

(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2004-525697

(P2004-525697A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 B 1/00

G 0 1 N 21/64

F I

A 6 1 B 1/00

G 0 1 N 21/64

3 0 0 D

Z

テーマコード (参考)

2 G 0 4 3

4 C 0 6 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁)

(21) 出願番号 特願2002-573046 (P2002-573046)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月15日 (2002.3.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年9月16日 (2003.9.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/007699
 (87) 国際公開番号 W02002/074339
 (87) 国際公開日 平成14年9月26日 (2002.9.26)
 (31) 優先権主張番号 60/276,036
 (32) 優先日 平成13年3月16日 (2001.3.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/336,316
 (32) 優先日 平成13年10月30日 (2001.10.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

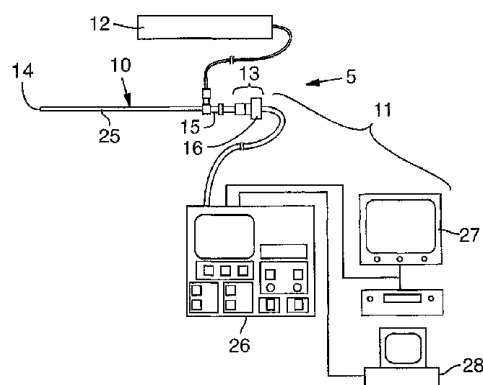
(71) 出願人 503337966
 ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・
 ファウンデーション
 アメリカ合衆国ユタ州84108, ソルト
 ・レイク・シティー, アラビーン・ドライ
 ブ 612, テクノロジー・トランスファ
 ー・オフィス, スウィート・ナンバー 1
 10
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍組織の光力学的診断用のデバイス及び方法

(57) 【要約】

遠位端部と近位端部とをもつ外科用テレスコープ型デバイスと、前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部に結合したカメラと、前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部と前記カメラとの間に挿入されたホログラフィックノッチフィルターとを含む装置。このカメラは電荷結合素子カメラ (CCDカメラ) であるのが好ましい。本装置は、焦点レンズまたは、ロングパスフィルター若しくは熱線フィルターなどの別のタイプのフィルターも含むことができる。この外科用テレスコープ型デバイスは、非白色光で材料を照射し、次いで放出された蛍光、燐光またはルミネセンスを検出することによって使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受容者において蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を検出し、画像化するための装置であって、

- (a) 蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を照射する光発生源；
- (b) 遠位端部と近位端部とをもつ外科用テレスコープ型デバイス；
- (c) 前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部に近接して配置された第一の端部をもつ焦点レンズ；
- (d) 前記焦点レンズの第二の端部に結合したカメラ；及び
- (e) 前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部と前記カメラとの間に挿入された少なくとも一つの部材であって、光発生源によって伝達された波長の少なくとも一部を除去する前記部材を含む前記装置。

【請求項 2】

前記部材が、フィルター、プリズム、グレーティング、及び鏡の少なくとも一つから選択される、請求項1に記載の装置。

【請求項 3】

前記部材がホログラフィックノッチフィルターである、請求項1に記載の装置。

【請求項 4】

前記外科用テレスコープ型デバイスと前記カメラとの間に配置された少なくとも一つの第二のフィルターをさらに含む、請求項3に記載の装置。

【請求項 5】

前記外科用テレスコープ型デバイスが、内視鏡、腹腔鏡、または顕微鏡を含む、請求項1に記載の装置。

【請求項 6】

前記外科用テレスコープ型デバイスが腹腔鏡を含む、請求項1に記載の装置。

【請求項 7】

前記カメラが電荷結合素子カメラを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項 8】

受容者において蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を検出し、画像化するための装置であって、

- (a) 遠位端部と近位端部とをもつ外科用テレスコープ型デバイス；
- (b) 前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部に結合したカメラ；及び
- (c) 前記カメラと前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部との間に挿入されたホログラフィックノッチフィルターを含む前記装置。

【請求項 9】

前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端に近接して配置された第一の端部をもつ焦点レンズをさらに含む、請求項8に記載の装置。

【請求項 10】

蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を照射する光発生源をさらに含む、請求項8に記載の装置。

【請求項 11】

前記光発生源が、レーザー、レーザーダイオード、発光ダイオード、光ファイバー、発光ガス放電または熱フィラメントランプから選択される、請求項10に記載の装置。

【請求項 12】

光発生源が、レーザー、レーザーダイオード、発光ダイオード、光ファイバー、発光ガス放電または熱フィラメントランプから選択される、請求項1に記載の装置。

【請求項 13】

前記ホログラフィックノッチフィルターが、光発生源の波長だけを実質的に遮蔽する、請求項10に記載の装置。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記部材がノッチフィルタを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項15】

前記外科用テレスコープ型デバイスに光学的に結合した赤色光発生レーザーまたはレーザーダイオードをさらに含み、前記ホログラフィックノッチフィルタが前記赤色光発生レーザーまたはレーザーダイオードによって伝達された波長だけを実質的に偏向させる、請求項8に記載の装置。

【請求項16】

前記光発生源が、白色光源と非白色光源とを含む、請求項10に記載の装置。

【請求項17】

前記光発生源が、白色光源と非白色光源とを含む、請求項1に記載の装置。

10

【請求項18】

受容者において蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を検出するための装置であって、

(a) 拡大レンズを含むハウジング；

(b) 前記拡大レンズと受容者との間に挿入されたホログラフィックノッチフィルタ；及び

(c) 蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を照射するための光発生源を含む、前記装置。

【請求項19】

さらにカメラを含む、請求項18に記載の装置。

20

【請求項20】

前記カメラが電荷結合素子カメラを含む、請求項19に記載の装置。

【請求項21】

前記光発生源が、約630 nm～約635 nmの波長の光を発生するレーザーまたはレーザーダイオードを含む、請求項12に記載の装置。

【請求項22】

前記光発生源が、約630 nm～約635 nmの波長の光を発生する、請求項15に記載の装置。

【請求項23】

前記部材が赤外線フィルタを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項24】

30

受容者において蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を検出する方法であって、非白色光で物質を照射し；次いで

非白色光の波長だけを実質的に除去する少なくとも一つの部材を含む外科用テレスコープ型デバイスで、放出された蛍光、燐光またはルミネセンスを検出することを含む、前記方法。

【請求項25】

前記外科用テレスコープ型デバイスに結合したカメラで前記物質を画像化することをさらに含み、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記外科用テレスコープ型デバイスが内視鏡または腹腔鏡を含む、請求項24に記載の方法。

40

【請求項27】

白色光及び非白色光で物質を交互に照射することをさらに含み、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

前記部材が、フィルタ、プリズム、グレーティング、及び鏡の少なくとも一つから選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

前記部材が、ホログラフィックノッチフィルタである、請求項24に記載の方法。

【請求項30】

前記カメラが電荷結合素子カメラを含む、請求項24に記載の方法。

50

【請求項 3 1】

材料に交互に照射するために、音声作動式スイッチ、機械式スイッチ、光学的スイッチまたは電気式スイッチを使用する、請求項27に記載の方法。

【請求項 3 2】

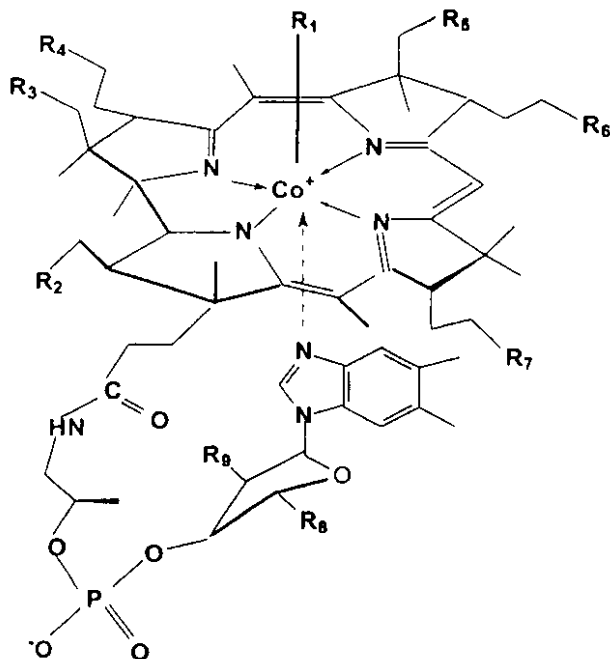
外科用テレスコープ型デバイスを使用して受容者から蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を除去することをさらに含む、請求項24に記載の方法。

【請求項 3 3】

個体の異型細胞を含む組織または癌組織を同定する方法であって、蛍光コバラミンと、癌であるかまたは異型細胞を含むものと疑われる組織とを接触させ、ここで前記蛍光コバラミンは、一般式：

10

【化 1】



20

[式中、 R_1 はCN、OH、 OH_2 、 CH_3 、5'-デオキシアデノシンまたは $(CH_2)_pNHC(=S)Y$ であり； R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 及び R_7 は独立して $CONH_2$ または $CO-X_mY$ であり； R_8 は CH_2OH 、 $O(C=O)X_mY$ または $CH_2O(C=O)X_mY$ であり； R_9 はOHまたは $O(C=O)X_mY$ であり；Xは式 $N(CH_2)_nNHO(C=O)$ または $NH-(CH_2)_n-NH$ をもつリンカーであり；Yはフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子であり；mは0または1であり、nは0~50であり、pは2~10であり、但し、 $R_1 \sim R_9$ 基の少なくとも一つはYを含む]により表される構造をもち；

30

前記組織を照射し；次いで

放出された蛍光、燐光またはルミネセンスを内視鏡、腹腔鏡、関節鏡または直腸鏡で検出することを含む、前記方法。

【請求項 3 4】

前記組織が赤色光発生源で照射される、請求項33に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記組織を電荷結合素子カメラで画像化することをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 3 6】

癌であるかまたは異型細胞を含むものと疑われる前記組織が蛍光、燐光またはルミネセンスを発光する請求項33に記載の方法であって、前記方法は、癌であるかまたは異型細胞を含むものと疑われる組織を受容者から内視鏡、腹腔鏡、関節鏡または結腸鏡により除去することをさらに含む、前記方法。

【請求項 3 7】

前記内視鏡、腹腔鏡、関節鏡または結腸鏡が、赤色光発生源の波長だけを実質的に除去す

50

る少なくとも一つの部材を含む、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、生物学的に標的化した分子を、光源（たとえばレーザー）からの光で励起させるためのデバイス及び方法に関する。特定の態様では、蛍光コバラミン類（本明細書中、CobalaFluorと称することもある）を、本開示のデバイス及び装置で使用することができる。この蛍光コバラミン類は、コバラミンに共有結合した蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物を含む。これらの蛍光コバラミン類は、診断及び予後診断マーカーとして使用して、（a）癌細胞を含むリンパ節を同定することを含む、健常細胞と組織から癌細胞と組織を区別し、（b）コバラミンベースの治療用バイオコンジュゲート（bioconjugate）を使用する化学療法に対して個体が積極的な反応を示すかどうかを検出することができる。

【0002】

発明の背景

本明細書中で引用した文献及び他の資料は、以下のテキスト中に著者及び年代順に参照し、付記文献目録に著者をアルファベット順に列記する。

【0003】

急速に分裂している細胞には、DNA複製前に1個の炭素の代謝をサポートするために酵素メチオニンシンターゼ（合成酵素）の補因子としてコバラミンが必要である（Hogenkampら、1999年）。急性骨髄球性白血病では、 B_{12} 結合タンパク質トランスコバラミン及びハプトコリン（haptocorrin）の濃度上昇により、血液の不飽和 B_{12} 結合能が3～26倍に上昇する（Schneiderら、1987年；Rachimelwitzら、1971年）。充実性腫瘍の患者は、トランスコバラミンとハプトコリンの循環レベルの顕著な増加を示すこともある（Carmelら、1975年）。不飽和血清コバラミン結合能の上昇は、急速に分裂している細胞によりコバラミンの取り込みが多くなっていることと対応する。ガンマ放出性放射線核種、たとえば ^{111}In が八配座子（octadentate）キレート化合物のジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）を介してコバラミンに結合しているならば、腫瘍は、診断用画像化目的に関して十分なコバラミンをまさに封鎖している（Hogenkamp及びCollins、1997年）。このことは、繊維肉腫を移植したマウス（Hogenkamp及びCollins、1997年）並びに、肺癌のヒト（Collinsら、1999年）、そして前立腺、肺及び脳腫瘍（Collinsら、2000年）において、立証されている。

【0004】

黒色腫及び乳癌手術の際のセンチネルリンパ節コンセプトでは、染料または放射線核種を腫瘍周辺の組織に注射して、腫瘍から流出する最初のリンパ節を同定する（Mortonら、1992年；McGreevy、1998年）。この節は、センチネルリンパ節（sentinel lymph node）と呼ばれ、原発腫瘍の域を超える転移度を決定するための診断試験用に取り出される。患者の約12%で転移性疾患を検出できないので、この手順は論議を巻き起こしている（McMasterら、1999年）。注射する染料または放射線核種は、癌細胞に対して特異的ではなく、外科医に腫瘍部分から流出する原発リンパ節を同定させるに過ぎない。癌細胞に特異的な蛍光マーカーを使用することによって、高比率の偽陰性を劇的に改善すべきである。

【0005】

かくして、優れた結果をもたらす、癌組織または細胞の診断及び予後診断に使用し得る試薬及び装置に対する需要がある。

発明の概要

蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ化合物または組織を受容者（host）内で、検出、操作及び／または除去するのに使用し得る検出及び画像化装置について記載する。第一の態様では、本装置は、遠位端部と近位端部とをもつ外科用テレスコープ型デバイス；前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部に結合したカメラ；前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部と前記カメラとの間に挿入されたホログラフィックノッチフィルターとを含む。態様によっては、このカメラは電荷結合素子カメラ（CCDカメラ）である。本装

置は、焦点レンズまたは、ロングパスフィルター若しくは熱線フィルターなどの別のタイプのフィルターも含むことができる。

【0006】

もう一つの態様では、本装置は、蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を照射する光発生源；遠位端部と近位端部とをもつ外科用テレスコープ型デバイス；前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部に近接して配置された第一の端部をもつ焦点レンズ；前記焦点レンズの第二の端部に結合したカメラ；及び前記外科用テレスコープ型デバイスの近位端部と前記カメラとの間に挿入された少なくとも一つの部材であって、前記光発生源によって伝達された少なくとも一部の波長を除去する前記部材を含む。この部材は、フィルター、プリズム、グレーティング、鏡または同様の波長選択デバイスであってもよい。

10

【0007】

さらに開示された態様において、本装置は、拡大レンズを含むハウジング；前記拡大レンズと受容者との間に挿入されたホログラフィックノッチフィルター；及び、蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を照射するための光発生源を含む。

【0008】

この外科用テレスコープ型デバイスは、物質に非白色光を照射し、次いで放出された蛍光、燐光またはルミネセンスを検出することによって使用することができる。

一態様では、コバラミンに共有結合した蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物から構成される蛍光コバラミン類を、上記装置と組み合わせて使用することができる。これらの蛍光コバラミン類は、診断用及び予後診断マーカーとして使用して、(a) 癌細胞を含むリンパ節を同定することを含む、健常細胞と組織から癌細胞と組織を区別でき、そして(b) コバラミンベースの治療用バイオコンジュゲートを使用する化学療法に対して個体が積極的な反応を示すかどうかを検出することができる。この蛍光コバラミン類は、(1) 癌細胞による迅速な輸送及び貯蔵(最大取り込みは4~6時間で起きる)、(2) 非常に低濃度で視覚的に検出し得る明るいフルオロフォア、及び(3) 非毒性成分という特徴を示す。

20

【0009】

一つの側面では、蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物がコバラミン(ビタミン B_{12})に共有結合している蛍光コバラミン類を提供する。この蛍光、燐光または光発生化合物は、コバラミンのコバルト原子、コリン環、またはリボース部分に共有結合することができる。蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物がコリン環またはリボース部分に共有結合するのが好ましい。任意の蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物をこの蛍光コバラミン類の製造に使用することができるとはいえ、可視光または赤外線で励起可能な蛍光、燐光、ルミネセンスまたは光発生化合物を使用するのが好ましい。好ましい蛍光化合物の例としては、フルオレセイン、フルオレセイン-5EX、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、BODIPY 493/503、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY 530/550、BODIPY TMR、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TR、Cascade Blue、Dansyl、ジアルキルアミノクマリン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、2',7'-ジクロロフルオレセイン、エオシン、エオシンF3S、エリトロシン、ヒドロキシクマリン、リサミンローダミンB、メトキシクマリン(methosycoumarin)、ナフトフルオレセイン(maphthofluorescein)、NBD、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、PyMP0、ピレン、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ロドル(rhodol)グリーン、2',4',5',7'-テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン(TMR)、Texas Red、X-ローダミン、Cy2染料、Cy3染料、Cy5染料、Cy5.5染料、Cy7染料、IC Greenまたは量子ドット構造(quantum dot structure)が挙げられるが、これらに限定されない。可視光または赤外線で励起したときに、好ましい蛍光コバラミン類は、コバラミンから蛍光または燐光化合物を分離する必要なく蛍光を発生する。この光は、適当なフィルターを使用するレーザーまたは光ファイバー光源によって供給してもよい。赤色光は組織によく浸透するので好ましい。

30

40

【0010】

50

第二の態様では、この蛍光コバラミン類は、新生物細胞、形成異常細胞、または過形成細胞などの異常細胞の同定に使用する。特にこの蛍光コバラミン類は、健常細胞と癌細胞を区別するのに使用する。一態様において、蛍光コバラミンは、手術前に患者に投与する。原発腫瘍であろうと転移部位であろうと、癌細胞での蛍光、燐光、ルミネセンスまたは放出光の存在は、除去すべき組織を画定するために外科医によって使用される。第二の態様では、蛍光コバラミンは、腫瘍の位置から流出するリンパ節によって取り込まれるのに好適な状態で、患者に投与する。蛍光、燐光、ルミネセンスまたは放出光が存在すると、手術の間に除去すべきこれらのリンパ節を確認できる。この後者の態様において、腹腔鏡、内視鏡及び顕微鏡法を使用して、癌細胞を含むリンパ節と同定することができる。これらの方法を使用すると、陽性のリンパ節の同定及び回収 (retrieval) が容易である。

10

【0011】

第三の側面では、この蛍光コバラミン類を使用して、個体がコバラミン-ベースの治療用バイオコンジュゲートを使用する化学療法に対して積極的な反応を示すかどうかを検出することができる。この側面において、蛍光コバラミンを使用して、定量的及び定性的の両面において、特定の型の癌細胞がコバラミンを輸送し貯蔵する能力を評価する。大量のコバラミンを輸送し貯蔵する種々のタイプの癌は、コバラミン-ベースの治療用バイオコンジュゲートを使用する治療の良い候補である。腫瘍細胞のコバラミンの結合、取り込み、輸送及び貯蔵の定量化は、目視検査 (たとえば、組織スライド) 下で蛍光により、エピ蛍光 (epifluorescence) 顕微鏡法、蛍光腹腔鏡法、蛍光内視鏡法またはフローサイトメトリによって実施することができる。

20

【0012】

第四の側面では、この蛍光コバラミン類を使用して、血液、血漿、血清、脳脊髄液または尿中のコバラミンレベルを測定したり、あるいは血液、血漿、血清または脳脊髄液中の未結合のコバラミン結合エネルギーを測定する。

【0013】

第五の側面では、腹腔鏡または内視鏡視覚化を利用して、リンパ節において、いずれかの蛍光分子 (癌-ターゲット化、または非ターゲット化) を検出することができる。

【0014】

幾つかの態様の詳細な説明

本明細書で開示の外科用テレスコープ型デバイスを使用して、蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を検出し除去することができる。そのような物質としては、本明細書中に記載の分子及び化合物、並びに蛍光、燐光、またはルミネセンスの分子または化合物で標識化したいずれかの組織を挙げることができる。本デバイスは、生物学的に標的化した蛍光分子を光で励起することができ、励起した光よりも長波長の派生蛍光の発光を検出することができる。

30

【0015】

具体的な外科用テレスコープ型デバイスとしては、たとえば内視鏡、腹腔鏡、関節鏡、結腸鏡または顕微鏡が挙げられる。この外科用テレスコープ型デバイスは、少なくとも一つの光除去または遮蔽部材及び/または赤色光照射源を含むように変形してある。これらの変形によって、蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ物質を可視化し易くなる。特定の態様では、本装置は、癌細胞を含んでいても含んでいなくてもよい腋窩リンパを同定及び除去するための腹腔鏡である。そのような腹腔鏡の一例を、図15~18及び21に関連して、以下詳細に記載する。

40

【0016】

上記の如く、本装置は少なくとも一つの光除去部材を含む。本明細書中、「光除去 (light-removing)」とは、光の所定の波長を吸収、反射、及び/または偏向させるような全ての光遮蔽メカニズムを含むが、これらに限定されない。代表的な部材としては、フィルター、プリズム、グレーティング、鏡または同様の波長選択デバイスが挙げられる。装置は、そのような部材を二つ以上、及び/またはそのような部材の組合せを含んでもよい。

【0017】

50

好適なフィルターとしては、ノッチフィルター、ロングパスフィルターまたは熱線フィルターが挙げられる。特定の態様によれば、このフィルターは、蛍光、燐光またはルミネセンスを放つ材料を励起するのに使用する光発生源の波長に対応する非常に狭い波長だけを遮蔽するホログラフィックノッチフィルターである。ホログラフィックノッチフィルターは、ヒトの目から見ると透明のように見える。このホログラフィックノッチフィルターによって、異なる種類のフィルター及びカメラを繰り返し置き換えることなく、手順を見られるようにカラーCCDカメラを使用することができる。ホログラフィックノッチフィルターは周知であり、たとえばKaiser Optical Systemsより市販されている。

【0018】

ロングパスまたはバンドパスフィルターも使用して、短波長を除去するが、長波長の光は通過するようにできる。分子の蛍光によって発生した光は、フルオロフォアを照射するのに使用する光の波長に対して長波長にシフトしているため、ロングパスフィルターは有用である。

10

【0019】

このフィルターは、光発生源からの反射及び直接入射光が、カメラによってもたらされる画像を歪曲または不明瞭にしないようにする。このフィルターは、非白色光発生源の波長を除去するように選択する。たとえば約625 nmの波長の赤色光レーザーまたはレーザーダイオードの場合には、約625 nmの光波長だけを除去するホログラフィックノッチフィルターを使用する。かくして、カメラによってもたらされたカラー画像は、赤色光によって歪曲されないだろう。

20

【0020】

この光除去部材は、ユーザーが所望の観察モードをベースとする種々の光除去部材の間で容易に入れ替えができるように、外科用テレスコープ型デバイス上に取り外し可能に固定されていてよい。たとえば、カメラの正面にフィルターを断続的に導入するために、機械シャッターを用意することができよう。

【0021】

この光発生源は、レーザー、レーザーダイオード、光放射性ダイオード、光ファイバー光源、発光ガス放電、熱フィラメントランプ、及び同様の光源などのいずれかの好適なデバイスであってもよい。特定の態様では、本発明の光発生源は、Cy5染料を含む蛍光コバラミンの場合には、たとえば、少なくとも約625 nm、特に約630～約635 nmの波長範囲の光などの赤色光を発生する。具体的な光発生源は、約633 nmの波長の赤色光を放出するHeNeレーザーである。このHeNeレーザーは、組織をよりよく照射するために少なくとも約10 mWで放射する。赤色光源は数センチメートルまで組織に透過することができ、これを使用してフルオロフォア及び全ての関連する癌細胞を照射及び同定する。

30

【0022】

より見慣れたフルカラーの画像化を可能にするために、白色光源も準備することができる。そのようなフルカラーの画像化は、受容者内部での解剖学的な方向付けのために、及びビデオモニターで見るために有用である。赤色光源（またはいずれかの非白色光）と白色光源との両方を含む二重光源を使用して、普通に見るための白色光と蛍光を見るための非白色光との間を迅速に切り替えるために簡単なメカニズムを提供することができる。そのような切り替えは、たとえば音声作動型切り替え、機械的操作による切り替え（たとえばフットペダル）、光学的に操作するスイッチ、または電氣的に操作するスイッチなどのいずれかのメカニズムによって実施することができる。たとえば、市販の光ファイバー・デュアルランプ・キセノン光源は、ランプの一つを赤色光ダイオードレーザーまたは赤色HeNeレーザーで置き換えることによって変更することができる。もう一つの変形例としては、二つの内部光源（一つは白色光で、もう一つは非白色光）と、この二つの光源の間を切り替えるために機械的または電気機械的制御下で鏡またはプリズムとを含むデバイスであってもよい。

40

【0023】

本発明のカメラは、蛍光、燐光またはルミネセンスの画像を検出、捕捉または伝達するこ

50

とができるいずれかのデバイスであってもよい。具体的なカメラとしては、ビデオカメラまたは写真用カメラが挙げられる。特定の態様では、このカメラはCCDカメラである。具体的なCCDカメラとしては、Santa Barbara Instrument Group(たとえば、STVなる商品名のもとに市販のカメラ)、Stryker及びKarl Storz製のものが挙げられる。

【0024】

本装置の具体的な態様は、図15、16、及び21に示す。図15を参照して、外科用伸縮系5は、CCDカメラ系11と、光発生源12とに結合した外科用テレスコープ型デバイス10を含む。この外科用テレスコープ型デバイスは、シャフト25、患者の切り口または開口部に挿入する遠位端部14と、CCDカメラ系11に結合している近位端部15とをもつ剛性または可撓性の筒状光学機器である。この外科用テレスコープ型デバイス10は、照射した組織によって放出された光を、CCDカメラ系11内のCCD光センサーに伝達し得るいずれかの接続構造体13によって、CCDカメラ系11と結合することができる。この接続構造体13は、図17と関連して、以下詳細に述べる。このCCDカメラ系は、この接続構造体13上に据え付けられたカメラヘッド16を含む。このカメラヘッド16は、カメラヘッド16のCCD光センサーから発生したビデオ出力シグナルから全国テレビジョン規格委員会(NTSC)またはビデオヘリカルスキャン(VHS)フォーマットを受け取ることができるビデオ・プロセッシング・モジュール26とケーブルを介して連絡している。このCCDカメラ系11は、外科手術の間に画像を見たり記録したりするためのビデオモニター27と、ビデオ・プロセッシング・モジュール26を制御するためのコンピューター28とをも含む。他の好適なCCDカメラ制御及び視聴システムをこの外科用テレスコープ型デバイスと共に使用することができる。

10

20

【0025】

図16を参照すると、光発生源12は、外科用テレスコープ型デバイス10のシャフト25と連通する継手24に受容される光ファイバーケーブル23を介して外科用テレスコープ型デバイス10に接続している。この光発生源は、光ファイバーケーブルを受容するためにカメラヘッド16内の開口部の入口を介して外科用テレスコープ型デバイスに接続することもできる。この光発生源12からの光は通常、外科用テレスコープ型デバイス10のシャフト25内に配置された光ファイバーまたはケーブル(示されていない)を通して伝わって、所望の受容者領域を照射する。あるいは、この光発生源12は、外科用テレスコープ型デバイス10には結合しないが、受容者の切り口に挿入された光ファイバーなどの独立した手段によって、所望の受容者領域を照射する。

30

【0026】

外科用テレスコープ型デバイス10の近位端部15とカメラヘッド16との間のこの接続構造体13は、種々の部品を含むことができる。この接続構造体13は、カメラヘッド16のレンズと外科用テレスコープ型デバイス10の接眼レンズとに合ったフィルター用のホルダーであってもよい。図17は、この接続構造体13の一態様のより詳細な例を図示している。

【0027】

図21は、特定の光源をより詳細に示している。HeNeレーザー50は光ビーム51を放出し、この光ビームは第一の鏡52と第二の鏡53とから反射して、次いで第一のプリズム54によって偏向され、バンドパスフィルター55を通して第二のプリズム56によってデュアルランプキセノン光源57へ偏向させる。このデュアルランプキセノン光源57は、第一の出口58を画定し、この中を通してレーザー光は光ファイバーケーブル23内へ出る。このデュアルランプキセノン光源57は、第二の出口59も画定し、キセノン光源から白色光がこの中を通して出る。第一の鏡52、第二の鏡53、第一のプリズム54、バンドパスフィルター55及び第二のプリズム56は、光学テーブル(optical table)上に配置されていてもよい。図21に示されている第一の鏡52、第二の鏡53、第一のプリズム54、バンドパスフィルター55及び第二のプリズム56は、特定のHeNeレーザー50の非干渉を分散するが、他の光源に関しては必要ないかもしれない。

40

【0028】

図17を参照して、外科用テレスコープ型デバイス10の近位端部15には、接触している接眼レンズ17が備えられている。ホログラフィックノッチフィルター18は、この接眼レンズ17

50

とフィルターホルダー19との間に配置されている。図18に示されているように、ホログラフィックノッチフィルター18を受容するために、接眼レンズ17内に窪み20を準備することができる。このホログラフィックノッチフィルター18は、通常、円形ディスクであるが、楕円、長方形または正方形などのいずれかの形状をとることができる。このホログラフィックノッチフィルター18の厚さは、所望の遮蔽波長及び他の性能特徴に応じて、当該技術分野において公知の如く変えることができる。このフィルターホルダー19は、接眼レンズ17の外周の周りにスリーブとして適合するような寸法にする。この接眼レンズ17の外周表面及びフィルターホルダー19の内部表面は、フィルターホルダー19と接眼レンズ17とが取り外し可能に噛み合うようにねじ山がつけられている。焦点レンズ22は、フィルターホルダー19に据え付けられている。アダプター21（たとえば、C-マウント）は、当該技術分野において公知の手段を介してCCDカメラヘッド16に焦点レンズ22を接続する。

10

【0029】

フィルターを配置するには、他の多くの可能な配置があると考えられる。たとえば、フィルターは、焦点レンズとCCDカメラヘッドとの間に備えてもよい。他には、内視鏡または腹腔鏡のシャフトの内部にフィルターをつけることがある。一つの装置に複数のフィルターを含めてもよい。たとえば、フィルターホルダーは二つ以上のフィルターを保持してもよいし、また第一のフィルターは接眼レンズと焦点レンズとの間に配置し、且つ第二のフィルターは焦点レンズとCCDカメラヘッドとの間に配置してもよい。ノッチフィルター、ロングパスフィルター及び／または熱線フィルターの組合せなどの、種々のフィルタータイプの組合せを使用してもよい。別の特定の態様では、第一の熱線フィルターを接眼レンズと焦点レンズとの間に配置し、第二及び第三の熱線フィルターを焦点レンズとCCDカメラヘッドとの間に配置する。この態様では、熱線フィルターによって、フルオロフォアの検出用により良いコントラストを提供し得る白黒CCDカメラを使用することができる。

20

【0030】

腫瘍の微小な縁（micromargin）を視覚化するのに有用である、拡大装置も開示する。通常、そのような装置は、拡大レンズ、接眼レンズ、及び顕微鏡の接眼レンズと受容者との間に配置されたフィルターを含む。

【0031】

一つの例は、図19に示されている外科用顕微鏡である。この外科用顕微鏡は、二つの接眼レンズ31を支えるヘッドまたはハウジング30を含む。このハウジング30は、シーリングマウント（ceiling mount）（示されていない）に固定されたフリーバランスアーム（articulating arm）33によって支持されている。この接眼レンズ31は、物体から反射または放出された光を受容する集光レンズ32と光学的に連通する。ホログラフィックノッチフィルター34は、スクリー、クリップまたは同様の付属手段によって、集光レンズ32に固定される。光ファイバー束（示されていない）を接続型外科用顕微鏡ヘッドに固定して、照射光を提供することができる。増倍スクリーン（示されていない）を別の接眼レンズ上で顕微鏡に据え付けて、検出感度を高くすることができる。乳腺腫瘍摘出により腫瘍を小さくした後で、残っている腫瘍を示す蛍光の痕跡に関して、腫瘍の微小な縁を拡大して観察するために、外科用顕微鏡を配置することができる。

30

【0032】

腫瘍の微小な縁を観察するための装置のもう一つの変形例を、図20に示す。この装置は、上記の如きCCDカメラ系40を含むが、内視鏡または腹腔鏡ではなく、拡大ビデオレンズ41をCCDカメラヘッドに据え付けている。フリーバランス位置決めアーム42はCCDカメラ40を支持する。ホログラフィックノッチフィルター43をCCDカメラ40と拡大ビデオレンズ41との間に配置するか、または上記の如くフィルターホルダーによって拡大ビデオレンズ41の遠位端部に固定してもよい。乳腺腫瘍摘出により腫瘍を小さくした後で、残存する腫瘍を示す蛍光の痕跡に関して、腫瘍の微小な縁を拡大して観察するために、CCDカメラを配置することができる。

40

【0033】

いずれかのタイプの蛍光、燐光、またはルミネセンスを放つ物質を、上記デバイスと共に

50

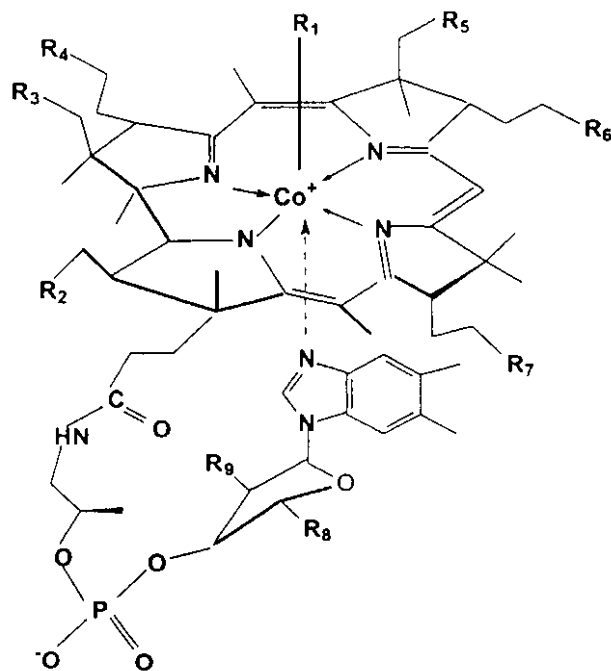
使用することができよう。特に有用な物質は、コバラミン（ビタミン B_{12} ）に共有結合している蛍光化合物（フルオロフォア）、燐光化合物（ホスホロフォア）、ルミネセンスの化合物（化学ルミネセンス発色団）または光発生化合物を含む蛍光コバラミンである。これらの蛍光コバラミン類は、診断及び予後診断マーカーとして使用して、（a）癌細胞を含むリンパ節を同定することを含む、健常細胞と組織から癌細胞と癌性組織を区別し、（b）コバラミンベースの治療用バイオコンジュゲートを使用する化学療法に対して個体が積極的な反応を示すかどうかを検出することができる。

【0034】

この蛍光コバラミン類は、以下の式：

【0035】

【化1】



【0036】

[式中、 R_1 はCN、OH、 OH_2 、 CH_3 、5'-デオキシアデノシンまたは $(CH_2)_p NHC(=S)Y$ であり； R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 及び R_7 は独立して $CONH_2$ または $CO-X_m Y$ であり； R_8 は $CH_2 OH$ 、 $O(C=O)X_m Y$ または $CH_2 O(C=O)X_m Y$ であり； R_9 はOHまたは $O(C=O)X_m Y$ であり；Xは式 $N(CH_2)_n NH O(C=O)$ または $NH-(CH_2)_n -NH$ をもつリンカーであり；Yはフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子であり；mは0または1であり、nは0~50であり、pは2~10であり、但し、 $R_1 \sim R_9$ 基の少なくとも一つはYを含む]により表わすことができる。

【0037】

この蛍光コバラミン類は、フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子をコバラミンに共有結合させることにより製造することができる。このフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子は、コバルト原子、コリン環またはリボース糖に直接またはリンカー分子を介して共有結合する。この共有結合は、リンカー分子を使用して得るのが好ましい。フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子がコバラミンのコバルト原子に結合していると、蛍光、燐光または放出した光は、コバルト原子の回転による消光のため強度が減退する。さらにこの蛍光コバラミンを長時間、光に暴露すると、このコバルト-炭素結合が開裂して、コバラミンからフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子を放出する（Howardら、1997年）。かくして、フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子をコバラミン分子のコリン環またはリボース部分に結合させるのが好ましい。これら後者のコバラミン類は、そのフルオロフォア

10

20

30

40

50

、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子がコバルト原子に共有結合している蛍光コバラミン類の欠点をもたない。

【0038】

コリン環または5'-リボースヒドロキシル基上のカルボキシレートにフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生化合物を結合させると、感度が低いことや光に不安定であるという問題が回避される。通常、コリン環カルボキシレート誘導体 (Collins及びHogenkamp、1997年) が公知であるが、合成されたどの化合物も蛍光マーカを含んでいなかった。このフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子は、刊行物に記載された方法に従ってコバラミンモノカルボキシレートを誘導体化することにより、コバルト原子よりも、むしろコリン環に直接結合させることができる (Hogenkamp、1997年、本明細書中で参照した文献)。図22は、変形に使用し得るコバラミン上の部位を示している。

10

【0039】

いずれかのフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または光発生分子をこの蛍光コバラミン類の製造で使用し得るとはいえ、可視光または赤外光で励起可能なフルオロフォアを使用するのが好ましい。蛍光コバラミン類のin-vivo利用には、可視光または赤外光を使用するのが好ましい。好ましいフルオロフォアの例としては、フルオレセイン、フルオレセイン-5EX、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、BODIPY 493/503、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY 530/550、BODIPY TMR、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TR、Cascade Blue、Dansyl、ジアルキルアミノクマリン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、2',7'-ジクロロフルオレセイン、エオシン、エオシンF3S、エリトロシン、ヒドロキシクマリン、リサミンローダミンB、メトキシクマリン (methosycoumarin)、ナフトフルオレセイン (naphthofluorescein)、NBD、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、PyMP0、ピレン、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ロドール (rhodol) グリーン、2',4',5',7'-テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン (TMR)、Texas Red、X-ローダミン、Cy2染料、Cy3染料、Cy5染料、Cy5.5染料、Cy7染料、IC Greenまたは量子ドット構造が挙げられるが、これらに限定されない。可視光または赤外光で励起したときに、好ましい蛍光コバラミン類は、コバラミンから蛍光または燐光化合物を分離する必要なく蛍光を発生する。この光は、適当なフィルターを使用するレーザーまたは光ファイバー光源によって供給してもよい。赤色光は組織によく浸透するので好ましい。

20

30

【0040】

正常及び白血病のヒトの骨髄では、蛍光コバラミン類似体の取り込みに差があることが見いだされている。正常な骨髄細胞と白血病の骨髄芽球 (癌細胞) との違いは特に著しく、正常な細胞では検出可能なコバラミンは取り込まれない。健常個体からの骨髄サンプルは、蛍光標識を示さない。潜在的な化学療法化合物として元々は合成された、ドキソルピシン-コバラミン結合体の取り込みがあることも見いだされている。このドキソルピシン-コバラミン結合体の細胞による取り込みは、P-388マウス白血病細胞、並びにHCT-116ヒト結腸癌細胞で観察することができる。かくして、白血病及び充実性腫瘍細胞系では、コバラミンの蛍光誘導体の取り込みが起きる。これらの結果は、全ての癌細胞でコバラミン輸送及び貯蔵が増加するという知見と組み合わせ、正常細胞から癌細胞を区別するために蛍光コバラミン類を使用する一般的な適用可能性を示している。

40

【0041】

かくして、この蛍光コバラミン類を使用して、

- ・ 蛍光顕微鏡法、蛍光腹腔鏡法、蛍光内視鏡法またはフローサイトメトリーによって、癌性組織を視覚的に同定する；
- ・ 組織バイオプシーによって組織切片またはサンプル中の癌細胞を同定する；
- ・ in-vivo、ex-vivoまたはin-situで腫瘍の縁を画定する；
- ・ in-vivo、ex-vivoまたはin-situで癌を診断、検出、予後診断、予見またはモニターする；

50

- ・ in-vivo、ex-vivoまたはin-situで転移癌を同定する；
- ・ 癌の進行段階を決定する；
- ・ 皮膚的にまたは経皮的に癌を同定する；
- ・ 皮膚的にまたは経皮的に転移癌を同定する；
- ・ 腹腔鏡法または内視鏡法などの最低限に侵襲的な方法を使用することを含む、単数若しくは複数のセンチネルリンパ節で、または単数若しくは複数の腋窩リンパ節を含むリンパ節の癌を同定する；
- ・ 癌、たとえば乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、上皮癌（腺癌）、肝臓癌、メラノーマ及びリンパ腫などの処置、検出、予測、予後診断またはモニタリングにおいて転移性疾患を同定する；
- ・ 白血病またはリンパ腫の診断、予測、予後診断、モニタリングまたは特徴付けの為に骨髓吸引液（aspirate）または末梢血液サンプルをフローサイトメトリー研究にかける；
- ・ コバラミン-治療用バイオコンジュゲートの使用をベースとした化学療法に対して患者が積極的な反応を示すかどうかを予測する；
- ・ バイオプシーまたは乳腺腫瘍摘出において腫瘍の微小な縁の画定を改善する；
- ・ バイオプシー、乳腺腫瘍摘出、または腫瘍摘出の後に癌細胞が残る可能性を減少させて、それにより残存している癌細胞を除去するための追尾手術の必要性を減少させることができる。

10

【0042】

予測とは、腫瘍の生物学的挙動を理解すること、及びどのように腫瘍が治療に（良くも悪くも）応答するかを指す。予後診断（prognosis）とは、治療後の予測した患者の結果（則ち、治療後、5年または10年生存可能性）を指す。モニタリングとは、処置後の治療の成功及び残留疾患（residual disease）の検出を決定することを指す。一例としては、白血病の処置後に、骨髓芽球の存在に関して骨髓を試験するために蛍光コバラミン結合体を使用することがある。特徴付けとは、非常に関連した種類の腫瘍と比較して、腫瘍の種類を記述的または定量的に分類することを指す。

20

【0043】

この蛍光コバラミン類は、当該技術分野において公知の慣例的な癌の診断、検出、予測、予後診断、モニタリングまたはキャラクタリゼーション法に従って、実施することができる。たとえば、この蛍光コバラミン類は、静脈内、くも膜下（intrathecally）、腫瘍内、筋肉内、リンパ組織内（intralymphatically）または経口的に投与することができる。通常、本発明の蛍光コバラミンの量は、医薬的に許容可能なキャリアと混合する。このキャリアは、経口、非経口、静脈内、くも膜下、腫瘍内、腫瘍周囲（circumtumoral）及び硬膜外などの、投与に好適な剤形に依存して広範な形を取ることができる。この組成物は、酸化防止剤、安定剤、防腐剤などをさらに含むことができる。方法及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見いだすことができる。投与すべき経口コバラミンの量は、通常、1～500 mgである。

30

【0044】

本明細書中に示されているように、コバラミン類似体は、高い親和性をもつ、ハプトコリン（haptocorrin）（TCI若しくはHC）、内性因子（IF）またはトランスコバラミン（TCII）等のコバラミン輸送タンパク質によって認識される。コバラミンに大きな分子を結合させても、タンパク質結合に悪影響は与えないようである。

40

【0045】

リンパ節で転移疾患を同定する外科医の能力が改善されると、たとえば健常組織を残しておくこと、及び除去した腋窩リンパ節の数を最小化することによって、外科的治療が進歩するだろう。これによって、患者のクオリティ・オブ・ライフが高まり、且つ罹患率及び長期の死亡率が改善するだろう。リンパ節に広がった癌細胞を詳細に同定することによって、健常腋窩リンパ節を痛めずに、病気の管及び節のみを除去することができるだろう。年間、186,000例もの新規乳癌のケースに関して、原発腫瘍を除去し、関連するリンパ節の状態を決定するための手術の数は、非常に多い。全ての腋窩リンパ節及び管を機械的に

50

除去すると、局所的な浮腫をもたらし、死亡率を高めることになる。転移癌細胞を含む腋窩リンパ節及び管を除去しないと、生存率が低くなり、長期死亡率が高くなる。

【 0 0 4 6 】

センチネルリンパ節バイオプシーアプローチでは、青色染料及び/または放射性トレーサーを腫瘍近くの乳房に注射する。腕の下を少し切開して、微量の染料または放射能を探索して、乳房部分から流出する（単数または複数の）リンパ節を同定すると、結果として、たいがい転移性癌細胞を含んでいる。上記の蛍光コバラミンは、センチネルリンパ節バイオプシーで現在使用されている青色染料及び放射性トレーサーの代わりになる。この蛍光コバラミン類を使用すると、全ての種類の癌にセンチネルリンパ節バイオプシーを適用することが可能になる。さらには、この蛍光コバラミン類により、癌の分析、特にリンパ節の癌細胞の分析において、腹腔鏡、内視鏡及び顕微鏡法などの最低限に侵襲的な方法を使用することができる。この蛍光コバラミンを使用すると、陽性のリンパ節の同定及び回収（retrieval）が容易になるだろう。かくして、この蛍光コバラミン類は、以下の癌：乳、皮膚（黒色腫）、婦人科（卵巣、前立腺、子宮、子宮頸、外陰、陰茎（penal）、精巢）、頭及び首（唇、舌、口、咽頭）、消化器官（食道、胃、小腸、大腸、直腸、結腸、肝臓、膵臓）、骨、結合組織、泌尿器管（膀胱、腎臓）、目、脳及び中枢神経系、内分泌腺（甲状腺）、リンパ組織、ホジキン病、非-ホジキン病リンパ腫及び複数の骨髄腫で使用する。 10

【 0 0 4 7 】

さらに、蛍光コバラミン類を使用すると、癌細胞を含み且つ除去しなければならないリンパ節の同定に関して、腹腔鏡及び内視鏡法などの最低限に侵襲的な方法を利用することが可能になる。この蛍光コバラミン類は、白色光下で肉眼で視覚的に検出し得る、十分に明るい光（たとえばCobalaFluor Yの場合には明るい青色）も放出することができる。この提案された方法を設計して、手術可能な乳癌を有する患者で腋窩リンパ節を外科的に検査する現行の二つの方法を、より正確で且つより痛みの少ない方法に置き換える。この現在使用されている二つの操作法は、大きな切開部（約5インチ）を使用し、低レベルのリンパ節を全て（10～15）除去する、標準的な腋窩リンパ節切開法である。第二の、現在実験段階の方法は、センチネルリンパ節バイオプシーである。この方法では、乳房から流出する最初のリンパ節を同定するために目に見える染料またはガンマエミッタを使用する。この方法も同様に、大きな切開部と、リンパ経路の技術的に難しい検査とが必要である。本明細書で開示されているコバラミン分子は、癌に冒されている節に対して発光器を利用する。このリンパ節を、腹腔鏡装置を使用して3つの小さな切開部（3～5 mm）を通して直接検査する。閉鎖操作法（closed operative technique）により、レーザー励起用の暗視野を提供する。腫瘍を持っているリンパ節中のコバラミン-発光器結合体からの誘導光が明るく放出されることによって、陽性のリンパ節の同定及び回収が容易になるだろう。この方法によって、切開部が小さくなり、痛みが少なく、精度も高まる。内視鏡法を使用して癌細胞を検出するために、この蛍光コバラミン類を使用することにも同様の原理が当てはまる。 20 30

【 0 0 4 8 】

この蛍光コバラミン類のさらに好都合な点とは、このコバラミン類がリンパ管を実質的に通過しないという点である。センチネルリンパ節方法で慣用的に使用された二種類の青色染料（Lymphazurine：商標及びメチレンブルー）は、リンパ管から流出する組織に注射された直後に、リンパ管から周囲組織に流れる傾向がある。そのような漏れにより、発生した青色で操作領域が不明瞭になってしまう。 40

【 0 0 4 9 】

さらに、この蛍光コバラミン類は、癌細胞によって特異的に取り込まれるので、これらの蛍光コバラミン類は、外科医が選択的に癌組織を切除できる優れたマーカーであり、そのため健常組織を残しておくことができる。

【 0 0 5 0 】

腹腔鏡的にまたは内視鏡的に検出すべき癌細胞に蛍光コバラミン類が結合する能力は、蛍 50

光分子を使用して、腹腔鏡的にまたは内視鏡的にセンチネルリンパ節を検出できることを示している。かくして、いずれかの蛍光分子（癌-標的化または非-標的化）は、腹腔鏡または内視鏡視覚化法を利用してリンパ節中で検出することができる。一例として、赤色のフルオロフォアは、センチネルリンパ節法で現在実施されているように、腫瘍内に注射することができよう。腋窩に注射することによって、外科医は蛍光を放つ節を（二つの小さな切開部を通して）腹腔鏡的に見つけることができるだろうから、それによりセンチネル節のだいたいの場所を外科医が見つけ易いように、非-癌細胞-特異的放射性トレーサーを使用しなくてよい。

【0051】

この蛍光コバラミン類は、手術中に利用するマーカーとして幾つかの改良点を提供する。これらの改良点としては、以下の点が挙げられる： 10

- ・この蛍光マーカーは、どの節がダイダルベイシン（tidal basin）から流出しているかを単に示すのではなく、リンパ管及びリンパ節中の癌細胞に特異的である。この蛍光マーカーは、健常細胞と癌細胞とを区別もする；

- ・蛍光検出法により与えられる固有の感度により、このマーカーは低濃度で使用することができる。現在使用している青色染料は、活性な節を不明瞭化し、病理学者による外科手術後の組織検査を複雑化させる傾向がある。この青色染料は、出血している導管を不明瞭化する傾向もあるので、それにより節の外科的摘出及び、続く傷の縫合を複雑化させてしまう。蛍光マーカーを使用して、このような問題点を避けられる；

- ・癌細胞に特異的な蛍光マーカーは、現在実施されている手順で見られるように、12%という偽陰性の割合を改善するだろう； 20

- ・偽陰性の割合が低くなると、患者及び外科医によってこの方法が許容され易くなるだろう。これによって、この方法を修得するのに外科医に必要な研修時間（複雑な腋窩節切開に関しては、通常30ケース以上）が少なくなるだろう；

- ・この蛍光マーカーにより、癌細胞の視覚化のための腹腔鏡、内視鏡及び顕微鏡法を利用できるようになる。これらの方法は、原発腫瘍、転移腫瘍、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節及び頸部リンパ節の視覚化に使用することもできる。これらの方法によって、癌の分析でリンパ経路の技術的に難しい検査及び大きな切開部の必要性を減少させることができよう。これらの方法によって、切開部が小さく、痛みが少なく、そして精度が高くなるだろう。 30

【0052】

この蛍光コバラミン類は、血液、血漿、血清または他の体液中の自然発生的なコバラミン（ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン、アデノシルコバラミン、またはシアノコバラミン）の量または濃度を検出する競合的結合アッセイでも使用することができる。この種のアッセイでは、当業者に公知の競合的結合アッセイで放射性標識化したコバラミンの代わりに、蛍光コバラミンを使用する。コバラミンに関する放射性アッセイは、中でも、本明細書中、参照として含まれる、米国特許第6,096,290号；同第5,614,394号；同第5,227,311号；同第5,187,107号；同第5,104,815号；同第4,680,273号；同第4,465,775号；同第4,355,018号に記載されている。このアッセイ手順を使用して、血液、血漿、血清または体液中の不飽和コバラミン結合能の量、並びにタンパク質、トランスコバラミン、ハプトコリン、または内因子に結合するコバラミンの濃度を決定することができる。蛍光コバラミン類を使用する場合には、放射性標識化コバラミンの場合に関連する特別な出荷、取り扱い及び廃棄処置などが必要ないので、臨床化学結合アッセイでの放射性標識化コバラミンよりもずっと好都合である。 40

【0053】

実施例

以下の実施例は、説明のために提供するものであって、付記請求の範囲をいかなる方法にも限定するものではない。当該技術分野において公知の標準的な方法及び、以下に具体的に記載した方法を使用した。

【0054】

実施例1フルオロフォアをコバラミンに結合させることによる蛍光コバラミンの合成

コバラミン局在化の視覚指標として、フルオレセインをコバラミンに共有結合させることにより、5種類のコバラミンの蛍光類似体を製造した。緑色光の照射下で、このフルオレセイン分子は、暗順応した眼で0.1 ppm未満の濃度まで検出し得る黄色光を放出する。この放出によって、エピ蛍光顕微鏡法により、並びに目視検査により感度の高い癌細胞の検出が可能になる。この5種類の蛍光コバラミン類は、それぞれ固有の蛍光を示した。これらの化合物は全て、刊行物に記載された方法に従って、塩化アミノプロピルとコブ(Ⅰ)アラミンとを反応させて、アミノプロピルコブ(ⅢⅠ)アラミンを製造することにより合成した。続く段階では、アミノプロピルコブ(ⅢⅠ)アラミンを種々のフルオロフォアイソチオシアネート類(則ち、フルオレセインイソチオシアネート: FITC)と反応させて、アミノプロピルリンカーを介してコバラミンに結合する対応するフルオロフォアを製造した(則ち、フルオレセイン-アミノプロピル-コブ(ⅢⅠ)アラミン)。この後者の反応は、図1に示す。

10

【0055】

同様の方法により、フルオロフォアがナフトフルオレセインまたはOregon Greenである、蛍光コバラミン類を製造した。これら蛍光コバラミン類は全て、組換えトランスコバラミン(rhTCⅡ)に対して高い親和性を保持していることが見いだされたので、自然発生的なコバラミンに関して見いだされたものと同様の生化学的分布が可能になる。

20

【0056】実施例2癌細胞によるコバラミンバイオコンジュゲートの取り込み

白血病骨髓芽球調製物は、急性骨髄性白血病(AML) M1 (FAB分類で最低限の成熟骨髓芽球)に罹患している61歳の患者の骨髓吸引液から調製した。実施例1に記載の如く製造した蛍光コバラミンで、入手後3日間、細胞を処理した。正常及び白血病のヒト骨髓細胞において、蛍光顕微鏡法または蛍光フローサイトメトリーにより決定したように、蛍光コバラミン類似体の差別的な取り込みが見いだされた。正常な骨髓細胞と白血病の骨髓芽球(癌細胞)との違いは特に注目すべきであり、正常な細胞によって検出可能なコバラミンは取り込まれなかった。健常個体からの骨髓サンプルは、蛍光標識を示さなかった。潜在的な化学療法薬化合物としてもともと合成されたドキソルピシン-コバラミン結合体の取り込みは、P-388ネズミ白血病細胞及びHCT-116ヒト結腸腫瘍細胞で見られた。これらの結果は、白血病及び充実性腫瘍細胞系ではコバラミンの蛍光誘導体を取り込まれることを示している。

30

【0057】実施例3シアノコバラミンモノカルボン酸の製造

b-、d-及びe-モノカルボン酸は、シアノコバラミンの酸触媒化加水分解により製造した。図2を参照されたい。手短に言えば、シアノコバラミン(527.0 mg, 0.389 mmol)を100 mlの丸底フラスコに入れ、40 mlの0.5 M HClに溶解した。このフラスコを50 °Cの水浴に入れ、4時間攪拌した。この反応物を、表1にまとめた勾配液を使用して、HPLC(Waters, Inc. 3.9×300 mm DeltaPak 100 C-18カラム)によりモニターした。

40

【0058】【表1】

表 1

時間 (分)	流速 (ml/分)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
18.0	2.0	83.7	16.3
23.0	2.0	30.0	70.0
25.0	2.0	30.0	70.0
30.0	2.0	90.0	10.0

10

【 0 0 5 9 】

4時間後、反応物を室温に冷却した。このpHを、pHメーターを使用して、NaOH (10%) で7.0に調節した。粗な物質を、C-18 SepPakカラム (Waters, Inc. PIN WAT023635) を使用して、最初に10 mlのメタノールで、続いて15 mlの脱イオンH₂Oで濯いで脱塩した。この粗な物質をシリンジでカラムに適用し、10~15 mlの脱イオンH₂Oで濯ぎ、続いて10 mlのメタノールで溶出した。メタノールをロータリーエバポレーター処理により除去すると、赤色化合物が得られた (5016-12-33)。

20

【 0 0 6 0 】

この粗な反応混合物を最小量の脱イオンH₂Oに溶解し、この溶液の半分を、表に計算した勾配液を使用して、セミ-プレッパHPLC (Waters, Inc. 25.0 × 300 mm, 100 C-18カラム) 上に注入した。

【 0 0 6 1 】

【 表 2 】

表 2

30

時間 (分)	流速 (ml/分)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	40.0	90.0	10.0
4.1	40.0	90.0	10.0
37.0	40.0	83.7	16.3
47.3	40.0	30.0	70.0
51.4	40.0	30.0	70.0
61.6	40.0	90.0	10.0

40

【 0 0 6 2 】

28.0分 (b-モノカルボン酸, CBC-195)、30.1分 (d-モノカルボン酸, CBC-226)、及び34.6分 (e-モノカルボン酸) におけるピークを、大きな試験管を使用して集めた。純粋な画分を脱イオンH₂Oで1:1に希釈し、上記と同じ方法により脱塩した。全ての場合において、赤色固体が得られた。

50

【 0 0 6 3 】

CBC-195 (b-モノカルボン酸) : 二つの分取実験で、74.8 mgのb-モノカルボン酸 (14.4%) を単離した。予想通り、M+1ピーク (1356) とM+22ピーク (1378) を示す陽イオン・エレクトロスプレー・マスペクトル (ES⁺) が得られた。このb-モノカルボン酸 (CBC-195) は、全収率14%で得られた。

【 0 0 6 4 】

CBC-226 (d-モノカルボン酸) : 二つの分取実験で、38.6 mgのd-モノカルボン酸 (7.3%) を単離した。予想通り、M+1ピーク (1356) と対応するM+Naピーク (1378) を示す陽イオン・エレクトロスプレー・マスペクトル (ES⁺) が得られた。このd-モノカルボン酸 (CBC-226) は、全収率7%で得られた。

10

【 0 0 6 5 】

e-モノカルボン酸は、全収率7%で、約78 mg得られた。

実施例 4

CNCbI酸と1,12ジアミノドデカンとの結合

b-アミド及びd-アミドは、図3に示す通りに製造した。CBC-195 (55.4 mg , 0.0408 mmol) を小さなガラスバイアルに添加し、約2.5 mlのDMSOに溶解し、続いてEDCIHCl (12 mg , 0.0626 mmol) とN-ヒドロキシスクシンイミド (NMS) (25 mg , 0.217 mmol) を添加した。この反応物を室温で一晩攪拌した。従前の試みから、反応を完了させるには、EDCIとNHSの数当量 (全部で6当量) が必要であった。24時間後、EDCIの追加の1当量を添加し、全部で26時間で反応が完了した。この反応は、表3の勾配液を使用してHPLCでモニターした。CBC-195は9.07分の保持時間であり、CBC-195のNHS-エステルは10.55分の保持時間であった。

20

【 0 0 6 6 】

【 表 3 】

表 3

時間 (分)	流速 (ml / 分)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
20.0	2.0	55.0	45.0
25.0	2.0	9.0	10.0

30

【 0 0 6 7 】

別のガラスバイアルに、1,12-ジアミノドデカン (81.8 mg , 0.408 mmol) を約2 mlのDMSOに溶解した。上記反応混合物を、4.0 ml/時間でシリンジポンプを使用して滴下添加して、ダイマー形成を最小化させた。生成物は即座に形成し、14.56分の保持時間であった。粗な反応混合物を100 mlの1:1のCH₂Cl₂:Et₂Oに添加すると、赤い沈殿物が形成した。この赤色化合物をガラスフリットを使用して濾過し、CH₂Cl₂の20 ml分を2回と、アセトン20 ml分2回と、最終的にEt₂Oの20 ml分2回で洗浄した。

40

【 0 0 6 8 】

粗な反応生成物を最小量の脱イオンH₂Oに溶解し、この溶液を表4に計算した勾配液を使用して、セミプレッパHPLC (Waters, Inc. 25.0 × 100 mm、100 C-18カラム) に注入した。

【 0 0 6 9 】

【 表 4 】

表 4

時間 (分)		0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	40.0	90.0	10.0
2.0	40.0	90.0	10.0
13.7	40.0	55.0	45.0
17.1	40.0	90.0	10.0

10

【 0 0 7 0 】

8.70分 (b-アミン、CBC-208) のピークを、大きな試験管を使用して集めた。純粋な画分
を蒸留H₂Oを使用して1:1に希釈し、最初にカラムを10 mlメタノール、続いて15 ml脱イ
オンH₂Oを使用して濯ぐことにより、C-18 SepPakカラム (Waters, Inc, P/N WAT023635)
を使用して脱塩した。純粋な物質をシリンジでカラムに適用し、10~15 mlの脱イオンH₂O
で濯ぎ、続いて10 mlメタノールで溶出した。このメタノールをロータリーエバポレータ
ー処理により除去すると、赤色化合物6 mgが得られた。

20

【 0 0 7 1 】

CBC-208 (b-アミン) : 全部で6.0 mgのb-アミンを単離した。予想通り、M+1ピーク (1538
) とM+23ピーク (1560) を示す陽イオン・エレクトロスプレー・マススペクトル (ES⁺)
が得られた。CBC-208は、精製後に収率9.5%で得られた。

【 0 0 7 2 】

CBC-226 (d-アミン) : 表3と同一のHPLC勾配液を使用すると、このd-モノカルボン酸は、
9.32分のHPLC保持時間であり、そのNHS-エステルは10.96分で移動し、d-アミン (CBC-226
) は14.93分で移動した。予想通り、M+1ピーク (1538) と対応するM+Naピーク (1560) を
示す粗な物質の陽イオン・エレクトロスプレー・マススペクトル (ES⁺) が得られた。

【 0 0 7 3 】

30

実施例 5CBC-208とフルオレセイン-5EX-NHSの結合

CBC-208は、図4に従って、フルオレセイン誘導体フルオレセイン-5EX (Molecular Probes
, Inc. 製) に結合させた。CBC-208 (6.0 mg, 3.87 μmol) を小さなガラスバイアルに添加
し、約0.5 mlのDMSOに溶解し、続いてフルオレセイン-5EX-NHS (2.5 mg, 4.23 μmol) を
添加した。この反応物を室温で一晩攪拌した。この反応は、表5の方法を使用してHPLCで
モニターした。

【 0 0 7 4 】

【 表 5 】

表 5

時間 (分)	流速 (ml/分)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
10.0	2.0	65.0	35.0
15.0	2.0	5.0	95.0
28	2.0	90.0	10.0

10

【 0 0 7 5 】

この反応は、最初非常に早く進み、接触させて約10分後には、所望の生成物が形成した。CBC-208の保持時間は11.47分であり、生成物（CBC-123）は、14.24分の保持時間であった。フルオレセイン化合物をもう一当量添加すると、反応が完了し、粗な混合物は88%の純度であった。

【 0 0 7 6 】

20

出発物質のフルオレセイン-5EX-NHSのHPLC分析により、これは75%純度でしかないことが判明し、このことで、反応を完了させるのにどうして追加の当量が必要であったかということが明らかになった。

【 0 0 7 7 】

CBC-123（b-フルオレセインコバラミン誘導体）：この化合物は、合成からの粗な単離物としてだいたい90%の純度であり、不純物の殆どは未反応CBC-208であった。M+1ピーク（2013）と対応するM+Naピーク（2035）を示す粗な物質の陽イオン・エレクトロスプレー・マスペクトル（ES⁺）が得られた。精製前の収率は22%であった。

【 0 0 7 8 】

この化合物の蛍光スペクトルは、350 nmにおける励起による光分解前後で、粗な化合物についてとった（図5を参照されたい）。光分解前後で蛍光に有意な変化はなく、このことは、この化合物が光安定性であり、且つ明らかに蛍光を発して、コバラミン近傍由来の弱い蛍光は示さないことを示唆している。

30

【 0 0 7 9 】

実施例 6

顕微鏡による乳癌組織のex-vivo検査

正常な辺縁組織をもつ、乳癌を含む悪性腫瘍と良性腫瘍のサンプルを患者より摘出した。これらのサンプルはUniversity of Utah Institutional Review Board（IRB）及びHuntsman Cancer Institute Clinical Cancer Investigation Committee（CCIC）の承認を得ている。この生組織サンプルを、上記の如く製造した蛍光コバラミン誘導体の一つと一緒に4～6時間インキュベートした。それぞれのサンプルの薄切組織切片は冷凍式ミクロトームで作成し、蛍光マーカー量はエピ蛍光顕微鏡法により正常組織及び癌組織において定量化する。対応する組織切片を解剖病理学者の評価用にヘマトキシリン/エオシン（H&E）染色した。正常細胞と癌細胞との境界面は慎重に検査した。腫瘍の低酸素領域内の細胞はしばしば代謝が低下しているので、腫瘍内部の細胞は、蛍光マーカーの取り込みに関しても調べた。

40

【 0 0 8 0 】

より具体的には、最少必須培地、α修飾（α-MEM：7.5%新生児ウシ血清、2.5%ウシ胎児血清、0.2%ナスタチン、2.5%ペニシリン/ストレプトマイシン、pH7.2；Sigma製）を調製し、25 mL滅菌ねじ蓋組織培養フラスコにアリコート（10 mL）を入れた。この培地を

50

37 にし、組織サンプルを蛍光標識化コバラミン類（50 nM；コバラミン-Oregon Green及び実施例1のコバラミン-ナフトフルオロセイン結合体と実施例5のコバラミン-フルオレセイン結合体）と、組換えヒトTCII（50 pM）と一緒に α -MEM中で3時間インキュベートした。ヒト乳房組織サンプルは、IRM-承認プロトコルの元で入手した。この組織をプラスチックから取り出し、ダルベッコのリン酸塩緩衝塩類溶液（DPBS；Sigma）で洗浄し、凍結切片スライス形成用にOCTコンパウンド（Shandon）で-20 で真鍮プレート上に据え付けた。組織を-20 でCTD Harrisクリオスタット中でスライス（4~6 μ m切片）した。薄切組織切片を小さな絵描き用ブラシで引き戻し、100%エタノールで顕微鏡スライドに固定した。標準的なヘマトキシリン染色手順：95%エタノール、20秒；水、5秒；ヘマトキシリン（Fisher）、45秒；水、5秒；青味つけ溶液（bluing solution）（水道水）、10秒；95%エタノール、10秒；100%エタノール、10秒；キシレン、10秒；及びキシレン、10秒で、スライドを染色した。相コントラスト及びエピ蛍光顕微鏡法により、10倍、60倍及び100倍の倍率でスライドを評価した。

10

【0081】

3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムチアゾリルブロミド（MTT；Sigma）を使用して、蛍光コバラミンで3時間のインキュベート後で組織の代謝能力を定性的に測定した。組織の一部を培地から取り出し、DPBSで洗浄し、MTT（2 mL；2.5 mg/mL）に浸した。この組織を、5% CO₂ 雰囲気下、37 で3時間インキュベートした。このインキュベーション時間の間に、スクシネートデヒドロゲナーゼ活性により組織サンプル中の生存細胞がMTT染料を還元して紫色のホルマザンにした（Cells and Celis, 1998年）。

20

【0082】

この蛍光コバラミンバイオコンジュゲートは、腫瘍性乳房組織及び健常乳房組織のいずれにも凝集したが、健常乳房組織よりも腫瘍性乳房組織にはたくさんの蛍光コバラミンを隔離していた。健常乳房組織により隔離された蛍光コバラミンの量は予想よりも多かったが、これは、健常細胞により有意に内在化されたものではなく、結合組織内の構造体への非特異的結合によるものと考えられる。

【0083】

実施例7

30

リンパ節中の癌細胞のex-vivo検査

転移性疾患に冒された摘出したリンパ節を患者から取りだし、上記の如く製造した蛍光コバラミン誘導体の一つと一緒に4~8時間インキュベートした。リンパ節をそれぞれ薄切して、癌細胞への蛍光コバラミンの輸送に関して顕微鏡的に検査した。この実験から、リンパ節内の転移細胞が画像化及び視覚化用に十分な蛍光コバラミンを取り込む能力が示された。

【0084】

実施例8

患者がコバラミン-ベースの治療用バイオコンジュゲートを用いる化学療法に対して良好に応答するかを測定蛍光するためのコバラミンの使用

40

白血病患者からの骨髓吸引液または末梢血液サンプルを、蛍光コバラミン結合体と一緒にインキュベーションした。4~8時間後、骨髓吸引液または末梢血液サンプルを洗浄して、取り込まれなかった蛍光標識を除去し、この細胞サンプルを、エピ蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーによる定性的または定量的分析にかけた。有意量の蛍光コバラミンを取り込んだ細胞は、明るい蛍光を示す。患者の白血病のタイプを示す有意量の蛍光コバラミンの取り込みは、コバラミンベースの治療を使用する処置に対して良好に応答するだろう。蛍光コバラミン結合体を用いる処置後でも有意な蛍光を示さない骨髓吸引液または末梢血液サンプルは、その患者がコバラミンベースの治療結合体にうまく応答しないことを示している。充実性腫瘍について同様のアプローチを適用することができる。この場合、切開した腫瘍組織の一部を蛍光コバラミン結合体と一緒にインキュベートし、約4~8時間

50

後、腫瘍組織中の蛍光を定量化する。腫瘍組織により示された蛍光が強い程、癌がコバラミンベースの化学療法による処置にうまく応答している可能性が高い。

【0085】

実施例9

CobalaFluor Yの合成

一般的な脱塩手順：

コバラミン類は全て、カートリッジを2カラム容積分のメタノールと、3カラム容積分の脱イオン水で調整することにより、10 gのC-18 SepPak (Waters, Inc) を用いて脱塩した。コバラミンをカラムに適用し、3カラム容積分の脱イオン水で洗浄し、メタノール (10 mL) で溶出した。ロータリーエバポレーション処理によりメタノールを除去して、生成物を凍結乾燥した。

10

【0086】

シアノコバラミン-b-モノカルボン酸の製造：

シアノコバラミン-b-モノカルボン酸は、刊行物に記載されたプロトコルを変更して製造した (Antonら、1980年)。手短に言えば、CNCbl (3.5 g, 2.6 mmol) を350 mLの1.0 M HClに溶解した。この反応物を37℃に4時間加熱し、逆相HPLCでモニターした。粗な物質を脱塩し、次いでセミプレップHPLCで精製できた。しかし、粗な反応混合物は45%を超えるシアノコバラミン (HPLCにより) を含んでいたもので、イオン交換カラムを使用して、未反応シアノコバラミンを分離した。粗な物質をddH₂Oに溶解し、2.5×30 cmのDowex AG-X1 (酢酸塩形) カラムに適用した。CNCblを脱イオン水でカラムから溶出した。次いで三種類のモノカルボン酸を0.04 M酢酸ナトリウム (pH4) で溶出し、さらにセミプレップHPLCで精製した。b-モノカルボン酸を分析用HPLCにより97%純度で単離した (全体で10%収率) ; ES⁺MS: (1:1 H₂O: CH₃CN) M+H = 1356.3 (C₆₃H₈₈CoN₁₃O₁₅Pの計算値 = 1356.5), M+N_a⁺=1378.4 (C₆₃H₈₈CoN₁₃O₁₅PNaの計算値 = 1378.5)。d-モノカルボン酸とe-モノカルボン酸はいずれも、それぞれ全体収率4%及び7%で単離した。

20

【0087】

シアノコバラミン-b-モノカルボン酸の分析用HPLC法：

Waters DeltaPak C-18 300×3.9 mmカラムを使用して、2 mL/分の流速で分析用クロマトグラフィー法を実施した。最初の2分間の90%溶液A (0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0) と10%溶液B (9:1アセトニトリルと水) の定組成で流した後、83.7% Aと16.3% Bへの16分の線状勾配液により、15.7分の保持時間の所望のb-モノカルボン酸誘導体が溶出した。このd-モノカルボン酸は16.9分の保持時間であり、e-モノカルボン酸は19.5分の保持時間であった。

30

【0088】

シアノコバラミン-b-モノカルボン酸のセミプレップHPLC：

Waters DeltaPak C-18 2.5×30 cmセミプレップカラムを使用し、40 mL/分の流速でクロマトグラフィー法を実施した。最初の4.1分間の90%溶液A (0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0) と10%溶液B (9:1アセトニトリルと水) の定組成で流した後、83.7% Aと16.3% Bへの32.9分の線状勾配液により、コバラミン酸誘導体を溶出した。この三種類のCNCbl-モノカルボン酸の保持時間は、以下のものであった：b-モノカルボン酸は23.1分で、d-モノカルボン酸は26.6分で、e-モノカルボン酸は32.1分で溶出した。

40

【0089】

シアノコバラミン-b-(5-アミノペンチルアミド)の合成：

シアノコバラミン-b-モノカルボン酸1 (50 mg, 0.037 mmol) を、EDCI (71 mg, 0.37 mmol) とNHS (25 mg, 0.22 mmol) の入った乾燥した10 mLの丸底フラスコに溶解した。窒素ガスで5分間フラッシュすることにより、このフラスコを脱ガスした。ジメチルスルホキシド (5 mL) をシリンジを介して添加し、この反応混合物を6時間撹拌した。この混合物を気密性シリンジを使用して丸底フラスコから取り出し、1,5-ジアミノペンタン (43 µL, 0.37 mmol) をフラスコに入れた。このCBI混合物を、5分間かけて1,5-ジアミノペンタンに滴下添加して、2:1付加物の形成を最小化した。逆相HPLCを使用して、この反応をモ

50

ニターした。出発物質が消費されたら、1:1の CH_2Cl_2 :ジエチルエーテル(60 mL)の溶液でコバラミン類を沈澱させた。得られた固体を中位のフリットフィルターで濾過し、ジエチルエーテル(2×10 mL)で洗浄し、フィルターからメタノールで溶出した。この粗な混合物を等容積の水で希釈し、セミプレップカラムに注入して、シアノコバラミン-b-(5-アミノペンチルアミド)2を精製した。所望の生成物を含有する画分を上記の如く脱塩し、ロータリーエバポレーター処理により乾燥した。シアノコバラミン-b-(5-アミノペンチルアミド)2が得られた。70%の収率;分析用HPLCにより98%の純度;ES⁺MS:(1:1 H₂O:CH₃CN) M+H=1440.5(C₆₃H₁₀₀CoN₁₅O₁₄Pの計算値=1440.7), M+Na⁺=1462.4(C₆₃H₁₀₀CoN₁₅O₁₄PNaの計算値=1462.6); $\epsilon_{362\text{nm}}=19500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (H₂O中)。

【0090】

10

シアノコバラミン-b-(5-アミノペンチルアミド)2の分析用HPLC法:

Waters DeltaPak C-18 300×3.9 mmカラムを使用して、2 mL/分の流速で分析用クロマトグラフィー法を実施した。最初の2分間の95%溶液A(0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成で流した後、70%Aと30%Bへの16.4分の線状勾配液により、11.8分の保持時間の当該化合物が溶出した。

【0091】

シアノコバラミン-b-(5-アミノペンチルアミド)2のセミプレップHPLC:

Waters DeltaPak C-18 25×30 cmセミプレップカラムを使用し、40 mL/分の流速でクロマトグラフィー法を実施した。95%溶液A(0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成で4.1分間流した後、70%Aと30%Bへの18分の線状勾配液により、所望の生成物を溶出した。

20

【0092】

CobaraFluor Y(Cy5-コバラミン=Cy5-Cbl=Cy5 CobalaFluor)の合成:

この合成は図6に示されている。手短かに言えば、シアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)は、刊行物に記載されたプロトコル(McEwanら, 1999年)に従って、シアノコバラミン(Sigma Chemical Co.)を使用して製造した。コバラミン類は、2:1のジエチルエーテル:塩化メチレン(50 mL)を使用して沈澱させ、この溶媒混合物(2×10 mL)でも洗浄した。この反応物をモニターし、逆相HPLCを使用して生成物を精製した。この生成物を標準的な手順により脱塩した。

【0093】

30

シアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)(20 mg, 0.013 mmol)を、乾燥した10 mLの丸底フラスコに入れ、窒素ガスで5分間フラッシュすることにより脱ガスし、ジメチルスルホキシド(1 mL)をシリンジを介して添加して、コバラミンを溶解した。Cy5スクシンイミジルエステル(10 mg, 0.013 mmol; Amersham Pharmacia)とDIPEA(15 μL, 0.13)をこのフラスコに添加して、この反応混合物を1時間攪拌した。逆相HPLCを使用して反応をモニターした。出発物質が消費されたら、2:1のジエチルエーテル:CH₂Cl₂(50 mL)の溶液でコバラミン類を沈澱させた。得られた固体を微細フリットフィルターで濾過し、ジエチルエーテルとCH₂Cl₂混合物(2×10 mL)で洗浄し、メタノールでフィルターから溶出した。粗な混合物をセミプレップカラムに注入して、CobalaFluor Yを精製し、標準的な手順により脱塩した。図7は、CobalaFluor Yの蛍光放出スペクトルを示す。

40

【0094】

シアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)の分析用HPLC法:

Waters DeltaPak C-18 300×3.9 mmカラムを使用して、2 mL/分の流速で、分析用クロマトグラフィー法を実施した。最初の2分間の95%溶液A(0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成で流した後、70%Aと30%Bへの18分の線状勾配液により、所望のシアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)を、保持時間12.5分で溶出した。

【0095】

シアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)のセミプレップHPLC:

50

Waters DeltaPak C-18 2.5×30 cmセミプレップカラムを使用し、40 mL/分の流速でクロマトグラフィー法を実施した。最初の4.1分間の95%溶液A(0.05 Mリン酸塩緩衝液, pH3.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成で流した後、70%Aと30%Bへの27.4分の線状勾配液により、コバラミン酸誘導体を溶出した。所望のシアノコバラミン-リボース-5'-0-(6-アミノヘキシルアミド)の保持時間は、15.5分であった。

【0096】

CobalaFluor Yの分析HPLC法:

Waters DeltaPak C-18 300×3.9 mmカラムで、2 mL/分の流速で分析用クロマトグラフィー法を実施した。最初の2分間の95%溶液A(0.01 M TEA緩衝液, pH7.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成で流した後、45%Aと55%Bへの16.4分の線状勾配液により、13.6分でCobalaFluor Yを溶出した。

10

【0097】

CobalaFluor YのセミプレップHPLC:

Waters DeltaPak C-18 25×30 cmカラムを使用して、20 mL/分の流速でセミプレップクロマトグラフィー法を実施した。95%溶液A(0.01 M TEA緩衝液, pH7.0)と5%溶液B(9:1アセトニトリルと水)の定組成を2分間流した後、70%Aと30%Bへの27.4分の線状勾配液により、12.2分で所望の生成物を溶出した。

【0098】

実施例10

競合アッセイ

20

材料

コバラミン類、ブタ非内性因子(HCとIFの50:1混合物)及びブタ内性因子は、Sigma Chemical Co.より購入した。HPLCトレースは、Waters 2487二重波長吸光度検出器を装備したWaters Delta 600システムを使用して得た。BIACORE 2000及び3000(BIACORE AB)装置は、表面プラスモン共鳴バイオセンサー分析に関して使用した。

【0099】

CNCbl-b-(5-アミノペンチルアミド)の固定化

全てのSPR研究は、BIACORE 2000光学バイオセンサーで実施した。標準CM5センサーチップ(BIACORE AB)のフローセルのカルボキシメチルデキストラン表面は、20 µL/分で15分間、チップを通して0.1 M EDCIと0.025 M NHSの混合物を37 °Cで流すことにより活性化した。pH4.5で10 mM酢酸ナトリウムで希釈したCNCbl-b-(5-アミノペンチルアミド)2を、図8に示すチップの3つのフローセルに固定化した。高密度センサー表面(500~700 RU)は、2 µL/分の速度で40分間、フローセル上にCbl類似体をパルスをかける(pulsing)ことにより作り出した。4つ全てのフローセルのチップ表面に残っている結合部位は、5 µL/分で16分間、1.0 Mエタノールアミン、pH8.0でブロックした。フローセル3を参照表面として使用して、非特異的結合と装置のノイズを差し引いた。

30

【0100】

タンパク質標準曲線

全ての標準曲線及び競合アッセイは、30 °CでHBSランニング緩衝液(150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH7.5, 3.4 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, 及び0.005% P20界面活性剤)を使用して実施した。rhTCII、NIF及びIF結合CNCbl-b-(5-アミノペンチルアミド)の校正曲線は以下のようにして出した。HBS緩衝液に希釈したそれぞれのタンパク質のストック溶液(15.6~500 pM)を、20 µL/分でフローセルに10分で注入して、結合を分析した。結合したタンパク質は、8 M尿素、0.125% SDS及びランニング緩衝液で移動した。タンパク質サンプルをそれぞれ二重に分析した。

40

【0101】

みかけの溶液平衡解離定数の測定

rhTCII、NIF及びIFの種々のコバラミン類似体への結合は、溶液競合結合アッセイ(Niebaら、1996年)により分析した。0.01~100 nMの範囲の濃度の類似体を、200 pMのrhTCII、200 pMのNIF、または500 pMのIFを含む等容積でインキュベートした。結合データは、30

50

、20 μ L/分の速度で10分間、競合Cbl類似体とタンパク質のアリコートを注入することにより出し、次いで8 M尿素、0.125% SDS、及び緩衝液のパルスで表面を刷新した。それぞれのコバラミンについての競合アッセイは、二重に実施した。

【0102】

データ分析

バイオセンサーデータは、参照表面から観察した結合応答を引き、3回のブランクの注射の平均を引くことによって分析から得た (Myszka, 1999年)。この競合アッセイからのデータは、BIAevaluations 3.0ソフトウェアをつけた非線形最小回帰分析と適合させた。図9は、この競合アッセイセンサグラムを示す。図10は、TCII結合に関するコバラミンの競合を示す。この結合データは、図11A~Cに示されている。これらの結果は、コバラミン類似体が、高い親和性でコバラミン輸送タンパク質 (トランスコバラミン、ハプトコリン及び内性因子) により認識されることを示している。この認識は、表面プラスモン共鳴によっても示された。コバラミンに大きな分子を結合させても、タンパク質結合に影響しないようである。

10

【0103】

実施例11

動物モデル研究

腫瘍を持つマウスにおけるin-vivo取り込み

雌のマウスの右後肢の皮下に、 1×10^6 RD995腫瘍細胞を移植することによって、腫瘍をマウスに移植した。このマウスの腫瘍細胞系は、in-vitroで増殖させた。細胞を移植してから6週間後、10 mmの腫瘍が認識できた。この時点で、マウスに、滅菌塩類溶液中に溶解した2.2 μ gのCobalaFluor Yを眼窩後に静脈注射した。注射6時間後、ハロタン吸入によりマウスを鎮静させた。この腫瘍を切開し、633 nm HeNeレーザーを照射した。マウスの腫瘍は、HeNeレーザーを使用して、CobalaraFluor Yの注射54時間後でも分析した。マウスを解剖して、内臓と健常組織を分析することができた。結果を図12に示す。この結果は、マウスの腫瘍組織中に蛍光標識化コバラミンが局在化したことを示している。

20

【0104】

実施例12

組織取り込み研究

蛍光コバラミン取り込み

最少必須培地、 α 修飾 (α -MEM、7.5% 新生児ウシ血清、2.5% ウシ胎児血清、0.2% ナイスタチン、2.5% ペニシリン/ストレプトマイシン、pH7.2; Sigma) を調製し、スクリーントップ組織培養フラスコとして滅菌25 mLにアリコート (10 mL) を入れた。培地を37 とし、組織サンプル (腫瘍性乳房組織、健常乳房組織、腫瘍リンパ節組織及び健常リンパ節組織) を、 α -MEM中、蛍光標識化コバラミン類 (10 pM)、シアノコバラミン (1 nM) と3時間インキュベートした。ヒト組織サンプルは、IRB-認可プロトコルのもとで、入手した。この組織をフラスコから取り出し、ダルベッコのリン酸塩緩衝塩類溶液 (DPBS; Sigma) で洗浄し、凍結切片スライス形成用にOCTコンパウンド (Shandon) で-20 で真鍮プレート上に据え付けた。組織を-20 でCTD Harris低温保持装置中でスライス (4~6 μ m切片) した。薄切組織切片を小さな絵描き用ブラシで引き戻し、100% エタノールで顕微鏡スライドに固定した。標準的なヘマトキシリン染色手順: 95% エタノール、20秒; 水、5秒; ヘマトキシリン (Fisher)、45秒; 水、5秒; 青味つけ溶液 (bluing solution) (水道水)、10秒; 95% エタノール、10秒; 100% エタノール、10秒; キシレン、10秒; 及びキシレン、10秒で、スライドを染色した。相コントラスト及びエピ蛍光顕微鏡法により、10倍、60倍及び100倍の倍率でスライドを測定した。(a) 腫瘍性乳房組織における腫瘍画像化を図13に、(b) 腫瘍性リンパ節組織における腫瘍画像化を図14に示す。

30

40

【0105】

細胞生存率及び組織代謝活性のアッセイ

3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムチアゾリルプロミド (MTT; Sigma) を使用して、蛍光コバラミンで3時間のインキュベート後で組織の代謝能

50

力を定性的に測定した。組織の一部を培地から取り出し、DPBSで洗浄し、MTT (2 mL ; 2.5 mg/mL) に浸した。この組織を、5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で3時間インキュベートした。このインキュベーション時間の間に、スクシネートデヒドロゲナーゼ活性により組織サンプル中の生存細胞がMTT染料を還元して紫色のホルマザンにした。この組織をDPBSで洗浄し、上記概説した冷凍ミクロトーム手順に従って調製して、組織の代謝能力を明らかにした。in-vitroにおいて健常組織と腫瘍性組織のいずれもが、蛍光コバラミン類を取り込んだことが見いだされた。

【0106】

実施例13

ブタ手術における外科用テレスコープ型デバイスの使用

解剖学的領域から流出するリンパ組織を同定及び/または悪性細胞を同定するためのデバイスの外科的利用を、ブタの手術で説明する。以前に行った解放式解剖に慣れていたので、鼠径節領域を使用した。10 mmのトロカールを腿の付け根の皮下層 (subcutaneous layer) に挿入し、この領域を15 mmHgの圧力で二酸化炭素で通気した。切開装置用に2つの5 mmトロカールを挿入した。リンパ節領域と、下部外肢 (lower extremity) からの主リンパ流出経路を、図15~18に示されている腹腔鏡を用いる鋭鈍解剖 (sharp and blunt dissection) で暴露させた。Cobala Fluor Y (1 mL容積中、1.5 mg/mL) を、主リンパ流出路近くの皮下層に注射した。Cobala Fluor Yは、633 nmの波長を持つ赤色レーザー光により刺激した蛍光と白色光とにより、リンパ幹 (lymphatic trunk) とセンチネルリンパ節中、図15~18に示す腹腔鏡で、2~5分で同定した。

【0107】

実施例14

他の手術におけるデバイスの利用

開示した方法及び/または装置は、外科的に除去されなかった特定の解剖学的領域及び/または腫瘍性組織から流出するリンパ節及び血管を同定するための様々な手術において実施例13で記載した方法と同様に使用することができる。特に所定の領域は、そこから腫瘍を除去すべきであるか、または既に除去した組織などの、切除領域であってもよい。たとえば、当該解剖学的領域は、腫瘍の位置から流出しているリンパ節及び/または腫瘍を同定するために、蛍光コバラミンを注射または注入してもよい。注射した蛍光コバラミン量は大きく変動可能であるが、具体的な範囲は約10 mL/分~約100 mL/分である。次いでこの腫瘍及び/またはリンパ節は以下の公知の外科手順により摘出し、外科用テレスコープ (たとえば、本明細書で開示の装置の一つ) を、腫瘍微小縁の拡大視診のために配置する。この蛍光コバラミンは、腫瘍細胞に対して選択的親和性をもつので、切除した組織の外科的辺縁に蛍光コバラミンが存在するということは、蛍光を発している組織または細胞の存在がもはや検出されなくなるまで、さらに辺縁組織を除去しなければならないことを示す。

【0108】

本発明の開示の方法及び組成物は、様々な態様の形態で含まれ、そのほんの一部が開示されたに過ぎないと考えべきである。他の態様も存在し、本開示の趣旨から逸脱しないことは、当業者には明らかであろう。従って、本記載の態様は例示的であって、限定的であると理解すべきではない。

【0109】

参考文献

【0110】

【表6-1】

10

20

30

40

LIST OF REFERENCES

- Cannel, R. (1975). "Extreme Elevation of Serum Transcobalamin I in Patients with Metastatic Cancer." *New Engl. J. Med.* 292:282-284.
- Celis, A. and Celis, J.E. (1998). *Cell Biology*, pp. 9-11. 10
- Collins, D. A. and Hogenkamp, H. P. C. (1997). "Transcobalamin II Receptor Imaging via Radiolabeled Diethylene-Triaminepentaacetate Cobalamin Analogs." *J. Nucl. Med.* 38:717-723.
- Collins, D.A. et al. (1999). "Tumor Imaging via Indium-111-Labeled DTPA-Adenosylcobalamin." *Mayo Clinic Proceedings* 74: 687-691. 20
- Collins, D.A. et al. (2000). "Biodistribution of Radiolabeled Adenosylcobalamin in Patients Diagnosed with Various Malignancies." *Mayo Clinic Proceedings* 75:568-580.
- Flodh, H. (1968). "Accumulation of labelled Vitamin B-12 in Some Transplanted Tumors." *Acta Radiol. Suppl.* 284:55-60. 30
- Hogenkamp, H. P.C., et al. (1999). "The Pharmacological Uses of Cobalamin Bioconjugates." In *The Chemistry and Biochemistry of B-12*, Banerjee, R., Ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 385-410.
- Howard, W.A. et al. (1997). "Sonolysis Promotes Indirect C-Co Bond Cleavage of Alkylcob(III)alamins." *Bioconj. Chem.* 8:498-502. 40
- McGreevy, J. M. (1998). "Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer." *Curr. Surg* 55:301-4.

【 0 1 1 1 】

【 表 6 - 2 】

Mitchell, A. M. et al. (1999). "Targeting Leukemia Cells with Cobalamin Bioconjugates" In *Enzymatic Mechanisms*, Frey, P. A.; Northrop, D. B., Eds., pp 150-154.

McMasters, K. M. et al. (1999). "Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer -- Not yet the Standard of Care." *New England J. Med.* 339:990.

10

Morton, D. L. et al. (1992). "Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma." *Arch. Surg* 127:392-9.

Rachmilewitz, B. et al. (1971)., "Serum Transcobalamin in Myeloid Leukemia." *J. Lab. Clin. Med.* 78:275.

Schneider, Z. and Stroinski, A. (1987). *Comprehensive B₁₂*, de Gmnyter, Berlin, pp. 358.

20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 2 】

【図 1】図1は、本発明で開示した蛍光コバラミンの一態様の合成を示す図である。

【図 2】図2は、コバラミンモノカルボン酸の合成を示す図である。

【図 3】図3は、コバラミンカルボン酸と1,12-ジアミノドデカンとの結合を示す図である。

【図 4】図4は、フルオレセイン-5EX-NHSエステルとジアミノドデカンコバラミン誘導体との結合を示す図である。

30

【図 5】図5は、フルオレセイン-5EX-b-コバラミン誘導体CBC-123の蛍光発光スペクトルを示す図である。

【図 6】図6は、CobalaFluor Yの合成を示す図である。

【図 7】図7は、CobalaFluor Y (Cy5 CobalaFluor) の蛍光発光スペクトルを示す図である。

【図 8】図8は、CM5 BIAcoreチップ上におけるコバラミン類似物質の固定化を示す図である。

【図 9】図9は、競合アッセイセンサグラムを示す図である。

【図 10】図10は、TCII結合に関するコバラミンの競合を示す図である。

40

【図 11 - A】図11A~11Cは、コバラミン、コバラミン類似体及びCobalaFluorのKd値を示す図である。

【図 11 - B】図11A~11Cは、コバラミン、コバラミン類似体及びCobalaFluorのKd値を示す図である。

【図 11 - C】図11A~11Cは、コバラミン、コバラミン類似体及びCobalaFluorのKd値を示す図である。

【図 12】図12は、動物モデルにおける腫瘍画像化を示す図である。

【図 13】図13は、新生物乳房組織における腫瘍画像化を示す図である。

【図 14】図14は、新生物リンパ節組織における腫瘍画像化を示す図である。

【図 15】図15は、ビデオモニターと制御系とを含む外科用テレスコープ型デバイスの略

50

図である。

【図 16】図 16は、外科用テレスコープ型デバイスの斜視図である。

【図 17】図 17は、外科用テレスコープ型デバイスの一部の斜視図である。

【図 18】図 18は、外科用テレスコープ型デバイスの一端の平面図である。

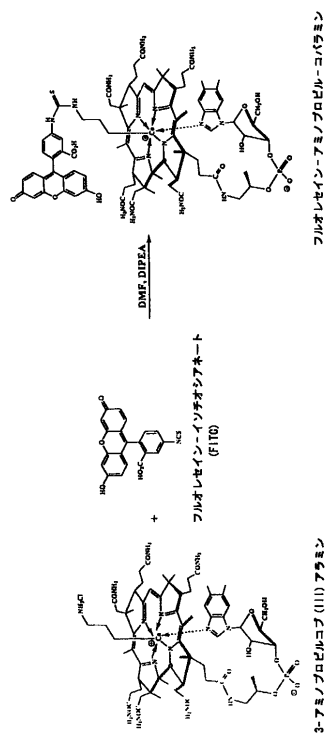
【図 19】図 19は、フィルターを含む外科用顕微鏡ヘッドの斜視図である。

【図 20】図 20は、フィルターを含むテレスコープ型デバイスの斜視図である。

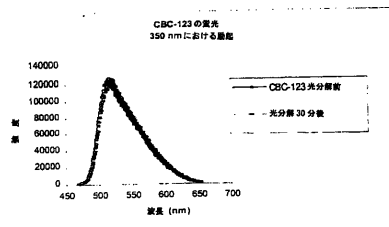
【図 21】図 21は、外科用テレスコープ型デバイスの光源の一態様の略図である。

【図 22】図 22は、コバラミン分子上の変形部位を示す図である。

【図 1】

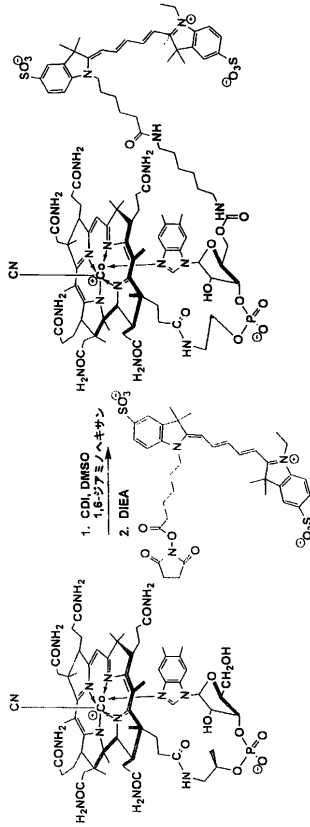


【図 5】



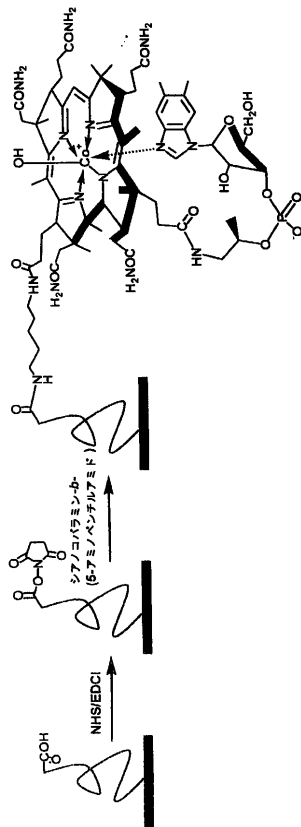
【 図 6 】

Cy5 CobalaFluor の合成



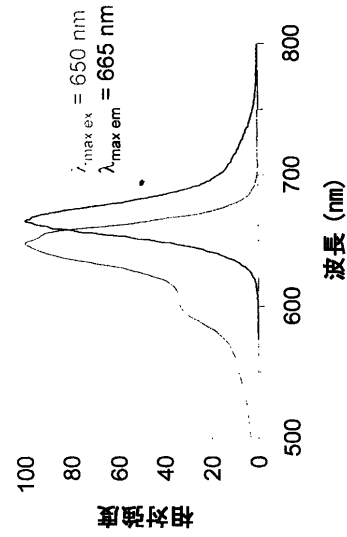
【 図 8 】

CM5 BIAcoreチップ上での 類似体の固定化



【 図 7 】

Cy5 CobalaFluor

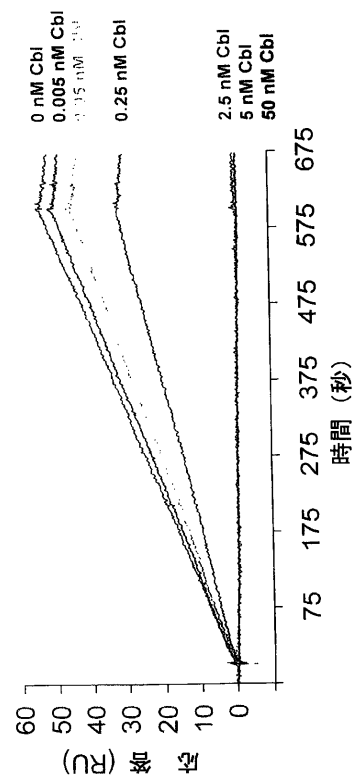


他の CobalaFluor 類に対する利点

- ・ 赤方偏移染料
- ・ 他のフルオロフォアのように pH 変化に対して感受性でない
- ・ 水溶性が非常に高い

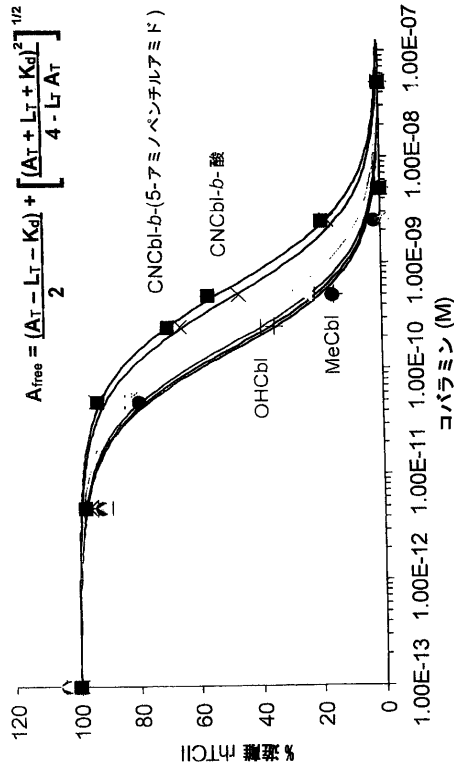
【 図 9 】

競合アッセイセンサグラム



【図 10】

TCII 結合に関する コバラミンの競合



【図 11 - B】

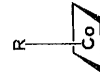
修飾側鎖コバラミン類のK_d 値

	TCII	非-IF	IF
CNCbl-b-COOH	410 +/- 18 pM	110 +/- 37 pM	100 +/- 10 pM
CNCbl-b-(5-アミノベンチルアミド)	430 +/- 100 pM	159 +/- 27 pM	100 +/- 17pM
CNCbl-c-COOH	230 +/- 24 pM	261 +/- 150 pM	483 +/- 130 pM
CNCbl-d-COOH	280 +/- 10 pM	100 +/- 17 pM	100 +/- 32 pM
CNCbl-e-COOH	280 +/- 20 pM	135 +/- 41 pM	100 +/- 22 pM

FIG. 11B

【図 11 - A】

K_d 値



OHCbl, CNCbl, MeCbl, AdoCbl

	TCII	非-IF	IF
R = OH	110 +/- 10 pM	137 +/- 23 pM	100 +/- 10 pM
R = CN	130 +/- 30 pM	137 +/- 49 pM	130 +/- 37 pM
R = CH ₃	140 +/- 22 pM	152 +/- 35 pM	101 +/- 41 pM
R = H ₂ C	190 +/- 82 pM	113 +/- 10 pM	100 +/- 40 pM

FIG. 11A

【図 11 - C】

CobalaFluor K_d 値



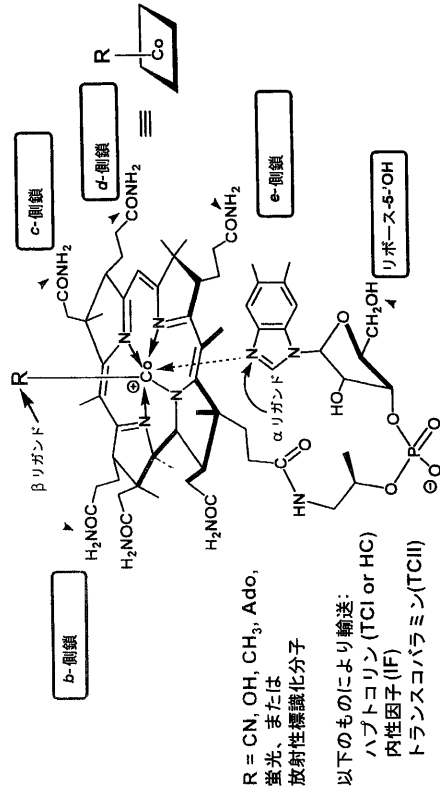
	TCII	非-IF	IF
R =	205 +/- 60 pM	110 +/- 37 pM	100 +/- 10 pM
R =	147 +/- 89 pM	176 +/- 10 pM	100 +/- 10 pM
R =	113 +/- 16 pM	126 +/- 11 pM	101 +/- 31 pM

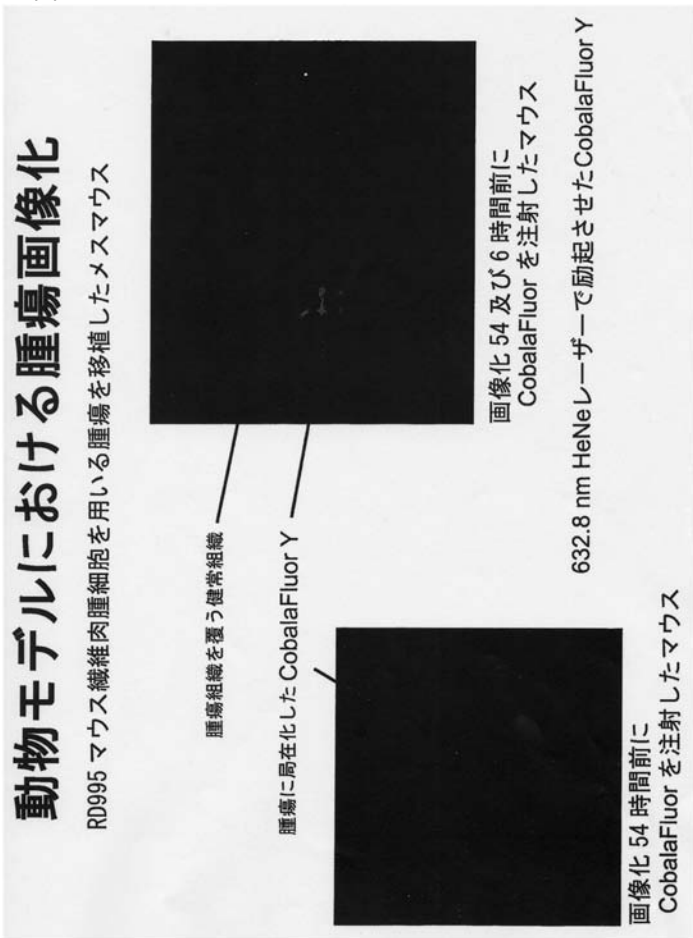
FIG. 11C

【図 2 2】

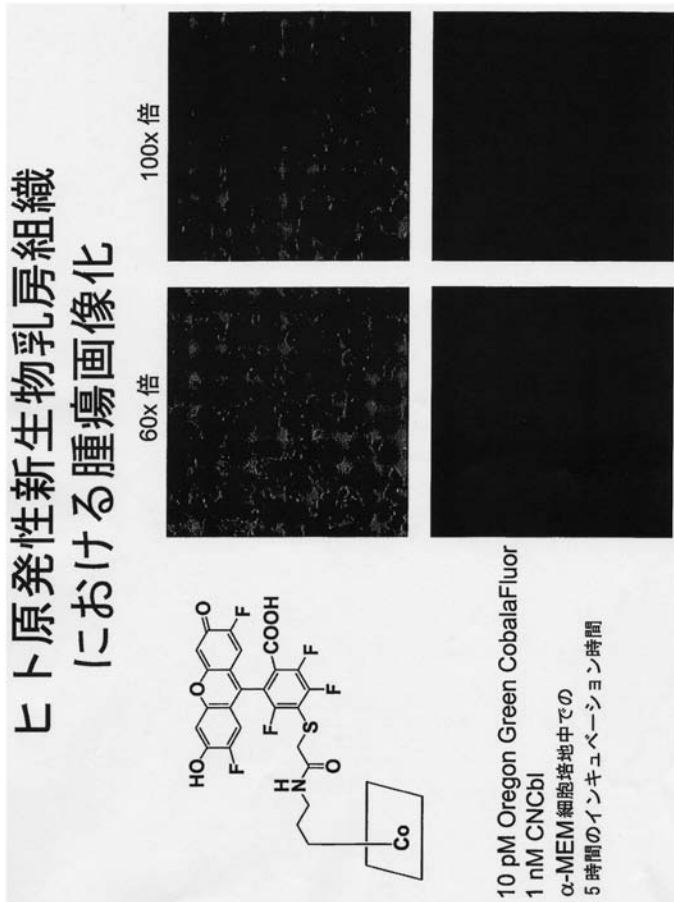
コバラミン(ビタミンB₁₂)

修飾部位





【図 1 3】



【図 1 4】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/074339 A1(51) International Patent Classification: **A61K 41/00**,
A61N 5/06, A61B 19/00, 5/00, G01N 21/64, A61B 1/04,
G02B 21/00

(21) International Application Number: PCT/US02/07699

(22) International Filing Date: 15 March 2002 (15.03.2002)

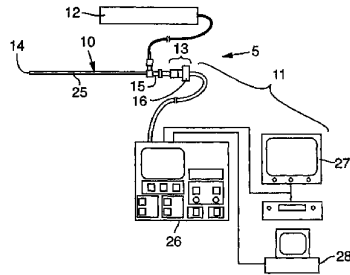
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/276,036 16 March 2001 (16.03.2001) US
60/336,316 30 October 2001 (30.10.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): UNI-
VERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
[US/US], Technology Transfer Office, Suite #110, 612
Arapahoe Drive, Salt Lake City, UT 84108 (US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MCGREEVY,**James** [US/US]; 6532 S. Houghs Canyon Drive, Salt
Lake City, UT 84121 (US); **GRISOM, Charles, B.**
[US/US]; 315 S. 1500 E., Salt Lake City, UT 84112 (US);
CANNON, Michelle [US/US]; 1135 University Village,
Salt Lake City, UT 84108 (US).(74) Agent: **RUPERT, Wayne, W.**, Klarquist Sparkman, LLP,
One World Trade Center, Suite 1600, 121 SW Salmon
Street, Portland, OR 97204 (US).(81) Designated States (national): 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, GH, GI,
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

[Continued on next page]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR THE PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS OF TUMOR TISSUE



(57) Abstract: An apparatus that includes a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end; a camera coupled to the proximal end of the surgical telescopic device; and a holographic notch filter interposed between the camera and the proximal end of the surgical telescopic device. The camera preferably is a charge-coupled-device camera ("CCD camera"). The apparatus may also include a focusing lens or an alternative type of filter such as a long-pass filter or an infrared filter. The surgical telescopic device may be used by illuminating the material with non-white light and detecting the emitted fluorescence, phosphorescence or luminescence.



WO 02/074339 A1

WO 02/074339 A1 

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

*before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments*

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:

with international search report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

PCT/US02/07699

- 1 -

DEVICE AND METHOD FOR THE PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS OF TUMOR TISSUE

The present disclosure relates to devices and methods for exciting a biologically-targeted fluorescent molecule with light from a light source (e.g., a laser). According to certain embodiments, fluorescent cobalamins (sometimes referred to herein as CobalaFluors) can be used with the disclosed devices and methods. The fluorescent cobalamins comprise a fluorescent, phosphorescent, luminescent or light producing compound that is covalently linked to cobalamin. These fluorescent cobalamins can be used as diagnostic and prognostic markers (a) to distinguish cancer cells and tissues from healthy cells and tissues, including identifying lymph nodes containing cancer cells, and (b) to determine if an individual will respond positively to chemotherapy using cobalamin-based therapeutic bioconjugates.

20 BACKGROUND

The publications and other materials cited herein are referenced in the following text by author and date and are listed alphabetically by author in the appended bibliography.

Rapidly-dividing cells require cobalamin as a cofactor for the enzyme methionine synthase to support one-carbon metabolism prior to DNA replication (Hogenkamp et al., 1999). In acute promyelocytic leukemia, a 3-26 fold increase in the unsaturated B₁₂ binding capacity of blood is observed, due to an increase in the concentration of the B₁₂ binding proteins transcobalamin and haptocorrin (Schneider, et al., 1987; Rachimelwitz, et al., 1971). Some patients with solid tumors also exhibit a significant increase in the circulating levels of transcobalamin and haptocorrin (Carmel, et al., 1975). The increase in unsaturated serum cobalamin

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 2 -

binding capacity corresponds to the increased uptake of cobalamin by rapidly dividing cells. Tumors even sequester sufficient cobalamin for diagnostic imaging purposes if a gamma-emitting radionuclide, such as ^{111}In , is attached to cobalamin through the octadentate chelator diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)

5 (Hogenkamp and Collins, 1997). This has been demonstrated in mice with an implanted fibrosarcoma (Hogenkamp and Collins, 1997), as well as in humans with breast cancer (Collins et al., 1999), and in tumors of the prostate, lung and brain (Collins et al., 2000).

In the sentinel lymph node concept for melanoma and breast cancer surgery, a dye or radionuclide is injected into the tissue around the tumor to identify the first lymph node that drains the tumor (Morton et al., 1992; McGreevy, 1998). This node is termed the sentinel node, and it is removed for diagnostic tests to determine the extent of metastasis beyond the primary tumor. This procedure is controversial, as it fails to detect metastatic disease in about 12% of patients (McMasters et al., 1999).
10
15 The dye or radionuclide that is injected is not specific for cancer cells, but merely identifies for the surgeon the primary lymph node that drains the region of the tumor. The high false-negative rate should be improved dramatically by using a fluorescent marker that is specific for cancer cells.

Thus, there exists a need for an agent and instruments that can be used for
20 the diagnosis and prognosis of cancer tissue or cells with improved results.

SUMMARY OF THE DISCLOSURE

Detection and imaging apparatuses are described that may be used to detect, manipulate and/or remove fluorescent, phosphorescent or luminescent compounds or
25 tissue in a host. According to a first embodiment, the apparatus includes a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end; a camera coupled to the proximal end of the surgical telescopic device; and a holographic notch filter interposed between the camera and the proximal end of the surgical telescopic device. In some embodiments, the camera is a charge-coupled-device camera
30 ("CCD camera"). The apparatus may also include a focusing lens or an additional type of filter such as a long-pass filter or an infrared filter.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 3 -

According to another embodiment, the apparatus includes a light-generating source that illuminates the fluorescent, phosphorescent or luminescent material; a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end; a focusing lens having a first end positioned adjacent to the proximal end of the surgical telescopic device; a camera coupled to a second end of the focusing lens; and at least one member interposed between the proximal end of the surgical telescopic device and the camera, wherein the member removes at least a portion of the wavelength transmitted by the light-generating source. The member may be a filter, prism, grating, mirror, or similar wavelength selection device.

In a further disclosed embodiment, the apparatus includes a housing that includes a magnifying lens; a holographic notch filter interposed between the magnifying lens and the host; and a light-generating source for illuminating the fluorescent, phosphorescent or luminescent material.

The surgical telescopic device may be used by illuminating the material with non-white light and detecting the emitted fluorescence, phosphorescence or luminescence.

According to one embodiment, fluorescent cobalamins comprised of a fluorescent, phosphorescent, luminescent or light-producing compound that is covalently linked to cobalamin can be used in conjunction with the above-described apparatuses. These fluorescent cobalamins can be used as a diagnostic and prognostic marker (a) to distinguish cancer cells and tissues from healthy cells and tissues, including identifying lymph nodes containing cancer cells, and (b) to determine if an individual will respond positively to chemotherapy using cobalamin-therapeutic bioconjugates. The fluorescent cobalamins offer the properties of (1) rapid transport and storage by cancer cells (maximum uptake occurs at 4-6 hours), (2) a bright fluorophore that can be visually detected at very low concentrations, and (3) nontoxic components.

In one aspect, fluorescent cobalamins are provided in which fluorescent, phosphorescent, luminescent or light-producing compounds are covalently linked to cobalamin (vitamin B₁₂). The fluorescent, phosphorescent or light-producing compounds can be covalently linked to the cobalt atom, the corrin ring, or the ribose moiety of cobalamin. It is preferred to covalently link the fluorescent,

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 4 -

phosphorescent, luminescent or light-producing compound to the corrin ring or the ribose moiety. Although, any fluorescent, phosphorescent, luminescent or light-producing compound can be utilized in preparing the fluorescent cobalamins, it is preferred to utilize fluorescent, phosphorescent, luminescent or light-producing compounds that are excitable with visible or infrared light. Examples of preferred fluorescent compounds include, but are not limited to, fluorescein, fluorescein-SEX, methoxycoumarin, naphthofluorescein, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, Cascade Blue, Dansyl, Dialkylaminocoumarin, 4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, 2',7'-dichlorofluorescein, eosin, eosin F3S, erythrosin, hydroxycoumarin, lissamine rhodamine B, methoxycoumarin, naphthofluorescein, NBD, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, PyMPO, pyrene, rhodamine 6G, rhodamine green, rhodamin red, rhodol green, 2',4',5',7'-tetrabromosulfonefluorescein, tetramethylrhodamine (TMR), Texas Red, X-rhodamine, Cy2 dye, Cy3 dye, Cy5 dye, Cy5.5 dye, Cy7 dye, IC Green, or a quantum dot structure. The preferred fluorescent cobalamins fluoresce when excited by visible or infrared light without the need to separate the fluorescent or phosphorescent compound from cobalamin. The light may be provided by a laser or a fiber optic light source with appropriate filter. Red light is preferred for better tissue penetration.

In a second aspect, the fluorescent cobalamins are used to identify atypical cells such as neoplastic cells, dysplastic cells, or hyperplastic cells. More particularly, the fluorescent cobalamins are used to distinguish cancer cells from healthy cells. In one embodiment, a fluorescent cobalamin is administered to a patient prior to surgery. The presence of fluorescence, phosphorescence, luminescence or emitted light in cancer cells is used by the surgeon to define the tissue to be removed, whether in a primary tumor or in a metastatic site. In a second embodiment, a fluorescent cobalamin is administered to a patient in a manner suitable for uptake by lymph nodes draining the *situs* of the tumor. The presence of fluorescence, phosphorescence, luminescence or emitted light identifies those lymph nodes that should be removed during surgery. In this latter embodiment, laparoscopic, endoscopic and microscopic techniques can be utilized to identify

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 5 -

lymph nodes with cancer cells. The use of these techniques facilitates the identification and retrieval of positive lymph nodes.

In a third aspect, the fluorescent cobalamins are used to determine if an individual will respond positively to chemotherapy using cobalamin-based therapeutic bioconjugates. In this aspect, a fluorescent cobalamin is used to assess the ability of the particular cancer cell type to transport and store cobalamin, both qualitatively and quantitatively. Various types of cancer that transport and store large amounts of cobalamin are good candidates for therapy with cobalamin-based therapeutic bioconjugates. Quantification of tumor cell cobalamin binding, uptake, transport, and storage can be carried out by fluorescence under visual inspection (e.g. tissue slide), by epifluorescence microscopy, fluorescence laparoscopy, fluorescence endoscopy or flow cytometry.

In a fourth aspect, the fluorescent cobalamins are used to determine the levels of cobalamin in blood, plasma, serum, cerebrospinal fluid or urine or to determine the amount of unbound cobalamin binding capacity in blood, plasma, serum or cerebrospinal fluid.

In a fifth aspect, any fluorescent molecule (cancer-targeted or non-targeted) can be detected in a lymph node using laparoscopic or endoscopic visualization.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the synthesis of one embodiment of the presently disclosed fluorescent cobalamin.

Figure 2 shows the synthesis of cobalamin monocarboxylic acids.

Figure 3 shows the conjugation of cobalamin carboxylic acids with 1,12-diaminododecane.

Figure 4 shows conjugation of fluorescein-5EX-NHS ester with the diaminododecane cobalamin derivative.

Figure 5 shows the fluorescence emission spectrum of fluorescein-5EX-b-cobalamin derivative CBC-123.

Figure 6 shows the synthesis of CobalaFluor Y.

Figure 7 shows fluorescence emission spectrum of CobalaFluor Y (Cy5 CobalaFluor).

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 6 -

- Figure 8 shows the immobilization of a cobalamin analog on a CM5 BIAcore chip.
- Figure 9 shows a competition assay sensorgram.
- Figure 10 shows the competition of cobalamin for TCII binding.
- 5 Figures 11A-11C show the K_d values for cobalamin, cobalamin analogs and CobalaFluors.
- Figure 12 shows tumor imaging in animal models.
- Figure 13 shows tumor imaging in neoplastic breast tissue.
- Figure 14 shows tumor imaging in neoplastic lymph node tissue.
- 10 Figure 15 is a schematic representation of a telescopic surgical device, including a video monitoring and control system.
- Figure 16 is a perspective view of a telescopic surgical device.
- Figure 17 is a perspective view of a portion of a telescopic surgical device.
- Figure 18 is a plan view of an end of a telescopic surgical device.
- 15 Figure 19 is a perspective view of surgical microscope head that includes a filter.
- Figure 20 is a perspective view of telescopic device that includes a filter.
- Figure 21 is a schematic representation of one embodiment of a light source for a telescopic surgical device.
- 20 Figure 22 shows sites for modification on the cobalamin molecule.

DETAILED DESCRIPTION OF SEVERAL EMBODIMENTS

- The disclosed surgical telescopic devices may be used to detect and remove
- 25 fluorescent, phosphorescent or luminescent material. Such material may include the molecules and compounds described herein as well as any tissue that has been labeled with fluorescent, phosphorescent or luminescent molecules or compounds. The devices can excite a biologically-targeted fluorescent molecule with light and can detect the resulting fluoresced light that is of longer wavelength than the
- 30 exciting light.

Illustrative surgical telescopic devices include, for example, an endoscope, laparoscope, arthroscope, colonoscope or microscope. The surgical telescopic

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 7 -

device has been modified to include at least one light-removing or blocking member and/or a red-light illumination source. These modifications enhance visualization of fluorescent, phosphorescent or luminescent material. According to one particular embodiment, the apparatus is a laparoscope for identifying and removing axillary lymph nodes that may or may not contain cancerous cells. An example of such a laparoscope is described below in more detail in connection with FIGS. 15-18 and 21.

As mentioned above, the apparatus includes at least one light-removing member. As used herein, "light-removing" includes, but is not limited to, any light-blocking mechanism such as absorbing, reflecting, and/or deflecting a predetermined wavelength of light. Illustrative members include a filter, prism, grating, mirror, or similar wavelength selection device. An apparatus may include more than one such member and/or a combination of such members.

Suitable filters include a notch filter, a long-pass filter or an infrared filter. According to a particular embodiment, the filter is a holographic notch filter that blocks only a very narrow wavelength that corresponds to the wavelength of the light-generating source that is used to excite the fluorescent, phosphorescent or luminescent material. A holographic notch filter appears clear when viewed by the human eye. The holographic notch filter allows for the use of color CCD cameras for visualization of the procedure without repeatedly substituting different types of filters and cameras. Holographic notch filters are well-known and are commercially available, for example, from Kaiser Optical Systems.

Long-pass or band pass filters could also be used to remove shorter wavelength light, but allow longer wavelength light to pass. Long-pass filters may be useful because light produced by the fluorescence of a molecule is shifted to a longer wavelength relative to the wavelength of the light used to illuminate the fluorophore.

The filter prevents the reflected and direct incident light from the light-generating source from distorting or obscuring the image acquired by the camera. The filter is selected to remove the wavelength of the non-white light-generating source. For example, in the case of a red light laser or laser diode with a wavelength of about 625 nm a holographic notch filter that removes only light wavelength of

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 8 -

about 625 nm is utilized. Thus, the color image obtained by the camera will not be distorted by the red light.

The light-removing member may be removably fixed in the surgical telescopic device so that a user can easily interchange between different light-removing members based on the desired viewing mode. For example, a mechanical shutter could be provided for intermittently introducing a filter in front of the camera.

The light-generating source may be any suitable device such as a laser, laser diode, a light-emitting diode, a fiber optic light source, a luminous gas discharge, a hot filament lamp, and similar light sources. According to a particular embodiment, the light-generating source generates red light such as, for example, light in a wavelength range of at least about 625 nm, particularly about 630 to about 635 nm, for the fluorescent cobalamin that includes Cy5 dye. An illustrative light-generating source is a HeNe laser that emits a red light with a wavelength of about 633 nm. The HeNe laser emits at least about 10 mW for better illumination of the tissue. A red light source can penetrate tissue up to several centimeters and is used to illuminate and identify the fluorophores and any associated cancer cells.

A white light source also may be provided allowing for more familiar full color viewing. Such full color viewing is useful for anatomical orientation within the host and for viewing on the video monitor. A dual light source that includes both the red light source (or light of any non-white color) and the white light source may be utilized to provide an easy mechanism for rapid switching between non-white light for fluorescence viewing and white light for conventional viewing. Such switching may be accomplished by any mechanism such as, for example, voice-actuated switching, a mechanically-operated switch (e.g., a foot pedal), an optically-operated switch, or an electronically-operated switch. For example, a commercially-available fiber optic dual-lamp xenon light source may be modified by replacing one of the lamps with either a red diode laser or the output of a red HeNe laser. Another variant could be a device that includes two internal light sources (one white and one non-white) and a mirror or prism under mechanical or electromechanical control to switch between the two light sources.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 9 -

The camera may be any device that can detect, capture or transmit a fluorescent, phosphorescent or luminescent image. Illustrative cameras include a video camera or a photographic film camera. According to a particular embodiment, the camera is a CCD camera. Illustrative CCD cameras include those available from Santa Barbara Instrument Group (such as their camera available under the trade designation "STV"), Stryker, and Karl Storz.

An illustrative embodiment of the apparatus is depicted in FIGS. 15, 16, and 21. Referring to FIG. 15, a surgical telescopic system 5 includes a surgical telescopic device 10 coupled to a CCD camera system 11 and to a light-generating source 12. The surgical telescopic device 10 is a rigid or flexible tubular optical instrument having a shaft 25, a distal end 14 that is inserted into an incision or opening in a patient, and a proximal end 15 that is coupled to the CCD camera system 11. The surgical telescopic device 10 may be coupled to the CCD camera system 11 by any connecting structure 13 capable of transmitting the light emitted by the illuminated tissue to CCD photosensors included in the CCD camera system 11. The connecting structure 13 is described below in more detail in connection with FIG. 17. The CCD camera system includes a camera head 16 that is mounted onto the connecting structure 13. The camera head 16 communicates via cables with a video processing module 26 that can accept national television standards committee ("NTSC") or video helical scan ("VHS") format from the video output signals generated from the CCD photosensors in the camera head 16. The CCD camera system 11 also includes a video monitor 27 for viewing and recording images during surgery and a computer 28 for controlling the video processing module 26. Other suitable CCD camera control and viewing systems may be used with the surgical telescopic device.

Referring to FIG. 16, the light-generating source 12 is connected to the surgical telescopic device 10 via a fiber optic cable 23 received in a fitting 24 that communicates with the shaft 25 of the surgical telescopic device 10. The light-generating source also may be connected to the surgical telescopic device 10 via an input opening in the camera head 16 for receiving a fiber optic cable. The light from the light-generating source 12 typically travels through an optical fiber or cable (not shown) disposed within the shaft 25 of the surgical telescopic device 10 to

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 10 -

illuminate the desired host region. Alternatively, the light-generating source 12 is not coupled to the surgical telescopic device 10 but illuminates the desired host region by independent means such as an optical fiber inserted into an incision in the host.

5 The connecting structure 13 between the camera head 16 and the proximal end 15 of the surgical telescopic device 10 may include various components. The connecting structure 13 may be a holder for the filter that is fitted to an eyepiece of the surgical telescopic device 10 and a lens of the camera head 16. FIG. 17 depicts a more detailed example of one embodiment of the connecting structure 13.

10 FIG. 21 shows one particular light source in more detail. A HeNe laser 50 emits a light beam 51 that reflects from a first mirror 52 and a second mirror 53, then is deflected by a first prism 54 through a band pass filter 55 for deflection by a second prism 56 into a dual-lamp xenon light source 57. The dual-lamp xenon light source 57 defines a first outlet 58 through which the laser light exits into the fiber optic cable 23. The dual-lamp xenon light source 57 also defines a second outlet 59 through which white light from the xenon light source exits. The first mirror 52, second mirror 53, first prism 54, band pass filter 55, and second prism 56 may be arranged on an optical table. The first mirror 52, second mirror 53, first prism 54, band pass filter 55, and second prism 56 shown in FIG. 21 dissipate the non-coherence of the particular HeNe laser 50 and may not be required with other light sources.

Referring to FIG. 17, the proximal end 15 of the surgical telescopic device 10 is provided with a contiguous eyepiece 17. A holographic notch filter 18 is disposed between the eyepiece 17 and a filter holder 19. As depicted in FIG. 18, a recess 20 may be provided in the eyepiece 17 for receiving the holographic notch filter 18. The holographic notch filter 18 typically is a circular disk but it may have any shape such as an oval, a rectangle or a square. The thickness of the holographic notch filter 18 may vary as is known in the art depending upon the desired blocking wavelength and other performance characteristics. The filter holder 19 is dimensioned so that it fits as a sleeve around the outer periphery of the eyepiece 17. The surface of the outer periphery of the eyepiece 17 and the inner surface of the filter holder 19 may be threaded for removably engaging the eyepiece 17 with the

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 11 -

filter holder 19. A focusing lens 22 is mounted to the filter holder 19. An adapter 21 (e.g., a C-mount) connects the focusing lens 22 to the CCD camera head 16 via means known in the art.

It will be appreciated that there are many other possible arrangements for locating the filter. For example, a filter may be provided between the focusing lens and the CCD camera head. Another option is to provide a filter inside the shaft of the endoscope or laparoscope. A plurality of filters may be included in a single apparatus. For example, the filter holder may hold more than one filter or a first filter may be disposed between the eyepiece and the focusing lens and a second filter may be disposed between the focusing lens and the CCD camera head. A combination of different filter types may also be used such as a combination of a notch filter, a long-pass filter and/or an infrared filter. According to one particular alternative embodiment, a first infrared filter is disposed between the eyepiece and the focusing lens, and second and third infrared filters are disposed between the focusing lens and the CCD camera head. In this embodiment, the infrared filters allow for the use of a black-and-white CCD camera that may provide better contrast for detection of the fluorophores.

Also disclosed are magnifying apparatuses that may be useful for tumor micromargin visualization. In general, such apparatuses includes a magnifying lens, an eyepiece, and a filter disposed between the host and the eyepiece of the microscope.

An example is a surgical microscope as shown in FIG. 19. The surgical microscope includes a head or housing 30 that carries two eyepieces 31. The housing 30 is supported by an articulating arm 33 that is secured to a ceiling mount (not shown). The eyepieces 31 optically communicate with a light collecting lens 32 that receives the light reflected or emitted by the object. A holographic notch filter 34 is affixed to the light collecting lens 32 by screws, clips or similar attachment means. A fiber optic bundle (not shown) may be fixed to the articulating surgical microscope head to provide the illuminating light. An intensifier screen (not shown) may be mounted to the microscope on a separate eyepiece to provide greater detection sensitivity. After tumor debulking via lumpectomy, the surgical

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 12 -

microscope may be positioned for magnified inspection of the tumor micromargins for fluorescence traces indicating remaining tumor.

Another variant of an instrument for tumor micromargin inspection is depicted in FIG. 20. This apparatus includes a CCD camera system 40 as described above, but a magnifying video lens 41 rather than an endoscope or laparoscope is mounted to the CCD camera head. An articulating positioning arm 42 supports the CCD camera 40. A holographic notch filter 43 is interposed between the CCD camera 40 and the magnifying video lens 41 or it may be affixed to the distal end of the magnifying video lens 41 by a filter holder as described above. After tumor debulking via lumpectomy, the CCD camera microscope may be positioned for magnified inspection of the tumor micromargins for fluorescence traces indicating remaining tumor.

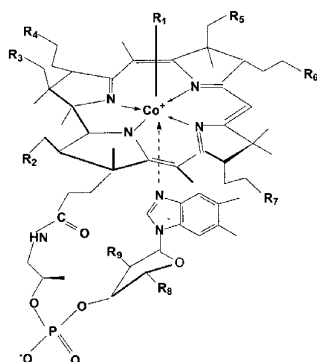
Any type of fluorescent, phosphorescent, or luminescent material could be used with the above-described devices. A particularly useful material is a fluorescent cobalamin that comprises a fluorescent compound (fluorophore), a phosphorescent compound (phosphorophore), a luminescent compound (chemiluminescent chromophore) or a light-producing compound that is covalently linked to cobalamin (vitamin B₁₂). These fluorescent cobalamins can be used as diagnostic and prognostic markers (a) to distinguish cancer cells and cancerous tissue from healthy cells and tissues, including identifying lymph nodes containing cancer cells, and (b) to determine if an individual will respond positively to chemotherapy using cobalamin-therapeutic bioconjugates.

The fluorescent cobalamins can be represented by the following formula

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 13 -



- 5 where R_1 is CN, OH, OH_2 , CH_3 , 5'-deoxyadenosine or $(CH_2)_pNHC(=S)Y$; R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , and R_7 are independently $CONH_2$ or $CO-X_mY$; R_8 is CH_2OH , $O(C=O)X_mY$ or $CH_2O(C=O)X_mY$; R_9 is OH or $O(C=O)X_mY$; X is a linker having the
- 10 formula $N(CH_2)_nNHO(C=O)$ or $NH-(CH_2)_n-NH$; Y is a fluorophore, a phosphorophore, chemiluminescent chromophore or a light-producing molecule; m is 0 or 1, n is 0-50 and p is 2-10, with the proviso that at least one of $R_1 - R_9$ groups contains Y.

The fluorescent cobalamins may be prepared by covalently attaching a fluorophore, a phosphorophore, chemiluminescent chromophore or a light-producing molecule to cobalamin. The fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule is covalently linked to the cobalt atom, to the corrin ring or to the ribose sugar directly or via a linker molecule. The covalent linkage is preferably accomplished with the use of a linker molecule. If the

15 fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 14 -

molecule is attached to the cobalt atom of cobalamin, the fluorescence, phosphorescence or emitted light is diminished in intensity through quenching by the spin of the cobalt atom. In addition, prolonged exposure of the fluorescent cobalamin to light will cleave the cobalt-carbon bond and release the fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule from cobalamin (Howard et al., 1997). Thus, it is preferred to attach the fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule to the corrin ring or the ribose moiety of the cobalamin molecule. These latter fluorescent cobalamins do not have the disadvantages of the fluorescent cobalamins in which the fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule is covalently linked to the cobalt atom.

Attachment of the fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule to a carboxylate on the corrin ring or the 5'-ribose hydroxyl group circumvents the problem of lower sensitivity and photolability. In general, corrin ring carboxylate derivatives (Collins and Hogenkamp, 1997) are known, but none of the compounds synthesized have contained a fluorescent marker. The fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule can be attached directly to the corrin ring, rather than to the cobalt atom by derivatization of the cobalamin monocarboxylate according to published methods (Collins and Hogenkamp, 1997 and references cited therein). Figure 22 shows sites on cobalamin which can be used for modification.

Although, any fluorophore, phosphorophore, chemiluminescent chromophore or light-producing molecule can be utilized in preparing the fluorescent cobalamins, it is preferred to utilize fluorophores that are excitable with visible or infrared light. It is preferred to use visible or infrared light for in vivo use of the fluorescent cobalamins. Examples of preferred fluorophores include, but are not limited to, fluorescein, fluorescein-5EX, methoxycoumarin, naphthofluorescein, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, Cascade Blue, Dansyl, Dialkylaminocoumarin, 4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, 2',7'-dichlorofluorescein, eosin, eosin F3S, erythrosin, hydroxycoumarin, lissamine

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 15 -

rhodamine B, methosycoumarin, maphthofluorescein, NBD, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, PyMPO, pyrene, rhodamine 6G, rhodamine green, rhodamin red, rhodol green, 2',4',5',7'-tetrabromosulfonefluorescein, tetramethylrhodamine (TMR), Texas Red, X-rhodamine, Cy2 dye, Cy3 dye, Cy5 dye, Cy5.5 dye, Cy7 dye, IC Green, or a quantum dot structure. The preferred fluorescent cobalamins fluoresce when excited by visible or infrared light without the need to cleave the fluorophore from the bioconjugate. The light may be provided by a laser or a fiber optic light source with an appropriate filter. Red light is preferred for better tissue penetration.

10 It has been found that there is differential uptake of fluorescent cobalamin analogues in normal and leukemic human bone marrow. The difference between normal marrow cells and leukemic myeloblasts (cancer cells) is particularly noteworthy, with no detectable cobalamin being taken up by normal cells. Bone marrow samples from healthy individuals show no fluorescent labeling. It has also
15 been found that there is uptake of a doxorubicin-cobalamin conjugate, originally synthesized as a potential chemotherapeutic compound. Cellular uptake of the doxorubicin-cobalamin conjugate can be observed in P-388 murine leukemia cells, as well as in HCT-116 human colon tumor cells. Thus, the uptake of fluorescent derivatives of cobalamin occurs in leukemia and solid tumor cell lines. These
20 results, in combination with the knowledge that all cancer cells increase cobalamin transport and storage, demonstrate the general applicability of the use of fluorescent cobalamins to distinguish cancer cells from normal cells.

Thus, the fluorescent cobalamins can be used to:

- identify cancerous tissue visually, via fluorescence microscopy, fluorescence
25 laparoscopy, fluorescence endoscopy, or flow cytometry;
- identify cancerous cells in tissue sections or samples from tissue biopsies;
- define tumor margins *in vivo*, *ex vivo* or *in situ*;
- diagnose, detect, prognose, predict or monitor cancer *in vivo*, *ex vivo* or *in situ*;
- identify metastatic cancer *in vivo*, *ex vivo* or *in situ*;
- 30 • determine the stage of cancer progression;
- identify cancer dermally or transdermally;

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 16 -

- identify metastatic cancer dermally or transdermally;
- identify cancer in lymph nodes, including in the sentinel lymph node or nodes or in an axillary lymph node or nodes, including with the use of minimally invasive techniques, such as laparoscopy or endoscopy;
- 5 • identify metastatic disease in the treatment, detection, prediction, prognostication or monitoring of cancer, such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, prostate cancer, epithelial cancer (adenocarcinoma), liver cancer, melanoma and lymphoma;
- conduct flow cytometry studies of bone marrow aspirates or peripheral blood
- 10 samples for diagnosing, predicting, prognosticating, monitoring or characterizing leukemia or lymphoma;
- predict whether a patient will respond positively to chemotherapy that is based on the use of a cobalamin-therapeutic bioconjugate;
- improve the definition of tumor micromargins in a biopsy or lumpectomy;
- 15 • decrease the chance of leaving cancerous cells behind in a biopsy, lumpectomy, or tumorectomy and thereby reduce the need for follow-up surgery to remove the remaining cancer cells.

Prediction refers to understanding the biological behavior of the tumor, and how the tumor will respond (favorably or unfavorably) to therapy. Prognosis refers

20 to the anticipated patient outcome following therapy (i.e. what is the likelihood of five- or ten-year survival following therapy). Monitoring refers to determining the success of therapy and detection of residual disease following treatment. An example is the use of a fluorescent cobalamin conjugate to test the bone marrow for the presence of myeloblasts following treatment of leukemia. Characterization

25 refers to a descriptive or quantitative classification of the type of tumor in comparison to closely related types of tumors.

The fluorescent cobalamins can be administered in accordance with customary cancer diagnostic, detection, prediction, prognostication, monitoring or

characterization methods known in the art. For example, the fluorescent cobalamins

30 can be administered intravenously, intrathecally, intratumorally, intramuscularly, intralymphatically, or so orally. Typically, an amount of the fluorescent cobalamin

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 17 -

of the present invention will be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier. The carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., oral, parenteral, intravenous, intrathecal, intratumoral, circumtumoral, and epidural. The compositions may further contain
5 antioxidizing agents, stabilizing agents, preservatives and the like. Examples of techniques and protocols can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*. The amount of fluorescent cobalamin to be administered will typically be 1-500 mg.

As shown herein, cobalamin analogs are recognized by cobalamin transport proteins, such as haptocorrin (TCI or HC), intrinsic factor (IF) or transcobalamin
10 (TCII), with high affinity. The attachment of large molecules to cobalamin does not appear to affect protein binding.

An improvement in the surgeon's ability to identify metastatic disease in lymph nodes will advance surgical therapy by preserving, e.g., healthy tissue and minimizing the number of axillary lymph nodes removed. This will improve the
15 patient's quality of life and improve morbidity and long-term mortality. Precise identification of cancer cells that have spread to lymph nodes will allow removal of only the diseased ducts and nodes, while sparing the healthy axillary nodes. With 186,000 new cases of breast cancer each year, the number of surgeries to remove primary tumors and determine the status of associated lymph nodes is significant.
20 The perfunctory removal of all axillary lymph nodes and ducts leads to local edema and increased morbidity. The non-removal of axillary lymph nodes and ducts that contain metastatic cancer cells leads to decreased survival and increased long-term mortality.

In the sentinel lymph node biopsy approach, a blue dye and/or radioactive
25 tracer are injected into the breast near the tumor. A small incision is made under the arm to look for traces of the dye or radioactivity to identify the lymph node(s) that drain the area of the breast and, as a consequence, are most likely to contain metastatic cancer cells. The above-described fluorescent cobalamin replaces the blue dye and radioisotope tracer currently used in sentinel lymph node biopsies. The
30 use of the fluorescent cobalamins enables the application of the sentinel lymph node biopsy approach to all types of cancer. In addition, the fluorescent cobalamins enable the use of minimally invasive techniques, such as laparoscopic, endoscopic

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 18 -

and microscopic techniques, in the analysis of cancer, especially the analysis of cancer cells in lymph nodes. The use of the fluorescent cobalamins will facilitate the identification and retrieval of positive lymph nodes. Thus, the fluorescent cobalamins can be used with the following cancers or cancers of: breast, skin
5 (melanoma), gynecological (ovarian, prostate, uterine, cervical, vulval, penal, testicular), head and neck (lip, tongue, mouth, pharynx), digestive organs (esophageal, stomach, small intestine, large intestine, rectum, colon, liver, pancreas), bone, connective tissue, urinary organs (bladder, kidney), eye, brain and central nervous system, endocrine glands (thyroid), lymph tissues, Hodgkin's disease,
10 non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.

In addition, the use of fluorescent cobalamins enables the use of minimally invasive techniques, such as laparoscopic and endoscopic techniques, for the identification of lymph nodes which contain cancer cells and which must be removed. The fluorescent cobalamins also may emit sufficiently bright light (e.g.,
15 bright blue in the case of CobalaFluor Y) that they can be visually detected with an unaided eye under white light. This proposed technology is designed to replace the two current methods of surgically examining the axillary lymph nodes in patients with operable breast cancer with a more accurate and less painful method. The two operations now in use are the standard axillary node dissection using a large incision
20 (approximately 5 inches) and removing all of the lower level lymph nodes (10-15). The second, and currently experimental method, is the sentinel lymph node biopsy. This method uses either a visual dye or a gamma emitter to identify the first lymph node to drain the breast. This requires a similarly large incision and a technically challenging examination of the lymphatic pathways. The presently disclosed
25 cobalamin molecules will take a photophore to the nodes with cancer. The lymph nodes are examined directly through three small incisions (3-5 mm) using laparoscopic instruments. The closed operative technique provides a dark field for laser excitation. The bright emission of stimulated light from the cobalamin-photophore conjugate in the tumor bearing lymph nodes will facilitate
30 identification and retrieval of positive lymph nodes. This method will result in less dissection, less pain and better accuracy. Similar principles apply to using the fluorescent cobalamins to detect cancer cells with endoscopic techniques.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 19 -

A further advantage of the fluorescent cobalamins is that they do not substantially pass through the lymphatic ducts. The two blue dyes conventionally used for sentinel lymph node procedures (Lymphazurine™ and methylene blue) tend to flow out of the lymphatic ducts into the surrounding tissue very quickly after they are injected into the tissue that drains the lymphatic ducts. Such leakage obscures the operative field with a generalized blue color.

Furthermore, since the fluorescent cobalamins are differentially taken up by cancer cells, these fluorescent cobalamins are an improved marker that will allow surgeons to excise cancerous tissue selectively, thereby leaving healthy tissue.

The ability of fluorescent cobalamins bound to cancer cells to be detected laparoscopically or endoscopically demonstrates that fluorescent molecules can be used to determine a sentinel lymph node laparoscopically or endoscopically. Thus, any fluorescent molecule (cancer-targeted or non-targeted) can be detected in a lymph node using laparoscopic or endoscopic visualization. As an example, a red fluorophore could be injected intratumorally as is now done in the sentinel lymph node procedure. Insufflation of the axilla would allow the surgeon to find the fluorescent node laparoscopically (through 2 small incisions) and thereby avoid the use of a non-cancer cell-specific radioactive tracer to help the surgeon find the general location of the sentinel node.

The fluorescent cobalamins offer several improvements as an intraoperative marker. These improvements include:

- The fluorescent marker will be specific for cancer cells in lymph ducts and nodes, rather than simply indicating which node is draining the tidal basin. The fluorescent marker will also distinguish cancer cells from healthy cells.
- The marker can be used in low concentrations because of the inherent sensitivity afforded by fluorescence detection. The blue dye now in use tends to obscure the active node and complicates postsurgical examination of the tissue by a pathologist. The blue dye also tends to obscure bleeding vessels, thereby complicating surgical excision of the node and subsequent wound closure. The use of a fluorescent marker should avoid these problems.
- A fluorescent marker that is specific for cancer cells will improve the false-negative rate of 12%, as is seen with the procedure as currently practiced.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 20 -

- A decreased false-negative rate would improve the acceptance of this technique by patients and surgeons. This might decrease the training time necessary (typically 30 or more cases with complete axial node dissection) for a surgeon to learn this procedure.
- 5 • The fluorescent marker enables the use of laparoscopic, endoscopic and microscopic techniques for the visualization of cancer cells. These techniques can also be used to visualize primary tumors, metastatic tumors, axillary lymph nodes, inguinal lymph nodes and cervical lymph nodes. These techniques will reduce the necessity for large incisions and technically challenging examination of lymphatic pathways in the analysis of cancer. These techniques will result in
10 less dissection, less pain and better accuracy.

The fluorescent cobalamins can also be used in a competitive binding assay to determine the concentration or amount of naturally-occurring cobalamin (hydroxocobalamin, methylcobalamin, adenosylcobalamin, or cyanocobalamin) in
15 blood, plasma, serum, or other bodily fluids. In this type of assay, a fluorescent cobalamin is used in place of radioactively-labeled cobalamin in a competitive binding assay, well known to a skilled artisan. Radioactive assays for cobalamin have been described in U.S. Patent Nos. 6,096,290; 5,614,394; 5,227,311; 5,187,107; 5,104,815; 4,680,273; 4,465,775; 4,355,018, among others, each
20 incorporated herein by reference. This assay procedure can be used to determine the amount of unsaturated cobalamin binding capacity in blood, plasma, serum, or bodily fluids, as well as the concentration of cobalamin that is bound to the proteins transcobalamin, haptocorrin, or intrinsic factor. The use of fluorescent cobalamins has a significant advantage over radioactively-labeled cobalamin in a clinical
25 chemistry binding assay because it does not require the special shipping, handling, and disposal procedures associated with radioactively-labeled cobalamin.

EXAMPLES

The following Examples are offered by way of illustration and are not
30 intended to limit the appended claims in any manner. Standard techniques well known in the art or the techniques specifically described below were utilized.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 21 -

EXAMPLE 1

Synthesis of Fluorescent Cobalamin by Attachment of the Fluorophore to Cobalt

As a visual indicator of cobalamin localization, five fluorescent analogues of cobalamin were prepared by covalently attaching fluorescein to cobalamin. Under
5 green light illumination, the fluorescein molecule emits yellow light that can be detected by the dark-adapted eye to concentrations lower than 0.1 ppm. This emission enables the sensitive detection of cancer cells via epifluorescence microscopy, as well as by visual inspection. Each of the five fluorescent cobalamins exhibited intrinsic fluorescence. All of these compounds were synthesized by
10 reacting aminopropyl chloride with cob(I)alamin to produce aminopropylcob(III)alamin in accordance with published techniques. In a subsequent step, aminopropylcob(III)alamin was reacted with a variety of fluorophore isothiocyanates (i.e. fluorescein isothiocyanate, "FITC") to produce the corresponding fluorophore that is linked to cobalamin through an aminopropyl
15 linker (i.e. fluorescein-aminopropyl-cob(III)alamin). This latter reaction is shown in Figure 1.

In a similar manner, fluorescent cobalamins were prepared in which the fluorophore is naphthofluorescein or Oregon Green. All the fluorescent cobalamins were found to retain high affinity for recombinant transcobalamin (rhTCII), thus
20 allowing for a biological distribution similar to that observed for naturally occurring cobalamin.

EXAMPLE 2

Uptake of Cobalamin Bioconjugates by Cancer Cells

25 A leukemic myeloblast preparation was made from a bone marrow aspirate of a 61-year old patient having acute myelogenous leukemia (AML) M1 (minimally mature myeloblasts in the FAB classification). Cells were treated three days post-harvest with a fluorescent cobalamin prepared as described in Example 1. Differential uptake of fluorescent cobalamin analogues, as determined by
30 fluorescence microscopy or fluorescence flow cytometry, in normal and leukemic human bone marrow cells was found. The difference between normal marrow cells and leukemic myeloblasts (cancer cells) is particularly noteworthy, with no

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 22 -

- detectable cobalamin being taken up by normal cells. A bone marrow sample from a healthy individual showed no fluorescent labeling. Uptake of a doxorubicin-cobalamin conjugate, originally synthesized as a potential chemotherapeutic compound, was seen in P-388 murine leukemia cells and in HCT-116 human colon tumor cells. These results illustrate the uptake of fluorescent derivatives of cobalamin in leukemia and solid tumor cell lines.

EXAMPLE 3

Preparation of Cyanocobalamin Monocarboxylic Acids

- The b-, d-, and e-monocarboxylic acids were prepared by acid-catalyzed hydrolysis of cyanocobalamin. See Figure 2. Briefly, cyanocobalamin (527.0 mg, 0.389 mmol) was placed into a 100 ml round bottom flask and dissolved in 40 ml of 0.5 M HCl. The flask was placed in a water bath at 50°C and stirred for 4 hours. The reaction was monitored via HPLC (Waters, Inc. 3.9 x 300mm DeltaPak 100 C-18 column) using the gradient tabulated in Table 1.

TABLE 1

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
18.0	2.0	83.7	16.3
23.0	2.0	30.0	70.0
25.0	2.0	30.0	70.0
30.0	2.0	90.0	10.0

- After 4 hours the reaction was cooled to room temperature. The pH was adjusted to 7.0 with NaOH (10%) using a pH meter. The crude material was desalted using a C-18 SepPak column (Waters, Inc. PIN WATO23635) by first rinsing the column with 10 ml methanol followed by 15 ml deionized H₂O. The crude material was applied to the column via a syringe and rinsed with 10-15 ml

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 23 -

deionized H₂O followed by elution with 10 ml methanol. The methanol was removed via rotary evaporation and a red compound was obtained (5016-12-33).

The crude reaction mixture was dissolved in minimal deionized H₂O and half of the solution was injected onto a semi-preparative HPLC (Waters, Inc.

5 25.0x300mm 100 C-18 column) using the gradient calculated in Table 2.

TABLE 2

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	40.0	90.0	10.0
4.1	40.0	90.0	10.0
37.0	40.0	83.7	16.3
47.3	40.0	30.0	70.0
51.4	40.0	30.0	70.0
61.6	40.0	90.0	10.0

10 Peaks at 28.0 minutes (b-monocarboxylic acid, CBC-195), 30.1 minutes (d-monocarboxylic acid, CBC-226) and 34.6 minutes (e-monocarboxylic acid) were collected using large test tubes. The pure fractions were diluted 1:1 with deionized H₂O and desalted in the same method above. In all cases, a red solid was obtained.

CBC-195 (b-monocarboxylic acid): In the two preparative runs, 74.8 mg of 15 the b-monocarboxylic acid (14.4 %) was isolated. A positive-ion electrospray mass spectrum (ES⁺) was obtained that shows a M+1 peak (1356) and a M+22 peak (1378) as expected. The b-monocarboxylic acid (CBC-195) was obtained in an overall yield of 14%.

CBC-226 (d-monocarboxylic acid): In the two prep. runs, 38.6 mg of the d- 20 monocarboxylic acid (7.3%) was isolated. A positive-ion electrospray mass spectrum (ES⁺) was obtained showing a M+1 peak (1356) and the corresponding M+Na peak (1378) as expected. The d-monocarboxylic acid (CBC-226) was obtained in an overall yield of 7%.

The e-monocarboxylic acid was isolated, ~78 mg in an overall yield of 14%.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 24 -

EXAMPLE 4

Conjugation of CNCbl Acids with 1, 12 Diaminododecane

5 The b- and d- amides were prepared as shown in Figure 3. CBC-195 (55.4 mg, 0.0408 mmol) was added to a small glass vial and dissolved in ~2.5 ml of DMSO followed by the addition of EDCIHC1 (12mg, 0.0626 mmol) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (25 mg, 0.217 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. From previous attempts, several equivalents of EDCI
10 and NHS (a total of 6 equivalents) were required to drive the reaction to completion. After 24 hours, one additional equivalent of EDCI was added and the reaction was complete in a total of 26 hours. The reaction was monitored via HPLC using the gradient in Table 3. CBC-195 has a retention time of 9.07 minutes and the NHS-ester of CBC-195 has a retention time of 10.55 minutes.

15

TABLE 3

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
20.0	2.0	55.0	45.0
25.0	2.0	9.0	10.0

In a separate glass vial, 1,12-diaminododecane (81.8 mg, 0.408 mmol) was
20 dissolved in ~2 ml DMSO. The above reaction mixture was added dropwise using a syringe pump at 4.0 ml/hr to minimize dimerization. The product was formed immediately and has a retention time of 14.56 minutes. The crude reaction mixture was added to 100 ml of 1:1 CH₂Cl₂:Et₂O and a red precipitate formed. The red compound was filtered using a glass frit and washed with two 20 ml portions of
25 CH₂Cl₂, two 20 ml portions of acetone, and finally by two 20 ml portions of Et₂O.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 25 -

The crude reaction product was dissolved in a minimal amount of deionized H₂O and the solution was injected onto a semi-preparative HPLC (Waters, Inc., 25.0x100mm 100 C-18 column) using the gradient calculated in Table 4.

5

TABLE 4

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	40.0	90.0	10.0
2.0	40.0	90.0	10.0
13.7	40.0	55.0	45.0
17.1	40.0	90.0	10.0

The peak at 8.70 minutes (b-amine, CBC-208) was collected using large test tubes. The pure fractions were diluted 1:1 with distilled H₂O and desalted using a C-18 SepPak column (Waters, Inc. P/N WATO23635) by first rinsing the column with 10 ml methanol followed by 15 ml deionized H₂O. The pure material was applied to the column via a syringe and rinsed with 10-15 ml deionized H₂O followed by elution with 10 ml methanol. The methanol was removed via rotary evaporation and 6 mg of a red compound was obtained.

15 CBC-208 (b-amine): A total of 6.0 mg of the b-amine was isolated. A positive-ion electrospray mass spectrum (ES⁺) was obtained that shows a M+1 peak (1538) and a M+23 peak (1560) as expected. CBC-208 was obtained in a yield of 9.5% after purification.

20 CBC-226 (d-amine): The d-monocarboxylic acid has an HPLC retention time of 9.32 minutes, the NHS-ester migrates at 10.96 minutes, and the d-amine (CBC-226) migrates at 14.93 minutes using the same HPLC gradient as in Table 3. A positive-ion electrospray mass spectrum (ES⁺) was obtained of the crude material showing a M+1 peak (1538) and the corresponding M+Na peak (1560) as expected.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 26 -

EXAMPLE 5

Conjugation of CBC-208 and Fluorescein-5EX-NHS

CBC-208 has been coupled to the fluorescein derivative fluorescein-5EX
5 (available from Molecular Probes, Inc.) according to Figure 4. CBC-208 (6.0 mg, 3.87 μ mol) was added to a small glass vial and dissolved in ~0.5 ml of DMSO followed by the addition of fluorescein-5EX-NHS (2.5 mg, 4.23 μ mol). The reaction was allowed to stir at room temperature overnight. The reaction was monitored via HPLC using the method in Table 5.

10

TABLE 5

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/NH ₃ OH)	9:1 CH ₃ CN:H ₂ O
0.0	2.0	90.0	10.0
2.0	2.0	90.0	10.0
10.0	2.0	65.0	35.0
15.0	2.0	5.0	95.0
28	2.0	90.0	10.0

The reaction proceeded very quickly initially forming the desired product
15 after only 10 minutes of contact. CBC-208 has a retention time of 11.47 minutes and the product (CBC-123) has a retention time of 14.24 minutes. With the addition of another equivalent of the fluorescein compound the reaction goes to completion and the crude mixture is 88% pure.

HPLC analysis of the starting material fluorescein-5EX-NHS shows that it is
20 only 75% pure, which explains why an additional equivalent was necessary in order to drive the reaction to completion.

CBC-123 (b-fluorescein cobalamin derivative): This compound is nearly 90% pure as the crude isolate from the synthesis, with the majority of the impurity being unreacted CBC-208. A positive-ion electrospray mass spectrum (ES⁺) was

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 27 -

obtained of the crude material showing a M+1 peak (2013) and the corresponding M+Na peak (2035). The yield before purification is 22%.

A fluorescence spectrum of this compound was taken of the crude compound before and after photolysis with excitation at 350 nm (see Figure 5). There is no significant change in fluorescence before and after photolysis suggesting that the compound is photostable and is overtly fluorescent and does not exhibit diminished fluorescence from the proximity of cobalamin.

EXAMPLE 6

10 Ex vivo Examination of Breast Tumor Tissue via Microscopy

Samples of malignant and benign tumors, including tumors of the breast, with attached normal margin tissue are excised from patients. These samples are taken with approval of the University of Utah Institutional Review Board (IRB) and the Huntsman Cancer Institute Clinical Cancer Investigation Committee (CCIC). The live tissue samples are incubated with one of the fluorescent cobalamin derivatives prepared above for 4-6 hours. Thin tissue sections of each sample are prepared with a cryomicrotome and the amount of fluorescent marker is quantified in normal and cancerous tissue by epifluorescence microscopy. Corresponding tissue sections are stained with hematoxylin/eosin (H&E) stain for evaluation by an anatomical pathologist. The interface between normal and cancerous cells is examined carefully. Cells from the interior of the tumor are also examined for uptake of fluorescent marker, since cells within hypoxic regions of a tumor often have decreased metabolism.

More specifically, Minimum Essential Medium, alpha modification (α-MEM; 7.5% newborn calf serum, 2.5% fetal bovine serum, 0.2% nystatin, 2.5% penicillin/streptomycin, pH7.2; Sigma) was prepared and aliquoted (10 mL) into sterile 25 mL screw top tissue culture flasks. The media was brought to 37°C, and tissue samples were incubated with fluorescently labeled cobalamins (50 nM; cobalamin-Oregon Green and cobalamin-naphthofluorescein conjugates of Example 1 and cobalamin-fluorescein conjugate of Example 5) and recombinant human TCII (50 pM) in α-MEM for 3 hours. Human breast tissue samples were procured under an IRM-approved protocol. The tissue was removed from the flask, washed with

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 28 -

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma), and mounted on a brass plate at -20°C with OCT compound (Shandon) for frozen section slicing. Tissue was sliced (4-6 µm sections) in a CTD Harris cryostat at -20°C. Thin tissue sections were pulled back with a small artist brush and fixed to a microscope slide with 100% ethanol. Slides were stained using a standard hematoxylin staining procedure: 95% ethanol, 20 seconds; water, 5 seconds; hematoxylin (Fisher), 45 seconds; water, 5 seconds; bluing solution (tap water), 10 seconds; 95% ethanol, 10 seconds; 100% ethanol, 10 seconds; xylene, 10 seconds; and xylene, 10 seconds. Slides were evaluated by phase contrast and epifluorescence microscopy at 10x, 60x and 100x magnification.

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium thiazolyl bromide (MTT; Sigma) was used to qualitatively determine the metabolic competency of the tissue after 3 hours incubation time with fluorescent cobalamin. A portion of the tissue was removed from the media, washed with DPBS, and immersed in MTT (2 mL; 2.5 mg/mL). This tissue was incubated for 3 hours under a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. During this incubation period, viable cells in the tissue sample reduced the MTT dye to purple formazan by succinate dehydrogenase activity (Cells and Celis, 1998). The tissue was washed with DPBS and prepared according to the cryomicrotome procedure outlined above to ensure the metabolic competency of the tissue.

The fluorescent cobalamin bioconjugates accumulated to some extent in both neoplastic and healthy breast tissue, with the neoplastic breast tissue sequestering more fluorescent cobalamin than healthy breast tissue. The amount of fluorescent cobalamin sequestered by healthy breast tissue is larger than expected, but it is believed that it is due to non-specific binding to structures within connective tissue rather than to significant internalization by healthy cells.

EXAMPLE 7

Ex vivo Examination of Cancer Cells in Lymph Nodes

Excised lymph nodes with metastatic disease are removed from patients and incubated for 4-8 hours with one of the fluorescent cobalamin derivatives prepared above. Each lymph node is sectioned and examined microscopically for transport of

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 29 -

the fluorescent cobalamin into cancer cells. This experiment showed the ability of metastatic cells within lymph nodes to take up sufficient fluorescent cobalamin for imaging and visualization.

5

EXAMPLE 8

Use of Fluorescent Cobalamin to determine whether a patient will respond favorably to chemotherapy with a cobalamin-based therapeutic bioconjugate

A bone marrow aspirate or a peripheral blood sample from a patient with leukemia is incubated with a fluorescent cobalamin conjugate. After 4-8 hours, bone marrow aspirate or peripheral blood sample is washed to remove unincorporated fluorescent label and the cell sample subjected to qualitative or quantitative fluorescence analysis by epifluorescence microscopy or flow cytometry. Cells that have taken up a significant amount of fluorescent cobalamin exhibit a brighter fluorescence. The uptake of a significant amount of fluorescent cobalamin indicates that the type of leukemia the patient has will respond favorably to treatment with a cobalamin-based therapeutic. A bone marrow aspirate or a peripheral blood sample that does not show significant fluorescence after treatment with a fluorescent cobalamin conjugate indicates that the patient will not respond favorably to a cobalamin-based therapeutic conjugate. A similar approach can be applied to solid tumors. In this case, a portion of the excised tumor tissue is incubated with the fluorescent cobalamin conjugate and, after about 4-8 hours, fluorescence in the tumor tissue is quantified. The greater fluorescence exhibited by the tumor tissue, the greater the likelihood that the cancer will respond favorably to treatment with a cobalamin-based chemotherapeutic.

25

EXAMPLE 9

Synthesis of CobalaFluor Y

General Desalting Procedure. All cobalamins were desalted with a 10 g C-18 SepPak (Waters, Inc.) by conditioning the cartridge with two column volumes of methanol and three column volumes of deionized water. The cobalamin was applied to the column, washed with three column volumes of deionized water, and

30

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 30 -

eluted with methanol (10 mL). The methanol was removed via rotary evaporation and the product was dried by lyophilization.

Preparation of cyanocobalamin-b-monocarboxylic acid. Cyanocobalamin-*b*-monocarboxylic acid was prepared according to a modified published protocol (Anton et al., 1980). In brief, CNCbl (3.5 g, 2.6 mmol) was dissolved in 350 mL of 1.0 M HCl. The reaction was heated to 37° C for 4 hours and monitored via reverse phase HPLC. The crude material was desalted and could then be purified via semi-prep HPLC. However, since the crude reaction mixture contained over 45% cyanocobalamin (via HPLC) an ion exchange column was used to separate the unreacted cyanocobalamin. Crude material was dissolved in ddH₂O and applied to a 2.5 x 30 cm Dowex AG-X1 (acetate form) column. CNCbl was eluted from the column with deionized water. The three monocarboxylic acids were then eluted with 0.04 M sodium acetate (pH 4) and were further purified via semi-preparative HPLC. The *b*-monocarboxylic acid was isolated (10% overall yield) in 97 % purity by analytical HPLC; ES⁺ MS: (1:1 H₂O:CH₃CN) M+H = 1356.3 (calc. C₆₃H₈₈CoN₁₃O₁₅P = 1356.5), M+Na⁺ = 1378.4 (calc. C₆₃H₈₈CoN₁₃O₁₅PNa = 1378.5). Both the *d*- and *e*-monocarboxylic acids were also isolated in 4% and 7% overall yields respectively.

Analytical HPLC method for cyanocobalamin-b-monocarboxylic acid:

Analytical chromatography was carried out at a flow rate of 2 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 300 x 3.9 mm column. After an initial 2 minute isocratic flow of 90% solution A (0.05 M phosphate buffer, pH 3.0) and 10% solution B (9:1 acetonitrile and water), a 16 minute linear gradient to 83.7% A and 16.3% B eluted the desired *b*-monocarboxylic derivative with a retention time of 15.7 minutes. The *d*-monocarboxylic acid had a retention time of 16.9 minutes and the *e*-monocarboxylic acid had a retention time of 19.5 minutes.

Semi-preparative HPLC for cyanocobalamin-b-monocarboxylic acid:

Chromatography was carried out at a flow rate of 40 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 2.5 x 30 cm semi-preparative column. After a 4.1 minute isocratic flow of 90% solution A (0.05 M phosphate buffer pH 3.0) and 10% solution B (9:1 acetonitrile and water), a 32.9 minute linear gradient to 83.7% A and 16.3% B eluted the cobalamin derivative. The retention times of the three CNCbl-monocarboxylic

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 31 -

acids were as follows: the b-monocarboxylic acid eluted at 23.1 minutes, the d-monocarboxylic acid at 26.6 minutes and the e-monocarboxylic acid at 32.1 minutes.

- Synthesis of cyanocobalamin-b-(5-aminopentylamide).* Cyanocobalamin-b-monocarboxylic acid 1 (50 mg, 0.037 mmol) was dissolved in a dry 10 mL round bottom flask with EDCI (71 mg, 0.37 mmol) and NHS (25 mg, 0.22 mmol). The flask was degassed by flushing with nitrogen for 5 minutes. Dimethylsulfoxide (5 mL) was added via syringe and the reaction mixture stirred for 6 hours. This mixture was removed from the round bottom flask using a gas-tight syringe, and 1,5-diaminopentane (43 μ L, 0.37 mmol) was placed in the flask. The Cbl mixture was added dropwise to the 1,5-diaminopentane over a period of 5 minutes to minimize formation of 2: 1 adduct. Reverse phase HPLC was used to monitor the reaction. When starting material was consumed, a solution of 1:1 CH_2Cl_2 :diethylether (60 mL) precipitated the cobalamins. The resultant solid was filtered on a medium frit filter, washed with diethylether (2 x 10 mL), and eluted from the filter with methanol. The crude mixture was diluted with an equal volume of water and injected onto a semi-preparative column to purify the cyanocobalamin-b-(5-aminopentylamide) 2. A fraction containing the desired product was desalted as described above and dried by rotary evaporation. Cyanocobalamin-b-(5-aminopentylamide) was obtained: 70% yield; 98% pure by analytical HPLC; ES^+ MS: (1:1 $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$) $\text{M}+\text{H} = 1440.5$ (calc. $\text{C}_{68}\text{H}_{100}\text{CoN}_{15}\text{O}_{14}\text{P} = 1440.7$), $\text{M}+\text{Na}^+ = 1462.4$ (calc. $\text{C}_{68}\text{H}_{100}\text{CoN}_{15}\text{O}_{14}\text{PNa} = 1462.6$); $\epsilon_{362\text{nm}} = 19500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in H_2O .

- Analytical HPLC method for cyanocobalamin-b-(5-aminopentylamide) 2:* Analytical chromatography was carried out at a flow rate of 2 mL/min on a Waters DeltaPak C-18 300 x 3.9 mm column. After a 2 minute isocratic flow of 95% solution A (0.05 M phosphate buffer, pH 3.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water), a 16.4 minute linear gradient to 70% A and 30% B eluted the compound of interest at 11.8 minutes.

- Semi-preparative HPLC for cyanocobalamin-b-(5-aminopentylamide) 2:* Semi-preparative chromatography was carried out at 40 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 25 x 30 cm semi-preparative column. After an isocratic flow of 95%

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 32 -

solution A (0.05 M phosphate buffer pH 3.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water) for 4.1 minutes, an 18 minute linear gradient to 70% A and 30% B eluted the desired product.

Synthesis of CobalaFluor Y (Cy5-Cobalamin = Cy5-Cbl = Cy5

- 5 *CobalaFluor*). This synthesis is shown in Figure 6. Briefly, cyanocobalamin-ribose-5'-O-(6-aminohexylamide) was prepared using cyanocobalamin (Sigma Chemical Co.) according to a published protocol (McEwan et al., 1999). Cobalamins were precipitated using 2:1 diethylether:methylene chloride (50 mL) and also washed with this solvent mixture (2 x 10 mL). The
- 10 reaction was monitored and the product purified via reverse phase HPLC. The product was desalted according to standard procedure. Cyanocobalamin-ribose-5'-O-(6-aminohexylamide) (20 mg, 0.013 mmol) was placed in a dry 10 mL round bottom flask and degassed by flushing with nitrogen for 5 minutes. Dimethylsulfoxide (1 mL) was added via syringe to dissolve the
- 15 cobalamin. Cy5 succinimidyl ester (10 mg, 0.013 mmol; Amersham Pharmacia) and DIPEA (15 μ L, 0.13) were added to the flask and the reaction mixture stirred for 1 hour. Reverse phase HPLC was used to monitor the reaction. When starting material was consumed, a solution of 2:1 diethylether:CH₂Cl₂ (50 mL) precipitated the cobalamins. The resultant solid was filtered on a fine frit filter, washed with the
- 20 diethylether and CH₂Cl₂ mixture (2 x 10 mL), and eluted from the filter with methanol. The crude mixture was injected onto a semi-preparative column to purify CobalaFluor Y and desalted according to standard procedure. Figure 7 shows fluorescence emission spectrum of CobalaFluor Y.

Analytical HPLC method for

- 25 *cyanocobalamin-ribose-5'-O-(6-aminohexylamide)*: Analytical chromatography was carried out at a flow rate of 2 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 300 x 3.9 mm column. After an initial 2 minute isocratic flow of 95% solution A (0.05 M phosphate buffer, pH 3.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water), an 18 minute linear gradient to 70% A and 30% B eluted the desired
- 30 *cyanocobalamin-ribose-5'-O-(6-aminohexylamide)* with a retention time of 12.5 minutes.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 33 -

Semi-preparative HPLC for cyanocobalamin-ribose-5'-O-(6-aminohexylamide): Chromatography was carried out at a flow rate of 40 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 2.5 x 30 cm semi-preparative column. After a 4.1 minute isocratic flow of 95% solution A (0.05 M phosphate buffer pH 3.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water), a 27.4 minute linear gradient to 70% A and 30% B eluted the cobalamin derivative. The retention time of the desired cyanocobalamin-ribose-5'-O- (6-aminohexylamide) was 15.5 minutes.

Analytical HPLC method for CobalaFluor Y: Analytical chromatography was carried out at a flow rate of 2 mL/min on a Waters DeltaPak C-18 300 x 3.9 mm column. After a 2 minute isocratic flow of 95% solution A (0.01 M TEA buffer, pH 7.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water), a 16.4 minute linear gradient to 45% A and 55% B eluted CobalaFluor Y at 13.6 minutes.

Semi-preparative HPLC for CobalaFluor Y: Semi-preparative chromatography was carried out at 20 mL/min using a Waters DeltaPak C-18 25 x 30 cm semi-preparative column. After an isocratic flow of 95% solution A (0.01 M TEA buffer, pH 7.0) and 5% solution B (9:1 acetonitrile and water) for 2 minutes a 27.4 minute linear gradient to 70% A and 30% D eluted the desired product at 12.2 minutes.

EXAMPLE 10

Competition Assay

Materials. Cobalamins, porcine non-intrinsic factor (50:1 mixture of HC and IF), and porcine intrinsic factor were purchased from Sigma Chemical Co. HPLC traces were obtained using a Waters Delta 600 system equipped with a Waters 2487 dual wavelength absorbance detector. BIACORE 2000 and 3000 (BIACORE AB) instruments were used for surface plasmon resonance biosensor analysis.

Immobilization of CNCbl-b-(5-aminopentylamide). All SPR studies were carried out on a BIACORE 2000 optical biosensor. Carboxymethyl dextran surfaces in the flow cells of a standard CM5 sensor chip (BIACORE AB) were activated by flowing a mixture of 0.1 M EDCI and 0.025 M NHS at 37°C through the chip at 20

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 34 -

5 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 15 minutes. CNCbl-*b*-(5-aminopentylamide) **2**, diluted in 10 mM sodium acetate at pH 4.5, was immobilized on three flow cells of the chip as shown in Figure 8. High density sensor surfaces (500-700 RU) were created by pulsing the Cbl analog over the flow cells for 40 minutes at a rate of 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. The remaining

10 binding sites on the surface of the chip in all four flow cells were blocked with 1.0 M ethanolamine, pH 8.5, for 16 minutes at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Flow cell 3 was used as a reference surface to subtract non-specific binding and instrument noise.

Protein Standard Curve. All standard curve and competition assays were performed using HBS running buffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.5, 3.4

15 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, and 0.005% P20 surfactant) at 30°C. Calibration curves for rhTCII, NIF, and IF binding CNCbl-*b*-(5-aminopentylamide) were generated as follows. Stock solutions of each protein (15.6-500 pM) diluted in HBS buffer were injected through the flow cells at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 10 minutes to analyze binding. The bound protein was removed with 8 M urea, 0.125% SDS, and running buffer. Each

20 protein sample was analyzed in duplicate.

Determination of the Apparent Solution Equilibrium Dissociation Constants. The binding of rhTCII, NIF, and IF to various cobalamin analogs were analyzed by a solution competition binding assay (Nieba et al., 1996). Analog concentrations ranging from 0.01-100 nM were incubated in equal volume with 200 pM rhTCII,

25 200 pM NIF, or 500 pM IF. Binding data were generated by injecting an aliquot of the competing Cbl analog and protein at a rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 10 minutes at 30°C, and the surface was regenerated with pulses of 8 M urea, 0.125% SDS, and buffer. The competition assay for each cobalamin was performed in duplicate.

Data Analysis. Biosensor data were prepared for analysis by subtracting the

30 binding responses observed from the reference surface and subtracting an average of three blank injections (Myszka, 1999). Data from the competition assays were fitted with non-linear least squares regression analysis supplied with BLAevaluations 3.0 software. Figure 9 shows the competition assay sensogram. Figure 10 shows the competition of cobalamin for TCII binding. The binding data is shown in Figures 11A-11C. These results demonstrate that cobalamin analogs are recognized by cobalamin transport proteins (transcobalamin, haptocorrin and intrinsic factor) with high affinity. This recognition has also been shown by surface plasmon resonance.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 35 -

The attachment of large molecules to cobalamin does not appear to affect protein binding.

EXAMPLE 11

5 Animal Model Study

In Vivo Uptake in Mice with Tumors. Tumors are implanted in mice by implanting 1×10^6 RD995 tumor cells subcutaneously on the right hind leg of female mice. The mouse tumor cell line was propagated *in vitro*. Six weeks after implantation of the cells, a 10 mm tumor was visible. At this time, the mice were
10 given a retro-orbital intravenous injection of 2.2 μ g of CobalaFluor Y dissolved in sterile saline. At 6 hours post-injection, the mouse was sedated with the inhalation halothane. The tumor was sliced open and irradiated with a 633 nm HeNe laser. A tumor on a mouse was also analyzed at 54 hours post-injection of CobalaFluor Y using the HeNe laser. The mice were dissected so internal organs and healthy tissue
15 could be analyzed. The results are shown in Figure 12, which demonstrates that fluorescently labeled cobalamin localizes in tumor tissue in mice.

EXAMPLE 12

20 Tissue Uptake Study

Fluorescent cobalamin uptake. Minimum Essential Medium, alpha modification (α -MEM; 7.5 % newborn calf serum, 2.5% fetal bovine serum, 0.2% nystatin, 2.5% penicillin/streptomycin, pH 7.2; Sigma) was prepared and aliquoted (10 mL) into sterile 25 mL as screw top tissue culture flasks. The media was brought to 37°C, and tissue samples (neoplastic breast tissue, healthy breast tissue,
25 neoplastic lymph node tissue and healthy lymph node tissue) were incubated with fluorescently labeled cobalamins (10 pM), cyanocobalamin (1 nM) and in α -MEM for 3 hours. Human tissue samples were procured under an IRB-approved protocol. The tissue was removed from the flask, washed with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma), and mounted on a brass plate at -20°C with OCT compound
30 (Shandon) for frozen section slicing. Tissue was sliced (4-6 11m sections) in a CTD Harris cryostat at -20°C. Thin tissue sections were pulled back with a small artist brush and fixed to a microscope slide with 100% ethanol. Slides were stained using

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 36 -

a standard hematoxylin staining procedure: 95% ethanol, 20 seconds; water, 5 seconds; hematoxylin (Fisher), 45 seconds; water, 5 seconds; bluing solution (tap water), 10 seconds; 95% ethanol, 10 seconds; 100% ethanol, 10 seconds; xylene, 10 seconds; and xylene, 10 seconds. Slides were evaluated by phase contrast and

5 epifluorescence microscopy at 10x, 60x, and 100x magnification. Tumor imaging in (a) neoplastic breast tissue is shown in Figure 13 and (b) neoplastic lymph node tissue is shown in Figure 14.

Cell viability and tissue metabolic activity assay.

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium thiazolyl bromide

10 (MTT; Sigma) was used to qualitatively determine the metabolic competency of the tissue after 3 hours incubation time with fluorescent cobalamin. A portion of the tissue was removed from the media, washed with DPBS, and immersed in MTT (2 mL; 2.5 mg/mL). This tissue was incubated for 3 hours under a 5% CO₂

15 atmosphere at 37°C. During this incubation period, viable cells in the tissue sample reduced the MTT dye to purple formazan by succinate dehydrogenase activity. The tissue was washed with DPBS and prepared according to the cryomicrotome procedure outlined above to ensure the metabolic competency of the tissue. It was found that in vitro both healthy and neoplastic tissue take up fluorescent

20 cobalamins.

EXAMPLE 13

Use of surgical telescopic device in pig surgery

A surgical use of the device for identifying lymph tissue that drains an anatomical region and/or identifying malignant cells was illustrated in a pig surgery.

25 The inguinal node area was used due to familiarity with the anatomy from a previous open dissection. A 10 mm trocar was inserted into the subcutaneous layer of the groin and the region was insufflated with carbon dioxide at a pressure of 15 mm Hg. Two 5 mm trocars were inserted for dissection instruments. The lymph node region and the route of the principal lymphatic drainage from the lower

30 extremity were exposed using sharp and blunt dissection with the laparoscope shown in FIGS. 15-18. CobalaFluor Y (1.5 mg/mL in a one mL volume) was injected into the subcutaneous layer near the principal lymphatic drainage.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 37 -

CobalaFluor Y was identified within 2 to 5 minutes with the laparoscope shown in FIGS. 15-18 in the lymphatic trunks and the sentinel node visually by white light and by fluorescence stimulated by red laser light having a wavelength of 633 nm.

5

EXAMPLE 14

Use of device in other surgeries

The disclosed method and/or apparatus may be used similarly to that described in Example 13 in a variety of surgeries to identify lymph nodes and vessels that drain a particular anatomical region and/or neoplastic tissue that has not been surgically removed. In particular, the field of interest may be an excised area, such as tissue from which a neoplasm is to be or has been removed. For example, the anatomical region of interest may be injected or infused with the fluorescent cobalamin to identify the tumor and/or lymph nodes draining the *situs* of the tumor. The amount of injected fluorescent cobalamin can vary widely, but one particular range is about 10 mL/min to about 100 mL/min. The tumor and/or lymph nodes are then excised following known surgical procedures, and a surgical telescope (such as one of the devices disclosed in this specification) is positioned for magnified inspection of the tumor micromargins. Since the fluorescent cobalamin has a selective affinity for neoplastic cells, the presence of the fluorescent cobalamin in the surgical margins of the excised tissue indicates that additional marginal tissue should be removed, until the presence of fluorescing tissue or cells is no longer detected.

25

It will be appreciated that the methods and compositions of the instant disclosure can be incorporated in the form of a variety of embodiments, only a few of which are disclosed herein. It will be apparent to the artisan that other embodiments exist and do not depart from the spirit of the disclosure. Thus, the described embodiments are illustrative and should not be construed as restrictive.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 38 -

LIST OF REFERENCES

- 5 Cannel, R. (1975). "Extreme Elevation of Serum Transcobalamin I in Patients with Metastatic Cancer." *New Engl. J. Med.* 292:282-284.
- Celis, A. and Celis, J.E. (1998). *Cell Biology*, pp. 9-11.
- 10 Collins, D. A. and Hogenkamp, H. P. C. (1997). "Transcobalamin II Receptor Imaging via Radiolabeled Diethylene-Triaminepentaacetate Cobalamin Analogs." *J. Nucl. Med.* 38:717-723.
- 15 Collins, D.A. et al. (1999). "Tumor Imaging via Indium-111-Labeled DTPA-Adenosylcobalamin." *Mayo Clinic Proceedings* 74: 687-691.
- 20 Collins, D.A. et al. (2000). "Biodistribution of Radiolabeled Adenosylcobalamin in Patients Diagnosed with Various Malignancies." *Mayo Clinic Proceedings* 75:568-580.
- Flodh, H. (1968). "Accumulation of labelled Vitamin B-12 in Some Transplanted Tumors." *Acta Radiol. Suppl.* 284:55-60.
- 25 Hogenkamp, H. P. C., et al. (1999). "The Pharmacological Uses of Cobalamin Bioconjugates." In *The Chemistry and Biochemistry of B-12*, Banerjee, R., Ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 385-410.
- Howard, W.A. et al. (1997). "Sonolysis Promotes Indirect C-Co Bond Cleavage of Alkylcob(III)alamins." *Bioconj. Chem.* 8:498-502.
- 30 McGreevy, J. M. (1998). "Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer." *Curr. Surg* 55:301-4.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 39 -

- Mitchell, A. M. et al. (1999). "Targeting Leukemia Cells with Cobalamin Bioconjugates" In *Enzymatic Mechanisms*, Frey, P. A.; Northrop, D. B., Eds., pp 150-154.
- 5
- McMasters, K. M. et al. (1999). "Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer -- Not yet the Standard of Care." *New England J. Med.* 339:990.
- Morton, D. L. et al. (1992). "Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma." *Arch. Surg* 127:392-9.
- 10
- Rachmilewitz, B. et al. (1971), "Serum Transcobalamin in Myeloid Leukemia." *J. Lab. Clin. Med.* 78:275.
- 15
- Schneider, Z. and Stroinski, A. (1987). *Comprehensive B₁₂*, de Gmyter, Berlin, pp. 358.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 40 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An apparatus for detecting and imaging fluorescent, phosphorescent or luminescent material in a host, comprising:
 - 5 (a) a light-generating source that illuminates the fluorescent, phosphorescent or luminescent material;
 - (b) a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end;
 - (c) a focusing lens having a first end positioned adjacent to the proximal end of the surgical telescopic device;
 - 10 (d) a camera coupled to a second end of the focusing lens; and
 - (e) at least one member interposed between the proximal end of the surgical telescopic device and the camera, wherein the member removes at least a portion of the wavelength transmitted by the light-generating source.
- 15 2. The apparatus of claim 1, wherein the member is selected from at least one of a filter, prism, grating, and mirror.
3. The apparatus of claim 1, wherein the member is a holographic notch filter.
- 20 4. The apparatus of claim 3, further comprising at least one second filter disposed between the surgical telescopic device and the camera.
5. The apparatus of claim 1, wherein the surgical telescopic device
- 25 comprises an endoscope, laparoscope, or microscope.
6. The apparatus of claim 1, wherein the surgical telescopic device comprises a laparoscope.
- 30 7. The apparatus of claim 1, wherein the camera comprises a charge-coupled device camera.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 41 -

8. An apparatus for detecting and imaging fluorescent, phosphorescent or luminescent material in a host, comprising:
- 5 (a) a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end;
(b) a camera coupled to the proximal end of the surgical telescopic device;
and
(c) a holographic notch filter interposed between the camera and the proximal end of the surgical telescopic device.
- 10 9. The apparatus of claim 8, further comprising a focusing lens having a first end positioned adjacent to the proximal end of the surgical telescopic device.
- 15 10. The apparatus of claim 8, further comprising a light-generating source that illuminates the fluorescent, phosphorescent or luminescent material.
11. The apparatus of claim 10, wherein the light-generating source is selected from a laser, a laser diode, a light-emitting diode, a fiber optic, a luminous gas discharge, or a hot filament lamp.
- 20 12. The apparatus of claim 1, wherein the light-generating source is selected from a laser, a laser diode, a light-emitting diode, a fiber optic, a luminous gas discharge, or a hot filament lamp.
- 25 13. The apparatus of claim 10, wherein the holographic notch filter blocks substantially only the wavelength of the light-generating source.
14. The apparatus of claim 1, wherein the member comprises a notch filter.
- 30 15. The apparatus of claim 8, further comprising a red-light-generating laser or laser diode optically coupled to the surgical telescopic device and wherein the

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 42 -

holographic notch filter deflects substantially only the wavelength transmitted by the red-light-generating laser or laser diode.

16. The apparatus of claim 10, wherein the light-generating source
5 comprises a white light source and a non-white light source.

17. The apparatus of claim 1, wherein the light-generating source comprises a white light source and a non-white light source.

10 18. An apparatus for detecting fluorescent, phosphorescent or luminescent material in a host, comprising:
(a) a housing that includes a magnifying lens;
(b) a holographic notch filter interposed between the magnifying lens and the host; and
15 (c) a light-generating source for illuminating the fluorescent, phosphorescent or luminescent material.

19. An apparatus according to claim 18, further comprising a camera.

20 20. An apparatus according to claim 19, wherein the camera comprises a charge-coupled device camera.

21. The apparatus of claim 12, wherein the light-generating source
comprises a laser or laser diode that generates light of a wavelength of about 630 nm
25 to about 635 nm.

22. The apparatus of claim 15, wherein the light-generating source generates light of a wavelength of about 630 nm to about 635 nm.

30 23. The apparatus of claim 1, wherein the member comprises an infrared filter.

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 43 -

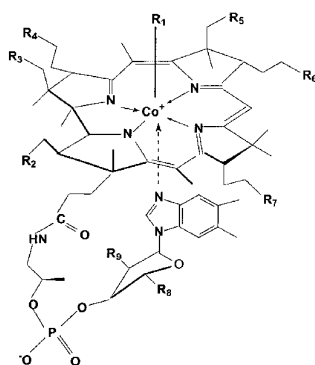
24. A method for detecting fluorescent, phosphorescent or luminescent material in a host, comprising:
illuminating the material with non-white light; and
5 detecting the emitted fluorescence, phosphorescence or luminescence with a surgical telescopic device that includes at least one member that removes substantially only the wavelength of the non-white light.
25. The method of claim 24, further comprising imaging the material with a
10 camera that is coupled to the surgical telescopic device.
26. The method of claim 24, wherein the surgical telescopic device comprises an endoscope or laparoscope.
- 15 27. The method of claim 24, further comprising alternately illuminating the material with white light and non-white light.
28. The method of claim 24, wherein the member is selected from at least one of a filter, prism, grating, and mirror.
20
29. The method of claim 24, wherein the member is a holographic notch filter.
30. The method of claim 24, wherein the camera comprises a charge-
25 coupled device camera.
31. The method of claim 27, wherein a voice-actuated switch, a mechanical switch, an optical switch, or an electronic switch is employed for alternately illuminating the material.
30

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 44 -

32. The method of claim 24, further comprising removing the fluorescent, phosphorescent or luminescent material from the host with the surgical telescopic device.
- 5 33. A method for identifying cancer tissue or tissue containing atypical cells of an individual, comprising:
 contacting a fluorescent cobalamin with tissue suspected of being cancerous or containing atypical cells, wherein the fluorescent cobalamin has a structure represented by the general formula



10

- where R_1 is CN, OH, OH_2 , CH_3 , 5'-deoxyadenosine or $(CH_2)_pNHC(=S)Y$; R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , and R_7 are independently $CONH_2$ or $CO-X_mY$; R_8 is CH_2OH , $O(C=O)X_mY$ or $CH_2O(C=O)X_mY$; R_9 is OH or $O(C=O)X_mY$; X is a linker having the formula $N(CH_2)_nNHO(C=O)$ or $NH-(CH_2)_n-NH$; Y is a fluorophore, a phosphorophore, chemiluminescent chromophore or a light-producing molecule; m is 0 or 1, n is 0-50 and p is 2-10, with the proviso that at least one of R_1 - R_9 groups contains Y;
- 15

WO 02/074339

PCT/US02/07699

- 45 -

illuminating the tissue; and
detecting the emitted fluorescence, phosphorescence or luminescence with an
endoscope, laparoscope, arthroscope or colonoscope.

5 34. The method of claim 33, wherein the tissue is illuminated with a red
light-generating source.

 35. The method of claim 33, further comprising imaging the tissue with a
charge-coupled-device camera.

10 36. The method of claim 33, wherein the tissue suspected of being cancerous
or containing atypical cells fluoresces, phosphoresces, or luminesces, the method
further comprising removing the tissue suspected of being cancerous or containing
atypical cells from the host with the endoscope, laparoscope, arthroscope or
15 colonoscope.

 37. The method of claim 34, wherein the endoscope, laparoscope,
arthroscope or colonoscope comprises at least one member that removes
substantially only the wavelength of the red light-generating source.

20

WO 02/074339

PCT/US02/07699

1/20

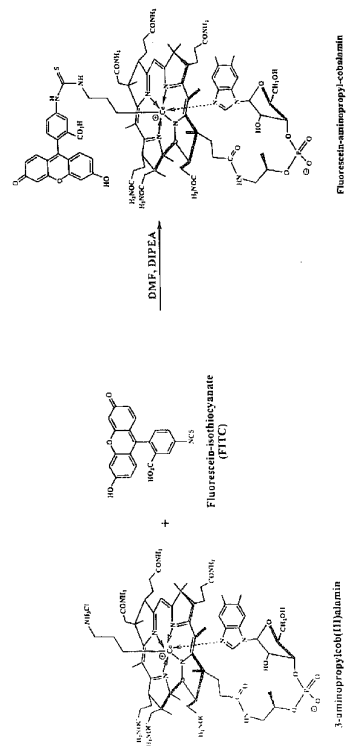


FIG. 1

WO 02/074339

PCT/US02/07699

2/20

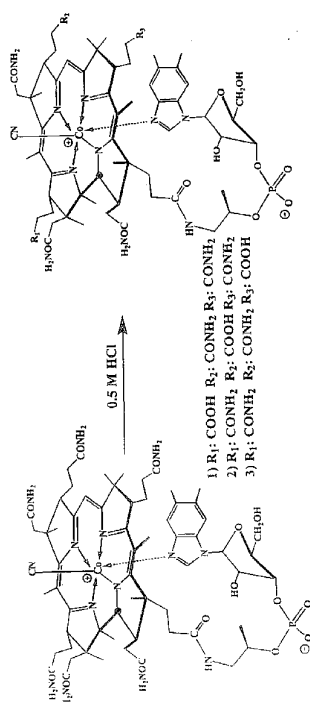


FIG. 2

WO 02/074339

PCT/US02/07699

3/20

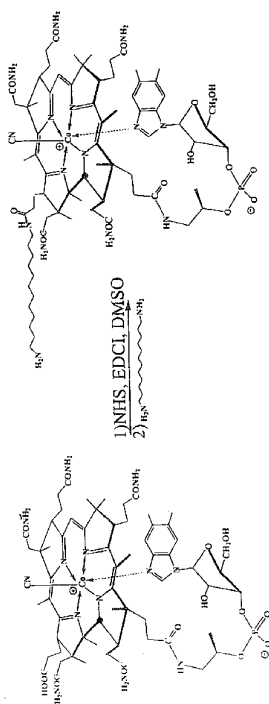


FIG. 3

WO 02/074339

PCT/US02/07699

4/20

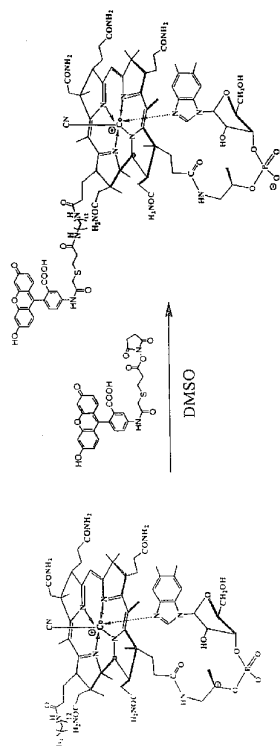


FIG. 4

WO 02/074339

PCT/US02/07699

5/20

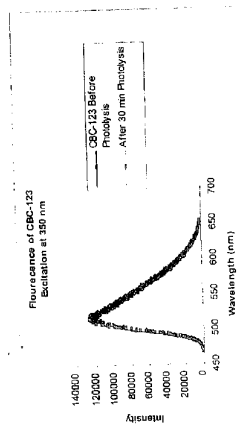


FIG. 5

WO 02/074339

PCT/US02/07699

6/20

Synthesis of Cy5 CobalalFluor

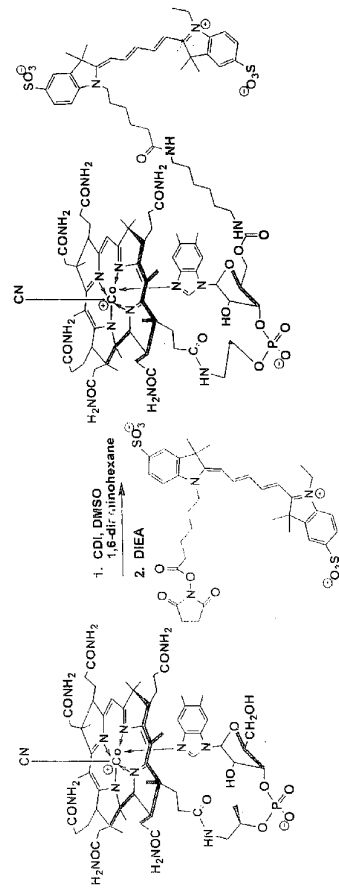


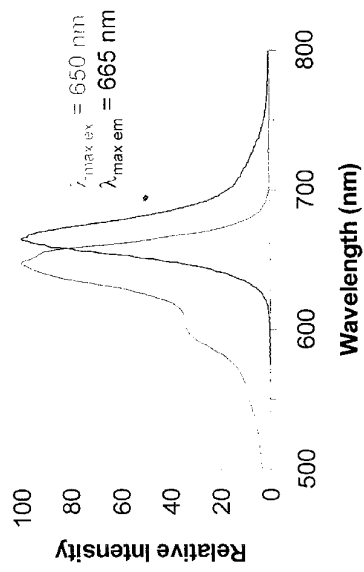
FIG. 6

WO 02/074339

PCT/US02/07699

7/20

Cy5 CobalaFluor



Advantages to Other CobalaFluors

- Red shifted dye
- Not as sensitive to pH changes as other fluorophores
- Highly water soluble

FIG. 7

WO 02/074339

PCT/US02/07699

8/20

Immobilization of Analog on CM5 BIAcore Chip

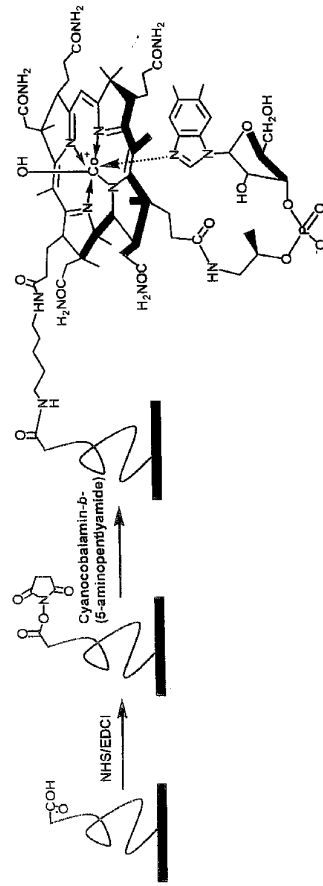


FIG. 8

WO 02/074339

PCT/US02/07699

9/20

Competition Assay Sensorgram

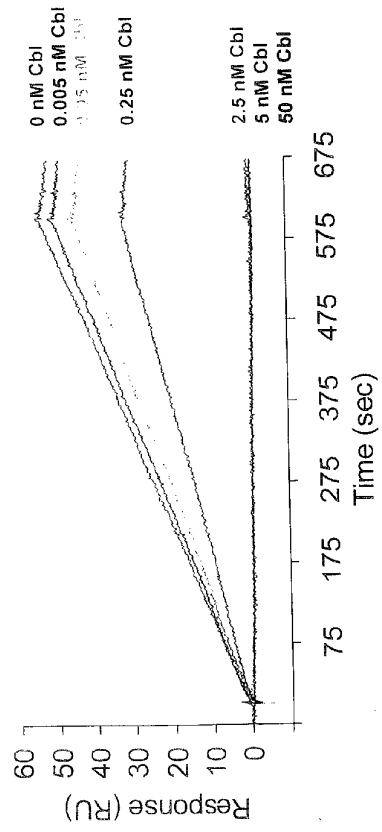


FIG. 9

WO 02/074339

PCT/US02/07699

10/20

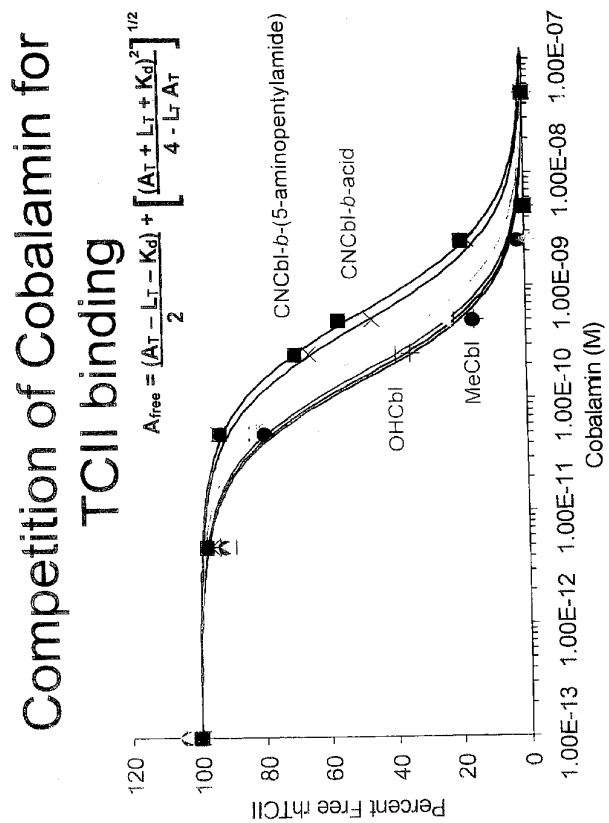


FIG. 10

WO 02/074339

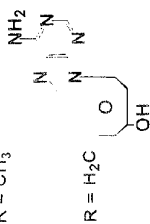
PCT/US02/07699

11/20



	TCII	Non-IF	IF
R = OH	110 +/- 10 pM	137 +/- 23 pM	100 +/- 10 pM
R = CN	130 +/- 30 pM	137 +/- 49 pM	130 +/- 37 pM
R = CH ₃	140 +/- 22 pM	152 +/- 35 pM	101 +/- 41 pM
R = H ₂ C	190 +/- 82 pM	113 +/- 10 pM	100 +/- 40 pM

FIG. 11A



WO 02/074339

PCT/US02/07699

12/20

K_d Values for modified side chain cobalamins

	TCII	Non-IF	IF
	410 +/- 18 pM	110 +/- 37 pM	100 +/- 10 pM
CNCbl- <i>b</i> -COOH			
CNCbl- <i>b</i> -(5-aminopentylamide)	430 +/- 100 pM	159 +/- 27 pM	100 +/- 17 pM
CNCbl- <i>c</i> -COOH	230 +/- 24 pM	261 +/- 150 pM	483 +/- 130 pM
CNCbl- <i>d</i> -COOH	280 +/- 10 pM	100 +/- 17 pM	100 +/- 32 pM
CNCbl- <i>e</i> -COOH	280 +/- 20 pM	135 +/- 41 pM	100 +/- 22 pM

FIG. 11B

WO 02/074339

PCT/US02/07699

13/20

CobalaFluor K_d Values

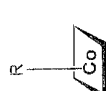
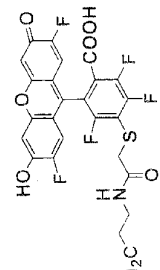
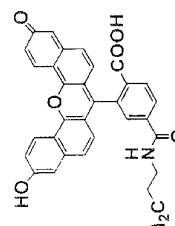
	TCII	Non-IF	IF
 $R = H_2C-CH_2-NH-C(=O)-S-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-O-phenyl-quinone$	205 +/- 60 pM	110 +/- 37 pM	100 +/- 10 pM
 $R = H_2C-CH_2-NH-C(=O)-S-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-O-phenyl-quinone$	147 +/- 89 pM	176 +/- 10 pM	100 +/- 10 pM
 $R = H_2C-CH_2-NH-C(=O)-S-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-O-phenyl-quinone$	113 +/- 16 pM	126 +/- 11 pM	101 +/- 31 pM

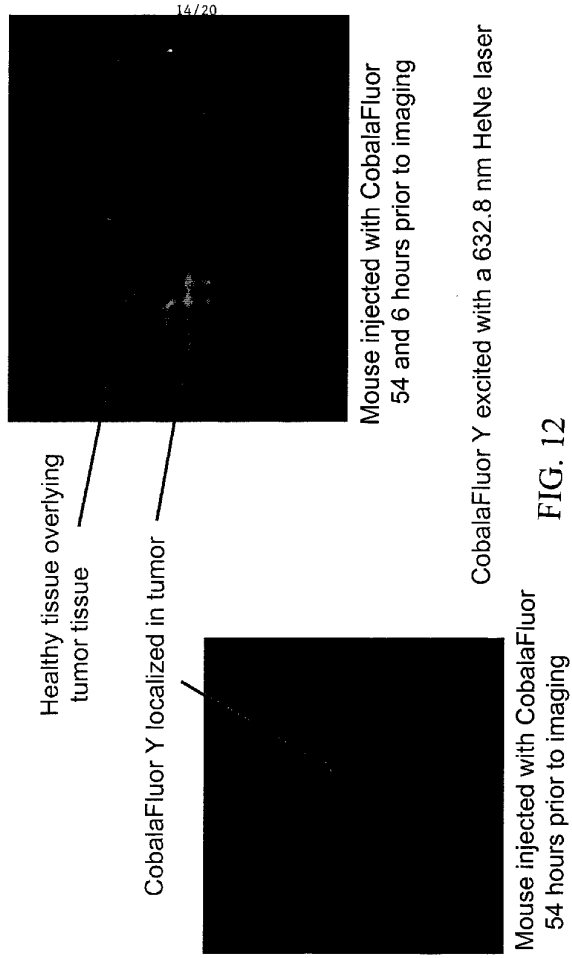
FIG. 11C

WO 02/074339

PCT/US02/07699

Tumor Imaging in Animal Models

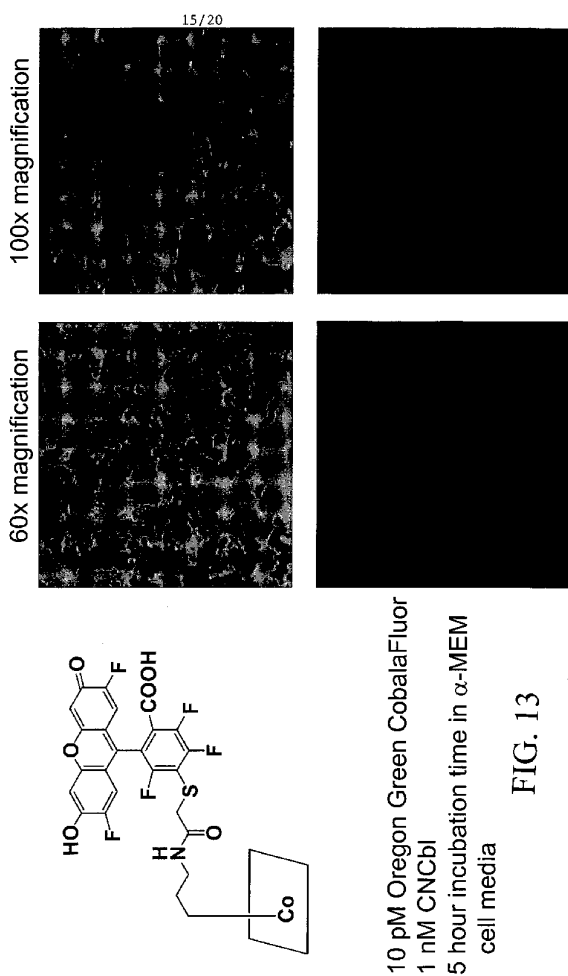
Female Mice with Implanted Tumor Using RD995 Murine Fibrosarcoma Cells



WO 02/074339

PCT/US02/07699

Tumor Imaging in Human Primary Neoplastic Breast Tissue



WO 02/074339

PCT/US02/07699

16/20

Tumor Imaging in Neoplastic Human Lymph Node Tissue

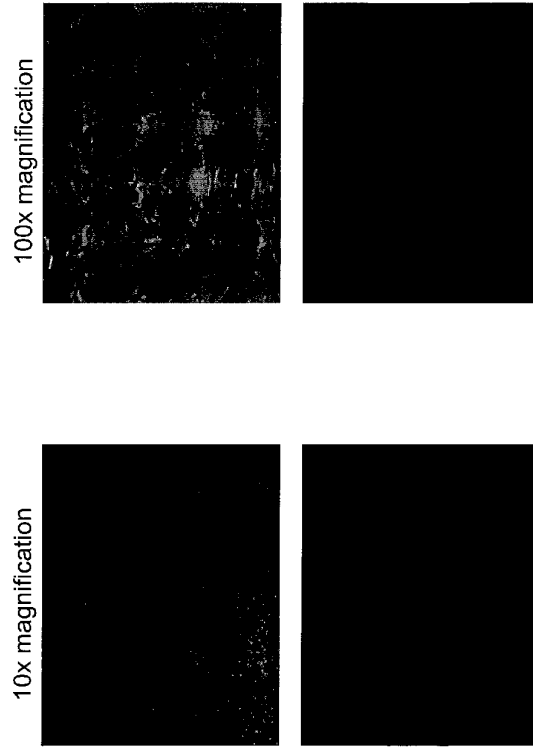


FIG. 14

WO 02/074339

PCT/US02/07699

17/20

FIG. 15

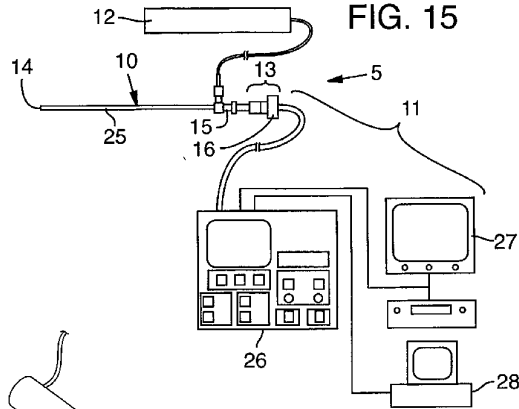
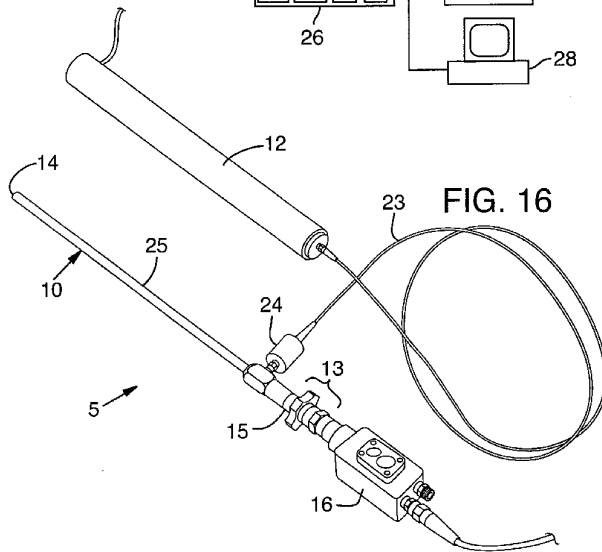


FIG. 16



WO 02/074339

PCT/US02/07699

18/20

FIG. 17

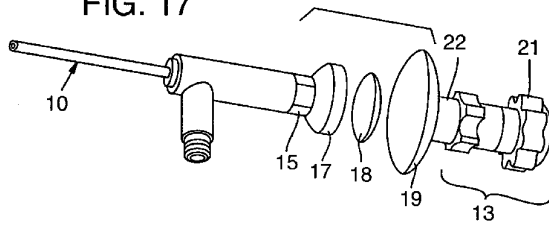


FIG. 18

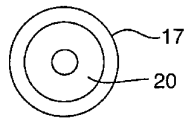
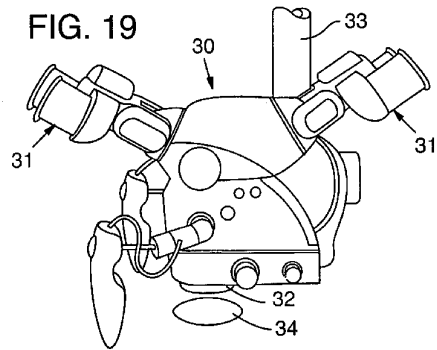


FIG. 19



WO 02/074339

PCT/US02/07699

19/20

FIG. 20

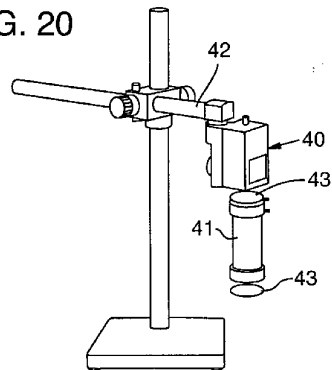
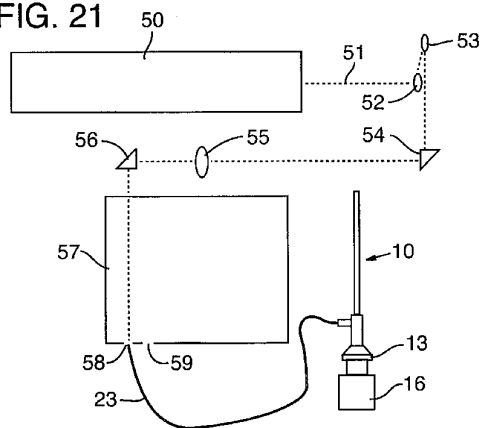


FIG. 21



Cobalamin (Vitamin B₁₂)

Sites for Modification

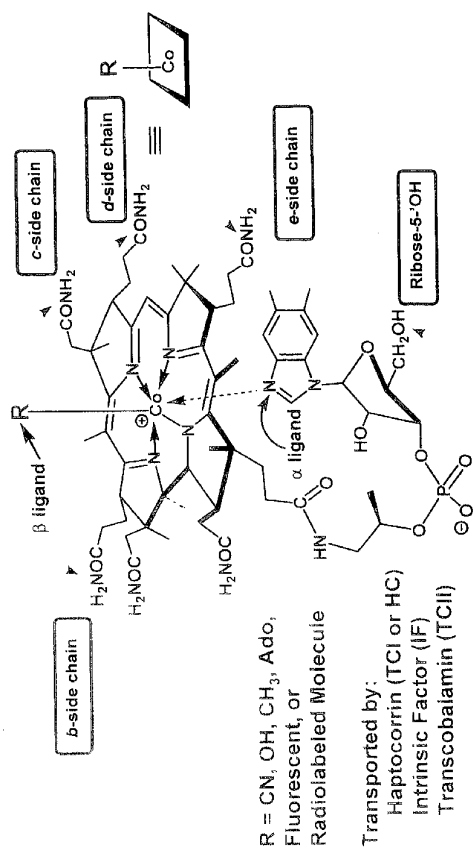


FIG. 22

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/074339 A1(51) International Patent Classification: A61K 41/00,
A61N 5/06, A61B 19/00, 5/00, G01N 21/64, A61B 1/04,
G02B 21/00

(21) International Application Number: PCT/US02/07699

(22) International Filing Date: 15 March 2002 (15.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/276,036 16 March 2001 (16.03.2001) US
60/336,316 30 October 2001 (30.10.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): UNI-
VERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
[US/US]; Technology Transfer Office, Suite #110, 612
Arapahoe Drive, Salt Lake City, UT 84108 (US).

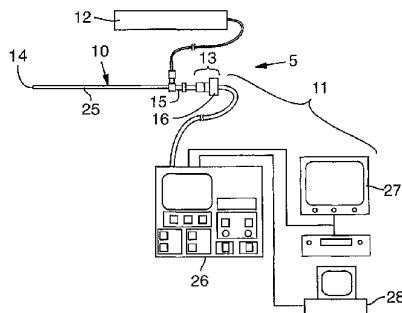
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MCGREEVY,

James [US/US]; 6532 S. Houghs Canyon Drive, Salt
Lake City, UT 84121 (US). GRISSOM, Charles, B.
[US/US]; 315 S. 1500 E., Salt Lake City, UT 84112 (US).
CANNON, Michelle [US/US]; 1135 University Village,
Salt Lake City, UT 84108 (US).(74) Agent: RUPERT, Wayne, W.; Klarquist Sparkman, LLP,
One World Trade Center, Suite 1600, 121 SW Salmon
Street, Portland, OR 97204 (US).(81) Designated States (national): AI, 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, GI,
GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG,
SL, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

[Continued on next page]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR THE PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS OF TUMOR TISSUE



(57) Abstract: An apparatus that includes a surgical telescopic device having a distal end and a proximal end; a camera coupled to the proximal end of the surgical telescopic device; and a holographic notch filter interposed between the camera and the proximal end of the surgical telescopic device. The camera preferably is a charge-coupled-device camera ("CCD camera"). The apparatus may also include a focusing lens or an alternative type of filter such as a long-pass filter or an infrared filter. The surgical telescopic device may be used by illuminating the material with non-white light and detecting the emitted fluorescence, phosphorescence or luminescence.

WO 02/074339 A1

WO 02/074339 A1 

GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BI), BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NT, SN, TD, TG).

with amended claims

Date of publication of the amended claims: 22 May 2003

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:

with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/07699
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K41/00 A61N5/06 A61B19/00 A61B5/00 G01N21/64 A61B1/04 G02B21/00		
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) IPC 7 A61K A61N A61B G01N G02B		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 912 735 A (XU JAMES JIANGUO) 15 June 1999 (1999-06-15)	1-5, 7-14, 16-20 15,21-23
Y	column 2, line 57 -column 2, line 67 column 3, line 40 -column 5, line 23 column 6, line 33 -column 6, line 50 column 9, line 44 -column 10, line 45; claims 1-7,9,10 --- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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 ** 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. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 July 2002		Date of mailing of the international search report 06/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Rick, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/07699
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 11636 A (IRION KLAUS ; STEPP HERBERT (DE); EHRHARDT ANDRE (DE); BAUMGARTNER) 3 April 1997 (1997-04-03)	1,2,5-7, 12,17
Y	page 5, line 29 -page 6, line 22 page 8, line 7 -page 9, line 30 page 11, line 14 -page 11, line 32 page 13, line 6 -page 13, line 11 page 14, line 27 -page 17, line 9 page 22, line 27 -page 23, line 7 page 27, line 1 -page 27, line 27; claims 2-9,22,23,28-31,40-42	15,21-23
X	EP 0 805 348 A (WOLF GMBH RICHARD) 5 November 1997 (1997-11-05) column 3, line 1 -column 4, line 59 column 9, line 22 -column 10, line 12; claims 1,3-5	1-7, 12, 14,17
X	DE 41 33 493 A (ASAHI OPTICAL CO LTD) 16 April 1992 (1992-04-16) column 1, line 53 -column 1, line 62 column 2, line 24 -column 3, line 40; claims 1,8 abstract	1,2,5,12
X	EP 0 280 397 A (ADAIR EDWIN LLOYD) 31 August 1988 (1988-08-31) column 9, line 23 -column 10, line 34; claims 17,18	1,2,12, 17,21
X	US 5 772 580 A (UTSUI TETSUYA ET AL) 30 June 1998 (1998-06-30) column 2, line 55 -column 3, line 62	1,2,12
A, P	WO 01 30967 A (GRISSOM CHARLES B ; UNIV UTAH RES FOUND (US); BENTZ JOEL S (US); MC) 3 May 2001 (2001-05-03)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/07699
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒	Claims Nos.: 24-37 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method with surgical character (endoscopy) practised on the human or animal body	
2. ☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 02/07699

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5912735	A	15-06-1999	NONE
WO 9711636	A	03-04-1997	DE 19548913 A1 03-07-1997 WO 9711636 A2 03-04-1997 DE 29620732 U1 24-04-1997 DE 59606558 D1 12-04-2001 EP 0861044 A1 02-09-1998 JP 11511369 T 05-10-1999 US 6212425 B1 03-04-2001
EP 0805348	A	05-11-1997	DE 19612536 A1 02-10-1997 EP 0805348 A2 05-11-1997 JP 10014857 A 20-01-1998 US 6061591 A 09-05-2000
DE 4133493	A	16-04-1992	JP 2862099 B2 24-02-1999 JP 4150845 A 25-05-1992 DE 4133493 A1 16-04-1992
EP 0280397	A	31-08-1988	US 4736733 A 12-04-1988 US 4782819 A 08-11-1988 CA 1297750 A1 24-03-1992 CA 1287541 A1 13-08-1991 DE 3875134 D1 12-11-1992 DE 3875134 T2 11-02-1993 DE 3881717 D1 22-07-1993 DE 3881717 T2 30-09-1993 EP 0280384 A1 31-08-1988 EP 0280397 A2 31-08-1988 JP 1759183 C 20-05-1993 JP 4042930 B 15-07-1992 JP 63288127 A 25-11-1988 JP 1760013 C 20-05-1993 JP 4044537 B 22-07-1992 JP 63272320 A 09-11-1988
US 5772580	A	30-06-1998	JP 9154809 A 17-06-1997 DE 19608027 A1 05-09-1996
WO 0130967	A	03-05-2001	AU 1230001 A 08-05-2001 WO 0130967 A2 03-05-2001

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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 マクグリービー, ジェームス

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 2 1, ソルト・レイク・シティ, サウス・ヒューズ・キャニオン・
ドライブ 6 5 3 2

(72)発明者 グリッソン, チャールズ・ビー

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 1 2, ソルト・レイク・シティ, サウス・1 5 0 0・イースト 3
1 5

(72)発明者 キャノン, ミシェル

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 8, ソルト・レイク・シティ, ユニバーシティ・ビルレッジ 1 1
3 5

Fターム(参考) 2G043 EA01 EA02 JA03 KA02 KA09 LA03

4C061 AA03 BB08 CC06 DD00 QQ04 WW17

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004525697A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002573046	申请日	2002-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学		
[标]发明人	マクグリービー,ジェームス グリッソン,チャールズ・ビー キャノン,ミシエル		
发明人	マクグリービー,ジェームス グリッソン,チャールズ・ビー キャノン,ミシエル		
IPC分类号	G01N21/64 A61B1/00 A61B1/04 A61B1/313 A61B5/00 A61B19/00 A61K47/48 A61K49/00 C09K11/06 G01N33/574 G02B21/00		
CPC分类号	A61K49/0032 A61B1/00186 A61B1/043 A61B1/0638 A61B1/0646 A61B1/313 A61B5/0071 A61B5/ /0084 A61B5/415 A61B5/417 A61B5/418 A61B90/30 A61B90/36 A61B90/361 A61B2090/3941 A61K47/ /54 A61K47/551 A61K49/0041 A61K49/0043 A61K49/0052 C09K11/06 C09K2211/1007 C09K2211/ /1011 C09K2211/1014 C09K2211/1029 C09K2211/1044 C09K2211/187 G01N21/64 G01N33/574 G02B21/0012 Y02B20/181		
FI分类号	A61B1/00.300.D G01N21/64.Z		
F-TERM分类号	2G043/EA01 2G043/EA02 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/KA09 2G043/LA03 4C061/AA03 4C061/ /BB08 4C061/CC06 4C061/DD00 4C061/QQ04 4C061/WW17		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/276036 2001-03-16 US 60/336316 2001-10-30 US		
其他公开文献	JP2004525697A		

摘要(译)

一种装置，包括具有远端和近端的手术伸缩装置;相机连接到手术伸缩装置的近端;以及插入在照相机和手术伸缩装置的近端之间的全息陷波滤波器。相机最好是电荷耦合器件相机 (“CCD相机”)。该装置还可包括聚焦透镜或替代类型的滤光器，例如长通滤光器或红外滤光器。可以通过用非白光照射材料并检测发射的荧光，磷光或发光来使用手术伸缩装置。