

明 細 書

発明の名称：放射性金属標識抗体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、放射性金属標識抗体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、抗体が有する標的分子に対する特異性を利用して、標的分子の検出のための試薬、診断薬、又は、疾患の治療のための医薬品として用いられている。検出性能及び治療効果の更なる向上を目的として、放射性核種や薬剤が結合した抗体に関する検討が進められている。

[0003] 特許文献1には、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、ヒト抗体と結合可能なペプチドが記載されている。同文献には、上記ペプチドが、放射性同位元素を含む錯体等の標識物質や抗がん剤等の薬剤によって修飾可能であること、及び該ペプチドと抗体との複合体を形成可能であることも記載されている。

[0004] 特許文献2には、放射性金属である¹¹¹InのDTPA錯体によって修飾されたペプチドと、抗体との複合体が記載されている。この抗体複合体は、腫瘍に発現した標的分子に特異的に結合することも記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2016/186206号パンフレット

特許文献2：国際公開第2017/217347号パンフレット

特許文献3：国際公開第2019/125982号パンフレット

発明の概要

[0006] ところで、放射性金属錯体が結合した抗体を製造する際に、用いる配位子及び放射性金属の組み合わせによっては、錯体の形成効率を高めるために反応系を加熱する必要がある。しかし、この条件では、抗体が加熱変性してしまうので、目的の抗体を得ることができない。このような問題点を解決する

反応条件に関して、特許文献 1 及び 2 では何ら検討されていない。

[0007] したがって、本発明の課題は、穏和な反応条件であっても、抗体に対する放射性金属の標識効率に優れる放射性金属標識抗体の製造方法を提供することにある。

[0008] 本発明は、放射性金属錯体と、ペプチドにより部位特異的に修飾された抗体とをクリック反応させて、放射性金属標識抗体を生成する工程を有し、

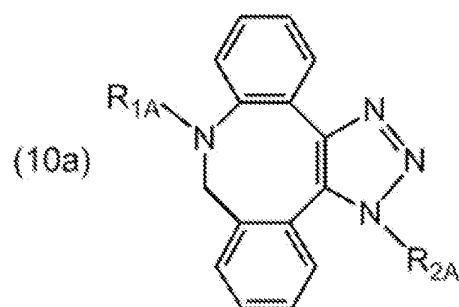
クリック反応は、放射性金属錯体が備える第 1 原子団と、ペプチドに直接的又は間接的に連結している第 2 原子団との間で実行され、

第 2 原子団が、アジド基を含む原子団であるか、又は *trans*-シクロオクテンを含む原子団である、放射性金属標識抗体の製造方法を提供するものである。

[0009] また本発明は、ペプチドにより部位特異的に修飾された放射性金属標識抗体であって、

放射性金属錯体がペプチドに直接的又は間接的に連結しており、該ペプチドと該放射性金属錯体との間に下記式 (10a) で表されるトリアゾール骨格含有構造を有するか、又は該ペプチドと該放射性金属錯体との間にピリダジン骨格含有構造を有する、放射性金属標識抗体を提供するものである。

[0010] [化1]

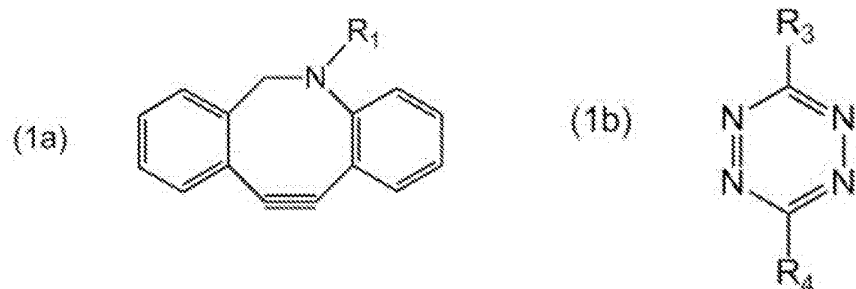


[0011] (式中、 R_{1A} は修飾部又はキレート部との結合部位を示し、 R_{2A} はペプチドとの結合部位を示す。)

[0012] また本発明は、放射性金属に配位するキレート部と、クリック反応可能な第 1 原子団を備える修飾部とを有し、第 1 原子団が下記式 (1a) 又は (1b

) のいずれかで表される原子団である、キレートリンカーを提供するものである。

[0013] [化2]



[0014] (式(1a)中、 R_1 は、修飾部又はキレート部との結合部位を示し、式(1b)中、 R_3 及び R_4 のうち一方が修飾部又はキレート部との結合部位を示し、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。)

[0015] また本発明は、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を含むペプチドによって、部位特異的に修飾されたペプチド修飾抗体であって、

ペプチドのN末端又はC末端にクリック反応可能な第2原子団を有し、第2原子団が、下記式(2a)又は(2b)のいずれかで表される原子団である、ペプチド修飾抗体を提供するものである。

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

(式中、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を表し、かつ、ジスルフィド結合を介して結合しているか若しくはスルフィド基がリンカ

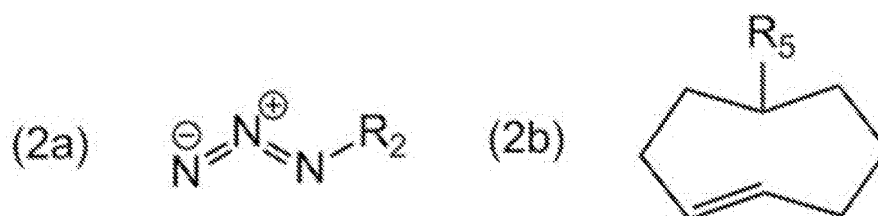
ーを介して結合しており、

又は、

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を表し、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を表し、かつ、チオエーテル結合を介して結合しており、

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る。）

[0016] [化3]



[0017] (式(2a)中、 R_2 は、ペプチドのN末端又はC末端との結合部位を示し、式(2b)中、 R_5 は、ペプチドのN末端又はC末端との結合部位を示す。)

[0018] 本発明によれば、穏和な反応条件であっても、抗体に対する放射性金属の標識効率に優れる。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の放射性金属標識抗体の製造方法を、その好ましい実施形態に基づき説明する。

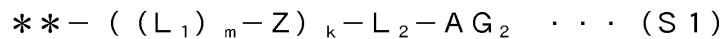
[0020] 本発明の製造方法は、放射性金属錯体と、ペプチドにより部位特異的に修飾された抗体（以下、これを単に「ペプチド修飾抗体」ともいう。）とをクリック反応させて、放射性金属標識抗体を生成する工程（標識工程）を備えている。放射性金属及びその錯体、並びにペプチドの詳細は後述する。

[0021] 放射性金属錯体及びペプチド修飾抗体は、クリック反応可能な原子団をそれぞれ有しており、これらの原子団が互いに反応して、放射性金属錯体とペプチド修飾抗体とを互いに結合できるようになっている。つまり、本工程に

おけるクリック反応は、放射性金属錯体が備える第1原子団と、ペプチド修飾抗体におけるペプチドに直接的に又は間接的に連結している第2原子団との間で実行されるものである。

[0022] 「直接的に又は間接的に」とは、第2原子団とペプチドとの間に、後述するリンカー構造を有しているか否かを指す。「直接的に」とは、リンカー構造を有していないことを指し、詳細には、第2原子団がリンカー構造を介さずにペプチドのN末端又はC末端に結合していることを指す。また、「間接的に」とは、リンカー構造を有していることを指し、詳細には、第2原子団がリンカー構造を介してペプチドのN末端又はC末端に結合していることを指す。「直接的に」あるいは「間接的に」のいずれの態様であっても、第2原子団は、ペプチドのN末端側に結合していることが好ましい。

[0023] 上述したリンカー構造は、以下の式(S1)で表される。



(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_1 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、 $(L_1)_m$ と L_2 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_2 は、第2のPEGリンカー部であり、

AG_2 は第2原子団である。)

[0024] 上記式(S1)において、 Z の構造は、 $(L_1)_m$ と L_2 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。

[0025] 本発明において、 L_2 を構成するPEGリンカー部は、以下の式(P1)に示す構造を有していることが好ましい。式(P1)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以下である。

[0026] [化4]

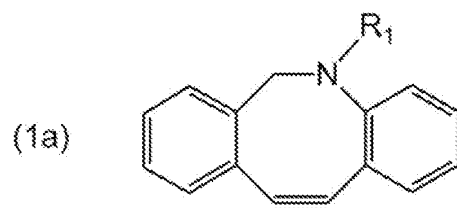


[0027] PEGリンカー部の構造の一端は、市販されているPEG化試薬に由来する構造又はPEG化する際に通常用いられる試薬に由来する構造によって修飾されていてもよく、特に限定されないが、例えばジグリコール酸又はその誘導体、マレイミド又はその誘導体に由来する構造が例示される。

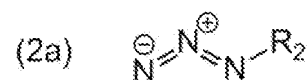
[0028] 本工程において、クリック反応可能な原子団の組み合わせとしては、クリック反応の種類に応じて適切なものが選択され、例えば、アルキンとアジドとの組み合わせ、1, 2, 4, 5-テトラジンとアルケンとの組み合わせ等が挙げられる。これらの原子団は、第1原子団が前記原子団のうち一つを有し、第2原子団が第1原子団の組み合わせとなる原子団を有していればよい。放射性金属錯体及びペプチド修飾抗体の安定性と、これらの結合効率の向上とを両立する観点から、第1原子団がアルキンであり且つ第2原子団がアジドであるか、又は第1原子団が1, 2, 4, 5-テトラジンであり且つ第2原子団がアルケンであることが好ましい。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。

[0029] 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。

[0030] [化5]



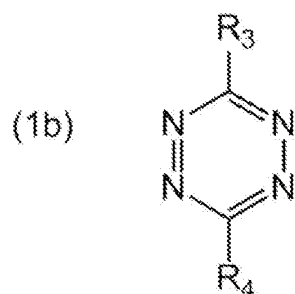
Dibenzylcyclooctyne



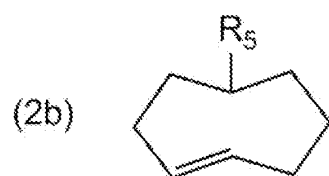
Azide

[0031] (式(1a)中、 R_1 は、修飾部又はキレート部との結合部位を示し、式(2a)中、 R_2 は、ペプチド修飾抗体におけるペプチドとの結合部位を示す。)

[0032] [化6]



1,2,4,5-tetrazine

*trans*-cyclooctene

[0033] (式(1b)中、 R_3 及び R_4 のうち一方が他の構造との結合部位を示し、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し、式(2b)中、 R_5 は、他の構造との結合部位を示す。)

[0034] 本工程は、放射性金属錯体とペプチド修飾抗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、放射性金属錯体及び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、放射性金属錯体及びペプチド修飾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。

[0035] 本工程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、トリスヒドロキシメチルアミノメタン緩衝液（以下、単に「T r i s 緩衝液」という）、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（以下、単に「H E P E S 緩衝液」という）、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として、下限は、3.5以上が好ましく、より好ましくは4.0以上、さらに好ましくは4.5以上、よりさらに好ましくは5.0以上、特に好ましくは5.5以上であり、上限は、好ましくは10.0以下、より好ましくは9.5以下、さらに好ましくは9.0以下、よりさらに好ましくは8.5以下、特に好ましくは8.0以下であり、好ましい範囲として4.0以上10.0以下、更に好ましい範囲として5.5以上8.5以下とする。

[0036] ペプチド修飾抗体の意図しない変性を防ぎつつ、放射性金属錯体とペプチド修飾抗体との結合効率を高める観点から、本工程におけるクリック反応は、反応温度として、上限は、120℃以下が好ましく、90℃以下がより好ましく、50℃以下がさらに好ましく、よりさらに好ましくは40℃以下である。また反応温度の下限は、クリック反応可能な温度であれば特に制限はないが、10℃以上が好ましく、15℃以上がより好ましく、20℃以上がさらに好ましく、30℃以上がよりさらに好ましく、35℃以上が特に好ましい。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、下限は、5分以上が好ましく、10分以上がより好ましく、20分以上がさらに好ましく、30分以上がよりさらに好ましく、60分以上が特に好ましく、上限は、36時間以下が好ましく、24時間以下がより好ましく、20時間以下がよりさらに好ましく、15時間以下が特に好ましく、好ましい範囲は5分以上24時間以下、更に好ましい範囲は10分以上20時間以下である。

[0037] 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、本工程の開始時において、下限は、0.01mL以上が好ましく、0.1mL

以上がより好ましく、さらに好ましくは1 mL以上であり、上限は、100 mL以下が好ましく、100 mL以下がより好ましく、さらに好ましくは10 mL以下であり、例えば、0.1 mL以上10 mL以下が好ましい。また、放射性金属錯体及びペプチド修飾抗体の反応液中の濃度は、それぞれ独立して、本工程の開始時において、下限は0.01 $\mu\text{mol/L}$ 以上が好ましく、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以上がより好ましく、さらに好ましくは1 $\mu\text{mol/L}$ 以上であり、上限は、10000 $\mu\text{mol/L}$ 以下が好ましく、1000 $\mu\text{mol/L}$ 以下がより好ましく、さらに好ましくは100 $\mu\text{mol/L}$ 以下であり、例えば1 $\mu\text{mol/L}$ 以上100 $\mu\text{mol/L}$ 以下であることが、目的とする放射性金属標識抗体の収量の観点から好ましい。

[0038] 得られた放射性金属標識抗体は、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。

[0039] 上述した工程を有する本発明の製造方法によれば、穏和な反応条件で、放射性金属錯体とペプチド修飾抗体とを結合させて、放射性金属によって標識された抗体を収率高く得ることができる。また、得られる標識抗体は、抗体の抗原特異性を阻害しない部位に特異的に標識を行うことができるので、抗体自体が有する抗原特異性が維持されたものとなる。特に上記工程は、放射性金属錯体とペプチド修飾抗体との結合反応を促進させるための加熱処理を行わなくとも、錯体と抗体との結合反応を十分に且つ短時間で進行させることができるので、陽電子放出核種等の半減期が短い放射性金属を用いた場合であっても、放射化学的純度及び放射化学的収率の高い標識抗体を短時間で得ることができる。

[0040] 本発明の製造方法は、標識抗体の用途及び目的に応じて、標識する放射性金属を特に制限なく使用可能とする観点から、リガンドと放射性金属とを反応させて、放射性金属錯体を形成する工程（錯体形成工程）を、標識工程の前に備えることが好ましい。本工程において用いられるリガンドは、第1原子団を有していることが好ましい。また、本工程における放射性金属は、錯

体形成効率を高める観点から、電離可能な放射性金属化合物の態様で用いることが好ましく、放射性金属イオンの態様で用いることが更に好ましい（以下、これらの態様を総称して「放射性金属源」ともいう。）。

[0041] また、リガンドと放射性金属との組み合わせに依存することなく、放射性金属錯体の形成効率を高める観点から、錯体形成工程において、リガンドと放射性金属とを加熱して反応させることが好ましい。この点に関して、リガンドと放射性金属との組み合わせによっては、非加熱条件下では錯体形成が良好に進行しない場合があるところ、放射性金属イオンが配位した錯体の形成を加熱条件下で行うことによって、リガンドと放射性金属との組み合わせに依存することなく、錯体形成を効率良く進行させることができる。

[0042] 錯体形成工程は、放射性金属イオンと錯体形成が可能であれば、リガンドと放射性金属源との添加順序は問わず、例えば、溶媒を収容した反応容器に、リガンド及び放射性金属源の一方を添加し、次いで他方を添加して反応させてもよく、リガンド及び放射性金属源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。

[0043] 錯体形成工程における反応条件としては、例えば以下の条件とすることができる。本工程で用いられる溶媒としては、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、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、若しくは炭素数 1 以上 5 以下のアルコール、アセトニトリル、N，N－ジメチルホルミアミド、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド及びアセトン等の水溶性有機溶媒又はこれらの混合溶媒を用いることができる。反応温度としては、例えば室温（25℃）であってもよく、加熱条件下であってもよいが、リガンド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、上限は、120℃以下が好ましく、90℃以下がより好ましくは、さらに好ましくは50℃以下であり、40℃以下で行うことがより更に好ましい。下限は、クリック反応可能な温度であれば

特に制限はないが、 0°C 以上が好ましく、 10°C 以上がより好ましく、 15°C 以上がさらに好ましく、 20°C 以上がよりさらに好ましく、 30°C 以上がより一層さらに好ましく、 35°C 以上が特に好ましい。好ましくは 30°C 以上 100°C 以下、更に好ましくは 37°C 以上 90°C 以下に加熱する。反応時間は、上述の反応温度であることを条件として、下限は、5分以上が好ましく、10分以上がより好ましく、20分以上がさらに好ましく、30分以上がよりさらに好ましく、特に好ましくは60分以上であり、上限は、300分以下が好ましく、150分以下がより好ましく、120分以下がさらに好ましく、特に好ましくは60分以下であり、好ましくは10分以上150分以下、更に好ましくは30分以上60分以下である。

[0044] 錯体形成工程における放射性金属源は、例えば、水を主体とする溶媒に、放射性金属イオンが分散又は溶解した溶液を用いることができる。

[0045] 本工程における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、本工程の開始時において、下限は、 0.01 mL 以上が好ましく、 0.1 mL 以上がより好ましく、さらに好ましくは 1 mL 以上であり、上限は、 1000 mL 以下が好ましく、 100 mL 以下より好ましく、さらに好ましくは 10 mL 以下であり、例えば、 0.01 mL 以上 100 mL 以下が好ましい。また、リガンド及び放射性金属イオンの反応液中の濃度は、それぞれ独立して、本工程の開始時において、下限は $0.01\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上が好ましく、 $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上がより好ましく、さらに好ましくは $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上であり、上限は、 $10000\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下が好ましく、 $1000\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下がより好ましく、さらに好ましくは $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下であり、例えば $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下であることが、目的とする放射性金属錯体の収率の観点から好ましい。リガンド及び放射性金属イオンのモル比率は、使用するリガンド及び放射性金属イオンの種類によっても異なるが、リガンド／放射性金属イオンとして、下限は、 $10/1$ 以上が好ましく、 $100/1$ 以上がより好ましく、 $200/1$ 以上、 $300/1$ 以上がさらに好ましく、よりさらに好ましくは 500

／1以上であり、上限は、10000／1以下が好ましく、9000／1以下がより好ましく、8000／1以下がさらに好ましく、よりさらに好ましくは7000／1以下であり、好ましくは200／1以上10000／1以下、特に好ましくは500／1以上7000／1以下の範囲である。

[0046] 得られた放射性金属錯体は、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。特に本工程は、検出が困難な低エネルギー放射線や、 α 線を放出する放射性金属核種を用いた場合であっても、錯体形成が良好に進行し、生成物の収率が高いので、該放射性金属核種を含む錯体を未精製の状態で以後の工程に供することができる点で有利である。

[0047] リガンドと放射性金属イオンとの反応の反応効率の向上と、得られる錯体とペプチド修飾抗体とのクリック反応の反応効率の向上とを両立する観点から、リガンドは、放射性金属イオンが配位する部位であるキレート部と、第1原子団と結合した修飾部とを有することが好ましい。

[0048] 以下の式(3a)で表されるように、修飾部(式(3a)中、 R_m で示す。)は、上述したキレート部(式(3a)中、 Ch で示す。)と結合されており、且つ上述した第1原子団(式(3a)中、 AG で示す。)が結合しているものである。式(3a)中、 R_m は、直鎖又は分枝鎖であり、置換又は無置換であり、且つ総炭素原子数10以上50以下の原子団である。

[0049] [化7]



[0050] 修飾部 R_m は、リガンドと放射性金属イオンとの錯体形成が可能であれば、キレート部 Ch との結合様式に特に制限はないが、リガンドと放射性金属イオンとの錯体形成を効率良く行う観点から、修飾部 R_m とキレート部 Ch とがチオウレア結合を形成して結合するか、又は修飾部 R_m とキレート部 C

hとがアミド結合を形成して結合することが好ましい。また、放射性金属錯体と抗体との標識効率を高める観点から、修飾部R_mは、第1原子団における上記式(1a)及び式(1b)で示されるR₁並びにR₃又はR₄と結合していることも好ましい。

[0051] 放射性金属錯体と抗体との標識効率を一層高める観点から、修飾部は、式(3a)中、R_mで表される構造中に、以下の式(P2)に示す構造が結合していることが好ましい。当該構造は、エチレングリコール由来の構造であり、式(P2)中、rは、好ましくは2以上50以下の整数、更に好ましくは2以上30以下の整数である。

[0052] [化8]



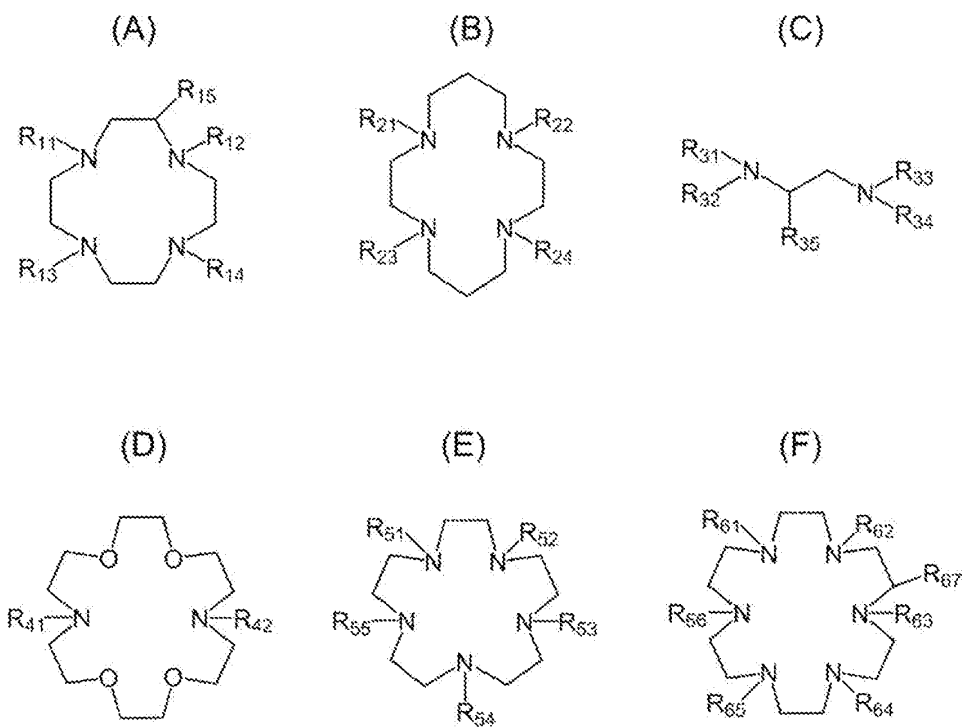
[0053] また、キレート部は、放射性金属が配位する部位を構造中に有するものであれば特に限定されないが、CB-TE2A (1, 4, 8, 11-Tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4, 11-diacetic acid)、CDTA (Cyclohexane-trans-1, 2-diamine tetra-acetic acid)、CDTPA (4-cyano-4-[[(dodecylthio) thioxomethyl] thio]-Pentanoic acid)、DOTA (1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid)、DOTMA ((1R, 4R, 7R, 10R)- α , α' , α'' , α''' -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-4 AMP (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] -)、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-tetraaza

tetradecanedioic acid)、HEHA (1, 2, 7, 10, 13-hexaazacyclooctadecane-1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaacetic acid)、1, 2-HOP O (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) -pyridine-2-yl} -methylamino] ethane)、H2macro pa (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) pyridine-2-yl] -methyl-1, 2-diaminoethane)、HP-D03A (Hydroxypropyltetraazacyclododecanetriacetic acid) 若しくはporphyrin又は下記式 (A) ないし (K) のいずれか一つで表されることが好ましい。これ

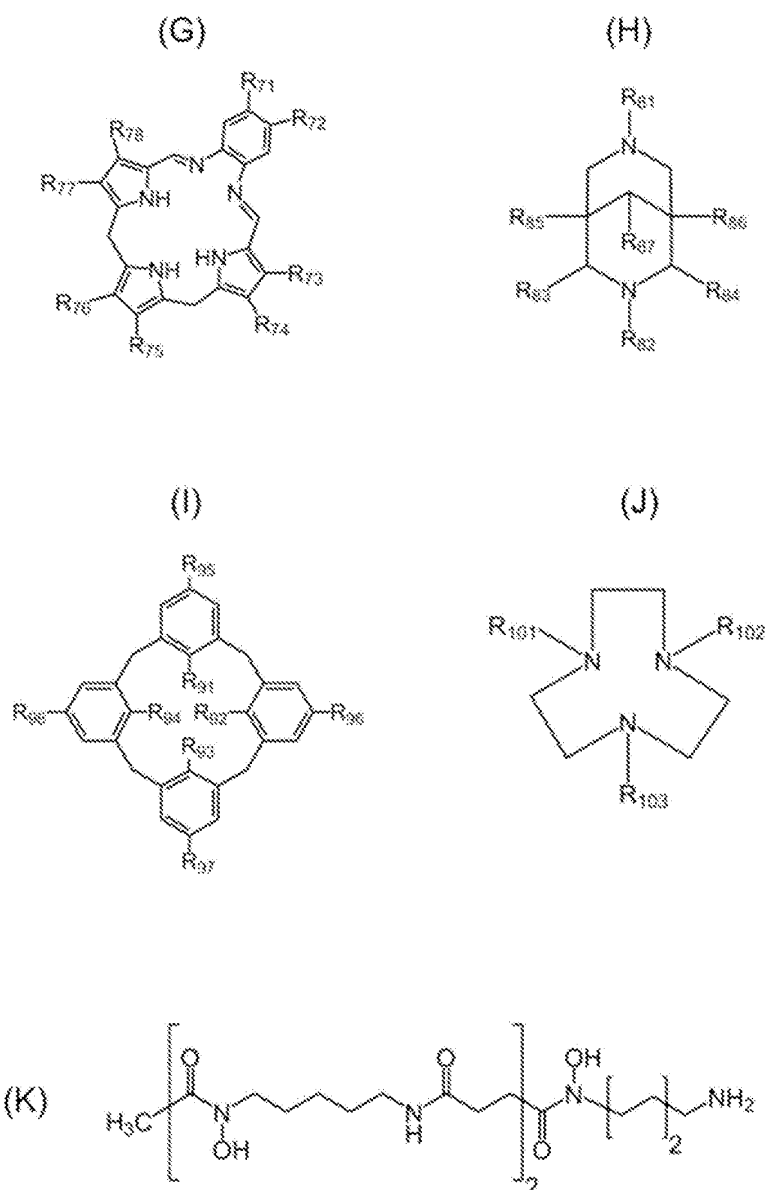
らの構造は、後述する放射性金属の種類に応じて、適宜選択することができる。いずれのキレート部であっても、本発明の効果は十分に奏される。

[0054] [化9]



[0055]

[化10]



[0056] 式(A)中、 R_{11} 、 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_{12} 又は R_{15} の一方が、水素原子、カルボキシル基、又は、炭素数2若しくは3のカルボキシアルキル基であり、他方が、上記修飾部と結合している基であり

、 p が0以上3以下の整数である。

[0057] 式(B)中、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 及び R_{24} は、それぞれ独立して、カルボキシル基又は、炭素数2若しくは3のカルボキシアルキル基であるが、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 又は R_{24} のいずれか一の基が上記修飾部と結合している基である。

[0058] 式(C)中、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 及び R_{34} は、それぞれ独立して、水素原子と2以上10以下の炭素原子とを有し、窒素原子又は酸素原子を含んでいてもよい原子団からなる基であり、 R_{35} は、上記修飾部と結合している基である。

[0059] 式(D)中、 R_{41} 又は R_{42} の一方が、水素原子と5以上20以下の炭素原子とを有し、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選ばれる一種以上を含む原子団からなる基であり、他方が上記修飾部と結合している基である。

[0060] 式(E)中、 R_{51} 、 R_{52} 、 R_{53} 、 R_{54} 及び R_{55} は、それぞれ独立して、カルボキシル基、又は、炭素原子数が2若しくは3のカルボキシアルキル基であるが、ただし、 R_{51} 、 R_{52} 、 R_{53} 、 R_{54} 又は R_{55} のいずれか一の基が、上記修飾部と結合している基である。

[0061] 式(F)中、 R_{61} 、 R_{62} 、 R_{63} 、 R_{64} 、 R_{65} 及び R_{66} は、それぞれ独立して、カルボキシル基、又は、炭素原子数が2若しくは3のカルボキシアルキル基であり、 R_{67} は、上記修飾部と結合している基である。

[0062] 式(G)中、 R_{71} 及び R_{72} は、 $-O(CH_2CH_2O)_nCH_3$ （但し、 n は1以上5以下の整数）であり、 R_{73} 、 R_{75} 、 R_{76} 及び R_{78} は、それぞれ独立して、炭素数1以上5以下のアルキル基であり、 R_{74} 又は R_{77} は、いずれか一方が炭素数1以上5以下のヒドロキシアルキル基であり、他方が上記修飾部と結合している基である。

[0063] 式(H)中、 R_{81} 及び R_{82} は、それぞれ独立して、炭素数1以上5以下のアルキル基であり、当該アルキル基の末端が、1以上のカルボキシル基で置換されたピリジル基で置換されていてもよく、 R_{87} は、 $-CHOH$ 又は $-C=O$ であるが、 R_{81} 、 R_{82} 又は R_{87} のいずれか一の基が上記修飾部と結合している基であり、 R_{83} 及び R_{84} は、置換されていてもよいピリジニル基であり、 R_{85} 及び R_{86} は、それぞれ独立して、 $-COOR_a$ であり、 R_a は炭素数1以上5以下のア

ルキル基である。

[0064] 式 (I) 中、 R_{91} 、 R_{92} 、 R_{93} 及び R_{94} は、それぞれ独立して、 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ であるが、 R_{91} 、 R_{92} 、 R_{93} 又は R_{94} のいずれか一の基が、上記修飾部と結合している基であり、 R_{95} 、 R_{96} 、 R_{97} 及び R_{98} は、それぞれ独立して、炭素数 1 以上 6 以下のアルキル基である。

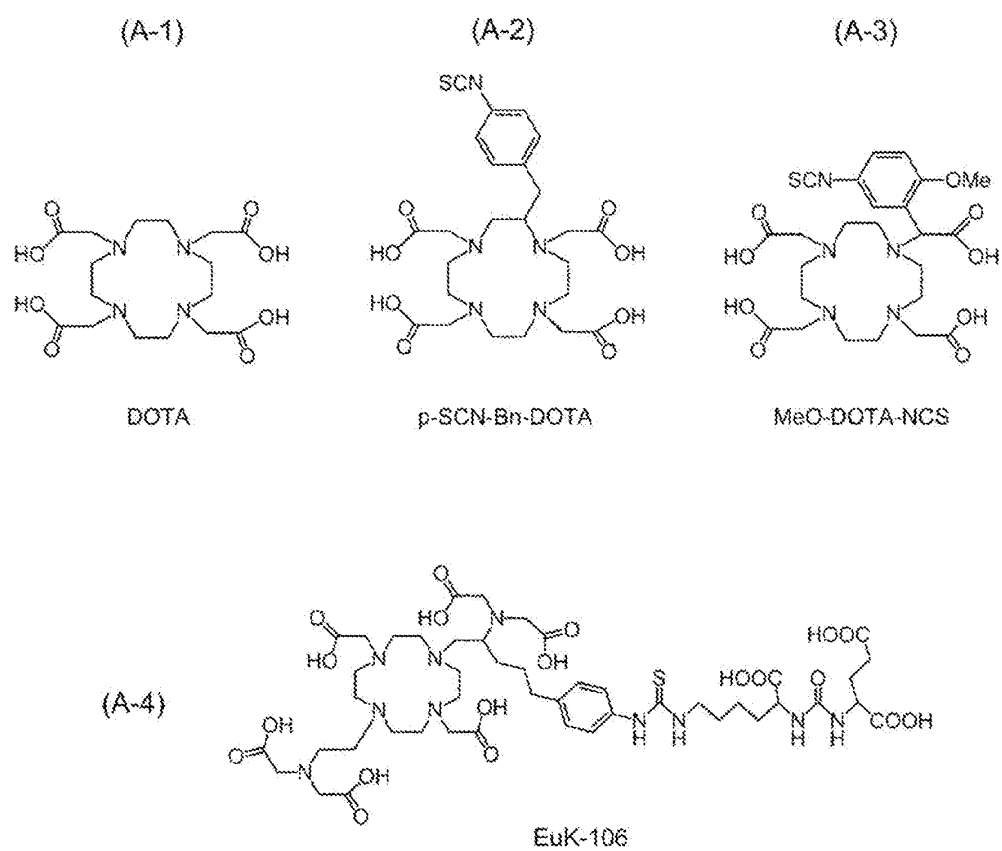
[0065] 式 (J) 中、 R_{101} 、 R_{102} 及び R_{103} は、それぞれ独立して、カルボキシル基、若しくは、炭素原子数が 2 若しくは 3 のカルボキシアルキル基であるか、又は、式 (J) 中、 R_{101} 、 R_{102} 及び R_{103} のうち少なくとも一つは、上記修飾部と結合している基であり、他の基は、カルボキシル基、若しくは、炭素原子数が 2 若しくは 3 のカルボキシアルキル基である。

[0066] 上記式 (A) ~ (J) 中、「修飾部と結合している基」は、カルボキシル基、アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) 基、2, 6-ジオキソテトラヒドロ-2H-ピラニル基、イソシアネート基、又はイソチオシアネート基に由来する構造と、修飾部とが結合している構造を示す。

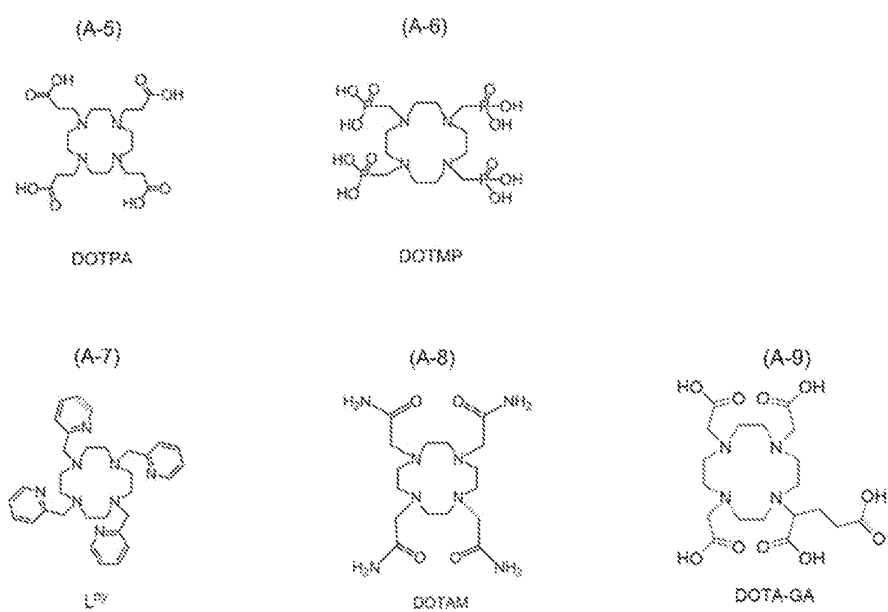
[0067] 式 (A) で表される具体的な構造としては、以下の式 (A-1) ~ (A-12) で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

[0068]

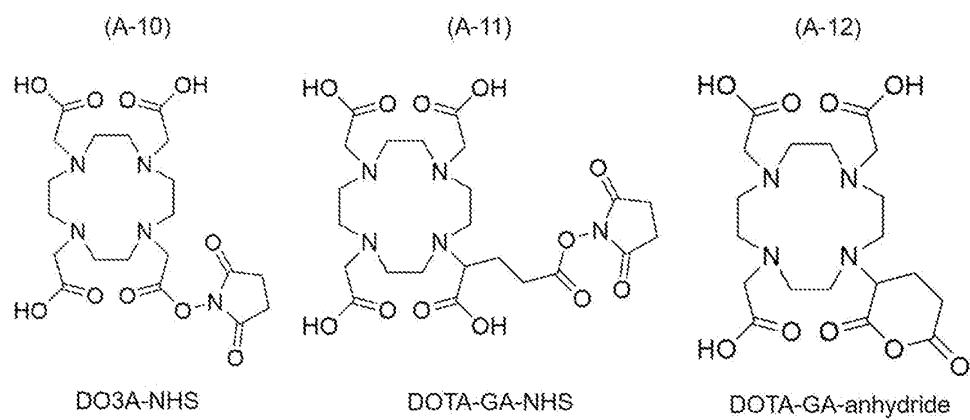
[化11]



[0069] [化12]

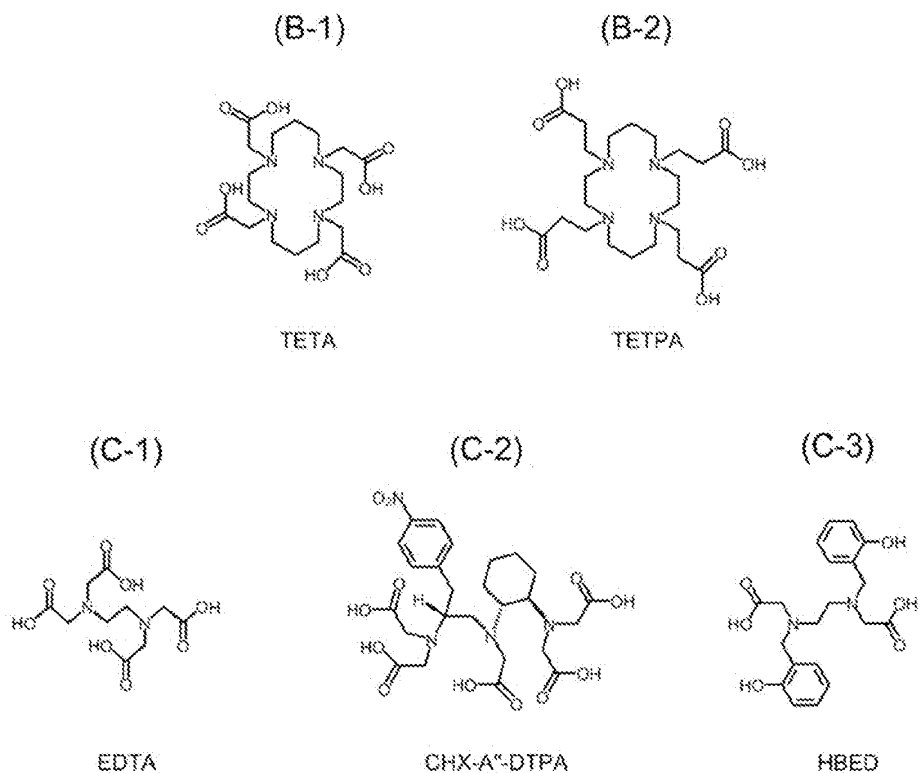


[0070] [化13]



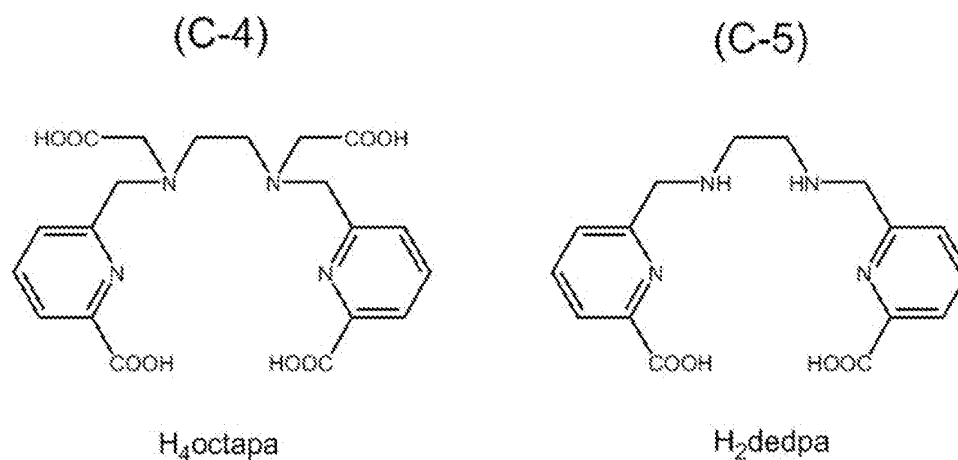
[0071] 式 (B) 及び (C) で表される具体的な構造としては、以下の式 (B-1) ~ (B-2) 及び (C-1) ~ (C-5) で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

[0072] [化14]



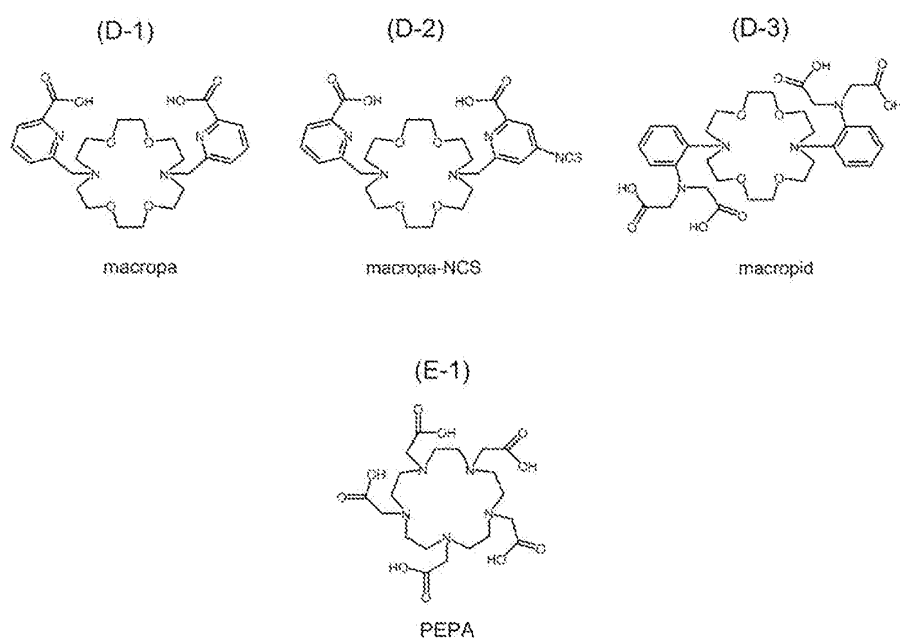
[0073]

[化15]



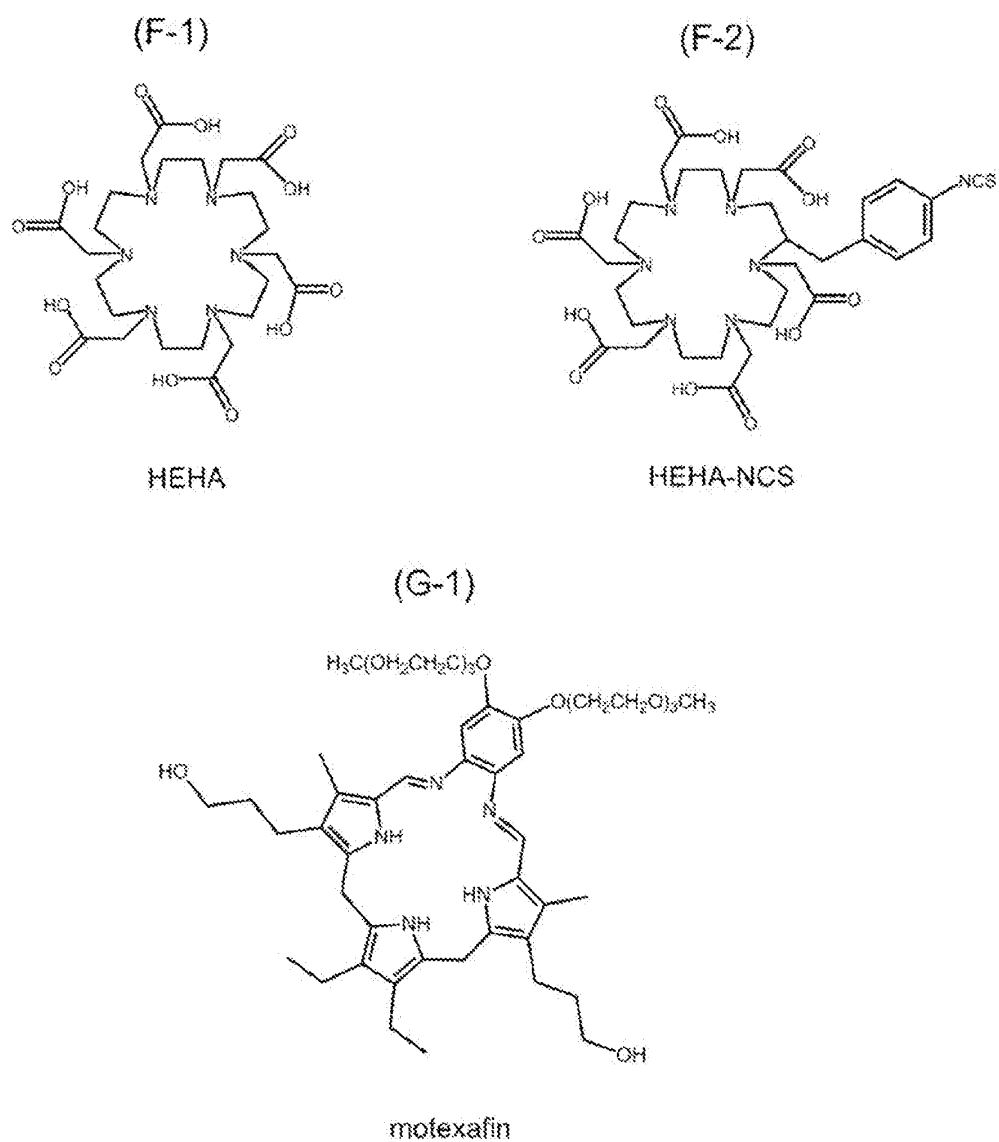
[0074] 式 (D) 及び (E) で表される具体的な構造としては、以下の式 (D-1) ~ (D-3)、及び (E-1) で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

[0075] [化16]



[0076] 式 (F) 及び (G) で表される具体的な構造としては、以下の式 (F-1) ~ (F-2)、及び (G-1) で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

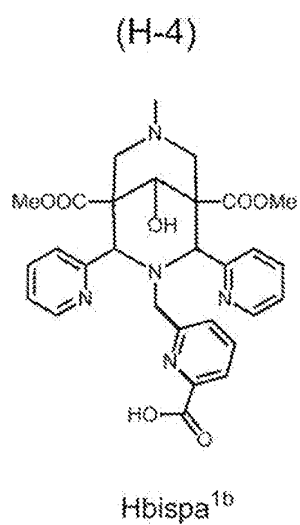
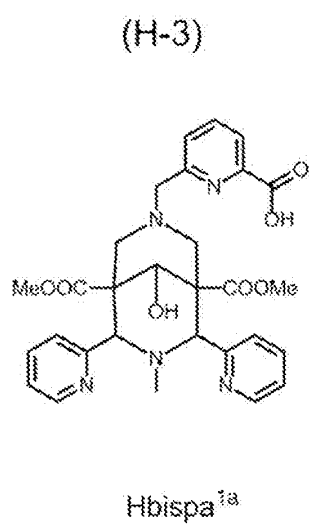
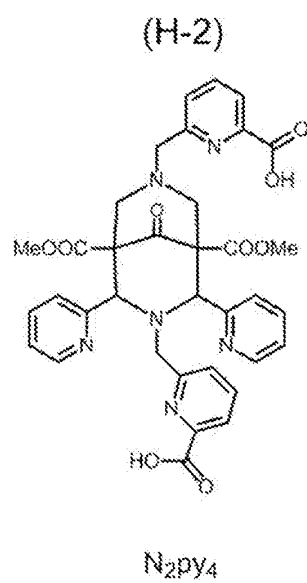
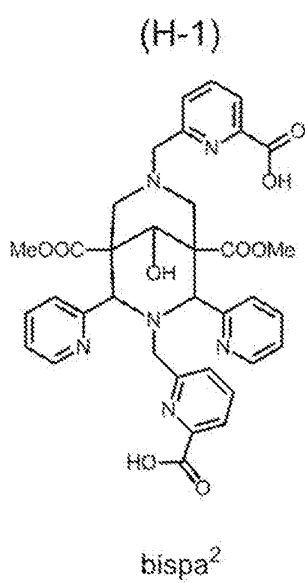
[0077] [化17]



[0078] 式 (H) 及び (I) で表される具体的な構造としては、以下の式 (H-1) ~ (H-4)、及び (I-1) で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

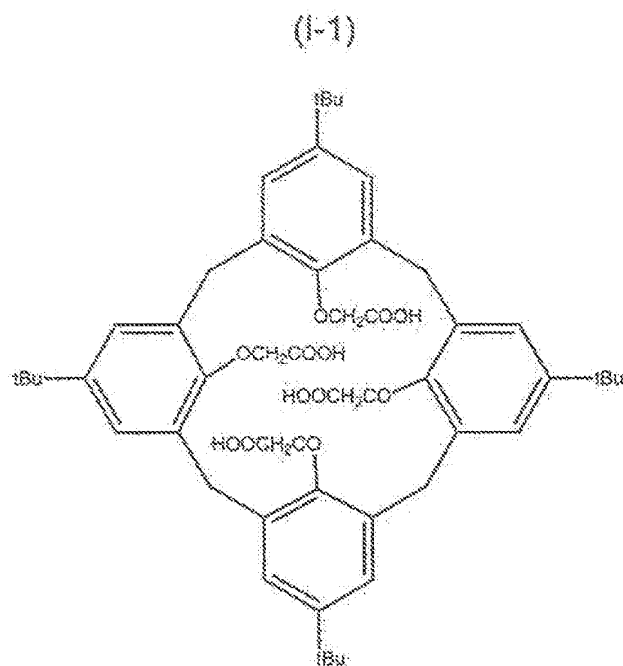
[0079]

[化18]



[0080]

[化19]

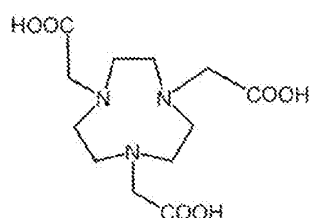


[0081] 式(J)で表される具体的な構造としては、以下の式(J-1)～(J-5)で表される化合物に由来する構造が挙げられる。

[0082]

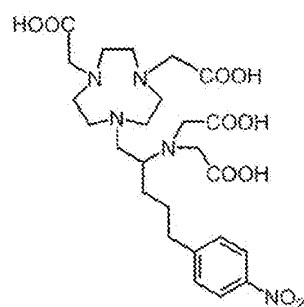
[化20]

(J-1)



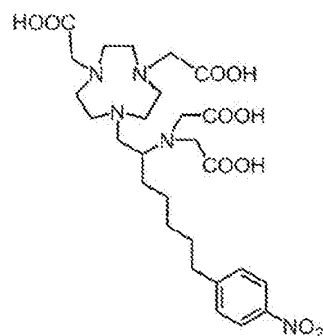
NOTA

(J-2)

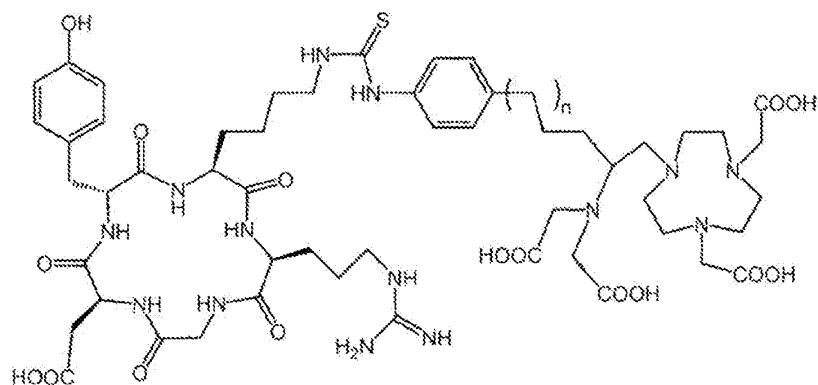


3p-C-NETA

(J-3)



5p-C-NETA



(J-4) 3p-C-NETA-c(RGDyK) (n=1)

(J-5) 5p-C-NETA-c(RGDyK) (n=3)

[0083] キレート部と修飾部との結合部位は、上述の通りアミド結合か、チオウレア結合であることが好ましいが、収率をより高める観点からアミド結合がより好ましい。

[0084] アミド結合は、例えば、上記式 (B-1) ~ (B-2)、(G-1)、(H-1) ~ (H-4)、(I-1)、(J-1) ~ (J-3) で示す化合物のカルボキシル基、上記式 (A-10) や (A-11) のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) 基、又は、上記 (A-12) の2, 6-ジ

オキソテトラヒドロ-2H-ピラニル基と、第1級アミンとの反応により形成されるか、式(K)で示す化合物の図中の右端に記載のアミノ基と、ヒドロキシ基、カルボキシ基、又はNHS基を有する試薬との反応により形成される。ここで、ヒドロキシ基を有する試薬と反応させる場合は、ヒドロキシ基をカルボキシ基に変換して用いる。また、チオウレア結合は、上記式(A-2)、(A-3)、(D-2)又は(F-2)で示す化合物のイソチオシアネート基と、第1級アミン又はマレイミド基との反応により形成される。

[0085] 修飾部は、所望の第1原子団が結合しており、第1級アミンを備える市販の試薬若しくはアミド結合やチオウレア結合を形成可能な市販の試薬から種々選択して形成することができる。

こうした試薬としては、第1原子団として上記式(1a)で表されるDibenzylcyclooctyne (DBCO)を用いる場合は、DBCO-アミン、DBCO-マレイミド、DBCO-PEG-NHSエステル、DBCO-PEG-アルコール、DBCO-PEG-アミン、DBCO-PEG-マレイミド等が選択できるが、好ましくはDBCO-アミン、DBCO-マレイミド、DBCO-PEG-アミン、DBCO-PEG-マレイミドを選択できる。

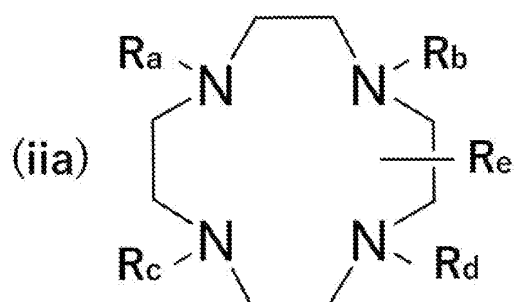
[0086] 放射性金属錯体は、上述した第1原子団、キレート部及び修飾部の中から適切なものを選択された構造を有するリガンドと、放射性金属とを反応させて形成されたものであれば特に限定されないが、放射性金属錯体は、以下の式(ii)で表される構造を有するリガンドと放射性金属とを反応させて形成されたものであることが好ましい。



式(ii)中、Aは以下の式(iia)で表される。

[0087]

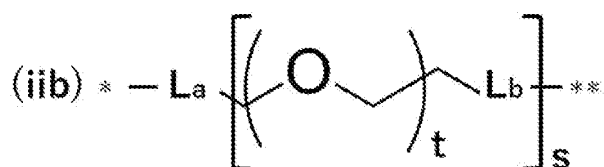
[化21]



[0088] 式 (iia) 中、 R_a 、 R_b 及び R_c は、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、 p は 0 以上 3 以下の整数であり、 R_d 又は R_e のいずれか一方が、B との結合部位 (*) であり、他方が水素原子であるか、 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 若しくは、 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ からなる基であり、 p は 0 以上 3 以下の整数である。

式 (ii) 中、B は以下の式 (iib) で表される。

[0089] [化22]

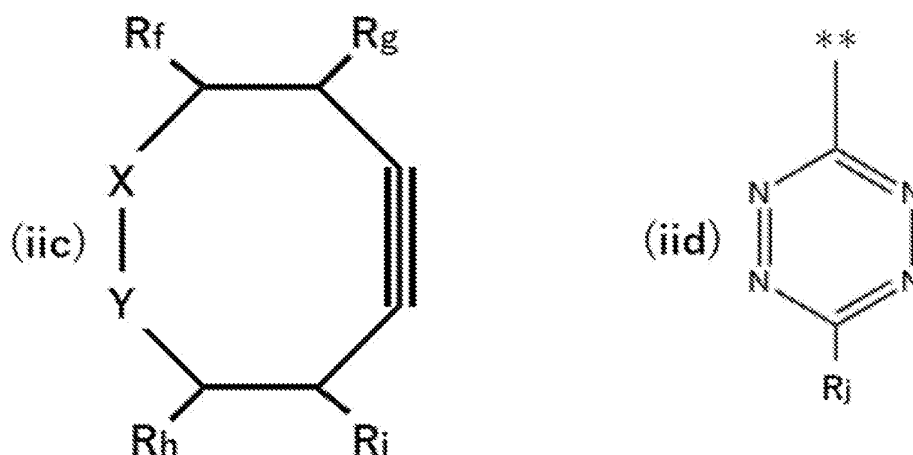


[0090] 式 (iib) 中、 L_a 及び L_b は、独立して、少なくともアミド結合又はチオウレア結合を含む炭素数 1 以上 50 以下の結合リンカーであり、 t は 0 以上 30 以下の整数であり、 s は 0 又は 1 であり、* は A との結合部位であり、** は C との結合部位である。

[0091] 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。

[0092]

[化23]



[0093] 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 (iid) 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。

[0094] また、リガンドは、Aとして、上記式 (iia) 中、R_a乃至R_dが、-(CH₂)_pCOOHであり、pが1であり、R_eがBとの結合部位であるDOTA誘導体；又はR_a乃至R_cが、-(CH₂)_pCOOHであり、pが1であり、R_dがBとの結合部位(*)であり、R_e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。

[0095] 式 (ii) 中、Aが上記DOTA誘導体である場合、Bは、L_aがチオウレア結合を含む炭素数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がアミド結合若しくはチオウレア結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーで

あり、Cは、式(ii c)で表されるアルキン誘導体であり、式(ii 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、DOTA-PEG_t-DBCO誘導体；又はBは、L_aがチオウレア結合を含む炭素数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がアミド結合若しくはチオウレア結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、Cは、式(ii d)で表されるテトラジン誘導体である、DOTA-PEG_t-Tz誘導体が更により好ましい。

[0096] 式(ii)中、Aが上記DO3A誘導体である場合、Bは、L_aがアミド結合若しくはチオウレア結合を含む炭素数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がアミド結合若しくはチオウレア結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、Cは、式(ii c)で表されるアルキン誘導体であり、式(ii 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誘導体が更により好ましい。

[0097] 式(ii)中、Aが上記DOTAGA誘導体である場合、Bは、L_aがアミド結合若しくはチオウレア結合を含む炭素数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若しくはチオウレア結合を含む炭素数1以上50以下の結合リンカーであり、Cは、式(ii c)で表されるアルキン誘導体であり、式(ii 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誘導体が更により好ま

しい。

[0098] 以下に、上述した各実施形態に共通して適用可能な事項について説明する。本発明に用いられるペプチド修飾抗体は、抗体の特定の部位がペプチドによって特異的に修飾されており、好ましくは抗体のFc領域（定常領域）が特異的に修飾され、特に好ましくは抗体のFc領域におけるリシン残基が部位特異的に修飾されてなるものである。つまり、本発明においては、ペプチドと抗体とを反応させて、ペプチド修飾抗体を得る工程（抗体修飾工程）を、標識工程よりも前に備えていてもよい。

[0099] 本発明で用いられる抗体は、Fc領域を含有するポリペプチドであればよく、モノクローナル抗体であってもポリ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。モノクローナル抗体には、抗体変異体（キメラ抗体、ヒト化抗体等）など人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。

[0100] 本発明で用いられるペプチドは、抗体のFc領域に部位特異的に修飾するものであれば、鎖状ペプチドであって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。また、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を含むことが好ましい。アミノ酸配列に関する以下の説明は、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。ペプチドに連結している第2原子団の結合位置は、第1原子団との間でクリック反応可能であれば特に制限はないが、反応性向上の観点から、好ましくはペプチドのN末端又はC末端に第2原子団を有しており、更に好ましくはペプチドのN末端に第2原子団を有する。

[0101] $(Xa) - Xaa1 - (Xb) - Xaa2 - (Xc) - Xaa3 - (Xd) \cdots (i)$

上記式（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、

X_{aa1} 及び X_{aa3} 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を表し、かつ、ジスルフィド結合を介して結合しているか、若しくはスルフィド基がリンカーを介して結合しており、又は、

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を表し、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を表し、かつ、チオエーテル結合を介して結合しており、

X_{aa2} 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、好ましくは、架橋剤で修飾されている。

[0102] 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、スレオニン、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。

[0103] 式 (i) 中の a、b、c 及び d は、上述した範囲内の数であれば特に制限はないが、ペプチドと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。

[0104] X_{aa1} 及び X_{aa3} 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。

[0105] [化24]



[0106] 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。

[0107] 式（i）で表されるペプチドの具体的なアミノ酸配列は、例えば国際公開 2016/186206 号パンフレット、国際公開 2017/217347 号パンフレット及び国際公開 2018/230257 号パンフレット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。

[0108] これらのうち、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。このようなアミノ酸配列を有していることによって、ペプチドと抗体（例えば、ヒト IgG）との結合親和性を高めることができる。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を示し、好ましくは、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。又、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。

- [0109] (1) DCAYH (X a a 2) GEL VWCT
(2) GPDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFH
(3) RCAYH (X a a 2) GEL VWCS
(4) GPRCAYH (X a a 2) GEL VWCSFH
(5) SPDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFH
(6) GDDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFH
(7) GPSCAYH (X a a 2) GEL VWCTFH
(8) GPDCAYH (X a a 2) GEL VWCSFH
(9) GPDCAYH (X a a 2) GEL VWCTHH
(10) GPDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFY
(11) SPDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFY
(12) SDDCAYH (X a a 2) GEL VWCTFY
(13) RGN CAYH (X a a 2) GQL VWCTYH
(14) G (X a a 1) DCAYH (X a a 2) GEL VWCT (X a a 3) H

- [0110] 本発明に用いられるペプチドは、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、遺伝子組み換え法又は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2017/217347号パンフレット及び国際公開2018/230257号パンフレットに記載の方法に準じて行うことができる。

- [0111] 本発明におけるペプチドへの第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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] ペプチドと抗体とを結合させて、ペプチド修飾抗体を得る方法は、例えば架橋剤を用いて行うことができる。架橋剤とは、ペプチドと、抗体とを共有結合により連結させるための化学物質であり、その例として、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)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、アジブイミド酸ジメチル等のイミド酸部分を好ましくは2以上含む化合物又はその塩からなる架橋剤、並びに3, 3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル、ジチオビススクシンイミジルプロピオン酸等のジスルフィド結合を有する化合物又はその塩からなるもの等が挙げられる。このような架橋剤を用いることによって、ペプチドにおけるXaa2のアミノ酸残基と、抗体との間で架橋反応を起こすことができる。抗体における架橋反応が生じる部位は、抗体としてヒトIgG(例えば、トラスツズマブ)を用いた場合、Xaa2のアミノ酸残基と、トラスツズマブにおけるEuナンバリングに従うLys246残基及びLys248残基の少なくとも一方との間に部位特異的に架橋構造を介して結合する。これらのLys残基は、ヒトIgGにおけるFc領域に存在し、トラスツズマブ以外の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。

- [0115] ペプチドと抗体との結合方法は、例えば、上述したペプチドと、抗体と、架橋剤と、必要に応じて触媒とを、適切な緩衝液中に10℃以上30℃以下環境下で分散させて行うことができる。反応時間は10分以上2時間程度とすることができる。ペプチドと抗体との反応時におけるモル比率は、ペプチド：抗体として、1：1～20：1の範囲とすることができる。
- [0116] 以上の工程を経て得られるペプチド修飾抗体は、抗体（好ましくは免疫グロブリンクラスがIgGである抗体）1分子に対して少なくともペプチド1分子以上が結合していればよいが、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、オプソニン作用）を維持する観点から、抗体のFc領域（定常領域）に部位特異的にペプチドが結合していることが好ましく、本発明において、ペプチド修飾抗体は、抗体1分子に対してペプチド1分子又は2分子結合していることがより好ましい。
- [0117] 上記ペプチド修飾抗体は、抗体1分子に対してペプチド1分子が結合した抗体（以下、「一価抗体」という）と、抗体1分子に対してペプチド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、これをそのまま以降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、これらを含む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好ましく、抗体等のタンパク質の分離精製に適した充填剤を充填したカラムを用いることがより好ましい。
- [0118] 放射性金属錯体にイオンの状態で配位されている放射性金属は、 α 線、 β 線若しくは γ 線又はこれらの組み合わせの放射線を放出する金属核種を用いることができる。このような放射性金属の核種としては、例えばアルカリ金

属、アルカリ土類金属、ランタノイド、アクチノイド、遷移金属若しくはこれらの金属以外の金属の放射性同位体等が挙げられる。これらのうち、商業利用可能であり且つ錯体形成性の向上を図る観点から、放射性金属の核種として、 ^{44}Sc 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{60}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{103}Ru 、 ^{111}In 、 ^{153}Sm 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{201}Tl 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{227}Th 又は ^{225}Ac を用いることが好ましい。これらの放射性金属は、常法に従って製造することができ、放射性金属が電離した態様で含む溶液として得ることが好ましい。

[0119] 放射性金属標識抗体を疾患の治療を目的として用いる場合には、治療効果を高める観点から、放射性金属として α 線放出核種又は β^- 線放出核種を用いることが好ましい。 α 線放出核種は、放射性金属の壊変過程で α 線を放出する核種であればよく、詳細には、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{227}Th 又は ^{225}Ac 等が好ましく用いられ、より好ましくは ^{227}Th 又は ^{225}Ac であり、更に好ましくは ^{225}Ac である。 β^- 線放出核種は、放射性金属の壊変過程で β^- 線を放出する核種であればよく、詳細には、 ^{60}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{103}Ru 、 ^{153}Sm 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{203}Hg 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 又は ^{212}Pb 等が好ましく用いられ、より好ましくは ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 又は ^{177}Lu が用いられる。

[0120] また、放射性金属標識抗体を疾患の診断や病巣の検出を目的として用いる場合には、診断性能を高める観点から、放射性金属として β^+ 線放出核種、電子捕獲壊変核種、又は γ 線放出核種を用いることが好ましい。 β^+ 線放出核種は、放射性金属の壊変過程で陽電子を放出する核種であればよく、 ^{44}Sc 、 ^{58}Co 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 又は ^{89}Zr 等が好ましく用いられ、より好ましくは ^{64}Cu 又は ^{89}Zr である。電子捕獲壊変核種は、放射性金属の壊変過程でオージェ電子又は特性X線を放出する核種であればよく、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{111}In 、 ^{186}Re 、 ^{201}Tl 又は ^{197}Hg 等が好ましく用いられる。 γ 線放出核種は、 γ 崩壊によって、 γ 線を放出する核種であればよく、 γ 崩壊によって γ 線を放出する核種としては、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{68}Ga 又は ^{201}Tl が好ましく用いられる。

[0121] 例えば、放射性金属錯体にイオンの状態で配位されている放射性金属を、

イオン半径に基づいて選択する場合、イオン半径が70～130 pm程度の放射性金属として、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{103}Ru 、 ^{111}In 、 ^{153}Sm 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{201}Tl 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{225}Ac 等が挙げられ、これらは好ましくは上記式（A）～（K）で示される構造のキレート部を有するリガンドと放射性金属錯体を形成できる。

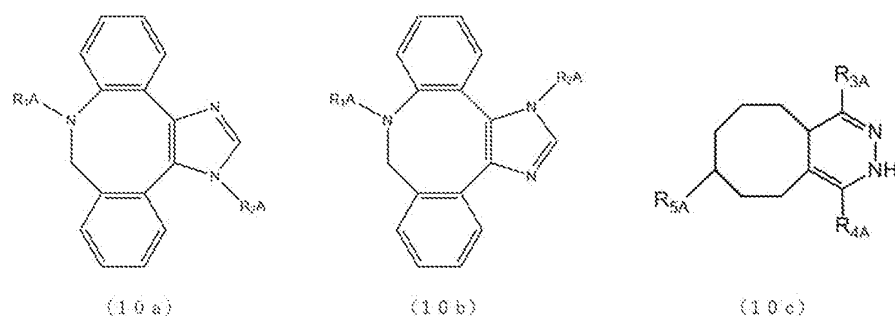
- [0122] 例えば、放射性金属標識抗体を疾患の治療を目的として用いる場合に、放射性金属として ^{225}Ac 、 ^{177}Lu 又は ^{90}Y を用いる場合は、上記式（A）又は（D）～（I）のいずれかで示される構造のキレート部を有するリガンドを用いることが好ましく、より好ましくは上記式（A）、（D）又は（F）のいずれかで示される構造のキレート部を有するリガンドを用いることがより好ましく、上記式（A）で示される構造のキレート部を有するリガンドを用いることが更に好ましい。また、放射性金属標識抗体を疾患の診断や病巣の検出を目的として用いる場合に、放射性金属として ^{89}Zr 又は ^{111}In を用いる場合は、リガンドとして上記式（A）、（C）又は（K）のいずれかで示される構造のキレート部を有するリガンドを用いることが好ましく、上記式（A）で示される構造のキレート部を有するリガンドを用いることが更に好ましい。
- [0123] 本発明において用いられる抗体の免疫グロブリンのクラスは、IgG、IgA、IgM、IgD又はIgEのいずれのクラスを特に制限なく用いることができるが、これらのうちIgGが免疫応答の二次応答における主要なクラスであり、血中で最も多く存在し、抗原に対する認識特異性が高い点で好ましく用いられる。さらに哺乳動物のIgGが好ましく、哺乳動物として具体的にはヒト、チンパンジーなどの霊長類；ラット、マウス及びウサギ等の実験動物；ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ及びヤギなどの家畜動物；並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物が挙げられる。また、ヒトIgG又はウサギIgGがさらに好ましく、ヒトIgGがさらにより好ましい。また、これらの抗体のサブクラスについても特に制限はなく、例えばヒトIgGを用いる場合、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の少なくとも一種であり得、IgG1、IgG3又はIgG4であることが好ましい。

[0124] 上述の製造方法を経て得られた放射性金属標識抗体は、抗体の特定の部位がペプチドにより特異的に修飾されたものである。放射性金属錯体は、ペプチドと直接的又は間接的に連結しており、ペプチドと放射性金属錯体との間に、好ましくはクリック反応で形成された結合部位を有している。結合部位は、放射性金属錯体が備える第1原子団と、ペプチドに連結されている第2原子団とに由来する化学構造であることが好ましい。このような化学構造としては、例えば、結合部位は、置換されたトリアゾール骨格を含む構造が形成されていたり、置換されたピリダジン骨格を含む構造が形成されていたりするものである。置換された前記骨格を含む構造としては、例えば、トリアゾール骨格又はピリダジン骨格に置換基、脂肪族環及び芳香族環の少なくとも一種を含む構造が結合しており、且つ修飾部又はキレート部との結合部位及びペプチドとの結合部位を有するものが挙げられる。

[0125] 具体的な結合部位の構造としては、例えば第1原子団及び第2原子団がD B C Oを含む原子団と、アジド基を含む原子団との組み合わせである場合は、用いる反応試薬によるが、以下の式(10a)又は式(10b)に示すトリアゾール骨格を含む構造が形成され、これら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。また、第1原子団及び第2原子団が1, 2, 4, 5-テトラジンを含む原子団と、T C Oを含む原子団との組み合わせである場合は、用いる反応試薬によるが、以下の式(10c)に示すピリダジン骨格を含む構造が形成される。式(10a)及び式(10b)中、 R_{1A} は修飾部又はキレート部との結合部位を示し、 R_{2A} はペプチドとの結合部位を示す。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、他方は修飾部又はキレート部との結合部位を示し、 R_{5A} はペプチドとの結合部位を示す。

[0126]

[化25]



[0127] 放射性金属標識抗体は、これをそのまま、又はこれを精製したあとで、該放射性金属標識抗体を有効成分として含む放射性医薬組成物を調製することもできる。放射性医薬組成物とは、放射性金属標識抗体又はその誘導体を含み、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。放射性医薬組成物は、例えば上述の方法で製造された放射性金属標識抗体を、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、放射性医薬組成物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。放射性医薬組成物は、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、疾患の治療、疾患の診断、あるいは病巣の検出等に用いられる。

[0128] 上記式(A)～(J)並びにトリアゾール骨格含有構造及びピリダジン骨格含有構造に置換されうる置換基としては、例えばハロゲン原子、飽和又は不飽和のアルキル基、ヒドロキシ基、アルデヒド基、カルボキシ基、アシル基、アミノ基、ニトロ基、エステル基、イソチオシアネート基、チオキシ基、シアノ基、アミド基、イミド基、リン酸基、フェニル基、ベンジル基、ピリジル基等が挙げられる。これらの置換基は、一種が単独で置換していてもよく、これらの置換基が二種以上組み合わせられて置換していてもよい。

実施例

[0129] 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。

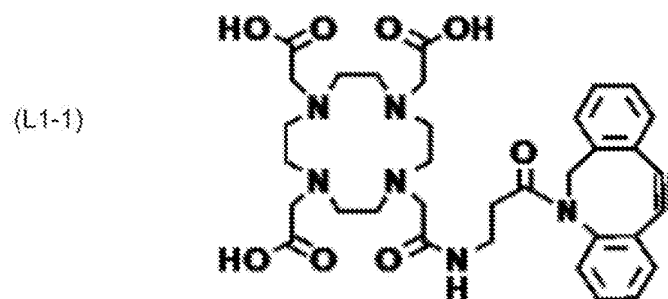
[0130] [実施例 1～4]

(1-1. 錯体形成工程)

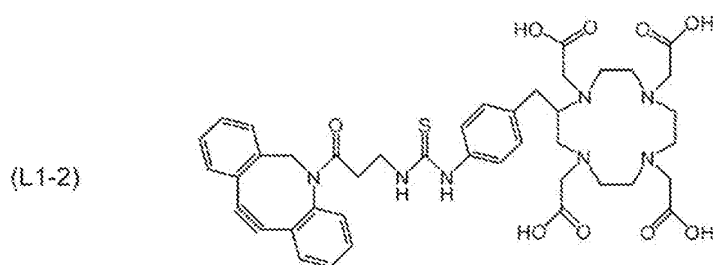
本実施例に用いられるリガンドの構造を、以下の式 (L 1-1) ~ (L 1-3) に示す。式 (L 1-1) で表される DO3A-DBCO は、L i a n g Y, J i a n g X, Y u a n R, Z h o u Y, J i C, Y a n g L e t a l. Metabolism-Based Click-Mediated Platform for Specific Imaging and Quantification of Cell Surface Sialic Acids. Anal Chem. Jan 3; 89 (1): 538-543. (2017) に記載の方法に従い、合成した。式 (L 1-2) で表される DOTA-DBCO は、W a n g H, W a n g R, C a i K, H e H, L i u Y, Y e n J e t a l. Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting. Nat Chem Biol. Apr; 13 (4): 415-424. (2017) に記載の方法に従い、合成した。また、式 (L 1-3) で表される DO3A-PEG4-DBCO は、市販品の I r i s B i o t e c h G m b H 社製を用いた。これらのリガンドを、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、リガンドを 1.7 mmol/L 含む分散液とした。この分散液 0.0025 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 160 MBq/mL、O a k R i d g e N a t i o n a l L a b o r a t o r y 製より調製、液量 0.0025 mL) 0.4 MBq (検定日時放射能量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。リガンドと放射性金属イオンとのモル比率は、リガンド : ^{225}Ac イオン = 3000 : 1 であり、反応液の加熱温度は 70℃、加熱時間は 90 分間とした。

[0131]

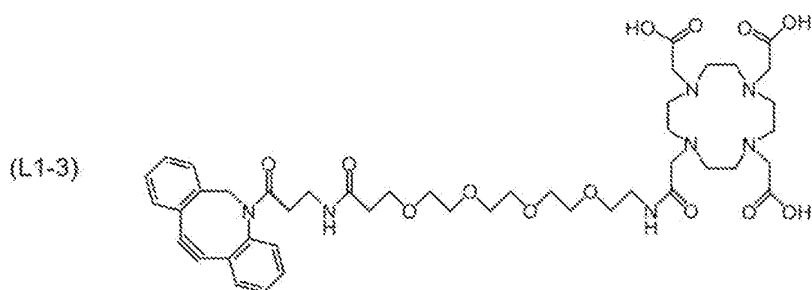
[化26]



DO3A-DBCO



DOTA-DBCO



DO3A-PEG4-DBCO

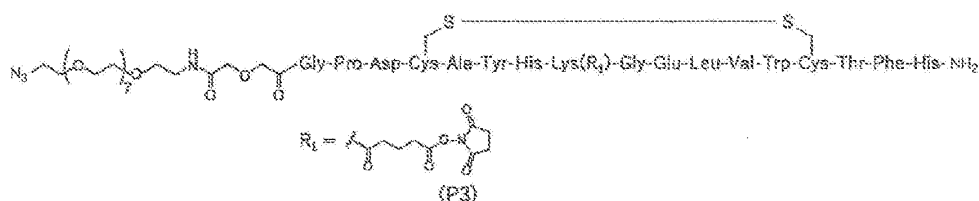
[0132] 得られた ^{225}Ac 錯体の放射化学的純度を、次の方法で測定した。すなわち、 ^{225}Ac 錯体溶液の一部を薄層クロマトグラフィー（Agilent社製、型番：SG10001、展開溶媒：アセトニトリル／水混合液（体積比1：1））で展開し、その後、ラジオγ-TLCアナライザー（raytest製、MODEL GITA Star）で測定した。検出された全放射能（

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 錯体の放射化学的純度 (%) とした。その結果、 ^{225}Ac 錯体の放射化学的純度は 89 ~ 99 % 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。

[0133] (1-2. 抗体修飾工程)

別途、ペプチドを国際公開 2017/217347 号パンフレットに記載の方法で製造して、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。

[0134] [化27]



[0135] (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。)

[0136] このペプチドと、ヒト IgG 抗体 (リツキシマブ; ロシュ社製、又はトラスツズマブ; ロシュ社製) とを酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 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。

[0137] (2. ペプチド修飾抗体分離工程)

上述のペプチド修飾抗体を、 1 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) で希釈して、Protein Aカラム (GEヘルスケア社製, HiTrap MabSelect SuRe) に添加し、 0.15 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 ($\text{pH } 5.7$) を流し、二価抗体を含む溶液を回収し、回収した画分に含まれる二価抗体の濃度が 15 mg/mL になるように濃度を調整した。その後、 0.15 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 ($\text{pH } 3.5$) を流し、一価抗体を含む溶液を回収し、回収した画分に含まれる未修飾抗体及び一価抗体の濃度が $17\sim 40\text{ mg/mL}$ になるように濃度を調整した。

[0138] (3. 標識工程)

上述の各工程を経て得られた ^{225}Ac 錯体の溶液と、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 0.02 mol/L アスコルビン酸含有 0.09 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液に添加し、 37°C で120分間クリック反応させて、実施例1ないし4の ^{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 $43\text{ }\mu\text{mol}$ 及び $46\text{ }\mu\text{mol}$ である (実施例1) か、又はともに $100\text{ }\mu\text{mol}$ であり (実施例2ないし4)、第1原子団 (DBCO) と第2原子団 (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 ^{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 錯体標識抗体の放射化学的純度 (%) 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°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: UFC505096) を用いて精製した。精製後の ^{225}Ac 錯体標識抗体の放射化学的純度 (RCP) 及び放射化学的収率 (RCY) を以下の表1に示す。

[0139] ^{225}Ac 錯体標識抗体の放射化学的純度及び放射化学的収率の測定方法は以

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：0.1mmol/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）の百分率を放射化学的純度（%）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：M7000（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エネルギー）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エネルギー）の百分率を放射化学的収率（%）とした。

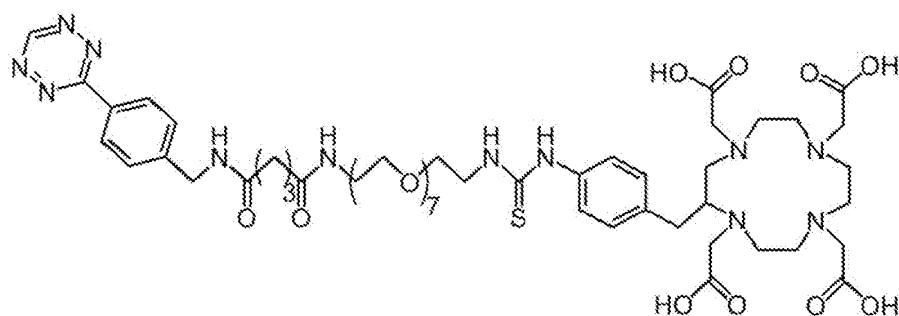
[0140] 〔実施例5〕

（1-1. 錯体形成工程）

本実施例では、以下の式（L2）に構造を示すリガンドを用いた以外は、実施例1と同様に行って、 ^{225}Ac 錯体溶液を得た。式（L2）で表されるDOTA-PEG7-Tzは、Poty S, Membreno R, Glaser JM, Ragupathi A, Scholz WW, Zeglis BM et al. The inverse electron-demand Diels-Alder reaction as a new methodology for the synthesis of ^{225}Ac -labelled radioimmunoconjugates. Chem Commun (Camb). Mar 8; 54(21): 2599-2602. (2018)に記載の方法に従い、合成した。

[0141] [化28]

(L2)

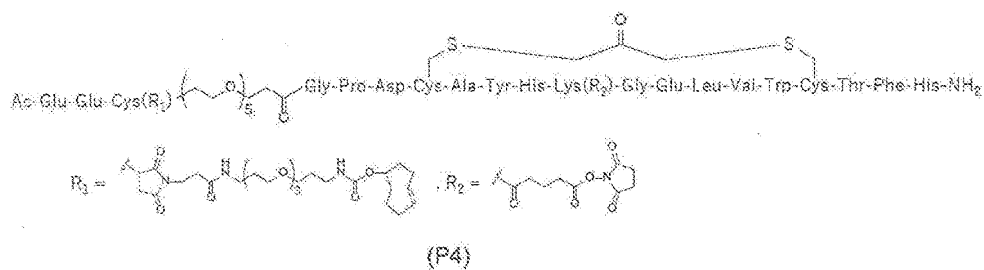


DOTA-PEG7-Tz

[0142] (1-2. 抗体修飾工程)

本実施例で用いたペプチドは、下記式 (P4) で表される 17 個のアミノ酸残基からなるペプチド得た。このペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 (2) の X a a 2 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 R₂ 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のチオール基同士が上記式 (4) で表されるリンカーにより連結されており、ペプチドの N 末端は、N 末端側から見て、5つの PEG、側鎖のチオール基が第2原子団である TCO を含む、R₁ で示される構造で置換されたシステイン残基、2つのグルタミン酸残基、アセチル基をこの順で有するリンカー構造を有していた。

[0143] [化29]



[0144] (式 (P4) 中、G l y はグリシンを、P r o はプロリンを、A s p はアス

パラギン酸を、C y sはシステインを、A l aはアラニン、T y rはチロシンを、H i sはヒスチジンを、G l uはグルタミン酸を、L e uはロイシンを、V a lはバリンを、T r pはトリプトファンを、P h eはフェニルアラニンを示す)

[0145] このペプチドと、ヒト I g G抗体（トラスツズマブ；ロシュ社製）とを酢酸ナトリウム緩衝液（p H 6）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。

[0146] （2．標識工程）

実施例1と同様の手順で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の量はいずれも100 μmol であり、第1原子団（1，2，4，5-テトラジン）と第2原子団（TCO）とのモル比は1：1であった。末精製時の実施例の ^{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 錯体標識抗体の放射化学的純度（％）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。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 ^{225}Ac 錯体標識抗体の放射化学的純度（RCP）及び放射化学的収率（RCY）を以下の表1に示す。

[0147] [表1]

	第1原子団を有するリガンド(A)	抗体	第2原子団(B)	モル比(A):(B)	反応率				精製後	
					室温 (6分反応 (％))	37℃ (15分反応 (％))	室温 (1時間反応 (％))	37℃ (2時間反応 (％))	RCP (％)	RCY (％)
実施例1	DOTA-PEG4-DBCO	リウキシマブ	アジド	1:1	—	—	—	49	94	36
実施例2	DOTA-PEG4-DBCO	トラスツズマブ	アジド	1:1	—	54	—	67	93	54
実施例3	DOTA-DBCO	トラスツズマブ	アジド	1:1	—	14	—	19	83	12
実施例4	DOTA-DBCO	トラスツズマブ	アジド	1:1	—	53	—	54	89	54
実施例5	DOTA-PEG2-Tz	トラスツズマブ	TCO	1:1	65	—	85	—	88	46

[0148] 表1に示すように、錯体形成工程を行った後に、錯体と抗体との反応を行った実施例は、抗体に対して過度な加熱を行わなくても、穏和な反応条件で標識反応が進行し、且つ抗体に対する放射性金属の標識効率に優れていることが判る。

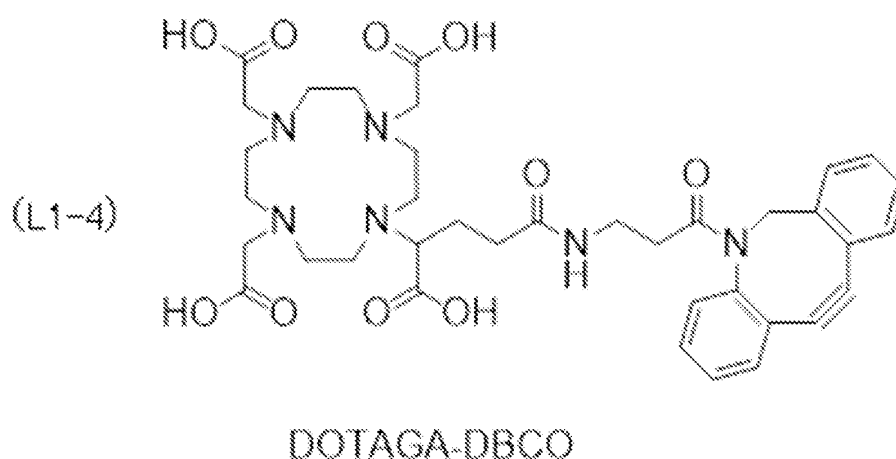
[0149] [実施例6～7] ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOを用いたTmab，R

m a b 製造

(1 . 錯体形成工程)

本実施例に用いられるリガンドの構造を、以下の式 (L 1 - 4) に示す。
式 (L 1 - 4) で表される DOTAGA-DBCO は Bernhard e
t a l . 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。これらのリガンドを、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、リガンドを 1.7 m
mol / L 含む分散液とした。この分散液 0.005 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 3
20 ~ 340 MBq / mL、Oak Ridge National Lab
oratory 製より調製、液量 0.005 mL) 1.6 ~ 1.7 MBq (検定日時放射能量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。リガンドと放射性金属イオンと
のモル比率は、リガンド : ^{225}Ac イオン = 約 2500 : 1 であり、反応液の
加熱温度は 70 °C、加熱時間は 30 分間とした。

[0150] [化30]



[0151] 得られた ^{225}Ac 錯体の放射化学的純度を実施例1と同様に測定した結果、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。

[0152] (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 ^{225}Ac 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、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、 ^{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85nmol及び100nmolであり(実施例6及び7)、第1原子団(DBCO)と第2原子団(アジド)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 ^{225}Ac 錯体標識抗体の放射化学的純度(%)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 錯体標識抗体の放射化学的純度(RCP)及び放射化学的収率(RCY)を以下の表2に示す。

[0153] ^{225}Ac 標識一価抗体の放射化学的純度及び放射化学的収率の測定方法は実施例1と同様に行った。

[0154] [表2]

	第1原子団を有するリガンド(A)	抗体	第2原子団(B)	モル比(A):(B)	反応率	精製後	
					37℃ 2時間反応(%)	RCP(%)	RCY(%)
実施例6	DOTAGA-DBCO	トラスツズマブ	アジド	1:1.2	77%	93%	71%
実施例7	DOTAGA-DBCO	リツキシマブ	アジド	1:1.2	77%	95%	73%

[0155] [実施例8] ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOを用いたTmab製造

(1. 錯体形成工程)

本実施例に用いられるリガンドの構造は、上述の式(L1-4)と同一である。このリガンドを、溶媒としてDMSOに分散させて、リガンドを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。リガンドと放射性金属イオンとのモル比率は、リガンド： ^{89}Zr イオン=約250：1であり、反応液の加熱温度は70℃、加熱時間は60分間とした。

[0156] 得られた ^{89}Zr 錯体の放射化学的純度を、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 錯体の放射化学的純度(%)とした。その結果、 ^{89}Zr 錯体の放射化学的純度は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。

[0157] (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8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、第1原子団(DBCO)と第2原子団(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 ^{89}Zr 錯体標識抗体の放射化学的純度（％）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°C 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 錯体標識抗体の放射化学的純度（RCP）及び放射化学的収率（RCY）を以下の表3に示す。

[0158] ^{89}Zr 錯体標識抗体の放射化学的純度及び放射化学的収率の測定方法は、実施例8と同様に行った。

[0159] [表3]

	第1原子団 を有するリ ガンド(A)	抗体	第2原子 団 (B)	モル比 (A):(B)	反応率	精製後	
					37°C 2時間反 応(%)	RCP (%)	RCY (%)
実施例 8	DOTAGA -DBCO	トラスツ ズマブ	アジド	1:1	52%	93%	43%

[0160] [実施例9] ^{89}Zr 標識DOTA-DBCOを用いたTma b製造
(1-1. 錯体形成工程)

本実施例に用いられるリガンドの構造は、上述の式(L1-2)と同一である。このリガンドを、溶媒としてDMSOに分散させて、リガンドを1 mmol/L含む分散液とした。この分散液0.1 mLと、放射性金属源として ^{89}Zr イオン含有溶液(0.1 mmol/L塩酸水溶液、放射能濃度450 MBq/mL、岡山大学製より調製、液量0.1 mL)45 MBq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。リガンドと放射性金属イオンとのモル比率は、リガンド： ^{89}Zr イオン＝約10000：1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。

[0161] 得られた ^{89}Zr 錯体の放射化学的純度は、実施例1に準じて行った。その結果、 ^{89}Zr 錯体の放射化学的純度は99%であった。

[0162] (1-2. 未反応物除去工程)

得られた ^{89}Zr 錯体溶液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分取し、未反応のDOTA-DBCOを除去した。HPLCの条件は下記のとおりである。検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254 nm）／シンチレーション検出器、カラム：XBridge C18 3.5 μm 、4.6 $\times$ 100 nm；Waters製、移動相A：10 mmol/Lヒスチジン緩衝液pH 6.5、移動相B：液体クロマトグラフィー用アセトニトリル、移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のように変えて濃度勾配制御した（A：B = 90：10（0分）→50：50（40分）（vol % / vol %））、流量：0.5 mL / 分、分取ピークの保持時間約32分。得られた分取液を約20 μL まで溶媒留去し、標識工程に用いた。 ^{89}Zr 錯体標識抗体の未反応物除去工程における放射化学的収率（HPLC回収率）は、以下の表4に示した。放射化学的収率（HPLC回収率）の測定方法は本工程開始時に仕込み放射エネルギーの量に対して、分取液の放射エネルギーの量の百分率を未反応物除去工程におけるHPLC回収率（%）とした。

[0163] （2. 標識工程）

上述の各工程を経て得られた ^{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、それぞれ0.1 mol / Lアルギニン含有0.1 mol / 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、 ^{89}Zr 錯体標識抗体を得た。未精製時の実施例の ^{89}Zr 錯体標識抗体の標識工程反応率（%）を以下の表4に示す。ここで、標識工程反応率（%）とはHPLC分取液の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 錯体標識抗体の放射化学的純度（RCP）及び放射化学的収率（RCY）を以下の表4に示す。

[0164] ^{89}Zr 錯体標識抗体の放射化学的純度及び放射化学的収率の測定方法は実施例1に準じて行った。

[0165] [表4]

	第1原子団を有するリガンド(A)	HPLC回収率	抗体	第2原子団(B)	標識工程反応率	精製後	
					37°C 2時間反応(%)	R C P (%)	R C Y (%)
実施例9	DOTA-DBCO	57%	トラスツズマブ	アジド	73%	98%	39%

[0166] 以上、実施形態を参照して本発明を説明したが、本発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本発明の構成や詳細には、本発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

[0167] 本発明によれば、穏和な反応条件であっても、抗体に対する放射性金属の高い標識効率が可能になる。

[0168] 本出願は、日本で出願された特願2019-191561（出願日：2019年10月18日）を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。