

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6219372号
(P6219372)

(45) 発行日 平成29年10月25日 (2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日 (2017.10.6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/444 (2006.01)

A 6 1 K 31/444

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 39/44 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

請求項の数 14 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-510840 (P2015-510840)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月13日 (2013.5.13)
 (65) 公表番号 特表2015-517483 (P2015-517483A)
 (43) 公表日 平成27年6月22日 (2015.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/059841
 (87) 国際公開番号 W02013/167756
 (87) 国際公開日 平成25年11月14日 (2013.11.14)
 審査請求日 平成28年3月23日 (2016.3.23)
 (31) 優先権主張番号 1208309.3
 (32) 優先日 平成24年5月11日 (2012.5.11)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 515280274
 バイエル・アーエス
 ノルウェー・O283・オスロ・ドランメ
 ンスファイエン・288
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 ボンゲーハンセン, ハンネ セレセ
 ノルウェー エヌ・O884 オスロ,
 クジャルサスファイエン 172エー,
 アルゲッタ エイエスエイ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 放射性医薬錯体

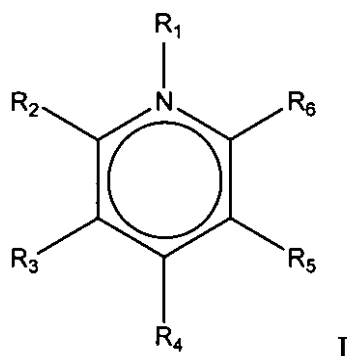
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、F a b、F (a b ')₂、F a b ' または s c F v を含む抗体フラグメント、このような抗体およびフラグメントの構築物および抗体模倣物から選択される組織標的化部分と、

式 I

【化 1】



(式中、R₁ がヒドロキシアシル部分であり；
 基 R₄ から R₆ が、H であり、

R_3 が OH であり、および、
 R_2 が、= O である)

の 4 つのキレート 3, 2 - H O P O 部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、
 アルファ放射性トリウム放射性核種 ^{227}Th の 4^+ イオン
 とを含む組織標的化錯体。

【請求項 2】

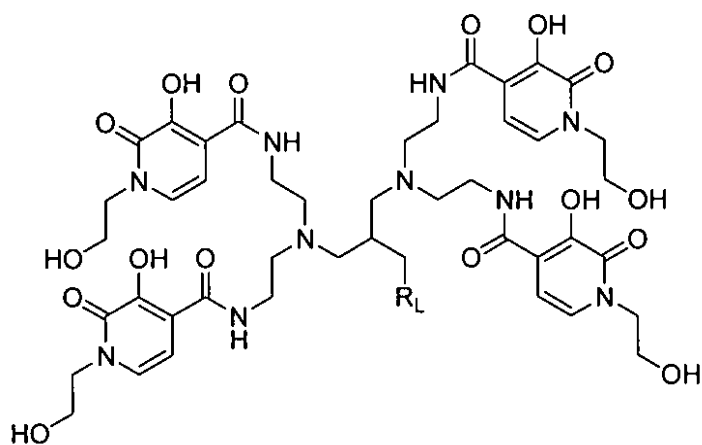
前記 4 つの H O P O 基のそれぞれの前記 N 置換基がそれぞれ独立して HOCH_2- 、 $\text{HOCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)-$ および $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ から選択される、請求項 1 に記載の錯体。

10

【請求項 3】

式 VI :

【化 2】



20

VI

30

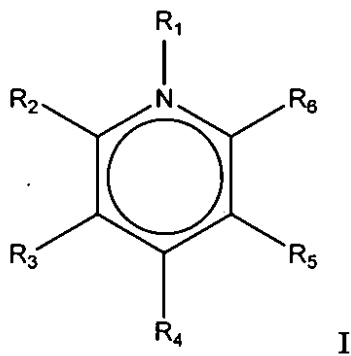
の配位子部分を含み、式中、 R_L が、配位子部分が組織標的化部分に結合するためのリンカー部分である、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 4】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、Fab、F(ab')₂、Fab' または scFv を含む抗体フラグメント、このような抗体およびフラグメントの構築物および抗体模倣物から選択される組織標的化部分と、

式 I

【化 3】



10

(式中、 R_1 がヒドロキシアシル部分であり、

基 R_4 から R_6 が、H であり、

R_3 が OH であり、および、

R_2 が、= O である)

の 4 つのキレート 3 , 2 - H O P O 部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、

アルファ放射性トリウム放射性核種 ^{227}Th の 4^+ イオン

20

とを含む、

治療を必要とするヒトまたは非ヒト動物を治療するための組成物。

【請求項 5】

過形成性疾患、または、腫瘍性疾患、癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫または混合型癌を治療するための、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの医薬担体または添加剤とともに含む、請求項 1 に記載の組織標的化錯体を含む、医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の組成物を含むキットであって、

30

4 つの 3 , 2 - H O P O 部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子とコンジュゲートしているかコンジュゲート可能な組織標的化部分を含み、前記 4 つの H O P O 部分のうちの全てが、N 位においてヒドロキシアシル可溶化基で置換されており、

アルファ放射性トリウム放射性核種 ^{227}Th を含む、

キット。

【請求項 8】

組織標的化錯体を形成する方法であって、

水溶液中で組織標的化部分と八座ヒドロキシピリジノン含有配位子とをカップリングさせることを含み、

前記錯体が、4 つの 3 , 2 - H O P O 部分とアルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、

40

前記 4 つの H O P O 部分のうちの全てが、N 位においてヒドロキシアシル可溶化基で置換されている、

方法。

【請求項 9】

第一の八座ヒドロキシピリジノン含有配位子の水溶液および第二の前記組織標的化部分の水溶液を調製することと、前記第一の水溶液と前記第二の水溶液とを接触させることとを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記接触を 40 未満で実施する、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

前記接触を、いかなる有機溶媒も実質的に存在しない状態で実施する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記カップリングにより、前記配位子部分と前記標的化部分との間にアミド結合、エステル結合、エーテル結合またはアミン結合が生じる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記アミド結合またはエステル結合が、少なくとも 1 つの活性エステル基によって形成される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記アミド結合またはエステル結合が、N - ヒドロキシマレイミドカップリング試薬、カルボジイミドカップリング試薬またはアゾジカルボキシラートカップリング試薬によって形成される、請求項 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トリウム同位体の錯体、具体的には、標的化部分とコンジュゲートしたある特定の八座配位子を有するトリウム - 227 の錯体に関する。本発明はこのほか、このような錯体の投与を含む、疾患、具体的には腫瘍性疾患の治療に関する。

【背景技術】

【0002】

哺乳動物対象の様々な疾患の治療に成功するのに特異的な殺細胞作用が不可欠となる場合がある。この典型的な例は肉腫および癌腫などの悪性疾患の治療にみられる。しかし、ある特定の細胞型の選択的除去はその他の疾患、特に過形成性疾患および腫瘍性疾患の治療にも重要な役割を果たし得る。

【0003】

現在最もよく用いられている選択的治療の方法が外科手術、化学療法および遠隔照射である。しかし、標的化した放射性核種療法は、望ましくない細胞型に細胞毒性の高い放射線を送達できる可能性を秘めた有望で発展しつつある分野である。現時点でヒトでの使用が承認され最もよく用いられている形態の放射性医薬品は、ベータ線放射性核種および/またはガンマ線放射性核種を用いるものである。しかし、アルファ線放射性核種にはさらに特異性の高い殺細胞作用がある可能性が秘められていることから、これを治療に使用することに一部関心が向けられている。

【0004】

生理的環境での典型的なアルファ放射体の放射範囲は一般に 100 マイクロメートル未満であり、この値は細胞の直径わずか数個分に相当するものである。このことから、腫瘍内の隣接する細胞に到達する放射範囲を有するものの、十分に標的化すれば放射されたエネルギーがほとんど標的細胞を通り抜けることがないため、このような放射線源は微小転移を含めた腫瘍の治療によく適している。したがって、すべての細胞を標的化する必要はなく、しかも周囲の健常組織の損傷を最小限に抑えることが可能である (Feinendegen et al., Radiat Res 148:195-201 (1997) を参照されたい)。これに対して、ベータ粒子の範囲は水中で 1 mm 以上である (Wilbur, Antigen Immunocn Radiopharm 4:85-96 (1991) を参照されたい)。

【0005】

アルファ粒子の放射エネルギーはベータ粒子、ガンマ線および X 線のものに比べて高く、通常 5 ~ 8 MeV、すなわちベータ粒子のもの 5 ~ 10 倍、ガンマ線のエネルギーの 20 倍以上である。したがって、このようにきわめて近距離に大量のエネルギーが蓄積することから、アルファ放射線はガンマ放射線およびベータ放射線に比べて線エネルギー付与 (LET) がきわめて高くなり、生物学的効果比 (RBE) が高くなり、酸素効果比 (

10

20

30

40

50

OER)が低くなる(Hall, "Radiobiology for the radiologist", 第5版, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2000を参照されたい)。このことにより、アルファ放射性核種のきわめて高い細胞毒性が説明されるとともに、このような同位体の生物学的標的化ならびに許容されない副作用を回避するのに必要なアルファ放射性核種の分布の管理および研究のレベルに対して厳しい要求が生じる。

【0006】

下の表1は、これまでに治療効果があると考えられるものとして文献で広く提案されているアルファ放射体の物理学的崩壊特性を示す。

【0007】

【表1】

候補核種	$T_{1/2}^*$	臨床試験の対象
^{225}Ac	10.0日	白血病
^{211}At	7.2時間	膠芽腫
^{213}Bi	46分	白血病
^{223}Ra	11.4日	骨転移
^{224}Ra	3.66日	強直性脊椎炎

*半減期

【0008】

これまで放射免疫療法への応用に関しては、主として ^{211}At 、 ^{213}Bi および ^{225}Ac が注目を集めており、この3つの核種が臨床免疫療法試験で検討されてきた。

【0009】

これまでに提案された放射性核種のいくつかは短寿命である、すなわち半減期が12時間未満である。半減期がこのような短いと、これらの放射性核種をベースとする放射性医薬品を商業的に製造および流通するのが難しくなる。ほかに、短寿命核種を投与すると、標的部位に到達する前に体内で放射される放射線量の割合が増大する。

【0010】

アルファ放射による反跳エネルギーは多くの場合、親核種の崩壊の位置からの娘核種の放出を引き起こす。この反跳エネルギーは、親核種を保持していた可能性のある化学環境、例えば、親核種がキレート剤などの配位子と錯体を形成していた環境から多数の娘核を崩壊させるのに十分なものである。この現象は、娘核が同じ配位子と化学的に適合性がある、すなわち錯体を形成し得る場合にも生じる。同様に、娘核種が気体、具体的にはラドンのような希ガスである場合または配位子と化学的に適合性がない場合、この放出効果はさらに大きいものとなる。娘核種の半減期が数秒以上である場合、親核種を保持していた錯体形成物質による拘束を受けずに血液系中に拡散し得る。次いで、これらの遊離の放射性娘核は望ましくない全身毒性を引き起こし得る。

【0011】

^{223}Ra 娘同位体のコントロールが維持された条件下でのトリウム-227($T_{1/2} = 18.7$ 日)の使用が数年前に提案された(国際公開第01/60417号および同第02/05859号を参照されたい)。これは閉環境によって娘核種を保持することができる担体系を用いた場合であった。1つの場合は、放射性核種をリポソーム内に配置し、(反跳距離に比べて)リポソームの相当な大きさが助けとなり娘核種をリポソーム内に保持するものである。2つ目の場合は、骨基質内に組み込まれる骨親和性の放射性核種錯体を用いることにより娘核種の放出を制限するものである。これらはきわめて有利な方法であると考えられるが、リポソームの投与が望ましくない場合があり、また娘同位体を保持するのに放射性核種を石灰化基質で囲むことができない軟部組織の疾患も多数存在する。

【0012】

ごく最近では、哺乳動物の体には、 ^{227}Th の崩壊時に放出される ^{223}Ra 娘核の毒性に対して同等の核に関する以前の試験から予測されるよりもはるかに高い耐容性があること

10

20

30

40

50

が確認されている。ラジウムの毒性に関して公開されている情報から、上述のトリウム - 227 のラジウム娘核を保持する特定の手段を用いない場合、トリウム - 227 崩壊から治療効果を得るのに必要な投与量では、ラジウム娘核の崩壊から毒性が高く、致死の可能性のある量の放射線が生じるであろう、すなわち治療域が存在しないことから、トリウム - 227 を治療剤として使用することは不可能であることが明らかであった。

【0013】

国際公開第04/091668号には、許容されない骨髄毒性を引き起こす量のラジウム - 223 を発生させずに治療有効量の標的化トリウム - 227 放射性核種を対象（通常、哺乳動物）に投与することができる治療域が確かに存在するという予想外の発見が記載されている。したがって、これを骨組織部位および軟部組織部位両方のあらゆるタイプの疾患の治療および予防に用いることができる。

10

【0014】

上に述べた進歩を考えると、生成した²²³Raによる致死的な骨髄毒性を引き起こさずにアルファ放射性トリウム - 227 核を内部放射性核種療法に用いることが可能である。しかし、その治療域は比較的狭いままであり、いずれの場合にも絶対に必要な量以上のアルファ放射性同位体を対象に投与しないことが望ましい。したがって、アルファ放射性トリウム - 227 核を錯体化し、高い信頼度で標的化すれば、この新たな治療域の有効活用が大いに促進されるであろう。

【0015】

放射性核種は常時崩壊しているため、単離し対象に投与する間に材料を取り扱うのに費やす時間が重要である。また、迅速かつ簡便に調製でき、好ましくは必要な段階が少なく、インキュベーション時間が短い形態で、かつ／または標的化実体の特性に不可逆的な影響を及ぼさない温度でアルファ放射性トリウム核を錯体化、標的化および／または投与することができれば相当有用なものとなろう。さらに、投与前に除去する必要のない溶媒中で（実質的には水溶液中で）実施可能な工程には、溶媒蒸発または透析段階を回避するという大きな利点がある。これにより、汚染物質の娘生成物に常時崩壊する放射性医薬品の作製に重要な鍵となる調製の時間および複雑性の低減がもたらされる。

20

【0016】

治療において細胞毒性薬を送達するのに選択性が必要であることを考えれば、アルファ放射性核種錯体の標的化が必要であるのは明らかである。しかし、適切なキレート剤と小さい標的化ペプチドまたは小さいタンパク質とのコンジュゲートは、小さい生体分子が不溶性のキレートを溶液中に保つことができないため、水溶液系における溶解度が低くなる傾向を示す。溶解度が低いと凝集または沈殿が生じる。凝集物があればヒト対象に投与する薬物製剤には許容されず、沈殿があれば組成物は使用できなくなることは明らかである。

30

【0017】

さらに、モノクローナル抗体などのより大きい標的化ペプチド／タンパク質を用いても、キレート剤がコンジュゲートの表面に疎水性の「スポット」として露出する。場合によってはこれが微小凝集の問題をもたらす。

【0018】

ヒト患者などの生体系では一般に、疎水性により肝臓での望ましくない取込みが生じる。これはアルファ放射体などの細胞毒性の高い薬剤において典型的な薬物化合物よりもはるかに重大な問題となる。キレート剤の疎水性はほかにも、疎水性が宿主の免疫系によって産生される抗体の結合を強化するため、免疫応答のリスクが増大する。これも同じくアルファ放射体の細胞毒性がきわめて高いことに起因する懸念である。したがって、上に述べた1つまたは複数の問題に対処するため、親水性、具体的には配位子部分の親水性が増大したコンジュゲートによってアルファ放射性トリウム放射性核種を選択的に送達する方法の必要性が相当高いことは明らかである。

40

【0019】

のちに標的化部分と結合させるにはヒドロキシピリジノン基を含む八座キレート剤がア

50

ルファ放射体トリウム - 277 の配位に適していることがこれまでに示されている（国際公開第2011098611号）。リンカー基によってアミン系足場と結合した4つの3, 2 - ヒドロキシピリジノン基を含み、標的化分子とのコンジュゲーションに用いられる別の反応基を有する八座配位子キレート剤が記載された。上に挙げた発明の好ましい構造は、複素環の1位にメチル置換窒素を有する3, 2 - ヒドロキシピリジノン基を含み、4位にギ酸が結合するアミン結合によってアミン系足場と結合し、化合物ALG-DD-NCs、ALG1005-38、Bb-1-HOPO-1-DEBNとして示されるものであった。上に挙げたヒドロキシピリジノン含有分子のうちの1つを腫瘍標的化抗体とコンジュゲートする実験では、分子を水性緩衝液に溶かすことができなかったため、これを有機溶媒DMSOに溶かした。

10

【0020】

現在、細胞毒性療法（癌の化学療法または内部放射性核種療法など）に特異的標的化部分を使用することは十分に確立された方法であり、多数の標的および潜在的な標的が知られている。これらは通常、疾患細胞もしくは疾患細胞に関連する細胞またはその周辺の基質にある程度優先的に発現する細胞表面または基質マーカー（受容体など）である。特異的結合部分が細胞毒性要素（化学的毒素または放射性核種など）を望ましくない細胞型（例えば、腫瘍細胞）の近傍に標的化し、運搬し、かつ/または結合させる役割を果たすことによって、細胞毒性薬がもたらす殺細胞作用の選択性を向上させ得る。このような特異的結合性を利用するには、結合部分が細胞毒性薬（錯体化放射性核種など）とコンジュゲートしているかコンジュゲート可能なものでなければならない。葉酸結合受容体、CD22、CD33、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体などをはじめとする多数の受容体を含め、細胞表面および基質標的が多数知られている。通常、このような細胞表面マーカーに対する特異性を有する抗体、抗体フラグメントまたはより小さい結合分子（「アフィボディ」など）を作製し、細胞毒性薬とコンジュゲートさせる。ここに挙げた既知の方法およびマーカーはいずれも、放射性核種薬剤とともに使用可能であると考えられる。しかし、調製の簡便性および時間が重要であり、またより小さい結合物質では、投与するのにコンジュゲート全体が溶解する必要があるため、溶解度が重要なものとなり得る。

20

【0021】

本発明者らは予想外にも、少なくとも1つが適切な可溶化部分で置換された4つのHOPO部分を含む八座配位子ヒドロキシピリジノン（HOPO）型配位子によって錯体化した4+トリウム-227イオンの使用により錯体の溶解度および対応する特性を劇的に向上させ得るということを確認した。

30

【発明の概要】

【0022】

したがって、第一の態様から見て、本発明は、組織標的化部分と、4つのHOPO部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、少なくとも4つのHOPO部分のうちの1つがN位（1位）においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている、組織標的化錯体を提供する。一実施形態では、このような錯体は純水に可溶性である。

【0023】

好ましい実施形態では、八座配位子は少なくとも1つの3, 2 - HOPO部分、好ましくは2つ、3つまたは4つの3, 2 - HOPO部分を含む。さらなる好ましい実施形態では、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ、最も好ましくは全4つのHOPO部分がN位にヒドロキシアルキル可溶化部分を含む。

40

【0024】

好ましい標的化部分としては、ポリクローナル、具体的にはモノクローナル抗体およびそのフラグメントが挙げられる。Fab、Fab'、Fab'2および一本鎖特異的結合抗体などの特異的結合フラグメントが典型的なフラグメントである。

【0025】

このような錯体（および好ましくは、本発明の全態様）では、一般にトリウムイオンを

50

八座ヒドロキシピリジノン含有配位子によって錯体化し、次いで、これを任意の適切な手段によって組織標的化部分と結合させる。このような手段としては、直接的な共有結合または任意の適切な特異的結合対（例えば、ビオチン／アビジン型結合対）の手段による結合が挙げられる。任意の適切な結合を用いることができるが、直接的な共有結合または共有もしくは結合対リンカー部分の使用が典型的な方法であろう。共有エステル結合または共有アミド結合が好ましい方法である。

【 0 0 2 6 】

さらなる態様から見て、本発明は、組織標的化部分と、4つのH O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、4つのH O P O部分のうちの少なくとも1つがN位においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている組織標的化錯体（本明細書に記載される任意のこのような錯体を含む）の、本明細書に記載される任意のものを含めた過形成性疾患または腫瘍性疾患を治療するための薬物の製造における使用を提供する。

10

【 0 0 2 7 】

対応する態様では、本発明は、ヒトまたは非ヒト動物（具体的には治療を必要とするもの）を治療する方法を提供し、この方法は、組織標的化部分と、4つのH O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、4つのH O P O部分のうちの少なくとも1つがN位においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている組織標的化錯体（本明細書に記載される任意のこのような錯体を含む）を少なくとも1つ投与することを含む。このような方法は、好ましくは、本明細書に記載される任意のものを含めた過形成性疾患または腫瘍性疾患の治療のためのものである。このような方法は通常、それを必要とするヒトまたは非ヒト哺乳動物対象などのヒトまたは非ヒト哺乳動物対象に対して実施する。

20

【 0 0 2 8 】

さらなる対応する実施形態では、本発明は、治療に使用するための、特に本明細書に記載される任意の疾患および方法を含めた過形成性疾患および／または腫瘍性疾患の治療に使用するための、組織標的化部分と、4つのH O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、4つのH O P O部分のうちの少なくとも1つがN位においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている組織標的化錯体（本明細書に開示されるこのような錯体をすべて含む）を提供する。

30

【 0 0 2 9 】

さらなる態様から見て、本発明は、組織標的化部分と、4つのH O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、4つのH O P O部分のうちの少なくとも1つがN位においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている組織標的化錯体（本明細書に記載される任意のこのような錯体を含む）を少なくとも1つの医薬担体または添加剤とともに含む、医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 0 】

天然に最も多く存在するトリウム同位体、すなわちトリウム - 2 3 2（半減期が 1.0^{10} 年であり、事実上非放射性である）のトリウム錯体と区別するため、本明細書で特許請求されるトリウム錯体およびその組成物は、アルファ放射性トリウム放射性同位体（すなわち、半減期が 1.0^3 年末満の少なくとも1つのトリウム同位体、例えばトリウム - 2 2 7）を天然の相対存在量よりも多く、例えば、少なくとも20%多く含むことを理解すべきである。このことは、治療有効量のトリウム - 2 2 7などの放射性トリウムを明示的に必要とする本発明の方法の定義に影響を及ぼす必要はないが、好ましくは全態様に当てはまる。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の全態様において、アルファ放射性トリウムイオンはトリウム - 2 2 7のイオンであることが好ましい。トリウムの4 + イオンは、本発明の錯体に使用するのに好ましいイオンである。それに応じて、トリウム - 2 2 7の4 + はきわめて好ましい。

【 0 0 3 2 】

50

さらなる態様では、本発明は、組織標的化錯体を形成する方法をさらに提供し、当該方法は、組織標的化部分と八座ヒドロキシピリジノン含有配位子とを水溶液中でカップリングさせることを含み、錯体は4つのHOP O部分とアルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含み、4つのHOP O部分のうちの少なくとも1つがN位においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている。このような方法は、いかなる有機溶媒も実質的に存在しない状態で実施し得る。

【0033】

またさらにさらなる態様から見て、本発明はほかに、本発明による方法に使用するキットを提供し、当該キットは、4つのHOP O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子とコンジュゲートしているかコンジュゲート可能な組織標的化部分を含み、4つのHOP O部分のうちの少なくとも1つがN位(1位)においてヒドロキシアルキル可溶化基で置換されている。結合部分および配位子はすべて、本明細書に記載されるものであるのが好ましい。このようなキットは、任意選択で、また好ましくは、 ^{227}Th などのアルファ放射性トリウム放射性核種を含む。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】それぞれ非コンジュゲートmAbおよび1つまたは2つのキレート剤とコンジュゲートしたmAbの分布を示す質量スペクトルAGC0715(上)である。平均キレート剤-抗体比(CAR)は約0.3である。

【図2A-B】フローサイトメトリーにより分析したCD33陽性HL-60細胞に対するAGC0700およびAGC0715の結合を示す図である。ヤギ抗ヒトFc、Alexa488とコンジュゲートした二次抗体を用いて抗体を検出し、平均蛍光強度(MFI)を一次抗体の濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対してプロットした。AC0103(Herceptin)をアイソタイプ様対照として用いた。様々なキレート剤-抗体(CAR)比のAGC0715を非コンジュゲートAGC700と比較した(A)。対照実験では、AGC700と参照マウス抗ヒトCD33抗体とを50:50の混合比で混合した(B)。

【図3】AGC0715-Th-227(黒四角)、AGC0703-Th-227(白四角)および陰性対照トラスツマブ-AC0015-Th-227(三角)の内部移行を示す図である。

【図4A-B】Th-227標識AGC0015とコンジュゲートしたCD33結合mAb AGC0715(黒丸)、Th-227標識AGC0015とコンジュゲートした対照mAbトラスツマブ(黒四角)または培地(黒菱形)とともにインキュベートしたHL-60リンパ腫細胞を示す図である。両mAbとも同じ比活性になるようTh-227で標識し、3nM(A)または0.3nM(B)で使用した。

【図5】HL-60腫瘍を有するヌードマウスにおける ^{227}Th -AGC0715の生体内分布を示す図である。データは、注射7日後に腫瘍内への取込みが高くなることを示している($23 \pm 10.7\% \text{ID/g}$)。

【図6】AGC1115の280nm(A)および335nm(B)におけるSEC-UVCクロマトグラムである。平均キレート剤-抗体比(CAR)は約0.9である。

【図7】フローサイトメトリーにより分析したCD22陽性Raji細胞に対するAGC1100およびAGC1115の結合を示す図である。マウス抗ヒトIgG Fc、PEとコンジュゲートした二次抗体を用いて検出を実施し、蛍光強度(MFI)中央値を一次抗体の対数濃度nMに対してプロットした。トラスツマブをアイソタイプ対照として使用した。

【図8】Th-227標識AGC0015とコンジュゲートしたCD22結合mAb AGC1115(黒丸)、Th-227標識AGC0015とコンジュゲートした対照mAbトラスツマブ(黒四角)または培地(黒菱形)とインキュベートしたRamoss細胞を示す図である。両mAbとも同じ比活性($44 \text{ kBq}/\mu\text{g}$)になるようTh-227で標識し、3nMで使用した(A)。

【図9】実施例18の生成物15のHPLC分析を示す図である。出発物質11が6.0

10

20

30

40

50

4 1 分、所望のアミド生成物 1 5 が 7 . 6 1 6 分、ジアシル化された副生成物が 8 . 1 5 7 分に示されている。

【図 1 0】A G C 0 2 0 3 (図 1 0 A) および A G C 0 2 1 5 (図 1 0 B) の F P L C - S E C クロマトグラムである。2 8 0 n m において吸光度をモニターした。ピーク下の総面積を求めたところ、それぞれ 1 6 6 m A U * m L および 4 0 9 m A U * m L であった。

【図 1 1】サイズ排除クロマトグラフィーによって分離された主要なタンパク質画分、A G C 0 2 0 0、A G C 0 2 0 3 および A G C 0 2 1 5 のダイオードアレイ分光光度分析を示す図である。コンジュゲート中のキレート剤は約 3 3 5 n m で吸収し、タンパク質は約 2 8 0 n m で吸収する。

【図 1 2】A G C 0 2 0 0 (1 2 A)、A G C 0 2 0 3 (1 2 B) および A G C 0 2 1 5 (1 2 C) の調製物の M S スペクトルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

本発明の文脈において、「組織標的化」は本明細書で、問題の物質（具体的には、本明細書に記載される組織標的化錯体の形態である場合）が、その存在（例えば、放射性崩壊を送達するため）が望まれる少なくとも 1 つの組織部位にそれ自体を優先的に局在させる役割（および具体的には、任意のコンジュゲートしたトリウム錯体を局在させる役割）を果たすことを表すのに使用される。したがって、組織標的化基または部分は、対象に投与した後に対象の体の少なくとも 1 つの所望の部位に平均よりも多く局在させる役割を果たす。標的化部分は、例えば、罹患細胞上に存在する細胞表面マーカー（例えば、受容体、輸送タンパク質、細胞接着分子など）と結合し得る。同様に、組織標的化部分は、罹患細胞近傍の細胞上に存在する細胞表面マーカー（例えば、受容体、輸送タンパク質、細胞接着分子など）と結合し得る。このような細胞表面マーカーには、疾患細胞表面に健常細胞表面よりも多く発現するタンパク質または成長期もしくは複製期に休止期よりも多く細胞表面に発現するタンパク質が含まれる。このほか、標的細胞もしくは組織またはそれに関連する細胞もしくは組織の近傍に存在する成分を本発明の任意の態様による治療法の標的に利用し得る。例えば、標的細胞または標的組織周囲の基質中に存在するか放出される成分であれば、その存在、形態または濃度によってその領域が健常組織と区別される場合にそれを標的として使用し得る。このような例には、脳腫瘍に関連するが細胞間の基質中に発現するテネイシンなどの基質抗原がある。このような基質抗原は、本明細書で述べられる単一または複合標的化部分によって標的化することができる。

【 0 0 3 6 】

組織標的化部分はほかにも、総体としてトリウム錯体を所望の組織（1 つまたは複数）に標的化する作用を有する 2 つ以上の成分を含み得る。これは例えば、最初に 1 つの成分が投与されて特定の組織、腫瘍または細胞型と結合し（組織結合物質）、同時にまたは好ましくはその後第二のおよび / またはさらなる成分（連結物質）が投与され、これが *in vivo* で組織結合物質と結合する場合であり得る。連結物質が錯体化アルファ放射性トリウムと直接的または間接的にコンジュゲートし、これにより組織結合物質と連結物質が総体として組織標的化部分を形成し得る。互いに親和性のある組織結合物質と連結物質を得るのに適した適切な特異的結合対は当該技術分野で周知である（例えば、ピオチンとアビジンまたはストレプトアビジン）。

【 0 0 3 7 】

本明細書に記載される本発明の様々な態様は、具体的には患部組織を選択的に標的とする疾患の治療に関するほか、このような方法に有用な錯体、コンジュゲート、薬物、製剤、キットなどに関する。全態様において、患部組織は体の単一の部位に存在するもの（例えば、局在する固形腫瘍の場合）であっても、複数の部位に存在するもの（例えば、関節炎で複数の関節が冒されている場合または癌性疾患が分散もしくは転移している場合）であってもよい。

【 0 0 3 8 】

標的とする患部組織は軟部組織部位にあっても、石灰化組織部位にあっても、すべて軟

10

20

30

40

50

部組織中にあり得る、すべて石灰化組織中にあり得る、あるいは少なくとも1つの軟部組織部位および/または少なくとも1つの石灰化組織部位を含み得る複数の部位であってもよい。一実施形態では、少なくとも1つの軟部組織部位を標的とする。標的化部位と疾患発生部位は同じ部位であり得るが、異なる部位（転移部位を特異的に標的とする場合など）であってもよい。2つ以上の部位に及ぶ場合、これは発生部位を含むものであっても、複数の二次部位であってもよい。

【0039】

本明細書では、「軟部組織」という用語は、「硬い」石灰化基質のない組織を表すのに使用される。特に本明細書で使用される軟部組織は、骨格組織ではない任意の組織であり得る。これに対応して、本明細書で使用される「軟部組織疾患」は、本明細書で使用される「軟部組織」に発生する疾患を表す。本発明は具体的には癌および「軟部組織疾患」の治療に適するものであるため、任意の「軟部」（すなわち、非石灰化）組織に発生する癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫および混合型癌のほかにも、このような組織の他の非癌性疾患を包含する。癌性「軟部組織疾患」には軟部組織に発生する固形腫瘍のほか、転移腫瘍および微小転移腫瘍が含まれる。実際、軟部組織疾患は、同じ患者の軟部組織の原発固形腫瘍と軟部組織の少なくとも1つの転移腫瘍とを含み得る。あるいは、「軟部組織疾患」は、原発腫瘍のみまたは原発腫瘍が骨格疾患である転移腫瘍のみからなるものであり得る。

【0040】

ある特定のアルファ放射性トリウム同位体（例えば、 ^{227}Th ）を治療的に有効でかつ許容されない骨髄毒性を引き起こさない量で投与し得るというのは近年発見された重要な事実である。本明細書で使用される「許容できる非骨髄毒性」という用語は、最も重要なことであるが、投与したトリウム-227放射性同位体の崩壊によって生じるラジウム-223の量が、一般に対象に直接致命的にならない程度であることを表すのに使用される。しかし、このような治療の許容される副作用となる骨髄損傷（および致命的反応の確率）の量が治療する疾患の種類、治療法の目的および対象の予後によって大幅に異なることは当業者には明らかであろう。本発明の好ましい対象はヒトであるが、その他の哺乳動物、具体的にはイヌでも本発明の使用による利益を受け、許容される骨髄損傷のレベルも対象の種を反映したものになり得る。許容される骨髄損傷のレベルは一般に、悪性疾患の治療の方が非悪性疾患の治療よりも高くなる。よく知られている骨髄毒性のレベルの尺度の1つが好中球細胞数であり、本発明では、許容される ^{223}Ra の非骨髄毒性量は通常、最低点（最下点）における好中球画分が治療前の細胞数の10%以上になるようコントロールされた量となる。好ましくは、許容される ^{223}Ra の非骨髄毒性量は、好中球細胞画分が最下点において少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%になる量となる。最下点の好中球細胞画分が少なくとも40%であるのが最も好ましい。

【0041】

さらに、幹細胞支持またはこれと同等の回復法を含める場合、通常であれば生成したラジウム（例えば、 ^{223}Ra ）の骨髄毒性が不耐容性である高用量レジメンに放射性トリウム（例えば、 ^{227}Th ）含有化合物を使用し得る。このような場合、適切な注意を払い、のちに幹細胞支持を実施する限り、最下点における好中球細胞数が10%未満まで減少してもよく、例外的には5%まで、必要に応じて5%未満まで減少する。このような技術は当該技術分野で周知である。

【0042】

本発明で特に関心がもたれるトリウム同位体がトリウム-227であり、文脈上可能であれば、本明細書でトリウムに言及する場合はいずれもトリウム-227が好ましい同位体である。トリウム-227は作製が比較的容易で、中性子を照射した ^{226}Ra から間接的に調製することが可能であり、これには ^{227}Th の母核種、すなわち ^{227}Ac （ $T_{1/2} = 22$ 年）が含まれる。アクチニウム-227は ^{226}Ra 標的から分離するのがきわめて容易であり、 ^{227}Th の発生源として使用することができる。この工程は必要に応じて工業規模に拡大することが可能であり、したがって、分子標的化放射線療法の候補に考えら

れている他のアルファ放射体のほとんどにみられる供給の問題が回避され得る。

【 0 0 4 3 】

トリウム - 2 2 7 はラジウム - 2 2 3 を経て崩壊する。この場合、主要な娘核種の半減期は 1 1 . 4 日である。最初の数日間は、純粋な ^{227}Th 入手源から中程度の量のラジウムしか生成しない。しかし、 ^{223}Ra からアルファ粒子が放射されて数分以内に短寿命の娘核種からアルファ粒子がさらに 3 種類放射されるため、 ^{223}Ra の潜在的な毒性は ^{227}Th よりも高い (トリウム - 2 2 7 の崩壊系列を記載した下の表 2 を参照されたい)。

【 0 0 4 4 】

【表 2】

核種	崩壊形式	平均粒子エネルギー(MeV)	半減期
^{227}Th	α	6.02	18.72日
^{223}Ra	α	5.78	11.43日
^{219}Rn	α	6.88	3.96秒
^{215}Po	α	7.53	1.78秒
^{211}Pb	β	0.45	36.1分
^{211}Bi	α	6.67	2.17分
^{207}Tl	β	1.42	4.77分
^{207}Pb			安定

10

【 0 0 4 5 】

トリウム - 2 2 7 ($T_{1/2} = 1 8 . 7$ 日) は有害な崩壊生成物を生じることの一部の理由に、アルファ粒子療法に広く考慮されることはなかった。

20

【 0 0 4 6 】

トリウム - 2 2 7 は、不耐容性の骨髄抑制を引き起こす量のラジウム - 2 2 3 を生じることなく望ましい治療効果が得られる量で投与し得る。娘同位体の崩壊からなおも治療効果が得られるよう娘同位体を標的となる領域内に維持するのが望ましい。しかし、許容されない骨髄毒性を誘発せずに有用な治療効果を得るのにトリウム崩壊生成物の制御を維持する必要はない。

【 0 0 4 7 】

殺腫瘍細胞作用が主としてトリウム - 2 2 7 によるものであり、その娘核種によるものではないことを想定すると、他のアルファ放射体との比較によってこの同位体の予想される治療量を確立することができる。例えば、アスタチン - 2 1 1 では、動物における治療量は通常、 $2 \sim 10 \text{ MBq} / \text{kg}$ とされてきた。半減期およびエネルギーを補正すれば、対応するトリウム - 2 2 7 の投与量は体重 1 kg 当たり少なくとも $36 \sim 200 \text{ kBq}$ になる。これにより、治療効果を期待して有効に投与し得る ^{227}Th の量の下限が設定される。この計算は、アスタチンとトリウムが同程度滞留すると仮定したものである。しかし、トリウムの 18.7 日という半減期により、この同位体の方が崩壊前に多く排出される可能性が高いことは明らかである。したがって、この算出された投与量は通常、最小の有効量と見なすべきである。 ^{227}Th が完全に保持される (すなわち、 ^{227}Th が体から排出されない) と考えて治療量を表せば、通常少なくとも 18 または $25 \text{ kBq} / \text{kg}$ 、好ましくは少なくとも $36 \text{ kBq} / \text{kg}$ 、より好ましくは少なくとも $75 \text{ kBq} / \text{kg}$ 、例えば $100 \text{ kBq} / \text{kg}$ 以上となる。トリウムの量をこれより多くすればさらに高い治療効果が期待されるが、不耐容性の副作用が生じる場合は多くすることはできない。これと同様に、トリウムを生物学的半減期 (すなわち、依然としてトリウムを保持している体から排出される前の半減期) が短い形態で投与する場合、多量のトリウムが崩壊前に排出されるため、治療効果を得るには放射性同位体の量を多くする必要がある。しかし、これに対応して、生成するラジウム - 2 2 3 の量は減少することになる。上に述べた同位体が完全に保持される場合に投与するトリウム - 2 2 7 の量と、生物学的半減期の短い同等の投与量との関係は容易に求めることができる。このような計算は当該技術分野で周知であり、国際公開第 $04/091668$ 号 (例えば、実施例 1 および 2 の本文) に記載されている。

30

40

50

【0048】

放射標識化合物が娘核種を放出する場合、該当すれば放射性娘核種（1つまたは複数）の運命を知ることが重要である。 ^{227}Th であれば、主要な娘生成物は ^{223}Ra であり、この生成物は骨親和性があるため臨床評価段階にある。ラジウム-223は血液からきわめて迅速に排出され、骨格内に濃縮されるか、腸および腎臓経路を介して排泄される（Larsen, J Nucl Med 43(5, Supplement):160P(2002)を参照されたい）。したがって、 ^{227}Th からin vitroで放出されたラジウム-223は、健常軟部組織にあまり影響を及ぼさないと考えられる。Int. J. Radiat. Biol. 20:233-243(1971)に記載されているMullerによる溶解したクエン酸塩としての ^{227}Th の分布に関する研究では、軟部組織内の ^{227}Th から生成した ^{223}Ra が容易に骨に再分布するか排泄されることが明らかにされている。したがって、知られているアルファ放射性ラジウムの毒性、具体的には骨髄に対する毒性はトリウム投与量の問題である。

10

【0049】

実際、投与量が少なくとも 200 kBq/kg の ^{223}Ra をヒト対象に投与しても耐容性が認められることが、国際公開第04/091668号で初めて確認されている。このデータは上記公開特許に示されている。したがって、全く予想外ではあるが、治療有効量（ 36 kBq/kg 以上など）の ^{227}Th を哺乳動物対象に、このような対象に許容されない重篤な、場合によっては致命的な骨髄毒性のリスクが発生することを予想せずに、投与することが可能な治療域量が実際に存在することがわかった。しかし、この治療域を最大限に活用することがきわめて重要であり、したがって、投与量のうち最大限の割合の量が標的部位に送達されるよう放射性トリウムを迅速かつ効率的に錯体化し、親和性がきわめて高くなるよう保持することが不可欠である。

20

【0050】

^{227}Th 医薬品から生成する ^{223}Ra の量は、放射標識化合物の生物学的半減期に左右される。理想的な状況は、腫瘍細胞へ内部移行し、腫瘍内に強固に滞留し、正常組織内での生物学的半減期が短いことを含め迅速に腫瘍内に取り込まれる錯体を用いることであると考えられる。しかし、生物学的半減期が理想値に達しない錯体であっても、 ^{223}Ra の投与量が耐容レベル内に維持される限り有用である。in vivoで生じるラジウム-223の量は、トリウム投与量とトリウム錯体の生物学的滞留時間の因子となる。任意の特定の場合に生じるラジウム-223の量は、当業者であれば容易に算出することができる。投与可能な ^{227}Th の最大量はin vivoで生じるラジウムの量によって決まり、不耐容レベルの副作用、具体的には骨髄毒性が生じる量未満でなければならない。この量は一般に、 300 kBq/kg 未満、具体的には 200 kBq/kg 未満、より好ましくは 170 kBq/kg 未満（例えば、 130 kBq/kg 未満）である。最小有効量はトリウムの細胞毒性、生じるアルファ放射線に対する患部組織の感受性およびトリウムがどの程度標的化錯体（この場合、配位子と標的化部分の組合せ）と効果的に結合し、これに保持され送達されるかによって決まる。

30

【0051】

本発明の方法では、トリウム錯体を望ましくは $18\sim400\text{ kBq/kg}$ 体重、好ましくは $36\sim200\text{ kBq/kg}$ （ $50\sim200\text{ kBq/kg}$ など）、より好ましくは $75\sim170\text{ kBq/kg}$ 、特に $100\sim130\text{ kBq/kg}$ のトリウム-227投与量で投与する。これに対応して、1回の投与量は、ここに挙げたいずれかの範囲に $30\sim150\text{ Kg}$ 、好ましくは $40\sim100\text{ Kg}$ などの適切な体重を乗じた数値前後（例えば、1投与当たり $540\text{ kBq}\sim4000\text{ Kg}$ の範囲など）を含み得る。トリウム投与量、錯化剤および投与経路はまた、in vivoで生じるラジウム-223量が 300 kBq/kg 未満、より好ましくは 200 kBq/kg 未満、さらにより好ましくは 150 kBq/kg 未満、特に 100 kBq/kg 未満になるものが望ましい。もう一度述べると、これにより、示されるいずれかの体重を上に乗げた範囲に乗じることによって示される ^{223}Ra への曝露が得られる。上記投与量レベルは ^{227}Th が完全に保持される投与量であるの

40

50

が好ましいが、崩壊前に一部の ^{227}Th が崩壊前に体から排出されることを考慮に入れた投与量であってもよい。

【0052】

^{227}Th 錯体の生物学的半減期が物理的半減期に比べて短い（例えば、7日未満、特に3日未満）場合、同等の投与量を保持するのに相当多い投与量を必要とする場合がある。したがって、例えば、完全に保持される投与量 150 kBq/kg は、半減期が5日の錯体を 711 kBq/kg の投与量で投与する場合と等しくなる。任意のしかるべき保持投与量に等しい投与量は、当該技術分野で周知の方法を用いて錯体の生物学的クリアランス速度から算出することができる。

【0053】

^{227}Th 核が1個崩壊すると ^{223}Ra 原子が1個生じるため、 ^{227}Th の保持および治療活性は、患者が受ける ^{223}Ra 投与量と直接関係がある。任意の特定の状況で生じる ^{223}Ra の量は周知の方法を用いて算出することができる。

【0054】

したがって、好ましい実施形態では、本発明は哺乳動物対象（本明細書に記載される）の疾患の治療のための方法を提供し、当該方法は、当該対象に組織標的化部分と、八座配位子（特に本明細書に記載されるいずれかのもの）と、放射性トリウム同位体（例えば、トリウム-227）を含むコンジュゲートを治療有効量投与することを含む。

【0055】

^{223}Ra 娘同位体の特性を有効に用いない限り、対象の ^{223}Ra 娘同位体への曝露を最小限に抑えることが望ましいのは明らかである。具体的には、*in vivo*で生じるラジウム-223は通常、 40 kBq/kg 超、例えば 60 kBq/kg 超となる。場合によっては、*in vivo*で生じる ^{223}Ra が 80 kBq/kg 超、例えば 100 または 115 kBq/kg 超となる必要がある。

【0056】

しかるべき担体溶液中のトリウム-227標識コンジュゲートを単回適用または分割適用レジメンとして静脈内に、腔内に（例えば、腹腔内に）、皮下に、経口的にまたは局所的に投与し得る。好ましくは、標的化部分とコンジュゲートした錯体を溶液として非経口（例えば、経皮）経路によって、特に静脈内にまたは腔内経路によって投与する。好ましくは、本発明の組成物を非経口投与用に無菌溶液に製剤化する。

【0057】

本発明の方法および製品におけるトリウム-227は単独で使用しても、または外科手術、遠隔照射療法、化学療法、他の放射性核種または組織温度調節などを含めた他の治療法と併用してもよい。これは本発明の方法のさらなる好ましい実施形態を形成するものであり、それに対応して、製剤/薬物は別の放射性薬剤または化学療法剤などの追加の治療活性薬剤を少なくとも1つ含み得る。

【0058】

1つの特に好ましい実施形態では、ほかにも対象に幹細胞治療および/またはその他の支持療法を実施して、ラジウム-223による骨髄毒性の作用を低減する。

【0059】

本発明に従って、 ^{227}Th を標的化錯化剤によって錯体化し得る。通常、標的化部分は分子量が 100 g/mol ～数百万 g/mol （具体的には 100 g/mol ～ 100万 g/mol ）であり、好ましくは疾患関連受容体に対して直接親和性があり、かつ/または ^{227}Th の投与前に疾患に対して標的化された分子と結合した予め投与する適切な結合物質（例えば、ピオチンまたはアビジン）を含む。適切な標的化部分としては、ポリペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、DNAおよびRNAフラグメント、アプタマーなど、好ましくはタンパク質、例えば、アビジン、ストレパタビジン（*streptavidin*）、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体（IgGおよびIgM型抗体を含む）あるいはタンパク質またはタンパク質のフラグメントもしくは構築物の混合物が挙げられる。抗体、抗体構築物、抗体のフラグメント（例えば、FABフラグメントまたは抗原

10

20

30

40

50

結合領域を少なくとも1つ含む任意のフラグメント)、フラグメントの構築物(例えば、一本鎖抗体)またはその混合物が特に好ましい。適切なフラグメントとしては、特に Fab、F(ab')₂、Fab' および/または scFv が挙げられる。抗体構築物は本明細書に示される任意の抗体またはフラグメントのものであり得る。

【0060】

一実施形態では、標的化部分は CD22、CD33、葉酸受容体、エストロゲンおよび/またはプロゲステロン受容体あるいは腫瘍性細胞型に付随する任意の細胞表面受容体などの細胞表面受容体に対する特異性を有し得る。

【0061】

別の実施形態では、標的化部分は CD22 または CD33 に対して特異性を有さない。一実施形態では、標的化部分は受容体 CD22 と結合せず、かつ/または受容体 CD33 と結合しない。結合しないことは、インスリン受容体などの対照受容体との結合以下の程度で結合することと考えられ得る。

【0062】

さらなる実施形態では、特異的結合部分は、抗体のものと類似した特異的結合領域を少なくとも1つ有し分子質量が約10kDa未満(例えば、0.5~7kDaなどの8kDa以下)のペプチド結合物質などの「抗体模倣物」であり得る。このような特異的結合剤物質は、例えば、20~100個のアミノ酸、好ましくは35~80個のアミノ酸(例えば、約45~約70個のアミノ酸)からなるペプチドであり得る。この種の特異的結合物質で周知のものとしては、約55~60個のアミノ酸からなり分子量が約5~7kDaのアフィボディ分子が挙げられる。本明細書ではアフィボディ含有融合タンパク質を例として挙げる。このような結合物質は1つの好ましい実施形態を形成するものである。比較のために挙げると、典型的な抗体の質量が約150kDaであり、単ドメイン抗体フラグメント(scFv)の質量が約12~15kDaである。

【0063】

このほか、本発明での使用に適したものには、錯体化²²⁷Thと、ペプチド、アミノ酸、ステロイドホルモンまたは非ステロイドホルモン、葉酸、エストロゲン、テストステロン、ピオチンをはじめとする分子量が通常1000g/mol未満の特異的結合化合物との治療用コンジュゲートがある。

【0064】

一般に、八座配位子を標的化部分と直接的または間接的に(例えば、リンカー部分を介して)コンジュゲートさせる。このタイプ、すなわち、活性な(例えば、治療的にまたは診断的に活性な)金属-錯体化部分-任意選択のリンカー部分-標的化部分のタイプの一般的な構築物は標的化放射性医薬品および標的化造影剤の分野で周知である。しかし、様々な配位子についてトリウム4+イオンに特異的に使用するのに適するかどうかを評価した研究はほとんどまたは全くない。この点に関しては、例えば、“Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents”, Torchilin編, CRC Press, 1995が参照されよう。

【0065】

ヒドロキシピリジノン配位子を有するトリウムイオンに関するこれまでの研究で最も適切なものが国際公開第2011/098611号として公開されており、これには八座HOPPO含有配位子と錯体化したトリウム(thorium)イオンの比較的容易な作製が開示されている。

【0066】

これまでに知られているトリウムのキレート剤としてはほかにも、主鎖の窒素部分に酸性(例えば、カルボキシアルキル)基が結合した直鎖状、環状または分岐状のポリアザアルカン主鎖を含むポリアミノポリ酸キレート剤が挙げられる。このようなキレート剤の例としては、p-イソチオシアナトベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1,4,7,10-四酢酸(p-SCN-Bz-DOTA)などのDOTA誘導体およびp-イソチオシアナトベンジル-ジエチレントリアミン五酢酸(p-SCN-Bz-

10

20

30

40

50

DTPA)などのDTPA誘導体が挙げられ、前者は環状キレート剤、後者は直鎖状キレート剤である。

【0067】

これまでに1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸の誘導体が例として挙げられているが、DOTA誘導体でトリウムをキレートするのに標準的な方法を容易に用いることはできない。DOTA誘導体と金属とともに加熱すると効率的にキレートされるが、収率が低くなる場合が多い。少なくとも一部の配位子が処理中に不可逆的に変性する傾向がある。さらに、標的化部分は不可逆的変性に対する感受性が比較的高いため、一般に加熱段階がすべて完了するまで標的化部分の結合を避ける必要がある。これにより、アルファ放射性トリウム同位体の崩壊寿命の間に実施しなければならない余分な化学的段階(すべての必要なワークアップおよび分離とともに)が加わる。アルファ放射性物質をこのように取り扱ったり、これに伴う無駄を必要以上に生じさせたりすることは好ましくないのは明らかである。さらに、コンジュゲートの調製に費やす時間はすべて、この調製時間中に崩壊する分のトリウムを浪費するものである。

10

【0068】

本発明の全態様においてアルファ放射性トリウムと八座配位子の錯体は、60 超に加熱せずに(例えば、50 超に加熱せずに)、好ましくは38 超に加熱せずに、最も好ましくは25 超に加熱せずに形成されるか形成可能であるのが好ましい。

【0069】

さらに、アルファ放射性トリウム同位体(例えば、 $^{227}\text{Th}^{4+}$ イオン)を加える前に標的化部分と八座配位子とのコンジュゲートを調製するのが好ましい。したがって、本発明の生成物は、八座配位子と組織標的化部分とのコンジュゲートによるアルファ放射性トリウム同位体(例えば、 $^{227}\text{Th}^{4+}$ イオン)の錯体化によって形成されるか形成可能であるのが好ましい。

20

【0070】

キレート剤は非ホスホン酸分子であり得、本発明の一実施形態では、 ^{227}Th はホスホン酸をはじめとする骨標的化基と結合させることも、このような物質とともに投与することもない。

【0071】

本発明者らは、4つのHOPPO部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子と、アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンとを含む錯体が、室温および/または生理的温度(例えば、20 または37)での作製にきわめて適していることを確認している。このような錯体は迅速に作製され得るものであり、さらには作製温度が比較的低いため、配位子部分が組織標的化部分と結合または別の方法でコンジュゲートした後にトリウム成分の錯体化が起こり得ることから、放射性同位体の添加後に必要な段階数が少なくなる。

30

【0072】

上記のことに加えて、少なくとも1つのHOPPO部分がヒドロキシアルキル可溶化基を含む4つのHOPPO部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子の水溶性が高いことが、完全なコンジュゲートの製造の簡便さをさらに向上させるのに役立つ。具体的には、コンジュゲートを製造するとき、既に知られている八座配位子などの疎水性キレート剤であればDMSOまたはDMAなどの有機溶媒に溶かす必要がある。コンジュゲーション後、有機溶媒を完全に除去する必要があるが、このような不揮発性の極性有機溶媒の除去は困難であり、完全に除去されたことを分析的に示すのは難しい。アルファ放射体が既に組み込まれている場合、分析に時間を費やすのは、放射性核種が崩壊し続け、コンジュゲートの効力が時間とともに減少することから明らかに望ましくない。

40

【0073】

有機溶媒を必要とすることから、疎水性キレート剤は、タンパク質性標的化分子のみならず、表面にPEGまたはデキストランを有するナノ粒子を含めたより親水性の高い別の標的化分子とはなおさら、組み合わせるのが困難である。

【0074】

50

半減期が長いまたは免疫応答を軽減するなどの生物学的な理由から、PEGまたは別の親水性で水溶性の高いスペーサーが望まれ得る。タンパク質とのコンジュゲーション前にキレート剤 - PEG単位を製造することも、この2つの部分の溶解性の違いから困難なものとなる。PEGまたはこれと同様のスペーサーがあると、分子のキレート部分と担体タンパク質との間により高い親水性がもたらされる。しかし、これはキレート剤を担体タンパク質からさらに離れた位置に移動させるだけで、キレート剤の疎水性は影響を受けない。したがって、疎水性キレート剤は依然として（ペグ化）標的化分子の表面に疎水性スポットとして認められ、本明細書で上に述べた通り望ましくない反応を起こし得る。

【0075】

八座配位子キレート剤（本明細書に記載されるカップリング部分を含む）を介してトリウム（例えば、トリウム - 227）と連結し得る様々なタイプの標的化化合物。標的化部分は既知の標的化基から選択することができ、このような標的化基としては、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、増殖因子、ペプチド、ホルモンおよびホルモン類似体、葉酸塩および葉酸塩誘導体、ボチン（botin）、アビジンおよびストレプトアビジンまたその類似体が挙げられる。ほかにも考えられる標的化基としては、RNA、DNAもしくはそのフラグメント（アプタマーなど）、オリゴヌクレオチド、炭水化物、脂質またはタンパク質を含めてもしくは含めずにこのような基を組み合わせることによって作製した化合物などが挙げられる。前述の通りPEG部分を加えて、例えば生物学的滞留時間を増大させ、かつ/または免疫刺激を低減してもよい。

【0076】

一実施形態では、組織標的化部分として、骨親和性物質、リポソームおよび葉酸とコンジュゲートした抗体または抗体フラグメントを除外し得る。あるいは、このような部分が含まれ得る。

【0077】

本発明のトリウム（例えば、トリウム - 227）標識分子は、疾患関連受容体を標的とすることによって癌性または非癌性疾患の治療に使用され得る。通常、このような²²⁷Thの医学的使用は、キレート剤によって²²⁷Thと抗体、抗体フラグメントまたは抗体もしくは抗体フラグメントの構築物とを連結することに基づく、癌性または非癌性疾患の治療のための放射免疫療法によるものとなる。本発明による方法および医薬品における²²⁷Thの使用は具体的には、癌腫、肉腫、リンパ腫および白血病を含めた任意の形態の癌、特に肺癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、胃癌、膵臓癌、食道癌、脳癌、卵巣癌、子宮癌、口腔癌、結腸直腸癌、黒色腫、多発性骨髄腫および非ホジキンリンパ腫の治療に適している。

【0078】

²²⁷Thを運搬する分子のin vivoでの生物学的保持半減期が短い場合、²²⁷Thの大部分が²²³Raに崩壊する前に放射性核種がほとんど除去されるため、放出される²²³Raの量が減少し得る。しかし、本発明によれば、治療効果を維持するために²²⁷Thの量を増加させる必要がある。²²⁷Thが標的細胞の内部に送達されるよう錯化剤を選択した場合、娘同位体が腫瘍部位に少なくとも一部保持されるため、これにより特異的細胞毒性がさらに増大し、放射性娘核種の全身毒性効果が低減される。これらの特徴はともに²²⁷Thの治療域を広げるため、本発明の好ましい実施形態を形成する。

【0079】

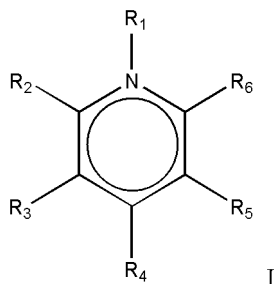
本発明のさらなる実施形態では、軟部組織および骨格の疾患をともに有する患者を²²⁷Thおよび投与したトリウムによりin vivoで生じる²²³Raの両方で治療し得る。この特に有利な態様では、骨格疾患に標的化することにより、許容される非骨髄毒性量の²²³Raから治療に追加の治療要素が得られる。この治療方法では通常、²²⁷Thを用いて、軟部組織の原発性および/または転移性癌をそれに対する適切な標的化により治療し、²²⁷Th崩壊から生じた²²³Raを用いて、同じ対象の関連する骨格疾患を治療する。この骨格疾患は原発性軟部組織癌に起因する骨格への転移であっても、軟部組織の治療で転移性癌を抑制する原発疾患であってもよい。軟部組織疾患と骨格疾患との間に関連がない

場合もあり得る（例えば、リウマチ性の軟部組織疾患を有する患者の骨格疾患に対する追加の治療）。

【 0 0 8 0 】

本発明のあらゆる点において重要な態様は、八座配位子、具体的には4つのH O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有配位子の使用である。このような配位子は通常、それぞれが独立して以下に挙げる置換ピリジン構造（I）を有する少なくとも4つのキレート基を含み：

【 化 1 】



10

式中、 R_1 は、式Iの4つの部分のうちの少なくとも1つに存在し、2つ、3つまたは全4つのこのような部分に存在し得る、任意選択のN置換基可溶化基である。したがって、 R_1 は存在していなくても、OHおよびヒドロキシアルキル部分から選択されるものであってもよい。適切なヒドロキシアルキル部分は少なくとも1つのOH基を含むが、任意選択で2つ、3つまたは4つなど2つ以上のOH基を含み得る。ヒドロキシアルキル部分に1つまたは2つのOH基があるのが最も好ましい。

20

【 0 0 8 1 】

H O P O部分（特に3, 2 - H O P Oおよび2, 3 - H O P O）のピリジノン環上にある窒素は、環の特性に大きな影響を及ぼさずに親水性置換基を導入するのに適した位置であり、重要なことに、分子と担体タンパク質または他の標的化分子とコンジュゲートした後外側を向く位置である。本発明者らはこれまでに、この位置にメチル基を有するピリミドン環をベースとしたキレート剤がトリウムイオンのキレート化に適していることを示した。新規なキレート剤には、N位のヒドロキシエチルを含めた別の基が導入されている。驚くべきことに、メチルからヒドロキシエチルにわずかに変化させただけで、純水に完全に溶解するキレート剤が得られた。この分子およびこれに関連するいくつかの例を以下に示す。

30

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用されるヒドロカルビル部分はすべて、C 1 ~ C 8 アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を含めたC 1 ~ C 8 ヒドロカルビルなどの短いヒドロカルビル基から独立して選択される。これに対応して、アルキル基は通常、メチル、エチル、n - またはイソ - プロピ（propyl）、n - 、イソ - またはsec - ブチルなどの直鎖または分岐鎖C 1 ~ C 8 アルキル基となる。

【 0 0 8 3 】

40

非常に好ましい R_1 基としては、アルキル鎖の炭素原子に結合したヒドロキシ基を1つ、2つまたはそれ以上有する直鎖または分岐鎖アルキル基（上に示したものなど）が挙げられる。いくつかの非常に好ましいヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシn - プロピル、ヒドロキシイソ - プロピル、ジ - ヒドロキシn - プロピル（例えば、1, 2 - 、2, 3 - または1, 3 - ジ - ヒドロキシプロピル）、ヒドロキシn - ブチル、ジ - ヒドロキシn - ブチルおよびトリ - ヒドロキシn - ブチルが挙げられ、ヒドロキシエチルが最も非常に好ましい。一実施形態では、八座配位子の4つのH O P O部分がそれぞれ R_1 位にヒドロキシアルキル（hydroxyl alkyl）（ヒドロキシエチルなど）基を含む。さらなる実施形態では、4つのH O P O部分がすべて同じヒドロキシアルキル基を含む（例えば、4つのH O P O基がすべてヒドロキシエチ

50

ルでN置換されているか、4つともジ - ヒドロキシプロピルで置換されている)。

【0084】

非常に好ましい実施形態では、4つのHOPPO基がすべて、3, 2 HOPPO基および2, 3 HOPPO基から選択される同じHOPPO基である。さらなる非常に好ましい実施形態(任意選択で前の実施形態と組み合わせてもよい)では、4つのHOPPO基がすべて、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピル、ヒドロキシブチル、ジヒドロキシプロピルおよびジヒドロキシブチルから選択される同じヒドロキシアルクリ(hydroxyalkyl)基でN置換されている。このリストのうち、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピルおよびジヒドロキシプロピルが最も好ましい。

【0085】

式Iにおいて、基 $R_2 \sim R_6$ はそれぞれ独立して、H、OH、=O、短いヒドロカルビル(本明細書に記載される)、リンカー部分(本明細書に記載される)および/またはカップリング部分(本明細書に記載される)から選択され得る。一般に、基 $R_2 \sim R_6$ のうちの少なくとも1つがOHである。一般に、基 $R_2 \sim R_6$ のうちの少なくとも1つが=Oである。一般に、基 $R_2 \sim R_6$ のうちの少なくとも1つがリンカー部分(本明細書に記載される)。好ましくは、基 $R_2 \sim R_6$ のうちのちょうど1つが=Oである。好ましくは、基 $R_2 \sim R_6$ のうちのちょうど1つがOHである。好ましくは、基 $R_2 \sim R_6$ のうちのちょうど1つがリンカー部分(本明細書に記載される)である。残りの基 $R_2 \sim R_6$ は本明細書に示される部分のいずれであってもよいが、好ましくはHである。リンカー部分またはリンカー部分に結合した任意の追加のリンカー、鋳型またはキレート基がカップリング部分を含まない場合、基 $R_1 \sim R_6$ のうちの1つがカップリング部分(本明細書に記載される)であるのが好ましい。

【0086】

好ましい実施形態では、基 $R_2 \sim R_6$ のうちの1つがOHであり、 $R_2 \sim R_6$ のうちの1つが=Oであり、OH基と=O基が環の隣接する原子上にある。したがって、好ましい実施形態では、OHと=Oはそれぞれ原子2, 3; 3, 2; 3, 4; または4, 3(予想される窒素からの番号付け)である。少なくとも1つのキレート部分を有し、OH基と=O基がそれぞれ3位および2位にある八座配位子が非常に好ましい。八座配位子はこのようなキレート基を2つ、3つまたは4つ有し得るが、この場合、このような基は2つまたは4つであるのが非常に好ましい。N置換3, 2-HOPPO部分は、八座配位子の全4つの錯体化部分として非常に好ましい。

【0087】

適切なキレート部分は、米国特許第5, 624, 901号(例えば、実施例1および2)および国際公開第2008/063721号(ともに参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている方法を含めた当該技術分野で公知の方法によって形成し得る。

【0088】

本明細書で使用する「リンカー部分」(式IIでは R_L)という用語は、本発明の様々な態様の重要な構成要素を形成する八座配位子内の少なくとも2つのキレート基を連結する役割を果たす化学物質を表すのに使用される。通常、各キレート基(例えば、上の式Iおよび/または下の式IIのキレート基)は二座であるため、少なくとも1つが式Iのものである4つのキレート基は通常、配位子内に存在する。このようなキレート基は、そのリンカー部分によって互いに連結している。したがって、リンカー部分(例えば、下の基 R_L)は、式Iおよび/またはIIの2つ以上のキレート基の間で共有され得る。リンカー部分はほかに、八座配位子の錯体化部分と標的化部分との間の結合点としての役割を果たし得る。このような場合、少なくとも1つのリンカー部分がカップリング部分(R_C)と連結する。適切なリンカー部分としては、あらゆるトポロジーのメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよび/またはヘキシル基を含むC1~C12アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を含めたC1~C12ヒドロカルビルなどの短いヒドロカルビル基が挙げられる。

【0089】

リンカー部分はほかに、エステル、エーテル、アミンおよび／またはアミド基を含めた他の任意の適度に堅固な化学結合であるか、これを含み得る。2つのキレート部分を連結する原子の総数（2つ以上の経路が存在する場合、最も短い経路で数えたもの）は一般に、キレート部分を錯体形成に適した配置に拘束するために制限される。したがって、通常、キレート部分の間の原子が15個以下、好ましくは1～12個、およびより好ましくは1～10個になるようリンカー部分を選択する。リンカー部分が2つのキレート部分を直接連結する場合、リンカーは通常、長さが1～12原子、好ましくは2～10原子（例えばエチル、プロピル、n-ブチルなど）である。リンカー部分が中心の鑄型と連結する場合（下を参照されたい）、各リンカーはこれより短いものであり得、2つの別々のリンカーがキレート部分を連結する。この場合、リンカーの長さは1～8原子、好ましくは1～6原子であるのが好ましい（メチル、エチルおよびプロピルのほか、一端または両端にエステル、エーテルまたはアミド結合を有する基が適している）。

10

【0090】

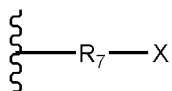
主として八座配位子の様々なキレート基を互いにおよび／または中心の鑄型と結合する役割を果たすリンカー部分に加えて、八座は、「カップリング部分」（ R_C ）をさらに含むのが好ましい。カップリング部分の機能は八座配位子と標的化部分とを結合することである。これは共有結合または非共有結合のいずれによっても（例えば、ビオチン／アビジン（ストレプトアビジン）などの特異的結合対によって）達成し得る。上記リンカー部分は、可能なカップリング部分を形成する。好ましくは、カップリング部分は、キレート基のうち的一方と直接共有結合することによって、またはより典型的には、リンカー部分もしくは鑄型と結合することによってキレート基と共有結合している。カップリング部分を2つ以上用いる場合、それぞれが任意の鑄型、リンカーまたはキレート基などにある利用可能な部分のいずれと結合していてもよい。

20

【0091】

－実施形態では、カップリング部分は構造：

【化2】



30

を有し、式中、 R_7 は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択されるメンバーである架橋部分であり；Xは標的化部分または反応性官能基である。好ましい架橋部分としては、本明細書に適切なリンカー部分として示される基すべてが挙げられる。好ましい標的化部分としては、本明細書に記載される標的化部分すべてが挙げられ、好ましい反応性X基としては、例えばCOOH、OH、SH、NHRおよびCOH基を含めた、標的化部分と共有結合を形成することが可能な任意の基が挙げられ、NHRのRはHであっても本明細書に記載されるいずれかの短いヒドロカルビル基であってもよい。標的化部分への結合に非常に好ましい基としては、リジン残基のイプシロン-アミンおよびシステイン残基のチオール基が挙げられる。適切な反応性X基の非限定的な例としては、N-ヒドロキシスクシミジルエステル、イミドエステル、ハロゲン化アシル、N-マレイミド、アルファ-ハロアセチルおよびイソチオシアナートが挙げられ、後ろの3つはチオール基との反応に適している。

40

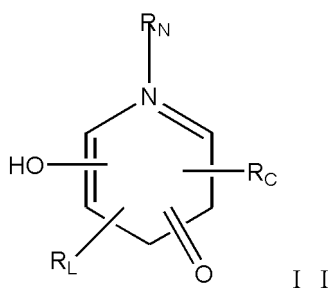
【0092】

カップリング部分は、得られるカップリングした八座配位子が安定な金属イオン錯体の形成を受けられるよう結合するのが好ましい。したがって、カップリング部分はリンカー、鑄型またはキレート部分と錯体化を著しく阻害しない部位で結合するのが好ましい。このような部位は、好ましくはリンカーまたは鑄型上の、より好ましくは標的と結合する表面から離れた位置にある。

【0093】

50

好ましいキレート基としては、下式 I I :
【化 3】



のキレート基が挙げられる。上式 I I において、= O 部分はピリジン環の任意の炭素と結合したケト基を表し、- O H はピリジン環の任意の炭素と結合したヒドロキシ部分を表し、- R_L は、ヒドロキシピリジノン部分と他の錯体化部分とを結合して八座配位子全体を形成するリンカー部分を表す。本明細書に記載されるリンカー部分はいずれも、あらゆるトポロジーのメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびノまたはヘキシル基を含む C 1 ~ C 8 アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を含めた C 1 ~ C 8 ヒドロカルビルなどの短いヒドロカルビル基を含め、R_L として適している。R_L は式 I I の環とピリジン環の任意の炭素において連結し得る。次に R_L 基は、別のキレート部分、別のリンカー基およびノまたは環もしくは他の鑄型（本明細書に記載される）などの中心の原子もしくは基と直接結合し得る。リンカー、キレート基および任意選択の鑄型部分は、しかるべき八座配位子を形成するよう選択される。

【0094】

好ましい一実施形態では、式 I I の - O H 部分と = O 部分がピリジン環の隣接する原子上に存在し、したがって、2, 3 - ; 3, 2 - ; 4, 3 - ; および 3, 4 - ヒドロキシピリジノン誘導体はすべて非常に適している。

【0095】

部分 R_L はピリジン環の窒素上に存在する。八座配位子内に式 I I の 2 つ以上の異なる基が存在する場合、式 I I の一部の基には基 R_N が存在しなくてもよい。しかし、各八座配位子内の少なくとも 1 つの R_N 基は、本明細書に示されるヒドロキシアルキル基である。

【0096】

好ましい一実施形態では、八座配位子構造内に 3, 2 - ヒドロキシピリジノン部分が少なくとも 1 つ存在する。これは本明細書に示される様々な置換基部分のいずれかによって置換されていてよいのは明らかである。

【0097】

式 I I の部分にはそれぞれ、錯体化する可能性のある酸素が 2 つあるため、本発明の 1 つの実施形態は、独立して選択された式 I I の部分を少なくとも 2 つ、好ましくは少なくとも 3 つ、および最も好ましくは 4 つ含む八座配位子を提供する。式 I I の部分はそれぞれ、独立した置換パターンを有し得るが、好ましい一実施形態では、少なくとも 1 つの部分が 3, 2 - ヒドロキシピリジノン部分である。配位子は 2 つ、3 つまたは 4 つの 3, 2 - ヒドロキシピリジノン部分（本明細書に記載される通り、必要に応じて置換されている）を含み得る。

【0098】

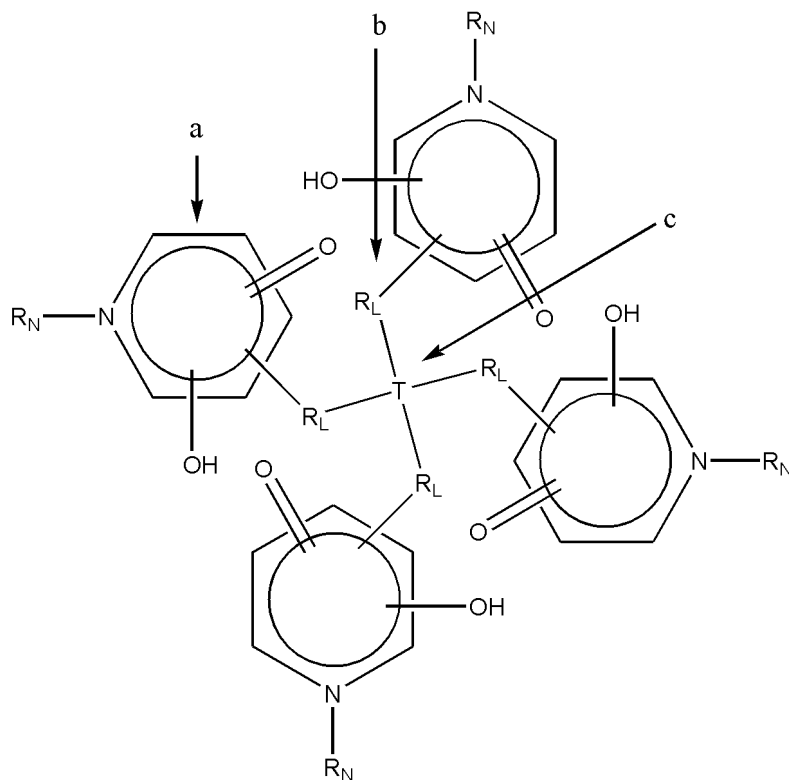
八座配位子内の式 I または I I の部分はそれぞれ、本明細書に記載される任意のしかるべきリンカー基によって、任意のしかるべきトポロジーで残りの配位子と連結し得る。例えば、式 I の 4 つの基がそのリンカー基により主鎖と連結して直鎖状の配位子を形成し得るか、リンカー基により架橋されて、直鎖状または環状であり得る「オリゴマー」型構造を形成し得る。あるいは、式 I およびノまたは I I の配位子部分が、それぞれリンカー（例えば、「R_L」部分）によって中心の原子または基と「十字型」または「星型」形状で連結し得る。リンカー（R_L）部分は炭素間結合のみを介して連結し得るか、アミン、ア

ミド、エステル、エーテル、チオ - エーテルまたはジスルフィド結合を含む任意の適度に堅固な官能基によって、互いに結合するか、他のキレート基、主鎖、鑄型、カップリング部分または他のリンカーと結合し得る。

【 0 0 9 9 】

「星型」配置は下式 I I I :

【 化 4 】



I I I

で示される。上式中、基および位置はすべて前述の通りであり、加えて「T」は中心の原子または鑄型基、例えば炭素原子、ヒドロカルビィ (h y d r o c a r b y) 鎖 (本明細書で上に記載されるもののいずれかなど)、脂肪族もしくは芳香環 (複素環を含む) または融合環系などである。最も基本的な鑄型は単一の炭素であり、これが連結基によって各キレート部分と結合し得る。同じようにエチルやプロピルなどのより長い鎖でも可能であり、鑄型の各末端に2つのキレート部分が結合する。鑄型とリンカー部分とを連結するのに炭素間結合、エステル、エーテル、アミン、アミド、チオ - エーテルまたはジスルフィド結合を含めた任意の適度に堅固な結合を用い得ることは明らかである。

【 0 1 0 0 】

式 I I、I I I、I V および I V b の構造において、特に置換されていない (例えば、リンカーまたはカップリング部分によって) ピリジン環 (1 つまたは複数) の位置が、必要に応じて式 I の R₁ ~ R₅ について記載されている置換基を有し得ることは明らかである。特に、メチル、エチルまたはプロピル基などの小さいアルキル置換基はいずれの位置にも存在し得る。

【 0 1 0 1 】

八座配位子は一般に、上記のようなカップリング部分を少なくとも1つさらに含む。これは本明細書に示される構造のいずれかを含む任意の適切な構造であってよく、末端が標的化部分、特異的結合物質またはこのような標的化部分もしくは特異的結合物質と結合することが可能な官能基になる。

【 0 1 0 2 】

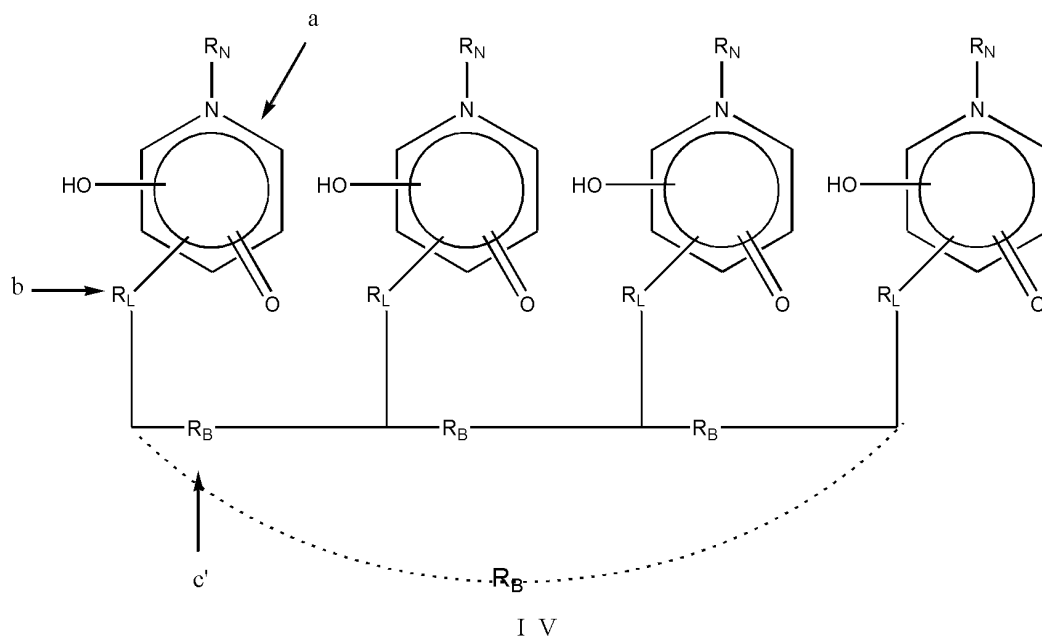
カップリング部分はリンカー、鑄型またはキレート部分の任意の適切な位置、例えば式

IIIに示される位置 a)、b) および/または c) などに結合し得る。カップリング部分の結合は炭素間結合、エステル、エーテル、アミン、アミド、チオ - エーテルまたはジスルフィド結合などの任意の適度に堅固な結合であり得る。同様に、標的化部分と任意のこのような結合を形成することが可能な基はカップリング部分の官能性末端に適しており、その部分が標的化部分と結合すると、終端がこのような基になる。

【0103】

別の「主鎖」型構造を式IVで下に示す。

【化5】



上式中、基および位置はすべて前述の通りであり、加えて「 R_B 」は主鎖部分であり、この部分は通常、本明細書に示されるリンカー部分のいずれかとほぼ同じ構造および機能を有するため、文脈上可能であれば、リンカー部分のいずれの定義も主鎖部分に当てはめることができる。適切な主鎖部分は、キレート部分とそのリンカー基によって結合する足場を形成する。通常、主鎖部分が3つまたは4つ必要である。通常、直鎖状の主鎖であれば3つ、環状の主鎖であれば4つになる。特に好ましい主鎖部分としては、任意選択で一端または両端にヘテロ原子または官能性部分を有する短い炭化水素鎖（本明細書に記載されるものなど）が挙げられる。この点ではアミンおよびアミド基が特に適している。

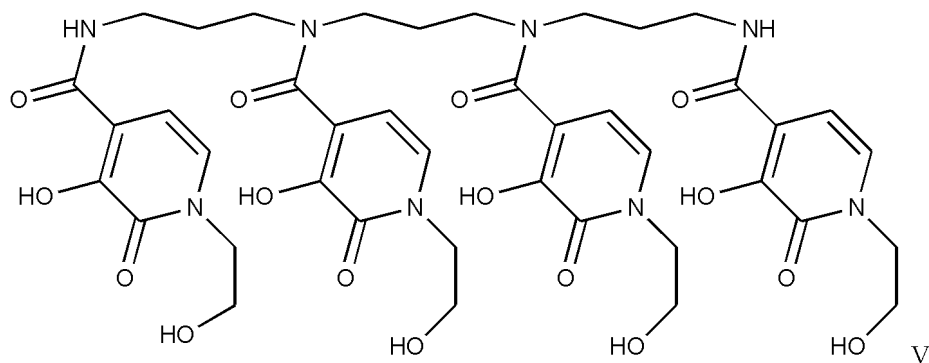
【0104】

カップリング部分はリンカー、主鎖またはキレート部分の任意の適切な位置、例えば式IVに示される位置 a)、b) および/または c') などに結合し得る。カップリング部分の結合は炭素間結合、エステル、エーテル、アミン、アミド、チオ - エーテルまたはジスルフィド結合などの任意の適度に堅固な結合であり得る。同様に、標的化部分と任意のこのような結合を形成することが可能な基はカップリング部分の官能性末端に適しており、その部分が標的化部分と結合すると、終端がこのような基になる。

【0105】

アミドリンカー基によって主鎖と結合した4つの3, 2 - H O P Oキレート部分（それぞれヒドロキシエチル可溶化基を有する）を有する「主鎖」型八座配位子は以下のような式V：

【化 6】



10

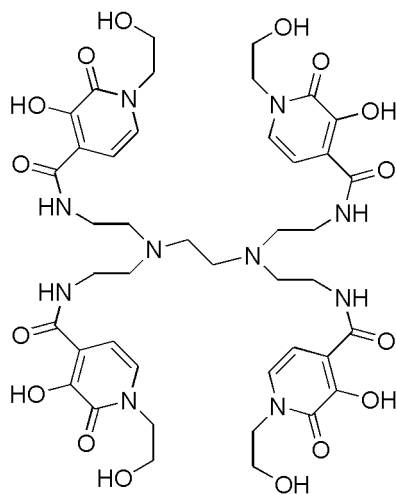
になる。この分子上の任意の適切な位置、例えば第二級アミン基のうちの1つまたは主鎖プロピレンまたはn置換エチレン基などの小さいアルキル基はすべて、他の小さいアルキレン、例えば本明細書に記載されるアルキレンのいずれか（特にメチレン、エチレン、プロピレンおよびブチレンが非常に適している）などで置換され得る。

【0106】

エチルアミド基によってそれぞれエチルジアミンおよびプロピルジアミンと結合した4つの3,2-HOP Oキレート部分をそれぞれ有する例示的な「鑄型」八座配位子は以下のような式V I：

20

【化 7】



V I

30

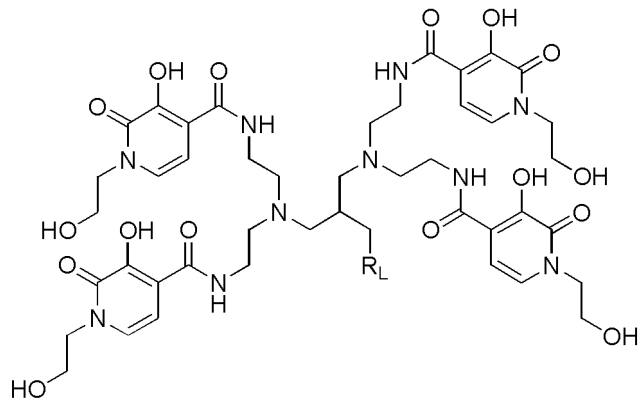
になる。式V Iにエチレン部分として示されるアルキレン基はいずれも、独立してメチレン、プロピレンまたはn-ブチレンなどの他の小さいアルキレン基で置換され得ることは明らかである。分子にある程度の対称性が保持されるのが好ましいため、例えば、中心のエチレン基がプロピレンで置換されていれば、他のエチレン基はそのままであるが、HOP O部分と中心の第三級アミンの一方または両方とを結合している2つのエチレンがメチレンまたはプロピレンに置き換わり得る。同様に、本明細書で述べる通り、N置換基は、本明細書全体を通して記載される他の任意のヒドロキシルアルキル基と置き換わり得る。

40

【0107】

前述の通り、八座配位子は通常、任意の位置にある残りの配位子と連結し得るカップリング部分を含む。リンカーの結合に適する位置を以下に式V Iで示す：

【化 8】



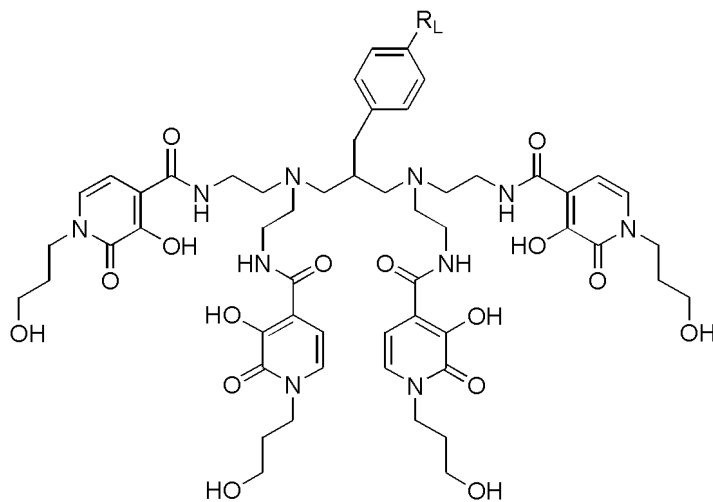
V I

上式中、 R_L は、具体的には組織標的化基と結合するための、任意の適切な結合部分である。末端がアミンなどの活性基であるC 1 ~ C 8 環状、分岐または直鎖芳香族または脂肪族基などの短いヒドロカルビル基が、式V I および本明細書全体の基 R_L として非常に適している。

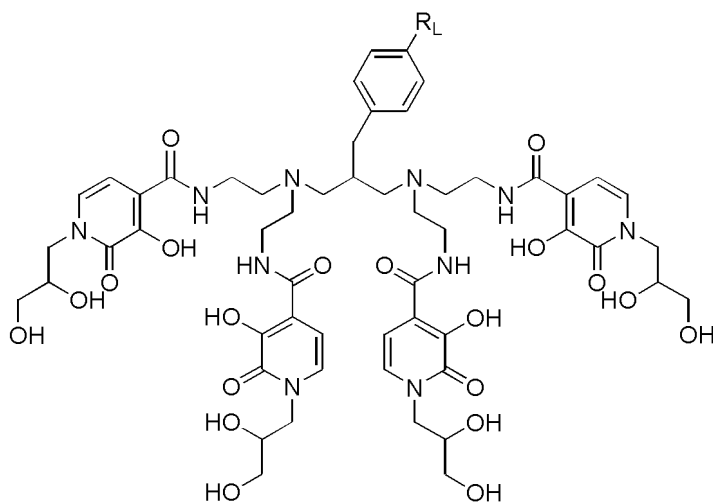
【 0 1 0 8】

配位子の結合に適した部位を示す非常に好ましい八座配位子としては、以下の式V I I およびV I I I のものが挙げられる：

【化 9】



V I I



V I I I

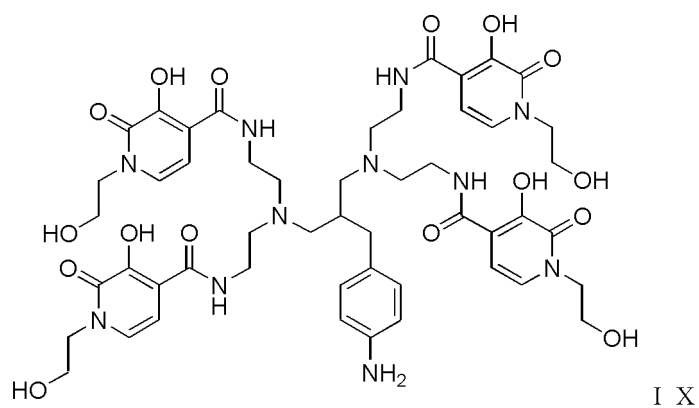
上式ⅤⅠⅠおよびⅤⅠⅠⅠ中、 R_L は、本明細書に記載される任意の適切なリンカー基または反応性部分であり得る。通常、 R_L が配位子と標的化部分との結合点を形成するため、直接または別のリンカーを用いて任意の適切な反応基をこの結合に用いることができる。式ⅤⅠⅠおよびⅤⅠⅠⅠの R_L に適した反応性部分としては、 NH_2 および $NC S$ 基が挙げられる。

【0109】

この実施形態による、カップリング部分の終端となる官能性部分を有する例示的な化合物が下の構造ⅠⅩである（リンカーのフェニルアミン基は、必要に応じて本明細書に示される他の任意の R_L 基で置換され得ることは明らかである）：

【化10】

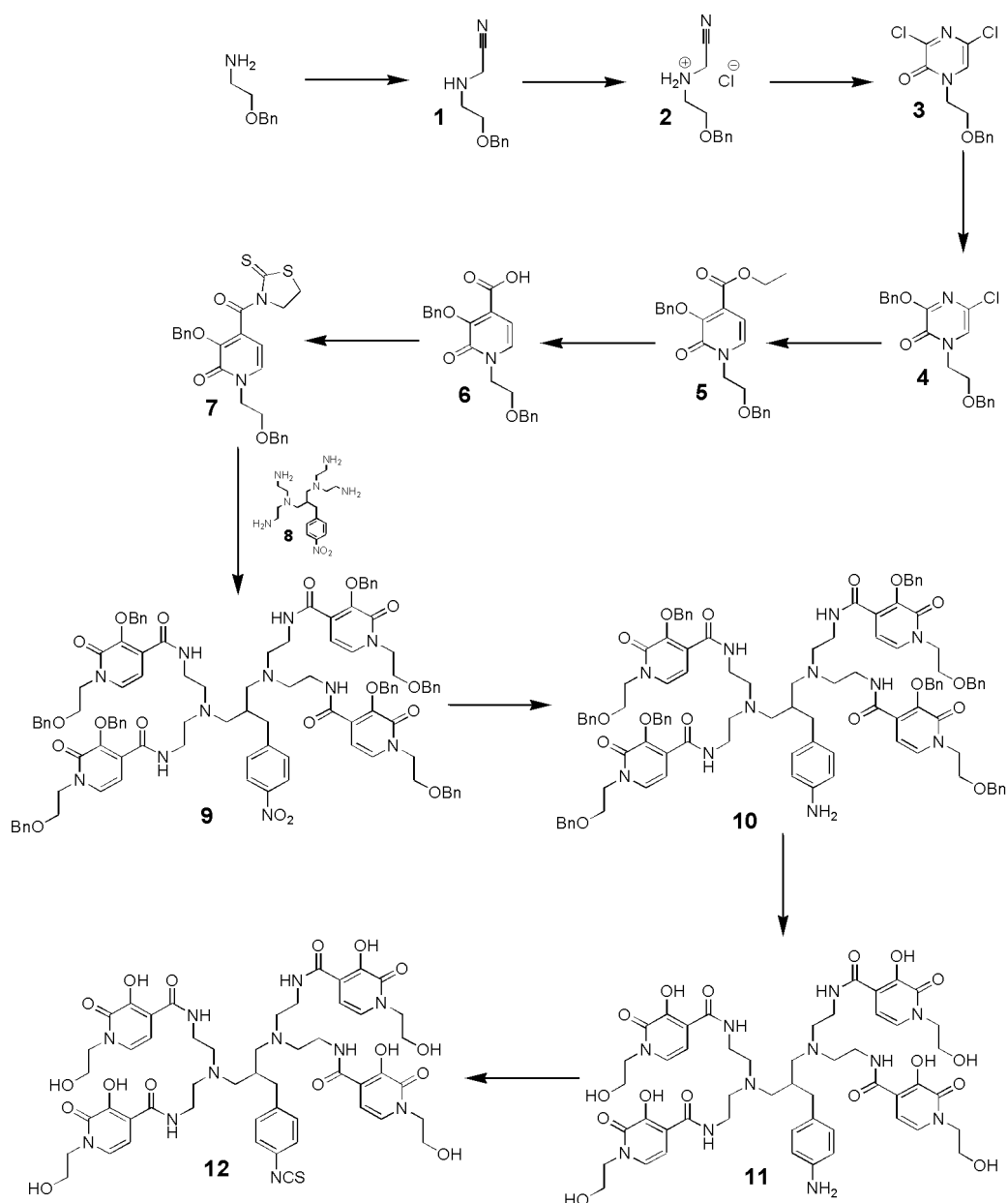
10



20

化合物ⅠⅩの合成は本明細書でのちに記載され、以下の合成経路を経る：

【化 1 1】



【0110】

本明細書に引用される文献はいずれも参照により組み込まれ、以下のものがこれに含まれる：Gordon AEV et al, Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. Chem. Rev. 2003, 103, 4207 - 4282、PCT特許出願国際公開第2008/063721号(A2)およびT. N. Lambert et al., Tetrahedron Letters 43 (2002) 7379 - 7383。

【0111】

本発明の錯体を形成する方法では、水溶液中で反応を実施するのが好ましい。これには利点がある。第一に、製造者が許容されるレベルになるまで溶媒をすべて除去し、その除去を証明する負担が取り除かれる。第二に、分離または除去段階を回避することによって、無駄が削減され、最も重要なことに生産スピードが上がる。本発明の放射性医薬品との関連においては、放射性同位体は常に崩壊し、調製に費やす時間は貴重な原料を浪費し、汚染物の娘同位体を生じるため、できる限り迅速に合成を実施することが重要で

ある。

【0112】

一実施形態では、この方法は、第一の八座ヒドロキシピリジノン含有配位子（本明細書全体を通して記載される）の水溶液および第二の組織標的化部分（本明細書全体を通して記載される）の水溶液を形成することと、当該第一の水溶液と当該第二の水溶液とを接触させることとを含む。

【0113】

関連する実施形態では、本発明の形成方法をいかなる有機溶媒も実質的に存在しない状態で実施する。この文脈において、「有機溶媒」は、室温またはその前後で液体であり、炭素を少なくとも1つ含む物質という本来の意味を表す。このような有機溶媒は通常、炭化水素、アルコール、エステル、アミド、エステルおよび/またはハロゲン化部分を含み、このような溶媒は本明細書で言及される水溶液中に1重量%以下（例えば、0.0001～1重量%）、好ましくは0.5重量%以下、および最も好ましくは0.2重量%以下で存在するのが好ましい。誤解を避けるために述べると、本明細書で言及される標的化部分および配位子は用語「有機溶媒」には包含されない。有機酸、アミンおよびその塩などのある特定の有機物質がいくぶん高濃度で水性溶媒中に存在し、pH緩衝剤として作用し得る。このような有機物質が存在する場合、通常、10重量%以下（例えば、0.001～10重量%）、好ましくは5重量%以下、より好ましくは1重量%以下の濃度である。これらの化合物は一般に、室温または周囲温度で液体ではないため、有機溶媒ではない。

【0114】

適切なカップリング部分については上で詳細に述べられており、本明細書でカップリング基および/または連結基として述べられる基および部分はすべて、標的化部分と配位子とをカップリングするのに適宜使用し得るものである。いくつかの好ましいカップリング基としては、アミド、エステル、エーテルおよびアミンカップリング基が挙げられる。エステルおよびアミドは、カルボン酸から活性エステル基を生成することによって形成するのが好都合である。このようなカルボン酸は標的化部分、カップリング部分および/または配位子部分に存在し得るものであり、通常、アルコールまたはアミンと反応してエステルまたはアミドを形成する。このような方法は当該技術分野では非常によく知られており、DCC、DIC、DEAD、DIADなどのN-ヒドロキシマレイミド、カルボジイミドおよび/またはアゾジカルボキシルート活性化試薬を含めた周知の活性化試薬を用いるものである。

【0115】

実施例

これより以下の非限定的な実施例によって本発明を説明する。実施例に例示される化合物はいずれも本発明の好ましい実施形態を形成し（好ましい中間体および前駆物質を含む）、文脈上可能であれば任意の態様で個々にも任意に組み合わせても使用し得るものである。したがって、例えば、実施例2の化合物2～4、実施例3の化合物10、実施例4の化合物7のそれぞれおよびすべてが、その様々なタイプの好ましい実施形態を形成する。

【0116】

実施例では、以下に挙げる配位子、抗体および抗体コンジュゲートに言及する：

AG0003 - 比較用配位子（下の構造13）

AG0015 - 本発明の高溶解性配位子。

AG0700 - 実施例5で作製される抗CD33抗体

AG0715 - 高溶解性配位子（12）とコンジュゲートしたAG0700

AGC1100 - 実施例（13）で作製される抗DC22抗体

AGC1115 - 高溶解性配位子（12）とコンジュゲートしたAGC1100

【実施例1】

【0117】

純粋なトリウム - 227の単離

アクチニウム - 227カウからトリウム - 227を単離する。ラジウム - 226の熱中

10

20

30

40

50

性子照射、次いでラジウム - 227 ($t_{1/2} = 42.2 \text{ m}$) からアクチニウム - 227 への崩壊によりアクチニウム - 227 が生成した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより、アクチニウム - 227 崩壊混合物の 8 M HNO_3 溶液からトリウム - 227 を選択的に保持した。AG (登録商標) 1-X8 樹脂 (200 ~ 400 メッシュ、硝酸形態) 70 mg を詰めた内径 2 mm 、長さ 30 mm のカラムを使用した。アクチニウム - 227、ラジウム - 223 および娘核種をカラムから溶出した後、 12 M HCl でトリウム - 227 をカラムから抽出した。トリウム - 227 を含有する溶出液を蒸発乾固させ、残渣を 0.01 M HCl に再懸濁させた。

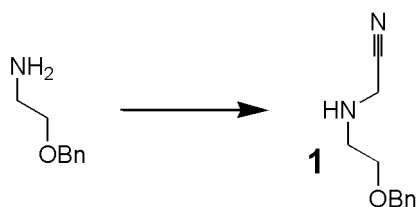
【実施例 2】

【0118】

化合物 IX の合成

段階 1

【化 12】



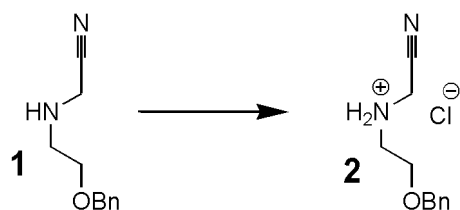
2 - ベンジルオキシエチルアミン (31 g 、 207 mmol) およびグリコロニトリル (16 mL 、 70% 水溶液、 207 mmol) を EtOH (無水) 300 mL に溶かし、4 時間還流した。減圧下で揮発性物質を除去した。粗生成物 (24.7 g 、 130 mmol) をこれ以上精製せずに次の段階に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $2.92 (\text{m}, 2\text{H})$, $3.58 - 3.62 (\text{m}, 4\text{H})$, $4.51 (\text{s}, 2\text{H})$, $7.25 - 7.37 (\text{m}, 5\text{H})$

【0119】

段階 2

【化 13】

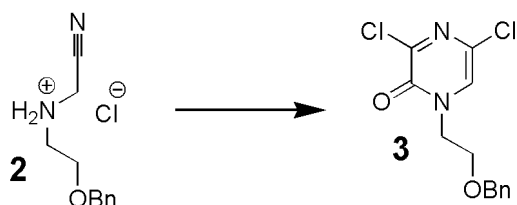


1 (24.7 g 、 130 mmol) を乾燥エーテルに溶かした。この溶液に HCl (g) を 30 分間吹き込んだ。沈殿物をろ過除去し、減圧下で乾燥させ、所望生成物を得た (27.8 g 、 122.6 mmol)。この生成物をこれ以上精製も分析も行わずに次の段階に用いた。

【0120】

段階 3

【化 14】



2 (27.8 g 、 122.6 mmol) をクロロベンゼン 230 mL に室温で溶かした

10

20

30

40

50

。クロロベンゼン 100 mL に溶かした塩化オキサリル (45 mL、530 mmol) を室温で 30 分間にわたって滴加した。反応混合物を室温で 45 時間攪拌した。水 100 mL を滴下して慎重に反応を停止させた。相を分離し、DCM 3 × 100 mL で水相を抽出した。有機相を合わせ、ブライン 100 mL で洗浄した。有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ろ過し、減圧下で揮発性物質を除去した。DCM 中の MeOH 勾配 (0 ~ 2 %) を用いた SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、所望生成物を得た (21.2 g、70.8 mmol)。

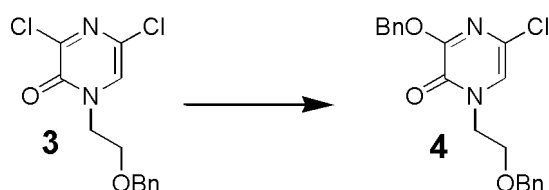
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 3.71 - 3.76 (m, 2H), 4.06 - 4.12 (m, 2H), 4.47 (s, 2H), 7.217 - 7.22 (m, 2H), 7.26 - 7.36 (m, 4H)

MS (ESI - pos, m/z,): 321.0

【0121】

段階 4

【化15】



水素化ナトリウム (60 % 分散液、3.60 g、90 mmol) を THF 50 mL 中、0 °C で攪拌し、ベンジルアルコール (8.3 mL、80 mmol) を 10 分間にわたって滴加した。反応混合物を 0 °C で 30 分間攪拌した後、THF 100 mL に溶かした 3 (21.2 g、70.8 mmol) を 0 °C で滴加した。反応混合物を暗所にて室温で一晩攪拌した。HCl のジオキサン溶液 (4 M) 50 mL を滴加した後、反応混合物を真空下で還元した。DCM 500 mL、次いで水 200 mL を加えた。相を分離し、DCM 200 mL で水相を抽出した。有機相を合わせ、ブライン 100 mL で洗浄した。有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ろ過し、減圧下で揮発性物質を除去した。DCM 中の MeOH 勾配 (0 ~ 6 %) を用いた SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより、所望生成物を得た (25.6 g、69 mmol)。

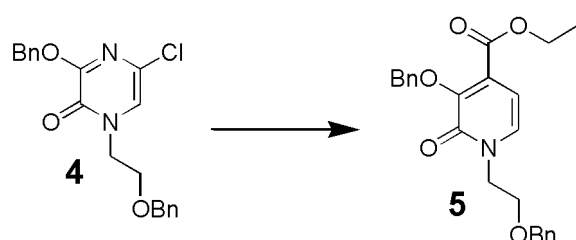
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.69 - 3.75 (m, 2H), 4.01 - 4.07 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 7.19 - 7.39 (m, 8H), 7.44 - 7.51 (m, 2H)

MS (ESI - pos, m/z,): 371.1, 763.2

【0122】

段階 5

【化16】



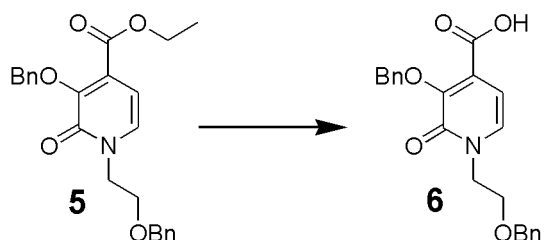
4 (25.6 g、69 mmol) およびプロピオール酸エチル (41 mL、0.4 mol) を 140 °C で 5 時間加熱した。反応混合物を室温まで冷却し、SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより反応混合物を精製した。DCM 中の MeOH 勾配 (0 ~ 10 %) により、所望生成物が分離不可能な所望の 4 - 異性体と 5 - 異性体との混合物と

して得られた。この混合物 (28.6 g、約 65 mmol) をこれ以上精製せずに次の段階に直接用いた。

【0123】

段階 6

【化17】



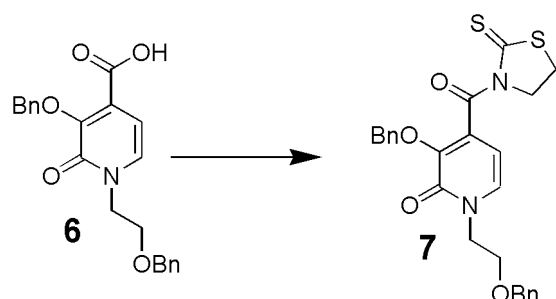
10

前段階で得られた 5 (28.6 g、約 65 mmol) を THF 300 mL に 0 で溶かした。KOH (1 M、水溶液) 100 mL を加え、反応混合物を室温で 40 時間攪拌した。HCl (1 M、水溶液) を pH 約 2 になるまで加え (125 mL)、CHCl₃ 3 × 250 mL で水相を抽出した。有機相を合わせ、ブライン 100 mL で洗浄し、ろ過し、真空下で揮発性物質を除去した。得られた物質 (25.9 g、約 65 mmol) をこれ以上精製も分析も行わずに次の段階に用いた。

【0124】

段階 7

【化18】



30

前段階で得られた 6 (25.9 g、約 64 mmol) を DCM 400 mL に一部溶かした。2-チアゾリン-2-チオール (8.94 g、75 mmol) および DMAP (0.86 g、7 mmol)、次いで DCC (15.48 g、75 mmol) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物をセライトパッドでろ過し、このセライトパッドを DCM 100 mL で洗浄した。真空下で揮発性物質を除去した。最初にヘプタン中の DCM 勾配 (50 ~ 100%)、次に DCM 中の THF 勾配 (0 ~ 15%) を用いた SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより、生成物の混合物を精製した。しかるべき画分を真空下で還元し、生成物の混合物を得た。ヘプタン中の EtOAc 勾配 (25 ~ 75%) を用いた SiO₂ でのフラッシュクロマトグラフィーにより、この不純物の入った混合物を精製した。しかるべき画分を真空下で還元し、生成物の混合物を得た。最後に、所望生成物を得るため、水中の MeCN 勾配 (25 ~ 75%) を用いた RP18-シリカでの乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより生成物の混合物を精製した。これにより所望生成物が得られた (8.65 g、18 mmol)。

40

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 2.90 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.77 - 3.84 (m, 2H), 4.18 - 4.23 (m, 2H), 4.35 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 6.11 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.21 - 7.48 (m, 11H)

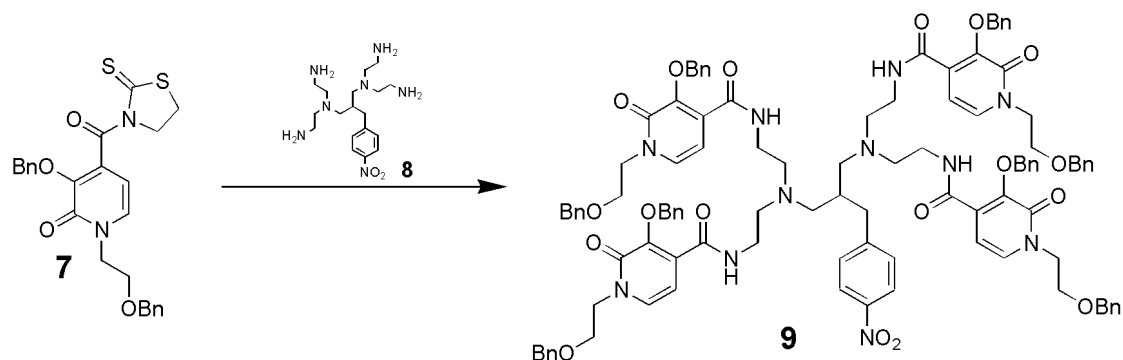
MS (ESI - pos, m/z): 503.1

【0125】

段階 8

50

【化 19】



10

7 (5.77 g、12 mmol) および 8 (1.44 g、2.4 mmol) を DMPU 40 mL に一部溶かした。DBU (2.7 mL、18 mmol) を滴加した。反応物を室温で4日間攪拌した。EtOAc 中の DCM / MeOH 勾配を用いた SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより精製し、所望生成物を得た (3.93 g、2.15 mmol)。

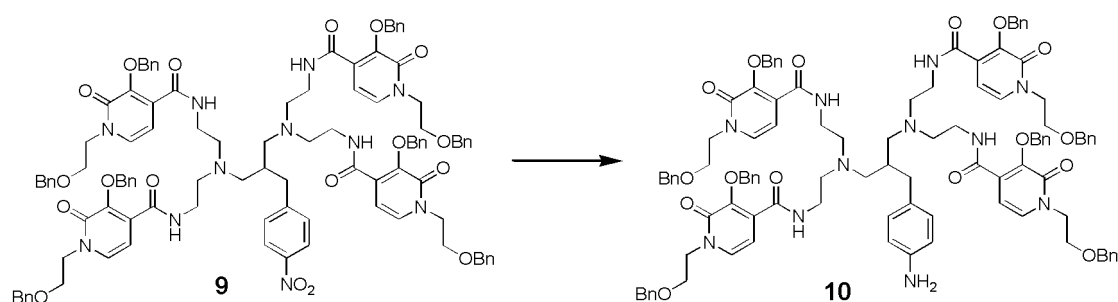
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 2.20 - 2.32 (m, 10H), 2.44 - 2.50 (m, 2H), 3.05 - 3.20 (m, 10H), 3.23 - 3.27 (m, 1H), 3.69 - 3.77 (m, 8H), 4.06 - 4.15 (m, 8H), 4.43 (s, 8H), 5.24 (s, 8H), 6.62 (d, J = 7.2 Hz, 4H), 7.13 (d, J = 7.2 Hz, 4H), 7.16 - 7.38 (m, 42H), 7.82 - 7.93 (m, 6H)

20

【0126】

段階 9

【化 20】



30

9 (3.93 g、2.15 mmol) を EtOH 300 mL に室温で溶かした。水 60 mL、次いで NH₄Cl (5.94 g、32.3 mmol) を加えた。反応混合物を 60

にした後、鉄粉 (1.80 g、32.3 mmol) を加えた。反応混合物を 60 で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、DCM 400 mL および水 100 mL を加えた。反応混合物をろ過し、有機相を水 100 mL およびブライン 100 mL で洗浄した。水相を合わせ、DCM 3 × 100 mL で逆抽出した有機相を合わせ、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、減圧下で揮発性物質を除去した。DCM 中の MeOH 勾配 (0 ~ 7%) を用いた SiO₂ での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより生成物の混合物を精製し、所望生成物を得た (3.52 g、1.96 mmol)。

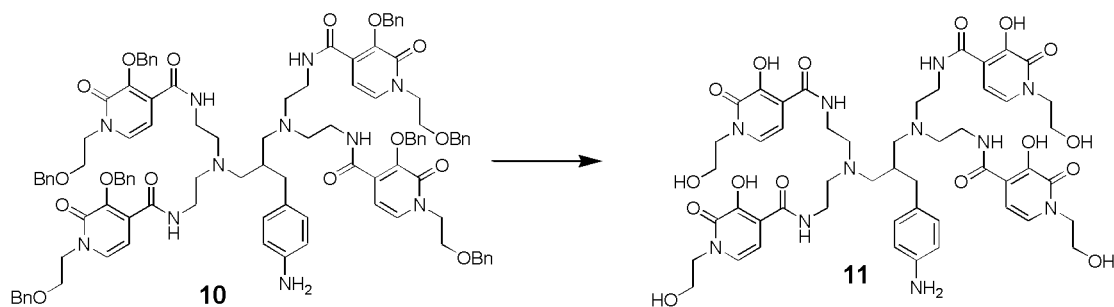
40

MS (ESI - pos, m/z): 899.2

【0127】

段階 10

【化 2 1】



10

10 (1.00 g、0.56 mmol)、Pd(OH)₂/C (パールマン触媒、1.00 g) および AcOH 10 mL を圧力反応器に入れた。水流吸引器により反応器を真空にし、H₂を導入した(7 bar)。反応混合物を1時間攪拌した後、圧力を解除し、HCl (6 M、水溶液) 5 mL を反応混合物に加えた。反応器を前の場合と同様にして真空にし、再びH₂を導入した(7 bar)。7日間攪拌した後、HPLCにより完全な変換が示された。反応混合物をろ過し、減圧下で揮発性物質を除去した。残基をMeOH/MeCN (1:1) に溶かし、Et₂Oの添加により生成物を沈殿させた。遠心分離および上清の傾捨により固体を収集した後、真空下で生成物を乾燥させた(484 mg、0.45 mmol)。

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): 2.70 - 2.95 (m, 2H), 3.00 - 3.10 (m, 2H), 3.15 - 3.65 (m, 19H), 3.75 - 4.23 (m, 16H), 6.25 (bs, 4H), 7.04 (d, J = 7.0 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 2H)

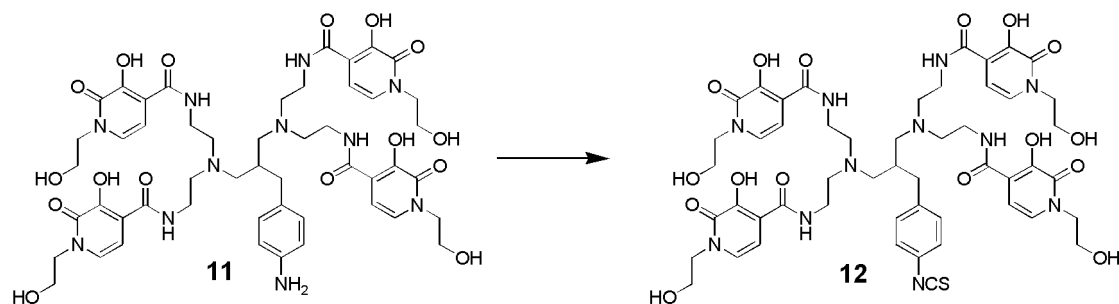
20

MS (ESI - pos, m/z): 1076.4

【0128】

段階 1 1

【化 2 2】



30

化合物 11 (20 mg、18 μmol) を MeCN 3 mL および水 3 mL に溶かした。チオホスゲン 20 μL を加えた。反応混合物を1時間厳しく攪拌した。減圧下で揮発性物質を除去し、残基を MeCN 4 mL に溶かした。アセトントリル (acetone trile) 相を Et₂O 40 mL に加えることにより生成物を沈殿させた。遠心分離および上清の傾捨により固体を収集した後、真空下で生成物を乾燥させた(10 mg、9 μmol)

40

MS (ESI - pos, m/z): 1118.4

【実施例 3】

【0129】

コンジュゲーション

0.9% NaCl 溶液 1.0 mL に溶かしてろ過したトラスツズマブ (9.5 mg/mL) および金属不含有 5 ~ 35 μL に溶かした新規なキレート剤 (式 IX) (10 mg/mL) を無菌ろ過したハウ砂緩衝液 (70 mM、pH 9) 1.0 mL に加えた。反応混合物を 37 °C で一晩、緩やかに攪拌し、得られたコンジュゲートを 0.9% NaCl 溶液中

50

、Amicon Ultra-4 (30k MWCO) 遠心ろ過ユニットを用いて精製し濃縮した。LC/MS分析によりコンジュゲーションの成功を確認した。

【実施例4】

【0130】

キレート化

0.9% NaCl 50 μ L に溶かした実施例3のコンジュゲート (5 μ g / μ L) に酢酸ナトリウム緩衝液 (0.5 M、pH 5.5) 100 μ L、次いで²²⁷Th 溶液 (0.05 M HCl 1 ~ 4 μ L 中、約 0.5 ~ 1 MBq) を加えた。37 で1時間または室温 (約 20) で15分間、緩やかにかき混ぜながら反応を実施し、得られた生成物を溶出緩衝液として酢酸ナトリウム緩衝液を用いたNAP-5カラムで精製した。保持された遊離の放射性金属を含む使用済みカラムおよび標識タンパク質を含有する溶出画分をHPLC検出器GEM (15) で測定して、反応収率および生成物の比活性を求めた (表1)。

【0131】

【表3】

表1：キレート化反応のまとめ

反応条件	放射性化学物質の収率 (%)
37°C、1時間	96
37°C、1時間	93
20°C、15分	95
20°C、15分	95

【実施例5】

【0132】

抗CD33モノクローナル抗体 (AGC0700) の作製。

(1) に記載され (2) に公開されているモノクローナル抗体 (mAb) HuM195 の配列をAGC0700作製の鋳型として用いた。IgG1重鎖遺伝子からC末端リジン (Lys) をコードするコドン进行削除した。得られるタンパク質は、完全長遺伝子から生成したときに抗体中に存在する3つの変異体のうちの1つであり、他の2つの変異体ではそれぞれ、重鎖の一方または両方にリジンが結合している。このLys残基を除去することにより、実施例6に概説される通り、コンジュゲートと抗体の比 (CAR) をより正確に決定することが可能になることが期待される。AGC0700の完全なアミノ酸配列の概要を表2に示す。

【0133】

標準的な分子生物学手法を用いて、AGC0700をコードする遺伝子を作製した。簡潔に述べると、Vector NTI (登録商標) ソフトウェア (Invitrogen / Life Technologies Ltd.、Paisley、United Kingdom) を用いて、各鎖のアミノ酸配列をDNA配列に逆翻訳した。最適化されたDNA配列をGeneArt (GeneArt / Life Technologies Ltd.、Paisley、United Kingdom) により哺乳動物での発現にコドン最適化して合成した。Cobra Biologics社 (Sodertalje、Sweden) により、VHドメインおよびVLドメインをエンドヌクレアーゼ制限消化により発現ベクターにサブクローニングした。チャイニーズハムスター卵巣浮遊 (CHO-S) 細胞にAGC0700のVHドメインおよびVLドメインをコードするプラスミドを安定にトランスフェクトし、ピューロマイシン (12.5 mg / l; Sigma Aldrich) を添加した標準的なCD-CHO培地 (Invitrogen / Life Technologies Ltd.、Paisley、United Kingdom) の存在下で増殖させた。25世代にわたる限界希釈により、AGC0700を発現する安定なクローンを選択した。上清のタンパク質の力価を測定することによりクローンの安定性を評価した。最も安定なクローンの細胞バンクを確立し、凍結保存した。使い捨てのバイオリアクター中、37 で約14日間、mAbを発現させた。上清をろ過した後、

モノクローナル抗体を回収した。プロテインAアフィニティークロマトグラフィー（Ma b S e l e c t S u R e、A t o l l、W e i n g a r t e n / G e r m a n y）、次いでイオン交換段階によってA G C 0 7 0 0をさらに精製する。静電性および疎水性に基づく3つ目の精製段階を用いて、生成物から凝集体および不純物をさらに除去する。等電点電気泳動およびS D S - P A G E分析によりA G C 0 7 0 0の同一性を確認する。サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）により試料の純度をさらに分析する。

【0134】

【表4】

表2。A G C 0 7 0 0のアミノ酸配列。

フラグメントの 可変V _H ドメイン (配列番号 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGL EWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSS	10
フラグメントの 可変V _L ドメイン (配列番号 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPG KAPKLLIYAASNQGSQGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK	
完全なV _H ドメイン (配列番号 3)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGL EWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	20
完全なV _L ドメイン (配列番号 4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPG KAPKLLIYAASNQGSQGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30

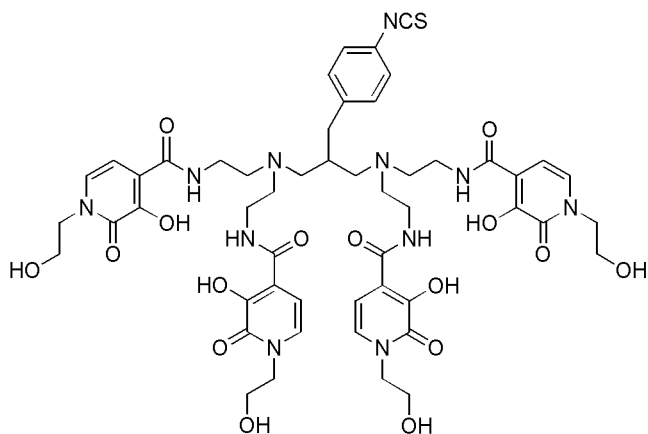
【実施例6】

【0135】

A G C 0 7 0 0とキレート剤A G C 0 0 1 5とのコンジュゲーション。

裸の抗体A G C 0 7 0 0を水溶性キレート剤A G C 0 0 1 5（12）とコンジュゲート（カップリング）させた。A G C 0 0 1 5を金属不含溶液で調製した。キレート剤（12）を下に示す：

【化 2 3】



1 2

10

【0136】

pH 8.5 の 70 mM ホウ酸塩緩衝液と混合した PBS の 1 : 1 (v/v) 混合物中で反応を実施した。キレート剤と抗体を名目モル比 1.3 : 1 で使用し、反応物を 21 で 20 時間インキュベートした。反応時間の終了時、HiLoad Superdex 200 16/600 PG カラム (GE Healthcare; パーツ番号 29-9893-35) および pH 6.0 の 50 mM ヒスチジン緩衝液を移動相として用いて、AKTA Purifier (Amersham) でのサイズ排除クロマトグラフィーにより、抗体を遊離のキレート剤から分離した。精製したコンジュゲートの最終的なキレート剤 - 抗体比 (CAR) をサイズ排除クロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (SEC - MS) 分析により決定した。LC - MS 分析の前に、組換え EndoS (IgGZERO、Genovis、Sweden) を用いて試料を酵素的に脱グリコシル化した。簡潔に述べると、Acquity UPLC システム (Waters) でクロマトグラフィーを実施し、カラムは 2.0 x 300 mm、4 μm 粒子の TSK Gel Super SW3000 (パーツ番号 21485) とし室温で維持した。移動相は、50% アセトニトリル水溶液、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (定組成溶離) とした。注入体積は最大 15 μL とし、LC 流速は、インタクトのコンジュゲートおよび還元コンジュゲートに対してそれぞれ 75 μL/分または 50 μL/分とした。SEC 実行時間は計 16 分であった。Xevo QTOF 質量分析計 (Waters) はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源が装備された。イオン源はポジティブイオンモードで稼働させ、スキャン範囲は 2000 ~ 4000 Da とした。Maximum Entropy ソフトウェアを用いて、多価イオンを一価種に変換した。質量分析計は予めヨウ化ナトリウムにより所与の質量範囲に校正した。インタクトのコンジュゲートでは、全コンジュゲート種 (キレート剤 0 ~ n) が含まれる SEC - MS クロマトグラムに 1 つのピークが見られる。CAR 決定の代表的な結果を図 1 に示す。裸の mAb (キレート剤なし)、キレート剤を 1 つ含むコンジュゲートおよびキレート剤を 2 つ含むコンジュゲートに対応する m/z シグナルを同定した。還元され脱グリコシル化したコンジュゲートでは、キレート剤が結合していない、1 つ結合したまたは 2 つ結合した重鎖および軽鎖に対応するピークに分かれた。

20

30

40

【実施例 7】

【0137】

Th - 227 による抗体 - キレート剤コンジュゲート AGC0715 のキレート化。
アクチニウム - 227 発生器システムからトリウム - 227 を 4+ イオンとして単離した。簡潔に述べると、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、8 M HNO₃ 中の Ac - 227 崩壊混合物から Th - 227 を選択的に保持した (²²⁷Th 4+ と負荷電硝酸錯体を形成した)。Ac - 227、Ra - 223 および娘核種をカラムから洗浄した後、12 M HCl を用いて Th - 227 を溶出した。Th - 227 溶出液を蒸発乾固させ、残基を 0.5 M HCl に溶かした。

50

【0138】

抗体コンジュゲートAGC0715をpH6.0のヒスチジン緩衝液中、抗体0.5mg当たり1MBqのTh-227の存在下、37℃で1時間インキュベートした。NAP-5 DNA Gradeカラム(GE Healthcare)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、放射標識抗体コンジュゲートを含有する高分子画分を遊離のTh-227および娘核種から分離した。標識効率は通常、NAP-5脱塩段階で起こり得る損失を含めて96~98%であった。

【実施例8】

【0139】

フローサイトメトリーによるAGC0700およびAGC0715とCD33陽性細胞との結合試験。

10

CD33陽性HL-60細胞との結合をフローサイトメトリーにより試験した。プロットした曲線に基づいてEC₅₀を求めることにより、親和性の近似値がわかる。親和性の評価には市販のマウス抗ヒトCD33(BD Pharmingen; #555450、1mg/mL)を参照抗体とし、分析するmAbとの50:50混合物の設定を含めて用いた。このアッセイを用いてほかに、標的結合親和性がキレート剤とのコンジュゲーションによる悪影響を受けないことを確認した。

【0140】

HL-60細胞をイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM; Invitrogen; #12440-046)中、20%のウシ胎仔血清およびペニシリン/ストレプトマイシンの存在下で増殖させた。4℃、300gで5分間の遠心分離により細胞培養物約20mLを回収した。1%のウシ胎仔血清(FBS)を添加したPBS10mLに細胞を再懸濁させ、4℃、300gで5分間の遠心分離によりペレット化した。次いで、再懸濁させた細胞の調製物20μLをCoulter Isoton II Diluentで1:500に希釈し、Beckman Coulter Z2機器(Beckman Coulter; CA, USA)を用いて計数した。調製物を細胞密度3~4×10⁶細胞/mLに調整し、100μLを丸底またはV字底の96ウェルプレート(Nunc/Fisher Scientific; NH, USA)の各ウェルに移した。細胞を遠沈し、傾捨後に再懸濁させて、1ウェル当たり体積約50μLの細胞懸濁液を得た。

20

【0141】

保存用緩衝液をPBSに変えることにより、分析するmAbまたはコンジュゲートを凍結ストックから新たに調製し、4℃で保管し、調製後数日以内に使用した。ヒトmAbを検出する二次抗体試薬としてF(ab)₂' Alexa488コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG Fc(Jackson Immuno Research; #109-546-170)を用いた。二次抗体試薬を0.1%BSAを添加したPBS中0.015mg/mLに調製した。mAbストックを5mg/mLから開始する10倍希釈段階で希釈した。アイソタイプ対照mAb(トラスツズマブ)をこれに準じて調製した。HL-60細胞を含むウェルに各希釈段階の抗ヒトCD33 mAbを20μL加えた。4℃で1時間インキュベートした後、細胞を遠沈し、0.1%BSAを添加した冷PBS200μLで3回洗浄した。4%ヤギ血清を含有する溶液をブロッキング剤として加え、15分間インキュベートした。次いで、二次抗体試薬から各ウェルに20μLを加えた後、暗所にて4℃で30分間インキュベートした。

30

40

【0142】

細胞を上記の通りに2回洗浄し、0.1%BSAを添加したPBS200μLに再懸濁させた。全試料を96ウェルの丸底または円錐底プレートで分析した。Beckman Coulter Cell lab Quant SCフローサイトメータ(Beckman Coulter; CA, USA)で蛍光シグナルを記録した。中央値をExcelグラフシートにエクスポートし、濃度に対してプロットした。GraphPad Prism(Prism Software; CA, USA)に「一部位特異的」結合モデルを用いてデータをフィットした(図2A~2B)。

50

【 0 1 4 3 】

二次抗体を加え一次抗体を加えない陰性対照はバックグラウンドの平均蛍光強度 (M F I) の値が約 5 (高い陽性値の 1 ~ 2 %) という低い値を示した。

【 0 1 4 4 】

コンジュゲート A G C 0 7 1 5 の結合親和性は非コンジュゲート A G C 0 7 0 0 と同程度であった。したがって、コンジュゲーションは結合親和性の低下をもたらさなかった (図 2 A) 。市販のマウス抗ヒト C D 3 3 参照 m A b は、2 つの抗体の 5 0 : 5 0 混合物中で A G C 0 7 0 0 よりも低い親和性で結合し、抗体結合が約 0 . 7 倍低かった (図 2 B) 。

【 実施例 9 】

10

【 0 1 4 5 】

A G C 0 7 1 5 の内部移行。

放射性免疫錯体が外側細胞膜に結合した後の内部移行の程度は、殺細胞作用の効力を決定する 1 つの因子である。放射性免疫錯体 A G C 0 7 1 5 - T h - 2 2 7 および陰性対照トラスツズマブ - A C 0 0 1 5 - T h - 2 2 7 の H L - 6 0 細胞への内部移行を試験した。

【 0 1 4 6 】

実施例 5 に記載される方法に従って、コンジュゲートした m A b を比活性が約 2 0 B q / μ g になるよう同時に標識した。培地 (2 0 % のウシ胎仔血清およびペニシリン / ストレプトマイシンを添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M ; I n v i t r o g e n ; # 1 2 4 4 0 - 0 4 6)) 5 0 0 μ L に 2 0 0 0 0 0 個の細胞を含むウェルに 1 2 k B q に相当する等量の放射性免疫錯体を加えた。

20

【 0 1 4 7 】

3 7 、 5 % C O ₂ で 0 分間、3 0 分間、6 0 分間、1 2 0 分間および 2 4 0 分間インキュベートした後、細胞の試料を回収した。回収後、p H 2 . 5 のグリシン、0 . 9 % N a C l で細胞を洗浄して、膜に結合した抗体コンジュゲートを除去した。フローサイトメトリーによる分析から、酸で 2 ~ 4 分間洗浄した後、膜に結合した抗体が残らないことが明らかになった。細胞ペレットでの内部移行をガンマカウンター (W i z a r d) により 6 0 秒間測定し、測定した 1 分当たりのカウント数を時間に対してプロットした (図 3) 。

30

【 実施例 1 0 】

【 0 1 4 8 】

A G C 0 7 1 5 - T h - 2 2 7 による T h - 2 2 7 誘導細胞毒性。

i n v i t r o の細胞毒性を C D 3 3 陽性 H L - 6 0 細胞で調査した。A G C 0 7 1 5 および対照トラスツズマブとコンジュゲートした A G C 0 0 1 5 を用いて、比活性が 4 4 k B q / μ g になるよう T h - 2 2 7 をキレートした。H L - 6 0 細胞を 3 7 、 5 % C O ₂ で増殖させ、週 3 回、1 : 5 に分割した。アッセイ前日、培地 (2 0 % F B S および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを含有するイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M)) を新しい培地と交換し、1 m L 当たりの細胞数が 4 0 0 0 0 0 個になるよう体積を調整した。

40

【 0 1 4 9 】

6 ウェルプレートの各ウェルに約 1 6 0 0 0 0 0 個の細胞 (4 m L) を加えた。標識 m A b または培地を加えるために翌日までプレートをインキュベートした。標識 m A b または培地を加えた後、プレートをさらに 4 時間インキュベートした。1 つの実験では、A G C 0 7 1 5 またはトラスツズマブ - A G C 0 0 1 5 を最終濃度が 3 n M になるよう各ウェルに加えた。別の実験では最終濃度を 0 . 3 n M とした。

【 0 1 5 0 】

インキュベーション後、細胞を培地中で 2 回洗浄し、上清およびペレット中の A T P を測定した。次いで、細胞を 1 : 2 に分割し、培地中、3 7 、 5 % C O ₂ でインキュベートした。2 日目、4 日目および 7 日目に洗浄を 1 回にして同じ方法を繰り返した。A T P

50

の定量化を様々な試料採取時間における細胞生存能の尺度として用いて (Promega 社の Cell Titer - Glo Luminescent 細胞生存能アッセイ)、図 4 A および 4 B に示される増殖曲線が得られた。

【0151】

HL-60 腫瘍細胞と結合する AGC0715-Th-227 では、HL60 細胞と結合しないトラスツズマブ構築物とは対照的に細胞毒性がみられた。培地対照における 4 日～7 日目の生存能の低下は、培地交換の間隔が長すぎたことによるものと考えられる。

【実施例 11】

【0152】

ヒト異種移植モデルにおける AGC0715 による効果的な腫瘍標的化。

10

雌 NMR I ヌードマウスにヒト HL-60 腫瘍細胞系の細胞を異種移植した。HL-60 細胞は急性前骨髄球性白血病の患者に由来し、Sutherland ら (3) によれば CD33 を発現する。この細胞系をヌードマウスの皮下に接種すると腫瘍原性を示すことが明らかにされている (4)。この試験には雌 NMR I ヌードマウス (Taconic、Europe) 54 匹を用いた。

【0153】

マウスには試験に用いる前に少なくとも 5 日間の馴化期間が設けられ、腫瘍接種前の時点で 4 週齢であった。試験開始時、マウスの体重は約 20 グラムであった。マウスは空気を HEPA フィルターに通す換気されたケージ (IVC、Scanbur) で個体ごとに飼育し、「Rat and mouse nr.3 Breeding」餌料 (Scanbur BK) およびモル濃度が 1 mM (pH 3.0) になるまで HCl を加えて酸性化した水を自由摂取させた。HL-60 細胞 (ATCC/United Kingdom; カタログ番号 CCL-240) を IMDM (Invitrogen; #12440-046) 中、20% FCS およびペニシリン/ストレプトマイシンの存在下で増殖させ、皮下接種用に調製した。継代数 4 (P4) の時点でストックを作製し、保存するため、5% DMSO を含有する培地中、 3×10^7 細胞/バイアルにて液体窒素で凍結させた。

20

【0154】

接種当日、細胞を 37 の水浴で急速に解凍し (約 2 分)、2% FCS を添加した PBS で洗浄し再懸濁させた (1200 rpm で 10 分間遠心分離した)。投薬シリンジに吸引する前に細胞同士を毎回十分にかき混ぜた。マウスが軽いガス麻酔下 (N_2O) にある間に、内径の小さい針 (25 G) を用いて体積 0.1 mL の細胞懸濁液を背中に皮下注射した。マウスをケージに戻し、腫瘍を 15 日間成長させた。被験試料 (0.1 mL) を尾静脈から静脈内ボラス投与した。

30

【0155】

21 日間の腫瘍成長の後、マウスを無作為化により 3 つのグループ ($n = 6$) に割り付け、被験化合物 ^{227}Th -AGC0715 を 15 kBq / マウスの用量で投与した。注射後の所定の時点でマウスを安楽死させ、血液、筋肉、大腿骨、腎臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸および腫瘍を採取した。組織および血液試料の重量を測定し、ガンマ分光測定法 (HPGe 15 p または HPGe 50 p ゲルマニウム検出器) を用いて各試料の放射活性を測定した。

40

【0156】

測定した放射活性 (Bq) と 10% 注射標準試料で測定した放射活性とを関連させ、Th-227 および Ra-223 の百分率を計算し、% ID または組織 1 グラム当たりの % ID で表した。2 匹のマウスにはグループの他のマウスよりも大きい腫瘍がみられ、後ろ向き解析により腫瘍取込みと腫瘍サイズとの間に逆相関関係が示されている (データ不掲載) ことから、分析から除外した。データは腫瘍による AGC0715-Th-227 の特異的取込みを裏付けるものである。これまでの試験では、血管漏出により腫瘍内に非特異的に滞留した mAb が時間とともに洗い流され、7 日目には数 % ID / g 以下になることが示されている (データ不掲載)。

【0157】

50

生体内分布試験の結果を図5に示す。このデータは予想された腫瘍標的化を示している。腫瘍には放射活性の増大がみられるが、正常組織にはみられない。

【実施例12】

【0158】

異種移植マウスにおける *in vivo* の AGC0715-Th-227 の有効性。

細胞調製および雌NMR1ヌードマウスの異種移植を実施例9に記載される通りに実施する。マウスには試験に用いる前に少なくとも5日間の馴化期間を設け、腫瘍接種前の時点で4週齢である。試験開始時、マウスの体重は約20グラムである。マウスは空気をHEPAフィルターに通す換気されたケージ(IVC、Scanbur)で個体ごとに飼育し、「Rat and mouse nr.3 Breeding」餌料(Scanbur BK)およびモル濃度が1mM(pH3.0)になるまでHClを加えて酸性化した水を自由摂取させる。マウスの腫瘍の平均サイズが75~150mm³の範囲内に収まるようにするため、投与の約10日前に腫瘍細胞をマウスに接種する。マウスを無作為化により4つの治療群および3つの対照群に割り付ける(n=10/グループ)。治療群のマウスにはAGC0715-Th-227を75kBq/mL、150kBq/mL、225kBq/mLまたは300kBq/mL含有する100μLを尾静脈内に注射して250、500、750または1000kBq/kg体重(b.w.)とする。対照群のマウスには溶媒のみ(緩衝液)、非放射性抗体(AGC0715)または比活性が500kBq/kgになるよう標識したトラスツズマブ-Th-227(アイソタイプ対照)のいずれかを投与する。

【0159】

腫瘍の出現を注意深くモニターし、週3回、以下に挙げるスキームに従って腫瘍をスコア化(測定できない大きさである場合)または測定する。

【0160】

【表5】

スコア:

0	腫瘍を検出できない
1	腫瘍を触知できる
2	測定可能になる直前

記号:

R	赤
W	創傷組織の徴候
N	壊死
B	青

【0161】

デジタル式ノギスを用いて腫瘍径を2次元で測定し、式: $L \times W \times \frac{1}{2}W$ (長さ×幅× $\frac{1}{2}$ 幅)によって体積を推定する。0日目、すなわち接種当日に測定/観察を開始する。腫瘍体積の測定を月曜日、水曜日および金曜日の週3回実施する。体重を週1回記録する。データを図で表し、記述統計を実施する。

【0162】

腫瘍サイズが最大値の直径15mmに達した後、マウスを屠殺する。この直径は、球形であると仮定した場合の体積1688mm³に相当する。この試験では有害な臨床徴候は予想されない。有害な臨床徴候が観察された場合、注記としてファイルに記録する。

【0163】

試験後、異なる治療群をカプラン・マイヤー生存曲線により比較する。このほか、治療による腫瘍成長をプロットし、平均の成長対時間の非線形回帰に従って成長遅延を計算し、スチューデントT検定を用いて比較する。

【 0 1 6 4 】

この有効性試験のデータは、既に公開されている、トリウム - 227 で標識したモノクローナル抗体トラスツズマブおよびリツキシマブの投与後に得られた有効性データとほぼ同じものになると予想される。

【実施例 13】

【 0 1 6 5 】

抗CD22モノクローナル抗体 (AGC1100) の作製。

エブラツズマブとも呼ばれ、ここではAGC1100と称するモノクローナル抗体 (mAb) hLL2の配列を(1)に記載されている通りに構築した。本実施例に使用されるmAbはImmunomedics社 (New Jersey、USA) によって作製されたものである。このmAbの作製は、例えば、軽鎖および重鎖をコードする遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巢浮遊 (CHO-S) 細胞で実施することができる。標準的な方法を用いて最初の安定なクローンを選択する。使い捨てのバイオリアクターに入れて約14日後、上清をろ過した後にモノクローナル抗体が回収され得る。プロテインAアフィニティークロマトグラフィー (MabSelect Sure、Atoll、Weingarten/Germany)、次いでイオン交換段階によってAGC1100をさらに精製する。静電性および疎水性に基づく3つ目の精製段階を用いて、生成物から凝集体および残存している可能性のある不純物をさらに除去し得る。等電点電気泳動、SDS-PAGE分析、N末端配列決定およびLC/MS分析によりAGC1100の同一性を確認する。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により試料の純度をさらに分析する。

【 0 1 6 6 】

既知のCD22結合抗体 (マウス抗体およびヒト化抗体) の配列としては以下のものが挙げられる (配列中、CDRを太字で表し、CDR外側の予測される接触領域に下線を施す) :

10

20

軽鎖：

D I Q L T Q S P S S L A V S A G E N V T M S C K S S Q S V L Y S A N H K N Y L
A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D E T
L T I S R V Q V E D L A I Y Y C H Q Y L S S W T F G G G T K L E I K R (配列番号
5)

D I Q L T Q S P S S L A S A A V E D R T M S C K S S Q S V L Y S A N H K N Y L
A W Y Q Q K P G Q K A K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D E T
F T I S S L Q P E D I A T Y Y C H Q Y L S S W T F G G G T K L E I K R (配列番号
6)

10

重鎖：

Q V Q L Q E S G A E L S K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W L H W I K Q
R P G Q G L E W I G Y I N P R N D Y T E Y N Q N F K D K A T L T A D K S S S T
A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R R D I T T F Y W G Q G T T L T V S S (配
列番号7)

Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y T F T S Y W L H W V R Q
A P G Q G L E W I G Y I N P R N D Y T E Y N Q N F K D K A T I T A D E S T N T
A Y M E L S S L R S E D T A F Y F C A R R D I T T F Y W G Q G T T V T V S S (配
列番号8)

20

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y T F T S Y W L H W V R Q
A P G Q G L E W I G Y I N P R N D Y T E Y N Q N F K D K A T I T A D E S T N T
A Y M E L S S L R S E D T A F Y F C A R R D I T T F Y W G Q G T T V T V S S (配
列番号9)

【0167】

参考文献：

(1) Leung, Goldenberg, Dion, Pellegrini, Shevitz, ShihおよびHansen. Molecular Immunology 32:1413-27, 1995.

30

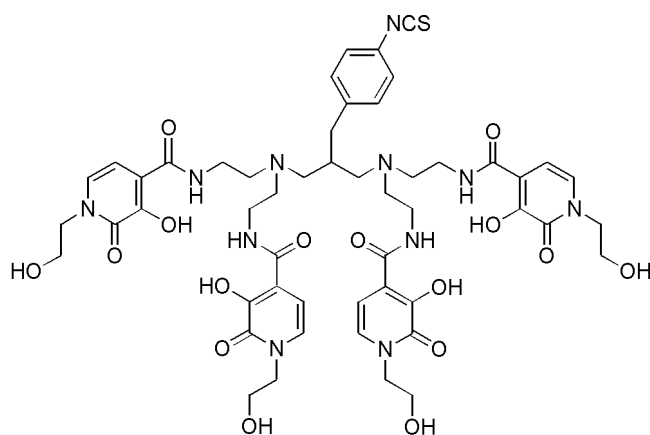
【実施例14】

【0168】

AGC1100とキレート剤AGC0015とのコンジュゲーション。

抗体AGC1100を水溶性キレート剤AGC0015(12)とコンジュゲートさせた。コンジュゲーション反応は、pH8.5の70mMホウ酸緩衝液と混合したPBSの1:1(v/v)混合物中で実施した。キレート剤、AGC0015を下に示す：

【化 2 4】



10

1 2

【 0 1 6 9 】

キレート剤、A G C 0 0 1 5（上記 1 2）を金属不含水に溶かした後、コンジュゲーション反応物に加えた。キレート剤と抗体を名目モル比 1 . 3 : 1 で使用し、反応物を 2 1 で 2 2 時間インキュベートした。反応時間の終了時、H i L o a d S u p e r d e x 2 0 0 1 6 / 6 0 0 P G カラム（G E H e a l t h c a r e ; コード番号 2 8 - 9 8 9 3 - 3 5）および p H 5 . 5 の 0 . 9 % N a C l 1 0 0 m M クエン酸緩衝液を移動相として用いて、A K T A P u r i f i e r（G E H e a l t h c a r e）でのサイズ排除クロマトグラフィーにより、抗体画分を遊離のキレート剤から分離した。精製したコンジュゲートの最終的なキレート剤 - 抗体比（C A R）を H P L C サイズ排除クロマトグラフィー - U V（S E C - U V）分析により決定した。C A R の決定は、A g i l e n t 1 2 0 0 シリーズ H P L C システム（A g i l e n t T e c h n o l o g i e s）、室温で維持した 4 . 6 x 3 0 0 m m、4 μ m 粒子のカラム T S K g e l S u p e r S W 3 0 0 0（T o s o h B i o s c i e n c e、パーツ番号 1 8 6 7 5）および p H 6 . 8 の 3 0 0 m M N a C l 2 0 0 m M 酢酸アンモニウム（定組成溶離）の移動相を使用し、計 1 5 分の実行時間で実施した。注入体積は 5 μ l とし、L C 流速は 0 . 3 5 m l / 分とした。それぞれ m A b およびキレート剤の最大吸収に対応する 2 8 0 n m および 3 3 5 n m で U V シグナルをモニターした。C A R 決定の代表的な結果を図 6 に示す。

20

30

【実施例 1 5】

【 0 1 7 0 】

T h - 2 2 7 による抗体 / キレート剤コンジュゲート A G C 1 1 1 5 のキレート化
アクチニウム - 2 2 7（ ^{227}Ac ）発生器システムからトリウム - 2 2 7（ ^{227}Th ）を 4 + イオンとして単離した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより、8 M H N O₃ 中の ^{227}Ac 崩壊混合物から ^{227}Th を選択的に保持し、 $^{227}\text{Th}^{4+}$ と負荷電硝酸錯体を形成した。 ^{227}Ac および娘核種をカラムから洗浄し、1 2 M H C l で ^{227}Th を溶出した。 ^{227}Th 溶出液を蒸発乾固させ、残渣を 0 . 5 M H C l に溶かした。

40

【 0 1 7 1 】

キレート化反応では、抗体コンジュゲート A G C 1 1 1 5 を p H 5 . 5 の 0 . 9 % N a C l 1 0 0 m M クエン酸緩衝液中、抗体コンジュゲート 0 . 5 m g 当たり 1 M B q の ^{227}Th の存在下、2 1 / 室温で 1 5 分間インキュベートした。N A P - 5 D N A G r a d e カラム（G E H e a l t h c a r e）を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、放射標識抗体コンジュゲートを含有する高分子画分を遊離の ^{227}Th および娘核種から分離した。標識効率は通常、N A P - 5 脱塩段階で起こり得る損失を含めて 9 6 ~ 9 8 % であった。

【実施例 1 6】

【 0 1 7 2 】

50

フローサイトメトリーによるAGC1115およびAGC1100とCD22陽性Raji細胞との結合分析。

AGC1115およびAGC1100（抗ヒトCD22、Immunomedics；hLL2、#1003164、10mg/ml）とCD22陽性Raji細胞（ATCC、#CCL-86）との結合をフローサイトメトリーにより分析した。近似曲線から求めたEC₅₀値を抗体と抗体コンジュゲートの結合能の比較に用いた。この分析を用いて、抗体コンジュゲートのCD22との結合能がコンジュゲーション法による影響を受けないことを確認した。

【0173】

Raji細胞をRPMI1640（PAA；#E15-840）中、10%ウシ胎仔血清（FBS）および1%ペニシリン/ストレプトマイシンの存在下で増殖させた。フローサイトメトリー分析には、4、340×gで5分間の遠心分離により細胞培養物50mLを回収した。1%のウシ胎仔血清（FBS）を添加したPBS10mLに細胞を再懸濁させて2回洗浄し、4、300×gで5分間の遠心分離によりペレット化した。次いで、再懸濁させた細胞の調製物20μLをCoulter Isoton II Diluentで1：500に希釈し、Beckman Coulter Z2機器（Beckman Coulter；CA、USA）を用いて計数した。調製物を細胞密度1×10⁶細胞/mlに調整し、100μLをV字底の96ウェルプレート（Nunc/Fisher Scientific；NH、USA）の各ウェルに移した。細胞を遠沈し、傾捨後に再懸濁させて、1ウェル当たり体積約50μLの細胞懸濁液を得た。

【0174】

AGC1115およびAGC1100を3倍希釈段階で50μg/mlに希釈し、12段階で漸増させた。アイソタイプ対照抗体（トラスツマブ）をこれに準じて調製した。Raji細胞を含むウェルに各抗体希釈物から100μlを加えた。4で1.5時間インキュベートした後、細胞を遠沈し、1%FBSを添加した冷PBS200μlで2回洗浄した。ヒトmAbを検出する二次抗体試薬としてPEコンジュゲートマウス抗ヒトIgG Fc（BioLegend；#409304）を使用した。二次抗体試薬を1%FBSを添加したPBSで1μg/mlに調製した。次いで、二次抗体試薬から100μlを各ウェルに加えた後、暗所にて4で1時間インキュベートした。細胞を上記の通りに2回洗浄し、1%FBSを添加したPBS200μlに再懸濁させた。全試料をV字底の96ウェルプレートで分析した。Beckham Coulter Cell Lab Quanta SC MPLフローサイトメータ（Beckman Coulter；CA、USA）で蛍光シグナルを記録した。中央値（MFI）をExcelシートにエクスポートし、濃度（[nM]）に対してプロットした。

【0175】

GraphPad Prism（Prism Software；CA、USA）に「log（アゴニスト）対反応 - 変数勾配（4つのパラメータ）」結合モデルを用いてデータをフィットし、そのフィットからEC₅₀値を計算した（図7）。Raji細胞を二次抗体で直接染色したところ、バックグラウンドのMFI値が約1（AGC1115のMFI値の0.5～1%）という低い値を示した。

【0176】

フィットしたAGC1100およびAGC1115の滴定曲線の算出されたEC₅₀値はそれぞれ9nMおよび6nMであり、コンジュゲートAGC1115の結合能がAGC1100と同程度であることを示していた。

【実施例17】

【0177】

AGC1115 - Th - 227によるTh - 227誘導細胞毒性。

in vitroの細胞毒性をCD22陽性Ramos細胞で調査した（実施例6を参照されたい）。AGC1115およびAGC0015とコンジュゲートした対照トラスツマブを用いて、比活性が44kBq/μgになるようTh - 227をキレートした。

【 0 1 7 8 】

R a m o s 細胞を 3 7 、 5 % C O₂ で増殖させ、週 3 回、 1 : 5 に分割した。アッセイ前日、培地 (2 0 % F B S および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを含有するイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M)) を新しい培地と交換し、 1 m L 当たりの細胞数が 4 0 0 0 0 0 個になるよう体積を調整した。 6 ウェルプレートの各ウェルに約 1 6 0 0 0 0 0 個の細胞 (4 m L) を加えた。標識 m A b または培地を加えるために翌日までプレートをインキュベートした。

【 0 1 7 9 】

標識 m A b または培地を加えた後、プレートをさらに 4 時間インキュベートした。この実験では、 A G C 1 1 1 5 またはトラスツズマブ - A G C 0 0 1 5 を最終濃度が 3 n M になるよう各ウェルに加えた。インキュベーション後、細胞を培地中で 2 回洗浄し、上清およびペレット中の A T P を測定した。次いで、細胞を 1 : 2 に分割し、培地中、 3 7 、 5 % C O₂ でインキュベートした。 3 日目、 5 日目および 7 日目に洗浄を 1 回のみにして同じ方法を繰り返した。

10

【 0 1 8 0 】

A T P の定量化を様々な試料採取時間における細胞生存能の尺度として用いて (P r o m e g a 社の C e l l T i t e r - G l o L u m i n e s c e n t 細胞生存能アッセイ) 、図 8 に示される曲線が得られた。 R a m o s 細胞と結合する A G C 1 1 1 5 - T h - 2 2 7 では、 R a m o s 細胞と結合しない T h - 2 2 7 で標識した対照構築物とは対照的に細胞毒性がみられた。

20

【実施例 1 8 】

【 0 1 8 1 】

酸誘導体

別のカップリング化学反応を可能にする水溶性キレート剤の酸誘導体の作製。

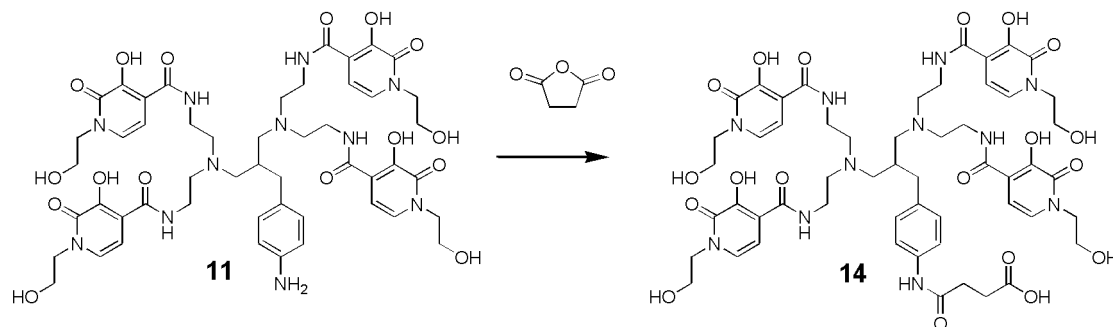
この実施例では成功した酸誘導体の合成を示す。このキレート剤の誘導体により、例えば、腫瘍標的化タンパク質のイブシロンアミンとのアミド結合形成が可能になる。

【 0 1 8 2 】

本実施例は可溶性キレート剤の合成を示し、物質 1 1 (実施例 2) から出発するものである。 4 3 m g (約 0 . 0 4 m m o l) の物質 1 1 を D M S O 4 m L 、アセトニトリル 4 m L および N E t₃ 3 0 μ L に溶かした。無水コハク酸 6 m g を加えた (0 . 0 6 m m o l) 。室温で 2 2 時間反応させた後の反応混合物の L C / M S 分析により、物質 1 5 が形成されることが示された。不純物のジアシル化された副生成物がいくらか形成された。無水物を一部ずつ加えればエステル形成が最小限に抑えられ、生成物 1 4 のモル収率が向上するはずである。得られた反応混合物の H P L C 分析を図 9 に示す。

30

【化 2 5 】



40

【実施例 1 9 】

【 0 1 8 3 】

A G C 0 0 0 3 および A G C 0 0 1 5 と小分子量タンパク質とのコンジュゲーションリジンカップリングを用いることになっていたため、キレート剤とのコンジュゲーション

50

ンの前にアフィボディ融合タンパク質の遊離のシステインを化学的にブロックした。基本的に T o l m a c h e v ら (1) により記載されている通りに大腸菌 (E . c o l i) で作製したアフィボディ融合タンパク質 P E P 9 2 3 7 (配列番号 1 0) を、2 m M トリス (2 - クロロエチル) ホスフィン (T C E P) を含有する P B S (B i o c h r o m L 1 8 2 5 ; 0 . 9 % N a C l 、リン酸緩衝液、p H 7 . 4) に 1 . 3 2 m g / m l になるよう溶かし、ジスルフィド形成を阻害した。アフィボディ融合タンパク質溶液 1 m l を 0 . 1 4 M ホウ酸緩衝液 0 . 9 8 5 m l と混合し、p H が約 8 . 4 であることを確認した。ヨードアセトアミド (S i g m a 1 1 4 9 - 5 g) の 1 m g / m l 溶液 1 5 μ L を加え、反応混合物を室温で 1 時間インキュベートした。

【 0 1 8 4 】

10

コンジュゲーション前、スルフィドリルをブロックしたアフィボディ融合タンパク質を含有する溶液 4 m l を A m i c o n スピンフィルターを用いて 0 . 5 m l に濃縮し、ホウ酸緩衝液で平衡化した N A P 5 脱塩カラム (G E H e a l t h c a r e 、ロット番号 8 3 8 9 2 6 2 4) で余分な反応物を除去した。溶出した高分子量画分 1 m l を A G C 0 0 0 3 または A G C 0 0 1 5 のいずれかと反応させるべく 2 部に分けた。

【 0 1 8 5 】

スルフィドリルをブロックしたアフィボディ融合タンパク質 0 . 5 m l を含むバイアルにキレート剤 A G C 0 0 0 3 (D M F (S i g m a 2 2 7 0 5 6 、ロット番号 S T B B 4 6 6 8) 8 . 3 μ L - 下の 1 3 - 1 0 m g / m l 含有) を加えた。スルフィドリルをブロックしたアフィボディ融合タンパク質 0 . 5 m l を含む別のバイアルにキレート剤 A G C 0 0 1 5 (1 0 m g / m l を含有する H₂O 9 . 3 μ L) を加えた。キレート剤タンパク質反応混合物を含む両バイアルを 3 0 ° で一晩インキュベートした。得られた透明な溶液に N A P 5 カラムを用いて P B S への緩衝液交換を行った。

20

【 0 1 8 6 】

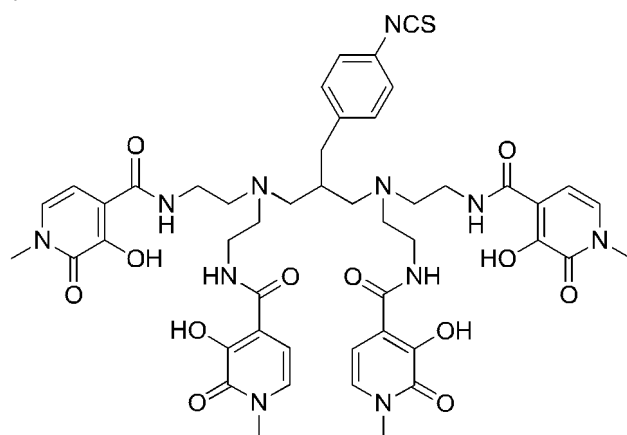
配列番号 1 0 :

A E A K Y A K E M R N A Y W E I A L L P N L T N Q Q K R A F I R K L Y D D P S Q
S S E L L S E A K K L N D S Q A P S G S G S L A E A K E A A N A E L D C Y G V S
D F Y K R L I D K A K T V E G V E A L K D A I L A A L P G

【 0 1 8 7 】

【 化 2 6 】

30



1 3 (A G 0 0 0 3)

40

【 実施例 2 0 】

【 0 1 8 8 】

A G C 0 0 0 3 および A G C 0 0 1 5 との小分子量タンパク質コンジュゲートの溶解度分析

実施例 1 9 で作製した 2 種類のアフィボディ融合タンパク質キレート剤コンジュゲートの透明な P B S 溶液を - 2 0 ° で凍結させた後、解凍した。A G C 0 0 0 3 コンジュゲートを含有する溶液には明らかな乳白色の沈殿物が見られたが、A G C 0 0 1 5 コンジュゲートの溶液には見られなかった。この沈殿は氷上で冷却すると一層明瞭に見えるようにな

50

った。

【0189】

両反応から得られた透明な溶液をFPLC-SECによって分析し、凝集体の可能性を調査した(図10)。AGC0003コンジュゲートでは50%超が凝集状態にあることが明らかになったのに対して、AGC0015コンジュゲートではごく一部(クロマトグラムの肩として現れている)が凝集状態にあった。総合した曲線下面積から、AGC0203(AGC0003コンジュゲート)の方がAGC0215よりも回収された総タンパク質はるかに少ないことがわかった(AUCはそれぞれ: 166 mA U^{*} mLおよび409 mA U^{*} mL)。

【0190】

次に、タンパク質とキレート剤の比をLC/MS分析により調査した。非コンジュゲートアフィボディ融合タンパク質(AGC200)を対照として含めた。LCでは280 nmおよび335 nm(キレート剤は約335 nmで吸収する)で吸収をモニターし、キレート剤が2種類のコンジュゲート溶液中には存在するが、AGC200調製物中には存在しないことがわかった(図11)。AGC0003コンジュゲート(AGC0203)では、MS分析により非コンジュゲート融合タンパク質およびキレート剤を1つ有するタンパク質コンジュゲートがともに示されたのに対して、AGC0015コンジュゲート(AGC0215)では、MS分析により非コンジュゲート融合タンパク質ならびにキレート剤を1つおよび2つ有するタンパク質コンジュゲートが示された(図12)。このことは、キレート剤を2つ以上有するAGC0203が沈殿したことを示している。

【0191】

参考文献

Tolmachev, Orlova, Pehrson, Galli, Baastrup, Andersson, Sandstrom, Rosik, Carlsson, Lundqvist, Wennborg, Nilsson. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a 177Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule. Cancer Res. 67: 2773-82, 2007.

【配列表フリーテキスト】

【0192】

配列番号1; HuM195モノクローナル抗体を逆翻訳し、最適化してチャイニーズハムスター卵巣浮遊細胞にサブクローニングした。

配列番号2; HuM195モノクローナル抗体を逆翻訳し、最適化してチャイニーズハムスター卵巣浮遊細胞にサブクローニングした。

配列番号3; HuM195モノクローナル抗体を逆翻訳し、最適化してチャイニーズハムスター卵巣浮遊細胞にサブクローニングした。

配列番号4; HuM195モノクローナル抗体を逆翻訳し、最適化してチャイニーズハムスター卵巣浮遊細胞にサブクローニングした。

配列番号5; マウス由来モノクローナル抗体

配列番号6; ヒト化マウス由来モノクローナル抗体

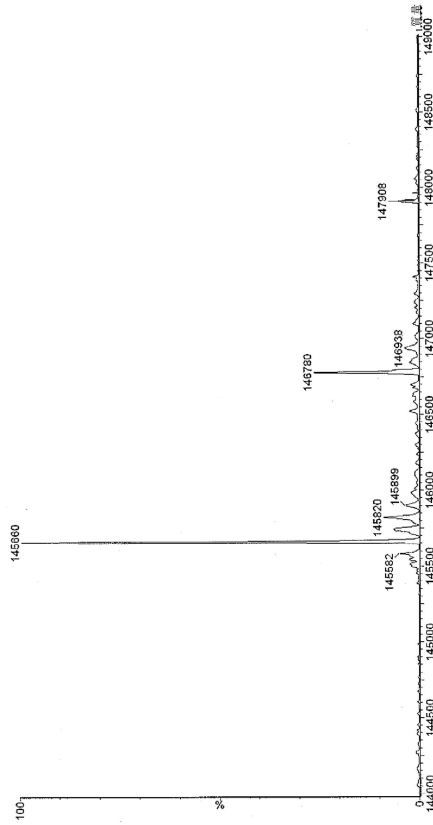
配列番号7; マウス由来モノクローナル抗体

配列番号8; ヒト化マウス由来モノクローナル抗体

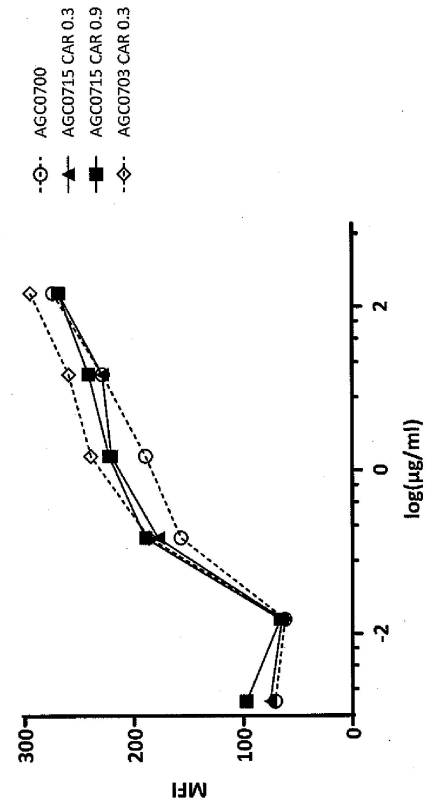
配列番号9; ヒト化マウス抗CD22モノクローナル抗体

配列番号10; 大腸菌に発現させたアフィボディ融合タンパク質

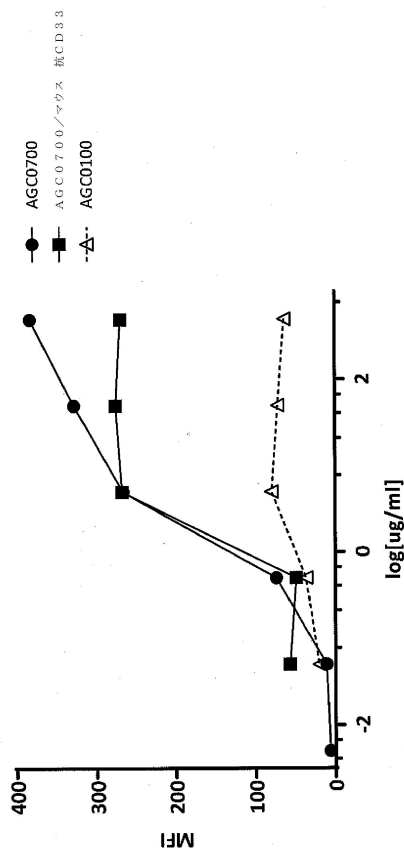
【図 1】



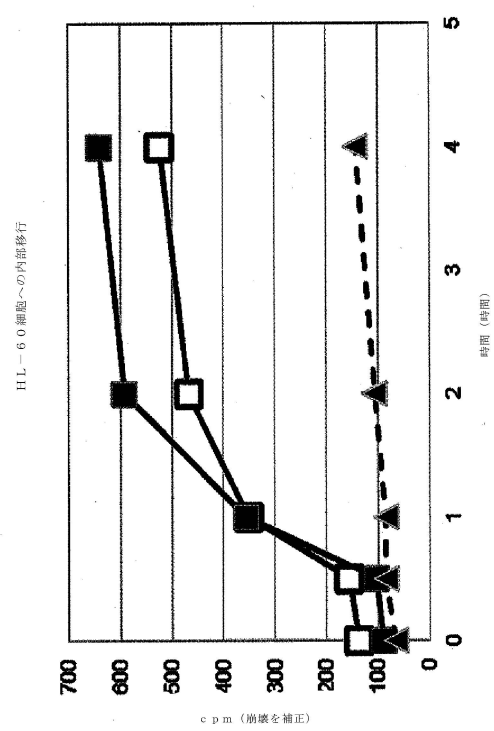
【図 2 a】



【図 2 b】



【図 3】



【図 4】

図 4 A

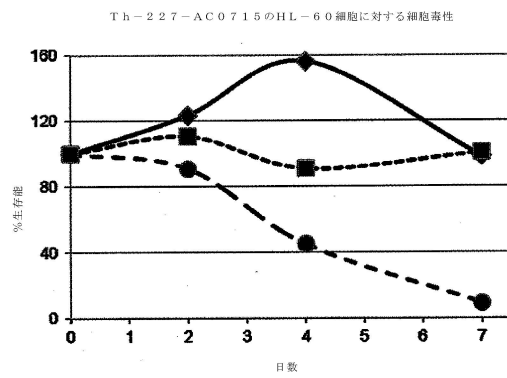
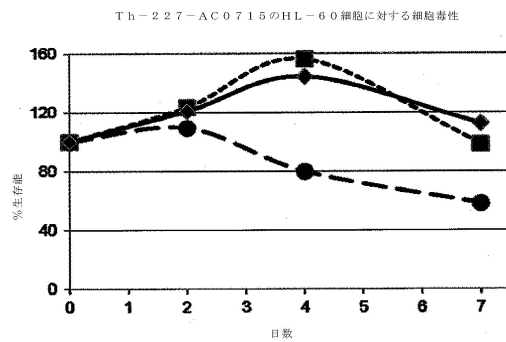
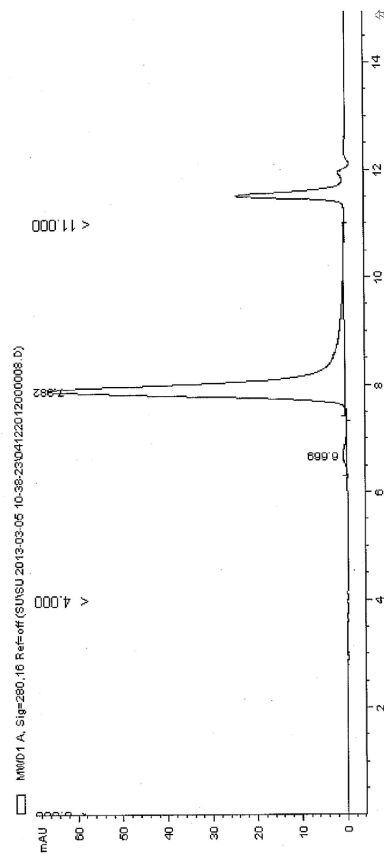


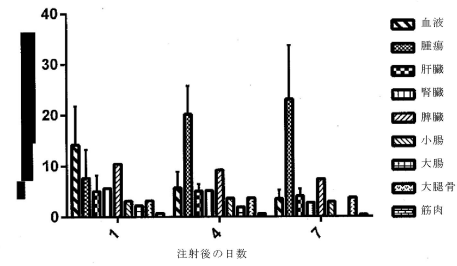
図 4 B



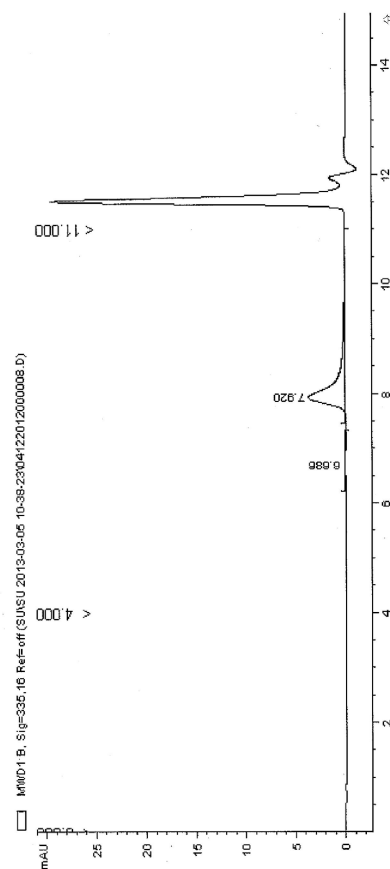
【図 6 a】



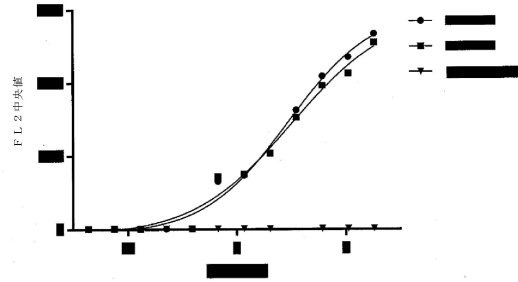
【図 5】



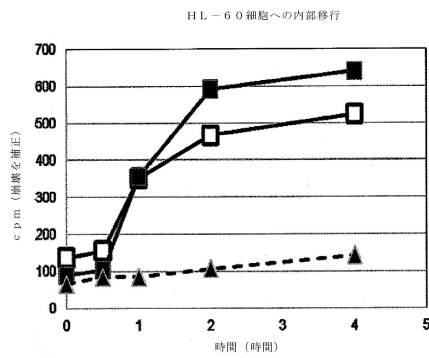
【図 6 b】



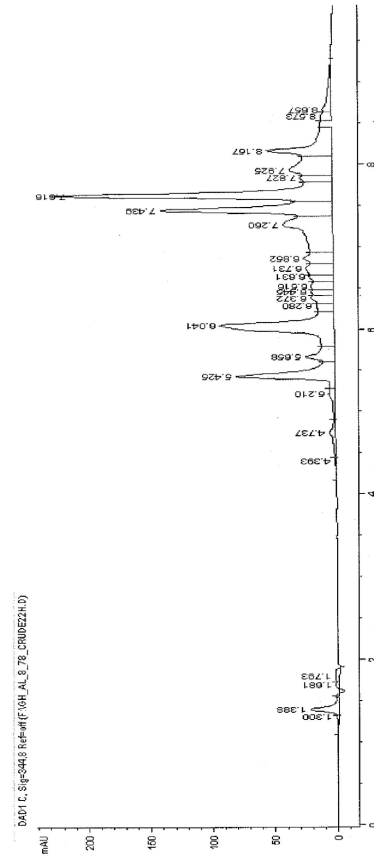
【図 7】



【図 8】



【図 9】



実施例 18 の生成物の HPLC 分析

【図 10】

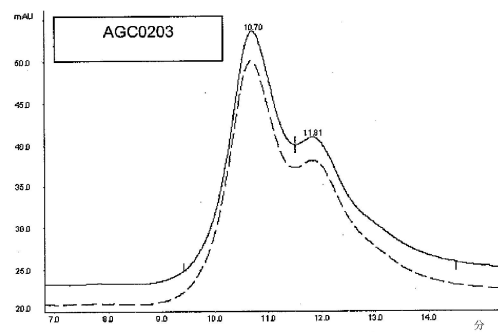


図 10 A

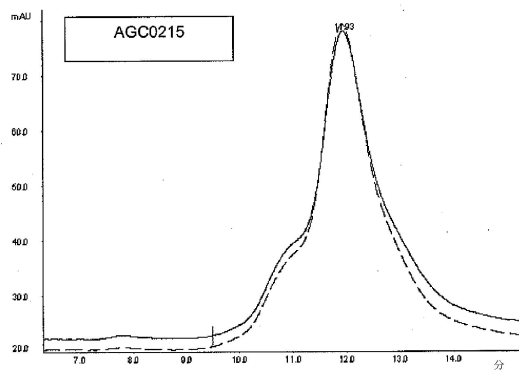
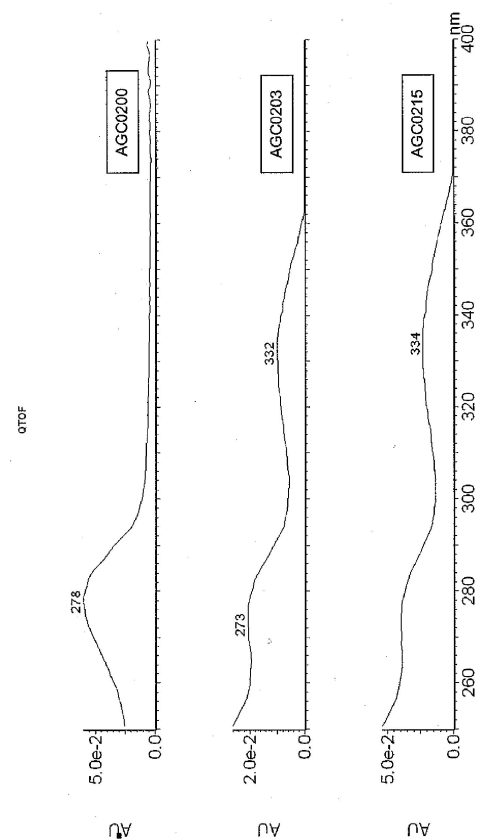
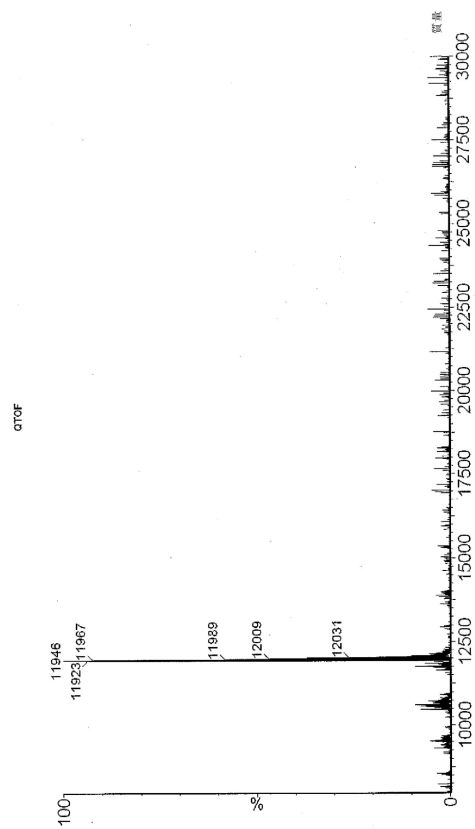


図 10 B

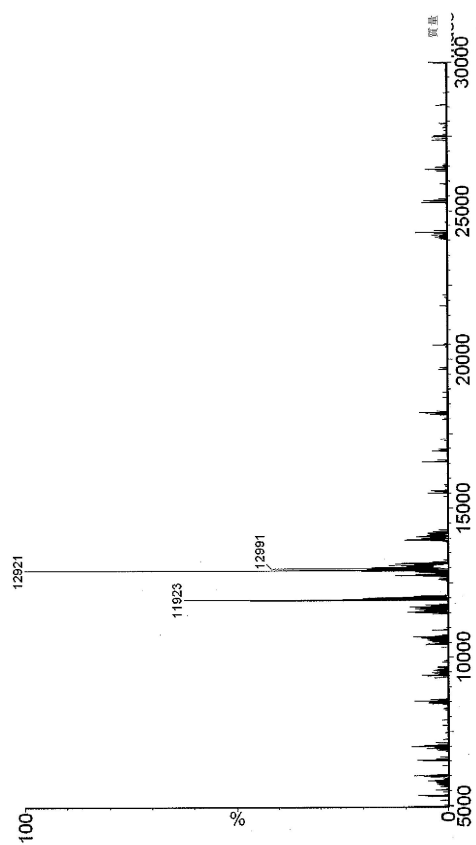
【図 11】



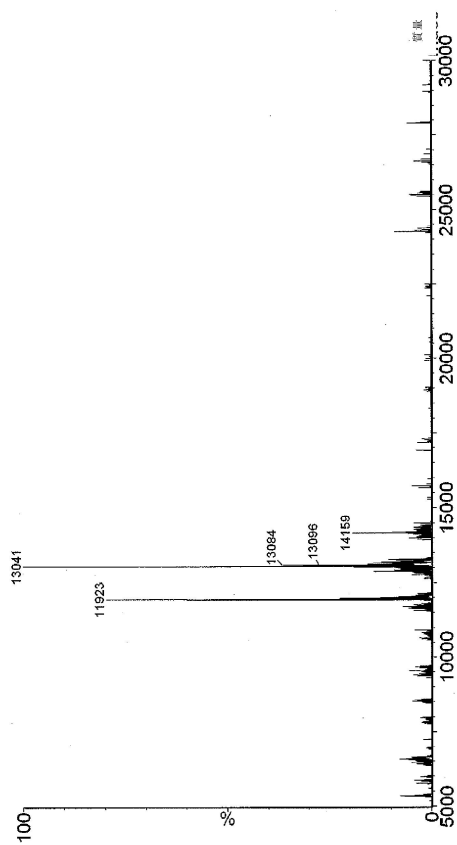
【図 1 2 a】



【図 1 2 b】



【図 1 2 c】



【配列表】

0006219372000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 33/24 (2006.01) A 6 1 K 39/44
C 0 7 K 16/18 (2006.01) A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 33/24
C 0 7 K 16/18 Z N A

(72)発明者 ライアン , オラブ ベンジャミン
ノルウェー エヌ - 0 8 8 4 オスロ , クジャルサスファイエン 1 7 2 エー , アルゲッタ
エイエスエイ内

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 8 6 1 1 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 0 8 / 0 8 5 0 6 4 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K
A 6 1 P