

明 細 書

発明の名称：複合体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、複合体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 標的分子の検出のための試薬及び診断薬、あるいは、疾患の治療のための医薬品への利用を目的として、放射性金属が抗体を修飾する配位子化合物に配位した複合体の標識率に関する検討が進められている。

[0003] 特許文献1には、放射性ジルコニウムと、配位子化合物の一種であるDOTPAとを酸性の生理食塩水中で反応させて、Zr錯体の形成を行ったことが開示されている。

[0004] 特許文献2には、放射性ジルコニウムと、配位子化合物の一種であるDOTAとを中性のHEPES緩衝液中で加熱して反応させて、Zr錯体を形成したことが開示されている。

[0005] 特許文献3には、放射性アクチニウムと配位子化合物の一種であるDOTAを修飾したリツキシマブとを塩基性のトリス緩衝液中で反応させて、Ac錯体の形成を行ったことが開示されている。

[0006] 特許文献4には、放射性アクチニウムと配位子化合物の一種であるDOTAを修飾した組み換えIgG1抗体であるHuM-195とをpH5.5～7.0のゲンチジン酸を含む酢酸緩衝液中で反応させて、Ac錯体の形成を行ったことが開示されている。

[0007] また非特許文献1には、放射性ジルコニウムと、配位子化合物であるDOTAとを緩衝液中で反応させて、Zr錯体を形成する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：米国特許出願公開第2014/147381号明細書

特許文献2：米国特許出願公開第2019/038785号明細書

特許文献3：米国特許出願公開第2015/0157742号明細書

特許文献4：米国特許出願公開第2012/0220754号明細書

非特許文献

[0009] 非特許文献1：P a n d y a e t a l, C h e m S c i. 2017
; 8 (3) : 2309-14

発明の概要

[0010] しかし、特許文献1及び2や非特許文献1に開示された条件では、配位子化合物と放射性同位元素との間の錯形成がうまく進行せず、配位子化合物を修飾した抗体（以下、配位子修飾抗体）に対して当該放射性同位元素による十分な標識率を達成できない。したがって、配位子修飾抗体に対して放射性同位元素による高い標識率を安定的に達成できる反応条件が望まれていた。

したがって、本発明は、配位子修飾抗体に対して放射性同位元素による高い標識率を付与することが可能な、放射性同位元素、配位子化合物及び抗体を含む複合体の製造方法を提供することにある。

[0011] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、pH緩衝剤を含まず、pHが2以上10以下の水を含む反応液中で、放射性金属核種と、配位子化合物で修飾された抗体とを反応させることにより、配位子修飾抗体に対して当該放射性同位元素による高い標識率を付与できることを見出した。

すなわち、本発明は、放射性金属核種と配位子修飾抗体との複合体の製造方法であって、放射性金属核種と、配位子修飾抗体とを水を含む反応液中で反応させて、該放射性金属核種を該配位子化合物に配位させる工程を備え、前記反応液は、pH緩衝剤が非含有であり、且つ、pHが2以上10以下である複合体の製造方法を提供するものである。

[0012] 本発明によれば、配位子修飾抗体に対して放射性同位元素による高い標識率を付与することが可能な、放射性同位元素、配位子化合物及び抗体を含む複合体の製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、実施例1及び比較例1で製造した複合体のSK-OV-3腫瘍切片及びMDA-MB-231腫瘍切片に対する抗原結合活性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 以下本発明を、その好ましい実施形態に基づき説明する。

本発明の複合体の製造方法は、放射性金属核種と、配位子修飾抗体とを水を含む反応液中で反応させて、該放射性金属核種を該配位子化合物に配位させる工程を備える。本工程は、反応液が水を含み、かつpH緩衝剤を含まず、pHが2以上10以下の状態で行う。本工程を経て、放射性同位元素が、抗体に修飾した配位子化合物に、配位結合に加えて、共有結合、イオン結合などの組み合わせにより結合し、抗体を直接的に標識する複合体が得られる。

[0015] 本工程に用いられる放射性同位元素は、標識率を高める観点から、水中で電離可能な化合物の態様で用いることが好ましく、放射性同位元素イオンの態様で用いることがより好ましい（以下、これらの態様を総称して「放射性同位元素源」ともいう。）。放射性同位元素源としては、例えば、水を主体とする溶媒に放射性同位元素イオンが溶解又は分散した放射性同位元素イオン含有液を用いることができる。

[0016] 放射性同位元素の核種としては、好ましくは ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 及び ^{225}Ac から選択される少なくとも一種であり、標識率の高さ及び容易さから ^{89}Zr 及び ^{225}Ac の少なくとも一種が特に好ましい。

[0017] ^{89}Zr は、 β^+ 線壊変核種であるとともに、電子捕獲壊変核種である。 ^{89}Zr は、例えばサイクロトロンを用いて ^{89}Y (p, n) ^{89}Zr の核反応により製造することができる。詳細には、プロトン照射後の ^{89}Y ターゲットを酸で溶解した溶解液を、 ^{89}Zr を吸着可能な捕集剤を担持したカラムカートリッジ等に通液する。その後、該カラムカートリッジを水などの溶媒で洗浄したのちに、シュウ酸水溶液を通液することで、 ^{89}Zr イオンを溶出させて溶液として回収することができる。

[0018] ^{225}Ac は、 $\text{Th}-229$ ジェネレータからのミルキング、 $\text{Th}-232$ 核破砕法、 $\text{Ra}-226$ 中性子付加法 ($^{226}\text{Ra} (n, 2n) ^{225}\text{Ra}$ の核反応及び ^{225}Ra の β -崩壊を経由する方法)、 $\text{Ra}-226$ 光核反応 ($^{226}\text{Ra} (\gamma, n) ^{225}\text{Ra}$ の核反応及び ^{225}Ra の β -崩壊を経由する方法)、又は、 $\text{Ra}-226$ 核変換 (サイクロトロンを用いた $^{226}\text{Ra} (p, 2n) ^{225}\text{Ac}$ の核反応) のいずれかによって生成することができる。 $\text{Ra}-226$ 核変換を用いる場合、生成した ^{225}Ac は、例えば、 ^{226}Ra ターゲットから分離精製することで精製することができ、 ^{225}Ac を含む ^{226}Ra ターゲットを酸等で溶解し、溶解液にアルカリを添加することで ^{225}Ac を含む塩を析出させ、当該塩を分離精製することで、精製した ^{225}Ac を得ることができる。

[0019] 本工程に用いられる配位子化合物は、放射性同位元素と配位可能な化合物であれば特に限定されないが、例えば、以下の有機化合物及び該化合物に由来する構造を含む化合物が挙げられる。

[0020] 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)

[0021] 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-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid)

cane)

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))

DO2P (Tetraazacyclododecane dimethanephosphonic acid)

[0022] Deferoxamine (DFO)

DTPA (N, N-bis [2- [bis (carboxymethyl) amino] ethyl] -glycine)

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)

OTP (1, 4, 7-Triazacyclononane-1, 4, 7

- triyltris (methylenephosphonic acid)

[0023] 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)

[0024] 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)) dipicol

inic acid)

H2dedpa (1, 2- [{6- (carboxy) -pyridin
-2-yl} -methylamino] ethane)

H2macropa (6- (1, 4, 10, 13-tetraoxa-7
, 16-diazacyclooctadecan-N, N' -methy
l) picolinic acid)

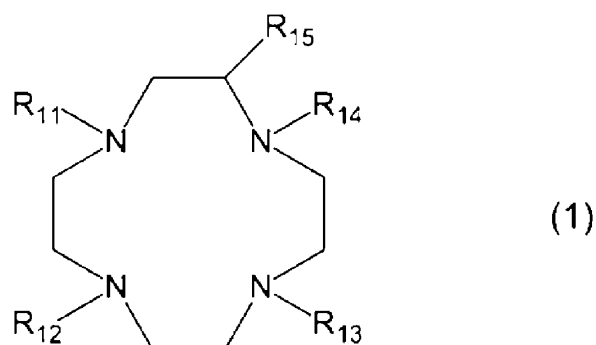
H5decapa (N, N' ' -bis (6-carboxy-2-py
ridylmethyl) -diethylenetriamine-N,
N' , N' ' -triacetic acid)

H6phospa (N, N' - (methylenephosphona
te) -N, N' - [6- (methoxycarbonyl) pyrid
in-2-yl] -methyl-1, 2-diaminoethane)

HP-D03A (Hydroxypropyltetraazacycl
ododecanetriacetic acid)

[0025] これらのうち、本工程で用いられる配位子化合物は、以下の式 (1) で表
される構造を有する有機化合物であることが好ましい。

[0026] [化1]



[0027] 式 (1) 中、 R_{11} 、 R_{13} 及び R_{14} は、それぞれ独立して、 $-(CH_2)_p$
 $COOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_4N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、又は $-(CH_2)_p$

)_pCONH₂からなる基である。上記pは、それぞれ独立して、0以上3以下の整数である。

[0028] 式(1)中、R₁₂又はR₁₅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、前記抗体に修飾するための置換基であり、R₁₂が前記抗体に修飾するための置換基であるときR₁₅は水素原子であり、R₁₂が前記抗体に修飾するための置換基でないときR₁₅は前記抗体に修飾するための置換基である。

[0029] 本工程に用いられる配位子化合物は、より好ましくは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、以下に示される1つの化合物又は該化合物由来する構造を含むことが更に好ましい。本工程に用いられる配位子化合物は、好ましくは水溶性である。

[0030] 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-Tetraazacyclododec

ane-1, 4, 7, 10-tetrakis (methylenephosphonic acid))

DOTA-4AMP (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetrakis (acetamidomethylenephosphonic acid))

DO2P (Tetraazacyclododecane dimethanephosphonic acid)

[0031] 本工程における反応液は、水を含み、pH緩衝剤及び好ましくは有機溶媒を含まない。

[0032] 水としては、本技術分野で通常用いられるものを採用することができ、例えば、蒸留水やイオン交換水を用いることができる。

[0033] pH緩衝剤は、水に溶解したときに、所定のpH範囲でpH緩衝作用を発揮するものである。本発明においては、反応液がpH緩衝剤を含まないようにすることによって、当該反応液内で、放射性金属核種と、配位子化合物で修飾された抗体とを反応させることにより、抗体に対して当該放射性同位元素による高い標識率を付与できることを見出したものである。

[0034] 非含有とするpH緩衝剤としては、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、リン酸、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剤である。

「緩衝剤が非含有である」とは、反応液中に意図的に緩衝剤を含有させないが、反応液中に不可避免的に緩衝剤が混入することは許容することを意味する。

[0035] 非含有とする有機溶媒としては、例えば水溶性有機溶媒及び非水溶性有機溶媒が挙げられる。

前記水溶性有機溶媒としては、メタノール及びエタノール等のプロトン性極性溶媒、並びにアセトニトリル、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非プロトン性極性溶媒が挙げられる。

前記非水溶性有機溶媒としては、ヘキサン、トルエン、酢酸エチル等が挙げられる。

このような有機溶媒を非含有とすることによって、例えば固相抽出法などといった有機溶媒を分離する工程を行う必要がないので、濃縮による放射線分解を回避しつつ、高い標識率を安定的に達成することができる。

「有機溶媒が非含有である」とは、反応液中に意図的に有機溶媒を含有させないが、反応液中に不可避免的に有機溶媒が混入することは許容することを意味する。

[0036] また、本発明において、反応液のpHは2以上10以下である。具体的には、放射性同位元素として、放射性金属核種として ^{89}Zr を用いる場合は、pHが2以上4以下であることが好ましく、更には3であることが好ましい。放射性金属核種として ^{225}Ac を用いる場合は、pHが4以上10以下であることが好ましく、更には6以上9以下であることが好ましい。

反応液のpHを上記範囲内に設定することにより、当該反応液内で、放射性金属核種と、配位子化合物で修飾された抗体とを反応させた際に、抗体に対して当該放射性同位元素による高い標識率を付与できる。

[0037] 反応液のpHは、反応開始前に、上記pHの範囲内となるように調整する。具体的には、水に対して、塩酸などの無機酸や、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物を添加して、反応液のpHを調整する。

なお、反応液中で、放射性金属核種と配位子修飾抗体とを反応させる際には、反応液内に放射性金属核種を予め含有させた後に、配位子修飾抗体を含有させて反応させてもよいし、反応液中に放射性金属核種と配位子修飾抗体とを同時に含有させることもできる。また、反応液中に配位子修飾抗体を予め含有させた後、放射性金属核種を含有させることもできる。

[0038] 次いで、反応圧力を例えば大気圧とし、必要に応じて加熱する。加熱することにより、短い製造時間で標識効率のさらなる向上を達成することができ

る。具体的には、30℃以上80℃以下であることが好ましく、放射性同位元素として、放射性金属核種として ^{89}Zr を用いる場合は、50℃以上80℃以下であることがより好ましく、放射性金属核種として ^{225}Ac を用いる場合は、30℃以上70℃以下であることがより好ましい。加熱の方法としては、反応系外部から熱を付与する方法が挙げられ、例えば、ブロックヒーター、エアヒーター、水浴、油浴、マイクロ波及びマントルヒーター等が挙げられる。特に自動合成装置への組み込みが可能である観点から、ブロックヒーター又はエアヒーターを用いた加熱が好ましい。

なお、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10分以上150分以下、更に好ましくは15分以上120分以下である。

[0039] 本工程における反応液量は、製造スケールに応じて適宜変更してもよいが、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、0.01 mL以上100 mL以下が現実的である。

[0040] 目的とする放射性同位元素による標識率を高める観点から、反応液中の抗体の濃度は、本工程の開始時において、好ましくは $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下、より好ましくは $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下、更に好ましくは $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以上 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下である。

[0041] なお、本発明においては、必要に応じて、スクロース、トレハロース、マンニトール、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、ソルビトール、フルクトース、グルコース、マンノース、メレジトース、及びニストースからなる糖類の群より選択される少なくとも一種、好ましくはグルコース、キシロース、スクロース、トレハロース、マンニトール、及びソルビトールからなる糖類の群より選択される少なくとも一種を反応液内に添加することができる。これによって、抗体、延いては放射性同位元素、配位子化合物及び抗体を含む複合体の凝集を抑制することができる。

これら凝集抑制剤の添加量は、例えば 10 mmol/L 以上 2000 mmol/L 以下であることが好ましく、 100 mmol/L 以上 1000 mmol/L

○ I / L 以下であることがより好ましい。

[0042] なお、最終的に得た複合体において、配位子化合物は、リンカーを介して抗体と接続されていてもよい。

抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体等を挙げることができるが、好ましくはヒトの I g G であり、更に好ましくは、ヒト I g G 1、I g G 2、若しくは I g G 4 である。

リンカーとしては、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 (P E G) 基、ペプチド、糖鎖、ジスルフィド基及びこれらの組み合わせなどが挙げられる。

好ましくは、配位子化合物は、リンカーを介して、抗体を部位特異的に、より好ましくは F c 領域に修飾している。この場合、リンカーは、下記式 (2) で表される、13 以上 17 以下のアミノ酸残基からなるペプチド (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た抗体修飾ペプチドと抗体との架橋反応によって形成されているものを用いることができる。

[0043] なお、式 (2) 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。配位子化合物がリンカーとして抗体修飾ペプチドを介して抗体と接続される場合、配位子化合物と抗体修飾ペプチドが連結する位置は特に限定しないが、例えば抗体修飾ペプチドの N 末端又は C 末端、好ましくは N 末端に直接又は間接的に連結することができる。また、抗体修飾ペプチドの C 末端はその安定性の向上等のためにアミド化等の修飾を受けていてもよい。

[0044] $(X_a) - X_{aa1} - (X_b) - X_{aa2} - (X_c) - X_{aa3} - (X_d) \cdots (2)$

式中、 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_{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、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、 X_{aa1} と X_{aa3} とが連結しており、 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-アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基であり、前記架橋剤で修飾されている。

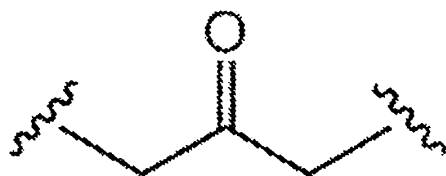
[0045] 上記式(2)におけるXに含まれ得るアミノ酸残基としては、例えば、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、プロリン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、チロシン、メチオニン等のアミノ酸に由来するものが挙げられ、Xは、同一の種類のアミノ酸からなるアミノ酸残基であってもよく、それぞれ異なる種類のアミノ酸からなるアミノ酸残基であってもよい。

[0046] 式(2)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。

[0047] 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(3)に示すリンカーを介して、スルフィド基が結合されていることが好ましい。式(3)中、破線部分はスルフィド基との結合部分を示す。

[0048]

[化2]



(3)

[0049] X_{aa1} 及び X_{aa3} は、上述した組み合わせに代えて、 X_{aa1} 及び X_{aa3} 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。

[0050] 式(2)で表される抗体修飾ペプチドの具体的なアミノ酸配列は、例えば国際公開2016/186206号、国際公開2017/217347号及び国際公開2018/230257号に記載のペプチドが挙げられ、これらを用いることもできる。

[0051] これらのうち、抗体修飾ペプチドのアミノ酸配列として、以下の配列(1)～(14)のいずれか一つを有していることが好ましく、以下の配列(1)、(2)、(13)又は(14)を有していることが更に好ましい。以下のアミノ酸配列(1)～(14)において、(X_{aa2})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、(X_{aa1})及び(X_{aa3})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_{aa1})、(X_{aa2})及び(X_{aa3})以外のアミノ酸は一文字略号にて表記する。

[0052] (1) DCAYH(X_{aa2})GELVWCT (配列番号9)

- (2) GPDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFH (配列番号 10)
- (3) RCAYH(X_{aa2})GELVWCS (配列番号 11)
- (4) GPRCAYH(X_{aa2})GELVWCSFH (配列番号 12)
- (5) SPDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFH (配列番号 13)
- (6) GDDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFH (配列番号 14)
- (7) GPSCAYH(X_{aa2})GELVWCTFH (配列番号 15)
- (8) GPDCAYH(X_{aa2})GELVWCSFH (配列番号 16)
- (9) GPDCAYH(X_{aa2})GELVWCTHH (配列番号 17)
- (10) GPDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFY (配列番号 18)
- (11) SPDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFY (配列番号 19)
- (12) SDDCAYH(X_{aa2})GELVWCTFY (配列番号 20)
- (13) RGNCAYH(X_{aa2})GQLVWCTYH (配列番号 21)
- (14) G(X_{aa1})DCAYH(X_{aa2})GELVWCT(X_{aa3})H (配列番号 22)

[0053] 本発明の上記の実施形態は、以下の技術思想を包含するものである。

[1] 放射性金属核種と抗体との複合体の製造方法であって、

放射性金属核種と、配位子化合物で修飾された抗体とを水を含む反応液中で反応させて、該放射性金属核種を該配位子化合物に配位させる工程を備え、

前記反応液は、pH緩衝剤が非含有であり、且つ、pHが2以上10以下である複合体の製造方法。

[2] 前記放射性金属核種が ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 及び ^{225}Ac から選択される少なくとも一種である、[1]に記載の複合体の製造方法。

[3] 前記放射性金属核種が ^{89}Zr であり、かつ、前記反応液のpHが2以上4以下である、[1]又は[2]に記載の複合体の製造方法。

[4] 前記放射性金属核種が ^{225}Ac であり、かつ、前記反応液のpHが5以上10以下である、[1]～[3]のいずれか1項に記載の複合体の製造方法。

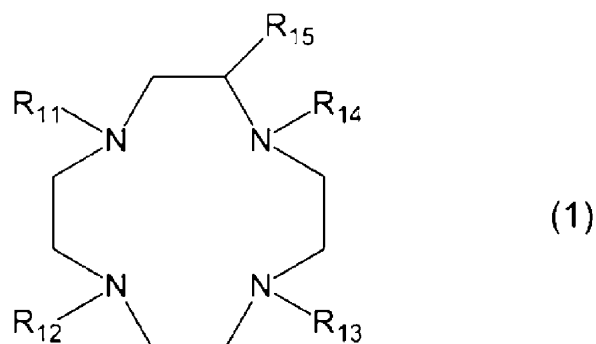
〔５〕 前記反応液に含まれる前記抗体の濃度が、 $1\ \mu\text{mol/L}$ 以上 $2000\ \mu\text{mol/L}$ 以下である、〔１〕～〔４〕のいずれか１項に記載の製造方法。

〔６〕 前記反応液を 30°C 以上 80°C 以下に加熱して前記放射性金属核種を前記配位子化合物に配位させる、〔１〕～〔５〕のいずれか１項に記載の複合体の製造方法。

〔７〕 前記反応液はスクロース、トレハロース、マンニトール、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、ソルビトール、フルクトース、グルコース、マンノース、メレジトース、及びニストースからなる糖類の群より選択される少なくとも一種の凝集阻害剤を含む、〔１〕～〔６〕のいずれか１項に記載の複合体の製造方法。

〔８〕 前記配位子化合物が下記式（１）で表される、〔１〕～〔７〕のいずれか１項に記載の複合体の製造方法。

〔化３〕



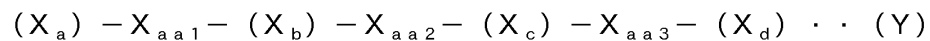
（式中、 R_{11} 、 R_{13} 及び R_{14} は、それぞれ独立して、 $-(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{CONH}_2$ 若しくは、 $-(\text{CHCOOH})(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$ からなる基であり、 R_{12} 又は R_{15} の一方が、水素原子、カルボキシル基、又は、炭素数２若しくは３のカルボキシアルキル基であり、他方が、前記抗体に修飾するための置換基

であり、 p が0以上3以下の整数であり、 R_{12} が前記抗体に修飾するための置換基であるとき R_{15} は水素原子であり、 R_{12} が前記抗体に修飾するための置換基でないとき R_{15} は前記抗体に修飾するための置換基である。）

[9] 前記配位子化合物が、リンカーを介して、前記抗体のFc領域を部位特的に修飾している、[1]～[8]のいずれか1項に記載の複合体の製造方法。

[10] 前記抗体がヒトIgG抗体であり、

前記リンカーが、下記式(Y)で表される、13以上17以下のアミノ酸残基からなるペプチドを含み、架橋剤で修飾された前記ペプチドと前記抗体の架橋反応によって形成されている、[1]～[9]のいずれか1項に記載の複合体の製造方法。



(式中、 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_{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、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、 X_{aa1} と X_{aa3} とが連結しており、 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-アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基であり、前記架橋剤で修飾されている。)

実施例

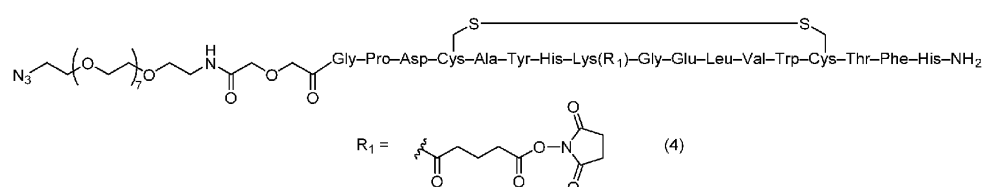
[0054] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。しかしながら本発明の範囲は、実施例に制限されない。

[0055] [実施例1] ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の製造

(1) ペプチド修飾ペルツズマブの合成

国際公開 2017/217347 号に記載の方法で、下記式 (4) 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、同文献明細書の段落 [0038] に記載の配列番号 2 において、 $X_{a_{a1}}$ がリシン残基である配列と同一であり、該リシン残基の側鎖末端アミノ基が下記式 (4) の R_1 で示される構造で修飾されている。また、2 つのシステイン残基間でジスルフィド結合を形成しており、ペプチドの N 末端に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、アジド基が結合している。

[0056] [化4]



(式中、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 はアラニンを、Tyr はチロシンを、His はヒスチジンを、Lys はリシンを、Glu はグルタミン酸を、Leu はロイシンを、Val はバリンを、Trp はトリプトファンを、Phe はフェニルアラニンを、Thr はトレオニンを示す。)

[0057] 次いで、20 mmol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 6.5 mL を加えた遠沈管にペルツズマブ溶液 1 mL (ペルツズマブ (販売名 Perjeta、Roche 社製) を 30 mg 含有する。) を加えた。その後、上記 17 個のアミノ酸残基を含むペプチドのジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液 (ペプチド濃度: 2.4 mmol/L) 140 μ L を加えた後に直ちにピペティングをし、室温で静置し 60 分間反応させることでペプチド修飾ペルツズマブを含む溶液を得た。

[0058] 次に、上記のようにして得たペプチド修飾ペルツズマブを含む溶液を、20 mmol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 22.5 mL で希釈して、IgG-BP カラム (配列として GSGGSGPDCA YHRG

ELVWCTFHで示されるペプチド5632nmolを容量5mLのHitrap NHS-activated HPカラム (Cytiva社製) に固相化したカラム、ペプチドシステイン残基間はジスルフィド結合で架橋される) に通液し、抗体を保持させた。このカラムに0.15mol/L塩化ナトリウム含有0.10mol/L酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.7) を通液し、ペルツズマブ分子に対し二分子のペプチドで修飾されたペプチド修飾抗体 (以下、「二価ペプチド修飾ペルツズマブ」という。) を除いた後に0.1mol/Lグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) を通液し、ペルツズマブ分子に対し一分子のペプチドで修飾されたペプチド修飾ペルツズマブ (以下、「一価ペプチド修飾ペルツズマブ」という。) を含む画分を回収した。

[0059] ペルツズマブ処方緩衝液 (スクロースを41g/L、L-ヒスチジンを3.1g/L、及び氷酢酸を657mg/Lの濃度で含む水溶液) 10mLを予め加えた限外ろ過フィルター (アミコンウルトラ-15、Merck社製) に、上記一価ペプチド修飾ペルツズマブを含む画分を注ぎ込み、遠心機で遠心した (遠心条件: 25°C、3000×g、20分)。遠心後、ろ液を捨て、再びペルツズマブ処方緩衝液を加えて溶液の全量が15mLとなるようにし、同条件で2回目の遠心を行った。

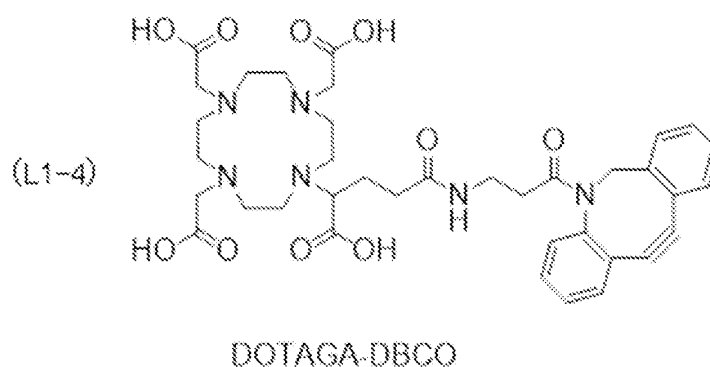
[0060] 次に、上述のようにして得られた溶液に対してペルツズマブ処方緩衝液を加えることにより、その一価ペプチド修飾ペルツズマブの濃度が15mg/mLに調製されたペプチド修飾ペルツズマブ溶液 (以下「溶液A」という場合がある) を得た。この際、溶液Aの一価ペプチド修飾ペルツズマブの濃度はUV-Vis分光光度計 (NanoDrop-2000、Thermo Scientific社製) を用いて、測定波長280nm、測定光路長1mm、吸光係数0.1% (280nm) 1.37 (1mg/mL IgG溶液の280nmにおける吸光係数) を測定条件に設定して測定した。

[0061] (2) 配位子修飾ペルツズマブの合成

以下式 (L1-4) に示す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。

[0062] [化5]



このDOTAGA-DBCOに水を加えて濃度が4 mg/mLのDOTAGA-DBCO含有溶液（以下「溶液B」という場合がある）とした。

[0063] 次いで、溶液A 0.6 mL（一価ペプチド修飾ペルツズマブを9 mg、0.06 μmol 含む）をマイクロチューブに加えた。次いで、溶液B 0.33 mLを加えて直ちにピペティングした。このマイクロチューブを37℃に設定したブロックヒーター上で1時間静置し、上記（1）で合成した一価ペプチド修飾ペルツズマブ及び上記DOTAGA-DBCOをクリック反応させた。

[0064] 次に、上記のようにして得た反応混合液を、ペルツズマブ処方緩衝液で10 mLとなるよう希釈して、プロテインAカラム（1 mL Mab Select SuRe、Cytiva社製）に通液し、ペプチド修飾抗体を保持させた。このカラムに0.15 mol/L塩化ナトリウム含有0.02 mol/Lヒスチジン緩衝液（pH 6.0）を通液し、未反応のDOTAGA-DBCOを洗浄した後に0.1 mol/Lグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）

を通過し、配位子修飾ペルツズマブを含む画分を回収した。

[0065] 予め注射用水 10 mL を加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ 15、Merck 社製）に、上記で得られた回収溶液の全量を加え、遠心機で遠心した（遠心条件：25℃、3000×g、20分）。遠心後、ろ液を捨て、再び注射用水 13.5 mL を加えて同条件で遠心した。この遠心は合計で2回行い、最後に注射用水で希釈することによって、一価ペプチド修飾抗体がDOTAGA-DBCOと反応して得られた一価配位子修飾ペルツズマブの濃度が15 mg/mLである配位子修飾ペルツズマブ溶液（以下「溶液C」という場合がある）を得た。

[0066] (3) 標識反応

$^{89}\text{Y}(\text{p}, \text{n})^{89}\text{Zr}$ の核反応により得られ、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン水溶液（日本メジフィジックス社製）に調製された ^{89}Zr をバイアルに加え、溶媒を留去した。

[0067] 上記バイアルに0.1 mol/Lの塩酸を加えてピペティングで底面を中心によく洗いこみ、マイクロチューブに放射能として19.8 MBq分注した。このマイクロチューブに0.1 mol/L塩酸と注射用水を加えたのち、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、pH 3.0の $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン溶液545.6 μL （反応液中の放射能濃度：36.3 MBq/mL）を得た。pHはpH試験紙により測定した。

[0068] 上記 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン溶液に、溶液C 60 μL （一価配位子修飾ペルツズマブを6 nmol含む）を加えることにより、反応液中の一価配位子修飾ペルツズマブの濃度を10 $\mu\text{mol/L}$ とし、ボルテックスミキサーで攪拌した。次いで、ブロックヒーターを用いて70℃で30分間加熱し、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを配位子修飾ペルツズマブの配位子に配位させ、 ^{89}Zr ペルツズマブ複合体を合成した。

反応混合物の0.5 μL を抜き取り、薄層クロマトグラフィー（iTLC- SG 、Agilent 社製、展開溶媒：EDTA水溶液（0.1 mol/L）と塩酸（1 mol/L）との混液（体積比1：1））で分離した。展開

後の薄層クロマトグラムをTLC解析装置（G I T A S t a r、エムエス機器株式会社製）に導入して、反応混合物中の未反応の ^{89}Zr を含む全 ^{89}Zr 放射能カウント及び ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、99.3%であった。

[0069] 〔実施例2〕 ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の製造

(1) ペプチド修飾トラスツズマブの合成

20 mmol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）25 mLを加えた遠沈管に秤量したトラスツズマブ（販売名H e r c e p t i n、R o c h e社製）50 mg分を溶解し、2 mg/mLの溶液とした。その後、実施例1（1）と同様の17個のアミノ酸残基を含むペプチドのDMSO溶液（濃度：2.4 mmol/L）233 μL を加えた後に直ちにピペッティングをし、室温で静置し60分間反応させることでペプチド修飾トラスツズマブを含む溶液を得た。

[0070] 次に、上記のようにして得たペプチド修飾トラスツズマブを含む溶液を、20 mmol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）25 mLで希釈して、I g G-B Pカラム（実施例1（1）で使用したものに同じ）に添加した。このカラムに0.15 mol/L 塩化ナトリウム含有0.10 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.7）を通液し、トラスツズマブ一分子に対し二分子のペプチドで修飾されたペプチド修飾抗体（以下、「二価ペプチド修飾トラスツズマブ」という。）を除いた後に0.15 mol/L 塩化ナトリウム含有0.10 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 3.5）を通液し、トラスツズマブ一分子に対し一分子のペプチドで修飾されたペプチド修飾抗体（以下、「一価ペプチド修飾トラスツズマブ」という。）を含む画分を回収した。

[0071] トラスツズマブ処方緩衝液（19 g/Lトレハロース水和物、470 mg/L L-ヒスチジン塩酸塩、300 mg/L L-ヒスチジン）を予め加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-15、M e r c k社製）に、

上記一価ペプチド修飾トラスツズマブを含む画分を注ぎ込み、遠心機で遠心した（遠心条件：20℃、2330×g、20分）。遠心後、ろ液を捨て、再びトラスツズマブ処方緩衝液を加えて溶液の全量が15mLとなるようにし、同条件で2回目の遠心を行った。なお、トラスツズマブ処方緩衝液の添加、ろ液の抽出及び遠心操作は合計3回行った。

[0072] 次いで、上述のようにして得られた溶液に対してトラスツズマブ処方緩衝液を加えることにより、一価ペプチド修飾トラスツズマブの濃度が15mg/mLに調製されたペプチド修飾トラスツズマブ溶液（以下「溶液D」という場合がある）を得た。この際、溶液Dの一価ペプチド修飾トラスツズマブの濃度はUV-Vis分光光度計（NanoDrop-2000、Thermo Scientific社製）を用いて、前述のように測定した。

[0073] （2）配位子修飾トラスツズマブの合成

溶液D 0.6mL（一価ペプチド修飾トラスツズマブを9mg、0.06μmol含む）をマイクロチューブに加えた。次いで、実施例1（2）と同様に調製した溶液B 0.33mLを加えて直ちにピペティングした。このマイクロチューブを37℃に設定したブロックヒーター上で1時間静置し、上記（1）で合成したペプチド修飾トラスツズマブ及びDOTAGA-DBCOをクリック反応させた。

[0074] 次に、上記のようにして得た反応混合液を、トラスツズマブ処方緩衝液で10mLとなるよう希釈して、プロテインAカラム（1mL MabSelect SuRe、Cytiva社製）に通液し、抗体を保持させた。このカラムに0.15mol/L塩化ナトリウム含有0.02mol/Lヒスチジン緩衝液（pH6.0）を通液し、未反応のDOTAGA-DBCOを洗浄した後に0.1mol/Lグリシン塩酸緩衝液（pH3.5）を通液し、配位子修飾トラスツズマブを含む画分を回収した。

[0075] 予め注射用水10mLを加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ15、Merck社製）に、上記で得られた回収溶液の全量を加え、遠心機で遠心した（遠心条件：25℃、3000×g、20分）。遠心後、ろ液を

捨て、再び注射用水 13.5 mL を加えて同条件で遠心した。この遠心は合計で 4 回行い、最後に注射用水で希釈することによって、一価ペプチド修飾抗体が DOTA-GA-DBCO と反応して得られた一価配位子修飾トラスツズマブの濃度が 15 mg/mL である配位子修飾トラスツズマブ溶液（以下「溶液 E」という場合がある）を得た。

[0076] (3) 標識反応

$^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを 36.3 MBq/mL で含む pH 3.0 の $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン溶液 545.6 μL を用いて、溶液 C の代わりに溶液 E に変更した以外は実施例 1 (3) と同様にして、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを配位子修飾トラスツズマブの配位子に配位させ、 ^{89}Zr トラスツズマブ複合体を合成した。実施例 1 (3) と同様に薄層クロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は 99.5 % であった。

[0077] [実施例 3] ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の製造

(1) 配位子修飾ペルツズマブの合成

実施例 1 (1) 及び (2) と同様な手順に従い、配位子修飾ペルツズマブを合成し、溶液 C を得た。

[0078] (2) 標識反応

オークリッジ国立研究所から購入した $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ が入ったバイアルに 0.2 mol/L の塩酸を加えてピペティングで底面を中心によく洗いこみ、マイクロチューブに放射能として 0.332 MBq 分注した。このマイクロチューブに 0.2 mol/L 塩酸と注射用水を加えたのち、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、pH 7.0 の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：1.2 MBq/mL）276 μL を得た。pH は pH 試験紙により測定した。

[0079] 上記 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液に溶液 C 30 μL （一価配位子修飾ペルツズマブを 3 nmol 含む）を加えることにより、反応液中の一価配位子修飾ペルツズマブの濃度を 9.8 $\mu\text{mol/L}$ とし、ボルテックスミキサーで攪拌した

。次いで、ブロックヒーターを用いて40℃で30分間加熱し、 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオンを配位子修飾ペルツズマブの配位子に配位させ、 ^{225}Ac ペルツズマブ複合体を合成した。

反応混合物の2 μL を抜き取り、薄層クロマトグラフィー（iTLC-SG、Agilent社、展開溶媒：EDTA水溶液（0.1 mol/L）と塩酸（1 mol/L）との混液（体積比1：1））で分離した。展開後の薄層クロマトグラムをTLC解析装置（GITAS tar、エムエス機器株式会社製）に導入して、反応混合物中の未反応の ^{225}Ac を含む全 ^{225}Ac 放射能カウント及び ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、91.0%であった。

[0080] 〔実施例4〕 ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造

（1）配位子修飾トラスツズマブの合成

実施例2（1）及び（2）と同様な手順に従い、配位子修飾トラスツズマブを合成し、溶液Eを得た。

[0081] （2）標識反応

pH 7.0の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：0.98 MBq/mL）276 μL を用いて、溶液Cの代わりに溶液Eに変更した以外は実施例3（2）と同様に、 ^{225}Ac イオンを配位子修飾トラスツズマブの配位子に配位させ、 ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を合成した。実施例3（2）と同様に薄層クロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は83.6%であった。

[0082] 〔実施例5〕安定剤添加条件での ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の製造

（1）配位子修飾ペルツズマブの合成

実施例1（1）及び（2）と同様な手順に従い、配位子修飾ペルツズマブを合成し、溶液Cを得た。

[0083] （2）標識反応

pH 7.0 の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：1.5 MBq / mL）186 μL を用いて、反応液に500 mmol / L スクロース水溶液90 μL を加えた以外は実施例3（2）と同様にして、 ^{225}Ac イオンを配位子修飾ペルツズマブの配位サイトに配位させ、 ^{225}Ac ペルツズマブ複合体を合成した。

実施例3（2）と同様に薄層クロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、91.0%であった。

[0084] 〔実施例6〕酸性条件での ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造

（1）配位子修飾トラスツズマブの合成

実施例2（1）及び（2）と同様な手順に従い、配位子修飾トラスツズマブを合成し、溶液（E）を得た。

[0085] （2）標識反応

オークリッジ国立研究所から購入した $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ が入ったバイアルに0.2 mmol / L の塩酸を加えてピペティングで底面を中心によく洗いこみ、マイクロチューブに放射能として0.301 MBq 分注した。このマイクロチューブに0.2 mmol / L 塩酸と注射用水を加えたのち、1 mmol / L 水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、pH 4.0 の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：1.1 MBq / mL）272 μL を得た。pH は pH 試験紙により測定した。

$^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液として上記 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液を用いた以外は、実施例4（2）と同様の方法で ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を合成し、薄層クロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、93.0%であった。

[0086] 〔比較例1〕2段階方法による ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の製造

（1） ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOの製造

放射能として19.9 MBq の $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを含有する0.1 mmol /

L塩酸20 μ Lに対して、DOTAGA-DBCO（濃度：0.3 mmol/L）と酢酸ナトリウム（濃度：0.156 mol/L）とを含有する水溶液20 μ L（配位子を6 nmol含む）並びにゲンチジン酸（濃度：0.15 mol/L）と酢酸ナトリウム（濃度：0.156 mol/L）とを含有する水溶液20 μ Lを加え、70℃で60分間反応させてDOTAGA-DBCOを $^{89}\text{Zr}^{4+}$ に配位させた。得られた ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOの反応混合物の0.5 μ Lを抜き取り、薄層クロマトグラフィー（iTLC-SG、Agilent社、展開溶媒：注射用水とアセトニトリルとの混液（体積比1：1））で分離した。展開後の薄層クロマトグラムをTLC解析装置（GITAStar、エムエス機器株式会社製）に導入して、反応混合物中の未反応の ^{89}Zr を含む全 ^{89}Zr 放射能カウント及び ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOの放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOの放射能カウントの百分率は、98.7%であった。

[0087] (2) ペプチド修飾ペルツズマブ

実施例1(1)と同様な手順に従い、ペプチド修飾ペルツズマブを合成した。

[0088] (3) ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の製造

上記で得られた ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCO溶液90 μ Lに溶液A 0.06 mL（1価抗体を6 nmol含む）を加えて37℃で90分間反応させ、抗体と ^{89}Zr 標識DOTAGA-DBCOとをクリック反応で結合させて、 ^{89}Zr ペルツズマブ複合体を配位子への ^{89}Zr 標識工程と ^{89}Zr 配位子のクリック反応の2工程からなる製法で得た。得られた ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の反応混合物中の未反応の ^{89}Zr を含む全 ^{89}Zr 放射能カウント及び ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の放射能カウントを実施例1(3)と同様の方法で測定した結果、全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr ペルツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、82.4%であった。

[0089] [比較例2] 2段階方法による ^{89}Zr トラストズマブ複合体の製造

(1) ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO の製造

比較例 1 (1) と同様な手順に従い、放射能として 19.8 MBq の $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを用いて ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO を製造した。得られた ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO の反応混合物の 0.5 μL を抜き取り、薄層クロマトグラフィー (iTLC-SG、Agilent 社、展開溶媒：注射用水とアセトニトリルとの混液 (体積比 1 : 1)) で分離した。展開後の薄層クロマトグラムを TLC 解析装置 (GITASTAR、エムエス機器株式会社製) に導入して、反応混合物中の未反応の ^{89}Zr を含む全 ^{89}Zr 放射能カウント及び ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO の放射能カウントの百分率は、98.6% であった。

[0090] (2) ペプチド修飾トラスツズマブ

実施例 2 (1) と同様な手順に従い、ペプチド修飾トラスツズマブを合成した。

[0091] (3) ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の製造

上記で得られた ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO 溶液 90 μL に溶液 D 0.06 mL (1 価抗体を 6 nmol 含む) を加えて 37°C で 90 分間反応させ、抗体と ^{89}Zr 標識 DOTAGA-DBCO とを結合させて、 ^{89}Zr トラスツズマブ複合体を得た。得られた ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の反応混合物中の未反応の ^{89}Zr を含む全 ^{89}Zr 放射能カウント及び ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の放射能カウントを実施例 1 (3) と同様の方法で測定した結果、全 ^{89}Zr 放射能カウントに対する ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、81.7% であった。

[0092] [比較例 3] 2 段階方法による ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の製造

(1) ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO の製造

放射能として 0.6 MBq の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオンを含有する 0.2 mol/L 塩酸 20 μL に対して、DOTAGA-DBCO (濃度：0.3 mol/L) と酢酸ナトリウム (濃度：0.156 mol/L) とを含有する水溶液

40 μ L 並びに酢酸ナトリウム水溶液（濃度：0.156 mol/L）20 μ L を加え、70°C で60分間反応させて $^{225}\text{Ac}^{3+}$ をDOTAGA-DBCOに配位させた。得られた ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCO反応混合物の2 μ L を抜き取り、薄層クロマトグラフィー（iTLC-SG、Agilent 社、展開溶媒：注射用水とアセトニトリルとの混液（体積比1：1））で分離した。展開後の薄層クロマトグラムをTLC解析装置（GITAS tar、エムエス機器株式会社製）に導入して、反応混合物中の未反応の ^{225}Ac を含む全 ^{225}Ac 放射能カウント及び ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOの放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOの放射能カウントの百分率は、98.9%であった。

[0093] (2) ペプチド修飾ペルツズマブ

実施例1(1)と同様な手順に従い、ペプチド修飾ペルツズマブを合成した。

[0094] (3) ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の製造

上記で得られた ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCO溶液40 μ L に溶液A 0.06 mL（1価抗体を6 nmol 含む）を加えて37°C で90分間反応させ、抗体と ^{225}Ac 標識DOTAGA-DBCOとを結合させて、 ^{225}Ac ペルツズマブ複合体を得た。得られた ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の反応混合物の2 μ L を抜き取り、薄層クロマトグラフィー（iTLC-SG、Agilent 社、展開溶媒：EDTA水溶液（0.1 mol/L）とアセトニトリルとの混液（体積比1：1））で分離した。展開後の薄層クロマトグラムをTLC解析装置（GITAS tar、エムエス機器株式会社製）に導入して、反応混合物中の未反応の ^{225}Ac を含む全 ^{225}Ac 放射能カウント及び ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、67.3%であった。

[0095] [比較例4] 2段階方法による ^{225}Ac ペルツズマブ複合体の製造

(1) ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO の製造

比較例 3 (1) と同様な手順に従い、 ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO を製造した。得られた ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO の反応混合物の $2\mu\text{L}$ を抜き取り、薄層クロマトグラフィー (iTLC-SG、Agilent 社、展開溶媒：注射用水とアセトニトリルとの混液 (体積比 1 : 1)) で分離した。展開後の薄層クロマトグラムを TLC 解析装置 (GITAS tar、エムエス機器株式会社製) に導入して、反応混合物中の未反応の ^{225}Ac を含む全 ^{225}Ac 放射能カウント及び ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO の放射能カウントの百分率は、98.8% であった。

[0096] (2) ペプチド修飾トラスツズマブ

実施例 2 (1) と同様な手順に従い、ペプチド修飾トラスツズマブを合成した。

[0097] (3) ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造

上記で得られた ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO 溶液 $40\mu\text{L}$ に溶液 D 0.06 mL (1 価抗体を 6nmol 含む) を加えて 37°C で 90 分間反応させ、抗体と ^{225}Ac 標識 DOTAGA-DBCO とを結合させて、 ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を得た。得られた ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の反応混合物の $2\mu\text{L}$ を抜き取り、薄層クロマトグラフィー (iTLC-SG、Agilent 社、展開溶媒：EDTA 水溶液 (0.1mol/L) とアセトニトリルとの混液 (体積比 1 : 1)) で分離した。展開後の薄層クロマトグラムを TLC 解析装置 (GITAS tar、エムエス機器株式会社製) に導入して、反応混合物中の未反応の ^{225}Ac を含む全 ^{225}Ac 放射能カウント及び ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントをそれぞれ測定した。全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率は、67.2% であった。

[0098] 一段階で抗体標識を行った実施例 1 ~ 6 はいずれも高標識率を示した。一

方で、二段階で標識を行った比較例1～4は標識率が低く、二段階による製造方法に比べて一段階による製造方法の方が優れていることが示された。

[0099] [比較例5] 1段階方法による ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造（米国特許出願公開第2015/0157742号明細書を参考に条件設定）

(1) 配位子修飾トラスツズマブ

実施例2(1)及び(2)と同様な手順に従い、配位子修飾トラスツズマブを合成した。合成した配位子修飾トラスツズマブを予め0.15mol/L塩化ナトリウム-50mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)10mLを加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-15、Merck社製）に加え、遠心機で遠心した（遠心条件：25℃、3000×g、20分）。遠心後、ろ液を捨て、再び0.15mol/L塩化ナトリウム-50mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)13.5mLを加えて同条件で遠心した。この遠心は合計で4回行い、最後に0.15mol/L塩化ナトリウム-50mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)で希釈することによって、一価抗体濃度が5mg/mLである配位子修飾抗体溶液（以下「溶液F」という場合がある）を得た。

[0100] (2) ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造

先行技術文献の開示条件を参考に、下記のように ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を(1)の配位子修飾トラスツズマブを用いて製造した。

オークリッジ国立研究所から購入した $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ が入ったバイアルに0.2mol/Lの塩酸を加えてピペティングで底面を中心によく洗いこみ、マイクロチューブに放射能として0.288MBq（液量5μL）分注した。このマイクロチューブに注射用水5μL、100mmol/L Tris緩衝液(pH9.0)500μLを加え、pH9.0の $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：0.56MBq/mL）510μLを得た。pHはpH試験紙により測定した。

上記 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液に、溶液Fを20μL加えて40℃で15分加熱して ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を合成し、実施例3(2)と同様に薄層ク

ロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{225}Ac 放射能カウントに対する ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率を測定した。その結果は、10.0%であった。

[0101] [比較例6] 1段階方法による ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造（米国特許出願公開第2012/0220754号明細書）

(1) 配位子修飾トラスツズマブ

実施例2(1)及び(2)と同様な手順に従い、配位子修飾トラスツズマブを合成した。合成した配位子修飾トラスツズマブを予め生理食塩水10mLを加えた限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-15、Merck社製）に加え、遠心機で遠心した（遠心条件：25℃、3000×g、20分）。遠心後、ろ液を捨て、再び生理食塩水13.5mLを加えて同条件で遠心した。この遠心は合計で4回行い、最後に生理食塩水で希釈することによって、一価抗体濃度が10mg/mLである配位子修飾抗体溶液（以下「溶液G」という場合がある）を得た。

[0102] (2) ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の製造

先行技術文献の開示条件を参考に、下記のように ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を(1)の配位子修飾トラスツズマブを用いて製造した。

オークリッジ国立研究所から購入した $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ が入ったバイアルに0.2mol/Lの塩酸を加えてピペティングで底面を中心によく洗いき、マイクロチューブに放射能として0.272MBq（液量75μL）分注した。このマイクロチューブに注射用水225μL、3mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液100μL、飽和ゲンチジン酸溶液20μLを加え、 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液（反応液中の放射能濃度：0.65MBq/mL）420μLを得た。pHはpH試験紙により測定し、5.5から7.0の範囲内であることを確認した。

上記 $^{225}\text{Ac}^{3+}$ イオン溶液に、溶液Gを100μL加えて37℃で90分加熱して ^{225}Ac トラスツズマブ複合体を合成し、実施例3(2)と同様に薄層クロマトグラフィー法により反応混合物を分析した結果、全 ^{225}Ac 放射能カ

ウントに対する ^{225}Ac トラスツズマブ複合体の放射能カウントの百分率を測定した。その結果は、17.9%であった。

[0103] 一段階で ^{225}Ac 標識を行った実施例3～6はいずれも高標識率を示した。一方で、先行技術文献の条件を元に設定した条件で標識を行った比較例5～6は標識率が低く、先行技術文献による製造方法に比べて本発明の一段階による製造方法の方が優れていることが示された。

[0104] [実施例7] 凝集抑制剤添加条件での ^{89}Zr トラスツズマブ複合体の製造

(1) 配位子修飾トラスツズマブの合成

実施例2(1)及び(2)と同様な手順に従い、配位子修飾トラスツズマブを合成し、溶液Eを得た。

[0105] (2) 標識反応

^{89}Y (p, n) ^{89}Zr の核反応により得られ、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン水溶液(日本メジフィジックス社製)に調製された ^{89}Zr をバイアルに加え、溶媒を留去した。

[0106] 上記バイアルに0.1 mol/Lの塩酸を814 μL 添加し、ピペッティングで底面を中心によく洗いこみ、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを1000 MBq/mLで含む溶液を得た。この溶液20 μL をマイクロチューブに分注し、0.1 mol/L塩酸40 μL と、凝集抑制剤として注射用水又は300 mmol/Lに調整したソルビトール、キシロース、グルコース、トレハロース、スクロース水溶液のいずれか300 μL と、注射用水210 μL を加えたのち、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、pH 3.0の $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン溶液570 μL (反応液中の放射能濃度: 35 MBq/mL)を得た。pHはpH試験紙により測定した。

[0107] 上記 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオン溶液に、溶液E 30 μL (一価配位子修飾トラスツズマブを3 nmol含む)を加えることにより、反応液中の一価配位子修飾トラスツズマブの濃度を5 $\mu\text{mol/L}$ とし、ボルテックスミキサーで攪拌した。次いで、ブロックヒーターを用いて70℃で30分間加熱し、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ イオンを配位子修飾トラスツズマブの配位子に配位させ、 ^{89}Zr トラスツズ

マブ複合体を合成した。

[0108] (評価)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析において、RI 検出器を用いたクロマトグラムを取得し標識率を評価した。また SEC 分析において、UV 検出器を用いたクロマトグラムを取得し凝集体の割合を評価することで、凝集抑制剤による抗体の安定化効果を検証した。液体クロマトグラフィー装置として Waters 社製の e2695 型セパレーションモジュールを使用し、UV 検出器として Waters 社製の 2489 型 UV/VIS 検出器を使用し、RI 検出器として Raytest 社製の Gabi Star 検出器を使用し、下記の条件で分析した。なお、RI 検出器を用いたクロマトグラム中の全ピーク面積値に対する⁸⁹Zr トラスツズマブ複合体のピーク面積値の面積百分率を標識率とした。また UV 検出器を用いたクロマトグラム中の⁸⁹Zr トラスツズマブ複合体のピーク (以下「主ピーク」という場合がある。)、それ以外として検出されるピークを凝集体のピークとした。

[0109] 製造終了後 (0 日点) 及び 14 日間保存した場合のそれぞれの標識率を表 1 に、各成分の割合を表 2 に示す。実施例 2 と比べて配位子修飾抗体の濃度が低い場合、標識率は低下しているが、いずれも標識率 50% を超えており、凝集抑制剤を加えた場合でも、凝集抑制剤を加えない場合に比べて 20% 以上標識率が低下することはなかった。更に 14 日間保存したとき、凝集抑制剤を加えない場合に比べ、凝集抑制剤を加えた場合では凝集体の形成が抑制された。

[0110] [HPLC 条件]

カラム: TOSOH TSK gel guard column SWXL (6 mm × 4 cm), TOSOH TSK gel G3000 SWXL (5 μm、7.8 × 30 cm)

カラム温度: 25℃ 付近の一定温度

移動相: 0.2 mol/L アルギニン塩酸塩含有 0.1 mol/L リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH 6.8)

流量：毎分 1.0 mL

面積測定範囲：15分

検出波長（UV）：280 nm

検出範囲（RI）：50～803 keV

[0111] [表1]

凝集抑制剤	測定日	標識率 (%)
—	0日点	71.5
	14日点	63.6
ソルビトール	0日点	52.5
	14日点	57.4
キシロース	0日点	73.7
	14日点	71.4
グルコース	0日点	54.3
	14日点	65.1
トレハロース	0日点	81.7
	14日点	74.6
スクロース	0日点	85.3
	14日点	72.7

[0112] [表2]

凝集抑制剤	測定日	主ピークの割合 (%)	凝集体のピークの割合 (%)
—	0日点	97.1	2.9
	14日点	89.0	11.0
ソルビトール	0日点	97.1	2.9
	14日点	94.5	5.5
キシロース	0日点	95.7	4.3
	14日点	95.6	4.4
グルコース	0日点	96.2	3.8
	14日点	95.6	4.4
トレハロース	0日点	96.3	3.7
	14日点	98.3	1.7
スクロース	0日点	95.0	5.0
	14日点	92.4	7.6

[0113] [抗原結合活性の評価]

抗原結合活性は *in vitro* オートラジオグラフィー (ARG) で

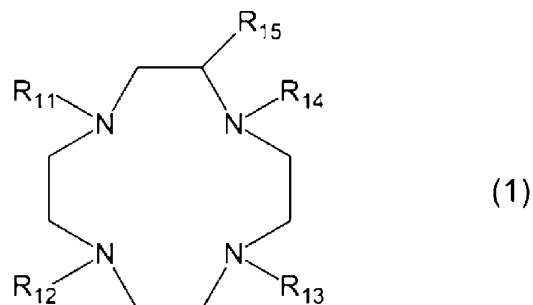
確認した。ATCC (American Type Culture Collection) から購入したHER2陽性のヒト卵巣がん細胞株であるSK-OV-3細胞及びHER2陰性のヒト乳がん細胞株であるMDA-MB-231細胞を雌性BALB/c nu/nuマウス（日本チャールス・リバー社製）の脇腹皮下にそれぞれ 5×10^6 cells及び 1×10^7 cells投与して担癌マウスを作製した。その後、SK-OV-3腫瘍及びMDA-MB-231腫瘍を摘出してティッシュ・テック O. C. T. コンパウンド（サクラファインテックジャパン社製）に包埋して凍結切片を作製した。1%ウシ血清アルブミン含有PBSに実施例1及び比較例1で得られた放射性複合体をそれぞれ5 kBq/mLとなるように添加し、SK-OV-3腫瘍切片及び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（GEヘルスケアジャパン製、Typhoon FLA 7000）で読み取り、切片に結合した放射エネルギーを評価した。結果を図1に示す。グラフの縦軸は、使用した腫瘍切片に設定したROI内のカウント値をROIの面積で除算した値を、標準線源のカウント値をROIの面積で除算した値で補正した値を示し、横軸は、評価に使用した腫瘍切片の細胞種を示す。グラフは、各サンプル内に設定したROIの平均値±標準偏差を示す。実施例1及び比較例1の記載に従って製造した放射性複合体において、HER2に対する結合活性が確認された。実施例1及び比較例1に従って製造した放射性複合体は、SK-OV-3腫瘍切片にのみ結合し、HER2選択的な結合活性が確認された。

[0114] 本出願は、日本で出願された特願2022-057723（出願日：2022年3月30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] 放射性金属核種と抗体との複合体の製造方法であって、
放射性金属核種と、配位子化合物で修飾された抗体とを水を含む反応液中で反応させて、該放射性金属核種を該配位子化合物に配位させる工程を備え、
前記反応液は、pH緩衝剤が非含有であり、且つ、pHが2以上10以下である複合体の製造方法。
- [請求項2] 前記放射性金属核種が ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 及び ^{225}Ac から選択される少なくとも一種である、請求項1に記載の複合体の製造方法。
- [請求項3] 前記放射性金属核種が ^{89}Zr であり、かつ、前記反応液のpHが2以上4以下である、請求項2に記載の複合体の製造方法。
- [請求項4] 前記放射性金属核種が ^{225}Ac であり、かつ、前記反応液のpHが5以上10以下である、請求項2に記載の複合体の製造方法。
- [請求項5] 前記反応液に含まれる前記抗体の濃度が、 $1\mu\text{mol/L}$ 以上 $2000\mu\text{mol/L}$ 以下である、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記反応液を 30°C 以上 80°C 以下に加熱して前記放射性金属核種を前記配位子化合物に配位させる、請求項1又は2に記載の複合体の製造方法。
- [請求項7] 前記反応液はスクロース、トレハロース、マンニトール、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、ソルビトール、フルクトース、グルコース、マンノース、メレジトース、及びニストースからなる糖類の群より選択される少なくとも一種の凝集阻害剤を含む、請求項1又は2に記載の複合体の製造方法。
- [請求項8] 前記配位子化合物が下記式(1)で表される、請求項1又は2に記載の複合体の製造方法。

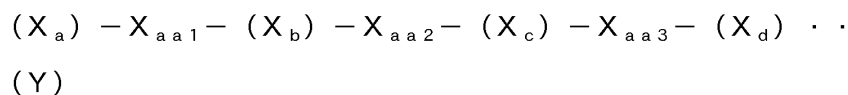
[化1]



(式中、 R_{11} 、 R_{13} 及び R_{14} は、それぞれ独立して、 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_4N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 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、前記抗体に修飾するための置換基であり、 p が0以上3以下の整数であり、 R_{12} が前記抗体に修飾するための置換基であるとき R_{15} は水素原子であり、 R_{12} が前記抗体に修飾するための置換基でないとき R_{15} は前記抗体に修飾するための置換基である。)

[請求項9] 前記配位子化合物が、リンカーを介して、前記抗体のFc領域を部位特的に修飾している、請求項1又は2に記載の複合体の製造方法。

[請求項10] 前記抗体がヒトIgG抗体であり、
前記リンカーが、下記式(Y)で表される、13以上17以下のアミノ酸残基からなるペプチドを含み、架橋剤で修飾された前記ペプチドと前記抗体の架橋反応によって形成されている、請求項9に記載の複合体の製造方法。



(式中、 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_{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、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、 X_{aa1} と X_{aa3} とが連結しており、 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-アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基であり、前記架橋剤で修飾されている。)