

(19)日本国特許庁（J P） (12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003－528041
(P2003－528041A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 0 7 D487/22		C 0 7 D487/22	2 G 0 4 5
A 6 1 B 10/00		A 6 1 B 10/00	T 2 G 0 5 4
A 6 1 K 49/00		A 6 1 K 49/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 5 0
G 0 1 N 21/76		G 0 1 N 21/76	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 39数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－533951(P2001－533951)	(71)出願人	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84108ユタ州ソルト・レイク ・シティ、アラピーン・ドライブ615番、ス ウィート110
(86)(22)出願日	平成12年10月26日(2000.10.26)	(72)発明者	チャールズ・ビー・グリソム アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・レイク ・シティ、イースト・コマンチー・ドライ ブ2740番
(85)翻訳文提出日	平成14年4月26日(2002.4.26)	(72)発明者	フレデリック・ジー・ウエスト アメリカ合衆国84105ユタ州ソルト・レイク ・シティ、サウス・1500・イースト998番
(86)国際出願番号	PCT/US00/29370	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外 2 名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W001/030967		
(87)国際公開日	平成13年5月3日(2001.5.3)		
(31)優先権主張番号	60/161,368		
(32)優先日	平成11年10月26日(1999.10.26)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 蛍光性コバラミンおよびその使用

(57)【要約】

本発明は蛍光性コバラミンおよびこれらの化合物の使用に関する。より詳細には、本発明は、コバラミンに共有結合する蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物を含む蛍光性コバラミンに関する。これらの蛍光性コバラミンは、診断および予後マーカーとして用いて、（a）癌の細胞および組織と健康な細胞および組織とを区別し、（b）個体が、コバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートを用いて化学療法に対してポジティブに反応するかを決定できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コバラミン中の原子に共有結合されたフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または発光分子を含む蛍光性コバラミンであって、ここに、該蛍光性コバラミンは、紫外線、可視光または赤外線で照射された場合、コバラミンからのフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団あるいは発光分子の開裂なくして、蛍光を発し、燐光を発し、ルミネセンスを示し、または発光する該蛍光性コバラミン。

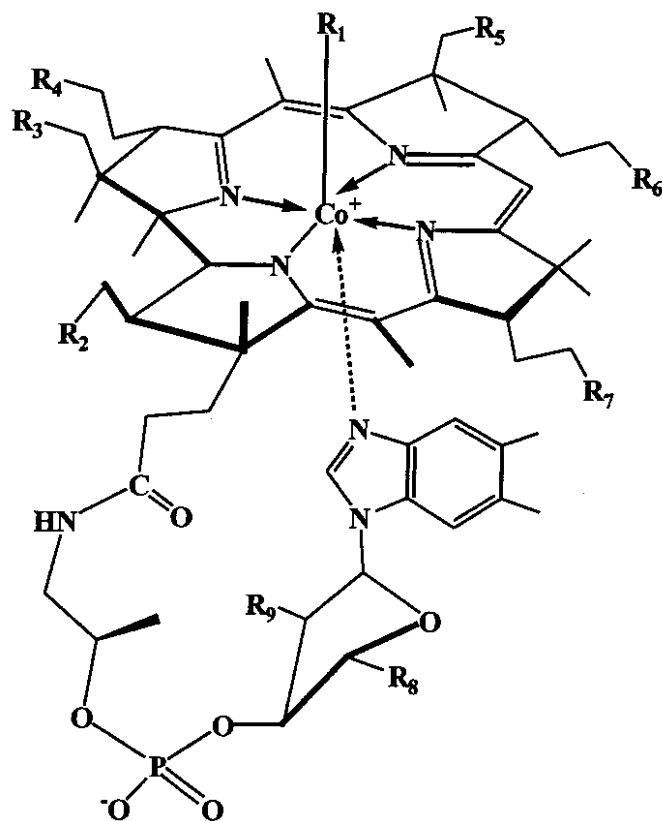
【請求項2】 該フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団あるいは発光分子が直接的か、あるいはリンカー分子を介してコバラミンのリボースヒドロキシルに結合する請求項1記載の蛍光性コバラミン。

【請求項3】 該フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団あるいは発光分子が直接的か、あるいはリンカー分子を介してコリン環上のアミドのうち1つから誘導されたカルボキシレートに結合する請求項1記載の蛍光性コバラミン。

【請求項4】 該フルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団あるいは発光分子が直接的か、あるいはリンカー分子を介してコバラミンのコバルト原子に結合する請求項1記載の蛍光性コバラミン。

【請求項5】 一般式：

【化1】



[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 および R_7 は、独立して、 $CONH_2$ または $CO-X_mY$ であり； R_8 は CH_2OH または $O(C=O)X_mY$ であり； R_9 は、 OH または $O(C=O)X_mY$ であり； X は、式 $N(CH_2)_nNHO(C=O)$ を有するリンカーであり； 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発光分子であり； m は0または1であり、 n は0～50であって、 p は2～10であり、但し、少なくとも一つの $R_1 \sim R_9$ 基は、 Y を含む]

を有する請求項1記載の蛍光性コバラミン。

【請求項6】 個体の癌組織または癌細胞を含んでいる組織の同定方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと、癌であるか、あるいは癌細胞を含むことが疑われる組織とを接触させ、光で該組織を照射し、次いで、発光した蛍光、燐光またはルミネセンスを検出することを含むことを特徴とする該方法。

【請求項7】 癌細胞を含むことが疑われる該組織がリンパ節であることを

特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】 該リンパ節が前哨リンパ節であることを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項9】 該リンパ節が腋窩リンパ節であることを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項10】 該蛍光性コバラミンがリンパ管に注入されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項11】 該同定が顕微鏡で行なわれることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項12】 該同定が視覚的に行なわれることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項13】 該同定が経皮的に行なわれることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項14】 該試料が生体組織検査によって該個体から得られることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項15】 個体の癌組織と健康な組織とを視覚的に区別する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと該個体からの組織とを接触させ、該組織を照射し、次いで、蛍光、燐光またはルミネセンスを視覚的に検出し、それによって、該癌組織が蛍光を発し、燐光を発するか、あるいはルミネセンスを示し、該健康な組織がほとんど蛍光、燐光またはルミネセンスを示さないことを特徴とする該方法。

【請求項16】 *in vivo*、*ex vivo*または*in situ*にて腫瘍の縁を規定する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと腫瘍を含んでいることが疑われる該個体からの組織とを接触させ、該組織を照射し、次いで蛍光、燐光またはルミネセンスを検出し、それによって、該腫瘍組織が蛍光を発し、燐光を発するか、あるいはルミネセンスを示し、腫瘍の縁を規定することを特徴とする該方法。

【請求項17】 個体における転移性の癌を同定する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと、個体からの転移性の癌であるこ

とが疑われる組織または細胞とを接触させ、該組織を照射し、次いで、蛍光、燐光またはルミネセンスを検出し、それによって、該転移性の癌の組織または細胞が蛍光を発し、燐光を発するか、あるいはルミネセンスを示すことを特徴とする該方法。

【請求項18】 該同定が視覚的に行なわれることを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項19】 該同定が経皮的に行なわれることを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項20】 該同定が顕微鏡的に行なわれることを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項21】 *in vivo*、*ex vivo*または*in situ*にて癌を診断、検出、予測またはモニターする方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと、該個体からの組織または細胞とを接触させ、該組織を照射し、次いで、蛍光、燐光またはルミネセンスを検出し、それによって、該癌の組織または細胞が蛍光を発し、燐光を発するか、あるいはルミネセンスを示し、健康な組織がほとんど蛍光、燐光またはルミネセンスを示さないことを特徴とする該方法。

【請求項22】 該接触が、該個体へ蛍光性コバラミンを静脈内投与、髄腔内投与、筋肉内投与、腫瘍内投与、リンパ内投与または経口投与することによって行なわれることを特徴とする請求項21記載の方法。

【請求項23】 該接触が、手術中に行なわれることを特徴とする請求項22記載の方法。

【請求項24】 組織および細胞の臨床病理学的評価中に行なわれることを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項25】 個体における癌の治療、診断、検出、予測、予後またはモニタリングにおける転移性疾患を同定する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと、該個体からの組織または細胞とを接触させ、該組織を照射し、次いで、蛍光を検出し、それによって、該癌の組織または細胞が蛍光を発するか、燐光を発するか、あるいはルミネセンスを示し、健康な組織が

ほとんど蛍光、燐光またはルミネセンスを示さないことを特徴とする該方法。

【請求項26】 該癌が乳癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。
。

【請求項27】 該癌が大腸癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項28】 該癌が卵巣癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項29】 該癌が肺癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。
。

【請求項30】 該癌が前立腺癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項31】 該癌がリンパ系を介して広がった癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項32】 該癌が肝癌であることを特徴とする請求項25記載の方法。
。

【請求項33】 該癌が黒色腫であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項34】 該癌がリンパ腫であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項35】 該組織が骨髓穿刺液であることを特徴とする請求項34記載の方法。

【請求項36】 該組織が末梢血であることを特徴とする請求項34記載の方法。

【請求項37】 該癌が白血病であることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項38】 該組織が骨髓穿刺液であることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項39】 該組織が末梢血であることを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項40】 フローサイトメトリーを利用することを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項41】 体液の自動分析を利用することを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項42】 治療に対する癌細胞の応答を予測する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと癌細胞とを接触させ、該細胞を照射し、次いで、蛍光を検出し、それによって、癌細胞でない細胞より大きな蛍光、燐光またはルミネセンスを示す癌細胞がコバラミンに基づいた化学療法剤での治療に対して有利に応答することを特徴とする該方法。

【請求項43】 該治療が化学療法であることを特徴とする請求項42記載の方法。

【請求項44】 該化学療法がコバラミン-治療剤コンジュゲートを利用することを特徴とする請求項43記載の方法。

【請求項45】 該治療がホルモン療法であることを特徴とする請求項42記載の方法。

【請求項46】 癌進行のステージを決定する方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンと癌細胞とを接触させ、該癌細胞を照射し、次いで、蛍光、燐光またはルミネセンスを検出し、それによって、コバラミンに基づいた治療に対する癌細胞の応答が癌でない細胞に比較して該癌細胞の蛍光、燐光またはルミネセンスに正比例することを特徴とする該方法。

【請求項47】 試料中のコバラミン量をアッセイする方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンを用いて該試料につき競合的結合アッセイを行い、該試料中に存在するコバラミン量を決定することを特徴とする該方法。

【請求項48】 試料中の不飽和のコバラミン結合能の量をアッセイする方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンを用いて該試料から単離されたコバラミン結合蛋白質につき競合的結合アッセイを行い、次いで、該試料中の不飽和のコバラミン結合能の量を決定することを特徴とする該方法。

【請求項49】 試料中のコバラミン結合蛋白質に結合したコバラミン量をアッセイする方法であって、請求項1～5のいずれか1記載の蛍光性コバラミンを用いて、該試料から単離されたコバラミン結合蛋白質から分離されたコバラミンの競合的結合アッセイを行い、次いで、該試料中の該蛋白質に結合したコバラミン量を決定することを特徴とする該方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、Maryland、Bethesdaの国立衛生研究所により授与されたグラント番号R01 CA73003下の政府援助のもとで部分的になされた。米国合衆国政府は、本発明においてある種の権利を有する。

【0002】**本発明の背景**

本発明は蛍光性コバラミンおよびこれらの化合物の使用に関する。より詳細には、本発明は、コバラミンに共有結合する蛍光性、燐光性、ルミネセンス、または発光の化合物よりなる蛍光性コバラミンに関する。これらの蛍光性コバラミンは、診断および予後マーカーとして用いられ、(a) 癌の細胞または組織と健康な細胞および組織とを区別し、(b) 個体が、コバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートを用いて化学療法にポジティブに反応するかを決定できる。

【0003】

本発明の背景を明らかにし、特に、実施に関してさらなる詳細を提供するための本明細書に用いた刊行物および他の資料は、出典明示して本明細書の一部とみなされ、便宜上、それらは、著者および日付によって以下のテキストに引用され、添付された文献目録中に著者によってアルファベット順にリストされている。

【0004】

急速に分裂する細胞は、DNA複製に先立って一炭素代謝を支持するために酵素メチオニン合成につきコファクターとしてコバラミンを必要とする (Hogenkampら、1999)。急性前骨髄球性白血病において、 B_{12} 結合蛋白質のトランスコバラミンおよびハプトコリン (haptocorrin) の濃度における増大のために、血液の不飽和 B_{12} 結合能における3~26倍の増大が観察される (Schneiderら、1987; Rachimelwitzら、1971)。また、充実性腫瘍を持ついくつかの患者は、トランスコバラミンおよびハプトコリンの循環レベルにかなりの増大を示す (Carmelら、1975)。不飽和血清中コバラミン結合能の増大は、急速に分裂する細胞によるコバラミンの取込の増大に一致する。 ^{111}In のごときガンマー放射の放射性核種がオクタデントキレート化剤のジエチレントリ

アミン五酢酸（DTPA）を介してコバラミンに結合するならば、腫瘍でさえ、診断的画像化目的のために十分なコバラミンを隔離（sequester）する（HogenkampおよびCollins、1997）。これは、埋込まれた線維肉腫を持つマウス（HogenkampおよびCollins、1997）、ならびに乳癌を持つヒト（Collinsら、1999）、前立腺、肺および脳の腫瘍（Collinsら、2000）において示されている。

【0005】

黒色腫および乳癌の手術のための前哨リンパ節の概念において、腫瘍をドレイン（drain）する最初のリンパ節を同定するために色素または放射性核種が腫瘍の周囲の組織に注入される（Mortonら、1992；McGreevy、1998）。この結節を前哨節といい、診断テストのためにそれを取り出して、一次腫瘍を超える転移の範囲を決定する。それが約12%の患者において転移性疾患を検出しない（McMastersら、1999）ので、この手順は論争的になっている。注入される色素および放射性核種は癌細胞に特異的ではないが、外科医のために腫瘍の領域をドレインする一次リンパ節を単に同定する。高い偽陰性率（false-negative rate）は、癌細胞に特異的である蛍光性マーカーを用いて劇的に改善されるべきである。

【0006】

かくして、改善された結果を持つ癌の組織または細胞の診断および予後のために用いることができる薬剤についての必要性が存在する。

【0007】

発明の概要

本発明は、蛍光性コバラミンおよびこれらの化合物の使用に関する。より詳細には、本発明は、コバラミンに共有結合する蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物よりなる蛍光性コバラミンに関する。これらの蛍光性コバラミンは、診断および予後マーカーとして用いて、（a）癌の細胞または組織と健康な細胞および組織とを区別し、（b）個体が、コバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートを用いて化学療法に対してポジティブに反応するかを決定できる。本発明の蛍光性コバラミンは、（1）癌細胞による急速な輸送および貯蔵（

最大取込みは、4～6時間にて生じる）、（2）非常に低濃度にて視覚的に検出できる明るいフルオロフォア（fluorophore）、および（3）非毒性化合物の必要な特性を提供する。

【0008】

本発明の一つの態様において、蛍光性コバラミンが提供され、ここに、蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物はコバラミン（ビタミンB₁₂）に共有結合する。蛍光性、燐光性または発光の化合物は、コバラミンのコバルト原子、コリン環またはリボース部位に共有結合できる。蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物を該コリン環またはリボース部位に共有結合することが好ましい。いずれの蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物も蛍光性コバラミンを調製するのに利用できるが、可視光または赤外線で励起できる蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光の化合物を利用することが好ましい。好ましい蛍光性化合物の例には、限定されるものではないが、フルオレセイン、フルオレセイン-5 EX、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'-ジメチオキシフルオセイン、2',7'-ジクロロフルオレセイン、エオシン、エオシンF3S、エリスロシン、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、マフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、PyMPO、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、ロードールグリーン、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色素、Cy3色素、Cy5色素、Cy5.5色素、または量子ドット（quantum dot）構造が含まれる。本発明の好ましい蛍光性コバラミンは、蛍光性または燐光性の化合物とコバラミンとを分離することを必要とせずに、可視光または赤外線によって励起される場合に蛍光発光する。

【0009】

本発明の第二の態様において、蛍光性コバラミンを用いて、癌細胞と健康な細胞とを区別する。本発明のこの態様の一つの具体例において、蛍光性コバラミンを手術に先立って患者に投与する。癌細胞中の蛍光性、燐光性、ルミネセンス、または発光した光の存在は、外科医によって用いられ、一次腫瘍または転移部位中を問わず、除去されるべき組織を規定する。第二の態様において、蛍光性コバラミンは、該腫瘍の位置をドレインしているリンパ節による取込みに適当な方法で患者に投与される。蛍光性、燐光性、ルミネセンスのまたは発光した光の存在は、手術中に取り除かれるべきそれらのリンパ節を同定する。

【0010】

本発明の第三の態様において、蛍光性コバラミンを用いて、個人がコバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートを用いて、化学療法にポジティブに応答するかを決定する。この態様において、蛍光性コバラミンを用いて、定性的および定量的の双方にて、コバラミンを輸送し、貯蔵するための特定の癌細胞のタイプの能力を評価する。大量のコバラミンを輸送および貯蔵する種々のタイプの癌は、コバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートでの治療についての良好な候補物である。腫瘍細胞のコバラミンの結合、取込み、輸送および貯蔵の定量化は、視覚的検査（例えば、組織スライド）下の蛍光性の測定、表面蛍光顕微鏡（epifluorescence microscopy）またはフローサイトメトリーによって行うことができる。

【0011】

本発明の第四の態様において、該蛍光性コバラミンを用いて、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決定するか、あるいは、血液、血漿、血清または脳脊髄液中の未結合コバラミン結合能の量を測定する。

【0012】発明の詳細な記載

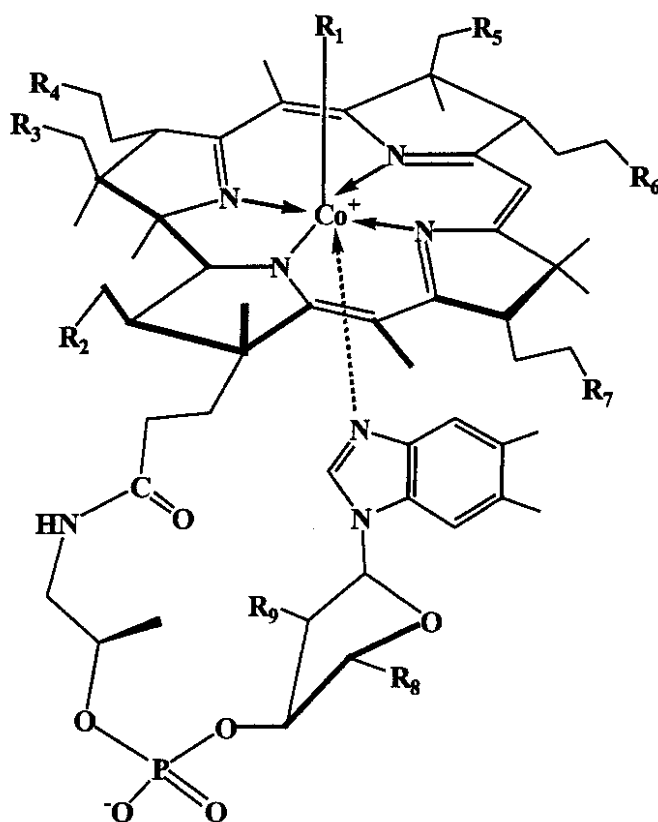
本発明は、蛍光性コバラミンおよびこれらの化合物の使用に関する。より詳細には、本発明は、コバラミン（ビタミンB₁₂）に共有結合する蛍光性化合物（フルオロフォア）、燐光性化合物（ホスホロフォア）、ルミネセンス化合物（化

学ルミネセンス発色団) または発光化合物よりなる蛍光性コバラミンに関する。
 これらの蛍光性コバラミンは、診断および予後マーカーとして用いて、(a) 癌細胞または癌組織と健康な細胞および組織とを区別し、(b) 個体が、コバラミン治療剤バイオコンジュゲートを用いて化学療法に対してポジティブに反応するかを決定できる。

【0013】

本発明の蛍光性コバラミンは、以下の式：

【化2】



[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 および R_7 は、独立して、 $CONH_2$ または $CO-X_mY$ であり； R_8 は CH_2OH または $O(C=O)X_mY$ であり； R_9 は、OHまたは $O(C=O)X_mY$ であり；Xは、式 $N(CH_2)_nNHO(C=O)$ を有するリンカーであり；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発光分子であり；mは0または1であり、nは0～50であって、pは2～10であり、但し、

少なくとも一つの $R_1 \sim R_9$ 基は、Yを含む]

によって表わすことができる。

【0014】

本発明の蛍光性コバラミンは、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発光分子にコバラミンに共有結合することによって調製される。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発光分子が、コバルト原子、コリン環またはリボース糖に、直接的またはリンカー分子を介して共有結合される。該共有結合は、リンカー分子の使用で好ましくは達成される。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発光分子は、コバラミンのコバルト原子に結合するならば、蛍光、燐光または発光した光は、コバルト原子のスピンによるクエンチングを介して強度内に減少する。加えて、光に対する蛍光性コバラミンの曝露の延長は、コバルト-炭素結合を開裂させ、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発光分子を放出するであろう (Hawardら、1997)。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発光分子をコバラミン分子のコリン環またはリボース部位に結合させることが好ましい。これらの後者の蛍光性コバラミンは、蛍光性コバラミンの不利を有さなく、ここに、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発光分子は、コバルト原子に共有結合する。

【0015】

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対するフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または発光分子の結合は、低感度および光不安定性の問題を回避する。一般的には、コリン環カルボキシレート誘導体 (CollinsおよびHogenkamp、1997) が知られているが、蛍光マーカーを含む合成化合物はない。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発光分子は、公開された方法によりコバラミンモノカルボキシレートの誘導体化によってコバルト原子よりむしろ、コリン環に直接的に結合できる (CollinsおよびHogenkamp、1997およびその中に引用された参考文献)。

【0016】

いずれのフルオロフォア、ホスホロフォア、化学ルミネセンス発色団または発光分子も蛍光性コバラミンを調製するのに利用できるが、可視光または赤外線で励起できるフルオロフォアを利用することが好ましい。蛍光性コバラミンの *in vivo* 使用について可視光または赤外線を用いるのが好ましい。好ましいフルオロフォアの例には、限定されるものではないが、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'-ジメチオキシフルオセイン、2',7'-ジクロロフルオレセイン、エオシン、エオシンF3S、エリスロシン、ヒドロキシクマリン、リサミン (lissamine) ローダミンB、メトキシクマリン、マフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、PyMPO、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、ロードールグリーン、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色素、Cy3色素、Cy5色素、Cy5.5色素、または量子ドット構造が含まれる。本発明の好ましい蛍光性コバラミンは、バイオコンジュゲートからフルオロフォアを開裂することを必要とせずして、可視光または赤外線によって励起される場合に蛍光発光する。

【0017】

正常および白血病のヒト骨髄における蛍光性コバラミンアナログの異なる取込みが存在することが判明している。正常骨髄細胞と白血病の骨髄芽球（癌細胞）との差は特に顕著であり、検出可能なコバラミンは、正常細胞によって吸収されない。健康な個人からの骨髄試料は、蛍光性ラベリングを示さない。また、潜在的な化学療法化合物として元来合成されたドキソルビシン-コバラミンコンジュゲートの取込みが存在することも判明している。ドキソルビシン-コバラミンコ

ンジュゲートの細胞取込みは、P-388ネズミ白血病細胞、ならびにHCT-116ヒト大腸腫瘍細胞において観察できる。かくして、コバラミンの蛍光性誘導体の取込みは、白血病および充実性腫瘍の細胞系において生じる。全ての癌細胞がコバラミンの輸送および貯蔵を増加させるという知識と組み合わせて、それらの結果は、癌細胞と正常細胞とを区別するための蛍光性コバラミンの使用の一般的な適用性を示す。

【0018】

かくして、本発明の蛍光性コバラミンを用いて、

- ・ 蛍光顕微鏡を介してまたはフローサイトメトリーによって癌組織を視覚的に同定し；
- ・ 組織生体検査からの組織切片または試料中の癌細胞を同定し；
- ・ *in vivo*、*ex vivo*または*in situ*にて腫瘍縁を規定し；
- ・ *in vivo*、*ex vivo*または*in situ*にて癌を診断、検出、予後、予測またはモニターし；
- ・ *in vivo*、*ex vivo*または*in situ*にて転移性の癌を同定し；
- ・ 癌の進行段階を決定し；
- ・ 癌を経皮的に同定し；
- ・ 転移性の癌を経皮的に同定し；
- ・ 前哨リンパの節もしくは複数の節または腋窩リンパの節もしくは複数の節中を含めたリンパ節中の癌を同定し；
- ・ 乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、上皮癌（腺癌）、肝癌、黒色腫およびリンパ腫のごとき癌の治療、検出、予後、予測またはモニタリングにおける転移性疾患を同定し；
- ・ 白血病またはリンパ腫を診断、予測、予後、モニタリングまたは特徴付けするための骨髓穿刺液または末梢血試料のフローサイトメトリー試験を行い；
- ・ 患者が、コバラミン-治療剤バイオコンジュゲートの使用に基づく化学療法にポジティブに応答するかを予測し；

- ・ 生体組織検査または乳腺腫瘍摘出における腫瘍マイクロマージン(micromargin)の定義を改善し；
- ・ 生体組織検査、乳腺腫瘍摘出または腫瘍摘出において、癌細胞を置き去りにする機会を減少させ、それによって、残っている癌細胞を取り除くためのフォローアップ手術の必要性を低下させる。

【0019】

予測とは、腫瘍の生物学的挙動および腫瘍が治療にどのように（有利にまたは不利に）応答するかを理解することをいう。予後とは、治療に続く、予期される患者の結果（すなわち、治療の5年または10年後の生存の見込み）をいう。モニタリングとは、治療後の残っている疾病の治療および検出の成功を決定することをいう。一例は、白血病の治療後の骨髄芽球の存在につき骨髄をテストするための蛍光性コバラミンコンジュゲートの使用である。特徴付けとは、密接に関連するタイプの腫瘍と比較して腫瘍のタイプの記述的および定量的な分類をいう。

【0020】

本発明の蛍光性コバラミンは、当該技術分野で知られた慣例の癌の診断、検出、予測、予後、モニタリングまたは特徴付けの方法に従って投与できる。例えば、蛍光性コバラミンは、静脈内、髄腔内、腫瘍内、筋肉内、リンパ内または経口的に投与できる。典型的には、本発明の蛍光性コバラミンの量は、医薬上許容される担体と混和されるでだろう。担体は、投与につき望ましい製剤の形態、例えば、経口、非経口、静脈内、髄腔内、腫瘍内、腫瘍周囲および硬膜外に依存して、非常に様々な形態を取り得る。さらに、組成物は、抗酸化剤、安定化剤、保存剤等を含み得る。技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見出すことができる。投与されるべき蛍光性コバラミンの量は、典型的には、1～500mgであろう。

【0021】

リンパ節中の転移性疾患を同定するための外科医の能力における改善は、例えば、健康な組織を保持し、除去される腋窩リンパ節数を最小化することによって、外科的治療を進めるであろう。これは、患者のクオリティー・オブ・ライフを改善し、罹患率および長期死亡率を改善するであろう。リンパ節まで広がった癌

細胞の正確な同定は、健康な腋窩リンパ節を残しつつ、病的な管および結節だけの除去を可能とするであろう。この発明は非常に価値がある。例えば、乳癌の毎年186,000例の新しい事例の場合、一次腫瘍を除去し、かつ関連するリンパ節の状態を決定するための手術数が重要である。全ての腋窩リンパ節および管の機械的な除去は、局所的な浮腫および罹患率の増加に導く。転移性癌細胞を含む腋窩リンパ節および管の非除去は、生存の減少および長期死亡率の増加に導く。

【0022】

前哨リンパ節生体組織検査のアプローチにおいて、青色染料および／または放射性トレーサーは腫瘍近くの乳癌に注入される。小さな切開が腕になされ、色素または放射活性の痕跡を見て、乳房の領域をドレインし、結果的に、転移性癌細胞を含むようである（複数の）リンパ節を同定する。本発明により、蛍光性コバラミンは、前哨リンパ節生体組織検査に現在用いられている青色色素および放射性同位元素トレーサーを置きかえる。本発明の蛍光性コバラミンの使用は、全てのタイプの癌に前哨リンパ節生体組織検査アプローチのさらなる適用を可能とする。

【0023】

加えて、本発明の蛍光性コバラミンが癌細胞によって異なって吸収されるので、これらの蛍光性コバラミンは、改善されたマーカーであり、それは外科医が選択的に癌細胞を摘出し、それによって健康な組織を残しておくのを可能とするであろう。

【0024】

本発明の蛍光性コバラミンは、手術中のマーカーとしていくつかの改善を提供する。これらの改善には：

- ・ 蛍光性マーカーは、結節が潮泊渠（tidal basin）をドレインしていることを単に示すというよりはむしろ、リンパ管および節中の癌細胞に特異的であろう。また、該蛍光性マーカーは、癌細胞と健康な細胞とを区別するであろう。
- ・ 該マーカーは、蛍光検出によって得られた固有の感度のために低濃度にて

用いることができる。現在使用中の青色色素は、活性な節を不明瞭にする傾向があり、病理学者による組織の手術後の検査を複雑にする。また、青色色素は出血している血管を不明瞭にする傾向があり、それによって、結節の外科的切除および後の傷を閉じることを厄介にする。蛍光性マーカーの使用はこれらの問題を回避するであろう。

- ・ 現在実践されるごとき手順で見られるごとく、癌細胞に特異的な蛍光性マーカーは、5～10%の偽陰性率を改善するであろう。
- ・ 減少した偽陰性率は、患者と外科医によるこの技術の受入を改善するであろう。これは外科医がこの手順を学習するのに必要なトレーニング時間（完全な軸結節切開を持つ典型的には30例以上の事例）を減少できる。

【0025】

本発明のさらなる具体例において、蛍光性コバラミンは、血液、血漿、血清または他の体液中で自然発生するコバラミン（ヒドロキソコバラミン、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）の濃度または量を決定するために競合結合アッセイにおいて用いることができる。このタイプのアッセイにおいて、蛍光性コバラミンは、当業者によく知られた競合的結合アッセイにおける放射性標識コバラミンの代わりに用いられる。コバラミンについての放射活性アッセイは、米国特許第6,096,290号；第5,614,394号；第5,227,311号；第5,187,107号；第5,104,815号；第4,680,273号；第4,465,775号；第4,355,018号に記載され、各々を出典明示して本明細書の一部とみなす。このアッセイ手順を用いて、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、ならびに蛋白質のトランスコバラミン、ヘプトコリンまたは内性因子に結合するコバラミンの濃度を決定できる。蛍光性コバラミンの使用は、放射活性標識コバラミンと関連する特定の輸送、取扱いおよび廃棄の手順を必要しないために、臨床的化学結合アッセイにおける放射活性標識コバラミンを超えてかなりの有利さを有する。

【0026】

実施例

本発明は、以下の実施例を引用してさらに記載され、それらは例示的に提供さ

れ、何ら本発明を限定することを意図するものではない。当業者によく知られた標準的技術または特に後記された技術を利用する。

【0027】

実施例1

フルオロフォアのコバルトへの結合による蛍光性コバラミンの合成

コバラミン局在性の視覚的指標として、フルオレセインをコバラミンに共有結合することによってコバラミンの5つの蛍光性アナログを調製した。緑色光の照明下、フルオレセイン分子は、0.1 ppm未満の濃度まで暗順応眼 (dark-adapted eye) によって検出できる黄色光を発光する。この発光は、表面蛍光顕微鏡を介して、ならびに視覚検査によって癌細胞の敏感な検出を可能とする。5つの各蛍光性コバラミンは、固有の蛍光性を示した。これらの全化合物は、公開された技術に従って、塩化アミノプロピルとcob(I)alaminとを反応させることによって合成して、アミノプロピルcob(III)alaminを生成した。引き続いての工程において、アミノプロピルcob(III)alaminを様々なフルオロフォアイソチオシアネート（すなわち、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（すなわち、フルオレセインーアミノプロピルcob(III)alamin）を生成した。この後者の反応を図1に示す。

【0028】

同様の方法にて、該フルオロフォアがナフトフルオレセインまたはOregon Greenである蛍光性コバラミンを調製した。全ての蛍光性コバラミンは、組換えトランスコバラミン (rhTCII) について高親和性を保持し、かくして、天然発生したコバラミンにつき観察されたものと同様な生物学的分布を可能とすることが判明した。

【0029】

実施例2

癌細胞によるコバラミンアナログの取込み

白血病の骨髓芽球標本を急性骨髓白血病 (AML) M1 (FAB分類における最小限の成熟骨髓芽球) を有している61歳の患者の骨髓穿刺液から調製した。

細胞は、実施例1に記載のごとく調製した蛍光性コバラミンで採取3日後に処理した。蛍光性コバラミンアナログの異なる取込みは、蛍光顕微鏡または蛍光フローサイトメトリーによって決定されるごとく、正常および白血病のヒト骨髄細胞で判明した。正常な骨髄細胞と白血病の骨髄芽球（癌細胞）の間との差は特に注目すべきものであり、正常細胞によって検出可能なコバラミンは、吸収されなかった。健康な個体からの骨髄試料は、蛍光性ラベリングを示さなかった。潜在的な化学療法化合物として元来合成されたドキソルビシン（doxorubicin）-コバラミンコンジュゲートの取込みは、P-388ネズミ白血病細胞およびHCT-116のヒト大腸腫瘍細胞において見られた。これらの結果は、白血病および充実性腫瘍の細胞系におけるコバラミンの蛍光性誘導体の取込みを示す。

【0030】

実施例3

シアノコバラミンモノカルボン酸の調製

b-、d-およびe-モノカルボン酸をシアノコバラミンの酸-触媒の加水分解によって調製した。図2を参照されたし。要約すると、シアノコバラミン（527.0mg、0.389ミリモル）を100mlの丸底フラスコに入れ、40mlの0.5M HClに溶解した。フラスコを50℃の水浴に置き、4時間攪拌した。その反応は、表1に作表された勾配を用いて、HPLC（Waters社、3.9×300mm DeltaPak 100C-18カラム）によってモニターした。

【0031】

【表1】

表 1

時間 (分)	流 速 (ml/分)	0.5 M H ₃ PO ₄ (pH 3.0 w/ NH ₄ 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

【0032】

4時間後、反応物を室温まで冷却した。pHをpHメーターを用いて、NaOH（10％）で7.0に調整した。粗物質を、最初に、10mlのメタノール、続いて15mlの脱イオン化H₂Oでカラムをすすぐことによって、C-18 SepPakカラム（Waters社、P/N WAT023635）を用いて脱塩した。粗物質をシリンジを介してカラムに適用し、10～15mlの脱イオン化H₂Oですすぎ、続いて10mlのメタノールで溶出した。メタノールを回転式エバポレーターを介して除去し、赤色化合物を得た（5016-12-33）。

【0033】

粗反応混合物を最小限の脱イオン化H₂Oに溶解し、該溶液の半分を表2中の計算された勾配を用いて、半分取用のHPLC（Waters社、25.0×300mm 100C-18カラム）に注入した。

【0034】

【表2】

表 2

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

【0035】

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)および34.6分(e-モノカルボン酸)のピークを大試験管を用いて集めた。純粋な画分を脱イオン化H₂Oで1:1に希釈し、前記の同一方法にて脱塩した。全ての場合に、赤色固体を得た。

【0036】

CBC-195(b-モノカルボン酸): 2つの分取用の試行では、74.8 mgのb-モノカルボン酸(14.4%)を単離した。正イオン電子スプレー質量スペクトル(E S⁺)を得、それは期待されるごとM+1ピーク(1356)およびM+22(1378)を示した。b-モノカルボン酸(CBC-195)を全収率14%で得た。

【0037】

CBC-226(d-モノカルボン酸): 2つの分取用の試行では、38.6 mgのd-モノカルボン酸(7.3%)を単離した。正イオン電子スプレー質量スペクトル(E S⁺)を得、それは期待されるごと、M+1ピーク(1356)および対応するM+Naピーク(1378)を示した。d-モノカルボン酸(CBC-226)を全収率7%で得た。

e-モノカルボン酸を単離し、全収率14%の約78mgであった。

【0038】

実施例4

CNCb1酸と1,12 ジアミノドデカンとのコンジュゲート

b-およびd-アミンを、図3に示すごとく調製した。CBC-195 (55.4mg、0.0408ミリモル) を、小さなガラスバイアルに加え、約2.5mlのDMSOに溶解し、続いてEDC1・HCl (12mg、0.0626ミリモル) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (25mg、0.217ミリモル) を添加した。反応物を室温で一晩攪拌した。従前の試みから、いくつかの当量のEDC1およびNHS (合計6当量) を反応を完了させるのに必要とした。24時間後、一つのさらなる当量のEDC1を添加し、反応を26時間内で完了した。反応を表3の勾配を用いてHPLCを介してモニターした。CBC-195は、9.07分の保持時間を有し、CBC-195のNHS-エステルは、10.55分の保持時間を有する。

【0039】

【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

【0040】

別々のガラスバイアル中で、1,12-ジアミノドデカン (81.8mg、0.408ミリモル) を約2mlのDMSOに溶解した。前記の反応混合物をシリンジポンプを用いて、二量化を最小限とするために4.0ml/時間にて滴下した。生成物は直ちに形成され、14.56分間の保持時間を有した。粗反応混合物を100mlの1:1のCH₂Cl₂:Et₂Oに添加し、赤色沈殿物を形成した。赤色化合物は、ガラスフリットを用いて濾過し、次いで、20mlの部分のCH₂Cl₂で2回、20mlの部分のアセトンで2回および最後に20mlの

部分のEt₂Oで2回洗浄した。

【0041】

粗反応生成物を最小量の脱イオン化H₂Oに溶解し、溶液を表4にて計算された勾配を用いて、半分取用HPLC（Waters社および25.0×100mm 100Å-18カラム）に注入した。

【0042】

【表4】

表 4

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
2.0	40.0	90.0	10.0
13.7	40.0	55.0	45.0
17.1	40.0	90.0	10.0

【0043】

8.70分（b-アミン、CBC-208）のピークを大試験管を用いて集めた。純粋な画分は、蒸留したH₂Oで1：1に希釈し、C-18 SepPakカラム（Waters社、P/N WAT023635）を用いて、まず、10mlのメタノール、続いて15mlの脱イオン化H₂Oでカラムをすすぐことによって脱塩した。純粋な物質をシリンジを介してカラムに適用し、10～15mlの脱イオン化H₂Oですすぎ、10mlのメタノールで溶出させた。メタノールを回転式エバポレーターによって除去し、6mgの赤色化合物を得た。

【0044】

CBC-208（b-アミン）：合計6.0mgのb-アミンを単離した。正イオン電子スプレー質量スペクトル（ES⁺）を得、それは期待されるごときM+1ピーク（1538）およびM+23ピーク（1560）を示した。CBC-208を精製後9.5%の収率で得た。

【0045】

CBC-226 (d-アミン) : 表3中と同一のHPLC勾配を用いて、d-モノカルボン酸は9.32分間のHPLC保持時間を有し、NHS-エステルは10.96分間にて移動し、d-アミン (CBC-226) は、14.93分間にて移動する。正イオン電子スプレー質量スペクトル (ES^+) を粗物質につき得、それは期待されるごとくM+1ピーク (1538) および対応するM+Naピーク (1560) を示した。

【0046】

実施例5

CBC-208およびフルオレセイン-5EX-NHSのコンジュゲーション

CBC-208を図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社から入手可能) にカップリングした。CBC-208 (6.0mg、3.87マイクロモル) を小さなガラスバイアルに加え、約0.5mlのDMSOに溶解し、続いて、フルオレセイン-5EX-NHS (2.5mg、4.23モル) を添加した。反応物は、室温にて一晩攪拌させた。反応は表5中の方法を用いて、HPLCを介してモニターした。

【0047】

【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

【0048】

反応は最初は非常に急速に進行し、接触のわずか10分後に所望の生成物を形成した。CBC-208は11.47分間の保持時間を有し、生成物 (CBC-123) は14.24分の保持時間を有する。もう一つの当量のフルオレセイン

化合物の添加で、反応は完了し、粗混合物は88%純粋である。

【0049】

出発物質フルオレセイン5EX-NHSのHPLC分析は、それがわずか75%純粋であることを示し、これは反応を完了させるためにさらなる当量が必要である理由を説明する。

【0050】

CBC-123 (b-フルオレセインコバラミン誘導体)：この化合物は、合成からの粗製の単離物として約90%純粋であり、大多数の不純物は、未反応CBC-208である。粗物質の正イオン電子スプレー質量スペクトル (ES^+) を得、それはM+1ピーク (2013) および対応するM+Naピーク (2035) を示した。精製前の収率は22%である。

【0051】

この化合物の蛍光スペクトルは、350nmの励起での光分解の前後にて、粗製の化合物で得た (図5参照)。光分解の前後にて重要な変化はなかったが、これは、該化合物が光安定性 (photostable) であり、明らかに蛍光性であり、コバラミンの付近からの蛍光性の低下を示さないことを示唆する。

【0052】

実施例6

顕微鏡を介する乳房腫瘍組織の *ex vivo* 評価

乳房の腫瘍を含めた悪性および良性の腫瘍の試料を、正常縁の組織を伴って、患者から摘出する。これらの試料は、Utah大学施設内倫理委員会 (IRB) およびHuntsman癌研究所臨床癌調査委員会 (CCIC) の承認をもって得る。生きている組織試料を前記の調製された蛍光性コバラミンの一つと4~6時間インキュベートする。各試料の薄い組織切片をクリオミクロトーム (cryomicrotome) で調製し、蛍光性マーカー量を表面蛍光顕微鏡によって正常および癌の組織中で定量する。対応する組織切片を解剖病理学者による評価のためにヘマトキシロン/エオシン (H&E) で染色する。正常および癌の細胞間の鏡界面は、注意深く評価する。また、腫瘍の低酸素症の領域内の細胞が代謝をしばしば低下させているので、腫瘍内部からの細胞を蛍光性マーカーの取込みにつき評価する。

【0053】

より詳細には、最少必須培地、アルファ修飾 (α -MEM; 7.5%新生仔ウシ血清、2.5%ウシ胎仔血清、0.2%ナイスタチン、2.5%ペニシリン/ストレプトマイシン、pH 7.2; Sigma) を調製し、無菌の25mlねじ蓋組織培養フラスコに等分した(10ml)。培地を37℃とし、組織試料を α -MEM中の蛍光標識したコバラミン(50nM; 実施例1のコバラミン-Oregon Green およびコバラミン-ナフトフルオレセインコンジュゲートおよび実施例5のコバラミン-フルオレセインコンジュゲート) および組換えヒトTCII (50pM) と3時間インキュベートした。ヒト乳房組織をIRMに承認されたプロトコール下にて得た。該組織をフラスコから取り出し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS; Sigma) で洗浄し、凍結切片を薄切するためにOCT化合物(Shandon) で-20℃にて真鍮板上に貼り付けた。組織をCTD Harris クリオスタット中で-20℃にて薄切(4~6 μ m切片)した。薄い組織切片を小さなアーティストブラシで引き戻し、100%エタノールで顕微鏡スライドに固定した。スライドを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; ブルーイング(bluing) 溶液(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; およびキシレン、10秒を用いて染色した。スライドを10倍、60倍、100倍にて位相差および表面蛍光顕微鏡によって評価した。

【0054】

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) を用いて、蛍光性コバラミンとの3時間のインキュベーション後に、組織の代謝能を定性的に決定した。一部分の組織を培地から取り出し、DPBSで洗浄し、MTT (2ml; 2.5mg/ml) に浸漬した。この組織を37℃の5%CO₂雰囲気下にて3時間インキュベートした。このインキュベーション期間中、組織試料中の生細胞はコハク酸デヒドロゲナーゼ活性(CelisおよびCelis、1998) によってMTT色素を紫色ホルマジンに還元した。該組織をDPBSで洗浄し、組織の代謝能を保証するために

前記に概説したクリオミクロトーム手順により調製した。

【0055】

蛍光性コバラミンバイオコンジュゲートは、新生物および健康な乳房組織の双方において、ある程度まで蓄積し、新生物乳房組織は、健康な乳房組織より多くの蛍光性コバラミンを隔離する。健康な乳房細胞によって隔離された蛍光性コバラミン量は期待されたより大きい、それは健康な細胞による有意な内向化のためというよりはむしろ、結合組織内の構造への非特異的な結合のためであると考えられる。

【0056】

実施例7

リンパ節における癌細胞のex vivo評価

転移性疾患を持つ摘出されたリンパ節は、患者から取り除かれ、前記に調製された蛍光性コバラミン誘導体のうちの1つで4～8時間インキュベートした。各リンパ節を薄切し、癌細胞への蛍光性コバラミンの輸送につき顕微鏡的に評価した。この実験は、画像化および視覚化のために十分な蛍光性コバラミンを吸収するリンパ節内の転移性細胞の能力を示した。

【0057】

実施例8

患者がコバラミンに基づいた治療剤バイオコンジュゲートでの化学療法に 有利に応答するかを決定するための蛍光性コバラミンの使用

白血病を持つ患者からの骨髓穿刺液または末梢血試料を蛍光性コバラミンコンジュゲートとインキュベートする。4～8時間後、骨髓穿刺液または末梢血試料を洗浄して、組込まれていない蛍光性標識を除去し、次いで、該細胞試料を表面蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーによって定性的および質的な蛍光分析に付した。かなりの量の蛍光性コバラミンを吸収した細胞をより明るい蛍光性を示す。かなりの量の蛍光性コバラミンの取込みは、患者が有する白血病のタイプがコバラミンに基づいた治療剤での処置に有利に応答するであろうことを示す。蛍光性コバラミンコンジュゲートでの処置後、大きな蛍光性を示さない骨髓穿刺液または末梢血試料は、患者がコバラミンに基づいた治療剤コンジュゲートに有

利には応答しないことを示す。同様なアプローチを充実性腫瘍に適用できる。この場合、摘出した腫瘍組織の一部分は蛍光性コバラミンコンジュゲートとインキュベートし、約4～8時間後、腫瘍組織中の蛍光性を定量する。腫瘍組織によって示された蛍光性が大きいほど、癌がコバラミンに基づいた化学療法での処置に有利に応答する見込みもより大きくなる。

【0058】

本発明の方法および組成物は、様々な具体例の形態で取り込むことができ、そのいくつかだけが本明細書に開示されると認識されるであろう。当業者ならば、他の具体例が存在し、本発明の精神から逸脱しないことは明らかであろう。かくして、記載された具体例は例示であり、制限として構成されるものではない。

【0059】

参考文献リスト

Carmel, R. (1975). "Extreme Elevation of Serum Transcobalamin I in Patients with Metastatic Cancer." *New Engl. J. Med.* 292 : 282-284.

Celis, A.およびCelis, J. E. (1998). *Cell Biology*, pp. 9-11.

Collins, D. A.およびHogenkamp, H. P. C. (1997). "Transcobalamin II Receptor Imaging via Radiolabeled Diethylene-Triaminepentaacetate Cobalamin Analogs." *J. Nucl. Med.* 38 : 717-723.

Collins, D. A.ら(1999). "Tumor Imaging via Indium-111-Labeled DTPA-Adenosyl-cobalamin." *Mayo Clinic Proceedings* 74 : 687-691.

Collins, D. A.ら(2000). "Biodistribution of Radiolabeled Adenosyl-cobalamin 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.

Hogenkamp, H. P. C., ら(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.ら(1997). "Sonolysis Promotes Indirect C-Co Bond Cleavage

of Alkylcob (III) alamins."Bioconj. Chem. 8 : 498-502.

McGreevy, J. M. (1998). "Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer." Curr. Surg. 55 : 301-4.

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

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

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

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

Schneider, Z. および Stroinski, A. (1987). Comprehensive B₁₂ de Gruyter, Berlin, pp. 358.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明による一つの蛍光性コバラミンの合成を示す。

【図2】

図2は、コバラミンモノカルボン酸の合成を示す。

【図3】

図3は、1,12-ジアミノドデカンでのコバラミンカルボン酸のコンジュゲートを示す。

【図4】

図4は、ジアミノドデカンコバラミン誘導体での蛍光性-5EX-NHSのコンジュゲートを示す。

【図5】

図5は、蛍光性-5EX-b-コバラミン誘導体のCBC-123の蛍光発光スペクトルを示す。

【図1】

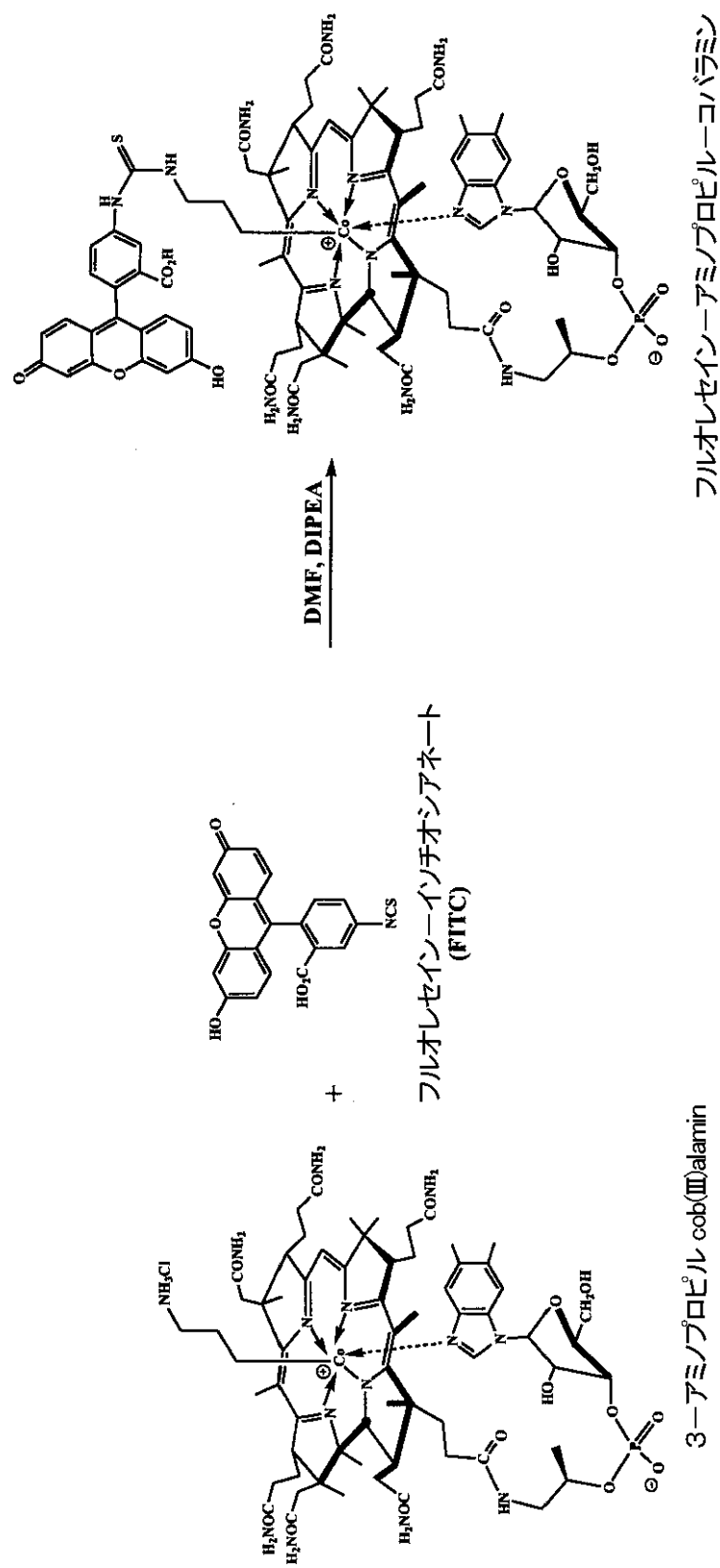


Figure 1

【図2】

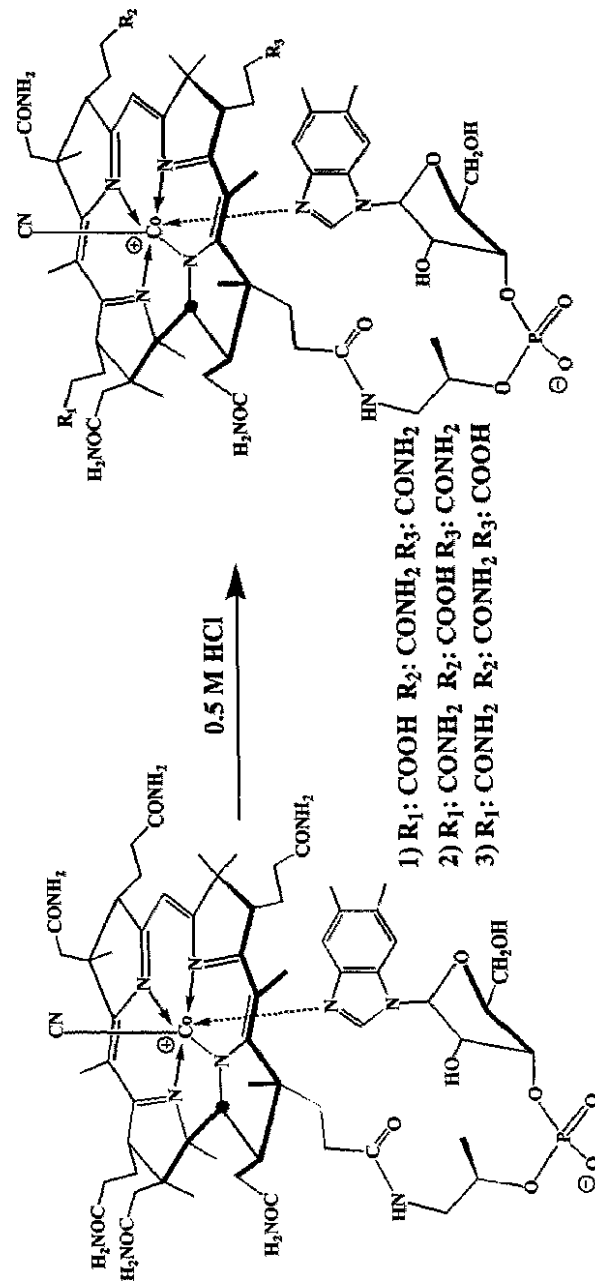


Figure 2

【図3】

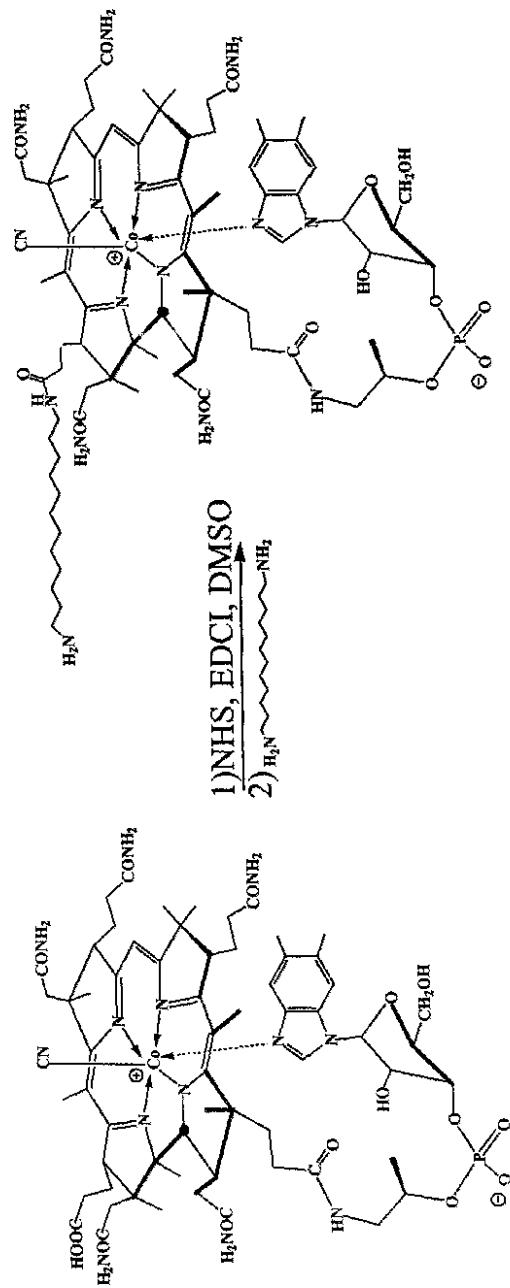


Figure 3

【図4】

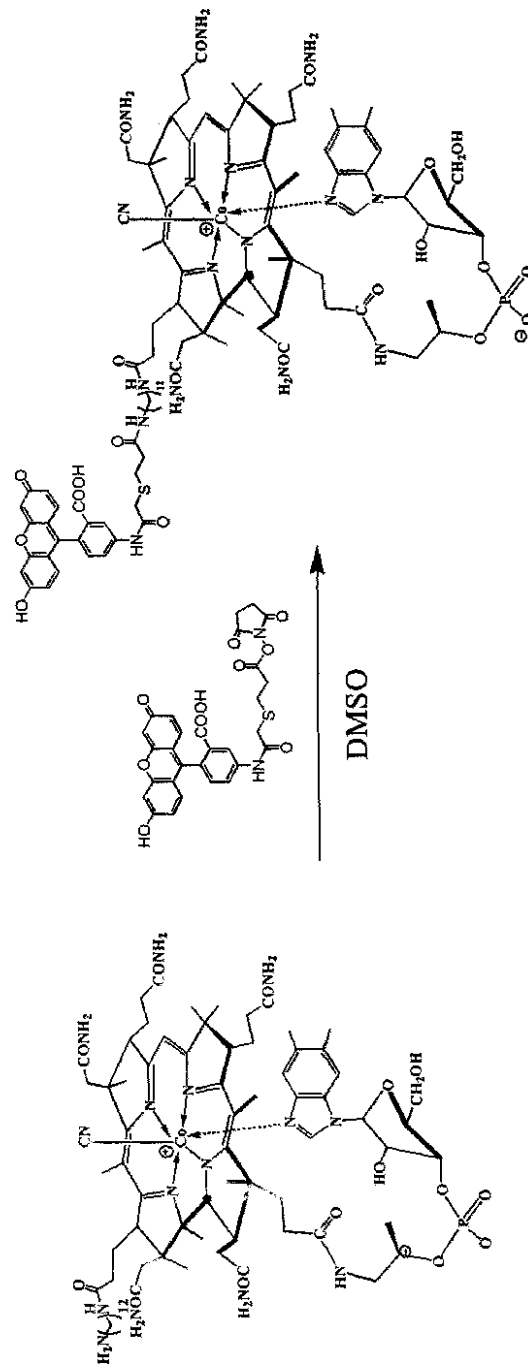


Figure 4

【図5】

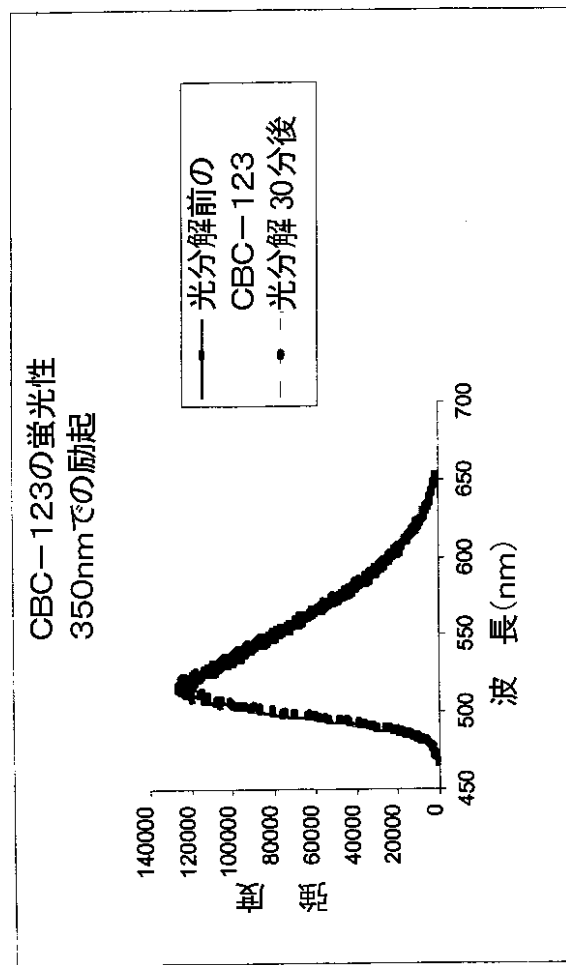


Figure 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/29370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 23/00; A61K 49/00; G01N 33/53 US CL : 514/52; 536/26.44; 435/968; 424/9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/52; 536/26.44; 435/968; 424/9 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,614,394 A (HOYLE et al.) 25 March 1997, see entire document.	1-49
Y	COLLINS et al. Transcobalamin II Receptor Imaging via Radiolabeled Diethylene-Triaminepentaacetate Cobalamin Analogs. The Journal of Nuclear Medicine. May, 1997. Vol. 38, No. 5, pages 717-723, see entire document.	1-49
Y	CARMEL. Extreme Elevation of Serum Transcobalamin I in Patients with Metastatic Cancer. The New England Journal of Medicine. 6 February 1975. Vol. 292, pages 282-284, see entire document.	1-49
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 APRIL 2001		Date of mailing of the international search report 10 MAY 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer LAWRENCE ERIC CRANE <i>Lawrence Eric Crane</i> Telephone No. (703) 308-1235

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/532		G 0 1 N 33/532	B
33/543	5 9 7	33/543	5 9 7
33/566		33/566	
33/574		33/574	D
33/58		33/58	Z
33/68		33/68	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者	フレデリック・ジー・ウエスト アメリカ合衆国84105ユタ州ソルト・レイク・シティ、サウス・1500・イースト998番		
(72)発明者	ジェイムズ・マッグリービー アメリカ合衆国84121-6308ユタ州ソルト・レイク・シティ、サウス・ヒューズ・キャニオン・ドライブ6532番		
(72)発明者	ジョエル・エス・ベンツ アメリカ合衆国84121ユタ州ソルト・レイク・シティ、イースト・サマーセット・ドライブ2102番		

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 DA78 FA16
FA18 FA25 FA26 FA27 FA37
FB03 FB07 FB12
2G054 AA07 AA08 BA04 CA21 CD04
CE02 EA03 EB01 EB12 FA08
GA01 GA02 GA03 GB04 JA02
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QR54
QR66 QR72 QR77 QS22 QS32
QS36 QX02
4C050 PA03
4C085 HH11 KA08 KA27 KB07 KB56
LL03 LL18

专利名称(译)	荧光钴胺素及其用途		
公开(公告)号	JP2003528041A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001533951	申请日	2000-10-26
[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	チャールズビーグリソム フレデリックジーウエスト ジェイムズマッグリービー ジョエルエスペンツ		
发明人	チャールズ・ビー・グリソム フレデリック・ジー・ウエスト ジェイムズ・マッグリービー ジョエル・エス・ペンツ		
IPC分类号	G01N33/532 A61B10/00 A61K49/00 C07D487/22 C07F15/06 C09K11/06 C12Q1/02 G01N21/76 G01N33/52 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K49/0052 A61B5/415 A61B5/417 A61B5/418 A61K47/551 A61K49/0013 A61K49/0015 A61K49/ /0041 A61K49/0043 C07F15/065 C09K11/06 G01N33/52 G01N33/574 G01N2800/52		
FI分类号	C07D487/22 A61B10/00.T A61K49/00.A C12Q1/02 G01N21/76 G01N33/532.B G01N33/543.597 G01N33/566 G01N33/574.D G01N33/58.Z G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FA16 2G045/FA18 2G045/FA25 2G045/ /FA26 2G045/FA27 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/BA04 2G054/CA21 2G054/CD04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/EB12 2G054/ /FA08 2G054/GA01 2G054/GA02 2G054/GA03 2G054/GB04 2G054/JA02 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR54 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS22 4B063/ /QS32 4B063/QS36 4B063/QX02 4C050/PA03 4C085/HH11 4C085/KA08 4C085/KA27 4C085/KB07 4C085/KB56 4C085/LL03 4C085/LL18		
优先权	60/161368 1999-10-26 US		
其他公开文献	JP5350570B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及荧光钴胺素以及这些化合物的用途。更具体地，本发明涉及荧光钴胺素，其包括与钴胺素共价结合的荧光，磷光，发光或发光化合物。这些荧光钴胺素用作诊断和预后标志物，以（a）区分癌性细胞和健康细胞及组织，（b）允许个体开发基于钴胺素的治疗性生物缀合物。它可用于确定对化学疗法的阳性反应。

