

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3664727号
(P3664727)

(45) 発行日 平成17年6月29日(2005.6.29)

(24) 登録日 平成17年4月8日(2005.4.8)

(51) Int. Cl.⁷

C07K 14/47

A61K 51/00

C07K 1/13

F I

C07K 14/47

C07K 1/13

A61K 43/00

A61K 49/02

A

請求項の数 14 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平7-519734
 (86) (22) 出願日 平成7年1月23日(1995.1.23)
 (65) 公表番号 特表平9-509050
 (43) 公表日 平成9年9月16日(1997.9.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/000953
 (87) 国際公開番号 W01995/019791
 (87) 国際公開日 平成7年7月27日(1995.7.27)
 審査請求日 平成14年1月22日(2002.1.22)
 (31) 優先権主張番号 08/185,660
 (32) 優先日 平成6年1月24日(1994.1.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 ネオルクス コーポレイション
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9811
 9 シアトル ウェスト ハリソン 41
 O
 (74) 代理人
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者
 カシーナ サダカー
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9803
 4 カークランド ワンハンドレッドフィ
 フティーンズ アヴェニュー ノースイー
 スト 13710

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】放射標識したアネキシン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

診断学的画像化剤と共に放射標識するのに適するアネキシン含有結合体において；

アネキシン；および

放射性核種と錯形成し得る、 N_2S_2 または N_3S 化合物、

を含むことを特徴とし、

該化合物がアネキシンに共有結合している、

アネキシン含有結合体。

【請求項2】

アネキシンがアネキシンVであることを特徴とする請求の範囲1記載のアネキシン含有結合体。 10

【請求項3】

アネキシンが変性され、変性がシステインアミノ酸の除去を含むことを特徴とする請求の範囲1記載のアネキシン含有結合体。

【請求項4】

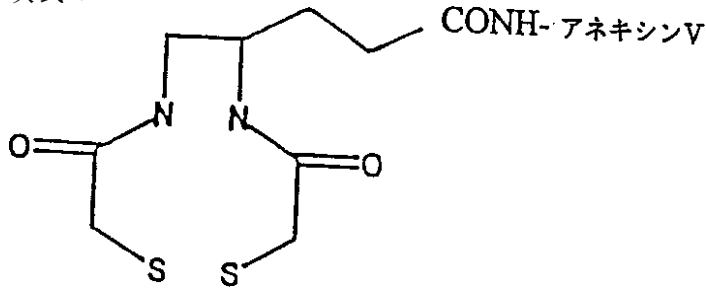
アネキシンが変性され、変性がシステインアミノ酸の硫黄非含有アミノ酸での置換を含むことを特徴とする請求の範囲1記載のアネキシン含有結合体。

【請求項5】

硫黄非含有アミノ酸がアラニンを含むことを特徴とする請求の範囲4記載のアネキシン含有結合体。

【請求項 6】

次式：



10

で表わされることを特徴とする請求の範囲 1 記載のアネキシン含有結合体。

【請求項 7】

血管血栓を画像化するのに適する放射標識したアネキシンにおいて、この放射標識したアネキシンの

アネキシン；

放射性核種と錯形成し得る N_2S_2 または N_3S 化合物であって、アネキシンに共有結合している、化合物；および

該化合物により錯形成された診断学的放射性核種を含むことを特徴とする放射標識したアネキシン。

20

【請求項 8】

アネキシンがアネキシン V であることを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

【請求項 9】

アネキシンが変性されており、変性がシステインアミノ酸の除去を含むことを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

【請求項 10】

アネキシンが変性されており、変性が、システインアミノ酸の硫黄非含有アミノ酸での置換を含むことを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

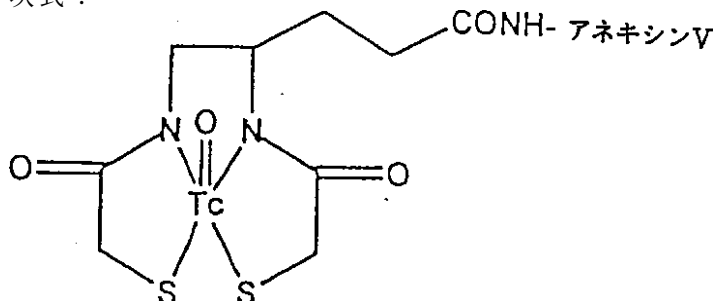
【請求項 11】

硫黄非含有アミノ酸がアラニンを含むことを特徴とする請求の範囲 10 記載の放射標識したアネキシン。

30

【請求項 12】

次式：



40

で表されることを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

【請求項 13】

放射性核種が Tc-99m, Re-186, Re-188, Pd-100, Bi-212, Pb-212, Pd-109 および Cu-67 から成る群から選択されていることを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

【請求項 14】

放射性核種が Tc-99m であることを特徴とする請求の範囲 7 記載の放射標識したアネキシン。

【発明の詳細な説明】

50

関連出願

本出願は、Kasina等により1994年1月24日に出願されたUS N 08/185,660号、発明の名称「放射標識したアネキシン(Radiolabeled Annexins)」の一部継続出願である。

技術分野

本発明は、放射標識した(radiolabeled)アネキシンに関する。また、本発明は放射標識したアネキシンの投与を伴う画像化プロトコルに関する。結合体のアネキシン成分は、結合体の放射標識活性成分を、血管血栓標的部位に送達する作用を有する。

発明の背景

患者が、胸痛、動悸または心臓障害または心臓病の他のあらゆる症状を患っている際には、心臓中の血管の血栓の存在が、治療を潜在的に顕著に複雑にする要因である。開業医が、1つ以上の血管血栓が存在するか否か、存在する場合にはこれらの血管血栓の位置を、健康な組織を侵すことなく決定することができたなら、治療の選択を一層良好に評価することができるであろう。さらに、開業医が、血管血栓が存在しないことを決定することができ、これにより治療における潜在的な複雑さを解消することができたなら、心臓病状態は一層安全かつ効果的に治療することができるであろう。

血管血栓の存在を決定するためのほとんどの現行の手法は、健康な組織を侵し、および／または厄介であり、および／またはこのような血栓を良好な感受性および特異性で検出することができない。従って、健康な組織を侵さない血管血栓画像化に有用な画像化剤が望ましい。

アネキシンは、陰イオン性リン脂質への結合がカルシウムで媒介されることを特徴とするタンパク質の群である。陰イオン性リン脂質は、活性化されていない血小板よりも、活性化されている血小板と20倍高い程度で会合し、活性化された血小板は血管血栓と関連する。

ヨウ素化アネキシンVは、インビボで血管血栓に局在することが示されているが、血栓巨大分子または非標的組織中への再導入による代謝的分解および／または可能なトランスヨードイネーション(transiodination)により血液クリアランスの顕著なβ相により、画像化特性は最適に及ばない。遊離の放射活性ヨウ素または代謝分解生成物を含むヨウ素は、非標的組織、特に甲状腺を放射活性にする。さらに、用いられるヨウ素放射標識は、得るのが困難であり、従って広く用いられるのに実用的でない。従って、優れた放射標識したアネキシン化合物が望ましい。

発明の要約

本発明は、放射標識したアネキシン並びにその製造および使用方法を提供する。本発明の好ましいアネキシン含有結合体は、診断学的画像化剤と共に放射標識するのに適するものであり、これは：アネキシン；および

アネキシンに共有結合した N_2S_2 キレートを含む。

また、本発明は、血管血栓を画像化するのに適する放射標識したアネキシンを提供し、この放射標識したアネキシンは：

アネキシン；

アネキシンに共有結合した N_2S_2 キレート；

キレートによりキレート化された診断学的放射性核種を含む。

本発明において用いるのに好ましいアネキシンはアネキシンVである。

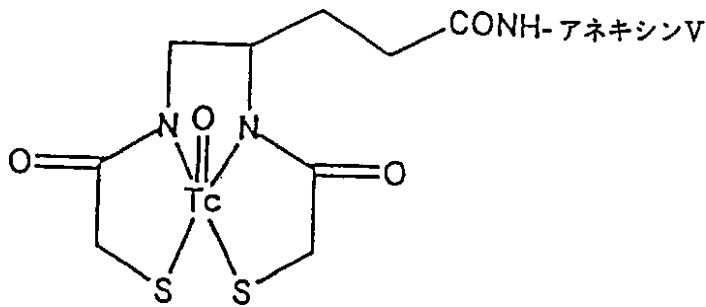
本発明において用いるのに好ましい放射標識したアネキシンは、次式：

10

20

30

40



で表されることを特徴とする。本発明を実施するのに用いるのに好ましい診断学的放射性核種は、 $Tc-99m$ 、 $Re-186$ および $Re-188$ であり、 $Tc-99m$ が特に好ましい。心臓内または心臓付近に位置する血管血栓は、特に本発明の画像化に基づいて分析可能である。

【図面の簡単な説明】

図1は、アネキシンVを放射標識する方法の図式図である。

図2は、pET-12aプラスミドマップの図式図である。

図3は、pET-12a-PAP1、3/7/94、クローン1の図式図である。

発明の詳細な説明

本発明を記載する前に、本明細書中の開示において用いられる若干の用語を定義するのが有用である。

アネキシン：ミリモル濃度のカルシウムの存在下で膜脂質と高い親和性で結合することができることを特徴とする一群の化合物。アネキシンは、アネキシンの、負に帯電した表面リン脂質（例えば活性化された血小板）により媒介された抗凝血効果を示すことが示されている。このアネキシン-リン脂質結合は、血液凝固因子の活性化を、このように負に帯電した表面リン脂質により遮断すると考えられている。アネキシン群の分子を認識する前に、これらの構成要素は、また、文献中で、胎盤抗凝血タンパク質（例えばPAP-1、2、3および4）、リポコルチン、カルパクチン、血管抗凝血物質(coagulant)（ α および β ）、カルホビンジン(calphobindin)I、胎盤タンパク質4（PP4）、エンドネキシンII、アンコリン(anchorin)C I I、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質等と呼ばれている。Crumpton等、「Nature」345: 212, 1990参照。アネキシンVは本発明の記載において用いられる原型のアネキシン分子である。

$N_x S_y$ キレート：ここで定義するように、「 $N_x S_y$ キレート」は、(i) 金属または放射性金属と配位結合することができ、(ii) アネキシン分子に共有結合することができる、二官能価キレーター(chelator)を含む。特に好ましい $N_x S_y$ キレートは、 $N_2 S_2$ および $N_3 S$ 核を有する。例示的な $N_x S_y$ キレートは、Fritzberg等、「Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A」85: 4024-29, 1988; weber等、「Bioconj Chem.」1: 431-37, 1990; および例えばこれらの中に引用されている文献中に記載されている。この記載に関して、原型の $N_x S_y$ キレートは、 $N_2 S_2$ キレートである。

$N_2 S_2$ キレート：適切な位置にある2個の窒素原子および2個の硫黄原子により放射性核種と安定にキレート化することができる $N_x S_y$ 族のジアミド、ジメルカプチド二官能価キレーター。

$N_3 S$ キレート：適切な位置にある3個の窒素原子と1個の硫黄原子により放射性核種と安定にキレート化することができる $N_x S_y$ 族のトリアミド、メルカプチド二官能価キレーター。好ましい $N_3 S$ キレーターは、例えば米国特許第4,965,392号明細書に記載されている。

結合体：結合体は、化学的結合体（共有または非共有結合）、融合タンパク質(fusion protein)等を含む。

本発明は、アネキシン含有結合体、放射標識したアネキシンおよびこれらの診断学的画像化用途での使用に関する。本発明の放射標識したアネキシンは、以下のことを特徴とする：陰イオン性リン脂質により特徴づけられた標的細胞部位への迅速な癒着；短い循環半減期；代謝的分解または放射性核種のキレートからの分離に対するインビボ耐性；および低

10

20

30

40

50

温キットフォーマット(cold kit format)中のパッケージングに基づいて分析可能であること。

本発明の例は、診断学的画像化剤と共に放射標識するのに適するアネキシン含有結合体に関し、これは、

アネキシン； および

アネキシンに共有結合した $N_x S_y$ キレートを含む。受容体の至る所（しかし特に心臓内または心臓付近）における血管血栓を画像化するのに適する放射標識したアネキシンにも関し、この放射標識したアネキシンはアネキシン、 $N_x S_y$ キレートおよびさらにキレートによりキレート化された診断学的放射性核種を含む。

本発明の好適例は、診断学的画像化剤と共に放射標識するのに適するアネキシン含有結合体に関し、これは、

アネキシン； および

アネキシンに共有結合した $N_2 S_2$ キレートを含む。血管血栓を画像化するのに適する放射標識したアネキシンにも関し、この放射標識したアネキシンは、アネキシン、 $N_2 S_2$ キレートおよびさらにキレートによりキレート化された診断学的放射性核種を含む。

多くの病的状態と関連する血管血栓の視覚化に関して、画像化放射性核種、例えば $Tc-99m$ とキレート化したキレートとアネキシンの結合体を、このような診断が望ましい受容者に投与する。結合体のアネキシン部分は、負に帯電した表面リン脂質例えば血管血栓により特徴づけられる標的部位に迅速に局在する。放射性核種は、その種々の手法の1つ、例えばガンマカメラ画像化によって視覚化する能力に関して選択される。アネキシンが標的部位に迅速に癒着し、アネキシンの血清半減期が短い（一般に30分以内）（これは放射標識によっては顕著に延長されない）ため、これらの標的部位の画像化は、非標的部位がほとんど放射活性とならずに進行する。アネキシンは一般的には単鎖(single chain)であり（最も顕著な例外はアネキシンIIである）、分子量が約33~72キロダルトンである非グリコシル化タンパク質である。アネキシンは、カルシウムイオン媒介結合と関連する多くのバイオロジカル(biological)を有する。

試験により、アネキシンが、陰イオン性膜脂質と、ミリモル濃度のカルシウムの存在下で高い親和性で結合することが示されている。カルシウムの存在下では、これらのタンパク質は、負に帯電したリン脂質、例えばホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸またはホスファチジイルイノシトールと、特に高い親和性を有する。

例えば、Funakoshi等、「Biochem.」26: 5572-87, 1987；およびTait等、「Biochem.」27: 6268-76, 1988参照。このような負に帯電したリン脂質は、血管血栓と会合する（例えば活性化されたヒト血小板の表面上に局在する）。

アネキシンは、抗凝血効果を奏する。凝血の障害は、アネキシンが負に帯電した表面リン脂質（例えば活性化された血小板の表面上に存在するもの）に結合することにより媒介される。この結合は、血液凝固因子の活性化を、このような負に帯電した表面リン脂質により遮断すると考えられる。アネキシンは、陰イオン性リン脂質を有する標的部位に、迅速、即ちその循環レベルに依存して5~30分の間に局在するが、血清中を、若干長い時間にわたり循環しつづける（循環半減期<30分）。以下の実施例IIIでは、画像化実験の結果を記載しており、ここでは、血管血栓は、82分の平均時間（アネキシン投与後）で平面画像に視覚化された。

これらの特性により、アネキシンあるいは診断または治療剤と結合したアネキシンを、多くの適応症、例えばDVT（深静脈血栓症）、PE（肺塞栓）、心筋梗塞、心房細動、人工心血管材料に関する問題、発作等に関連する血管血栓のインビボ診断または治療のプロトコルにおいて用いることができる。本発明のアネキシン結合体が有用である活性化された血小板の蓄積に関連する他の適応症には以下のものが含まれる：膿瘍画像化、再狭窄ポストバルーン(post balloon)血管形成(PCI)、関節の炎症（即ち慢性関節リウマチ）、損傷を受けた内皮細胞（即ちアルツハイマー症）、大脳動脈における血液凝固の画像化、末梢動脈における閉塞、心房血栓症の画像化並びに冠動脈および頸動脈血栓の画像化。

10

20

30

40

50

また、血小板集団を臨床的、インビトロ診断、および基礎的研究技術において特徴づけることも重要である。現在血小板を特徴づけることができる細胞表面マーカーの中で、多くは種の間で交差反応性ではなく、活性化された血小板集団とは対象的にすべての血小板を認識する。アネキシンは、多くの種の活性化した血小板に選択的に結合すると考えられる。従って、本発明のアネキシン結合体は、研究および診断技術、例えば免疫組織化学およびフローサイトメトリーにおいて代用細胞マーカーとして用いることができる。例えば、本発明の結合体を用いて、固定組織／腫瘍、血液塗沫標本、凝固障害を有する動物および種々の化学的または感染性刺激に応答する血小板活性化アッセイにおいて活性化された血小板を検出することができ、血液、細胞培養アッセイおよび血小板応答アッセイにおいて活性化された血小板を検出することができる。放射標識したアネキシンを用いる例示

10

本発明を実施するのに有用な好ましいアネキシンの一例はアネキシンVであり、これは、1979年にBohnにより、アネキシンの豊富な源であるヒト胎盤から分離され、プラセンタプロテイン(Placenta Protein) 4 (PP4)と命名された。アネキシンVは、E. coliにおいて発現した。また、アネキシンVの全長cDNAクローンが得られ、発現ベクターにおいてサブクローン化され(subcloned)、これによりアネキシンVを含む融合タンパク質の生成が促進された。アネキシンVは4つの領域(4つのタンデム、約75個のアミノ酸残基の不完全なくり返し、Funakoshi等、「Biochem.」26:8087-92、1987)から成り、ここで各領域は、5個の α -ヘリックスから構成されている。横からは、アネキシンV分子は、その凸面上に少なくとも4つのカルシウム結合部位を有する王冠状の外見

20

アネキシンVは複数のカルシウム結合部位を有するため、およびアネキシンVの負に帯電したリン脂質への結合がカルシウムにより媒介されるため、1個以上の個別のアネキシンV領域から成る加工した分子を、本発明の画像化プロトコルに用いることができる。また、アネキシン分子は、領域の境界とは異なる位置で分割して、陰イオン性リン脂質のカルシウム媒介結合が可能な加工した分子を提供することができる。また、陰イオン性リン脂質へのアネキシンVの親和性が顕著に損なわれない限りは、アネキシンVを、1個以上のアミノ酸残基において変化させることができる。例えば、アネキシンVのシステイン(位置316)アミノ酸残基を、除去するかまたは業界において知られているアラニンまたは他の硫黄非含有アミノ酸で置換することができる；ここで標識により、モノマー的に(monomerically)放射標識したアネキシンVが形成する。アネキシンのリン脂質への結合の程度はTait等、「J. Biol. Chem.」264:7944-49、1989により記載されたように、蛍光消失により定量することができる。

30

アネキシンの中では、アネキシンVが、血漿および細胞外流体(1.2 mMのイオン化カルシウム、0.15モルのイオン強度)に相当する条件の下で、80%のホスファチジルコリンと20%のホスホチジルセリンとを含むリン脂質小胞に対する親和性が最も強い($K_d < 10^{-10}$ M)。この結合は可逆的であり、カルシウム依存性である。

アネキシンVは、本発明において用いるための画像化放射性核種で放射標識される。本発明において用いるのに有用な放射性核種には、 γ 線エミッター、陽電子エミッター、オー

40

ジェ電子エミッター、X線エミッター、蛍光エミッター等が含まれる。
 ^{64}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{100}Pd , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{67}Cu ,
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{105}Ru , ^{99}Rh , ^{105}Rh , ^{111}In , ^{153}Sm , ^{177}Lu ,
 ^{170}Lu , ^{189}Pt , ^{193}Pt , ^{199}Au , ^{197}Hg

等が含まれる。

Tc-99mは、本発明を実施するのに好ましい放射性核種である。Tc-99mは、低いおよび高い比活性の両方において($0.53 \mu\text{Ci} / \mu\text{g} \sim 101.2 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$)

50

、本発明のアネキシンVに安定に結合した。適切な放射線化学収量および良好な放射線化学純度が得られた。活性化された血小板への結合試験もまた実施し、放射標識したアネキシンV結合体は、活性化された血小板に良好に結合した。

N_2S_2 および N_3S キレートは、業界において知られている。例えば、好ましい N_3S キレートは、米国特許第4,965,392号明細書に記載されている。本発明は、この安定なキレート化技術を、アネキシン分子の血栓症標的能力を示し、これにより血管血栓をインビボで迅速に視覚化することができる画像化剤を提供するのに用いた。本発明の放射標識したアネキシンを用いて、代謝的に分解された放射標識した結合体から生じる高レベルの背景放射活性を低減または除去する血栓症画像を得ることができる。また、放射標識したアネキシンは、非標的細胞部位への臨床的に受入れられない毒性を回避する。Tc-99mで放射標識したアネキシンVは本明細書中の実施例IIIで述べたブタにおける実験において、I-123より良好な性能を示した。

N_2S_2 または N_3S キレートを用いてアネキシンVを放射性核種で放射標識することは、プレフォームド(pre-formed)またはポストフォームド(post-formed)方法により実施することができる。即ち、放射性核種は、アネキシンVへのキレートの結合の前(プレフォームド)または後(ポストフォームド)にキレート内にキレート化される。プレフォームド方法が好ましく、実施例IおよびIIにおいてこれらの適切な方法を述べる。他の実験により、プレフォームド放射標識方法で、2つの放射分析ピークが、HPLC分析により得られることが示された。2つのピークの出現は、システイン結合アネキシンVおよびリン結合アネキシンVの結果である。従って、アネキシンVのシステインアミノ酸を、除去するかまたは硫黄非含有アミノ酸で置換してモノマー的に標識したアネキシンVを生じる。実施例V参照。

アネキシン分子は、約2〜約6個の末端アミノ酸残基を加えることにより変性させて、アネキシン分子とキレートとの間の結合反応を促進することができる。この変性は、タンパク質化学的方法によりまたは適切な融合タンパク質の生成により行うかまたは有用な他の方法により行う。

本発明の放射標識したアネキシンは、更に、前に製造されたI-123で標識したアネキシンよりも、低温キット中のパッケージングにより分析可能である点で利点を提供する。即ち、アネキシンおよびキレート成分は、個別にガラスビンに入れ、Tc-99m成分(および場合によっては、互いに別のガラスビンに入れられた)から個別に得られる。血栓画像化が必要である患者を識別する際には、低温キットを順に並べるかまたは貯蔵から取り出すことができる; Tc-99mは放射性医薬品または他の源から得られる; プレフォームドまたはポストフォームドキレート化方法を実施することができる; 放射標識したアネキシンを患者に投与する; 患者は次に画像化される。

結合体成分の無菌のピロゲンのない環境での凍結乾燥およびガラスビン入れは、当業者に知られている方法により、良好な製造実際、特に生体物質に関する実際で行う。

本発明の放射標識したアネキシンは、診断的に有効な量の放射性核種を標的部位に放出する量で投与する。適切な投与量は、大いに患者特異性である種々の要因に依存する。また、放射標識したアネキシンの成分は、当業者に知られているかまたは慣用されている方法により投与量を与える。一般的に、放射標識したアネキシンを、大きい動物に、患者の生理学的特性および伴われるまたは疑われる慢性病気に依存して、受容者の体重1kgあたり約0.3〜300μgの範囲内の投与量で投与し、約3〜10μg/kgが好ましい。当業者は、所与の受容者に対して、所与の照準で、適切な投与量および投与経路を同定することができる。

本発明の放射標識したアネキシンを、任意の好都合な方法により投与することができる。例えば、静脈内注入を用いて放射標識したアネキシンを投与することができる。他の投与経路もまた、本発明を実施するのに有用である。例示的な付加的な投与経路は、動脈(例えば冠動脈)、冠動脈内、リンパ球内、膜内または他の腔内経路等による注射である。

放射性核種を投与した後、放射性核種の性質および投与目的に依存して、受容者は、放射性核種が局在する部位からの放射活性発光の検出のための種々の手順をうけることができ

10

20

30

40

50

る。例えば、 $Tc-99m$ を含む結合体は、ガンマカメラにより画像化することができる。

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。これらの実施例は例示のためのものであり、本発明を限定するものではない。

実施例 I

アネキシン- N_2S_2 キレート結合体を放射標識する手順

アネキシン V は、種々の組織抽出物、例えば肝臓、肺および胎盤から、例えば Funakoshi 等、「Biochem.」26:8087-92、1987) ; Tait 等、「Biochem.」27:6268-76、1988 ; および米国特許第 4,937,324 号明細書に記載されたように分離することができる。さらに、アネキシン V を、E. coli 中で、Tait 等、「Archives of Biochemistry and Biophysics」288:141-44、1991 に記載されたよう発現させることができる

10

。アネキシン V を、 $Tc-99m$ で、ジアミドジメルカプチド N_2S_2 キレートを用いることにより、「J. Nucl. Med.」32:1445-51、1991 に記載されたようにオンコトラック (Oncotrac) (登録商標) スモール セル ラング キャンサー イメージング キット (Small Cell Lung Cancer Imaging Kit) 標識方法で放射標識した。

アネキシン V を $Tc-99m$ で放射標識する好ましい方法は、C-18 ベーカー (Baker) で精製した $Tc-99m-N_2S_2-TFP$ を用いる改良されたオンコトラック (登録商標) キット方法を構成する。この方法において、酸性化された活性エステル溶液を、0.16 ml の 0.2 M 塩酸 : 氷酢酸 (14:2 の比率) を 0.6 ml の 2,3,5,6-テトラフルオロフェニル 4,5-ビス-(S-1-エトキシエチルメルカプトアセトアミド) ペンタノエート (0.3 mg、0.0005 モル、0.9 ml のイソプロピアルコール中に新たに溶解した) に溶解させた溶液を加えることにより調製した。次に、この溶液 0.5 ml を、1.1 ml の $Tc-99m$ -グルコネート (0.12 mg の $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 、5.0 mg のグルコン酸ナトリウムおよび 100 mCi/ml の $[Tc-99m]$ 過テクネチウム酸塩から、即ちオンコトラック (登録商標) キット標識手順の第 1 段階で pH 6.1~6.3 で調製した) に加えた。反応混合物を 75°C で 15 分間加熱し、次に氷上で冷却した。形成した $Tc-99m-4,5$ -ビス(チオアセトアミド)ペンタノエートの $Tc-99m$ トランスキレート化テトラフルオロフェニル活性エステル誘導体を、反応混合物を特定の条件に調整した C-18 カートリッジ (J. T. Baker) に装填し、2.0 ml の水で 8 回洗浄し、次にカラムで 5 分間乾燥し、100% アセトニトリルで溶出させることにより精製した。溶媒を N_2 の定常流中で蒸発させた。次に、0.15 ml のリン酸緩衝液 (PBS)、0.15 ml のアネキシン V (2.35 mg/ml) および 0.2 ml の 0.2 M 重炭酸塩 (pH 10.0) を加えて $Tc-99m-N_2S_2$ に結合させた。室温で 20 分後、 $Tc-99m-N_2S_2$ -アネキシン V 結合体を、PBS で平衡にした G-25 セファデックス (Sephadex) (PD-10) カラム (Pharmacia から市場で入手できる) を通すことにより精製した。フラクション (1.0 ml) を採集し、アネキシン V を含むフラクションをプールした。タンパク質濃度を 280 nm における紫外線吸収により測定した。 $Tc-99m$ -アネキシン V (300~350 mg) 結合体溶液を希釈し、注射前にウシ血清アルブミン (BSA) を 15~20 mg BSA/ml PBS の最終濃度で含む PBS 中に貯蔵した。

20

30

40

実施例 I I

アネキシン- N_3S キレート結合体を放射標識する手順

S-ベンゾイルメルカプトアセチルグリシルグリシルグリシン (S-ベンゾイル MAG₃) を、米国特許第 4,965,392 号明細書に記載された手順により調製した。次に、25 μg の S-ベンゾイルメルカプトアセチルグリシルグリシルグリシンを、0.10 ml の 1.0 M 炭酸塩緩衝液 (pH 12) 中に溶解した。次に、75 mCi の $Tc-99m$ 過テクネチウム酸塩を、約 1.0 ml、次に 1.0 mg の新たに溶解したジチオン酸ナトリウム (10 mg/ml) に加えた。この混合物を 100 ± 4°C で 3 分間加熱し、次に氷浴中で 5 分間冷却して、ITLC (CH_3CN 溶媒) ; 陰イオン交換 HPLC (ベックマ

50

ン (Bechman) AX、10ミクロン0.01M Na_2SO_4 / 0.01M Na_3PO_4 , pH 7.0; および逆相HPLC (ベックマンODS, 5ミクロン2% CH_3CN / 0.01M Na_3PO_4 , pH 7.0) により決定されたように、Tc-99m-MAG₃ が得られた。

カルボン酸形態でのTc-99m-MAG₃錯体を次にエステル化した; 0.20mlの1N HCl, 0.30mlの0.2Mリン酸緩衝液、pH 6.0, 10.0mgの2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェノール (TFP) を0.01mlの90%、 CH_3CN に溶解した溶液および12.5mgのEDC (1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩) を0.10mlの90% CH_3CN に溶解した溶液と一緒にし、反応体を室温 (25 ± 2 °C) で1時間混合した。この時点で、Tc-99m-MAG₃-TFPエステルの収率を、ITLC (CH_3CN 溶媒); 陰イオン交換HPLC (ベックマンAX、10ミクロン0.01M Na_2SO_4 / 0.01M Na_3PO_4 , pH 7.0); および逆相HPLC (ベックマンODS, 5ミクロン34% CH_3CN / 0.01M Na_3PO_4 , pH 7.0) で測定した。この生成物を、C-18ペーカークラムを用いて精製した。反応混合物をカラム中に装填し、水で2回、次に10% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ / 0.01M Na_3PO_4 , pH 7.0で8回洗浄した。生成物を CH_3CN で溶出し、アネキシンVと結合させる前に溶媒を除去した。

活性エステルのアネキシンVへの結合を、アネキシンVをリン酸緩衝液、pH 9.5に溶解した溶液をTc-99m-MAG₃-TFPエステルに加えることにより実施した。反応を少なくとも30分間実施し、所望の放射標識したアネキシン生成物を、PD-10ゲル濾過カラムを通すことにより得た。

実施例 I I I

放射標識したアネキシンを用いた血栓画像化

A. 動物の準備 - LA 血管血栓

絶食させた25~30kgのヨークシャーブタ (Yorkshire Swine) に、筋肉内投与テラゾール (Telazol) (5~10mg/kg) (AVECO Co. から市場で入手できる) および市場で入手できるアトロピン (1mg、米国ニュージャージー州チエリーヒル所在のElkins Simm Inc.) を用いて鎮静剤を投与した。スリタル (Surital) (200mg) (Abbott Laboratoriesから市場で入手できる) 麻酔を静脈内投与した。動物に挿管し、1.5~2%のハロタン (Abbott Laboratoriesから市場で入手できる) 並びに深いレベルの麻酔および生理的動脈血液ガスを得るのに十分な量の O_2 で吸入麻酔した。連続的心電図モニタリングを、ワニ口クリップ電極を用いて設けた。頸部の切り落としを行い8フレンチカテーテル (French Catheter) (USCI Co. 米国マサチューセッツ州ビレリカ所在) を右側総頸動脈中に配置して血圧および動脈血液ガスをモニタリングし、血液サンプリングを行った。

ブタを右側横方向臥床位置に配置し、横方向の開胸を実施して心臓を露出させた。切開部を、開胸開創器により開放したままとした。心膜を開き、左心房付属体を左心房から血管クロス Clamp (cross-clamp) により分離した。ゴム栓をした鉗子を用いて、付属体をおだやかに押しつぶした。5分後、リシノール酸塩 (1mg, ICN Pharmaceuticals, 米国カリフォルニア州 コスタメサ所在) およびトロネピン (50mg, Johnson and Johnson Co., 米国テキサス州アーリントン所在) をLAA (左心房付属体) 中に27G ニードルを用いて注入した。10分後にクロス Clamp を除去した。

つぶして損傷させてから1時間後、前記実施例 I に従って調製したTc-99m-アネキシンVを、耳静脈中に静脈内巨丸剤投与として投与した。次に静脈内ラインを生理的食塩水で洗浄した。7匹の動物において、I-125で標識したオボアルブミンを非特異性対照プレパラブル (preparable) として、例えばFraker等、「Biochem. Biophys. Res. Commun.」80: 849-57, 1978に記載された方法により投与した。要するに、I-125で標識したオボアルブミンをヨードゲン (Jodogen) 法で、600mgのオボアルブミン (Sigma Chemical Co., 米国ミズーリ州セントルイス所在) およびNaI-125 (2mCi, 0.92ナノモル) を用いて調製した。

画像の取得を下記のようにして実施した。実験手順の終了時において（一般的に約150分）、動物を、80mEqのKClの静脈内巨丸投与により絶命させ、この間動物は尚通常の麻酔下にあった。最終的な血液試料を採取して十分にカウントした。心臓を迅速に摘出し、洗浄して血液を除去し解剖して試料とし十分にカウントした。頸動脈、肺、肝臓、脾臓、筋肉および腎臓の付加的な試料を、若干の動物において得た。

B. 対照 5種の異なるタイプの対照を用いた：オープンチェストシャム(open chest sham)：クローズチェストシャム(closed chest sham)；オボアルブミン；インジウム血小板；および非特異性Tc-99m標識抗体。

1. オープンチェストシャム 3匹の動物において、前記のようにして心臓を露出させたが、左心房を分離せず、つぶさず、リシノール酸塩／トロンビンを注入しなかった。コバルトマーカを用いたマーカ画像化を前記のようにして実施し、LAA暴露の30～60分後にTc-99m-アネキシンVを注入した。画像化および試料取得は、前記Aに記載したものと同様にした。

2. クローズチェストシャム 7匹の動物において、耳静脈ラインを確立した。開胸は実施しなかった。鎮静剤投与および麻酔は前記Aと同様にした。Tc-99m-アネキシンV（＋／－他の対照放射性核種、例えばI-125オボアルブミンまたはIn-111血小板）を投与し、画像取得を実施した。

3. オボアルブミン I-125オボアルブミンを、負の対照タンパク質として7匹の動物に投与した。オボアルブミンはアネキシンと類似する分子の大きさを有し、わずかに遅い血液クリアランスを示す。

4. インジウム血小板 In-111血小板標識を、7匹の動物に、正の十分にカウントするレベルとして実施した。In-111で放射標識した血小板を、Stratton等、「Am. J. Cardiol.」47: 874, 1981およびStratton等、「Circulation」69: 561, 1984に記載された方法に従って調製した。In-111血小板の血清半減期が長いいため、画像化は実施しなかった。

5. 非特異性Tc標識抗体 単一の実験において、左心房(LA)血栓を前記方法により形成したが、Tc-99mアネキシンVを投与しなかった。代わりに、NR-LU-10と呼ばれるTc-99m-Fabフラグメントを投与した。NR-LU-10は、分子量が150キロダルトンのIgG2bモノクローナル抗体であり、これは、ほとんどの腫瘍上に発現する約40キロダルトンの糖タンパク質抗原を認識する。NR-LU-10は、ヒト臨床試験において565人を超える患者に安全に投与された十分に特徴づけられたパンカルシノーマ(pancarcinoma)抗体である。NR-LU-10-Fabを、既知の手法により調製し、「J. Nucl. Med.」32: 1445-51, 1991に記載された手順および実施例Iに記載された改良C-18ベーカー精製Tc-99m-N₂S₂-TFP方法に従って放射標識して放射標識したアネキシンVを調製した。このTc-99m-Fab結合体を、十分なカウンティングおよび画像化の両方に関する負の対照とした。

C. 画像化 コバルトマーカをLAAの露出面上に配置し、開胸開創器に固定した手術テーブルで一定の位置に保持した。このテーブルを、マーカが各心臓サイクルと共にLAAと共に一般に移動するように調整した。マーカ画像化を各平面画像に関して10秒間および各断層撮影スライスに関して10秒間得た。次にコバルトマーカを除去した。

一般的用途のコリメーターを有するゼネラル エレクトリック スターポートカメラ(General Electric Starport Camera)を用いて、Tc-99m画像を得た。5分間の平面画像を左側の横方向、45LAO、および前面において連続的に得た。これらに続いて断層撮影の取得を10分間行った。3回の平面および1回の断層撮影のこれらの完全なセットの取得を、全部で5セットくりかえした。一連の画像化手順の全体にわたりブタまたは画像化構台が動かないように注意した。

画像を、VAXメインフレームシステムに従属して作動するマイクロデルタ(Microdelta)コンピュータに記録した。画像をテープまたはVAXハードドライブに記憶させた。平面画像分析は、第1に画像をマーカで観察し、観察末端スクリーンにおけるマーカ位置を記録することから成っていた。Tc-99m-アネキシンV注入の後に得られた第1の

10

20

30

40

50

画像を用いて、心臓血液プールを決定した。その後の画像各々を、マーカーおよび参照として初期血液プールを用いて観察し、分析した。各画像を陽性、中間または陰性として記録した。

13匹の動物は、左心房血栓が形成しており、これを前記のようにして画像化した。12匹の動物に画像化のためにTc-99m-アネキシンVを注入し、1匹の動物には、対照として、非特異性Tc-99m-Fabを注入した。クロース Chest 画像化を7匹の動物において心房を損傷させることなく実施し、オープン Chest シャム実験を3匹の動物において実施した。心房血栓を有する動物において、Tc-99m-アネキシンVの投与後35分以内に撮影したすべての平面画像を陰性であった。70分以上において撮影した9つの心房血栓平面画像は陽性であり、1つは中間であり、2つは陰性であった。心房血栓の断層撮影はすべて、注入から2時間を超える画像化時間において、陽性(n=10)または中間(n=2)のいずれかであった。Tc-99m-アネキシンVを投与してから平面画像が陽性になるまでの平均時間は、82分(35~135分)であった。

クロース Chest 対照の動物はいずれも、陽性の画像を示さなかった。3匹のオープン Chest シャムのうち1匹は、85分後において陽性の画像を示した。この偽りの陽性は、手術により誘発された血栓の形成の結果であると考えられる。

これらの結果は、Tc-99m-アネキシンVの静脈内投与により、結合体の投与から短時間のうちに、心房血管血栓を識別する診断的画像が得られたことを示す。

D. 試料採集 前記した試料(血液試料と組織試料と両方)を秤量し、ガラスビン中に入れ、直ちにTc-99mをカウントした。Tc-99mが崩壊した後(代表的には5~7日後)、試料を再びアッセイしてI-125カウントを得た。各ガラスビン中の試料を1分間カウントした。このカウントを崩壊、次に重量に関して補正しカウント/分/gとして記録した。各試料に関するカウント/分/gの値を次に最終血液標本のカウント/分/gの値を除することにより標準化した。従って、各試料に関する結果を最後の血液試料に対する比率で計算し、動物間で有意の比較ができるようにした。この手順を、所与の実験においてすべての放射性核種に関して実施した。

種々の組織試料に関して十分にカウントした比率が得られた。損傷を受けた組織および血栓に関しては、通常複数の標本を同一の動物から採取した。これらの場合において、任意の1つの標本に関する最大比率を、採取したすべての標本の平均と共に記録する。各動物の最大値を、すべての動物に関して平均し、最大Anx-V比率(Maximum Anx-V Ratio)として記録する。

これらの結果は、Tc-99m-アネキシンVが心房血栓および損傷を受けた左心房に選択的に局在し、最高の非標的局在は腎臓において発生したことを示す。腎臓におけるレベルは、Tc-99m-アネキシンVの腎臓経路を通過しての排出を少なくとも部分的に示す。

実施例 I V

アネキシンVの細胞発現クローンを生成する方法

親クローン、λHPAP1.6は、Funakoshi等、「Primary Structure of Human Placental Anticoagulant Protein」、Biochemistry, 第26巻、第8087-8092頁(1987)に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて、アネキシン遺伝子をλHPAP1.6親クローンから増幅した。センスプライマー(CAT ATG GCA CAG CTT CTC A)はNdeI制限部位(下線)を含んでおり、アネキシンリーダー配列の最初の16個のヌクレオチドは、ATG開始コドンで始まっている。アンチセンスプライマー(GCA TCC TTA GTC ATC TTC TCC ACA)は暗号配列の末端、終結コドン(太字)およびBamHI制限部位(下線)を暗号化していた。ノーバゲン(Novagen)(米国カリフォルニア州 パロ アルト所在)から得られたPCR生成物およびプラスミドpET-12a(図2)をそれぞれNdeIおよびBamHIで消化し、T4 DNAリガーゼと共につないだ。結合溶液の一部をE. Coliホスト菌株に形質転換し、アンピシリンを含む普通寒天プレート上に選択した。形成したクローンからのプラスミドをpET-12a-PAP1-E287G、7/16/93、クローン1と表示した。ディデオキシDNA配列分析により、このプラスミドは、

2つの突然変異〔855 G→A（サイレント）；860 A→G（Glu-287をGly-287に転化）〕を除いて、野性型のアネキシン配列と一致するDNAを含むことが示された。

pET-12a-PAP-E287G、7/16/93、クローン1中に存在する配列の変化は、以下のようにして補正した。プラスミドを、両方の突然変異体を含む約240の塩基対のフラグメントを切り取る制限酵素SfuIおよびBamHIで消化した。このフラグメントを、240の塩基対フラグメントで、野性型配列を含むことが知られている独立したクローンから置き換えた。このDNAをつなぎ、E. Coliホスト菌株に形質転換した。プラスミドDNAを含むE. Coliコロニーを、普通寒天プレートを含むアンピシリン上で選択した。形成したクローンは、プラスミドpET-12a-PAP1、3/7/94、クローン1（図3）を収容していた。DNA配列決定により、プラスミドにおけるアネキシン暗号化配列が野性型配列と正確に一致することが確認された。

ノーバゲンから得られたホスト菌株BL21（DE3）をプラスミドpET-12a-PAP1、3/7/94、クローン1で形質転換した。グリセロールストックを、形成した形質転換細胞BL21（DE3）（pET-12a-PAP1、3/7/94、クローン1）で製造し、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。

液体培養液中での 37°C におけるE. Coli BL21（DE3）（pET-12a-PAP1、3/7/94、クローン1）の成長の結果、E. Coli細胞周辺腔にアネキシンVタンパク質が蓄積した。

実施例 V

アネキシンVを変性させる手順

プラスミドpET-12aは、前記実施例IVに記載した。アネキシンアミノ酸突然変異体遺伝子をpET-12aプラスミド上のNdeIとBamHI制限部位との間に配置した。

アネキシンVの独立した変性を、PCR増幅を用いて、部位特異的なアミノ酸変化により発生させた。この変化を達成するために、アネキシンの3'末端のアンチセンス方向においてアニル化したオリゴヌクレオチドを作成した。本明細書中に記載したアネキシンVの特定の変化は、システイン残基（316の位置）のアラニンでの置換である。この変化を達成するために、ヌクレオチド配列をTGTからGCAに変化させた。このオリゴヌクレオチドは、BamHI制限酵素部位および終結コドンを含んでいる。

センスオリゴヌクレオチドは、NdeI制限部位またはアネキシンVの5'末端のすぐ上流のpET-12aのT7プロモーター領域内でアニル化する。以下にアンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド配列をそれぞれ示す：

(Nx168 Cys→Ala アンチセンス)

5' GTACCTGGATCCTTAGTCATCTTCTCCGCGAGCAGCAGAAGAGCTTTCTT 3'；

および(T7 センス)

5' CGAAATTAATACGACTCACTATAGGG 3'

Nx168およびT7オリゴヌクレオチドを、DNAシンセサイザー、モデル381A（アプライド バイオシステム インコーポレイテッド(Applied Biosystem Inc.)、モデル381A）を用いて合成した。合成が完了した後、両方のオリゴヌクレオチドを前記製造者のプロトコルの付録(appendix)5に関して脱保護(deprotected)した。精製を、セファデックス(Sephadex)（登録商標）G-25カラム（ファーマシア(Pharmacia)、スウェーデン国アップサラ所在）を用いて行った。

PCR反応を、ウルトマ(Ultima)（登録商標）ポリメラーゼ（パーキンエルマー(Perkin Elmer)、米国コネティカット州 ノーウォーク所在）を用いて行った。反応を、約10ngのpET12a-アネキシンV鋳型、30ピコモルのT7およびNx168オリゴヌクレオチドおよび0.4mMの各ヌクレオチドを用いて行った。鉱油オーバーレイを含ませた。反応をコイ(Coy)温度循環器(temperature cycler)、モデル110P中に配置し、 94°C で5分間インキュベートした。インキュベーション約2分で、0.5ユニットのポリメラーゼを加えた。次に、 94°C で30秒間、 55°C で1分間、 74°C で1分間、

10

20

30

40

50

反応を30回くりかえした。次に反応を5分間74℃でインキュベートし、次に15℃で浸漬した。

形成したアネキシン-a1a置換遺伝子を次に、製造者のプロトコルに従って、DNA精製キット(Promega MagicTM PCR Preps DNA Purification System、米国ウイスコンシン州マジソン所在)を用いて精製した。

次に、アネキシン-a1aおよびpET-12aをNde IおよびBamH I (ギブコ(Gibco)/BRL、米国メリーランド州ガイサーブルグ所在)制限酵素で消化した。次に、消化生成物を、アガロースゲル電気泳動により精製した。適切なバンドを切り取り、製造者のプロトコルに従って、ジーンクリーン(Gene Clean)I I (登録商標)キットを用いて精製した。次に、アネキシン-a1aとpET-12aとを、T4 DNAリガーゼ(プロ

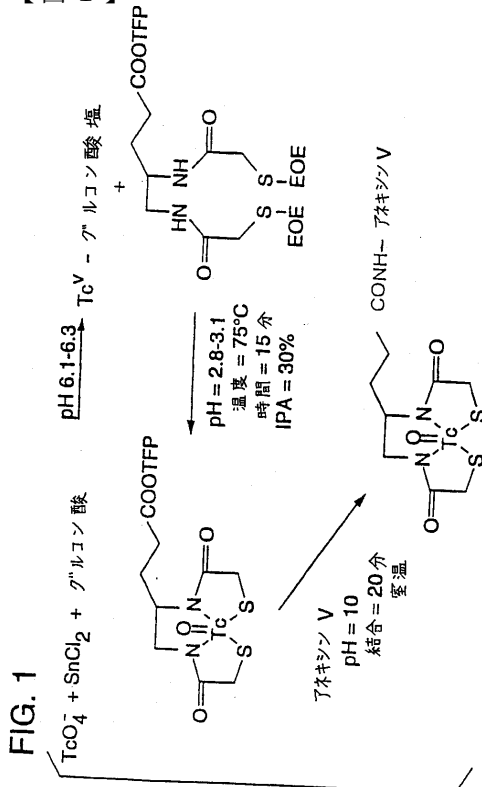
10

メガ)で12~18時間4℃でつないだ。アネキシン-a1a-pET-12aをE. Coli菌株DH5αマックス効率的相補細胞(ギブコ/BRL)に形質転換した。pET-12aプラスミドに関する任意の他の適切な宿主菌株を用いた。E. Coli形質転換細胞をLBアガー(ギブコ/BRL)上に配置し、100 μg/mLのアンプシリン(米国コネティカット州ニューハーベン所在のインターナショナル バイオテクノロジー インコーポレイテッド(International Biotechnologies Inc.))を加え、37℃で12~18時間インキュベートした。当業者に明らかな適切なコロニーを次に、テリフィック ブロス(Terrific Broth)(ギブコ/BRL)中に配置するために選択し、これに100 μg/mLのアンプシリン(インターナショナルバイオテクノロジー インコーポレイテッド)を加えた。

20

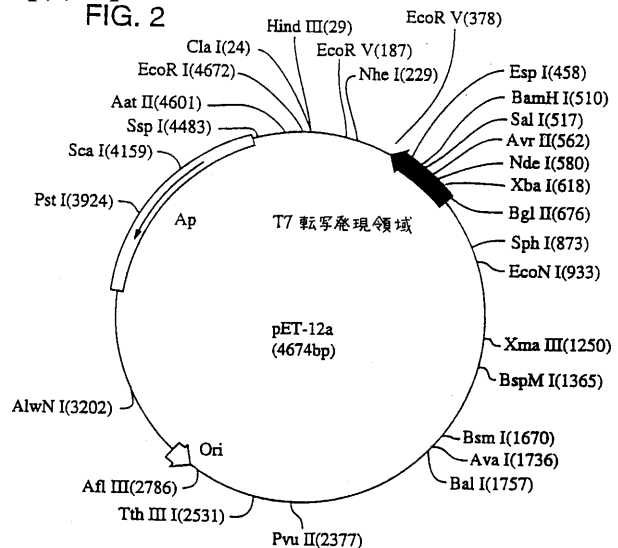
LB寒天プレートからの若干のコロニーを選択し、増殖させた。プラスミドDNAを、プロメガス ウィザード ミニプレップ(Promega's Wizard miniprep) 精製キットを用いて精製した。DNAプラスミドを精製した後、コロニーを配列分析によりスクリーニングして、特定の選択したクローンが、アミノ酸変性または変化を受けたことを確認した。

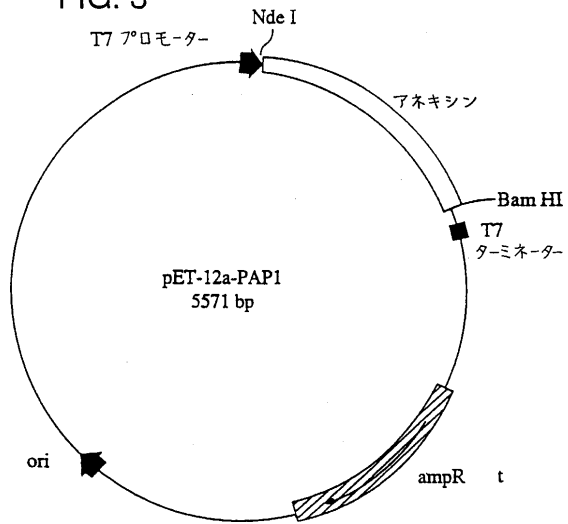
【図1】



【図2】

FIG. 2



【図 3】
FIG. 3

フロントページの続き

- (72)発明者 デュハースト ティモシー エイ
アメリカ合衆国 ワシントン州 98119 シアトル エイス アヴェニュー ウエスト 18
25
- (72)発明者 レノ ジョン エム
アメリカ合衆国 ワシントン州 98036 ブライアー エルム ドライブ 2452
- (72)発明者 タイト ジョナサン
アメリカ合衆国 ワシントン州 98125 シアトル サーティナインス アヴェニュー ノー
スイースト 13716
- (72)発明者 ストラットン ジョン
アメリカ合衆国 ワシントン州 98119 シアトル エイス アヴェニュー ウエスト 14
11

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特表平05-502877 (JP, A)
特開昭61-225163 (JP, A)
特開平01-019058 (JP, A)
特表平10-504534 (JP, A)
特表平10-512852 (JP, A)
特表2001-525790 (JP, A)
Circulation, Vol.92, No.10(1995.Nov.)p.3113-3121
J.Nucl.Med., Vol.32, No.7(1991)p.1445-1451
Proc.Natl.Acad.Sci.USA., Vol.85, No.11(1988)p.4025-4029
J.Nucl.Med., Vol.35, No.5(1994.May)p.254P-255P
J.Nucl.Med., Vol.37, No.5 suppl.(1996)p.29P

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed