

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6211066号
(P6211066)

(45) 発行日 平成29年10月11日 (2017.10.11)

(24) 登録日 平成29年9月22日 (2017.9.22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 213/81 (2006.01)

C O 7 D 213/81

A 6 1 K 31/444 (2006.01)

A 6 1 K 31/444

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

C

請求項の数 29 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-510838 (P2015-510838)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月13日 (2013.5.13)
 (65) 公表番号 特表2015-517482 (P2015-517482A)
 (43) 公表日 平成27年6月22日 (2015.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/059839
 (87) 国際公開番号 W02013/167754
 (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 エヌー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】

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む組織標的化錯体であって、前記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シル基で置換されており、前記組織標的化部分がC D 2 2受容体に対して結合親和性を有する、組織標的化錯体。

【請求項 2】

少なくとも1つの3, 2 - H O P O部分を含む、請求項 1 に記載の錯体。

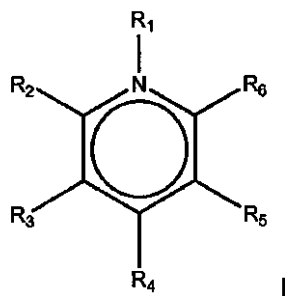
【請求項 3】

4つのH O P O部分がすべてN位にヒドロキシアシル基を含む、請求項 1 または 2 に記載の錯体。

【請求項 4】

式 I

【化 1】



10

のキレート部分を4つ含む八座配位子を含み、式中、

R_1 が、前記式Iの4つの部分のうちの少なくとも1つに存在する任意選択のヒドロキシアルキル基であり；

基 $R_2 \sim R_6$ がそれぞれ独立してH、OH、=O、C1～C12ヒドロカルビル基、リンカー部分および/またはカップリング部分から選択され、 $R_2 \sim R_6$ 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、

前記リンカー部分が、少なくとも2つのキレート基を連結するか、または八座配位子部分と組織標的化部分とを連結し、前記カップリング部分が、八座配位子と標的化部分とを結合する、

20

請求項1または2に記載の錯体。

【請求項5】

基 $R_1 \sim R_6$ のうちの少なくとも1つがリンカー部分である、請求項4に記載の錯体。

【請求項6】

4つの3, 2-ヒドロキシピリジノン部分を含む、請求項4～5のいずれかに記載の錯体。

【請求項7】

前記4つのHOP O基のそれぞれの前記ヒドロキシアルキル基がそれぞれ独立してH O C H₂-、H O C H₂ C H₂-、H O - C H₂ C H₂ C H₂-、H O - C H (C H₃) C H₂-、H O - C H₂ C H₂ C H₂ C H₂-、H O - C H (C H₃) C H₂ C H₂-、H O - C H (C H₂ C H₃) C H₂-、H O - C (C H₃)₂ C H₂-、H O - C H (C H₃) C H (C H₃) - およびH O C H₂ C H (C H₂ C H₃) - から選択される、請求項1～6のいずれかに記載の錯体。

30

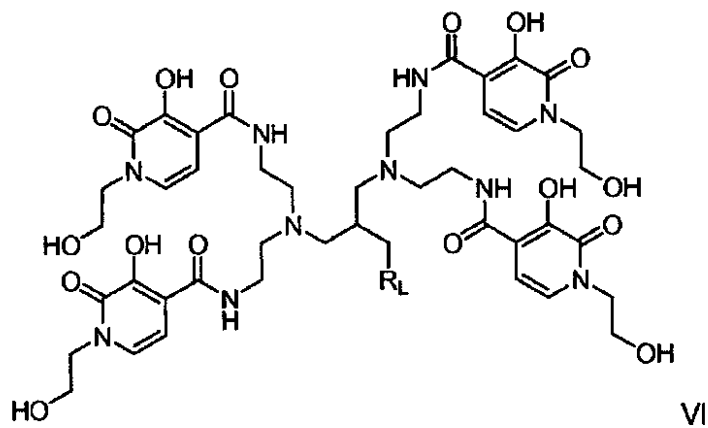
【請求項8】

前記アルファ放射性トリウム放射性核種のイオンが、²²⁷Thなどのアルファ放射性トリウム放射性核種の4+イオンである、請求項1～7のいずれかに記載の錯体。

【請求項9】

式VI：

【化 2】



10

の配位子部分を含み、式中、 R_L が任意の適切なリンカー部分である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の錯体。

【請求項 10】

前記組織標的化部分がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、抗体フラグメント (Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab' または scFv など) またはこのような抗体および/またはフラグメントの構築物である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の錯体。

20

【請求項 11】

前記組織標的化部分が、以下の配列：

【表 1】

軽鎖：

DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRE
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISRVQVEDLAIYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR (配列番号 1)

DIQLTQSPSSLASAAVEDRTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGQKAKLLIYWASTRE
SGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR (配列番号 2)

重鎖：

QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFTSYWLHWIKQRPGGGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATLTADKSSSTAYMLSSLTSEDSAVYYCARRDITTFYWGQGTTLTVSS
(配列番号 3)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGGGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTTVTVSS
(配列番号 4)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGGGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTTVTVSS
(配列番号 5)

30

40

のうちの少なくとも 1 つと少なくとも 90 % の配列類似性を有するペプチド鎖を少なくとも 1 つ含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の錯体。

【請求項 12】

過形成性疾患または腫瘍性疾患の治療のための薬物の製造における、組織標的化部分と、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組織標的化錯体の使用であって、前記4つのHOPPO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基で置換されており、前記組織標的化部分がCD22受容体に対して結合親和性を有する、使用。

50

【請求項 13】

前記組織標的化錯体が、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の錯体である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

前記疾患が非ホジキンリンパ腫または B 細胞腫瘍を含めた癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫または混合型癌である、請求項 12 または 13 に記載の使用。

【請求項 15】

治療に使用する、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の組織標的化錯体。

【請求項 16】

非ホジキンリンパ腫または B 細胞腫瘍を含めた癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫または混合型癌などの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、請求項 15 に記載の組織標的化錯体。

10

【請求項 17】

医薬組成物であって、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む組織標的化錯体を少なくとも 1 つの医薬担体または添加剤とともに含み、前記 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基で置換されており、前記組織標的化部分が C D 2 2 受容体に対して結合親和性を有する、医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の錯体である組織標的化錯体を含む、請求項 17 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 19】

ヒトまたは非ヒト動物（特に、治療を必要とするもの）を治療するための、請求項 17 又は 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

非ホジキンリンパ腫または B 細胞腫瘍を含めた癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫または混合型癌などの過形成性疾患または腫瘍性疾患を治療するための、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

ヒトまたは非ヒト動物（特に、治療を必要とするもの）を治療する方法に使用するキットであって、

30

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 部分のうちの少なくとも 1 つが N 位においてヒドロキシアルキル基で置換されており、前記組織標的化部分が C D 2 2 受容体に対して結合親和性を有し、

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、

キット。

【請求項 22】

前記組織標的化部分、八座ヒドロキシピリジノン含有配位子、およびアルファ放射性トリウム放射性核種が、請求項 1 ~ 11 に規定するものである、請求項 21 に記載のキット。

40

【請求項 23】

非ホジキンリンパ腫または B 細胞腫瘍を含めた癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫または混合型癌などの過形成性疾患または腫瘍性疾患を治療するための、請求項 21 または 22 に記載のキット。

【請求項 24】

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 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、前記 4 つの H O P O 部分のう

50

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基で置換されており、前記組織標的化部分がCD22受容体に対して結合親和性を有する、方法。

【請求項25】

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24に記載の方法。

【請求項26】

前記接触を40未満で実施する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

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25または26に記載の方法。

10

【請求項28】

前記カップリングにより、前記キレートと前記抗体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24～27のいずれかに記載の方法。

【請求項29】

前記エステル結合またはアミド結合が、少なくとも1つの活性エステル基によって形成される、例えば、少なくとも1つの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28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、トリウム同位体の錯体、具体的には、組織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。

30

【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】

40

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1mm以上である(Wilbur, Antigen Immunoclon Radiopharm 4:85-96(1991)を参照されたい)。

50

【 0 0 0 5 】

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、および生物学的効果比(RBE)が高くなり、酸素効果比(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。

10

【 0 0 0 6 】

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。

【 0 0 0 7 】

【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

20

【 0 0 0 8 】

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。

【 0 0 0 9 】

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。半減期がこのように短いと、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。

30

【 0 0 1 0 】

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。

40

【 0 0 1 1 】

^{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、放射性核種をリボソーム内に配置し、(反跳距離に比べて)リボソームの相当な大きさが助けとなり娘核種をリボ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

50

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。

【 0 0 1 2 】

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。

10

【 0 0 1 3 】

国際公開第 0 4 / 0 9 1 6 6 8 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。

【 0 0 1 4 】

上に述べた進歩を考えると、生成した ^{223}Ra 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。

20

【 0 0 1 5 】

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。

30

【 0 0 1 6 】

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。

40

【 0 0 1 7 】

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。

【 0 0 1 8 】

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

50

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。

【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】

CD22はある特定の哺乳動物細胞、特にB細胞に発現する膜貫通型の糖結合受容体であり、B細胞においてB細胞受容体シグナル伝達の抑制性受容体として機能する。CD22は抗体主体の治療法の有力な標的であると考えられてきた。

【0021】

20

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。さらに、このような配位子とCD22結合標的化部分とをカップリングさせることにより、有利な特性を有するコンジュゲートを得ることができる。

【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おり、組織標的化部分がCD22受容体に対して結合親和性を有す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。

30

【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。

【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。

40

【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、ピオチン/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。

50

【 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おり、組織標的化部分がC D 2 2受容体に対して結合親和性を有する組織標的化錯体（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。

【 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おり、組織標的化部分がC D 2 2受容体に対して結合親和性を有する組織標的化錯体（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。

【 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おり、組織標的化部分がC D 2 2受容体に対して結合親和性を有する組織標的化錯体（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。

【 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おり、組織標的化部分がC D 2 2受容体に対して結合親和性を有する組織標的化錯体（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 年未満の少なくとも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。

【 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 】

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H O P O部分を含む八座ヒドロキシピリジノン含有

10

20

30

40

50

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おり、組織標的化部分がCD22受容体に対して結合親和性を有する。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。

【0033】

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おり、組織標的化部分がCD22受容体に対して結合親和性を有する。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。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】AGC1115の280nm(A)および335nm(B)におけるSEC-U V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2】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。トラスツズマブをアイソタイプ対照として使用した。

【図3】:Th-227標識AGC0015とコンジュゲートしたC22結合mAb AGC1115(黒丸)、Th-227標識AGC0015とコンジュゲートした対照mAbトラスツズマブ(黒四角)または培地(黒菱形)とインキュベートしたRamos細胞を示す図である。両mAbとも同じ比活性(44kBq/μg)になるようTh-227で標識し、3nMで使用した(A)。

【発明を実施するための形態】

【0035】

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。この場合の標的化部分は、細胞表面受容体CD22と特異的に結合するよう選択される。このことは、例えば、CD22を発現する細胞に対する結合親和性がCD22を発現しない細胞に対する結合親和性の100倍以上であることに反映され得る。CD22はある特定の疾患状態(本明細書に示される)を有する細胞に発現および/または過剰発現するため、CD22特異的結合物質は、錯体をこのような罹患細胞に標的化する役割を果たし得ると考えられる。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、CD22受容体)と結合し得る。CD22細胞表面マーカーは、疾患細胞表面に健常細胞表面よりも多く発現するか、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し得る。一実施形態では、CD22特異的結合リガンドを疾患特異的細胞表面マーカーに対する別の結合物質と組み合わせて使用することにより、二重結合錯体を作製し得る。

【0036】

組織標的化部分はほかに、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、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン）。

【0037】

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。

【0038】

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。本発明のあらゆるしかるべき態様での治療および／または標的化に特に適しているのは、血液腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫のB細胞腫瘍を含めたリンパ腫およびリンパ性白血病などのリンパ系細胞の腫瘍性疾患である。同様に、骨髄、脊椎（特に脊髄）リンパ節および／または血液細胞のいずれの腫瘍性疾患も本発明のあらゆるしかるべき態様での治療および／または標的化に適している。

【0040】

本発明のあらゆるしかるべき態様での治療および／または標的化に適したB細胞腫瘍の一部の例としては、慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレームマクログロブリン血症など）、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞腫瘍（例えば、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、単クローン性免疫グロブリン沈着症、H鎖病）、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫（MALTリンパ腫）、節性辺縁帯B細胞リンパ腫（NMZL）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体液性リンパ腫およびパーキットリンパ腫／白血病が挙げられる。

【0041】

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

10

20

30

40

50

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する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。

【0042】

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。

【0043】

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）が含有される。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。

【0044】

トリウム - 227 はラジウム - 223 を経て崩壊する。この場合、主要な娘核種の半減期は11.4日である。最初の数日間、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 - 227 の崩壊系列を記載した下の表2を参照されたい）。

【0045】

【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ミリ秒
^{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

【0046】

トリウム - 227（ $T_{1/2} = 18.7$ 日）は有害な崩壊生成物を生じることを一部の理

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。

【 0 0 4 7 】

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 8 】

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）と考えると治療量を表せば、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。

【 0 0 4 9 】

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 - 2 2 3 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 - 2 2 3 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。

【 0 0 5 0 】

実際、投与量が少なくとも $200 \text{ kBq} / \text{kg}$ 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（ $36 \text{ kBq} / \text{kg}$ 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。

【0051】

^{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、具体的には骨髓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。

10

【0052】

本発明の方法では、トリウム錯体を望ましくは18 ~ 400 kBq / kg 体重、好ましくは36 ~ 200 kBq / kg (50 ~ 200 kBq / kg など)、より好ましくは75 ~ 170 kBq / kg、特に100 ~ 130 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 ~ 150 Kg、好ましくは40 ~ 100 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 kBq ~ 4000 kBq 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。

20

30

【0053】

^{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。

【0054】

^{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。

40

【0055】

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対象）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。

【0056】

^{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

50

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。

【0057】

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。

10

【0058】

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つ含む得る。

【0059】

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。

【0060】

20

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、ビ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、 $(\text{Fab}')_2$ 、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。

30

【0061】

一態様では、特異的結合物質（組織標的化部分）は、以下に示す少なくとも1つの配列と配列類似性または配列同一性を有するペプチドであり得る：

【表 A】

軽鎖：

マウス DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSC**KS**SSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGQSP
 ヒト化 -----SA-V-DR-----KA

マウス KLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFLTISRQVEDLAIYYCHQYLSS
 ヒト化 -----S--S-----F---SL-P--I-T-----

マウス **WTFGGG**TKLEIKR (配列番号 1)
 ヒト化 ----- (配列番号 2)

10

重鎖：

マウス QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFT**SYWL**HWIKQRPGQGLEWIG
 ヒト化 1 -----Q---VK---S---V-----VR-A-----

ヒト化 2 ----VQ---VK---S---V-----VR-A-----

マウス **YINPRNDYTEYNQNF**KDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
 ヒト化 1 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---
 ヒト化 2 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---

20

マウス **RDITTFY**WGQGTTLTVSS (配列番号 3)
 ヒト化 1 -----V---- (配列番号 4)
 ヒト化 2 -----V---- (配列番号 5)

【0062】

上記配列において、ヒト化配列中の「-」は、残基がマウス配列から変化していないことを示している。

【0063】

上記配列（配列番号 1～5）において、太字の領域は重要な特異的結合領域（CDR）であると考えられ、下線部の領域は結合に 2 番目に重要なものであると考えられ、強調が施されていない領域は特異的結合領域ではなく、構造的な領域を表していると考えられる。

30

【0064】

本発明のあらゆる態様において、組織標的化部分は、配列番号 1～5 で示される配列のうちのいずれかの少なくとも 1 つと実質的な配列同一性または実質的な配列類似性を有する配列を有し得る。実質的な配列同一性 / 配列類似性は、完全な配列と少なくとも 80 % および / または特異的結合領域（上記配列の太字で示される領域および任意選択で下線部の部分）と少なくとも 90 % の配列類似性 / 同一性を有するものであると考えられ得る。好ましい配列類似性またはより好ましくは同一性は、太字の領域について、また好ましくは全配列についても、少なくとも 92 %、95 %、97 %、98 % または 99 % であり得る。配列類似性および / または同一性は、ウィスコンシン大学の Genetics Computer Group Version 10 ソフトウェアパッケージの「Best Fit」プログラムを用いて決定され得る。このプログラムは、Smith および Waterman の局所 had アルゴリズムを初期値：ギャップ生成ペナルティ = 8、ギャップ伸長ペナルティ = 2、平均マッチ = 2.912、平均ミスマッチ 2.003 で用いるものである。

40

【0065】

組織標的化部分は 2 つ以上のペプチド配列を含んでよく、この場合、少なくとも 1 つの配列、好ましくは全配列が（独立して）、配列番号 1～5 のいずれかとの上記配列類似性

50

、および好ましくは配列同一性と一致し得る。

【0066】

組織標的化部分はCD22に対する結合親和性を有し、一実施形態ではこのほか、完全ドメインに対して最大約40の変異（好ましくは0～30の変異）を有する配列を有し得る。変異体は挿入、欠失および/または置換によるものであってよく、また配列番号1～5に隣接するものであっても、隣接しないものであってもよい。置換または挿入は通常、遺伝暗号の20のアミノ酸のうちの少なくとも1つによるものであり、置換は最も一般的には、保存的置換である。しかし、一実施形態では、少なくとも1つの挿入および/または置換が、配位子部分との結合に有用な反応性側鎖を有するアミノ酸に施され得る。このような側鎖は、例えば、チオール、アミン、アルコール、酸もしくはアミド基またはその任意の保護された同等物（例えば、エステル、チオエステルなど）を少なくとも1つ含み得る。保護基は有機化学の分野でよく知られており、Theodora Greeneによる「Protective Groups in Organic Chemistry」（参照により本明細書に組み込まれる）などの標準的なテキストから選択され得る。

10

【0067】

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。

20

【0068】

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。

【0069】

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、カルボキシアシル）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-テトラアザシクロドデカン-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-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。

30

【0070】

これまでに1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-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。

40

【0071】

50

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。

【0072】

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。

【0073】

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。

【0074】

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。

【0075】

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DMO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。

【0076】

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。

【0077】

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。

【0078】

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

10

20

30

40

50

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 P E G 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。

【 0 0 7 9 】

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。

【 0 0 8 0 】

本発明のトリウム（例えば、トリウム - 2 2 7）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 ^{227}Th の医学的使用は、キレート剤によって ^{227}Th 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 ^{227}Th 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。

【 0 0 8 1 】

^{227}Th 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、 ^{227}Th の大部分が ^{223}Ra 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 ^{223}Ra 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 ^{227}Th の量を増加させる必要がある。 ^{227}Th 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 ^{227}Th 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。

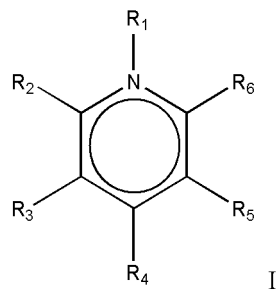
【 0 0 8 2 】

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 ^{227}Th および投与したトリウムにより *in vivo* で生じる ^{223}Ra 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 ^{223}Ra 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、 ^{227}Th 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、 ^{227}Th 崩壊から生じた ^{223}Ra 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 3 】

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】



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。

【0084】

HOPPO 部分（特に 3, 2-HOPPO および 2, 3-HOPPO）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には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。

【0085】

本明細書で使用されるヒドロカルビル部分はすべて、C1 ~ C8 アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を含めた C1 ~ C8 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

【0086】

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 HOPPO 部分がそれぞれ R_1 位にヒドロキシアルキル（hydroxyalkyl）（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 HOPPO 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 HOPPO 基がすべてヒドロキシエチルで 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）。

【0087】

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（hyd

roxyallyl) 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。

【0088】

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、鑄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。

10

【0089】

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-HOPO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。

20

【0090】

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。

【0091】

本明細書で使用される「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。リンカー部分はほかに、八座配位子部分と組織標的化部分とを連結し得る。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 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を含めた $C_1 \sim C_{12}$ 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。

30

40

【0092】

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

50

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）。

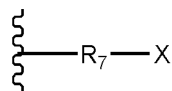
【0093】

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。

【0094】

—実施形態では、カップリング部分は構造：

【化 2】



を有し得るものであり、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 - ヒドロキシスクシイミジルエステル、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。

【0095】

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。

【0096】

好ましいキレート基としては、下式 I I：

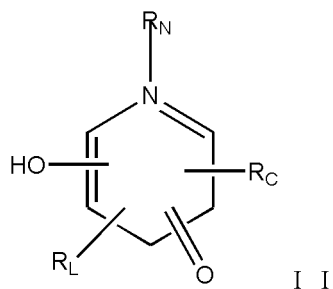
10

20

30

40

【化 3】



10

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 / 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 / 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。

20

【0097】

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。

【0098】

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。

30

【0099】

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。

【0100】

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。

40

【0101】

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 / 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

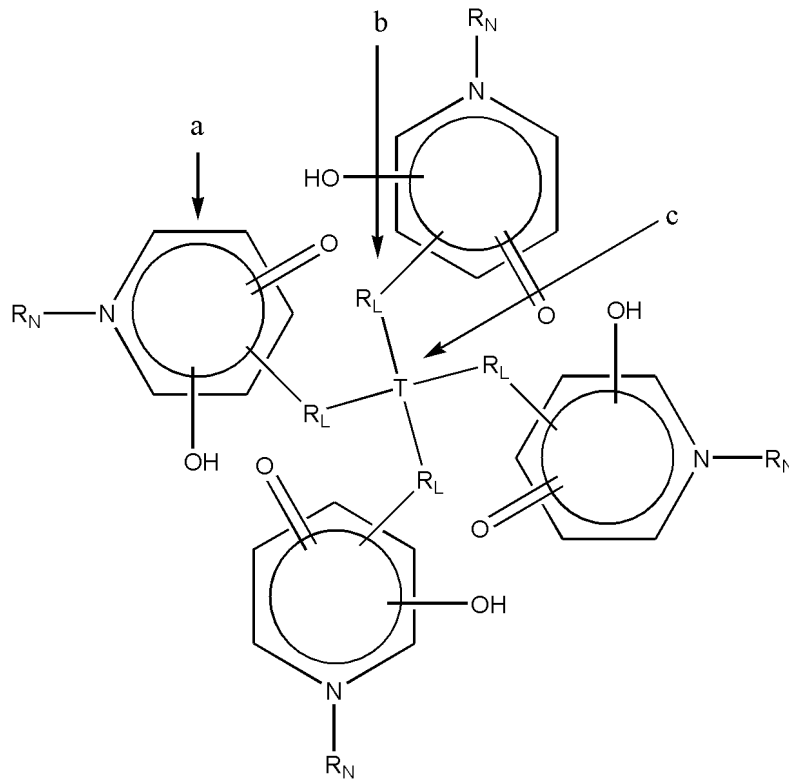
50

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 1 0 2 】

「星型」配置は下式 I I I :

【 化 4 】



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、ヒドロカルビイ (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 3 】

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 $R_1 \sim R_5$ 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 4 】

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、終端が標的化部分、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 5 】

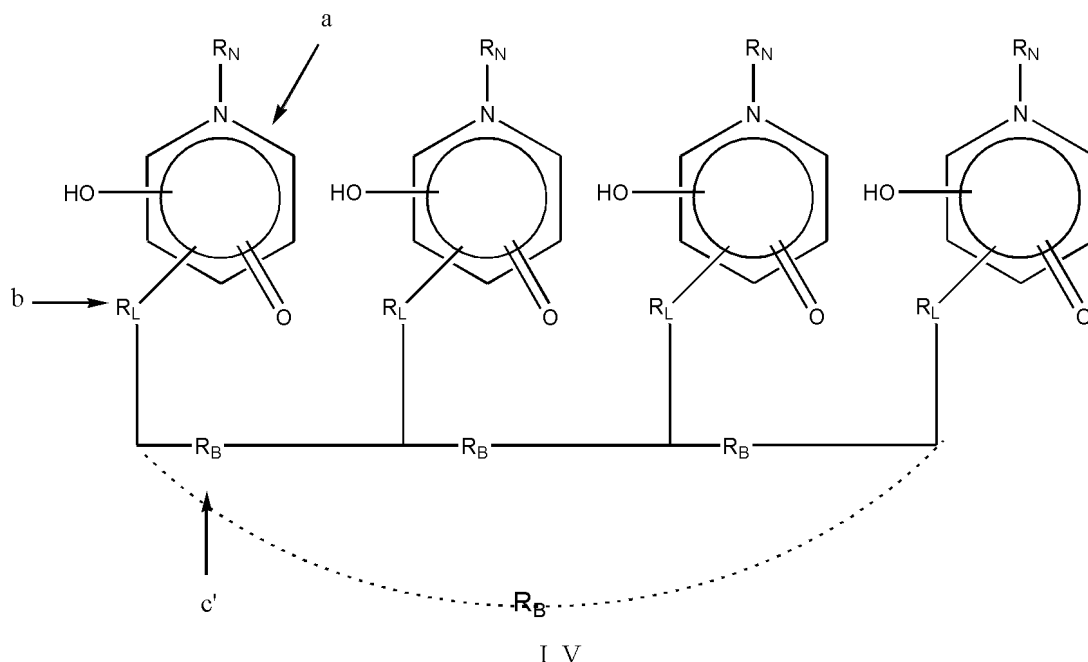
カップリング部分はリンカー、鑄型またはキレート部分の任意の適切な位置、例えば式 I I I に示される位置 a)、b) および / または c) などに結合し得る。カップリング部

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。

【 0 1 0 6 】

別の「主鎖」型構造を式 I V 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、キレート部分が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。

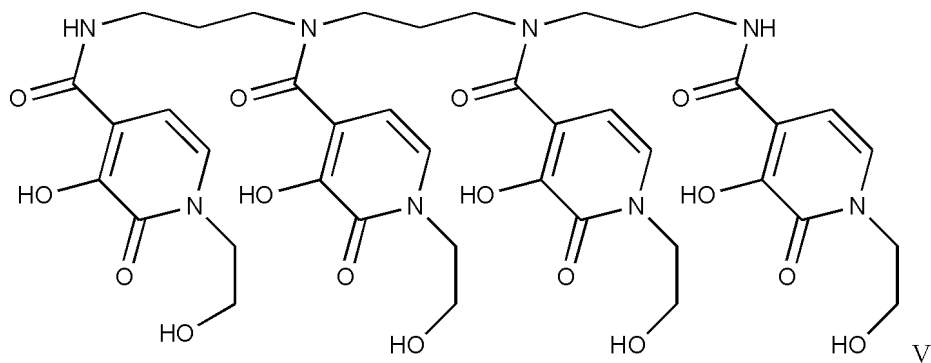
【 0 1 0 7 】

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 I V 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。

【 0 1 0 8 】

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

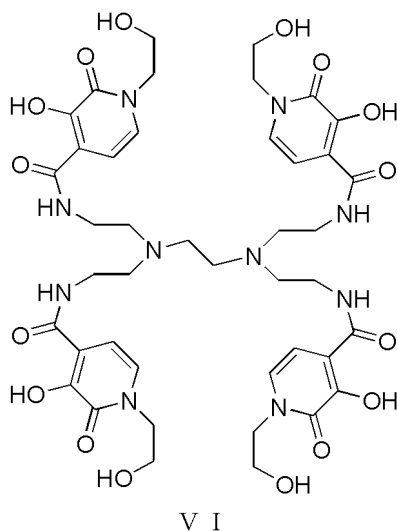
になる。この分子上の任意の適切な位置、例えば第二級アミン基のうちの1つまたは主鎖アルキル基のいずれかの分岐点にリンカー基 R_L を加え得ることは明らかである。主鎖プロピレンまたは n 置換エチレン基などの小さいアルキル基はすべて、他の小さいアルキレン、例えば本明細書に記載されるアルキレンのいずれか（特にメチレン、エチレン、プロピレンおよびブチレンが非常に適している）などで置換され得る。

【0109】

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-HOPO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VI:

20

【化 7】



30

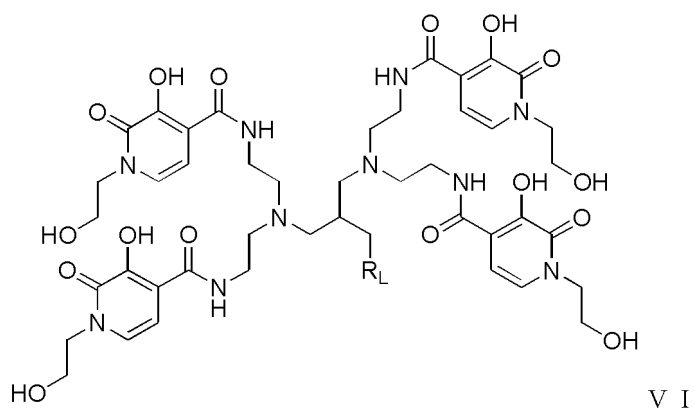
になる。式VIにエチレン部分として示されるアルキレン基はいずれも、独立してメチレン、プロピレンまたは n -ブチレンなどの他の小さいアルキレン基で置換され得ることは明らかである。分子にある程度の対称性が保持されるのが好ましいため、例えば、中心のエチレン基がプロピレンで置換されていれば、他のエチレン基はそのままであるか、HOPO部分と中心の第三級アミンの一方または両方とを結合している2つのエチレンがメチレンまたはプロピレンに置き換わり得る。同様に、本明細書で述べる通り、 N 置換基は、本明細書全体を通して記載される他の任意のヒドロキシアルキル基と置き換わり得る。

40

【0110】

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VIで示す:

【化 8】



10

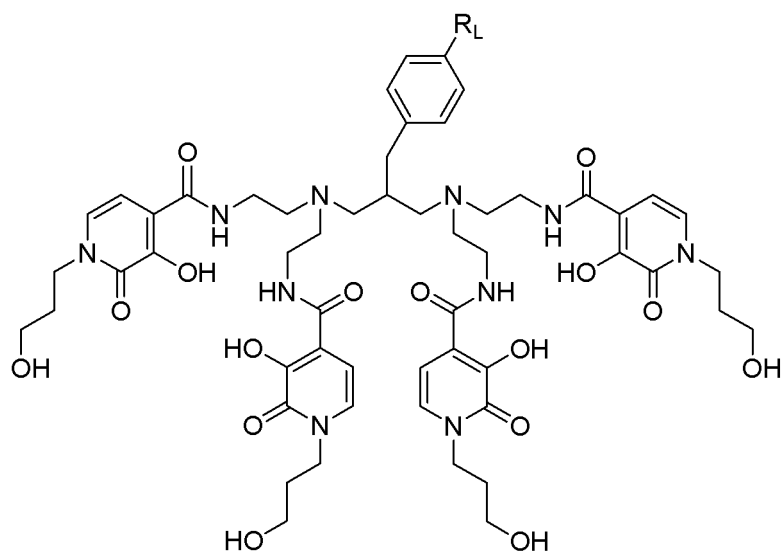
上式中、 R_L は、具体的には組織標的化基と結合するための、任意の適切な結合部分である。末端がアミンなどの活性基であるC 1 ~ C 8 環状、分岐または直鎖芳香族または脂肪族基などの短いヒドロカルビル基が、式V I および本明細書全体の基 R_L として非常に適している。

【 0 1 1 1 】

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：

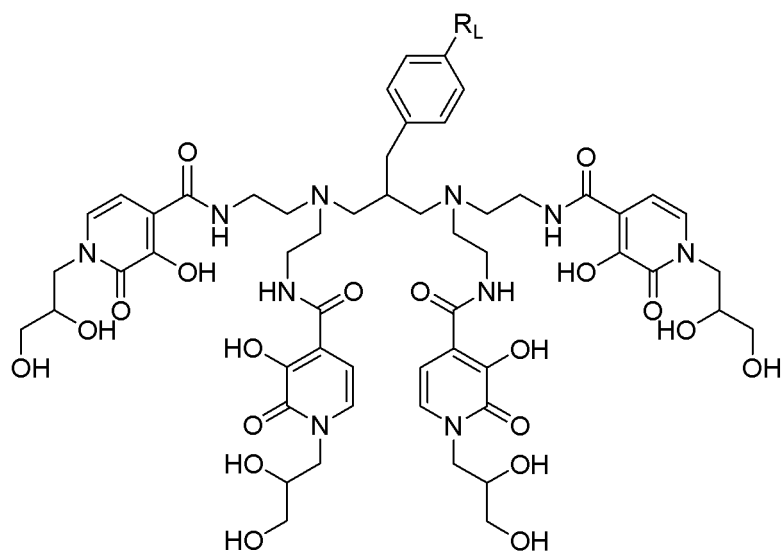
20

【化 9】



V I I

10



V I I I

20

30

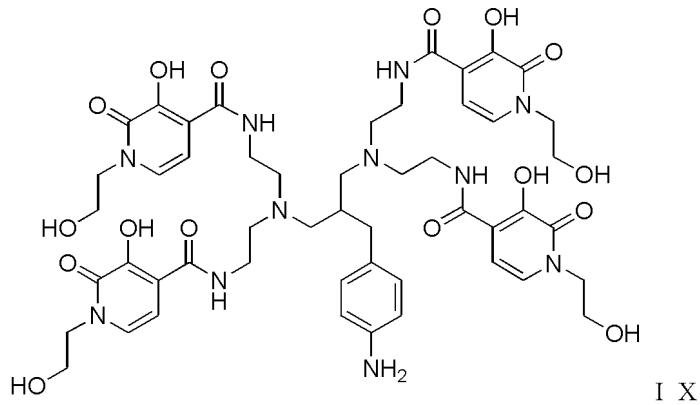
上式VIIおよびVIII中、 R_L は、本明細書に記載される任意の適切なリンカー基または反応性部分であり得る。通常、 R_L が配位子と標的化部分との結合点を形成するため、直接または別のリンカーを用いて任意の適切な反応基をこの結合に用いることができる。式VIIおよびVIIIの R_L に適した反応性部分としては、 NH_2 および $NC S$ 基が挙げられる。

【0112】

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、化合物12の $NC S$ などの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）：

40

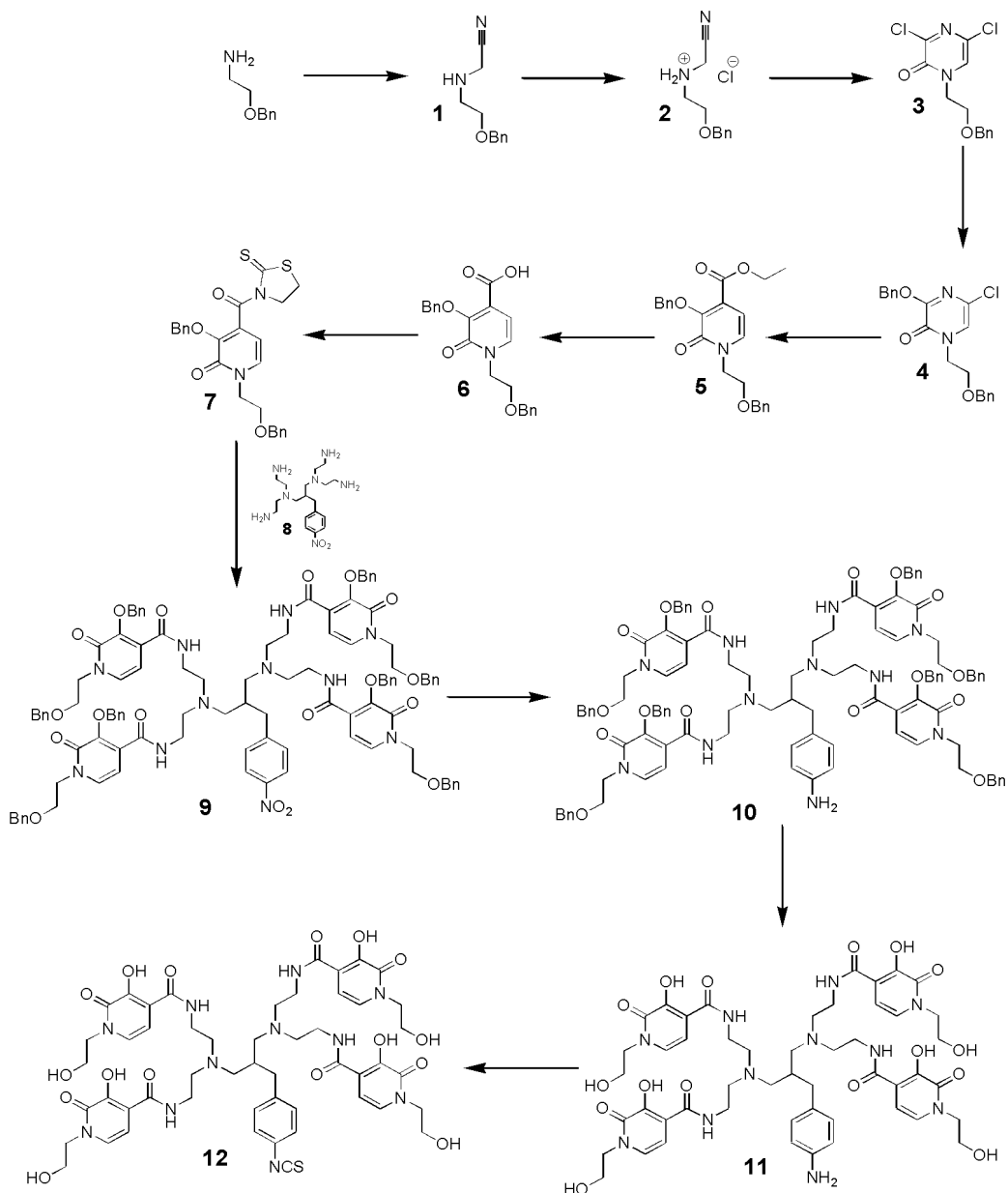
【化 10】



10

化合物 I X 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 11】



20

30

40

【 0 1 1 3 】

本明細書に引用される文献はいずれも参照により本明細書に組み込まれ、以下のものがこれに含まれる：Gordon A E V et al, Rational design of sequestering agents for plutonium an

50

d 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。

【0114】

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。これには利点がいくつかある。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。

10

【0115】

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。

【0116】

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。

20

【0117】

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。

30

40

【0118】

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。

【0119】

実施例では、以下に挙げる抗体および抗体コンジュゲートに言及する：

50

A G 0 1 1 0 0 - 実施例 3 で作製される抗 D C 2 2 抗体

A G 0 1 1 1 5 - 高溶解性コンジュゲート物質 (1 2) とコンジュゲートした A G 0 1 1 0 0

【実施例 1】

【0120】

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 の熱中性子照射、次いでラジウム - 227 ($t_{1/2} = 42.2$ 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。A G (登録商標) 1 - X 8 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。

10

【実施例 2】

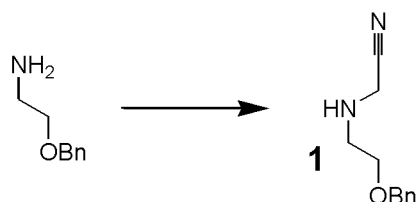
【0121】

化合物 12 の合成

段階 1

【化 12】

20



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。

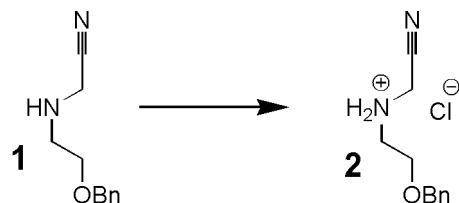
30

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

【0122】

段階 2

【化 13】



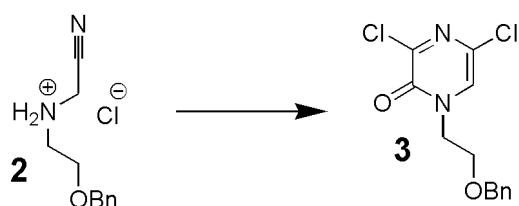
40

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。

【0123】

段階 3

【化 1 4】



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。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)。

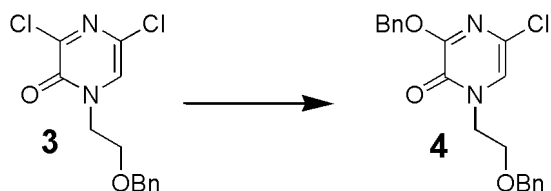
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 3.71 - 3.76 (m, 2H), 4.06 - 4.12 (m, 2H), 4.47 (s, 2H), 7.217 - 7.22 (m, 2H), 7.26 - 7.36 (m, 4H)

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

【0124】

段階 4

【化 1 5】



水素化ナトリウム (60% 分散液、3.60 g、90 mmol) を THF 50 mL 中、0 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 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 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 (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)。

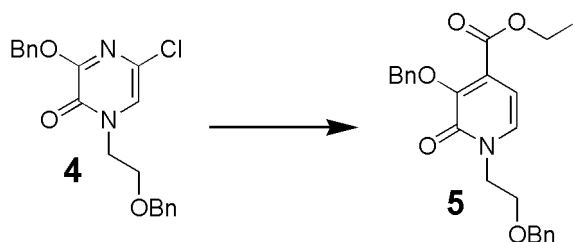
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.69 - 3.75 (m, 2H), 4.01 - 4.07 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 7.19 - 7.39 (m, 8H), 7.44 - 7.51 (m, 2H)

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

【0125】

段階 5

【化 1 6】

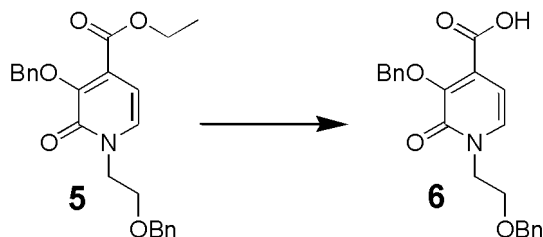


4 (25.6 g、69 mmol) およびプロピオール酸エチル (41 mL、0.4 mol) を 140 で 5 時間加熱した。反応混合物を室温まで冷却し、 SiO_2 での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより反応混合物を精製した。DCM中のMeOH勾配 (0 ~ 10%) により、所望生成物が分離不可能な所望の 4 - 異性体と 5 - 異性体との混合物として得られた。この混合物 (28.6 g、約 65 mmol) をこれ以上精製せずに次の段階に直接用いた。

【0126】

段階 6

【化 1 7】

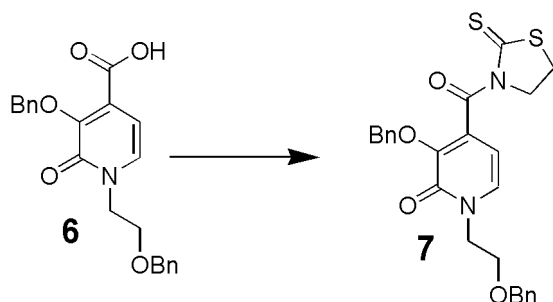


前段階で得られた 5 (28.6 g、約 65 mmol) を THF 300 mL に 0 で溶かした。KOH (1 M、水溶液) 100 mL を加え、反応混合物を室温で 40 時間攪拌した。HCl (1 M、水溶液) を pH 約 2 になるまで加え (125 mL)、 $\text{CHCl}_3 \times 250$ mL で水相を抽出した。有機相を合わせ、ブライン 100 mL で洗浄し、ろ過し、真空下で揮発性物質を除去した。得られた物質 (25.9 g、約 65 mmol) をこれ以上精製も分析も行わずに次の段階に用いた。

【0127】

段階 7

【化 1 8】



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 SiO_2

2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、この不純物が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(8.65g、18mmol)。

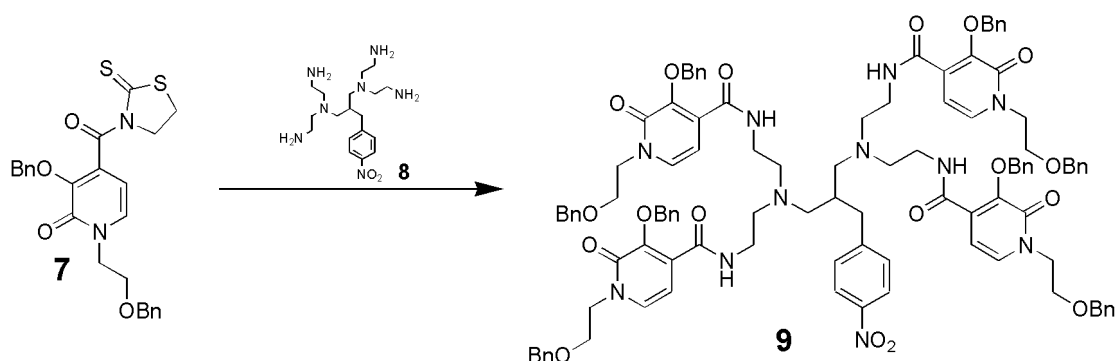
¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): 2.90(t, J=7.3Hz, 2H), 3.77-3.84(m, 2H), 4.18-4.23(m, 2H), 4.35(t, J=7.3Hz, 2H), 4.51(s, 2H), 5.33(s, 2H), 6.11(d, 7.0Hz, 1H), 7.21-7.48(m, 11H)

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

【0128】

段階8

【化19】



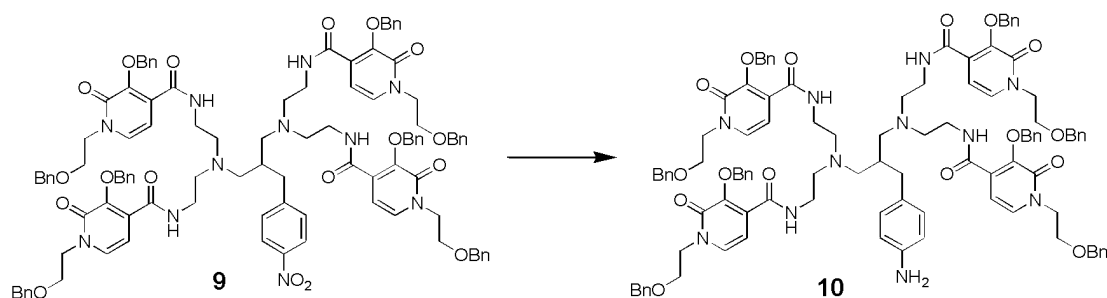
7(5.77g、12mmol)および8(1.44g、2.4mmol)をDMPU 40mLに一部溶かした。DBU(2.7mL、18mmol)を滴加した。反応物を室温で4日間攪拌した。EtOAc中のDCM/MeOH勾配を用いたSiO₂での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより精製し、所望生成物を得た(3.93g、2.15mmol)。

¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz): 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=7.2Hz, 4H), 7.13(d, J=7.2Hz, 4H), 7.16-7.38(m, 42H), 7.82-7.93(m, 6H)

【0129】

段階9

【化20】



9(3.93g、2.15mmol)をEtOH300mLに室温で溶かした。水60mL、次いでNH₄Cl(5.94g、32.3mmol)を加えた。反応混合物を60

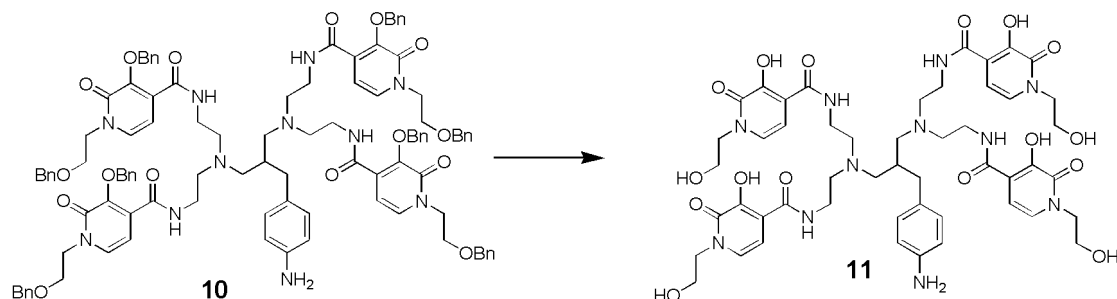
にした後、鉄粉（1.80 g、32.3 mmol）を加えた。反応混合物を60℃で1時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、DCM 400 mLおよび水100 mLを加えた。反応混合物をろ過し、有機相を水100 mLおよびブライン100 mLで洗浄した。水相を合わせ、DCM 3 × 100 mLで逆抽出した有機相を合わせ、Na₂SO₄上で乾燥させ、減圧下で揮発性物質を除去した。DCM中のMeOH勾配（0～7%）を用いたSiO₂での乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより生成物の混合物を精製し、所望生成物を得た（3.52 g、1.96 mmol）。

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

【0130】

段階10

【化21】



10

20

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）。

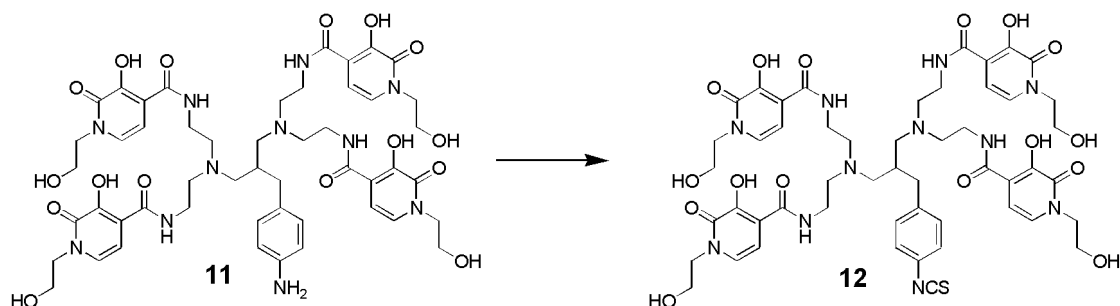
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) : 2.70 - 2.95 (m, 2H), 3.00 - 3.10 (m, 2H), 3.15 - 3.65 (m, 19H), 3.75 - 4.23 (m, 16H), 6.25 (bs, 4H), 7.04 (d, J = 7.0 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 2H)

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

【0131】

段階11

【化22】



30

40

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

50

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(10mg、9μmol)。

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

【実施例3】

【0132】

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巣浮遊(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。

【0133】

参考文献:

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

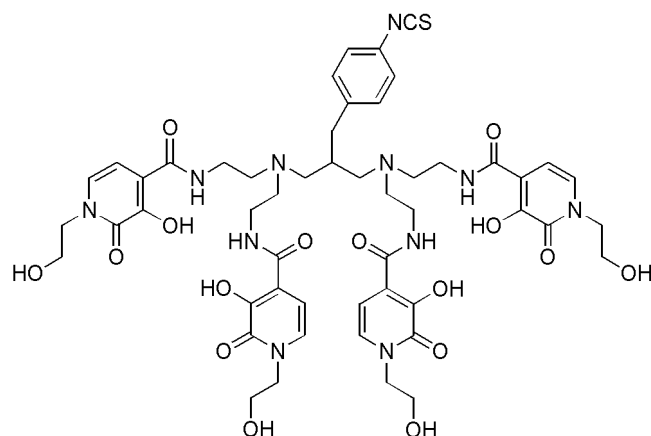
【実施例4】

【0134】

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23】



12

【0135】

キレート剤AGC0015(上の12)を金属不含水に溶かした後、コンジュゲーション反応に加えた。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21で22時間インキュベートした。反応時間の終了時、HiLoad Superdex 2

10

20

30

40

50

00 16 / 600 PGカラム (GE Healthcare; コード番号 29 - 9893 - 35) および pH 5.5 の 0.9% NaCl 100 mM クエン酸緩衝液を移動相として用いて、AKTA Purifier (GE Healthcare) 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 (CAR) を HPLC サイズ排除クロマトグラフィー - UV (SEC - UV) 分析により決定した。CAR の決定は、Agilent 1200 シリーズ HPLC システム (Agilent Technologies)、室温で維持した 4.6 × 300 mm、4 μm 粒子のカラム TSK gel Super SW 3000 (Tosoh Bioscience、パーツ番号 18675) および pH 6.8 の 300 mM NaCl 200 mM 酢酸アンモニウム (定組成溶離) の移動相を使用し、計 15 分の実行時間で実施した。注入体積は 5 μl とし、LC 流速は 0.35 ml / 分とした。それぞれ mAb およびキレート剤の最大吸収に対応する 280 nm および 335 nm で UV シグナルをモニターし、CAR 決定の代表的な結果を図 1 に示す。

10

【実施例 5】

【0136】

Th - 227 による抗体 / キレート剤コンジュゲート AGC 1115 のキレート化
アクチニウム - 227 (^{227}Ac) 発生器システムからトリウム - 227 (^{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 HNO₃ 中の ^{227}Ac 崩壊混合物から ^{227}Th を選択的に保持し、 ^{227}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、12 M HCl 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 HCl に溶かした。

20

【0137】

キレート化反応では、抗体コンジュゲート AGC 1115 を pH 5.5 の 0.9% NaCl 100 mM クエン酸緩衝液中、抗体コンジュゲート 0.5 mg 当たり 1 MBq の ^{227}Th の存在下、21 / 室温で 15 分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 ^{227}Th 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 6】

30

【0138】

フローサイトメトリーによる AGC 1115 および AGC 1100 と CD 22 陽性 Raji 細胞との結合分析。

AGC 1115 および AGC 1100 (抗ヒト CD 22、Immunomedics; hLL 2、# 1003164、10 mg / ml) と CD 22 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 CD 22 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。

【0139】

40

Raji 細胞を RPMI 1640 (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 50 mL を回収した。1% のウシ胎仔血清 (FBS) を添加した PBS 10 mL 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 20 μL 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、100 μL 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

50

後に再懸濁させて、1ウェル当たり体積約50 μ Lの細胞懸濁液を得た。

【0140】

AGC1115およびAGC1100を3倍希釈段階で50 μ g/mlに希釈し、12段階で漸増させた。アイソタイプ対照抗体(トラスツズマブ)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100 μ l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%BSAを添加した冷PBS200 μ l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1 μ g/mlに調製した。次いで、二次抗体試薬から100 μ l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PBS200 μ l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。

10

【0141】

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2)。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。

20

【0142】

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7】

【0143】

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ズマブを用いて、比活性が44kBq/ μ gになるようTh-227をキレートした。

30

【0144】

Ramos細胞を37、5%CO₂で増殖させ、週3回、1:5に分割した。アッセイ前日、培地(20%FBS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(IMDM))を新しい培地と交換し、1mL当たりの細胞数が40000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160000個の細胞(4mL)を加えた。標識mAbまたは培地を加えるためにプレートをインキュベートした。

【0145】

標識mAb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、AGC1115またはトラスツズマブ-AGC0015を最終濃度が3nM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ATPを測定した。次いで、細胞を1:2に分割し、培地中、37、5%CO₂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。

40

【0146】

TP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3に示される曲線が得られた。Ramos細胞と結合するAGC1115-Th-227では、Ramos細胞と結合しないTh-227で標識した対照構築物とは対照的に

50

細胞毒性がみられた。

【実施例 8】

【0147】

酸誘導体

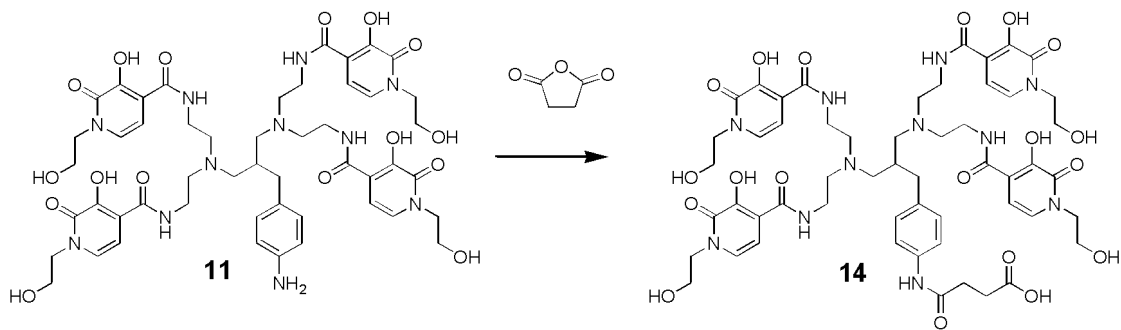
別のカップリング化学反応を可能にする水溶性キレート剤の酸誘導体の作製。

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。

【0148】

本実施例は可溶性キレート剤の合成を示し、物質 11 (実施例 2) から出発するものである。43 mg (約 0.04 mmol) の物質 11 を DMSO 4 mL、アセトニトリル 4 mL および NEt₃ 30 μL に溶かした。無水コハク酸 6 mg を加えた (0.06 mmol)。室温で 22 時間反応させた後の反応混合物の LC/MS 分析により、物質 15 が形成されたことが示された。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 14 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 HPLC 分析を図 6 に示す。

【化 24】



【配列表フリーテキスト】

【0149】

配列番号 1 ; マウス由来モノクローナル抗体

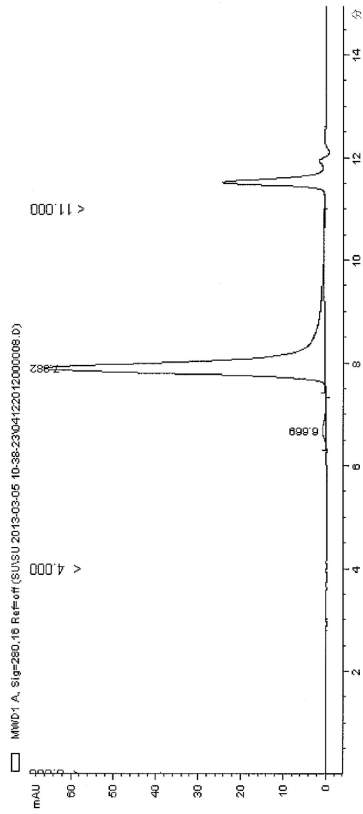
配列番号 2 ; ヒト化マウス由来モノクローナル抗体

配列番号 3 ; マウス由来モノクローナル抗体

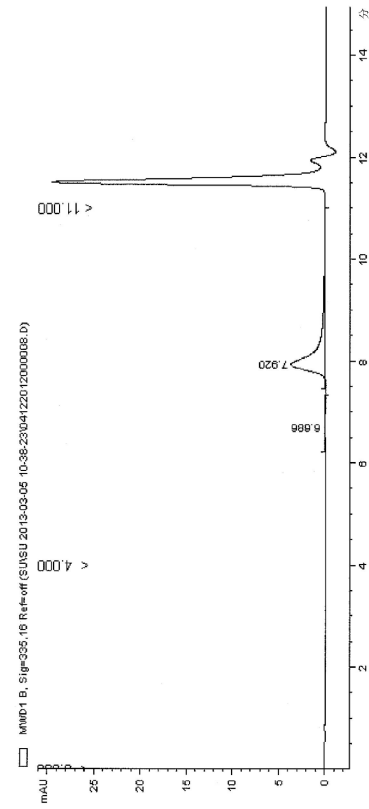
配列番号 4 ; ヒト化マウス由来モノクローナル抗体

配列番号 5 ; ヒト化マウス抗 CD22 モノクローナル抗体

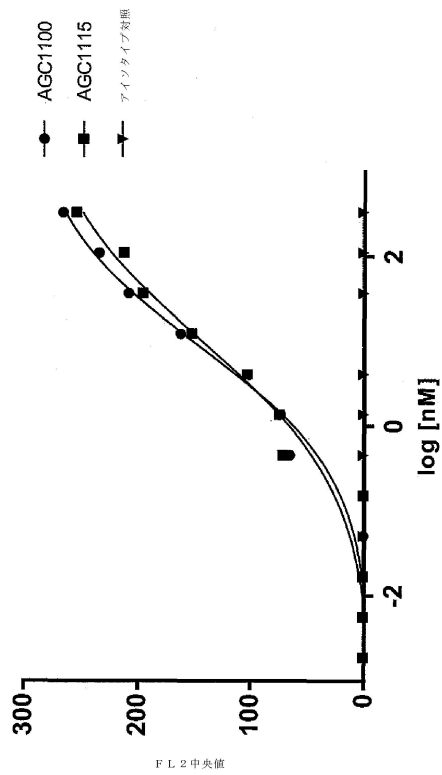
【図 1 a】



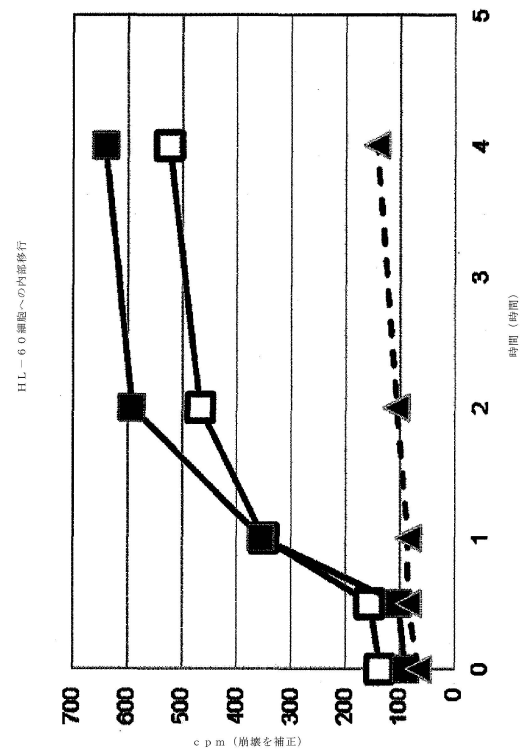
【図 1 b】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0006211066000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
			C 1 2 P	21/08	

(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 黒川 美陶

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 8 6 1 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 8 / 0 8 5 0 6 4 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 6 / 0 0 3 1 2 3 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 F
C 0 7 D
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)