

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504363

(P2004-504363A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

A 61 K 49/00

F I

A 61 K 49/00

C

テーマコード (参考)

4 C 0 8 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2002-513574 (P2002-513574)	(71) 出願人	503031134
(86) (22) 出願日	平成13年7月20日 (2001.7.20)		ハインフェルド, ジェイムズ・エフ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月21日 (2003.1.21)		アメリカ合衆国ニューヨーク州11786
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/022832		シヨアハム・ブラドリッドライブ44
(87) 国際公開番号	W02002/007846	(74) 代理人	100060782
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		弁理士 小田島 平吉
(31) 優先権主張番号	09/621, 185	(72) 発明者	ハインフェルド, ジェイムズ・エフ
(32) 優先日	平成12年7月21日 (2000.7.21)		アメリカ合衆国ニューヨーク州11786
(33) 優先権主張国	米国 (US)		シヨアハム・ブラドリッドライブ44
(31) 優先権主張番号	09/834, 049	Fターム(参考)	4C085 HH07 KA09 KB07 KB42 KB45
(32) 優先日	平成13年4月11日 (2001.4.11)		KB52 LL18 LL20
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, JP		

(54) 【発明の名称】 拡張有機コバルトおよびニッケル磁性複合体

(57) 【要約】

拡張コバルト複合体をコントラスト増強剤として利用して磁気共鳴画像法を実施することにより、個体の組織を *in vivo* において画像化するための方法。前記拡張コバルト複合体は、コバルト原子、カルボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドから成り、前記コバルト原子がチオール基および対イオンに結ばれている。また、拡張コバルト複合体にカップリングされた抗体を用いて、サンプル中における抗原の存在を視覚的に検出するための方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) コバルト原子、カルボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドを含む拡張コバルト複合体を提供し、前記コバルト原子がチオール基および対イオンに結合されており、前記拡張複合体が、

i) 安定であり；

ii) 水溶性であり；

iii) 非凝集性であり；

iv) 磁性であり；かつ

v) 0.5 から 10 nm までの大きさである；ということを特徴とし、

b) 組織を拡張コバルト複合体に触れさせるために、段階 a) の拡張コバルト複合体を個体に投与し、そして、

c) 組織を画像化するために個体に対して磁気共鳴画像法を実施すること、より成る個体の組織を *in vivo* で画像化するための方法。

【請求項 2】

前記組織が腫瘍である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記組織が創傷から再生している請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記組織が骨、筋肉、軟骨、肝臓、脾臓、腎臓、静脈、動脈、肺、心臓、脳、胸部、結腸、リンパ節、消化管、および前立腺である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記個体がヒトである請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記個体が動物である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

a) コバルト原子、カルボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドを含む拡張コバルト複合体を提供し、前記コバルト原子がチオール基および対イオンに結合されており、前記拡張複合体が、

i) 安定であり；

ii) 水溶性であり；

iii) 非凝集性であり；

iv) 磁性であり；かつ

v) 0.5 から 10 nm までの大きさである；ということを特徴とし、

b) 腫瘍を拡張コバルト複合体に触れさせるために、段階 a) の拡張コバルト複合体を個体内に投与し、そして、

c) 腫瘍を同定するために個体に対して磁気共鳴画像法を実施すること、より成る個体中の腫瘍を同定するための方法。

【請求項 8】

前記個体がヒトである請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記個体が動物である請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記拡張コバルト複合体がターゲティング分子に連結されている請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

前記ターゲティング分子が、抗体フラグメント、抗体、ポリペチド、核酸、炭水化物、脂質、合成分子から成るグループより選択される請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

投与段階 b) が、腹膜内投与、静脈内投与、筋肉内投与、および経口投与から成るグループより選択される投与形態による、請求項 7 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

- a) コバルト原子、カルボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドを含む拡張コバルト複合体を提供し、前記コバルト原子がチオール基および対イオンに結合されており、前記拡張複合体が、
- i) 安定であり；
 - ii) 水溶性であり；
 - iii) 非凝集性であり；
 - iv) 磁性であり；かつ
 - v) 0.5 から 10 nm までの大きさである；ということを特徴とし、
- b) 組織を拡張コバルト複合体に触れさせるために、前記拡張コバルト複合体を個体に投与し、そして、
- c) 傷ついた組織を画像化するために個体に対して磁気共鳴画像法を実施すること、より成る創傷から再生している個体の組織を *in vivo* で画像化するための方法。

10

【請求項 14】

前記組織が骨格組織、分泌組織、消化組織、筋組織、生殖組織、循環組織、および、免疫組織、神経組織から成るグループより選択される請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

前記組織が肝臓、脾臓、腎臓、静脈、動脈、肺、心臓、脳、胸部、結腸、リンパ節、消化管、および前立腺から成るグループより選択される請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

- a) 分子マーカーに特異的な結合部分に機能的に連結されている拡張コバルト複合体を提供し、前記拡張コバルト複合体がコバルト原子、カルボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドを含み、前記コバルト原子がチオール基および対イオンに結合されており、前記拡張複合体が、
- i) 安定であり；
 - ii) 水溶性であり；
 - iii) 非凝集性であり；
 - iv) 磁性であり；かつ
 - v) 0.5 から 10 nm までの大きさである；ということを特徴とし、
- b) 組織の分子マーカーを拡張コバルト複合体に触れさせるために、段階 a) の拡張コバルト複合体を個体に投与し、そして、
- c) 分子マーカーを発現する組織を画像化するために、個体に対して磁気共鳴画像法を実施すること、より成る特異的な分子マーカーを発現している個体の組織を *in vivo* で画像化するための方法。

20

30

【請求項 17】

- a) 抗原に特異的に結合する抗体を提供し、前記抗体が特徴的な色を持つ拡張コバルト複合体にカップリングされており、
- b) 段階 a) の抗体を、抗体 - 抗原結合に適切な条件の下で、サンプルに触れさせ、そして、
- c) 拡張コバルト複合体の存在が抗体の存在の指標となり、そして従ってサンプル中の抗原の存在の指標となることにより、拡張コバルト複合体の特徴的な色の検出を通して、サンプル中の拡張コバルト複合体の存在を視覚的に検出すること、より成るサンプル中の抗原の存在を視覚的に検出するための方法。

40

【請求項 18】

- a) 抗原に特異的に結合する抗体を提供し、前記抗体が特徴的な色を持つ拡張コバルト複合体にカップリングされており、
- b) 段階 a) の抗体を、抗体 - 抗原結合に適切な条件の下で、サンプルに触れさせ、そして、
- c) 拡張コバルト複合体の存在が、抗体の存在の指標となり、そして従ってサンプル中の抗原の存在の指標となることにより、拡張コバルト複合体の磁氣的性質の検出を通して

50

、サンプル中の拡張コバルト複合体の存在を検出すること、より成るサンプル中の抗原の存在を検出するための方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔発明の背景〕

磁性材料は、コンピューターディスク記憶装置、オーディオおよびビデオ用の記録テープ、センサー、コーティング、光磁気デバイスにおける使用、磁気共鳴画像法(MRI)コントラスト増強剤として、そして、分子もしくは細胞のタギングもしくは分離のためのバイオラベルにおける使用を初めとする多くの実用性を持っている。磁気テープでは一般に、酸化鉄、赤鉄鉱、 Fe_2O_3 、磁赤鉄鉱、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、および磁鉄鉱、 Fe_3O_4 が使用され、または、アルニコ磁石(アルミニウム、ニッケル、コバルト)におけるようなさまざまな合金鋼、もしくはスピネル $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ および $\text{Ba}_2\text{Mn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$ などの八面体 Fe^{3+} イオンとの混合酸化物材料が使用される。MRI増強のためには、DTPA(ジエチレントリアミン五酢酸)と複合体化したガドリニウム、 Gd-DTPA が一般に用いられる。

10

【0002】

残念なことに、現在利用できる磁性材料は、それらが用いられる用途の潜在能力を制限する多くの欠点を持つ。たとえば、磁気記録メディアは、記憶ビット(storage bit)を調製し、磁氣的に分離し、規則的なより小さい要素をアレイ状にまとめ上げる際における正確な制御の欠如のために、その潜在的な密度のはるかに下にある。これは主として、記録メディアが不規則な領域を形成する大量のコーティングをアニーリングすることによって生成されるためである。十分な情報の分離を提供するためには、望ましいものより大きな面積が各情報ビットに割り当てられなければならない。磁気記録メディアが、その代わりに、至適な大きさにされた磁性ナノ粒子から構成されたなら、全体的な品質を減じることなく、より高い記録密度が利用されうるであろう。医療分野においては、造影剤として使われる酸化鉄ナノ粒子は大きさが不規則で、関連した毒性を有し、また、*in vivo* で投与されると不規則な生体分布を示す。受け入れられているMRIコントラスト増強剤である Gd-DTPA は、血流中で短い半減期を持ち、これは、より長い可視化期間を必要とする使用を不可能としている。また、 Gd-DTPA が抗体などのターゲティング部分に連結されると、標的で生成される画像化シグナルはあまりに弱く、たとえば、腫瘍、凝血塊もしくはアテローム斑のターゲティングされた画像化には一般に役立たない。体内の一つの部位に分配された鉄などの磁性粒子への振動磁場の治療的応用が、腫瘍を加熱してそれらを破壊することにおける使用について提案された。しかし、特定の腫瘍による不十分な粒子の取り込み、十分な粒子蓄積の欠如、および相応な粒子の毒性によって、成功は限定された。

20

30

【0003】

磁性ナノ粒子の合成は一般に、巨視的な磁石の粉碎、超音波処理、ミセルの形成、pH調整、もしくは調節された酸化を含む。残念なことに、現在使われているこれらの方法は、多くの用途において最適以下であったり、それらの使用を妨げてしまう不均一な大きさの粒子を生成する。一様で小さな磁性材料、特に10nm未満のものに対しては、関連する技術分野においてニーズがある。

40

【0004】

当該技術分野において現在利用できる磁性ナノ粒子は通常、材料の電子顕微鏡写真から立証されるように、形成および使用の間に凝集する。凝集は望ましくない性質である。さらなる望ましくない性質は、磁性材料の安定度の欠如である。当該技術分野における磁性粒子は、短期間の貯蔵後に変質し、劣化した磁氣的性質を示す。多くの鉄粒子は、さびつきに普通なように、酸化し続ける。

【0005】

しばしば、使用前にさらに磁気粒子を修飾することが必要である。たとえば、多くの磁性材料はコーティングされなければならない。コーティングは糖、ポリマーおよび、さまざま

50

な他の物質を粒子と混ぜ合わせることによる。これらのコーティングは吸着の不安定性をこ
うむる。もう一つの修飾は、粒子への分子の共有結合的な付着である。一つの例は、酸化
鉄粒子の酸素原子への分子の付着である。この産物 (p r o d u c e) は多くの用途に有
用な共有結合を有しているものの、使用を制限する不安定性、乏しいサイズ分布、毒性お
よび凝集といった、鉄粒子を磁性材料として利用することに関連する多くの他の不利益が
ある。

【 0 0 0 6 】

〔 発明の概要 〕

本発明の一つの態様は、拡張コバルト複合体 (e x t e n d e d c o b a l t c o m
p l e x) をコントラスト増強剤として利用して、個体の内部成分 (たとえば組織) を i
n v i v o で画像化するための方法である。拡張コバルト複合体は、コバルト原子、カル
ボン酸リガンド、アミンリガンド、および多座配位性チオール含有有機リガンドを含ん
で成り、このコバルト原子はチオール基および対イオンに結合している。この拡張コバル
ト複合体は、安定で、水溶性で、非凝集性で、磁性であり、0.5 ~ 10 nm の大きさで
あることを特徴とする。本方法は、拡張コバルト複合体を個体に投与して組織を拡張コバ
ルト複合体に触れさせ、そして、個体に磁気共鳴画像法を実施して組織を画像化すること
を含む。一つの実施態様では、画像化される組織は腫瘍である。この方法は腫瘍の臨床診
断に非常に有用である。もう一つの実施態様では、組織が創傷から再生している。拡張コ
バルト複合体は、場合によって、生体分子、好ましくは、画像化される組織上で選択的に
発現される標的分子へと拡張コバルト複合体を特異的に誘導する結合部分に連結される。

【 0 0 0 7 】

本発明のもう一つの態様は、抗原に特異的に結合する抗体であって、特徴的な色を持つ拡
張コバルト複合体にカップリングされている抗体を用いて、サンプル中の抗原の存在を視
覚的に検出するための方法に関する。この方法では、抗体は抗体 - 抗原結合に適切な条件
の下でサンプルに接触され、サンプルは未結合の抗体を取り除くために洗浄され、残って
いる拡張コバルト複合体の存在が、その特徴的な色により視覚的に検出される。

【 0 0 0 8 】

〔 発明の詳細な記述 〕

本発明の態様は、ニッケルおよび/もしくはコバルトを含むナノ粒子の形態の新しいクラ
スの有機磁性材料の開発に関する。先行技術の磁性ナノ粒子は、コバルトもしくは酸化鉄
などの磁性材料の固形粒子である。そのような粒子はそのまま使用されるか、もしくは
、たとえば、デキストランでコーティングされる。大きさの範囲の他端には、ガドリニウ
ム - D T P A のような、さまざまな有機分子と複合体化した単一の磁性イオンがある。本
発明では、磁性ナノ粒子組成物は、チオール基を含む小さいペプチド (本明細書中ではチ
オール含有ペプチドもしくはチオールペプチドという) および、さまざまな対イオン (リ
ガンドともいう) から合成されて、(溶出剤として水を用いたゲル濾過カラム上での排除
によって測定されるところでは) 見かけの分子量が約 3 , 0 0 0 ダルトンよりも大きくな
るような、複数のコバルトもしくはニッケル原子が複数のペプチドに結合されている拡張
複合体を形成する。この拡張複合体は、分子量 3 , 0 0 0 (名目上) のフィルター (A m
i c o n C e n t r i c o n 3) を通り抜けないが、分子量 1 0 , 0 0 0 のフィルタ
ー (A m i c o n C e n t r i c o n 1 0) を大部分通り抜ける。形成される複合体
は、G d - D T P A (分子量 5 4 8) などの低分子量複合体よりも、はるかに大きなサイ
ズであることから、「拡張 (e t x e n d e d) 」もしくは「大きな (l a r g e) 」と
呼ばれる。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の態様は、拡張複合体の合成方法に関する。超音波処理、ミセル、強い還元剤
、粉碎、酸化、もしくは単純なコンプレキション (c o m p l e x i o n) を使用する既
存の磁性材料の合成方法とは異なり、本拡張複合体を形成するためには、コバルトもし
くはニッケル金属塩が、塩基性の溶液中でチオールペプチド (グルタチオン)、クエン酸、
アンモニア、および塩化物と複合体化される。この方法は、新たな形態の磁性ナノ粒子を

捜している間に偶然に発見された。本明細書に記述されている方法は、もとの手順を洗練したものである。拡張コバルト複合体を合成する際、合成中に薄赤色もしくは桃色から濃い、ほぼ不透明な茶色への瞬間的な溶液の色の変化が、沈殿なしに生じる。拡張ニッケル複合体を合成する際には、緑色から濃い、ほぼ不透明な茶色への変色が、沈殿なしに起こる。観察される変色は、初め予期せぬものであった。その結果生じる材料の色と光学密度の変化は、近接して間隔をあけられた金属原子のプラズモン相互作用、もしくは複合体化しているリガンドの変更を示す。また、合成反応から作り出された拡張複合体が、出発反応物のどれよりも著しく大きいという発見および、それが本明細書に記述される磁氣的性質を有するという発見も予期せぬものであった。

【0010】

拡張有機コバルトおよび/もしくはニッケル磁性複合体は、チオール含有多座配位性架橋リガンド(「多座配位性チオール含有有機リガンド」)ならびにカルボン酸およびアミンリガンドと複合体を形成した金属イオンCo(II)およびNi(II)から構成され、個々の出発成分よりも著しく大きな産物を形成する。他のリガンドもまた、豊富な多リガンド性の拡張複合体に取り込まれうる(たとえば、塩化物もしくは水酸化物イオン)。水力学的測定は、以下の実施例のセクションに詳しく述べられている方法によって生成される茶色の複合体が3,000~20,000の範囲にあるように見える分子量を持つことを示す。

【0011】

多座配位性架橋リガンドが、拡張複合体の形成に用いられる。好ましい実施態様では、チオールペプチドのグルタチオンが使用されている。さらに、アミンおよびカルボン酸リガンド、好ましくは塩基性溶液中のアンモニウムイオンからのアンモニア、およびクエン酸三ナトリウムからのクエン酸もまた使用される。

【0012】

グルタチオンは、ガンマ・グルタミン酸-システイン-グリシンから成るトリペプチドである。これは一般に6個の配位部位を持つ金属に配位する、アミン、カルボキシルおよびチオールリガンドを提供する。これは、架橋配位複合体が形成されて、本発明の「拡張」つまり多量体性の複合体が生成されうることを意味する。グルタチオンは、他の分子への架橋に有用であり、よって、コンジュゲートの形成を可能とする、いくつかの反応性の基(アミン、カルボキシルおよびチオール)を含む。

【0013】

拡張複合体は、したがって、金属原子に配位した複数の種を含む。複合体の合成中もしくは合成後に、さらなる分子がこれらのリガンドのうちの一つと置換され、置換分子の拡張複合体への直接的な取り込み、もしくは結合を生じることができる。たとえば、Fab'抗体フラグメントは、複合体の形成中にそれらが存在すると、複体内に安定に取り込まれうるが見出された。本発明のこの態様は、以下にさらに詳細に記述される。

【0014】

本発明の拡張複合体はまた、上に同定された成分に類似の物質を使っても合成されうる。たとえば、金属イオンを架橋することによって拡張複合体を形成することができる多座配位性リガンド(たとえば、ペプチドもしくはポリマー)が、グルタチオンの代わりに使用されうる。アンモニアおよびクエン酸などの配位性リガンドもまた、金属に同様に配位する他の物質と交換されうる。アンモニアおよびクエン酸の代わりに用いられうる、コバルトおよびニッケルについて一般に既知のいくつかのリガンドには、I⁻、Br⁻、Cl⁻、SCN⁻、F⁻、尿素、OH⁻、酢酸、シュウ酸、水、NCs⁻、グリシン、ピリジン、アンモニア、エチレンジアミン、SO₃²⁻、ジピリジン、o-フェナントロリン、NO₂⁻およびCN⁻がある。

【0015】

以下の段階が、コバルト有機複合体、ニッケル有機複合体、もしくはコバルトおよびニッケル有機複合体の組み合わせを調製するために使用されうる：

1. 適切な金属の塩が水の中に溶解される；好ましいコバルト塩は塩化コバルトであり

10

20

30

40

50

、好ましいニッケル塩は硫酸ニッケルである。混合金属複合物を生成するためには、コバルトおよびニッケルの両方を含む溶液が使用される。

【0016】

2. 塩基が調製される；好ましい塩基は、水酸化アンモニウムおよび水酸化ナトリウムである。

【0017】

3. 多座配位性チオール含有有機リガンドの水溶液が調製される；好ましい材料は、ペプチド・グルタチオンである。

【0018】

4. アミンリガンドが調製される；好ましい供給源は、塩化アンモニウムの水溶液である（水酸化アンモニウムが塩基に用いられる場合は、これは省略されることができる）。 10

【0019】

5. カルボン酸リガンドが調製される；好ましい供給源は、クエン酸三ナトリウムの水溶液である。

【0020】

6. 上記の溶液が、拡張有機コバルトおよび/もしくはニッケル複合体を生成するために組み合わせられる；好ましい添加の順番は、以下の通りである：クエン酸溶液がコバルトおよび/もしくはニッケル溶液に加えられ、その後、水酸化アンモニウム、それから、チオールペプチドを添加。この順番は沈殿物を生じることなく、すべてを可溶性で維持する。添加の順番は、本質的に同様な産物を生じるために変更されうるが、これは中間体の沈殿物を生じることもある。 20

【0021】

複合体形成のための最終的な調製物の好ましいpHは9～10である。ある一定の範囲外では拡張複合体が形成しないか、もしくはその代わりに大量の凝集が生じることから、さまざまな成分の量および濃度は重要である。好ましい量は、0.4 mlのH₂O中の（重量で）20%のCoCl₂・6H₂OもしくはNiSO₄・6H₂O、0.4 mlのH₂O中の20% Na₃C₆H₅O₇・2H₂O、0.4 mlの2M NH₄OH、および0.15 mlの8%グルタチオンである。使用される成分の好ましい最終濃度は、以下の通りである：120 mMのコバルトもしくはニッケルイオン、100 mMのクエン酸イオン、20 mMのグルタチオン、および0.3 Mの水酸化アンモニウム。あるいは、0.3 Mの水酸化アンモニウムは、0.5 Mの塩化アンモニウムおよび0.3 Mの水酸化ナトリウムと交換されてもよい。体積はもちろん、より多く、もしくはより少ない産物を生成するためにスケーリングされうる。これらの値の付近での、ある程度の異なる成分の変更は、なお同一もしくは同様な産物をもたらすであろう。複合体に取り込まれない過剰成分は、ゲル濾過、クロマトグラフィー、もしくは当該技術分野において知られている他の技法によって分離されうる。好結果の調製物は、これらの濃度値を適度にスケーリングし、相対値を同一に保つことによって、作製されうる。好ましい成分のモル比は、以下の通りである：1モルのグルタチオン：6モルのコバルトもしくはニッケル：5モルのクエン酸塩：15モルの水酸化アンモニウム。拡張複合体の形成に有用な、これらの成分の範囲は、以下を含む：4～8モルのコバルトおよび/もしくはニッケルの塩、0.6～1.5モルの多座配位性チオール含有有機リガンド、8～30モルのアミンリガンド、および3～7モルのカルボン酸リガンド（ただし、他の組み合わせも可能である）。 30 40

【0022】

驚くべきことに、形成される複合体は、出発成分のどれよりもはるかに大きな、3,000～20,000ダルトンの間の見かけの水力学的分子量を持つ。好ましい出発成分の分子量は、以下の通りである：CoCl₂・6H₂O：238；Na₃C₆H₅O₇・2H₂O：294；NH₄OH：35；グルタチオン：309。

【0023】

上述の手順は0.5～10 nm、典型的には0.5～5 nmの範囲の大きさを持つ拡張複合体を生成する。5～20 nmの複合体は、調製物中のチオール複合体化剤の量を減少さ 50

せることによって取得されうる。これは茶色ではなく、オレンジ色もしくは赤色の粒子をもたらす。

【0024】

コバルトおよびニッケルは、混合された組成の磁性原子との複合体を生成するために、合成中に比例した量のコバルトおよびニッケルの塩を混合することによって、調製物中で組み合わされうる。生成されるそのようなハイブリッド粒子は、ユニークな磁氣的性質を有するであろう。さらに、他の金属もまた、取り入れられることができる。コバルト、ニッケル、もしくはコバルトおよびニッケルの組み合わせを含む上述の拡張複合体は、本明細書に記述される方法における使用に適している。特に明記しない限り、用語「拡張複合体」は、拡張コバルト複合体、ニッケルの拡張複合体、ならびにコバルトおよびニッケルの合金拡張複合体を包含する。

10

【0025】

この拡張複合体は、それが示すいくつかの性質によって特徴づけられる。それは非常に水溶性であり、乾燥されることができ、そのあと明白な変質なく、水に容易に再懸濁されることができる。合成反応で形成された複合体の電子顕微鏡法による検査は、それらが密集した固形の核として金属を持つのではなく、金属が各複合体上にかなり均一に分布されており、その範囲にわたって比較的一様な密度を与える、約0.5 ~ 5 nmの大きさの構造物であることを示す。複合体の凝集は検出されない。

【0026】

コバルト複合体の水溶液から得られる磁気計測は、磁場(M)対磁界強度(H)が、最高13,000 Gaussまでの浅い勾配を持つ直線であり、強磁性もしくは超常磁性の徴候は与えないことを示す。材料のモル磁化率は低く、約0.02(cgs単位系)未満であり、溶液中のコバルトイオンの範囲内である。これらのデータのすべては、金属が中央の核に高度に濃縮されてない有機金属複合体に一致している。この複合体は濃い茶色をしており、紫外-可視分光法は、約380および450 nmにピークもしくは肩を持ち、240 nm(測定された最も短い波長)の高い吸収から600 nmの低い吸収まで減少するスペクトルを明らかにする；一つの形態は約364 nmに肩を示す。より大きなコバルトおよびニッケルの複合体もまた、合成されることができる。これらは、より長い波長(およそ520 ~ 540 nm)にピークもしくは肩を持ち、オレンジ色もしくは赤色をしている。乾燥もしくは、溶液への塩基の添加によって沈殿された場合、その結果生じる微粒子は、不均質な磁場中で運動を示す。室温で水中に保管すると、コバルト複合体は数ヶ月の期間にわたって性質に明白な変化を示さない。この材料は非常に水溶性であるだけでなく、それは「粘着性」でもなく、ガラス表面もしくはアルミニウムのようなタンパク質に粘着しない。拡張複合体は、ゲル濾過カラム上では水性バッファー中で単一のピークとして移動し、TLC(薄層クロマトグラフィー)プレート上では50:50のメタノール:水の中で単一のスポットとして移動する。イオン交換クロマトグラフィーは、関連するいくつかの荷電した種を分離することができ、拡張複合体産物が完全に均一な混合液ではないことを示す。これらの珍しい特性は、この新たな磁性材料と以前に記述された他のものとを区別する。

20

30

【0027】

ニッケルの拡張複合体は、拡張コバルト複合体よりも安定性が低い。それは時間が経つとその性質に変化を示し、一般に数時間後に部分的な形成の逆転を示す。しかし、ニッケル複合体は複合体の有機部分を架橋することによって安定化されうる。

40

【0028】

そのユニークな性質のため、本拡張複合体はさまざまな用途(その大半は水溶液を利用する)に有用である。その安定性は、ほぼすべての使用にとって価値のある強みとなる。複合体粒子の非凝集性は、それらの使用にとって特に重要である。凝集した材料は、変化した性質を示し、大きさの制御は困難であり、精製は妨げられ、拡張複合体を分子的に操作する際、制御は一般に失われる。この複合体の極めて小さなサイズ(0.5 ~ 10 nm)は、それをin vivoでの使用のため、超薄の層もしくはコーティングを形成するため

50

、および材料への迅速な拡散のために理想的とする。複合体はアルブミンおよび多くの他のタンパク質に粘着しないため、バックグラウンドもしくは変化した生体分布へと導く望ましくない非特異的接着を生じることなく、*in vivo*もしくは*in vitro*で使用されることができる。拡張複合体粒子の大きい着色された性質は、それらを放射性タグもしくは他の二次的増強手順の非存在下における、直接的な可視化および染色に理想的にする。拡張複合体は、酸化鉄およびガドリニウムのような一般に使われる他の、より磁性の高い材料の代わりに、コバルトもしくはニッケルからできている。比べると、コバルトの毒性はとても低く、より大量の複合体が投与されうる*in vivo*での応用において、かなり有利に使用されることができる。

【0029】

拡張複合体中における金属原子の散布的な配置は、この材料を、いくつかの用途における使用に理想的とする。コバルトおよびニッケル原子が一般に、中央の密集した核にあるのではなく、複合体上に分散されているため、それらはさまざまな理由から、当該技術分野において一般に使われる他の磁性材料よりも優れている。たとえば、MRIの手順において、画像化の部位にあるコントラスト増強剤は、隣接する水のプロトンの緩和時間を変化させる。最大の効果は、磁性原子が水分子と緊密な接触にあるときに得られる。拡張複合体は、より多くの金属原子への水のアクセスを許容するため、それは内部原子が水分子から遮蔽される固形領域を含む材料よりも、はるかに効果的な増強剤として働く。この点について、本発明の拡張複合体は、同数の磁性原子を持つ固形粒子に比べ、向上されたMRI増強を提供する。

【0030】

拡張複合体の有機ペプチド成分は、結合部分（たとえば、抗体および受容体）のような他の分子への共有結合による連結を容易にする。別の分子への拡張複合体の連結は、つながれた産物に磁氣的性質を授ける。抗体、ペプチド、核酸、炭水化物、もしくはタンパク質といった別の分子につながれた拡張複合体は、たとえば、拡張複合体を特定の分子へとターゲティングする際（たとえば、腫瘍、アテローム斑、凝血塊、もしくは特定の細胞外マトリックス成分、組織もしくは細胞の同定において）に有用である。結合をつくる方法は以下で議論される。

【0031】

拡張複合体は複数のコバルトおよび/もしくはニッケル原子を含むため、1もしくは数個の磁性原子のみにつながれた抗体（たとえば、ガドリニウムにつながれた抗体）から成る類似した薬剤に比べ、より多くのこれらの磁氣的に活性な原子が、単一の連結された抗体によって標的に送達されることができる。抗原を磁性材料で標識（本明細書ではターゲティングともいう）する際、標的に届けられる磁性材料の量は、得られることのできるシグナル、もしくは生成されることのできる治療効果に正比例する。よって、画像化もしくは治療のためのターゲティングされた送達における感度と効力は、磁性複合体の使用によって強化される。*In vitro*標識は同様に、単一の磁性原子による標識の使用を上まわって改善される。センサーもしくはコーティングにおけるような材料的な用途には、磁性原子の密度もまた、産物の品質に相關する。

【0032】

拡張複合体の一つのそのような使用は、マトリクス内の特定部位で熱を発生させることにおいてなされる。これは、拡張複合体を標的部位に送達し、それから、遠隔的に磁性粒子を熱するために振動磁場を適用することによって引き起こされる。これは、磁性粒子を含む領域のマトリクスのみにおける選択的な加熱を生じる。材料的な用途については、本発明の拡張複合体の使用は、ナノファブリケーション（*nanofabrication*）、選択的な重合、および局所的な加熱が要求される他の使用において、助けとなりうる。*In vivo*における治療の場合、好ましくは、除去もしくは改変を必要とする腫瘍もしくは他の組織、アテローム斑、もしくは細胞外マトリックス成分に対する結合部分によってターゲティングされた拡張複合体の送達と、その後の磁場の適用によるこれら特定領域における温度の上昇は、その場所における細胞死もしくは他の熱関連応答を引き起こす

10

20

30

40

50

であろう。この治療様式は、現在利用できる磁性材料が持つ問題（送達、毒性、副作用、および不十分な反応の生成など）のために、現在では臨床的に利用可能でない。しかし、拡張複合体の使用、特にターゲティングされた拡張複合体の使用は、大量の非毒性磁性材料が目的部位へと特異的に誘導されることを可能とすることによって、これらの困難の多くを克服する。

【0033】

本発明の別の態様は、拡張複合体に他の分子をカップリングさせるための方法に関する。拡張複合体に他の分子を連結するために、いくつかの方法が開発され、よって、さまざまな物質の結合のための柔軟なプロトコールが提供された。好ましい方法は、一つもしくはそれより多いフリーな蝶番チオール（hinge thiol）を有するFab'抗体フラグメントに拡張複合体をつなげることである。この方法では、Fab'抗体フラグメントはチオールペプチドの添加に先立ち、拡張複合体合成反応に加えられる。それから、金属がチオールと複合体化され、拡張複合体の形成中にFab'を取り込む。これは、これらの粒子の合成に特異的なユニークな方法であり、他で記述されたことはない。本方法は、それが長々しい段階もしくは精製を要求しないという点で迅速である。安定なコンジュゲートが数秒のみで形成する。同様に、チオール基を含む他の分子もまた、合成反応におけるそのような取り込みによって、拡張複合体にカップリングされることができる。

10

【0034】

拡張複合体を他の分子につなげるための代替の方法は、前もって形成された拡張複合体上に存在する他の官能基（たとえば、アミノ基、カルボキシル基、もしくはチオール基）に、望まれる分子を共有結合的にカップリングさせることである。たとえば、チオールペプチドのαアミノ基は、ヒドロキシスクシニミドエステルの使用といった、標準的な架橋試薬によって連結されうる。チオール基へのカップリングはマレイミドの使用によることができ、カルボキシル基はカルボジイミド（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）など）もしくは他のそのような反応によって連結されうる。当該技術分野において知られている他の反応基および連結剤もまた利用されうる。

20

【0035】

したがって、複合体がつくられる前もしくは後に、さらなる分子のカップリングが行われることができる。これらの方法によって、実質的に他のあらゆる分子もしくは表面が、複合体に共有結合で結び付けられうる。付着させるのに有用な分子には、Fab'、IgG、ペプチド、ホルモン、色素、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、核酸、ポリマー、およびガラスがある。

30

【0036】

本発明の別の態様は、拡張複合体（コバルトおよび/もしくはニッケル、または他の合金）をコントラスト増強剤として用いた磁気共鳴画像法による、個体の組織のin vivoにおける画像化に関する。個体の組織を画像化するため、画像化される個体の組織への薬剤の接触を促進する方法によって、拡張複合体分子が個体に投与される。投与に続き、当該技術分野における通常の方法によって、磁気共鳴画像法が個体に対して実施される。

【0037】

個体の組織の画像化は本明細書中で記述される。しかし、本明細書に記述されている同一の方法によって、組織、器官、細胞、血液、細胞外基質成分、アミロイド斑およびアテローム斑などの沈着物、封入体（inclusion）、および体の他の内部構造を限定することなく含む、さまざまな個体の内部成分を画像化するために、本発明が使用されうるということは当業者によって認識されるであろう。

40

【0038】

拡張複合体分子の投与方法は、画像化される組織の位置に依存し、熟練した実務家によって容易に決定される。投与は、たとえば、腹膜内注射、静脈内注射、筋肉内注射、および経口投与を通してなされうる。投与される拡張複合体の量は、磁気共鳴画像法に使用される機械の感度、および他の変数に依存し、各特定の応用に対して熟練した実務家によって決定されるであろう。一般的な経験則としては、個体の体重1キログラムあたり0.1～

50

10 mg の量のコントラスト増強剤が好ましい。しかし、これらの量は本発明にとって限定的であるとみなされるべきではない。

【0039】

In vivoにおける画像化のための本方法は、磁気共鳴画像法が通常実施される、あらゆる動物に適している。好ましい実施態様では、個体はヒトである。この方法による画像化に適した組織は、骨格組織、分泌組織、消化組織、筋組織、生殖組織、循環組織、免疫組織、神経組織、および腫瘍組織を限定することなく含む。画像化のための組織の特定のいくつかの例は、肝臓、脾臓、腎臓、静脈、動脈、肺、心臓、脳、胸部、結腸、リンパ節、消化管、および前立腺である。

【0040】

上述の方法による組織の in vivo 画像化は、個体中の腫瘍を同定する際に特に有用であり、ルーチ的な診断スクリーニングに使用されることができる。一つの実施例において、腫瘍は脳腫瘍である。下記の実施例セクションにおいて詳述されるように、拡張コバルト複合体のコントラスト増強剤としての使用は、さもなければ、当該技術分野において使用される標準的なコントラスト増強剤であるガドジアミドを用いては検出されない、ラット中の脳腫瘍の検出を可能とした。

【0041】

コントラスト増強剤による組織もしくは他の内部成分の特異的なターゲティングを容易にするために、拡張複合体は、画像化される組織もしくは成分に独特な成分に対して親和性を持つ部分、またはそうでなければ、個体のバイオプロセスによって画像化される組織の領域に局在化もしくは運ばれる部分に、操作可能に連結されうる。そのような部分は、有用な生体分子（たとえば、抗原に結合する抗体フラグメント、抗体、ポリペチド、核酸、炭水化物、もしくは脂質）、薬剤、または組織のターゲティングのために特別に改変もしくは設計された合成分子でありうる。一つの実施態様では、この部分は分子マーカーに特異的に結合する、もしくは結合される結合部分である。非常に有用な結合部分は、特異的な結合ペアのメンバー（たとえば、抗体-抗原、受容体-リガンド、ハイブリダイズする核酸）である。生理的条件下で十分な親和性を持つそのような結合が、画像化中に、結びつけられているコバルト複合体を分子マーカーに固定するために必要である。本明細書中で使用される「操作可能に連結」という用語は、その結合中の成分（コントラスト増強剤および結合部分）の基本機能が保存されることを示すために使用される。したがって、拡張複合体は造影剤としての機能を保持し、結合部分は分子マーカーに対するその親和性を保持する。拡張複合体の結合部分への連結は、生理的条件下で結合部分を拡張複合体へと安定して物理的に結合させるあらゆる方法による。好ましくは、この結合は共有結合である。そのような結合をつくるための方法は、上述されている。

【0042】

拡張複合体がターゲティングされうる分子マーカーは、好ましくは、標的を構成する細胞上で、体内の他の場所よりも有意に高いレベルで発現される。たとえば、前立腺に特異的な抗原は、前立腺組織の画像化に有用である。いくつかの有用な分子マーカーは、受容体、腫瘍性タンパク質、表面抗原、脂質、炭水化物、および腫瘍抗原を限定することなく含む。拡張複合体のターゲティングは、たとえば、診断を助けるために、外来の細胞もしくは細胞の副産物（たとえば、真菌細胞）が選択的にターゲティングされうるという点で、個体の内在性の細胞に限定されない。

【0043】

画像化のために好ましい投与後の時間は、未結合の薬剤が明らかに取り除かれた時間の後である（これが最適な信号雑音比を生成するからである）。この時間はルーチン実験を通して決定され、平均的な当業者の能力の範囲内である。

【0044】

本発明の別の態様は、特定の分子マーカーを発現している腫瘍組織を選択的に画像化することによって、in vivoにおける腫瘍の進行もしくは機能性を診断するための方法に関する。分子マーカーを発現している腫瘍の画像化は、特異的な結合部分への連結を通

10

20

30

40

50

して分子マーカーへと特異的にターゲティングされた拡張複合体を用いて実施される。このようにして、磁気共鳴画像法により、腫瘍上における腫瘍進行のマーカー（たとえば、癌遺伝子）の有無が決定される。同様に、ターゲティングされた拡張複合体は、表面抗原の差別的な発現をもたらす他の疾患（たとえば、ウイルス感染）のマーカーの存在を決定するために用いられることができる。拡張複合体に連結された結合部分もしくは他のターゲティング作用剤は、コントラスト増強剤を分子マーカーの位置に誘導する。拡張複合体を利用して、診断目的のためにコントラスト増強剤をターゲティングすることは、感度が標的上に存在する抗原の量によって制限されるガドリニウムを用いた同じアプローチよりも優れている。拡張複合体は、より強力であるため、この手順はより感度が高い。

【0045】

本発明の拡張複合体はまた、創傷から再生している組織を画像化するためにも、磁気共鳴画像法においてコントラスト増強剤として用いられうる。この方法は基本的に、個体における組織の *in vivo* 画像化について上に示されたようにして、拡張複合体造影剤により授けられる増加したコントラストによって容易にされた再生中の創傷の特異的同定によって実施される。本明細書中で述べるところでは、創傷は組織に損害を与えて、裂傷、切傷、もしくは擦過傷を生じた力もしくは病態の結果である。画像化される創傷の部分は、組織の再生およびモデリングを受けている領域である。あらゆる損害を受けた組織が、このようにして画像化されうる。たとえば、傷つけられ、再生している骨格組織（硬骨、軟骨）、分泌組織、消化組織、筋組織、生殖組織、血管組織、循環組織、脳組織、胸部組織、前立腺組織、動脈組織、および心臓組織は、本方法によって画像化されることができる。傷ついた組織を画像化することは、診断目的および治療過程のモニタリングのために有用である。これは、臨床視診によって容易に観察できない内部の損傷もしくは病変に特に有用である。

【0046】

本発明の別の態様は、蓄積された拡張複合体の視覚的もしくは、その代わりに磁気的な検出による、サンプル中の標的分子（たとえば、抗原）の存在の検出における、上述の拡張複合体の使用に関する。以下の実施例セクションに詳述される実験（例5および6）は、上で述べたように、特異的な結合部分（たとえば、抗体）に機能的に連結された拡張複合体の分子が、標的分子への暴露に伴い、標的分子の特定の位置に集中することを示している。この濃縮は拡張複合体の特徴的な色のために、目に見えて検出できる。

【0047】

サンプル中における標的分子（たとえば、抗原）の存在を検出するために、標的分子に特異的にターゲティングされた拡張複合体が、結合部分による標的の結合に適切な条件の下で、サンプルに接触させられる。場合により、サンプルはそれから、未結合の拡張複合体を取り除くために洗浄され、よって、信号雑音比が改善される。標的に結合したまま残っている拡張複合体の存在はそれから、その特徴的な性質（色もしくは磁気的性質）によって同定される。拡張複合体の存在は結合部分の存在の指標であり、それゆえ、標的分子の存在の指標である。好ましくは、結合部分は抗体であり、標的分子は抗体が結合する抗原である。

【0048】

標的分子は、検出過程を通して（たとえば、洗浄および、使用されるあらゆる検出の過程）結合が持続する十分な親和性をもって、必ず特異的な結合部分によって結合され、もしくは代わりに、必ず特異的な結合部分に結合する。検出されることのできる標的の最小量は、色もしくは磁気的な検出の感度によって制限される。マイクログラム量の標的分子で、裸眼に見えるだけの十分な量の蓄積が可能である。検出感度は、拡張複合体の特異的な色吸収波長（*specific color absorption wavelength*）を検出するための光学的検出装置を用いて、もしくは磁気検出装置を用いて高められうる。

【0049】

サンプルは水溶液であっても、もしくは非水溶液サンプル（たとえば、組織）であっても

10

20

30

40

50

よい。検出は、サンプルの分画（たとえば、大きさにより）および／もしくは固形支持体上へのサンプルの固定化（たとえば、免疫プロットもしくはE L I S A）によって、大いに容易にされる。そのような応用は、in vitroおよびin situの分析に非常に適している。

【0050】

標的分子の定量的検出が、ターゲティングされた拡張複合体を用いて可能である。定量的検出のためには、標準化された量の標的分子が、ターゲティングされた拡張複合体によって生成される検出シグナルを校正するために用いられる。サンプル中の標的分子の量はそれから、サンプルから生成された検出シグナルと、標準で得られた校正されたシグナルとの比較によって決定される。そのような校正は、当該技術分野において日常的に実施されており、熟練した実務家には公知である。本発明のこの態様は、家庭用妊娠検査として現在市販されているキットの類のような、現在コロイド状の金および着色ラテックス粒子／ビーズを利用しているワンステップ検出キットにおいて極めて有用である。

10

【0051】

【実施例】

以下の例は、当業者にとって変更、拡張および応用が明らかであることから、本明細書で特定される可能性の見本としてのみ提供され、限定的となることは意図されていない。

例1： 有機コバルト複合体の製造。

【0052】

0.4 mlの水に溶かした（重量で）20%の塩化コバルト（II）六水化物溶液が、0.4 mlのH₂Oに溶かした20%のクエン酸（三）ナトリウム溶液と混合された。次に、0.4 mlの2 M水酸化アンモニウムが加えられ、赤い溶液が、より桃／紫色に変化した。次に、0.1 mlの8%還元グルタチオン水溶液が加えられ、溶液はそれから濃い茶色に変化した。5分後、さらなる一定量、すなわち0.05 mlの8%グルタチオン水溶液が加えられ、溶液はより濃い色になった。

20

【0053】

この産物はAmicon GH25を充填したゲル濾過サイズ分画カラム上で精製され、溶出剤としての水と共に流された。複合体は空隙容量中に現れ、見かけの分子量が約3,000未満のあらゆる種、すなわち、あらゆる遊離のコバルトイオンもしくはグルタチオンを取り除くために、この段階が使用された。

30

【0054】

複合体を含む画分は、真空回転蒸発によって乾燥され、それから、少量の水の中に再懸濁された。これは産物の容易な濃縮を可能とした。電子顕微鏡は0.5～10 nmの複合体が形成されたことを確認した。

例2： 有機ニッケル複合体の製造。

【0055】

0.2 mlの10%クエン酸ナトリウム水溶液が、0.2 mlの10%硫酸ニッケル水溶液に加えられた。次に、0.2 mlの1 M水酸化アンモニウム溶液が加えられた。それから、0.05 mlの4%グルタチオン水溶液が加えられ、混合液は濃い茶色に変化した。5分後に、0.05 mlの4%グルタチオン水溶液がさらに加えられた。

40

例3： 10～20 nmの有機コバルト複合体の製造。

【0056】

0.2 mlの10%クエン酸ナトリウム水溶液が、0.2 mlの10%塩化コバルト水溶液に加えられた。次に、0.2 mlの10%塩化アンモニウム溶液が加えられ、それに続き、0.2 mlの0.1%次亜リン酸ナトリウム水溶液が加えられた。次に、0.3 mlの1 M水酸化アンモニウム溶液が加えられた。それから、0.02 mlの4%グルタチオン水溶液が加えられ、混合液はオレンジ色に変わり、その後、数時間をかけてオレンジ赤色に、それから赤色の溶液へと熟した。別の製法では、0.2 mlの10%クエン酸ナトリウム水溶液と0.2 mlの10%塩化コバルト水溶液を混合し、その後、0.4 mlの1 M水酸化アンモニウム溶液を加え、それから、0.05 mlの4%グルタチオン水溶

50

液を加えることにより、同様な大きさのコバルト複合体が形成された。

例 4： コバルトおよびニッケルの混合複合体の製造。

【 0 0 5 7 】

0 . 1 m l の 1 0 % 塩化コバルト水溶液が、0 . 1 m l の 1 0 % 硫酸ニッケル水溶液と混合された。それから、0 . 2 m l の 1 0 % クエン酸ナトリウム水溶液が加えられた。次に、0 . 2 m l の 1 M 水酸化アンモニウム溶液が加えられた。それから、0 . 0 5 m l の 4 % グルタチオン水溶液が加えられ、混合液は茶色に変化した。5 分後に、0 . 0 5 m l の 4 % グルタチオン水溶液がもう一度加えられた。

例 5： 有機コバルトもしくはニッケル拡張複合体の調製中における、抗体の共有結合による複合体への連結、および複合体の抗原へのターゲティング。

10

【 0 0 5 8 】

F a b ' 抗体フラグメントは、マウス I g G に特異的に結合するウサギ抗マウス抗体 0 . 2 m g を 5 m M の E D T A (エチレンジアミン四酢酸) を含む 0 . 1 M リン酸バッファー (p H 6) 中、3 0 m M ジチオトレイトール (D T T) で 1 時間、還元することによって調製された。F a b ' 抗体フラグメントはそれから、ゲル排除カラム (A m i c o n G H 2 5) に溶出剤としての水と共に流して、D T T および他の低分子量成分から精製された。タンパク質ピークは 2 m l 体積中にプールされた。

【 0 0 5 9 】

コバルトもしくはニッケルの複合体は、0 . 4 m l の水に溶かした (重量で) 2 0 % の塩化コバルトもしくは硫酸ニッケルの溶液を、0 . 4 m l の水に溶かした 2 0 % のクエン酸 (三) ナトリウム溶液と混合することによって調製された。次に、0 . 4 m l の 2 M 水酸化アンモニウムが加えられた。この点まで、いくつかの同一な調製物が作製された。いくつかには約 0 . 0 8 m g の抗体を含む 1 m l の精製 F a b ' 抗体溶液が加えられ、他のいくつかには 0 . 3 m l の F a b ' が加えられ、その他のいくつかには 0 . 0 3 m l が加えられ、その他のいくつかには抗体は加えられなかった。0 . 1 m l の 8 % グルタチオン水溶液が各反応に加えられ、それから、溶液は濃い茶色に変わった。5 分後、さらなる一定量、すなわち 0 . 0 5 m l の 8 % グルタチオン水溶液が加えられ、溶液はより濃い色になった。

20

【 0 0 6 0 】

さらなる精製もしくは、反応量および時間の最適化がなされえたが、サンプルは直ちに使用された。それらはすべて 2 m l に希釈され、各 1 m l が 5 マイクログラムのマウス I g G (標的抗原) の結合した個々のニトロセルロース膜に適用された。ニトロセルロース膜はあらかじめ乾燥され、4 % 血清アルブミンでブロッキングされていた。5 分後、最大量のウサギ抗マウス F a b ' で生成されたサンプルは、抗原の位置に茶色の呈色を生じた。これは抗体の連結された複合体の抗原へのターゲティングを表わした。より少ない量の F a b ' で生成されたサンプルもまた、抗原の位置に茶色の呈色を生じたが、この呈色は同時に、より弱く、現像により長い時間を要した (1 0 分後に明白となった) 。 F a b ' を使用せずに生成したサンプルは抗原の呈色を生じず、これは抗体を持たない複合体が抗原に対して非特異的な結合を有意に示さなかったことを示している。アルブミンで覆った膜上の抗原を含まない領域では、有意な茶色の呈色が検出されなかったという事実は、抗体の有無にかかわらず、複合体がアルブミンに対して有意な親和性を持たなかったことを示す。

30

40

例 6： 調製後における、抗体の共有結合による有機コバルトもしくはニッケル拡張複合体への連結、および複合体の抗原へのターゲティング。

【 0 0 6 1 】

コバルトもしくはニッケル有機複合体は、上記の例 1 ~ 3 に記述されているようにして調製および精製された。粒子中の有機ペプチドのフリーなアミノ基は、過剰モル量 (m o l a r e x c e s s) のビス (スルホスクシニミジル) (b i s (s u l f o s u c c i n i m i d y l)) 基質を混合することによって、連結された。3 0 分後、粒子はゲル排除クロマトグラフィーによって過剰な試薬から精製された。ウサギ抗マウス I g G が加え

50

られ、4 で一晚インキュベートされた。粒子はそれから、例5のプロット法を用いて、それらの適切な抗原への免疫ターゲティングを実証した。これは、粒子が有機部分のアミノ基を使って共有結合的にカップリングされることができ、フリーなアミノ基を含む分子に連結されうることを示した。

例7： 拡張コバルト複合体の磁氣的性質の実証。

【0062】

拡張コバルト複合体は、例1に記述されているようにして調製された。この複合体は、さらなる量のグルタチオンを追加することにより、もしくは水酸化ナトリウムの添加によって沈殿された。水溶液の底の茶色の沈殿物はそれから、マグネトロン磁石の極の端 (pole edge) 近くに置かれ、粒子はこの不均質な場の中で磁石極 (magnet pole) の方へ引き寄せられた。 10

結論

上述の実験は、ユニークな性質を持つ新しいクラスの拡張有機コバルトおよびニッケル磁性複合体の生産、およびそれらを合成するための過程を詳述している。コバルトおよびニッケルの混合された拡張複合体もまた含まれている。有機部分は従来の架橋技法による抗体、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、核酸、または他の有機もしくは無機分子への便利な共有結合的連結を可能とする。複合体の合成中における Fab' 抗体フラグメントもしくは他のチオール化合物の新たな取り込みもまた、記述されている。これらは in vivo もしくは in vitro で磁性複合体を目的の部位へとターゲティングする方法、または表面をコーティングするための方法、またはポリマーもしくは他の材料への包含のための方法を提供する。粒子の大きさを制御する方法もまた発見された。 20

【0063】

磁性材料はセンサー、コンピューター記憶装置、光磁気装置、医療用の画像化および治療を含む多くの分野において有用であることが見出されていることから、この新しいクラスの磁性材料の効果 (ramifications) は遠くまで及ぶ。

例8： コバルト複合体を用いた脳腫瘍のMRI。

【0064】

ラットは、腫瘍細胞の定位的注入によって、脳内に腫瘍が移植された。14日後、脳走査磁気共鳴画像が、標準的なガドリニウム造影剤であるガドジアミド (Omniscan, Nycomed) および、本発明のコバルト複合体の両方を使って撮影された。それぞれ同じ腫瘍 (N32もしくはF98のいずれか) を移植された2匹のラットが、造影剤としてガドジアミドもしくはコバルト複合体のいずれかを用いて、並行して画像化された。ガドジアミドでは、どちらの脳腫瘍 (N32およびF98) の増強も見られなかった。この薬剤を用いては、MRIによって腫瘍は位置付けられなかった。しかし、造影剤としてコバルト複合体を用いると、腫瘍は明瞭に画像化された。これらの画像は優れたコントラストを有していた。18日目に、ラットは解剖され、すべての動物に当量の腫瘍が存在したことが実証された。よって、差異的な腫瘍の発達、ガドジアミドとコバルト複合体の差異的な腫瘍の検出における要因ではなかった。ガドリニウムを使用して得られた結果は、ヒトにおける腫瘍可視化のためのその使用を反映しており、それによってガドリニウム剤はいくつかの腫瘍の画像化を容易にするが、他の多くの場合には不十分である。 40

【0065】

さまざまなMRI画像化モードが、分析において使用された：T1強調、T2強調、およびT2*強調。すべての場合において、コバルト複合体を用いると腫瘍は明瞭に可視であったが、ガドジアミンを用いては、どの腫瘍の痕跡も明白でなかった。重要なことに、良い画像コントラストが、画像化が終了する時間であるコバルト複合体の注射後30分まで保持された。撮像期間中におけるこの画像コントラストの最小の変化は、有用な画像化がこの時点を十分に超えて達成されうることを示す。これは、ガドリニウム剤が系を迅速に一掃するという事実のために、一般にはるかにより一過性であるガドリニウム画像とは対照的である。この長寿性は、コバルト複合体が、ガドリニウム剤では現在可能でない、長期間にわたる画像化 (たとえば、外科手術中) のために使用されうることを示す。 50

例 8 方法

腫瘍の移植。 2つの細胞株が腫瘍を接種するために使用された：F98およびN32 (Barth, R. F., J. of Neuro-Oncology 36: 91 (1998); Siesjo et al., Cancer Immunol. Immunother. 37: 67 (1993))。F98もしくはN32細胞のいずれかを接種された約350gの体重のラットが、腫瘍の画像化のために使用された。麻酔下のラットの頭蓋骨を通して、0.5mm未満の穿頭孔が接種の個所にあけられた。腫瘍は10,000個の培養細胞を含む1マイクロリットルの培養培地を、左線条体 (left striatum) 中の深さ4~5mm、(鋸歯状の)冠状縫合 (coronal suture) の正中線の左4mmの個所に、接種することによって惹起された。頭蓋骨の下4~5mmの細胞注入を確実にするために深さを制限するプラスチック襟を装備された27ゲージ針が、柔軟な管を介してハミルトン微量注射器に接続された。30秒間の細胞の注入後、針を取り除く前に、もう30秒間が細胞を安定させるためにとられた。F98腫瘍動物の場合、接種後24+日に死亡が生じた。

コバルト複合体： コバルト複合体は例1のようにして調製された。

MRI。 MRIは腫瘍細胞の移植後、16日目に実施された。動物は麻酔され、200マイクロリットルのガドジアミド (1mlあたり287mgのガドジアミド) (Omniscan, Nycomed, Princeton, NJ) もしくは200マイクロリットルの拡張コバルト複合体 (1mlあたり10mg $\pm$ 30%のCoを含む) のいずれかが腹膜内に注入された。ラットは直ちに支持体上に配置され、MRIが1.5テスラ全身臨床スキャナー (Siemens Vision, Germany) 上でヒト四肢 (膝) 用コイルを用いて実施された。高分解能ターボスピンエコー矢状画像化 (High-resolution turbo spin-echo sagittal imaging) が、以下の画像化パラメーターと共にスライス位置を選ぶために使用された。T2強調画像について：繰り返し時間 (TR) = 3000 msec; エコー時間 (TE) = 25 msec; 視野 (FOV) = 100 $\times$ 100 mm; マトリクスサイズ = 256 $\times$ 256; 画像スライス厚 (TH) = 2 mm。腫瘍画像は1回の腹膜内注入の後、さまざまな時間に収集された。撮像時間は1スキャンあたり3分であり、分解能は0.3125 mmであった。画像化は注入後30分の期間にわたった。

【0066】

1匹はガドジアミド、もう1匹はコバルト試薬を用いた2匹のラットが同時に画像化された。T2強調画像化が、わずかにより良いように見えた。T1強調およびT2*強調画像は同等の結果を与えた。腫瘍のコントラストは、注入後30分でもまだ明白であった。

例 9： コバルト複合体を用いたMRIによる創傷治癒の描写

例8において腫瘍を移植されたラットの造影剤としてコバルト複合体を用いたMRIは、腫瘍細胞を注入する2週間前に切開された部位における画像のコントラストを明らかにした。この部位は画像中で白く見え、非常にコントラストが良かった。ガドジアミド造影剤を用いて生成された画像では、対応する部位におけるこのようなコントラストは明白でなかった。これは、創傷治癒の領域 (たとえば、血管再生、凝固、リモデリング、血塊溶解、および組織再生) が、コバルト複合体によって明瞭に画像化されうること示す。創傷領域の脈管構造および成分は正常組織とは微妙にのみ異なり、これらの差異はガドジアミド試薬によっては強調されないことから、これは驚くべきことである。この種の画像化は、内部損傷、内出血、もしくは他の形の病変を、コバルト複合体を造影剤として用いたMRIで検出するために使用されうる。

例 9 方法

方法は例8のようにして実施された。

例 10： コバルト複合体の毒性測定。【0067】

2つの造影剤の毒性を研究するため、コバルト複合体もしくはガドジアミドを受けたラットに対して、血液分析が実施された。分析は、1) 対照のラット、2) ガドジアミドの注

入後のラット、および3)コバルト複合体の注入後のラット、に対して実施された。毒性を示すために一般に用いられている標準的な血液学的および血液化学的指標が、標準的な方法によって測定された。これらの指標は、グルコース (GLUCm)、血中尿素窒素 (BUNm)、クレアチン (CREm)、ナトリウム (NA)、カリウム (K)、塩化物 (CL)、二酸化炭素 (CO₂)、クレアチンキナーゼ (CK)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニン・トランスアミナーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP) およびアルブミン (ALBm) の濃度であった。結果は、以下の表1に示されている。対照と比較して、肝酵素活性におけるわずかな増加が、コバルト複合体もしくはガドジアミドを注入したラットについて観察された。観察された上昇は、コバルト複合体を注入したラットよりも、ガドジアミドを注入したラットの方が大きかった。全体として、非毒性として受け入れられているガドジアミドと比較して、コバルト複合体の認識可能な毒性はなかった。

10

【0068】

【表1】

表1

	対照のラット	+ガドジアミド	+コバルト
GLUCm	250mg/dL	177	210
BUNm	12mg/dL	16	12
CREm	0.3mg/dL	0.2	0.3
NA	139mEq/L	139	138
K	4.0mEq/L	5.5	4.0
CL	101mEq/L	101	103
CO ₂	31mEq/L	30	23
CK	531IU/L	820	795
AST	73IU/L	183	128
ALT	35IU/L	62	41
ALP	187IU/L	202	252
ALBm	1.7g/dL	1.5	1.5

20

30

【0069】

例10 方法

ラットは例8に記述されているようにして腫瘍を接種された。標準のラットはN32腫瘍を接種され、ガドジアミドもしくはコバルト複合体のいずれかを受けたラットはF98腫瘍を接種された。ガドジアミドおよびコバルト複合体は、IP注入によって送達された。血液が薬剤注入の1日後に採取され、室温に20～30分間静置して凝固させられ、それから3500rpmで遠心分離された。透明な血清は-20℃で凍結された。血清はそれから、標準的な方法によってGLUCm、BUNm、CREm、NA、KCl、CO₂、CK、AST、ALT、ALP、およびALBmについて分析された。データは各試験ラットのの一つから導き出されている。これらの結果は、さらなる被検ラットにおいて確かめられた。

40

【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
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/07846 A1

(51) International Patent Classification: A66B 5/055, G01N 24/00 (74) Agents: FARRELL, Kevin, M., PC, Box 999, York Harbor, ME 03911 (U.S.).

(21) International Application Number: PCT/US01/23832 (81) Designated States (national): CA, JP.

(22) International Filing Date: 29 July 2001 (20.07.2001) (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

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(30) Priority Data:
09/621,185 21 July 2000 (21.07.2000) US
09/634,049 11 April 2001 (11.04.2001) US

(71) Applicant: HAINFELD, James, E. [US/US]; 44 Bradley Drive, Shelton, NY 11786 (U.S.).

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 02/07846 A1

(54) Title: EXTENDED ORGANIC COBALT AND NICKEL MAGNETIC COMPLEXES

(57) Abstract: A method for *in vivo* imaging tissue of a individual, by performing magnetic resonance imaging utilizing an extended cobalt complex as a contrast enhancement agent. The extended cobalt complex is comprised of cobalt atoms, a carboxylate ligand, an uric acid ligand and a multidentate thiol-containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions. Also, a method for visually detecting the presence of an antigen in a sample using an antibody being coupled to an extended cobalt complex.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

EXTENDED ORGANIC COBALT AND NICKEL MAGNETIC COMPLEXESBackground Of The Invention

Magnetic materials have many utilities including use in computer disk memory storage, audio and video recording tape, sensors, coatings, magneto-optical devices, as magnetic resonance imaging (MRI) contrast enhancement agents, and biolabels for molecular or cell tagging or separations. Typically iron oxides, hematite, Fe_2O_3 , maghemite, gamma- Fe_2O_3 and magnetite, Fe_3O_4 , are used, or various alloys, such as in alnico magnets (aluminum, nickel, cobalt), or mixed oxide materials with octahedral Fe^{3+} ions such as, the spinels $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ and $\text{Ba}_2\text{Mn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$, used in magnetic tapes. Gadolinium, complexed with DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid), Gd-DTPA, is commonly used for MRI enhancement.

Unfortunately, currently available magnetic materials have a number of shortcomings which limit the potential of the applications in which they are used. For example, magnetic recording media is far below its potential density due to a lack of precise control in preparing and magnetically isolating storage bits, and organizing regular smaller elements into arrays. This is largely because the recording media is generated by annealing bulk coatings which form irregular domains. In order to provide adequate information isolation, larger than desired areas must be assigned to each information bit. If the magnetic recording media was instead constructed from optimally sized magnetic nanoparticles, higher recording densities could be utilized without detracting from overall quality. In the medical field, iron oxide nanoparticles used as imaging agents are irregular in size, have associated toxicity, and have irregular biodistributions when administered *in vivo*. The accepted MRI contrast enhancement agent, Gd-DTPA, has a short half-life in the bloodstream, which precludes uses which require longer visualization periods. Also, when Gd-DTPA is conjugated to a targeting moiety, such as an antibody, imaging signal generated at the target is

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-2-

too weak to be generally useful for targeted imaging of, for example, tumors, clots, or atherosclerotic plaques. The therapeutic application of oscillating magnetic fields to magnetic particles, such as iron distributed at a site in the body, has been proposed for use in heating tumors to destroy them. Success however, has been limited by poor specific tumor uptake of particles, lack of sufficient particle accumulation, and commensurate particle toxicity.

10 The synthesis of magnetic nanoparticles generally involves grinding of macroscopic magnets, sonication, the formation of micelles, pH adjustment, or controlled oxidation. Unfortunately, these presently used methods produce heterogeneously sized particles which are suboptimal or precludes their use in many applications. There is a need in the related arts for uniform, small magnetic materials, especially less than 10 nm.

20 The magnetic nanoparticles currently available in the art usually aggregate during formation and use, as evidenced from electron micrographs of the material. Aggregation is an undesirable property. An additional undesirable property is a lack of stability of the magnetic materials. Magnetic particles in the art exhibit altered and degraded magnetic properties after short periods of storage. Many iron particles continue to oxidize, as is common with rusting.

30 It is often necessary to further modify the magnetic particles prior to use. For instance, many magnetic materials must be coated. Coating is by mixing the particle with sugars, polymers and various other substances. These coatings suffer from the instability of adsorption. Another modification is the covalent attachment of molecules to the particles. One example is the attachment of a molecule to the oxygen atom of an iron oxide particle. Although the produce has a covalent linkage, which is useful for many applications, there are many other drawbacks associated with utilizing iron particles as magnetic material, such as instability, poor

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-3-

size distributions, toxicity and aggregation, which limits use.

Summary Of The Invention

One aspect of the present invention is a method for
5 in vivo imaging an internal component of an individual,
such as tissue, utilizing an extended cobalt complex as a
contrast enhancement agent. The extended cobalt complex
is comprised of cobalt atoms, a carboxylate ligand, an
amine ligand, and a multidentate thiol-containing organic
10 ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and
counter ions. The cobalt extended complex is
characterized as stable, water soluble, non-aggregating,
magnetic, and from 0.5 to 10 nm in size. The method
comprises administering the extended cobalt complex to
15 the individual to contact the tissue with the extended
cobalt complex, and performing magnetic resonance imaging
on the individual to image the tissue. In one
embodiment, the tissue which is imaged is a tumor. This
method is highly useful for clinical diagnosis of a
20 tumor. In another embodiment, the tissue is regenerating
from a wound. The extended cobalt complex is optionally
linked to a biomolecule, preferably a binding moiety
which specifically targets the extended cobalt complex to
a target molecule selectively expressed on the tissue
25 which is to be imaged.

Another aspect of the present invention relates to a
method for visually detecting the presence of an antigen
in a sample using an antibody which specifically binds
the antigen, the antibody being coupled to an extended
30 cobalt complex which has a characteristic color. In the
method, the antibody is contacted to the sample under
conditions appropriate for antibody-antigen binding, the
sample is washed to remove unbound antibody, and the
presence of the remaining extended cobalt complex is
35 visually detected by its characteristic color.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-4-

Detailed Description Of The Invention

Aspects of the present invention relate to the development of a new class of organic magnetic material in the form of nanoparticles, which contains nickel and/or cobalt. Magnetic nanoparticles of the prior art are solid particles of magnetic material, such as cobalt or iron oxide. Such particles are either used as is, or coated, for example, with dextrans. At the other end of the size spectrum are single magnetic ions complexed with various organic molecules, such as gadolinium-DTPA. In the present invention, a magnetic nanoparticle composition is synthesized from a small peptide containing a thiol group (referred to herein as a thiol-containing peptide, or a thiol peptide) and various counter ions (referred to also as ligands) to form an extended complex in which multiple cobalt or nickel atoms are linked with multiple peptides such that the apparent molecular weight is greater than about 3,000 daltons (as gauged by exclusion on a gel filtration column with water as the eluent). The extended complex does not pass through a 3,000 molecular weight (nominal) filter (Amicon Centricon 3), but mostly passes through a 10,000 molecular weight filter (Amicon Centricon 10). The complex formed is termed "extended" or "large" because it is much larger in size than low molecular weight complexes, such as Gd-DTPA (molecular weight of 548).

Another aspect of the present invention relates to the method of synthesis of the extended complex. Unlike existing methods for synthesis of magnetic materials, which use sonication, micelles, strong reducing agents, grinding, oxidation, or simple complexation, cobalt or nickel metal salts are complexed with a thiol peptide (glutathione), citrate, ammonia, and chloride in basic solution to form the extended complex. This method was discovered fortuitously while searching for a novel form of magnetic nanoparticle. The method described herein is a refinement of the original procedure. During

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-5-

synthesis, an instant color change of the solution from light red or pink to dense, almost opaque brown, without precipitation, occurs when synthesizing extended cobalt complexes. Color change from green to dense, almost opaque brown, without precipitation, occurs when synthesizing extended nickel complexes. The observed color changes were initially unexpected. The resulting color and optical density change of the material indicates plasmon interactions of closely spaced metal atoms or alterations in complexing ligands. Also unexpected was the finding that the extended complex produced from the synthesis reaction was significantly larger than any of the starting reactants, and that it possessed the magnetic properties described herein.

The extended organic cobalt and/or nickel magnetic complex is composed of metal ions Co (II) and Ni (II) complexed with a thiol-containing multidentate bridging ligand ("multidentate thiol-containing organic ligand"), and carboxylate and amine ligands to form a product which is significantly larger than the individual starting components. Other ligands may also be incorporated into the rich, multi-ligand extended complex, for example, chloride or hydroxide ions. Hydrodynamic measurements indicate that the brown-colored complex, produced by methods detailed in the Exemplification section below, has a molecular weight that appears to be in the range of 3,000 to 20,000.

A multidentate bridging ligand is used in the formation of the extended complex. In a preferred embodiment, the thiol peptide glutathione is used. In addition, amine and carboxylate ligands, preferably ammonia from ammonium ions in basic solution, and citrate from trisodium citrate, are also used.

Glutathione is a tripeptide, consisting of gamma-glutamic acid - cysteine - glycine. This provides amine, carboxyl and thiol ligands that coordinate to the metal which typically has 6 coordination sites. This means

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-6-

that a bridging coordination complex can be formed, to produce the "extended" or multimeric complex of the present invention. Glutathione contains several reactive groups: amine, carboxyl, and thiol, useful for crosslinking to other molecules, thus enabling the formation of conjugates.

The extended complex therefore contains multiple species coordinated to the metal atoms. During or after synthesis of the complex, an additional molecule can be substituted for one of these ligands, resulting in direct incorporation or conjugation of the substituted molecule to the extended complex. For example, it was found that Fab' antibody fragments could be stably incorporated into the complex if they are present during complex formation. This aspect of the present invention is described in greater detail below.

The extended complex of the present invention can also be synthesized using analogous substances to the above identified components. For example, any multidentate ligand that is capable of forming an extended complex by bridging metal ions (e.g., peptides or polymers) might be used in place of glutathione. Also, coordinating ligands, such as ammonia and citrate, can be replaced with other substances which similarly coordinate with the metals. Some commonly known ligands for cobalt and nickel which may be used in place of ammonia and citrate are I^- , Br^- , Cl^- , SCN^- , F^- , urea, OH^- , acetate, oxalate, water, NCS^- , glycine, pyridine, ammonia, ethylene diamine, SO_3^{2-} , dipyridine, o-phenanthroline, NO_2^- , and CN^- .

The following steps can be used to prepare a cobalt organic complex, a nickel organic complex, or a combination of cobalt and nickel organic complex:

1. A salt of the appropriate metal is dissolved in water; a preferred cobalt salt is cobalt chloride, a preferred nickel salt is nickel sulfate. A solution

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-7-

containing both cobalt and nickel is used to produce a mixed metal complex.

2. A base is prepared; preferred bases are ammonium hydroxide and sodium hydroxide.

5 3. An aqueous solution of a multidentate thiol-containing organic ligand is prepared; a preferred material is the peptide glutathione.

4. An amine ligand is prepared; a preferred source is an aqueous solution of ammonium chloride (this can be omitted if ammonium hydroxide is used for the base).

10 5. A carboxylate ligand is prepared; a preferred source is an aqueous solution of trisodium citrate.

6. The above solutions are combined to produce the extended organic cobalt and/or nickel complex; a preferred order of addition is: citrate solution added to the cobalt and/or nickel solution, followed by addition of ammonium hydroxide, and then the thiol peptide. This order maintains everything in soluble form, without precipitates. The order of addition may be varied to produce an essentially similar product, but this may also produce intermediate precipitates.

A preferred pH of the final preparation for complex formation is 9-10. The amounts and concentrations of the various components are important since outside of some range, the extended complex does not form, or alternatively, extensive aggregation occurs. Preferred amounts are 20% (by weight) $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ or $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 0.4 ml H_2O , 20% $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 0.4 ml H_2O , 0.4 ml of 2 M NH_4OH , and 0.15 ml of 8% glutathione. A preferred final concentration of components used is: 120 mM of cobalt or nickel ions, 100 mM of citrate ions, 20 mM of glutathione, and 0.3 M ammonium hydroxide.

Alternatively, the 0.3 M ammonium hydroxide may be replaced with 0.5 M ammonium chloride and 0.3 M sodium hydroxide. Volumes may of course be scaled to produce more or less product. Variation of the different components to some extent around these values will still result in the same or similar product. Excess components

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-8-

not incorporated into the complex may be separated by gel filtration, chromatography, or other techniques known in the art. Successful preparations may be made by scaling these concentration values within limits, keeping the relative values the same. The preferred molar ratio of components is: 1 mole glutathione: 6 moles cobalt or nickel: 5 moles citrate: 15 moles ammonium hydroxide. Ranges of these components useful for forming the extended complex include: 4 to 8 moles cobalt and/or nickel salts, 0.6 to 1.5 moles multidentate thiol-containing organic ligand, 8 to 30 moles amine ligand, and 3 to 7 moles carboxylate ligand, although other combinations are possible.

Surprisingly, the formed complex has an apparent hydrodynamic molecular weight between 3,000 to 20,000 daltons, far greater than any of the starting components. The weights of the preferred starting components are: $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 238; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 294; NH_4OH : 35; glutathione: 309.

The above described procedure produces extended complexes which range in size from 0.5 to 10 nm, typically 0.5 to 5 nm. Complexes from 5 to 20 nm can be obtained by decreasing the amount of thiol complexing agent in the preparation. This results in particles that are orange or red in color, rather than brown.

Cobalt and nickel may be combined in the preparation to produce a complex with a mixed composition of magnetic atoms, by mixing proportional amounts of the cobalt and nickel salts during synthesis. Such hybrid particles produced will possess unique magnetic properties. In addition, other metals can also be incorporated. The extended complex described above, which contains cobalt, nickel, or a combination of cobalt and nickel, is suitable for use in the methods described herein. Unless otherwise stated, the term "extended complex" encompasses the extended cobalt complex, nickel extended complex, and cobalt and nickel alloy extended complex.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-9-

The extended complex is characterized by several properties which it exhibits. It is highly water soluble and can be dried and then resuspended easily in water, with no apparent alteration. Examination of the complexes formed in a synthesis reaction by electron microscopy indicates they are structures of about 0.5 to 5 nm in size, where the metal is fairly evenly distributed over each complex, rather than having the metal as a dense solid core, giving it a relatively uniform density over its extent. No aggregation of the complexes is detected.

Magnetic measurements taken of a water solution of the cobalt complex show the magnetic field, M , vs. magnetic field strength, H , to be a straight line with a shallow slope up to 13,000 Gauss, giving no indication of ferromagnetism or superparamagnetism. The molar susceptibility of the material is low, less than about 0.02 (cgs units), in the range of cobalt ions in solution. All of these data are consistent with an organometallic complex where the metal is not highly condensed into a central core. The complex is dark brown in color and ultraviolet-visible spectroscopy reveals a spectrum that decreases from high absorption at 240 nm (the shortest wavelength measured) to low absorption at 600 nm, with peaks or shoulders at approximately 380 and 450 nm; one form shows a shoulder at about 364 nm. Larger cobalt and nickel complexes can also be synthesized. These have peaks or shoulders at longer wavelengths, about 520 to 540 nm, and are orange or red in color. If dried or precipitated by the addition of a base to the solution, the resulting particulates exhibit motion in an inhomogeneous magnetic field. When stored in water at room temperature, the cobalt complex exhibits no apparent change in properties, over a period of several months. Not only is the material highly water soluble, but it is not "sticky" and does not adhere to glass surfaces or proteins, such as albumin. The

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-10-

extended complex runs as a single peak on a gel filtration column in aqueous buffer, and run as a single spot on a TLC (thin layer chromatography) plate in 50:50 methanol:water. Ion exchange chromatography is able to
5 separate several related charged species, indicating that the extended complex product is not a completely homogeneous mixture. These unusual characteristics distinguish this new magnetic material from others previously described.

10 The nickel extended complex is less stable than the extended cobalt complex. It exhibits alteration in its properties over time, and generally a partial reversal of formation after several hours. However, the nickel complex can be stabilized by crosslinking the organic
15 moiety of the complex.

Due to its unique properties, the extended complex is useful for a variety of applications, most of which utilize aqueous solutions. The stability is a valuable asset to almost all uses. The non-aggregation of the
20 complex particles is particularly significant to their use. Aggregated material exhibits altered properties, size control is difficult, purification is hampered, and control, when molecularly manipulating the extended complex, is generally lost. The extremely small size of
25 the complex, 0.5-10 nm, makes it ideal for *in vivo* use, for forming ultrathin layers or coatings, and for rapid diffusion into materials. Since the complex does not stick to albumin and many other proteins, it can be used *in vivo* or *in vitro* without unwanted non-specific
30 adhesion leading to background or altered biodistributions. The highly colored nature of the extended complex particles make them ideal for direct visualization and staining, in the absence of radioactive tags or other secondary enhancement procedures. The
35 extended complex is made of cobalt or nickel, instead of other more magnetic materials commonly used, such as iron oxides and gadolinium. By comparison, the toxicity of cobalt is extremely low, which can be used to

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-11-

considerable advantage in *in vivo* applications in that larger amounts of complex can be administered.

The distributed disposition of the metal atoms in the extended complex makes the material ideal for use in several applications. Because the cobalt and nickel atoms are generally dispersed over the complex rather than in a dense central core, they are superior to other magnetic materials commonly used in the art for a variety of reasons. For example, in the procedure of MRI, contrast enhancement agents at the site of imaging alter relaxation times of adjacent water protons. The greatest effect is obtained when the magnetic atom is in intimate contact with the water molecules. Because the extended complex permits access of the water to more metal atoms, it serves as a far more effective enhancement agent than a material which contains a solid sphere, where internal atoms are shielded from water molecules. In this regard, the extended complex of the present invention provides improved MRI enhancement compared to a solid particle which has the same number of magnetic atoms.

The organic peptide component of the extended complex facilitates covalent conjugation to other molecules, such as binding moieties (e.g., antibodies and receptors). Linkage of an extended complex to another molecule confers magnetic properties to the linked product. An extended complex linked to another molecule, such as an antibody, peptide, nucleic acid, carbohydrate, or protein, is useful for instance, in targeting the extended complexes to specific molecules (e.g., in the identification of tumors, atherosclerotic plaques, clots, or specific extracellular matrix components, tissues, or cells). Methods for creating the linkage are discussed below.

Because extended complex contains multiple cobalt and/or nickel atoms, more of these magnetically active atoms can be delivered to a target by a single linked antibody, as compared to similar agents composed of antibodies linked to only one or a few magnetic atoms

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-12-

(e.g., antibodies linked to gadolinium). When labeling (also referred to herein as targeting) an antigen with a magnetic material, the amount of magnetic material delivered to a target is directly proportional to the signal which can be obtained, or the therapeutic effect which can be produced. Thus, sensitivity and efficacy in targeted delivery for imaging or therapy, is enhanced by use of the magnetic complex. In vitro labeling is similarly improved over use of single magnetic atom labels. For material applications, such as in sensors or coatings, the density of magnetic atoms also correlates with product quality.

One such use of the extended complex is in generating heat at a specific site within a matrix. This is produced by delivering the extended complex to the target site and then applying an oscillating magnetic field to remotely heat the magnetic particles. This produces selective heating in a matrix of only regions that contain the magnetic particles. For material applications, use of the extended complex of this invention may aid in nanofabrication, selective polymerization, and other uses where localized heating is required. For in vivo therapy, delivery of the extended complex, preferably targeted with a binding moiety to tumors or other tissues, atherosclerotic plaques, or extracellular matrix components that necessitate removal or alteration, followed by the application of a magnetic field to elevate the temperature in these specific regions, will cause cell death, or other heat-related responses, at that location. This modality of therapy is not currently available clinically due to problems with presently available magnetic materials, such as delivery, toxicity, side effects, and insufficient production of a response. However, use of the extended complex, especially use of a targeted extended complex, overcomes many of these difficulties by enabling large amounts of non-toxic magnetic material to be specifically targeted to the site of interest.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-13-

Another aspect of the present invention relates to a method for coupling other molecules to the extended complex. Several methods have been developed for linking other molecules to the extended complex, thus providing flexible protocols for the attachment of a variety of substances. A preferred method is to link the extended complexes to a Fab' antibody fragment that has one or more free hinge thiols. In the method, the Fab' antibody' fragment is added to the extended complex synthesis reaction prior to addition of the thiol peptide. The metal is then complexed with the thiols, incorporating the Fab' during formation of the extended complex. This is a unique method, specific to the synthesis of these particles, and has not been described elsewhere. This method is rapid in that it does not require lengthy steps or purifications. Stable conjugates form in only a few seconds. Similarly, other molecules containing thiol groups can also be coupled to the extended complex by such incorporation in the synthesis reaction.

An alternative method for linking the extended complex to other molecules is to covalently couple the desired molecule to other functional groups (e.g., amino groups, carboxyl groups, or thiol groups) present on the preformed extended complex. For example, the alpha amino group of the thiol peptide may be linked by standard crosslinking reagents, such as the use of hydroxysuccinimide esters. Coupling to thiol groups may be by use of maleimides, and carboxyl groups may be linked with carbodiimides (e.g., 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)) or other such reactions. Other reactive groups and linking agents known in the art may also be utilized.

Therefore, coupling of additional molecules can be done before or after the complex is formed. By these methods, virtually any other molecules or surfaces may be covalently attached to the complex. Useful molecules to attach are Fab', IgG, peptides, hormones, dyes, proteins,

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-14-

nucleic acids, carbohydrates, lipids, nucleic acids, polymers, and glass.

Another aspect of the present invention relates to *in vivo* imaging tissue of an individual via magnetic resonance imaging using the extended complex (cobalt and/or nickel, or other alloys) as a contrast enhancement agent. To image the tissue of an individual, extended complex molecules are administered to the individual by a method which promotes contact of the agent to the tissue of the individual which is to be imaged. Following administration, magnetic resonance imaging is performed on the individual by methods standard in the art.

Imaging a tissue of an individual is described herein. However, it will be recognized by one of skill in the art that the present invention may be used to image a variety of internal components of an individual, including, without limitation, tissues, organs, cells, blood, extracellular matrix components, deposits, such as amyloid plaques and atherosclerotic plaques, inclusions, and other internal structures of the body, by the same methods described herein.

The method of administration of the extended complex molecules depends upon the location of the tissue which is to be imaged, and is easily determined by the skilled practitioner. Administration, for example may be via intraperitoneal injection, intravenous injection, intramuscular injection, and oral administration. The amount of the extended complex administered will depend upon the sensitivity of the machine used for magnetic resonance imaging, as well as other variables, and will be determined by the skilled practitioner for each specific application. As a general rule of thumb, an amount from 0.1 to 10 mg of contrast enhancement agent per kilogram of body weight of the individual is preferred. These amounts, however, should not be seen as limiting to the present invention.

This method for *in vivo* imaging is suitable for any animal in which magnetic resonance imaging is usually

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-15-

performed. In a preferred embodiment, the individual is human. Tissues suitable for imaging by this method include, without limitation, skeletal, secretory, digestive, muscular, reproductive, circulatory, immunological, neurological, and tumor tissue. Some specific examples of tissues for imaging are liver, pancreas, kidney, veins, arteries, lung, heart, brain, breast, colon, lymph nodes, alimentary tract, and prostate.

10 In vivo imaging of a tissue by the above described method is particularly useful for identifying a tumor in an individual, and can be used for routine diagnostic screening. In one embodiment, the tumor is a brain tumor. As detailed in the Exemplification section below,

15 use of extended cobalt complex as a contrast enhancement agent allowed detection of brain tumors in rats which were not otherwise detectable using gadodiamide, a standard contrast enhancement agent used in the art.

To facilitate specific targeting of a tissue or

20 other internal component, by the contrast enhancement agent, the extended complex may be operably linked to a moiety which has an affinity for a component unique to the imaged tissue or component, or is otherwise localized or channeled to the region of the imaged tissue by bio-

25 processes of the individual. Such a moiety can be a useful biomolecule (e.g., an antibody fragment which binds antigen, an antibody, a polypeptide, a nucleic acid, a carbohydrate, or a lipid), a drug, or a synthetic molecule specifically engineered or designed for tissue targeting. In one embodiment, the moiety is a binding

30 moiety which specifically binds, or is bound by, the molecular marker. Highly useful binding moieties are members of a specific binding pair, (e.g., antibody-antigen, receptor-ligand, hybridizing nucleic acids).

35 Such binding is necessary under physiological conditions with sufficient affinity to anchor the attached cobalt complex to the molecular marker during imaging. The term "operably linked", as used herein, is used to indicate

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-16-

that the basic functions of the components in the linkage (contrast enhancement agent and binding moiety) are preserved. Thus, the extended complex retains function as a contrast agent and the binding moiety retains its affinity for the molecular marker. Linkage of the extended complex to the binding moiety is by any means which stably, physically associates the binding moiety to the extended complex under physiological conditions. Preferably, the linkage is covalent. Methods for creating such a linkage are described above.

Molecular markers to which the extended complex may be targeted are preferably expressed on the cells which make up the target at significantly higher levels than elsewhere in the body. For example, prostate specific antigen is useful for imaging prostate tissue. Some useful molecular markers include, without limitation, receptors, oncoproteins, surface antigens, lipids, carbohydrates, and tumor antigens. Extended complex targeting is not limited to endogenous cells of the individual, in that a foreign cell or cell byproduct, (e.g., fungal cells) may be selectively targeted, for example, to aid in diagnosis.

The preferred time post administration for imaging is following a period of time in which unbound agent has appreciably cleared, as this generates an optimal signal to noise ratio. The time period is determined through routine experimentation and is within the ability of one of average skill in the art.

Another aspect of the present invention relates to a method for diagnosing the progression or functionality of a tumor *in vivo* by selectively imaging tumor tissue which expresses a particular molecular marker. Imaging of the tumor, which expresses the molecular marker, is performed with extended complex that is specifically targeted to the molecular marker via linkage to a specific binding moiety. In this way, the presence or absence of a marker for tumor progression (e.g., an oncogene) on the tumor is determined by magnetic resonance imaging. Similarly,

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-17-

targeted extended complex can be used to determine the presence of markers for other diseases which result in differential expression of surface antigens (e.g., viral infection). The binding moiety or other targeting agent, which is linked to the extended complex, targets the contrast enhancement agent to the location of the molecular marker. Targeting contrast enhancement agent for diagnostic purposes utilizing the extended complex is superior to the same approach using gadolinium, the sensitivity of which is limited by the amount of antigen present on the target. Because the extended complex is more potent, this procedure is more sensitive.

The extended complex of the present invention may also be used as a contrast enhancement agent in magnetic resonance imaging to image tissue which is regenerating from a wound. The method is performed essentially as that indicated above for *in vivo* imaging tissue in an individual, with specific identification of a regenerating wound being facilitated by increased contrast conferred by the extended complex contrast agent. As referred to herein, a wound is the result of a force or pathology which has caused damage to tissue to produce a tear, break, or abrasion. The portions of the wound which are imaged are the regions undergoing tissue regeneration and remodelling. Any damaged tissue may be thus imaged. For instance, skeletal (bone, cartilage) secretory, digestive, muscular, reproductive, vascular, circulatory, brain, breast, prostate, arterial, and heart tissue, which has been wounded and is regenerating can be imaged by this method. Imaging wounded tissue is useful for diagnostic purposes as well as monitoring the healing process. This is especially useful for internal injuries or lesions not easily observable by clinical inspection.

Another aspect of the present invention relates to the use of the extended complex, described above, in detecting the presence of a target molecule (e.g., an antigen) in a sample via visual or alternatively magnetic detection of accumulated extended complex. Experiments

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-18-

detailed in the Exemplification section below (Examples 5 and 6) indicate that molecules of the extended complex operatively linked to a specific binding moiety (e.g., an antibody), as discussed above, concentrate at the particular location of target molecule upon exposure to the target molecule. This concentration is visibly detectable, due to the characteristic color of the extended complex.

To detect the presence of a target molecule (e.g., antigen) in a sample, targeted extended complex specific for the target molecule is contacted to the sample under conditions appropriate for binding of target by the binding moiety. Optionally, the sample is then washed to remove unbound extended complex, thus improving the signal to noise ratio. The presence of extended complex which remains bound to the target is then identified by its characteristic properties (color or magnetic properties). The presence of the extended complex is an indication of the presence of the binding moiety and hence the presence of the target molecule. Preferably, the binding moiety is an antibody and the target molecule is an antigen to which the antibody binds.

The target molecule is necessarily bound by the specific binding moiety, or alternatively necessarily binds the specific binding moiety, with sufficient affinity that binding persists throughout the detection process (e.g., washing, and any process of detection employed). The minimal amount of target which can be detected is limited by the sensitivity of the color or magnetic detection. Sufficient amounts of accumulation are possible with microgram quantities of target molecule to be visible to the naked eye. Sensitivity of detection may be enhanced using an optical detection device to detect the specific color absorption wavelength of the extended complex, or using a magnetic detection device.

Sample may be an aqueous solution, or a non-aqueous sample (e.g., tissue). Detection is greatly facilitated by fractionation of the sample (e.g., by size) and/or

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-19-

immobilization of the sample onto a solid support (e.g., an immunoblot or ELISA). Such applications are highly suited for *in vitro* and *in situ* analysis.

Quantitative detection of the target molecule is possible with the targeted extended complex. For quantitative detection, standardized amounts of target molecule are used to calibrate the detection signal produced by the targeted extended complex. The amount of a target molecule in a sample is then determined by comparison of the detection signal generated from the sample to the calibrated signal obtained with the standards. Such calibration is routinely performed in the art and known to the skilled practitioner. This aspect of the present invention is extremely useful in one-step detection kits which presently utilize colloidal gold and colored latex particles/beads, such as the kind of kits currently marketed as home pregnancy tests.

Exemplification

The following examples are provided only as a sampling of the possibilities defined herein, and are not intended to be limiting, since variations, extensions, and applications will be obvious to persons skilled in the art.

Example 1: Preparation of organic cobalt complex.

A solution of 20% (by weight) cobalt (II) chloride hexahydrate in 0.4 ml water was mixed with a 20% solution of (tri)sodium citrate in 0.4 ml H₂O. Next, 0.4 ml of 2 Molar ammonium hydroxide was added, and the red solution changed to a more pink/purple color. Next, 0.1 ml of an aqueous solution of 8% reduced glutathione was added, and the solution then turned dark brown. After 5 min, an additional aliquot, namely 0.05 ml of an aqueous solution of 8% glutathione was added, and the solution became darker in color.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-20-

The product was purified on a gel filtration sizing column packed with Amicon GH25, and run with water as the eluent. The complex appeared in the void volume and this step was used to remove any species less than about 1,000 apparent molecular weight, namely, any free cobalt ions or glutathione.

Fractions containing the complex were dried by vacuum rotary evaporation, then resuspended in a small amount of water. This permitted facile concentration of the product. Electron microscopy confirmed that 0.5 to 10 nm complex had formed.

Example 2: Preparation of organic nickel complex.

0.2 ml of an aqueous 10% sodium citrate solution was added to 0.2 ml of a 10% aqueous nickel sulfate solution. Next, 0.2 ml of a 1 Molar ammonium hydroxide solution was added. Then 0.05 ml of a 4% aqueous glutathione solution was added and the mixture turned dark brown. After 5 minutes, an additional 0.05 ml of the 4% aqueous glutathione solution was added.

Example 3: Preparation of 10 to 20 nm organic cobalt complex.

0.2 ml of an aqueous 10% sodium citrate solution was added to 0.2 ml of a 10% aqueous cobalt chloride solution. Next, 0.2 ml of a 10% ammonium chloride solution was added, followed by 0.2 ml of a 0.1% sodium hypophosphite aqueous solution. Next, 0.3 ml of a 1 molar ammonium hydroxide solution was added. Then 0.02 ml of a 4% aqueous glutathione solution was added and the mixture turned orange, and later matured over several hours into an orange-red then red solution. In another preparation, similar sized cobalt complex was formed by mixing 0.2 ml of an aqueous 10% sodium citrate solution with 0.2 ml of a 10% aqueous cobalt chloride solution, followed by addition of 0.4 ml of a 1 molar ammonium hydroxide solution, then addition of 0.05 ml of a 4% aqueous glutathione solution.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-21-

Example 4: Preparation of mixed cobalt and nickel complex.

0.1 ml of a 10% aqueous cobalt chloride solution was mixed with 0.1 ml of a 10% aqueous nickel sulfate solution. 0.2 ml of an aqueous 10% sodium citrate solution was then added. Next, 0.2 ml of a 1 molar ammonium hydroxide solution was added. Then 0.05 ml of a 4% aqueous glutathione solution was added and the mixture turned brown. After 5 minutes, another 0.05 ml of the 4% aqueous glutathione solution was added.

Example 5: Covalent linking of antibody to organic cobalt or nickel extended complex during their preparation, and targeting of the complex to an antigen.

Fab' antibody fragments were prepared by reducing 0.2 mg of rabbit anti-mouse antibodies which specifically bind mouse IgG with 30 mM dithiothreitol (DTT) in 0.1 molar phosphate buffer, pH 6 containing 5 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) for 1 hr. Fab' antibody fragments were then purified from DTT and other low molecular weight components on a gel exclusion column (Amicon GH25) running with water as the eluent. The protein peak was pooled into a 2 ml volume.

Cobalt or nickel complex was prepared by mixing a solution of 20% (by weight) cobalt chloride or nickel sulfate in 0.4 ml water with a 20% solution of (tri)sodium citrate in 0.4 ml water. Next, 0.4 ml of 2 Molar ammonium hydroxide was added. Several identical preparations up to this point were made. To some, 1 ml of the purified Fab' antibody solution was added, containing about 0.08 mg of antibody; to others, 0.3 ml of Fab' was added, and others 0.03 ml, and others no antibody was added. 0.1 ml of an aqueous solution of 8% glutathione was added to each reaction, and the solutions then turned dark brown. After 5 min, an additional aliquot, namely 0.05 ml of an aqueous solution of 8%

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-22-

glutathione was added, and the solutions became darker in color.

Although further purification or optimization of reaction amounts and times could have been done, the samples were used immediately. They were all diluted to 2 ml, and 1 ml of each was applied to individual nitrocellulose membranes to which was bound 5 micrograms of mouse IgG (the target antigen). The nitrocellulose membranes had previously been dried and blocked with 4% serum albumin. After 5 minutes, the samples generated with the highest amount of rabbit anti-mouse Fab' produced a brown coloration at the location of the antigen. This indicated targeting of the antibody linked complex to the antigen. Samples generated with lower amounts of Fab' also produced a brown coloration at the location of antigen, however this coloration was concomitantly weaker and took longer to develop (it was obvious after 10 minutes). The samples generated with no Fab' produced no coloration of the antigen, indicating that the complex without the antibody did not exhibit significant non-specific binding to the antigen. The fact that no significant brown coloration was detected on the albumin coated membrane at regions which did not contain antigen, indicates that the complex, with or without antibody had no significant affinity for albumin.

Example 6: Covalent linking of antibody to organic cobalt or nickel extended complex after preparation, and targeting of the complex to an antigen.

Cobalt or nickel organic complex were prepared and purified as described in Examples 1 through 3 above. The free amino groups of the organic peptide in the particles was linked to by mixing with a molar excess of bis(sulfosuccinimidyl) suberate. After 30 min, the particles were purified from excess reagent by gel exclusion chromatography. Rabbit anti-mouse IgG was added and incubated overnight at 4 degrees C. The

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-23-

particles then demonstrated immunotargeting to their appropriate antigen, using the blot method of Example 5. This showed that the particles could be covalently coupled using the amino groups of the organic moiety, and could be linked to molecules containing free amino groups.

Example 7: Demonstration of magnetic properties of the extended cobalt complex.

Extended cobalt complex was prepared as described in Example 1. The complex was precipitated by adding additional amounts of glutathione or by addition of sodium hydroxide. The brown precipitate at the bottom of the aqueous solution was then placed near a pole edge of a magnetron magnet, and the particles were drawn to the magnet pole in this inhomogeneous field.

Conclusion

The above described experiments detail the production of a new class of extended organic cobalt and nickel magnetic complex with unique properties and a process for synthesizing them. Also included is a mixed cobalt and nickel extended complex. The organic moieties permit convenient covalent linking to antibodies, peptides, proteins, carbohydrates, lipids, nucleic acids, or other organic or inorganic molecules by conventional crosslinking technology. A novel incorporation of Fab' antibody fragments, or other thiol compounds during the complex synthesis is also described. These provide a way of targeting the magnetic complex to sites of interest, in vivo or in vitro, or for coating surfaces, or for inclusion into polymers or other materials. A method of controlling the size of the particles has also been discovered.

The ramifications of this new class of magnetic materials are far reaching since magnetic materials have been found to be useful in many areas including sensors,

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-24-

computer storage, magneto-optical devices, medical imaging and therapy.

Example 8: MRI of brain tumors using cobalt complex.

5 Rats were implanted with tumors by stereotactic infusion of tumor cells into the brain. After 14 days, brain scan magnetic resonance images were taken using both the standard gadolinium contrast agent gadodiamide (Omniscan, Nycomed) and the cobalt complex of the present invention. Two rats, each implanted with the same tumor
10 (either N32 or F98) were imaged side-by-side using either gadodiamide or cobalt complex as the contrast agent. No enhancement of either brain tumor (N32 and F98) was seen with the gadodiamide. Tumors could not be located via MRI using this agent. However, the tumors were clearly
15 imaged using the cobalt complex as contrast agent. These images had excellent contrast. On day 18, the rats were dissected to demonstrate that equivalent tumors existed in all animals. Thus, differential tumor development was not a factor in the differential tumor detection of the
20 gadodiamide versus the cobalt complex. The results obtained using the gadolinium is reflective of its usage in humans for tumor visualization, whereby the gadolinium agents facilitate imaging for some tumors, but are unsatisfactory for many others.

25 Various MRI imaging modes were used in the analysis: T1-weighted, T2-weighted, and T2*-weighted. In all cases the tumors were clearly visible using cobalt complex, but no trace of any tumors was evident using the gadodiamide. Importantly, good image contrast was retained up to 30
30 minutes post injection of the cobalt complex, at which time imaging was concluded. This minimal change in image contrast over the imaging time indicates that useful imaging can be accomplished well beyond this time point. This is in contrast to gadolinium images, which in
35 general are much more transitory due to the fact that the gadolinium agents clear the system rapidly. This longevity indicates that cobalt complex can be used for

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-25-

imaging over extended periods of time (e.g., during surgery), currently not possible with the gadolinium agents.

Example 8. Methods

5 Tumor Implantation. Two cell lines were used to seed the tumors: F98 and N32 (Barth, R.F., *J. of Neuro-Oncology* 96: 91 (1998); Siesjo et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 67 (1993)). Rats weighing about 350 g, seeded with
10 either F98 or N32 cells were used for tumor imaging. A < 0.5 mm burr hole was drilled through the skull of the anesthetized rats at the point of inoculation. Tumors were initiated by inoculating one microliter of culture medium, containing 10,000 cultured cells, 4-5 mm deep
15 into the left striatum, at a point 4mm to the left of the midline in the (serrated) coronal suture. A 27-gauge needle fitted with a depth-limiting plastic collar to ensure cell injection 4-5 mm beneath the skull was connected to a Hamilton microsyringe via flexible tubing. Following a 30-second infusion of the cells, another 30
20 seconds was taken to allow the cells to settle before removing the needle. For F98 tumor animals, death ensued 24+ days after inoculation.

Cobalt Complex: Cobalt complex was prepared as in Example 1.

25 MRI. MRI was performed at day 16 after tumor cell implantation. The animals were anesthetized and injected interperitoneally with either 200 microliters of gadodiamide (287 mg gadodiamide/ml) (Omniscan, Nycomed, Princeton, NJ) or 200 microliters of the extended cobalt
30 complex (containing 10 mg Co/ml $\pm 30\%$). The rats were immediately positioned on a support and MRI was performed in a 1.5 tesla whole-body clinical scanner (Siemens Vision, Germany) with a human extremity (knee) coil. High-resolution turbo spin-echo sagittal imaging was used

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-26-

for selecting slice position with imaging parameters as follows. For T2 weighted images: repetition time (TR) = 3000 msec; echo time (TE) = 25 msec; field of view (FOV) = 100 x 100 mm; matrix size = 256 x 256; image slice thickness (TH) = 2mm. Tumor images were collected at various times after a single interperitoneal injection. Imaging times were 3 min/scan and resolution was 0.3125 mm. Imaging covered a 30 min period after injection.

Two rats were imaged simultaneously, one with gadodiamide, and one with cobalt reagent. T2 weighted imaging seemed to be slightly better. T1 weighted and T2* weighted images gave comparable results. Tumor contrast was still evident 30 min after injection.

Example 9: Wound healing delineation by MRI using cobalt complex

MRI of the rats implanted with tumors in Example 8 using cobalt complex as contrast agent revealed image contrast at the site which had been opened two weeks prior to injecting the tumor cells. This site appeared white in the images, and was very well contrasted. No such contrast was evident at the corresponding site in images produced with the gadodiamide contrast agent. This indicates that regions of wound healing (e.g., revascularization, clotting, remodelling, clot dissolution, and tissue regrowth) can be clearly imaged with the cobalt complex. This is surprising as the vasculature and components of a wounded region differ from normal tissue only subtly, and these differences are not highlighted by the gadodiamide reagent. This type of imaging can be used to detect internal damage, internal bleeding, or other forms of lesions with MRI using the cobalt complex as contrast agent.

Example 9 Methods

Methods were performed as in Example 8.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-27-

Example 10: Toxicity measurement of cobalt complex.

Blood analysis was performed on rats which received the cobalt complex or the gadodiamide to study toxicity of the two contrast agents. Analysis was performed on:

5 1) a control rat, 2) a rat after injection of the gadodiamide, and 3) a rat after injection of the cobalt complex. Standard hematology and blood chemistry indicators commonly used to indicate toxicity were measured by standard methods. These indicators were

10 glucose (GLUCm), blood urea nitrogen (BUNm), creatine (CREm), sodium (NA), potassium (K), chloride (CL), carbon dioxide (CO2), creatine kinase (CK), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and albumen (ALBm) levels. Results are

15 presented in Table 1, below. A slight increase in liver enzyme activity compared to the control was observed for the rats injected with the cobalt complex or gadodiamide. The observed elevation was greater for the gadodiamide injected rat than for the cobalt complex injected rat.

20 Overall, there was no discernable toxicity of the cobalt complex compared to the gadodiamide, which is accepted to be non-toxic.

Table 1

	<u>control rat</u>	<u>+ gadodiamide</u>	<u>+ cobalt</u>
GLUCm	250 mg/dL	177	210
BUNm	12 mg/dL	16	12
CREm	0.3 mg/dL	0.2	0.3
NA	139 mEq/L	139	138
K	4.0 mEq/L	5.5	4.0
CL	101 mEq/L	101	103
CO2	31 mEq/L	30	23
CK	531 IU/L	820	795
AST	73 IU/L	183	128
ALT	35 IU/L	62	41
ALP	187 IU/L	202	252
ALBm	1.7 g/dL	1.5	1.5

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-28-

Example 10 Methods

Rats were seeded with tumor as described in Example 8. The normal rat was seeded with the N32 tumor, and the rats which received either gadodiamide or cobalt complex were seeded with the F98 tumor. The gadodiamide and cobalt complex was delivered by IP injection. Blood was drawn 1 day after injection of the agents, allowed to sit and clot at room temperature for 20-30 min, then centrifuged at 3500 rpm. The clear serum was frozen at -20°C. Serum was then analyzed for GLUCm, BUNm, CREm NA, KCl, CO2, CK, AST, ALT, ALP, and ALBm by standard methods. Data are derived from one of each test rat. These results were verified in additional rat subjects.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-29-

CLAIMS

1. A method for *in vivo* imaging tissue of a individual, comprising:
 - a) providing an extended cobalt complex which comprises cobalt atoms, a carboxylate ligand, an amine ligand, and a multidentate thiol-containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions, the extended complex being characterized as:
 - i) stable;
 - ii) water soluble;
 - iii) non-aggregating;
 - iv) magnetic; and
 - v) from 0.5 to 10 nm in size;
 - b) administering the extended cobalt complex of step a) to the individual to contact the tissue with the extended cobalt complex; and
 - c) performing magnetic resonance imaging on the individual to image the tissue.
2. The method of Claim 1 wherein the tissue is a tumor.
3. The method of Claim 1 wherein the tissue is regenerating from a wound.
4. The method of Claim 1 wherein the tissue is bone, muscle, cartilage, liver, pancreas, kidney, veins, arteries, lung, heart, brain, breast, colon, lymph nodes, alimentary tract, and prostate.
5. The method of Claim 1 wherein the individual is human.
6. The method of Claim 1 wherein the individual is an animal.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-30-

7. A method for identifying a tumor in an individual comprising:
 - a) providing an extended cobalt complex which comprises cobalt atoms, a carboxylate ligand, an amine ligand, and a multidentate thiol-containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions, the extended complex being characterized as:
 - i) stable;
 - ii) water soluble;
 - iii) non-aggregating;
 - iv) magnetic; and
 - v) from 0.5 to 10 nm in size;
 - b) administering the extended cobalt complex of step a) into the individual to contact the tumor with the extended cobalt complex; and
 - c) performing magnetic resonance imaging on the individual to identify the tumor.
8. The method of Claim 7 wherein the individual is human.
9. The method of Claim 7 wherein the individual is an animal.
10. The method of Claim 7 wherein the extended cobalt complex is linked to a targeting molecule.
11. The method of Claim 10 wherein the targeting molecule is selected from the group consisting of an antibody fragment, an antibody, a polypeptide, a nucleic acid, a carbohydrate, a lipid, a synthetic molecule.
12. The method of Claim 7 wherein administering step b) is by a form of administration selected from the group consisting of intraperitoneal, intravenous, intramuscular, and oral.

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-31-

13. A method for *in vivo* imaging tissue in an individual, wherein the tissue is regenerating from a wound, comprising:
 - a) providing an extended cobalt complex which comprises cobalt atoms, a carboxylate ligand, an amine ligand, and a multidentate thiol-containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions, the extended complex being characterized as:
 - i) stable;
 - ii) water soluble;
 - iii) non-aggregating;
 - iv) magnetic; and
 - v) from 0.5 to 10 nm in size;
 - b) administering the extended cobalt complex to the individual to contact the tissue with the extended cobalt complex; and
 - c) performing magnetic resonance imaging on the individual to image the wounded tissue.
14. The method of Claim 13 wherein the tissue is selected from the group consisting of skeletal, secretory, digestive, muscular, reproductive, circulatory, and, immunological, neurological.
15. The method of Claim 13 wherein the tissue is selected from the group consisting of liver, pancreas, kidney, veins, arteries, lung, heart, brain, breast, colon, lymph nodes, alimentary tract, and prostate.
16. A method for *in vivo* imaging a tissue in an individual, wherein the tissue expresses a specific molecular marker, comprising:
 - a) providing an extended cobalt complex which is functionally linked to a binding moiety specific for the molecular marker, wherein the extended cobalt complex comprises cobalt atoms,

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-32-

a carboxylate ligand, an amine ligand, and a multidentate thiol-containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions, the extended complex being characterized as:

- i) stable;
 - ii) water soluble;
 - iii) non-aggregating;
 - iv) magnetic; and
 - v) from 0.5 to 10 nm in size;
- b) administering the extended cobalt complex of step a) to the individual to contact the molecular marker of the tissue with the extended cobalt complex; and
 - c) performing magnetic resonance imaging on the individual to image the tissue which expresses the molecular marker.
17. A method for visually detecting the presence of an antigen in a sample, comprising:
- a) providing antibody which specifically binds the antigen, the antibody having been coupled to an extended cobalt complex which has a characteristic color;
 - b) contacting the antibody of step a) to the sample under conditions appropriate for antibody-antigen binding; and
 - c) visually detecting the presence of the extended cobalt complex in the sample via detection of the characteristic color of the extended cobalt complex, with the presence of the extended cobalt complex being an indication of the presence of the antibody and thus an indication of the presence of the antigen in the sample.
18. A method for detecting the presence of an antigen in a sample, comprising:

WO 02/07846

PCT/US01/22832

-33-

- a) providing antibody which specifically binds the antigen, the antibody having been coupled to an extended cobalt complex which has a characteristic color;
- b) contacting the antibody of step a) to the sample under conditions appropriate for antibody-antigen binding; and
- c) detecting the presence of the extended cobalt complex in the sample via detection of the magnetic properties of the extended cobalt complex, with the presence of the extended cobalt complex being an indication of the presence of the antibody and thus an indication of the presence of the antigen in the sample.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/007846 A1

- (51) International Patent Classification: **A66B 5/055**, (81) Designated States (*national*): CA, JP,
GB, IN, 24888
- (21) International Application Number: PCT/US01/22832 (84) Designated States (*regional*): European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC,
(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001) NL, PT, SE, TR;
- (25) Filing Language: English Published:
(26) Publication Language: English with international search report
- (30) Priority Data: 21 July 2000 (21.07.2000) US 09/824,029 11 April 2001 (11.04.2001) US (48) Date of publication of this corrected version: 25 July 2002
- (71) Applicant and (15) Information about Correction:
(72) Inventor: HAINFIELD, James, E. [US/US]; 44 Bradley see PCT Gazette No. 30/2002 of 25 July 2002, Section II
Drive, Shureham, NY 11789 (US);
- (74) Agent: FARRELL, Kevin, M.; P.O. Box 999, York Har- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
bor, ME 03911 (US). ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette



WO 02/007846 A1

(54) Title: EXTENDED ORGANIC COBALT AND NICKEL MAGNETIC COMPLEXES

(57) Abstract: A method for *in vivo* imaging tissue of a individual, by performing magnetic resonance imaging utilizing an extended cobalt complex as a contrast enhancement agent. The extended cobalt complex is comprised of cobalt atoms, a carboxylate ligand, an amine ligand, and a multidentate chel containing organic ligand, the cobalt atoms being linked to thiol groups and counter ions. Also, a method for visually detecting the presence of an antigen in a sample using an antibody being coupled to an extended cobalt complex.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/22832
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A60B 5/055, G01N 24/06 US CL : 424/9.3, 9.36, 436/173 According to International Patent Classification (IPC) as to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.3, 9.36, 9.32, 9.34; 436/173, 503, 544 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data bases 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.
Y	US 5,521,289 A (HAINFIELD et al) 28 May 1996, see columns 7-9.	1-18
Y	US 5,656,529 A (BENG et al) 12 January 1999, see columns 4-6.	1-18
Y	US 5,879,659 A (EDWARDS et al) 09 March 1999, see columns 3-5.	1-18
Y	US 4,795,626 A (DEUTSCH et al) 03 January 1989, see entire document.	1-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
Special categories of cited documents: *A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *C* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *D* documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* documents published prior to the international filing date but later than the publication date of the cited document *F* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *G* 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 *H* 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 *I* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2001 (28.09.2001)		Date of mailing of the international search report 19 NOV 2001
Name and mailing address of the ISA/IIR Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20535 Facsimile No. (703) 305-3230		Author/Inventor Michael G. Hickey Telephone No. (703) 308-1255

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/22832

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAPLUS

search terms: cobalt, MRI, PMR, ligands, carboxylate, amine, thiol, multidentate, tripodal, tertiary.