

明 細 書

発明の名称：抗HER2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HER2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] HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2: ヒト上皮増殖因子受容体2型) は、ヒト癌遺伝子 HER2/neuの遺伝子産物として同定された増殖因子受容体であり、分子量約185 kDaの膜貫通型たんぱく質である。

[0003] 抗HER2抗体としてトラスツズマブ (Trastuzumab) が知られており、HER2過剰発現した乳癌または胃癌を適応症とする抗腫瘍剤として、臨床にて用いられている。

[0004] トラスツズマブは上市されているいくつかのADC (Antibody Drug Conjugate (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。ADCは、抗体にリンカーを介して化学療法剤であるペイロード (薬物) を共有結合した薬剤である。

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。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性用量が低く、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性用量も高くなることで、治療用量域が広くな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] 例えば、非特許文献1、2には、キレート剤として1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid (DOTA) を用い、DOTAに導入されたイソチオシアネート基とトラスツズマブの末端アミノ基とを反応させることで、トラスツズマブをランダムに²²⁵Acで標識した、²²⁵Ac標識トラスツズマブが記載されている。

[0007] また、特許文献1には、抗HER2抗体として、トラスツズマブ及びペルツズマブに対しランダムにアジド基を修飾した後、Ac-225で標識されたDOTAGA-DBCOとクリック反応させることでトラスツズマブをランダムに²²⁵Acで標識した²²⁵Ac標識トラスツズマブ及び²²⁵Ac標識ペルツズマブが記載されている。

[0008] 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と抗HER2抗体との複合体が記載されている。また、特許文献3には、このペプチドにDTPAを導入してトラスツズマブを修飾し、In-111で標識して¹¹¹In標識トラスツズマブを得たこと、当該ペプチドにDFOを導入してトラスツズマブを修飾し、Zr-89で標識して⁸⁹Zr標識トラスツズマブを得たことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：WO2019/125982

特許文献2：WO2016/186206

特許文献3：WO2017/217347

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Cancer Res. 2003 Aug 15; 63 (16) : 5084-90

非特許文献2: Clin Cancer Res. 2004 Jul 1; 10 (13) : 4489-97

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] しかしながら、イソチオシアネート基が導入されたDOTAとアミノ基との反応によりチオウレア結合を形成した抗HER2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。

[0012] 特許文献1には、ペプチドによる抗HER2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HER2抗体の課題についての開示ないし示唆はない。

課題を解決するための手段

[0013] 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HER2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。

[0014] 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。

[0015] 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HER2抗体との複合体を有効成分として含有し、抗HER2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。

[0016] 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。

発明の効果

[0017] 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HER2抗体の放射性複合体が提供される。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]放射性複合体（実施例1）群、放射性複合体（比較例1）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（ $p < 0.05$ ）が認められた時間点、「**」は抗体対照群に対して有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた時間点、「†」はVehicle群に対して有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた時間点、「‡」はVehicle群に対して有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた時間点を示す。

[図2]放射性複合体（実施例1）群、放射性複合体（比較例1）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3]実施例1及び比較例1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、横軸は各評価日点における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4]実施例4及び比較例4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、横軸は各評価日点における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5]実施例5及び比較例5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、横軸は各評価日点における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6]実施例2に従って製造した放射性複合体をSK-OV-3細胞の皮下担癌モデルマウスに投与し、PET撮像を行った結果の代表例を示す画像である。図中の矢印は担癌した腫瘍を示す。

[図7]各放射性複合体投与群、各ADC薬剤投与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。グラフは各群の腫瘍体積の平均値±標準偏差を表し、「*」はエンハーツ（登録商標）低用量群に対して有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた時間点を示す。

[図8]各放射性複合体投与群、各ADC薬剤投与群、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（ $p < 0.01$ ）が認められた時間点、「‡」はVehicle群に対して有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた時間点を示す。

発明を実施するための形態

[0019] （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HER2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。

[0020] (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、Ac-225、Y-90、Lu-177又はZr-89であることが、より好ましい。

[0021] (1-2) 抗体

本発明の放射性複合体に含まれる抗体は、HER2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。

[0022] 本発明の放射性複合体に用いられる抗体は、トラスツズマブ又はペルツズマブであることがより好ましい。

トラスツズマブ (t r a s t u z u m a b) は、マウスモノクローナル抗体 (4 D 5) の抗原結合部位のアミノ酸配列を、ヒト I g G₁ の相当部分に遺伝子工学的に置換した遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗ヒト上皮増殖因子受容体2型 (H E R 2) モノクローナル抗体の相補性決定部、ヒトフレームワーク部及びヒト I g G₁ の定常部からなる。トラスツズマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。

本明細書において、トラスツズマブは、特表平6-508267号に記載された抗体であり、具体的には、軽鎖可変ドメインアミノ酸配列：

[0023] [化1]

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWY  
QQKPGKAPKLLIYSASFVPSRFSRSGTDF  
LTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT  
(配列番号1)
```

[0024] 及び重鎖可変ドメインアミノ酸配列：

[0025] [化2]

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW  
VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA  
DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD  
YWGQGTLLTVSS  
(配列番号2)
```

[0026] を含むヒト化抗体である。

トラスツズマブは、H E R 2 過剰発現が確認された乳癌またはH E R 2 過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の胃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、ハーセプチン (登録商標)、又は、種々のバイオシミラー品 (トラスツズマブB S) として入手可能である。

ハーセプチン (登録商標) 及びそのバイオシミラー品においてトラスツズマブは、450個のアミノ酸残基からなるH鎖 (γ1鎖) 2分子及び214個のアミノ酸残基からなるL鎖 (κ鎖) 2分子で構成される糖タンパク質 (分子量：約148,000) である。

[0027] ペルツズマブ (p e r t u z u m a b) は、マウスモノクローナル抗体 (2 C 4) の抗原結合部位のアミノ酸配列を、ヒト I g G₁ の相当部分に遺伝子工学的に置換した遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗

HER2モノクローナル抗体の相補性決定部、並びにヒトIgG₁のフレームワーク及び定常部からなる。ペルツズマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。ペルツズマブは、HER2陽性の乳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、パージェタ（登録商標）として入手可能である。パージェタ（登録商標）においてペルツズマブは、449個のアミノ酸残基からなるH鎖（ γ 1鎖）2分子及び214個のアミノ酸残基からなるL鎖（ κ 鎖）2分子で構成される糖タンパク質（分子量：約148,000）である。

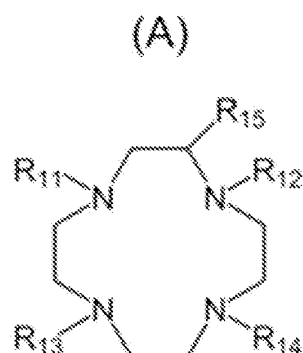
[0028] (1-3) キレート剤

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)、DOTA-GA(α -(2-Carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)、D0TP(((1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(methylene))tetrakisphosphonic 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 (DFO)、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''''-penta-acetic 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(Hydroxypropyltetraazacyclododecanetriacetic 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。

[0029]

[化3]

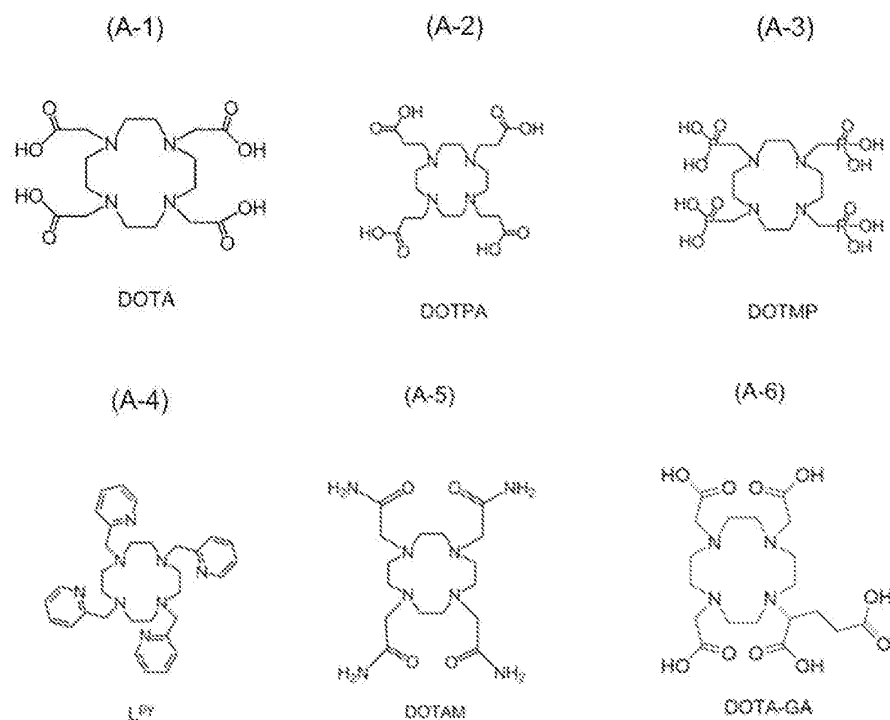


[0030] (式(A)中、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 及び R_{14} は、それぞれ独立して、 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 若しくは、 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ からなる基であり、であり、 R_{15} が、水素原子であり、 p が0以上3以下の整数である。

[0031] 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)、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-tetraazacyclododecane-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) がさらに好ましい。

[0032] [化4]



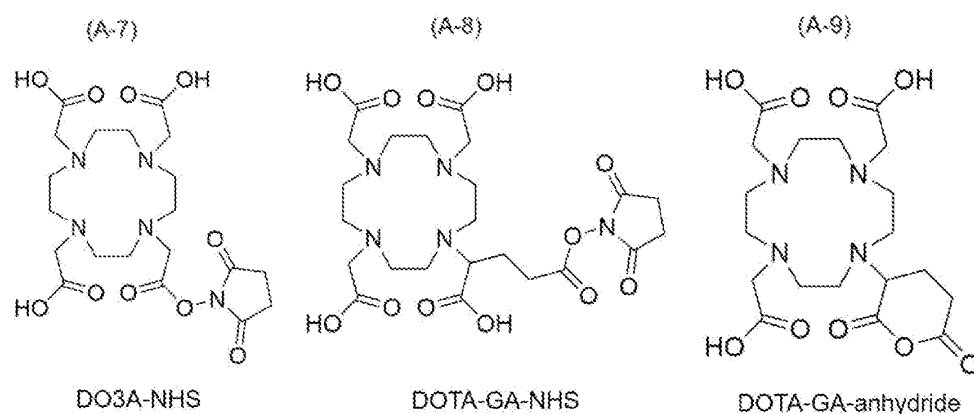
[0033] 本発明で用いられるキレート剤は、リンカー (L) を介してペプチドと連結している。本発明の放射性複合体において、キレート剤とリンカー (L) とは共有結合により接続されていることが好ましい。したがって、前述したキレート剤は、本発明の放射性複合体においては、化合物内の一部の基がリンカー (L) と共有結合を形成する基に置換されていてもよい。例えば、本発明で用いられるキレート剤が、式 (A) で表される化合物である場合は、 R_{12} 又は R_{15} がリンカー (L) と共有結合を形成する基に置換されていてもよい。好ましくは、 R_{12} がリンカー (L) と共有結合を形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、 $-(CH_2)_pCONHCH_2CH_2CONH_2$ であることが好ましい。

(CHCOOH)(CH_2) $_p$ COOH 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] [化5]



[0037] (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。

[0038] 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。

[0039] (Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd) . . . (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、好ましくは、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、好ましくはリシン残基であり、かつ X a a 2 が架橋剤で修飾されている。

[0040] 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。

[0041] 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HER2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。

[0042] X a a 1 及び X a a 3 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、破線部分はスルフィド基との結合部分を示す。

[0043] [化6]



[0044] X a a 1 及び X a a 3 は、上述した組み合わせに代えて、X a a 1 及び X a a 3 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。

[0045] 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 WO 2 0 1 6 / 1 8 6 2 0 6、WO 2 0 1 7 / 2 1 7 3 4 7 及び WO 2 0 1 8 / 2 3 0 2 5 7 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。



[0046] 式中、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、

X a a 1' 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、

X a a 2' 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、

X a a 3' 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

X a a 4' はチロシン残基又はトリプトファン残基である。

上記式で、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。

[0047] 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、（X a a 2）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。

[0048] （1）DCAYH(Xaa2)GELVWCT（配列番号3）
（2）GPDCAVH(Xaa2)GELVWCTFH（配列番号4）
（3）RCAYH(Xaa2)GELVWCS（配列番号5）

- (4) GPRCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (配列番号6)
- (5) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号7)
- (6) GDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号8)
- (7) GPSCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (配列番号9)
- (8) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (配列番号10)
- (9) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTHH (配列番号11)
- (10) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号12)
- (11) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号13)
- (12) SDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (配列番号14)
- (13) RGNCAYH(Xaa2)GQLVWCTYH (配列番号15)
- (14) G(Xaa1)DCAYH(Xaa2)GELVWCT(Xaa3)H (配列番号16)

[0049] 上記の式(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Xaa2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ヒトIgGまたはウサギIgGのFc領域と共有結合することができる。ここで、本明細書において、「ヒト抗HER抗体」というときは、ヒトIgGにおいて、抗体修飾ペプチドが結合できる領域が保存されている抗HER抗体を意味し、好ましくは、ヒトIgGのFc領域が保存されている抗HER2抗体をいう。

[0050] 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、ヒト抗HER2抗体(例えば、トラスツマブ)におけるEuナンバリングに従うLys248残基又はLys246残基、好ましくはLys248残基と反応することで、ヒト抗HER2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、トラスツマブ以外の抗HER2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。

[0051] (1-5) リンカー(L)

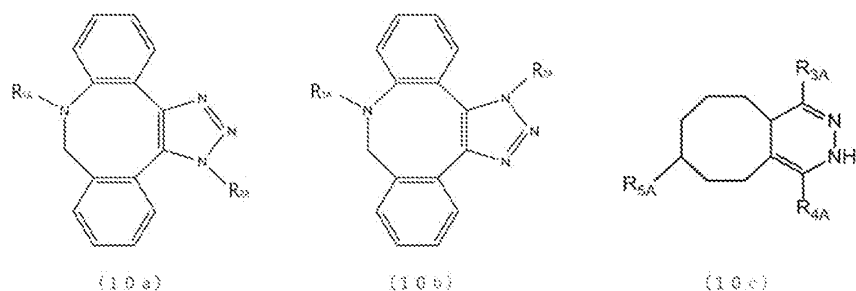
リンカー(L)は、本発明の放射性複合体において、キレート剤とペプチドとを連結できるものであれば特に限定されない。本発明で用いられるリンカー(L)は、チオウレア結合を含むものでなければ特に限定されず、置換又は無置換のアルキル基、置換又は無置換のヘテロアルキル基、ポリエチレングリコール(PEG)基、ペプチド、糖鎖、ジスルフィド基、アミド基、

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HER2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（L₁）及びキレートリンカー（L₂）を含む用語である。抗体修飾リンカー（L₁）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（L₂）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。

[0052] 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（L₁）とキレートリンカー（L₂）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（L₂）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。

[0053] [化7]



[0054] 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。

[0055] 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HER2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。

[0056] （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HER2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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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領域が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。

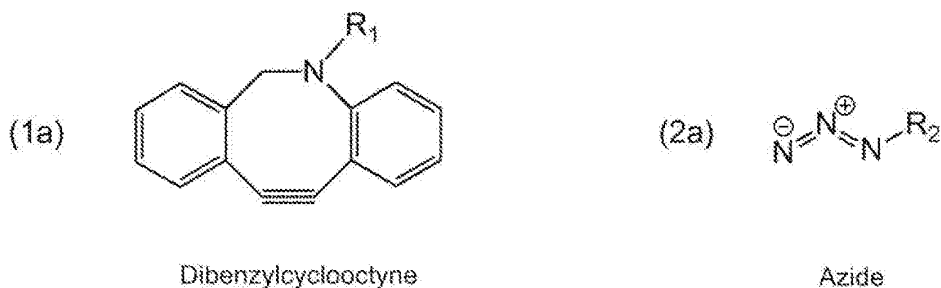
以下工程（A）及び（B）について、詳述する。

[0060] 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。

[0061] 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原子団が1, 2, 4, 5-テトラジンを有する原子団（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

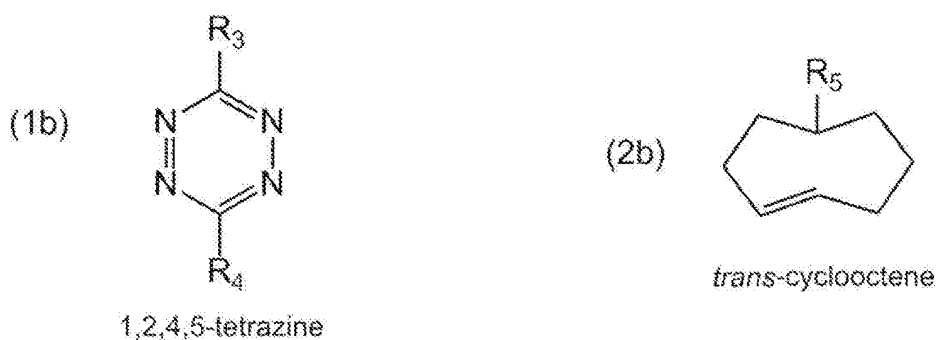
合せである。

[0062] [化8]



[0063] 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。

[0064] [化9]



[0065] 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(1b)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(1b)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。

[0066] 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、DBCO-C6-Acid、Dibenzylcyclooctyne-Amine、Dibenzylcyclooctyne Maleimide、DBCO-PEG acid、DBCO-PEG-Alcohol、DBCO-PEG-amine、DBCO-PEG-NH-Boc、Carboxyrhodamine-PEG-DBCO、Sulforhodamine-PEG-DBCO、TAMRA-PEG-DBCO、DBCO-PEG-Biotin、DBCO-PE

G-DBCO、DBCO-PEG-Maleimide、TCO-PEG-DBCO、DBCO-mPEGなどが選択できるが、好ましくはDibenzylcyclooctyne Maleimideを用いる。

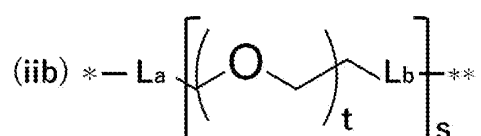
[0067] 錯体形成工程（A）では、より好ましくは、以下の式（ii）で表される構造を有する化合物を用いる。



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（L₂）である

[0068] 式（ii）中、Bは以下の式（iib）で表される。

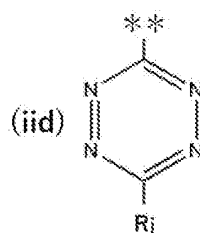
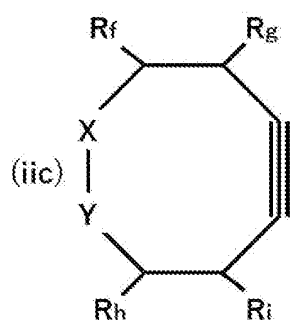
[0069] [化10]



[0070] 式（iib）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。

[0071] 式（ii）中、Cは、以下の式（iic）で表されるアルキン誘導体又は式（iid）で表されるテトラジン誘導体のいずれかである。

[0072] [化11]



[0073] 式（iic）中、XはCHR_k-**又はN-**であり、YはCHR_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CHR_k-**で、YがCHR_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)

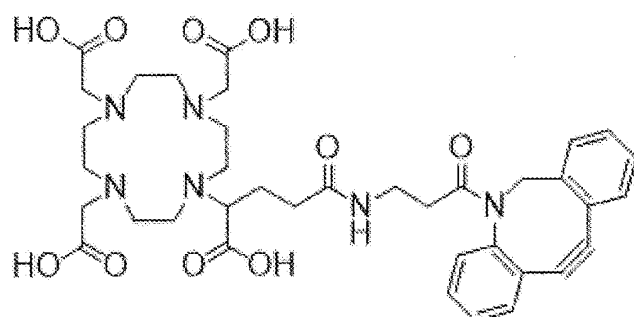
[0074] 工程(A)で使用されるキレート剤として、上記式(A)中、R₁₁乃至R₁₄が、 $-(CH_2)_pCOOH$ であり、pが1であり、R₁₅がBとの結合部位であるDOTA誘導体；又はR₁₁乃至R₁₄が、 $-(CH_2)_pCOOH$ であり、pが1であり、R₁₂がBとの結合部位(*)であり、R₁₅が水素原子であるDO3A誘導体若しくはDOTAGA誘導体のいずれかがより好ましい。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] [化12]



DOTAGA-DBCO

[0078] 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。

[0079] 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-ピペラジン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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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HER2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。

[0084] 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、WO2017/217347及びWO2018/230257に記載の方法に準じて行うことができる。

[0085] 抗体修飾リンカー (L_2) は、抗体修飾ペプチドと、以下の式 (S1) 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。)

[0086] 前記式 (S1) 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。

[0087] 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 (P2) に示す構造を有していることが好ましい。式 (P2) 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。

[0088] [化13]



[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 抗体修飾ペプチドとヒト抗HER2抗体とを結合させて、ペプチド修飾抗体を得る方法は、WO2016/186206の記載に準じて、例えば、上述した抗体修飾ペプチドと、ヒト抗HER2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。

[0094] 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ヒト抗HER2抗体を混合する工程を含む、抗体修飾ペプチドとヒト抗HER2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ヒト抗HER2抗体の間で架橋反応が生じ得る。架橋反応は、抗体修飾ペプチドの上記Xaa2のアミノ酸残基と、ヒトI

g G F cにおけるE u n u m b e r i n gに従うL y s 2 4 8又はL y s 2 4 6、好ましくはL y s 2 4 8との間で部位特異的に生じ得る。

[0095] 該混合工程の条件は、抗体修飾ペプチドとヒト抗H E R 2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ヒト抗H E R 2抗体を、適当なバッファー中において、室温（例えば約1 5℃～3 0℃）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。

[0096] 一例として、少なくとも水を含む溶媒を加えて、ヒト抗H E R 2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、T r i s緩衝液、H E P E S緩衝液、若、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、2 5℃におけるp Hを好ましくは4. 0以上1 0. 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 μ m o l / L以上、上限を1 0 0 0 μ m o l / L以下とし、上限についてより好ましくは5 0 0 μ m o l / L以下とすることが好ましい。

[0097] 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、1 0℃以上3 0℃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ヒト抗H E R 2抗体の混合比率は、特に限定しない。抗体修飾ペプチドとヒト抗H E R 2抗体のモル比率は、例えば1 : 1～2 0 : 1、好ましくは2 : 1～2 0 : 1又は5 : 1～1 0 : 1とすることができる。

[0098] ある好ましい態様では、上記混合工程においては、ヒト抗H E R 2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、ヒト抗H E R 2

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。

[0099] 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ヒト抗 H E R 2 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 1 0 分～2 時間とすることができる。

[0100] 以上の工程を経て得られるペプチド修飾抗体は、ヒト抗 H E R 2 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、ヒト抗 H E R 2 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 I g G - B P カラムが例示できる（WO 2 0 2 1 / 0 8 0 0 0 8 参照）。

[0101] I g G - B P カラムは、I g G 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 I g G 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 I g G - B P 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 $4 \sim 47 : 53 \sim 96$ 、好ましくは $4 \sim 30 : 70 \sim 96$ 、より好ましくは $4 \sim 20 : 80 \sim 96$ 、さらに好ましくは、 $4 \sim 10 : 90 \sim 96$ である。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 得られた複合体は、これをそのままでもよく、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。

[0110] 工程（A）及び（B）によって製造される複合体は、抗HER2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。

[0111] （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、且つ生体と略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HER2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HER2が過剰発現しているがんは、HER2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、唾液腺がん、卵巣がん、膀胱がん、胆道がん、胃がん又は乳がんを挙げることができる。また、HER2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HER2遺伝子が非腫瘍組織に比べて有意な増幅又はHER2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。

[0112] 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95%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95%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HER2抗体または抗HER2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、ヒスチジン緩衝液またはコハク酸緩衝液を使用することができる。ヒスチジン緩衝液は、ヒスチジンとその塩から構成され、例えば、ヒスチジンとその塩酸塩、または、ヒスチジンとその酢酸塩から構成することができる。コハク酸緩衝液は、コハク酸とその塩から構成され、例えば、コハク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、スクロース又はトレハロースなどの任意の糖類を含んでいてもよいし、ポリソルベート20、ポリソルベート80などの可溶化剤を含んでいてもよい。

[0113] 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。

[0114] 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、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、P E T (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、S P E C T (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。

[0115] (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H E R 2抗体との複合体を有効成分として含有し、抗H E R 2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、L u - 1 7 7 又はY - 9 0) 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95%以上である。また、放射性金属核種が α 線核種 (例えば、A c - 2 2 5) 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95%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H E R 2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

[0116] 本発明では、抗HER2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HER2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。

[0117] 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HER2抗体とキレート剤との

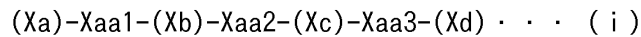
複合体であって、

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) :



(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、

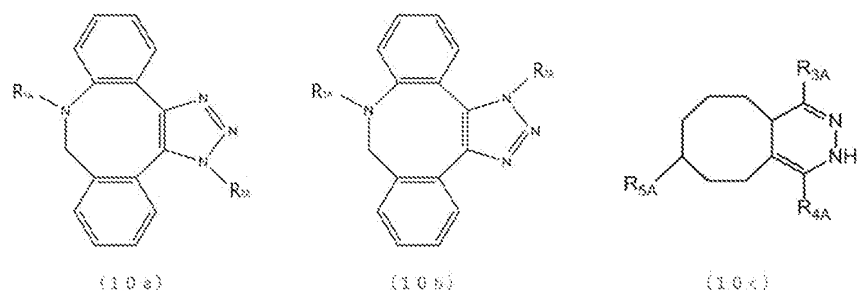
X a a 2 は、リシン残基、アルギニン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸、又はジアミノプロピオン酸であり、かつ X a a 2 が架橋剤で修飾されている。) で表される、13～17 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である、[1] 又は [2] に記載の複合体。

[4] 前記放射性金属核種が Ac-225、Y-90、Lu-177 又は Z

r-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。

[0118] [化14]

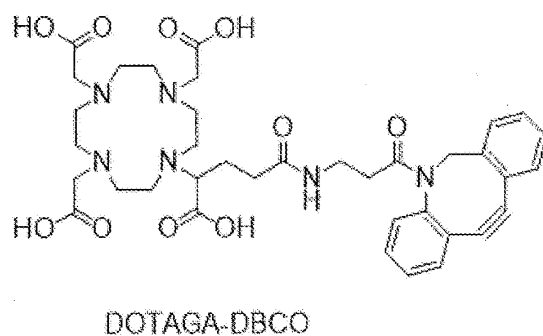


[0119] (式(10a)及び式(10b)中、 R_{1A} は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{2A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。式(10c)中、 R_{3A} 及び R_{4A} のうち一方は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示し、他方は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{5A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。)

[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]に記載の放射性複合体。

[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HER2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]に記載の放射性複合体

[0120] [化15]



[0121] [8] 前記抗HER2抗体がトラスツズマブである、[1]乃至[7]いずれか一項に記載の複合体。

[9] 前記抗HER2抗体がペルツズマブである、[1]乃至[7]いずれか一項に記載の複合体。

[10] [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。

[11] がんの放射線内用療法に用いられる、[10]に記載の放射性医薬。

[12] がんの診断に用いられる、[10]に記載の放射性医薬。

[13] [11]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、[12]に記載の放射性医薬。

[14] 放射性金属核種がキレート化したキレート剤と、抗HER2抗体との複合体を有効成分として含有し

抗HER2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90%以上である、放射性医薬。

[15] 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、[14]に記載の放射性医薬。

[16] がんの放射線内用療法に用いられる、[15]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HER2抗体との複合体を有効成分として含有し

抗HER2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HER2抗体との複合体を有効成分として含有し

抗HER2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

[0122] 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。

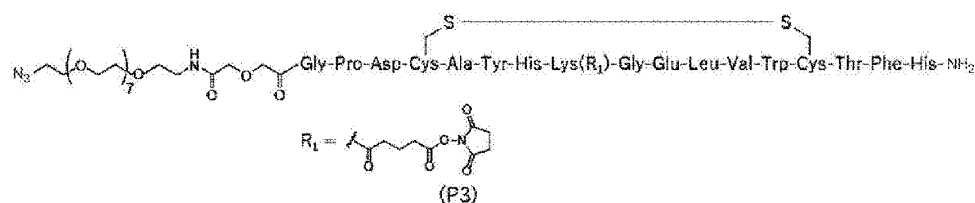
[0123] [実施例1] ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOを用いたトラスツズマブとの複合体の製造

(1. 抗体修飾工程)

WO2017/217347に記載の方法で、下記式(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。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 R_1 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(L_1)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。

[0124]

[化16]



[0125] (配列番号 17)

(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、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、Pheはフェニルアラニンを示す。)

[0126] このペプチドと、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標）、ロシュ社製）とを0.02mol/L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。

[0127] 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と、二価抗体を相対的に多く含む第二の抗体組成物とに分離した。

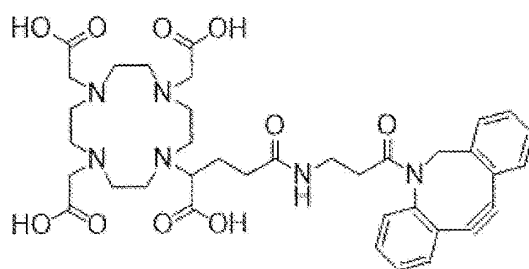
上記工程で得られたペプチド修飾抗体を含む溶液を、0.02mol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で希釈して、上記IgG-BPカラムに添加し、0.15mol/L塩化ナトリウム含有0.10mol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.7）を流し、第二の抗体組成物を回収し、回収した画分に含まれる二価抗体の濃度が15mg/mLになるように濃度を調整した。その後、IgG-BPカラムに0.15mol/L塩化ナトリウム含有0.10mol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.5）を流し、第一の抗体組成物を回収し、回収した画分に含まれる一価抗体の濃度が15mg/mLになるように濃度を調整した。得られた第一の抗体組成物を含む溶液を後述

の標識工程に供した。

[0128] (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0.005 mLと、0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0) 0.075 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320~340 MBq/mL、Oak Ridge National Laboratory製より調製、液量0.005 mL) 1.6~1.7 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2500：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は30分間とした。

[0129] [化17]



DOTAGA-DBCO

[0130] 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90%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。

[0131] （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 mmol/L アルギニン含有0.1 mmol/L ヒスチジン緩衝液 pH 6.0 に添加し、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85 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（%）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。

[0132] ^{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。

[0133] [表1]

	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 1	DOTAGA	トラスツ ズマブ	1:1.2	77%	93%	71%

[0134] [実施例2] ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOを用いたトラスツズ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DMSOに分散させて、キレート剤を0.33mmol/L含む分散液とした。この分散液0.030mL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181MBq/mL、日本メジフィジックス株式会社製より調製、液量0.33mL)60MBq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250:1であり、反応液の加熱温度は70°C、加熱時間は60分間とした。

[0135] 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90%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。

[0136] （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、未精製のままそれぞれ0.1mol/Lアルギニン含有0.1mol/Lヒスチジン緩衝液pH6.0に添加し、37℃で120分間クリック反応させて、実施例2の ^{89}Zr 錯体標識抗体を得た。 ^{89}Zr 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100nmolであり、DBCOとアジドとのモル比はそれぞれ約1:1であった。未精製時の実施例の ^{89}Zr 錯体標識抗体の反応率（%）を以下の表2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 ^{89}Zr 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 ^{89}Zr 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 ^{89}Zr 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 ^{89}Zr 錯体標識抗体のRCP及びRCYを以下の表2に示す。

[0137] ^{89}Zr 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。

[0138]

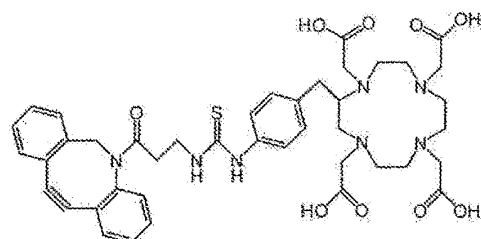
[表2]

	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2	DOTAGA	トラスツ ズマブ	1:1	52%	93%	43%

[0139] [比較例1] ^{225}Ac 標識DOTA-DBCOを用いたトラスツズ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3に示した。

[0140] [化18]



DOTA-DBCO

[0141] [表3]

	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1	DOTA	トラスツ ズマブ	1:1	60%	95%	34%

[0142] [実施例3] 製剤化工程

実施例1および比較例1の記載に従って製造する放射性複合体をそれぞれ0.5 mL エッペンチューブ (LoBind、エッペンドルフ社製) に一部抜き取り、保存緩衝液 (1.9 g/L トレハロース水和物、0.47 g/L L-ヒスチジン塩酸塩水和物、0.30 g/L L-ヒスチジン及び85 mg/L ポリソルベート20混液) で希釈した。

[0143] [評価1] 安定性評価

実施例3で得られた各放射性複合体を、室温（24.5～25.5℃）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、凝集体の割合、抗原結合活性を評価した。なお、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半減期に相当する。

[0144] [評価1-1] 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で反応率を調べる際に使用した条件と同様とした。

結果を表4に示す。

[0145] [表4]

	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)	99.98	99.91	99.93	99.84
放射性複合体 (比較例1)	98.32	98.74	94.66	76.54

[0146] 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日間保存した場合はRCPとして99%以上が維持されていた。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。製造終了後室温で14日間保存した場合では、RCPとして80%を下回っていた。

[0147] [評価1-2] 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e2695型セパレーションモジュールを用い、UV検出器としてWaters社製の2489型UV/Vis検出器を使用し、下記の条件で分析した。製造終了後14日間保存した場合の各成分の割合を表5に示す。製造終了後14日間保

存した場合、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の凝集体の割合は、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の凝集体の割合に比べて少なくなった。

[0148] [表5]

	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 1）	94.79	1.51
放射性複合体（比較例 1）	93.18	3.34

[0149] [HPLC条件]

カラム：TOSOH TSKgel guard column SWXL (6mm x 4cm) , TOSOH TSKgel G3000SWXL (5 μ m, 7.8 $\times$ 30cm) $\times$ 2本（直列）

カラム温度：25 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相：0.2mol/Lアルギニン塩酸塩含有0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH6.8）

流量：毎分 1.0mL

面積測定範囲：30分

検出波長：280nm

[0150] [評価1－3] 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日点）及び保存最終日（14日点）のみ）。ATCC（American Type Culture Collection）から購入したHER2陽性のヒト卵巣がん細胞株であるSK-OV-3細胞およびHER2陰性のヒト乳がん細胞株であるMDA-MB-231細胞を雌性BALB/c nu/nuマウスの脇腹皮下にそれぞれ 5×10^6 cellsおよび 1×10^7 cells投与して担癌マウスを作製した。その後、SK-OV-3腫瘍およびMDA-MB-231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）に包埋して凍結切片を作製した。10%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、SK-OV-3腫瘍切片およびMDA-MB-231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3に示す。

それぞれの溶液にトラスツズ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HER2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HER2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SK-OV-3腫瘍切片にのみ結合し、HER2選択的な結合を示した。トラスツズマブを添加した溶液ではSK-OV-3腫瘍切片に対する結合が阻害され、結合のHER2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HER2に対する結合の選択性が維持されていた。SK-OV-3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。

[0151] [評価2] 薬効評価

マウスを用いてSK-OV-3細胞の皮下担癌モデルを作製し、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抗腫瘍効果を確認した。

ATCCから購入したHER2陽性のヒト卵巣がん株であるSK-OV-3細胞をMcCoy's 5A培地（gibco）に懸濁し、5週齢の雌性BALB/c nu/nu（日本チャールス・リバー）の脇腹皮下に 5×10^6 cells投与して担癌マウスを作製した。担癌処置から3週間後、腫瘍体積がおおよそ100~300 mm³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を表6に示す。腫瘍体積は以下式に従って算出した。

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

[0152] [表6]

	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）群	218.1±38.1	19.8±1.6
放射性複合体（比較例1）群	212.6±34.3	20.0±1.2
抗体対照群	210.0±28.7	19.3±1.4
Vehicle 群	207.6±32.6	20.0±1.4

[0153] 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をいずれも15kBq/匹（トラスツズマブとして50μg/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、各放射性複合体と同じ抗体量のトラスツズマブを投与した群（抗体対照群）およ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38日まで経時的に、一般状態の観察、体重および腫瘍体積を計測した。経時的な腫瘍体積の変化を図1に、経時的な体重変化を図2に示す。

[0154] 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を投与した群は、投与後38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 Preclinica（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。一方で、各放射性複合体を投与した群の間で、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。

[0155] [実施例4] ¹⁷⁷Lu標識DOTAGA-DBCOを用いたトラスツズ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。

[0156] （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0.156mol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）を用いて、

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 0.02 mL と、 0.225 mmol/L のゲンチジン酸を溶解した 0.156 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} 5.5$) 0.02 mL と、放射性金属源として ^{177}Lu イオン含有溶液 (0.04 mmol/L 塩酸水溶液、放射能濃度 516 MBq/mL , POLATOM 製より調製、液量 0.05 mL) 25.8 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、 ^{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 $236:1$ であり、反応液の加熱温度は 70°C 、加熱時間は 5 分間とした。

[0157] 得られた ^{177}Lu 錯体の RCP 測定は実施例 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 99% 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。

[0158] (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 mmol/L アルギニン含有 0.1 mmol/L ヒスチジン緩衝液 $\text{pH} 6.0$ に添加し、 37°C 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 8.4 nmol 及び 10 nmol であり、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 ^{177}Lu 錯体標識抗体の反応率 (%) を以下の表 7 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 7 に示す。

[0159] ^{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。

[0160]

[表7]

	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 4	DOTAGA	トラスツ ズマブ	1:1.2	55%	99%	55%

[0161] [比較例4] ^{177}Lu 標識DOTAGA-DBCOを用いたトラスツズ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4に準じて操作を行った。結果を表8に示す。

[0162] [表8]

	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	トラスツ ズマブ	1:1.2	81%	94%	74%

[0163] [実施例5] ^{90}Y 標識DOTAGA-DBCOを用いたトラスツズ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。

[0164] (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0.156mol/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0.03mLと、0.15mol/Lのゲンチジン酸を溶解した0.156mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)0.03mLと、放射性金属源として ^{90}Y イオン含有溶液(0.04mol/L塩酸水溶液、放射能濃度3786~3943MBq/mL、Eckert & Ziegler社製より調製、液量0.03mL)113~118MBq(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、 ^{90}Y 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： ^{90}Y イオン＝69～72：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は5分間とした。

[0165] 得られた ^{90}Y 錯体のRCP測定は実施例1のRCP測定と同様に行った。その結果、 ^{90}Y 錯体のRCPは99%であった。得られた ^{90}Y 錯体溶液は、そのまま標識工程に用いた。

[0166] (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 ^{90}Y 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0.1mol/Lアルギニン含有0.1mol/Lヒスチジン緩衝液pH6.0に添加し、37℃で120分間クリック反応させて、 ^{90}Y 錯体標識抗体を得た。 ^{90}Y 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9nmol及び10nmol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 ^{90}Y 錯体標識抗体の反応率(%)を以下の表9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 ^{90}Y 錯体標識抗体のRCP及びRCYを以下の表9に示す。

[0167] ^{90}Y 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。

[0168] [表9]

	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 5	DOTAGA	トラスツ ズマブ	1：1.1	88%	99%	77%

[0169] [比較例5] ^{90}Y 標識DOTA-DBCOを用いたトラスツズ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5

に準じて操作を行った。結果を表 10 に示す。

[0170] [表10]

	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 5	DOTA	トラスツ ズマブ	1:1.2	57%	92%	45%

[0171] [実施例 6] 実施例 4、実施例 5、比較例 4 又は比較例 5 の記載に従って製造した放射性複合体の保存安定性

[0172] (製剤化工程)

実施例 4、実施例 5、比較例 4 又は比較例 5 の記載に従って製造した放射性複合体をそれぞれ 0.5 mL エッペンチューブ (LoBind、エッペンドルフ社製) に一部抜き取り、保存緩衝液 (4.2 g/L トレハロース水和物、0.47 g/L L-ヒスチジン塩酸塩水和物、0.30 g/L L-ヒスチジン及び 85 mg/L ポリソルベート 20 混液) で希釈した。

[0173] [評価 3] 安定性評価

実施例 6 で得られた各放射性複合体を、室温 (20.6~21.8℃) 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、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、Y-90 である場合には、約 2.5 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 Lu-177 である場合には、約 2 半減期に相当し、Y-90 である場合には、約 5 半減期に相当する。

[0174] [評価 3-1] 放射化学的純度

RCP を 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 11 に示す。

[0175]

[表11]

	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4)	98.5	98.2	97.9	98.0
放射性複合体 (比較例4)	96.7	95.4	84.7	59.8
放射性複合体 (実施例5)	99.0	98.3	96.6	95.4
放射性複合体 (比較例5)	92.2	87.7	72.8	62.4

[0176] チオウレア結合を含まない実施例4又は5の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後7日間保存した場合はRCPとして95%以上が維持されていた。チオウレア結合を含まない実施例4又は5の記載に従って製造した放射性複合体は、製造終了後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。

比較例4の記載に従って製造した放射性複合体を製造終了後室温で7日間保存した場合はRCPとして85%を下回っており、比較例5の記載に従って製造した放射性複合体を製造終了後室温で7日間保存した場合はRCPとして75%を下回っていた。比較例4の記載に従って製造した放射性複合体を製造終了後室温で14日間保存した場合は、RCPとして60%を下回っており、比較例5の記載に従って製造した放射性複合体を製造終了後室温で14日間保存した場合は、RCPとして65%を下回っていた。

[0177] [評価3-2] 抗原結合活性

抗原結合活性は *in vitro* ARGで確認した(0及び14日点のみ)。評価方法は評価1-3記載の方法と同様に行った。結果を図4、5に示す。

保存最終点(14日点)において、実施例4、実施例5、比較例4又は比較例5の記載に従って製造した放射性複合体のいずれでもHER2に対する結合活性が確認された。実施例4、実施例5、比較例4又は比較例5の記載に従って製造した放射性複合体はいずれもSK-OV-3腫瘍切片にのみ結

合し、HER2選択的な結合を示した。保存最終点（14日点）において、すべてのサンプルでHER2に対する結合の選択性が維持されていた。SK-OV-3腫瘍切片に結合した放射能は実施例4又は5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4又は5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よりも多くなった。

[0178] [評価4]

マウスを用いてSK-OV-3細胞の皮下担癌モデルを作製し、実施例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HER2陽性のヒト卵巣癌株であるSK-OV-3細胞をMcCoy's 5A培地（gibco）に懸濁し、5週齢のBALB/c nu/nu（日本チャールス・リバー）の脇腹皮下に 5×10^6 cells投与して担癌マウスを作製した。担癌処置から4週間後、腫瘍体積がおおよそ100～400 mm³であることを確認した。

実施例2の記載に従って製造した放射性複合体を5 MBq/匹（n=24）の用量で尾静脈内投与した。投与後60時間後に小動物PETイメージング装置（PET/CT Si78、Bruker社製）を用いて下表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6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、HER2陽性腫瘍の描出が可能であった。

[0179] [表12]

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

[0180] [実施例7] ²²⁵Ac錯体標識抗体とADC薬剤の薬効比較

[評価5] ²²⁵Ac錯体標識抗体を用いた薬効評価

マウスを用いてSK-OV-3の皮下担癌モデルを作製し、実施例1の記

載に従って製造した ^{225}Ac 錯体標識抗体と市販のAntibody-Drug-Conjugate (ADC) 薬剤の抗腫瘍効果を比較した。ADC薬剤はトラスツズマブ デルクステカン（エンハーツ（登録商標）、第一三共株式会社）及びトラスツズマブ エムタンシン（カドサイラ（登録商標）、中外製薬株式会社）を使用した。また、抗体対照としてトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標）、ロシュ社製）を使用した。

評価2に記載の方法を用いて、SK-OV-3腫瘍担癌マウスを作製した。担癌処置後、腫瘍体積が $150 \sim 550 \text{ mm}^3$ 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。その際の各群マウスの腫瘍体積と体重を表13に示す。なお、エンハーツ（登録商標）は投与量に応じて低用量投与群と高用量投与群に分け、低用量投与群は投与される抗体量が ^{225}Ac 錯体標識抗体群と同程度になるように調整し、高用量投与群は臨床用量をマウスで体重換算した抗体量を投与するように調整した。

[0181] [表13]

	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	342.9 ± 57.9	19.8 ± 1.2
ハーセプチン（登録商標） 投与群	302.7 ± 123.8	20.7 ± 1.1
カドサイラ（登録商標） 投与群	270.2 ± 23.4	20.3 ± 1.8
エンハーツ（登録商標） 低用量投与群	357.5 ± 172.0	19.9 ± 1.5
エンハーツ（登録商標） 高用量投与群	379.1 ± 113.7	20.9 ± 1.3

[0182] 実施例1の記載に従って製造した放射性複合体を $20 \text{ kBq}/\text{匹}$ （トラスツズマブとして $20 \mu\text{g}/\text{匹}$ ）の用量で尾静脈内投与した。また、ハーセプチン（登録商標）では、 $20 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で、カドサイラ（登録商標）では、 $72 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で、エンハーツ（登録商標）低用量群では、 $20 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で、エンハーツ（登録商標）高用量群では、 $108 \mu\text{g}/\text{匹}$ の

用量で、尾静脈内投与した。各群は4匹とし、投与後35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。その際の各群マウスの腫瘍体積の変化を図7に示す。

[0183] 放射性複合体投与群は、投与後35日点において、エンハーツ（登録商標）低用量群と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた（ $P < 0.05$ ）。有意差の検定には、統計解析ソフトStat Preclinicalを用いてTukey検定を行った。また、投与後35日点において、エンハーツ（登録商標）低用量群以外のADC薬剤投与群と比較して、放射性複合体投与群では、抗腫瘍効果が強くなる傾向が確認されたが、有意な差は認められなかった。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。

[0184] 〔実施例8〕放射性複合体の投与量毎の薬効比較

〔評価6〕放射性複合体を用いた薬効評価

マウスを用いてSK-OV-3の皮下担癌モデルを作製し、実施例1の記載に従って製造した放射性複合体と市販のADC薬剤の抗腫瘍効果を比較した。ADC薬剤はトラスツズマブ デルクステカン（エンハーツ（登録商標）、第一三共株式会社）を使用した。

評価2に記載の方法を用いて、SK-OV-3腫瘍担癌マウスを作製した。担癌処置から3週間後、腫瘍体積が $100 \sim 300 \text{ mm}^3$ 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を表14に示す。

[0185]

[表14]

	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） 高放射能投与群	210.5±26.5	19.2±1.2
放射性複合体（実施例1） 中放射能投与群	210.5±28.8	18.0±1.0
放射性複合体（実施例1） 低放射能投与群	205.4±33.6	19.0±1.8
A D C 薬剤中用量投与群	210.9±28.0	19.1±0.4
抗体対照群	206.9±35.2	19.5±1.1
V e h i c l e 群	209.7±30.9	18.8±1.1

[0186] 実施例1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20 k B q / 21 g の用量で、中放射能投与群では10 k B q / 21 g の用量で、低放射能投与群では5 k B q / 21 g （各群ともトラスツズマブとして3.57 mg / k g ）の用量で、尾静脈内投与した。A D C 薬剤は10 mg / k g の中用量で、尾静脈内投与した。また放射性複合体投与群と同じ抗体量（トラスツズマブとして3.57 mg / k g ）のトラスツズマブを投与した群（抗体対照群）及び保存緩衝液を投与したV e h i c l e 群を設定した。各群は6匹とし、投与後46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。その際の各群マウスの腫瘍体積の変化を図8に示す。また、観察最終日に培検を実施し、心臓、肺、脾臓、肝臓、及び腎臓を採取し、その重量を測定した。

[0187] 各放射性複合体投与群は、投与後46日点において、抗体対照群及びV e h i c l e 群と比較して抗腫瘍効果に有意な差が認められた（ $P < 0.01$ ）。また、投与した放射能依存的に抗腫瘍効果が強くなる傾向が確認され、投与放射能依存的に抗腫瘍効果が強くなることが示唆された。有意差の検定には、統計解析ソフトS t a t P r e c l i n i c a を用いてT u k e y 検定を行った。また、投与46日点において、A D C 薬剤投与群と比較して、放射性複合体高放射能群及び放射性複合体中放射能群では、抗腫瘍効果に有意な差が認められず、抗腫瘍効果は同等であることが示唆された。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。また、観察最終日に、培検により採取した臓器の重量に有意な差は認められなかった。

[0188] [実施例 9] ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO を用いたペルツズマブとの複合体の製造

(1. 抗体修飾工程)

実施例 1 と同様の方法にて、上記式 (P 3) で表されるアミノ酸残基を含むペプチドを得た。

[0189] このペプチドと、ペルツズマブ（パージェタ（登録商標）、中外製薬株式会社）とを 0.02 mol/L 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。

[0190] 次に、 1 g G-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 14.6 mg/mL になるように保存緩衝液 (41 g/L スクロース、 3.1 g/L L-ヒスチジン、 0.66 g/L 氷酢酸混液) ($\text{pH } 6.0$) で濃度を調整した。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。

[0191] (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 ($\text{pH } 5.5$) 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 0.02835 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 259 MBq/mL 、Rosatom State Atomic Energy Corporation 製より調製、液量 0.0126 mL) 3.25 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

A c 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 1 2 7 0 : 1 であり、反応液の加熱条件は 7 0 °C、加熱時間は 3 0 分とした。

[0192] 得られた ^{225}Ac 錯体の R C P を実施例 1 と同様に測定した。その結果、 ^{225}Ac 錯体の R C P は 6 7 % 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。

[0193] (3. 標識工程)

上述の工程 (2) を経て得られた未精製のまの ^{225}Ac 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) を含む溶液とを混合し、3 7 °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。D B C O 基とアジド基とのモル比はそれぞれ約 1 : 1. 3 であった。未精製の ^{225}Ac 錯体標識抗体の反応率を以下の表 1 5 に示す。

更に、3 7 °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 (M e r c k 社製、型番 : U F C 8 0 3 0 9 6) を用いて精製した。精製後の ^{225}Ac 錯体標識抗体の R C P 及び R C Y を以下の表 1 5 に示す。なお、 ^{225}Ac 錯体標識抗体の R C P 及び R C Y 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。

[0194] [表15]

	キレート剤 (A)	抗体 (B)	モル比 (A) : (B)	反応率 (%)	精製後	
				3 7 °C 2 時間 反応	R C P (%)	R C Y (%)
実施例 9	D O T A G A	ペルツ ズマブ	1 : 1. 3	4 9	1 0 0	3 8

[0195] [実施例 1 0] 製剤化工程

実施例 9 の記載に従って製造した放射性複合体をそれぞれ 0. 5 m L 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 (4 1 g / L スクロース、3. 1 g / L L - ヒスチジン、0. 6 6 g / L 氷酢酸及び 0. 2 g / L ポリソルベート 2 0 混液) で希釈した。

[0196] [評価 7] 安定性評価

実施例 9 で得られた放射性複合体を、室温（24.5～25.5℃）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、凝集体の割合を評価した。

[0197] [評価 7-1] RCP

RCP は TLC 分析結果から算出した。TLC の条件は実施例 1 で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 16 に示す。

[0198] [表16]

	RCP (%)			
	0 日点	1 日点	7 日点	14 日点
放射性複合体 (実施例 9)	99.6	99.3	98.0	97.8

[0199] 実施例 9 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 98% 以上維持された。製造終了後室温で 14 日間保存した場合でも RCP として 97% 以上維持されていた。

[0200] [評価 7-2] 凝集体の割合

凝集体の割合は、実施例 1 に記載の方法と同様に、SEC で確認した。製造終了後 14 日間保存した場合の各評価日点での各成分の割合を表 17 に示す。製造終了後 14 日保存した場合の凝集体の割合は 1.66% であった。

[0201] [表17]

	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 9），製造 後 0 日点	99.77	0.23
放射性複合体（実施例 9），製造 後 1 日点	98.68	0.25
放射性複合体（実施例 9），製造 後 7 日点	93.28	0.47
放射性複合体（実施例 9），製造 後 14 日点	89.51	1.66

[0202] 本出願は、日本で出願された特願 2020-174840（出願日：2020 年 10 月 16 日）、特願 2020-215740（出願日：2020 年

１２月２４日）、及び特願２０２１－０２４６８８（出願日：２０２１年２月１８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HER2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：

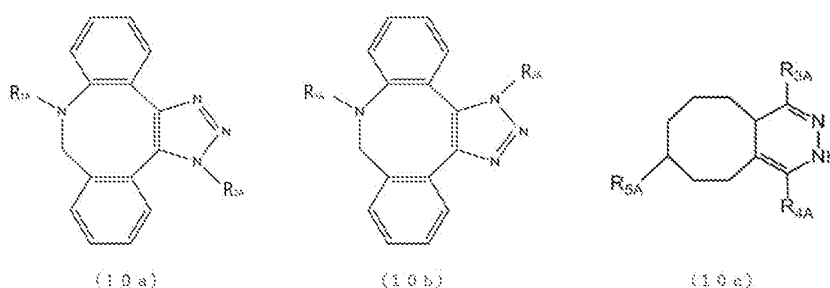
$$(Xa) - Xaa1 - (Xb) - Xaa2 - (Xc) - Xaa3 - (Xd) \cdots (i)$$
 （式（i）中、Xa、Xb、Xc及びXdは、それぞれ、連続するa個のX、連続するb個のX、連続するc個のX、及び連続するd個のXを表し、
 Xは、側鎖にチオール基及びハロアセチル基のいずれも有しないアミノ酸残基であり、
 a、b、c及びdはそれぞれ独立に1以上5以下の整数で、かつ $a + b + c + d \leq 14$ を満たし
 Xaa1及びXaa3は、それぞれ独立に、
 側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は、
 側鎖にハロアセチル基を有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]

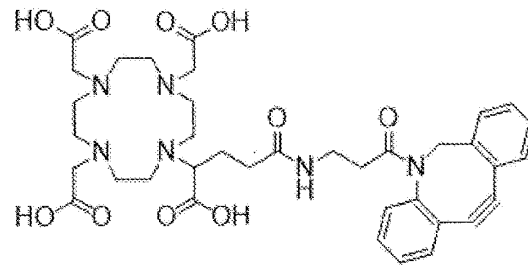


(式(10a)及び式(10b)中、 R_{1A} は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{2A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。式(10c)中、 R_{3A} 及び R_{4A} のうち一方は水素原子、メチル基、フェニル基又はピリジル基を示し、他方は前記キレート剤との連結部位を示し、 R_{5A} は前記ペプチドとの連結部位を示す。)

[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に記載の放射性複合体。

[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HER2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放射性複合体。

[化2]



DOTAGA-DBCO

- [請求項8] 前記抗HER2抗体がトラスツズマブまたはペルツズマブである、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HER2抗体との複合体を有効成分として含有し
抗HER2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HER2抗体との複合体を有効成分として含有し
抗HER2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。