

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7307797号
(P7307797)

(45)発行日 令和5年7月12日(2023.7.12)

(24)登録日 令和5年7月4日(2023.7.4)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/542 (2006.01)

G 0 1 N 33/542

A Z N A

G 0 1 N 33/84 (2006.01)

G 0 1 N 33/84

A

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 21/64

F

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z

G 0 1 N 33/533 (2006.01)

G 0 1 N 33/533

請求項の数 13 (全102頁)

(21)出願番号 特願2021-531481(P2021-531481)

(86)(22)出願日 令和1年12月2日(2019.12.2)

(65)公表番号 特表2022-510369(P2022-510369
A)

(43)公表日 令和4年1月26日(2022.1.26)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/064053

(87)国際公開番号 WO2020/117701

(87)国際公開日 令和2年6月11日(2020.6.11)

審査請求日 令和3年7月30日(2021.7.30)

(31)優先権主張番号 62/774,314

(32)優先日 平成30年12月2日(2018.12.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 399019892

ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
THE UNIVERSITY OF C
HICAGO
アメリカ合衆国60637イリノイ州シ
カゴ、サウス・エリス・アベニュー58
01番

(74)代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(74)代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試料中のpHおよびカルシウムまたは塩化物イオン濃度を決定する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の1) pH、および2) Ca^{2+} 濃度または Cl^- 濃度を同時に決定する方法であって、

(a) 第1の鎖が、配列5' - Ca^{2+} フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有し、第2の鎖が、配列5' - 第1の標識 - CCC* CTA ACC* CCT AAC CC*C TAA CC*C CAT ATA TAT CCT AGA ACG ACA GAC AAA CAG TGA GTC - 3' (配列番号08) を有し、ここでC*は5-ブロモシトシンである、であるか、

(b) 第1の鎖が、配列5' - TTA TAG GAT CCT GCG GTC GG / Ca^{2+} フルオロフォア / GGC ACC AGG CGT AAA ATG TA - 3' (配列番号09) を有し、第2の鎖が、配列：5' - 第1の標識 - CCC CAA CCC CAA TAC ATT TTA CGC CTG GTG CC - 3' (配列番号10) を有し、第3の鎖が、配列：5' - CCG ACC GCA GGA TCC TAT AAA ACC CCA ACC CC - 第2の標識 - 3 (配列番号11) を有するか、

(c) 第1の鎖が、配列5' - Ca^{2+} フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有し、第2の鎖が

10

20

、配列 5' - 第 1 の標識 - AT AAC ACA TAA CAC ATAACAAAA T
AT ATA TCC TAG AAC GAC AGA CAA ACA GTG AGT
C - 3' (配列番号 12) を有するか、または

(d) 第 1 の鎖が、配列 5' - C l - フルオロフォア - ATC AAC ACT GCA -
Lys - COOH (配列番号 22) を有し、第 2 の鎖が、配列 5' - TAT TGT GTA
TTG TGT ATT GTT TTA TAT AT / 第 1 の標識 / A TAG GAT
CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT - 3' (配列番号 2
3) を有し、第 3 の鎖が、配列: 5' - CAC CAG ACA GCA AGA TCC
TAT ATA TAT ACC C*CA ATC C*CC AAT CCC CAA T
CC* CC - 第 2 の標識 - 3' (配列番号 24) を有し、ここで C* は 5 - ブロモシトシン
である、である、を含む核酸複合体を提供することと、
核酸複合体を試料に接触させることと、
接触させた試料を所定の励起波長にさらすことと、
さらされた試料によって生成したシグナルの該強度を測定することと、
測定されたシグナルから該 pH、および Ca²⁺ または C l - 濃度のいずれかを決定す
ることとを含む、方法。

【請求項 2】

試料が細胞、細胞抽出物、細胞溶解物、組織、組織抽出物、体液、血清、血液および血
液製剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

決定することが、初期エンドソーム、後期エンドソーム、原形質膜、リソソーム、オー
トファゴリソソーム、リサイクリングエンドソーム、シスゴルジネットワーク、トランス
ゴルジネットワーク、小胞体、ペルオキシソーム、または分泌小胞において行われる、請
求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

C l - フルオロフォアが、10, 10' - ビス [3 - カルボキシプロピル] - 9, 9' -
ビアクリジニウム二硝酸塩を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

Ca²⁺フルオロフォアが、Rhod - 5 F、XRhod - 5 F、または Rhod - F
F を含む単一波長指標である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

Ca²⁺フルオロフォアが、Rhod - 5 F である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記
載の方法。

【請求項 7】

第 1 および第 2 の標識が FRET 対のメンバーである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に
記載の方法。

【請求項 8】

核酸複合体 (a) および (b) に対して、第 1 の標識が Alexa - 488 および第 2 の
標識が Alexa - 647 であり；核酸複合体 (c) に対して、第 1 の標識がオレゴン
グリーンおよび第 2 の標識が Alexa - 647 であり；および核酸複合体 (d) に対して
、第 1 の標識が Alexa - 647 および第 2 の標識が Alexa - 546 である、請求
項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

pH の変化に依存するシグナルの強度が、核酸複合体のコンホメーションに応じて変動
する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

pH 依存性シグナルの強度が、第 1 の標識と、第 2 の標識との間の距離、ならびに第 1
の標識および第 2 の標識の相対的な配向性の少なくとも 1 つに応じて変動する、請求項 9
に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

核酸複合体が、ターゲティング部分をさらに含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

決定された Ca^{2+} 濃度が、 $10\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ の範囲、もしくは $10\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲、もしくは $1\text{ }\mu\text{M} \sim 10\text{ mM}$ の範囲であるか、または決定された Cl^- 濃度が、 $10\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ の範囲、もしくは $10\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲、もしくは $1\text{ }\mu\text{M} \sim 10\text{ mM}$ の範囲である、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

決定された pH が、 $\text{pH } 5.5$ 未満であるか、または決定された pH が、 $\text{pH } 7.0$ を超える、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる 2018 年 12 月 2 日に出願された米国仮特許出願第 62/774,314 号の優先権の利益を主張する。

【0002】

連邦支援の研究または開発に関する記述

本発明は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) の国立トランスレーショナル科学振興センター (National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS)) の助成金番号 1UL1TR002389-01 で支給された米国政府支援を受けて行われた。米国政府は、本発明においてある特定の権利を有する。

【0003】

開示の分野

本開示は、生体試料中の pH、および同様にカルシウム (Ca^{2+}) 濃度または塩化物イオン (Cl^-) 濃度を決定する方法に関する。より詳細には、本開示は、核酸複合体を使用して、pH および Ca^{2+} 濃度、または pH および Cl^- 濃度を同時に決定することが可能な方法に関する。

【背景技術】

【0004】

リソソームは、ファゴソームとの融合による自然免疫、原形質膜との融合による細胞膜修復、オートファゴソームとの融合によるオートファジー、および mTOR 経路による栄養センシング等の細胞プロセスを調節する高度融合性細胞小器官である。リソソーム機能障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ならびにリソソーム蓄積症と呼ばれる約 60 個の稀な大部分が治療不可能な遺伝子疾患等の一般的な神経傷害の病態の中心となる。その多面的役割それぞれが、どのようにリソソーム関連疾患と関連付けられる多様な病態生理学の影響を受けるかを解析することが課題となっている。

【0005】

リソソームは、概して、特定のリソソーム機能に関してアッセイする間は、単一集団とみなされる。しかしながら、近年の前途有望な研究により、リソソームの部分集団が、課題のサブセットを遂行し得ると考察されている。実際に、多くの細胞型が、別個の機能を遂行する特殊化リソソームを進化させてきた。例えば、リソソームの他に、皮膚細胞は、メラノソームを含み、好中球は、アズール親和性顆粒を有し、細胞傷害性 T 細胞は、あらゆる細胞がオートリソソームを有するのと同時に、分泌性リソソームを有する。細胞内のリソソーム移動、形態または空間的位置等の物理学的パラメーターに基づく機能的イメージングにより、異なる挙動および機能を示す亜集団が明らかとなった。例えば、オートリソソームおよびリソソームは、それぞれ、管小胞性 (tubulovesicular) および小胞性形態を取る。リソソームはまた、それらが細胞内でどれほど活発に移動するかに基づいて、2つの集団に分類されている。リソソームの空間的位置付けは、リソソ-

10

20

30

40

50

ム機能の相関物として出現している。それにもかかわらず、生存細胞におけるリソソーム集団を化学的に区別する能力は、化学種を機能と定量的に相関させる能力を提供することによって、リソソーム生物学の理解を大いに補助する。例えば、1960年代に、電子顕微鏡および明視野イメージングは、それぞれ、形態およびメラニン含有量に基づいて、メラノソーム成熟において最大3つの段階を区別することができるにすぎなかった。しかしながら、タンパク質マーカーを、メラノソームをケモタイピングするのに使用した場合、タンパク質マーカーは、メラノソーム成熟において4つの段階を明らかにした。化学的分解能により、リソソームとのその高い物理的類似性および形態学的類似性に起因して、これまで同定を回避してきた無色の段階Ⅰのメラノソームが明らかとなった。しかしながら、依然として、リソソーム集団を化学的に分離する方法は、依然として存在しない。

10

【0006】

特殊リソソームは、正常なリソソームと異なるタンパク質組成物を有し、それらの管腔内で別個の生化学を可能にする。この管腔生化学は、最適な化学的環境によって促進され、最適な化学的環境の重要な成分は、リソソームタンパク質組成物によって恒常的に維持される高濃度の特定イオンである。

【0007】

H^+ および Cl^- は、その機能にとって重要なリソソーム中の2つの非常に豊富なイオンである。実際に、他の細胞小器官は、より高い濃度のいずれかのイオンを有さない。リソソームpHは、リソソーム成熟、カーゴ分解および分解された材料の再循環に重要である。リソソーム中の高い管腔 Cl^- は、ある特定のリソソーム常在性ヒドロラーゼの活性に必要とされる。しかしながら、他の細胞小器官と異なり、リソソーム中の管腔 Cl^- レベルは、管腔pHと無関係である。

20

【0008】

Ca^{2+} は、シグナル伝達カスケードを開始する種々の細胞内ストアからのその制御された放出時に、多様な細胞機能を調節する。リソソームは、近年、「酸性 Ca^{2+} ストア」と認識されており、管腔 Ca^{2+} は、その多様な機能にとって中心となる。例えば、LRKK2、ATP6AP2、ATP13A2、および遺伝子リスク関連GBA1遺伝子等のパーキンソン病に関するリスク遺伝子は、リソソーム経路で作用すると予測される。

【0009】

電機生理学により、リソソーム Ca^{2+} を放出するいくつかのチャネルの発見が可能になったが、リソソーム Ca^{2+} 移入の媒介物質は、いまだ同定されていない。 Ca^{2+} 放出は、細胞質ゾル Ca^{2+} 色素またはリソソームの細胞質面に係留された遺伝的にコードされる Ca^{2+} 指示薬を使用して追跡することができるので、リソソーム Ca^{2+} 放出チャネルは、検討に適している。 Ca^{2+} 放出時に、これらのプローブは、リソソームを取り囲む領域において、細胞質ゾル Ca^{2+} を示す。対比して、管腔 Ca^{2+} は、定量化することができず、リソソーム Ca^{2+} 移入体の研究を妨害する。したがって、リソソーム Ca^{2+} 移入体は、動物においていまだ同定されておらず、ゼノパス属(*Xenopus*)CAX遺伝子が、過剰発現時にリソソーム中で局在化することが、最新の証拠である。

30

【0010】

全ての Ca^{2+} 指示薬が、酸性pHでプロトン化されるようになるカルボキシレート基を通じて Ca^{2+} を配位させることによって機能するため、酸性細胞小器官において Ca^{2+} を定量化することができないということが起こる。これが、 Ca^{2+} イオンに対するプローブ親和性を変化させる。さらに、細胞小器官のpHは、管腔 Ca^{2+} 出入りと関係がある。したがって、任意の Ca^{2+} 指示薬の観察される蛍光変化に対する Ca^{2+} の寄与を解析することは、簡単ではない。これまでの試みは、pHまたは Ca^{2+} 感受性色素のいずれかを保有するエンドサイトーシストレーサーを使用して、細胞の異なるバッチにおける集団の平均的なpHおよび見かけの Ca^{2+} を順次測定し、したがって、個々のエンドソームからの情報を集めるものであった。エンドサイトーシス細胞小器官における広範のpH分布を考慮すると、このアプローチは、 Ca^{2+} 移入を研究するのに必要とされる分解能を提供しない。

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、本開示の新規核酸複合体が、試料中の Ca^{2+} 濃度または Cl^- 濃度に加えて、 pH を効率的且つ正確に決定することができると決定した。ある特定の実施形態では、本開示の新規核酸複合体は、試料中の pH および Ca^{2+} 濃度、または pH および Cl^- 濃度を同時に決定する。

【0012】

したがって、本開示の一態様は、

第1の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアを含む第1の一本鎖核酸分子と、

該第1の一本鎖分子に部分的にまたは完全に相補的な第2の一本鎖核酸分子とを含む核酸複合体であって、該核酸複合体が、該第1の一本鎖核酸分子または該第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされた第1の標識をさらに含み、該第1の標識が、シグナルを発生することが可能である、核酸複合体を提供する。

【0013】

本開示の別の態様は、本明細書中で提供されるとおりの本開示の核酸複合体を使用して、試料中の1) pH 、および2) Ca^{2+} 濃度または Cl^- 濃度を同時に決定する方法を提供する。一般に、かかる方法は、 Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアおよびシグナルを発生することが可能な第1の標識を含む本開示の核酸複合体を提供することと、シグナルの該強度を測定することと、測定されたシグナルから pH 、および Ca^{2+} または Cl^- 濃度を決定することとを含む。したがって、一実施形態では、本開示の方法は、

第1の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアを含む第1の一本鎖核酸分子と、

該第1の一本鎖分子に部分的にまたは完全に相補的な第2の一本鎖核酸分子とを含む核酸複合体を提供することであって、該核酸複合体が、該第1の一本鎖核酸分子または該第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされた第1の標識をさらに含み、該第1の標識が、シグナルを発生することが可能であり、該シグナルの強度が、 pH の変化に依存する、を提供することと、

該シグナルの該強度を測定することと、

測定されたシグナルから該 pH 、および Ca^{2+} または Cl^- 濃度を決定することとを含む。

【0014】

本開示の別の態様は、本明細書中に記載される核酸複合体を含む細胞に関する。

【0015】

本開示の別の態様は、モデル細胞または生物において候補薬物をスクリーニングする方法であって、本開示の核酸複合体を、細胞または生物に送達することと、細胞または生物を、候補薬物と接触させることと、シグナルの強度を測定することと、測定されたシグナルから pH 、および Ca^{2+} または Cl^- を決定することとを含む、方法に関する。いくつかの実施形態では、モデル細胞または生物は、リソソーム蓄積症に関するモデルである。いくつかの実施形態では、疾患は、リソソーム蓄積症である。

【0016】

本開示の別の態様は、疾患の重篤性、疾患の進行、または疾患の存在を検出する方法であって、本開示の核酸複合体を、試料に送達することと、シグナルの強度を測定することと、測定されたシグナルから pH 、および Ca^{2+} または Cl^- を決定することとを含む、方法に関する。

【0017】

本発明の他の目的、特徴および利点は、下記の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、本発明の主旨および範囲内での様々な変更ならびに修正が、この詳細な説明から当

業者に明らかとなるため、詳細な説明および具体例は、本発明の特定の実施形態を示す一方で、単なる説明の目的で付与されていることが理解されるべきである。

【0018】

図面の簡単な説明

添付の図面は、本開示の方法および材料のさらなる理解を提供するために含まれるものであり、本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成する。図面は、本開示の1つまたは複数の実施形態（複数可）を示し、説明と共に、本開示の原理および操作を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】図1A～図Dは、本開示の一実施形態による核酸複合体であるCalipHluorLyの設計および特性化を示す。図1Aは、CalipHluorLyの動作原理を提供し、Alexa488（ドナー、D、球形）と、Alexa647（アクセプター、A、星形）との間のpH誘導性FRETは、比率計測的にpHに関して報告している。Ca²⁺感受性色素（Rhod-5F、菱形、 $\lambda_{ex}=560\text{nm}$ ）およびAlexa647（ $\lambda_{ex}=650\text{nm}$ ）は、直接的な励起によって比率計測的にCa²⁺を報告している。

【図1B】図1Bは、pH7.2で[Ca²⁺]の増加に伴う、Rhod-5F（左、O）およびAlexa647（右、R）に相当するCalipHluorLyの蛍光発光スペクトルを示す。

【図1C】図1Cは、ドナーの、アクセプターに対する比（D/A）またはpHおよび[Ca²⁺]の関数としてのCalipHluorLyのpH応答の3D表面プロットを示す。

【図1D】図1Dは、Rhod-5Fの、Alexa647に対する比（O/R）またはpHおよび[Ca²⁺]の関数としてのCalipHluorLyのCa²⁺応答の3D表面プロットを示す。

【図2A】図2A～図2Jは、本開示の一実施形態による核酸複合体であるCalipHluorLyのin vivoでのセンシング特性を示す。図2Aは、ドナー（D、i）、アクセプター（A、ii）、Rhod-5F（O、iii）およびAlexa647（R、iv）チャンネルにおいてイメージングした代表的なCalipHluorLy標識体腔細胞を示す。D/A（v）およびO/R（vi）は、相当するピクセルサイズ疑似カラー画像である。図2Bは、表示したpHおよび遊離[Ca²⁺]でクランピングされた体腔細胞の代表的な疑似カラーのD/AおよびO/Rマップを示す。図2Cは、表示したpHでクランピングされた50個以上のエンドソームのD/A比の分布を示す（n=10個の細胞）。図2Dは、種々の表示した遊離[Ca²⁺]でクランピングされた50個以上のエンドソームのO/R比の分布を示す（n=10個の細胞）。in vitro（淡灰色）およびin vivo（濃灰色）で得られる種々の[Ca²⁺]でのCalipHluorLyのpH4～6.5のD/A比の倍率変化（図2E）およびpH4～6.5のpH_{1/2}（図2F）の比較。図2Gは、解離定数K_d（μM）を示し、図2Hは、pHの関数としてのO/Rの倍率変化を示す。in vitro（淡灰色）およびin vivo（濃灰色）で得られる表示したpHでのCalipHluorLyの1μM～10mM [Ca²⁺]のO/R比の倍率変化（図2I）および解離定数K_d（μM）（図2J）の比較。スケールバー、5μm。データは、平均値±S.E.Mを表す。*誤差は、非指数関数的フィットから得られる。実験は、独立して三度繰り返して、類似した結果を伴った。

【図2B】同上

【図2C】同上

【図2D】同上

【図2E】同上

【図2F】同上

【図2G】同上

【図2H】同上

【図 2 I】 同上

【図 2 J】 同上

【図 3 A】 図 3 A～図 3 Mは、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluor のエンドソーム成熟に付随する pH および $[Ca^{2+}]$ マップを示す。図 3 A は、CalipHluor が、スカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシスによって、時間依存的に体腔細胞において、表示した細胞小器官を指し示すことを示す。図 3 B は、線形動物における注入後の表示した時点での、エンドサイトーシス細胞小器官の CalipHluor および GFP でタグ付けしたマーカーの共局在を示す。図 3 C は、図 3 B において提供される共局在の定量化を示す ($n=10$ 個の細胞、50 個以上のエンドソーム)。図 3 D～図 3 H は、D/A マップ (3 D) が、相当する pH マップ (3 E) に変換される CalipHluor_{Ly} で標識したリソソームの疑似カラー画像を示し、pH マップは、 K_d の値が、そのピクセルでの pH に準じてピクセルワイズにコードされる K_d マップ (3 F) に変換され、 K_d マップ (3 F) は、O/R マップ (3 G) によって拡大されて、 Ca^{2+} マップ (3 H) をもたらす。図 3 I は、CalipHluor および CalipHluor_{Ly} で標識した初期エンドソーム (EE)、後期エンドソーム (LE) およびリソソーム (Ly) の代表的な疑似カラー pH および Ca^{2+} マップを示す。図 3 J～図 3 K は、 $n=15$ 個の細胞、50 個のエンドソームからの EE、LE および Ly の D/A 比ならびに O/R 比の分布を示す。図 3 L は、EE、LE および Ly の平均エンドソーム pH を示す。図 3 M は、EE、LE および Ly における平均エンドソーム $[Ca^{2+}]$ を示す。データは、平均値 $\pm$ S.E.M を表す。実験は、独立して三度繰り返して、類似した結果を伴った。

【図 3 B】 同上

【図 3 C】 同上

【図 3 D～F】 同上

【図 3 G～H】 同上

【図 3 I】 同上

【図 3 J】 同上

【図 3 K】 同上

【図 3 L】 同上

【図 3 M】 同上

【図 4 A】 図 4 A～図 4 H は、Catp-6 が、リソソーム Ca^{2+} 蓄積を促進することを示す。図 4 A は、ヒトリソソーム遺伝子データベース (hLGDB) から得られるヒトリソソームにおける P 型 ATPアーゼを示す。図 4 B は、catp-6 と cup-5 との間の機能的結合性を示す。図 4 C は、表示したタンパク質が RNAi によってノックダウンされる成体 cup-5 + / - 子孫の数を示す。データは、3 回の独立した試行の平均値 $\pm$ S.E.M. を表す。図 4 D は、表示したタンパク質の RNAi ノックダウン時の arIs37 [myo-3p::ssGFP+dpv-20(+)] I および arIs37; cup-5 (ar465) の代表的な蛍光画像を示す。図 4 E は、表示した遺伝的背景における肥大したリソソームが占める面積の割合を示す。 ($n=15$ 個の細胞、100 個以上のリソソーム)。図 4 F は、表示した遺伝的背景における体腔細胞での CalipHluor_{Ly} で標識したリソソームにおける pH および Ca^{2+} マップを示す。図 4 G は、表示した遺伝的背景における平均リソソーム pH を示し、図 4 H は、表示した遺伝的背景における平均リソソーム $[Ca^{2+}]$ を示す。データは、平均値 $\pm$ S.E.M を表す。スケールバー 5 μ m。実験は、独立して三度繰り返して、類似した結果を伴った。

【図 4 B】 同上

【図 4 C】 同上

【図 4 D】 同上

【図 4 E】 同上

【図 4 F】 同上

【図 4 G】 同上

【図 4 H】 同上

【図 5 A】 図 5 A～図 5 D は、ヒト細胞における、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluor^{mLy} のリソソーム Ca^{2+} を示す。図 5 A は、TMR デキストラン (TMR、中央パネル) および CalipHluor^{mLy} (Alexa 647、左パネル) で標識した正常な個体ならびにクフォーラケブ症候群患者 (L6025S) 由来の線維芽細胞におけるリソソームの代表的な画像を示す。図 5 B は、時間の関数としての CalipHluor^{mLy} と、リソソームとの間の共局在のピアソン相関係数 (PCC) を示す ($n=20$ 個の細胞)。図 5 C は、正常な線維芽細胞および L6025 線維芽細胞におけるリソソームの疑似カラー pH および Ca^{2+} マップを示す。図 5 D は、正常な線維芽細胞および L6025 線維芽細胞における、平均リソソーム pH を示し、図 5 E は、平均リソソーム $[Ca^{2+}]$ を示す。 ($n=5$ 個の細胞、50 個のエンドソーム)。スケールバー: $10\mu m$ 。データは、平均値 $\pm$ S.E.M を表す。実験は、独立して三度繰り返して、類似した結果を伴った。

10

【図 5 B】 同上

【図 5 C】 同上

【図 5 D】 同上

【図 5 E】 同上

【図 6 A】 図 6 A は、それぞれ、 $560nm$ および $650nm$ での Rhod-5F および Alexa 647 の励起時の $[Ca^{2+}]$ の増加に伴う Rhod-5F (左) および Alexa 647 (右) の蛍光発光スペクトルを示す。

20

【図 6 B】 図 6 B は、 $pH 7.2$ および 5.5 での $[Ca^{2+}]$ の増加に伴う Rhod-5F / Alexa 647 の正規化した O/R 比を示す。エラーバーは、3 回の独立した実験の $\pm$ S.E.M を表す。

【図 7 A】 図 7 A～図 7 G は、本開示の或る特定の実施形態による核酸複合体である CalipHluor^{Ly} および CalipHluor の特性化を示す。図 7 A は、Rhod-5F の、D2-DBCO 鎖へのコンジュゲーションを示すゲルを示す。ゲルは、EtBr および TMR チャンネルにおいて可視化させた。図 7 B は、CalipHluor^{Ly} の形成を示す非変性 PAGE を示す。ゲルは、Alexa 488、TMR および Alexa 647 チャンネルにおいて可視化させた。図 7 C は、CalipHluor の動作原理の模式図である。Alexa 488 (ドナー、球形) と、Alexa 647 (アクセプター、星形) との間の pH 誘導性 FRET 変化を使用して、比率計測的に pH に関して報告している。 Ca^{2+} 感受性フルオロフォア (Rhod-5F、菱形) および Alexa 647 は、各色素の直接的な励起によって比率計測的に Ca^{2+} を報告している (所定の pH で)。図 7 D は、Rhod-5F の、O3-DBCO 鎖へのコンジュゲーションを示すゲルを示す。ゲルは、EtBr および TMR チャンネルにおいて可視化させた。図 7 E は、CalipHluor の形成を示す非変性 PAGE を示す。ゲルは、Alexa 488、TMR および Alexa 647 チャンネルにおいて可視化させた。図 7 F は、 $488nm$ での励起時に、 $7.5\sim 5.0$ の範囲の pH 値での CalipHluor の発光スペクトルを示す。図 7 G は、pH の関数としての CalipHluor のアクセプターの蛍光強度に対するドナーの蛍光強度の正規化した比 (D/A) を示す。 ($D\lambda_{ex}=495nm$ 、 $\lambda_{em}=520nm$; $A\lambda_{ex}=495nm$ 、 $\lambda_{em}=665nm$)。エラーバーは、3 回の独立した実験の $\pm$ S.E.M を表す。

30

40

【図 7 B】 同上

【図 7 C】 同上

【図 7 D】 同上

【図 7 E】 同上

【図 7 F】 同上

【図 7 G】 同上

【図 8 A】 図 8 A～図 8 B は、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluor^{Ly} の *in vivo* での性能を示す。図 8 A は、CalipHluor^{Ly} で標

50

識され、表示した pH でクランピングされた体腔細胞の代表的な疑似カラー画像を提供する。図 8 B は、CalipHluorLy で標識され、pH 5.5 で種々の遊離 $[Ca^{2+}]$ でクランピングされた体腔細胞の代表的な疑似カラー画像を提供する。実験は、独立して三度繰り返して、類似した結果を伴った。

【図 8 B】同上

【図 9-1】図 9 A ~ 図 9 H は、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluorLy の *in vitro* および *in vivo* での pH ならびに Ca^{2+} 較正プロファイルの比較を示す。図 9 A ~ 図 9 D は、種々の量の添加 $[Ca^{2+}]$ でクランピングされた pH の関数としての、CalipHluorLy の D/A 比を提供する。図 9 E ~ 図 9 H は、種々の pH 点でクランピングされた遊離 $[Ca^{2+}]$ の関数としての、CalipHluorLy の正規化された O/R 比を提供する。*in vivo* に関して、 $n = 10$ 匹の虫 (worms)、15 個の細胞および 50 個のエンドソームが検討され、*in vitro* に関して、 $n = 2$ が検討された。エラーバーは、平均値 $\pm$ S.E.M. を表す。

10

【図 9-2】同上

【図 10 A】図 10 A ~ 図 10 C は、体腔細胞における、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluorA647 のエンドサイトーシス輸送を示す。GFP::RAB-5、GFP::RAB-7 および LMP-1::GFP を発現する虫において、CalipHluorA647 の注入の 5 分後、17 分後および 60 分後に撮影した代表的な共焦点画像。スケールバー 5 μ m。実験は、 $n = 10$ 匹の虫において一度実施した。

20

【図 10 B】同上

【図 10 C】同上

【図 11 A】図 11 A は、catp-6 が、cup-5+/- の致死性をレスキューすることを示す。mrp-4 (陽性対照)、clh-6、catp-6、catp-5 および e.v. (対照) の RNAi 細菌を含有するプレートにおける、cup-5+/- 虫の子孫の数を示す代表的な画像。実験は、独立して二度繰り返して、類似した結果を伴った。

【図 11 B】図 11 B は、RNAi 前および後の線虫 (C. elegans) から単離した総 RNA の RT-PCR 分析を示す。レーンは、RNAi 処理なしの野生型 (遺伝子名で示される) および相当する dsRNA を付与した虫 (「- 遺伝子名」で示される) から単離した、表示した遺伝子産物の PCR 増幅した cDNA に相当する。

【図 11 C】図 11 C は、様々な表示した RNAi のバックグラウンドにおける LMP-1::GFP を発現する虫の代表的な画像 (左パネル) を示し、虫に、CalipHluorLyA647 を注入して (中央パネル)、注入の 60 分後にイメージングした。スケールバー: 5 μ m。

30

【図 11 D】図 11 D は、LMP-1::GFP の虫における CalipHluorLyA647 と、GFP と間の共局在の定量化を示す。 $n = 10$ 個の細胞; エラーバーは、平均値 $\pm$ S.E.M. を表す。

【図 12 A】図 12 A ~ 図 12 H は、本開示の一実施形態による核酸複合体である CalipHluor^{mLy} の設計および特性化を示す。図 12 A は、CalipHluor^{mLy} の動作原理の模式図である。Oregon Green ベースの pH センサー (球形) およびイオン非感受性 Alexa647 (アクセプター、星形) および Ca^{2+} 感受性フルオロフォア (Rhod-5F、菱形)。図 12 B および図 12 C は、それぞれ、pH 4.6 および pH 5.1 で、*in vitro* (灰色の塗りつぶし) およびビーズ上 (淡灰色) 較正を比較する較正曲線を提供する。図 12 D および図 12 E は、CalipHluorLy (塗りつぶし) および CalipHluor^{mLy} (斜線) の O/R における、それぞれ、 K_d および倍率変化 (FC) の比較を提供する。図 12 F は、代表的な画像を提供する。図 12 G および図 12 H は、*in vitro* (中央の灰色)、ビーズ上 (淡灰色) および *in cellulo* (濃灰色) での CalipHluor^{mLy} の、それぞれ、O/R の倍率変化 (FC) および K_d の比較を提供する。 ($n = 5$ 個の細胞、30 個のエンドソーム、 $n = 60$ 個のビーズ)。実験は、独立して三度実施した。* 誤差は、Hill 方程式フィットから得られる。エラーバーは、平均値 $\pm$ S.E.M. を表す。スケール

40

50

ルバー：10 μm 。

【図12B】同上

【図12C】同上

【図12D】同上

【図12E】同上

【図12F】同上

【図12G】同上

【図12H】同上

【図13A】図13Aは、初代培養ヒト皮膚線維芽細胞によるCalipHluorTMLY内部移行が、過剰なマレイル化BSA (mBSA、10 μM) によって競合されることの画像を、図13Bは、グラフを提供し、取込みが、スカベンジャー受容体によるものであること明らかとなる。細胞は、Alexa647チャンネルにおいてイメージングさせる。AF：自己蛍光。スケールバー：10 μm 。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値 $\pm$ S.E.Mを示す ($n=25$ 個の細胞)。

【図13B】同上

【図14A】図14A～図14Eは、Chlorophoreの設計および特性化を示す。図14Aは、動作原理の模式図である。Alexa546 (ドナー、球体) と、Alexa647 (アクセプター、星形) との間のFRETにおけるpH誘導性の変化は、比率計測的にpHを報告している。Cl⁻感受性フルオロフォア (BAC、三角形) およびAlexa647は、比率計測的にCl⁻を報告している。図14Bは、ChlorophoreのpHおよびCl⁻応答プロファイルを示す：pHおよび50mMのCl⁻の関数としてのin vitroでのドナー励起時のドナー (D) およびアクセプター (A) の正規化した蛍光強度比 (D/A) (下部、淡灰色)。pH7でのCl⁻濃度の関数としてのAlexa647 (R) およびBAC (G) の正規化した蛍光強度比 (R/G) (上部、濃灰色)。値は、 R/G に関しては正規化した5mMのCl⁻、または D/A に関してはpH4であった。図14Cは、種々の[Cl⁻]でのpHセンシングモジュールおよび種々のpHでのCl⁻センシングモジュールの性能を示す。pHおよびCl⁻センシングモジュールに関する D/A (淡灰色の斜線の棒、右側) または R/G (濃灰色の斜線の棒、中央) の倍率変化が示される。各pHでのCl⁻センシングに関するStern-Volmer定数 (K_{SV} 、灰色の塗りつぶしの棒)。Cl⁻およびpHの関数としてのChlorophoreの (図14D) D/A および (図14E) R/G の蛍光強度比の校正表面プロット。エラーバーは、3回の独立した測定 of 平均値 $\pm$ s.e.m.を示す。

【図14B】同上

【図14C】同上

【図14D】同上

【図14E】同上

【図15A】図15A～図15Gは、ヒト皮膚線維芽細胞におけるChlorophoreの輸送経路を示す。図15Aは、スカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシス経路に沿ったChlorophoreの輸送を示す。図15Bおよび図15Cは、初代培養皮膚線維芽細胞 (HDF細胞) におけるChlorophore取込みが、過剰なマレイル化BSA (mBSA、10 μM) によって競合されることを示す。細胞は、Alexa647チャンネルにおいてイメージングされる。AF：自己蛍光。図15Dおよび図15Gは、Chlorophoreが、HDF細胞においてリソソームを標識することを示す。図15Dは、相当するピアソン相関係数を用いた場合のFITCデキストラで標識したHDF細胞のリソソーム (中央パネル) と、LAMP-1 RFP (左パネル) との間の共局在の代表的な画像である (図15E)。図15Fは、TMRデキストラで標識したHDF細胞のリソソーム (TMR、中央パネル) およびChlorophore (Alexa647、左パネル) の代表的な画像である。図15Gは、Chlorophoreチェイス時間の関数としてのChlorophoreとリソソームとの間の共局在のピアソン相関係数である。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、3回の独立した実験の平均

値 $\pm s.e.m.$ であった。($n = 20$ 個の細胞)。

【図 15 B】 同上

【図 15 C】 同上

【図 15 D】 同上

【図 15 E】 同上

【図 15 F】 同上

【図 15 G】 同上

【図 16-1】 図 16 A ~ 図 16 O は、Chlorophore および Chlorophore_{LY} の細胞内較正を示す。図 16 A は、Chlorophore で標識し、表示した pH および $[Cl^-]$ でクランピングされ、ドナー (D)、アクセプター (A)、参照 (R)、BAC (G) チャネルおよび相当する疑似カラー D/A (pH) および R/G (Cl^-) マップでイメージングされた初代培養 HDF 細胞の蛍光画像である。図 16 B および図 16 C は、それぞれ、様々な $[Cl^-]$ および pH 値で、Chlorophore におけるセンシングモジュールの pH および Cl^- 応答プロファイルに相当する細胞における較正表面を示す。図 16 D は、表示した pH および $[Cl^-]$ でクランピングされた正常な個体由来の初代培養 HDF 細胞におけるエンドソームの D/A 値対 R/G 値の代表的な散乱プロットである。データ点はそれぞれ、単一のエンドソームに相当する。図 16 E は、赤色および青色が、より高い周波数およびより低い周波数の出現を伴う集団に相当する疑似カラーにおける密度プロットとして表される、図 16 D における散乱プロット、即ち、2-IM プロファイルである。図 16 F および図 16 H は、様々な pH および固定 $[Cl^-]$ でクランピングされた HDF 細胞の 2-IM プロファイルを示す。図 16 I および図 16 K は、固定 pH および増加する $[Cl^-]$ での HDF 細胞の 2-IM プロファイルを示す。図 16 A ~ 図 16 K において、実験は、二重反復で実施した ($n = 15$ 個の細胞、 $n = 150$ 個のエンドソーム)。図 16 L は、HDF 細胞における単一エンドソームクランピングである。表示した pH (i) および Cl^- (ii) でクランピングされた Chlorophore 標識細胞は、種々の表示した pH および同じ Cl^- にクランピングされた (iv)。図 16 M は、2D-散乱プロットを示し、同じエンドソームの各クランピングステップの単一軸上のそれらの投影されたヒストグラムが示される。灰色の矢印は、各エンドソームに関する D/A (pH) 値の変化の方向を表す。図 16 N は、表示した pH (i) および Cl^- (ii) でクランピングされた Chlorophore_{LY} 標識 HDF であり、同じ pH (iii) であるが、異なる $[Cl^-]$ (iv) にクランピングされた。図 16 O は、2D-散乱プロット、および各クランピングステップに関する単一軸上のそれらの投影されたヒストグラムを示す。灰色の矢印は、各エンドソームに関する R/G (Cl^-) 値における変化の方向を示す。スケールバー、 $10 \mu m$ 。図 16 L ~ 図 16 O において、実験は、二重反復で実施した ($n = 30$ 個のエンドソーム)。

【図 16-2】 同上

【図 17-1】 図 17 A ~ 図 17 G は、2-IM が、リソソーム集団を化学的に分離することを示す。図 17 A は、Chlorophore_{LY} で標識した正常な個体 1、NP-A 患者 1 および NP-C 患者 1 に由来する HDF 細胞の代表的な疑似カラー D/A および R/G マップである。(図 17 B、図 17 I) 正常な個体 (N.I.) の、およびバフィロマイシン A1 (図 17 C) または NPPB (図 17 D) の存在下での D/A、R/G 比の 2-IM プロファイルならびにヒストグラム。3つの反復を示す同じ正常な個体 (図 17 B、 $ii \sim vi$)、2つの異なる正常な個体 2 ~ 3、(図 17 E) NP-A、NP-B、NPC 患者由来の初代培養 HDF 細胞のリソソームの 2-IM プロファイル。図 17 F は、正常な個体および NP-A 患者において、リソソームサイズ対それらの R/G または D/A 値の散乱プロットである。図 17 G は、 $65 \mu M$ のアミトリプチリン (AH) または $20 \mu M$ の U18666A で処理した HDF 細胞の D/A、R/G 比の 2-IM プロファイルおよび相当するヒストグラムである。(h) 酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) $5 \mu g$ の存在下での NP-A、NP-B 患者の線維芽細胞ならびに $50 \mu M$ の β -CD の存在下での NP-C 患者の線維芽細胞の 2-IM プロファイル。実験は、二重反復で実

10

20

30

40

50

施した ($n = 550$ 個のリソソーム、 $= 55$ 個の細胞)。スケールバー $10 \mu\text{m}$ 。

【図17-2】 同上

【図18】 図18は、Chlorophoreの形成を示す。Chlorophoreの形成を示すゲル移動度シフトアッセイ。1×TBE緩衝液 ($\text{pH} 8.3$) 中で 4°C にて 12% 非変性PAGEを実行。臭化エチジウム、Alexa546およびAlexa647チャンネルにおける、レーン1: C1、レーン2: C2、レーン3: C2+P、レーン4: C1+C2+P (Chlorophore)。実験は、三重反復で実施した。

【図19】 図19は、CD分光法によるChlorophoreの特性化を示す。(a) $\text{pH} 7.5$ (淡灰色)、 $\text{pH} 4.0$ (濃灰色) でのChlorophoreのCDスペクトル、および差スペクトル ($\text{pH} 4.0 - \text{pH} 7.5$) を黒色で示す。熱変性は、(b) $\text{pH} 4.0$ で、ならびに (c) $\text{pH} 7.5$ でChlorophoreに関して実行され、i-モチーフ形成を実証した。実験は、三重反復で実施した。

【図20】 図20は、およそ $0\text{mM} \sim 100\text{mM}$ の全ての表示したイオンおよび30%グリセロールからのR/Gの倍率変化によって付与されるChlorophore (200nM) の応答を示す。* 2mM 。エラーバーは、3回の独立した測定の平均値 $\pm \text{s.e.m.}$ を示す。

【図21A】 図21A~図21Eは、Chlorophore_{Ly}の設計および特性化を示す。図21Aは、高いpHでの「開いた状態」(低FRET)の、および低いpHでの「閉じた」状態(高FRET)のChlorophore_{Ly}の動作原理の模式図である。Cl⁻感受性フルオロフォアBACは、Cl⁻イオンの非存在下で高い蛍光を示すのに対して、蛍光は、増加濃度のCl⁻イオンによってクエンチングされている。pHセンシングモジュールおよびCl⁻センシングモジュールはともに、互いに独立している。より酸性のpHセンシング範囲を有する臭化シトシンを取り込んでいるChlorophore_{Ly}。図21Bは、pHの関数としてのin vitroでのドナー(D)およびアクセプター(A)の正規化した蛍光強度比(D/A)を示す。増加濃度の塩化物イオンに対するAlexa647(R)およびBAC(G)の正規化した蛍光強度比(R/G)を示す、Chlorophore_{Ly}のin vitroでのCl⁻校正プロファイル。種々の塩化物濃度でのR/G値を、5mMの塩化物での値に対して正規化した。図21Cは、Chlorophore_{Ly}のpHセンシングモジュールを示し、Cl⁻濃度およびCl⁻センシングモジュールに対して非感受性であり、pHに対して非感受性である。pHおよびCl⁻センシングモジュールの性能は、それぞれ、淡灰色および濃灰色である。表示したCl⁻濃度でのpHセンシングモジュールの倍率変化のプロット(淡灰色の斜線の棒、右側)。Cl⁻センシングモジュール対pHに関する倍率変化(濃灰色の斜線の棒、中央)およびK_{sv}(灰色の塗りつぶし)。Cl⁻およびpHの関数としてのChlorophore_{Ly}の蛍光強度比(図21D) D/Aならびに(図21E) R/G。エラーバーは、3回の独立した測定の平均値 $\pm \text{s.e.m.}$ を示す。

【図21B-E】 同上

【図22】 図22は、HDF細胞におけるChlorophoreの安定性を示す。(a) 表示した時点でのHDF細胞の代表的な画像。(b) 平均R/O比、(c) (R)チャンネルにおけるAlexa647標識Chlorophoreおよび(d) TMR-Dex(O)チャンネル全細胞強度を示すプロット。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、細胞強度の平均値 $\pm \text{s.e.m.}$ を示す ($n = 60$ 個の細胞)。スケールバー $= 10 \mu\text{m}$ 。(e) チェイス時間の関数としての管腔[Cl⁻]の増加を示すR/G比(濃灰色トレース)および管腔酸性度の増加を示すD/A比(淡灰色トレース)を示すプロット。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値 $\pm \text{s.e.m.}$ を示す。($n = 25$ 個の細胞、250個のエンドソーム)。

【図23】 図23は、Chlorophoreの細胞内校正プロファイルを示す。(a) ドナーチャンネルおよび相当する疑似カラーpHマップでイメージングされた、Chlorophoreで標識し、表示したpHおよび[Cl⁻] = 100mM でクランピングされた初代培養ヒト皮膚線維芽細胞の蛍光画像。(b) 各pHでのエンドソームのD/A比の

ヒストグラム。(c) Alexa647チャネルおよび各々の疑似カラー [Cl⁻] マップにおいて示される、表示した [Cl⁻]、pH5でクランピングされたChlorophore標識線維芽細胞の蛍光画像。スケールバー=10 μmおよび挿入図のスケールバー=5 μm。(d) 各 [Cl⁻] でのエンドソームのR/G比のヒストグラム。実験は、二重反復で実施した (n=15個の細胞、150個のエンドソーム)。

【図24】図24は、Chlorophoreの細胞内較正プロファイルを示す。指定したpH/Cl⁻クランピングされた条件での細胞内較正プロファイルをそれぞれが示す、ヒト皮膚線維芽細胞のエンドソームにおけるpHおよびCl⁻の関数としてのChlorophoreの(a) D/Aおよび(b) R/G比(カラードット)。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値±s.e.m.を示す。(n=15個の細胞、150個のエンドソーム)。

10

【図25】図25は、線維芽細胞におけるI^{mL}Yの性能を示す。(a) 低いpHおよび高いpHでのI^{mL}Yの動作原理の模式図。pH指示薬であるOregon green (OG)を、DNAにコンジュゲートさせて、そのAlexa647標識相補鎖とハイブリダイズさせる。(b) I^{mL}Yのin vitro (濃灰色) およびin cellulo (淡灰色) での較正曲線。(c) 500 nMのバフィロマイシンA1を用いない場合の、または(d) 500 nMのバフィロマイシンを用いた場合の、正常な個体由来の細胞のリソソームのG/R比の広がりを示すヒストグラム。(e) 500 nMのバフィロマイシンを用いて、または500 nMのバフィロマイシンA1を用いずに処理した正常な個体細胞のリソソームから得られる平均リソソームpH (G/R) 比を示す棒グラフ。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値±s.e.m.を表す。(n=15個の細胞、150個のエンドソーム)。

20

【図26】図26は、単一リソソーム内のI^{mL}Yの定量的性能を示す。(a) I^{mL}Yで標識し、表示したpHおよび[Cl⁻]=100 mMでクランピングされた正常な個体の皮膚線維芽細胞の代表的な疑似カラーG/Rマップ。スケールバー=10 μm。(b) pH7.5およびpH4.5でクランピングされた細胞のリソソームのG/R変化。実験は、三重反復で実施した (n=15個のリソソーム)。

【図27】図27は、BHK-21細胞の標識リソソームを示す。(a~b) BHK-21細胞によるChlorophore内部移行が、過剰なマレイル化BSA (mBSA、10 μM) によって競合され、取込みが、スカベンジャー受容体によるものであることが明らかとなる。細胞は、Alexa647チャネルにおいてイメージングされる。(c) 液体相のエンドサイトーシスによる、およびChlorophore (Alexa647) のスカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシスによる、TMRデキストラン (TMR; G) で標識したHDF細胞のリソソームの代表的な画像。(d) Chlorophore標識チェイス時間の関数としてのChlorophoreと、リソソームとの間の共局在のピアソン相関係数。スケールバー=10 μm。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、4回の独立した実験の平均値±s.e.m.を表す。(n=20個の細胞)。

30

【図28】図28は、T47D細胞の標識を示す。(a~b) T47D細胞によるChlorophore内部移行が、過剰なマレイル化BSA (mBSA、10 μM) によって競合され、取込みが、スカベンジャー受容体によるものであることが明らかとなる。細胞は、Alexa647チャネルにおいてイメージングされる。(c) 液体相のエンドサイトーシスによる、およびChlorophore (Alexa647) のスカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシスによる、TMRデキストラン (TMR; G) で標識したT47D細胞のリソソームの代表的な画像。また、共局在に関する、相当するピアソン相関係数が(d)に示される。スケールバー=10 μm。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値±s.e.m.を表す (n=20個の細胞)。

40

【図29】図29は、様々な細胞型におけるリソソームの2-IMプロファイルを示す。(a) ヒト皮膚線維芽細胞、(b) ベビーハムスター腎臓線維芽細胞であるBHK-21、(c) マウスマクロファージJ774A.1および(d) T47Dヒト乳癌細胞株におけるリソソームの2-IMプロファイル。実験は、二重反復で実施した (n=55個の細

50

胞、= 550個のリソソーム)。

【図30】図30は、線維芽細胞における、取り込まれたChlorophoreのリソソーム標識を示す。Chlorophoreの1時間のパルスおよび9時間のチェイス時の、(a)正常な個体の皮膚線維芽細胞、(c)アミトリプチリン(AH)誘導性NP-A/Bモデル、(e)U18666A誘導性NP-Cモデル、(g)NP-A患者由来の皮膚線維芽細胞、(i)NP-B患者由来の皮膚線維芽細胞ならびに(k)TMRデキストラン(TMR-Dex)およびChlorophore(Alexa647)で標識したNP-C患者由来の皮膚線維芽細胞のリソソームの代表的な画像。表示したチェイス時間での、(b)正常な個体の皮膚線維芽細胞、(d)アミトリプチリン(AH)誘導性NP-A/Bモデル、(f)U18666A誘導性NP-Cモデル、(h)NP-A患者由来の皮膚線維芽細胞、(j)NP-B患者由来の皮膚線維芽細胞および(l)NP-C患者由来の皮膚線維芽細胞における、Chlorophoreと、リソソームマーカーであるTMRデキストランとの間の共局在に関するピアソン相関係数(PCC)。スケールバー=10 μ mおよび挿入図のスケールバー=5 μ m。実験は、三重反復で実施した。エラーバーは、3回の独立した実験の平均値 $\pm$ s.e.m.を示す(n=25個の細胞)。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

開示される方法および材料について記載する前に、本明細書中に記載される態様は、特定の実施形態に限定されず、したがって、当然のことながら変えることができることが理解されよう。また、本明細書中で使用される専門用語は、単に特定の態様を記載する目的のためのものであり、本明細書中で特に定義されない限り、限定することを意図しないことが理解されよう。本開示を鑑みて、本明細書中に記載される方法は、所望の必要性を満たすように、当業者によって設定され得る。

【0021】

小分子ならびに遺伝子コード可能なCa²⁺指示薬は、生物学に多大な影響を与えてきた。しかしながら、それらのpH感受性は、pHが中性であり、ほぼ一定である細胞質または小胞体に、それらの使用を制限してきた。したがって、酸性微小環境のCa²⁺マッピングは、これまで可能ではなかった。一般に、開示される方法は、pHおよびCa²⁺濃度の測定における改善を提供する。本発明者らは、pHおよびCa²⁺に関する複合レポーターが、単一エンドソームの場所指定能力(addressability)を有する同じエンドソームにおいて並行して両方のイオンをマッピングすることができることを見出し、管腔Ca²⁺の高度に正確な測定を達成した。例えば、複合レポーターのpHレポーターモジュールを使用して、pHは、個々のエンドソーム中で決定される。Ca²⁺感受性モジュールの親和性、例えば、解離定数(K_d)およびpHによる変化、各エンドソームの管腔pHに適したK_d補正因子を適用して、単一エンドソーム分解能を用いて管腔Ca²⁺の真値を計算し得る。例えば、K_dは、pHマップにおけるあらゆるピクセルで計算されて、K_dマップを作成した。K_dマップおよびO/Rマップから、酸性細胞内小器官の真のCa²⁺マップが構築され得る。

【0022】

DNAナノデバイスは、生存系において、リアルタイムでセカンドメッセンジャーを定量的にマッピングすることができる万能な化学レポーターである。DNAのモジュール方式により、別個の機能を、正確な化学量論で単一アセンブリに組み込むことが可能となる。これらとして、例えば、(i)所定のイオンを蛍光的に感知するためのモジュール、(ii)比率計測的定量化のための正規化モジュール、および/または(iii)特定の細胞小器官においてレポーターを局在化させるためのターゲティングモジュールが挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示の一実施形態による核酸複合体であるCalipHluorは、細胞小器官のpHおよびCa²⁺を、同時に、且つ単一細胞小器官の場所指定能力でマッピングする本開示の方法において使用される。例えば、CalipHluorを、スカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシス経路にターゲティングすることに

よって、管腔 Ca^{2+} は、線形動物においてエンドソーム成熟に応じてマッピングされた。 Ca^{2+} は、初期および後期エンドソームにおいて極めて低く、リソソームにおける管腔 Ca^{2+} において約 35 倍に急増し、リソソーム特異的な Ca^{2+} 移入メカニズムの存在を含意する。P5 Ca^{2+} ATPアーゼ ATP13A2 は、小胞体における周知の Ca^{2+} 移入体に対するその類似性を考慮して、潜在的な候補物として同定された。ATP13A2（パーキンソン病に関するリスク遺伝子）は、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 等の二価イオンをいまだ輸送しており、 Ca^{2+} を輸送するその能力に関しては検査していない。ATP13A2 の線虫相同体である *catp-6* は、周知のリソソーム Ca^{2+} 放出チャネルである *cup-5* と反対に機能することがわかった。3つの異なるレベルでの *cup-5* 表現型、生物全体の表現型、細胞内の表現型およびリソソーム内の表現型が明らかとなった。ヒト相同体である ATP13A2 はまた、本明細書では、クフォーラケブ症候群を患う患者に由来する線維芽細胞においてリソソーム Ca^{2+} を測定することによって、リソソーム Ca^{2+} 進入を促進することが本明細書中で示された。これは、動物界においてリソソーム Ca^{2+} 移入体の第 1 の例となる。

【0023】

pH および Ca^{2+} をマッピングする能力、または単一細胞小器官場所指定能力を用いた能力は、リソソーム低酸性化と、 Ca^{2+} 調節異常とを区別するのに重要である。本開示の核酸複合体は、ある特定の実施形態では、多様な細胞小器官における管腔 Ca^{2+} 変化をマッピングするのに使用され得る。結果として、本開示の核酸複合体は、例えば、細胞小器官の Ca^{2+} 調節に対する新たな洞察を提供し得る。

【0024】

本発明者らはまた、同じリソソームにおいて pH および Cl^- を同時に測定すること（本明細書中では、「2-IM」と称される）と、単一リソソームの場所指定能力とともにこの情報を保持することによって、生存細胞において定量的に、リソソーム部分集団を分離することができることを示した。2-IM 等の方法は、いくつかの理由で、これまでのところ、実現しにくいことがわかっている。 Cl^- 感受性の小分子プローブは、必要な化学的選択性、モル輝度および長波長励起を付与するが、必要とされる空間的場所指定能力または細胞小器官のターゲティング可能性を付与しない。遺伝的にコードされる Cl^- センサーは、安定な空間的局在化を付与するが、これらのレポーターの、 Cl^- に対する応答は、pH 感受性である。これは、管腔 Cl^- 進入が、それらの酸性化に連結されるため、ほとんどの細胞小器官の分析を含蓄する。蛍光タンパク質は、エンドサイトーシストレーサーよりも低い特異性を有する細胞小器官を標識して、DNA ベースのナノデバイスと比較して、より低いダイナミックレンジを有する。DNA ナノデバイスは、小分子の光物理学的利点、エンドサイトーシストレーサーに利用しやすい細胞小器官ターゲティングの精度とともにタンパク質によって提供される安定な局在化をまとめる広範囲の生物学的に調和可能な定量的イメージングプローブを含む。単一リソソームの場所指定能力を用いて pH および (Cl^-) を同時に比率計測的にイメージングすることができる本開示の核酸複合体を使用して、管腔 pH を管腔 (Cl^-) と相関させる二元マップ上のリソソーム化学種を識別することができる。健常な個体から得られる細胞のリソソームプロファイルにより、ニーマンピック病 A 型、ニーマンピック病 B 型またはニーマンピック病 C 型に苦しむ患者に由来する細胞では存在しない高い塩化物、高い酸性度集団が明らかとなった。興味深いことに、これらの疾患に関する既知の治療薬で、これらの培養した患者細胞を処理することによって、高い塩化物の高い酸性度集団の最出現をもたらした。

【0025】

ある特定の実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの本開示の核酸複合体は、化学量論的精度を有する 4 つの機能：(i) pH センシング機能、(ii) Cl^- センシング機能、(iii) Cl^- および pH の両方の同時比率計測的定量化のための内部標準および (vi) 場所指定能力のためのリソソームターゲティング機能を単一プローブ上に組み込むために、DNA ハイブリダイゼーションの 1:1 の化学量論を含む。例えば、2-IM は、正常な健常なヒトの皮膚バイオプシーから単離したヒト線維芽細胞において、高

い塩化物で高い酸性度のリソソーム集団を化学的に分離する高感受性する方法である。この高い塩化物で高い酸性度の集団の有意性は、この集団が失われたニーマンピック病の3つの異型に苦しむ患者の皮膚バイオプシーに由来する線維芽細胞の2-IM検討時に明らかとなり、非常に単分散の2-IMプロファイルをもたらした。関連する治療薬、即ち欠損酵素で細胞を補充することで、高い塩化物で高い酸性度の集団が回復した。限られた治療有効性を有するように文書化された分子による処理は、この集団の周辺の回復を示した。ある特定の実施形態では、リソソームの2-IMプロファイリングを使用して、ニーマンピック病に関する潜在的なリード化合物に関してスクリーニングして、例えば、不偏の様式で臨床試験に適した患者コホートを潜在的に同定することができ、治療有効性をモニタリングすることができ、または疾患進行を追跡することができる。

10

【0026】

本開示の核酸複合体

上記で提供するとおり、本開示の一態様は、核酸複合体を含む。本明細書中に記載されるとおりの本開示の核酸複合体は、第1の一本鎖核酸分子に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアを含む。

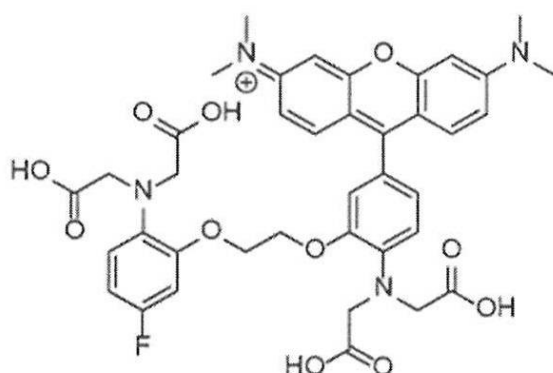
【0027】

ある特定の実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの本開示の核酸複合体は、第1の一本鎖核酸分子に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアを含む。かかる Ca^{2+} フルオロフォアは、単一波長指示薬または比率計測的指示薬であり得る。一実施形態では、 Ca^{2+} フルオロフォアは、単一波長指示薬である。当該技術分野で既知の多数の Ca^{2+} フルオロフォアは、本開示の複合体および方法において使用され得る。かかる例として、Rhod-5F、XRhod-5F、Rhod-FF、XRhod-FF、Oregon Green 488 BAPTA-6F、Fluo 5F、Fluo 4FF、Oregon Green BAPTA-5N、Fluo-5N、およびMag-Fluo-4指示薬が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる Ca^{2+} フルオロフォアは、本明細書中に開示される標識から選択され得る。本開示のある特定の実施形態では、 Ca^{2+} フルオロフォアとして、Rhod-5F、XRhod-5F、またはRhod-FF指示薬が挙げられる。本開示のある特定の実施形態では、 Ca^{2+} フルオロフォアは、Rhod-5F指示薬である。Rhod-5F分子は、下記式：

20

【0028】

【化1】



40

(式中、任意の利用可能な位置は、第1の鎖への架橋を可能にするように官能基化されてもよい)を有する。例えば、当業者は、上記で提供されるRhod-5F分子上の水素原子を、第1の鎖に架橋するように設定されている官能基で置き換えられ得ることを認識する。

【0029】

本明細書中に記載されるとおりの Ca^{2+} フルオロフォアは、当該技術分野で既知のリンカーおよび方法を使用して、第1の一本鎖核酸分子に架橋され得る。例えば、 Ca^{2+} フルオロフォアは、ペプチド化学、クリック化学を使用して、エステル、エーテル、チオ

50

エーテル、ジスルフィド、アミン反応性N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）エステル、イソシアネート、およびイソチオシアネート結合等を形成することによって架橋され得る。一般に、 Ca^{2+} フルオロフォアは、生理学的条件下で安定なリンカー部分を通じて第1の鎖に架橋される。

【0030】

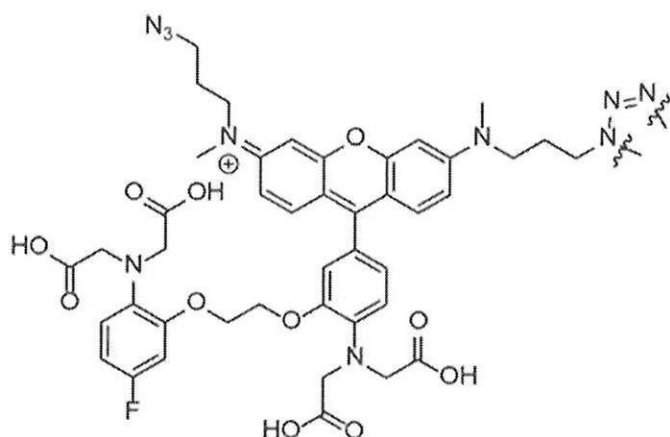
ある特定の実施形態において、本発明は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、クリック化学を使用して、第1の一本鎖核酸分子に架橋され得ることを決定している。したがって、ある特定の実施形態では、 Ca^{2+} フルオロフォアは、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基を通じて第1の鎖に架橋される。例えば、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基は、 Ca^{2+} フルオロフォア上のアジドまたはチオール部分と、第1の鎖上のアルキンまたはアルケン部分とから形成され得る。別の例では、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基は、第1の鎖上のアジドまたはチオール部分と、 Ca^{2+} フルオロフォア上のアルキンまたはアルケン部分とから形成され得る。

【0031】

ある特定の実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの本開示の Ca^{2+} フルオロフォアは、下記式：

【0032】

【化2】



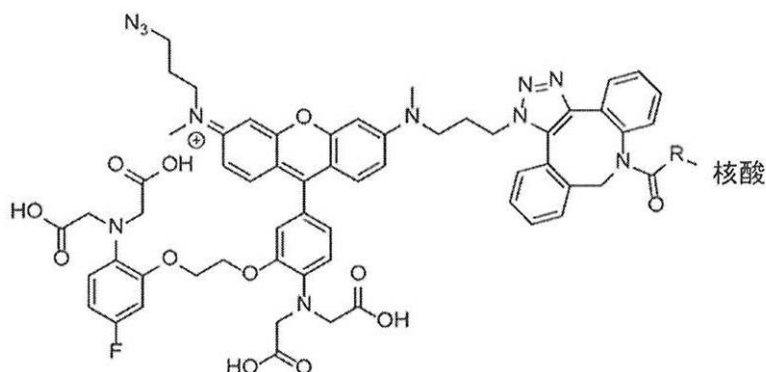
を含む。

【0033】

本開示のある特定の実施形態では、 Ca^{2+} フルオロフォアを含む第1の一本鎖核酸分子は、式：

【0034】

【化3】



（式中、Rはリンカーである）

を有する。

【0035】

ある特定の実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの本開示の核酸複合体は、第1の一本鎖核酸分子に架橋されたC-フルオロフォアを含む。

【0036】

当該技術分野で既知の多数のC-フルオロフォアは、本開示の複合体および方法で使用され得る。いくつかの例として、6-メトキシ-1-(3-スルホナトプロピル)キノリニウム(SPQ)、6-メトキシ-N-エチルキノリニウムC-フルオロ(MEQ)、およびN-(6-メトキシキノリル)-アセトエチルエーテル(MQAE)が挙げられるが、これらに限定されない。さらなるC-フルオロフォアは、本明細書中に開示される標識から選択され得る。本開示のある特定の実施形態では、C-フルオロフォアとして、10, 10'-ビス[3-カルボキシプロピル]-9, 9'-ビアカリジニウム二硝酸塩(BAC)フルオロフォアが挙げられる。本開示のある特定の実施形態では、C-フルオロフォアとして、ルシゲニンに由来するフルオロフォアが挙げられる。

【0037】

本明細書中に記載される組成物および方法におけるオリゴヌクレオチドならびに核酸分子は、1つまたは複数の標識を含み得る。核酸分子は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的アッセイを含むがこれらに限定されない1つまたは複数の手段によって検出可能な部分を組み入れることによって標識され得る。標識を、ヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドに連結またはコンジュゲートする方法は、使用される標識(複数可)のタイプおよびヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド上の標識の位置に依存する。

【0038】

本明細書中で使用する場合、「標識」は、核酸を標識するのに有用な化学的または生化学的部分である。「標識」として、例えば、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、クエンチャー、放射性ヌクレオチド、酵素、基質、補因子、阻害剤、ナノ粒子、磁気粒子、および当該技術分野で既知の他の部分が挙げられる。標識は、測定可能なシグナルを生成することが可能であり、オリゴヌクレオチドもしくはヌクレオチドに、共有結合的に、または非共有結合的に結合され得る。

【0039】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、「蛍光色素」または「フルオロフォア」で標識され得る。開示される方法において使用され得る色素として、下記の商品名で販売される下記色素が挙げられるが、これらに限定されない：1, 5-IAEDANS；1, 8-ANS；4-メチルウンベリフェロン；5-カルボキシ-2, 7-ジクロロフルオレセイン；5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)；5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA)；5-ヒドロキシトリプタミン(HAT)；5-ROX(カルボキシ-X-ローダミン)；6-カルボキシローダミン6G；6-JOE；7-アミノ-4-メチルクマリン；7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)；7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン；9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン；ABQ；アシッドフクシン；ACMA(9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン)；アクリジンオレンジ；アクリジンレッド；アクリジンイエロー；アクリフラビン；アクリフラビンフォイルゲンSITSA；Alexa Fluor 350(商標)；Alexa Fluor 430(商標)；Alexa Fluor 488(商標)；Alexa Fluor 532(商標)；Alexa Fluor 546(商標)；Alexa Fluor 568(商標)；Alexa Fluor 594(商標)；Alexa Fluor 633(商標)；Alexa Fluor 647(商標)；Alexa Fluor 660(商標)；Alexa Fluor 680(商標)；アリザリンコンプレクソン；アリザリンレッド；アロフィコシアニン(APC)；AMC；AMCA-S；AMCA(アミノエチルクマリン)；AMCA-X；アミノアクチノマイシンD；アミノクマリン；アミノメチルクマリン(AMCA)；アニリンブルー；ステアリン酸アントロシル(Anthro

cyl stearate) ; APC (アロフィコシアニン) ; APC-Cy 7 ; APT
 S ; アストラゾンブリリアントレッド4G ; アストラゾンオレンジR ; アストラゾンレ
 ド6B ; アストラゾンイエロー7 GLL ; アタブリン ; ATTO-TAG (商標) CB
 QCA ; ATTO-TAG (商標) FQ ; オーラミン ; オーロホスフィンG ; オーロホス
 フィン ; BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール) ; ベルベリン硫酸塩 ; ペー
 タラクタマーゼ ; BFPブルーシフトGFP (Y66H) ; 青色蛍光タンパク質 ; BFP
 / GFP FRET ; ビマン ; ビスベンズアミド ; ビスベンズイミド (Hoechst社
) ; ブランコホル (Blancophor) FFG ; ブランコホルSV ; BOBO (商標
) -1 ; BOBO (商標) -3 ; Bodipy 492/515 ; Bodipy 493/
 503 ; Bodipy 500/510 ; Bodipy 505/515 ; Bodipy 530/550 ; Bodipy 542/563 ; Bodipy 558/568 ; Bod
 ipy 564/570 ; Bodipy 576/589 ; Bodipy 581/591 ;
 Bodipy 630/650-X ; Bodipy 650/665-X ; Bodipy 66
 5/676 ; Bodipy FL ; Bodipy FL ATP ; Bodipy FL-セ
 ラミド ; Bodipy R6G SE ; Bodipy TMR ; Bodipy TMR-コ
 ンジュゲート ; Bodipy TMR-X, SE ; Bodipy TR ; Bodipy T
 R ATP ; Bodipy TR-X SE ; BO-PRO (商標) -1 ; BO-PRO (商
 標) -3 ; ブリリアントスルホフラビン (Brilliant Sulphoflav
 in) FF ; カルセイン ; カルセイブルー ; Calcium Crimson (商標)
 ; カルシウムグリーン ; カルシウムオレンジ ; カルコフロールホワイト ; Cascade
 Blue (商標) ; カスケードイエロー ; カテコールアミン ; CCF2 (Gene Bla
 zer) ; CFDA ; CFP-Cyan 蛍光タンパク質 ; CFP/YFP FRET ; ク
 ロロフィル ; クロモマイシンA : CL-NERF (色素比、pH) ; CMFDA ; セレン
 テラジンf ; セレンテラジンfcp ; セレンテラジンh ; セレンテラジンhcp ; セレン
 テラジンip ; セレンテラジンn ; セレンテラジンO ; クマリンファロイジン ; C-フィ
 コシアニン ; CPMメチルクマリン ; CTC ; CTCホルマザン ; Cy 2 (商標) ; Cy
 3.18 ; Cy 3.5 (商標) ; Cy 3 (商標) ; Cy 5.18 ; Cy 5.5 (商標) ;
 Cy 5 (商標) ; Cy 7 (商標) ; シアングFP ; サイクリックAMPフルオロセンサー
 (FiCRhR) ; ダブシル ; ダンシル ; ダンシルアミン ; ダンシルカダベリン ; ダンシ
 ルクロリド ; ダンシルDHPE ; ダンシルフルオリド ; DAPI ; ダポキシル (Dapo
 xyl) ; ダポキシル2 ; ダポキシル3 ; DCFDA ; DCFH (ジクロロジヒドロフル
 オレセインジアセテート) ; DDAO ; DHR (ジヒドロローダミン123) ; ジー4-
 ANEPPS ; ジー8-ANEPPS (比なし) ; DiA (4-ジー16-ASP) ; ジ
 クロロジヒドロフルオレセインジアセテート (DCFH) ; DiD-親油性トレーサー ;
 DiD (DiIC18 (5)) ; DIDS ; ジヒドロローダミン123 (DHR) ; Di
 I (DiIC18 (3)) ; ジニトロフェノール ; DiO (DiOC18 (3)) ; Di
 R ; DiR (DiIC18 (7)) ; DNP ; ドーパミン ; DsRed ; DTAF ; DY
 -630-NHS ; DY-635-NHS ; EBFP ; ECFP ; EGFP ; ELF 9
 7 ; エオシン ; エリスロシン ; エリスロシンITC ; 臭化エチジウム ; エチジウムホモダ
 イマー1 (EthD-1) ; オイクリシン (Euchrysin) ; EukoLight
 ; ユーロピウム (III) クロリド ; EYFP ; ファストブルー ; FDA ; フォイルゲン
 (パラローズアニリン) ; フラゾオレンジ ; Fluor-3 ; Fluor-4 ; フルオレセイ
 ン (FITC) ; フルオレセインジアセテート ; フルオローエメラルド ; フルオローゴー
 ルド (ヒドロキシルスチルバミジン) ; Fluor-Ruby ; FluorX ; FM 1-
 43 (商標) ; FM 4-46 ; Fura Red (商標) ; Fura RedTm/Fl
 uo-3 ; Fura-2 ; Fura-2/BCECF ; ゲナクリルブリリアントレッドB
 ; ゲナクリルブリリアントイエロー10GF ; ゲナクリルピンク3G ; ゲナクリルイエロー
 -5GF ; GeneBlazer (CCF2) ; GFP (S65T) ; GFPレッドシフ
 ト (rsGFP) ; GFP野生型、非UV励起 (wtGFP) ; GFP野生型、UV励起
 (wtGFP) ; GFPuv ; グロキサン酸 ; グラニューラブルー (Granular

10

20

30

40

50

Blue) ; ヘマトポルフィリン ; ヘキスト 3 3 2 5 8 ; ヘキスト 3 3 3 4 2 ; ヘキスト 3 4 5 8 0 ; HPTS ; ヒドロキシクマリン ; ヒドロキシルバミジン (フルオロゴールド) ; ヒドロキシトリプタミン ; Indo-1 ; インドジカルボシアニン (DiD) ; インドトリカルボシアニン (DiR) ; イントラホワイト (Intrawhite) Cf ; JC-1 ; JO-JO-1 ; JO-PRO-1 ; ラウロダン ; LDS 751 (DNA) ; LDS 751 (RNA) ; ロイコファー (Leucophor) PAF ; ロイコファー SF ; ロイコファー WS ; リサミンローダミン ; リサミンローダミン B ; カルセイン / エチジウムホモダイマー ; LOLO-1 ; LO-PRO-1 ; ルシファーイエロー ; リゾトラッカー (Lyso Tracker) ブルー ; リゾトラッカーブルー-ホワイト ; リゾトラッカーグリーン ; リゾトラッカーレッド ; リゾトラッカーイエロー ; リゾセンサー (Lyso Sensor) ブルー ; リゾセンサーグリーン ; リゾセンサーイエロー / ブルー ; マグ (Mag) グリーン ; マグダラレッド (フロキシシン B) ; マグフラ (Mag-Fura) レッド ; マグフラ-2 ; マグフラ-5 ; マグインド (Mag-Indo) -1 ; マグネシウムグリーン ; マグネシウムオレンジ ; マラカイトグリーン ; マリーナブルー ; マキシロン (Maxilon) ブリリアントフラビン 10 GFF ; マキシロンブリリアントフラビン 8 GFE ; メロシアニン ; メトキシクマリン ; ミトトラッカー (Mitotracker) グリーン FM ; ミトトラッカーオレンジ ; ミトトラッカーレッド ; ミトラマイシン ; モノプロモビマン ; モノプロモビマン (mBBr-GSH) ; モノクロロビマン ; MPS (メチルグリーンピロニンスチルベン) ; NBD ; NBD アミン ; ナイルレッド ; NED (商標) ; ニトロベンゾオキサジドル (Nitrobenzoxadidole) ; ノルアドレナリン ; ヌクレアファストレッド ; ヌクレアイエロー ; ナイロサン (Nylasan) ブリリアントイアピン E 8 G ; オレゴングリーン ; オレゴングリーン 488-X ; Oregon Green (商標) ; Oregon Green (商標) 488 ; Oregon Green (商標) 500 ; Oregon Green (商標) 514 ; パシフィックブルー ; パラローズアニリン (フォイルゲン) ; PBF I ; PE-Cy 5 ; PE-Cy 7 ; PerCP ; PerCP-Cy 5.5 ; PE-テキサスレッド [レッド 613] ; フロキシシン B (マグダラレッド) ; Phorwhite AR ; Phorwhite BKL ; Phorwhite Rev ; Phorwhite RPA ; ホスフィン 3 R ; フィコエリトリン B [PE] ; フィコエリトリン R [PE] ; PKH26 (Sigma 社) ; PKH67 ; PMIA ; ポントクローム (Pontochrome) ブルーブラック ; POPO-1 ; POPO-3 ; PO-PRO-1 ; PO-PRO-3 ; プリムリン ; プロシオンイエロー ; ヨウ化プロピジウム (PI) ; PYMPO ; ピレン ; ピロニン ; ピロニン B ; ピロザール (Pyrozal) ブリリアントフラビン 7 GF ; QSY 7 ; キナクリンマスタード ; レッド 613 [PE-テキサスレッド] ; レゾルフィン ; RH 414 ; Rhod-2 ; ローダミン ; ローダミン 110 ; ローダミン 123 ; ローダミン 5 GLD ; ローダミン 6 G ; ローダミン B ; ローダミン B 200 ; ローダミン B エキストラ ; ローダミン BB ; ローダミン BG ; ローダミン グリーン ; ローダミン ファリシジン (Phalloidine) ; ローダミン ファロイジン ; ローダミン レッド ; ローダミン WT ; ローズベungal ; R-フィコシアニン ; R-フィコエリトリン (PE) ; Rs GFP ; S65A ; S65C ; S65L ; S65T ; サファイア GFP ; SBFI ; セロトニン ; セブロン (Sevron) ブリリアントレッド 2 B ; セブロンブリリアントレッド 4 G ; セブロンブリリアントレッド B ; セブロンオレンジ ; セブロンイエロー-L ; sgBFP (商標) ; sgBFP (商標) (super glow BFP) ; sgGFP (商標) ; sgGFP (商標) (super glow GFP) ; SITS ; SITS (プリムリン) ; SITS (スチルベンイソチオスルホン酸) ; SNAFL カルセイン ; SNAFL-1 ; SNAFL-2 ; SNARF カルセイン ; SNARF 1 ; ナトリウムグリーン ; スペクトラムアクア ; スペクトラムグリーン ; スペクトラムオレンジ ; スペクトラムレッド ; SPQ (6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル) キノリニウム) ; スチルベン ; スルホローダミン B can C ; スルホローダミン G エキストラ ; SYTO 11 ; SYTO 12 ; SYTO 13 ; SYTO 14 ; SYTO 15 ; SYTO 16 ; SYTO

10

20

30

40

50

17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOXブルー; SYTOXグリーン; SYTOXオレンジ; TET (商標); テトラサイクリン; テトラメチルローダミン (TRITC); Texas Red (商標); Texas Red-X (商標) コンジュゲート; チアジカルボシアニン (DISC3); チアジンレッドR; チアゾールオレンジ; チオフラビン5; チオフラビンS; チオフラビンTCN; チオライト (ThioLyte); チオゾール (Thiozole) オレンジ; チノポール (Tinopol) CBS (カルコフロールホワイト); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; Tricolor (PE-Cy5); TRITCテトラメチルローダミンイソチオシアネート; トゥルブルー; トゥルレッド; ウルトラライト (Ultralite); ウラニンB; ユビテックスSFC; VIC (商標); wt GFP; WW 781; X-ローダミン; XRICTC; キシレンオレンジ; Y66F; Y66H; Y66W; イエローGFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; YOYO-3; pHrodo (商標) (Thermo Fischer Scientific社、MA、ウォルサムから入手可能)、およびそれらの塩。

【0040】

蛍光色素またはフルオロフォアは、別の反応性分子へのコンジュゲーションを促進するように修飾されている誘導体を含んでもよい。したがって、蛍光色素またはフルオロフォアは、フルオロフォアのイソチオシアネート誘導体および／またはスクシンイミジルエステル誘導体等のアミン反応性誘導体を含み得る。

【0041】

開示される組成物および方法の核酸分子は、クエンチャーで標識されてもよい。クエンチングは、動的クエンチング（例えば、FRETによる）、静的クエンチング、またはその両方を含み得る。実例的なクエンチャーとして、Dabcylが挙げられ得る。また、実例的なクエンチャーとして、商品名「BHQ」（例えば、BHQ-0、BHQ-1、BHQ-2、およびBHQ-3、Biosearch Technologies社、カリフォルニア州、ノヴァット）で販売されるブラックホールクエンチャーを包含し得るダーククエンチャーが挙げられ得る。ダーククエンチャーにはまた、商品名「QXL (商標)」(Anaspec社、カリフォルニア州、サンノゼ)で販売されるクエンチャーが包含され得る。ダーククエンチャーにはまた、2, 4-ジニトロフェニル基を含むDNP型非フルオロフォアが包含され得る。

【0042】

いくつかの実施形態では、核酸複合体におけるコンホメーション変化中に標識の分離を可能にするための核酸分子上の標識の適切なスペーシングを維持するために十分な考慮が成されて、2つまたはそれよりも多いオリゴヌクレオチド上の相互作用的標識を含むことが有用であり得る。相互作用的標識対のタイプの1つは、クエンチャー-色素対であり、これは、フルオロフォアおよびクエンチャーを含み得る。当業者は、特定のフルオロフォアの発光をクエンチングする適切なクエンチャー部分を選択することができる。実例的な実施形態では、Dabcylクエンチャーは、フルオロフォア部分からの蛍光の発光を吸収する。

【0043】

いくつかの実施形態では、2つの標識の近接は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) または蛍光偏光を使用して検出することができる。FRETは、2つの色素分子の電子励起状態間の距離依存的な相互作用であり、そこでは、励起は、光子の発光を伴わずに、ドナー分子からアクセプター分子へ移動される。FRETに関するドナー／アクセプター色素対の例は、当該技術分野で既知であり、フルオレセイン／テトラメチルローダミン、

IAEDANS／フルオレセイン（Molecular Probes社、オレゴン州、ユージーン）、EDANS／Dabcyl、フルオレセイン／フルオレセイン（Molecular Probes社、オレゴン州、ユージーン）、BODIPY FL／BODIPY FL（Molecular Probes社、オレゴン州、ユージーン）、BODIPY TMR／ALEXA 647、ALEXA-488／ALEXA-647、およびフルオレセイン／QSY7（商標）等の本明細書中に記載されるフルオロフォアおよびクエンチャーを包含し得る。

【0044】

標識は、様々な技法によって、直接的または間接的に、核酸分子にコンジュゲートされ得る。使用される標識の正確なタイプに応じて、標識は、シグナル相互作用を促進するように、オリゴヌクレオチドの5'もしくは3'末端に位置付けられ得るか、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列において内部に位置付けられ得るか、またはオリゴヌクレオチドから伸長し、様々なサイズおよび組成を有するスパーサーアームに結合され得る。市販のホスホルアミダイト試薬を使用して、例えば、ホスフェート結合の形成による、ホスホルアミダイト色素の、5'塩基の5'水酸基へのカップリングによって一方の末端に、または適切な保護ホスホルアミダイトを介して内部に、官能基（例えば、チオールまたは第一級アミン）を含有する核酸分子を産生することができる。

【0045】

核酸分子はまた、1つまたは複数のスルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル部分を有する官能基化用試薬を、核酸配列に取り込んでもよい。例えば、5'ホスフェート基は、ポリヌクレオチドキナーゼおよび $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを使用することによって、放射性同位体として取り込まれて、レポーター基を提供し得る。ビオチンは、合成中に導入されたアミノチミジン残基を、ビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させることによって、5'末端に付加され得る。例えば、3'末端にある標識は、ポリヌクレオチド末端トランスフェラーゼを用いて、例えばコーディセピン、 ^{35}S -dATPおよびビオチン化dUTP等の所望の部分を付加することができる。

【0046】

オリゴヌクレオチド誘導体はまた、標識としても利用可能である。例えば、エテノー-dAおよびエテノー-Aは、レポーターに取り込まれ得る既知の蛍光アデニンヌクレオチドである。同様に、エテノー-dCは、レポーター合成において使用され得る別の類似体である。かかるヌクレオチド誘導体を含有するレポーターは、加水分解されて、核酸ポリメラーゼがPCR中にプライマーを伸長するため、ポリメラーゼの5'から3'へのヌクレアーゼ活性によって遙かに強力な蛍光モノヌクレオチドを放出することができる。

【0047】

いくつかの実施形態では、第1の標識は、第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされる。

【0048】

本開示のある特定の実施形態では、第2の標識は、第1の一本鎖核酸分子または第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、第1の標識は、第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされ、第2の標識は、第1の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされ、ここで、第1の標識は、シグナルを発生することが可能であり、シグナルの強度は、核酸複合体のコンホメーションに応じて変動する。

【0049】

本開示のある特定の実施形態では、第2の標識は、第3の一本鎖核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、第1の標識は、第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされ、第2の標識は、第3の一本鎖核酸にコンジュゲートされ、ここで、第1の標識は、シグナルを発生することが可能であり、シグナルの強度は、核酸複合体のコンホメーションに応じて変動する。

【0050】

ある特定の実施形態では、シグナルの強度は、第1の標識と第2の標識との間の距離、

10

20

30

40

50

ならびに／または第1の標識および第2の標識の相対的な配向性と無関係である。

【0051】

ある特定の実施形態では、シグナルの強度は、第1の標識と、第2の標識との間の距離ならびに第1の標識および第2の標識の相対的な配向性の少なくとも1つに応じて変動する。

【0052】

いくつかの実施形態では、第1の標識および第2の標識は、ドナーおよびアクセプター対を含む。いくつかの実施形態では、シグナルは、FRET技法を使用して測定される。例えば、シグナルは、2つの異なる波長で測定され得る。別の例では、シグナルは、4つの異なる波長で測定され得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの標識は、Atto色素、Alexa Flour（登録商標）色素、Cy（登録商標）色素、およびBODIPY色素からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーおよびアクセプター対は、FITCおよびTRITC、Cy3およびCy5、またはAlexa-488およびAlexa-647である。いくつかの実施形態では、ドナーおよびアクセプター対は、本明細書中に記載される標識である。いくつかの実施形態では、第1の標識および第2の標識は、ドナーフルオロフォアおよびアクセプタークエンチャーを含む。

【0053】

いくつかの実施形態では、シグナルおよび標識は、方向的に依存している（異方性）。かかる標識の非限定的な例として、Atto色素、BODIPY色素、Alexa色素、TMR/TAMRA色素、またはCy色素が挙げられる。

【0054】

上記で提供するように、本開示の核酸複合体は、第1の一本鎖分子および第1の一本鎖分子に部分的にまたは完全に相補的な第2の一本鎖核酸分子を含む。ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体は、第1の一本鎖分子、第1の一本鎖分子に部分的に相補的な第2の一本鎖核酸分子、および第1の一本鎖分子に部分的に相補的な第3の一本鎖核酸分子を含む。

【0055】

本明細書中に記載される方法および核酸分子および複合体のある特定の実施形態では、第2の核酸鎖および／または第3の核酸鎖は、第1の核酸に単に部分的に相補的なものである。核酸鎖は、全ての塩基が、従来のワトソン-クリック塩基対形成（例えば、G-C塩基対形成およびA-T塩基対形成）を形成することが可能である場合、完全に相補的である。塩基対の少なくとも1個が、反対の鎖に相補的でない場合、核酸鎖は、部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、第2の単一核酸鎖は、少なくとも4個の非相補的核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、第2の単一核酸鎖は、少なくとも、多くとも、または正確に2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、14個、16個、18個、もしくは20個（またはその中の任意の誘導可能な範囲）の非相補的核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸鎖は、8個の非相補的核酸塩基を含む。

【0056】

本開示の核酸複合体のある特定の実施形態では、第1の一本鎖核酸分子、第2の一本鎖核酸分子、および／または第3の一本鎖核酸分子はそれぞれ独立して、200個未満のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第1の一本鎖核酸分子、第2の一本鎖核酸分子、および／または第3の一本鎖核酸分子はそれぞれ独立して、少なくとも、または正確に、20個未満、30個未満、40個未満、60個未満、80個未満、100個未満、125個未満、150個未満、175個未満、200個未満、225個未満、250個未満、275個未満、300個未満、350個未満、400個未満、450個未満、500個未満、550個未満、600個未満、650個未満、700個未満、750個未満、800個未満、900個未満、または1000個未満のヌクレオチド長、あるいはその中の任意の誘導可能な範囲である。

【0057】

本明細書中に記載される核酸複合体は、 Ca^{2+} 濃度センサーとして有用であり、共同性の実質的な変化を伴わずに、高い感受性を有する。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $10\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ の範囲で Ca^{2+} 濃度を決定することが可能であり、範囲は、列挙した Ca^{2+} 濃度を含める。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $10\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ 、または $10\text{ nM} \sim 100\text{ nM}$ 、または $10\text{ nM} \sim 500\text{ nM}$ 、または $100\text{ nM} \sim 500\text{ nM}$ 、または $100\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ 、または $500\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ 、または $500\text{ nM} \sim 50\text{ }\mu\text{M}$ 、または $1\text{ }\mu\text{M} \sim 1\text{ mM}$ 、または $1\text{ }\mu\text{M} \sim 10\text{ mM}$ 、または $10\text{ }\mu\text{M} \sim 10\text{ mM}$ 、または $100\text{ }\mu\text{M} \sim 1\text{ mM}$ 、または $100\text{ }\mu\text{M} \sim 10\text{ mM}$ の範囲の Ca^{2+} 濃度を決定することが可能である。他の実施形態では、列挙した Ca^{2+} 濃度は、除外される。

【0058】

本明細書中に記載される核酸複合体は、 Cl^- 濃度センサーとして有用であり、共同性の実質的な変化を伴わずに、高い感受性を有する。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $1\text{ mM} \sim 100\text{ mM}$ の範囲で Cl^- 濃度を決定することが可能であり、範囲は、列挙した Cl^- 濃度を含める。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $1\text{ mM} \sim 50\text{ mM}$ 、 $1\text{ mM} \sim 25\text{ mM}$ 、または $1\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 、または $5\text{ mM} \sim 100\text{ mM}$ 、または $5\text{ mM} \sim 50\text{ mM}$ 、 $5\text{ mM} \sim 25\text{ mM}$ 、または $5\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 、または $10\text{ mM} \sim 25\text{ mM}$ 、または $10\text{ mM} \sim 50\text{ mM}$ 、または $10\text{ mM} \sim 75\text{ mM}$ 、または $20\text{ mM} \sim 80\text{ mM}$ 、または $30\text{ mM} \sim 70\text{ mM}$ の範囲の Cl^- 濃度を決定することが可能である。他の実施形態では、列挙した Cl^- 濃度は、除外される。

【0059】

本明細書中に記載される核酸複合体はまた、 pH センサーとしても有用であり、共同性の実質的な変化なしに、高い感受性を有する。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 5.5 未満または 7.0 を超える pH を決定することが可能である。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $\text{pH } 5.8$ 、 5.7 、 5.6 、 5.5 、 5.4 、 5.3 、 5.2 、 5.0 、 4.8 、 4.6 、 4.4 、 4.2 、または 4.0 未満、あるいは正確に $\text{pH } 5.8$ 、 5.7 、 5.6 、 5.5 、 5.4 、 5.3 、 5.2 、 5.0 、 4.8 、 4.6 、 4.4 、 4.2 、または 4.0 （またはその中の任意の誘導可能な範囲）の pH を決定することが可能である。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $\text{pH } 6.8$ 、 6.9 、 7.0 、 7.1 、 7.2 、 7.3 、 7.4 、 7.5 、 7.6 、 7.7 、 7.8 、 8.0 、 8.2 、 8.4 、 8.6 、 8.8 または 9.0 を超える、あるいは正確に $\text{pH } 6.8$ 、 6.9 、 7.0 、 7.1 、 7.2 、 7.3 、 7.4 、 7.5 、 7.6 、 7.7 、 7.8 、 8.0 、 8.2 、 8.4 、 8.6 、 8.8 または 9.0 （またはその中の任意の誘導可能な範囲）の pH を決定することが可能である。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 $5.5 \sim 7$ の範囲の pH を決定することが可能である。ある特定の実施形態では、本明細書中に記載される核酸複合体は、 5.8 および 6.8 、または $5.8 \sim 7$ 、または $5.6 \sim 6.8$ 、または $5.4 \sim 6.8$ の範囲の pH を決定することが可能である。

【0060】

シトシンリッチなDNA配列は、テロメアおよびいくつかの癌遺伝子、例えばc-mycのプロモーター等のヒトゲノムに見出される。ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体は、2つの平行した二本鎖が、i-モチーフと呼ばれるヘッドトウテイルの配向性で互いにインターカレートされるC・CH+対により対形成したわずかに酸性の条件下で、特殊な四重体構造を形成することができる。「i-モチーフ」は、シトシンまたはその誘導体が塩基対を形成して、2つの二本鎖が、互いに逆平行で結合される2つの平行鎖の二本鎖を含む、シトシンリッチな一続き(stretches)またはシトシン誘導が豊富な一続きの存在を特徴とする複合体を含有する核酸(DNAおよび/またはRNA)である。一方の二本鎖のシトシンまたはその誘導体の対は、他方の二本鎖のシトシンまたはその誘導体の対とインターカレートされる。

【0061】

塩基対形成スキームが、 $C \cdot C +$ 塩基対の形成をもたらす半プロトン化された (hemiprotonated) シトシンを包含するため、i-モチーフの構造は、通常のDNA二本鎖の構造と異なる。具体的には、各対に含有されるシトシンの1個がプロトン化される。i-モチーフはまた、上述するとおりの2つの二本鎖の結合によって形成される四量体として存在し得る。

【0062】

ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体は、少なくとも2個、少なくとも3個、または少なくとも4個の連続したシトシンの一続きを含むオリゴヌクレオチド配列から合成され得る。シトシンの数、ならびに両方の鎖間の相補性度を修正することによって、本開示の核酸複合体の応答時間およびpHセンシング範囲をモジュレートすることが可能である。より多くのシトシンが、i-モチーフに寄与する場合、モチーフの安定性が増加する。さらに、このモチーフは、種々の数のシトシンを含有する一続きの相互作用によって形成され得る。さらに、シトシンリッチな一続きは、シトシン間に1個または2個の非シトシン塩基（複数可）を含有し得る。しかしながら、このことは、i-モチーフの安定性を低減し得る。i-モチーフを含むシトシンの一続きは、核酸の異なる鎖に属してもよいが、それらの2個はまた、共有結合的に、または非共有結合的に一緒に連結され得る。また、それらの2個は、単一核酸鎖の一部であってもよく、ここで、それらの2個は、一続きの指定塩基によって分離される。

【0063】

ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体の第2の一本鎖核酸分子は、配列 $C_n X C_n Y C_n Z C_n$ （配列番号13）（式中、Cは、シトシンであり、X、YおよびZはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、核酸分子の少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む。いくつかの実施形態では、第2の一本鎖核酸分子のシトシン残基の少なくとも、または正確に2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、14個、16個、または18個（またはその中の任意の誘導可能な範囲）のシトシン残基が修飾される。いくつかの実施形態では、修飾される第2の一本鎖核酸分子のシトシン残基の数は、2個～18個、または4個～18個、または10個～18個、または14個～18個、または2個～14個、または4個～14個、または10個～14個、または2個～10個、または4個～10個、または8個～16個の範囲である。

【0064】

いくつかの実施形態では、X、Y、およびZはそれぞれ独立して、AAまたはTAAである。ある特定の実施形態では、X、Y、およびZはそれぞれ独立して、TAAである。いくつかの実施形態では、nは、3、4、または7である。さらなる実施形態では、nは、少なくとも、多くとも、または正確に3、4、5、6、7、8、または9（またはその中の任意の誘導可能な範囲）である。いくつかの実施形態では、nは4である。いくつかの実施形態では、修飾は、メチル、フルオロ、ブロモ、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基である。いくつかの実施形態では、シトシンは、メチル基またはブロモ基で修飾される。いくつかの実施形態では、修飾は、シトシンの5'位である。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、同じ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、負に帯電した修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、正に帯電した修飾で修飾される。

【0065】

いくつかの実施形態では、第2の一本鎖分子は、配列 $(C_a)_n X (C_b)_n Y (C_c)_n Z (C_d)_n$ （配列番号14）（式中、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d は、数n個の連続したシトシン残基に等しく、X、Y、およびZは、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、3よりも大きいか、または3に等しい）を含む。いくつかの実施形態では、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d はそれぞれ、少なくとも1個

の修飾シトシンを含む。いくつかの実施形態では、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d はそれぞれ、少なくとも、多くとも、または正確に1個、2個、3個、4個、または5個の修飾シトシン（またはその中の任意の誘導可能な範囲）を含む。いくつかの実施形態では、修飾シトシンは、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d それぞれにおける最初の連続したシトシンまたは最後の連続したシトシンである。いくつかの実施形態では、 $n=3$ であり、修飾シトシンは、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d それぞれにおける2番目の連続したシトシンである。いくつかの実施形態では、 $n=4$ であり、修飾シトシンは、 C_a 、 C_b 、 C_c および C_d それぞれにおける2番目または3番目の連続したシトシンである。いくつかの実施形態では、 C_b および C_c はそれぞれ、少なくとも2個の修飾シトシンを含み、 C_a および C_d はそれぞれ、未修飾シトシンからなる。いくつかの実施形態では、 C_a または C_d は、修飾シトシン残基からなる。いくつかの実施形態では、 C_a 、 C_b 、 C_c 、および／または C_d は、少なくとも、多くとも、または正確に1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個の修飾シトシン残基、もしくはその中の任意の誘導可能な範囲からなるか、または1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個の修飾シトシン残基、もしくはその中の任意の誘導可能な範囲を含む。

【0066】

ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体の第2の一本鎖核酸分子は、本明細書中で提供されるとおりの、配列 $C_n X C_n Y C_n Z C_n$ （配列番号13）または $(C_a)_n X (C_b)_n Y (C_c)_n Z (C_d)_n$ （配列番号14）を除外する。

【0067】

ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体の第2の一本鎖核酸分子および／または第3の一本鎖核酸分子は、配列 $C_n X C_n$ （式中、 C は、シトシンであり、 X および Y はそれぞれ、アデニン、チミン、グアニンの1個または複数、またはそれらの組合せであり、 n は、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む。いくつかの実施形態では、第2の一本鎖核酸分子の少なくとも、または正確に2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、14個、16個、または18個（またはその中の任意の誘導可能な範囲）のシトシン残基が修飾される。いくつかの実施形態では、修飾される第2の一本鎖核酸分子のシトシン残基の数は、2個～18個、または4個～18個、または10個～18個、または14個～18個、または2個～14個、または4個～14個、または10個～14個、または2個～10個、または4個～10個、または8個～16個の範囲である。

【0068】

いくつかの実施形態は、 X 、 Y 、および Z は独立して、 AA または TAA である。ある特定の実施形態では、 X および Y は独立して、 AA である。いくつかの実施形態では、 n は、3、4、または7である。さらなる実施形態では、 n は、少なくとも、多くとも、または正確に3、4、5、6、7、8、または9（またはその中の任意の誘導可能な範囲）である。いくつかの実施形態では、 n は4である。いくつかの実施形態では、修飾は、メチル、フルオロ、ブロモ、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基である。いくつかの実施形態では、シトシンは、メチルまたはブロモ基で修飾される。いくつかの実施形態では、修飾は、シトシンの5'位である。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、同じ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、負に帯電した修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、第2の核酸分子におけるシトシンは全て、正に帯電した修飾で修飾される。

【0069】

本明細書中に記載される核酸複合体は、pHセンサーとして有用であり、共同性の実質的な変化を伴わずに、高い感受性（ D/A 比の倍率変化から明らかであるとおりの）を有する。いくつかの実施形態では、方法は、シグナル強度値から D/A 比を算出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、 D/A 比は、正規化した値である。いくつかの実施形態では、 D/A 比の倍率変化は、少なくとも、4.1、5、6、7、または7.5である。いくつかの実施形態では、 D/A 比の倍率変化は、4.1～7.5、5～7.5、

10

20

30

40

50

6～7.5、7～7.5、4.1～7、5～7、6～7、4.1～6、5～6、または4.1～5である。いくつかの実施形態では、D/A比の倍率変化は、少なくとも、または正確に4.5、5、6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、または14（またはその中の任意の誘導可能な範囲）である。いくつかの実施形態では、共同性は、未修飾の核酸複合体と比較して、2倍未満、もしくは1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍、0.25倍、0.2倍、0.1倍またはその中の任意の誘導可能な範囲未満で変化される。いくつかの実施形態では、共同性は、未修飾核酸複合体と5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%未満異なる。いくつかの実施形態では、D/A比の倍率変化は、少なくとも、または正確に4.5、5、6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、または14（またはその中の任意の誘導可能な範囲）であり、共同性は、未修飾の核酸複合体と比較して、1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍、0.25倍、0.2倍、0.1倍またはその中の任意の誘導可能な範囲未満で変更される。いくつかの実施形態では、 pH_{half} は、共同性を実質的増加せずに変更される。いくつかの実施形態では、 pH_{half} は、少なくとも、多くとも、または正確に5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、または9.0（またはその中の任意の誘導可能な範囲）である。いくつかの実施形態では、 pH_{half} は、未修飾核酸複合体と比較して、少なくとも、多くとも、または正確に0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、2.9、または3.0 pH単位異なる（またはその中の任意の誘導可能な範囲）。いくつかの実施形態では、 pH_{half} は、未修飾核酸複合体と比較して、少なくとも、多くとも、または正確に3%、5%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、24%、24%、26%、28%、または30%異なる（またはその中の任意の誘導可能な範囲）。いくつかの実施形態では、 pH_{half} は、未修飾核酸複合体と比較して、少なくとも、多くとも、または正確に0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、2.9、または3.0 pH単位異なるか、あるいは少なくとも、多くとも、または正確に3%、5%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、24%、24%、26%、28%、または30%異なり（またはその中の任意の誘導可能な範囲）、共同性は、未修飾の核酸複合体と比較して、1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍、0.25倍、0.2倍、もしくは0.1倍またはその中の任意の誘導可能な範囲未満で変化される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載される測定値（即ち、シグナル強度、 pH_{half} 、倍率変化、または共同性）は、正規化した値である。

【0070】

いくつかの実施形態では、第1および第2の一本鎖核酸分子は、酸性条件下でi-モチーフを形成することが可能である。いくつかの実施形態では、第1の核酸分子鎖は、酸性条件下で逆平行の配向性でインターカレートされる2つの平行鎖C-HC+塩基対形成された二本鎖を含む分子内複合体を形成することが可能である。

【0071】

本開示の核酸分子および複合体は、いくつかの実施形態では、ある特定の標的に対して親和性を有するか、またはその化学組成により、細胞における特定の位置にターゲティングされる核酸、小分子またはポリペプチド等のターゲティング部分を含む。ターゲティング部分は、本開示の核酸複合体を、種々の細胞内位置にターゲティングさせるためのハンドルとして作用し得る。ターゲティング部分は、受容体タンパク質に結合する核酸であっ

10

20

30

40

50

てもよく、受容体タンパク質は、細胞内でターゲティングされるか、または細胞内でターゲティングされるタンパク質にコンジュゲートされるものであり得る。ターゲティング部分または受容体タンパク質は、ターゲティング核酸またはエンドサイトーシスすることが可能な原形質膜タンパク質等のタンパク質、天然受容体を保有する任意のタンパク質、原形質膜を介して細胞内位置間を進むタンパク質、毒素、ウイルスおよびウイルスコートタンパク質、細胞透過性ペプチド、シグナル配列、細胞内ターゲティング配列、小有機分子、エンドサイトーシスリガンドおよび輸送タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、アプタマー、人工タンパク質受容体にターゲティングされた二本鎖ドメイン、陰イオンリガンド結合受容体に結合する核酸配列、またはエンドサイトーシスリガンドである。ターゲティング部分はまた、G 4 コア配列またはリボザイムであ

10

【0072】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、核酸配列である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、コグネイト人工タンパク質受容体を有する。人工受容体は、例えば、一本鎖可変断片 (s c F v)、転写因子、Z nフィンガータンパク質、ロイシンジッパー、またはDNA結合免疫グロブリンであり得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、第1および／または第2の一本鎖核酸分子と同じ核酸鎖上でコードされる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、アプタマー、人工タンパク質受容体にターゲティングされた二本鎖ドメイン、陰イオンリガンド結合受容体に結合する核酸配列、およびエンドサイトーシスリガンドから選択される。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、核酸分子に、直接または間接的にコンジュゲートされたペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分ペプチドは、融合性ペプチド、膜透過性ペプチド、細胞内局在化配列、または細胞受容体リガンドの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、細胞内局在化配列は、ターゲティングされるタンパク質の空間的局在化が存在する細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる。いくつかの実施形態では、細胞内局在化配列は、細胞質ゾル、小胞体、ミトコンドリアマトリクス、葉緑体管腔、メディアルトランスゴルジ槽、リソソームの管腔、エンドソームの管腔、ペルオキシソーム、核、および原形質膜上の特定の空間的位置からなる群から選択される細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる。いくつかの実施形態では、細胞内細胞小器官は、原形質膜と、直接または間接的に膜を交換するものである。

20

30

【0073】

いくつかの実施形態では、核酸は、ペプチド核酸 (PNA) である。鎖は、 Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、第2の標識は、 Cl^- または Ca^{2+} 感受性フルオロフォア、例えば、PNAにコンジュゲートされたBAC等の Cl^- 感受性フルオロフォアである。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、PNAおよび Cl^- フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態では、第2の標識は、非感受性フルオロフォア、例えば、センシングモジュールのPNAに相補的なDNA配列にコンジュゲートされたAlexa 647等の塩化物イオン非感受性フルオロフォアである。

【0074】

本方法、核酸、および核酸複合体は、参照により本明細書に組み込まれる国際特許公開第2015/159122号に記載されるもの等のさらなる核酸ベースのセンサーと組み合わせて使用され得る。

40

【0075】

本開示では、PNAまたはPNA鎖またはPNA配列は、交換可能に使用され、同じ範囲または意味を有する。本開示では、DNAまたはDNA鎖またはDNA配列は、交換可能に使用され、同じ範囲または意味を有する。本開示では、RNAまたはRNA鎖またはRNA配列は、交換可能に使用され、同じ範囲または意味を有する。

【0076】

いくつかの実施形態では、本開示の核酸複合体は、ワトソン-クリック塩基対形成によ

50

り2つまたは3つ全ての鎖を自己集合させ、これは、生理学的条件下で安定である。

【0077】

本開示の実施形態では、2つのタイプのターゲティング部分を使用される：A) DNAのみおよびB) DNAおよびRNAの組合せ。DNAのみを含むターゲティング部分は、ノーマライジングモジュールにハイブリダイズして、陰イオン性リガンド結合受容体 (ALBR) を介した細胞内ターゲティングに必要とされる dsDNA ドメインを形成する。ターゲティング部分において DNA と組み合わせて使用される RNA 配列は、トランスフェリン経路へのターゲティングを達成するために使用される。

【0078】

いくつかの実施形態では、DNA 鎖は、第1の鎖および／または第2の鎖として使用される。本開示の実施形態では、核酸複合体は、第1の鎖および第2の鎖の、または第1の鎖および第3の鎖の、または第1の鎖と、第2の鎖および第3の鎖とのハイブリダイゼーションをもたらす dsDNA 部分 (最小 15 bp 配列) を有する。ある特定の実施形態では、核酸複合体は、d(AT)4 配列を含み、したがって、選り抜きの scFV でタグ付けしたタンパク質を発現する任意の細胞における任意の所定の区画にターゲティングされる。

【0079】

例示的で非限定的な実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体は、配列 5' - C²⁺フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有する第1の鎖、および配列 5' - 第1の標識 - CCC CTA ACC CCT AAC CCC TAA CCC CAT ATA TAT CCT AGA ACG ACA GAC AAA CAG TGA GTC - 3' (配列番号08) を有する第2の鎖を含む。

【0080】

例示的で非限定的な実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体は、配列 5' - TTA TAG GAT CCT GCG GTC GG / C²⁺フルオロフォア / GGC ACC AGG CGT AAA ATG TA - 3' (配列番号09) を有する第1の鎖、配列：5' - 第1の標識 - CCC CAA CCC CAA TAC ATT TTA CGC CTG GTG CC - 3' (配列番号10) を有する第2の鎖、および配列：5' - CCG ACC GCA GGA TCC TAT AAA ACC CCA ACC CC - 第2の標識 - 3' (配列番号11) を有する第3の鎖を含む。

【0081】

例示的で非限定的な実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体は、5' - Ca²⁺フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有する第1の鎖、および配列 5' - 第1の標識 - AT AAC ACA TAA CAC ATAACAAA TAT ATA TCC TAG AAC GAC AGA CAA ACA GTG AGT C - 3' (配列番号12) を有する第2の鎖を含む。

【0082】

例示的で非限定的な実施形態では、本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体は、配列 5' - C²⁺フルオロフォア - ATC AAC ACT GCA - Lys - COOH (配列番号22) を有する第1の鎖、配列 5' - TAT TGT GTA TTG TGT ATT GTT TTA TAT AT / 第1の標識 / A TAG GAT CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT - 3' (配列番号23) を有する第2の鎖、および配列：5' - CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC - 第2の標識 - 3' (配列番号24) を有する第3の鎖を含む。

【0083】

10

20

30

40

50

試料中の pH および Ca^{2+} または Cl^- 濃度の検出

本明細書中に記載される方法は、細胞プロセス中にリアルタイムで pH 変化および／または Ca^{2+} もしくは Cl^- 濃度をモニタリングするために使用され得る。いくつかの実施形態では、方法は、エンドサイトーシスをモニタリングするためのものである。理論に拘束されるのを望まないが、酸性化は、受容体からのカーゴ解離を促進することにおいて、またはエンドサイトーシス中に毒素およびウイルスの細胞進入を媒介することにおいて主要な役割を果たす。ある特定の実施形態では、核酸複合体は、生存細胞において、エンドサイトーシスと関連付けられる時空間的な pH 変化の捕捉によって説明される細胞内部の pH 応答を示す。

【0084】

試料中の蛍光は、様々な方法で、例えば蛍光光度計または蛍光分光分析法を使用して、測定することができる。一般に、第1の波長を有する励起源からの励起放射は、励起オプティクスを通過する。励起オプティクスは、励起放射を引き起こして、試料を励起させる。それに応じて、試料中の標識は、励起波長と異なる波長を有する放射線を放出する。デバイスは、デバイスがスキャンされている間に、試料を特定の温度で維持するための温度コントローラーを含み得る。必要に応じて、多軸トランスレーションステージは、曝露されるように種々のウェルを位置付けるように、複数の試料を保持するマイクロタイタープレートを動かすために使用することができる。多軸トランスレーションステージ、温度コントローラー、オートフォーカス機構、ならびにイメージングおよびデータ収集と関連付けられるエレクトロニクスは、適切にプログラミングされたデジタルコンピュータによって管理され得る。コンピュータはまた、アッセイ中に収集されたデータを、プレゼンテーション用の別の方式に変換することができる。

【0085】

いくつかの実施形態では、検出することは、発生したシグナルの規模を測定することを含み、ここで、規模は、細胞もしくはその領域の pH または細胞もしくはその領域の Ca^{2+} または Cl^- 濃度を示す。ある特定の実施形態では、核酸複合体が閉じた状態を形成する場合に、即ち、pH が減少すると i-モチーフが形成される場合に、アクセプターフルオロフォアからの放出は増加する。同様に、核酸複合体が開いた状態を想定する場合に、即ち、pH が増加すると i-モチーフが解離される場合に、アクセプターフルオロフォアからの放出は減少する。蛍光クエンチングに関して、核酸複合体が閉じた状態を形成する場合に、即ち、pH が減少すると i-モチーフが形成される場合に、フルオロフォアからの放出は減少する。同様に、核酸複合体が開いた状態を形成する場合に、即ち、pH が増加すると i-モチーフが解離される場合に、フルオロフォアからの放出は増加する。ある特定の実施形態では、フルオロフォアからの放出は、核酸複合体のコンホメーションとは無関係である。

【0086】

本明細書中で使用する場合、核酸複合体からのシグナルにおける「増加」（または「減少」）は、参照試料と比較した試料中のシグナルの変化を指す。参照試料は、対照試料（例えば、薬物または作用物質の効果が検査されている細胞の未処理集団）であってもよく、または参照試料は、例えば、細胞内 pH および／または Ca^{2+} または Cl^- 濃度をモニタリングして、1つまたは複数の細胞プロセスを続ける場合、異なる時間での同じ試料であってもよい。

【0087】

本明細書中で使用する場合、「検出可能」という用語は、ある特定の条件下で核酸複合体によって保有される活性、例えば、蛍光活性を検出することによって、生体試料の pH および／または Ca^{2+} または Cl^- 濃度を決定するのを可能にする核酸複合体の特性を指す。いくつかの実施形態では、核酸複合体からのシグナルは、標準的な参照試料における pH の関数としてドナー／アクセプター（D/A）シグナル比をプロットすることによって正規化される。二重標識した核酸複合体変化時の pH 変動は、その閉じた状態と、開いた状態との間の比を変化させて、それによって、i-モチーフ形成に起因した閉じた状態

10

20

30

40

50

の FRET のため、ドナーおよびアクセプター強度 (D/A) の種々の比をもたらす。

【0088】

一実施形態では、pH 較正曲線および／または Ca^{2+} または Cl^{-} 濃度較正曲線が作成されて、それに対して、検査試料は、比較および正規化され得る。細胞内較正曲線は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2010/0304370 号に記載される方法に従って作成され得る。簡潔に述べると、pH 較正曲線に関して、細胞をパルス化して、洗浄して、緩衝液中で所与の pH でイオノフォアとともにインキュベートして、続いて、穏やかに固定する。ドナーおよびアクセプター FRET 画像を獲得し、そこから、 D/A 比が得られる。細胞内 pH 較正曲線に関して、各 pH での個々の細胞またはそれらの領域の平均 D/A が、pH の関数としてプロットされる。検査試料の D/A 比は、較正曲線と比較され得る。類似したアプローチを使用して、 Ca^{2+} 濃度較正曲線および Cl^{-} 濃度較正曲線を作成し得る。関連する方法はまた、本出願の実施例にも記載されている。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、細胞内 pH および／または Ca^{2+} または Cl^{-} 濃度は、細胞現象を検討する目的で、および／または様々な化合物の効果をスクリーニングする目的でモニタリングされてもよく、ここで、第 1 の時点での検査試料における核酸複合体からのシグナル（例えば、増加したシグナルまたは減少したシグナル）のレベルが決定されて、より遅い時点で得られる検査試料において見られるレベルと比較される。シグナルの変化は、2 つの試料間の pH および／または Ca^{2+} または Cl^{-} 濃度の相対的变化を反映し得る。例えば、FRET 対が、標識として使用される場合、ある時点から別の時点までのシグナルの増加は、2 つの時点間での pH の増加を示し得る。同様に、ある時点から別の時点までのシグナルの減少は、pH の減少または Ca^{2+} もしくは Cl^{-} 濃度の減少を示し得る。試料の正確な pH および／または Ca^{2+} または Cl^{-} 濃度を決定するために、シグナルの絶対的レベルは、既知の標準物質の参照試料または参照試料と比較され得る。測定レベルが、どれくらい類似して所与の群に関して対照レベルと比較されたかに基づいて、試料は、特定の pH 値に対して分類され得るか、または割り当てられ得る。

20

【0090】

当業者に理解されるとおり、この決定を行うことに関与するある特定の不確実性の度合いが存在することになる。したがって、対照群レベルの標準偏差を使用して、確率的決定を行うことができ、本開示の方法は、広範囲の蓋然性に基づく決定にわたって適用可能である。したがって、例えば、また限定の目的ではなく、一実施形態では、シグナルの測定レベルが、対照群のいずれかの平均値の標準偏差の 2.5 倍以内に収まる場合、その試料は、その群に割り当てられ得る。別の実施形態では、シグナルの測定レベルが、対照群のいずれかの平均値の標準偏差の 2.0 倍以内に収まる場合、その試料は、その群に割り当てられ得る。さらに別の実施形態では、シグナルの測定レベルが、対照群のいずれかの平均値の標準偏差の 1.5 倍以内に収まる場合、その試料は、その群に割り当てられ得る。さらなる別の実施形態では、シグナルの測定レベルが、対照群レベルのいずれかの平均値の標準偏差の 1.0 倍以内に収まる場合、その試料は、その群に割り当てられ得る。したがって、このプロセスは、様々な蓋然性の度合いで決定を可能にし、その群において、特定の試料が配置されるべきである。

30

40

【0091】

また、統計学的方法を使用して、検査試料におけるシグナル強度が、参照レベルと異なるか、または参照レベルと類似していると認められ得るかを決定するための閾値を設定することができる。さらに、統計学を使用して、検査試料のシグナル強度、参照レベルとの間で観察される差または類似性の妥当性を決定することができる。有用な統計解析方法は、L. D. Fisher & G. van Belle, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences* (Wiley-Interscience, NY, 1993 年) に記載されている。例えば、信頼 (「P」) 値は、対応のない両側 t 検定を使用して算出することができ、p 値が、0.05 未

50

満であるか、または0.05に等しい場合、群間の差は、有意であると判断した。

【0092】

本明細書中に記載される核酸複合体は、pHおよび Ca^{2+} 濃度センサーとして有用であり、それらの各々のpKaが異なる可能性があり、pKaの差は、特定の用途に最も適した核酸複合体を選択するために使用することができる。一般的に、pKaが、測定されるべき試料のpHに近いセンサーを使用すべきである。例えば、pKaは、試料の1.5 pH単位内、1.0 pH単位内、または0.5 pH単位内であり得る。

【0093】

本明細書中に記載される核酸複合体は、pHおよび Cl^- 濃度センサーとして有用である。ある特定の実施形態では、 Cl^- フルオロフォアのシグナルは、一定のStern-Volmerクエンチング定数(K_{SV})で、 Cl^- 濃度に線形従属である。ある特定の実施形態では、 Cl^- フルオロフォアのシグナルは、pHの生理学的変化、ならびに陽イオン、非ハロゲン化物陰イオン(硝酸塩、リン酸塩、炭酸水素塩、硫酸塩)およびアルブミンに対して非感受性である。

【0094】

細胞運動またはフォーカシングに起因して生じる人為現象的に(artificially)低い蛍光測定値を最低限に抑えるために、核酸複合体の蛍光は、第2のセンサー、例えば、測定試料中に同様に存在する第2の核酸複合体の蛍光と比較され得る。第2の核酸複合体は、第1の核酸複合体とは異なる発光スペクトルを有するべきであり、その結果、2つのセンサーの発光スペクトルを、区別することができる。フォーカシングおよび細胞運動等の実験条件が、第2のセンサーならびに第1のセンサーの蛍光に影響を及ぼすため、2つのセンサーの相対的蛍光を比較することで、蛍光の正規化が可能となり得る。試料を比較する利便性の高い方法は、第1の蛍光タンパク質センサーの蛍光の、第2の蛍光タンパク質センサーの蛍光に対する比を計算することである。

【0095】

いくつかの実施形態では、円二色性分光法を使用して、pHおよび/または Ca^{2+} もしくは Cl^- 濃度の変化に応答して、核酸複合体の二次構造の変化を検出し得る。光学活性な物質が、わずかに異なって、左側および右側の円偏光を吸収する場合に、円二色性(CD)が観察される。それは、CD分光偏光計を用いて測定される。別の実施形態では、細胞内pHの変化は、核酸複合体においてラマンバンド変化を観察することによって検出され得る。この実施形態では、核酸複合体は、金ナノ粒子標識およびラマンタグを含有する。ラマンバンド変化は、金ナノ粒子が、ラマンタグに近づけられるとき検出され得る。

【0096】

いくつかの実施形態では、FLIMを使用して、i-モチーフ形成時のコンホメーション変化を測定する。いくつかの実施形態では、異方性イメージングを使用して、コンホメーション変化を測定する。蛍光-寿命イメージング顕微鏡法(FLIM)は、蛍光試料由来の蛍光の指数関数的減衰率の差に基づいて画像を生じるイメージング技法である。蛍光-寿命イメージング顕微鏡法(FLIM)は、共焦点顕微鏡法、二光子励起顕微鏡法、および多光子断層撮影法におけるイメージング技法として使用され得る。フルオロフォアシグナルの強度ではなく、フルオロシグナルの寿命を使用して、FLIMにおいて画像を創出する。いくつかの実施形態では、FLIMを使用して、核酸複合体が、pHの変化に起因してコンホメーションを変化させると、変化するであろう色素の光物理的特性の1つとして、pH情報を獲得する。いくつかの実施形態では、色素は、Atto色素、BODIPY色素、Alexa色素、TMR/TAMRA色素、またはCy色素である。異方性イメージングおよびFLIMは、全ての目的で参照により本明細書に組み込まれるEktamakhijara、「Probing Chromatin Structure and Dynamics Using Fluorescence Anisotropy Imaging」CRC Handbook, Imaging Biological Mechanics (2014年)およびLevittr、「Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging

10

20

30

40

50

in cell biology」 Current Opinion in Biotechnology 20 (1) : 28~36頁 (2009年) にさらに記載されている。

【0097】

いくつかの実施形態では、シグナル強度は、 Ca^{2+} 濃度が挙げられると、少なくとも20%変化する。いくつかの実施形態では、シグナル強度は、 Ca^{2+} 濃度が挙げられた場合、少なくとも10、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、もしくは90%またはその中の任意の誘導可能な範囲で変化する。

【0098】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、10 nM~10 mMの範囲の Ca^{2+} 濃度を決定し、範囲は、列挙した Ca^{2+} 濃度の両端を含む。例えば、本開示の方法によって決定される Ca^{2+} 濃度は、10 nM~1 μ M、または10 nM~100 nM、または10 nM~500 nM、または100 nM~500 nM、または100 nM~1 μ m、または500 nM~1 μ M、または500 nM~50 μ M、または1 μ M~1 mM、または1 μ M~10 mM、または10 μ M~10 mM、または100 μ M~1 mM、または100 μ M~10 mMの範囲である。他の実施形態では、列挙した Ca^{2+} 濃度は、除外される。

【0099】

いくつかの実施形態では、 Ca^{2+} 濃度は、測定されたシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、 Ca^{2+} 濃度は、測定されたシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、シグナル値および／または参照値は、正規化される。いくつかの実施形態では、上記方法は、標準曲線を作成することをさらに含む。標準曲線は、種々の既知の Ca^{2+} 濃度値でシグナル強度を測定することによって作成され得る。曲線は、シグナル強度対 Ca^{2+} 濃度としてプロットされ得る。続いて、未知の Ca^{2+} 濃度のシグナル強度は、プロット上の相当する参照値を見つけることによって決定することができる。

【0100】

いくつかの実施形態では、シグナル強度は、 Cl^- 濃度が上昇するにつれ、少なくとも20パーセント変化する。いくつかの実施形態では、シグナル強度は、 Cl^- 濃度が上昇するとき、少なくとも10、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、もしくは90%またはその中の任意の誘導可能な範囲で変化する。

【0101】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、1 mM~100 mMの範囲の Cl^- 濃度を決定し、範囲は、列挙した Cl^- 濃度の両端を含む。例えば、本開示の方法によって決定される Cl^- 濃度は、1 mM~50 mM、1 mM~25 mM、または1 mM~10 mM、または5 mM~100 mM、または5 mM~50 mM、5 mM~25 mM、または5 mM~10 mM、または10 mM~25 mM、または10 mM~50 mM、または10 mM~75 mM、または20 mM~80 mM、または30 mM~70 mMの範囲である。他の実施形態では、列挙した Cl^- 濃度は、除外される。

【0102】

いくつかの実施形態では、 Cl^- 濃度は、測定されたシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、 Cl^- 濃度は、測定されたシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、シグナル値および／または参照値は、正規化される。いくつかの実施形態では、上記方法は、標準曲線を作成することをさらに含む。標準曲線は、種々の既知の Cl^- 濃度値でシグナル強度を測定することによって作成され得る。曲線は、シグナル強度対 Cl^- 濃度としてプロットされ得る。続いて、未知の Cl^- 濃度のシグナル強度は、プロット上の相当する参照値を見つけることによって決定することができる。

【0103】

いくつかの実施形態では、シグナル強度は、pHが、pH 4からpH 5まで、pH 5か

10

20

30

40

50

らpH6まで、pH6からpH7まで、およびpH7からpH8までの少なくとも1つ上昇するにつれ、少なくとも20パーセント変化する。いくつかの実施形態では、シグナル強度は、pHが、少なくともpH4、5、6または7から、pH5、6、7または8まで（またはその中の任意の誘導可能な）上昇するとき、少なくとも10、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、もしくは90%またはその中の任意の誘導可能な範囲で変化する。

【0104】

いくつかの実施形態では、pH範囲または値が、本明細書中で論述される場合、範囲は、列挙したpHの両端を含む。例えば、4.0～5.0または4.0と5.0との間のpH範囲は、pH4.0およびpH5.0を含む。他の実施形態では、列挙したpHは、除外される。

10

【0105】

いくつかの実施形態では、pHは、測定したシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、pHは、測定されたシグナルを、参照値と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、シグナル値および／または参照値は、正規化される。いくつかの実施形態では、方法は、標準曲線を作成することをさらに含む。標準曲線は、種々の既知のpH値でシグナル強度を測定することによって作成され得る。曲線は、シグナル強度対pHとしてプロットされ得る。続いて、未知のpHのシグナル強度は、プロット上の相当する参照値を見つけることによって決定することができる。

20

【0106】

上述するように、本開示の一態様は、試料中のpHおよび Ca^{2+} 濃度を決定する方法を提供する。かかる方法は、 Ca^{2+} フルオロフォアおよびシグナルを発生することが可能な第1の標識を含む核酸複合体を提供することと、シグナルの強度を測定することと、測定されたシグナルからpH、および Ca^{2+} 濃度を決定することとを含む。本開示の別の態様は、試料中のpHおよび Cl^{-} 濃度を決定する方法を提供する。かかる方法は、 Cl^{-} フルオロフォアおよびシグナルを発生することが可能な第1の標識を含む核酸複合体を提供することと、シグナルの強度を測定することと、測定されたシグナルからpH、および Cl^{-} 濃度を決定することとを含む。

【0107】

30

本開示の方法は、ある特定の実施形態では、初期エンドソーム、後期エンドソーム、原形質膜、リソソーム、オートファゴリソソーム、リサイクリングエンドソーム、シスゴルジネットワーク（CGN）、トランスゴルジネットワーク（TGN）、小胞体（ER）、ペルオキシソーム、または分泌小胞において、pHおよび Ca^{2+} または Cl^{-} の濃度を測定するのに適している。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、初期エンドソーム、後期エンドソーム、原形質膜、リソソーム、オートファゴリソソーム、リサイクリングエンドソーム、またはTGNにおいて、pHおよび Ca^{2+} または Cl^{-} の濃度を測定するのに適している。

【0108】

概して、 Ca^{2+} または Cl^{-} を含有する任意の試料が、本開示の方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、試料は、細胞、細胞抽出物、細胞溶解物、組織、組織抽出物、体液、血清、血液および血液製剤から選択される生体試料である。いくつかの実施形態では、試料は、生存細胞である。いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の生体試料である。

40

【0109】

本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体は、当該技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物（任意選択で、ヒト）、細菌、寄生虫、酵母または昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、核酸は、物理的、化学的または生物学的手段によって、宿主細胞に移行され得る。核酸分子の導入により、細胞内pHがモニタリングされ得る細胞を生じることは、容易に理解されよう。したがって、上記方法は、in

50

*in vitro*で培養した細胞における細胞内pHを測定するのに使用することができる。本開示の核酸複合体はまた、生物全体に容易に導入して、*in vivo*で細胞または組織におけるpHを測定することができる。例えば、本開示の核酸複合体は、物理的、化学的または生物学的手段、例えば、直接的な注入によって、生物に移行され得る。

【0110】

ある特定の実施形態では、本開示の核酸複合体を導入する方法は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるChakrabortyら、「Nucleic Acid-Based Nanodevices in Biological Imaging」、*Annu. Rev. Biochem.* 85:349~73頁(2016年)に開示されるものであり得る。

【0111】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段として、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。*in vitro*および*in vivo*での送達ビヒクルとしての使用のためのコロイド系の1つは、リポソーム(即ち、人工膜小胞)である。かかる系の調製および使用は、当該技術分野で周知である。

【0112】

いくつかの実施形態では、脂質配合物の使用は、宿主細胞への本開示の核酸複合体の導入(*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*で)に関して意図される。いくつかの実施形態では、本開示の核酸複合体は、脂質と結合され得る。脂質結合された本開示の核酸複合体は、リポソームの水性内部に封入され得るか、リポソームの脂質二重膜内に散在され得るか、リポソームおよびオリゴヌクレオチド(複数可)の両方と結合される連結分子を介してリポソームに結合され得るか、リポソーム中に捕捉され得るか、リポソームと複合体形成され得るか、脂質を含有する溶液中に分散され得るか、脂質と混合され得るか、脂質と組み合わせられ得るか、脂質中に懸濁液として含有され得るか、ミセルとともに含有され得るか、もしくはミセルと複合体形成され得るか、または他の方法で脂質と結合され得る。脂質、脂質/核酸複合体組成物は、溶液中の任意の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造で、ミセルとして、または「崩壊された」構造で存在し得る。それらはまた、単に溶液中に散在されてもよく、場合によってはサイズまたは形状のいずれかが一様でない凝集物を形成する。

【0113】

いくつかの実施形態では、本開示の1つまたは複数の核酸複合体は、核酸複合体を所望の細胞区画へと誘導するターゲティング配列に連結される。

【0114】

疾患検出およびモニタリング

本開示の方法、組成物、核酸複合体、およびキットは、疾患の検出、疾患のモニタリングに、また薬物スクリーニングプラットフォームとして使用され得る。本開示のいくつかの実施形態では、疾患は、リソソーム機能障害疾患を特徴とする。本開示のいくつかの実施形態では、疾患の病態は、リソソーム機能障害を含む。

【0115】

リソソーム機能障害疾患として、例えば、常染色体劣性大理石骨病、ファーパー病、クラッパ病(乳児発症型および後期発症型)、ファブリー病(アルファーガラクトシダーゼA)、シンドラー病(アルファーガラクトシダーゼB)、サンドホフ病(乳児発症型、若年発症型、または成人発症型)、テイサックス、若年性ヘキササミニダーゼA欠乏症、慢性ヘキササミニダーゼA欠乏症、グルコセレブロシド、ゴーシェ病(I型、II型およびIII型)、リソソーム酸性リパーゼ欠乏症(初期発症型および後期発症型)、ニーマンピック病(A型およびB型)、スルファチドーシス、異染性白質ジストロフィー(MLD)、サポニンB欠乏症、マルチプルスルファターゼ欠乏症、ムコ多糖症:MPS I型ハーラー症候群、MPS IS型シャイエ症候群、MPS IH-S型ハーラーシャイエ

10

20

30

40

50

症候群、II型（ハンター症候群）、III型（サンフィリポ症候群）、MPS III A型（タイプA）、MPS III B型（タイプB）、MPS III C型（タイプC）、MPS III D型（タイプD）、IV型（モルキオ）、MPS IVA型（タイプA）、MPS IVB型（タイプB）、VI型（マロトラーミー症候群）、VII型スライ症候群、IX型（ヒアルロニダーゼ欠乏症）；ムコリピドーシス：I型（シアリドーシス）、I型（I細胞疾患）、III型（偽性ハーラーポリジストロフィー／ホスホトランスフェラーゼ欠乏症）、IV型（ムコリピジン（Mucopolysaccharidosis））1欠乏症；ニーマンピック病（C型およびD型）、神経セロイドリポフスチン症：1型（サンタヴォリハルティア（Santavuori-Haltia）病）／乳児型NCL（CLN1 PPT1）、2型ヤンスキービールショースキー病／続発性乳児型NCL（CLN2／LINCL TPP1）、3型バッテンシュピルマイアーフォクト病／若年型NCL（CLN3）、4型クフス病／成人型NCL（CLN4）、5型フィンニッシュバリエーション（Finnish Variant）／続発性乳児型（CLN5）、6型続発性乳児型バリエーション（CLN6）、7型CLN2、8型北部型てんかん（CLN8）、8型トルコ型続発性乳児型（CLN8）、9型ドイツ型／セルビア型続発性乳児型（未知）、10型先天性カテプシンD欠乏症（CTSD）；ウォルマン病、アルファーマンノシドーシス、ベーターマンノシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、フコシドーシス、リソソーム輸送疾患、シスチン症、濃化異骨症、サラ病／シアル酸蓄積症、乳児型遊離シアル酸蓄積症（ISSD）、糖原病、II型ポンペ病、III型ダノン病、およびコレステリルエステル蓄積症が挙げられる。いくつかの実施形態では、疾患は、常染色体劣性大理石骨病である。いくつかの実施形態では、疾患は、ニーマンピックC型疾患である。

【0116】

キット

上記方法における使用に関して記載される材料および構成成分は、キットの調製に適し得る。したがって、本開示は、試料、細胞またはその領域における、pHおよび Ca^{2+} の存在、非存在、または濃度を決定するのに有用な検出キットを提供する。具体的には、上記技術は、試料における1つまたは複数の細胞のpHおよび Ca^{2+} を測定するためのキットを包含する。本開示はまた、試料、細胞またはその領域における、pHおよび Cl^{-} の存在、非存在、または濃度を決定するのに有用な検出キットを提供する。具体的には、上記技術は、試料における1つまたは複数の細胞のpHおよび Cl^{-} を測定するためのキットを包含する。例えば、キットは、本明細書中に記載されるとおりの核酸複合体を含み得る。

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法は、必須の試薬を含む予めパッケージングされた診断キットを利用して、上記技術の方法のいずれかを実施することによって実施され得る。例えば、かかるキットは、細胞もしくはその領域のpHおよび Ca^{2+} を測定するための検出試薬、または細胞もしくはその領域のpHおよび Cl^{-} を測定するための検出試薬を含むであろう。かかるキットの一実施形態では、検出試薬は、本開示の核酸複合体である。オリゴヌクレオチドは、容易に合成されて、様々な配合物で長期間、特に凍結乾燥させたか、または他の場合には粉末形態に乾燥させた場合に安定である。この形態では、オリゴヌクレオチドは、当業者によって使用のために容易に再構成される。キットを使用するのに必要とされる他の試薬および消耗品は、キットの使用を望む当業者によって、容易に同定および生産され得る。キットはまた、上記技術の方法において有用な緩衝液を含み得る。キットは、試薬の使用のための、且つ結果を解釈する説明書を含有し得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、上記技術は、対照としての使用のための1つまたは複数のバイアルにパッケージングした少なくとも1つの試料（例えば、pH標準物質および／または Ca^{2+} 濃度標準物質および／または Cl^{-} 濃度標準物質）を含むキットを提供する。キットの各構成成分は、個々の容器内に封入することができ、各種容器全てが、アッセイを

実施するための、且つキットを使用して実施したアッセイの結果を解釈するための説明書とともに単一パッケージ内に存在し得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、キットは、試料におけるpHおよび Ca^{2+} の測定用のデバイスを含む。いくつかの実施形態では、キットは、試料におけるpHおよび Cl^- の測定用のデバイスを含む。いくつかの実施形態では、デバイスは、細胞培養物、もしくは透明な生物（例えば、線虫）全体におけるpHおよび／または分析物を測定するためのものである。

【0120】

定義

本明細書全体にわたって、文脈が他の状況を要求しない限りは、語句「を含む」および「を包含する」ならびに変化形（例えば、「を含む (comprises)」、「を含んでいる (comprising)」、「を包含する (includes)」、「を包含している (including)」）は、記載した構成成分、特徴、要素、もしくはステップ、または構成成分、特徴、要素もしくはステップの群の包含を含蓄するが、任意の他の整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群の除外を含蓄しないことが理解されよう。

【0121】

本明細書および併記の特許請求の範囲で使用される場合、単数形（「a」、「an」および「the」）は、文脈が明らかに他の状況を指示しない限りは、複数の指示対象物を包含する。

【0122】

本明細書中で使用する場合、「蛍光色素」または「フルオロフォア」は、光によって励起されて、蛍光を放出することができる化学基である。いくつかのフルオロフォアは、光によって励起されて、蛍光を放出し得る。色素は、蛍光ドナー色素からの蛍光シグナルをクエンチングすることが可能なアクセプター色素を包含し得る。

【0123】

本明細書中で使用する場合、「架橋された」は、核酸分子と、目的の別の部分、例えば、 Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアとの間の共有結合を指す。ある特定の実施形態では、核酸分子と、この部分との間の架橋は、水適合性である。ある特定の実施形態では、核酸分子と、この部分との間の架橋は、生理学的条件下で安定である。

【0124】

本明細書中で使用される場合、「核酸」、「ヌクレオチド配列」、または「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの任意の断片を、また天然に存在する分子または合成分子を指す。「ペプチド核酸」または「PNA」という用語は、本明細書中で使用される場合、一般的に、天然核酸の糖ホスフェート骨格が、合成ペプチド骨格で置き換えられた核酸類似体を指す。DNA配列に関連する「RNA等価体」という用語は、参照DNA配列と同じ、ヌクレオチドの直鎖配列で構成されるが、但し、窒素性塩基チミンの出現は全て、ウラシルで置き換えられ、糖骨格は、デオキシリボースに代わって、リボースで構成される。DNA配列に関連する「RNA等価体」は、規定の間隔で、主に同一モノマー単位からなる骨格上に塩基の配列を有する分子であると理解される。塩基は、それらが、オリゴヌクレオチドの塩基に相補的な塩基の配列を有する核酸との結合に進入することができよう、骨格上に配置される。最も一般的なオリゴヌクレオチドは、糖ホスフェート単位の骨格を有する。2'位置に水酸基を有さないオリゴデオキシリボヌクレオチドと、この位置に水酸基を有するオリゴヌクレオチドとの間で区別され得る。オリゴヌクレオチドはまた、水酸基の水素が、有機基、例えば、アリル基で置き換えられる誘導体を含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つのヌクレオチドを含む核酸である。

【0125】

1つの核酸配列は、第2の核酸配列に「相補的であり」得る。本明細書中で使用される場合、「相補的な」または「相補性」という用語は、核酸（即ち、オリゴヌクレオチドま

10

20

30

40

50

たは標的核酸等のヌクレオチドの配列)を関連して使用される場合、塩基対形成の規則によって関連される配列を指す。天然塩基に関して、塩基対形成の規則は、ワトソンおよびクリックが開発した規則である。例えば、配列「T-G-A」に関して、相補的な配列は、「A-C-T」である。相補性は、「部分的」であってもよく、そこでは、核酸の塩基のいくつかのみが、塩基対形成の規則に従って適合される。あるいは、核酸間に「完全な」または「総合的な」相補性が存在し得る。核酸鎖間の相補性度は、核酸鎖間のハイブリダイズの効率および強度に対して影響を与える。

【0126】

本明細書中に記載されるとおりのオリゴヌクレオチドは、相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと水素結合を形成することが可能であり得る。これらの塩基として、A、G、C、TおよびU等の天然塩基、ならびに人工塩基が含まれ得る。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド置換を包含し得る。例えば、人工塩基が、天然塩基に類似した特定の相互作用を示すように、人工塩基または修飾塩基は、天然塩基に代わって使用され得る。

【0127】

別の核酸に相補的なオリゴヌクレオチドは、適切な条件(以下に記載される)下で核酸に「ハイブリダイズする」。本明細書中で使用する場合、「ハイブリダイゼーション」または「ハイブリダイズすること」は、オリゴヌクレオチド単一鎖が、規定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対形成により相補鎖とアニーリングするプロセスを指す。「特異的なハイブリダイゼーション」は、2つの核酸配列が、高度な相補性を共有することの表示である。特異的なハイブリダイゼーション複合体は、許容アニーリング条件下で形成して、任意の続く洗浄ステップ後にハイブリダイズされたままである。低ストリンジェンシーの条件下で結合する「ハイブリダイズ用」配列は、非ストリンジェントな条件(室温で6×SSC/50%ホルムアミド)下で結合するものであり、低ストリンジェンシーの条件(2×SSC、42℃)下で洗浄した場合に結合されたままである。高ストリンジェンシー下でハイブリダイズすることは、洗浄が、2×SSC、65℃(ここで、SSCは、0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.2)で実施される上記条件を指す。

【実施例】

【0128】

本開示のある特定の態様は、下記の実施例によってさらに説明され、それは、範囲および主旨において、本開示を、それらに記載される特定の方法及び材料に限定すると解釈されるべきではない。

【0129】

材料および方法

試薬。化学物質は全て、Sigma社(米国)およびAlfa Aesar社(米国)から購入した。¹H-NMRおよび¹³C-NMRは、CDCl₃およびDMSO-d₆ならびに内部標準として使用されるテトラメチルシラン(TMS)中で、Bruker AVANCE II+, 500MHz NMR分光光度計に記録した。質量スペクトルは、Agilent 6224 Accurate-Mass TOF LC/MSにおいて記録した。蛍光標識されたオリゴヌクレオチドは全て、IDT社(米国)およびIBA社(ドイツ)から購入した。HPLCで精製したオリゴヌクレオチドを、Milli-Q水中に溶解して、ストック溶液100μMを作製し、UV分光光度計を使用して定量化して、-20℃で保管した。エチレングリコール-ビス(β-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、アンピシリン、カルベニシリン(carbencillin)、イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)、ニゲリシンおよびモネンシンは、Sigma社から購入し、イオノマイシンは、Cayman Chemical社(米国)から入手した。硝酸カルシウム四水和物、硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム二塩基性、リン酸ナトリウム一塩基性、硫酸マグネシウム無水物、グリセロール、ウシ血清アルブミン(66kDa)、ニゲリシン、モネンシン、塩化トリブチルスズ(TBT-Cl)およびアミトリプチリン塩酸塩は、Sigma社から入手し、塩化ナト

10

20

30

40

50

リウムは、Alfa Aesar社から購入した。硝酸マグネシウム六水和物、酢酸ナトリウム無水物、炭酸水素ナトリウムは、Fisher Scientific社（米国）から購入した。2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（β-CD）およびU18666Aは、Cayman Chemical社（米国）から購入した。CellLight（登録商標）試薬* BacMam 2.0、DMEMおよびFBSは、Life Technologies社（米国）のmolecular probesから購入した。マレイル化BSA（mBSA）は、確立されたプロトコル（Modira（2009）Nat. Nanotechnol. 4: 325~330頁）に従ってマレイル化した。単分散シリカミクロスフェアは、Cospheric社（米国）から入手した。

【0130】

ゲル電気泳動。12%アクリルアミド [アクリルアミド/ビスアクリルアミド19:1] を含有する非変性ポリアクリルアミドゲルを、ゲル電気泳動に使用した。ゲルは、1×TBE緩衝液（100mM Tris・HCl、89mM ホウ酸、および2mM EDTA、pH8.3）中、4℃で流した。Biorad Universal Hood II Gel Doc System（Bio-Rad Laboratories社）下で、Alexa647およびAlexa546チャンネルに関する画像獲得のためImage Lab（商標）ソフトウェア6.0.0を使用して、ゲルを観察した。測定後、ゲルを、臭化エチジウム（1μg/mL）で染色して、観察した。

【0131】

in vitroでの蛍光測定。蛍光スペクトルは、これまでに確立されたプロトコル（Modira（2009））を使用して、FluoroMax-4分光光度計（Horiba Scientific社、NJ、エジソン）で測定した。表示したpHの、UB4緩衝液（20mM HEPES、MESおよび酢酸ナトリウム、150mM KNO₃、5mM NaNO₃、1mM Ca（NO₃）₂およびMg（NO₃）₂）中の200nMのIMLY、ChlorophoreまたはChlorophore_{LY}を混合して、37℃で30分間インキュベートして、その後、25℃で測定を実施した。in vitroでのpH測定に関して、CalipHluor_{LY}試料を、所望のpHのpHクランピング緩衝液 [CaCl₂（50μM~10mM）、HEPES（10mM）、MES（10mM）、酢酸ナトリウム（10mM）、EGTA（10mM）、KCl（140mM）、NaCl（5mM）およびMgCl₂（1mM）] 中で30nMに希釈して、室温で30分間平衡化した。試料は全て、495nmで励起させて、発光スペクトルを、505nm~750nmで収集した。520nmでのドナー（D）発光強度の、665nmでのアクセプター（A）発光強度に対する比を、pHの関数としてプロットして、pH較正曲線を作成した。2つの独立した実験からのD/Aの平均値およびそれらのS.E.M.を、各pHに関してプロットした。CalipHluor_{LY}のD/Aの倍率変化は、pH4.0およびpH6.5でのD/Aの比から算出した。種々の[Ca²⁺]値でのCalipHluor_{LY}のpH_{1/2}は、ボルツマンシグモイドにフィッティングすることによって、pH較正曲線から導かれた。

【0132】

in vitroでの[Ca²⁺]測定に関して、CalipHluor_{LY}試料を、Ca²⁺クランピング緩衝液 [HEPES（10mM）、MES（10mM）、酢酸ナトリウム（10mM）、EGTA（10mM）、KCl（140mM）、NaCl（5mM）およびMgCl₂（1mM）] 中で30nMに希釈した。[Ca²⁺]の量は、0mM~20mMまで多様であり、種々のpH値（4.5~7.20）に調整した。所与のpHでの遊離[Ca²⁺]の量は、Maxchelatorソフトウェア（maxchelator.stanford.edu）に基づいて算出した。Rhod-5FおよびAlexa647はそれぞれ、5545nmおよび630nmで励起させた。Rhod-5F（O）およびAlexa647（R）に関する発光スペクトルを、それぞれ、570nm~620nm、および660nm~750nmで収集した。2つの独立した実験からのO/Rの平均値およびそれらのS.E.M.を、各[Ca²⁺]に関してプロットした。同様の実

10

20

30

40

50

験を、50 nM CalipHluor^{mLy}を用いて、pH 4.6およびpH 5.1で実施した。580 nmでのRhod-5F (O) 発光強度の、665 nmでのAlexa 647 (R) 発光強度に対する比を、遊離 $[Ca^{2+}]$ の関数としてプロットすることによって、Rhod-5Fの*in vitro*でのカルシウム結合親和性 (K_d) が得られ、シグモイド成長Hill (1) 方程式を使用してフィッティングさせた。

【0133】

【数1】

$$Y = S + (E - S) \times (X^n / (K_d^n + X^n)) \quad (1)$$

Xは、遊離 $[Ca^{2+}]$ であり、Yは、所与の遊離 $[Ca^{2+}]$ でのO/R比であり、Sは、低 $[Ca^{2+}]$ でのO/R比であり、Eは、高 $[Ca^{2+}]$ でのO/R比であり、 K_d は、解離定数であり、nは、Hill係数である。CalipHluor^{Ly}のO/Rにおける倍率変化応答は、高 $[Ca^{2+}]$ でのO/Rおよび低 $[Ca^{2+}]$ でのO/Rの比から算出した。

【0134】

シュテルン-フォルマーのクエンチング定数 K_{SV} の決定。 $[Cl^-]$ に対する強度比A647およびBAC (R/G) を明らかにするChlorophoreおよびChlorophore^{Ly}の*in vitro*での Cl^- 校正曲線。種々の塩化物濃度でのR/Gは、5 mM塩化物での値に対して正規化した。R/G対 $[Cl^-]$ プロットは、 F_0/F 対 $[Cl^-]$ プロットまたはシュテルン-フォルマープロットに等しい。

【0135】

円二色性分光測定。CDスキャンは、温度コントローラーを装備したJasco J-1500 CD分光計で実行した。pH 4.0およびpH 7.5での7 μ M 非標識Chlorophoreを、80 mMリン酸カリウム緩衝液で調製した。続いて、試料を測定して、3回のスキャンの平均値として表す。

【0136】

線虫の方法および株。線虫の維持に関して、標準的な方法を行った。使用した野生型株は、ブリストル由来の線虫単離体である株N2 (Brenner, 1974年)であった。研究に使用した株は、Caenorhabditis Genetics Center (CGC) によって提供され、RRID:WB-STRAIN:RB2510 W08D2.5 (ok3473) およびRRID:WBSTRAIN:VC1242 [+ / mT1 II; cup-5 (ok1698) / mT1 [dpy-10 (e128)] III] である。同様にCGCによって提供されたこの研究で使用されるトランスジェニック体は、体腔細胞内部でGFP融合初期エンドソームマーカーRAB-5を発現するトランスジェニック株であるRRID:WB-STRAIN:NP1129 cdIs131 [pcc1::GFP::rab-5+unc-119 (+)+myo-2p::GFP]、体腔細胞内部でGFP融合後期エンドソーム/リソソームマーカーRAB-7を発現するトランスジェニック株であるRRID:WB-STRAIN:NP871 cdIs66 [pcc1::GFP::rab-7+unc-119 (+)+myo-2p::GFP]、GFPでタグ付けしたリソソームマーカーLMP-1を発現するトランスジェニック株であるRRID:WB-STRAIN:RT258 pwIs50 [lmp-1::GFP+Cbr-unc-119 (+)] および偽体腔において分泌されて、体腔細胞によって取り込まれる体筋においてssGFPを発現するトランスジェニック株であるarIs37 [myo-3p::ssGFP+dpy-20 (+)] Iおよび欠損分解に起因して体腔細胞において肥大したGFP含有小胞を有するトランスジェニック株であるarIs37 [myo-3p::ssGFP+dpy-20 (+)] Icup5 (ar465) である。遺伝子ノックダウンは、Ahringer libraryベースのRNAi法を使用して実施した。使用したRNAiクローンは、L4440空ベクター対照、catp-6 (W08D2.5、Ahringer Library社)、catp-5 (K07E3

10

20

30

40

50

． 7、Ahringer Library社）およびmrp-4（F21G4.2、Ahringer Library社）であった。

【0137】

体腔細胞におけるCalipHluor輸送。体腔細胞におけるCalipHluor輸送は、これまでに記載されるように（Suranaら（2011年）Nat. Commun. 2:340）、GFP::RAB-5（EE）、GFP::RAB-7（LE）およびLMP-1::GFP（Ly）等のエンドソームマーカーを発現するトランスジェニック株で行った。簡潔に述べると、虫にCalipHluor_{A647}（500nM）を注入して、特定の時点の間、インキュベートして、氷上に移した。M9溶液中の40mMのアジ化ナトリウムを使用して、虫に麻酔した。次に、Leica TCS SP5 II STEDレーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica Microsystems社、IL、バッファローグロブ）で、488nm励起用のアルゴンイオンレーザーおよび633nm励起用のHe-Neレーザーを使用して、それぞれGFPおよびAlexa647に適したフィルターセットを用いて、虫をイメージングした。GFPおよびCalipHluor_{A647}の共存は、GFP陽性斑点と共存するCalipHluor_{A647}の数を計数することによって決定され、CalipHluor_{A647}陽性斑点の総数のパーセントとして定量化した（Suranaら（2011年）Nat. Commun. 2:340）。所与の遺伝的背景においてリソソーム標識を確認するために、pwIs50[lmp-1::GFP+Cb-unc-119(+)]において、関連する突然変異体またはRNAiノックダウンに関して、同じ手順を実施した。

【0138】

線虫におけるRNAi実験。関連する遺伝子に対するdsRNAを発現するAhringer RNAi libraryからの細菌を虫に供給して、F1子孫の一日齢の成体において、測定を実行した（KamathおよびAhringer、2003年）。RNAノックダウンは、RT-PCRによってアッセイされる、候補遺伝子のmRNAレベルを精査することによって確認された。簡潔に述べると、トリゾールクロロホルム法を使用して、総RNAを単離した。オリゴ-dTプライマーを使用して、総RNA 2.5μgをcDNAに変換した。RT反応物5μLを使用して、遺伝子特異的なプライマーを使用したPCRを設定した。アクチンmRNAを対照として使用した。PCR産物を、1.5%アガロース-TAEゲルで分離した。

【0139】

細胞培養方法および維持。BHK-21細胞、ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）、ATP13A2において突然変異を保有し、1550C>T（L6025）に対してホモ接合性であるヒト線維芽細胞、J774A.1およびT47D細胞を、10%FBS、100U/mlのペニリシンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを有するDMEM-F12中で培養して、5%CO₂下で37℃に維持した。線維芽細胞AG01518、GM08429、GM00112、GM16195、GM13205、GM03252、GM03393、GM11097、GM18414、GM23162およびGM17910は、Coriell Institute社（NJ、カムデン）から購入し、Coriell Institute社から提示されたプロトコルを用いて培養した。

【0140】

競合実験。HDF細胞を、1×PBS緩衝液で洗浄した後、10μMのマレイル化BSAまたはBSAとともに15分間インキュベートした。次に、細胞を、細胞培養培地中で、1μM Chlorophoreおよび10μMのマレイル化BSAまたはBSAで1時間パルス化した。細胞を1×PBSで3回洗浄した後、イメージングした。A647チャンネルにおける1皿当たり20個の細胞の全細胞強度を定量化した。

【0141】

細胞における共存実験。CellLight（登録商標）Reagents* BacMam 2.0を用いて、製造業者のプロトコルに従って、細胞をLAMP-1-RFPでトランスフェクトした。簡潔に述べると、CellLight（登録商標）Reagen

t sを、細胞1個当たりの最終粒子数20個で細胞に添加して、10時間インキュベートした。続いて、トランスフェクトされた細胞を、0.25 mg/mLの10 kDa FITC-デキストラン (FITC-Dex) で1時間パルス化して、16時間チェイスした後、イメージングを行った。クロストークおよびブリードスルーを測定して、RFPチャネルと、FITC-Dexチャネルとの間で無視できることがわかった。これらの実験により、リソソームのFITC-Dex標識に関して選択したパルスチェイス時点が、LAMP-1 RFPとの約80%共存を示すことが明らかとなった。TMR-Dexで予め標識したリソソームを利用して、Chlorophoreに関する輸送時間スケールを検査した。予め標識した細胞を、1 μ MのChlorophoreでパルス化して、表示した時間、チェイスして、イメージングした。クロストークおよびブリードスルーを記録して、TMRチャネルとA647チャネルとの間で無視できることを発見した (disciver)。ピアソン相関係数 (PCC) は、2つの画像のピクセルバイピクセル共分散を測定する一方で、ピアソン相関係数は、0~1の範囲であり、1は、完全共存を示す。PCCは、ImageJ/Fiji 2.0.0-rc-54/1.51hにおけるツールによって検査した。ピクセルシフト時に、PCC値は、有意に減少して、非ランダム共存を示唆した。pHおよび Ca^{2+} センサーに関して、予め標識した細胞を、500 nMのCalipHluorA647Lyでパルス化して、表示した時間、チェイスして、イメージングした。クロストークおよびブリードスルーを測定して、TMRチャネルとAlexa647チャネルとの間で無視できることを見出した。ピアソン相関係数 (PCC) は、2つの画像のシグナルレベルにおいてピクセルバイピクセル共分散を測定する。PCCを定量化するためのツールは、Fujisoftware社において提供される。ピアソン相関係数 (PCC) は、2つの画像のシグナルレベルのピクセルバイピクセル共分散を測定する。PCCを定量化するためのツールは、Fujisoftware社において提供される。

【0142】

in celluloでのクランピング。これまでに公開されたプロトコルを使用して、Chlorophoreを用いて、pHおよび塩化クランピングを実行した。HDF細胞を、1時間パルス化して、2 μ MのChlorophoreを用いて2時間、チェイスした。標識後、細胞を、4%パラホルムアルデヒド200 mLで、25°Cにて5分間固定した。固定した細胞を、1×PBSで3回洗浄して、50 μ M ニゲリシン、50 μ M モネンシン、および25 μ M 塩化トリブチルスズ (TBT-Cl) も含有する、表示したpHおよび塩化物濃度の塩化物クランピング緩衝液中で、25°Cで1時間インキュベートした。塩化物陽性緩衝液 (150 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, MES, 酢酸ナトリウム) を、塩化物陰性緩衝液 (150 mM KNO_3 , 20 mM $NaNO_3$, 1 mM $Ca(NO_3)_2$, 1 mM $Mg(NO_3)_2$, 10 mM HEPES, MES, 酢酸ナトリウム) に、同じ表示したpHで種々の比で添加することによって、様々な濃度の塩化物イオンを有するクランピング緩衝液を調製した。続いて、細胞を、クランピング緩衝液中でイメージングした。CalipHluor^{mLy}を使用して、pHおよびカルシウムクランピングを実行した。線維芽細胞を、1時間パルス化して、500 nM CalipHluor^{mLy}を用いて2時間、チェイスした。次に、細胞を、4%パラホルムアルデヒド (PFA) 200 mLで、室温にて15分間固定して、3回洗浄して、1×PBS中に保持した。細胞内pHおよびカルシウム較正プロファイルを得るために、様々な量の遊離 [Ca^{2+}] を1 μ Mから10 mMまで変更させることによって、適切なカルシウムクランピング緩衝液 [HEPES (10 mM)、MES (10 mM)、酢酸ナトリウム (10 mM)、EGTA (10 mM)、KCl (140 mM)、NaCl (5 mM) および $MgCl_2$ (1 mM)] 中で、予め固定した細胞をインキュベートすることによって、エンドソームカルシウム濃度を等しくして、種々のpH値に調整した。緩衝液はまた、ニゲリシン (50 μ M)、モネンシン (50 μ M) およびイオノマイシン (20 μ M) も含有し、細胞を、室温で2時間インキュベートした。リアルタイムpHおよびカルシウム測定に関して、線維芽細胞を、500 nM

10

20

30

40

50

のCalipHluor^{mLY}で1時間パルス化して、9時間チェイスした（L0625に関しては、8時間）後、1×PBSで洗浄し、ハンス平衡塩類溶液（HBSS）中でイメージングした。イメージングは、IX83研究倒立顕微鏡（米国のOlympus社、PA、センターバレー）で、100倍の1.42NA、DIC油浸対物レンズ（PLAPON、米国のOlympus社、PA、センターバレー）およびEvolve Delta 512 EMCCDカメラ（Photometrics社、米国）を使用して実行した。

【0143】

単一リソソームクランピング。第1回目の細胞クランピングおよびイメージング後に、クランピング緩衝液を、50 μM ニゲリシン、50 μM モネンシン、および25 μM TBT-Cl、pHまたは[Cl⁻]のいずれかの相違を含有する第2のクランピング緩衝液と交換した。細胞を、第2のクランピング緩衝液中で、室温にて1時間インキュベートして、その後、同じ細胞をイメージングした。

10

【0144】

DNA安定性アッセイ。DNA安定性アッセイを、これまでに記載されるとおり実施した。細胞を、1 mg/mL TMR-Dexで1時間パルス化して、16時間チェイスする。TMR-Dex標識細胞を、2 μMのChlorophoreでパルス化して、イメージングのために表示した時点の間、チェイスする。

【0145】

リソソームpHおよび塩化物測定。線維芽細胞を、2 μMのImLY、ChlorophoreまたはChlorophore^{LY}で1時間パルス化して、9時間チェイスした（J774.A1、BHK-21およびT47D細胞に関しては、30分のパルスおよび1時間のチェイス）後、1×PBSで洗浄して、イメージングに付す。

20

【0146】

リソソームプロトンポンプおよびイオンチャネルブロッカーの添加時の2-IM。リソソーム標識時に、最終濃度500 nM バフィロマイシンA1および300 μMの5-ニトロ-2-(3-フェニルプロピル-アミノ)安息香酸（NPPB）を、細胞に添加して、45分間インキュベートした。続いて、細胞をPBSで洗浄して、各々のブロッカー化合物を含有するハンス平衡塩類溶液（HBSS）中でイメージングした。

【0147】

ニーマンピックA/B型（NP-A/B）およびC型（NP-C）に関する薬理的に誘導した細胞培養モデルの調製。ニーマンピックA/B型およびC型モデルを、これまでに報告された方法に従って調製した。細胞を、65 μMの酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）阻害剤アミトリプチリン（AH）および20 μMのNPC1阻害剤U18666Aとともに、24時間インキュベートして、それぞれNP-A/BおよびNP-Cモデルを創出した。細胞を、2 μMのChlorophore^{LY}および65 μM AHまたは20 μM U18666Aのいずれかで1時間パルス化して、65 μM AHまたは20 μM U18666Aのいずれかで9時間チェイスした後、1×PBSで洗浄して、イメージングする。

30

【0148】

ASMおよびβ-CDを使用したリソソーム集団レスキュー。組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼを、先の方法に従って、NP-A/B患者細胞とともにインキュベートした。NP-A/B患者に由来する初代培養ヒト線維芽細胞を、1% FBSを有するDME M培地中で24時間維持した。続いて、培地を、0.2% BSAおよびrhASM 5 μgを含有する1% FBSを有するDMEMに変更した。24時間後、細胞を、2 μMのChlorophore^{LY}で1時間パルス化して、9時間チェイスした後、1×PBSで洗浄して、イメージングする。NP-C患者由来の初代培養ヒト線維芽細胞を、50 μMのα-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（β-CD）とともに24時間インキュベートした。細胞を、2 μMのChlorophore^{LY}および50 μMのβ-CDで1時間パルス化して、50 μMのβ-CDで9時間チェイスした後、1×PBSで洗浄して、イメージングする。

40

50

【0149】

画像獲得。画像獲得は、広視野IX83倒立顕微鏡（米国のOlympus社、P.A、センターバレー）で、60倍の1.42NA、位相差油浸対物レンズ（PLAPON、米国のOlympus社、P.A、センターバレー）およびEvolve Delta 512 EMCCDカメラ（Photometrics社）を使用して実行した。使用されるフルオロフォアに適したフィルターホイール、シャッターおよびCCDカメラは、Metamorph Premier Ver 7.8.12.0（Molecular Devices社）を使用して制御した。同日の画像を、同じ獲得設定下で獲得した。Alexa488チャンネル画像（D）は、480/20バンドパス励起フィルター、520/40バンドパス発光フィルターおよび89016-ET-FITC/Cy3/Cy5二色性フィルターを使用して得られた。Alexa647チャンネル画像（A）は、640/30バンドパス励起フィルター、705/72バンドパス発光フィルターおよび89016-ET-FITC/Cy3/Cy5二色性フィルターを使用して得られた。FRETチャンネル画像は、480/20バンドパス励起フィルター、705/72バンドパス発光フィルターおよび89016-ET-FITC/Cy3/Cy5二色性フィルターを使用して得られた。Rhod-5Fチャンネル画像（O）は、545/25バンドパス励起フィルター、595/50バンドパス発光フィルターおよび89016-ET-FITC/Cy3/Cy5二色性フィルターを使用して得られた。共焦点画像は、63倍の1.4NA、油浸対物レンズを装備したLeica TCS SP5 II STEDレーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica Microsystems社、IL、バッファローグロブ）で獲得した。Alexa488は、488nm励起用のアルゴンイオンレーザーを使用して、Alexa647は、633nm励起用のHe-Neレーザーを使用して、Rhod-5Fは、561nm励起用のDPSSレーザーを使用して、各フルオロフォアに適した二色性フィルター、励起フィルター、および発光フィルターセットを用いて励起させた。

【0150】

pHおよびCl⁻センサーに関する画像解析。画像は、ImageJ/Fiji 2.0.0-rc-54/1.51hで解析した。pHおよび塩化物測定は、これまでに記載されるように実施する。密度プロットを作成して、リソソーム集団を表すために、個々のD/A（Y軸）対相当するR/G（X軸）値をまず、およそ60個の細胞およびおよそ600個のリソソームを含む所与の線維芽細胞試料に関して得られる各リソソームに関してプロットした。密度プロットは、2D Kernel Density plot on Origin 2018 SR1 b9.5.1.195（OriginLab社、米国）を使用して作成した。これは、個々の散乱点を、蓋然性密度関数として集団行列に変換した。続いて、密度プロットは、疑似着色されて、高密度を赤色で（1に近い値）、また低密度を青色で（0に近い値）表す。プロット上の10%未満の蓋然性を有する点は捨てた。日数間での正規化に関して、正常なHDF細胞の最高密度の点（値=1）を、x, y座標（1, 1）でプロットの中心として指定した。異なる日数で行われる実験間の正規化に関して、正常なHDF細胞の試料のリソソームpHおよびCl⁻を同様に常に測定し、その密度プロットは、参照として機能を果たした。したがって、同日に同じ設定を用いて獲得した密度プロットは全て、HDF細胞密度プロットに対して正規化されて、異なる日数にわたるデータの比較を可能にした。

【0151】

データは、下記の通りに正規化した。参照HDF細胞密度プロットのD/AおよびR/Gの最大値ならびに最小値は、参照点とみなされて、所与の試料のリソソームプロファイルのX軸およびY軸整列させた。これらの最大および最小は、それぞれ密度プロットのリソソームプロファイルの25%および75%とみなされた。したがって、新たに得られたHDF細胞データのD/AおよびR/Gの最大および最小は、それらが重なり合うように、これに調整された。続いて、密度プロファイルの中心（最高密度を示す点）は、x=1、y=1の座標に調整された。同じ組の実験における他の試料由来の密度プロットは、HDF細胞データ組を、参照HDF細胞データ組と整列させるのに使用される同一パラメー

ターを使用して整列させた。異なる日数で実施した独立した実験から得られたHDF細胞の密度プロットを正規化して、図23に示し、この方法の再現性を実証する。

【0152】

pHおよび Ca^{2+} センサーに関する画像解析。単一エンドソームにおけるpHおよびカルシウムの定量化用の画像解析は、カスタムMATLAB（登録商標）コードを使用して行った。各細胞に関して、最も集中的な平面が、Alexa 647チャンネルにおいて手動で選択された。この画像および他のチャンネルにおける同じz位からの相当する画像をプログラムに入力した。次に、異なるチャンネルからの画像を、Enhanced Cross Correlation Optimizationを使用して整列させた。エンドソームの位置を決定するために、まず低い閾値を使用して、細胞全体を選択した。続いて、細胞内の領域のみが、エンドソーム選択に関して認められた。個々のエンドソームに相当する目的の領域は、Sauvolaの方法を使用して、適応閾値化によってAlexa 647チャンネルにおいて選択された。初期選択は、流域分割およびサイズフィルタリングによってさらに精製された。分割後、目的の領域を各画像において検査して、選択誤差を手動で補正した。細胞境界環状領域を使用して、細胞周辺の10ピクセル幅を選択および使用して、各画像におけるバックグラウンド強度を算出した。次に、平均蛍光強度を、ドナー（D）、アクセプター（A）、Rhod-5F（O）およびAlexa 647（R）チャンネルにおける各エンドソームにおいて測定して、細胞およびチャンネルに相当するバックグラウンド強度を除去した。次に、強度の2つの比（ D/A および O/R ）を各エンドソームに関して計算した。各分布の平均 D/A は、pHの関数としてプロットされて、*in vivo*でのpH較正曲線が得られた。各分布の平均 O/R は、遊離 $[\text{Ca}^{2+}]$ の関数としてプロットされて、*in vivo*での Ca^{2+} 較正曲線を作成した。疑似カラーpHおよび Ca^{2+} 画像は、それぞれ、1ピクセル当たりの D/A および O/R 比を測定することによって得られた。

【0153】

pHおよび $[\text{Ca}^{2+}]$ の*in vivo*での測定。CalipHluorLyの*in vivo*でのpH較正実験を、これまでに確立されたプロトコル（Modira, 2009年; Suranaら, 2011年）を使用して実行した。簡潔に述べると、CalipHluorLy（500nM）を、若年成体虫の疑体腔において、産卵口の反対側で微量注入した。微量注入後、体腔細胞リソソームの最大標識のため、虫を、22°Cで2時間インキュベートした。次に、虫を、イオノフォアアニゲリシン（50 μM ）、モネンシン（50 μM ）およびイオノマイシン（20 μM ）を含有する所望のpH溶液のクランピング緩衝液 $[\text{CaCl}_2$ （50 μM ~10mM）、HEPES（10mM）、MES（10mM）、酢酸ナトリウム（10mM）、EGTA（10mM）、KCl（140mM）、NaCl（5mM）および MgCl_2 （1mM）]中に浸した。虫の角質を穿孔して、身体への緩衝液の進入を促進させた。クランピング緩衝液中の75分のインキュベーション後、広視野顕微鏡法を使用して、体腔細胞をイメージングした。10匹の虫それぞれを用いた3回の独立した測定を、各pH値に関して行った。

【0154】

CalipHluorLyを使用して、 Ca^{2+} クランピング測定を実行した。虫に、CalipHluorLy（500nM）を注入して、22°Cで2時間インキュベートした。2時間後、遊離 $[\text{Ca}^{2+}]$ の量を1 μM から10mMまで変更させることによって、虫を、 Ca^{2+} クランピング緩衝液 $[\text{HEPES}$ （10mM）、 MES （10mM）、酢酸ナトリウム（10mM）、EGTA（10mM）、KCl（140mM）、NaCl（5mM）および MgCl_2 （1mM）]中に浸して、種々のpH値（5.3~6.5）に調整した。10匹の虫それぞれを用いた3回の独立した測定を、 Ca^{2+} 値に関して行った。

【0155】

初期エンドソームおよび後期エンドソームのpHならびに遊離 $[\text{Ca}^{2+}]$ 測定を、CalipHluorLyを使用して実行し、リソソームのpHおよび遊離 $[\text{Ca}^{2+}]$ 測定を

、CalipHluorLyを使用して実行した。リアルタイムpHおよび $[Ca^{2+}]$ 測定に関して、10匹の雌雄同体に、それぞれ、EE、LEおよびLyに関して、500nMのCalipHluorおよびCalipHluorLyを注入し、表示した時点の間（EE 5分、LE 17分、およびLy 60分）インキュベートした。M9溶液中の40mMのアジ化ナトリウムを使用して、虫に麻酔して、広視野顕微鏡法でイメージングした。画像解析は、画像解析において記載されるように、カスタムMATLAB（登録商標）コードを使用して実行した。

【0156】

EE、LEおよびLyにおけるpH補正した $[Ca^{2+}]$ の計算。Ly、LEおよびEEにおけるD/AおよびO/R比を、単一エンドソーム分解能で、上述するようにCalipHluorLyおよびCalipHluorを使用して測定した。100個を超えるエンドソームを、虫における各測定において解析して、D/Aのガウスの広がりを作成した。平均値±2倍のS.D（S.D＝標準偏差）の範囲の外側に収まるおよそ5%のエンドソームを、EE、LEおよびLyにおける測定に関する閾値として設定した。pH補正した $[Ca^{2+}]$ 値を得るために、それぞれのエンドソームにおけるpH値を、単一エンドソーム分解能で、それらのD/A比から測定した。エンドソームにおけるpH値は、in vivoでのpH較正曲線から得られる方程式（2）を使用して算出した、

【0157】

【数2】

$$pH = pH_{1/2} + [0.3 \ln \left(\left(\frac{K_1 - K_2}{Y - K_2} \right) - 1 \right)] \quad (2)$$

K_1 、 K_2 および $pH_{1/2}$ は、in vivoでのpH較正曲線のボルツマンフィットから得られるパラメーターを表し、Yは、所与のエンドソームにおけるD/A比を表す。

【0158】

次に、CalipHluorLyの K_d および低 $[Ca^{2+}]$ O/Rから高 $[Ca^{2+}]$ までのCalipHluorLyのO/R比の倍率変化応答を、pHの関数として得た。in vitroおよびin vivoでの K_d は、Hill方程式（1）にフィッティングすることにより Ca^{2+} 較正曲線をフィッティングすることによって、4.5～7.2の範囲の種々のpH点で測定した。in vitroおよびin vivoでの $[Ca^{2+}]$ 較正曲線から、CalipHluorLyの K_d を、下記の方程式（3）を使用して、pHの関数としてプロットした、

【0159】

【数3】

$$K_d = 1.03 + 5.14 \times 10^{12} \times e^{\left(-\frac{pH}{0.189}\right)} + 3.108 \times 10^6 \times e^{\left(-\frac{pH}{0.412}\right)} \quad (3)$$

【0160】

方程式（3）を使用することによって、CalipHluorLyの K_d を、EE、LEおよびLyにおいて、任意の所与のpHで推定することができる。O/R_{max}（即ち、高 $[Ca^{2+}]$ でのO/R比）は、10mMの遊離 $[Ca^{2+}]$ で、種々のpH点で虫をクランピングすることによって得られた。in vitroおよびin vivoでの $[Ca^{2+}]$ 較正曲線により、CalipHluorLyが、種々のpH点で、1μM～10mMのO/Rのその倍率変化応答を保持することが示された。O/R_{min}（即ち、低 $[Ca^{2+}]$ でのO/R比）値を、pHの関数として、倍率変化応答から算出して（4）、O/R_{max}に対して正規化した。

【0161】

【数4】

$$O/R_{\min} = \frac{1}{4.24 + 0.12 \times \exp(0.5 \times pH)} \quad (4)$$

【0162】

上述するように、EE、LEおよびLyにおけるpHを、単一エンドソーム分解能で方程式（2）を使用することによって、D/Aから測定した。pHおよびO/Rを使用して、方程式（3）および（4）から、K_dおよびO/R_{min}を算出した。最終的に、K_d、O/R_{min}、O/RおよびO/R_{max}を下記方程式において代入して、エンドソームレベルによるエンドソームにおけるpH補正した遊離 [Ca²⁺] 値を得た。

10

【0163】

【数5】

$$\text{遊離 } [Ca^{2+}] = K_d \times \left[\frac{O/R - O/R_{\min}}{O/R_{\max} - O/R} \right] \quad (5)$$

【0164】

EE、LEおよびLyにおけるpHおよび[Ca²⁺] 値に関して、10匹の虫それぞれを用いて3回の独立した測定を行った。

【0165】

20

画像解析—pH補正した[Ca²⁺] 画像。方法のセクションにおいて言及するように、共焦点顕微鏡法を使用して、高分解能画像を獲得した。画像は、4つのチャンネル（Alexa488、FRET、Rhod-5FおよびAlexa647チャンネル）において獲得され、単一エンドソーム分解能で、pHおよび[Ca²⁺] を定量化した。Ca²⁺測定においてpH構成成分を埋め合わせるために、単一エンドーリソーム区画でのCalipHluorLyのK_dは、上記で論述したK_d較正プロットに基づいて算出した。エンドーリソームのpHは、生理学的pH（4.0～6.5）にわたって較正されたドナー／アクセプター値を測定することによって定量化した。ドナー（D）およびアクセプター（A）画像は、虫の外側のROIを引くことによって、バックグラウンド除去した。ドナー（D）画像を二重反復して、閾値を設定して、バイナリマスクを作成した。続いて、バックグラウンド除去したドナーおよびアクセプター画像を、バイナリマスクを用いて増やして、加工処理されたドナーおよびアクセプター画像を得た。この加工処理されたドナー（D）画像を、加工処理されたアクセプター（A）画像で分割して、ImageJのImage計算機モジュールを使用して、疑似カラーD/A画像を得た。pH値は、in vivoおよびin vitroでのpH較正プロットから定式化した方程式（2）を使用することによって算出した。

30

【0166】

図3に示されるように、疑似カラーのpH画像を加工処理して、K_d画像を得た。CalipHluorLyのK_dは、pHの関数であり、この関係は、方程式（3）を使用して、in vivoおよびin vitroでK_d較正プロットによって定式化される。K_d画像に対するpH画像の画像処理に関して、バックグラウンドを、ゼロではない値に設定した。K_d画像は、カルシウムに対するCalipHluorLyの親和性を表し、したがって、カルシウム画像（O/R）をK_dで埋め合わせることにより、単一エンドーリソームでカルシウムレベルが正確に表される。pH依存性K_d埋め合わせは、方程式（5）に従って実施され、式中、O/R_{max}およびO/R_{min}は、それぞれ、10mMおよび1μMで、CalipHluorでコーティングされたビーズをインキュベートすることによって算出される。画像算出は、ImageJにおける画像計算機モジュールを使用して行われた。この画像を、バイナリ画像で乗じて、バックグラウンド値をゼロにした。pH補正されたK_d画像を、リソソームにおけるカルシウムレベルの正確な比較のため、様々な突然変異体に関して得た。

40

50

【0167】

生存アッセイ。+ / mT1 II ; cup-5 (ok1698) / mT1 [dpy-10 (e128)] III 線形動物株をこのアッセイに使用した。cup-5 遺伝子のホモ接合性致死の欠失は、dpy-10 でマークされたトランスロケーションによって平衡化される。ヘテロ接合体は、表面上は野生型 [cup5 + / -] であり、Dpy (mT1 ホモ接合体) は、不稔性であり、cup-5 (ok1698) ホモ接合体は、致死性である。cup5 + / - L4 虫を、L4440 空ベクター (陽性対照)、mrp-4、catp-6、catp-5 および clh-6 用の RNAi 細菌株を含有するプレート上に配置させた。これらの虫は、24 時間成長して、産卵し、その後、成体虫をプレートから取り出した。卵を孵化させて、3 日間成体へと成長させた。次に、虫プレートを、Olympus SZX-Zb12 Research Stereomicroscope (米国の Olympus 社、PA、センターバレー) 下で、Zeiss AxioCam カラー CCD カメラ (Carl Zeiss Microscopy 社、NY、ソーンウッド) を用いてイメージングした。画像を、ImageJ ソフトウェアを使用して解析して、プレート 1 つ当たりの成体虫の数を計数した。各 RNAi バックグラウンドに関して、3 つの独立したプレートを使用した。

10

【0168】

リソソームサイズ回収アッセイ。arIs37 [myo-3p :: ssGFP + dpy-20 (+)] I. cup-5 (ar465) は、体筋細胞から GFP を分泌するトランスジェニック線形動物株であり、これは、cup5 突然片によって引き起こされる欠損分解の結果として肥大した GFP 標識小胞を示す体腔細胞によって取り込まれる。これまでのアッセイと同様に、arIs37 ; cup-5 (ar465) L4 虫を、空ベクター (対照)、catp-6、catp-5 および mrp-4 (陽性対照) 用の RNAi 細菌株を含有するプレート上に配置させた。24 時間、産卵し、その後、虫をプレートから取り出す。結果として、卵は孵化して、成人期へと成長し、その後、それらをイメージングして、リソソームのサイズの相違に関して検査した。虫は、63 倍の 1.4 NA、油浸対物レンズを装備した Leica TCS SP5 II STED レーザー走査型共焦点顕微鏡 (Leica Microsystems 社、IL、バッファローグローブ) で、Alexa 488 nm チャンネルにおけるアルゴンレーザーによる励起時に、虫をイメージングした。リソソーム面積を、ImageJ を使用して測定した。arIs37 虫における 100 個のリソソームのうち、7 個のリソソームが、 $7.0 \mu\text{m}^2 \sim 9.5 \mu\text{m}^2$ の範囲の面積を有した。肥大したリソソームは、その直径が、正常な N2 虫で観察される最大リソソームの直径の 33% 以上であるリソソームと定義される。arIs37 ; cup-5 (ar465) 虫におけるリソソーム面積は、様々な RNAi 細菌含有プレートにおいて測定された。リソソームサイズ回復データは、総リソソーム面積に対する、大きなリソソームによって占有される面積の割合としてプロットした ($n = 15$ 個の細胞、100 個を超えるリソソーム)。

20

30

【0169】

CalipHluor^{MLY} のビーズ較正。CalipHluor^{MLY} でコーティングされた $0.6 \mu\text{m}$ の単分散シリカミクロスフェア (Cospheric 社、米国) を使用して、ビーズ較正を実施した。簡潔に述べると、シリカミクロスフェアを、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} = 5.1$) および 500 mM NaCl 中の $5 \mu\text{M}$ CalipHluor^{MLY} の溶液中で 1 時間インキュベートした。この結合溶液を遠心沈降させて、ビーズをクランピング緩衝液 [HEPES (10 mM)、MES (10 mM)、酢酸ナトリウム (10 mM)、EGTA (10 mM)、KCl (140 mM)、NaCl (500 mM) および MgCl_2 (1 mM)] 中に再構成させた。[Ca^{2+}] の量を、約 0 mM から 10 mM まで変化させて、pH を、pH 4.6 または pH 5.1 のいずれかに調整した。ビーズをクランピング緩衝液中で 30 分間インキュベートして、その後、G、O および R チャンネルにおいて、IX83 倒立顕微鏡上のスライド上でイメージングして、G/R (pH) および O/R (Ca^{2+}) 画像を得た。

40

50

【0170】

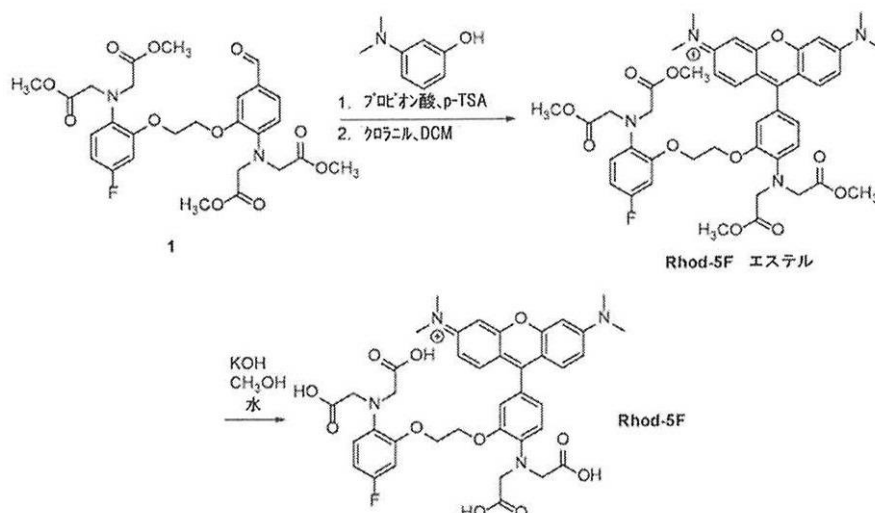
細胞における競合実験。HDF細胞を1×PBS緩衝液pH7.4で洗浄した後、標識した。細胞を、10μMのマレイル化BSA (mBSA) またはBSAとともに15分間インキュベートして、500nM CalipHluorTMおよび10μMのmBSAまたはBSAを含有する培地で1時間パルス化して、受容体媒介性エンドサイトーシスによる内部移行を可能にし、1×PBSで3回洗浄した後、広視野顕微鏡下でイメージングした。Alexa647チャンネルにおける全細胞強度を、1皿当たり30個を超える細胞に関して定量化した。3回の異なる実験からの平均強度を、自己蛍光に関して正規化して、内部移行された割合として示した。

【0171】

実施例1：Ca²⁺フルオロフォアの調製

【0172】

【化4】



【0173】

BAPTA-5Fアルデヒド (1) を、これまでに報告された手順に従って合成した (Grynkiiewiczら (1985) J. Biol. Chem. 260:3440~3450頁; Collotら (2015) eLife 4:e05808)。POCl₃ (1.12g、7.3mmol) を0℃でDMF (5mL) に添加して、10分間攪拌した。10分後、DMF (3mL) 中のBAPTA-5F (1.6g、2.9mmol) を上記溶液に添加して、65℃に加熱した。反応の完了後、反応混合物を水中に注いで、NaOH (1M) 水溶液を添加することによって、pHを6.0に調整した。生成物を酢酸エチル (3×50mL) で抽出して、溶媒を蒸発させた。溶離液としてヘキサン/EtOAc (70/30~60/40) を使用したシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって、粗生成物を精製して、収率65%でBAPTA-5Fアルデヒド (1) を得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} 9.80 (s, 1H), 7.30-7.45 (m, 2H), 6.83 (t, 1H, J = 7 Hz), 6.76 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.59 (t, 2H, J = 8 Hz), 4.40 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 4.35 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 4.33 (s, 4H), 4.22 (s, 4H), 3.59 (s, 6H), 3.57 (s, 6H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} 190.5, 171.8, 171.2, 159.4, 157.5, 151.4, 151.3, 149.6, 145.1, 135.6, 135.5, 130.0, 126.9, 120.3, 120.2, 116.6, 110.8, 107.3, 107.1, 101.3, 101.1, 67.1, 67.0, 53.5, 53.4, 51.9, 51.7. HRMS (ESI) m/z: [M]⁺ C₂₇H₃₁FN₂O₁₁⁺の計算値578.1912, 実測値: 578.1927.

【0174】

プロピオン酸 (4mL) 中のBAPTA-5Fアルデヒド (1) (50mg、0.086mmol) の溶液に、3-(ジメチルアミノ)フェノール (26mg、0.19mmol) およびp-トルエンスルホン酸 (p-TSA) (1.5mg、0.009mmol)

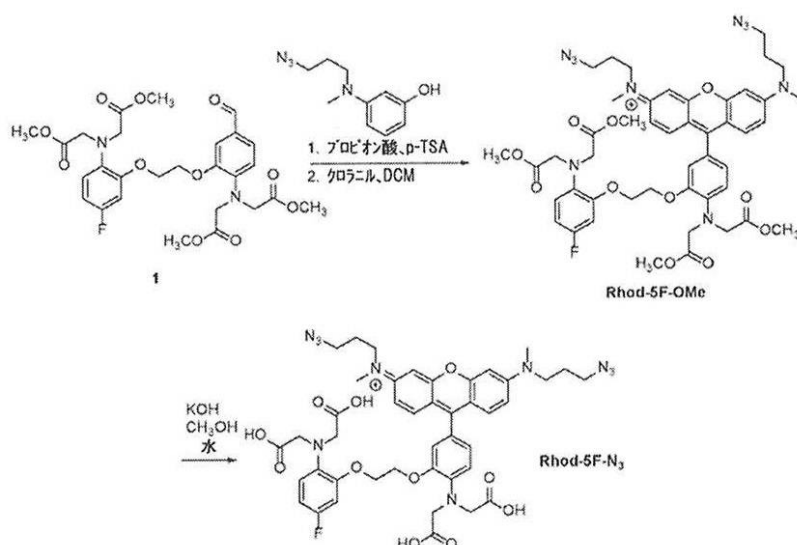
を添加して、室温で12時間攪拌した。12時間後、ジクロロメタン(3 mL)中のクロラニル(21 mg、0.086 mmol)を、上記混合物に添加して、室温で一晩攪拌した。反応の完了後、粗生成物をジクロロメタン(3×30 mL)で抽出した。続いて、溶離液としてジクロロメタン/メタノール(95/5~90/10%)を使用したシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって、粗生成物を精製して、収率35%で濃赤色固体としてRhod-5Fエステルを得た。LCMS (ESI) m/z: $[M]^+$ $C_{43}H_{48}FN_4O_{11}^+$ の計算値815.3298, 実測値: 815.5。Rhod-5Fエステル(5 mg、0.006 mmol)を、メタノールおよび水混合物(1:0.5 mL)中に溶解して、そこに、KOH(3.5 mg、0.063 mmol)を添加して、室温で8時間攪拌した。反応の完了後、溶液pHを6.0に調整して、粗製Rhod-5Fをジクロロメタン(3×5 mL)で抽出した。HPLC(50:50 アセトニトリル/水、0.1% TFA)によって生成物を精製して、Rhod-5Fを得た。LCMS (ESI) m/z: $[M]^+$ $C_{39}H_{40}FN_4O_{11}^+$ の計算値759.2672, 実測値: 759.4。

【0175】

実施例2: 架橋にすぐ使用できる Ca^{2+} フルオロフォアの調製

【0176】

【化5】



【0177】

DMSO(8 mL)中の1-ブロモ-3-クロロプロパン(1 g、6.4 mmol)の溶液に、アジ化ナトリウム(0.5 g、7.7 mmol)を添加して、室温で12時間攪拌した。反応の完了後、混合物を水で希釈して、生成物をヘキサンで抽出して、1-アジド-3-クロロプロパンを得た。次に、ヨウ化ナトリウム(1.5 g、10 mmol)を、アセトン(25 mL)中の1-アジド-3-クロロプロパン(1 g、8.4 mmol)の溶液に添加して、室温で8時間攪拌した。反応の完了後、溶媒を真空下で蒸発させた。粗生成物を、 $Na_2S_2O_3$ の飽和溶液で希釈して、未反応のヨウ素をクエンチした後、酢酸エチル(3×50 mL)で化合物を抽出した。これを、 Na_2SO_4 で乾燥させて、生成物1-アジド-3-ヨードプロパンを、精製せずにさらなる反応に使用した。

【0178】

アセトン(30 mL)中の3-アミノフェノール(1 g、9.2 mmol)の溶液に、炭酸カリウム(2.5 g、18.4 mmol)を添加して、室温で20分間攪拌した。20分後、ヨードメタン(1.3 g、9.2 mmol)を添加して、混合物を室温で8時間、さらに攪拌した。反応の完了後、溶媒を蒸発させて、粗生成物をジクロロメタン(3×30 mL)で抽出した。この後、溶離液としてヘキサン/酢酸エチル(80/20%)を使用したシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによってクロマトグラフィーによ

て粗生成物を精製して、収率 45 % で 3- (メチルアミノ) フェノールを得た。

【0179】

DMF (8 mL) 中の 3- (メチルアミノ) フェノール (1 g、8.1 mmol) の溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.26 g、9.7 mmol) を添加して、室温で 20 分間攪拌した。20 分後、1-アジド-3-ヨードプロパン (1.7 g、8.1 mmol) を上記反応混合物に添加して、65 °C で 8 時間加熱した。反応の完了後、溶媒を蒸発させて、粗生成物をジエチルエーテル (3 × 40 mL) で抽出した。続いて、溶離液としてヘキサン/酢酸エチル (90/10 %) を使用したシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって、粗生成物を精製して、収率 72 % で 3- ((3-アジドプロピル) (メチル) アミノ) フェノール液体を得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} 7.09-7.13 (m, 1H), 6.3 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.21 (dd, 2H, J = 2 Hz, 8.5 Hz), 3.42 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 3.38 (t, 2H, J = 7 Hz), 2.94 (s, 3H), 1.87 (t, 2H, J = 6.5 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} 156.7, 150.7, 130.2, 105.1, 103.5, 99.3, 49.8, 49.2, 38.6, 26.3. HRMS (ESI) m/z: [M]⁺ C₁₀H₁₄N₄O⁺ の計算値 206.1168, 実測値: 206.1177.

【0180】

プロピオン酸 (4 mL) 中の BAPTA-5F アルデヒド (1) (50 mg、0.086 mmol) 溶液に、3- ((3-アジドプロピル) (メチル) アミノ) フェノール (40 mg、0.19 mmol) および p-トルエンスルホン酸 (p-TSA) (1.5 mg、0.009 mmol) を添加して、室温で 12 時間攪拌した。12 時間後、ジクロロメタン (3 mL) 中のクロラニル (21 mg、0.086 mmol) を上記反応混合物に添加して、室温で一晩攪拌した。反応の完了後、溶媒を蒸発させて、粗生成物をジクロロメタン (3 × 20 mL) で抽出した。次に、溶離液としてジクロロメタン/メタノール (95/5 ~ 90/10 %) を使用したシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって、粗生成物を精製して、収率 30 % で濃赤色固体として Rhod-5F-OMe を得た。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ_{ppm} 7.55 (d, 2H, J = 8 Hz), 7.15-7.16 (m, 3H), 7.00-7.04 (m, 3H), 6.88 (dd, 2H, J = 3 Hz, 9 Hz), 6.75 (dd, 1H, J = 6 Hz, 9 Hz), 6.65 (td, 1H, J = 3 Hz, 6 Hz), 4.20-4.30 (m, 8H), 4.02 (s, 4H), 3.71 (t, 4H, J = 7 Hz), 3.53 (s, 6H), 3.47 (s, 10H), 3.25 (s, 6H), 1.88 (q, 4H, J = 7 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ_{ppm} 171.2, 171.1, 158.3, 157.3, 156.4, 156.1, 140.7, 135.2, 135.1, 131.9, 123.6, 123.1, 119.1, 116.8, 114.9, 114.4, 106.4, 106.2, 101.2, 101.0, 96.4, 67.3, 67.2, 54.9, 53.2, 53.0, 51.5, 51.2, 49.7, 48.6, 48.1, 26.0, 22.1. HRMS (ESI) m/z: [M]⁺ C₄₇H₅₄FN₁₀O₁₁⁺ の計算値 953.3952, 実測値: 953.3967.

【0181】

Rhod-5F-OMe (5 mg、0.005 mmol) を、メタノールおよび水混合物 (1:0.5 mL) 中に溶解して、KOH (3.5 mg、0.063 mmol) を添加して、室温で 8 時間攪拌した。反応の完了後、pH を 6.0 に調整して、粗製 Rhod-5F-N₃ をジクロロメタン (3 × 5 mL) で抽出した。生成物を HPLC (1:1 アセトニトリル:水、0.1 % TFA) によって精製した。LCMS (ESI) m/z: [M]⁺ C₄₃H₄₆FN₁₀O₁₁⁺ の計算値 897.33, 実測値: 897.5.

【0182】

実施例 3: Ca²⁺ フルオロフォアコンジュゲートの調製

Rhod-5F-N₃ (25 μM) を、pH 7.0 の KCl (100 mM) を含有するリン酸ナトリウム (10 mM) 緩衝液 100 μL 中の 5 μM のジベンゾシクロオクチン (DBCO) 標識一本鎖核酸分子に添加して、室温で一晩攪拌した。反応の完了後、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.5) 10 μL およびエタノール 250 μL を反応混合物に添加して、DNA 沈殿のため -20 °C で一晩保持した。続いて、反応混合物を 14000 rpm で、4 °C にて 20 分、遠心分離して、未反応の Rhod-5F-N₃ を除去して、沈殿物をエタノール中に再懸濁させて、遠心分離した。未反応の Rhod-5F-N₃ の完全な

除去のため、この手順を3回繰り返した。Rhod-5Fコンジュゲートは、1×TBE緩衝液中（Tris HCl（100mM）、ホウ酸（89mL）、EDTA（2mM）、pH8.3）中に15%（19：1 アクリルアミド：ビスアクリルアミド）を含有する非変性ポリクリルアミドゲルを流すことによって、ゲル電気泳動により確認された。

【0183】

実施例4：本開示の核酸複合体の調製

CalipHluor、CalipHluor_{Ly}およびCalipHluor^{mLy}を形成するために使用される配列を、表1に提供する。D1およびD2は、CalipHluor_{Ly}を形成するために使用され、OG-D1およびD2は、CalipHluor^{mLy}を形成するために使用された。D1におけるプロモシトシンは、太字で下線を付してある。O1-A488、O2-A647およびO3鎖は、CalipHluorを形成するために使用された。

【0184】

Rhod-5Fをまず、実施例3に提供されるように、D2鎖またはO3-DBCO鎖にコンジュゲートした。CalipHluor_{Ly}およびCalipHluor^{mLy}試料を調製するために、5μMのD1またはOG-D1および5μMのRhod-5FコンジュゲートD2鎖を、100mMのKClを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）中で当モル比で混合した。溶液を90℃に15分間加熱して、15分当たり5℃で室温まで冷却して、4℃で一晩保持した（Modira（2009年）Nat. Nanotechnol. 4：325～330頁）。CalipHluorに関しては、5μMのO1-A488、5μMのO2-A647および5μMのRhod-5FコンジュゲートO3鎖を、100mMのKClを含有するpH5.5の10mMリン酸ナトリウム緩衝液中で当モル比で混合した。溶液を90℃に15分間加熱して、15分当たり3℃で室温まで冷却して、4℃で一晩保持した。

【0185】

【表1】

表1

鎖	配列情報（配列番号）
D1	5'- Alexa 488 - CCC CTA ACC CCT AAC CCC TAA CCC CAT ATA TAT CCT AGA ACG ACA GAC AAA CAG TGA GTC - 3' (配列番号：01)
D2	5'- DBCO - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA /iAlexa 647N/ AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT-3' (配列番号：02)
O1-A488	5'- Alexa - 488 - CCCCCAACCCCAATACATTTTACGCCTGGTGCC - 3' (配列番号：03)
O2-A647	5'- CCGACCGCAGGATCCTATAAAACCCCAACCCC - Alexa 647 - 3' (配列番号：04)
O3-DBCO	5'-TTA TAG GAT CCT GCG GTC GG /DBCON/ GGC ACC AGG CGT AAA ATG TA -3' (配列番号：05)
OG-D1	5'-Oregon Green - AT AAC ACA TAA CAC ATAACAAAA TAT ATA TCC TAG AAC GAC AGA CAA ACA GTG AGT C - 3' (配列番号：06)

【0186】

CalipHluor_{Ly}およびCalipHluorの形成は、非変性および変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を使用して、電気泳動移動度アッセイによって検証した。DBCO標識鎖（CalipHluor_{Ly}に関してはD2鎖およびCalipHluorに関してはO3-DBCO鎖）に対するRhod-5F-N3の銅を含まないクリック反応は、120Vで3時間、1×TBE中で15%変性PAGEを流すことによって検証された。10kDa（DBCO鎖）への、1kDa（Rhod-5F）の添加に起因した、Rhod-5Fコンジュゲート鎖のよりゆっくりとした移動度。Rhod-5Fコンジュゲーションは、TMRチャンネルにおいてゲルを記録することによってさらに確認され、ここでは、より低い移動度が、強力な蛍光を示す。Rhod-5F標識鎖を精製して、方法のセクションに記載されるように、正規化およびpHセンシングモジュールとハイブリダイズさせた。12%非変性PAGEを流して、完全なセンサーの形成の特

性化した。12%アクリルアミド：ビスアクリルアミドは、二重鎖DNAをssDNAと分離させる。より高い分子量によるCalipHluor_{Ly}およびCalipHluorのゆっくりした移動度により、非常に高収率（99%を超える）での形成が検証される。これにより、よりゆっくりした移動度バンドが、Alexa488、TMR（Rhod-5F）およびAlexa647チャンネルでの蛍光を示すことがさらに確認された。

【0187】

実施例5：本開示の核酸複合体のin vitroでの特性化

CalipHluor_{Ly}は、2つの鎖D1およびD2を含む57塩基対DNA二本鎖であり、3つの別個のドメインを保有する（図1A、表1）。CalipHluor_{Ly}における第1のドメインは、Rhod-5Fと示されるCa²⁺指示薬として機能する新規小分子を使用するCa²⁺レポータードメインである。Rhod-5Fは、BAPTAコア、ローダミンフルオロフォア（ $\lambda_{ex}=560\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=580\text{nm}$ ）およびアジドリンカーからなる。Ca²⁺の非存在下で、Rhod-5Fにおけるローダミンフルオロフォアは、BAPTAコアからの光誘起電子移動（PeT）によってクエンチングされる。Ca²⁺キレート化時、クエンチングが解放されて、高いフルオロフォアを生じる。BAPTAにおけるアミンのプロトン化もまた、PeTを開放することに留意されたい。したがって、Rhod-5Fにおけるシグナルの変化パーセントならびに解離定数（K_d）は、pHの関数として影響される。Ca²⁺結合に関するRhod-5FのK_dは、pH依存的であり、図6に示される。

【0188】

Rhod-5Fは、クリック化学を使用して、ジベンゾシクロオクテン（DBCO）基を保有するD2鎖に結合される。D2へのコンジュゲーションは、CalipHluor_{Ly}におけるRhod-5FのK_dを変化させなかった（図1B）。CalipHluor_{Ly}において、Rhod-5F（O、橙色菱形）は、pH7.2で1.1μMのK_dを示し、これは、酸性度が増加するにつれ増加する（図1B）。CalipHluor_{Ly}は、ゲル電気泳動によって特性化された（図7A～図7B）。

【0189】

Ca²⁺の比率計測的定量化に関して、Alexa647は、Rhod-5Fを用いてFRETしないように位置付けられたCalipHluor_{Ly}上の参照色素（ $\lambda_{ex}=630\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=665\text{nm}$ ）として取り込まれた。Alexa647は、Rhod-5Fとのその無視し得るスペクトルの重なりならびにpH、Ca²⁺および他のイオンに対する非感受性に関して選択された（球、図1A）。Alexa647の固定された化学量論は、細胞における不均質なプローブ分布に起因したRhod-5F強度変化を効率的に補正し、したがって、CalipHluorプローブにおけるRhod-5F（O）およびAlexa647（R）強度の比を、pHおよびCa²⁺に比例させる。第2のドメイン（灰色線）は、イースイッチと呼ばれる、これまでに記載されたとおりのDNAベースのpHレポータードメインを構成する（図1A）。このイースイッチは、生存細胞における多様なエンドサイトーシス細胞小器官においてpHをマッピングするのに使用されている。

【0190】

初期および後期エンドソームにおいてpHをマッピングするために、これらの細胞小器官においてより低い酸性度に向いているバリエーションであるCalipHluorを使用する。CalipHluorは、3つの鎖O1、O2およびO3を含む（図7C、表1）。CalipHluorは、ゲル電気泳動によって特性化された（図7D～図7E）。第3の「組込み」ドメインは、pHおよびCa²⁺レポータードメインを、単一DNAアセンブリに組み込む30塩基長の二本鎖を含む。一方の末端は、イースイッチに融合され、他方の末端は、Ca²⁺センサーに融合される。このドメインはまた、その陰イオン性が、DNA配列非依存性様式でスカベンジャー受容体による認識および輸送を助けるので、ターゲティングにも役立つ（Suranaら（2011年）Nat. Commun. 2:340）。

【0191】

CalipHluorおよびCalipHluor_{Ly}の応答特性は、pHならびにCa²⁺の関数として検討され、それらのpHおよびCa²⁺感受性レジメン (regimes) を決定した (図1C～図1D、図7F～図7G)。pHおよび種々の値の遊離 [Ca²⁺] の関数としてのD/Aの3D表面プロットを図1Cに示す。これらから、CalipHluorおよびCalipHluor_{Ly}のpH記録能力は、それぞれD/A比の倍率変化4.0および5.5で、pH5.0～7.0およびpH4.0～6.5であることが明らかとなった (図1C)。D/A比の倍率変化は、20nM～10mMの遊離Ca²⁺濃度範囲にわたって不変であり、これらのプローブによるpHセンシングが、Ca²⁺レベルに影響されないことを示した (図1C)。

10

【0192】

並行して、直接的な励起から得られるCalipHluor_{Ly}におけるRhod-5F (O) およびAlexa647 (R) の強度は、O/R値をもたらした。[Ca²⁺] およびpHの関数としてのO/R値の類似した3D表面プロットは、pH7.2でのO/Rの倍率変化約9で、Ca²⁺の関数としてシグモイド増加を示した (図1D)。線虫におけるリソソームpH、即ち、pH5.5で、CalipHluor_{Ly}は、7.2μMのK_dを示した。予想通り、Ca²⁺のキレート時のシグナル変化のパーセントはまた、酸性度が増加するにつれ減少する (図1D)。

【0193】

実施例6：本開示の核酸の複合体のin vivoでの性能

20

CalipHluor_{Ly}のin vivoでのレポーター特性を、管腔pHおよび[Ca²⁺] の関数として検討した。DNAベースのレポーターは、線虫における偽体腔に注入されると、DNAベースのレポーターは具体的に、スカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシスにより体腔細胞によって特異的に取り込まれ、それにより、エンドリソソーム経路上の細胞小器官を標識する。したがって、エンドサイトーシス細胞小器官を、CalipHluor_{Ly}で標識した後、体腔細胞の管腔pHおよび[Ca²⁺] をクランピングした。これは、周囲の緩衝液の[K⁺] に対して、エンドソームイオン環境をクランピングする高い[K⁺] のニゲリシン、モネンシン、イオノマイシンおよびEGTAを含有する固定されたpHおよび[Ca²⁺] のクランピング緩衝液中で、虫をインキュベートすることによって達成された。続いて、クランピング後、虫を4つのチャンネルにおいてイメージングした；(i) ドナーチャンネル (DまたはAlexa488)、(ii) A488の励起時のA647蛍光の強度画像に相当する、FRETアクセプターチャンネル (A)、(iii) 橙色チャンネル (OまたはRhod-5F)、および(iv) Alexa647の直接的な励起時のA647蛍光の強度画像に相当する赤色チャンネル (R)。図2A (i～iv) は、4つのチャンネルにおいてイメージングされたCalipHluor_{Ly}標識体腔細胞の代表的な画像を示す。

30

【0194】

指定pHおよびCa²⁺濃度の所与のクランピング緩衝液中で、ドナーチャンネル (D) 画像の、アクセプターチャンネル (A) 画像に対する比は、クランピング緩衝液pHに相当するD/A画像をもたらす (図2A、v)。同様に、O/R画像は、そのpHでのCa²⁺濃度に相当する (図2A、vi)。表示したpHおよび[Ca²⁺] でクランピングされた体腔細胞の代表的なD/AおよびO/R画像を、図2Bおよび図8に示す。種々の表示したpHおよび[Ca²⁺] 値でクランピングされたリソソームのD/AおよびO/R値の分布を、図2C～図2Dに示す。広範囲のpHおよびCa²⁺にわたる両方のイオンセンシングモジュールのin vivoおよびin vitroでのセンシング性能を比較するために、CalipHluor_{Ly}における各モジュールに関して、2つのパラメーターをプロットした。pHセンシングモジュールに関して、これらは、D/Aの倍率変化 (FC_{D/A})、ならびに移行pH (pH_{1/2}) であった (図2E～図2F、図9A～図9D)。Ca²⁺センシングモジュールに関して、これらは、O/Rの倍率変化 (FC_{O/R})、ならびにCa²⁺に関するK_dであった (図2G～図2H)。in vivoおよびi

40

50

*in vitro*での FC_D/A 、 FC_O/R 、 $pH_{1/2}$ および K_d の値は一貫しており、*CalipHluorLy*の*in vitro*での性能特性が、*in vivo*で定量的に再現されることが明らかとなった（図2E～図2Fおよび図2I～図2K）。

【0195】

較正した D/A および O/R 比は、方法で記載されるように、4つ全てのチャンネルにおける単一リソソーム分解能で強度値を測定することによって算出された。種々の Ca^{2+} 濃度で、 pH 値に対して D/A をプロットすることによって、 Ca^{2+} レベルに対する pH センシングモジュールの非感受性が示される。図9A～図9Dは、*in vitro*と、*in vivo*での間の種々の Ca^{2+} レベルでの D/A 対 pH プロットの比較を示す。倍率変化および $pH_{1/2}$ の有意でない変化は、生物系における本開示の核酸複合体の頑強性を示す。体腔細胞の*in vivo*での Ca^{2+} クランピングは、 Ca^{2+} クランピング緩衝液[HEPES (10mM)、MES (10mM)、酢酸ナトリウム (10mM)、EGTA (10mM)、KCl (140mM)、NaCl (5mM) およびMgCl₂ (1mM)] 中で、遊離 [Ca^{2+}] の量を1 μ Mから10mMまで変化させることと、ニゲリシン (50 μ M)、モネンシン (50 μ M) およびイオノマイシン (20 μ M) の存在下で pH (5.5～6.5) を調整することによって実施された。1 μ M未満の遊離 [Ca^{2+}] で体腔細胞をクランピングすることが難しいため、1 μ M未満のクランピング点を、*in vivo*での較正から外挿して、 pH 6.5および5.7での*CalipHluorLy*の K_d を得た。図9E～図9Hに示されるように、*CalipHluorLy*の*in vivo*での [Ca^{2+}] 較正プロファイルは、 pH 5.5～6.5および1 μ M～10mMの遊離 [Ca^{2+}] の*in vitro*での較正プロファイルと十分合致する。さらに、 pH の関数としての*CalipHluorLy*の*in vivo*での K_d 値は、*in vitro*での K_d 値と一致した（図2J）。これらの結果により、*CalipHluorLy*の pH および [Ca^{2+}] センシング特性が、体腔細胞で保存されたことが確認される。

【0196】

受容体媒介性エンドサイトーシスにおいて、取り込まれたカーゴは、初期エンドソーム (EE) および後期エンドソーム (LE) を通じて輸送されて、分解およびリサイクリングのためにリソソーム (Ly) に達する。EE、LEおよびLyに達する、*CalipHluorA647*の推定時点を調べるために、時間依存的な共存実験を、GFPでタグ付けしたエンドソームマーカーGFP::RAB-5 (EE)、GFP::RAB-7 (LE) およびLMP-1::GFP (Ly) を発現する虫において実施した。これらの結果により、*CalipHluorA647*は、それぞれ、5分、17分および60分にてEE、LEおよびLy中に存在することが示される。これらの時点を使用して、野生型虫におけるEE、LEおよびLyにおいて、 pH および [Ca^{2+}] を測定した。

【0197】

実施例7：エンドリソソーム経路の細胞小器官における [Ca^{2+}] の測定

細胞小器官の機能およびカーゴ輸送の両方に重要なエンドソーム成熟は、細胞小器官管腔の進行性酸性化を伴う（図3A）。 pH とは異なり、エンドソーム成熟に応じた管腔 Ca^{2+} 変化についてほとんど知られていない。プローブの適用性は、エンドソーム成熟に応じた管腔 Ca^{2+} をマッピングすることによって、広範囲の酸性細胞小器官にわたって実証された。*CalipHluorLy*が初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームにおいて局在化する時点を、これまでに記載されるように (Suranaら (2011年) Nat. Commun. 2:340)、体腔細胞において決定した（図3B～図3C）。注入後、*CalipHluorLy*は、初期エンドソーム (EE)、後期エンドソーム (LE) およびリソソーム (LY) において、それぞれ5分、17分および60分にて局在化することがわかった（図3B～図3C、図10）。

【0198】

pH および見かけの Ca^{2+} を、プローブを使用した単一エンドソーム場所指定能力で、野生型N2線形動物における各段階で測定した。続いて、 K_d 補正因子が、その測定 p

Hに従って、各エンドソームにおいて取り込まれた後、あらゆるエンドソームにおける Ca^{2+} の真の値を計算した。図3Dは、この解析方法が実施された体腔細胞の代表的なセットを示す。初期および後期エンドソームを、CalipHluorで標識した一方で、リソソームは、CalipHluorLyバリエーションで標識された後、体腔細胞のD/AおよびO/Rマップを作成した(図3D、iおよびiv)。D/Aマップは、in vivoでのpHクランピング実験から得られる校正したD/A値を使用して、pHマップに直接変換された(図3D、ii、表2)。あらゆるpHでのin vivoおよびin vitroでの Ca^{2+} 応答特性(図2H)は、CalipHluorおよびCalipHluorLyの両方に対して、あらゆるpH値で Ca^{2+} に関する K_d を提供する。

【0199】

【表2】

表2. Maxchelatorソフトウェアを使用して算出したpH5.5でのクランピング緩衝液中の遊離 $[Ca^{2+}]$

添加したカルシウム(μM)	添加したカルシウムの濃度	50 μL 中の遊離 $[Ca^{2+}]$ (μM)	50 μL 中の遊離 $[Ca^{2+}]$ (μM)
0	0	0	0
1	1	50 μM	3.89 E-2
2	2	50 μM	7.80 E-2
10	1	0.5 mM	3.89 E-1
20	2	0.5 mM	7.80 E-1
50	1	2.5 mM	1.9
100	2	2.5 mM	3.9
200	1	10 mM	7.9
500	1	25 mM	20.4
1E3	1	50 mM	43.1
2E3	2	50 mM	96.3
5E3	1	250 mM	360.3
10E3	2	250 mM	1.86 E3
20E3	2	500 mM	10.4 E03

【0200】

図3D、iiにおけるpHマップを使用して、pHマップにおける各ピクセルでの Ca^{2+} に対する K_d に相当する「 K_d マップ」を構築した(図3D、iii)。方程式 $(O/R - O/R_{min}) / (O/R_{max} - O/R)$ を用いて、 K_d マップにおける各ピクセルで K_d の値を増加させて、真の Ca^{2+} マップが得られた(図3D、v)。この方程式では、 O/R は、 O/R マップにおいて所与のピクセルで観察された O/R 値に相当し、 O/R_{min} および O/R_{max} は、特定のピクセルで相当するpH値で、1 μM および 10 mM Ca^{2+} での O/R 値に相当する。したがって、初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームのpHおよび Ca^{2+} マップが、N2虫において得られ(図3E)、D/AおよびpH補正した O/R の相当する分布を、図3F~図3Gに示す。各エンドソーム段階におけるpHおよび Ca^{2+} の平均値を、図3H~図3Iに示す。

【0201】

表3は、野生型(N2)虫のEE、LEおよびLy、catp-6、cup-5⁺/- およびCalipHluorLyを使用したcup-5⁺/- 虫におけるcatp-6 RNAiのリソソームにおける平均pHならびに遊離 $[Ca^{2+}]$ を提供する。pHは、エンドソーム成熟とともに徐々に減少し、管腔酸性度は、各エンドサイトーシス段階で約3倍の減少を示す。対比して、初期エンドソームおよび後期エンドソームにおける Ca^{2+} は同等であり、かなり低く、即ち、0.3 μM であった。興味深いことに、後期エンドソームからリソソームまで、管腔 Ca^{2+} は、約35倍と急激に増加し、 Ca^{2+} の段階特異的な富化を示し、酸性 Ca^{2+} 貯蔵であるリソソームと一致する(表3)。リソソーム Ca^{2+} と、細胞質ゾル Ca^{2+} との間の100倍の差は、管腔 Ca^{2+} を放出して、リソソーム機能を制御するためのリソソーム Ca^{2+} チャンネルのストリンジェントな調節と一致し

ている。

【0202】

【表3】

表3

虫	pH	遊離[Ca ²⁺](μM)
N2のEE	6.46 ± 0.07	0.3 ± 0.1
N2のLE	5.95 ± 0.02	0.3 ± 0.1
N2のLy	5.30 ± 0.02	11 ± 0.8
catp-6のLy	5.47 ± 0.03	1.6 ± 0.4
cup-5+/-のLy	5.15 ± 0.01	40 ± 1.5
cup-5+/-におけるCATP-6 RNAiのLy	5.50 ± 0.10	16 ± 4.9

10

初期エンドソーム(EE)、後期エンドソーム(LE)およびリソソーム(Ly)

全ての実験に関して、n=15個の細胞、50個のエンドソーム;データは、平均値±S.E.Mで表す。

実験は、独立して3回繰り返し、同様の結果を伴った。

【0203】

実施例8: catp-6は、潜在的なリソソームCa²⁺移入体として同定される

20

リソソーム段階における特異的な管腔Ca²⁺のこの急増は、Ca²⁺のリソソーム移入を助ける要因の存在に関与する。しかしながら、リソソームCa²⁺蓄積を媒介するプレーヤーは依然として、より高度な真核細胞において未知である。小胞体(ER)上に存在するP型ATP分解酵素である周知のCa²⁺移入体、即ちSERCAからインスピレーションを受けた。原形質膜Ca²⁺ATP分解酵素(PMCA)および分泌経路Ca²⁺ATP分解酵素(SPCA1)のような他のCa²⁺移入体もまた、P型ATP分解酵素である。ヒトリソソームプロテオームにおける潜在的なP型ATP分解酵素を手動で同定した。P5-ATP分解酵素ATP13A2は、毒性アッセイに基づいて、Mn²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、およびCd²⁺のような陽イオンを輸送するが、Ca²⁺は輸送しないと記載されていることがわかった。Ca²⁺ホメオスタシスは、主要なシグナル伝達経路全てに重要であるため、細胞における代償機構は、過剰なCa²⁺を計数することができ、それにより、ATP13A2によるCa²⁺輸送の同定を省く。

30

【0204】

線虫は、ATP13A2の2つの相同体、即ち、catp-5およびcatp-6を有する(図4A)。catp-6がリソソームCa²⁺蓄積を媒介したかどうかを検査するために、そのノックダウンが、高い管腔Ca²⁺に起因して生じる表現型をレスキューするかどうかを検討した(図4B)。TRPML1は、そのノックダウンが、リソソームCa²⁺を上昇されると予想される、周知のリソソームCa²⁺放出チャネルである。TRPML1における突然変異は、リソソーム蓄積症ムコ多糖症IV型(MPS IV型)を招くリソソーム機能障害をもたらす。線虫において、TRPML1の線虫相同体であるcup-5の損失は、リソソーム蓄積および胚性致死をもたらす。したがって、同様に、catp-6ノックダウンであるcup-5+/-遺伝的バックグラウンドが、cup-5-/-致死を逆転させることができるかどうかを検査した。この株において、cup-5遺伝子のホモ接合性致死的欠失は、dpy-10でマークされたトランスロケーションによって平衡化される。生存アッセイは、cup-5+/-虫において特異的な遺伝子をノックダウンすることと、致死性に関してスコア付けすることによって実施された(図4Cおよび図11)。

40

【0205】

多剤耐性タンパク質-4(MRP-4)は、薬物、毒素、ペプチドおよび脂質に関する万能な流出輸送体であり、cup-5-/-致死性をレスキューすることが知られている

50

。cup-5の非存在下で、mrp-4は、エンドサイトーシス区画において誤って局在化させ、続いてそのノックダウン時に軽減される毒性を引き起こすことが仮定される。catp-6またはcatp-5のいずれかのRNAiノックダウンが、mrp-4ノックダウンと比較して、cup-5-/-致死性を好適にレスキューした(図11)。clh-6をノックダウンすると、管腔塩化物を調節する別のリソソーム常在性チャネルは、かかるレスキューを示さなかった。

【0206】

実施例9: catp-6は、リソソームCa²⁺蓄積を促進する。

致死性のレスキューは、リソソーム機能を回復せずに起こり得ると仮定して、候補遺伝子のいずれかが、リソソーム表現型を逆転させるどうかを検査した。cup-5ノックダウンは、リソソーム蓄積に起因して、異常に多いリソソームを示す。したがって、ハイボモルフar645は、cup-5においてG401E突然変異とともに使用されて、致死性にとって不十分であり、さらには拡張した(engorged)リソソームをもたらす機能障害を引き起こす。arIs37; cup-5(ar465)株では、筋肉細胞から偽体腔へ分泌される可溶性GFPは、体腔細胞によって内部移行されて、機能障害リソソームへの分解のために輸送される。したがって、これらの虫では、体腔細胞におけるリソソームは、異常に肥大して、GFPで標識される(図4D)。

【0207】

これらの線形動物におけるcatp-6のRNAiノックダウンは、リソソーム形態をレスキューした(図4D~図4E)。catp-5またはmrp-4のいずれかをノックダウンすることによって、表現型の周辺回復のみが示された。mrp-4が、リソソーム常在性タンパク質ではなく、それがレスキューすることができないことを考慮すると、リソソーム表現型は、機構的に、cup-5-/-致死性のそのレスキューが、これまでの仮説と一致して、リソソーム外である可能性が高いことを示唆している。

【0208】

次に、物理的な表現型、即ち、リソソーム形態のcatp-6媒介性レスキューがまた、化学的表現型、即ち、その管腔Ca²⁺の回復も引き起こすかどうかを検査した。cup-5+/-線形動物において、catp-6ノックダウンでCalipHluorLyを使用したリソソームCa²⁺測定。野生型線形動物は、リソソームCa²⁺レベル11±0.8 μMを示した(図4F~図4H)。cup-5+/-線形動物では、リソソームCa²⁺は、40±1.5 μMに上昇し、Ca²⁺放出チャネルであるcup-5と一致した(図4F~図4H)。興味深いことに、catp-6ノックダウンは、野生型レベルに対して、リソソームCa²⁺を回復させた。したがって、catp-6機能は、それが、3つのレベルで、致死性に関して生物全体で、リソソーム表現型に関して細胞下レベルで、その管腔化学組成に関して細胞小器官下レベルで、cup-5欠損表現型をレスキューするため、cup-5の機能と直接的に対比する。累積的に、これらにより、catp-6は、リソソームCa²⁺移入を促進することが示される。したがって、catp-6欠失は、1.6±0.4 μMに低下したリソソームCa²⁺をもたらし、Ca²⁺移入を促進するそれと一致している。

【0209】

実施例10: ATP13A2は、リソソームCa²⁺蓄積を促進する

catp-6のヒト相同体であるATP13A2における突然変異は、PARK9パーキンソン病(PD)感受性遺伝子座に属する。これらの突然変異は、認知症を伴うPDの重篤な早期発症型の常染色体劣性形態であるクフォーラケブ症候群を引き起こす。過剰な細胞質ゾルCa²⁺がドーパミン作動性ニューロンの興奮毒性を引き起こすため、PDは、Ca²⁺調節異常と強力に関係がある。ATP13A2を過剰発現することにより、毒性が抑制されて、細胞質ゾルCa²⁺が低減される。さらに、ATP13A2機能の損失は、リソソーム蓄積症であるニューロンセロイドリポフスチン症を引き起こし、その潜在的な作用部位としてリソソームに関与する。

【0210】

A T P 1 3 A 2 はまた、リソソーム Ca^{2+} 移入を促進したかどうかを確認するために、ヒト線維芽細胞におけるリソソーム Ca^{2+} をマッピングした。哺乳動物リソソームの高い酸性度を測定するのに適している *CalipHluor^{mLy}* と呼ばれるバリエーションを創出した (図 1 2 A)。*CalipHluor^{mLy}* は、*in vitro* で、ビーズ上で、および *in cellulo* で、類似した pH および Ca^{2+} 応答特性を示し、その Ca^{2+} センシング特性は、新たな pH センシングモジュールによって影響を受けない (図 1 2 B ~ 図 1 2 E)。

【0211】

CalipHluor^{mLy} は、パンチ皮膚バイオプシーから得られる初代ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF 細胞) のリソソームにおいて局在化された。*CalipHluor^{mLy}* は、スカベンジャー受容体媒介性エンドサイトーシスによって、HDF 細胞におけるリソソームを標識する (図 5 A ~ 図 5 B、図 1 3)。簡潔に述べると、500 nM *CalipHluor^{mLy}* の 1 時間のパルス、続く 9 時間のチェイスにより、この細胞型においてリソソームが効率的に標識される (図 5 A ~ 図 5 B)。

【0212】

リソソーム Ca^{2+} は、正常な個体、および A T P 1 3 A 2 の 1 5 5 0 における C > T 突然変異に関してホモ接合性であるクフォーラケブ症候群を患う男性患者から単離した L 6 0 2 5 初代線維芽細胞において測定した。この突然変異は、ER を出ることができない A T P 1 3 A 2 をもたらし、リソソームは、A T P 1 3 A 2 を欠如している。L 6 0 2 5 細胞におけるそのリソソーム局在化を確認した後、*CalipHluor^{mLy}* を使用して、リソソーム pH および Ca^{2+} を測定した (図 5 B ~ 図 5 D)。KRS 患者におけるリソソームは、正常 (図 5 C ~ 図 5 E) よりも 1 4 倍低い Ca^{2+} および約 2 倍低い $[\text{H}^+]$ を示し、A T P 1 3 A 2 が、リソソーム Ca^{2+} 蓄積を媒介することが確認された。

【0213】

実施例 11: *ChloropHore* の設計および *in vitro* での特性化

ChloropHore は、鎖 C 1、C 2 および P を含む 61 塩基対の DNA 二本鎖であり (表 4)、3 つの別個のドメインを保有する (図 1 4 A)。これらのうちの 2 つが、これまでに報告されている蛍光性の比率計測的レポータードメイン、即ち、C L -レポータードメインである *Clensor* および *E-スイッチ* と呼ばれる pH レポータードメインである。レポータードメインはそれぞれ、「組み込みドメイン」の一方の末端に融合され、組み込みドメインは、pH レポータードメインおよび C L -レポータードメインを、単一 DNA 構築に組み込むように作用する 27 塩基長の二本鎖を含む。この 27 塩基長の二本鎖はまた、その陰イオン性が、DNA 配列非依存的様式で、スカベンジャー受容体による認識および輸送を助力するので、ターゲティングにも役立つ。*ChloropHore* の pH センシングレジメを、哺乳動物リソソーム *ChloropHore_{Ly}* に直面した低 pH レジメに適合させるために、C リッチな領域において修飾 5' -プロモシトシンを使用するバリエーションも作製した (表 4)。*ChloropHore_{Ly}* 構築に使用される配列は、オリゴ P、オリゴ C L -B r およびオリゴ C 2 である。

【0214】

具体的には、*ChloropHore* の形成は、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を利用した電気泳動移動度シフトアッセイによって検証した (図 1 8)。C 2 および P 1 のハイブリダイゼーションは、臭化エチジウム (EB) および *Alexa 647* チャンネルにおける試料 C 2 と比較して、試料 (C 2 + P) のより低い移動度によって明らかにされた。その一方で、EB、*Alexa 546* および *Alexa 647* チャンネルにおける試料 (C 1 + C 2 + P 1) の最低の電気泳動移動度により、優れた収率で、C 1、C 2 および P 1 によって構築された *ChloropHore* の形成が示される。

【0215】

酸性化時の *ChloropHore* のコンホメーション変化を検証するため、円二色性 (CD) 分光計を用いて、*in vitro* で構造変化を検証した。*ChloropHore* は、二本鎖 DNA の特徴である pH 7.5 における 272 nm での陽性ピークおよび

10

20

30

40

50

248 nmでの陰性ピークを示す。しかしながら、pH 4.0では、285 nmでの陽性ピークおよび248 nmでの陰性ピークが観察された。pH 4.0およびpH 7.5でのChlorophoreの差スペクトルは、292 nmでの陽性ピークおよび263 nmでの陰性ピークを示し、これは、i-モチーフのCD痕跡と一致した。これはまた、iモチーフ形成が、親E-スイッチにおいて証明された方法であった。

【0216】

図14では、H⁺センシングモジュールのセンシング特性は、Cl⁻センシングモジュールへの組込みによって影響されないことおよびその逆も実証され、したがって、並行してこれらの2つのイオンの潜在的な検出を可能にした。Mg(NO₃)₂、Ca(NO₃)₂、NaNO₃、Na₂HPO₄、MgSO₄、NaHCO₃およびCH₃COONaならびに30%グリセロール等の各種イオンに対する、Chlorophoreの応答も検討した(図20)。これにより、Chlorophoreの、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、NO₃⁻およびPO₄³⁻を含む多様な生物学的に豊富なイオンに対する感受性が、無視できることが明らかとなる。BACはまた、臭化物およびヨウ化物(Br⁻およびI⁻)等のハロゲン物によってクエンチングされる。しかしながら、生物学的細胞においてCN⁻およびSCN⁻を含むこれら全てのイオンの複合濃度は、塩化物の値の0.1%未満である。この低いバイオアベイラビリティで、生物系におけるBAC蛍光の変化に対するそれらの寄与は無視でき、したがって、BACは、生物系において塩化物センサーとして作用する。

【0217】

ChlorophoreおよびChlorophore_{LY}の形成ならびに特異性は、ゲルシフトアッセイ、円二色性分光法およびUV融解研究によって確認された(図18～図20)。

【0218】

【表4】

表4

鎖	配列情報(配列番号)
P	5'-BAC-NH ₂ -Lys-ATC AAC ACT GCA-Lys-COOH (配列番号: 15)
C2	5'-TAT TGT GTA TTG TGT ATT GTT TTA TAT AT/iAlexa 647/A TAG GAT CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT-3' (配列番号: 16)
C1	5'-CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC- Alexa 546-3' (配列番号: 17)
C1-Br	5'-CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC-3' (配列番号: 18)(下線を付したCは、5'-プロモントシンである)
C2 未標識	5'-TAT TGT GTA TTG TGT ATT GTT TTA TAT A T/iAlexa 647/A TAG GAT CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT-3' (配列番号: 19)
C1 未標識	5'-CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC-3' (配列番号: 20)
mLY _{OG}	5'-ATCAACACTGCACACCAGACAGCAAGATCCTATATATA-3' (配列番号: 21)

【0219】

ChlorophoreおよびChlorophore_{LY}の蛍光応答特性を、それらのpHおよび[Cl⁻]感受性レジメンを決定するために、pHおよび[Cl⁻]の関数として検討した。ChlorophoreおよびChlorophore_{LY}のD/A比の漸増により、それぞれ、pH 5.5と6.5との間(図14B)およびpH 4.5～6.5との間のpH報告能力が明らかとなり(図21B)、後者は、非常に酸性のヒトリソームのpHを測定するのに十分適している。ChlorophoreおよびChlorophore_{LY}はともに、感受性レジメンにおいてpHの関数としてD/Aのシグモイド増加、ならびにそれぞれ5.5および3のD/A比の倍率変化を示す。とりわけ、D/

A比の倍率変化は、5mM～120mMの範囲の $[Cl^-]$ にわたるChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}の両方に関して不変のままであった（図14Cおよび図21C）。したがって、ChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}のpHセンシング特性は、生理学的 $[Cl^-]$ の変化に対して非感受性である。これは、図14Dに示されるとおりの $[Cl^-]$ の種々の固定値で実施されたpHの関数としてのD/Aの3D表面プロットによって示される（図21D）。

【0220】

並行して、R/G比は、 $[Cl^-]$ を増加させるにつれ線形の依存性を示し、 $[Cl^-]$ を5mMから120mMまで増加させると、約2.5の倍率変化を示す（図14B～図14Cおよび図21B、図21C）。さらに、ChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}の両方に関して、シュテルンフォルマー係数（ K_{SV} ）およびR/Gの倍率変化は、pH4.5～7.0のpHの関数として一定のままであった（図14Cおよび図21C）。これは、図14Eに示されるようなpHの種々の固定値で実施された Cl^- の関数としてのR/Gの3D表面プロットによって示される（図21E）。したがって、ChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}の $[Cl^-]$ センシング特性は、生理学的pHの変化に対して非感受性である。これにより、ChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}において、 H^+ センシングモジュールのセンシング特性は、 Cl^- センシングモジュールへの組み込みによって影響されないことおよびその逆も示され、したがって、並行してこれらの2つのイオンの潜在的な検出を可能にする。

【0221】

実施例12：単一エンドソーム場所指定能力を用いた2つのイオン測定

生存細胞において、リソソームpHおよび $[Cl^-]$ を同時に測定するために、ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）のリソソームに対するChlorophoreをターゲティングした。ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）は、陰イオン性リガンドを取り込むスカベンジャー受容体（SR）を発現する。したがって、DNAナノデバイスは、多様な生存系においてエンドリソソーム経路上の細胞小器官に輸送され得る（図15A）。ChlorophoreをHDF細胞とともに1時間インキュベートする（1時間の「パルス」と称する）と、点状エンドソームへの取込みが良好であった（図15B、図15D、図15F）。取込みは、10倍当量のマレイル化BSAによって効率的に競合されて、HDF細胞において、Chlorophoreが、SR経路を介して内部移行されることが明らかとなった（図15B～図15C）。

【0222】

続いて、Chlorophoreのリソソーム局在化に必要なとされる時間は、リソソームマーカーとのその時間依存的な共存によって推定された。HDF細胞を、10kDaの蛍光デキストラン（0.25mg/mL）で1時間でパルス化した後の16時間のチェイスにより、LAMP1-RFPとの共存によって明らかであるように、リソソームを効率的にマークした（図15D～図15E）。次に、リソソームが上記の通りにTMR-デキストランで予め標識されたHDF細胞において、Chlorophoreをパルス化して、洗浄して、様々なチェイス時間で細胞をイメージングした。ChlorophoreおよびTMR-デキストランは、9時間で最大の共存を示した（図15F～図15G、図22）。安定性測定により、ChlorophoreおよびChlorophore_{Ly}は、半減期20時間を有し、HDFリソソームにおいて少なくとも10時間安定であることが明らかとなった（図22）。

【0223】

次に、Chlorophoreの細胞内pHおよび $[Cl^-]$ センシング特性を検討した。Chlorophoreで標識したHDF細胞における管腔pHおよび $[Cl^-]$ は、高 $[K^+]$ でニゲリシン、モネンシンおよび塩化トリブチルスズを含有する固定pHおよび $[Cl^-]$ のクランピング緩衝液中でのインキュベーションによってクランピングした。図16Aは、相当するD/AおよびR/Gマップとともに、D、A、RおよびGチャネルにおいてイメージングされた、表示したpHおよび $[Cl^-]$ でクランピングした細

胞の代表的な蛍光画像を示す。種々の pH および $[Cl^-]$ でのクランピングした 150 個のエンドソームの D/A および R/G 値のヒストグラムを図 23 に示す。Chlorophore は、 $[Cl^-]$ の検査した全ての値にわたって、pH 4.0 から pH 7.0 までの D/A 値のおよそ 5.5 倍の倍率変化を示し、in vitro での 3D 表面プロットは、細胞において定量的に再現された (図 16B、図 24)。同様に、 $[Cl^-]$ の関数としての R/G に関する Chlorophore 応答を、生理学的 pH の種々の固定値で実施した (図 16C)。5mM ~ 120mM $[Cl^-]$ の K_{SV} および R/G の倍率変化の両方が、pH 4.0 ~ 7.0 で一定であり、R/G の in vitro での 3D 表面プロットを、細胞において定量的に再現させた (図 16C、図 24)。これにより、Chlorophore および Chlorophore_{Ly} は、それらの in vitro での pH および $[Cl^-]$ センシング特性を密接に適合させる細胞における性能特性で、pH および $[Cl^-]$ を同時に報告することができることが明らかとなった。

【0224】

次に、エンドソームにおける両方のイオンを、生存細胞における単一エンドソーム場所指定能力でこの情報を保持しながら、同時にマッピングした。したがって、所与のエンドソームにおける管腔 pH を反映する D/A 値を、エンドソーム 150 個に関して、管腔 $[Cl^-]$ を反映する同じエンドソームにおける R/G 値に対してプロットし、それは、単一エンドソームに相当する各データ点を用いた散乱プロットとして表される (図 16D)。より明白な可視化のため、このデータは、それらの発生頻度に従ってコードされた密度プロットカラーとして表される (図 16E)。これは、2つのイオン測定 (2-IM) としての単一エンドソーム場所指定能力、および 2-IM プロファイルとしての相当する密度プロットで濃度情報を保持しながらの単一エンドソームにおける 2つのイオンの同時定量的イメージングの方法である。図 16F ~ 図 16H は、同じ $[Cl^-]$ (100mM) であるが、異なる pH でクランピングしたエンドソーム 150 個の 2-IM プロファイルを示すのに対して、図 16I ~ 16K は、同じ pH (pH 6.5) であるが、異なる $[Cl^-]$ でクランピングしたエンドソーム 150 個の 2-IM プロファイルを示す。

【0225】

2-IM の、単一エンドソームを場所指定する能力を示すため、Chlorophore_{Ly} で標識した HDF は、リソソームにおけるその最適な pH 応答性に起因して、順次、pH および $[Cl^-]$ の種々のクランピングした状態に付された細胞であった (図 25)。Chlorophore_{Ly} で標識したエンドソームを、表示した pH および Cl^- でクランピングして、D、A、R および G チャネルにおいてイメージングした (図 16L、図 16N)。図 16L (i ~ ii) は、pH 4.5 および 5mM Cl^- でクランピングした細胞の D/A および相当する R/G マップを示す。同じ値の $[Cl^-]$ であるが、pH 6.5 で続いてクランピングしたこれらの同じ細胞の D/A および相当する R/G マップを、図 16L (iii ~ iv) に示す (図 26)。図 16M は、各クランピングされた状態における個々のエンドソームのプロットを示し、黒線は、いずれかのクランピングされた状態において同じエンドソームを結び付ける。 $[Cl^-]$ が一定であり、pH を変化させた場合、エンドソームは全て、D/A の増加および R/G の無視できる変動を示し、Y 軸に対して平行に移動することが明らかである。同様に、図 16N (i ~ iv) は、同じ値の pH であるが、5mM $[Cl^-]$ で続いてクランピングした 100mM Cl^- および pH 6.5 でクランピングした細胞の D/A および R/G マップを示す。さらに、pH が一定であり、 $[Cl^-]$ を変化させた場合、個々のエンドソームは、X 軸に平行して、右から左に移動した (図 16O)。したがって、集団測定に加えて、2-IM は、単一エンドソーム分解能で情報を提供する。

【0226】

実施例 13: 2つのイオン測定は、リソソーム集団を化学的に分離する

健常な個体の線維芽細胞におけるリソソームの 2-IM プロファイルは、2つの別個の化学種を有する集団を明らかにする。HDF 細胞における Chlorophore_{Ly} で標識したリソソームをイメージングして、D/A および R/G マップを得た (図 17A (

i) ~ 図 17 A (i i))。相当する 2-IM プロファイルにより、1.3 未満の R/G で、比較的低い塩化物を含有するおよそ 68% のリソソームの主要な集団が明らかとなった (図 17 B (i))。しかしながら、より高い管腔 Cl⁻ およびプロトン含有量で、1.5 を上回る R/G および 1.25 未満の D/A を有する少数集団 (およそ 23%) が存在する (図 17 B (i))。これは、同じ個体に由来する試料で、ならびに多重の正常個体にわたって、実験的反复に関して一致した (図 17 B (i) ~ 図 17 B (v i))。BHK-21 細胞、マウスマクロファージおよび T-47D 細胞等の多様な細胞型のリソソームにおける 2-IM はまた、これらの特性を有するリソソーム化学種を示した (図 27 ~ 図 29)。バフィロマイシン A1 または 5-ニトロ-2-(3-フェニルプロピルアミノ)安息香酸で、V-ATP 分解酵素または塩化物チャネルのいずれかを薬理的に阻害すると、高 Cl⁻ の高い酸性度集団は損失され、それが、それぞれ、リソソームプロトンまたは Cl⁻ 蓄積を選択的に阻止する (図 17 C ~ 図 17 D)。

【0227】

これらのリソソーム集団が、どのようにして病理学的なリソソーム蓄積に対して影響されるかを理解するために、リソソーム蓄積障害を患う患者の線維芽細胞を、2-IM プロファイリングに付した。リソソーム蓄積障害は、特異的な生体分子のリソソーム分解に影響を及ぼすタンパク質の遺伝的欠陥に起因して起きる。さらに、広範のリソソーム蓄積障害における機能障害性リソソームは、不備のあるリソソーム完全性の結果として、管腔 Cl⁻ および / または H⁺ の低減を示した。2-IM は、提示のそれらの類似性、突然変異が、3つの同定した遺伝子の1つのみに存在するという事実に起因して、3つの関連したリソソーム蓄積障害、即ち、ニーマンピック病バリエーションを研究するのに適用され、3つ全ての遺伝子産物が、リソソーム常在性であり、重要なことに、治療薬が、これらの疾患に利用可能である。

【0228】

ニーマンピック病 A (NP-A) およびニーマンピック病 B (NP-B) は、酵素酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) の欠損に起因して起こり、それに関して、酵素補充療法が利用可能である。ニーマンピック病 C (NP-C) は、2つの重要なタンパク質 NPC1 または NPC2 のいずれか1つにおける突然変異に起因して、欠損コレステロール輸送に起因して起こり、それに関して、シクロデキストリン誘導体を使用した臨床試験が進行中である。NP-A および NP-C 疾患に相当する3つの患者試料ならびに NP-B に関する2つを、試料利用可能性、一般的な突然変異および酵素活性による特性化に基づいて研究した (表 5)。

【0229】

【表 5】

表 5

試料	試料番号	遺伝子	遺伝子突然変異	年齢 (サンプリング時)
正常な個体2	GM08429	N/A	N/A	M (1 DA)
正常な個体3	AG01518	N/A	N/A	M (3 DA)
NP-A患者1	GM00112	SMPD1	L302P	M (10 Mo)
NP-A患者2	GM13205	SMPD1	P330fsX382	F (2 Yr)
NP-A患者3	GM16195	SMPD1	L302P	M (データなし)
NP-B患者1	GM03252	SMPD1	L302P	F (2 Fw)
NP-B患者2	GM11097	SMPD1	SMPD1において最も一般的な3つの突然変異に関して陰性(R496L、L302PおよびP330fsX382)	M (1 Yr)
NP-C患者1	GM18414	NPC1	T1036M	F (データなし)
NP-C患者2	GM23162	NPC1	D948N	F (1 Yr)
NP-C患者3	GM17910	NPC2	C93F	M (データなし)

DA=日、Mo=ヵ月、Yr=年、Fw=胎生週

【0230】

Chlorophorelyが、あらゆる患者試料においてリソソームを標識することができることを立証した(図30、g~l)後、2-IMにそれぞれ付した(図17E)。NP-AおよびNP-C患者から得られる線維芽細胞におけるChlorophorelyで標識したリソソームの典型的なD/AおよびR/Gマップを、図17A(iii)から図17A(vi)に示す。全ての患者試料の皮膚バイオプシーから得られる線維芽細胞の2-IMプロファイルにより、高塩化物で高酸性度のリソソーム集団が存在しないことが示された(図17E(i)~図17E(viii))。特に、NP-C患者試料の2-IMプロファイルは、健常な試料と比較して、高度の単分散性を示した(図17E(vi)~図17E(viii))。

【0231】

リソソームpHは、ある特定の細胞型において空間位置と相関するが、かかる依存性は、リソソームC₁に関しては現段階では利用可能ではない。末梢リソソームは、C2C12マウス筋芽細胞、ヒト脂肪微小血管内皮細胞およびHeLa細胞ではより低い酸性度を示すが、初代培養ヒト樹状細胞、またはCHO細胞では示さない。興味深いことに、初代培養HDF細胞における2-IMプロファイルにより、末梢リソソームは、核周囲型リソソームよりも高いpHを有することが示された(図17A(i)、矢頭)。さらに、NP-A細胞およびNP-C細胞では、リソソームpHにおける空間的不均一性は失われ、リソソームは、一様に低酸性となる(図17A(iii)および図17(v))。pHと対比して、かかる空間的相関は、正常な個体由来のHDF細胞において、管腔C₁に関しては観察することができなかった(図17A(ii))。しかしながら、NP-A患者試料およびNP-C患者試料では、核周囲型リソソームの管腔C₁が、末梢リソソームの管腔C₁よりも影響されて、より少なかった(図17A(iv)&図17A(vi))。まとめると、このことにより、核周囲型リソソームの環境が、残りの部分よりも損なわれること、また高塩化物の高酸性度集団が、これらのリソソームに相当し得ることが示唆される。管腔イオンと、リソソームサイズとの間の相関は、図17F(i)~図17F(iv)に提供される。これらの研究により、高塩化物リソソームは、サイズがより小さく、それらの数は、患者細胞において減少することが明らかとなった。かかる明らかな相関は、リソソームpHに関しては見られなかった。

【0232】

実施例14. Chlorophorelyは、治療有効性の評価を可能にする

高塩化物の高酸性度集団が、病理学的リソソーム蓄積の誘導にどのように影響されたかを理解するために、NP-A/B疾患およびNP-C疾患の細胞培養モデルを創出した。これらの障害を特徴付けるスフィンゴミエリンおよびコレステロール蓄積を模倣するために、健常な個体由来のHDF細胞を、それぞれASMおよびNPC1を阻害するアミトリプチリン塩酸塩(AH)およびU18666Aで処理した。Chlorophorelyがこれらの細胞においてリソソームを効率的に標識することを立証した後に、2-IMを実施した(図30、c~f)。2-IMプロファイルは、両方の細胞培養物モデルにおける単分散リソソーム集団、および高塩化物で高酸性度のリソソーム集団の減少を示した(図17G(i)&図17G(ii))。

【0233】

次に、この高塩化物で高酸性度のリソソーム集団が、患者細胞を、相当する治療薬で補完する際に回復され得るかどうかを検討した。組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ(rhASM)を使用して、酵素補充療法によって、NP-A/B患者を治療した。文献に概説されるように、NP-A患者試料およびNP-B患者試料由来の線維芽細胞を、rhASMとともにインキュベートした。これらの細胞は、細胞外環境からrhASMを内部移行させて、rhASMをリソソームに輸送すると予想され、そこで、rhASMは、スフィンゴミエリンを分解して、蓄積を軽減させる。rhASMで治療した患者細胞の2-IMプロファイルは、高塩化物の高酸性度リソソーム集団の再出現を示した(図17H(i)&図17(ii))。

【0234】

NPCは、分解酵素の欠乏に起因せず、どちらかと言えば輸送欠陥に起因し、それに関して、依然としてFDAが認可した治療薬は存在しない。しかしながら、24時間の α -2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン(β CD)処理が、リソソームから小胞体へのコレステロール輸送を改善することがわかっており、それによりコレステロールを、エステル化のためにERに送達して、リソソームにおける蓄積を低減させる。興味深いことに、NPC1(図17H(iii)&図17H(iv))またはNPC2(図17H(v))のいずれかで突然変異させたNPC患者試料を、 β CDで処理することにより、2-IMプロファイルにおける単分散性の損失ならびにより高い管腔 Cl^- および H^+ 含有量を有するリソソームの出現が示された。

【0235】

本発明を実行するための本発明者らに既知のベストモードを含む、本発明のいくつかの実施形態が、本明細書中に記載される。当然のことながら、これらの記載される実施形態に対する変形は、先述の説明を読み取ると、当業者に明らかになる。本発明者らは、当業者が、必要に応じて、かかる変形を用いると予想し、本発明者らは、本発明が、本明細書中に具体的に記載されるもの以外に実践されると意図する。したがって、本発明は、適用法に認められるように、本明細書に併記される特許請求の範囲において列挙される対象主題の修正および等価体全てを含む。さらに、本発明の全ての考え得る変形における上述の要素の任意の組合せは、本明細書中に別記しない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限りは、本発明に包含される。

【0236】

本開示の様々な例示的な実施形態として、以下で列挙される実施形態が挙げられるが、これらに限定されず、それらは、任意の数で、また技術的にまたは論理的に相反しない任意の組合せで組み合わせることができる。

【0237】

実施形態1は、試料中の1) pH、および2) Ca^{2+} 濃度または Cl^- 濃度を同時に決定する方法であって、

第1の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアを含む第1の一本鎖核酸分子と、

該第1の一本鎖分子に部分的にまたは完全に相補的な第2の一本鎖核酸分子とを含む核酸複合体を提供することであって、該核酸複合体が、該第1の一本鎖核酸分子または該第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされた第1の標識をさらに含み、該第1の標識が、シグナルを発生することが可能であり、該シグナルの強度が、pHの変化に依存する、提供することと、

該シグナルの該強度を測定することと、

測定されたシグナルから該pH、および Ca^{2+} または Cl^- 濃度を決定することとを含む、方法を提供する。

【0238】

実施形態2は、試料が、細胞、細胞抽出物、細胞溶解物、組織、組織抽出物、体液、血清、血液および血液製剤から選択される生体試料である、実施形態1の方法を提供する。

【0239】

実施形態3は、試料が、生存細胞である、実施形態1の方法を提供する。

【0240】

実施形態4は、決定することが、初期エンドソーム、後期エンドソーム、原形質膜、リソソーム、オートファゴリソソーム、リサイクリングエンドソーム、シスゴルジネットワーク、トランスゴルジネットワーク、小胞体、ペルオキシソーム、または分泌小胞において行われる、実施形態1~3のいずれかの方法を提供する。

【0241】

実施形態5は、核酸複合体が、第1の鎖に架橋された Cl^- フルオロフォアを含む、実施形態1~4のいずれかの方法を提供する。

【0242】

10

20

30

40

50

実施形態 6 は、 Cl^- フルオロフォアが、10, 10'-ビス[3-カルボキシプロピル]-9, 9'-ビアクリジニウム二硝酸塩を含む、実施形態 5 の方法を提供する。

【0243】

実施形態 7 は、核酸複合体が、第 1 の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアを含む、実施形態 1～4 のいずれかの方法を提供する。

【0244】

実施形態 8 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、単一波長指標である、実施形態 7 の方法を提供する。

【0245】

実施形態 9 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F、XRhod-5F、Rhod-FF、XRhod-FF、Oregon Green 488 BAPTA-6F、Fluo 5F、Fluo 4FF、Oregon Green BAPTA-5N、Fluo-5N、または Mag-Fluo-4 指示薬を含む、実施形態 7 の方法を提供する。

【0246】

実施形態 10 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F、XRhod-5F、または Rhod-FF 指示薬を含む、実施形態 7～9 のいずれかの方法を提供する。

【0247】

実施形態 11 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F 指示薬を含む、実施形態 7～9 のいずれかの方法を提供する。

【0248】

実施形態 12 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基を通じて第 1 の鎖に架橋される、実施形態 7～11 のいずれかの方法を提供する。

【0249】

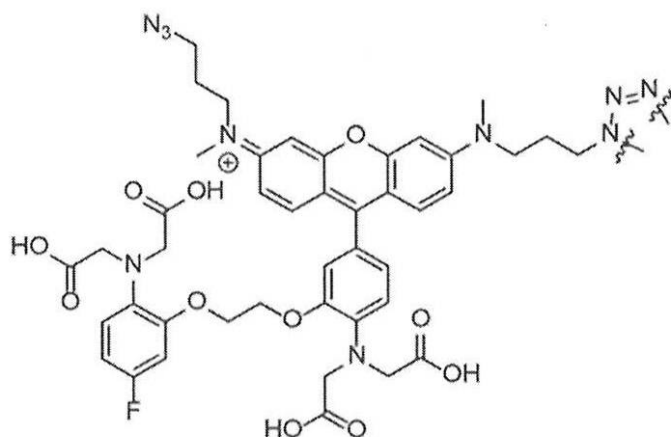
実施形態 13 は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、 Ca^{2+} フルオロフォア上のアジドまたはチオール部分と、第 1 の鎖上のアルキンまたはアルケン部分との反応を通じて、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基を形成するように設定されたリンカー部分をさらに含む、実施形態 12 の方法を提供する。

【0250】

実施形態 14 は、架橋された Ca^{2+} フルオロフォアが、

【0251】

【化 6】



である、実施形態 7～13 のいずれかの方法を提供する。

【0252】

実施形態 15 は、 Ca^{2+} フルオロフォアを含む第 1 の一本鎖核酸分子が、式：

【0253】

10

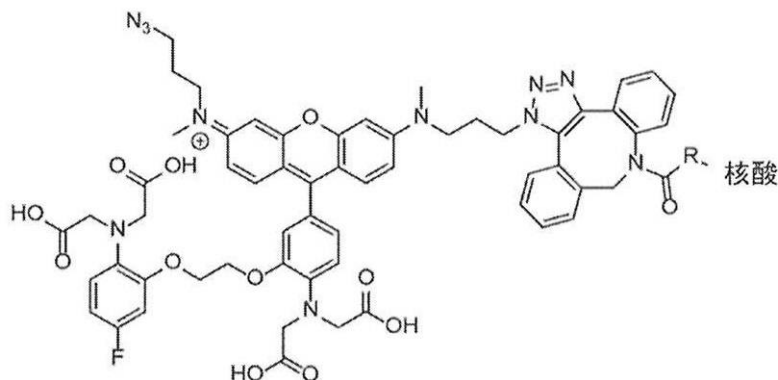
20

30

40

50

【化 7】



10

(式中、Rはリンカーである)

を有する、実施形態7～14のいずれかの方法を提供する。

【0254】

実施形態16は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、生理学的条件下で安定なリンカー部分を通じて第1の鎖に架橋される、実施形態7～11のいずれかの方法を提供する。

【0255】

実施形態17は、第1の標識が、Oregon green、FITC、またはpH rhodo標識を含む、実施形態1～16のいずれかの核酸複合体を提供する。

20

【0256】

実施形態18は、pHの変化に依存するシグナルの強度が、核酸複合体のコンホメーションに応じて変動する、実施形態1～16のいずれかの方法を提供する。

【0257】

実施形態19は、第2の一本鎖核酸分子が、配列 $\text{C}_n\text{X}\text{C}_n\text{Y}\text{C}_n\text{Z}\text{C}_n$ （配列番号13）（式中、Cは、シトシンであり、X、YおよびZはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む、実施形態18の方法を提供する。

【0258】

実施形態20は、X、Y、およびZがそれぞれ独立して、AAまたはTAAである、実施形態19の方法を提供する。

30

【0259】

実施形態21は、第2の一本鎖核酸分子が、配列 $\text{C}_n\text{X}\text{C}_n$ （式中、Cは、シトシンであり、XおよびYはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む、実施形態18の方法を提供する。

【0260】

実施形態22は、XおよびYがそれぞれ独立して、AAまたはTAAである、実施形態21の方法を提供する。

40

【0261】

実施形態23は、nがそれぞれ独立して、3、4、または7である、実施形態19～22のいずれかの方法を提供する。

【0262】

実施形態24は、修飾が、1個または複数のメチル、フルオロ、ブromo、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基から選択される、実施形態19～23のいずれかの方法を提供する。

【0263】

実施形態25は、修飾が、メチルまたはブromo基である、実施形態19～23のいずれかの方法を提供する。

50

【0264】

実施形態26は、修飾が、シトシンの5'位である、実施形態19～23のいずれかの方法を提供する。

【0265】

実施形態27は、核酸が、第1の一本鎖核酸または第2の一本鎖核酸にコンジュゲートされた第2の標識をさらに含む、実施形態1～26のいずれかの方法を提供する。

【0266】

実施形態28は、シグナルの強度が、第1の標識と、第2の標識との間の距離、ならびに第1の標識および第2の標識の相対的な配向性の少なくとも1つに応じて変動する、実施形態27の方法を提供する。

10

【0267】

実施形態29は、第1の標識および第2の標識が、ドナーおよびアクセプター対を含む、実施形態27の方法を提供する。

【0268】

実施形態30は、シグナルが、FRET技法を使用して測定される、実施形態1～29のいずれかの方法を提供する。

【0269】

実施形態31は、シグナルが、2つの異なる波長で測定される、実施形態1～30のいずれかの方法を提供する。

【0270】

実施形態32は、シグナルが、4つの異なる波長で測定される、実施形態27～30のいずれかの方法を提供する。

20

【0271】

実施形態33は、 Ca^{2+} 濃度が、第2の標識からの測定されたシグナルとともに、 Ca^{2+} フルオロフォアからの測定されたシグナルから決定される、実施形態27～32のいずれかの方法を提供する。

【0272】

実施形態34は、 Cl^{-} 濃度が、第1の標識または第2の標識からの測定されたシグナルとともに、 Cl^{-} フルオロフォアからの測定されたシグナルから決定される、実施形態27～32のいずれかの方法を提供する。

30

【0273】

実施形態35は、第1の一本鎖核酸分子および第2の一本鎖核酸が、酸性条件下でi-モチーフを形成する、実施形態1～34のいずれかの方法を提供する。

【0274】

実施形態36は、第2の一本鎖核酸が、酸性条件で逆平行の配向性でインターカレートされる2つの平行鎖 $C-HC+$ 塩基対形成された二本鎖を含む分子内複合体を形成することが可能である、実施形態1～34のいずれかの方法を提供する。

【0275】

実施形態37は、核酸複合体が、第1の一本鎖分子に部分的に相補的な第3の一本鎖核酸分子をさらに含む、実施形態1～36のいずれかの方法を提供する。

40

【0276】

実施形態38は、第2の一本鎖核酸分子が、配列 $C_n X C_n Y C_n Z C_n$ （配列番号13）（式中、Cは、シトシンであり、X、YおよびZはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む、実施形態37の方法を提供する。

【0277】

実施形態39は、X、Y、およびZがそれぞれ独立して、AAまたはTAAである、実施形態38の方法を提供する。

【0278】

実施形態40は、第3の一本鎖核酸分子が、配列 $C_n X C_n$ （式中、Cは、シトシンで

50

あり、XおよびYはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される)を含む、実施形態37の方法を提供する。

【0279】

実施形態41は、XおよびYがそれぞれ独立して、AAである、実施形態37の方法を提供する。

【0280】

実施形態42は、nがそれぞれ独立して、3、4、または7である、実施形態37または04の方法を提供する。

【0281】

実施形態43は、修飾が、1個または複数のメチル、フルオロ、ブromo、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基から選択される、実施形態37～42のいずれかの方法を提供する。

【0282】

実施形態44は、修飾が、メチルまたはブromo基である、実施形態37～42のいずれかの方法を提供する。

【0283】

実施形態45は、修飾が、シトシンの5'位である、実施形態37～44のいずれかの方法を提供する。

【0284】

実施形態46は、第1の標識が、第2の一本鎖核酸上に存在する、実施形態37～45のいずれかの方法を提供する。

【0285】

実施形態47は、核酸複合体が、第3の一本鎖核酸にコンジュゲートされた第2の標識をさらに含む、実施形態37～46のいずれかの方法を提供する。

【0286】

実施形態48は、第2の一本鎖核酸および第3の一本鎖核酸が、酸性条件下でi-モチーフを形成する、実施形態37～47のいずれかの方法を提供する。

【0287】

実施形態49は、第2の一本鎖核酸または第3の一本鎖核酸が、酸性条件下で逆平行の配向性でインターカレートされる2つの平行鎖C-HC+塩基対形成された二本鎖を含む分子内複合体を形成することが可能である、実施形態37～47のいずれかの方法を提供する。

【0288】

実施形態50は、第1の標識および第2の標識が独立して、Atto色素、Alexa Fluor (登録商標)色素、Cy (登録商標)色素、およびBODIPY色素からなる群から選択される、実施形態27～49のいずれかの方法を提供する。

【0289】

実施形態51は、第1の標識および第2の標識が、ドナーフルオロフォアおよびアクセプタークエンチャーを含む、実施形態27～50のいずれかの方法を提供する。

【0290】

実施形態52は、ドナーフルオロフォアおよびアクセプタークエンチャー対が、FITCおよびTRITC、またはCy3およびCy5、またはAlexa-488およびAlexa-647である、実施形態51の方法を提供する。

【0291】

実施形態53は、核酸複合体が、ターゲティング部分をさらに含む、実施形態1～52のいずれかの方法を提供する。

【0292】

実施形態54は、ターゲティング部分が、核酸配列である、実施形態53の方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0293】

実施形態55は、ターゲティング部分が、コグネイト人工タンパク質受容体を有する、実施形態53の方法を提供する。

【0294】

実施形態56は、ターゲティング部分が、第1の一本鎖核酸分子、第2の一本鎖核酸分子、第3の一本鎖核酸分子、またはそれらの任意の組合せと同じ核酸鎖上でコードされる、実施形態53～55のいずれかの方法を提供する。

【0295】

実施形態57は、ターゲティング部分が、アプタマー、人工タンパク質受容体にターゲティングされた二本鎖ドメイン、陰イオンリガンド結合受容体に結合する核酸配列、およびエンドサイトーシスリガンドから選択される、実施形態53～55のいずれかの方法を提供する。

10

【0296】

実施形態58は、ターゲティング部分が、核酸分子に、直接または間接的にコンジュゲートされたペプチドを含む、実施形態53～55のいずれかの方法を提供する。

【0297】

実施形態59は、ターゲティング部分が、融合性ペプチド、膜透過性ペプチド、細胞内局在化配列、または細胞受容体リガンドの1つまたは複数を含む、実施形態53～55のいずれかの方法を提供する。

【0298】

実施形態60は、細胞内局在化配列が、ターゲティングされるタンパク質の空間的局在化が存在する細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる、実施形態59の方法を提供する。

20

【0299】

実施形態61は、細胞内局在化配列が、細胞質ゾル、小胞体、ミトコンドリアマトリクス、葉緑体管腔、メデイアルトランスゴルジ囊、リソソームの管腔、エンドソームの管腔、ペルオキシソーム、核、および原形質膜上の特定の空間的位置からなる群から選択される細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる、実施形態60の方法を提供する。

【0300】

実施形態62は、第1および／または第2の一本鎖核酸分子が、200個未満のヌクレオチド、または100個未満のヌクレオチド、または50個未満のヌクレオチドである、実施形態1～61のいずれかの方法を提供する。

30

【0301】

実施形態63は、決定された Ca^{2+} 濃度が、10nM～10mMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

【0302】

実施形態64は、決定された Ca^{2+} 濃度が、10nM～1μMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

【0303】

実施形態65は、決定された Ca^{2+} 濃度が、1μM～10mMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

40

【0304】

実施形態66は、決定された Cl^{-} 濃度が、10nM～10mMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

【0305】

実施形態67は、決定された Cl^{-} 濃度が、10nM～1μMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

【0306】

実施形態68は、決定された Cl^{-} 濃度が、1μM～10mMの範囲である、実施形態1～62のいずれかの方法を提供する。

50

【0307】

実施形態69は、決定されたpHが、pH5.5未満である、実施形態1～68のいずれかの方法を提供する。

【0308】

実施形態70は、決定されたpHが、pH7.0を超える、実施形態1～68のいずれかの方法を提供する。

【0309】

実施形態71は、第1の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアまたは Cl^- フルオロフォアを含む第1の一本鎖核酸分子と、

該第1の一本鎖分子に部分的にまたは完全に相補的な第2の一本鎖核酸分子とを含む核酸複合体であって、

該核酸複合体が、該第1の一本鎖核酸分子または該第2の一本鎖核酸分子にコンジュゲートされた第1の標識をさらに含み、該第1の標識が、シグナルを発生することが可能である、核酸複合体を提供する。

【0310】

実施形態72は、核酸複合体が、第1の鎖に架橋された Cl^- フルオロフォアを含む、実施形態71の方法を提供する。

【0311】

実施形態73は、 Cl^- フルオロフォアが、10, 10'-ビス[3-カルボキシプロピル]-9, 9'-ビアカリジニウム二硝酸塩を含む、実施形態72の方法を提供する。

【0312】

実施形態74は、核酸複合体が、第1の鎖に架橋された Ca^{2+} フルオロフォアを含む、実施形態71の方法を提供する。

【0313】

実施形態75は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、単一波長指標である、実施形態74の核酸複合体を提供する。

【0314】

実施形態76は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F、XRhod-5F、Rhod-FF、XRhod-FF、Oregon Green 488 BAPTA-6F、Fluo 5F、Fluo 4FF、Oregon Green BAPTA-5N、Fluo-5N、またはMag-Fluo-4指示薬を含む、実施形態74の核酸複合体を提供する。

【0315】

実施形態77は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F、XRhod-5F、またはRhod-FF指示薬を含む、実施形態74の核酸複合体を提供する。

【0316】

実施形態78は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、Rhod-5F指示薬を含む、実施形態74の核酸複合体を提供する。

【0317】

実施形態79は、 Ca^{2+} フルオロフォアが、 Ca^{2+} フルオロフォア上のアジドまたはチオール部分と、第1の鎖上のアルキンまたはアルケン部分との反応を通じて、トリアゾール、チオエーテル、またはアルケニルスルフィド基を形成するように設定されたリンカ一部分をさらに含む、実施形態74～78のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0318】

実施形態80は、架橋された Ca^{2+} フルオロフォアが、

【0319】

10

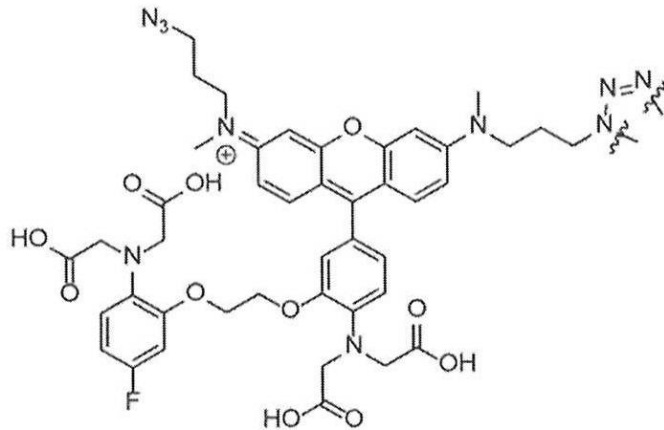
20

30

40

50

【化 8】



10

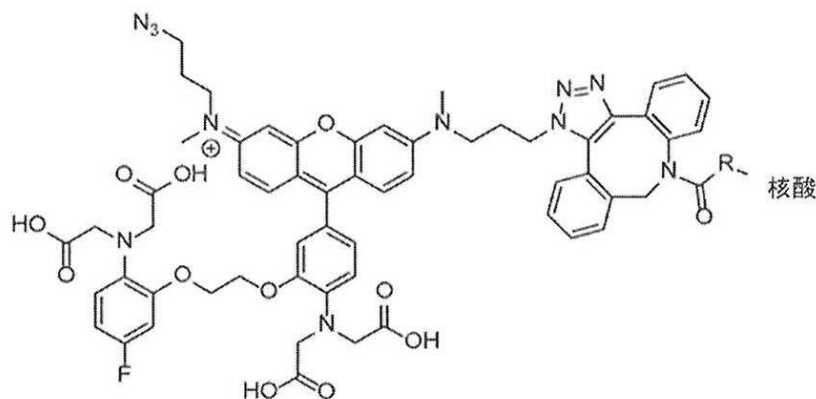
である、実施形態 74～79 のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0320】

実施形態 81 は、 Ca^{2+} フルオロフォアを含む第 1 の一本鎖核酸分子が、式：

【0321】

【化 9】



20

30

(式中、R はリンカーである)

を有する、実施形態 74～80 のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0322】

実施形態 82 は、第 1 の標識が、Oregon green、FITC、または pH rhodol 標識を含む、実施形態 71～81 のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0323】

実施形態 83 は、第 2 の一本鎖核酸分子が、配列 $\text{C}_n\text{X}\text{C}_n$ (式中、C は、シトシンであり、X および Y はそれぞれ、1 個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、n は、2 以上であり、少なくとも 2 個のシトシン残基が修飾される) を含む、実施形態 71～81 のいずれかの核酸複合体を提供する。

40

【0324】

実施形態 84 は、X および Y がそれぞれ独立して、AA または TAA である、実施形態 83 の核酸複合体を提供する。

【0325】

実施形態 85 は、第 2 の一本鎖核酸分子が、配列 $\text{C}_n\text{X}\text{C}_n\text{Y}\text{C}_n\text{Z}\text{C}_n$ (配列番号 13) (式中、C は、シトシンであり、X、Y および Z はそれぞれ、1 個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、n は、2 以上であり、少なくとも 2 個のシトシン残基が修飾される) を含む、実施形態 71～81 のいずれかの核酸複合体を提供する。

50

【0326】

実施形態86は、X、Y、およびZがそれぞれ独立して、AAまたはTAAである、実施形態85の核酸複合体を提供する。

【0327】

実施形態87は、nがそれぞれ独立して、3、4、または7である、実施形態83～86のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0328】

実施形態88は、修飾が、1個または複数のメチル、フルオロ、ブロモ、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基から選択される、実施形態83～87のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0329】

実施形態89は、修飾が、メチルまたはブロモ基である、実施形態83～87のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0330】

実施形態90は、修飾が、シトシンの5'位である、実施形態83～89のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0331】

実施形態91は、第1の一本鎖核酸または第2の一本鎖核酸にコンジュゲートされた、シグナルを発生することが可能な第2の標識をさらに含む、実施形態83～90のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0332】

実施形態92は、第1の標識および第2の標識が、ドナーおよびアクセプター対を含む、実施形態91の核酸複合体を提供する。

【0333】

実施形態93は、第1の一本鎖核酸分子および第2の一本鎖核酸が、酸性条件下でi-モチーフを形成するように設定されている、実施形態83～92のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0334】

実施形態94は、第2の一本鎖核酸が、酸性条件で逆平行の配向性でインターカレートされる2つの平行鎖C-HC+塩基対形成された二本鎖を含む分子内複合体を形成するように設定されている、実施形態83～92のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0335】

実施形態95は、第1の一本鎖分子に部分的に相補的な第3の一本鎖核酸分子をさらに含む、実施形態83～94のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0336】

実施形態96は、第3の一本鎖核酸分子が、配列 $C_n X C_n Y C_n Z C_n$ （配列番号13）（式中、Cは、シトシンであり、X、YおよびZはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む、実施形態95の核酸複合体を提供する。

【0337】

実施形態97は、X、Y、およびZがそれぞれ独立して、AAまたはTAAである、実施形態96の核酸複合体を提供する。

【0338】

実施形態98は、第3の一本鎖核酸分子が、配列 $C_n X C_n$ （式中、Cは、シトシンであり、XおよびYはそれぞれ、1個または複数のアデニン、チミン、グアニン、またはそれらの組合せであり、nは、2以上であり、少なくとも2個のシトシン残基が修飾される）を含む、実施形態95の核酸複合体を提供する。

【0339】

実施形態99は、XおよびYがそれぞれ独立して、AAである、実施形態98の核酸複合体を提供する。

10

20

30

40

50

【0340】

実施形態100は、nがそれぞれ独立して、3、4、または7である、実施形態96～99の核酸複合体を提供する。

【0341】

実施形態101は、修飾が、1個または複数のメチル、フルオロ、ブロモ、ヒドロキシメチル、ホルミル、またはアセチル基から選択される、実施形態96～100のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0342】

実施形態102は、修飾が、メチルまたはブロモ基である、実施形態96～100のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0343】

実施形態103は、修飾が、シトシンの5'位である、実施形態96～102のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0344】

実施形態104は、第1の標識が、第2の一本鎖核酸上に存在する、実施形態96～103のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0345】

実施形態105は、核酸複合体が、第3の一本鎖核酸にコンジュゲートされた第2の標識をさらに含む、実施形態96～104のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0346】

実施形態106は、第2の一本鎖核酸および第3の一本鎖核酸が、酸性条件下でi-モチーフを形成するように設定されている、実施形態96～105のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0347】

実施形態107は、第2の一本鎖核酸または第3の一本鎖核酸が、酸性条件で逆平行の配向性でインターカレートされる2つの平行鎖C-HC+塩基対形成された二本鎖を含む分子内複合体を形成するように設定されている、実施形態96～105のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0348】

実施形態108は、第1の標識および第2の標識が独立して、Atto色素、Alexa Fluor（登録商標）色素、Cy（登録商標）色素、およびBODIPY色素からなる群から選択される、実施形態71～107のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0349】

実施形態109は、第1の標識および第2の標識が、ドナーフルオロフォアおよびアクセプタークエンチャーを含む、実施形態91～108のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0350】

実施形態110は、ドナーフルオロフォアおよびアクセプタークエンチャー対が、FITCおよびTRITC、Cy3およびCy5、またはAlexa-488およびAlexa-647である、実施形態109の核酸複合体を提供する。

【0351】

実施形態111は、ターゲティング部分をさらに含む、実施形態71～107のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0352】

実施形態112は、ターゲティング部分が、核酸配列である、実施形態111の核酸複合体を提供する。

【0353】

実施形態113は、ターゲティング部分が、コグネイト人工タンパク質受容体を有する、実施形態111の核酸複合体を提供する。

【0354】

実施形態114は、ターゲティング部分が、第1の一本鎖核酸分子、第2の一本鎖核酸

10

20

30

40

50

分子、第3の一本鎖核酸分子、またはそれらの任意の組合せと同じ核酸鎖上でコードされる、実施形態111～113のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0355】

実施形態115は、ターゲティング部分が、アプタマー、人工タンパク質受容体にターゲティングされた二本鎖ドメイン、陰イオンリガンド結合受容体に結合する核酸配列、およびエンドサイトーシスリガンドから選択される、実施形態111～113のいずれかの核酸複合体を提供する。

【0356】

実施形態116は、ターゲティング部分が、核酸分子に、直接または間接的にコンジュゲートされたペプチドを含む、実施形態115の核酸複合体を提供する。

10

【0357】

実施形態117は、ターゲティング部分が、融合性ペプチド、膜透過性ペプチド、細胞内局在化配列、または細胞受容体リガンドの1つまたは複数を含む、実施形態115の核酸複合体を提供する。

【0358】

実施形態118は、細胞内局在化配列が、ターゲティングされるタンパク質の空間的局在化が存在する細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる、実施形態117の核酸複合体を提供する。

【0359】

実施形態119は、細胞内局在化配列が、細胞質ゾル、小胞体、ミトコンドリアマトリクス、葉緑体管腔、メダイアルトランスゴルジ槽、リソソームの管腔、エンドソームの管腔、ペルオキシソーム、核、および原形質膜上の特定の空間的位置からなる群から選択される細胞の領域に、核酸複合体をターゲティングさせる、実施形態118の核酸複合体を提供する。

20

【0360】

実施形態120は、第1の鎖が、配列5' - C²⁺フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有し、第2の鎖が、配列5' - 第1の標識 - CCC CTA ACC CCT AAC CCC TAA CCC CAT ATA TAT CCT AGA ACG ACA GAC AAA CAG TGA GTC - 3' (配列番号08) を有する、実施形態71の核酸複合体を提供する。

30

【0361】

実施形態121は、第1の鎖が、配列5' - TTA TAG GAT CCT GCG GTC GG / Ca²⁺フルオロフォア / GGC ACC AGG CGT AAA ATG TA - 3' (配列番号09) を有し、第2の鎖が、配列：5' - 第1の標識 - CCC CAA CCC CAA TAC ATT TTA CGC CTG GTG CC - 3' (配列番号10) を有し、第3の鎖が、配列：5' - CCG ACC GCA GGA TCC TAT AAA ACC CCA ACC CC - 第2の標識 - 3' (配列番号11) を有する、実施形態71の核酸複合体を提供する。

40

【0362】

実施形態122は、第1の鎖が、配列5' - C²⁺フルオロフォア - GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA / 第2の標識 / AT ATT TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT - 3' (配列番号07) を有し、第2の鎖が、配列5' - 第1の標識 - AT AAC ACA TAA CAC ATAA CAAAA TAT ATA TCC TAG AAC GAC AGA CAA ACA GTG AGT C - 3' (配列番号12) を有する、実施形態71の核酸複合体を提供する。

【0363】

実施形態123は、第1の鎖が、配列5' - C²⁺フルオロフォア - ATC AAC A

50

CT GCA-Lys-COOH (配列番号22)を有し、第2の鎖が、配列5'-TAT TGT GTA TTG TGT ATT GTT TTA TAT AT/第1の標識/ATAG GAT CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT-3' (配列番号23)を有し、第3の鎖が、配列:5'-CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC-第2の標識-3' (配列番号24)を有する、実施形態71の核酸複合体を提供する。

【0364】

実施形態124は、第1の鎖が、配列5'-C²⁺フルオロフォア-GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA/第2の標識/AT AT T TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT-3' (配列番号07)を有し、および第2の鎖が、配列5'-第1の標識-CCC CTA ACC CCT AAC CCC TAA CCC CAT ATA TAT CCT AGA ACG ACA GAC AAA CAG TGA GTC-3' (配列番号08)を有する、実施形態1の方法を提供する。

10

【0365】

実施形態125は、第1の鎖が、配列5'-TTA TAG GAT CCT GCG GTC GG/Ca²⁺フルオロフォア/GGC ACC AGG CGT AAA ATG TA-3' (配列番号09)を有し、第2の鎖が、配列:5'-第1の標識-CCC CAA CCC CAA TAC ATT TTA CGC CTG GTG CC-3' (配列番号10)を有し、および第3の鎖が、配列:5'-CCG ACC GCA GGA TCC TAT AAA ACC CCA ACC CC-第2の標識-3 (配列番号11)を有する、実施形態1の方法を提供する。

20

【0366】

実施形態126は、第1の鎖が、配列5'-C²⁺フルオロフォア-GAC TCA CTG TTT GTC TGT CGT TCT AGG ATA/第2の標識/AT AT T TTG TTA TGT GTT ATG TGT TAT-3' (配列番号07)を有し、および第2の鎖が、配列5'-第1の標識-AT AAC ACA TAA CAC ATAACAAAA TAT ATA TCC TAG AAC GAC AGA CAA A CA GTG AGT C-3' (配列番号12)を有する、実施形態1の方法を提供する。

30

【0367】

実施形態127は、第1の鎖が、配列5'-C²⁺フルオロフォア-ATC AAC ACT GCA-Lys-COOH (配列番号22)を有し、第2の鎖が、配列5'-TAT TGT GTA TTG TGT ATT GTT TTA TAT AT/第1の標識/ATAG GAT CTT GCT GTC TGG TGT GCA GTG TTG AT-3' (配列番号23)を有し、および第3の鎖が、配列:5'-CAC CAG ACA GCA AGA TCC TAT ATA TAT ACC CCA ATC CCC AAT CCC CAA TCC CC-第2の標識-3' (配列番号24)を有する、実施形態1の方法を提供する。

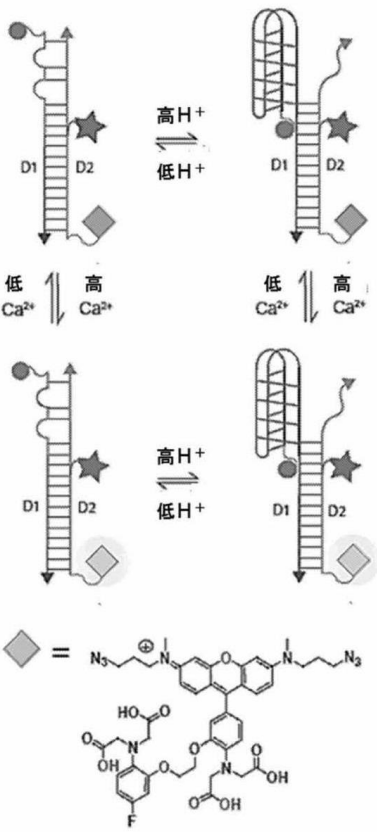
【0368】

本明細書中に記載される実施例および実施形態は、単に例示的な目的のためのものであること、また様々な修正または変更が、本明細書中に記載される実施例および実施形態を鑑みて、当業者に示唆されて、本出願の主旨および視野ならびに併記の特許請求の範囲内に組み込まれ得ることが理解されよう。本明細書中で引用される刊行物、特許、および特許出願は全て、全ての目的で、参照により本明細書に組み込まれる。

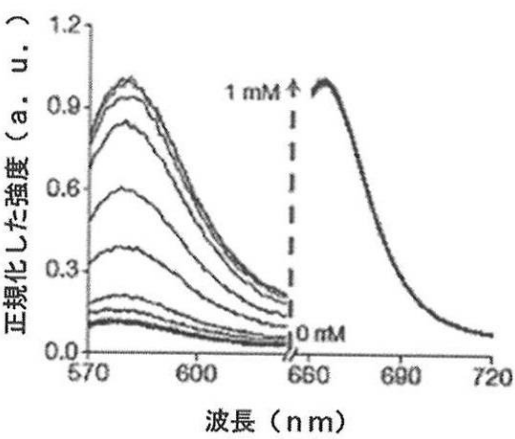
40

【図面】

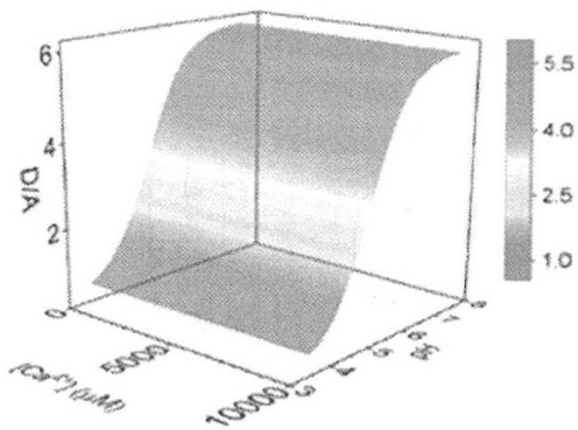
【図 1 A】



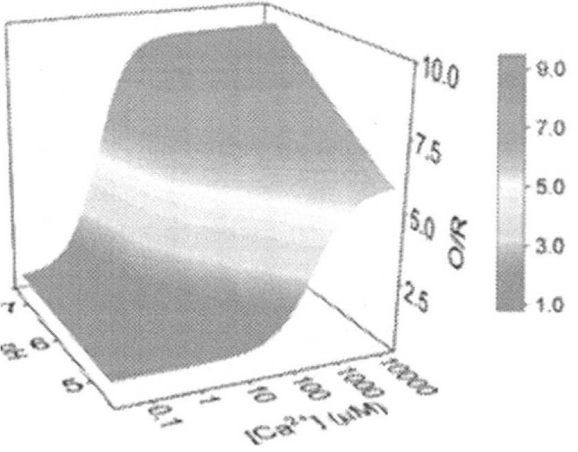
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

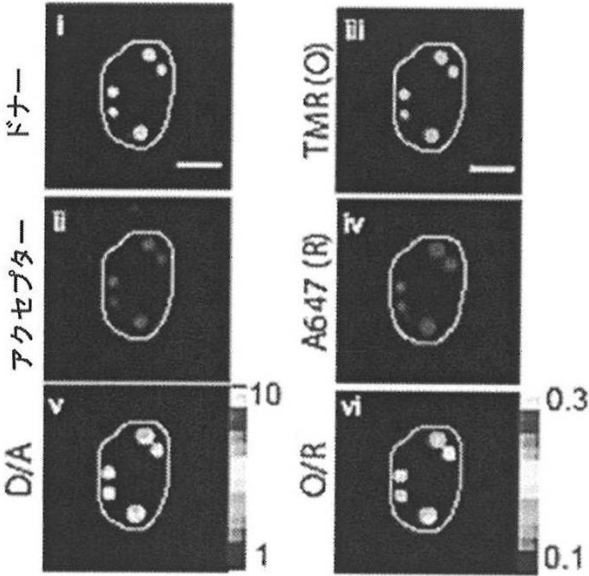
20

30

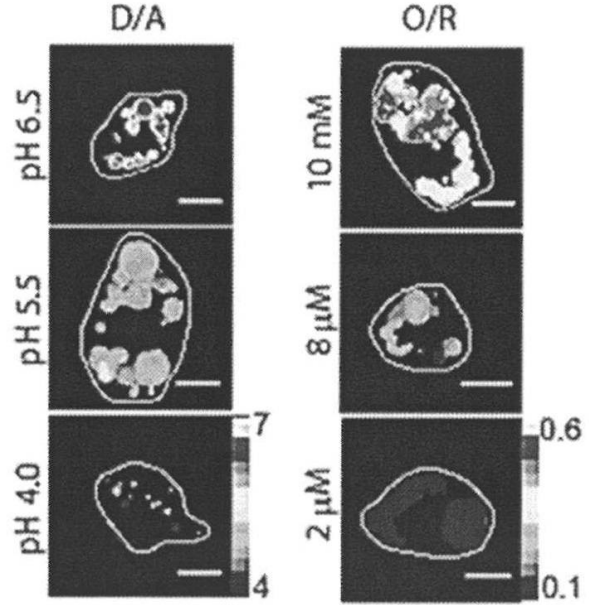
40

50

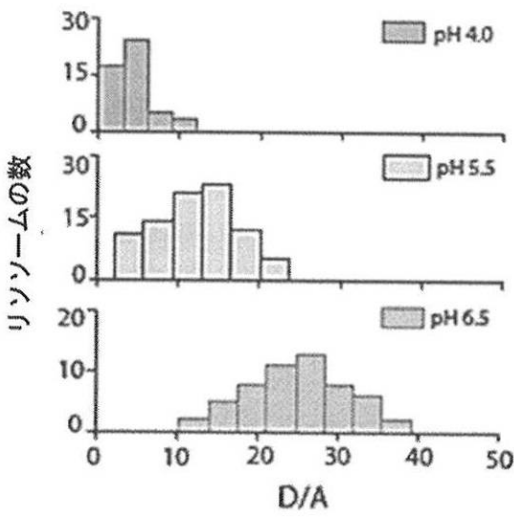
【図 2 A】



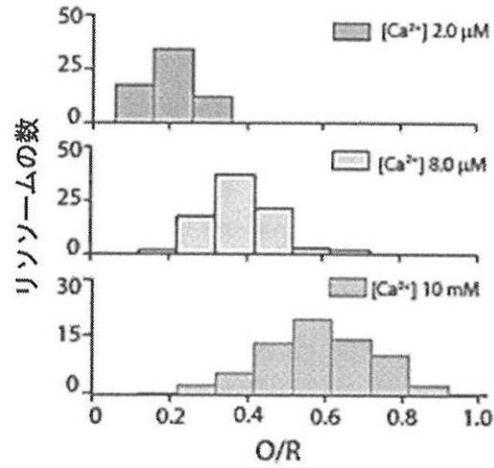
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

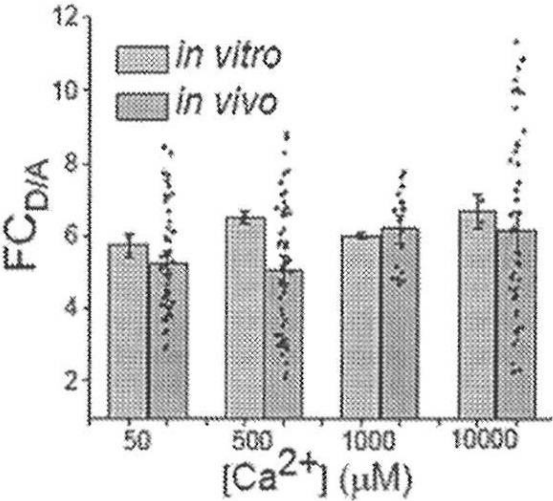
20

30

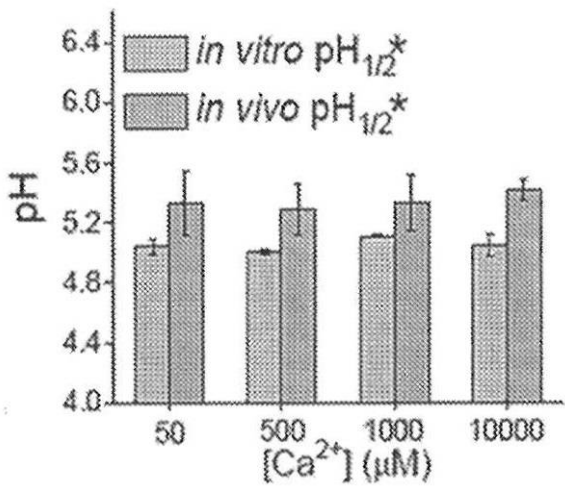
40

50

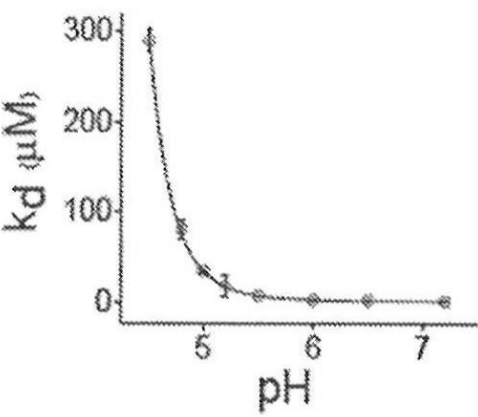
【図 2 E】



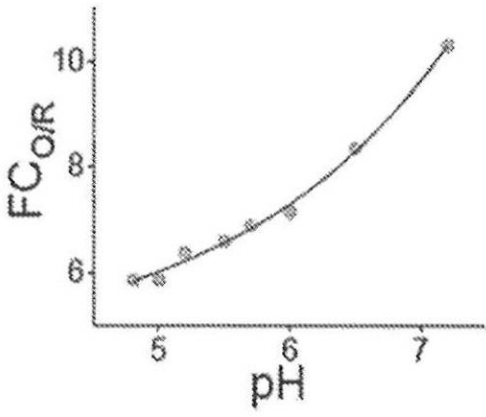
【図 2 F】



【図 2 G】



【図 2 H】



10

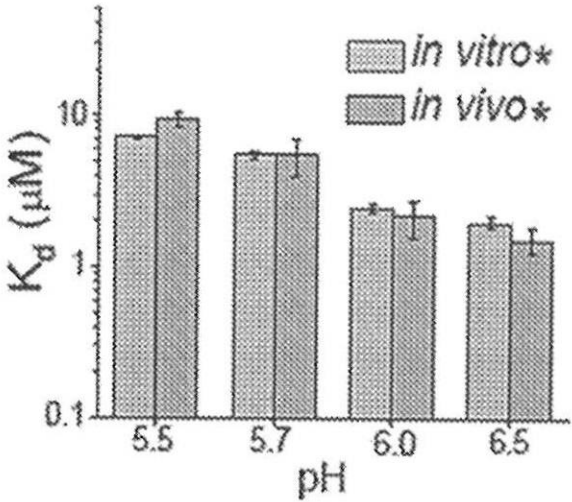
20

30

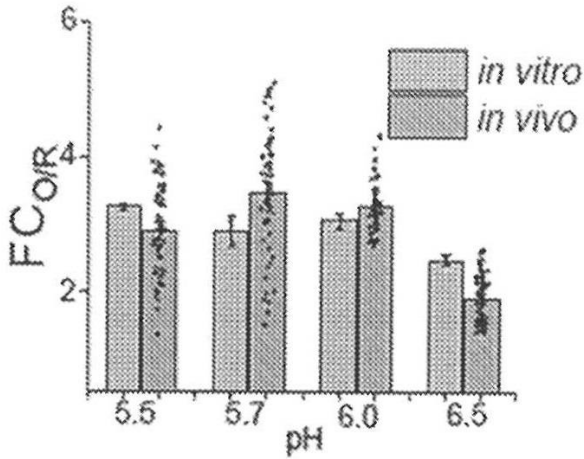
40

50

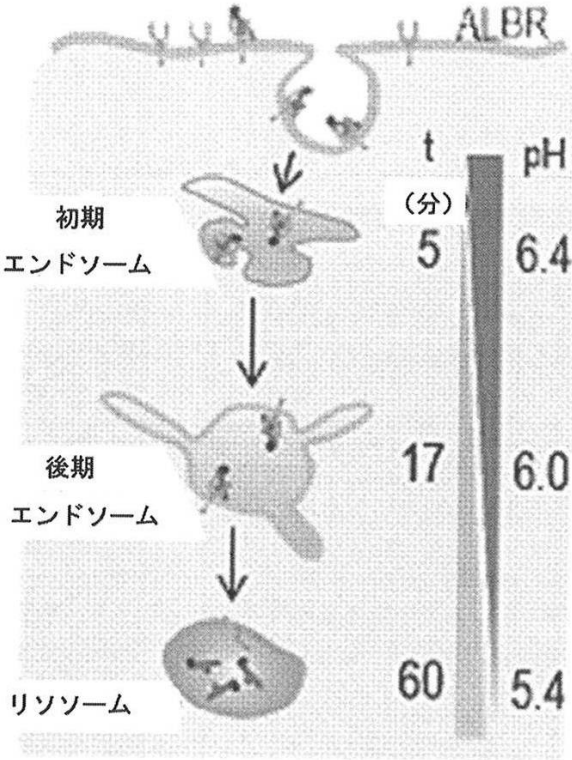
【図 2 I】



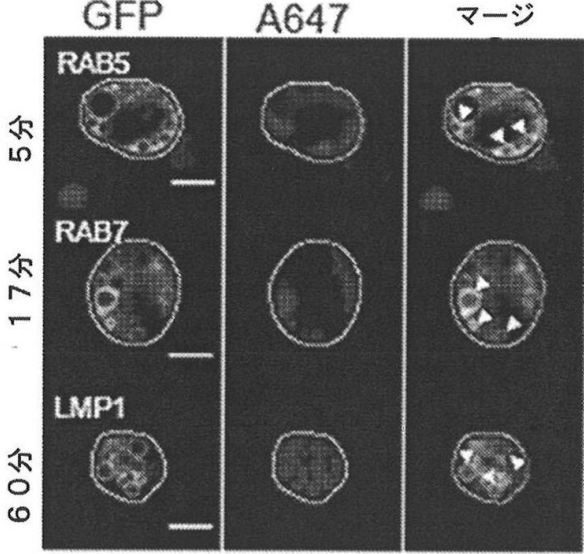
【図 2 J】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

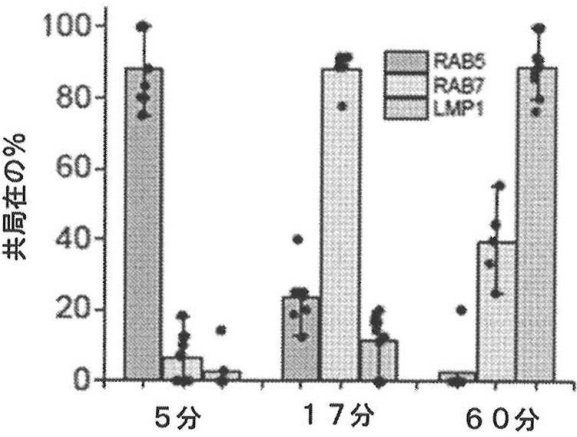
20

30

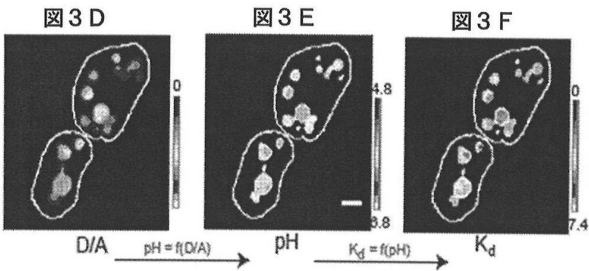
40

50

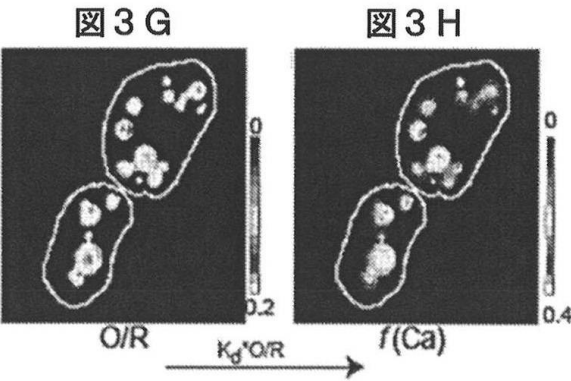
【図 3 C】



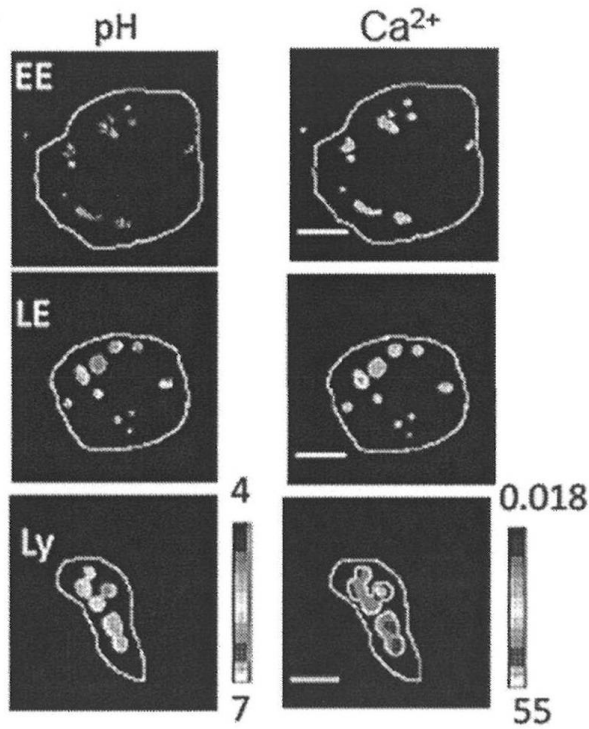
【図 3 D - F】



【図 3 G - H】



【図 3 I】



10

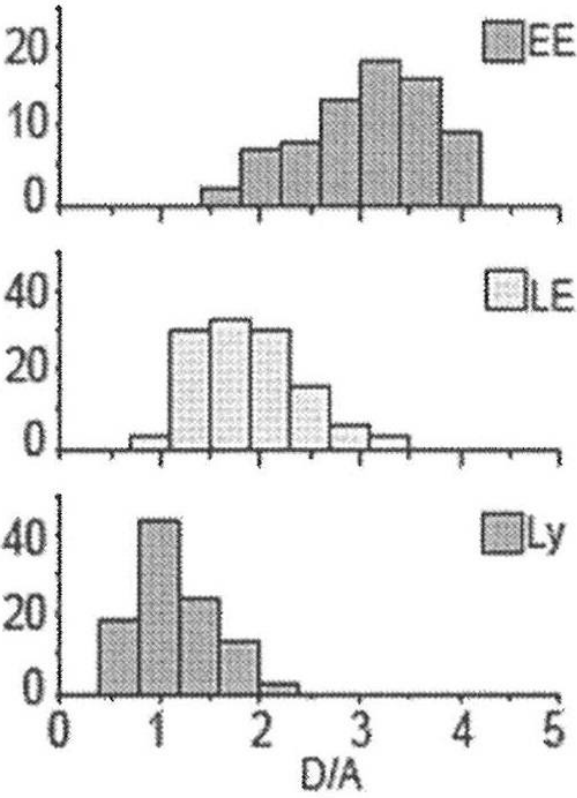
20

30

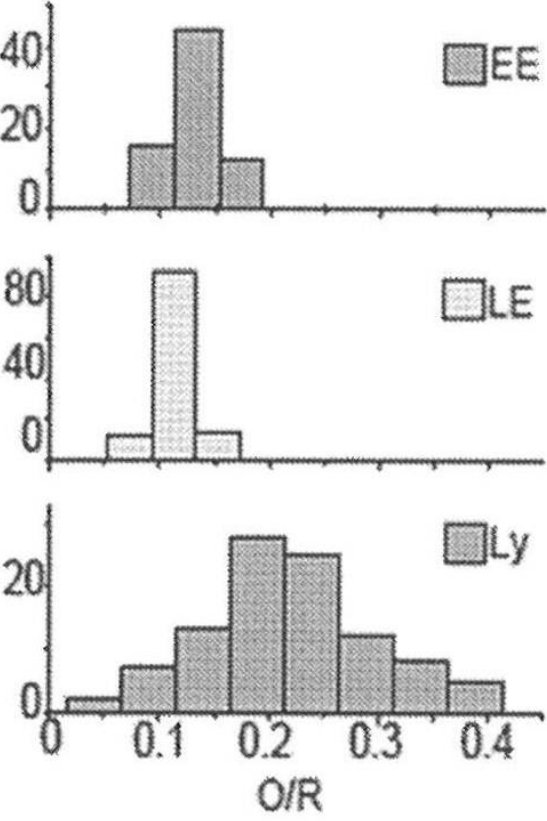
40

50

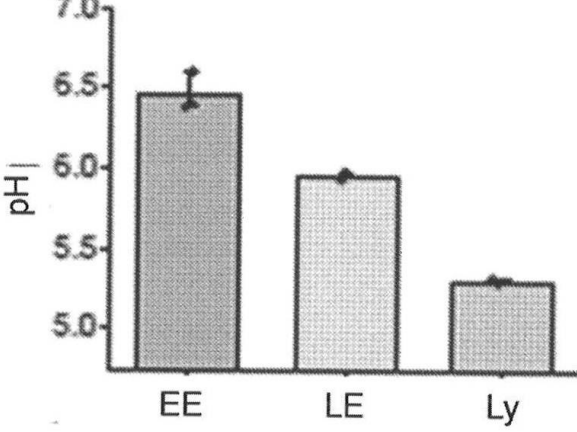
【図 3 J】



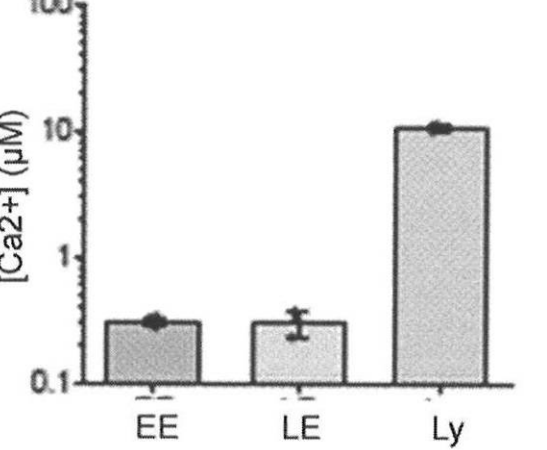
【図 3 K】



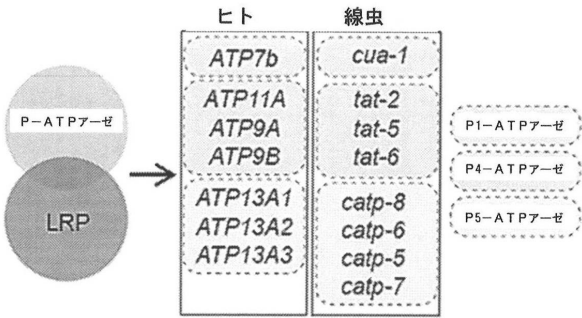
【図 3 L】



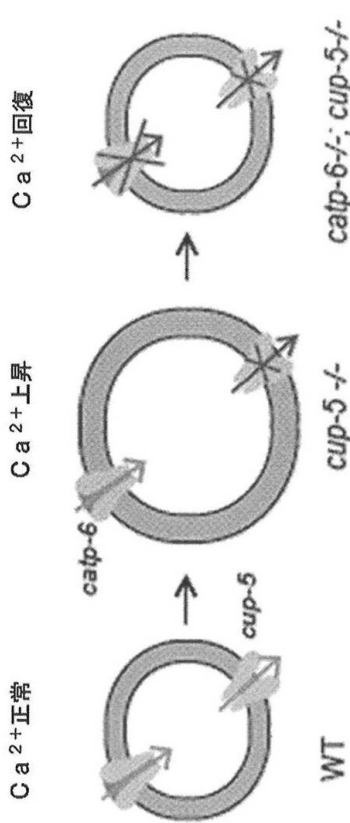
【図 3 M】



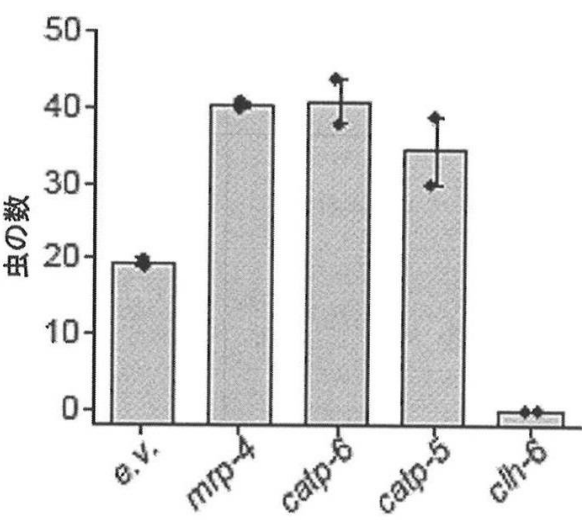
【図 4 A】



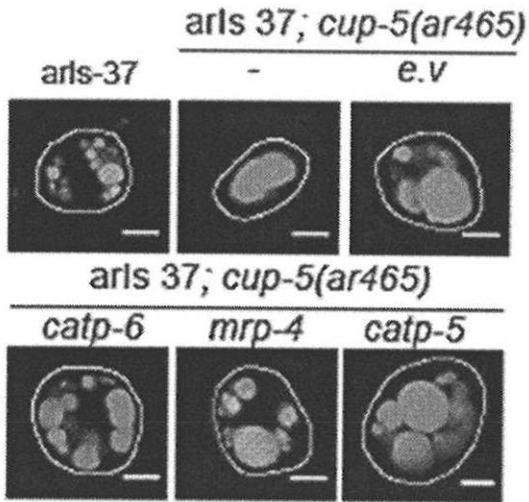
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 D】



10

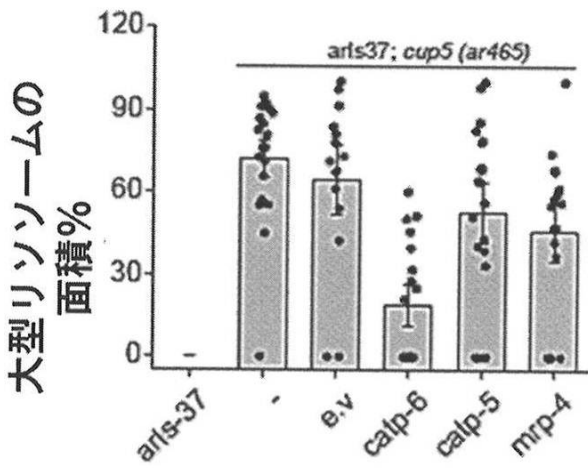
20

30

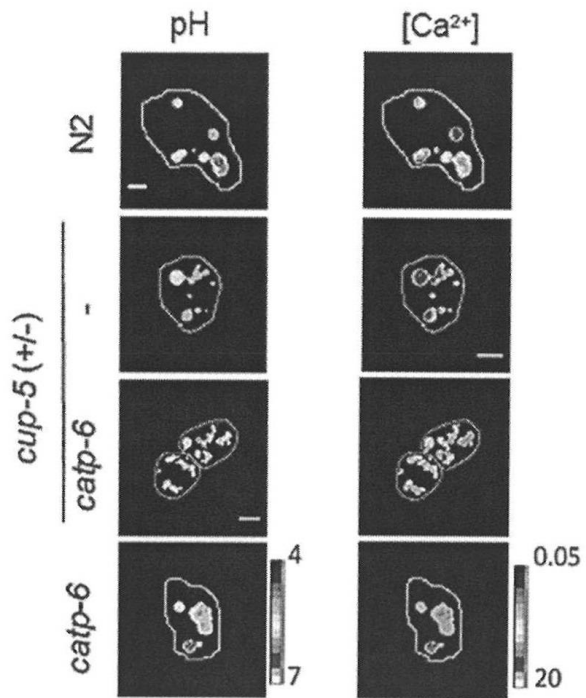
40

50

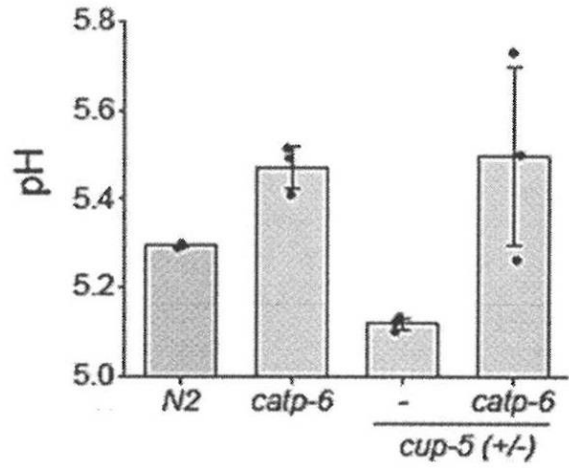
【図 4 E】



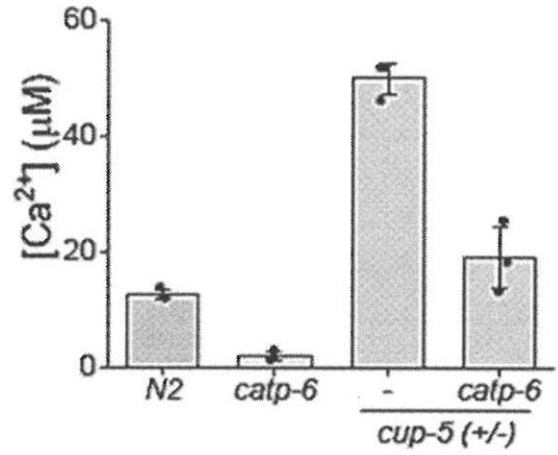
【図 4 F】



【図 4 G】



【図 4 H】



10

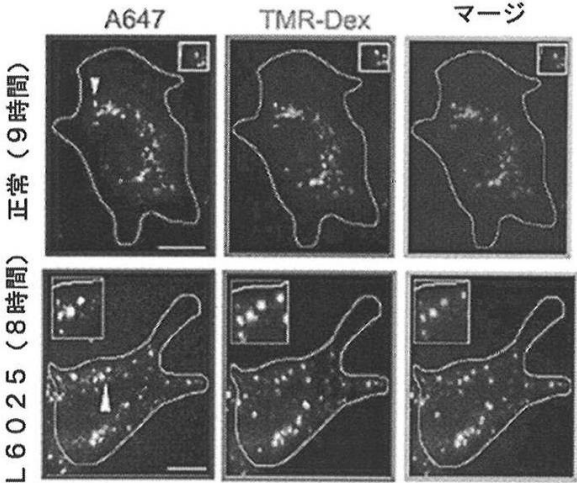
20

30

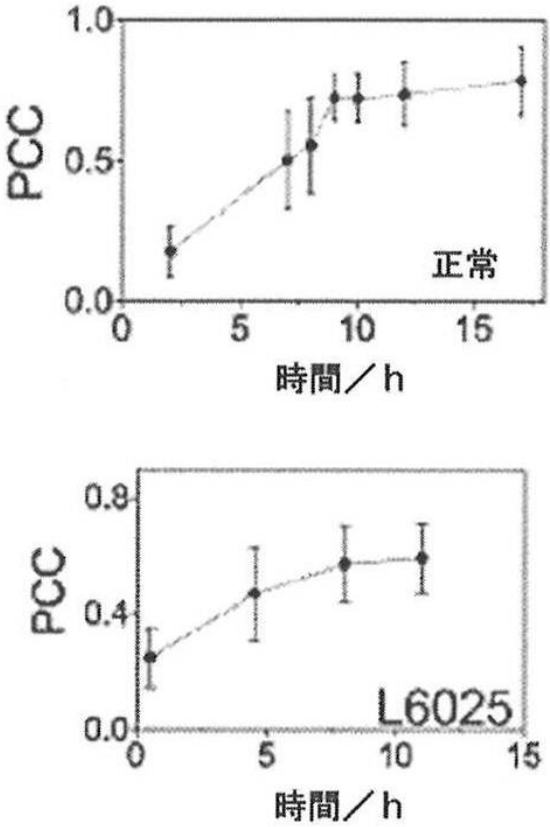
40

50

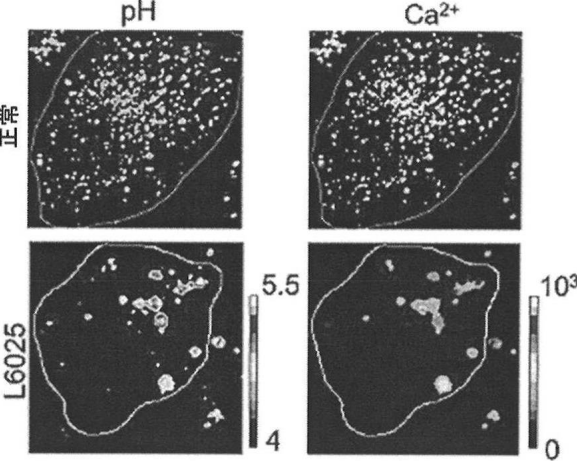
【図 5 A】



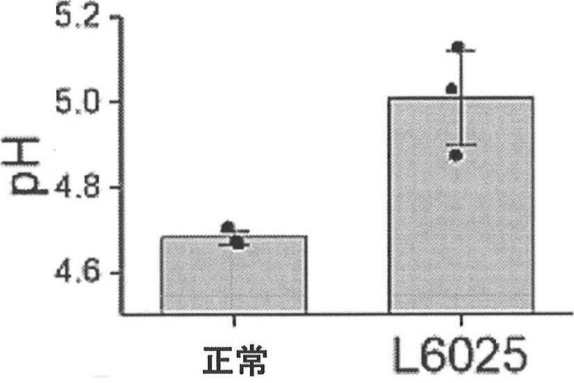
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】



10

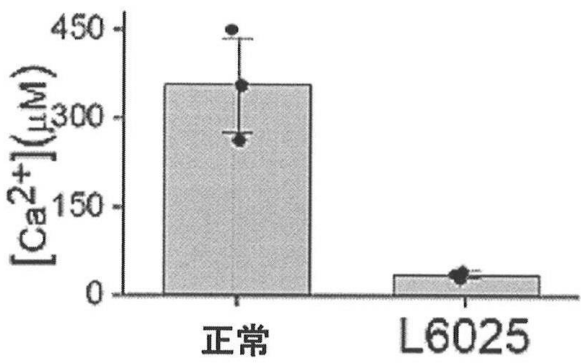
20

30

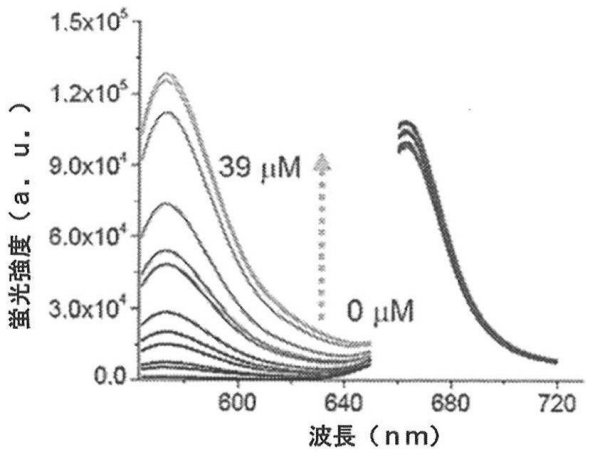
40

50

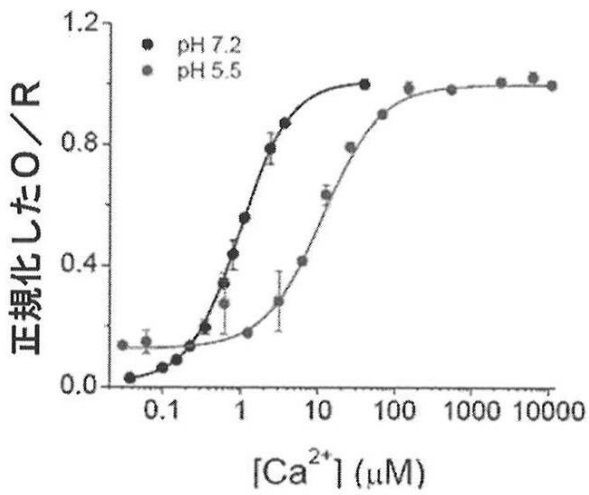
【図 5 E】



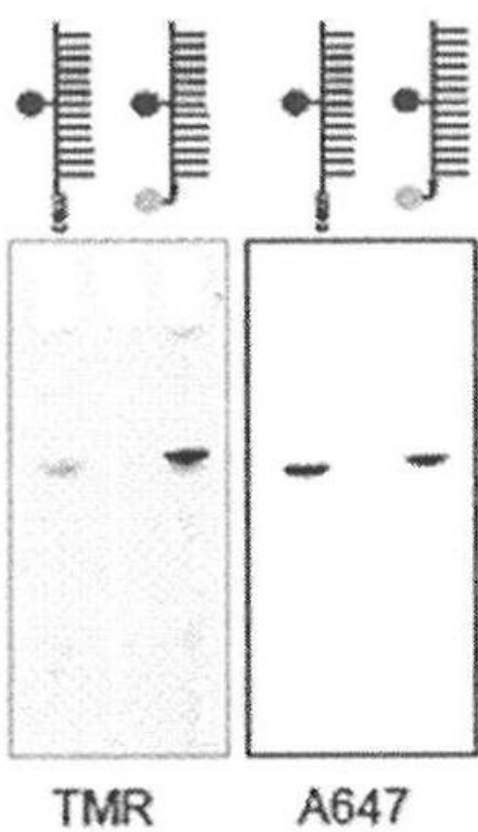
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7 A】



10

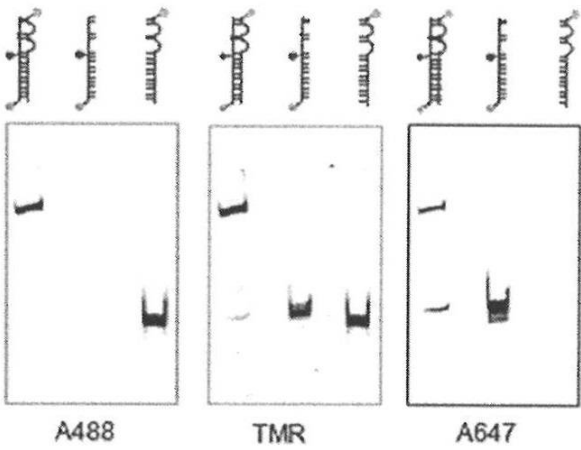
20

30

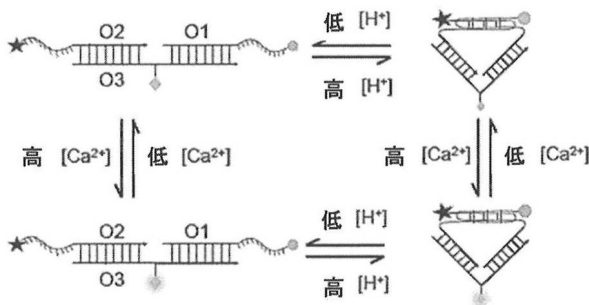
40

50

【図 7 B】

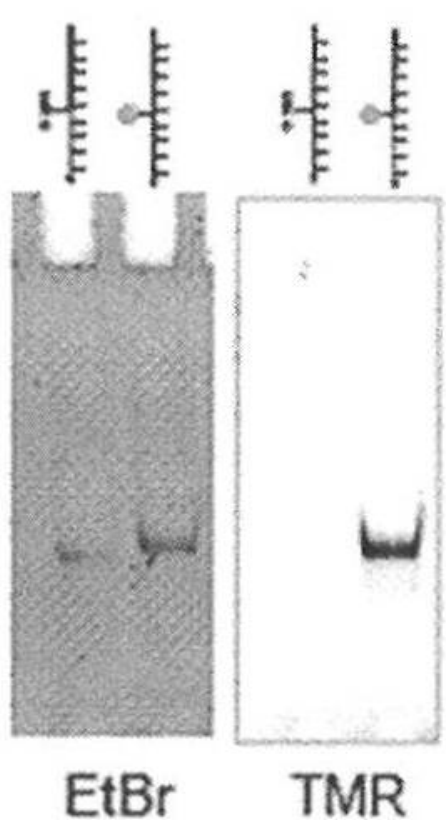


【図 7 C】

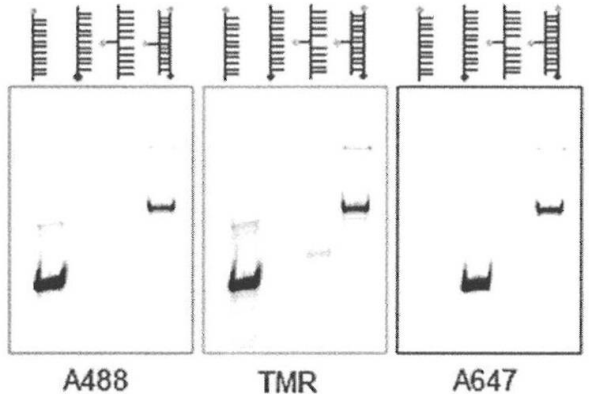


10

【図 7 D】



【図 7 E】



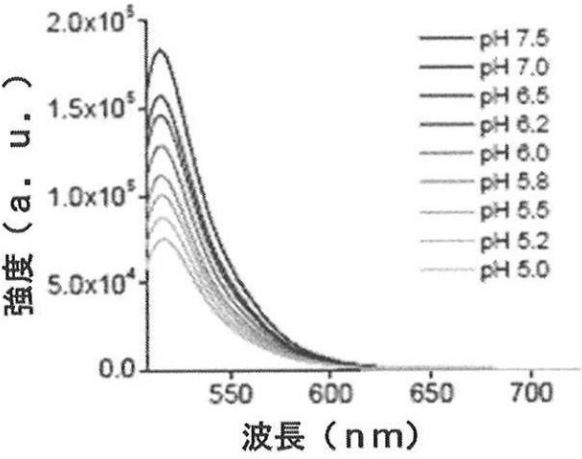
20

30

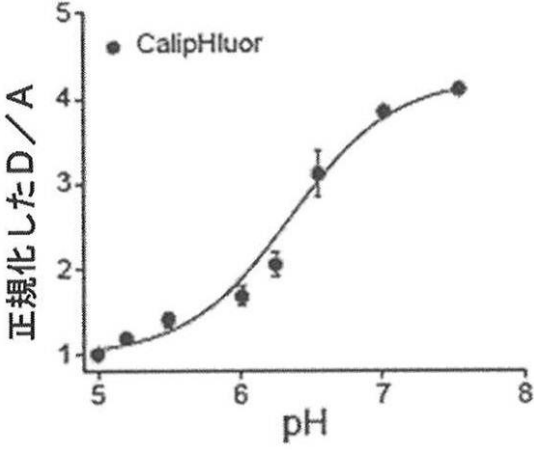
40

50

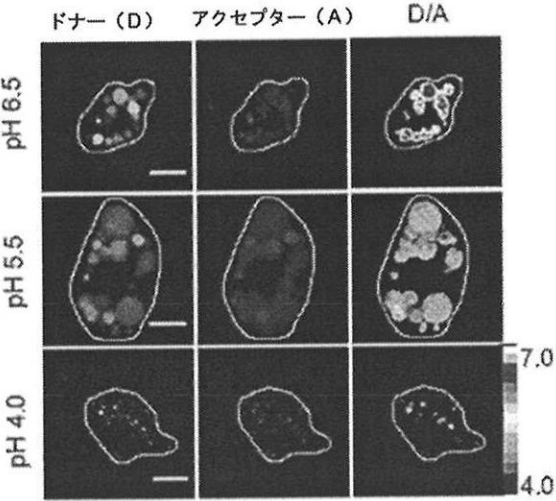
【図 7 F】



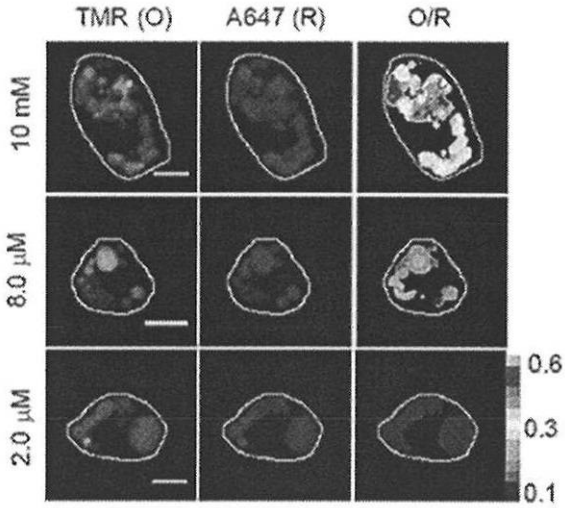
【図 7 G】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

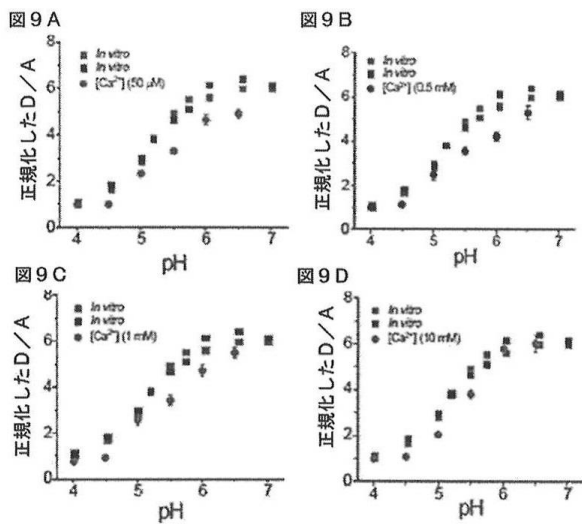
20

30

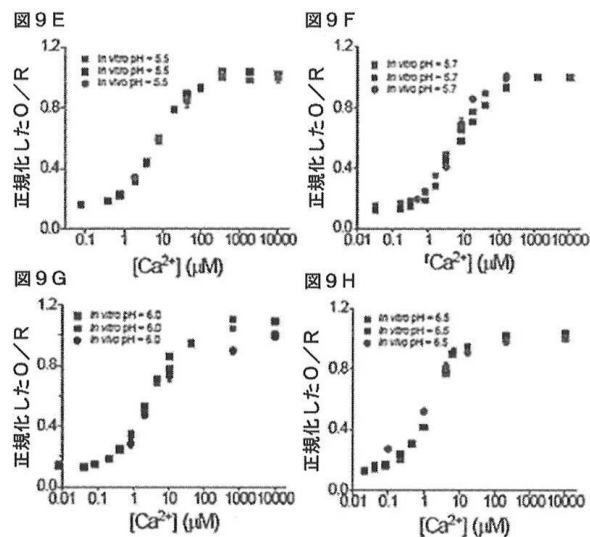
40

50

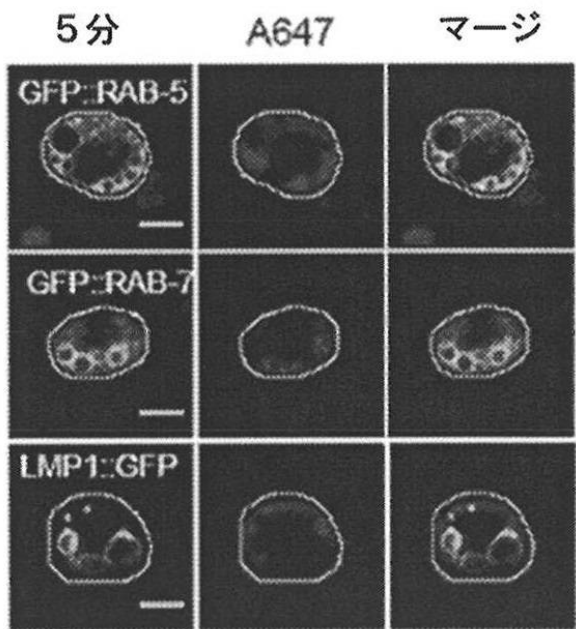
【図 9 - 1】



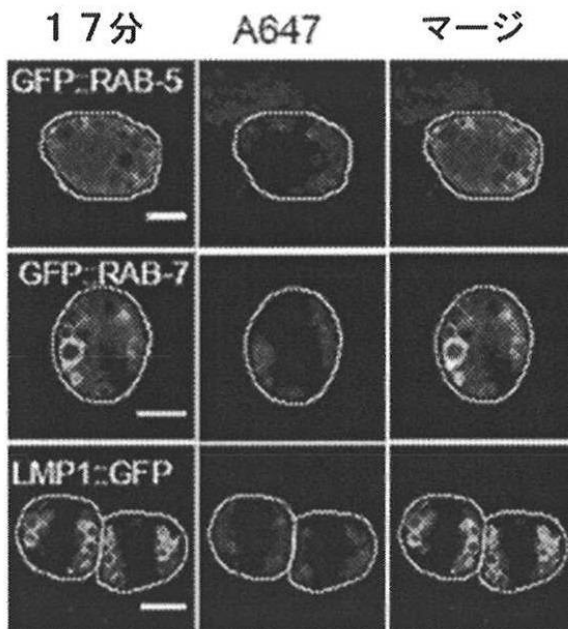
【図 9 - 2】



【図 10 A】



【図 10 B】



10

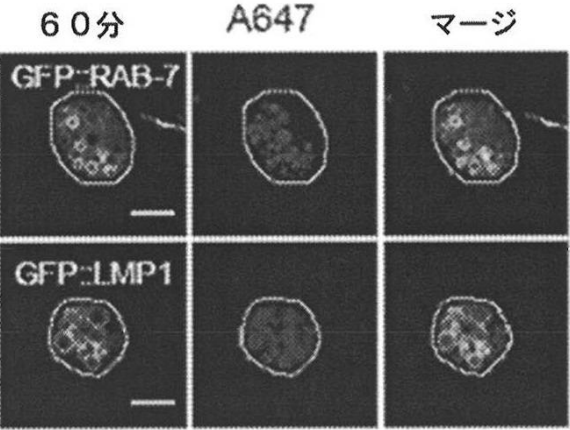
20

30

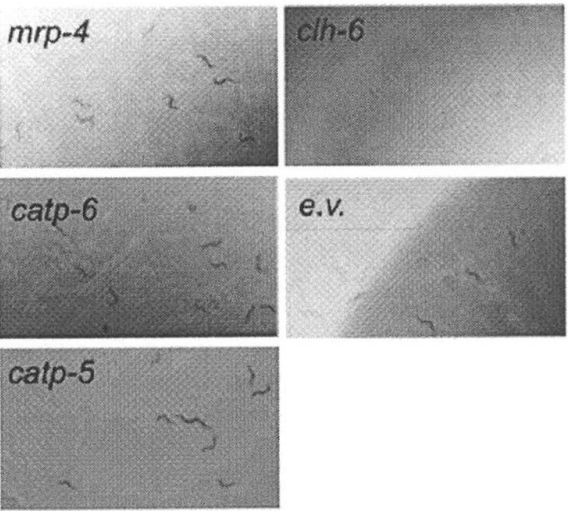
40

50

【図10C】

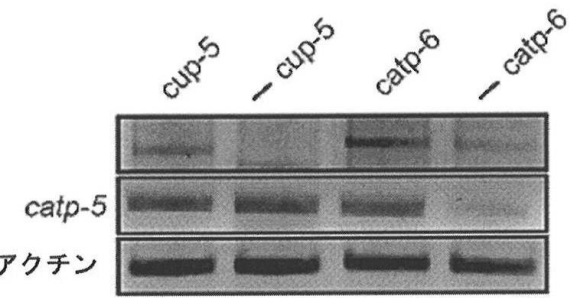


【図11A】

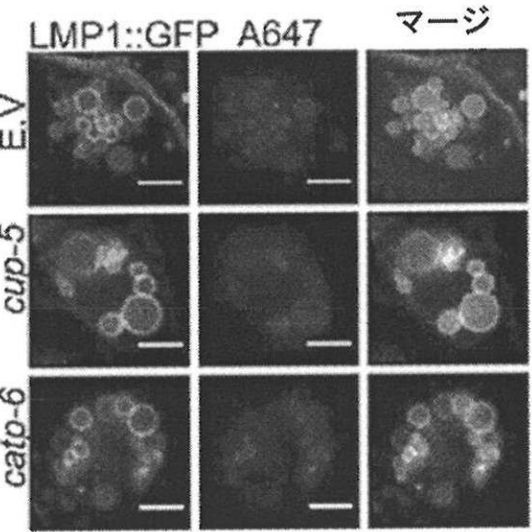


10

【図11B】



【図11C】



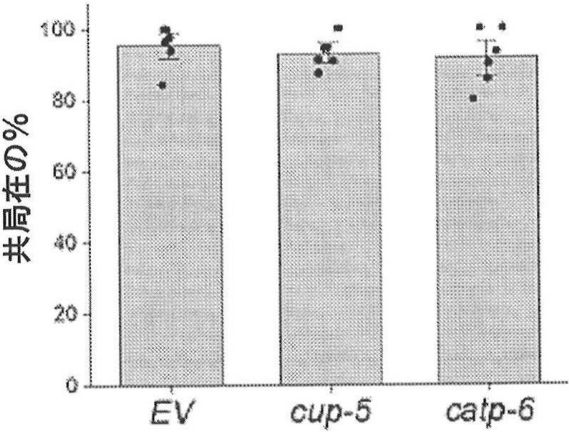
20

30

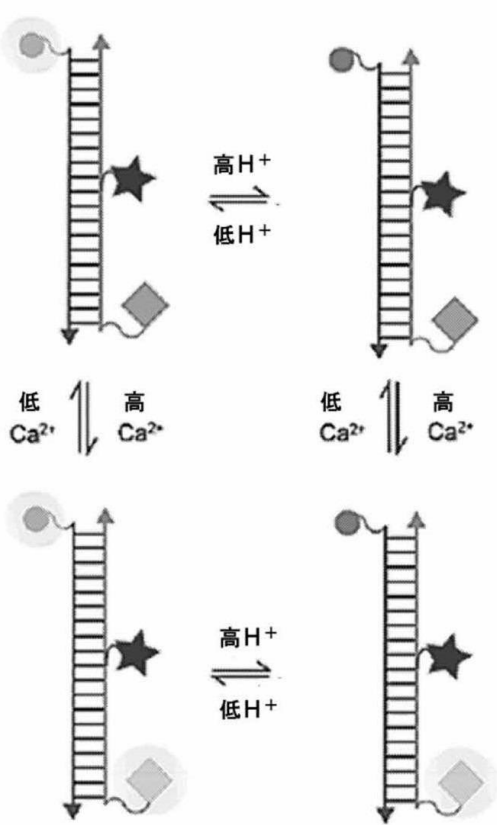
40

50

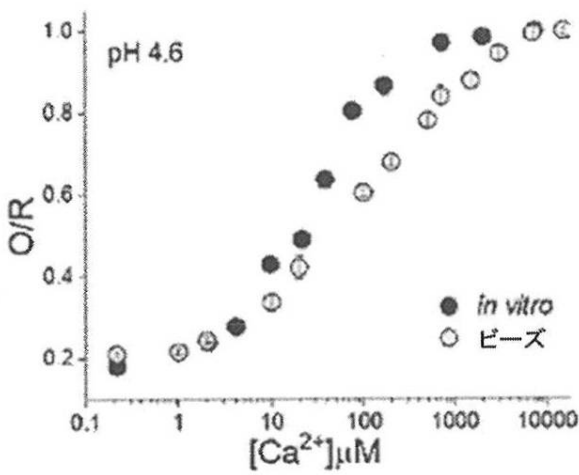
【図 1 1 D】



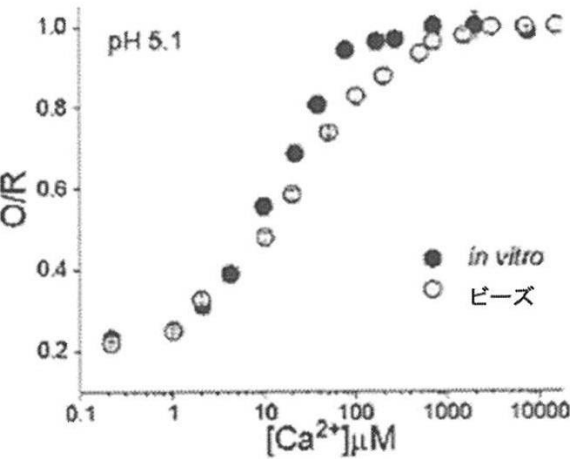
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

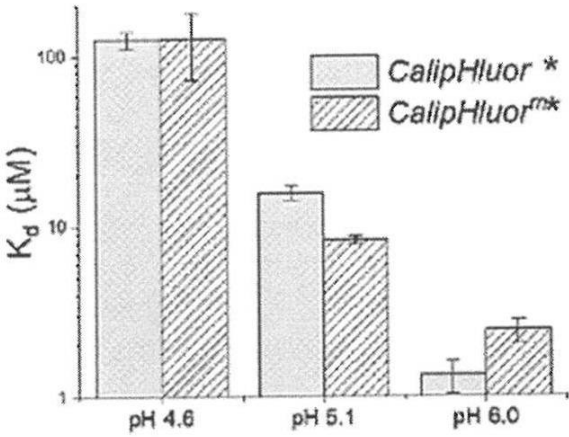
20

30

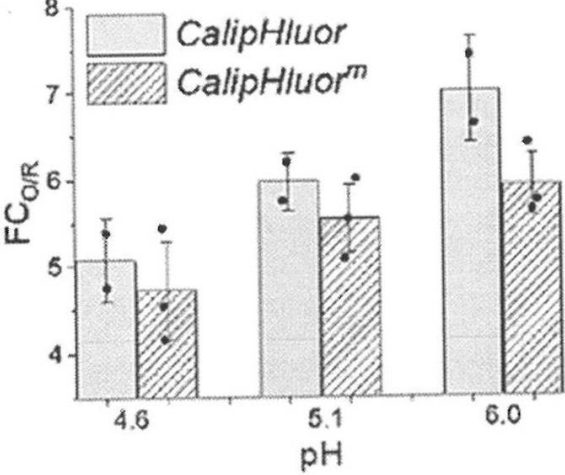
40

50

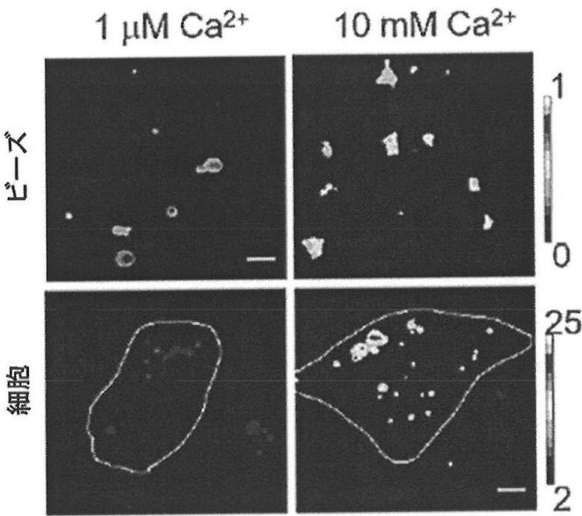
【図 1 2 D】



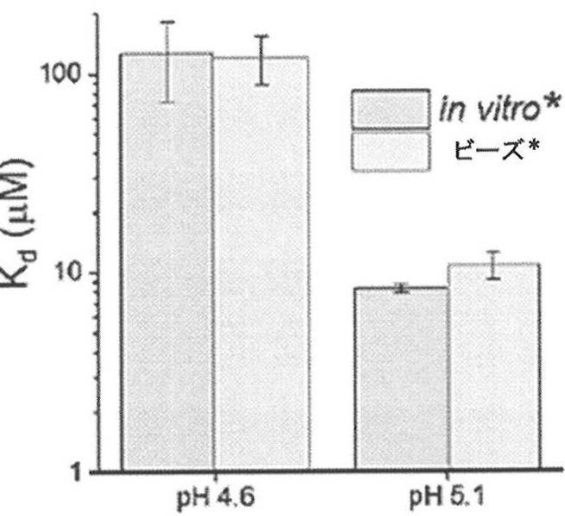
【図 1 2 E】



【図 1 2 F】



【図 1 2 G】



10

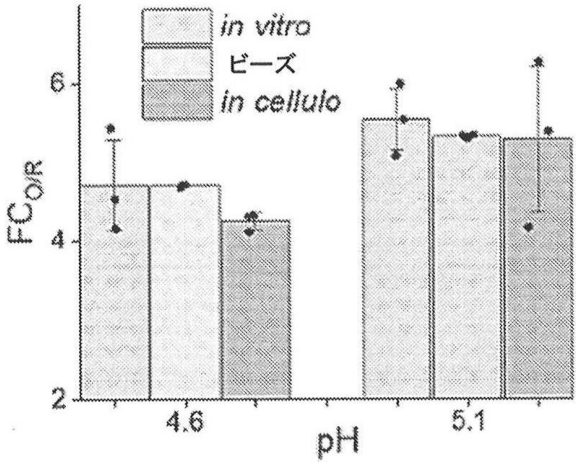
20

30

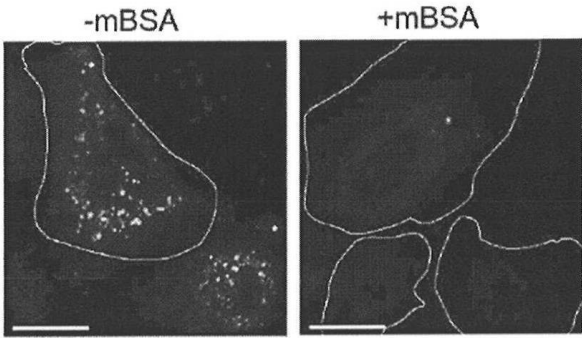
40

50

【図 1 2 H】

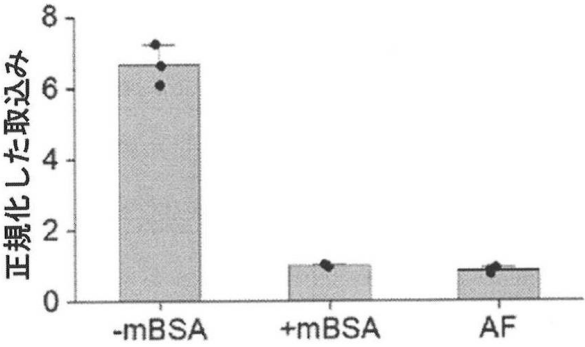


【図 1 3 A】

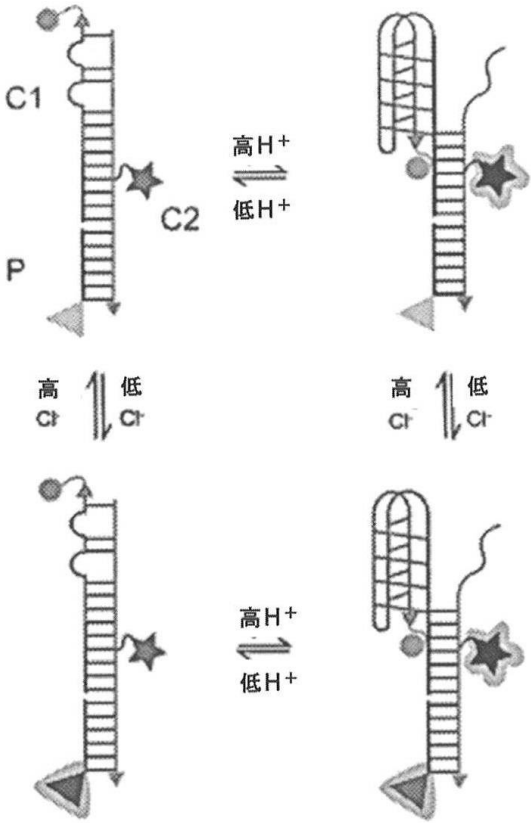


10

【図 1 3 B】



【図 1 4 A】



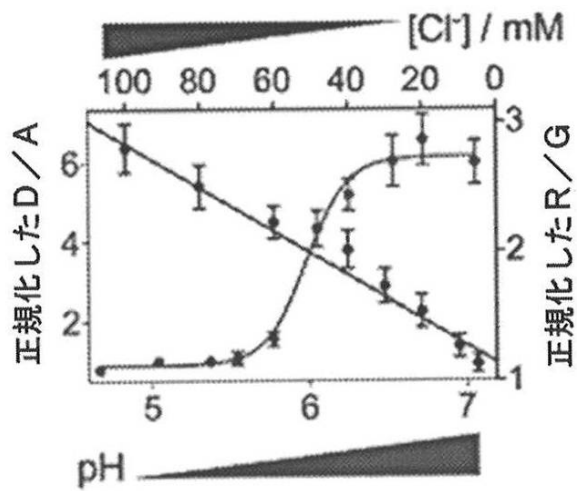
20

30

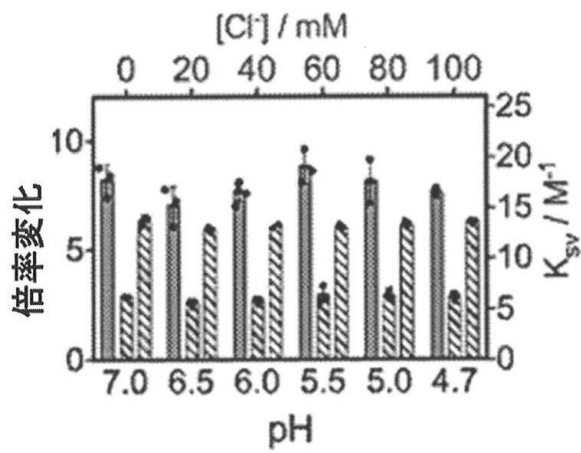
40

50

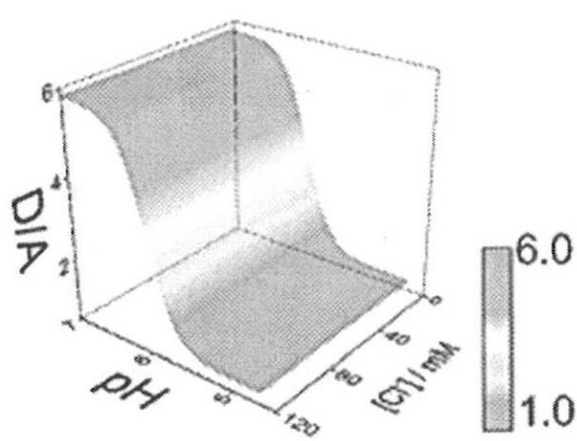
【図 1 4 B】



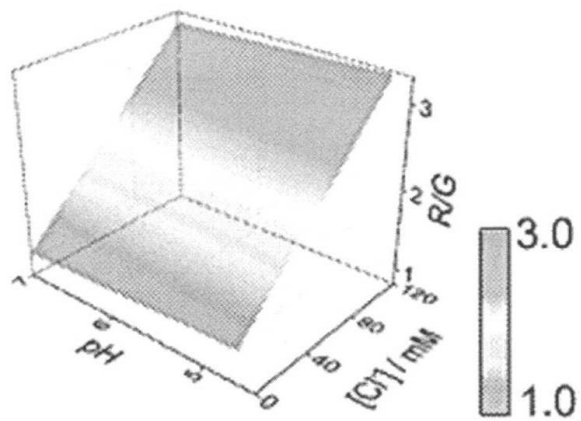
【図 1 4 C】



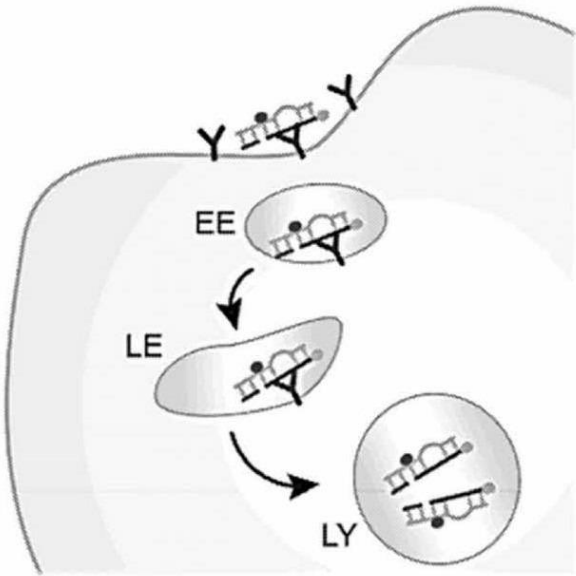
【図 1 4 D】



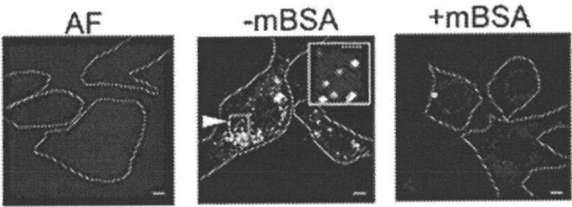
【図 1 4 E】



【図 1 5 A】

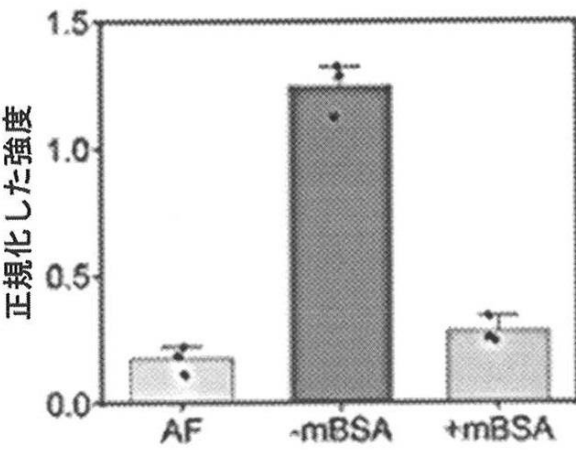


【図 1 5 B】

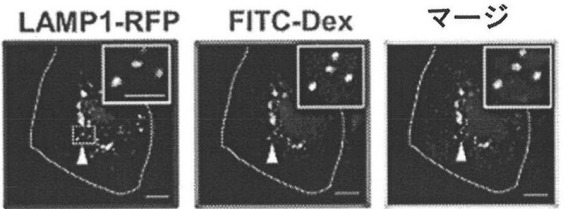


10

【図 1 5 C】



【図 1 5 D】



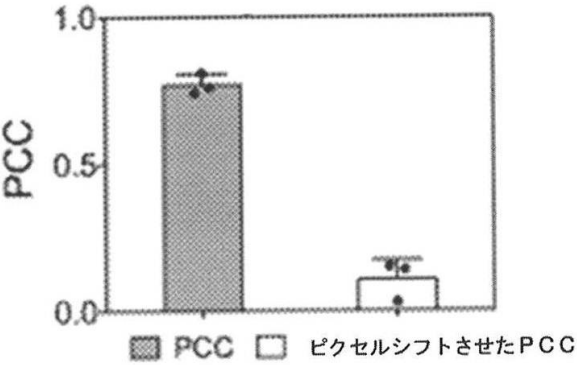
20

30

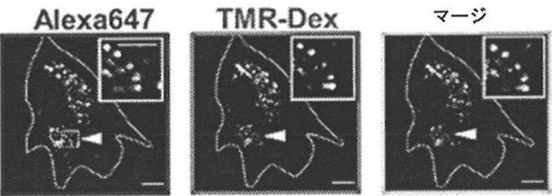
40

50

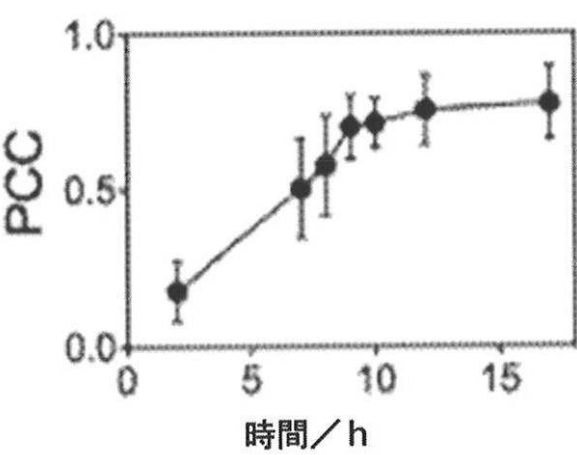
【図 1 5 E】



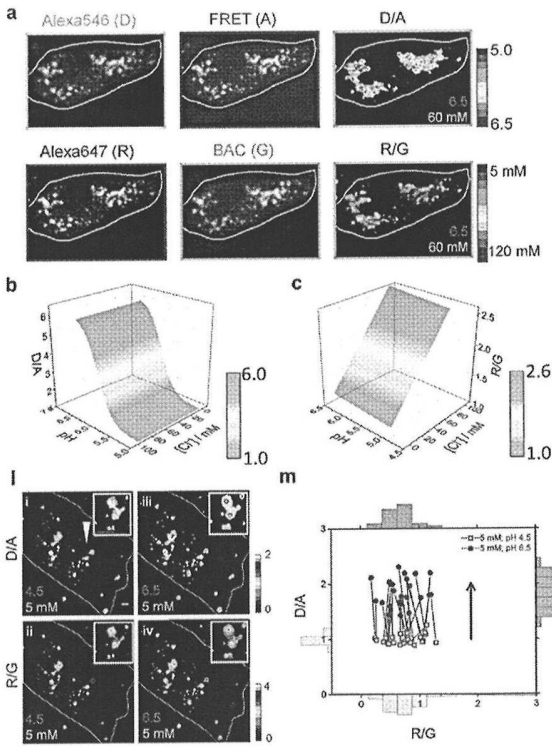
【図 1 5 F】



【図 1 5 G】



【図 1 6 - 1】



10

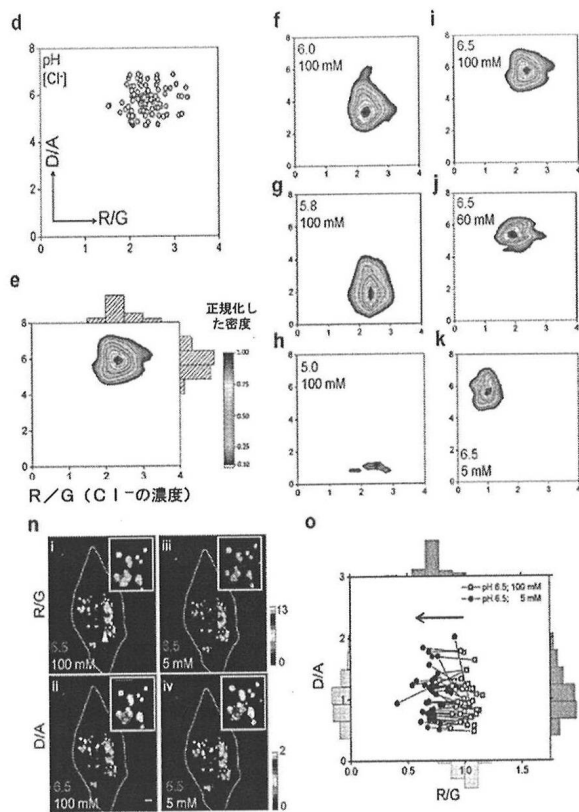
20

30

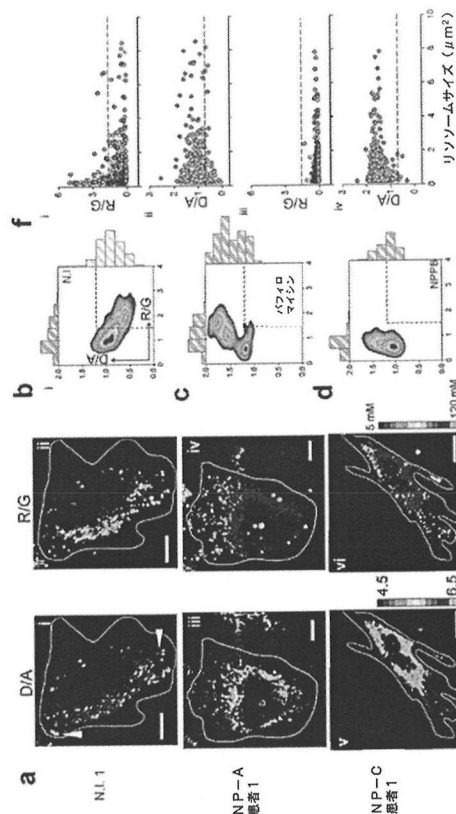
40

50

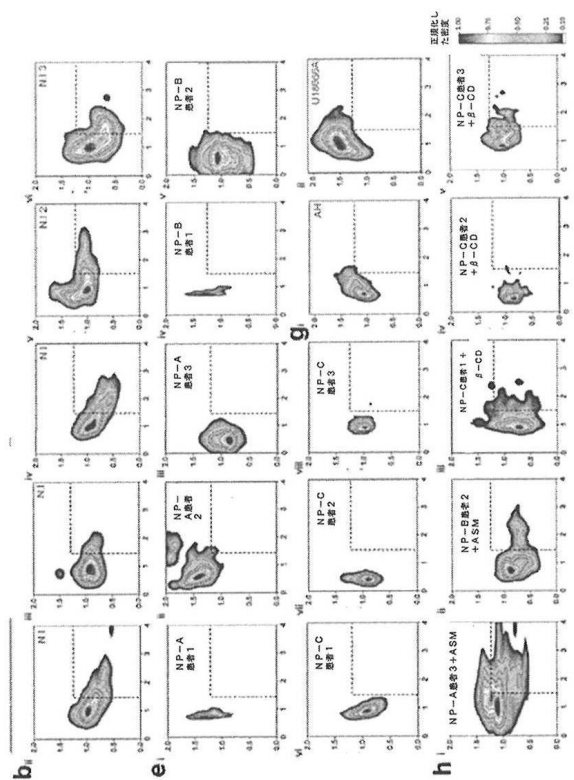
【図 16-2】



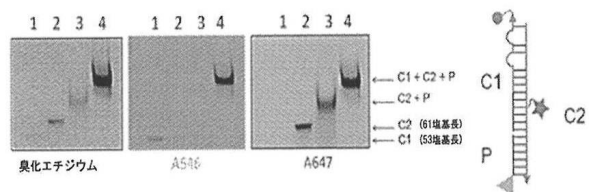
【図 17-1】



【図 17-2】



【図 18】



10

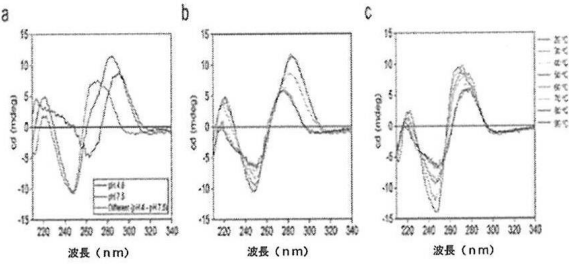
20

30

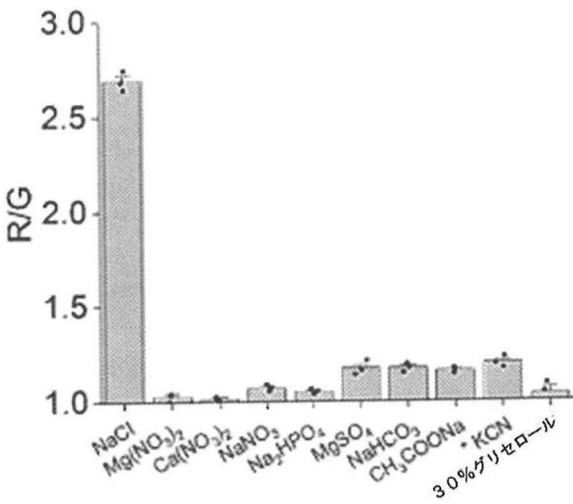
40

50

【図 19】

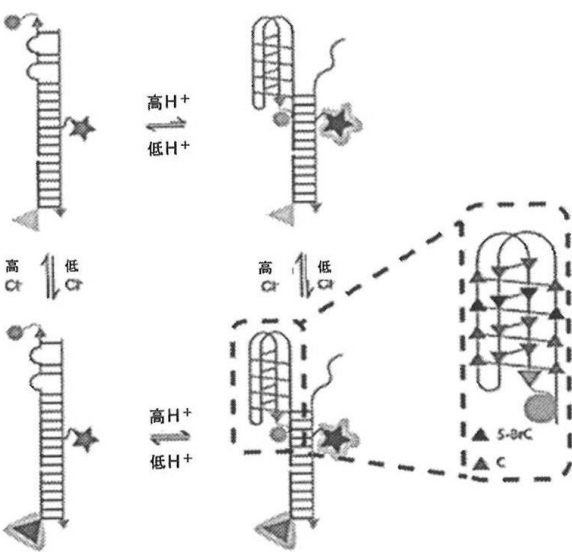


【図 20】

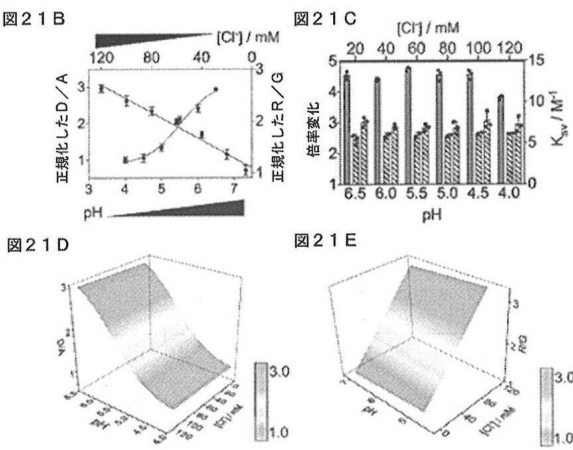


10

【図 21 A】



【図 21 B - E】



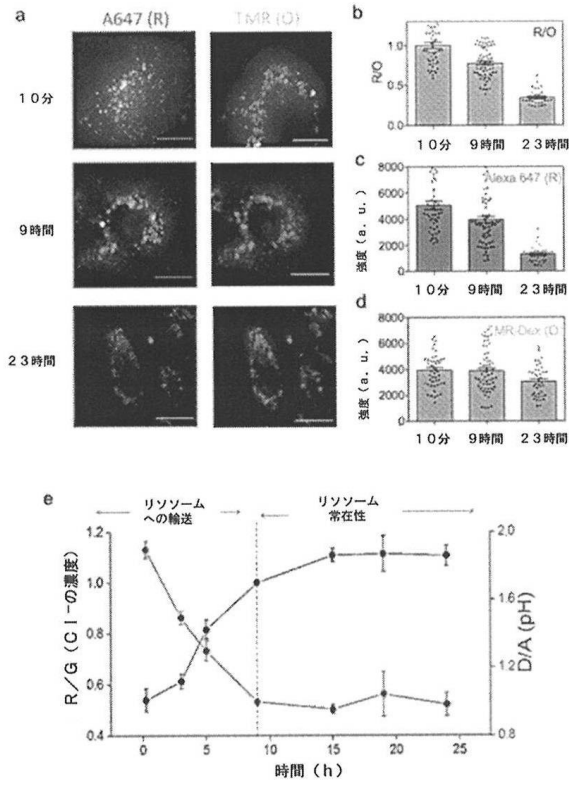
20

30

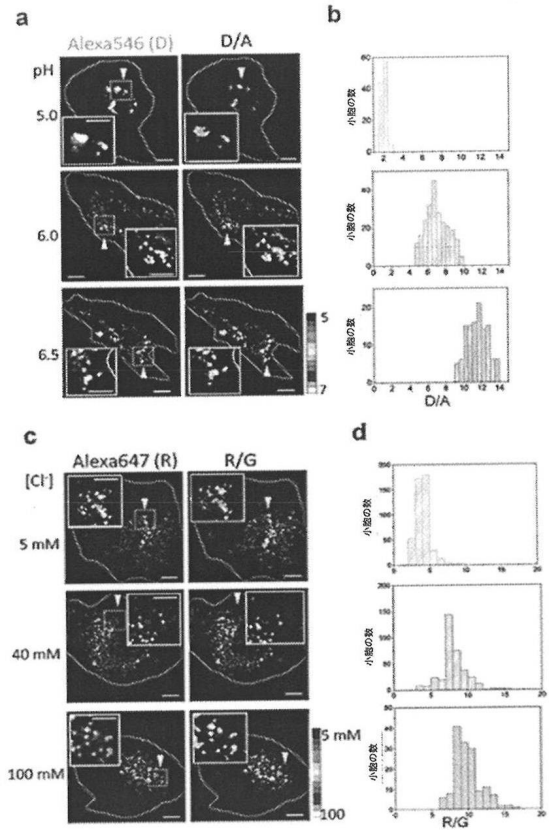
40

50

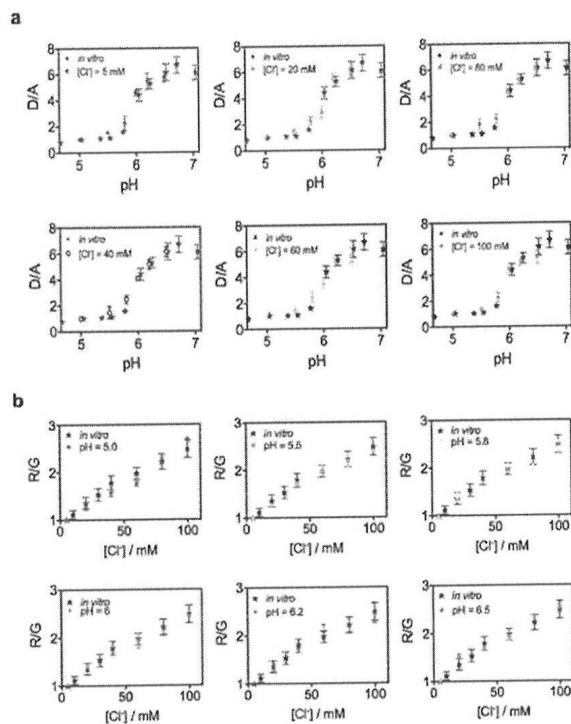
【図 2 2】



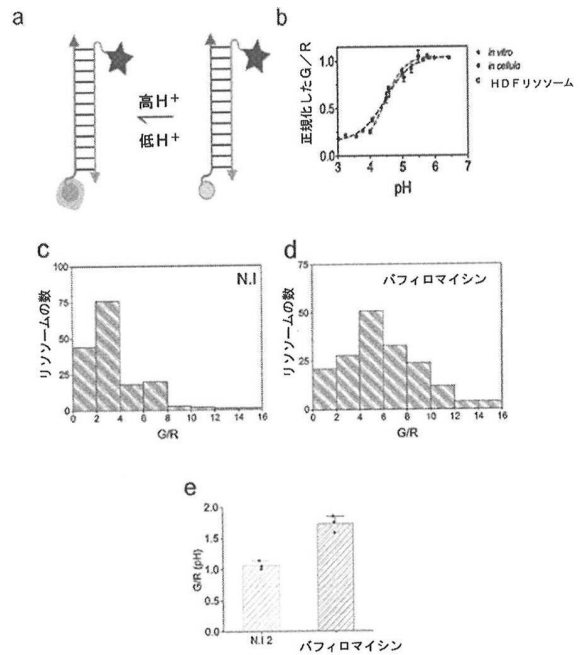
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

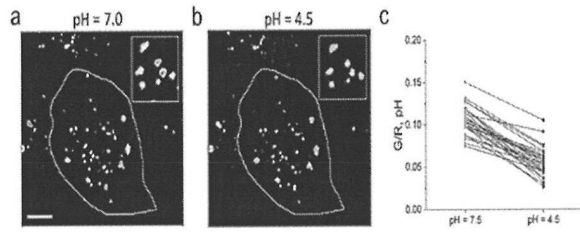
20

30

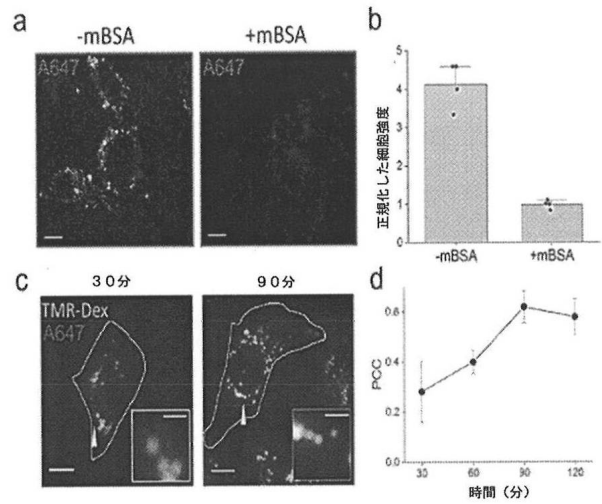
40

50

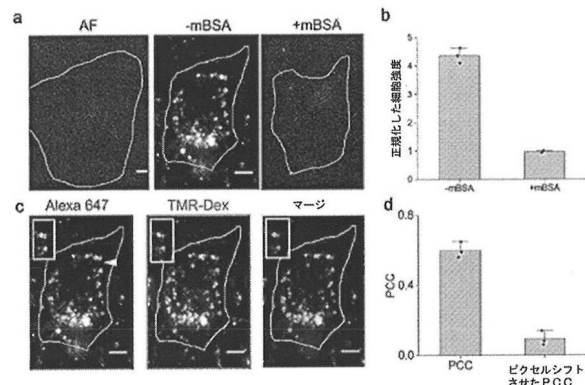
【図 26】



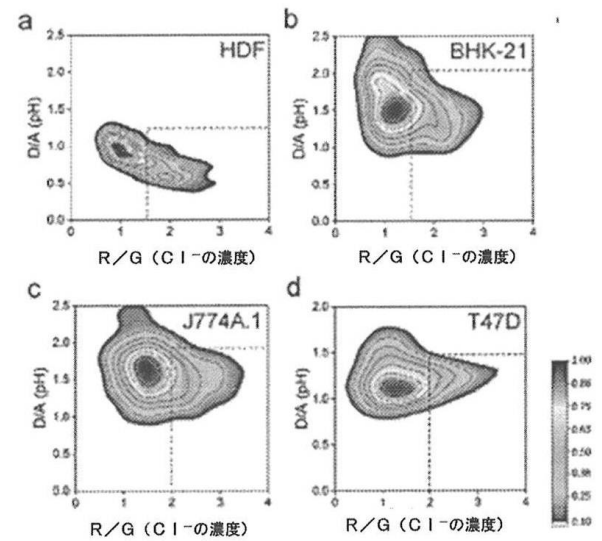
【図 27】



【図 28】



【図 29】



10

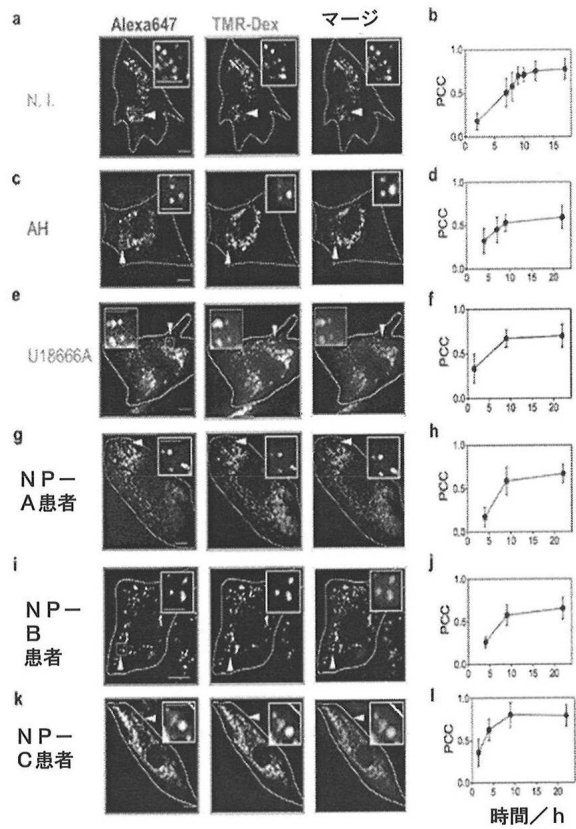
20

30

40

50

【図 30】



【配列表】

0007307797000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
- (74)代理人 100204582
弁理士 大栗 由美
- (72)発明者 クリシュナン, ヤムナ
アメリカ合衆国 60615 イリノイ州, シカゴ, サウス コーネル アヴェニュー 5145
- (72)発明者 チャクラボルティ, カストゥーリ
アメリカ合衆国 60615 イリノイ州, シカゴ, サウス レイク ショア ドライヴ 5050
- (72)発明者 リュン, カ, ホ
アメリカ合衆国 60615 イリノイ州, シカゴ, サウス イングルサイド アヴェニュー 5445
- (72)発明者 サミナタン, アナンド
アメリカ合衆国 60637 イリノイ州, シカゴ, サウス エリス アヴェニュー 5801, ザ
ユニバーシティ オブ シカゴ内
- 審査官 高田 亜希
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2018/0245137 (US, A1)
国際公開第2016/157937 (WO, A1)
米国特許出願公開第2016/0376441 (US, A1)
Sonali Saha et al., A pH-independent DNA nanodevice for quantifying chloride transport in
organelles of living cells, Nature Nanotechnology, 2015年06月22日, 10, P645-651
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
G01N 21/64
C12N 15/11
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)