特異的リンパ球ホーミングに関与する。従って、薬物をL-セレクトリンまたは $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに連結することにより、この薬物を、それぞれ、罹病リンパ節またはパイアー斑へと標的化するための手段を提供し得る。ただし、これらの分子は、有意な数の他の器官または組織において存在する類似のリガンドには結合しない。

【0007】

50

非リンパ系組織の血管に存在するホーミング分子は明確には規定されていないが、リンパ球の循環の特定の観察によって、器官特異的内皮マーカーおよび組織特異的内皮マーカーが存在することが示唆される。同様に、特定の器官または組織への特定の型の腫瘍細胞のホーミングまたは転移は、器官特異的マーカーおよび組織特異的マーカーが存在し得ることをさらに示唆する。従って、このような器官特異的マーカーまたは組織特異的マーカーに結合し得、それゆえ、この器官または組織にホーミングし得る分子を同定する必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、そして関連する利点も提供する。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、種々の正常な器官または組織（肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸を含む）に選択的にホーミングする分子を提供する。例えば、本発明は、ペプチドCGFECVRQCPERC（配列番号1）およびCGFELETC（配列番号2）を含む肺ホーミングペプチド（例えば、GFEモチーフを含む肺ホーミングペプチド）；CVALCREACGEGC（配列番号3）のような皮膚ホーミングペプチド；ペプチドSWCEPGWCR（配列番号4）のような膵臓ホーミングペプチド；ならびにペプチドCSCFRDVCC（配列番号5）およびCRDVVSVIC（配列番号6）を含む網膜ホーミングペプチド（例えば、RDVモチーフを含む網膜ホーミングペプチド）を提供する。

【0009】

本発明はまた、部分に連結された器官ホーミング分子または組織ホーミング分子を含む、結合体を提供する。このような部分は、毒素、細胞死を阻害する薬剤、細胞による有害もしくはは有用な物質の産生もしくはは活性を変化させる薬剤、またはこの薬剤に曝露された細胞の増殖を変更する薬剤のような治療的薬剤であり得る。部分または、放射性核種のような検出可能な薬剤、または室のあるマイクロデバイスまたは不溶性クロマトグラフィー支持体のようなタグであり得る。本発明のこのような結合体は、この部分を選択された器官または組織へ指向させるために有用である。

【0010】

本発明はまた、選択された器官または組織にホーミングする分子を、病理を有するかまたは病理を有する疑いのある被験体に投与することによって、本発明の器官ホーミング分子を使用して、肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸の病理を診断または処置する方法を提供する。例えば、肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸の病理は、この病理を有する被験体に、治療的薬剤に連結した、適切な器官ホーミング分子を含む結合体を投与することによって処置され得る。同様に、検出可能な薬剤に連結した適切な器官ホーミング分子を含む結合体を被験体に投与することにより、選択された器官もしくは組織を同定する方法、または選択された器官における病理を診断する方法。

【0011】

本発明はさらに、肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸のホーミング分子に対する標的分子の選択的結合を検出することにより、それぞれ、肺、膵臓、皮膚、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸における標的分子を同定する方法を提供する。例えば、肺に選択的にホーミングするペプチドは、固体マトリックスに結合され得、肺のサンプルが入手され得、そしてこの標的分子の特異的結合を可能にする条件下でアフィニティマトリックスに通過させられ得、そして標的分子が収集および同定され得る。従って、本発明はまた、器官ホーミング分子、特に、肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸のホーミング分子を結合する標的分子を提供する。このような標的分子は、例えば、この標的分子に特異的な抗体を惹起するために有用であり得る。

【0012】

本明細書中ではまた、肺内皮に選択的にホーミングする分子である、膜ジペプチダーゼ（MDP）結合ホーミング分子を同定する方法が提供される。この方法は、MDPを1以上

10

20

30

40

50

の分子と接触させる工程；およびこのMDPへの分子の特異的な結合を決定する工程を包含し、ここで、特異的な結合の存在は、この分子を、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子として同定する。本発明の1つの方法では、このMDPは、例えば、その天然の状態にあり得るか、または実質的に精製され得、そして所望であれば、支持体に固定化される。膜ジペプチダーゼは、任意の哺乳動物MDP、例えば、配列番号448を有するヒトMDPであり得る。

【0013】

本発明によってさらに、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子に連結された部分を含む結合体を被験体に投与し、それによって、この部分がこの被験体における肺内皮に選択的に指向されることによる、被験体において、部分を肺内皮に選択的に指向させる方法が提供される。このような方法は、例えば、肺への薬物標的化に有用であり得る。本発明の1つの方法では、MDP結合ホーミング部分は、膜ジペプチダーゼ(MDP)を1以上の分子と接触させる工程；およびこのMDPへの分子の特異的な結合を決定する工程によって同定され、ここで、特異的な結合の存在は、この分子を、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子として同定する。種々の部分は、本発明の方法に従って肺内皮に選択的に指向され得る。本発明において有用な部分は、例えば、遺伝子治療ベクターまたは薬物であり得る。

【0014】

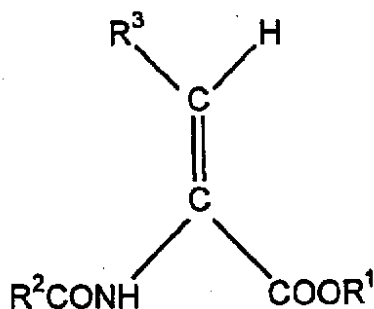
1つの実施態様では、本発明は、肺内皮へ部分を選択的に指向するための方法を提供し、ここで、MDP結合ホーミング分子は、配列 $X_1-G-F-E-X_2$ (配列番号17)を含むペプチドであり、ここで、 X_1 および X_2 の各々は、独立して選択される1~10個のアミノ酸である。このようなMDP結合ホーミングペプチドとしては、例えば、配列CGFE CVRQC PERC (配列番号1)またはCGFELETC (配列番号2)が挙げられ得る。

【0015】

別の実施態様では、本発明は、肺内皮へ部分を選択的に指向するための方法を提供し、ここで、MDP結合ホーミング分子は、以下の構造1：

【0016】

【化3】



を含み、ここで、 R^2 および R^3 は、それぞれ、3~10個の炭素原子および1~15個の炭素原子の範囲の炭化水素ラジカルであり；これらの R^2 炭化水素鎖もしくは R^3 炭化水素鎖のいずれか1つでは、1~6個の水素がハロゲンによって置換され得るか、または非末端メチレンが酸素もしくは硫黄(硫黄の酸化型形態を含む)によって置換され得；さらに、 R^3 の末端水素もまたヒドロキシルもしくはチオールによって置換され得、これは、アシル化もしくはカルバモイル化され得；あるいは、この水素はアミノによって置換され得、これはアシルアミノ基、ウレイド基、アミジノ基、グアニジノ(quanidino)基もしくはアルキル基または置換されたアミノ基(四級窒素基化を含む)におけるように誘導体化され得；あるいはカルボン酸基、ホスホン酸基もしくはスルホン酸基のような酸性基、またはそれらのエステルもしくはアミド、またはシアノによる置換が存在し得；あるいは末端アミノ酸基化のようなそれらの組み合わせ；ならびに R^1 は、水素もしくは低

級アルキル (C_{1-6}) もしくはジアルキルアミノアルキル、または薬学的に受容可能な陽イオンである。肺転移を低減または予防するためのこのようなMDP結合ホーミング分子は、例えば、シラスタチンとしても公知の、7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸であり得る。

【0017】

MDP結合ホーミング分子は、例えば、 R^2 が、カルボニルに隣接した炭素が第三級ではあり得ないという制限を有する、分枝したアルキルまたはシクロアルキルである、構造1を有する化合物であり得る。

【0018】

MDP結合ホーミング分子はまた、例えば、 R^2 が、カルボニルに隣接した炭素が第三級ではあり得ないという制限を有する、分枝したアルキルまたはシクロアルキルであり、そして R^3 が第四級窒素、アミン誘導体またはアミノ酸誘導基である末端置換基を有する、 n -アルキル (1~9個の炭素) または n -アルキル (1~9個の炭素) である、構造1を有する化合物であり得る。MDP結合ホーミング分子は、例えば、 R^2 が、2, 2-ジメチルシクロプロピルもしくは2, 2-ジクロロシクロプロピルであり、そして R^3 が、末端置換基を有さないか、またはトリメチルアンモニウム、アミジノ、グアニジノもしくは2-アミノ-2-カルボエチルチオである末端置換基を有する、3~7個の炭素原子の炭化水素鎖である、構造1を有する化合物であり得る。

【0019】

本発明において有用な、構造1を有する例示的なMDP結合ホーミング分子としては、以下が挙げられる：Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルクロロプロパンカルボキサミド)-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-ウレイド-2-オクテン酸；Z-8-(1-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸 (ラセミ形および右旋性形)；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸；および6-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘキセン酸。

【0020】

本発明はまた、被験体に膜ジペプチダーゼ (MDP) 結合ホーミング分子を投与することによって、癌を有する被験体において、肺転移を低減または予防する方法を提供する。好ましい実施態様では、MDP結合ホーミング分子は、配列 $X_1-G-F-E-X_2$ (配列番号17) を含む肺ホーミングペプチドである (ここで、 X_1 および X_2 の各々は、独立して選択される1~10個のアミノ酸 (例えば、配列CGFECVRQCPERC (配列番号1) またはCGFELETC (配列番号2) を含むペプチド) である)。

【0021】

別の好ましい実施態様では、MDP結合ホーミング分子は、本明細書中上記の、構造1を含む分子である。このようなMDP結合ホーミング分子は、例えば、シラスタチンとして通常公知の、7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸であり得る。

【0022】

1つの実施態様では、本発明において有用なMDP結合ホーミング分子は、MDPインヒビターである。このようなMDPインヒビターは、例えば、MDPに対して、1000n

10

20

30

40

50

M以下のK_iを示し得る。別の実施態様では、肺転移を低減または予防する際に有用なMDPインヒビターは、MDPに対して100nM以下のK_i、またはMDPに対して1nM以下のK_iを示す。

【0023】

本発明はまた、被験体にMDP陰性調節因子を投与することによって、癌を有する被験体において、肺転移を低減または予防する方法を提供する。本発明において有用なMDP陰性調節因子は、例えば、可溶性MDPポリペプチド、またはMDPと選択的に反応する抗体であり得る。

【0024】

本明細書中でさらに、被験体にMDP陰性調節因子を投与することによって、被験体において、肺内皮への細胞ホーミングを低減または予防する方法が提供される。肺内皮への細胞ホーミングを低減または予防するために有用なMDP陰性調節因子は、例えば、可溶性MDPポリペプチド、またはMDPと選択的に反応する抗体であり得る。

【0025】

本発明はまた、肺転移を低減または予防する分子を同定する方法を提供し、この方法は、膜ジアミノペプチダーゼ(MDP)を1以上の分子と接触させる工程；およびこの分子の存在下でのMDP活性をコントロール値と比較して決定する工程を包含し、ここで、この分子の存在下での減少したMDP活性は、肺転移を低減または予防する分子としてこの分子を同定する。膜ジアミノペプチダーゼは、例えば、実質的に精製され得る。MDP活性は、例えば、Gly-D-PheからのD-Pheの放出により決定され得る。

【0026】

1つの実施態様において、本発明は、以下の工程によって肺転移を減少または予防する分子を同定する方法を提供する；MDPを1つ以上の分子と接触させる工程；コントロール値と比較して、その分子の存在下でMDP活性を決定する工程；癌を有する被験体に、その分子を投与する工程；および転移のコントロールレベルと比較して、被験体における肺転移をアッセイする工程であって、ここでその分子の存在下においてMDP活性の減少が、その分子を、肺転移を減少または予防する分子として同定する工程。

【0027】

(発明の詳細な説明)

本発明は、器官および組織ホーミング分子、ならびに選択された器官または組織に部分を標的とするためにこれらの分子を使用する方法を提供する。本発明の分子は、インビボパンニングの方法(1997年4月22日に発行された、米国特許第5,622,699号、これを本明細書中で参考として援用する)によって本質的に同定され、種々の正常器官または組織(肺、皮膚、脾臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸を含む)および腫瘍を保有する器官(肺腫瘍を保有する肺および脾臓腫瘍を保有する脾臓を含む)にホーミングするペプチドを含む。例えば、本発明は、肺ホーミングペプチドを提供し、このペプチドとしては、ペプチドCGFECVRRQCPERC(配列番号1)およびCGFELETC(配列番号2)(これらの各々は、トリペプチドGFEモチーフを含む)、ならびにペプチドGIGEEVC(配列番号8)が挙げられる。本発明はまた、ペプチドCVALCREACGEGC(配列番号3)のような皮膚ホーミングペプチド；ペプチドSWCEPGWCR(配列番号4)のような脾臓ホーミングペプチドならびにペプチドCSCFRDVCC(配列番号5)およびCRDVVSVIC(配列番号6)のような網膜ホーミングペプチド(これらの各々は、トリペプチドRDVモチーフを含む)を提供する。前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓および腸にホーミングするペプチドの例もまた提供される(表2~11を参照のこと)。特定の器官ホーミングペプチドに共通のモチーフがこのペプチドの単純な検査によって同定され得ることが認識されるべきである。例えば、表9の検査は、以下のことを明らかにする：ペプチドAGCSVTVCG(配列番号315)およびAGCVQSQCYS(配列番号370)はAGCモチーフを共有する；ペプチドLECRRWRC(配列番号328)およびLECVANLCT(配列番号337)はLECモチーフを共有する；ならびにペプチドSECAYRACS(配列番号

319) および SECYTGSCP (配列番号 375) は SECモチーフを共有する。さらに、これらのペプチドのいくつかは、1回を超えて単離され (表9のアスタリスクを参照のこと)、このことは、そのようなモチーフが、選択的にホーミングするペプチドの能力に関連することを示す。本明細書中に開示される特定のモチーフ、および開示されたペプチドの検査によって同定可能な他のモチーフを含むペプチドは、このモチーフが RGDモチーフではない場合、本願発明の範囲内であると考えられる。

【0028】

本発明のホーミング分子は、特定の器官または組織に部分を標的とするために有用である。従って、本発明は、部分に連結される器官ホーミング分子を含む結合体を提供する。このような部分は、ウイルスのような治療剤；ウイルス遺伝子療法ベクター；薬物；放射性核種のような検出可能化剤もしくは画像化剤；またはビオチンのようなタグであり得る。本明細書中に開示されるように、本発明のそのような器官ホーミング分子 (特に、本発明の結合体) は、選択された器官もしくは組織を検出もしくは可視化するため、または選択された器官もしくは組織における病理を診断もしくは処置するために使用され得る。本発明の器官ホーミング分子はまた、選択された器官もしくは組織において発現され、そして器官ホーミング分子を結合する標的分子を単離するために使用され得る。便宜上、選択された器官または分子にホーミングする本発明の分子は、「器官ホーミング分子」と称される。

【0029】

本明細書中で使用されるように、用語「分子」は、1つ以上の異なる基を置換することによって変化され得る少なくとも1つの反応基を有する有機化合物を意味するために幅広く使用される。有機分子は、薬物；核酸分子 (RNA または DNA を含む)；ペプチド；改変体もしくは修飾ペプチドまたはペプチド模倣物；タンパク質もしくはそのフラグメント；オリゴ糖；脂質；糖脂質；あるいはリポタンパク質であり得る。

【0030】

有機分子は、天然に存在する分子であり得、これは、有機分子を含む基およびその基を連結する結合が生物学的プロセスによって産生される天然の産物であり得る。例えば、天然に存在する有機分子は、RNA 分子またはそのフラグメントであり得、これは、細胞から単離され得るか、または組換え核酸分子から発現され得る。同様に、ペプチドは、化学合成によって産生される場合でさえ、天然に存在する有機分子であると考えられる。なぜなら、アミノ酸基およびその基に連結する結合は、通常の生物学的プロセスによって産生され得、そしてペプチド自体が、例えば、ペプチドを含有するタンパク質のタンパク質分解性分解に起因して細胞中で産生され得るからである。

【0031】

有機分子はまた、天然には存在しない分子であり得る。このような分子は、生物学的プロセスによって天然に産生されない化学基または結合を有する。例えば、天然に存在しないヌクレオシドアナログ、またはヌクレオチドを連結しそしてヌクレアーゼによる分解に対して保護するホスホロチオエート結合を含む核酸配列は、天然に存在しない分子の例である。通常のヒドロキシル基のかわりに、リボース残基の2'炭素原子に結合される2-メチル基を含むリボヌクレオチドは、酵素分解および化学分解に対して耐性である天然に存在しないRNA分子の例である。天然に存在しない有機分子の他の例としては、RNA 含有2'-アミノピリミジンが挙げられ、そのようなRNAは、天然に存在するRNAと比較して、ヒト血清および尿素において1000倍を超えて安定である (Linら、Nucleic Acids Res., 22:5229-5234 (1994)；およびJellinekら、Biochemistry, 34:11363-11372 (1995) (これらの各々を本明細書中で参考として援用する) を参照のこと)。

【0032】

便宜上、用語「ペプチド」は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質およびタンパク質のフラグメントを意味するように本明細書中で広く使用される。本発明に有用な他の分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物などが挙げられる。本発明の器官または組織ホーミ

10

20

30

40

50

ングペプチドに関して、ペプチド模倣物（これは、化学修飾されたペプチド、天然に存在しないアミノ酸分子を含むペプチド様分子、ペプトイドなどを含む）は、ペプチド模倣物が由来する器官ホーミングペプチドの結合活性を有する（例えば、「Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery」第5版、第1～3巻（M. E. Wolff編；Wiley Interscience 1995）（これを本明細書中で参考として援用する）を参照のこと）。ペプチド模倣物は、ペプチドを超える様々な利点を提供し、この利点としては、ペプチド模倣物は、被験体に投与される場合、例えば、消化管を通過する間安定であり得、それゆえ経口投与に有用であることが挙げられる。

【0033】

ペプチド模倣物を同定する方法は当該分野で周知であり、そして、その方法には、例えば、可能性のあるペプチド模倣物のライブラリーを含むデータベースのスクリーニングが挙げられる。例えば、Cambridge Structural Databaseは、公知の結晶構造を有する300,000より多くの化合物の収集物を含む（Allenら, Acta Crystallogr. B項, 35:2331(1979)）。この構造寄託は、新しい結晶構造が決定されるにつれて絶えず更新され、そして適切な形状、例えば、器官もしくは組織ホーミング分子と同じ形状を有する化合物について、ならびに器官もしくは組織ホーミングペプチドによって結合された標的分子への可能性のある幾何学のおよび化学的に相補性についてスクリーニングされ得る。ホーミングペプチド、または器官もしくは組織ホーミング分子を結合する標的分子の結晶構造が利用可能でない場合、構造は、例えば、プログラムCONCORD（Rusinkoら, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251(1989)）を使用して生成され得る。別のデータベース、Available Chemicals Directory（Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro CA）は、市販されている約100,000化合物を含み、そしてまた器官または組織ホーミング分子の可能性のあるペプチド模倣物を同定するために検索され得る。

【0034】

用語「核酸分子」はまた、2つ以上のヌクレオチドの任意のポリマーを意味するために幅広く使用され、このヌクレオチドは、ホスホジエステル結合のような共有結合、チオエステル結合、またはヌクレオチドを連結するために有用かつ有効であることが当該分野で公知の任意の様々な他の結合によって連結される。このような核酸分子は、線状、環状、またはスーパーコイルであり得、そして一本鎖もしくは二本鎖DNAもしくはRNAであり得るか、またはDNA/RNAハイブリッドであり得る。

【0035】

本明細書中で使用されるように、用語「ライブラリー」は、分子の収集物を意味する。ライブラリーは、少数または多数の異なる分子を含み得、約2～約 10^{15} 分子以上まで変動する。ライブラリーの分子の化学構造は、互いに関連し得るか、または多様であり得る。所望される場合、ライブラリーを構成する分子は、共通タグまたは独特のタグに連結され得、このタグは、分子の回収および／または同定を促進し得る。

【0036】

ペプチド、ペプトイド、およびペプチド模倣物のような分子の種々の型の多様な集団を含むライブラリーを調製するための方法は、当該分野で周知であり、そして種々のライブラリーが市販されている（例えば、EckerおよびCrooke, Biotechnology 13:351-360(1995)、ならびにBlondelleら, Trends Anal. Chem. 14:83-92(1995)、およびその中で引用される参考文献（それらの各々が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと；GoodmanおよびRo, Peptidomimetics for Drug Design, 「Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery」第1巻（M. E. Wolff編；John Wiley & So

10

20

30

40

50

ns 1995), 803-861頁、ならびにGordonら、J. Med. Chem. 37:1385-1401 (1994) (それらの各々が参考として本明細書中に援用される)も参照のこと)。ある分子が、ペプチド、タンパク質、またはそのフラグメントである場合、その分子は、インビトロで直接生成され得るか、またはインビトロで生成され得る核酸から発現され得る。合成ペプチドおよび核酸化学の方法は当該分野で周知である。

【0037】

ペプチド分子のライブラリーはまた、例えば、目的の細胞、組織、器官、または生物から集められたmRNAからcDNA発現ライブラリーを構築することによって産生され得る。このようなライブラリーを産生する方法は当該分野で周知である(例えば、Sambr 10
ookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) (これは参考として本明細書中に援用される)を参照のこと)。好ましくは、cDNAによってコードされるペプチドは、cDNAを含む細胞またはウイルスの表面上で発現される。例えば、cDNAは、融合物5 (実施例I)のようなファージベクター中にクローン化され得、ここで、発現の際、コードされたペプチドは、そのファージの表面上で融合タンパク質として発現される。

【0038】

さらに分子のライブラリーは、核酸分子のライブラリーであり得、この核酸分子は、DNA、RNA、またはそのアナログであり得る。例えば、cDNAライブラリーは、目的の 20
細胞、組織、器官、または生物から収集されるmRNAからか、または制限エンドヌクレアーゼもしくはゲノムDNAを無作為にフラグメント化する方法を使用して適切な大きさのフラグメントを生じるように処理され得る、ゲノムDNAを収集することによって構築され得る。RNA分子を含むライブラリーはまた、細胞由来のRNAを収集することによってか、またはRNA分子を化学的に合成することによって構築され得る。核酸分子の多様なライブラリーは、分子中の無作為化された領域の産生を容易にする、固相合成を使用して作製され得る。所望される場合、無作為化は、分子中の位置で特定の割合の1以上のヌクレオチドを含む核酸分子のライブラリーを生じるように偏られ得る(米国特許第5, 270, 163号、1993年12月14日発行、これは、本明細書中で参考として援用 30
される)。

【0039】

所望の場合、核酸分子は、ヌクレアーゼによる分解に感受性がより低い、核酸アナログであり得る。例えば、リボース残基に2'-O-メチルプリン置換を、および3'末端および5'末端に短いホスホロチオエートキャップを含むRNA分子は、ヌクレアーゼに対して抵抗性の増強を示す(Greenら、Chem. Biol.、2:683~695 (1995)、これは、本明細書中で参考として援用される)。同様に、2'-アミノ-2'-デオキシピリミジンまたは2'-フルオロ-2'-デオキシピリミジンを含むRNAは、ヌクレアーゼ活性に対してより感受性が低い(Pagratissら、Nature Biotechnol. 15:68~73 (1997)、これは、本明細書中で参考として 40
援用される)さらに、L-RNA (これは、天然に生じるD-RNAの立体異性体である)は、ヌクレアーゼ活性に対して抵抗性である(Nolteら、Nature Biotechnol.、14:1116~1119 (1996); Klobmannら、Nature Biotechnol.、14:1112~1115 (1996) これらの各々は、本明細書中で参考として援用される)。このようなRNA分子およびこれらを産生する方法は、周知でありかつ慣用的である(EatonおよびPiekeren、Ann. Rev. Biochem.、64:837~863 (1995)を参照のこと。これは、本明細書中で参考として援用される)。オリゴヌクレオチドに連結されるホスホロチオエートを含むDNA分子は、ヌクレアーゼ抵抗性である(Reedら、Cancer Res. 50:6565~6570 (1990)、これは、本明細書中で参考として援用される)。ホスホジエステル結合のホスホロチオエート-3'ヒドロキシプロピルアミン改変は 50

また、ヌクレアーゼ分解に対するDNA分子の感受性を減少する（Tamら、Nuc l. A c i d s Res.、22：977～986（1994）（これは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。所望される場合、DNAライブラリーの多様性は、チミジンを5-（1-ペンチニル）-2'-デオキシウリジンと置換することによって増強され得る（Lathamら、Nuc l. A c i d s Res. 22：2817～2822（1994）、これは、本明細書中で参考として援用される）。このような改変された核酸分子は、ライブラリーの製造またはタグとする目的のために有用であり得る（下記）。

【0040】

本明細書中で開示されるように、器官または組織のホーミング分子を同定するためのインビボでのパニングは、被検体にライブラリーを投与する工程、器官または組織のサンプルを収集する工程および当該分野にて周知の種々の方法を使用して、器官または組織のホーミング分子を同定する工程を包含する。一般に、収集された器官または組織中の器官または組織ホーミング分子の存在は、ライブラリー中に存在する分子に共通である、1以上の特性に基づいて同定され、次いで、特定の器官または組織のホーミング分子の構造を、決定し得る。

【0041】

高感度の検出方法（例えば、質量分析（MS））は、単独またはガスクロマトグラフィー（GC）のような方法との組合せのいずれかで、選択された器官または組織中に少量存在する場合であっても、密接に関連したホーミング分子を同定するために使用され得る。例えば、MSとの組み合わせでGCを使用して、ラットへのリドカインの注射および尿の分析の後に、2つの主要なリドカイン代謝物および4つの微量なリドカイン代謝物を同定した（Couttsら、J. Chromatogr. 421：267～280（1987）、これは、本明細書中で参考として援用される）。同様に、ライブラリーが、有機分子（例えば、薬物）の構造に一般的に基づく多様な分子を含む場合、器官または組織のホーミング分子は、特定分子のもののピークの存在を決定することによって同定され得る。

【0042】

所望される場合、選択された器官または組織は、HPLCのような方法を使用して処理され得、これらの方法は、規定された範囲の分子量または極性などを有する分子の濃縮した画分を、複雑な混合物から得るために使用され得る。次いで、分子の濃縮した画分は、器官または組織のホーミング分子を同定するためにさらに分析され得る。例えば、GCおよびMSと連結したHPLCを使用して、ラットへのジヒドロタキステロール3の注射および単離され灌流された腎臓の分画後に、ビタミンDアナログの7つの代謝物を同定した（Porteousら、Biomed. Environ. Mass Spectrum 16：87～92（1988）、これは、本明細書中で参考として援用される）。HPLCについての条件は、特定の分子の構造に依存し、そしてその分子の知識に基づいて、当業者により最適化され得る。

【0043】

収集された器官または組織のサンプル中に存在する、器官のホーミング分子は、規定された塩濃度および温度を有する溶液中でのインキュベーションにより、そのサンプルから回収され得る。選択的な抽出もまた使用して、1以上の溶液中で収集されたサンプルを連続してインキュベーションすることによって有機分子の異なる画分を入手し得る。このような溶液は、異なる塩濃度を有し得るか、または特定の温度で有機ホーミング分子の抽出をもたらし得る。収集されたサンプルから得られた溶出液を、別々に収集し得るか、または1以上の画分中にプールし得、そして器官のホーミング分子を検出および同定し得る。同様に、潜在的に妨害する細胞性物質（例えば、DNA、RNA、タンパク質、脂質または炭水化物）の大量除去のための方法は、当該分野で周知である。このような方法を使用して、収集されたサンプル中の潜在的に混入している物質から、特定の器官のホーミング分子を濃縮し得、そしてその分子を検出する感度を上昇させ得る。

【0044】

器官または組織のホーミング分子、特にタグ化されていない分子の同定の容易さは、種々の因子に依存し、この因子としては、潜在的に混入しているバックグラウンド細胞性物質の存在が挙げられる。例えば、ホーミング分子が非タグ化ペプチドである場合、細胞性タンパク質のバックグラウンドを超える特定のペプチドを同定するために、より多数が、器官または組織にホーミングしなければならない。対照的に、はるかに少量の非タグ化ホーミング分子（例えば、薬物）が同定可能である。なぜなら、このような分子は通常、体内において、一般に存在しないか、または非常に少数で存在するからである。この状況において、高感度の方法（例えば、MS）を使用して、器官のホーミング分子を同定し得る。当業者は、分子を同定する方法が、部分的に、特定の分子の構造に依存することを認識する。

10

【0045】

本明細書中で開示されるように、インビボでのパニングの間に、十分な数の分子が、この分子を容易に同定し得るように、選択された器官または組織に選択的にホーミングする。例えば、特定の収集された器官において、ペプチドが2回以上同定された（表1を参照のこと）。例えば、種々の選択された器官から配列決定された40個のクローンのうち、腸のホーミングペプチドであるYSGKWGK（配列番号9）は、そのクローンの22%に存在した；卵巣のホーミングペプチドであるEVRSLS（配列番号10）およびRVGLVAR（配列番号11）の各々は、クローンの22%に存在した；そして肝臓のホーミングペプチドであるVKSVCRT（配列番号12）は、クローンの11%に存在した（表1を参照のこと）。同様に、肺のホーミングペプチドであるCLAKENVVC（配列番号13）およびCGFECVRQCPCERC（配列番号1）；皮膚のホーミングペプチドであるCVALCREACGEGC（配列番号3）；および網膜のホーミングペプチドであるCGEFKVC（配列番号14）の各々は、他の器官のホーミングペプチド（表2～11；ペプチドをアステリクスで印を付ける）のように、それぞれの器官のインビボでのパニングの間に、数回独立して単離された。これらの結果は、同定された器官のホーミング分子の実質的な画分が同じ構造を有するか、または、多くの場合、保存されたモチーフを共有することを実証する。

20

【0046】

種々のインビボでのパニングスクリーニングの後に、数十万から数百万のホーミングペプチドを発現するファージを、それぞれの器官または組織から回収した。一般に、1回のインビボでのパニングから収集されたファージを、寒天上に播種し、約250～約300個のクローンを選択し、5ml培養で増殖させ、次いでプールし、そしてインビボでのパニングの引き続く回のために再投与した（「規則的な方法」）。しかし、いくつかの実験において、1000個のクローンを選択し、2ml培養中で増殖させ、次いでプールし、そしてスクリーニングの引き続く回のために投与するか；または寒天プレート全体をこすり取り、そして全てのファージを一緒に培養し、そしてスクリーニングの引き続く回のために投与した。種々の単離されたファージのペプチド挿入物を、ホーミングした数百万のうちの、少数の配列のみを同定するように測定した。これらの結果は、特定の型のホーミング分子が、インビボでのホーミングの後に器官または組織中に相対的に高い比率で存在し得、これによってその分子を同定し得る容易さを増大させることを示す。

30

40

【0047】

器官または組織のホーミング分子が核酸分子である場合、種々のアッセイ方法を使用して、その分子を実質的に単離または同定し得る。例えば、PCRは、ホーミング分子の存在を同定するために特に有用である。なぜなら、原理的に、PCRは、単一の核酸分子の存在を検出し得るからである（例えば、Erllich、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification（Stockton Press（1989）（これは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。PCRはまた、インビトロで所定の標的に結合する核酸分子を増幅するために使用されており、核酸がヌクレアーゼに抵抗性になり、そして被検体に投与される場合に、それらは、生物学的プロセス（例えば、インビボでのリ

50

ンパ球輸送)を調節した(例えば、H i c k e rら、J. C l i n. I n v e s t. 98: 2688~2692(1996)(これは、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。これらの知見は、インビボでのパニングを使用して、インビボで器官または組織に選択的にホーミングする核酸分子を同定するように、被検体の循環中に投与される場合、この核酸分子が十分に安定であることを示す。

【0048】

ライブラリーの分子は、タグ化され得、これは、器官のホーミング分子の回収または同定を容易にし得る。本明細書中で使用される場合、用語「タグ」とは、そのライブラリーの分子に連結されている、それぞれプラスチックまたは金属マイクロビーズ、オリゴヌクレオチド、またはバクテリオファージのような物理的部分、化学的部分、または生物学的部分

10

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「共有されたタグ」とは、ライブラリー中の各々の分子に共通である、物理的部分、化学的部分、または生物学的部分の意味する。共有されたタグを使用し、サンプル中のそのライブラリーの分子の存在を同定し得るか、またはインビボでのパニングの後に、サンプルからその分子を実質的に単離し得る。例えば、多様な分子(例えば、核酸)の集団を含むライブラリーを、共有されたタグに結合し得る。例えば、共有されたタグがビオチンである場合、核酸ホーミング分子は、例えば、ストレプトアビジンアフィニティーカラムに結合することによって、選択された器官または組織から実質的に単離され得る。器官または組織のホーミング核酸分子の存在はまた、標識されたストレプトアビジンと結合することによって検出され得る。血球凝集素抗原のようなペプチドはまた、共有されたタグであり得、これは、ライブラリー中の各分子に結合されている場合、選択された器官または組織からホーミング分子を実質的に単離する、血球凝集素抗原に特異的である抗体の使用を可能にする。さらに、分子または分子を含む支持体は、4-エトキシメチレン-2-フェニル-2-オキサゾリン-5-オン(p h O x)のようなハプテンに結合され、これはホーミング分子を回収する手段として、磁気ビーズに連結された抗p h O x抗体により結合され得る。p h O x標識された結合体を精製するための方法は、当該分野で公知であり、そしてこれらの手順を実行するための材料は、市販されている(I n v i t r o g e n、L a J o l l a C A; P r o m e g a C o r p .、M a d i s o n W I)。

20

30

【0050】

共有されたタグはまた、サンプル中のそのライブラリーの分子の存在を同定するために、またはサンプルからのライブラリーの分子を実質的に単離するために使用され得る核酸配列であり得る。例えば、ライブラリーの各々の分子は、共有されたタグを構成する、選択された同じヌクレオチド配列に結合され得る。次いで、共有されたタグに相補的なヌクレオチド配列を含むアフィニティーカラムは、その分子に結合した共有されたタグにハイブリダイズすることにより、器官または組織のサンプルからホーミング分子を単離するために使用され得る。共有されたタグの一部に相補的なヌクレオチド配列もまた、共有されたタグを含む分子の存在が、P C Rによってサンプル中で同定され得るように、P C Rプライマーとして使用され得る。

40

【0051】

タグはまた、特異的タグまたは独特のタグであり得る。本明細書中で使用される場合、用語「特異的タグ」とは、ライブラリー中である分子に連結される物理的、化学的、または生物学的タグを意味し、そしてその特定の分子に対して独特である。特異的タグは、それが容易に同定可能であるならば、特に有用である。あるライブラリーの特定の分子に独特であるヌクレオチド配列は、特異的タグ(例えば、あるライブラリーまたはペプチドの各

50

ペプチドに連結された独特のオリゴヌクレオチドタグ（例えば、BrennerおよびLerner, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:5381-5383 (1992)を参照のこと、これは参考として本明細書中に援用される）の例である。器官または組織へのホーミングの際、そのホーミングペプチドは、独特のオリゴヌクレオチドタグの配列を、例えば、PCRを用いて決定することによって同定され得る（例えば、Erllich, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Stockton Press 1989)を参照のこと、これは参考として本明細書中に援用される）。同様に、ファージで提示されるペプチドをコードする核酸配列は、特異的な核酸タグの別の例である。なぜなら、核酸の配列決定が、発現されたペプチドのアミノ酸配列を同定するからである（実施例Iを参照のこと）。そのような独特のオリゴヌクレオチド配列タグは、分子の他のライブラリーに連結される場合、それに連結されたホーミング分子の配列を同定するために使用され得る。

10

【0052】

共有されたタグおよび特異的タグは、組み合わせると、ホーミング分子がわずかな量で存在する場合、器官または組織のホーミング分子を単離し、そして同定するために特に有用であり得る。例えば、あるライブラリーの各分子は、2つの部分を含むオリゴヌクレオチドタグに連結され得る；内部の独特のヌクレオチド配列タグおよびPCRにおける使用のためのプライマー結合部位として作用する共有の隣接5'および3'ヌクレオチドタグ。従って、各分子は、そのホーミング分子を同定するための独特の部分、およびPCRプライマー結合部位を提供するための共有部分を有するオリゴヌクレオチドタグを含む。このようなタグ化分子は、選択された器官または組織へのホーミングの際に、共有された隣接5'および3'ヌクレオチドタグにハイブリダイズするプライマーを用いてPCRを実行すること、次いでDNA配列決定を行って内部の独特の配列タグのヌクレオチド配列を決定することによって、同定され得る。そのPCR産物は、PCRプライマーの一つを用いて直接配列決定され得るか、またはそのPCR産物は、ベクターにクローニングされ得、そしてそのDNA配列は、当該分野で周知の慣用方法によって決定され得る。

20

【0053】

共有されたタグおよび独特のタグの種々の他の組合せが使用され得る。例えば、あるライブラリーにおけるその分子の各々は、特定のヌクレオチド配列タグに連結され得る（例えば、BrennerおよびLerner、前出、1992を参照のこと）。これはまた、共有された3'ヌクレオチド配列を含み、その配列は、PCRにおける使用のためのプライマー結合部位であり得、そしてビオチンのような共有されたタグへとさらに連結され得る。器官または組織へのホーミングの際に、その特定のホーミング分子は、ビオチンタグに基づいて、器官または組織のサンプルから実質的に単離され得る。次いで、単離された分子は、例えば、そのヌクレオチドタグの共有された3'ヌクレオチド配列をプライマー結合部位として用いて、PCRに基づいた特異的タグのDNA配列決定によって同定され得る。

30

【0054】

タグはまた、支持体として役立ち得る。本明細書中で使用される場合、用語「支持体」とは、分子が付着され得る所定の表面を有するタグを意味する。一般に、支持体として有用なタグは、共有されたタグである。例えば、支持体は、ウイルスまたはバクテリオファージのようなウイルス様粒子（「ファージ」）；E. coliのような細菌；あるいは酵母、昆虫、または哺乳動物細胞のような真核生物細胞のような生物学的タグであり得；あるいはリボソームまたはマイクロビーズのような物理的タグであり得、これは、プラスチック、アガロース、ゼラチン、または他の生物学的もしくは人工的物質から構成され得る。所望であれば、支持体として有用な共有されたタグは、特異的タグをそこに連結し得る。

40

【0055】

本明細書において示されるように、選択された正常な器官もしくは組織（例えば、肺、皮

50

膚、脾臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸)へ、または腫瘍を含む器官もしくは組織(例えば、肺腫瘍を含む肺もしくは脾臓腫瘍を含む脾臓)へホーミングし得ることが疑われるペプチドは、融合タンパク質のN末端として発現され、ここで、C末端は、ファージ被覆タンパク質からなった(実施例Iを参照のこと)。その融合タンパク質の発現の際に、融合タンパク質の発現の際、C末端コートタンパク質は、N末端ペプチドがその器官または組織において標的分子と相互作用する位置にあるように、ファージの表面に対して融合タンパク質を連結した。従って、共有されたタグを有する分子を、ペプチドのファージへの連結によって形成し、ここで、ファージは生物学的支持体を提供し、ペプチド分子は融合タンパク質として連結され、融合タンパク質のファージコード部分はスパーサー分子として作用し、そしてそのペプチドをコードする核酸は、器官および組織のホーミングペプチドの同定を可能にする特異的タグを提供した。

10

【0056】

分子が支持体に連結される場合、タグ化された分子は、支持体の表面に付着された分子を含み、その結果、被験体において細胞中の標的分子と相互作用し得る疑いのある分子の一部が、相互作用に関与し得るように配置される。例えば、ホーミング分子が増殖因子レセプターのリガンドである疑いがある場合、支持体に付着された分子の結合部分は、器官または組織における細胞上の増殖因子レセプターと相互作用し得るように配置される。所望であれば、適切なスパーサーが、分子と支持体との間に配置され得、その結果、可能性のある器官または組織のホーミング分子が標的分子と相互作用する能力は妨害されない。スパーサー分子はまた、反応性基を含み得、これは分子を支持体に連結する便利かつ効率的な手段を提供し、そして所望であれば、分子の回収または同定を容易にし得るタグを含み得る(Hermanson、前出、1996を参照のこと)。

20

【0057】

一般的に、支持体は、その支持体が、被験体に存在するキャピラリーベッドを通して比較的妨害されずに通過し得、そして循環を塞ぎ得ないように、その最短の寸法で約10μm未満から約50μmの直径を有するべきである。さらに、支持体は、生物学的に不活性であり得、そのため、細胞表面分子の正常発現または被験体の正常生理状態を混乱させない。さらに、支持体は、特にインビボパニングに使用される被験体が選択された器官または組織をのサンプルを収集するために屠殺されない場合には、分泌性であり得るか、または生分解性であり得る。

30

【0058】

本明細書中で使用される場合、器官または組織のホーミング分子の同定に関して使用される場合に、用語「インビボパニング」とは、ライブラリーを被験体に投与する工程、および被験体において器官または組織に選択的にホーミングする分子を同定する工程によって、ライブラリーをスクリーニングする方法を意味する(米国特許第5,622,699号、前出を参照のこと)。分子のライブラリーまたはこのようなライブラリーの一部に関して使用される場合、用語「被験体に投与する(こと)」は、ライブラリーが、一般的に脊椎動物、特にヒトのような哺乳動物である被験体において選択された器官または組織に送達されることを意味するために、その最も広義に使用される。分子のライブラリーは、投与の任意の経路または手段(例えば、静脈内、筋肉内、経口的、眼科的、眼球的、腹膜内、鼻内、腔内、直腸内、子宮内、眼の房内、中枢神経系内または末梢神経系内、吸入により、局所投与により、あるいは任意の正常な器官もしくは組織、あるいは腫瘍または病因に関与する器官もしくは組織のような病理学的領域(特に、その器官または組織の循環系)への注射による)によって投与され得る。

40

【0059】

ライブラリーは、例えば、分子が選択された器官または組織を透過するように被験体の循環中にライブラリーを注射することによって被験体に投与され得；適切な時間の後、循環は、例えば、心臓を通る灌流によって、あるいはその器官または組織のサンプルを取り出すことによって終結される(実施例I；米国特許第5,622,699号 前出、1997；PasqualiniおよびRuoslahti, Nature 380:364-

50

366 (1996) もまた参照のこと、これらは、本明細書において参考として援用される。) 。あるいは、カニューレが被験体の血管中に挿入され得、その結果、ライブラリーは適切な時間の灌流によって投与され、その後、そのライブラリーはカニューレを通して循環から取り出され得るか、またはその被験体が器官サンプルまたは組織サンプルを収集するために屠殺され得るか、あるいは麻酔にかけられ得る。ライブラリーはまた、被験体における適切な血管のカニューレーションによって、選択された器官または組織を含む1つまたはいくつかの器官または組織を通して分流され得る。ライブラリーがまた単離された灌流した器官または組織に投与され得ることが認識される。単離された灌流した器官または組織におけるこのようなパニングは、その器官または組織に結合する分子を同定するために有用であり得る。

10

【0060】

器官または組織のホーミング分子を同定するためのインビボパニングの使用は、マウスにおいてファージペプチド提示ライブラリーをスクリーニングすること、および網膜へホーミングするペプチドについて、ラットにおいて肺、脾臓、皮膚などに選択的にホーミングするペプチドを同定することによって、本明細書中で例示される（実施例 I および II）。しかし、例えば、抗体または抗体の抗原結合フラグメント（例えば、Fv、Fd、または Fab フラグメント）；増殖因子レセプターのようなホルモンレセプター；またはインテグリンまたはセレクチンのような細胞接着レセプターを含む、他のタンパク質分子を提示するファージライブラリーはまた、本発明を実施するために使用され得る。このような分子の改変体は、ランダム、部位特異的、またはコドンに基づく変異誘発のような周知の方法を使用して構築され得（Huse, 1993年11月23日に発行された米国特許第5,264,563号を参照のこと、これは本明細書中で参考として援用される）、そして所望であれば、ペプチドは、ファージの発現後であるが被験体への投与の前に、例えば、ジスルフィド架橋を導入することによって、化学的に改変され得る。従って、多くの異なるタイプのファージ提示ライブラリーが、インビボパニングによってスクリーニングされ得る。

20

【0061】

ファージ提示技術は、ランダムまたは選択的にランダムにされたペプチドの多様な集団を発現する手段を提供する。ファージ提示の種々の方法およびペプチドの多様な集団を産生する方法は、当該分野で周知である。例えば、Ladnerら（1993年6月29日に発行された米国特許第5,223,409号、これは本明細書中で参考として援用される）は、ファージの表面上の結合ドメインの異なる集団を調製する方法を記載する。特に、Ladnerらは、ファージ提示ライブラリーを産生するために有用なファージベクター、ならびに可能性のある結合ドメインを選択しそしてランダムにまたは選択的に変異した結合ドメインを産生する方法を記載する。

30

【0062】

同様に、SmithおよびScott (Meth. Enzymol. 217:228-257 (1993) ; ScottおよびSmith, Science 249:386-390 (1990) もまた参照のこと、その各々は本明細書中で参考として援用される) は、ファージペプチド提示ライブラリーを産生する方法（発現されるペプチドの集団を多様化させるベクターおよび方法を含む）を記載する（Huse, WO 91/07141およびWO91/07149もまた参照のこと、その各々は本明細書中で参考として援用される；実施例 I もまた参照のこと）。ファージ提示技術は、例えば、コドンに基づく変異誘発法とともに使用される場合、特に強力であり得、これはランダムペプチドまたはランダムにもしくは所望して偏ったペプチドを産生するために使用され得る（Huse, 米国特許第5,264,563号, 前出, 1993）。これらまたは他の周知の方法は、ファージ提示ライブラリーを産生するために使用され得、このファージ提示ライブラリーは、選択された器官または組織へホーミングするペプチドを同定するために、本発明のインビボパニング方法に供され得る。

40

【0063】

50

ファージ提示ライブラリーをスクリーニングすることに加えて、インビボパニングは、種々の他のタイプのライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。例えば、細胞表面レセプターに結合する核酸分子が記載されている (O'Connellら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5883-5887 (1996); TurkおよびGold、Science 249:505-510 (1990); Goldら、前出 (1995) を参照のこと、これらの各々は、本明細書において参考として援用される)。これらのインビトロの結果は、核酸分子のライブラリーもまた、インビボパニングによって試験されて、選択された器官または組織へホーミングする核酸分子を同定し得ることを示す。スクリーニングに適したさらなるライブラリーは、例えば、オリゴヌクレオチドライブラリー (Yorkら、Carb. Res. 285:99-128 (1996); Liangら、Science 274:1520-1522 (1996); および Dingら、Adv. Expt. Med. Biol. 376:261-269 (1995)、これらの各々は、本明細書において参考として援用される); リポタンパク質ライブラリー (de Kruijfら、FEBS Lett. 399:232-236 (1996)、これは、本明細書において参考として援用される。); 糖タンパク質または糖脂質のライブラリー (Karaogluら、J. Cell Biol. 130:567-577 (1995)、これは、本明細書において参考として援用される。); または化学物質ライブラリー (例えば、薬物または他の薬学的因子を含む) (Gordonら、J. Med. Chem. 37:1385-1401 (1994); EckerおよびCrook、Bio/Technology 13:351-360 (1995); これらの各々は、本明細書において参考として援用される。)。そのようなライブラリーは、所望であれば、タグ化され得、これは、以前に記載したように器官または組織からのその分子の回収あるいはその同定を容易にし得る。

【0064】

インビボパニングは、器官または組織へ選択的にホーミングし得る分子を直接同定する方法を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「ホーミングする」または「選択的にホーミングする」とは、特定の分子が、被験体への投与後にその器官または組織（特に、その器官または組織に存在する脈管）に存在する標的分子に比較的特異的に結合することを意味する。一般に、選択的ホーミングは、コントロール器官または組織と比較して、器官または組織への分子の少なくとも2倍（2×）大きな選択的結合を検出することによって、一部特徴づけられる。

【0065】

選択された器官または組織への分子の選択的ホーミングは、その器官または組織における細胞上に存在する細胞表面タンパク質のような、特定の細胞標的分子の分子による選択的認識に起因し得る。ホーミングの選択性は、1つまたはいくつかのみの異なる細胞型において発現される特定の標的分子に依存し、そのため、その分子は、1つまたはいくつかのみの器官または組織へホーミングする。この点に関して、ほとんどの異なる細胞型、特に、器官または組織について独特である細胞型は、独特の標的分子を発現し得る。従って、肝臓、脾臓またはリンパ節のような、その器官について特異的な細胞によって形成される洞様毛細血管を通じて血液が循環する器官において、インビボパニングは、その特定の器官または組織へホーミングする分子を同定するために有用であり得る。

【0066】

いくつかの場合には、分子は、器官または組織に非特異的に局在し得ることが認識されるべきである。例えば、ファージ提示ライブラリーのインビボパニングは、肝臓および脾臓のような器官において高いバックグラウンドを生じ得、これは細網内皮系 (RES) の顕著な成分を含む。従って、そのような器官または組織のRESによる取り込みに起因する分子の非特異的結合は、器官または組織のホーミング分子を同定することをより困難にし得る。しかし、本明細書において開示したように、潜在的な非特異的結合は、例えば、選択された器官または組織を収集する前に、心臓を灌流することによって、回避され得る（実施例I）。

【0067】

さらに、選択的ホーミングは、異なる個々のファージが器官または組織へホーミングする能力における相違を検出することによって、非特異的結合から容易に識別され得る。例えば、選択的ホーミングは、推定のホーミング分子（例えば、ファージ上に発現されたペプチド）と、過剰の非感染性のファージまたは選択していないペプチドを発現する約5倍過剰のファージとを組み合わせること、この混合物を、被験体に注射すること、およびその器官または組織のサンプルを収集することによって、同定され得る。後者の場合において、例えば、器官または組織のホーミングペプチドがその標的分子について満足するようなものではない程度に十分低い、注射されたファージの部分の場合、器官または組織において約20%を超えるファージがその推定のホーミング分子を含むということが決定されることは、そのファージによって発現されるペプチドが、選択的な器官または組織のホーミング分子であるという実証的な証拠である。さらに、非特異的な局在化は、例えば、推定の器官または組織のホーミングペプチドを発現するファージを、過剰量の「遊離」ペプチドと組み合わせて使用した競合実験を行うことによって、選択的なホーミングから識別可能であり得る（実施例 I I を参照のこと）。

10

【0068】

種々の方法が、RESの成分を含む器官または組織のような器官または組織への分子の非特異的な局在化を防止するために使用され得る。例えば、本明細書中に開示されるように、ファージ循環の開始直後に心臓を通した溶液の灌流は、バックグラウンドの結合を減少させ、そして肺および肝臓（これらの両方はRESの成分を含む）に選択的にホーミングするペプチドの同定を可能にした（実施例 I I を参照のこと）。さらに、ファージディスプレイライブラリーと、非複製性コントロールファージとの同時投与は、肝臓および脾臓のような器官（これらはまた、RESの成分を含む）において非特異的ファージ捕捉を減少させた。このアプローチは、肝臓へ選択的にホーミングする分子の同定を可能にした（実施例 I I）。従って、支持体に付着した分子のライブラリーは、過剰な支持体とともに被験体へ同時投与され、器官または組織における非特異的な結合を阻害し得る。

20

【0069】

RESの成分による非特異的取り込みはまた、RESによる取り込みを阻害するブロッキング剤を投与することによって防止され得る。例えば、ポリスチレンラテックス粒子またはデキストラン硫酸は、ライブラリーの投与前に被験体に投与され得る（Kalinaら、Nucl. Med. Biol. 20:171~174 (1993); Illumら、J. Pharm. Sci. 75:16~22 (1986); Takeyaら、J. Gen. Microbiol. 100:373~379 (1997)を参照のこと。これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。デキストラン硫酸500またはポリスチレンミクロスフェアのこのような前投与（pre-administration）は、肝臓のRES成分であるクッパー細胞による試験物質の非特異的取り込みをブロックするために使用されている（Illumら、前出、1986）。同様に、RESによる薬剤の非特異的取り込みは、炭素粒子またはシリカ（Takeyaら、前出、1977）またはゼラチンコロイド（Kalinaら、前出、1993）を使用してブロックされている。従って、RESによる非特異的取り込みを阻害するために有用な多くの方法が当該分野において公知であり、そして慣用的に使用される。

30

40

【0070】

非特異的ファージ捕捉を減少させる方法は、特定の器官または組織への低いバックグラウンド結合を示すファージの使用を含む。例えば、Merrillら（Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:3188-3192 (1996)、これは本明細書中で参考として援用される）は、RESによって取り込まれず、そして結果として延長された時間にわたり循環中に残存する、入型ファージを選択した。例えば、匹敵する糸状ファージ改変体は、類似の方法を使用して選択され得る。

【0071】

選択的ホーミングは、選択された器官または組織に対するホーミング分子が比較的特異的

50

であるか否かを決定することによって実証され得る。例えば、選択された器官または組織におけるホーミング分子の量は、コントロールの器官または組織、あるいは異なる器官または組織と比較され得る。選択的ホーミングはまた、インビボパニングの1ラウンドによって同定されるように、器官または組織へホーミングする分子が、インビボパニングのそれに続くラウンドにおいて富化されることを示すことによって、証明され得る。例えば、ペプチドCGFECVRQCPEERC（配列番号1）およびCGFELETC（配列番号2）を発現するファージを、肺からのインビボパニングの第2ラウンドおよび第3ラウンドのために富化し、そして選択されていないファージと比較した場合、それぞれ35倍および9倍の富化を示した（実施例II.Bを参照のこと）。さらに、腎臓または脳に対する選択的なホーミングは、検出されなかった。

10

【0072】

本明細書中で使用される場合、用語「選択された器官または組織」は、分子が選択的にホーミングされ得る、正常器官もしくは組織、または病状を有する器官もしくは組織（例えば、肺腫瘍を含む肺）を意味するその最も広い意味において使用される。従って、用語「器官または組織」は、正常な細胞型または癌細胞のような病的細胞型を含み、この場合選択された器官または組織は原発性腫瘍または転移病巣であり得る、任意の組織または器官を意味するように広く使用される。

【0073】

一般に、選択された器官または組織は、細胞（これは、脈管構造細胞であり得る）を含み、これは、ホーミング分子が結合し得る細胞表面タンパク質のような、特定の標的分子を発現する。少なくとも2ラウンドのインビボパニングを実施することによって、選択された器官または組織についての分子のホーミングの選択性が決定され得る。しかし、以下で議論されるように、いくつかの場合において、ホーミング分子は1つより多くの選択された器官または組織にホーミングし得、この場合において、この分子是一群の選択された器官または組織に選択的にホーミングし得ると考えられる。しかし一般に、本発明のホーミング分子の利点は特定の器官または組織の標的化を可能にすることであるので、1つより多くの、またはいくつかの異なる器官または組織にホーミングする分子は、特に有用ではない。

20

【0074】

用語「コントロールの器官または組織」は、選択された器官または組織以外の器官または組織を意味するために使用される。コントロールの器官または組織は、器官または組織のホーミング分子がコントロールの器官または組織にホーミングできない点で特徴付けられ、従って、コントロールの器官または組織は、選択された器官または組織への分子の選択的な結合を同定するために有用である（実施例II）。器官または組織のホーミング分子が、器官または組織における病的病巣にホーミングするその能力に基づいて同定される場合、コントロールの器官または組織は、病的病巣を示さない、選択された器官または組織の対応する部分であり得る。

30

【0075】

コントロールの器官または組織は、例えば、分子の非特異的結合を同定するため、またはこの分子のホーミングの選択性を決定するために収集され得る。さらに、非特異的結合は、例えば、器官または組織へホーミングしないことが公知であるが可能性のあるホーミング分子に化学的に類似するコントロール分子を投与することによって、同定され得る。あるいは、投与される分子が支持体に連結される場合、支持体単独の投与もまた、非特異的結合を同定するために使用され得る。例えば、ペプチド融合タンパク質を含まないファージが被験体に投与され得、そして選択された器官または組織がファージ支持体の非特異的結合のレベルを決定するために調べられ得る。

40

【0076】

被験体にライブラリーを投与する工程、選択された器官または組織を収集する工程、およびその器官または組織にホーミングする分子を同定する工程は、インビボパニングの単一のラウンドを構成する。必要ではないが、インビボパニングの1つ以上の追加のラウンド

50

が、一般的に実施される。インビボパニングの追加のラウンドが行われる場合、それまでのラウンドにおいて、選択された器官または組織から回収された分子が、被験体に投与され、この被験体は、その器官または組織の一部のみが収集されたそれまでのラウンドで使用された同じ被験体であり得る。

【0077】

インビボパニングの第2ラウンドを行うことによって、第1ラウンドから回収された分子の相対的な結合選択性は、同定された分子を被験体に投与する工程、選択された器官または組織を収集する工程、および第1ラウンド後に回収されたものと比較して、特定の分子を提示する、より多くのファージが、スクリーニングの第2ラウンド後に器官または組織から回収されるかどうかを決定する工程によって決定され得る。必要ではないが、コントロールの器官または組織もまた収集され得、そして選択された器官または組織から回収された分子は、コントロールの器官または組織から回収された分子と比較され得る。理想的には、たとえあったとしても、分子は、インビボパニングの第2ラウンドまたはその後のラウンド後にコントロールの器官または組織からほとんど回収されない。しかし、一般には、一定の割合の分子は、コントロールの器官または組織にも存在する。この場合には、コントロールの器官と比較した場合の、選択された組織または器官における分子の比（選択された：コントロール）が決定され得る。インビボパニングの追加ラウンドは、特定の分子が、選択された器官もしくは組織にのみホーミングするのか、あるいはもともと選択された器官もしくは組織において標的と同一であるかまたは標的に十分に類似する、1つ以上の他の器官もしくは組織において発現される標的を認識し得るのかを決定するために使用され得る。

【0078】

一般に、無作為なまたは選択的に無作為化された目的の分子の多様な集団を含む、分子のライブラリーが調製され、次いで被験体に投与される。投与のいくらかの時間の後、選択された器官または組織が収集され、そしてこの選択された器官または組織中に存在する分子が同定される（実施例Iを参照のこと）。所望であれば、1つ以上の、コントロールの器官または組織、あるいはコントロールの器官または組織の一部が同様にサンプリングされる。例えば、ファージペプチドディスプレイライブラリーを注射して約1～5分後のマウスを麻酔し、次いで素早く凍結するかあるいは心臓を通して灌流するかのいずれかでファージの循環を終結させた。肺、脾臓もしくは他の器官または組織および1つ以上のコントロールの器官をそれぞれから収集し、そして選択された器官およびコントロールの器官に存在するファージを収集した。それぞれの器官または組織に選択的にホーミングするペプチドを同定した（実施例IIおよび表1～11）。

【0079】

本明細書中において例示されるように、実験動物を屠殺して、選択された器官もしくは組織またはコントロールの器官もしくは組織を収集した。しかし、器官または組織にホーミングする分子を回収するために、その器官または組織の一部しか収集する必要はないことを理解するべきである。同様に、器官または組織の一部しかコントロールとして収集する必要がない。従って、例えば、分子のライブラリーの被験体への投与に続いて、選択された器官または組織の一部が生検によって収集され得、ホーミング分子が回収され得、所望であれば、インビボパニングの第2ラウンドのために、同じ被験体に増幅および再投与され得る。同じ被験体へ2回目に投与されるべき分子が、タグ化されるかまたは例えば支持体に連結される場合、そのタグまたは支持体は、スクリーニングのその後のラウンドを妨害しないように、生物学的に不活性かつ生分解性または排泄性（*excretable*）であるべきである。

【0080】

ファージライブラリーのインビトロスクリーニングは、以前に、抗体または細胞表面レセプターに結合するペプチドを同定するために使用された（SmithおよびScott、前出、1993）。例えば、ファージペプチドディスプレイライブラリーのインビトロスクリーニングは、インテグリン接着レセプター（Koivunenら、J. Cell B

10

20

30

40

50

i o l. 1 2 4 : 3 7 3 - 3 8 0 (1 9 9 4 a) 、これは参考として本明細書中に援用される)、およびヒトウロキナーゼレセプター (G o o d s o n ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. , U S A 9 1 : 7 1 2 9 - 7 1 3 3 (1 9 9 4) 、これは参考として本明細書中に援用される) に特異的に結合した新規ペプチドを同定した。同様に、核酸分子のインビトロスクリーニングは、抗体、細胞表面レセプターまたは有機分子に特異的に結合する分子を同定した (G o l d ら、前出、1 9 9 3 、1 9 9 5 、1 9 9 7) 。例えば、H I V - 1 逆転写酵素に特異的に結合するRNA分子は、精製されたH I V - 1 逆転写酵素を標的分子として使用して同定された (G r e e n ら、J. M o l. B i o l. 、2 4 7 : 6 0 ~ 6 8 (1 9 9 5) 、これは参考として本明細書中に援用される)。これらのインビトロ方法は、人工の系において、規定され、十分に特徴付けられた標的分子を使用して実施された。しかし、このようなインビトロ研究は、インビトロで結合する分子がまたインビボで標的に結合し得るか否かについての見識を提供しない。例えば、培養中で増殖させた内皮細胞は、その組織特異的差異を失う傾向にある (P a u l i および L e e 、L a b. I n v e s t. 5 8 : 3 7 9 ~ 3 8 7 (1 9 8 8) 、これは参考として本明細書中に援用される)。従って、インビトロで細胞上の標的に結合する分子は、インビボで結合しないかもしれない。なぜなら、この標的はこの細胞上に存在しないかもしれないからである。さらに、このようなインビトロ方法は、標的分子に関する事前の知識を必要とし、そしてインビボでの有用性に関する情報は、あるにしてもほとんど得られない点で制限される。例えば、G o o d s o n ら (前出、1 9 9 4) は、培養された細胞を利用して組換えウロキナーゼレセプターを発現させ、結合ペプチドを得た。しかし、このウロキナーゼレセプターは多くの異なる器官および組織の細胞において発現し、従って、ウロキナーゼレセプターに結合する分子は多くの器官または組織と相互作用し得、そして本発明の範囲内の器官または組織のホーミング分子とは考えられない。

【0081】

インビトロパニング法と対照的に、インビボパニングは、事前の知識も、インビボで発現される標的分子に結合する分子を同定するための公知の標的分子の利用可能性をも必要としない。また、「標的化されていない」器官または組織がスクリーニングの間に存在するので、ホーミングの選択性を欠失した器官または組織のホーミング分子を単離する見込みは、非常に減少する。さらに、インビボパニングによって器官または組織のホーミング分子を得る際に、例えば、代謝活性に起因してインビボでの循環における分解に対して特に感受性であり得る任意の分子が、選択され、そして回収されない。従って、インビボパニングは、インビボで選択的にホーミングする分子を同定することによって、以前の方法を超えて有意な利点を提供し、そして所望であれば、標的分子は、選択された器官または組織上に存在する。

【0082】

特定の器官または組織において、種々の正常組織および病的病巣に選択的にホーミングする、器官ホーミング分子の同定は、本明細書中で例示されるように、選択された器官または組織で発現される内皮細胞の特定の標的分子が、この器官または組織の生理学的状態または病理学的状態を反映することを示す。器官または組織において生じる特定の生理学的状態または病理学的状態に基づいてこの器官または組織に選択的にホーミングする、このような器官ホーミング分子は、インビボパニング法を使用して同定され得、そしてこの器官または組織の生理学的状態または病理学的状態に対するホーミング分子の選択性は、免疫組織学的分析によって確認され得る (実施例 I I I) 。例えば、膵炎に罹患した膵臓にホーミングする分子は、膵炎を有する被験体のインビボパニングによって同定され得、そしてホーミング分子の選択性は、正常膵臓におけるこの分子のホーミングと、膵炎を罹患した膵臓におけるホーミングとを比較する免疫組織化学を使用することによって、確認され得る。

【0083】

正常器官または組織あるいは病理学的状態を示す器官または組織に選択的であるホーミング分子は、病状の存在または非存在を検出するために有用であり得る。例えば、被験体に

対して画像化部分に結合体化された前立腺ホーミング分子の投与の後に、前立腺が可視化され得る。画像が異常な場合、例えば、前立腺のサイズが、大きさおよび年齢が一致する被験体に予測されるサイズとは異なる場合、この画像化の結果は、前立腺を冒す異常な生理学的状態または病理学的状態を示し得る。例えば、画像化剤、および正常な前立腺にはホーミングするが異常な前立腺にはホーミングしない前立腺ホーミング分子を含む結合体が、被験体に投与され得る。例えば、このホーミング分子を結合しない前立腺の領域の同定は、前立腺における異常な血流の出現を示し得、そして前立腺腫瘍の存在のような病理学的状態の診断であり得る。前立腺腫瘍組織にホーミングするが正常な前立腺にはホーミングしない分子を含む結合体は、前立腺腫瘍を直接的に画像化するために使用され得る。

【0084】

器官または組織について選択性のホーミング分子は、その器官または組織へ治療剤を送達するために使用され得る。薬剤のこのような選択的標的化は、その標的器官または標的組織へ送達される薬剤の有効量を増加し得る一方、その薬剤が他の器官または組織に対して副作用を有する可能性を低減させる。例えば、嚢胞性線維症患者の肺に対して、嚢胞性線維症膜貫通レセプター（CFTR）（これは、嚢胞性線維症において欠損している）をコードする遺伝子を送達するために肺ホーミング分子を使用し得る。従って、本発明の器官ホーミング分子は、インビボの遺伝子治療のために特に有用である。なぜなら、それらは遺伝子を所望の標的器官に対して方向づけるための手段を提供し、それによって標的細胞がその遺伝子を受容する可能性を増大し、そして正常な非標的である細胞が副作用を受ける可能性を低減するからである。肺ホーミング分子はまた、治療剤を肺に対して方向付けるために使用され得、それによって非標的器官または組織をその薬剤の毒性作用から免れさせる。例えば、肺胞細菌性肺炎において、肺ホーミング分子は、肺の罹患した領域へ抗生物質を方向付けるために有用であり得、従って所望の部位での薬物の有効量を増大させる。

【0085】

細胞性レセプター、および特定のレセプターに結合するリガンドの保存された性質に起因して、マウスもしくはラットにおいてインビボパンニングを使用して同定される器官または組織ホーミング分子がまた、ヒトもしくは他の哺乳動物種の選択された器官または組織において対応する標的分子に結合し得ることを当業者は理解する。実験的動物を使用して同定されるそのようなホーミング分子は、例えば、その分子がまた、ヒト被験体から得られる選択された器官または組織のサンプルに対してインビトロで選択的に結合し得ることを実証することによって、ヒト被験体の対応する器官または組織に結合するその能力について容易に試験され得る。あるいは、ヒト器官または組織由来の初代細胞または確立された細胞株は、そのホーミング分子のインビトロでの結合について試験するために使用され得る。同様に、特定のヒト器官もしくは組織の病理を反映する初代細胞または確立された細胞株は、その病理に対して選択的なホーミング分子の結合を試験するために使用され得る。ヒト病理の動物モデル（例えば、霊長類モデル）が公知であり、そしてインビボでのパンニングを使用する分子のホーミングについて試験するために使用され得る。従って、実験的動物におけるインビボパンニングを使用して同定された器官または組織ホーミング分子がまた、ヒト被験体における器官または組織特異的標的分子を結合し得ることを確認するために、慣用的な方法が使用され得る。さらに、選択された器官、組織、または病理を含むことが疑われるサンプルとのホーミング分子のインビトロ接触は、サンプルにおける選択された器官、組織、または病理の存在を同定し得る。インビボパンニングによって標的分子を同定したので、当業者はその標的分子が器官ホーミング分子についての真の標的であることを知り、従って、その標的分子をインビトロで使用して、インビボでその標的分子に対して特異的である可能性を有するさらなる器官ホーミング分子を同定し得るということを知る。次いで、そのような潜在能のある器官ホーミング分子をインビボパンニングによって試験して、器官ホーミング能力を確認し得る。

【0086】

インビボパンニングを使用して、肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎

10

20

30

40

50

、肝臓または腸、および肺腫瘍を含有する肺、または膵臓腫瘍を含有する膵臓に対して選択的にホーミングするファージによって発現されるペプチドを同定した（実施例 I I および I V；表 2～11 もまた参照のこと）。ファージの大きなサイズ（300 nm）、およびそのファージを循環させる時間の短さに起因して、実質的に多くのファージが循環系に存在していたことはないようである。実際、種々の器官および組織のホーミング分子の免疫組織化学的研究は、この分子が、血管系の内皮細胞表面マーカーに主にホーミングし、そしてそれに結合することを実証した。従って、本発明は、選択された器官または組織の血管系に選択的にホーミングするペプチドのような分子を提供する。

【0087】

ファージペプチド提示ライブラリーを、本質的に、Smith および Scott（前出、1993；Koivunen ら、Biotechnology 13：265－270（1995）；Koivunen ら、Meth. Enzymol. 245：346－369（1994b）もまた参照のこと。これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）に記載のように構築した。いくつかのライブラリーにおいて、システインをコードする少なくとも 1 つのコドンもまた各オリゴヌクレオチド内に含ませた。その結果、ジスルフィド結合を通して環状ペプチドを形成し得る（実施例 I）。インビボパンニングの実施に際して、肺、膵臓、皮膚、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓もしくは腸、または肺腫瘍を含有する肺、または膵臓腫瘍を含有する膵臓に対して選択的にホーミングするペプチドが得られた。従って、本発明は特定の器官または組織に対して選択的にホーミングする種々の器官ホーミング分子を提供する。

【0088】

注目すべきことに、インビボパンニング手順の 1 回の間に、いくつかの器官ホーミングペプチドは独立して 4 回以上まで回収された（例として、表 1 を参照のこと）。さらに、特定の器官または組織にホーミングする種々のペプチドは、保存されたアミノ酸配列モチーフを共有した。例えば、いくつかの肺ホーミングペプチドは GFE モチーフを共有し；いくつかの網膜ホーミングペプチドは RDV モチーフを共有し；そしていくつかの副腎ホーミングペプチドは、LPR モチーフを共有した（それぞれ、表 2、表 6、および表 11 を参照のこと）。例えば、トリペプチド RGD モチーフは、インテグリン結合に十分であることが公知であるので（Ruoslahti、Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 12：697（1996）；Koivunen ら、前出、1995；WO 95/14714）、本明細書中に開示されるこの結果は、多くのリガンド／レセプター相互作用は、トリペプチドと同じほど小さい認識モチーフからそれらの特異性を誘導し得ることを示す。

【0089】

【表 1】

10

20

30

表 1

種々の器官のインジボ標的化のまとめ

器官/モチーフ (配列番号)	全クローン中の モチーフの%	肺/脳 比率
<u>腸</u>		
YSGKWGK (9)	22	30
GISALVLS (19)	11	検出不能
SRRQPLS (153)	11	2
MSPQLAT (159)	11	検出不能
MRRDEQR (172)		
QVRRVPE (155)		
VRRGSPQ (164)		
GGRGSWE (167)		
FRVRGSP (169)		
RVRGPER (165)		
<u>肝臓</u>		
VKSVCRT (12)	11	検出不能
WRQNMPL (418)	6	検出不能
SRRFVGG (406)	6	検出不能
ALERRSL (408)		
ARRGWTL (405)		
<u>前立腺</u>		
SMSIARL (21)	6	34
VSFLEYR (22)	6	17
RGRWLAL (279)	6	検出不能
<u>副腎</u>		
LMLPRAD (27)	11	50
LPRYLLS (28)		
R(Y/F)LLAGG (404)		
RYPLAGG (389)		

10

20

30

(表1の続き)

器官/モチーフ (配列番号)	全クローン中の モチーフの%	肺/脳 比率
<u>卵巣</u>		
EVR SRLS (10)	22	3
FFAAVRS (295)		
VRAR LMS (301)		
RVGLVAR (11)	22	5
RVRLVNL (294)		
<u>脾臓</u>		
SWCEPGWCR (4)		20
<u>皮膚</u>		
CVALCREACGEGC (3)	9	7
CSSGCSKNCLEMC (181)	6	2
<u>肺</u>		
CTLRDRNC (15)	10	8
CGKRYRNC (20)	5	5
CLRPYLNC (45)	10	6
CGFELETC (2)	5	9
CIGVEVC (16)	5	6
CKWSRLHSC (65)	11	3
CWRGDRKIC (56)	8	2
CERVVGSSC (59)	9	4
CLAKENVVC (13)	13	2
CTVNEAYKTRMC (75)	22	3
CRLRSYGTL SLC (76)	5	0.4
CRPWHNQAHTC (82)	14	5
CGFECVRQCPERC (1)	40	60

開示された器官ホーミングペプチドの配列はいずれも、内皮細胞レセプターについての既知のリガンドと有意な類似性を示さなかった。多くの器官ホーミングペプチドが、より大きなペプチドまたはタンパク質内に含まれ得るが、そのより大きな分子上でホーミング機能をそれらが提供し得るか否かは公知ではない。しかし、より大きなペプチドおよびタンパク質内に存在する場合に、RGDがインテグリン結合を媒介するという以前の知見に基づいて、より大きなペプチドまたはタンパク質内に局在化された場合にそのようなホーミングペプチドおよびモチーフがホーミング機能を提供し得るということを当業者は認識する。しかし、そのような天然に存在する内因性のペプチドおよびタンパク質は、本発明内の器官または組織ホーミング分子であると見なされない。

【0090】

本明細書中に例示される器官または組織ホーミングペプチド分子は、サイズが長さ約7～13アミノ酸の範囲である。しかし、例えば、それ自体によりまたは大きなタンパク質内に存在する場合にインテグリン結合を媒介するRGDインテグリン結合モチーフの能力に基づいて、本発明の器官ホーミング分子がまた、有意により長いポリペプチド配列の状況下でそれらの器官ホーミング能力を維持することが予期され得ることが認識される。従っ

て、本発明の器官ホーミングペプチドは、少なくとも3アミノ酸、一般的には少なくとも6アミノ酸、または7以上のアミノ酸であり得、そして有意により長く、例えば、約20～50アミノ酸または100以上のアミノ酸であり得る。

【0091】

本発明は、CGFECVRQC PERC（配列番号1）およびCGFELET C（配列番号2）（これらは、GFEモチーフを共有する）；CTLRDRNC（配列番号15）；ならびにCIGEEVC（配列番号16；表1を参照のこと）（これは、CGFELET C（配列番号2）に存在するELEモチーフに類似性であるEVEモチーフを含む）のような肺ホーミングペプチドを提供する。例示された肺ホーミングペプチドは、CX₃CX₃CX₃C（配列番号25）、CX₇C（配列番号24）またはCX₆C（配列番号26）の環状ライブラリーのマウスへの注射によって同定された（実施例II）。肺ホーミングペプチドであるCGFECVRQC PERC（配列番号1）およびCGFELET C（配列番号2）は、選択されていないファージと比較した場合に、それぞれ60倍および9倍の富化を示し、腎臓または脳においてほとんどファージは検出されなかった（実施例II；図1および2、ならびに表1もまた参照のこと）。さらに、肺ホーミングペプチドであるCTLRDRNC（配列番号15）およびCIGEEVC（配列番号16）は、選択されていないファージよりもそれぞれ8倍および6倍の富化を示した（表1）。コグネイトCGFECVRQC PERC（配列番号1）ペプチドを発現するファージとのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST-）CGFECVRQC PERC（配列番号1）融合ペプチドの同時注射はホーミングを70%阻害し、そして（配列番号2）を発現するファージとのGST-CGFELET C（配列番号2）の同時注射は肺ホーミングを30%阻害した（図3）。肺ホーミングペプチドを提示するファージのマウスへの投与後の肺の免疫組織化学的染色は、肺胞毛細血管内の染色を明らかにした。肺のいずれの特定領域へのファージのホーミングについても明らかな優先性は観察されなかった；しかし、細気管支管腔壁またはいくつかのより大きな血管において（実施例III）、あるいは分析された多くの他の組織において、染色は全く観察されなかった。これらの結果は、インビボパンニングを使用して、肺内の内皮細胞特異性を同定および分析し、それによって示差的に肺を標的化するための手段を提供し得ることを示す。

【0092】

本発明はまた、CVALLCREACGEGC（配列番号3；表5）（これは、CX₃CX₃CX₃C（配列番号25）環状ライブラリーのマウスへの注射によって同定された（実施例II））のような皮膚ホーミングペプチドを提供する。皮膚ホーミングペプチド配列CVALLCREACGEGC（配列番号3）は、選択されていないファージよりも、ならびに脳および腎臓におけるバックグランドよりも皮膚に対して7倍の選択性を示した（図2；表1もまた参照のこと）。CVALLCREACGEGC（配列番号3）を発現するファージとのGST-CVALLCREACGEGC（配列番号3）の同時注射は、皮膚へのホーミングを55%阻害したが、GST単独との同時注射は、ホーミングに対して全く効果を有さなかった（図3Bを参照のこと）。皮膚ホーミングペプチドを提示するファージ投与後の皮膚の免疫組織化学的染色は、染色が皮下組織に局在化し；真皮には全く染色が観察されないことを明らかにした（実施例III）。

【0093】

本発明はさらに、SWCEPGWCR（配列番号4；表3）のような脾臓ホーミングペプチドを提供する。例示された脾臓ホーミング分子は、CX₇C（配列番号24）またはX₂CX₄CX（配列番号23）の環状ライブラリーのマウスへの注射によって同定された（実施例II）。脾臓ホーミングペプチドであるSWCEPGWCR（配列番号4）は、選択されていないファージおよび脳よりも脾臓に対して20倍の選択性を示した（表1；図2）。しかし、GST-SWCEPGWCR（配列番号4）の同時注射は、SWCEPGWCR（配列番号4）の脾臓ホーミングを阻害しなかった。これはおそらく、脾臓ホーミングペプチドに対するGSTの立体配座的効果に起因する。脾臓ホーミングペプチドを提示するファージの投与後の脾臓の免疫組織化学的染色は、染色が毛細血管および外分泌脾

臓のより大きな血管に局在化し；内分泌血管系において有意な染色が全く観察されなかったことを明らかにした（実施例 I I I）。この結果は、特定の器官内の組織学的および生理学的に識別可能な領域が、本発明の器官ホーミング分子に対する標的を提供する特有の標的分子を発現し得ることを実証する。従って、本発明の器官ホーミング分子は、選択された器官または組織の特異的領域を示差的に標的化するための手段を提供する。

【0094】

網膜ホーミングペプチド（例えば、C S C F R D V C C（配列番号5）およびC R D V V S V I C（配列番号6））もまた提供される（表6を参照のこと）。例示された網膜ホーミング分子は、C X₇C（配列番号24）環状ライブラリーのラットへの注射によって同定された（実施例 I I）。網膜ホーミングペプチドであるC S C F R D V C C（配列番号5）およびC R D V V S V I C（配列番号6）は、コントロール f d A M P L A Y 8 8 ファージと別々に注射された場合に、網膜においてそれぞれ3倍および2倍の富化を示した（実施例 I I）。しかし、免疫組織化学的染色は、網膜染色の欠如を明らかにした。これはおそらく、標的組織におけるこの網膜ホーミングファージの比較的多くない蓄積に起因する。

10

【0095】

本発明はまた、S M S I A R L（配列番号21）およびV S F L E Y R（配列番号22）（これらは、X₇（配列番号29）ライブラリーのマウスへの注射によって同定された）のような前立腺ホーミングペプチドを提供する（表7）。このペプチドは、正規の方法によってより単離された。前立腺ホーミングペプチドであるS M S I A R L（配列番号21）およびV S F L E Y R（配列番号22）は、脳と比較した場合に、前立腺へのホーミングにおいてそれぞれ34倍および17倍の富化を示した（表1）。

20

【0096】

X₇（配列番号29）ライブラリーのマウスへの注射によって同定された、R V G L V A R（配列番号11）およびE V R S R L S（配列番号10）のような卵巣ホーミングペプチドもまた提供される。このペプチドを、正規の方法によって単離した（表8）。卵巣ホーミングペプチドのR V G L V A R（配列番号11）およびE V R S R L S（配列番号10）は、各々、配列決定された40クローンの22%を含み、そして脳と比較した場合に卵巣においてそれぞれ5倍および3倍の富化を示した（表1）。

30

【0097】

本発明はまた、L P Rモチーフ（表11を参照のこと）を共有するL M L P R A D（配列番号27）およびL P R Y L L S（配列番号28）、またはモチーフL A G G（配列番号430；表10を参照のこと）を共有するペプチドR（Y/F）L L A G G（配列番号404）およびR Y P L A G G（配列番号389）のような副腎ホーミングペプチドを提供する。例示された副腎ホーミングペプチドを、X₇（配列番号29）ライブラリーのマウスへの注射によって同定した。このペプチドを、正規の方法によって単離した。この副腎ホーミングペプチドL M L P R A D（配列番号27）は、脳と比較した場合に副腎において50倍の富化を示した（表1）。

【0098】

肝臓ホーミングペプチドもまた提供される。そのようなペプチドを、X₇（配列番号29）ライブラリーのマウスへの注射によって同定した。このペプチドを、正規の方法によって単離した（以下の実施例 I I、表1、および表11を参照のこと）。

40

【0099】

さらに、A G C S V T V C G（配列番号315）のようなリンパ節ホーミングペプチドを提供する（以下の表9を参照のこと）。そのようなペプチドを、X₂C X₄C X（配列番号23）ライブラリーのマウスへの注射によって同定した。このペプチドを、正規の方法によって単離した。

【0100】

本発明はまた、X₇（配列番号29）ライブラリーのマウスへの注射によって同定された、Y S G K W G K（配列番号9）およびY S G K W G W（配列番号156）（表1および

50

4) (これらは、最後のアミノ酸位置においてのみ異なる) のような腸ホーミングペプチドを提供する。このペプチドを、正規の方法によって単離した。腸ホーミングペプチドの Y S G K W G K (配列番号 9) は、配列決定された 40 クローンの 22% で存在し、そして脳と比較した場合に腸において 30 倍の富化された (表 1)。さらに、V R R モチーフを共有する Q V R R V P E (配列番号 155) および V R R G S P Q (配列番号 164) のような腸ホーミングペプチドを、R G S モチーフを共有するペプチド V R R G S P Q (配列番号 164)、G G R G S W E (配列番号 167)、および F R V R G S P (配列番号 169) と同様に同定した。

【0101】

本発明の器官ホーミング分子は、部分に連結された器官ホーミング分子を含む結合体として特に有用である。従って、本発明の肺ホーミング分子、皮膚ホーミング分子、脾臓ホーミング分子、網膜ホーミング分子、前立腺ホーミング分子、卵巣ホーミング分子、リンパ節ホーミング分子、副腎ホーミング分子、肝臓ホーミング分子、または腸ホーミング分子は、部分に結合され得、そのような結合体は、この部分を特定の選択された器官に指向するために有用である。

【0102】

本明細書中で使用される用語「部分」は、器官ホーミング分子または組織ホーミング分子に連結される物理学的物質、化学的物質、または生物学的物質を意味するように広く使用される。一般に、器官ホーミング分子に連結される部分は、ホーミング分子に生物学的に有用な機能を与える。部分は、任意の天然または非天然の物質、例えば、ペプチドまたはポリペプチド配列、有機分子もしくは無機分子または有機組成物もしくは無機組成物、核酸分子、炭水化物、脂質、あるいはそれらの組み合わせからなり得る。

【0103】

部分は、物理学的物質、化学的物質または生物学的物質 (例えば、ウイルス、ウイルス遺伝子治療ベクター、細胞、リボソーム、マイクロカプセル、マイクロポンプまたは他の空洞のある (chambered) マイクロデバイス) であり得、これは、例えば、薬物送達系として使用され得る。一般に、このようなマイクロデバイスは、生物学的に不活性であるべきであり、所望であれば、生分解性または排出可能であるべきである。マイクロカプセルを含む種々の部分 (薬剤を含み得る)、および部分または空洞のあるマイクロデバイスを本発明の有機分子に連結させる方法は、当該分野で周知であり、そして市販されている (例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第 18 版 (Mack Publishing Co. 1990)、第 89-91 章; Harlow および Lane、Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988) を参照のこと、これらはそれぞれ本明細書において参考として援用される; Hermanson、前出、1996 もまた参照のこと)。部分のさらなる例は、当業者に公知であり、そしてそれらが本発明のホーミング分子に連結される場合に、生物学的に有用な機能を有する限り、この用語の意味に含まれることが意図される。

【0104】

選択された器官または組織に部分を指向する目的のために器官ホーミング分子にこの部分を連結することが、脳ホーミングペプチドの赤血球 (RBC) への連結 (ここで、このペプチドは、脳への RBC のホーミングを指向した) によって実証された (米国特許第 5,622,699 号、前出、1997)。これらの結果は、本発明の器官ホーミング分子または組織ホーミング分子が、この部分を選択された器官または組織に指向するために、別の部分に連結され得ることを示す。例えば、肝臓ホーミング分子または肺ホーミング分子は、C F T R 遺伝子をコードする核酸に連結され得、そして被験体への投与の際に、C F T R の発現が、それぞれ肝臓または肺に標的化される。同様に、肺ホーミング分子は、肺ホーミング分子およびプロテアーゼインヒビターを含む結合体を被験体に投与する際に、このプロテアーゼインヒビターが肺に標的化されるように、プロテアーゼインヒビターに連結され得る。そのような結合体は、例えば、肺における過剰なプロテアーゼ産生および

10

20

30

40

50

器官の自己消化によって特徴付けられる気腫を罹患する被験体を処置するために有用であり得る。

【0105】

本発明の器官ホーミング分子および組織ホーミング分子は、選択された組織または器官に、治療剤、診断剤、または画像化剤、タグまたは不溶性支持体、例えば透過性もしくは半透過性膜を含むリポソームまたはマイクロカプセル（ここで、選択された器官または組織に送達されるべき薬物のような薬剤は、リポソームまたはマイクロカプセル内に含まれる）を指向するために有用であり得る。当該分野において公知のこれらの部分および他の部分は、本明細書中に開示されるような本発明の結合体において、および本発明の方法において使用され得る。

10

【0106】

1つの実施態様において、部分は、選択された器官または組織の検出または可視化を可能にする、放射性核種または画像化剤のような検出可能な薬剤であり得る。従って、本発明は、検出可能な薬剤に連結された、肺ホーミング分子、皮膚ホーミング分子、脾臓ホーミング分子、網膜ホーミング分子、前立腺ホーミング分子、卵巣ホーミング分子、リンパ節ホーミング分子、副腎ホーミング分子、肝臓ホーミング分子、または腸ホーミング分子を含む結合体を提供する。選択される検出可能な薬剤の型は、適用に依存する。例えば、被験体における肺のインビボ診断画像化研究のために、肺ホーミング分子は、被験体への投与の際に被験体に対して外側で検出可能である薬剤に連結され得る。そのような内部器官または組織（例えば、前立腺）の検出のために、 γ 線放出放射性核種（例えば、インジウム-113、インジウム-115またはテクネチウム-99）は、前立腺ホーミング分子に連結され得、そして被験体への投与後に、固体シンチレーション検出器を用いて可視化され得る。あるいは、被験体の外部表面またはその近傍の器官または組織（例えば、網膜）について、フルオレセイン標識した網膜ホーミング分子は、網膜の内皮構造が検眼鏡（ophthalmoscope）および適切な光学システムを使用して可視化され得るよう

20

【0107】

器官または組織中の病理学的病変に選択的にホーミングする分子は、同様に、その病変のサイズおよび分布が可視化され得るよう適切な検出可能な薬剤に連結され得る。例えば、器官ホーミング分子または組織ホーミング分子が正常な器官または組織にホーミングするが、器官または組織における病理学的病変にホーミングしない場合、病理学的病変の存在は、器官または組織の異常な画像または異型の画像（例えば、病変領域における検出可能な薬剤の非存在）を同定することによって検出され得る。

30

【0108】

検出可能な薬剤はまた、インビトロにて検出を容易にする薬剤であり得る。例えば、適切な基質が存在する場合に可視シグナルを生じる酵素に連結されたホーミング分子を含む結合体は、ホーミング分子が指向される器官または組織の存在を検出し得る。そのような結合体（例えば、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼなどを含み得る）は、免疫組織化学のような方法において有用であり得る。そのような結合体はまた、例えば標的分子の精製の間に、サンプル中の器官ホーミング分子が結合する標的分子の存在を検出するために使用され得る。

40

【0109】

別の実施態様において、部分は治療剤であり得る。従って、本発明は、治療剤に連結された、肺ホーミング分子、皮膚ホーミング分子、脾臓ホーミング分子、網膜ホーミング分子、前立腺ホーミング分子、卵巣ホーミング分子、リンパ節ホーミング分子、副腎ホーミング分子、肝臓ホーミング分子、または腸ホーミング分子を含む結合体を提供する。

【0110】

治療剤は、本発明の器官ホーミング分子に連結される場合、選択された器官または組織の部位でその機能を働かせる任意の生物学的に有用な薬剤であり得る。例えば、治療剤は、連結された器官ホーミング分子に起因して標的細胞に連結される際に、それがその機能を

50

もたらし得る細胞によってインターナリゼーションを受ける有機低分子であり得る。治療剤は、所望される場合、選択される器官または組織における細胞生存、細胞増殖、または細胞死を刺激または阻害することに関与するタンパク質をコードする核酸分子であり得る。例えば、アポトーシスを阻害する Bcl-2 のようなタンパク質をコードする核酸分子を使用して、細胞生存を促進し得るが、アポトーシスを刺激する Bax のようなタンパク質をコードする核酸分子を使用して、標的細胞の細胞死を促進し得る。

【0111】

細胞死を刺激するのに特に有用な治療剤は、本発明の器官ホーミング分子に連結される場合に、過剰増殖性障害（例えば、癌）を処置するのに有用であり得るリシンである。本発明の器官ホーミング分子、および抗生物質（例えば、アンピシリン）または抗ウイルス剤（例えば、リバビリン）を含む結合体は、例えば、選択された器官または組織における細菌感染またはウイルス感染を処置するために有用であり得る。

10

【0112】

治療剤はまた、その発現または欠損が病理学に関連する生物学的分子の産生または活性を阻害または促進し得る。従って、プロテアーゼインヒビターは、器官ホーミング分子に連結される場合、選択された器官または組織（例えば、膵臓）でのプロテアーゼ活性を阻害し得る治療剤であり得る。選択された器官または組織におけるタンパク質の産生を補給または回復させ得る cDNA のような遺伝子またはその機能的等価物もまた、病理学の重篤度を改善するために有用な治療剤であり得る。治療剤はまた、その発現が有害なタンパク質の産生を阻害するアンチセンス核酸分子であり得るか、または有害なタンパク質の活性を阻害し得るドミナントネガティブタンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸分子であり得る。

20

【0113】

別の実施態様において、本発明は、タグに連結された肺ホーミング分子、皮膚ホーミング分子、膵臓ホーミング分子、網膜ホーミング分子、前立腺ホーミング分子、卵巣ホーミング分子、リンパ節ホーミング分子、副腎ホーミング分子、肝臓ホーミング分子、または腸ホーミング分子を含む結合体を提供する。タグは、例えば、クロマトグラフィーマトリクスのような不溶性支持体、またはビオチン、赤血球凝集素抗原、ポリヒスチジン、T7、もしくは当該分野において公知の他の分子のような分子であり得る。タグを含むそのような結合体は、器官ホーミング分子が結合する標的分子を単離するために有用であり得る。

30

【0114】

被験体に投与される場合、器官ホーミング分子および部分を含む結合体は、例えば、結合体および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物として投与される。薬学的に受容可能なキャリアは、当該分野で周知であり、そして例えば、水溶液（例えば、水または生理学的緩衝化生理食塩水）、あるいは他の溶媒またはビヒクル（例えば、グリコール、グリセロール、オイル（例えば、オリーブオイル）もしくは注射可能な有機エステル）を含む。

【0115】

薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、複合体の吸収を安定させるか、または増加させるように作用する、生理学的に受容可能な化合物を含み得る。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、炭水化物（例えば、グルコース、スクロースもしくはデキストラン）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸もしくはグルタチオン）、キレート剤、低分子量タンパク質、または他の安定剤もしくは賦形剤を含む。当業者には、薬学的に受容可能なキャリア（生理学的に受容可能な化合物を含む）の選択が、例えば、組成物の投与経路に依存することを理解する。薬学的組成物はまた、所望される場合、薬剤（例えば、ガン治療剤または他の治療剤）を含み得る。

40

【0116】

当業者は、器官ホーミング分子を含む薬学的組成物が、種々の経路（例えば、経口または非経口（例えば、静脈内）を含む）により被験体に投与され得ることを理解する。組成物は、注射または挿管により投与され得る。薬学的組成物はまた、例えば細胞死を促進また

50

は阻害する薬物を中共に取り込み得る部分（例えば、リポソームまたは他のポリマーマトリクス）に連結された器官ホーミング分子であり得る（Gregoriadis, Liposome Technology, 第1巻（CRC Press, Boca Raton, FL 1984）、これは、本明細書中に参考として援用される）。例えば、リン脂質または他の脂質からなるリポソームは、作製および投与するのが比較的簡単な、非毒性の、生理学的に受容可能、かつ代謝可能なキャリアである。

【0117】

本明細書中で開示される診断方法または治療方法の実施において、器官ホーミング分子を含む結合体の有効量が、被験体に投与されなければならない。「有効量」は、所望の効果を生じる結合体の量である。有効量は、例えば、器官ホーミング分子に連結された成分、および意図される用途に依存する。例えば、細胞殺傷が所望される場合、治療目的のために投与される放射性標識分子の量と比較して、より少ない量の放射性標識ホーミング分子が画像化に必要とされ得る。特定の目的のための特定結合体の有効量は、当業者に周知の方法を用いて決定され得る。

10

【0118】

器官分子の投与経路は、部分的に、器官ホーミング分子の化学構造に依存する。例えば、ペプチドは、それらが消化管において分解され得るので、経口的に投与される場合、特に有用ではない。しかし、ペプチドを内因性プロテアーゼによる分解にあまり受けないようにするか、または消化管を通してより吸収可能にするように、ペプチドを化学的に改変するための方法は、周知である（例えば、Blondelleら、前出、1995；Eck

20

【0119】

本発明は、肺、皮膚、脾臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸を含む結合体および検出可能薬剤を被験体に投与することにより、選択された器官または組織を同定する方法を提供する。検出可能成分結合体に連結される本発明の器官ホーミング分子を含む結合体は、被験体に投与され得、そして選択された器官または組織を同定または可視化するために用いられ得る。器官、特に内臓器官を可視化する能力は、選択された器官または組織の病状を診断する手段を提供する。例えば、インジウム-113に連結する前立腺ホーミング分子は、被験体に投与され、前立腺を画像化し得る。このような方法は、特に有益であり得る。なぜなら、前立腺を画像化するための方法は限定されているからである。前立腺の病理症状の存在は、前立腺の領域が結合体を含まず、従って、その領域への循環における異常を示すことを検出することによるか、または前立腺が異常に増大されるか、もしくはその正常な境界を欠くことを検出することにより明らかにされ得る。網膜のような器官または組織（検眼鏡を用いて直接可視化され得る）について、フルオレセ

30

40

【0120】

原則として、本発明の器官ホーミング分子は、分子の投与が直接の生物学的効果を提供するように固有の生物学的特性を有し得る。例えば、器官ホーミング分子は、器官ホーミング分子が天然のリガンドの活性を模倣する標的分子について天然に存在するリガンドと十分に類似であり得る。このような器官ホーミング分子は、天然のリガンドの活性を有する治療剤として有用であり得る。例えば、器官ホーミング分子が、選択された器官または組

50

織により発現されるレセプターを結合する成長因子（例えば、上皮増殖因子の活性を模倣する皮膚ホーミング分子）の活性を模倣する場合、器官ホーミング分子の投与は、器官または組織において細胞増殖を生じ得る。本発明の器官ホーミング分子のこのような固有の生物学的活性は、選択された器官または組織の細胞をホーミング分子と接触させること、および生物学的効果（例えば、細胞増殖、または固有の活性が毒性効果である場合、細胞死）の証明のために細胞を試験することにより同定され得る。

【0121】

さらに、本発明の器官ホーミング分子は、対応するリガンドがレセプターに結合し得ないように特定の標的分子を結合する固有の活性を有し得る。例えば、種々の型の癌細胞が特定の器官または組織に転移することは、癌細胞がその転移する器官内で標的分子に結合するリガンドを発現することを示すことが、公知である。従って、例えば、肺に転移する腫瘍を有する被験体への、肺ホーミング分子の投与は、潜在的に転移性の癌細胞が肺において樹立されたのを防ぐ手段を提供し得る。しかし、一般的に、本発明の器官ホーミング分子は、選択された器官または組織、特に肺、皮膚、膵臓、網膜、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸への成分の標的化に特に有用である。従って、本発明は、治療剤に連結する本発明の器官ホーミング分子を含む結合体を、病状を有する被験体に投与することにより、選択された器官または組織における病状を処置する方法を提供する。

【0122】

例えば、肺の特異的障害は、治療剤に連結する肺ホーミング分子を含む結合体を、被験体に投与することにより処置され得る。本発明の肺ホーミング分子は、肺の毛細血管および肺胞に局在化し得るので、これらの領域に関連する障害は、特に、肺ホーミング分子を含む結合体で処置することが可能である。例えば、細菌性肺炎は、しばしば肺の肺胞および毛細血管において始まる（RubinおよびFarber、Pathology 第2版、（Lippincott Co. , 1994））。従って、適切な抗生物質に結合体化された肺ホーミング分子は、肺炎を処置するために被験体に投与され得る。同様に、嚢胞性線維症は、CFTRの欠損に起因して、肺において病理的損傷を生じる。従って、CFTRをコードする核酸分子に結合体化される肺ホーミング分子の投与は、インビボにおける遺伝子治療処置方法として肺へ核酸分子を指向するための手段を提供する。

【0123】

本発明はまた、病理症状を有する被験体に、皮膚ホーミング分子および治療剤を含む結合体を投与することにより皮膚の病状を処置する方法を提供する。例えば、火傷の被災者は、上皮性増殖因子に連結した皮膚ホーミング分子を含む結合体または増殖因子に由来する血小板を投与され得、その結果、増殖因子が上皮性および深在真皮の再生または修復を促進し得、増殖因子は、皮膚に局在化される。さらに、本発明の方法は、抗生物質に連結される皮膚ホーミング分子を含む結合体を被験体に投与することによって、細菌性感染、特に皮下組織および真皮を通じて伝播する感染、またはそれらの領域に局在化される感染により生じる皮膚の病状を処置するために有用であり得る。

【0124】

本発明はまた、病状を有する被験体に、治療剤に連結する膵臓ホーミング分子を含む結合体を投与することにより、膵臓の病状を処置する方法を提供する。特に、本発明の膵臓ホーミング分子は、膵臓外分泌部に局在化し得るので、膵臓外分泌部に関連する病状は処置され得、そしてある場合には、膵臓内分泌部に有害に影響し得ない。本発明の方法は、分泌されたプロテアーゼが器官を傷害することにより生じる膵臓外分泌部の炎症性状態である急性膵炎を処置するために特に有用であり得る。プロテアーゼインヒビターに連結される膵臓ホーミング分子を含む結合体は、組織のプロテアーゼ媒介性崩壊を阻害するために用いられ得、従って、病状の重篤度を軽減する。このような結合体において有用な適切なプロテアーゼインヒビターは、膵炎に関連する酵素を阻害するものであり、これには、例えば、トリプシンのインヒビター、キモトリプシン、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼおよび膵臓リパーゼのインヒビターが挙げられる。本発明の方法はまた、膵臓にホーミングする分子に連結する治療剤を含む結合体を被験体に投与することにより、膵臓癌（

10

20

30

40

50

例えば、膵管癌)を有する被験体を処置するために用いられ得る。

【0125】

本発明の方法はまた、病状を有する被験体に、治療剤に連結する網膜ホーミング分子を含む結合体を投与することにより、眼、特に網膜の病理症状を処置するために用いられ得る。例えば、増殖性網膜症は、網膜虚血(例えば、糖尿病に起因する)に対する応答における網膜の新生血管形成と関連する。従って、アポトーシスを刺激する遺伝子(例えば、Bax)に連結する網膜ホーミング分子を含む結合体の投与は、増殖性網膜症を処置するために用いられ得る。同様に本発明の方法は、本明細書において開示される適切な器官または組織のホーミング分子を、単独かあるいは所望の成分と連結してかのいずれかで用いて、前立腺、卵巣、リンパ節、副腎、肝臓または腸の病状を診断または処置するために用いられ得る。

10

【0126】

器官または組織のホーミング分子は、例えば、選択された器官または組織に対して、治療剤または検出剤を標的化するために有用である。さらに、器官または組織のホーミング分子は、サンプル中の標的分子の存在を同定するために用いられ得る。本明細書中において用いる場合、用語「サンプル」は、身体から単離される細胞、組織、器官またはその部分を意味する最も広い意味で用いられる。サンプルは、例えば、生検により得られた組織切片もしくは標品もしくは組織培養に置かれるかまたはそれに適応される細胞であり得る。

【0127】

所望される場合、サンプルは、例えば、器官または組織のホーミング分子に結合する標的分子を単離するための最初の工程であり得るホモジナイズ(homogenization)により処理され得る。

20

【0128】

本明細書において開示されたように得られる器官ホーミング分子は、ホーミング分子により認識される標的分子(特に細胞表面タンパク質)の存在を同定するために、または標的分子を実質的に単離するために有用で有り得る。従って、本発明は、肺ホーミング分子、皮膚ホーミング分子、膵臓ホーミング分子、網膜ホーミング分子、前立腺ホーミング分子、卵巣ホーミング分子、リンパ節ホーミング分子、副腎ホーミング分子、肝臓ホーミング分子または腸ホーミング分子を選択的に結合する標的分子の同定の方法を提供する。このような方法は、選択された器官または組織(例えば、前立腺)のサンプルを前立腺ホーミング分子に接触する工程、そしてサンプルの成分の選択的結合を検出する工程を包含する。ここで、このような結合は、標的分子の存在を確認する。

30

【0129】

前立腺ホーミングペプチドのような器官または組織のホーミング分子は、タグ(例えばクロマトグラフィーマトリックスのような固体支持体)に連結され得る。次いで、固定された器官ホーミング分子は、特定の標的分子に対して前立腺ホーミング分子の特異的結合を可能にする条件下で、マトリックスを含有するカラムに、前立腺組織の適切に処理されたサンプルを通過させることによりアフィニティークロマトグラフィーに用いられ得る(例えば、Deutscher, Meth. Enzymol., Guide to Protein Purification (Academic Press, Inc., 編. M. P. Deutscher, 1990), 第182巻(これは、参考として本明細書において援用されている)を参照のこと;例えば、357~379頁を参照のこと)。未結合物質および非特異的結合物質は、取り除かれ得、そして標的分子(前立腺ホーミング分子と複合体を形成する)は、カラムから溶出され、そして実質的に単離された形態で収集される。次いで、実質的に単離された前立腺標的分子は、周知の方法を用いて特徴付けられ得る。器官または組織のホーミング分子はまた、検出可能な因子(例えば、放射性核種、蛍光分子、酵素または標識化ビオチンタグ)に連結され得、そして例えば、標的分子の存在を検出するためにか、またはその単離工程の間に標的分子を追跡するために、サンプルをスクリーニングするために用いられ得る。

40

【0130】

50

選択された器官または組織の標的分子を同定するために、器官または組織のサンプルを用いることに替えて、選択された器官もしくは組織に由来する培養細胞の抽出物、または培養された内皮細胞の抽出物が、開始物質として用いられ得る。標的分子を含有する細胞の選択は、結合アッセイおよび細胞接着アッセイを用いることにより決定され得る（Barryら、Nature Med. 2: 299~305 1996（これは参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。標的分子を含有するそれらの細胞は、上記のように、標的分子の単離および同定のための抽出物を調製するために用いられ得る。

【0131】

標的分子を発現する適切な細胞株を同定する際に、標的分子は、放射性標識されたアミノ酸を含有する培地中において細胞を増殖させることにより標識され得る。放射性標識化アミノ酸は、標的分子に組み込まれ、従って、これは、精製の間のその同定を容易にする。次いで、標識化細胞は、オクチルグルコシドで抽出され得、そしてこの抽出物は、セファロースのようなマトリックスに結合した胄臓ホーミング分子を用いて、アフィニティークロマトグラフィーにより分画され得る。例えば、ヒト臍静脈内皮細胞から調製された抽出物が、コントロールとして用いられ得る。次いで、精製された標的分子はマイクロ配列決定され得、そして抗体が調製され得る。所望の場合、オリゴヌクレオチドプローブが調製され得、そして標的レセプターをコードするcDNAクローンを単離するために使用され得る。あるいは、抗レセプター抗体を使用して、発現ライブラリーからcDNAクローンを単離し得る（Argavesら、J. Cell. Biol. 105: 1183-1190 (1987)（これは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【0132】

標的分子を生化学的に単離することに加えて、標的分子をコードする核酸が、例えば、標的分子を発現するクローンについての胄臓cDNA発現ライブラリーをスクリーニングするための化学的プローブとして胄臓ホーミング分子を用いることにより単離され得る。例えば、胄臓cDNAライブラリーを発現する細菌は、膜に付着され、溶解され、そして例えば、比色シグナルまたは蛍光シグナルを産生する酵素に結合体化された胄臓ホーミング分子を用いてスクリーニングされ得る。標的分子を発現している細菌性クローンは、同定され、そして標的分子をコードするcDNAが単離され得る。さらに、COS細胞系のような哺乳動物細胞発現クローニング系が、標的分子を同定するために用いられ得る。例えば、cDNAライブラリーは、発現ベクターにクローニングされ得る胄臓初代細胞由来のmRNAを用いて調製され得る。次いで、標的分子をコードするcDNAを発現している細胞は、例えば、プレートに付着する胄臓ホーミングペプチドに対する細胞クローンのパニングにより、プローブとして、胄臓ホーミングペプチドを用いて、選択され得る。あるいは、ファージは、胄臓ホーミングペプチドを提示するために用いられ得、そして、例えば、抗M13抗体（Pharmacia）を用いてコートされた磁気ビーズに付着され得る。次いで、胄臓ホーミングペプチドに結合する標的分子を発現する細胞が、回収され、そしてレセプターをコードするプラスミドが、単離され得る。回収されたプラスミド調製物はプール中へ分割され得、そしてCOS細胞トランスフェクションにおいて試験され得る。この手順は、COS細胞が胄臓ホーミングペプチドを結合するのを可能にする単一のプラスミドが得られるまで繰り返され得る。

【0133】

本発明はまた、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子を同定する方法を提供する。この方法は、膜ジペプチダーゼ（MDP）を1つ以上の分子と接触させる工程；および分子のMDPへの特異的結合を決定する工程を包含し、ここで特異的結合の存在により、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子として、その分子を同定する。本発明の方法において、膜ジペプチダーゼは、実質的に精製され得、そして例えば、支持体に固定され得る。この膜ジペプチダーゼは、任意の哺乳動物MDP（例えば、配列番号448を有するヒトMDP）であり得る。

【0134】

本明細書中に記載されるように、このCGFECVVRQCPCERC（配列番号1）ペプチ

10

20

30

40

50

ドは、静脈注射後、マウス肺血管系に選択的に結合し得る（実施例 I I A）。さらに、実施例 I V B に記載されるように、G F E - 1 (C G F E C V R Q C P E R C ; 配列番号 1) を選択的に結合する 5 5 k D a の肺細胞表面タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーを用いてラット肺抽出物から単離した。トリプシン処理による消化および質量分析による配列決定は、5 5 k D a のタンパク質由来の 2 つのペプチドが、ラット膜ジペプチダーゼ (E C 3 . 4 . 1 3 . 1 9) の一部分に完全に同一であることを明らかにした。さらなる実験が、ラットの肺細胞抽出物の G F E - 1 (配列番号 1) アフィニティー精製画分が、特異的 M D P 基質 G l y - D - P h e の D - P h e への時間依存的な変換によって示されるように、膜ジペプチダーゼ活性を有することを示した（実施例 I V C および図 5）。さらに、G F E - 1 ファージ (C G F E C V R Q C P E R C ; 配列番号 1) の、およびより少ない程度では、G F E - 2 ファージ (C G F E L E T C ; 配列番号 2) の、膜ジペプチダーゼでトランスフェクトされた C O S 細胞への結合は、関連しないペプチド配列を有するファージの結合より、有意に高かった（実施例 I V D および図 6 B）。このことは、膜ジペプチダーゼが G F E - 1 (配列番号 1) レセプターであることを示す。

【0135】

従って、本明細書中で開示されるように、肺メタロプロテアーゼ、膜ジペプチダーゼは、肺内皮に対する分子の選択的ホーミングについてのレセプターとして働く。膜ジペプチダーゼを標的化することによって、肺内皮に選択的にホーミングする分子の例証的な分類は、G F E モチーフ（例えば、C G F E C V R Q C P E R C (配列番号 1)）を保有するペプチドの分類である。

【0136】

膜ジペプチダーゼ（腎性ジペプチダーゼ、ミクロソームジペプチダーゼ、デヒドロペプチダーゼ-1、または M D P としてもまた知られ、そして近年 E C 3 . 4 . 1 3 . 1 9（以前は、E C 3 . 4 . 1 3 . 1 1）として分類された）は、形質膜グリコシルホスファチジルイノシトール固定化糖タンパク質である（Keynanら、Hooper編、Zinc Metalloproteases in Health and Disease Taylor and Francis, London、285-309頁（1996））、これは、本明細書中に参考として援用される）。このジンクメタロプロテアーゼ（これは主に、肺および腎臓刷子縁において発現される）は、インビボでは、グルタチオンの腎臓代謝、およびペプチジルロイコトリエンの肺代謝に関与する。さらに、M D P は、哺乳動物β-ラクタマーゼの唯一公知の例である。M D P は、ジスルフィド結合ホモダイマーを形成し、これは、起源種に依存して約 4 8 ~ 5 9 k D a の範囲の分子量のモノマーを有する（Keynanら、Biochem. 35:12511-12517（1996））、これは、本明細書中で参考として援用される；また実施例 I V B を参照のこと）。

【0137】

膜ジペプチダーゼの発現は、いくつかの組織において検出されているが、主に肺および腎臓において発現される。肝臓、脾臓、小腸および脳由来の全抽出物において低いレベルの M D P 活性の報告が存在しているが、他では、これらの器官において検出可能な活性は見出されていない。マウスにおいて、4 つの異なる M D P mRNA が存在し、そしてそれらは、いくつかの器官において示差的に発現される（Habibら、J. Biol. Chem. 271:16273-16280（1996））。ブタ M D P N 結合グリコシル化の性質および程度の器官特異的差異もまた、報告されている（Hooperら、Biochem. J. 324:151-157（1997））。

【0138】

腎臓において、M D P 発現は、近位細管の刷子縁領域における上皮細胞に制限される。肺において、M D P 発現は、内皮細胞ならびに誘導気道、肺胞管、毛細管、ならびに肺胞および終末細気管支の基底膜を含む、多くの細胞型において検出されている（Habibら、前出、1996）；Inamuraら、Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 50:85-92（1994））。M D P 発現はまた、ヒト気管における粘膜下微細血管の内皮細胞にお

いて観察されている (Yamayaら、Res p. Physiol. 111:101-109 (1998)。MDP活性のレベルは、肺において最も高い (Hirotaら、Eur. J. Biochem. 160:521-525 (1986) ; Habibら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4859-4863 (1998))。この発現パターンは、GFE-1 (配列番号1) のような分子の強力な肺の分子のホーミングと相関する。

【0139】

本明細書中で使用される、用語「膜ジペプチダーゼ」とは、「MDP」と同義であり、そして近年EC 3. 4. 13. 19 (以前はEC 3. 4. 13. 11) として分類され、そして腎性もしくはミクロソームのジペプチダーゼまたはデヒドロペプチダーゼ-1としてもまた公知である酵素をいう。この用語、膜ジペプチダーゼは、任意の哺乳動物の膜ジペプチダーゼ (例えば、ヒト、ブタ、マウス、ラットおよびウサギのホモログを含み、これらは、図9中の配列番号448~452に示されるアミノ酸配列を有する)、ならびにこれらのポリペプチドの1つに対して実質的なアミノ酸配列類似性を有する関連ポリペプチドを含む。このような関連ポリペプチドは、他のジンクメタロプロテアーゼまたはペプチダーゼ (例えば、ジペプチジルペプチダーゼIV) に対してよりも、配列番号448、449、450、451、または452に対してより大きな配列類似性を示し、そして、MDPの代替的にスプライスされた形態および図9に示されるアミノ酸配列のアイソタイプ改変体を含む。従って、用語MDPは、異なる哺乳動物種から得られた相同なポリペプチド、ならびに他の改変体および一般に配列番号448、449、450、451または452の約65%より大きな、好ましくは、約70%より大きな、およびより好ましくは約80%または90%より大きな、アミノ酸同一性を有する関連ポリペプチドを含む。本発明の方法は、好ましくは、ヒト膜ジペプチダーゼ (配列番号448) を使用する。

【0140】

膜ジペプチダーゼポリペプチドに関して本明細書中で使用される、用語「実質的に精製される」とは、ポリペプチドが、混入脂質、核酸、非関連ポリペプチドおよび細胞中で膜ジペプチダーゼと通常結合しない他の細胞物質を比較的含まない形態であることを、意味する。

【0141】

MDP結合ホーミング分子を同定するための本発明の方法は、インビボまたはインビトロで実施され得、そして膜ジペプチダーゼは多くの供給源から得られ得る。膜ジペプチダーゼの供給源としては、細胞全体あるいは内因性MDPまたは外因性MDPを含む細胞抽出物が挙げられる。MDPのさらなる供給源は、部分的に精製された細胞抽出物；生化学的に精製された酵素 (例えば、アフィニティー精製されたMDP) ；組換えポリペプチド；およびトランスフェクトされた細胞株を含む。

【0142】

アフィニティークロマトグラフィーは、本発明の方法における使用のための膜ジペプチダーゼを精製または部分的に精製するために特に有用であり得る。例えば、膜ジペプチダーゼは、実施例IVCにおいてマウスおよびラット膜ジペプチダーゼについて記載されるように、固定化GFE-1ペプチド (配列番号1) を使用して、アフィニティークロマトグラフィーによって肺細胞抽出物から精製され得る。同様に、膜ジペプチダーゼは、他の固定化リガンド (例えば、シラスタチン) を使用して、アフィニティークロマトグラフィーによって得られ得る。例えば、膜ジペプチダーゼは、Littlewoodら、Biochem. J. 257:361-367 (1989) ；およびCampbellら、J. Biol. Chem. 259:14586-14590 (1984) (これらの各々は、本明細書中で参考として援用される) に記載されるように、シラスタチン-セファロースアフィニティークロマトグラフィーに結合した細菌性ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC) による、MDPの選択的放出を通じて、2つの工程で効率的に精製され得る。

【0143】

組換え膜ジペプチダーゼもまた、本発明の方法において有用であり得る。種々のMDPホモログのアミノ酸配列および核酸配列は、当該分野において公知である。図9に示される膜ジペプチダーゼポリペプチドをコードする核酸配列は、例えば、GenBankのようなデータベースからかまたは文献（例えば、Genbank登録番号第D13139号および同第285150号；Adachiら、J. Biol. Chem. 265:3992-3995（1990）；Rachedら、1990；Keynanら、FEBS Letts. 349:50-54（1994）；Satoら、Biochim. Biophys. Acta 1163:234-242（1993）；Adachiら、Biochim. Biophys. Acta 1132:311-314（1992）；Anら、Biochim. Biophys. Acta 1226:337-340（1994）；なら
びにIgarashiおよびKarniski、Biochem. J. 280:71-78（1991）、これらの各々は、本明細書中に参考として援用される）から得られ得る。新規な膜ジペプチダーゼcDNAは、分子生物学の分野において周知の方法を使用して、ヌクレオチド配列を、プローブまたはプライマーとして用いて、さらなる哺乳動物種から単離され得る（Innisら（編）、PCR Protocols、San Diego:Academic Press、Inc.（1990）；Erllich、前出、1989；Sambrookら、前出、1989、これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。当業者は、MDPのコード核酸の発現および、後の組換えMDPポリペプチドの単離のための種々の方法を知っている。

【0144】

肺内皮へ選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子を同定するための本発明の方法において、分子のMDPへの特異的結合は、その分子を、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子として同定する。分子およびMDPに関して本明細書中で使用される用語「特異的結合」とは、その分子が、非特異的相互作用とは測定可能に異なるMDPの親和性を有することを意味する。特異的結合は、例えば、コントロール分子の結合と比較した分子の結合の決定によって、測定され得る。これは、一般的に、結合活性を有さない類似した構造の分子、例えば、GFEモチーフを欠失した類似した大きさのペプチドである。この場合、特異的結合は、分子がコントロール分子より、膜ジペプチダーゼに対して測定可能により高い親和性を有するかどうかを示される。結合の特異性はまた、例えば、MDPに結合することが公知であるコントロール分子（例えば、GFEモチーフを含むペプチド）との競合によって決定され得る。

【0145】

本明細書中で使用される用語、特異的結合とは、低い親和性特異的結合および高い親和性特異的結合の両方を含む。特異的結合は、例えば、膜ジペプチダーゼについて約 10^{-4} M～約 10^{-7} Mの K_d を有する低親和性MDP結合ホーミング分子によって提示され得る。特異的結合はまた、高い親和性MDP結合ホーミング分子（例えば、膜ジペプチダーゼについて少なくとも約 10^{-7} M、少なくとも約 10^{-8} M、少なくとも約 10^{-9} M、少なくとも約 10^{-10} M、または少なくとも約 10^{-11} Mもしくは 10^{-12} Mまたはそれより大きい K_d を有するMDP結合ホーミング分子）によって提示され得る。配列 X_1 -G-F-E- X_2 （配列番号17）（ここで X_1 および X_2 各々が独立して選択された1～10のアミノ酸である）を含むMDP結合ホーミングペプチドは、例えば、膜ジペプチダーゼについて約 2×10^{-5} M～ 10^{-7} Mの K_d 、例えば約 10^{-6} ～ 10^{-7} Mの K_d を有し得る。肺内皮に選択的にホーミングする、低親和性MDP結合ホーミング分子および高親和性MDP結合ホーミング分子の両方が、以下にさらに記載されるように、被験体において部分を肺内皮に選択的に指向するのに有用であり得る。

【0146】

種々の当該分野で公知の技術を用いて、本発明の方法に従う膜ジペプチダーゼへの分子の特異的結合を決定し得る。特異的結合に適切な条件が、例えば実施例IVBにおいて記載される。特異的結合はまた、MDP発現欠損細胞を、例えば、実施例IVDに記載されるように、MDPを用いてトランスフェクトすることによって決定され得る。この場合、特

異的結合は、一部には、分子の非トランスフェクト細胞への結合よりもMDPトランスフェクト細胞への結合が有意に高いことによって、決定される。

【0147】

本発明は、MDP結合分子が他の組織（例えば、腎臓）におけるMDP発現にも関わらず、肺血管系に特異的にホーミングするという、驚くべき発見に関する。本明細書中に開示されるように、MDP結合GFE-1（配列番号1）保有ファージのマウスの循環への注射によって、隣接細胞上でいくらかの拡散染色を伴って、ファージの肺微小血管系への迅速な結合を生じた。同じ結果が、GFE-1（配列番号1）保有ファージのラット循環への注射によって得られた。特に、例えば、MDP結合GFE-1ファージは、腎近位細管の刷子縁（高いレベルのMDPを発現する）に結合しなかった。これらの結果は、肺内皮細胞の管腔表面上のMDPの発現が、MDP結合ファージが循環から肺内皮へホーミングするのを媒介し得、一方、MDP結合ファージは、腎臓MDPに接近し得ずかつホーミングし得ないことを示す。従って、MDPは、分子が他の内皮細胞に優先して、肺内皮に選択的ホーミングすることを媒介する。

10

【0148】

GFE-1（配列番号1）保有ファージの肺血管系への選択的ホーミングは、ファージのような部分が、MDP結合ホーミング分子に結合され得、それによって肺内皮へ選択的に指向され得ることをさらに示す。従って、本発明は、肺の障害の処置のために肺内皮に対して、部分（例えば、ファージ、遺伝子治療ベクター、または抗生物質）を選択的に標的化する方法を提供する。

20

【0149】

被験体における部分を肺内皮に選択的に指向させるための本発明の方法は、肺内皮へ選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子に連結された部分を含む結合体を被験体に投与し、それによって、その部分が被験体中の肺内皮に選択的に指向される工程を含む。MDP結合ホーミング分子は、膜ジペプチダーゼ（MDP）を1つ以上の分子と接触させること；および分子のMDPとの特異的結合を決定することによって同定され、ここで、特異的結合の存在が、その分子を肺内皮へ選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子として同定する。本発明の方法は、例えば、肺炎；ぜん息；気腫；呼吸器感染；慢性気管支炎；慢性間質性肺疾患；肺癌；胸膜炎または嚢胞性線維症に罹患している被験体の肺への遺伝子または薬物を標的化することのために有用であり得る。所望される場合、本発明の方法は、予防的に、例えば部分を、肺障害の家族歴を有する個体、または例えば、肺感染に感受性の個体の肺内皮に選択的に指向させるように、使用され得る。

30

【0150】

肺内皮に選択的に指向されるべき部分は、物理的、化学的または生物学的材料（例えば、ウイルス、ウイルス遺伝子治療ベクター、細胞、リポソーム、マイクロカプセル、マイクロポンプまたは他のチャンバー化マイクロデバイス）であり得、これらは、例えば薬物送達システムとして使用され得る。このようなマイクロデバイスは、一般に、生物学的に不活性であり、そして所望される場合、これらは生分解性または排出可能であり得る。薬剤を含み得る種々の部分（マイクロカプセルを含む）、および部分またはチャンバー化マイクロデバイスを有機分子に連結させるための方法は、当該分野において周知であり、そして本明細書上に記載のように市販されている。治療用結合体を生成するために、肺内皮に選択的にホーミングするMDP結合ホーミング分子に連結され得る例示的な部分は、治療的抗菌性バクテリオファージ；アンピシリンのような抗生物質；およびリバビリンのような抗ウイルス剤を含む（上記を参照のこと）。

40

【0151】

本発明の方法に従って肺内皮に選択的に指向される部分は、例えば、治療的バクテリオファージ（「ファージ」）であり得る。ファージは、無毒であることが示されており（Ochsら、J. Clin. Invest. 50:2559-2568（1971）、これは本明細書中に参考として援用される）、そしてファージ療法の使用は、細菌感染（例えば、抗生物質耐性感染）の処置について当該分野で公知である（BarrowおよびSo

50

thill, Trends in Microbiology 5:268-271 (1997); Slopekら, Arch. Immunol. Ther. Exp. 35:553-561 (1987); および Merrillら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:3188-3192 (1996)、これらの各々は本明細書中に参考として援用される; Practical Applications of Bacteriophages CRC Press, Boca Raton, Florida もまた参照のこと)。例えば、抗生物質療法で首尾よく処置されなかった大部分である一連の550人の患者において、ファージ療法は、種々の感染（気道化膿性感染および気管支肺炎（broncopneumonia）（Slopekら、前出、1987）を含む）を軽減するにおいて75～100%の成功を生じた。ファージ療法は、院内感染および多剤耐性感染を処置するにおいて特に有用であり得る。

10

【0152】

研究は、予防および処置の両方ともが、細菌に接種するよりも少ないファージを使用して可能であることを示した。この研究は、ファージがインビボで増殖することを示す。従って、ファージ療法は、ファージがインビボで複製する能力のために、抗生物質（例えば、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、およびスルファフラゾール）による従来の処置より有効であり得る。所望であれば、MDP結合ホーミング分子を含有するファージ結合体での処置が、抗生物質薬物療法と組み合わせられ得る。

【0153】

好ましくは、肺内皮に選択的に指向されるファージ部分は、溶解性ファージである。このようなファージは、肺内皮に選択的に指向される結合体を生成するためにMDP結合ホーミングペプチド（例えば、GFE-1（配列番号1））をコードするように、標準的な遺伝子技術によって容易に改変され得る。本発明の方法において有用なファージは、例えば、T4関連ファージ（これはまた、「T偶数ファージファミリー」のメンバーとして公知である）を含む。当業者は、処置される感染に特徴的な細菌に対するレセプター特異性を有するファージ部分（例えば、Staphylococcus、Klebsiella、Proteus、Escherichia、Shigella、Pseudomonas、またはSalmonellaに対するレセプター特異性を有するファージ）が、選択されることを理解する。所望であれば、病原性細菌は、分類化され得、そしてファージ感受性についてモニタリングされ得る。耐性細菌の処置のために、ファージ結合体は、所望であれば、種々のタイプの細菌に対する異なるレセプター特異性を有するファージの混合物を含み得る。

20

30

【0154】

ファージ/MDP結合ホーミング結合体は、被験体に、例えば、静脈内で投与され得る。このような結合体はまた、例えば、各食事の一時間半前に、10ml滅菌ファージ溶解物として経口投与され得る。胃液が、Vichy水、重曹、またはゼラチンによって中和される。経口投与後、ファージ/MDP結合ホーミング結合体は、血液に接近し、続いて肺内皮に選択的に指向される。必要であれば、投与は、数週間または数ヶ月の期間にわたって毎日繰り返され得る。ファージ結合体の適当な用量は、当業者によって容易に決定され得、そして一般に、約100～約10¹⁰プラーク形成単位（pfu）、通常、約100～10⁶pfuの範囲内である。

40

【0155】

遺伝子治療のために肺内皮に選択的に指向される部分は、遺伝子治療ベクターであり得る。本明細書中で使用される用語「遺伝子治療ベクター」は、宿主細胞に送達されたとき、インビボでその宿主細胞においてコードされる遺伝子産物を一過的または永続的に発現する核酸成分を含有するベクターを意味する。

【0156】

MDP結合ホーミング分子を用いて肺内皮に選択的に指向され得る種々の遺伝子治療ベクターもまた、当該分野で公知である。このようなベクターには、ウイルスおよび非ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベ

50

クター (AAV)、ヘルペスウイルスベクター、およびリポソームプラスミドベクターが挙げられる (Chang, Somatic Gene Therapy CRC Press, Boca Raton, Florida (1995)、その各々は、本明細書中に参考として援用される)。レトロウイルスベクターおよびAAVベクターは、例えば、永続的な発現のために有用であり得、一方、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびリポソームプラスミドベクターは、一般に、一過性発現を与える。例えば、アデノウイルスベクターは、肺において、嚢胞性線維芽症膜貫通レセプター (CFTR) および組換え $\alpha 1$ -アンチトリプシンを発現させるために使用されている (Rosenfeldら、Cell、68:143 (1992); Rosenfeldら、Science 252:431 (1991)、これらの各々は、本明細書中に参考として援用されている)。リポソームDNA複合体もまた、肺への遺伝子移入を生じさせるために使用されている (例えば、Zhuら、Science 261:209 (1993) (これは、本明細書中に参考として援用されている) を参照のこと)。ファージベクターもまた、所望の核酸をインビボで発現させるために有用であり得る (例えば、Ivanenkovら、Biochimica et Biophysica Acta 1448:450-462 (1999); Ivanekovら、Biochimica et Biophysica Acta 1448:463-472 (1999) (これらの各々は、本明細書中に参考として援用されている) を参照のこと)。

【0157】

MDP結合ホーミング分子 (例えばGFE-1 (配列番号1)) を含有する結合体を用いて肺内皮に部分を選択的に指向させるための、本発明の方法は、種々の肺障害の治療的取り扱いにおいて有用であり得る。例えば、サイトカインをコードする遺伝子治療ベクターを肺内皮に選択的に指向させることにより、本発明の方法は、免疫療法のために有用であり得る。種々のサイトカインまたはケモカインは、本発明の方法に従って投与された場合、免疫応答 (例えば、抗癌免疫応答もしくは抗ウイルス免疫応答) の刺激において有用であり得る。このようなサイトカインまたはケモカインは、GM-CSF、G-CSF、IFN- γ 、IFN- α 、TNF- α 、TNF- β 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、リンホタクチン (lymphotactin)、またはDC-CK1 (Pardoll、Annu. Rev. Immunol. 13:399-415 (1995); Huntら、J. Immunotherapy 14:314-321 (1993); Chang、前出、1995、これらの各々は、本明細書中に参考として援用されている) を含む。本発明の方法は、循環中のサイトカインの半減期が短いことおよびそれらの肺への標的化がないことに起因して、組換えサイトカインの投与よりも有効であり得る。

【0158】

上記で考察したように、本発明の方法は、ファージ部分もしくは抗生物質薬物 (例えば、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、もしくはスルファフラゾール) を肺内皮へ選択的に指向させることにより肺感染を治療するために有用であり得る。例えば、本発明の方法は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) または嚢胞性線維症に続発性の感染を処置するために有用であり得る。

【0159】

肺内皮に部分を選択的に指向させるための、本発明の方法はまた、肺障害 (例えば、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠損および嚢胞性線維症) の置換遺伝子治療のために使用され得る (AltonおよびGeddes、Brit. J. Hosp. Medicine 58:38-40 (1997); Wood、Radiology 204:1-10 (1997)、これらの各々は、本明細書中に参考として援用されている)。野生型 $\alpha 1$ -アンチトリプシン ($\alpha 1$ -AT) および嚢胞性線維症膜貫通レセプター (CFTR) をコードする遺伝子が、単離されており (Riordanら、Science 245:1066-1073 (1989); Richら、Nature 347:358:63 (1990); Rosenfeldら、Science 252:431-434 (1991)、これらの

各々は、本明細書中に参考として援用されている）、そしてMDP結合ホーミング分子（例えば、GF E-1（配列番号1））に連結された遺伝子治療ベクターにおいて肺に選択的に移入され得る。

【0160】

1つの実施態様では、本発明は、部分を肺内皮に選択的に指向させる方法であって、ここでMDP結合ホーミング分子が配列 $X_1-G-F-E-X_2$ （配列番号17）（ここで、 X_1 および X_2 の各々は、1～10の独立して選択されたアミノ酸である）を含むペプチドである、方法を提供する。このようなMDP結合ホーミングペプチドは、例えば、配列CGFECVRQCPCERC（配列番号1）またはCGFEL ETC（配列番号2）を含み得る。

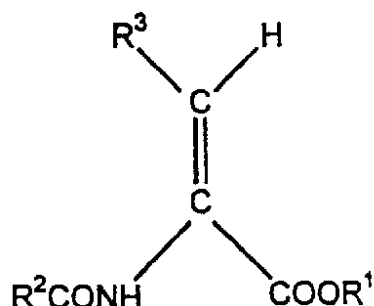
10

【0161】

別の実施態様では、本発明は、部分を肺内皮に選択的に指向するための方法であって、ここでMDP結合ホーミング分子が以下の構造1を含む、方法を提供する：

【0162】

【化4】



20

ここで R^2 および R^3 はそれぞれ、3～10炭素原子および1～15炭素原子の範囲の炭化水素ラジカルであり；これら R^2 または R^3 炭化水素鎖のいずれか一方で、1～6の水素が、ハロゲンで置換され得るか、または非末端メチレンが、酸素または硫黄（後者の酸化型を含む）で置換され得；さらに、 R^3 中の末端水素もまた、ヒドロキシルまたはチオール（これはアシル化またはカルバモイル化され得る）で置換され得；あるいは、水素が、アミノ（これは、アシルアミノ、ウレイド、アミジノ、グアニジノ、もしくはアルキルにおけるように誘導体化され得る）または置換アミノ基（第4級窒素基（grouping）を含む）で置換され得る；あるいは、酸基（例えば、カルボン酸基、ホスホン酸基、またはスルホン酸基）またはそれらのエステルもしくはアミド、またはシアノによる置換が存在し得る；あるいは、それらの組み合わせ（例えば、末端アミノ酸基を含む）；そして R^1 は、水素もしくは低級アルキル（ C_{1-6} ）もしくはジアルキルアミノアルキル、または薬学的に受容可能なカチオンである。このようなMDP結合ホーミング分子は、例えば、7-（L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ）-2-（2,2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-2-ヘプテン酸（heptenoic acid）（シラスタチンとしても公知である）であり得る。

30

40

【0163】

MDP結合ホーミング分子は、例えば、 R^2 が、カルボニルに隣接した炭素が第三級であり得ないという限定を伴う、分枝アルキルまたはシクロアルキルである、構造1を有する化合物であり得る。

【0164】

MDP結合ホーミング分子はまた、例えば、 R^2 が、カルボニルに隣接した炭素が第三級であり得ないという限定を伴う、分枝アルキルまたはシクロアルキルであり、そして R^3 が、 n -アルキル（1～9炭素）、または第4級窒素、アミン誘導体、もしくはアミノ酸誘導基である末端置換基を有する n -アルキル（1～9炭素）である、構造1を有する化

50

化合物であり得る。MDP結合ホーミング分子は、例えば、例えば、 R^2 が、2, 2-ジメチルシクロプロピルまたは2, 2-ジクロロシクロプロピルであり、そして R^3 が、末端置換基を有さない3~7炭素原子の炭化水素鎖であるか、またはトリメチルアンモニウム、アミジノ、グアニジノもしくは2-アミノ2-カルボエチルチオである末端置換基を有する3~7炭素原子の炭化水素鎖である、構造1を有する化合物であり得る。

【0165】

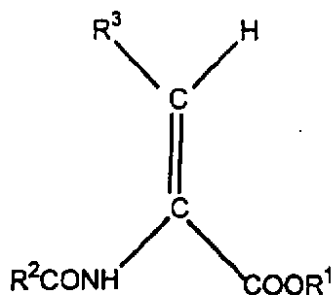
本発明において有用である、構造1を有する例示のMDP結合ホーミング分子には、以下が含まれる：Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-ウレイド-2-オクテン酸；Z-8-(1-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸（ラセミ型および右旋性型）；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸；および6-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘキセン酸。

【0166】

上述のように、肺に処置を標的化するための、本発明の方法は、MDP結合ホーミング分子を用いて実施され得、このMDP結合ホーミング分子は、以下の構造1を有する、Z-2-アシルアミノ-3-モノ置換プロペネートである：

【0167】

【化5】



ここで R^2 および R^3 はそれぞれ、3~10炭素原子および1~15炭素原子の範囲の炭化水素ラジカルである。これら炭化水素ラジカル R^2 および R^3 のいずれか一方で、6までの水素が、ハロゲンで置換され得るか、または非末端メチレンが、酸素または硫黄（後者の酸化型を含む）で置換され得る。

【0168】

R^3 中の末端水素もまた、ヒドロキシル基またはチオール基（これはアシル化（例えば、1~8炭素原子のアルカノイル酸を有するように）またはカルバモイル化（アルキルおよびジアルキルカルバメート誘導体を含む）され得る）で置換され得；あるいは、水素が、アミノ基（これは、アシルアミノ、ウレイド、アミジノ、グアニジノ、またはアルキルもしくは置換アルキルアミノ基（第4級窒素基を含む）におけるように誘導体化され得る）で置換され得る；あるいは、酸基（例えば、カルボン酸基、ホスホン酸基、またはスルホン酸基）またはそれらのエステルもしくはアミド、ならびにシアノによる置換が存在し得る；あるいは、それらの組み合わせ（例えば、末端アミノ酸基を含む）。

【0169】

構造1を有するMDP結合ホーミング分子において、 R^2 は、好ましくは、カルボニルに隣接した炭素が第三級であり得ないという限定を伴う、分枝アルキルまたはシクロアルキルラジカル (C_{3-10}) である。 R^3 が、1～4炭素原子の直鎖低級アルキルである場合、 R^2 は、フェニルまたは1～4炭素原子の直鎖低級アルキルではあり得ない。 R^1 は、水素、低級アルキル (C_1-C_6) またはジアルキルアミノアルキル (例えば、 $-CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)N(CH_3)_2$) である。

【0170】

上記構造1を有するMDP結合ホーミング分子は、不斉型を有し得る。ラセミZ-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸が、分離されている。活性は、右旋性異性体に存在する。これはS-配置を有する。

10

【0171】

構造1を有する化合物の R^2 の定義において、以下の部分基が含まれる：

$-R^4$

ここで、 R^4 は、3～10炭素原子の直鎖、分枝、または環状の炭化水素ラジカルであり、これは、 R^2 の定義において上述したように置換され得る；

$-R^5R^6$

ここで、 R^5 は、3～6炭素原子のシクロアルキルであり、そして R^6 は、結合してシクロアルキル基上に別の環を形成し得る1または2のいずれかのアルキル置換基であるか、あるいは、 R^5 および R^6 は、 R^2 の定義において上述したように置換され得る；そして

20

$-R^7R^8$

ここで、 R^7 は、1～3炭素原子のアルキレン基であり、そして R^8 は、3～6炭素原子のシクロアルキルであり、この炭素原子は、 R^2 および R^3 の定義において上述したように置換され得る。

【0172】

構造1における R^2 の定義内で特に好ましい置換基は、2, 2-ジメチルシクロプロピル基および2, 2-ジクロロシクロプロピル基を含む。

【0173】

構造1における R^3 の定義内で、化合物の特に好ましい群は、n-アルキル (1～9炭素)、および4級窒素、アミン誘導体、またはアミノ酸由来基である、末端置換基を有するn-アルキル (1～9炭素) を含む。

30

【0174】

用語「4級窒素」は、構造1に関して、正に帯電した4置換型 (tetrasubstituted) 窒素または複素環式芳香族の窒素を意味するために本明細書中で使用される。これは1～7個の炭素原子を有する炭化水素基 (それらは同じまたは異なり得る) で置換された、アンモニウム部分を意味する。

【0175】

構造1に関して本明細書中で使用されるように、用語「アミノ誘導体」とは、そのアミノ誘導体、アシルアミノ誘導体、ウレイド誘導体、アミジノ誘導体、グアニジノ誘導体およびアルキル (1～7個の炭素原子) 誘導体のような基を意味する。

40

【0176】

構造1に関して本明細書中で使用されるように、用語「アミノ酸由来基」とは、システイニル ($-SCH_2CH(NH_2)COOH$) またはサルコシル ($-N(CH_3)CH_2COOH$) のような部分を意味し、ここで、公知のアミノ酸O、NまたはSに結合する水素は置換される。

【0177】

構造1を有する特に好ましいMDP-結合ホーミング分子は、 R^2 が2, 2-ジメチルシクロプロピルまたはジクロロシクロプロピルであり、かつ R^3 が末端置換基を有さない3～7個の炭素原子の炭化水素鎖であるか、あるいはトリメチルアンモニウム、アミジノ、グアニジノ、または2-アミノ-2-カルボキシエチルチオである末端置換基を有する3

50

～7個の炭素原子の炭化水素鎖である、ホーミング分子である。

【0178】

本発明において有用な模範的なMDP-結合ホーミング分子は、以下を含む；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキシアミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-8-トリメチルアンモニウムヒドロキシド-2-オクテン酸内部塩；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-ホルムアミジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-8-ウレイド-2-オクテン酸；Z-8-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；Z-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸（ラセミ型および右旋回型）；Z-2-(2, 2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド)-2-オクテン酸；7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸；および6-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘキセン酸。

10

【0179】

構造1を有するMDP-結合ホーミング分子を調製するための方法は、本明細書中に開示され、そして当該分野で公知である。このようなMDP-結合ホーミング分子を調製するためのいくつかの方法は、実施例VIに示される（また、Kahanらに対する米国特許第4,616,038号（本明細書中で参考として援用される）も参照のこと）。

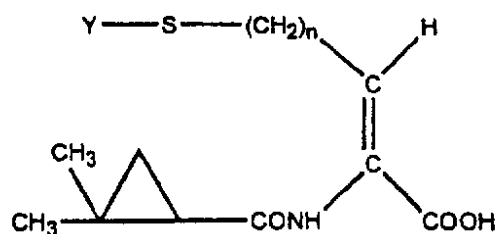
20

【0180】

当該分野で公知のさらなるMDP-結合ホーミング分子もまた、本発明の方法に従って、肺内皮に対して選択的に遺伝子または医薬を標的にするために使用され得る。このようなMDP-結合ホーミング分子は、以下の構造2：

【0181】

【化6】



30

を含む、置換型2-アルケン酸（ここで、nは3～5までの整数であり、かつYは複素環式基またはフェニル基であり、これは置換されてもよく、置換されなくてもよい）、ならびに低級アルキル（C₁～C₆）エステルおよびその薬学的に受容可能な塩を含む。

40

【0182】

構造2に関して本明細書中で使用されるように、用語「複素環式」とは、ピリジル、ピリミジニル、テトラゾリル、イミダゾリル、チアゾリニルなどを意味する。このような複素環式環およびフェニル環は、置換されなくてもよく、あるいはヒドロキシル、オキソ、カルボニル、またはメチルで置換されてもよい。構造2におけるY基としては、例えば、2-ピリジニル；4-ピリジニル；3-ヒドロキシ-2-ピリジニル；3-カルボキシ-2-ピリジニル；5-カルボキシ-2-ピリジニル；2-カルボキシフェニル；1-メチル-1, 2, 3, 4-テトラゾール-5-イル；および4-カルボキシ-6-ヒドロキシ-2-ピリミジニルが挙げられる。

【0183】

50

構造 2 を有する置換型 2-アルケン酸 MDP-結合ホーミング分子のシクロプロピル中心の立体配置は、好ましくは、S (+) であるが、化合物の R, S (+/-) ラセミ混合物もまた、本発明の方法において使用され得る。

【0184】

このクラスの特に活性な MDP-結合ホーミング分子は、n が 4 であり、かつ Y が 3-カルボキシ-2-ピリジルまたは 3-ヒドロキシ-2-ピリジル（各々 S 形態の）である、ホーミング分子である。構造 2 を有する模範的な MDP-結合ホーミング分子は、以下を含む：Z-7-（3-ヒドロキシ-2-ピリジルチオ）-2-（2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキシアミド）-2-ヘプテン酸および Z-（5-カルボキシ-2-ピリジルチオ）-2-（2, 2-ジメチルシクロプロパンカルボキシアミド）-2-ヘプテン酸。

10

【0185】

構造 2 を有する MDP 結合ホーミング分子、ならびに種々の薬学的に受容可能な誘導体（例えば、アルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩またはアミン塩など（これらもまた本発明において有用である））は、慣用的な方法を使用して当業者により調製され得る。構造 2 を有する MDP-結合ホーミング分子は、例えば、A s h t o n に対する米国特許第 4, 406, 902 号（これは、本明細書中に参考として援用される）に記載のように、例えば、プロモアルケン酸を適切なメルカプタンである Y S H と、周囲温度で炭酸水素ナトリウム存在下の水中で縮合することにより調製され得る。

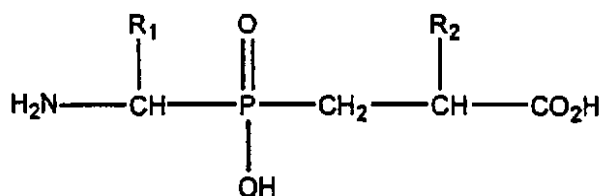
20

【0186】

本発明において有用である MDP-結合ホーミング分子はまた、以下の構造 3：

【0187】

【化 7】

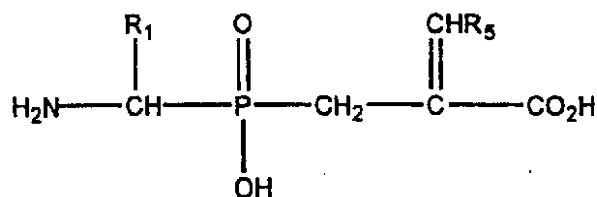


30

または以下の構造 4：

【0188】

【化 8】



40

を有するホスフィン酸であり得、
ここで：

R₁は、

- (a) C₂~C₁₂の直鎖または分枝の非置換型アルキル；
- (b) C₂~C₁₂の直鎖または分枝の置換型アルキル；
- (c) C₂~C₁₂の直鎖または分枝のモノアルケニル；

50

- (d) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のアルキニル；
 - (e) $C_7 \sim C_{20}$ のアラルキルであって、ここで、そのアルキル鎖が直鎖または分枝の $C_1 \sim C_8$ であり、かつそのアリアル部分が $C_6 \sim C_{12}$ である、アラルキル；
 - (f) $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル；
 - (g) $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルキルアルキル（構造4に対してのみ）；
- であって、ここで、(a)を除いて、 R_1 についての上記の価が、以下： $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルオキシ、 $C_1 \sim C_4$ のアルキルチオ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルチオ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルチオ、 $C_7 \sim C_{10}$ のアラルキルオキシ、 $C_7 \sim C_{16}$ のアラルキルチオの1以上のものにより置換され得；

R_2 は、

10

- (a) Hまたは $C_1 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のアルキル；
- (b) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のモノアルケニル；
- (c) $C_7 \sim C_{20}$ のアラルキルであって、ここで、そのアルキル鎖が直鎖または分枝の $C_1 \sim C_8$ であり、かつそのアリアル部分が $C_6 \sim C_{12}$ である、アラルキル；
- (d) 複素環式アルキルであって、ここで、そのアルキル鎖が直鎖または分枝の $C_1 \sim C_8$ であり、かつその複素環部分は5～6員の、必要に応じて、ベンゼン環と融合される完全芳香族であり、以下：O、NまたはSのヘテロ原子の1～2個を含む、複素環式アルキル；

- (e) $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル；
- (f) $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルキルアルキル；

20

であって、ここで、 R_2 についての上記の価が、以下：ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $C_1 \sim C_4$ のアルコキシカルボニル、 $C_7 \sim C_{16}$ のアリアルアルコキシカルボニル、 $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル、 $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルチオ、アミノ、 $C_1 \sim C_8$ のモノーまたはジールキルアミノ、チオ、 $C_1 \sim C_4$ のアルキルチオ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルチオ、 $C_7 \sim C_{16}$ のアラルキルチオ、またはラジカルー $S - (CH_2)_n - CH(NH_2)COOH$ に示す1以上のものにより置換され得；

R_5 は、

- (a) Hまたは $C_1 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のアルキル；
- (b) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のモノアルケニル；
- (c) $C_7 \sim C_{20}$ のアラルキルであって、ここで、そのアルキル鎖が直鎖または分枝の $C_1 \sim C_8$ であり、かつそのアリアル部分が $C_6 \sim C_{12}$ である、アラルキル；
- (d) 複素環式アルキルであって、ここで、そのアルキル鎖が直鎖または分枝の $C_1 \sim C_8$ であり、かつその複素環部分は5～6員の、必要に応じて、ベンゼン環と融合される完全芳香族であり、以下：O、NまたはSのヘテロ原子の1～2個を含む、複素環式アルキル；

30

- (e) $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルキルアルキル；
- (f) $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル；

であって、ここで、 R_5 についての上記の価が、以下：ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $C_1 \sim C_4$ のアルコキシカルボニル、 $C_7 \sim C_{16}$ のアリアルアルコキシカルボニル、 $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル、 $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ のシクロアルキルチオ、アミノ、 $C_1 \sim C_8$ のモノーまたはジールキルアミノ、チオ、 $C_1 \sim C_4$ のアルキルチオ、 $C_6 \sim C_{12}$ のアリアルチオ、 $C_7 \sim C_{16}$ のアラルキルチオ、またはラジカルー $S - (CH_2)_n - CH(NH_2)COOH$ に示す1以上のものにより置換され得る；

40

そして、その構造3および4のMDP-結合立体異性体ならびにラセミ化合物を含む、ホスフィン酸であり得る。

【0189】

構造3または4を有するMDP-結合ホーミング分子において、(a) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝の非置換型アルキルについての R_1 の価は、エチル、プロピル、イソプロピル

50

、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、イソオクチル、*n*-デシル、*n*-ウンデシル、*n*-ドデシルなどを含む。この系列においては、*n*-ブチル、イソブチル、*n*-ペンチルおよび*n*-ヘキシルが好ましい。

【0190】

構造3または4を有するMDP-結合ホーミング分子において、(b) $C_1 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝の置換型アルキルについての R_1 の価は、上記に定義された置換基により置換された、 R_1 (a)についての上記の価を含み、これは以下の好ましい置換基を含む：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、ブチルチオ、シクロペンチルオキシ、シクロペンチルチオ、シクロプロピルチオ、ベンジルチオ、2-フェネチルチオ、2-フェネチルチオなど。

10

【0191】

構造3または4を有するMDP-結合ホーミング分子において、(e) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のモノアルキルについての R_1 の価は、エチニル、プロピニル、1-ブテニル、2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、2-メチル-2-ブテニルなどを含む。

【0192】

構造3または4を有するMDP-結合ホーミング分子において、(d) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のアルキニルについての R_1 の価は、エチニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、2-メチル-3-ペンチニルなどを含む。

20

【0193】

(d) $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖または分枝のアルキニルについての R_1 の価は、エチニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、2-メチル-3-ペンチニルなどを含む。

【0194】

(e) $C_7 \sim C_{20}$ のアラルキルについての R_1 の価は、ベンジル、2-フェニルエチル、1-フェニルエチル、4-メチルフェニル-メチルなどを含む。この系列においては、ベンジルが好ましい。

【0195】

(f) $C_4 \sim C_{10}$ のシクロアルキルアルキルについての R_1 の価は、以下を含む：シクロヘキシルメチル、シクロペンチルメチル、2-シクロヘキシルエチル、2-シクロオクチルエチルなど。この系列においては、シクロペンチルメチルおよびシクロヘキシルメチルが好ましい。

30

【0196】

(g) $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキルについての R_1 の価は、以下を含む：シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど。この系列においては、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが好ましい。

【0197】

好ましい R_1 の置換基の価は、以下を含む：メトキシ、エトキシ、フェノキシ、メチルチオ、エチルチオ、フェニルチオ、ベンジルオキシ、2-フェニルエチルオキシ、ベンジルチオ、2-フェニルエチルチオなど。

40

【0198】

任意の変数により示される、 R_2 および R_5 についてのアルキル、アルケニル基の価は、他で示される場合を除いて、直鎖または分枝の、2~12炭素原子からのアルキルおよびモノアルケニルおよび鎖状炭化水素ラジカル（例えば、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、*n*-ヘプチル、*n*-ノニル、4,4-ジメチルペンチル、またはビニル、アリル、1-ブテニル、2-ブテニル、5-ヘキセニルなど）を含む。イソプロピル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘプチルまたは1-ブテニルが好ましい。

【0199】

$C_3 \sim C_7$ のシクロアルキルおよび $C_4 \sim C_{10}$ のシクロアルキルアルキルの価は、以下を含

50

む：シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロペンチルメチル、シクロペンチルエチル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、シクロプロピルなど。

【0200】

上記の変数により表されるアラルキル基は、アルキル部分に1～8の炭素原子を有し、そしてここで示される「アリール」は、フェニル、ナフチル、またはビフェニルを表す。代表的な例としては、ベンジル、フェネチル、4-フェニル-n-ブチル、1-フェニル-n-オクチルなどが挙げられる。

【0201】

構造3または4を有する本発明のMDP-結合ホーミング分子において、芳香族複素環、すなわち「ヘテロアリール」置換基は、同義であり、そして上記に引用されるものは、1～3個のO、NまたはSヘテロ原子、好ましくは、1個のOまたはSあるいは1～3個のNヘテロ原子を含む、5員または6員の芳香環、例えば、ピリジル、チエニル、フリル、イミダゾリル、およびチアゾリルならびにこれらの任意の二環式基誘導体（ここで、上記の任意の複素環式環は、ベンゼン環（例えば、インドリル、キノリニル、イソキノリニル、ベンジミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾフリル、およびベンゾチエニルのような）に融合される）を表す。

【0202】

名前を挙げた R_2 および R_5 のアルキル鎖ならびにアルケニル鎖上の置換基は、アラルキル基、複素環アルキル基およびヘテロアリール基における芳香環上にも同様に存在し得る。置換部位は、任意の利用可能な部位であり得、そして置換は、1以上の同じかまたは異なる基を含み得る。

【0203】

置換基は、以下のものである：ハロ（フルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードを意味する）；ヒドロキシ；カルボキシ； $C_1 \sim C_4$ の直鎖または分枝のアルコキシカルボキシ（例えば、メトキシカルボニルおよびエトキシカルボニル）； $C_7 \sim C_{16}$ のアリールアルコキシカルボニル（例えば、ベンジルオキシカルボニル、n-ブチルオキシカルボニル）； $C_3 \sim C_7$ のシクロアルキル（例えば、シクロペンチルおよびシクロヘキシル）； $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ（例えば、t-ブトキシおよびエトキシ）； $C_6 \sim C_{12}$ のアリールオキシ（例えば、ビフェニルオキシ、ベンジルオキシ）；アミノ；モノ-またはジ- $C_1 \sim C_8$ のジアルキルアミノ（例えば、メチルアミノ、イソプロピルアミノ、n-ブチルアミノ、イソヘキシルアミノ、N,N-ジエチルアミノ、メチルエチルアミノ、メチル-t-ブチルアミノ、ジ-n-オクチルアミノ）；チオ； $C_1 \sim C_4$ のアルキルチオ（例えば、メチルチオ、エチルチオ）； $C_6 \sim C_{12}$ のアリールチオ（例えば、フェニルチオ）； $C_7 \sim C_{16}$ のアラルキルチオ（例えば、ベンジルチオ、ナフチルメチルチオ）；ラジカル-S-CH₂-CH(NH₂)COOHおよび-S-(CH₂)₂-CH(NH₂)COOH（両方とも、好ましくはL立体配置）；そしてチオ置換基が存在する場合、 R_2 または R_5 は、少なくとも1つの C_2 のアルキル基でなければならない。アリールまたはヘテロアリール基が、置換基に存在する場合、環上の炭素は、以下の1以上のものによりさらに置換され得る：直鎖または分枝の $C_1 \sim C_4$ アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、t-ブチル）；トリハロメチル（「ハロ」は、上記と同じ意味を有する）（例えば、トリクロロメチル、トリフルオロメチル）；ニトロ、シアノまたはスルホンアミド。

【0204】

好ましいのは、 R_1 がシクロヘキシルメチル、シクロペンチルメチル(cyclopentylmethyl)、n-ペンチル、n-ブチル、n-ヘキシル、イソブチルであり、 R_2 および R_3 は： $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル；置換しているかまたは置換していない、 $C_1 \sim C_{10}$ 直鎖または分枝アルキル；置換しているかまたは置換していない、 $C_7 \sim C_{14}$ アラルキルである化合物である。ここで、これらの基は、ハロ、アミノ、モノ-もしくはジ- $C_1 \sim C_4$ 直鎖または分枝アルキルアミノ、カルボキシル、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシカルボニル、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、 $C_5 \sim C_6$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリロキシ(aryloxy)、チオ、 $C_1 \sim C_4$ 直鎖または分枝アルキルチオ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールチ

10

20

30

40

50

オ、 C_7-C_{14} アラルキルチオ、 $-S-(CH_2)_n-CH(NH_2)CO_2H$ で置換され得；ここで、このアリアル基環炭素はさらに、直鎖または分枝 C_1-C_4 アルキルによって置換され得； R_3 および R_4 は、水素、 C_1-C_4 直鎖または分枝アルキル、例えば、メチル、エチル、または C_7-C_{14} アラルキル（例えば、ベンジル）である。

【0205】

構造3または4を有するMDP-結合ホーミング分子において、炭素は、好ましくは(R)または(RS)立体配置の R_1 に、より好ましくは(R)に結合され、そして R_2 に結合した炭素は、(R)、(RS)または(S)立体配置、好ましくは(RS)または(S)であり、そして R_5 が存在する場合、その二重結合は好ましくはZ立体配置にある。当業者は、構造3に基づくMDP-結合ホーミング分子が、無機または有機の酸および塩基に由来する塩の形態において使用され得ることを理解する。

10

【0206】

構造3または構造4を有するMDP-結合ホーミング分子を調製する方法は、当該分野において周知である。例えば、Parsonsら、Biochemistry International 23:1107~1115(1991)；および米国特許第5,145,990号を参照のこと。これらのそれぞれは、本明細書中において参考として援用される。

【0207】

当該分野で公知の他の種々のMDP-結合ホーミング分子はまた、本発明の方法に従って、遺伝子または薬剤を選択的に肺内皮に指向させるために有用であり得る。このようなMDP-結合ホーミング分子は、Kahanら、米国特許第4,616,038；Ash-tonら、米国特許第4,406,902号；Parsonsら、米国特許第5,145,990号；Parsonsら、Biochem. International 23:1107~1115(1991)；Uchidaら、米国特許第5,061,730号；Hashimotoら、J. Antibiotics XLIII:281~285(1990)；およびTakaseら、J. Antibiotics XLIII:38~42(1990)に記載される分子を含み、これらの各々は本明細書中で参考として援用される。

20

【0208】

転移性の細胞は、細胞接着分子のレパートリーの変更を示し、これは、原発性腫瘍からの逸脱、細胞外マトリックスの接着および突出、ならびに微小血管系への侵入を可能にする。大部分のこのような細胞は、通常肺中で、狭い毛細管の網とのそれらの細胞の最初の衝突に際して、幾何学および血流力学的な力によって破壊される。肺への転移の頻度は単に腫瘍細胞塞栓の機械的な捕捉に起因しているが、特定の腫瘍細胞型は、特定の標的器官に転移することを好むことが長期にわたって観察されてきた。

30

【0209】

いくつかの系統の証拠は、転移の標的器官の選択が、血液に由来する癌細胞とその標的器官の内皮との間の特異的な相互作用によって媒介されることを示す(Albelda, Lab. Invest. 68:4~17(1993)；Auerbachら、Cancer Res. 47:1492~1496(1987)；Johnsonら、Cancer Res. 51:394~399(1991)、これらの各々は、本明細書中に参考として援用される)。肺においては、2つの血管のレセプターが転移細胞の接着を媒介することが見出されている。LuECAM-1は、塩素チャンネルと相同な配列を有する内皮表面タンパク質であり、悪性のメラノーマ細胞の肺内皮への接着を媒介する(Elbleら、J. Biol. Chem. 272:27853~27861(1997)、これは、本明細書中で参考として援用される)。さらに、プロテアーゼである、肺内皮ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP IV/CD 26)は、転移性の乳癌細胞および前立腺癌細胞の肺へのホーミングを促進する(Johnsonら、J. Cell. Biol. 121:1423~1432(1993)、これは、本明細書中で参考として援用される)。転移細胞の表面に存在するフィブロネクチンは、乳癌細胞の肺血管へのDPP IV依存性ホー

40

50

ミングのためのリガンドであることが示された (Chenら、J. Biol. Chem. 273: 24207~24215 (1998)、これは、本明細書中で参考として援用される)。これらの結果は、器官選択的ホーミングが、古典的な細胞接着分子および他の分子によって媒介され得ることを示す。

【0210】

本明細書中で開示されるように、インビボでのGFE-1 (配列番号1) の肺内皮への選択的ホーミングは、細胞表面プロテアーゼであるMDPによって媒介される。本明細書中でさらに開示されるように、GFE-1 (配列番号1) の投与は、マウスにおける2つのメラノーマ細胞系統 (ヒトC8161およびマウスB16) の実験的肺転移を阻害し得る。これは、GFE-1 (配列番号1) が、同じレセプターに結合することについて腫瘍細胞を転移させることと競合し得ることを実証する (図8を参照のこと)。これらの結果は、MDPが肺血管において腫瘍細胞を転移させるためのレセプターをして働くこと、およびMDP-結合ホーミング分子が、肺転移の固着を減少させ得るか、または妨害し得ることを示す。

10

【0211】

従って、本発明は、癌を有する患者に膜ジペプチダーゼ (MDP) -結合ホーミング分子を投与することによって、その患者における肺転移を減少させるか、または妨害する方法を提供する。一般に肺に拡散した原発性腫瘍は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、精巣癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、腎細胞癌、および前立腺癌、骨原性肉腫、軟部組織肉腫およびメラノーマを含む (Smith、Seminars Oncology Nurs、14: 178~186 (1988)、これは、本明細書中で参考として援用される)。本発明の方法は、例えば、乳癌、腎臓癌、メラノーマ、膀胱癌、子宮頸部癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸直腸癌、または肺癌の肺転移を減少または妨害するために使用され得る。

20

【0212】

本明細書中で使用される場合、用語「転移」は、細胞が増殖性の病巣を形成後、1つの部位から、直接的にその部位と連絡していない別の部位への悪性細胞の移動を意味する。従って、転移細胞は、原発性腫瘍から剥離するようになり、身体他の部分に移動し、そして別個の腫瘍の塊として増殖する。当業者は、悪性細胞が、器官内の第1の部位から同じ器官内の第2の部位に局所的に移動し得るか、または身体内の異なる器官に離れて移動し得ることを理解する。さらに、転移の悪性細胞は、それ自体がさらなる転移を生じ得る。

30

【0213】

用語「肺転移」は、本明細書中で使用される場合、細胞が肺の中で増殖性の病巣を形成後、第1の部位とは直接的には連絡していない肺の中の1つ以上の部位への悪性細胞の移動をいう。肺の中で生じる癌細胞の剥離した塊は、肺「転移」または二次腫瘍と呼ばれる。肺転移は、種々の原発性腫瘍から生じ得、これは、それらが一般的に組織学的に類似するものである。例えば、乳癌、腎臓癌、およびメラノーマは、しばしば肺に転移する。さらに、膀胱癌、子宮頸部癌、卵巣癌、および前立腺癌は肺に転移し、より少ない頻度では、結腸直腸癌、または原発性肺癌は、肺における1つ以上の第2の部位に転移する。

【0214】

用語「減少するかまたは妨害する」は、肺転移に関連して本明細書中で使用される場合、肺転移の速度または程度が減少されることを意味する。従って、肺転移は、肺転移の発生が完全に防止されるか、もしくは顕著に遅延された場合に減少または妨害されるか；または肺転移の大きさもしくは数が顕著に減少した場合に、減少または妨害される。当業者は、肺転移の発生の遅延または肺転移の大きさもしくは数の減少が、本発明の方法に従って、MDP-結合ホーミング分子を用いて処置していない1以上のコントロール被験体における肺転移の速度または程度と比較して、測定されることを理解する。

40

【0215】

さらに、検出可能な癌を有さない被験体は、将来肺転移が起こることを減少または防止するために、MDP-結合ホーミング分子を用いて予防的に処置され得る。このようは被験体は、例えば、癌を有することが疑われ得るか、または家族が癌の病歴を有し得る。

50

【0216】

上記に示したように、MDP-結合ホーミング分子は、肺内皮に選択的なホーミングを示し、そして部分的には、膜ジペプチダーゼに対して特異的結合を示すことによって特徴付けられる。肺転移を減少または妨害するうえで有用なMDP-結合ホーミング分子は、本明細書中上記に記載したように、MDPへの特異的結合によって容易に同定され得る。所望の場合、さらなるMDP-結合ホーミング分子はまた、公知のMDP-結合ペプチド（例えば、GFE-1（配列番号1））または細胞（例えば、C8161細胞）の膜ジペプチダーゼへの結合を競合的に阻害する能力によって同定され得る。

【0217】

1つの実施態様において、肺転移を減少または妨害するうえで有用なMDP-結合ホーミング分子は、配列 X_1 -G-F-E- X_2 （配列番号17）を含む肺ホーミングペプチドである。ここで、 X_1 および X_2 のそれぞれは、1～10の独立して選択されるアミノ酸であり、例えば、配列CGFECVRQCPERC（配列番号1）またはCGFELETC（配列番号2）を含むペプチドである。このようなMDP-結合ホーミング分子は、例えば、ペプチドCGFECVRQCPERC（配列番号1）またはCGFELETC（配列番号2）であり得る。配列 X_1 -G-F-E- X_2 （配列番号17）を含むさらなるMDP-結合ホーミング分子（ここで、 X_1 および X_2 のそれぞれは、1～10の独立して選択されるアミノ酸である）は、以下に記載するように、例えば、不変の残基としてモチーフGFEを含むコンビナトリアルペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。

【0218】

別の実施態様において、MDP-結合ホーミング分子は、膜ジペプチダーゼインヒビターである。本明細書中で使用される場合、用語「膜ジペプチダーゼインヒビター」は、「MDPインヒビター」と同義語であり、そして膜ジペプチダーゼの酵素活性を選択的に減少させる有機分子を意味する。一般的に、MDPインヒビターは、MDPの活性部位に結合する分子である。MDPインヒビターは、薬物；ペプチド；修飾ペプチドもしくはペプチド模倣物；タンパク質またはタンパク質フラグメント；核酸分子（例えばリボ核酸もしくはデオキシリボ核酸）；オリゴサッカリド；脂質；糖脂質；またはリボタンパク質のような有機分子であり得る。本明細書中に開示される例示的なMDPインヒビターは、CGFECVRQCPERC（配列番号1）およびシラスタチンである。

【0219】

用語「選択的なインヒビター」は、MDPインヒビターに関連して本明細書中で使用される場合、インヒビターが、他のプロテアーゼのような関連するが異なる酵素と比較した場合、MDP酵素に対して選択的な様式でMDP活性を減少させることを意味する。従って、MDPインヒビターは、例えば、亜鉛メタロプロテアーゼの非特異的インヒビターとは異なる。従って、MDPインヒビターは、MDP活性を選択的に減少させ得るが、例えば、ジペプチジルペプチダーゼIVの活性にはほとんど効果を有さないか、または全く効果を有さない。

【0220】

MDP酵素活性を測定するためのアッセイは、当該分野で公知である。MDPは、N-末端アミノ酸がL-立体配置にあり、かつブロックされていないジペプチド基質を切断する。C-末端アミノ酸は、L-またはD-立体配置のいずれかにあり、この酵素は、D-立体配置のC-末端残基を有する基質をより迅速に加水分解する。MDP活性は、例えば、グリル-D-フェニルアラニン（Gly-D-Phe）を基質として使用してアッセイされ得る（Keynanら、前出、1996；Parsonsら、前出、1991）。MDP酵素活性のための便利な特異的蛍光測定アッセイは、基質としてGly-D-Pheを使用し、そして遊離したD-PheとのD-アミノ酸オキシダーゼの引き続く反応を使用する（例えば、実施例IVEを参照のこと；また、HeywoodおよびHooper、Analyt. Biochem. 226:10～14（1995）を参照のこと、これは、本明細書中で参考として援用される）。

【0221】

膜ジペプチダーゼインヒビターは、天然のMDP基質に対する構造的な相同性を示す分子であり得る。例えば、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼによって、トリペプチドグルタチオンを切断して、グルタメートおよびシステイニルグリシン (Cys-Gly) を形成した後、ジペプチドCys-Glyは、ジペプチドのみを切断するMDPにより認識され、そして切断される。グルタチオンのアミノ酸配列は、GFE-1 (配列暗号1) のN-末端部分と類似しており、ここで最初の2つのアミノ酸は、Cys-Glyである。図7に示すように、GFE-1 (配列番号1) は、用量依存性の様式でGly-D-Phe基質の加水分解を阻害し、これは、GFEを含むペプチド (例えば、GFE-1 (配列番号1)) が、MDPインヒビターであり得ることを示す。これらの結果はさらに、MDPインヒビターは、天然に存在するMDP基質に構造的に類似し得ることを示す。

10

【0222】

種々のMDPインヒビターは、当該分野で公知である。例えば、MDPインヒビターは、本明細書中上記にMDP-結合ホーミング分子 (例えば、構造1、構造2、構造3、または構造4を有するMDP-結合分子) であり得る。

【0223】

本発明において有用なMDPインヒビターは、例えば、膜ジペプチダーゼに対して、約 10^{-4} M~約 10^{-12} MのKiを有し得る。例えば、配列 $X_1-G-F-E-X_2$ (配列暗号17) を含むMDPインヒビター (ここで、 X_1 および X_2 の各々は、1~10の独立して選択されるアミノ酸である) は、例えば、膜ジペプチダーゼに対して、約 2×10^{-5} M~ 10^{-7} M、例えば、約 10^{-6} ~ 10^{-7} MのKiを有し得る。

20

【0224】

本発明において有用なMDPインヒビターは、例えば、MDPに対して1000nM以下のKiを示し得る。肺転移を減少するかまたは妨害する際に有用なMDPインヒビターはまた、例えば、MDPに対して100nM以下のKi、または1nM以下のKiを示し得る。例えば、構造3または構造4を有するMDPインヒビターは、例えば、約0.5nM~10nMのKiを有する強固に結合するインヒビターであり得る。従って、構造3または構造4を有するMDPインヒビターは、癌を有する被験体にMDPインヒビターを投与することによって肺転移を減少するかまたは妨害するための本発明の方法において特に有用であり得る。

30

【0225】

別の好ましい実施態様において、MDPインヒビターは、構造1を含み、ここで R^2 および R^3 は、それぞれ3~10および1~15の炭素原子の範囲の炭化水素ラジカルである；これらの R_2 または R_3 炭化水素鎖のいずれの1つにおいても、1~6の水素が、ハロゲンによって置換され得るか、または非末端メチレンが、酸素もしくはイオウで置換され得、これらには後者の酸化型が含まれる；さらに、 R_3 における末端水素はまた、ヒドロキシルまたはチオールによって置換され得、これは、アシル化され得るか、またはカルバモイル化され得る；あるいは、水素は、アミノで置換され得、これは、アシルアミノ、ウレイド、アミジノ、グアニジノ (guanidino)、またはアルキル、あるいは置換されたアミノ基 (4級窒素基を含む) において誘導体化され得；あるいはこれらはカルボキシル基、ホスホン酸基、またはスルホン酸基のような酸性基、またはそのエステルもしくはそのアミド、またはシアノ；あるいはその組み合わせ (例えば、末端アミノ基) によって置換され得；そして R^1 は、水素または低級アルキル (C_{1-6}) またはジアルキルアミノアルキル、あるいは薬学的に受容可能なカチオンである。肺転移を減少するかまたは妨害するためのこのようなMDPインヒビターは、例えば、7-(L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ)-2-(2,2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド)-2-ヘプテン酸 (シラスタチンとしてもまた公知) であり得る。

40

【0226】

MDPインヒビターは、例えば、構造1を有する化合物であり得、ここで R_2 は、カルボニルに隣接する炭素が3級ではあり得ないという限定を有する、分枝アルキルまたはシク

50

ロアルキルである。

【0227】

例えば、MDPインヒビターはまた、 R^2 が、カルボニルに隣接する炭素が三級ではありえないという制限を有する分枝アルキルまたはシクロアルキルであり、そして R^3 が、 n -アルキル（1-9炭素）または4級の窒素、アミン誘導体またはアミノ酸誘導基である末端置換基を有する n -アルキル（1-9炭素）である構造1を有する化合物であり得る。例えば、MDPインヒビターは、 R^2 が2，2-ジメチルシクロプロピルまたは2，2-ジクロロシクロプロピルであり、そして R^3 は、末端置換基を有さないかまたはトリメチルアンモニウム、アミジノ、グアニジノもしくは2-アミノ-2-カルボエチルチオである末端置換基を有する3-7の炭素原子の炭化水素鎖である構造1を有する化合物であり得る。

10

【0228】

本発明において有用な構造1を有する模範的なMDPインヒビターとしては、以下が挙げられる：Z-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-8-トリメチル水酸化アンモニウム-2-オクテン酸内部塩；Z-2-（2，2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド）-8-トリメチル水酸化アンモニウム-2-オクテン酸内部塩；Z-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-8-グアニジノ-2-オクテン酸；Z-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-8-ウレイド-2-オクテン酸；Z-8-（1-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ）-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-2-オクテン酸；Z-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-2-オクテン酸（ラセミ形態および右旋性形態）；Z-2-（2，2-ジクロロシクロプロパンカルボキサミド）-2-オクテン酸；7-（L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ）-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキサミド）-2-ヘプテン酸；および6-（L-2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ）-2-（2，2-ジメチルシクロプロパンカルボキシアミド）-2-ヘキセン酸。

20

【0229】

本発明はまた、MDPの負の調節薬剤を被験体に投与することによって、癌を有する被験体において肺転移を減少するかまたは予防する方法を提供する。本発明に役立つMDPの負の調節薬剤は、例えば、可溶性MDPポリペプチドまたはMDPと選択的に反応する抗体であり得る。

30

【0230】

さらに本明細書中で提供されるものは、MDPの負の調節薬剤を被験体に投与することによって被験体内の肺内皮への細胞ホーミングを減少するかまたは予防する方法である。肺内皮への細胞ホーミングを減少するか予防するのに有用なMDPの負の調節薬剤は、例えば、可溶性MDPポリペプチドか、またはMDPと選択的に反応する抗体であり得る。

【0231】

本明細書中で用いられる場合、用語「MDPの負の調節薬剤」とは、直接的または間接的にMDPの発現または活性を選択的に減少する有機分子を意味する。例えば、このようなMDPの負の調節薬剤は以下であり得る：薬物；リボ核酸分子およびデオキシリボ核酸分子を含む核酸分子；ペプチド；改変体または改変化ペプチドもしくはペプチド模倣物；タンパク質またはそれらのフラグメント；抗体またはそれらのフラグメント；オリゴ糖類；脂質；糖脂質；またはリポタンパク質。

40

【0232】

MDPの負の調節薬剤が、MDPの発現または活性を選択的に減少するために種々の機構によって作用し得ることを当業者は理解する。MDPの負の調節薬剤は、例えば、肺内皮において発現された機能的MDPの量を減少するように作用する有機分子であり得る。このような薬剤は、MDPの転写または翻訳を選択的に減少し得て、そして、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、MDPの発現を負に調節する転写因子、またはこのような

50

転写因子をコードする核酸であり得る。

【0233】

M D Pの負の調節薬剤はまた、例えば、野生型の膜ジペプチダーゼと効率的に競合し、転移細胞もしくは他の細胞が肺内皮におけるM D Pへ選択的にホーミングすることを減少するかまたは予防するM D Pのフラグメントであり得る。可溶性の細胞外で発現される形態のM D P、またはM D Pの他の優性な負のフラグメントは、本発明において有用なM D Pの負の調節薬剤であり得る。M D P調節薬剤はまた、M D P模倣物であり得る。M D P模倣物は、M D Pまたはその下位区分（subpart）と三次構造的相同性を共有するタンパク質または他の有機分子であり、そしてM D P模倣物は、発現される場合、転移細胞またはリンパ球のような他のホーミング細胞へ結合するために、内因性M D Pと競合する。M D P模倣物は、転移細胞と接触するM D Pの領域に構造的に共通点があり得；M D P模倣物は、例えば、M D Pの活性部位に構造的に共通点があり得る。

10

【0234】

1つの実施態様において、M D Pの負の調節薬剤は、M D Pと選択的に反応する抗体である。本明細書中で使用される場合、「M D Pと選択的に反応する」抗体とは、別の亜鉛金属プロテアーゼのような無関係のポリペプチドに対してよりも、膜ジペプチダーゼに対して実質的により高い親和性で結合する。用語「抗体」は、その最も広範な意味では、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに少なくとも約 $1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ の膜ジペプチダーゼに対する選択的親和性を保持する抗体のポリペプチドフラグメントを含むように本明細書中で使用される。F a b、F（a b'）₂およびF vフラグメントのような抗体フラグメントは、膜ジペプチダーゼと選択的に反応し得、それ故に、本明細書中で定義される場合、用語抗体の意味の範囲内に含まれる。用語抗体は、本明細書中で使用される場合、膜ジペプチダーゼと選択的に反応する天然に存在する抗体、ならびにキメラ抗体およびヒト化抗体のような天然に存在しない抗体ならびにフラグメントを含む。

20

【0235】

抗体を産生するための方法は、当該分野で慣用的である。上記のような天然の供給源から調製され得るかまたは組換え的に産生され得る膜ジペプチダーゼあるいはそのフラグメント（例えば合成ペプチド）は、免疫原として用いられ得る。非免疫原性フラグメントまたは合成ペプチドは、ハプテンをウシ血清アルブミン（B S A）またはキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）のようなキャリア分子と結合することによって、免疫原性にされ得る。さらに、種々の他のキャリア分子およびキャリア分子とハプテンを結合する方法は、例えば、本明細書中で参考として援用されるHarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)に記載されるように当該分野において周知である。キメラ抗体およびヒト化抗体のような天然に存在しない抗体を含む抗体はまた、固相ペプチド合成を用いて構築され得るか、組換え的に生成され得るか、または例えば、本明細書中で参考として援用されるBorrebaeck（編）、Antibody Engineering（第2版）New York: Oxford University Press（1995）によって記載されるような可変性の重鎖および可変性の軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。

30

40

【0236】

別の実施態様において、M D Pの負の調節薬剤は、可溶性M D Pポリペプチドである。本明細書中で使用される場合、用語「可溶性ポリペプチド」とは、膜に結合しないポリペプチドを意味する。本発明において有用な可溶性M D Pポリペプチドは分泌され、したがって細胞外で発現される。

【0237】

本発明において有用な可溶性M D Pポリペプチドは、例えば、G P Iアンカーの付加のために必要とされる1つ以上のC末端残基を欠失する短縮型または変異型M D Pポリペプチドであり得る（図9を参照のこと）。特定の短縮型または変異型M D P誘導体は可溶性で

50

あるかどうか決定するために、その誘導体は、例えば、C O S細胞において発現され得、そしてトランスフェクトした細胞および上清はその後、MD P活性についてアッセイされ、MD Pが膜に結合されるか、または可溶性であるかを決定され得る。

【0238】

本発明はまた、膜ジペプチダーゼ (MD P) を1つ以上の分子と接触する工程；およびこの分子の存在下でMD P活性を、コントロール値と比較して決定する工程によって、肺転移を減少するかまたは予防する分子を同定する方法を提供する。ここで、この分子の存在下で減少したMD P活性は、この分子を肺転移を減少するかまたは予防する分子と同定する。膜ジペプチダーゼは、例えば、実質的に精製され得る。MD P活性が、例えば、G l y - D - P h eからのD - P h eの放出によって決定され得る。

10

【0239】

本発明の1つの実施態様において、肺転移を減少するかまたは予防する分子は、膜ジペプチダーゼ (MD P) を1つ以上の分子と接触する工程；この分子の存在下でのMD P活性を、コントロール値と比較して決定する工程；この分子を、癌を有する被験体に投与する工程；およびこの被験体における肺転移を、転移のコントロールレベルと比較してアッセイする工程によって同定され得る。ここでこの分子の存在下で減少したMD P活性は、この分子を肺転移を減少するかまたは予防する分子と同定する。

【0240】

以下の実施例は、本発明を例示することが意図されるが、本発明を限定するようには意図されない。

20

【0241】

(実施例 I インビボパニング)

本実施例は、ファージディスプレイライブラリーを調製し、そしてインビボパニングを使用してライブラリーをスクリーニングし、選択された器官または組織へホーミングするペプチドを発現するファージを同定する方法を示す。

【0242】

(A. ファージライブラリーの調製)

ファージディスプレイライブラリーを、K o i v u n e nら (前出、1995；またK o i v u n e nら、前出、1994bを参照のこと) によって記載されるように融合5ベクターを使用して構築した。C X₆C (配列番号26)、C X₇C (配列番号24)、C X₁₀C (配列番号30)、およびC X₃C X₃C X₃C (配列番号25)、X₂C X₄C X (配列番号23)、およびX₇ (配列番号29) と命名したペプチドをコードするライブラリーを調製した。ここで「C」はシステインを示し、そして「X_N」は別々に選択したアミノ酸の所定の数を示す。これらのライブラリーは、少なくとも2つのシステイン残基がペプチド内に存在する場合、環状ペプチドを表し得る。

30

【0243】

規定したシステイン残基を含むライブラリーを、「C」がコドンT G Tによってコードされ、そして「X_N」がN N Kによってコードされるように (ここで、「N」はA、C、G、およびTの等モル混合物であり、そしてここで「K」はGおよびTの等モル混合物である) 構築したオリゴヌクレオチドを使用して作製した。従って、C X₆C (配列番号26) によって表されるペプチドを、配列T G T (N N K)₆T G T (配列番号31) を有するオリゴヌクレオチドによって表し得る。オリゴヌクレオチドを3サイクルのP C R増幅によって2本鎖にし、精製し、そして、発現に際して、ペプチドが遺伝子I I Iタンパク質のN末端に融合タンパク質として存在するように融合5ベクター中に遺伝子I I Iタンパク質をコードする核酸に連結した。

40

【0244】

ベクターをM C 1 0 6 1細胞へエレクトロポレーションによってトランスフェクトした。細菌を20 μg/ml テトラサイクリンの存在下で24時間培養し、次いでファージをポリエチレングリコールを使用して2回沈澱させることによって上清から回収した。各ライブラリーは、約10¹²形質導入単位/ml (T U；個々の組換えファージ) を含んだ。

50

【0245】

(B. ファージのインビボパニング)

肺および脾臓について、 10^{10} TUを含むファージライブラリーの混合物を、 $200\mu\text{l}$ DMEMで希釈し、そして麻酔したBALB/cマウス(2ヶ月齢; Harlan Sprague Dawley; San Diego CA)の尾静脈に注射した; AVERTIN (0.017ml/g)を麻酔薬として使用した(PasqualiniおよびRuoslahti、前出、1996)。1~4分後、マウスを液体窒素中で急速凍結した。あるいはファージの循環の約5分後、このマウスを5~10mlのDMEM(SIGMA; St. Louis MO)で心臓を通して灌流した。ファージを回収するために、灌流したマウスからの器官、または急速凍結したマウスから部分的に解凍した器官を、回収しそして重量を測定し、次いで 1ml DMEM-PI(プロテアーゼインヒビター(PI); フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF; 1mM)、アプロチニン($20\mu\text{g/ml}$)、ロイペプチン($1\mu\text{g/ml}$)を含むDMEM)中でホモジナイズした。

10

【0246】

器官サンプルを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む氷冷DMEM-PIで3回洗浄し、次いで 1ml K91-kan細菌とともに1時間直接的にインキュベートした。 $0.2\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリンを含む 10ml のNZY培地(NZY/tet)を、細菌培養物に添加し、混合物を 37°C 振盪機中で1時間インキュベートし、次いで $200\mu\text{l}$ アリコート、 $40\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリンを含む寒天プレート(tet/寒天)にプレートした。

20

【0247】

皮膚のインビボパニングのために、2ヶ月齢のBALB/cヌードマウスを、毛による汚染を回避するために用いた。このマウスに、上に記載されるようにファージを静脈注射し、心臓を通した灌流後、皮膚を大きな切片で切り出し、そして皮下組織を上に向けて氷冷プレート上に置いた。この皮膚をメスでかき出し、大部分の皮下組織を除去した。次いで皮膚を、以下に記載されるようにファージを回収するためにプロセス化した。

【0248】

網膜のインビボパニングのために、2ヶ月齢の雌のSimonson Albino ラットを、マウスよりも大きな組織サンプルを提供するために用いた。このラットを、フェノバルビタール(50mg/kg 体重)で麻酔し、そして深い麻酔下の間に、ラットの腹腔を開腹し、そして 10^{10} TUのファージライブラリーを横隔膜を通じて心臓の左心室へ注射した。ファージの循環の2~5分後、目を取り出し、次いで70% EtOHで一回およびPBSで一回洗浄した。角膜および水晶体と共に前眼房を取り出し、そして網膜を残りの後眼房から剥がした。組織を秤量し、プロテアーゼインヒビター(1mM のPMSF、 $20\mu\text{g/ml}$ のアプロチニンおよび $1\mu\text{g/ml}$ のロイペプチン; 全てSIGMA; St. Louis MOから)を含む 1ml の氷冷DMEM中でシリンジバルブ(bulb)を用いてホモジナイズした。組織を 1ml のDMEMで3回洗浄し、そしてファージを以下に記載されるように回収した。

30

【0249】

種々の器官または組織から回収したファージを含む約250~300の個々の細菌コロニーを、 5ml のNZY/tet中にて16時間増殖した。いくつかの実験において、ファージを含む約1000の個々の細菌を精選し、そしてファージを 2ml のNZY/tet中で増幅するか、またはファージを含むプレート全体をかき出し、プールし、大量に増殖し、そして注射のためにプロセッシングした。ファージを別々に培養した場合、この培養物をプールし、そしてファージを、2回目のインビボパニングについて上に記載されるように、マウスまたはラットへ注射した。いくつかの実験において、3回目または4回目のパニングを行った。ファージDNAを、得られた個々の細菌コロニーから精製し、そして選択されたファージによって発現されたペプチドをコードするDNA配列を決定した(Koivunenら、前出、1994bを参照のこと)。

40

50

【0250】

(実施例2：選択された器官にホーミングするペプチドの特徴付け)

この実施例は、器官または組織にホーミングする本発明のペプチドが、選択された器官または組織（RESの成分を含む器官を含む）に選択的にホーミングすることを実証する。

【0251】

(A. 肺は、選択された器官である)

2回または3回、環状CX₃CX₃CX₃C（配列番号25）ファージディスプレイライブラリーまたは環状CX₆C（配列番号26）ファージディスプレイライブラリーを注射したマウスのインビボバニングの後に、肺にホーミングする4つのペプチドを同定した。ペプチド配列CGFECVRQC PERC（配列番号1；GFE-1）およびCGFELETC（配列番号2；GFE-2）は、肺に繰り返し出現し、そしてCX₆C（配列番号26）ライブラリー由来の2つのペプチド配列CTLRDRNC（配列番号15）およびCIGEEVVC（配列番号16）もまた、肺にホーミングすることが見出された（以下の表2を参照のこと）。

10

【0252】

同定された個々のペプチドの肺ホーミングの特異性を決定するために、ペプチドをディスプレイするファージを個々に増幅し、同じ投入力価に希釈し、そしてマウスに投与した。投与後、コントロールの腎臓器官および脳器官を取り出し、そして肺、腎臓および脳におけるファージのTU数を決定した。図2に示された結果は、ペプチド配列CGFECVRQC PERC（配列番号1；GFE-1）を有する10×および35×を超えるファージが、それぞれ、腎臓および脳より、肺に結合したことを示す。図2はまた、CGFELETC（配列番号2；GFE-2）が、12×および20×より高いレベルで、それぞれ、腎臓および脳より、肺において見出されたことを示す。肺ホーミングペプチド、CGFECVRQC PERC（配列番号1；GFE-1）、CGFELETC（配列番号2；GFE-2）、CTLRDRNC（配列番号15）およびCIGEEVVC（配列番号16）は、非選択ファージに対して、肺において、それぞれ35×、9×、6×、および5×に富化される（図2を参照のこと）。従って、コントロールの脳および腎臓と比較して、そして非選択ファージと比較して、肺に結合するファージの実質的な富化が観察された。

20

【0253】

肺ホーミングペプチドに対する特異性もまた、GST融合ペプチドを用いた競合実験によって決定した。GFE-1（配列番号1）を同時投与したGST-GFE-1（配列番号1）融合ペプチドは、肺にホーミングするGFE-1（配列番号1）を阻害した一方で、GSTは、ホーミングに対する効果を有さなかった（図3A）。さらに、GST-GFE-1（配列番号1）のホーミングに対する阻害効果は、用量依存性であり；500μgのGST-GFE-1（配列番号1）融合タンパク質を注射した場合、70%のホーミング阻害が生じた（図3B）。GST-GFE-2（配列番号2）のGFE-2（配列番号2）との同時注射は、より少ない程度にホーミングを阻害し；500μgのGST-GFE-2（配列番号2）融合タンパク質を注射した場合、30%のホーミング阻害が生じた（図3B）。興味深いことに、GST-GFE-1（配列番号1）融合物は、肺にホーミングするGFE-2（配列番号2）の阻害においてより有効であった；500μgのGST-GFE-1（配列番号1）融合タンパク質を注射した場合、60%のGFE-2（配列番号2）ホーミング阻害が生じた（図3B）。しかし、GST-GFE-2（配列番号2）を同時注射した場合、GFE-1（配列番号1）ホーミングの阻害効果は全く観察されなかった。このことは、GFE-2（配列番号2）より、共有標的分子に対してより高い親和性を有するGFE-1（配列番号1）によって説明され得る。

30

40

【0254】

さらなる肺ホーミングペプチドを獲得し、そしてそのアミノ酸配列を挿入のために決定した（表2を参照のこと）。GFEモチーフを含むペプチドが優勢であった（表1を参照のこと；配列番号1および2）。肺に1回を超えて存在した他のペプチドを、表2（以下）中でアスタリスクをつけて示し、そして残りのペプチドは、各々1回同定された。

50

【0255】

これらの結果は、G F Eモチーフを含むペプチドの選択が、G F E配列を有するペプチドをディスプレイするいくつかの独立したファージの選択的な結合を示し、そして例えば、ファージ増幅に起因する人為的結果ではないことを示す。さらに、いくつかの場合、同じアミノ酸配列を有するペプチドを発現するファージは、異なる配列を有するオリゴヌクレオチドによってコードされ、従って、肺に特定のファージがホーミングすることが、このファージで発現された特定のペプチドに起因することを確認した。

【0256】

これらの結果は、肺にホーミングするペプチド（R E Sの成分を含む）を発現するファージを同定するために、インビボパニングを使用して、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングし得ることを実証する。

10

【0257】

（B．皮膚は選択された組織である）

2回または3回、環状C X₃C X₃C X₃C（配列番号25）ファージディスプレイライブラリーを注射したマウスのインビボパニング後に、ペプチド配列C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）（これは、皮膚に繰り返し出現した）を同定した（表1）。配列C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）の皮膚ホーミングの特異性を決定するために、ペプチドをディスプレイするファージを個々に増幅し、同じ投入力価に希釈し、そしてマウスに投与した。投与後、コントロールの腎臓器官および脳器官を取り出し、そして皮膚、腎臓および脳におけるファージのT U数を決定した。

20

【0258】

結果は、ペプチド配列C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）をディスプレイする7×を超えるファージが、腎臓および脳より、皮膚に結合したことを示す（図2；表1を参照のこと）。配列C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）は、非選択ファージに対して、皮膚において、7×に富化された（図2）。従って、コントロールの脳および腎臓と比較して、そして非選択ファージと比較して、皮膚に結合するファージの実質的な富化が観察された。

【0259】

さらなる皮膚ホーミングペプチドを、環状C X₃C X₃C X₃C（配列番号25）ファージディスプレイライブラリーまたは環状C X₁₀C（配列番号30）ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって得た；アミノ酸配列を、以下の表5に示すように、挿入のために決定した。スクリーニングの間に1回を超えて同定されたペプチドを、アスタリスクをつけて示す。例えば、頭皮にホーミングした、回収したC X₃C X₃C X₃C（配列番号25）ファージの14％は、配列C V D V C C D G C P V C C（配列番号437）を有した。配列R V P L S G D V E H（配列番号438）、L R V M S F T S G Q（配列番号439）、またはR F S V G S L F G S（配列番号440）を有するファージは、各々、頭皮にホーミングする、回収したC X₁₀C（配列番号30）ファージの14％を構成した。尾部皮膚にホーミングすることに対するスクリーニングは、回収したC X₃C X₃C X₃C（配列番号25）ファージの12％が、配列C G A T C E M Q C P S G C（配列番号441）を有したことを示した。

30

40

【0260】

皮膚ホーミングペプチドに対する特異性もまた、G S T融合ペプチドを用いた競合実験によって決定した。図3Bは、C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）を同時投与したG S T-C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）融合ペプチドが、皮膚へのホーミングを阻害した一方で、G S Tは、ホーミングに対する効果を全く有さなかったことを示す。500 μgのG S T-C V A L C R E A C G E G C（配列番号3）融合タンパク質を注射した場合、ホーミングに対するG S T-G F E-1の阻害効果は、約55％であった（図3）。

【0261】

これらの結果は、皮膚にホーミングし、そしてこのようなホーミングが特異的であるペプ

50

チドを発現するファージを同定するために、インビボパニングを使用して、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングし得ることを実証する。

【0262】

(C. 脾臓は、選択された器官である)

2回または3回、環状CX₇C (配列番号24) ファージディスプレイライブラリーを注射したマウスのインビボパニングの後に、種々の脾臓ホーミングペプチドを同定した (表3)。特に、ペプチド配列SWCEPGWCR (配列番号4) は、脾臓に繰り返し出現した。SWCEPGWCR (配列番号4) の特異性を決定するために、この配列をディスプレイするファージを、個々に増幅し、同じ投入力価に希釈し、そしてマウスに投与した。投与後、コントロールの脳器官を取り出し、そして各脾臓におけるファージのTU数を決定した。図2に示された結果は、ペプチド配列SWCEPGWCR (配列番号4) をディスプレイする10×を超えるファージが、脳より脾臓に結合したことを示し、そしてさらなる実験は、脳と比較して、脾臓において20×まで富化されたことを示した (表1)。さらに、SWCEPGWCR (配列番号4) は、非選択ファージと比較した場合、脾臓への22×のファージの富化を示した (図2を参照のこと)。従って、コントロール組織 (脳) と比較して、そして非選択ファージと比較して、脾臓に結合するファージの実質的な富化が観察された。

10

【0263】

これらの結果は、インビボパニングを使用して、脾臓に選択的にホーミングする分子を同定し得ることを実証する。さらに、これらの結果は、インビボパニングが、同じペプチドをコードする独立したファージを同定することを示す。

20

【0264】

(D. 網膜は、選択された組織である)

環状CX₇C (配列番号24) ファージディスプレイライブラリーを注射したラットをインビボパニングに供し、3回行った後に、ペプチド配列CSCFRDVCC (配列番号5) およびCRDVVSVIC (配列番号6) を網膜において同定した。組織サンプルのサイズが小さいため、単離したファージを正確に定量できなかった。従って、これらのペプチドをディスプレイするファージの選択性を、これらの配列をディスプレイするファージを個々に増幅し、そしてこのファージを、コントロールファージfdAMP LAY88とともに、ラットに投与することにより決定した。このfd-アンピシリンファージは、同じ感染性を有するという点で、fd-テトラサイクリン (融合5型 (fuse 5-based)) に類似である。

30

【0265】

等量のCSCFRDVCC (配列番号5) またはCRDVVSVIC (配列番号6) およびfdAMP LAY88ファージをラットに注射した。投与後、網膜へのホーミングを、網膜から回収したテトラサイクリンプレート上で選択したファージのTU数、およびアンピシリンプレート上でのfdAMP LAY88のTU数を比較することによって評価した。

【0266】

結果は、コントロールのfdAMP LAY88ファージと比較して、網膜においてCSCFRDVCC (配列番号5) が3×の富化を示し、そしてCRDVVSVIC (配列番号6) が2×の富化を示したことを示した。従って、コントロールファージと比較して、網膜に結合するファージの実質的な富化が観察された。

40

【0267】

さらなる網膜ホーミングペプチドを獲得し、そしてそのアミノ酸配列を挿入のために決定した (以下の表6)。1回を超えて出現したペプチドを示す。特に、RDVトリペプチドモチーフは、いくつかの異なる配列状況において存在し、このことは、このペプチドをコードする核酸が、多くの独立したファージに由来することを示した。

【0268】

これらの結果は、RDVモチーフを含むペプチドの選択が、RDV配列を有するペプチド

50

をディスプレイするいくつかの独立したファージの選択的な結合を示し、そして例えば、ファージ増幅に起因する人為的結果ではないことを示す。さらに、いくつかの場合で、同じアミノ酸配列を有するペプチドを発現するファージは、異なる配列を有するオリゴヌクレオチドによってコードされ、従って、網膜に特定のファージがホーミングすることが、このファージで発現された特定のペプチドに起因することを確認した。

【0269】

これらの結果は、インビボバニング方法が、同定するライブラリー（例えば、選択された器官または組織（RESの成分を含む器官および組織を含む）にホーミングするペプチドを発現するファージ）をスクリーニングするために、一般に適用可能な方法であることをさらに実証する。データベース検索は、内皮細胞レセプターについての公知のリガンドに

10

【0270】

（実施例3：肺、脾臓および皮膚のホーミングペプチドの免疫組織学的分析）

この実施例は、肺、脾臓および皮膚のホーミング分子の所在を免疫組織学的試験を用いて実証する。

【0271】

ホーミングペプチドをディスプレイするファージを、肺、脾臓または皮膚のホーミングペプチドを発現するファージ（「ペプチドファージ」）をマウスに投与して5分後に得た組織切片を免疫染色することによって、肺、脾臓および皮膚において検出した。ペプチドファージの投与後、マウスを上記のように取り扱い、そして種々の器官（肺、脾臓および皮膚を含む）を取り出し、そしてブワン（Bouin's）溶液（Sigma）中で固定した。組織切片を調製し、そして抗M13（ファージ）抗体（Pharmacia Biotech；米国特許第5,622,699号、前出、1997；PasqualiniおよびRuoslahti、前出、1996を参照のこと）と反応させた。製造業者の指示に従って、ペルオキシダーゼ結合体化2次抗体（Sigma）を用いて、結合した抗M13抗体の可視化を行った。

20

【0272】

肺ホーミングペプチドであるGF E-1（配列番号1）をディスプレイするファージをマウスに静脈投与し、そして循環させて5分後に肺を単離し、そして上記のように処理した。肺胞毛細管の免疫組織化学的染色を観察し、そしていずれの解剖部分に対する優勢も検出されなかった。しかし、気管壁およびいくつかの大きな血管の染色では、存在しなかった。非選択ファージを注射したマウスは、肺染色を示さず、そしてGF E-1（配列番号1）の注射後の脾臓および皮膚においては、染色が観察されなかった。

30

【0273】

同様の実験を、脾臓ホーミングペプチドであるSWCEPGWCR（配列番号4）をディスプレイするファージを使用して、脾臓において行った。これらの実験において、脾臓ならびにコントロール器官および組織の組織学的サンプル（肺および皮膚を含む）を調製し、そして上記のように、免疫染色によって試験した。結果は、外分泌脾臓の毛細管およびより大きな血管において染色が検出された一方で、内分泌脾臓の染色は、（あるとしても）ほとんど検出されないことを示した。再び、非選択ファージは脾臓を染色せず、SWCEPGWCR（配列番号4）をディスプレイするファージを注射したマウスの肺および皮膚も染色が全く観察されなかった。興味深いことに、子宮内の血管のいくつかの染色がSWCEPGWCR（配列番号4）ペプチドについて観察された。さらに、SWCEPGWCR（配列番号4）をディスプレイするファージの静脈内注射後に、非選択ファージと比較して、6×高いレベルでファージを子宮から回収した。従って、SWCEPGWCR（配列番号4）は、脾臓および子宮の両方にホーミングする。

40

【0274】

皮膚ホーミングペプチドCVALCREACGEGC（配列番号3）をディスプレイするファージを用いて、皮膚において実験を行った。これらの実験において、皮膚ならびにコ

50

ントロールの器官および組織（肺および脾臓を含む）由来の組織学的サンプルを調製し、そして上記のように免疫染色によって試験した。結果は、皮下組織の血管において染色が示された一方で、真皮の染色は（あったとしても）ほとんど検出されないことを示した。再び、非選択ファージは、これらの血管を染色せず、そしてCVALCREACGEGC（配列番号3）をディスプレイするファージを注射したマウスのコントロールの肺および脾臓において染色は全く観察されなかった。

【0275】

全てのファージ（非選択ファージを含む）は、肝臓および脾臓の染色を引き起こした。この結果は、以前記載されたRESの成分によるファージの捕捉と一致する。

【0276】

これらの結果は、肺、脾臓および皮膚のホーミングペプチドは、肺、脾臓および皮膚（特に血管系）に選択的にホーミングすることを実証する。さらに、これらの結果は、器官および組織は、特定の領域（おそらく、器官または組織内の標的分子の異なる発現を反映する）内での染色パターンの差異を示し得ることを示す。免疫組織化学的分析は、肺、脾臓および皮膚のホーミングペプチドを発現するファージの所在および分布を同定するための簡便なアッセイを提供する。

【0277】

（実施例IV：GFE-1肺ホーミングペプチドについてのレセプターは、膜ジペプチダーゼである）

本実施例は、GFE-1（配列番号1）のようなペプチドを含む「GFE」についてのレセプターが、膜ジペプチダーゼであることを実証する。本実施例は、さらにGFE-1（配列番号1）が結合し、そして膜ジペプチダーゼの活性を阻害することを実証する。

【0278】

（A. GFE-1ファージは、肺始原細胞に選択的に結合する）

上述のように、CGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）ファージは、インビボで注射した場合、マウスの肺血管系に結合する。肺始原細胞に対するファージ結合アッセイを行ない、インビボで、肺組織に結合するCGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）ファージの特異性が、インビトロにおいて再構成され得るかどうかを決定した。

【0279】

始原細胞へのファージの結合は、以下のように行なった。簡潔には、Balb/cマウス（Harlan Sprague Dawley）を、Gardnerら、Lab. Animal Sci. 45:199-204（1995）（これは、本明細書中に参考として援用される）に記載されるように、0.017ml/gのアベルチンを用いて麻酔した。深い麻酔の下で、マウスは、心臓を通して10mlのダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；Irvine Scientific；Santa Ana, CA）で灌流した。次いで、肺、腎臓および脳を採取し、細かく刻み、0.5%BSA（Intergen；Purchase, NY）および0.5μg/mlのコラゲナーゼV（SIGMA）を含む2mlのDMEM中に置き、そして37℃で25分間インキュベートした。コラゲナーゼでの処理に続いて、組織を70μMの細孔の細胞濾過機（Becton Dickinson；Franklin Lake, NJ）を強制的に通した。濾過した細胞を、10%の血清を補給した10mlのDMEMを用いて1回洗浄した。結合アッセイに使用したファージ粒子を、増幅および精製し、そしてファージディスプレイされたインサートを、SmithおよびScott、前出、1993に記載されるように配列決定した。試験されるべき異なるファージの等しい投入量を保証するために、ファージを、数回K91Kan細菌を使用して力価決定した（SmithおよびScott、前出、1993）。

【0280】

結合反応のために、10⁹形質導入単位（TU）のファージを、10%血清を補給した1mlのDMEM中に5×10⁶細胞でインキュベートした。結合を4℃で2時間やさしく攪拌しながら行なった。結合反応の後、細胞を10%の血清を補給した1mlのDMEM

10

20

30

40

50

で、室温にて4回、各回につき5～10分間洗浄した。細胞を遠心分離し、そして細胞ペレットを100 μ lのDMEMに再懸濁し、そして新しいチューブに移した。細胞に結合したファージを、1 mlのK91 Kan細菌培養液 (SmithおよびScott、前出、1993)の添加により採取し、続いて30分間室温でインキュベートした。次いで、細菌を、0.2 μ g/mlのテトラサイクリンを補給した10 mlのLB培養培地で希釈し、そしてさらに30分間室温でインキュベートした。細菌培養の段階希釈物を40 μ g/mlのテトラサイクリンを含むLBプレートにプレートした。プレートを、一晚37℃でインキュベートした後、コロニーを計数した (形質導入単位、TU)。

【0281】

インビトロにおける肺始原細胞に対するファージの結合アッセイの結果は、肺始原細胞が、インサートを欠くfd-tetファージよりも約60倍多くのCGFECVRQCPE RC (配列番号1; GFE-1) ファージを結合することを示した。腎臓細胞へのCGFECVRQCPE RC (配列番号1; GFE-1) ファージの結合もまた、fd-tet結合よりも高かった (t検定、 $p < 0.02$) が、この結合は、肺細胞に対するGFE-1 (配列番号1) の結合よりもずっと低かった。インビボ研究において、GFE-1 (配列番号1) のファージを静脈内に注射した場合、腎臓に対する特異的なファージのホーミングは検出されなかった。GFE-1 (配列番号1) ファージは、インビトロにおいて始原脳細胞 (primary brain cell) に対して特異的な結合を示さなかった。

【0282】

肺細胞に対するGFE-1 (配列番号1) ファージの結合は、150 μ MのGFE-1 (配列番号1) ペプチドの存在下でおよそ70%阻害されたが、一方同じ濃度のコントロールペプチドであるGRGESP (配列番号442) は、効果を有さなかった。インサートを欠くfd-tetファージの非特異的結合は、GFE-1 (配列番号1) ペプチドまたはコントロールペプチドの存在により影響されなかった。これらの結果は、肺内皮に対するGFE-1 (配列番号1) ペプチド配列の選択的なインビボでの結合を全肺始原細胞に対するインビトロアッセイにおいて再構成し得ること、および全肺細胞抽出物が単離のために十分な量のGFE-1レセプターを含むことを実証する。

【0283】

(B. GFE-1 (配列番号1) ペプチドは、55 kDaの表面タンパク質と結合する) GFE-1 (配列番号1) に結合する細胞表面分子のみを検出するために、マウスの肺内皮表面タンパク質を、インビボでビオチン化し、そして全肺抽出物を調製した。標識した抽出物を、最初にGFE-1 (配列番号1) ペプチドに対するアフィニティークラムで分画し; 続いて、カラムを洗浄し、そして結合タンパク質を、GFE-1 (配列番号1) ペプチド溶液で溶出した。

【0284】

インビボでの内皮細胞表面タンパク質のビオチン化を、以前にDe La Fuenteら、Am. J. Physiol. 272:L461-L470 (1997) (これは、本明細書中に参考として援用される) に記載されるように、いくつかの変更を伴って行なった。簡潔には、Balb/cマウスを、アベルチンで麻酔し、そして0.5 mg/mlのスルホ-NHS-LC-ビオチン (Pierce; Rockford, IL) を含む約15 mlのPBSで10～15分間心臓を通してゆっくりと灌流した。次いで、よく灌流した肺または脳のような制御組織を、採取し、そして氷上で20分間インキュベートした。次いで、この組織をさらに以下に記載されるように抽出物を調製するためにホモジナイズした。

【0285】

抽出物の調製のために、マウスまたはラットの肺を、最初に細かく刻み、次いで、1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、20 μ g/mlのアプロチニンおよび1 μ g/mlのロイペプチンを含む100 mMのN-オクチル- β -D-グルコピラノシド (Calbiochem; La Jolla, CA) を含む最小溶容量 (2.5

10

20

30

40

50

ml/gの組織)の冷PBS(PBS/オクチルグルコシド)中で、Brinkman Homogenizer(Brinkman;Wesbury, NY)を用いてホモジナイズした。ホモジナイズした組織を、氷上で2時間インキュベートし、次いで、細胞の細片を取り除くために12,000×gで30分間遠心分離した。プールした上清を、アフィニティークロマトグラフィーの前にあらゆる細片を取り除いた。

【0286】

GFE-1(配列番号1)アフィニティークロマトグラフィーを、RGDペプチドクロマトグラフィーによるインテグリンの単離のためにPytelaらにより確立された一般的な原則に従って、行なった(Pytelaら、Cell 40:191-198(1985);Pytelaら、Methods Enzym. 144:475-489(1987)、これらの各々は、本明細書中に参考として援用される)。全ての工程を、4℃で行なった。簡潔には、GFE-1(配列番号1)またはコントロールペプチド(AnaSpec;San Jose, CA)を、製造者の手引書(Pharmacia Biotech;Uppsala, Sweden)に従って、CNBr活性化Sephrose 4Bに結合させた。このマトリックスは、およそ2mg/mlのペプチドを含有した。2匹のマウス肺からのビオチン標識化抽出物を、カラム緩衝液(50mMのオクチルグリコシドおよび1mM PMSFを含むPBS)中で平衡化した500μlのアフィニーマトリックスに添加した。この抽出物をカラムに添加し、そして素通りした画分を、90分間の期間にわたって再添加した。次いで、このカラムを20容量のカラム緩衝液で洗浄した。合成GFE-1(配列番号1)ペプチドでの溶出を、1mg/mlのGFE-1ペプチド(配列番号1)を補充した2倍量のカラム緩衝液を用いて、1時間以上カラムをゆっくりと洗浄することにより行なった。このカラムに結合した残りのタンパク質を、8Mの尿素で溶出した。

【0287】

溶出物を、Centricon 10,000 MWCOカラム(Amicon;Beverly, MA)を用いて5倍に濃縮した。次いで、各溶出物のアリコート、成形済みのポリアクリルアミド4~12%ゲル(Novex;San Diego, CA)を用いてSDS-PAGEにより分離した。ビオチン標識化抽出物を用いて行なう実験のために、このタンパク質をPVDF膜(Millipore;Bedford, MA)に転写し、ストレプトアビジン-HRP(Pierce;Rockford, IL)を用いてプロットし、そしてECL化学発光システム(NEN;Boston, MA)を用いて発色させた。

【0288】

図4に示したように(左のパネル)、55kDaのビオチン化タンパク質は、GFE-1(配列番号1)により選択的に溶出された。溶出の前に、カラムからの洗浄物は、検出可能なビオチン化タンパク質を示さなかった;続いて、8Mの尿素の添加が、カラム中に非特異的に保持されている多くのビオチン化タンパク質を溶出した。コントロールペプチド(GRGESP;配列番号442)カラムに対して同じ手順で行なった後では、55kDaの範囲のタンパク質は、検出されなかった(図4;右のパネル)。さらなるコントロールとして、インビボビオチン化脳細胞抽出物を、同じ条件下で、GFE-1(配列番号1)ペプチドカラムを通して分画した;GFE-1(配列番号1)ペプチドカラムに特異的に結合する、脳抽出物からのビオチン化タンパク質はなかった(データは示さず)。

【0289】

これらの結果は、GFE-1ペプチド(配列番号1)が、55kDaの肺血管表面タンパク質に特異的に結合することを示す。非還元条件下では、55kDaのタンパク質を110kDaのバンドとして移動した(データ示さず)。従って、これらの結果は、GFEレセプターが、ジスフィルド結合ホモ二量体であることをさらに示す。

【0290】

(C. 55kDaのGFE-1(配列番号1)レセプターは、膜ジペプチダーゼである) GFE-1(配列番号1)ファージは、循環中に注射した場合、ラットの肺血管を選択的

に標的し得る。マウス組織から入手し得るよりも大量の55 kDaタンパク質を精製するために、非ビオチン化抽出物を100個の凍結ラット肺から調製した(Pel-Freez Biologicals; Rogers, AR)。大規模な抽出物を、PBS/オクチルグリコシドの最小量を有するペレットの第2の抽出物の添加と共に、基本的には上記のように調製した。

【0291】

大規模な抽出物を、3 mlのアフィニティマトリックスを用いて、上述のようにGFE-1 (配列番号1) ペプチドアフィニティカラム上で分画した。クマシーブルー染色により検出可能な55 kDaのタンパク質を、配列番号1のGFE-1 ペプチドによりカラムから抽出した(データは示さず)。マウスの肺から単離された55 kDaの表面タンパク質と共に移動したこのタンパク質を、トリプシン消化に供し、そしてFinnigan LCQ 四重極(quadrupole) イオントラップ質量分析計上でマイクロキャピラリー逆相HPLC直列質量分析(μ LC/MS/MS)による、Harvard University Microchemistry Facility (Boston, MA)での質量分析により、配列決定した。

10

【0292】

55 kDaタンパク質由来の2つのトリプシンペプチドである、YPDLIAELLR (配列番号444) およびTTPVIDGHNDLPWQMLTLFNNQLR (配列番号445) は、ミクロソームジペプチダーゼ、デヒドロペプチダーゼ-1またはMDPとしてもまた公知のラット膜ジペプチダーゼ(EC 3. 4. 13. 19)と完全な同一性を示した。いくつかの他のペプチド配列は、サンプル中でラットIgGの存在を示した。IgGでのサンプルの汚染は、この分子量範囲で予期され、非灌流肺からの抽出物中に大量のIgGを生じた。

20

【0293】

膜ジペプチダーゼ(MDP)が、GFE-1 (配列番号1) ペプチド結合タンパク質であることを確認するために、55 kDaタンパク質を膜ジペプチダーゼ活性についてアッセイした。アフィニティークロマトグラフィー洗浄画分およびGFE-1 (配列番号1) ペプチド溶出物(図4)からのサンプルを、特定のMDP基質Gly-D-Pheの存在下でインキュベートし、そしてD-Pheを、HeywoodおよびHooper、前出、1995 (Keynanら、前出、1996もまた参照のこと)に記載されるように正確に蛍光的に検出した。簡潔には、サンプルを、まずMDP基質、Gly-D-Phe (1 mM; SIGMA)とともに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、D-アミノ酸オキシダーゼ(I型; SIGMA)およびペルオキシダーゼ(VI型; SIGMA; HeywoodおよびHooper、前出、1995)の存在下で、6, 6'-ジヒドロキシー[1, 1'-ビフェニル]-3, 3'-二酢酸に変換した。蛍光を、Molecular Devices (Sunnyvale, CA)からのfmax蛍光マイクロプレートリーダーを使用して測定した。

30

【0294】

図5は、上記(図4)のアフィニティークロマトグラフィー洗浄画分およびGFE-1 ペプチド溶出物からのサンプル中での蛍光化合物へのD-Pheの変換の時間経過を示す。洗浄画分は、蛍光の基準線レベルのみを示したが、GFE-1 (配列番号1) ペプチド溶出物は、D-Pheの時間依存的変換によって例示したように高い膜ジペプチダーゼ活性を含んだ(図5参照のこと)。さらに、ラットの肺抽出物から単離したGFE-1 (配列番号1) ペプチド溶出物もまた、強いMDP活性を示した(データは示さず)。MDP活性をまた、全肺抽出物においても検出したが、GFE-1 ペプチド(配列番号1)溶出物(200 nmol D-Phe/min/mg)についての比活性は、ラットの全肺抽出物(0.34 nmol D-Phe/min/mg)についての比活性よりも約600倍高かった。

40

【0295】

(D. GFE-1 (配列番号1) およびGFE-2 (配列番号2) フェージは、MDPで

50

トランスフェクトした細胞に結合する)

低レベルまたは検出できないレベルのMDP活性を有することが公知の、COS-1細胞株を広範に使用して、MDPの構造および機能を研究した (Keynanら、前出、1996; Keynanら、Biochem. J. 326: 47-51 (1997))。COS-1細胞をマウスMDPでトランスフェクトし、そして以下に記載するように、配列番号1および2への結合をアッセイするために使用した。

【0296】

COS-1細胞へのトランスフェクションのために、マウスMDP発現ベクターを以下のように調製した。全マウス肺RNAを、Qiagen RNA精製カラム (Qiagen; Santa Clarita, CA) を使用して単離し、そして逆転写酵素ならびにランダムヘキサマーおよびポリdTオリゴヌクレオチドの混合物 (GIBCO/BRL; Grand Island, NY) を用いる第一鎖cDNA合成のためのテンプレートとして使用した。マウスMDP cDNA (Pasqualiniら、J. Cell Biol. 130: 1189-1196 (1995)) を、以下のオリゴヌクレオチド対を使用してPCRにより、GIBCO/BRLからのTaqポリメラーゼを使用して、cDNAプールから増幅した: KpnIアダプターを含む、CCGCTGGTACCGCAGATCCCTGGGGACCTTG (配列番号446) XbaIアダプターを含む、TCTTTCTTAGAGCTCAGAGAGCACTGGAGGAG (配列番号447)。増幅した1.3 kbのマウスMDP cDNAを、KpnIおよびXbaIで消化し、そしてNew England Biolabs (Beverly, MA) からのDNA制限酵素およびT4 DNAリガーゼを使用して、pcDNA3発現ベクター (Invitrogen; Carlsbad, CA) の同じ部位に挿入した。マウスMDP cDNAの首尾よいクローニングを、DNA配列決定により確認した。COS-1細胞のトランスフェクションを、QiagenからのSuperfect Reagentを用いて、製造者により推奨されるように行なった。

【0297】

MDPでトランスフェクトしたCOS-1細胞へのファージの結合を、以下のように決定した。簡潔には、 10^7 のCOS-1細胞を、 $10 \mu\text{g}$ のMDP発現ベクターか、またはベクターのみのいずれかでトランスフェクトした。48時間後、細胞をディッシュから穏やかにはがし、1回洗浄し、そして上述のファージ結合アッセイまたは膜ジペプチダーゼ活性アッセイに供した。ファージ結合アッセイのために、ファージインプットの 5×10^6 細胞および 10^{10} 形質導入単位 (TU) を使用した。膜ジペプチダーゼ活性の測定のために、 10^6 細胞を、プロテアーゼインヒビターを含まない $100 \mu\text{l}$ のPBS/オクチルグリコシド中に溶解した。抽出物の $10 \mu\text{l}$ のアリコートを使用して、MDP活性を測定した。

【0298】

図6Aに示すように、マウスMDPでトランスフェクトしたCOS-1細胞は、偽トランスフェクト細胞よりも少なくとも15倍高いMDP活性を示した。さらに、GFE-1 (配列番号1) ファージは、MDPでトランスフェクトしたCOS-1細胞に結合した。図6Bに示すように、GFE-1 (配列番号1) ファージは、偽トランスフェクト細胞よりも、MDPトランスフェクト細胞に4倍より多く結合した。GFE-1 (配列番号1) ペプチドの構造特性に類似した構造特性を有するペプチドを提示する、ネガティブコントロールファージである、fd-tetファージおよび皮膚ホーミングファージ (CVALC REACGEGC; 配列番号3) は、偽トランスフェクト細胞と比較した場合、MDP発現細胞への特異的な結合を示さなかった。さらに、図6Bは、GFE-2 (配列番号2) ファージもまた、MDPトランスフェクト細胞に結合し; この結合は、上述のインビボ肺ホーミングデータと同様に、GFE-1 (配列番号1) の結合よりも弱かったことを示す。GFE-1 (配列番号1) ファージおよびGFE-2 (配列番号2) ファージの両方のMDPトランスフェクト細胞への結合は、GFE-1 ペプチドにより完全に阻害された (配列番号1; データ示さず)。これらの結果は、GFE-1 (配列番号1) ペプチドおよ

びG F E - 2 (配列番号2) ペプチドが、同じレセプターに結合することを示す。

【0299】

(E. G F E - 1 (配列番号1) は、M D P活性を阻害し得る)

トリペプチドグルタチオンの代謝は、グルタミン酸およびシステニルグリシン (C y s - G l y) を形成するためのγ-グルタミルトランスぺプチダーゼによるトリペプチドの切断を含む。ジペプチドC y s - G l yは、実質的に認識され、そしてM D Pによって切断され、これは、ジペプチドのみを切断する。グルタチオンのアミノ酸配列は、G F E - 1 ペプチドのN末端部分、C G F E C V R Q C P E R C (配列番号1) と類似しており、これは、C y s - G l yである最初の2つのG F E - 1の第一のアミノ酸を有する。

【0300】

G F E - 1 (配列番号1) をM D PによるG l y - D - P h eの加水分解を阻害する能力についてアッセイした。D - P h eの蛍光定量的検出を上記のように実施した。図7は、G F E - 1 (配列番号1) が用量依存的な様式でG l y - D - P h e基質 (0. 5 m M) の加水分解を阻害したことを示す。コントロールの環状ペプチド (C A R A C ; 配列番号443) は、この酵素を阻害しなかった。

【0301】

これらの結果は、G F E - 1 (配列番号1) がM D P活性の拮抗阻害剤として作用し得ることを示す。

【0302】

(実施例V : G F E - 1 (配列番号1) は、肺転移を阻害する)

この実施例は、G F E - 1 ペプチド (配列番号1) がマウスにおける実験的な肺転移を阻害し得ることを実証する。

【0303】

実験的な肺転移を、A r a pら、S c i e n c e 279 : 377 - 380 (1998) およびP a s q u a l i n iら、N a t u r e M e d . 11 : 1197 - 1203 (これらの各々は、参考として本明細書中に援用される) に本質的に記載されるように、C 8 1 6 1 ヒト黒色腫細胞を使用して、マウスにおいて誘導した。簡潔には、C 8 1 6 1 細胞を75%のコンフルエンスまで培養し、次いで、2. 5 m M E D T A / P B Sで収集する。C 8 1 6 1 癌細胞を雌ヌードB A L B / cマウス (2ヶ月齢) の尾静脈中に、動物当たり 10^5 細胞の濃度で注射した。2組の5匹のマウスをこの細胞のみ ; 250 μ g のコントロールC A R A C ペプチド (配列番号443) を有する細胞、または250 μ g のG F E - 1 ペプチド (配列番号1) を有する細胞で注射した。各注射は、200 μ l の総容量であった。

【0304】

黒色腫細胞およびペプチド混合物のアリコートを一晩培養し、このペプチドが腫瘍細胞の生存度に影響しないことを確認した。G F E - 1 (配列番号1) ペプチドまたはC A R A C (配列番号443) ペプチドは、黒色腫細胞に対する毒性を両方とも示さなかった (データを示さず)。

【0305】

マウスを注射後、5週間で屠殺し、そして肺を収集し、秤量した。図8に示すように、G F E - 1 (配列番号1) ペプチドを投与されたマウスの肺重量は、黒色腫細胞単独 (「ビヒクル」) またはコントロールペプチドC A R A C (配列番号443、(「コントロールペプチド」)) を有する黒色腫細胞を投与されたマウスにおいて認められる肺重量より有意に少なかった。これらの結果は、G F E - 1 が、ヒト癌細胞の肺転移を阻害し得ることを示す。

【0306】

同様の肺転移実験を、R a j o t t eら、J . C l i n i c a l I n v e s t . 102 : 430 - 437 (1998) (これは、本明細書中で参考として援用される) に記載されるように調製した、G F E - 1 (配列番号1) グルタチオン S - トランスフェラーゼ融合タンパク質を使用して、実施した。G F E - 1 (配列番号1) グルタチオン S -

10

20

30

40

50

ランスフェラーゼ融合タンパク質は、肺重量の増加を阻害し、この増加は、図 8 に示したように配列番号 1 のペプチドで観察された結果と類似の様式で、C 8 1 6 1 ヒト黒色腫細胞の注射から得られる。

【0307】

これらの結果は、G F E - 1 (配列番号 1) が肺転移を阻害し得、そして M D P が肺血管系における腫瘍細胞の転移のためのレセプターとして作用することを示す。

【0308】

(実施例 V I : Z - 2 アシルアミノ - 3 - モノ置換プロペン酸 M D P 結合ホーミング分子の調製)

この実施例は、構造 1 を有する M D P 結合分子の調製のいくつかの方法を実証する。

10

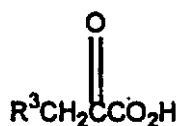
【0309】

(A. 構造 1 を有する M D P 結合ホーミング分子の調製方法)

構造 1 を有する M D P 結合ホーミング分子を、以下の適切な 2 - ケト酸およびアミドを直接縮合することによって作製する。

【0310】

【化 9】



+



20

ここで、 R^2 および R^3 は、規定された通りである。一般的な反応条件は、不活性溶媒 (例えば、トルエンまたはメチルイソ吉草酸) 中で約 1 4 : 1 の割合の酸対アミドを混合する工程、および 3 ~ 4 8 時間、好ましくは 5 ~ 2 4 時間、水の共沸除去を伴った還流加熱する工程を包含する。通常、冷却された場合、この溶液は、結晶形態の産物を生じる。所望の場合、この産物を、塩基抽出プロセスを使用して単離する。この産物を一般に公知の技術を使用して再結晶化する。

30

【0311】

この手順の必要に応じた改変は、反応中に触媒として、さらなる少量の p - トルエンスルホン酸を必要とする。

【0312】

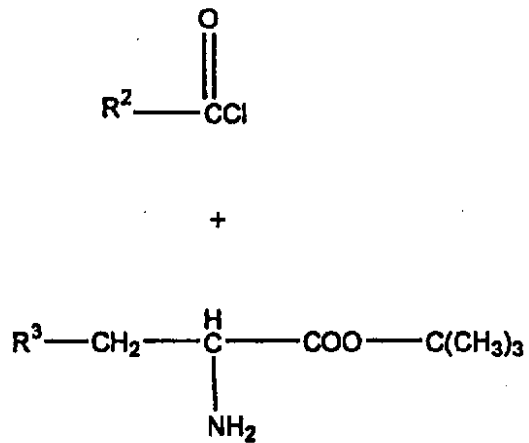
(B. 構造 1 を有する M D P 結合ホーミング分子の調製方法)

構造 1 を有する M D P 結合ホーミング分子を、以下の酸塩化物を伴う反応において α - アミノ酸、 γ - ブチルエステルを使用して調製する：

40

【0313】

【化 10】



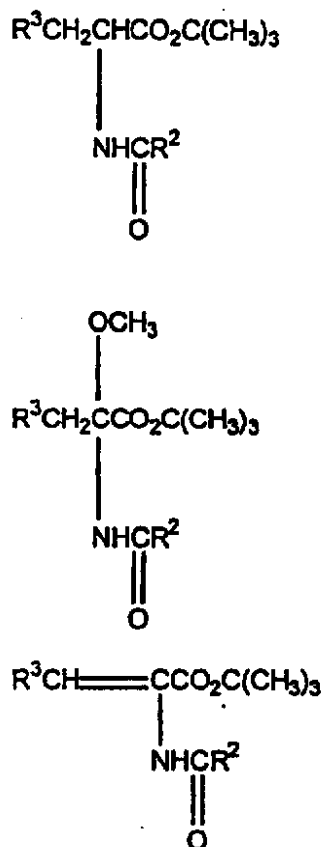
10

この反応は、塩基（例えば、トリエチルアミン）の存在下、塩化メチレンのような溶媒中で生じる。次いで、生じたN-アセチル化産物をト-ブチル次亜塩素酸塩での処理、続いてナトリウムメトキシドの添加によって酸化する。これは、 α 、 β -不飽和エステルである、2-メトキシ誘導体またはその脱離産物を生じる。無水塩酸でのさらなる処理は、この2-メトキシ誘導体か、またはこの不飽和エステルのいずれか（または両方の混合物）を、所望の α 、 β -不飽和遊離酸に変換する。

【0314】

20

【化11】



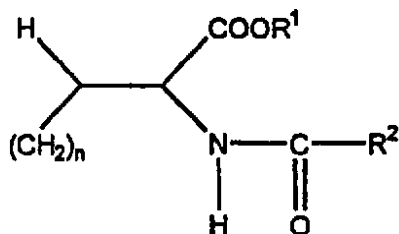
30

40

R^3 がアミノ、4級の窒素、チオールまたはカルボキシルである末端置換を有する、いくつかの化合物、誘導体を、末端の臭素を有する中間体から最も都合良く作製し得る。この場合、この中間体は、以下の構造を有し：

【0315】

【化12】



ここで、 n は、所望の炭化水素鎖（例えば、3～7）の炭素数である。

10

【0316】

末端のトリメチルアンモニウム置換基を有する R^3 を調製するために、臭素中間体をトリメチルアミンと反応させる；アミノを得るために、この臭素中間体をアンモニアと反応させる；グアニジノ反応をグアニジンで行う；2-アミノ-2-カルボキシエチルチオを含むチオ誘導体を調製するために、この臭素化合物をシステイン塩酸塩または適切なメルカプタンと反応させる。誘導体化したアミノ（例えば、ホルムアミジノ、ウレイドおよびアシルアミド（アセトアミド））を α -ベンジルホルムイミデート塩酸塩、シアン酸カリウムおよび適切なアシル無水物（無水酢酸）とそれぞれ反応させることによって、アミノ基を有する化合物から作製する。

【0317】

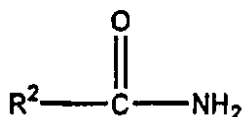
20

（C．構造1を有するMDP結合ホーミング分子の調製方法）

R^3 が末端に置換されたチオ誘導体である場合、化合物を調製するための別の経路は、触媒量のp-トルエンスルホン酸の存在下での還流におけるトルエン中で以下：

【0318】

【化13】

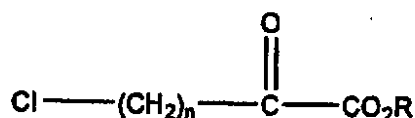


30

の所望のアミドでの反応において以下：

【0319】

【化14】



40

のようなクロロケトエステル中間体を利用する。生じた中間体を酸で加水分解する；次いで、塩素基を適切なメルカプタンとの反応で置換する。この反応は、キラルアミドの使用を許容し、それによって、官能化された側鎖を調製するので価値があり。あるいは、メルカプタン縮合後に調製された、ZおよびEアイソマーの混合物を、約3のpHまで酸を添加し、そして約90℃まで、30分間加熱することによって、Z型に直接異性化する。Z型のみが残存し、そして回収は、単純かつ複雑でない。

【0320】

（D．Z-7-（L-アミノ-2-カルボキシエチルチオ）-2-（2,2-ジメチルシ

50

クロロプロパンカルボキシアミド) - 2 - ヘプテン酸ナトリウムの調製)

(1. エチルー 7 - クロロ - 2 - オキソヘプタン酸のグリニャール調製)

等モル量 (各 8 モル) の 1 - ブロモ - 5 - クロロペンタンおよびマグネシウムを 25℃でテトラヒドロフラン (THF) (960 ml) 中で反応させる。このフラスコを THF 中でマグネシウムと共に装填し、そして臭化ブロモペンタンを 1 時間にわたって添加し、次いで 2 時間熟成した。反応が終了したと判断した後、この反応溶液を添加する (-15℃で冷却し、1856 ml の THF 中で 16 モルのジエチルシュウ酸となるまで、10℃で温度を維持しながら)。3 N 塩酸を、25℃未満の温度を保ちながら、添加し、反応をクエンチする。溶媒をストリッピングした後、計算された収量は、48.8% のエチルー 1 - クロロ - 6 - オキソヘプタン酸であった。

10

【0321】

(2. 縮合および加水分解)

S - 2、2 - ジメチルシクロプロピルカルボキシアミド (1017 g)、2143.6 g のエチルー 7 - クロロ - 2 - ケトヘプタン酸、9 リットルのトルエンおよび 12 g の p - トルエンスルホン酸を 22 L のフラスコに装填し、そして攪拌しながら、加熱して還流する。23 時間後、液体クロマトグラフィーは、予期した産物の割合を示し、そして 4 L のトルエンをわずかな減圧下で除去する。このポットを水で装填し、2 N の NaOH で pH 7 に中性化し、そして約 5 リットルの最終ポット容量を残して、減圧蒸留する。これを 1760 g の 50% NaOH 水溶液 (水、4 リットル) を加え、そして一晩攪拌することによって加水分解する。このフラスコを 4 L の塩化メチレンで装填し、そして pH を HCl を用いて 8.8 に調整する。未反応のアミドを結晶化する。有機層を水から分離し、次いで蒸発させる。粘着性の残査を 720 g の 50% NaOH を含む 8 L の水中で溶解し、そしてこの溶液に 1818 g の L - システイン塩酸塩、水、2 kg の水、2484 g の 50% NaOH および 1 L の水を装填する。室温で一晩熟成後、この溶液の pH は、濃縮した塩酸で 3.0 に調整し、そして生じた粘着性の懸濁液を 95℃に加熱し、透明な溶液を生じる。30 分後、1c によって検出された E アイソマーはなかった。混合および精製の後、産物は全体で 2060 g であり、87% の収量であった。この物質をアセトニトリルから再結晶させる。1500 g の再結晶物質を 6 L の水および 910 ml の 3.88 N NaOH 中で溶解し、次いで、pH 7 に中性化し、そして凍結乾燥し、1569 g (98.6%) の標記の化合物を生じる。

20

30

【0322】

【化 15】

分析 : 実測値, : C, 50.52; H, 6.62; N, 7.36;

S, 8.43; Na, 6.04. 計算値 : C, 50.71; H, 6.78; N, 7.49; S,

8.52; Na, 5.92

括弧中、または別の方法で上記に提供される全ての学術文献、参考文献および特許の引用は、以前に述べられようとなかろうと、本明細書中で参考として援用される。

40

【0323】

本発明は、上記で提供される実施例に対する参考と共に記載されるが、種々の改変が本発明の精神から逸脱することなく行われ得ることが理解されるべきである。従って、本発明は、特許請求の範囲によってのみ制限される。

【0324】

【表 2】

表2

肺から回収されたファージ由来のペプチド

CIKGNVNC (32)	CRHESSSC (33)	
CLYIDRRRC (34)	CYSLGADC (35)	
CSKLMMTC (349)	CGFELETC* (2)	
CNSDVDLC (36)	CVGNLSMC* (37)	
CEKKLLYC (38)	CKGQRDFC* (39)	10
CTFRNASC (40)	CNMGLTRC* (41)	
CHEGYLTC* (42)	CGTFGARC (43)	
CIGEVEVC* (16)	CRISAHPC (44)	
CLRPYLNC* (45)	CSYPKILC (46)	
CMELSKQC* (47)	CSEPSGTC (48)	
CGNETLRC (49)	CTLSNRFC (50)	
CMGSEYWC (51)	CLFSDENC* (52)	
CAHQHIQC (53)	CKGQGDWC (54)	
CAQNMLCC (55)	CWRGDRKIC* (56)	20
CLAKENVVC* (13)	CIFREANVC (57)	
CRTGQYQGC (58)	CERVVGSSC (59)	
CKTNHMESC (60)	CYEEKSQSC (61)	
CKDSAMTIC (62)	CTRSTNTGC (63)	
CMSWDAVSC* (64)	CKWSRLHSC* (65)	
CMSPQRSDC (66)	CLHSPRSKC (67)	
CPQDIRRNC (68)	CLYTKEQRC (69)	
CQTRNFAQC (70)	CTGHLSTDC (71)	
CQDLNIMQC (72)	TRRTNNPLT (73)	
CGYIDPNRISQC (74)	CTVNEAYKTRMC* (75)	30
CRLRSYGTLSLC* (76)	CAGTCATGCNGVC (77)	
CADYDLALGLMC (78)	CPKARPAPQYKC (79)	
CSSHQGGFQHG (80)	CQETRTEGRKKC (81)	
CRPWHNQAHTC* (82)	CSFGTHDTEPHC (83)	

表 2 (続)

CSEAASRMIGVC* (84)	CWEEHPSIKWWC* (85)
CWDADQIFGIKC (86)	CVDSQSMKGLVC (87)
CRLQTMGQGQSC (88)	CRPAQRDAGTSC (89)
CGGRDRGTYGPC (90)	CGEVASNERIQC (91)
CNSKSSAELEKC (92)	CVLNFKNQARDC (93)
CRGKPLANFEDC (94)	CEGHSMRGYGLC (95)
CRDRGDRMKSLC (96)	CDNTCTYGVDDC (97)
CSAHSQEMNVNC (98)	CGAACGVGCRGRC (99)
CGFECVRQCPERC* (1)	CLVGCRRLSCGGEC (100)
CRSGCVEGCGGRC (101)	CIARCGGACGRHC (102)
CGGECGWECEVSC (103)	CGVGCPGLCGGAC* (104)
CKWLCLLLCAVAC (105)	CSEGCVPWCWPEC (106)
CGAACGVGCGGRC (107)	CSGSCRRCGIDC (108)
CGASCALGCRAYC (109)	CDTSCENNCQGPC (110)
CSRQCRGACGQPC (111)	CYWWCDGVICALQC (112)
CAGGCAVRCGGTC (113)	CGGACGGVCTGGC* (114)
CGRPCVGECRMGC (115)	CLVGCEVGCSPAC (116)
CPRTCGAACASPC (117)	CRGDCGIGCRRLC (118)
CCFTNFDCYLGC (435)	

10

20

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【 0 3 2 5 】

【 表 3 】

表3

脾臓から回収されたファージ由来のペプチド

EICQLGSCT (119)	WRCEGFNCQ (120)
RKCLRPDCG (121)	SWCEPGWCR* (4)
LACFVTGCL (122)	GLCNGATCM* (123)
DMCWLIGCG (124)	SGCRTMVCV (125)
QRCPRSFCL (126)	LSCAPVICG (127)
RECTNEICY (128)	NECLMISCR (129)
SCVFCDWLS (130)	WACEELSCF (131)
QNCPVTRCV (132)	CATLTNDEC (133)
CDNREMSC (134)	CFMDHSNC (135)
CGEYGREC (136)	CHMKRDRTC (137)
CKKRLNVC (138)	CLDYHPKC (139)
CMTGRVTC (140)	CNKIVRRC (141)
CPDLLVAC (142)	CSDTQSIGC (143)
CSKAYDLAC (144)	CSKKGPSYC (145)
CTLKHTAMC (146)	CTQHIANC (147)
CTTEIDYC (148)	CVGRSGELC (149)

10

20

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0326】

【表4】

表4
腸から回収されたファージ由来のペプチド

YAGFFLV* (150)	RSGARSS (151)
CVESTVA (152)	SRRQPLS* (153)
SKVWLLL (154)	QVRRVPE (155)
YSGKWGW* (156)	MVQSVG (157)
LRAVGRA (158)	MSPQLAT* (159)
GAVLPGE (160)	WIEEAER* (161)
LVSEQLR (162)	RGDRPPY (163)
VRRGSPQ (164)	RVRGPER (165)
GISAVLS* (166)	GGRGSWE (167)
GVSASDW (168)	FRVRGSP (169)
SRLSGGT (170)	WELVARS (171)
MRRDEQR (172)	GCRCWA (173)
LSPPYMW (7)	LCTAMTE (18)

10

20

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0327】

【表5】

表5
皮膚から回収されたファージ由来のペプチド

CYADCEGTTCGMVC (174)	CWNICPGGCRAIC* (175)
GPGCEEECQPAC (176)	CKGTCVLGCSEEC* (177)
CSTLCGLRCMGTC (178)	CMPRCGVNCKWAC (179)
CVGACDLKCTGGC (180)	CVALCREACGEGC* (3)
CSSGCSKNCLEMC* (181)	CGRPCRGGCAASC (182)
CQGGCGVSCPIFC (183)	CAVRCDGSCVPEC* (184)
CGFGCSGSCQMOC (185)	CRVVCADGCRFIC (186)
CTMGCTAGCAFAC (187)	CEGKCGLTCECTC (188)
CNQGCSGSCDVMC (189)	CASGCSESCYVGC (190)
CGGGCQWGCAGEC* (191)	CSVRCKSVIGLC (192)
CPSNCVALCTSGC (193)	CVEGCSSGCGPGC (194)
CRVVCADGCRLIC (195)	CSTLCGLRCMGTC (196)
CFTFCEYHCQLTC (197)	CVDVCCDGCVPCC (437)
RVPLSGDVEH (438)	LRVMSFTSGQ (439)
RFSVGSIFGS (440)	CGATCEMQCPSGC (441)

10

20

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0328】

【表6】

表6

網膜から回収されたファージ由来のペプチド

CRRIWYAVC (198)	CSAYTTSPC (199)
CSCFRDVCC* (5)	CTDKSWPC (200)
CTDNRVGS (201)	CTIADFPC (202)
CTSDISWWDYKC (203)	CTVDNELC (204)
CVGDCIGSCWMFC (205)	CVKFTYDC ² (206)
CVSGHLNC (207)	CYGESQQMC (208)
CYTGETWTC (209)	CAVSIPRC (210)
CDCRGDCFC (211)	CDSLCCGACAARC (212)
CERSQSKGVHHC (213)	CFKSTLLC (214)
CFWHNRAC (215)	CGDVCPSECPGWC (216)
CGEFKVG* (14)	CGLDCLGDCSGAC (217)
CGPGYQAQCSLRC (218)	CGSHCGQLCKSLC (219)
CHMGCVSPCAYVC (220)	CILSYDNPC (221)
CISRPFYC (222)	CKERLEYTRGVC (223)
CKERPSNGLSAC (224)	CKPFRTEC (225)
CKSGCGVACRHMC (226)	CLKPGGQEC (227)
CMDSQSSC* (228)	CMNILSGC (229)
CNIPVTPIFGC (230)	CNQRNRESGNC* (231)
CNRKNSNEQRAC (232)	CNRMEMPC (233)
CQIRPIDKC (234)	CAIDIGGAC (235)
CGRFDTAPQRC (236)	CKRANRLSC (237)
CLLNYTYC* (238)	CLNGLVSMC (239)
CMSLGNNC (240)	CNRNRMTPC (241)
CQASASDHC* (242)	CQLINSSPC (243)
CQRVNSVENASC (244)	CRKEHYPC (245)
CRRHMERC (246)	CSGRPFKYC (247)
CTHLVTLC (248)	CTSSPAYNC (249)
CVTSNLRVC* (250)	CWDSGSHIC (251)
CERSHGRLC ¹ (252)	CGNLLTRRC (253)
CINCLSQC (254)	CLRHDFFVC (255)

10

20

30

表 6 (続)

CNSRSENC (256)	CRYKGPSC (257)
CSHHDNTNC (258)	CSRWYTTC (259)
CYAGSPLC (260)	CQTTSWNC* (261)
CQWSMNVC (262)	CRARIRAEDISC* (263)
CRDVVSVIC (6)	CRREYSAC (264)

Blast検索:

¹ラット網膜グアニルシクラーゼ前駆体 EC4. 6. 1. 2.

²ラットグルタミン酸レセプターサブユニットε1前駆体

試験されたいずれのモチーフについても染色はなく、

アンピシリン-ファージと比較して、

優先的なホーミングについての唯一の証拠はPDV含有ファージである。

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0329】

【表7】

表7

前立腺から回収されたファージ由来のペプチド

EVQSAKW (265)	KRVYVLG (266)
GRLSVQV (267)	WKPASLS (268)
FAVRVVG (269)	LVRPLEG (270)
GFYRMLG (271)	EGRPMVY (272)
GSRSLGA (273)	RVWQGDV (274)
GDELLA (275)	FVWLVG (276)
GSEPMFR (277)	VSFLEYR (22)
WHQPL (278)	SMSIARL* (21)
RGRWLAL* (279)	QVEEFPC (280)
LWLSGNW (281)	GPMLSVM (282)
WTFLERL (283)	VLPGGQW (284)
REVKES (285)	RTPAAVM (286)
GEWLGEC (287)	PNPLMPL (288)
SLWYLGA (289)	YVGGWEL (290)

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0330】

【表8】

表 8

卵巣から回収されたファージ由来のペプチド

EVRSRLS* (10)	RVGLVAR* (11)
AVKDYFR (291)	GVRTSIW (292)
RPVGMRK (293)	RVRLVNL (294)
FFAAVRS (295)	KLVNSSW (296)
LCERVWR (297)	FGSQAFV (298)
WLERPEY (299)	GGDVMWR (300)
VRARLMS (301)	TLRESGP (302)

10

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【 0 3 3 1 】

20

【表 9】

表9

リンパ節から回収されたファージ由来のペプチド

WGCKLRFC	(303)	MECIKYSCL	(304)
GICATVKCS	(305)	PRCQLWACT	(306)
TTCMSQLCL	(307)	SHCPMASLC	(308)
GCVRRLLCN	(309)	TSCRLEFSCA	(310)
KYCTPVECL	(311)	RGCNGSRCS	(312)
MCPQRNCL	(313)	PECEGVSCI	(314)
AGCSVTVC*	(315)	IPCYWESCR	(316)
GSCEMFPCS*	(317)	QDCVKRPCV	(318)
SECAYRACS*	(319)	WSCARPLCG*	(320)
SLCGSDGCR	(321)	RLCPSSPCT	(322)
MRCGFSGCT	(323)	RYCYPDGCL	(324)
STCGNWTCT	(325)	LPCTGASCP	(326)
CSCTGQLCR	(327)	LECRRWRCD	(328)
GLCQIDECR*	(329)	TACKVAACH	(330)
DRCLDIWCL*	(331)	XXXQGSPL	(332)
PLCMATRCA*	(333)	RDCSHRSCE*	(334)
NPCLRAACI*	(335)	PTCAYGWCA*	(336)
LECVANLCT*	(337)	RKCGEEVCT*	(338)
EPCTWNACL*	(339)	LVCPTGACV	(340)
LYCLDASCL	(341)	ERCPMAKCY	(342)
LVCQGSPL	(343)	QQCQDPYCL*	(344)
DXCXDIWCL	(345)	QPCRSMVCA	(346)
KTCVGVVRV	(347)	WSCHEFMCR	(348)
LTCWDWSCR	(350)	SLCRLSTCS	(351)
KTCAGSSCI	(352)	VICTGRQCG	(353)
NPCFGLLV	(354)	SLCTAFNCH	(355)
RTCTPSRCM	(356)	QSCLWRICI	(357)
QYCWSKGCR	(358)	LGCFPSWCG	(359)

10

20

30

表 9 (続)

VTCSSEWCL (360)	RLCSWGGCA (361)
STCISVHCS (362)	EVCLVLSCQ (363)
IACDGYLCG (364)	RDCVKNLCR (365)
XGCYQKRCT (366)	LGCFXSWCG (367)
IRCWGGRCs (368)	IPCSLLGCA (369)
AGCVQSQCY (370)	PRCWERVCS (371)
KACFGADCX (372)	TLCPLVACE (373)
SACWLSNCA (374)	SECYTGSCP (375)
) GLCQEHRCW (376)	VECGFSAVF (377)
EDCREWGCR (378)	HWCRLACR (379)

10

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

X=未知。

20

【0332】

【表10】

表10

副腎から回収されたファージ由来のペプチド

HKGQVYS (380)	FSDVHFW* (381)
RGIFVSS (382)	PKVKLSE (383)
LRFWQES (384)	IWTVVGQ (385)
DKVGLSV (386)	SETWRQF (387)
LDGMIVK (388)	RYPLAGG (389)
FTDGEDK (390)	RSTEHMS (391)
SGRRHEL (392)	LMLPRAD* (27)
SSSRVRS (393)	YHRSVGR (394)
PLLRRPH (395)	SDKLGfV* (396)
LPRYLLS (28)	AGSRTNR (397)
ITQLHKT (398)	ARCLVYR (399)
GYVAVMT* (400)	GLQVKWV (401)
IFTPGWL (402)	KQTSREL (403)
R(Y/F)LLAGG (404)	

30

40

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【0333】

【表11】

表 11
肝臓から回収されたファージ由来のペプチド

ARRGWTL (405)	SRRFVGG* (406)	
QLTGGCL (407)	ALERRSL (408)	
KAYFRWR (409)	RWLAWTV (410)	10
VGSFIYS* (411)	LSLLGIA (412)	
LSTVLWF (413)	SLAMRDS (414)	
GRSSLAC (415)	SELLGDA (416)	
CGGAGAR (417)	WRQNMPL* (418)	
DFLRCRV (419)	QAGLRCH (420)	
RALYDAL (421)	WVSVLGF (422)	
GMAVSSW (423)	SWFFLVA (424)	
WQSVVRV (425)	VKSVCRT* (426)	
CGNGHSC (426)	AEMEGRD (427)	
SLRPDNG (428)	PAMGLIR (429)	20

括弧は配列番号を含む

*は、一回より多く単離された配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、肺にホーミングする分子を同定するための CX₆C（配列番号 26）ライブラリーの 3 回のインビボパンニングの結果を示す。マウスの尾静脈への 10¹⁰形質導入単位の注射の 5 分後に肺から回収したファージを増幅し、そして 2 回継続して再注射した。1 グラムの肺、腎臓または脳当たりの回収したファージの数を、3 連のプレーティングからの平均の標準誤差を示すバーとともに、各回について示す。 30

【図 2】 図 2 A～2 D は、肺（図 2 A および 2 B）、皮膚（図 2 C）または脾臓（図 2 D）ホーミングペプチドを提示するファージの選択性を示す。肺（図 2 A、CGFECVRQC PERC、配列番号 1、「GFE-1」；図 2 B、CGFELETC、配列番号 2、「GFE-2」）；皮膚（図 2 C、CVALCREACGEGC、配列番号 3）または脾臓（図 2 D、SWCEPGWCR、配列番号 4）にホーミングするペプチドを発現する選択したファージを個々に増幅し、マウスに注射し、そして回収した（実施例 I）。1 グラムの肺、皮膚または脾臓あるいはコントロール腎臓または脳当たりの回収された、選択したペプチドを提示するファージの量を決定した。肺、皮膚、脾臓、腎臓または脳から回収した非選択（コントロール）ファージの量もまた決定した。バーは、3 連のプレーティングからの平均の標準誤差を示す。 40

【図 3】 図 3 A および 3 B は、肺または皮膚ホーミングペプチドを提示するファージのホーミングにおける、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）-融合タンパク質の同時投与の効果を示す。

図 3 A において、100 μg もしくは 500 μg の GST-CGFECVRQC PERC（配列番号 1、「GFE-1」）または 500 μg の GST を、肺ホーミング配列 CGFECVRQC PERC（配列番号 1）を提示する個々に増幅したファージの 10⁹形質導入単位で、マウスに同時注射した。循環の 5 分後に肺および腎臓からのファージ回収を、3 連のプレーティングからの平均の標準誤差を示すバーとともに、決定した。 50

図3Bにおいて、肺ホーミングペプチドCGFECVRQCPERC（配列番号1、「GFE-1」）もしくはCGFELETC（配列番号2、「GFE-2」）または皮膚ホーミングペプチドCVALLCREACGEGC（配列番号3）のいずれかを提示する個々に増幅したファージの 10^9 形質導入単位を、 $500\mu\text{g}$ の同族GST融合ペプチドとともにマウスに同時注射した。コントロールマウス（示さず）に、選択したファージおよび $500\mu\text{g}$ のGSTを注射した。GSTに比較して、同族GST融合ペプチドの存在下で肺または皮膚にホーミングする選択されたファージの阻害の割合を示す。

【図4】 図4は、肺抽出物からの 55kDa 細胞表面タンパク質が、GFE-1ペプチドアフィニティーカラムに特異的に結合することを示す。インビボでビオチン化した肺抽出物を、CGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）ペプチドカラムまたはコントロールペプチドカラム（GRGESP；配列番号442）上に分画し、洗浄し、そしてGFE-1ペプチドで溶出した。洗浄画分（「-」）、GFE-1ペプチド溶出物、および 8M 尿素溶出物からのアリコート（ $30\mu\text{l}$ ）を、還元条件下で、SDS-PAGEによって分離した。分子量マーカー（ kDa ）を、各パネルの右側に示す。

【図5】 図5は、Gly-D-Pheの加水分解により生じたD-フェニルアラニン（D-Phe）の蛍光検出の経時変化を示す。GFE-1ペプチドアフィニティーカラムからの洗浄画分（白丸）およびCGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）ペプチド溶出物（黒丸）からのサンプルを、Gly-D-Phe基質とのMDP活性についてアッセイした。D-Pheの蛍光化合物への時間依存性変換を示す。

【図6】 図6は、ファージ保有ペプチドCGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）またはCGFELETC（配列番号2；GFE-2）のCOS-1細胞発現膜ジペプチド（MDP）への結合を示す。

図6Aにおいて、COS-1細胞を、MDP発現ベクターまたはベクター単独でトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、細胞抽出物を調製し、そしてMDP活性について分析した。

図6Bにおいて、MDP発現ベクターまたはコントロール空ベクターのいずれかでトランスフェクトしたCOS-1細胞を、コントロールファージ（fd-tet）または皮膚ホーミングペプチドCVALLCREACGEGC（配列番号3；「shp-1」）、CGFECVRQCPERC（配列番号1、GFE-1）ペプチド、もしくはCGFELETC（配列番号2；GFE-2）ペプチドを保有するファージのいずれかの等量の存在下で結合アッセイに供した。各場合において、これらの細胞からレスキューしたファージ形質導入単位の総数を示す。エラーバーは、3連のプレーティングからの平均の標準偏差を示す。

【図7】 図7は、GFE-1ペプチドCGFECVRQCPERC（配列番号1）によるMDP活性の阻害を示す。MDPを発現するCOS-1細胞からの抽出物を、漸増濃度のCGFECVRQCPERC（配列番号1；GFE-1）（黒丸）またはCARACコントロールペプチド（配列番号443）（白丸）として示す）の存在下でMDP活性についてアッセイした。

【図8】 図8は、GFE-1（配列番号1）が、ヒト黒色腫細胞の肺転移を阻害することを示す。肺重量は、 10^5 のC8161ヒト黒色腫細胞単独（「ビヒクル」）； $250\mu\text{g}$ のGFE-1ペプチド配列番号1（「GFE-1ペプチド」）と同時投与した 10^5 のC8161細胞；または $250\mu\text{g}$ のCARACペプチド配列番号443（「コントロールペプチド」）と同時投与した 10^5 のC8161細胞を注射した5週間後のマウスについて示される。

【図9】 図9は、5つの種由来の膜ジペプチダーゼの推定アミノ酸配列のアラインメントを示す。ヒト（「HUM」；配列番号448）；ブタ（「PIG」；配列番号449）；ラット（「RAT」；配列番号450）；およびマウス（「MOU」；配列番号451）MDPのアミノ酸配列を、ウサギMDP（「RAB」；配列番号452）の配列とともに整列する。アステリスクは、ヒトMDPにおけるN結合型グリコシル化部位を示す。囲まれた残基Glu¹²⁵およびHis²¹⁹は、活性に必須である（Adachiら、Biochem

10

20

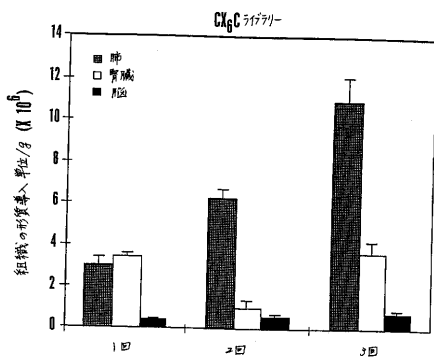
30

40

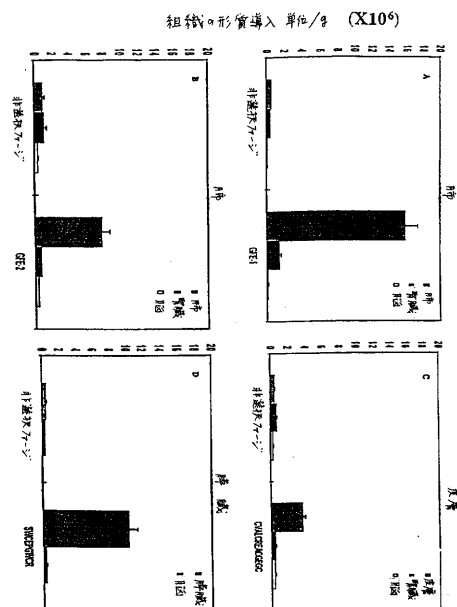
50

him. Biophys. Acta 1163:42-48 (1993); Keynan ら、FEBS Letters 349:50-54 (1994)。下線を付した残基は(-1~-16)はシグナルペプチドを示す。C末端において囲まれた残基は、成熟タンパク質においてグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーによって置換される疎水性シグナルを示す。GPIアンカー付加の部位を、矢印によって示す。

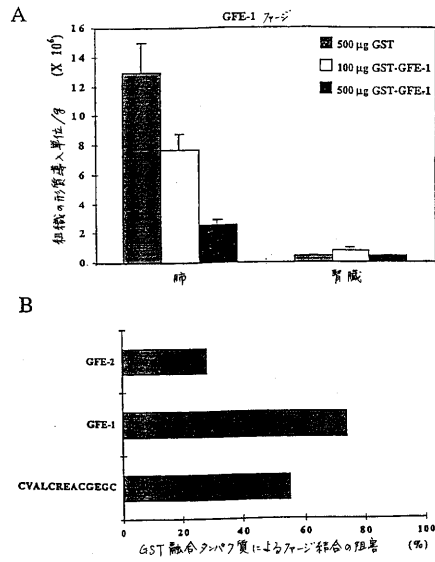
【図1】



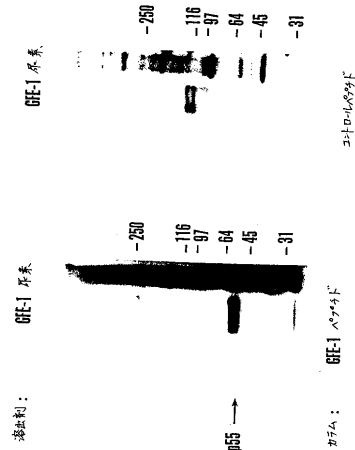
【図2】



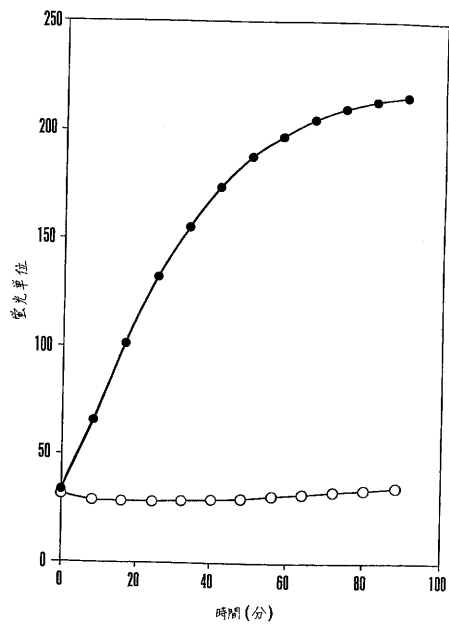
【図 3】



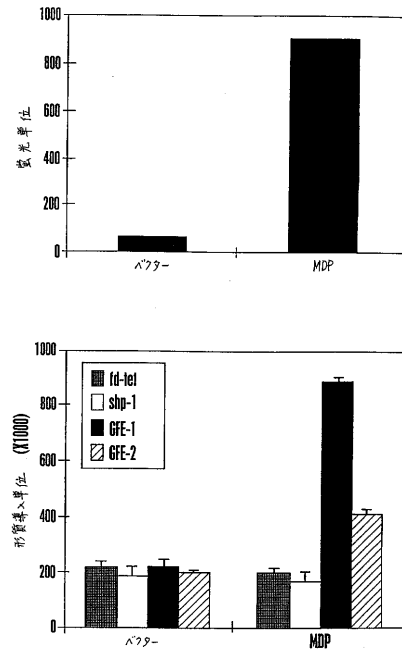
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 ルオスラーチ, アーキ アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタ フェ, ピー.オー. ボ
ックス 1054

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表平10-502674 (JP, A)
Nature, 1996年, Vol.380, pp.364-366
Mol. Cell. Endocrinol., 1997年, Vol.134, pp.59-67
J. Biol. Chem., 1993年, Vol.268, No.25, pp.18929-18935

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
JSTPlus(JDreamII)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed
Science Direct
CA/REGISTRY(STN)