

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523945

(P2005-523945A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47	C07K 14/47	2G043
A61B 10/00	A61B 10/00	4H045
C07K 16/44	C07K 16/44	
G01N 21/64	G01N 21/64	ZNAF

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-512720 (P2004-512720)	(71) 出願人	399037243
(86) (22) 出願日	平成15年4月28日 (2003. 4. 28)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月17日 (2004. 12. 17)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルート ストリート 55
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/013494	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02003/105814		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成15年12月24日 (2003. 12. 24)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	60/376, 052		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成14年4月26日 (2002. 4. 26)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	10/424, 232	(72) 発明者	ボグダノフ アレクセイ
(32) 優先日	平成15年4月25日 (2003. 4. 25)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アーリントン ハサウェイ サークル 10
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシスのインビボにおける画像化

(57) 【要約】

本発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分と蛍光色素との結合体を用いた、アポトーシスのインビボにおける画像化のための、結合体および方法に関連する。特定の態様においては、蛍光色素は、近赤外域の蛍光を発光し、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分、例えばアネキシンA5またはシナプトタグミンのようなタンパク質に結合される。本方法は、非侵襲的なものであり、例えばヒトのような哺乳動物のような生きた動物個体の組織においてアポトーシス細胞の画像を得るために使用することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象におけるアポトーシス部位の、インビボでの非侵襲的な画像化に使用するための、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部分に共有結合された蛍光色素とを含む結合体。

【請求項 2】

対象におけるアポトーシス部位の、インビボでの非侵襲的な画像化のための薬剤の製造における、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部分に共有結合された蛍光色素とを含む結合体の使用。

【請求項 3】

部分がタンパク質またはその活性断片である、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 4】

タンパク質がアネキシンおよびシナプトタグミンからなる群より選択される、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 5】

活性断片がシナプトタグミンのC2ドメインを含む、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 6】

部分が抗アミノリン脂質抗体またはその活性断片である、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 7】

抗体が抗ホスファチジルセリン抗体またはその活性断片である、請求項6記載の結合体または使用。

【請求項 8】

抗体が抗ホスファチジルエタノールアミン抗体またはその活性断片である、請求項6記載の結合体または使用。

【請求項 9】

蛍光色素が近赤外領域の蛍光を発する、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 10】

蛍光色素が、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される、請求項1または請求項2記載の結合体または使用。

【請求項 11】

対象におけるアポトーシス部位の、インビボでの非侵襲的な画像化のための薬剤の調製における、アネキシン、シナプトタグミン、抗ホスファチジルセリン抗体、および抗ホスファチジルエタノールアミン抗体、その活性断片からなる群より選択される部分、ならびに、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される蛍光色素を含む結合体の使用。

【請求項 12】

部分がアネキシンまたはその活性断片を含む、請求項11記載の使用。

【請求項 13】

部分がシナプトタグミンまたはその活性断片を含む、請求項11記載の使用。

【請求項 14】

部分が抗ホスファチジルセリン抗体またはその活性断片を含む、請求項11記載の使用。

【請求項 15】

部分が抗ホスファチジルエタノールアミン抗体またはその活性断片を含む、請求項11記載の使用。

10

20

30

40

50

- 【請求項16】
シナプトタグミンの活性断片がシナプトタグミンのC2ドメインである、請求項11記載の使用。
- 【請求項17】
アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部分に共有結合された蛍光色素とを含む結合体；ならびに
アポトーシスのインビボでの非侵襲的な画像化の方法において、結合体を使用するための使用説明書を含むキット。
- 【請求項18】 10
アポトーシス細胞に特異的に結合する部分；
蛍光色素；
蛍光色素を部分に結合させてフルオロフォア結合体を形成させるための使用説明書；および
アポトーシスのインビボでの非侵襲的な画像化の方法において、フルオロフォア結合体を使用するための使用説明書を含むキット。
- 【請求項19】 20
部分が、アネキシン、シナプトタグミン、または抗アミノリン脂質抗体、またはその活性断片のうちの1つである、請求項17または請求項18記載のキット。
- 【請求項20】
蛍光色素が、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、またはLicor NIRのうちの1つである、請求項17または請求項18記載のキット。
- 【請求項21】
アポトーシス細胞に特異的に結合する部分に結合された蛍光色素を含む組成物を対象に投与する段階；および
対象の少なくとも一部の蛍光画像を得て、対象におけるアポトーシス部位を検出する段階を含む、対象におけるアポトーシス部位のインビボでの非侵襲的な検出法。
- 【請求項22】 30
部分がタンパク質またはその活性断片である、請求項21記載の方法。
- 【請求項23】
タンパク質がアネキシンおよびシナプトタグミンからなる群より選択される、請求項22記載の方法。
- 【請求項24】
活性断片がシナプトタグミンのC2ドメインを含む、請求項22記載の方法。
- 【請求項25】
部分が抗アミノリン脂質抗体またはその活性断片である、請求項21記載の方法。
- 【請求項26】 40
抗体が抗ホスファチジルセリン抗体またはその活性断片である、請求項25記載の方法。
- 【請求項27】
抗体が抗ホスファチジルエタノールアミン抗体またはその活性断片である、請求項25記載の方法。
- 【請求項28】
蛍光色素が近赤外領域の蛍光を発する、請求項21記載の方法。
- 【請求項29】
蛍光色素が、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される、請求項21記載の方法。
- 【請求項30】 50

対象が動物である、請求項21記載の方法。

【請求項31】

対象が哺乳動物である、請求項21記載の方法。

【請求項32】

哺乳動物がマウスである、請求項31記載の方法。

【請求項33】

対象がヒトである、請求項21記載の方法。

【請求項34】

投与が、経口により、非経口により、吸入により、局所的に、直腸に、点鼻により、口腔に、腔内に、移植されたりザバーを介して、カテーテルを介して、または組織に針を通して行われる、請求項21記載の方法。 10

【請求項35】

画像を得る段階が近赤外蛍光（NIRF）画像化によって行われる、請求項21記載の方法。

【請求項36】

NIRF画像化が蛍光によるトモグラフィ（FMT）である、請求項21記載の方法。

【請求項37】

NIRF画像化が鏡面反射画像化である、請求項21記載の方法。

【請求項38】

NIRF画像化で内視鏡を使用する、請求項21記載の方法。

【請求項39】

アポトーシス細胞に特異的に結合する部分；および
その部分に共有結合された蛍光色素
を含む、部分および蛍光色素が少なくとも1：2の化学量論にて存在する結合体。 20

【請求項40】

部分がアネキシンもしくはその活性断片、または、シナプトタグミンもしくはその活性断片である、請求項39記載の結合体。

【請求項41】

部分が抗アミノリン脂質抗体またはその活性断片である、請求項39記載の結合体。

【請求項42】

蛍光色素が近赤外蛍光を発光する、請求項39記載の結合体。 30

【請求項43】

蛍光色素が、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニングリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される、請求項42記載の結合体。

【請求項44】

アネキシンと、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される蛍光色素とを含む結合体。

【請求項45】

シナプトタグミンまたは抗アミノリン脂質抗体と、Cy5、Cy5.5、Cy7、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される蛍光色素とを含む結合体。 40

【請求項46】

抗アミノリン脂質抗体が抗ホスファチジルセリン抗体である、請求項45記載の結合体。

【請求項47】

抗アミノリン脂質抗体が抗ホスファチジルエタノールアミン抗体である、請求項45記載の結合体。

【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、その全内容が本明細書により参照として組み入れられる、2002年4月26日に
出願された、米国特許出願第60/376,052号に対して米国特許法 § 119条(e)項における優先
権を主張するものである。

【0002】

発明の分野

本発明は、光学的画像化に関連し、より特定的には、アポトーシス細胞のインビボでの
画像化のための方法および組成物に関連する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アポトーシス、またはプログラムされた細胞死は、正常な発生にとって、および、多く
の疾患状態において、根本的に重要な過程である。生きている生物体においてアポトーシ
スを検出することにより、癌、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症および他の疾患に
おける細胞死の程度、ならびに、これらの疾患の治療への反応の、非侵襲的な評価が可能
になる。しかし、インビボにおけるアポトーシスの画像化は挑戦的であることがわかって
いる。真のアポトーシスは通常、ゲノムDNAの断片化、核の緊密化および断片化、ならび
に細胞の激的な緊密化（細胞容量の減少）を含む。しかし、アポトーシスの早期のサイン
は、通常は原形質膜の細胞質側（膜の二重膜の細胞質側の単分子層）に残るアミノリン脂
質の表層出現を含む。細胞ストレスのシグナルとしてのこれらの前アポトーシス変化は、
完全に可逆的である可能性がある。アポトーシスの開始とマクロファージによる細胞の除
去との間には限られた時間しかない；したがって、インビボにおけるアポトーシス細胞の
存在は通常一過的である。また、アポトーシス細胞はしばしば、放射線同位体を用いた検
出法の分解能よりも小さい、（血管のような）比較的小さな構造体に存在する。

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

本発明は、部分的には、生きている動物個体におけるアポトーシスを検出するために、
ある非放射性フルオロフォア結合体を使用することが可能であるという発見に基づく。し
たがって、本発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分と蛍光色素との非放射性
結合体を用いた、インビボにおけるアポトーシスの画像化のための、非侵襲的な方法を提
供する。幾つかの態様においては、蛍光色素は、近赤外域の蛍光を発光し、アポトーシス
細胞に特異的に結合する部分または分子、例えばアネキシン（例えばアネキシンA5）、シ
ナプトタグミン（例えばシナプトタグミンI）のようなタンパク質の1つもしくはそれ以上
のアミノ酸残基、または抗アミノリン脂質抗体（例えば抗ホスファチジルセリン抗体また
は抗ホスファチジルエタノールアミン抗体）、または、アポトーシス細胞もしくはホスフ
ァチジルセリン-カルシウム複合体に特異的に結合するその活性断片（例えばシナプトタ
グミンのC2ドメイン、または抗体の抗原結合断片）に結合される。結合体は、生きている
ヒトおよび動物、例えば哺乳動物のような対象の組織におけるアポトーシス細胞を検出
するために、およびアポトーシス細胞の画像を得るために使用されうる。本明細書において
説明されるような結合体は、例えば本明細書において説明されるような、アポトーシスの
インビボにおける画像化の方法のいずれかにおいて使用するための薬剤の調製用を使用さ
れうる。

【0005】

ある局面においては、本発明は、対象におけるアポトーシス部位のインビボでの非侵襲
的な画像化において使用するための、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部
分に共有結合された蛍光色素とを含む結合体を特徴とする。その他の局面においては、本
発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部分に共有結合された蛍光色素
とを含む結合体の、対象におけるアポトーシス部位のインビボでの非侵襲的な画像化のた

10

20

30

40

50

めの薬剤の製造における使用を特徴とする。

【0006】

幾つかの態様においては、部分は、アネキシンおよびシナプトタグミンもしくはシナプトタグミンのC2ドメインのようなその活性断片などの、タンパク質もしくはその活性断片、または、抗ホスファチジルセリン抗体もしくは抗ホスファチジルエタノールアミン抗体のような抗アミノリン脂質抗体もしくはその活性断片でありうる。

【0007】

幾つかの態様においては、蛍光色素は近赤外領域の蛍光を発する。例えば、蛍光色素は、Cy5(商標)、Cy5.5(商標)、Cy7(商標)、もしくはLicor NIR(商標)、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、IRDye38(商標)、IRDye78(商標)、IRDye80(商標)、インドシアニングリーン、LaJolla Blue(商標)、およびLicor NIR(商標)のうちの1つでありうる、または、米国特許第6,083,875号において開示される蛍光色素のうちの1つでありうる。

10

【0008】

その他の局面においては、本発明は、アネキシン、シナプトタグミンまたは例えば抗ホスファチジルセリン抗体もしくは抗ホスファチジルエタノールアミン抗体のような抗アミノリン脂質抗体、または例えばシナプトタグミンのC2ドメインもしくはFv、Fab、もしくはF(ab')₂のようなその活性断片、ならびに、Cy5(商標)、Cy5.5(商標)、Cy7(商標)もしくはLicor NIR(商標)、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、IRDye38(商標)、IRDye78(商標)、IRDye80(商標)、インドシアニングリーン、LaJolla Blue(商標)、およびLicor NIR(商標)からなる群より選択される蛍光色素、または、米国特許第6,083,875号において開示される蛍光色素のうちの1つを含む結合体の、対象におけるアポトーシス部位のインビボでの非侵襲的な画像化のための薬剤の調製における使用を特徴とする。

20

【0009】

他の局面においては、本発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分とその部分に共有結合された蛍光色素とを含む結合体；および、アポトーシスのインビボでの非侵襲的な画像化の方法において結合体を使用するための使用説明書を含むキットを特徴とする。他の局面においては、本発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分；蛍光色素；蛍光色素を部分に結合させ、フルオロフォア結合体を形成させる段階についての使用説明書；および、アポトーシスのインビボでの非侵襲的な画像化の方法においてフルオロフォア結合体を使用するための使用説明書を含むキットを特徴とする。幾つかの態様においては、部分は、アネキシン、シナプトタグミンまたは抗アミノリン脂質抗体またはその活性断片のうちの1つである。幾つかの態様においては、蛍光色素は、Cy5(商標)、Cy5.5(商標)、Cy7(商標)もしくはLicor NIR(商標)、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、IRDye38(商標)、IRDye78(商標)、IRDye80(商標)、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue(商標)、およびLicor NIR(商標)のうちの1つである、または、米国特許第6,083,875号において開示される蛍光色素のうちの1つである。

30

【0010】

さらなる局面においては、本発明は、蛍光結合体を用いてインビボにおいてアポトーシスを画像化するための、非侵襲的な、放射線同位体を用いない方法を特徴とする。ある態様においては、本方法は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分に結合された蛍光色素を含む組成物を対象に投与する段階、および、対象の少なくとも一部(例えば、乳房、背部、胸部、胃、上腕、脚、または他の特定の器官または特定の組織部)の蛍光画像を得て、対象におけるアポトーシスの部位を検出する段階を含む。その他の態様においては、本方法は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分を得る段階；(例えば、1つまたはそれ以上の共有結合により)蛍光色素を部分に付着または連結させ、結合体を形成させる段階；結合体を対象に投与する段階；および、対象の少なくとも一部の蛍光画像を得て、アポトーシスの部位を検出する段階を含む。

40

50

【0011】

結合体は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分（例えば、タンパク質またはその活性断片）および蛍光色素を含み、ここで蛍光色素は例えば共有結合によって部分に連結される。幾つかの態様においては、部分は、例えば実質的に精製された形態にある、例としてアネキシンもしくはその活性断片、または、シナプトタグミンもしくはその断片のような、例えばタンパク質またはその活性断片でありうる。幾つかの態様においては、活性断片は、シナプトタグミンのC2ドメインである。または、タンパク質は抗体、例えば抗アミノリン脂質抗体もしくはその活性（例えば抗原結合性の）断片、例えば抗ホスファチジルセリン抗体もしくは抗ホスファチジルエタノールアミン抗体、または例としてFv、Fab、もしくはF(ab')₂のようなその抗原結合断片でありうる。

10

【0012】

蛍光色素は、例えば、例として可視光波長の遠赤外域における励起後に、近赤外（NIR）領域（600~1,100 nmの範囲）の蛍光を発する蛍光色素でありうる。特定の例は、Cy5（商標）、Cy5.5（商標）、Cy7（商標）またはLicor NIR（商標）、ALEXA FLUOR（登録商標）680、ALEXA FLUOR（登録商標）700、ALEXA FLUOR（登録商標）750、IRDye38（商標）、IRDye78（商標）、IRDye80（商標）、インドシアニングリーン、LaJolla Blue（商標）、およびLicor NIR（商標）、ならびに、その全体を参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,083,875号において開示される蛍光色素を含む。対象は、ヒト、または、例えばネコ、イヌ、マウス、ヒツジ、ウマ、ラット、ウサギ、ブタあるいはウシのような哺乳動物；鳥類；爬虫類；もしくは魚類のような動物でありうる。

20

【0013】

結合体は、例えば経口により、非経口により、吸入により、局所的に、直腸に、点鼻により、口腔に、腔内に、または移植されたリザーバー（reservoir）を介して投与することができる。結合体は、カテーテルを介して、または、針を通して任意の組織に投与されることも可能である。

【0014】

蛍光画像化は、任意の適した画像化カメラまたは装置を用いて行うことが可能である。深部の組織においてNIR蛍光を検出するために、多くの反射画像化システムおよびトモグラフィ画像化システムが開発されてきた。幾つかの態様においては、蛍光画像は、例えば蛍光によるトモグラフィ（fluorescence mediated tomography、FMT）または鏡面反射画像化のような、NIRF画像化によるものである。幾つかの態様においては、画像化は内視鏡を用いて行われる。

30

【0015】

その他の局面においては、本発明は、アポトーシス細胞に特異的に結合する部分（例えば、アネキシンもしくはその活性断片またはシナプトタグミンもしくはその活性断片、または、抗アミノリン脂質抗体もしくはその活性断片）と、その部分に共有結合された蛍光色素とを含み、例えば対照として有用な「不活性」結合体のような、部分と蛍光色素とが少なくとも1:2の化学量論にて存在するような、結合体を特徴とする。幾つかの態様においては、蛍光色素は、本明細書において説明されるような、近赤外領域の蛍光を発する蛍光色素である。

40

【0016】

その他の局面においては、本発明は、アネキシンと、ALEXA FLUOR 680、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750、IRDye38、IRDye78、IRDye80、インドシアニンググリーン、LaJolla Blue、およびLicor NIRからなる群より選択される蛍光色素とを含む結合体を特徴とする。本発明は、シナプトタグミンと、本明細書に記載されるものからなる群より選択される蛍光色素とを含む結合体を特徴とする。他の局面においては、本発明は、例えば抗ホスファチジルセリン抗体または抗ホスファチジルエタノールアミン抗体のような抗アミノリン脂質抗体と、蛍光色素とを含む結合体を特徴とする。

【0017】

本明細書において使用されるように、「蛍光色素（fluorochrome）」および「蛍光色素

50

体 (fluorochrome dye)」という用語は双方とも、基底状態においてエネルギーを吸収し、励起状態から蛍光を発光することができる発色団 (chromophores) を指す。発色団は、他の分子 (例えば、生物学的高分子) と結合させ、フルオロフォア結合体 (例えば、NIR 蛍光プローブのような、画像化プローブとして有用な結合体) を形成させることが可能である。

【0018】

本発明は、幾つかの利点を提供するものである。例えば、結合体は、アポトーシス細胞に対して高い親和性を有し、循環から迅速に取り除かれる。アネキシンA5のようなタンパク質と蛍光色素との結合では、タンパク質の質量が有意に変化せず、高い親和性が保存され、かつ、組織深部に透過する能力を有する非電離放射線を利用する励起源を用いて検出されうる結合体が得られるという点で、天然タンパク質と同様の画像化剤が生じる。

10

【0019】

新しい方法では、アポトーシスの画像化のために、非電離放射線、NIR照射 (およそ600 ~ 1,100 nm) が好都合に使用される。NIRは、数十センチメートルまでの組織への透過を示し、したがって内部組織を非侵襲的に画像化するために使用することができる (例えば、Wyatt, Phil. Trans. R. Soc. London B, 352: 701 ~ 706, 1997; および Trombergら, Phil. Trans. R. Soc. London B, 352: 661 ~ 667, 1997を参照のこと)。非侵襲的であることに加えて、NIR蛍光画像化法は、他の画像化法を上回る多くの利点を提供する: 一般に高い感受性が提供され、(放射性標識されたタンパク質の使用によっては必要となりうるような) 対象または研究者の電離放射線への曝露を必要とせず、画像化法を繰り返し頻繁に使用する可能性が提供され、(分子画像化においては重要となる) 複数の識別可能な結合体を同時に使用することができ、(機能的画像化およびインビボでの顕微鏡観察法の各々においては重要となる) 高い一時的な空間解像能が提供される。結合体は非常に安定でもある; この新しい方法において使用されるタンパク質には、好都合なことに、画像化前の標識を、試験を処方する度に行う必要はない。

20

【0020】

その他の利点は、光学的画像化が、内視鏡試験法および内視鏡画像化法と高度に適合性であるという点である。NIRF法は、例えば、NIRF蛍光によるトモグラフィ (FMT) 全身イメージャー (例えば、Ntziachristosら, Molecular Imaging, 1(2): 82 ~ 88, 2002; Ntziachristosら, Nature Medicine, 8: 757 ~ 760, 2002において説明されるものと同様のもの) と共に、または、他のNIRF内視鏡検査法と共に使用することができる。さらに、アネキシンA5に基づくアポトーシスの画像化では、例えば患者の病歴により定められる組織のような標的組織におけるアポトーシスの程度を定量化することができる。

30

【0021】

他に定義付けられない限り、本明細書において使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する当技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験においては、本明細書において説明されるものと同様または同等の方法および材料を使用することが可能であるが、適した方法および材料が下記にて説明される。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参照は、その全体を参照として組み入れられる。係争の場合は、定義を含む本明細書によって統制される。加えて、材料、方法、および実施例は、説明のためのものにすぎず、限定することを意図するものではない。

40

【0022】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかとなる。

【0023】

発明の詳細な説明

本発明は、アポトーシスのインビボでの画像化のために蛍光結合体を使用する方法を指向するものである。結合体は、アポトーシス細胞に特異的に結合する、例えばタンパク質またはタンパク質断片 (例えば、アネキシンA5またはシナプトタグミンまたはその活性断

50

片)または他の分子のような部分を含み、(例えば、Cy5(商標)、Cy5.5(商標)、Cy7(商標)、またはLicor NIR(商標)、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、IRDye38(商標)、IRDye78(商標)、IRDye80(商標)、インドシアニングリーン、LaJolla Blue(商標)、およびLicor NIR(商標)のようなNIR蛍光色素、ならびに、米国特許第6,083,875号において開示される蛍光色素のような)蛍光色素に結合された部分を含む。アポトーシス細胞に特異的に結合する部分は、アポトーシス細胞に対する高い親和性を有し、アポトーシス細胞と生きている細胞との混合集団においては、アポトーシス細胞に優先的に結合し、アポトーシスを起こしかけている(on-apoptotic)細胞、生きている細胞には実質的に結合しない。

【0024】

本方法は、例えば、動物個体に結合体を投与する段階、およびその後、特定の蛍光色素について適切な励起波長で励起した後に、動物個体の周辺組織および深部組織において(例えば、表面から数ミクロン~数センチメートルの深さから、例えば、少なくとも1 cm、2 cm、3 cm、4 cm、5 cm、6 cm、7 cm、8 cm、9 cm、10 cm、12 cm、15 cmから)発光される光子を検出する段階を含みうる。

【0025】

作用のいかなる特定の機構または理論に縛られることも意図しないが、通常は細胞原形質膜の細胞質側に残るアミノリン脂質の表層出現が、アポトーシスの最も早期のサインであり、結合体は、細胞の表面上に多数のホスファチジルセリン分子を認識することによって、アポトーシスが行われている細胞を認識すると考えられる。細胞表面上におけるアミノリン脂質の発現により、アポトーシスの効率の良い検出が可能になる。例えば、アネキシンA5は、早期アポトーシスの間に細胞の表面上に認められるホスファチジルセリン-カルシウム複合体に結合する。

【0026】

結合体の調製

本明細書において説明されるような結合体は、例えば、本明細書において説明されるアポトーシスのインビボでの画像化の方法のいずれかにおいて使用するための薬剤の調製用に使用することが可能である。

【0027】

結合体は、結合剤の存在下において、アポトーシス細胞に選択的におよび/もしくは特異的に結合する部分(例えばタンパク質または他の分子)と、光学的画像化蛍光性色素もしくは蛍光色素とを組み合わせることによって、または、色素もしくは蛍光色素の活性化類似体を使用し、その後、色素もしくは蛍光色素を反応させて、タンパク質もしくは他の分子と色素もしくは蛍光色素との間に結合もしくは連結(例えば、共有結合またはイオン相互作用もしくは疎水性相互作用のような静電的相互作用)を形成させることによって、調製することが可能である。結合は、翻訳後修飾の結果として、色素または蛍光色素と、糖類、リン脂質、脂肪酸、および/または他の補欠分子族のような、タンパク質中に存在する基との間に形成させることも可能である。例えば、色素のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはイソチオシアン酸は、タンパク質のアミノ基と反応させることが可能であり、色素のマレイミド基は、タンパク質のスルフヒドリル基と反応させることが可能である。

【0028】

1つまたはそれ以上の蛍光色素を結合部分に付着させるために、リンカー分子を使用することも可能である。適したリンカーは、アミノカプロン酸、アミノヘキサン酸、末端アミノ官能基をもつヘテロ二官能基ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールビニルスルホネート、分枝ポリエチレングリコール、および特にアミノ化デキストランを含む。リンカーの好ましい分子量範囲は、200~20,000 Dである。結果的に生じる結合体はその後精製し、遊離型の非結合色素または非結合蛍光色素を結合体から分離することができる。

【0029】

10

20

30

40

50

過剰修飾されたアネキシン5Aを用いた実験からは、複数の大インドシアニン残基の存在が、アネキシン5Aのホスファチジルセリンへの結合に負の影響を与えることが示される。この問題に対処するためには、幾つかのアプローチを使用することができる。例えば、例としてジアシルホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンリポソームを用いて、結合部位を可逆的に保護することが可能である。さらに、アネキシンとキャリアタンパク質（例えば、血清アルブミン）との融合タンパク質を調製することができる。例えば、アネキシンのcDNAが融合タンパク質のN末端部分をコードし、キャリアタンパク質がその融合タンパク質のC末端部分をコードするような方法で、結合中心のアミノ酸配列をコードする、アネキシンのcDNAまたはcDNA断片を、キャリアタンパク質のcDNAとライゲーションすることが可能である。タンパク質は、例えば、適切な細菌宿主または昆虫または哺乳動物細胞において発現され、標準の生化学的方法（例えば、Hisタグアプローチ）を用いて精製される。精製タンパク質は、その後、アネキシン上の結合部位を可逆的にブロックする脂質と組み合わせることができる。蛍光性色素活性化類似体その後に加え、曝露されるシステインのアミノ基またはSH基を修飾することが可能である。または、部分の結合部位からフルオロフォアをさらに離して維持するために、リンカー基を使用することができる。

10

【0030】

表1は、市販の近赤外蛍光色素の例を提供する。加えて、現在は市販されていない、幾つかの他の近赤外蛍光色素が説明されている。Weisslederらの米国特許第6,083,486号；Zabeerら, *Molecular Imaging*, 1: 354~364, 2002；Beckerら, *Nature Biotechnol.*, 19: 327~331, 2001；Lichaら, *Bioconj Chem*, 12: 44~50, 2001を参照のこと。近赤外域の蛍光を発する量子ドットを使用することもできる（例えば、Watsonら, *BioTechniques*, 34(2): 296~300, 302~3, 2003；Goldmanら, *J. Am. Chem. Soc.* 124(22): 6378~82, 2002；Hanら, *Nat. Biotechnol.*, 19(7): 631~5, 2001；Chanら, *Science*, 281(5385): 2016~8, 1998を参照のこと）。現在のところ、1つのNIRF化合物、インドシアニングリーン（ICG）のみが臨床試験または実用における使用を承認されている。当業者には、新しい方法においては、異なる化学的特性および光学的特性を有する多数の蛍光色素を使用することができることが理解される。

20

【0031】

（表1）NIRF蛍光色素

30

蛍光色素	励起 & 発光 最大 (nm)	吸光係数 ($\times 10^{-3}$)	入手元
Cy5(商標)	649/670	250	アマシヤム (Amersham)
Cy5.5(商標)	675/694	250	アマシヤム
Cy7(商標)	743/767	200	アマシヤム
Alexa Fluor (登録商標) 680	679/702	184	モレキュラプローブス (Molecular Probes)
Alexa Fluor (登録商標) 700	696/719	192	モレキュラプローブス
Alexa Fluor (登録商標) 750	752/779	240	モレキュラプローブス
IRDye(商標)38	778/806	179	LiCor
IRDye(商標)78	768/796	220	LiCor
IRDye(商標)80	767/791	250	LiCor
LaJolla Blue(商標)	680/700	170	ダイアトロン (Diatron)
ICG	780/812	115	アコーン (Akorn) およびその他

10

20

【0032】

アポトーシス細胞に特異的に結合する部分は、アネキシンまたはその活性変異体もしくは活性断片でありうる。本明細書において使用されるように、「アネキシン」という用語は、その共通の特性がリン脂質へのカルシウム依存性結合であるような、構造的に関連するタンパク質のファミリーのメンバーを指す。ファミリーには、Aアネキシン（例えば、アネキシンA1～A13）、Bアネキシン（例えば、アネキシンB12）、Cアネキシン（例えば、アネキシンC1）、Dアネキシン（例えば、アネキシンD）、およびEアネキシン（例えば、アネキシンE1～E3）が含まれる。ある態様においては、アネキシンはアネキシンA5（本明細書においては「アネキシンV」とも呼ばれる；ゲンバンク（Genbank）アクセッション番号：NM_001154；配列番号：1）またはその活性変異体である。例えばリン脂質への結合能を保持する断片のような、アネキシンの活性断片を使用することも可能である。

30

【0033】

アポトーシス細胞に特異的に結合する部分は、シナプトタグミンまたはその活性変異体もしくは活性断片であってもよい。本明細書において使用されるように、「シナプトタグミン」という用語は、リン脂質に結合するC2ドメインを含む内在性膜タンパク質のファミリーのメンバーを指す。ファミリーには、Syt1～13が含まれる。ヒトにおいては、ファミリーは、Syt1～7およびSyt12～13を含む。ある態様においては、シナプトタグミンはシナプトタグミンI、またはSYT1（ゲンバンクアクセッション番号：M55047；配列番号：2）、またはその活性変異体である。例としてC2ドメインまたはその変異体のような、例えばリン脂質への結合能を保持する断片のようなシナプトタグミンの活性断片を使用することも可能である。インターネットアドレス us.expasy.org/cgi-bin/prosite-search-ac?PS50004 において挙げられるC2ドメインを含む、アポトーシス細胞に特異的に結合する他のC2ドメインを、本発明の範囲内で使用することも可能である。

40

【0034】

本明細書において使用されるように、「活性変異体」という用語は、例えば結合能のような関連生物学的活性を保持する、選択されたタンパク質（例えば、天然タンパク質または野生型タンパク質）の変異体であるポリペプチドを指す。変異体は、1つまたはそれ以上の残基において、選択されたタンパク質からは異なってもよく、例えば、1つまたはそれ以上の保存的なアミノ酸置換を有しうる。変異体は、例えば自然界において生じる

50

ポリペプチド（例えば天然タンパク質）のように、天然に生じるポリペプチドでありうる、または、遺伝的に改変された変異体でありうる。1つの例として、アネキシンの活性変異体は、アネキシンの配列、例えば、リン脂質への結合能を保持する配列番号：1と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または99%同一でありうる。アネキシンの活性変異体は、少なくとも1つの保存されたアネキシン-カルシウム/リン脂質結合反復配列（例えばリポコルチンドメイン）を含むべきである。1つの例として、アネキシンの活性変異体は、例えばTaitら、Bioconjug Chem, 11, 918~925, 2000において開示されるような、遺伝的に改変されたアネキシン5Aでありうる。その他の例としては、シナプトタグミンの活性変異体は、シナプトタグミンの配列、例えば、リン脂質への結合能を保持する配列番号：2と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、または99%同一でありうる。変異体は、リン脂質への結合能を保持する、例えばアネキシンまたはシナプトタグミンの相同体のような相同体を含みうる。配列間の相同性または配列同一性（本用語は、本明細書においては交換可能なように使用される）の計算は、以下のように行うことができる。

10

【0035】

2つのアミノ酸配列、または、2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、最適な比較のための配列アラインメントを行う（例えば、最適なアラインメントのために、第一および第二のアミノ酸配列または核酸配列の一方または双方にギャップを導入することが可能であり、非相同配列は比較については無視することができる）。ある態様においては、比較のためにアラインメントを行った参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%である。それから、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列におけるある位置が、第二の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、その分子はその位置において同一である（本明細書において使用されるように、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と同等である）。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適アラインメントのために導入されることが必要なギャップの数、および、各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一な位置の数の関数である。

20

【0036】

2つの配列間における配列の比較および同一性パーセントの決定は、例えば、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかを用いて、およびギャップの重み付け16、14、12、10、8、6、または4、および長さの重み付け1、2、3、4、5または6を用いて、GCGソフトウェアパッケージ（ウェブサイトgcg.comにおいて入手可能である）におけるGAPプログラムに組み入れられている、NeedlemanおよびWunsch（1970）J.Mol.Biol. 48: 444~453）のアルゴリズムのような、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。当技術分野においては他の比較方法が知られている。

30

【0037】

アネキシンおよびシナプトタグミンの核酸配列およびタンパク質配列は、例えば変異体を同定するために、公共のデータベースに対して探索を行うための「照会配列（query sequence）」として使用することができる。そのような探索は、Altschulら（1990）J.Mol. Biol. 215: 403~10のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて行うことができる。BLASTヌクレオチド探索は、参照核酸分子に対して相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12を用いて行うことができる。BLASTタンパク質探索は、参照タンパク質に対して相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて行うことができる。比較のためにギャップを入れたアラインメントを得るためには、Altschulら、Nucleic Acids Res., 25: 3389~3402, 1997において説明されるように、Gapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用した場合、各々のプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。例えば、ウェブサイトアドレスncbi.nlm.nih.gov.を参照のこと。

40

【0038】

50

本明細書において使用されるように、「保存的なアミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられることの1つである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義付けられてきた。これらのファミリーは、塩基性の側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、電荷をもたない極性側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

10

【0039】

本明細書において使用されるように、「活性断片」という用語は、関連生物学的活性、例えば結合能を保持する、より大きなタンパク質の部分であるポリペプチドを指す。例えば、シナプトタグミンの1つの活性断片は、ホスファチジルセリンへの結合能を保持するC2ドメインである。活性断片は、変異体であってもよく、例えば、選択されたタンパク質からは1つまたはそれ以上の残基が異なってもよく、例えば、1つまたはそれ以上の保存的なアミノ酸置換を有しうる。

【0040】

アポトーシス細胞に特異的に結合する部分は、例えば抗ホスファチジルセリン抗体もしくは抗ホスファチジルエタノールアミン抗体のような抗アミノリン脂質抗体、または、その活性変異体もしくは活性断片であることも可能である。そのような抗体は、例えば、当技術分野において既知の方法、例えば本明細書において説明される方法によって得ることができる。加えて、多くのそのような抗体が、例えばコルジェニックス社 (Corgenix, Inc.) (Denver, CO) またはミッドウエストヘモスタシス&トロンボシスラボラトリーズ社 (Midwest Hemostasis and Thrombosis Laboratories, Inc.) (Muncie, IN) から市販されている。抗体の活性断片は、例えばホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンのような抗原への結合能を保持する、Fv、FabまたはF(ab')₂でありうる。そのような断片は、当技術分野において十分に確立された技術を用いて、抗体から作製することができる（例えば、Rousseauxら, *Methods Enzymol.*, 121: 663~69, 1986を参照のこと）。

例えば、F(ab')₂断片は、抗体分子のペプシンによる分解によって作製することができ、Fab断片は、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製することができる。当技術分野においては、ヒト抗マウス抗体 (HAMA) 反応のような抗抗体反応のリスクを低下させるために抗体をヒト化または脱免疫化するための、多くの方法が知られている。抗アミノリン脂質抗体の活性変異体は、本明細書において説明されるように、例えば、非ヒト抗体、例としてマウスまたはウサギの抗体の、ヒト化または脱免疫化した型を含みうる。

20

30

【0041】

抗体を作製する方法

抗体は、免疫グロブリン分子、および、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な（例えば抗原結合性の）部分である。免疫グロブリン分子の断片の例は、アポトーシス細胞、例えば、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンのようなアミノリン脂質アポトーシスマーカーに特異的に結合しうる抗体の断片、例えばFv、FabまたはF(ab')₂部分を含む。断片は、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって作製することができる。モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体組成物という用語は、ポリペプチドまたはタンパク質の特定のエピトープと免疫反応できる抗原結合部位をただ1種のみ含む抗体分子の集団を指す。したがって、モノクローナル抗体組成物は、典型的に、それが特異的に結合するタンパク質について単一の結合親和性を示す。

40

【0042】

免疫化

50

アポトーシス細胞に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、適切な免疫原を含む免疫原性調製物を用いて、適切な対象（例えばウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物）を免疫化することによって産生させることができる。免疫原は、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミン、または、ホスホリルセリン基または酸化不飽和もしくは多不飽和ジアシルホスファチジルセリンによって共有結合修飾した人工タンパク質抗原（例えばヘモシアニン）を含む。典型的には、免疫原はホスファチジルセリンである。

【0043】

対象において生じた抗体をその後、抗体がアポトーシス細胞に結合するかどうか決定するためにスクリーニングすることができる。そのような抗体は、本明細書において説明されるアッセイ法においてさらにスクリーニングすることが可能である。例えば、これらの抗体をアッセイし、それらが例えばアネキシン5Aのようなアネキシンまたはシナプトタグミンと同様の結合パターンを示すかどうかを決定することができる。望ましい特徴を有する抗体を同定するために適した方法は本明細書において説明されており、当技術分野において知られている。

10

【0044】

免疫原（例えばホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミン）の単用量、および、免疫化プログラムは、免疫化される対象、その免疫状態、および対象の体重に依存する。対象における免疫反応を増強させるために、完全フロイントアジュバントまたは不完全フロイントアジュバントのようなアジュバントと共に免疫原を投与することが可能である。上記にて説明されるような免疫原を用いた対象の免疫化は、ポリクローナル抗体反応を誘導する。免疫化された対象における抗体価は、固定化抗原、例えばホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンを用いたELISAのような標準の技術によって経時的にモニタリングすることができる。

20

【0045】

アポトーシス細胞に対する抗体を産生させる他の方法は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いる段階を含む（例えば、Woodら、PCT刊行物国際公開公報第91/00906号、Kucherlapatiら、PCT刊行物国際公開公報第91/10741号；または、Lonbergら、PCT刊行物国際公開公報第92/03918号を参照のこと）。または、ヒト抗体産生細胞または組織（例えばヒト骨髄細胞、末梢血リンパ球(PBL)、ヒト胎児リンパ節組織、または造血幹細胞）を移植された免疫欠損マウスに抗原を導入することによって、ヒトモノクローナル抗体を作製することができる。そのような方法は、SCID-huマウス（Ducosalら、PCT刊行物国際公開公報第93/05796号；米国特許第5,411,749号；またはMcCuneら、Science 241: 1632~1639, 1988を参照のこと）またはRag-1/Rag-2欠損マウスにおいて抗体を産生させる段階を含む。ヒト抗体-免疫欠損マウスは市販されてもいる。例えば、Rag-2欠損マウスは、Taconic Farms (Germantown, NY) から入手可能である。

30

【0046】

ハイブリドーマ

モノクローナル抗体は、免疫原を用いて対象を免疫化することによって作製することができる。免疫化後適切な時点において、例えば、抗体価が十分に高いレベルにある時点において、免疫化動物個体から抗体産生細胞を採集し、標準の技術を用いてモノクローナル抗体を調製するために使用することが可能である。例えば、抗体産生細胞を、標準の体細胞融合法によって、骨髄腫細胞のような不死化細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能である。そのような技術は当技術分野においてはよく知られており、例えば、KohlerおよびMilstein (Nature, 256: 495~497, 1975) によって最初に開発されたようなハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbarら、Immunology Today, 4: 72, 1983)、および、ヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBVハイブリドーマ技術 (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77~96(1985)) を含む。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための技術はよく知られている。

40

50

【 0 0 4 7 】

モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する、適切な抗原を用いて免疫化されたトランスジェニックマウスから抗体産生細胞、例えば脾細胞を採集することによって作製することも可能である。脾細胞は、ヒト骨髄腫細胞との融合によって、または、エプスタインバーウイルス (EBV) による形質転換によって、不死化することが可能である。これらのハイブリドーマは、当技術分野において説明されている、ヒトB細胞またはEBVハイブリドーマ技術を用いて作製することができる (例えば、Boyleら, 欧州特許刊行物第0 614 984号を参照のこと)。

【 0 0 4 8 】

アポトーシス細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えばアポトーシス細胞またはアポトーシスマーカー、例えばホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンのようなアミノリン脂質に特異的に結合する抗体を選択するスクリーニングにより、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出される。

【 0 0 4 9 】

本明細書において説明されるスクリーニングアッセイ法において陽性を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマから培養培地にモノクローナル抗体を分泌させるために、したがって完全な抗体を産生させるために十分な条件下および期間において、栄養培地で培養してもよい。ハイブリドーマ細胞に適した組織培養技術および培養培地は、当技術分野において一般に説明されている (例えば、R.H.Kenneth, 「モノクローナル抗体：生物学的解析における新たな次元 (Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analysis)」, Plenum Publishing Corp., New York, New York(1980)を参照のこと)。抗体を含む調整ハイブリドーマ培養上清をその後採集することが可能である。

【 0 0 5 0 】

組換えコンビナトリアル抗体ライブラリ

モノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリを構築し、適切な抗原、例えばホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンを用いてそのライブラリをスクリーニングすることにより作製することができる。ファージディスプレイライブラリを作製・スクリーニングするためのキットは市販されている (例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号：27-9400-01; および Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, カタログ番号：240612)。簡潔に言えば、抗体ライブラリをスクリーニングし、望ましい抗原に特異的に結合する抗体を発現するファージを同定および単離する。ある態様においては、ライブラリの一次スクリーニングは、固定化ホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンを用いたスクリーニングに關与する。

【 0 0 5 1 】

スクリーニングに続き、ディスプレイファージを単離し、選択された抗体をコードする核酸をディスプレイファージから (例えばファージゲノムから) 回収し、よく知られた組換えDNA技術によって他の発現ベクターにサブクローニングすることができる。核酸は、さらに操作する (例えば、付加的な定常領域のような付加的な免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結する) ことが可能である、および/または、宿主細胞において発現させることが可能である。

【 0 0 5 2 】

キメラ抗体およびヒト化抗体

ヒトの患者による抗体への反応を最小化するために、キメラ抗体およびヒト化抗体のような、抗体の組換え形態を調製することも可能である。非ヒト対象において作製された抗体、または、非ヒト抗体遺伝子の発現に由来する抗体がヒトにおいて治療的に使用される場合、それらは様々な程度で外来のものであると認識され、患者において免疫反応が生じる可能性がある。この免疫反応を最小化するまたは排除する1つのアプローチは、キメラ

10

20

30

40

50

抗体誘導体、即ち、非ヒト動物の可変領域とヒトの定常領域を組み合わせた抗体分子を作製するものである。そのような抗体は、もとのモノクローナル抗体のエピトープ結合特異性を保持しているが、ヒトに投与された場合に免疫原性が低い可能性があるため、患者によって寛容される可能性がより高い。

【0053】

キメラモノクローナル抗体は、当技術分野において既知の組換えDNA技術によって作製することができる。例えば、非ヒト抗体分子の定常領域をコードする遺伝子を、ヒトの定常領域をコードする遺伝子と置換する（Robinsonら，PCT特許刊行物PCT/US86/02269；Akiraら，欧州特許出願第184,187号；またはTaniguchi，M.，欧州特許出願第171,496号を参照のこと）。

10

【0054】

キメラ抗体は、抗原結合に関与しない可変領域の部分をヒト可変領域に由来する同等の部分と置き換えることによってさらに「ヒト化」されうる。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な総説は、Morrison，S.L.Science，229：1202～1207，1985およびOiら，BioTechniques，4：214，1986によって提供されている。そのような方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも1つからの免疫グロブリン可変領域の全てまたは部分をコードする核酸配列を単離する段階、操作する段階、および発現させる段階を含む。ヒト化キメラ抗体をコードするcDNAまたはその断片をその後、適切な発現ベクターにクローニングすることができる。または、適切な「ヒト化」抗体は、相補性決定領域（CDR）置換（米国特許第5,225,539号；Jonesら，Nature，321：552～525，1986；Verhoeyanら，Science，239：1534，1988；およびBeidlerら，J.Immunol.，141：4053～4060，1988を参照のこと）によって作製することができる。

20

【0055】

アポトーシス細胞に対して特異的な抗体の結合特異性を保持する「ヒト」抗体ポリペプチド二量体を作製するために、エピトープのインプリンティングを使用することも可能である。簡潔に言えば、ある抗原に対して特異的な結合性を有する非ヒト可変領域（VH）およびヒト定常領域（CH1）をコードする遺伝子を大腸菌において発現させ、ヒトV_HC_{H1}遺伝子のファージライブラリを用いて感染させる。抗体断片をディスプレイしているファージをその後、40 kDaタンパク質への結合についてスクリーニングする。選択されたヒトV_HC_{H1}遺伝子を、V_HC_{H1}鎖を発現させるために再クローニングし、これらの鎖を有する大腸菌に、ヒトVHCH1遺伝子のファージライブラリを感染させ、抗原で被覆した管を用いて、ライブラリを数回のスクリーニングに供する。Hoogenboomら，PCT刊行物国際公開公報第93/06213号を参照のこと。

30

【0056】

結合体の投与

本明細書において説明される結合体を含む組成物または薬学的製剤を形成させるために、薬学的に許容される担体および賦形剤を使用することができる。

【0057】

限定はしないが、有用な担体および賦形剤は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、アルブミンのような血清タンパク質、リン酸のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（「TRIS」）、脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩類または電解物、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩類、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースに基づく物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリプロピレンブロックコポリマー、グルコースのような糖類、および適切な凍結保護剤を含む。

40

【0058】

本明細書において説明される結合体の薬学的組成物は、注射可能な滅菌調製物の形態にあることが可能である。注射可能な調製物を作製するために使用できる可能な賦形剤また

50

は溶媒は、水、リンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液、および5% D-グルコース溶液 (D5W) を含む。加えて、モノグリセリドまたはジグリセリドのような油ならびにオレイン酸およびその誘導体のような脂肪酸を使用することができる。

【0059】

本発明の結合体および薬学的組成物は、経口により、非経口により、吸入により、局所的に、直腸に、点鼻により、口腔に、腔内に、または移植されたりザバーを介して投与することができる。「非経口投与」という用語は、静脈内、筋内、関節内、滑液包内、胸骨内、髄腔内、腹腔内、槽内、肝臓内、病巣内、および頭蓋内注射または注入の技術を含む。結合体は、カテーテルを介して、または針を通して、任意の組織に投与することも可能である。

10

【0060】

眼に使用するためには、本発明の薬学的組成物を、等張の、pH調整された、滅菌食塩水中に微粒化された懸濁液として処方することができる。または、組成物は、ワセリンのような軟膏剤として処方することができる。

【0061】

局所適用のためには、新しい薬学的組成物を、ワセリンのような適切な軟膏剤として処方することができる。下部消化管または腔のための局所適用は、坐剤処方または浣腸剤処方によって行うことができる。

【0062】

結合体の処方は、抗酸化剤、または、ベースライン蛍光の分解を妨げるもしくは減少させる、もしくは限定はしないが量子収率、蛍光寿命、ならびに励起波長および発光波長を含む蛍光特性を保存する、何か他の化学的化合物をも含むうる。これらの抗酸化剤または他の化学的化合物には、限定はしないが、メラトニン、ジチオトレイトール (dTt)、デフェロキサミン (DFX)、メチオニン、およびN-アセチルシステインが含まれうる。

20

【0063】

本発明の投与は、装置の感受性を含む多くの要素、ならびに、動物種、年齢、体重、投与様式、性別、食事、投与期間、および排泄率を含む、対象に関連した多くの変数に依存する。

【0064】

本発明の結合体または任意の薬学的組成物を使用する前に、対象は、画像化の工程を増強するために、ある作用物質または投与プログラムによって処置されうる。例えば、摂取された食物からのあらゆる自家蛍光または干渉を減少させるために、画像化前に対象を、緑色野菜のようなある食物に由来する蛍光フェオホルバイトからの干渉を減少させるための低フェオホルバイト食のような特別な食事プログラム下に置くことが可能である。または、結腸鏡検査の前に使用され、Visicol (商標) などの作用物質の使用を含む清浄プログラムのような清浄プログラムを画像化前に使用することができる。

30

【0065】

対象は、画像の質を改善するために、薬学的修飾剤によって処置してもよい。例えば、低用量の酵素阻害剤を使用して (二次的には、正常な組織における既に低い酵素活性が、酵素的に活性な病的組織よりも大幅に比例的に下がる)、疾患のスクリーニング中における標的対バックグラウンド比率を改善することができる。その他の非限定的な例として、葉酸塩に基づく標的化送達と組み合わせた、異常な組織 (即ち、代謝的に活性な癌) における取り込みを相対的に増加させるためのメトトレキサートによる前処理を使用することが可能である。

40

【0066】

インビボにおける画像化の使用

本明細書において説明されるインビボでの画像化法は、例えば、個々の患者および臨床試験の双方において、対象におけるアポトーシスを検出するために、および、治療を施した効果を評価するために、使用することができる。本方法は、例えば、経時的にアポトーシスの比率をモニタリングするために、および、損傷の絶対レベルを検出するために、使

50

用することができる。例えば、本方法は、例えば腫瘍におけるアポトーシスのようなアポトーシスの早期のサインを検出するために、例えば化学療法剤、放射線治療、ホルモン剤または抗ホルモン剤、および抗血管形成療法のような癌治療の効果を評価するために、したがって臨床ケアを導くために使用することができる。本方法の感受性により、アポトーシスのより早期の、および迅速な検出が可能になり、有効な療法を発見する可能性が高まる。

【0067】

本方法は、主にリンパ球細胞におけるアポトーシス過程における障害によって特徴付けられる慢性関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスのような自己免疫状態をモニタリングするために使用することもできる。

【0068】

本明細書において説明される方法を用いて、急性アポトーシスおよび/または壊死、例えば発作または心筋梗塞のような低酸素性-虚血性の損傷に関連する状態の進行および治療をモニタリングすることができ、そして例えば治療の選択を導くために、例えば、カスパーゼ阻害剤のような抗アポトーシス薬の投与の効果を評価するために使用されうる。本方法を用いて、移植後の急性臓器拒絶をモニタリングすることも可能であり、そして免疫抑制剤または他の作用物質の投与の効果をモニタリングすることができる。細菌および/またはウイルス感染と関連する細胞の損傷を評価することも可能であり、選択される治療（例えばどの作用物質または他の治療を施すべきか）、および治療の有効性が評価される。

【0069】

本方法を用いて、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン変性疾患、多発性硬化症、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、およびハンチントン病を含む、慢性アポトーシスに特徴付けられる神経変性疾患の進行をモニタリングすることもできる。例えば、損傷の程度および局在を決定することができ、経時的な疾患の進行、ならびに、治療薬の選択および効果を決定することができる。

【0070】

NIR蛍光画像化

NIR蛍光（「NIRF」）画像化においては、励起光源は一般にフィルターにかけられた光源または定められた帯域を有するレーザーである。励起光は体組織中を進行する。NIR蛍光分子（即ち「造影剤」）と遭遇した場合、励起光は吸収される。蛍光分子はその後、例えば検出可能なように異なるスペクトル特性を有する光（例えば、若干長い波長）を励起光から発光する。組織および血液は、可視光とは反対に近赤外域（700～850 nm）において高い透過率を有するため、そして水も多くの天然に生じる蛍光色素もこの領域においては有意に吸収を行わないため、NIR技術では、画像化病理学のための独特の利点が提供される。したがって、NIR光は、可視光または赤外領域の光子よりも効率良く組織を透過する。加えて、遠赤光では散乱した励起光の干渉はより低い。その結果、組織のより深い層において励起された蛍光シグナルが得られうる（HawryszおよびSevick-Muraca, Neoplasia, 2: 388～417, 2000において総説されている）。一般に、組織の画像は、数十センチメートルまでの深さ、例えば、少なくとも1 cm、2 cm、3 cm、4 cm、5 cm、6 cm、7 cm、8 cm、9 cm、10 cm、12 cm、15 cm、18 cm、または20 cmの深さにおいて得られうる。

【0071】

インビボにおける近赤外画像化

本発明は、新規の方法に関するものであるが、蛍光画像、光学的画像の入手、および画像処理の一般的な原則が、本発明の実施において適用されうる。光学的画像化技術の総説については、例えば、Alfanoら, Ann.NY Acad.Sci., 820: 248～270, 1997を参照のこと。

【0072】

本発明の実施において有用な画像化システムは、典型的に、3つの基本的な成分を含む：（1）近赤外光源またはフルオロフォアに蛍光をもたらすのに適した波長の他の光源、

10

20

30

40

50

(2) フルオロフォア励起のために使用される光から発光を分離または識別するための装置、および(3) 検出系。例えば、Weisslederら, *Nat. Biotechnol.*, 17: 375~8, 1999を参照のこと。例えば、コダック(Kodak) ImageStation440画像化ステーションおよび外部の低パワーの励起源を用いて、図1において示されるような画像化システムを組み立てることができる。この鏡面反射蛍光(SRF)画像化デバイスは、本明細書において説明されるインビボにおけるデータを作製するために使用された。デバイスは、強度の低い(650 nmにおいて $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$)光を生じる白色ハロゲン光源を備える。鏡面反射画像化においては、蛍光色素を励起するために必要とされる波長における光が、プラテンガラス上に配置された動物個体の表面に与えられ、ストークス・シフト(Stokes-shifted)('蛍光')光から画像が作製される。波長の弁別にはバンドパスフィルターを使用することが可能である。レーザーからの高パワーレーザー励起(737 nmにおいて $1\text{mW}/\text{cm}^2$)、および他の波長における光のための水銀ランプ、より様々なフィルター、および改善されたCCDカメラを特徴とする、図2に示されるようなより精巧なシステムを使用することもできる。

10

【0073】

典型的に、光源は、NIRフルオロフォアを用いた場合に、単色の(または実質的に単色の)近赤外光を提供する。光源は、適切にフィルターにかけられた白色光、例えば、広帯域源からのバンドパスフィルターをかけた光でありうる。例えば、150ワットのハロゲンランプからの光は、オメガオプティカル(Omega Optical)(Brattleboro, VT)から市販されているバンドパスフィルターを通過させることができる。幾つかの態様においては、光源はレーザーである。例えば、Boasら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4887~4891, 1994; Ntziachristosら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 2767~2772, 2000; Alexander, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 9: 416~418, 1991を参照のこと。画像化のための近赤外レーザーについての情報は、インターネット上にて(例えばimds.comにおいて)、および、様々な他の既知の情報源において見出すこともできる。

20

【0074】

励起光から光学的発光を分離するために、ハイパスフィルターまたはバンドパスフィルター(700 nm)を使用することができる。適切なハイパスフィルターまたはバンドパスフィルターは、オメガオプティカルから市販されている。蛍光色素が1つまたはそれ以上の量子ドットからなる場合、(異なる活性化部位を有する)単一のプローブまたは複数のプローブ上の複数の異なる蛍光色素を励起するために単一の励起波長を使用することができ、一連のバンドパスフィルター、回折格子、または他の方法を用いたスペクトルの分離を、異なる活性化を独立に読み取るために使用することができる。

30

【0075】

一般に、光検出系は、集光/像形成および光検出/画像記録の成分を含みうる。光検出系は、双方の成分を組み入れる単一の統合デバイスでありうるが、集光/像形成および光検出/画像記録の成分は別々に議論される。しかし、記録デバイスは、画像の代わりに、単一の(時間によって変化する)スカラー強度を単に記録することが可能である。例えば、カテーテルに基づく記録デバイスは、複数の部位からの情報を同時に(即ち画像を)記録しうる、または、(透視検査法によって検査されるカテーテルチップにおける放射線不透過性(radio-opaque)マーカーのような)他の方法によって、位置と相関するスカラー

40

【0076】

NIRFおよび他の画像化にトモグラフィーによるアプローチを使用することもできる。一般に、トモグラフィー法では、均一に散乱する環境に置かれた動物個体を通して指向されるレーザー光パルスを利用する;動物個体を通過した散乱光および蛍光光は、多数の位置において記録される。媒体における励起光源を位置付けるために、複雑なモデリングアルゴリズムがその後適用される。FMT(蛍光によるトモグラフィー)と呼ばれる本アプローチは、Ntziachristosら, *Molecular Imaging*, 1(2): 82~88, 2002およびNtziachristosら, *Nature Medicine*, 8:757~760, 2002において説明されている。

【0077】

50

特に有用な集光/像形成成分は、内視鏡である。腹膜 (Gahlenら, J.Photochem.Photobiol., B 52: 131~135, 1999)、卵巣癌 (Majorら, Gynecol.Oncol., 66: 122~132, 1997)、結腸 (Mycekら, Gastrointest.Endosc., 48: 390~394, 1998; Steppら, Endoscopy, 30: 379~386, 1998)、胆管 (Izuishiら, Hepatogastroenterology, 46: 804~807, 1999)、胃 (Abeら, Endoscopy 32: 281~286, 2000)、膀胱 (Kriegmairら, Urol.Int., 63: 27~31, 1999; Riedlら, J.Endourol., 13: 755~759, 1999)、および脳 (Ward, J.Laser Appl., 10: 224~228, 1998)を含む、多くの組織および器官のインビボにおける光学的画像化のために使用されてきた内視鏡デバイスおよび技術を本発明の実施において使用することもできる。蛍光内視鏡も当該技術分野においては知られている (Bhunchetら, Gastrointest.Endosc., 55, 562~571, 2002; Kobayashiら, Cancer Lett., 165, 155~159, 2001)。当業者には、例えば特定の器官または組織部の画像化における使用のためにデバイスの発光スペクトルおよび検出スペクトルを最適化するために、必要とされうる任意の改変を認識し、作出することが可能である。

【0078】

本発明において有用な、他のタイプの集光成分は、光ファイバーデバイスを含む、カテーテルに基づくデバイスである。そのようなデバイスは、脈管内の画像化に特に適している。例えば、Tearneyら, Science, 276: 2037~2039, 1997; Boppartら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 94: 4256~4261, 1997を参照のこと。

【0079】

本方法の実施においては、フェイズドアレイ技術 (Boasら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 91: 4887~4891, 1994; Chance, Ann.NY Acad.Sci., 838: 29~45, 1998)、光拡散トモグラフィ (Chengら, Optics Express, 3: 118~123, 1998; Siegelら, Optic Express, 4: 287~298, 1999)、生体内顕微鏡検査 (Dellianら, Br.J.Cancer, 82: 1513~1518, 2000; Monskyら, Cancer Res., 59: 4129~4135, 1999; Fukumuraら, Cell, 94: 715~725, 1998)、および共焦点画像化 (Korlachら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 96: 8461~8466, 1999; Rajadhyakshaら, J.Invest. Dermatol., 104: 946~952, 1995; Gonzalezら, J.Med., 30: 337~356, 1999)を含む、なおも他の画像化技術を使用することができる。

【0080】

本発明においては、任意の適した光検出/画像記録成分、例えば、電荷結合素子 (CCD)系または写真用フィルムを使用することが可能である。光検出/画像記録成分の選択は、使用される集光/像形成成分の型を含む要素に依存する。適した成分を選択する段階、それらを近赤外画像化システムに組み立てる段階、およびシステムを操作する段階は、当業者の能力の範囲内にある。

【0081】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。以下の実施例は、請求項において説明される本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

【0082】

実施例

実施例1. アネキシンA5の調製

アネキシンA5を、実質的に米国特許第6,323,313号において説明されるように精製した。簡潔に言えば、アネキシンA5を発現する大腸菌クローンACL3 (大腸菌株BL21(DE3)、プラスミドpET12a.PAPIを含む)を、50 μ g/mlカナマイシンを含む500 mlのTB (Terrific Broth)において、37、200 rpmにて一晚増殖させた。2,500 \times g、4にて10分間遠心した後、20 mMのトリエタノールアミンpH 7.2および150 mMのNaClを含む溶液500 mlによって細胞を洗浄し、その後同じ条件下においてスピンドウンした。それから細胞を、20 mMのトリエタノールアミンおよび10 mMのCaCl₂を含む溶液500 ml中に再懸濁させた。結果的に生じる懸濁液の10画分を、6つ毎に、50 ml管中にて音波処理し、氷上にて、8 Wに設定したFisher Scientific Dismembrator 60 (登録商標)を用いた1分間の処理を行い、その後、22,500 \times g、4にて20分間遠心した。氷上にて、20 mMのトリエタノールアミンpH 7.2および20 mMのEDTAを含む溶液60 ml中に沈殿を再懸濁し、その後、22,500 \times g、4にて2

0分間遠心した。上清を、20 mMのトリエタノールアミンpH 8.0に対して4 で一晩透析し（膜分子量カットオフ値：12~14 kDa）、その後、0.45 μmのフィルターを通してろ過した。ろ液をHiTrap Qカラム（Pharmacia, Piscataway, NJ）に注ぎ、20 mMのトリエタノールアミンpH 8.0を含む、0~1 M勾配のNaCl 100 mlを用いてアネキシンA5を溶出した（およそ0.22 M NaClにおける溶出）。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）（Laemmli, 1970）に基づいて画分をプールし、その後濃縮し、Centriprep 10（商標）カラム（3,000×g、4 ）を用いて、0.1 Mの重炭酸pH 8.0に対して透析した。SDSゲル電気泳動によって評価した純度は97%であった。

【0083】

実施例2. 近赤外インドシアニン色素 Cy5.5と結合させた活性アネキシンA5の合成

1 mgのアネキシンA5の3 mg/ml溶液を調製し、3,000×g、4 にて、Centriprep（商標）10カラム（Millipore, Milford MA）を用いて、0.1 M 重炭酸pH 8.0に対して透析した。Cy5.5標識アネキシンVを合成するために、333 μlのアネキシンV（3.0 mg/ml、0.1 M 重炭酸pH 8.0に対して透析した）をCy5.5 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（Amersham-Pharmacia, Piscataway NJ）1バイアルに加えた。室温における20分間のインキュベーション後、混合物を第二のCy5.5バイアルに移し、室温にてさらに40分間インキュベートした。PBS pH 7.4を用いて平衡させたBioGel P6（Bio-Rad, Hercules CA）における二重のスピンカラム分離によって、アネキシンA5とCy5.5との結合体（Cy-アネキシン）を分離した。最初に、カラムを1,000×gにて2分間遠心し、その後、アネキシン-Cy5.5をカラムに加え、カラムを1,000×gにて5分間、再度スピンした。溶出液を収集し、BioGel P6を充填した別のカラム上において精製を繰り返した。Cy5.5色素濃度を675 nmにおいて分光光度法で決定し（ $E_{678} = 250,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）、BCAアッセイ法（Pierce-Endogen, Rockford IL）を用いてタンパク質濃度を決定し、Cy5.5 / アネキシンモル比率を計算した。活性Cy5.5-アネキシンでは、平均して、アネキシン1モル当たり1.1モルのCy5.5分子が結合していた。

【0084】

実施例3. 近赤外インドシアニン色素Cy5.5と結合させた不活性アネキシンA5の合成

ある範囲の色素対タンパク質比率を有するアネキシン-Cy5.5結合体を合成するために、7 μlのDMSOを用いてCy5.5を可溶化し、1.0、2.0、または4.0 μlのアリコート（30 μgのアネキシンA5（0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液pH 8.0））に加え、最終容量20 μlを与えた。室温にて1.5時間反応管をインキュベートした。30 μlのPBS、pH 7.4を加えた後、PBS pH 7.4によって平衡させた1 ml Biospin P6カラム（Bio-Rad）を用いた、2回の連続したスピン分離によって、未反応色素からタンパク質を分離した。

【0085】

高いCy5.5含量を有する結合体（タンパク質1モル当たり2.4モルのCy5.5、「不活性アネキシン」）は、アポトーシス細胞に対して結合親和性をもたなかったため、腫瘍細胞のバイオアベイラビリティにおける差異を説明するための優れた対照をなす。アネキシンA5およびCy5.5の分子量は、各々36 kDaおよび0.9 kDaであるため、活性Cy-アネキシン[総質量 = 1.1(0.900) + 36 kDa]と不活性Cy-アネキシン[総質量 = 2.4(0.90) + 36 kDa]は、1.35 kDaだけ異なる。

【0086】

活性アネキシンおよび不活性アネキシンの試料を、およそ等しい濃度（500 nM）のCy5.5色素においてトリプシン処理し（100 μg/ml、37 において2時間）、Cy5.5の蛍光強度を、トリプシン処理の前後に $\text{ex } 675 \text{ nm} / \text{em } 694 \text{ nm}$ において測定した。処理によって、双方の場合において、2,500 AUから12,500 AUまでのCy5.5蛍光の増加がもたらされたことから、タンパク質の修飾の程度に関わらず、色素のタンパク質への結合によって同じ程度の蛍光消光が生じたことが示される。

【0087】

実施例4. 近赤外インドシアニン色素Cy7と結合させた活性アネキシンA5の合成

Cy7標識アネキシンA5を合成するために、5 μlまたは10 μl（DMSO 400 μl中にCy7 200 μ

10

20

30

40

50

g) のCy7 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Amersham-Pharmacia, Piscataway NJ) を333 μ lのアネキシンA5 (0.1 M 重炭酸pH 8.0に対して透析した3.0 mg/ml) に加えた。反応物を室温にて90分間インキュベートした。10 mLのBioGel P6カラム (Bio-Rad, Hercules CA) をPBS pH 7.4において用いた、2回の連続したスピン分離によって、未反応色素からタンパク質を分離した。Cy7色素濃度を分光光度法で決定した ($E_{747} = 200,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。BCA法 (Bio-Rad, Richmond, CA) によってタンパク質を決定した。結合体は、1モルのアネキシンA5当たり0.8モルおよび1.6モルのCy7が付着していた。双方ともその結合能を保持していた。

【0088】

実施例5. 近赤外インドシアニン色素Cy7と結合させた不活性アネキシンA5の合成

不活性Cy7標識アネキシンA5を合成するために、333 μ lのアネキシンA5 (0.1 Mの炭酸水素ナトリウムpH 8.0に対して透析した3.0 mg/ml) をCy7 (1 mg) N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Amersham-Pharmacia, Piscataway NJ) の1バイアルに加えた。反応混合物を室温にて90分間インキュベートした。10 mlのBioGel P6カラム (Bio-Rad, Hercules CA) をPBS pH 7.4において用いた2回の連続したスピン分離によって、未反応色素からタンパク質を分離した。Cy7色素濃度を分光光度法で決定した ($E_{747} = 200,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。BCA法 (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いて、タンパク質濃度を決定した。不活性結合体では、アネキシンA5 1モル当たり4.9モルのCy7が付着していた。化合物は膜のホスファチジルセリンに対して親和性をもたない。

【0089】

実施例6. 近赤外色素IR38と結合させた不活性アネキシンA5の合成

1 mgのアネキシンA5の3 mg/ml溶液を調製し、3,000 g、4 において、Centriprep (商標) 10カラム (Millipore, Milford MA) を用いて、0.1 Mの炭酸ナトリウムpH 8.7に対して透析した。IR38イソチオシアネート (LI-COR, Lincoln NE) 2 mgをDMSO 40 μ l中に溶解し、アネキシンA5溶液に加え、混合し、室温にて1時間インキュベートした。PBS pH 7.4を用いて平衡させたBioGel P6 (Bio-Rad, Hercules CA) 上における二重のスピンカラム分離によって、アネキシンA5とIR38との結合体 (アネキシン-IR38) を分離した。最初に、1,000 \times gにおいて2分間、カラムを遠心し、カラム中のゲルの先端にアネキシン-IR38を加え、その後、1,000 \times gにおいて5分間、カラムを再度スピンした。溶出液を収集し、BioGel P6を充填した別のカラム上にて精製を繰り返した。分光光度法で、778 nmにおいてIR38色素濃度を決定した ($E_{778} = 179,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。BCAアッセイ法 (Pierce-Endogen, Rockford IL) を用いてタンパク質濃度を決定し、IR38/アネキシンモル比率を計算した。活性アネキシン-IR38では、平均して、アネキシン1モル当たり1.0~1.5モルのIR38分子が結合していることになる。

【0090】

実施例7. 近赤外インドシアニン色素Cy5.5と結合させたシナプトタグミンIのC2ドメインの合成

最初に、シナプトタグミンIの組換えC2ドメイン (11 kDa, C2) を標準法を用いて精製する。Cy5.5標識C2を合成するために、300 μ lのC2 (0.1 Mの炭酸水素ナトリウム pH 8.0に対して透析した1.0 mg/ml) をCy5.5 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Amersham-Pharmacia, Piscataway NJ) 1バイアルに加える。室温にて20分後、第二のCy5.5バイアルに混合物を移し、室温にてさらに40分間インキュベートする。10 mlのBioGel P6カラム (Bio-Rad, Hercules CA) をPBS pH 7.4中用いて、2回の連続したスピン分離によって未反応色素からタンパク質を分離する。Cy7色素濃度を分光光度法で決定し ($E_{678} = 250,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)、BCA法 (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いてタンパク質濃度を決定する。

【0091】

実施例8. Cy5.5標識ポリクローナル抗ホスファチジルセリン抗体の合成

Cy5.5標識ホスファチジルセリン抗体を合成するために、500 μ lのホスファチジルセリン抗体 (0.1 Mの炭酸水素ナトリウムpH 8.0中において1 mg/ml) をCy5.5 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Amersham-Pharmacia, Piscataway NJ) 1バイアルに加える。反

10

20

30

40

50

応混合物を室温にて90分間インキュベートし、その後、1 mLのBioGel P6カラム (Bio-Rad, Hercules CA) をPBS pH 7.4中用いて、2回の連続したスピン分離によって未反応色素からタンパク質を分離する。実施例6において説明されるように、タンパク質 / Cy比率を決定する。

【0092】

実施例9. 生物学的親和性

アネキシンA5-Cy5.5のアポトーシス細胞に対する生物学的親和性を試験するために、カンプトテシンを用いた処理によって、Jurkat T細胞リンパ腫細胞 (Clone E6-1, ATCC #TIB-152) においてアポトーシスを誘導した。付加的な胎児ウシ血清 (FBS, VitaceII #30-2021) (最終濃度10%) を加えたRPMI 1640培地 (VitaceII #30-2001) において、Jurkat T細胞を増殖させた。2日または3日毎に培地を交換した。培養培地1 mlあたりに7 μ lのカンプトテシン (DMSO中に1 mM) を用いた細胞の処理によって、5~6時間アポトーシスを誘導した。洗浄し、Ca²⁺含有結合緩衝液 (BB, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) を用いて、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンA5-FITC (ApoAlert アネキシンA5-FITCアポトーシスキット, Clontech) によって染色した後、FACS-Calibur (登録商標) サイトメーター (Becton Dickinson) を用いて細胞を解析した。

【0093】

アネキシンA5-Cy5.5の合成および精製の質を解析するために、SDS-PAGEタンパク質ゲル電気泳動を行った (図3A~図3C)。図3Aは、レーン1 (約36 kDaにおいてバンドが現れた) の非標識アネキシンA5、レーン2のアネキシンA5-Cy5.5、およびレーン3のタンパク質サイズマーカーを含むゲルのタンパク質銀染色を示す。タンパク質は高度に精製されていると考えられ、アネキシンA5-Cy5.5は、非標識アネキシンA5と比較して若干遅く泳動された。図3Bにおける同じゲルの近赤外蛍光画像では、アネキシンA5-Cy5.5に対応する1つのバンドが示された。図3Cにおいては、図3Aと図3Bのネガが合わせられている。

【0094】

アネキシンA5-Cy5.5の、アポトーシス細胞と非アポトーシス細胞を識別する能力を、カンプトテシン処理した、アポトーシスの一般的なモデルであるJurkat T細胞リンパ腫細胞のFACS解析によって評価した。図4Aは、アネキシンA5-FITCによって染色した、非処理T細胞 (灰色域) およびカンプトテシン処理T細胞 (白色域) の、FACS-Calibur装置の蛍光チャンネル1 (FL1) におけるFACSヒストグラムを示す。低いアネキシン-FITC蛍光を有するM1領域は、非処理の健常な対照細胞の93%を含んでいたが、一方、カンプトテシン処理細胞の43%は、高いアネキシンA5-FITC 蛍光を有していたため、アポトーシス画分を表している。図4Bは、装置のNIR蛍光チャンネル4 (FL4) において測定されたアネキシン-Cy5.5についての類似の実験を示す。アネキシン-Cy5.5も、健常な細胞とアポトーシス細胞との間の非常に明らかな識別を可能にするが、近赤外域においてである。非アポトーシス細胞とアポトーシス細胞との間のシグナルの差は、非処理細胞のM1領域と処理細胞のM2領域のメジアンを除算の商の整数部を求める関数 (quotient) によって評価された (図4Aおよび図4B)。双方のヒストグラムによって示されるように、アポトーシス細胞は、双方の標識について有意により高いアネキシンA5シグナルを有していた。アネキシンA5-FITCおよびアネキシン-Cy5.5についての結果は、図5Aおよび図5Bにおいて示され、対照細胞のM1領域とカンプトテシン処理JurkatT細胞のM2領域のメジアン (図4) が比較される。活性不可能な結合体については、アネキシンA5-Cy5.5 (図5B) は非常に高いシグナル対ノイズ比率を有しているが (即ち41; アポトーシス細胞対非アポトーシス細胞)、これは、アネキシンA5-FITCのもの (図5A) (即ち136) と比べて低い。

【0095】

別のFACS実験においては、非処理細胞およびカンプトテシン処理細胞を、アネキシンA5-FITCおよびアネキシンA5-Cy5.5によって二重に標識した。蛍光チャンネル1および4から結果的に生じたドットプロットが、図6Aおよび図6Bにおいて示される。カンプトテシン処理細胞の58.9%は右上の象限 (quadrant) にあり、アネキシンA5陽性のアポトーシス細胞を含んでいた (図6B; 36%が左下の象限にあった)。健常な細胞に対応する、左下の象限は

、非処理の対照細胞を92%を含んでいたが、一方、右上の象限は非処理細胞の7.4%のみを含んでいた(図6A)。

【0096】

アネキシンA5の結合能について、Cy5.5色素を結合する強さを、FACS競合アッセイ法において評価した。カンプトテシン処理T細胞を、アネキシン分子当たりCy5.5を含まない、またはCy5.5色素の比率が増加している(1.1~2.4に渡る)、アネキシンA5-Cy5.5の異なる調製物の10倍過剰量を用いて10分間プレインキュベートした。アネキシンA5-FITCを加え、さらに10分間インキュベートした後、FITCチャンネル(FACSチャンネルFL1)におけるFACS解析を行った(図7Aのヒストグラム)。競合、およびしたがって結合親和性が、アネキシンA5に結合されたCy5.5の量が増加するにつれ著しく低下することが認められた。最高比率のCy5.5_{2.4}-アネキシンA5(2.4モル色素/モルタンパク質)により、何も加えないアネキシンA5についての参照値1.0と比較して、0.98の非常に低い置換がもたらされた(蛍光ピーク高さは競合剤を使用しない試料におけるものとほとんど同じ高さである)(図7Bの図)。タンパク質1モル当たり2.4モルのCy5.5色素を有するアネキシンA5-Cy5.5の相対蛍光のメジアン(即ち1265)は、競合剤を使用しない試料のもの(即ち1286)と非常に似ていたことから、結合親和性が非常に低いことが示される。したがって、Cy5.5_{2.4}-アネキシンA5は、「不活性Cy5.5-アネキシンA5」と呼ばれる。対照的に、Cy5.5_{1.1}-アネキシンA5では、非標識アネキシンA5についての参照値0.17と比較して、0.32の置換がもたらされ、本明細書においては「活性Cy-アネキシンA5」と呼ばれる。不活性Cy-アネキシンは対照として使用され、活性Cy-アネキシンについてインビボで得られたNIRFが非特異的な蓄積よりもPS結合を反映していることを示した。

10

20

【0097】

実施例10. DsRed2を用いた細胞の安定したトランスフェクション

Hind IIIおよびNot I エンドヌクレアーゼを用いて、pDsRed2-1ベクター(Clontech, Palo Alto, CA)からDNAインサートを切り出すことによって、DsRed2をコードするcDNAを得、真核発現ベクターpcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングした。Maxfect(商標)(Molecular Research, Herndon, VA, USA)を1μg DNA:3μg Maxfect(商標)試薬の比率で用いて、50~60%コンフルエントな細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後または72時間後、細胞をトリプシン処理し、FACSVantage(商標)(Beckton-Dickinson)を用いてソーティングした。

30

【0098】

10%のFCS、1 mg/mlのG418(Invitrogen-Gibco BRL, Grand Island, NY)を加えたDMEMにおいて、DsRed2でトランスフェクトした系を維持した。

【0099】

実施例11. 動物モデルにおけるインビボでの近赤外蛍光画像化を用いた、腫瘍におけるアポトーシスのスクリーニング: 一般的方法

25μlの血清を含まない細胞培養培地中の 2×10^5 個の細胞を、麻酔した動物個体の適切な位置に皮下注射することによって、nu/nuマウスにおいてGFPまたはDsRed2を発現する腫瘍を増殖させた。動物個体は接種後7~10日目に、腫瘍が直径3~4 mmに達したときに評価した。光学的画像化前に、蛍光-アネキシンA5結合体をアネキシンA5 75μg/動物個体を超えない用量において、即ちアネキシンA5 3.1 mg/kg未満において、尾部静脈を介して静脈内注射した。170 mg/kgの単回腹腔内注射として与えられたシクロホスファミド(CPA, Mead Johnson, Princeton, NJ)の投与によって腫瘍のアポトーシスが誘導された。動物個体は麻酔し、化学療法を施した24時間後にNIRF画像化に供した。ハロゲンランプまたは他の適したNIR励起源ならびにGFP、DsRed2およびCy5.5、Cy7およびIR38(Omega Optical, B Rattleboro, VT)のために適した励起フィルターセットを備えた防光室を用いて光学的反射NIRF画像化を行った(図1を参照のこと)。励起光は、光ディフューザーを用いて視野数(FOV)に渡って分布させる。励起源からの固定された距離における動物個体の再現性のある画像化を可能にする鋳型を用いて、麻酔した動物個体をプラテンガラス上に置いた。プラテンガラス表面に面している腫瘍と動物個体を画像化した。f/1.2 12.5~75 mmのズ

40

50

ームレンズおよび発光フィルター (Omega Optical) を備えた CCD (Kodak, Rochester, NY または同様のもの) を用いて蛍光画像を収集した。以下の手順において、麻酔した動物個体における光学的画像を得た: 1) (動物個体の輪郭を描くための) 可視光画像、2) 腫瘍マーカー (GFP または DsRed2) の蛍光画像、3) バックグラウンド反射画像を得るための、NIRF-アネキシン結合体を注射する前の NIRF チャンネルにおける蛍光画像、および 4) NIRF-アネキシン結合体を注射した後の様々な時点での NIRF チャンネルにおける蛍光画像。TIFF ファイルとして画像を得、市販のソフトウェアを用いて処理した。バックグラウンド (注射前) シグナルを差し引くことによって、蛍光シグナルの変化を決定した。

【0100】

実施例 12. 近赤外 (NIRF) 画像化を用いた、癌動物モデルにおける、シクロホスファミドによるインビボにおける処理後の腫瘍細胞のアポトーシスの検出: 神経膠肉腫 10

GFP を構成的に発現する 9L-GFP 神経膠肉腫腫瘍系を DMEM/10% FCS において増殖させた。5 × 10⁵ 細胞/0.025 ml を右耳の耳介に接種することによって、皮下腫瘍を nu/nu マウス (25 ~ 28 g; Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) に移植した。式 $V = p(X \times Y \times X)/6$ を用いて、3つの直交する直径 (X, Y, Z) のカリパス測定によって腫瘍容量を決定した。腫瘍の局在の独立した光学的マーカーとして GFP 発現を使用した。

【0101】

9L-GFP を有する全てのマウス (n = 4) を 2 群に分けた: a) CPA 170 mg/kg の単回 IP 腹腔内注射による処理群 (n = 2); および b) 対照、食塩水による処理群 (n = 2)。投与直前に、滅菌食塩水溶液でシクロホスファミド (MeadJohnson) を 17 mg/ml まで希釈した。 20

【0102】

第 0 日目において、上記に説明されるように、CPA または食塩水を動物個体に注射した。第 1 日目において、腫瘍を有する全動物個体を麻酔し、蛍光結合体の投与前に、可視光、GFP、および NIRF チャンネルを用いて光学的画像化を行った。改良型化学発光画像化システム (Eastman Kodak, Rochester, NY) を用いて画像化を行った。第一の画像化の後、活性アネキシン A5-Cy5.5 結合体を動物個体の尾部静脈に注射した。注射直後に、および 1.5 時間、3 時間、および 24 時間後の時点において、NIRF-結合体投与後の画像化を行った。一連の各画像化の前に、動物個体を麻酔した。IP Lab スペクトルソフトウェア (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA) を用いて画像を解析した。腫瘍の周縁を局在するために、GFP 画像化データを用いて、関心対象の領域 (ROI) を選択し、腫瘍における NIRF シグナル強度を測定した。 30

【0103】

CPA 処理群および対照群の双方において、活性 Cy アネキシンの注射後最初の 200 分の間では、NIRF チャンネルにおいて測定された蛍光強度の時間依存的な増加が明らかであった。しかし、CPA 処理動物個体においては、薬剤代謝産物によって腫瘍における細胞死率の上昇が誘導され、この効果は、アネキシン注射後に蛍光強度値を測定することによって確認された (図 8)。対照腫瘍に対して CPA 処理腫瘍では、全体で 30 ~ 40% 高い蛍光強度が測定された。両側性ルイス (Lewis) 肺癌モデルを用いた別個の実験において、本発明者らは、CPA 処理後の腫瘍シグナル強度の目に見える強い増強を観察した (図 9A および 図 9B)。

【0104】

図 10 は、独立した実験からの 2 つの動物個体を示す (右図および左図)。緑色蛍光タンパク質シグナルからは、腫瘍周縁の輪郭が与えられた (列 A)。活性アネキシン 5A の注射前の NIRF は列 B において示される。ルイス肺癌について得られた結果と一致して、シクロホスファミド処理 (列 D) によって、処理前の動物個体について得られるもの (列 C) よりも高い腫瘍の NIRF がもたらされた。9L-GFP の組織学的解析からは、これらの腫瘍における実質的な数のアポトーシス細胞は腫瘍の血管の内皮細胞であることが示唆された。これは、蛍光抗 CD31 (抗 PECAM-1) 抗体を用いたアネキシン A5 陽性細胞の共染色によって確かめられた。

【0105】

実施例 13. 近赤外 (NIRF) 画像化を用いた、癌動物モデルにおける、シクロホスファミド 50

を用いたインビボにおける処理後の腫瘍細胞のアポトーシスの検出：両側性ルイス肺癌モデル

両側性腫瘍モデルにおいて、活性Cyアネキシンおよび不活性Cyアネキシンをインビボにおいて試験した。シクロホスファミド（CPA）感受性ルイス肺癌腫瘍（LLC）およびシクロホスファミド抵抗性ルイス肺癌腫瘍（CR-LLC）を移植したヌードマウスに、NIRF標識アネキシンA5を注射し、本明細書において説明されるように鏡面反射法を用いて画像化した。図11Bおよび図11Cにおいて示されるように、化学療法感受性のLLC腫瘍は、化学療法抵抗性のCR-LLC腫瘍よりもはるかに高い蛍光を有しており、不活性Cyアネキシンはシグナルを全く与えなかったため、活性Cyアネキシンについて得られた腫瘍NIRFはPS結合を反映するものであった（図11Bおよび図11Dを比較のこと）。図11A～図11Fの著しい視覚的効果を裏付けるために、付加的な動物個体を用いたさらなる実験を行った。図12は、LLC腫瘍およびCR-LLC腫瘍を有する、4つの付加的な動物個体において得られた結果を示す。CPAによる処理の後、CR-LLC についての 1.89 ± 0.19 と比較して、化学療法感受性のLLCは 2.56 ± 0.29 の特定のシグナルを有しており、これらは有意に異なっていた（ $p = 0.002$ ）。したがって、CPA処理後の腫瘍シグナルは、腫瘍の化学療法感受性の関数であった。

10

【0106】

CPA処理は、LLC腫瘍とCR-LLC腫瘍の双方の腫瘍シグナルを有意に増加させ、この増加の統計的有意性は、CR-LLC腫瘍よりもLLC腫瘍について高かった。CPA処理は、化学療法感受性のLLC腫瘍の腫瘍蛍光を増加させた（ 1.22 ± 0.34 から 2.56 ± 0.29 、 $p = 0.001$ 、対応のないスチューデントのt検定）一方、化学療法抵抗性のCR-LLC腫瘍では、より穏やかなシグナル増加が認められた（ 1.43 ± 0.53 から 1.89 ± 0.19 、 $p = 0.183$ 、対応のないスチューデントのt検定）。CPA処理して、またはCPA処理せずに、LLC腫瘍およびCR-LLC腫瘍を有する動物個体に不活性Cy-アネキシンを注射した場合、腫瘍NIRF/バックグラウンドNIRF値は $0.99 \sim 1.17$ に渡っており、非腫瘍シグナル強度の大きさ（バックグラウンド）は活性Cy-アネキシンを用いても不活性Cy-アネキシンを用いても同様であった（図11D）。

20

【0107】

DsRed2マーカータンパク質を発現するようにトランスフェクトした化学療法感受性のルイス肺癌において、シクロホスファミド処理後の腫瘍NIRFシグナル強度の時間依存性を調べた（図13；白い棒グラフ：シクロホスファミド（CPA）処理 / 不活性Cy-アネキシン（ $n = 3$ ）；点を施した棒グラフ：CPA処理なし / 活性Cy-アネキシン（ $n = 6$ ）；黒い棒グラフ：CPA処理 / 活性Cy-アネキシン（ $n = 6$ ））。動物個体はシクロホスファミドの単回投与によって処理し、その後、活性Cy-アネキシンまたは不活性Cy-アネキシンを注射した（図11A～Fおよび図12）。DsRed2蛍光によって定められる関心対象の領域からのシグナル強度を測定し、バックグラウンド蛍光を差し引いたメジアンシグナルとして表す。結果は平均 \pm SDとして示す。Cy-アネキシンの注射後の様々な時点においてシグナル強度を測定した。活性Cy-アネキシンA5の注射後、腫瘍NIRFは時間に伴って増加し、注射75～285分後にプラトーに達した。図12におけるように、シクロホスファミド処理によって腫瘍NIRFが増加し、不活性Cy-アネキシンは、腫瘍におけるアネキシンの非特異的な蓄積についての対照として役立つ。

30

【0108】

他の態様

本発明はその詳細な説明に関して説明されたが、前述の説明は説明することを意図するものであり、添付の特許請求の範囲によって定められる本発明の範囲を制限するものではないことが理解されるべきである。他の局面、利点、および改変は特許請求の範囲内にある。

40

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】150 Wのハロゲン光源、610～650 nmのバンドパスフィルター、冷却したCCD、700 nmのロングパスフィルター、および画像化ソフトウェアを備えたコンピューターを含む、NIRF画像化装置の概略図である。

50

【図2】737 nm/1.5 Wレーザー、レーザー光エクスパンダー、画像化ソフトウェアを備えたコンピューターによるカメラコントローラーを介して制御されるCCDカメラ、水銀ランプ、水銀ランプ光エクスパンダー、適切なフィルター、および対象を入れるための防光暗室を含む、NIRF画像化装置の概略図である。

【図3】精製アネキシンA5-Cy5.5に対応する、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ゲルを示す一連のものであり、レーン1は非標識アネキシンA5(約36 kDaにおいてバンドが現れた)、レーン2はアネキシンA5-Cy5.5、レーン3はタンパク質のサイズマーカーである。図3Aは、BIO-RAD(登録商標)銀染色後のゲルの写真の複製である；図3Bは、同じゲルの近赤外蛍光画像である；図3Cは、図3Aと図3Bのネガを重ね合わせたものである。

10

【図4】FACS解析による、アポトーシス細胞に対するアネキシン A5-FITC(4A)およびアネキシンA5-Cy5.5(4B)の特異性を比較した一連のヒストグラムである；ヒストグラムの灰色の部分は、非処理対照Jurkat T細胞に対応し、白い部分は、カンプトテシン処理細胞に対応する。

【図5】非アポトーシスT細胞およびアポトーシスT細胞の蛍光ピーク高さを比較した棒グラフである。

【図6】アネキシンA5-FITCおよびアネキシンA5-Cy5.5によって二重標識した一連のドットプロットである；図6Aは、非処理の対照細胞がアネキシンA5-FITCおよびアネキシンA5-Cy5.5陰性の非アポトーシス細胞の高い画分を有する(左下の象限92.0%、右上7.4%)ことを示す。一方、図6Bにおけるカンプトテシン処理細胞は、アネキシンA5-FITCおよびアネキシンA5-Cy5.5陽性のアポトーシス細胞の高い画分を有する(左下の象限36.0%、右上58.9%)。

20

【図7】タンパク質分子毎に異なる比率のCy5.5色素を有するアネキシンA5-Cy5.5を用いた競合アッセイ法に対応するヒストグラム(7A)および棒グラフ(7B)である。

【図8】9L-GFP腫瘍を有する処理動物個体および非処理動物個体において測定されたNIRFシグナル強度の時間依存性を示すグラフである。

【図9】アネキシンA5-Cy5.5を注射した2時間後に、CPA処理した両側性ルイス肺癌腫瘍(矢印)の写真の複製である。9A:可視光；9B:NIRF画像。

【図10】独立した実験からの2動物個体を示す(右図および左図)、神経膠肉腫腫瘍の一連の8つの写真の複製である。列A:緑色蛍光タンパク質シグナル；列B:活性アネキシン5Aの注射前のNIRF画像；列C:活性アネキシン5Aの注射後であるが、シクロホスファミド処理前のNIRF画像；列D:シクロホスファミド処理後のNIRF画像。

30

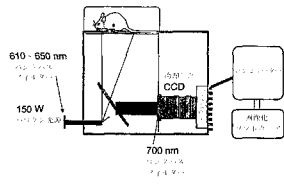
【図11】化学療法抵抗性のルイス肺癌腫瘍(CR-LLC)および化学療法感受性のルイス肺癌腫瘍(LLC)の写真の複製である。11A:活性アネキシン5Aの注射後の可視光画像；11B:11AのNIRF生画像；11C:白色光画像上に重ねられたNIRF強度のマップ；11D:不活性アネキシン5Aの注射後の癌の生画像；11E:LLC腫瘍のTUNEL解析；11F:CR-LLC腫瘍のTUNEL解析。

【図12】NIRFによって測定された、化学療法感受性のルイス肺癌腫瘍(LLC)および化学療法抵抗性のルイス肺癌腫瘍(CR-LLC)に対する、CPAを用いた処理の効果を示す棒グラフである。

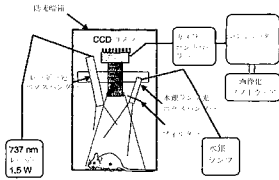
40

【図13】化学療法感受性のDs Red2ルイス肺癌モデルについての、腫瘍NIRFシグナル強度の時間依存性を示す棒グラフである。白い棒グラフ:シクロホスファミド(CPA)処理/不活性Cy-アネキシン(n=3)。点を施した棒グラフ:CPA非処理/活性Cy-アネキシンV(n=6)。黒い棒グラフ:CPA処理/活性Cy-アネキシン(n=6)。

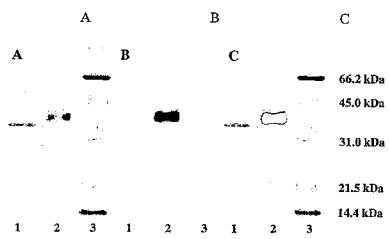
【 図 1 】



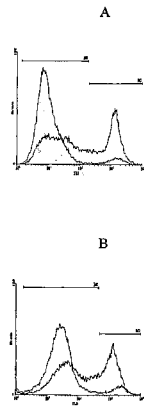
【 図 2 】



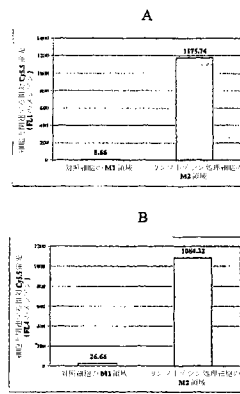
【 図 3 】



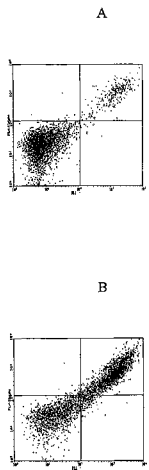
【 図 4 】



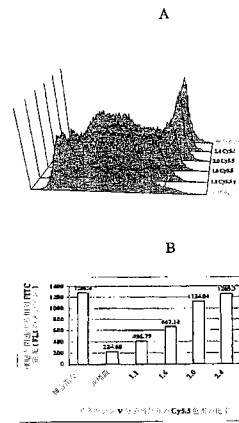
【 図 5 】



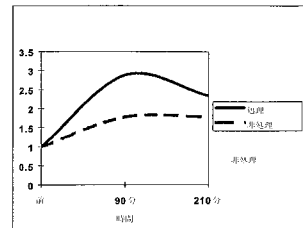
【 図 6 】



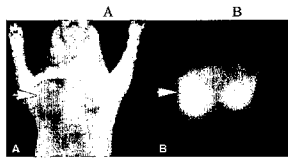
【 図 7 】



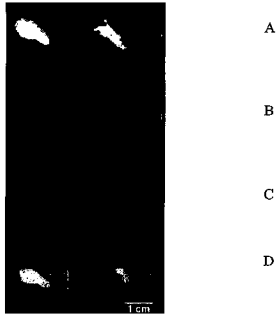
【 図 8 】



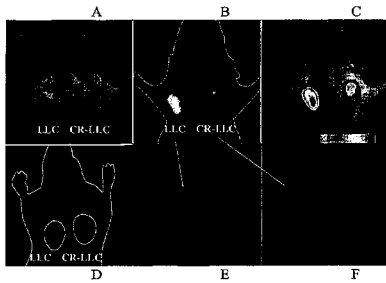
【 図 9 】



【 図 10 】



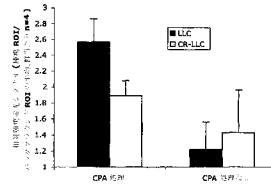
【 図 11 】



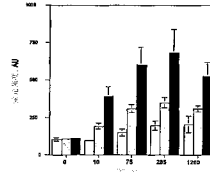
【 配列表 】

2005523945000001.app

【 図 12 】



【 図 13 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/13494		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 10/00 US CL : 424/9.6				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.6, 9.61, 9.2				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X --- Y	US 5,627,036 A (REUTELINGSPERGER) 06 May 1997 (06.05.2997), see abstract and columns 5-6.	1-4,9,17-19,21-23,28,33-40 and 42 ----- 1-47		
X --- Y	US 6,312,694 B1 (THORPE et al) 06 November 2001 (06.11.2001), see columns 2, 4, 9, column 21, lines 37-49 and column 81.	1-3,6-9,14,15,17-22,25-28,30-39,41 and 42 ----- 1-47		
Y	US 5,843,719 A (STUART et al) 01 December 1998 (01.12.1998), see column 2, lines 55+.	5,13,16,24		
Y	US 6,117,631 A (NILSEN) 12 September 2000 (12.09.2000), see column 1, lines 52+.	10,11,20,29 and 43-45		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 28 August 2003 (28.08.2003)		Date of mailing of the international search report 17 SEP 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Michael E. Hartley</i> Michael E. Hartley Telephone No. (703) 308-1235		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/13494

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAS ONLINE

search terms: annexine, anti-phospholipid antibodies, synaptotagmin, fluorochrome, fluorescent, fluorescein, imaging, apoptotic, apoptosis.

 フロントページの続き

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

(72) 発明者 シュレンベルガー エイク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ソマービル ニューバリー ストリート 86 #6

(72) 発明者 ペトロフスキー アレクサンドル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ハーバード ストリート 295 #209

(72) 発明者 ジョセフソン リー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リーディング オーク ストリート 139

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 DA02 EA01 FA01 GA07 GB21 HA09 KA03

KA09 LA03

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA70 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	细胞凋亡的体内成像		
公开(公告)号	JP2005523945A	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2004512720	申请日	2003-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	ボグダノフアレクセイ シュレンベルガーエイク ペトロフスキーアレクサンドル ジョセフソンリー		
发明人	ボグダノフ アレクセイ シュレンベルガー エイク ペトロフスキー アレクサンドル ジョセフソン リー		
IPC分类号	G01N21/64 A61B10/00 A61K49/00 C07K14/47 C07K16/44		
CPC分类号	A61K49/0056 A61K49/0032 A61K49/0058		
FI分类号	C07K14/47 A61B10/00.E C07K16/44 G01N21/64.ZNA.F		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/GA07 2G043/GB21 2G043/HA09 2G043/KA03 2G043/KA09 2G043/LA03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/376052 2002-04-26 US 10/424232 2003-04-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用特异性结合凋亡细胞的部分和荧光染料的缀合物进行细胞凋亡的体内成像的缀合物和方法。在一个具体实施方案中，荧光染料在近红外区域发射荧光并附着于特异性结合凋亡细胞的部分，例如蛋白质如膜联蛋白A5或突触结合蛋白。该方法是非侵入性的，并且可以用于获得活体动物个体（例如人类等哺乳动物）的组织中的凋亡细胞的图像。

荧光色素	励起 & 荧光 最大 (nm)	吸光系数 (x 10 ³)	入手元
Cy5 (商標)	649/670	250	アマシャム (Amersham)
Cy5.5 (商標)	675/694	250	アマシャム
Cy7 (商標)	743/767	200	アマシャム
Alexa Fluor (登録商標) 680	679/702	184	モレキュラプローブス (Molecular Probes)
Alexa Fluor (登録商標) 700	696/719	192	モレキュラプローブス
Alexa Fluor (登録商標) 750	752/779	240	モレキュラプローブス
IRDye (商標) 38	778/806	179	LiCor
IRDye (商標) 78	768/796	220	LiCor
IRDye (商標) 80	767/791	250	LiCor
LaJolla Blue (商標)	680/700	170	ダイアトロン (Diatron)
ICG	780/812	115	アコーン (Akorn) およびその他