

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508332

(P2005-508332A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/401	A 6 1 K 31/401	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/4709	A 6 1 K 31/4709	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/496	A 6 1 K 31/496	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/5383	A 6 1 K 31/5383	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 167 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-530309 (P2003-530309)	(71) 出願人	502132243 メイオウ・ファウンデーション・フォー・ メデイカル・エジュケーション・アンド・ リサーチ アメリカ合衆国、ミネソタ・55905、 ロチエスター、ファースト・ストリート・ サウス・ウエスト・200
(86) (22) 出願日	平成14年9月30日 (2002. 9. 30)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月26日 (2004. 3. 26)	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031038	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W02003/026674	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003. 4. 3)		
(31) 優先権主張番号	60/326, 183		
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001. 9. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤を送達するための、輸送タンパク質とコンジュゲートコバラミンとの同時投与

(57) 【要約】

診断薬または薬学的に活性な物質が結合したコバラミンと共にコバラミン輸送タンパク質を投与して、診断薬または薬学的に活性な物質が吸収される程度を高める。コバラミン輸送タンパク質としては、内性因子、トランスコバラミンI、トランスコバラミンIIおよびトランスコバラミンIIIが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。コバラミンまたはコバラミン誘導体とコバラミン輸送タンパク質とを組み合わせることで、細胞への取り込みを向上させる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コバラミンが結合した検出可能な薬剤またはコバラミンが結合した治療薬を、コバラミン輸送タンパク質と共に供給することを含む、コバラミンが結合した検出可能な薬剤またはコバラミンが結合した治療薬の、それが必要な宿主への取り込みを促進する方法。

【請求項 2】

コバラミン輸送タンパク質が内性因子、トランスコバラミン I、トランスコバラミン I I、トランスコバラミン I I I またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものを、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介して投与する、請求項 1 に記載の方法。

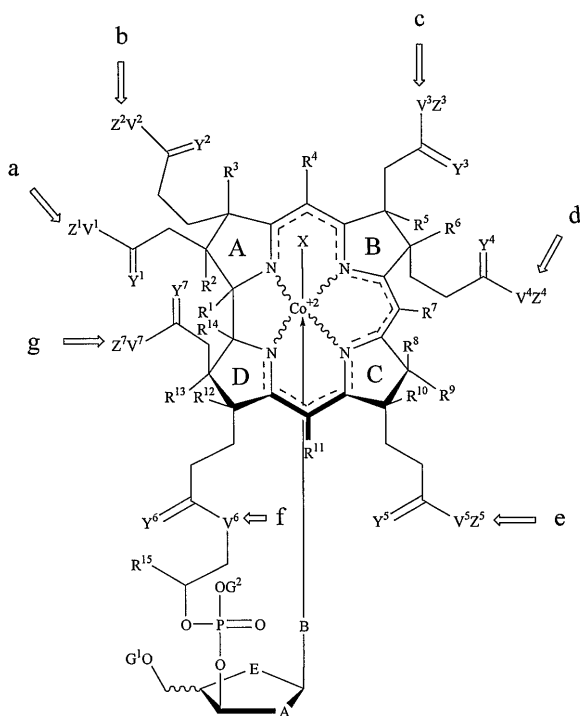
【請求項 4】

コバラミンまたはコバラミン輸送タンパク質が不足していない患者に、コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものを投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

コバラミンコンジュゲートが式：

【化 1】



式中：

(i) 化学構造における波線は、三つの Co - N の配位結合と一つの Co - N の共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合に

10

20

30

40

50

は、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

(i i) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない（すなわち炭素を五価としない）ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す；

(i i i) X は、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシル L - T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(i v) B は、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L - T で場合により置換されているもよい；

(v) A は、O、S、N^{J¹}、C R^{1 0 0} R^{1 0 1} または C (R^{1 0 0}) V⁸ Z⁸ である；

(v i) E は O または S である；

(v i i) G¹ および G² は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩または L - T である；

(v i i i) Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶ および Y⁷ は、独立して O、S または N J² である；

(i x) V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷ および V⁸ は、独立して O、S もしくは N J³；C R^{1 0 2} R^{1 0 3}、または直接の結合である；

(x) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷ および Z⁸ は、独立して R^{1 0 4} または L - T である；

(x i) それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

(x i i) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；

(x i i i) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷、Z⁸、A、B、G¹ および G² のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(x i v) J¹、J² および J³ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；

(x v) R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R^{1 0}、R^{1 1}、R^{1 2}、R^{1 3}、R^{1 4} および R^{1 5} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、S O₂、S O₃、カルボン酸、C₁₋₆ のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである；

(x v i) R^{1 3} および R^{1 4} は、場合により一緒になって 結合を形成してもよい；ならびに

(x v i i) R^{1 0 0}、R^{1 0 1}、R^{1 0 2}、R^{1 0 3} および R^{1 0 4} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、S O₂、S O₃、チオアルキルまたはアミノである；

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

治療薬が抗生物質である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

治療薬が、正常でない細胞増殖に関連する疾患の治療に有用である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 8】

治療薬が感染症の治療に有用である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

治療薬が心臓血管系障害の治療に有用である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 10】

治療薬が核酸、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、もしくは遺伝子発現に影響を与えるその他の物質である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 11】

検出可能な薬剤がラジオイメージングに有用である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 12】

検出可能な薬剤が放射性核種または常磁性の金属原子である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

10

【請求項 13】

コバラミン輸送タンパク質が、検出可能な放射性核種もしくは検出可能な常磁性の金属原子と直接結合しているかまたはリンカーによって結合している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

金属の放射性核種または常磁性の金属原子を含む検出可能な薬剤がコバラミンと結合している、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

検出可能なキレート基が D P T A である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

金属の放射性核種または常磁性の金属原子がテクネチウム 99m、インジウム 111 またはガドリニウム 157 である、請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 17】

検出可能な放射性核種が非金属の放射性核種である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

非金属の放射性核種が炭素 11、フッ素 18、臭素 76、ヨウ素 123 またはヨウ素 124 である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

コバラミンが結合した検出可能な薬剤またはコバラミンが結合した治療薬の、それが必要な宿主への取り込みを促進するために使用するための、検出可能な薬剤または治療薬を、コバラミン輸送タンパク質と共に含む組成物。

30

【請求項 20】

コバラミン輸送タンパク質が内性因子、トランスコバラミン I、トランスコバラミン II、トランスコバラミン III またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものが、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介して投与される、請求項 19 に記載の組成物。

40

【請求項 22】

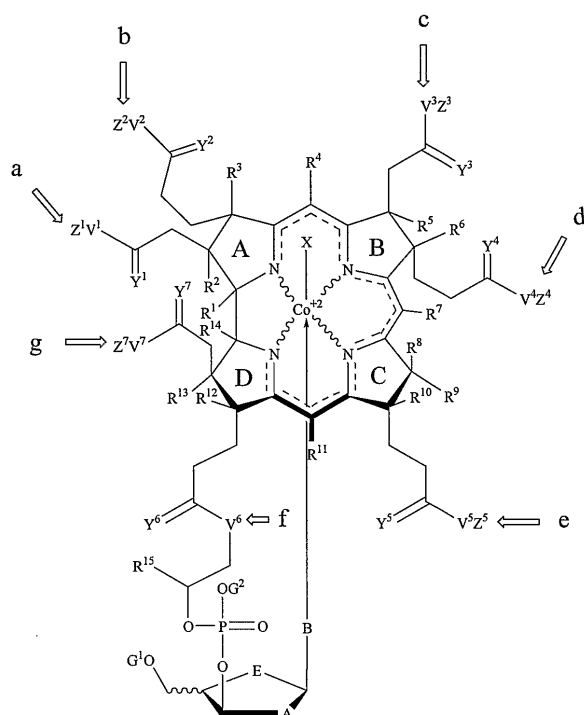
コバラミンまたはコバラミン輸送タンパク質が不足していない患者に、コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものを投与する、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 23】

コバラミンコンジュゲートが式：

50

【化2】



10

20

式中：

(xviii) 化学構造における波線は、三つのCo-Nの配位結合と一つのCo-Nの共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合には、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

(xix) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない(すなわち炭素を五価としない)ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す；

30

(xx) Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシルL-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(xxi) Bは、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L-Tで場合により置換されているもよい；

(xxii) Aは、O、S、NJ¹、CR^{1 0 0}R^{1 0 1}またはC(R^{1 0 0})V⁸Z⁸である；

(xxiii) EはOまたはSである；

40

(xxiv) G¹およびG²は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩またはL-Tである；

(xxv) Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷は、独立してO、SまたはNJ²である；

(xxvi) V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷およびV⁸は、独立してO、SもしくはNJ³；CR^{1 0 2}R^{1 0 3}、または直接の結合である；

(xxvii) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸は、独立してR^{1 0 4}またはL-Tである；

(xxviii) それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

50

(x x i x) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；

(x x x) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷、Z⁸、A、B、G¹ および G² のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(x x x i) J¹、J² および J³ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；

(x x x i i) R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴ および R¹⁵ は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、SO₂、SO₃、カルボン酸、C₁₋₆ のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである；

(x x x i i i) R¹³ および R¹⁴ は、場合により一緒になって結合を形成してもよい；ならびに

(x x x i v) R¹⁰⁰、R¹⁰¹、R¹⁰²、R¹⁰³ および R¹⁰⁴ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、SO₂、SO₃、チオアルキルまたはアミノである；

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 24】

治療薬が抗生物質である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

治療薬が、正常でない細胞増殖に関連する疾患の治療に有用である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

治療薬が感染症の治療に有用である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 27】

治療薬が心臓血管系障害の治療に有用である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 28】

治療薬が核酸、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、もしくは遺伝子発現に影響を与えるその他の物質である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 29】

検出可能な薬剤がラジオイメージングに有用である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 30】

検出可能な薬剤が放射性核種または常磁性の金属原子である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 31】

コバラミン輸送タンパク質が、検出可能な放射性核種もしくは検出可能な常磁性の金属原子と直接結合しているかまたはリンカーによって結合している、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 32】

金属の放射性核種もしくは常磁性の金属原子を含む検出可能な薬剤がコバラミンと結合している、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 33】

検出可能なキレート基が D P T A である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 34】

金属の放射性核種もしくは常磁性の金属原子がテクネチウム 99m、インジウム 111 もしくはガドリニウム 157 である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 35】

10

20

30

40

50

検出可能な放射性核種が非金属の放射性核種である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 36】

非金属の放射性核種が炭素 11、フッ素 18、臭素 76、ヨウ素 123 もしくはヨウ素 124 である、請求項 19 または 23 に記載の組成物。

【請求項 37】

コバラミンが結合した検出可能な薬剤またはコバラミンが結合した治療薬の、それが必要な宿主への取り込みを促進するための薬剤を製造するための、検出可能な薬剤または治療薬を、コバラミン輸送タンパク質と共に含む組成物の使用。

【請求項 38】

コバラミン輸送タンパク質が内性因子、トランスコバラミン I、トランスコバラミン II、トランスコバラミン III またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 37 に記載の使用。

10

【請求項 39】

コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものとまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものが、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、腔内投与または尿道内投与を介して投与される、請求項 37 に記載の使用。

20

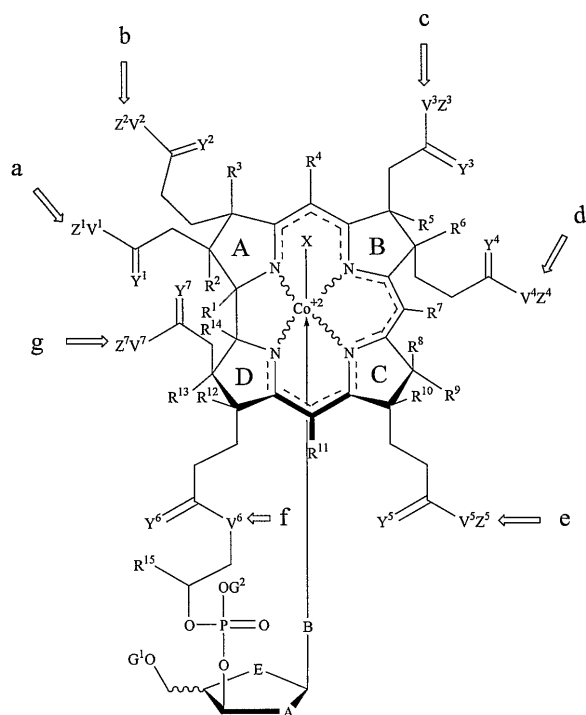
【請求項 40】

コバラミンまたはコバラミン輸送タンパク質が不足していない患者に、コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものとまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものを投与する、請求項 37 に記載の使用。

【請求項 41】

コバラミンコンジュゲートが、式：

【化3】



10

20

式中：

(x x x v) 化学構造における波線は、三つの Co - N の配位結合と一つの Co - N の共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合には、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

(x x x v i) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない（すなわち炭素を五価としない）ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す

30

(x x x v i i) X は、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシル L - T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(x x x v i i i) B は、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L - T で場合により置換されていてもよい；

(x x x i x) A は、O、S、N J¹、C R^{1 0 0} R^{1 0 1} または C (R^{1 0 0}) V⁸ Z⁸ である；

(x l) E は O または S である；

40

(x l i) G¹ および G² は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩または L - T である；

(x l i i) Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶ および Y⁷ は、独立して O、S または N J² である；

(x l i i i) V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷ および V⁸ は、独立して O、S もしくは N J³；C R^{1 0 2} R^{1 0 3}、または直接の結合である；

(x l i v) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷ および Z⁸ は、独立して R^{1 0 4} または L - T である；

(x l v) それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

50

(xlv i) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；

(xlv ii) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、A、B、 G^1 および G^2 のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(xlv iii) J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；

(xl ix) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである；

(l) R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって 結合を形成してもよい；ならびに

(li) R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである；

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグである、請求項 37 に記載の使用。

【請求項 42】

コバラミンが結合した検出可能な薬剤またはコバラミンが結合した治療薬の取り込みを促進するための、検出可能な薬剤または治療薬を、コバラミン輸送タンパク質と共に含む組成物。

【請求項 43】

コバラミン輸送タンパク質が内性因子、トランスコバラミン I、トランスコバラミン II、トランスコバラミン III またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 44】

コバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした診断薬にコバラミンが結合したものとまたはコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートした治療薬にコバラミンが結合したものが、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介する投与に適するものである、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 45】

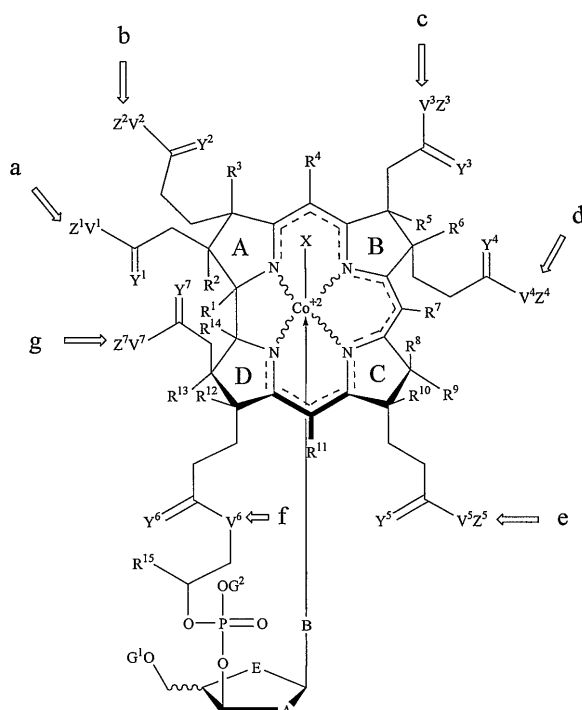
コバラミンコンジュゲートが、式：

10

20

30

【化4】



10

20

式中：

(lii) 化学構造における波線は、三つのCo-Nの配位結合と一つのCo-Nの共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合には、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

(liii) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない（すなわち炭素を五価としない）ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す

30

(liv) Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシルL-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(lv) Bは、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L-Tで場合により置換されていてもよい；

(lvi) Aは、O、S、NJ¹、CR^{1 0 0}R^{1 0 1}またはC(R^{1 0 0})V⁸Z⁸である；

(lvii) EはOまたはSである；

40

(lviii) G¹およびG²は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩またはL-Tである；

(lix) Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷は、独立してO、SまたはNJ²である；

(lx) V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷およびV⁸は、独立してO、SもしくはNJ³；CR^{1 0 2}R^{1 0 3}、または直接の結合である；

(lxi) Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸は、独立してR^{1 0 4}またはL-Tである；

(lxii) それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

50

(1 x i i i) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；
 (1 x i v) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、A、B、 G^1 および G^2 のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(1 x v) J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；

(1 x v i) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである；

(1 x v i i) R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって結合を形成してもよい；ならびに

(1 x v i i i) R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである；

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグである、請求項 42 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断薬または治療薬が結合したコバラミンまたはその誘導体を輸送タンパク質と共に同時投与して、宿主細胞へ送達される薬剤の量を増加させることである。本出願は、2001年9月28日に出願された米国特許出願第60/326,183号についての優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

ビタミン B_{12} は正常な生理作用にとって極めて重要である。ビタミン B_{12} は水溶性であり、毒性を示さないことが知られており、そして過剰なものは腎系球体で濾過されて排泄される。 B_{12} は、少なくとも二種の極めて重要な細胞内の代謝経路に関与する。1948年にビタミン B_{12} がシアノコバラミンとして単離されてから数年の間は、シアノコバラミンと、その光による分解産物かもしれないヒドロキシコバラミンとが人体に存在することが想定された。その後、シアノコバラミンは、ビタミン B_{12} の単離での人為的な産物であること、およびヒドロキシコバラミンおよび二種の補酵素型（メチルコバラミンとアデノシルコバラミン）が体内での天然型の物質であることが認められてきた。誘導体であるメチルコバラミンは、メチオニンシンターゼの補因子として機能する。メチオニンシンターゼはホモシステインのメチル化を触媒し、そこでは、 N^5 -メチル-テトラヒドロ葉酸塩がメチル基を提供し、テトラヒドロ葉酸塩は種々の葉酸経路において再利用可能なものとなる。メチルマロニル-CoA をスクシニル CoA に転位させる代謝経路において、デオキシアデノシルコバラミンはメチルマロニル CoA ムターゼと共に機能する。高等生物は B_{12} を合成することができない。

【0003】

B_{12} または生物学上の代謝産物を生理学的に活用するには、タンパク質の結合に要する多数の複雑に組み立てられたメカニズムの境界面と、吸収、輸送および細胞への取り込みのための膜レセプターとが必要である。これらのタンパク質のうちの最も重要なものとしては：胃壁細胞によって分泌され、食物の B_{12} と結合し、そして吸収のために回腸に沿ってさらに輸送するタンパク質である内性因子 (IF)；回腸の中間部から末端部における上皮粘膜の刷子縁上にある、IF- B_{12} と結合し吸収する IF- B_{12} レセプター；結合して TCII- B_{12} の複合体を吸収するよりも、腸での吸収部位およびその最初の

貯蔵部位の肝臓から、身体組織および組織細胞の原形質膜上の特定のレセプターへ B_{12} を輸送する血漿タンパク質であるトランスコバラミン I I (TCII) が挙げられる。

【0004】

ビタミン B_{12} (アデノシル -、シアノ -、ヒドロキソ - またはメチルコバラミン) は、輸送タンパク質のトランスコバラミン I、II または III (「TC」) と結合して生物学的に活性となるはずであり、経口投与の場合は IF と結合するはずである。IF - B_{12} の複合体が回腸末端部の IF - B_{12} レセプターと結合すると、ビタミン B_{12} の胃腸内での吸収が起こる。同様に、体全体でのビタミン B_{12} の血管内の輸送とそれに続く細胞への取り込みは、それぞれコバラミン輸送タンパク質 (I、II または III) および細胞膜のコバラミンレセプターを経由して起きるのが典型的である。コバラミン輸送タンパク質 - ビタミン B_{12} コンジュゲートが細胞内に吸収された後、輸送タンパク質はリゾチームにより分解され、ビタミン B_{12} が細胞質内に放出される。次いで、細胞内の需要に応じて、ビタミン B_{12} のすべての型がアデノシル -、ヒドロキソ - またはメチルコバラミンに相互転換することができる。たとえば、エー・イー・フィンクラー (A. E. Finckler) ら、Arch. Biochem. Biophys., 120, 79 (1967); シー・ホール (C. Hall) ら、J. Cell Physiol., 133, 187 (1987); エム・イー・ラパッツ (M. E. Rappazzo) ら、J. Clin. Invest., 51, 1915 (1972) およびアール・ソダ (R. Soda) ら、Blood, 65, 795 (1985) を参照すること。

10

【0005】

IF および TC - II の両方が不足すると、巨赤芽球性貧血および神経系の脱髄疾患などの異常に至る。血漿において、TC - I のターンオーバーは極めて遅く ($t_{1/2} = 10$ 日間)、そしてこのものはコバラミンの主要な貯蔵タンパク質として機能するように見える。アレン (Allen) (1975) は、TC - I が過剰のコバラミンの貯蔵に参与し、分解されたコバラミンを取り除くためにそれと結合するのかもしれないことを示唆している。TC - I は、皮膚を通しての光分解に対して血清のコバラミンを安定化させる。

20

【0006】

刷子縁膜の先端に IF - B_{12} が一旦付着すると、TC に結合した腸細胞から B_{12} が離れる前に 3 時間から 4 時間の遅延が存在する。レセプター媒介型エンドサイトーシスを介して IF - B_{12} が吸収される (セーザラム (Seetharam) ら、1985)。トランスサイトーシスの製造方法は、24 時間から 48 時間の範囲に収まるのが典型的である。

30

【0007】

IF - B_{12} のレセプターは精製されており、キュビリンと称されている。キュビリンには、その他の知られているレセプターとの明らかなホモロジーは見られない。IF - B_{12} のキュビリンへの結合は、カルシウムに依存する単一の結合部位 (20° での $K_d = 1 \sim 5$ nM) を伴った、高いアフィニティーの相互作用である。

【0008】

TC - II の主要な機能は、ビタミンの腸管吸収に続けて B_{12} を組織に送達することである。食物が不足している条件 (たとえば完全な菜食主義者の食事) 下で、または個体が食物からビタミンを取り込むことができない場合 (たとえば悪性貧血、胃または遠位小腸の外科的切除、吸収不良) では、 B_{12} の主要な貯蔵部位である肝臓は、そこから B_{12} を TC - II に転換することができる供給源である。 B_{12} に結合した TC - II の血漿からのクリアランスは急速である。

40

【0009】

血漿における B_{12} に結合した TC - II は、その原形質膜上で TC - II レセプターが発現している細胞に運ばれる。このレセプターは結合し、エンドサイトーシスによって複合体を吸収する。この TC - II / B_{12} / レセプター複合体は、エンドソーム内でレセプターと B_{12} に結合した TC - II との解離を伴う処理を受ける。リソソームの融合に続けて、TC - II から B_{12} が解離する。遊離の B_{12} は細胞質の区画およびミトコン

50

ドリアの区画に入る。そこでは、補因子の Me - コバラミンおよび Ado - コバラミンがそれぞれ合成される。

【0010】

血漿においておよび腸以外の組織液において、 B_{12} は TC と結合している。TC - B_{12} は、 B_{12} を組織へ輸送するのに不可欠な担体である。

【0011】

ビタミン B_{12} 誘導体は、薬物療法用の種々の薬剤を送達するための手段として提案されてきた。このような薬剤としては、抗生物質、抗ガン剤、放射標識、心臓血管系用薬、栄養補助食品および細胞増殖性疾患の治療に有用な薬剤が挙げられる。

【0012】

B_{12} の誘導体を調製するための製造方法は当分野において知られている。たとえば、¹²⁵I - ビタミン B_{12} 誘導体を調製するための製造方法は、ニースベンダー (Niesswender) ら (米国特許第 3,981,863 号) に記載されている。この製造方法において、ビタミン B_{12} は最初に軽度の加水分解処理を受けてモノカルボン酸の混合物となり、後述のハウツ (Houts) は主に (e) - 異性体が含まれることを開示している。次いで、この混合物を p - (アミノアルキル) フェノールと反応させて、 B_{12} 酸にフェノール基を導入する (遊離カルボン酸基のうちの一つとの反応を介する)。次いで、置換基が雑多の B_{12} 誘導体のフェノール基の置換基をヨウ素化する。この米国特許から、このようにして作製される ¹²⁵I - B_{12} 誘導体の混合物は、その混合物に対して産生された抗体を用いる B_{12} のラジオイムノアッセイに有用であることが教示される。

10

20

【0013】

ティー・エム・ハウツ (米国特許第 4,465,775 号) には、放射標識化されたニースベンダーらの混合物の成分が、同等のアフィニティーで IF とは結合しないことが報告されていた。ハウツは、純粋なモノカルボン酸の (d) - 異性体の放射性ヨウ化誘導体が、IF が用いられる B_{12} のアッセイに有用であることを開示した。

【0014】

発明者としてコリンズ (Collins) およびホゲンkamp (Hogenkamp) が列挙されている米国特許第 5,739,313 号; 第 6,004,533 号; 第 6,096,290 号および PCT 公報 WO 97/18231 号では、天然型のビタミン B_{12} のプロピオンアミド部分を介してのビタミン B_{12} の放射性核種による標識化が開示されている。発明者らは、軽度の加水分解を経て、コロール環の b -、d - および e - 位のプロピオンアミド部分をモノカルボン酸に転換し、カラムクロマトグラフィーによってカルボン酸を分離した。次いで、発明者らは、二官能性のリンキング部分をアミド結合を介してカルボン酸官能基に結合させ、再度アミド結合を介してキレート剤をリンキング部分に結合させた。次いで、キレート部分を用いて、放射性核種を、治療目的または診断目的に用いることができるビタミンに結合させた。

30

【0015】

コリンズらは、WO 01/28595 号 (PCT/US 00/10098) において、タンパク質のリンカーを介して検出可能な基と結合している一連の新規コバラミンコンジュゲートを開示しており、このものは腫瘍の画像化に有用である。

40

【0016】

コリンズらは、WO 01/28592 号 (PCT/US 00/10097) において、化学療法薬の残基と直接結合しているかまたはリンカーによって結合している一連の新規コバラミンコンジュゲートを開示しており、このものは、正常でない細胞増殖の治療に有用である。

【0017】

コリンズらは、WO 00/62808 号 (PCT/US 00/10100) において、B - 10 もしくは Gd - 157 を含む分子の残基と直接結合しているかまたはリンカーによって結合している一連の新規コバラミンコンジュゲートを開示しており、このものは、正常でない細胞増殖の治療に有用である。

50

【0018】

発明者としてグリソム (G r i s s o m) らが列挙されている P C T 公報 W O 9 8 / 0 8 8 5 9 号では、生理活性物質を含むコンジュゲートと、その中で生理活性物質が共有的に直接コバルト原子と結合しているか、またはスペーサーを介して間接的に結合している有機コバルト複合体が開示されている。有機コバルト複合体はコバラミンであってもよく、そして生理活性物質は化学療法薬であってもよい。しかしながら、ただ一つの生理活性物質 (すなわち化学療法薬) だけが有機コバルト複合体 (すなわちコバラミン) に結合し、そしてその連結はコバルト原子 (すなわちコバラミンの 6 - 位) を介するものだけである。細胞の求核剤もしくは酵素作用による通常の置換の結果として、または外部のシグナル (たとえば、光、光励起、超音波もしくは磁場の存在) の適用によって、生理活性物質とコバルト原子との間の弱い共有結合が切断され、それにより生体複合体から生理活性物質が遊離する。

10

【0019】

ラッセル - ジョーンズ (R u s s e l l - J o n e s) らによる米国特許第 5 , 4 2 8 , 0 2 3 号では、経口用のホルモン製剤を送達するためのビタミン B₁₂ コンジュゲートが開示されている。ラッセル - ジョーンズは、ビタミン B₁₂ コンジュゲートが、インビボで内性因子と結合すること、脊椎動物の宿主の腸管内腔からの複合体の取り込みとその宿主の体循環への輸送が可能であるはずであることを教示している。ビタミンの加水分解されたプロピオンアミド結合を介して、ホルモンはビタミン B₁₂ と結合する。この特許では、ホルモン、生理活性ペプチド、治療薬、抗原およびハプテンを経口投与するのに有用な方法が記載され、そしてネオマイシン、塩化サルブタモール、ピリメタミン、ペニシリン G、メチシリン、カルベニシリン、ペチジン、キシラジン、塩酸ケタミン、メフェネシンおよびデキストラン鉄が治療薬として列挙されている。ラッセル - ジョーンズらによる米国特許第 5 , 5 4 8 , 0 6 4 号では、' 0 2 3 号特許と同じアプローチを用いる、エリスロポエチンおよび顆粒球コロニー刺激因子を送達するためのビタミン B₁₂ コンジュゲートが開示されている。

20

【0020】

ラッセル - ジョーンズらによる P C T 公報 W O 9 4 / 2 7 6 4 1 号には、ポリマーを介して種々の活性を示す薬剤に結合するビタミン B₁₂ が開示されており、そこでは、全身に送達されるために、複合体は内性因子と結合することができる。特に、その文書では、種々のポリマー性のリンカーがビタミン B₁₂ 分子のプロピオンアミドの位置に連結すること、および種々の生理活性物質がポリマー性のリンカーに連結することが開示されている。具体的な生理活性物質としては、ホルモン、生理活性ペプチドおよびポリペプチド、抗ガン剤、抗生物質、解熱剤、鎮痛剤、抗炎症剤ならびに止血剤が挙げられる。ポリマーの具体例としては、炭水化物のポリマーおよび分岐鎖アミノ酸のポリマーが挙げられる。W O 9 4 / 2 7 6 4 1 号において用いられたリンカーはポリマー性のものである (それぞれが約 5 0 0 0 かそれを超える分子量を有する)。重要なことは、リンカーが作製される重合製造方法に起因して、リンカーは分子量の混合したものと表現されている。特に、この発明において用いられたポリマーが、确实でないサイズおよび/または确实でない構造であることが記載されている第 1 1 頁、第 2 5 ~ 2 6 行を参照すること。

30

40

【0021】

ラッセル - ジョーンズらによる P C T 公報 W O 9 9 / 6 5 9 3 0 号には、種々の薬剤がビタミン B₁₂ のリボース環の 5' - O H の位置に連結することが開示されている。この公報から、ポリマー、ナノ粒子、治療薬、タンパク質およびペプチドをビタミンに結合するために用いることができるシステムが示唆される。

【0022】

ハバーフィールド (H a b b e r f i e l d) らによる米国特許第 5 , 5 7 4 , 0 1 8 号には、治療上有用なタンパク質がリボース部分の第一ヒドロキシル部位に結合しているビタミン B₁₂ のコンジュゲートが開示されている。この特許には、治療上有用なタンパク質としてエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子およびヒト内性因子が列挙されてお

50

り、そしてこの特許から、複合体は経口投与に特に適していることが示唆される。

【0023】

モルガン、ジュニア (Morgan, Jr.) らによる米国特許第 5, 840, 880 号には、レセプター調節性の薬剤が結合したビタミン B₁₂ コンジュゲートが開示されており、このものは、細胞性の取り込みとビタミン B₁₂ の代謝を支配するレセプター輸送経路に影響を与える。このレセプター調節性の薬剤は、ビタミンと b -、d - または e - 位で結合する。

【0024】

ビタミン B₁₂ の使用について記載するその他の特許出願としては、ナス (Nath) による米国特許第 3, 936, 440 号 (放射性同位体の金属による金属キレート複合体の標識化方法) ; パーンスタイン (Bernstein) らによる米国特許第 4, 209, 614 号 (放射標識化に適するビタミン B₁₂ 誘導体) ; 米国特許第 4, 279, 859 号 (葉酸塩とビタミン B₁₂ の同時ラジオアッセイ) ; ヨレース (Yolles) による米国特許第 4, 283, 342 号 (抗ガン剤および製造方法) ; フランク (Frank) らによる米国特許第 4, 301, 140 号 (放射性医薬品による腎臓をモニタリングする方法) ; ホウツによる米国特許第 4, 465, 775 号 (そのようなアッセイのためのビタミン B₁₂ と標識化された誘導体) ; ウィルソン (Wilson) らによる米国特許第 5, 308, 606 号 (軟部組織腫瘍の治療方法および/または診断方法) ; 米国特許第 5, 405, 839 号 (ビタミン B₁₂ 誘導体、その調製方法およびその使用) ; ラッセル - ジョーンズらによる米国特許第 5, 449, 720 号 (ポリマーを用いてのビタミン B₁₂ 取り込みシステムの増幅) ; ラッセル - ジョーンズによる米国特許第 5, 589, 463 号 (ビタミン B₁₂ が結合した生理活性物質の経口による送達) ; アクスウォーシー (Axworthy) らによる米国特許第 5, 608, 060 号 (ピオチニダーゼ抵抗性ピオチン - DOTA コンジュゲート) ; ラッセル - ジョーンズらによる米国特許第 5, 807, 832 号 (ビタミン B₁₂ が結合した生理活性物質の経口による送達) ; モルガンらによる米国特許第 5, 869, 465 号 (レセプターの調節方法とその使用) ; ラッセル - ジョーンズらによる米国特許第 5, 869, 466 号 (GCSF のための、ビタミン B₁₂ が介在する経口による送達システム) が挙げられる。

【0025】

ルマ・パネルジー (Ruma Banerjee)、B₁₂ の化学と生化学、ジョン・ウィリー・アンド・サン (John Wiley and Sons) 社 (1999)、およびその本の特に第 II 部、第 15 節、題名は「コバラミンの診断用および治療用類似体」、エイチ・ピー・シー・ホゲンキャンプ、ダグラス・エイ・コリンズ、チャールズ・ピー・グリソムおよびフレデリック・ジー・ウェスト (West) による、も参照すること。

【0026】

B₁₂ または B₁₂ がコンジュゲートした薬剤を投与することには、悩ましい多数の問題がある。経口投与後の B₁₂ の胃腸系への取り込みは、IF の量と利用できる程度によって限定されている。一日あたりわずかに 2 μg から 5 μg の B₁₂ が消化管内で取り込まれ得る。そして実際に血流に吸収された 2 μg から 5 μg のうちで残存する割合は不明である。B₁₂ または B₁₂ がコンジュゲートした薬剤を静脈内に投与した場合、わずかに 1 mg 未満しか吸収され得ない。25% から 40% が排泄され、そして残りが貯蔵されるのが典型的である。IF の不足は、B₁₂ の取り込みの低下を導き、そして悪性貧血のような疾患の状態の一因となり得る。コンジュゲートした B₁₂ の取り込みと、コンジュゲートしていない B₁₂ 単独の取り込みとの間には顕著な違いがないという証拠が存在する。

【0027】

クーパー、ビー・エー (Cooper, BA) ら ((1961) Nature, 191: 393 - 395) は、内性因子に結合した、放射標識化されたビタミン B₁₂ の、ヒトおよびマウスの腫瘍細胞におけるインビトロでの取り込みが高まったことを述べている。

【0028】

10

20

30

40

50

ウチノ、ハルト (Uchino, Haruto) ら ((1964年4月24日) *Annals of the NY Academy of Science*, 112: 844-863) は、予め内性因子が結合したアデノシルコバラミンをラットに経口投与および静脈内投与した結果、ラット組織におけるコバラミンの取り込みが向上したことを開示している。クーバーおよびウチノがこれらの予備的な結果を公表して以来40年の間、そしてコバラミンの分野で集中的な研究があったのにもかかわらず、この手の調査の追求は無視されてきた。

【0029】

セーザラムらによる米国特許第6,183,723号には、トランスコバラミン-IIをコバラミンにコンジュゲートさせることによって、内性因子または内性因子レセプターが欠損している患者を治療する方法が開示されている。セーザラムらは、その経路によって、消化管からトランスコバラミンIIレセプターを介するトランスコバラミンIIとのコンジュゲートを經由して、コバラミンが吸収され得るところの新規経路を発見した。彼らは、十分に認められている、内性因子/内性因子レセプターが介在するコバラミンの消化管における輸送を、このトランスコバラミンIIが介在する輸送が迂回するということは、正常な条件下ではまったく想像できないということを開示している。しかしながら、コバラミンの正常な取り込みの重要性を欠いているのにもかかわらず、内性因子または内性因子が欠損している患者などの遺伝病を患う患者にとっては有用である。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0030】

本発明の目的は、ビタミンB₁₂、または治療目的および診断目的の物質がコンジュゲートしたビタミンB₁₂の効率性を高めるための方法および組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0031】

コバラミンをコバラミン輸送タンパク質と(共有的に、イオンのにまたは混合して)組み合わせて投与することによって、診断薬または治療薬が結合したコバラミンの取り込みが顕著に高められることを見出した。一般的な実施形態において、検出可能な薬剤もしくは治療薬とコンジュゲートしたトランスコバラミンIIまたは内性因子レセプターのリガンドのあらゆるものの量であって細胞に送達された量を、コバラミン輸送タンパク質と(共有的に、イオンのにまたは混合して)組み合わせることによって増加させることができる。

30

【0032】

この時点まで、静脈注射(1日あたり1mg)を經由するのと同じく、消化管(1日あたり2μgから5μg)からのコバラミンの吸収に制限があることが一般的に承認されてきた。コバラミン輸送タンパク質(たとえば、内性因子、トランスコバラミンI、トランスコバラミンIIおよびトランスコバラミンIIIなど)に、コバラミンが結合した診断薬または治療薬を組み合わせると、消化管からの吸収は1日あたり2μgから5μgより多くなり、または静脈注射を介する投与では1日あたり1mgより多くなるという発見は、当分野における真の進展を意味する。発明の背景において開示された特許の教示では、取り込み、バイオアベイラビリティおよび/または診断上のシグナルの向上を達成させる、コバラミンが結合した診断薬または治療薬の送達可能な濃度を高める方法は述べられてはいない。セーザラムらの公報とは反対に、B₁₂の不足またはB₁₂に関連するものの不足を示さない患者にこの方法を用いることができる。

40

【0033】

トランスコバラミンIIまたは内性因子レセプターのリガンドとしては、たとえば、ビタミンB₁₂、シアノコバラミン、アデノシルコバラミン、ヒドロキシコバラミンもしくはメチルコバラミンまたは式Iの化合物などのコバラミンとすることができる。

【0034】

有効量のコバラミン輸送タンパク質(本明細書で用いられるように、この用語は内性因子

50

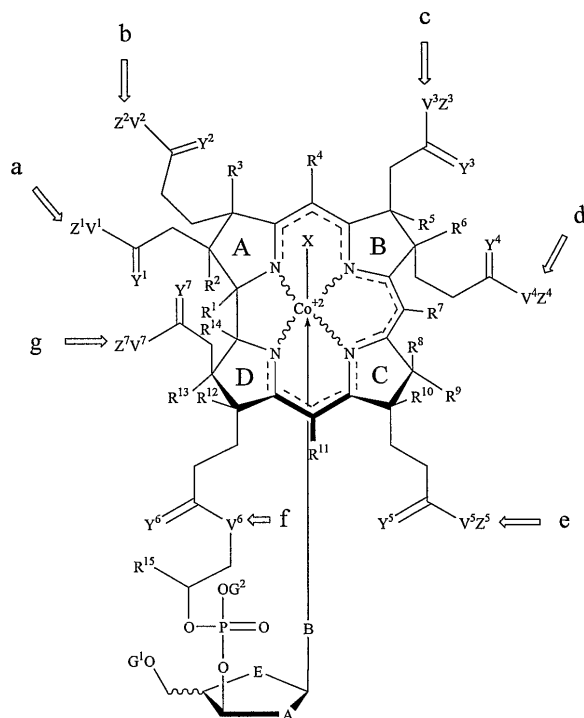
、トランスコバラミンⅠ、トランスコバラミンⅠⅠおよびトランスコバラミンⅠⅠⅠを包含するが、これらに限定されるわけではない)と共に、式Ⅰの化合物を診断用、治療用またはその他の物質と結合させることができる。

【0035】

式Ⅰの化合物はその構造のものである：

【0036】

【化1】



10

20

式中：

(i) 化学構造における波線は、三つのCo-Nの配位結合と一つのCo-Nの共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合には、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

30

(ii) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない(すなわち炭素を五価としない)ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す；

(iii) Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシルL-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(iv) Bは、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L-Tで場合により置換されていてもよい；

40

(v) Aは、O、S、NJ¹、CR^{1 0 0}R^{1 0 1}またはC(R^{1 0 0})V⁸Z⁸である；

(vi) EはOまたはSである；

(vii) G¹およびG²は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩またはL-Tである；

(viii) Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷は、独立してO、SまたはNJ²である；

(ix) V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷およびV⁸は、独立してO、SもしくはNJ³；CR^{1 0 2}R^{1 0 3}、または直接の結合である；

50

(x) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} または L-T である；

(xi) それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

(xii) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；

(xiii) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、A、B、 G^1 および G^2 のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(xiv) J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； 10

(xv) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである；

(xvi) R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって結合を形成してもよい；ならびに

(xvii) R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである； 20

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグである。

【0037】

診断のためには、(i) コバラミン輸送タンパク質、または (ii) 診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物、のいずれか一方または両方を、放射リガンドもしくはその他の検出可能な薬剤で標識化すればよい。

【0038】

治療のためには、(i) コバラミン輸送タンパク質、または (ii) 診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物、のいずれか一方または両方を、既知の治療薬とコンジュゲートすればよい。具体的には、感染症の場合には既知の抗生物質であり；心臓血管系障害の場合には既知の心臓血管系用薬であり；正常でない細胞増殖の場合には既知の増殖抑制剤またはアンチセンス治療薬である。 30

【0039】

種々の実施形態において、次のタイプの物質を、コバラミン輸送タンパク質と同時投与されるコバラミンコンジュゲートまたは式 I の化合物の複合体と結合させることができる。ここで、これらの物資には次のものが含まれるが、これらに限定されるわけではない：

(i) 正常でない細胞増殖に関連する疾患の治療に有用な化合物；

(ii) 抗生物質または抗ウイルス剤などの、感染症の治療に有用な化合物；

(iii) 心臓血管系障害の治療に有用な化合物； 40

(iv) 核酸、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、または転写因子などの遺伝子発現に影響を与えるその他の物質；

(v) 種々の疾患の状態を画像化するためのラジオイメージングに有用な化合物；および

(vi) 検出可能な放射性核種または検出可能な常磁性の金属原子。

【0040】

そのようなコンジュゲート物質の具体例は、発明の背景で列挙された特許または公表された特許出願に詳細に記載されている。

【0041】

一つの実施形態において、本発明は、コバラミンが結合した診断薬または治療薬をコバラミン輸送タンパク質と（共有的に、イオンのもしくは混合して）組み合わせて投与する 50

ことによって、診断薬もしくは治療薬が結合したコバラミンまたは診断薬もしくは治療薬が結合した式 I の化合物の送達効率を増加させる方法を包含する。コバラミン輸送タンパク質は、内性因子、トランスコバラミン I、トランスコバラミン I I またはトランスコバラミン I I I であってよい。コバラミンが結合した診断薬またはコバラミンが結合した治療薬をコバラミン輸送タンパク質と共に投与することによって、診断薬もしくは治療薬に結合したコバラミンまたは診断薬もしくは治療薬に結合した式 I の化合物を、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介して投与することができる。

10

【 0 0 4 2 】

診断薬もしくは治療薬が結合したコバラミンまたは診断薬もしくは治療薬が結合した式 I の化合物を、コバラミン輸送タンパク質と共に、コバラミンの不足またはコバラミンに関連するものの不足を示さない患者に投与することができる。たとえば、遺伝によるかまたは後天的なコバラミンの欠乏症（たとえば内性因子、内性因子レセプターもしくはトランスコバラミン I I などのコバラミン輸送タンパク質の欠如による欠損症）などの患者である。

【 0 0 4 3 】

一つの実施形態において、医薬適合性の担体にて内性因子と共に、診断用、治療用またはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物を宿主に経口的に送達する。コバラミンまたは式 I の化合物は、内性因子と（共有的に、イオンの、配位的にもしくはファンデルワールス力を介して）結合した状態で、または内性因子とは結合していない（すなわち混合）状態で投与される。

20

【 0 0 4 4 】

別の実施形態において、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物を、トランスコバラミン I、I I または I I I と共に、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介して投与する。コバラミンまたは式 I の化合物は、トランスコバラミン I、I I または I I I と（共有的に、イオンの、配位的にまたはファンデルワールス力を介して）結合した状態で、またはトランスコバラミン I、I I もしくは I I I とは結合していない（すなわち混合）状態で投与される。

30

【 0 0 4 5 】

典型的な実施形態において、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物は、所望の結果を達成する任意の比率にて投与される。一つの実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のコバラミンまたは一分子の式 I の化合物である。本発明の代替可能な実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のコバラミンまたは一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のコバラミン輸送タンパク質、たとえば 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍またはそれを超える過剰量のコバラミン輸送タンパク質である。本発明の別の実施形態において、この比率は、一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、少なくとも一分子のコバラミンまたは少なくとも一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のコバラミンまたは過剰量の式 I の化合物、たとえば 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍またはそれを超える過剰量のコバラミンまたは式 I の化合物である。

40

【 0 0 4 6 】

医薬適合性の担体で製剤化する前に、コバラミン輸送タンパク質を、診断用、治療用もし

50

くはその他の物質が結合したコバラミンもしくはそれが結合した式 I の化合物と物理的に混合することによって、または担体と一緒に、これらを別個に単純に混合することによって混合物を調製することができる。

【0047】

当分野において知られている任意の供給源から、IF またはトランスコバラミン I、II もしくは III などのコバラミン輸送タンパク質を得ることができる。具体的な実施形態において、当分野における既知の方法によって、血液からコバラミン輸送タンパク質を抽出する。本発明の代替可能な実施形態において、技術的に既知の方法によって、牛乳からコバラミン輸送タンパク質を抽出する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

治療薬または診断薬（すなわち検出可能なもの）とコンジュゲートしたコバラミン誘導体を、さらに IF も TC-I、-II もしくは -III などのコバラミン輸送タンパク質とコンジュゲートするかまたはそれと共に投与すると、コバラミン誘導体と治療薬または診断薬を単独で投与したもの比べて、吸収される活性成分または診断用の成分がより多くなることが見出された。

【0049】

開示されたとおりの発明は、有効量のコバラミン輸送タンパク質（本明細書で用いられるように、この用語は内性因子、トランスコバラミン I、II および III を含むがこれらに限定されるわけではない）と共に投与することによって宿主に送達される診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミン、またはそれが結合した式 I の化合物のいずれかの取り込みおよび生体内吸収を向上させる方法および組成物である。

【0050】

一つの実施形態において、医薬適合性の担体にて内性因子と共に、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物を宿主に経口的に送達する。コバラミンまたは式 I の化合物は、内性因子と（共有的に、イオンの、配位的にもしくはファンデルワールス力を介して）結合した状態で、または内性因子とは結合していない（すなわち混合）状態で投与される。

【0051】

別の実施形態において、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物を、トランスコバラミン I、II もしくは III と共に、坐剤、経皮、鼻内噴霧、手術による移植、手術による体内への塗布、輸液ポンプまたはカテーテルを介することを含む、静脈内投与、腸管外投与、皮内投与、硬膜外投与、髄腔内投与、胸骨内投与、関節内投与、滑膜内投与、クモ膜下腔内投与、動脈内投与、心臓内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、眼窩内投与、関節包内投与、局所投与、経皮貼布投与、直腸内投与、膣内投与または尿道内投与を介して投与する。コバラミンまたは式 I の化合物は、トランスコバラミン I、II もしくは III と（共有的に、イオンの、配位的にもしくはファンデルワールス力を介して）結合した状態で、またはトランスコバラミン I、II もしくは III とは結合していない（すなわち混合）状態で投与される。

【0052】

典型的な実施形態において、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物は、所望の結果を達成する任意の比率にて投与される。一つの実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のコバラミンまたは一分子の式 I の化合物である。本発明の代替可能な実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のコバラミンまたは一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のコバラミン輸送タンパク質、たとえば 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍またはそれを超える過剰量のコバラミン輸送タンパク質である。本発明の別の実施形態において、この比率は、一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、少なくとも一分子のコバラミンまたは少なくとも一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のコバラミンまたは過剰量の式

10

20

30

40

50

Iの化合物、たとえば1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれを超える過剰量のコバラミンまたは式Iの化合物である。

【0053】

医薬適合性の担体で製剤化する前に、コバラミン輸送タンパク質を、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンもしくはそれが結合した式Iの化合物と物理的に混合することによって、または担体と一緒に、これらを別個に単純に混合することによって混合物を調製することができる。あるいは、イオンのもしくは共有的に輸送タンパク質をコバラミンまたは式Iの化合物と結合させることができ、またはその他の方法によってコンジュゲートすることができる。

【0054】

診断のためには、(i)コバラミン輸送タンパク質、または(ii)診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式Iの化合物、のいずれか一方または両方を、放射リガンドもしくはその他の検出可能な薬剤で標識化すればよい。

【0055】

一例として、宿主に送達される、診断用の成分が結合したコバラミンまたは診断用の成分が結合した式Iの化合物の同時投与によって、以前より検出可能なサイズよりも小さな充実性腫瘍の塊を発見することが可能となる。というのは、腫瘍細胞がより多くの検出可能な薬剤を吸収するからである。このことは、乳ガンの患者に関して特に重要である。というのは、この技術によって、より楽観的な予後の可能性を伴った、進行のより早期の段階での乳房の腫瘍の成長を確認する可能性の余地があるからである。

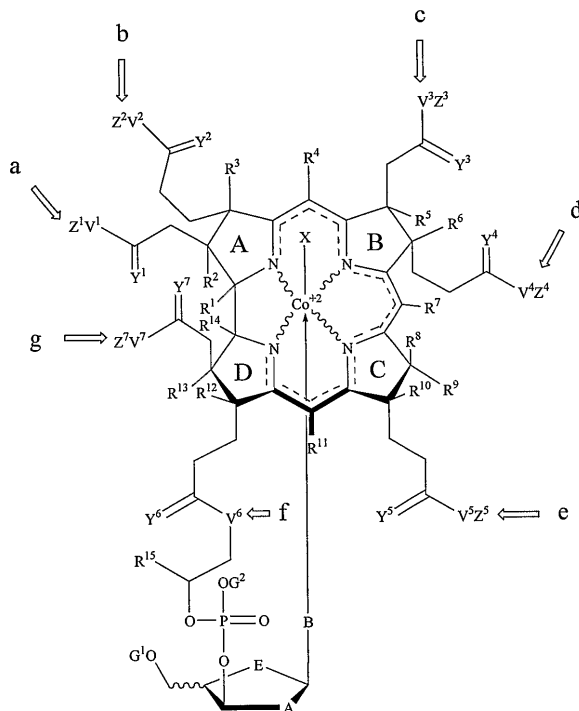
【0056】

I.TC-レセプターのリガンドまたはIF-レセプターのリガンド

本発明のTC-レセプターのリガンドまたはIF-レセプターのリガンドの一つは、式Iのものである：

【0057】

【化2】



式中：

(i)化学構造における波線は、三つのCo-Nの配位結合と一つのCo-Nの共有結合が存在するような配位結合または共有結合のいずれかを示し、ここで、配位結合の場合には、窒素の原子価は、隣接する環炭素との二重結合によってかまたは水素によって満たされる；

10

20

30

40

50

(i i) 化学構造における破線は、二重結合が元素の原子価を増加させない(すなわち炭素を五価としない)ような、そして単結合の場合には、原子価が水素によって満たされるような、二重結合または単結合のいずれかを示す；

(i i i) X は、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、アデノシル L - T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環、ヘテロアリールまたはアルキルヘテロアリールである；

(i v) B は、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L - T で場合により置換されていてよい；

(v) A は、O、S、 $N J^1$ 、 $C R^{1 0 0}$ 、 $R^{1 0 1}$ または $C (R^{1 0 0}) V^8 Z^8$ である 10

；

(v i) E は O または S である；

(v i i) G^1 および G^2 は、独立して水素、アルキル、アシル、シリル、リン酸塩または L - T である；

(v i i i) Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立して O、S または $N J^2$ である；

(i x) V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立して O、S もしくは $N J^3$ ； $C R^{1 0 2}$ 、 $R^{1 0 3}$ 、または直接の結合である；

(x) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して $R^{1 0 4}$ または L - T である； 20

(x i) それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；

(x i i) それぞれの T は、独立して診断薬または治療薬である；

(x i i i) Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、A、B、 G^1 および G^2 のうちの少なくとも一つは、アンチセンス技術に有用な核酸配列、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸を含む；

(x i v) J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；

(x v) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 $R^{1 0}$ 、 $R^{1 1}$ 、 $R^{1 2}$ 、 $R^{1 3}$ 、 $R^{1 4}$ および $R^{1 5}$ は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 $S O_2$ 、 $S O_3$ 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； 30

(x v i) $R^{1 3}$ および $R^{1 4}$ は、場合により一緒になって結合を形成してもよい；ならびに

(x v i i) $R^{1 0 0}$ 、 $R^{1 0 1}$ 、 $R^{1 0 2}$ 、 $R^{1 0 3}$ および $R^{1 0 4}$ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 $S O_2$ 、 $S O_3$ 、チオアルキルまたはアミノである；

の化合物、もしくはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、塩またはそのプロドラッグ 40

である。

【0058】

診断のためには、(i) コバラミン輸送タンパク質、または (i i) 診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物、のいずれか一方または両方を、放射リガンドもしくはその他の検出可能な薬剤で標識化すればよい。

【0059】

治療のためには、(i) コバラミン輸送タンパク質、または (i i) 診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したコバラミンまたはそれが結合した式 I の化合物、のいずれか一方または両方を、既知の治療薬とコンジュゲートすればよい。具体的には、感染症の場合には既知の抗生物質であり；心臓血管系障害の場合には既知の心臓血管系用薬であり； 50

正常でない細胞増殖の場合には既知の増殖抑制剤またはアンチセンス治療薬である。

【0060】

種々の実施形態において、次のタイプの物質を、コバラミン輸送タンパク質と共に投与されるコバラミンコンジュゲートまたは式 I の化合物の複合体と結合させることができる。ここで、これらの物質には次のものが含まれるが、これらに限定されるわけではない：

- (i) 正常でない細胞増殖に関連する疾患の治療に有用な化合物；
- (ii) 抗生物質または抗ウイルス剤などの、感染症の治療に有用な化合物；
- (iii) 心臓血管系障害の治療に有用な化合物；
- (iv) 核酸、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、または転写因子などの遺伝子発現に影響を与えるその他の物質；
- (v) 種々の疾患の状態を画像化するためのラジオイメージングに有用な化合物；および
- (vi) 検出可能な放射性核種または検出可能な常磁性の金属原子；

そのようなコンジュゲート物質の具体例は、発明の背景で列挙された特許または公表された特許出願に詳細に記載されている。

【0061】

天然型のビタミン B₁₂ において、リン酸塩を介して B₁₂ 部分と結合し、そしてコバルトイオンと配位結合している -D-5, 6-ジメチルベンズイミダゾリルリボース 3'-リン酸塩が存在する。修飾を受けたビタミン B₁₂ の TC-レセプターのリガンドまたはその IF-レセプターのリガンドにおいて、M-糖成分は、その他の配置（すなわち -L、 -D および -L）であり得るにもかかわらず、同じように -D 配置であるのが一般的である。

【0062】

ビタミン B₁₂ が生理活性を示す形態の一つでは、X 位において 5'-デオキシアデノシル部分を有する。ビタミンの 5'-デオキシの位置でのメチレンラジカルの解離と再連結を介して、補酵素 B₁₂ の触媒作用が生じる。

【0063】

一つの具体的な実施形態において、コバラミンまたは式 I の化合物と診断薬または治療薬とをコンジュゲートさせるのに用いられるリンカーは、スペルミンまたはスペルミジンなどのポリアミンである。

【0064】

（正常でない細胞増殖に関連する感染または疾患のいずれかに由来する）増殖部位内またはその近傍でビタミン B₁₂ が優先的に取り込まれるので、コバラミンまたは本発明の式 I の化合物によって、感染部位または正常でない細胞増殖の部位を標的化したり、そして正常な細胞に対するこのような部位の割合がより高いものを選択的に画像化したりまたは治療することができる送達システムが提供される。上記で引用した化学構造および変数で反映されるように、広い範囲の類似体および誘導体がこれらの特性を獲得することができる。

【0065】

コバラミン輸送タンパク質に結合するというその基本的な能力を妨げないようなやり方で、コバラミンまたは式 I の化合物を修飾することができ、従って TC または IF レセプターと結合する。一つの実施形態において、ビタミン B₁₂ 構造のそれぞれの変数は独立して、(i) その天然のビタミン B₁₂ 構造を保持する、(ii) コバラミンコンジュゲートに診断薬もしくは治療薬を付与する、(iii) コバラミンコンジュゲートにより高い水溶性もしくはより高い安定性を与える、(iv) 担体のバイオアベイラビリティを高める；(v) コバラミン輸送タンパク質の TC-結合性タンパク質もしくは IF-結合性タンパク質についての結合親和性を、ビタミン B₁₂ についてよりも高くするか、もしくは少なくとも低下させない；または (vi) 製薬上の性能もしくは診断上の性能について望まれている別の特性を付与する。

【0066】

上記のように、Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷、Z⁸、M および G¹ の各部分の少

10

20

30

40

50

なくとも一つは診断薬または治療薬を含むのではあるが、V - Zの部分、X部分、M部分、K部分および/またはG¹部分の任意の部分を含む多数の位置を介して、診断薬または治療薬は式Iの化合物と結合することができる。一つの実施形態において、診断薬または治療薬は、Z²、Z⁴および/またはZ⁵を介して式Iの化合物に結合している(すなわち、Z²、Z⁴およびZ⁵の一つ以上がL - Tであり、そしてTが診断薬または治療薬である)。より具体的な実施形態において、診断薬または治療薬は、Z²の部分を通じて式Iの化合物に結合している(すなわち、Z²がL - Tであり、そしてTが診断薬または治療薬である)。上記の実施形態のそれぞれにおいて、診断薬または治療薬を含んでいない(単数または複数の)Z部分は、好ましくはその天然のビタミンB₁₂配置を保持し、ここではVZはNH₂である。あるいは、診断薬または治療薬を含んでいない(複数の)Z部分は、一つもしくは二つのJ¹で置換されたNH₂の第二アミノ類似体または第三アミノ類似体を有してもよい。

10

【0067】

診断薬または治療薬がそれらを介して結合するところのZ¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁶、Z⁷、Z⁸、X、MおよびG¹のいずれかの部分において、このような部分が、二つ以上の診断薬もしくは治療薬、または薬剤の組み合わせを含んでもよいこと、すなわち、それぞれのTは独立して、一つ以上のキレート部分を介してLに結合した一つ以上の診断薬または治療薬の残基を含んでもよいことが理解される。さらに具体的に言えば、一連の実施形態において、それぞれのTは、一つ以上のキレート部分を介して結合した1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10種の診断薬または治療薬を含んでもよい。

20

【0068】

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²およびR¹³は独立して、化合物とコパラミン輸送タンパク質またはレセプターとの間の結合を妨げない部分を表す。これらの部分を介してビタミンB₁₂を修飾して、分子の物理的特性、たとえば水への溶解性、安定性または*max*などを調節することができる。水への溶解性を高めるために好ましい基としては、ヘテロアルキル、アミノ、C₁₋₆のアルキルアミノ、C₁₋₆のアルコール、C₁₋₆のカルボン酸およびSO₃⁻が挙げられる。

【0069】

別の実施形態において、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²およびR¹³のうちの一つ、いくつかまたはすべては独立して、ビタミンB₁₂におけるそれらの本来の機能を果たすと想定する。従って、R¹、R²、R⁴、R⁵、R⁸、R⁹、R¹¹、R¹²およびR¹⁵のうちの一つ、いくつかまたはすべては独立して、一つの実施形態においてはメチルであり、そしてR³、R⁶、R⁷、R¹⁰、R¹³およびR¹⁴のうちの一つ、いくつかまたはすべては独立して水素である。

30

【0070】

別の実施形態において、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷のうちの一つ、いくつかまたはすべては独立して、ビタミンB₁₂におけるそれらの本来の機能を果たすと想定し、そしてそれらはOである。同様に、別の実施形態において、V⁶がビタミンB₁₂におけるその本来の機能を果たすと想定し、そしてそれはNHかまたはJ¹で置換されたその第一アミノ類似体である。

40

【0071】

さらに別の実施形態において、Xの位置がビタミンB₁₂におけるその本来の機能を果たすものと、すなわち、シアノ、ヒドロキシル、メチルまたは5'-デオキシアデノシルとして、最も好ましくは5'-デオキシアデノシルとして想定する。

【0072】

別の実施形態において、Mはプリン塩基またはピリミジン塩基のラジカルである。別の実施形態において、Mはアデノシン、グアニン、シトシン、ウリジンまたはチミンのラジカルである。さらに別の実施形態において、Mは5,6-ジメチルベンズイミダゾールのラジカルである。

50

【0073】

さらに別の実施形態において、KはCH(OH)である。

【0074】

さらに別の実施形態において、EはOである。

【0075】

別の実施形態において、G¹はOHである。

【0076】

さらに別の実施形態において、コンジュゲートの、任意の(単数もしくは複数の)診断薬または治療薬がそれを介して結合する部分以外のすべての構成要素がビタミンB₁₂におけるそれらの本来の機能を果たすものと想定する。(単数もしくは複数の)診断薬または治療薬は、好ましくはZ²、Z⁴および/またはZ⁵を介して、さらに好ましくはZ²部分を介してビタミンB₁₂構造に結合する。

10

【0077】

II. リンカー

上で述べたように、Lは、式Iの化合物とコンジュゲートした一つ以上の(単数もしくは複数の)診断薬または治療薬のリンカー分子の残基である。もし、複合体がコバラミン輸送タンパク質またはレセプターに結合する能力を顕著に弱めないのであれば、(Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁶、Z⁷、X、MおよびG¹の部分のいずれか一つにおける)Lが由来するところのリンカーの構造は決定的なものではない。Lとしては、TC担体がコバラミン輸送タンパク質またはレセプターに結合する能力を顕著に弱めないような任意の多価分子(二価以上)が好ましい。リンキング部分がコバラミンまたは式Iの化合物に接触することによって、ビタミンB₁₂またはTC-結合性担体の、コバラミンまたは式Iの化合物の50%以上が最も急速に結合するコバラミン輸送タンパク質へのアフィニティーが低下する場合、コバラミンまたは式Iの化合物がコバラミン輸送タンパク質またはレセプターに結合する能力は、「有意に弱められる」。ディー・エイ・コリンズおよびエイチ・ピー・シー・ホゲンカンブによって、J. Nuclear Medicine, 1997, 38, 717-723において記述された不飽和ビタミンB₁₂結合能力(UBBC)アッセイを用いて、このレセプターについてのリガンドの相対的なアフィニティーを比較することができる。

20

【0078】

一つの実施形態において、リンカーは明確な分子量を持ち、分子量分布を持たない。一つの実施形態において、リンカーの分子量は約2500、約2000、約1900、約1800、約1500、約1000または約500未満である。

30

【0079】

特に好ましいリンカーは、一種以上の造影剤とコンジュゲートするための複数の部位を持つものであり、ここで、このリンカーはユニモーダルな分子量を持つ。組み換えタンパク質の製造技術を採用して、実質的に一定した分子量のポリ(アミノ酸)リンカーを得ることができる。

【0080】

一つの実施形態において、リンカーはアミノ酸もしくはポリマーまたは複数のアミノ酸から形成されるペプチドである。ポリマーまたはペプチドは一つ以上のアミノ酸に由来してもよい。アミノ酸、ポリ(アミノ酸)またはペプチドは、カルボキシ末端またはアミノ末端を介してTをVに結合させることができる。アミノ酸残基、ペプチド残基またはポリ(アミノ酸)残基は、アミド結合(たとえば-N(R)C(-O)-もしくは-C(=O)N(R)-)、エステル結合(たとえば-OC(=O)-もしくは-C(=O)O-)、エーテル結合(たとえば-O-)、ケトン結合(たとえば-C(=O)-)、チオエーテル結合(たとえば-S-)、スルフィニル結合(たとえば-S(O)-)、スルホニル結合(たとえば-S(O)₂-)または直接の結合(たとえばC-C結合)(ここで、それぞれのRは独立してHまたは(C₁-C₁₄)のアルキルである)を介して、VおよびTと共有的に結合することができる。

40

50

【0081】

米国特許第4,612,302号;第4,853,371号;および第4,684,620号に開示されたようにして、ペプチド誘導体を調製することができる。本明細書で具体的に列挙されるペプチド配列は、左側がアミノ末端で、そして右側がカルボキシ末端で書かれているが、反対の流れをも含むことを意味する。特に適するペプチドおよびポリ(アミノ酸)としては、2~約20アミノ酸、2~約15アミノ酸または2~約12アミノ酸のものが含まれる。

【0082】

ポリ(アミノ酸)の一例は、ポリ-L-リシン($(-NHCH(CH_2)_4-NH_2)CO-$)_m-Qであり、ここで、QはH、(C₁-C₁₄)のアルキルまたは適切なカルボキシ保護基であり、mは2~約20、約5~約15または約8~約11である。ポリリシンは、活性を示す薬剤が容易に結びつくことができる第一アミン部位を複数提供する。あるいは、遊離のチオールまたは複数のグルタミン酸塩もしくはアスパラギン酸塩を供与するために、適切なカルボジイミドを用いてコンジュゲートするための遊離のカルボキシルを供与するために、複数のシステインを用いてリンカーを形成してもよい。同様に、リンカーは、コンジュゲートするための複数のヒスチジンまたはチロシンを含んでもよい。ポリ(アミノ酸)リンカーのその他の例は、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-ヒスチジン、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-セリン、ポリ-L-スレオニン、ポリ-L-チロシン、ポリ-L-リシン-L-フェニルアラニンまたはポリ-L-リシン-L-チロシンである。リンカーがポリリシン以外のポリ(アミノ酸)から導かれる場合、そのリンカーは、一連の実施形態において、2~約30アミノ酸、5~約20アミノ酸または8~約15アミノ酸から調製される。

【0083】

別の具体的な実施形態において、Lは次の化学構造の(少なくとも三つのアミノ部分を有する)ポリアミン残基である:NR'(アルキレン-NR')_nアルキレンNR'、ここで、nは1~20であり、アルキレンの炭素の長さをn単位の範囲内で変化させることができ、そしてそれぞれのR'は独立して、水素、低級アルキルまたはTである。Nは1~10が好ましい。さらに、Lが100原子以下、75原子以下、50原子以下、40原子以下、30原子以下、20原子以下または15原子以下の最も長い長さのものに沿ったバックボーンを有することが好ましい。Lを導くことができるポリアミンの具体例としては、スペルミン(H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂)、スペルミジン(H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH₂)、デカメチレンテトラアミンおよびペンタメチレンヘキサミンが挙げられる。これらのリンカーのサイズは明確であり、従って、造影剤についての複数の結合部位に加えて、コバラミンコンジュゲートによって、一貫性がありかつ予測可能な標的化が提供される。

【0084】

別の実施形態において、Lは式NH₂(CH₂)_xNH₂で示されるジアミンであり、ここで、xは2~20であり、2~12が好ましい。従って、1,6-ジアミノヘキサン、1,5-ジアミノペンタン、1,4-ジアミノブタンおよび1,3-ジアミノプロパンからリンカーを調製することができる。

【0085】

その他の適切なリンカーは、種々の水溶性分子と、アミノ酸、ペプチド、ポリ(アミノ酸)、ポリアミン、ポリオキシアルキレン、ポリ無水物、ポリエステル、ポリアミド、ポリグリコリドおよびジアミンとの共有結合から形成される。適切な水溶性分子としては、たとえば、ポリエチレングリコールおよびグルカル酸、ガラクトール酸およびキシラル酸などのジカルボン酸のモノサッカライドが挙げられる。

【0086】

その他の適切なリンカーとしては、式HO(O)C(CH₂)_xC(O)OHによって表されるものが挙げられ、ここで、xは2~20であり、2~12が好ましい。従って、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸、セバシン酸、アゼライン酸またはマレイ

10

20

30

40

50

ン酸からリンカーを調製することができる。その他のさらに適切なリンカーには、アミンと反応させた際にアミドを生じるカルボン酸誘導体が含まれる。このような反応性の群としては、一例として、酸塩化物および酸臭化物などのカルボン酸ハロゲン化物；無水酢酸およびトリフルオロ酢酸無水物などのカルボン酸無水物；p-ニトロフェニルエステルおよびN-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのエステル；ならびにイミダゾリドが挙げられる。このようなリンカーを用いるための技術は、ボダンスキー（Bodanszky）、ペプチド合成の原理、シュプリンガー・フェアラグ（Springer Verlag）社、ベルリン、1984に詳細に記載されている。

【0087】

一つの実施形態において、リンカーを修飾してVまたはTのいずれかとのコンジュゲートを容易にする。リンカーを修飾するのに適切な分子としては：ジスクシンイミジルスベラート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（BSS）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシナート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシナート）（スルホ-EGS）、p-アミノフェニル酢酸、ジチオ-ビス-（スクシンイミジルプロピオナート）（DSP）、3,3'-ジチオビス-（スルホスクシンイミジルプロピオナート）（DTSSP）、ジスクシンイミジルタルトラート（DST）、ジスルホスクシンイミジルタルトラート（スルホ-DST）、ビス（2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチレン）スルホン（BSOCOS）、ビス（2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチレン）スルホン（スルホ-BSOCOS）、ジメチルアジピミダート二塩酸（DMA）、ジメチルピメリミダート二塩酸（DMP）およびジメチルスベリミダート二塩酸（DMS）が挙げられる。

【0088】

生物分解性リンカー

種々の分解性リンカーを用いて、コバラミンまたは式Iの化合物を、活性を示す薬剤に結合させることができる。所望のリンカーは、たとえば酵素による切断によるかまたは全身のpHまたは体温による生物学的な条件の下で分解可能である。あるいは、pH、温度、超音波、磁場、放射（すなわちUVの放射）または光の変化などの外部からの操作によって、これらのリンカーの分解を誘導することができる。

【0089】

リンキング剤としての使用に適する放出制御製剤が記載されている米国特許の非限定的な例は：ローランサン（Laurencin）らによる米国特許第5,356,630号（生理活性因子の放出制御のための送達システム）；サンチーニ、ジュニア（Santini, Jr.）らによる米国特許第5,797,898号（薬物送達用マイクロチップデバイス）；エドワーズ（Edwards）らによる米国特許第5,874,064号（肺への薬物送達のための空気力学的に軽量の粒子）；キム（Kim）らによる米国特許第5,548,035号（ポリエチレンオキシドと脂肪族ポリエステルブロックとを含有する薬物送達マトリクスとしての生物分解性コポリマー）；サベージ（Savage）らによる米国特許第5,532,287号（放射線加硫を施した薬物放出制御膜）；カール（Kahl）らによる米国特許第5,284,831号（薬物送達ポルフィリン組成物と方法）；アグラウォール（Agrawal）らによる米国特許第5,741,329号（生物分解性インプラント近傍でのpHの調節方法）；タイス（Tice）らによる米国特許第5,820,883号（粘膜に関連するリンパ系組織内へのおよびそれを介する生理活性物質の送達方法ならびにそれらの放出の制御）；グーイン（Gouin）らによる米国特許第5,955,068号（胆汁酸の二量体由来する生物分解性ポリ無水物と薬物の放出制御システムとしてのその使用）；クームズ（Combes）らによる米国特許第6,001,395号（薬物送達のためのポリマー性の層状基質粒子）；アタナシオウ（Athanasios）らによる米国特許第6,013,853号（連続的に放出するポリマー性のインプラント担体）；ハッベル（Hubbell）らによる米国特許第6,060,582号（組織に接触する素材および放出制御担体としての光重合可能な生物分解性ヒドロゲル）；オカダ（Okada）らによる米国特許第6,113,943号（生理活性

物質の放出が可能な徐放性製剤) ; およびオウ (Oh) らによる P C T 公報 W O 9 9 / 5 9 5 4 8 号 (薬剤と生物分解性ポリエステルとのコンジュゲートを利用する、制御された薬物送達システム) ; 米国特許第 6 , 1 2 3 , 8 6 1 号 (薬物送達用マイクロチップデバイスの製造) ; 米国特許第 6 , 0 6 0 , 0 8 2 号 (経口によるまたは経粘膜による薬物送達に有用な、M細胞を標的化した重合化リポソーム) ; 米国特許第 6 , 0 4 1 , 2 5 3 号 (薬物の経皮送達についての電場および超音波の影響) ; 米国特許第 6 , 0 1 8 , 6 7 8 号 (低周波ソノフォレシスを利用するタンパク質の経皮送達または測定) ; 米国特許第 6 , 0 0 7 , 8 4 5 号の非線形親水性 - 疎水性マルチブロックコポリマーのナノ粒子および微粒子 ; 米国特許第 6 , 0 0 4 , 5 3 4 号の薬物送達を改善するための標的とされた重合化リポソーム ; 米国特許第 6 , 0 0 2 , 9 6 1 号の低周波ソノフォレシスを利用するタンパク質の経皮送達 ; 米国特許第 5 , 9 8 5 , 3 0 9 号の吸入用粒子の調製 ; 米国特許第 5 , 9 4 7 , 9 2 1 号の薬物を経皮送達するための化学的および物理的エンハンサーおよび超音波 ; 米国特許第 5 , 9 1 2 , 0 1 7 号の多層のポリマー性マイクロスフェア ; 米国特許第 5 , 9 1 1 , 2 2 3 号の修飾を受けた薬剤の皮膚へのエレクトロポレーションによる導入 ; 米国特許第 5 , 8 7 4 , 0 6 4 号の肺への薬物送達のための空気力学的に軽量の粒子 ; 米国特許第 5 , 8 5 5 , 9 1 3 号の肺への薬物送達を行うために界面活性剤を組み込んだ粒子 ; 米国特許第 5 , 8 4 6 , 5 6 5 号の充実性腫瘍を治療するための、化学療法薬の局所への制御された送達 ; 米国特許第 5 , 8 3 7 , 7 5 2 号のある程度の浸透性を有するポリマー性の網状構造 ; 米国特許第 5 , 8 1 4 , 5 9 9 号のカプセル化された薬剤の経皮送達 ; 米国特許第 5 , 8 0 4 , 1 7 8 号の腸間膜の組織、網の組織または腹膜の組織の近傍への細胞 - マトリクス構造の移植 ; 米国特許第 5 , 7 9 7 , 8 9 8 号の薬物送達用マイクロチップデバイス ; 米国特許第 5 , 7 7 0 , 4 1 7 号の血管が新生した組織をインビボで生産するための、付着細胞を含有する三次元の繊維状骨格 ; 米国特許第 5 , 7 7 0 , 1 9 3 号の細胞が付着して血管が新生した組織をインビボで生産するための三次元の繊維状骨格の作製 ; 米国特許第 5 , 7 6 2 , 9 0 4 号の重合化リポソームを用いるワクチンの経口による送達 ; 米国特許第 5 , 7 5 9 , 8 3 0 号の血管が新生した組織をインビボで生産するための、付着細胞を含有する三次元の繊維状骨格 ; 米国特許第 5 , 7 4 9 , 8 4 7 号のエレクトロポレーションによるヌクレオチドの生物体への送達 ; 米国特許第 5 , 7 3 6 , 3 7 2 号の軟骨性の構造をインビボで生産するための、軟骨細胞を含有する生物分解性の合成ポリマーの繊維状マトリクス ; 米国特許第 5 , 7 1 8 , 9 2 1 号のポリマーおよび薬剤をその中に分散させた状態で含有するマイクロスフェア ; 米国特許第 5 , 6 9 6 , 1 7 5 号の細胞の移植のための繊維で固められた構造物の作製 ; 米国特許第 5 , 6 6 7 , 4 9 1 号の組織を通過する分子の輸送を急速にかつ一時的に制御する方法 ; 米国特許第 5 , 6 5 4 , 3 8 1 号の機能が付与されたポリエステルのグラフトコポリマー ; 米国特許第 5 , 6 5 1 , 9 8 6 号の充実性腫瘍を治療するための化学療法薬の局所への制御された送達 ; 米国特許第 5 , 6 2 9 , 0 0 9 号の生理活性因子の放出制御のための送達システム ; 米国特許第 5 , 6 2 6 , 8 6 2 号の充実性腫瘍を治療するための化学療法薬の局所への制御された送達 ; 米国特許第 5 , 5 9 3 , 9 7 4 号の局所的なオリゴヌクレオチドでの治療 ; 米国特許第 5 , 5 7 8 , 3 2 5 号の非線形親水性 - 疎水性マルチブロックコポリマーのナノ粒子および微粒子 ; 米国特許第 5 , 5 6 2 , 0 9 9 号の造影剤を含有するポリマー性の微粒子 ; 米国特許第 5 , 5 4 5 , 4 0 9 号の生理活性因子の放出制御のための送達システム ; 米国特許第 5 , 5 4 3 , 1 5 8 号の注射可能な生物分解性ナノ粒子 ; 米国特許第 5 , 5 1 4 , 3 7 8 号の生体適合性ポリマー膜と三次元の膜構造の作製方法 ; 米国特許第 5 , 5 1 2 , 6 0 0 号の繊維で固められた、細胞を移植するための構造体の作製 ; 米国特許第 5 , 5 0 0 , 1 6 1 号の疎水性ポリマーの微粒子の作製方法 ; 米国特許第 5 , 4 8 7 , 3 9 0 号の超音波画像診断のためのガスを満たしたポリマー性の微小気泡 ; 米国特許第 5 , 3 9 9 , 6 6 5 号の細胞移植用の生物分解性ポリマー ; 米国特許第 5 , 3 5 6 , 6 3 0 号の生理活性因子の放出制御のための送達システム ; 米国特許第 5 , 3 3 0 , 7 6 8 号のポリマー / プルロニックの混合物を用いる薬物の制御された送達 ; 米国特許第 5 , 2 8 6 , 7 6 3 号の骨内へ薬物を送達するための生体内崩壊性ポリマー ; 米国特許第 5 , 1 4 9 , 5

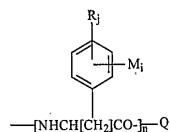
43号のイオンによって架橋されたポリマー性のマイクロカプセル；米国特許第5,128,420号の第一アミドのポリマーからヒドロキサム酸ポリマーを作製する方法；米国特許第5,122,367号の安定化させた成長ホルモンを投与するための放出制御用の生体内崩壊性ポリ無水物インプラント；米国特許第5,100,668号のヘパリンおよび成長因子を含有する放出制御システム；米国特許第5,019,379号の不飽和ポリ無水物；米国特許第5,010,167号の生物学的に応用するためのポリ（アミド-およびイミド-共無水物）；米国特許第4,948,587号の薬物の舌下を經由する送達の超音波による促進；米国特許第4,946,929号の分解速度が予測可能なインプラントおよび人工器官として有用な生体内崩壊性の物品；米国特許第4,933,431号のポリ（アミド-無水物）の一工程での調製；米国特許第4,933,185号の生理活性化合物の放出制御のためのシステム；米国特許第4,921,757号の生理活性物質の遅延放出およびパルス状放出のためのシステム；米国特許第4,916,204号のジカルボン酸およびカップリング剤からの純粋なポリ無水物；米国特許第4,906,474号の薬物の送達を制御するための生体内崩壊性ポリ無水物；米国特許第4,900,556号の生理活性物質の遅延放出およびパルス状放出のためのシステム；米国特許第4,898,734号の放出制御または膜形成のためのポリマー複合物；米国特許第4,891,225号の薬物の送達を制御するための生体内崩壊性ポリ無水物；米国特許第4,888,176号の高分子量ポリ無水物による薬物の制御された送達；米国特許第4,886,870号の分解速度が予測可能なインプラントおよび人工器官として有用な生体内崩壊性の物品；米国特許第4,863,735号のアジュバント活性を有する生物分解性ポリマーの薬物送達システム；米国特許第4,863,611号の固定化された種を備える体外の反応装置；米国特許第4,861,627号の多層ポリマー性のマイクロカプセルの調製；米国特許第4,857,311号の加水分解の性質が改善されたポリ無水物；米国特許第4,846,786号の浮遊し、固定化された種を備えるバイオリクター；米国特許第4,806,621号の生体適合性を有し、生体内崩壊性を示し、疎水性であり、移植可能なポリイミノカーボネート物品；米国特許第4,789,724号の無水物コポリマーの調製；米国特許第4,780,212号の超音波による膜の透過性の促進；米国特許第4,779,806号の組成物を送達するための、超音波で調節できるポリマー性デバイス；米国特許第4,767,402号の薬物の経皮送達の超音波による促進；米国特許第4,757,128号の高分子量のポリ無水物およびその調製；米国特許第4,657,543号の組成物を送達するための、超音波で調節できるポリマー性デバイス；米国特許第4,638,045号の非ペプチド性ポリアミノ酸の生体内崩壊性ポリマー；米国特許第4,591,496号の高分子の放出制御のためのシステムを作製する方法である。

【0090】

次の式を有するペプチドの残基を介して、非金属の放射性同位体をビタミンB₁₂構造と共有結合させることができる：

【0091】

【化3】



ここで、それぞれのMは独立して、非金属の放射性核種である；それぞれのRは独立して、(C₁ - C₁₄)のアルキル、(C₂ - C₁₄)のアルケニル、(C₂ - C₁₄)のアルキニル、(C₁ - C₁₄)のアルコキシ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、ハロ、トリフルオロメチル、N(R_a)(R_b)、(C₁ - C₁₄)のアルカノイル、(C₂ - C₁₄)のアルカノイルオキシ、(C₆ - C₁₀)のアリールまたは(C₃ - C₈)のシクロアルキルであり、ここで、R_aおよびR_bはそれぞれ独立して、Hまたは(C₁ - C₁₄)

10

20

30

40

50

のアルキルである；P；QはH、(C₁ - C₁₄)のアルキルまたは適切なカルボキシ保護基である；nは2～約20である；iは1～5であり、jは0～4であり、そしてi + jは5である；あるいは医薬適合性のその塩である。具体的に言えば、iは1となり得、jは0となり得、Mはフッ素18、臭素76、ヨウ素124などのポジトロン放射体、またはヨウ素123もしくはヨウ素131などのガンマ放射体となり得、そしてnは約6～約12となり得る。

【0092】

上記の検討から、本発明のコバラミンコンジュゲートに関連する種々の変数を、どのようにして独立して変化させて、本発明に包含されるコバラミンコンジュゲートの特定のクラスをより詳細に明示することができるかについて説明された。一つの変数を、その他のあらゆる変数を変更することと独立して変更することが可能であることが理解される。さらに、そのような実施形態において、二つ以上の変数を変更することによって、あらゆる数の実施形態を明示することができる。少数のそのような実施形態を、例示を目的として以下に記載する。

【0093】

下位実施形態1：Xは5'-デオキシアデノシルである；Mは、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L - Tで場合により置換されていてもよい；Kは、O、S、N^{J¹}、C^{R^{1 0 0} R^{1 0 1}}またはC(R^{1 0 0})^{V⁸ Z⁸}である；EはOまたはSである；G¹は、水素、アルキル、アシル、シリル、モノ-、ジ-もしくはトリ-リン酸塩またはL - Tである；Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷は、独立してO、SまたはN^{J²}である；V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷およびV⁸は、独立してO、SもしくはN^{J³}；C^{R^{1 0 2} R^{1 0 3}}、または直接の結合である；Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸は、独立してR^{1 0 4}、L - TまたはL - T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む；Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸のうちの少なくとも一つ、MまたはG¹は、診断薬または治療薬を含む；J¹、J²およびJ³は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R^{1 0}、R^{1 1}、R^{1 2}、R^{1 3}、R^{1 4}およびR^{1 5}は、それらの天然のビタミンB₁₂の配置を保持する；そしてR^{1 0 0}、R^{1 0 1}、R^{1 0 2}、R^{1 0 3}およびR^{1 0 4}は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、SO₂、SO₃、チオアルキルまたはアミノである。

【0094】

下位実施形態2：Xは5'-デオキシアデノシルである；M、K、EおよびG¹は、それらの天然のビタミンB₁₂の配置を保持する；Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵、Y⁶およびY⁷は、独立してO、SまたはN^{J²}である；V¹、V²、V³、V⁴、V⁵、V⁶、V⁷およびV⁸は、独立してO、SもしくはN^{J³}；C^{R^{1 0 2} R^{1 0 3}}、または直接の結合である；Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸は、独立してR^{1 0 4}、L - TまたはL - T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む；Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁷およびZ⁸のうちの少なくとも一つ、MまたはG¹は、診断薬または治療薬を含む；J¹、J²およびJ³は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである；R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R^{1 0}、R^{1 1}、R^{1 2}、R^{1 3}、R^{1 4}お

10

20

30

40

50

よび R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって二重結合を形成してもよい；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0095】

下位実施形態3：Xは5'-デオキシアデノシルである；Mは、少なくとも一つのラジカルがヘテロ原子上に位置してコバルトとの配位結合を形成するように、ラジカルが環または環の置換基の範囲内に位置できるところの二価のヘテロ環であり、L-Tで場合により置換されていてもよい；Kは、O、S、 NJ^1 、 $CR^{100}R^{101}$ または $C(R^{100})V^8Z^8$ である；EはOまたはSである； G^1 は、水素、アルキル、アシル、シリル、モノ-、ジ-もしくはトリ-リン酸塩またはL-Tである； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{102}R^{103}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りのZ部分はそれらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって二重結合を形成してもよい；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0096】

下位実施形態4：Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、5'-デオキシアデノシル、L-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環またはヘテロアリールもしくはアルキルヘテロアリールである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{102}R^{103}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、Mおよび G^1 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含む； J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、R

$R^{1\ 3}$ 、 $R^{1\ 4}$ および $R^{1\ 5}$ は、それらの天然のビタミン $B_{1\ 2}$ の配置を保持する；そして $R^{1\ 0\ 0}$ 、 $R^{1\ 0\ 1}$ 、 $R^{1\ 0\ 2}$ 、 $R^{1\ 0\ 3}$ および $R^{1\ 0\ 4}$ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0097】

下位実施形態5：Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、5'-デオキシアデノシル、L-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環またはヘテロアリールもしくはアルキルヘテロアリールである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン $B_{1\ 2}$ の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{1\ 0\ 2}$ $R^{1\ 0\ 3}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して $R^{1\ 0\ 4}$ 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の放射性核種の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りのZ部分はそれらの天然のビタミン $B_{1\ 2}$ の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 $R^{1\ 0}$ 、 $R^{1\ 1}$ 、 $R^{1\ 2}$ 、 $R^{1\ 3}$ 、 $R^{1\ 4}$ および $R^{1\ 5}$ は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； $R^{1\ 3}$ および $R^{1\ 4}$ は、場合により一緒になって二重結合を形成してもよい；そして $R^{1\ 0\ 0}$ 、 $R^{1\ 0\ 1}$ 、 $R^{1\ 0\ 2}$ 、 $R^{1\ 0\ 3}$ および $R^{1\ 0\ 4}$ は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0098】

下位実施形態6：Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、5'-デオキシアデノシル、L-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロ環またはヘテロアリールもしくはアルキルヘテロアリールである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン $B_{1\ 2}$ の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{1\ 0\ 2}$ $R^{1\ 0\ 3}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して $R^{1\ 0\ 4}$ 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りのZ部分はそれらの天然のビタミン $B_{1\ 2}$ の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 $R^{1\ 0}$ 、 $R^{1\ 1}$ 、 $R^{1\ 2}$ 、 $R^{1\ 3}$ 、 $R^{1\ 4}$ および $R^{1\ 5}$ は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； $R^{1\ 3}$ および $R^{1\ 4}$ は、場合により一緒になって二重結合を形成してもよい；そして $R^{1\ 0\ 0}$ 、 $R^{1\ 0\ 1}$ 、 $R^{1\ 0\ 2}$ 、 $R^{1\ 0\ 3}$ および $R^{1\ 0\ 4}$ は、独立して水

素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0099】

下位実施形態7：Xは5'-デオキシアデノシルである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{102}R^{103}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 、 Z^8 、Mおよび G^1 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含む； J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

10

20

【0100】

下位実施形態8：Xは5'-デオキシアデノシルである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{102}R^{103}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} 、L-TまたはL-T'である；それぞれのLは、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれのTまたはT'は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りのZ部分はそれらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して水素、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、低級シクロアルキル、ヘテロ環式、低級アルコキシ、アジド、アミノ、低級アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、 SO_2 、 SO_3 、カルボン酸、 C_{1-6} のカルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、シアノ、オキシムまたはヒドラジンである； R^{13} および R^{14} は、場合により一緒になって二重結合を形成してもよい；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

30

40

【0101】

下位実施形態9：Xは、水素、シアノ、アミノ、アミド、ヒドロキシル、5'-デオキシアデノシル、L-T、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロ環またはヘテロアリールもしくはアルキルヘテロアリールである；M、K、Eおよび G^1 は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立してO、Sまたは NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立してO、Sもしくは NJ^3 ； $CR^{102}R^{103}$ 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 およびZ

50

⁸ は、独立して R^{104} 、L-T または L-T' である；それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれの T または T' は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りの Z 部分はそれらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} のすべては、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0102】

下位実施形態 10：X は 5'-デオキシアデノシルである；M、K、E および G^1 は、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 、 Y^6 および Y^7 は、独立して O、S または NJ^2 である； V^1 、 V^2 、 V^3 、 V^4 、 V^5 、 V^6 、 V^7 および V^8 は、独立して O、S もしくは NJ^3 ； CR^{102} R^{103} 、または直接の結合である； Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^7 および Z^8 は、独立して R^{104} 、L-T または L-T' である；それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれの L は、独立して直接の結合、または化合物がコバラミン輸送タンパク質に結合する能力を有意に低下させないところの多価部分の残基である；それぞれの T または T' は、独立して一種以上の診断薬または治療薬の残基を含む； Z^2 、 Z^4 または Z^5 のうちの少なくとも一つは診断薬または治療薬を含み、残りの Z 部分はそれらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する； J^1 、 J^2 および J^3 は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、シクロアルキル、アリール、シクロアリール、ヘテロ環、ヘテロアリール、ヒドロキシル、アルコキシまたはアミンである； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} のすべては、それらの天然のビタミン B_{12} の配置を保持する；そして R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} および R^{104} は、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、アルコキシ、シアノ、アジド、ハロゲン、ニトロ、 SO_2 、 SO_3 、チオアルキルまたはアミノである。

【0103】

下位実施形態 11 ~ 20：リンカーが実質的に一定した分子量を有する、下位実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つ。

【0104】

下位実施形態 21 ~ 30：リンカーが次の化学構造のポリアミンである、下位実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つ： NR' (アルキレン- NR')_n アルキレン NR' 、ここで、n は 1 ~ 20 であり、アルキレンの炭素の長さを n の単位の範囲内で変更することができ、そしてそれぞれの R' は独立して、水素、低級アルキルまたは T である。

【0105】

下位実施形態 31 ~ 40：リンカーがスペルミン、スペルミジン、デカメチレンテトラアミンまたはペンタメチレンヘキサミンである、下位実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つ。

【0106】

III. 立体異性と多形性

キラル中心を有する本発明の化合物は光学活性体およびラセミ体で存在してもよく、そして光学活性体およびラセミ体で単離されてもよい。いくつかの化合物が多形性を示してもよい。本発明は、本発明のラセミ体、光学活性体、多形体もしくは立体異性体またはそれらの混合物を包含する。このものは本明細書に記載されるような有用な特性を有する。た

例えば、再結晶技術による、光学活性な出発材料からの合成による、キラル合成による、もしくはキラルな固定相を用いるクロマトグラフィーによる分離によるラセミ体の分割によって、または酵素による分割によって、光学活性体を調製することができる。

【0107】

追加的な化合物、中間体およびその化学合成は、たとえば、ホゲンカンブ、エイチら、ニド・カルボラン・コバラミンコンジュゲートの合成とキャラクタライゼーション、N u c l . M e d . a n d B i o l . , 2 0 0 0 , 2 7 , 8 9 - 9 2 ; コリンズ、ディーら、インジウム111-標識化DTPA-アデノシルコバラミンを介する腫瘍の画像化、M a y o C l i n i c P r o c . , 1 9 9 9 , 7 4 : 6 8 7 - 6 9 1 に開示されている。

【0108】

10

IV. 定義

「コバラミン輸送タンパク質」とは、ビタミンB₁₂もしくは生理活性を示す代謝産物のタンパク質担体またはその担体の前駆体のあらゆるものを表し、内性因子、トランスコバラミンI、トランスコバラミンIIまたはトランスコバラミンIIIが含まれる。「トランスコバラミンレセプター」または「コバラミンレセプター」とは、コバラミン輸送タンパク質複合体と結合するあらゆるレセプターを表す。

【0109】

本明細書で用いられる「コバラミン」とは、ビタミンB₁₂またはそのアデノシル、メチルもしくはシアノ-誘導体のあらゆるものを表す。

【0110】

20

アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニルなどは、直鎖の基および分岐鎖の基の両方を意味する；しかし、「プロピル」などの個別のラジカルに言及するときは、直鎖のラジカルのみを包含し、「イソプロピル」などの分岐鎖の異性体は具体的に言及される。

【0111】

本明細書で用いられるように、アルキルという用語は、別途明記されていない限り、飽和の直鎖、分岐鎖または環状の第一、第二または第三の、好ましくはC₁ ~ C₁₀の炭化水素を表し、そして具体的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、シクロペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシル、シクロヘキシルメチル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチルおよび2,3-ジメチルブチルが挙げられる。この用語は、置換アルキル基および非置換アルキル基の両方を含む。アルキル基を置換することができる部分は、ヒドロキシル、アミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルコキシ、アリールオキシ、ニトロ、シアノ、スルホン酸、硫酸塩、ホスホン酸、リン酸塩もしくはホスホン酸塩からなる群より選択され、保護されていないとしても、必要に応じて当業者が知っているように保護されていてもよく、たとえばグリーン(Greene)ら、有機合成における保護基、ジョン・ウィリー・アンド・サン社、第二版、1991年にて教示されており、参照してここに組み込まれる。

30

【0112】

本明細書で用いられるように、低級アルキルという用語は、別途明記されていない限り、C₁ ~ C₄の飽和の直鎖、分岐鎖または適切な場合は環状(たとえばシクロプロピル)のアルキル基を表し、置換体および非置換体の両方を含む。本出願において別途明記されていない限り、アルキルが適切な部分である場合、低級アルキルが好ましい。同様に、アルキルまたは低級アルキルが適切な部分である場合、非置換アルキルまたは低級アルキルが好ましい。

40

【0113】

アルケニルおよびアルキニルという用語は、少なくとも一つの飽和のC-C結合が二重結合または三重結合で置換されているアルキル部分を表す。従って、(C₂-C₆)のアルケニルとしては、ビニル、アリル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、また

50

は5 - ヘキセニルがあり得る。同様に、(C₂ - C₆)のアルキニルとしては、エチニル、1 - プロピニル、2 - プロピニル、1 - ブチニル、2 - ブチニル、3 - ブチニル、1 - ペンチニル、2 - ペンチニル、3 - ペンチニル、4 - ペンチニル、1 - ヘキシニル、2 - ヘキシニル、3 - ヘキシニル、4 - ヘキシニルまたは5 - ヘキシニルがあり得る。

【0114】

「アルキレン」という用語は、式 - (CH₂)_n - の飽和の直鎖の二価のアルキルラジカルを表し、ここで、nとしては、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10があり得る。

【0115】

ヘテロアルキルという用語は、アルキル鎖において、O、S、NまたはPを含むヘテロ原子を含むアルキル基を表し、ここで、ヘテロ原子は(R¹⁻⁵を含む)その他の置換基と結合して原子価を満たすことができる。ヘテロアルキル部分の非限定的な例としてはポリオキシアルキレンが挙げられ、二価の - (CH₂O)_n - の場合、nは0 ~ 20の整数である。

10

【0116】

本明細書で用いられるように、アルコキシという用語は、別途明記されていない限り、-O-アルキル構造の部分を表し、ここでアルキルとしては上記に定義されるものである。

【0117】

本明細書で用いられるように、記載のものを除いて、「アリール」とは、それぞれの環において八員までの、単環式、二環式または三環式の安定な任意の炭素環を意味し、ここで、少なくとも一つの環がヒュッケルの4n + 2則に定義される芳香族である。アリール環系の例としては、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチルおよびビフェニルが挙げられる。アリール基は、ヒドロキシル、アミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルコキシ、アリールオキシ、ニトロ、シアノ、スルホン酸、硫酸塩、ホスホン酸、リン酸塩もしくはホスホン酸塩からなる群より選択される一つ以上の部分で置換されてもよく、保護されていない場合でも、必要に応じて当業者が知っているように保護されていてもよく、たとえばグリーンら、有機合成における保護基、ジョン・ウィリー・アンド・サン社、第二版、1991年に教示されている。

20

【0118】

本明細書で用いられるように、ヘテロ環またはヘテロ環式という用語は、安定な五 ~ 七員の単環式または安定な八 ~ 十一員の二環式で表されると記載されたものを除く、飽和または不飽和のヘテロ環であり、炭素原子と、N、OおよびSからなる群より選択される1 ~ 3のヘテロ原子とから構成されるものである；そしてヘテロ原子の窒素および硫黄は必要に応じて酸化されていてもよく、ヘテロ原子の窒素は場合により四価になってもよく、上記に定義されたヘテロ環のいずれかがベンゼン環に融合している任意の二環式の基が含まれる。ヘテロ環は、安定な構造を生じさせる任意のヘテロ原子または炭素原子と結合してもよい。

30

【0119】

プリン塩基またはピリミジン塩基という用語には、アデニン、N⁶-アルキルプリン、N⁶-アシルプリン(ここで、アシルはC(O)(アルキル、アリール、アルキルアリールまたはアリールアルキル)、N⁶-ベンジルプリン、N⁶-ハロプリン、N⁶-ビニルプリン、N⁶-アセチレンプリン、N⁶-アシルプリン、N⁶-ヒドロキシアルキルプリン、N⁶-チオアルキルプリン、N²-アルキルプリン、N²-アルキル-6-チオプリン、チミン、シトシン、5-フルオロシトシン、5-メチルシトシン、6-アザシトシンを含む6-アザピリミジン、2-および/または4-メルカプト-ピリミジン、ウラシル、5-フルオロウラシルを含む5-ハロウラシル、C⁵-アルキル-ピリミジン、C⁵-ベンジルピリミジン、C⁵-ハロピリミジン、C⁵-ビニルピリミジン、C⁵-アセチレンピリミジン、C⁵-アシルピリミジン、C⁵-ヒドロキシアルキルプリン、C⁵-アミドピリミジン、C⁵-シアノ-ピリミジン、C⁵-ニトロピリミジン、C⁵-アミノピリミジン、N²-アルキルプリン、N²-アルキル-6-チオプリン、5-アザシチジニル、

40

50

5 - アザウラシリル、トリアゾロピリミジニル、イミダゾロピリミジニル、ピロロピリミジニルおよびピラゾロピリミジニルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。プリン塩基としては、グアニン、アデニン、ヒポキサンチン、2, 6 - ジアミノ - プリンおよび6 - クロロプリンが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。塩基上の含酸素官能基および含窒素官能基を必要に応じてまたは所望により保護することができる。適切な保護基は当業者に十分に知られており、トリメチルシリル、ジメチルヘキシルシリル、t - ブチルジメチルシリルおよびt - ブチルジフェニルシリル、トリチル、アセチルおよびプロピオニルなどのアルキル基およびアシル基、メタンスルホニルならびにp - トルエンスルホニルが挙げられる。

【0120】

本明細書で用いられるように、アラルキルという用語は、別途明記されていない限り、上記で定義されたアリアル基に上記で定義されたアルキル基を介して分子が結合したものを表す。本明細書で用いられるように、アルカリルという用語は、別途明記されていない限り、上記で定義されたアルキル基に上記で定義されたアリアル基を介して分子が結合したものを表す。

【0121】

ハロとは、フルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードである。

【0122】

アシルという用語は、エステル基の非カルボニル部分が、直鎖、分岐鎖または環状のアルキルもしくは低級アルキル、メトキシメチルを含むアルコキシアリル、ベンジルを含むアラルキル、フェノキシメチルなどのアリアルオキシアリル、ハロゲン、C₁ ~ C₄ のアルキルもしくはC₁ ~ C₄ のアルコキシで場合により置換されてもよいフェニルを含むアリアル、メタンスルホニルを含むアルキルスルホニルもしくはアラルキルスルホニルなどのスルホン酸エステル、モノ、ジもしくはトリリン酸エステル、トリチルもしくはモノメトキシトリチル、置換されたベンジル、トリアルキルシリル（たとえばジメチル - t - ブチルシリル）またはジフェニルメチルシリルから選択されるカルボン酸エステルを表す。このエステル中のアリアル基は、必要に応じてフェニル基を含んでもよい。「低級アシル」という用語は、非カルボニル部分が低級アルキルであるアシル基を表す。

【0123】

本明細書で用いられるように、アミノという用語は、-NR₂という構造によって示される部分を表し、第一アミンおよび第二アミン、ならびにアルキルで置換された第三アミン（すなわちアルキルアミノ）を含む。従って、R₂は、二つの水素、二つのアルキル部分または一つの水素と一つのアルキル部分を表してもよい。

【0124】

本明細書で用いられるように、アミドという用語は、-C(O)NR₂の構造によって示される部分を表し、ここでR₂はアミノについて定義されたとおりのものである。

【0125】

本明細書で用いられるように、「アデノシル」とは、アデノシンの5'の位置を介してコバラミンの6 - 位に結合したアデノシンラジカルである。

【0126】

本明細書で用いられるように、「アミノ酸」とは、D体またはL体の天然のアミノ酸残基（たとえば、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Hyl、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrおよびVal）、または一つ以上の遊離原子価を有する非天然のアミノ酸（たとえば、ホスホセリン；ホスホスレオニン；ホスホチロシン；ヒドロキシプロリン；-カルボキシグルタミン酸塩；馬尿酸；オクタヒドロインドール - 2 - カルボン酸；スタチン；1, 2, 3, 4, -テトラヒドムイソキノリン - 3 - カルボン酸；ペニシラミン；オミシン；シチュリン；-メチル - アラニン；パラ - バンゾイルフェニルアラニン；フェイルグリシン；プロパルギル - グリシン；サルコシン；およびt - ブチルグリシン）残基である。その他の非天然のアミノ酸としては、NH₂(CH₂)_yCOOHの式

10

20

30

40

50

で示されるものが挙げられ、ここで、 $y = 2 \sim 20$ 、好ましくは $2 \sim 12$ であり、 α -アミノカブロン酸 ($H_2N - (CH_2)_5 - COOH$) などのアミノアルカン酸が含まれる。

【0127】

この用語はさらに、アセチル、アシル、トリフルオロアセチルおよびベンジルオキシカルボニル) などのアミノ保護基を有する天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸、ならびにカルボキシが、 $C_1 - C_6$ のアルキル、フェニルまたはベンジルエステルおよびアミドなどの保護基で保護されている天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸を含む。その他の適切なアミノ保護基およびカルボキシ保護基は、当業者によって知られている。たとえば、ティー・ダブリュ・グリーン、有機合成における保護基；ウィリー社：ニューヨーク、1981年；ディー・ポート (D. Voet)、生化学、ウィリー社：ニューヨーク、1990年；エル・ストライヤー (L. Stryer)、生化学、(第三版)、ダブリュ・エイチ・フリーマン社 (W. H. Freeman and Co.)：ニューヨーク、1975年；ジェイ・マーチ (J. March)、上級有機化学、反応、メカニズムおよび構造、(第二版)、マックグロウ・ヒル (McGraw Hill) 社：ニューヨーク、1977年；エフ・キャレイ (F. Carey) およびアール・サンドバーグ (R. Sundberg)、上級有機化学、B部：反応と合成、(第二版)、プレナム (Plenum) 社：ニューヨーク、1977年；およびこれらに引用されている参考文献を参照すること。

10

【0128】

本明細書で用いられるように、「ペプチド」とは、 $2 \sim 25$ アミノ酸の配列 (たとえば上記で定義されているようなもの) または一つ以上の遊離原子価を持つペプチド残基である。配列は直線状でも環状でもよい。たとえば、環状ペプチドを一つの配列における二つのシステイン残基の間のジスルフィド架橋の形成から調製することができ、または生じてもよい。

20

【0129】

本明細書で用いられるように、宿主という用語は、病原菌がその中で複製することができる単細胞生物または多細胞生物を表し、セルラインおよび動物が含まれ、ヒトが好ましい。あるいは、宿主が病原菌のゲノムの一部を持っていてもよく、本発明の化合物によってその複製または機能を変化させることができる。宿主という用語は、具体的には、感染細胞、病原菌のゲノムのすべてまたは一部を形質移入した細胞および動物を表し、特に (チンパンジーを含む) 霊長類およびヒトである。本発明の動物への応用の大部分において、宿主はヒトの患者である。しかしながら、本発明によるある特定の適応症においては、獣医学上の応用が明らかに先行している (たとえばチンパンジー)。

30

【0130】

明細書全体を通して、患者に投与する際の診断薬または治療薬の医薬適合性のあらゆる形態であって、薬剤の作用を阻害しない形態を記述するために、「残基」という用語が用いられる。非限定的な例として、医薬適合性の薬剤の残基とは、コバラミンまたは式Iの化合物と共有的に、イオンのまたはキレート剤を介して結合することを促進するために修飾されたものであり、ここで、この修飾は、疾患を調節するという薬剤の能力を阻害しないという点で、薬剤の生物学的作用を阻害しないような修飾である。好ましい実施形態において、残基とは、化合物への共有結合が可能となるような遊離原子価の状態を保持する薬剤を表す。本明細書に記載された方法論を含む当分野において知られた任意の手段によって、この遊離原子価の状態を実現することができる。好ましい実施形態において、一つの元素、たとえば水素を除去して遊離原子価の状態を実現し、官能基を活性化させる。

40

【0131】

明細書全体を通して、患者に投与する際のTC-結合担体またはIF-結合担体の医薬適合性のあらゆる形態 (たとえばエステル、モノ-、ジ-もしくはトリ-リン酸エステル、エステルまたは関連する基の塩) であって、活性を示す化合物を提供する形態を記述するために、「医薬適合性の塩またはプロドラッグ」という用語が用いられる。医薬適合性の

50

塩としては、医薬適合性の無機または有機の塩基および酸に由来するものが挙げられる。適切な塩としては、製薬技術において十分に知られているその他の多数の酸の中から、カリウムおよびナトリウムなどのアルカリ金属、カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属に由来するものが挙げられる。医薬適合性のプロドラッグとは、宿主内で代謝される、たとえば加水分解を受けるまたは酸化されることが可能な化合物であって、それによって本発明の化合物を形成する化合物を表す。プロドラッグの典型的な例としては、活性を示す化合物の機能性部分上に生物学的に不安定な保護基を有する化合物が挙げられる。プロドラッグには、酸化、還元、アミノ化、脱アミノ化、ヒドロキシル化、脱ヒドロキシル化、加水分解、縮合、アルキル化、脱アルキル化、アシル化、脱アシル化、リン酸化、脱リン酸化を受けて、活性を示す化合物を生じる化合物が含まれる。本発明の化合物は、感染症に対する活性を有するか、または代謝されてそのような活性を発揮する化合物である。

10

【0132】

V. 診断用または治療用の放射性核種

検出可能な放射性核種（たとえば金属の放射性核種）または検出可能な常磁性の金属原子が、適切なリンカーによって化合物の残基と結合している場合、もし、標的細胞に対する効果的な治療指数および/または診断指数を示し、そして疾患の内部または近傍に局在化できるような本発明の化合物を提供できるならば、リンカーの構造は決定的なものではない。

20

【0133】

適切なリンカーとしては、化合物の残基と検出可能な放射性核種とを（リンカーの長さを含めて）約5オングストロームから約200オングストローム引き離すリンカーが挙げられる。その他の適切なリンカーとしては、式Iの化合物の残基と検出可能な放射性核種とを約5オングストロームから約100オングストローム引き離すリンカー、ならびに化合物の残基と検出可能な放射性核種とを約5オングストロームから約50オングストローム引き離すリンカー、または約5オングストロームから約25オングストローム引き離すリンカーが挙げられる。適切なリンカーは、たとえば米国特許第5,735,313号に開示されている。

【0134】

米国特許第5,739,313号に記載された方法と同様の方法を用いて、または本明細書に記載された方法と同様の方法を用いて、本明細書に開示された化合物を調製することができる。本発明の化合物を調製するのに有用な追加的な中間体および化学合成は、たとえば、ホゲンカンブ、エイチら、ニド-カルボラン-コバラミンコンジュゲートの合成とキャラクタライゼーション、*Nucl. Med. and Biol.*, 2000, 27, 89-92; コリンズ、ディーら、インジウム111-標識化DTPA-アデノシルコバラミンを介する腫瘍の画像化、*Mayo Clinic Proc.*, 1999, 74: 687-691; 1999年4月16日に出願された米国特許出願第60/129,733号; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,874号; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,753号; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,873号; およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

30

40

【0135】

米国特許第5,739,313号に記載された方法と同様の方法を用いて、または本明細書に記載された方法と同様の方法を用いて、本明細書に開示された化合物を調製することができる。上記のようにして、抗生物質の残基を式Iの化合物の残基と結合させることができる。検出可能な放射性核種を式Iの化合物の残基と結合させることができる。上記のようにして、本発明の中間体を調製するのに有用な追加的な中間体および合成方法は、たとえば、ホゲンカンブ、エイチら、ニド-カルボラン-コバラミンコンジュゲートの合成とキャラクタライゼーション、*Nucl. Med. and Biol.*, 2000, 27, 89-92; コリンズ、ディーら、インジウム111-標識化DTPA-アデノシルコ

50

バラミンを介する腫瘍の画像化、Mayo Clinic Proc., 1999, 74 : 687 - 691 ; 1999年4月16日に出願された米国特許出願第60/129,733号 ; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,874号 ; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,753号 ; 1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,873号 ; 米国特許第5,739,313号 ; 米国特許第6,004,533号 ; およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

【0136】

一般的に、金属の放射性核種（すなわち金属の放射性同位体または金属の常磁性イオン）としては、アンチモン124、アンチモン125、砒素74、バリウム103、バリウム140、ベリリウム7、ビスマス206、ビスマス207、カドミウム109、カドミウム115m、カルシウム45、セリウム139、セリウム141、セリウム144、セシウム137、クロム51、コバルト55、コバルト56、コバルト57、コバルト58、コバルト60、コバルト64、銅67、エルビウム169、ユーロピウム152、ガリウム64、ガリウム68、ガドリニウム153、ガドリニウム157、金195、金199、ハフニウム175、ハフニウム175-181、ホルミウム166、インジウム110、インジウム111、イリジウム192、鉄55、鉄59、クリプトン85、鉛210、ルテチウム177、マンガン54、水銀197、水銀203、モリブデン99、ネオジウム147、ネプツニウム237、ニッケル63、ニオブ95、オスミウム185+191、パラジウム103、白金195m、プラセオジウム143、プロメチウム147、プロトアクチニウム233、ラジウム226、レニウム186、レニウム188、ルビジウム86、ルテニウム103、ルテニウム106、スカンジウム44、スカンジウム46、セレン75、銀110m、銀111、ナトリウム22、ストロンチウム85、ストロンチウム89、ストロンチウム90、硫黄35、タンタル182、テクネチウム99m、テルル125、テルル132、タリウム204、トリウム228、トリウム232、タリウム170、錫113、錫114、錫117m、チタニウム44、タングステン185、バナジウム48、バナジウム49、イッテルビウム169、イットリウム86、イットリウム88、イットリウム90、イットリウム91、亜鉛65およびジルコニウム95が挙げられる。

【0137】

具体的に言えば、金属の放射性核種としては、診断用のガンマ放射体（たとえばTc-99m、In-111、ヨウ素131または鉄59）；診断用の金属ポジトロンを放射する放射性核種（たとえばビスマス206、ビスマス207、コバルト55、ガリウム64、銅67、イットリウム86またはイットリウム88）；診断用の常磁性の金属イオン（たとえばユーロピウム152またはガドリニウム157）、すなわち診断に用いる常磁性の金属イオンであり得る。

【0138】

一般的に、非金属の放射性核種としては、非金属の常磁性の原子（フッ素19など）；または非金属のポジトロンを放射する放射性核種（たとえば炭素11、フッ素18、ヨウ素12もしくは臭素76）もしくはヨウ素123もしくはヨウ素131などの非金属のガンマ線を放射する放射性核種がある。フッ素19は、本発明の化合物を用いるのにある程度適した非金属の常磁性体である。というのは、哺乳動物（たとえばヒト）の体内で診断用途で用いるフッ素に関連するバックグラウンドノイズは、通常ほとんどまたはまったくないからである。

【0139】

式Iの化合物/リンカー/診断薬 - 検出可能な放射性核種
本明細書で用いられるように、「検出可能な放射性核種」とは、インビボまたはインビトロで、診断用の手段で検出されることが可能な、任意の適切な放射性核種（すなわち放射性同位体）である。適切な検出可能な放射性核種としては、金属の放射性核種（すなわち金属の放射性同位体）および非金属の放射性核種（すなわち非金属の放射性同位体）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0140】

式Iの化合物/リンカー/治療薬 - 治療用の放射性核種

本明細書で用いられるように、「治療用の放射性核種」とは、インビボまたはインビトロで、感染症に対する治療効果を有する任意の適切な放射性核種（すなわち放射性同位体）である。適切な治療用の放射性核種としては、金属の放射性核種（すなわち金属の放射性同位体）が挙げられる。

【0141】

具体的に言えば、金属の放射性核種としては、治療用の金属の放射性核種（たとえば、アクチニウム223、ビスマス212、インジウム111、レニウム186、レニウム188、ストロンチウム89、錫117mおよびイットリウム90）または治療用の常磁性の金属イオン（たとえばガドリニウム157）があり得る。

10

【0142】

VI. 治療薬としての抗生物質

本明細書で用いられるように、「抗生物質」とは、グラム陽性の生物体またはグラム陰性の生物体のいずれか、あるいは真菌、酵母またはウイルスに対する活性（すなわち、グラム陽性の生物体またはグラム陰性の生物体のいずれかの増殖を阻害するか、発達を無効にする）を有する任意の化合物である。ステッドマンの図解医学大辞典（第25版）、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ（Williams and Wilkins）社、ポルティモア（1990）およびモスビーの医学看護学および関連する保健学辞典（Mosby's Medical, Nursing, and Allied Health Dictionary）、（第5版）、モスビー社、セントルイス（1998）。

20

【0143】

感染症としては、たとえば、急性の下気道感染症（たとえば肺炎）、下部尿路感染症（UTI）、結核（TB）、ライム病、マラリア、髄膜炎、髄膜炎菌により引き起こされる髄膜炎、肝炎、はしか、新生児破傷風、下痢（たとえばコレラ、腸チフスおよび赤痢が挙げられる）、百日咳（百日咳）、腸内の寄生虫病および性感染症が挙げられる。

【0144】

いくつかの原因物質、およびそれらに関連する疾患としては、ロタウイルス、世界中の乳幼児下痢症の主要な原因；クリプトスポリジウム・パルブム、急性および慢性の下痢を引き起こす寄生虫；レジオネラ・ニューモフィラ、潜在的に致死性の在郷軍人病を引き起こす細菌；エボラウイルス、出血性の熱を引き起こす - 80%までの患者が死亡する；ハンターウイルス、潜在的に致死性の腎症候性出血熱を引き起こす；カンピロバクター・ジエジュニ、下痢を引き起こす細菌；ヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-1）、リンパ腫 - 白血病を引き起こす；大腸菌O157:H7株の細菌、出血性下痢を引き起こす；HTLV-2ウイルス、ヘアリー細胞白血病を引き起こす；ヘリコバクター・ピロリ、消化性潰瘍および胃ガンに関係する細菌；ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、AIDSを引き起こす；E型肝炎ウイルス、暑い気候下で黄疸を流行させる；ヒトヘルペスウイルス6、熱と発疹を引き起こす；C型肝炎ウイルス、肝臓病だけでなく肝臓ガンを引き起こす；グアナリトウイルス、ベネズエラ出血熱を引き起こす；コレラ菌O139、真性コレラを引き起こす；サビアウイルス、ブラジル出血熱を引き起こす；およびヒトヘルペスウイルス8、AIDS患者のカポジ肉腫に関連する、が挙げられる。

30

40

【0145】

適切な抗生物質は、たとえば、医師用添付文書集（PDR）、メディカル・エコノミクス（Medical Economics）社（モントベール、ニュージャージー州）、（第53版）、1999；メイヨー・メディカル・センター処方集、完全版、メイヨークリニック（Mayo Clinic）（ロチェスター、ミネソタ州）、1998年1月；メルク・インデックス、化学物質、薬物、生物学的製剤の百科事典、（第11版）、メルク（Merck）社（ローウェー、ニュージャージー州）、1989；ウィスコンシン大学の抗菌剤の使用の手引、<http://www.medsch.wisc.edu/clinsci/amcg/amcg.html>；抗生物質のガイドラインの使用の手引、具

50

体的な抗生物質の部類の解説、トマス・ジェファーソン大学、http://jeffline.tju.edu/CWIS/OAC/antibiotics_guide/intro.html ; およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

【0146】

適切な抗生物質としては、たとえば、アミノグリコシド、β-ラクタム抗生物質、セファロスポリン、マクロライド、その他の抗生物質、ペニシリン、テトラサイクリン、抗真菌剤、抗マラリア剤、抗結核剤、抗ウイルス剤、抗らい菌薬、その他の抗感染症剤、キノロン類、スルホンアミド、尿管の抗感染症剤、鼻用の抗生物質、眼科用の抗生物質、眼科用の抗ウイルス剤、眼科用のキノロン類、眼科用のスルホンアミド、皮膚および粘膜用の抗生物質、皮膚および粘膜用の抗真菌剤、皮膚および粘膜用の抗ウイルス剤、皮膚および粘膜用のその他の抗感染症剤、皮膚および粘膜用の抗疥癬薬およびペデュリシド、皮膚および粘膜用の抗新生物薬、ニトロフラン、およびオキサゾリジノン類が挙げられる。医師用添付文書集(PDR)、メディカル・エコノミクス社(モンテベール、ニュージャージー州)、(第53版)、1999およびメイヨー・メディカル・センター処方集、完全版、メイヨークリニック(ロチェスター、ミネソタ州)、1998年1月。

10

【0147】

アミノグリコシドとしては、たとえば、アミカシン(アミカシンスルファート); ガラマイシン(ゲンタマイシンスルファート); ネブシン(トブラマイシンスルファート); ネットロマイシン(ネチルミシンスルファート); ストレプトマイシンスルファート; およびTOBI(トブラマイシン)が挙げられる。

20

【0148】

β-ラクタム抗生物質としては、たとえば、アザクタム(アズトレオナム); セフォタン(セフォテタン); ローラピド(ローラカベフ); メフォキシシン(セフォキシチン); メルレム(メロペナム); およびプリマキシシン(注射可能な懸濁剤用のイミペネムとシラスタチン)が挙げられる。

【0149】

セファロスポリンとしては、たとえば、アンセフ(セファゾリン); セクラール(セファクラー); セダックス(セフチブテン); セフィゾックス(セフチゾキシムナトリウム); セフォピド(セフォペラゾンナトリウム); セフチン(セフロキシムアキセチル); セフジル(セプロジル); セプタズ(セフタジジム); クラフォラン(セフォタキシム); デュリセフ(セファドロキシムモノヒドレート); フォルタズ(セフタジジム); ケフレックス(セファレキシン); ケフタブ(塩酸セファレキシン); ケフロックス(セフロキシム); ケフゾール(セファゾリン); マンドール(セファマンドールナフアート); マキシピン(塩酸セフェピン); モノシッド(セフォニシッドナトリウム); オムニセフ(セフジニル); ロセフィン(セフトリアキゾン); スプラックス(セフィキシム); タジセフ(セフタジジム); タジジム(セフタジジム); パンチン(セフォドキシムプロキセチル); およびジナセフ(セフロキシム)が挙げられる。

30

【0150】

マクロライドとしては、たとえば、ピアキシシン(クラリスロマイシン); ダイナバック(ジリスロマイシン); E.E.S. 200(エリスロマイシンエチルスクシナート); E.E.S. 400(エリスロマイシンエチルスクシナート); Ery-Ped 200(エリスロマイシンエチルスクシナート); Ery-Ped 400(エリスロマイシンエチルスクシナート); Ery-Tab(エリスロマイシンの遅延放出型錠剤); エリスロシンステアレート(エリスロマイシンステアレート); イロソン(エリスロマイシンエストレート); PCEディスパータブ(錠剤中のエリスロマイシン粒子); ペディアゾール(経口用懸濁剤のためのエリスロマイシンエチルスクシナートおよびアセチルスルフィソキサゾール); タオ(トロレアンドマイシン); ジスロマックス(アジスロマイシン); およびエリスロマイシンが挙げられる。

40

【0151】

当業者であれば、本発明に有用な抗生物質は、上記に開示された任意の抗生物質の薬剤中

50

に存在する生理活性化合物であることを理解できる。たとえば、アザクタム（アズトレオナム）は一般的に注射用の溶液として利用可能である。しかしながら、抗生物質は（Z）-2-[[[(2-アミノ-4-チアゾリル)[[(2S, -3S)-2-メチル-4-オキシ-1-スルホ-3-アセチミジル]カルバモイル]メチレン]アミノ]オキシ]-2-メチル=プロピオン酸である。医師用添付文書集（PDR）、メディカル・エコノミクス社（モントペール、ニュージャージー州）、（第53版）、pp. 820-823、1999。

【0152】

本明細書で用いられるように、「抗生物質の残基」とは、抗生物質の一つ以上の遊離原子価を持つラジカルである。もし、ラジカルが直接またはリンカーを介して式Iの化合物の残基に結合した時に、グラム陽性の生物体またはグラム陰性の生物体のいずれかに対する活性が実質的に保持されているか、もし、検出可能な放射性核種または検出可能な常磁性の金属原子と直接またはリンカーを介して結合している化合物が、感染症を効果的に画像化できるのであれば、合成に適した抗生物質の（単数または複数の）あらゆる原子を除去して、遊離原子価を提供することができる。当業者であれば、所望の結合を基礎として、当分野において知られた方法を用いて、抗生物質から導くことができる、適切な機能を有する出発原料を選択することができる。

10

【0153】

式Iの化合物/リンカー/治療薬-抗生物質

化合物の残基に直接結合していることに加えて、適切なリンカーによって、抗生物質の残基が化合物の残基に結合することもできる。もし、得られる本発明の化合物が抗生物質として効果的な治療指数を示し、そして好ましくは経口投与が可能であるならば、リンカーの構造は決定的なものではない。適切なリンカーは、たとえば、米国特許第5,735,313号；1999年4月16日に出願された米国特許出願第60/129,733号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,874号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,753号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,873号；およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

20

【0154】

VII. 治療薬としての心臓血管系用薬

一種以上の既知の心臓血管系用薬と同時に本発明の化合物を場合により投与することができる。適切な心臓血管系用薬は、「心臓血管系用薬」として上記に開示されている。

30

【0155】

本明細書で用いられるように、「心臓血管系障害」とは、心臓または血管の機能障害に特徴を有するあらゆる異常な状態である。心臓血管系障害のいくつかの例が、たとえば、エール大学医学部のハートブックの第23章、心臓血管系用薬、<http://www.infomed.yale.edu/library/heartbk>、1999年4月16日；モスビーの医学看護学および関連する保健学辞典、第5版、モスビー社、セントルイス、ミズーリ州、1998年；ならびにステッドマン医学大辞典（第25版）、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ社、バルティモア、メリーランド州、1990年に開示されている。

40

【0156】

心臓血管系障害としては、動脈硬化性の心臓病（すなわち動脈硬化症）、狭心症、心筋梗塞、血管系の疾患（たとえば末梢血管疾患（PVD）および動脈瘤）、高血圧、高血圧、発作（たとえば血栓性の発作、脳出血および塞栓性の発作）、うっ血性心不全、心臓弁膜症、リウマチ性心臓病、不整脈（たとえば心房細動、心室性頻拍、心房性不整脈、心室細動、徐脈型不整脈および心室性期外収縮）、心膜炎、心筋炎、心内膜炎ならびに心筋症が挙げられる。

【0157】

「心臓血管系用薬」としては、心臓血管系系に関連する異常な状態の一つ以上を治療する

50

のに有用な任意の化合物である。適切な心臓血管系用薬は、たとえば、医師用添付文書集（PDR）、メディカル・エコノミクス社（モントベール、ニュージャージー州）、（第53版）、1999；メイヨー・メディカル・センター処方集、完全版、メイヨークリニック（ロチェスター、ミネソタ州）、1998年1月；エール大学医学部ハートブック：第23章、心臓血管系用薬、<http://www.info.med.yale.edu/library/heartbk>、1999年4月16日；メルク・インデックス、化学物質、薬物、生物学的製剤の百科事典、（第11版）、メルク社（ローウェー、ニュージャージー州）、1989；およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

【0158】

10

適切な心臓血管系用薬としては、血液飾物質、アドレナリン遮断薬（末梢性）、アドレナリン刺激薬（中心性）、 / アドレナリン遮断薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンジオテンシンIIレセプター拮抗薬、不整脈治療剤（グループI、II、IIIおよびIV）、その他の不整脈治療剤、30抗高脂血症剤、アドレナリン遮断薬、カルシウムチャンネル遮断薬、利尿薬、高血圧性緊急症治療薬、強心薬、その他の心臓血管系用薬、ジャボク誘導体、血管拡張薬および昇圧剤が挙げられる。

【0159】

適切な血液飾物質としては、抗凝血剤（たとえばクーマディン（結晶性ワルファリンナトリウム）；フラグミン（ダルテパリンナトリウム注射液）；ヘパリンロック（ヘパリン錠フラッシュ溶液）；ヘパリンナトリウム（ヘパリンナトリウム；ロベノックス（エノキサパリンナトリウム）；ノルミフロ（アルデパリンナトリウム）；オルガラン（ダンパロイドナトリウム））；抗血小板薬（たとえば、アグラストット（チロフィバン塩酸塩モノヒドレート）；アグリリン（アナグレライド塩酸塩）；エコトリン（腸溶性被膜化アスピリン）；フローラン（エポプレステノールナトリウム）；ハルプリン（腸溶性被膜化アスピリン）；インテグリン（エプチフィバチド）；ペルサンチン（ジピリダモール）；プラビックス（クロピドグレルビスルファート）；レオプロ（アブシキマブ）；およびチシライド（チクロピジン塩酸塩））；コロニー刺激因子（たとえば、ニューボゲン（フィルグラスチム）などの顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；ロイキン（サグラモスチム）などの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、）；および造血剤（たとえば、アナドール-50（オキシメソロン）などのアナボリックステロイド；およびナスコバル（シアノコバラミン）；およびトリンシコン（内性因子を含む濃縮造血剤）；およびエポゲン（エポチンアルファ）などのエリスロポエチン；およびプロクリット（エポチンアルファ）が挙げられる。

20

30

【0160】

適切なアドレナリン遮断薬（末梢性）としては、カードウラ（ドキサゾシンメシレート）；ジベンジリン（フェノキシベンズアミン）；ヒローレル（グアナドレルスルファート）；ヒトリン（テラゾシン塩酸塩）；ミニプレス（プラゾシン塩酸塩）；およびミニザイド（プラゾシン塩酸塩 / ポリチアシド）が挙げられる。

【0161】

適切なアドレナリン刺激薬（中心性）としては、アルドコール（メチルドーパおよびクロロチアシドナトリウム）；アルドメット（メチルドーパ）；アルドメット塩酸エステル（メチルドーパ塩酸塩）；アルドリル（メチルドーパおよびヒドロクロロチアシド）；カタプレス（クロニジン塩酸塩）；カタプレス-TTS（クロニジン）；クロルプレス（クロニジン塩酸塩および25クロロタリドン）；コンビプレス（クロニジン塩酸塩およびクロロタリドン）；およびテネックス（グアンファシン）が挙げられる。

40

【0162】

適切な / アドレナリン遮断薬としては、コレッグ（カルベジロール）；ノルモダイン（ラベタロール）；およびトランデイト（ラベタロール）が挙げられる。

【0163】

適切なアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤としては、30アクプリル（キナプリ

50

ル塩酸塩)；アルテイス(ラミプリル)；カプトプリル；ロテンシン(ベナゼプリル塩酸塩)；マビック(トランドラプリル)；モノプリル(フォシノプリルナトリウム錠)；プリニビル(リジノプリル)；ユニバスク(メキシプリル塩酸塩)；バソテック(マレイン酸エナラプリル)；およびゼストリル(リジノプリル)が挙げられる。

【0164】

適切なアンギオテンシンⅠⅠレセプター拮抗薬としては、アタカンド(カンデサルタンシレクセチル)；アパプロ(イルベサルタン)；コザール(ロザルタンカリウム)；およびジオバン(バルサルタン)HCT(商標)(ヒドロクロロチアシド)が挙げられる。

【0165】

適切なグループⅠの不整脈治療剤としては、カルジオキン(キニジンポリガラクトナー ト)；エチモジン(モリシジン塩酸塩)；メキシチル(メキシレチン塩酸塩)；ノルペイス(ジソピラミドリン酸塩)；ノルペイスCR(制御放出ジソピラミドリン酸塩)；プロカンビド(プロカインアミド塩酸塩、徐放性錠剤)；キナグルート(キニジン)；キニデックス(キニジンスルファート)；リズモール(プロパフェノン塩酸塩)；タンボコール(フレカイニド酢酸塩)；およびトノカード(トカイニド塩酸塩)が挙げられる。適切なグループⅠⅠの不整脈治療剤としては、ベタピース(ソタロール塩酸塩)；プレビブロック(エスモロール塩酸塩)；インデラール(ポプラノロール)；およびセクトラール(アセプトロール)が挙げられる。

10

【0166】

適切なグループⅠⅠⅠの不整脈治療剤としては、ベタピース(ソタロール塩酸塩)；コーダロン(アミオダロン)；コルパート(イブチリドフマル酸塩注射液)；およびピースロン(アミオダロン塩酸塩)が挙げられる。

20

【0167】

適切なグループⅠⅣの不整脈治療剤としては、カラン(ベラパミル)；およびカルジゼム(ジルチアゼム塩酸塩)が挙げられる。

【0168】

適切なその他の不整脈治療剤としては、アデノカード(アデノシン)；ラノキシキャプス(ジゴキシン)；およびラノキシン(ジゴキシン)が挙げられる。

【0169】

適切な抗高脂血症剤としては、胆汁酸金属イオン封鎖剤(たとえば、コレステド(微小イオン化コレステロール塩酸塩)；ロコレスト(コレステラミン)；およびケストラン(コレステラミン)；フィブリン酸誘導体(たとえば、アトロミド-S(クロフィブレート)；ロピッド(ゲムフィプロジル)；およびトリコール(フェノフィブレートカプセル剤)；HMG-CoAレダクターゼ阻害剤(たとえば、バイコール(セリバスタリンナトリウム錠)；レスコール(フルバスタチンナトリウム)；リピトール(アトロバスタチンカルシウム)；メバコール(ロバスタチン)；プラバコール(プラバスタチンナトリウム)；およびゾコール(シンバスタチン)；およびニコチン酸(たとえばニアスパン)が挙げられる。

30

【0170】

適切な アドレナリン遮断薬としては、ベタピース(ソタロール塩酸塩)；プロカドレン(マレイン酸チモロール)；プレビブロック(エスモロール塩酸塩)；カルトロール(カルテオロール塩酸塩)；インデラール(ポプラノロール塩酸塩)；ケルロン(ベタキソロール塩酸塩)；レバトール(ペンブトロールスルファート)；ロプレッサ(メトロポロール酒石酸塩)；セクトラール(アセプトロール塩酸塩)；テノルミン(アテノロール)；トプロール-XL(メトプロロールスクシナート、徐放性)；およびゼベタ(ピソプロロールフムラート)が挙げられる。

40

【0171】

適切なカルシウムチャンネル遮断薬としては、アダラット(ニフェジピン)；アダラットC(ニフェジピン)；カラン(ベラパミル塩酸塩)；カランSR(ベラパミル塩酸塩)；カルデン(ニカルジピン塩酸塩)；カルジゼムCD(ジルチアゼム塩酸塩)；カルジゼム

50

(ジルチアゼム塩酸塩) ; カルジゼムSR (ジルチアゼム塩酸塩) ; コベラ-HS (ベラパミル塩酸塩) ; ジラトールXR (ジリチアゼム) ; ダイナサーク (イスラジピン) ; ダイナサークCR (イスラジピン) ; イソプチンSR (ベラパミル塩酸塩) ; ニモトップ (ニモジピン) ; ノルバスク (アムロジピンベシル酸塩) ; プレンジル (フェロジピン) ; プロカルディア (ニフェジピン) ; プロカルディアXL (ニフェジピン、徐放性) ; スルアー (ニソルジピン) ; チアザック (ジルチアゼム塩酸塩) ; バスコール (ペプリジル塩酸塩) ; およびベレラン (ベンパミル塩酸塩) が挙げられる。

【0172】

適切な利尿薬としては、カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤 (たとえば、ダルアニド (ジクロルフェナミド)) ; ループ利尿薬 (たとえば、デマデックス (トルセミド) ; エデクリン (エタクリン酸) ; エデクリンナトリウム (エタクリン酸) ; およびラシックス (フロセミド)) ; カリウム保持性利尿薬 (たとえば、アルダクトン (スピロノラクトン) ; ダイレニウム (トリアムテレン) ; およびミダモール (アミロリド)) ; チアジドおよびそれに関連する利尿薬 (たとえば、ジューカジン (ヒドロフルメタシド) ; ジューウリル (クロロチアシド) ; ジューウリルナトリウム (クロロチアシド) ; エンデュロン (メチクロチアシド) ; ヒドロジウリル (ヒドロクロロチアシド (HCTZ)) ; ミクロシド (ヒドロクロロチアシド) ; ミクロックス (メトラゾン) ; レニース (ポリチアシド) ; タリトン (クロロタリドン USP) ; およびザロコリン (メトラゾン)) が挙げられる。

10

【0173】

適切な高血圧性緊急症治療薬としては、ハイパースタット (ジアゾキシド) が挙げられる。

20

【0174】

適切な強心薬としては、ドブトレックス (ドブタミン塩酸塩) ; ラノキシキャプス (ジゴキシン) ; およびラノキシン (ジゴキシン) ; およびプリマコール (ミルリノン乳酸塩注射液) が挙げられる。

【0175】

適切なその他の心臓血管系用薬としては、デムセル (メチロシン) ; インバーシン (メカミラミン塩酸塩) ; レジチン (フェントラミンメシラート) ; およびレオプロ (アブシキシマブ) が挙げられる。

【0176】

適切なジャボク誘導体としては、ジウプレス (レセルピンおよびクロロチアシド) ; およびヒドロプレス (レセルピンおよびヒドロクロロチアシド) が挙げられる。

30

【0177】

適切な血管拡張薬としては、冠拡張薬 (たとえば、デポニット (経皮ニトログリセリン) ; ジラトレート-SR (イソソルビドジニトレート、徐放性) ; イムツール (イソソルビドモノニトレート) ; イスモ (イソソルビドモノニトレート) ; イソルジル (イソソルビドジニトレート) ; モノケット (イソソルビドモノニトレート) ; ニトロ-Bid (ニトログリセリン) ; ニトロ-Dur (ニトログリセリン) ; ニトロリングアル (噴射剤中のニトログリセリン、ジクロロジフルオロメタンおよびジクロロテトラフルオロメタン) ; ニトロスタット (ニトログリセリン) ; ソルビトレート (イソソルビドジニトレート) ; および経皮用-ニトロ (ニトログリセリン)) ; 末梢血管拡張薬 (たとえば、クロロパム (フェノルドパムメシラート) ; フロラン (エポプロステノールナトリウム) ; およびプリマコール (ミルリノン乳酸塩注射液)) が挙げられる。

40

【0178】

適切な昇圧剤としては、アナ-キット (エピネフリン) ; アラミン (メタラミノールニ酒石酸塩) ; エピペン (エピネフリン) ; プロアマチン (ミドドリン塩酸塩) ; およびバソキシル (メトキサミン塩酸塩) が挙げられる。

【0179】

当業者であれば、本発明において有用な心臓血管系用薬は、上記に開示された任意の心臓血管系用組成物に存在する生理活性化合物であることを理解できる。たとえば、カルジゼ

50

ム（ジルチアゼム塩酸塩）は、一般的に注射用の溶液として、徐放性のカプセルとしておよび直接圧縮される錠剤として利用可能である。しかしながら、心臓血管系用薬（+）-シス-1,5-ベンゾチアゼピン-4（5H）オン,3-（アセチルオキシ）-5-[2-（ジメチル-アミノ）エチル]-2,3-ジヒドロ-2-（4-メトキシフェニル）-モノヒドロ-クロリドである。医師用添付文書集（PDR）、メディカル・エコノミクス社（モントベール、ニュージャージー州）、（第53版）、pp.1311-1318,1999。

【0180】

式Iの化合物/リンカー/治療薬-心臓血管系用薬

化合物の残基に直接結合していることに加えて、適切なリンカーによって、心臓血管系用薬の残基が化合物の残基に結合することもできる。もし、得られる本発明の化合物が心臓血管系用薬として効果的な治療指数を示し、そして好ましくは経口投与が可能であるならば、リンカーの構造は決定的なものではない。適切なリンカーは、たとえば、米国特許第5,735,313号；1999年4月16日に出願された米国特許出願第60/129,733号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,874号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,753号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,873号；およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

10

【0181】

VI II . 治療薬としての増殖抑制剤

現在、以下に記載されるようなアルキル化剤、代謝拮抗剤、天然物、酵素、生物反応修飾物質、その他の薬剤、ホルモンおよび拮抗薬を含めた種々のクラスの化合物によって増殖性疾患を治療している。

20

【0182】

アルキル化剤としては、(1)ニトロジェンマスタード：メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン（L-サルコリシン）、クロラムブシル；(2)エチレンイミンおよびメチルメラミン：ヘキサメチルメラミン、チオテパ；(3)アルキルスルホン酸塩：プスルファン、(4)ニトロソウレア：カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、セムスチン（メチル-CCNU）、ストレプトゾシン（ストレプトゾシン）；および(5)トリアゼン：ダカルバジン（DTIC；ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサイド）が挙げられる。

30

【0183】

代謝拮抗剤としては、(1)葉酸類似体：メトトレキサート（アメトプテリン）；(2)ピリミジン類似体：フルオロウラシル（5-フルオロウラシル；5-FU）、フロクスウリジン（フルオロデオキシウリジン；FdR）、シタラピン（シトシンアラビノシド）；(3)プリン類似体：メルカプトプリン（6-メルカプトプリン；6-MP）、チオグアニン（6-チオグアニン；TG）、ペントスタチン（2'-デオキシシオフォマイシン）；(4)ピンカルカロイド：ピンブラスチン（VLB）、ピンクリスチン；および(5)エピポドフィロトキシン：エトポシド、テニポシドが挙げられる。

40

【0184】

ホルモンおよび拮抗薬としては、(1)エストロゲン：ジエチルstilbestrol、エチニルエストラジオール；(2)抗エストロゲン：タモキシフェン；(3)アンドロゲン：プロピオン酸テストステロン、フルクソミエステロン；(4)抗アンドロゲン：フルタミド；および(5)性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体：ロイプロリドが挙げられる。

【0185】

正常でない細胞増殖の治療に有用なその他の薬剤としては、(1)抗生物質：ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルピシン（ダウノマイシン；ルビドマイシン）、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシン（マイトマイシンC）；(2)酵素：L-アスパラギナーゼ；(3)生物反応修飾物質：インターフェロン；(4)プラチナ配位複合体：シスプラチン（シス-DDP）、カ

50

ルボプラチン；(5) アントラセンジオン：ミクストラントロン；(6) 置換尿素：ヒドロキシウレア；(7) メチルヒドラジン誘導体：プロカルバジン（N - メチルヒドラジン、MIH）；(8) 副腎皮質抑制剤：ミオタン（o, p' - DDD）、アミノグルテチミド；(9) アドレノコルチコステロイド：プレドニゾン；および(10) プロゲステン：カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロールが挙げられる。

【0186】

コバラミン輸送タンパク質（すなわちトランスコバラミンI、IIもしくはIIIまたは内性因子）（TC - またはIF - 結合担体）と結合する化合物と（ビタミンB₁₂の代わりに）直接的または間接的に（トランスコバラミンレセプター（TR）との結合が可能な様式で）連結することによって、増殖性疾患を治療するためのホウ素10を含む分子などの中性子捕獲剤は、不必要な増殖部位内に極めて効率的に吸収されることが分かった。その後、中性子捕獲療法を開始することで、正常でない増殖をしている細胞を選択的に破壊することができる。

10

【0187】

コバラミンまたは式Iの化合物および中性子捕獲剤を経口ではなく腸管外に投与することは、バイオアベイラビリティと増殖性の組織への送達を促進するため、好ましい。重要なことは、コバラミンまたは式Iの化合物/中性子捕獲剤を経口投与すると、増殖性疾患を治療するためのバイオアベイラビリティが不十分となることが分かったことである。活性を示す薬剤の吸収経路に結合する回腸の内性因子レセプターに依存しない様式で、中性子捕獲剤を投与することは重要であり、そして恐らくは不可欠である。

20

【0188】

式Iの化合物/リンカー/治療薬 - 増殖抑制剤

化合物の残基に直接結合していることに加えて、適切なリンカーによって、増殖抑制剤の残基が化合物の残基に結合することもできる。もし、得られる本発明の化合物が増殖抑制剤として効果的な治療指数を示し、そして好ましくは経口投与が可能であるならば、リンカーの構造は決定的なものではない。適切なリンカーは、たとえば、米国特許第5,735,313号；1999年4月16日に出願された米国特許出願第60/129,733号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,874号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,753号；1999年10月15日に出願された米国特許出願第60/159,873号；およびこれらに引用されている参考文献に開示されている。

30

【0189】

従って、本発明の一つの実施形態において、(1) コバラミンまたは式Iの化合物、(2) コバラミンまたは式Iの化合物と直接またはリンカーを介して結合した中性子捕獲剤、ここでリンカーは(i) ユニモダル（すなわち単一）かつ定義された分子量か、または(ii) 約2000未満、好ましくは1900未満、1800未満または1500未満の分子量のいずれかを持つ；そして(3) コバラミン輸送タンパク質（IFまたはTC - I、IIもしくはIIIなど）を含む中性子捕獲コンジュゲートであって、正常でない増殖をしている細胞に対して高い特異性を有する中性子捕獲コンジュゲートが提供される。

40

【0190】

IX. 治療薬としてのアンチセンスオリゴヌクレオチド

その用途に従ってポリ核酸の配列を適切に選択し、そしてそのポリ核酸の配列をトランスコバラミンレセプターについてのリガンドと、または内性因子 - コバラミンレセプターについてのリガンドとコンジュゲートすることによって、それを必要とする様々な種類の生物に、好ましくは哺乳動物に、より好ましくはヒトにポリ核酸を送達するために、本発明を利用することができる。ポリ核酸を、コバラミンまたは式Iの化合物が結合したコバラミン輸送タンパク質の複合体とコンジュゲートすることができる。本発明を用いて、特定の遺伝子の発現を制御する核酸配列または特定のタンパク質もしくはタンパク質の断片をコード化している核酸配列を、トランスコバラミンレセプターまたはIFレセプターを発

50

現している細胞に送達することによって、疾患を治療することができる。

【0191】

ポリ核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド（場合により安定化させたオリゴヌクレオチド）、短い鎖長（20ヌクレオチド未満）、中間の鎖長（20～100ヌクレオチドの間）もしくは長い鎖長（100ヌクレオチドより大きい）のPNAまたはMNAのあらゆるものであって、所望に応じて二本鎖または一本鎖とすることができる。好ましい実施形態において、ポリ核酸の配列を、20ヌクレオチド以下のアンチセンスRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスPNAまたはアンチセンスMNAとすることができる。

【0192】

特に、本発明の担体とコンジュゲートすることができるアンチセンスヌクレオチドを表1に分類する。

【0193】

【表1】

表 1

名称および提供者	配列	標的/疾患	状況(相)
ホビドレン(アイヌ社)	GCGTTGCTCTTCTT CTTGCG	IE-2/CMV 網膜炎	FDA
2302 (アイヌ社)	GCCCAAGCTGGCATCCGTCA	3' -UTR/ICAM-1、クローン病、 乾癬、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、同種腎移植	II A/B
3521/CPG, 64128A (アイヌ社/ノバルティス社)	GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA	3' -UTR/PKC-a、卵巣がん	II A
5132/CPG, 69846A (アイヌ社/ノバルティス社)	TCCCGCCTGTGACATGCATT	c-RAF キナーゼ、乳がん、前立腺がん、結腸がん、脳腫瘍、卵巣がん	I / II
2503 (アイヌ社)	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	Ha-ras オncジーン 種々の 充実性腫瘍	I
G3139 (ジェンタ社)	TCTCCAGCGTGCGCCAT	bcl-2、プロトオncジーン、非ホジキンリンパ腫、前立腺がん、乳がん	I / II A
LR3280 (リンクス社)	AACGTTGAGGGCAT	c-myc/プロトオncジーン、ステント再狭窄	I
LR3001 (リンクス社)	TATGCTGTGCCGGGG TCTTCGGGC	c-myb、プロトオncジーン 慢性骨髄性白血病	II
LR4437 (リンクス社)	GGACCCTCCTCCGGA GCC	IGF-IR、エクシトロでの腫瘍細胞	I
GEM-132 (ハイフリトン社)	<u>UGGGGCTTACCTTGC</u> <u>GAACA</u>	イントロン-エクソン、UL36/27、CMV-網膜炎	I / II
GEM-92 (ハイフリトン社)	<u>UCGCACCCATCTCTC</u> <u>TCCUUC</u>	Gag/HIV-1, AIDS	I
GEM-231 (ハイフリトン社)	<u>GCGUGCCTCCTCACU</u> <u>GGC</u>	pka-1、難治性の充実性腫瘍	I
GPI-2A (ノバルティス社)	G(ps)GTTC(ps)TTTTG(ps) G(ps)TCC(ps)TTG(ps)T C(ps)T	Gag/HIV-1, AIDS	I
13312 (アイヌ社)	<u>GC(ps)GTTTGC(ps)TC(ps)</u> <u>TTC(ps)TTC(ps)TTGCG</u>	IE-2, CMV 網膜炎	I

注釈: GEM-132, GEM-92 および GEM-231 において下線を付した塩基は、2' OMe の糖の修飾体である。

GPI-2A において、(ps)で表される七箇所の PS 結合があり、そして残りの残りはヌクレオチドである。

10

20

30

40

13312において、下線を付した塩基は2'-O(CH₂)₇OCH₃の糖の修飾体であり、すべてのU残基およびC残基は5-メチルで置換されている。

サンバー,ワイ・ス(Sanghvi, Y. S.)ら:アザノスの方法論の手引 ハートマン,ジー
(Hartmann, G.)およびエンドレス,ス(Endres, S.)ら編、クルーバー・アカデミック・パブリッ
シャー(Kluwer Academic Publisher)社、1998年、印刷中:からの引用。

【0194】

X. コバラミン輸送タンパク質

ヒトにおいて、ビタミンB₁₂の一日あたりの平均的な摂取量(西欧での食事の中の)は、約4 μgから5 μgである。回腸および結腸の右側においてコバラミンの追加的な合成がなされることもあるが、量は不明である。ヒトにおいて一日あたりに吸収されるはずである腸内のコバラミンの総計は、7 μgから14 μgと推定され、食物および内因性のコバラミンの合計である。腸の上皮細胞には、ビタミン、ミネラルおよびアミノ酸などの消化による少量の産物を極めて効率的に取り込む担体とトランスポーターがある。上皮細胞層には、5または6アミノ酸のサイズよりも大きなペプチドがほとんど通過できない障壁が存在するため、これらのメカニズムはこれらの分子の取り込みにとって必要である。本発明のコバラミンは、あまりにも大きすぎて腸壁を横切って拡散することができないような、腸から直接吸収されない大きな分子である。したがって、コバラミンの吸収は輸送タンパク質に依存する。腸から血液へのビタミンB₁₂の取り込みは、すべてのビタミンの中でおそらく最も複雑な取り込みメカニズムであり、少なくとも四つの別個のコバラミン結合タンパク質とレセプターが関わっている。

【0195】

コバラミンの吸収と輸送には、三種の別個のグループの輸送タンパク質が関与している: 内性因子(IF)、ハプトコリン(HC; R-タンパク質とも呼ばれ; トランスコバラミンI(TC-I)とトランスコバラミンIII(TC-III)はそのメンバーである)およびトランスコバラミンII(TC-II)である。IFおよびTC-IIの両方が不足すると、巨赤芽球性貧血および神経系の脱髄疾患などの異常に至る。それぞれのタンパク質のみが、一つのサブユニットとコバラミンについての一箇所の結合部位を有する。IFは45 kDa(ヒト)から55 kDa(ブタ)の血漿糖タンパク質であり、炭水化物の含量は15%である。HCは58 kDa(ヒト)から60 kDa(ウサギ)の血漿糖タンパク質であり、炭水化物の含量は33%から40%で、16~19のシアル酸残基を含む。ヒトのTC-IIは43 kDaの血漿タンパク質(ヒト)であり、炭水化物の含量は0%である。それぞれの結合タンパク質はコバラミンについて異なるアフィニティーを持ち、同様に細胞のレセプターも異なっている。一般的に、コバラミンは胃の中で最初にHCと結合し、次いで小腸内でIFと結合する。次いで、腸の上皮細胞の近傍でIFレセプターがIF-コバラミン複合体の取り込みに関与する。タンパク質の分解によってコバラミンの放出が導かれ、それに続いてTC-IIに結合する。

【0196】

内性因子(IF)とハプトコリン(HC; は腸管内腔の主要なコバラミン結合成分である。特に、IFは経口でのペプチドおよびタンパク質の送達分野に対して格別の関わりを持つ。従って、IFは主に胃の本体および標準サイズの管路で生産され、そしてHCは主に顆粒球、卵黄嚢、乳腺、唾液腺および管路内で生産される。一般的に、血漿または血清内でも、コバラミンは(白血球に由来する)HCまたはTC-IIと結合している。前記の複合体は肝臓によって取り込まれ、腸肝循環の最初の肢としての腸管内腔に遊離のコバラミンが送達される。

【0197】

IFは最も特異性の高いコバラミン-結合タンパク質である。シアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン(HOCbl)、メチルコバラミン(MeCbl)およびアデノシルコバ

10

20

30

40

50

ラミン (AdoCbl) は、同様のアフィニティーで内性因子と結合する。このことから、コバルトの上方の γ -軸のリガンドは結合に有意な影響を与えないことが示唆される。しかしながら、食事の後でビタミン B_{12} が放出されると、pHが低いせいで、IFに関するコバラミンに対するアフィニティーが低下する。HCは酸による加水分解からビタミンを保護するかもしれないので（おそらくはHCがかなりの程度グリコシル化されていることが理由だと思われる）、むしろ、放出されたビタミン B_{12} は優先的に唾液のHCと結合する。

【0198】

HCは、免疫学的に同一のタンパク質の一群を含み、多数のタイプの細胞（顆粒球、乳腺、卵黄嚢または臓側胸膜、唾液管および腺房細胞、ならびにいくつかの種での胃粘膜）から、多種の体液（血漿、乳、羊水、唾液および胃液）に分泌される。これらのタンパク質は、（迅速な電気泳動についての）Rタンパク質、非内性因子またはトランスコバラミンIおよびIIIとして既に知られていた。これらは異なるグリコシル化製造方法で特徴付けられ、そして血清中で結合しているコバラミンの総量の大部分の割合を占める（血清中で結合しているコバラミンの約80%）。HCのターンオーバーは極めて遅く（ $t_{1/2} = 10$ 日間）、コバラミンの主要な貯蔵タンパク質として機能するように見え、そして皮膚を通しての光分解に対して血清のコバラミンを安定化させるのかもしれない（アレン、アール・エイチ、Prog Hematol. 1975, 9, 57-84）。

10

【0199】

近位小腸の中で、膵臓の酵素によってHCは分解され、遊離したコバラミンはその他の輸送タンパク質と、特にIFと結合する。HCとは対照的に、IF-コバラミン複合体はタンパク質分解性の消化に対して抵抗性を有する。レセプター媒介型エンドサイトーシスを介してコバラミン-輸送タンパク質が内部に一旦移行すると、（単数または複数の）プロテアーゼを介して輸送タンパク質からコバラミンが切断され、そしてトランスコバラミンII (TC-II) と結合する。ここから、吸収されたコバラミンの末梢組織への輸送に、TC-II-コバラミン複合体が用いられる。従って、TC-IIはほとんどの組織内で見出される。TC-IIに対する抗体は、コバラミンの輸送を阻害し、そしてインビトロで白血病性の細胞の増殖を妨害する（マックリーン、ジー・アール (McLean, G. R.) ら、Blood, 1997, 89, 235-242）。牛乳中では、特に主要なコバラミンとの結合成分はHCではなく、むしろTC-IIである（フェドソフ、エス・エヌ (Fedosov, S. N.) ら、Biochemistry 1995, 34, 16082-16087およびフェドソフ、エス・エヌら、Biochim. Biophys. Acta. 1996, 1292, 113-119）。

20

30

【0200】

輸送タンパク質を精製する初期の試みは、硫酸アンモニウム分画、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーなどの従来技術を利用するものであった。これらの方法から得られた産物は、他のタイプの輸送タンパク質を欠いており、特にTC-IからTC-IIを分離することは可能ではあったが、その他の血漿タンパク質が混入していた。アフィニティークロマトグラフィーの導入によって、極めて濃度が小さくとも、純粋なタンパク質を提供できた。アフィニティークラムの主な三種のタイプを用いて、特に、異なるマトリクスにコバラミンを結合させたカラムを用いて、輸送タンパク質を精製してきた。最初のもは、セファロースビーズにジアミノ-ジプロピルアミンのスペーサーアームを介してコバラミンのモノカルボン酸誘導体を結合させたものである（アレン、アール・エイチら、J. Biol. Chem. 1972, 247, 7695-7701およびアレン、アール・エイチら、J. Biol. Chem. 1973, 248, 3660-3669）。しかしながら、カオトロピック試薬を用いてマトリクスからタンパク質を溶出する必要があったため、結果として輸送タンパク質が変性してしまう恐れがあり、これを復元することはできない。たとえば、ヒトの血漿のコーン分画III（血漿のTC-IIの27-40%を含有する混合物である）からの結合したタンパク質の溶出には、グアニジン塩酸塩を用いる必要があった。そして遊離した変性TC-IIを復元することはできなかった。

40

50

【0201】

カオトロピック試薬の使用を避けるために、コバラミンと不溶性マトリクスとの間に、温度または光に不安定な結合を作り上げた（ネクスコ、イー（Nexo, E.）ビタミンB₁₂およびB₁₂-タンパク質における「コバラミン結合タンパク質」、クラントラー、ビー（Krantler, B.）；アリゴニ、ディー（Arigoni, D.）およびゴールドディング、ビー・ティー（Golding, B.T.）編；ウィリー・アンド・サンズ社461-475）。この様式で作製されたマトリクスは、マトリクスからコバラミンを解離することによって、輸送タンパク質を放出することができる。したがって、カオトロピック薬による変性の影響を回避しつつ、コバラミンで飽和された輸送タンパク質が提供される。

10

【0202】

好ましい実施形態において、輸送タンパク質を大規模に精製するために、アフィニティーカラムを介する輸送タンパク質の精製の前に、イオン交換クロマトグラフィーまたは硫酸アンモニウム分画法を用いて、サンプルを濃縮する。本発明の代替可能な実施形態において、アフィニティーカラムを介する輸送タンパク質の精製に続けて、イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーを行う。

【0203】

XI. 医薬の投与形態

内性因子またはトランスコバラミンI、IIもしくはIIIなどのコバラミン輸送タンパク質が結合した、診断薬または治療薬とコンジュゲートしたコバラミンまたは式Iの化合物の投与の形態は、当業者に知られているように、疾患の位置および性質に依存する。内性因子またはトランスコバラミンI、IIもしくはIIIなどのコバラミン輸送タンパク質が結合した、診断薬または治療薬とコンジュゲートしたコバラミンまたは式Iの化合物を、医薬組成物として製剤化することができ、そしてヒトの患者などの哺乳動物の宿主に、選択した投与経路に適合した種々の形態で投与する。ここで、投与経路としては、すなわち経口でまたは腸管外に、静脈内に、筋肉内にまたは皮下に、舌下に、粘膜に（たとえば鼻に）、吸入にて、経皮にて、関節内に、滑膜内に、クモ膜下腔内に、動脈内に、心臓内に、眼窩内に、関節包内に、眼球内に、髄腔内に、胸骨内に、局所に、経皮貼布で、直腸を経て、膣または尿道の坐剤で、腹膜に、経皮で、手術による移植にて、手術による体内への塗布で、輸液ポンプまたはカテーテルである。医薬製剤に関する標準的な情報は、アンセル（Ansel）ら、医薬の投与形態と薬物送達システム、第六版、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス社（1995）を参照すること。

20

30

【0204】

コバラミンまたは式Iの化合物/診断薬または治療薬/コバラミン輸送タンパク質を、たとえば、静脈内にまたは腹膜内に輸液または注射によって投与することができる。水で薬物の溶液を調製することができるが、場合により非毒性の界面活性剤を混合してもよい。グリセリン、液体のポリエチレングリコール、トリアセチンおよびそれらの混合物で、および油で分散液を調製することもできる。貯蔵および使用の標準的な条件下では、微生物の繁殖を防止するために、これらの調製品は防腐剤を含む。

【0205】

輸液または注射に適した医薬の投与形態としては、滅菌済みの注射可能なもしくは導入可能な溶液または分散液、場合によりリポソーム内にカプセル化したものを即時に調製できるように適合化した、薬剤を含有する滅菌水溶液もしくは分散液または滅菌粉末が挙げられる。すべての場合において、最終的な投与形態は、製造および貯蔵の条件下で安定な、滅菌した流動体でなければならない。液体の担体またはビヒクルは、たとえば、水、生理食塩水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセリン、プロピレングリコール、液体のポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性のグリセリルエステルおよびそれらな適切な混合物を含む溶媒または液体の分散媒であり得る。たとえばリポソームを形成することによって、分散液の場合は必要とされる粒子サイズを維持することによって、または界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することができる。種々の抗菌剤お

40

50

よび抗真菌剤によって、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ベンジルアルコール、ソルビン酸、チメロサルなどによって、微生物の作用を予防することができる。多くの場合、等張用の物質、たとえば糖類、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンによって吸収を遅延化させる薬剤の組成物における使用によって、注射用組成物の吸収を長時間化することができる。

【0206】

必要に応じて上記に列挙した種々のその他の成分を含む適切な溶媒中に、必要な量の物質を組み込み、次いでフィルターで滅菌することによって、滅菌した注射用の溶液を調製する。滅菌した注射用の溶液の調製品の代わりに滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、これによって、予め滅菌フィルターにかけた溶液中に存在する所望の成分を、任意に追加して有効成分に加えた粉末が得られる。

10

【0207】

注射可能な溶液は、治療用組成物を局所に投与するためには特に有利である。特に、実質に注射して腫瘍の成長部分に直接治療用組成物を送達することができる。開業医が一箇所かほんの数箇所（2～6など）の関節を治療したいと希望する場合の関節炎のケースでは、関節内注射は補助的に好ましい。さらに、妥当な場合において、治療用化合物を損傷内に直接注射する（病変内局注投与）。皮膚の病変部については、皮内投与を選択できる。

【0208】

経皮治療システムを利用して、治療用化合物を場合により局所に投与する（バリー（Barry）、皮膚用製剤、（1983）p. 181およびそこに列挙された文献を参照すること）。薬物の経皮送達（TDD）には、経口送達よりもいくつか優れた点がある。経口送達と比較した場合、TDDは胃腸での薬の代謝を回避でき、初回通過効果を軽減し、そして薬剤に最大で7日間までの徐放性を提供できる（エリアス（Elias）ら、経皮での吸収：メカニズム - 方法論 - 薬物送達；マーセル・デッカー（Marcel Dekker）社、ニューヨーク：1, 1989）。この方法は特に、胃腸内での分解に影響されやすく、胃腸内での取り込みが乏しい多数の治療用タンパク質を用いる場合に有用である。注射と比較すれば、TDDは痛みと感染の可能性を排除できる。このような局所での送達システムは、低分子量の薬剤の経皮投与のために大部分が設計されてきた間、定義からしてこれらは経皮的な送達を可能にしたものである。比率の制御が可能な微小孔性の膜を適切に選択することによって、これらを容易に本発明の治療用化合物の投与に適合させることができる。クリーム、ローション、軟膏またはオイルに基づく担体中の対象化合物を直接皮膚に塗布することによって、局所への応用も達成することができる。クリーム、ローションまたはオイル中の治療用化合物の典型的な濃度は1%から2%である。

20

30

【0209】

肺の組織を標的化する薬剤について、治療用化合物を、呼吸器系への応用に適した溶液、懸濁液、エアロゾルまたは微粒子の分散液に製剤化する。ネブライザー、吸入用カプセル、吸入用エアロゾル、鼻用溶液を介して治療薬を吸入させてもよく、注射器または気管内チューブを介する溶液として、またはネブライザー用溶液を介するエアロゾルとして気管に投与してもよい。化合物を含む含水エアロゾル、リポソーム調製品または固体粒子を用いてエアロゾルを調製する。非水性の（たとえば噴射剤のフルオロカーボン）懸濁液を用いてもよい。ネブライザーは、治療用化合物が剪断を被ることを最小限にする（剪断の結果、化合物が分解することがあり得る）ため、超音波ネブライザーが好ましい。

40

【0210】

粘膜を経る経路によって本発明の対象のコバラミンコンジュゲートを送達することは、魅力のある投与の選択肢を提案することでもある。鼻用溶液のための剤形の原型には、プロピレングリコール、抗酸化剤および香料としての芳香油などの適切な水性または非水性の溶媒中で溶解した状態のコバラミンまたは式Iの化合物のコンジュゲートが含まれる。製剤には、適切な（単数または複数の）噴射剤が含まれてもよい。

【0211】

50

眼への応用について、治療用化合物を、眼への使用に適した溶液、懸濁液および軟膏に製剤化する。眼科用の処方については、ミトラ (M i t r a) (編)、眼科用の薬物送達システム、マーセル・デッカー社、ニューヨーク、ニューヨーク (1993) およびさらにはハベナー、ダブリュ・エイチ (H a v e n e r , W . H .)、眼の薬理学、シー・ブイ・モスピー (C . V . M o s b y) 社、セントルイス (1983) を参照すること。

【0212】

式 I の化合物のインビトロ活性と動物モデルでのそのインビボ活性とを比較することによって、その有効な投与量を求めることができる。マウスおよびその他の動物における効果的な投与量をヒトに外挿するための方法は当分野において知られている；たとえば米国特許第 4, 938, 949 号を参照すること。治療に用いるのに必要な薬剤の量は、選択される特定の塩によるだけでなく、投与経路、治療を受ける条件の種類、患者の年齢および病状によって変化するだろうし、そして結局のところ、担当の医師すなわち臨床医の裁量に従うことになる。

10

【0213】

一般的に、核医学についての適切な投与量 (たとえば、放射性造影剤の使用時) は、約 0.1 μ g / 患者 ~ 約 1000 μ g / 患者の範囲、約 0.5 ~ 約 500 μ g / 患者の範囲、または 1 μ g / 患者 ~ 約 100 μ g / 患者の範囲となる。

【0214】

造影剤についての適切な投与量 (たとえば、常磁性造影剤の使用時) は、約 0.1 mg / 患者 ~ 約 100 mg / 患者、約 0.5 ~ 約 50 mg / 患者、または 1 mg / 患者 ~ 約 10 mg / 患者の範囲となる。

20

【0215】

治療のために応用することに関して、適切な投与量は一日・体重 1 kg あたり約 0.05 μ g から約 100 mg、約 10 mg から約 75 mg の範囲となり、たとえば一日・受容者の体重 1 kg あたり 3 mg から約 50 mg、好ましくは 6 mg から 90 mg の範囲、最も好ましくは 15 mg から 60 mg の範囲となる。薬物は、都合のよい投与形態の単位で投与される；たとえば、投与形態の単位あたり、有効成分を 5 mg から 1000 mg、好ましくは 10 mg から 750 mg、最も好ましくは 50 mg から 500 mg 含有する。

【0216】

理想的には、血漿濃度のピークが約 0.05 μ M から約 100 μ M、好ましくは約 1 μ M から 50 μ M、最も好ましくは約 2 μ M から約 30 μ M となるように薬物を投与すべきである。たとえば、0.005% から 10% の薬物の溶液の静脈注射によって、必要に応じて生理食塩水溶液か、あるいは約 0.5 mg から 250 mg の薬物を含む丸薬として経口投与することで、これを達成してもよい。連続的に輸液で約 0.01 mg / kg から 5.0 mg / kg / hr を供給するか、または約 0.4 mg / kg から 15 mg / kg の薬剤を含有する輸液を断続的に供給することによって、望ましい血液レベルを維持してもよい。

30

【0217】

単回での投与に都合の良い量で薬剤を与えてもよく、または適切な間隔で投与される分割された投与量として、たとえば一日に二回、三回、四回またはそれ以上のサブドーズとして与えてもよい。

40

【0218】

不活性な希釈剤または食べることができる担体などの医薬適合性のビヒクルと共に、コバラミンコンジュゲートを経口で投与してもよい。これらを硬ゼラチンカプセルまたは軟ゼラチンカプセル内に同封してもよく、圧縮して錠剤としてもよく、または患者の食物に直接組み込んでよい。治療剤を経口投与するために、薬剤を一種以上の賦形剤と組み合わせてもよく、そして摂取可能な錠剤、舌下用の錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ剤、ウエハースなどの剤形で用いる。このような組成物および調製品には、薬剤が少なくとも 0.1% 含まれるべきである。組成物および調製品の割合は、当然のことながら変化させることができ、所定の投与剤形あたり約 2 重量% から約 60 重量%

50

の間が好都合である。このような治療上有用な組成物における薬剤の量は、効果を発揮する投与レベルが得られる量とする。

【0219】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセルなどは、次のものを含んでもよい：トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどのバインダー；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、カタクリ粉、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；およびショ糖、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテームなどの甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーン油またはチェリー香料などの香料を添加してもよい。投与形態の単位がカプセルの場合、上記の型の材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体の担体が含まれていてもよい。その他の種々の材料が被膜として存在してもよく、または固体の投与形態の単位の物理的形狀を変更するようなその他のものとして存在してもよい。たとえば、錠剤、丸薬またはカプセルが、ゼラチン、ワックス、シェラックまたは糖などで覆われていてもよい。シロップまたはエリキシルは、活性成分、甘味料としてのショ糖またはフルクトース、防腐剤としてのメチルパラベンおよびプロピルパラベン、着色料およびチェリー香料またはオレンジ香料などの香料を含んでいてもよい。当然のことながら、任意の投与形態の単位を調製する際に用いられるあらゆる材料は、医薬適合性であり、かつ採用される量で実質的に非毒性であるべきである。さらに、薬剤は徐放性製剤およびデバイス内に組み込まれてもよい。

10

【0220】

極めて急激に溶解する舌下用錠剤を設計する。このような剤形の例としては、酒石酸エルゴタミン、イソソルビドジニトレート、塩酸イソプロテレノールが挙げられる。これらの錠剤の剤形には、薬剤に加えて、限られた数の水溶性賦形剤、通常はラクトースおよび粉末状のショ糖が含まれ、グルコースおよびマンニトールが時折含まれる。舌下用錠剤の作製方法は、混合した粉末成分を、約60%のアルコールおよび40%の水を含むアルコール-水溶媒系で湿らせる工程を含む。

20

【0221】

コバラミンコンジュゲートに加えて、舌下用錠剤の剤形の原型には、ポビドンまたはHPMCなどのバインダー、ラクトース、マンニトール、デンプンまたはセルロースなどの希釈剤、ゼラチンで覆っていないデンプンまたは加工デンプンなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸または水素化植物油などの潤滑剤、サッカリンまたはショ糖などの甘味料、ならびに適切な香料および着色料が含まれてもよい。

30

【0222】

XII. 制御放出製剤

一つの実施形態において、インプラント、丸薬、微粒子、ミクロスフェア、ナノ粒子もしくはナノスフェアなどの、分解性もしくは非分解性ポリマー、ヒドロゲルもしくはガノゲル、またはコバラミンもしくは式Iの化合物/診断薬もしくは治療薬/コバラミン輸送タンパク質の生体内吸収、半減期または生分解性を改変するその他の物理的構築体であり得る製剤であって、放出が緩徐な製剤にて薬剤および担体を投与する。制御放出製剤は、内部または外部のいずれかの悩ましい部位上に塗布するか、またはその他の方法で適用する物質であり得る。一つの実施形態において、本発明によって、腫瘍の外科的切除によって生じたポケット内に、または腫瘍それ自身の内部に直接挿入される、生物分解性の丸薬またはインプラントが提供される。別の例において、乾癬による損傷、湿疹、アトピー性皮膚炎、扁平苔癬、いば、尋常性天疱瘡、光線性角化症、基底細胞ガンまたは扁平上皮ガンに、制御放出製剤を適用することができる。同様に、制御放出製剤を血管に適用して、再狭窄、網膜障害またはアテローム性動脈硬化症の治療や予防を行うことができる。適切に選択された造影剤と共に制御放出製剤を用いて、移植された器官または組織を被覆して拒絶反応を防ぐことができる。あるいは、慢性関節リウマチの部位の近傍に移植するかまたはその他の方法で適用することもできる。

40

【0223】

ポリ乳酸の合成および生物分解性が1966年にクルカーニ(Kulkarni)らによ

50

って、「外科手術用インプラントのためのポリ乳酸」、Arch. Surg., 93, 839にて最初に報告されて以来、生物分解性ポリマーの分野は急速に発展してきた。ポリ無水物およびポリオルトエステルなどのその他のいくつかのポリマーが、生物分解することが現在では知られており、不安定なバックボーン結合を巧みに利用している(ドン(Domb)ら、Macromolecules, 22, 3200, 1989; およびヘラー(Heller)ら、薬物送達システムとしての生物分解性ポリマー、デッカー(Dekker)社、ニューヨーク: 1990を参照すること)。天然型の物質に分解されるいくつかのポリマーも記述されており、たとえば、架橋ゼラチン、ヒアルロン酸(デラバレー(della Valle)ら、米国特許第4, 987, 744号および米国特許第4, 957, 744号)およびポリアミノ酸(ミヤケ(Miyake)ら、1974)、ホーランド(Holland)らによってポリエステルの使用法が促進されたもの、Controlled Release, 4, 155, 1986、および - ヒドロキシ酸(すなわち乳酸およびグリコール酸)、これらは閉鎖用のデバイス(縫合糸および止め金)から薬物送達システムまでの範囲を適用するための生物分解性物質として最も広く使われ続けられている(スミス(Smith)ら、米国特許第4, 741, 337号; スピリゼクスキ(Spilizecki)ら、J. Control. Rel., 2, 197, 1985)。

10

【0224】

適切なモノマー、調製方法と分子量を選択することによって、所望の速度でかつ所望の動態で分解するようにこれらのポリマーを調整することができる。モノマーの結晶性の違いによって、ポリマーの分解速度を変化させることができる。たいていのポリマーは比較的疎水性の性質を示すことから、現実に塊が小さくなることは、水に十分溶解できる程度の小ささのオリゴマーの断片から始まることがある; 従って、最初の分子量でさえ分解速度に影響を与えることができる。

20

【0225】

ヒドロゲルを制御放出製剤に用いることができる。少なくとも一箇所の分解性領域で分離されている非分解性の領域を有する重合可能なマクロマーから、このようなポリマーを形成する。たとえば、水溶性で、非分解性の領域から、マクロマーの中心のコアを形成することができ、そして分解の際に非分解性の領域(特に重合したゲル)が分離するように、その領域は少なくとも二箇所の、コアに接触する分解性領域を有する。具体的に言えば、マクロマーとしては、ハッセルらによる米国特許第5, 626, 863号に開示されているような、急激な重合とゲル化が可能となる適切なエンドキャップを伴うPEG-オリゴグリコリル-アクリラートである。エオシン色素、紫外光または可視光などのいくつかの開始系によって、アクリラートは容易に重合化することができる。ポリエチレングリコール(PEG)は親水性と生体適合性が高い。オリゴグリコール酸は、エステル結合の加水分解によって容易に非毒性の代謝産物であるグリコール酸に分解することができるポリ(a-ヒドロキシ酸)である。その他の鎖の延長には、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物およびポリペプチドが含まれる。この網状構造の全体をゲル化して、生物分解性の網状構造体とすることができる。この網状構造体を、送達のを制御する目的で用いて、水溶性の薬剤を取り込み、そして均一に分散させることができる。さらに、このゲルは水不溶性の薬剤粒子状の浮遊物を取り込むことができる。(コーエン(Cohen)らによる米国特許第4, 591, 496号(高分子の放出制御のためのシステムを作製する方法); バンサベージ(Van Savage)らによる米国特許第5, 545, 442号(放射線加硫を施した薬物放出制御膜の使用法); パーク(Park)らによる米国特許第5, 330, 768号(ポリマー/ブルロニックの混合物を用いる薬物の制御された送達); ロン(Ron)らによる米国特許第5, 122, 367号(安定化させた成長ホルモンを投与するための放出制御用の生体内崩壊性ポリ無水物インプラント); ローランサンらによる米国特許第5, 545, 409号(生理活性因子を制御放出するための送達システム); ローランサンらによる米国特許第5, 629, 009号(生理活性因子を制御放出するための送達システム)も参照すること。

30

40

50

【0226】

あるいは、インビトロおよびインビボの両方で、カプセル化を介して生理活性物質を送達することは、従来技術において十分に記載されている。リム(Lim)らによる「生体物質のカプセル化」という名称の米国特許第4,352,883号では、水溶性の粘性物質を含む水性の媒体中にタンパク質を懸濁させることによって、膜の内部にタンパク質をカプセル化することが開示されており、ここで、この粘性物質は可逆的にゲル化して、懸濁物から小滴を形成させることができる。これらの小滴が多価カチオン溶液の助けを借りてさらにゲル化して、別個に分離した、形状が保たれたままの、水不溶性の一時的なカプセルとなることができる。次いで、この一時的なカプセルはイオンによって架橋された表層によってさらに覆われ、小さな分子は透過できるがより大きな分子は透過できない半透膜をカプセルの周りに形成させることができる。糖タンパク質のマイクロカプセル化についても十分に記載されている。リムらによる「不安定な生体物質のカプセル化」という名称の米国特許第4,324,683号では、二工程の界面重合法によって糖タンパク質をカプセル化し、間隙率が十分に制御されたカプセルを作製する。マイクロカプセルは、微生物による攻撃やあらゆる免疫応答から有効成分を保護する機能を有する。マティオビッツ(Mathowitz)らによる米国特許第5,718,921号(ポリマーと、その中で分散している薬剤とを含有するミクロスフェア)では、温度に対して比較的不安定な薬剤をミクロスフェア内にカプセル化する方法が開示されている。

10

【0227】

生理活性物質を可逆的にカプセルに封入するためのいくつかの方法が開発されてきた。インビトロおよびインビボの両方に適用することができるという一つの研究が、ホイートリー(Wheatley)らによる「生理活性物質の遅延放出およびパルス状放出のためのシステム」という名称の米国特許第4,900,556号に記載されている。開示されたこのシステムにおいて、ある時間の間一定の速度で、または別個のパルスのように生理活性物質を放出することができる。生理活性物質は、半透性のマイクロカプセル内にてまたは透過性のポリマーのマトリクス内にてカプセル化されたリポソーム内に取り込まれる。所望の物質の放出は、リポソームおよびその周りのマトリクス(このマトリクスの完全性はリポソームの完全性に正比例する)の両方の透過性に支配される;組成とリポソームの作製方法を改変して、温度、pHまたは光などの特定の刺激に対して鋭敏なリポソームを生産することによって、リポソームの透過性を設計することができる。たとえば、リポソームまたは周りのマトリクスの一部または全部の中に、リポソームを分解するホスホリパーゼを封入することによって、リポソームを不安定化させることができ、そして一定の時間の後で崩壊させることができる。たとえば、ポリマー(たとえば、アルギン酸カルシウムまたはキチンを用いてイオニックに架橋された多糖)で作られたコアを利用する、ホイートリーらによる米国特許第4,933,185号などのその他のシステムが開発されつつあり、ここで、コアの周囲はイオニックに結合された被膜(たとえばポリ-L-リシンからなるポリカチオン性の被膜)が存在し、その被膜の完全性はコアのポリマーに依存する。不透過性の被膜を用いて、コアのポリマーを酵素(たとえば細菌に由来するアルギナーゼ、キチナーゼまたはヒドロラーゼ)で分解できる場合、コアから突発的に生理活性物質が放出される。あるいは、コアが分解した時点で薬剤が徐々に放出されるように、被膜を部分的に透過性にすることもできる。

20

30

40

【0228】

ナノ粒子は、薬剤を腸管外にまたは静脈内に送達するのに特に有用であるため、この送達デバイスは小さくて循環する半減期が長い。マイクロカプセル、微粒子、リポソームおよびエマルジョンを含む多数の注射可能な薬物送達システムが調査されてきた。これらの送達システムに関する主要な障害は、細網内皮系(RES)のマクロファージによる血流からの物質のクリアランスが急速なことである。たとえば、直径が60nmという小ささのポリスチレン粒子は、血液から2分から3分以内にクリアランスされる。この応用のために、リポソームの薬物送達システムについても広く研究されてきた。というのは、これらは血液の中を自由に循環することが期待できるからであった。リポソームをポリ(エチレ

50

ングリコール) (PEG) で被覆することによって、PEGの疎水性鎖にてそのタンパク質の吸収が抑制され、それによってRESでの取り込みが抑制されるため、担体の半減期が長くなった。グレフ (Gref) らによる米国特許第5,543,158号 (注射可能な生物分解性ナノ粒子) には、改変ポリグリコールを用いる制御放出メカニズムを利用した、静脈内への送達に適する担体を特に標的化した担体系が記載されている。

【0229】

ブレム (Brem) らによる米国特許第5,626,862号、米国特許第5,651,986号および米国特許第5,846,565号 (充実性腫瘍を治療するための化学療法薬の局所への制御された送達) には、化学療法薬を特異的に送達するためにこれらの担体の使用して、バイオアベイラビリティを高めることが開示されている。従って、このデバイスは、幅のある期間にわたって薬剤を放出する一方、それと同時に薬剤の生理活性とバイオアベイラビリティを維持する貯蔵庫として機能する。ジェラルド (Gerhard) らによる米国特許第5,286,763号 (骨内へ薬物を送達するための生体内崩壊性ポリマー) ではさらに、生体内崩壊性ポリマーを用いて、化学療法薬を直接骨の中に送達することができることが開示されている。コーエンらの米国特許第5,562,099号 (造影剤を含有するポリマー性の微粒子) では、造影剤としてのこれらの担体の使用法が検討されている。ポリマー性の微粒子は、画像化を促進するための造影剤が満たされている。

10

【0230】

コバラミンまたは本発明の式Iの化合物 / 造影剤の送達に適する制御された送達方法が記載された書籍としては：ロバート・エス・ランガー (Robert S. Langer)、ドナルド・エル・ワイズ (Donald L. Wise) 編；制御放出の医学への応用 (第一巻および第二巻)；ボカ・ラトン、フロリダ州：シーアールシー・プレス (CRC Press) 社、1984；およびウィリアム・ジェイ・エム・ハーシェキー (William J. M. Hruschsky)、ロバート・ランガーおよびフェリックス・シューウェス (Felix Theeuwes) 編；薬物送達の一時的な制御 (シリーズ)；ニューヨーク：ニューヨーク科学アカデミー、1991が挙げられる。

20

【0231】

本発明を、次の非限定的な実施例によって例証してみる。

実施例

30

【実施例1】

【0232】

シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミドの調製

100 mL の水中の、シアノコバラミン - b - カルボン酸 (1.0 g、0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.81 g、6 mmol) および 1,4 - ジアミノブタン = ジヒドロクロリド (4.8 g、30 mmol) を含有する混合物の pH を 7.8 に調整した。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (1.26 g、6.6 mmol) を添加し、その pH を 6.4 に調整し、そして室温で 24 時間、反応物を攪拌した。n - ブタノール - 酢酸 - 水 (5 : 2 : 3) を用いての、シリカゲル上での TLC から、反応が完結したことが示された。92% のフェノール水溶液中にシアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミドを抽出し、そして同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄した。3 体積のジエチルエーテルと 1 体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加した。水で数回抽出することによって、有機相から所望のコバラミンを取り出した。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで 3 回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約 20 mL に濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化した。収量・収率は 955 mg、92%。

40

【実施例2】

【0233】

メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミドの調製

シアノ誘導体に代えて、上記のようにして、メチルコバラミン - b - カルボン酸 (1.0

50

g、0.6 mmol) をジアミノブタン = ジヒドロクロリドと反応させた。フェノールを介する抽出によってコバラミンを精製し(上記を参照すること)、そして得られた水溶液を減圧して濃縮した。この溶液を酢酸型の AG 1 - X 2 · 200 - 400 メッシュ (20 倍、2.5 cm) 上でのクロマトグラフィーにかけ、そして通過液を回収した。この通過液を約 20 mL に濃縮し、そしてアセトン水溶液から所望のコバラミンを結晶化した。収量・収率は 920 mg、88%。未反応のメチルコバラミン - b - カルボン酸を 1 M の酢酸で溶出させ、濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化した。収量・収率は 60 mg、6%。

【実施例 3】

【0234】

アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミドの調製

上記のようにして、アデノシルコバラミン - b - カルボン酸 (500 mg、0.3 mmol) をジアミノブタン = ジヒドロクロリド (2.4 mg、15 mmol) と反応させた。フェノールを介する抽出によってコバラミンを精製した(上記を参照すること)。得られた水溶液を減圧して濃縮し、そして水素型の AG - 50 · X 2、200 - 400 メッシュ (20 倍、2.5 cm) に添加した。水でカラムを十分に洗浄してヒドロキシベンゾトリアゾールを取り除き、そして 1 M の水酸化アンモニウムで所望のコバラミンを溶出させた。フェノールを介してさらに抽出した後、ガラス状のアデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミドを単離した。収量・収率は 366 mg、77%。

【実施例 4】

【0235】

シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - のシプロフロキサシン - 、レボフロキサシン - 、オフロキサシン - およびスパルフロキサシン - コバラミンコンジュゲートの調製案

100 mL の水中の、シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド (0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (6 mmol) および抗生物質 (たとえばシプロフロキサシン、レボフロキサシンまたはオフロキサシン) (30 mmol) を含有する混合物の pH を 7.8 に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (6.6 mmol) を添加し、その pH を 6.4 に調整し、そして室温で 24 時間、反応物を攪拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水 (5 : 2 : 3) を用いての、シリカゲル上での TLC から、反応が完結したことが示される。92% のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3 体積のジエチルエーテルと 1 体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。水で数回抽出することによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで 3 回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約 20 mL に濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。

【実施例 5】

【0236】

メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - のシプロフロキサシン - 、レボフロキサシン - 、オフロキサシン - およびスパルフロキサシン - コバラミンコンジュゲートの調製案

100 mL の水中の、メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド (0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (6 mmol) および抗生物質 (たとえば、シプロフロキサシン、レボフロキサシンまたはオフロキサシン) (30 mmol) を含有する混合物の pH を 7.8 に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (6.6 mmol) を添加し、その pH を 6.4 に調整し、そして室温で 24 時間、反応物を攪拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水 (5 : 2 : 3) を用いての、シリカゲル上での TLC から、反応が完結したことが示される。92% のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3 体積のジエチルエーテルと 1 体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。水で数回抽出する

10

20

30

40

50

ことによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで3回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約20 mLに濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。

【実施例6】

【0237】

アデノシルコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - のシプロフロキサシン - 、レボフロキサシン - 、オフロキサシン - およびスパルフロキサシン - コパラミンコンジュゲートの調製案

100 mLの水中の、アデノシルコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド(0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(6 mmol)および抗生物質(たとえばシプロフロキサシン、レボフロキサシンまたはオフロキサシン)(30 mmol)を含有する混合物のpHを7.8に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(6.6 mmol)を添加し、そのpHを6.4に調整し、そして室温で24時間、反応物を撹拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水(5 : 2 : 3)を用いての、シリカゲル上でのTLCから、反応が完結したことが示される。92%のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3体積のジエチルエーテルと1体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。水で数回抽出することによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで3回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約20 mLに濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。

10

20

【実施例7】

【0238】

シアノコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - のリジノプリル - 、フォシノプリルナトリウム - 、エナラプリラート - およびカプトプリル - コパラミンコンジュゲートの調製案

100 mLの水中の、シアノコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド(0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(6 mmol)および心臓血管系用薬(たとえばリジノプリル、フォシノプリルナトリウム、エナラプリラートまたはカプトプリル)(30 mmol)を含有する混合物のpHを7.8に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(6.6 mmol)を添加し、そのpHを6.4に調整し、そして室温で24時間、反応物を撹拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水(5 : 2 : 3)を用いての、シリカゲル上でのTLCから、反応が完結したことが示される。92%のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3体積のジエチルエーテルと1体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。

30

【0239】

水で数回抽出することによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで3回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約20 mLに濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。

【実施例8】

【0240】

メチルコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - のリジノプリル - 、フォシノプリルナトリウム - 、エナラプリラート - およびカプトプリル - コパラミンコンジュゲートの調製案

100 mLの水中の、メチルコパラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド(0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(6 mmol)および心臓血管系用薬(たとえばリジノプリル、フォシノプリルナトリウム、エナラプリラートまたはカプトプリル)(30 mmol)を含有する混合物のpHを7.8に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(6.6 mmol)を添加し、そのpHを6.4に調整し、そして室温で24時間、反応物を撹拌する。n - ブタノール - 酢酸 -

40

50

水(5:2:3)を用いての、シリカゲル上でのTLCから、反応が完結したことが示される。92%のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3体積のジエチルエーテルと1体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。水で数回抽出することによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで3回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約20 mLに濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。

【実施例9】

【0241】

アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - のリジノプリル - 、フォシノプリルナトリウム - 、エナラプリラート - およびカプトプリル - コバラミンコンジュゲートの調製案 10

100 mLの水中の、アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド(0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(6 mmol)および心臓血管系用薬(たとえばリジノプリル、フォシノプリルナトリウム、エナラプリラートまたはカプトプリル)(30 mmol)を含有する混合物のpHを7.8に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(6.6 mmol)を添加し、そのpHを6.4に調整し、そして室温で24時間、反応物を攪拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水(5:2:3)を用いての、シリカゲル上でのTLCから、反応が完結したことが示される。92%のフェノール水溶液中に産物を抽出し、同じ体積の水でフェノール層を数回洗浄する。3体積のジエチルエーテルと1体積のアセトンとを、フェノール抽出物に添加する。水で数回抽出することによって、有機相から所望の産物を取り出す。一つにまとめた水層をジエチルエーテルで3回抽出して残りのフェノールを取り除き、減圧して約20 mLに濃縮し、そしてアセトン水溶液から結晶化する。 20

【実施例10】

【0242】

シアノコバラミン - b - (ポリ - L - リシン)アミドの調製
一方は約8残基を含み、もう一方は約11残基を含む二種のポリ - L - リシン = ヒドロプロミド調製品を、シアノコバラミン - 1 - カルボン酸と別個に反応させた。20 mLの水に溶解したそれぞれのポリマー(500 mg)に、150 mg(0.1 mmol)のシアノコバラミン - 1 - カルボン酸、338 mg(2.5 mmol)のヒドロキシベンゾトリアゾールおよび480 mg(2.5 mmol)の1 - エチル - 3(3 - ジメチル - アミノプロピル)カルボジイミドを添加した。1 NのNaOHでpHを9に調整し、そして反応混合物を室温で2時間から3時間攪拌した。これらをG - 10セファデックス上で精製した：サイジングカラム(3 x 40 cm)を水で溶出し、そして1.5 mLの画分を回収した。コバラミンの存在(550 mmでのOD)およびポリリシンの存在(ニンヒドリン陽性)を示すこの画分を集めて凍結乾燥した。 30

【実施例11】

【0243】

シアノコバラミン - b - (ポリリシン)アミド - のシプロフロキサシン - 、レボフロキサシン - 、オフロキサシン - およびスパルフロキサシン - 複合体の調製案 40
100 mLの水中の、シアノコバラミン - b - (ポリリシン)アミド(0.6 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(0.81 g、6 mmol)および抗生物質(たとえばシプロフロキサシン、レボフロキサシン、オフロキサシンまたはスパルフロキサシン)(30 mmol)を含有する混合物のpHを7.8に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(1.26 g、6.6 mmol)を添加し、そのpHを6.4に調整し、そして室温で24時間、反応物を攪拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水(5:2:3)を用いての、シリカゲル上でのTLCから、反応が完結したことが示される。この産物をG - 10セファデックス上で精製する：サイジングカラム(3 x 40 cm)を水で溶出し、そして1 mLから5 mLの画分を回収する。コバラミンの存在(550 mmでのOD)およびポリリシンの存在(ニンヒドリン陽性)を示すこ 50

の画分を集めて凍結乾燥する。

【実施例 12】

【0244】

シアノコバラミン - b - (ポリリシン)アミド - のリジノプリル - 、フォシノプリルナトリウム - 、エナラプリラート - およびカプトプリル - 複合体の調製案

100 mL の水中の、シアノコバラミン - b - (ポリリシン)アミド、ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.81 g、6 mmol) および心臓血管系用薬 (たとえばリジノプリル、フォシノプリルナトリウム、エナラプリラートまたはカプトプリル) (30 mmol) を含有する混合物の pH を 7.8 に調整する。次いで、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1.26 g、6.6 mmol) を添加し、その pH を 6.4 に調整し、そして室温で 24 時間、反応物を攪拌する。n - ブタノール - 酢酸 - 水 (5 : 2 : 3) を用いての、シリカゲル上での TLC から、反応が完結したことが示される。この反応混合物を G - 10 セファデックス上で精製する：サイジングカラム (3 × 40 cm) を水で溶出し、そして 1.5 mL の画分を回収する。コバラミンの存在 (550 mm での OD) およびポリリシンの存在 (ニンヒドリン陽性) を示すこの画分を集めて凍結乾燥する。

【実施例 13】

【0245】

シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド・DTPA .

シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド (500 mg)、0.3 mmol) を、30 mL の飽和炭酸水素ナトリウム溶液に溶解させ、そして固体の DTPA 二無水物 (1.2 g、3.4 mmol) で処理した。溶媒として n - ブタノール - 酢酸 - 水 (5 : 2 : 3) を用いる PEI プレート上での TLC によって、反応の進行状況を観測した。室温で 30 分間インキュベートした後、二回目の 1.2 g の二無水物を添加した。二無水物の二回の追加的な添加の後、pH を 8.2 に調整した反応混合物を一晩インキュベートした。次いで、シアノコバラミン - DTPA 付加物を 92% のフェノール水溶液中に抽出し、上記のようにして精製した。調製品を減圧下蒸発乾固させ、そしてガラス状のものを単離した。収量・収率は 460 mg、77%。pH 7.1 の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液による濾紙電気泳動上では、このシアノコバラミン - DTPA 付加物はポリアニオンとして挙動する。

【実施例 14】

【0246】

メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド・DTPA .

メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド (500 mg、0.3 mmol) を、30 mL の飽和炭酸水素ナトリウム溶液に溶解させ、そして固体の DTPA 二無水物で上記のように処理した。メチルコバラミン - DTPA 付加物をフェノールを介して抽出することにより精製し、減圧下蒸発乾固させ、そしてガラス状のものを単離した。収量・収率は 600 mg、96%。

【実施例 15】

【0247】

アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド・DTPA .

アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド (366 mg、0.23 mmol) を、30 mL の飽和炭酸水素ナトリウム溶液に溶解させ、そして固体の DTPA 二無水物 (1.0 g、2.8 mmol) で上記のように処理した。フェノールを介する抽出によってコバラミンを精製した (上記を参照すること)。得られた水溶液を濃縮し、そして水素型の AG - 50 · X2、200 - 400 メッシュ (6.0 × 2.5 cm) に添加し、水でカラムを洗浄し、そして 0.1 M の水酸化アンモニウムで所望のコバラミンを溶出させた。この溶液を蒸発乾固させ、そしてガラス状のアデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド・DTPA を単離した。収量・収率は 400 mg、80%。

【実施例 16】

10

20

30

40

50

【0248】

放射性核種のキレート化

かすかな明かりの下で、1000 μg のメチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A、アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A、およびシアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A を、200 μL の生理食塩水に別個に溶解させた。次に、500 μCi のインジウム 111 または 250 μCi のガドリニウム 153 を、コバラミン - D T P A 溶液に添加した。室温・大気下で反応を行った。テクネチウムをキレート化するために、溶解させたコバラミン・D T P A 複合体を、密封した 2 mL のバイアル内に別個に注入した。次に、200 μL の塩化第一スズ溶液 (生理食塩水 1 mL あたり 1000 μg) をそれぞれのバイアルに添加した。これらのバイアルを窒素ガスで 5 分間パージした。次に、1 ~ 5 μCi のテクネチウム 99m を、 N_2 でパージしたバイアルに添加した。それぞれのバイアルをさらに 5 分間窒素でパージした。すべてのキレート化反応物を 5 分間緩やかに攪拌した。

10

【0249】

コントロールの混合物である 1000 μg のシアノコバラミンを、200 μL の生理食塩水に溶解させた。シアノコバラミンを Tc - 99m と室温・大気下で混合するのと同じく、記載されている 200 μL の塩化第一スズ溶液を含む、窒素でパージしたバイアルの中でも混合した。さらに、塩化第一スズがない状態で、大気下の蓋がないバイアル中にて Tc - 99m によるこのコバラミン - D T P A 複合体の標識化を行った。

【実施例 17】

20

【0250】

ダウノルピシン - コバラミンコンジュゲートおよびドキシソルピシン - コバラミンコンジュゲートの合成。

【0251】

pH = 10 の 100 mL の (KCl を含有する) ホウ酸塩緩衝液中の塩酸ダウノルピシン (0.5 g) を、L - ロイシン - カルボン酸無水物 (5 mL のアセトン中に 1 mmol) と窒素下 0 $^{\circ}\text{C}$ にて反応させることによって、L - ロイシンによるダウノルピシン (1) の炭水化物部分 (ダウノサミン) の修飾を完成することができる。0 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間反応させた後、 H_2SO_4 にて混合物を pH 3.5 の酸性にしてもよく、15 分間攪拌し、そして pH = 7 に調整して所望の L - ロイシルダウノルピシン (2) を得る。水溶性のカルボジイミドおよびヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下で、(2) をコバラミン - モノカルボン酸またはコバラミン - ジカルボン酸と反応させると、ダウノルピシン - コバラミンコンジュゲート (3) が得られる。通常のフェノール抽出、水によるフェノール相の十分な洗浄、そして最後にアセトンおよびジエチルエーテルの添加によるフェノール相から水へのコバラミン - コンジュゲートの置換を経由して、これらのコンジュゲートを単離することができる。

30

【0252】

ドキシソルピシンの修飾も同様にすべきである (ドイツ国特許第 1,813,518 号、1969 年 7 月 10 日; Chem Abstracts, 71, 91866 (1969))。ディー・デプレツ - デカンパニーレ、エム・モスケラー、アール・ブーラインおよびエイ・トロセクト (D. Deprez - Decampagneere, M. Mosquelier, R. Bourain and A. Trosect), Curr. Chemother. Proc., Int. Congr. Chemother., 10th, p. 1242 (1978) は、D 異性体ではなく N - (L - ロイシル) ダウノルピシンがインピボで加水分解してダウノルピシンが再び生じることを見出した。「ドキシソルピシン、抗ガン抗生物質 (Doxorubicin, Anticancer Antibiotics)」、フェデリコ・アルカモネ (Federico Arcamone), Medicinal Chemistry, 第 17 巻, アカデミック・プレス (Academic Press) 社、1981 を参照すること。

40

【実施例 18】

50

【0253】

ペプチド核酸 (PNA) の合成 - 核局在化ペプチド (TAT) キメラ
 N^al^ph^a - Fmoc - L - アミノ酸 (カルビオケム・ノバビオケム (Calbiochem - Novabiochem) 社、サンディエゴ、カリフォルニア州) を用いる rink (4 - 2', 4' - ジメトジフェニル - Fmoc - アミノメチル - フェノキシ) コポリスチレン樹脂 (0.1 mmol) 上での固相法によって、核局在化シグナルペプチドの TAT (Tyr - Gly - Arg - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg - Arg) をペプチドアミンとして合成する。それぞれの Fmoc - L - アミノ酸の 10 当量 (1.0 mmol) を PyBop / Hobt / 4 - メチルモルホリンで活性化させた。そして、30 分かけて、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (NMP) 中の 20% ピペリジンによってそれぞれの N^al^ph^a - Fmoc 保護基の脱保護を行い、それに続けて、2 時間かけて NMP を樹脂結合ペプチド鎖に結合させた。

10

【0254】

抗ウイルス性ペプチド核酸 (PNA) を、樹脂に結合した TAT ペプチドの遊離アミノ基に連続して付加する。ここで、PNA 分子の 3' - 末端の最初の塩基から開始する。PNA の合成には、製造メーカー (プレスペクティブ・バイオシステムズ (Perseptive Biosystems) 社、フォスターシティ、カリフォルニア州) によって作成されたサイクルのプロトコールに従って、Expidite 8909 核酸合成装置にて、Fmoc - N - (2 - アミノエチル) グリシル PNA モノマーを用いる。それぞれの Fmoc - PNA モノマーの塩基であるアデニン、グアニン、およびシトシンの環外のアミンは、保護基のベンズヒドリルオキシカルボニルで保護されている)。

20

【0255】

ジメチルホルムアミド (DMF) 中の 20% ピペリジンで 15 分間処理することによって、それぞれの PNA モノマーの Fmoc 基を除去し、次いで HATU (4.5 当量)、2, 6 - ルチジン (7.5 当量) およびジイソプロピルエチルアミン (5 当量) を用いて 30 分間かけて、次の PNA モノマー (5 当量) の活性化およびカップリングを行う。ビタミン B₁₂ 分子との結合前のスペーサー群として、AEEA すなわち [2 (2 - アミノエトキシ) エトキシ] 酢酸モノマーの付加物を合成 PNA の 5' - 末端に付加する。

【実施例 19】

【0256】

PNA - TAT キメラへのビタミン B₁₂ (Bカルボン酸塩型) の合成
 DMF 中の PyBop / Hobt / 4 - メチルモルホリンを用いてビタミン B₁₂ のカルボン酸を活性化し、続けて DMF 中で 2 時間かけて混合物をカップリングさせることによって、AEEA - PNA - TAT キメラのアミノ基末端に、ビタミン B₁₂ (遊離カルボン酸塩型) を付加する。

30

【0257】

ビタミン B₁₂ のカップリングの後、ビタミン B₁₂ - PNA - TAT キメラを脱保護し、そして 90% の TFA / 5.0% の水 / 2.5% のエタンジチオール / 2.5% のチオアニソールからなる混合物で室温にて 90 分間処理することによって、rink - 樹脂の支持体から取り外す。この脱保護された粗産物を洗浄し、そして 3 x 50 体積の冷メチル = t - ブチルエーテル中で沈殿させることによって分離し、そして 0.1% の TFA / 水にて、60 分間の 0.1% の TFA 中の 10% から 89% の勾配のアセトニトリルを用いる Vydac C18 カラム (2.1) x 25 cm) 上での逆相 HPL によって精製する。PESCIEX API 165 Biospectrometer (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社) のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析装置によって、このビタミン B₁₂ - PNA - TAT 産物の組成を分析する。

40

【実施例 20】

【0258】

コバラミン輸送タンパク質との相互作用

50

かすかな明かりの下で、1000 μg の非標識化メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA、非標識化アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA、および非標識化シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA、ならびに1000 μg のシアノコバラミンとDTPA (シグマ (Sigma) 社、セントルイス、ミズーリ州63178) を、10 mL の生理食塩水に室温で別個に溶解させた。五種の1000 μg / 10 mL のサンプルのそれぞれを、アルミニウムで覆って密封した10 mL のバイアル内に保存して、光にさらされるのを防いだ。これらの溶液には緩衝剤を添加しなかった。これらの溶液のpHを、Beckman 40 pHメーター (ベックマン・インスツルメンツ (Beckman Instruments) 社、フラートン、カリフォルニア州) によって測定した：シアノコバラミン = 5.75、DTPA = 3.78；シアノコバラミン - DTPA類似体、メチルコバラミン - DTPA類似体およびアデノシルコバラミン - DTPA類似体はそれぞれ5.75、6.10、および6.19。

10

【0259】

インビトロでの内性因子 (IF) およびトランスコバラミン (TC) への結合を評価するために、メイヨークリニック (Mayo Clinic) において悪性貧血であると評価された五人の患者から、ランダムに得られた血清を用いて、内性因子遮断抗体 (IFBA) および不飽和ビタミンB₁₂ 結合能力 (UBBC) の評価を実施した。ブイ・エフ・フェアバンクス (V. F. Fairbanks) ら、Mayo Clin. Proc., 58, 203 (1983)；内性因子遮断抗体 (⁵⁷Co) ラジオアッセイ - パッケージインサート、ダイアグノスティック・プロダクツ (Diagnostic Products) 社；ディー・グロスビッツ (D. Grossowicz) ら、Proc. Exp. Biol., 109, 604 (1962) およびシー・ゴットリーブ (C. Gottlieb) ら、Blood, 25, 6 (1965) によって既に記述されているように、臨床上の目的のために、最初にIFBAアッセイおよびUBBCアッセイを実施した。

20

【0260】

次に、同じ五人の患者からの血清について、修正IFBAアッセイおよび修正UBBCアッセイを行った。具体的に言えば、既述の五種の溶液の1 μL を精製IFまたは血清と別個にインキュベートして、すべてのIF結合部位およびTC結合部位を潜在的に飽和状態にさせた。室温で20分間、そして4 μL でさらに20分間インキュベートした後、コバルト57 - シアノコバラミン (マリנקロット・メディカル (Mallinckrodt Medical) 社、セントルイス、ミズーリ州63134) 溶液のストック (1000 μg / L) を500 μL 添加し、次いで、通常のIFBAのプロトコールおよびUBBCのプロトコールに従った。ガンマ線測定装置 (Micromedix 10/20、ハンツビル、アラバマ州35805) にて、すべての上清について四分間の活性を計算した。

30

【0261】

IFBAアッセイから、DTPAはIFには有意に結合しない (ネガティブコントロールよりも低い値である) のに対して、シアノコバラミンおよびコバラミン - DTPA類似体は種々の程度で結合し、Co-57シアノコバラミンが内性因子と結合することを競合的に阻害することが実証された。五種の溶液のカウントを分類するこのクリニックのカウントを利用することによって、内性因子に結合する効果を推定することができる。五種の溶液がIFに結合するパーセントの平均は：シアノコバラミン = 92.5%；メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA = 63.2%；シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA = 52.9%；アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル)アミド - DTPA = 41.0% およびDTPAについては0.8%であった。ビタミンB₁₂ の (b) - モノカルボン酸およびその放射性ヨウ化誘導体はIFにほとんど結合しないというハウツ (米国特許第4, 465, 775号) における開示とは、このことは対照的である。

40

【0262】

同様に、五種の溶液がトランスコバラミンタンパク質に結合するパーセントの平均は：シ

50

アノコバラミン = 100%、メチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A = 94.0%、アデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A = 90.4%、シアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A = 66.4% および D T P A については 3.6% であった。

【0263】

このように、D T P A のビタミン B₁₂ への結合が、その担体タンパク質への結合性を变化させる。予想どおり、非標識化シアノコバラミンは、I F およびトランスコバラミンタンパク質について最も強いアフィニティを有していた。次にメチルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A であり、その次がアデノシルコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A であり、そして最後にシアノコバラミン - b - (4 - アミノブチル) アミド - D T P A であった。D T P A の担体タンパク質への若干の非特異的な結合も存在した (0.8% および 3.6%)。

10

【実施例 21】

【0264】

同時投与の処方プログラム

以下で用いられる「有効成分」という用語は、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したビタミン B₁₂ またはそれが結合した式 I の化合物であって、所望の結果を達成する任意の比率にて投与されるものである。一つの実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のビタミン B₁₂ または一分子の式 I の化合物である。本発明の代替可能な実施形態において、この比率は、少なくとも一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、一分子のビタミン B₁₂ または一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のコバラミン輸送タンパク質、たとえば 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍またはそれを超える過剰量のコバラミン輸送タンパク質である。本発明の別の実施形態において、この比率は、一分子のコバラミン輸送タンパク質に対して、少なくとも一分子のビタミン B₁₂ または少なくとも一分子の式 I の化合物であり、好ましくは、過剰量のビタミン B₁₂ または過剰量の式 I の化合物、たとえば 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍またはそれを超える過剰量のビタミン B₁₂ または式 I の化合物である。

20

【0265】

医薬適合性の担体で製剤化する前に、輸送タンパク質を、診断用、治療用もしくはその他の物質が結合したビタミン B₁₂ またはそれが結合した式 I の化合物と物理的に混合することによって、これらの混合物を調製する。あるいは、担体と一緒に、これらを別個に単純に混合することによって、混合物を調製する。有効成分には、内性因子と (共有的に、イオニックに、配位的にもしくはファンデルワールス力を介して) 結合したコバラミンもしくはそれと結合した式 I の化合物の複合体、または内性因子とは結合していない (すなわち混合状態の) コバラミンもしくは式 I の化合物の複合体が含まれる。

30

【0266】

以下の非限定的な例示を介して、医薬製剤としての有効成分を調製する：

カプセル剤 (硬カプセル剤)

従来型のカプセル充填装置を用いて、標準的な、二つで一組の硬ゼラチンカプセルに次の混合物を充填することによって、硬カプセル剤を調製することができる：

40

有効成分：1 mg

ラクトース：125 mg

タルク：12 mg

ステアリン酸マグネシウム：3 mg

カプセル剤 (軟カプセル剤)

ダイズ油中の有効成分の混合物を調製し、容積式ポンプを用いてゼラチン内に注入することができる。その結果、5 mg の有効成分を含有する軟ゼラチンカプセル剤が形成される。このカプセル剤を石油エーテルで洗浄して乾燥することができる。

【0267】

50

錠剤

それぞれのユニットが含まれるような従来のやり方によって、錠剤を調製することができる：

有効成分：1 mg

噴霧乾燥したラクトース：150 mg

微結晶性セルロース：35 mg

ステアリン酸マグネシウム：3 mg

注射剤

それぞれ mL あたり次の重量%を含むような、筋肉内投与に適する注射剤用組成物を調製することができる：

10

有効成分：1 mg

カルボキシメチルセルロースのナトリウム塩：0.75%

ポリソルベート80：0.04%

ベンジルアルコール：0.9%

塩化ナトリウム：0.9%

十分な量の注射用蒸留水：1 mL

懸濁剤

それぞれ 5 mL あたり次の重量%を含むような、経口投与のための水性懸濁剤を調製することができる：

20

有効成分：5 mg

メチルセルロース：5%

カルボキシメチルセルロース：5%

シロップ：30%

ポリソルベート80：0.2%

サッカリンナトリウム：2 mg

チェリー香料：0.1%

安息香酸ナトリウム：5 mg

十分な量の水：5 mL

種々の特定のおよび好ましい実施形態および技術を参照しつつ、本発明を記述してきた。しかしながら、多数の変形物および修飾物は本発明の精神および範囲の中に含まれると同時に、それらを作製できることを理解すべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【0268】

【図1】式Iの化合物の一例である。

【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
3 April 2003 (03.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/026674 A1

- (51) International Patent Classification: **A61K 31/70**,
C07H 23/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/31038
- (22) International Filing Date:
30 September 2002 (30.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/326,183 28 September 2001 (28.09.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH** [US/US]; 200 First Street S.W., Rochester, MN 55905 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): **COLLINS, Douglas, A.** [US/US]; 1150 Meadowlark Court S.W., Rochester, MN 55902 (US).
- (74) Agent: **KNOWLES, Sherry, M.**; King & Spalding, 191 Peachtree Street, Atlanta, GA 30303-1763 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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.*



WO 03/026674 A1

(54) Title: COADMINISTRATION OF TRANSPORT PROTEIN WITH CONJUGATED COBALAMIN TO DELIVER AGENTS

(57) Abstract: Cobalamin transport proteins are administered in combination with cobalamin coupled to a diagnostic or pharmaceutically active agents to increase the extent of absorption of the diagnostic or pharmaceutically active agent. Cobalamin transport proteins include, but are not limited to intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II and transcobalamin III. The combination of the cobalamin or cobalamin derivative with the cobalamin transport protein provides enhanced cellular uptake.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

**COADMINISTRATION OF TRANSPORT PROTEIN WITH
CONJUGATED COBALAMIN TO DELIVER AGENTS**

FIELD OF THE INVENTION

5 This invention is the coadministration of cobalamin or a derivative thereof linked to a diagnostic or therapeutic agent with a transport protein to increase the amount of agent delivered to the host cell. This application claims priority to U.S.S.N. 60/326,183 filed on September 28, 2001.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Vitamin B₁₂ is critical to normal physiological functioning. Vitamin B₁₂ is water soluble, has no known toxicity and in excess is excreted by glomerular filtration. B₁₂ participates in at least two essential intracellular metabolic pathways. For several years after the isolation of vitamin B₁₂ as cyanocobalamin in 1948, it was assumed that cyanocobalamin and possibly hydroxocobalamin, its photolytic breakdown product, occurred in man. Since then it has been recognized that cyanocobalamin is an artifact of the
15 isolation of vitamin B₁₂ and that hydroxycobalamin and the two coenzyme forms, methylcobalamin and adenosylcobalamin, are the naturally occurring materials in the body. The derivative methylcobalamin serves as the cofactor for methionine synthetase, which catalyzes the methylation of homocysteine in which N⁵-methyl-tetrahydrofolate provides the methyl groups and tetrahydrofolate becomes available for recycling in the various folate
20 pathways. Deoxyadenosylcobalamin functions with methylmalonyl CoA mutase in a metabolic pathway in the rearrangement of methylmalonyl-CoA to succinylCoA. B₁₂ cannot be synthesized by higher organisms.

The physiological utilization of B₁₂ or a biological metabolite requires the interface of a number of intricately woven mechanisms requiring binding proteins and membrane
25 receptors for absorption, transport and cellular uptake. The most important of these proteins include: intrinsic factor (IF), a protein secreted by gastric parietal cells that binds dietary B₁₂ and transports further along to the ileum for absorption; an IF-B₁₂ receptor on the brush borders of the epithelial mucosa in the mid- to terminal ileum that binds and internalizes IF-

WO 03/026674

PCT/US02/31038

B₁₂; transcobalamin II (TCII), a plasma protein that transports B₁₂ from the site of intestinal absorption and from its primary storage site, the liver, to bodily tissues, and specific receptors on the plasma membrane of tissue cells than bind and internalize the TCII-B₁₂ complex.

5 Vitamin B₁₂ (adenosyl-, cyano-, hydroxo-, or methylcobalamin) must be bound by the transport protein Transcobalamin I, II, or III ("TC") to be biologically active, and by IF if administered orally. Gastrointestinal absorption of vitamin B₁₂ occurs when the IF-B₁₂ complex is bound to the IF-B₁₂ receptor in the terminal ileum. Likewise, intravascular
10 transport and subsequent cellular uptake of vitamin B₁₂ throughout the body typically occurs through the cobalamin transport protein (I, I or III) and the cell membrane cobalamin receptors, respectively. After the cobalamin transport protein-vitamin B₁₂ complex has been internalized in the cell, the transport protein undergoes lysozymal degradation, which releases vitamin B₁₂ into the cytoplasm. All forms of vitamin B₁₂ can then be
15 interconverted into adenosyl-, hydroxo- or methylcobalamin depending upon cellular demand. See, for example, A.E. Finkler *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 79 (1967); C. Hall *et al.*, *J. Cell Physiol.*, **133**, 187 (1987); M.E. Rappazzo *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **51**, 1915 (1972) and R. Soda *et al.*, *Blood*, **65**, 795 (1985).

Both IF and TC-II deficiencies lead to abnormalities such as megaloblastic anemia and demyelinating disorders of the nervous system. In plasma, TC-I turns over very slowly
20 ($t_{1/2}$ = 10 days) and appears to serve as the major storage protein for cobalamin. Allen (1975) has suggested that TC-I may participate in the storage of excess cobalamin and bind degraded cobalamin for removal. TC-I may also stabilize serum cobalamin against transdermal photolysis.

Once IF-B₁₂ is attached to the apical brush border membrane, there is a 3-4-hour
25 delay before B₁₂ exits the enterocyte bound to TC. IF-B₁₂ is internalized via receptor-mediated endocytosis (Seetharam *et al.*, 1985). The process of transecytosis is typically in the 24-48 hours range.

The receptor for IF-B₁₂ has been purified and has been designated *cubilin*. Cubilin
30 has no apparent homology to other known receptors. The binding of IF-B₁₂ to cubilin is a high-affinity interaction, with a single binding site (K_d = 1-5 nM at 20° C) dependent on calcium.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

The primary function of TC-II is to deliver B₁₂ to the tissues following intestinal absorption of the vitamin. The liver, the major storage site for B₁₂, is a source from which B₁₂ can be transferred to TC-II under conditions of dietary deficiency (e.g., a strict vegetarian diet) or when an individual is unable to absorb the vitamin from the diet (e.g., pernicious anemia, surgical removal of the stomach or distal small intestine, malabsorption).
5 Clearance of TC-II bound to B₁₂ from the plasma is rapid.

TC-II bound to B₁₂ in plasma is carried to cells expressing the TC-II receptor on the plasma membrane, which binds and internalizes the complex by endocytosis. The TC-II/B₁₂/receptor complex is processed in the endosome with dissociation of the receptor and TC-II bound to B₁₂. Following lysosomal fusion, B₁₂ dissociates from TC-II. The free B₁₂ enters the cytoplasmic and mitochondrial compartments, where the cofactors Me-cobalamin and Ado-cobalamin, respectively, are synthesized.
10

In plasma and nonintestinal tissue fluids, B₁₂ is bound to a TC. TC-B₁₂ is the essential carrier for the transport of B₁₂ to tissues.
15

Vitamin B₁₂ derivatives have been proposed as a means to deliver various pharmacotherapeutic agents. Such agents include antibiotics, anti-tumor agents, radiolabels, cardiovascular agents, nutraceuticals and agents useful for the treatment of cellular proliferative disorders.

Processes for preparing derivatives of B₁₂ are known in the art. For example, a process for preparing ¹²⁵I-vitamin B₁₂ derivatives is described in Niswender *et al.* (U.S. Patent No. 3,981,863). In this process, vitamin B₁₂ is first subjected to mild hydrolysis to form a mixture of monocarboxylic acids, which Houts, *infra*, disclosed to contain mostly the (ε)-isomer. The mixture is then reacted with a p-(aminoalkyl)phenol to introduce a phenol group into the B₁₂ acids (via reaction with one of the free carboxylic acid groups). The mixed substituent B₁₂ derivatives are then iodinated in the phenol-group substituent. This U.S. patent teaches that the mixed ¹²⁵I-B₁₂ derivatives so made are useful in the radioimmunoassay of B₁₂, using antibodies raised against the mixture.
20
25

T. M. Houts (U.S. Patent No. 4,465,775) reported that the components of the radiolabelled mixture of Niswender *et al.* did not bind with equal affinity to IF. Houts disclosed that radioiodinated derivatives of the pure monocarboxylic (d)-isomer are useful in assays of B₁₂ in which IF is used.
30

WO 03/026674

PCT/US02/31038

U.S. Patent Nos. 5,739,313; 6,004,533; 6,096,290 and PCT Publication WO 97/18231 listing Collins and Hogenkamp as inventors disclose radionuclide labeling of vitamin B₁₂ through the propionamide moieties on naturally occurring vitamin B₁₂. The inventors converted the propionamide moieties at the *b*-, *d*-, and *e*- positions of the corrole ring to monocarboxylic acids, through a mild hydrolysis, and separated the carboxylic acids by column chromatography. The inventors then attached a bifunctional linking moiety to the carboxylate function through an amide linkage, and a chelating agent to the linking moiety again through an amide linkage. The chelating moiety was then used to attach a radionuclide to the vitamin that can be used for therapeutic or diagnostic purposes.

Collins, et al. in WO 01/28595 (PCT/US00/10098) disclose a series of novel cobalamin conjugates that are linked via a protein linker to a detectable group, which are useful in the imaging of tumors.

Collins, et al. in WO 01/28592 (PCT/US00/10097) disclose a series of novel cobalamin conjugates that are linked directly or by a linker to a residue of a chemotherapeutic agents, which are useful in the treatment of abnormal cellular proliferation.

Collins, et al. in WO 00/62808 (PCT/US00/10100) disclose a series of novel cobalamin conjugates that are linked directly or by a linker to a residue of a molecule comprising B-10 or Gd-157, which are useful in the treatment of abnormal cellular proliferation.

PCT Publication WO 98/08859 listing Grissom *et al* as inventors discloses conjugates containing a bioactive agent and an organocobalt complex in which the bioactive agent is covalently bound directly or indirectly, via a spacer, to the cobalt atom. The organocobalt complex can be cobalamin and the bioactive agent can be a chemotherapeutic agent. However, only one bioactive agent (*i.e.*, chemotherapeutic agent) is attached to the organocobalt complex (*i.e.*, cobalamin) and the attachment is solely through the cobalt atom (*i.e.*, the 6-position of cobalamin). The bioactive agent is released from the bioconjugate by the cleavage of the weak covalent bond between the bioactive agent and the cobalt atom as a result of normal displacement by cellular nucleophiles or enzymatic action, or by application of an external signal (e.g., light, photoexcitation, ultrasound, or the presence of a magnetic field).

WO 03/026674

PCT/US02/31038

U.S. Patent No. 5,428,023 to Russell-Jones *et al.* discloses a vitamin B₁₂ conjugate for delivering oral hormone formulations. Russell-Jones teaches that the vitamin B₁₂ conjugate must be capable of binding *in vivo* to intrinsic factor, enabling uptake and transport of the complex from the intestinal lumen of a vertebrate host to the systemic circulation of the host. The hormones are attached to the vitamin B₁₂ through a hydrolyzed propionamide linkage on the vitamin. The patent states that the method is useful for orally administering hormones, bioactive peptides, therapeutic agents, antigens, and haptens, and lists as therapeutic agents neomycin, salbutamol chloride, pyrimethamine, penicillin G, methicillin, carbenicillin, pethidine, xylazine, ketamine hydrochloride, mephanesin and iron dextran. U.S. Patent No. 5,548,064 to Russell-Jones *et al.* discloses a vitamin B₁₂ conjugate for delivering erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor, using the same approach as the '023 patent.

PCT Publication WO 94/27641 to Russell-Jones *et al.* discloses vitamin B₁₂ linked through a polymer to various active agents wherein the conjugate is capable of binding to intrinsic factor for systemic delivery. In particular, the document discloses the attachment of various polymeric linkers to the propionamide positions of the vitamin B₁₂ molecule, and the attachment of various bioactive agents to the polymeric linker. Exemplary bioactive agents include hormones, bioactive peptides and polypeptides, antitumor agents, antibiotics, antipyretics, analgesics, antiinflammatories, and haemostatic agents. Exemplary polymers include carbohydrates and branched chain amino acid polymers. The linkers used in WO 94/27641 are polymeric (each having a molecular weight of about 5000 or greater). Importantly, the linkers are described as exhibiting a mixture of molecular weights, due to the polymerization process by which they are made. See in particular, page 11, lines 25-26 wherein it is stated that the polymer used in that invention is of uncertain size and/or structure.

PCT Publication WO 99/65930 to Russell-Jones *et al.* discloses the attachment of various agents to the 5'-OH position on the vitamin B₁₂ ribose ring. The publication indicates that the system can be used to attach polymers, nanoparticles, therapeutic agents, proteins and peptides to the vitamin.

U.S. Patent No. 5,574,018 to Habberfield *et al.* discloses conjugates of vitamin B₁₂ in which a therapeutically useful protein is attached to the primary hydroxyl site of the ribose moiety. The patent lists erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor and

WO 03/026674

PCT/US02/31038

human intrinsic factor as therapeutically useful proteins, and indicates that the conjugates are particularly well adapted for oral administration.

U.S. Patent No. 5,840,880 to Morgan, Jr. *et al.* discloses vitamin B₁₂ conjugates to which are linked receptor modulating agents, which affect receptor trafficking pathways that govern the cellular uptake and metabolism of vitamin B₁₂. The receptor modulating agents are linked to the vitamin at the *b-*, *d-*, or *e-* position.

Other patent filings which describe uses of Vitamin B₁₂ include U.S. Patent No. 3,936,440 to Nath (Method of Labeling Complex Metal Chelates with Radioactive Metal Isotopes); U.S. Patent No. 4,209,614 to Bernstein *et al.*, (Vitamin B₁₂ Derivatives Suitable for Radiolabeling); U.S. Patent No. 4,279,859 (Simultaneous Radioassay of Folate and Vitamin B₁₂); U.S. Patent No. 4,283,342 to Yolles (Anticancer Agents and Methods of Manufacture); U.S. Patent No. 4,301,140 to Frank *et al* (Radiopharmaceutical Method for Monitoring Kidneys); U.S. Patent No. 4,465,775 to Houts (Vitamin B₁₂ and labeled Derivatives for Such Assay); U.S. Patent No. 5,308,606 to Wilson *et al* (Method of Treating and/or Diagnosing Soft Tissue Tumors); U.S. Patent No. 5,405,839 (Vitamin B₁₂ Derivative, Preparation Process Thereof, and Use Thereof); U.S. Patent No. 5,449,720 to Russell-Jones *et al.*, (Amplification of the Vitamin B₁₂ Uptake System Using Polymers); U.S. Patent No. 5,589,463 to Russell Jones (Oral Delivery of Biologically Active Substances Bound to Vitamin B₁₂); U.S. Patent No. 5,608,060 to Axworthy *et al* (Biotinidase-Resistant Biotin-DOTA Conjugates); U.S. Patent No. 5,807,832 to Russell-Jones *et al* (Oral Delivery of Biologically Active Substances Bound to Vitamin B₁₂); U.S. Patent No. 5,869,465 to Morgan *et al* (Method of Receptor Modulation and Uses Therefor); U.S. Patent No. 5,869,466 to Russell-Jones *et al* (vitamin B₁₂ Mediated Oral Delivery systems for GCSEF).

See also Ruma Banerjee, *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* John Wiley & Sons, Inc. (1999), and in particular Part II, Section 15 of that book, entitled "Diagnostics and Therapeutic Analogues of Cobalamin," by H.P.C. Hogenkamp, Douglas A. Collins, Charles B. Grissom, and Frederick G. West.

Administration of B₁₂ or B₁₂ conjugated agents suffers from a number of problems. The uptake of B₁₂ into the gastrointestinal system after oral administration is limited by the amount and availability of IF. Only two to five micrograms of B₁₂ can be taken up in the gastrointestinal tract daily, and the percentage of the two to five micrograms that is actually

WO 03/026674

PCT/US02/31038

absorbed into the blood stream remains unknown. If B₁₂ or a B₁₂ conjugated agent is administered intravenously, slightly less than one milligram can be absorbed. Typically, twenty five to forty percent is excreted, and the remaining is stored. Deficiencies in IF lead to impaired uptake of B₁₂ and can contribute to disease states as pericious anemia. There is evidence that the uptake of conjugated-B₁₂ is not significantly different from that of unconjugated B₁₂ alone.

Cooper, BA et al ((1961) Nature. 191:393-395) describe that radiolabeled vitamin B₁₂ bound to intrinsic factor showed increased uptake *in vitro* in human and mouse tumor cells.

Uchino, Haruto et al. ((April 24, 1964) Annals of the NY Academy of Science. 112:844-863) disclose that oral and intravenous administration of adenosyl cobalamin prebound to intrinsic factor in rats resulted in enhanced uptake of the cobalamin in rat tissues. In the forty years since Cooper and Uchino published these preliminary results, and despite concentrated research in the area of cobalamins, there has been negligible pursuit of this line of investigation.

U.S. Patent No. 6,183,723 to Seetharam et al. discloses a method to treat an intrinsic factor or intrinsic factor receptor deficient patient by conjugating transcobalamin-II to cobalamin. Seetharam et al. discovered a novel pathway by which cobalamin can be absorbed from the gastrointestinal tract through conjugation to transcobalamin II via the transcobalamin II receptor. They disclose that under normal conditions, it is highly unlikely that this transcobalamin II mediated transport bypasses the well accepted intrinsic factor/intrinsic factor receptor mediated cobalamin transport in the gastrointestinal tract, but despite its lack of importance in the normal uptake of cobalamin, it may be useful in patients with inherited disorders such as intrinsic factor or intrinsic factor receptor deficient patients.

It is an object of the invention to provide a method and composition for the increased efficiency of vitamin B₁₂ or vitamin B₁₂ conjugated materials for therapeutic and diagnostic purposes.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

SUMMARY OF THE INVENTION

It has been discovered that the uptake of a cobalamin linked to a diagnostic or therapeutic agent can be significantly enhanced by administering the cobalamin in (covalent, ionic or admixed) combination with a cobalamin transport protein. In a broader embodiment, the amount delivered to cells of any transcobalamin II or intrinsic factor receptor ligand conjugated to a detectable or therapeutic agent can be increased by combination (covalent, ionic or admixed) with a cobalamin transport protein.

Up to this point, it has generally been accepted that there is limited absorption of cobalamin from the gastrointestinal tract (2-5 micrograms per day) as well as through intravenous injection (1 milligram per day). The discovery that the combination of cobalamin transport proteins (such as intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II, and transcobalamin III) with a cobalamin-linked diagnostic or therapeutic results in absorption greater than 2 to 5 micrograms per day from the gastrointestinal tract, or greater than one milligram per day when administered via intravenous injection represents a true advance in the art. The teachings of the patents disclosed in the background of the invention do not describe methods to increase the deliverable concentration of a cobalamin-linked diagnostic or therapeutic agent that accomplishes an increase in uptake, bioavailability and/or the diagnostic signal. Contrary to the publication of Seetharam et al., this method can be used in patients that do not exhibit any type of B₁₂ or B₁₂-related deficiency.

The transcobalamin II or intrinsic factor receptor ligand can be a cobalamin, such as vitamin B₁₂, cyanocobalamin, adenosylcobalamin, hydroxycobalamin or methylcobalamin, or a compound of Formula I.

A compound of Formula I can be linked to a diagnostic, therapeutic or other material in combination with an effective amount of a cobalamin transport protein (which term, as used herein, includes but is not limited to intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II and transcobalamin III).

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (iv) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- (v) A is O, S, NJ¹, CR¹⁰⁰R¹⁰¹ or C(R¹⁰⁰)V⁸Z⁸;
- 5 (vi) E is O or S;
- (vii) G¹ and G² are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (viii) Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²;
- (ix) V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ³; CR¹⁰²R¹⁰³, or a direct bond;
- 10 (x) Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴ or L-T;
- (xi) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind to a cobalamin transport protein;
- (xii) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- 15 (xiii) at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷, Z⁸, A, B, G¹, and G² comprises an a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (xiv) J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
- 20 (xv) R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;
- 25 (xvi) R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a pi bond; and
- (xvii) R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³, and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl, or amino.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

For diagnosis, either or both of the (i) cobalamin transport protein or the (ii) cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material, can be labeled with a radioligand or other detectable agent.

5 For treatment, either or both of the (i) cobalamin transport protein or the (ii) cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material, can be conjugated to a known therapeutic agent, such as in the case of infection, a known antibiotic; in the case of a cardiovascular disease, a known cardiovascular agent; and in the case of abnormal cellular proliferation, a known anti-proliferative agent or antisense therapeutic.

10 In various embodiments, the following types of materials can be linked to the cobalamin or compound of Formula I complexes that are coadministered with a cobalamin transport protein, include but are not limited to the following:

- (i) a compound useful for the treatment of a disorder associated with abnormal cellular proliferation;
- 15 (ii) a compound useful for the treatment of an infectious disease such as an antibiotic or antiviral agent;
- (iii) a compound useful in the treatment of a cardiovascular disorder;
- (iv) nucleic acids, peptide nucleic acid, morpholino nucleic acid, or other material that affects gene expression, for example, a transcriptional factor;
- 20 (v) a compound useful for the radioimaging to image a variety of disease states; and
- (vi) a detectable radionuclide or paramagnetic metal atom.

Examples of such conjugated materials are described in detail in the patents or published patent applications cited in the Background of the Invention.

25 In one embodiment, the invention encompasses a method for increasing the efficiency of delivery of a cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic or therapeutic by administering a cobalamin linked diagnostic or therapeutic in combination (covalent, ionic or admixed) with a cobalamin transport protein. The cobalamin transport protein can be intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II or transcobalamin III. A
30 cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic or therapeutic by administering the cobalamin linked diagnostic or therapeutic in combination with a

WO 03/026674

PCT/US02/31038

cobalamin transport protein can be administered via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter.

The cobalamin or compound of Formula I linked diagnostic or therapeutic agent in combination with a cobalamin transport protein can be administered to patients that do not have a cobalamin or cobalamin-related deficiency, such as inherited or acquired cobalamin deficiencies, for example, deficiencies due to the absence of cobalamin transport proteins, such as intrinsic factor, intrinsic factor receptor, or transcobalamin II.

In one embodiment, the cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is orally delivered to a host in combination with intrinsic factor, in a pharmaceutically acceptable carrier. A cobalamin or a compound of Formula I is either administered bound (i.e. either covalently, ionically, datively or via van der Waals attraction), or unbound (i.e. admixed with) to intrinsic factor.

In another embodiment, the cobalamin or the compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is administered in combination with transcobalamin I, II or III via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter. The cobalamin or the compound of Formula I is either administered bound (i.e. either covalently, ionically, datively or via van der Waals attraction), or unbound (i.e. admixed with) to transcobalamin I, II or III.

In a typical embodiment, the cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is administered in any ratio that achieves the desired result. In one embodiment the ratio is one molecule of the cobalamin or compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein. In an alternate embodiment of the invention, the ratio is one molecule of cobalamin or the compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of cobalamin transport protein, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of

WO 03/026674

PCT/US02/31038

cobalamin transport protein. In another embodiment of the invention, the ratio is at least one molecule of the cobalamin or compound of Formula I to one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of the cobalamin or compound of Formula I, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of the cobalamin or compound of Formula I.

The mixtures can be prepared by either physically mixing the cobalamin transport protein with the cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material prior to formulation in a pharmaceutically acceptable carrier, or by simply mixing them separately with the carrier.

Cobalamin transport proteins, such as IF or transcobalamin I, II or III, can be obtained from any source known in the art. In a particular embodiment, the cobalamin transport protein is extracted from blood by methods known in the art. In an alternate embodiment, the cobalamin transport protein is extracted from cow's milk by methods known in the art.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It has been discovered that when cobalamin derivatives conjugated to therapeutic or diagnostic (i.e., detectable) agents are further conjugated to or administered with a cobalamin transport protein, such as IF or TC-I, -II or -III, more of the active or diagnostic material is absorbed compared administration of the a cobalamin derivative and the therapeutic or diagnostic agent alone.

The invention as disclosed is a method and composition to increase the uptake and bioabsorption of either cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material being delivered to a host by administration in combination with an effective amount of a cobalamin transport protein (which term, as used herein, includes but is not limited to intrinsic factor, transcobalamin I, II, and III).

In one embodiment, the cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is orally delivered to a host in combination with intrinsic factor, in a pharmaceutically acceptable carrier. A cobalamin or a compound of Formula I is either administered bound (i.e. either covalently, ionically, datively or via van der Waals attraction), or unbound (i.e. admixed with) to intrinsic factor.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

In another embodiment, the cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is administered in combination with transcobalamin I, II or III via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump, or via catheter. A cobalamin or a compound of Formula I is either administered bound (i.e. either covalently, ionically, datively or via van der Waals attraction), or unbound (i.e. admixed with) to transcobalamin I, II or III.

In a typical embodiment, the cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material is administered in any ratio that achieves the desired result. In one embodiment the ratio is one molecule of a cobalamin or a compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein. In an alternate embodiment of the invention, the ratio is one molecule of a cobalamin or a compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of cobalamin transport protein, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of cobalamin transport protein. In another embodiment of the invention, the ratio is at least one molecule of a cobalamin or a compound of Formula I to one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of a cobalamin or a compound of Formula I, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of a cobalamin or a compound of Formula I.

The mixtures can be prepared by either physically mixing the cobalamin transport protein with a cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material prior to formulation in a pharmaceutically acceptable carrier, or by simply mixing them separately with the carrier. Alternatively, the transport protein can be ionically or covalently bound or otherwise conjugated to the cobalamin or compound of Formula I.

For diagnosis, either or both of the (i) cobalamin transport protein or the (ii) cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material can be labeled with a radioligand or other detectable agent.

As one example, the coadministration of a cobalamin or a compound of Formula I linked to a diagnostic material being delivered to a host allows the detection of solid tumor masses at sizes smaller than previously detectable, because more of the detectable agent is

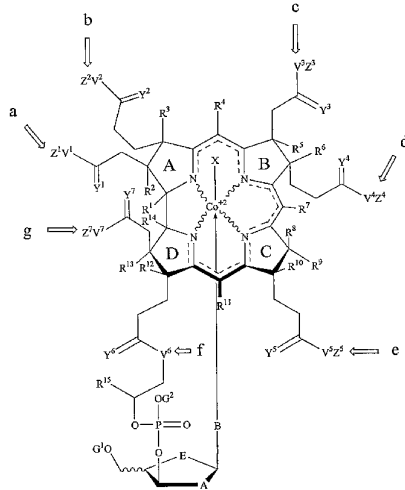
WO 03/026674

PCT/US02/31038

absorbed by the tumor cell. This is especially important for breast cancer patients, because the technology allows the possibility of identifying breast tumor growths at an earlier stage of development, with the possibility of more optimistic prognosis.

I. TC- or IF-Receptor Ligand

5 One TC- or IF-receptor ligand of the present invention is of the Formula I:



or its enantiomer, diastereomer, salt or prodrug thereof, wherein:

- (i) the wavy line in the chemical structure indicates either a dative or covalent bond such that there are three dative Co-N bonds and one covalent Co-N bond, wherein, in the case of the dative bond, the valence of nitrogen is completed either with a double bond with an adjacent ring carbon or with a hydrogen;
- 10

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (ii) the dotted line in the chemical structure indicates either a double or single bond such that the double bond does not over-extend the valence of the element (i.e. to give pentavalent carbons) and, in the case of a single bond, the valence is completed with hydrogen
- 5 (iii) X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, adenosyl L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, aralkyl, heterocycle, heteroaryl or alkylheteroaryl;
- (iv) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- 10 (v) A is O, S, NJ^1 , $\text{CR}^{100}\text{R}^{101}$ or $\text{C}(\text{R}^{100})\text{V}^6\text{Z}^6$;
- (vi) E is O or S;
- (vii) G^1 and G^2 are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (viii) Y^1 , Y^2 , Y^3 , Y^4 , Y^5 , Y^6 and Y^7 independently are O, S or NJ^2 ;
- (ix) V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 , V^6 , V^7 and V^8 independently are O, S or NJ^3 ; $\text{CR}^{102}\text{R}^{103}$, or
15 a direct bond;
- (x) Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^7 and Z^8 independently are R^{104} or L-T;
- (xi) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind a cobalamin transport protein;
- 20 (xii) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- (xiii) at least one of Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^7 , Z^8 , A, B, G^1 , and G^2 comprises an a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (xiv) J^1 , J^2 and J^3 independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
25
- (xv) R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} and R^{15} independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol,

WO 03/026674

PCT/US02/31038

SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;

(xvi) R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a pi bond; and

5 (xvii) R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³, and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl, or amino.

10 For diagnosis, either or both of the (i) cobalamin transport protein or the (ii) cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material, can be labeled with a radioligand or other detectable agent.

15 For treatment, either or both of the (i) cobalamin transport protein or the (ii) cobalamin or compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material, can be conjugated to a known therapeutic agent, such as in the case of infection, a known antibiotic; in the case of a cardiovascular disease, a known cardiovascular agent; and in the case of abnormal cellular proliferation, a known anti-proliferative agent or antisense therapeutic.

In various embodiments, the following types of materials can be linked to a cobalamin or a compound of Formula I complex that is administered with a cobalamin transport protein, include but are not limited to the following:

- 20 (i) a compound useful for the treatment of a disorder associated with abnormal cellular proliferation;
- (ii) a compound useful for the treatment of an infectious disease such as an antibiotic or antiviral agent;
- (iii) a compound useful in the treatment of a cardiovascular disorder;
- 25 (iv) nucleic acids, peptide nucleic acid, morpholino nucleic acid, or other material that affects gene expression, for example, a transcriptional factor;
- (v) a compound useful for the radioimaging to image a variety of disease states; and
- (vi) a detectable radionuclide or paramagnetic metal atom;

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Examples of such conjugated materials are described in detail in the patents or published patent applications cited in the Background of the Invention.

5 In naturally occurring vitamin B₁₂, there is an α -D-5,6-dimethylbenzimidazolyl ribose 3'-phosphate that is bound through the phosphate to the B₁₂ moiety and coordinated to the cobalt ion. In a modified vitamin B₁₂ TC- or IF-receptor ligand, the M-sugar component is typically likewise in an α -D configuration, although other configurations (i.e. α -L, β -D and β -L) are possible.

10 One of the biologically active forms of vitamin B₁₂ has a 5'-deoxyadenosyl moiety in the X position. Coenzyme B₁₂ catalysis occurs via the detachment and reattachment of the methylene radical at the 5'-deoxy position of the vitamin.

In one particular embodiment the linker used to conjugate the cobalamin or compound of Formula I and the diagnostic or therapeutic agent is a polyamine such as spermine or spermidine.

15 Because vitamin B₁₂ is preferentially taken up in or near sites of proliferation (either from infection or diseases associated with abnormal cellular proliferation), the cobalamin or compound of Formula I of the present invention provides a delivery system capable of targeting sites of infection or abnormal cellular proliferation and selectively imaging or treating a greater proportion of such sites in relation to healthy cells. A wide range of analogs and derivatives are capable of attaining these properties, as reflected by the above referenced chemical structure and variables.

20 The cobalamin or compound of Formula I can be modified in any manner that does not interfere with its fundamental ability to bind a cobalamin transport protein, and thereafter bind the TC or IF receptor. In one embodiment, each variable on the vitamin B₁₂ structure independently either (i) retains its natural vitamin B₁₂ structure, (ii) imparts a diagnostic or therapeutic agent to the cobalamin conjugate, (iii) renders the cobalamin conjugate more water soluble or more stable, (iv) increases the bioavailability of the carrier; (v) increases or at least does not decrease the binding affinity of the cobalamin transport protein for the TC-binding or IF-binding protein over vitamin B₁₂; or (vi) imparts another characteristic that is desired for pharmaceutical or diagnostic performance.

30

WO 03/026674

PCT/US02/31038

The diagnostic or therapeutic agent can be linked to a compound of Formula I through a number of positions, including any of the V-Z moieties, the X moiety, the M moiety, the K moiety and/or the G¹ moiety, though as mentioned above at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷, Z⁸, M and G¹ moieties comprises a diagnostic or therapeutic agent. In one embodiment a diagnostic or therapeutic agent is linked to a compound of Formula I through Z², Z⁴, and/or Z⁵ (i.e. one or more of Z², Z⁴ and Z⁵ is L-T and T is a diagnostic or therapeutic agent). In a more particular embodiment a diagnostic or therapeutic agent is linked to a compound of Formula I through the Z² moiety (i.e. Z² is L-T and T a diagnostic or therapeutic agent). In each of the foregoing embodiments, the Z moiety or moieties not containing a diagnostic or therapeutic agent preferably retain its natural vitamin B₁₂ configuration, in which VZ is NH₂. Alternatively, the Z moieties not containing a diagnostic or therapeutic agent may comprise a secondary or tertiary amino analog of NH₂ substituted by one or two of J¹.

In any Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷, Z⁸, X, M or G¹ moieties through which a diagnostic or therapeutic agent is linked, it will be understood that such moiety may comprise more than one diagnostic or therapeutic agent, or a combination of agents, i.e. each T can independently comprise the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s) bound to L through one or more chelating moieties. More specifically, in a series of embodiments, each T can comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 a diagnostic or therapeutic agent(s) bound through one or more chelating moieties.

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹² and R¹³ independently represent moieties that do not interfere with binding between the compound and the cobalamin transport protein or receptor. Vitamin B₁₂ can be modified through these moieties to modulate physical properties of the molecule, such as water solubility, stability or λ_{max}. Preferred groups for enhancing water solubility include heteroalkyl, amino, C₁₋₆ alkylamino, C₁₋₆ alcohol, C₁₋₆ carboxylic acid and SO₃⁻.

In another embodiment, one, some or all of R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹² and R¹³ independently assume their natural roles in vitamin B₁₂. Thus, one, some or all of R¹, R², R⁴, R⁵, R⁸, R⁹, R¹¹, R¹² and R¹⁵ are independently methyl in one embodiment and one, some or all of R³, R⁶, R⁷, R¹⁰, R¹⁵ and R¹⁴ are independently hydrogen.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

In another embodiment, one, some or all of Y^1 , Y^2 , Y^3 , Y^4 , Y^5 , Y^6 and Y^7 assume their natural roles in vitamin B₁₂ and are O. Similarly, in another embodiment V^6 assumes its natural role in vitamin B₁₂ and is NH or a primary amine analog thereof substituted by J^1 .

5 In still another embodiment, position X assumes its natural role in vitamin B₁₂, *i.e.* as cyano, hydroxyl, methyl or 5'-deoxyadenosyl, most preferably 5'-deoxyadenosyl.

In another embodiment M is the radical of a purine or pyrimidine base. In another embodiment M is the radical of adenosine, guanine, cytosine, uridine or thymine. In still another embodiment M is the radical of 5,6-dimethylbenzimidazole.

In still another embodiment K is CH(OH).

10 In yet another embodiment E is O.

In another embodiment G^1 is OH.

In still another embodiment, all constituents of the conjugate assume their natural roles in vitamin B₁₂, except for the moieties through which any diagnostic or therapeutic agent(s) are linked. The diagnostic or therapeutic agent(s) are preferably linked to the vitamin B₁₂ structure through Z^2 , Z^4 and/or Z^5 and even more preferably through the Z^2 moieties.

15

II. Linkers

As noted above, L is the residue of a linker molecule that conjugates one or more diagnostic or therapeutic agent(s) to a compound of Formula I. The structure of the linker from which L is derived (in any one of the Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^6 , Z^7 , X, M or G^1 moieties) is not crucial, provided it does not significantly impair the ability of the conjugate to bind to the cobalamin transport protein or receptor. L is preferably any multivalent molecule (divalent or greater) that does not significantly impair the ability of the TC carrier to bind to the cobalamin transport protein or receptor. The ability of a cobalamin or a compound of Formula I to bind to the cobalamin transport protein or receptor is "significantly impaired" when attaching a linking moiety to a cobalamin or a compound of Formula I lessens the affinity of the vitamin B₁₂ or the TC-binding carrier for the cobalamin transport protein to which the a cobalamin or a compound of Formula I is most readily bound by 50% or more. The unsaturated vitamin B₁₂ binding capacity (UBBC) assay described by D. A. Collins and

20

25

WO 03/026674

PCT/US02/31038

H. P. C. Hogenkamp in *J. Nuclear Medicine*, 1997, 38, 717-723 can be used to compare the relative affinities of ligands for this receptor .

In one embodiment the linker is of precise molecular weight and does not possess a molecular weight distribution. In one embodiment, the linker has a molecular weight less than about 2,500, 2,000, 1,900, 1,800, 1,500, 1,000 or 500.

A particularly preferred linker is one having multiple sites for conjugation to one or more imaging agents, wherein the linker has a unimodal molecular weight. Recombinant protein production techniques can be employed to obtain poly(amino acid) linkers of substantially constant molecular weight.

In one embodiment the linker is an amino acid or a polymer or peptide formed from a plurality of amino acids. The polymer or peptide can be derived from one or more amino acids. The amino acid, poly(amino acid) or peptide can link T to V through the carboxy terminus or the amino terminus. The amino acid residue, peptide residue or poly(amino acid) residue can conveniently be linked to V and T through an amide (e.g. -N(R)C(O)- or -C(O)N(R)-), ester (e.g. -OC(=O)- or -C(=O)O-), ether (e.g. -O-), ketone (e.g. -C(=O)-), thioether (e.g. -S-), sulfinyl (e.g. -S(O)-), sulfonyl (e.g. -S(O)₂-) or a direct (e.g. C-C bond) linkage, wherein each R is independently H or (C₁-C₁₂) alkyl.

Peptide derivatives can be prepared as disclosed in U.S. Patent Numbers 4,612,302; 4,853,371; and 4,684,620. Peptide sequences specifically recited herein are written with the amino terminus on the left and the carboxy terminus on the right, but are meant to also include the opposite flow. Particularly suitable peptides and poly(amino acids) comprise from 2 to about 20 amino acids, from 2 to about 15 amino acids or from 2 to about 12 amino acids.

One exemplary poly(amino acid) is poly-L-lysine ((-NHCH((CH₂)₄-NH₂)CO-)_m-Q, wherein Q is H, (C₁-C₁₂)alkyl or a suitable carboxy protecting group and m is from 2 to about 20, from about 5 to about 15 or from about 8 to about 11. The polylysine offers multiple primary amine sites to which active agents can be readily attached. Alternatively, the linkers can be formed with multiple cysteines, to provide free thiols or multiple glutamates or aspartates, to provide free carboxyls for conjugation using suitable carbodiimides. Similarly the linker can contain multiple histidines or tyrosines for conjugation. Other exemplary poly(amino acid) linkers are poly-L-glutamic acid, poly-L-aspartic acid, poly-L-histidine, poly-L-ornithine, poly-L-serine, poly-L-threonine, poly-L-

WO 03/026674

PCT/US02/31038

tyrosine, poly-L-lysine-L-phenylalanine or poly-L-lysine-L-tyrosine. When the linker is derived from a poly(amino acid) other than polylysine, the linker is, in a series of embodiments, prepared from 2 to about 30 amino acids, 5 to about 20 amino acids or 8 to about 15 amino acids.

5 In another particular embodiment L is a polyamine residue (having at least three amino moieties) of the following chemical structure: $\text{NR}'(\text{alkylene-NR}')_n\text{alkyleneNR}'$, wherein n is from 1 to 20, the carbon length of alkylene can vary within the n units and each R' is independently hydrogen, lower alkyl or T. N is preferably from 1 to 10. Moreover, L preferably has a backbone along its longest length of no more than 100, 75, 50, 40, 30, 20 or 15 atoms. Exemplary polyamines from which L can be derived include spermine
10 $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)$, spermidine $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)$, decamethylene tetraamine and pentamethylene hexamine. These linkers are a definite size and thus provide consistent and predictable targeting by the cobalamin conjugate, in addition to multiple binding sites for the imaging agent.

15 In another embodiment L is a diamine represented by the formula $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$, in which x is 2-20 and preferably 2-12. Thus, the linker can be prepared from 1,6-diaminohexane, 1,5-diaminopentane, 1,4-diaminobutane and 1,3-diaminopropane.

Other suitable linkers are formed from the covalent linkage of various water soluble molecules with amino acids, peptides, poly(amino acids), polyamines, polyoxyalkylenes, polyanhydrides, polyesters, polyamides, polyglycolides and diamines. Suitable water
20 soluble molecules include, for example, polyethylene glycol and dicarboxylic monosaccharides such as glucaric acid, galactaric acid and xylaric acid.

Other suitable linkers include those represented by the formula $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_x\text{C}(\text{O})\text{OH}$, in which x is 2-20 and preferably 2-12. Thus, the linker can be prepared from succinic acid, glutaric acid, adipic acid, suberic acid, sebacic acid, azelaic acid or maleic acid. Still other suitable linkers comprise carboxylic acid derivatives that
25 yield an amide upon reaction with an amine. Such reactive groups include, by way of example, carboxylic acid halides such as acid chlorides and bromides; carboxylic acid anhydrides such as acetic anhydrides and trifluoroacetic anhydrides; esters such as p-nitrophenyl esters and N-hydroxysuccinimide esters; and imidazolides. Techniques for using such linkers are described in detail in Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis,
30 Springer Verlag, Berlin, 1984.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

In one embodiment, the linker is modified to facilitate its conjugation either to V or T. Suitable molecules for modifying the linker include: disuccinimidyl suberate (DSS), bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BSS), ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate) (EGS), ethylene glycolbis(sulfosuccinimidyl-succinate) (Sulfo-EGS), p-aminophenylacetic acid, dithio-bis-(succinimidyl-propionate) (DSP), 3,3'-dithiobis-(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP), disuccinimidyl tartarate (DST), disulfosuccinimidyl tartarate (Sulfo-DST), bis(2-(succinimidooxycarbonyloxy)-ethylene)sulfone (BSOCOES), bis(2-(sulfosuccinimidooxycarbonyloxy)ethylene)sulfone (Sulfo-BSOCOES), dimethyl adipimidate.2HCl (DMA), dimethyl pimelimidate.2HCl (DMP) and dimethyl suberimidate.2HCl (DMS).

Biodegradable linkers

Various degradable linkers can be used to link a cobalamin or a compound of Formula I to the active agent. The desired linkers can degrade under biological conditions such as by enzymatic cleavage or by systemic pH or temperature. Alternatively, these linkers can be induced to degrade by external manipulation such as changes in pH, temperature, ultrasound, magnetic field, radiation (i.e. UV radiation) or light.

Nonlimiting examples of U.S. Patents that describe controlled release formulations suitable for use as linking agents are: U.S. Patent No. 5,356,630 to Laurencin *et al.* (Delivery System for Controlled Release of Bioactive Factors); U.S. Patent No. 5,797,898 to Santini, Jr. *et al.* (Microchip Drug Delivery Devices); U.S. Patent No. 5,874,064 to Edwards *et al.* (Aerodynamically Light Particles for Pulmonary Drug Delivery); U.S. Patent No. 5,548,035 to Kim *et al.* (Biodegradable Copolymer as Drug Delivery Matrix Comprising Polyethyleneoxide and Aliphatic Polyester Blocks); U.S. Patent No. 5,532,287 to Savage *et al.* (Radiation Cured Drug Release Controlling Membrane); U.S. Patent No. 5,284,831 to Kahl *et al.* (Drug Delivery Porphyrin Composition and Methods); U.S. Patent No. 5,741,329 to Agrawal *et al.* (Methods of Controlling the pH in the Vicinity of Biodegradable Implants); U.S. Patent No. 5,820,883 to Tice *et al.* (Methods for Delivering Bioactive Agents into and Through the Mucosally-Associated Lymphoid Tissues and Controlling Their Release); U.S. Patent No. 5,955,068 to Gouin *et al.* (Biodegradable polyanhydrides Derived from Dimers of Bile Acids and Use Thereof as Controlled Drug Release Systems); U.S. Patent No. 6,001,395 to Coombes *et al.* (Polymeric Lamellar Substrate Particles for Drug Delivery); U.S. Patent No. 6,013,853 to Athanasiou *et al.* (Continuous Release Polymeric Implant Carriers); U.S. Patent No. 6,060,582 to Hubbell *et*

WO 03/026674

PCT/US02/31038

al. (Photopolymerizable Biodegradable Hydrogels as Tissue Contacting Materials and Controlled Release Carriers); U.S. Patent No. 6,113,943 to Okada *et al.* (Sustained-Release Preparation Capable of Releasing a Physiologically Active Substance); and PCT Publication No. WO 99/59548 to Oh *et al.* (Controlled Drug Delivery System Using the Conjugation of

5 Drug to Biodegradable Polyester); U.S. Patent No. 6,123,861 (Fabrication of Microchip Drug Delivery Devices); U.S. Patent No. 6,060,082 (Polymerized Liposomes Targeted to M cells and Useful for Oral or Mucosal Drug Delivery); U.S. Patent No. 6,041,253 (Effect of Electric Field and Ultrasound for Transdermal Drug Delivery); U.S. Patent No. 6,018,678 (Transdermal protein delivery or measurement using low-frequency sonophoresis); U.S.

10 Patent No. 6,007,845 Nanoparticles And Microparticles Of Non-Linear Hydrophilic-Hydrophobic Multiblock Copolymers; U.S. Patent No. 6,004,534 Targeted Polymerized Liposomes For Improved Drug Delivery; U.S. Patent No. 6,002,961 Transdermal Protein Delivery Using Low-Frequency Sonophoresis; U.S. Patent No. 5,985,309 Preparation Of Particles For Inhalation; U.S. Patent No. 5,947,921 Chemical And Physical Enhancers And Ultrasound For Transdermal Drug Delivery; U.S. Patent No. 5,912,017 Multiwall Polymeric Microspheres; U.S. Patent No. 5,911,223 Introduction Of Modifying Agents Into Skin By Electroporation; U.S. Patent No. 5,874,064 Aerodynamically Light Particles For Pulmonary Drug Delivery; U.S. Patent No. 5,855,913 Particles Incorporating Surfactants For Pulmonary Drug Delivery; U.S. Patent No. 5,846,565 Controlled Local

20 Delivery Of Chemotherapeutic Agents For Treating Solid Tumors; U.S. Patent No. 5,837,752 Semi-Interpenetrating Polymer Networks; U.S. Patent No. 5,814,599 Transdermal Delivery Of Encapsulated Drugs; U.S. Patent No. 5,804,178 Implantation Of Cell-Matrix Structure Adjacent Mesentery, Omentum Or Peritoneum Tissue; U.S. Patent No. 5,797,898 Microchip Drug Delivery Devices; U.S. Patent No. 5,770,417 Three-Dimensional Fibrous Scaffold Containing Attached Cells For Producing Vascularized Tissue *In vivo*; U.S. Patent No. 5,770,193 Preparation Of Three-Dimensional Fibrous Scaffold For Attaching Cells To Produce Vascularized Tissue *In vivo*; U.S. Patent No. 5,762,904 Oral Delivery Of Vaccines Using Polymerized Liposomes; U.S. Patent No. 5,759,830 Three-Dimensional Fibrous Scaffold Containing Attached Cells For Producing Vascularized Tissue *In vivo*; U.S. Patent No. 5,749,847 Delivery Of Nucleotides Into

30 Organisms By Electroporation; U.S. Patent No. 5,736,372 Biodegradable Synthetic Polymeric Fibrous Matrix Containing Chondrocyte For *In vivo* Production Of A Cartilaginous Structure; U.S. Patent No. 5,718,921 Microspheres Comprising Polymer And Drug Dispersed There Within; U.S. Patent No. 5,696,175 Preparation Of Bonded Fiber

WO 03/026674

PCT/US02/31038

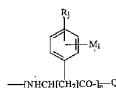
Structures For Cell Implantation; U.S. Patent No. 5,667,491 Method For Rapid Temporal Control Of Molecular Transport Across Tissue; U.S. Patent No. 5,654,381 Functionalized Polyester Graft Copolymers; U.S. Patent No. 5,651,986 Controlled Local Delivery Of Chemotherapeutic Agents For Treating Solid Tumors; U.S. Patent No. 5,629,009 Delivery System For Controlled Release Of Bioactive Factors; U.S. Patent No. 5,626,862 Controlled Local Delivery Of Chemotherapeutic Agents For Treating Solid Tumors; U.S. Patent No. 5,593,974 Localized Oligonucleotide Therapy; U.S. Patent No. 5,578,325 Nanoparticles And Microparticles Of Non-Linear Hydrophilic-Hydrophobic Multiblock Copolymers; U.S. Patent No. 5,562,099 Polymeric Microparticles Containing Agents For Imaging; U.S. Patent No. 5,545,409 Delivery System For Controlled Release Of Bioactive Factors; U.S. Patent No. 5,543,158 Biodegradable Injectable Nanoparticles; U.S. Patent No. 5,514,378 Biocompatible Polymer Membranes And Methods Of Preparation Of Three Dimensional Membrane Structures; U.S. Patent No. 5,512,600 Preparation Of Bonded Fiber Structures For Cell Implantation; U.S. Patent No. 5,500,161 Method For Making Hydrophobic Polymeric Microparticles; U.S. Patent No. 5,487,390 Gas-filled polymeric microbubbles for ultrasound imaging; U.S. Patent No. 5,399,665 Biodegradable polymers for cell transplantation; U.S. Patent No. 5,356,630 Delivery system for controlled release of bioactive factors; U.S. Patent No. 5,330,768 Controlled drug delivery using polymer/pluronic blends; U.S. Patent No. 5,286,763 Bioerodible polymers for drug delivery in bone; U.S. Patent No. 5,149,543 Ionically cross-linked polymeric microcapsules; U.S. Patent No. 5,128,420 Method of making hydroxamic acid polymers from primary amide polymers; U.S. Patent No. 5,122,367 Polyanhydride bioerodible controlled release implants for administration of stabilized growth hormone; U.S. Patent No. 5,100,668 Controlled release systems containing heparin and growth factors; U.S. Patent No. 5,019,379 Unsaturated polyanhydrides; U.S. Patent No. 5,010,167 Poly(amide- and imide-co-anhydride) for biological application; U.S. Patent No. 4,948,587 Ultrasound enhancement of transbuccal drug delivery; U.S. Patent No. 4,946,929 Bioerodible articles useful as implants and prostheses having predictable degradation rates; U.S. Patent No. 4,933,431 One step preparation of poly(amide-anhydride); U.S. Patent No. 4,933,185 System for controlled release of biologically active compounds; U.S. Patent No. 4,921,757 System for delayed and pulsed release of biologically active substances; U.S. Patent No. 4,916,204 Pure polyanhydride from dicarboxylic acid and coupling agent; U.S. Patent No. 4,906,474 Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery; U.S. Patent No. 4,900,556 System for delayed and pulsed release of biologically active substances; U.S.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Patent No. 4,898,734 Polymer composite for controlled release or membrane formation; U.S. Patent No. 4,891,225 Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery; U.S. Patent No. 4,888,176 Controlled drug delivery high molecular weight polyanhydrides; .S. Patent No. 4,886,870 Bioerodible articles useful as implants and prostheses having predictable degradation rates; U.S. Patent No. 4,863,735 Biodegradable polymeric drug delivery system with adjuvant activity; U.S. Patent No. 4,863,611 Extracorporeal reactors containing immobilized species; U.S. Patent No. 4,861,627 Preparation of multiwall polymeric microcapsules; U.S. Patent No. 4,857,311 Polyanhydrides with improved hydrolytic degradation properties; U.S. Patent No. 4,846,786 Bioreactor containing suspended, immobilized species; U.S. Patent No. 4,806,621 Biocompatible, bioerodible, hydrophobic, implantable polyimino carbonate article; U.S. Patent No. 4,789,724 Preparation of anhydride copolymers; U.S. Patent No. 4,780,212 Ultrasound enhancement of membrane permeability; U.S. Patent No. 4,779,806 Ultrasonically modulated polymeric devices for delivering compositions; U.S. Patent No. 4,767,402 Ultrasound enhancement of transdermal drug delivery; U.S. Patent No. 4,757,128 High molecular weight polyanhydride and preparation thereof; .S. Patent No. 4,657,543 Ultrasonically modulated polymeric devices for delivering compositions; U.S. Patent No. 4,638,045 Non-peptide polyamino acid bioerodible polymers; U.S. Patent No. 4,591,496 Process for making systems for the controlled release of macromolecules.

20 Nonmetallic radioisotopes can conveniently be linked to the vitamin B₁₂ structure through a residue of a peptide having the following formula:



wherein each M is independently a non-metallic radionuclide; each R is independently (C₁-C₁₄)alkyl, (C₂-C₁₄)alkenyl, (C₂-C₁₄)alkynyl, (C₁-C₁₄)alkoxy, hydroxy, cyano, nitro, halo, trifluoromethyl, N(R_a)(R_b), (C₁-C₁₄)alkanoyl, (C₂-C₁₄)alkanoyloxy, (C₆-C₁₀)aryl or (C₃-C₈)cycloalkyl wherein R_a and R_b are each independently H or (C₁-C₁₄)alkyl; P; Q is H, (C₁-C₁₄)alkyl or a suitable carboxy protecting group; n is 2 to about 20; I is 1-5, j is 0-4 and I+j is ≤ 5; or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Specifically, i can be 1, j can be 0, M can be a positron emitter such as Fluorine-18, Bromine-76, Iodine-124 or a gamma emitter such as Iodine-123 or Iodine-131 and n can be about 6 to about 12.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

The above discussion has demonstrated how the various variables associated with the cobalamin conjugates of the present invention can be independently varied to more particularly define specific classes of cobalamin conjugates encompassed by this invention.

5 It is to be understood that the modification of one variable can be made independently of the modification of any other variable. Moreover, any number of embodiments can be defined by modifying two or more of the variables in such embodiments. A few of such embodiments are described below for purposes of exemplification.

10 Subembodiment 1: X is 5'-deoxyadenosyl; M is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T; K is O, S, N^{J1}, CR¹⁰⁰R¹⁰¹ or C(R¹⁰⁰)V⁸Z⁸; E is O or S; G¹ is hydrogen, alkyl, acyl, silyl, mono-, di- or tri-phosphate or L-T; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ²; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T'; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T' independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶ and Z⁸, M or G¹ comprises a diagnostic or therapeutic agent; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

25 Subembodiment 2: X is 5'-deoxyadenosyl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ²; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T'; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T' independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶ and Z⁸, M or G¹ comprises a diagnostic or therapeutic agent; J¹, J² and J³ independently

WO 03/026674

PCT/US02/31038

are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine; R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a double bond; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 3: X is 5'-deoxyadenosyl; M is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T; K is O, S, NJ¹, CR¹⁰⁰R¹⁰¹ or C(R¹⁰⁰)V⁸Z⁸; E is O or S; G¹ is hydrogen, alkyl, acyl, silyl, mono-, di- or tri-phosphate or L-T; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ²; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T'; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T' independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z², Z⁴ or Z⁵ comprises a diagnostic or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine; R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a double bond; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 4: X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, 5'-deoxyadenosyl, L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, alkaryl, heterocycle or heteroaryl or alkylheteroaryl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸

WO 03/026674

PCT/US02/31038

independently are O, S or NJ^3 ; $\text{CR}^{102}\text{R}^{103}$ or a direct bond; $Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, Z^5, Z^7$ and Z^8 independently are R^{104} , L-T or L-T'; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T' independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of $Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, Z^5, Z^7, Z^8$, M and G^1 comprises a diagnostic or therapeutic agent; J^2 and J^3 independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}, R^{13}, R^{14}$ and R^{15} retain their natural vitamin B₁₂ configuration; and $R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103}$ and R^{104} are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO_2 , SO_3 , thioalkyl or amino.

Subembodiment 5: X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, 5'-deoxyadenosyl, L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, alkaryl, heterocycle or heteroaryl or alkylheteroaryl; M, K, E and G^1 retain their natural vitamin B₁₂ configuration; $Y^1, Y^2, Y^3, Y^4, Y^5, Y^6$ and Y^7 independently are O, S or NJ^2 ; $V^1, V^2, V^3, V^4, V^5, V^6, V^7$ and V^8 independently are O, S or NJ^3 ; $\text{CR}^{102}\text{R}^{103}$ or a direct bond; $Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, Z^5, Z^7$ and Z^8 independently are R^{104} , L-T or L-T'; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T' independently comprises the residue of one or more radionuclides; at least one of Z^2, Z^4 or Z^5 comprises a diagnostic or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J^1, J^2 and J^3 independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}, R^{13}, R^{14}$ and R^{15} independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO_2 , SO_3 , carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine; R^{13} and R^{14} optionally can come together to form a double bond; and $R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103}$ and R^{104} are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO_2 , SO_3 , thioalkyl or amino.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Subembodiment 6: X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, 5'-deoxyadenosyl, L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, aralkyl, heterocycle or heteroaryl or alkylheteroaryl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ³; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T¹; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T¹ independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z², Z⁴ or Z⁵ comprises a diagnostic or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine; R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a double bond; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 7: X is 5'-deoxyadenosyl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ³; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T¹; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T¹ independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷, Z⁸, M and G¹ comprises a diagnostic or therapeutic agent; J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴

WO 03/026674

PCT/US02/31038

are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 8: X is 5'-deoxyadenosyl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ²; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T¹; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T¹ independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z², Z⁴ or Z⁵ comprises a diagnostic or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine; R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a double bond; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 9: X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, 5'-deoxyadenosyl, L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, aralkyl, heterocycle or heteroaryl or alkylheteroaryl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ²; CR¹⁰²R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T¹; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T¹ independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z², Z⁴ or Z⁵ comprises a diagnostic

WO 03/026674

PCT/US02/31038

or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ all retain their natural vitamin B₁₂ configuration; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiment 10: X is 5'-deoxyadenosyl; M, K, E and G¹ retain their natural vitamin B₁₂ configuration; Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²; V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ³; CR¹⁰⁰R¹⁰³ or a direct bond; Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴, L-T or L-T^{*}; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind cobalamin transport proteins; each T or T^{*} independently comprises the residue of one or more diagnostic or therapeutic agent(s); at least one of Z², Z⁴ or Z⁵ comprises a diagnostic or therapeutic agent, the remaining Z moieties retaining their natural vitamin B₁₂ configuration; J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine; R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ all retain their natural vitamin B₁₂ configuration; and R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl or amino.

Subembodiments 11-20: Any one of subembodiments 1-10, wherein the linker has a substantially constant molecular weight.

Subembodiments 21-30: Any one of subembodiments 1-10, wherein the linker is a polyamine of the following chemical structure: NR¹(alkylene-NR¹)_nalkyleneNR¹, wherein n is from 1 to 20, the carbon length of alkylene can vary within the n units and each R¹ is independently hydrogen, lower alkyl or T.

Subembodiments 31-40: Any one of subembodiments 1-10, wherein the linker is spermine, spermidine, decamethylene tetraamine or pentamethylene hexamine.

III. Stereoisomerism and Polymorphism

Compounds of the present invention having a chiral center may exist in and be isolated in optically active and racemic forms. Some compounds may exhibit polymorphism. The present invention encompasses racemic, optically-active, polymorphic, or stereoisomeric form, or mixtures thereof, of a compound of the invention, which possess the useful properties described herein. The optically active forms can be prepared by, for example, resolution of the racemic form by recrystallization techniques, by synthesis from optically-active starting materials, by chiral synthesis, or by chromatographic separation using a chiral stationary phase or by enzymatic resolution.

Additional compounds, intermediates, and synthetic preparations thereof are disclosed, for example, in Hogenkamp, H. et al., Synthesis and Characterization of nido-Carborane-Cobalamin Conjugates, Nucl. Med. & Biol., 2000, 27, 89-92; Collins, D., et al., Tumor Imaging Via Indium 111-Labeled DTPA-Adenosylcobalamin, Mayo Clinic Proc., 1999, 74:687-691.

IV. Definitions

"Cobalamin transport protein" refers to any of the protein carriers of vitamin B₁₂ or a biologically active metabolite or precursor thereof, including intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II or transcobalamin III. "Transcobalamin receptor" or "cobalamin receptor" refers to any receptor to which a cobalamin transport protein conjugate binds.

"Cobalamin" as used herein refers to vitamin B₁₂ or any of its adenosyl, methyl or cyano- derivatives.

Alkyl, alkoxy, alkenyl, alkynyl, etc. denote both straight and branched groups; but reference to an individual radical such as "propyl" embraces only the straight chain radical, a branched chain isomer such as "isopropyl" being specifically referred to.

The term alkyl, as used herein, unless otherwise specified, refers to a saturated straight, branched, or cyclic, primary, secondary, or tertiary hydrocarbon preferably of C₁ to C₁₀, and specifically includes methyl, ethyl, propyl, isopropyl, cyclopropyl, butyl, isobutyl, *t*-butyl, pentyl, cyclopentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, cyclohexyl,

WO 03/026674

PCT/US02/31038

cyclohexylmethyl, 3-methylpentyl, 2,2-dimethylbutyl, and 2,3-dimethylbutyl. The term includes both substituted and unsubstituted alkyl groups. Moieties with which the alkyl group can be substituted are selected from the group consisting of hydroxyl, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, cyano, sulfonic acid, sulfate, phosphonic acid, phosphate, or phosphonate, either unprotected, or protected as necessary, as known to those skilled in the art, for example, as taught in Greene, *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991, hereby incorporated by reference.

The term lower alkyl, as used herein, and unless otherwise specified, refers to a C₁ to C₄ saturated straight, branched, or if appropriate, a cyclic (for example, cyclopropyl) alkyl group, including both substituted and unsubstituted forms. Unless otherwise specifically stated in this application, when alkyl is a suitable moiety, lower alkyl is preferred. Similarly, when alkyl or lower alkyl is a suitable moiety, unsubstituted alkyl or lower alkyl is preferred.

The terms alkenyl and alkynyl refer to alkyl moieties wherein at least one saturated C-C bond is replaced by a double or triple bond. Thus, (C₂-C₆)alkenyl can be vinyl, allyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 3-butenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 3-pentenyl, 4-pentenyl, 1-hexenyl, 2-hexenyl, 3-hexenyl, 4-hexenyl, or 5-hexenyl. Similarly, (C₂-C₆)alkynyl can be ethynyl, 1-propynyl, 2-propynyl, 1-butylnyl, 2-butylnyl, 3-butylnyl, 1-pentylnyl, 2-pentylnyl, 3-pentylnyl, 4-pentylnyl, 1-hexynyl, 2-hexynyl, 3-hexynyl, 4-hexynyl, or 5-hexynyl.

The term "alkylene" refers to a saturated, straight chain, divalent alkyl radical of the formula -(CH₂)_n-, wherein n can be 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10.

The term heteroalkyl refers to an alkyl group that contains a heteroatom in the alkyl chain, including O, S, N, or P, and wherein the heteroatom can be attached to other substituents (including R¹⁵) to complete the valence. Nonlimiting examples of heteroalkyl moieties include polyoxyalkylene, and when divalent, -(CH₂O)_n- wherein n is an integer of from 0 to 20

The term alkoxy, as used herein, and unless otherwise specified, refers to a moiety of the structure -O-alkyl, wherein alkyl is as defined above.

As used herein, with exceptions as noted, "aryl" is intended to mean any stable monocyclic, bicyclic or tricyclic carbon ring of up to 8 members in each ring, wherein at least one ring is aromatic as defined by the Huckel $4n+2$ rule. Examples of aryl ring systems include phenyl, naphthyl, tetrahydronaphthyl and biphenyl. The aryl group can be substituted with one or more moieties selected from the group consisting of hydroxyl, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, cyano, sulfonic acid, sulfate, phosphonic acid, phosphate, or phosphonate, either unprotected, or protected as necessary, as known to those skilled in the art, for example, as taught in Greene, *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991.

The term heterocycle or heterocyclic, as used herein except where noted represents a stable 5- to 7-membered monocyclic or stable 8- to 11-membered bicyclic heterocyclic ring which is either saturated or unsaturated, and which consists of carbon atoms and from one to three heteroatoms selected from the group consisting of N, O and S; and wherein the nitrogen and sulfur heteroatoms may optionally be oxidized, and the nitrogen heteroatom may optionally be quaternized, and including any bicyclic group in which any of the above-defined heterocyclic rings is fused to a benzene ring. The heterocyclic ring may be attached at any heteroatom or carbon atom that results in the creation of a stable structure.

The term purine or pyrimidine base includes, but is not limited to, adenine, N⁶-alkylpurines, N⁶-acylpurines (wherein acyl is C(O)(alkyl, aryl, alkylaryl, or arylalkyl), N⁶-benzylpurine, N⁶-halopurine, N⁶-vinylpurine, N⁶-acetylenic purine, N⁶-acyl purine, N⁶-hydroxyalkyl purine, N⁶-thioalkyl purine, N²-alkylpurines, N²-alkyl-6-thiopurines, thymine, cytosine, 5-fluorocytosine, 5-methylcytosine, 6-azapyrimidine, including 6-azacytosine, 2- and/or 4-mercapto-pyrimidine, uracil, 5-halouracil, including 5-fluorouracil, C⁵-alkyl-pyrimidines, C⁵-benzylpyrimidines, C⁵-halopyrimidines, C⁵-vinylpyrimidine, C⁵-acetylenic pyrimidine, C⁵-acyl pyrimidine, C⁵-hydroxyalkyl purine, C⁵-amidopyrimidine, C⁵-cyano-pyrimidine, C⁵-nitropyrimidine, C⁵-aminopyrimidine, N²-alkylpurines, N²-alkyl-6-thiopurines, 5-azacytidinyl, 5-azauracilyl, triazolopyridinyl, imidazolopyridinyl, pyrrolopyrimidinyl, and pyrazolopyrimidinyl. Purine bases include, but are not limited to, guanine, adenine, hypoxanthine, 2,6-diamino-purine and 6-chloropurine. Functional oxygen and nitrogen groups on the base can be protected as necessary or desired. Suitable protecting groups are well known to those skilled in the art, and include trimethylsilyl, dimethylhexylsilyl, *t*-butyldimethylsilyl and *t*-butyldiphenylsilyl, trityl, alkyl groups, and acyl groups such as acetyl and propionyl, methanesulfonyl, and *p*-toluenesulfonyl.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

The term aralkyl, as used herein, and unless otherwise specified, refers to an aryl group as defined above linked to the molecule through an alkyl group as defined above. The term alkaryl, as used herein, and unless otherwise specified, refers to an alkyl group as defined above linked to the molecule through an aryl group as defined above.

5 Halo is fluoro, chloro, bromo or iodo.

The term acyl refers to a carboxylic acid ester in which the non-carbonyl moiety of the ester group is selected from straight, branched, or cyclic alkyl or lower alkyl, alkoxyalkyl including methoxymethyl, aralkyl including benzyl, aryloxyalkyl such as phenoxyethyl, aryl including phenyl optionally substituted with halogen, C₁ to C₄ alkyl or
10 C₁ to C₄ alkoxy, sulfonate esters such as alkyl or aralkyl sulphonyl including methanesulfonyl, the mono, di or triphosphate ester, trityl or monomethoxytrityl, substituted benzyl, trialkylsilyl (e.g. dimethyl-t-butylsilyl) or diphenylmethylsilyl. Aryl groups in the esters optimally comprise a phenyl group. The term "lower acyl" refers to an acyl group in which the non-carbonyl moiety is lower alkyl.

15 The term amino, as used herein, refers to a moiety represented by the structure -NR₂, and includes primary amines, and secondary, and tertiary amines substituted by alkyl (i.e. alkylamino). Thus, R₂ may represent two hydrogens, two alkyl moieties, or one hydrogen and one alkyl moiety.

20 The term amido, as used herein, refers to a moiety represented by the structure -C(O)NR₂, wherein R₂ is as defined for amino.

As used herein, "adenosyl" is an adenosine radical attached to the 6-position of cobalamin via the 5' position of adenosine.

25 As used herein, an "amino acid" is a natural amino acid residue (e.g. Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Val) in D or L form, or an unnatural amino acid (e.g. phosphoserine; phosphothreonine; phosphotyrosine; hydroxyproline; gamma-carboxyglutamate; hippuric acid; octahydroindole-2-carboxylic acid; statine; 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid; penicillamine; ornithine; cituline; α-methyl-alanine; para-benzoylphenylalanine; phenylglycine; propargyl-glycine; sarcosine; and tert-butylglycine) residue having one or
30 more open valences. Other unnatural amino acids include those represented by the formula

WO 03/026674

PCT/US02/31038

NH₂ (CH₂)_y COOH, wherein y=2-20, and preferably 2-12, and include the aminoalkanoic acids such as ϵ -amino caproic acid (H₂N-(CH₂)₅-COOH).

5 The term also comprises natural and unnatural amino acids bearing amino protecting groups such as acetyl, acyl, trifluoroacetyl, and benzyloxycarbonyl), as well as natural and unnatural amino acids protected at carboxy with protecting groups such as a C₁-C₆ alkyl, phenyl or benzyl ester and amide. Other suitable amino and carboxy protecting groups are known to those skilled in the art. See for example, T. W. Greene, Protecting Groups in Organic Synthesis; Wiley: New York, 1981; D. Voet, Biochemistry, Wiley: New York, 1990; L. Stryer, Biochemistry, (3rd Ed), W. H. Freeman and Co.: New York, 1975; J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, (2nd Ed.), McGraw Hill: New York, 1977; F. Carey and R. Sundberg, Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, (2nd Ed.), Plenum: New York, 1977; and references cited therein.

15 As used herein, a "peptide" is a sequence of 2 to 25 amino acids (e.g. as defined hereinabove) or peptidic residues having one or more open valences. The sequence may be linear or cyclic. For example, a cyclic peptide can be prepared or may result from the formation of disulfide bridges between two cysteine residues in a sequence.

20 The term host, as used herein, refers to a unicellular or multicellular organism in which the infectious agent can replicate, including cell lines and animals, and preferably a human. Alternatively, the host can be carrying a part of the infectious agent's genome, whose replication or function can be altered by the compounds of the present invention. The term host specifically refers to infected cells, cells transfected with all or part of the infectious agent's genome and animals, in particular, primates (including chimpanzees) and humans. In most animal applications of the present invention, the host is a human patient. 25 Veterinary applications, in certain indications, however, are clearly anticipated by the present invention (such as chimpanzees).

30 The term "residue" is used throughout the specification to describe any pharmaceutically acceptable form of a diagnostic or therapeutic agent, which, upon administration to a patient, does not inhibit the action of the agent. As a non-limiting example, a pharmaceutically acceptable residue of an agent is one that is modified to facilitate binding to the cobalamin or the compound of Formula I, covalently, ionically or through a chelating agent, such that the modification does not inhibit the biological action of

WO 03/026674

PCT/US02/31038

the agent, in that it does not inhibit the drug's ability to modulate the disease. In a preferred embodiment, the residue refers to the agent with an open valence state such that covalent bonding to the compound is possible. This open valence state can be achieved by any means known in the art, including the methodology described herein. In a preferred embodiment, the open valence state is achieved through the removal of an atom, such as hydrogen, to activate a functional group.

The term "pharmaceutically acceptable salt or prodrug" is used throughout the specification to describe any pharmaceutically acceptable form (such as an ester, mono-, di- or tri-phosphate ester, salt of an ester or a related group) of a TC- or IF- binding carrier, which, upon administration to a patient, provides the active compound. Pharmaceutically acceptable salts include those derived from pharmaceutically acceptable inorganic or organic bases and acids. Suitable salts include those derived from alkali metals such as potassium and sodium, alkaline earth metals such as calcium and magnesium, among numerous other acids well known in the pharmaceutical art. Pharmaceutically acceptable prodrugs refer to a compound that is metabolized, for example hydrolyzed or oxidized, in the host to form the compound of the present invention. Typical examples of prodrugs include compounds that have biologically labile protecting groups on a functional moiety of the active compound. Prodrugs include compounds that can be oxidized, reduced, aminated, deaminated, hydroxylated, dehydroxylated, hydrolyzed, dehydrolyzed, alkylated, dealkylated, acylated, deacylated, phosphorylated, dephosphorylated to produce the active compound. The compounds of this invention possess activity against infectious disease or are metabolized to a compound that exhibits such activity.

V. Diagnostic or Therapeutic Radionuclides

When a detectable radionuclide (e.g., metallic radionuclide) or paramagnetic metal atom is linked to the residue of a compound by a suitable linker, the structure of the linker is not crucial, provided it provides a compound of the invention which has an effective therapeutic and/or diagnostic index against the target cells, and which will localize in or near the disease.

Suitable linkers include linkers that separate the residue of a compound and the detectable radionuclide by about 5 angstroms to about 200 angstroms, inclusive, in length.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

5 Other suitable linkers include linkers that separate the residue of a compound of formula I and the detectable radionuclide by about 5 angstroms to about 100 angstroms, as well as linkers that separate the residue of a compound and the detectable radionuclide by about 5 angstroms to about 50 angstroms, or by about 5 angstroms to about 25 angstroms. Suitable linkers are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,735,313.

10 The compounds disclosed herein can be prepared using procedures similar to those described in U.S. Patent Number 5,739,313, or using procedures similar to those described herein. Additional intermediates and synthetic preparations useful for preparing compounds of the present invention are disclosed, for example, in Hogenkamp, H. et al., *Synthesis and Characterization of nido-Carborane-Cobalamin Conjugates*, Nucl. Med. & Biol., 2000, 27, 89-92; Collins, D., et al., *Tumor Imaging Via Indium 111-Labeled DTPA-Adenosylcobalamin*, Mayo Clinic Proc., 1999, 74:687-691; U.S. Application Ser. No. 60/129,733 filed 16 April 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,874 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,753 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,873 filed 15 October 1999; and references cited therein.

15 The compounds disclosed herein can be prepared using procedures similar to those described in U.S. Patent Number 5,739,313, or using procedures similar to those described herein. The residue of an antibiotic can be linked to the residue of a compound of formula I as described hereinabove. The detectable radionuclide can be linked to the residue of a compound of formula I as described hereinabove. Additional intermediates and synthetic procedures useful for preparing intermediates of the invention are disclosed, for example, in Hogenkamp, H. et al., *Synthesis and Characterization of nido-Carborane-Cobalamin Conjugates*, Nucl. Med. & Biol., 2000, 27, 89-92; Collins, D., et al., *Tumor Imaging Via Indium 111-Labeled DTPA-Adenosylcobalamin*, Mayo Clinic Proc., 1999, 74:687-691; U.S. Application Ser. No. 60/129,733 filed 16 April 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,874 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,753 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,873 filed 15 October 1999; U.S. Patent No. 5,739,313; U.S. Patent No. 6,004,533; and references cited therein.

20 In general, the metallic radionuclides (i.e. metallic radioisotopes or metallic paramagnetic ions) include Antimony-124, Antimony-125, Arsenic-74, Barium-103, Barium-140, Beryllium-7, Bismuth-206, Bismuth-207, Cadmium-109, Cadmium-115m, Calcium-45, Cerium-139, Cerium-141, Cerium-144, Cesium-137, Chromium-51, Cobalt-

WO 03/026674

PCT/US02/31038

55, Cobalt-56, Cobalt-57, Cobalt-58, Cobalt-60, Cobalt-64, Copper-67, Erbium-169, Europium-152, Gallium-64, Gallium-68, Gadolinium-153, Gadolinium-157, Gold-195, Gold-199, Hafnium-175, Hafnium-175-181, Holmium-166, Indium-110, Indium-111, Iridium-192, Iron-55, Iron-59, Krypton-85, Lead-210, Lutetium-177, Manganese-54, Mercury-197, Mercury-203, Molybdenum-99, Neodymium-147, Neptunium-237, Nickel-63, Niobium-95, Osmium-185 + 191, Palladium-103, Platinum-195m, Praseodymium-143, Promethium-147, Protactinium-233, Radium-226, Rhenium-186, Rhenium-188, Rubidium-86, Ruthenium-103, Ruthenium-106, Scandium-44, Scandium-46, Selenium-75, Silver-110m, Silver-111, Sodium-22, Strontium-85, Strontium-89, Strontium-90, Sulfur-35, Tantalum-182, Technetium-99m, Tellurium-125, Tellurium-132, Thallium-204, Thorium-228, Thorium-232, Thallium-170, Tin-113, Tin-114, Tin-117m, Titanium-44, Tungsten-185, Vanadium-48, Vanadium-49, Ytterbium-169, Yttrium-86, Yttrium-88, Yttrium-90, Yttrium-91, Zinc-65 and Zirconium-95.

Specifically, the metallic radionuclide can be a diagnostic gamma emitter (e.g., Tc-99m, In-111, Iodine-131, or Iron-59); a diagnostic metallic positron emitting radionuclide (e.g., Bismuth-206, Bismuth-207, Cobalt-55, Gallium-64, Copper-67, Yttrium-86, or Yttrium-88); a paramagnetic diagnosis metal ion (e.g., Europium-152 or Gadolinium-157), or a diagnostic paramagnetic metal ion.

In general, the non-metallic radionuclide is a non-metallic paramagnetic atom (e.g. Fluorine-19); or non-metallic positron emitting radionuclide (e.g. Carbon-11, Fluorine-18, Iodine-12 or Bromine-76) or a nonmetallic gamma emitting radionuclide such as Iodine-123 or Iodine-131. Fluorine-19 is a suitable non-metallic paramagnetic for use the compounds of the present invention in part because there is typically little or no background noise associated with the diagnostic use of fluorine in the body of a mammal (e.g. human).

Compound of Formula I / Linker / Diagnostic Agent – Detectable Radionuclide

As used herein, a “detectable radionuclide” is any suitable radionuclide (i.e. radioisotope) capable of being detected in a diagnostic procedure *in vivo* or *in vitro*. Suitable detectable radionuclides include metallic radionuclides (i.e. metallic radioisotopes) and non-metallic radionuclides (i.e. non-metallic radioisotopes).

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Compound of Formula I / Linker / Therapeutic Agent – Therapeutic Radionuclide

As used herein, a “therapeutic radionuclide” is any suitable radionuclide (*i.e.*, radioisotope) that possesses therapeutic efficacy against an infectious disease *in vivo* or *in vitro*. Suitable therapeutic radionuclides include metallic radionuclides (*i.e.*, metallic radioisotopes).

5 Specifically, the metallic radionuclide can be a therapeutic metallic radionuclide (e.g., Actinium-223, Bismuth-212, Indium-111, Rhenium-186, Rhenium-188, Strontium-89, Tin-117m, and Yttrium-90) or a therapeutic paramagnetic metal ion (e.g., Gadolinium-157).

VI. Antibiotics as Therapeutic Agents

10 As used herein, an “antibiotic agent” is any compound having activity against either Gram-positive or Gram-negative organisms (*i.e.*, inhibits the growth or destroys the development of either Gram-positive or Gram-negative organisms) or alternatively a fungus, yeast, or virus. Stedman’s Medical Dictionary, Illustrated, (25th Ed.), Williams & Wilkins: Baltimore (1990) and Mosby’s Medical, Nursing, & Allied Health Dictionary, (5th Ed.), Mosby: St. Louis (1998).

15 Infectious diseases include, e.g., acute lower respiratory infections (e.g., pneumonia), lower urinary tract infections (UTI), tuberculosis (TB), Lyme’s disease, malaria, meningitis, meningitis caused by *Neisseria meningitis*, hepatitis, measles, neonatal tetanus, diarrheal diseases (e.g., including cholera, typhoid and dysentery), whooping cough (pertussis), intestinal worm diseases, and sexually transmitted diseases.

20 Some of the causative agents, and diseases associated with them, include Rotavirus, a major cause of infantile diarrhea worldwide; *Cryptosporidium parvum*, a parasite which causes acute and chronic diarrhea; *Legionella pneumophila*, the bacterium which causes potentially fatal Legionnaires’ disease; Ebola virus, which causes hemorrhagic fever - fatal in up to 80% of cases; Hantaan virus, which causes potentially fatal hemorrhagic fever with renal syndrome; *Campylobacter jejuni*, a bacterium which causes diarrhea; Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I), which causes lymphoma-leukemia; *Escherichia coli* O157:H7 strain of bacteria, which causes bloody diarrhea; HTLV-2 virus, which causes hairy cell leukemia; *Helicobacter pylori*, the bacterium associated with peptic ulcer disease and stomach cancer; Human immunodeficiency virus (HIV), which causes AIDS; Hepatitis

25

WO 03/026674

PCT/US02/31038

5 E virus, which causes epidemics of jaundice in hot climates; Human herpesvirus 6, which causes fever and rash; Hepatitis C virus, which causes liver cancer as well as liver disease; Guanarito virus, which causes Venezuelan hemorrhagic fever; *Vibrio cholerae* O139, which causes epidemic cholera; Sabia virus, which causes Brazilian hemorrhagic fever; and Human herpesvirus 8, associated with Kaposi's sarcoma in AIDS patients.

10 Suitable antibiotic agents are disclosed, e.g., in Physician's Desk Reference (PDR), Medical Economics Company (Montvale, NJ), (53rd Ed.), 1999; Mayo Medical Center Formulary, Unabridged Version, Mayo Clinic (Rochester, MN), January 1998; Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, (11th Ed.), Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ), 1989; University of Wisconsin Antimicrobial Use Guide, <http://www.medsch.wisc.edu/clinsci/amcg/amcg.html>; Introduction on the Use of the Antibiotics Guideline, Descriptions of Specific Antibiotic Classes, Thomas Jefferson University, http://jeffline.tju.edu/CWIS/OAC/antibiotics_guide/intro.html; and references cited therein.

15 Suitable antibiotics include, e.g., aminoglycosides, β -lactam antibiotics, cephalosporins, macrolides, miscellaneous antibiotics, penicillins, tetracyclines, antifungals, antimalarial agents, antituberculosis agents, antivirals, leprostatics, miscellaneous anti-infectives, quinolones, sulfonamides, urinary anti-infectives, nasal antibiotics, ophthalmic antibiotics, ophthalmic antivirals, ophthalmic quinalones, ophthalmic sulfonamides, skin and mucous membrane antibiotics, skin and mucous membrane antifungals, skin and mucous membrane antivirals, skin and mucous membrane miscellaneous anti-infectives, skin and mucous membrane scabicides and pediculicides, skin and mucous membrane antineoplasts, nitrofurans, and oxazolidinones. Physician's Desk Reference (PDR), Medical Economics Company (Montvale, NJ), (53rd Ed.), 1999 and Mayo Medical Center Formulary, Unabridged Version, Mayo Clinic (Rochester, MN), January 1998.

20 Aminoglycosides include, e.g., Amikacin (amikacin sulfate); Garamycin (gentamicin sulfate); Nebcin (tobramycin sulfate); Netromycin (netilmicin sulfate); Streptomycin Sulfate; and TOBI (tobramycin).

30 β -Lactam antibiotics include, e.g., Azactam (aztreonam); Cefotan (cefotetan); Lorabid (loracarbef); Mefoxin (cefoxitin); Merrem (meropenem); and Primaxin (imipenem and cilastatin for injectable suspension).

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Cephalosporins include, e.g., Ancef (cefazolin); Ceclor (cefaclor); Cedax (cefibuten); Cefizox (ceftizoxime sodium); Cefobid (cefoperazone sodium); Cefin (cefuroxime axetil); Cefzil (cefprozil); Ceptaz (ceftazidime); Claforan (cefotaxime); Duricef (cefadroxil monohydrate); Fortaz (ceftazidime); Keflex (cephalexin); Keflab (cephalexin HCl); Kefurox (cefuroxime); Kefzol (cefazolin); Mandol (cefamandole nafate); Maxipime (cefepime HCl); Monocid (cefonicid sodium); Omnicef (cefdinir); Rocephin (ceftriaxone); Suprax (cefixime); Tazicef (ceftazidime); Tazidime (ceftazidime); Vantin (cefepodoxime proxetil); and Zinacef (cefuroxime).

Macrolides include, e.g., Biaxin (clarithromycin); Dynabac (dirithromycin); E.E.S. 200 (Erythromycin Ethylsuccinate); E.E.S. 400 (Erythromycin Ethylsuccinate); Ery-Ped 200 (Erythromycin Ethylsuccinate); EryPed 400 (Erythromycin Ethylsuccinate); Ery-Tab (Erythromycin delayed-release tablets); Erythrocin Stearate (Erythromycin stearate); Ilosone (erythromycin estolate); PCE Dispertab (erythromycin particles in tablets); Pediazole (erythromycin ethylsuccinate and sulfisoxazole acetyl for oral suspension); Tao (troleandomycin); Zithromax (azithromycin); and Erythromycin.

It is appreciated that those skilled in the art understand that the antibiotic useful in the present invention is the biologically active compound present in any of the antibiotic drugs disclosed above. For example, Azactam (aztreonam) is typically available as an injectable solution. The antibiotic agent, however, is (z)-2-[[[(2-amino-4-thiazolyl) [(2S,3S)-2-methyl-4-oxo-1-sulfo-3-azetidiny] carbamoyl] methylene] amino] oxy]-2-methyl propionic acid. Physician's Desk Reference (PDR), Medical Economics Company (Montvale, NJ), (53rd Ed.), pp. 820-823, 1999.

As used herein, a "residue of an antibiotic" is a radical of an antibiotic having one or more open valences. Any synthetically feasible atom or atoms of the antibiotic can be removed to provide the open valence, provided activity against either Gram-positive or Gram-negative organisms is substantially retained when the radical is attached, either directly or via a linker, to a residue of a compound of formula I or provided the compound, upon being linked directly or by a linker to a detectable radionuclide or paramagnetic metal atom, can effectively image the infectious disease. Based on the linkage that is desired, one skilled in the art can select suitably functionalized starting materials that can be derived from an antibiotic using procedures that are known in the art.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Compound of Formula I / Linker / Therapeutic Agent – Antibiotic Agent

In addition to being directly linked to the residue of a compound, the residue of an antibiotic can also be linked to the residue of a compound by a suitable linker. The structure of the linker is not crucial, provided the resulting compound of the invention has an effective therapeutic index as an antibiotic drug and preferably can be orally administered. Suitable linkers are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,735,313; U.S. Application Ser. No. 60/129,733 filed 16 April 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,874 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,753 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,873 filed 15 October 1999; and references cited therein.

10 **VII. Cardiovascular Agents as Therapeutics**

The compounds of the invention can optionally be administered in conjunction with one or more known cardiovascular drugs. Suitable cardiovascular drugs are disclosed hereinabove as "cardiovascular agents."

As used herein, a "cardiovascular disease" is any abnormal condition characterized by the dysfunction of the heart or blood vessels. Some examples of cardiovascular diseases are disclosed, e.g., in Yale University School of Medicine Heart Book, Chapter 23, Cardiovascular Drugs, <http://www.info.med.yale.edu/library/heartbk>, April 16, 1999; Mosby's Medical, Nursing, & Allied Health Dictionary, (5th Ed.), Mosby, St. Louis, MO, 1998; and Stedman's Medical Dictionary, (25th Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1990.

Cardiovascular diseases include arteriosclerotic heart disease (*i.e.*, arteriosclerosis), angina pectoris, myocardial infarction, vascular diseases (e.g., peripheral vascular disease (PVD) and aneurysms), high blood pressure, hypertension, stroke (e.g., thrombotic stroke, hemorrhagic stroke, and embolic stroke), congestive heart failure, valvular disease, rheumatic heart disease, cardiac arrhythmias (e.g., atrial fibrillation, ventricular tachycardia, atrial arrhythmias, ventricular fibrillation, bradyarrhythmia, and premature ventricular contractions), pericarditis, myocarditis, endocarditis, and cardiomyopathies.

A "cardiovascular agent" is any compound useful to treat one or more abnormal conditions associated with the cardiovascular system. Suitable cardiovascular agents are disclosed, e.g., in Physician's Desk Reference (PDR), Medical Economics Company

WO 03/026674

PCT/US02/31038

(Montvale, NJ), (53rd Ed.), 1999; Mayo Medical Center Formulary, Unabridged Version, Mayo Clinic (Rochester, MN), January 1998; Yale University School of Medicine Heart Book: Chapter 23, Cardiovascular Drugs, <http://www.info.med.yale.edu/library/heartbk>, April 16, 1999; Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, (11th Ed.), Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ), 1989; and references cited therein.

Suitable cardiovascular agents include blood modifiers, adrenergic blockers (peripheral), adrenergic stimulants (central), alpha/beta adrenergic blockers, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, anti-arrhythmics (groups I, II, III and IV), miscellaneous anti-arrhythmics, 30 anti-lipemic agents, beta adrenergic blocking agents, calcium channel blockers, diuretics, hypertensive emergency agents, inotropic agents, miscellaneous cardiovascular agents, rauwolfia derivatives, vasodilators and vasopressors.

Suitable blood modifiers include anticoagulants (e.g., Coumadin (crystalline warfarin sodium); Fragmin (dalteparin sodium injection); Heparin Lock (heparin lock flush solution); Heparin sodium (heparin sodium); Lovenox (enoxaparin sodium); Normiflo (ardeparin sodium); Orgaran (danaparoid sodium)); antiplatelet agents (e.g., Aggrastat (tirofiban hydrochloride monohydrate); Agrylin (anagrelide hydrochloride); Ecotrin (enteric-coated aspirin); Flolan (epoprostenol sodium); Halfprin (enteric-coated aspirin); Integriilin (eptifibatide); Persantine (dipyridamole); Plavix (clopidogrel bisulfate); ReoPro (abciximab); and Ticlid (ticlopidine hydrochloride)); colony stimulating factors (e.g., Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) such as Neupogen (filgrastim); Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), such as Leukine (sagramostim)); and hematinics (e.g., Anabolic steroids, such as Anadrol-50 (oxymetholone); and Nascobal (cyanocobalamin); and Trinsicon (hematinic concentrate with intrinsic factor); and Erythropoietin, such as Epogen (epoetin alfa); and Procrit (epoetin alfa).

Suitable adrenergic blockers (peripheral) include Cardura (doxazosin mesylate); Dibenzylamine (phenoxybenzamine); Hylorrel (guanadrel sulfate); Hytrin (terazosin hydrochloride); Minipress (prazosin hydrochloride); and Minizide (prazosin hydrochloride/polythiazide).

Suitable adrenergic stimulants (central) include Aldoclor (methyldopa and chlorothiazide sodium); Aldomet (methyldopa); Aldomet ester HCL (methyldopate HCl);

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Aldoril (methyldopa and hydrochlorothiazide); Catapres (clonidine HCl); Catapres-TTS (clonidine); Clorpres (clonidine hydrochloride and 25 chlorthalidone); Combipres (clonidinehydrochloride and chlorthalidone); and Tenex (guanfacine).

5 Suitable alpha/beta adrenergic blockers include Coreg (carvedilol); Normodyne (Labetalol); and Trandate (Labetalol).

Suitable angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors include 30 Accupril (quinapril hydrochloride); Altace (ramipril); Captopril; Lotensin (benazepril hydrochloride); Mavik (trandolapril); Monopril (fosinopril sodium tablets); Prinivil (Lisinopril); Univas (moexipril hydrochloride); Vasotec (enalapril maleate); and Zestril (lisinopril).

10 Suitable angiotensin II receptor antagonists include Atacand (candesartan cilexetil); Avapro (irbesartan); Cozaar (losartan potassium); and Diovan (Valsartan) HClTM (Hydrochlorothiazide).

15 Suitable anti-arrhythmics, group I, include Cardioquin (quinidine polygalacturonate); Ethmozine (moricizine hydrochloride); Mexitil (mexiletine hydrochloride); Norpace (disopyramide phosphate); Norpace CR (controlled release disopyramide phosphate); Procanbid (procainamide hydrochloride extended-release tablets); Quinaglute (Quinidine); Quinidex (quinidine sulfate); Rythmol (propafenone hydrochloride); Tambocor (flecainide acetate); and Tenocard (tocainide HCl). Suitable anti-arrhythmics, group II, include Betapace (sotalol HCl); Brevibloc (esmolol hydrochloride); Inderal (Propranolol); and Sactal (acebutolol).

Suitable anti-arrhythmics, group III include Betapace (sotalol HCl); Cordarone (amiodarone); Corvert (ibutilide fumarate injection); and Pacerone (Amiodarone hydrochloride).

25 Suitable anti-arrhythmics, group IV, include Calan (verapamil); and Cardizem (diltiazem HCl).

Suitable miscellaneous anti-arrhythmics include Adenocard (adenosine); Lanoxicaps (digoxin); and Lanoxin (digoxin).

30 Suitable anti-lipemic agents include bile acid sequestrants (e.g., Colestid (microionized colestipol hydrochloride); .LoCholest (cholestyramine); and Questran (cholestyramine)); fibric acid derivatives (e.g., Atromid-S (clofibrate); Lopid (gemfibrozil);

WO 03/026674

PCT/US02/31038

and TriCor (fenofibrate capsules); HMG-CoA reductase inhibitors (e.g., Baycol (cerivastatin sodium tablets); Lescol (fluvastatin sodium); Lipitor (atorvastatin calcium); Mevacor (lovastatin); Pravachol (pravastatin sodium); and Zocor (simvastatin)); and Nicotinic Acid (e.g., Niaspan).

5 Suitable beta adrenergic blocking agents include Betapace (sotalol HCl); Blocadren (Timolol Maleate); Brevibloc (esmolol hydrochloride); Cartrol (carteolol hydrochloride); Inderal (propranolol hydrochloride); Kerlone (betaxolol hydrochloride); Levatol (Penbutolol sulfate); Lopressor (metoprolol tartrate); Sectral (acebutolol hydrochloride); Tenormin (atenolol); Toprol-XL (metoprolol succinate, extended release); and Zebeta (bisoprolol fumarate).

10 Suitable calcium channel blockers include Adalat (nifedipine); Adalat CC (nifedipine); Calan (verapamil hydrochloride); Calan SR (verapamil hydrochloride); Cardene (nicardipine hydrochloride); Cardizem CD (diltiazem hydrochloride); Cardizem (diltiazem hydrochloride); Cardizem SR (diltiazem hydrochloride); Covera-HS (verapamil hydrochloride); Dilator XR (diltiazem); DynaCirc (isradipine); DynaCirc CR (isradipine); Isoptin SR (verapamil hydrochloride); Nimotop (nimodipine); Norvasc (amlodipine besylate); Plendil (felodipine); Procardia (nifedipine); Procardia XL (nifedipine, extended release); Sular (nisoldipine); Tiazac (diltiazem hydrochloride); Vascor (bepridil hydrochloride); and Verelan (Vempamil Hydrochloride).

15 Suitable diuretics include carbonic anhydrase inhibitors (e.g., Daranide (dichlorophenamide)); loop diuretics (e.g., Demadex (torsemide); Edecrin (ethacrynic acid); Edecrin sodium (ethacrynic acid); and Lasix (furosemide)); potassium-sparing diuretics (e.g., Aldactone (Spironolactone); Dyrenium (triamterene); and Midamor (amiloride)); thiazides and related diuretics (e.g., Diucardin (hydroflumethazide); Diuril (chlorothiazide); Diuril sodium (chlorothiazide); Enduron (methyclothiazide); HydroDIURIL (hydrochlorothiazide (HCTZ)); Microzide (hydrochlorothiazide); Mykrox (metolazone); Renese (polythiazide); Thalitone (chlorthalidone USP); and Zaroxolyn (metolazone)).

20 Suitable hypertensive emergency agents include Hyperstat (diazoxide).

25 Suitable inotropic agents include Dobutrex (dobutamine hydrochloride); Lanoxicaps (digoxin); and Lanoxin (digoxin); and Primacor (milrinone lactate injection).

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Suitable miscellaneous cardiovascular agents include Demser (metyrosine); Inversine (Mecamylamine HCL); Regitine (phentolamine mesylate); and ReoPro (abciximab).

5 Suitable rauwolfia derivatives include Diupres (reserpine and chlorothiazide); and Hydropres (reserpine and hydrochlorothiazide).

Suitable vasodilators include coronary vasodilators (e.g., Deponit (Transdermal Nitroglycerin); Dilatrate-SR (isosorbide dinitrate sustained release); Imdur (isosorbide mononitrate); Ismo (isosorbide mononitrate); Isordil (isosorbide dinitrate); Monoket (isosorbide mononitrate); Nitro-Bid (nitroglycerin); Nitro-Dur (nitroglycerin); Nitrolingual (Nitroglycerin in propellants, Dichlorodifluoromethane and Dichlorotetrafluoromethane); Nitrostat (nitroglycerin); Sorbitrate (isosorbide dinitrate); and Transderm-Nitro (nitroglycerin)); peripheral vasodilators (e.g., Corlopam (fenoldopam mesylate); Flolan (epoprostenol sodium); and Primacor (milrinone lactate injection)).

15 Suitable vasopressors include Ana-Kit (epinephrine); Aramine (Metaraminol bitartrate); EpiPen (epinephrine); ProAmatine (midodrine hydrochloride); and Vasoxyl (methoxamine hydrochloride).

It is appreciated that those skilled in the art understand that the cardiovascular agent useful in the present invention is the biologically active compound present in any of the cardiovascular compositions disclosed above. For example, Cardizem (diltiazem HCL) is typically available as an injectable, as a sustained release capsule and as a direct compression tablet. The cardiovascular agent, however, is (+)-cis-1,5-benzothiazepin-4(5H)one,3-(acetyloxy)-5-[2-(dimethyl-amino)ethyl]-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-monohydro-chloride. Physician's Desk Reference (PDR), Medical Economics Company (Montvale, NJ), (53rd Ed.), pp. 1311-1318, 1999.

Compound of Formula I / Linker / Therapeutic Agent – Cardiovascular Agent

25 In addition to being directly linked to the residue of a compound, the residue of a cardiovascular agent can also be linked to the residue of a compound by a suitable linker. The structure of the linker is not crucial, provided the resulting compound of the invention has an effective therapeutic index as a cardiovascular drug and preferably can be orally administered. Suitable linkers are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,735,313; 30 U.S. Application Ser. No. 60/129,733 filed 16 April 1999; U.S. Application Ser. No.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

60/159,874 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,753 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,873 filed 15 October 1999; and references cited therein.

VIII. Antiproliferative Agents as Therapeutics

5 Proliferative disorders are currently treated by a variety of classes of compounds including alkylating agents, antimetabolites, natural products, enzymes, biological response modifiers, miscellaneous agents, hormones and antagonists, such as those listed below.

Alkylating Agents include (1) nitrogen mustards: Mechlorethamine, Cyclophosphamide Ifosfamide, Melphalan (L-sarcosine), Chlorambucil; (2) Ethylenimines and Methylmelamines: Hexamethylmelamine, Thiotepa; (3) Alkyl Sulfonates: Busulfan, (4) 10 Nitrosoureas: Carmustine (BCNU), Lomustine (CCNU), Semustine (methyl-CCNU), Streptozocin (streptozocin); and (5) Triazines: Dacarbazine (DTIC; dimethyltriazenoimidazolecarboxamide).

Antimetabolites include (1) Folic Acid Analogs: Methotrexate (amethopterin); (2) 15 Pyrimidine Analogs: Fluorouracil (5-fluorouracil; 5-FU) Floxuridine (fluorodeoxyuridine; FUDR), Cytarabine (cytosine arabinoside); (3) Purine Analogs: Mercaptopurine (6-mercaptopurine; 6-MP), Thioguanine (6-thioguanine: TG), Pentostatin (2'-deoxycyclofomycin); (4) Vinca Alkaloids: Vinblastine (VLB), Vincristine; and (5) Epidodophyl-toxins: Etoposide, Teniposide.

20 Hormones and Antagonists include (1) Estrogens: Diethylstilbestrol Ethinyl estradiol; (2) Antiestrogen: Tamoxifen; (3) Androgens: Testosterone propionate Fluoxymesterone; (4) Antiandrogen: Flutamide; and (5) Gonadotropin-Releasing Hormone Analog: Leuprolide.

25 Other miscellaneous agents useful in the treatment of abnormal cellular proliferation include (1) Antibiotics: Dactinomycin (actinomycin D), Daunorubicin (daunomycin; rubidomycin), Doxorubicin, Bleomycin, Plicamycin (mithramycin), Mitomycin (mitomycin C); (2) Enzymes: L-Asparaginase; (3) Biological Response Modifiers: Interferon- α ; (4) 30 Platinum Coordination Complexes: Cisplatin (cis-DDP), Carboplatin; (5) Anthracenedione: Mixtozantrone; (6) Substituted Urea: Hydroxyurea; (7) Methylhydrazine Derivative: Procarbazine (N-methylhydrazine, MIH); (8) Adrenocortical Suppressant: Miotane (o,p'-

WO 03/026674

PCT/US02/31038

DDD), Aminoglutethimide; (9) Adrenocorticosteroids: Prednisone; and (10) Progestins: Hydroxprogesterone caproate, Medroxyprogesterone acetate, Megestrol acetate.

5 It has been discovered that a neutron capture agent such as a molecule comprising Boron-10, for the treatment of a proliferative disorder, is highly and effectively absorbed into a site of unwanted proliferation by direct or indirect attachment to a compound that binds to a cobalamin transport protein for vitamin B₁₂ (*i.e.* transcobalamin I, II or III, or intrinsic factor) (the TC- or IF-binding carrier) in a manner that allows binding to a transcobalamin receptor (TR). Subsequent initiation of neutron capture therapy will selectively destroy abnormally proliferating cells.

10 It is preferred that the cobalamin or compound of Formula I and the neutron capture agent be administered parenterally, not orally, to increase bioavailability and delivery to proliferative tissue. Importantly, it has been discovered that oral administration of the cobalamin or compound of Formula I/neutron capture agent provides insufficient bioavailability to treat proliferative disorders. It is important, and perhaps essential, to administer the neutron capture agent in a manner that does not rely on the ileal intrinsic factor receptor binding absorption pathway of the active agent.

Compound of Formula I / Linker / Therapeutic Agent – Antiproliferative Agent

15 In addition to being directly linked to the residue of a compound, the residue of an antiproliferative agent can also be linked to the residue of a compound by a suitable linker. The structure of the linker is not crucial, provided the resulting compound of the invention has an effective therapeutic index as an antiproliferative drug and preferably can be orally administered. Suitable linkers are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,735,313; U.S. Application Ser. No. 60/129,733 filed 16 April 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,874 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,753 filed 15 October 1999; U.S. Application Ser. No. 60/159,873 filed 15 October 1999; and references cited therein.

20 Thus, in one embodiment the invention provides a neutron capture conjugate having a high specificity for abnormally proliferative cells, comprising (1) a cobalamin or a compound of Formula I, (2) a neutron capture agent linked directly or through a linker to the cobalamin or compound of Formula I, wherein the linker has either (i) a unimodal (*i.e.*, single) and defined molecular weight, or (ii) a molecular weight less than about 2000, and

WO 03/026674

PCT/US02/31038

preferably, below 1900, 1800 or 1500; and (3) a cobalamin transport protein (such as IF or TC-I, II or III).

IX. Antisense Oligonucleotides as Therapeutic Agents

5 The present invention can be utilized to deliver polynucleic acids, to various kinds of organisms, preferably mammals, more preferably humans, in need thereof by suitably selecting a polynucleic acid sequence in compliance with its use and conjugating the polynucleic acid sequence to a ligand for the transcobalamin receptor or a ligand for the intrinsic factor-cobalamin receptor. The polynucleic acids can be conjugated to a complex of cobalamin transport protein bound to a cobalamin or a compound of Formula I. The present invention can be used to treat diseases by delivering to cells expressing transcobalamin receptors or IF receptors nucleic acid sequences that regulate the expression of specific genes or encode for specific proteins or fragments of proteins.

10 The polynucleic acid can be any antisense oligonucleotide (optionally a stabilized oligonucleotide), PNA or MNA of short (less than 20 nucleotides), intermediate (between 20 and 100 nucleotides) or long chain length (greater than 100 nucleotides), as desired, doubly or singly stranded. In a preferred embodiment the polynucleic acid sequence can be an antisense RNA, an antisense oligonucleotide, antisense PNA or antisense MNA of 20 nucleotides or less.

20 In particular, the antisense nucleotides that can be conjugated to the carriers of the present invention are distinguished in Table I.

Table I

Name and Sponsor	Sequence	Target/Disease	Status (Phase)
Fomivirsen (Isis)	GCGTTTGCTCTTCTT CTTGCG	IE-2/CMV Retinitis	FDA

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Name and Sponsor	Sequence	Target/Disease	Status (Phase)
2302 (Isis)	GCCCAAGCTGGCATCCGTCA	3'-UTR/ICAM-1, Crohn's Disease, Psoriasis, Rheumatoid Arthritis, Ulcerative Colitis, Renal Allograft	II A/B
3521/CPG, 64128A (Isis/Novartis)	GTTCTCGTGGTGAGTTTCA	3'-UTR/PKC- α , Ovarian Cancer	II A
5132/CPG, 69846A (Isis/Novartis)	TCCCGCCTGTGACATGCATT	c-RAF kinase, Breast, prostate, colon, brain, ovarian cancer	I/II
2503 (Isis)	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	Ha-ras oncogene variety of solid tumors	I
G3139 (Genta)	TCTCCAGCGTGCGCCAT	bcl-2, Proto-oncogene, Non-Hodgkin's, Lymphoma, Prostate, Breast	I/II A
LR3280 (Lynx)	AACGTTGAGGGCAT	c-myc/proto-oncogene, Stent Restenosis	I
LR3001 (Lynx)	TATGCTGTGCCGGGG TCTTCGGGC	c-myb, Proto-oncogene, Chronic Myeloid, Leukemia	II
LR4437 (Lynx)	GGACCTCCTCCGGA GCC	IGF-IR, Ex-vitro tumor cells	I
GEM-132 (Hybridon)	<u>UGGGGCTTACCTTGC GAACA</u>	Intron-exon, UL36/27, CMV-retinitis	I/II
GEM-92 (Hybridon)	<u>UCGCACCCATCTCTC TCCUUC</u>	Gag/HIV-1, AIDS	I
GEM-231 (Hybridon)	<u>GCGUGCCTCCTCACU GGC</u>	pka-1, Refractory Solid Tumors	I
GPI-2A (Novopharm)	G(ps)GTTC(ps)TTTTG(ps)G(ps)TCC(p s)TTG(ps)TC(ps)T	Gag/HIV-1, AIDS	I

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Name and Sponsor	Sequence	Target/Disease	Status (Phase)
13312 (Isis)	GC(ps) <u>GTTTGC</u> (ps)TC(ps)TTC(ps)TT C(ps)TTGCG	IE-2, CMV retinitis	I

Note: The underlined bases in GEM-132, GEM-92, and GEM-231 are 2'OMe sugar modifications.

In GPI-2A, there are seven PS linkages represented by (ps) and the rest of the oligo is a phosphodiester.

- 5 In 13312, the underlined bases are 2'-O(CH₂)₂OCH₃ sugar modifications and all U and C residues are 5-methyl substituted.

Cited from: Sanghvi, Y. S. et al. in Manuals of Antisense Methodology. Eds., Hartmann, G., and Endres, S., Kluwer Academic Publisher, 1998, In Press.

10 X. Cobalamin Transport Proteins

In humans, the average daily intake (in a Western diet) of vitamin B₁₂ is about 4-5 µg. Additional synthesis of cobalamin may be produced in the ileum and the right colon, but in an unknown amount. The total lumenal cobalamin that must be assimilated each day in humans is estimated at 7-14 µg, the sum of the dietary and endogenous cobalamin.

15 Intestinal epithelial cells possess carriers and transporters that are highly efficient in the uptake of the small products of digestion, such as vitamins, minerals and amino acids. These mechanisms are necessary for the uptake of these molecules, as the epithelial cell layer presents an almost impenetrable barrier to peptides larger than five or six amino acids in size. The cobalamins of the present invention are large molecules that are not absorbed

20 directly from the intestine, as they are too big to diffuse across the intestinal wall. Therefore, the absorption of the cobalamins is dependent upon transport proteins. The uptake of vitamin B₁₂ from the intestine to the blood is perhaps the most complex uptake mechanism of all the vitamins, involving at least four separate cobalamin binding proteins and receptors.

25 Three distinct groups of transport proteins are involved in the absorption and transport of cobalamins: intrinsic factor (IF), haptocorrin (HC; also called R-protein; in which transcobalamin I (TC-I) and transcobalamin III (TC-III) are members) and transcobalamin II (TC-II). Both IF and TC II deficiencies lead to abnormalities such as

WO 03/026674

PCT/US02/31038

megaloblastic anemia and demyelinating disorder of the nervous system. Each protein only has one subunit and one binding site to cobalamin. IF is a 45 kDa (in humans) to 55 kDa (in hogs) plasma glycoprotein with 15% carbohydrate content. HC's are 58 kDa (in humans) to 60 kDa (in rabbits) plasma glycoproteins of 33-40% carbohydrate content with 16-19 sialic acid residues. Human TC-II is a 43 kDa plasma protein (in humans) with 0% carbohydrate content. Each binding protein has a separate affinity for cobalamin, as well as separate cell receptors. Generally, cobalamin is initially bound by HC in the stomach, followed by IF in the small intestine. An IF receptor is then involved in the uptake of the IF-cobalamin complex by the intestinal epithelial cell, leading to the proteolytic release of cobalamin, and subsequent binding to TC-II.

Intrinsic factor (IF) and haptocorrin (HC; are the main intestinal luminal cobalamin binders. In particular IF is of particular relevance to the field of oral peptide and protein delivery. Therefore, IF is mainly produced in the gastric body and medium sized ducts and HC is mainly produced in granulocytes, the yolk sac, mammary glands, salivary acini and ducts. In general, in plasma or serum, cobalamin is also bound to HC (derived from white cells) or to TC-II. The former complex is taken up by the liver, delivering free cobalamin to the intestinal lumen as the first limb of an enterohepatic circulation.

IF is the most specific of the cobalamin-binding proteins. Cyanocobalamin, hydroxy-cobalamin (HOCbl), methylcobalamin (MeCbl) and adenosylcobalamin (AdoCbl) bind to intrinsic factor with similar affinities, thereby suggesting that the upper β -axial ligand of the cobalt does not influence the binding significantly. However, after dietary release of vitamin B₁₂, the affinity for the cobalamin for IF is reduced, due to the low pH. Rather, the released vitamin B₁₂ is preferentially bound to salivary HC, as HC may protect the vitamin from acid hydrolysis (possibly due to the extensive glycosylation of HC).

HC comprises a group of immunologically identical proteins secreted into many body fluids (plasma, milk, amniotic fluid, saliva and gastric juices) from many types of cells (granulocytes, mammary glands, yolk sac or visceral placental membranes, salivary duct and acinar cells, and gastric mucosa of some species). These proteins were known previously as R proteins (for rapid electrophoresis), non-intrinsic factors or transcobalamin I and III. They are characterized by different glycosylation processes and account for much of the total bound cobalamin in the serum (about 80% of bound cobalamin in serum). HC turns over very slowly ($t_{1/2}$ = 10 days) and appears to serve as the major storage protein for

WO 03/026674

PCT/US02/31038

cobalamin and may also stabilize serum cobalamin against transdermal photolysis (Allen, R. H. *Prog Hematol*. 1975, 9, 57-84).

5 Within the proximal small intestine, HC is degraded by pancreatic enzymes, freeing cobalamin to combine with other transport proteins, most notably IF. In contrast to HC's, the IF-cobalamin complex is resistant to proteolytic digestion. Once the cobalamin-transport protein is internalized via receptor-mediated endocytosis, the cobalamin is cleaved from transport protein via protease(s) and bound to transcobalamin II (TC II). From there, the TC II-cobalamin complex is used for the transport of absorbed cobalamin to peripheral tissues. Therefore, TC-II is found in most tissues. Antibodies to TC II inhibit the transport of cobalamins and block the proliferation of leukemic cells in vitro (McLean, G. R. et al. *Blood*, 1997, 89, 235-242). In cow's milk, in particular, the major cobalamin binder is not HC, but rather TC-II (Fedosov, S. N. et al. *Biochemistry* 1995, 34, 16082-16087 and Fedosov, S. N. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1292, 113-119).

15 Early attempts to purify transport proteins utilized conventional techniques such as ammonium sulfate fractionation, ion exchange and size exclusion chromatography. These methods yielded a product that was devoid of the other types transport proteins, and in particular, separation of TC-II from TC-I was possible, but contained other plasma proteins. The introduction of affinity chromatography provided pure proteins even in extremely low concentrations. Three main types of affinity columns have been used to purify the transport proteins, in particular, columns containing cobalamin coupled to different matrices. The first was a monocarboxylic acid derivative of cobalamin linked to Sepharose beads via a diamino-dipropylamine spacer arm (Allen, R. H. et al. *J. Biol Chem*, 1972, 247, 7695-7701 and Allen, R. H. et al. *J. Biol Chem*, 1973, 248, 3660-3669). However, it may be necessary to use a chaotropic reagent to elute the protein from the matrix, possibly resulting in a denatured transport protein, which may not be able to renature. For instance, the elution of the bound protein from Cohn fraction III of human plasma, a mixture that contains 27-40% of the plasma TC-II, required the use of guanidine hydrochloride to release the denatured TC-II, which could not be renatured.

25 To avoid the use of chaotropic reagents, temperature- or photolabile linkages between the cobalamin and the insoluble matrix were developed (Nexo, E. "Cobalamin binding proteins," in *Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins*, eds Krantler, B.; Arigoni, D. and Golding, B. T.; Wiley & Sons, Ltd. 461-475). Matrices formed in this manner are able to

WO 03/026674

PCT/US02/31038

release the transport protein by dissociating the cobalamin from the matrix, thus providing the transport protein saturated with cobalamin, circumventing the denaturant effect of chaotrophic agents.

5 In a preferred embodiment, for large scale purification of transport protein, ion exchange chromatography or ammonium sulfate fractionation is used prior to the purification of the transport protein via an affinity column to concentrate the sample. In an alternate embodiment, ion exchange or size exclusion chromatography is used subsequent to the purification of the transport protein via an affinity column.

XI. Pharmaceutical Dosage Forms

10 The mode of administration of the cobalamin or compound of Formula I conjugated to a diagnostic or therapeutic agent, bound to a cobalamin transport protein such as intrinsic factor or transcobalamin I, II or III will depend upon the location and nature of the disease, as known to workers skilled in the art. The cobalamin or compound of Formula I conjugated to a diagnostic or therapeutic agent, bound to a cobalamin transport protein such as intrinsic factor or transcobalamin I, II or III can be formulated as pharmaceutical compositions and administered to a mammalian host such as a human patient in a variety of forms adapted to the chosen route of administration, *i.e.*, orally or parenterally, by intravenously, intramuscularly, or subcutaneously, sublingually, mucosally (e.g. nasally), 15 inhalation, transdermally, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intraorbital, intracapsular, ophthalmically, intraspinal, intrasternal, topical, transdermal patch, via rectal, vaginal or urethral suppository, peritoneal, percutaneous, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter. For standard information on pharmaceutical formulations, see Ansel, *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Sixth Edition, Williams & Wilkins (1995).

25 The cobalamin or compound of Formula I/diagnostic or therapeutic agents/cobalamin transport protein can, for example, be administered intravenously or intraperitoneally by infusion or injection. Solutions of the substance can be prepared in water, optionally mixed with a nontoxic surfactant. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, triacetin and mixtures thereof and in oils. Under

WO 03/026674

PCT/US02/31038

ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

5 The pharmaceutical dosage forms suitable for injection or infusion can include sterile aqueous solutions or dispersions or sterile powders comprising the substance which are adapted for the extemporaneous preparation of sterile injectable or infusible solutions or dispersions, optionally encapsulated in liposomes. In all cases, the ultimate dosage form must be sterile, fluid and stable under the conditions of manufacture and storage. The liquid carrier or vehicle can be a solvent or liquid dispersion medium comprising, for example, water, normal saline, ethanol, a polyol (for example, glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycols and the like), vegetable oils, nontoxic glyceryl esters and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the formation of liposomes, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions or by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, benzyl alcohol, sorbic acid, thimerosal and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, buffers or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

20 Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the substance in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filter sterilization. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze drying techniques, which yield a powder of the active ingredient plus 25 any additional desired ingredient present in the previously sterile-filtered solutions.

Injectable solutions are particularly advantageous for local administration of the therapeutic composition. In particular, parenchymal injection can be used to deliver the therapeutic composition directly to a tumorous growth. Intra-articular injection is a preferred alternative in cases of arthritis where the practitioner wishes to treat one or only a few (such as 2-6) joints. Additionally, the therapeutic compounds are injected directly into lesions (intra-lesion administration) in appropriate cases. Intradermal administration is an alternative for dermal lesions.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

5 The therapeutic compound is optionally administered topically by the use of a transdermal therapeutic system (see, Barry, *Dermatological Formulations*, (1983) p. 181 and literature cited therein). Transdermal drug delivery (TDD) has several advantages over oral delivery. When compared to oral delivery, TDD avoids gastrointestinal drug metabolism, reduces first pass effects and provides a sustained release of drugs for up to seven days (Elias, *et al. Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*; Marcel Dekker, NY: 1, 1989). This method is especially useful with many therapeutic proteins that are susceptible to gastrointestinal degradation and exhibit poor gastrointestinal uptake. When compared to injections, TDD eliminates the associate pain and the possibility of infection. While such topical delivery systems have been designed largely for transdermal administration of low molecular weight drugs, by definition they are capable of percutaneous delivery. They can be readily adapted to administration of the therapeutic compounds of the invention by appropriate selection of the rate-controlling microporous membrane. Topical application can also be achieved by applying the compound of interest, in a cream, lotion, ointment or oil based carrier, directly to the skin. Typically, the concentration of therapeutic compound in a cream, lotion or oil is 1-2%.

10 For drug targeting to lung tissue, the therapeutic compound is formulated into a solution, suspension, aerosol or particulate dispersion appropriate for application to the pulmonary system. The therapeutic agent may be inhaled via nebulizer, inhalation capsule, inhalation aerosol, nasal solution, intratracheal as a solution via syringe or endotracheal tube as an aerosol or via as a nebulizer solution. Aerosols are prepared using an aqueous aerosol, liposomal preparation or solid particles containing the compound. A nonaqueous (e.g. fluorocarbon propellant) suspension could be used. Sonic nebulizers are preferred because they minimize exposing the therapeutic compound to shear, which can result in degradation of the compound.

25 Delivery of the cobalamin conjugates of the instant invention by the mucosal route also offers an attractive administration alternative. The prototype formulation for nasal solutions will contain the cobalamin or compound of Formula I conjugate dissolved in a suitable aqueous or non-aqueous solvent such as propylene glycol, an antioxidant and aromatic oils as flavoring agents. The formulation may also contain suitable propellant(s).

30 For ophthalmic applications, the therapeutic compound is formulated into solutions, suspensions and ointments appropriate for use in the eye. For ophthalmic formulations, see

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Mitra (ed.), Ophthalmic Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, New York (1993) and also Havener, W. H., Ocular Pharmacology, C.V. Mosby Co., St. Louis (1983).

5 Useful dosages of the compounds of formula I can be determined by comparing their *in vitro* activity and *in vivo* activity in animal models. Methods for the extrapolation of effective dosages in mice and other animals, to humans are known to the art; for example, see U.S. Patent No. 4,938,949. The amount of the substance required for use in treatment will vary not only with the particular salt selected but also with the route of administration, the nature of the condition being treated and the age and condition of the patient and will be
10 ultimately at the discretion of the attendant physician or clinician.

In general, a suitable dose for nuclear medicine (for example, using a radioactive imaging agent) will be in the range of from about 0.1 $\mu\text{g}/\text{patient}$ to about 1000 $\mu\text{g}/\text{patient}$, from about 0.5 to about 500 $\mu\text{g}/\text{patient}$ or from 1 $\mu\text{g}/\text{patient}$ to about 100 $\mu\text{g}/\text{patient}$.

15 A suitable dose for imaging medicine (for example, using a paramagnetic imaging agent) will be in the range of from about 0.1 mg/patient to about 100 mg/patient, from about 0.5 to about 50 mg/patient or from 1 mg/patient to about 10 mg/patient.

For therapeutic applications, a suitable dose will be in the range of from about 0.05 picograms/kilogram to about 100 mg/kg, from about 10 to about 75 mg/kg of body weight per day, such as 3 to about 50 mg per kilogram body weight of the recipient per day, preferably in the range of 6 to 90 mg/kg/day, most preferably in the range of 15 to 60
20 mg/kg/day. The substance is conveniently administered in unit dosage form; for example, containing 5 to 1000 mg, conveniently 10 to 750 mg, most conveniently, 50 to 500 mg of active ingredient per unit dosage form.

Ideally, the substance should be administered to achieve peak plasma concentrations of from about 0.05 to about 100 μM , preferably, about 1 to 50 μM , most preferably, about 2 to about 30 μM . This may be achieved, for example, by the intravenous injection of a 0.005 to 10% solution of the substance, optionally in saline or orally administered as a bolus containing about 0.5-250 mg of the substance. Desirable blood levels may be maintained by continuous infusion to provide about 0.01-5.0 mg/kg/hr or by intermittent infusions
25 containing about 0.4-15 mg/kg of the substance.
30

WO 03/026674

PCT/US02/31038

The substance may conveniently be presented in a single dose or as divided doses administered at appropriate intervals, for example, as two, three, four or more sub-doses per day.

5 The cobalamin conjugates may be administered orally in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle such as an inert diluent or an edible carrier. They may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsules, may be compressed into tablets or may be incorporated directly with the food of the patient's diet. For oral therapeutic administration, the substance may be combined with one or more excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers and 10 the like. Such compositions and preparations should contain at least 0.1% of the substance. The percentage of the compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 to about 60% of the weight of a given unit dosage form. The amount of substance in such therapeutically useful compositions is such that an effective dosage level will be obtained.

15 Tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the following: binders such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, fructose, lactose or aspartame or a flavoring agent such as peppermint, oil of wintergreen or cherry 20 flavoring may be added. When the unit dosage form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier, such as a vegetable oil or a polyethylene glycol. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the solid unit dosage form. For instance, tablets, pills or capsules may be coated with gelatin, wax, shellac or sugar and the like. A syrup or elixir may contain the 25 active compound, sucrose or fructose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing any unit dosage form should be pharmaceutically acceptable and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the substance may be incorporated into sustained-release preparations and devices.

30 Sublingual tablets are designed to dissolve very rapidly. Examples of such formulations include ergotamine tartrate, isosorbide dinitrate, isoproterenol HCl. The formulation of these tablets contain, in addition to the drug, a limited number of soluble

WO 03/026674

PCT/US02/31038

excipients, usually lactose and powdered sucrose, but occasionally dextrose and mannitol. The process of making sublingual tablets involves moistening the blended powder components with an alcohol-water solvent system containing approximately 60% alcohol and 40% water.

5 In addition to the cobalamin conjugate, the prototype formulation for sublingual tablets may contain a binder such as povidone or HPMC, diluents such as lactose, mannitol, starch or cellulose, a disintegrant such as pregelatinized or modified starch, lubricants such as magnesium stearate, stearic acid or hydrogenated vegetable oil, a sweetener such as saccharin or sucrose and suitable flavoring and coloring agents.

10 XII. Controlled Release Formulations

In one embodiment, the agent and carrier are administered in a slow release formulation that can be a degradable or nondegradable polymer, hydrogel or ganogel or other physical construct that modifies the bioabsorption, half life or biodegradation of the cobalamin or compound of Formula I /diagnostic or therapeutic agent/cobalamin transport protein, such as an implant, bolus, microparticle, microsphere, nanoparticle or nanosphere. The controlled release formulation can be a material that is painted or otherwise applied onto the afflicted site, either internally or externally. In one embodiment, the invention provides a biodegradable bolus or implant that is inserted into the pocket created by surgical resection of a tumor or directly into the tumor itself. In another example, the controlled release formulation can be applied to a psoriatic lesion, eczema, atopic dermatitis, lichen planus, wart, pemphigus vulgaris, actinic keratosis, basal cell carcinoma or squamous cell carcinoma. The controlled release formulation can likewise be applied to a blood vessel to treat or prevent restenosis, retinopathies or atherosclerosis. The controlled release formulation with appropriated selected imaging agent can be used to coat a transplanted organ or tissue to prevent rejection. It can alternatively be implanted or otherwise applied near the site of rheumatoid arthritis.

The field of biodegradable polymers has developed rapidly since the synthesis and biodegradability of polylactic acid was first reported in 1966 by Kulkarni *et al.* "Polylactic acid for surgical implants," *Arch. Surg.*, 93, 839. Several other polymers are now known to biodegrade, such as polyanhydrides and polyorthoesters, which take advantage of labile

WO 03/026674

PCT/US02/31038

backbone linkages (see: Domb *et al.* Macromolecules, 22, 3200, 1989; and Heller *et al.* Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Dekker, NY: 1990). Several polymers which degrade into naturally occurring materials have also been described, such as crosslinking gelatin, hyaluronic acid (della Valle *et al.* U.S. Patent No. 4,987,744 and U.S. Patent No. 4,957,744) and polyaminoacids (Miyake *et al.*, 1974), which spurred the usage of polyesters by Holland *et al.* Controlled Release, 4, 155, 1986 and alpha-hydroxy acids (i.e. lactic acid and glycolic acid), which remain the most widely used biodegradable materials for applications ranging from closure devices (sutures and staples) to drug delivery systems (Smith *et al.* U.S. Patent No. 4,741,337; Spilizeqski *et al.* J. Control. Rel., 2, 197, 1985).

These polymers can be tailored to degrade at a desired rate and with a desired kinetics by selecting the appropriate monomers, method of preparation and molecular weight. Differences in crystallinity of the monomer can alter the polymeric degradation rate. Due to the relatively hydrophobic nature of most polymers, actual mass loss can begin with the oligomeric fragments that are small enough to be water soluble; hence, even the initial molecular weight can influence the degradation rate.

Hydrogels can be used in controlled release formulations. Such polymers are formed from macromers with a polymerizable, non-degradable, region that is separated by at least one degradable region. For example, the water soluble, non-degradable, region can form the central core of the macromer and have at least two degradable regions which are attached to the core, such that upon degradation, the non-degradable regions (in particular a polymerized gel) are separated. Specifically, as disclosed in U.S. Patent No. 5,626,863 to Hubbell *et al.*, the macromers are PEG-oligoglycolyl-acrylates, with the appropriate end caps to permit rapid polymerization and gelation. Acrylates can be polymerized readily by several initiating systems such as eosin dye, ultraviolet or visible light. The polyethyleneglycol (PEG) is highly hydrophilic and biocompatible. The oligoglycolic acid is a poly(alpha-hydroxy acid) which can be readily degraded by hydrolysis of the ester linkage into glycolic acid, a nontoxic metabolite. Other chain extensions include polylactic acid, polycaprolactone, polyorthoesters, polyanhydrides and polypeptides. This entire network can be gelled into a biodegradable network that can be used to entrap and homogeneously disperse water-soluble drugs for delivery at a controlled rate. Further, the gel can entrap particulate suspensions of water-insoluble drugs. (See also: U.S. Patent No. 4,591,496 to Cohen *et al.* (Process for Making Systems for the Controlled Release of Macromolecules); U.S. Patent No. 5,545,442 to Van Savage *et al.* (Method for Using a Radiation Cured Drug

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Release Controlling Membrane); U.S. Patent No. 5,330,768 to Park *et al.* (Controlled Drug Delivery Using Polymer/Pluronic Blends); U.S. Patent No. 5,122,367 to Ron *et al.* (Polyanhydride Bioerodible Controlled Release Implants for Administration of Stabilized Growth Hormone); U.S. Patent No. 5,545,409 to Laurencin *et al.* (Delivery System for Controlled Release of Bioactive Factors); U.S. Patent No. 5,629,009 to Laurencin *et al.* (Delivery System for Controlled Release of Bioactive Factors).

Alternatively, delivery of biologically active substances, both *in vitro* and *in vivo*, via encapsulation has been well described in the prior art. U.S. Patent No. 4,352,883 to Lim *et al.* entitled "Encapsulation of Biological Material" discloses the encapsulation of proteins within a membrane by suspending the protein in an aqueous medium containing a water-soluble gum that can be reversibly gelled to form the suspension into droplets. These droplets can be gelled further into discrete, shape-retaining, water insoluble temporary capsules with the aid of a solution of multivalent cations. The temporary capsules then can be further wrapped by an ionically cross-linking surface layer to form a semipermeable membrane around the capsules that is permeable to small molecules but impermeable to larger molecules. Microencapsulations of glycoproteins have also been well described. U.S. Patent No. 4,324,683 to Lim *et al.* entitled "Encapsulation of Labile Biological Material" encapsulates a glycoprotein by a two-step interfacial polymerization process to form capsules with well-controlled porosity. The microcapsules serve to protect the active substances from attack by microorganisms and from any immunological response. U.S. Patent No. 5,718,921 to Mathiowitz *et al.* (Microspheres Comprising Polymer and Drug Dispersed There Within) discloses a method to encapsulate relatively temperature-labile drugs into a microsphere.

Several methods have been developed to reversibly encapsulate biologically active substances. One that can be applied both to *in vitro* and *in vivo* studies has been described in U.S. Patent No. 4,900,556 by Wheatley *et al.* entitled "System for Delayed and Pulsed Release of Biologically-Active Substances." In this disclosed system, the biologically-active substance can be released either at a constant rate over a period of time or in discrete pulses. The biologically active materials are entrapped within liposomes encapsulated within semipermeable microcapsules or permeable polymeric matrix. Release of the desired materials is governed by the permeability of both the liposome and the surrounding matrix (the matrix integrity is directly proportional to the liposome integrity); the permeability of the liposome can be engineered by modifying the composition and the

WO 03/026674

PCT/US02/31038

method for making the liposome to produce liposome that are sensitive to specific stimuli such as temperature, pH or light. For example, by including a phospholipase that degrades the liposome within some or all of the liposomes or the surrounding matrix, the liposome can be destabilized and broken down over a period of time. Other systems have been developed, e.g. U.S. Patent No. 4,933,185 by Wheatley *et al.*, which utilize a core made up of a polymer (such as an ionically cross-linked polysaccharide with calcium alginate or chitin) around which there is an ionically bound skin (such as a polycationic skin of poly-L-lysine) whose integrity is dependent on the core polymer. With an impermeable skin, when the core polymer can be degraded by enzymes (such as alginase from the bacteria, chitinase or hydrolase), there is a sudden release of biologically active substance from the core. Alternatively, the skin can be partially permeable for a gradual release of drug upon degradation of the core.

Nanoparticles are especially useful in the delivery of drugs parenterally or intravenously such that the delivery device is small with a long circulating half-life. A number of injectable drug delivery systems have been investigated, including microcapsules, microparticles, liposomes and emulsions. The major obstacle for these delivery systems is the rapid clearance of the materials from the blood stream by the macrophages of the reticuloendothelial system (RES). For example, polystyrene particles as small as sixty nanometers in diameter are cleared from the blood within two to three minutes. Liposomal drug delivery systems have also been extensively studied for this application because they were expected to freely circulate in the blood. Coating of the liposomes with poly(ethylene glycol) (PEG) increased the half-life of the carriers due to PEG's hydrophobic chains which reduced its protein absorption and thus its RES uptake. U.S. Patent No. 5,543,158 to Gref *et al.* (Biodegradable Injectable Nanoparticles) describes a carrier system specifically targeted towards carriers suitable for intravenous delivery with a controlled release mechanism with modified polyglycols.

U.S. Patent No. 5,626,862, U.S. Patent No. 5,651,986 and U.S. Patent No. 5,846,565 to Brem *et al.* (Controlled Local Delivery of Chemotherapeutic Agents for Treating Solid Tumors) discloses the use of these carriers for the specific delivery of chemotherapeutic agents to increase bioavailability. Therefore, the devices act as reservoirs that release drugs over an extended period of time while at the same time preserves the bioactivity and bioavailability of the agent. U.S. Patent No. 5,286,763 to Gerhard *et al.* (Bioerodible Polymers for Drug Delivery in Bone) further discloses that bioerodible polymers can be

WO 03/026674

PCT/US02/31038

used to deliver chemotherapeutic agents directly into the bone. Cohen *et al.* U.S. Patent No. 5,562,099 (Polymeric Microparticles Containing Agents for Imaging) discusses the usage of these carriers as contrast agents. The polymeric microparticle is filled with contrast agents for enhanced imaging.

5 Books describing methods of controlled delivery that are appropriate for the delivery of the cobalamin or compound of Formula I/imaging agents of the present invention include: Robert S. Langer, Donald L. Wise, editors; Medical applications of controlled release (Volumes 1 and 2); Boca Raton, FL: CRC Press, 1984; and William J. M. Hruschsky, Robert Langer and Felix Theeuwes, editors; Temporal control of drug delivery
10 (series); New York: New York Academy of Sciences, 1991.

The invention will now be illustrated by the following non-limiting Examples.

EXAMPLES

15 Example 1

Preparation of Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide

A mixture containing cyanocobalamin-b-carboxylic acid (1.0 g, 0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (0.81 g, 6 mmol) and 1,4-diaminobutane dihydrochloride (4.8 g, 30 mmol) in 100 ml of water was adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (1.26 g, 6.6 mmol) was then added, the pH was adjusted to 6.4 and the
20 reaction stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) showed the reaction to be complete. Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide was extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer was washed several times with equal volumes of water. To the phenol extract were added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone. The desired cobalamin was removed from the organic phase by several
25 extractions with water. The combined aqueous layers were extracted three times with diethylether to remove residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous acetone. Yield 955 mg, 92%.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 2Preparation of Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide

Methylcobalamin-b-carboxylic acid (1.0 g, 0.6 mmol) was reacted with diaminobutane dihydrochloride as described above for the cyano derivative. The cobalamin was purified by extraction through phenol (see above) and the resulting aqueous solution was concentrated in vacuo. This solution was chromatographed on AG1-X2 200-400 mesh in the acetate form (20.times.2.5 cm) and the pass through collected. The pass through was concentrated to approximately 20 ml and the desired cobalamin crystallized from aqueous acetone. Yield 920 mg, 88%. Unreacted methylcobalamin-b-carboxylic acid was eluted with 1M acetic acid, concentrated and crystallized from aqueous acetone. Yield 60 mg, 6%.

Example 3Preparation of Adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide

Adenosylcobalamin-b-carboxylic acid (500 mg, 0.3 mmol) was reacted with diaminobutane dihydrochloride (2.4 mg, 15 mmol) as described above. The cobalamin was purified by extraction through phenol (see above). The resulting aqueous solution was concentrated in vacuo and applied to AG-50 X2, 200-400 mesh, in the hydrogen form (20.times.25 cm). The column was washed thoroughly with water to remove hydroxybenzotriazole and the desired cobalamin eluted with 1M ammonium hydroxide. After an additional extraction through phenol, adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide was isolated as a glass. Yield 366 mg, 77%.

Example 4Proposed Preparation of Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-, Ciprofloxacin-, Levofloxacin-, Ofloxacin- and Sparfloxacin-Cobalamin Conjugates

A mixture containing cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the antibiotic agent (e.g. Ciprofloxacin, Levofloxacin or Ofloxacin) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and

WO 03/026674

PCT/US02/31038

the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal volumes of water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone. The desired product is removed from the organic phase by several extractions with water. The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous acetone.

Example 5

Proposed Preparation of Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide- Ciprofloxacin-, Levofloxacin-, Ofloxacin- and Sparfloxacin-Cobalamin Conjugates

A mixture containing methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the antibiotic agent (e.g. Ciprofloxacin, Levofloxacin or Ofloxacin) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal volumes of water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone. The desired product is removed from the organic phase by several extractions with water. The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous acetone.

Example 6

Proposed Preparation of Adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide- Ciprofloxacin-, Levofloxacin-, Ofloxacin- and Sparfloxacin-Cobalamin Conjugates

A mixture containing adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the antibiotic agent (e.g. Ciprofloxacin, Levofloxacin

WO 03/026674

PCT/US02/31038

or Ofloxacin) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-
dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and
the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-
acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is extracted into
5 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal volumes of
water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone.
The desired product is removed from the organic phase by several extractions with water.
The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove residual
phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous
10 acetone.

Example 7

Proposed preparation of Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide- Lisinopril-, Fosinopril Sodium-, Enalaprilat-, and Captopril-Cobalamin Conjugates

A mixture containing cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol),
hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the cardiovascular agent (e.g., Lisinopril, Fosinopril
Sodium, Enalaprilat, or Captopril) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-
15 Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is
adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel
using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is
extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal
volumes of water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume
20 of acetone.

The desired product is removed from the organic phase by several extractions with
water. The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove
residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from
aqueous acetone.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 8Proposed preparation of Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide- Lisinopril-, Fosinopril Sodium-, Enalaprilat-, and Captopril-Cobalamin Conjugates

5 A mixture containing methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the cardiovascular agent (e.g., Lisinopril, Fosinopril Sodium, Enalaprilat, or Captopril) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal volumes of water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone. The desired product is removed from the organic phase by several extractions with water. The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous acetone.

Example 9Proposed preparation of Adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide- Lisinopril-, Fosinopril Sodium-, Enalaprilat-, and Captopril-Cobalamin Conjugates

15 A mixture containing adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mmol) and the cardiovascular agent (e.g., Lisinopril, Fosinopril Sodium, Enalaprilat, or Captopril) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is extracted into 92% aqueous phenol and the phenol layer is washed several times with equal volumes of water. To the phenol extract is added 3 volumes of diethylether and 1 volume of acetone. The desired product is removed from the organic phase by several extractions with water. The combined aqueous layers are extracted three times with diethylether to remove residual phenol, concentrated to approximately 20 ml in vacuo and crystallized from aqueous acetone.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 10Preparation of Cyanocobalamin-b-(poly-L-lysine)amide

Two preparations of poly-L-lysine hydrobromide, one containing approximately 8 residues and a second one containing about 11 residues were separately reacted with cyanocobalamin-l-carboxylic acid. To each polymer (500 mg) dissolved in 20 mL of water was added 150 mg (0.1 mmol) of cyanocobalamin-l-carboxylic acid, 338 mg (2.5 mmol) of hydroxybenzotriazole and 480 mg (2.5 mmol) of 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide. The pH was adjusted to 9 with 1N NaOH and the reaction mixtures were stirred at room temperature for 2-3 h. They were purified on G-10 sephadex: the sizing columns (3 x 40 cm) were eluted with water and 1.5 mL fractions collected. The fractions showing the presence of the cobalamin (OD at 550 nm) and the presence of polylysine (ninhydrin positive) were pooled and freeze-dried.

Example 11Proposed Preparation of Cyanocobalamin-b-(polylysine)amide-, Ciprofloxacin-, Levofloxacin-, Ofloxacin- and Sparfloxacin-Conjugates

A mixture containing cyanocobalamin-b-(polylysine)amide (0.6 mmol), hydroxybenzotriazole (0.81 g, 6 mmol) and the antibiotic (e.g. Ciprofloxacin, Levofloxacin, Ofloxacin or Sparfloxacin) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (1.26 g, 6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The product is purified on G-10 sephadex; the sizing columns (3 x 40 cm) are eluted with water and 1-5 mL fractions are collected. The fractions showing the presence of cobalamin (OD at 550 nm) and the presence of polylysine (ninhydrin positive) are pooled and freeze-dried.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 12Proposed Preparation of Cyanocobalamin-b-(polylysine)amide- Lisinopril-, Fosinopril Sodium-, Enalaprilat-, and Captopril-Conjugates

5 A mixture containing cyanocobalamin-b-(polylysine)amide, hydroxybenzotriazole (0.81 g, 6 mmol) and the cardiovascular agent (e.g., Lisinopril, Fosinopril Sodium, Enalaprilat, or Captopril) (30 mmol) in 100 ml of water is adjusted to pH 7.8. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (1.26 g, 6.6 mmol) is then added, the pH is adjusted to 6.4 and the reaction is stirred at room temperature for 24 h. TLC on silica gel using n-butanol-acetic acid water (5:2:3) shows the reaction to be complete. The reaction mixture is purified on G-10 sephadex: the sizing columns (3 x 40 cm) are eluted with water and 1.5 mL fractions collected. The fractions showing the presence of the cobalamin (OD at 550 10 mm) and the presence of polylysine (ninhydrin positive) are pooled and freeze-dried.

Example 13Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide DTPA.

15 Cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl) amide (500 mg), 0.3 mmol) was dissolved in 30 ml saturated sodium bicarbonate and treated with solid DTPA dianhydride (1.2 g, 3.4 mmol). The progress of the reaction was monitored by TLC on PEI plates using n-butanol-acetic acid-water (5:2:3) as the solvent. After 30 min incubation at room temperature a second 1.2 g of the dianhydride was added. After two additional additions of dianhydride with adjustments of the pH to 8.2 the reaction mixture was incubated overnight. Cyanocobalamin-DTPA adduct was then extracted into 92% aqueous phenol and purified as described above. The preparation was evaporated to dryness *in vacuo* and isolated as a 20 glass. Yield 460 mg, 77%. The cyanocobalamin-DTPA adduct behaves as a polyanion on paper electrophoresis in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.1.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 14Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide DTPA.

Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (500 mg, 0.3 mmol) was dissolved in 30 ml saturated sodium bicarbonate and reacted with solid DTPA dianhydride as described above. The methyl cobalamin-DTPA adduct was purified by extraction through phenol, evaporated to dryness *in vacuo* and isolated as a glass. Yield 600 mg, 96%.

Example 15Adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide DTPA.

Adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide (366 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 30 ml saturated sodium bicarbonate and treated with solid DTPA dianhydride (1.0 g, 2.8 mmol) as described above. The cobalamin was purified through phenol (see above). The resulting aqueous solution was concentrated and applied to AG-50 X2, 200-400 mesh, in the hydrogen form (6.0 x 2.5 cm), the column was washed with water and the desired cobalamin eluted with 0.1 M ammonium hydroxide. The solution was evaporated to dryness *in vacuo* and adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide DTPA isolated as a glass. Yield 400 mg, 80%.

Example 16Chelation of Radionuclides

Under dim light, 1000 µg of methyl-, adenosyl-, and cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA were separately dissolved in 200 µL of normal saline. Next, 500 µCi of Indium-111 or 250 µCi of Gadolinium-153 were added to the cobalamin-DTPA solutions. The reactions were carried out at room temperature and room air. For the chelation of technetium, the dissolved cobalamin DTPA complexes were separately placed into sealed 2 ml vials. Next, 200 µL of stannous chloride solution (1000 µg/ml normal saline) was added to each vial. The vials were purged with nitrogen gas for 5 minutes. After this time, 1-5 µCi of Technetium-99m was added to the N₂ purged vials. Each vial

WO 03/026674

PCT/US02/31038

underwent further nitrogen purging for 5 minutes. All chelation reactions were mixed gently for 5 minutes.

Control mixtures of 1000 µg of cyanocobalamin were dissolved in 200 µL of normal saline. Cyanocobalamin was mixed with Tc-99m at room temperature and room air, as well as within nitrogen purged vials containing 200 µL of the described stannous chloride solution. Additionally, the cobalamin-DTPA complexes underwent Tc-99m labeling in open vials at room air in the absence of the stannous chloride.

Example 17

Synthesis of Daunorubicin- and Doxorubicin-Cobalamin Conjugates.

Modification of the carbohydrate moiety (daunosamine) of daunorubicin (1) with L-leucine can be accomplished by reacting daunorubicin HCl (0.5 g) in 100 mL borate buffer pH=10 (containing KCl) with L-leucine-carboxyanhydride (1 mmole in 5 mL acetone) at 0°C under nitrogen. After reaction for 5 minutes at 0°C, the mixture can be acidified to pH 3.5 with H₂SO₄, stirred for 15 minutes and adjusted to pH=7 to give the desired L-leucyl daunorubicin (2). Reaction of (2) with a cobalamin-mono or dicarboxylic acid in the presence of a water-soluble carbodiimide and hydroxybenzotriazole will yield the daunorubicin-cobalamin conjugate (3). These conjugates can be isolated via the usual phenol extraction, extensive washing of the phenol phase with water and finally displacing the cobalamin-conjugates from the phenol phase into water by the addition of acetone and diethyl ether.

Modification of doxorubicin should be similar (Ger. Patent 1,813,518, July 10, 1969; Chem Abstracts, 71, 91866 (1969)). D. Deprez-Decampaneere, M. Mosquellier, R. Bourain and A. Trosect, Curr. Chemother. Proc., Int. Congr. Chemother., 10th, p. 1242 (1978) have found that N-(L-leucyl) daunorubicin but not the D isomer was hydrolyzed *in vivo* to regenerate daunorubicin. See, "Doxorubicin, Anticancer Antibiotics," Federico Arcamone, Medicinal Chemistry, Vol. 17, Academic Press, 1981.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Example 18Synthesis of Peptide Nucleic Acid (PNA)-Nuclear Localization Peptide (TAT) Chimera

The nuclear localization signal peptide TAT (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) is synthesized as a peptide amine by a solid-phase method on Rink (4-2', 4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl-phenoxy) co-polystyrene resin (0.1 mmole) with N^ε-Fmoc L-amino acids (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA). Ten equivalents (1.0 mmole) of each Fmoc-L-amino acid was activated with PyBop/HoBt/4-Methylmorpholine and coupled to the resin-linked peptide chain in 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP) for 2 h following deprotection of each N^ε-Fmoc protecting group with 20% piperidine in NMP for 30 minutes.

An anti-viral peptide nucleic acid (PNA) is sequentially added to the free amino group of the resin-bound TAT peptide, starting with the first base at the 3'-end of the PNA molecule. The synthesis of the PNA uses Fmoc-N-(2-aminoethyl) glycyI PNA monomers on an Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer according to cycle protocols developed by the manufacturer (Perseptive Biosystems, Inc., Foster City, CA). The exocyclic amines of the bases adenine, guanine, and cytosine of each Fmoc-PNA monomer are protected with the blocking group benzhydryloxycarbonyl.

The Fmoc group of each PNA monomer is removed by treatment with 20% piperidine in dimethylformamide (DMF) for 15 min, followed by activation and coupling of the next PNA monomer (5 equivalents) with HATU (4.5 equiv.), 2,6-lutidine (7.5 equiv.) and diisopropylethylamine (5 equiv.) for 30 minutes. Addition of an AEEA [2(2-aminoethoxy) ethoxy] acetic acid monomer is added to the 5'-end of the synthesized PNA as a spacer group before linkage of the vitamin B₁₂ molecule.

Example 19Synthesis of Vitamin B₁₂ (B carboxylate form) to PNA-TAT chimera

Vitamin B₁₂ (free carboxylate form) is added to the amino terminal groups of the AEEA-PNA-TAT chimera by activation of vitamin B₁₂'s carboxylic acid with PyBop/HoBt/4-Methylmorpholine in DMF, and subsequent coupling of the mixture in DMF for 2 hours.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

After coupling of the Vitamin B₁₂, the vitamin B₁₂-PNA-TAT chimera is deprotected and removed from the rink-resin support by treatment with a mixture of 90% TFA/5.0% water/2.5% ethanedithiol/2.5% thioanisole for 90 min at room temperature. The deprotected crude product is washed and separated by precipitation in 3 x 50 volumes of cold methyl t-butyl ether, and purified by reverse phase HPLC on Vydac C18 column (2.1 x 25 cm) in 0.1% TFA/water with a 60 min gradient of 10%-89% acetonitrile in 0.1% TFA. The composition of the vitamin B₁₂-PNA-TAT product is analyzed by Electrospray Ionization (ESI) Mass Analysis on a PE SCIEX API 165 Biospectrometer (Applied Biosystems, Inc.)

10

Example 20Interaction with Cobalamin Transport Protein

Under dim light, 1000 µg of the non-labeled methyl-, adenosyl-, and cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA, as well as 1000 µg of cyanocobalamin and DTPA (Sigma, St. Louis, MO 63178), were separately dissolved in 10 mL of normal saline at room temperature. Each of the five 1000 µg/10 ml samples were stored in sealed, aluminum-wrapped 10 ml vials to prevent exposure to light. No buffers were added to the solutions. The pH of the solutions, measured by a Beckman 40 pH meter (Beckman Instruments, Fullerton, CA): Cyanocobalamin = 5.75, DTPA = 3.78; cyano, methyl and adenosylcobalamin-DTPA analogues were 5.75, 6.10, and 6.19, respectively.

To assess *in vitro* binding to Intrinsic Factor (IF) and Transcobalamins (TC), the intrinsic factor blocking antibody (IFBA) and Unsaturated vitamin B₁₂ Binding Capacity (UBBC) assays were performed with serum randomly obtained from five patients being evaluated for pernicious anemia at the Mayo Clinic. The IFBA and UBBC assays were first performed for clinical purposes as previously described by V. F. Fairbanks *et al.*, Mayo Clin. Proc., **58**, 203 (1983); Intrinsic Factor Blocking Antibody (⁵⁷Co) Radioassay-Package insert, Diagnostic Products Corp.; D. Grossowicz *et al.*, Proc. Exp. Biol., **109**, 604 (1962) and C. Gottlieb *et al.*, Blood, **25**, 6 (1965).

Next, the serum from the same five patients underwent modified IFBA and UBBC assays. Specifically, 1 µL of the five previously described solutions were separately incubated with purified IF or serum, to potentially saturate all IF and TC-binding sites.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

After incubation for 20 minutes at room temperature and for another 20 minutes at 4°C, 500 µL of the stock (1000 µg/l) Cobalt-57-cyanocobalamin (Mallinckrodt Medical, Inc., St. Louis, MO 63134) solution was added and the usual IFBA and UBBC protocols were then followed. All supernatant activity was counted for four minutes on a gamma counter (Micromedix 10/20, Huntsville, AL 35805).

The IFBA assay demonstrated that DTPA does not significantly bind to IF (values less than the negative reference), whereas cyanocobalamin and the cobalamin-DTPA analogs do, in varying degrees, competitively inhibit Co-57 cyanocobalamin from binding to intrinsic factor. By using the counts of the Clinical run divided into the counts of the five solutions, the efficacy of binding to intrinsic factor can be estimated. The averaged percent binding of the five solutions to IF was: cyanocobalamin = 92.5%; methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)-amide-DTPA=63.2%; cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)-amide-DTPA=52.9%; adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)-amide-DTPA = 41.0% and 0.8% for DTPA. This is in contrast to the disclosure in Houts (U.S. Patent No. 4,465,775) that the (b)-monocarboxylic acid of vitamin B₁₂ and its radioiodinated derivative exhibit very low binding to IF.

Likewise the averaged percent binding of the five solutions to the transcobalamin proteins was: cyanocobalamin = 100%, methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA = 94.0%, adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA = 90.4%, cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA = 66.4% and 3.6% for DTPA.

Thus, the attachment of DTPA to vitamin B₁₂ does alter its binding to the carrier proteins. As expected, non-labeled cyanocobalamin had the greatest affinity for IF and the transcobalamin proteins. Methylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA was next, followed by adenosylcobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA, and finally cyanocobalamin-b-(4-aminobutyl)amide-DTPA. There was also some nonspecific binding of DTPA to the carrier proteins (0.8% and 3.6%).

Example 21

Coadministration Dosage Regimes

The term "active ingredient" as used below is vitamin B₁₂ or a compound of Formula I, linked to a diagnostic, therapeutic or other material, administered in any ratio

WO 03/026674

PCT/US02/31038

that achieves the desired result. In one embodiment the ratio is one molecule of the vitamin B₁₂ or a compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein. In an alternate embodiment of the invention, the ratio is one molecule of the vitamin B₁₂ or a compound of Formula I to at least one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of cobalamin transport protein, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of cobalamin transport protein. In another embodiment of the invention, the ratio is at least one molecule of the vitamin B₁₂ or a compound of Formula I to one molecule of cobalamin transport protein, and preferably with an excess of vitamin B₁₂ or a compound of Formula I, for example, 1.5, 2, 3, 4, 5, or more times excess of vitamin B₁₂ or a compound of Formula I.

The mixtures are prepared by physically mixing the transport protein with the vitamin B₁₂ or a compound of Formula I linked to a diagnostic, therapeutic or other material prior to formulation in a pharmaceutically acceptable carrier. Alternatively, the mixtures are prepared by simply mixing them separately with the carrier. The active ingredient contains a cobalamin or a compound of Formula I complex that is either administered bound (i.e. either covalently, ionically, datively or via van der Waals attraction), or unbound (i.e. admixed with) to intrinsic factor.

Non-limiting examples, the active ingredient is prepared as pharmaceutical formulations via the following:

20 CAPSULES (Hard)

Hard capsules can be prepared by filling standard two-piece hard gelatin capsules with the following mixture using conventional encapsulating equipment:

Active ingredient: 1 mg
Lactose: 125 mg
25 Talc: 12 mg
Magnesium stearate: 3 mg

WO 03/026674

PCT/US02/31038

CAPSULES (Soft)

A mixture of active ingredient in soybean oil can be prepared and injected by means of a positive displacement pump in gelatin to form soft gelatin capsules containing 5 mg of the active ingredient. The capsules can be washed in petroleum ether and dried.

5

TABLETS

Tablets can be prepared by conventional procedures so that each unit will contain:

Active ingredient: 1 mg

Spray dried lactose: 150 mg

10

Microcrystalline cellulose: 35 mg

Magnesium stearate: 3 mg

PARENTERAL

Parenteral composition suitable for intramuscular administration can be prepared so that each mL contains, percentages being by weight:

15

Active ingredient: 1 mg

Sodium carboxymethyl cellulose: 0.75%

Polysorbate 80: 0.04%

Benzyl alcohol: 0.9%

20

Sodium chloride: 0.9%

Water for injection Q.S.: 1 mL

SUSPENSION

An aqueous suspension can be prepared for oral administration so that each 5 mL contain, percentages being by weight:

25

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Active ingredient: 5 mg
Methylcellulose: 5%
Carboxymethyl cellulose: 5%
Syrup: 30%
5 Polysorbate 80: 0.2%
Sodium saccharin: 2 mg
Cherry flavor: 0.1%
Sodium benzoate: 5 mg
10 Water Q.S.: 5 mL

The invention has been described with reference to various specific and preferred embodiments and techniques. However, it should be understood that many variations and modifications may be made while remaining within the spirit and scope of the invention.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

Claims

What is claimed is:

- 5 1. A method for increasing the uptake of cobalamin-bound detectable or therapeutic agent to a host in need thereof comprising providing the cobalamin-bound detectable or therapeutic agent in combination with a cobalamin transport protein.
2. The method of claim 1 wherein the cobalamin transport protein is intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II, transcobalamin III, or any combination thereof.
- 10 3. The method of claim 1 wherein the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion
15 pump or catheter.
4. The method claim 1 wherein the the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered to patients that do not have a cobalamin or cobalamin transport protein deficiency.
- 20 5. The method of claim 1, wherein the cobalamin conjugate is a compound of the formula:

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (iv) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- (v) A is O, S, NJ^1 , $\text{CR}^{100}\text{R}^{101}$ or $\text{C}(\text{R}^{100})\text{V}^8\text{Z}^8$;
- 5 (vi) E is O or S;
- (vii) G^1 and G^2 are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (viii) Y^1 , Y^2 , Y^3 , Y^4 , Y^5 , Y^6 and Y^7 independently are O, S or NJ^2 ;
- (ix) V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 , V^6 , V^7 and V^8 independently are O, S or NJ^3 ; $\text{CR}^{102}\text{R}^{103}$, or a direct bond;
- 10 (x) Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^7 and Z^8 independently are R^{104} or L-T;
- (xi) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind to a cobalamin transport protein;
- (xii) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- 15 (xiii) at least one of Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^7 , Z^8 , A, B, G^1 , and G^2 comprises an a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (xiv) J^1 , J^2 and J^3 independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
- 20 (xv) R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} and R^{15} independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO_2 , SO_3 , carboxylic acid, C_{1-6} carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;
- 25 (xvi) R^{13} and R^{14} optionally can come together to form a pi bond; and
- (xvii) R^{100} , R^{101} , R^{102} , R^{103} , and R^{104} are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO_2 , SO_3 , thioalkyl, or amino.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

6. The method of claim 1, or 5, wherein the therapeutic is an antibiotic.
7. The method of claim 1 or 5, wherein the therapeutic is useful for the treatment of a disorder associated with abnormal cellular proliferation.
- 5 8. The method of claim 1 or 5, wherein therapeutic agent is useful for the treatment of an infectious disease.
9. The method of claim 1 or 5, wherein the therapeutic agent is useful in the treatment of a cardiovascular disorder.
- 10 10. The method of claim 1 or 5, wherein the therapeutic agent is a nucleic acid, peptide nucleic acid, morpholino nucleic acid, or other material that affects gene expression.
11. The method of claim 1 or 5, wherein the detectable agent is useful in radioimaging.
12. The method of claim 1 or 5, wherein the detectable agent is a radionuclide or paramagnetic metal atom.
- 15 13. The method of claim 1, wherein the cobalamin transport protein is linked directly or by a linker to a detectable radionuclide, or paramagnetic metal atom.
14. The method of claim 13 wherein a detectable agent comprising a metallic radionuclide or paramagnetic metal atom is linked to the cobalamin.
15. The method of claim 14 wherein the detectable chelating group is DPTA.
- 20 16. The method of claim 14 wherein the metallic radionuclide or paramagnetic metal atom is Technetium-99m, Indium-111, or Gadolinium-157.
17. The method of claim 13 wherein the detectable radionuclide is a non-metallic radionuclide.
- 25 18. The method of claim 17 wherein the non-metallic radionuclide is Carbon-11, Fluorine-18, Bromine-76, Iodine-123, or Iodine-124.
19. A composition comprising a cobalamin-bound detectable or therapeutic agent in combination with a cobalamin transport protein for use to increase the uptake of the detectable or therapeutic agent to a host in need thereof.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

20. The composition of claim 19 wherein the cobalamin transport protein is intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II, transcobalamin III, or any combination thereof.
- 5 21. The composition of claim 19 wherein the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter.
- 10 22. The composition of claim 19 wherein the the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered to patients that do not have a cobalamin or cobalamin transport protein deficiency.
- 15 23. The composition of claim 19, wherein the cobalamin conjugate is a compound of the formula:

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (xxi) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- (xxii) A is O, S, N^{I} , $\text{CR}^{100}\text{R}^{101}$ or $\text{C}(\text{R}^{100})\text{V}^8\text{Z}^8$;
- 5 (xxiii) E is O or S;
- (xxiv) G^1 and G^2 are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (xxv) $\text{Y}^1, \text{Y}^2, \text{Y}^3, \text{Y}^4, \text{Y}^5, \text{Y}^6$ and Y^7 independently are O, S or N^{I} ;
- (xxvi) $\text{V}^1, \text{V}^2, \text{V}^3, \text{V}^4, \text{V}^5, \text{V}^6, \text{V}^7$ and V^8 independently are O, S or N^{I} ; $\text{CR}^{102}\text{R}^{103}$, or a direct bond;
- 10 (xxvii) $\text{Z}^1, \text{Z}^2, \text{Z}^3, \text{Z}^4, \text{Z}^5, \text{Z}^7$ and Z^8 independently are R^{104} or L-T;
- (xxviii) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind to a cobalamin transport protein;
- (xxix) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- 15 (xxx) at least one of $\text{Z}^1, \text{Z}^2, \text{Z}^3, \text{Z}^4, \text{Z}^5, \text{Z}^7, \text{Z}^8, \text{A}, \text{B}, \text{G}^1$, and G^2 comprises an a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (xxxi) J^1, J^2 and J^3 independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
- 20 (xxxii) $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{R}^{10}, \text{R}^{11}, \text{R}^{12}, \text{R}^{13}, \text{R}^{14}$ and R^{15} independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO_2 , SO_3 , carboxylic acid, C_{1-6} carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;
- 25 (xxxiii) R^{13} and R^{14} optionally can come together to form a pi bond; and
- (xxxiv) $\text{R}^{100}, \text{R}^{101}, \text{R}^{102}, \text{R}^{103}$, and R^{104} are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO_2 , SO_3 , thioalkyl, or amino.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

24. The composition of claim 19 or 23, wherein the therapeutic is an antibiotic.
25. The composition of claim 19 or 23, wherein the therapeutic is useful for the treatment of a disorder associated with abnormal cellular proliferation.
- 5 26. The composition of claim 19 or 23, wherein therapeutic agent is useful for the treatment of an infectious disease.
27. The composition of claim 19 or 23, wherein the therapeutic agent is useful in the treatment of a cardiovascular disorder.
- 10 28. The composition of claim 19 or 23, wherein the therapeutic agent is a nucleic acid, peptide nucleic acid, morpholino nucleic acid, or other material that affects gene expression.
29. The composition of claim 19 or 23, wherein the detectable agent is useful in radioimaging.
- 15 30. The composition of claim 19 or 23, wherein the detectable agent is a radionuclide or paramagnetic metal atom.
31. The composition of claim 19 or 23, wherein the cobalamin transport protein is linked directly or by a linker to a detectable radionuclide, or paramagnetic metal atom.
32. The composition of claim 19 or 23 wherein a detectable agent comprising a metallic radionuclide or paramagnetic metal atom is linked to the cobalamin.
- 20 33. The composition of claim 19 or 23 wherein the detectable chelating group is DPTA.
34. The composition of claim 19 or 23 wherein the metallic radionuclide or paramagnetic metal atom is Technetium-99m, Indium-111, or Gadolinium-157.
- 25 35. The composition of claim 19 or 23 wherein the detectable radionuclide is a non-metallic radionuclide.
36. The composition of claim 19 or 23 wherein the non-metallic radionuclide is Carbon-11, Fluorine-18, Bromine-76, Iodine-123, or Iodine-124.
37. Use of a composition comprising a cobalamin-bound detectable or therapeutic agent in combination with a cobalamin transport protein in the manufacture of a

WO 03/026674

PCT/US02/31038

medicament to increase the uptake of the detectable or therapeutic agent to a host in need thereof.

38. The use of claim 37 wherein the cobalamin transport protein is intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II, transcobalamin III, or any combination thereof.

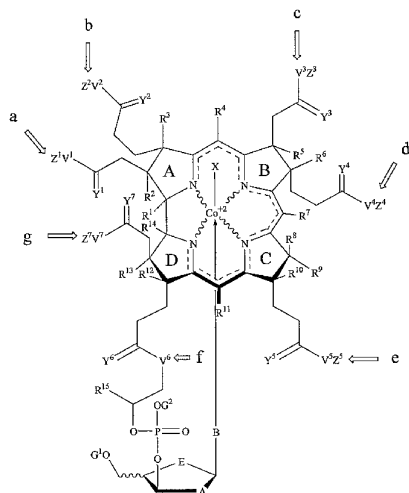
5 39. The use of claim 37 wherein the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including
10 via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter.

40. The use of claim 37 wherein the the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is administered to patients that do not have a cobalamin or cobalamin transport protein deficiency.

15 41. The use of claim 37, wherein the cobalamin conjugate is a compound of the formula:

WO 03/026674

PCT/US02/31038



or its enantiomer, diastereomer, salt or prodrug thereof, wherein:

5 (xxxv) the wavy line in the chemical structure indicates either a dative or covalent bond such that there are three dative Co-N bonds and one covalent Co-N bond, wherein, in the case of the dative bond, the valence of nitrogen is completed either with a double bond with an adjacent ring carbon or with a hydrogen;

10 (xxxvi) the dotted line in the chemical structure indicates either a double or single bond such that the double bond does not over-extend the valence of the element (i.e. to give pentavalent carbons) and, in the case of a single bond, the valence is completed with hydrogen

(xxxvii) X is hydrogen, cyano, amino, amido, hydroxyl, adenosyl L-T, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, aralkyl, heterocycle, heteroaryl or alkylheteroaryl;

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (xxxviii) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- (xxxix) A is O, S, NJ¹, CR¹⁰⁰R¹⁰¹ or C(R¹⁰⁰)V⁸Z⁸;
- 5 (xl) E is O or S;
- (xli) G¹ and G² are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (xlii) Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²;
- (xliii) V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ⁵; CR¹⁰²R¹⁰³, or a direct bond;
- 10 (xliv) Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴ or L-T;
- (xlv) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind to a cobalamin transport protein;
- (xlvii) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- 15 (xlviii) at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷, Z⁸, A, B, G¹, and G² comprises a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (xlviii) J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
- 20 (xlix) R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;
- 25 (l) R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a pi bond; and
- (li) R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³, and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl, or amino.

WO 03/026674

PCT/US02/31038

42. A composition comprising a cobalamin-bound detectable or therapeutic agent in combination with a cobalamin transport protein to increase the uptake of the detectable or therapeutic.

5 43. The composition of claim 42 wherein the cobalamin transport protein is intrinsic factor, transcobalamin I, transcobalamin II, transcobalamin III, or any combination thereof.

10 44. The composition of claim 42 wherein the cobalamin linked diagnostic or therapeutic conjugated to a cobalamin transport protein is suitable for administration via intravenous, parenteral, intradermal, epidural, intraspinal, intrasternal, intra-articular, intra-synovial, intrathecal, intra-arterial, intracardiac, intramuscular, intranasal, subcutaneous, intraorbital, intracapsular, topical, transdermal patch, rectal, vaginal or urethral administration including via suppository, percutaneous, nasal spray, surgical implant, internal surgical paint, infusion pump or catheter.

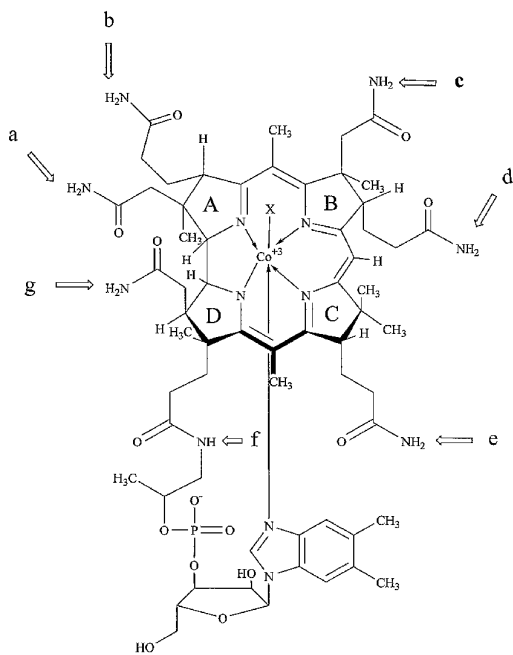
15 45. The composition of claim 42, wherein the cobalamin conjugate is a compound of the formula:

WO 03/026674

PCT/US02/31038

- (lv) B is a divalent heterocycle wherein the radical positions can be within the ring or a substituent to the ring such that at least one radical is on a heteroatom to form a dative bond with cobalt, optionally substituted by L-T;
- (lvi) A is O, S, NJ¹, CR¹⁰⁰R¹⁰¹ or C(R¹⁰⁰)V⁸Z⁸;
- 5 (lvii) E is O or S;
- (lviii) G¹ and G² are independently hydrogen, alkyl, acyl, silyl, phosphate, or L-T;
- (lix) Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶ and Y⁷ independently are O, S or NJ²;
- (lx) V¹, V², V³, V⁴, V⁵, V⁶, V⁷ and V⁸ independently are O, S or NJ³; CR¹⁰²R¹⁰³, or a direct bond;
- 10 (lxi) Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, Z⁷ and Z⁸ independently are R¹⁰⁴ or L-T;
- (lxii) each L is independently a direct bond or the residue of a multivalent moiety that does not significantly impair the ability of the compound to bind to a cobalamin transport protein;
- (lxiii) each T is independently a diagnostic or therapeutic agent;
- 15 (lxiv) at least one of Z¹, Z², Z³, Z⁵, Z⁷, Z⁸, A, B, G¹, and G² comprises an a nucleic acid sequence useful in antisense technology, a peptide nucleic acid or morpholino nucleic acid;
- (lxv) J¹, J² and J³ independently are hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkaryl, cycloalkyl, aryl, cycloaryl, heterocycle, heteroaryl, hydroxyl, alkoxy or amine;
- 20 (lxvi) R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ and R¹⁵ independently are hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, lower alkynyl, lower cycloalkyl, heterocyclic, lower alkoxy, azido, amino, lower alkylamino, halogen, thiol, SO₂, SO₃, carboxylic acid, C₁₋₆ carboxyl, hydroxyl, nitro, cyano, oxime or hydrazine;
- 25 (lxvii) R¹³ and R¹⁴ optionally can come together to form a pi bond; and
- (lxviii) R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³, and R¹⁰⁴ are independently hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, hydroxyl, alkoxy, cyano, azido, halogen, nitro, SO₂, SO₃, thioalkyl, or amino.

FIGURE 1



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
		PCT/US02/31038
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 31/70; C07H 23/00 US CL : 514/52; 536/26.1, 26.4, 26.44		
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; 536/26.1, 26.4, 26.44		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLLINS, D.A. et al. Transcobalamin II Receptor Imaging via Radiolabeled Diethylene-Triamminepentacetate Cobalamin Analogs. The Journal of Nuclear Medicine. May 1997, Vol. 38, No. 5, pages 717-723, see the Abstract and "In Vitro Biological Activity of DCAs" on page 718.	19-23, 29-34, and 37-45
A	US 5,877,165 A (MIURA et al.) 02 March 1999 (02.03.1999).	1-18, 24-28, 35, and 36
A	US 6,211,355 B1 (COLLINS et al.) 03 April 2001 (03.04.2001).	1-45
A	WO 00/45857 A2 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 10 August 2000 (10.08.2000).	1-45
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underlie the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2002 (26.11.2002)	Date of mailing of the international search report 04 FEB 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>A. Britton Lawrence</i> Certified Examiner, Patent, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31038

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
databases: EAST, Registry, HCAPLUS
search terms: structures, applicants and inventors, cobalamin, transcobalamin, transport protein, intrinsic factor, neutron capture, boron-10, gadolinium-157

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 49/02	B
	A 6 1 K 49/02	C

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 コリンズ, ダグラス・エイ

アメリカ合衆国、ミネソタ・5 5 9 0 2、ロチエスター、メドウラーク・コート・サウス・ウエスト・1 1 5 0

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB01 CC11 CC31 EE41 EE59 FF34 FF68
 4C084 AA13 MA05 NA10 NA13
 4C085 HH03 KA11 KA29 KB09 KB11
 4C086 AA01 AA02 BC08 BC28 BC50 GA07 GA12 MA01 NA10 NA11
 NA13 ZA40 ZB35