

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/170573

発行日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)

(43) 国際公開日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 A	4 J 0 3 1
C 0 8 G 83/00 (2006.01)	C 0 8 G 83/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

出願番号 特願2016-517855 (P2016-517855)	(71) 出願人 505127721 公立大学法人大阪府立大学 大阪府堺市中区学園町1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/061943	
(22) 国際出願日 平成27年4月20日 (2015. 4. 20)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-96756 (P2014-96756)	(71) 出願人 504300181 国立大学法人浜松医科大学 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
(32) 優先日 平成26年5月8日 (2014. 5. 8)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
	(72) 発明者 児島 千恵 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学 法人大阪府立大学内
	(72) 発明者 仁木 悠一郎 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学 法人大阪府立大学内

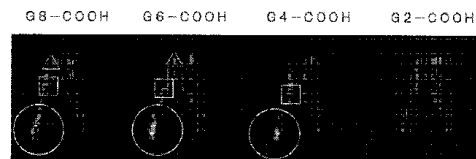
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンパ節イメージング剤

(57) 【要約】

本発明は少量で且つ簡便な投与方法でリンパ節を撮像することができるリンパ節イメージング剤を提供することを目的とする。

リンパ節イメージング剤として用いられる、少なくとも1種の標識物質を有し、分子径が5~20nmである、アニオン性分岐ポリマー。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

リンパ節イメージング剤として用いられる、少なくとも一種の標識物質を有し、分子径が 5 ~ 20 nm である、アニオン性分岐ポリマー。

【請求項 2】

ゼータ電位が - 10 mV 以下である、請求項 1 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 3】

少なくとも一種のアニオン性基を有する、請求項 1 又は 2 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 4】

前記アニオン性基が、カルボキシル基、スルホン基、及びフェノール基からなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 3 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 5】

前記アニオン性基が、カルボキシル基である、請求項 3 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 6】

前記標識物質が、放射性同位体、低分子有機色素、蛍光色素、及びガドリニウム配位キレート剤からなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 7】

皮下投与用リンパ節イメージング剤として用いられる、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 8】

アニオン性分岐ポリマーが、グラフトポリマー、スターポリマー、ハイパーブランチポリマー、デンドロン、デンドリマー、デンドロンポリマー、又はデンドリグラフトポリマーである、請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマーを含む、リンパ節イメージング剤。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマーを投与する工程を含む、リンパ節の撮像方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はリンパ節イメージング剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

センチネルリンパ節（1次リンパ節）は、癌細胞が転移する際に最初に通過するリンパ節であり、リンパ節を検出することは、転移癌の検出、診断等を行う際に非常に重要とされる。

【0003】

非特許文献 1 には、放射標識されたりポソームを用いてリンパ節を検出する方法が開示されている。斯かるリポソームは 100 nm 程度の分子サイズを有するアニオン性リポソームであり、これが皮下投与されることによってリンパ節に存在するマクロファージによって貪食され、結果としてリンパ節に集積することが知られている。

【0004】

非特許文献 2 には、ベンジルサルフェート基を表面に有する、分子径が 2.8 nm 程度のポリ-L-リジンデンドリマーが皮下投与及び尾静脈投与されることによってリンパ節に集積することが開示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

非特許文献 3 には 20 ~ 40 nm の量子ドットを尾静脈投与することによってリンパ節を検出する方法が開示されている。

【 0 0 0 6 】

非特許文献 4 には放射標識されたポリアミドアミンアミン dendrimer を用いたリンパ節のイメージング方法が開示されており、G4 ~ G8 の dendrimer がイメージングに好適であることが開示されている。なお、投与方法として直接乳腺に斯かる dendrimer を投与する方法が開示されている。

【 0 0 0 7 】

特許文献 1 には、ポリアミドイミンおよびポリアミドアミンを用いて作製した dendrimer とアルギン酸又はガンマポリグルタミン酸との複合体であって、分子径が 24 nm 程度、ゼータ電位が -49 mV 程度の複合体を、マウスの Foot pad 投与してセンチネルリンパ節をイメージングする方法が開示されている。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 国際公開 2011/105520 号パンフレット

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 *Biochim Biophys Acta* . 1984 Sep 7 ; 801 (1) : 76 - 86 .

20

【 非特許文献 2 】 *J Control Release* . 2009 Dec 3 ; 140 (2) : 108 - 16

【 非特許文献 3 】 *Bioconj Chem* . 2007 Mar - Apr ; 18 (2) : 389 - 96 .

【 非特許文献 4 】 *J Control Release* . 2006 Apr 10 ; 111 (3) : 343 - 51 .

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

上述のように、これまでにセンチネルリンパ節を造影するための手段として種々の方法が開発されている。センチネルリンパ節を造影するために、造影剤となる物質をリンパ管に直接投与することは、リンパ節が微小で複雑な構造である点から現実的ではなく、間質を介してリンパ節へ造影剤を送達することが好ましいとされる。

30

【 0 0 1 1 】

しかしながら、これまでに知られるリンパ節の造影するために採用されている投与方法は、何れも乳腺への投与、皮下投与等といった投与方法が難しいか又は多量の投与を必要とする方法といった面で欠点を有している。

【 0 0 1 2 】

このような現状に鑑み、本発明は少量で且つ簡便な投与方法でリンパ節を撮像することができるリンパ節イメージング剤を提供することを目的とする。

40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明者らはこれらの問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定の分子径を有するアニオン性分岐ポリマーを用いることによって、少ない投与量でリンパ節の撮像を行うことができることを見出した。

【 0 0 1 4 】

本発明は斯かる知見に基づいて完成されたものであり、下記に示す広い態様の発明を包含する。

【 0 0 1 5 】

50

項 1 リンパ節イメージング剤として用いられる、少なくとも 1 種の標識物質を有し、分子径が 5 ~ 20 nm である、アニオン性分岐ポリマー。

【0016】

項 2 ゼータ電位が -10 mV 以下である、上記項 1 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【0017】

項 3 少なくとも一種のアニオン性基を有する、上記項 1 又は項 2 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【0018】

項 4 前記アニオン性基が、カルボキシル基、スルホン基、及びフェノール基からなる群より選択される少なくとも 1 種である、上記項 3 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

10

【0019】

項 5 前記アニオン性基が、カルボキシル基である、上記項 3 に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【0020】

項 6 前記標識物質が、放射性同位体、低分子有機色素、蛍光色素、及びガドリニウム配位キレート剤からなる群より選択される少なくとも 1 種である、上記項 1 ~ 項 5 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【0021】

項 7 皮内投与用リンパ節イメージング剤として用いられる、上記項 1 ~ 項 6 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

20

【0022】

項 8 アニオン性分岐ポリマーが、グラフトポリマー、スターポリマー、ハイパーブランチポリマー、デンドロン、デンドリマー、デンドロンポリマー、又はデンドリグラフトポリマーである、項 1 ~ 項 7 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマー。

【0023】

項 9 上記項 1 ~ 項 8 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマーを含む、リンパ節イメージング剤。

【0024】

項 10 上記項 1 ~ 項 9 の何れか 1 項に記載のアニオン性分岐ポリマーを投与する工程を含む、リンパ節の撮像方法。

30

【発明の効果】

【0025】

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーは、リンパ節のイメージング剤として好適に用いることができる。

【0026】

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーをリンパ節のイメージング剤として用いることにより、少量で且つ簡便な投与方法、例えば皮内投与によってリンパ節をイメージングすることが可能である。

【図面の簡単な説明】

40

【0027】

【図 1】本実施例にて作製した各種デンドリマーの NMR スペクトラムと部分構造。

【図 2】本実施例にて作製した各種デンドリマーの NMR スペクトラム。

【図 3】本実施例にて作製した各種デンドリマーの NMR スペクトラム。

【図 4】本実施例にて作製した各種デンドリマーの NMR スペクトラム。

【図 5】本実施例にて作製した各種デンドリマーを投与した後の分布を示す図（センチネルリンパ節）。

【図 6】本実施例にて作製した各種デンドリマーを投与した後の分布を示す図（肝臓）。

【図 7】本実施例にて作製した各種デンドリマーを投与した後の分布を示す図（脾臓）。

【図 8】本実施例にて作製した各種デンドリマーを投与した後の分布を示す図（腎臓）。

50

【図 9】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後の分布を示す図（投与部位）。

【図 10】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後の分布を示す図（血液）。

【図 11】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後の分布を示す図（肺臓）。

【図 12】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後の分布を示す図（心臓）。

【図 13】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後の分布を示す図（筋肉）。

【図 14】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後に撮影した SPECT / CT 像。

【図 15】本実施例にて作製した各種 dendrimer を投与した後に撮影した SPECT / CT 像。

【発明を実施するための形態】

【0028】

<アニオン性分岐ポリマー>

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーはリンパ節イメージング剤として用いられる。また、本発明に係るアニオン性分岐ポリマーは、少なくとも 1 種の標識物質を有し、分子径が 5 ~ 20 nm である。

【0029】

本発明に係る分岐ポリマーは、5 nm 以上であることから、投与部位から拡散することなく、リンパ節に集積しやすいという効果を発揮する。また、20 nm 以下であることからマクロファージ等に認識されにくい効果を発揮する。

【0030】

本発明に係る分岐ポリマーは 5 ~ 15 nm 程度であることが好ましい。15 nm 以下であることからマクロファージ等に更に認識されにくいといった効果を発揮する。

【0031】

なお、平均分子径は下記実施例に示すように、動的光散乱法 (DLS) 法に基づいて測定される分子径であり、DLS の原理に基づいて得た測定値を、多分散系である Marquardt 法で解析して求めた体積基準の粒径分布における一番小さい分布の平均粒径である。動的光散乱法に用いる測定機器は、ELS Z-DN2 (大塚電子) 又はその同等品である。

【0032】

分岐ポリマーとは、分岐構造を有するポリマーであり、大きく分けると、グラフトポリマー、スターポリマー等のように主鎖又は中心点に存在する分岐点から伸びた分子鎖が一本鎖である分岐ポリマーと、ハイパーブランチポリマー、デンドロン、樹状ポリマー (dendrimer)、デンドロンポリマー (Dendronized polymer) 等のように、主鎖又は中心点に存在する分岐点から伸びた分子鎖が更に分岐点を有し、分岐の起点から遠くなるにつれて末端数が増加していく分岐ポリマーとがある。

【0033】

また、グラフトポリマーの枝ポリマーに更に枝ポリマーがグラフトポリマー状に連結した dendrograft polymer も本発明に係る分岐ポリマーに包含される。

【0034】

デンドリマーは、その中心から伸びる分子鎖が規則的な分岐を有し、階層 (世代ともいう) 毎に段階的に合成することができ、形及び大きさが完全に揃っており、規則性及び対称性に富む分岐ポリマーである。一方、ハイパーブランチポリマー及びデンドロンポリマーは、デンドリマーの様な規則性、対称性等を有さない分岐ポリマーである。

【0035】

また、デンドロンポリマーとは、主鎖のポリマーの側鎖にデンドリマーの部分構造であ

10

20

30

40

50

るデンドロンが結合する分岐ポリマーである。

【0036】

本発明に係る分岐ポリマーは、上述のように複数の分岐鎖を有しているため、アニオン性基を複数有することができる点で共通している。そのため、当該分岐ポリマーは何れも本願発明の効果を発揮することができる。

【0037】

本発明に係る分岐ポリマーは上記の分岐ポリマーであれば特に限定はされず、例えばデンドリマーであることが好ましい。

本発明に係る分岐ポリマーはアニオン性を有しており、アニオン性であることに起因して、斯かるポリマーを生体に投与した際に、これがリンパ節に集積される効果を発揮する。

【0038】

本発明に係る分岐ポリマーがアニオン性であることは、塩化ナトリウムを溶媒として測定した分岐ポリマーのゼータ電位を基に決定することができる。

【0039】

本発明に係る分岐ポリマーの具体的なゼータ電位は特に限定はされない。ゼータ電位は、通常 - 10 mV 程度以下であり、好ましくは - 20 mV 程度以下である。

【0040】

このような本発明に係る分岐ポリマーのアニオン性は、分岐ポリマーが有するアニオン性基に依って付与されることができ、分岐ポリマーの表面基にアニオン性基を有することが好ましい。さらに好ましくは、分岐ポリマーの末端にアニオン性基を有することが好ましい。このようなアニオン性基は、分岐ポリマーと共有結合することが好ましい。

【0041】

本発明に係る分岐ポリマーがその表面基にアニオン性を有している際のアニオン性基の割合は、分岐ポリマーの表面基全体に対して、通常は100%以下で、且つ50%程度以上、好ましくは60%程度以上、より好ましくは70%程度以上、より好ましくは80%程度以上、より好ましくは85%程度以上、より好ましくは90%程度以上、より好ましくは95%程度以上であり、98%程度以上が最も好ましい。

【0042】

具体的なアニオン性基の種類は特に限定はされず、例えばカルボキシル基、スルホン基、及びフェノール基等が挙げられる。これらの本発明に係る分岐ポリマーに含まれるアニオン性基は1種のみであっても、2種以上であってもよい。上述のアニオン性基の中でもカルボキシル基が特に好ましい。

【0043】

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーは、少なくとも1種の標識物質を有する。これ等の標識物質は、特に限定はされず、例えば ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 化合物等の放射性同位体（PET用）、 ^{111}In 化合物等の放射性同位体（SPECT用）、インジゴカルミン、またはパテントブルーV等の低分子有機色素；インドシアニングリーン、フルオレセイン、ローダミン、Alexa Fluor色素等の蛍光色素；及びガドリニウムキレート剤等の核磁気共鳴イメージング用の造影剤等が挙げられる。

【0044】

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーは、公知の方法で作製することができる。分岐ポリマーにアニオン性を付与するには、分岐ポリマー中に公知の方法を用いてアニオン性基を結合されることが挙げられる。斯かる結合様式は特に限定はされず、例えば共有結合させることが好ましい。

【0045】

分岐ポリマーに結合させる標識物質も公知の方法を用いて付与させることができ、例えばキレート剤などといった他の化合物を介して分岐ポリマーに標識物質を結合させることもできる。斯かる結合様式も特に限定されることはなく、例えば分岐ポリマーの物性等と標識物質の物性等とに鑑みて適宜決定することができる。

【0046】

10

20

30

40

50

本発明に係るアニオン性分岐ポリマーは、リンパ節イメージング剤として用いられる。具体的な使用方法は、後述する<本発明に係るリンパ節イメージング剤>の記載と同様にすることができる。

【0047】

<本発明に係るリンパ節イメージング剤>

本発明に係るリンパ節イメージング剤は、上述の本発明に係るアニオン性分岐ポリマーを含む。アニオン性分岐ポリマーの含有量は特に限定されない。具体的な含有量として、例えばリンパ節イメージング剤100重量部に対して、通常0.001~100重量部程度である。すなわち、本発明に係るアニオン性分岐ポリマーそのものを、本発明に係るリンパ節イメージング剤として用いることができる。

10

【0048】

本発明に係るリンパ節イメージング剤の剤形は特に限定はされない。このような剤形として、例えば後述のような投与量、投与方法等に鑑みて、従来より公知の薬学上許容され得る各種の担体と共に、所望の剤形とすることができる。

【0049】

具体的な剤形としては、液剤、埋め込み注射剤、持続性注射剤等の注射剤；腹膜透析用剤、血液透析用剤等の透析用剤等が挙げられる。

【0050】

これらの剤形は、第16改正日本薬局方解説書等の公知の文献に基づいて製造することができる。

20

【0051】

本発明に係るリンパ節イメージング剤には、上述のアニオン性分岐ポリマー以外にpH調整剤；保存剤；等張化剤；防腐剤；注射用水、ゴマ油、大豆油、トウモロコシ油、オリーブ油等の溶剤；不活性ガス（窒素、二酸化炭素等）、キレート剤（EDTA、チオグリコール酸等）、還元物質（亜硫酸水素ナトリウム、L-アスコルビン酸等）等の安定剤；パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、塩化ベンザルコニウム等の保存剤；結合性溶解補助剤（ヨウ化ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ニコチン酸ナトリウム等）、溶剤性溶解補助剤（アルコール、プロピレングリコール、液状マクロゴール等）等の溶解補助剤；塩酸プロカイン、ベンジルアルコール等の局所麻酔剤；ブドウ糖、ソルビトール、アミノ酸等の無痛化剤；クエン酸、酢酸、リン酸ナトリウム塩、これらの注射用のもの等の緩衝剤；カルメロースナトリウム、PVP、アルミニウムモノステアレート、これらの注射用のもの等の懸濁化剤等を含ませることができる。

30

【0052】

本発明に係るリンパ節イメージング剤の投与量は、特に限定はされることはなく、剤形、投与方法、リンパ節イメージングの部位、目的、投与される個体の性別、年齢、体重、イメージング手法、標識物質の種類等に鑑みて、適宜設定することができる。また、このような投与量は容量に換算して通常50~300 μ L程度である。

【0053】

本発明のリンパ節イメージング剤の投与方法は、特に限定はされず、例えば、静脈投与、皮下投与、皮内投与等が挙げられる。中でも、皮内投与が好ましい。

40

【0054】

本発明に係るリンパ節イメージング剤を用いて撮像を行うことができる装置は、上述のアニオン性分岐ポリマーに含まれる標識物質の種類に応じて適宜選択することができ、特に限定はされない。このような装置として、通常は核医学検査装置、MRI装置、蛍光検出装置等が挙げられる。具体的な撮像方法は、上記の装置のマニュアルに沿って、適宜条件を変更することによって行うことができる。

【0055】

<本発明に係るリンパ節の撮撮像影方法>

本発明に係るリンパ節の撮像方法は、上述のアニオン性分岐ポリマーを投与する工程を

50

含む。

【0056】

アニオン性分岐ポリマー、投与量、投与方法、撮像に用いる機器等については、上述の<本発明に係るアニオン性分岐ポリマー>又は<本発明に係るリンパ節イメージング剤>に記載した通りとすることができる。

【0057】

<実施例>

以下に本発明をより詳細に説明するための実施例を示す。ただし、本発明が以下に示す実施例に限定されないのは言うまでもない。

【0058】

製造例1：キレート化PAMAM dendrimerの作製

各種サイズを有するポリアミドアミン(PAMAM) dendrimerをキレート剤である p-SCN-Bn-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriaminepentaacetic acid) で修飾した。

【0059】

使用したPAMAM dendrimerはALDRICHから入手した、PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 2.0 solution (412406; 以後、本実施例にてこれをG2-NH₂と呼ぶ。)、PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 4.0 solution (412449; 以後、本実施例にてこれをG4-NH₂と呼ぶ。)、PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 6.0 solution (536717; 以後、本実施例にてこれをG6-NH₂と呼ぶ。)、及びPAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 8.0 solution (536741; 以後、本実施例にてこれをG8-NH₂と呼ぶ。) であり、p-SCN-Bn-DTPAはMACROCYCLICSから入手した(B-305)。

【0060】

溶媒を減圧留去し、真空乾燥および凍結乾燥した上記各種PAMAM dendrimerに p-SCN-Bn-DTPAを加え、125mMのNaHCO₃バッファー中で37、24時間撹拌した。

【0061】

ここでp-SCN-Bn-DTPAの添加量は、G2-NH₂は10当量、G4-NH₂及びG6-NH₂は7当量、そしてG8-NH₂は17当量である。

【0062】

その後得られた溶液をG2-NH₂はMwCO1000の透析膜、G4-NH₂、G6-NH₂、及びG8-NH₂はMwCO3000の限外ろ過膜を用いて精製し、その後凍結乾燥した。

【0063】

p-SCN-Bn-DTPAの結合量はUVスペクトルを測定し、p-SCN-Bn-DTPAの検量線から見積もった。

【0064】

製造例2：アセチル化・カルボキシル化PAMAM dendrimerの作製

上述の各種サイズを有するキレート化PAMAM dendrimerをさらにアセチル化又はカルボキシル化に供した。

【0065】

(アセチル化)

上記p-SCN-Bn-DTPAで修飾されたG2-NH₂、G4-NH₂、G6-NH₂、及びG8-NH₂を4mlのNaHCO₃バッファー(125mM)に溶解させた

10

20

30

40

50

。pH 9 ~ 10 を維持しながら、無水酢酸及び 4 N の NaOH aq を少量ずつ（無水酢酸を 10 μ l ; 4 N の NaOH を 50 μ l ずつ）、交互に加えた（ \times 20 回 ; 室温、1 時間）。

【0066】

その後、上記混合物を一晩攪拌し、精製（G2 - NH₂ は MwCO1000 の透析膜、G4 - NH₂、G6 - NH₂、及び G8 - NH₂ は MwCO3000 の限外ろ過膜を用いて精製を行い、その後凍結乾燥した。

【0067】

反応率の同定は、フルオレスカミン呈色反応を用いて行った。併せて ¹H NMR 測定を用いて反応の確認を行った（図 1 ~ 4）。1.95 ppm にアセチル化のピークが存在することが明らかとなった。

10

【0068】

G2 - NH₂、G4 - NH₂、G6 - NH₂、及び G8 - NH₂ をアセチル化した各種サンプルを、以後の実施例においてそれぞれ G2 - Ac、G4 - Ac、G6 - Ac、及び G8 - Ac と呼ぶ。

【0069】

（カルボキシル化）

上記 p - SCN - Bn - DTPA で修飾された G2 - NH₂、G4 - NH₂、G6 - NH₂、及び G8 - NH₂ を 4 ml の NaHCO₃ バッファー（125 mM）に溶解させた。pH 9 ~ 10 を維持しながら、無水コハク酸及び 1 N の NaOH aq を少量ずつ交互に加えた（室温、1 時間）。

20

【0070】

その後、上記混合物を一晩攪拌し、精製（G2 - NH₂ は MwCO1000 の透析膜、G4 - NH₂、G6 - NH₂、及び G8 - NH₂ は MwCO3000 の限外ろ過膜を用いて精製を行い、その後凍結乾燥した。

【0071】

反応率の同定は、フルオレスカミン呈色反応を用いて行った。併せて ¹H NMR 測定を用いて反応の確認を行った（図 1 ~ 4）。2.4 ppm にカルボキシル基のピークが存在することが明らかとなった。

【0072】

G2 - NH₂、G4 - NH₂、G6 - NH₂、及び G8 - NH₂ をアセチル化した各種サンプルを、以後の実施例においてそれぞれ G2 - COOH、G4 - COOH、G6 - COOH、及び G8 - COOH と呼ぶ。

30

【0073】

また、上記アセチル化及びカルボキシル化の効率を、フルオレスカミンによって、得られた各種 PAMAM デンドリマーに残る未反応のアミノ基の量を差し引くことで算出した。結果を表 1 に示す。

【0074】

【表 1】

<表 1>

サンプル名	測定値	反応率 (%)
G2-Ac	4.16	93.8
G2-COOH	5.56	87.5
G4-Ac	8.83	99.1
G4-COOH	7.4	99.1
G6-Ac	13.87	98.9
G6-COOH	19.54	98.2
G8-Ac	26.37	99.2
G8-COOH	9.76	99.7

10

20

【0075】

作製した各種PAMAM dendrimerの物性を測定した。各種 dendrimer をそれぞれ PBS に 10 mg/mL の濃度となるように溶解し、粒径は動的光散乱 (DLS) 法に基づいた ELSZ-DN2 (大塚電子) を用いて測定し、ゼータ電位は ELSZ-DN2 (大塚電子) を用いて測定した。測定値を、多分散系である Marquardt 法で解析して求めた体積基準の粒径分布における一番小さい分布を粒径とした。結果を表 2 に示す。

【0076】

ゼータ電位は、PBS を溶媒として測定したことによって、全体的にマイナス側に寄った結果が得られた。キレート化していない G4-NH₂ PAMAM dendrimer を 10 mM の NaCl で測定したゼータ電位は +2.82 mV であるのに対して、PBS で測定したゼータ電位は -15.63 mV であった。

30

【0077】

【表 2】

〈表 2〉

サンプル名	修飾数	修飾後粒径 (nm)	分子量 (Da)	ゼータ電位 (mV)
G2-NH ₂	5	N. D.	5,954	N. D.
G2-Ac		N. D.	6,416	N. D.
G2-COOH		N. D.	7,055	N. D.
G4-NH ₂	8	7.5	18,530	-2.44
G4-Ac		7.1	20,842	-11.77
G4-COOH		5.8	24,034	-21.62
G6-NH ₂	7	7.8	61,823	-1.06
G6-Ac		7.6	72,164	-4.49
G6-COOH		12.1	86,340	-20.48
G8-NH ₂	8	11.8	237,690	6.41
G8-Ac		14.7	280,062	-11.95
G8-COOH		14.1	339,061	-32.08

10

20

【0078】

「修飾数」とは各種 dendrimer-1 分子当たりの p-SCN-Bn-DTPA による修飾数を示す。

【0079】

製造例 3：放射標識化 PAMAM dendrimer の作製

上記 12 種類の各種 PAMAM dendrimer (20 nmol) を、1.2 mL の酢酸アンモニウム (0.15 M) に溶解させ、¹¹¹InCl₃ (22.2 MBq ~ 37 MBq) を加え、室温で 1 時間反応させた。

【0080】

その後、反応物を PD-10 カラム (溶媒: PBS) を用いて精製した。続いて MWC O3000 の限外濾過膜を用いて精製し、溶媒を PBS から生理食塩水に置換した。

30

【0081】

実施例 1：生体内分布実験

製造例 3 にて作製した 12 種類の放射標識化 PAMAM dendrimer を、各々 0.37 MBq (0.15 ~ 0.37 MBq / DTPA nmol) / 100 μL に調製し、その全量を S1c:SD ラット (オス、5 週齢、120 - 140 g) の足背に皮内投与し、投与部位を 30 秒間マッサージした (n = 4)。

【0082】

投与から 1、6、24 時間後にラットをそれぞれ安楽死させ、投与部位及び各種臓器 (膝窩リンパ節、血液、脾臓、腎臓、肝臓、心臓、肺臓、及び筋肉) を取り出し、それらの重量とラジオアクティビティーを測定した。結果を図 5 ~ 13 に示す。

40

【0083】

リンパ節への取り込みは G4 以上のアニオン性末端 (G4-COOH、G6-COOH、及び G8-COOH) が著しく高いことが分かった。

【0084】

細網内皮系である肝臓および脾臓でもアニオン性末端 (-COOH) のものの取り込みが高いことがわかった。中性 (-Ac) のものは後述するように、血中の取り込みが高いため肝臓および脾臓でも取り込みも高くなっていると考えられる。

【0085】

G2 および G4 の一部は、低分子であるために腎臓から排出されていることが分かった

50

。

【0086】

投与部位への滞留性はカチオン性（ $-NH_2$ ）、アニオン性（ $-COOH$ ）、及び中性（ $-Ac$ ）の順で高く、G8、G6、G4、及びG2の順で高くなることが明らかとなった。

【0087】

血液中では、中性のG6及びG8（G6-Ac及びG8-Ac）の取り込みが高いことが分かった。肺、心臓、及び筋肉でも血液と同様の取り込みを示すことが分かった。

【0088】

カチオン性（ $-NH_2$ ）のものは大部分が投与部位にとどまり、アニオン性（ $-COOH$ ）のものはリンパ節、肝臓、および脾臓に取り込まれた。中性のG8-Ac及びG6-Acは各種臓器と相互作用しづらいため、取り込みが高くなったと考えられる。

10

【0089】

実施例2：SPECTイメージング

製造例3にて作製したサンプルのうち、G8-COOH、G6-COOH、G6-NH₂、G6-Ac、G4-COOH、及びG2-COOHの6種をそれぞれ7.4 MBq / 100 μLに調製し、その全量をSlc:SDラット（オス、5週齢、120-140g）の足背に皮内投与して、投与部位を30秒間マッサージした（n=1）。

【0090】

投与から24時間後にFX Pre-clinical platform（Gamma Medica Ideas Inc）を用いてSPECTイメージングを行った（60 sec / projection ; 64 projection）。撮影像を図14及び15に示す。図中の丸で囲まれた部位が投与部位であり、四角で囲まれた部位が1次リンパ節、そして三角で囲まれた部位が2次リンパ節を示す。

20

【0091】

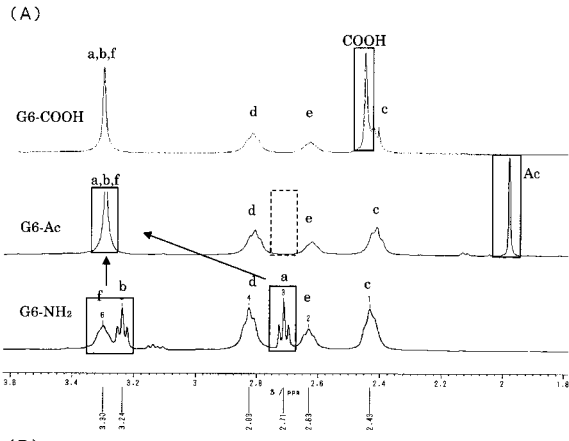
G8-COOH及びG6-COOHでは、センチネルリンパ節（1次リンパ節）に止まらず、2次リンパ節までイメージングできていることがわかった。G4-COOHでは、センチネルリンパ節はイメージングできているが、G2-COOHでは分子量が小さすぎるため拡散していることがわかった。G6-NH₂では投与部位にかなり滞留することが、G6-Acでは投与部位から拡散しているのが分かった。

30

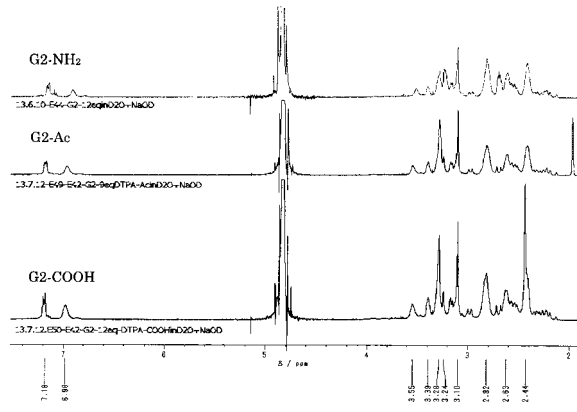
【0092】

以上より、センチネルリンパ節のイメージングにはG6-COOH又はG8-COOHが適していると考えられる。

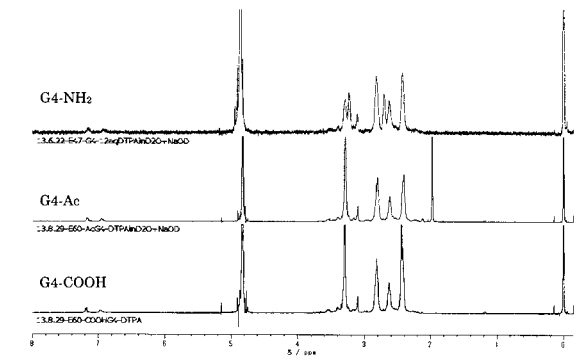
【 図 1 】



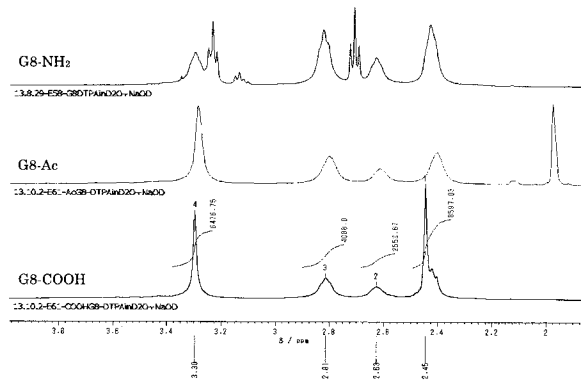
【 図 2 】



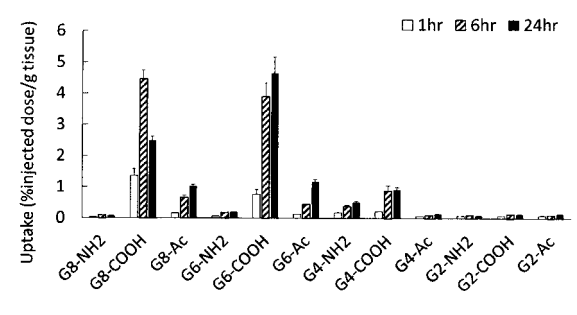
【 図 3 】



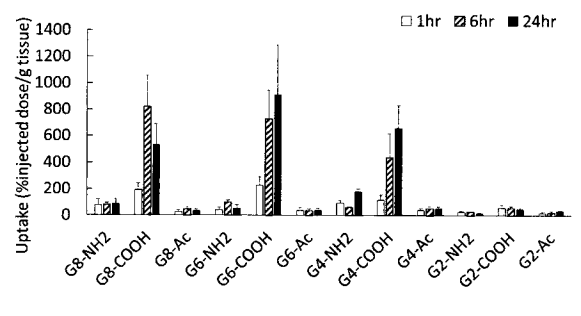
【 図 4 】



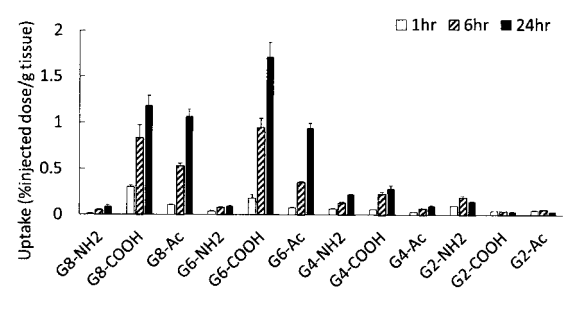
【 図 6 】



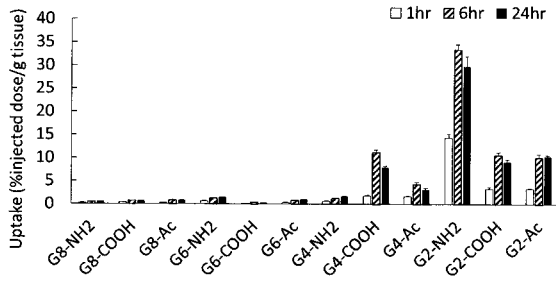
【 図 5 】



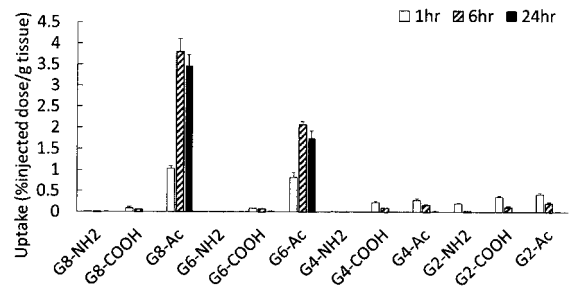
【 図 7 】



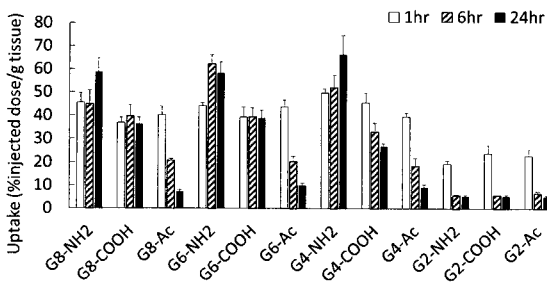
【 8 】



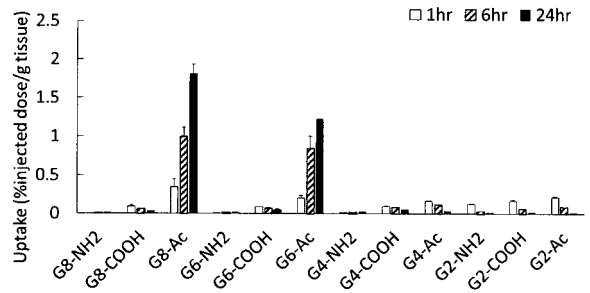
【 1 0 】



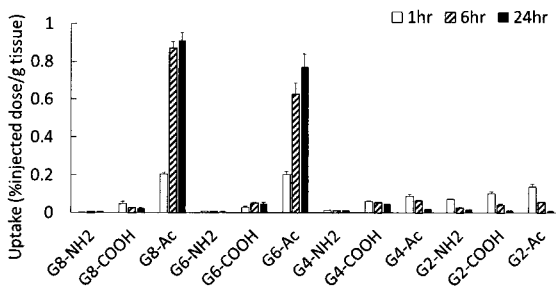
【 9 】



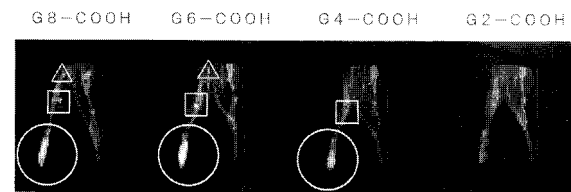
【 1 1 】



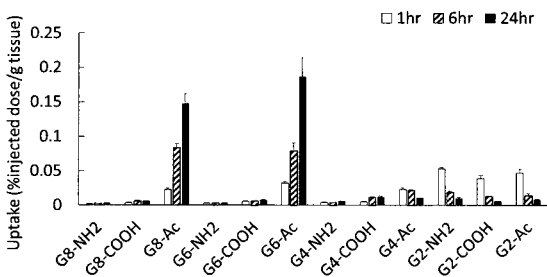
【 1 2 】



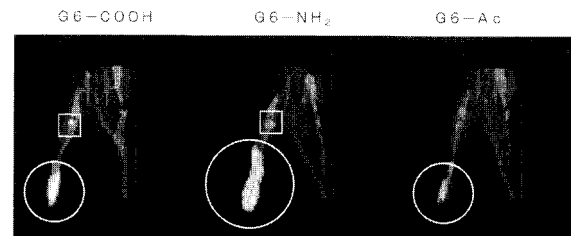
【 1 4 】



【 1 3 】



【 1 5 】



【手続補正書】**【提出日】**平成28年2月18日(2016.2.18)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

リンパ節イメージング剤として用いられる、少なくとも一種の標識物質を有し、分子径が5～20nmである、アニオン性 dendrimer。

【請求項2】

ゼータ電位が-10mV以下である、請求項1に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項3】

少なくとも一種のアニオン性基を有する、請求項1又は2に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項4】

前記アニオン性基が、カルボキシル基、スルホン基、及びフェノール基からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項3に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項5】

前記アニオン性基が、カルボキシル基である、請求項3に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項6】

前記標識物質が、放射性同位体、低分子有機色素、蛍光色素、及びガドリニウム配位キレート剤からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1～5の何れか1項に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項7】

皮内投与用リンパ節イメージング剤として用いられる、請求項1～6の何れか1項に記載のアニオン性 dendrimer。

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

請求項1～8の何れか1項に記載のアニオン性 dendrimerを含む、リンパ節イメージング剤。

【請求項10】

請求項1～9の何れか1項に記載のアニオン性 dendrimerを投与する工程を含む、リンパ節の撮像方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/061943
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K51/00(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01T1/161(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K51/00, A61K49/00, G01N33/58, G01T1/161 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2013-518841 A (MIVENTON GMBH), 23 May 2013 (23.05.2013), claims 4 to 5; paragraphs [0057], [0150], [0156], [0159], [0169] to [0170], [0183] & US 2013/0095035 A1 & WO 2011/095311 A1 & EP 2531221 A1 & AU 2011212742 A & CA 2788736 A & CN 102781478 A & NZ 601550 A	1-4, 6-10 1-10
X A	N. Malik et al, Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo, Journal of Controlled Release, 2000, vol 65, no.1-2, p.133-148, page 135, right column, lines 4 to 7, page 138, right column, lines 9 to 24, fig. 1	1-8 9-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 July 2015 (14.07.15)		Date of mailing of the international search report 21 July 2015 (21.07.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/061943

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-507933 A (DOW CHEMICAL CO.), 24 March 2005 (24.03.2005), claims 1, 10 to 14; paragraphs [0034] to [0036] & US 2006/0039891 A1 & WO 2003/037383 A1 & EP 1439859 A1 & CN 1558777 A	1-10
A	WO 2011/105520 A1 (Nagasaki University, National University Corp.), 01 September 2011 (01.09.2011), claims 14 to 15; paragraphs [0177] to [0178] & US 2013/0052127 A1 & EP 2540311 A1 & CN 102858367 A	1-10
A	Vladimir S. Talanov et al, Dendrimer-Based Nanoprobe for Dual Modality Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging, Nano letters, 2006, vol.6, no.7, p. 1459-1463 entire text	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 1 9 4 3									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K51/00(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01T1/161(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K51/00, A61K49/00, G01N33/58, G01T1/161											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 2013-518841 A (MIVENION GMBH) 2013.05.23, 請求項4~5, 【0057】, 【0150】, 【0156】, 【0159】, 【0169】~【0170】, 【0183】 & US 2013/0095035 A1 & WO 2011/095311 A1 & EP 2531221 A1 & AU 2011212742 A & CA 2788736 A & CN 102781478 A & NZ 601550 A	1-4, 6-10 1-10									
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 14.07.2015		国際調査報告の発送日 21.07.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 天野 貴子	4U 9444								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 1 9 4 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	N. Malik et al, Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo, Journal of Controlled Release, 2000, vol 65, no. 1-2, p. 133-148, 1 3 5 頁右欄 4 ~ 7 行, 1 3 8 頁右欄 9 ~ 2 4 行, 図 1	1-8 9-10
Y	JP 2005-507933 A (DOW CHEMICAL CO) 2005.03.24, 請求項 1, 1 0 ~ 1 4, 【 0 0 3 4 】 ~ 【 0 0 3 6 】 & US 2006/0039891 A1 & WO 2003/037383 A1 & EP 1439859 A1 & CN 1558777 A	1-10
A	WO 2011/105520 A1 (国立大学法人 長崎大学) 2011.09.01, 請求項 1 4 ~ 1 5, [0 1 7 7] ~ [0 1 7 8] & US 2013/0052127 A1 & EP 2540311 A1 & CN 102858367 A	1-10
A	Vladimir S. Talanov et al, Dendrimer-Based Nanoprobe for Dual Modality Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging, Nano letters, 2006, vol.6, no.7, p. 1459-1463 文献全体	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 間賀田 泰寛

静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内

(72)発明者 小川 美香子

静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内

Fターム(参考) 4C085 HH03 HH11 HH13 KA27 KA29 KB72 KB76 LL03

4J031 BA29 BB01 BB02 BB03 BC19 BD03 CD09 CD14 CD25 CD28

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。