

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5539324号
(P5539324)

(45) 発行日 平成26年7月2日 (2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日 (2014.5.9)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/00

C

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/02

A

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/60 (2006.01)

G 0 1 N 33/60

Z

請求項の数 15 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2011-506768 (P2011-506768)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月29日 (2009.4.29)
 (65) 公表番号 特表2011-519367 (P2011-519367A)
 (43) 公表日 平成23年7月7日 (2011.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2009/001082
 (87) 国際公開番号 W02009/133362
 (87) 国際公開日 平成21年11月5日 (2009.11.5)
 審査請求日 平成24年4月18日 (2012.4.18)
 (31) 優先権主張番号 0807831.3
 (32) 優先日 平成20年4月29日 (2008.4.29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 501308812
 ケンブリッジ エンタープライズ リミテ
 ッド
 イギリス国, シービー2 1 ティーエヌ
 ケンブリッジ, トリニティー レーン, ジ
 オールド スクールズ
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (72) 発明者 ブリンドル, ケビン
 イギリス国, ケンブリッジ シービー2
 1 ジーエー, テニス コート ロード, ユ
 ニバーシティ オブ ケンブリッジ, デ
 パートメント オブ バイオケミストリー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞死を検出しイメージングするための薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置でシステイン残基を有するシナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドと；

前記システイン残基に結合した検出可能標識と、
 を含む造影剤であって、

前記造影剤はフォスファチジルセリン (P S) に結合することを特徴とする、造影剤。

【請求項 2】

前記シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の造影剤。

【請求項 3】

前記検出可能標識が、蛍光検出可能標識、核磁気共鳴画像法の検出可能標識、またはシンチグラフィ検出可能標識であり、随意に、前記核磁気共鳴画像法の検出可能標識が、ガドリニウム (G d ³⁺) イオン等の常磁性イオンまたは超常磁性イオンであり、随意に、前記シンチグラフィ検出可能標識が、フッ素 ¹⁸、ガリウム ⁶⁸、および銅 ⁶⁴ 等の陽電子放出放射性同位元素、あるいはテクネチウム ^{99m} またはインジウム ¹¹¹ 等のガンマ放出放射性同位元素である請求項 1 または請求項 2 に記載の造影剤。

【請求項 4】

前記検出可能標識が、前記シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドの前記システ

10

20

イン残基に結合するチオール反応基、随意にマレイミド基を含む請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の造影剤。

【請求項 5】

二機能性リンカーをさらに含み、前記リンカーは前記シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドの前記システイン残基に結合するチオール反応基、随意にマレイミド基と、前記検出可能標識に結合する結合部分とを含む請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の造影剤。

【請求項 6】

前記検出可能標識が金属イオンであり、前記結合部分が前記金属イオンと錯体化するキレート、随意に DOTA または DTPA である請求項 5 に記載の造影剤。

10

【請求項 7】

個体内の細胞死のイメージングのための薬剤の製造における請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤の使用であって、

ここで細胞死は、前記造影剤を前記個体に投与する工程と、

前記個体内における前記造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成する工程と、
によりイメージングされることを特徴とする、使用。

【請求項 8】

前記個体が 1 つ以上の部位の細胞死の存在によって特徴付けられる病状を有しており、前記 1 枚以上の画像が前記 1 つ以上の部位での前記造影剤の分布を示す請求項 7 に記載の使用。

20

【請求項 9】

前記個体が腫瘍を有しており、前記 1 枚以上の画像が前記腫瘍の部位での前記造影剤の分布を示す請求項 7 に記載の使用。

【請求項 10】

個体において腫瘍を治療する癌治療の効果の決定に使用するための薬剤の製造における請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤の使用であって、

ここで前記癌治療の効果は、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に前記造影剤を前記個体に投与する工程と、

前記個体内の前記腫瘍の部位で前記造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成する工程と、
により決定され、

30

前記治療前に対して前記治療中または前記治療後に前記腫瘍の部位での前記造影剤の結合が増加することは、前記治療が前記個体に有効であることを示す、使用。

【請求項 11】

個体内の 1 つ以上の部位の細胞死によって特徴付けられる病状に対する治療の効果の決定に使用するための薬剤の製造における請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤の使用であって、

ここで前記治療の効果は、治療前、治療中、または治療後に前記造影剤を前記個体に投与する工程と、

前記個体内の細胞死の前記 1 つ以上の部位で前記造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成する工程と、
により決定され、

40

前記治療前に対して前記治療中または前記治療後に細胞死の 1 つ以上の部位での前記造影剤の結合が減少することは、前記治療が前記個体に有効であることを示す、使用。

【請求項 12】

前記病状が、心筋梗塞、心臓ブランク形成、炎症、または感染症からなる群から選択される請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

個体内の細胞死のイメージングに用いる医薬組成物の調製方法であって、

請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤を提供する工程と、

前記造影剤を医薬的に許容される賦形剤と混合する工程と、

50

を含む方法。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤を含む第 1 の容器と、医薬的に許容される希釈剤を含む第 2 の容器と、を含む細胞死をイメージングするためのキット。

【請求項 15】

フローサイトメトリーまたは組織化学の *in vitro* 法における、請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の造影剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、分子イメージングに用いる造影剤に関し、特に、*in vivo*での細胞死の発現および範囲を検出するための造影剤に関する。

【背景技術】

【0002】

治療後の腫瘍における細胞死の発現および広がり速度は、治療結果の良好な予後指標と考えられる。従って、*in vivo*での細胞死の発現および範囲を検出することが可能な、例えば、核磁気共鳴画像法 (MRI) 用の標的造影剤は、例えば、癌治療の効果を評価するのに有用である。*in vivo*での細胞死の発現および範囲の検出は、心筋梗塞、心臓ブロック、炎症、または感染症などの他の病的状態にも有用であろう。

20

【0003】

死につつある細胞の表面上に外面化したフォスファチジルセリン (PS) に結合するアネキシン V は、*in vivo*での細胞死を検出するために造影剤に使用されている。しかしながら、アネキシン V は、サイズが大きい (36 kDa)、GMP 産生プロセスが複雑である、*in vivo*での腎クリアランスが遅いなどのいくつかの制限があり、造影剤としての臨床用途が制限されている (Hanら、(2008), Nat Med 14 (3): 343; van de Wieleら、(2003), J Clin Oncol 21: 3483; Belhocineら、(2002), Clin Cancer Res 8: 2766)。

【0004】

30

フォスファチジルセリン (PS) にも結合するシナプトタグミン I の C2A ドメインは、酸化鉄ナノ粒子で標識されて、*in vivo*での細胞死の検出に使用されている [Zhao 他、Nat Med 7 (11): 1241, 2001]。しかしながら、このアプローチの有用性は、これらの構築物のサイズが比較的大きい (~25 nm) ことによって、血管系からの構築物の溢出、および腫瘍からの非結合材料のクリアランスを両方とも制限し、それ故に組織コントラストの生成を制限していた。

【0005】

ガドリニウム (Gd^{3+}) - キレート系 MRI 造影剤は、陽性コントラストを与え、腫瘍にしばしば見られる空間的および一時的に不均一なコントラストの検出を容易にする。 Gd^{3+} - キレート系造影剤は、*in vitro* [Jung 他、Bioconj Chem 15 (5): 983, 2004] および *in vivo* [Krishnan 他、Radiology, 246 (3): 854, 2008] で使用されており、腫瘍治療の効果を上手く検出している。

40

【0006】

(Gd^{3+}) - 標識アビジンに結合された 2 つのビオチニル化された野生型 C2A ドメインに基づいた造影剤は、*in vitro*で試験されている [Neves 他、Nano Lett 7 (5): 1419, 2007]。

【0007】

C2A - GST 融合タンパク質は、 ^{99m}Tc で標識されており、治療後における腫瘍の細胞死を検出するために SPECT と一緒に使用されている [Wang 他、Nuc l .

50

Med. Biol. 35 (3) : 359 - 364 , 2008]。

【 0 0 0 8 】

上記の薬剤は全て、いくつかの本質的な限界を有している。野生型 C 2 A のリジンイブシロンアミノ基を修飾することは、活性を部分的に喪失させる。さらに、リジン残基の修飾により、フォスファチジルセリンに対する種々の結合親和性をもつ複数の C 2 A 種が生成される。ピオチニル化により、野生型 C 2 A を 1 ~ 3 個のピオチン分子で標識することが示されている。複数種を生成することに加えて、野生型 C 2 A の分子 1 個あたりに 2 個以上のピオチン分子が存在することで、複数のアビジン分子の分子間反応が促進され、高分子量複合体が生成される。これは、造影剤を使用する前に取り除く必要がある。

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、修飾されたシナプトタグミン I C 2 A ドメインに基づいた改良型の分子造影剤を開発した。これらの薬剤は、例えば、癌治療後の腫瘍における *in vivo* での細胞死の評価に有用であろう。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

一態様において、本発明は、配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置でシステイン残基を有するシナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドと；システイン残基に結合した検出可能標識とを含む造影剤を提供する。

【 0 0 1 1 】

造影剤は、シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドを介してフォスファチジルセリン (P S) に結合する。その後、検出可能標識により、個体において *in vivo* で結合した薬剤の画像を生成することができる。死につつある細胞は、フォスファチジルセリン (P S) を細胞表面上に外面化するか、または、フォスファチジルセリン (P S) を細胞膜の内側膜 (*inner leaflet*) 上に露出するため、得られた画像において結合造影剤の濃度が増加することは、個体内の組織または領域で細胞死が起きていることを示すものである。換言すれば、ある部位でアポトーシス細胞または壊死細胞が存在することは、個体において、他の部位に対して前記部位での造影剤の量が増すことによって示される。

【 0 0 1 2 】

シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドは、哺乳動物シナプトタグミン I の C 2 A ドメインまたはその変異体のアミノ酸配列を含んでもよく、修飾されたアミノ酸配列は、配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置でシステイン残基を含む。配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置のシステイン残基は、シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドにおける唯一のシステイン残基であることが好ましい。

【 0 0 1 3 】

配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置でシステイン残基を有するシナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドは、本明細書では「 C 2 A m 」と呼ぶ。

【 0 0 1 4 】

検出可能標識が C 2 A ドメインのシステイン基に結合することで、フォスファチジルセリンに対して単一の結合親和性をもつ一様な形式 (即ち、単一の分子種) の造影剤を生成することができる。

【 0 0 1 5 】

例えば、シナプトタグミン C 2 A ドメインポリペプチドは、配列番号 1 の 7 8 番目に対応する位置でシステイン残基を保持する配列番号 1 のアミノ酸配列、または、配列番号 1 のアミノ酸配列の変異体を含んでもよい。

【 0 0 1 6 】

哺乳動物シナプトタグミン I の C 2 A ドメインの変異体は、参照する哺乳動物シナプトタグミン I の C 2 A ドメインの配列と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有してもよい。

10

20

30

40

50

【0017】

適当な参照哺乳動物シナプトタグミンI配列としては、ヒトシナプトタグミンIのC2 Aドメインのアミノ酸配列(SYT1: Gene ID: 6857; 核酸配列NM_005639.1 GI: 5032138; アミノ酸配列NP_005630.1 GI: 5032139)または、ドブネズミなどの別の哺乳類種からのホモログ(Syt1: Gene ID: 25716; アミノ酸配列P21707.3 GI: 94730428またはNP_001028852.2 GI: 148356226; ヌクレオチド配列NM_001033680.2 GI: 148356225)が挙げられる。シナプトタグミンIのC2 Aドメインの78番目(配列番号1)は、完全長ドブネズミシナプトタグミンIの217番目および完全長ヒトシナプトタグミンIの218番目に一致する。

10

【0018】

適当な参照配列としては、配列番号1に示すシナプトタグミンIのS78C変異C2 Aドメインが挙げられる。配列番号1は、ラットおよびヒトのC2 Aドメインアミノ酸配列(両方とも同一)に対応する。

【0019】

アミノ酸配列同一性は、一般に、アルゴリズムGAP(GCG Wisconsin Package(商標)、アクセルリス社、カリフォルニア州サンディエゴ)を参照して定義される。GAPは、Needleman-Wunschアルゴリズム(J. Mol. Biol. (48): 444-453(1970))を用いて、マッチ数を最大化し、かつ、ギャップ数を最小化する2つの全配列を整列させる。一般に、ギャップ創製ペナルティ=12およびギャップ伸長ペナルティ=4のデフォルトパラメータを用いる。GAPを使用することが好ましいが、他のアルゴリズム、例えば、BLASTもしくはTBLASTN(Altschulら、(1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410の方法を用いる)、FASTA(Pearson and Lipman(1988) PNAS USA 85: 2444-2448の方法を用いる)、またはSmith-Watermanアルゴリズム(Smith and Waterman(1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197)を用いてもよく、これらは、一般に、デフォルトパラメータを用いる。

20

【0020】

具体的なアミノ酸配列変異体は、1個のアミノ酸、2、3、4、5~10、10~20、または20~30個のアミノ酸を挿入、付加、置換、または欠失することによって、所与の配列のものとは異なり得る。

30

【0021】

C2 Aドメインにおける配列番号1のシナプトタグミンIのC2 Aドメインの78番目に対応する位置は、ルーチンの配列分析技術を用いて、シナプトタグミンポリペプチド配列において容易に決定することができる。この位置のアミノ酸は、ルーチンの部位特異的変異導入技術を用いて、システイン残基に置き換えてもよい(例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第3版、Russellら、(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい)。

40

【0022】

1つ以上の異種アミノ酸(例えば、異種ペプチドまたは異種ポリペプチド配列)は、本明細書に記載のC2 Aドメイン配列に結合または融合してもよい。例えば、シナプトタグミンC2 Aドメインポリペプチドは、1つ以上の異種アミノ酸に結合または融合した上述のC2 Aドメインポリペプチドを含んでもよい。1つ以上の異種アミノ酸は、シナプトタグミンIタンパク質以外のソースからの配列を含んでもよい。

【0023】

いくつかの実施形態において、分子造影剤は、複数のC2 Aドメインを含んでもよい。例えば、造影剤は、上述の変異型C2 Aドメインに加えて、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上のC2 Aドメインを含んでもよい。これらの追加C2 Aドメインは、薬剤中

50

に追加の検出可能標識を組み込むために、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドの親和性を増す1つ以上の野生型C2Aドメインと、上述の1つ以上の追加S78C C2Aドメイン変異体とを含んでもよい。

【0024】

いくつかの実施形態において、造影剤に使用されるシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、例えば、トロニンまたは第Xa因子などの部位特異的プロテアーゼを用いて、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドを含む融合タンパク質を開裂することによって作ることができる。このようにして作られたシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、部位特異的プロテアーゼ認識配列の全部または一部を形成するNまたはC末端で1つ以上の異種アミノ酸を含んでもよい。融合タンパク質は、精製後に部位特異的プロテアーゼによって除去される精製タグを含んでもよい。適当な精製タグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(日本住血吸蟲から)が挙げられる。シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドの作製については、以下により詳細に説明する。

【0025】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の分子造影剤は、40kDa未満、30kDa未満、または20kDa未満の分子量を有する。

【0026】

本発明の別の態様は、

配列番号1の78番目に対応する位置でシステイン残基を有するシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと；

前記システイン残基が結合するのに適当な検出可能標識と

を含む、細胞死を検出するための造影剤に使用される単離結合部分を提供する。

【0027】

シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、上記でより詳細に説明している。

【0028】

シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、化学合成によって全体的または部分的に生成してもよい。例えば、ポリペプチドは、液相もしくは固相合成法を用いて；溶液中で；または、固相、液相、および溶液化学のいずれかの組み合わせによって合成することができる。例えば、最初に各々のペプチド部分を完成させ、次に、所望かつ適切ならば存在する任意の保護基を除去後、各々の炭酸もしくはスルホン酸またはそれらの反応性誘導体の反応によって残基Xを導入することによる。

【0029】

ポリペプチドの化学合成は、当該技術分野で周知である(J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984); M. Bodanzsky and A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York (1984); J. H. Jones, The Chemical Synthesis of Peptides. Oxford University Press, Oxford 1991; in Applied Biosystems 430A Users Manual, ABI Inc., Foster City, California; G. A. Grant, (Ed.) Synthetic Peptides, A User's Guide. W. H. Freeman & Co., New York 1992, E. Atherton and R. C. Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach. IRL Press 1989 and in G. B. Fields, (Ed.) Solid-Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzymology Vol. 289). Academic Press, New York and London 1997)。

【0030】

シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、組み換え技術によって全体的または部分的に生成してもよい。例えば、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドでコード化した核酸は、宿主細胞で発現され、発現されたポリペプチドは、細胞培養から単離、および/または、精製してもよい。

【0031】

上述の核酸配列および構築物は、発現ベクター内に含まれてもよい。適当なベクターは、プロモーター配列、終結フラグメント、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および必要に応じて他の配列を含む適切な調節配列を含んで選択または構築することができる。ベクターは、宿主細胞内の核酸の発現を駆動するための適切な調節配列を含むのが好ましい。発現系における異種核酸コード配列の発現を駆動するための適当な調節配列は、当該技術分野で周知であり、構成的プロモーター（例えば、CMVまたはSV40などのウイルスプロモーター）、および誘導性プロモーター（例えば、Tet-on制御プロモーター）が挙げられる。ベクターは、大腸菌などの細菌宿主、および/または、真核細胞内で選択、複製、および発現することが可能な、複製起点および選択マーカーなどの配列も含んでよい。

10

【0032】

ベクターは、プラスミド、ウイルス（例えば、ファージ）、または必要に応じてファージミドでもよい。さらなる詳細については、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第3版、Russellら、2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。細胞培養中の組み換えポリペプチドの発現、その後の単離および精製の多くの公知技術およびプロトコルは当該技術分野で周知である（例えば、Protocols in Molecular Biology, 第2版、Ausubelらeds. John Wiley & Sons, 1992; Recombinant Gene Expression Protocols Ed RS Tuan (Mar 1997) Humana Press Incを参照されたい）。

20

【0033】

いくつかの実施形態において、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、精製タグを備えた融合タンパク質として発現されてもよい。融合タンパク質は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと精製タグの間にプロテアーゼ認識部位を含むのが好ましい。発現後、融合タンパク質は、精製タグに結合する固定化された化学物質を用いて、アフィニティークロマトグラフィーによって単離することができる。単離後、融合タンパク質は、例えば、トロンピンまたは第Xa因子を用いてタンパク質分解によって開裂して、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドを生成することができる。

30

【0034】

精製タグは、特異的結合対の一メンバーを形成する異種アミノ酸配列である。精製タグを含むポリペプチドは、特異的結合対の他のメンバーがポリペプチドに結合することで検出され、単離され、および/または、精製されてもよい。いくつかの好適な実施形態において、タグ配列は、抗体分子によって結合されるエピトープを形成してもよい。

40

【0035】

種々の適当な精製タグは、当該技術分野で周知であり、例えば、MRGS(H)₆、DYKDDDDK(FLAG(商標))、T7-、S-(KETAAAKFERQHMDS)、ポリ-Arg(R₅₋₆)、ポリ-His(H₂₋₁₀)、ポリ-Cys(C₄)、ポリ-Phe(F₁₁)、ポリ-Asp(D₅₋₁₆)、ストレプト-タグII(WSPQFEK)、c-myc(EQKLISEEDL)、インフルエンザ-HAタグ(Murray, P. J. ら(1995) Anal Biochem 229, 170-9)、Glu-Glu-Pheタグ(Stammers, D. K. ら(1991) FEBS Lett 283, 298-302)、タグ100(Qiagen; 哺乳類MAPキナーゼ2由来の12aaタグ)、Cruzタグ09(商標)(MKAEFRRQESDR、Sa

50

nta Cruz Biotechnology Inc.)、およびCruzタグ22 (商標)(MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.)が挙げられる。公知のタグ配列は、Terpe(2003)Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533で概説されている。
【0036】

いくつかの好適な実施形態において、精製タグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼである。発現後、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドとグルタチオン-S-トランスフェラーゼとを含む融合タンパク質は、固定化グルタチオンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによって単離することができる。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質の精製は、当該技術分野で周知である。単離後、融合タンパク質をタンパク質分解によって開裂し、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドを生成することができる。

10

【0037】

検出可能標識は、分子イメージングモダリティによって*in vivo*で検出可能な任意の分子、原子、イオン、または基であってよい。適当な検出可能標識としては、金属、放射性同位元素および放射線不透過性剤(例えば、ガリウム、テクネチウム、インジウム、ストロンチウム、ヨウ素、バリウム、臭素、およびリンを含有する化合物)、放射線透過性剤、造影剤、および蛍光染料が挙げられる。

【0038】

検出可能標識の選択は、使用される分子イメージングモダリティによる。使用される分子イメージングモダリティとしては、X線撮影、蛍光透視法、蛍光イメージング、高解像度超音波イメージング、生物発光イメージング、核磁気共鳴画像法(MRI)、および核イメージング、例えば、ポジトロン断層法(PET)および単一光子放射断層撮影法(SPECT)などのシンチグラフィ技術が挙げられる。

20

【0039】

*In vivo*蛍光イメージング技術は、使用された特定の蛍光検出可能標識に適当な発光および吸光スペクトルを用いた画像の生成を伴う。画像は、従来技術によって視覚化することができ、蛍光イメージング技術としては、蛍光反射イメージング(FRI)、蛍光分子トモグラフィー(FMT)、ハイパースペクトル3D蛍光イメージング(Guido Zavattiniら、Phys. Med. Biol. 51:2029, 2006)、および拡散光学分光法(Luker & Luker、J. Nucl. Med. 49(1):1, 2008)が挙げられる。

30

【0040】

適当な蛍光検出可能標識としては、フルオレセイン、フィコエリトリン、ユーロピウム、トルレッド、アロフィコシアニン(APC)、PerCP、リサミン、ローダミン、B-X-ローダミン、TRITC、BODIPY-FL、FluorX、Red613、R-フィコエリトリン(PE)、NBD、ルシファーイエロー、カスケードブルー、メトキシクマリン、アミノクマリン、テキサスレッド、ヒドロキシクマリン、アレクサフルオル(商標)染料(分子プローブ)(例えば、アレクサフルオル(商標)350、アレクサフルオル(商標)488、アレクサフルオル(商標)546、アレクサフルオル(商標)568、アレクサフルオル(商標)633、アレクサフルオル(商標)647、アレクサフルオル(商標)660、およびアレクサフルオル(商標)700)、スルホネートシアニン染料(AP Biotech)(例えば、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、およびCy7)、IRD41、IRD700(Li-Cor, Inc.)、NIR-I(Dejindom, Japan)、ラジヨラブルー(Diatron)、Dylight(商標)405、488、549、633、649、680、および800反応性染料(Pierce/Thermo Fisher Scientific Inc)、またはLI-COR(商標)染料(例えば、IRDye(商標)(LI-COR(商標) Biosciences)が挙げられる。

40

【0041】

50

他の適当な蛍光検出可能標識としては、テルビウムおよびユーロピウムなどのランタニドイオンが挙げられる。ランタニドイオンは、本明細書のどこかで説明するように、キレートによってシナプトタグミンポリペプチドに結合することができる。

【0042】

他の適当な蛍光検出可能標識としては、量子ドット（例えば、Qdot（商標）、Invitrogen）が挙げられる。タンパク質を量子ドットで標識する技術は、当該技術分野で周知である（Michalet, X.ら. Science 307:538, 2005; Alivisatos, P. Nat Biotechnol 22:47-52, 2004）。

【0043】

核磁気共鳴画像法ベースの技術は、特異な化学環境における水プロトンの相対緩和率（relative relaxation rate）に基づいて画像を生成する。適当なMRI技術は、Gadian, D. 「NMR and its applications to living systems」. Oxford Univ. Press, 1995, 第2版により詳細に説明されている。核磁気共鳴画像法としては、従来の核磁気共鳴画像法（MRI）、磁化移動コントラストイメージング（MTI）、磁気共鳴スペクトロスコピー（MRS）、拡散強調画像法（DWI）、および機能的磁気共鳴画像法（fMRI）（Rovarisら. (2001) J Neurol Sci 186 Suppl 1:S3-9; Pomper & Port (2000) Magn Reson Imaging Clin N Am 8:691-713; Kean & Smith, (1986) Magnetic Resonance Imaging: Principles and Applications, Williams and Wilkins, Baltimore, Md）が挙げられる。

【0044】

核磁気共鳴画像法（MRI）の標識として使用するのに適当な標識としては、常磁性イオンまたは超常磁性イオン、酸化鉄粒子、および水溶性造影剤が挙げられる。超常磁性イオンおよび常磁性イオンとしては、遷移元素、ランタニド元素、およびアクチニド元素（例えば、鉄、銅、マンガン、クロム、エルビウム、ユーロピウム、ジスプロシウム、ホルミウム、およびガドリニウムなど）が挙げられる。好適な常磁性検出可能標識としては、ガドリニウムが挙げられる。

【0045】

いくつかの実施形態において、標識は、シンチグラフィ検出可能標識であってもよい。適当なシンチグラフィ検出可能標識としては、放射性同位元素（例えば、陽電子放出放射性同位元素およびガンマ放出放射性同位元素）が挙げられる。

【0046】

シンチグラフィ画像法としては、SPECT（単一光子放射断層撮影法）、PET（ポジトロン断層法）、ガンマカメラ画像法、および直線走査法が挙げられる。シンチグラフィ画像法は、単一面における放射能を検出するためにガンマカメラまたは直線スキャナの使用を含んでもよい。SPECTイメージングシステムは、解析対象を中心にして回転する1台以上のガンマカメラの使用に基づいてもよい。PETイメージングシステムは、複数次元で放射能を検出する、リング型の検出器のアレイを含んでもよい。

【0047】

陽電子放出放射性同位元素を含むシンチグラフィ検出可能標識は、例えば、ポジトロン断層法（PET）に有用であろう。適当な放射性同位体としては、炭素-11、窒素-13、酸素-15、フッ素-18、ガリウム-68、および銅-64が挙げられる。

【0048】

ガンマ放出放射性同位元素を含むシンチグラフィ検出可能標識は、例えば、単一光子放射断層撮影法（SPECT）に有用であろう。適当な放射性同位体としては、テクネチウム-99m、インジウム-111、インジウム-123、ガリウム-67、タリウム-2

10

20

30

40

50

01、キセノン - 124 が挙げられる。

【0049】

上述の *in vivo* 用途に加えて、本明細書に記載の造影剤は、*in vitro* 法、例えば、フローサイトメトリーおよび組織化学アッセイにも有用であろう。

【0050】

本明細書に記載の造影剤の生成方法は、

配列番号1の217番目に対応する位置でCysを有するシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドを提供する工程と；

検出可能標識をCys残基に結合させる工程と、
を含んでもよい。

10

【0051】

シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドが検出可能標識に結合するモードは、一部は、検出可能標識の化学的性質によって変化する。標準的な範囲の結合技術を用いることができる（例えば、Hermanson, G., 「Bioconjugate techniques」、Academic Press、サンディエゴ、米国、1996を参照されたい）。

【0052】

検出可能標識は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドに直接結合してもよいし、または、1つ以上のリンカー分子を介して間接的に結合してもよい。

【0053】

20

いくつかの好適な実施形態において、検出可能標識は、1つ以上の共有結合を介してシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドに結合してもよい。例えば、検出可能標識は、システイン残基のチオール基と反応してチオエーテルリンケージなどの共有結合を形成する反応基によって、システイン残基に結合してもよい。

【0054】

適当なチオール反応基としては、ハロアセチルおよびハロゲン化アルキル誘導体、ヨードアセトアミド、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリアル化剤、およびチオール-ジスルフィド交換試薬が挙げられる。いくつかの実施形態において、フェニル水銀基が用いられる。

【0055】

30

反応基はマレイミド基であるのが好ましい。

【0056】

チオール基と反応する反応基は、検出可能標識の一部であってもよい（即ち、検出可能標識は反応基を含んでもよい）、または、検出可能標識およびシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドに結合する二機能性試薬もしくはリンカーの一部であってもよい（即ち、検出可能標識およびシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、反応基を含む二機能性試薬またはリンカー経由で結合してもよい）。二機能性試薬は、分子間結合を形成するための2つの別個の結合基を含む。二機能性試薬は、同種官能性または異種官能性であってもよい（即ち、結合基は同じであっても異なってもよい）。

【0057】

40

二機能性試薬は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドおよび検出可能標識に直接結合してもよい。例えば、二機能性試薬は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと共有結合を形成するチオール反応基と、検出可能標識に結合する第2の結合基とを含んでもよい。第2の結合基は、共有または非共有結合を介して検出可能標識に結合することができる。例えば、二機能性試薬は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドのシステイン残基に共有結合する反応基と、金属イオン標識と錯体を形成するキレート基とを含む二機能性キレートであってもよい。

【0058】

適当な反応基としては、上述のマレイミド基などのチオール反応基が挙げられる。

【0059】

50

適当なキレート基は、当該技術分野で周知であり、例えば、DTPA（ジエチレントリアミン-5酢酸）、置換DTPA、DOTA（1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸）、置換DOTA、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、置換EDTA、CDTA（トランス-1, 2-シクロヘキシレンジニトリロ四酢酸）、置換CDTA、H₄-TETA（1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸）、およびNOTA（1, 4, 7-トリアザシクロノナン-1, 4, 7-三酢酸）からなる群から選択される。

【0060】

いくつかの実施形態において、検出可能標識は、キレート化ペプチドを用いて、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドにキレート化してもよい。適当なキレート化ペプチド配列は、当該技術分野で周知である（例えば、国際公開第2006/107794号；米国特許第5594115号；国際公開第1993/023425号；Smithら J. Biol. Chem. (1988) 263 15 7211；Tianら J. Nucl. Med. 45 12 2070-2082；Kievensら Biophysical Journal 64:919-924 (1993) を参照されたい）。

【0061】

好適な二機能性キレートとしては、マレイミド-モノ-アミド-DOTAが挙げられる。

【0062】

二機能性キレートは、任意の便利な技術によって、検出可能標識およびシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと反応することができる。例えば、二機能性キレートのキレート基は、二機能性キレートの反応基がシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと反応する前、後、または該反応と同時に、金属イオン標識とキレート化して、金属キレート錯体を形成してもよい。

【0063】

金属イオン標識がキレートに結合する手順は、使用する二機能性キレートおよび金属イオンのみならず、用途に要する比活性および量にもよる。適当な方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Sosabowski, J. & Mather, S. (2006) Nat Protoc 1 (2): 972-6 および Cooper M. ら (2006) Nat Protoc 1 (1): 314-7 に記載されている。例えば、¹¹¹Inなどの三価金属イオンのDOTAによるキレート化において、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドをわずかに酸性の緩衝液に移す。三価金属同位体を加え、37 °Cで1時間インキュベートし、標識反応を起こさせて、EDTAでクエンチする。標識効率は、薄層クロマトグラフィーによって監視する。標識効率は、>95%であるのが好ましい。未結合金属からの標識種をさらに精製することは、例えば、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって達成される。

【0064】

いくつかの好適な造影剤は、

配列番号1の78番目に対応する位置でシステイン残基を有するシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと、

システイン残基に結合した検出可能標識とを含み、

ここで、検出可能標識はガドリニウムイオンである。

【0065】

ガドリニウムイオンは、金属キレート錯体中のDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）またはDOTA（1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸）などのキレートに結合してもよい。

【0066】

ガドリニウム-キレート錯体は、チオエーテル結合によってシステイン残基に結合してもよい。例えば、キレートは、システイン残基と反応してチオエーテル結合を形成するマレイミド基（即ち、二機能性試薬中で）をさらに含んでもよい。

【0067】

いくつかの実施形態において、二機能性試薬は、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドと、検出可能標識に結合する第2のリンカーとに結合してもよい。例えば、第2のリンカーは、PET同位体（例えば、フッ素-18）で標識された化学基を含んでもよい。

【0068】

いくつかの実施形態において、クリックケミストリーを用いることができる。クリックケミストリーは、トリアゾール環を形成するために2成分（一方はアジド基、他方は末端アセチレン基を含む）間のCuI触媒カップリングを伴う。アジド基およびアルキン基は他のカップリング手順の条件に不活性であり、かつ、ペプチド内に見られる他の官能基は

10

【0069】

例えば、シナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドのシステイン残基は、一端でオール-特異性反応基（例えば、ヨードアセトアミド、マレイミド、またはフェニルチオスルホネート）、他端でアジドまたはアセチレンを含む二機能性試薬と反応することができる。標識基は、クリックケミストリーを用いて末端アジドまたはアセチレンに結合することができる。例えば、リンカーの一端にアセチレンまたはアジド基、他端にキレート（金属同位体用）または脱離基（ハロゲン標識用）を備えた第2のリンカー（Baskin, J. (2007) PNAS 104(43)16793-97）を用いることができる。

20

【0070】

本発明の別の態様は、
上述の造影剤を個体に投与する工程と、
個体内における造影剤の分布の1枚以上の画像を生成する工程と、
を含む個体内の細胞死のイメージング方法を提供する。

【0071】

画像は、例えば、薬剤の投与後、一定期間にわたって（即ち、一定間隔で）作製してもよい。

30

【0072】

個体のある部位での造影剤の量は、その部位での細胞死の量を示す。例えば、他の部位に対して標的部位での造影剤の量が増すことは、標的部位での細胞死が増したことを示す。

【0073】

関連態様は、in vivoでの細胞死のイメージング方法に使用される造影剤と、in vivoでの細胞死のイメージング方法に使用される製剤の製造における造影剤の用途を提供する。

【0074】

造影剤を個体に投与することについては、以下により詳細に説明する。

40

【0075】

個体内における造影剤の分布の1枚以上の画像は、分子イメージング技術を用いて生成することができる。造影剤の検出可能標識を検出する任意の分子イメージング技術を用いることができる。例えば、MRIを用いて、MRI検出可能標識を含む造影剤を検出することができる。種々の適当な分子イメージング技術は、当該技術分野で周知である。

【0076】

フォスファチジルセリン（PS）は、細胞死が起こっている細胞の表面に外面化する。投与後、造影剤のシナプトタグミンC2Aドメインポリペプチドは、細胞上に露出するフォスファチジルセリン（PS）、例えば、細胞膜表面の内側膜上に外面化または露出したPSに結合することで、細胞死が起こっているまたは起こった細胞を標識する。

50

【 0 0 7 7 】

適切な分子イメージング技術を用いて、薬剤の投与後の一定期間にわたる個体の全部または一部内の検出可能標識の分布を示す 1 枚以上の画像を生成することができる。身体の組織または領域における検出可能標識の量または濃度は、組織または領域における細胞死の量を示す。身体の組織または領域において検出可能標識の濃度が増すことは、組織または領域における細胞に起こっている細胞死が身体の他の組織または領域に対して増加していることを示す。例えば、身体の腫瘍または他の癌組織で検出可能標識の濃度が増すことは、腫瘍または他の癌組織における細胞に起こっている細胞死が身体の他の組織または領域に対して増加していることを示す。従って、本発明の造影剤は、治療後の腫瘍における細胞死のイメージングに有用であろう。

10

【 0 0 7 8 】

本発明の別の態様は、
腫瘍を有する個体に上述の造影剤を投与する工程と、
個体内の腫瘍部位で造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成する工程と、
を含む個体内の腫瘍のイメージング方法を提供する。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、癌治療後の腫瘍における細胞死の発現および広がり
の速度は、イメージングにより決定することができる。これは、例えば、癌治療の結果を予測
するのに有用であろう (Brindley, K. (2008) Nat Rev Cancer 8 (2): 94 - 107; Neves, A. A. & Brindley, K. M. (2
006) Biochim Biophys Acta 1766 (2): 242 - 61)
。

20

【 0 0 8 0 】

個体内の腫瘍の治療における癌治療の効果を決定する方法は、
癌治療中または癌治療後に、個体に上述の造影剤を投与する工程と、
個体内の腫瘍部位での造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成する工程と、
を含んでもよい。

【 0 0 8 1 】

癌治療中または癌治療後に、個体内の腫瘍部位での造影剤の分布の 1 枚以上の画像を生成
することができる。

30

【 0 0 8 2 】

造影剤は癌治療前に個体に投与してもよいし、個体内の腫瘍部位での造影剤の分布の 1
枚以上の画像を癌治療前に生成してもよい。

【 0 0 8 3 】

腫瘍部位での造影剤の分布の画像を用いて、造影剤が腫瘍に結合している量または範囲
を決定してもよい。従来の化学療法および放射線療法は、うまくいった場合、通常は腫瘍
の広範な局所的細胞死を誘導する。この細胞死は、造影剤によって画像にすることができ
る。癌治療後に造影剤の腫瘍への結合が増すことにより、癌治療が腫瘍の治療に有効であ
ることを示す。

【 0 0 8 4 】

結合の増加は、癌治療前の腫瘍への結合、または、非腫瘍組織への結合と比較して決定
される。

40

【 0 0 8 5 】

例えば、治療中または治療後の腫瘍部位での造影剤の分布は、治療前の分布と比較され
る。治療前に対して治療中または治療後に造影剤の密度または分布が増すことは、癌治療
が腫瘍の治療に有効であることを示す。

【 0 0 8 6 】

適当な癌治療は、当該技術分野で周知であり、放射線治療および化学療法が挙げられる
。

【 0 0 8 7 】

50

身体の組織または部位で検出可能標識の濃度が増すことは、例えば、炎症、感染症、心筋梗塞、または心臓プラーク形成などの、細胞死によって特徴付けられる病状の結果として、組織または部位の細胞に起こっている細胞死が、身体の他の組織または部位に対して増していることを示す。従って、本発明の造影剤は、かかる病状の治療後の細胞死のイメージングに有用であろう。

【0088】

本発明の別の態様は、

個体に上述の造影剤を投与する工程と、

個体内の造影剤の分布の1枚以上の画像を生成する工程と、

を含む、個体内の細胞死の増加によって特徴付けられる病状の評価方法を提供する。

10

【0089】

いくつかの実施形態において、細胞死の発現および広がり速度は、イメージングを用いて決定することができる。これは、例えば、病状の評価、例えば、病状の程度もしくは重症度、予後、および/または、治療への反応性を決定するのに有用であろう。

【0090】

個体内の細胞死の増加によって特徴付けられる病状の治療における治療効果を決定する方法は、

治療中または治療後に個体に上述の造影剤を投与する工程と、

個体内の造影剤の分布の1枚以上の画像を生成する工程と、

を含む。

20

【0091】

造影剤の分布の画像を用いて、個体内の死細胞または死につつまる細胞に造影剤が結合している量または範囲を決定することができる。結合の減少、または、治療後に結合が増した部位の数が減少することは、治療が細胞死の量を減らすことに有効であり、それによって病状を治療していることを示す。

【0092】

結合の増減は、対照に対して決定される。適当な対照実験は、当業者には明らかであり、例えば、治療前の結合、または、必要に応じて健常組織に対する結合が挙げられる。

【0093】

本明細書に記載の造影剤を用いて、早期の臨床試験およびその後の診療で薬効を評価することができる。ここで、該造影剤は、治療を誘導するのに用いることができる。無効な治療は早期に断念することで、より効果的な薬剤を選択することができる（例えば、Brindle, K. (2008) Nat Rev Cancer 8(2): 94-107を参照されたい）。

30

【0094】

個体に対する治療計画の効果を決定する方法は、

(a) 個体に初期の治療計画を施す工程と、

(b) 個体内の死細胞または死につつまる細胞に本明細書に記載の造影剤が結合している量または範囲を決定する工程と、

を含み、

40

ここで計画に応じて結合の量または範囲が変化することは、計画が個体に有効であることを示す。

【0095】

初期の治療計画が、造影剤が結合する量または範囲を変化させるのに不十分である場合、個体内に造影剤が結合する量または範囲が変化するまで計画を変更または調整することができる。従って、方法は、

(c) 治療計画を変更し、変更された計画を個体に施す工程と、

(d) 個体内の死細胞または死につつまる細胞に本明細書に記載の造影剤が結合する量または範囲を決定する工程と、

(e) 造影剤が結合する量または範囲に変化が観察されるまで、工程(c)および(d)を

50

繰り返す工程と、

をさらに含み、

ここで計画に応じて造影剤が結合する量または範囲が変化することは、計画が個体に有効であることを示す。

【0096】

いくつかの実施形態において、造影剤が結合する量または範囲が所定の値を超えて変化するまで、工程(e)は、工程(c)および(d)を繰り返してもよく、

造影剤が結合する量または範囲が所定の値を超えて変化することは、計画が個体に有効であることを示す。

【0097】

個体は、癌状態を有することがあり、治療は、放射線治療または化学療法などの癌治療である。計画に応じて腫瘍組織に造影剤が結合する量または範囲が増大することは、計画が腫瘍組織の細胞死を引き起こし、個体に有効であることを示す。

【0098】

個体は、細胞死によって特徴付けられる病状を有することがある。計画に応じて個体内の1つ以上の疾患部位に造影剤が結合する量または範囲が減少することは、計画がその部位での細胞死を改善し、個体に有効であることを示す。

【0099】

関連態様は、上記方法のいずれかに使用される本明細書に記載の造影剤と、上記方法のいずれかに使用される製剤の製造における本明細書に記載の造影剤の用途とを提供する。

【0100】

造影剤を単独で投与することは可能であるが、それを1種以上の医薬的に許容される担体、アジュバント、賦形剤、希釈剤、充填剤、緩衝剤、安定剤、保存剤、潤滑剤、もしくは当業者には公知の他の物質および適宜他の治療薬または予防薬とともに、上記で定義した造影剤を含む医薬組成物(例えば、製剤)として提供することが好ましい。

【0101】

1種以上の医薬的に許容される担体、賦形剤、緩衝剤、アジュバント、安定剤または他の物質とともに混合または製剤化された本明細書に記載の造影剤を含む医薬組成物を本明細書に記載の方法で用いてもよい。

【0102】

本発明の別の態様は、

上述の造影剤を提供する工程と、

造影剤を医薬的に許容される賦形剤と混合する工程と、

を含む医薬組成物の調製方法を提供する。

【0103】

本明細書で使用される「医薬的に許容される」という用語は、妥当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、もしくは他の問題または合併症を起こさず、妥当な利益/リスク比が得られて、対象(例:ヒト)の組織との接触における使用に適した化合物、物質、組成物、および/または、剤形に係するものである。各担体、賦形剤なども、製剤の他の成分と適合性であるという意味において「許容される」ものでなければならない。

【0104】

適切な担体、賦形剤などは標準的な医薬テキストに記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、MacK Publishing Company, Easton, Pa., 1990を参照されたい。

【0105】

製剤は、単位剤形で提供することが便利であり、製薬分野で公知の任意の方法によって製造することができる。かかる方法は、1種以上の副成分を構成する担体と造影剤を組み合わせる工程を含む。一般に、製剤は、液体担体もしくは微粉碎固体担体またはその両方

10

20

30

40

50

を活性化化合物と均一かつ十分に組み合わせ、次に必要に応じて生成物を成形することにより製造される。

【0106】

製剤は、液体、溶液、懸濁液、乳剤、エリキシル剤、シロップ剤、錠剤、トローチ剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、アンプル、坐剤、腔坐剤、軟膏剤、ゲル剤、ペースト、クリーム、スプレー、ミスト、泡、ローション、オイル、ポーラス、舐剤、またはエロゾル剤の形態であってもよい。

【0107】

造影剤、または、造影剤を含む医薬組成物は、対象に、任意の都合のよい投与経路で、限定的ではないが、経口（例えば、摂取）；局所（例えば、経皮、鼻腔内、眼内、口腔、および舌下）；肺内（例えば、エロゾル剤を用いて、口または鼻を経由した吸入または注入療法による）；直腸内；腔内；非経口（例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、動脈内、心臓内、髄腔内、脊椎内、嚢内、被覆下、眼窩内、腹腔内、気管内、表皮下、関節内、クモ膜下、および胸骨内への注入）；皮下または筋肉内へのデポ剤の埋め込みを含めて、全身的／末梢的に、または所望の作用部位に投与することができる。

10

【0108】

好適な実施形態において、造影剤、または、造影剤を含む医薬組成物は、静脈内または眼内注射によって対象に投与される。

【0109】

経口投与（例えば摂取による）に適切な製剤は、それぞれが既定量の活性化化合物を含有するカプセル剤、カシェ剤、もしくは錠剤などの個別の単位として；粉末もしくは顆粒として；水性もしくは非水性の液体中の溶液もしくは懸濁液として；水中油型液体エマルジョンもしくは油中水型液体エマルジョンとして；ポーラスとして；舐剤として；または、ペーストとして、提供することができる。

20

【0110】

非経口投与（例えば、皮膚、皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含む注射によるもの）に適切な製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、防腐剤、安定剤、静菌剤、および製剤を対象とする受容者の血液と等張にする溶質を含み得る、水性および非水性の等張で、発熱物質フリーの無菌注射液；懸濁剤および増粘剤を含み得る水性および非水性の無菌懸濁液；ならびに、化合物が血液成分または1つ以上の器官を標的とするように設計されるリポソームまたは他の微粒子系が挙げられる。かかる製剤に使用される適当な等張性ビヒクルの例としては、塩化ナトリウム注射液、リンガー溶液、または乳加リンガー液が挙げられる。典型的には、溶液中の活性化化合物の濃度は、約 1 ng/ml ～ 約 $10 \mu\text{g/ml}$ 、例えば、約 10 ng/ml ～ 約 $1 \mu\text{g/ml}$ である。製剤は、単回投与量または複数回投与量を密閉した容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提供するものであってもよく、使用直前に無菌の液体担体、例えば、注射用水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存されていてもよい。

30

【0111】

造影剤、および造影剤を含有する組成物の適切な投与量が患者によって異なり得ることは理解されるであろう。最適な投与量の決定は、一般に、投与における何らかのリスクまたは有害な副作用に対する治療効果のレベルのバランスが関係するであろう。選択される投与量のレベルは、限定するものではないが、投与経路、投与時間、造影剤の排出速度、必要な造影剤の量、併用される他の薬物、化合物、および／または物質、患者の年齢、性別、体重、症状、全身の健康状態、既往歴を含む、様々な要因に依存するであろう。造影剤の量および投与経路は、最終的には医師の裁量となるが、一般的には、投与量は、部位（例えば、腫瘍、対象組織、または全身）で、実質的に有害または有毒な副作用を引き起こさずに造影することが可能な造影剤の濃度を達成し得るものであろう。

40

【0112】

*in vivo*での投与は、単回投与で、連続的または断続的に（例えば、適当な間隔をおいた分割用量で）実施することができる。最も効果的な投与手段および投与量の決定

50

方法は、当業者に周知であり、治療に用いる製剤、治療の目的、治療される標的細胞、および治療される対象によって異なるであろう。単回または複数回投与は、医師によって選択される投与レベルおよびパターンで実施することができる。

【0113】

上述のように、造影剤、および造影剤を含む組成物は、治療の効果を評価するために、癌治療前、癌治療と併用して、または癌治療後に投与してもよい。個体の治療、例えば、癌治療の効果を評価するための適当な投与計画は、治療する医師が選択することができる。

【0114】

本発明の別の態様は、本明細書に記載の細胞死をイメージングするためのキットを提供する。キットは、(a)第1のバイアルが凍結乾燥された造影剤を含み、(b)第2のバイアルが医薬的に許容される希釈剤を含む、本明細書に記載の凍結乾燥された造影剤と水性希釈剤との二室バイアルシステムを含んでもよい。

【0115】

キットは、例えば、*in vivo*での細胞死のイメージング方法で造影剤を用いる取扱説明書を含んでもよい。

【0116】

本発明の種々のさらなる態様および実施形態は、本開示から当業者には明らかになるであろう。本明細書で引用した全ての文献は、その内容全体を参照によって組み込んだものとする。

【0117】

本明細書で使用される「および/または」は、他のものを含むかまたは含まない、2つの特定の特徴または成分の各々の具体的な開示として理解すべきである。例えば「Aおよび/またはB」は、各々が個別に記載されるかのように、(i)A、(ii)B、(iii)AおよびB、の各々の具体的な開示であると理解されたい。

【0118】

特に明記しない限り、上述した特徴の説明および定義は、本発明の任意の具体的な態様または実施形態に限定するものではなく、記載される全ての態様および実施形態に等しく適用される。

【0119】

以下の図および表を参照しながら本発明のある態様および実施形態について一例として示す。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】発現ベクター(pGEX-2T、GE Healthcare)中のプラスミド制限部位(A)を示し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)ドメイン(シアン色)を示し、かつ、リンカー(濃緑色)およびC2Am(黄色)を挿入したベクターマップを示す。

【0121】

【図2】3つの元の候補となる突然変異の配置を左から右(Gln154、Ser217、およびAsn248)に示すシナプトタグミンIのC2Aドメイン(ドブネズミ由来)構造の概略図を示す。

【0122】

【図3】IPTGによる誘導前後の、3つの元の候補GST-C2A変異体(S217C、N248C、およびQ154C)のSDS-PAGEゲルを示す。ゲルは、全ての形質転換菌が変異タンパク質をある程度過剰発現するが、S217Cをより過剰に発現することをはっきりと示している。

【0123】

【図4】過剰発現が異なる誘導OD(0.6、0.8、1.0)で起こることを示す、3つの元の候補GST-C2A変異体(変異体1つ当たり2つのクローン)のSDS-PAGE

10

20

30

40

50

G E ゲルを示す。

【 0 1 2 4 】

【図 5】G S T - C 2 A 精製の S D S P A G E を示す。レーン (A) : G S T カラム上の溶解細胞の非結合画分、(B) : G S T - C 2 A のトロンピン開裂後の G S T および C 2 A、(C) : H i T r a p セファロースカラムの非結合画分、(D) H i T r a p セファロースカラムからの溶出 C 2 A m、(E) 野生型 C 2 A。

【 0 1 2 5 】

【図 6】C 2 A m - A l x F (第 1 カラム) または A n x V - A l x F (A n x V - A l x F) (第 2 カラム) (A l x F = アレクサフルオル 4 8 8、I n v i t r o g e n) で標識した E L 4 細胞の二重散布図を示す。(A) S Y T O X (商標) 赤色蛍光 (細胞死マーカー ; E x c、 = 6 3 3 n m ; E m、 = 6 7 0 n m) 対 C 2 A m - A l x F または A n x V - A l x F (E x c、 = 4 8 8 n m ; E m、 = 5 1 9 n m) のプロット。(B) S Y T O X (商標) 赤色蛍光対 U V 自己蛍光プロット (アポトーシス細胞集団 (黄色) は、U V 自己蛍光が低いことを表し ; この現象は、細胞における N A D (H) プールのポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ (P A R P) - 介在欠乏の結果であり得る)。C 2 A m - A l x F および A n x V - A l x F は 0 . 2 μ M で用いた。R 1 (緑色) = 生存細胞 ; R 2 (黄色) = 初期アポトーシス細胞 ; R 3 (橙色) = 後期アポトーシス細胞 ; R 4 (赤色) = 壊死細胞。

【 0 1 2 6 】

【図 7】C 2 A m - A l x F で標識した E L 4 細胞の二重散布図を示す。(A) S Y T O X (商標) 赤色蛍光 (細胞死マーカー ; E x c、 = 6 3 3 n m ; E m、 = 6 7 0 n m) 対 C 2 A m - A l x F (E x c、 = 4 8 8 n m ; E m、 = 5 1 9 n m) のプロット。(B) S Y T O X (商標) 赤色蛍光対 U V 自己蛍光のプロット。C 2 A m - A l x F は、0 . 2、0 . 5、または 2 μ M で用いた。R 1 (緑色) = 生存細胞 ; R 2 (黄色) = 初期アポトーシス細胞 ; R 3 (橙色) = 後期アポトーシス細胞 ; R 4 (赤色) = 壊死細胞。

【 0 1 2 7 】

【図 8】野生型 C 2 A (A) および C 2 A m (B) のフォスファチジルセリン被覆チップとの相互作用の表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラムを示す。S P R は任意単位で応答。時間は秒である。二重曲線。一連のタンパク質濃度 : 9 5、8 0、7 0、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0、5 n M。野生型 C 2 A (A) および C 2 A m (B) のフォスファチジルセリンへの結合に対する S P R センサーグラムに由来する熱平衡データを用いた。S P R は任意単位で応答。線は、一対一ラングミュア結合モデルへのフィッティングに対応する。得られた対応する解離定数 (K D) は、4 8 . 5 \pm 3 . 5 n M (C 2 A 野生型) および 4 9 . 4 \pm 4 . 9 n M (C 2 A m) であった。各濃度のデータは二重である。

【 0 1 2 8 】

【図 9】C 2 A 野生型 (図 9)、C 2 A m (図 1 0)、C 2 A m - アレクサフルオル 4 8 8 (図 1 1)、および C 2 A m - D O T A (図 1 2) の質量分析 (E S I) を示す。

【 0 1 2 9 】

【図 1 0】C 2 A 野生型 (図 9)、C 2 A m (図 1 0)、C 2 A m - アレクサフルオル 4 8 8 (図 1 1)、および C 2 A m - D O T A (図 1 2) の質量分析 (E S I) を示す。

【 0 1 3 0 】

【図 1 1】C 2 A 野生型 (図 9)、C 2 A m (図 1 0)、C 2 A m - アレクサフルオル 4 8 8 (図 1 1)、および C 2 A m - D O T A (図 1 2) の質量分析 (E S I) を示す。

【 0 1 3 1 】

【図 1 2】C 2 A 野生型 (図 9)、C 2 A m (図 1 0)、C 2 A m - アレクサフルオル 4 8 8 (図 1 1)、および C 2 A m - D O T A (図 1 2) の質量分析 (E S I) を示す。

【 0 1 3 2 】

【図 1 3】死につつある細胞の C 2 A m - A F 6 4 7 または A n x V - A F 6 4 7 標識を示す。C 2 A m (A) または A n x V (B) 標識 (アレクサフルオル (登録商標) 6 4 7

10

20

30

40

50

チャンネル; E_{xc} 、 $\lambda = 647$; E_m 、 $\lambda = 670$ nm、 x 軸) の関数としての細胞生存度 (Sytox (登録商標) Green 核染色、細胞死マーカー; E_{xc} 、 $\lambda = 504$; E_m 、 $\lambda = 523$ nm、 y 軸) の二重散布図である。代表的なプロットは、エトポシド ($5 \mu M$) で 16 時間処理した EL4 細胞で得た。(A) および (B) の象限 (赤十字) は、壊死細胞 (n)、アポトーシス細胞 (a)、および生存細胞 (v) を示す。NADH 自己蛍光 (E_{xc} 、 $\lambda = 350$; E_m 、 $\lambda = 475$ nm、 x 軸) の関数としての Sytox (登録商標) Green (y 軸) の二重散布図も、薬物療法 (16 時間) 後の同一時点の (C) で示す。C2Am (D) または AnxV (E) を用いた EL4 細胞死検出の経時変化を示す。試料を 2 時間ごとに回収し、フローサイトメトリーによって分析した。各タンパク質によって表示された集団分離に基づいた 4 象限ゲートを用いて、生存細胞、アポトーシス細胞、および壊死細胞の画分割合を算出した。実験を 3 回行い、示したデータは、代表的なデータセット (各時点で三重) に対応する。示したデータは、各時点の平均 \pm SEM ($n = 3$ 重、誤差棒は、見えない場合にはマーク内にある) である。[C2Am] = $0.2 \mu M$ 、[AnxV] = $4 nM$ 。各象限の出隅の数字は、細胞画分の各割合を示す。
【0133】

【図 14】C2Am (A) または AnxV (B) を用いた EL4 細胞の蛍光標識の経時変化を示す。C2Am (黒三角) および AnxV (黒四角) で標識した、生存細胞 (A)、壊死細胞 (B)、およびアポトーシス細胞 (C) の平均蛍光強度 (MFI) である。データは図 13 と同様にゲートした。実験を 3 回行い、示したデータは、代表的なデータセット (各時点で三重) に対応する。示したデータは、各時点の平均 \pm SEM ($n = 3$ 重、誤差棒は、見えない場合にはマーク内にある) である。[C2Am] = $0.2 \mu M$ 、[AnxV] = $4 nM$ 。+ $P < 0.0001$ で、生存細胞は常に、壊死細胞は $t = 6$ 時間で、アポトーシス細胞は $t = 4, 6, 10, 12, 16 \sim 24$ 時間、* $P < 0.001$ で、アポトーシス細胞は $t = 14$ 時間である。任意単位の平均蛍光強度 (MFI) は、各チャンネルの自己蛍光レベルに標準化した。C2Am (D) または AnxV (E) を用いた死につつつある EL4 細胞対生存細胞の選択的標識の経時変化を示す。データは、壊死細胞 / 生存細胞 (D) およびアポトーシス細胞 / 生存細胞 (E) の MFI 比として示す。実験を 3 回行い、示したデータは、代表的なデータセット (各時点で三重) に対応する。示したデータは、各時点の平均 \pm SEM ($n = 3$ 重、誤差棒は、見えない場合にはマーク内にある) である。[C2Am] = $0.2 \mu M$ 、[AnxV] = $4 nM$ 。+ $P < 0.0001$ で、壊死細胞 / 生存細胞比は $t > 10$ 時間で、アポトーシス細胞 / 生存細胞比は $t = 0, 4 \sim 20$ 時間であり、* $P < 0.001$ で、アポトーシス細胞 / 生存細胞比は 22 時間で、壊死細胞 / 生存細胞比は 6 ~ 8 時間であり、* $P < 0.05$ で、壊死細胞 / 生存細胞比は 0 時間で、アポトーシス細胞 / 生存細胞比は 2 時間である。
【0134】

【図 15】未処理細胞およびエトポシドで 16 時間処理した EL4 細胞における、C2Am (A) または AnxV (B) 標識 (アレクサフルオル (登録商標) 647; E_{xc} 、 $\lambda = 647$; E_m 、 $\lambda = 670$ nm、 x 軸) の関数としての活性カスパーゼ標識 (ポリカスパーゼ FLICA (登録商標) カルボキシフルオレセイン; E_{xc} 、 $\lambda = 490$; E_m 、 $\lambda = 530$ nm、 y 軸) の二重散布図を示す。未処理コホートまたは処理コホートのいずれかにおけるアポトーシス細胞および壊死細胞を、それぞれ、最大 2 倍および 16 倍以上に FLICA で染色し、生存細胞と比較した。(A) および (B) の象限 (赤十字) は、壊死細胞 (n)、アポトーシス細胞 (a)、および生存細胞 (v) を示す。各象限の出隅の数字は、細胞画分の各割合を示す。
【0135】

【図 16】EL4 細胞を示し、これは、死につつつある細胞 (B) には C2m - AF647 結合しているが、生存細胞 (A) には C2m - AF647 結合していないことを示す。対応する EL4 細胞の明視野画像 (左側パネル、チャンネル Ch2 の下) および蛍光画像 EL4 細胞 (右側パネル、チャンネル Ch6 の下) を得た。C2Am で染色されなかった細胞 (A) の画像は、対応する明視野画像において、丸い正常な形態で生存可能であると示され

10

20

30

40

50

た。C 2 A mでポジティブ染色された細胞 (B) は、異常な形態をもち、対応する明視野画像において、細胞死を起こしていることを示した。

【 0 1 3 6 】

【 図 1 7 】 C 2 A m (黒三角) または A n x V (黒四角) を用いた E L 4 細胞の標識におけるプローブ濃度の効果を示す。試験した濃度範囲は、C 2 A mおよびA n x Vに対して、それぞれ、0 . 0 5 ~ 1 . 0 μ Mおよび1 ~ 2 0 n Mであった。C 2 A mおよびA n x Vで標識したE L 4 細胞の生存細胞 (a)、壊死細胞 (b)、およびアポトーシス細胞 (c) の平均蛍光強度 (M F I) データを示す。任意単位の平均蛍光強度 (M F I) は、各チャンネルの自己蛍光レベルに標準化した。データは、壊死細胞 / 生存細胞 (d) およびアポトーシス細胞 / 生存細胞 (e) のM F I比としても表される。データは、図 1 3 Cと同様に、N A D (H) 自己蛍光レベルを用いてゲートした。実験を3回行い、示したデータは、全実験からの平均結果に対応する (一連の各濃度は二重に行った)。データは、各濃度の平均 \pm S E M (n = 3 重、誤差棒は、見えない場合にはマーク内にある) として示す。* P < 0 . 0 5。

10

【 0 1 3 7 】

【 図 1 8 】 2 つのプローブが E L 4 細胞のアポトーシス細胞および壊死細胞に結合するカルシウム依存性の研究を示す。カルシウムの存在下 (白色棒) または非存在下 (1 0 m M E D T A ; 灰色棒) におけるアポトーシス細胞 / 生存細胞および壊死細胞 / 生存細胞のM F I比を示す。カルシウムの非存在下で得られた比率は、カルシウムの存在下で得られた比率 (棒の上の縦軸ラベル) の a %としても示す。

20

【 0 1 3 8 】

【 図 1 9 】 C 2 A m (C) または A n x V (B) を用いた M D A - M B - 2 3 1 細胞の蛍光標識の経時変化を示す。データは、生存細胞 (青色)、アポトーシス細胞 (黄色)、および壊死細胞 (赤色) の N A D (H) 自己蛍光プロファイル (A) に基づいて、図 1 3 と同様にゲートした。示したデータは、代表的なデータセットである。[C 2 A m] = 0 . 2 μ M、[A n x V] = 4 n M。アポトーシス細胞 / 生存細胞 (D) および壊死細胞 / 生存細胞 (E) のM F I比を示す。

【 0 1 3 9 】

表 1 は、図 1 4 で示したデータから N A D (H) U V 自己蛍光を測定することで決定された、C 2 A mまたはA n x Vによって特定されたE L 4 細胞死の程度の比較を示す。x および y は、それぞれ、N A D (H) 自己蛍光の測定から決定された、各タンパク質で検出された細胞画分のベストフィットラインの勾配および切片を表し ; 1 未満の勾配 (x) の値は、所与の細胞画分の過小評価値を示す。R ² は、分析範囲におけるベストフィットの相関係数である (% 細胞)。

30

【 0 1 4 0 】

表 2 は、非修飾タンパク質 C 2 A m および修飾後のタンパク質 (C 2 A m - A 1 x A F 6 4 7) に対する S P R データの親和性および動態解析から得られた解離定数 (K d) を示す。C 2 A m (二重注入) に対する親和性分析により、K d はおよそ 5 5 \pm 3 . 5 n M と示された。動態解析は、非常に似た値であった。修飾タンパク質 C 2 A m - A 1 x A F 6 4 7 は、親和性分析によれば 7 1 \pm 6 . 9 n M、動態解析によれば 8 7 . 9 n M と僅かに高い K d を示した。動態および親和性の分析は似た値であった。分析により、タンパク質の活性は化学修飾後に多く保たれることが示唆された。

40

【 0 1 4 1 】

配列番号 1 は、S e r 7 8 C y s 変異型 C 2 A ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 4 2 】

配列番号 2 は、S e r 7 8 C y s 変異型 C 2 A ドメイン (C 2 A m) でコードされたヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 4 3 】

配列番号 3 は、G S T / C 2 A ドメイン融合が挿入された p G E X - 2 T ベクターのヌクレオチド配列を示す。p G E X - 2 T 配列、ヌクレオチド 1 ~ 2 5 7 および 1 3 7 4 ~

50

6379; GSTドメイン:ヌクレオチド258~917;リンカー:ヌクレオチド918~970;C2ドメイン:ヌクレオチド971~1364(変異:1213~1214);アーチファクト:ヌクレオチド1365~1373;GST lacプロモーター:-10:ヌクレオチド205~211;-35:ヌクレオチド183~188;lacオペレーター=ヌクレオチド217~237;リボゾーム結合部位=244 開始コドン=258。

【0144】

実験

材料および方法

全ての組織培養用試薬、SYTOX(登録商標)Green死細胞染色、アネキシンV-アレクサフルオル647(商標)(AnxV-AlexF647)は、Invitrogen(Paisley、Renfrewshire、UK)から入手した。グリーンポリカスパーゼFLICA(登録商標)キットは、Immunochemistry technologies LLC(Bloomington、MN、USA)から入手した。SDS-PAGEによるAnxV-AlexF647調製物の分析は、37kDaよりも僅かに小さな質量をもつバンドを示した。これは、633nmの光を照射した際に蛍光を発した唯一のバンドであった。クマシー染色ゲルのデンストメトリーにより、このバンドは、Non-Interfering Protein Assay(登録商標)(Merck Chemicals Ltd、Nottingham、UK)により16μg/mlまたは~460nMのAnxV-AlexF647を含有すると示されたゲルにおいて全タンパク質質量の~2%を表すことを示した。全ての化学物質は、他に指定しない限り、Sigma-Aldrich Co.Ltd(Poole、Dorset、UK)が提供する分析グレードであった。エトポシド(EPOSIN)は、PCH Pharmachemie(Haarlem、Netherlands)から入手した。マウスリンパ腫(EL-4)細胞およびヒト乳癌細胞(MDA-MB-175細胞)は、American Type Culture Collection(Teddington、UK)から入手した。

【0145】

部位特異的変異

ドブネズミシナプタグミン配列は、NCBI Genbankサービス(配列同一性NM_001033680;NM_001033680.2)を用いて取得し、この配列からC2Aドメインを選択した。3つの候補のス테인変異体には、Ser217、Gln154、Asn248を選択した(図2を参照)。変異誘発に適切なプライマーは、Quikchange Primer Designソフトウェアを用いて設計した。C2A含有pGEX-2Tベクター(GE Healthcare、Chalfont St Giles、UK)をBL21大腸菌細胞から単離し、二重制限消化を行い、その同一性を確認した。Stratagene QuikChange部位特異性変異誘発キットによって変異誘発を行った。大腸菌DH5コンピテント細胞を熱ショックによって変異プラスミドで形質転換し、増幅ベクターを単離し、シーケンシングを行った。最後に、大腸菌BL21細胞をエレクトロポレーションによってベクターで形質転換した。

【0146】

タンパク質過剰発現の試験

3つの変異体のタンパク質の過剰発現量を評価するために、変異型C2Aベクターを含有する大腸菌BL21(各変異体に2つのクローン)を、2L型三角フラスコ中のLB培地(Merck Biosciences)で増殖させた。変異体の発現を、対照として野生型GST-C2A-発現細菌と比較した。細胞培養は、光学密度(600nmでのOD)が0.6、0.8、および1.0であった場合に、IPTG(イソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド、GE Healthcare)によって誘導を行った。誘導前、および、誘導後一時間ごとに試料を回収し、その後、細胞溶解を行った。SDS-PAGEゲルは、3つの変異体全て(図3)に対して42kDaの期待分子量(GST

10

20

30

40

50

- C 2 A m) のバンドを示し、3つの誘導時間での発現量に著しい違いはないことを示した。

【 0 1 4 7 】

異なる変異体の相対発現量を比較するために、変異体1つ当たり1つのクローンで実験を繰り返し、0.7 ~ 0.8のODで誘導を行い、3時間増殖させた。細胞ペレットを溶解させ、最終体積を均一にした。これらの細胞溶解物のSDS-PAGEの結果を図3に示す。

【 0 1 4 8 】

変異 S e r 2 1 7 C y s の選択

C 2 A の最もよく発現した部位特異性変異体として S 2 1 7 C (C 2 A ドメインの 7 8 番目 ; 完全長シナプトタグミン I の 2 1 7 番目) 変異体 (C 2 A m) を選択した。

10

【 0 1 4 9 】

C 2 A m タンパク質は、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) との融合タンパク質として発現した。G S T - C 2 A の精製は参考文献 2 に記載されている。簡潔に言えば、G S T - アフィニティークロマトグラフィー (G S T p r e p カラム、G E H e a l t h c a r e) によって G S T - C 2 A m を溶解細胞から抽出し、トロンピンと共にインキュベートし、H i T r a p セファロースカラム (G E H e a l t h c a r e) 上で精製した。図 5 は、これらの精製工程の S D S P A G E ゲルを示す。レーン A は、G S T カラム上の溶解細胞の非結合 (「 フロースルー 」) 画分を示す。レーン B は、C 2 A ドメインを表す 1 6 k D a バンドと、G S T ドメインの 2 6 k D a バンドとを示す。これは、G S T - C 2 A m のトロンピン開裂の結果である。レーン C は、H i T r a p セファロースカラムのフロースルーを示し、レーン D は、溶出 C 2 A m ドメインを表す。最後に、レーン D および E は、C 2 A m および C 2 A の分子量が同じであることを示す。

20

【 0 1 5 0 】

変異 C 2 A の精製

C 2 A m タンパク質は、I P T G による誘導の後、4 2 k D a の G S T タグ融合タンパク質として発現し、S 7 8 C 変異体は、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。5 0 μ g / m L アンピシリンを含有する L B 培地 (G i b c o 、 I n v i t r o g e n 、 G r a n d _ I s l a n d 、 N Y) 中で細胞を 3 7 ° で培養した。G S T - C 2 A m の発現は、c a . 1 ~ 1 . 2 O . D . 単位の光学密度 (6 0 0 n m) で、0 . 1 m M のイソプロピル - β - D - チオガラクトシド (I P T G 、 A m e r s h a m 、 P i s c a t a w a y 、 N J) によって誘導された。誘導を 5 時間進行させた後、遠心分離 (1 5 0 0 0 g 、 3 0 分、4 °) によって細胞を採取し、凍結ペレットとして - 2 0 ° で 2 4 時間保持した。2 m M の 4 - (2 - アミノエチル) ベンジルスルホニルフルオリド (A E B S F 、 M e l f o r d L a b o r a t o r i e s 、 C h e l s w o r t h 、 I p s w i c h 、 U K) とプロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e D i a g n o s t i c s L t d . 、 L e w e s 、 E a s t S u s s e x 、 U K) とを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S 、 O x o i d U S A 、 C o l u m b i a 、 M D) 中で細胞ペレットを再懸濁させた。水冷 E m u l s i F l e x - C 5 ホモジナイザー (A v e s t i n 、 O t t a w a 、 O n t a r i o 、 C a n a d a) によって、1 , 0 0 0 パールでの 3 フローサイクルを用いて細胞を壊した後、D N A s e I (c a . 2 5 0 μ g) (S i g m a 、 S t . L o u i s 、 M O) およびオクチルフェノールエトキシレート (トリトン X - 1 0 0 (商標) 、最終濃度 0 . 1 %) を穏やかに攪拌しながら加えた (1 5 分、4 °) 。遠心分離 (4 0 0 0 0 g 、 3 0 分、4 °) によって細胞の破片を除去し、0 . 2 2 μ m の低タンパク質結合フィルター (M i l l i p o r e 、 B e d f o r d 、 M A 、 U S A) を通して残りの上清を濾過し、クロマトグラフィーで精製した。添加液および溶出緩衝液として、それぞれ、P B S 、および、p H 8 . 0 の 5 0 m M の トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (T r i z m a (商標) 塩基、S i g m a) 中の 2 5 m M グルタチオン (M e l f o r d) を用いて、G S T P r e p (商標) F F カラム (G E H e a l t h c a r e 、 P i s c a t a w a y 、 N J 、 U S A) で F P L C によって初期精製を行った。添加液および

30

40

50

溶出緩衝液として、それぞれ、2 mMのCaCl₂、または10 mMのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)のいずれかを含有するHEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)-緩衝生理食塩水(HBS、20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4)を用いて、第2のタンパク質精製をHiPrep(商標)SP FFカラム(GE Healthcare)上で行った。最後に、10 kDa濃縮器(Vivaspin(商標)、Vivascience、Edgewood、NY、USA)を用いて精製タンパク質(GST-C2Am)を濃縮し、緩衝液をHBSに交換した。この細菌発現システムにより、1 Lの培地当たり約60~80 mgの組換えGST-C2Amを一貫して得た。GST-C2Am 1 mg当たり2 NIH単位のトロンピン(GE Healthcare)をもつHBS中で22 にて16時間インキュベーションすることによって、GSTタグを融合タンパク質(およそ10 mg/mLのタンパク質濃度)から除去した。酵素消化物を0.22 μmの低タンパク質結合フィルターを通して濾過し、C2Amに特異的に結合するHiPrep(商標)SP FFカラム(GE Healthcare)を用いて開裂GSTタグを除去した。Pre-cast NUPAGE(商標)4~12%勾配ゲル、試料緩衝液、分子量マーカー、およびInvitrogen(Grand Island、NY、USA)からのNovex(商標)ゲルタンクを用いて、精製の程度をSDS-PAGEによって分析した。

【0151】

タンパク質濃度の推定

Non-Interfering Protein Assay(商標)キット(NIPA)(Merck Chemicals Ltd)を用いて、非修飾および修飾タンパク質の濃度を推定した。これは、銅イオンがペプチドバックボーンに特異的に結合することに基づいている。市販のアネキシンV-アレクサフルオル647(商標)(0.1% BSAも含有)中のアネキシンVの濃度を測定するために、試料をSDS-PAGEで分析した。励起波長633 nmによるTyphoon蛍光ゲルスキャナー(GE Healthcare)を用いて、対応ゲルの蛍光についてもチェックした。SDS-PAGE上のアネキシンVの分子量に対応するタンパク質バンドは、蛍光した唯一のバンドとして確認された。デンストメトリーを用いてバンドを定量化した。これにより、光学密度を測定することによって、他の全てのバンドにおける割合として対象のバンドの強さが得られる。全タンパク質濃度を示した、試料のデンストメトリーおよびNIPAアッセイを用いて、アネキシンVのおおよその濃度を算出した。

【0152】

蛍光標識タンパク質の生成

変異タンパク質(C2Am)は、システイン-78残基とアレクサフルオル647 C2マレイミド(Invitrogen)のマレイミド基との反応を介して、蛍光色素アレクサフルオル647(AlexaFluor 647)と共有結合的に標識した。簡潔に言えば、10 mMのDTTを用いて、タンパク質を30分間室温で還元した。その後、HNE緩衝液(20 mM HEPES、100 mM NaCl、5 mM EDTA、pH 7.4)中の5 kDaピバスピン濃縮器(Sartorius、Epsom、UK)でタンパク質を洗浄した。これにより、共役反応を妨害する任意の残渣DTTを除去した。タンパク質を50~100 μMの濃度範囲に保持し、およそ10倍のモル過剰の蛍光マレイミド色素を加えた。マグネチックスターラー上で4 にて一晚反応を進行させた。ゲル濾過を用いて、修飾タンパク質を未反応色素から分離した。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を用いて、タンパク質の修飾がうまくいったことを確認した。これにより、およそ17204 Daの単一種(C2Am-AlexaFluor 647)が得られた。アネキシンV-アレクサフルオル647(商標)のESI質量分析も行った。簡潔に言えば、ミリポアジップチップmC18を用いて試料を脱塩し、50% MeCN/0.2%ギ酸で溶出した。移動相として70% MeOH/0.2%ギ酸を用いて、1.7 mL/分の流量でWaters QtoF Microに直接注入することによって試料を分析した。標準設定(キャピラリー3000 V、コーン90 V、キャピラリー温度80 、脱溶媒温度150 、ミオグロ

ピンおよびノまたはトリブシノーゲンによる校正)は同一ファイルに後で収集した。Waters Mass Lynx MaxEnt 1ソフトウェア(Waters Ltd、Manchester、UK)を用いてデコンボリューションを行った。

【0153】

フローサイトメトリーを用いたアポトーシス細胞結合の実証

変異タンパク質(C2Am)は、上述の蛍光標識アポトーシス検出プローブ(C2Am-A1xF)を作製するために、システイン-217残基を介して蛍光色素アレクサフルオル488-マレイミド(A1xF、Invitrogen)で標識した。

【0154】

マウスリンパ腫EL4細胞を化学療法剤(エトポシド、15 μM)で14時間処理し、アポトーシスを誘導させた。氷冷の細胞標識緩衝液100 μL(20 mM HEPES、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂、pH 7.4)中で再懸濁した、試料1つ当たり10⁶個の細胞を、SYTOX(商標)Red(Invitrogen;試料1つ当たり1.5 μL)およびC2Am-A1x(0.2、0.5、もしくは2 μM)またはアネキシンV-アレクサフルオル488(AnxV-A1xF;0.1もしくは0.2 μM)のいずれかで室温にて15分間インキュベートした。試料を細胞標識緩衝液で1000 μLに希釈した。結果を図6に示す。488 nmでの蛍光強度の増加が、初期アポトーシス細胞(黄色)、後期アポトーシス細胞(橙色)、および壊死細胞(赤色)で観察された。このシフトは、同一濃度(0.2 μM)でAnxV-A1xFよりもC2Am-A1xFを用いることでより顕著であった(図6Aを参照)。

【0155】

488 nmでの蛍光強度の増加は、プローブ濃度が増加するにつれて観察された(図7)。この増加した標識は、初期および後期のアポトーシス細胞および壊死細胞で主に見られた。

【0156】

一連の濃度試験において、細胞ペレット(10⁶個の細胞)を1%ウシ胎仔血清を有する氷冷HEPES-緩衝生理食塩水(10 mM HEPES、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂、pH 7.4)で洗浄し、C2m-AF647またはアネキシンV-アレクサフルオル647(商標)(Invitrogen)を含有する同じ緩衝液100 μL(SYTOX(登録商標)Green(Invitrogen;50 nM)と組み合わせ、0.05~1.0 μMの全タンパク質濃度範囲において用いた)で再懸濁し、37で15分間インキュベートした。得られた混合物を2回洗浄し、氷上に短時間保持した後、LSRII細胞計(BD Biosciences、Rockville、MD USA)で分析した。1回当たり20,000個の細胞がカウントされた。時間経過データにおいて、処理誘導時点から2時間ごとにEL4細胞を回収し、処理し、上で略述したプロトコルに従って分析した。タンパク質は、各時点でC2AmおよびAnxVを、それぞれ、0.2 μMおよび4 nMの固定濃度で用いた。試料は三重に分析した。プローブへの結合のカルシウム依存性を試験するため、タンパク質は、HEPES緩衝生理食塩水中でC2mおよびAnxVを、それぞれ、0.1 μMおよび2 nMの固定濃度で用いた。いくつかの実験において、緩衝液中のCa²⁺は10 mM EDTAで置き換えた。インキュベーション後に、同じ緩衝液で洗浄も行った。

【0157】

活性カスパーゼを検出するため、処理EL4細胞および未処理EL4細胞を洗浄した後、グリーンポリカスパーゼFLICA(登録商標)で37にて30分間インキュベートした(300倍に希釈したストック)。別の洗浄工程を行い、C2AmおよびAnxVでインキュベートした。他の全てのフローサイトメトリー試験と同様に、同じ洗浄工程を適用した。

【0158】

ヒト乳癌細胞(MDA-MB-175)を化学療法剤(ドキソルビシン、1 μg/mL)で96時間処理し、アポトーシスを誘導させた。6ウェルプレート(0.25%トリブ

シン、1 mM EDTA) からトリプシン処理した、試料1つ当たり 10^6 個の細胞を、SYTOX (商標) Green (Invitrogen; 50 nM) および C2Am - AF647 (0.2 μ M) または Annexin V - AF647 (0.004 μ M) のいずれかを含有する 100 μ L の氷冷した細胞標識緩衝液 (20 mM HEPES、150 mM NaCl、2 mM CaCl_2 、pH 7.4) 中に再懸濁させ、37 にて20分間インキュベートした。試料を細胞標識緩衝液で1000 μ L に希釈し、フローサイトメリー分析を行った。結果を図19に示す。647 nmでの蛍光強度の増加が、C2Am - AF647 (図19C) を用いて、アポトーシス細胞 (黄色) および壊死細胞 (赤色) 対生存細胞 (青色) で観察された。Annexin V - AF647 も生存細胞よりもアポトーシス細胞および壊死細胞でより標識されたが、薬物療法の96時間後には、Annexin V - AF647 で染色したアポトーシス細胞および生存細胞のMFIに違いはほとんどなかった (図19B)。

10

【0159】

表面プラズモン共鳴分析

大きな多層膜ベシクル (LMV) は、3種類のリン脂質 (ホスファチジルセリン、PS; ホスファチジルエタノールアミン、PE、およびホスファチジルコリン、PC、アバンティポーラーリピッド、Alabaster、AL、USA) を用いて調製した。2.6 μ mol のリン脂質 (クロロホルム中の PS: PE: PC 混合物; モル比 35: 50: 15) の試料に窒素を穏やかに30分間吹きつけて乾燥させ、強い渦混合によって、2.6 mL の C2A 結合緩衝液 (HBS = 20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、2 mM CaCl_2 を含有) 中に再懸濁させた。これにより、LMV の混濁状の懸濁液が形成された。これを完全に清澄するまで氷上で超音波破碎し (Misonix Inc、Farmingdale、NY、USA からの Ultrasonic Processor XL Sonicator で3サイクル、30秒パルス、パルス間10秒間隔、低出力)、小さな単層ベシクル (SMV) の形成が示唆された。

20

【0160】

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析は、Biacore T100 システム (Biacore、GE Healthcare) を用いて、L1 センサーチップ上で行った。

【0161】

いくつかの実験において、チップフローセルをイソプロパノール / NaOH 50 mM の混合物 (2: 3 体積) 2分パルスで5 μ L / 分で洗浄し、その1つを1 mM のリン脂質を含有する SMV の懸濁液 5 μ L で被覆し (1 μ L / 分)、約 2,000 RU (相対単位) の平均相対応答を得た。水酸化ナトリウム (50 mM、20 μ L / 分) の20秒再生パルスを3回印加することによって、未結合の多層材料を SMV 注入後にチップから除去した。

30

【0162】

他の実験において、チップフローセルを20 mM の 3 - [(3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホネート (CHAPS、30 μ L / 分) の2回の30秒パルスで洗浄し、リン脂質 1 mM (5 μ L / 分) を含有する試験 SMV (PS: PE: PC) の懸濁液で1つのフローセル (試験) を被覆し、約 5,000 RU (相対単位) の平均相対応答に達した。水酸化ナトリウム (50 mM、30 μ L / 分) の30秒パルスを2回印加することによって、未結合の多層材料を SMV 注入後に脂質二重層から除去した。

40

【0163】

別のフローセルは対照パスとして被覆しないでおいた。いくつかの実験において、リン脂質 1 mM (5 μ L / 分) を含有する対照 SMV (PE: PC) の懸濁液で別のフローセル (対照) を被覆し、約 5,000 RU (相対単位) の平均相対応答を得た。PE および PC (モル比 77: 23) を用いて対照 SMV を調製し、非結合材料を上述のように除去した。

【0164】

安定なベースラインが達成された後、30 μ L / 分で2分間 (会合相) および1分間 (

50

解離相)、または、40 μ L / 分で37 にて60秒間(会合相)、タンパク質を2つの対象フローセルのチップ表面と順次相互作用させた。各個体に注入後、40 μ L / 分で10 mM Na EDTAを含有するHBSまたは(HBS、20 mM EDTA、pH 7.4)の15秒または20秒パルスを用いてリン脂質二重層を再生した。

【0165】

各タンパク質溶液は、自動混合の画分調合液を用いて、0 ~ 100 nMまたは5 nM ~ 75 nMに濃度を変えるシステムで自動的に調製し、全注入は、30 μ L / 分の流量かつ37 でC2A結合緩衝液において二重に行った。全濃度は二重に分析した。対応する相互作用センサーグラムの会合相が終わる前に応答値(4秒)から得られた熱平衡親和性の解離定数(K_D)を推定することによって、PSのタンパク質親和性を評価した(図8)。

10

。二重参照分析、およびBiacore T100評価ソフトウェア(バージョン1.1.1)(Biacore AB、GE Healthcare)を用いた。

【0166】

細胞培養

EL4マウスリンパ腫およびMDA-MB-175ヒト乳癌細胞を、10%ウシ胎仔血清および2 mM L-グルタミンを添加したRPMI 1640培地で増殖させた。5% CO₂を含有する湿気のある環境で37 にて細胞を継代培養した。トリパンブルー色素染色を用いて細胞の数および生存度をモニタリングした。5 μ Mのエトポシドを16時間加えることでEL4細胞死を誘発させ、1 μ g/mLのドキソルビシンを最長で96時間まで加えることでMDA-MB-175細胞死を誘発させた。

20

【0167】

蛍光造影用のC2Aベースプローブ

蛍光標識アポトーシス検出プローブ(C2A-A1xF)を作製するために、変異タンパク質(C2A)をシステイン217残基を介して蛍光色素アレクサフルオル488-マレイミド(A1xF、Invitrogen)で標識した。同様のプロトコルを用いて市販のアネキシンVも比較用に標識した。質量分析(エレクトロスプレーイオン化法、またはESI)を用いてC2AおよびC2A-A1xFを特徴付けた。

【0168】

簡潔に言えば、両方のタンパク質を1 ~ 100 μ Mの濃度で保持し、蛍光マレイミド色素を1 ~ 10 mMの濃度で保持した。0.25 mgのアレクサフルオルマレイミド488 nm(Invitrogen)を50 μ LのミリQ水に溶解した。20 μ gのAnx-Vを500 μ LのHBS(HEPES緩衝生理食塩水: 20 mM HEPES = 4 - (2-ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂、pH 7.4)(1 μ M)に溶解した。0.56 mgのC2Aを500 μ LのHBS(69 μ M)に溶解した。DTTの0.5 M原液をミリQ水で作製した。10 mMのDTTをタンパク質に加え、マグネチックスターラー上に室温で30分間置いた。タンパク質をHNE緩衝液(20 mM HEPES、100 mM NaCl、5 mM EDTA、pH 7.4)中で3回、5 KDaビバスピコン濃縮器で洗浄した。これにより、共役反応を妨害する残渣DTTを除去する。0.5 mLに沈降させると、タンパク質を7 mLのビジューフラスコに移した。およそ10倍モル過剰の色素をタンパク質に加えた(Anx-Vには2.9 μ L、C2Aには47.1 μ Lの色素ストック)。両方のビジュを暗闇で保持した。マグネチックスターラー上で4 にて一晩反応を進行させた。タンパク質を5 KDaビバスピコン中のHBSで4回十分に洗浄した。最終希釈標準溶液は、C2A-A1xFには28 μ M(1.1 mL)、AnxV-A1xFには0.83 μ M(0.6 mL)であった。

30

40

【0169】

質量分析結果を図9乃至図12に示す。

【0170】

PETおよびSPECT用のC2Aベースプローブ

SPECTイメージングに使用される¹¹¹Inジウム標識アポトーシス検出プローブ

50

(C2Am-DOTA-¹¹¹In)を作製するために、システイン217残基を介してC2Amを二機能性キレート(BFC)マレイミド-モノ-アミド-DOTA(Macrocyclus)で修飾した。

【0171】

簡潔に言えば、5mgのC2Amを2mLのHBS(154μM)に溶解した。DTTの0.5M原液をミリQ水で作製した。10mM DTTをタンパク質に加え、マグネチックスターラー上に室温で30分間置いた。HNE緩衝液を用いて、タンパク質を5KDaビバスピコン濃縮器で3回洗浄し、残渣DTT(ジチオスレイトール)を除去した。沈降させた後に、タンパク質を1800μLのHNE緩衝液中に再懸濁させ、7mLのビジュースコに移した。10倍モル過剰のBFCを200μL DMSOに溶解し、タンパク質に加えた。マグネチックスターラー上で、pH7.4で4に overnight 反応を進行させた。5KDaビバスピコン中のHBSでタンパク質を十分に洗浄し、残渣BFCを除去した。試料をエレクトロスプレーイオン化質量分析で分析し、共役がうまくいったかを確認した。質量分析によって試料の均一性を確認した(ESI; 図11を参照)。

10

【0172】

得られた共役材料を¹¹¹Inで放射標識し、適当な腫瘍モデルにおいてin vitro(細胞結合アッセイ)およびin vivoで確認してもよい。処理EL4腫瘍および未処理EL4腫瘍に結合したC2Am-DOTA-¹¹¹InのSPECTイメージングを比較してもよい。

【0173】

20

同様のアプローチの後、細胞死のPETイメージングのために、C2AmをBFCで修飾し、陽電子放出放射性同位元素で放射標識してもよい。

【0174】

結果

C2(S78C)の調製

部位特異性変異誘発を用いて、シナプトタグミンIのC2Aドメインの78番目(シナプトタグミンIの217番目)のセリン残基をシステイン残基に置換した。3つの候補アミノ酸残基を置換用を選択した: Ser217、Gln154、Asn248。3つのGST-C2A変異体(S217C、N248C、およびQ154C)のSDS-PAGEを用いて、IPTG誘導前後の発現レベルを評価した。全てのベクター形質転換菌は変異タンパク質をある程度発現したが、はるかに高い過剰発現がS217Cで得られた。単離したC2ドメイン[C2(S78C)]を上述のように調製した。

30

【0175】

C2(S78C)-アレクサフルオル(登録商標)647の合成

上述のように、C2(S78C)をアレクサフルオル(登録商標)647のマレイミド誘導体と反応させた。修飾タンパク質(以下、「C2Am」という)は、エレクトロスプレーイオン化質量分析で単一ピークが得られ、修飾タンパク質の期待質量は17204Daであった。SDS-PAGEは、共役に期待されるものと同様の質量をもつ単一バンドも示した。タンパク質修飾はPSの親和性にはほとんど影響しなかった。表面プラズモン共鳴(SPR)測定を用いた親和性分析により、PSの2つのタンパク質で同様の解離定数(Kd)が得られ、非修飾種および修飾種に対して、それぞれ、55.4±3.5nMおよび71.0±6.9nMであった。これらの解離定数は、SPRデータの動態解析によって確認された(表2)。

40

【0176】

フローサイトメトリーおよびC2Amを用いた細胞死の検出

フローサイトメトリーを用いて薬剤処理したマウスリンパ腫細胞株(EL4)中の細胞死をC2Amが検出する能力を、同じ蛍光体(以下、「AnxV」という)で標識した市販のアネキシンV製剤を用いた検出と比較した。エトポシドによる処理によって細胞死を誘導し、薬物療法後24時間の間でフローサイトメトリー分析を2時間ごとに行った。Sytox(登録商標)Green(細胞壊死のマーカー)で標識した細胞対C2Amまた

50

は $A n \times V$ で標識した細胞の、薬物療法 16 時間後の代表的な散布図を図 13 に示す。両方の薬剤は、3 つ異質な細胞集団 (図 13 A および図 13 B) : 壊死細胞 (n 、 x および y 軸正方向)、アポトーシス細胞 (a 、 x 軸正方向、および y 軸負方向)、および生存細胞 (v 、 x 軸および y 軸負方向) を示した。時間経過を通して各々がこれら 3 つのグループに分類する細胞集団の割合を $C2Am$ (図 13 D) および $A n \times V$ (図 13 E) に対して示す。薬物療法後 24 時間を通じて $C2Am$ および $A n \times V$ によって特定された細胞画分間には良好な相関があった (生存細胞、 $R^2 = 0.9956$ 、アポトーシス細胞、 $R^2 = 0.9758$ 、壊死細胞、 $R^2 = 0.9957$; $n = 13$)。

【0177】

エトポシドなどの DNA 傷害剤による細胞処理は、ポリ ADP - リボースポリメラーゼ (PARP) の活性化をもたらす、かつ、 NAD^+ は PARP の基質であるため、細胞 $NAD(H)$ プールの枯渇をもたらす¹⁻³。その結果、 $NADH$ 自己蛍光はエトポシドを用いた細胞死の誘導時にかなり減少し、EL4 細胞では薬物療法後の比較的早期にこの減少が起こる¹⁻⁴。従って、 $NADH$ UV 自己蛍光の変化によって特定されたものと $C2Am$ および $A n \times V$ を用いて特定した細胞集団を相関させることによって、 $C2Am$ および $A n \times V$ を用いて特定した細胞集団を確認した (図 13 C)。これらの相関を表 1 に示す。 $C2Am$ または $A n \times V$ 蛍光によって特定された細胞集団対 $NADH$ 自己蛍光によって特定された細胞集団のプロットにおいて、両方のタンパク質によって特定された生存細胞集団と高い $NADH$ 自己蛍光によって特定された生存細胞集団との間の線形相関 ($A n \times V$ および $C2Am$ に対して、それぞれ、 $R^2 = 0.996$ および $R^2 = 0.999$) と、両方のタンパク質によって特定された壊死細胞集団と低い $NADH$ 自己蛍光によって特定された壊死細胞集団との間の線形相関 ($A n \times V$ および $C2Am$ に対して、それぞれ、 $R^2 = 0.998$ および $R^2 = 0.999$) は良好であった。しかしながら、 $A n \times V$ は、生存細胞の画分を僅かに低く算定し ($C2Am$ の勾配 = 0.994 に対して勾配 = 0.942)、アポトーシス細胞の画分は明らかに低く算定した ($C2Am$ の勾配 = 0.884 に対して勾配 = 0.727)。しかしながら、 $NAD(H)$ レベルによる相関は $C2Am$ よりも僅かに良好であった ($A n \times V$ および $C2Am$ に対して、それぞれ、 $R^2 = 0.994$ および $R^2 = 0.975$)。

【0178】

2 つのタンパク質による各細胞集団の標識の程度についても分析した (図 14)。ここで、これらの細胞集団は、高い $NADH$ 自己蛍光 (生存細胞)、低い $NADH$ 自己蛍光 (アポトーシス細胞)、低い $NADH$ 自己蛍光、および高い Sytox (登録商標) Green 結合 (壊死細胞) から独立して特定されている。生存細胞 (図 14 A) は、50 倍低い濃度 ($4 nM$ $A n \times V$ および $200 nM$ $C2Am$) を用いたにも拘らず、 $C2Am$ と比較して、 $A n \times V$ (~ 4 倍; $P < 0.0001$) で一貫して高い染色を示した。壊死細胞 (図 14 B) も、薬物療法後の最初の 6 時間では $A n \times V$ でより有意に標識されることを示したが ($P < 0.0001$)、それ以後はそうではなく、 $C2Am$ によるアポトーシス細胞の標識は、ほとんどの時間経過で高かった (図 14 C、 $P < 0.0001$)。壊死細胞の染色レベルは、薬物療法後、ほとんどの時間経過にわたって両方のタンパク質で同様であり、生存細胞のものよりもかなり高かった (~ 10 倍)。

【0179】

死につつある細胞対生存細胞の薬剤特異性の測定として、壊死細胞 / 生存細胞 (図 14 D) およびアポトーシス細胞 / 生存細胞 (図 14 E) 比も薬物療法後の時間経過を通して算出した。 $C2Am$ は、アポトーシス細胞に対してより大きな特異性を示した ($P < 0.01$)。比率は ~ 5 倍高かった。壊死細胞 ($P < 0.01$) に対して、比率は $A n \times V$ よりも ~ 3 倍高かった。

【0180】

フローサイトメトリーを用いて、薬剤処理されたヒト乳癌細胞株 (MDA - MB - 231) における細胞死を検出する $C2Am$ の能力についても評価し、 $A n \times V$ を用いた検出と比較した。細胞死はドキソルビシンによる処理で誘導され、フローサイトメトリー分析

10

20

30

40

50

は、薬物療法後、96時間にわたって24時間ごとに行った。S y t o x (登録商標) g r e e n (細胞壊死のマーカー)で標識した細胞対C 2 A m (C)またはA n x V (B)で標識した細胞の、薬物療法の48、72、96時間後の代表的な散布図を図19に示す。両方の薬剤とも3つの異なる細胞集団を示した。これは、S y t o x G r e e n 対N A D (H)自己蛍光の二重散布図(図19A)において:壊死細胞(赤色)、アポトーシス細胞(黄色)、および生存細胞(青色)と特定されている。C 2 A mは、治療の時間経過を通して、3つの細胞集団(生存細胞、アポトーシス細胞、および壊死細胞)の明確な分離をもたらした(図19C)。C 2 A mとは異なり、A n x Vが3つの集団を区別する能力は低かった(図19C)。これは、処理誘導後72時間で特に明白であった。死につ

つつあるM D A細胞対生存M D A細胞の薬剤特異性の測定として、アポトーシス細胞/生存細胞(図19D)および壊死細胞/生存細胞(図19E)比も薬物療法後の時間経過を通して算出した。C 2 A mは、アポトーシス細胞に対してより大きな特異性を示した。比率は~2倍高かった。壊死細胞に対して、比率はA n x Vよりも~6倍高かった。

10

【0181】

C 2 AおよびA n x Vで標識した細胞とカスパーゼ活性化との比較

細胞死の別の独立した測定として、緑色(カルボキシフルオレセイン)蛍光体に結合するカスパーゼ阻害剤に基づく、ポリカスパーゼF L I C A (登録商標)(カスパーゼの蛍光標識阻害剤)キットを用いてカスパーゼ活性化を評価した。F L I C Aは、細胞浸透性であり、細胞内の活性カスパーゼにのみ結合する。カスパーゼ活性化は、この細胞株内のエトポシド誘導細胞死における比較的早期のイベントである¹⁴。F L I C AおよびC 2 A mまたはA n x Vのいずれかで染色した処理細胞および未処理細胞の二重散布図を図15に示す。未処理細胞または処理細胞のいずれかにおけるアポトーシス細胞および壊死細胞を、生存細胞と比較した際に、それぞれ、F L I C Aで最大2倍までと16倍以上で染色した。これらのプロットにより、C 2 A mおよびA n x Vの両方とも生存細胞への結合レベルは低いが(F L I C A陰性)、これらの細胞へのA n x V結合はC 2 A mのものよりも高いことが確認される。

20

【0182】

C 2 A mで染色した死につつつある細胞のイメージング

C 2 A mの結合レベルに従って分類された薬剤処理細胞から画像を取得した。明視野画像および対応する蛍光画像を図16に示す。C 2 A m (A)で染色されず、その結果、蛍光を示さなかった細胞は、明視野画像で生存の円形形態および無傷膜を有していた。一方、C 2 A m (B)で染色され、その結果、蛍光を発した細胞は、対応する明視野画像で不規則かつブレブ形成の細胞膜であった。

30

【0183】

選択性および特異性におけるプローブ濃度の効果

試験した濃度範囲は、C 2 A mおよびA n x Vで、それぞれ、0.05~1.0 μ Mおよび1~20 nMであった。プローブ濃度は変化していたため、N A D (H)自己蛍光を用いて3つの細胞集団をゲートした。A n x Vで染色された生存細胞の平均蛍光強度(M F I)は、C 2 A mで染色したものよりもかなり高かった(図17A)。A n x V染色レベルは、全ての細胞集団において、C 2 A mよりも一貫して高かった(図17A乃至図17C)。しかしながら、アポトーシス細胞/生存細胞(図17E)および壊死細胞/生存細胞(図17D)の細胞染色比は、C 2 A mでより高く、アポトーシス細胞($P < 0.05$; [C 2 A m] = 0.5 μ M、[A n x V] = 0.01 nM)および壊死細胞($P < 0.05$ 、[C 2 A m] = 0.1 μ M、[A n x V] = 2 nM)の両方のより特異的な標識を示した。

40

【0184】

死につつつある細胞へのC 2 A mおよびA n x V結合のC a²⁺依存性

死につつつある細胞上に露出したP SへのC 2 A mおよびA n x Vの結合は、カルシウム依存性である。しかしながら、両方のタンパク質は、C a²⁺非依存的に他の細胞膜リン脂質に結合することも知られている¹⁵。薬剤処理細胞をC a²⁺(2 mM)またはE D

50

T A (1 0 m M) の存在下でインキュベートし、C 2 A m および A n x V の結合をフローサイトメトリーで評価した。アポトーシス細胞対生存細胞および壊死細胞対生存細胞への結合に対する平均蛍光強度比を図 1 8 に示す。アポトーシス細胞への結合は、両方のタンパク質に対して大きく Ca^{2+} 依存的であった。 Ca^{2+} の非存在下での残留結合レベルは、C 2 A m および A n x V に対して、それぞれ、4 . 4 % および 1 2 . 4 % であった。しかしながら、C 2 A m は、壊死細胞に Ca^{2+} 非依存的に結合することがより顕著に示された (A n x V の 1 6 . 1 % に対して 5 2 . 4 %) 。

【 0 1 8 5 】

上記の試験により、A n x V ^{1 6} と比較して、シナプトタグミン I ⁷、^{1 9} の C 2 A ドメインに基づいて細胞死を検出するための新規の分子プローブを評価する。これは、*in vitro* および *in vivo* でアポトーシス細胞死を検出するための一般に使用されているプローブである ^{1 1}、^{1 8}。単一のシステイン残基 C 2 (S 7 8 C) を含有する C 2 A の部位特異性変異体は、単一の化学種 (C 2 A m) を得るために、化学量論的に蛍光体で標識した。C 2 A m は、アポトーシスマウスリンパ腫細胞および壊死マウスリンパ腫細胞上の P S を検出することを示す。同様に標識した A n x V 誘導体よりも感度は低かったが、C 2 A m は、生存細胞への結合が弱いことを示した。その結果、アポトーシスおよび壊死の検出に対してはより良い特異性を示した。

【 0 1 8 6 】

臨床的に用いられる化学療法剤 (エトポシド、2 型トポイソメラーゼ阻害剤) によるマウスリンパ腫細胞株 (E L 4) の処理によって、アポトーシスの誘導をもたらした。C 2 A m および A n x V によって検出された生存リンパ腫細胞、アポトーシスリンパ腫細胞、および壊死リンパ腫細胞のレベルは同様であり、N A D (H) 自己蛍光によって測定された同じ細胞集団と良い相関を示した。しかしながら、アポトーシス細胞および壊死細胞に対する特異性は、アポトーシス細胞 / 生存細胞および壊死細胞 / 生存細胞の比率によってそれぞれ定義されるように、A n x V よりも C 2 A m に対してより高かった。これは、A n x V が生存細胞集団により強く結合することによるところが大きかった (図 1 4 および図 1 7 を参照)。ヒト乳癌接着細胞株 (M D A - M B - 2 3 1) に対しても同様の結果が得られた。生存細胞への A n x V の明らかな結合をさらに調べるために、活性カスパーゼの蛍光標識した一般的阻害剤 (F L I C A (商標)、Immunocytochemistry Technologies、L L C) を用いて、この細胞集団が本当に生存細胞であり、アポトーシス細胞経路にすでに入っていたかもしれない細胞を含有していなかったことを確認した。カスパーゼ活性化は、これらの細胞におけるアポトーシス誘導後の比較的早期のイベントである ^{1 4}。この細胞集団は、アポトーシス細胞および壊死細胞と比較して、それぞれ、F L I C A (商標) での標識は 2 倍および 1 6 倍低かったため、これは本当に生存細胞集団であることが確認された。これにも拘わらず、この細胞集団は、C 2 A m よりも A n x V ではるかに高い標識 (~ 5 倍) を示した。

【 0 1 8 7 】

本明細書に記載のシナプトタグミン I (S 7 8 C) の C 2 A ドメインの部位特異性変異体の化学的に明確に規定され標識された誘導体は、同様に標識されたアネキシン V 誘導体よりも生存細胞への結合は弱かったことを示したため、細胞死を検出するのにより良い特異性を有している。生存細胞への結合の弱さは、P S に対する C 2 A の親和性が低いことによるのであろう。これは、アネキシン V の放射性核種標識誘導体で観察された非特異的な組織内蓄積を減らし得るため、このタンパク質の放射性核種誘導体を用いて *in vivo* での細胞死を検出する場合には、特に有用であろう。

【表 1】

	生存細胞				アポトーシス細胞				壊死細胞			
	x	y	R ²	%細胞	x	y	R ²	%細胞	x	y	R ²	%細胞
C2Am	0.9939	1.498	0.999	20-100	0.8839	0.0361	0.9941	0-25	0.9722	-1.043	0.9988	0-70
AnxV	0.9422	4.2731	0.9964	20-100	0.7269	3.1232	0.9751	0-25	0.9224	-1.281	0.998	0-70

【表 2】

	親和性		動態			
	KD (nM)	カイニ乗	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	カイニ乗
C2Am	55.4 +/- 3.5	5.45	2.01E+06	0.110	54.2	26.85
C2Am-AixAF647	71.0 +/- 6.9	4.1	2.14E+06	0.188	87.9	10.8

10

【0188】

参考文献

1. Dowsett M⁵、Endocr Relat Cancer. 1999; 6: 25 - 28。
2. Wheeler JA⁵、Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 32: 1487 - 1493。
3. Savill J⁵、Immunol Today. 1993; 14: 131 - 136。
4. Belhocine T⁵、Clin Cancer Res. 2002; 8: 2766 - 2774。
5. Kemerink GJ⁵、J Nucl Med. 2001; 42: 382 - 387。
6. Boersma HH⁵、Br J Radiol. 2003; 76: 553 - 560。
7. Davletov BA⁵、J Biol Chem. 1993; 268: 26386 - 26390。
8. Sudhof TC⁵、Cell. 1993; 75: 1 - 4。
9. Krishnan AS⁵、Radiology. 2008; 246: 854 - 862。
10. Zhao M⁵、Nat Med. 2001; 7: 1241 - 1244。
11. Zhao M⁵、J Nucl Med. 2006; 47: 1367 - 1374。
12. Neves AA⁵、Nano Lett. 2007; 7: 1419 - 1423。
13. Sims JL⁵、Biochemistry. 1983; 22: 5188 - 5194。
14. Witney TH⁵、Neoplasia、in press. 2009。
15. Almeida PF⁵、Biochemistry. 2005; 44: 10905 - 10913。
16. van Genderen H⁵、Nat Protoc. 2006; 1: 363 - 367。
17. Petrovsky A⁵、Cancer Res. 2003; 63: 1936 - 1942。
18. Schellenberger EA⁵、Neoplasia. 2003; 5: 187 - 192。
19. Sutton RB⁵、Cell. 1995; 80: 929 - 938。

20

30

40

50

20. van den Eijnde SM⁵, Cytometry . 1997 ; 29 : 313 - 320。

21. Kuo W、J Mol Biol . 2009。

22. Emoto K⁵, Exp Cell Res . 1997 ; 232 : 430 - 434。

23. Shao X⁵, Biochemistry . 1998 ; 37 : 16106 - 16115。

24. Liemann S⁵, 1997 ; 53 : 516 - 521。

25. Silvestro L⁵, Biochemistry . 1999 ; 38 : 113 - 121。

10

26. Concha NO⁵, Science . 1993 ; 261 : 1321 - 1324。

27. Tait JF⁵, Arch Biochem Biophys . 1992 ; 298 : 187 - 191。

28. Concha NO⁵, FEBS Lett . 1992 ; 314 : 159 - 162。

29. Appelt U⁵, Cell Death Differ . 2005 ; 12 : 194 - 196。

【0189】

配列：

20

E K L G K L Q Y S L D Y D F Q N N Q L L V G I I Q A A E L P A L D M G G
T S D P Y V K V F L L P D K K K K F E T K V H R K T L N P V F N E Q F T
F K V P Y C E L G G K T L V M A V Y D F D R F S K H D I I G E F K V P M N
T V D F G H V T E E W R D L Q S A E K

配列番号1：シナプトタグミンIの変異型C2Aドメイン。

G A G A A A C T G G G A A A G C T C C A A T A T T C A C T G G A C T A T G A C
T T C C A G A A T A A C C A G C T G T T G G T G G G A A T C A T C C A G G C T G
C T G A A C T G C C C G C C C T G G A C A T G G G G G G T A C A T C C G A T C C
A T A C G T C A A A G T C T T C C T G C T G C C T G A C A A A A A G A A G A A A
T T T G A G A C T A A A G T C C A C C G G A A A A C C C T C A A T C C A G T C T
T C A A T G A A C A A T T T A C T T T C A A G G T A C C C T A C T G C G A A T T
A G G T G G C A A A A C C C T G G T G A T G G C T G T G T A T G A T T T G A T C
G C T T C T C C A A G C A C G A C A T C A T C G G A G A G T T C A A A G T T C C
T A T G A A C A C C G T G G A T T T T G G C C A T G T G A C C G A G G A G T G G
C G C G A T C T C C A G A G C G C T G A G A A A

30

配列番号2：変異型C2Aドメインコード配列

1 A C G T T A T C G A C T G C A C G G T G C A C C A A T G C T T C T G G
C G T C A G G C A G C C A T C G G A A G C T G T G
61 G T A T G G C T G T G C A G G T C G T A A A T C A C T G C A T A A T
T C G T G T C G C T C A A G G C G C A C T C C C G T
121 T C T G G A T A A T G T T T T T T G C G C C G A C A T C A T A A C
G G T T C T G G C A A A T A T T C T G A A A T G A G C
181 T G T T G A C A A T T A A T C A T C G G C T C G T A T A A T G T G
T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A
241 C A C A G G A A A C A G T A T T C A T G T C C C C T A T A C T A G
G T T A T T G G A A A A T T A A G G G C C T T G T G C
301 A A C C C A C T C G A C T T C T T T T G G A A T A T C T T G A A G
A A A A A T A T G A A G A G C A T T T G T A T G A G C
361 G C G A T G A A G G T G A T A A A T G G C G A A A C A A A A A G T
T T G A A T T G G G T T T G G A G T T T C C C A A T C

40

50

4 2 1 T T C C T T A T T A T A T T G A T G G T G A T G T T A A A T T A A
C A C A G T C T A T G G C C A T C A T A C G T T A T A
4 8 1 T A G C T G A C A A G C A C A A C A T G T T G G G T G G T T G T C
C A A A A G A G C G T G C A G A G A T T T C A A T G C
5 4 1 T T G A A G G A G C G G T T T T G G A T A T T A G A T A C G G T G
T T T C G A G A A T T G C A T A T A G T A A A G A C T
6 0 1 T T G A A A C T C T C A A A G T T G A T T T T C T T A G C A A G C
T A C C T G A A A T G C T G A A A A T G T T C G A A G
6 6 1 A T C G T T T A T G T C A T A A A A C A T A T T T A A A T G G T G
A T C A T G T A A C C C A T C C T G A C T T C A T G T
7 2 1 T G T A T G A C G C T C T T G A T G T T G T T T T A T A C A T G G
A C C C A A T G T G C C T G G A T G C G T T C C C A A
7 8 1 A A T T A G T T T G T T T T A A A A A A C G T A T T G A A G C T A
T C C C A C A A A T T G A T A A G T A C T T G A A A T
8 4 1 C C A G C A A G T A T A T A G C A T G G C C T T T G C A G G G C T
G G C A A G C C A C G T T T G G T G G T G G C G A C C
9 0 1 A T C C T C C A A A A T C G G A T C T G G T T C C G C G N G G A T
C C C C G G G A A T T T C C G G T G G T G G T G G T G
9 6 1 G A A T T C T A G A C T C C A T G G T G G A G A A A C T G G G A A
A G C T C C A A T A T T T C A C T G G A C T A T G A C T
1 0 2 1 T C C A G A A T A A C C A G C T G T T G G T G G G A A T C A T C
C A G G C T G C T G A A C T G C C C G C C C T G G A C A
1 0 8 1 T G G G G G G T A C A T C C G A T C C A T A C G T C A A A G T C
T T C C T G C T G C C T G A C A A A A A G A A G A A A T
1 1 4 1 T T G A G A C T A A A G T C C A C C G G A A A A C C C T C A A T
C C A G T C T T C A A T G A A C A A T T T A C T T T C A
1 2 0 1 A G G T A C C C T A C T G C G A A T T A G G T G G C A A A A C C
C T G G T G A T G G C T G T G T A T G A C T T T G A T C
1 2 6 1 G C T T C T C C A A G C A C G A C A T C A T C G G A G A G T T C
A A A G T T C C T A T G A A C A C C G T G G A T T T T G
1 3 2 1 G C C A T G T G A C C G A G G A G T G G C G C G A T C T C C A G
A G C G C T G A G A A A T A A G C T T A A T T C A T C G
1 3 8 1 T G A C T G A C T G A C G A T C T G C C T C G C G C G T T T C G
G T G A T G A C G G T G A A A A C C T C T G A C A C A T
1 4 4 1 G C A G C T C C C G G A G A C G G T C A C A G C T T G T C T G T
A A G C G G A T G C C G G G A G C A G A C A A G C C C G
1 5 0 1 T C A G G G C G C G T C A G C G G G T G T T G G C G G G T G T C
G G G G C G C A G C C A T G A C C C A G T C A C G T A G
1 5 6 1 C G A T A G C G G A G T G T A T A A T T C T T G A A G A C G A A
A G G G C C T C G T G A T A C G C C T A T T T T T A T A
1 6 2 1 G G T T A A T G T C A T G A T A A T A A T G G T T T C T T A G A
C G T C A G G T G G C A C T T T T T C G G G G A A A T G T
1 6 8 1 G C G C G G A A C C C C T A T T T G T T T A T T T T T C T A A A
T A C A T T C A A A T A T G T A T C C G C T C A T G A G
1 7 4 1 A C A A T A A C C C T G A T A A A T G C T T C A A T A A T A T T
G A A A A A G G A A G A G T A T G A G T A T T C A A C A
1 8 0 1 T T T C C G T G T C G C C C T T A T T C C C T T T T T T G C G G
C A T T T T T G C C T T C C T G T T T T T G C T C A C C C
1 8 6 1 A G A A A C G C T G G T G A A A G T A A A A G A T G C T G A A G
A T C A G T T G G G T G C A C G A G T G G G T T A C A T

10

20

30

40

50

1 9 2 1 C G A A C T G G A T C T C A A C A G C G G T A A G A T C C T T G
A G A G T T T T C G C C C C G A A G A A C G T T T T C C
1 9 8 1 A A T G A T G A G C A C T T T T A A A G T T C T G C T A T G T G
G C G C G G T A T T A T C C C G T G T T G A C G C C G G
2 0 4 1 G C A A G A G C A A C T C G G T C G C C G C A T A C A C T A T T
C T C A G A A T G A C T T G G T T G A G T A C T C A C C
2 1 0 1 A G T C A C A G A A A A G C A T C T T A C G G A T G G C A T G A
C A G T A A G A G A A T T A T G C A G T G C T G C C A T
2 1 6 1 A A C C A T G A G T G A T A A C A C T G C G G C C A A C T T A C
T T C T G A C A A C G A T C G G A G G A C C G A A G G A
2 2 2 1 G C T A A C C G C T T T T T T G C A C A A C A T G G G G G A T C
A T G T A A C T C G C C T T G A T C G T T G G G A A C C
2 2 8 1 G G A G C T G A A T G A A G C C A T A C C A A A C G A C G A G C
G T G A C A C C A C G A T G C C T G C A G C A A T G G C
2 3 4 1 A A C A A C G T T G C G C A A A C T A T T A A C T G G C G A A C
T A C T T A C T C T A G C T T C C C G G C A A C A A T T
2 4 0 1 A A T A G A C T G G A T G G A G G C G G A T A A A G T T G C A G
G A C C A C T T C T G C G C T C G G C C C T T C C G G C
2 4 6 1 T G G C T G G T T T A T T G C T G A T A A A T C T G G A G C C G
G T G A G C G T G G G T C T C G C G G T A T C A T T G C
2 5 2 1 A G C A C T G G G G C C A G A T G G T A A G C C C T C C C G T A
T C G T A G T T A T C T A C A C G A C G G G G A G T C A
2 5 8 1 G G C A A C T A T G G A T G A A C G A A A T A G A C A G A T C G
C T G A G A T A G G T G C C T C A C T G A T T A A G C A
2 6 4 1 T T G G T A A C T G T C A G A C C A A G T T T A C T C A T A T A
T A C T T T A G A T T G A T T T A A A A C T T C A T T T
2 7 0 1 T T A A T T T A A A A G G A T C T A G G T G A A G A T C C T T T
T T G A T A A T C T C A T G A C C A A A A T C C C T T A
2 7 6 1 A C G T G A G T T T T C G T T C C A C T G A G C G T C A G A C C
C C G T A G A A A A G A T C A A A G G A T C T T C T T G
2 8 2 1 A G A T C C T T T T T T T C T G C G C G T A A T C T G C T G C T
T G C A A A C A A A A A A C C A C C G C T A C C A G C
2 8 8 1 G G T G G T T T T G T T T G C C G G A T C A A G A G C T A C C A A
C T C T T T T T C C G A A G G T A A C T G G C T T C A G
2 9 4 1 C A G A G C G C A G A T A C C A A A T A C T G T C C T T C T A G
T G T A G C C G T A G T T A G G C C A C C A C T T C A A
3 0 0 1 G A A C T C T G T A G C A C C G C C T A C A T A C C T C G C T C
T G C T A A T C C T G T T A C C A G T G G C T G C T G C
3 0 6 1 C A G T G G C G A T A A G T C G T G T C T T A C C G G G T T G G
A C T C A A G A C G A T A G T T A C C G G A T A A G G C
3 1 2 1 G C A G C G G T C G G G C T G A A C G G G G G G T T C G T G C A
C A C A G C C C A G C T T G G A G C G A A C G A C C T A
3 1 8 1 C A C C G A A C T G A G A T A C C T A C A G C G T G A G C T A T
G A G A A A G C G C C A C G C T T C C C G A A G G G A G
3 2 4 1 A A A G G C G G A C A G G T A T C C G G T A A G C G G C A G G G
T C G G A A C A G G A G A G C G C A C G A G G G A G C T
3 3 0 1 T C C A G G G G G A A A C G C C T G G T A T C T T T A T A G T C
C T G T C G G G T T T C G C C A C C T C T G A C T T G A
3 3 6 1 G C G T C G A T T T T T G T G A T G C T C G T C A G G G G G G C
G G A G C C T A T G G A A A A A C G C C A G C A A C G C

10

20

30

40

50

3 4 2 1 G G C C T T T T T A C G G T T C C T G G C C T T T T G C T G G C
C T T T T G C T C A C A T G T T C T T T C C T G C G T T
3 4 2 1 A T C C C C T G A T T C T G T G G A T A A C C G T A T T A C C G
C C T T T G A G T G A G C T G A T A C C G C T C G C C G
3 4 8 1 C A G C C G A A C G A C C G A G C G C A G C G A G T C A G T G A
G C G A G G A A G C G G A A G A G C G C C T G A T G C G
3 5 4 1 G T A T T T T C T C C T T A C G C A T C T G T G C G G T A T T T
C A C A C C G C A T A A A T T C C G A C A C C A T C G A
3 6 0 1 A T G G T G C A A A A C C T T T C G C G G T A T G G C A T G A T
A G C G C C C G G A A G A G A G T C A A T T C A G G G T 10
3 6 6 1 G G T G A A T G T G A A A C C A G T A A C G T T A T A C G A T G
T C G C A G A G T A T G C C G G T G T C T C T T A T C A
3 7 2 1 G A C C G T T T C C C G C G T G G T G A A C C A G G C C A G C C
A C G T T T C T G C G A A A A C G C G G G A A A A A G T
3 7 8 1 G G A A G C G G C G A T G G C G G A G C T G A A T T A C A T T C
C C A A C C G C G T G G C A C A A C A A C T G G C G G G
3 8 4 1 C A A A C A G T C G T T G C T G A T T G G C G T T G C C A C C T
C C A G T C T G G C C C T G C A C G C G C C G T C G C A
3 9 0 1 A A T T G T C G C G G C G A T T A A A T C T C G C G C C G A T C
A A C T G G G T G C C A G C G T G G T G G T G T C G A T 20
3 9 6 1 G G T A G A A C G A A G C G G C G T C G A A G C C T G T A A A G
C G G C G G T G C A C A A T C T T C T C G C G C A A C G
4 0 2 1 C G T C A G T G G G C T G A T C A T T A A C T A T C C G C T G G
A T G A C C A G G A T G C C A T T G C T G T G G A A G C
4 0 8 1 T G C C T G C A C T A A T G T T C C G G C G T T A T T T C T T G
A T G T C T C T G A C C A G A C A C C C A T C A A C A G
4 1 4 1 T A T T A T T T T C T C C C A T G A A G A C G G T A C G C G A C
T G G G C G T G G A G C A T C T G G T C G C A T T G G G
4 2 0 1 T C A C C A G C A A A T C G C G C T G T T A G C G G G C C C A T
T A A G T T C T G T C T C G G C G C G T C T G C G T C T 30
4 3 2 1 G G C T G G C T G G C A T A A A T A T C T C A C T C G C A A T C
A A A T T C A G C C G A T A G C G G A A C G G G A A G G
4 3 8 1 C G A C T G G A G T G C C A T G T C C G G T T T T C A A C A A A
C C A T G C A A A T G C T G A A T G A G G G C A T C G T
4 4 4 1 T C C C A C T G C G A T G C T G G T T G C C A A C G A T C A G A
T G G C G C T G G G C G C A A T G C G C G C C A T T A C
4 5 0 1 C G A G T C C G G G C T G C G C G T T G G T G C G G A T A T C T
C G G T A G T G G G A T A C G A C G A T A C C G A A G A
4 5 6 1 C A G C T C A T G T T A T A T C C C G C C G T T A A C C A C C A
T C A A A C A G G A T T T T C G C C T G C T G G G G C A 40
4 6 2 1 A A C C A G C G T G G A C C G C T T G C T G C A A C T C T C T C
A G G G C C A G G C G G T G A A G G G C A A T C A G C T
4 6 8 1 G T T G C C C G T C T C A C T G G T G A A A A G A A A A A C C A
C C C T G G C G C C C A A T A C G C A A A C C G C C T C
4 7 4 1 T C C C C G C G C G T T G G C C G A T T C A T T A A T G C A G C
T G G C A C G A C A G G T T T C C C G A C T G G A A A G
4 8 0 1 C G G G C A G T G A G C G C A A C G C A A T T A A T G T G A G T
T A G C T C A C T C A T T A G G C A C C C C A G G C T T
4 8 6 1 T A C A C T T T A T G C T T C C G G C T C G T A T G T T G T G T
G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A 50

```

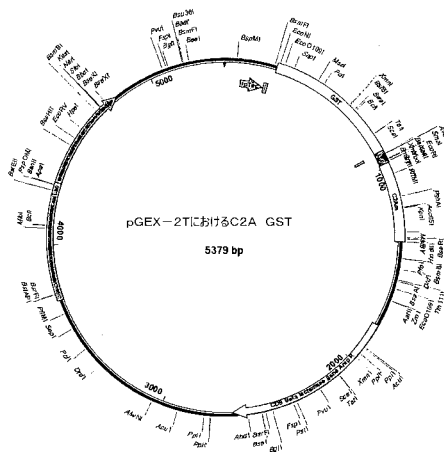
4 9 2 1   C A G G A A A C A G   C T A T G A C C A T   G A T T A C G G A T   T C
A C T G G C C G   T C G T T T T A C A   A C G T C G T G A C
4 9 8 1   T G G G A A A A C C   C T G G C G T T A C   C C A A C T T A A T   C G
C C T T G C A G   C A C A T C C C C C   T T T C G C C A G C
5 0 4 1   T G G C G T A A T A   G C G A A G A G G C   C C G C A C C G A T   C G
C C C T T C C C   A A C A G T T G C G   C A G C C T G A A T
5 1 0 1   G G C G A A T G G C   G C T T T G C C T G   G T T T C C G G C A   C C
A G A A G C G G   T G C C G G A A A G   C T G G C T G G A G
5 1 6 1   T G C G A T C T T C   C T G A G G C C G A   T A C T G T C G T C   G T
C C C C T C A A   A C T G G C A G A T   G C A C G G T T A C
5 2 2 1   G A T G C G C C C A   T C T A C A C C A A   C G T A A C C T A T   C C
C A T T A C G G   T C A A T C C G C C   G T T T G T T C C C
5 2 8 1   A C G G A G A A T C   C G A C G G G T T G   T T A C T C G C T C   A C
A T T T A A T G   T T G A T G A A A G   C T G G C T A C A G
5 3 4 1   G A A G G C C A G A   C G C G A A T T A T   T T T T G A T G G C   G T
T G G A A T T

```

配列番号3：C2A - GST融合インサートを備えたpGEX - 2Tベクター。

10

【図1】



【図2】

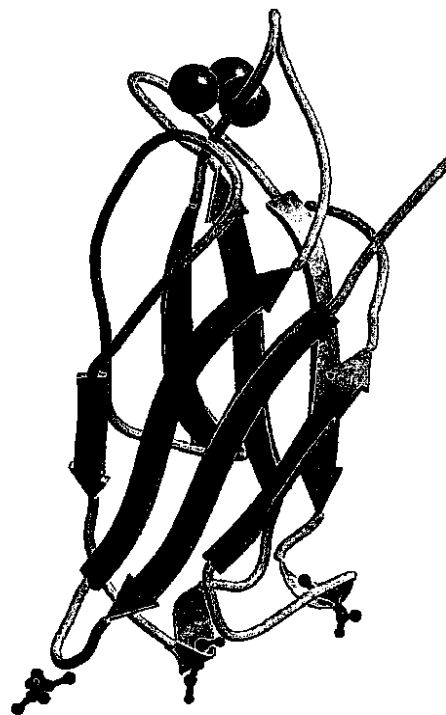
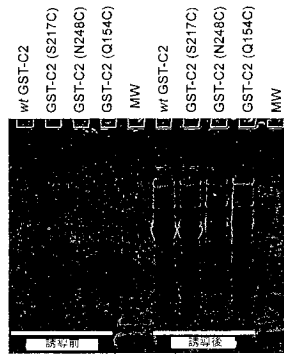


Figure 2

【図 3】



【図 4】

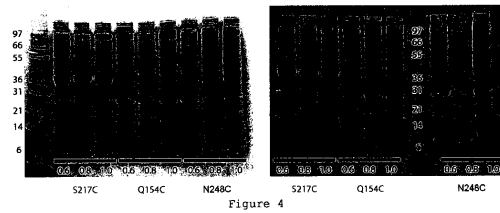


Figure 4

【図 5】

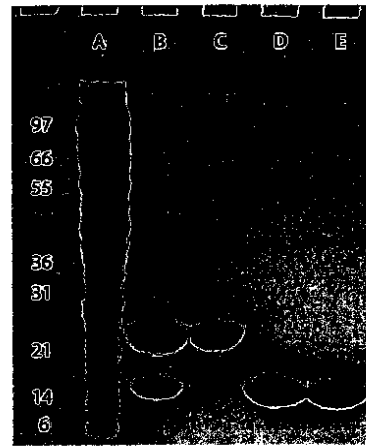
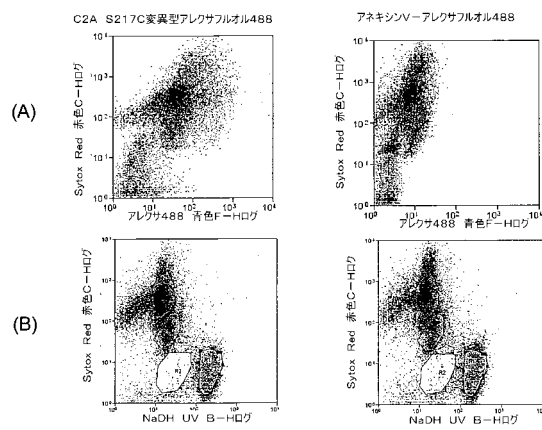
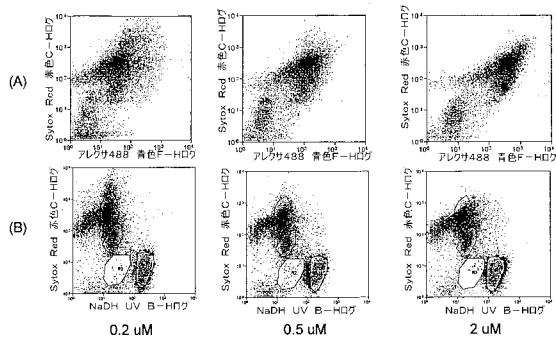


Figure 5

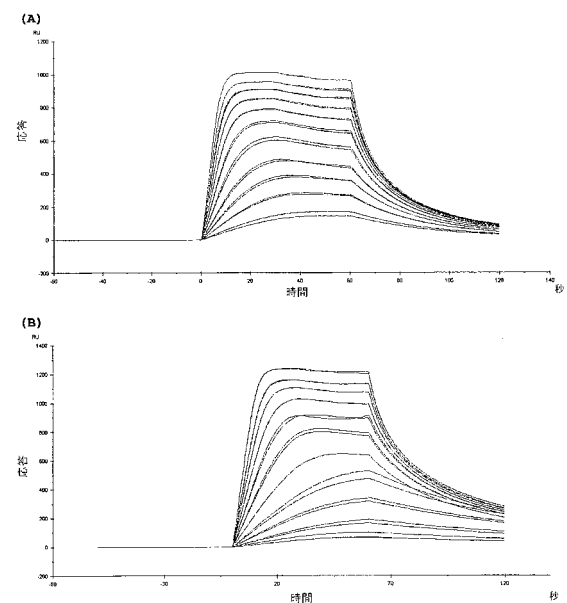
【図 6】



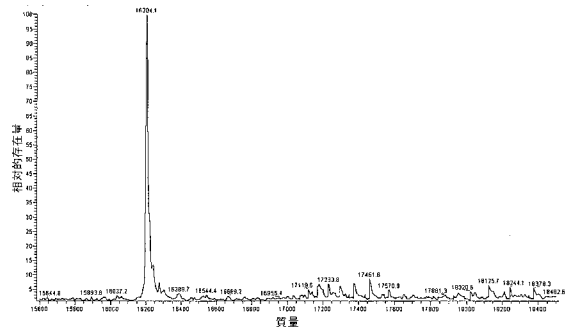
【図 7】



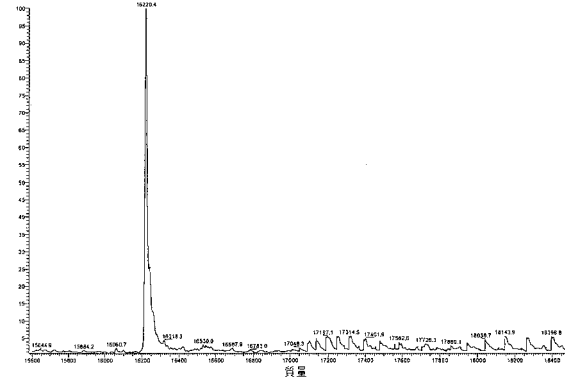
【図 8】



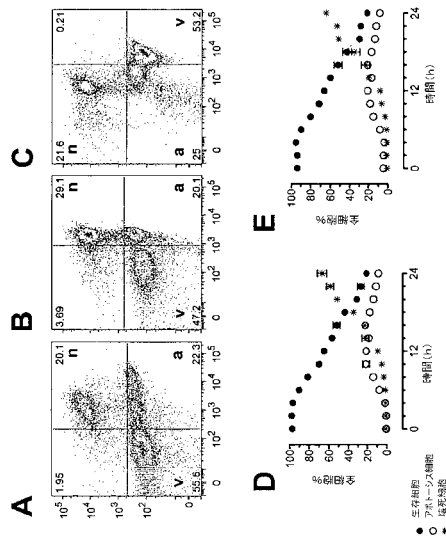
【図 9】



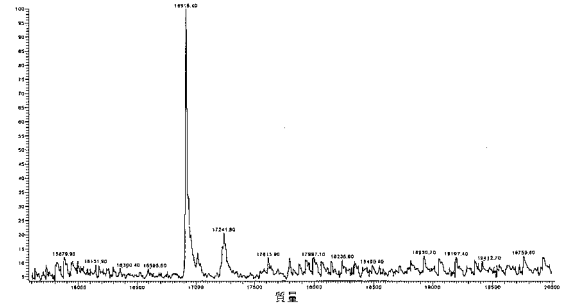
【図 10】



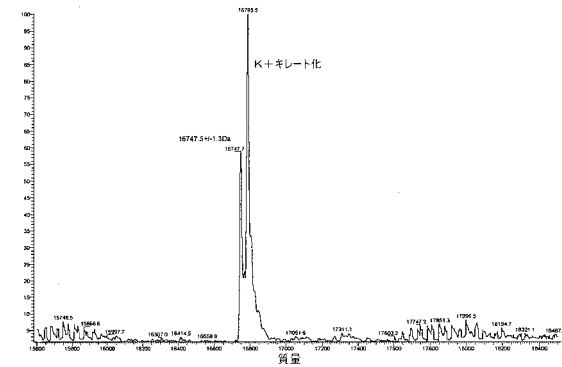
【図 13】



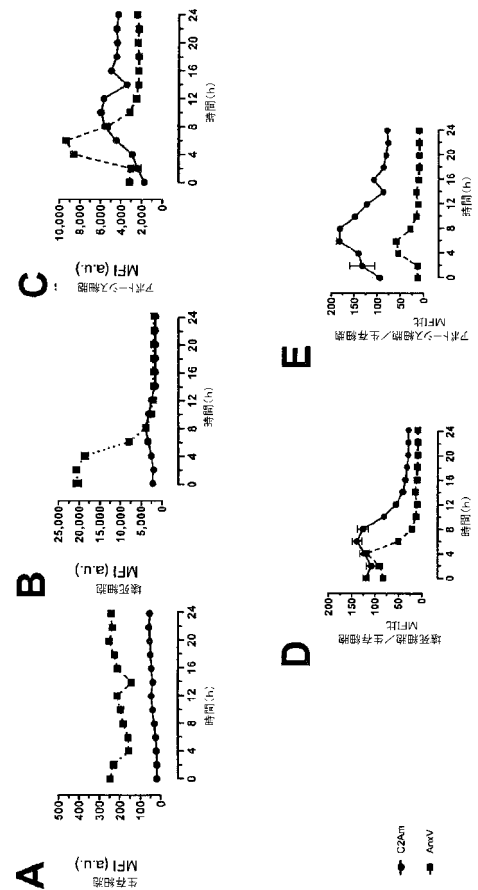
【図 11】



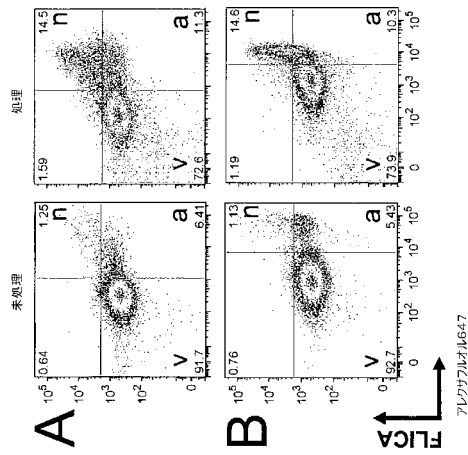
【図 12】



【図 14】



【図 15】



【図 16】

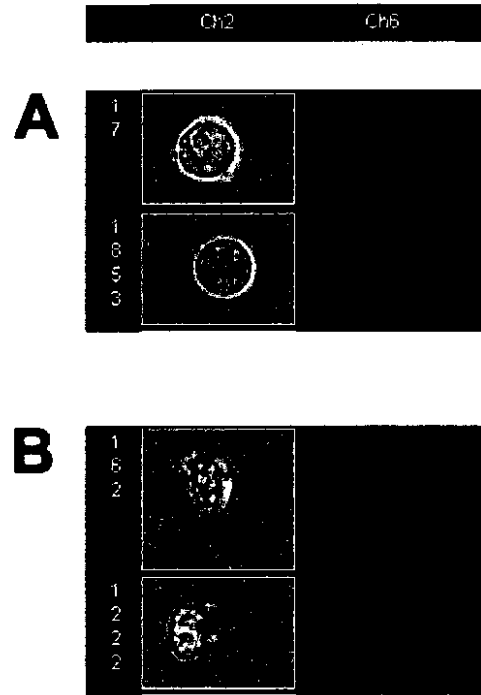
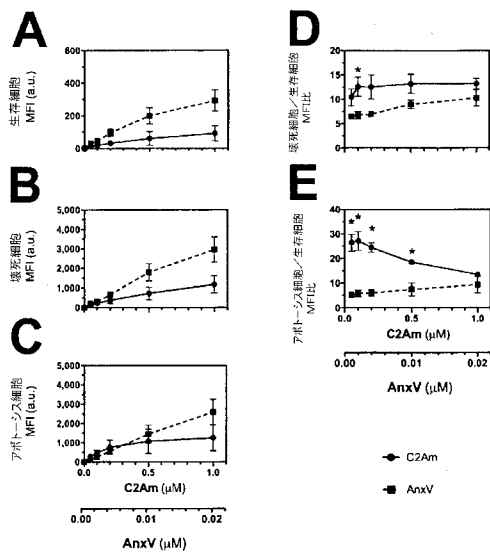
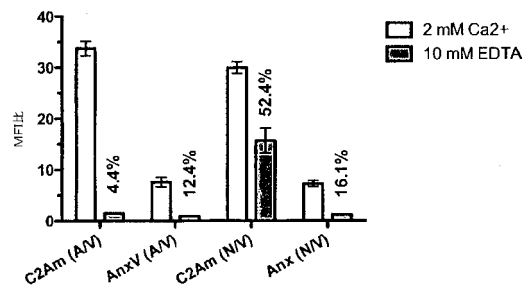


Figure 16

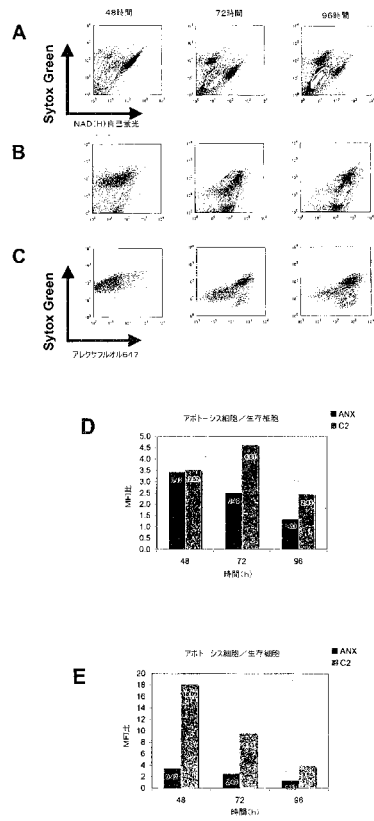
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

0005539324000001.xml

フロントページの続き

- (72)発明者 ニーブス, アンドレ
イギリス国, ケンブリッジ シービー2 1ジーエー, テニス コート ロード, ユニバーシティ
ー オブ ケンブリッジ, デパートメント オブ バイオケミストリー
- (72)発明者 デ バッカー, マアイケ
オランダ王国, エヌエル - 2 3 3 3 ゼットエー ライデン, アルピナスドリーフ, デパートメン
ト オブ ラジオロジー, ライデン ユニバーシティー メディカル センター, モレキュラー
イメージング ラボラトリーズ ライデン
- (72)発明者 アラム, イスラット
イギリス国, ケンブリッジ シービー2 1ジーエー, テニス コート ロード, ユニバーシティ
ー オブ ケンブリッジ, デパートメント オブ バイオケミストリー

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特表2008-521013(JP, A)
Biochemistry, 2003年, Vol.42, p.96-105

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 49 / 00

A 61 K 38 / 00

A 61 K 51 / 00

C 12 Q 1 / 02

G 01 N 33 / 48 - 33 / 98