

明 細 書

発明の名称：抗EGFR抗体の放射性複合体、及び、放射性医薬
技術分野

[0001] 本発明は、抗EGFR抗体の放射性複合体、及び、放射性医薬に関する。

背景技術

[0002] EGFR (E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r : 上皮増殖因子受容体) は、細胞の増殖や成長を制御する増殖因子を認識し、シグナル伝達を行う、チロシンキナーゼ型の受容体で、分子量約170kDaの膜貫通型たんぱく質である。HER1、ErbB1とも呼ばれる。

[0003] 抗EGFR抗体としてセツキシマブ (C e t u x i m a b) が知られている。セツキシマブは、EGFRの働きを阻害するモノクローナル抗体であり、抗がん剤として使用され、がんの増殖などに関する特定の分子を狙い撃ちする分子標的治療薬のひとつである。

[0004] セツキシマブは上市されているADC (A n t i b o d y D r u g C o n j u g a t e (抗体薬物複合体)) で使用されている抗体であることが知られている。セツキシマブを使用したADCとしては、抗体にリンカーを介して化学療法剤や光感受性物質であるペイロード (薬物) を共有結合した薬剤がある。

抗体医薬は、標的への選択性が高く比較的副作用が少ない一方で、薬効が不十分な場合がある。ペイロードの一種である化学療法剤は、強力な薬効を有するが、標的に対する選択性が低いため、がん細胞を死滅させるために必要な最小有効量が高く、一方で、毒性の観点から用量をあまり上げられないことから最大耐量が低く、治療用量域が狭いことが課題とされている。

ADCによれば、化学療法剤をがん細胞に選択的に多く届けることができるようになり、その結果、より少量で効果を示すようになり、正常細胞へ到達する化学療法剤が低減することから最大耐量も高くなることで、治療用量

域が広がることが期待される。

[0005] ADCの一つのアプローチとして放射性免疫複合体 (Radioimmun conjugate) がある。放射性免疫複合体においては、ペイロードの代わりに放射性核種が用いられる。

[0006] また、特許文献1には、3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]-pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid (PCTA) 等の二官能性キレート剤を用いて放射性銅でセツキシマブを修飾した放射性の医薬組成物が記載されている。

[0007] また、放射性核種として、ガンマ線やポジトロンを放出する放射性核種を用いた放射性免疫複合体は、核医学検査に利用することができる。特許文献2には、抗体のFc領域を部位特異的に修飾するペプチドにDTPAを導入してセツキシマブを修飾し、放射性金属核種で標識し得ることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2017-214308号公報

特許文献2：国際公開第2017/217347号

発明の概要

[0009] しかしながら、従来の抗EGFR抗体の放射性複合体は、安定性が低い等の課題があることが本発明者らの知見により明らかとなった。

[0010] 特許文献1には、ペプチドによる抗EGFR抗体の部位特異的修飾については記載されていない。また、チオウレア結合を形成した抗EGFR抗体の課題についての開示ないし示唆はない。

[0011] 本発明の一態様は、ペプチドで部位特異的に修飾された抗EGFR抗体とキレート剤との複合体であって、キレート剤に放射性金属核種がキレート化しており、ペプチドとキレート剤とがリンカー(L)を介して連結しており、リンカー(L)はチオウレア結合を含まない、複合体である。

[0012] 本発明の他の態様は、上記の複合体を有効成分として含有する放射性医薬

である。

[0013] また、本発明の他の態様は、放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し、抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まず、室温で7日間保管した時の複合体の放射化学的純度が90%以上である、放射性医薬である。

[0014] なお、本発明でいう「連結」とは、特に断りがない場合、直接的または間接的に接続していることの両方を意味する。

[0015] 本発明によれば、薬効を損なうことなく従来よりも安定性が高められた抗EGFR抗体の放射性複合体が提供される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]実施例1及び比較例1の記載に従って製造した放射性複合体の抗原結合性を評価した結果を示したグラフである。縦軸は使用した腫瘍切片上に設定した関心領域(ROI)内のカウント値をROIの面積で除算した値を、標準線源のカウント値を標準線源の面積で除した値で補正した値を示し、横軸は評価に使用した腫瘍切片の細胞種を示す。グラフは各サンプル($n=10$)の平均値±標準偏差を表す。

[図2]実施例2に従って製造した放射性複合体の担癌マウスにおけるPET画像(MIP画像)の代表例を示す図である。矢印は担癌したA431細胞に由来する腫瘍を示す。

[図3]比較例2に従って製造した放射性複合体の担癌マウスにおけるPET画像(MIP画像)の代表例を示す図である。矢印は担癌したA431細胞に由来する腫瘍を示す。

[図4]放射性複合体(実施例1)投与群、放射性複合体(比較例1)投与群、抗体対照群及びVehicle群の担癌マウスにおける経時的な腫瘍体積の変化を示したグラフである。縦軸は、各薬剤投与時の腫瘍体積を1とした場合の相対値を表し、横軸は、各薬剤を投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「**」は抗体対照群に対して有意差($p<0.01$)が認められた時点、「†」はVehicle群

に対して有意差 ($p < 0.05$) が認められた時点、「‡」は Vehicle 群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点を示す。

[図5]放射性複合体(実施例1)投与群、放射性複合体(比較例1)投与群、抗体対照群及び Vehicle 群の担癌マウスにおける経時的な体重の変化を示したグラフである。縦軸は各薬剤投与時の体重を1とした場合の相対値を示し、横軸は各薬剤を投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の体重の平均値±標準偏差を表す。

[図6]実施例6の記載に従って製造した放射性複合体のEGFRに対する特異性を評価した結果を示したグラフである。縦軸は、使用した腫瘍切片上に設定したROI内のカウント値をROIの面積で除算した値を、標準線源のカウント値を標準線源の面積で除算した値で補正した値を示し、横軸は、評価に使用した腫瘍切片の細胞種を示す。グラフは、各サンプル ($n = 10$) の平均値±標準偏差を示す。

[図7A]COLO205細胞(上段)、HCT-116細胞(下段)に対する²²⁵Ac錯体標識パニツムマブの殺細胞効果を示したグラフである。比較対象として未標識のパニツムマブを添加した。縦軸は、抗体を添加しなかった条件での生細胞数を1とした場合の相対値を表し、横軸は、添加した抗体濃度を示す。グラフは各群の平均値±標準偏差を表す。

[図7B]SW48細胞(上段)、MIA PaCa-2細胞(下段)に対する²²⁵Ac錯体標識パニツムマブの殺細胞効果を示したグラフである。比較対象として未標識のパニツムマブを添加した。縦軸は、抗体を添加しなかった条件での生細胞数を1とした場合の相対値を表し、横軸は、添加した抗体濃度を示す。グラフは各群の平均値±標準偏差を表す。

[図7C]NCI-H358細胞に対する²²⁵Ac錯体標識パニツムマブの殺細胞効果を示したグラフである。比較対象として未標識のパニツムマブを添加した。縦軸は、抗体を添加しなかった条件での生細胞数を1とした場合の相対値を表し、横軸は、添加した抗体濃度を示す。グラフは各群の平均値±標準偏差を表す。

[図8]C O L O 2 0 5細胞、S W 4 8細胞に対する ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブのアポトーシス誘導能を示したグラフである。比較対象として未標識のパニツムマブを添加した。縦軸は、抗体を添加しなかった条件でのC a s p a s e - 3 / 7 活性を1とした場合の相対値を表し、横軸は、添加した抗体濃度を示す。グラフは各群の平均値±標準偏差を表す。

[図9A]S W 4 8細胞に対する ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブのD N A二重鎖切断効果を示した図である。D A P Iにより細胞核を染色し、検出し（上段画像）、 $\gamma\text{H}2\text{AX}$ を染色し、検出した（下段画像）。

[図9B]M I A P a C a - 2細胞に対する ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブのD N A二重鎖切断効果を示した図である。D A P Iにより細胞核を染色し、検出し（上段画像）、 $\gamma\text{H}2\text{AX}$ を染色し、検出した（下段画像）。

[図9C]N C I - H 3 5 8細胞に対する ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブのD N A二重鎖切断効果を示した図である。D A P Iにより細胞核を染色し、検出し（上段画像）、 $\gamma\text{H}2\text{AX}$ を染色し、検出した（下段画像）。

[図10]放射性複合体（実施例6）高放射能投与群、放射性複合体（実施例6）低放射能投与群、抗体腹腔投与群、抗体対照群及びV e h i c l e群の担癌マウス（C O L O 2 0 5細胞）における経時的な腫瘍体積の変化を示したグラフである。縦軸は、各群の腫瘍体積の平均値を表し、横軸は、各薬剤を投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「*」は抗体対照群に対して有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた時点、「**」は抗体対照群に対して有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた時点、「†」はV e h i c l e群に対して有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた時点、「§」は抗体腹腔投与群に対して有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた時点を示す。

[図11]放射性複合体（実施例6）高放射能投与群、放射性複合体（実施例6）低放射能投与群、抗体腹腔投与群、抗体対照群及びV e h i c l e群の担癌マウス（H C T - 1 1 6細胞）における経時的な腫瘍体積の変化を示したグラフである。縦軸は、各群の腫瘍体積の平均値を表し、横軸は、各薬剤を

投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「**」は抗体対照群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点、「‡」はVehicle群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点、「§」は抗体腹腔投与群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点、「||」は放射性複合体（実施例6）高放射能投与群に対して有意差 ($p < 0.05$) が認められた時点を示す。

[図12]放射性複合体（実施例6）高放射能投与群、放射性複合体（実施例6）低放射能投与群、抗体腹腔投与群、抗体対照群及びVehicle群の担癌マウス（SW48細胞）における経時的な腫瘍体積の変化を示したグラフである。縦軸は、各群の腫瘍体積の平均値を表し、横軸は、各薬剤を投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「**」は抗体対照群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点、「‡」はVehicle群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点を示す。

[図13]放射性複合体（実施例6）投与群、オキサリプラチン投与群、及びVehicle群のCOLO205担癌マウスにおける経時的な腫瘍体積の変化を示したグラフである。

[図14]放射性複合体（実施例6）投与群、オキサリプラチン投与群、及びVehicle群のCOLO205担癌マウスにおける観察最終日での肝毒性（上図及び中図）及び腎毒性（下図）マーカーの測定結果を示したグラフである。

[図15]実施例2の記載に従って製造した放射性複合体を投与したCOLO205細胞担癌マウスにおけるPET画像（MIP画像）の代表例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] (1) 放射性複合体

本発明は、ペプチドで部位特異的に修飾された抗EGFR抗体とキレート剤との複合体であって、キレート剤に放射性金属核種がキレート化しており

、ペプチドとキレート剤とがリンカー（L）を介して連結しており、リンカー（L）はチオウレア結合を含まない、複合体（以下、本発明の放射性複合体とも称する）である。

[0018] （１－１）放射性金属核種

本発明の放射性複合体に含まれる放射性金属核種は、 α 線を放出する放射性核種、 β 線を放出する放射性核種、ポジトロンを放出する放射性核種又は γ 線を放出する放射性核種である。本発明の放射性複合体をがん治療に用いる場合は、 α 線を放出する放射性核種又は β 線を放出する放射性核種を用いることが好ましい。また、本発明の放射性複合体をがんの診断若しくは検出に用いる場合は、ポジトロンを放出する放射性核種又は γ 線を放出する放射性核種を用いることが好ましい。 α 線を放出する放射性核種として、Bi-212、Bi-213、Ac-225、Th-227が例示される。また、 β 線を放出する放射性核種として、Cu-64、Y-90又は、Lu-177が例示される。また、ポジトロンを放出する放射性核種として、Cu-64、Ga-68、Y-86、Zr-89が例示される。また、 γ 線を放出する放射性核種として、Tc-99m又はIn-111が例示される。本発明の放射性複合体に含まれる放射性金属核種は、Ga-68、Zr-89、Y-90、In-111、Lu-177又はAc-225がより好ましく、Zr-89、Y-90、Lu-177又はAc-225であることが、さらに好ましい。

[0019] （１－２）抗体

本発明の放射性複合体に含まれる抗体は、EGFRに特異的に結合する免疫グロブリン（以下、本発明で用いられる抗体とも称する）である。本発明で用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。抗体の由来は、特に限定されないが、例えば、非ヒト動物の抗体、非ヒト哺乳動物の抗体、およびヒト抗体が挙げられ、好ましくは、ヒト、ラット、マウス及びウサギの抗体を例示できる。抗体がヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を

用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましいが、本発明に用いられる抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってもよい。また、本発明で用いられる抗体は、二重特異性抗体であってもよい。本発明で用いられる抗体は、例えば、IgGであり、例えば、IgG1、IgG2（例えば、IgG2aおよびIgG2b）、IgG3、またはIgG4であり得る。

[0020] 本発明の放射性複合体に用いられる抗体は、セツキシマブ又はパニツムマブであることがより好ましい。

セツキシマブ (Cetuximab) は、EGFRを特異的に認識するIgG₁サブクラスのヒト・マウスキメラ化モノクローナル抗体であり、EGFRの活性化・二量体化を阻害することにより、結腸直腸癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌、胃癌等に腫瘍増殖抑制効果を奏することが知られている。

セツキシマブの化学名（命名法）は、マウス抗ヒト上皮細胞増殖因子受容体モノクローナル抗体の可変部及びヒトIgG₁定常部からなるヒト／マウスキメラ型モノクローナル抗体をコードするcDNAの導入によりマウスハイブリドーマSP2／O-Ag14細胞株で産生される214個のアミノ酸残基（C₁₀₂₅H₁₅₉₅N₂₈₁O₃₃₈S₅；分子量：23,422.64）からなる軽鎖2分子と449個のアミノ酸残基（C₂₂₀₈H₃₄₀₀N₅₈₂O₆₇₄S₁₅；分子量：49,363.09）からなる重鎖2分子からなる糖タンパク質である。

本明細書において、セツキシマブは、特開2005-047934号公報に記載された抗体であり、具体的には、

軽鎖アミノ酸配列（配列番号1）：

[0021] [化1]

```
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRPNQSPRLIKYASESISGIPS 60
RFSGSGSGFTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTPVAAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT 180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSENRGEC
```

[0022] 及び重鎖アミノ酸配列（配列番号2）：

[0023] [化2]

```

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLFNIGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN 60
TPFTSRLSINKDNSKSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQCTLVTVSAA 120
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
LYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP 240
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 300
TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYECKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM 360
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ 420
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

[0024] を含むヒト化抗体である。

セツキシマブは、RAS遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌、頭頸部癌を適応症とする抗腫瘍剤として、臨床にて用いられており、アービタックス（Erbix；登録商標）として入手可能である。

[0025] パニツムマブ（Panitumumab）は、EGFRを特異的に認識するヒト型IgG2モノクローナル抗体である。その化学名（命名法）は、ヒト抗ヒトEGFRモノクローナル抗体であるIgG2をコードするゲノムDNAを導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される214個のアミノ酸残基（ $C_{1028}H_{1588}N_{274}O_{336}S_6$ ；分子量：23,353.63）からなる軽鎖2分子及び445個のアミノ酸残基（ $C_{2171}H_{3355}N_{573}O_{672}S_{18}$ ；分子量：48,811.47）からなる重鎖2分子から構成される糖タンパク質（分子量：約147,000）であり、重鎖サブユニットの主成分はC末端のリジンを欠く。

パニツムマブのアミノ酸配列は、ベクティビックス点滴静注100mg「タケダバイオ」についての独立行政法人医薬品医療機器総合機構による審査報告書において、以下のように示されている。

軽鎖（配列番号3）：

[0026] [化3]

Asp - Ile - Gln - Met - Thr - Gln - Ser - Pro - Ser - Ser - Leu - Ser - Ala - Ser - Val - Gly - Asp - Arg - Val - Thr -
 Ile - Thr - Cys - Gln - Ala - Ser - Gln - Asp - Ile - Ser - Asn - Tyr - Leu - Asn - Trp - Tyr - Gln - Gln - Lys - Pro -
 Gly - Lys - Ala - Pro - Lys - Leu - Leu - Ile - Tyr - Asp - Ala - Ser - Asn - Leu - Glu - Thr - Gly - Val - Pm - Ser -
 Arg - Phe - Ser - Gly - Ser - Gly - Ser - Gly - Thr - Asp - Phe - Thr - Phe - Thr - Ile - Ser - Ser - Leu - Gln - Pro -
 Glu - Asp - Ile - Ala - Thr - Tyr - Phe - Cys - Gln - His - Phe - Asp - His - Leu - Pro - Leu - Ala - Phe - Gly - Gly -
 Gly - Thr - Lys - Val - Glu - Ile - Lys - Arg - Thr - Val - Ala - Ala - Pro - Ser - Val - Phe - Ile - Phe - Pro - Pro -
 Ser - Asp - Glu - Gln - Leu - Lys - Ser - Gly - Thr - Ala - Ser - Val - Val - Cys - Leu - Leu - Asn - Asn - Phe - Tyr -
 Pro - Arg - Glu - Ala - Lys - Val - Gln - Trp - Lys - Val - Asp - Asn - Ala - Leu - Gln - Ser - Gly - Asn - Ser - Gln -
 Glu - Ser - Val - Thr - Glu - Gln - Asp - Ser - Lys - Asp - Ser - Thr - Tyr - Ser - Leu - Ser - Ser - Thr - Leu - Thr -
 Leu - Ser - Lys - Ala - Asp - Tyr - Glu - Lys - His - Lys - Val - Tyr - Ala - Cys - Glu - Val - Thr - His - Gln - Gly -
 Leu - Ser - Ser - Pro - Val - Thr - Lys - Ser - Phe - Asn - Arg - Gly - Glu - Cys²

[0027] 重鎖（配列番号4）：

[0028] [化4]

Gln¹ - Val - Gln - Leu - Gln - Glu - Ser - Gly - Pro - Gly - Leu - Val - Lys - Pro - Ser - Glu - Thr - Leu - Ser - Leu -
 Thr - Cys - Thr - Val - Ser - Gly - Gly - Ser - Val - Ser - Ser - Gly - Asp - Tyr - Tyr - Trp - Thr - Trp - Ile - Arg -
 Gln - Ser - Pro - Gly - Lys - Gly - Leu - Glu - Trp - Ile - Gly - His - Ile - Tyr - Tyr - Ser - Gly - Asn - Thr - Asn -
 Tyr - Asn - Pro - Ser - Leu - Lys - Ser - Arg - Leu - Thr - Ile - Ser - Ile - Asp - Thr - Ser - Lys - Thr - Gln - Phe -
 Ser - Leu - Lys - Leu - Ser - Ser - Val - Thr - Ala - Ala - Asp - Thr - Ala - Ile - Tyr - Tyr - Cys - Val - Arg - Asp -
 Arg - Val - Thr - Gly - Ala - Phe - Asp - Ile - Trp - Gly - Gln - Gly - Thr - Met - Val - Thr - Val - Ser - Ser - Ala -
 Ser - Thr - Lys - Gly - Pro - Ser - Val - Phe - Pro - Leu - Ala - Pro - Cys - Ser - Arg - Ser - Thr - Ser - Glu - Ser -
 Thr - Ala - Asn - Leu - Gly - Cys - Leu - Val - Lys - Asp - Tyr - Phe - Pro - Glu - Pro - Val - Thr - Val - Ser - Trp -
 Asn - Ser - Gly - Ala - Leu - Thr - Ser - Gly - Val - His - Thr - Phe - Pro - Ala - Val - Leu - Gln - Ser - Ser - Gly -
 Leu - Tyr - Ser - Leu - Ser - Ser - Val - Val - Thr - Val - Pro - Ser - Ser - Asn - Phe - Gly - Thr - Gln - Thr - Tyr -
 Thr - Cys - Asn - Val - Asp - His - Lys - Pro - Ser - Asn - Thr - Lys - Val - Asp - Lys - Thr - Val - Glu - Arg - Lys -
 Cys - Cys² - Val - Glu - Cys² - Pro - Pro - Cys² - Pro - Ala - Pro - Pro - Val - Ala - Gly - Pro - Ser - Val - Phe - Leu -
 Phe - Pro - Pro - Lys - Pro - Lys - Asp - Thr - Leu - Met - Ile - Ser - Arg - Thr - Pro - Glu - Val - Thr - Cys - Val -
 Val - Val - Asn - Val - Ser - His - Glu - Asp - Pro - Glu - Val - Gln - Phe - Asn - Trp - Tyr - Val - Asp - Gly - Val -
 Glu - Val - His - Asn - Ala - Lys - Thr - Lys - Pro - Arg - Glu - Glu - Gln - Phe - Asn - Ser - Thr - Phe - Arg - Val -
 Val - Ser - Val - Leu - Thr - Val - Val - His - Gln - Asp - Trp - Leu - Asn - Gly - Lys - Glu - Tyr - Lys - Cys - Lys -
 Val - Ser - Asn - Lys - Gly - Leu - Pro - Ala - Pro - Ile - Glu - Lys - Thr - Ile - Ser - Lys - Thr - Lys - Gly - Gln -
 Pro - Arg - Glu - Pro - Gln - Val - Tyr - Thr - Leu - Pro - Pro - Ser - Arg - Glu - Glu - Met - Thr - Lys - Asn - Gln -
 Val - Ser - Leu - Thr - Lys - Leu - Val - Lys - Gly - Phe - Tyr - Pro - Ser - Asp - Ile - Ala - Val - Glu - Trp - Glu -
 Ser - Asn - Gly - Gln - Pro - Glu - Asn - Asn - Tyr - Lys - Thr - Thr - Pro - Pro - Met - Leu - Asp - Ser - Asp - Gly -
 Ser - Phe - Phe - Leu - Tyr - Ser - Lys - Leu - Thr - Val - Asp - Lys - Ser - Arg - Trp - Gln - Gln - Gly - Asn - Val -
 Phe - Ser - Cys - Ser - Val - Met - His - Glu - Ala - Leu - His - Asn - His - Tyr - Thr - Gln - Lys - Ser - Leu - Ser -
 Leu - Ser - Pro - Gly - Lys²

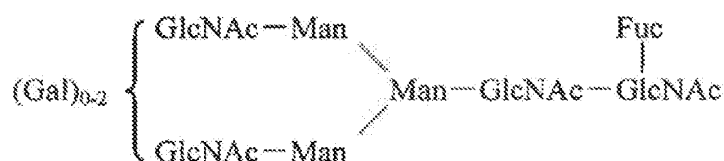
[0029] ここで、分子内ジスルフィド結合は実線で示す。分子間ジスルフィド結合は、重鎖のCys 222残基と軽鎖のCys 214残基、重鎖のCys 225残基同士、重鎖のCys 228残基同士で形成されている。

下線が付与されたAsn (Asn) は、糖鎖結合位置であり、アスタリス

クが付与されたGln (Gln*) は、一部ピログルタミン酸へ環化している。アスタリスクが2つ付与されたLys (Lys**) は、ほぼ完全に欠損している。

糖鎖構造は以下に示されている。

[0030] [化5]



[0031] ここで、FucがL-フコースであり、(Gal) 0-2が0、1又は2分子のD-ガラクトースであり、GlcNAcがD-N-アセチルグルコサミンであり、ManがD-マンノースである。

パニツムマブは、KRAS遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌を適応症とする抗腫瘍剤として、臨床にて用いられており、ベクティビックス (Vectibix; 登録商標) として入手可能である。

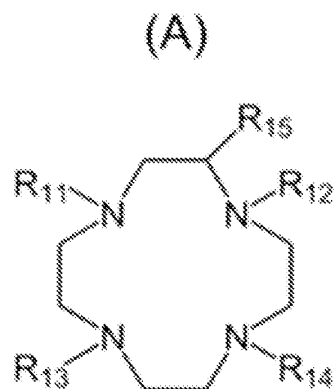
[0032] (1-3) キレート剤

本発明においてキレート剤は、放射性金属核種が配位する部位を構造中に有するものであれば特に限定されない。キレート剤として、例えば、CB-TE2A (1,4,8,11-Tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diacetic acid)、CDTA (Cyclohexane-trans-1,2-diamine tetra-acetic acid)、CDTPA (4-cyano-4-[[[dodecylthio]thioxomethyl]thio]-pentanoic acid)、DOTA(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -tetramethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)、DOTAM (1,4,7,10-tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane)、DOTPA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra propionic acid)、1,4,7,10-tetrakis(pyridin-2-ylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (L^{py})、DOTA-GA(α -(2-Carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)、DOTP(((1,4,7,1

0-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(methylene))tetraphosphonic acid)、DOTMP(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(methylenephosphonic acid))、DOTA-4AMP(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(acetamidomethylenephosphonic acid)、D02P(Tetraazacyclododecane dimethanephosphonic acid)、Deferoxamine (DF0)、DTPA(Glycine, N,N-bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-)、CHX-A"-DTPA(2,2'-(2-(((1S,2R)-2-(bis(carboxymethyl)amino)cyclohexyl)(carboxymethyl)amino)ethyl)azanediyl)diacetic acid)、DTPA-BMA(5,8-Bis(carboxymethyl)-11-[2-(methylamino)-2-oxoethyl]-3-oxo-2,5,8,11-tetraazatridecan-13-oic acid)、EDTA(2,2',2'',2''''-(ethane-1,2-diylbis(azanetriyl))tetraacetic acid)、NOTA(1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)、NOTP(1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triyltris(methylenephosphonic acid))、TETPA(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetrapropionic acid)、TETA(1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N''''-tetraacetic acid)、TTHA(3,6,9,12-Tetrakis(carboxymethyl)-3,6,9,12-tetraazatetradecanedioic acid)、HEHA(1,2,7,10,13-hexaazacyclooctadecane-1,4,7,10,13,16-hexaacetic acid)、1,2-HOPO(N,N',N'',N''''-tetra(1,2-dihydro-1-hydroxy-2-oxopyridine-6-carbonyl)-1,5,10,14-tetraazatetradecane)、PEPA(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane-N,N',N'',N''',N''''-pentaacetic acid)、H4octapa(N,N'-bis(6-carboxy-2-pyridylmethyl)-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid)、H2bispa2(6,6'-({9-hydroxy-1,5-bis(methoxycarbonyl)-2,4-di(pyridine-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane-3,7-diyl}bis(methylene))dipicolinic acid)、H2dedpa(1,2-[6-(carboxy)-pyridin-2-yl]-methylamino]ethane)、H2macropa(6-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan-N,N'-methyl)picolinic acid)、H5decapa(N,N''-bis(6-carboxy-2-pyridylmethyl)-diethylenetriamine-N,N',N''-triacetic acid)、H6phospa(N,N'-(methylenephosphonate)-N,N'-[6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl]-methyl-1,2-diaminoethane)、HP-D03A(Hydroxypropyltetraazacyclododeca-

netriacetic acid)、porphyrinといったものが挙げられるが、下記式 (A) で表される化合物が好ましい。

[0033] [化6]

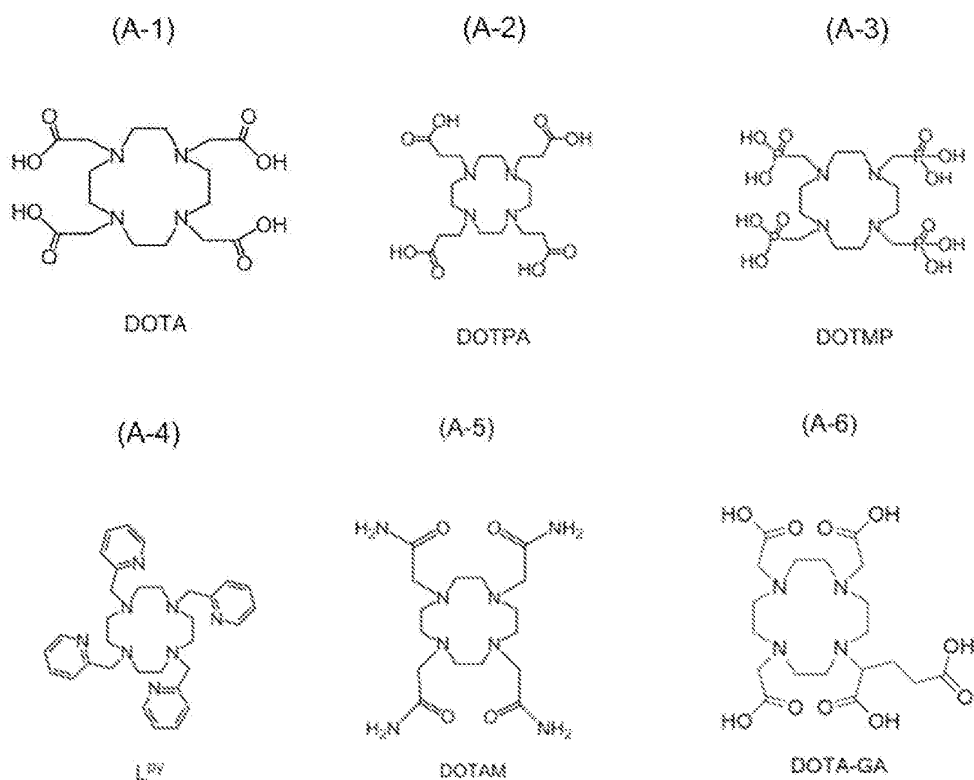


[0034] (式 (A) 中、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 及び R_{14} は、それぞれ独立して、 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 若しくは、 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ からなる基であり、 R_{15} が、水素原子であり、 p が 0 以上 3 以下の整数である。)

[0035] 式 (A) で表される化合物としては、好ましくは 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸 (DOTA)、又はその誘導体由来する構造を含む化合物であり、具体的には、構造中に DOTA (1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid)、DOTMA ((1R, 4R, 7R, 10R)- $\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -tetramethyl-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid)、DOTAM (1, 4, 7, 10-tetrakis(carbamoylmethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane)、DOTPA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetrapropionic acid)、1, 4, 7, 10-tetrakis(pyridin-2-ylmethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane (L^{py})、DOTA-GA (α -(2-Carboxyethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid)、DOTP ((1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetrayl)tetrakis(methylene)) tetraphosphonic acid)、DOTMP (1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetrakis(methylenephosphonic acid))、DOTA-4AMP (1, 4, 7, 10-tetraazacyclod

odecane-1,4,7,10-tetrakis(acetamidomethylenephosphonic acid)、D02P(Tetraazacyclododecane dimethanephosphonic acid)から選択される一のキレート剤に由来する構造を含むことができ、より好ましくは以下の式(A-1)～(A-6)で表される化合物が挙げられる。本発明の放射性複合体に用いられるキレート剤は、DOTA-GA(式(A-6)で表される化合物)がさらにより好ましい。用いられるキレート剤がDOTA-GAである場合、前記キレート剤は、立体異性体(S体、R体)であっても、ラセミ体であってもよい。S体とR体の立体異性体が任意の割合で混合されたものであってもよい。

[0036] [化7]



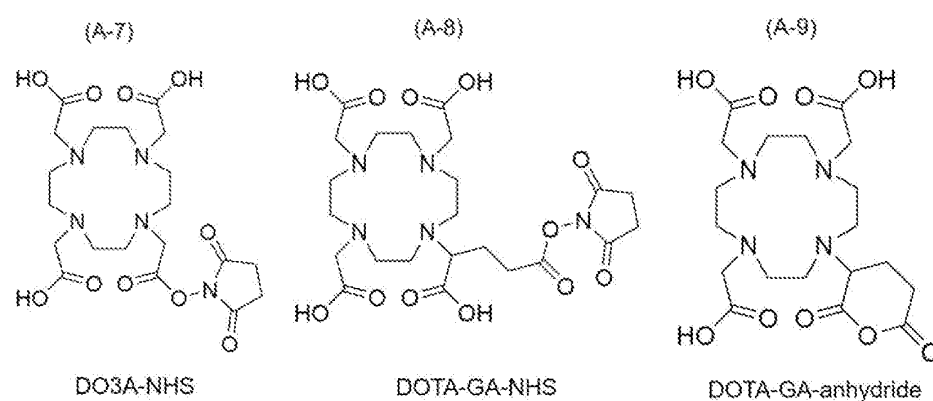
[0037] 本発明で用いられるキレート剤は、リンカー(L)を介してペプチドと連結している。本発明の放射性複合体において、キレート剤とリンカー(L)とは共有結合により接続されていることが好ましい。したがって、前述した

キレート剤は、本発明の放射性複合体においては、化合物内の一部の基がリンカー（L）と共有結合を形成する基に置換されていてもよい。例えば、本発明で用いられるキレート剤が、式（A）で表される化合物である場合は、 R_{12} 又は R_{15} がリンカー（L）と共有結合を形成する基に置換されていてもよい。好ましくは、 R_{12} がリンカー（L）と共有結合を形成する基に置換されているとき R_{15} は水素原子であり、 R_{12} が $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 又は、 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ からなる基であるとき、 R_{15} がリンカー（L）と共有結合を形成する基に置換されている。

[0038] キレート剤とリンカー（L）との共有結合は、チオウレア結合を含まなければよく、炭素－炭素結合、アミド結合、エーテル結合、エステル結合などが挙げられる。

[0039] キレート剤とリンカー（L）との接続は、例えば、下記式（A-7）や（A-8）のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHS）基、又は、下記式（A-9）の2,6-ジオキソテトラヒドロ-2H-ピラニル基と、リンカー（L）の第1級アミンとの反応により形成される。

[0040] [化8]



[0041] （1-4）抗体修飾ペプチド

本発明においてペプチドは、抗体を部位特異的に、好ましくはFc領域を部位特異的に、より好ましくは抗体のFc領域におけるリシン残基を部位特

異的に修飾するものであれば、特に限定されない。これにより、抗体そのものの活性（抗原認識作用、中和作用、補体活性化作用及び／又はオプソニン作用）を維持することができる。

[0042] 本発明に用いられるペプチドは、鎖状ペプチドでも環状ペプチドであってもよいが、環状ペプチドが好ましい。より好ましくは、下記式（i）で表される、13以上17以下のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列（以下、「抗体修飾ペプチド」ともいう。）を含み、かつ架橋剤で修飾されている。なお、式（i）において、アミノ酸配列の紙面左側がN末端側を示し、アミノ酸配列の紙面右側がC末端側を示すものとして説明する。

[0043] (Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd)・・・(i)

式（i）中、Xa、Xb、Xc及びXdは、それぞれ、連続するa個のX、連続するb個のX、連続するc個のX、及び連続するd個のXを表し、Xは、側鎖にチオール基及びハロアセチル基のいずれも有しないアミノ酸残基であり、

a、b、c及びdはそれぞれ独立に1以上5以下の整数で、かつ $a + b + c + d \leq 14$ を満たし

Xaa1及びXaa3は、それぞれ独立に、

側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を表し、ただし、Xaa1及びXaa3のいずれか一方がチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、好ましくは、Xaa1及びXaa3が連結することで、環構造が形成されており、

Xaa2は、リシン残基、アルギニン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸、好ましくはリシン残基であり、かつXaa2が架橋剤で修飾されている。

[0044] 上記式（i）におけるXに含まれ得るアミノ酸残基としては、例えば、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、プロリン、アスパラギン、アスパラ

ギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、セリン、トレオニン、チロシン、メチオニン等のアミノ酸に由来するものが挙げられ、Xは、同一の種類のアミノ酸からなるアミノ酸残基であってもよく、それぞれ異なる種類のアミノ酸からなるアミノ酸残基であってもよい。

[0045] 式(i)中のa、b、c及びdは、上述した範囲の数であれば特に制限はないが、ペプチドと抗EGFR抗体との結合安定性の観点から、 $a + b + c + d \leq 14$ を条件として、aは好ましくは1以上3以下の整数、bは好ましくは1以上3以下の整数、cは好ましくは3以上5以下の整数、及びdは好ましくは1以上3以下の整数である。

[0046] Xaa1及びXaa3の少なくとも一方は、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、該アミノ酸はそれぞれ同一であってもよく、異なってもよい。側鎖にチオール基を有するアミノ酸としては、例えばシステイン、ホモシステインが挙げられる。このようなアミノ酸残基は、ジスルフィド結合によって結合しているか、又は以下の式(4)に示す構造を介して、スルフィド基が結合されていることが好ましい。式(4)中、波線部分はスルフィド基との結合部分を示す。

[0047] [化9]

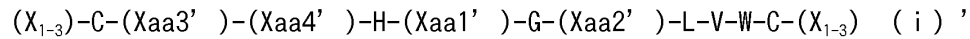


[0048] Xaa1及びXaa3は、上述した組み合わせに代えて、Xaa1及びXaa3のうち一方が側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であってもよい。これらは、チオエーテル結合を介して結合している。ハロアセチル基は、その末端がヨウ素等のハロゲンで置換されており、他方の側鎖におけるチオール基との反応によってハロゲンが脱離して、チオエーテル結合が形成される。

[0049] 式(i)で表される抗体修飾ペプチドの具体的なアミノ酸配列は、例えば

国際公開第2016/186206号、国際公開第2017/217347号及び国際公開第2018/230257号に記載のペプチドが挙げられ、これらを用いることもできる。

好ましくは、本発明で用いられる抗体修飾ペプチドは、下記式(i)'で表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。



[0050] 式(i)'中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Xaa1' はリシン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2' はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、

Wはトリプトファン残基であり、

Xaa3' はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、かつ

Xaa4' はチロシン残基又はトリプトファン残基である。

上記式(i)'で、N末端又はC末端の X_{1-3} という表記は、システイン(C又はCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが1～3個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか又は異なる残基であるが、好ましくは3個すべてが同じ残基でない配列からなる。

[0051] これらのうち、抗体修飾ペプチドのアミノ酸配列として、以下の配列(1)～(14)のいずれか一つを有していることが好ましく、以下の配列(1)、(2)、(13)又は(14)を有していることが更に好ましい。以下のアミノ酸配列(1)～(14)において、(Xaa2)はリシン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリ

ン酸、又はジアミノプロピオン酸、好ましくはリシン残基を示し、好ましくは (X a a 2) は架橋剤で修飾されており、(X a a 1) 及び (X a a 3) はともにホモシステイン残基を示す。また、以下のアミノ酸配列 (1) ~ (14) 中、(X a a 1)、(X a a 2) 及び (X a a 3) 以外のアミノ酸は一文字略号にて表記する。

- [0052] (1) DCAYH(Xaa2)GELVWCT (配列番号 5)
(2) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号 6)
(3) RCAYH(Xaa2)GELVWCS (配列番号 7)
(4) GPRCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (配列番号 8)
(5) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号 9)
(6) GDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号 10)
(7) GPSCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号 11)
(8) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (配列番号 12)
(9) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTHH (配列番号 13)
(10) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号 14)
(11) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号 15)
(12) SDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号 16)
(13) RGNCAYH(Xaa2)GQLVWCTYH (配列番号 17)
(14) G(Xaa1)DCAYH(Xaa2)GELVWCT(Xaa3)H (配列番号 18)
- [0053] 上記の式 (i) 又は (i)' で表されるペプチド、又は、配列 (1) ~ (14) を有するペプチドは、好ましくは N 末端にリンカー (L) が導入され、C 末端がアミド化される。また、これらのペプチドの X a a 2 (又は X a a 2 相当部分) が架橋剤で修飾されており、これにより、架橋剤を介してペプチドが抗 E G F R 抗体の F c 領域と共有結合することができる。式 (i)' において X a a 2 相当部分は X a a 1' である。
- [0054] 架橋剤は、当業者であれば適宜選択することが可能であり、所望のアミノ酸 (例えば、リシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、2-アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸、及びアルギニン等) と結合可

能な部位を少なくとも2箇所有する化合物とすることができる。その例として、限定するものではないが、DSG (disuccinimidyl glutarate、ジスクシンイミジルグルタレート)、DSS (disuccinimidyl suberate、ジスクシンイミジルスベレート) 等のスクシンイミジル基を好ましくは2以上含む架橋剤、DMA (dimethyl adipimidate · 2HCl、アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩)、DMP (dimethyl pimelimidate · 2HCl、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩)、及びDMS (dimethyl suberimidate · 2HCl、スベルイミド酸ジメチル二塩酸塩) 等のイミド酸部分を好ましくは2以上含む架橋剤、並びにDTBP (dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate · 2HCl、3, 3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル二塩酸塩) 及びDSP (dithiobis(succinimidyl propionate)、ジチオビススクシンイミジルプロピオン酸) 等のSS結合を有する架橋剤、SBAP (succinimidyl 3-(bromoacetamido) propionate) が挙げられる。DSS又はDSG等のスクシンイミジル基を含む架橋剤は、N末端に存在する一級アミンと反応するため、N末端をブロッキングした上でDSS又はDSGと反応させることで、Xaa2のアミノ基のみをDSS又はDSGで特異的に修飾することができる。例えば、抗体修飾ペプチドのN末端にあらかじめリンカー(L)を導入させた後にDSS又はDSGと反応させてもよい。DSS又はDSGのスクシンイミジル基が、抗EGFR抗体として、例えば、セツキシマブにおけるEu numberingに従うLys248残基又はLys250残基、好ましくはLys250残基と、例えば、パニツムマブにおけるEu numberingに従うLys244残基又はLys246残基、好ましくはLys246残基反応することで、抗EGFR抗体がペプチドで部位特異的に修飾される。これらのLys残基は、ヒトIgGにおけるFc領域に存在し、セツキシマブ以外の抗EGFR抗体であっても当業者で

あれば抗体のアミノ酸配列をアラインメントし、相当するLys残基を特定することができる。

[0055] (1-5) リンカー (L)

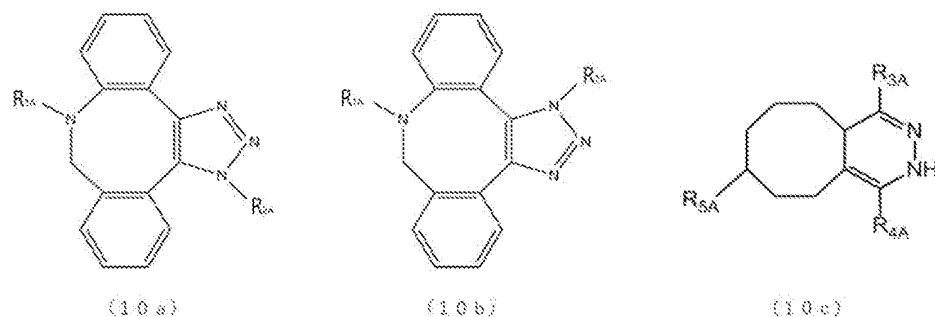
リンカー (L) は、本発明の放射性複合体において、キレート剤とペプチドとを連結できるものであれば特に限定されない。本発明で用いられるリンカー (L) は、チオウレア結合を含むものでなければ特に限定されず、置換又は無置換のアルキル基、置換又は無置換のヘテロアルキル基、ポリエチレングリコール (PEG) 基、ペプチド、糖鎖、ジスルフィド基、アミド基、及びこれらの組み合わせなどが挙げられる。

本明細書においてリンカー (L) とは、ペプチドで修飾された抗EGFR抗体とキレート剤との接続に用いられるリンカーの総称であり、抗体修飾リンカー (L_1) 及びキレートリンカー (L_2) を含む用語である。抗体修飾リンカー (L_1) は、詳細は後述するが、(1-4) で説明したペプチドのN末端側に導入されるものであり、キレートリンカー (L_2) も、詳細は後述するが、(1-3) で説明したキレート剤の官能基に導入されるものである。

[0056] 本発明で用いられるリンカー (L) は、クリック反応で形成された結合部位を含んでいてもよく、好ましくは、抗体修飾リンカー (L_1) とキレートリンカー (L_2) とがクリック反応により結合している。本発明において、クリック反応で形成された結合部位と、キレート剤との間に、チオウレア結合を含まないことが好ましい。言い換えると、キレートリンカー (L_2) がチオウレア結合を含まないことが好ましい。ここで、クリック反応で形成された結合部位は、好ましくは、下記式 (10a) 又は (10b) で表されるトリアゾール骨格含有構造又は下記式 (10c) で表されるピリダジン骨格含有構造が考えられる。式 (10a) と式 (10b) は異性体の関係にあるため任意の割合で含まれていてもよい。

[0057]

[化10]



[0058] 式(10a)及び式(10b)中、 R_{1A} はキレート剤との連結部位を示し、 R_{2A} は抗体修飾ペプチドとの連結部位を示す。式(10c)中、 R_{3A} 及び R_{4A} のうち一方は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示し、他方はキレート剤との連結部位を示し、 R_{5A} は抗体修飾ペプチドとの連結部位を示す。式(10a)、式(10b)及び式(10c)において、抗体修飾ペプチドとの連結部位は、抗体修飾リンカー(L_1)を介してペプチドが連結しており、キレート剤との連結部位は、キレートリンカー(L_2)を介してキレート剤が連結している。

[0059] 本発明の放射性複合体は、ペプチドで部位特異的に抗体が修飾され、ペプチドとキレート剤とがリンカー(L)を介して連結するため、抗EGFR抗体1分子に対して1分子又は2分子のキレート剤を複合化させたものになる。

[0060] (1-6) 複合体の製造方法

本発明の放射性複合体の製造方法は、キレート剤と抗EGFR抗体とをコンジュゲーションするコンジュゲーション工程と、放射性金属核種とキレート剤との錯体を形成する錯体形成工程との2つの工程から製造することができる。コンジュゲーション工程は、錯体形成工程の前であってもよいし錯体形成工程の後であってもよい。

[0061] コンジュゲーション工程においては、前述した式(i)で示す抗体修飾ペプチドを有するキレート剤またはリンカー(L)を、抗体のFc領域に部位特

異的に修飾する。

- [0062] 錯体形成工程では、キレート剤に放射性金属核種をキレート（錯体形成）させる。ここで使用する放射性金属核種は、錯体形成効率を高める観点から、電離可能な態様で用いることが好ましく、イオンの態様で用いることが更に好ましい。錯体形成工程は、放射性金属核種との錯体形成が可能であれば、キレート剤への放射性金属核種の添加順序は問わない。例えば、水を主体とする溶媒に、放射性金属イオンが溶解した溶液を放射性核種として用いることができる。

錯体形成後、ろ過フィルター、メンブランフィルター、種々の充填剤を充填したカラム、クロマトグラフィー等を用いて、得られた錯体を精製してもよい。

- [0063] 本発明の放射性複合体の製造方法は、錯体形成工程の後にコンジュゲーション工程が実行されることが好ましい。

より好ましい態様において、錯体形成工程（A）では、放射性金属核種と、クリック反応可能な第1原子団を抗体と複合化を可能とするための置換基として有するキレート剤と、の間で錯体を形成する。次いで、コンジュゲーション工程（B）では、前述した式（i）で示す抗体修飾ペプチドとクリック反応可能な第2原子団とを有する抗体修飾リンカー（ L_1 ）を用いて、Fc領域を部位特異的に修飾されたペプチド修飾抗体と、工程（A）で得られた錯体形成されたキレート剤との間でクリック反応を実行し、本発明の放射性複合体を得る。

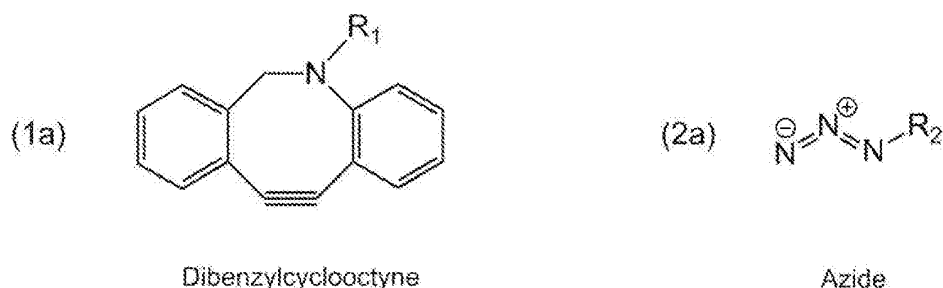
以下、工程（A）及び（B）について、詳述する。

- [0064] クリック反応可能な第1原子団と第2原子団の組み合わせとしては、クリック反応の種類に応じて適切なものが選択され、例えば、アルキンとアジドとの組み合わせ、1, 2, 4, 5-テトラジンとアルケンとの組み合わせ等が挙げられる。これらの原子団は、第1原子団が上記原子団の組み合わせのうち一つを有し、第2原子団が上記原子団の組み合わせのうち第1原子団と異なる一つとなる原子団を有していればよい。キレート剤及び抗体の安定性

と、これらの結合効率の向上とを両立する観点から、キレートリンカー (L_2) がアルキンであり且つ抗体修飾リンカー (L_1) がアジドであるか、又はキレートリンカー (L_2) が 1, 2, 4, 5-テトラジンであり且つ抗体修飾リンカー (L_1) がアルケンであることが好ましい。このような原子団の組み合わせによるクリック反応の具体例として、ヒュスゲン環化付加反応、あるいは逆電子要請型ディールスアルダー反応等が挙げられる。

[0065] クリック反応可能な原子団の組み合わせの具体例としては、以下の式に示すように、第1原子団のアルキンとしてジベンジルシクロオクチン (DBCO) を含む原子団 (式 (1a)) と、第2原子団のアジドとしてアジド基を含む原子団 (式 (2a)) との組み合わせ、あるいは、第1原子団として 1, 2, 4, 5-テトラジンを含む原子団 (式 (1b)) と、第2原子団のアルケンとして *trans*-シクロオクテン (TCO) を含む原子団 (式 (2b)) との組み合わせが挙げられる。好ましくは式 (1a) と式 (2a) との組合せである。

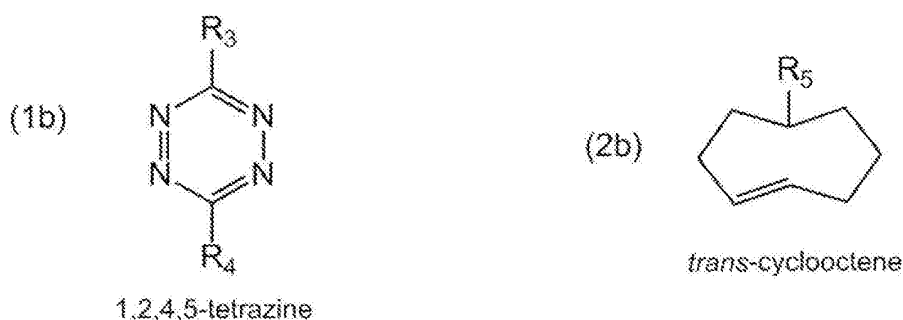
[0066] [化11]



[0067] 式 (1a) 中、 R_1 は、キレート剤との連結部位を示し、式 (2a) 中、 R_2 は、抗体修飾ペプチドとの連結部位を示す。

[0068]

[化12]



[0069] 式(1b)中、 R_3 及び R_4 のうち一方がキレート剤との連結部位または抗体修飾ペプチドとの連結部位を示し、他方が水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示す。 R_5 は、式(2b)の原子団がキレート剤と連結しているとき、抗体修飾ペプチドとの連結部位であり、式(2b)の原子団が抗体修飾ペプチドと連結しているときキレート剤との連結部位を示す。

[0070] 第1原子団のアルキンとして、上記式(1a)で表されるジベンジルシクロオクチン(DBCO)を含む原子団を用いる場合は、市販されている種々のDBCO試薬が挙げられる。具体的には、例えば、DBC0-C6-Acid、Dibenzylcyclooctyne-Amine、Dibenzylcyclooctyne Maleimide、DBC0-PEG acid、DBC0-PEG-Alcohol、DBC0-PEG-amine、DBC0-PEG-NH-Boc、Carboxyrhodamine-PEG-DBC0、Sulforhodamine-PEG-DBC0、TAMRA-PEG-DBC0、DBC0-PEG-Biotin、DBC0-PEG-DBC0、DBC0-PEG-Maleimide、TCO-PEG-DBC0、DBC0-mPEGなどが選択できるが、好ましくはDibenzylcyclooctyne Maleimideを用いる。

[0071] 錯体形成工程(A)では、より好ましくは、以下の式(ii)で表される構造を有する化合物を用いる。

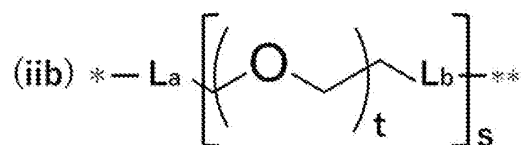


式(ii)中、Aは、前述したキレート剤であり、BとCとの総称がキレートリンカー(L_2)である

[0072] 式(ii)中、Bは以下の式(ii b)で表される。

[0073]

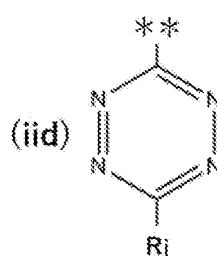
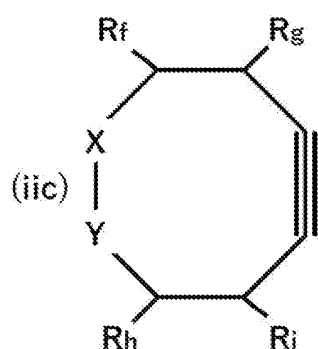
[化13]



[0074] 式 (i i b) 中、 L_a 及び L_b は、独立して、少なくともアミド結合を含む炭素数 1 以上 50 以下の結合リンカーであり、 t は 0 以上 30 以下の整数であり、 s は 0 又は 1 であり、 $*$ は A との結合部位であり、 $**$ は C との結合部位である。

[0075] 式 (i i) 中、C は、以下の式 (i i c) で表されるアルキン誘導体又は式 (i i d) で表されるテトラジン誘導体のいずれかである。

[0076] [化14]



[0077] 式 (i i c) 中、 X は $CH R_k - **$ 又は $N - **$ であり、 Y は $CH R_k$ 又は $C=O$ であり、 R_k は独立して水素原子であるか、炭素数 1 以上 5 以下のアルキル基であって、 X が $CH R_k - **$ で、 Y が $CH R_k$ である場合は、 R_k 部分が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよく、 R_f 、 R_g 、 R_h 及び R_i は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、炭素数 1 以上 5 以下のアルキル基であり、 R_f と R_g が一緒になって、若しくは R_h と R_i が一緒になって炭化水素環を形成してもよく、 $**$ は B との結合部位を示し、式 (i i d) 中、 $**$ は B との結合部位を示し、 R_j は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示す。

[0078] 工程 (A) で使用されるキレート剤として、上記式 (A) 中、 R_{11} 乃至 R_1

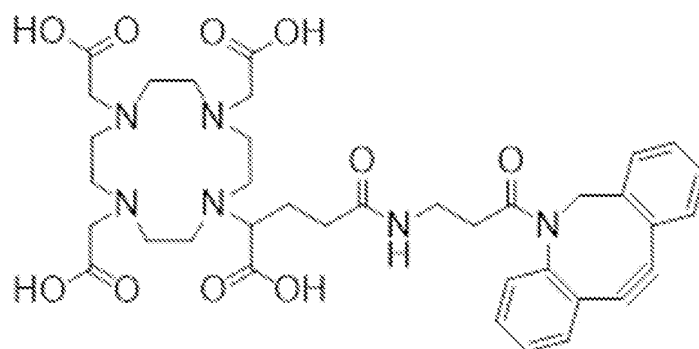
$_4$ が、 $-(CH_2)_pCOOH$ であり、 p が1であり、 R_{15} がBとの結合部位であるDOTA誘導体；又は R_{11} 乃至 R_{14} が、 $-(CH_2)_pCOOH$ であり、 p が1であり、 R_{12} がBとの結合部位(*)であり、 R_{15} が水素原子であるDO3A誘導体若しくはDOTAGA誘導体のいずれかがより好ましい。

[0079] 式(i i)中、Aが上記DO3Aである場合、Bは、 L_a がアミド結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、 s が0又は1であり、 s が1である場合は、 t が0以上30以下の整数であり、 L_b がアミド結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、Cは、式(i i c)で表されるアルキン誘導体であり、式(i i c)中、Xが $N-^{**}$ であり、Yが CHR_k であり、 R_k が水素原子であり、 R_f と R_g が一緒になってベンゼン環を形成しており、 R_h と R_i が一緒になってベンゼン環を形成しており、 ** はBとの結合部位である、DO3A-PEG t -DBCOが好ましい。

[0080] 式(i i)中、Aが上記DOTAGA誘導体である場合、Bは、 L_a がアミド結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、 s が0又は1であり、 s が1である場合は、 t が0以上30以下の整数であり、 L_b がアミド結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、Cは、式(i i c)で表されるアルキン誘導体であり、式(i i c)中、Xが $N-^{**}$ であり、Yが CHR_k であり、 R_k が水素原子であり、 R_f と R_g が一緒になってベンゼン環を形成しており、 R_h と R_i が一緒になってベンゼン環を形成しており、 ** はBとの結合部位である、DOTAGA-PEG t -DBCO誘導体が好ましい。より好ましくは、下記のDOTAGA-DBCOである。

[0081]

[化15]



DOTAGA-DBCO

[0082] キレート剤と放射性金属核種とのモル比率は、キレート部／放射性金属核種として、下限が、 $10/1$ 以上が好ましく、 $100/1$ 以上がより好ましく、 $500/1$ 以上がさらに好ましく、上限が、 $10000/1$ 以下が好ましく、 $8000/1$ 以下がより好ましく、 $7000/1$ 以下がさらに好ましく、例えば、 $100/1$ 以上 $7000/1$ 以下の範囲が好ましく、より好ましくは $500/1$ 以上 $7000/1$ 以下の範囲である。

[0083] 錯体形成反応は、溶媒下に行うことが好ましい。溶媒としては、例えば水、生理食塩水、又は酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリスヒドロキシメチルアミノメタン緩衝液（Tris緩衝液）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸緩衝液（HEPES緩衝液）、若しくはテトラメチルアンモニウム酢酸緩衝液等の緩衝液等を用いることができる。

[0084] 溶媒の液量は特に限定されないが、製造工程における実用性の観点から、工程（A）の開始時において、下限は、 0.01 mL 以上、好ましくは 0.1 mL 以上、より好ましくは 1.0 mL 以上、さらに好ましくは 10 mL 以上、よりさらに好ましくは 100 mL 以上であり、上限は、好ましくは 1000 mL 以下、より好ましくは 100 mL 以下、さらに好ましくは 10 mL 以下、よりさらに好ましくは 1.0 mL 以下であり、例えば、 0.01 mL

以上 100 mL 以下の範囲である。

[0085] 錯体形成反応の反応液中のキレート剤の濃度は、目的とするキレート剤の収率の観点から、それぞれ独立して、工程（A）の開始時において、下限は、好ましくは $0.001 \mu\text{mol/L}$ 以上、より好ましくは $0.01 \mu\text{mol/L}$ 以上、さらに好ましくは $0.1 \mu\text{mol/L}$ 以上、より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 以上であり、上限は、好ましくは $1000 \mu\text{mol/L}$ 以下、より好ましくは $100 \mu\text{mol/L}$ 以下、さらに好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ 以下であり、例えば、 $1 \mu\text{mol/L}$ 以上 $100 \mu\text{mol/L}$ 以下の範囲が挙げられる。

[0086] 錯体形成反応の温度としては、例えば室温（ 25°C ）であってもよく、加熱条件下であってもよいが、キレート剤の分解抑制と錯体の形成効率向上とを両立する観点から、下限は、好ましくは 20°C 以上、より好ましくは 30°C 以上、さらに好ましくは 35°C 以上、よりさらに好ましくは 37°C 以上、特に好ましくは 45°C 以上であり、上限は、好ましくは 150°C 以下、より好ましくは 120°C 以下、さらに好ましくは 100°C 以下、よりさらに好ましくは 90°C 以下であり、例えば、 30°C 以上 100°C 以下の範囲が好ましく、より好ましくは 35°C 以上 90°C 以下の範囲である。

[0087] 工程（B）で使用される抗体は、前述した式（i）で示す抗体修飾ペプチドと、クリック反応可能な第2の原子団とを有する抗体修飾リンカー（ L_2 ）を用いて、上記「（1-2）抗体」の項で詳述した抗EGFR抗体のFc領域（定常領域）が部位特異的に修飾されたペプチド修飾抗体である。

[0088] 抗体修飾ペプチドは、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸を問わないアミノ酸を組み合わせ用いて、例えば液相合成法、固相合成法、自動ペプチド合成法、遺伝子組み換え法及びファージディスプレイ法等のペプチド合成法に供することによって製造することができる。ペプチドの合成にあたり、必要に応じて、用いられるアミノ酸の官能基の保護を行ってもよい。これらは、例えば、国際公開第2017/217347号及び国際公開第2018/230257号に記載の方法に準じて行うことができる。

[0089] 抗体修飾リンカー (L_2) は、抗体修飾ペプチドと、以下の式 (S 1) で表されるリンカー (L_2) とが結合したものであってもよい。



(式中、*は、ペプチドのN末端又はC末端との結合部位を示し、

L_i は、ポリエチレングリコール (PEG) リンカー部であり、

m は、1以上50以下の整数であり、

Z は、(L_i) $_m$ と L_{ii} とを結合する第2リンカー部であり、

k は、0又は1であり、

L_{ii} は、第2のPEGリンカー部であり、

$AG2$ は第2原子団である。)

[0090] 前記式 (S 1) において、 Z の構造は、(L_i) $_m$ と L_{ii} とを互いに結合するリンカー構造であれば特に限定されないが、例えば1以上5以下のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むことができる。この場合、 Z に含まれるアミノ酸配列は、システイン残基を含むことが好ましく、システイン残基のチオール基とマレイミド基との結合により形成されたチオエーテル基を介して L_2 と結合していることがより好ましい。

[0091] 本発明において、 L_{ii} を構成するポリエチレングリコール (PEG) リンカー部は、以下の式 (P 2) に示す構造を有していることが好ましい。式 (P 2) 中、 n は整数であり、好ましくは1以上50以下、より好ましくは1以上20以下、さらに好ましくは2以上10以下、一層好ましくは2以上6以下である。

[0092] [化16]



[0093] PEGリンカー部の構造の一端は、市販されているPEG化試薬に由来する構造又はPEG化する際に通常用いられる試薬に由来する構造によって修

飾されていてもよく、特に限定されないが、例えばジグリコール酸又はその誘導体、マレイミド又はその誘導体に由来する構造が例示される。

[0094] 抗体修飾リンカー (L_2) への前記第2原子団への導入方法は、上述の方法によって所望のアミノ酸配列を有する抗体修飾ペプチドを得た後、該ペプチドを、溶解補助剤及び還元剤、並びに必要なに応じて酸を加えた溶液に溶解し、該溶液に第2原子団として、アジド基又は *trans*-シクロオクテン (TCO) を含む原子団の有機溶媒溶液を添加し、室温で攪拌することにより導入する方法が挙げられる。

[0095] 第2原子団としてアジド基を含む原子団を導入する場合には、市販のアジド基導入試薬を用いて、常法に従い、ペプチドのN末端又はC末端に直接アジド基を導入するか、又は上述したリンカー構造を介してアジド基を含む原子団を導入することができる。用いられるアジド基導入試薬としては例えば、シリルアジド、リン酸アジド、アルキルアンモニウムアジド、無機アジド、スルホニルアジド、又はPEGアジド等が挙げられる。

[0096] また、第2原子団としてTCOを含む原子団を導入する場合には、TCOを含む市販のクリックケミストリー用試薬を用いて、常法に従い、ペプチドのN末端又はC末端に直接TCOを導入するか、又は上述したリンカー構造を介してTCOを含む原子団を導入することができる。

[0097] 抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体とを結合させて、ペプチド修飾抗体を得る方法は、国際公開第2017/217347号の記載に準じて、例えば、上述した抗体修飾ペプチドと、抗EGFR抗体と、架橋剤と、必要なに応じて触媒とを、適切な緩衝液中に分散させて行うことができる。ここで、架橋剤は上述のものをを用いることができる。また、抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体とを結合させる際に、必要なに応じて抗EGFR抗体を含む溶液を、限外ろ過フィルター等で処理して緩衝液に分散させる緩衝液置換を1回又は2回以上実施してから、抗体修飾ペプチドと結合させてもよい。

[0098] 一態様において、本開示は、架橋剤で修飾されている抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体を混合する工程を含む、抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体

の複合体を生産する方法に関する。本工程により、架橋剤で修飾されている抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体の間で架橋反応が生じ得る。架橋反応は、例えば、セツキシマブでは、抗体修飾ペプチドの上記Xaa2のアミノ酸残基と、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys 248残基又はLys 250残基、好ましくはLys 250残基との間で部位特異的に生じ得、例えばパニツムマブでは、抗体修飾ペプチドの上記Xaa2のアミノ酸残基と、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys 244残基又はLys 246残基、好ましくはLys 246残基との間で部位特異的に生じ得る。

[0099] 該混合工程の条件は、抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体の間で架橋反応が生じる条件で行うものであれば特に限定しない。例えば、抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体を、適当なバッファー中において、室温（例えば約15℃～30℃）で混合することにより反応を行うことができる。該混合工程は、必要に応じて架橋反応を促進する触媒を適量加えて行ってもよい。

[0100] 一例として、少なくとも水を含む溶媒を加えて、抗EGFR抗体を溶解する。この溶媒は、水以外には、例えば、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、生理食塩水、又は、酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、Tris緩衝液、HEPES緩衝液、テトラメチルアンモニウム酢酸緩衝液若しくはヒスチジン緩衝液等の緩衝液等が挙げられる。緩衝液を用いる場合、抗体の安定性の観点から、25℃におけるpHを好ましくは4.0以上10.0以下、より好ましくは5.5以上8.5以下とする。抗体の濃度は、架橋反応の開始時において、好ましくは、下限を1.0 μmol/L以上、上限を1000 μmol/L以下とし、上限についてより好ましくは500 μmol/L以下とすることが好ましい。

[0101] 次いで、架橋剤により修飾された抗体修飾ペプチドと必要に応じて触媒を加え、10℃以上30℃以下で分散させて行うことができる。

該混合工程における抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体の混合比率は、特

に限定しない。抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体のモル比率は、例えば1 : 1 ~ 20 : 1、好ましくは2 : 1 ~ 20 : 1又は5 : 1 ~ 10 : 1とすることができる。

[0102] ある好ましい態様では、上記混合工程においては、抗EGFR抗体に対して抗体修飾ペプチド（モル比）は、0.5 ~ 2.2、好ましくは0.8 ~ 1.8で混合することができる。このようにすることで、抗EGFR抗体1分子に対して抗体修飾ペプチド1分子が結合した抗体（以下、「一価抗体」という）を効率よく得ることができる。

[0103] 該混合工程における混合時間（反応時間）は、抗体修飾ペプチドと抗EGFR抗体の間で架橋反応が生じる限り限定するものではないが、例えば、1分 ~ 5時間、好ましくは10分 ~ 2時間とすることができる。

[0104] 以上の工程を経て得られるペプチド修飾抗体は、抗EGFR抗体1分子に対して抗体修飾ペプチド1分子が結合した抗体（すなわち、一価抗体）と、抗EGFR抗体1分子に対して抗体修飾ペプチド2分子が結合した抗体（以下、「二価抗体」という）とを任意の割合で含有する混合物であるが、これをそのまま以後の工程に供してもよく、ろ過フィルター、メンブランフィルター、種々の充填剤を充填したカラム、各種クロマトグラフィー等の方法で、未修飾抗体と、一価抗体と、二価抗体とを分離精製したあとでいずれかの価数の抗体のみを以後の工程に供してもよい。精製の結果、未修飾抗体と他の価数の抗体との分離ができない場合には、これらを含有する混合物として以降の工程に供してもよい。

未修飾抗体と、一価抗体と、二価抗体とを分離精製する場合は、上記のいずれの精製方法で分離精製してもよいが、種々の充填剤を充填したカラムを用いることができ、例えば、プロテインA、プロテインG又は上述の抗体修飾ペプチド等のタンパク質が担体に結合した充填剤が充填されたカラムを用いることができる。このようなカラムに充填される充填剤の担体の形状としては、ゲル（例えばカラム用ゲル）、粒子、ビーズ、ナノ粒子、微粒子及びマクロビーズなどの形状が挙げられ、担体の材質としては、磁性物質、ラテ

ックス、アガロース、ガラス、セルロース、セファロース、ニトロセルロース、ポリスチレン、その他の高分子材料が挙げられる。具体的には上述の抗体修飾ペプチドを、カラム用ゲルに結合させたIgG-BPカラムが例示できる（国際公開第2021/080008号）。

[0105] IgG-BPカラムは、IgG結合ペプチドを固相化したカラムである。二価抗体は、結合部位がすでにIgG結合ペプチドで占有されているために当該カラムには結合し得ず、一価抗体のみが当該カラムに対して親和性を示す。このIgG-BPカラムを用いて、抗体修飾ペプチドに対するそれぞれの相互作用の違いを利用して、未修飾抗体および一価抗体を相対的に多く含む第一の抗体組成物と、二価抗体を相対的に多く含む第二の抗体組成物とをそれぞれ分離精製することができる。ある好ましい態様では、第一の抗体組成物において、未修飾抗体と一価抗体とのモル比が4～47：53～96、好ましくは4～30：70～96、より好ましくは4～20：80～96、さらに好ましくは、4～10：90～96である。

[0106] このようにして、分離精製した第一の抗体組成物又は第二の抗体組成物は、そのまま以降の工程（B）におけるクリック反応に用いてもよく、含有するペプチド修飾抗体のタンパク質濃度を調節してから工程（B）におけるクリック反応に用いてもよい。

[0107] 工程（B）におけるクリック反応は、キレート剤が有するクリック反応可能な第一原子団と、ペプチド修飾抗体が有するクリック反応可能な第二原子団との間で実行されるものである。かかるクリック反応によりキレート剤と抗体とを連結する結合基（抗体との複合化を可能とする置換基）が形成される。

[0108] ペプチド修飾抗体と工程（A）で得られた錯体とがクリック反応可能であれば、これらの添加順序は問わず、例えば、溶媒を収容した反応容器に、該錯体及び該ペプチド修飾抗体の一方を添加し、次いで他方を添加して反応させてもよく、該キレート剤及び該抗体の一方を溶媒に分散した分散液に他方を添加して反応させてもよい。あるいは、溶媒を収容した反応容器に、これ

らを同時に添加して反応させてもよい。

- [0109] 工程（B）のクリック反応に用いられる溶媒としては、水を含む溶媒を用いることができ、例えば、水、生理食塩水、又は酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、T r i s 緩衝液、H E P E S 緩衝液、若しくはテトラメチルアンモニウム酢酸緩衝液等の緩衝液等を用いることができる。緩衝液を用いる場合、錯体及び抗体の安定性と、これらの結合効率とを両立する観点から、25℃におけるpHを好ましくは4.0以上10.0以下、更に好ましくは5.5以上8.5以下とする。
- [0110] 反応液量は、特に限定されないが、製造工程における実用性の観点から、工程（B）の開始時において、下限は、0.001mL以上が好ましく、0.01mL以上がより好ましく、0.1mL以上がさらに好ましく、1mL以上がよりさらに好ましく、上限は、1000mL以下が好ましく、100mL以下がより好ましく、10mL以下がさらに好ましく、1mL以下がよりさらに好ましく、例えば0.001mL以上1000mL以下の範囲が好ましく、0.1mL以上10mL以下の範囲がより好ましい。
- [0111] また、キレート剤及び抗体の反応液中の濃度は、それぞれ独立して、工程（B）の開始時において、下限として、0.001μmol/L以上が好ましく、0.01μmol/L以上がより好ましく、0.1μmol/L以上がさらに好ましく、1.0μmol/L以上がよりさらに好ましく、上限として、1000μmol/L以下が好ましく、100μmol/L以下がより好ましく、例えば、0.1μmol/L以上1000μmol/L以下の範囲が好ましく、1μmol/L以上100μmol/L以下の範囲であることが、目的とする複合体の収量の観点からより好ましい。
- [0112] 抗体の意図しない変性を防ぎつつ、反応効率を高める観点から、工程（B）におけるクリック反応は、反応温度の上限は、50℃以下が好ましく、40℃以下がより好ましい。また、反応温度の下限は、反応が進行する温度であれば特に制限はないが、15℃以上が好ましい。クリック反応の反応時間

は、上述の反応温度であることを条件として、好ましくは5分以上、より好ましくは10分以上であり、24時間以下が好ましく、より好ましくは20時間以下であり、例えば、5分以上24時間以下の範囲が好ましく、より好ましくは10分以上20時間以下の範囲である。

[0113] 得られた複合体は、これをそのまま用いてもよく、あるいは、ろ過フィルター、メンブランフィルター、種々の充填剤を充填したカラム、クロマトグラフィー等を用いて精製してもよい。

[0114] 工程（A）及び（B）によって製造される複合体は、抗EGFR抗体のFc領域のリシン残基がキレート剤により特異的に修飾されたものである。この複合体は、該抗体1分子に対し、前記キレート剤を1分子又は2分子備える。キレート剤は、リンカー（L）を介して、本発明の抗体のFc領域を部位特異的に修飾している。該リンカー（L）は、キレート剤に接続するキレートリンカー（L₂）、該リンカー（L₂）に接続する第1原子団、第1原子団とクリック反応し得る第2原子団、第2原子団に接続する抗体修飾リンカー（L₁）（上記式（i）で表される抗体修飾ペプチドを含む）で構成される。従って、該リンカー（L）は、第1原子団と第2原子団とに由来する化学構造を有する。このような化学構造としては、前述の式（10a）又は（10b）で表されるトリアゾール骨格含有構造又は前述の式（10c）で表されるピリダジン骨格含有構造が考えられる。式（10a）と式（10b）は異性体の関係にあるため任意の割合で含まれていてもよい。

[0115] （1-7）放射性医薬（放射性医薬（1））

放射性医薬とは、本発明の放射性複合体を含み、対象の生体内への投与に適した形態となっている組成物を指す。放射性医薬は、例えば上述の（1-6）に示す方法で製造した放射性複合体をそのまま、又はこれを精製したあとで、水を主体とし、且つ生体と等張の溶媒に溶解させて製造することができる。この場合、放射性医薬は水溶液の形態であることが好ましく、必要に応じて、薬学的に許容される他の成分を含んでいてもよい。放射性医薬は、その有効量が、経口的に、又は静脈内、皮下、腹腔内若しくは筋肉内等の

非経口的に生体に投与され、がんの治療、がんの診断、あるいは病巣の検出等に用いられる。

ここで投与対象としてはヒト、またはマウス、ラット、サル、モルモット、チンパンジー、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシもしくはウマなどの動物であるが、特に限定されるものではない。好ましくはヒトである。

好ましい対象疾患としてEGFRが過剰発現しているがんが挙げられる。本発明で治療、診断若しくは検出されるEGFRが過剰発現しているがんは、EGFRを過剰発現していればその種類は特に限定されないが、例えば、結腸・直腸癌（特に、RAS遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発性の癌）、頭頸部癌を挙げることができる。また、EGFRが過剰発現しているがんは、いかなる病期のがんであってもよく、限局性若しくは転移性、又は原発性若しくは再発性のいずれであってもよい。ここで「過剰発現」とは、公知の検査手法で測定した場合に腫瘍組織におけるEGFR遺伝子が非腫瘍組織に比べて有意な増幅又はEGFRタンパク質の発現が非腫瘍組織に比べて有意な亢進が観察される状態をいう。

ここでの「有効量」とは、投与対象における診断上または治療上有効な効果を得ることができる量である。対象に投与すべき有効量は、対象の種類、対象の体重、投与する剤形（錠剤、注射剤など）および経路（経口投与、非経口投与など）、および疾患（例、がん）の重篤度などにより異なる。医師や獣医師はそれらの因子を考慮して、適切な有効量を決定することができる。

[0116] 本発明の放射性医薬は、室温で保管したとき、その放射性医薬を構成する放射性金属核種の半減期を基準として、半減期の1以上5以下の倍数の期間経過時点において、一定の割合以上の放射化学的純度を有する。上記の放射性金属核種が β 線核種（例えば、 $Lu-177$ 又は $Y-90$ ）であるとき、好ましくは、室温で製造終了から7日間保管した時の複合体の放射化学的純度が90%以上であり、より好ましくは93%以上である。また、放射性金属核種が α 線核種（例えば、 $Ac-225$ ）であるときに、好ましくは、室

温で製造終了から14日間保管した時の複合体の放射化学的純度が90%以上であり、より好ましくは94%以上である。ここで本明細書における「室温」とは、好ましくは日本薬局方で定義される「常温」をいい、具体的には15～25℃である。

ここで、放射化学的純度は、試料を市販の放射線検出器で分析した場合に検出された全放射能（カウント）に対する、複合体に相当するピークの放射能（カウント）の百分率をいう。放射化学的純度の分析には高速液体クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーを用いることができるが、薄層クロマトグラフィーを用いることが好ましい。より好ましくは後述する実施例に記載の条件を用いた薄層クロマトグラフィーを用いる。

前述のとおり、本発明の放射性医薬は、水溶液の形態であることが好ましいが、上記の通り放射化学的純度を維持する観点から緩衝液の形態がより好ましい。緩衝液としては、抗EGFR抗体または抗EGFR抗体のADCを有効成分として含有する抗体医薬で使用されている任意の緩衝液を用いることができ、特に限定されない一例として、クエン酸緩衝液または酢酸緩衝液を使用することができる。クエン酸緩衝液は、クエン酸とその塩から構成され、例えば、クエン酸とそのナトリウム塩から構成することができる。酢酸緩衝液は、酢酸とその塩から構成され、例えば、酢酸とそのナトリウム塩から構成することができる。本発明の放射性医薬には、グリシンなどの任意のアミノ酸を含んでもよいし、ポリソルベート80などの可溶化剤を含んでもよい。

[0117] 放射性金属核種として治療効果を有するもの、具体的には、 α 線を放出する放射性核種又は β 線を放出する核種（好ましくは、Ac-225、Y-90、Lu-177であり、より好ましくはAc-225）を選択することにより、本発明の放射性医薬は、がんの放射線内用療法に用いることができる。この放射線内用療法では、本発明の放射性医薬を静注や経口で投与し、がん原発巣や転移巣のような病巣部位に本発明の放射性複合体を集積させ、放射性金属核種から放出される放射線により、病巣部位のがん細胞を破壊する

ことができる。本発明の放射性医薬の投与量、用量は、有効成分の有効性、投与の形態・経路、がんの進行ステージ、患者の体型・体重・年齢、併用する他の疾患の治療薬の種類や量に応じ、適宜選択される。

[0118] また、放射性金属核種として、ポジトロンを放出する放射性核種や γ 線を放出する放射性核種（好ましくは、Ga-68、Zr-89、In-111、より好ましくは、Zr-89）を選択することで、がんの診断又は病巣の検出に用いることができる。ポジトロンを放出する放射性核種が用いられた放射性医薬の場合、PET（Positron Emission Tomography）検査に好適に用いることができ、 γ 線を放出する放射性核種が用いられた放射性医薬の場合、SPECT（Single Photon Emission Computed Tomography）検査に好適に用いることができる。これを上述したがんの放射線内用療法におけるがんの診断又は病巣の検出に併用してもよい。本発明のがんの診断用放射性医薬は、がんの放射線内用療法を行う前の診断に用いてもよいし、がんの放射線内用療法を行った後の診断に用いてもよい。がんの放射線内用療法を行う前の診断に用いられることによって、 α 線を放出する金属核種を備えた本発明の放射性医薬を用いたがんの放射線内用療法を実行するかどうかの治療選択の判断に用いることができる。また、がんの放射線内用療法を行った後の診断に用いられることによって、本発明の放射性医薬を用いたがんの放射線内用療法の効果があるかどうかの判定や投与量の増減などの治療計画の適正化に用いることができる。

[0119] （２）放射性医薬（放射性医薬（２））

本発明の他の態様は、放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し、抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まず、室温で保管したとき、その放射性医薬を構成する放射性金属核種の半減期を基準として、半減期の１以上５以下の倍数の期間経過時点において、一定の割合以上の放射化学的純度を有する。上記の放射性金属核種が β 線核種（例えば、Lu-177又はY-90）であるとき、好ましくは、室温で製造終了から７日間保管した時の前記複

合体の放射化学的純度が90%以上であり、より好ましくは93%以上である。また、放射性金属核種が α 線核種（例えば、Ac-225）であるときに、好ましくは、室温で製造終了から14日間保管した時の複合体の放射化学的純度が90%以上であり、より好ましくは94%以上である。室温の定義は上述の放射性医薬（1）と同様である。

放射性医薬（2）では、キレート剤と、抗EGFR抗体との複合化において、ペプチドを用いた部位特異的修飾の方法に加えて、以下（a）から（d）の方法も使用することができるが、これ以外は、放射性医薬（1）と同様であるため、説明を省略する。

（a）抗体のヒンジ部位にあるポリペプチド鎖間のジスルフィド結合（SS結合）を部分的に還元することによって生じるスルフヒドリル（SH）基に対して、SH基に反応性を有するマレイミド基を持つキレート剤またはリンカー（L）で修飾する方法

（b）遺伝子工学によるアミノ酸変異によって、抗体に新たに導入されたシステインに対してマレイミド基をもつキレート剤またはリンカー（L）を修飾する方法

（c）遺伝子工学によるアミノ酸変異によって、抗体に新たに導入されたアジド化リシンのアジド基に、クリック反応を利用して、アルキン（例えばDibenzocyclooctyne: DBCO）をもつキレート剤またはリンカー（L）を修飾する方法

（d）トランスグルタミナーゼを利用して、抗体の特定の位置に導入されたグルタミンに、リシンの側鎖を有するキレート剤またはリンカー（L）を修飾する方法

[0120] 本発明では、抗EGFR抗体を部位特異的に修飾するペプチドとキレート剤とをチオウレア結合を使用せずに連結させているので、室温においても安定な放射性複合体および放射性医薬とすることができる。抗体の部位特異的修飾は、ランダム修飾とは異なり、一価抗体もしくは二価抗体又はこれらの両方を任意の割合で含むようにできるので、安定した品質の放射性複合体お

よび放射性医薬となる。また、本発明の放射性複合体は、従来と同等な薬効を維持している。したがって、本発明によれば、薬効を維持しつつ、より品質の優れた抗E G F R抗体の複合体及びその放射性医薬を提供することができる。

[0121] 以下の態様も本発明の技術的思想に包含される。

[1] ペプチドで部位特異的に修飾された抗E G F R抗体とキレート剤との複合体であって、

前記キレート剤に放射性金属核種がキレート化しており、

前記ペプチドとキレート剤とがリンカー（L）を介して連結しており、前記リンカー（L）はチオウレア結合を含まない、複合体。

[2] 前記キレート剤がDOTAGA（ α -(2-Carboxyethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid）である、[1]に記載の複合体。

[3] 前記ペプチドが、下記の式（i）：

$(Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd) \cdots (i)$

（式（i）中、X a、X b、X c及びX dは、それぞれ、連続するa個のX、連続するb個のX、連続するc個のX、及び連続するd個のXを表し、Xは、側鎖にチオール基及びハロアセチル基のいずれも有しないアミノ酸残基であり、

a、b、c及びdはそれぞれ独立に1以上5以下の整数で、かつ $a + b + c + d \leq 14$ を満たし

X a a 1及びX a a 3は、それぞれ独立に、

側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を表し、ただし、X a a 1及びX a a 3のいずれか一方がチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、

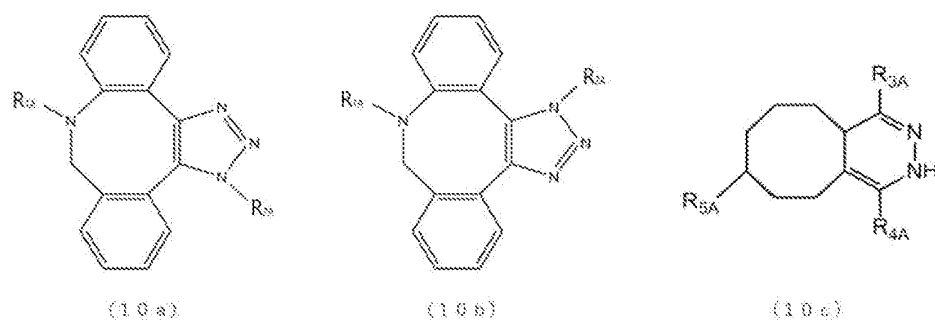
X a a 1及びX a a 3が連結することで、環構造が形成されており、

X a a 2 は、リシン残基、アルギニン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸であり、かつX a a 2 が架橋剤で修飾されている。)で表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である、[1]又は[2]に記載の複合体。

[4] 前記放射性金属核種がAc-225、Y-90、Lu-177又はZr-89である、[1]乃至[3]いずれか一項に記載の複合体。

[5] 前記リンカー(L)が式(10a)、式(10b)又は式(10c)を含む、[1]乃至[4]いずれか一項に記載の複合体。

[0122] [化17]

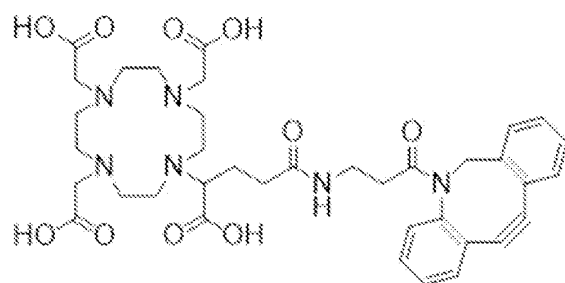


[0123] (式(10a)及び式(10b)中、R_{1a}は前記キレート剤との連結部位を示し、R_{2a}は前記ペプチドとの連結部位を示す。式(10c)中、R_{3a}及びR_{4a}のうち一方は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示し、他方は前記キレート剤との連結部位を示し、R_{5a}は前記ペプチドとの連結部位を示す。)

[6] 前記ペプチドとの連結部位と前記ペプチドとの間に、ポリエチレングリコール基を含む、[5]に記載の複合体。

[7] N末端にアジド基が導入された前記ペプチドが部位特異的に修飾している抗EGFR抗体と、下記式で表されるDOTAGA-DBCOの放射性金属錯体とをクリック反応させることで複合化した、[1]乃至[6]いずれか一項に記載の複合体。

[0124] [化18]



DOTAGA-DBCO

[0125] [8] 前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブである、[1] 乃至 [7] いずれか一項に記載の複合体。

[9] 前記抗 E G F R 抗体がパニツムマブである、[1] 乃至 [7] いずれか一項に記載の複合体。

[1 0] [1] 乃至 [9] いずれか一項に記載の複合体を有効成分として含有する放射性医薬。

[1 1] がんの放射線内用療法に用いられる、[1 0] に記載の放射性医薬。

[1 2] がんの診断に用いられる、[1 0] に記載の放射性医薬。

[1 3] [1 1] に記載された放射性医薬を用いたがんの放射線内用療法に併用される、[1 2] に記載の放射性医薬。

[1 4] 放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗 E G F R 抗体との複合体を有効成分として含有し

抗 E G F R 抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まず、
室温で 7 日間保管した時の前記複合体の放射化学的純度が 9 0 % 以上である、放射性医薬。

[1 5] 前記複合体が [1] 乃至 [9] いずれか一項に記載の複合体である、[1 4] に記載の放射性医薬。

[1 6] がんの放射線内用療法に用いられる、[1 5] に記載の放射性医薬。

〔17〕がんの診断に用いられる、〔15〕に記載の放射性医薬。

〔18〕〔16〕に記載された放射性医薬を用いたがんの放射線内用療法に併用される、〔17〕に記載の放射性医薬。

〔19〕放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し

抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まない、下記（1）または（2）の条件を満たす放射性医薬：

（1）前記放射性金属核種が ^{177}Lu 又は ^{90}Y であって、室温で7日間保管した時の前記複合体の放射化学的純度が90%以上である。

（2）前記放射性金属核種が ^{225}Ac であって、室温で14日間保管した時の前記複合体の放射化学的純度が90%以上である。

〔20〕放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し

抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まず、

前記放射性金属核種の半減期を基準として、前記半減期の1以上5以下の倍数の期間経過時点において、前記複合体の放射化学的純度が90%以上である放射性医薬。

実施例

[0126] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。しかしながら本発明の範囲は、かかる実施例に制限されない。以下の表中、「－」欄は、実施していないことを示す。

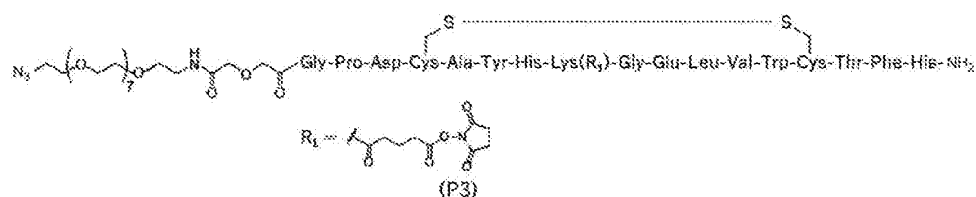
[0127] [実施例1] ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

（1．抗体修飾工程）

国際公開第2017/217347号に記載の方法で、下記式（P3）（配列番号19）で表される17個のアミノ酸残基を含むペプチドを得た。このペプチドのアミノ酸配列は、配列番号（2）のXaa2がリシン残基である配列と同一であり、リシン残基の側鎖末端アミノ基がR₁で示される構造で

修飾されていた。また、2つのシステイン残基で互いにジスルフィド結合しており、ペプチドのN末端はジグリコール酸及び8つのPEGを有するリンカー（L₁）構造を介して、第2原子団であるアジド基を含む原子団として、エチルアジドが結合しているものであった。

[0128] [化19]



[0129] （式（P3）中、Glyはグリシンを、Proはプロリンを、Aspはアスパラギン酸を、Cysはシステインを、Alaはアラニン、Tyrはチロシンを、Hisはヒスチジンを、Lysはリシンを、Gluはグルタミン酸を、Leuはロイシンを、Valはバリンを、Trpはトリプトファンを、Thrはスレオニンを、Pheはフェニルアラニンをそれぞれ示す。）

[0130] セツキシマブ（メルク社製）を含有する溶液を0.02mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-15）を用いて緩衝液置換を行った。この操作を2回繰り返した。

上述のペプチドと、緩衝液置換したセツキシマブとを、0.02mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に混合した混合液を、室温で30分間反応させて、ペプチド修飾抗体を含む溶液を得た。このペプチド修飾抗体は、上記のペプチドによって抗体のFc領域が部位特異的に修飾されたものである。

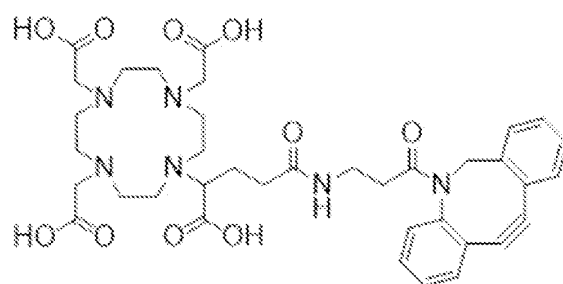
[0131] 次に、IgG-BPカラムに通液して、未標識抗体及び一価抗体を相対的に多く含む第一の抗体組成物を得た。回収した画分に含まれる一価抗体の濃度が15mg/mLになるように0.1mol/L塩化ナトリウム及び0.1mol/Lグリシン含有0.01mol/Lクエン酸緩衝液（pH5.5）で濃度を調整した。得られた第一の抗体組成物を含む溶液を後述の標識

工程に供した。

[0132] (2. 錯体形成工程)

下記式で表されるDOTAGA-DBCOをBernhard et al. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents. Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841に記載の方法を基にして製造した。このキレート剤を、溶媒として0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に分散させて、キレート剤を1.7 mmol/L含む分散液とした。この分散液0.01 mLと、0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0) 0.15 mLと、放射性金属源として ^{225}Ac イオン含有溶液(0.2 mol/L塩酸水溶液、放射能濃度358 MBq/mL、Oak Ridge National Laboratory製より調製、液量0.01 mL)約3.6 MBq(検定日時放射エネルギーから減衰計算した計算値)とを混合した反応液を、加熱条件下で反応させて、 ^{225}Ac 錯体溶液を得た。キレート剤と放射性金属イオンとのモル比率は、キレート剤： ^{225}Ac イオン=約2290：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は30分間とした。

[0133] [化20]



DOTAGA-DBCO

[0134] 得られた ^{225}Ac 錯体の放射化学的純度(RCP)を次の方法で測定した。

すなわち、 ^{225}Ac 錯体溶液の一部を薄層クロマトグラフィー(Agilent

t 社製、型番：SG10001、展開溶媒：アセトニトリル／水混合液（体積比1：1））で展開し、その後、ラジオγ-TLCアナライザー（raytest社製、MODEL GITA Star）で測定した。検出された全放射能（カウント）に対する、原点付近に検出されたピークの放射能（カウント）の百分率を ^{225}Ac 錯体のRCP（％）とした。その結果、 ^{225}Ac 錯体のRCPは91％であった。得られた ^{225}Ac 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0135] （3．標識工程）

上述の工程（2）を経て得られた未精製のままの ^{225}Ac 錯体の溶液に、上記の工程（1）で得られたペプチド修飾抗体（一価抗体）を含む溶液を添加し、37℃で120分間クリック反応させて、 ^{225}Ac 錯体標識抗体を得た。 ^{225}Ac 錯体の量及びペプチド修飾抗体（一価抗体）の量はそれぞれ17 nmol及び20 nmolであり、DBCO基とアジド基とのモル比はそれぞれ約1：1.2であった。未精製時の ^{225}Ac 錯体標識抗体の反応率（％）を以下の表1に示す。ここで、反応率（％）とは、錯体形成工程での標識率（％）に対する ^{225}Ac 錯体標識抗体のRCPを意味し、標識率（％）とは仕込み放射エネルギーに対する ^{225}Ac 錯体の放射エネルギーの割合（％）を意味する。

更に、37℃で2時間反応させて得られた ^{225}Ac 錯体標識抗体の溶液を限外ろ過フィルター（Merck社製、型番：UFC505096）を用いて精製した。精製後の ^{225}Ac 錯体標識抗体のRCP及び放射化学的収率（RCY）を以下の表1に示す。

[0136] ^{225}Ac 錯体標識抗体のRCP及びRCYの測定方法は以下のとおりとした。すなわち、薄層クロマトグラフィー（Agilent社製、型番：SG10001、展開溶媒はアセトニトリル：0.1 mmol/L EDTA溶液の混液（体積比1：1））をラジオγ-TLCアナライザー（raytest社製、MODEL GITA Star）で測定し、検出された全放射能（カウント）に対する、原点付近に検出されたピークの放射能（カウント）の百分率をRCP（％）とした。また、標識工程開始時に加えた全放射能（γ

線スペクトロメーター（Ge半導体検出器：GMX10P4-70（ORTEC社製）、マルチチャンネルアナライザ：M7-000（セイコー・イージーアンドジー社製）、データ処理：Spectrum Navigator：DS-P300（セイコー・イージーアンドジー社製）及びGamma Studio：DS-P600（セイコー・イージーアンドジー社製））で測定したカウントから計算した放射能量）に対して、限外ろ過精製後に回収した放射能（上述と同様に、γ線スペクトロメーターで測定したカウントから計算した放射能量）の百分率をRCY（%）とした。

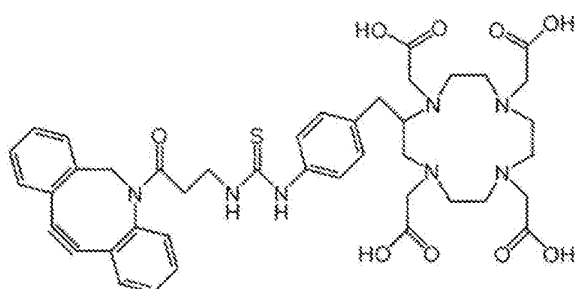
[0137] [表1]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
実施例 1	DOT AGA	セツキ シマブ	1 : 1, 2	89%	98%	74%

[0138] [比較例1] ^{225}Ac 標識DOTA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

DOTAGA-DBCOを下記DOTA-DBCOに変えた以外は、実施例1に準じて操作を行った。結果を表2に示した。

[0139] [化21]



DOTA-DBCO

[0140]

[表2]

	キレート 剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
比較例 1	DOTA	セツキ シマブ	1 : 1	66%	99%	62%

[0141] [実施例2] ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

(1. 錯体形成工程)

DOTAGA-DBCOを、溶媒として0.195mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)に分散させて、キレート剤を0.3mmol/L含む分散液とした。この分散液0.0375mLと、放射性金属源として ^{89}Zr イオン含有溶液(0.1mol/L塩酸水溶液、放射能濃度5.2GBq/mL、日本メジフィジックス株式会社製より調製、液量0.0375mL)195MBqとを混合した反応液を、加熱条件下で反応させて、 ^{89}Zr 錯体溶液を得た。キレート剤と放射性金属イオンとのモル比率は、キレート剤： ^{89}Zr イオン=約85：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は60分間とした。

[0142] 得られた ^{89}Zr 錯体のRCPを、次の方法で測定した。すなわち、 ^{89}Zr 錯体溶液の一部を薄層クロマトグラフィー(Agilent社製、型番：SG10001、展開溶媒：アセトニトリル/水混合液(体積比1：1))で展開し、その後、ラジオγ-TLCアナライザー(raytest社製、MODEL GITA Star PS)で測定した。検出された全放射能(カウント)に対する、原点付近に検出されたピークの放射能(カウント)の百分率を ^{89}Zr 錯体のRCP(%)とした。その結果、 ^{89}Zr 錯体のRCPは96%であった。得られた ^{89}Zr 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0143] (2. 標識工程)

上述の工程（１）を経て得られた未精製のまゝの⁸⁹Zr錯体の溶液と、実施例１と同様にして得られたペプチド修飾抗体（一価抗体）を含む溶液とを、未精製のまゝそれぞれ0.1mol/L塩化ナトリウム及び0.1mol/Lグリシン含有0.01mol/Lクエン酸緩衝液（pH5.5）に添加し、37℃で90分間クリック反応させて、実施例２の⁸⁹Zr錯体標識抗体を得た。⁸⁹Zr錯体の量及びペプチド修飾抗体（一価抗体）の量はそれぞれ11.3nmol及び12nmolであり、DBCOとアジドとのモル比はそれぞれ約1：1.1であった。未精製時の実施例の⁸⁹Zr錯体標識抗体の反応率（％）を以下の表３に示す。ここで、反応率（％）とは、錯体形成工程での標識率（％）に対する⁸⁹Zr錯体標識抗体のRCPを意味し、標識率（％）とは仕込み放射エネルギーに対する⁸⁹Zr錯体の放射エネルギー（％）を意味する。

更に、37℃で2時間反応させて得られた⁸⁹Zr錯体標識抗体の溶液を限外ろ過フィルター（Merck社製、型番：UFC505096）を用いて精製した。精製後の⁸⁹Zr錯体標識抗体のRCP及びRCYを以下の表３に示す。

[0144] ⁸⁹Zr錯体標識抗体のRCP及びRCYの測定方法は、実施例１と同様に行った。

[0145] [表3]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
実施例 2	DOT AGA	セツキ シマブ	1 : 1.1	70%	97%	55%

[0146] [比較例２] ⁸⁹Zr標識DOTA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

DOTAGA-DBCOをDOTA-DBCOに変えた以外は、実施例２に準じて操作を行った。結果を表４に示した。

[0147] [表4]

	キレート 剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
比較例 2	DOTA	セツキ シマブ	1 : 1.1	56%	93%	38%

[0148] [実施例3] ^{177}Lu 標識DOTAGA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

(1. 抗体修飾工程)

実施例1での抗体修飾工程に記載の方法と同様に行った。

[0149] (2. 錯体形成工程)

DOTAGA-DBCOの製造方法は実施例1と同様に行った。このキレート剤を、溶媒として0.156 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に分散させて、キレート剤を0.45 mmol/L 含む分散液とした。この分散液0.015 mLと、0.225 mmol/L のゲンチジン酸を溶解した0.156 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 0.015 mLと、放射性金属源として ^{177}Lu イオン含有溶液 (0.04 mol/L 塩酸水溶液、放射能濃度3.4 GBq/mL, POLATOM製より調製、液量0.0375 mL) 127 MBqとを混合した反応液を、加熱条件下で反応させて、 ^{177}Lu 錯体溶液を得た。キレート剤と放射性金属イオンとのモル比率は、キレート剤： ^{177}Lu イオン=約38：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は5分間とした。

[0150] 得られた ^{177}Lu 錯体のRCPを実施例1の放射性複合体のRCP測定と同様に行った。その結果、 ^{177}Lu 錯体のRCPは100%であった。得られた ^{177}Lu 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0151] (3. 標識工程)

上述の工程(2)を経て得られた未精製のままの ^{177}Lu 錯体の溶液と、上記の工程(1)で得られたペプチド修飾抗体(一価抗体)を含む溶液とを、

それぞれ0.1 mol/L塩化ナトリウム及び0.1 mol/Lグリシン含有0.01 mol/Lクエン酸緩衝液(pH 5.5)に添加し、37℃で120分間クリック反応させて、 ^{177}Lu 錯体標識抗体を得た。 ^{177}Lu 錯体の量及びペプチド修飾抗体(一価抗体)の量はそれぞれ6.75 nmol及び7.5 nmolであり、DBCO基とアジド基とのモル比はそれぞれ約1:1.1であった。未精製時の ^{177}Lu 錯体標識抗体の反応率(%)を以下の表5に示す。

また、実施例1と同様に限外ろ過フィルターを用いて精製した後の ^{177}Lu 錯体標識抗体のRCP及びRCYを以下の表5に示す。

[0152] ^{177}Lu 錯体標識抗体のRCP及びRCYの測定方法は実施例1と同様に実施した。

[0153] [表5]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A): (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
実施 例3	DOT AGA	セツキ シマブ	1:1.1	98%	100%	48%

[0154] [比較例3] ^{177}Lu 標識DOTA-DBCOを用いたセツキシマブとの複合体の製造

DOTAGA-DBCOをDOTA-DBCOに変えた以外は、実施例3に準じて操作を行った。結果を表6に示した。

[0155] [表6]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A): (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
比較例 3	DOTA	セツキ シマブ	1:1.1	91%	100%	64%

[0156] [実施例4] 製剤化工程

実施例1、実施例3、比較例1及び比較例3の記載に従って製造する放射性複合体をそれぞれ5mLエッペンチューブ（L o B i n d、エッペンドルフ社製）に一部抜き取り、保存緩衝液（0.1mol/L塩化ナトリウム及び0.1mol/Lグリシン含有0.01mol/Lクエン酸緩衝液（pH 5.5）、並びに1.0重量/体積%ポリソルベート80、0.1mol/L塩化ナトリウム及び0.1mol/Lグリシン含有0.01mol/Lクエン酸緩衝液（pH 5.5）混液）で希釈した。

[0157] [評価1] 安定性評価

実施例4で得られた各放射性複合体を、室温で2週間保存し、各時間点（0日点、1日点、7日点、及び／又は14日点）において、RCP及び抗原結合活性を評価した。なお、製造終了から7日間は、放射性金属核種がLu-177である場合には、約1半減期に相当し、製造終了から14日間は、放射性金属核種がAc-225である場合には、約1.5半減期に相当し、放射性金属核種がLu-177である場合には約2半減期に相当する。

[評価1-1] RCP（放射化学的純度）

RCPを薄層クロマトグラフィー（TLC）で分析した。TLCの条件は、実施例1で反応率を調べるときに使用した条件と同様とした。

結果を表7に示す。

[0158] [表7]

	放射化学的純度 (%)			
	0日点	1日点	7日点	14日点
放射性複合体 (実施例1)	100.0	99.7	97.9	94.9
放射性複合体 (比較例1)	99.8	99.5	91.5	71.4
放射性複合体 (実施例3)	99.7	97.5	93.9	88.2
放射性複合体 (比較例3)	99.4	93.5	79.6	61.4

[0159] チオウレア結合を含まない実施例1の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で7日間保存した場合、RCPとして95%以上が維持されていた。また、製造終了後室温で14日間保存した場合でもRCPとして90%以上が維持されていた。

チオウレア結合を含む比較例1の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で7日間保存した場合、RCPとして90%以上が維持されていたが、95%を下回っていた。また、製造終了後室温で14日間保存した場合、RCPとして75%を下回っていた。

チオウレア結合を含まない実施例3の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で7日間保存した場合、RCPとして90%以上が維持されていた。また、製造終了後室温で14日間保存した場合でもRCPとして85%以上が維持されていた。

チオウレア結合を含む比較例3の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で7日間保存した場合、RCPとして75%以上が維持されていたが、90%を下回っていた。また、製造終了後室温で14日間保存した場合、RCPとして65%を下回っていた。

[0160] [評価1-2] 抗原結合活性

抗原結合活性は *in vitro* オートラジオグラフィー (ARG) で確認した (製造日 (0) 及び保存最終日 (14日点) のみ)。ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) から購入したEGFR高発現のヒト類上皮がん細胞株であるA431細胞およびATCC (American Type Culture Collection) から購入したEGFR低発現のヒト胃がん細胞株であるSNU-16細胞を雌性SCID Beigeマウス (日本チャールス・リバー社製) の脇腹皮下にそれぞれ 5×10^6 cells および 2×10^6 cells 投与して担癌マウスを作製した。その後、A431腫瘍およびSNU-16腫瘍を摘出してティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (サクラファインテックジャパン社製) に包埋して

凍結切片を作製した。1%ウシ血清アルブミン含有PBSに実施例1および比較例1で得られた放射性複合体をそれぞれ1 kBq/mLとなるように添加し、A431腫瘍切片およびSNU-16腫瘍切片を浸漬した。切片をイメージングプレートにコンタクトした後、スキャナータイプ画像解析装置で読み取り、切片に結合した放射エネルギーを評価した。結果を図1に示す。

それぞれの溶液にセツキシマブを添加した溶液で同様に評価を行うことで、各放射性複合体のEGFRに対する特異性を確認することができる。

保存最終点（14日点）において、実施例1および比較例1の記載に従って製造した放射性複合体のいずれでもEGFRに対する結合活性が確認された。実施例1および比較例1の記載に従って製造した放射性複合体はどちらもA431腫瘍切片及びSNU-16腫瘍切片に結合を示し、A431腫瘍切片により強く結合し、EGFR選択的な結合を示した。セツキシマブを添加した溶液ではA431腫瘍切片に対する結合が阻害され、結合のEGFR特異性が確認される。保存最終点（14日点）において、すべてのサンプルでEGFRに対する結合の選択性が維持されていた。A431腫瘍切片に結合した放射能は実施例1の記載に従って製造した放射性複合体を用いたサンプルの方が比較例1の記載に従って製造した放射性複合体よりも多くなった。

[0161] [評価2] *in vivo*腫瘍集積性

評価1-2に準じてマウスを用いてA431細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例2又は比較例2の記載に従って製造した放射性複合体の腫瘍集積を確認した。

ATCCから購入したEGFR陽性のヒト類上皮癌株であるA431細胞をDMEM培地（gibco、サーモフィッシューサイエンティフィック社製）に懸濁し、5週齢の雌性BALB/c nu/nu（日本チャールス・リバー社製）の脇腹皮下に 5×10^6 cells投与して担癌マウスを作製した。腫瘍体積がおおよそ100~250 mm³となるまで成長させ、実施例2又は比較例2の記載に従って製造した放射性複合体を3.7 MBq/匹（各n=3）の用量で尾静脈内投与した。投与後96時間後に小動物PETイメージ

ージング装置（PET／CT Si 7 8、B r u k e r 社製）を用いて表 8 の条件で撮像を行った。

P E T 撮像を実施した結果の代表例を図 2（実施例 2）及び図 3（比較例 2）に示す。腫瘍には他の臓器と比較して放射能が高い濃度で集積し、E G F R 陽性腫瘍の描出が可能であった。また、実施例 2 の記載に従って製造した放射性複合体と、比較例 2 の記載に従って製造した放射性複合体とでは、腫瘍集積性は視覚的に同程度であり、図 2 又は図 3 に示した代表例の画像において腫瘍に V O I（関心体積）を設定して解析した場合、実施例 2 の記載に従って製造した放射性複合体が、投与放射能に対する単位体積あたりの放射能の割合として 5. 1 % I D / c c（I n j e c t e d d o s e / c c）であり、比較例 2 の記載に従って製造した放射性複合体が 4. 6 % I D / c c で同程度であった。

[0162] [表8]

Isotope	89-Zr
Acquisition time	600 sec
Energy Window	30% (357.7-664.3keV)
PET 画像再構成	MLEM GPU 32x32 0.25 (Iterations: 12)
補正	Scatter、Randoms、Decay、Partial volume、Attenuation

[0163] [実施例 5] ²²⁵A c 錯体標識抗体を用いた薬効評価（²²⁵A c 錯体標識セツキシマブの抗腫瘍効果）

マウスを用いて A 4 3 1 の皮下担癌モデルを作製し、実施例 1 及び比較例 1 の記載に従って製造した放射性複合体の抗腫瘍効果を確認した。

E C A C C から購入した E G F R 高発現のヒト類上皮がん細胞株である A 4 3 1 細胞を D M E M 培地（g i b c o、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に懸濁し、5 週齢の雌性 B A L B / c n u / n u（日本チャールス・リバー社製）の脇腹皮下に 5 × 1 0 ⁶ c e l l s 投与して担癌マウスを作製した。腫瘍体積が 2 0 0 ～ 3 5 0 m m ³ となるまで成長させ、腫瘍径測定に適した形状の個体から無作為に群分けを実施した。その際の各マウスの腫瘍体積と体重を表 9 に示す。腫瘍体積は以下の式に従って算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{腫瘍長径} \times (\text{腫瘍短径})^2) \times 1 / 2$$

[0164] [表9]

	腫瘍体積 平均値±標準偏差 (mm ³)	体重 平均値±標準偏差 (g)
放射性複合体 (実施例1) 投与群	316.2±68.0	20.5±1.5
放射性複合体 (比較例1) 投与群	309.2±81.5	20.7±1.4
抗体対照群	311.9±51.6	20.5±1.1
Vehicle群	307.3±68.0	20.5±1.1

[0165] 実施例1及び比較例1の記載に従って製造した放射性複合体をいずれも15kBq/匹 (セツキシマブとして100μg/匹) の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群として、各放射能複合体と同じ抗体量のセツキシマブを投与した群 (抗体対照群) 及び保存緩衝液を投与したVehicle群を設定した。各群は6匹とし、投与後37日まで経時的に、一般状態の観察、体重及び腫瘍体積を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図4に、経時的な体重変化を図5に示す。

[0166] 実施例1及び比較例1の記載に従って製造した放射性複合体を投与した群は、投与後37日点において、2つのコントロール群 (抗体対照群、Vehicle群) と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた ($P < 0.05$ もしくは $P < 0.01$)。有意差の検定には、統計解析ソフトStatPreclinical (タクミインフォメーションテクノロジー社製) を用いてTukey検定を行った。また、各群とも一般状態に著しい変化はなく、著しい体重減少などの毒性兆候は認められなかった。

[0167] [実施例6] ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOを用いたパニツムマブとの複合体の製造

(1. 抗体修飾工程)

国際公開第2017/217347号に記載の方法で、上記(P3)で表される17個のアミノ酸残基を含むペプチドを得た。

[0168] 上述のペプチドと、パニツムマブ (Amgen社製) を含有する溶液とを

、 0.02 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH } 6.0$ ）に混合した混合液を、室温で60分反応させて、ペプチド修飾抗体を含む溶液を得た。このペプチド修飾抗体は、上記のペプチドによって抗体のFc領域が部位特異的に修飾されたものである。

[0169] 次いで、IgG-BPカラムに通液して、未標識抗体及び一価抗体を相対的に多く含む抗体組成物を得た。回収した画分に含まれる一価抗体の濃度が 15 mg/mL になるように 0.1 mol/L 塩化ナトリウム含有 0.05 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH } 5.8$ ）で濃度を調整した。得られた未標識抗体及び一価抗体を相対的に多く含む溶液を後述の標識工程に供した。

[0170] （2. 錯体形成工程）

DOTAGA-DBCOを実施例1と同様にして製造した。このキレート剤を、溶媒として 0.156 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH } 6.0$ ）に分散させて、キレート剤を 0.3 mmol/L 含む分散液とした。この分散液 0.0136 mL と 0.156 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH } 5.5$ ） 0.0136 mL と、放射性金属源として ^{225}Ac イオン含有溶液（ 0.1 mol/L 塩酸水溶液、放射能濃度 $210\sim 222\text{ MBq/mL}$ 、Oak Ridge National Laboratory製より調製、液量 0.0093 mL ） $1.95\sim 2.06\text{ MBq}$ （検定日時放射能から減衰計算した計算値）とを混合した反応液を加熱条件下で反応させて、 ^{225}Ac 錯体溶液を得た。その際のキレート剤と放射性金属イオンとのモル比率は、キレート剤： ^{225}Ac イオン＝約 $989:1$ であり、反応液の加熱条件は 70°C 、加熱時間は30分とした。

[0171] 得られた ^{225}Ac 錯体のRCPを実施例1と同様に測定した。その結果、 ^{225}Ac 錯体のRCPは95%であった。得られた ^{225}Ac 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0172] （3. 標識工程）

上述の工程（2）を経て得られた未精製のままの ^{225}Ac 錯体の溶液に、上

記の工程（１）で得られるペプチド修飾抗体（一価抗体）を含む溶液を添加し、 37°C で２時間クリック反応させて、 ^{225}Ac 錯体標識抗体を得た。DBC O基とアジド基とのモル比はそれぞれ約１：１．２であった。未精製時の ^{225}Ac 錯体標識抗体の反応率を以下の表１０に示す。

更に、 37°C で２時間反応させて得られた ^{225}Ac 錯体標識抗体の溶液を限外ろ過フィルター（Merck社製、型番：UFC803096）を用いて精製した。精製後の ^{225}Ac 錯体標識抗体のRCP及びRCYを以下の表１０に示す。なお、 ^{225}Ac 錯体標識抗体のRCP及びRCYは実施例１と同様の方法で得られた放射エネルギーを基に算出した。

[0173] [表10]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37°C 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
実施例 6	DOTA GA	パニツムマブ	1 : 1.2	70	99	61

[0174] [比較例 4] ^{225}Ac 標識DOTA-DBCOを用いたパニツムマブとの複合体の製造

DOTAGA-DBCOをDOTA-DBCOに変更した以外は、実施例 6 に準じて操作を行った。結果を表 11 に示す。なお、 ^{225}Ac 錯体標識抗体の RCP 及び RCY は実施例 1 と同様の方法で得られた放射エネルギーを基に算出した。

[0175] [表11]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37°C 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
比較例 4	DOTA	パニツムマブ	1 : 1.2	50	99	44

[0176] [実施例 7] ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOを用いたパニツムマブとの複合体の製造

(1. 錯体形成工程)

実施例2と同様に、キレート剤を含む分散液を調整し、この分散液0.0939mLと0.150mol/Lゲンチジン酸含有0.156mmol/L酢酸ナトリウム溶液(pH5.5)0.0626mL、放射性金属源として ^{89}Zr イオン含有溶液(0.1mol/L塩酸水溶液、放射能濃度2.6GBq/mL、日本メジフィジックス株式会社製より調製、液量0.0626mL)161.6MBqとを混合し、実施例2に準じて、 ^{89}Zr 錯体溶液を得た。その際のキレート剤と放射性金属イオンとのモル比率は、キレート剤： ^{89}Zr イオン=約236：1であった。

[0177] 得られた ^{89}Zr 錯体のRCPを実施例2と同様の方法で測定した。その結果、 ^{89}Zr 錯体のRCPは98%であった。得られた ^{89}Zr 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0178] (2. 標識工程)

上述の工程(1)を経て得られた未精製のままの ^{89}Zr 錯体溶液と実施例6と同様にして得られたペプチド修飾抗体(一価抗体)を含む溶液とを混合し、37℃で90分間クリック反応させて、 ^{89}Zr 錯体標識抗体を得た。DBCOとアジドとのモル比はそれぞれ約1：1であった。未精製時の ^{89}Zr 錯体標識抗体の反応率(%)を以下の表12に示す。

さらに、37℃で2時間反応させて得られた ^{89}Zr 錯体標識抗体の溶液を限外ろ過フィルターを用いて精製した。精製後の ^{89}Zr 錯体標識抗体のRCP及びRCY(%)を以下の表12に示す。なお、 ^{89}Zr 錯体標識抗体のRCP及びRCYは実施例1と同様の方法で得られた放射エネルギーを基に算出した。

[0179] [表12]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率	精製後	
				37℃ 2時間反応 (%)	RCP (%)	RCY (%)
実施例7	DOTAG A	パニツム マブ	1 : 1	64	94	57

[0180] [実施例 8] 製剤化工程

実施例 6 及び比較例 4 に従って製造した放射性複合体をそれぞれ 5 mL エッペンチューブ (L o B i n d、エッペンドルフ社製) に 1. 0 mL 抜き取り、処方緩衝液 (0. 1 mol/L 塩化ナトリウム含有 0. 05 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5. 8)) 1. 5 mL で希釈した。

[0181] [評価 3] 安定性評価

実施例 8 で得られた各放射性複合体を、室温 (24. 5 ~ 25. 5 °C) で 2 週間保存し、各時間点 (0 日点、1 日点、7 日点、及び 14 日点) において、RCP、凝集体の割合及び抗原結合活性を評価した。

[評価 3-1] RCP

RCP は TLC 分析結果から算出した。TLC の条件は実施例 1 において反応率を評価した際に使用した条件と同様とした。結果を表 13 に示す。

[0182] [表 13]

	RCP (%)			
	0 日点	1 日点	7 日点	14 日点
放射性複合体 (実施例 6)	100. 0	99. 9	99. 8	99. 5
放射性複合体 (比較例 4)	99. 6	99. 0	95. 0	92. 9

[0183] チオウレア結合を含まない実施例 6 の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で 7 日間保存した場合は、RCP として 99 % 以上維持されていた。製造終了後室温で 14 日間保存した場合でも RCP として 99 % 以上維持されていた。チオウレア結合を含む比較例 4 の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後室温で 7 日間保存した場合、RCP として 95 % 以上維持されていた。製造終了後室温で 14 日間保存した場合は、RCP として 93 % を下回っていた。

[0184] [評価 3-2] 凝集体の割合

凝集体の割合は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で確認した。液体クロマトグラフィー装置として Waters 社製の 2695 型セパレー

ションモジュール又はe 2 6 9 5 型セパレーションモジュールを用い、UV 検出器としてW a t e r s 社製の2 4 8 9 型UV/V i s 検出器を使用し、下記の条件で分析した。製造終了後7 日間保存した場合の各成分の割合を表1 4 に示す。製造終了後7 日間保存した場合、実施例6 の記載に従って製造した放射性複合体の凝集体の割合は、比較例4 の記載に従って製造した放射性複合体の凝集体と同等であった。

[0185] [表14]

	主ピークの割合 (%)	凝集体のピーク割合 (%)
放射性複合体 (実施例6) 0 日点	9 2 . 2 0	7 . 8 0
放射性複合体 (比較例4) 0 日点	9 1 . 4 9	8 . 5 1
放射性複合体 (実施例6) 7 日点	8 9 . 9 2	1 0 . 0 3
放射性複合体 (比較例4) 7 日点	8 9 . 7 7	1 0 . 1 7

[0186] [HPLC条件]

カラム：T O S O H T S K g e l g u a r d c o l u m n S W X L (6 m m × 4 c m) , T O S O H T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L (5 μ m, 7 . 8 × 3 0 c m) × 2 本 (直列)

カラム温度：2 5 ° C 付近の一定温度

移動相：0 . 2 m o l / L アルギニン塩酸塩含有0 . 1 m o l / L リン酸緩衝液 (p H 6 . 8)

流量：毎分 1 . 0 m L

面積測定範囲：3 0 分

検出波長：2 8 0 n m

[0187] [評価3-3] 抗原結合活性

抗原結合活性は、評価する腫瘍切片に、A T C C から購入したE G F R 高発現のヒト結腸がん由来細胞株であるS W 4 8 細胞、A T C C から購入したE G F R 低発現のヒト結腸がん由来細胞株であるH C T - 1 1 6 及びE C A C C から購入したE G F R 低発現のヒト大腸がん由来細胞株であるC O L O 2 0 5 細胞を追加した以外は、実施例1 の記載に準じてi n v i t r o A R G により確認した (製造日点のみ)。また、それぞれの溶液に未標識の

パニツムマブを添加した溶液（添加したパニツムマブ濃度：10 nM）で同様に評価を行い、放射性複合体のEGFRに対する特異性を確認した。結果を図6に示す。実施例6の記載に従って製造した放射性複合体において、EGFRに対する結合活性が確認された。実施例6に従って製造した放射性複合体は、A431腫瘍切片、SNU-16腫瘍切片、SW48腫瘍切片、HCT-116腫瘍切片及びCOLO205腫瘍切片に結合が確認され、A431腫瘍切片及びSW48腫瘍切片により強く結合し、EGFR発現依存的な結合活性が確認された。パニツムマブを添加した溶液では、評価に使用した全ての切片において、結合が阻害されており、結合のEGFR特異性が確認された。

[0188] [実施例9] ^{225}Ac 錯体標識抗体を用いた薬効評価（ ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブの殺細胞効果評価）

培養細胞を用いて、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の殺細胞効果を確認した。COLO205細胞（RPMI 1640培地）、HCT-116細胞（MaCoys' 5A培地）、SW48細胞（Leibovitz' s L-15培地）、ECACCから購入したEGFR高発現であるヒト膵臓がん由来細胞株であるMIA PaCa-2細胞（D-MEM培地）、ATCCから購入したEGFR高発現である非小細胞肺癌由来細胞株であるNCI-H358細胞（RPMI 1640培地）をそれぞれ適した培地で培養し、実施例6に従って製造した放射性複合体を0、0.001、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 kBq/mL（パニツムマブとして0.000764、0.00764、0.0229、0.0764、0.229、0.764、2.29、7.64、22.9 μg /mL）となるよう各培地で希釈し、細胞に添加した。また、未標識のパニツムマブを各放射能濃度のサンプルと同様の抗体濃度になるように添加し、培養した。サンプル添加から120時間後、培地にCell Titer-Glo（登録商標）2.0 Cell Viability Assay（Promega社製）を添加し、マイクロプレートリーダー（Spectra

Max i 3 x、モレキュラーデバイス社製）を用いて化学発光を検出し、生細胞数を算出した。算出された生細胞数に対し、抗体を添加していない条件の場合の生細胞数との比率を取り、殺細胞効果を評価した。結果を図7A～7Cに示す。また、得られた結果をGraphPad Prism7（GraphPad Software社製）を用いて、非線形直線回帰法によりフィッティングし、EC₅₀を算出した。その結果、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の殺細胞効果におけるEC₅₀は、SW48細胞に対しては0.5 pM、NCI-H358細胞に対しては2.8 pM、COLO205細胞に対しては7.3 pMとなった。また、未標識のパニツムマブでは、添加した最大濃度（抗体濃度：156 nM）以下では、殺細胞効果は確認されなかった。

評価細胞において、KRAS（v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog）、及びBRAF（v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1）に変異を有する細胞を含め、未標識のパニツムマブでは殺細胞効果が確認されていない細胞においても、²²⁵Ac錯体標識パニツムマブでは、殺細胞効果が確認された。

[0189] [実施例10] ²²⁵Ac錯体標識抗体を用いた薬効評価（²²⁵Ac錯体標識パニツムマブのアポトーシス誘導評価）

実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の培養細胞に対するアポトーシス誘導を確認した。

ヒト大腸がん由来細胞であるSW48細胞、COLO205細胞を実施例9と同様の条件で培養し、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を0、0.001、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 kBq/mL（パニツムマブとして0.00764、0.0764、0.229、0.764、2.29、7.64、22.9 μg/mL）となるよう添加した。また、未標識のパニツムマブを各放射能濃度の群と同様の抗体濃度になるように添加し、培養した。サンプル添加72時間後、アポトーシスアッセイキ

ット (Caspase-Glo (登録商標) 3/7 Assay、Promega社製) を添加し、Caspase-3/7の活性を、マイクロプレートリーダーを用いて検出した。その結果を図8に示す。両細胞とも、未標識のパニツムマブではアポトーシスの誘導は確認されなかったが、 ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブでは、添加放射能依存的にCaspase-3/7の活性が増加しており、放射線によるアポトーシス誘導が確認された。

[0190] [実施例 1 1] ^{225}Ac 錯体標識抗体を用いた薬効評価 (^{225}Ac 錯体標識パニツムマブのDNA二重鎖切断評価)

実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の培養細胞に対するDNA二重鎖切断効果を確認した。

SW48細胞、MIA PaCa-2細胞、NCI-H358細胞を実施例9と同様に培養し、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を1 kBq/mL、10 kBq/mL、30 kBq/mL (パニツムマブとして3.73、37.3、112 $\mu\text{g/mL}$) となるように添加し、培養した。サンプル添加48時間後、DNAダメージ検出キット (DNA Damage Detection Kit- γH2AX -Green、同仁化学研究所製) により、 γH2AX を染色し、DAPI含有水溶性マウント剤 (ProlongTM Diamond Antifade Mountant with DAPI、Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、核染色及び封入を行った。封入後、HSオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス社製) を用いて、 γH2AX 陽性部位及び細胞核を検出した。その結果を図9A~9Cに示す。各細胞とも、添加放射能依存的に γH2AX 陽性細胞の割合が増加しており、放射線によるDNA二重鎖切断が確認された。

[0191] [実施例 1 2] ^{225}Ac 錯体標識抗体を用いた薬効評価 (^{225}Ac 錯体標識パニツムマブの抗腫瘍効果)

マウスを用いて、COLO205細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の抗腫瘍効果を確認した。

ECACCから購入したEGFR高発現であるヒト大腸がん由来細胞株であるCOL0205細胞をDMEM (gibco、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) に懸濁し、6週齢の雌性BALB/c nu/nu (日本チャールス・リバー社製) の脇腹皮下に 5×10^6 cells投与して担癌マウスを作製した。担癌処置後、腫瘍体積がおおよそ $100 \sim 300 \text{ mm}^3$ であることを確認し、腫瘍径測定に適した形状の個体から無作為に群分けを実施した。その際の各マウスの腫瘍体積と体重は以下の表15に示す。

[0192] [表15]

	腫瘍体積 平均値±標準偏差 (mm^3)	体重 平均値±標準偏差 (g)
放射性複合体 (実施例6) 高放射能投与群	189.7 ± 35.7	18.5 ± 0.8
放射性複合体 (実施例6) 低放射能投与群	199.2 ± 48.6	18.6 ± 0.6
抗体腹腔投与群	186.0 ± 36.5	17.9 ± 1.9
抗体対照群	289.2 ± 159.8	18.2 ± 1.3
Vehicle群	208.0 ± 31.5	18.1 ± 1.5

[0193] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を高放射能投与群では $10 \text{ kBq}/\text{匹}$ の用量で、低放射能投与群では $5 \text{ kBq}/\text{匹}$ (どちらもパニツムマブとして $50 \mu\text{g}/\text{匹}$) の用量で尾静脈内投与した。コントロール群として、 $200 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量でパニツムマブを尾静脈内投与した群 (抗体対照群) 及び保存緩衝液を尾静脈内投与したVehicle群を設定した。また、パニツムマブをベクティビックス (Vectibix; 登録商標、武田薬品工業社製) のCTD (Common Technical Document) に従って、 $200 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で、1週間に2回の頻度で、2週間腹腔内投与した群 (抗体腹腔投与群) を設定した。各群は6匹とし、投与後33日まで経時的に、一般状態の観察、体重及び腫瘍体積を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図10に示す。

[0194] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を高放射能投与した群では、投与後33日点において、2つのコントロール群 (抗体対照群、Vehicle

c l e群) 及び抗体腹腔投与群と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた ($P < 0.05$ もしくは $P < 0.01$)。有意差の判定には統計解析ソフト Stat Preclonica を用いて Tukey 検定を行った。実施例 6 の記載に従って製造した放射性複合体を低放射能投与した群では、投与後 33 日点において、抗体対照群及び抗体腹腔投与群と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた ($P < 0.05$ もしくは $P < 0.01$)。一方で、各放射性複合体を投与した群間で、抗腫瘍効果に有意な差は認められなかった。また、各群とも一般状態に著しい変化はなく、著しい体重減少などの毒性兆候は認められなかった。

[0195] [実施例 13] ^{225}Ac 錯体標識抗体を用いた薬効評価 (^{225}Ac 錯体標識パニツムマブの抗腫瘍効果)

マウスを用いて、HCT-116 細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例 6 の記載に従って製造した放射性複合体の抗腫瘍効果を確認した。

ATCC から購入した EGFR 高発現であるヒト結腸がん由来細胞株である HCT-116 細胞を DMEM (gibco、サーモフィッシュサイエントフィック社製) に懸濁し、使用した点以外は実施例 12 と同様に抗腫瘍効果を確認した。各溶液を投与した際の各マウスの腫瘍体積と体重は以下の表 16 に示す。

[0196] [表 16]

	腫瘍体積 平均値±標準偏差 (mm^3)	体重 平均値±標準偏差 (g)
放射性複合体 (実施例 6) 高放射能投与群	284.1 ± 116.1	18.2 ± 0.7
放射性複合体 (実施例 6) 低放射能投与群	251.7 ± 124.7	18.3 ± 0.9
抗体腹腔投与群	266.1 ± 90.7	17.6 ± 1.3
抗体対照群	289.2 ± 159.8	17.9 ± 1.1
Vehicle 群	263.9 ± 66.5	17.8 ± 1.1

[0197] 群設定及び投与放射能、投与抗体量は、実施例 12 と同様とした。各群は 6 匹とし、投与後 26 日まで経時的に、一般状態の観察、体重及び腫瘍体積

を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図11に示す。

[0198] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を高放射能投与した群は投与後26日点において、2つのコントロール群（抗体対照群、Vehicle群）及び抗体腹腔投与群と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた（ $P < 0.01$ ）。有意差の判定には統計解析ソフトStat Preclinicalを用いてTukey検定を行った。また、各放射性複合体投与群間で、抗腫瘍効果に有意な差は認められ（ $P < 0.05$ ）、抗腫瘍効果に投与した放射能依存が確認された。また各群とも一般状態に著しい変化はなく、著しい体重減少などの毒性兆候は認められていない。

[0199] [実施例14] ^{225}Ac 錯体標識抗体を用いた薬効評価（ ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブの抗腫瘍効果）

マウスを用いて、SW48細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の抗腫瘍効果を確認した。

ATCCから購入したEGFR高発現であるヒト結腸がん由来細胞株であるSW48細胞をDMEM（gibco、サーモフィッシューサイエンティフィック社製）に懸濁し、使用した点以外は実施例12と同様に抗腫瘍効果を確認した。各溶液を投与した際の各マウスの腫瘍体積と体重は以下の表17に示す。

[0200] [表17]

	腫瘍体積 平均値±標準偏差 (mm ³)	体重 平均値±標準偏差 (g)
放射性複合体（実施例6） 高放射能投与群	516.9±76.1	19.8±1.6
放射性複合体（実施例6） 低放射能投与群	510.7±67.7	19.4±0.8
抗体腹腔投与群	641.2±195.7	19.8±1.6
抗体対照群	492.8±85.2	19.0±1.3
Vehicle群	495.0±89.9	19.8±1.1

[0201] 群設定及び投与放射能、投与抗体量は、抗体対照群における投与抗体量を50 µg／匹とした以外は実施例12と同様とした。各群は6匹とし、投与

後18日まで経時的に、一般状態の観察、体重及び腫瘍体積を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図12に示す。

[0202] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を投与した群は投与後18日点において、2つのコントロール群（抗体対照群、Vehicle群）と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた（ $P < 0.01$ ）。有意差の判定には統計解析ソフトStat Preclinicalを用いてTukey検定を行った。一方で、各放射性複合体を投与した群間で、抗腫瘍効果に有意な差は認められなかった。また各群とも一般状態に著しい変化はなく、著しい体重減少などの毒性兆候は認められなかった。

[0203] [実施例15] ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブと既存薬剤との薬効比較

マウスを用いて、COLO205細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の抗腫瘍効果を既存薬と比較した。

実施例12と同様に、COLO205細胞を担癌したマウスを作製し、抗腫瘍効果を確認した。各溶液を投与した際の各マウスの腫瘍体積と体重は以下の表18に示す。

[0204] [表18]

	腫瘍体積 平均値±標準偏差 (mm^3)	体重 平均値±標準偏差 (g)
放射性複合体（実施例6） 投与群	267.8±66.4	20.1±1.0
オキサリプラチン投与群	269.4±65.4	19.8±1.0
Vehicle群	260.2±77.2	19.7±1.0

[0205] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の投与群では10kBq／匹の用量で尾静脈内投与した。比較群として、オキサリプラチンを5mg／mLの用量で33 μL を1週間おきに3回尾静脈内投与した群（オキサリプラチン投与群）を設定した。また、対照群として、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体の保存緩衝液を尾静脈内投与したVehicle群を設定した。各群は6匹とし、観察期間終了まで経時的に、一般状態の観察、体重及び腫瘍体積を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図13に示す。図の

縦軸は、各群の腫瘍体積の平均値を表し、横軸は、各薬剤を投与してからの経過日数を示す。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「*」はオキサリプラチン投与群に対して有意差 ($p < 0.05$) が認められた時点、「†」はVehicle群に対して有意差 ($p < 0.01$) が認められた時点を示す。また、観察最終日に採検を実施し、血液を採取した。採取した血液を乾式臨床化学分析装置 (スポットケム D-02、アークレイ社製) を用いて、血漿中のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及び血液尿素窒素 (BUN) を、スポットケム D 総合 A2 (アークレイ社製) を用いて測定することにより肝毒性及び腎毒性を評価した。結果を図14に示す。縦軸は各マーカーの濃度を示し、横軸は評価した群を示し、グラフは各群の平均値±標準偏差を表す。各群とも観察最終日には、肝毒性及び腎毒性マーカーに大きな差はなく、観察最終点において、肝毒性及び腎毒性は確認されなかった。

[0206] [実施例16] ^{225}Ac 錯体標識パニツムマブの血漿中安定性評価

実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を各動物種 (ヒト (ヒト血漿 (プール、ヘパリン)、コスモバイオ社製)、マウス (マウス血漿プール BALB/c-nu系統、日本チャールス・リバー社製)、ラット (血漿 (プール) Wistar、日本チャールス・リバー社製)、サル (カニクイザル血漿、日本チャールス・リバー社製)) の血漿中に 37°C で2週間保存し、各時間点 (0日点、1日点、7日点、14日点 (ヒト血漿のみ)) での ^{225}Ac 標識パニツムマブの血漿中での安定性を評価した。各動物種の血漿を 37°C でインキュベートし、実施例6の記載に従って製造した放射性複合体を最終濃度で 100 kBq/mL となるように添加した。各評価時間点において、Dynabeads (登録商標) Protein G (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、免疫沈降を行い、 0.1% Tween 20含有PBSによる洗浄後、Protein Gと結合した抗体を回収した。ビーズの洗浄に用いた 0.1% Tween 20含有PBSは回収し、回収した洗浄液の放射能、及び回収した抗体の放射能を

オートウェルガンマカウンター（2480 WIZARD² ガンマカウンター、PerkinElmer社製）を用いて測定し、ビーズの洗浄に用いた0.1% Tween 20含有PBSの放射能と回収した抗体の放射能の合計に対する、回収した抗体の放射能の比率を算出することでProtein Gと結合した²²⁵Ac標識パニツムマブの割合を評価した。その結果を表19に示す。表内の数値は、ビーズの洗浄に用いた0.1% Tween 20含有PBSの放射能と回収した抗体の放射能の合計に対する、回収した抗体の放射能の比率の平均値±標準偏差（n = 3）を表している。

[0207] [表19]

安定性 (%)	0 日点	1 日点	7 日点	14 日点
ヒト血漿	92.4±0.4	85.6±5.0	88.6±3.9	71.6±6.3
サル血漿	91.0±2.0	89.9±4.5	86.9±3.0	—
マウス血漿	97.8±0.4	87.9±1.2	88.2±0.6	—
ラット血漿	96.8±1.0	88.5±3.3	69.9±6.4	—

[0208] 実施例6の記載に従って製造した放射性複合体は、ラットを除く各動物種の血漿中に7日間保存した場合では、安定性として85%以上が維持されており、また、ヒト血漿においては血漿中に14日保存した場合でも安定性として70%以上が維持されていた。

[0209] [実施例17] ⁸⁹Zr 錯体標識パニツムマブの腫瘍集積性評価

実施例12に準じてマウスを用いてC O L O 2 0 5細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例7の記載に従って製造した放射性複合体の腫瘍集積性を確認した。

A T C Cから購入したE G F R高発現のヒト大腸がん由来細胞株であるC O L O 2 0 5細胞をD M E M培地に懸濁し、5週齢の雌性B A L B / c n u / n u（日本チャールス・リバー社製）の脇腹皮下に 5×10^6 cells投与して担癌マウスを作製した。腫瘍体積がおおよそ100~250 mm³となるまで成長させ、実施例7の記載に従って製造した放射性複合体を約6 MBq/匹（各n = 3）の用量で尾静脈内投与した。投与72時間後及び120時間後に小動物PETイメージング装置を用いて評価2と同様の条件で撮

像を行った。

PET撮像を実施した結果の代表例を図15に示す。画像内の矢印は担癌したCOL0205細胞に由来する腫瘍を示す。撮像した各マウスにおいて腫瘍及び筋肉（大腿筋）にVOIを設定し、SUV（Standard Uptake Value）を算出した場合、投与72時間後では、腫瘍においては 3.18 ± 0.72 、筋肉においては 0.48 ± 0.02 となり、投与120時間後では腫瘍においては 4.38 ± 0.96 、筋肉においては 0.48 ± 0.05 となった。その値を用いて、筋肉に対する腫瘍の放射能集積比率を算出した結果、投与72時間後では 6.67 ± 1.52 であり、投与120時間後では 9.19 ± 2.02 となり、腫瘍には他の臓器と比較して放射能が高い濃度で集積し、EGFR陽性腫瘍の描出が可能であった。

[0210] 本出願は、日本で出願された特願2021-062104（出願日：2021年3月31日）、特願2021-179348（出願日：2021年11月2日）、及び特願2022-021670（出願日：2022年2月15日）を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] ペプチドで部位特異的に修飾された抗EGFR抗体とキレート剤との複合体であって、
 前記キレート剤に放射性金属核種がキレート化しており、
 前記ペプチドとキレート剤とがリンカー（L）を介して連結しており、前記リンカー（L）はチオウレア結合を含まない、複合体。
- [請求項2] 前記キレート剤がDOTAGA（ α -（2 - Carboxyethyl） - 1, 4, 7, 10 - tetraazacyclododecane - 1, 4, 7, 10 - tetraacetic acid）である、請求項1に記載の複合体。
- [請求項3] 前記ペプチドが、下記の式：

$$(Xa) - Xaa1 - (Xb) - Xaa2 - (Xc) - Xaa3 - (Xd) \cdots (i)$$
 （式（i）中、Xa、Xb、Xc及びXdは、それぞれ、連続するa個のX、連続するb個のX、連続するc個のX、及び連続するd個のXを表し、
 Xは、側鎖にチオール基及びハロアセチル基のいずれも有しないアミノ酸残基であり、
 a、b、c及びdはそれぞれ独立に1以上5以下の整数で、かつ $a + b + c + d \leq 14$ を満たし
 Xaa1及びXaa3は、それぞれ独立に、
 側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は、
 側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を表し、ただし、Xaa1及びXaa3のいずれか一方がチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、
 Xaa1及びXaa3が連結することで、環構造が形成されており、
 Xaa2は、リシン残基、アルギニン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2 - アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸であり、かつXaa2が架橋剤で修飾されている。

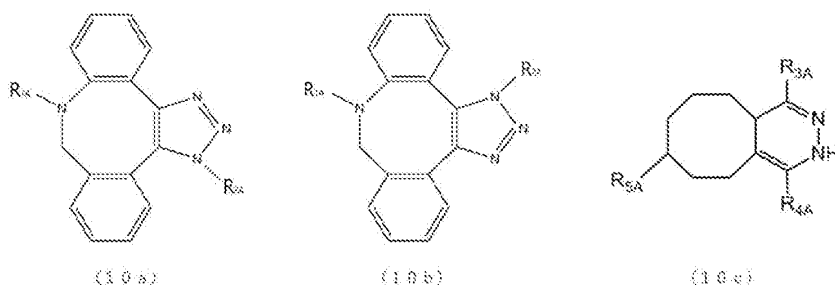
)

で表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である、請求項1又は2に記載の複合体。

[請求項4] 前記放射性金属核種がAc-225、Y-90、Lu-177又はZr-89である、請求項1乃至3いずれか一項に記載の複合体。

[請求項5] 前記リンカー(L)が式(10a)、式(10b)又は式(10c)を含む、請求項1乃至4いずれか一項に記載の複合体。

[化1]

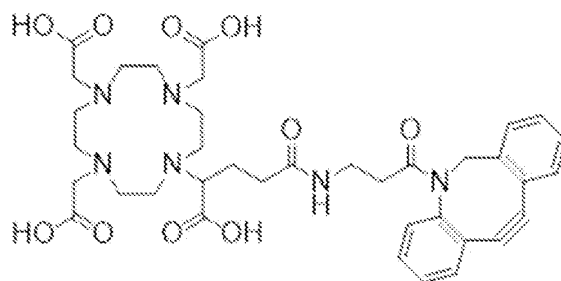


(式(10a)及び式(10b)中、 R_{1A} は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{2A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。式(10c)中、 R_{3A} 及び R_{4A} のうち一方は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示し、他方は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{5A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。)

[請求項6] 前記ペプチドとの連結部位と前記ペプチドとの間に、ポリエチレングリコール基を含む、請求項5に記載の複合体。

[請求項7] N末端にアジド基が導入された前記ペプチドが部位特異的に修飾している抗EGFR抗体と、下記式で表されるDOTAGA-DBCOの放射性金属錯体とをクリック反応させることで複合化した、請求項1乃至6いずれか一項に記載の複合体。

[化2]



DOTAGA-DBCO

[請求項8] 前記抗EGFR抗体がセツキシマブまたはパニツムマブである、請求項1乃至7いずれか一項に記載の複合体。

[請求項9] 請求項1乃至8いずれか一項に記載の複合体を有効成分として含有する放射性医薬。

[請求項10] がんの放射線内用療法に用いられる、請求項9に記載の放射性医薬。

[請求項11] がんの診断に用いられる、請求項9に記載の放射性医薬。

[請求項12] 請求項10に記載された放射性医薬を用いたがんの放射線内用療法に併用される、請求項11に記載の放射性医薬。

[請求項13] 放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し

抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まない、下記(1)または(2)の条件を満たす放射性医薬：

(1) 前記放射性金属核種が ^{177}Lu 又は ^{90}Y であって、室温で7日間保管した時の前記複合体の放射化学的純度が90%以上である。

(2) 前記放射性金属核種が ^{225}Ac であって、室温で14日間保管した時の前記複合体の放射化学的純度が90%以上である。

[請求項14] 放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗EGFR抗体との複合体を有効成分として含有し

抗EGFR抗体とキレート剤との連結にチオウレア結合を含まず、

前記放射性金属核種の半減期を基準として、前記半減期の1以上5以下の倍数の期間経過時点において、前記複合体の放射化学的純度が90%以上である放射性医薬。