

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6701378号
(P6701378)

(45) 発行日 令和2年5月27日 (2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月8日 (2020.5.8)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 51/08 (2006.01)

A 6 1 K 51/08 2 0 0

請求項の数 6 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2018-553981 (P2018-553981)	(73) 特許権者	514039912
(86) (22) 出願日	平成29年4月21日 (2017.4.21)		ナショナル キャンサー センター
(65) 公表番号	特表2019-513783 (P2019-513783A)		大韓民国 1 0 4 0 8 ギョンギード ゴ
(43) 公表日	令和1年5月30日 (2019.5.30)		ヤン-シ イルサンドン-グ イルサン-
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/004302		ロ 3 2 3
(87) 国際公開番号	W02017/183946	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成29年10月26日 (2017.10.26)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成30年10月11日 (2018.10.11)	(74) 代理人	100110364
(31) 優先権主張番号	10-2016-0049425		弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成28年4月22日 (2016.4.22)	(74) 代理人	100133400
(33) 優先権主張国・地域又は機関			弁理士 阿部 達彦
	韓国 (KR)		
(31) 優先権主張番号	10-2017-0050971		
(32) 優先日	平成29年4月20日 (2017.4.20)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関			
	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病変標識用注射剤組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分を含有し、平均密度が $1.1 \sim 1.4 \text{ g/ml}$ である複合体を含む第 1 組成と；
 平均分子量が $0.5 \sim 3.0 \text{ MDa}$ である第 2 組成と；を含み、
 前記第 1 組成は、大凝集アルブミン (macroaggregated albumin、M A A) に生体組織染色用色素、放射性同位元素またはこれらの組合せが結合された複合体を含み、
 前記第 2 組成は、生体適合性粘性物質であり、及び、前記生体適合性粘性物質が、ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid；H A) またはコラーゲンであり、
 前記第 2 組成は、全体注射剤組成物に対して $0.2 \sim 1\% (w/v)$ 含まれ、
 前記第 2 組成は、常温で $24 \sim 1500 \text{ cps}$ の粘度を有することを特徴とする
 病変標識用注射剤組成物。

【請求項 2】

前記注射剤組成物は、
 常温で測定時に、下記数式 1 を満たすことを特徴とする請求項 1 に記載の病変標識用注射剤組成物：

[数式 1]

$$|T_2 - T_1| < 15\%$$

T_1 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で、前記容器高さの $1/4$ の地点で測定した 550 nm に対する透過度 (%) であり、

T_2 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で 120 分間放置した後、前記容器高さの $1/4$ の地点で測定した 550 nm に対する透過度 (%) である。

【請求項 3】

前記注射剤組成物は、
常温で測定時に、下記数式 2 を満たすことを特徴とする請求項 1 に記載の病変標識用注射剤組成物：

〔数式 2〕

$$|F_2 - F_1| < 20 \text{ gf}$$

F_1 は、製造された注射剤組成物を 26 G 針を含む注射器に担持された状態で注射開始時に測定した滑走力であり、

F_2 は、製造された注射剤組成物を 26 G 針を含む注射器に担持された状態で 120 分間放置した後、注射するときの注射開始時に測定した滑走力である。

【請求項 4】

前記数式 2 によって測定された滑走力は、15 gf 以下であることを特徴とする請求項 3 に記載の病変標識用注射剤組成物。

【請求項 5】

前記 F_2 は、120 ~ 165 gf の滑走力を有することを特徴とする請求項 3 に記載の病変標識用注射剤組成物。

【請求項 6】

前記生体組織染色用色素は、目視で確認可能な色素または蛍光色素であり、
前記放射性同位元素は、H - 3、C - 14、P - 32、S - 35、Cl - 36、Cr - 51、Co - 57、Co - 58、Cu - 64、Fe - 59、Y - 90、I - 124、I - 125、Re - 186、I - 131、Tc - 99m、Mo - 99、P - 32、CR - 51、Ca - 45、Ca - 68 およびこれらの組合せよりなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の注射剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病変標識用注射剤組成物および前記注射剤組成物を利用して病変の位置に関する情報を提供する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的に、抗癌治療の場合、多様な抗癌剤を利用する方法が開発されているが、未だに外科手術的な方法を用いて癌細胞を除去する方法が最も多く行われている。

【0003】

しかしながら、外科手術的な方法を使用する場合、手術後における患者の健康および福祉のために、手術中に手術範囲を最小化する技術が必須である。特に乳癌の場合、乳房が小さい韓国女性の手術時に、切除する病変が他の国に比べて少なくしなければ、乳房保存的治療法の目標を達成することができなくなる。

【0004】

一方、手術範囲は、病変と病変周囲のエッジ余分部位に決定される。執刀医が病変部位と範囲を正確に知らなければ、病変周囲のエッジ余分を大きくして置く必要がある。なぜなら、むやみに手術範囲を縮めていては、腫瘍が切除面に残ってしまうことがあるからである。

【0005】

ところが、実際臨床手術では、手術執刀医が手術中に病変を正確にリアルタイムで確認するための方法が多くない。非常に精密な診断方法が開発されたにもかかわらず、このような診断方法は、手術中には使用できなく、実際手術中には、主に執刀医の触感や視覚に依存することになり、この場合、病変が明確に区別される場合はまれである。

【0006】

特に、病変が小さい場合は、さらに区別できなくなる。微細浸湿手術および保存的手術の目的を達成するために、執刀医に、病変を手術中にリアルタイムで知らせる技術が必要とされる。

【0007】

従来の腫瘍除去手術、特に乳癌手術時には、患者の微細病変の位置を手術前に超音波、マンモグラフィー、または磁気共鳴映像で確認し、確認された病変の位置を標識した後、標識された部位の組織を除去しており、確認された病変の位置を標識する方法としては、皮膚の表面に絵を描く方法、ワイヤーを利用する方法、チャコール(charcoal)のような黒い色素を注射する方法などが使用されている。

10

【0008】

しかし、病変の位置を標識するために皮膚上にペンを利用して絵を描く方法は、非常に柔軟な乳房組織の特性上、診断するときとは異なって、手術室で乳房の形状が大きく変化するという点、乳房深部の病変である場合には、皮膚の表面に標識したことだけでは不充分であるという点のため、最も容易に使用できるが正確度が最も低いという短所がある。

【0009】

次に、ワイヤーを利用して乳房の病変に刺す方法は、本来ワイヤーを皮膚の表面に垂直に挿入させなければならないが、超音波プローブに影響を与えることがあるので、仕方なく斜線に挿入させなければならないという点、ワイヤーの位置が乳房の動きに応じて移動してしまうという点などのため、予想より低い正確度を示し、挿入されたワイヤーは、手術に邪魔となり、ワイヤーの挿入部位を切除する施術がさらに行われなければならないという短所がある。最後に、チャコールのような色素を注射する方法は、注射された色素が病変に結合して、病変の位置を正確に標識することができるという長所があるのに対し、乳房深部の病変である場合、外部では黒色の色素を確認することができなく、色素により手術部位が汚染されることがあるという短所がある。前記列挙した短所は、乳癌以外の癌組織を除去するための外科的手術の際にも共通して適用され得る。

20

【0010】

このように現在までに開発された技術では、外科的に病変、特に癌病変を除去するための手術範囲を精密に決定することは難しいため、今のところは、外科的に癌病変を除去する場合、切除範囲が必要以上に拡大されるしかなく、手術後にも病変が正常に除去されたかを確認するための検査が伴わなければならない。

30

【0011】

このような問題を解決するために、韓国特許登録第10-1552138号によれば、大凝集アルブミンに生体組織染色用色素、放射性同位元素またはこれらの組合せが結合された複合体を含む癌病変標識用組成物を開示することにより、標識子が癌病変に効果的に吸着して病変の位置を正確に標識することができ、前記色素をリアルタイムで追跡して除去しようとする病変の範囲を正確に確認することができるようにした。

【0012】

なお、韓国特許登録第10-1552138号に開示された複合体の水溶液形態は、単数色素形態に比べて組織においての拡散が少ないため、手術用標識子として有利であるが、実際適用時に、注射の準備中にすでに沈んでいて一定の量が注射されない問題が発生した。

40

【0013】

また、韓国特許登録第10-1552138号に開示された複合体の水溶液形態は、粘度が低いため、注射時に過量あるいは少量で注射される傾向にあった。したがって、注射経験が少ない場合や注射が難しい臨床状況で一定の大凝集アルブミン量が注射されなかった。注射の準備中に注射器内で沈む場合、固まったまま、注射されて、標識部位が一定でない場合が観察された。また、注射量が多かったり、注射される組織が堅い場合(癒痕組織、筋肉組織)、注射された溶液が緩い組織に組織と組織間の膜や筋肉部位などに沿って広く広がる場合もあった。

50

【 0 0 1 4 】

すなわち、筋肉の場合、筋膜に沿って広く広がることができ、瘢痕組織の場合、瘢痕組織の繊維組織のきめに沿って長く広がることことができる。これを防止するために、比較的太い針を利用し、少量をゆっくり注射しなければならないが、このような方式は、臨床的に使用するに際して、非常に不便な側面がある。

【 0 0 1 5 】

したがって、注射剤内に含まれる複合体が固まって注射針を塞いだり、一定の量で注射されない問題や周辺の組織に非常に早く広がる問題を解決できる注射剤組成物などが必要な実情である。

【 先行技術文献 】

10

【 特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 韓国特許登録第 1 0 - 1 5 5 2 1 3 8 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

本発明は、前述した問題点を解決するためのものであって、注射剤組成物内に粘度を調節できる組成を追加して、複合体が早く沈む問題を解決できる病変標識用注射剤組成物を提供しようとする。

【 0 0 1 8 】

20

特に、複合体が早く沈む問題を解決して、一定の量の複合体が注射され得、周辺組織に非常に早く広がる問題点を解決できる病変標識用注射剤組成物を提供しようとする。

【 0 0 1 9 】

なお、前述した病変標識用注射剤組成物を利用して、病変の位置に関する情報を提供する方法を提供しようとする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 0 】

上記の目的を達成するために、

本発明は、一実施例において、

活性成分を含有し、平均密度が $1.1 \sim 1.4 \text{ g/ml}$ である複合体を含む第 1 組成と；
平均分子量が $0.5 \sim 3.0 \text{ MDa}$ である第 2 組成と；を含み、
前記第 2 組成は、常温で $24 \sim 1500 \text{ cps}$ の粘度を有することを特徴とする病変標識用注射剤組成物を提供する。

30

【 0 0 2 1 】

また、本発明は、一実施例において、

下記段階を含む、病変の位置に関する情報を提供する方法を提供する：

(a) 前記注射剤組成物を個体で発生した病変に投与する段階；および

(b) 前記個体から活性成分の信号が発生して病変の位置を確認する段階。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 2 】

40

本発明による病変標識用注射剤組成物は、活性成分を含有する複合体を含む第 1 組成に生体適合性粘性物質を含む第 2 組成を含むことにより、複合体が早く沈む問題を解決することができる。

【 0 0 2 3 】

特に、本発明による病変標識用注射剤組成物は、注射の準備中に複合体が早く沈む問題を解決して、一定の量の複合体が注射され得るようにする効果を有し、過量の複合体が注射される問題および複合体が周辺に非常に早く広がる問題を解決することにより、臨床的に便利で且つ安定的に使用され得る効果を有することができる。

【 0 0 2 4 】

また、本発明の注射剤組成物にヒアルロン酸またはコラーゲンなどのような生体適合性粘

50

性物質が一定量添加されることにより、筋肉組織、乳房組織、皮下組織、皮膚組織などのような様々な組織に同じ量を注射する場合、前記粘性物質が含まれていない場合に比べて、極めて一定に注射される効果を示すことができ、注射を早くする場合にも、前記粘性物質が含まれていない場合に比べて極めて少なく広がる効果を示すことができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、ICG-MAAの密度を推定するための線形回帰式を示すグラフである。

【図2】図2は、ICGとMAAの濃度変化によるICG-MAA複合体の近赤外線蛍光の信号強度の変化を示すグラフである。

10

【図3】図3は、HA濃度が互いに異なる二つのMAAを比較した写真である((a) 0.1%のHA、(b) 0.5%のHA)。

【図4】図4は、HAが存在する／存在しないMAA水溶液の明視野イメージ(bright field image)を示す。

【図5】図5は、多様なMAAの濃度で、5 μ MのICGからの蛍光信号を測定したものを示す。

【図6】図6は、鶏ささみと鶏砂嚢に注射した後、切開前あるいは切開後に撮影したNIRF(Near-Infrared Fluorescent)イメージを示す。

【図7】図7は、注射針経路に沿って注射された鶏ささみを切開した後の可視化した切断面の明視野およびNIRFイメージを示す。

20

【図8】図8は、内視鏡用注射器(endoscopic catheter)を利用して胃癌手術におけるICG-MAA-HA混合物の適用性を実験したものを示す。

【図9】図9は、ヒアルロン酸の有無によって蛍光信号を測定した結果を示す図である((a) ヒアルロン酸が添加されていない、(b) 0.1%のヒアルロン酸が添加される)。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、多様な変更を加えることができ、様々な実施例を有することができる、特定の実施例を図面に例示し、詳細な説明に詳細に説明しようとする。

しかしながら、これは、本発明を特定の実施形態に対して限定しようとするものではなく、本発明の思想および技術範囲に含まれるすべての変更、均等物ないし代替物を含むことが理解されなければならない。

30

【0027】

本発明において、「含む」または「有する」などの用語は、明細書上に記載された特徴、数字、段階、動作、構成要素、部品またはこれらを組み合わせたものが存在することを指定しようとするものであって、一つまたはそれ以上の他の特徴や数字、段階、動作、構成要素、部品またはこれらを組み合わせたものなどの存在または付加可能性をあらかじめ排除しないものと理解されなければならない。

【0028】

本発明は、病変標識用注射剤組成物に関し、より詳細には、注射剤組成物内に粘度を調節できる組成を追加して、複合体が早く沈む問題を解決できる病変標識用注射剤組成物に関する。

40

【0029】

特に、本発明による病変標識用注射剤組成物は、前記粘度を調節できる組成を追加して、複合体が早く沈む問題を解決することができ、これに伴い、一定の量の複合体が注射され得る効果がある。

【0030】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、一実施例において、

活性成分を含有し、平均密度が1.1~1.4 g/mlである複合体を含む第1組成と；

50

分子量が0.5～3.0MDaである第2組成と；を含み、
前記第2組成は、常温で24～1500cpsの粘度を有することを特徴とする病変標識用注射剤組成物を提供する。

【0031】

より具体的に、大凝集アルブミンに活性成分が結合された複合体は、平均密度が1.1～1.4g/mLと比較的高い密度を有していて、前記複合体は、注射の準備中に注射器内で沈む問題が発生した。

【0032】

したがって、本発明は、注射の準備中に複合体が早く沈む問題点を解決するためのものであって、前述した第1組成に平均分子量が0.5～3.0MDaである第2組成を追加して粘度を調節したことを特徴とする。

10

【0033】

まず、以下では、本発明の第1組成について詳細に説明することとする。

本発明の一実施例において、第1組成は、大凝集アルブミン(macroaggregated albumin、MAA)に活性成分が結合された組成を含むことができる。

【0034】

本発明において、「大凝集アルブミン(MAA)」とは、ヒトの血清アルブミンを加熱して凝固させて製造された直径10～50μmのタンパク質性粒子を意味する。

【0035】

一方、直径が10nm未満のヒト血清アルブミンと比較して、その構造および物理的特性が異なり得、前記MAAは、静脈注射する場合、約8μmの肺毛細管に滞留し、微小塞栓を引き起こす特性を示すので、前記特性を利用して、放射性同位元素で標識されたMAAは、肺シンチグラフィ（肺塞栓、肺血栓、高安病、肺炎、肺癌などの肺血類異常あるいは左右シャントや肺静脈圧亢進の診断）または静脈スキャン（当該部位で中枢の静脈血診断）や静脈スキャン（バージャー病など末梢動脈血流異常の診断）等に使用されてきた。本発明のMAAは、癌病変組織に注入して、癌病変組織に標識物質を結合させるための媒介体として使用され得る。

20

【0036】

なお、本発明のMAA、組換えHSAを利用して合成することができ、自己由来でないHSAを利用して合成することもできる。また、商業的に利用可能なものを購入して使用することもできる。本発明のMAAは、癌病変組織に注入して、癌病変組織に標識物質を結合させるための媒介体として使用され、前記媒介体は、標識物質を吸着させて前記標識物質が癌病変組織に広がることを防止する役割を行うことができる。

30

【0037】

なお、本発明の一実施例において、「活性成分」は、輻射エネルギーの吸収、放電、粒子の衝撃などにより分子、原子イオンなどのエネルギーを高めて化学反応を起こしやすい状態になる成分を意味するものであって、活性成分は、生体組織染色用色素、放射性同位元素またはこれらの組合せを意味し得る。

【0038】

本発明の一実施例において、前記生体組織染色用色素は、目視で確認可能な色素または蛍光色素であってもよい。

40

【0039】

前記目視で確認可能な色素は、中性赤、ナイル青、ビスマルクブラウン、リチウムカルミン、トリパンブルー、ヤヌスグリーン、メチルバイオレット、オーラミン、マラガライトグリーン、サブラニン、エオシン、コンゴレッド、エリスロシン、ニグロシン、アルシアンプルー、ヘマトキシリン、アニリンブルー、ライトグリーンおよびこれらの組合せよりなる群から選択され得る。

【0040】

本発明の一実施例において、前記蛍光色素は、近赤外線蛍光色素であってもよく、前記近赤外線蛍光色素は、インドシアニングリーン(indocyanine green、I

50

(CG)であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0041】

本発明の用語「生体組織染色用色素」とは、生体組織に結合して、結合された位置を標識することにより、標識された位置を目視でまたは検出用ツールを使用して確認できるようにする物質を意味する。本発明の目的上、前記生体組織染色用色素は、癌組織に結合されて、癌の発生部位を標識する用途に使用され得る標識物質となり得る。好ましくは、目視で確認可能な色素、結合部位で蛍光を発生させて蛍光カメラなどの装置を使用して検出できる蛍光色素などを単独でまたは組み合わせて使用することができるが、特にこれに制限されるものではない。

【0042】

本発明の用語「目視で確認可能な色素」とは、生体組織に結合した標識物質が可視光線領域の色を示し、標識された部位を目視で確認できるようにする色素の一種を意味する。本発明の目的上、前記目視で確認可能な色素は、癌が発生した部位に注射して、外科手術的な方法で癌を除去する場合、切除する癌病変を明確に確認できるようにして、癌手術の成功率を向上させる役割を行うことができる。前記目視で確認可能な標識物質は、好ましくは、中性赤、ナイル青、ピスマルクブラウン、リチウムカルミン、トリパンプルー、ヤヌスグリーン、メチルバイオレット、オーラミン、マラガライトグリーン、サブラニン、エオシン、コンゴレッド、エリスロシン、ニグロシン、アルシアンブルー、ヘマトキシリン、アニリンブルー、ライトグリーンなどを単独でまたは混合して使用することができるが、癌病変組織を確認できるようにする目的を達成できる限り、特にこれに制限されるものではない。

【0043】

本発明の用語「蛍光色素」とは、一定波長の光を吸収して励起状態を形成した後、光の浸透距離が最大となり、水分によるエラー信号を最小化できる蛍光を発生する有機化合物を意味する。好ましくは700nm～3000nm、より好ましくは750nm～900nmの近赤外線波長の蛍光を発生する有機化合物である近赤外線蛍光色素であってもよい。前記近赤外線蛍光色素から発生する近赤外線波長の蛍光は、蛍光カメラ、蛍光センシングプローブ(PCT/KR2011/009271)等の装置を利用して写真の形態で撮影したり、リアルタイムでモニタリングすることができる。本発明の近赤外線波長の蛍光は、生体内における吸収が他の波長帯に比べて相対的に少ないため、比較的体内の深い部位で発生する近赤外線も生体の外部で検出が可能である。本発明の目的上、前記近赤外線領域蛍光色素は、癌が発生した部位に注射して外科手術的な方法で癌を除去する場合、切開する前に癌病変部位を正確に確認できるようにして、癌手術の成功率を向上させる役割を行うことができる。特に、前記目視で確認可能な色素とは異なって、切開して直接的な病変を確認する前に、体外でも病変の位置を検出することができるので、迅速で且つ正確な癌手術の実行を図ることができるようにする。前記近赤外線蛍光色素としては、好ましくは、インドシアニングリーンなどが使用でき、人体に使用可能な近赤外線蛍光色素である限り、本発明の範囲に含まれていてもよい。

【0044】

前記近赤外線蛍光色素がMAAに結合された複合体は、腫瘍に蓄積されるものとして知られている他の物質に近赤外線蛍光色素が結合された複合体に比べて、検出される蛍光信号の安定性および正確性に優れているという長所を示すので、微細病変を見出すことができる割合が高く、病変切除の正確度を向上させることができる。

【0045】

本発明の用語「インドシアニングリーン(indocyanine green、ICG)」とは、生物学または医学分野において広く使用される近赤外線領域の蛍光映像用染料を意味する。人体に注入された後、一時間程度経過すると、分解されてなくなったり、大小便として排出される特性があって、人体に使用可能な蛍光染料として臨床的適用に有利である。実際に、インドシアニンググリーンを利用して人体に適用した事例は、様々な論文に報告されたことがあり、一例として乳癌患者18名において安全に臨床的に使用したこ

10

20

30

40

50

とが報告された(T. Kitai, et al., Breast Cancer, 12: 211-215, 2005)。なお、前記近赤外線蛍光色素を吸着結合させることは、本発明のM A Aに近赤外線蛍光色素を混合させる段階を通じて達成することができる。

【0046】

本発明の一実施例によれば、M A AにI C Gが結合された複合体(I C G - M A A)の製造時に、高い水準の近赤外線蛍光信号を示す複合体を製造するのに適した混合比率は、0.23 mg/mlのM A Aに対しては、3.9 μMのI C G、2.3 mg/mlのM A Aに対しては6.5 μMのI C Gおよび11.5 mg/mlのM A Aに対しては6.5 μMのI C Gであることを確認した。生体内に注射する場合は、生体内における拡散などにより濃度が変化するので、注射時点に正確な濃度を定めることができないが、実験的に注射注入が容易な2~4 mg/mlのM A Aに対して6.5 μMのI C Gで最も蛍光が高い値を示すことを確認したので、好ましくは2 mg/mlのM A Aに対して6.5 μMのI C Gが使用できる。

10

【0047】

本発明の用語「放射性同位元素」とは、原子番号が同一であるが、原子量が異なり、放射能を発散できる元素を意味する。ガンマ線や他の亜原子粒子を放出して放射性減衰をする特性を利用して一般的に疾病を診断するのに重要な標識子として使用されることもある。本発明の目的上、前記放射性同位元素は、近赤外線蛍光色素で発生する蛍光が検出されない程度の深部組織に癌が発生した部位に注射して、外科手術的な方法で癌を除去する場合、切開する前に癌病変部位を正確に確認できるようにして、癌手術の成功率を向上させる役割を行うことができる。前記放射性同位元素は、癌病変に結合し得るM A Aに標識できる特性を示すものであれば、特に制限されない。好ましくは、H-3、C-14、P-32、S-35、Cl-36、Cr-51、Co-57、Co-58、Cu-64、Fe-59、Y-90、I-124、I-125、Re-186、I-131、Tc-99m、Mo-99、P-32、CR-51、Ca-45、Ca-68等が挙げられ、より好ましくは、医学的に使用されるI-124、I-125、I-131、Cu-64、Tc-99m、Mo-99、CR-51、Ca-45、Ca-68等が挙げられ、最も好ましくは、Tc-99mが使用できる。

20

【0048】

本発明の用語「Tc-99m」とは、テクネチウム(t e c h n e t i u m、Tc)の放射性同位元素であって、6時間の短い半減期を有し、ガンマ線を発生させて映像用に使用され、被爆量が非常に少なく、組織透過度に優れ、一部の色素に現れるアレルギー反応も起こらないため、医学研究に広く使用される。

30

【0049】

本発明の用語「個体」とは、癌が発病して病変を示すことができ、本発明の癌病変標識用複合体または組成物が投与され得る生きている有機体を意味する。

【0050】

本発明において提供する病変標識用注射剤組成物を生体内の癌病変組織に投与する場合、投与された癌病変に結合されて、病変の位置を色、近赤外線蛍光、放射能またはこれらの組合せを通じて標識することができ、前記標識を検出することにより、癌病変の位置、大きさなどを手術中にリアルタイムで検出することができるので、外科的な癌病変の除去時に正確性を向上させることができ、正常組織の過大な損失を防止することができる。

40

【0051】

なお、本発明の注射剤組成物に含まれた複合体は、他の物質に生体組織染色用色素を結合させた複合体に比べて、生体内の癌病変で長期間残留することができるので、癌病変の外科的な切開時だけでなく、外科的な施術による癌病変切除の正確度を容易に確認することができる。例えば、超音波等を用いて手術前に微細病変の位置を確認した後、本発明の複合体を病変部の上に注入し、数時間後に手術中にも安定で且つ正確に病変部位を確認することができる。

【0052】

50

本発明の一実施例において、前記M A Aは、緩衝液に対して1 ~ 8 m g / m lの濃度で使用されることが好ましいが、これに制限されるものではない。

【0053】

本発明の一実施例において、1 ~ 8 m g / m lのM A Aに対して前記I C Gは4 ~ 250 μ Mが使用されることが好ましい。M A Aの溶解度を考慮するとき、より好ましくは、2 ~ 4 m g / m lのM A Aに対して6 . 5 μ MのI C Gが使用できる。しかし、体内の注射後に条件に応じて最大の蛍光強度を示すように、実施例では、記述した範囲内で適切なM A AとI C Gの濃度は調整が可能である。

【0054】

本発明の一実施例において、前記放射線同位元素は、H - 3、C - 14、P - 32、S - 35、C l - 36、C r - 51、C o - 57、C o - 58、C u - 64、F e - 59、Y - 90、I - 124、I - 125、R e - 186、I - 131、T c - 99m、M o - 99、P - 32、C R - 51、C a - 45、C a - 68およびこれらの組合せよりなる群から選択され得る。

10

【0055】

次に、以下では、本発明の一実施例による第2組成について詳細に説明することとする。本発明の一実施例による第2組成は、分子量が0 . 5 ~ 3 . 0 M D aであり、生体適合性粘性物質を含むことを特徴とする。

【0056】

特に、第2組成は、所定の粘度を有していて、病変標識用注射剤組成物に追加することにより、第1組成に含まれる複合体が早く沈む問題を解決することができ、これに伴い、一定の量の複合体が注射され得る効果がある。

20

【0057】

前記第2組成の分子量は、0 . 5 ~ 3 . 0 M D aであってもよく、または1 . 0 ~ 2 . 0 M D aであってもよい。第2組成は、比較的小さい分子量と所定の粘度を有していて、第1組成に含まれる複合体が早く沈む問題を解決することができる。

【0058】

ここで、分子量の単位「D a」は、質量を表示する単位であって、酸素原子の質量の1 / 16を1 d a l t o nといえる。

【0059】

30

なお、第2組成は、常温で5 ~ 1500 c p sの粘度を有することができ、100 ~ 900 c p sを有することができ、好ましく100 ~ 350 c p sの粘度を有することができる。

【0060】

より具体的に、常温で第2組成の粘度が5 c p s未満である場合には、粘度が小さいため、第1組成に含まれる複合体が早く沈む問題を解決することができず、1500 c p sを超過する場合には、粘度が非常に高く、組織に注射時に高い圧力により注射が難しくなる困難を経験することができる。

【0061】

本発明の一実施例において、第2組成は、生体適合性粘性物質を含むことができ、前記生体適合性粘性物質は、ヒアルロン酸 (H y a l u r o n i c a c i d、H A) またはコラーゲンであってもよいが、これに制限されるものではない。

40

【0062】

好ましくは、前記生体適合性粘性物質は、ヒアルロン酸であってもよい。

【0063】

本発明の一実施例において、第2組成は、全体注射剤組成物に対して0 . 2 % (w / v) ~ 1 % (w / v) で添加され得る。

【0064】

より具体的に、第2組成が全体注射剤組成物に対して、0 . 2 % (w / v) 未満で含まれる場合、注射剤組成物の懸濁性維持時間が短いため、複合体が早く沈んで、組織に一定の

50

量で注射させることが難しいことがあり、特に、組織内注射時に一度に過量が注射されたり、周辺に非常に早く広がる問題が発生し得る。

【0065】

また、全体注射剤組成物に対して、前記第2組成が1% (w/v) を超過すると、第2組成の濃度により粘度が高くなって、注射時に高い圧力が加えられて、手ぶらでは注射しにくいことがある。

【0066】

一様態として、注射剤組成物を18~26G針を含む注射器に担持された状態で0.2% (w/v) ~ 1% (w/v) で添加され得、他の様態として、内視鏡用注射器を利用する場合、0.2~0.5% (w/v) を含むことができる。

10

【0067】

一方、本発明の一実施例による注射剤組成物は、常温で測定時に、下記数式1を満たす病変標識用注射剤組成物を提供することを特徴とする。

【0068】

[数式1]

$$|T_2 - T_1| < 15\%$$

【0069】

T_1 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で、前記容器高さの1/4の地点で測定した550nmに対する透過度(%)であり、
 T_2 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で120分間放置した後、前記容器高さの1/4の地点で測定した550nmに対する透過度(%)である。

20

【0070】

ここで、透過度というのは、物質層を光が通過する程度、物質層に対する入射光の強さを I_1 、これを通過して出た光の強さを I_2 というとき、 $T = I_2 / I_1$ を透過度と言える。

【0071】

なお、透明容器は、横×縦×高さが $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0072】

また、容器高さの1/4の地点というのは、前記容器の底面から1/4に該当する地点を意味することができる。

30

【0073】

一例において、0.4% (w/v) のヒアルロン酸を添加して製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で、前記容器の1/4の地点で測定した550nmに対する透過度(T_1)が0.4%であってもよく、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で120分間放置した後、前記容器の1/4の地点で測定した550nmに対する透過度(T_2)は、78.71%であってもよい。

【0074】

すなわち、注射剤組成物内に粘度を調節できる第2成分を添加することにより、懸濁性維持時間が長くなることになって、 $|T_2 - T_1| < 15\%$ であってもよい。

40

【0075】

これに加えて、本発明の一実施例による注射剤組成物は、常温で測定時に、下記数式2を満たす病変標識用注射剤組成物を提供することができる。

【0076】

[数式2]

$$|F_2 - F_1| < 20 \text{ gf}$$

【0077】

F_1 は、製造された注射剤組成物を26G針が結合された注射器に担持された状態で注射開始時に測定した滑走力であり、

50

F_2 は、製造された注射剤組成物を 26 G 針を含む注射器に担持された状態で 120 分間放置した後、注射するときの注射開始時に測定した滑走力である。

【0078】

ここで、滑走力の単位である「gf」は、力の大きさを意味するものであり、g 重 (gravitational force) を意味することができ、1 g 重は、0.0098 N を示す。

【0079】

なお、「滑走力」というのは、組成物を注射器内に担持させた状態で注射器で注射するときに指にかかる力 (gliding force) を意味することができる。

【0080】

一方、26 G (Gauge) は、針の内径が 0.241 mm である注射器を意味することができる。

【0081】

特定の様態として、前記数式 2 によって測定された滑走力は、5 gf 以下であってもよい。すなわち、 $|F_2 - F_1|$ は、5 gf 以下であってもよい。

【0082】

特に、 $|F_2 - F_1|$ に対する数値が少なく出るというのは、注射剤組成物を所定時間放置した後、注射開始と注射するときの中間基点の圧力が差異が小さいことを意味し、これは、120 分間放置しても、注射剤組成物の懸濁性が維持されたことを意味し、特に、注射剤組成物内で複合体の沈降速度が遅くなったことを意味する。

【0083】

なお、 F_2 は、120 ~ 165 gf の滑走力を有することを特徴とし、より具体的に、第 2 組成が全体注射剤組成物に対して 0.2% (w/v) ~ 1% (w/v) 含まれるとき、 F_2 は、120 ~ 165 gf であってもよい。

【0084】

すなわち、本発明の注射剤組成物にヒアルロン酸またはコラーゲンなどのような生体適合性粘性物質を一定量添加することにより、注射の準備中に複合体が早く沈む問題を解決して、一定の量の複合体が注射され得るようにする効果を有し、過量の複合体が注射される問題および複合体が周辺に非常に早く広がる問題を解決することができる。また、本発明の注射剤組成物にヒアルロン酸またはコラーゲンなどのような生体適合性粘性物質が一定量添加されることにより、筋肉組織、乳房組織、皮下組織、皮膚組織などのような様々な組織に同じ量を注射する場合、前記粘性物質が含まれていない場合に比べて、極めて少なく広がる効果を示すことができ、注射を早くする場合にも、前記粘性物質が含まれていない場合に比べて、極めて少なく広がる効果を示すことができる。

【0085】

本発明の一実施例において、前記病変は、癌病変であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0086】

本発明の一実施例において、前記癌は、前立腺癌、乳癌、子宮癌、皮膚癌、子宮頸癌、肺癌、脳腫瘍、胃腸管腫瘍、肝癌、軟組織肉腫、リンパ腫およびこれらの組合せよりなる群から選択される固形癌であってもよい。

【0087】

本発明の一実施例において、本発明による注射剤組成物は、癌除去手術中にリアルタイムで前記癌病変組織の大きさおよび位置を確認するのに使用できる。

【0088】

また、本発明は、下記段階を含む、病変の位置に関する情報を提供する方法に関する：

(a) 本発明による注射剤組成物を個体で発生した病変に投与する段階；および

(b) 前記個体から活性成分の信号が発生して病変の位置を確認する段階を含む。

【0089】

以下、実施例を通じて本発明をより一層詳細に説明しようとする。これらの実施例は、た

10

20

30

40

50

だ本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されるものと解釈されないことは、当業界における通常の知識を有する者にとって自明だろう。

【0090】

<製造例>

製造例1：大凝集アルブミン(MAA)の製造

大凝集アルブミン(MAA)を製造するために、0.1Mのアセート緩衝液(pH5.4、Sigma Aldrich、Korea)に希釈された2%ヒト血清アルブミン10ml(SKプラズマ)を塩化スズ50mg(Sigma Aldrich、Korea)と混合し、10分間室温で強く攪拌した後、70℃で20分間さらに攪拌して反応させた。

10

そして、反応が終了した後、更なる凝集を防止するために、前記反応物を氷に入れて急速冷却させた。

【0091】

次に、冷却させた反応物に20%ヒト血清アルブミン0.35mlを追加した後(ヒト血清として70mg)、室温で10分間攪拌し、前記反応物をMAA基準1、2、4、8mgずつガラスバイアルに分注し、凍結乾燥して、凍結乾燥したMAAキットを製造した。

【0092】

最終的に、MAAキットには、凍結乾燥したMAAがそれぞれ1、2、4、8mgが含まれた。

20

【0093】

前述したように、記述したように、MAAを製造するとき、アセート緩衝液が製造過程中使用され、凍結乾燥したMAAキットには、注射用水あるいはHAが含まれた注射用水で溶かして使用される。

【0094】

製造例2：インドシアニンググリーン(ICG)が結合されたMAA基盤標識子の製造

製造例2-1：ICGとMAAの混合比率の決定

近赤外線蛍光を示すMAA基盤の標識子を製造するために、実施例1で製造したMAAに近赤外線蛍光を示すインドシアニンググリーン(Indocyanine green、ICG、第一薬品、ジアグノグリーン注射)を結合して、複合体(ICG-MAA)を製造した。

30

【0095】

この際、最も強い近赤外線蛍光を示すことができるICGとMAAの混合比を決定するために、1.3~1032μMのICGと0~11.5mg/mlのMAAを多様な割合で反応させて、それぞれのICG-MAA複合体を製作した。

そして、製作されたそれぞれのICG-MAA複合体に示される近赤外線蛍光の信号強度を測定した(表1および図2)。

【0096】

図2は、ICGとMAAの濃度変化によるICG-MAA複合体の近赤外線蛍光の信号強度の変化を示すグラフである。

40

【0097】

【表 1】

ICG (μ N)	MAA (mg/ml)			
	0	0.23	2.3	11.5
1.3	18	42	238	530
3.9	120	52	424	931
6.5	212	38	456	979
9.0	289	32	444	942
12.9	363	27	342	915
25.8	466	12	255	563
38.7	425	8	162	366
51.6	399	7	101	280
64.5	374	13	75	244
77.4	332	16	55	182
103	289	23	39	94
258	139	30	16	60
516	71	13	2	20
774	39	6	2	9
1032	30	6	1	4

【0098】

表1と図2を参照すると、MAAを処理しない場合には、25.8 μ MのICGが、最も高い値の近赤外線蛍光の信号強度を示し、0.23 mg/mlのMAAを処理した場合には、3.9 μ MのICGが、最も高い値の近赤外線蛍光の信号強度を示した。

【0099】

なお、2.3 mg/mlのMAAを処理した場合には、6.5 μ MのICGが、最も高い値の近赤外線蛍光の信号強度を示し、11.5 mg/mlのMAAを処理した場合にも、7.5 μ MのICGが、最も高い値の近赤外線蛍光の信号強度を示すことを確認することができた。

【0100】

一方、生体に注射する場合は、生体内における拡散などによりMAAとICGの濃度が変わることができ、注射時点に正確な濃度を定めることができないが、実験的に2 mg/mlのMAAに対して6.5 μ MのICGで最も蛍光が高い値を示すことを確認した。

【0101】

製造例2-2：ICGが結合されたICG-MAA複合体の製造

MAA濃度が1、2、4、8 mg/mlであるICG-MAA複合体を製造した。ICG-MAA複合体製造反応は、常温で進めた。

【0102】

より具体的に、1、2、4、8 mgのMAA凍結乾燥キットにそれぞれ13 μ MのICGを0.5 mlずつ加え、約1分間軽く振って反応させた。次に、それぞれ蒸留水0.5 mlを加えて約5分間軽く振って、MAA濃度が異なる6.5 μ MのICG-MAA複合体を製造した。

【0103】

<実施例>

実施例1：ICG-MAA-HAの製造

MAA濃度が1、2、4、8 mg/mlであり、ICGが6.5 μ Mであり、ヒアルロン酸(hyaluronic acid、HA、Shandon Focuschem Biotech Co.)の濃度が0.5%であるICG-MAA-HA注射剤組成物を製造した。

【0104】

より具体的に、1、2、4、8 mg の MAA 凍結乾燥キットにそれぞれ 13 μ M の ICG を 0.5 ml ずつ加え、約 1 分間軽く振って反応させる。次に、きあらかじめ溶解した 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、4、8 % (w/v) の HA (1、448 kDa) をそれぞれ 0.5 ml 添加した後、約 5 分間強く攪拌して、均一に混合されるようにした。

【0105】

結果的に、最終組成比率で 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、4 % (w/v) の HA がそれぞれ含有され、ICG の濃度が 6.5 μ M であり、MAA が 1、2、4、8 mg/ml である ICG - MAA - HA 注射剤組成物の合計 32 種類を製造した。参考として、ICG - MAA - HA の製造工程は、常温で進めた。

10

【0106】

< 実験例 >

実験例 1 . ICG - MAA 複合体の密度測定

ICG - MAA 複合体の密度を測定した。

ICG - MAA 複合体は、生体物質などの形態を損傷せず、水溶液の状態で実際使用形態で密度を直接測定することは難しいため、間接的に濃度による密度の変化を参考にして ICG - MAA 複合体の密度を測定した。

【0107】

前記で製造した MAA の濃度が 2 mg/ml であり、ICG が 6.5 μ M である ICG - MAA 複合体を利用して密度を測定し、20 mg/ml ~ 200 mg/ml (2 ~ 20 % (w/v) の濃度の ICG - MAA 複合体を利用して、下記のように ICG - MAA の密度を測定した。

20

【0108】

より具体的に、常温で、透明容器に 20 mL の蒸留水を満たした後、前述した ICG - MAA 複合体を投与して、前記 ICG - MAA 複合体を含む蒸留水の変化する密度を測定し、特に、ICG - MAA 複合体の濃度によって変化する密度を測定した。

【0109】

参考として、ICG - MAA 複合体を蒸留水に投与して溶解した場合、蒸留水が白色の懸濁性を呈することを確認することができた。

30

【0110】

表 2 は、ICG - MAA 複合体を含む蒸留水に対する密度を示した表であり、ICG - MAA 複合体が含まれる濃度別に記述した。

【0111】

【表 2】

ICG-MAA複合体% (w/v)	密度 (g/ml)
20	1.0616
12	1.0395
10	1.0338
8	1.0283
6	1.0228
4	1.0177
2	1.0118

40

【0112】

表 2 を参照して線形回帰分析で線形回帰式を求め、外挿で 100 % であるときの密度を測定した (0.2757 * 100 + 1.0064 = 1.2821)。

50

【0113】

その結果、回帰式によって、ICG-MAA複合体の密度は、 1.2821 g/mL と推定された(図1)。

なお、20分後、蒸留水にICG-MAA複合体を溶解した蒸留水を確認したところ、容器の下方の部分に白色の懸濁液が沈んでいることを確認することができた。

【0114】

結果的に、ICG-MAA複合体の密度は、 1.2821 g/mL であり、常温における蒸留水の密度(0.99821 g/mL)より高いものと判断した。

【0115】

実験例2. 注射剤組成物の有用性評価

10

実験例2-1: 注射剤組成物としてのICG-MAA-HAの有用性-1

注射剤組成物としてのICG-MAA-HAの有用性を判断するために、HAの濃度によるICG-MAA-HAの懸濁性維持時間を測定した。参考として、MAAは、 2 mg/mL の濃度を利用し、ICG-MAA-HA最終注射物は、MAAとICGが完全に溶解すると、淡緑色の懸濁液の性状を示す。

【0116】

より具体的に、ICG-MAA-HA注射物が製造された後に、懸濁性を維持する時間を測定し、追加されるHAの濃度による懸濁性を維持する時間を測定した。ここで、懸濁性は、 500 nm 光の透過度20%を基準として沈む部位と浮遊部位が区分される基準が見える時点で懸濁性維持時間を定義した。

20

そして、その結果を表2に記述した。

【0117】

表3は、ICG-MAA-HA注射物が製造された後に懸濁性が維持される時間をHA溶剤の濃度別に示した表である。

【0118】

【表3】

HA溶剤の濃度 (%、w/v)	懸濁性維持時間
0% (単純注射用水)	10分以内
0.1%	30分以内
0.2%	2時間以内
0.3%	8時間以内
0.4%	14時間以内
0.5%	24時間以内
*軽く攪拌する場合、強く機械式攪拌器で攪拌する場合、溶解時間は短縮されるが、攪拌する強度によって溶解時間が一定でない。	

30

【0119】

表3を参照すると、HAが添加されていない注射剤組成物は、HAを添加した組成物より懸濁性維持時間が比較的短く、HAが添加される比率が増加するほど懸濁性維持時間が長くなることを確認することができた。

40

【0120】

一方、0.1%のHAが注射剤組成物に添加されたとき、懸濁性維持時間が30分以内に増加したが、HAの濃度が0.2%(w/v)から懸濁性が2時間を超え、HAの濃度が0.3%(w/v)からは懸濁性が8時間を超えることを確認した。

すなわち、0.2%(w/v)から実際の注射用製剤として効果的であると判断された。

【0121】

図3は、HA濃度が互いに異なる二つのMAAを比較した写真を示す。

50

より具体的に、前記で製造した I C G - M A A - H A 注射剤を 30 分が経過した後に撮影した写真であり、図 3 (a) は、0.1%の H A が添加された M A A の写真であり、図 3 (b) は、0.5%の H A が添加された M A A の写真である。

【0122】

図 3 を参照すると、0.1%の H A が添加された注射剤組成物は、早く沈むのに対し、0.5%の H A が添加された注射剤組成物は、長時間沈まないことが分かった。すなわち、図 3 から、I C G - M A A に 0.5%の H A が添加された I C G - M A A - H A は、注射の準備中に早く沈まないことであるから、注射剤組成物として非常に有用であることが分かる。

【0123】

実験例 2 - 2 : 注射剤組成物としての I C G - M A A - H A の有用性 - 2

実験例 2 - 2 では、ヒアルロン酸 (H A) の濃度によって注射時に指にかかる力 (g l i d d i n g f o r c e) を様々な条件で測定し、注射剤組成物として I C G - M A A - H A の有用性を判断した。

【0124】

より具体的に、最終製造された注射物を注射剤として使用する場合、注射の容易性を 18 G、21 G、22 G、23 G、26 G 針をそれぞれ装着した 1 c c の使い捨て注射器を利用して評価した。

【0125】

一方、組成物の特性として注射器で注射するときにかかる負荷は、18 G a u g e (針の内径 : 0.838 mm)、21 G (針の内径 : 0.495 mm)、22 G (針の内径 : 0.394 mm)、23 G (針の内径 : 0.318 mm)、26 G (針の内径 : 0.241 mm) 別に調査した。

【0126】

なお、1.8 m の連結導管を有する内視鏡注射器 (7 F r、長さ 180 c m、M T W、G e r m a n y) を用いて抵抗性 (注射時に指にかかる力) を測定した。

そして、その結果を下記の表 4 に記述した。

【0127】

【表 4】

gf	注射器	水	ヒアルロン酸 (% (w / v))											
			0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00	2.00	3.00
26G	79	91	107.5	110.0	115.0	120.0	125.0	131.0	136.0	142.0	146.0	152.5	253.2	注射不可
23G	82.6	81	97.5	100.0	102.0	104.0	107.0	112.0	120.0	128.0	132.0	138.0	240.6	注射不可
22G	72.5	72.5	92.5	93.0	95.0	97.0	99.0	110.0	115.0	118.0	120.0	124.0	223.8	690.4
21G	67	72.5	87.5	93.0	90.0	91.0	92.5	97.0	102.0	105.0	110.0	114.0	220.5	650.2
18G	62	75	78	81.0	83.0	85.0	87.5	91.0	95.0	99.0	102.0	104.0	208.9	640.3
7Fr		145	280	380	490	600	631	780	注射不可	注射不可	注射不可	注射不可	注射不可	注射不可

【0128】

一般的に、臨床で使用する注射針を利用する場合、60 ~ 140 g f の力が注射時に加えられた。ヒアルロン酸 (H A) 1%濃度までは、注射時に抵抗が大きくないため、使用に困難がなかった。

【0129】

他方で、導管の長さが長くて、抵抗が多くかかる内視鏡用注射器針 (7 F r、180 c m) を利用する場合、水は、140 g f の力がかかり、H A の濃度が 0.6% (w / v) である場合は、780 g f の力がかかって、顕著に高い圧力が加えられる場合にのみ、注射

10

20

30

40

50

が可能であった。

【0130】

個人差があるが、700gfの滑走力 (gliding force) がかかる場合、組織に注射することに困難を感じて精密に注射することが難しい。一方、内視鏡用注射器針 (7Fr、180cm) を利用したとき、HA0.60%は、780gfの力がかかって、顕著に高い圧力が加えられる場合のみに注射が可能であり、HA0.70%からは抵抗が大きくなって、手ぶらでは注射することができなかった。

【0131】

すなわち、ヒアルロン酸は、一般的な注射条件では1% (w/v) まで可能であり、針が長く、注射器から針まで微細な導管で連結された特殊注射器 (内視鏡注射器) の場合には、0.5% (w/v) まで手で注射することができた。

10

【0132】

一方、組織と直接当接する一般的な注射器 (26G~18G) を利用する場合には、組織に柔らかに注射することが好ましく、200gf未満の力がかかることが理想的であり、ヒアルロン酸の場合、1% (w/v) までは200gf未満の力で注射が可能になることを確認することができた。

【0133】

実験例3: ICG-MAA-HAの沈降による注射器圧力の変化

実験例3-3: ICG-MAA-HAの沈降による注射器圧力の変化 - 1

実施例3-3では、ヒアルロン酸が添加される注射剤組成物をすぐに注射する場合の圧力 (A) と前記注射剤組成物を120分間放置した後、組成物が沈降した後に注射器にかかる圧力 (B) を測定して、下記の表に記述した。

20

【0134】

この際、注射器は、26Gを使用して注射器の滑走力 (gliding force) を測定した。

なお、滑走力の単位は、gfであり、g重 (1g重 = 0.0098N) を示す。

【0135】

【表5】

HA (%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
A	91	107.5	110.0	115.0	120.0	125.0	131.0	136.0	142.0	146.0	152.5
B	400	310	125	126	130	140	144	152	160	155	165
B-A	309	202.5	15	11	10	15	13	16	18	9	12.5

30

【0136】

表5を参照すると、ヒアルロン酸が添加される注射剤組成物をすぐに注射する場合の圧力 (A) と前記注射剤組成物を120分間放置した後、組成物が沈降した後に注射器にかかる圧力 (B) は、ヒアルロン酸の濃度が高くなるほど、圧力 (A、B) が高くなることを確認することができた。

40

【0137】

なお、ヒアルロン酸の濃度が高くなるほど注射剤組成物を120分間放置した後に注射器にかかる圧力 (B) と注射剤組成物をすぐに注射する場合の圧力 (A) とが差異が大きくなかった。特に、ヒアルロン酸の濃度が0.2% (w/v) であるときから1.0% (w/v) であるときまで平均B-A値は、13.27778gfであり、これによる標準偏差は、2.969755であった。

【0138】

実験例3-3: ICG-MAA-HAの沈降による注射器圧力 (gliding force) の変化 - 2

一般的に、ヒアルロン酸の濃度によって26Gの注射器にかかる圧力は、約20gf (0

50

．１％ ＨＡ）から７０ｇｆ（１．０％ ＨＡ）増加する。注射剤内にヒアルロン酸の他に注射剤組成物によって注射器にかかる圧力は増加し、一例として８ｍｇ／ｍｌの場合、約１５ｇｆの力がさらに加えられる。

【０１３９】

したがって、実験例３－３において、ヒアルロン酸が添加される注射剤組成物をすぐに注射する場合と前記注射剤組成物を１２０分間放置した後、組成物が沈降した後に注射器にかかる圧力を測定して、下記の表に記述した。

【０１４０】

参考として、表６の（Ａ）は、注射剤組成物をすぐに注射する場合を示し、（Ｂ）は、注射剤組成物を１２０分間放置した後、注射開始時の圧力を示す。なお、（Ｃ）は、注射剤組成物を１２０分間放置した後、注射するときの中間基点の圧力（指にかかる力、ｇｌｉｄｄｉｎｇ ｆｏｒｃｅ）を示す。

【０１４１】

【表６】

HA(%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	2.0	3.0
A	115	120	123	127.5	132.5	137.5	143.5	148.5	154.5	158.5	165	252	721
B	400	310	125	126	130	140	144	152	160	155	165	257	711
C	110	120	125	128	138	138	142	150	155	160	170	253	718

【０１４２】

表６を参照すると、ヒアルロン酸が入っていない場合、２時間放置後に注射開始時に、圧力が４００ｇｆを超えることを確認することができる。これは、注射剤内の組成物により注射針が詰まることを意味する。

そして、組成物により詰まった針があけられながら１２０ｇｆに圧力が減少した。

【０１４３】

ヒアルロン酸が０．２％（ｗ／ｖ）以上の場合、１２０分間放置した後にも、注射剤内の組成物により注射針が詰まらないため、すぐに注射する場合のように、小さい力（２００ｇｆ）でも注入が可能であった。

【０１４４】

すなわち、ヒアルロン酸を適正量（０．２％以上）添加することにより、沈降速度を遅延させることができ、沈降した組成物により注射針が詰まって、過度な力を加える場合に注射が始まる短所を解決することができた。

【０１４５】

一方、ヒアルロン酸の濃度が１％（ｗ／ｖ）を超過する場合には、ヒアルロン酸の粘度に起因して注射時に抵抗感が激しかった。

【０１４６】

実験例３．ＩＣＧ－ＭＡＡ－ＨＡの沈降による透過度の変化

実施例１で製造された注射剤組成物を利用して、時間による吸光度の変化を測定した。参考として、ＭＡＡは、２ｍｇ／ｍｌを含む注射剤組成物を利用して吸光度の変化を測定した。

【０１４７】

なお、透過度は、ＵＶ分光計（ＴＥＣＡＮ．ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ２００ＰＲＯ）を利用して可視光線透過度を測定した。

【０１４８】

より具体的に、注射剤組成物を１×１×３ｃｍ^３サイズの透明容器に担持された状態で前記容器高さの１／４の地点でＵＶ分光計で透過度を測定するとき、５５０ｎｍに対して透過度を測定した。

【０１４９】

この際、 T_1 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で、前記容器高さの $1/4$ の地点で測定した 550 nm に対する透過度 (%) であり、 T_2 は、製造された注射剤組成物を $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ サイズの透明容器に担持された状態で 120 分放置した後、前記容器高さの $1/4$ の地点で測定した 550 nm に対する透過度 (%) である。

【0150】

【表7】

HA (%)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
T_1	77.76	78.76	78.53	78.61	78.78	78.65	78.48	78.18	77.97	77.69	77.65
T_2	87.88	87.95	78.71	78.77	78.65	78.71	78.56	78.20	78.11	77.81	77.73
$ T_2 - T_1 $	10.12	9.19	0.18	0.16	0.13	0.06	0.08	0.02	0.14	0.12	0.08

10

【0151】

表7を参照して、ICG-MAA-HAの沈降による透過度の変化を調べると、ヒアルロン酸が添加されていないときに最初に測定した透過度が 77.76% であり、 120 分が経過した後は、 87.88% と透過度が増加した。

【0152】

これは、最初に注射剤組成物内にICG-MAAが溶解して注射剤組成物が懸濁されてから、 120 分が経過した後に、ICG-MAAの粒子が高い密度に起因して、下側に沈むことにより、容器の底からの $1/4$ の地点における透過度は高くなることである。

20

【0153】

なお、ヒアルロン酸(HA)が 0.4% (w/v) 以上からは、最初に測定した透過度(T_1)と 120 分間放置した後に測定した透過度(T_2)の差は、 1% 未満とその差異が大きくなかった。

【0154】

これは、ICG-MAA-HAを注射剤組成物に含まれることにより、時間が経過しても懸濁性が維持されることを意味する。

【0155】

結果的に、注射剤組成物にヒアルロン酸(HA)を添加しつつ、ICG-MAA複合体の粘度を制御することにより、注射剤組成物において、前記複合体を早く沈むことを防止できることが分かった。

30

【0156】

一方、ヒアルロン酸 0.2% (w/v) であるとき、 T_1 と T_2 の差が 9.19% と差異があつて、前記複合体が 2 時間以内に沈んだことを確認することができる。通常、注射剤組成物として使用するとき、製造後に 30 分以内に投与するので、ICG-MAAの複合体に 0.2% のヒアルロン酸(HA)を添加した場合にも、実際注射用組成物として使用可能なものと判断した。

【0157】

実験例4. HAの適用の有無によるICG-MAAの明視野イメージ

40

図4は、 0.5% (w/v) のHA、 $6.5 \mu\text{M}$ のICG、 $2, 4, 8 \text{ mg/ml}$ のMAAが含まれたICG-MAA-HAと $6.5 \mu\text{M}$ のICG、 $2, 4, 8 \text{ mg/ml}$ のMAAが含まれたICG-MAA注射物の明視野イメージ(bright field image)を示す。MAA粒子分布は、血球計がある光学顕微鏡を使用して可視化した。各正四角形は 0.05 mm^2 を示す。上部の行(図4の1、2、3)は、HAが含有されていないICG-MAAを示し、下部の行(図4の4、5、6)は、 0.5% HA(w/v)が含有されたICG-MAA-HAを示す。MAA濃度は、それぞれ下記の通りである：図4の1 & 4： 2 mg/ml ；図4の2 & 5： 4 mg/ml ；図4の3 & 6： 8 mg/ml 。上部の行でMAA粒子は、全部沈んでいて、明視野で全部焦点が合って鮮明な映像

50

を得たが、下部行では、M A A 粒子が沈んでおり、注射物内で浮遊していて、一部の粒子は焦点が合って鮮明な映像を得、一部の粒子は、焦点が合わない様相を示した。

【 0 1 5 8 】

実験例 5 . I C G - M A A - H A における蛍光維持特性

図 5 は、多様な M A A の濃度で、 $5 \mu\text{M}$ の I C G と 0.5% H A が添加された I C G - M A A - H A からの蛍光信号を測定したものを示す。図 5 の A は、明視野イメージを示し、図 5 の B は、N I R F イメージを示す。図 5 の A および図 5 の B の左側から、M A A 濃度は、 0 mg/ml 、 1 mg/ml 、 2 mg/ml 、 4 mg/ml および 8 mg/ml である。N I R F イメージは、 740 nm のピーク波長を有する 17 個の 2 mA の N I R L E D を発光させることにより取得された。前記イメージは、下記カメラの設定によって A V T U n i C a m v i e w e r s o f t w a r e (A l l i e d V i s i o n T e c h n o l o g i e s) により撮影され、可視化した：露出時間： 200 ms ；ゲイン： 200 ；ターゲット階調値： 125 ；明るさ： 16 。

10

【 0 1 5 9 】

図 5 の A および図 5 の B の間で、水に存在する M A A は、エペンドルフチューブ (e p p e n d o r f t u b e s) の壁に非常に早く沈むので、本発明者らが明視野イメージを撮影した後、各チューブを混合し、さらに位置させることにより、チューブ位置の小さい変化が発生した。

【 0 1 6 0 】

図 5 の C は、多様な濃度の M A A に存在する $5 \mu\text{M}$ の I C G の蛍光発光スペクトルを示す。相対蛍光強度 (r e l a t i v e f l u o r e s c e n c e i n t e n s i t y) (a . u : a r b i t r a r y u n i t) がコンピュータで調節された蛍光マイクロプレートリーダー (c o m p u t e r - c o n t r o l l e d f l u o r e s c e n c e m i c r o p l a t e r e a d e r) (S a f i r e I I ; T e c a n , D u r h a m , N C) を利用して取得された。I C G に対する励起 (e x c i t a t i o n) 波長は、 760 nm であり、発光波長は、 $790 \sim 850 \text{ nm}$ であった。

20

【 0 1 6 1 】

すなわち、図 5 の A ~ 図 5 の C から、I C G - M A A - H A においても蛍光が維持されることが分かった。

【 0 1 6 2 】

30

実験例 6 . 鶏ささみに I C G - M A A - H A を注射した結果

図 6 は、H A 0.5% (w / v) の添加による差異を示す実験結果である。また、一般的な組織強度を示す鶏ささみおよび緻密な組織強度を示す鶏砂嚢を利用して組織強度による差異を確認した。I C G - M A A - H A と I C G - M A A $50 \mu\text{l}$ を鶏ささみおよび鶏砂嚢に 5 mm の深さでそれぞれ 5 回ずつゆっくり注射した。N I R F イメージは、 740 nm のピーク波長を有する 17 個の 2 mA の N I R L E D を発光させることにより取得された。前記イメージは、下記カメラの設定によって A V T U n i C a m v i e w e r s o f t w a r e (A l l i e d V i s i o n T e c h n o l o g i e s) により撮影され、可視化した：露出時間： 195 ms ；ゲイン： 170 ；ターゲット階調値： 125 ；明るさ： 16 。注射を準備し注射するまで約 $2 \sim 3$ 分の時間が必要とされた。I C G - M A A は、鶏ささみ 5 回のうち 2 回、鶏砂嚢 5 回のうち 3 回で I C G - M A A 粒子が沈んでいて、注射針が詰まって、注射が困難であった。注射が困難な場合、さらに注射器を振った後、短い時間にさらに注射した。これに対し、I C G - M A A - H A は、10 回の試みのうち注射が良好に行われなかった場合はない。

40

【 0 1 6 3 】

図 6 の 1 と図 6 の 2 は、鶏ささみに 0.5% H A が含まれた I C G - M A A - H A を注射し撮影した切開前および切開後の N I R F イメージである。標識が適切に良好に分布していることを見ることができる。図 6 の 3 と図 6 の 4 は、鶏砂嚢に 0.5% H A が含まれた I C G - M A A - H A を注射し撮影した切開前および切開後の N I R F イメージである。やはり標識が適切に分布していることを見ることができる。図 6 の 5 と図 6 の 6 は、鶏さ

50

さみに0.5%HAが含まれていないICG-MAAを注射し撮影した二回のNIRFイメージである。図6の5は、適切に標識になったが、図6の6は、全体注射量は同一にもかかわらず、注射中にICG-MAA粒子が沈んでいて、少ない量が注射されたものと判断される。図6の7と図6の8は、鶏砂嚢に0.5%HAが含まれていないICG-MAAを注射し撮影した切開前および切開後のNIRFイメージである。ICG-MAAが注射トラックに沿って逆流するなど標識が正確に行われなかった。

【0164】

図7は、注射針経路に沿って注射された鶏ささみを切開した後の可視化した切断面の明視野およびNIRFイメージを示す。ICG-MAA-HAが注射された部位が明視野イメージにおいて白色円で表示されている。NIRFイメージは、740nmのピーク波長を有する17個の2mAのNIR LEDを発光させることにより取得された。前記イメージは、下記カメラの設定によってAVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)により撮影され、可視化した：露出時間：195ms；ゲイン：170；ターゲット階調値：125；明るさ：16。

10

【0165】

これから、ICG-MAA-HAが組織（鶏ささみ）に注射された場合、蛍光特性を良好に維持するだけでなく、広がり性が非常に少ないことが分かる。すなわち、ICG-MAA-HAを使用することにより、ICG-MAA複合体が周辺に非常に早くおよび非常に多く広がる問題が解決されたことを確認することができる。

20

【0166】

実験例7．内視鏡用注射器を利用して鶏ささみにICG-MAA-HAを注射した結果
図8は、内視鏡用注射器(endoscopic catheter)を利用して胃癌手術におけるICG-MAA-HA混合物の適用性を実験したものを示す。図8の1～図8の3および図8の5は、明視野イメージを示し、図8の4および図8の6は、NIRFイメージを示す；

【0167】

図8の1：廃棄可能な内視鏡用注射器を利用して鶏ささみの片方にICG-MAA-HA混合物[6.5μMのICG、2mg/mlのMAA、および0.5%HA(w/v)]を注射する；

30

図8の2：鶏ささみの第2部位に前記混合物を注射する；

図8の3：二つの矢印は、注射部位を示す；

図8の4：胃壁の内側にあるような注射部位のNIRFイメージを示す；

図8の5：注射された鶏ささみをひっくり返したイメージを示す；

図8の6：ひっくり返った鶏ささみ上の注射部位のNIRFイメージを示し、前記注射部位は、外部NIR供給源(sources)を利用して示すことができる。

【0168】

前記NIRFイメージは、740nmのピーク波長を有する17個の2mAのNIR LEDを発光させることにより取得された。前記イメージは、下記カメラの設定によってAVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)により撮影され、可視化した：露出時間：195ms；ゲイン：170；ターゲット階調値：125；明るさ：16。

40

【0169】

これから、ICG-MAA-HAが内視鏡用注射器を利用して組織（鶏ささみ）に注射された場合、蛍光特性を良好に維持するだけでなく、広がり性が非常に少ないことが分かる。すなわち、鶏ささみと同様に、胃癌などの手術をする場合においても、ICG-MAA-HAを使用することにより、蛍光特性を良好に維持しながらも、ICG-MAA複合体が周辺に非常に早くおよび非常に多く広がらないようにできることが分かる。

【0170】

実験例8．ICG-MAA-HAの一定の濃度効果

50

沈降速度の増加によって注射時に一定量が注射される効果を調べるために、ヒアルロン酸が添加されていないICG-MAAと0.1% (w/v) のHAが添加されたICG-MAA-HA注射剤組成物の注射量を100 μ lずつ連続的にチューブに注射して、蛍光信号を測定した。

一方、蛍光信号は、チューブに注射し、5分間沈降させた後に測定した。

【0171】

参考として、ICG-MAA注射剤組成物は、2 mg/mlのMAAの濃度で、1.5 μ M (約0.001 mg) のICGが添加され、前記ICG-MAAに0.1% (w/v) のHAが添加された。

【0172】

図9は、ヒアルロン酸の有無によって蛍光信号を測定した結果を示す図である(左側から最初100 μ l、(a)ヒアルロン酸が添加されていない、(b)0.1%のヒアルロン酸が添加される)。

【0173】

図9のNIRF(近赤外線蛍光)イメージは、740 nmのピーク波長を有する17個の2 mAのNIR LEDを発光させることにより取得された。前記イメージは、下記カメラの設定によってAVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)により撮影され、可視化した：露出時間：200 ms；ゲイン：200；ターゲット階調値：125；明るさ：16。

【0174】

図9を参照すると、ヒアルロン酸が添加されていない注射剤組成物の場合、注射組成物の用量のCV(標準偏差/平均)が28%であった。

【0175】

特に、図9(a)を参照して蛍光強度を比較してみれば、左側と右側の蛍光強度の差が大きく出ることから見て、ICG-MAAが初期には多く注入され、後半に行くほど少なく注入されて、一定に注射されないと判断された。

【0176】

他方で、図9(b)を参照すると、注射剤組成物にヒアルロン酸を添加した場合、ICG-MAAが沈降する速度が遅くなって、結果的に、一定の量のICG-MAAが注射が可能であることを知ることになった。

【0177】

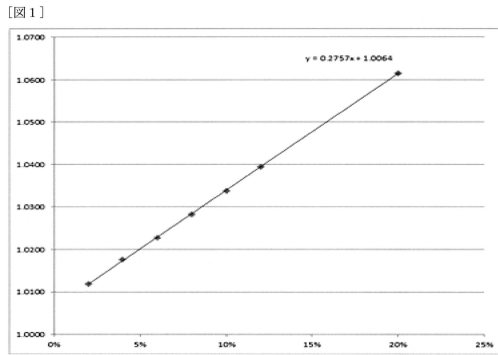
以上、本発明についてその好ましい実施例を中心に記述した。本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明が本発明の本質的な特性を逸脱しない範囲で変形された形態で具現され得ることを理解することができる。したがって、開示された実施例は、限定的な観点でなく、説明的な観点で考慮されなければならない。本発明の範囲は、前述した説明でなく、特許請求範囲に示されており、それと同等な範囲内にあるすべての差異点は、本発明に含まれたものと解釈されなければならない。

10

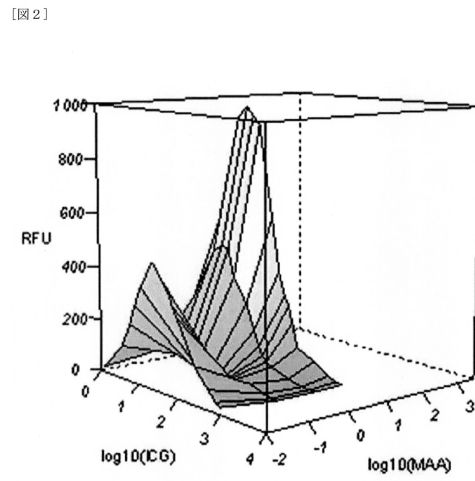
20

30

【図 1】



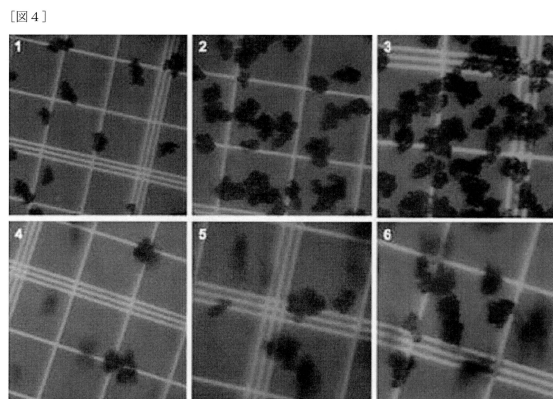
【図 2】



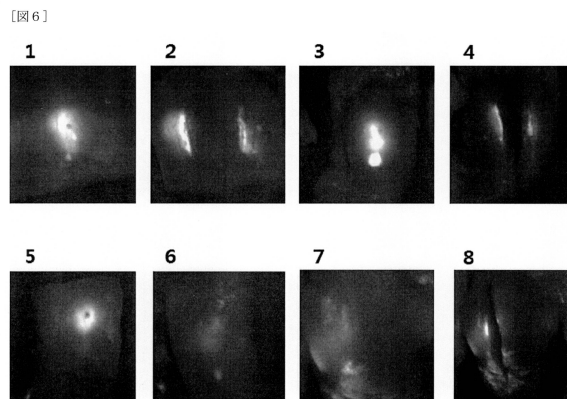
【図 3】



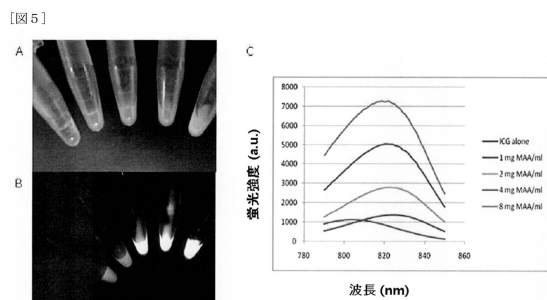
【図 4】



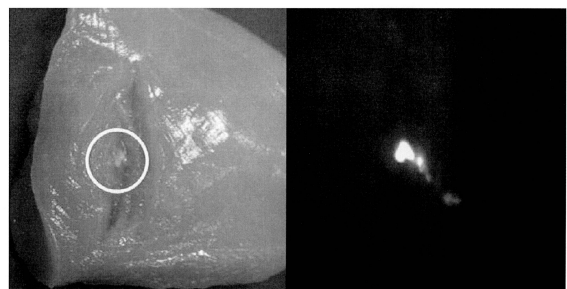
【図 6】



【図 5】

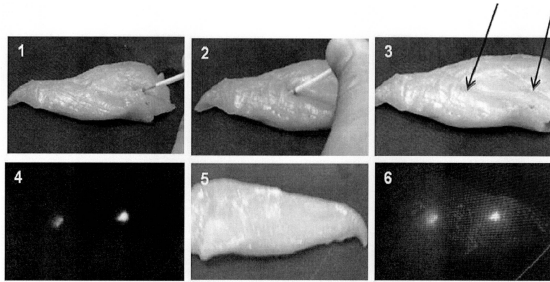


【図 7】



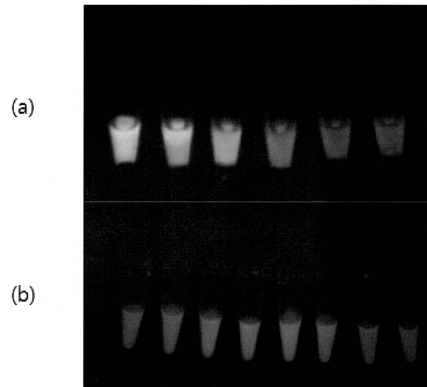
【図 8】

[図 8]



【図 9】

[図 9]



フロントページの続き

- (72)発明者 ソク・キ・キム
大韓民国・ソウル・03095・チョンノ・グ・チボン・ロ・87・101・ドン・1504・ホ
・(チャンシン・ドン・チャンシン・イス・アパート)
- (72)発明者 インス・パク
大韓民国・ソウル・07525・カンソ・グ・ホチュン・ロ・139・305・ドン・1407・
ホ・(カヤン・ドン・カンビョン・アパート)
- (72)発明者 チン・ヒ・ノ
大韓民国・キョンギ・ド・10372・コヤン・シ・イルサンソ・グ・フゴク・ロ・55・206
・ドン・505・ホ・(イルサン・ドン・フゴクマウル・2・ダンチ・アパート)

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特表2016-511745(JP,A)
Am. J. Roentgenol., (1968), 102, [1], p.81-87

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 49/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)