



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202306983 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：111114988

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 20 日

(51) Int. Cl. :

*C07K16/18 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61K51/10 (2006.01)**A61K51/00 (2006.01)**A61K47/68 (2017.01)**A61K45/00 (2006.01)**A61K31/704 (2006.01)**A61K31/57 (2006.01)**A61K31/365 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/04/20 日本

2021-071320

2022/02/28 日本

2022-030389

(71) 申請人：日商日本醫事物理股份有限公司 (日本) NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD. (JP)
日本

(72) 發明人：河谷稔 KAWATANI, MINORU (JP)；竹中文章 TAKENAKA, FUMIAKI (JP)；花田貴壽 HANADA, TAKAHISA (JP)；殿谷豪太 TONOYA, GOTA (JP)；武田拓也 TAKEDA, TAKUYA (JP)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：7 共 86 頁

(54) 名稱

抗 CD 20 抗體之放射性複合體，及放射性醫藥

(57) 摘要

本發明之課題為提供在不損及藥效下，較以往更提高安定性之複合體。本發明之複合體為抗 CD20 抗體與鉗合劑之複合體，其中放射性金屬核種係鉗合化於鉗合劑，抗 CD20 抗體與鉗合劑係透過連結子(L)而連結，連結子(L)不含硫脲鍵。

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗 C D 2 0 抗體之放射性複合體，及放射性醫藥

【中文】

本發明之課題為提供在不損及藥效下，較以往更提高安定性之複合體。本發明之複合體為抗 CD20 抗體與鉗合劑之複合體，其中放射性金屬核種係鉗合化於鉗合劑，抗 CD20 抗體與鉗合劑係透過連結子(L)而連結，連結子(L)不含硫脲鍵。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗 CD 20 抗體之放射性複合體，及放射性醫藥

【技術領域】

【0001】本發明係關於抗 CD20 抗體之放射性複合體，及放射性醫藥。

【先前技術】

【0002】CD20 為表現於人類 B 淋巴細胞表面之顯示 33~37kDa 之分子量的膜貫通型磷酸化蛋白質，其除了末梢血、脾臟、扁桃腺、骨髓中之正常 B 細胞以外，表現於許多之惡性腫瘤 B 細胞。

【0003】作為抗 CD20 抗體已知有利妥昔單抗 (rituximab)。利妥昔單抗為將人類 B 細胞之 SB 細胞株誘發免疫所得之由源自小鼠抗體 2B8 之人類/小鼠嵌合體抗體所構成的單株抗體(專利文獻 3)，其製劑係作為分子標的治療藥之一而使用為抗癌劑/免疫抑制劑等。

【0004】已知利妥昔單抗為於 ADC (Antibody Drug Conjugate (抗體藥物複合體)) 中使用之抗體。作為使用利妥昔單抗之 ADC，係有透過連結子使化學療法劑之載荷藥物(藥物)共價鍵結於抗體之藥劑。

抗體醫藥係對標的之選擇性高，副作用較少，另一方面，藥效可能有不充分的情況。載荷藥物之一種即化學療

法劑，具有強力之藥效，但對標的之選擇性低，故為了消滅癌細胞，必要之最小有效量高，另一方面，就毒性之觀點，用量不太能夠上升，故最大耐性用量低、治療用量範圍窄係成為課題。

若依照ADC，可使化學療法劑選擇性地多量到達癌，其結果以較少量即顯示效果，到達正常細胞之化學療法劑減低，故最大耐性用量亦變高，藉此期待治療用量範圍變廣。

【0005】 作為ADC之一個方法，係有放射性免疫複合體(Radioimmunoconjugate)。於放射性免疫複合體中，係使用放射性核種來取代載荷藥物。

【0006】 專利文獻1係關於抗CD20抗體之ADC，揭示抗CD20抗體經RI標誌。專利文獻2係關於抗CD20抗體(利妥昔單抗)之ADC，記載透過連結子使載荷藥物共價鍵結於抗體之藥劑，作為連結子，記載了DOTA-Bn-硫脲連結子。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻1]國際公開第2004/032828號

[專利文獻2]日本特表2006-511532號公報

[專利文獻3]美國專利第5736137號

【發明內容】

【0008】但是，依本發明者等人之見解，得知以往之抗CD20抗體之放射性複合體，有安定性低等之課題。

【0009】專利文獻1或專利文獻2中，並未揭示或暗示形成了硫脲鍵之抗CD20抗體之課題。

【0010】本發明之一態樣，為一種複合體，其係抗CD20抗體與鉈合劑之複合體，其中放射性金屬核種係鉈合化於鉈合劑，抗CD20抗體與鉈合劑係透過連結子(L)而連結，連結子(L)不含硫脲鍵。

【0011】本發明之其他態樣為含有上述複合體作為有效成分之放射性醫藥。

【0012】又，本發明之其他態樣為一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核種所鉈合化之鉈合劑與抗CD20抗體之複合體作為有效成分，於抗CD20抗體與鉈合劑之連結中不含硫脲鍵，於室溫保管7日時之複合體之放射化學的純度為90%以上。

【0013】再者，本發明所稱的「連結」，無特別指明時，則意指直接或間接地連接的兩方。

【0014】若依本發明，提供在不損及藥效下，較以往更提高安定性之抗CD20抗體之放射性複合體。

【圖式簡單說明】

【0015】

[圖1]顯示利妥昔單抗之輕鏈之胺基酸序列。

[圖2-1]顯示利妥昔單抗之重鏈之胺基酸序列。

[圖 2-2]顯示利妥昔單抗之重鏈之胺基酸序列。

[圖 2-3]顯示利妥昔單抗之重鏈之胺基酸序列。

[圖 3]顯示評估遵照實施例 1 及比較例 1 之記載所製造的放射性複合體之抗原結合活性的結果之圖。縱軸表示將所使用之腫瘤切片上所設定的 ROI 內之計數值除以 ROI 之面積的值，經標準射線源之計數值除以 ROI 之面積的值補正之值，橫軸表示使用於評估的腫瘤切片之細胞種。圖表示各樣品內所設定的 ROI (n=10) 之平均值 ± 標準偏差。

[圖 4]顯示放射性複合體 (實施例 1) 群、放射性複合體 (比較例 1) 群、抗體對照群及 Vehicle 群之荷癌小鼠中的腫瘤體積之經時變化之圖 (n=6)。縱軸表示以各藥劑投予時之腫瘤體積為 1 時之相對值，橫軸表示各藥劑投予後的經過日數。圖表示各群之腫瘤體積 (相對值) 之平均值 ± 標準偏差，「*」表示相對於抗體對照群觀察到顯著差 (p<0.05) 之時間點、「†」表示相對於 Vehicle 群觀察到顯著差 (p<0.05) 之時間點。

[圖 5]顯示評估遵照實施例 3 及比較例 2 之記載所製造的放射性複合體之抗原結合活性的結果之圖。縱軸表示將所使用之腫瘤切片上所設定的 ROI 內之計數值除以 ROI 之面積之值，以標準射線源之計數值除以 ROI 之面積之值所補正之值，橫軸表示使用於評估的腫瘤切片之細胞種。圖表示各樣品內所設定之 ROI (n=10) 之平均值 ± 標準偏差。

[圖 6]顯示於投予遵照實施例 3 之記載所製造之放射性複合體的荷癌小鼠中，腫瘤相對於血液之放射能累積的比

率之圖 (n=3)。縱軸表示對腫瘤之放射能累積相對於對血液之放射能累積的比率，橫軸表示使用於評估的荷癌腫瘤。圖表示腫瘤相對於血液之放射能累積的比率之平均值 ± 標準偏差。

[圖 7]顯示 ^{225}Ac 錯合物標誌利妥昔單抗對 SU-DHL-2 細胞的殺細胞效果之圖。作為比較對象係添加未標誌之利妥昔單抗及 POLIVY(註冊商標)。圖表示各群 (n=4) 之平均值 ± 標準偏差。

【實施方式】

(1) 放射性複合體

【0016】本發明為一種複合體(以下亦稱本發明之放射性複合體)，其係抗 CD20 抗體與鉈合劑之複合體，其中放射性金屬核種係鉈合化於鉈合劑，抗 CD20 抗體與鉈合劑係透過連結子(L)而連結，連結子(L)不含硫脲鍵。

【0017】

(1-1) 放射性金屬核種

本發明之放射性複合體中所含有的放射性金屬核種，為釋出 α 線之放射性核種、釋出 β 線之放射性核種、釋出正子之放射性核種或釋出 γ 線之放射性核種。將本發明之放射性複合體用於癌治療時，較佳使用釋出 α 線之放射性核種或釋出 β 線之放射性核種。又，將本發明之放射性複合體用於癌之診斷或檢測時，較佳使用釋出正子之放射性核種或釋出 γ 線之放射性核種。作為釋出 α 線之放射性核種，

例示有 Bi-212、Bi-213、Ac-225、Th-227。又，作為釋出 β 線之放射性核種，例示有 Cu-64、Y-90 或 Lu-177。又，作為釋出正子之放射性核種，例示有 Cu-64、Ga-68、Y-86、Zr-89。又，作為釋出 γ 線之放射性核種，例示有 Tc-99m 或 In-111。本發明之放射性複合體中所含的放射性金屬核種，更佳為 Ga-68、Zr-89、Y-90、In-111、Lu-177 或 Ac-225；又更佳為 Zr-89、Y-90、Lu-177 或 Ac-225。

【0018】

(1-2) 抗體

本發明之放射性複合體中所含的抗體，為特異性結合於 CD20 之免疫球蛋白(以下亦稱為本發明所用之抗體)。本發明所用之抗體，可為多株抗體、亦可為單株抗體，較佳為單株抗體。抗體之來源不特別限定，例如可列舉非人類動物之抗體、非人類哺乳動物之抗體，及人類抗體，較佳可例示人類、大鼠、小鼠及兔子之抗體。抗體源自人類以外之種時，較佳使用週知之技術進行嵌合體化或人源化，但本發明所用之抗體，亦可為嵌合體抗體、人源化抗體，或人類抗體。又，本發明所用之抗體亦可為雙特異性抗體。本發明所用之抗體，例如為 IgG，例如可為 IgG1、IgG2(例如 IgG2a 及 IgG2b)、IgG3，或 IgG4。

【0019】本發明之放射性複合體所用之抗體，更佳為利妥昔單抗或 ibritumomab。

本說明書中，利妥昔單抗，具體而言，為包含圖 1 記載之輕鏈胺基酸序列(序列編號 1)

及圖 2-1~圖 2-3 記載之重鏈胺基酸序列(序列編號 2)

之人源化抗體。

利妥昔單抗，係作為以 CD20 陽性之 B 細胞性非何杰金氏淋巴瘤或免疫抑制狀態下之 CD20 陽性之 B 細胞性淋巴增殖性疾病為適應症的抗癌劑，而於臨床使用，可作為 Rituxan(註冊商標)而獲得。

【0020】 Ibritumomab 為小鼠型 CD20 單株抗體，經鈷(Y-90)標誌之藥劑可作為 Zevalin(註冊商標)而獲得。

【0021】

(1-3) 鉈合劑

本發明中鉈合劑只要係於結構中具有放射性金屬核種所配位之部位者則不特別限定。鉈合劑例如可列舉 CB-TE2A(1,4,8,11-四氮雜雙環[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸)、CDTA(環乙烷-反-1,2-二胺四-乙酸)、CDTPA(4-氰基-4-[[十二烷硫基]硫酮基甲基]硫基]-戊酸)、DOTA(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-肆(胺甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷)、DOTPA(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四丙酸)、1,4,7,10-肆(吡啶-2-基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷(L^{py})、DOTA-GA(α -(2-羧基乙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTP(((1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四基)肆(亞甲基))四膦酸)、DOTMP(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-

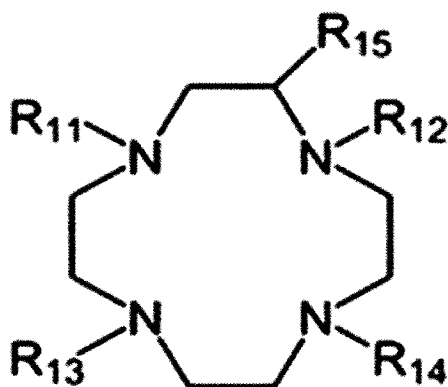
肆(亞甲基膦酸))、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-肆(乙醯胺基亞甲基膦酸)、D02P(四氮雜環十二烷二甲烷膦酸)、去鐵胺(DFO)、DTPA(甘胺酸, N,N-雙[2-[雙(羧基甲基)胺基]乙基]-)、CHX-A''-DTPA(2,2'-((2-(((1S,2R)-2-(雙(羧基甲基)胺基)環己基)(羧基甲基)胺基)乙基)一氫化氮基(azanediyl))二乙酸)、DTPA-BMA(5,8-雙(羧基甲基)-11-[2-(甲基胺基)-2-側氧基乙基]-3-側氧基2,5,8,11-四氮雜十三-13-酸)、EDTA(2,2',2'',2'''-(乙烷-1,2-二基雙(氮三基))四乙酸)、NOTA(1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三乙酸)、NOTP(1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三基參(亞甲基膦酸))、TETPA(1,4,8,11-四氮雜環十四烷-1,4,8,11-四丙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、TTHA(3,6,9,12-肆(羧基甲基)-3,6,9,12-四氮雜十四烷二酸)、HEHA(1,2,7,10,13-六氮雜環十八烷-1,4,7,10,13,16-六乙酸)、1,2-HOPO(N,N',N'',N'''-四(1,2-二氫-1-羥基-2-側氧基吡啶-6-羰基)-1,5,10,14-四氮雜十四烷)、PEPA(1,4,7,10,13-五氮雜環十五烷-N,N',N'',N''',N''''-五乙酸)、H4octapa(N,N'-雙(6-羧基-2-吡啶基甲基)-乙二胺-N,N'-二乙酸)、H2bispa2(6,6'-({9-羥基-1,5-雙(甲氧基羰基)-2,4-二(吡啶-2-基)-3,7-二氮雜雙環[3.3.1]壬烷-3,7-二基}雙(-亞甲基))二吡啶甲酸)、H2dedpa(1,2-[{6-(羧基)-吡啶-2-基}-甲基胺基]乙烷)、H2macropa(6-(1,4,10,13-四氧雜-7,16-二氮雜環十八-N,N'-甲基)吡啶甲酸)、H5decapa(N,N''-雙(6-羧基-2-吡啶基甲

基)-二仲乙基三胺-N,N',N''-三乙酸)、H6phospa(N,N'-(亞甲基膦酸酯)-N,N'-[6-(甲氧基羰基)吡啶-2-基]-甲基-1,2-二胺基乙烷)、HP-D03A(羥基丙基四氮雜環十二烷三乙酸)、紫質等者，較佳為下述式(A)表示之化合物。

【0022】

[化1]

(A)



【0023】(式(A)中， R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 及 R_{14} 係分別獨立地為由 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_pCONH_2$ 或 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ 所構成之基， R_{15} 為氫原子， p 為0以上3以下之整數)。

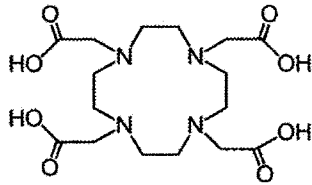
【0024】式(A)表示之化合物，較佳為包含源自1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)或其衍生物之結構的化合物，具體而言，於結構中可包含源自選自DOTA(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-肆(胺

甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷)、DOTPA(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四丙酸)、1,4,7,10-肆(吡啶-2-基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷(L^{py}), DOTA-GA(α -(2-羧基乙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTP(((1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四基)肆(亞甲基))四膦酸)、DOTMP(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-肆(亞甲基膦酸))、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-肆(乙醯胺基亞甲基膦酸)、D02P(四氮雜環十二烷二甲烷膦酸)的一種鉈合劑之結構,更佳可列舉以下之式(A-1)~(A-6)表示之化合物。用於本發明之放射性複合體的鉈合劑,又更佳為DOTA-GA(式(A-6)表示之化合物)。所使用之鉈合劑為DOTA-GA時,前述鉈合劑可為立體異構物(S體、R體)、亦可為消旋體。S體與R體之立體異構物可以任意比例混合。

【0025】

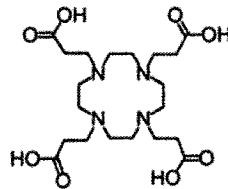
[化2]

(A-1)



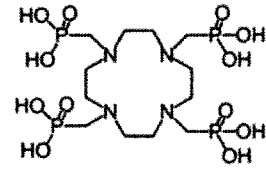
DOTA

(A-2)



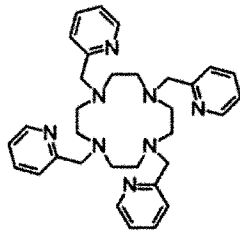
DOTPA

(A-3)



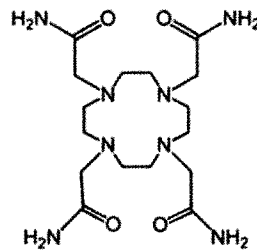
DOTMP

(A-4)



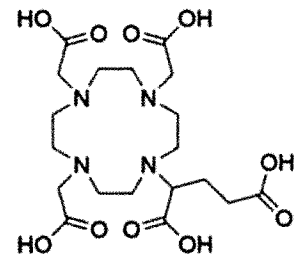
Lpy

(A-5)



DOTAM

(A-6)



DOTA-GA

【0026】本發明所用之鉗合劑，係透過連結子(L)與抗CD20抗體連結。較佳為，本發明所用之抗CD20抗體，係經胜肽部位特異性地修飾，此時本發明所用之鉗合劑，係透過連結子(L)與胜肽連結。本發明之放射性複合體中，鉗合劑與連結子(L)較佳藉由共價鍵而連接。因此，前述之鉗合劑，於本發明之放射性複合體中，化合物內之一部分之基亦可取代為與連結子(L)形成共價鍵之基。例如，本發明所用之鉗合劑為式(A)表示之化合物時， R_{12} 或 R_{15} 亦可取代為與連結子(L)形成共價鍵之基。較佳為， R_{12} 取代為與連結子(L)形成共價鍵之基時， R_{15} 為氫原子， R_{12} 為由 $-(CH_2)_pCOOH$ 、 $-(CH_2)_pC_5H_5N$ 、 $-(CH_2)_pPO_3H_2$ 、

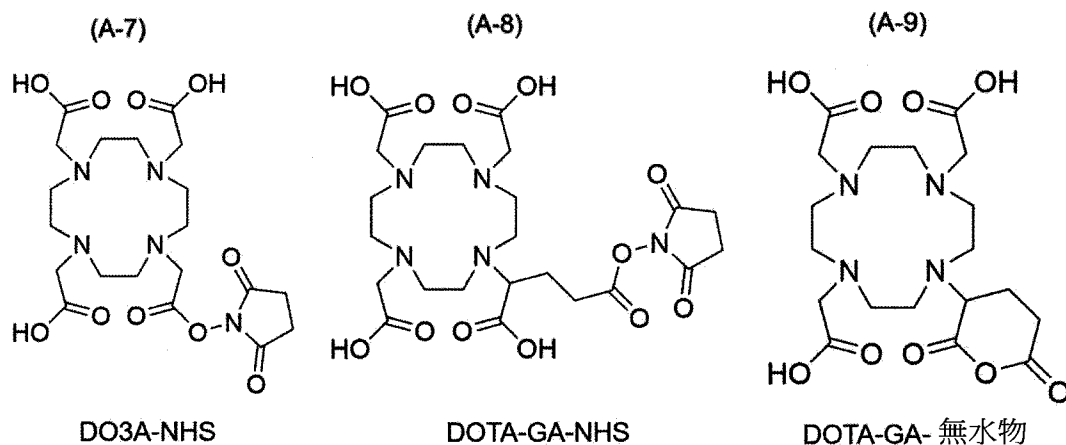
$-(\text{CH}_2)_p\text{CONH}_2$ 或 $-(\text{CHCOOH})(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$ 所構成之基時， R_{15} 係取代為與連結子(L)形成共價鍵之基。

【0027】鉗合劑與連結子(L)之共價鍵，只要不含硫脲鍵即可，可列舉碳-碳鍵、醯胺鍵、醚鍵、酯鍵等。

【0028】鉗合劑與連結子(L)之連接，例如係藉由下述式(A-7)或(A-8)之N-羥基琥珀醯亞胺酯(NHS)基或下述式(A-9)之2,6-二側氧基四氫-2H-吡喃基，與連結子(L)之1級胺的反應而形成。

【0029】

[化3]



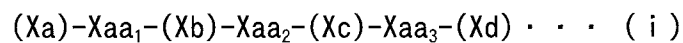
【0030】

(1-4) 抗體修飾胜肽

本發明中，胜肽只要係將抗體部位特異性地、較佳為將Fc區域部位特異性地、更佳為將抗體之Fc區域中的離胺酸殘基部位特異性地修飾者，則不特別限定。藉此，可維持抗體本身的活性(抗原辨識作用、中和作用、補體活性化作用及/或調理素作用)。

【0031】本發明所用之胜肽可為鏈狀胜肽亦可為環狀胜肽，較佳為環狀胜肽。更佳為包含下述式(i)表示之由13個以上17個以下之胺基酸殘基所構成的胺基酸序列(以下亦稱「抗體修飾胜肽」)，且經交聯劑修飾。再者，式(i)中，係以胺基酸序列之紙面左側表示N末端側、胺基酸序列之紙面右側表示C末端側來說明。

【0032】



式(i)中，Xa、Xb、Xc及Xd係分別表示連續的a個X、連續的b個X、連續的c個X，及連續的d個X，

X為側鏈不具有硫醇基及鹵乙醯基之胺基酸殘基，

a、b、c及d係分別獨立地為1以上5以下之整數，且滿足 $a+b+c+d \leq 14$ ，

Xaa₁及Xaa₃係分別獨立地表示

源自側鏈具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，或源自側鏈具有鹵乙醯基的胺基酸之胺基酸殘基，惟，Xaa₁及Xaa₃之任一者為源自具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，較佳為Xaa₁及Xaa₃連結以形成環結構，

Xaa₂為離胺酸殘基、精胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸；較佳為離胺酸殘基，且Xaa₂經交聯劑修飾。

【0033】上述式(i)中的X中可含有的胺基酸殘基，例如可列舉源自甘胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、天門

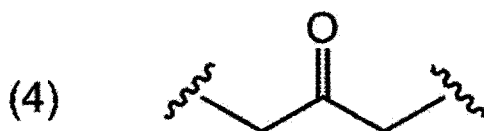
冬醯胺、天門冬胺酸、麩胺酸、精胺酸、組胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸等之胺基酸者，X存在複數個時，該等可為由同一種類之胺基酸所構成的胺基酸殘基、亦可分別為由不同種類之胺基酸所構成的胺基酸殘基。

【0034】式(i)中之a、b、c及d，只要為上述範圍之數則無特別限制，就胜肽與抗CD20抗體之結合安定性之觀點，以 $a+b+c+d \leq 14$ 為條件，a較佳為1以上3以下之整數、b較佳為1以上3以下之整數、c較佳為3以上5以下之整數，及d較佳為1以上3以下之整數。

【0035】 Xaa_1 及 Xaa_3 之至少一者，為源自側鏈具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，該胺基酸分別可相同亦可相異。側鏈具有硫醇基的胺基酸，例如可列舉半胱胺酸、同半胱胺酸。如此之胺基酸殘基，較佳藉由雙硫鍵而鍵結，或透過以下之式(4)所示之結構，而鍵結有硫醚基。式(4)中，波浪線部分表示與硫醚基之鍵結部分。

【0036】

[化4]

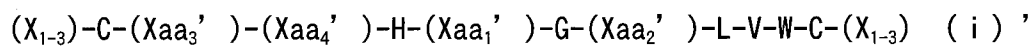


【0037】 Xaa_1 及 Xaa_3 ，亦可為 Xaa_1 及 Xaa_3 中之一者為源自側鏈具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，另一方為源自側鏈具有鹵乙醯基的胺基酸之胺基酸殘基，來取代上述

組合。此等係透過硫醚鍵而鍵結。鹵乙醯基其末端係經碘等之鹵素取代，藉由與另一方之側鏈中的硫醇基之反應使鹵素脫離，形成硫醚鍵。

【0038】式(i)表示之抗體修飾胜肽之具體的胺基酸序列，例如可列舉國際公開第2016/186206號、國際公開第2017/217347號及國際公開第2018/230257號記載之胜肽，亦可使用此等。

較佳為，本發明所用之抗體修飾胜肽，為下述式(i)'表示之由13~17個胺基酸殘基所構成的胺基酸序列。



【0039】式(i)'中，X各自獨立地為半胱胺酸以外之任意之胺基酸殘基，

C為半胱胺酸殘基，

H為組胺酸殘基，

Xaa₁'為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸，

G為甘胺酸殘基，

Xaa₂'為麩胺酸殘基或天門冬醯胺殘基，

L為白胺酸殘基，

V為纈胺酸殘基，

W為色胺酸殘基，

Xaa₃'為丙胺酸殘基、絲胺酸殘基或蘇胺酸殘基，且

Xaa₄'為酪胺酸殘基或色胺酸殘基。

上述式(i)'中，N末端或C末端之 X_{1-3} 的表述，意指半胱胺酸(C或Cys)以外之獨立的任意胺基酸殘基X連續1~3個，構成其之胺基酸殘基為相同或相異之殘基，較佳為由3個全部非相同殘基之序列所構成。

【0040】此等之中，作為抗體修飾胜肽之胺基酸序列，較佳具有以下序列(1)~(14)的任一者，更佳具有以下序列(1)、(2)、(13)或(14)。以下胺基酸序列(1)~(14)中，(Xaa₂)表示離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸；較佳表示離胺酸殘基，較佳為(Xaa₂)經交聯劑修飾，(Xaa₁)及(Xaa₃)均表示同半胱胺酸殘基。又，以下胺基酸序列(1)~(14)中，(Xaa₁)、(Xaa₂)及(Xaa₃)以外之胺基酸係以一字母縮寫表述。

【0041】

- (1)DCAYH(Xaa₂)GELVWCT(序列編號3)
- (2)GPDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFH(序列編號4)
- (3)RCAYH(Xaa₂)GELVWCS(序列編號5)
- (4)GPRCAYH(Xaa₂)GELVWCSFH(序列編號6)
- (5)SPDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFH(序列編號7)
- (6)GDDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFH(序列編號8)
- (7)GPSCAYH(Xaa₂)GELVWCTFH(序列編號9)
- (8)GPDCAYH(Xaa₂)GELVWCSFH(序列編號10)
- (9)GPDCAYH(Xaa₂)GELVWCTHH(序列編號11)
- (10)GPDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFY(序列編號12)

(11)SPDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFY(序列編號 13)

(12)SDDCAYH(Xaa₂)GELVWCTFY(序列編號 14)

(13)RGNCA YH(Xaa₂)GQLVWCTYH(序列編號 15)

(14)G(Xaa₁)DCAYH(Xaa₂)GELVWCT(Xaa₃)H(序列編號 16)

【0042】上述式(i)或(i)'表示之胜肽，或具有序列(1)~(14)之胜肽，較佳為於N末端導入連結子(L)，且C末端經醯胺化。又，此等之胜肽之Xaa₂(或相當Xaa₂之部分)係經交聯劑修飾，藉此，胜肽可透過交聯劑與抗CD20抗體之Fc區域進行共價鍵結。式(i)'中相當Xaa₂之部分為Xaa₁'。

【0043】交聯劑可由所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇，可為至少具有2處之可與所期望之胺基酸(例如離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸，及精胺酸殘基等)鍵結之部位的化合物。其例子雖不限定，但可列舉DSG(disuccinimidyl glutarate、二琥珀醯亞胺基戊二酸酯)、DSS(disuccinimidyl suberate、二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)等之琥珀醯亞胺基較佳含2個以上之交聯劑、DMA(dimethyl adipimidate · 2HCl、己二醯亞胺酸二甲酯二鹽酸鹽)、DMP(dimethyl pimelimidate · 2HCl、庚二醯亞胺酸二甲酯二鹽酸鹽)，及DMS(dimethyl suberimidate · 2HCl、辛二醯亞胺酸二甲酯二鹽酸鹽)等之醯亞胺酸部分較佳含2個以上之交聯劑，以及DTBP(dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate · 2HCl、

3,3'-二硫代雙丙醯亞胺酸二甲酯二鹽酸鹽)及 DSP (dithiobis(succinimidyl propionate)、二硫代雙琥珀醯亞胺基丙酸酯))等之具有SS鍵之交聯劑、SBAP(琥珀醯亞胺基3-(溴乙醯胺基)丙酸酯)。DSS或DSG等之含琥珀醯亞胺基之交聯劑，由於會與存在於胜肽之N末端之一級胺反應，故藉由在將N末端封端後與DSS或DSG反應，可僅將Xaa₂之胺基以DSS或DSG特異性修飾。例如，亦可於對抗體修飾胜肽之N末端預先導入連結子(L)後，與DSS或DSG反應。DSS或DSG之琥珀醯亞胺基，藉由與抗CD20抗體(例如利妥昔單抗)中遵照Eu numbering之Lys250殘基或Lys252殘基反應，而使抗CD20抗體經胜肽予以部位特異性地修飾。此等之Lys殘基，存在於人類IgG中之Fc區域，即使利妥昔單抗以外之抗CD20抗體，所屬技術領域中具有通常知識者亦可比對(alignment)抗體之胺基酸序列，特定出所相當之Lys殘基。

【0044】

(1-5)連結子(L)

連結子(L)只要係於本發明之放射性複合體中，可將鉗合劑與胜肽連結者則不特別限定。本發明所用之連結子(L)，只要非含有硫脲鍵者則不特別限定，可列舉取代或無取代之烷基、取代或無取代之雜烷基、聚乙二醇(PEG)基、胜肽、糖鏈、二硫醚基、醯胺基，及此等之組合等。

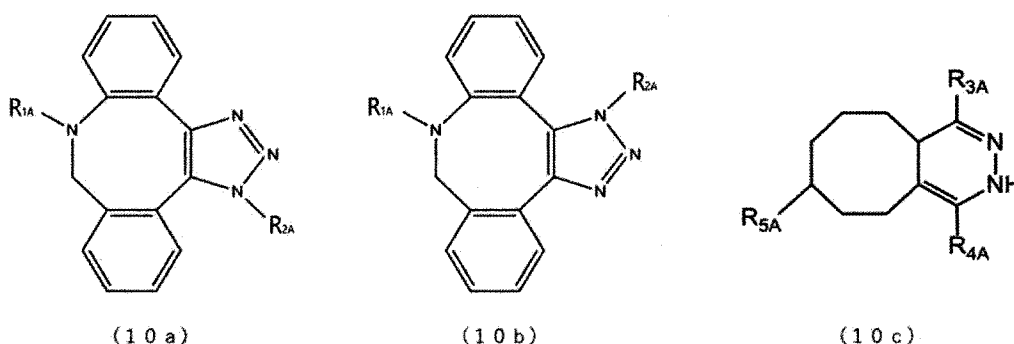
本說明書中連結子(L)係指經胜肽修飾之抗CD20抗體與鉗合劑之連接所用的連結子之總稱，其係包含抗體修飾

連結子(L₁)及鉗合連結子(L₂)之用語。詳如後述，抗體修飾連結子(L₁)，為對(1-4)所說明之胜肽的N末端側所導入者，詳如後述，鉗合連結子(L₂)亦為對(1-3)所說明之鉗合劑的官能基所導入者。

【0045】本發明所用之連結子(L)，可包含以點擊反應所形成之鍵結部位，較佳為抗體修飾連結子(L₁)與鉗合連結子(L₂)藉由點擊反應而鍵結。本發明中，以點擊反應所形成之鍵結部位與鉗合劑之間，較佳不含硫脲鍵。換言之，鉗合連結子(L₂)較佳不含硫脲鍵。此處，以點擊反應所形成之鍵結部位，較佳可認為係下述式(10a)或(10b)表示之含三唑骨架之結構或下述式(10c)表示之含噁嗪骨架之結構。式(10a)與式(10b)係處於異構物的關係，因此可以任意比例含有。

【0046】

[化5]



【0047】式(10a)及式(10b)中，R_{1A}表示與鉗合劑之連結部位，R_{2A}表示與抗體修飾胜肽之連結部位。式(10c)中，R_{3A}及R_{4A}中一者表示氫原子、甲基、苯基或吡啶基，

另一者表示與鉗合劑之連結部位， R_{5A} 表示與抗體修飾胜肽之連結部位。式(10a)、式(10b)及式(10c)中，與抗體修飾胜肽之連結部位，係透過抗體修飾連結子(L_1)連結胜肽，與鉗合劑之連結部位，係透過鉗合連結子(L_2)連結鉗合劑。

【0048】 本發明之放射性複合體，係以胜肽部位特異性地修飾抗體，胜肽與鉗合劑係透過連結子(L)而連結，因此為使1分子或2分子之鉗合劑對於抗CD20抗體1分子複合化者。

【0049】

(1-6)複合體之製造方法

本發明之放射性複合體，可由以下2個步驟製造：將鉗合劑與抗CD20抗體接合之接合步驟，與形成放射性金屬核種與鉗合劑之錯合物之錯合物形成步驟。接合步驟可為錯合物形成步驟之前亦可為錯合物形成步驟之後。

【0050】 接合步驟中，係將具有前述抗體修飾胜肽之鉗合劑或連結子(L)，於抗體之Fc區域部位特異性地修飾。

【0051】 錯合物形成步驟中，係使放射性金屬核種與鉗合劑鉗合(形成錯合物)。此處所使用之放射性金屬核種，就提高錯合物形成效率之觀點，較佳以可電離之態樣使用、更佳以離子之態樣使用。錯合物形成步驟，只要可與放射性金屬核種形成錯合物，則不問放射性金屬核種對鉗合劑之添加順序。例如可使用於以水為主體之溶劑中溶

解有放射性金屬離子之溶液作為放射性核種。

錯合物形成後，亦可使用過濾濾器、膜濾器、填充有各種填充劑之管柱、層析等，將所得之錯合物純化。

【0052】 本發明之放射性複合體之製造方法，較佳於錯合物形成步驟之後實行接合步驟。

更佳之態樣中，錯合物形成步驟(A)中，係於放射性金屬核種，與具有可點擊反應之第1原子團作為用以可與抗體複合化之取代基的鉗合劑之間形成錯合物。接著，於接合步驟(B)中，係使用具有前述抗體修飾胜肽與可點擊反應之第2原子團之抗體修飾連結子(L₁)，於將Fc區域經部位特異性地修飾的胜肽修飾抗體，與步驟(A)所得之形成有錯合物之鉗合劑之間實行點擊反應，得到本發明之放射性複合體。

以下詳述步驟(A)及(B)。

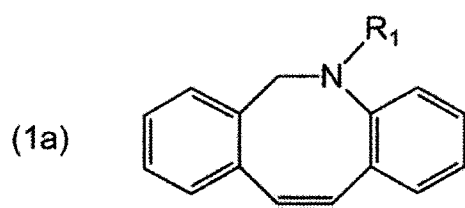
【0053】 可點擊反應之第1原子團與第2原子團之組合，係依點擊反應之種類而選擇適切者，例如可列舉炔與疊氮化物之組合、1,2,4,5-四嗪與烯之組合等。此等之原子團，只要第1原子團具有上述原子團之組合中的一者、第2原子團具有上述原子團之組合中成為與第1原子團相異之一者的原子團即可。就兼顧鉗合劑及抗體之安定性，與提高此等之結合效率之觀點，較佳為鉗合連結子(L₂)為炔且抗體修飾連結子(L₁)為疊氮化物，或者鉗合連結子(L₂)為1,2,4,5-四嗪且抗體修飾連結子(L₁)為烯。如此之原子團之組合所致之點擊反應之具體例子，可列舉Huisgen環化

加成反應，或反電子需求型 Diels-Alder 反應等。

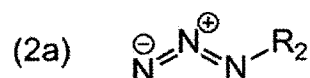
【0054】可點擊反應之原子團之組合之具體例子，如下式所示，可列舉含有二苄基環辛炔(DBCO)作為第1原子團之炔之原子團(式(1a))，與含有疊氮化物基作為第2原子團之疊氮化物之原子團(式(2a))的組合，或者含有1,2,4,5-四嗪作為第1原子團之原子團(式(1b))，與含有反-環辛烯(TCO)作為第2原子團之烯之原子團(式(2b))的組合。較佳為式(1a)與式(2a)之組合。

【0055】

[化6]



二苄基環辛炔

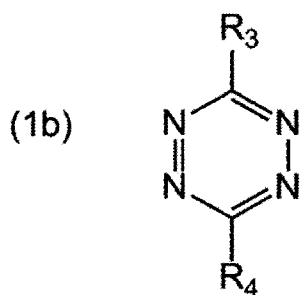


疊氮化物

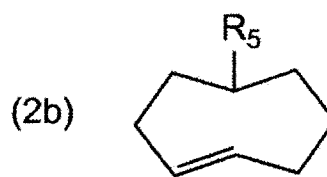
【0056】式(1a)中， R_1 表示與鉗合劑之連結部位，式(2a)中， R_2 表示與抗體修飾胜肽之連結部位。

【0057】

[化7]



1,2,4,5-四嗪



反-環辛烯

【0058】式(1b)中， R_3 及 R_4 中的一者表示與鉗合劑之連結部位或與抗體修飾胜肽之連結部位，另一者表示氫原子、甲基、苯基或吡啶基。 R_5 ，當式(1b)之原子團與鉗合劑連結時，為與抗體修飾胜肽之連結部位，當式(1b)之原子團與抗體修飾胜肽連結時，表示與鉗合劑之連結部位。

【0059】使用含有上述式(1a)表示之二苄基環辛炔(DBCO)作為第1原子團之炔的原子團時，可列舉市售之各種DBCO試藥。具體而言，例如可選擇DBCO-C6-酸、二苄基環辛炔-胺、二苄基環辛炔馬來醯亞胺、DBCO-PEG-酸、DBCO-PEG-醇、DBCO-PEG-胺、DBCO-PEG-NH-Boc、羧基玫紅-PEG-DBCO、磺酸玫紅-PEG-DBCO、TAMRA-PEG-DBCO、DBCO-PEG-生物素、DBCO-PEG-DBCO、DBCO-PEG-馬來醯亞胺、TCO-PEG-DBCO、DBCO-mPEG等，較佳使用二苄基環辛炔馬來醯亞胺。

【0060】錯合物形成步驟(A)中，更佳使用具有以下式(ii)表示之結構的化合物。

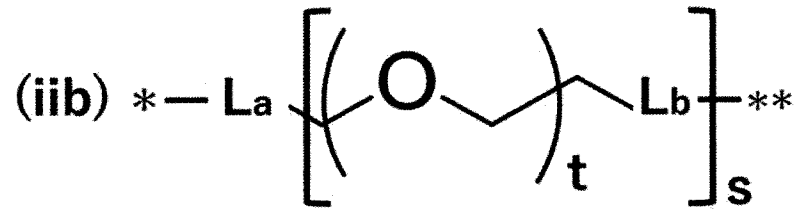


式(ii)中，A為前述鉗合劑，B與C之總稱為鉗合連結子(L_2)。

【0061】式(ii)中，B係由以下之式(iib)表示。

【0062】

[化8]

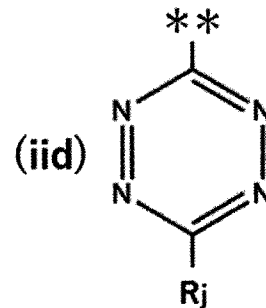
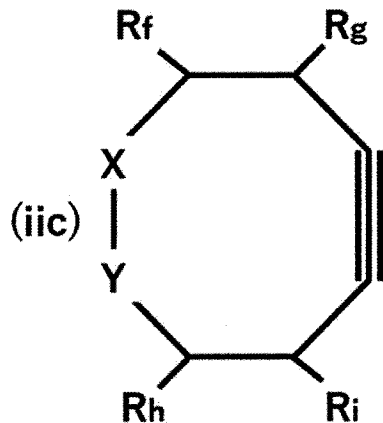


【0063】式(iib)中， L_a 及 L_b 係獨立地為至少包含醯胺鍵之碳數1以上50以下之鏈結連結子， t 為0以上30以下之整數， s 為0或1，*為與A之鏈結部位，**為與C之鏈結部位。

【0064】式(ii)中，C為以下之式(iic)表示之炔衍生物或式(iid)表示之四嗪衍生物之任一者。

【0065】

[化9]



【0066】式(iic)中，X為 CHR_k -**或 N -**，Y為 CHR_k 或 $\text{C}=\text{O}$ ， R_k 係獨立地為氫原子，或碳數1以上5以下之烷基，X為 CHR_k -**、Y為 CHR_k 時， R_k 部分亦可一起形成環烷基， R_f 、 R_g 、 R_h 及 R_i 係獨立地為氫原子、鹵素原子、碳數1以上5以下之烷基， R_f 與 R_g 亦可一起，或 R_h 與 R_i 亦可一起

形成烴環，**表示與B之鍵結部位，式(iid)中，**表示與B之鍵結部位，R_j表示氫原子、甲基、苯基或吡啶基。

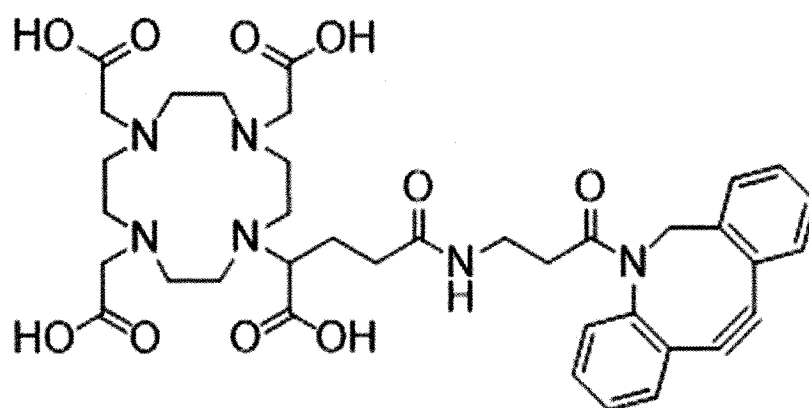
【0067】步驟(A)所使用之鉗合劑，更佳為上述式(A)中，R₁₁至R₁₄為-(CH₂)_pCOOH，p為1，R₁₅為與B之鍵結部位之DOTA衍生物；或R₁₁至R₁₄為-(CH₂)_pCOOH，p為1，R₁₂為與B之鍵結部位(*)，R₁₅為氫原子之DO3A衍生物或DOTAGA衍生物之任一者。

【0068】式(ii)中，A為上述DO3A時，B較佳為L_a為包含醯胺鍵之碳數1以上50以下之鍵結連結子，s為0或1，s為1時，t為0以上30以下之整數，L_b為包含醯胺鍵之碳數1以上50以下之鍵結連結子，C為式(iic)表示之炔衍生物，式(iic)中，X為N-**，Y為CHR_k，R_k為氫原子，R_f與R_g一起形成苯環，R_h與R_i一起形成苯環，**為與B之鍵結部位的DO3A-PEGt-DBCO。

【0069】式(ii)中，A為上述DOTAGA衍生物時，B較佳為L_a為包含醯胺鍵之碳數1以上50以下之鍵結連結子，s為0或1，s為1時，t為0以上30以下之整數，L_b為包含醯胺鍵之碳數1以上50以下之鍵結連結子，C為式(iic)表示之炔衍生物，式(iic)中，X為N-**，Y為CHR_k，R_k為氫原子，R_f與R_g一起形成苯環，R_h與R_i一起形成苯環，**為與B之鍵結部位的DOTAGA-PEGt-DBCO衍生物。更佳為下述之DOTAGA-DBCO。

【0070】

[化10]



DOTAGA-DBCO

【0071】 鉈合劑與放射性金屬核種之莫耳比率，以鉈合部/放射性金屬核種計，下限較佳為 10/1 以上、更佳為 100/1 以上、又更佳為 500/1 以上；上限較佳為 10000/1 以下、更佳為 8000/1 以下、又更佳為 7000/1 以下；例如較佳為 100/1 以上 7000/1 以下之範圍、更佳為 500/1 以上 7000/1 以下之範圍。

【0072】 錯合物形成反應較佳於溶劑下進行。溶劑例如可使用水、生理食鹽水，或乙酸鈉緩衝液、乙酸銨緩衝液、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、參羥基甲基胺基甲烷緩衝液 (Tris 緩衝液)、4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙磺酸緩衝液 (HEPES 緩衝液)，或四甲基銨乙酸緩衝液等之緩衝液等。

【0073】 溶劑之液量不特別限定，就製造步驟中之實用性之觀點，於步驟 (A) 開始時，下限為 0.01 mL 以上、較佳為 0.1 mL 以上、更佳為 1.0 mL 以上、又更佳為 10 mL 以

上、又再更佳為100mL以上；上限較佳為1000mL以下、更佳為100mL以下、又更佳為10mL以下、又再更佳為1.0mL以下；例如為0.01mL以上100mL以下之範圍。

【0074】錯合物形成反應之反應液中之鉗合劑的濃度，就作為目標之鉗合劑之產率的觀點，分別獨立地，於步驟(A)之開始時，下限較佳為0.001 $\mu\text{mol/L}$ 以上、更佳為0.01 $\mu\text{mol/L}$ 以上、又更佳為0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以上、更佳為1 $\mu\text{mol/L}$ 以上；上限較佳為1000 $\mu\text{mol/L}$ 以下、更佳為100 $\mu\text{mol/L}$ 以下、又更佳為10 $\mu\text{mol/L}$ 以下；例如可列舉1 $\mu\text{mol/L}$ 以上100 $\mu\text{mol/L}$ 以下之範圍。

【0075】錯合物形成反應之溫度，例如可為室溫(25 $^{\circ}\text{C}$)、亦可為加熱條件下，就兼顧鉗合劑之分解抑制與錯合物之形成效率提高的觀點，下限較佳為20 $^{\circ}\text{C}$ 以上、更佳為30 $^{\circ}\text{C}$ 以上、又更佳為35 $^{\circ}\text{C}$ 以上、又再更佳為37 $^{\circ}\text{C}$ 以上、特佳為45 $^{\circ}\text{C}$ 以上；上限較佳為150 $^{\circ}\text{C}$ 以下、更佳為120 $^{\circ}\text{C}$ 以下、又更佳為100 $^{\circ}\text{C}$ 以下、又再更佳為90 $^{\circ}\text{C}$ 以下，例如較佳為30 $^{\circ}\text{C}$ 以上100 $^{\circ}\text{C}$ 以下之範圍、更佳為35 $^{\circ}\text{C}$ 以上90 $^{\circ}\text{C}$ 以下之範圍。

【0076】步驟(B)所使用之抗體，為使用具有前述抗體修飾胜肽，與可點擊反應之第2原子團之抗體修飾連結子(L₂)，而使上述「(1-2)抗體」項目中詳述的抗CD20抗體之Fc區域(恆定區域)經部位特異性地修飾之胜肽修飾抗體。

【0077】抗體修飾胜肽，可組合使用不問天然胺基酸

及非天然胺基酸之胺基酸，藉由進行例如液相合成法、固相合成法、自動胜肽合成法、基因重組法及噬菌體展現法等之胜肽合成法來製造。胜肽之合成時，亦可依需要進行所用胺基酸之官能基的保護。此等例如可根據國際公開第2017/217347號及國際公開第2018/230257號記載之方法進行。

【0078】抗體修飾連結子(L₂)，亦可為抗體修飾胜肽，與以下式(S1)表示之連結子(L₂)經鍵結者。



(式中，*表示與胜肽之N末端或C末端之鍵結部位，

L_i為聚乙二醇(PEG)連結子部，

m為1以上50以下之整數，

Z為鍵結(L_i)_m與L_{ii}之第2連結子部，

k為0或1，

L_{ii}為第2PEG連結子部，

AG2為第2原子團)。

【0079】前述式(S1)中，Z之結構，只要係使(L_i)_m與L_{ii}彼此鍵結之連結子結構則不特別限定，例如可包含由1個以上5個以下之胺基酸殘基所構成的胺基酸序列。此時，Z中所含的胺基酸序列，較佳包含半胱胺酸殘基，更佳為透過藉由半胱胺酸殘基之硫醇基與馬來醯亞胺基之鍵結所形成的硫醚基而與L₂鍵結。

【0080】本發明中，構成L_{ii}之聚乙二醇(PEG)連結子

部，較佳具有以下式(P2)所示之結構。式(P2)中， n 為整數，較佳為1以上50以下、更佳為1以上20以下、又更佳為2以上10以下、又再更佳為2以上6以下。

【0081】

[化11]



【0082】 PEG連結子部之結構之一端，亦可經源自市售之PEG化試藥的結構或源自PEG化時通常使用之試藥的結構修飾，不特別限定，例如例示有源自二乙醇酸或其衍生物、馬來醯亞胺或其衍生物之結構。

【0083】 對抗體修飾連結子(L₂)之前述第2原子團之導入方法，可列舉藉由上述方法得到具有所期望之胺基酸序列的抗體修飾胜肽後，將該胜肽溶解於添加有溶解輔助劑及還原劑，以及依需要之酸的溶液中，於該溶液中添加作為第2原子團之含有疊氮化物基或反-環辛烯(TCO)之原子團的有機溶劑溶液，並藉由於室溫攪拌而導入的方法。

【0084】 導入含有疊氮化物基之原子團作為第2原子團時，可使用市售之疊氮化物基導入試藥，遵照常規方法，於胜肽之N末端或C末端直接導入疊氮化物基，或者透過上述之連結子結構，導入含有疊氮化物基之原子團。所用之疊氮化物基導入試藥例如可列舉矽烷基疊氮化物、

磷酸疊氮化物、烷基銨疊氮化物、無機疊氮化物、磺醯基疊氮化物，或PEG疊氮化物等。

【0085】又，導入含有TCO之原子團作為第2原子團時，可使用含有TCO之市售之點擊化學用試藥，遵照常規方法，於胜肽之N末端或C末端直接導入TCO，或透過上述之連結子結構，導入含有TCO之原子團。

【0086】使抗體修飾胜肽與抗CD20抗體鍵結而得到胜肽修飾抗體之方法，可根據國際公開第2017/217347號之記載，例如使上述抗體修飾胜肽、抗CD20抗體、交聯劑與依需要之觸媒，在適切之緩衝液中分散來進行。此處，交聯劑可使用上述者。又，使抗體修飾胜肽與抗CD20抗體鍵結時，亦可依需要將含有抗CD20抗體之溶液實施1次或2次以上的以超微過濾器等進行處理並分散於緩衝液之緩衝液取代後，與抗體修飾胜肽鍵結。

【0087】一態樣中，本揭示係關於包含將經交聯劑修飾之抗體修飾胜肽與抗CD20抗體混合之步驟的生產抗體修飾胜肽與抗CD20抗體之複合體之方法。藉由本步驟，經交聯劑修飾之抗體修飾胜肽與抗CD20抗體之間可產生交聯反應。交聯反應，例如於利妥昔單抗中，可於抗體修飾胜肽之上述Xaa₂之胺基酸殘基，與人類IgG Fc中遵照Eu numbering之Lys250殘基或Lys252殘基、較佳為Lys252殘基之間部位特異性地產生。

【0088】該混合步驟之條件，只要係於抗體修飾胜肽與抗CD20抗體之間產生交聯反應的條件下進行者，則不

特別限定。例如，可藉由將抗體修飾胜肽與抗CD20抗體，於適當之緩衝液中，室溫(例如約15°C~30°C)下進行混合來進行反應。該混合步驟亦可依需要適量添加促進交聯反應之觸媒來進行。

【0089】作為一例，係添加至少含有水之溶劑，將抗CD20抗體溶解。該溶劑，於水以外，例如可列舉二甲基亞砷、乙腈、生理食鹽水，或乙酸鈉緩衝液、乙酸銨緩衝液、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris緩衝液、HEPES緩衝液、四甲基銨乙酸緩衝液或組胺酸緩衝液等之緩衝液等。使用緩衝液時，就抗體之安定性之觀點，於25°C之pH較佳為4.0以上10.0以下、更佳為5.5以上8.5以下。抗體之濃度，於交聯反應之開始時，較佳為下限1.0 μmol/L以上、上限1000 μmol/L以下，上限更佳為500 μmol/L以下為佳。

【0090】接著，可添加經交聯劑修飾之抗體修飾胜肽與依需要之觸媒，於10°C以上30°C以下分散來進行。

該混合步驟中之抗體修飾胜肽與抗CD20抗體之混合比率不特別限定。抗體修飾胜肽與抗EGFR抗體之莫耳比率，例如可為1：1~20：1、較佳可為2：1~20：1或5：1~10：1。

【0091】某較佳態樣中，上述混合步驟中，相對於抗CD20抗體而言，抗體修飾胜肽(莫耳比)可為0.5~2.2、較佳可為0.8~1.8來進行混合。藉此，可效率良好地得到對於抗CD20抗體1分子鍵結有抗體修飾胜肽1分子之抗體(以下稱

「一價抗體」)。

【0092】該混合步驟中之混合時間(反應時間)，只要於抗體修飾胜肽與抗CD20抗體之間產生交聯反應則不限定，例如可為1分鐘~5小時、較佳可為10分鐘~2小時。

【0093】經以上步驟所得之胜肽修飾抗體，為以任意比例含有對於抗CD20抗體1分子鍵結有抗體修飾胜肽1分子之抗體(以下稱「一價抗體」)，與對於抗CD20抗體1分子鍵結有抗體修飾胜肽2分子之抗體(以下稱「二價抗體」)的混合物，可將其直接用於以後之步驟，亦可藉由過濾濾器、膜濾器、填充有各種填充劑之管柱、各種層析等之方法，分離純化未修飾抗體、一價抗體與二價抗體後，僅將任一價數之抗體用於以後之步驟。純化之結果，無法分離未修飾抗體與其他價數之抗體時，亦可作為含有此等之混合物而用於以後之步驟。

分離純化未修飾抗體、一價抗體與二價抗體時，可藉由上述任意之純化方法分離純化，可使用填充有各種填充劑之管柱，例如可使用填充有使蛋白質A、蛋白質G或上述抗體修飾胜肽等之蛋白質結合於承載體而得的填充劑之管柱。如此之管柱中填充之填充劑的承載體之形狀，可列舉凝膠(例如管柱用凝膠)、粒子、珠、奈米粒子、微粒子及大珠(microbeads)等之形狀，承載體之材質，可列舉磁性物質、乳膠、瓊脂糖、玻璃、纖維素、Sephacrose、硝基纖維素、聚苯乙烯、其他高分子材料。具體而言可例示使上述抗體修飾胜肽結合於管柱用凝膠而得的IgG-BP管柱

(國際公開第2021/080008號)。

【0094】 使用該 IgG-BP 管柱，利用對於抗體修飾胜肽之各自的相互作用之不同，可各自分離純化相對多量含有未修飾抗體及一價抗體之第一抗體組成物，與相對多量含有二價抗體之第二抗體組成物。經分離純化之第一抗體組成物或第二抗體組成物，可直接使用於以後的步驟(B)中之點擊反應、亦可調節所含有之胜肽修飾抗體之蛋白質濃度後，使用於步驟(B)中之點擊反應。

【0095】 步驟(B)中的點擊反應，為於鉗合劑所具有的可點擊反應之第一原子團，與胜肽修飾抗體所具有的可點擊反應之第二原子團之間實行者。藉由該點擊反應，形成連結鉗合劑與抗體之結合基(可與抗體複合化之取代基)。

【0096】 只要胜肽修飾抗體與步驟(A)所得之錯合物可進行點擊反應，則此等之添加順序不限定，例如，可於容納有溶劑之反應容器中添加該錯合物及該胜肽修飾抗體之一方，接著添加另一方來進行反應，亦可於將該鉗合劑及該抗體之一方分散於溶劑而得的分散液中添加另一方來進行反應。或者亦可於容納有溶劑之反應容器中同時添加此等來進行反應。

【0097】 步驟(B)之點擊反應所用之溶劑，可使用含有水之溶劑，例如可使用水、生理食鹽水，或乙酸鈉緩衝液、乙酸銨緩衝液、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食鹽水、Tris緩衝液、HEPES緩衝液，或四甲基銨乙酸緩衝液等之

緩衝液等。使用緩衝液時，就兼顧錯合物及抗體之安定性與此等之結合效率之觀點，於 25℃ 之 pH 較佳為 4.0 以上 10.0 以下、更佳為 5.5 以上 8.5 以下。

【0098】反應液量不特別限定，就製造步驟中之實用性之觀點，於步驟(B)之開始時，下限較佳為 0.001mL 以上、更佳為 0.01mL 以上、又更佳為 0.1mL 以上、又再更佳為 1mL 以上；上限較佳為 1000mL 以下、更佳為 100mL 以下、又更佳為 10mL 以下、又再更佳為 1mL 以下，例如較佳為 0.001mL 以上 1000mL 以下之範圍、更佳為 0.1mL 以上 10mL 以下之範圍。

【0099】又，鉗合劑及抗體之反應液中之濃度係分別獨立地，於步驟(B)之開始時，下限較佳為 0.001 μ mol/L 以上、更佳為 0.01 μ mol/L 以上、又更佳為 0.1 μ mol/L 以上、又再更佳為 1.0 μ mol/L 以上；上限較佳為 1000 μ mol/L 以下、更佳為 100 μ mol/L 以下，例如較佳為 0.1 μ mol/L 以上 1000 μ mol/L 以下之範圍，以 1 μ mol/L 以上 100 μ mol/L 以下之範圍就目標之複合體的產量之觀點而言更佳。

【0100】就防止抗體之非意圖的變性同時提高反應效率之觀點，步驟(B)中之點擊反應，反應溫度之上限較佳為 50℃ 以下、更佳為 40℃ 以下。又，反應溫度之下限，只要係反應進行的溫度則無特別限制，較佳為 15℃ 以上。點擊反應之反應時間，以上述反應溫度為條件，較佳為 5 分鐘以上、更佳為 10 分鐘以上；較佳為 24 小時以下、更佳為 20 小時以下，例如較佳為 5 分鐘以上 24 小時以下之範圍、

更佳為10分鐘以上20小時以下之範圍。

【0101】所得之複合體可直接予以使用，或可使用過濾濾器、膜濾器、填充有各種填充劑之管柱、層析等純化。

【0102】藉由步驟(A)及(B)所製造之複合體，為抗CD20抗體之Fc區域之離胺酸殘基經鉗合劑特異性修飾者。該複合體，相對於該抗體1分子，具備前述鉗合劑1分子或2分子。鉗合劑係透過連結子(L)，將本發明之抗體之Fc區域予以部位特異性地修飾。該連結子(L)係以連接於鉗合劑之鉗合連結子(L₂)、連接於該連結子(L₂)之第1原子團、可與第1原子團點擊反應之第2原子團、連接於第2原子團之抗體修飾連結子(L₁)(包含上述式(i)表示之抗體修飾胜肽)所構成。因此，該連結子(L)，具有源自第1原子團與第2原子團之化學結構。如此之化學結構，可認為有前述式(10a)或(10b)表示之含三唑骨架之結構或前述式(10c)表示之含嗒嗒骨架之結構。式(10a)與式(10b)處於異構物之關係，故能夠以任意比例含有。

【0103】

(1-7)放射性醫藥(放射性醫藥(1))

放射性醫藥係指含有本發明之放射性複合體，且成為適於對於對象之生物體內投予之形態的組成物。放射性醫藥，例如可將上述(1-6)所示方法所製造的放射性複合體直接，或將其純化後，溶解於以水為主體且與生物體等張之溶劑中來製造。此時，放射性醫藥較佳為水溶液之形態，

亦可依需要含有藥學上容許之其他成分。放射性醫藥，係將其有效量，經口性或於靜脈內、皮下、腹腔內或肌肉內等之非經口性地對生物體投予，而用於癌之治療、癌之診斷，或病灶之檢測等。

此處，投予對象為人類，或小鼠、大鼠、猴子、天竺鼠、黑猩猩、綿羊、山羊、狗、貓、豬、牛或馬等之動物，但不特別限定。較佳為人類。

較佳的對象疾病可列舉CD20過剩表現之疾病。具體而言，可列舉CD20陽性之B細胞性非何杰金氏淋巴瘤、免疫抑制狀態下之CD20陽性之B細胞性淋巴增殖性疾病、多發血管炎性肉芽腫症(韋格納氏肉芽腫症，Wegener's granuloma)、顯微多血管炎、難治性之腎病症候群、腎移植/肝移植時之ABO血型不相容移植中的抗體相關型排斥反應之抑制等。

此處之「有效量」係指可得到投予對象中之診斷上或治療上有效的效果之量。應對於對象投予之有效量，係依對象之種類、對象之體重、所投予之劑型(錠劑、注射劑等)及路徑(經口投予、非經口投予等)，及疾病(例如癌)的嚴重度等而異。醫師或獸醫師可考慮該等之因子，來決定適切之有效量。

【0104】本發明之放射性醫藥，於室溫保管時，以構成該放射性醫藥之放射性金屬核種之半衰期為基準，於經過半衰期之1以上5以下之倍數的期間之時間點，具有一定比例以上之放射化學的純度。上述之放射性金屬核種為 β

線核種(例如 Lu-177或 Y-90)時，較佳為於室溫製造結束起保管7日時的複合體之放射化學的純度為90%以上。又，放射性金屬核種為 α 線核種(例如 Ac-225)時，較佳為，於室溫下製造結束起保管14日時的複合體之放射化學的純度為90%以上、更佳為95%以上、又更佳為97%以上。此處本說明書中之「室溫」，較佳係指日本藥典所定義之「常溫」，具體而言為15~25°C。

此處，放射化學的純度，係指相對於將試樣以市售之放射線檢測器分析時所檢測的全部放射能(計數)而言，相當於複合體之波峰之放射能(計數)的百分率。放射化學的純度之分析可使用高效能液體層析或薄層層析，較佳使用薄層層析。更佳使用利用後述實施例記載之條件的薄層層析。

如前所述，本發明之放射性醫藥，較佳為水溶液之形態，如上所述，就維持放射化學的純度之觀點，更佳為緩衝液之形態。作為緩衝液，可使用含有抗CD20抗體或抗CD20抗體之ADC作為有效成分的抗體醫藥所使用的任意緩衝液，作為不特別限定的一例，可使用組胺酸緩衝液、磷酸緩衝液、乙酸緩衝液，或檸檬酸緩衝液。組胺酸緩衝液，係由組胺酸及其鹽所構成，例如可由組胺酸及其鹽酸鹽，或組胺酸及其乙酸鹽構成。乙酸緩衝液，係由乙酸及其鹽所構成，例如可由乙酸及其鈉鹽構成。磷酸緩衝液，係由磷酸及其鹽所構成，例如可由磷酸氫鈉、磷酸二氫鉀等構成。檸檬酸緩衝液，係由檸檬酸及其鹽所構成，例如

可由檸檬酸及其鈉鹽構成。本發明之放射性醫藥中，可含有蔗糖(純化白糖)等之任意糖類，可含有聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80 等之溶解化劑，可含有二乙三胺五乙酸(DTPA)或其鹽、乙二胺四乙酸(四乙酸乙二胺、EDTA)或其鈉鹽等之金屬螯合劑，亦可含有人類血清白蛋白。

【0105】作為放射性金屬核種，藉由選擇具有治療效果者，具體而言，為釋出 α 線之核種或釋出 β 線之核種(較佳為Ac-225、Y-90、Lu-177；更佳為Ac-225)，本發明之放射性醫藥，可用於癌之放射線內用療法。該放射線內用療法中，可將本發明之放射性醫藥進行靜脈注射或經口投予，於如癌原發病灶或轉移病灶般的病灶部位使本發明之放射性複合體累積，並藉由自放射性金屬核種所釋出之放射線，破壞病灶部位之癌細胞。本發明之放射性醫藥之投予量、用量，係依有效成分之有效性、投予之形態/路徑、癌之進行期數、患者之體型/體重/年齡、合併使用的其他之疾病治療藥的種類或量而適當選擇。

【0106】又，作為放射性金屬核種，藉由選擇釋出正子之放射性核種或釋出 γ 線之放射性核種(較佳為Ga-68、Zr-89、In-111；更佳為Zr-89)，可用於癌之診斷或病灶之檢測。使用釋出正子之放射性核種的放射性醫藥的情況時，可適合使用於PET(Positron Emission Tomography)檢查，使用釋出 γ 線之放射性核種的放射性醫藥的情況時，可適合使用於SPECT(Single Photon Emission Computed Tomography)檢查。亦可將其合併使用於上述癌之放射線

內用療法中的癌之診斷或病灶之檢測。本發明之癌之診斷用放射性醫藥，可用於進行癌之放射線內用療法之前的診斷、亦可用於進行癌之放射線內用療法之後的診斷。藉由用於進行癌之放射線內用療法之前的診斷，可用於判斷是否實行使用具備釋出 α 線之金屬核種的本發明之放射性醫藥的癌之放射線內用療法之治療選擇。又，藉由用於進行癌之放射線內用療法之後的診斷，可用於判定有無使用了本發明之放射性醫藥的癌之放射線內用療法的效果，或投予量之增減等之治療計畫的最適化。

【0107】

(2)放射性醫藥((放射性醫藥(2))

本發明之其他態樣為含有放射性金屬核種所鉗合化之鉗合劑與抗CD20抗體之複合體作為有效成分，於抗CD20抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，於室溫保管時，以構成該放射性醫藥之放射性金屬核種之半衰期為基準，於經過半衰期之1以上5以下之倍數的期間之時間點，具有一定比例以上之放射化學的純度。上述之放射性金屬核種為 β 線核種(例如Lu-177或Y-90)時，較佳為，於室溫下製造結束起保管7日時的前述複合體之放射化學的純度為90%以上。又，放射性金屬核種為 α 線核種(例如Ac-225)時，較佳為，於室溫下製造結束起保管14日時之複合體之放射化學的純度為90%以上、更佳為95%以上、又更佳為97%以上。室溫之定義係與上述之放射性醫藥(1)相同。

放射性醫藥(2)中，於鉗合劑與抗CD20抗體之複合化

中，除了使用胜肽之部位特異性修飾的方法以外，亦可使用以下(a)至(d)之方法，其以外係與放射性醫藥(1)相同，故省略說明。

(a)對藉由將位於抗體之絞鏈部位的多胜肽鏈間之雙硫鍵(SS鍵)部分還原所產生的氫硫(SH)基，以具備對SH基具有反應性之馬來醯亞胺基的鉗合劑或連結子(L)修飾之方法、

(b)對藉由以基因工程所進行的胺基酸變異對抗體新導入之半胱胺酸，以具備馬來醯亞胺基之鉗合劑或連結子(L)修飾之方法、

(c)對藉由以基因工程所進行的胺基酸變異對抗體新導入的疊氮化物化離胺酸之疊氮化物基，利用點擊反應以具備炔(例如二苄基環辛炔：DBCO)之鉗合劑或連結子(L)修飾之方法、

(d)對利用轉麩醯胺酸酶於抗體之特定位置所導入的麩醯胺，以具有離胺酸之側鏈的鉗合劑或連結子(L)修飾之方法。

【0108】本發明中，係使將抗CD20抗體部位特異性地修飾的胜肽與鉗合劑不使用硫脲鍵地連結，因此於室溫亦可成為安定的放射性複合體及放射性醫藥。抗體之部位特異性修飾，與隨機修飾不同地，可以任意比例含有一價抗體或二價抗體或此等兩者，因此成為安定品質之放射性複合體及放射性醫藥。又，本發明之放射性複合體，會維持與以往同等的藥效。因此，若依本發明，可提供在維持

藥效的同時，品質更優良的抗CD20抗體之複合體及其放射性醫藥。

【0109】以下之態樣亦包含於本發明之技術思想中。

[1]一種複合體，其係抗CD20抗體與鉈合劑之複合體，其中

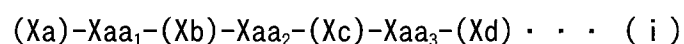
放射性金屬核種係鉈合化於前述鉈合劑，

前述抗CD20抗體與鉈合劑係透過連結子(L)而連結，前述連結子(L)不含硫脲鍵。

[2]如[1]之複合體，其中前述複合體為經胜肽部位特異性地修飾的抗CD20抗體與鉈合劑之複合體，前述胜肽與前述鉈合劑係透過前述連結子(L)而連結。

[3]如[1]之複合體，其中前述鉈合劑為DOTAGA(α -(2-羧基乙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)。

[4]如[2]或[3]之複合體，其中前述胜肽為下述式(i)：



(式(i)中，Xa、Xb、Xc及Xd係分別表示連續的a個X、連續的b個X、連續的c個X，及連續的d個X，

X為側鏈不具有硫醇基及鹵乙醯基之胺基酸殘基，

a、b、c及d係分別獨立地為1以上5以下之整數，且滿足 $a+b+c+d \leq 14$ ，

Xaa₁及Xaa₃係分別獨立地表示

源自側鏈具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，或源自側鏈具有鹵乙醯基的胺基酸之胺基酸殘基，惟，Xaa₁及

Xaa₃之任一者為源自具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，

Xaa₁及Xaa₃連結以形成環結構，

Xaa₂為離胺酸殘基、精胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸，且Xaa₂經交聯劑修飾)

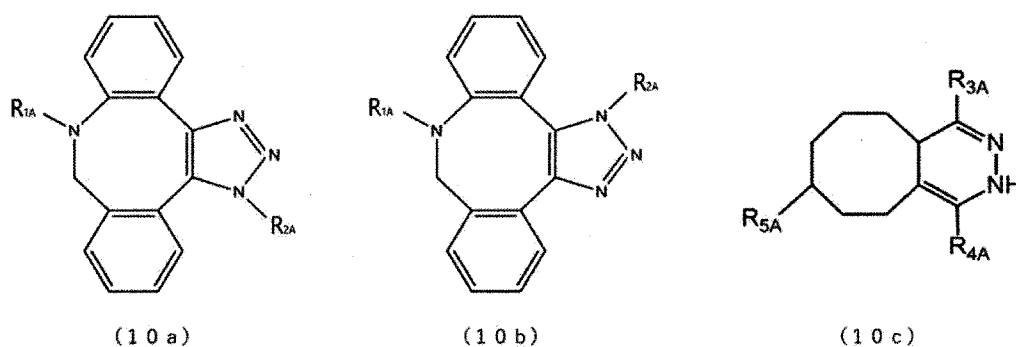
表示之由13~17個胺基酸殘基所構成的胺基酸序列。

[5]如[1]至[4]中任一項之複合體，其中前述放射性金屬核種為Ac-225、Y-90、Lu-177或Zr-89。

[6]如[1]至[5]中任一項之複合體，其中前述連結子(L)包含式(10a)、式(10b)或式(10c)；

【0110】

[化12]



【0111】

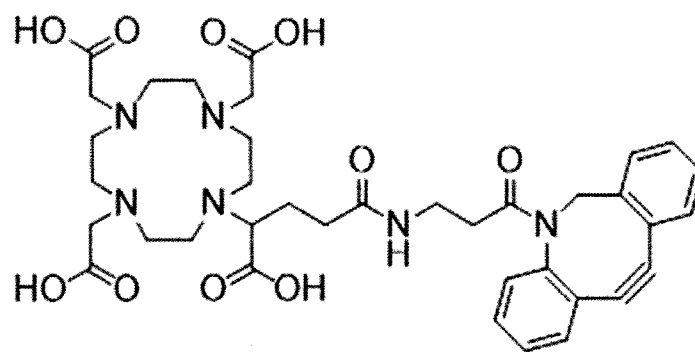
(式(10a)及式(10b)中，R_{1A}表示與前述鉗合劑之連結部位，R_{2A}表示與前述抗體或前述胜肽之連結部位；式(10c)中，R_{3A}及R_{4A}中的一者表示氫原子、甲基、苯基或吡啶基，另一者表示與前述鉗合劑之連結部位，R_{5A}表示與前述抗體或前述胜肽之連結部位)。

[7]如[6]之放射性複合體，其中於與前述抗體或前述胜肽之連結部位及前述抗體或前述胜肽之間，包含聚乙二醇基。

[8]如[2]至[7]中任一項之放射性複合體，其係藉由使於N末端導入有疊氮化物基之前述胜肽進行部位特異性地修飾的抗CD20抗體，與下述式表示之DOTAGA-DBCO之放射性金屬錯合物進行點擊反應而複合化；

【0112】

[化13]



DOTAGA-DBCO

【0113】 [9]如[1]至[8]中任一項之複合體，其中前述抗CD20抗體為利妥昔單抗。

[10]一種放射性醫藥，其含有如[1]至[9]中任一項之複合體作為有效成分。

[11]如[10]之放射性醫藥，其係使用於癌之放射線內用療法。

[12]如[10]之放射性醫藥，其係使用於癌之診斷。

[13]如[12]之放射性醫藥，其係合併使用於使用如

[11]之放射性醫藥的癌之放射線內用療法。

[14]一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核種所鉗合化之鉗合劑與抗CD20抗體之複合體作為有效成分，
於抗CD20抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，
於室溫保管7日時的前述複合體之放射化學的純度為90%以上。

[15]如[14]之放射性醫藥，其中前述複合體為如[1]至[9]中任一項之複合體。

[16]如[15]之放射性醫藥，其係使用於癌之放射線內用療法。

[17]如[15]之放射性醫藥，其係使用於癌之診斷。

[18]如[17]之放射性醫藥，其係合併使用於使用如[16]之放射性醫藥的癌之放射線內用療法。

[19]一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核種所鉗合化之鉗合劑與抗CD20抗體之複合體作為有效成分，
於抗CD20抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，且滿足下述(1)或(2)之條件：

(1)前述放射性金屬核種為 ^{177}Lu 或 ^{90}Y ，且於室溫保管7日時的前述複合體之放射化學的純度為90%以上；

(2)前述放射性金屬核種為 ^{225}Ac ，且於室溫保管14日時的前述複合體之放射化學的純度為90%以上。

[20]一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核種所鉗合化之鉗合劑與抗CD20抗體之複合體作為有效成分，
於抗CD20抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，

以前述放射性金屬核種之半衰期為基準，於經過前述半衰期之1以上5以下的倍數之期間的時間點，前述複合體之放射化學的純度為90%以上。

[實施例]

【0114】 以下藉由實施例更詳細說明本發明。但是本發明之範圍不被該實施例限制。以下之表中，「-」欄表示未實施。

【0115】

[實施例1]使用 ^{225}Ac 標誌DOTAGA-DBCO之與利妥昔單抗之複合體之製造

(1.抗體修飾步驟)

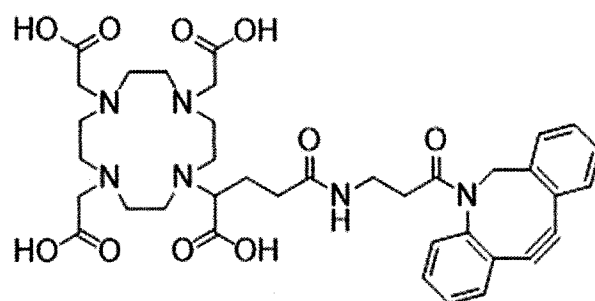
以國際公開第2017/217347號記載之方法，得到下述式(P3)表示之包含17個胺基酸殘基的胜肽(序列編號17)。該胜肽之胺基酸序列，係與序列編號(2)之 Xaa_2 為離胺酸殘基的序列相同，離胺酸殘基之側鏈末端胺基經 R_1 表示之結構修飾。又，其為2個半胱胺酸殘基彼此雙硫鍵結，胜肽之N末端係透過具有二乙醇酸及8個PEG之連結子(L_1)結構，作為第2原子團之包含疊氮化物基之原子團，鍵結有乙基疊氮化物者。

【0116】

DOTAGA-Anhydride : A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841記載之方法進行製造。將該鉈合劑分散於作為溶劑之0.1mol/L乙酸鈉緩衝液(pH6.0)，成為含有鉈合劑1.7mmol/L之分散液。使將該分散液0.003mL、0.1mol/L乙酸鈉緩衝液(pH6.0)0.045mL、0.1mol/L鹽酸0.001mL，與作為放射性金屬源之含 ^{225}Ac 離子之溶液(0.2mol/L鹽酸水溶液、放射能濃度994MBq/mL、由Oak Ridge National Laboratory製所調製、液量0.002mL)約2.0MBq(從檢定日時放射能量起衰減計算而得的計算值)混合而得的反應液，於加熱條件下反應，得到 ^{225}Ac 錯合物溶液。鉈合劑與放射性金屬離子之莫耳比率為鉈合劑： ^{225}Ac 離子=約1230：1，反應液之加熱溫度為70℃、加熱時間為30分鐘。

【0121】

[化15]



DOTAGA-DBCO

【0122】以如下方法測定所得之 ^{225}Ac 錯合物之放射化學的純度(RCP)。亦即，將 ^{225}Ac 錯合物溶液之一部分以

薄層層析(Agilent公司製、型號：SGI0001、展開溶劑：乙腈/水混合液(體積比1：1))展開，之後以放射性 γ -TLC分析器(raytest製、MODEL GITA Star)測定。以相對於所檢測之全部放射能(計數)而言，於溶劑前端附近所檢測之波峰之放射能(計數)之百分率作為 ^{225}Ac 錯合物之RCP(%)。其結果， ^{225}Ac 錯合物之RCP為93%。所得之 ^{225}Ac 錯合物溶液係直接用於標誌步驟。

【0123】

(3.標誌步驟)

於經上述步驟(2.錯合物形成步驟)所得之未純化之 ^{225}Ac 錯合物的溶液中，添加上述步驟(1.抗體修飾步驟)所得到的含有胜肽修飾抗體(一價抗體)之溶液，於 37°C 進行120分鐘點擊反應，得到 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體。 ^{225}Ac 錯合物之量及胜肽修飾抗體(一價抗體)之量分別為 5.1nmol 及 6.0nmol ，DBCO基與疊氮化物基之莫耳比分別為約1：1.2。未純化時之 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之反應率(%)為75%。此處，反應率(%)意指相對於在錯合物形成步驟中的標誌率(%)而言， ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之放射化學的純度(%)，標誌率(%)意指相對於給入放射能量而言， ^{225}Ac 錯合物之放射能量之比例(%)。

進一步地將於 37°C 反應2小時所得之 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之溶液使用超微過濾濾器(Merck公司製、型號：UFC505096)純化。純化後之 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之RCP為93%、放射化學的產率(RCY)為61%。

【0124】 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之RCP及RCY之測定方法係如以下所述。亦即以薄層層析(Agilent公司製、型號：SGI0001、展開溶劑為乙腈：0.1mmol/L EDTA溶液之混合液(體積比1：1))進行展開，之後，以放射性 γ -TLC分析器(raytest製、MODEL GITA Star)進行測定。以相對於所檢測之全部放射能(計數)而言，於原點附近所檢測之波峰之放射能(計數)之百分率作為RCP(%)。又，以相對於標誌步驟開始時所添加的全部放射能(從以 γ 線分光計(Ge半導體檢測器：GMX10P4-70(ORTEC公司製)、多通道分析儀：M7-000(SEIKO EG&G公司製)、數據處理：Spectrum Navigator：DS-P300(SEIKO EG&G公司製)及Gamma Studio：DS-P600(SEIKO EG&G公司製))所測定的計數所計算之放射能量)而言，超微過濾純化後所回收之放射能(與上述同樣地從以 γ 線分光計所測定之計數所計算的放射能量)的百分率作為RCY(%)。

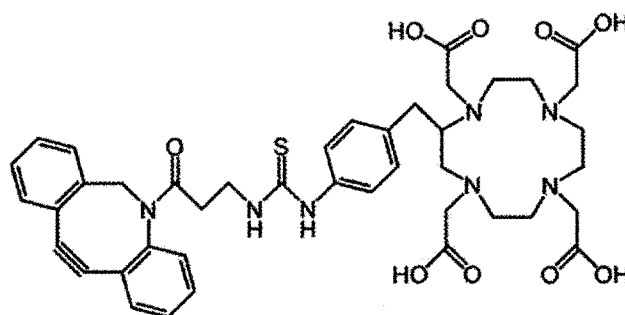
【0125】

[比較例1]使用 ^{225}Ac 標誌DOTA-DBCO之與利妥昔單抗之複合體之製造

除了將DOTAGA-DBCO變更為下述DOTA-DBCO以外，係根據實施例1進行操作。其結果，反應2小時後之反應率為71%、純化後之 ^{225}Ac 錯合物標誌抗體之RCP為99%、RCY為46%。

【0126】

[化16]



DOTA-DBCO

【0127】

[實施例2]製劑化步驟

將遵照實施例1及比較例1之記載所製造之放射性複合體分別取出一部分於5mL 離心管(LoBind、Eppendorf製)，以保存緩衝液(含有0.154mol/L氯化鈉之0.025mol/L檸檬酸鈉緩衝液(pH5.5)，以及含有0.07重量/體積%聚山梨醇酯80、0.154mol/L氯化鈉之0.025mol/L檸檬酸鈉緩衝液(pH5.5)混合液)稀釋。

【0128】

[評估1]安定性評估

將實施例2所得之各放射性複合體於室溫保存，於各時間點(0日點、1日點、7日點、14日點、21日點、30日點，及/或40日點)，評估放射化學的純度及抗原結合活性。再者，放射性金屬核種為Ac-225時，自製造結束起14日相當約1.5半衰期、自製造結束起21日相當約2半衰期、自製造結束起30日相當約3半衰期、自製造結束起40日相當約4半衰期。

[評估 1-1]放射化學的純度(RCP)

將RCP以薄層層析(TLC)分析。TLC之條件係與實施例1中求得反應率時所使用之條件相同。

結果示於表1。

【0129】

[表1]

	放射化學的純度 (%)						
	0日點	1日點	7日點	14日點	21日點	30日點	40日點
放射性複合體 (實施例1)	99.9	99.9	99.3	99.5	94.9	93.1	89.6
放射性複合體 (比較例1)	99.9	99.4	79.1	84.1	68.2	67.6	64.8

【0130】遵照不含硫脲鍵之實施例1之記載所製造之放射性複合體，當製造結束後於室溫保存7日時，作為RCP係維持99%以上。又，當製造結束後於室溫保存14日時亦作為RCP係維持99%以上。又，製造結束後於室溫保存30日時亦作為RCP係維持90%以上。

遵照包含硫脲鍵之比較例1之記載所製造之放射性複合體，當製造結束後於室溫保存7日時，作為RCP係維持75%以上，但低於99%。又，當製造結束後於室溫保存14日時，作為RCP係低於85%。

【0131】

[評估 1-2]抗原結合活性

抗原結合活性係以in vitro 放射顯影(ARG)確認(僅製造日(0日點))。將由ATCC(American Type Culture Collection)

所購入之源自CD20陽性之人類布凱特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)的細胞株 Ramos細胞及CD20陰性之人類急性淋巴母細胞性白血病/類T淋巴球細胞株 CCRF-CEM細胞對雌性 BALB/c nu/nu小鼠(日本 Charles River公司製)之側腹皮下分別投予 5×10^6 cells，製作荷癌小鼠。之後，摘出 Ramos 腫瘤及 CCRF-CEM 腫瘤，包埋於 Tissue-Tech O.C.T. Compound(Sakura Finetek Japan公司製)，製作冷凍切片。於含有1%牛血清白蛋白之PBS中添加實施例1及比較例1所得之放射性複合體使分別成為1kBq/mL，浸漬 Ramos 腫瘤切片及 CCRF-CEM 腫瘤切片。使切片接觸於成像板後，以掃描器型影像解析裝置(Typhoon FLA 7000、GE Healthcare Japan公司製)讀取，評估結合於切片之放射能量。結果示於圖3。遵照實施例1及比較例1之記載所製造的放射性複合體均確認到對CD20之結合活性。遵照實施例1及比較例1所製造之放射性複合體均僅結合於 Ramos 腫瘤切片，顯示出CD20選擇性的結合。就結合於 Ramos 腫瘤切片之放射能而言，使用遵照實施例1所製造之放射性複合體的樣品，多於遵照比較例1之記載所製造之放射性複合體。

【0132】

[評估1-3]²²⁵Ac錯合物標誌利妥昔單抗之血漿中安定性評估

將遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體於各動物種(人類(人類血漿(混合液、肝素)、COSMO BIO公司製)、小鼠(小鼠血漿混合液 BALB/c-nu系統、日本 Charles

River公司製)、大鼠(血漿(混合液) Wistar、日本 Charles River公司製)、猴子(食蟹猴血漿、日本 Charles River公司製))之血漿中於 37°C 保存 2 週，評估於各時間點(0 日點、1 日點、7 日點、14 日點(僅人類血漿))之 ^{225}Ac 標誌利妥昔單抗的血漿中之安定性。將各動物種之血漿於 37°C 培置 (incubate)，添加遵照實施例 1 之記載所製造之放射性複合體使最終濃度成為 100kBq/mL。於各評估時間點，使用 Dynabeads(註冊商標) Protein G(Thermo Fisher Scientific 公司製)進行免疫沈降，以含 0.1% Tween20 之 PBS 洗淨後，回收與 Protein G 結合之抗體。回收用於洗淨之含 0.1% Tween20 之 PBS，使用 Auto-well 伽馬計數器 (2480 WIZARD² 伽馬計數器、PerkinElmer 公司製)測定所回收之洗淨液之放射能，及所回收之抗體之放射能。藉由算出相對於珠之洗淨所用的含 0.1% Tween20 之 PBS 之放射能與所回收之抗體之放射能的合計而言，所回收之抗體之放射能的比率，來評估與 Protein G 結合之 ^{225}Ac 標誌利妥昔單抗之比例。其結果示於表 2。表內之數值，表示相對於珠之洗淨所用的含 0.1% Tween20 之 PBS 之放射能與所回收之抗體之放射能的合計而言，所回收之抗體之放射能的比率之平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。

【 0133 】

[表2]

	以珠之回收率(%)			
	0日點	1日點	7日點	14日點
人類血漿	95.0±2.8	90.5±2.4	81.0±4.1	76.4±0.8
猴子血漿	92.9±1.2	90.4±0.5	90.5±0.8	—
小鼠血漿	98.1±0.4	95.0±1.3	93.1±0.4	—
大鼠血漿	97.4±0.1	94.8±1.8	90.4±5.1	—

【0134】遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體，即使於各動物種之血漿中保存7日時，以珠之回收率亦為80%以上，又，於人類血漿，即使於血漿中保存14日時，以珠之回收率亦維持76%以上，可認為於所評估之各動物血漿中為安定。

【0135】

[評估2]藥效評估

使用小鼠製作Ramos細胞之皮下荷癌模式，確認遵照實施例1及比較例1之記載所製造的放射性複合體之抗腫瘤效果。

將由ATCC所購入之Ramos細胞懸浮於RPMI1640培養基(gibco、Thermo Fisher Scientific公司製)，對5週齡之雌性BALB/c nu/nu(日本Charles River)之側腹皮下投予 5×10^6 cells，製作荷癌小鼠。成長至腫瘤體積約成為 $100 \sim 400 \text{mm}^3$ ，由適於腫瘤直徑測定之形狀之個體實施隨機分群。此時之各小鼠之腫瘤體積與體重係示於表3。腫瘤體積係依照以下之式算出。

$$\text{腫瘤體積}(\text{mm}^3) = (\text{腫瘤長徑} \times (\text{腫瘤短徑})^2) \times 1/2$$

【0136】

[表3]

	腫瘤體積 平均值 ± 標準偏差 (mm ³)	體重 平均值 ± 標準偏差 (g)
放射性複合體(實施例1)群	217.0 ± 94.3	20.7 ± 1.4
放射性複合體(比較例1)群	221.3 ± 108.2	20.1 ± 1.2
抗體對照群	236.9 ± 97.1	19.7 ± 2.3
Vehicle群	242.8 ± 91.9	20.7 ± 1.2

【0137】將遵照實施例1及比較例1之記載所製造的放射性複合體均以15kBq/隻(以利妥昔單抗計為56μg/隻)之用量對尾靜脈內投予。又，作為對照群，係設定投予與各放射性複合體相同抗體量之利妥昔單抗之群(抗體對照群)及投予保存緩衝液之Vehicle群。各群係設為6隻，至投予後20日為止經時性地測量腫瘤體積。腫瘤體積之經時變化示於圖4。

【0138】投予遵照實施例1及比較例1之記載所製造的放射性複合體之群，於投予後20日點，相較於2個對照群(抗體對照群、Vehicle群)，於抗腫瘤效果觀察到顯著差(P<0.05)。又，投予遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體之群與投予遵照比較例1之記載所製造之放射性複合體之群間，於抗腫瘤效果未確認到顯著差。顯著差之檢定，係使用統計解析軟體Stat Preclinica(Takumi Information Technology公司製)進行Steel-Dwass檢定。

【0139】

[實施例3]使用⁸⁹Zr標誌DOTAGA-DBCO之與利妥昔單抗之複合體之製造

(1.錯合物形成步驟)

將 DOTAGA-DBCO 分散於作為溶劑之 0.156mol/L 乙酸钠緩衝液 (pH5.5)，成為含鉈合劑 0.3mmol/L 之分散液。使將該分散液 0.045mL、含有 0.15mol/L 龍膽酸之 0.156mol/L 乙酸钠緩衝液 (pH5.5) 0.030mL，與作為放射性金屬源之含有 ^{89}Zr 離子之溶液 (0.1mol/L 鹽酸水溶液、放射能濃度 1.9GBq/mL、由日本 Medi-Physics 股份有限公司製所調製、液量 0.03mL) 57.2MBq 混合而得的反應液，於加熱條件下反應，得到 ^{89}Zr 錯合物溶液。鉈合劑與放射性金屬離子之莫耳比率為鉈合劑： ^{89}Zr 離子 = 約 630：1，反應液之加熱溫度為 70°C、加熱時間為 60 分鐘。

【0140】藉由如下方法測定所得 ^{89}Zr 錯合物之 RCP。亦即，將 ^{89}Zr 錯合物溶液之一部分以薄層層析 (Agilent 公司製、型號：SGI0001、展開溶劑：乙腈/水混合液 (體積比 1：1)) 展開，之後，以放射性 γ -TLC 分析器 (raytest 公司製、MODEL GITA Star PS) 進行測定。以相對於所檢測之全部放射能 (計數) 而言，於溶劑前端附近所檢測之波峰之放射能 (計數) 之百分率作為 ^{89}Zr 錯合物之 RCP (%)。其結果， ^{89}Zr 錯合物之 RCP 為 98%。所得之 ^{89}Zr 錯合物溶液係直接用於標誌步驟。

【0141】

(2. 標誌步驟)

將經過上述步驟 (1) 所得到的未純化之 ^{89}Zr 錯合物之溶液，及與實施例 1 同樣地得到的含有胜肽修飾抗體 (一價抗體) 之溶液，在未純化下混合，於 37°C 進行 2 小時點擊反

應，得到 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體。DBCO與疊氮化物之莫耳比分別為約1：1。未純化時之實施例之 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之反應率(%)為72%。此處，反應率(%)意指相對於在錯合物形成步驟之標誌率(%)而言， ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之RCP(%)，標誌率(%)意指相對於給入放射能量而言， ^{89}Zr 錯合物之放射能量之比例(%)。

進一步地，將於37°C反應2小時所得到的 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之溶液使用超微過濾濾器(Merck公司製、型號：UFC803096)純化。純化後之 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之放射化學的純度(RCP)為96%、放射化學的產率(RCY)為49%。

【0142】 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之RCP及RCY之測定，係與實施例1同樣地進行。

【0143】

[比較例2]使用 ^{89}Zr 標誌DOTA-DBCO之與利妥昔單抗之複合體之製造

除了將DOTAGA-DBCO變更為DOTA-DBCO以外，係根據實施例3進行操作。其結果，反應2小時後之反應率為61%、純化後之 ^{89}Zr 錯合物標誌抗體之放射化學的純度(RCP)為93%、放射化學的產率(RCY)為48%。

【0144】

[實施例4]製劑化步驟

將遵照實施例3及比較例2所製造之放射性複合體分別取出一部分於5mL離心管(LoBind、Eppendorf公司製)，以保存緩衝液(含有0.154mol/L氯化鈉之0.025mol/L檸檬酸

鈉緩衝液(pH5.5)以及含有0.07重量/體積%聚山梨醇酯80、0.154mol/L氯化鈉之0.025mol/L檸檬酸鈉緩衝液(pH5.5)混合液)稀釋。

【0145】

[評估3-1]⁸⁹Zr錯合物標誌利妥昔單抗之抗原結合活性

抗原結合活性係與評估1-2同樣地藉由in vitro ARG來確認。又，藉由以於實施例3之溶液中添加了利妥昔單抗之溶液同樣地進行評估，來確認各放射性複合體對CD20之特異性。結果示於圖5。遵照實施例3及比較例2之記載所製造的放射性複合體均確認到對CD20之結合活性。遵照實施例3及比較例2所製造之放射性複合體均僅結合於Ramos腫瘤切片，顯示出CD20選擇性的結合。又，於添加了利妥昔單抗之溶液中，對Ramos腫瘤切片之結合被阻礙，確認到結合之CD20特異性。

【0146】

[評估4-1]⁸⁹Zr錯合物標誌利妥昔單抗之腫瘤累積之評估

使用小鼠，製作Ramos細胞及CCRF-CEM細胞之皮下荷癌模式，確認遵照實施例3之記載所製造之放射性複合體之腫瘤累積。

與評估2同樣地製作Ramos細胞及CCRF-CEM細胞荷癌小鼠。自荷癌處置起約2週後，確認腫瘤體積約為100~400mm³。將遵照實施例3之記載所製造之放射性複合體以4MBq/隻(各群n=3)之用量對尾靜脈內投予。此時之各小鼠之腫瘤體積與體重係示於表4。腫瘤體積係依照以下

之式算出。

$$\text{腫瘤體積 (mm}^3\text{)} = (\text{腫瘤長徑} \times (\text{腫瘤短徑})^2) \times 1/2$$

【0147】

[表4]

	腫瘤體積 平均值 ± 標準偏差 (mm ³)	體重 平均值 ± 標準偏差 (g)
Ramos細胞荷癌群	206.1 ± 191.9	21.4 ± 0.9
CCRF-CEM細胞荷癌群	297.2 ± 30.3	20.3 ± 0.9

【0148】投予遵照實施例3之記載所製造之放射性複合體186小時後，將小鼠於異氟烷麻醉下自心臟採血藉以安樂死後，採取血液及腫瘤。測定所採取之血液及腫瘤之重量，使用 γ 線井型閃爍計數測定裝置(JDC-1712、日立製作所公司製)測定血液及腫瘤之計數率。使用所得之組織重量及計數率，及投予放射能，算出每單位重量之投予放射能之累積率。使用所算出之每單位重量之投予放射能之累積率，求得相對於血液之腫瘤的累積比率，評估遵照實施例3之記載所製造之放射性複合體之腫瘤累積之CD20選擇性。其結果示於圖6。

【0149】相對於血液之腫瘤的累積比率，相較於CD20陰性之CCRF-CEM腫瘤而言，CD20陽性之Ramos腫瘤較高，確認到遵照實施例3之記載所製造之放射性複合體之CD20選擇性的累積。

【0150】

[評估5-1]²²⁵Ac錯合物標誌利妥昔單抗與已知藥劑之in

vitro藥效比較

使用培養細胞，將遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體的殺細胞效果與已知藥比較。將由ATCC所購入之源自CD20陽性之人類瀰漫性大細胞型B細胞淋巴瘤之細胞的SU-DHL-2細胞以RPMI1640培養基(gibco、Thermo Fisher Scientific公司製)進行培養，將遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體以成為0、0.001、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30kBq/mL(以利妥昔單抗計為0.000874、0.00874、0.0262、0.0874、0.262、0.874、2.62、8.74、26.2 μ g/mL)的方式以各培養基稀釋，添加於細胞。又，作為比較對象，添加POLIVY(註冊商標)(Genentech公司製)使最終濃度成為0、0.001、0.01、0.1、1、2、5、10 μ g/mL。又，將未標誌之利妥昔單抗，以成為與於各放射能濃度之樣品中所添加的總抗體濃度相同的方式(0,0.005、0.05、0.15、0.5、1.5、5、15、50、150 μ g/mL)進行添加並培養。自樣品添加起120小時後，於培養基中添加CellTiter-Glo(註冊商標)2.0 Cell Viability Assay(Promega公司製)，使用微盤分析儀(SpectraMax i3x、Molecular Devices公司製)檢測化學發光，算出活細胞數。對於所算出之活細胞數，取與未添加樣品之條件的活細胞數之比率，評估殺細胞效果。結果示於圖7。圖之縱軸表示以未添加抗體之條件下的活細胞數為1時之相對值，橫軸表示所添加之抗體濃度。圖表示各群(n=4)之平均值 \pm 標準偏差。

【0151】SU-DHL-2細胞中，未標誌之利妥昔單抗中未確認到殺細胞效果，遵照實施例1之記載所製造之放射性複合體中，於低於POLIVY(註冊商標)之添加抗體濃度中確認到殺細胞效果。

【0152】本申請案係基於在日本申請的特願2021-071320(申請日：2021年4月20日)，及特願2022-030389(申請日：2022年2月28日)，該等之內容全部包含於本說明書中。

【序列表】

<110> 日本醫事物理股份有限公司 (NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD.)

<120> 抗CD20抗體之放射性複合體，及放射性醫藥

<130> 093256

<140> TW 111114988

<141> 2022-04-20

<150> JP2021-071320

<151> 2021-04-20

<150> JP2022-030389

<151> 2022-02-28

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利妥昔單抗輕鏈

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 2
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 利妥昔單抗重鏈

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 3

Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 4

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
 1 5 10 15

His

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 5

Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser
 1 5 10

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 6

Gly Pro Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser Phe
 1 5 10 15

His

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 7

Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
 1 5 10 15

His

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 8

Gly Asp Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
 1 5 10 15

His

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 9

Gly Pro Ser Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
 1 5 10 15

His

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
 麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 10

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser Phe
1 5 10 15

His

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 11

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr His
1 5 10 15

His

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 12

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 13

Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 14

Ser Asp Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為離胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、
麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸或二胺基丙酸

<400> 15

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體修飾用胜肽

<220>

<221> SITE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 為同半胱氨酸殘基

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為離氨酸殘基、半胱氨酸殘基、天門冬氨酸殘基、
 麩氨酸殘基、2-氨基辛二酸或二氨基丙酸
 diaminopropionic acid.

<220>
 <221> SITE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa 為同半胱氨酸殘基

<400> 16

Gly Xaa Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Xaa
 1 5 10 15

His

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗體修飾用胜肽

<220>
 <221> 雙硫鍵
 <222> (4)..(14)

<400> 17

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Lys Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
 1 5 10 15

His

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種抗CD20抗體與鉈合劑之複合體，其中

放射性金屬核種係鉈合化於前述鉈合劑，

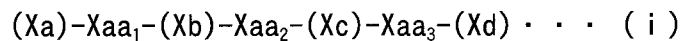
前述抗CD20抗體與鉈合劑係透過連結子(L)而連結，
前述連結子(L)不含硫脲鍵。

【請求項2】如請求項1之複合體，其中前述複合體為經胜肽部位特異性地修飾的抗CD20抗體與鉈合劑之複合體，

前述胜肽與前述鉈合劑係透過前述連結子(L)而連結。

【請求項3】如請求項1之複合體，其中前述鉈合劑為DOTAGA(α -(2-羧基乙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)。

【請求項4】如請求項2之複合體，其中前述胜肽為下述式：



(式(i)中，Xa、Xb、Xc及Xd係分別表示連續的a個X、連續的b個X、連續的c個X，及連續的d個X，

X為側鏈不具有硫醇基及鹵乙醯基之胺基酸殘基，

a、b、c及d係分別獨立地為1以上5以下之整數，且滿足 $a+b+c+d \leq 14$ ，

Xaa₁及Xaa₃係分別獨立地表示

源自側鏈具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，或源自側鏈具有鹵乙醯基的胺基酸之胺基酸殘基，惟， Xaa_1 及 Xaa_3 之任一者為源自具有硫醇基的胺基酸之胺基酸殘基，

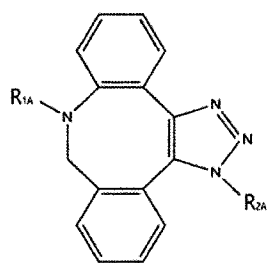
Xaa_1 及 Xaa_3 連結以形成環結構，

Xaa_2 為離胺酸殘基、精胺酸殘基、半胱胺酸殘基、天門冬胺酸殘基、麩胺酸殘基、2-胺基辛二酸，或二胺基丙酸，且 Xaa_2 經交聯劑修飾)

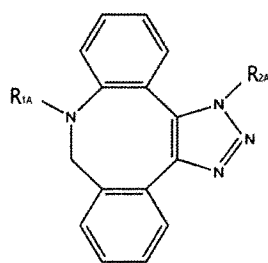
表示之由13~17個胺基酸殘基所構成的胺基酸序列。

【請求項5】如請求項1之複合體，其中前述放射性金屬核種為Zr-89、Y-90、Lu-177或Ac-225。

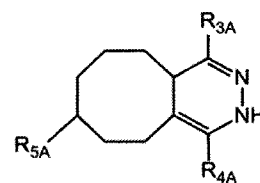
【請求項6】如請求項1之複合體，其中前述連結子(L)包含式(10a)、式(10b)或式(10c)；



(10a)



(10b)



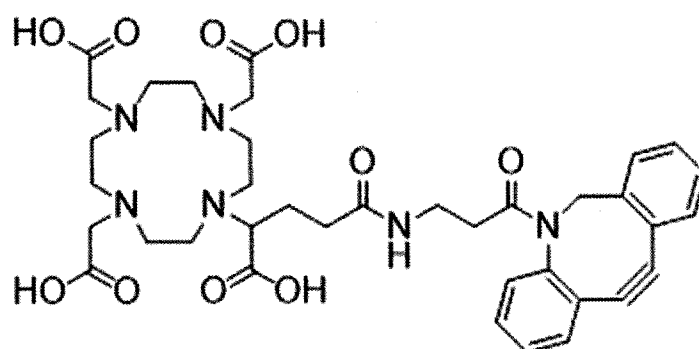
(10c)

(式(10a)及式(10b)中， R_{1A} 表示與前述鉗合劑之連結部位， R_{2A} 表示與前述抗體或前述胜肽之連結部位；式(10c)中， R_{3A} 及 R_{4A} 中的一者表示氫原子、甲基、苯基或吡啶基，另一者表示與前述鉗合劑之連結部位， R_{5A} 表示與前述抗體或前述胜肽之連結部位)。

【請求項7】如請求項6之放射性複合體，其中於與前述抗體或前述胜肽之連結部位及前述抗體或前述胜肽之

間，包含聚乙二醇基。

【請求項8】如請求項2之放射性複合體，其係藉由使於N末端導入有疊氮化物基之前述胜肽進行部位特異性地修飾的抗CD20抗體，與下述式表示之DOTAGA-DBCO之放射性金屬錯合物進行點擊反應而複合化；



DOTAGA-DBCO

【請求項9】如請求項1之複合體，其中前述抗CD20抗體為利妥昔單抗(rituximab)。

【請求項10】一種放射性醫藥，其含有如請求項1至9中任一項之複合體作為有效成分。

【請求項11】如請求項10之放射性醫藥，其係使用於癌之放射線內用療法。

【請求項12】如請求項10之放射性醫藥，其係使用於癌之診斷。

【請求項13】如請求項12之放射性醫藥，其係合併使用於使用如請求項11之放射性醫藥的癌之放射線內用療法。

【請求項14】一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核

種所鉗合化之鉗合劑與抗 CD20 抗體之複合體作為有效成分，

於抗 CD20 抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，且滿足下述(1)或(2)之條件：

(1)前述放射性金屬核種為 ^{177}Lu 或 ^{90}Y ，且於室溫保管 7 日時的前述複合體之放射化學的純度為 90% 以上、

(2)前述放射性金屬核種為 ^{225}Ac ，且於室溫保管 14 日時的前述複合體之放射化學的純度為 90% 以上。

【請求項 15】 一種放射性醫藥，其含有放射性金屬核種所鉗合化之鉗合劑與抗 CD20 抗體之複合體作為有效成分，

於抗 CD20 抗體與鉗合劑之連結中不含硫脲鍵，

以前述放射性金屬核種之半衰期為基準，於經過前述半衰期之 1 以上 5 以下的倍數之期間的時間點，前述複合體之放射化學的純度為 90% 以上。

【發明圖式】

Light Chain (輕鏈)

1 Gln-Ile-Val-Leu-Ser-Gln-Ser-Pro-Ala-Ile-
 11 Leu-Ser-Ala-Ser-Pro-Gly-Glu-Lys-Val-Thr-
 21 Met-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-
 31 Tyr-Ile-His-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-
 41 Ser-Ser-Pro-Lys-Pro-Trp-Ile-Tyr-Ala-Thr-
 51 Ser-Asn-Leu-Ala-Ser-Gly-Val-Pro-Val-Arg-
 61 Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-
 71 Ser-Leu-Thr-Ile-Ser-Arg-Val-Glu-Ala-Glu-
 81 Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Trp-
 91 Thr-Ser-Asn-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-
 101 Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Thr-Val-Ala-
 111 Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Ser-
 121 Asp-Glu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-
 131 Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-Pro-
 141 Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val-Asp-
 151 Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-Glu-
 161 Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-
 171 Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-
 181 Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-
 191 Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly-Leu-
 201 Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-
 211 Gly-Glu-Cys 213

1-128：源自小鼠(下線部)

129-213：源自人類

【圖 1】

Heavy Chain (重鏈)

1 Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Pro-Gly-Ala-Glu-
 11 Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Met-
 21 Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-
 31 Ser-Tyr-Asn-Met-His-Trp-Val-Lys-Gln-Thr-
 41 Pro-Gly-Arg-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Ala-
 51 Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-
 61 Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-
 71 Thr-Ala-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr-
 81 Met-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-
 91 Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Ser-Thr-
 101 Tyr-Tyr-Gly-Gly-Asp-Trp-Tyr-Phe-Asn-Val-
 111 Trp-Gly-Ala-Gly-Thr-Thr-Val-Thr-Val-Ser-
 121 Ala-Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-
 131 Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-
 141 Gly-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gly-Cys-Leu-Val-
 151 Lys-Asp-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-

【圖 2-1】

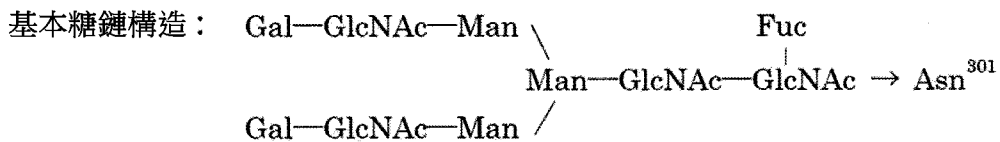
161 Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ala-Leu-Thr-Ser-Gly-
171 Val-His-Thr-Phe-Pro-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-
181 Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Val-Val-
191 Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-
201 Thr-Tyr-Ile-Cys-Asn-Val-Asn-His-Lys-Pro-
211 Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Lys-Ala-Glu-
221 Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-
231 Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-
241 Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-
251 Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-
261 Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-
271 Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-
281 Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
291 Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-
301 Asn*-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-
311 Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-
321 Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-
331 Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-

【圖 2-2】

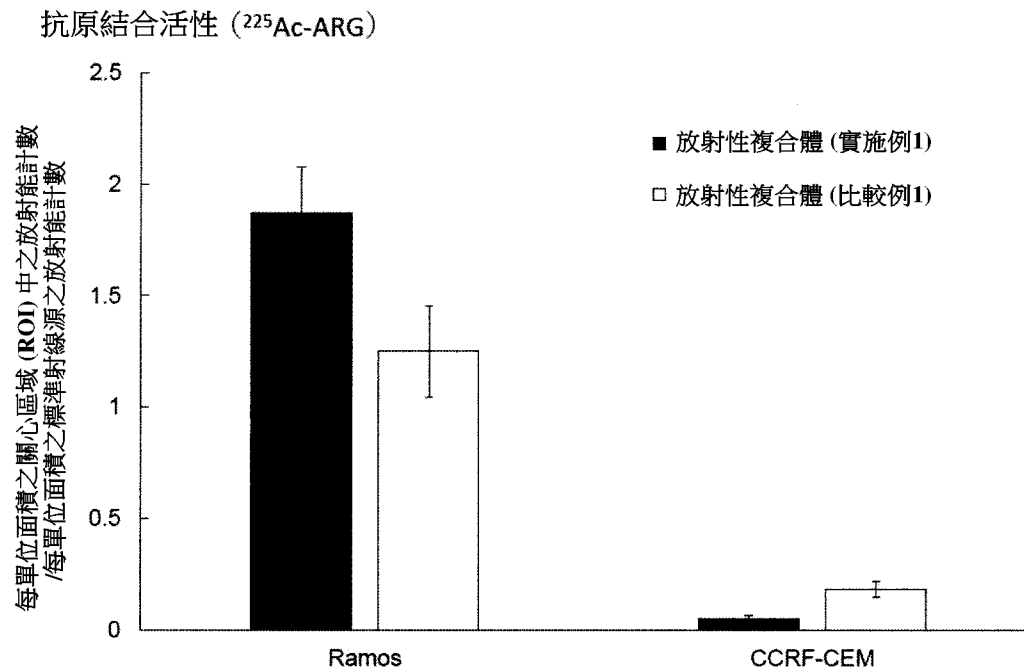
341 Ser—Lys—Ala—Lys—Gly—Gln—Pro—Arg—Glu—Pro—
 351 Gln—Val—Tyr—Thr—Leu—Pro—Pro—Ser—Arg—Asp—
 361 Glu—Leu—Thr—Lys—Asn—Gln—Val—Ser—Leu—Thr—
 371 Cys—Leu—Val—Lys—Gly—Phe—Tyr—Pro—Ser—Asp—
 381 Ile—Ala—Val—Glu—Trp—Glu—Ser—Asn—Gly—Gln—
 391 Pro—Glu—Asn—Asn—Tyr—Lys—Thr—Thr—Pro—Pro—
 401 Val—Leu—Asp—Ser—Asp—Gly—Ser—Phe—Phe—Leu—
 411 Tyr—Ser—Lys—Leu—Thr—Val—Asp—Lys—Ser—Arg—
 421 Trp—Gln—Gln—Gly—Asn—Val—Phe—Ser—Cys—Ser—
 431 Val—Met—His—Glu—Ala—Leu—His—Asn—His—Tyr—
 441 Thr—Gln—Lys—Ser—Leu—Ser—Leu—Ser—Pro—Gly—
 451 Lys

1-150：源自小鼠(下線部) ， 151-451：源自人類

*：糖鏈鍵結位置

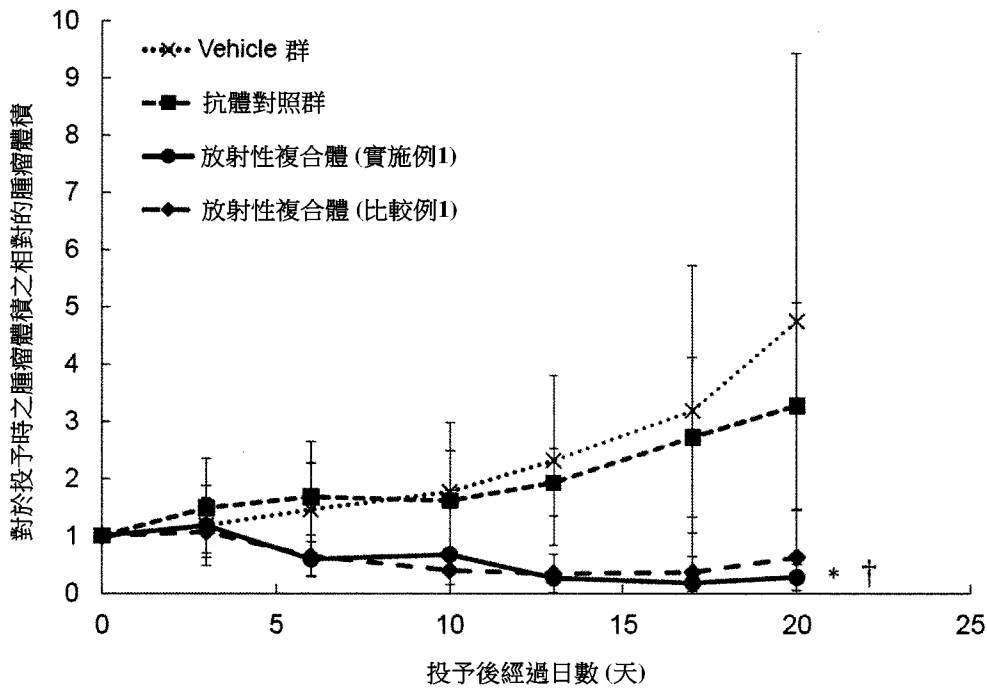


【圖 2-3】



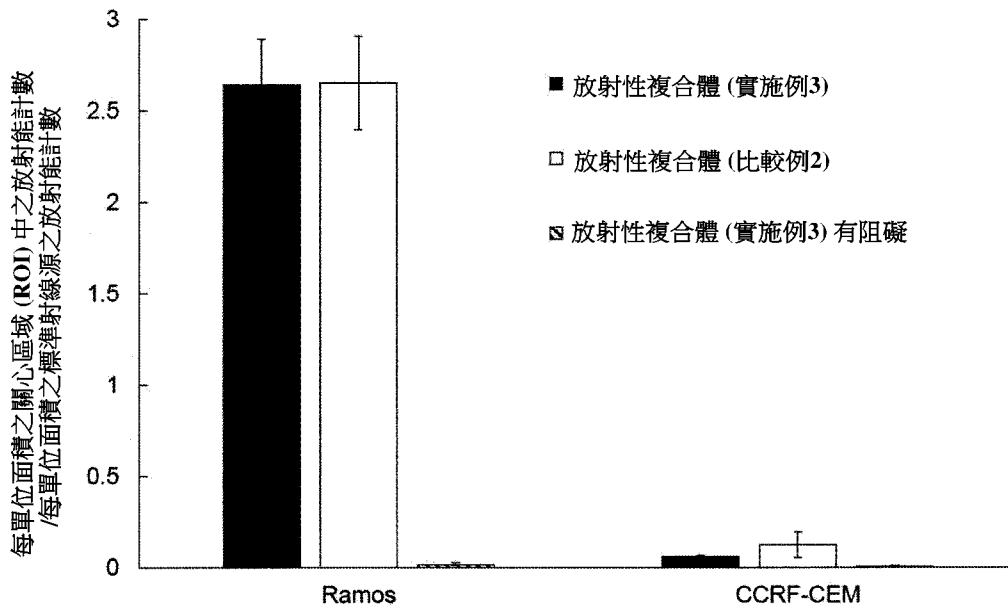
【圖 3】

藥效評估 (^{225}Ac 治療實驗)



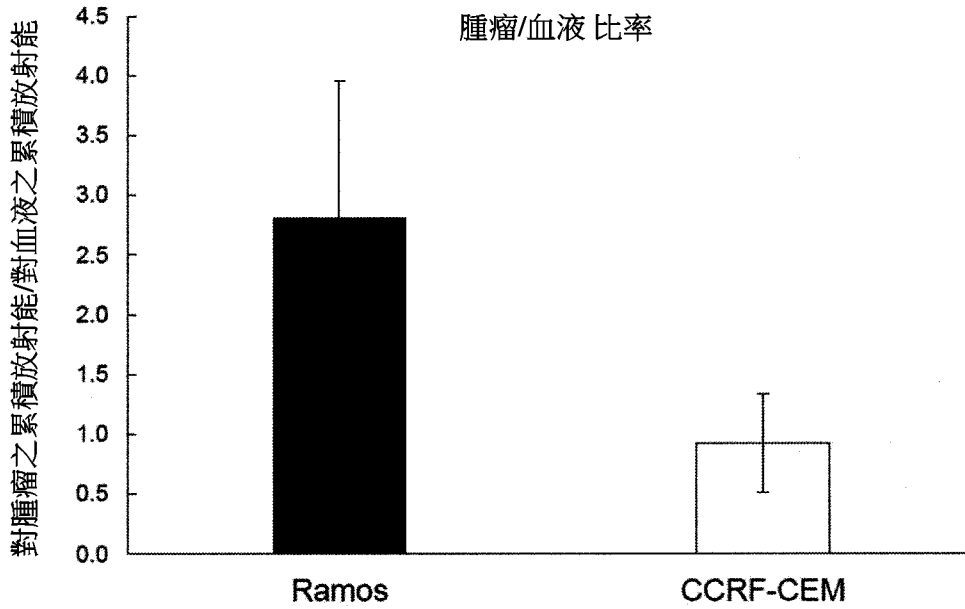
【圖 4】

抗原結合活性 (^{89}Zr -ARG)

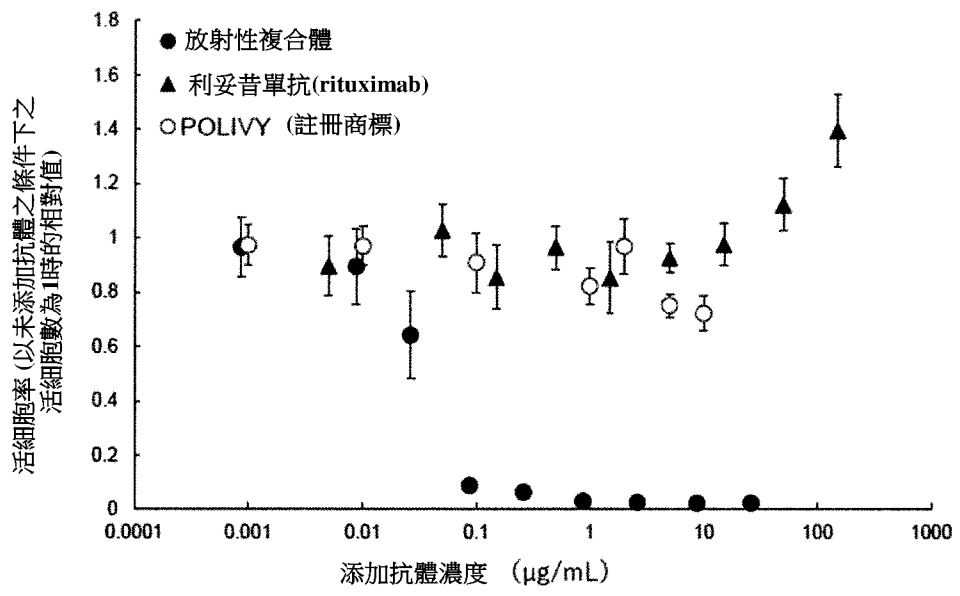


【圖 5】

藥效評估 (^{89}Zr 腫瘤累積性)



【圖 6】



【圖 7】