

明 細 書

発明の名称：

配位子、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体 技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒトCEACAM5抗体FabフラグメントあるいはヒトMUC1抗体Fabフラグメント、及び配位子からなる複合体に関する。本発明はまた、前記複合体を含む診断用組成物及び／又は医薬組成物、並びに、当該複合体を用いた癌の診断及び／又は治療方法等に関する。さらに、配位子、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体、当該複合体を含む診断用組成物及び／又は医薬組成物、並びに、当該複合体を用いた当該生物分子に関連した疾患の診断及び／又は治療方法等に関する。また、当該配位子と金属とから形成された錯体及び当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントあるいは当該ヒトMUC1抗体Fabフラグメントからなる複合体に関する。また、当該錯体、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体に関する。

背景技術

[0002] CEA (Carcinoembryonic antigen) 又はCEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) は1965年に発見された腫瘍マーカーであり (J. Exp. Med. ; 1965 ; 121 : 439-462、PNAS ; 1969 ; 64 : 161-167)、現在までに23個のCEA関連分子が明らかとなっている (Bio Med Central Biology ; 2010 ; 8 : 12-33)。そのうち、CEACAM5は正常組織でほとんど発現が認められないが、胎児の消化管や大腸癌で発現している (BBA ; 1990 ; 1032 : 177-189、J. Clin. Mol. Pathol. ; 1999 ; 52 : 174-178)。また、CEACAM5は乳癌、肺癌、甲状腺癌でも発現していることが知

られている (Diagn. Cytopathol. ; 1993 ; 9 : 377
- 382、Cancer Res. ; 1990 ; 50 : 6987 - 6994
、Histopathology ; 2000 ; 37 : 530 - 535)。

[0003] 大腸癌患者では健常人に比べ血中CEACAM5の濃度が高く (J. Exp. Med. ; 1965 ; 121 : 439 - 462)、CEACAM5は腫瘍マーカーとして使用されている。大腸癌患者の組織学的な検討では90%以上の組織でCEACAM5が高発現している (British J. Cancer ; 2013 ; 108 : 662 - 667)。

大腸癌の早期の転移は肝臓に局限しているため、早期に肝転移を発見し治療できれば、再発率を低下させることができる (Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol. ; 2017 ; 3 : 163 - 173)。

ムチン1 (Mucin 1 : MUC1) は、乳腺、気管及び消化管等の上皮組織を構成する上皮細胞の内腔側に発現する膜結合型糖タンパク質である (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan ; 4 (1) : 45 - 60)。MUC1は乳癌 (Mod. Pathol., 2005 Oct ; 18 (10) : 1295 - 304)、肺癌 (Hum. Pathol., 2008 Jan ; 39 (1) : 126 - 36)、大腸癌 (Int. J. Oncol., 2000 Jan ; 16 (1) : 55 - 64)、膀胱癌 (PLoS One, 2014 Mar ; 9 (3) : e92742)、皮膚癌 (Histopathology, 2000 Sep ; 37 (3) : 218 - 23)、甲状腺癌 (J. Pathol., 2003 Jul ; 200 (3) : 357 - 69)、胃癌 (J. Pathol., 2000 Mar ; 190 (4) : 437 - 43)、膵臓癌 (Int. J. Oncol., 2004 Jan ; 24 (1) : 107 - 13)、腎臓癌 (Mod. Pathol., 2004 Feb ; 17 (2) : 180 - 8)、卵巣癌 (Gynecol. Oncol., 2007 Jun ; 105 (3) : 695 - 702) 及び子宮頸癌 (Am. J. Clin. Pa

thol., 2004 Jul;122(1):61-9)等の癌細胞で過剰に発現しており、MUC1は癌病巣を検出するための標的分子として有用である(Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan;4(1):45-60、Pathol. Res. Pract., 2010 Aug15;206(8):585-9)。

MUC1は細胞外ドメインに存在する20アミノ酸のタンデムリピート配列であるHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA(本願配列表の配列番号19)の9番目のスレオニンがO-グリコシル化される。癌細胞ではこのO-グリコシル化が不完全であり、T(Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr)、Tn(GalNAc α 1-O-Ser/Thr)及び2,3ST(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr)等のO-グリコシル化が癌特異的に起こることが知られている(特許文献1、非特許文献1)。正常組織のMUC1は、これらの癌特異的なO-グリコシル化は受けないため、ヒト癌特異的MUC1はヒトでの各種癌を治療するための標的分子として特に有用である。このような抗ヒト癌特異的MUC1抗体として、例えば1B2抗体(特許文献1)、Pank oMa b抗体(非特許文献2)、5E5抗体(特許文献2)等が知られている。これらの抗体のうち、1B2抗体はPank oMa b抗体に比較してヒト癌特異的MUC1に対する特異性が高いことが報告されている(特許文献1)。

肝転移の診断にはCT(コンピュータ断層撮影)やMRI(核磁気共鳴画像法)、FDG-PET(Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography)が使用されている。CTやMRI、FDG-PETの検出感度はそれぞれ74.4、80.3、81.4%で、1cm以下の腫瘍では検出感度はCTで47.3%、MRIで60.2%に低下する(Radiology;2010;257:674-684)。肝特異性造影剤MRIも使用されているが、1cm以下の腫瘍ではその検出感度は29~38%である(Radiology;2005

; 237 : 89 - 98)。

[0004] 癌を診断、治療するために、抗癌剤や金属放射性同位元素を結合させた抗体が用いられている。抗体を用いたターゲティングは腫瘍細胞に対する特異性が高く、副作用が少ない。現在までにいくつかの金属放射性同位元素で標識されたモノクローナル抗体が診断及び治療に臨床応用されている (Cancer Control ; 2012 ; 19 : 196 - 203)。

一方で、一般に抗体は血中半減期が長く、体内に投与後、癌を可視化するのに十分なシグナルを与える腫瘍対血液比に達するのに4日～5日の長い期間を必要とする (Clin. Pharmacol. Ther. ; 2010 ; 87 : 586 - 592)。また抗体のFc領域は、抗体依存性細胞障害 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity : ADCC) や補体依存性細胞障害 (Complement-Dependent Cytotoxicity : CDC) の薬理作用を引き起こす (Glycoconj. J. ; 2013 ; 30 : 227 - 236、Curr. Opin. Biotechnol. ; 2002 ; 13 : 609 - 614)。また抗体は肝臓で代謝されるため標的に関わらず肝臓に高集積するが、大腸癌の早期の転移は肝臓に局限しているため、抗体で肝転移の病巣を検出することは難しい (Clin. Pharmacol. Ther. ; 2010 ; 87 : 586 - 592)。

Fab、scFv、ダイアボディのような低分子化された組み換え抗体フラグメントは、組織浸透性が高いため病巣に届きやすく、大腸菌や酵母での発現系を用いた低コストでの生産が期待できることから治療用抗体として利用される一方、血中半減期が短く、腎排泄される特徴を有することから、診断薬としての利用も報告されている (Nat. Biotechnol. ; 2005 ; 23 : 1126 - 1136)。

[0005] 診断薬として応用されている抗ヒトCEACAM5抗体としては、マウスモノクローナル抗体T84.66のヒト化抗体であるM5A (特許文献3) が知られている。⁶⁴Cuで標識したM5Aは、皮下に癌細胞を移植したマウス

を用いた試験で、良好なPETイメージを得るには投与後22時間以上経過する必要があること（非特許文献3）、また、肝転移のモデルマウスを用いた試験において、肝臓の正常組織と肝臓の病巣部位への取り込みは投与後3時間では同程度であり、24時間経過後には有意差があること（非特許文献4）が報告されている。

抗ヒトCEACAM5抗体のフラグメントでは、マウスモノクローナル抗体のNP-4のFab'を^{99m}Tcで標識したCEA-Scanが大腸癌の診断に利用できることが報告されている（非特許文献5）。しかしながら、CEA-Scanの病巣部位への取り込みは正常な肝臓への取り込みを上回らず、また、肝転移の検出感度はFDG-PETより低い（非特許文献6）。CEA-Scanは、1999年にFDAに大腸癌の診断薬として認可されたが、もはや販売されていない（非特許文献7）。

DOTA（1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸）は、放射性金属のキレーターとして臨床実績がありかつ広く用いられている。近年DOTAを用いて金属標識を行い、ペプチドや抗体と結合させ、ターゲティングする研究が報告されている（非特許文献8）。

がん治療では、DOTAを有する医薬として、Satoreotide tetraxetan（非特許文献9）がフェーズI開発中として報告されている。⁹⁰Y-epratuzumab tetraxetanを血液系腫瘍を有する患者に投与したことが報告されている（非特許文献10）。

一般的に、DOTA等のキレート剤および低分子化抗体やペプチドが結合した複合体は、腎臓で高度に取り込まれ、保持されるまたは集積される（非特許文献11, 12）。

このように、当該複合体の腎臓の集積は正確な診断や治療において不都合が生じる（非特許文献13）。

[0006] 例えば [¹¹¹In] DOTA-リツキサンFabの複合体を投与したマウスでの試験において、腎臓に高度に集積した報告がされている（非特許文献11

）。

このように腎臓で高度に集積されることを回避するために、第一として抗体のフラグメント、例えばF a b、s c F V、F a b'、d s F V等に改変した複合体での検討があげられ、第二としてキレートと抗体の間に特異的に腎臓内で切断されるリンカー（ペプチドリinkerともいう）を有する複合体での検討があげられる（非特許文献12）。

当初、ペプチドリinkerがG l y（グリシン）-L y s（リジン）であるヨード馬尿酸-G l y-L y s-F a bが腎刷子縁膜酵素により切断されヨード馬尿酸が代謝物として尿中に含まれ排出されることが報告されている（非特許文献14）。また、ペプチドリinkerがG l y-T y r（チロシン）であるヨード馬尿酸-G l y-T y s-F a bが報告されている（非特許文献13）。

一方、馬尿酸の代わりに有機レニウム錯体C p T R-C O O HにペプチドリinkerのG l y-L y sを結合させた $[^{188}\text{Re}] \text{C p T R-G l y-L y s-F a b}$ が報告されている（非特許文献15）。

また、ペプチドリinkerがG l y-P h e（フェニルアラニン）-L y sである $^{99\text{m}}\text{Tc-P G G F M L-I T-F a b}$ が報告されている（特許文献4）。

また、キレートとしてN O T Aに着目し、当該N O T Aとペプチドリinkerからなる複合体が報告されている（特許文献5）。

前記ペプチドリinkerを有する複合体が創製されたが、キレート剤の種類によっては当該酵素により切断されない課題が生じ、キレート剤とペプチドリinkerとの間に特定構造の連結部（-C H₂-P h-C O-N H-）を導入することにより解決しようとした複合体が報告されている（特許文献6）。放射性同位体として汎用されているインジウム等の比較的大きな原子半径を有する原子を配位できる配位子を有する複合体を得ることを目指している。キレートとペプチドリinkerを介するスペーサーとして特許文献5に記載のチオウレア構造を有するものを導入したが腎刷子縁膜酵素による分解が進行

しないことを言及している。

リソソームによる切断を目指したペプチドリンカーがMet（メチオニン）-Ile（イソロイシン）である、複合体 ^{67}Ga -NOTA-Met-Ile-Fabが以下の知見に基づき報告されている（非特許文献16）。

ペプチドリンカーを有していない複合体NOTA-（p-SCN-Bz）-dsFvのリソソーム切断で生じる代謝物 ^{67}Ga -NOTA-Bn-Metが尿排泄されることが報告されたこと（非特許文献17）、上記複合体NOTA-（p-SCN-Bz）-dsFvのdsFvの軽鎖N末端から2番目がIleであることから、複合体 ^{67}Ga -NOTA-Met-Ile-Her2（ハーセプチン）Fabを設計した（非特許文献19）。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Glycoconj. J., 2013 Apr; 30 (3) : 227-36.

非特許文献2: Cancer Immunol Immunother, 2006 Nov; 55 (11) : 1337-47

非特許文献3: Bioconj. Chem.; 2008; 19: 89-96

非特許文献4: PLOS ONE; 2014; 9 (9) : e106921

非特許文献5: Ann. Surg.; 1997; 226: 621-631

非特許文献6: J. Nucl. Med.; 2000; 41: 1657-1663

非特許文献7: Kenneth T. Cheng, "99mTc-Arcitumomab", [online], Update: March 17, 2008., Molecular Imaging and Contrast Agent Database, [平成29年5月17日検索]、インターネット<URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23676/>>

非特許文献8: Bioorg. Med. Chem. ; 2019 ; 27 :
3248-3253

非特許文献9: Clinical Trials.gov Identifier: NCT02592707

非特許文献10: Eur J Haematol. 2013 Dec ; 91
(6) : 552-6

非特許文献11: Bioconjugate Chem. 2001, 12,
264-270

非特許文献12: Bioconjugate Chem. 2002, 13,
985-995

非特許文献13: Bioconjugate Chem. 2013, 24,
291-299

非特許文献14: Cancer Res. 1999, 59, 128-1
34

非特許文献15: Bioconjugate Chem. 2007, 18
, 190-198

非特許文献16: Bioconjugate Chem. 2014, 25
, 2038-2045

非特許文献17: Bioconjugate Chem. 1997, 8,
365-369

特許文献

[0008] 特許文献1: 国際公開第WO2010/050528号パンフレット

特許文献2: 国際公開第WO2008/040362号パンフレット

特許文献3: 国際公開第WO2005/086875号パンフレット

特許文献4: 国際公開第WO2013/081091号パンフレット

特許文献5: 国際公開第WO2017/150549号パンフレット

特許文献6: 国際公開第WO2019/065774号パンフレット

特許文献7: 国際公開第WO2018/092885号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 一価のF a bフラグメントは、分子量約50kDaであり、約150kDaの抗体より小さく、腎排泄され、血中半減期も短い。そのため、投与後2～32時間以内に癌を可視化するのに十分なシグナルを与える腫瘍対血液比に達する。Fc領域がないためADCCやCDCを引き起こすこともない。F a bフラグメントは、主に腎排泄のため、肝転移の検出の妨げになることもない。このような特長から、抗体と比べ、F a bフラグメントは、体内診断薬としてより有効であることが期待できる。

しかしながらF a bフラグメントでは、抗体の二価から一価になるため、その結合活性が減弱することが多い。さらに抗体を体内診断薬や光免疫療法で用いる薬剤として利用するためには、金属や蛍光色素等で標識しなければならないが、そのような物質で標識されることにより、その抗体の結合活性が減弱するとの課題がある。

本発明の課題は、金属や蛍光色素等による標識によっても結合活性が減弱しない抗ヒトCEACAM5抗体F a bフラグメントを用いた、体内診断薬および放射線内用療法に有用な標識化された複合体を提供することにある。抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント（特許文献7）とペプチドリンカー及び配位子からなる複合体、並びに抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメントと配位子とからなる複合体を提供することにある。また、本発明の別の課題は、上記複合体を含む診断用組成物及びそれを利用した診断方法を提供すること、並びに、上記複合体を含む医薬組成物及びそれを利用した治療方法を提供することにある。

また、本発明の課題は、腎臓に集積するキレーターおよび生物分子を有する複合体がより速やかに排泄する複合体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、先にヒトCEACAM5に対する良好な親和性を有する抗ヒトCEACAM5抗体F a bフラグメントを作製した（国際出願PCT／

JP2018/025618)。さらに鋭意検討を重ねた結果、当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントに、標識に用いる配位子及びペプチドリンカーを介して（或いは介さずに）結合させた複合体を作製し、当該複合体が抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント自体と同等のヒトCEACAM5に対する親和性を有すること、即ち、標識部とFabフラグメントとの結合によっても結合活性が減弱しないことを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントとペプチドリンカー及び配位子からなる複合体、並びに抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントと特定の配位子とからなる複合体を提供する。当該複合体が、標識部とFabフラグメントとの結合によってもヒトCEACAM5に対する結合活性が減弱せず、良好なヒトCEACAM5に対する結合活性を保持していることを確認しており、これらの結果に基づき、本発明の複合体を用いた診断手段及び治療手段を提供するものである。

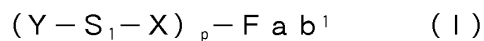
[0011] また、本発明者らは、ヒト癌特異的MUC1に対する良好な親和性を有する抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを作製し、さらに鋭意検討を重ねた結果、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントに、配位子をペプチドリンカーを介して（或いは介さずに）結合させた複合体を作製した。当該複合体は抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント自体と同等のヒト癌特異的MUC1に対する親和性を有する。即ち、本発明は、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントとペプチドリンカー及び配位子からなる複合体、並びに抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントと特定の配位子とからなる複合体を提供する。更に、当該複合体が、標識部の結合によってもヒト癌特異的MUC1に対する結合活性が減弱せず、良好なヒト癌特異的MUC1に対する結合活性を保持していることを確認しており、これらの結果に基づき、本発明の複合体を用いた診断手段及び治療手段を提供するものである。

また、本発明者らは、造影剤や抗がん剤等の医薬として有用な抗体等の配位子と金属から形成された錯体(金属錯体ともいう)、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体が、腎臓に集積する恐れがあるため

、より速やかに排泄される複合体につき検討した。その結果、放射性金属のキレーターとして臨床実績がありかつ広く用いられているDOTA（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）に着目し、3 arm DOTA、特定のスペーサー、特定のペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体が腎臓内で分解され排出されることを見出した。

以上より、本発明は以下のCEACAM5のFab抗体からなる複合体及び当該複合体を含む診断用組成物及び／又は医薬組成物、並びに、当該複合体を用いた癌の診断及び／又は治療方法等に関する。また、本発明は以下のMUC1のFab抗体からなる複合体及び当該複合体を含む診断用組成物及び／又は医薬組成物、並びに、当該複合体を用いた癌の診断及び／又は治療方法等に関する。また、本発明は腎臓から速やかに排出されるDOTA、スペーサー、ペプチドリンカー及び生物分子からなる複合体、当該複合体の中間体、並びに、当該複合体を用いた生物分子に関連した疾患の診断及び／又は治療方法等に関する。

[0012] [1] 下式(1)：



[式中、

Fab¹は、

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、及び

(b) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、

からなる群より選択される、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントであり、該Fab¹は該Fab¹中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介してXに結合しており；

Xは、ペプチドリinker又は結合であり；

S₁は、スペーサー又は結合であり；

Yは、配位子であり；並びに、

pは、1～25の自然数であり、Fab¹に結合している基(Y-S₁-X)の数を示し；

但し、Xが結合であるときは、S₁が-CH₂-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-又は結合であり、且つ、Y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(以下、DOTAと略記する場合がある)である]

で示される複合体。

[0013] [2] Fab¹が、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、及び

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、からなる群より選択される、上記[1]に記載の複合体。

[0014] [3] Fab¹が、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、Fabフラグメント(以下Fab²という)を含む、上記[2]に記載の複合体。

[4] Xが、腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有する、2～4個のアミノ酸からなるペプチドを含むペプチドリinkerである、上記[1]～[3]のいずれかに記載の複合体。

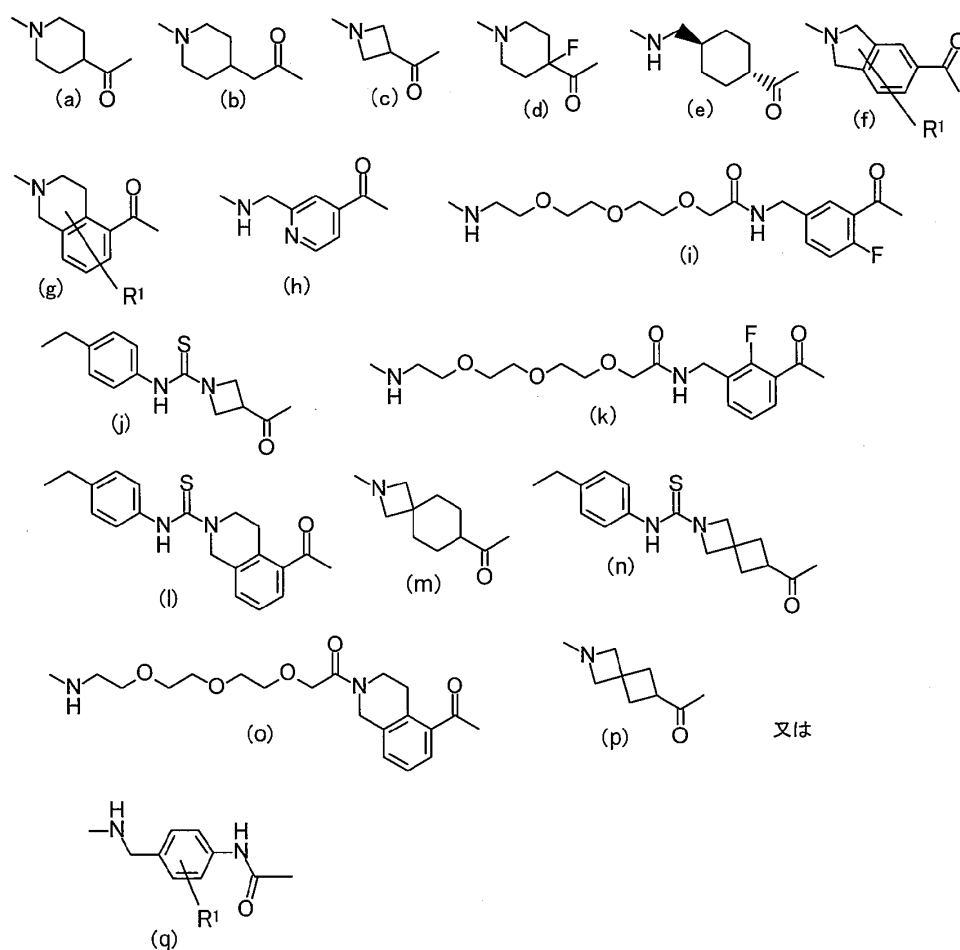
[0015] [5] S₁が、

$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 ー、

下式 (a) ~ (q) で示されるスペーサー、又は、結合であり、

[0016]

[化1]



[0017] 上記式中、 R^1 は水素原子、ハロゲンまたは C_{1-6} アルキルを意味する。以下同様。Xが、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (6) $-\text{Gly}-\text{Lys}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (7) $-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、

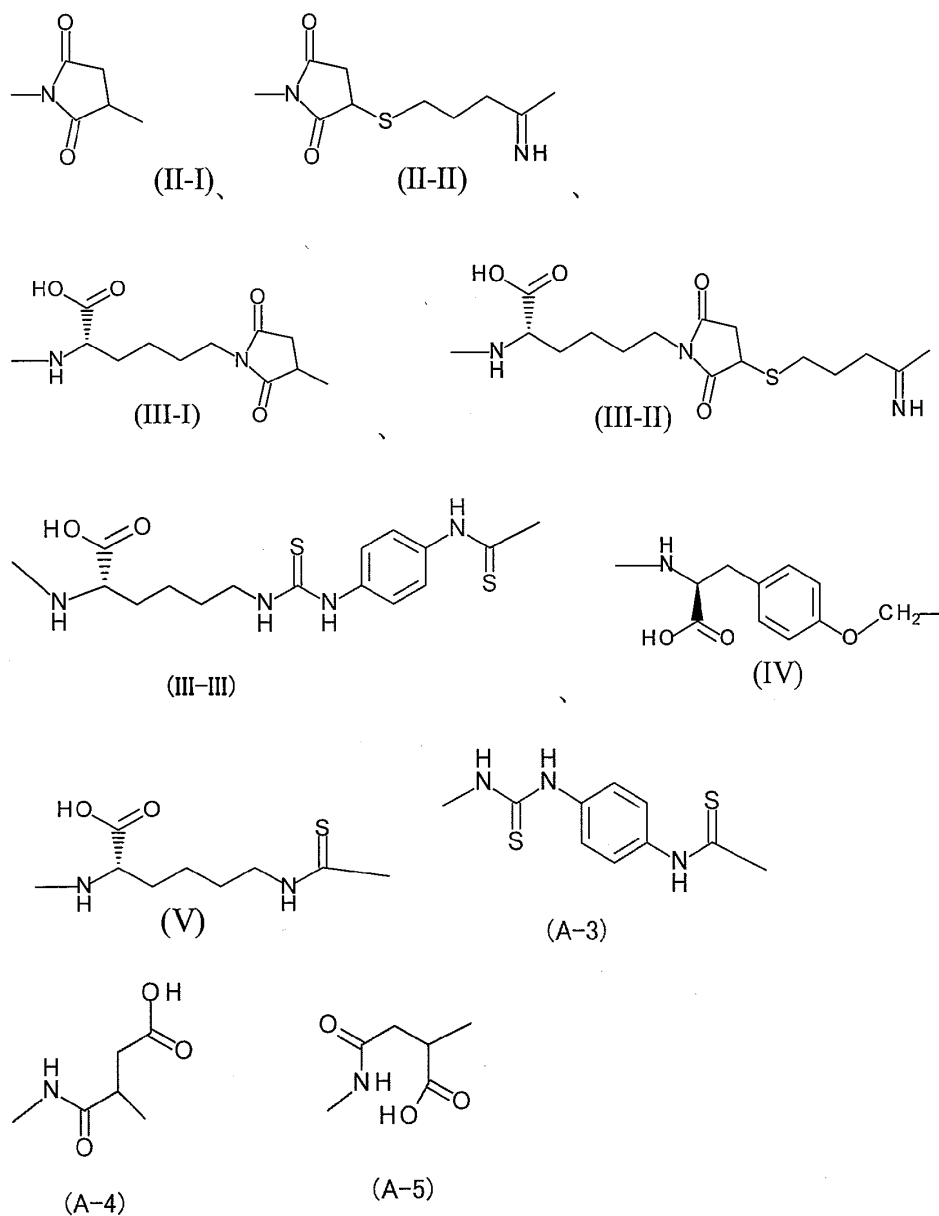
- (8) $-Gly-Lys^*-C(=S)-NH-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-$ 、
- (9) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-NH-C(=S)-NH-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-$ 、
- (10) $-Asp-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、
- (11) $-Met-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、
- (12) $-Met-Ile-Lys^*-Z_2-$ 、
- (13) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-Lys^*-Z_2-$ 、
- (14) $-Val-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
- (15) $-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
- (16) $-Gly-Val-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
- (17) $-Gly-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
- (18) $-Met-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、
- (19) $-Gly-Tyr-Lys^*-Z_2-$ 、
- (20) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
- (21) $-Gly-(3-(2-ナフチル)アラニン)-Lys^*-Z_2-$ 、
- (22) $-Gly-ジフェニルアラニン-Lys^*-Z_2-$ 、
- (23) $-Gly-Tyr-NH-(CH_2)_5-Z_1-$ 、
- (24) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-4)-$ 、
- (25) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-5)-$ 、
- (26) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(II-II)-$ 、
- (27) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-3)-$ 及び
- (28) $-Met-Gly-Lys^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカー、又は
- (29) 結合、

であり、ここに、Metはメチオニンを、Ileはイソロイシンを、Glyはグリシンを、Lysはリシンを、Pheはフェニルアラニンを、Valは

バリンを、T y rはチロシンを、A r gはアルギニンを、A s pはアスパラギン酸を、Z₁は下式 (I I - I) 又は (I I - I I) に示される基を、-L y s * -Z₂-は下式 (I I I - I) 又は (I I I - I I) に示される基を、-T y r * -C H₂-は下式 (I V) に示される基を、-L y s * -C (= S) -は下式 (V) に示される基を、-L y s * -Z₃-は下式 (I I I - I I I) に示される基をそれぞれ示す、基 (A - 3) 、 (A - 4) 又は (A - 5) は下式のとおりであり、上記 [1] ~ [4] のいずれかに記載の複合体。

[0018]

[化2]



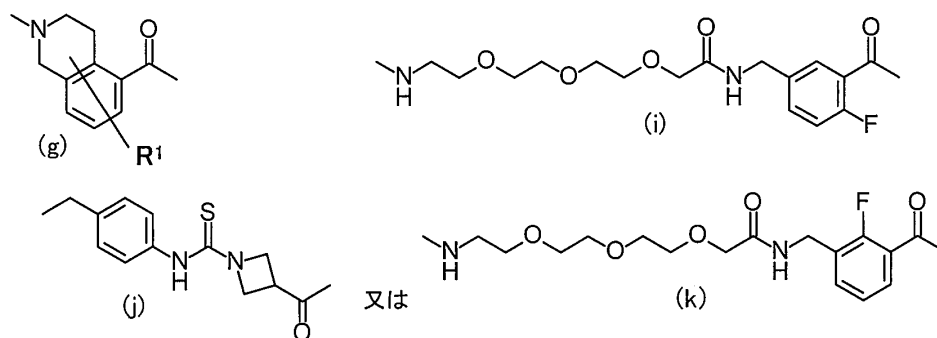
[0019] [6] S_1 が $-C(=O)-CH_2O-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$
 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$
 $-$ 、又は、 $-C(=O)-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$ であり、
 X が
 (1) $-Me t - l l e - NH - (CH_2)_2 - Z_1 -$ 、

- (2) $-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、
 (3) $-Gly-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、
 (5) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
 (6) $-Gly-Lys-Lys^*-Z_2-$ 、及び
 (8) $-Gly-Lys^*-C(=S)-NH-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-$

からなる群より選択されるペプチドリinkerである、上記 [1] から [5] のいずれかに記載の複合体。

[7-1] S_1 が $-C(=O)-CH_2O-(1,3-フェニレン)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-(1,3-フェニレン)-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-(1,3-フェニレン)-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-(1,4-フェニレン)-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-(1,4-フェニレン)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(1,3-フェニレン)-C(=O)-$ であり、又は、下式

[0020] [化3]



Xが

- [0021] (1) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
 (2) $-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、
 (3) $-Gly-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、
 (5) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、
 (6) $-Gly-Lys-Lys^*-Z_2-$ 、

(8) $-\text{Gly-Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、

(24) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、

(25) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、

(26) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{II-II})-$ 、

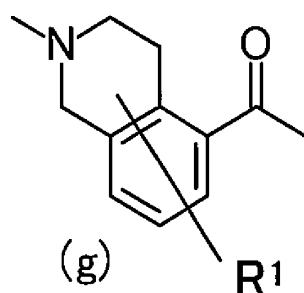
(27) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び

(28) $-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、

上記 [1] から [5] のいずれかに記載の複合体。

[7-2] S_1 が、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、であり、又は、下式

[0022] [化4]



[0023] X が

(1) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、

(24) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、

(25) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、

(26) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{II-II})-$ 、

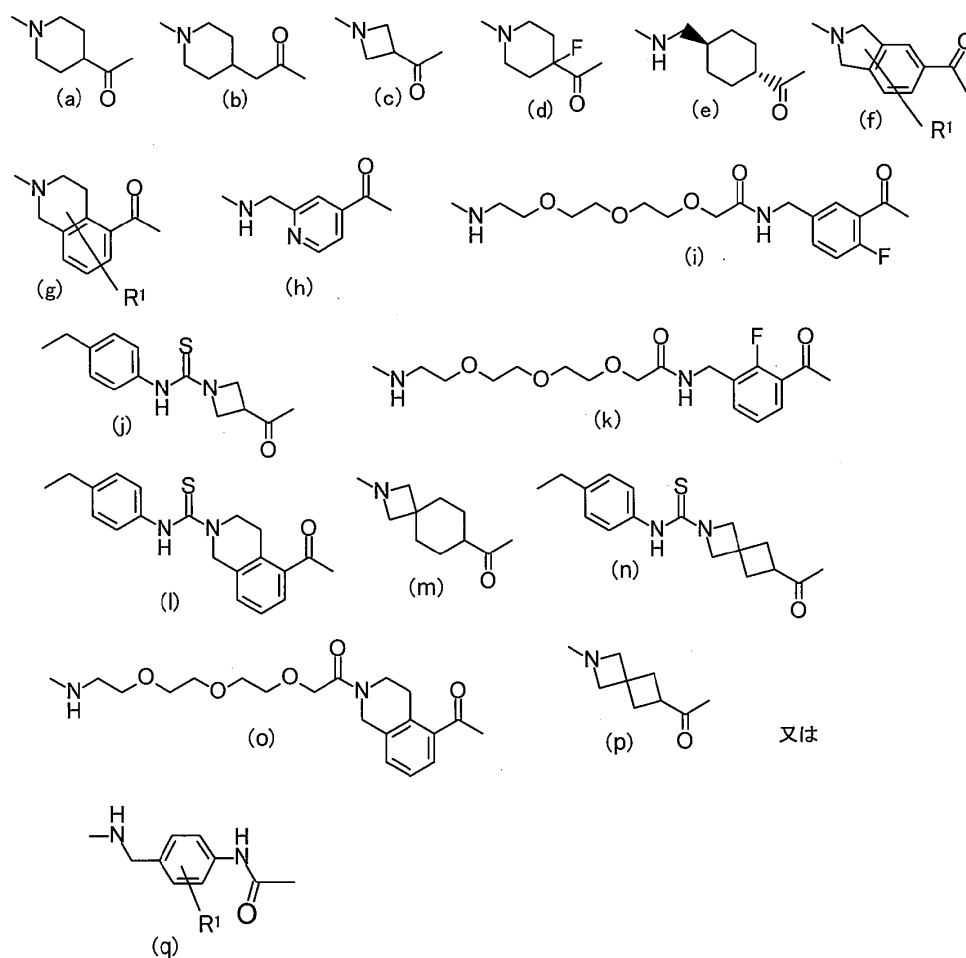
(27) $-\text{Met-Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び

(28) $-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [7-1] に記載の複合体。

[8] S_1 が $-NH-CH_2-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ 、 $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-CH_2-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-C(=O)-$ 、 $-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-NH-CH_2-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$ 、 $-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-CH_2-(1,3\text{-フェニレン})-C(=O)-$ 、下式(a)～(q)で示されるスペーサー、又は、結合であり、

[0024]

[化5]



[0025] Xが、

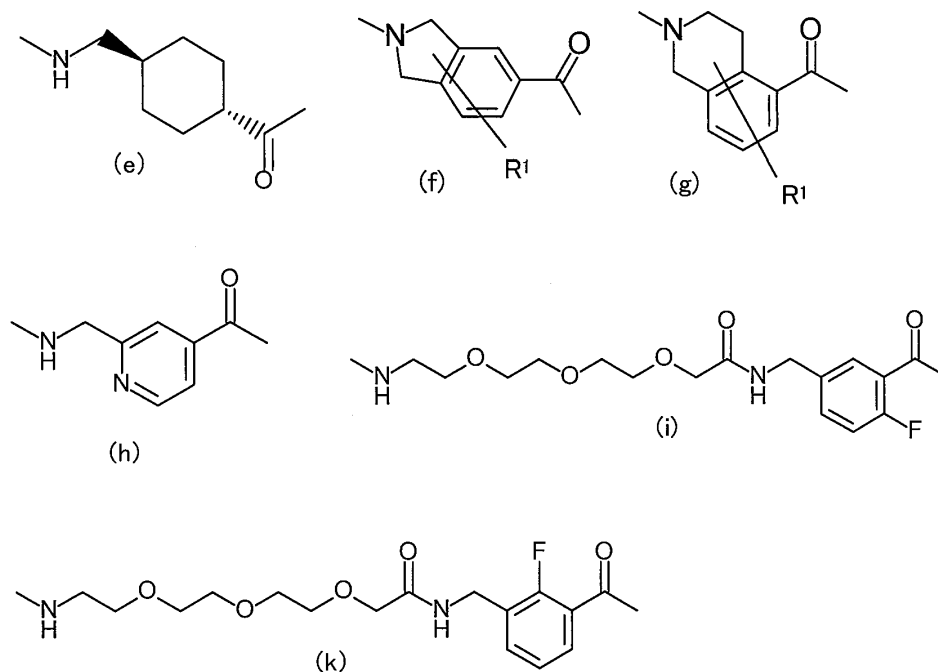
- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (7) $-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、

- (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1, 4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
- (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (13) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (14) $-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (15) $-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (16) $-\text{Gly}-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (17) $-\text{Gly}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (19) $-\text{Gly}-\text{Tyr}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (20) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (21) $-\text{Gly}-(3-(2\text{-ナフチル})\text{アラニン})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (22) $-\text{Gly}-\text{ジフェニルアラニン}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (23) $-\text{Gly}-\text{Tyr}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{Z}_1-$
- (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
- (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
- (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{I}-\text{I})-$ 、
- (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
- (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。

[0026] [9] S_1 が $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1, 4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1, 4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 4\text{-フェニレン})$

) —NH—C(=O)— 、下式 (e) ~ (i) 若しくは (k) で示されるス
ペーサー、又は、結合であり、

[0027] [化6]



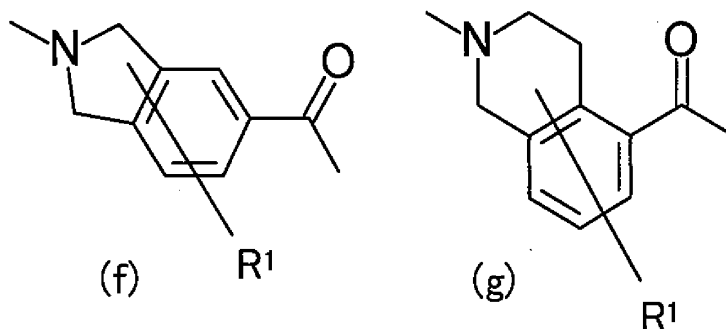
[0028] Xが

- (1) $\text{—Met—Ile—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—Z}_1\text{—}$ 、
- (2) $\text{—Gly—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (3) $\text{—Gly—Phe—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (9) $\text{—Met—Ile—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—NH—C(=S)—NH—(1, 4-フェニレン)—NH—C(=S)—}$ 、
- (10) $\text{—Asp—Gly—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (11) $\text{—Met—Gly—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (12) $\text{—Met—Ile—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (21) $\text{—Gly—(3-(2-ナフチル)アラニン)—Lys*—Z}_2\text{—}$ 、
- (24) $\text{—Met—Ile—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—(A-4)—}$ 、
- (25) $\text{—Met—Ile—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—(A-5)—}$ 、

(26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{Ile}-\text{Ile})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。。

[10] S_1 が $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、下式 (f) 若しくは (g) で示されるスペーサー、又は、結合からなる群より選択される基であり、

[0029] [化7]



[0030] Xが、

(1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、

(25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{I}-\text{I})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。

[11] Xが、

(1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-Z_1-$ 、
 (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{I}-\text{I})-$ 、及び
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。

[12] Xが、

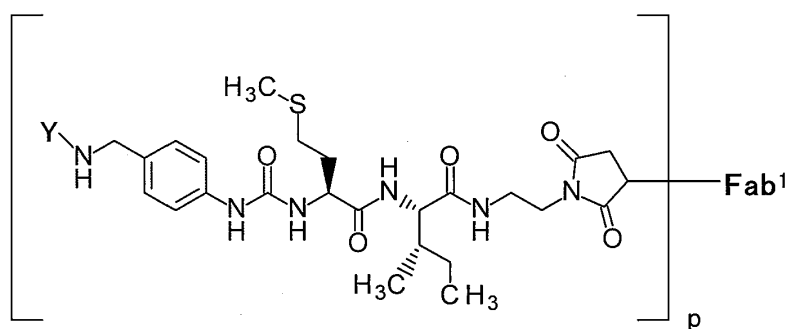
(4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、及び
 (28) $\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_3-$
 からなる群より選択されるペプチドリンカーである、上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。

[13] Xが、

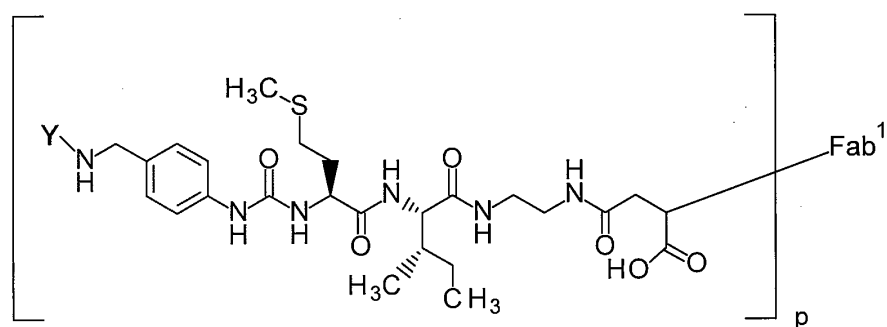
(11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_3-$
 からなる群より選択されるペプチドリンカーである上記 [1] ~ [5] の何れかに記載の複合体。

[14] 下式に示される化合物からなる群より選択される複合体であって、
Fab¹が該Fab¹中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している、上記[1]～[5]の何れかに記載の複合体。

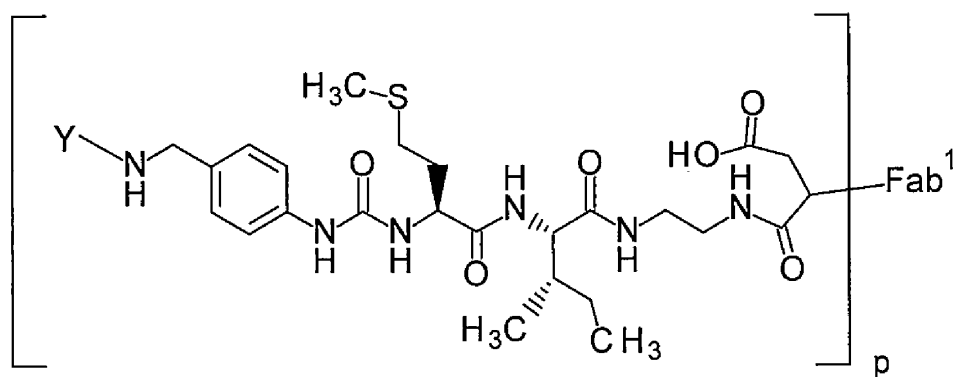
[0031] [化8]



[0032] [化9]

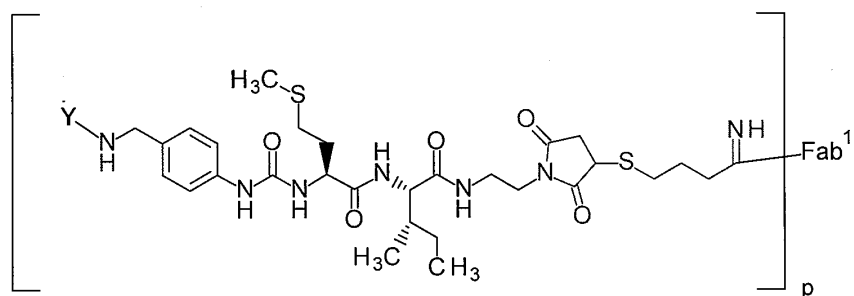


[0033] [化10]

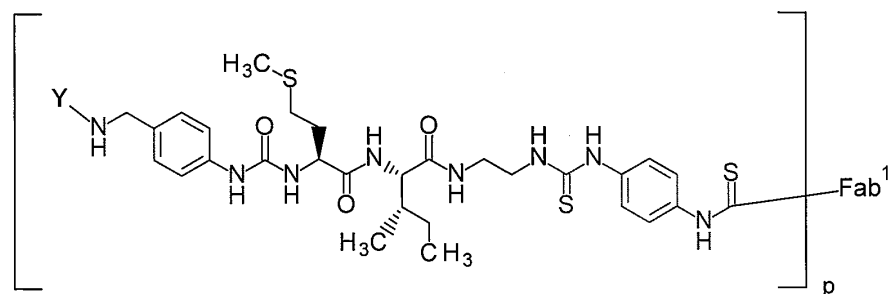


[0034]

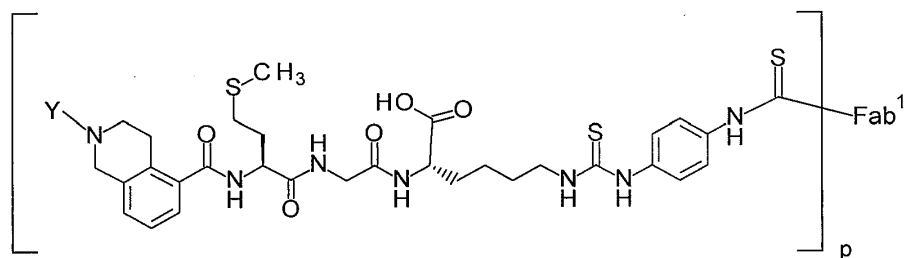
[化11]



[0035] [化12]



[0036] [化13]



。

[0037] [15] Yが、デフェロキサミン（以下、DFOと略記する場合がある）、又は1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸である（以下、DOTAと略記する場合がある）、上記[1]～[14]のいずれかに記載の複合体。

[16] Yが、DFOである、上記[15]に記載の複合体。

[17] Yが、DOTAである、上記[15]に記載の複合体。

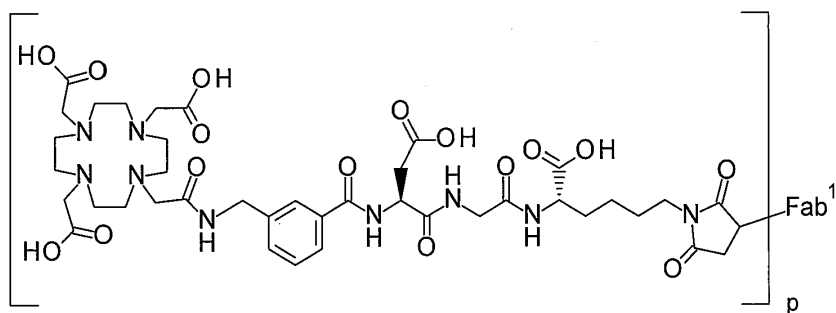
[1 8] Yが、3 a r m D O T A又は4 a r m D O T Aである、上記 [1 7] に記載の複合体。

[19] Yが、3 arm DOTAである、上記[18]に記載の複合体。

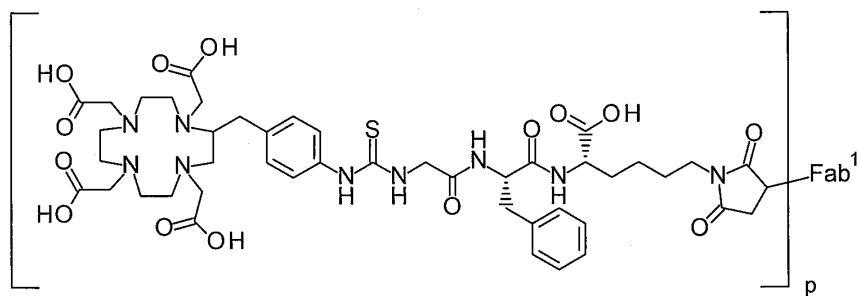
[20] Yが、4 a r m D O T Aである、上記 [18] に記載の複合体。

〔21〕下式に示される化合物からなる群より選択される複合体であって、
 Fab^1 が該 Fab^1 中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している、上記〔15〕又は〔17〕から〔20〕のいずれかに記載の複合体。

[0038] [化14]



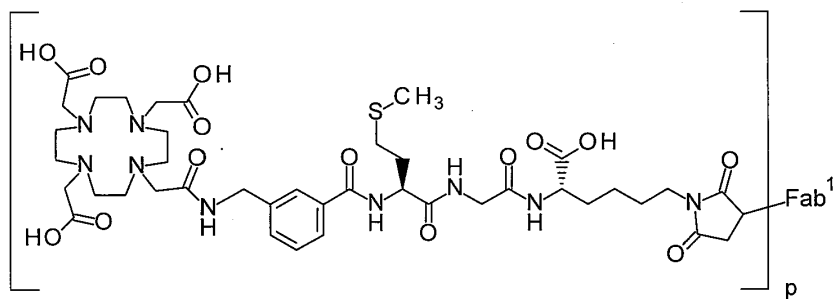
[0039] [化15]



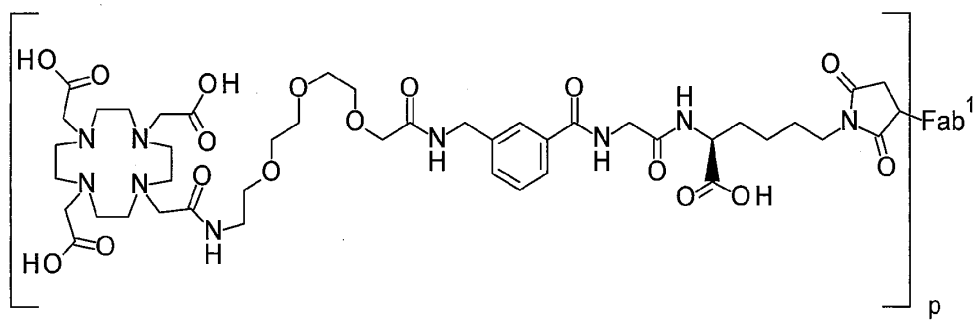
—

[0040]

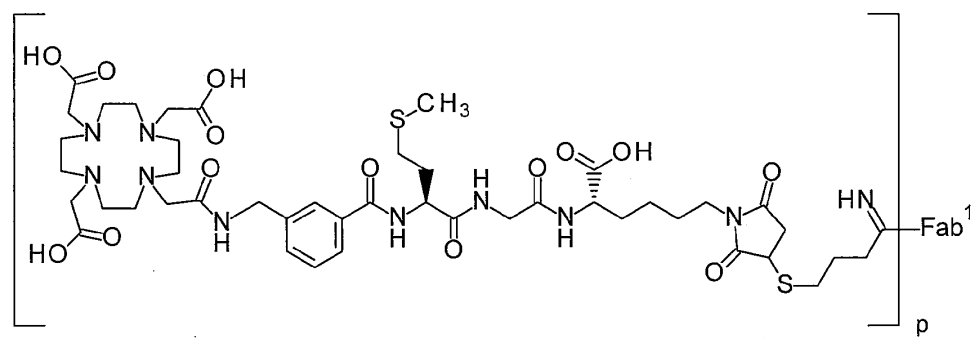
[化16]



[0041] [化17]

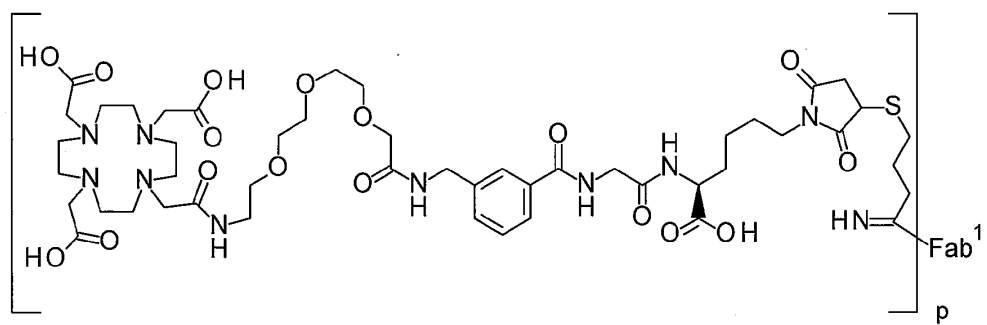


[0042] [化18]

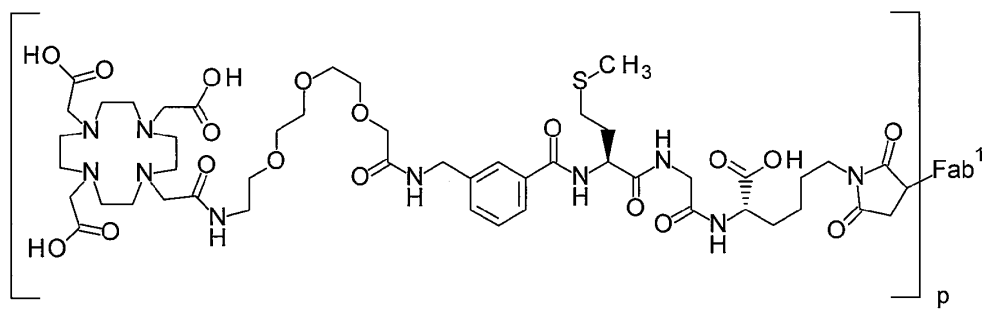


[0043]

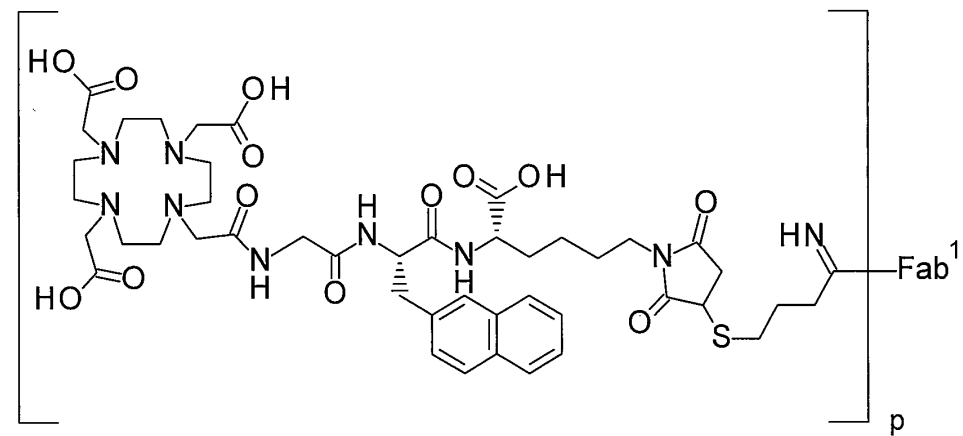
[化19]



[0044] [化20]

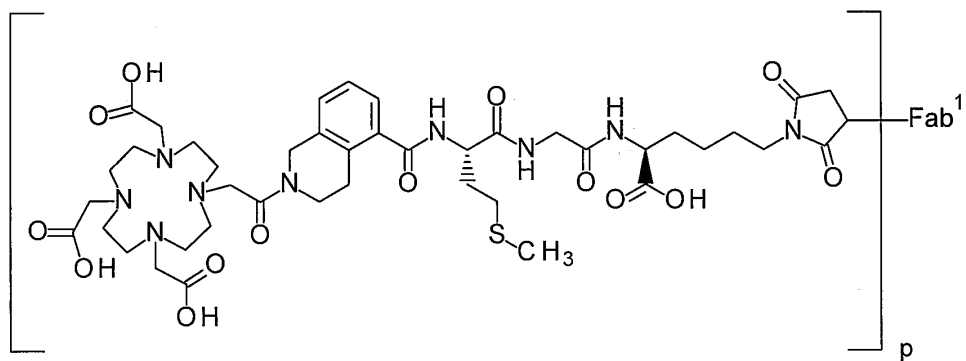


[0045] [化21]

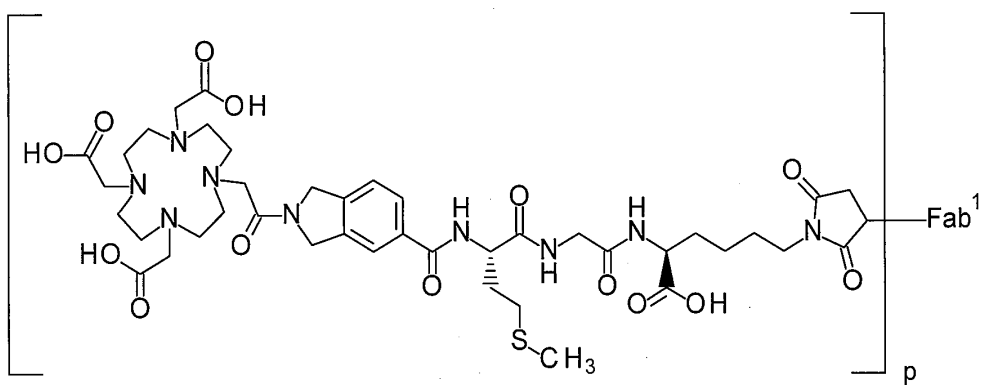


[0046]

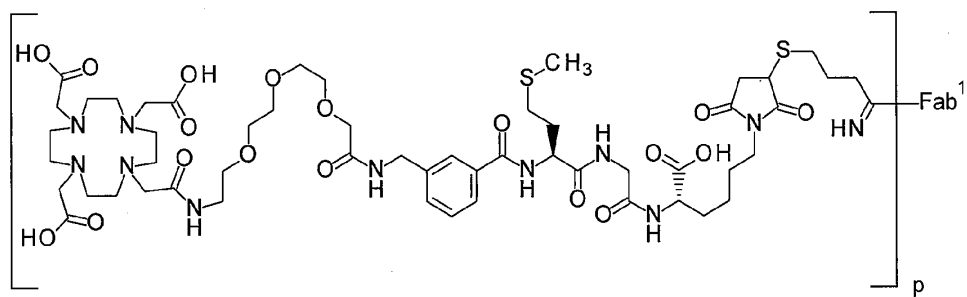
[化22]



[0047] [化23]

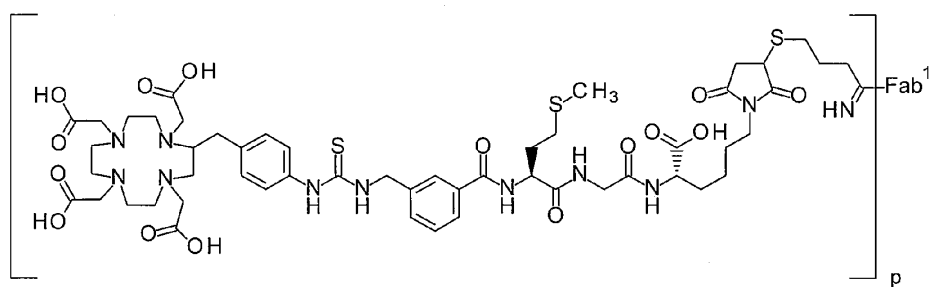


[0048] [化24]

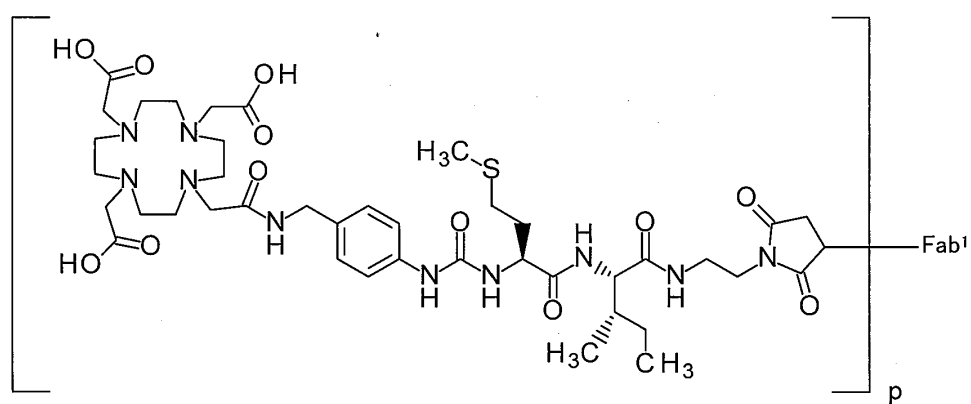


[0049]

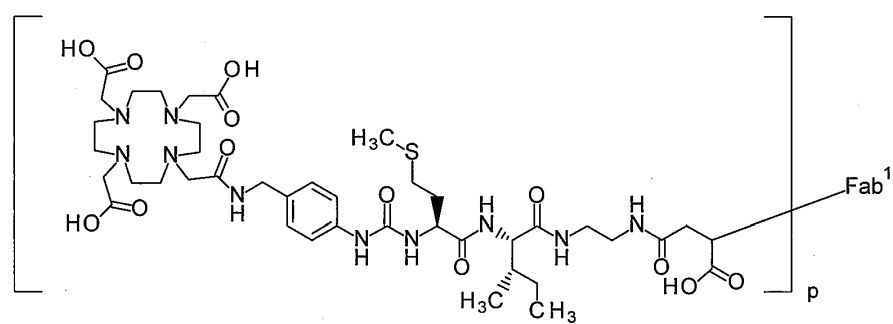
[化25]



[0050] [化26]

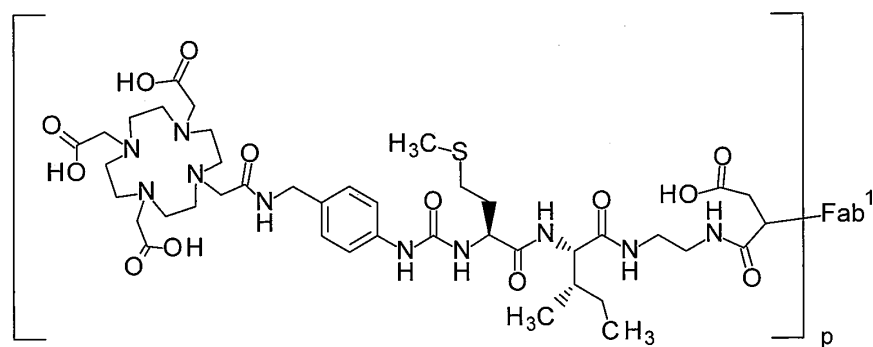


[0051] [化27]

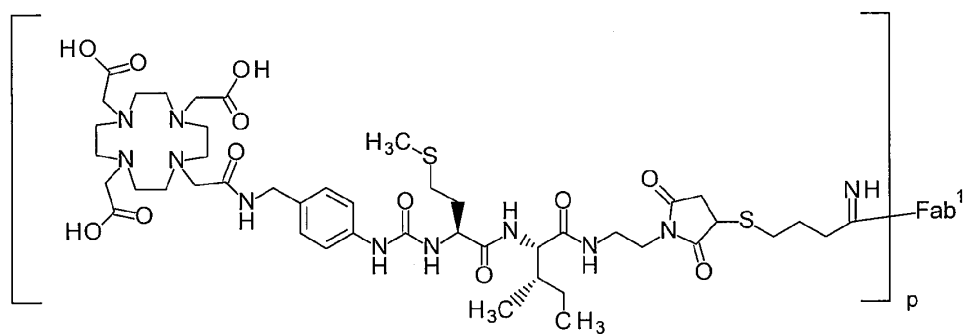


[0052]

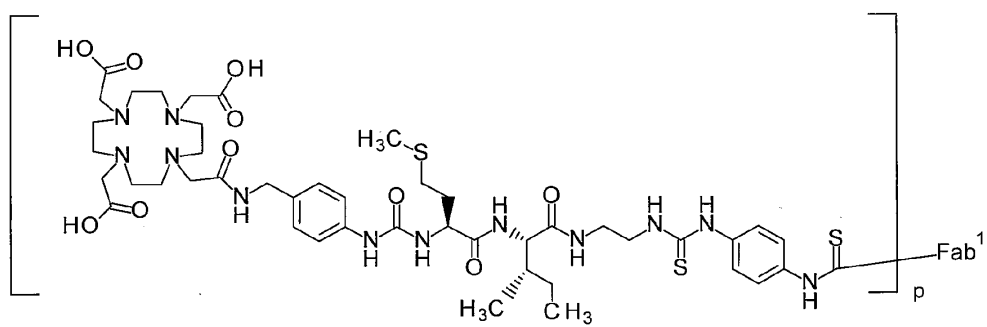
[化28]



[0053] [化29]

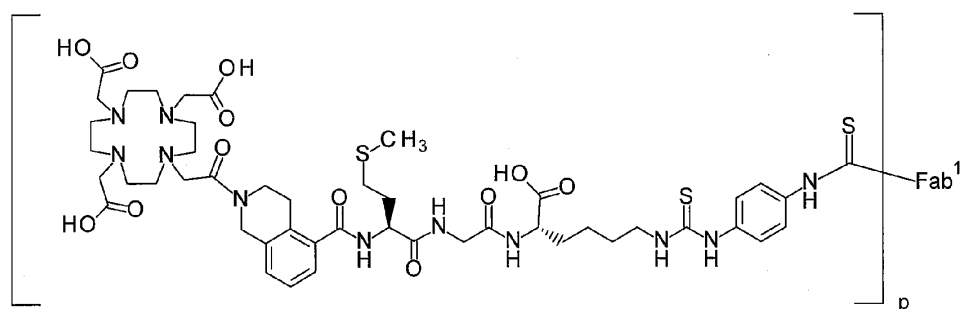


[0054] [化30]



[0055]

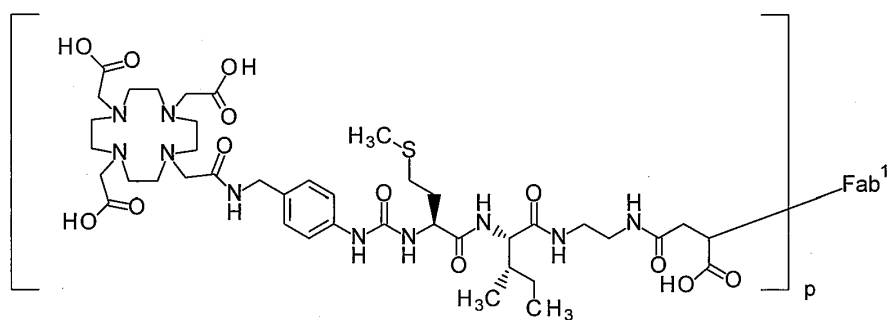
[化31]



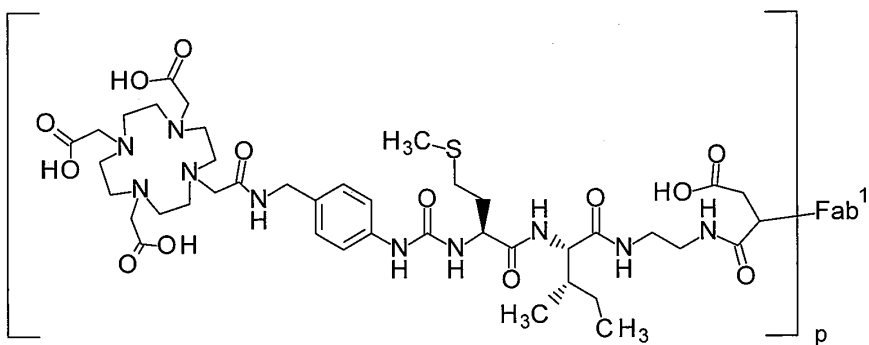
[0056] ○

また、本発明複合体は、下記二つの複合体の混合物でもよい。

[0057] [化27]



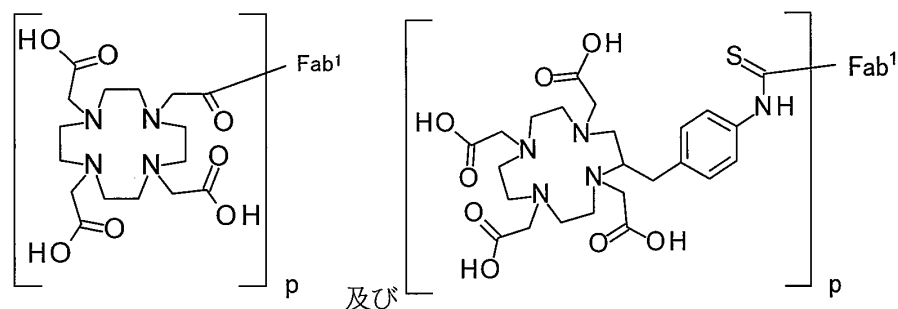
[0058] [化28]



[22] 下式に示される化合物からなる群より選択される複合体であって、
F a b¹が該F a b¹中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接す

る炭素原子に結合している、上記〔１５〕又は〔１７〕から〔２０〕の何れかに記載の複合体。

[0059] [化32]



[0060] [２３] p が１～５の自然数である、上記〔１〕～〔２２〕のいずれかに記載の複合体。

[２４] Y に金属が配位した、上記〔１〕～〔２０〕のいずれかに記載の複合体。

[２５] 金属が配位した、上記〔２１〕～〔２２〕のいずれか１項に記載の複合体

[２６] 金属が金属放射性同位元素である、上記〔２４〕または〔２５〕に記載の複合体。

[２７] 金属が ^{89}Zr である、上記〔２６〕に記載の複合体。

[２８] 金属が常磁性金属イオンである、上記〔２４〕または〔２５〕に記載の複合体。

[２９] 金属が Gd^{3+} である、上記〔２８〕に記載の複合体。

[３０] PETトレーサーである、上記〔２４〕～〔２９〕のいずれかに記載の複合体。

[0061] [３１] 上記〔２４〕～〔３０〕のいずれかに記載の１種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む診断用組成物。

[３２] 早期診断薬、又は病期診断薬として用いられる、上記〔３１〕に記載の診断用組成物。

[33] ヒトCEACAM5を発現する癌の診断に用いられる、上記[31]又は[32]のいずれかに記載の診断用組成物。

[34] 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌又はこれらが転移した癌である、上記

[33]に記載の診断用組成物。

[0062] [35] 上記[24]～[29]のいずれかに記載の1種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

[36] ヒトCEACAM5を発現する癌を治療するための医薬組成物である、上記[35]に記載の医薬組成物。

[37] 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌又はこれらが転移した癌である、上記[36]に記載の医薬組成物。

[38] 癌の診断用組成物、及び／又は癌の治療用医薬組成物の製造のための、上記[24]～[29]のいずれかに記載の1種類以上の使用。

[0063] [39] 癌の診断、及び／又は癌の治療に用いられる、上記[24]～[30]のいずれかに記載の複合体。

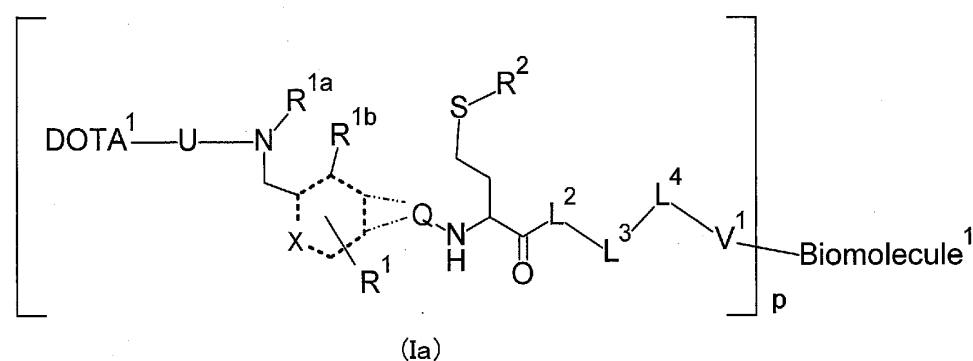
[40] 上記[24]～[30]のいずれかに記載の1種類以上の複合体を対象に投与することを含む、癌の診断方法。

[41] 上記[24]～[30]のいずれかに記載の複合体の治療有効量を対象に投与することを含む、癌の治療方法。

[42]

下式(1a)：

[0064] [化33]



[0065] [式中、

DOTA^1 : 3 a r m D O T A、

U: 結合、又は、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$

Q: $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

X: C、又はN

R^{1a} 、 R^{1b} : 同一又は異なって、H、又は、 C_{1-6} アルキル、

なお、 R^{1a} 及び R^{1b} は、一緒になって C_{1-6} アルキレンを形成することができる

。

pは、1～25の自然数であり、 $\text{B i o m o l e c u l e}^1$ 中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。

R^1 : H、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、

R^2 : C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、

L^2 : I l e、G l y、A l a、V a l、P h e、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{NR}^3$

$\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}$

$\text{CH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、

R^3 : H、 C_{1-6} アルキル、

R^4 : H、 C_{1-6} アルキル、

L^3 : 結合、A r g、又は、H i s、

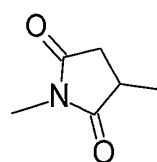
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、

又は、結合、

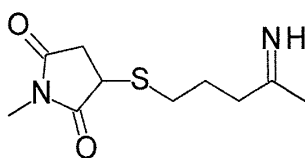
V^1 : 下式(A-1)～(A-5)に示される基、

[0066]

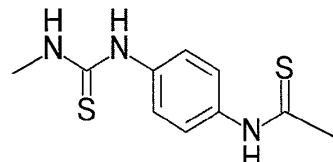
[化34]



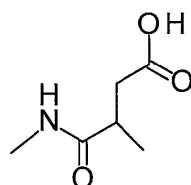
(A-1)



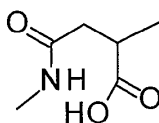
(A-2)



(A-3)



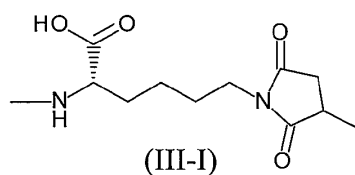
(A-4)



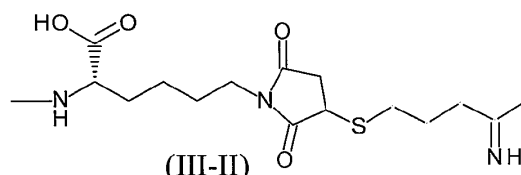
(A-5)

[0067] 又は、基-L³-L⁴-V¹-が一緒になって下式

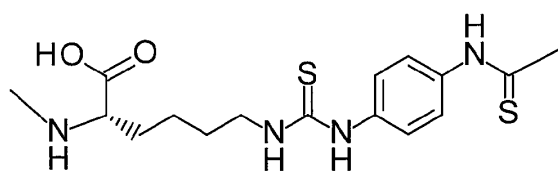
[0068] [化35]



(III-I)



(III-II)



(III-III)

[0069] であり、

Biomolecule¹: 生物分子

[0070] [化36]

点線 — · · — · : 環上の2個の炭素原子のいずれか1個にQは結合する。

点線 ······ : 単結合、又は、二重結合]

[0071] で示される複合体。

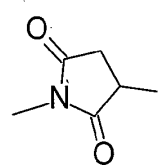
[43] L^3 、 L^4 および V^1 が以下の基である[42]記載の複合体。

L^3 : 結合、Arg、又は、His、

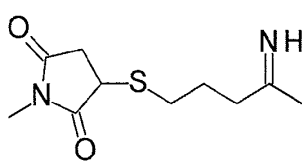
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、
、又は、結合、

V^1 : 下式(A-1)から(A-5)のいずれかに記載の基、

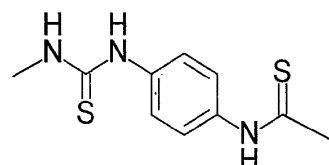
[0072] [化37]



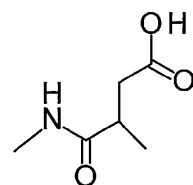
(A-1)



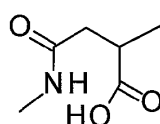
(A-2)



(A-3)



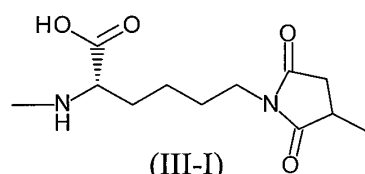
(A-4)



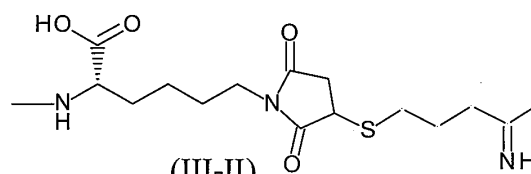
(A-5)

[0073] [44] 基- L^3 - L^4 - V^1 -が一緒になって下式

[0074] [化38]



(III-I)



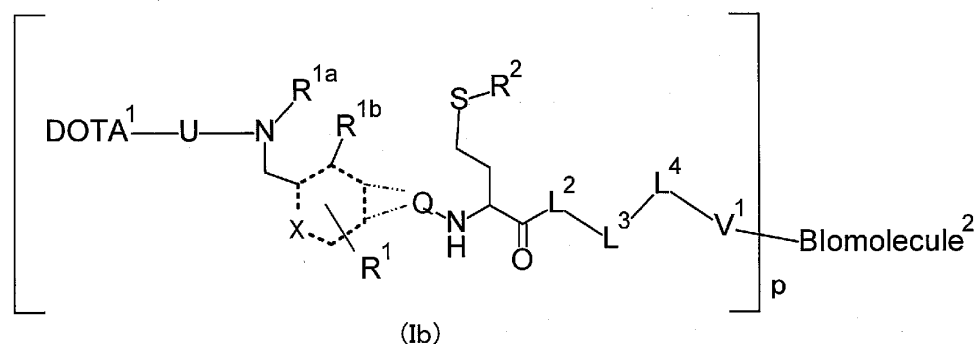
(III-II)

[0075] である[43]記載の複合体。

[45] 下式(Ib):

[0076]

[化39]



[0077] [式中、

DOTA¹: 3 arm DOTA、

U: 結合、又は、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ Q: $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

X: C、又はN

 R^{1a} 、 R^{1b} : 同一又は異なって、H、又は、 C_{1-6} アルキルなお、 R^{1a} 及び R^{1b} は、一緒になって C_{1-6} アルキレンを形成することができる

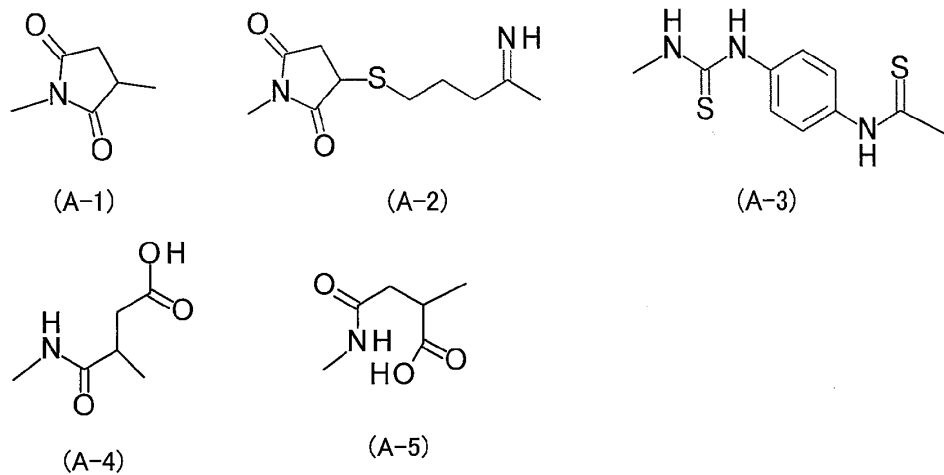
。

 p は、1～25の自然数であり、 Blomolecule^2 中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。 R^1 : H、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 R^2 : C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 L^2 : Ile、Gly、Ala、Val、Phe、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{NR}^3$ $\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}$ $\text{CH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、 R^3 : H、 C_{1-6} アルキル、 R^4 : H、 C_{1-6} アルキル、 L^3 : 結合、Arg、又は、His、 L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、

又は、結合、

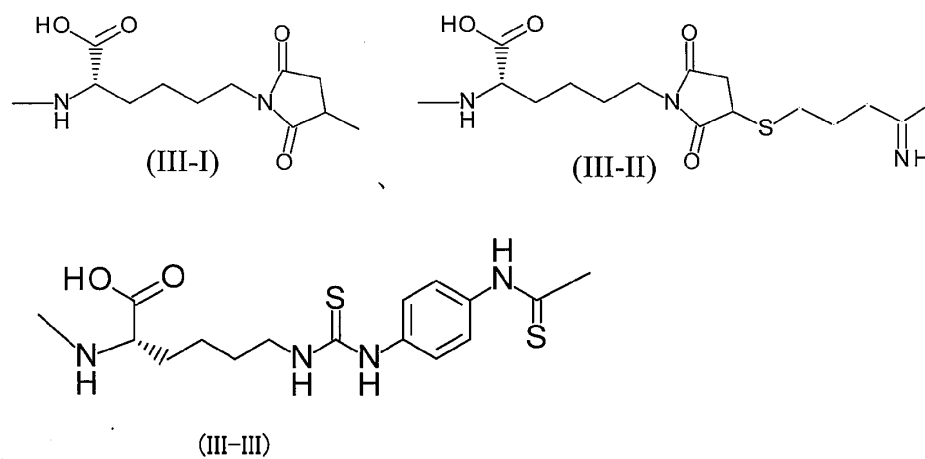
V¹: 下式 (A-1) から (A-5) のいずれかに記載の基、

[0078] [化40]



[0079] 又は、基-L³-L⁴-V¹と一緒に下式

[0080] [化41]



[0081] であり、

Biomolecule²: 抗体Fabフラグメント、

[0082]

[化42]

点線 $\text{---} \cdots \text{---}$: 環上の2個の炭素原子のいずれか1個にQは結合する。

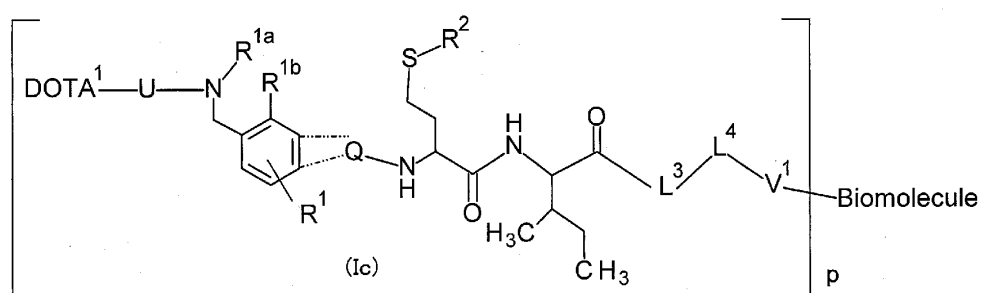
点線 $\cdots$: 単結合、又は、二重結合]

[0083] で示される複合体。

[46-1]

下式 (1c) :

[0084] [化43]



[0085] [式中、

 L^3 : 結合、

L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ または、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、

Biomolecule : Biomolecule¹ 又は Biomolecule² である]

である上記 [42] から [45] のいずれかに記載の複合体。

[46-2]

前記 [46-1] の複合体において、式 (1c) 中、

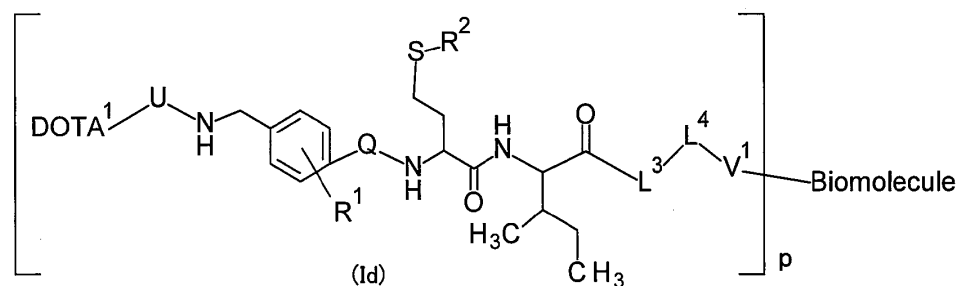
 L^3 が結合であり、

L^4 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ である複合体。

[47-1] 下式 (1d) で示される上記 [42] から [46-2] に記載の複合体。

[0086]

[化44]



[0087] [式中、

 L^3 : 結合、
 L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ または、 $-\text{NHCH}((\text{C}=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、

 Biomolecule : Biomolecule^1 又は Biomolecule^2 である]

である上記[42]から[45]のいずれかに記載の複合体。

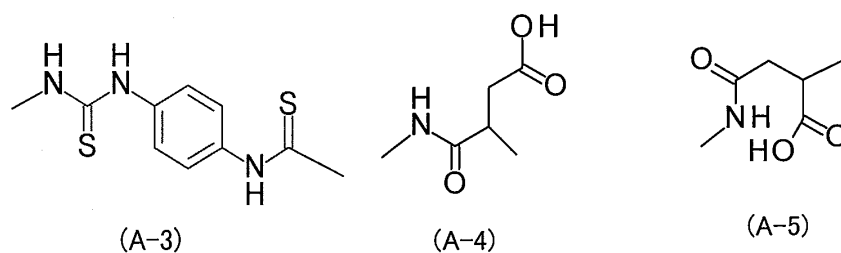
[47-2] 前記[47-1]の複合体において、式(Id)中、

 L^3 が結合であり、 L^4 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ である複合体。

[48]

 V^1 が、下式(A-3)から(A-5)

[0088] [化45]

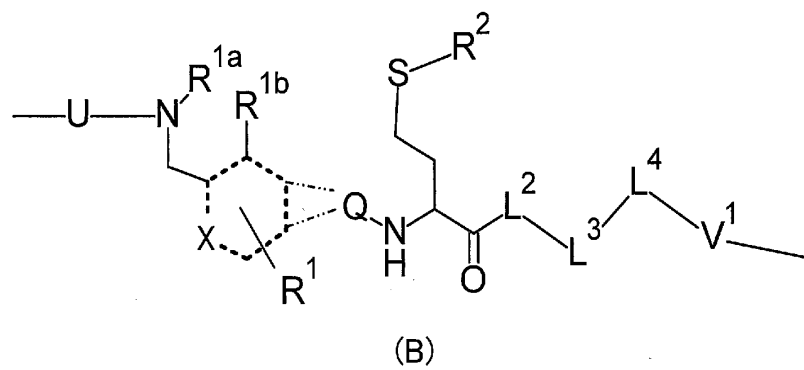


[0089] のいずれかである上記[42]～[47-2]の何れかに記載の複合体。

[49]

式 (I a) 又は (I b) 中の基 (B) が、

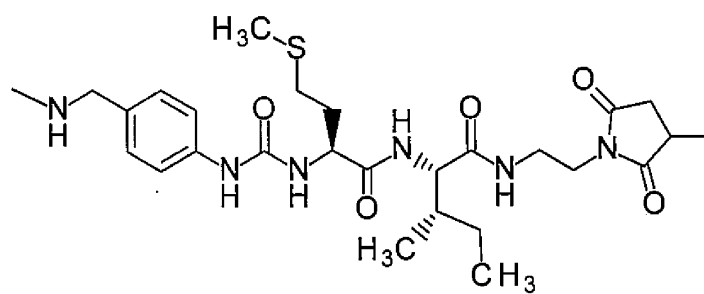
[0090] [化46]



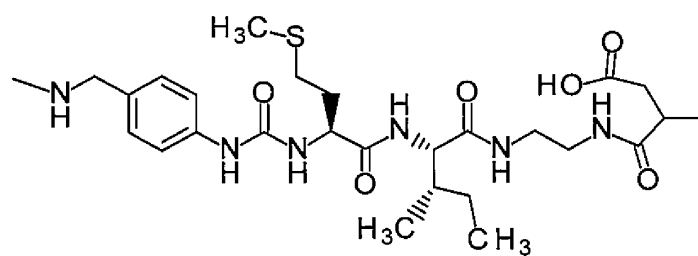
[0091] 下式 (B-1) から (B-7) の群から選択された基である [42] から [48] のいずれかに記載の複合体。

[0092]

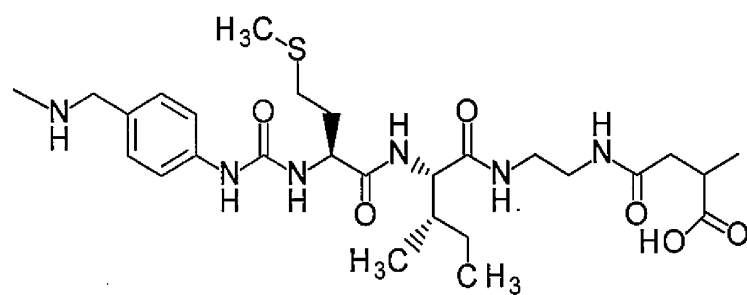
[化47]



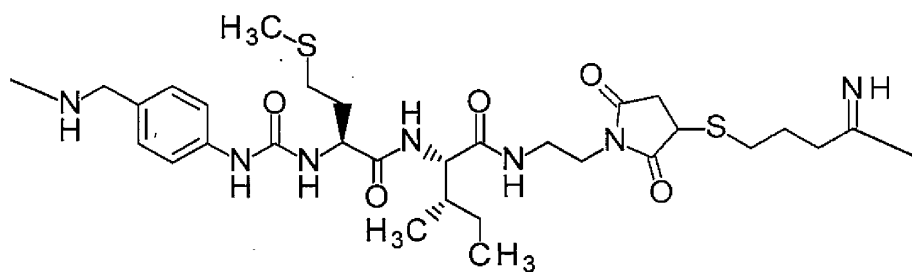
(B-1)



(B-2)

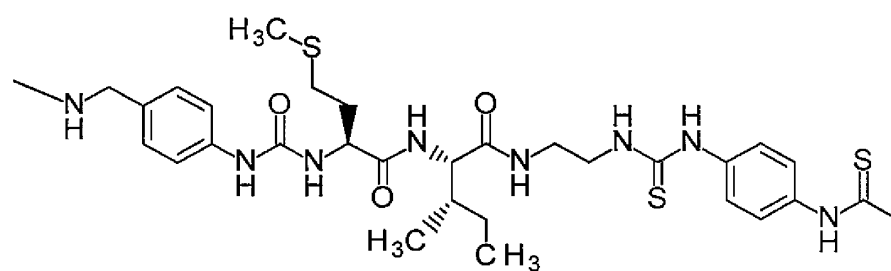


(B-3)

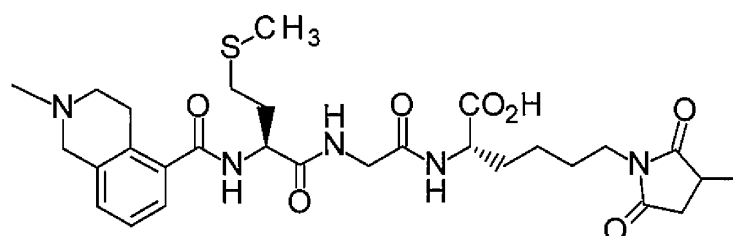


(B-4)

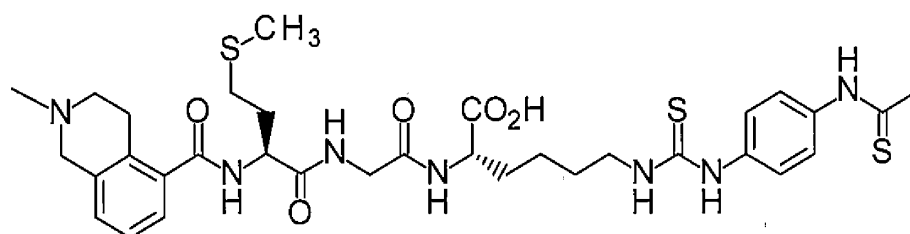
[0093] [化48]



(B-5)



(B-6)

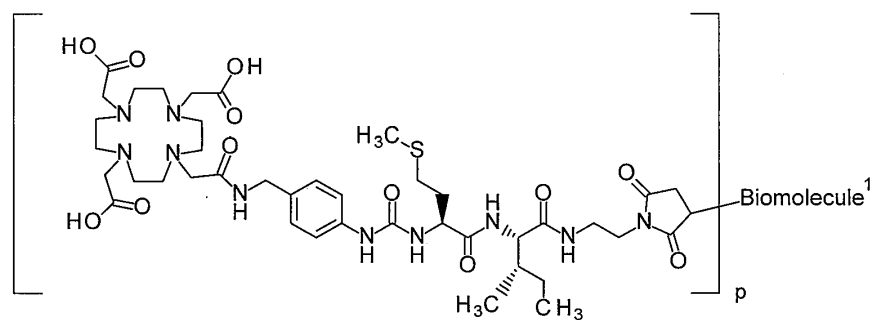


(B-7)

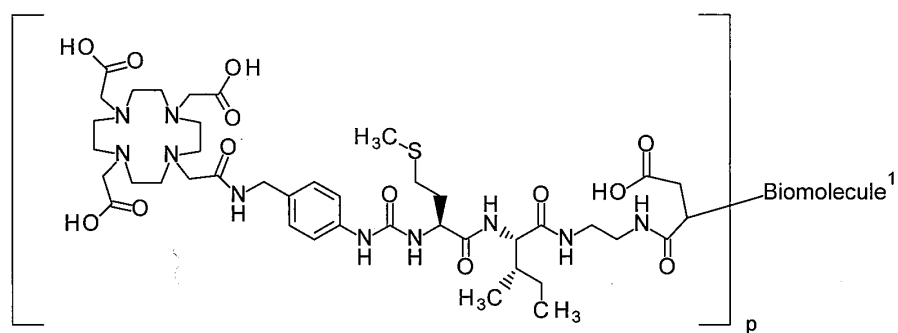
[0094] [50] 下式に示される化合物からなる群より選択される [42] ~ [49] の何れかに記載の複合体。

[0095]

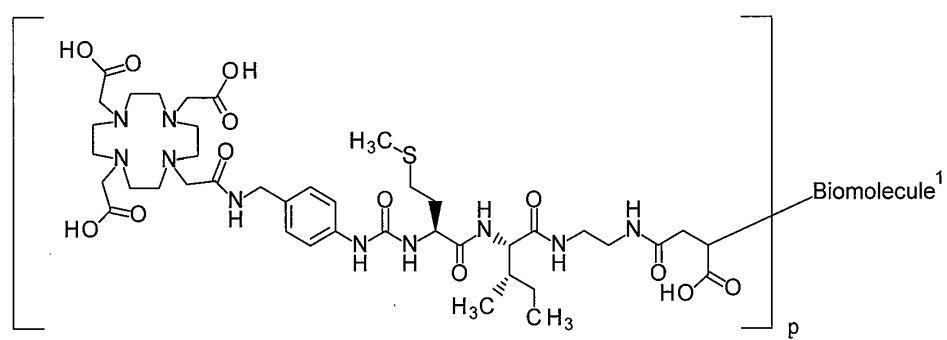
[化49]



[0096] [化50]

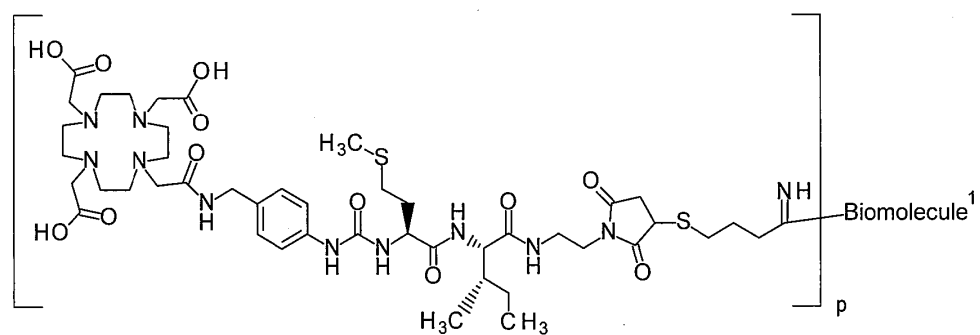


[0097] [化51]

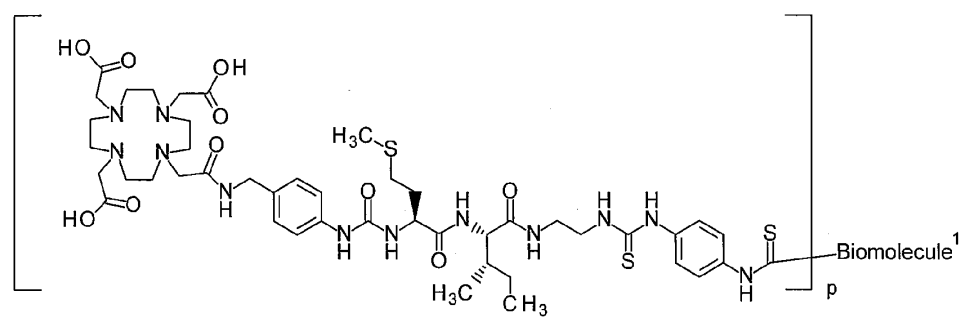


[0098]

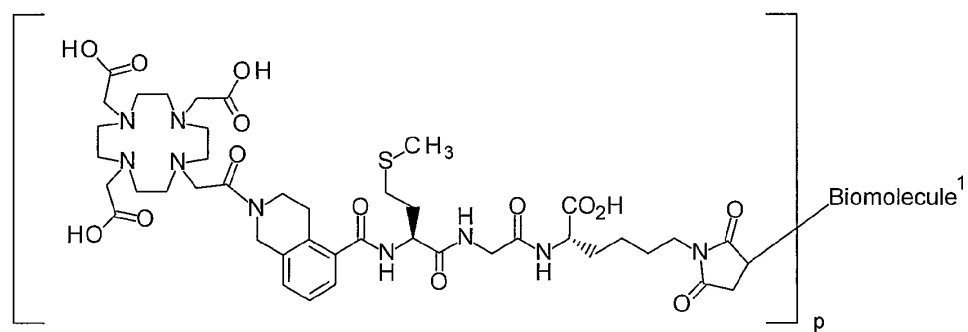
[化52]



[0099] [化53]

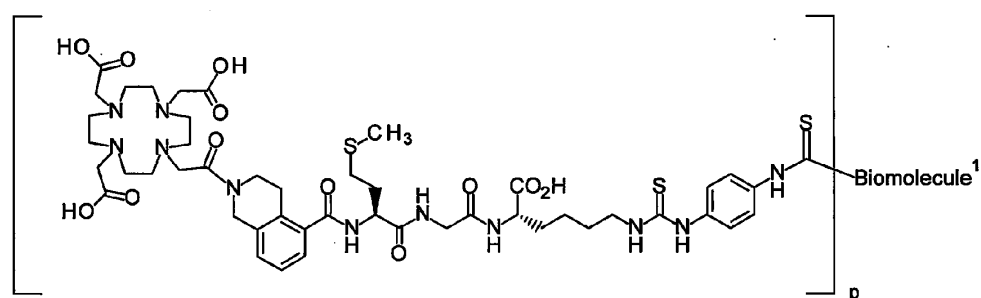


[0100] [化54]



[0101]

[化55]



[51-1]

Biomolecule¹及びBiomolecule²において、以下の抗体Fabフラグメントを除く生物分子又は抗体Fabフラグメントである[42]から[50]の何れかに記載の複合体：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、及び

(b) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、からなる群より選択される、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント。

[51-2]

Biomolecule¹及びBiomolecule²において、以下の抗体Fabフラグメントを除く生物分子又は抗体Fabフラグメントである[51-1]に記載の複合体：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒト

C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメント、

(b) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 1 2 1 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 1 1 2 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメント、

(c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメント、又は、

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 4 に示される軽鎖を含む軽鎖を含む、抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメント。

[0102] [52] B i o m o l e c u l e ¹または B i o m o l e c u l e ²が、以下の

(a) 及び (b) の群から選択される抗ヒト M U C 1 抗体 F a b フラグメントである [42] から [51-2] のいずれかに記載の複合体：

(a) 配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒト M U C 1 抗体 F a b フラグメント、

及び

(b) 配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒト M U C 1 抗体 F a b フラグメントからなる群より選択される、抗ヒト M U C 1 抗体 F a b フラグメント。

[53] B i o m o l e c u l e ¹または B i o m o l e c u l e ²が、以下 (

a) 及び (b) からの群から選択される抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントである [5 2] に記載の複合体:

(a) 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメント; 及び

(b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメント。

[0103] [5 4] B i o m o l e c u l e¹またはB i o m o l e c u l e²が、以下の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントである [5 3] に記載の複合体:

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメント。

[5 5] p が1~4の自然数である、上記 [4 2] ~ [5 4] のいずれかに記載の複合体。

[5 6] D O T A¹に金属が配位した、上記 [4 2] ~ [5 5] のいずれかに記載の複合体。

[5 7] 金属が金属放射性同位元素である、上記 [5 6] に記載の複合体。

[5 8] 金属が⁸⁹Z rである、上記 [5 7] に記載の複合体。

[5 9] 金属が常磁性金属イオンである、上記 [5 6] に記載の複合体。

[6 0] 金属がG d³⁺である、上記 [5 9] に記載の複合体。

[6 1] P E Tトレーサーである、上記 [5 6] ~ [6 0] のいずれかに記載の複合体。

[6 2] 上記 [5 6] ~ [6 1] のいずれかに記載の1種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む診断用組成物。

[6 3] 早期診断薬、又は病期診断薬として用いられる、上記 [6 2] に記

載の診断用組成物。

[64] *Biomolecule*¹又は*Biomolecule*²に関連した疾患の診断に用いられる、上記[62]又は[63]のいずれかに記載の診断用組成物。

[65] *Biomolecule*¹又は*Biomolecule*²に関連した疾患がMUC1に関連した疾患である、上記[64]に記載の診断用組成物。

[66] MUC1を発現する癌の診断に用いられる、上記[65]に記載の診断用組成物。

[67] 癌が、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌である、上記[66]に記載の診断用組成物。

[0104] [68] 上記[56]～[60]のいずれかに記載の1種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

[69] *Biomolecule*¹又は*Biomolecule*²に関連した疾患の診断に用いられる、上記[68]に記載の医薬組成物。

[70] *Biomolecule*¹又は*Biomolecule*²に関連した疾患がMUC1に関連した疾患である、上記[69]に記載の医薬組成物。

[71] MUC1を発現する癌を治療するための医薬組成物である、上記[70]に記載の医薬組成物。

[72] 癌が、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌である、上記[71]に記載の医薬組成物。

[73] 癌の診断用組成物、及び／又は癌の治療用医薬組成物の製造のための、上記[56]～[60]のいずれかに記載の1種類以上の使用。

[74] 癌の診断、及び／又は癌の治療に用いられる、上記[56]～[60]のいずれかに記載の複合体。

[75] 上記[56]～[60]のいずれかに記載の1種類以上の複合体を対象に投与することを含む、癌の診断方法。

[76] 上記[56]～[60]のいずれかに記載の複合体の治療有効量を対象に投与することを含む、癌の治療方法。

発明の効果

[0105] 本発明に記載された抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、ペプチドリンカー及び配位子を含む複合体、並びに、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントと特定の配位子を含む複合体は、ヒトCEACAM5に対する優れた結合活性を有する。そのため、更に金属を含む本発明の複合体は、癌の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。また、本発明に記載されたヒトMUC1抗体Fabフラグメント、ペプチドリンカー及び配位子を含む複合体は、ヒトMUC1に対する優れた結合活性を有する。本発明に記載された3arm DOTA、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生体分子からなる複合体が腎臓からより速やかに排泄する。そのため、更に金属を含む本発明の複合体は、癌の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。

図面の簡単な説明

[0106] [図1]⁶⁴Cuータンパク複合体溶液(A)を含むPBS溶液を投与して約3時間後に得られたPET/CT画像を示す。

[図2]⁶⁴Cuータンパク複合体溶液(B)を含むPBS溶液を投与して約3時間後に得られたPET/CT画像を示す。

[図3]図3はSUVを示す。

発明を実施するための形態

[0107] 以下に、本発明について詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書で特段に定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。

「アルキル」とは、いずれも直鎖又は分枝状の飽和炭化水素鎖を意味し、一価基を意味する。

「C₁₋₆アルキル」とは、炭素数が1～6のアルキル、例えばメチル、エチル

、*n*－プロピル、イソプロピル、*n*－ブチル、イソブチル、*sec*－ブチル、*tert*－ブチル、*n*－ペンチル、*n*－ヘキシル等である。ある態様としては C_{1-4} アルキルであり、ある態様としてはメチル又はエチルであり、ある態様としてはメチルである。

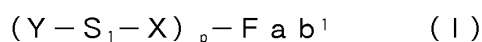
「 C_{1-6} アルキレン」とは、上記 C_{1-6} アルキルの水素を除いた2価基である。ある態様としてはメチレン、エチレン、プロピレン又はメチルメチレン等である。

「ハロゲン」は、F、Cl、Br、Iを意味する。

「ハロ C_{1-6} アルキル」とは、1個以上のハロゲンで置換された C_{1-6} アルキルである。ある態様としては1～5個のハロゲンで置換された C_{1-6} アルキルであり、ある態様としては CF_3 である。

[0108] 1－1. 本発明の複合体

本発明の複合体は、下式(1)：



[式中、

Fab^1 は、抗ヒトCEACAM5抗体 Fab フラグメントであり、該 Fab^1 は該 Fab^1 中にある

個のアミノ基又はチオール基を介してXに結合しており、

Xは、ペプチドリンカー又は結合であり、

S_1 は、スペーサー又は結合であり、

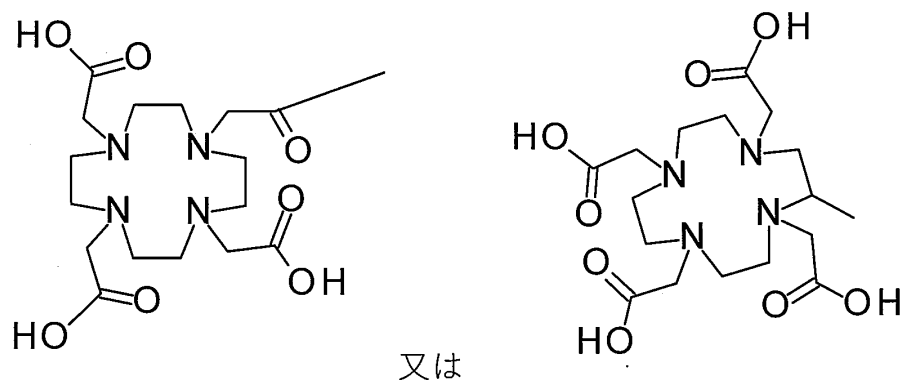
Yは、配位子であり、並びに、

pは、1～25の自然数であり、 Fab^1 に結合している $(Y-S_1-X)$ の数を示し、

但し、Xが結合であるときは、 S_1 が $-CH_2-$ (1, 4-フェニレン) $-NH-C(=S)-$ 又は結合であり、且つ、Yは下式

[0109]

[化56]



[0110] に示される基である。]

で示される複合体である。

抗ヒトCEACAM5抗体F a bフラグメント (F a b¹)

前記式 (1) において「F a b¹」で示される抗ヒトCEACAM5抗体F a bフラグメントについて説明する。

抗体分子の基本構造は、各クラス共通で、分子量5万～7万の重鎖と2～3万の軽鎖から構成される。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、I g G、I g M、I g A、I g D、I g Eに対応して γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 鎖とよばれる。さらにI g Gには、I g G1、I g G2、I g G3、I g G4が存在し、それぞれ γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4と呼ばれている。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、L型とK型の2種が知られており、それぞれ λ 、 κ 鎖とよばれる。抗体分子の基本構造のペプチド構成は、それぞれ相同な2本の重鎖及び2本の軽鎖が、ジスルフィド結合 (S-S結合) 及び非共有結合によって結合され、分子量15万～19万である。2種の軽鎖は、どの重鎖とも対をなすことができる。個々の抗体分子は、常に同一の軽鎖2本と同一の重鎖2本からできている。

鎖内S-S結合は、重鎖に四つ (μ 、 ϵ 鎖には五つ)、軽鎖には二つあって、アミノ酸100～110残基ごとに一つのループを成し、この立体構造

は各ループ間で類似していて、構造単位あるいはドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにN末端に位置するドメインは、同種動物の同一クラス（サブクラス）からの標品であっても、そのアミノ酸配列が一定せず、可変領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、重鎖可変領域（ V_H ）及び軽鎖可変領域（ V_L ）とよばれている。これよりC末端側のアミノ酸配列は、各クラスあるいはサブクラスごとにほぼ一定で定常領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 あるいは C_L と表される。

[0111] 抗体と抗原との結合の特異性は、 V_H 及び V_L によって構成される部分のアミノ酸配列によっている。一方、補体や各種細胞との結合といった生物学的活性は各クラスIgの定常領域の構造の差を反映している。重鎖と軽鎖の可変領域の可変性は、どちらの鎖にも存在する3つの小さな超可変領域にほぼ限られることがわかっており、これらの領域を相補性決定領域（CDR；それぞれN末端側からCDR1、CDR2、CDR3）とよんでいる。可変領域の残りの部分はフレームワーク領域（FR）とよばれ、比較的一定である。

[0112] 抗体の重鎖定常領域の C_H1 ドメインと C_H2 ドメインとの間にある領域はヒンジ領域とよばれ、この領域は、プロリン残基を多く含み、2本の重鎖をつなぐ複数の鎖間S-S結合を含む。例えば、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4の各ヒンジ領域には、重鎖間のS-S結合を構成している、それぞれ、2個、4個、11個、2個のシステイン残基を含む。ヒンジ領域は、パパインやペプシン等のタンパク質分解酵素に対する感受性が高い領域である。抗体をパパインで消化した場合、ヒンジ領域の重鎖間S-S結合よりもN末端側の位置で重鎖が切断され、2個のFabフラグメントと1個のFcフラグメントに分解される。Fabフラグメントは、軽鎖と、重鎖可変領域（ V_H ）、 C_H1 ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される。Fabフラグメントは可変領域を含み、抗原結合活性を有する。

1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、以下の特徴を有するFabフラグメントであ

る：

配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント。

[0113] 本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖定常領域としては、Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3又はIg γ 4等のいずれの定常領域も選択可能である。1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖定常領域は、ヒトIg γ 1定常領域である。

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖定常領域としては、Ig λ 又はIg κ のいずれの定常領域も選択可能である。1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖定常領域は、ヒトIg κ 定常領域である。

1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、以下のFab²フラグメントである：

配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント（Fab²という）。

Fabフラグメントを含め、抗体を細胞で発現させる場合、抗体が翻訳後に修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾の例としては、重鎖C末端のリシンのカルボキシペプチダーゼによる切断、重鎖及び軽鎖N末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾、グリコシル化、酸化、脱アミド化、糖化等が挙げられ、種々の抗体において、このような翻訳後修飾が生じることが知られている（J. Pharm. Sci. ; 2008 ; 97 : 2426 - 2447）。

本発明の複合体に含まれる抗CEACAM5抗体Fabフラグメントには

、翻訳後修飾により生じたF a bフラグメントも含まれ得る。翻訳後修飾により生じ得る本発明の抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントの例としては、重鎖N末端のピログルタミル化した抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントが挙げられる。このようなN末端のピログルタミル化による翻訳後修飾は、抗体の活性に影響を及ぼすものではないことは当該分野で知られている（A n a l . B i o c h e m . ; 2 0 0 6 ; 3 4 8 : 2 4 - 3 9 ）。

[0114] 1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントである：

配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメント。

ある実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントである：

配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメント。

別の実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗C E A C A M 5抗体F a bフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメントである：

配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号2のアミノ酸番号99から110までのアミノ酸配

列からなるCDR3を含む重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、並びに、配列番号4のアミノ酸番号24から38までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号54から60までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4のアミノ酸番号93から101までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント。

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、ヒトCEACAM5に結合する。得られた抗ヒトCEACAM5抗体FabフラグメントのヒトCEACAM5に対する結合活性を測定する方法としては、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) 法による解析やELISA等の方法がある。例えば、SPR法による解析を用いる場合、Biacore T200 (GEヘルスケア・ジャパン社) を用いて、センサーチップにBiotin Capture Kit (GEヘルスケア・ジャパン社) とビオチン化したヒトCEACAM5を固相化し、段階希釈したFabフラグメントを添加することで結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、及び解離定数 (K_D) を測定できる。

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、本明細書に開示される、本発明の抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメント及び軽鎖の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、後述の<本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産方法>に記載の方法に従い生産することができる。

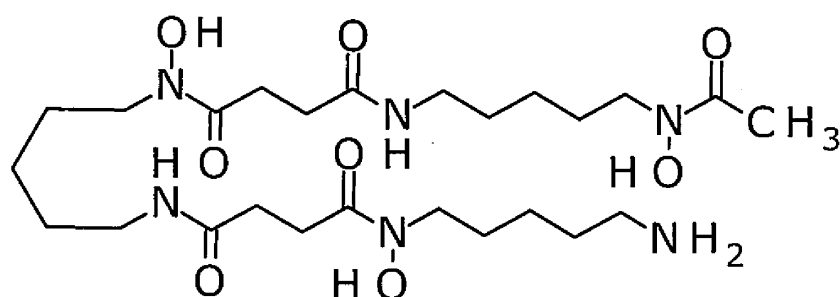
[0115] 1-2. 配位子について

「配位子」とは、複合体において、金属とキレート錯体を形成しうる部分であり、キレート剤から構成される基を意味する。構成される基とは、キレート剤からプロトンが除かれて、結合手を有する基である。当該キレート剤

から構成される基は、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントと直接、或いは、スパーサー及び／又はペプチドリンカーを介して結合するものである。

「キレート剤」とは、金属と配位結合できる化合物をいう。本明細書における「キレート剤」としては、シデロホアと、非シデロホアが挙げられる。シデロホアとしては、ヒドロキサム酸型、カテコール型、又は、混合配位子型が挙げられる。ヒドロキサム酸型シデロホアとしては、例えば、フェリクローム、下式：

[0116] [化57]

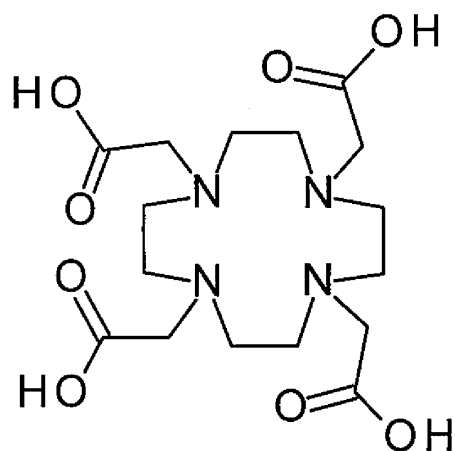


[0117] で表されるデフェロキサミン（DFO）、フサリニンC、オルニバクチン、ロドトルル酸が挙げられる。カテコール型シデロホアとしては、例えば、エンテロバクチン、バチリバクチン、ビブリオバクチンが挙げられる。混合配位子型シデロホアとしては、例えば、アゾトバクチン、ピヨベルジン、エルシニアバクチンが挙げられる。なお、上記シデロホアの場合、DFOはその反応性官能基である $-NH_2$ を介してスパーサー又はペプチドリンカーと反応させることができ、DFO以外のシデロホアの場合には、カルボキシル基、水酸基、アミノ基等の反応性官能基を介して、当業者が通常用いる方法でスパーサー又はペプチドリンカーと反応させることもできる。

非シデロホアとしては、例えば、下式：

[0118]

[化58]



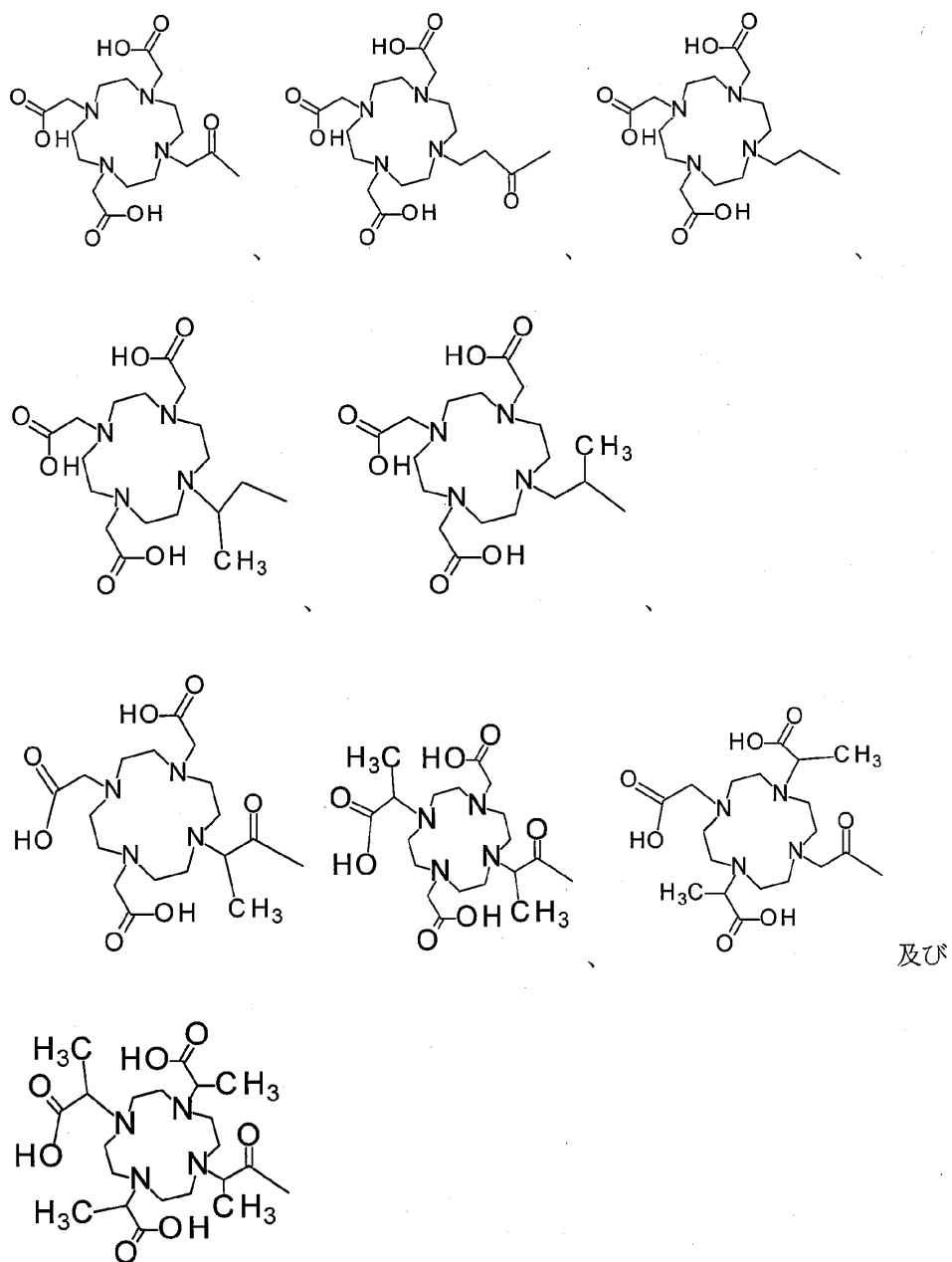
[0119] で表されるDOTA（1，4，7，10－テトラアザシクロドデカン－1，4，7，10－テトラ酢酸、CAS番号：60239-18-1）、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸、CAS番号：67-43-6）、DTPA-BMA（1，7－ビス（メチルカルバモイルメチル）－1，4，7－トリアザヘプタン－1，4，7－三酢酸、CAS番号：119895-95-3）、EOB-DTPA（N－〔（2S）－2－〔ビス（カルボキシメチル）アミノ〕－3－（4－エトキシフェニル）プロピル〕－N－〔2－〔ビス（カルボキシメチル）アミノ〕エチル〕グリシン、CAS番号：158599-72-5）、TTHA（トリエチレンテトラミン六酢酸、CAS番号：869-52-3）、DO3A（1，4，7，10－テトラアザシクロドデカン－1，4，7－三酢酸、CAS番号：217973-03-0）、HP-DO3A（10－（2－ヒドロキシプロピル）－1，4，7，10－テトラアザシクロドデカン－1，4，7－三酢酸、CAS番号：120041-08-9）、及びこれらの公知の反応性誘導体が挙げられる。

DOTAはその反応性官能基であるカルボン酸の1つを介してスペーサー又はペプチドリンカーと反応させることができ（以下、このように結合した3つのカルボン酸を有するDOTAを3arm DOTAと記載する場合がある（PLoS One, 2019 Mar 22; 14 (3) : e02

13397)。)。

DOTAのうち、3 arm DOTAとして、例えば以下のものが挙げられる。

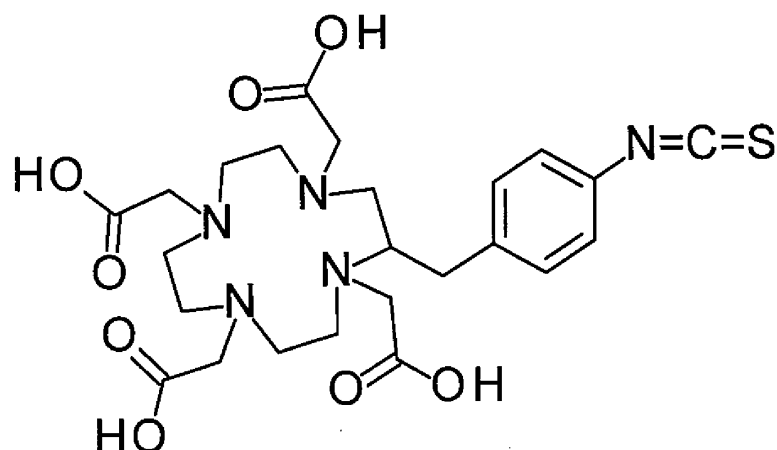
[0120] [化59]



[0121] あるいは下式の試薬 p-SCN-Bn-DOTAを用いて4つのカルボン酸

を維持したDOTA（以下、4arm-DOTAと記載する場合がある）として、スペーサー又はペプチドリンカーと反応させることもできる。

[0122] [化60]



[0123] 本発明の複合体に含まれる配位子を形成する「キレート剤」のある態様としては、DFO、DOTA、DTPA、DTPA-BMA、EOB-DTPA、DO3A、HP-DO3A、が挙げられる。ある態様としては、DFO、DOTAが挙げられる。

なお、本明細書中の化合物及び複合体は、特に記載がない限りフリー体及びその塩も包含する。ここに「その塩」とは、その化合物及び複合体の置換基の種類によって、酸付加塩又は塩基との塩を形成する場合があります、その化合物及び複合体が形成しうる塩である。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リシン、オルニチン等の有機塩基との塩、アセチルロイシン等の各種アミノ酸及びアミノ酸誘

導体との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。例えば、DFOは、デフェロキサミンメタンスルホン酸塩としても存在し、他の塩としても存在する。DTPAは、フリー体とともにDTPAナトリウム塩としても存在する。

[0124] 金属を含む本発明の複合体は、各種造影剤及び／又は癌の治療剤に用いることができ、例えば、MRI造影剤、PETトレーサーに使用される薬剤等に用いられる。

MRI造影剤に用いる場合の「キレート剤」のある態様としては、上記のシデロホア及び非シデロホアキレート剤である。

PETトレーサーに用いる場合の「キレート剤」のある態様としては、上記のシデロホア及び非シデロホアキレート剤であり、ある態様としては、DFO又はDOTAである。

本発明の複合体において、キレート剤は金属を含んでいてもよい。本明細書において、「金属」は、常磁性金属イオン又は金属放射性同位元素を意味する。金属としては、各キレート剤に配位結合する金属であれば特に制限はない。複合体の使用目的に応じて、適切なキレート剤と金属の組合せが選択される。

[0125] 常磁性金属イオンはMRI造影剤に好適に用いられる。常磁性金属イオンの態様としては、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Rh^{2+} 、 Co^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Pm^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Y^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 、 La^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Mn^{3+} 、又は Mn^{2+} が挙げられるが、これらに限定されない。ある態様としては、 Gd^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、又は Fe^{3+} が挙げられる。ある態様としては、 Gd^{3+} が挙げられる。ある態様としては、 Mn^{3+} 又は Mn^{2+} が挙げられる。この場合、複合体にはカウンターアニオンとしてハロゲン等を用いることができる。また、カウンターアニオンは配位子の $\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ であってもよく、さらに複合体は、 Na^+ などのカウンターカチオンを有していてもよい。

金属放射性同位元素はPETトレーサー等に用いられる。金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{89}Zr 、 ^{52}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 72

As、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 又は ^{177}Lu が挙げられるが、これらに限定されない。PETトレーサーやSPECTトレーサー等に用いられる金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、又は ^{111}In が挙げられる。ある態様としては、ジルコニウム（Zr）の放射同位体が挙げられる。ある態様としては ^{89}Zr が挙げられる。癌の治療に用いられる金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{90}Y 又は ^{177}Lu が挙げられる。

本発明の複合体のある態様としては、Yが、 ^{89}Zr が配位結合しているDFOである複合体である。別の態様としては、Yが、 ^{90}Y 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 及び ^{177}Lu からなる金属放射性同位元素が配位結合しているDOTAである複合体である。また別の態様としては、Yが、 Gd^{3+} 及び Y^{3+} からなる常磁性金属イオンが配位結合しているDOTAである複合体である。また別の態様としては、Yが、 Gd^{3+} が配位結合しているDOTAである複合体である。

[0126] 1-3. ペプチドリンカー又は結合

本発明の複合体は、配位子（Y）又はスペーサー（ S_1 ）とFab'とが、直接結合（即ち、Xが結合）していてもよく、あるいはペプチドリンカー（即ち、Xがペプチドリンカー）を介して結合していてもよい。

本明細書において「ペプチドリンカー」とは、2～4個のアミノ酸からなるペプチドを含むリンカーであって、所望により抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントとの結合に適するアタッチメント Z_1 から Z_3 等を有していてもよい。ここに、ペプチドリンカーに包含されるペプチドとしては、特に限定されないが、好ましくはグリシン（Gly）、リシン（Lys）、メチオニン（Met）、イソロイシン（Ile）、フェニルアラニン（Phe）、バリン（Val）、チロシン（Tyr）、アルギニン（Arg）、アラニン（Ala）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、ヒスチジン（His）及びロイシン（Leu）、3-（2-ナフチル）アラニン、及び、ジフェニルアラニンからなる群よりそれぞれ選択される、2～4個のアミノ酸からなるペプチド、より好ましくはグリシン、リシン、メチオニン、イソロイシン、フェ

ニルアラニン、バリン、チロシン、アスパラギン酸、アルギニン、3-(2-ナフチル)アラニン、及び、ジフェニルアラニンからなる群よりそれぞれ選択される2~4個のアミノ酸からなるペプチドである。なお、特に断りのない限りグリシン以外のアミノ酸残基の立体はL-体とする。

[0127] ペプチドリンカーのある態様としては、腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有する2~4個のアミノ酸からなるペプチドを含み、更に当該ペプチドリンカーと生物分子や抗体Fabフラグメントとの間を介するアタッチメントを有していてもよいペプチドリンカーである。腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカーは、腎臓に存在するこれらの酵素により特異的に切断されるため、標識部の腎臓への集積が低減され、腎臓の被ばくや腎障害のおそれの低減が期待できることが報告されている。例えば、Adv Drug Deliv Rev. 2008 Sep; 60(12): 1319-28.、Bioconjug Chem. 2005 Nov-Dec; 16(6): 1610-6.、及び、Cancer Res. 1999 Jan 1; 59(1): 128-34. には、グリシン-リシンリンカーが腎臓に存在する腎臓刷子縁膜酵素により特異的に切断されることが記載されている。日本特許第6164556号公報には、グリシン-フェニルアラニン-リシンリンカーが腎臓で腎臓刷子縁膜酵素により特異的に切断されることが記載されており、また、Bioconjug Chem. 2002 Sep-Oct; 13(5): 985-95. には、グリシン-ロイシン-グリシン-リシン配列を含むリンカーが、また、Bioconjug Chem. 2013 Feb 20; 24(2): 291-9. にはグリシン-チロシンリンカーが、腎臓刷子縁膜酵素により特異的に切断されることが記載されている。更に、Bioconjug Chem. 2014 Nov 19; 25(11): 2038-45. には、メチオニン-イソロイシン配列を含むリンカーが、腎臓に存在するリソソーム酵素により特異的に切断されることが記載されている。ペプチドリンカーのある態様としては、メチオニ

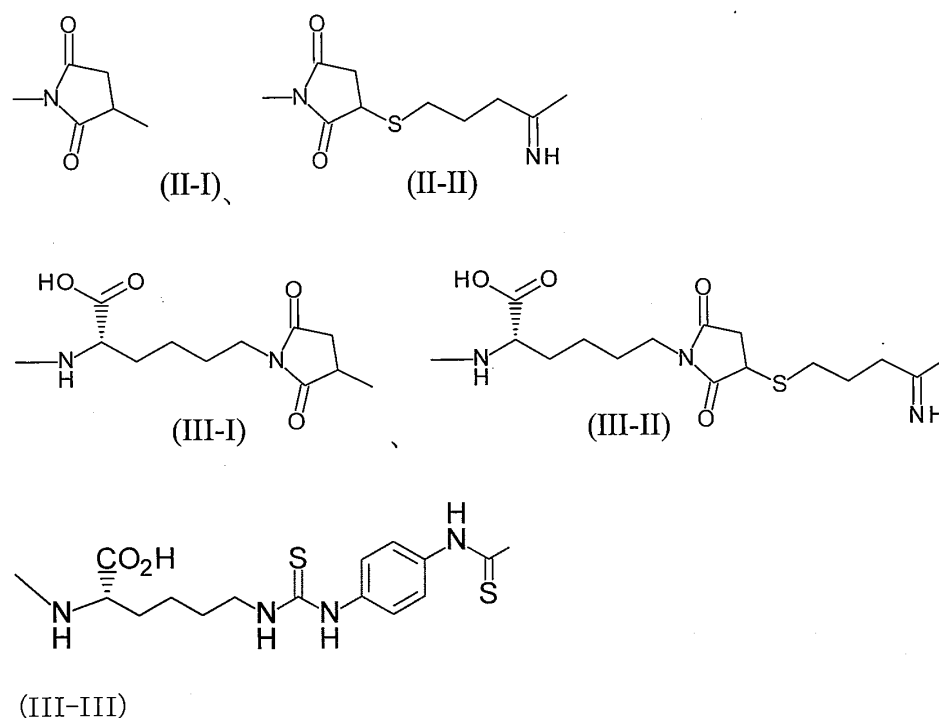
ン-イソロイシン、グリシン-リシン、グリシン-フェニルアラニン-リシン、メチオニン-バリン-リシン、グリシン-チロシン、グリシン-リシン-リシン、及び、グリシン-アルギニン-リシン、アスパラギン酸-グリシン-リシン、メチオニン-グリシン-リシン、メチオニン-イソロイシン-リシン、グリシン-チロシン-リシン、グリシン-バリン、グリシン-イソロイシン、メチオニン-フェニルアラニン-リシン、グリシン-（3-（2-ナフチル）アラニン）-リシン、及び、グリシン-ジフェニルアラニン-リシンからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドリンカーである。ある態様としては、メチオニン-イソロイシンアスパラギン酸-グリシン-リシン、グリシン-フェニルアラニン-リシン、メチオニン-グリシン-リシン、グリシン-リシン、及び、グリシン-（3-（2-ナフチル）アラニン）-リシンからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドリンカーである。

[0128] 「ペプチドリンカー」は、任意に抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントとの結合に適するアタッチメントを有していてもよく、ここに、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントとの結合に適するアタッチメントとは、ペプチドリンカー部と抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントのアミノ基又はチオール基との間を有機化学的に結合させる基であり、ある態様としては、末端にマレイミド由来の基（例えば、下式（I I - I）又は（I I - I I）で示される基）又はイソチオシアネート由来の基（ -NH-C(=S)- ）を含む基である。ある態様としては、 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-Z}_1\text{-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-Z}_1\text{-}$ 、 $\text{-C(=S)-NH-(1, 4-フェニレン)-NH-C(=S)-}$ 、又は $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(=S)-NH-(1, 4-フェニレン)-NH-C(=S)-}$ であり、ここで Z_1 は下式（I I - I）又は（I I - I I）で表される。更に、下式（I I - I）を $\text{-Z}_1\text{(#N)-}$ 、下式（I I - I I）を $\text{-Z}_1\text{(#S)-}$ と記載する場合がある。

アタッチメントはペプチド末端のアミノ酸のアミノ基又はカルボキシル基

と、或いは、アミノ酸の側鎖中のアミノ基（例えばリシン）や水酸基（例えばチロシン）と結合してペプチドリンカーを形成している。ペプチド末端のアミノ酸の側鎖中の官能基にアタッチメントが結合してペプチドリンカーを形成した例としては、例えば、Lysと一体となったアタッチメントとして下式（ⅠⅠⅠ-Ⅰ）又は（ⅠⅠⅠ-ⅠⅠ）で示される基が挙げられ、本明細書においてはこれら2つを併せて $-Lys^*-Z_2-$ と記載する。下式（ⅠⅠⅠ-Ⅰ）を $-Lys^*-Z_2(\#N)-$ 、下式（ⅠⅠⅠ-ⅠⅠ）を $-Lys^*-Z_2(\#S)-$ と記載する場合がある。下式（ⅠⅠⅠ-ⅠⅠⅠ）を $-Lys^*-Z_3-$ と記載する場合がある。

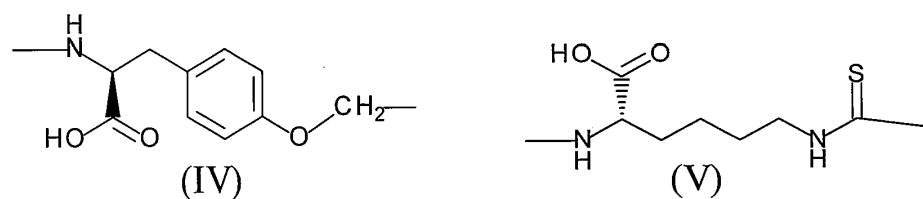
[0129] [化61]



[0130] 更に、本明細書中では、同様に末端アミノ酸の側鎖中の官能基とアタッチメントが結合した構造を有する、下式（ⅠⅤ）で示される基を $-Tyr^*-CH_2-$ 、下式（Ⅴ）で示される基を $-Lys^*-C(=S)-$ と、それぞれ記載する。

[0131]

[化62]



[0132] 「X」のペプチドリンカーのある態様としては、アタッチメントを含むペプチドリンカーである。ある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (6) $-\text{Gly}-\text{Lys}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (7) $-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
- (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
- (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (13) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (14) $-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (15) $-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (16) $-\text{Gly}-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (17) $-\text{Gly}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (19) $-\text{Gly}-\text{Tyr}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、

(20) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、

(21) $-Gly-(3-(2-ナフチル)アラニン)-Lys^*-Z_2-$ 、

(22) $-Gly-ジフェニルアラニン-Lys^*-Z_2-$ 、

(23) $-Gly-Tyr-NH-(CH_2)_5-Z_1-$ 、

(24) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-4)-$ 、

(25) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-5)-$ 、

(26) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(11-11)-$ 、

(27) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-3)-$ 及び

(28) $-Met-Gly-Lys^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

[0133] 更に「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

(1) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、

(2) $-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、

(3) $-Gly-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、

(4) $-Met-Val-Lys^*-Z_2-$ 、

(5) $-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、

(6) $-Gly-Lys-Lys^*-Z_2-$ 、

(7) $-Gly-Arg-Lys^*-Z_2-$ 、

(8) $-Gly-Lys^*-C(=S)-NH-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-$ 、及び

(9) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-NH-C(=S)-NH-(1,4-フェニレン)-NH-C(=S)-$ からなる群から選択されるペプチドリンカーである。

ある態様としては、

(1) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、

(2) $-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、

(3) $-Gly-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、

- (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (21) $-\text{Gly}-(3-(2\text{-ナフチル})\text{アラニン})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{I}-\text{I})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群から選択されるペプチドリンカーである。

「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (7) $-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (13) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (14) $-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (15) $-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (16) $-\text{Gly}-\text{Val}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (17) $-\text{Gly}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、

- (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (19) $-\text{Gly}-\text{Tyr}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (20) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (21) $-\text{Gly}-(3-(2\text{-ナフチル})\text{アラニン})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (22) $-\text{Gly}-\text{ジフェニルアラニン}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (23) $-\text{Gly}-\text{Tyr}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{Z}_1-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{II}-\text{II})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

[0134] 「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (6) $-\text{Gly}-\text{Lys}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (7) $-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、及び、
 (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ からなる群から選択されるペプチドリンカーである。

「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、及び
 (21) $-\text{Gly}-(3-(2\text{-ナフチル})\text{アラニン})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ か

らなる群から選択されるペプチドリinkerである。

[0135] 「X」のペプチドリinkerのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (6) $-\text{Gly}-\text{Lys}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、及び
- (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

からなる群より選択されるペプチドリinkerである。

「X」のペプチドリinkerのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (5) $-\text{Gly}-\text{Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (6) $-\text{Gly}-\text{Lys}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (8) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
- (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
- (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
- (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{I}-\text{I})-$ 、
- (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
- (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリinkerである。

[0136] 「X」のペプチドリinkerのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
- (2) $-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
- (3) $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、

(9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (10) $-\text{Asp}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (21) $-\text{Gly}-(3-(2\text{-ナフチル})\text{アラニン})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 及び
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{II}-\text{II})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

(1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{II}-\text{II})-$ 、
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A}-3)-$ 及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$

からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

[0137] 「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (1) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$ 、
 (9) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1, 4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$ 、
 (12) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (24) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(A-4)-$ 、
 (25) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(A-5)-$ 、
 (26) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(11-11)-$ 、及び
 (27) $-\text{Met}-\text{Ile}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-(A-3)-$ 、

からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (4) $-\text{Met}-\text{Val}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、
 (18) $-\text{Met}-\text{Phe}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_3-$

からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

「X」のペプチドリンカーのある態様としては、

- (11) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_2-$ 、及び
 (28) $-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Lys}^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリンカーである。

[0138] 1-4. スペーサー又は結合 (S_1)

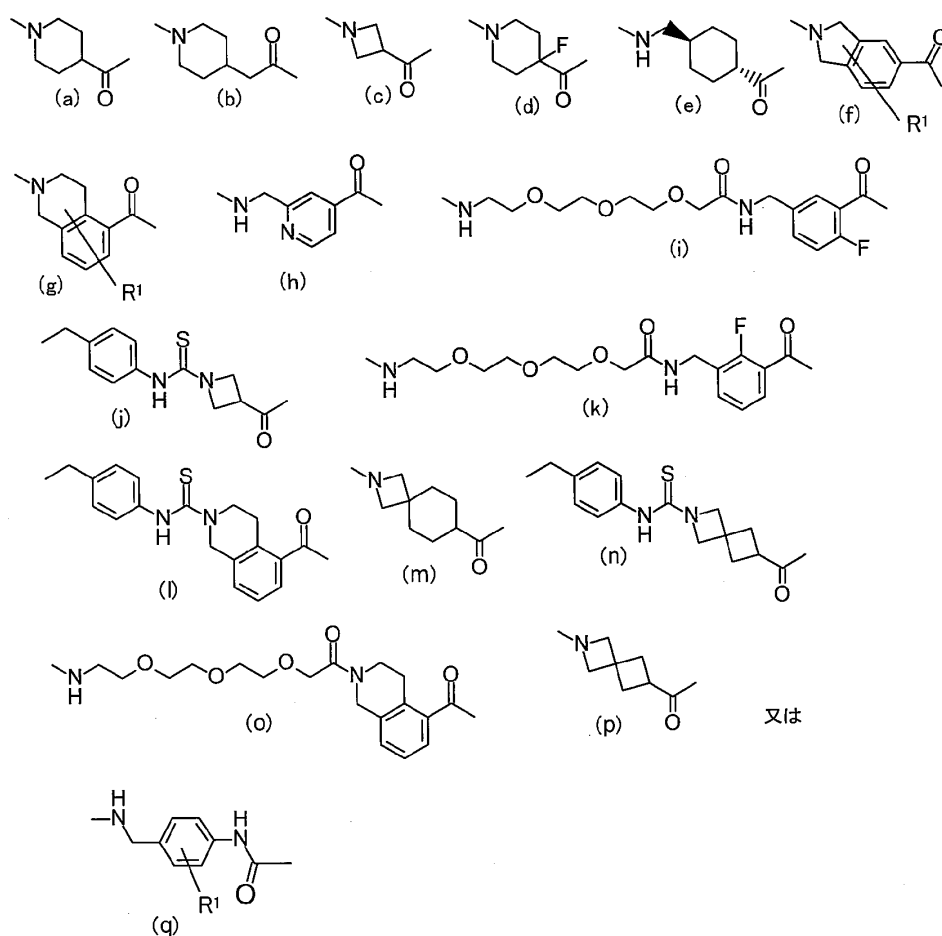
本発明の複合体は、配位子 (Y) とペプチドリンカー (X) とが、直接結合 (即ち、 S_1 は結合) するか、又は、スペーサー (即ち、 S_1 はスペーサー) を介して結合している。

本明細書において S_1 の「スペーサー」は、配位子と、ペプチドリンカー又は Fab' との間に一定の距離を作るため、或いは、配位子と、ペプチドリンカーとの結合のために、導入する基であり、ある態様としては、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1, 3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(1, 3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(1$

, 3-フェニレン) -C(=O)-、-NH-CH₂-(1, 3-フェニレン)
) -C(=O)-、-NH-(CH₂)₂-C(=O)-、-CH₂-(1, 4-
 フェニレン)-NH-C(=S)-、-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C
 (=O)-NH-CH₂-(1, 3-フェニレン)-C(=O)-、-NH-
 CH₂-(1, 4-フェニレン)-NH-C(=O)-、-NH-(CH₂)₃-
 C(=O)-、-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-、-NH-
 CH₂-(1, 4-フェニレン)-C(=O)-、-CH₂-(1, 4-フェニ
 レン)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1, 3-フェニレン)-C(=
 O)-、-CH₂-(1, 4-フェニレン)-NH-C(=S)-NH-(C
 H₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1, 3-フェニレン)-
 C(=O)-、下式(a)～(q)で示されるスペーサー等が挙げられる。

[0139]

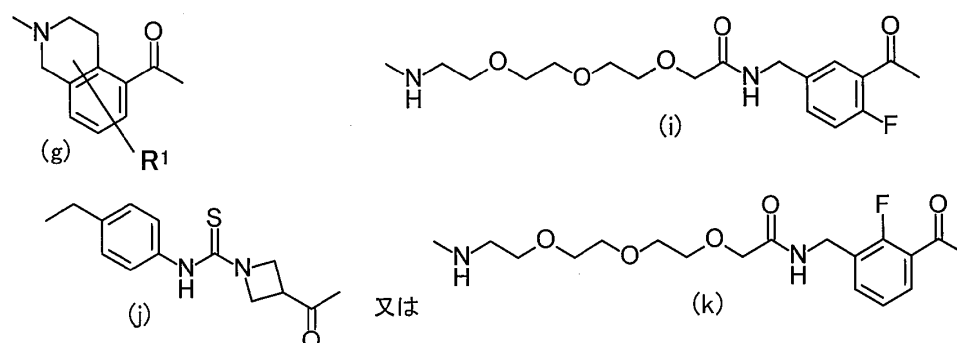
[化63]



[0140] ある態様としては、 S_1 は $-C(=O)-CH_2O-$ (1, 3-フェニレン)
 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-$ (1, 3-フェニレン)
 $-C(=O)-$ 、又は、 $-C(=O)-(1, 3-フェニレン)-C(=O)-$
)である。ある態様としては、 S_1 は、 $-NH-CH_2-$ (1, 3-フェニレン)
 $-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2-$ (1, 4-
 フェニレン) $-NH-C(=S)-$ 、 $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-$
 $C(=O)-NH-CH_2-$ (1, 3-フェニレン) $-C(=O)-$ 、 $-NH-$
 $-CH_2-$ (1, 4-フェニレン) $-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_3-$
 $-C(=O)-$ 、 $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-$

$-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、上式 (a) ~ (q) で示されるスペーサーである。
 ある態様としては、 S_1 は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、上式 (g)、(i)、(k) で示されるスペーサーである。
 ある態様としては、 S_1 が $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(1,3\text{-フェニレン})-\text{C}(=\text{O})-$ であり、又は、下式

[0141] [化64]



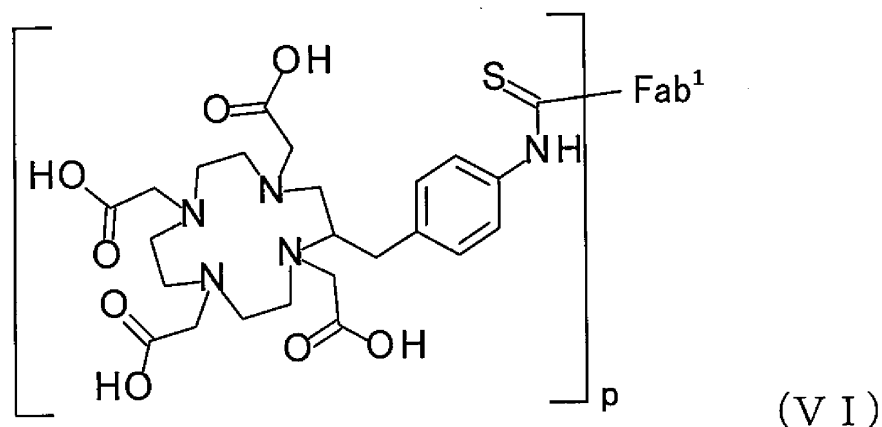
[0142] である。

ある態様としては、 S_1 は、結合である。

また、本発明のYがDOTAである複合体は、DOTAと抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント (Fab') が、直接結合又はスペーサー ($-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$) を介して結合していてもよい。但し、DOTAと抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント (Fab') とがスペーサーである $-\text{CH}_2-(1,4\text{-フェニレン})-\text{NH}-$

C(=S)－を介して結合した複合体は、下式(VI)で示される複合体である。

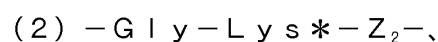
[0143] [化65]



[0144] また、本願明細書に記載の S_1 のスペーサーには新規なスペーサー、前記式(g)及び(l)で示されるスペーサーが包含されており、これらは、殊に、DOTAに、腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有する、2～4個のアミノ酸からなるペプチドを含むペプチドリンカーと結合する場合のスペーサーとして有用である。後記実施例4の腎臓集積性評価試験に示すように、DOTAと前記式(g)で示されるスペーサーに酵素で切断されるペプチドリンカーを組み合わせた複合体において、標識部の腎への集積性低減が確認されている。ある態様としては、 S_1 は上記式(g)及び(l)で示されるスペーサーである。

本発明の複合体のある態様としては、YがDOTAであり、 S_1 が式(g)及び(l)で示されるスペーサーであり、且つ、Xが、腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有する、2～4個のアミノ酸からなるペプチドを含む、ペプチドリンカーである複合体である。

ある態様としては、YがDOTAであり、 S_1 が式(g)及び(l)で示されるスペーサーであり、且つ、Xが



(3) $-Gly-Phe-Lys^*-Z_2-$ 、

(10) $-Asp-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、

(11) $-Met-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、及び

(21) $-Gly-(3-(2-ナフチル)アラニン)-Lys^*-Z_2-$ からなる群から選択されるペプチドリinkerである複合体である。

ある態様としては、YがDOTAであり、 S_1 が $-NH-CH_2-$ (1, 4-フェニレン) $-NH-C(=O)-$ 、上式 (g)、(i)、(k) で示されるスペーサーであり、かつXが

(1) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1-$ 、

(11) $-Met-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、

(12) $-Met-Ile-Lys^*-Z_2-$ 、

(24) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-4)-$ 、

(25) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-5)-$ 、

(26) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(I-I-I)-$ 、

(27) $-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-3)-$ 、及び

(28) $-Met-Gly-Lys^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリinkerである。

ある態様としては、YがDOTAであり、 S_1 が式 (g) で示されるスペーサーであり、かつXが、

(11) $-Met-Gly-Lys^*-Z_2-$ 、及び

(28) $-Met-Gly-Lys^*-Z_3-$ からなる群より選択されるペプチドリinkerである。

[0145] 本発明の複合体は、上記態様の組み合わせからなる。

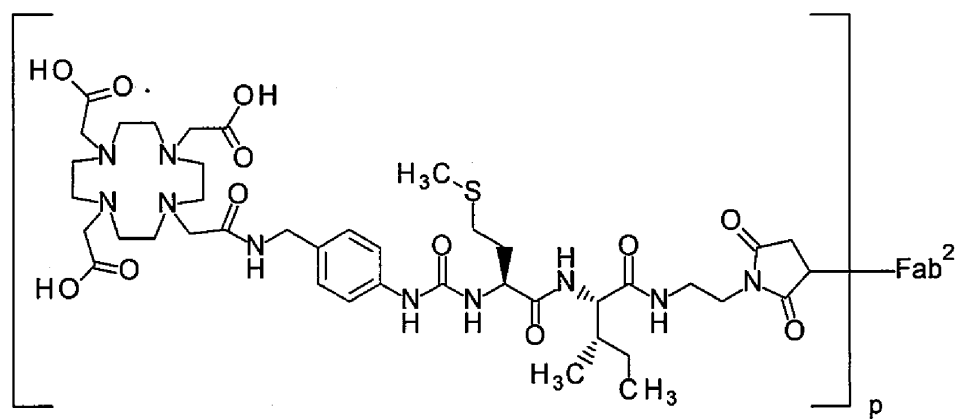
本発明の複合体の具体的な態様は以下の通りである。

式中、 Fab^2 は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むFabフラグメントである。

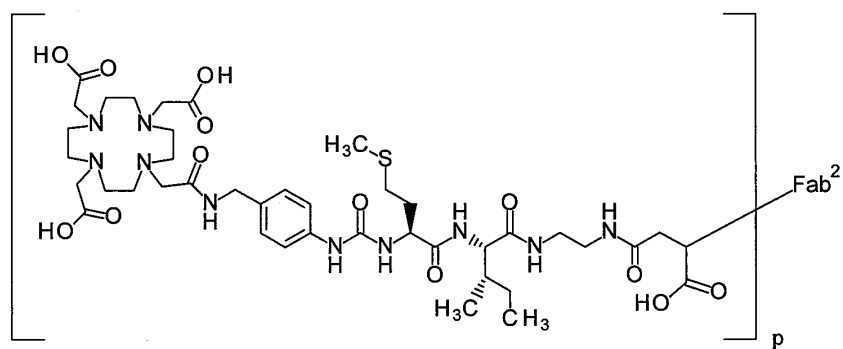
pは、1～25の自然数である。 Fab^2 が該 Fab^2 中にあるp個のアミノ基

又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。

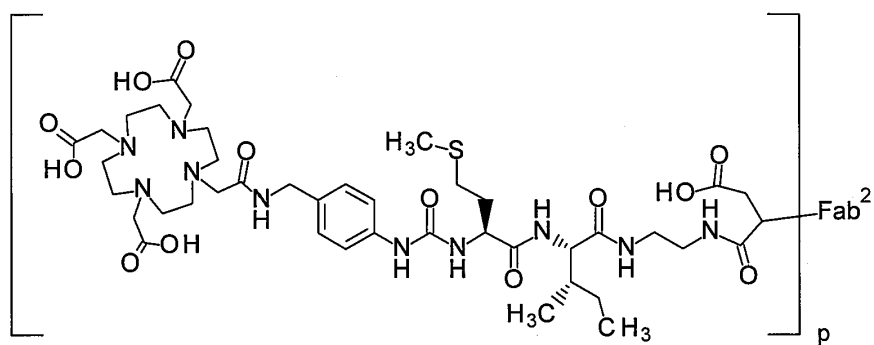
[0146] [化66]



[0147] [化67]

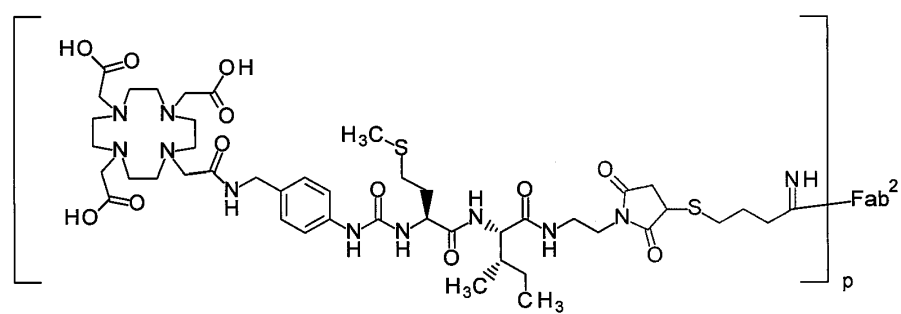


[0148] [化68]

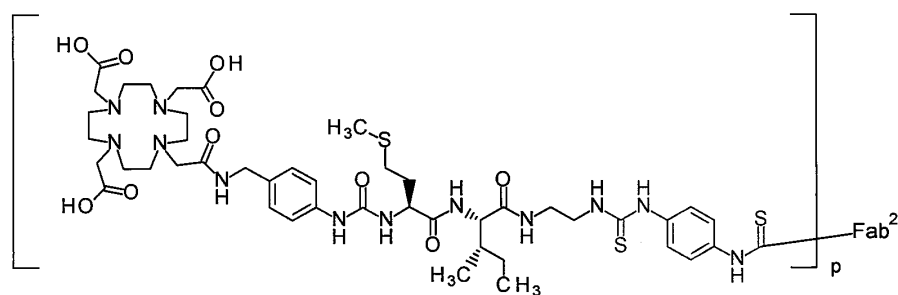


[0149]

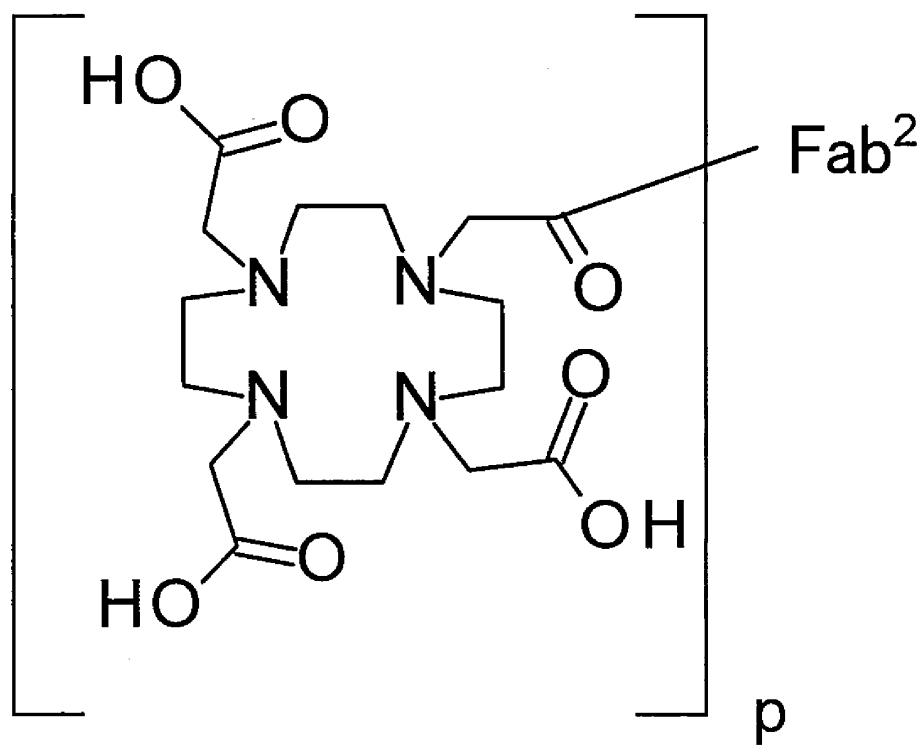
[化69]



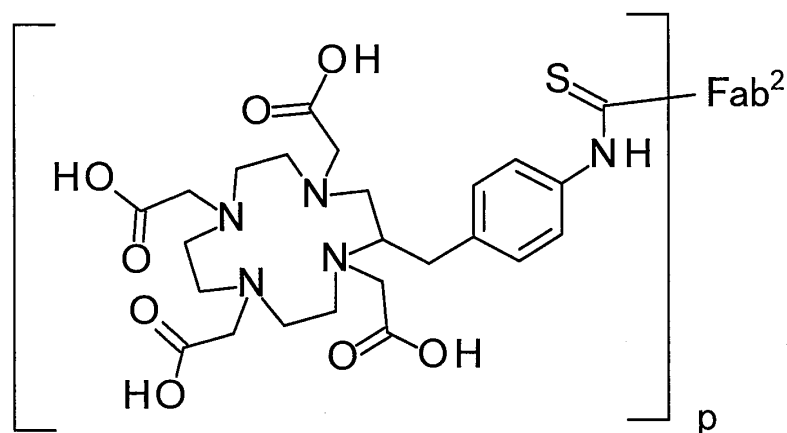
[0150] [化70]



[0151] [化71]



[0152] [化72]



[0153] なお、YがDOTAであり、 S_1 が式(g)及び(l)で示されるスパーサーであり、且つ、Xが腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有する、2～4個のアミノ酸からなるペプチドを含むペプチドリンカーである組合せの標識部は、本発明のFab¹との組合せに限らず、各種Fab抗体を用いた同様の複合体における、腎毒性等の低減が期待される標識部として有用であり、本発明には当該標識部自体の発明も包含される。

本発明の複合体の製造において、抗CEACAM5抗体Fabフラグメントと、配位子、スパーサー及び／又はペプチドリンカーとの結合、及び配位子とスパーサー及び／又はペプチドリンカーとの結合は、公知の手法により、当業者が適宜行うことができる。

[0154] 本明細書で「標識部」とは、例えば式(l)においては、Fab¹以外の部分を、式(la)又は(lb)では、Biomolecule¹又はBiomolecule²以外の部分を意味する。(i)配位子及びペプチドリンカー(Y-S₁-X：但し、S₁が結合であり、Xがペプチドリンカーである。)、(ii)配位子(Y-S₁-X：但し、S₁及びXがそれぞれ結合である。)、又は(iii)配位子、スパーサー及びペプチドリンカー(Y-S₁-X：但し、S₁がスパーサーであり、Xがペプチドリンカーである。)である。ある態様としては、(ii)配位子が挙げられる。ある態様としては、(i)配位子及びペプチドリンカー、又は(iii)配位子、スパーサー及びペプチ

ドリンカーが挙げられる。ここに、「標識部」の配位子は更に金属を含んでもよく、ある態様としては、金属を含む (i) 配位子及びペプチドリンカー、(ii) 配位子、又は (iii) 配位子、スペーサー及びペプチドリンカーであり、言い換えると、(i) 金属とキレート錯体を形成した配位子及びペプチドリンカー、(ii) 金属とキレート錯体を形成した配位子、又は (iii) 金属とキレート錯体を形成した配位子、スペーサー及びペプチドリンカーである。さらに (iv) 前記ペプチドリンカーにさらにスペーサーを含めたペプチドリンカーの場合がある。また式 (1a) 又は (1b) においては、Biomolecule¹又はBiomolecule²以外の部分を意味する。

[0155] 1-5. 抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント (Fab¹) に対する標識部 (Y-S₁-X) の結合数 (p) 及び式 (1a) 又は (1b) のBiomolecule¹及びBiomolecule²に対する標識部の結合数 (p)

本発明の複合体は、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント (Fab¹) 中の1以上のアミノ基又はチオール基を介して1以上の標識部 (Y-S₁-X) が結合した複合体である。また、本発明の複合体は、式 (1a) 又は (1b) のBiomolecule¹及びbiomolecule²中1以上のアミノ基又はチオール基を介して1以上の標識部が結合した複合体である。本発明の複合体は結合する標識部の数が互いに相違する複体の混合物であってもよく、式 (1) において、Fab¹に1~25の標識部 (Y-S₁-X) が結合した複体のいずれか又はそれらの混合物であることを示す。ある態様としては、本発明の複合体は、1つのFab¹に対して、1~25の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては、1~23の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては1~15の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては1~11の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては1~9の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては1~7の標識部 (Y-S₁-X) を含み、ある態様としては1~5の標識部 (Y-S₁-X) を含み

、更に、ある態様としては1～4の標識部（ $Y-S_1-X$ ）を含む。

式（1a）又は（1b）において、 $Biomolecule^1$ 及び $Biomolecule^2$ は1～25の当該標識部が結合したFab'のいずれか又はそれらの混合物であることを示す。ある態様としては、本発明の複合体は、1つの $Biomolecule^1$ 及び $Biomolecule^2$ に対して、1～25の当該標識部を含み、ある態様としては、1～23の当該標識部を含み、ある態様としては1～15の当該標識部を含み、ある態様としては1～11の当該標識部を含み、ある態様としては1～9の当該標識部を含み、ある態様としては1～7の当該標識部を含み、ある態様としては1～5の当該標識部を含み、更に、ある態様としては1～4の当該標識部を含む。

即ち、1つのFab'に対する標識部（ $Y-S_1-X$ ）の結合数を表す「p」及び1つの $Biomolecule^1$ 及び $Biomolecule^2$ に対する当該標識部の結合数を表す「p」は、同一又は異なって、ある態様としては1～25の自然数であり、ある態様としては1～23の自然数であり、ある態様としては1～15の自然数であり、ある態様としては1～11の自然数であり、ある態様としては1～9の自然数であり、ある態様としては1～7の自然数であり、ある態様としては1～6の自然数であり、ある態様としては1～5の自然数であり、ある態様としては1～4の自然数であり、更に、ある態様としては1～3の自然数である。

[0156] 2. 本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをコードするポリヌクレオチド

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントは、ある態様では、当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

ある態様において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ

酸番号 1 から 1 2 1 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 1 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 1 2 1 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 1 の塩基番号 1 から 3 6 3 までの塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 1 1 2 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 3 の塩基番号 1 から 3 3 6 までの塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

1 つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメントをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 1 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 3 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

本発明の複合体に含まれる抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメントをコードするポリヌクレオチドは、当該抗ヒト C E A C A M 5 抗体 F a b フラグメントの重鎖フラグメント及び軽鎖のアミノ酸配列に基づいてデザインされた塩基配列に基づき、当該技術分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、国際公開第 9 0 / 0 7 8 6 1 号に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種

々の方法が使用され得る。

[0157] 3. 本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをコードするポリヌクレオチドの発現ベクター

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをコードするポリヌクレオチドの発現ベクターには、当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、並びに当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び当該抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。

好ましい発現ベクターとしては、配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、並びに配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが挙げられる。

好ましい発現ベクターには、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、並びに配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコ

ードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。

[0158] これらの発現ベクターは、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを産生できるものであれば特に制限されない。このような発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げられ、好ましくは、pEE6.4やpEE12.4（Lonza社）を使用することができる。

また、これらの発現ベクターは、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをコードするポリヌクレオチドの重鎖フラグメント及び／又は軽鎖をコードする遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。宿主細胞中でFabフラグメントを発現させるためのプロモーターとしては、宿主細胞がエシェリキア属菌の場合、例えば、Trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどが挙げられる。酵母中での発現用プロモーターとしては、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、バチルス属菌での発現用プロモーターとしては、SLO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、CMV、RSV、SV40などのウイルス由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、アクチンプロモーター、EF（elongation factor）1 α プロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

[0159] これらの発現ベクターは、宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域及び複製可能単位をさらに含み得る。一方、宿主として酵母、動物細胞又は昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは、開始コドン、終止コドンを含み得る。また、この場合、エンハンサー配列、本発明の重鎖フラグメント及び／又は軽鎖をコードする遺伝子の5'側及び3'側の非翻訳領域、分泌シグナル配列、スプライシング接

合部、ポリアデニレーション部位、又は複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでいてもよい。

[0160] 4. 発現ベクターで形質転換される宿主細胞

発現ベクターで形質転換される宿主細胞には、以下の（a）～（d）からなる群より選択される宿主細胞が含まれる：

（a）抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（b）抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（c）抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

（d）抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0161] 1つの実施形態において、発現ベクターで形質転換される宿主細胞は、以下の（a）～（d）からなる群より選択される、発現ベクターで形質転換された宿主細胞である：

（a）配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0162] 1つの実施形態において、発現ベクターで形質転換される宿主細胞は、以下の(a)～(d)からなる群より選択される、発現ベクターで形質転換された宿主細胞である：

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4

に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0163] 好ましい発現ベクターで形質転換される宿主細胞は、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、並びに、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞が挙げられる。

[0164] 発現ベクターで形質転換される宿主細胞としては、使用する発現ベクターに適合し、該発現ベクターで形質転換されて、Fabフラグメントを発現しうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞又は人工的に樹立された細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞又は昆虫細胞（例えば、Sf9）など）、哺乳動物細胞株（例えば、CHO-K1SV細胞、CHO-DG44細胞、293細胞等の培養細胞）が例示される。形質転換自体は、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法など、公知の方法により行われ得る。

5. 本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産方法

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産は、上記の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを発現させる工程を含む。

[0165] 1つの実施形態において、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産において培養する形質転換された宿主細胞

は、以下の（a）～（c）からなる群より選択される：

（a）本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（b）本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

（c）本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0166] ある態様としては、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産において培養する形質転換された宿主細胞は、以下の（a）～（c）からなる群より選択される：

（a）配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（b）配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩

基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 配列番号2のアミノ酸番号1から121に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から112に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0167] ある態様としては、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産において培養する形質転換された宿主細胞は、以下の(a)～(c)からなる群より選択される：

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0168] 好ましくは、使用される形質転換された宿主細胞は、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列

を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、あるいは、本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産において、形質転換された宿主細胞は、栄養培地中で培養され得る。栄養培地は、形質転換された宿主細胞の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

[0169] 形質転換された宿主細胞の培養自体は、公知の方法により行われる。培養条件、例えば、温度、培地のpH及び培養時間は、適宜選択される。例えば、宿主が動物細胞の場合、培地としては、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（Science；1955；122：501.）、DMEM培地（Virology；1959；8：396－97.）、RPMI1640培地（J. Am. Med. Assoc.；1967；199：519－24.）、199培地（Proc. Soc. Exp. Biol. Med.；1950；73：1－8.）等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～336時間行われ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば、胎児牛血清を含むGrace's培地（PNAS；1985；82

: 8404-8.) 等が挙げられ、そのpHは約5~8であるのが好ましい。培養は通常約20~40℃で15~100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば、上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5~8である培地である。宿主が*E. coli*の場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(Millerら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory; 1972: 431.) 等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14~43℃、約3~24時間行うことができる。宿主が*Bacillus*属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30~40℃、約16~96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えば、Burkholder最小培地(PNAS; 1980; 77: 4505-4508.) が挙げられ、pHは5~8であることが望ましい。培養は通常約20~35℃で約14~144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明の複合体に含まれる抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの生産においては、上記の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを発現させる工程に加えて、発現させた抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを回収、好ましくは単離、精製する工程を含めてもよい。単離、精製方法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

[0170] 6. 本発明の複合体を生産する方法

本発明の複合体を生産する方法には、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを、標識部($Y-S_1-X$)と共有結合させる工程を含めることができる。前記標識部($Y-S_1-X$)における各構成要素間の結合は、公知の手法により、当業者が適宜行うことができる。反応例としては、配位子(Y)を直接又はスペーサー(S_1)を介してペプチドリンカー(X)に結合させた後に、前記ペプチドリンカーと抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントとを結合させることができる。また、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントをペプチドリンカー(X)に結合させた後に、前記ペプチドリンカーと配位子(Y)とを直接又はスペーサー(S_1)を介して結合させることもできる。なお、原料としてあらかじめ配位子とスペーサー(S_1)とが結合した化合物を用いることもできる。

[0171] 本発明の複合体を生産する方法はまた、上記の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを発現させる工程、及び、当該Fabフラグメントと標識部($Y-S_1-X$)とを共有結合させる工程を含んでもよい。本発明の複合体を生産する方法はまた、上記の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを発現させる工程、発現させた当該Fabフラグメントを回収する工程、及び、当該Fabフラグメントと標識部($Y-S_1-X$)とを共有結合させる工程を含んでもよい。本発明の複合体を生産する方法は、更に、金属を添加する工程を含んでもよい。使用されるキレート剤、ペプチドリンカー、スペーサー、標識部の数、金属などは、本明細書に記載のものを使用することができる。

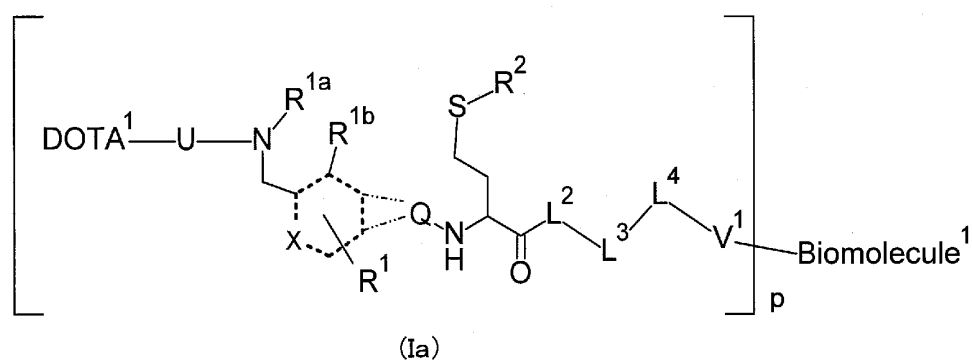
[0172] 本発明の複合体を生産する方法は、上記で特定する2以上の工程を一連の工程として含む方法として実施することもできるし、上記で特定する少なくとも一つの工程を含む方法として実施することもできる。例えば、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントを標識部($Y-S_1-X$)と結合させる工程を含む方法、及び、標識部($Y-S_1-X$)を結合させた抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントに金属を配位させる工程を含む方法もまた、

本発明の複合体を生産する方法に含まれる。また、本発明の複合体を生産する方法には、工程の順番が異なる方法も含まれる。例えば、配位子に金属を配位させた標識部（ $Y-S_1-X$ ）に、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントと共有結合させる方法も、本発明の複合体を生産する方法に含まれる。

また、上記抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントに代えて、本発明に記載の生物分子でも同様に生産することが可能である。

7. 配位子、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体
下式に示される本発明の配位子、スペーサー、ペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体について説明する。

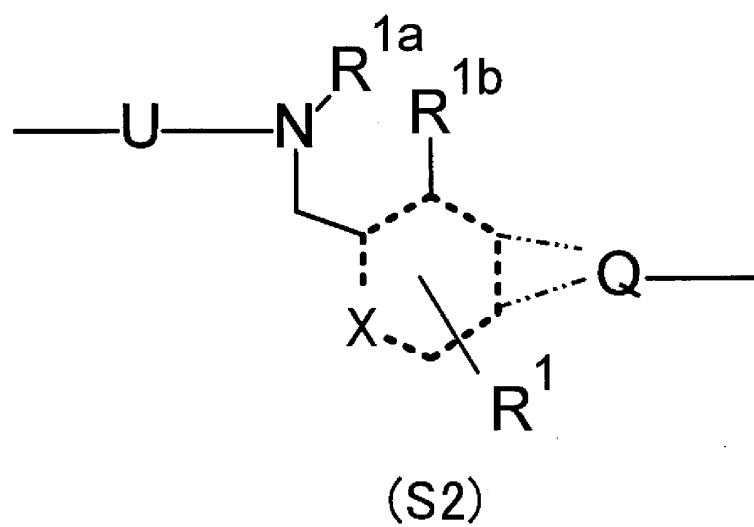
[0173] [化73]



[0174] スペーサーに相当する下式（S2）

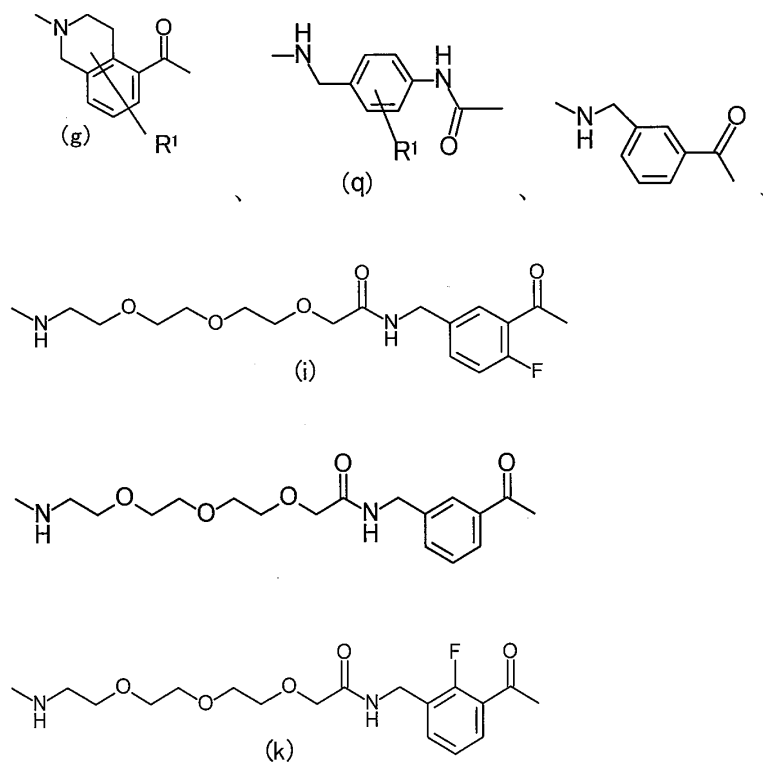
[0175]

[化74]



[0176] の態様として、

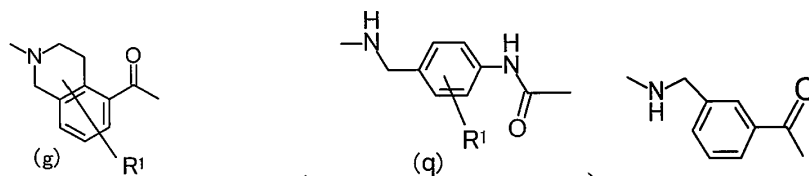
[0177] [化75]



[0178] が挙げられる。

別の態様として、式 S 2 が、

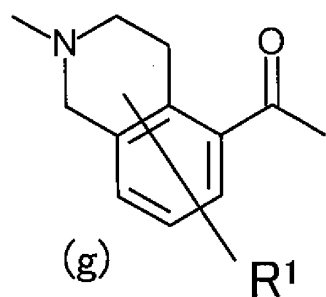
[0179] [化76]



[0180] である基が挙げられる。

別の態様として、式 S 2 が

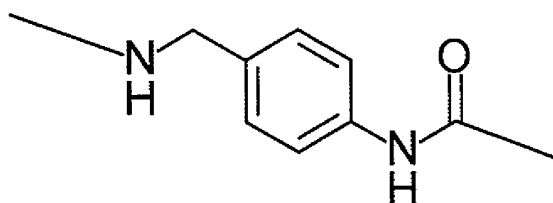
[0181] [化77]



[0182] である基が挙げられる。

別の態様として、式 S 2 が

[0183] [化78]



[0184] である基が挙げられる。

式 (S 2) 中の基 Q の態様として、 $-C(=O)-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、又は、 $-NH-C(=S)-$ が挙げられる。

式 (S 2) 中の基 Q の態様として、 $-C(=O)-$ 、又は、 $-NH-C(=O)-$ が挙げられる。

式 (S 2) 中の基 Q の態様として、 $-NH-C(=O)-$ が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^2 の態様として、I l e、P h e、G l y が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^2 の態様として、I l e が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^2 の態様として、P h e が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^2 の態様として、G l y が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^3 の態様として、結合、A r g、H i s が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^3 の態様として、結合が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^3 の態様として、A r g が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^3 の態様として、H i s が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^4 の態様として、 $-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-NHCH(C(=O)OH)(CH_2)_4-$ 、又は、結合が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^4 の態様として、 $-NH-(CH_2)_2-$ が挙げられる。

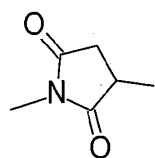
式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^4 の態様として、 $-NHCH(C(=O)OH)(CH_2)_4-$ が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 L^4 の態様として、結合が挙げられる。

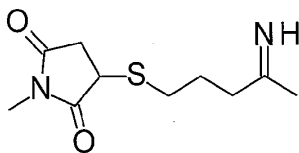
式 (I a) 又は (I b) 中の基 V^1 の態様として、下式 (A-1) ~ (A-5) に示される基、

[0185]

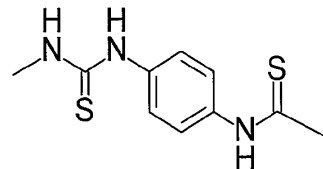
[化79]



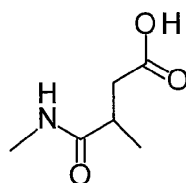
(A-1)



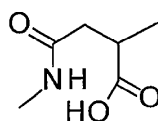
(A-2)



(A-3)



(A-4)

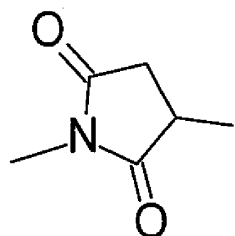


(A-5)

[0186] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 V' の態様として、下式 (A-1) に示される基、

[0187] [化80]



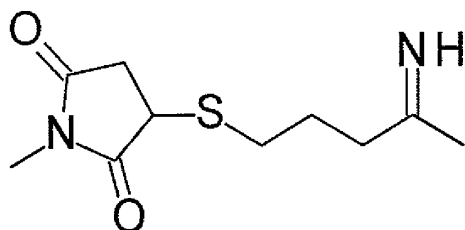
(A-1)

[0188] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 V' の態様として、下式 (A-2) に示される基、

[0189]

[化81]

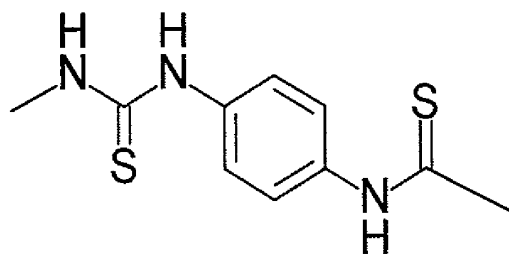


(A-2)

[0190] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 V' の態様として、下式 (A-3) に示される基、

[0191] [化82]



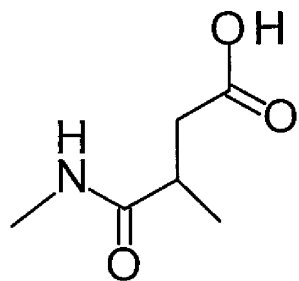
(A-3)

[0192] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 V' の態様として、下式 (A-4) に示される基、

[0193]

[化83]

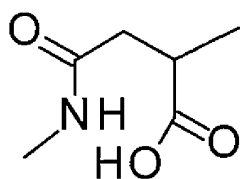


(A-4)

[0194] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の基 V' の態様として、下式 (A-5) に示される基、

[0195] [化84]



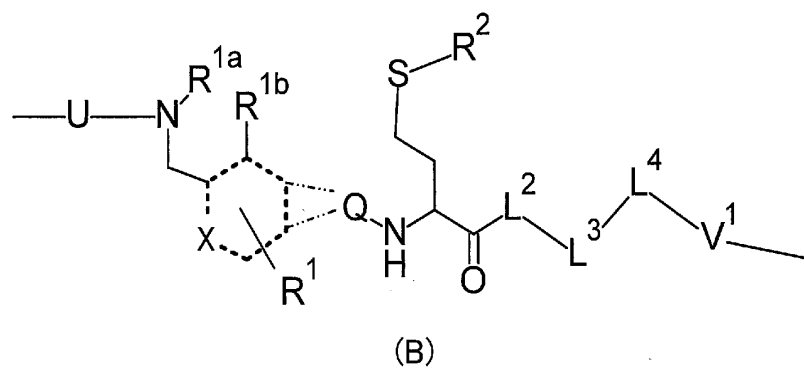
(A-5)

[0196] が挙げられる。

式 (I a) 又は (I b) 中の下式 (B) は、スペーサーおよびペプチドリンカーからなる基である。

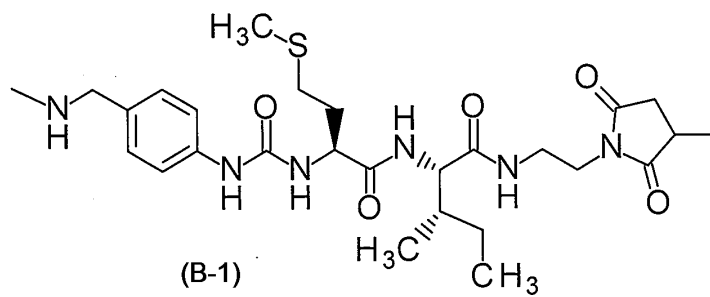
[0197]

[化85]

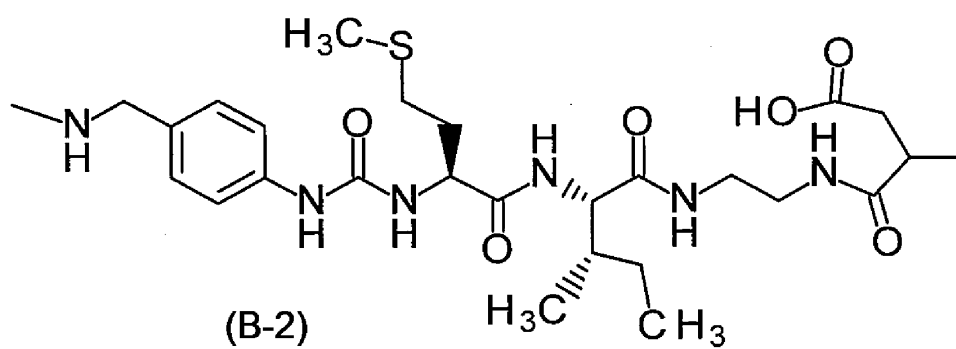


[0198] 下式 (B-1) から (B-7) の群から選択された基が挙げられる。

[0199] [化86]

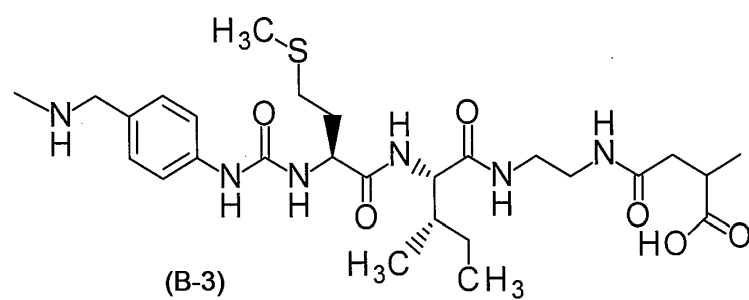


[0200] [化87]

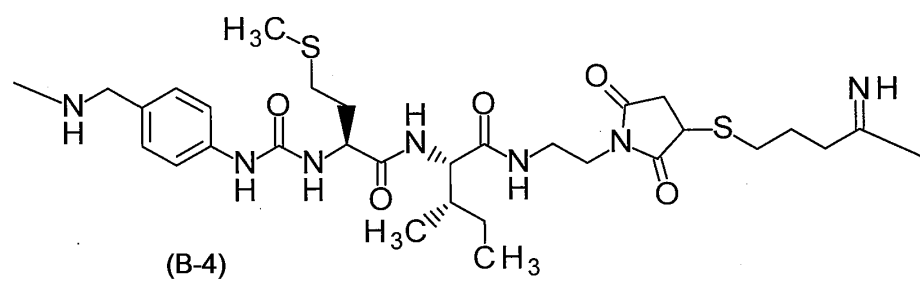


[0201]

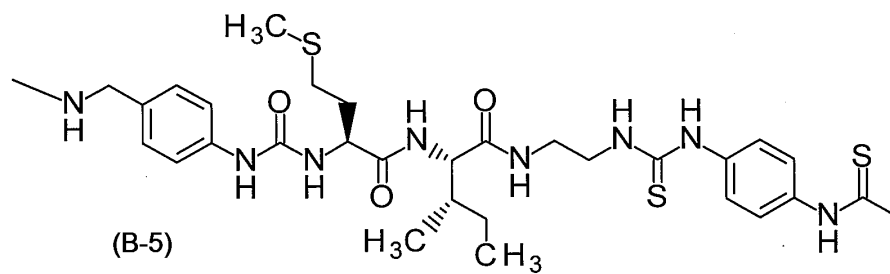
[化88]



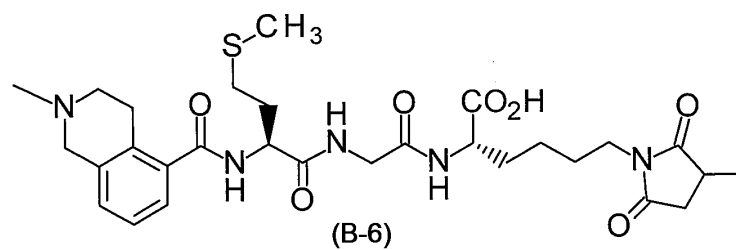
[0202] [化89]



[0203] [化90]

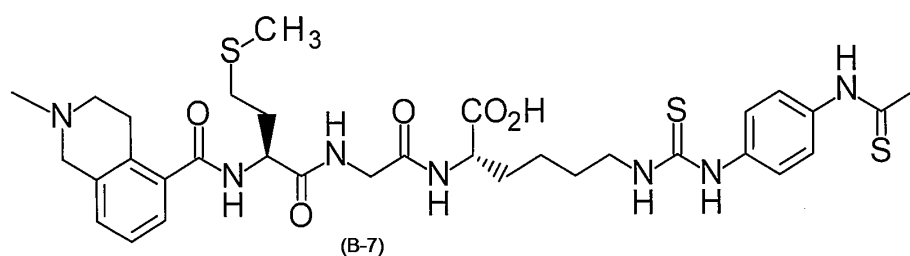


[0204] [化91]



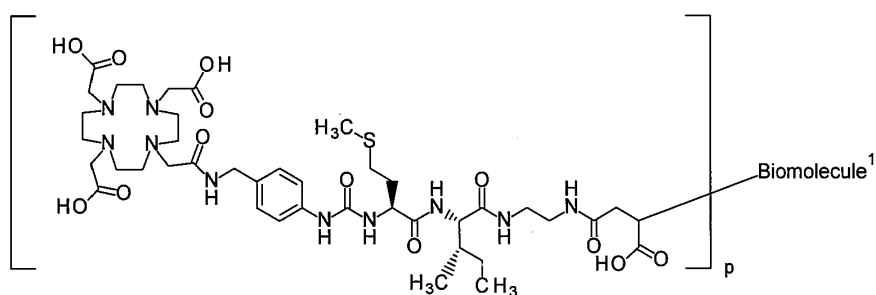
[0205]

[化92]

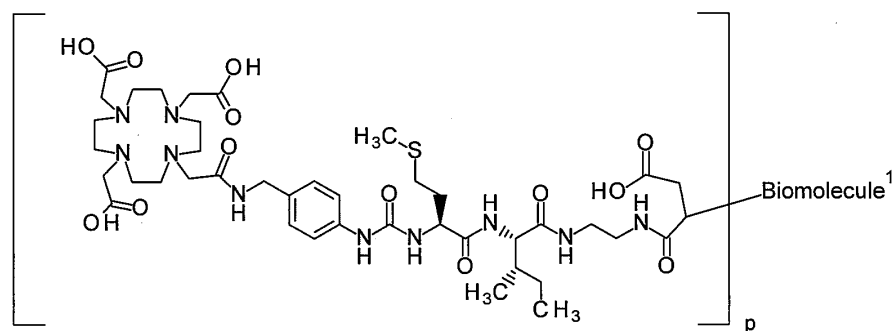


[0206] ある態様として、下式の化合物からなる群より選択される複合体であって、
 p は、1～25の自然数であり、Biomolecule¹中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している、上記式
 (I a)に記載の複合体が挙げられる。

[0207] [化93]

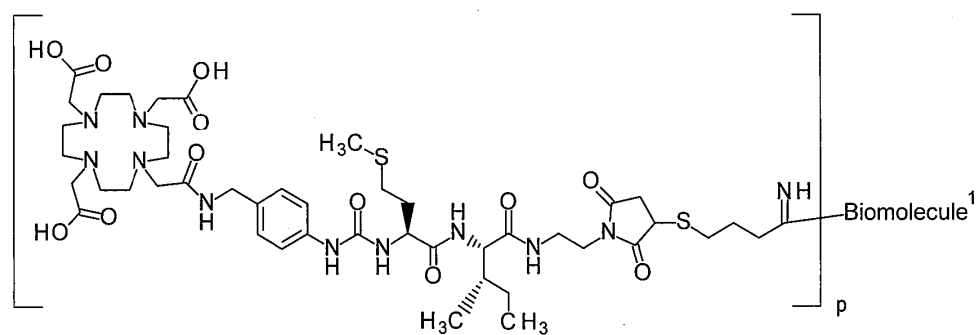


[0208] [化94]

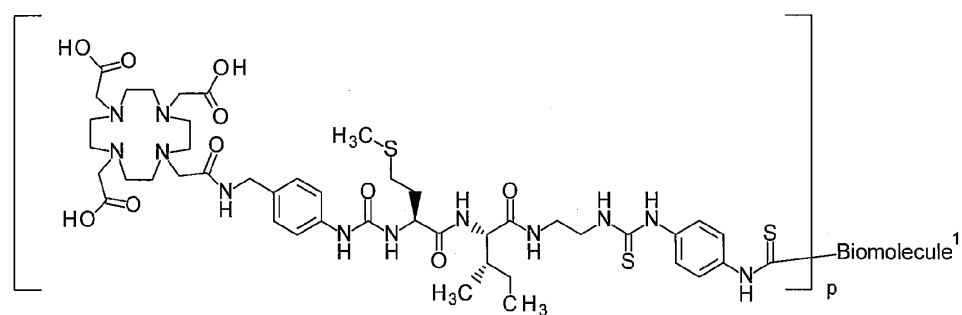


[0209]

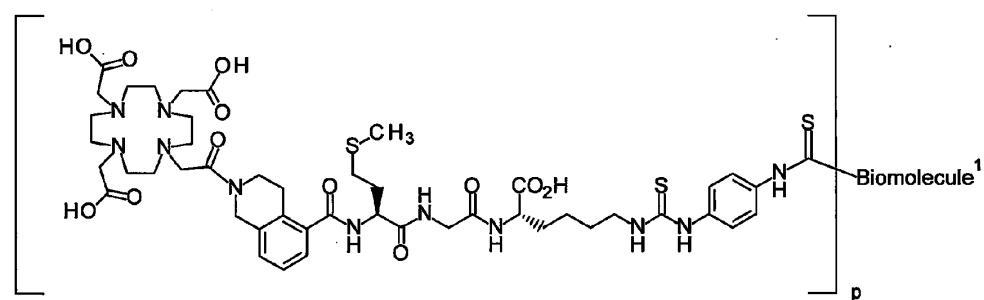
[化95]



[0210] [化96]



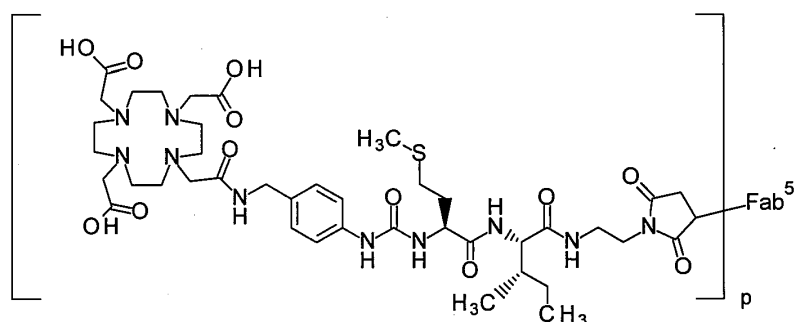
[0211] [化97]



[0212] 本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0213]

[化98]

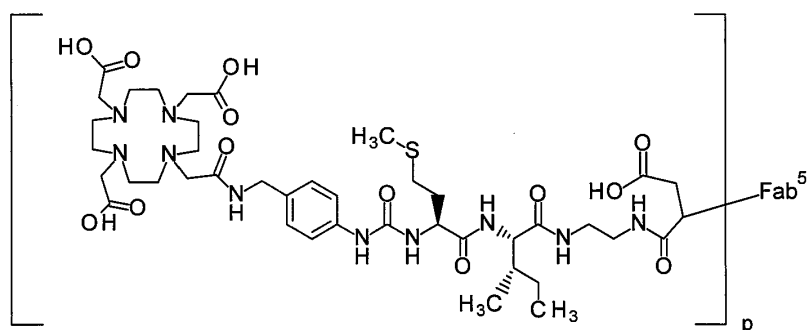


[0214] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0215] [化99]



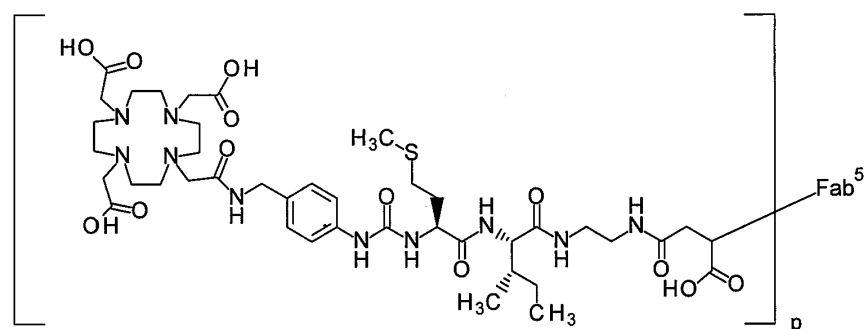
[0216] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0217]

[化100]

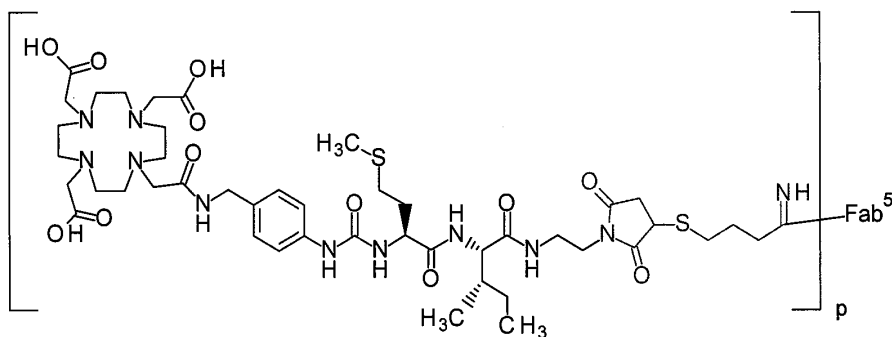


[0218] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0219] [化101]



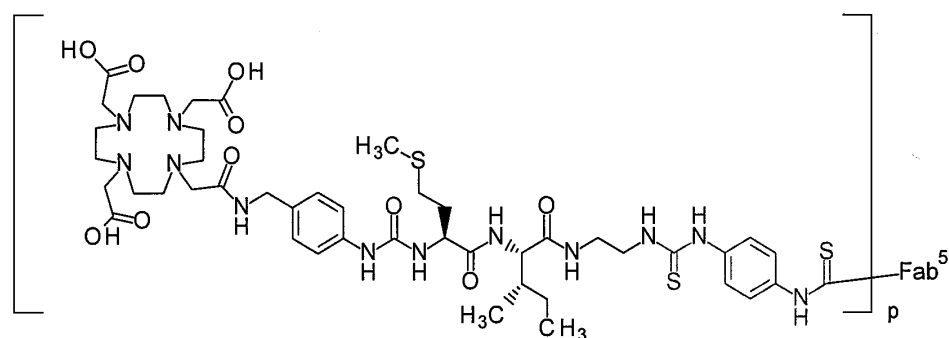
[0220] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0221]

[化102]

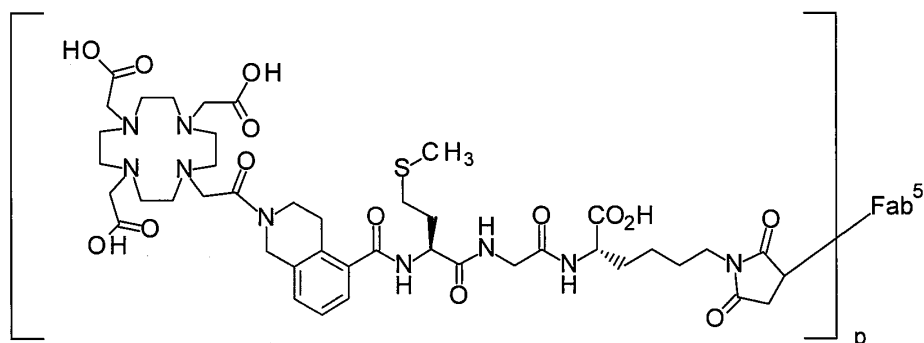


[0222] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0223] [化103]



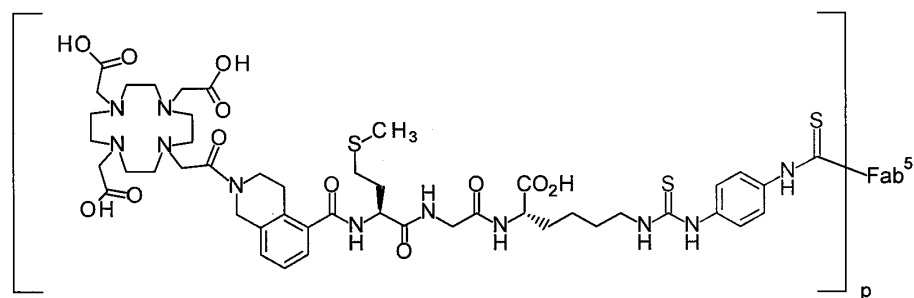
[0224] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメント。]

本発明の態様は、下式に示される複合体。

[0225]

[化104]

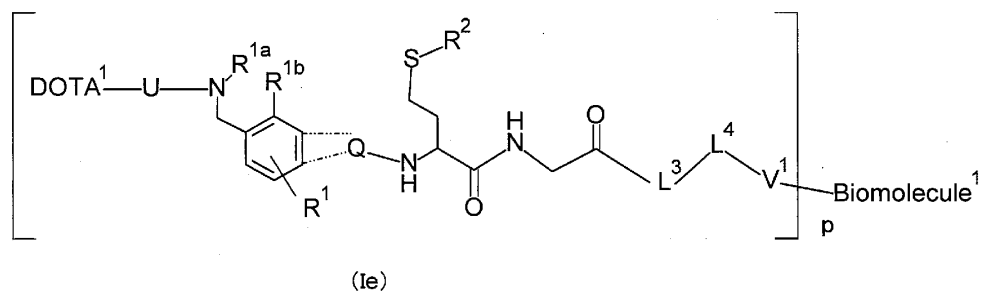


[0226] 「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

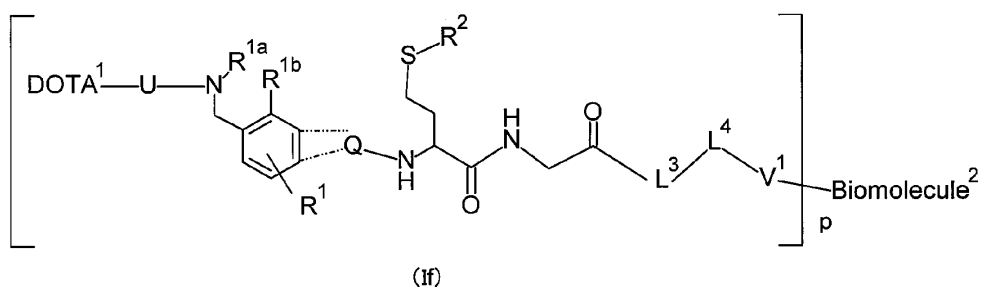
配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。]

また本発明の態様として、下式(1e)及び(1f)が挙げられる。

[0227] [化105]



[0228] [化106]



[0229] 本発明複合体は、幾何異性体や互変異性体が存在する場合がある。また、本発明化合物は不斉炭素を有する場合がある。本発明には、これら異性体の

分離したもの、あるいはそれらの混合物が包含される。また、ラベル体、即ち、本発明化合物の1つ以上の原子を放射性同位元素若しくは非放射性同位元素で置換した化合物も本発明に包含される。

生物分子の態様としては、生理活性を有するものであればいずれでもよく、ペプチド、タンパク質、ホルモン、薬物、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、多糖類などがあげられる。タンパク質の場合、抗体、酵素、受容体およびそれらの断片が含まれる。

別の生物分子の態様としては、ペプチド、タンパク質が挙げられる。

別の生物分子の態様としては、タンパク質が挙げられる。

別の生物分子の態様としては、タンパク質のうち、Fabフラグメント、酵素、受容体、それらの断片が挙げられる。例えばソマトスタチン、PSMAリガンド、RGD (Arg-Gly-Asp) Peptide、ATSM (Di acetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone))、 ^{211}At -ALTM (4- ^{211}At -astato-N-[4-(6-(isopropylamino)pyridine-4-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-N-methylbenzamide) がそれにあたる。

[0230] 別の生物分子の態様として、上市されている抗体又はそのFabフラグメントが挙げられる。

例えばnivolumab、pembrolizumab、bevacizumab、rituximab、pertuzumab、daratumumab、denosumab、cetuximab、ipilimumab、panitumumab、brentuximab、ramucirumab、atezolizumab、obinutuzumab、elotuzumab、avelumab、ibritumomab、alemtuzumab、gemtuzumab、necitumumab等が挙げられる。

また、別の生物分子の態様として、アルファ線治療やベータ線治療に期待で

きるものが挙げられる。

例えば、Octreoscan、¹³¹I-MIBG (I-131 metaiodobenzylguanidine)、²¹¹At-MABG (²¹¹At-a-stato-benzylguanidine)、Trastuzumab、Humanized antibody A33 (Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2005 Oct; 20 (5) : 514-23.)、Omburtamab、Tenatumomab、CD45 antibody (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03128034; 9595; NCI-2017-00452)、Ibritumomab、Actimabが挙げられる。

また、別の生物分子の態様として、Cancer studies and molecular medicineに記載のHuM195, MX35-F(ab')₂ monoclonal antibodies, Murine 9.2.27, Proteoglycan (MCSP) antigen, CD20 antigen, CD30 antigen等が挙げられる (Cancer studies and molecular medicine (2004), 1, 1, 1-7)。

また、別の生物分子の態様として、CD19, GD2, VE cadherin等が挙げられる。

[0231] ある生物分子の態様としては、MUC1抗体Fabフラグメント (Fab³、Fab⁴又はFab⁵という) であり、国際公開WO2018/092885記載のものが挙げられる。

[1M] 具体的に当該Fab³又はFab⁴は、以下の(a)及び(b)からなる群より選択される、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントであり、なお配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントを有するFabフラグメントをFab³、配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントを有するFabフ

ラグメントをF a b⁴という：

(a) 配列番号12又は配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント；及び

(b) 配列番号12又は配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号12又は配列番号14のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。

[2M] ある態様として、以下の(a)及び(b)からなる群より選択される、上記[1M]に記載の抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント：

(a) 配列番号6又は配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント；及び

(b) 配列番号6又は配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号6又は配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。

[3M] ある態様として、以下の(a)及び(b)からなる群より選択される、上記[1M]に記載の抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント：

(a) 配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント；及び

(b) 配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号16に示される

アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[0232] [4 M] ある態様として以下の (a) 及び (b) からなる群より選択される、上記 [3 M] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント：

(a) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント；及び

(b) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[5 M] ある態様として、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメントである、上記 [4 M] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[6 M] ある態様として配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメントである、上記 [4 M] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[7 M] 国際公開WO 2018/092885 記載の抗MUC 1 抗体 F a b フラグメントである P 10-1 または P 10-2 (F a b⁵ という) である。また本発明複合体は、上記個々の態様の組み合わせから構成することができる。

[0233] 7. 診断用組成物・診断方法

本発明は、金属を含む本発明の複合体（以下、検出可能な本発明の複合体と称する。）を含む、診断用組成物に関する。本発明の診断用組成物は、本発明の複合体を 1 種類以上含むものであってもよい。すなわち、本発明の診

断用組成物は、本発明の複合体を1種類含むものであってもよく、または2種類以上の本発明の複合体の組合せを含むものであってもよい。検出可能な本発明の複合体は、常法に従って製剤化され、早期診断薬、又は病期診断薬（特に癌の診断薬）として利用することができる。

早期診断薬とは、病状が観察されない、又は病期の早い段階で診断を行うことを目的とする診断薬を意味する。例えば、癌においては、病状が観察されないか、ステージ0又はステージ1の段階で用いる診断薬を意味する。

病期診断薬とは、病状がどの程度進行しているかを検査することが可能な診断薬を意味する。例えば、癌については、そのステージを検査することが可能な診断薬を意味する。

本発明の診断用組成物により診断できることが期待される癌は、ヒトCEACAM5を発現する癌である。ある態様としては、大腸癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌及びこれらが転移した癌が挙げられる。ある態様として、当該癌は大腸癌又は大腸癌が転移した癌である。より好ましくは、当該癌は大腸癌が転移した癌であり、そのような癌には転移性肝癌が含まれる。また、ヒトMUC1を発現する癌である。ある態様としては、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌が挙げられる。ある態様は、当該癌は乳癌又は膀胱癌である。

[0234] 本発明の診断用組成物の製剤化にあたっての本発明の複合体の添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいはFabフラグメントまたは生物分子の結合力価等により異なるが、例えば、患者の単位体重あたりFabフラグメント又は生物分子の質量ベースで0.001mg/kgないし100mg/kg程度を用いればよい。

本発明の診断用組成物の剤型の例としては、注射剤、点滴用剤等の非経口剤を挙げることができ、静脈内注射、標的組織局所への筋肉内注射、皮下注射、膀胱内投与等により投与することができる。また、製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた担体や添加剤を使用することができる。薬学的に許容される担体や添加剤の種類は特に限定されず、

当業者に周知の担体や添加剤を用いることができる。

本発明はまた、癌の早期診断用組成物、病期診断用組成物の製造のための、検出可能な本発明の複合体の使用に関する。本発明は、癌の早期診断、病期診断において使用するための、検出可能な本発明の複合体にも関する。

そして、本発明は、検出可能な本発明の複合体を、対象に投与することを含む癌の診断方法にも関する。ここにおいて、「対象」とは、その診断を受けることを必要とするヒト又はその他の哺乳動物である。ある態様としては、その診断を受けることを必要とするヒトである。本発明の診断方法における検出可能な本発明の複合体の有効量は上記製剤化にあたっての本発明の複合体の有効量と同様の量であってもよい。本発明の診断方法において、検出可能な本発明の複合体は、標的組織局所への筋肉内注射、皮下注射等により投与することが挙げられる。

別の態様において、本発明は、本発明の抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、ペプチドリンカー及び／又は配位子を含む複合体の製造のための、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの使用にも関する。ある態様としては、本発明は、本発明の複合体を含む診断用組成物の製造のための、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの使用にも関する。

また、金属放射性同位元素を含む本発明の診断用組成物が提供される際の態様としては、当該組成物の使用の直前に金属放射性同位元素で標識されてもよく、金属放射性同位元素を含む診断用組成物として提供されてもよい。

[0235] 8. 医薬組成物・治療方法

本発明には、⁹⁰Y又は¹⁷⁷Lu等の金属放射性同位元素を含む1種類以上の本発明の複合体Fabフラグメントの質量ベースで0.001mg/kgないし100mg/kg程度を用いることができる。

本発明の複合体を含む医薬組成物は、癌の治療のために用いることができる。本発明の複合体を含む医薬組成物により治療できることが期待される癌は、ヒトCEACAM5を発現する癌であり、例えば、大腸癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌及びこれらが転移した癌が挙げられる。または、本発明の複合体

を含む医薬組成物により治療できることが期待される癌は、ヒトMUC1を発現する癌であり、例えば、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌が挙げられる。ある態様は、当該癌は乳癌又は膀胱癌である。

本発明には、本発明の複合体を含む、大腸癌又は大腸癌が転移した癌を治療するための医薬組成物が含まれる。また、本発明には、本発明の複合体の治療有効量を投与する工程を包含する、大腸癌又は大腸癌が転移した癌を治療する方法が含まれる。また、本発明には、本発明の複合体の治療有効量を投与する工程を包含する、大腸癌又は大腸癌が転移した癌の癌細胞の細胞死を誘導する方法が含まれる。

癌を治療するための医薬組成物は、癌の診断にも用いることができる。例えば、大腸癌又は大腸癌が転移した癌を治療するための医薬組成物を、当該癌の診断にも用いることもできる。

また、本発明には、大腸癌又は大腸癌が転移した癌の治療に使用するための、本発明の複合体が含まれる。さらに、本発明には、大腸癌又は大腸癌が転移した癌を治療するための医薬組成物の製造のための、本発明の複合体の使用が含まれる。

別の実施形態において、本発明は、本発明の複合体を含む医薬組成物の製造のための、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの使用にも関する。

上記実施形態あるいは態様において、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの代わりに生物分子で行うことが可能である。本発明の複合体は、生物分子に関連した疾患の診断用組成物又は医薬組成物として提供されうる。

本発明について全般的に記載したが、さらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供する。しかし、これらは例示を目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0236] 以下の実施例並びに後記表において、以下の略号を用いる場合がある。

Gd/DOTA : Gdで標識された3 arm DOTA、Gd/4 arm DOTA : Gdで標識された4 arm DOTA、MS : 質量分析、ESI⁺ : m/z値（イオン化法ESI、断りのない場合 [M+H]⁺）、ESI⁻ : m/z値（イオン化法ESI、断りのない場合 [M-H]⁻）、APCI/ESI⁺ : m/z値（イオン化法APCI/ESI、APCI/ESIはAPCIとESIの同時測定を意味する。断りのない場合 [M+H]⁺）、APCI/ESI⁻ : m/z値（イオン化法APCI/ESI、断りのない場合 [M+H]⁻）、Ex-No : 複合体番号、S-No : 製造例番号、Str : 化学構造式、Me : メチル、Et : エチル、tBu : tert-ブチル、1, 3-Ph : 1, 3-フェニレン、1, 4-Ph : 1, 4-フェニレン、diph-Ala : ジフェニルアラニン、及び、naph-Ala : 3-(2-ナフチル) アラニン。

[0237] （実施例1 : 抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメントの作製）

マウス由来の抗ヒトCEACAM5抗体であるT84. 66を文献（Protein Eng. Des. Sel. ; 2004 ; 17 : 481-489）に記載の方法を参考にしてヒト化後、文献（Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics ; 2014 ; 82 : 1624-1635）に準じて構築したヒト化抗体の分子モデルを用いて、標識部を結合させても親和性が減弱しないことが期待される可変領域を有する抗体を設計した。

前記抗体の重鎖可変領域遺伝子の5'側にシグナル配列（Protein Engineering ; 1987 ; 1 : 499-505）をコードする遺伝子を、そして3'側にヒトIgγ1のFab領域遺伝子（配列番号1の塩基番号364から678までの塩基配列からなる）をそれぞれ繋げ、この重鎖フラグメント遺伝子をGSベクターpEE6. 4（Lonza社）に挿入した。また、抗体の軽鎖可変領域遺伝子の5'側にシグナル配列をコードする遺伝子を、そして3'側にヒトIgκの定常領域遺伝子（配列番号3の

塩基番号337から657までの塩基配列からなる)をそれぞれ繋げ、この軽鎖遺伝子をGSベクターpEE12.4(Lonza社)に挿入した。抗体の重鎖フラグメントと軽鎖の遺伝子がそれぞれ挿入された前述のpEEベクターをNotIとPvuIで制限酵素切断し、ライゲーション用キットTAKARA Ligation Kit Ver2.1(Takara社)を用いてライゲーションを行い、重鎖フラグメントと軽鎖の両遺伝子が挿入されたGSベクターを構築した。

[0238] 前述の重鎖フラグメントと軽鎖の両遺伝子が挿入されたGSベクターを用いて、一過性発現及び恒常的発現の2種類の方法で抗体発現を行った。一過性発現については、Expi293 Expression Medium(Thermo Fisher Scientific社)で約300万個/mLに培養されたExpi293F細胞(Thermo Fisher Scientific社)に対し、前述の重鎖フラグメントと軽鎖の両遺伝子が挿入されたGSベクターをExpiFectamine 293 Transfection Kit(Thermo Fisher Scientific社)を用いてトランスフェクトし、5~7日間培養した。培養上清をKappaSelect(GEヘルスケア・ジャパン社)を用いて精製し、Fabフラグメントを得た。恒常的発現については、CHOK1SV細胞(Lonza社)にPvuIで直鎖にした前述の重鎖フラグメントと軽鎖の両遺伝子が挿入されたGSベクターをGene Pulser(Bio-Rad社)を用いたエレクトロポレーション法にてトランスフェクトした。トランスフェクト翌日にメチオニンスルホキシミンを添加し、5~7日間培養した。メチルセルロース含有半固形培地に細胞を播種し、コロニー形成後にClonePix FL(Molecular Devices社)を用いてFabフラグメントの発現量が多い細胞を取得した。当該細胞の培養上清をCapto L(GEヘルスケア・ジャパン社)、Q Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア・ジャパン社)、及び、BioPro S75(ワイエムシ社)を用いて精製し、Fabフラグメントを得

た。

- [0239] 作製した抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント（PB009-01またはFab²と称する。）の重鎖フラグメントをコードする塩基配列を配列番号1に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号2に、PB009-01の軽鎖をコードする塩基配列を配列番号3に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。PB009-01の重鎖可変領域は、配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなり、重鎖のCDR1、CDR2、CDR3は、それぞれ配列番号2のアミノ酸番号31から35、50から66、99から110までのアミノ酸配列からなる。PB009-01の軽鎖可変領域は、配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなり、軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3は、それぞれ配列番号4のアミノ酸番号24から38、54から60、93から101までのアミノ酸配列からなる。

なお、可変領域及びCDR配列はKabat番号付けに従って決定した（Kabatら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5th Ed.、United States Public Health Service、National Institute of Health、Bethesda）。

- [0240]（実施例2：抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント複合体の作製）

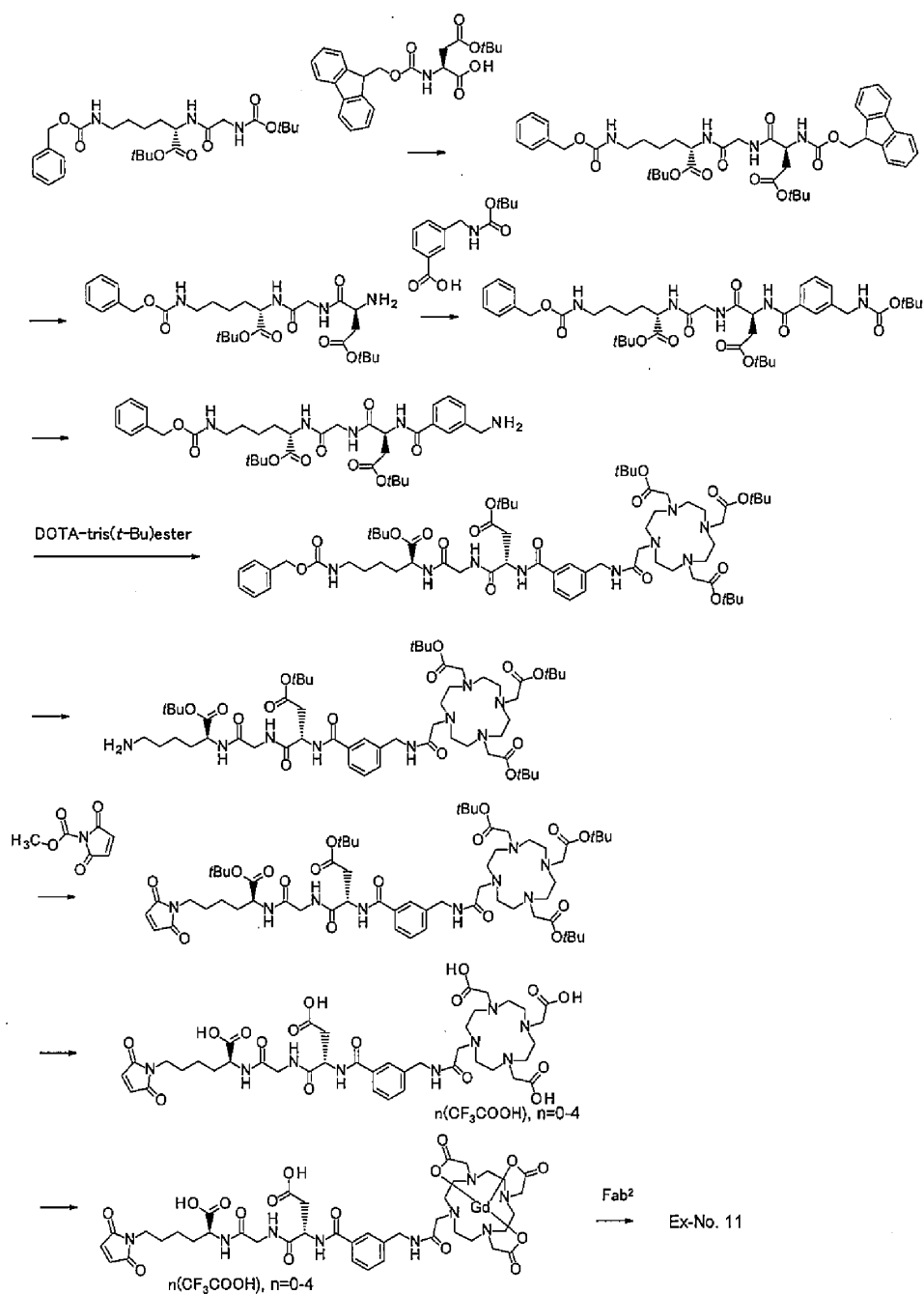
本実施例は複合体の製造実施例を開示する。本実施例中の各製造実施例では「実施例2」にハイフンを介して「複合体の番号」を記載する。例えば、「実施例2-11」は、本実施例における複合体11の製造実施例であることを示す。また、本実施例におけるFab²は実施例1で得られた抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント（PB009-01／Fab²）であり、「p-Fab」はFab²がそのp個のアミノ基を介してp個の[]又は（ ）中に記載の標識部に結合して複合体を形成していることを示す。なお、以下のいくつかの実施例において、MS解析により確認できた各複合体のF

$a b^2$ が結合する標識部 ($Y-S_1-X$) の数を記載しているが、その結果はそれ以外の結合数を有する複合体を含まないことを示すものではない。MS解析機器の精度の関係でその存在を確認できていない結合数の複合体が存在している可能性が残ることは容易に理解されよう。また、本実施例中の構造式において、Gdが結合したDOTAの構造式は、Gdで標識されたDOTAを模式的に示したものである。

(実施例2-11. ($[Gd/DOTA-NH-CH_2-(1, 3-Ph)-C(=O)-Asp-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)]_p-Fab^2$) の合成)

[0241]

[化107]



[0242] (i) O⁴-tert-ブチル-N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] -L- α -アスパルチルグリシル-N⁶- [(ベンジルオ

キシ)カルボニル]ーLーリシン tertーブチルエステルの合成

Nー(tertーブトキシカルボニル)グリシルーN⁶ー[(ベンジルオキシ)カルボニル]ーLーリシン tertーブチルエステル(1.00 g)のジクロロメタン(6 mL)溶液に氷冷下でトリフルオロ酢酸(以下TFAと略称)(3 mL)を加え、同温で2時間攪拌した。減圧濃縮した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮した。この残渣にNー[(9Hーフルオレンー9ーイルメトキシ)カルボニル]ーLーアスパラギン酸水素O⁴ーtertーブチルエステル(920 mg)、ジクロロメタン(10 mL)、ジイソプロピルエチルアミン(以下DIEAと略称)(2 mL)、ヘキサフルオリドリン酸(1ー)1ー(ジメチルアミノ)ーN, Nージメチルー1ー[(3Hー[1, 2, 3]トリアゾロ[4, 5-b]ピリジンー3ーイル)オキシ]メタンイミニウム(以下HATUと略称)(1.2 g)を加え、室温で16時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮することで標題化合物(2.86 g)を得た。MS(ESI+); 809.5 [M+Na]+

[0243] (ii) O⁴ーtertーブチルーLーαーアスパルチルグリシルーN⁶ー[(ベンジルオキシ)カルボニル]ーLーリシン tertーブチルエステルの合成

O⁴ーtertーブチルーNー[(9Hーフルオレンー9ーイルメトキシ)カルボニル]ーLーαーアスパルチルグリシルーN⁶ー[(ベンジルオキシ)カルボニル]ーLーリシン tertーブチルエステル(2.86 g)のテトラヒドロフラン(以下THFと略称)(10 mL)溶液にモルホリン(6 mL)を加え、室温で1時間攪拌した。氷浴下で冷却した後、生じた固体を濾過し、残渣をメタノールで洗浄した。濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→4%メタノール/

クロロホルム)で精製することにより標題化合物(1.04 g)を得た。

MS (ESI+); 565.5

(iii) N-(3-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベンゾイル)-O⁴-tert-ブチル-L-α-アスパルチルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

O⁴-tert-ブチル-L-α-アスパルチルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステル(570 mg)、ジクロロメタン(6 mL)、3-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}安息香酸(305 mg)、DIPEA(520 μL)、HATU(575 mg)の混合物を室温で43時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→80%酢酸エチル/ヘキサン)で精製することにより標題化合物(712 mg)を得た。MS (ESI+); 798.6

[0244] (iv) N-[3-(アミノメチル)ベンゾイル]-O⁴-tert-ブチル-L-α-アスパルチルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-(3-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベンゾイル)-O⁴-tert-ブチル-L-α-アスパルチルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステル(712 mg)のジクロロメタン(2 mL)溶液に氷冷下でTFA(2 mL)を加え、同温にて7時間攪拌した。トリエチルアミン、アミノシリカゲルを加え減圧下濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(アミノシリカゲル, 溶媒勾配; 0→2%メタノール/クロロホルム)で精製することにより標題化合物(495 mg)を得た。MS (ESI+); 698.4

(v) O⁴-tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テ

トラアザシクロドデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル]
 -L- α -アスパルチルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル]
 -L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-[3-(アミノメチル) ベンゾイル]-O⁴-tert-ブチル-L- α -アスパルチルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル]-L-
 リシン tert-ブチルエステル (495 mg)、N, N-ジメチル
 ホルムアミド (以下DMFと略称) (5 mL)、[4, 7, 10-トリス
 (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テト
 ラアザシクロドデカン-1-イル] 酢酸 (以下DOTA-tris (t-B
 u) esterと略称) (446 mg)、DIPEA (400 μ L)、
 HATU (404 mg) の混合物を室温で66時間攪拌した。反応混合物
 を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配
 ; 0 $\rightarrow$ 20%メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物
 (387 mg) を得た。MS (ESI+); 1275.5 [M+Na]
 +

[0245] (vi) O⁴-tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリ
 ス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-
 テトラアザシクロドデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル
]-L- α -アスパルチルグリシル-L-リシン tert-ブチルエステ
 ルの合成

O⁴-tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2
 -tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラア
 ザシクロドデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル]-L-
 α -アスパルチルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル]-L-
 リシン tert-ブチルエステル (387 mg)、10%パラジウム担
 持炭素 (50%含水、65 mg)、エタノール (4 mL) の混合物を水
 素雰囲気下 (1 atm) 室温で5時間攪拌した。セライトを用いてその混
 合物を濾過、濃縮した。残渣に10%パラジウム担持炭素 (50%含水、6

50 mg)、エタノール(8 mL)を加え、この混合物を水素雰囲気下(1 atm)室温で20時間攪拌した。その混合物を、セライトを用いて濾過後、濃縮することにより標題化合物(336 mg)を得た。MS (ESI+); 1140.5 [M+Na] +

(vii) O⁴-tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)ベンゾイル]-L- α -アスパルチルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

O⁴-tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)ベンゾイル]-L- α -アスパルチルグリシル-L-リシン tert-ブチルエステル(336 mg)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(2.5 mL)の混合物に2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸メチルエステル(56 mg)、THF(5 mL)の溶液を氷冷下にて加え、この混合物を同温にて2時間攪拌した。氷冷下、1M水酸化ナトリウム水溶液(60 μ L)を加えた後、室温で1時間攪拌した。酢酸エチル、10%クエン酸水溶液を加えた後、有機層を分離した。水層を10%メタノール/クロロホルムで抽出し、集めた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した。濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→20%メタノール/クロロホルム)で精製することにより標題化合物(341 mg)を得た。MS (ESI+); 1198.5

[0246] (viii) N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)ベンゾイル]-L- α -アスパルチルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノ

ルロイシンの合成

O^4 -tert-ブチル-N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L- α -アスパルチルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシンtert-ブチルエステル (341 mg)、のジクロロメタン (2 mL) 溶液にTFA (2 mL) を加え、室温で5時間攪拌した。減圧濃縮した後、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0→20%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液) で精製することにより標題化合物 (99.6 mg) を得た。MS (ESI+); 918.3

(ix) [N-{3-[(2-{4, 7, 10-トリス [(カルボキシ- κ O) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4N^1 , N^4 , N^7 , N^{10} } アセトアミド- κ O) メチル] ベンゾイル} -L- α -アスパルチルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムの合成

N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L- α -アスパルチルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン (20.0 mg)、水 (2 mL)、塩化ガドリニウム (6 mg) の混合物に炭酸水素ナトリウム水溶液 (0.1 M、800 μ L) を加え、室温で10分間攪拌した。炭酸水素ナトリウム水溶液 (0.1 M、60 μ L) を加え、室温で1時間攪拌した。エチレンジアミン四酢酸 (以下EDTAと略称) 水溶液 (0.5 M、300 μ L) を加え、室温で10分間攪拌した。反応混合物を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0→25%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液) で精製することにより標題化合物

(12.0 mg)を得た。MS (ESI-) ; 1071.4

[0247] (x) 複合体No. 11の合成

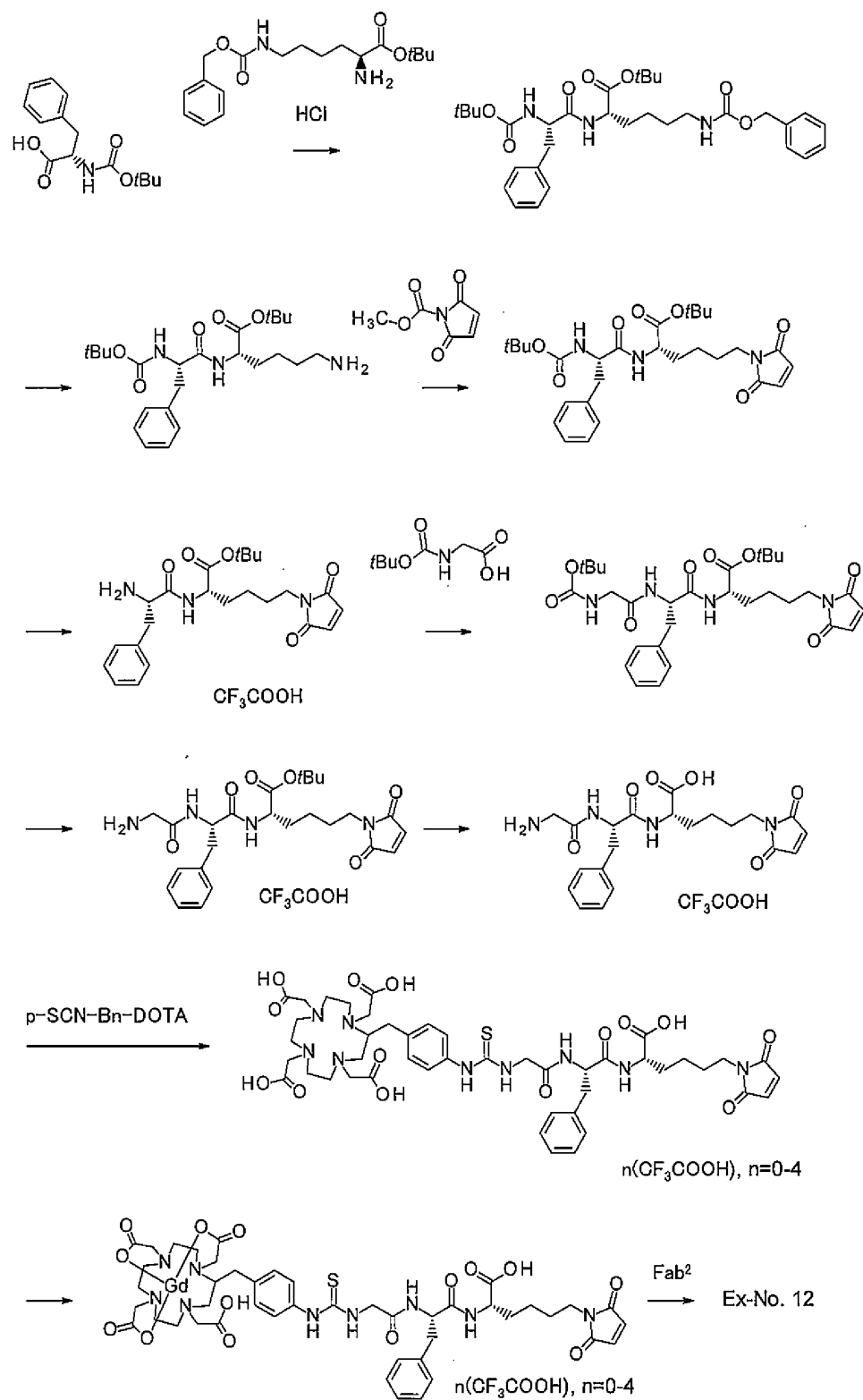
[N- {3- [(2- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシーκO) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} アセトアミド-κO) メチル] ベンゾイル} -L-α-アスパルチルグリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロロール-1-イル) -L-ノロイシナト (3-)] ガドリニウム (1 mg) をDMSO (40 μL) に溶解させた。その溶液40 μLを分注し、0.1 Mホウ酸緩衝液 (40 μL) を加え、pH 6.6になるように0.1 M炭酸ナトリウム水溶液を加えた。

4.45 mg/mL Fa b²のホウ酸緩衝液 (160 μL) に、先に調製した溶液を加え、30℃で2時間インキュベートした。0.05 M EDTA水溶液 (40 μL) を加えた後、30℃で10分間インキュベートした。PD-10 カラムで精製し、アミコンウルトラ-0.5 mL遠心式フィルター (メルクミリポア社) を用いて回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄を7回繰り返し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFa b²の1つに対して、分子量1073の[Gd/DOТА-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Asp-Gly-Lys*-Z₂(#N)] が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-12. ([Gd/4arm-DOТА-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-Gly-Phe-Lys*-Z₂(#N)] p-Fa b²) の合成)

[0248]

[化108]



[0249] (i) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニン (1.5 g) のジクロロメタン (30 ml) 混合液に、N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステル塩酸塩 (2.1 g), Et₃N (2.4 mL) とHATU (2.5 g) を順番に加え、室温で、一晩反応した。

反応混合物を濃縮後、シリカゲルカラム (溶媒勾配; 10→50%酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、標題化合物 (3.16 g) を得た。MS (ESI⁺): 606.4 [M+Na]⁺

(ii) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-L-リシンtert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステル (3150 mg) のエタノール (60 ml)、10%パラジウム担持炭素 (50%含水、1000 mg) の混合物を、水素雰囲気下 (1 atm) 室温で4時間半攪拌した。原料が残存していたため、系内をアルゴン置換後、混合物をセライトろ過し、ろ液を濃縮した。残渣をメタノール (60 ml) に溶かし、10%パラジウム担持炭素 (50%含水、1000 mg) 加えた混合物を、水素雰囲気下 (1 atm) 室温で5時間攪拌した。原料消失を確認後、系内をアルゴン置換し、混合物をセライトろ過し、ろ液を濃縮し、標題化合物 (2520 mg) を得た。MS (ESI⁺): 450.4

[0250] (iii) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-L-リ

シンtert-ブチルエステル (825 mg) の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (6 ml) 懸濁液に、2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸メチルエステル (340 mg) のTHF (12 ml) 溶液を氷冷下、加えた。同温で、2時間攪拌後、1M水酸化ナトリウム水溶液 (0.36 ml) を加え、1時間室温で攪拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈後、10% クエン酸水溶液で酸性にした。有機層を分離し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (溶媒勾配; 0→8% メタノール/クロロホルム) で精製し、標題化合物 (743 mg) を得た。MS (ESI+): 552.4 [M+Na]⁺

(iv) L-フェニルアラニル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステル (325 mg) のジクロロメタン (4 ml) 溶液に、氷冷下、TFA (2 ml) を滴下した。混合物を同温で、1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、標題化合物 (418 mg) の粗生成物を得た。MS (ESI+): 430.4

[0251] (v) N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルの合成

L-フェニルアラニル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩 (415 mg) のジクロロメタン (10 ml) 混合物に、N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシン (118 mg)、トリエチルアミン (以下TEAと略称) (0.26 ml)

、HATU (256 mg) を順に加え、混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を減圧濃縮後、シリカゲルカラム (溶媒勾配; 0→30%アセトン/クロロホルム) で精製し、標題化合物 (206 mg) を得た。MS (ESI+): 609.4 [M+Na]+

[0252] (v i) グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステル(205 mg) を用いて、上記実施例2-12(i v)と同様にして、標題化合物(223 mg)の粗生成物を得た。MS (ESI+): 487.4

(v i i) グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩(9 mg) のジクロロメタン (1 ml) 混合物に、TFA (1 ml) を加え、室温で1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、標題化合物(8 mg)の粗生成物を得た。MS (ESI+): 431.3

[0253] (v i i i) N-[(4-{ [1, 4, 7, 10-テトラキス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-2-イル]メチル}フェニル)カルバモチオイル]グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンの合成

グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンモノ(トリフルオ

ロ酢酸) 塩 (8 mg) と 2, 2', 2'', 2''' - {2 - [(4 - イソチオシアナトフェニル) メチル] - 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - 1, 4, 7, 10 - テトライル} 四酢酸 (p-SCN-Bn-DOTA と略称) (8 mg) の DMF (1 ml) 混合物に、DIPEA (35 μ L) を加え、室温で、1.5 時間攪拌した。混合物を 1% TFA 水溶液 (約 5 ml) で希釈し、逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配 5 - 50% アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液) にて精製し、標題化合物 (13 mg) を得た。MS (ESI+) : 982.3

(ix) ヒドロゲン = [N - { [4 - ({1, 4, 7, 10 - テトラキス [(カルボキシ- κ O) メチル] - 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - 2 - イル - κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ } メチル) フェニル] カルバモチオイル} グリシル - L - フェニルアラニル - 6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - L - ノルロイシナト (4 -)] ガドリナート (1 -) の合成

N - [(4 - { [1, 4, 7, 10 - テトラキス (カルボキシメチル) - 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - 2 - イル] メチル} フェニル) カルバモチオイル] グリシル - L - フェニルアラニル - 6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - L - ノルロイシン (12 mg) を水 (5 ml) で希釈し、塩化ガドリニウム (4 mg) を加えた。0.1 M 炭酸水素ナトリウムで、混合物の pH を 5 - 6 に調節し、室温で、1 時間攪拌した。混合物に 0.5 M EDTA 水溶液 (80 μ L) を加え、室温で 5 分攪拌した。TFA (10 μ L) を加えた後、逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配 5 - 50% アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液) にて精製し、標題化合物 (5 mg) を得た。MS (ESI+) : 1137.0

(x) 複合体 No. 12 の合成

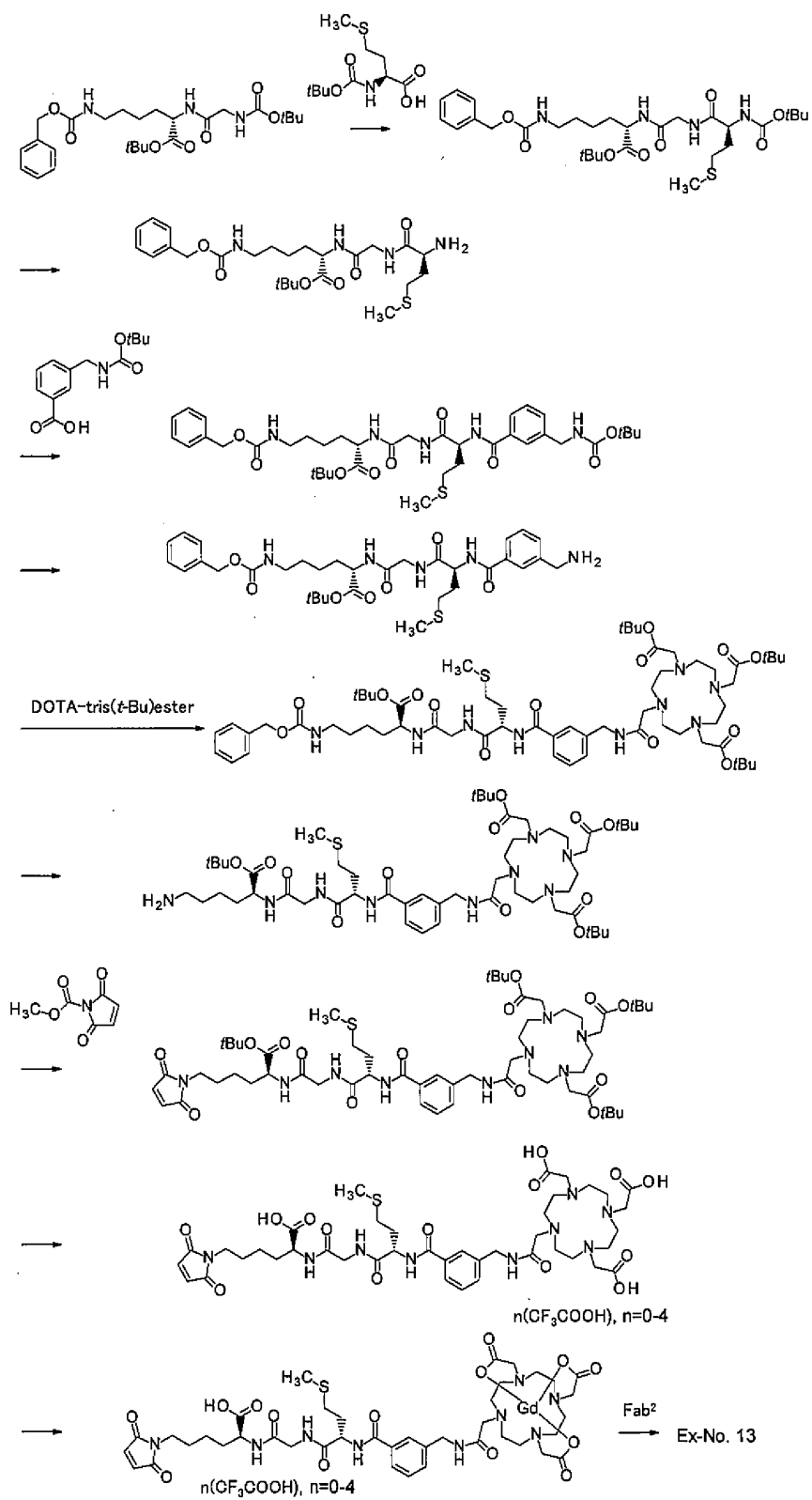
ヒドロゲン = [N - { [4 - ({1, 4, 7, 10 - テトラキス [(カル

ボキシ- κ O)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-2-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}メチル)フェニル]カルバモチオイル}グリシル-L-フェニルアラニル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト(4-)]ガドリナート(1-)を用いて、上記実施例2-11の工程(x)と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1136の[Gd/4arm-DOTA-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-Gly-Phe-Lys*-Z₂(#N)]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-13. ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²)の合成)

[0254]

[化109]



[0255] (i) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステル (1.00 g) のジクロロメタン (6 mL) 溶液に氷冷下で TFA (3 mL) を加え、同温にて 2 時間攪拌した。減圧濃縮した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで 2 回抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮した。この残渣に N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニン (556 mg)、ジクロロメタン (10 mL)、DIPEA (2 mL)、HATU (1.16 g) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を濃縮後、残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで 2 回抽出した。合わせた有機層を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液および飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮することで標題化合物 (1.70 g) を得た。MS (ESI+); 625.5

(ii) L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステル (1.70 g) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に氷冷下で TFA (4 mL) を加え、同温にて 7 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (アミノシリカゲル, 溶媒勾配; 0→4% メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (663 mg) を得た。MS (ESI+); 525.4

[0256] (iii) N-(3-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベンゾイル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)

カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステルの合成

L-メチオニルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステル (663 mg)、ジクロロメタン (6 mL)、3- { [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] メチル} 安息香酸 (480 mg)、DIPEA (700 μL)、HATU (960 mg) の混合物を室温で39時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0→100% 酢酸エチル/ヘキサン) で精製することにより標題化合物 (935 mg) を得た。MS (ESI+); 758.5

(iv) N- [3- (アミノメチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N- (3- { [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] メチル} ベンゾイル) -L-メチオニルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステル (935 mg) のジクロロメタン (2 mL) 溶液に氷冷下でTFA (2 mL) を加え、同温にて1時間攪拌した。Et₃N、アミノシリカゲルを加え減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (アミノシリカゲル, 溶媒勾配; 0→10% メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (260 mg) を得た。MS (ESI+); 658.5

[0257] (v) N- [3- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N- [3- (アミノメチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステル (260 mg) を用いて、上記実施例2-11の工程(v)と同様に

して、標題化合物 (353 mg) を得た。MS (ESI-) : 1210.4

(vi) N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステル (353 mg) を用いて、上記実施例 2-11 の工程 (vi) と同様にして、標題化合物 (245 mg) を得た。MS (ESI+) : 1078.8

[0258] (vii) N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-L-リシン tert-ブチルエステル (245 mg) を用いて、上記実施例 2-11 の工程 (vii) と同様にして、標題化合物 (139 mg) を得た。MS (ESI+) : 1158.8

(viii) N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル] -L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイ

シンの合成

N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル]-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル (341 mg) を用いて、上記実施例 2-11 の工程 (viii) と同様にして、標題化合物 (38.2 mg) を得た。MS (ESI+) : 934.4

(ix) [N-{3-[(2-{4, 7, 10-トリス [(カルボキシ-κO) メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} アセトアミド-κO) メチル] ベンゾイル}-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムの合成

N-[3-({2-[4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) ベンゾイル]-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン (28 mg) を用いて、上記実施例 2-11 の工程 (ix) と同様にして、標題化合物 (13.8 mg) を得た。MS (ESI+) : 1089.2

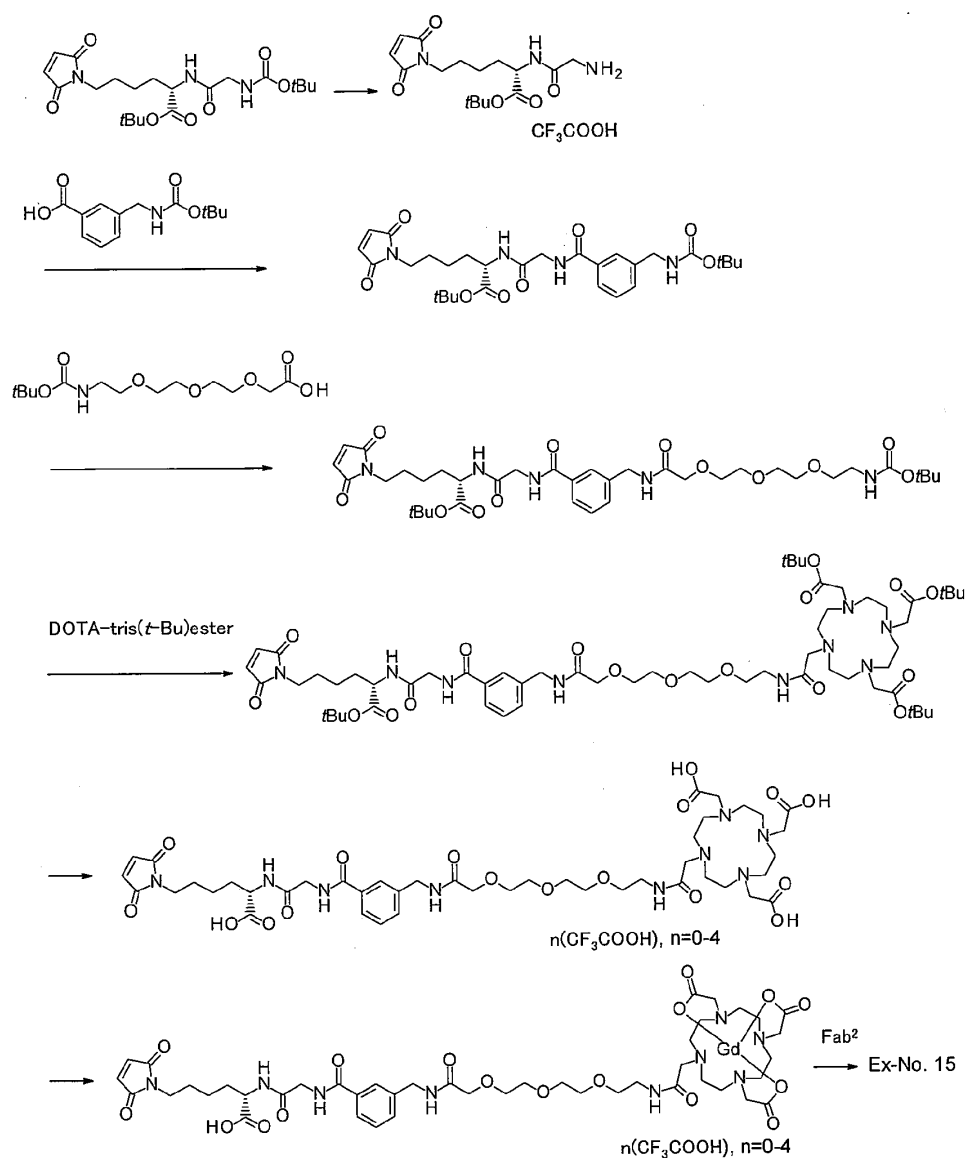
(x) 複合体 No. 13 の合成

[N-{3-[(2-{4, 7, 10-トリス [(カルボキシ-κO) メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} アセトアミド-κO) メチル] ベンゾイル}-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムを用いて、上記実施例 2-11 の工程 (x) と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量 47.9 kDa の Fab² の 1 つに対して、分子量 1089 の [Gd/

DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)] が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-15. ([Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#N)] p-Fab²) の合成)

[0259] [化110]



[0260] (i) グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(*tert*-ブトキシカルボニル)グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステル(400 mg)のジクロロメタン(4 mL)溶液に氷冷下でTFA(4 mL)を加え、氷冷下で1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮することにより標題化合物(642 mg)を得た。MS(ESI+); 340.4

(ii) N-(3-{[(*tert*-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベンゾイル)グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステルの合成

グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩(642 mg)、ジクロロメタン(6 mL)の混合物に氷冷下で3-{[(*tert*-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}安息香酸(228 mg)、DIPEA(1.5 mL)、HATU(345 mg)を加え、この混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→4%メタノール/クロロホルム)で精製することにより標題化合物(489 mg)を得た。MS(ESI+); 573.4

(iii) N-[3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサ-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)ベンゾイル]グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステルの合成

N-(3-{[(*tert*-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベン

ゾイル)グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル(489 mg)、アニソール(280 μ L)、ジクロロメタン(5 mL)の混合物に氷冷下でTFA(2 mL)を加え、同温にて1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、ジクロロメタン(7 mL)を加え、氷冷下で2,2-ジメチル-4-オキソ-3,8,11,14-テトラオキサ-5-アザヘキサデカン-16-酸(289 mg)、DIPEA(1.5 mL)、HATU(487 mg)を加え、この混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配;0 $\rightarrow$ 1%メタノール/クロロホルム)で精製することにより標題化合物(427 mg)を得た。MS(ESI+); 762.5

[0261] (iv) N-(3-{3,15-ジオキソ-16-[4,7,10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5,8,11-トリオキサ-2,14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-[3-(17,17-ジメチル-3,15-ジオキソ-5,8,11,16-テトラオキサ-2,14-ジアザオクタデカン-1-イル)ベンゾイル]グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル(427 mg)、アニソール(200 μ L)、ジクロロメタン(4 mL)の混合物に氷冷下でTFA(1.3 mL)を加え、同温にて1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、DMF(6 mL)を加え、氷冷下でDOTA-*tris*(*t*-Bu)ester(353 mg)、DIPEA(0.96 mL)、HATU(320 mg)を加え、この混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配;0 $\rightarrow$ 10%メタノール/クロロホルム)で精製す

ることにより、標題化合物 (863 mg) を得た。MS (ESI+) :

1238.9 [M+Na]⁺

(v) N-(3-{3,15-ジオキソ-16-[4,7,10-トリス(カルボキシメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5,8,11-トリオキサ-2,14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンの合成

N-(3-{3,15-ジオキソ-16-[4,7,10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5,8,11-トリオキサ-2,14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル (863 mg) を用いて、上記実施例2-11の工程(viii)と同様にして、標題化合物 (40.0 mg) を得た。

MS (ESI+) : 992.5

(vi) [N-{3-[3-オキソ-15-(オキソ-κO)-16-{4,7,10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}-5,8,11-トリオキサ-2,14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル}グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト(3-)]ガドリニウムの合成

N-(3-{3,15-ジオキソ-16-[4,7,10-トリス(カルボキシメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5,8,11-トリオキサ-2,14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン (40 mg) を用いて、上記実施例2-11の工程(ix)と同様にして、標題化合物 (15.9 mg) を得た。MS (ESI-) : 1145.0

(v i i) 複合体No. 15の合成

[0262] [N- {3- [3-オキソ-15- (オキソ- κ O) -16- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシー- κ O) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} -5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル] ベンゾイル} グリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムを用いて、上記実施例2-11の工程(x)と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1147の[Gd/DOXA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#N)] が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-24. ([Gd/DOXA-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)] p-Fab²) の合成)

複合体No. 24の合成(イミノチオラン経由コンジュゲーション)

4.45 mg/mL Fab²のホウ酸緩衝液(160 μ L)に2 mg/mL 2-イミノチオラン(以下、2-ITと略称)の0.1Mホウ酸緩衝液(5 μ L)を加え、37°Cで40分間インキュベートした。過剰の2-ITはアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用い、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄を3回繰り返し、最後に濃縮した。

実施例2-13(ix)で合成した[N- {3- [(2- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシー- κ O) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} アセトアミド- κ O) メチル] ベンゾイル} -L-メチオニルグリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウム(1 mg)をDMSO(40 μ L)に溶解させた。

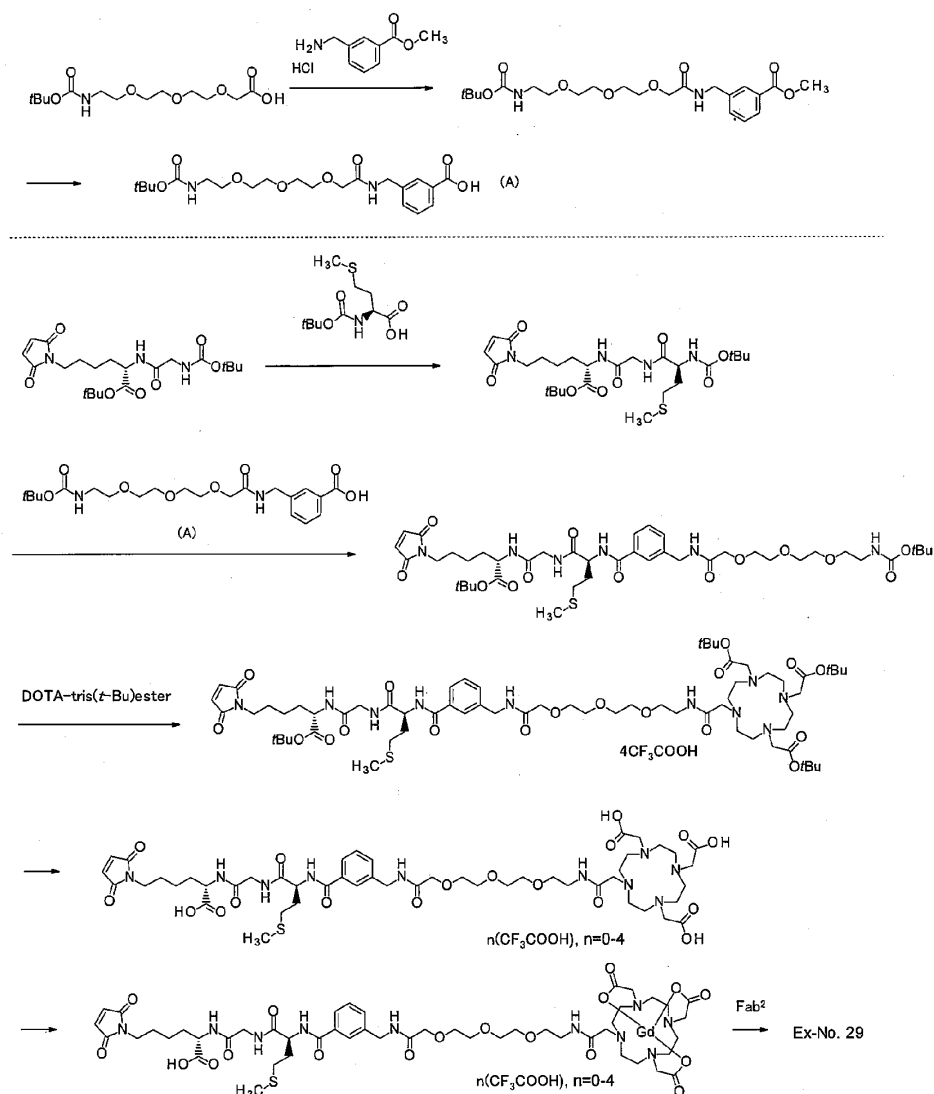
その溶液に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (40 μ L) を加え、pH 6.0 になるように 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液を加えた。

抗体を含む得られた濾液に調製したリンカー溶液を加え、30℃で2時間インキュベートした。EDTA 含有リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) を加えた後、30℃で10分間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で7回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量 47.9 kDa の Fab² の1つに対して、分子量 1190 の [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)] が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例 2-29. ([Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)] p-Fab²) の合成)

[0263]

[化111]



[0264] (i) 3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサー-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)安息香酸メチルエステルの合成

2, 2-ジメチル-4-オキソ-3, 8, 11, 14-テトラオキサー-5-アザヘキサデカン-16-酸 (396 mg) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に 3-(アミノメチル)安息香酸メチルエステル-塩酸塩 (28

6 mg)、HATU (590 mg)、Et₃N (900 μL)を加え、室温にて2時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 2→6%メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (598 mg)を得た。MS (ESI+);

455.2

(ii) 3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサー-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)安息香酸の合成

3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサー-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)安息香酸メチルエステル (597 mg)のTHF (15 mL)溶液に1M水酸化ナトリウム水溶液 (4 mL)及び水 (5 mL)を加え、室温にて5時間攪拌した。反応溶液を水で希釈し、10%クエン酸を加えた後、酢酸エチルで抽出し、集めた有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、濾液を減圧濃縮することで標題化合物 (662 mg)を得た。MS (ESI+); 441.1

(iii) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル (1.63 g)、ジクロロメタン (5 mL)の混合物に氷冷下でTFA (3 mL)を加え、同温にて1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した。N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニン (1.11 g)、ジクロロメタン (8 mL)、HATU (2.12 g)の混合物にDIPEA (5 mL)を加え、室温で5分間攪拌した。この反応混合物に先の反応で得られた残渣のジクロロメタン (4 mL)溶液を加え、室温で20時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、

残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶媒勾配；0→5%メタノール／クロロホルム）で精製することにより標題化合物（1.63 g）を得た。MS（APCI／ESI+）； 571.3

[0265] (iv) N-[3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサ-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)ベンゾイル]-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル（150 mg）、ジクロロメタン（2 mL）の混合物に氷冷下でTFA（2 mL）を加え、同温にて1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した。3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサ-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)安息香酸（120 mg）、ジクロロメタン（3 mL）、HATU（150 mg）の混合物にDIPEA（360 μL）を加え、室温で5分間攪拌した。この反応混合物に先の反応で得られた残渣のジクロロメタン（2 mL）溶液を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶媒勾配；0→5%メタノール／クロロホルム）で精製することにより標題化合物（113 mg）を得た。MS（ESI+）； 893.4

(v) N-(3-{3, 15-ジオキソ-16-[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-[3-(17, 17-ジメチル-3, 15-ジオキソ-5, 8, 11, 16-テトラオキサ-2, 14-ジアザオクタデカン-1-イル)ベンゾイル]-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステル (113 mg) とジクロロメタン (2 mL) の混合物に氷冷下で TFA (2 mL) を加え、同温にて1時間攪拌後、減圧濃縮し、粗生成物を得た。DOTA-*tris* (t-Bu) ester (80 mg) と HATU (80 mg) 及びジメチルアセトアミド (以下DMAcと略称) (1 mL) の混合物に DIPEA (0.22 mL) を室温にて加え10分攪拌した後、先に得られた粗生成物のDMAc (1 mL) 混合物を加え、同温で2時間攪拌した。反応混合物は逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0→50%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液) で精製することにより標題化合物 (178 mg) を得た。MS (ESI-) : 1345.8

(vi) N-(3-{3, 15-ジオキソ-16-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンの合成

N-(3-{3, 15-ジオキソ-16-[4, 7, 10-トリス(2-*tert*-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]-5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル}ベンゾイル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン *tert*-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩 (178 mg) を用いて、上記実施例2-11の工程(viii)と同様にして、標題化合物 (60.0 mg) を得た。MS (APCI/ES

l +) : 1 1 2 3 . 4

[0266] (v i i) [N- {3- [3-オキソ-15- (オキソ-κO) -16- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシ-κO) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} -5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル] ベンゾイル} -L-メチオニルグリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムの合成

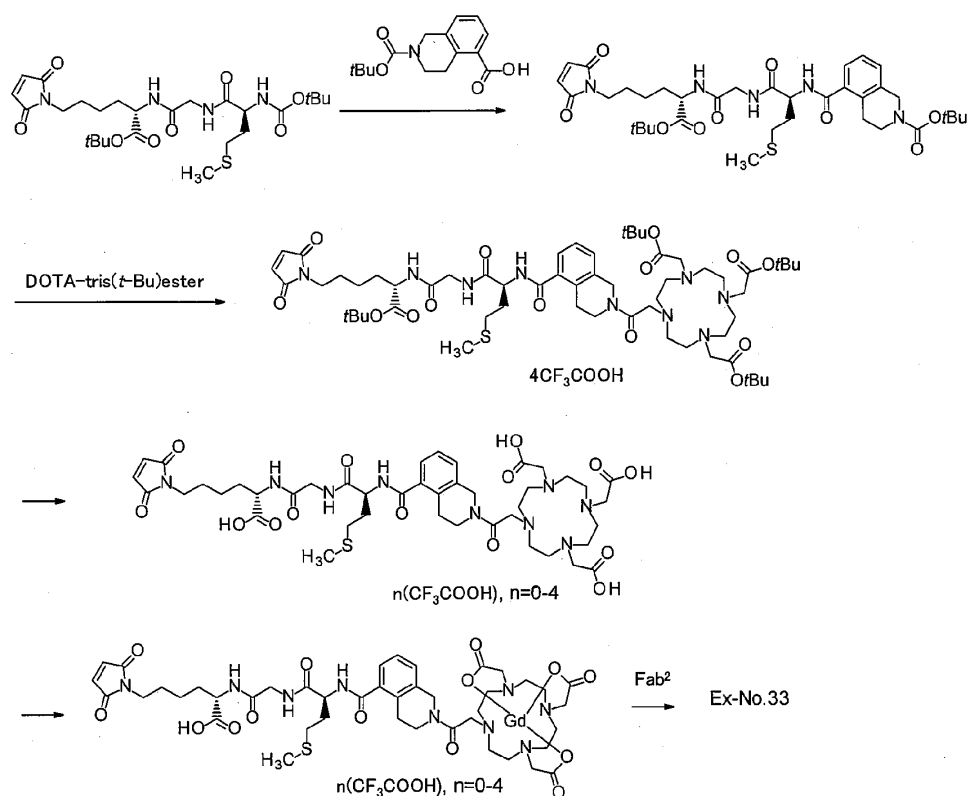
N- (3- {3, 15-ジオキソ-16- [4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] -5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル} ベンゾイル) -L-メチオニルグリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン (40 mg) を用いて、上記実施例2-11の工程 (i x) と同様にして、標題化合物 (10.3 mg) を得た。MS (ESI+) : 1 2 7 8 . 3

(v i i i) 複合体No. 29の合成

[N- {3- [3-オキソ-15- (オキソ-κO) -16- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシ-κO) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} -5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル] ベンゾイル} -L-メチオニルグリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシナト (3-)] ガドリニウムを用いて、上記実施例2-11の工程 (x) と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1278の [Gd/DOTA-NH- (CH₂CH₂O)₃-CH₂-C (=O) -NH-CH₂- (1, 3-Ph) -C (=O) -Met-Gly-Lys*-Z₂ (#N)] が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例 2-33. ([Gd/DOТА-[2, 5-(1, 2, 3, 4-
テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-
Z₂(#N)] p-Fab²) の合成)

[0267] [化112]



[0268] (i) N-[2-(tert-ブトキシカルボニル)-1, 2, 3, 4-
テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-
6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-
L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-
(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-
ノルロイシン tert-ブチルエステル (150 mg)、ジクロロメ
タン (2 mL) の混合物に氷冷下で TFA (2 mL) を加え、同温にて
1 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した。2-(tert-ブトキシカ

ルボニル) - 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボン酸 (88 mg)、ジクロロメタン (2 mL)、HATU (150 mg)、DIPEA (360 μ L) の混合物に、先の反応で得られた残渣のジクロロメタン (2 mL) 溶液を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0 $\rightarrow$ 6%メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (231 mg) を得た。MS (APCI/ESI+); 752.2 [M+Na]⁺

(ii) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-[2-(tert-ブトキシカルボニル)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステル (231 mg) を用いて、上記実施例2-29の工程(v)と同様にして、標題化合物 (222 mg) を得た。MS (ESI-): 1182.7

(iii) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンの合成

N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル

)-L-メチオニルグリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンtert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩(222 mg)を用いて、上記実施例2-11の工程(viii)と同様にして、標題化合物(53 mg)を得た。MS(APCI/ESI+): 960.2

[0269] (iv) {N-[2-({4,7,10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1-イル-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}アセチル-κO)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト(3-)}ガドリニウムの合成

N-(2-{[4,7,10-トリス(カルボキシメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1-イル]アセチル}-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン(22 mg)を用いて、上記実施例2-11の工程(ix)と同様にして、標題化合物(7.0 mg)を得た。MS(ESI+): 1115.3

(v) 複合体No. 33の合成

(iv)の化合物を用いて、上記実施例2-11の工程(x)と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1115の[Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)]が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-35. ([Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]p-Fab²)の合成)

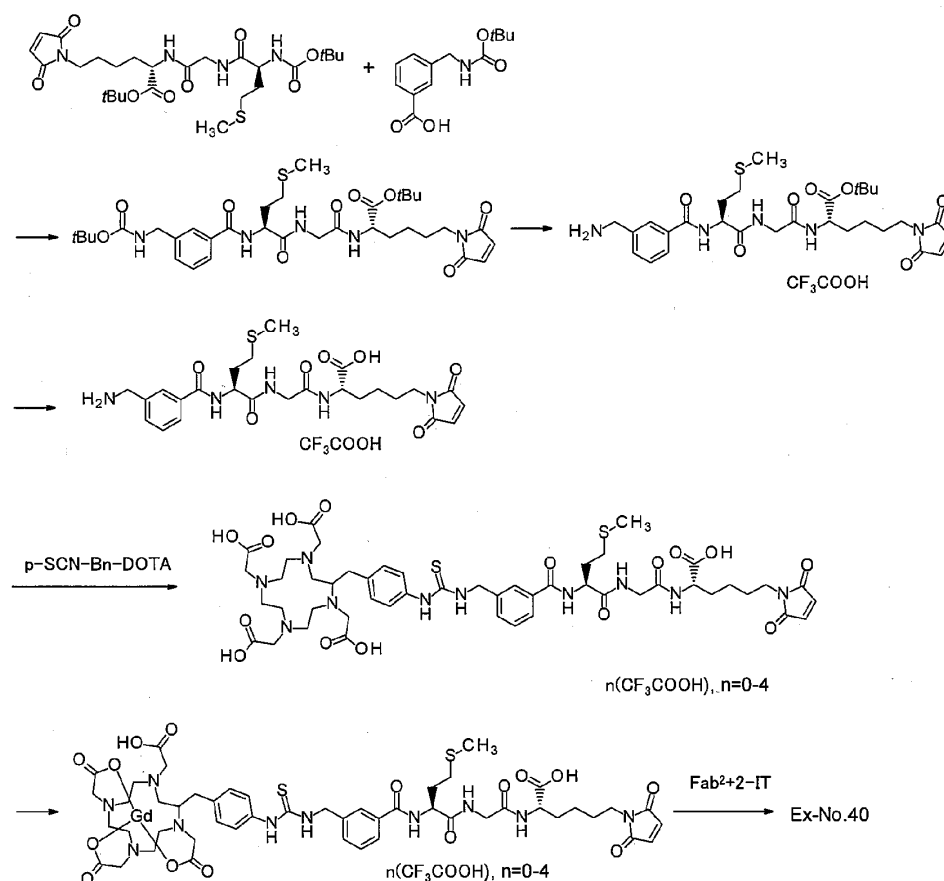
複合体No. 35の合成

実施例2-29(vii)で合成した[N- {3- [3-オキソ-15-(オキソ- κ O)-16- {4, 7, 10-トリス[(カルボキシ- κ O)-メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰]-5, 8, 11-トリオキサ-2, 14-ジアザヘキサデカン-1-イル]ベンゾイル}-L-メチオニルグリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシナト(3-)]ガドリニウムを用いて、上記実施例2-24の工程と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1380の[Gd/DOXA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]が1つ結合した複合体であることをMS解析により確認した。

(実施例2-40. ([Gd/4arm-DOXA-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1, 3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]p-Fab²)の合成)

[0270]

[化113]



[0271] (i) N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}benzoyl)-L-methionylglycyl-6-(2,5-joxiso-2,5-jihidoro-1H-pirol-1-yl)-L-norleucine tert-butyl ester synthesis

N-(tert-butoxycarbonyl)-L-methionylglycyl-6-(2,5-joxiso-2,5-jihidoro-1H-pirol-1-yl)-L-norleucine tert-butyl ester (690 mg) was used, and the same procedure as in Example 2-33 (i) was performed to obtain the title compound (710 mg). MS (ESI+): 726.5 [M+Na]+

(ii) N-[3-(aminomethyl)benzoyl]-L-methionylglycyl-

シルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシン tert－ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N－(3－{[(tert－ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}ベンゾイル)－L－メチオニルグリシルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシン tert－ブチルエステル(41 mg)を用いて、上記実施例2－12(iv)と同様にして、標題化合物(42 mg)の粗生成物を得た。MS(ESI+)：

604.3

(iii) N－[3－(アミノメチル)ベンゾイル]－L－メチオニルグリシルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシンモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N－[3－(アミノメチル)ベンゾイル]－L－メチオニルグリシルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシン tert－ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩(41 mg)のジクロロメタン(4 ml)混合物に、TFA(2 ml)を加え、室温で1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮後、トルエン共沸して粗生成物(43 mg)を得た。そのうち16 mgを逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配；5→50%アセトニトリル／0.1%TFA水溶液)にて精製し、標題化合物(11 mg)を得た。MS(ESI+)：548.2

(iv) N－[3－({[(4－{[1, 4, 7, 10－テトラキス(カルボキシメチル)－1, 4, 7, 10－テトラアザシクロデカン－2－イル]メチル}フェニル)カルバモチオイル]アミノ}メチル)ベンゾイル]－L－メチオニルグリシルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシンの合成

N－[3－(アミノメチル)ベンゾイル]－L－メチオニルグリシルー6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1 H－ピロール－1－イル)－

Ｌ－ノルロイシンモノ（トリフルオロ酢酸）塩（１１ ｍｇ）を用いて、実施例２－１２の工程（v i i i）と同様にして、標題化合物（１７ ｍｇ）を得た。MS（ESI+）： １０９９．５

[0272] (v) ヒドロゲン＝[N－{3－[({ [4－({1, 4, 7, 10－テトラキス[(カルボキシ－ κ O)メチル]－1, 4, 7, 10－テトラアザシクロドデカン－2－イル－ κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ }メチル)フェニル]カルバモチオイル}アミノ)メチル]ベンゾイル}－L－メチオニルグリシル－6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシナト(4－)]ガドリナート(1－)の合成

N－[3－({ [(4－{ [1, 4, 7, 10－テトラキス(カルボキシメチル)－1, 4, 7, 10－テトラアザシクロドデカン－2－イル]メチル}フェニル)カルバモチオイル]アミノ}メチル)ベンゾイル]－L－メチオニルグリシル－6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシン（１６ ｍｇ）を用いて、実施例２－１２の工程（i x）と同様にして、標題化合物（６ ｍｇ）を得た。MS（ESI+）： １２５４．６

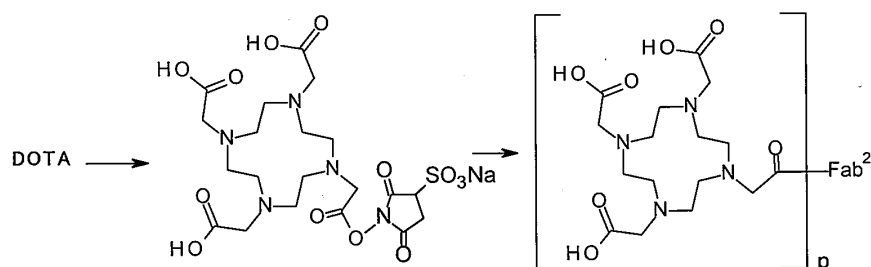
(v i) 複合体No. 40の合成

ヒドロゲン＝[N－{3－[({ [4－({1, 4, 7, 10－テトラキス[(カルボキシ－ κ O)メチル]－1, 4, 7, 10－テトラアザシクロドデカン－2－イル－ κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ }メチル)フェニル]カルバモチオイル}アミノ)メチル]ベンゾイル}－L－メチオニルグリシル－6－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル)－L－ノルロイシナト(4－)]ガドリナート(1－)を用いて、上記実施例２－２４の工程と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量４７．９ kDaのF a b²の１つに対して、分子量１３５５の[G d／4 a r m－D O T A－CH₂－(1, 4－P h)－NH－C(=S)－NH－CH₂－(1, 3－P h)－C(=O)－M e t－G l y－L y s＊－Z₂(#S)]が１つ結合した複合体及び２つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確

認した。

(実施例 2-47 : ([Gd/DOXA] p-Fab²) の合成)

[0273] [化114]

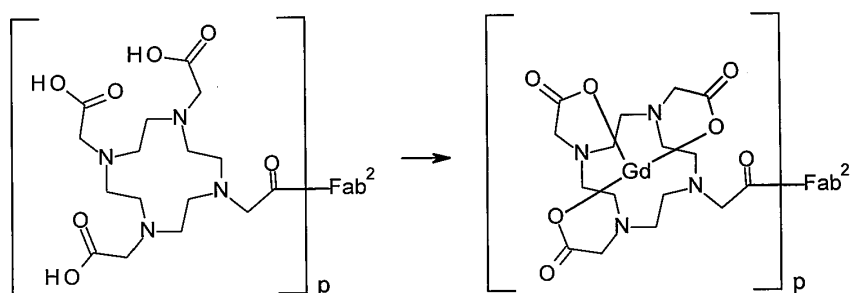


[0274] 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸 (DOXA) (16 mg) および水 (810 μ L) の混合溶液に、氷冷下、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (80 μ L) を加え pH 6 に調製した。得られた溶液 (239 μ L) に、氷冷下、水 (117 μ L) に溶解させた 1-ヒドロキシ-2, 5-ジオキソピロリジン-3-スルホン酸ナトリウム (2.3 mg) を加えた。その後、3- { [(エチルイミノ) メチリデン] アミノ } -N, N-ジメチルプロパン-1-アミン-塩酸塩 (以下 EDC HCl と略称) 水溶液 (8.3 μ L、25 mg/mL) を加え、氷冷下 30 分攪拌し、N-ヒドロキシルホスクシンイミジル DOXA 溶液を調製した。Fab² 添加前に 0.2 M リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH 9) (40 μ L) を加え pH 7 に調製した。

(i) 17.8 mg/mL Fab² (60 μ L) の 0.1 M リン酸水素二ナトリウム水溶液 (390 μ L) に調製した N-ヒドロキシルホスクシンイミジル DOXA 溶液 (200 μ L) を加え、4℃ で 23 時間インキュベートした。過剰のリinker はアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用い 10 mM リン酸緩衝液で洗浄を 3 回繰り返し、0.3 M の酢酸アンモニウム緩衝液で洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。

[0275]

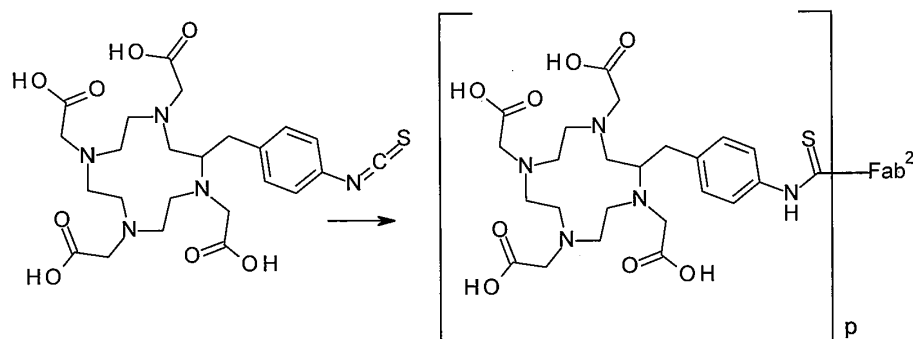
[化115]



[0276] (ii) (i) で作製した複合体を含む 0.3 M の酢酸アンモニウム緩衝液を同様の緩衝液で希釈し、0.25 M Acetate buffer を用いて pH 6.62 に整えた。この 2.8 mg/ml に調製した Fab² 溶液に、0.057 M に調製した GdCl₃ 水溶液 (35 μL) を添加し、37℃ で 0.5 時間インキュベートした。反応後、0.05 M EDTA (525 μL) を加え、その後 PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で 5 回洗浄し、最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量 47.9 kDa の Fab² の 1 つに対して、分子量 542 の [Gd/DO₃A] が 1 つまたは 2 つ結合した複合体の混合物であることを MS 解析により確認した。

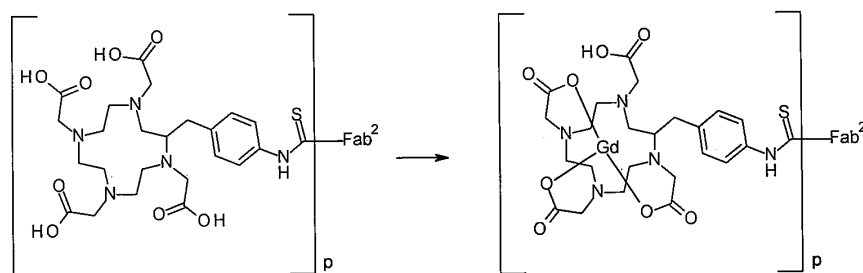
(実施例 2-48: ([Gd/4 arm-DO₃A-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]_p-Fab²) の合成)

[0277] [化116]



[0278] (i) キレート剤であるDOTAのFab²への結合には、p-SCN-Bn-DOTA (Macrocyclics社)を使用した。リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) およびグリセリンにて2.54 mg/mLに調製したFab²溶液に、0.1 M炭酸ナトリウム溶液 (pH 9.0) を添加してpH 8.8-9.5に整えた。これにp-SCN-Bn-DOTAを添加し、37℃で2時間インキュベートした。反応後、アミコンウルトラ-0.5 mL遠心式フィルターで回収し、複合体を精製した。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量553の[4arm-DOTA-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]が1つ又は2つ結合した複合体であることをMS解析により確認した。

[0279] [化117]

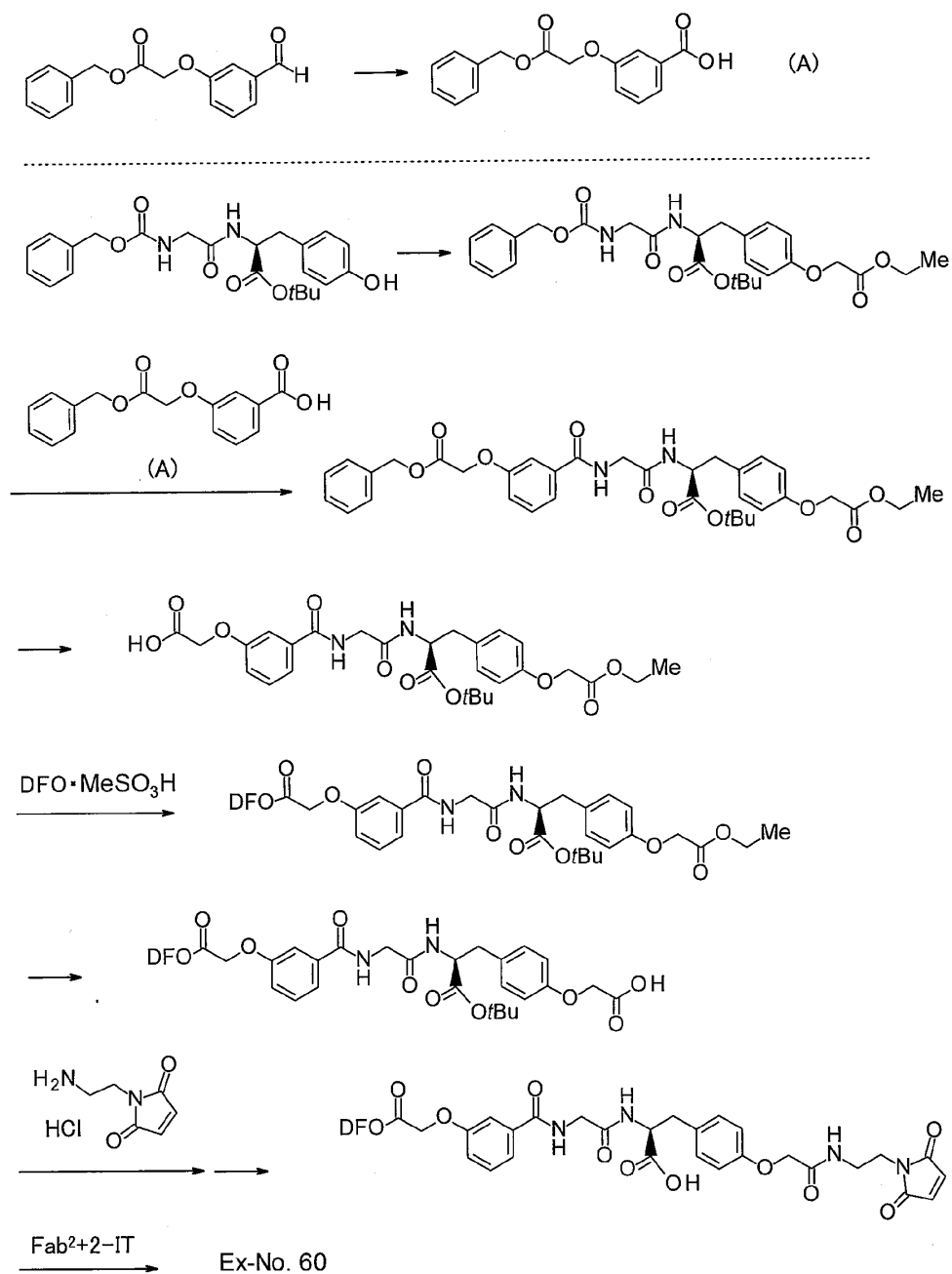


[0280] (ii) (i) で作製した複合体を用いて上記実施例2-47の工程(i)と同様にして複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量706の[Gd/4arm-DOTA-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]が1つ結合した複合体であることをMS解析により確認した。

(実施例2-60: ([DFO-C(=O)-CH₂O-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]_p-Fab²) の合成)

[0281]

[化118]



[0282] (i) 3-[2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエトキシ]安息香酸の合成

(3-ホルミルフェノキシ)酢酸ベンジルエステル(2.90 g)、2

ーメチルプロパン-2-オール (60 mL) および水 (30 mL) の混合物に、室温で2-メチルブタ-2-エン (6 mL)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (3.35 g) および亜塩素酸ナトリウム (3.64 g) を加え、2時間攪拌した。反応液に酢酸エチルと1 M塩酸 (60 mL) を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した。濾液を濃縮することで標題化合物 (2.93 g) を得た。MS (ESI-) ; 285.1
(ii) N-[(ベンジルオキシ)カルボニル]グリシル-O-(2-エトキシ-2-オキソエチル)-L-チロシン tert-ブチルエステルの合成

N-[(ベンジルオキシ)カルボニル]グリシル-L-チロシン tert-ブチルエステル (2.49 g) をアセトン (50 mL) に溶解し、ブromo酢酸エチルエステル (2.05 g)、炭酸カリウム (2.41 g) を加え、室温で4時間攪拌した。不溶物を濾去し、濾液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=30:70-60:40) で精製して、標題化合物 (2.99 g) を得た。MS (ESI+) : 537.4 [M+Na] +

(iii) N-{3-[2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエトキシ]ベンゾイル}グリシル-O-(2-エトキシ-2-オキソエチル)-L-チロシン tert-ブチルエステルの合成

N-[(ベンジルオキシ)カルボニル]グリシル-O-(2-エトキシ-2-オキソエチル)-L-チロシン tert-ブチルエステル (2.75 g) をエタノール (55 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下、10%パラジウム担持炭素 (50%含水、550 mg) を加え、水素雰囲気下 (1 atm) 室温で終夜攪拌した。系内をアルゴン置換後、不溶物を濾去、濾液を濃縮し、残渣をジクロロメタン (55 mL) に溶解し、3-[2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエトキシ]安息香酸 (1.99 g)、HATU (2.84 g)、Et₃N (1.5 mL) を加え、室温で1時間

攪拌した。反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝30：70－70：30）で精製して、標題化合物（3.07 g）を得た。MS（ESI－）： 647.4

[0283] (iv) N－[3－（カルボキシメトキシ）ベンゾイル]グリシル－O－（2－エトキシ－2－オキソエチル）－L－チロシン tert－ブチルエステルの合成

N－{3－[2－（ベンジルオキシ）－2－オキソエトキシ]ベンゾイル}グリシル－O－（2－エトキシ－2－オキソエチル）－L－チロシン tert－ブチルエステル（3282 mg）をTHF（66 mL）に溶解し、アルゴン雰囲気下、10%パラジウム担持炭素（50%含水、328 mg）を加え、水素雰囲気下、室温で終夜攪拌した。反応液をセライト濾過し、濾液を濃縮して、標題化合物（2.54 g）を得た。MS（ESI－）： 557.4

(v) N－{3－[(9,20,31－トリヒドロキシ－2,10,13,21,24,32－ヘキサオキソ－3,9,14,20,25,31－ヘキサアザトリトリアコンタン－1－イル)オキシ]ベンゾイル}グリシル－O－（2－エトキシ－2－オキソエチル）－L－チロシン tert－ブチルエステルの合成

N⁴－{5－[アセチル（ヒドロキシ）アミノ]ペンチル}－N¹－{4－[(5－アミノペンチル)（ヒドロキシ）アミノ]－4－オキソブタンアミド}ペンチル}－N¹－ヒドロキシブタンジアミドモノメタンスルホン酸塩（DFO, MeSO₃H）（500 mg）、N－[3－（カルボキシメトキシ）ベンゾイル]グリシル－O－（2－エトキシ－2－オキソエチル）－L－チロシン tert－ブチルエステル（446 mg）、EDC HCl（175 mg）、1H－ベンゾトリアゾール－1－オール（以下HOBtと略称）（123 mg）にDMF（5 mL）、Et₃N（0.16 mL）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液に0.1%TFA水溶液（1 mL）、TFA（0.03 mL）を加え、逆相カラムクロマトグラフ

ィー（0.1% TFA水溶液：アセトニトリル＝95：5－0：100）にて精製し、標題化合物（548 mg）を得た。MS（ESI－）： 1099.7

(v i) N－{3－[(9, 20, 31－トリヒドロキシ－2, 10, 13, 21, 24, 32－ヘキサオキソ－3, 9, 14, 20, 25, 31－ヘキサアザトリトリアコンタン－1－イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル－O－(カルボキシメチル)－L－チロシン tert－ブチルエステルの合成

N－{3－[(9, 20, 31－トリヒドロキシ－2, 10, 13, 21, 24, 32－ヘキサオキソ－3, 9, 14, 20, 25, 31－ヘキサアザトリトリアコンタン－1－イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル－O－(2－エトキシ－2－オキソエチル)－L－チロシン tert－ブチルエステル（500 mg）にメタノール（5 mL）およびDMF（5 mL）を加え、少し加熱して溶解し、1 M水酸化ナトリウム水溶液（600 μL）を加え、室温で終夜攪拌した。1 M水酸化ナトリウム水溶液（600 μL）を追加して、室温で終夜攪拌した。氷冷下でTFA（90 μL）を加え、減圧下メタノールを留去し、得られた溶液を逆相カラムクロマトグラフィー（0.1% TFA水溶液：アセトニトリル＝95：5－0：100）にて精製することで標題化合物（315 mg）を得た。MS（ESI－）： 1071.6

[0284] (v i i) N－{3－[(9, 20, 31－トリヒドロキシ－2, 10, 13, 21, 24, 32－ヘキサオキソ－3, 9, 14, 20, 25, 31－ヘキサアザトリトリアコンタン－1－イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル－O－(2－{[2－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル) エチル] アミノ}－2－オキソエチル)－L－チロシン tert－ブチルエステルの合成

N－{3－[(9, 20, 31－トリヒドロキシ－2, 10, 13, 21, 24, 32－ヘキサオキソ－3, 9, 14, 20, 25, 31－ヘキサア

ザトリトリアコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル- O -(カルボキシメチル)- L -チロシン *tert*-ブチルエステル (269 mg)、EDC HCl (58 mg)、HOBt (41 mg) の混合物にDMF (4 mL) を加え、更に1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン-塩酸塩 (44 mg)、 Et_3N (35 μ L) を加え、室温で4時間攪拌した。反応液に0.1% TFA水溶液 (1 mL) を加え、逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA水溶液: アセトニトリル=95:5-0:100) で精製して、原料カルボン酸と標題化合物の混合物 (155 mg、約6:4) を得た。これをDMSO (1 mL) およびDMF (2 mL) に溶解させ、EDC HCl (22 mg)、HOBt (15 mg) を加え、室温で5分間攪拌後、1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン-塩酸塩 (15.5 mg)、 Et_3N (12 μ L) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液に0.1% TFA水 (1 mL) を加え、逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA水溶液: アセトニトリル=95:5-10:90) にて精製することで、標題化合物 (118 mg) を得た。MS (ESI-): 1193.6

(viii) N-{3-[(9, 20, 31-トリヒドロキシ-2, 10, 13, 21, 24, 32-ヘキサオキソ-3, 9, 14, 20, 25, 31-ヘキサアザトリトリアコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル- O -(2-{[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] アミノ}-2-オキソエチル)- L -チロシンの合成

N-{3-[(9, 20, 31-トリヒドロキシ-2, 10, 13, 21, 24, 32-ヘキサオキソ-3, 9, 14, 20, 25, 31-ヘキサアザトリトリアコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル- O -(2-{[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] アミノ}-2-オキソエチル)- L -チロシン *tert*

ーブチルエステル (118 mg) を TFA (1.2 mL) に溶解し、室温で 1.5 時間攪拌した。反応液を濃縮し、DMF (1.5 mL)、水 (0.5 mL) を加え、逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA 水溶液 : アセトニトリル = 95 : 5 - 10 : 90) にて精製することで、標題化合物 (82 mg) を得た。MS (ESI-) : 1137.5

[0285] (ix) 複合体 No. 60 の合成

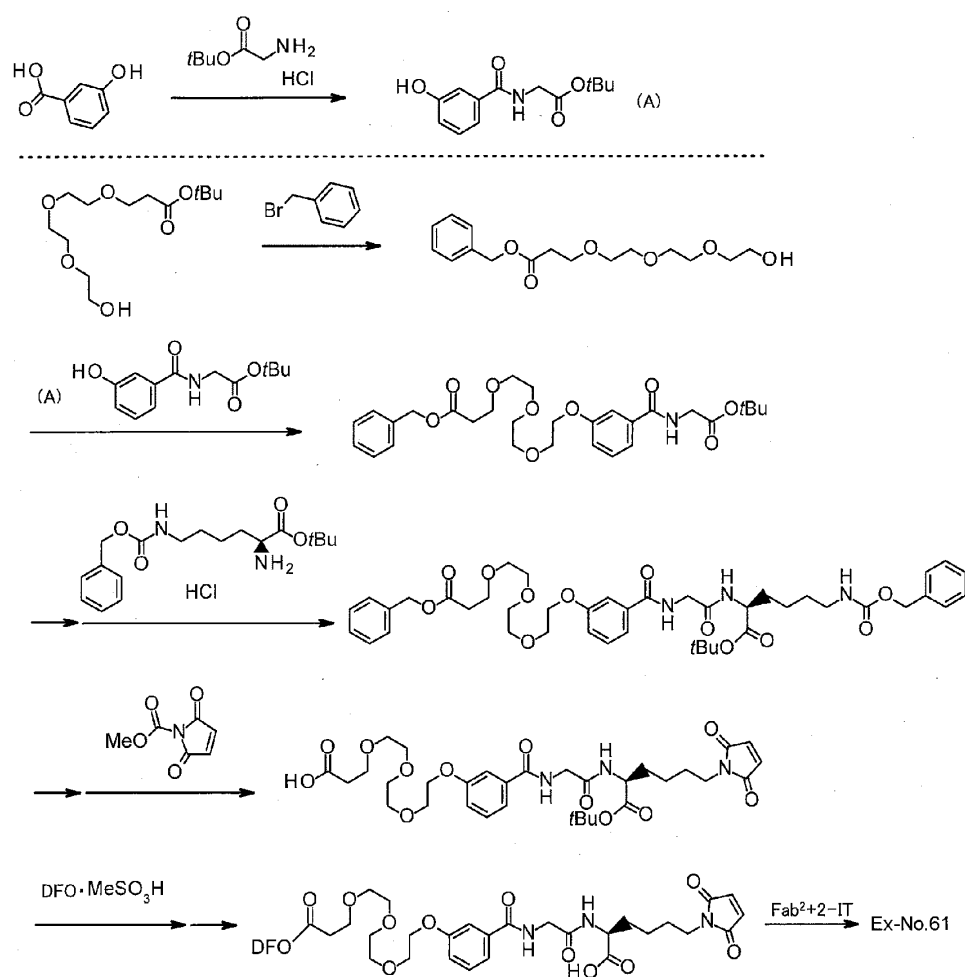
0.1 M ホウ酸緩衝液にて 4.45 mg/mL に調製した Fab² 溶液に 0.1 M ホウ酸緩衝液にて調製した 2-IT 溶液を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。過剰の 2-IT はアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用いて EDTA 含有リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) で洗浄し、最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過した。得られた濾液に、DMF に溶解させた N- {3- [(9, 20, 31-トリヒドロキシー 2, 10, 13, 21, 24, 32-ヘキサオキソ-3, 9, 14, 20, 25, 31-ヘキサアザトリトリアコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-0- (2- { [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] アミノ} -2-オキソエチル) -L-チロシンを加え、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。過剰の試薬はアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用い EDTA 含有リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) で洗浄し、それを 3 回繰り返し、最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過した。

続いて、得られた上澄みに、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) にて 10 mg/mL に調製した 2-ヨードアセトアミド溶液を加えた後、37°C で 30 分間インキュベートした。過剰のヨードアセトアミドはアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用いリン酸緩衝生理食塩水で洗浄を 3 回繰り返し、最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、Fab² が結合した複合体を精製した。当該複合体は、分子量 47.9 kDa の Fab² の 1 つに対して、分子量 1241 の [DFO-C(=O)-CH₂O-(1, 3-

Ph) - C (=O) - Gly-Tyr* - CH₂ - C (=O) - NH - (CH₂)₂ - Z₁ (#S)] が1つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例 2-61: ([D F O - C (= O) - (C H ₂ C H ₂ O) ₄ - (1 , 3 - P h) - C (= O) - G l y - L y s * - Z ₂ (# S)] _p - F a b ²) の合成)

[0286] [化119]



[0287] (i) N-(3-ヒドロキシベンゾイル)グリシン *tert*-ブチルエステル
 テルの合成

3-ヒドロキシ安息香酸 (1.0 g) とグリシンtert-ブチルエ

ステルー塩酸塩 (1.2 g) の DMF (10 mL) 混合物に氷冷下 HATU (3.3 g) および DIPEA (3 mL) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物に水および酢酸エチルを加えて二回分液抽出し、有機層を水及び飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した後、濾液を減圧濃縮し、得られた固体に酢酸エチルを加え室温にて攪拌したのち不溶物を濾取し、ろ液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=95/5-50/50) にて精製し目的物のフラクションを集めて濃縮し、減圧乾燥して、標題化合物 (1.23 g) を得た。MS (ESI+) : 274.2 [M+Na] +

(ii) 3- {2- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エトキシ] エトキシ} プロパン酸 ベンジルエステルの合成

氷冷下 3- {2- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エトキシ] エトキシ} プロパン酸 tert-ブチルエステル (3.0 g) に 4 M 塩化水素/ジオキサン (10 mL) を加えたのち、その混合物を室温にて 1 時間攪拌した。濃縮後、トルエンで 2 度共沸乾燥を行った後、室温にてメタノール (20 mL) と 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (13 mL) を加え、同温で 1 時間半攪拌した。混合物を濃縮した後、THF (10 mL) , メタノール (10 mL) 及び臭化ベンジル (1.8 mL) を加え、室温にて 3 日間攪拌した。混合物を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (ヘキサン/酢酸エチル=95/5-0/100 → クロロホルム/メタノール=90/10) し、標題化合物 (2.19 g) を得た。MS (ESI+) : 313.2

(iii) N- {3- [(3-オキソ-1-フェニル-2, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-14-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシン tert-ブチルエステルの合成

N- (3-ヒドロキシベンゾイル) グリシン tert-ブチルエステル (915 mg) 、 3- {2- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エトキシ]

] エトキシ} プロパン酸ベンジルエステル (1.38 g)、アゾジカルボン酸ジエチル (40%トルエン溶液, 約2.2 M、3.4 mL)、THF (20 mL) を加え、その後室温でトリフェニルホスフィン (2.0 g) を少しずつ加えた後、バス温60℃で終夜攪拌した。塩化マグネシウム (1.5 g) およびトルエン (20 mL) を加え、バス温60℃で2時間加熱攪拌した。室温まで放冷したあと、析出した固体を濾過で除去し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (シリカゲル; ヘキサン/酢酸エチル=95/5-20/80) した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて再度精製 (アミノシリカゲル; ヘキサン/酢酸エチル=95/5-50/50) し、標題化合物 (1.12 g) を得た。MS (ESI+): 546.4

(iv) N- {3- [(3-オキソ-1-フェニル-2, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-14-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシンの合成

室温にてN- {3- [(3-オキソ-1-フェニル-2, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-14-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシン tert-ブチルエステル (1.11 g) を4 M 塩化水素/ジオキサン (5 mL) に溶解させ、同温にて2時間攪拌した。混合物を濃縮し、減圧乾燥して標題化合物 (1.12 g) を得た。MS (ESI+): 490.3

[0288] (v) N- {3- [(3-オキソ-1-フェニル-2, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-14-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N- {3- [(3-オキソ-1-フェニル-2, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-14-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシン (1300 mg)、N⁶- [(ベンジルオキシ) カルボニル] -L-リシン tert-ブチルエステル-塩酸塩 (1.0 g) のDMF (20 mL) 溶液

に氷冷下 HATU (1.2 g) 及び DIPEA (1.4 mL) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。混合物に水および酢酸エチルを加えて分液抽出し、有機層を水及び飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した後、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (アミノシリカゲル; ヘキサン/酢酸エチル = 90/10 - 0/100) し、標題化合物 (1.14 g) を得た。MS (ESI+) : 808.5

(vi) N-[3-(2-{2-[2-(2-カルボキシエトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)ベンゾイル]グリシル-L-リシン tert-ブチルエステルの合成

N-{3-[(3-オキソ-1-フェニル-2,6,9,12-テトラオキサテトラデカン-14-イル)オキシ]ベンゾイル}グリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシン tert-ブチルエステル (1.12 g), Et₃N (20 μL) 及びエタノール (20 mL) の混合物に、10%パラジウム担持炭素 (50%含水、200 mg) を室温で加え、水素雰囲気下、同温にて終夜攪拌した。開放系にして 30 分以上室温攪拌後、反応液をセライト濾過し、濾液を濃縮して、標題化合物 (825 mg) を得た。MS (ESI+) : 584.5

(vii) N-[3-(2-{2-[2-(2-カルボキシエトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)ベンゾイル]グリシル-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N-[3-(2-{2-[2-(2-カルボキシエトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)ベンゾイル]グリシル-L-リシン tert-ブチルエステル (350 mg)、THF (3 mL) 及び DMF (1 mL) の混合物に室温にて 2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸メチルエステル (150 mg) 及び Et₃N (500 μL) を加え、バス温度 60℃にて 4 日間攪拌した。混合物を室温まで冷

却後、TFA (300 μ L) 及び水 (500 μ L) を加えて中和した。その混合物に水とDMFを適量加えて、逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA水溶液 : アセトニトリル = 95 : 5 - 0 : 100) で精製した。目的物のフラクションを集めて濃縮し、減圧乾燥して、標題化合物 (250 mg) を得た。MS (ESI+) : 664.5

[0289] (viii) N- {3- [(19, 30, 41-トリヒドロキシ-12, 20, 23, 31, 34, 42-ヘキサオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-13, 19, 24, 30, 35, 41-ヘキサアザトリテトラコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

N⁴- {5- [アセチル (ヒドロキシ) アミノ] ペンチル} -N¹- (5- {4- [(5-アミノペンチル) (ヒドロキシ) アミノ] -4-オキソブタンアミド} ペンチル) -N¹-ヒドロキシブタンジアミドモノメタンスルホン酸塩 (DFO, MeSO₃H) (240 mg)、N- [3- (2- {2- [2- (2-カルボキシエトキシ) エトキシ] エトキシ} エトキシ) ベンゾイル] グリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン tert-ブチルエステル (243 mg) のDMF (3 mL) 及びDMSO (1 mL) の混合物に氷冷下 EDC HCl (140 mg), HOBt (100 mg) 及びDIPPA (200 μ L) を加え、室温にて3時間攪拌した。TFA (100 μ L) 及び水 (500 μ L) を加え、その溶液を逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA水溶液 : アセトニトリル = 95 : 5 - 10 : 90) で精製し、凍結乾燥して標題化合物 (207 mg) を得た。MS (ESI+) : 1228.5 [M+Na] +

(ix) N- {3- [(19, 30, 41-トリヒドロキシ-12, 20, 23, 31, 34, 42-ヘキサオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-13, 19, 24, 30, 35, 41-ヘキサアザトリテトラコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -L-ノルロイシン tert-ブチルエステルの合成

ル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンの合成

室温にてN-{3-[(19, 30, 41-トリヒドロキシ-12, 20, 23, 31, 34, 42-ヘキサオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-13, 19, 24, 30, 35, 41-ヘキサアザトリテトラコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシン tert-ブチルエステル (202 mg) にTFA (1 mL) を加え、同温にて1時間攪拌した。混合物を濃縮し、DMF (4 mL) 及び水 (500 μ L) を加えた混合物を逆相カラムクロマトグラフィー (0.1% TFA水溶液: アセトニトリル=95:5-10:90) で精製し、凍結乾燥して標題化合物 (137 mg) を得た。MS (ESI-) : 1148.7

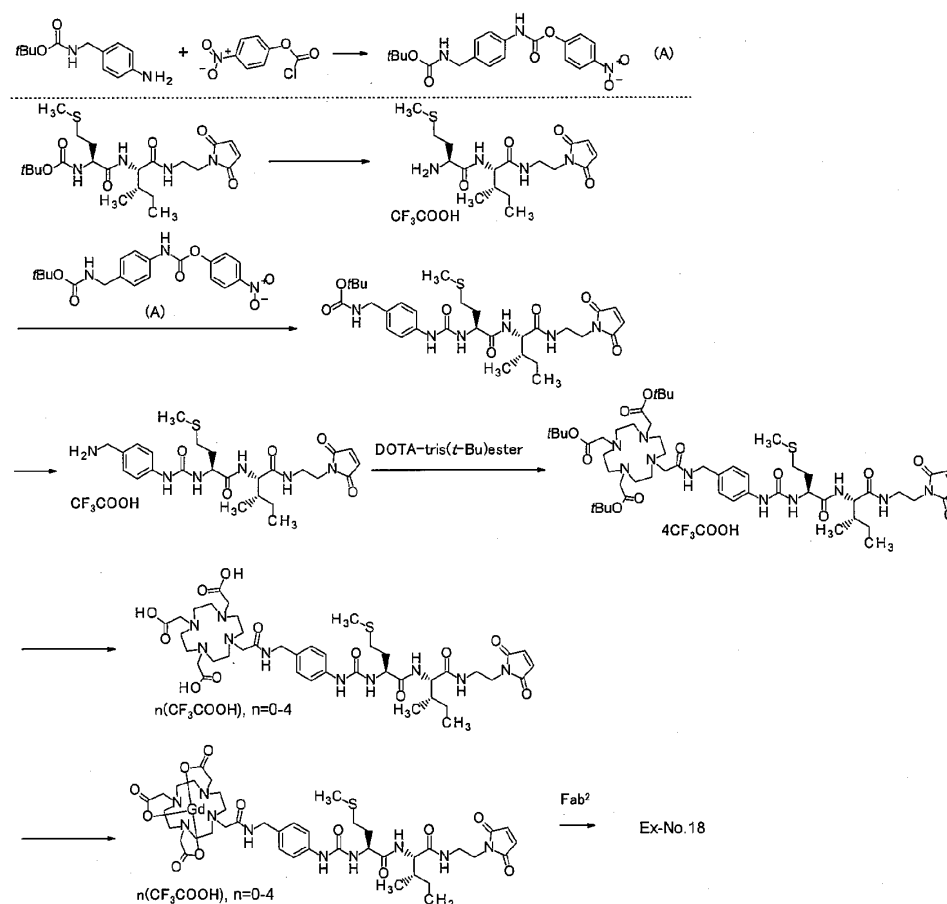
(x) 複合体No. 61の合成

N-{3-[(19, 30, 41-トリヒドロキシ-12, 20, 23, 31, 34, 42-ヘキサオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-13, 19, 24, 30, 35, 41-ヘキサアザトリテトラコンタン-1-イル) オキシ] ベンゾイル} グリシル-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-L-ノルロイシンを用いて、上記実施例2-60の工程 (ix) と同様にして、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1252の[DFOC(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1, 3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#S)] が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-18. ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)] p-Fab²) の合成)

[0290]

[化120]



[0291] (i) (4- { [(*tert*-ブトキシカルボニル) アミノ] メチル} フェニル) カルバミン酸 4-ニトロフェニルエステル の合成

窒素雰囲気下、カルボノクロリド酸 4-ニトロフェニルエステル (952 mg) のジクロロメタン (10 ml) 溶液を氷冷し、[(4-アミノフェニル) メチル] カルバミン酸 *tert*-ブチルエステル (1000 mg) 及びピリジン (430 μ L) のジクロロメタン (10 mL) 混合溶液を滴下した後、同温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 10 $\rightarrow$ 100 %酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、粗生成物を得た。粗生成物に酢酸エチルを加え攪拌して固体を粉碎した。固体をろ取し、酢酸エチルで洗浄後、減

圧乾燥することで標題化合物 (861 mg) を得た。MS (ESI+) : 410.3 [M+Na] +

(ii) L-メチオニル-N'-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミドモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニル-N'-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミド (257 mg) のジクロロメタン (4 ml) 溶液に、氷冷下、TFA (2 ml) を滴下した。混合物を同温で、1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、ジイソプロピルエーテルを加え、デカンテーションを2回行い沈殿した固体を洗浄し、標題化合物 (248 mg) の粗生成物を得た。MS (ESI+) : 385.3

(iii) N-[4-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}フェニル]カルバモイル]-L-メチオニル-N'-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミドの合成

(4-{[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]メチル}フェニル)カルバミン酸4-ニトロフェニルエステル (54 mg) とL-メチオニル-N'-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミドモノ(トリフルオロ酢酸)塩 (70 mg) のジクロロメタン (5 ml) 混合溶液にTEA (59 μL) を加え、室温で30分間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 2→6%メタノール/クロロホルム)で精製し、標題化合物 (55 mg) を得た。MS (ESI+) : 633.5

[0292] (iv) N-{[4-(アミノメチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N'-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミドモノ(トリフルオロ

酢酸) 塩の合成

N- [(4- { [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] メチル} フェニル) カルバモイル] -L-メチオニル-N'- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミド (54 mg) のジクロロメタン (4 ml) 溶液に、氷冷下、TFA (2 ml) を滴下し、同温で1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、ジイソプロピルエーテルを加えデカンテーションを2回行い沈殿した固体を洗浄し、標題化合物 (65 mg) の粗生成物を得た。MS (ESI+) : 555.4 [M+Na] +

(v) N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N'- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミドテトラキス (トリフルオロ酢酸) 塩の合成

N- { [4- (アミノメチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N'- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミドモノ (トリフルオロ酢酸) 塩 (64 mg)、DOTA-tris (t-Bu) ester (50 mg) のDMAc (2 mL) 混合溶液にHATU (66 mg)、DIPEA (45 μL) を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物に1% TFA水溶液 (約4 ml) 及び アセトニトリル (約1 ml) を加えた後、その希釈溶液を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 20→100% 0.1% TFAアセトニトリル/0.1% TFA水溶液) で精製することにより標題化合物 (92 mg) を得た。MS (ESI+) : 1109.4 [M+Na] +

(vi) N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトア

ミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミドテトラキス (トリフルオロ酢酸) 塩の合成
 N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミドテトラキス (トリフルオロ酢酸) 塩 (90 mg) のジクロロメタン (4 mL) 溶液にTFA (4 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。減圧濃縮した後、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 5→50%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液) で精製することにより標題化合物 (57 mg) を得た。MS (ESI+) : 919.4

(vii) [N- ({4- [(2- {4, 7, 10-トリス [(カルボキシ-κO) メチル] -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰] アセトアミド-κO) メチル] フェニル} カルバモイル) -L-メチオニル-N¹- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミダト (3-)] ガドリニウムの合成

N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (カルボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- [2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エチル] -L-イソロイシンアミドテトラキス (トリフルオロ酢酸) 塩 (22 mg)、水 (3 mL) の混合物に塩化ガドリニウム (8 mg) を加え、0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてpH 5-6に調整し、室温で1時間攪拌した。反応混合物にTFA (10 μL) を加えた後、その溶液を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 5→50%アセトニトリル/0.1%

TFA水溶液)で精製することにより標題化合物(16 mg)を得た。MS (ESI-) : 1072.1

[0293] (viii) 複合体No. 18の合成

実施例2-18(vii)で合成した[N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}アセトアミド-κO)メチル}フェニル}カルバモイル)-L-メチオニル-N¹-(2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)-L-イソロイシンアミダト(3-)]ガドリニウム(1 mg)をDMSO(40 μL)に溶解させた。その溶液に0.1 Mホウ酸緩衝液(40 μL)を加え、0.1 M炭酸ナトリウム水溶液及び0.25 M 酢酸緩衝液を用いてpH 7.3に調整した。

4.45 mg/mL Fab²のホウ酸緩衝液(160 μL)に、先に調製した溶液を40 μL加え、30℃で2時間インキュベートした。PD-10カラムを用い精製し、アミコンウルトラ0.5 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で7回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1074の[Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び、3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0294] (実施例2-66. ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 and/or A-5)]p-Fab²)の合成)

(i) 複合体No. 66の合成

実施例2-18(vii)で合成した[N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}アセトアミド-κO

メチル}フェニル}カルバモイル)ーLーメチオニル-N¹-[2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]ーLーイソロイシンアミダト(3-)]ガドリニウム(1 mg)をDMSO(40 μL)に溶解させた。その溶液に0.1 Mホウ酸緩衝液(40 μL)を加え、0.1 M炭酸ナトリウム水溶液を用いてpH 6.5に調整した。

4.45 mg/mL Fab₂のホウ酸緩衝液(320 μL)に、先に調製した溶液を加え、30℃で2時間インキュベートした。0.05 MのEDTAを10 μL加え、30℃で10分間インキュベートした。アミコンウルトラー15 mL遠心式フィルターを用い、リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、溶液を回収した。

回収した溶液に20 mM ビストリスプロパン緩衝溶液(pH 9.5)を加え5倍量に希釈し、5 mL HiTrap Q column(GE Healthcare)に担持させ、室温で6時間静置した。20 mM ビストリスプロパン緩衝溶液(pH 9.5)及び1 M塩化ナトリウム水溶液を用いカラムを洗浄して、担持溶液を回収した。アミコンウルトラー15 mL遠心式フィルターを用いてリン酸緩衝生理食塩水へと緩衝溶液交換を行った後、その溶液をPD-10カラムを用い精製し、アミコンウルトラー15 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1092の[Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 and/or A-5)]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体及び4つ結合した複体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0295] (実施例2-67. ([Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]p-F

a b²) の合成)

(i) 複合体No. 67の合成

実施例2-18(vii)で合成した[N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ }アセトアミド-κO)メチル}フェニル}カルバモイル)-L-メチオニル-N¹-[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミダト(3-)]ガドリニウム(2 mg)をDMSO(80 μL)に溶解させ0.1 Mホウ酸緩衝液(80 μL)を加えた後0.1 M炭酸ナトリウム水溶液を用いてpH7.3に調整した。

4.45 mg/mL Fab²のホウ酸緩衝液(320 μL)に0.1 Mホウ酸緩衝液にて調製した2 mg/mLの2-IT溶液(10 μL)を加え、37℃で40分間インキュベートした。過剰の2-ITはアミコンウルトラ-15 mL遠心式フィルターを用いてリン酸緩衝生理食塩水で洗浄、200 μLまで濃縮した後、先に調整した溶液を加え、30℃で2時間インキュベートした。0.05 MのEDTA(10 μL)を加え、30℃で10分間インキュベートした後、PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。

当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1175の[Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-68. [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)]p-Fab²) の合成)

[0297] (i) $N^1 - (2 - \{[(\text{ベンジルオキシ})\text{カルボニル}]\text{アミノ}\}\text{エチル})$
 $- N^2 - (\text{tert-ブトキシカルボニル}) - \text{L} - \text{イソロイシナムイドの合成}$
 $N - (\text{tert-ブトキシカルボニル}) - \text{L} - \text{イソロイシン} \quad (3.00)$

g) と HATU (5.92 g) のジクロロメタン (30 mL) 混合溶液に DIPEA (6.6 mL), (2-アミノエチル) カルバミン酸ベンジルエステル塩酸塩 (3.29 g) を順に加え、室温で、1 時間攪拌した。反応混合物に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで 2 回抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮した。残渣に酢酸エチル/ジクロロメタン (1:2) 溶液を 200 mL を加えた後、濃縮し 100 mL 溶液とした後、氷冷した。析出した固体をろ取り、酢酸エチル/ジクロロメタン (1:1) 溶液で洗浄して固体を得た。ろ液を再度濃縮後、氷冷し、析出した固体をろ取して酢酸エチル/ジクロロメタン (1:1) 溶液で洗浄し固体を得た。得られた固体を合わせ、減圧乾燥することで標題化合物 (4.10 g) を得た。MS (ESI+): 408.3

(ii) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニル-N¹-(2-{[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミドの合成

N¹-(2-{[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}エチル)-N²-(tert-ブトキシカルボニル)-L-イソロイシンアミド (2.00 g) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に氷冷下で TFA (7.51 mL) を加え、同温で 1 時間攪拌した。減圧濃縮した後、この残渣に N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニン (1.35 g)、DIPEA (4.2 mL)、ジクロロメタン (20 mL) 及び HATU (2.24 g) を加え、室温で 1 時間攪拌した。析出した固体をろ取りジクロロメタン及びメタノールで洗浄後、減圧乾燥することで標題化合物 (1.58 g) を得た。MS (ESI+): 539.4

(iii) L-メチオニル-N¹-(2-{[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミドの合成

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-メチオニル-N¹-(2-{[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミド

ド (1.05 g) のジクロロメタン (6 ml) 溶液に、氷冷下、TFA (3 ml) を滴下した。混合物を同温で、2時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、ジクロロメタン及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、濃縮することで標題化合物 (690 mg) の粗生成物を得た。MS (ESI+) : 439.4

[0298] (iv) N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}phenyl)carbamoyl]-L-methionine-N'-[(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleucine]amideの合成

アルゴン雰囲気下、4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}安息香酸 (395 mg), TEA (660 µL) 及びトルエン (20 mL) の混合溶液にホスホロアジド酸ジフェニルエステル (680 µL) を加え、室温で1時間攪拌後、バス温100℃にて2時間攪拌した。反応溶液を室温まで放冷し、L-methionine-N'-[(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleucine]amide (690 mg) のTHF (7 mL) 溶液を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、炭酸水素ナトリウム水溶液及び酢酸エチルを加え、生じた固体を濾過、酢酸エチルで洗浄後、減圧乾燥することで標題化合物 (790 mg) を得た。MS (ESI+) : 687.5

(v) N-{[4-(aminomethyl)phenyl]carbamoyl}-L-methionine-N'-[(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleucine]amideの合成

N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}phenyl)carbamoyl]-L-methionine-N'-[(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleucine]amide (790 mg) のジクロロメタン (3 ml) 溶液に、氷冷下、TFA (2 m

l) を滴下した。混合物を同温で、1時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。析出した固体を濾取し、水で洗浄後、減圧乾燥することで標題化合物 (720 mg) の粗生成物を得た。

MS (ESI+) : 587.6

(vi) N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- (2- { [(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} エチル) -L-イソロイシンアミドの合成

N- { [4- (アミノメチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- (2- { [(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} エチル) -L-イソロイシンアミド (360 mg)、DOTA-tris (t-Bu) ester (386 mg)、DIP EA (320 μ L) のDMAc (2 mL) 混合溶液にHATU (280 mg) を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配 ; 0 $\rightarrow$ 20%メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (683 mg) を得た。MS (ESI+) ; 1141.9

[0299] (vii) N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- (2-アミノエチル) -L-イソロイシンアミドの合成
N- { [4- ({2- [4, 7, 10-トリス (2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセトアミド} メチル) フェニル] カルバモイル} -L-メチオニル-N¹- (2- { [(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} エチル) -L-イソロイシンアミド (683 mg)、10%パラジウム担持炭素 (50%含水、382 mg) 及びメタノール (10 mL) の混合物を水素雰囲気下 (1 atm) 室温で18時間攪拌した。その混合物を、濾過し不溶

物を除去後、濃縮した。残渣に10%パラジウム担持炭素(50%含水、382 mg)及びメタノール(10 mL)を加え、この混合物を水素雰囲気下(1 atm)室温で2時間攪拌した。その混合物を、濾過し不溶物を除去後、濃縮することにより標題化合物(417 mg)を得た。MS (ESI+); 1007.7

(viii) N-{[4-({2-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N¹-(2-アミノエチル)-L-イソロイシンアミドペンタキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-{[4-({2-[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N¹-(2-アミノエチル)-L-イソロイシンアミド (417 mg)、水(210 µL)、トリ(プロパン-2-イル)シラン (210 µL)及びTFA(8 mL)の混合溶液を、室温で3時間攪拌した。減圧濃縮した後、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→33%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液)で精製することにより標題化合物(255 mg)を得た。MS (ESI+); 839.7

(ix) N-{[4-({2-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N¹-(2-{[4-イソチオシアナトフェニル]カルバモチオイル}アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミドテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成
N-{[4-({2-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N¹-(2-アミノエチル)-L-イソロイシンアミドペンタキス(トリフルオロ酢酸)塩 (255

mg) の DMAc (2 mL) 溶液に氷冷下 TEA (200 μ L) を加え、同温にて 10 分間攪拌した。その溶液に 1, 4-ジイソチオシアナトベンゼン (174 mg) の DMAc (2 mL) 溶液を加え、同温にて 1 時間攪拌した。その反応溶液を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0 $\rightarrow$ 50% アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液) で精製することにより標題化合物 (136 mg) を得た。MS (ESI+); 1031.4

[0300] (x) [N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシー κ O)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰]アセトアミド- κ O)メチル]フェニル}カルバモイル)-L-メチオニル-N¹-(2-{[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミダト(3-)]ガドリニウム]の合成

N-{[4-({2-[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル}-L-メチオニル-N¹-(2-{[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]アミノ}エチル)-L-イソロイシンアミドテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩 (36 mg)、水 (1.8 mL) の混合物に塩化ガドリニウム (10 mg)、0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (1.7 mL) を加え pH 5.4 に調整し、室温で 30 分間攪拌した。反応混合物を逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0 $\rightarrow$ 50% アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液) で精製することにより標題化合物 (33.0 mg) を得た。MS (ESI-); 1184.3

(xi) 複合体 No. 68 の合成

実施例 2-68 (x) で合成した [N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシー κ O)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰]アセトアミド- κ O)メ

チル] フェニル} カルバモイル) -L-メチオニル-N¹- (2- { [(4-
イソチオシアナトフェニル) カルバモチオイル] アミノ} エチル) -L-イ
ソロイシンアミダト (3-)] ガドリニウム (1 mg) をDMSO (3
10 μL) に溶解させた。

4.45 mg/mL Fab²のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (320 μL) に、先に調製した溶液を30 μL加え、0.1 M炭酸ナトリウム水溶液を用いて約pH 9.0に調整し、37℃で24時間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1187の[Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例2-69. ([Gd/DOTA-[2, 5-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)] p-Fab²) の合成)

[0301]

ルボン酸 (160 mg) のジクロロメタン (10 mL) 混合溶液に T E A (0.24 mL) 及び H A T U (241 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒勾配; 0→4%メタノール/クロロホルム) で精製することにより標題化合物 (191 mg) を得た。MS (ESI+); 784.4

(ii) N-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩の合成
N-[2-(tert-ブトキシカルボニル)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステル (190 mg) のジクロロメタン (3 mL) 溶液に、氷冷下、T F A (1 mL) を滴下した。混合物を同温で、1 時間攪拌した後、減圧濃縮することで標題化合物 (262 mg) の粗生成物を得た。MS (ESI+): 684.5

(iii) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

D O T A-t r i s (t -B u) e s t e r (138 mg) のDMAc (1 mL) 溶液にH A T U (184 mg) およびD I P E A (124 μL) を加え、室温で5分攪拌した。その反応溶液にN-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステルモノ(トリフルオロ酢酸)塩 (261 mg) のDMAc (

1 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物を1% TFA 水溶液(約1 mL)で希釈後、その溶液を逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 20→100%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液)で精製することにより標題化合物(231 mg)を得た。MS (ESI+);

1260.7 [M+Na]⁺

[0303] (iv) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-L-リシンtert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(ベンジルオキシ)カルボニル]-L-リシンtert-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩 (230 mg)、10%パラジウム担持炭素(50%含水、300 mg)、メタノール(10 mL)の混合物を室温で10分間攪拌した。その混合物を濾過し不溶物を除去した後、ろ液を濃縮した。その残渣に10%パラジウム担持炭素(50%含水、300 mg)、メタノール(10 mL)を加えた後、水素雰囲気下(3 atm)室温で18時間攪拌した。その混合物を濾過し不溶物を除去した後、濃縮することにより標題化合物(152 mg)を得た。MS (ESI+); 1104.5

(v) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-L-リシンペンタキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(2-{[4, 7, 10-トリス(2-tert-ブトキシ-2-オキソエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]ア

セチル} - 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル) - L-メチオニルグリシル-L-リシン *tert*-ブチルエステルテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩 (152 mg) のジクロロメタン (1 mL) 溶液に TFA (1.5 mL) を加え、室温で4時間攪拌した。減圧濃縮した後、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→33%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液)で精製することにより標題化合物 (76 mg) を得た。MS (ESI+); 880.4

(v i) N-(2-{[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]-L-リシンテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩の合成

N-(2-{[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル]アセチル}-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル)-L-メチオニルグリシル-L-リシンペンタキス(トリフルオロ酢酸)塩 (76 mg), 1, 4-ジイソチオシアナトベンゼン (50 mg) のDMAc (1 mL) 溶液に氷冷下TEA (60 μL) を加え、同温にて1時間攪拌した。その反応溶液を逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→50%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液)で精製することにより標題化合物 (46 mg) を得た。MS (ESI-); 1070.6

(v i i) {N-[2-({4, 7, 10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}アセチル-κO)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]-L-リシナト(3-)}ガドリニウムの合成

N-(2-{[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7,

10-テトラアザシクロデカン-1-イル] アセチル} -1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル) -L-メチオニルグリシル-N⁶-[(4-イソチオシアナトフェニル) カルバモチオイル] -L-リシンテトラキス(トリフルオロ酢酸) 塩 (16 mg)、水(800 μL)の混合物に塩化ガドリニウム(8 mg)、0.1 M炭酸水素ナトリウム水溶液(700 μL)を加え、室温で30分間攪拌した。反応混合物を逆相カラムクロマトグラフィー(溶媒勾配; 0→40%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液)で精製することにより標題化合物(7.4 mg)を得た。MS (ESI-); 1225.3

[0304] (v i i i) 複合体No. 69の合成

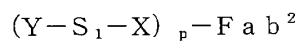
実施例2-69(v i i)で合成した{N-[2-({4, 7, 10-トリス[(カルボキシ-κO)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル-κ⁴N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰}アセチル-κO)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル]-L-メチオニルグリシル-N⁶-[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]-L-リシナト(3-)}ガドリニウム(1 mg)をDMSO(310 μL)に溶解させた。

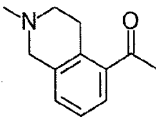
4.45 mg/mL Fab²のリン酸緩衝生理食塩水溶液(320 μL)に、先に調製した溶液を30 μL加え、0.1 M炭酸ナトリウム水溶液を用いて約pH 9.0に調整し、37℃で24時間インキュベートした。PD-10カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.9 kDaのFab²の1つに対して、分子量1228の[Gd/DOXA-[2, 5-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体、4つ結合した複合体及び5つ結合した複合体の混合物

であることをMS解析により確認した。

上記製造実施例で得られた複合体を表1～2に示す。

[0305] [表1]

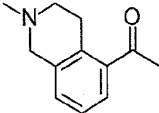


Ex-No	Y	S ₁	X
11	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Asp-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
12	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	-Gly-Phe-Lys*-Z ₂ (#N)-
13	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
15	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
18	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
24	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
29	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
33	Gd/DOTA		-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
35	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
40	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
47	Gd/DOTA	—	—

[0306]

[表2]

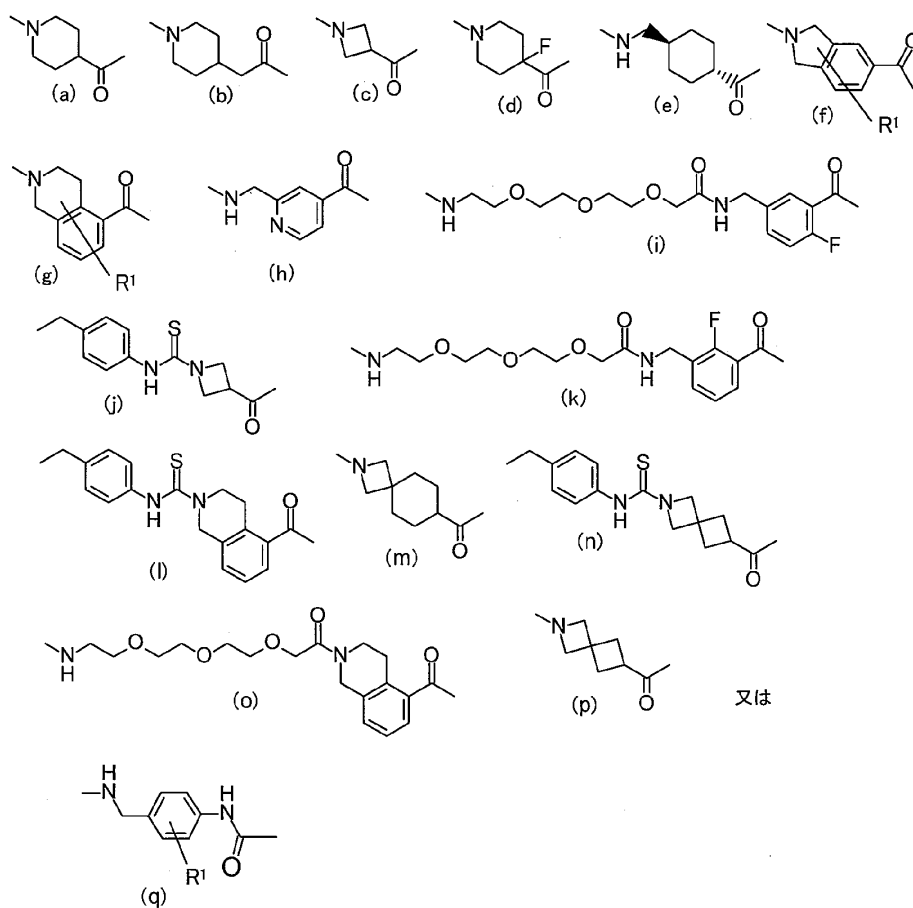
$(Y-S_1-X)_p-Fab^2$

Ex-No	Y	S ₁	X
48	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	—
60	DFO	-C(=O)-CH ₂ O-(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
61	DFO	-C(=O)-(CH ₂ CH ₂ O) ₄ -(1, 3-Ph)-C(=O)- —	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
66	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -(A-4 and/or A-5)-
67	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
68	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -(A-3)-
69	Gd/DOTA		-Met-Gly-Lys*-Z ₃ -

[0307] なお、前記表並びに後記表 15～18 において、—は結合を表わし、S₁欄の記号 (a)～(q) はそれぞれ下記の式 (a)～(q) で示されるスペーサーを表す。

[0308]

[化123]

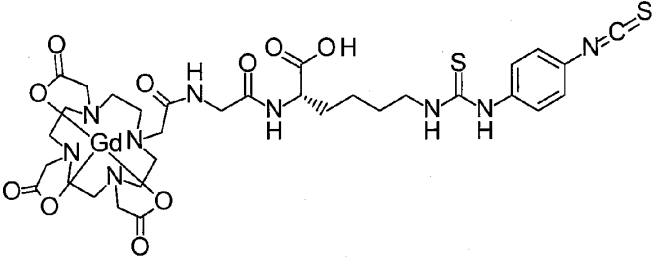
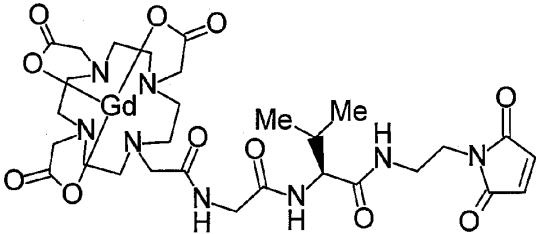
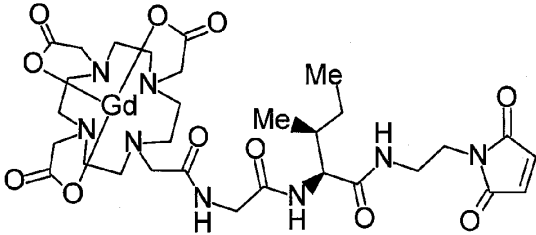
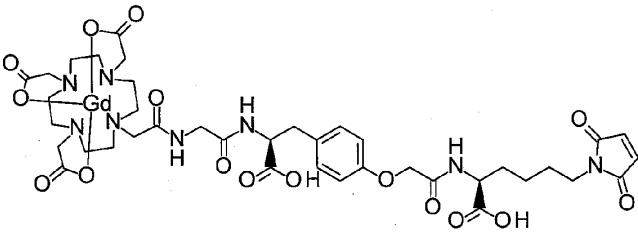


X

[0309] 上記製造実施例と同様の方法、又は当業者に公知の方法を用いて、表3～14の製造例番号 A1～A43及びB1～B4の化合物を合成し、これらを用いて後記表15～18に示す複合体を得た。

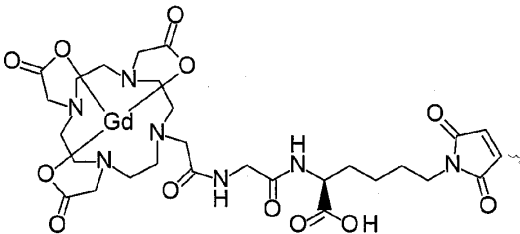
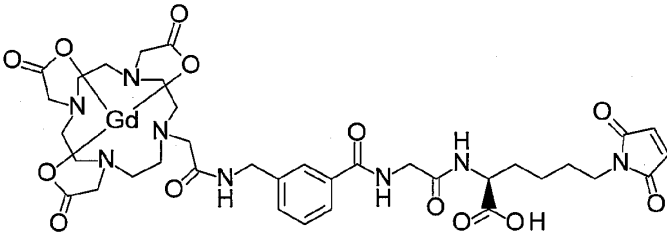
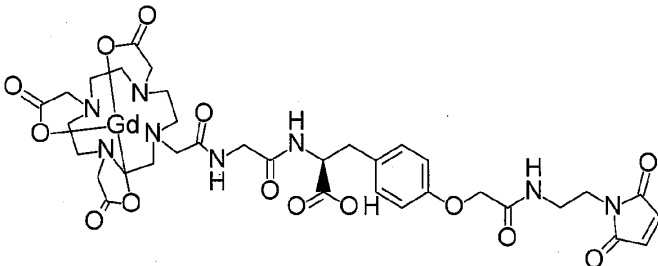
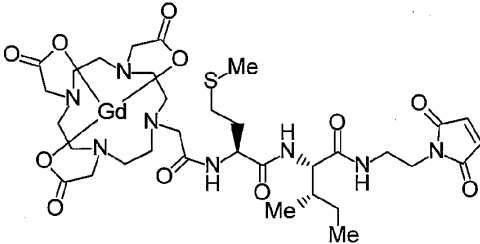
[0310]

[表3]

SNo	Str	MS
A1		ESI+; 937.8
A2		ESI+; 838.4
A3		ESI+; 852.4
A4		ESI+; 1046.1

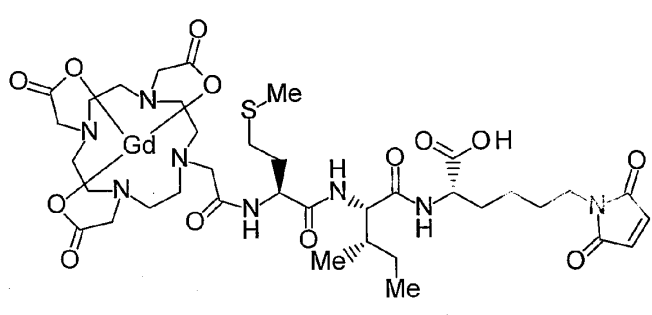
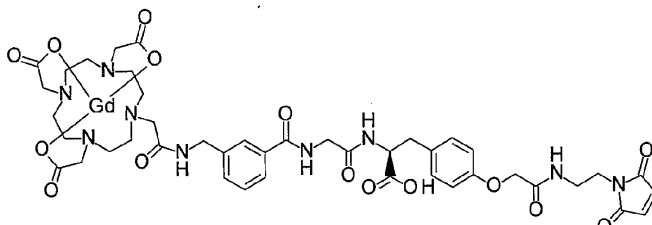
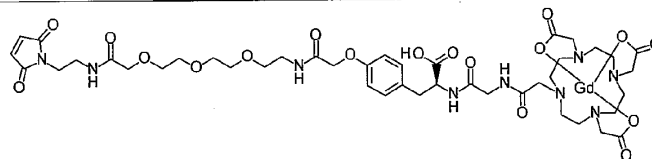
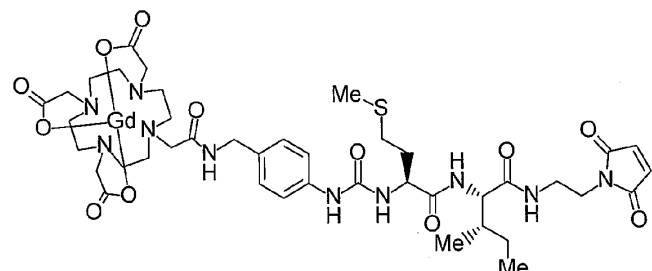
[0311]

[表4]

SNo	Str	MS
A5		ESI+; 825.1
A6		ESI+; 958.4
A7		ESI+; 959.8
A8		ESI+; 926.2

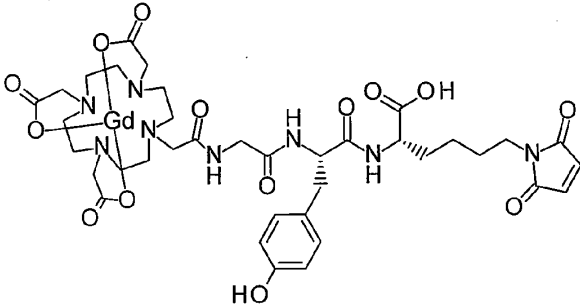
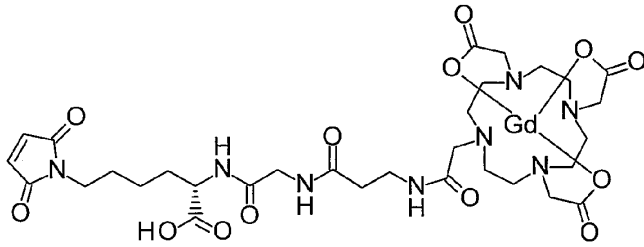
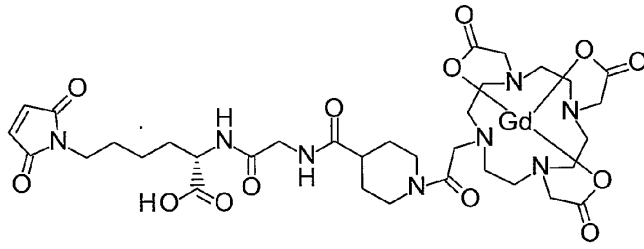
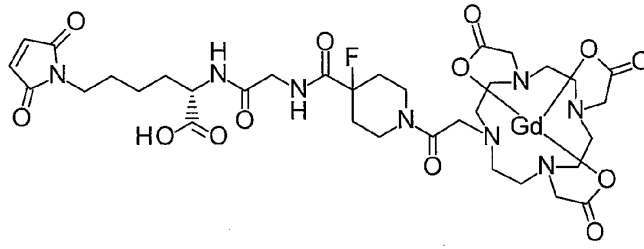
[0312]

[表5]

SNo	Str	MS
A9		ESI-; 1010.2
A10		ESI-; 1090.7
A11		APCI/ESI+; 1149.9
A12		ESI-; 1072.1

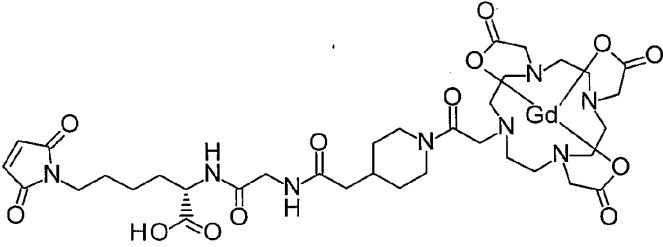
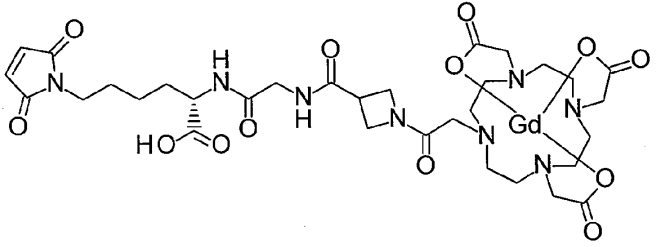
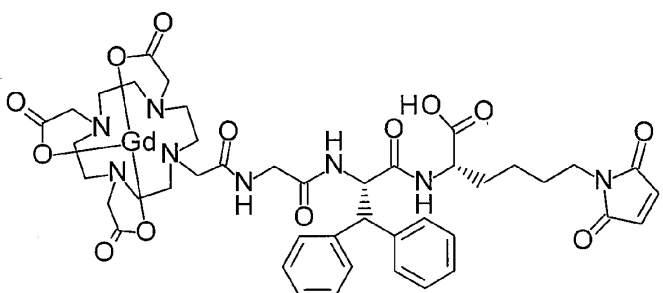
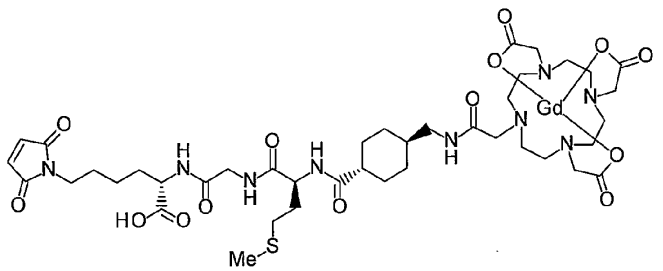
[0313]

[表6]

SNo	Str	MS
A13		ESI+; 988.4
A14		ESI+; 896.1
A15		ESI+; 936.3
A16		ESI+; 954.3

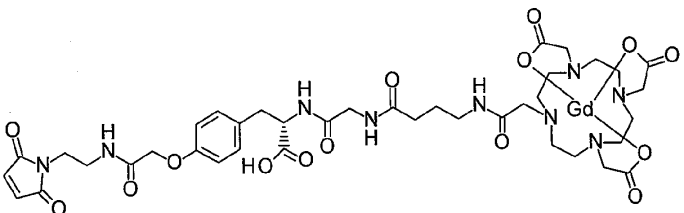
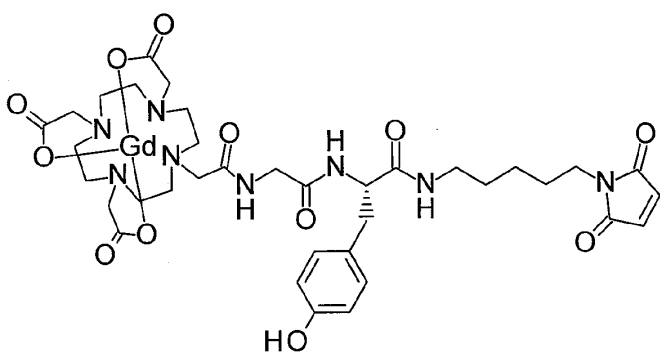
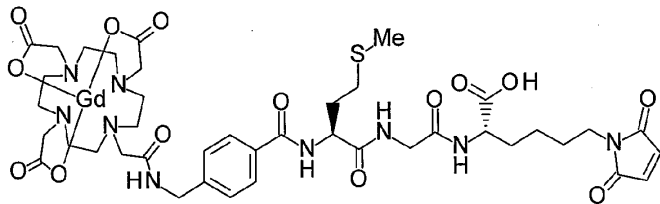
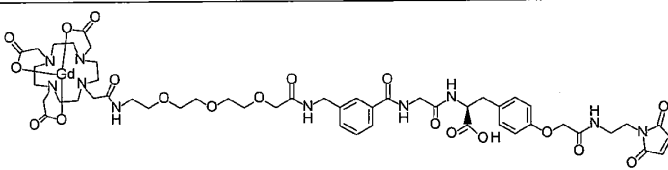
[0314]

[表7]

SNo	Str	MS
A17		ESI+; 950.3
A18		ESI+; 908.2
A19		ESI+; 1048.4
A20		ESI+; 1095.3

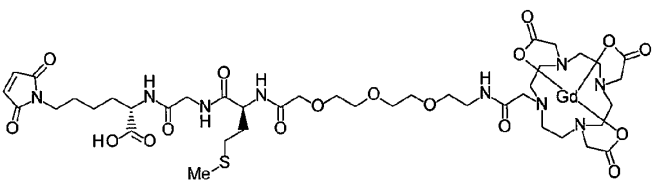
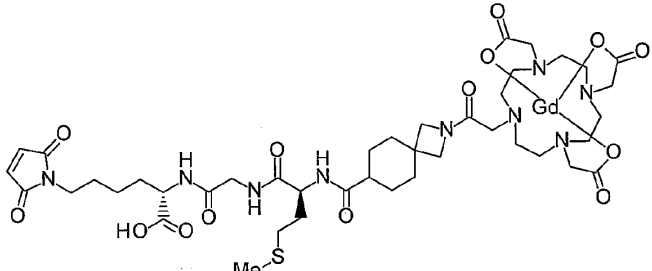
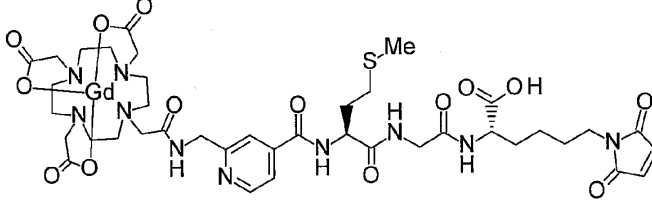
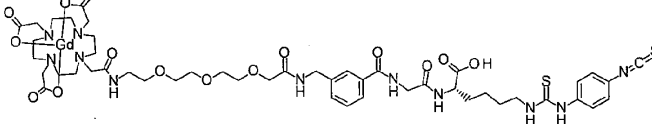
[0315]

[表8]

SNo	Str	MS
A21		APCI/ESI+; 1045.1
A22		ESI+; 944.2
A23		ESI+; 1089.1
A24		ESI-; 1280 .4

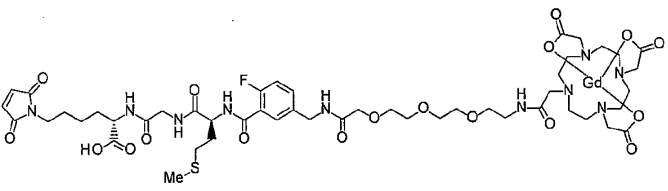
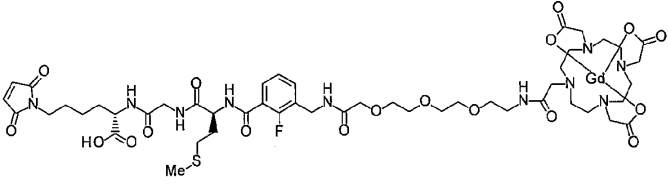
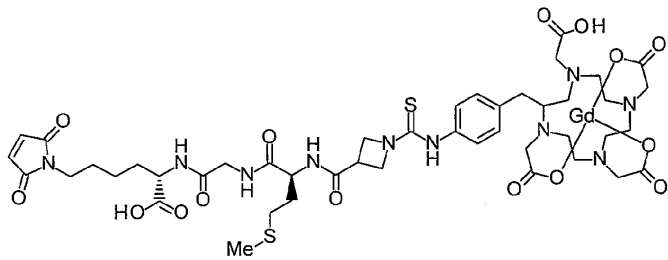
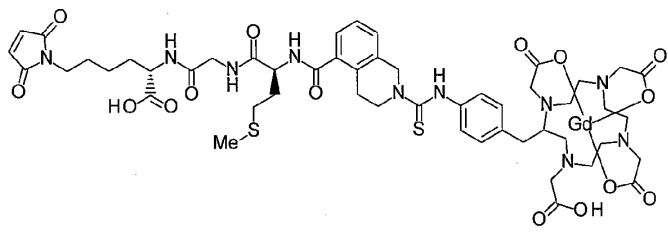
[0316]

[表9]

SNo	Str	MS
A25		ESI-; 1143 .5
A26		ESI+; 1107.3
A27		ESI+; 1090.4
A28		ESI+; 1259.5

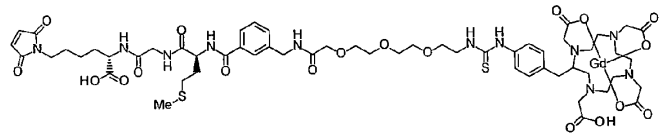
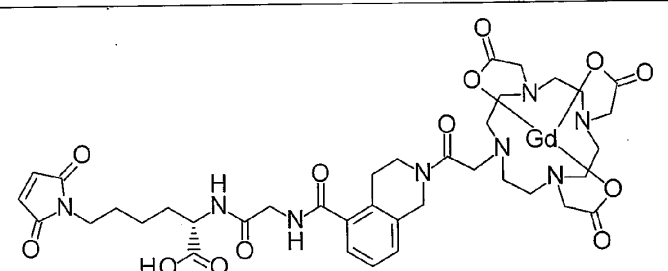
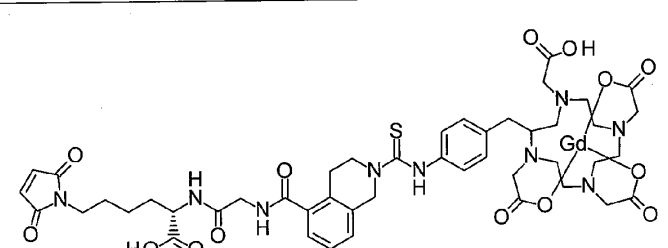
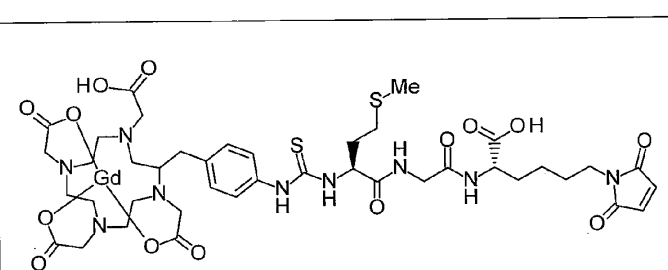
[0317]

[表10]

SNo	Str	MS
A29		ESI+; 1296.5
A30		ESI-; 1294.2
A31		ESI-; 1201.6
A32		ESI-; 1277.7

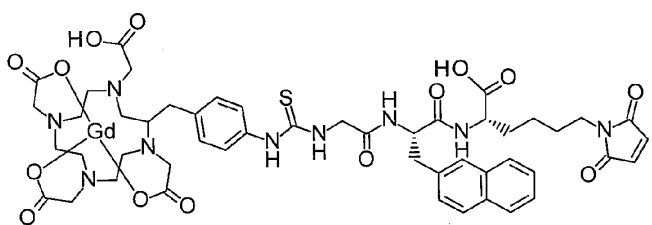
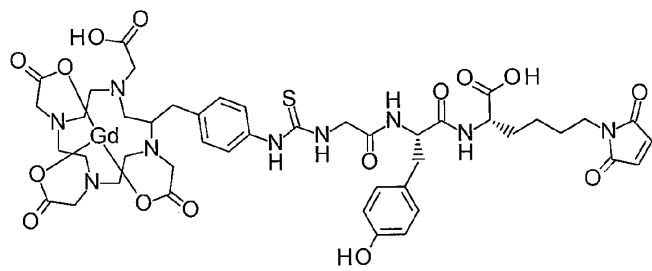
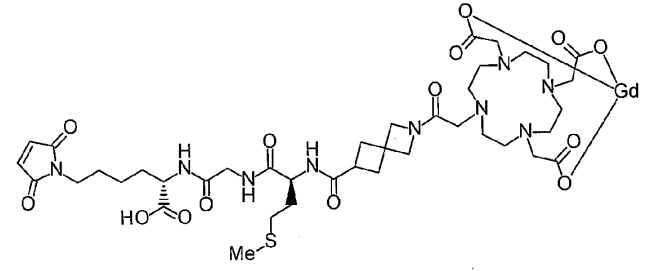
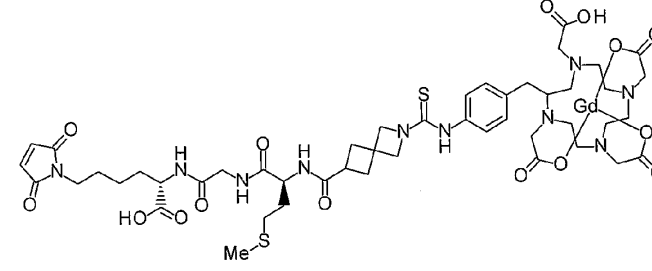
[0318]

[表11]

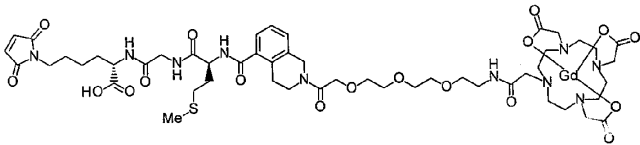
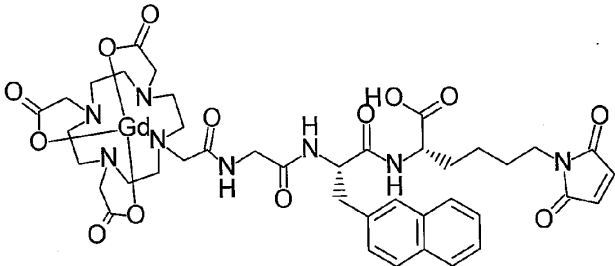
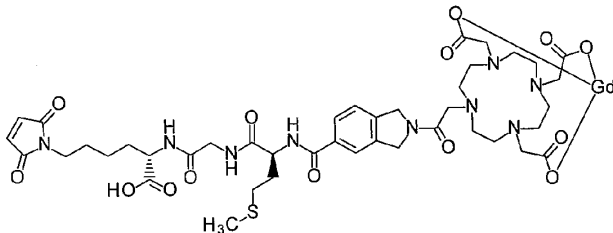
SNo	Str	MS
A33		APCI/ESI-; 1441.1
A34		ESI+; 984.1
A35		ESI-; 1147.2
A36		ESI+; 1120.9

[0319]

[表12]

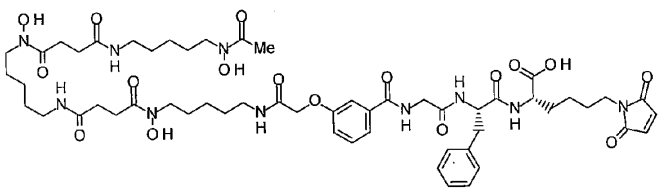
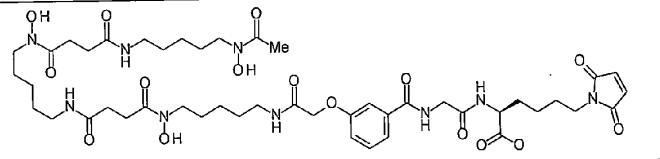
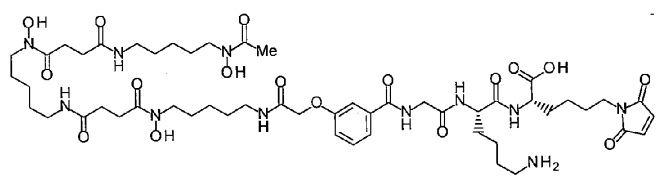
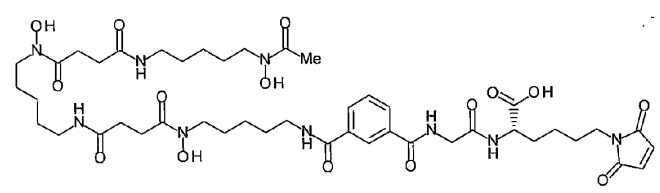
SNo	Str	MS
A37		ESI+; 1187.9
A38		ESI+; 1153.5
A39		ESI-; 1077.4
A40		ESI-; 1242.4

[0320]

SNo	Str	MS
A41		ESI+; 1304.6
A42		ESI+; 1022.3
A43		ESI+; 1101.3

[0321]

[表14]

SNo	Str	MS
B1		ESI-; 1149.6
B2		ESI-; 1002.6
B3		ESI-; 1130.7
B4		ESI-; 972.6

[0322]

[表15]

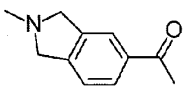
(Y-S₁-X)_p-F a b²

Ex-No	Y	S ₁	X
1	Gd/DOXA	—	-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)- —
2	Gd/DOXA	—	-Gly-Val-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
3	Gd/DOXA	—	-Gly-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
4	Gd/DOXA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-Lys*-Z ₂ (#N)-
5	Gd/DOXA	—	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
6	Gd/DOXA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
7	Gd/DOXA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
8	Gd/DOXA	—	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
9	Gd/DOXA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
10	Gd/DOXA	—	-Met-Ile-Lys*-Z ₂ (#N)-
14	Gd/DOXA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
17	Gd/DOXA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-

[0323]

[表16]

$$(Y-S_1-X)_p-Fab^2$$

Ex-No	Y	S ₁	X
18	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)- NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
19	Gd/DOTA	—	-Gly-Tyr-Lys*-Z ₂ (#N)-
20	Gd/DOTA	—	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
21	Gd/DOTA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
22	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂) ₂ -C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
23	Gd/DOTA	(a)	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
25	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ - C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3 -Ph)-C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
26	Gd/DOTA	(d)	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
27	Gd/DOTA	(b)	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
28	Gd/DOTA	(c)	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
30	Gd/DOTA	—	-Gly-(diph-Ala)-Lys*-Z ₂ (#S)-
31	Gd/DOTA	—	-Gly-(naph-Ala)-Lys*-Z ₂ (#S)-
32	Gd/DOTA	(e)	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
34	Gd/DOTA		-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-

[0324]

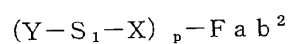
[表17]

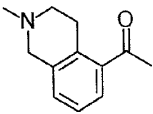
$$(Y-S_1-X)_p-Fab^2$$

Ex-No	Y	S ₁	X
36	Gd/DOTA	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ $Z_1(\#N)-$
37	Gd/DOTA	—	$-\text{Gly-Tyr-NH}-(\text{CH}_2)_5-Z_1(\#S)-$
38	Gd/DOTA	$-\text{NH-CH}_2-(1,4\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#S)-$
39	Gd/DOTA	$-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ $\text{CH}_2-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ $Z_1(\#N)-$
41	Gd/DOTA	$-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
42	Gd/DOTA	(m)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
43	Gd/DOTA	(h)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
44	Gd/DOTA	$-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ $\text{CH}_2-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Lys}^*-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-Ph})-\text{N}$ $\text{H}-\text{C}(=\text{S})-$
45	Gd/DOTA	(i)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
46	Gd/DOTA	(k)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
49	Gd/4arm-DO TA	(j)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$
50	Gd/4arm-DO TA	(l)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-Z_2(\#N)-$

[0325]

[表18]



Ex-No	Y	S ₁	X
51	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-NH- (CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ - (1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
52	Gd/DOTA		-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
53	Gd/4arm-DOTA	(1)	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
54	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
55	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	-Gly-(naph-Ala)-Lys*-Z ₂ (#N)-
56	Gd/4arm-DOTA	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	-Gly-Tyr-Lys*-Z ₂ (#N)-
57	Gd/DOTA	(p)	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
58	Gd/4arm-DOTA	(n)	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
59	Gd/DOTA	(o)	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
62	DFO	-C(=O)-CH ₂ O-(1, 3-Ph)-C(=O)- -	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
63	DFO	-C(=O)-CH ₂ O-(1, 3-Ph)-C(=O)- -	-Gly-Phe-Lys*-Z ₂ (#S)-
64	DFO	-C(=O)-(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
65	DFO	-C(=O)-CH ₂ O-(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Gly-Lys-Lys*-Z ₂ (#S)-

[0326] 表 1 5 から 1 8 に記載の実施例化合物のMS解析を下表 1 9 から 2 3 に示す。

[0327]

[表19]

Ex-No	MS
1	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量937の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
2	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量838の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量852の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
4	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1046の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
5	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量926の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
6	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1059の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
7	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1061の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
8	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1027の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
9	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量958の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
10	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1012の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
14	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1093の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
17	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1149の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0328]

[表20]

Ex-No	MS
18	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1074の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
19	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量988の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体及び4つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
20	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量825の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
21	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量960の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体及び4つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
22	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量896の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
23	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量936の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
25	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1248の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
26	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量954の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
27	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量950の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
28	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量908の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
30	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1149の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0329]

[表21]

Ex-No	MS
3 1	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1123の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 2	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1095の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 4	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1101の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 6	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1045の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 7	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1045の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 8	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1190の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
3 9	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1384の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
4 1	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1145の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体及び4つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
4 2	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1107の低分子が1つ結合した複合体であることをMS解析により確認した。
4 3	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1090の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
4 4	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1259の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0330]

[表22]

Ex-No	MS
45	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1296の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
46	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1296の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
49	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1203の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
50	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1280の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
51	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1443の低分子が1つ結合した複合体との混合物であることをMS解析により確認した。
52	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量984の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
53	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1148の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
54	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1121の低分子が1つ結合した複合体との混合物であることをMS解析により確認した。
55	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1187の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
56	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1153の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
57	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1079の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
58	分子量47.9kDaのF a b ² の1つに対して、分子量1244の低分子が1つ結合した複合体との混合物であることをMS解析により確認した。

[0331]

[表23]

E x - N o	M S
5 9	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1304の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
6 2	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1106の低分子が1つ結合した複合体であることをMS解析により確認した。
6 3	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1253の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
6 4	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1076の低分子が1つ結合した複合体2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
6 5	分子量47.9 kDaのFab ² の1つに対して、分子量1234の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0332] 実施例3-1：CEACAM5抗体Fabフラグメント複合体の結合活性評価

実施例2で作製した各抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント複合体について、CEACAM5に対する結合活性を評価するためにELISAを行った。本試験では、抗原固相化液の溶媒として、蒸留水で10倍に希釈して10 mMに調製したリン酸緩衝液（ナカライテスク、0.1 mol/Lーリン酸緩衝液（pH 7.2））を、洗浄液として、蒸留水で20倍に希釈した20X PBS/Tween 20バッファー（Thermo社、28352）を用いた。また、本試験中に用いるウシ血清アルブミン（BSA）は30% Bovine Serum Albumin solution（SIGMA社、A9576-50ML）を適切な割合になるように添加して使用した。CEACAM5（R&D Systems社、4128-CM-050）を10 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）で0.1 µg/mLとなるように希釈し、ヌンクマキシソープ白色384プレート（Nunc社、460372）に1ウェル当たり30 µL添加し、4℃で一晩プレートをインキュベートすることで固相化した。CEACAM5固相化液を逆遠心で除去した後に、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを添加することでブロッキングした。その後、逆遠心によりブロッ

キング溶液を除去し、1.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて、上記各CEACAM5抗体Fab²フラグメント複合体、あるいは対照として標識部を有さないFab²フラグメント(PB009-01)を10000 ng/mL程度の溶液を3倍希釈で14段階希釈し、1ウェル当たり30 μL添加して、室温にて60分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて1000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase:HRP)標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L chain)抗体(MBLライフサイエンス社、206)を1ウェル当たり30 μL添加し、室温で30分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、基質としてECL Prime Western Blotting DETECTION Reagent(GE Healthcare社、RPN2232)を1ウェル当たり30 μL添加した。室温にて15分間インキュベートした後に、そのシグナル値をEnvisionカウンター(パーキンエルマー社)で測定した。

各抗体の試験をデュプリケートで行い、4パラメータロジスティック曲線モデルによりEC₅₀値を算出した。PB009-01についての、9試行のEC₅₀値(nM)の幾何平均(Geometric mean)、標準偏差(Geometric SD factor)、95%信頼区間(95% CI of geo. mean)の下限値(Lower)と上限値(Upper)を表24に示す。また、デュプリケートで試行した各複合体のEC₅₀値を表25に示す。なお、表中Ex-Noは実施例2における複合体番号を示す。

[0333] [表24]

	PB009-01
Geometric mean (nM)	0.20
Geometric SD factor	1.45
Lower 95% CI of geo. mean (nM)	0.15
Upper 95% CI of geo. mean (nM)	0.27

[0334] [表25]

Ex-No	EC ₅₀ (nM)	Ex-No	EC ₅₀ (nM)	Ex-No	EC ₅₀ (nM)
1	0.16	20	0.22	39	0.20
2	0.14	21	0.27	40	0.22
3	0.13	22	0.32	41	0.21
4	0.15	23	0.33	42	0.21
5	0.14	24	0.25	43	0.23
6	0.14	25	0.32	44	0.29
7	0.17	26	0.30	45	0.23
8	0.11	27	0.46	46	0.22
9	0.10	28	0.36	47	0.25
10	0.11	29	0.30	48	0.21
11	0.14	30	0.31	54	0.23
12	0.11	31	0.30	55	0.26
13	0.14	32	0.37	56	0.26
14	0.13	33	0.33	57	0.29
15	0.13	34	0.38	58	0.28
17	0.23	35	0.43	59	0.30
18	0.24	36	0.38	60	0.18
19	0.26	37	0.23	61	0.18
		38	0.18	64	0.20

[0335] 実施例3－2：

実施例2で作製した各抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント複合体について、CEACAM5に対する結合活性を評価するためにELISAを行った。本試験では、抗原固相化液の溶媒として、蒸留水で10倍に希釈して10 mMに調製したりん酸緩衝液（ナカライテスク、0.1 mol/Lーりん酸緩衝液（pH 7.2））を、洗浄液として、蒸留水で20倍に希釈した20X PBS/Tween 20バッファー（Thermo社、28352）を用いた。また、本試験中に用いるウシ血清アルブミン（BSA）は30% Bovine Serum Albumin solution（SIGMA社、A9576-50ML）を適切な割合になるように添加して使用した。CEACAM5（R&D Systems社、4128-CM-050）を10 mMりん酸緩衝液（pH 7.2）で0.1 μg/mLとなるように希釈し、ヌンクマキシソープ白色384プレート（Nunc社、460372）に1ウェル当たり30 μL添加し、4℃で一晩プレー

トをインキュベートすることで固相化した。CEACAM5 固相化液を逆遠心で除去した後に、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファを添加することでブロッキングした。その後、逆遠心によりブロッキング溶液を除去し、1.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファを用いて、上記各CEACAM5抗体Fab²フラグメント複合体、あるいは対照として標識部を有さないFab²フラグメント(PB009-01)を10000 ng/mL程度の溶液を3倍希釈で14段階希釈し、1ウェル当たり30 μ L添加して、室温にて60分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファで3回洗浄し、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファを用いて1000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase:HRP)標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L chain)抗体(MBLライフサイエンス社、206)を1ウェル当たり30 μ L添加し、室温で30分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファで3回洗浄し、基質としてECL Prime Western Blotting DETECTION Reagent(GE Healthcare社、RPN2232)を1ウェル当たり30 μ L添加した。室温にて15分間インキュベートした後に、そのシグナル値をEnvisionカウンター(パーキンエルマー社)で測定した。

[0336] 各抗体の試験をデュプリケートで行い、4パラメータロジスティック曲線モデルによりEC₅₀値を算出した。PB009-01についての、2試行それぞれのEC₅₀値(nM)を表26に示す。また、デュプリケートで試行した各複合体のEC₅₀値を表27に示す。なお、表中Ex-Noは実施例2における複合体番号を示す。

[0337]

[表26]

P B 0 0 9 - 0 1 (nM)
0 . 1 4
0 . 2 1

[0338] [表27]

Ex-No.	EC50 (nM)
66	0.16
68	0.31

[0339] 実施例 4 - 1 : G d 標識複合体の腎臓集積性評価試験 (正常マウス)

複合体には、「X」のペプチドリンカーとして、腎臓刷子縁膜酵素又はリソソーム酵素で切断されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを有するものが包含される。これらのリンカーを有する本発明の複合体は、当該リンカー部分において、腎臓に存在するこれらの酵素により特異的に切断されるため、標識部の腎臓への集積性が低減されることが期待される。以下に、本発明のこのような複合体の腎臓集積性の評価結果を示す。

(試験方法)

前記実施例で製造したペプチドリンカーを含む複合体のG d 標識複合体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg (100 μL) となるように、マウス (BALB/c 又は BALB/c nu/nu) の尾静脈より投与した。およそ24時間後に屠殺して腎臓を摘出し、腎臓中のG d 量を1

CP-MSを用いて測定した。各群3例で実施し、3例の平均値を算出し、投与後の腎臓一個あたりに含まれるGd量を、全投与Gd量に対する百分率(% of dose/tissue)で示した。結果を後記表28に示す。表中、Ex-Noは実施例2の複合体番号を示す。また、対照複合体としてペプチドリンカーを含まない、前記製造実施例2-47で製造したEx-No. 47 ([Gd/DOTA] p-Fab)を使用し同様に試験を行い、5試行の幾何平均(Geometric mean)、標準偏差(Geometric SD factor)、95%信頼区間(95% CI of geo. mean)の下限値(Lower)と上限値(Upper)を算出した。

[0340] (結果)

結果を後記表29に示す。当該対照複合体の百分率(% of dose/tissue)を基準として、前記ペプチドリンカーを有する各複合体の腎臓に含まれるGd量の低下割合を求め、表28に示した。表28に示す通り、対照複合体に対して、前記ペプチドリンカーを有する各複合体では標識部の腎臓への集積性が39.6~82.9%ポイント低かった。

[0341] [表28]

Ex-No	% of dose/tissue	低下割合(%)
11	14.8	52.2
12	9.9	68.0
13	15.4	50.3
15	17.1	44.8
24	12.9	58.3
25	14.2	54.1
29	6.8	78.0
31	18.7	39.6
33	5.3	82.9
34	11.9	61.6
35	7.0	77.4
40	8.4	72.9

[0342]

[表29]

	Ex-No 47
Geometric mean (% of dose/tissue)	31.0
Geometric SD factor	1.2
Lower 95% CI of geo. mean (% of dose/tissue)	25.3
Upper 95% CI of geo. mean (% of dose/tissue)	37.9

[0343] 実施例4-2：Gd標識複合体の腎臓集積性評価試験（正常マウス）

（試験方法）

前記実施例で製造したペプチドリンカーを含む複合体のGd標識複合体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg（100 μL）となるように、マウス（BALB/c 又は BALB/c nu/nu）の尾静脈より投与した。およそ24時間後に屠殺して腎臓を摘出し、腎臓中のGd量をICP-MSを用いて測定した。各群3例で実施し、3例の平均値を算出し、投与後の腎臓一個あたりに含まれるGd量を、全投与Gd量に対する百分率（% of dose/tissue）で示した。結果を後記表30に示す。表中、Ex-Noは実施例2の複合体番号を示す。また、対照複合体としてペプチドリンカーを含まない、前記製造実施例2で製造したEx-No 47（[Gd/DOTA]p-Fab）を使用し同様に試験を行った。

（結果）

結果を後記表30に示す。当該対照複合体の百分率（% of dose/tissue）を基準として、前記ペプチドリンカーを有する各複合体の腎臓に含まれるGd量の低下割合を求め、表30に示した。表30に示す通り、対照複合体47に対して、前記ペプチドリンカーを有する各複合体では標識部の腎臓への集積性が92.15～95.38%ポイント低かった。

[0344]

[表30]

腎残存量（正常マウス）

Ex-No	% of dose / tissue	低下割合 (%)
66	2.43	92.15
68	1.43	95.38
47	31.33	—

[0345] 実施例4-3：Gd標識複合体の腎臓集積性評価試験（正常マウス）

（試験方法）

前記実施例で製造したペプチドリンカーを含む複合体のGd標識複合体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg (100 μL) となるように、マウス (BALB/c 又は BALB/c nu/nu) の尾静脈より投与した。およそ24時間後に屠殺して腎臓を摘出し、腎臓中のGd量をICP-MSを用いて測定した。各群3例で実施し、3例の平均値を算出し、投与後の腎臓一個あたりに含まれるGd量を、全投与Gd量に対する百分率 (% of dose / tissue) で示した。対照複合体としてペプチドリンカーを含まない、前記製造実施例2で製造したEx-No. 47を使用し同様に試験を行い、Ex-No. 47についての、5試行の腎残存量の平均を表31に示す。

（結果）

当該対照複合体の百分率 (% of dose / tissue) を基準として、前記ペプチドリンカーを有する各複合体の腎臓に含まれるGd量の低下割合 (%) を求め、表32に示した。表32に示す通り、対照複合体に対して、前記ペプチドリンカーを有する各複合体では標識部の腎臓への集積性が21.00～94.66%ポイント低下した。

[0346] [表31]

腎残存量（正常マウス）

	腎残存量 (% of dose / tissue)
Mean	29.33

[0347] [表32]

腎残存量（正常マウス）

Ex-No.	% of dose / tissue	低下割合 (%)
8	23.17	21.00
10	20.10	31.46
18	2.60	91.13
32	10.10	65.56
38	13.33	54.54
41	21.67	26.12
43	8.97	69.42
45	12.00	59.08
46	11.33	61.35
67	1.57	94.66
69	7.13	75.68

[0348] 実施例4-4：Gd標識複合体の腎臓集積性評価試験（担癌マウス）

（試験方法）

前記実施例で製造したペプチドリンカーを含む複合体のGd標識複合体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg（100 μL）となるように担癌マウスの尾静脈より投与した。本実施例で使用する担癌マウスは、検体を投与する前にヒト大腸癌細胞株LS174T細胞（ATCC（登録商標）；CL-188）を $2.0 \sim 5.0 \times 10^6$ 個／個体を背部皮下に移植して担癌状態としたマウス（BALB/c nu/nu）を用いた。検体を投与して24時間後に屠殺して腎臓ならびに腫瘍を摘出し、腎臓中ならびに腫瘍中のGd量をICP-MSを用いて測定した。本試験は各群3例で実施し、3例の平均値を算出した。投与後の腎臓一個あたりに含まれるGd量を投与Gd量に対する百分率（% of dose / tissue）、また、腫瘍組織1gあたりに含まれるGd量を、全投与Gd量に対する百分率（% of dose / g）で示した。結果を表35、36に示す。表中、Ex-Noは実施例2の複合体番号を示す。また、対照複合体としてペプチドリンカーを含まない、製造実施例2-47で製造したEx-No. 47を使用し同様に試験を行った。、Ex-No. 47についての、2試行の平均を表33、34

に示す。

(結果)

表35、36に示す通り、対照複合体に対して、ペプチドリンカーを有する各複合体では標識部の腎臓への集積性が52.26～77.68%ポイント低下した。

[0349] [表33]

腎残存量 (担癌マウス)

	腎残存量 (% of dose / tissue)
Mean	25.83

[0350] [表34]

腫瘍集積性

	腫瘍集積量 (% of dose / g)
Mean	4.92

[0351] [表35]

腎残存量 (担癌マウス)

Ex-No.	% of dose / tissue	低下割合 (%)
18	5.77	77.68
24	12.33	52.26
29	8.40	67.48
33	7.30	71.74
35	9.40	63.61

[0352]

[表36]

腫瘍集積量（担癌マウス）

E x - N o .	% o f d o s e / g
1 8	1 0 . 6 3
2 4	1 0 . 5 0
2 9	4 . 3 7
3 3	4 . 5 3
3 5	6 . 9 0

[0353]（実施例5-1：抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体の作製）

本実施例は複合体の製造実施例を開示する。本実施例中の各製造実施例では「実施例5」にハイフンを介して「複合体の番号」を記載する。例えば、「実施例5-101」は、本実施例における複合体101の製造実施例であることを示す。また、本実施例におけるFab⁵は国際公開WO2018/092885記載の（P10-2）を用いた。「p-Fab⁵」はFab⁵がそのp個のアミノ基を介してp個の[]又は()中に記載の標識部に結合して複合体を形成していることを示す。なお、以下のいくつかの実施例において、MS解析により確認できた各複合体のFab⁵が結合する標識部)の数を記載しているが、その結果はそれ以外の結合数を有する複合体を含まないことを示すものではない。MS解析機器の精度の関係でその存在を確認できていない結合数の複合体が存在している可能性が残ることは容易に理解されよう。また、本実施例中の構造式において、Gdが結合したDOTAの構造式は、Gdで標識されたDOTAを模式的に示したものである。

[0354]（実施例5-101．（[Gd/DOTA-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)] p-Fab⁵）の合成）

(i) 複合体No. 101の合成

実施例2-18(vii)で合成した[N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシー κ O)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ }アセトアミド- κ O)メチル]フェニル}カルバモイル)-L-メチオニル-N¹-[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-L-イソロイシンアミダト(3-)]ガドリニウム(1 mg)をDMSO(40 μ L)に溶解させた。その溶液に0.1 Mホウ酸緩衝液(40 μ L)を加え、0.25 M 酢酸緩衝液を用いてpH 6.6に調整した。

5.2 mg/mL Fab⁵のホウ酸緩衝液(240 μ L)に、先に調製した溶液を80 μ L加え、30°Cで2時間インキュベートした。0.05 MのEDTAを15 μ L加え、30°Cで10分間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-0.5 mL遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で7回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量47.5 kDaのFab⁵の1つに対して、分子量1074の[Gd/DOТА-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)]が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0355] (実施例5-104. ([Gd/DOТА-NH-CH₂-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 and/or A-5)]p-Fab⁵)の合成)

(i) 複合体No. 104の合成

実施例2-18(vii)で合成した[N-({4-[(2-{4, 7, 10-トリス[(カルボキシー κ O)メチル]-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ }アセトアミド- κ O)メチル]フェニル}カルバモイル)-L-メチオニル-N¹-[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル]-

Ｌ－イソロイシンアミダト（３－）］ガドリニウム（１ ｍｇ）をＤＭＳＯ（４０ μＬ）に溶解させた。その溶液に０．１ Ｍホウ酸緩衝液（４０ μＬ）を加え、０．１ Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を用いてｐＨ １０．２に調整した。

[0356] ５．２ ｍｇ／ｍＬ Ｆａｂ⁵のホウ酸緩衝液（２４０ μＬ）に、先に調製した溶液を全て加え、３０℃で２時間インキュベートした。アミコンウルトラ－１５ ｍＬ遠心式フィルターで回収し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。３ ｍＬ の ＨＥＰＥＳ－ＮａＯＨ ｂｕｆｆｅｒ （ｐＨ＝４．５）を用いて緩衝溶液交換を二回行い、濃縮し、ｐＨ＝４．５２の１００ μＬ溶液とした後、その溶液を４５℃で３０分間インキュベートした。

ＰＤ－１０ カラムを用い精製し、アミコンウルトラ－１５ ｍＬ遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で３回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量４７．５ ｋＤａのＦａｂ⁵の１つに対して、分子量１０９２の〔Ｇｄ／ＤＯＴＡ－ＮＨ－ＣＨ₂－（１，４－Ｐｈ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－ＮＨ－（ＣＨ₂）₂－（Ａ－４ ａｎｄ／ｏｒ Ａ－５）〕が１つ結合した複合体、２つ結合した複合体及び３つ結合した複合体の混合物であることをＭＳ解析により確認した。

[0357] （実施例５－１０７．（〔Ｇｄ／ＤＯＴＡ－ＮＨ－ＣＨ₂－（１，４－Ｐｈ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－ＮＨ－（ＣＨ₂）₂－Ｚ₁（＃Ｓ）〕 ｐ－Ｆａｂ⁵）の合成）

（ｉ）複合体Ｎｏ．１０７の合成

実施例２－１８（ｖｉｉ）で合成した〔Ｎ－（〔４－〔（２－〔４，７，１０－トリス〔（カルボキシーκＯ）メチル〕－１，４，７，１０－テトラアザシクロデカン－１－イル－κ⁴Ｎ¹，Ｎ⁴，Ｎ⁷，Ｎ¹⁰〕アセトアミド－κＯ）メチル〕フェニル〕カルバモイル）－Ｌ－メチオニル－Ｎ¹－〔２－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）エチル〕－Ｌ－イソロイシンアミダト（３－）〕ガドリニウム（０．７５ ｍｇ）をＤ

MSO (40 μ L) に溶解させ 0.1 M ホウ酸緩衝液 (40 μ L) を加えた後 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液及び 0.25 M 酢酸緩衝液を用いて pH 8.2 に調整した。

5.2 mg/mL Fab⁵ のホウ酸緩衝液 (240 μ L) に 0.1 M ホウ酸緩衝液にて調製した 2 mg/mL の 2-IT 溶液 (7.5 μ L) を加え、37°C で 40 分間インキュベートした。過剰の 2-IT はアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルターを用いてリン酸緩衝生理食塩水で洗浄、濃縮した後、先に調整した溶液を加え、30°C で 2 時間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。

当該複合体は、分子量 47.5 kDa の Fab⁵ の 1 つに対して、分子量 1175 の [Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)] が 1 つ結合した複合体、2 つ結合した複合体及び 3 つ結合した複合体の混合物であることを MS 解析により確認した。

(実施例 5-112. [Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] p-Fab⁵) の合成)

(i) 複合体 No. 112 の合成

[0358] 実施例 2-68 (x) で合成した [N-({4-[(2-{4,7,10-トリス [(カルボキシー- κ O) メチル] -1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰} アセトアミド- κ O) メチル] フェニル} カルバモイル) -L-メチオニル-N¹-(2-{ [(4-イソチオシアナトフェニル) カルバモチオイル] アミノ} エチル) -L-イソイシンアミダト (3-)] ガドリニウム (0.46 mg) を DMSO (155 μ L) に溶解させた。

ホウ酸緩衝液及びグリセリン溶液にて 5.2 mg/mL に調製した Fab⁵

溶液 (240 μ L) に 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液及び先に調製した溶液を 30 μ L 加え、pH 8.8 とし、37°C で 2 時間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量 47.5 kDa の Fab⁵ の 1 つに対して、分子量 1187 の [Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] が 1 つ結合した複合体及び 2 つ結合した複体の混合物であることを MS 解析により確認した。

[0359] (実施例 5-113. ([Gd/DOXA-[2,5-(1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)] p-Fab⁵) の合成)

(i) 複合体 No. 113 の合成

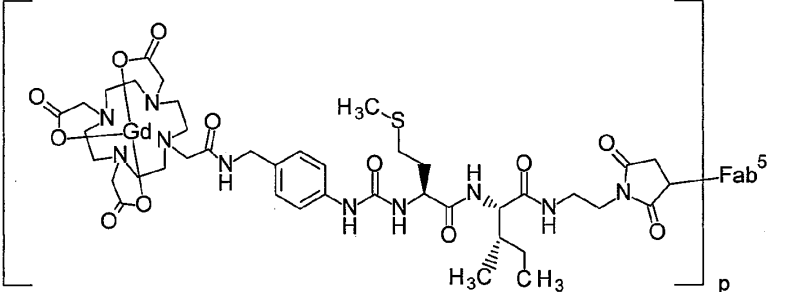
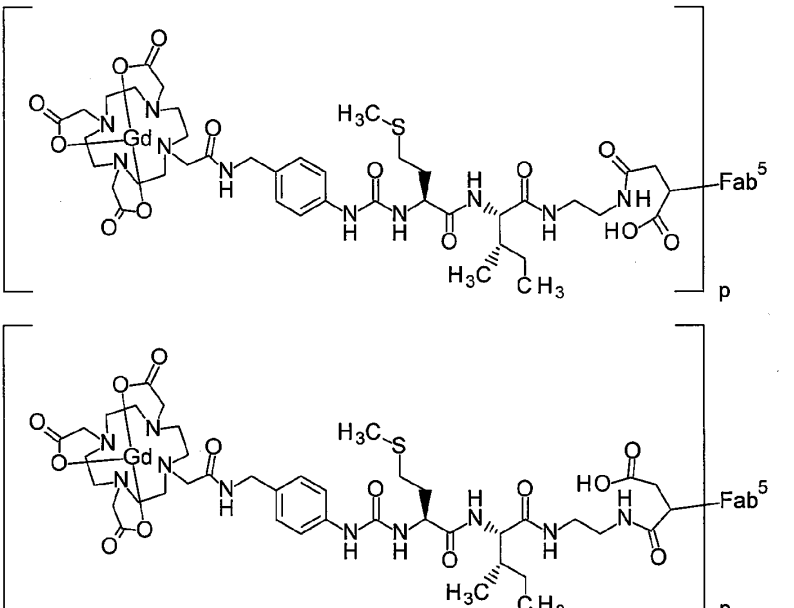
実施例 2-69 (vii) で合成した {N-[2-({4,7,10-トリス [(カルボキシ- κ O) メチル] -1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1-イル- κ^4 N¹, N⁴, N⁷, N¹⁰ } アセチル- κ O) -1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-5-カルボニル] -L-メチオニルグリシル-N⁶- [(4-イソチオシアナトフェニル) カルバモチオイル] -L-リシナト (3-)} ガドリニウム (0.22 mg) を DMSO (72 μ L) に溶解させた。

ホウ酸緩衝液及びグリセリン溶液にて 5.2 mg/mL に調製した Fab⁵ 溶液 (240 μ L) に 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液及び先に調製した溶液を 30 μ L 加え、pH 9.3 とし、37°C で 2 時間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体を得た。当該複合体は、分子量 47.5 kDa の Fab⁵ の 1 つに対して、分子量 1228 の [G

d/DOТА-[2, 5-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1, 4-Ph)-NH-C(=S)] が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

上記製造実施例で得られた複合体の化学構造式 (S t r) を表37及び38に示す。

[0360] [表37]

Ex- No	S t r
101	
104	

[0361]

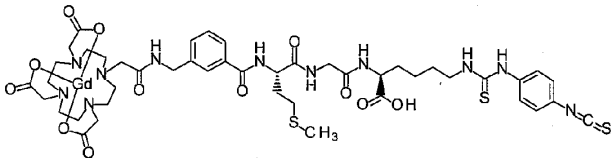
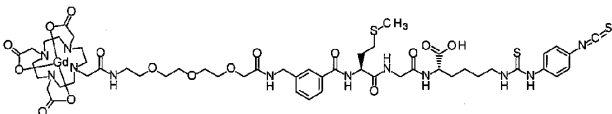
[表38]

Ex-No	Str
107	
112	
113	

[0362] 上記製造実施例と同様の方法、又は当業者に公知の方法を用いて、表39の製造例番号 C1, C2の化合物を合成しこれらを用いて、あるいは実施例2で合成した化合物を用いて後記表40及び41に示すFab⁵との複合体を得た。

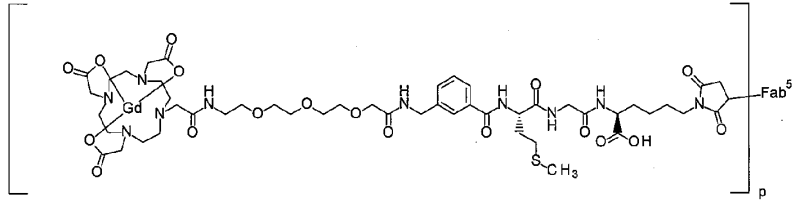
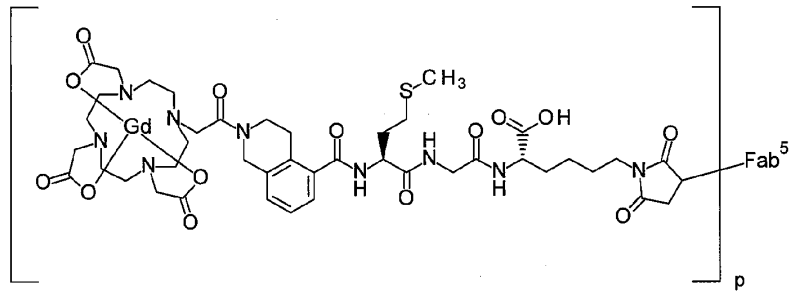
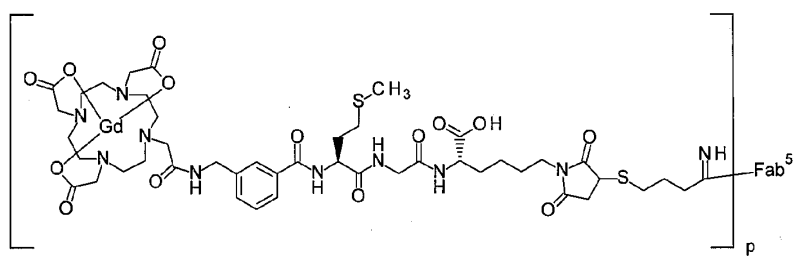
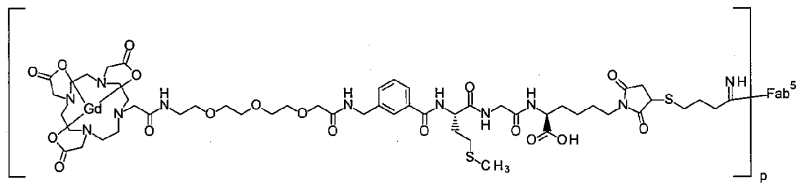
[0363]

[表39]

SNo	Str	MS	同様な製造法
C1		ESI-; 1199 .2	Ex No. 68, 69 と同様
C2		ESI-; 1388 .3	Ex No. 68, 69 と同様

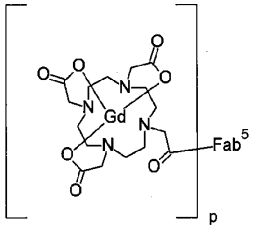
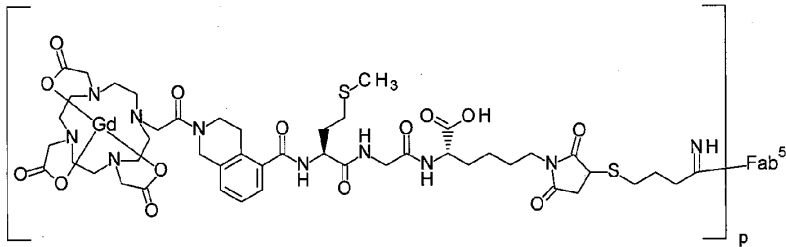
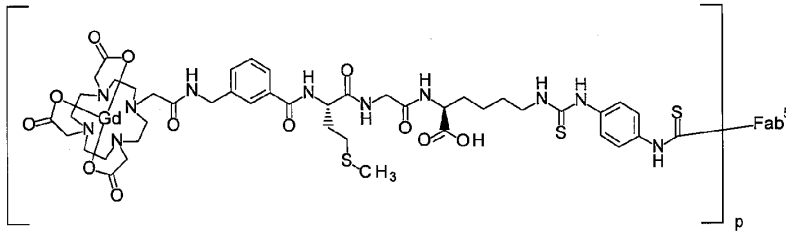
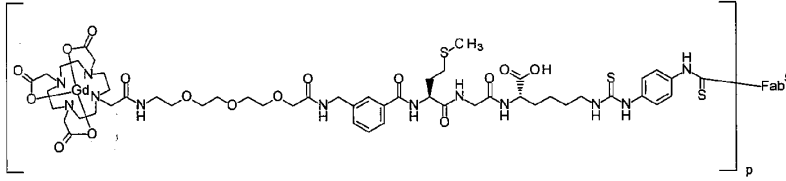
[0364]

[表40]

Ex-No	Str
102	
103	
105	
106	

[0365]

[表41]

Ex-No	Str
108	
109	
110	
111	

[0366] 表40から41に記載の上記実施例化合物のMS解析を下表に示す。

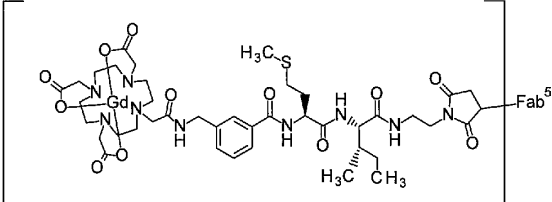
[0367]

[表42]

Ex-No	MS
102	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1278の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
103	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1115の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
105	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1190の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
106	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1380の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
108	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量542の低分子が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体及び3つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
109	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1216の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
110	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1201の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。
111	分子量47.5kDaのF a b ⁵ の1つに対して、分子量1391の低分子が1つ結合した複合体及び2つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

[0368] 上記製造実施例と同様の方法、又は当業者に公知の方法を用いて、表43の実施例化合物を得た。

[表43]

Ex-No	Str	同様な製造法
114		Ex No 15, 18と同様

[0369] 表43に記載の上記実施例化合物のMS解析を下表44に示す。

[0370]

[表44]

Ex-No	MS
114	分子量47.5kDaのFab ⁵ の1つに対して、分子量1059の低分子が1つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

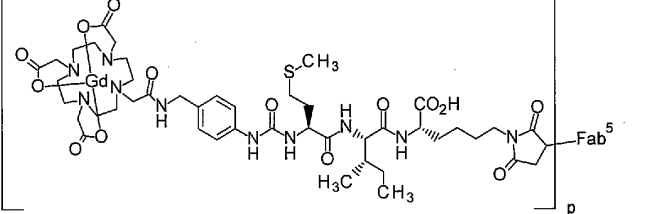
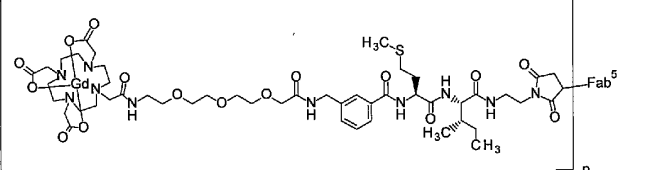
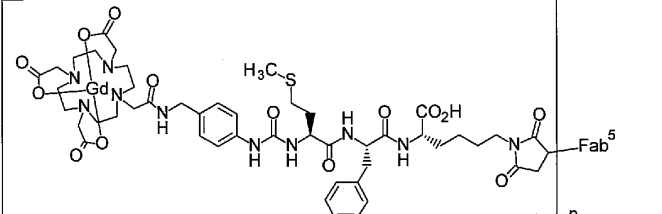
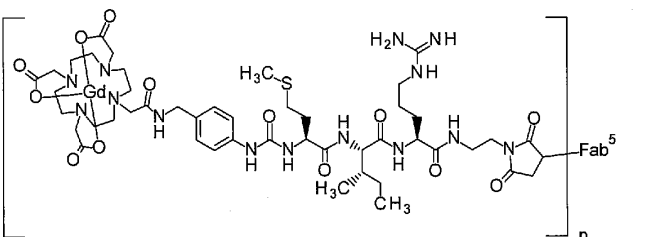
さらに上記製造実施例と同様の方法、又は当業者に公知の方法を用いて、表45から50の複合体を得ることができる。

[0371] [表45]

Ex-No	Str
P1	
P2	
P3	
P4	

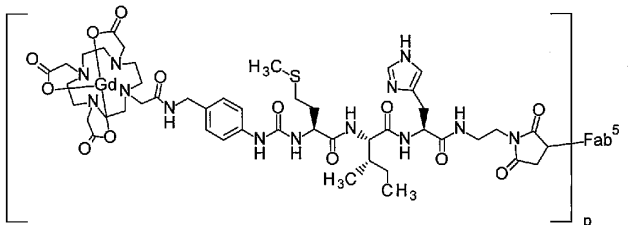
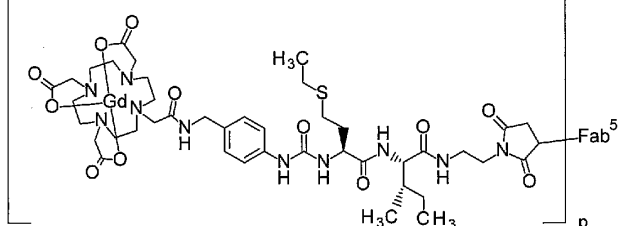
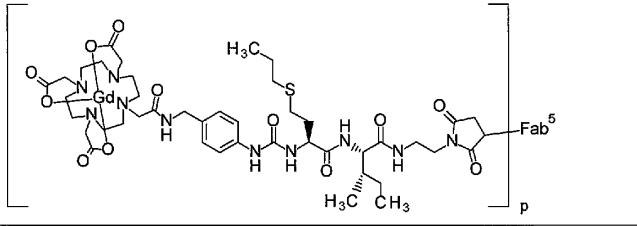
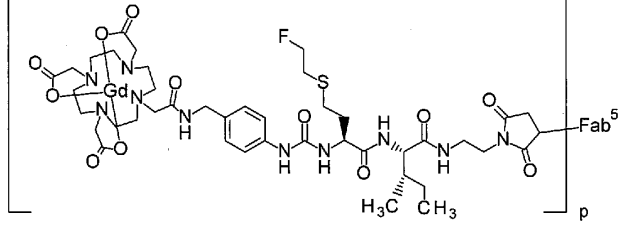
[0372]

[表46]

Ex-No	Str
P 5	
P 6	
P 7	
P 8	

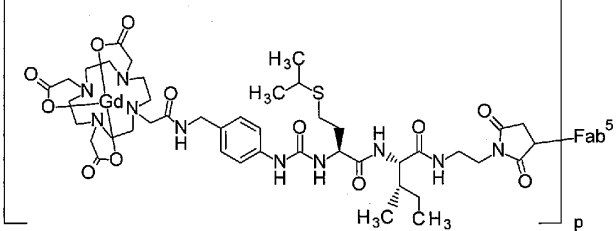
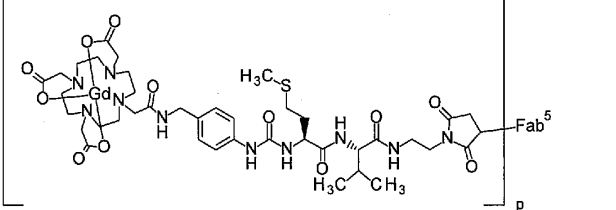
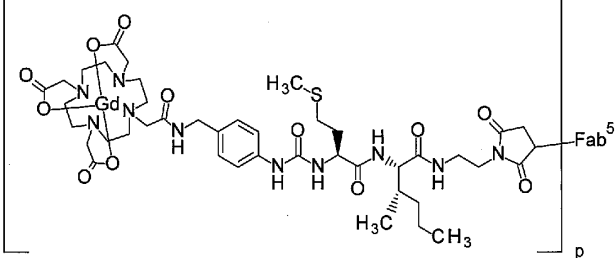
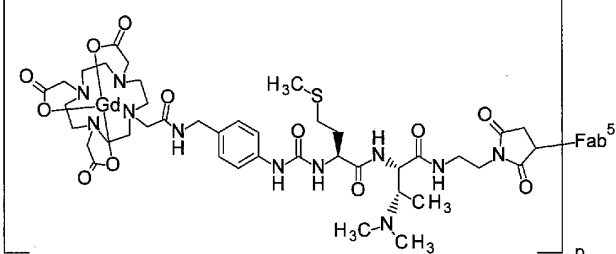
[0373]

[表47]

Ex-No	Str
P 9	
P 10	
P 11	
P 12	

[0374]

[表48]

E x - N o	S t r
P 1 3	
P 1 4	
P 1 5	
P 1 6	

[0375]

[表49]

Ex-No	Str
P 1 7	
P 1 8	
P 1 9	
P 2 0	

[0376] [表50]

Ex-No	Str
P 2 1	

[0377] 実施例6－1：抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体の結合活性評価

実施例5の方法で作製した各抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体について、ヒト癌特異的MUC1に対する結合活性を評価するためにELISAを行った。本試験では、洗浄液として、蒸留水で20倍に希釈した20X PBS/Tween 20バッファー（Thermo社、28352）を用いた。また、本試験中に用いるウシ血清アルブミン（BSA）は30% Bovine Serum Albumin solution（SIGMA社、A9576-50ML）を適切な割合になるように添加して使用した。ヒト癌特異的MUC1ペプチド（特許文献1）を0.5 $\mu\text{mol/L}$ でヌンクマキシソープ白色384プレート（Nunc社、460372）に1ウェル当たり30 μL 添加し、4℃で一晩プレートをインキュベートすることで固相化した。MUC1ペプチドを逆遠心で除去した後に、5.0% BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを添加することでブロッキングした。その後、逆遠心によりブロッキング溶液を除去し、1.0% BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて、上記各抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体（Ex-No. 104、108、112）を10000 ng/mL程度の溶液を3倍希釈で14段階希釈し、1ウェル当たり30 μL 添加して、室温にて60分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、5.0% BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて10000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIg κ 抗体（Southern Biotechnology Associates社）を1ウェル当たり30 μL 添加し、室温で30分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、基質としてECL Prime Western Blotting DETECTION Reagent（GE Healthcare社、RPN2232）を1ウェル当たり30 μL 添加した。室温にて15分間インキュベ-

トした後に、そのシグナル値をE n v i s i o nカウンター（パーキンエルマー社）で測定した。

各抗体の試験をデュプリケートで行い、4パラメータロジスティック曲線モデルによりE C₅₀値を算出した。P 1 0－2についての、3試行それぞれのE C₅₀値（nM）を表5 1に示す。また、デュプリケートで試行した各複合体のE C₅₀値を表5 2に示す。

[0378] [表51]

P 1 0－2 （nM）
0 . 0 6
0 . 0 6
0 . 1 4

[0379] [表52]

E x－N o .	E C 5 0 (nM)
1 0 4	0 . 0 8
1 1 2	0 . 1 5
1 0 8	0 . 0 7

[0380] 実施例6－2：抗ヒトMUC 1抗体F a b⁵フラグメント複合体の結合活性評価

実施例5の方法で作製した各抗ヒトMUC 1抗体F a b⁵フラグメント複合体について、ヒト癌特異的MUC 1に対する結合活性を評価するためにE L I S Aを行った。本試験では、洗浄液として、蒸留水で20倍に希釈した20 X P B S / T w e e n 20バッファー（T h e r m o社、28352）を用いた。また、本試験中に用いるウシ血清アルブミン（B S A）は30% B o v i n e S e r u m A l b u m i n s o l u t i o n (S I G

MA社、A9576-50ML)を適切な割合になるように添加して使用した。ヒト癌特異的MUC1ペプチド(特許文献1)を $0.5\ \mu\text{mol/L}$ でヌンクマキシソープ白色384プレート(Nunc社、460372)に1ウェル当たり30 μL 添加し、4℃で一晩プレートをインキュベートすることで固相化した。MUC1ペプチドを逆遠心で除去した後に、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを添加することでブロッキングした。その後、逆遠心によりブロッキング溶液を除去し、1.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて、上記各抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体(Ex-No. 101-113)を10000 ng/mL程度の溶液を3倍希釈で14段階希釈し、1ウェル当たり30 μL 添加して、室温にて60分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、5.0%BSAを含有するPBS/Tween 20バッファーを用いて10000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIg κ 抗体(Southern Biotechnology Associates社)を1ウェル当たり30 μL 添加し、室温で30分間インキュベートした。プレートをPBS/Tween 20バッファーで3回洗浄し、基質としてECL Prime Western Blotting DETECTION Reagent(GE Healthcare社、RPN2232)を1ウェル当たり30 μL 添加した。室温にて15分間インキュベートした後に、そのシグナル値をEnvisionカウンター(パーキンエルマー社)で測定した。

各抗体の試験をデュプリケートで行い、4パラメータロジスティック曲線モデルによりEC₅₀値を算出した。P10-2についての、3試行それぞれのEC₅₀値(nM)を表53に示す。また、デュプリケートで試行した各複合体のEC₅₀値を表54に示す。

[0381]

[表53]

P 1 0 - 2 (nM)
0 . 0 6
0 . 0 6
0 . 1 4

[0382] [表54]

E x - N o .	E C 5 0 (nM)
1 0 1	0 . 0 8
1 0 2	0 . 0 7
1 0 3	0 . 0 8
1 0 5	0 . 1 1
1 0 6	0 . 1 0
1 0 7	0 . 0 9
1 0 8	0 . 0 7
1 0 9	0 . 0 8
1 1 0	0 . 1 9
1 1 1	0 . 1 6
1 1 3	0 . 1 9

[0383] 実施例 7 : G d 標識複合体の腎臓集積性評価試験 (正常マウス)

(試験方法)

前記実施例で製造したペプチドリinkerを含む複合体のG d 標識複合体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg (100 μL) となるように、マウス (BALB/c or BALB/c nu/nu) の尾静脈より投与した。およそ24時間後に屠殺して腎臓を摘出し、腎臓中のG d 量をIC

P-M Sを用いて測定した。各群3例で実施し、3例の平均値を算出し、投与後の腎臓一個あたりに含まれるG d量を、全投与G d量に対する百分率（% o f d o s e / t i s s u e）で示した。対照複合体としてペプチドリinkerを含まない、前記製造実施例5で製造したE x - N o 108 を使用し同様に試験を行った。E x - N o 108 についての2試行の平均を表55に示す。

（結果）

結果を表56に示す。当該対照複体の腎臓に含まれるG d量を基準として、前記ペプチドリinkerを有する各複体の腎臓に含まれるG d量の低下割合を求めた。表56 に示す通り、対照複合体に対して、前記ペプチドリinkerを有する各複体では標識部の腎臓への集積性が91.52～93.03%ポイント低かった。

[0384] [表55]

腎臓存量（正常マウス）

	E x - N o . 108
M e a n (% o f d o s e / t i s s u e)	33.00

[0385] [表56]

腎臓存量（正常マウス）

E x - N o .	% o f d o s e / t i s s u e	低下割合 (%)
104	2.30	93.03
112	2.80	91.52

[0386] 実施例8：G d標識複体の腎臓集積性評価試験（担癌マウス）

（試験方法）

前記実施例で製造したペプチドリinkerを含む複体のG d標識複体を、蛋白質量として一匹当たり0.02 mg（100 μL）となるように担癌マウスの尾静脈より投与した。本実施例で使用する担癌マウスは、検体を投与する前にヒト乳癌細胞株M D A - M B - 4 6 8（A T C C（登録商標）；H T B - 1 3 2）を5.0×10⁶個／個体を背部皮下に移植して担癌状態

としたマウス（BALB／c nu／nu）を用いた。検体を投与して24時間後に屠殺して腎臓ならびに腫瘍を摘出し、腎臓中ならびに腫瘍中のGd量をICP－MSを用いて測定した。本試験は各群3例で実施し、3例の平均値を算出した。投与後の腎臓一個あたりに含まれるGd量を投与Gd量に対する百分率（% of dose／tissue）、また、腫瘍組織1gあたりに含まれるGd量を、全投与Gd量に対する百分率（% of dose／g）で示した。結果を表59、60に示す。表中、Ex－Noは実施例5の複合体番号を示す。また、対照複合体としてペプチドリンカーを含まない、前記製造実施例5で製造したEx－No. 108を使用し同様に試験を行った。Ex－No. 108についての、2試行の平均を表57、58に示す。

（結果）

結果を表57から60に示す通り、対照複合体に対して、前記ペプチドリンカーを有する各複合体では標識部の腎臓への集積性が88.08～90.87％ポイント低下した。

[0387] [表57]

腎残存量

	腎残存量 (% of dose／tissue)
Mean	34.67

[0388] [表58]

腫瘍集積性

	腫瘍集積量 (% of dose／g)
Mean	0.92

[0389]

[表59]

腎残存量 (担癌マウス)

Ex-No.	% of dose / tissue	低下割合 (%)
104	3.17	90.87
112	4.13	88.08

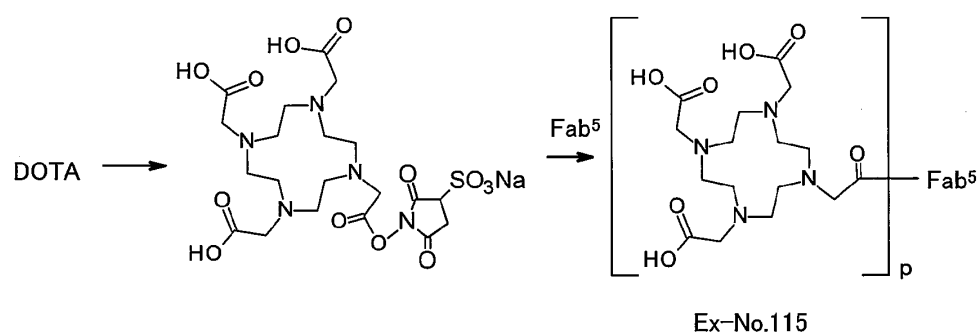
[0390] [表60]

腫瘍集積量 (担癌マウス)

Ex-No.	% of dose / g
104	1.04
112	1.27

[0391] 実施例9：抗ヒトMUC1抗体Fab⁵フラグメント複合体の作製(実施例9-115. [DOTA] p-Fab⁵の合成)

[0392] [化124]



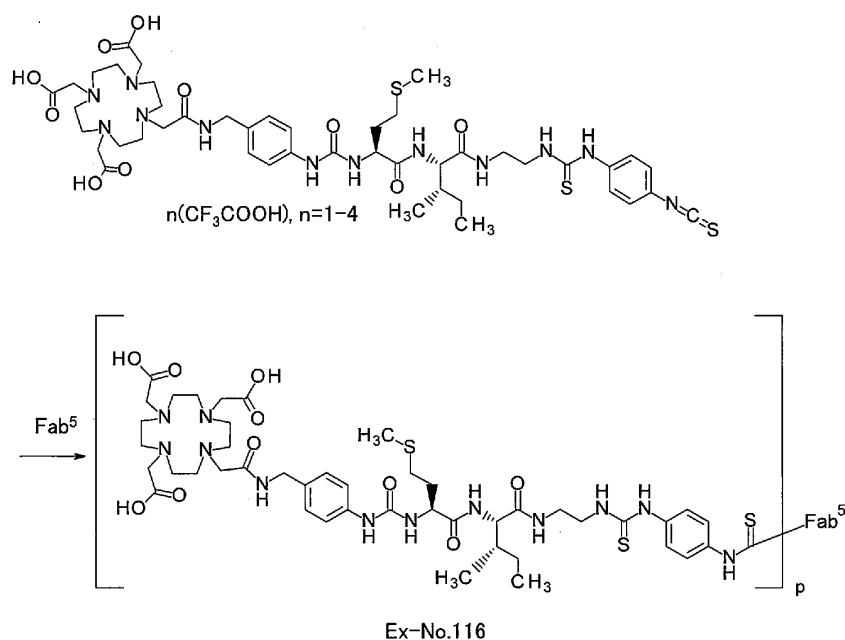
[0393] 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸 (DOTA) (16 mg) および水 (810 μ L) の混合溶液に、氷冷下、1 M水酸化ナトリウム水溶液 (80 μ L) を加え pH 5.5 ~ 6 に調製した。得られた溶液 (239 μ L) に、氷冷下、水 (117 μ L) に溶解させた1-ヒドロキシ-2, 5-ジオキソピロリジン-3-スルホン酸ナトリウム (2.3 mg) を加えた。その後、EDC HCl 水溶液 (8.3 μ L、25 mg/mL) を加え、氷冷下30分攪拌し、N-ヒドロキシルホスホニルイミジルDOTA溶液を調製した。Fab⁵添加

前に0.2 Mリン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH 9) (40 μ L) を加え pH 7 に調製した。

20.8 mg/mL Fab⁵ (90 μ L) の0.1 Mリン酸水素二ナトリウム水溶液 (585 μ L) に、調製したN-ヒドロキシルホスクシンイミジルDOTA溶液 (300 μ L) を加え、4℃で23時間インキュベートした。過剰のリンカーはアミコンウルトラ-15 mL遠心式フィルターを用い10 mMリン酸緩衝液で洗浄を2回繰り返し、0.3 Mの酢酸アンモニウム緩衝液で洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体Ex-No. 115を得た。当該複合体は、分子量47.5 kDaのFab⁵の1つに対して、分子量387の[DOTA]が1つ結合した複合体、2つ結合した複合体、3つ結合した複合体及び4つ結合した複合体の混合物であることをMS解析により確認した。

(実施例9-116. [DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)]_p-Fab⁵の合成

[0394] [化125]



[0395] 実施例 2-68 (ix) で合成した $N-\{[4-(\{2-[4, 7, 10\text{-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10\text{-テトラアザシクロドデカン-1-イル]アセトアミド}メチル)フェニル]カルバモイル\}-L\text{-メチオニル}-N'\text{-(2-\{[(4-イソチオシアナトフェニル)カルバモチオイル]アミノ\}エチル)-L\text{-イソロイシンアミドテトラキス(トリフルオロ酢酸)塩}$ (1 mg) を DMSO (336 μL) に溶解させた。

5.2 mg/mL Fab⁵ のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (240 μL) に、先に調製した溶液を 30 μL 加え、0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液を用いて約 pH 8.0 に調整し、30°C で 2 時間インキュベートした。PD-10 カラムを用い精製し、アミコンウルトラ-15 mL 遠心式フィルターで回収した。回収した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し最後に濃縮後、メンブレンフィルターで濾過し、複合体 Ex-No. 116 を得た。同様の操作を再度行い、得られた複合体 Ex-No. 116 を混合した。当該複合体は、分子量 47.5 kDa の Fab⁵ の 1 つに対して、分子量 1032 の $[DOTA-NH-CH_2-(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-(A-3)]$ が 1 つ結合した複合体、2 つ結合した複合体、3 つ結合した複合体及び 4 つ結合した複合体の混合物であることを MS 解析により確認した。

[0396] 実施例 10：金属錯体化合物のコモンマーモセット体内動態の検討

⁶⁴Cu 標識タンパクの調製例 1

$[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ の 0.05 mol/L 塩酸溶液 10 μL (19.8 MBq、富士フイルム富山化学) に 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 139 μL を加え混和した。さらに実施例 9-115 で調製したタンパク複合体を 51 μL 加え、これを室温で 60 分間インキュベートし、反応させた。反応液を限外濾過膜 (Amicon Ultra 10K、Millipore) に加え、さらに 50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液を加えて限外濾過精製を行うことで、目的の ⁶⁴Cu-タンパク複合体溶液 (A) を得た。得られた溶液にタンパク複合体 140

μL とPBS溶液145 μL を混合し、シリンジフィルター (Millex-GV 0.22 μm , Millipore) を使って濾過することで、 ^{64}Cu -タンパク複合体 (A) 含有PBS溶液 (11.5 MBq, 19.17 MBq/mg) を調製した。

^{64}Cu 標識タンパクの調製例2

$[^{64}\text{Cu}] \text{CuCl}_2$ の0.05 mol/L塩酸溶液20 μL (37.1 MBq、富士フイルム富山化学) に0.1 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 285 μL を加え混和した。さらに実施例9-116で調製したタンパク複合体を94.7 μL 加え、これを室温で60分間インキュベートし、反応させた。反応液を限外濾過膜 (Amicon Ultra 10K, Millipore) に加え、さらに50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液を加えて限外濾過精製を行うことで、目的の ^{64}Cu -タンパク複合体溶液 (B) を得た。得られた溶液にタンパク複合体260 μL とPBS溶液377 μL を混合し、シリンジフィルター (Millex-GV 0.22 μm , Millipore) を使って濾過することで、 ^{64}Cu -タンパク複合体 (B) 含有PBS溶液 (31.5 MBq, 26.27 MBq/mg) を調製した。

PET/CT撮像

コモンマーマセット (2歳齢) をイソフルランで麻酔し、 ^{64}Cu -タンパク複合体溶液 (A) または (B) を含むPBS溶液175-185 μL を尾静脈から投与した。投与後に麻酔下、PET/CT撮像装置 (PET: Clairvivo PET、島津製作所製、CT: Aquilion、TOSHIBA製) で画像を取得した。

^{64}Cu -タンパク複合体溶液 (A) を含むPBS溶液を投与して約3時間後に得られたPET/CT画像が図1である。また、 ^{64}Cu -タンパク複合体溶液 (B) を含むPBS溶液を投与して約3時間後に得られたPET/CT画像が図2である。図3はSUVを示す。SUVとは組織1gあたりの放射能を体重1gあたりの投与放射能で割った値、つまり、 $\text{SUV} = \text{組織1g}$

あたりの放射能／体重 1 g あたりの投与放射能で表される値である。尚、放射能は減衰補正した値を用いる。図 1 に比べ、図 2 の方が腎臓への集積が低いことが観察された。

産業上の利用可能性

[0397] 本発明は、ヒト C E A C A M 5 に対する優れた結合活性を有する複合体を含み、ヒト C E A C A M 5 が関与する癌の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。

また、本発明は、M U C 1 に対する優れた結合活性を有する複合体を含み、M U C 1 が関与する癌の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。

また本発明複合体 3 a r m D O T A、特定のスペーサー、特定のペプチドリンカーおよび生物分子からなる複合体が腎臓内で分解され排出されることから、生物分子に関連する疾患の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。

配列表フリーテキスト

[0398] 以下の配列表の数字見出し< 2 2 3 >には、代表的な「A r t i f i c i a l S e q u e n c e」の説明を記載する。具体的には配列表の配列番号 1 及び 3 で表される塩基配列は、それぞれの P B 0 0 9 - 0 1 の重鎖フラグメント及び軽鎖の塩基配列であり、配列番号 2 及び 4 で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 及び 3 によりコードされる重鎖フラグメント及び軽鎖のアミノ酸配列である。また配列表の配列番号 5 及び 9 で表される塩基配列は、それぞれの P 1 0 - 1 の重鎖フラグメント及び軽鎖の塩基配列であり、配列番号 6 及び 1 0 で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 5 及び 9 によりコードされる重鎖フラグメント及び軽鎖のアミノ酸配列である。

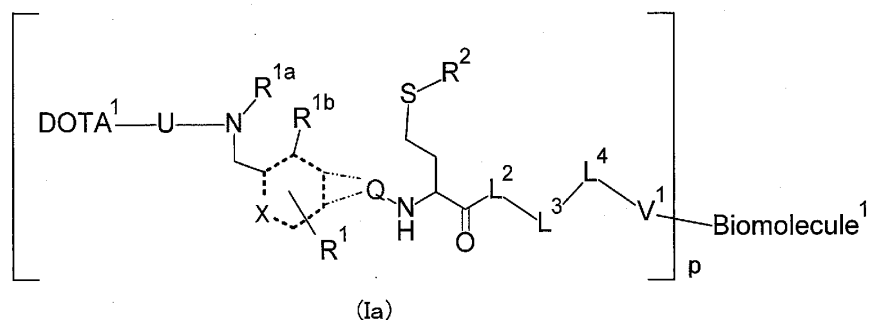
配列番号 7 及び 9 で表される塩基配列は、それぞれの P 1 0 - 2 の重鎖フラグメント及び軽鎖の塩基配列であり、配列番号 8 及び 1 0 で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 7 及び 9 によりコードされる重鎖フラグメント及び軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 及び 1 5 は、それぞれの P

10-1の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であり、配列番号12及び16で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号11及び15によりコードされる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。配列番号13及び15は、それぞれのP10-2の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であり、配列番号14及び16で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号13及び15によりコードされる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

請求の範囲

[請求項1] 下式 (Ia) :

[化126]



[式中、

DOTA¹: 3 arm DOTA、U: 結合、又は、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ Q: $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

X: C、又はN

 R^{1a} 、 R^{1b} : 同一又は異なって、H、又は、 C_{1-6} アルキルなお、 R^{1a} 及び R^{1b} は、一緒になって C_{1-6} アルキレンを形成することができる。 p : 1~25の自然数であり、Biomolecule¹中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。 R^1 : H、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 R^2 : C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 L^2 : Ile、Gly、Ala、Val、Phe、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{NR}^3\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$

、

R^3 : H、 C_{1-6} アルキル、

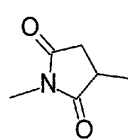
R^4 : H、 C_{1-6} アルキル、

L^3 : 結合、Arg、又は、His、

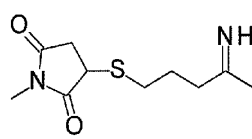
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、又は、結合、

V^1 : 下式(A-1)～(A-5)に示される基、

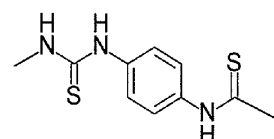
[化127]



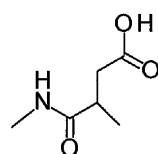
(A-1)



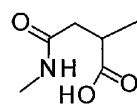
(A-2)



(A-3)



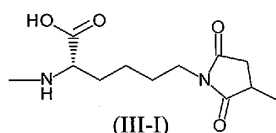
(A-4)



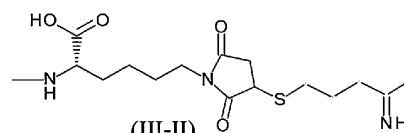
(A-5)

又は、式 $-\text{L}^3-\text{L}^4-\text{V}^1-$ が一緒になって下式

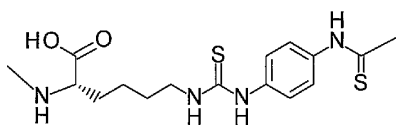
[化128]



(III-I)



(III-II)



(III-III)

であり、

Biomolecule¹: 生物分子

[化129]

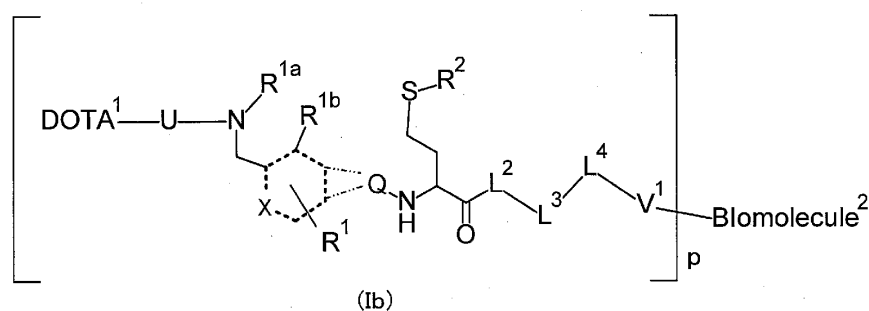
点線 --- : 環上の2個の炭素原子のいずれか1個にQは結合する。点線 $\cdots$: 単結合、又は、二重結合]

で示される複合体。

[請求項2]

下式 (Ib) :

[化130]



[式中、

DOTA¹: 3 arm DOTA、

U: 結合、又は、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ Q: $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

X: C、又はN

 R^{1a} 、 R^{1b} : 同一又は異なって、H、又は、 C_{1-6} アルキルなお、 R^{1a} 及び R^{1b} は、一緒になって C_{1-6} アルキレンを形成することができる。 p : 1~25の自然数であり、Blomolecule²中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。 R^1 : H、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 R^2 : C_{1-6} アルキル、又は、ハロ C_{1-6} アルキル、 L^2 : Ile、Gly、Ala、Val、Phe、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

$\text{CH}_3\text{NR}^3\text{R}^4) \text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3) \text{C}(=\text{O})-$
 $)-$ 、又は、 $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3) \text{C}(=\text{O})-$

、

R^3 : H、 C_{1-6} アルキル、

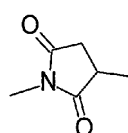
R^4 : H、 C_{1-6} アルキル、

L^3 : 結合、Arg、又は、His、

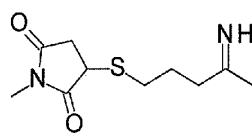
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$ 、又は、結合、

V^1 : 下式(A-1)から(A-5)に示される基、

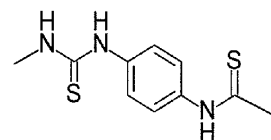
[化131]



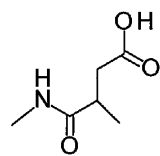
(A-1)



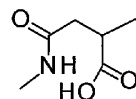
(A-2)



(A-3)



(A-4)



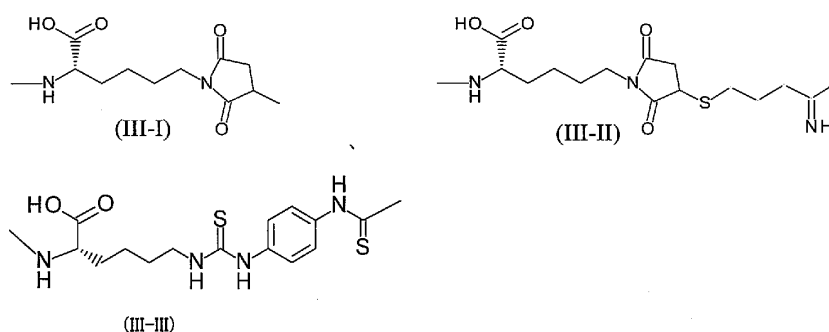
(A-5)

、

又は、基- $\text{L}^3-\text{L}^4-\text{V}^1-$: 一緒になって下式(III-1)、(III-2)または(III-3)

式

[化132]

Biomolecule²: 抗体Fabフラグメント、

[化133]

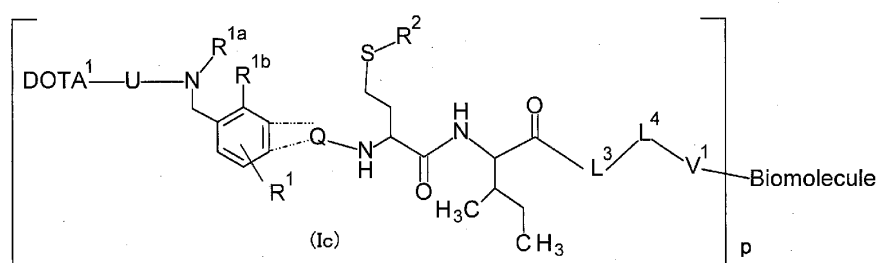
点線 — . . . — : 環上の2個の炭素原子のいずれか1個にQは結合する。
 点線 : 単結合、又は、二重結合]

で示される複合体。

[請求項3]

下式(1c)に示される複合体である請求項1から2の何れかに記載の複合体。

[化134]



[式中、

L³: 結合、

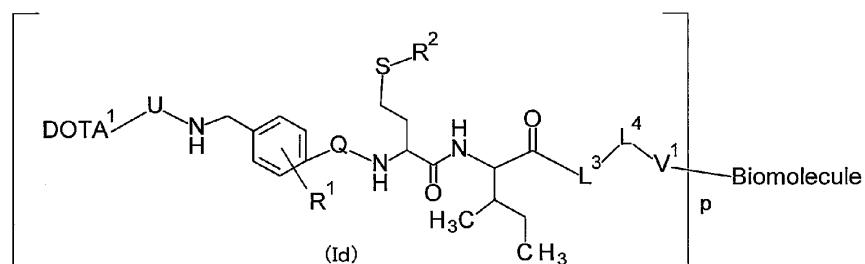
L⁴: —NH—(CH₂)₂—または、—NHCH(C(=O)OH)
 (CH₂)₄—、

Biomolecule: Biomolecule¹又はBiomolecule²である]

[請求項4]

下式(1d)で示される請求項1から3の何れかに記載の複合体。

[化135]

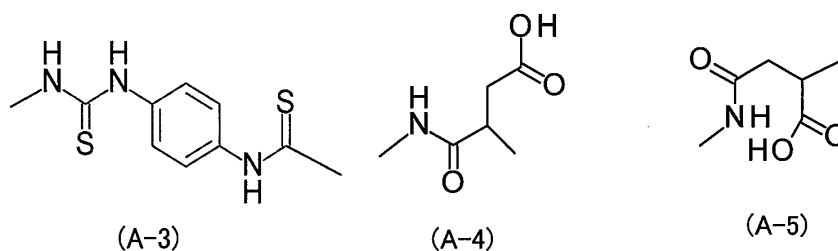


[式中、Biomoleculeは、Biomolecule¹又は Biomolecule²である。]

[請求項5]

式 (Id) 中V¹が、下式 (A-3) から (A-5) のいずれかである請求項1から4の何れかに記載の複合体。

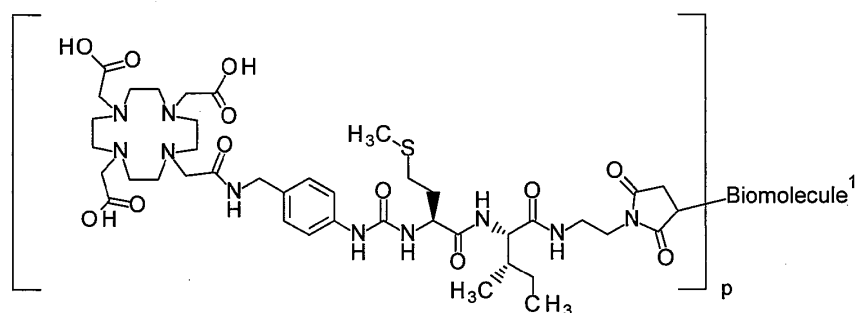
[化136]



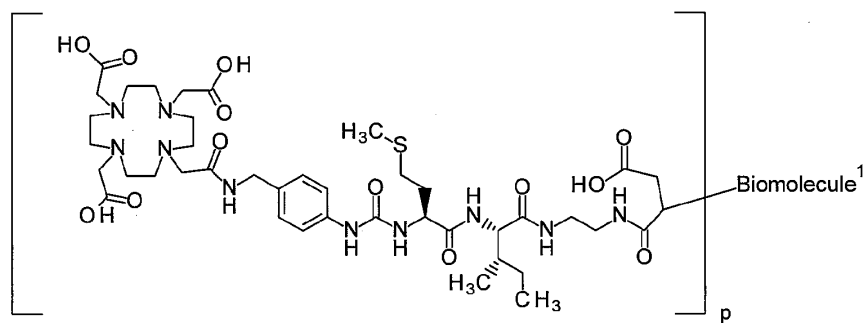
[請求項6]

下式に示される化合物からなる群より選択される請求項1から5の何れかに記載の複合体。

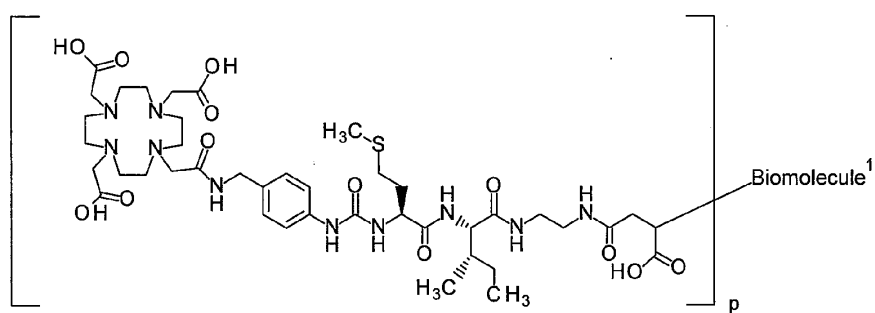
[化137]



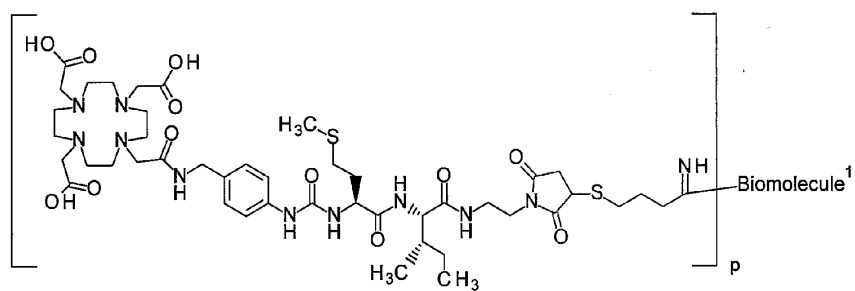
[化138]



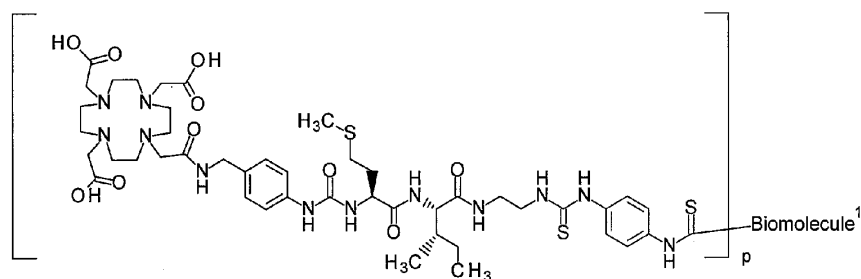
[化139]



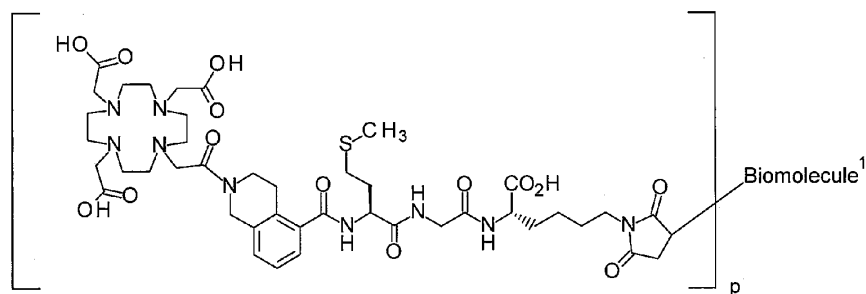
[化140]



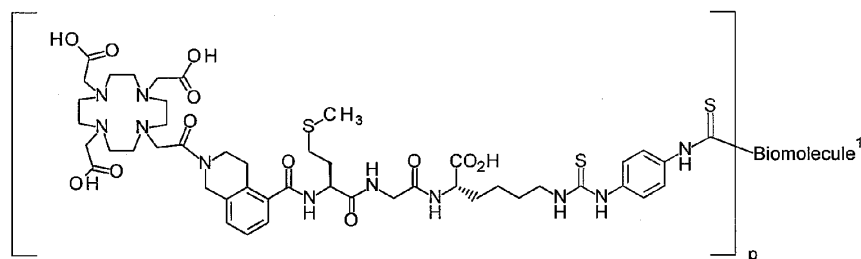
[化141]



[化142]



[化143]



[請求項7]

B i o m o l e c u l e ¹及びB i o m o l e c u l e ²において、以下の抗体F a bフラグメントを除く生物分子又は抗体F a bフラグメントである請求項1から6の何れかに記載の複合体：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトC E A C A M 5抗体F a bフラグメント、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号1から121までのアミノ酸配列か

らなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント、又は、

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号4に示される軽鎖を含む軽鎖を含む、抗ヒトCEACAM5抗体Fabフラグメント。

[請求項8]

Biomolecule¹またはBiomolecule²が、

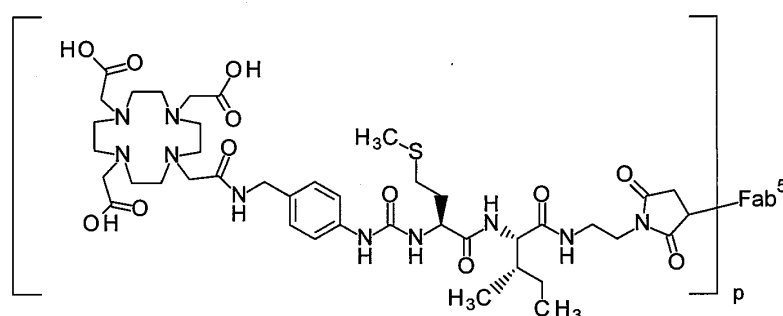
(a) 配列番号12又は配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント、

及び

(b) 配列番号12又は配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号12又は配列番号14のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントからなる群より選択される、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントであり、該フラグメントは該フラグメント中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介してV¹に結合している請求項1から7のいずれか1項に記載の複合体。

- [請求項9] $Biomolecule^1$ または $Biomolecule^2$ が、
- (a) 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント；及び
- (b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント請求項8記載の複合体。
- [請求項10] $Biomolecule^1$ または $Biomolecule^2$ が、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである請求項9記載の複合体。
- [請求項11] 下式に示される複合体。

[化144]



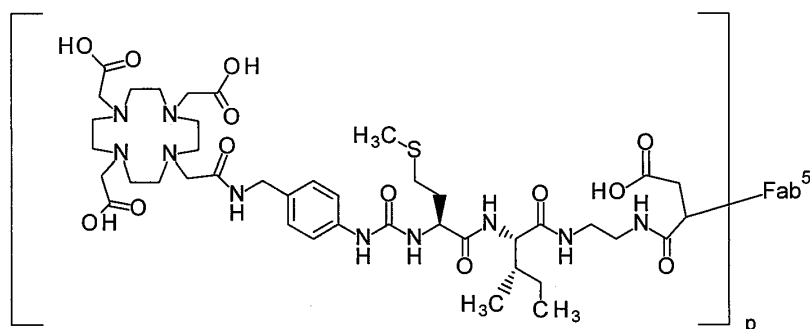
「式中、 Fab^5 は以下の抗体Fabフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

pは、1～25の自然数である。F a b⁵が該F a b⁵中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
。]

[請求項12] 下式に示される複合体。

[化145]

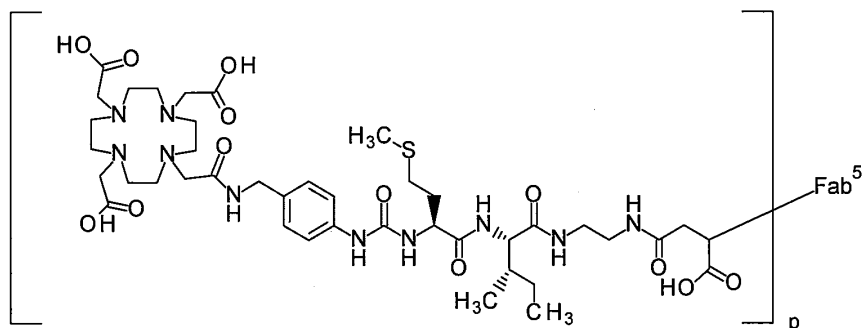


「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。
pは、1～25の自然数である。F a b⁵が該F a b⁵中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
。]

[請求項13] 下式に示される複合体。

[化146]

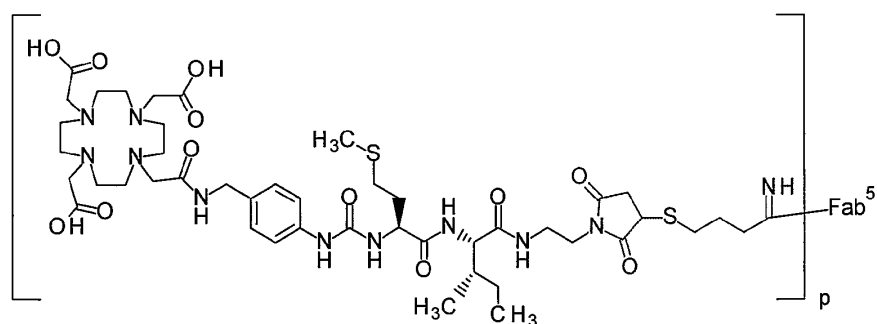


「式中、 Fab^5 は以下の抗体 Fab フラグメントである：

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 Fab フラグメント。 p は、1～25 の自然数である。 Fab^5 が該 Fab^5 中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
。]

[請求項14] 下式に示される複合体。

[化147]

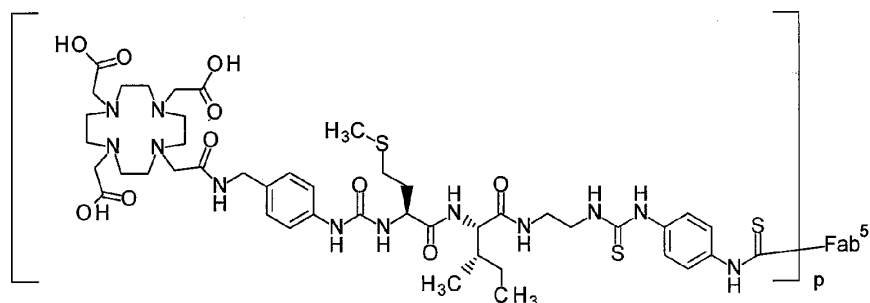


「式中、 Fab^5 は以下の抗体 Fab フラグメントである：

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 Fab フラグメント。 p は、1～25 の自然数である。 Fab^5 が該 Fab^5 中にある p 個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
。]

[請求項15] 下式に示される複合体。

[化148]



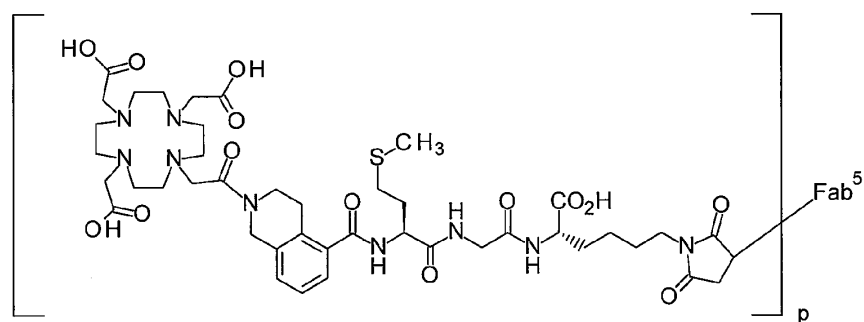
「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体F a bフラグメント。
pは、1～25の自然数である。F a b⁵が該F a b⁵中にあるp個のアミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
。]

[請求項16]

下式に示される複合体。

[化149]



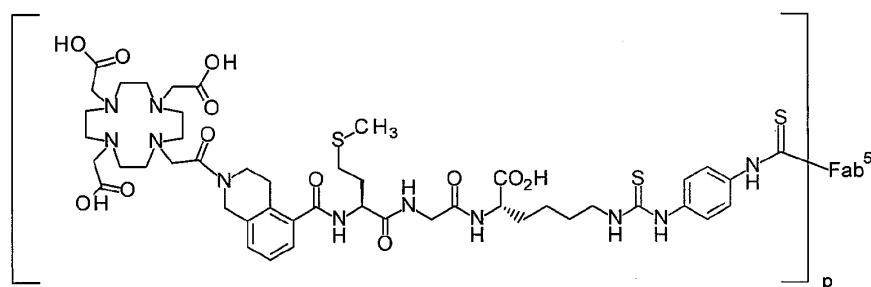
「式中、F a b⁵は以下の抗体F a bフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ

酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。
 p は、1～25の自然数である。Fab⁵が該Fab⁵中にある p 個の
 アミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
 。]

[請求項17] 下式に示される複合体。

[化150]



「式中、Fab⁵は以下の抗体Fabフラグメントである：

配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであつて、配列番号8のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。
 p は、1～25の自然数である。Fab⁵が該Fab⁵中にある p 個の
 アミノ基又はチオール基を介して、隣接する炭素原子に結合している。
 。]

[請求項18] p が1～4の自然数である、請求項1～17のいずれか1項に記載の複合体。

[請求項19] 3arm DOTAに金属が配位した、請求項1～18のいずれか1項に記載の複合体。

[請求項20] 金属が金属放射性同位元素である、請求項19に記載の複合体。

[請求項21] 金属が⁸⁹Zrである、請求項20に記載の複合体。

[請求項22] 金属が常磁性金属イオンである、請求項19に記載の複合体。

[請求項23] 金属がGd³⁺である、請求項22に記載の複合体。

- [請求項24] PETトレーサーである、請求項19～23のいずれか1項に記載の複合体。
- [請求項25] 請求項19～24のいずれか1項に記載の1種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む診断用組成物。
- [請求項26] 早期診断薬、又は病期診断薬として用いられる、請求項25に記載の診断用組成物。
- [請求項27] ヒトMUC1を発現する癌の診断に用いられる、請求項25又は26に記載の診断用組成物。
- [請求項28] 癌が、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌である、請求項27に記載の診断用組成物。
- [請求項29] 請求項19～23のいずれか1項に記載の1種類以上の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
- [請求項30] ヒトMUC1を発現する癌を治療するための医薬組成物である、請求項29に記載の医薬組成物。
- [請求項31] 癌が、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌である、請求項30に記載の医薬組成物。
- [請求項32] 癌の診断用組成物、及び／又は癌の治療用医薬組成物の製造のための、請求項19～23のいずれか1項に記載の複合体の使用。
- [請求項33] 癌の診断、及び／又は癌の治療に用いられる、請求項19～23のいずれか1項に記載の複合体。
- [請求項34] 請求項19～23のいずれか1項に記載の複合体を対象に投与することを含む、癌の診断方法。
- [請求項35] 請求項19～23のいずれか1項に記載の複合体の治療有効量を対象に投与することを含む、癌の治療方法。