

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年2月3日(03.02.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/025184 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01) *G01N 33/58* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *G01N 27/62* (2021.01)

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/028099

(22) 国際出願日: 2021年7月29日(29.07.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-128088 2020年7月29日(29.07.2020) JP

(71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 南部 健(NAMBU, Takeru); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 尾関 和久(OZEKI, Kazuhisa); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 高野 陽子(TAKANO, Yoko); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 渡邊 美穂(WATANABE, Miho); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 山本 修, 外(YAMAMOTO, Osamu et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

一 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て(規則4.17(ii))

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR MEASURING PHARMACOKINETICS OF DRUG LABELED WITH NON-RADIOACTIVE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 非放射性物質で標識した薬剤の薬物動態を測定する方法

(57) Abstract: The present invention provides: a drug labeling method comprising (i) a step for chelating a chelating agent having a reactive group with a non-radioactive substance and (ii) a step for binding the chelating agent that has been chelated with the non-radioactive substance to a drug through the reactive group, the method being intended to be used in the evaluation of pharmacokinetics; and others.

(57) 要約: 本発明は、薬剤の標識方法であって、(i) 反応基を有するキレート剤に、非放射性物質をキレートさせる工程、および(ii) 工程(i)で非放射性物質をキレートさせたキレート剤を、前記反応基を介して薬剤に結合させる工程を含み、該方法は、薬物動態の評価において使用するための方法である、前記方法などを提供する。



WO 2022/025184 A1

明 細 書

発明の名称：

非放射性物質で標識した薬剤の薬物動態を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、非放射性物質で薬剤を標識する方法、非放射性物質で標識した薬剤の薬物動態を測定する方法、所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法などに関する。

背景技術

[0002] 従来、医薬品候補物質（例えば抗体に代表される高分子量のタンパク製剤など）の開発過程において、候補物質の臓器分布や血中濃度推移などの薬物動態を評価する一般的な方法として、放射性同位元素（ R ）で標識した医薬品候補物質をマウスやサルなどの実験用動物に投与し、一定期間後に採取した組織や血液中の放射能を測定することで、その医薬品候補物質の薬物動態を評価する方法が知られている（非特許文献１）。

[0003] この方法のメリットは、 R に由来する放射能を直接測定するため、医薬品候補物質の絶対定量が可能である点、および組織や血液中に含まれるマトリックス（すなわち、測定対象物以外の物質）の影響をほとんど受けない点にある。一般的な定量法では、測定対象物を有機溶媒やカラムなどによってマトリックスから分離し回収する操作を行う必要がある。その際に、対象物を十分に回収できないなどの問題により、分析が困難となる場合がある。 R を利用する方法では、そのような問題はほとんど考慮する必要がない。

[0004] 一方で、 R を用いた実験の実施は、放射線被ばくの観点から、また放射性物質を封じ込める必要性から、特別に許可を得た専用の施設に限られる。そのため、 R を用いた実験は、 R の使用に関する特別な知識を有する者が R 施設内に置かれた機器や動物飼育施設を使って初めて可能となる。また放射線被ばくを防ぐために特殊な防護措置をとりながら実験しなければならないという作業上の煩雑さ、放射性物質による汚染の防止措置の必要性、

放射性物質で汚染した廃棄物の処理の問題など、R Iを用いた実験には様々なデメリットが伴う。

[0005] さらに、各核種の使用量は、規制当局からの許可が得られた範囲内に限られる。医薬品開発の初期段階では多数の候補物質を評価する必要があるが、そのような使用量の制限から、候補物質の全てをR Iを用いて評価することはできない。R Iを用いて薬物動態評価を行うためには、候補物質をあらかじめ絞り込む必要がある。

[0006] 上記のようなR Iを用いた実験のデメリットを回避するために、R Iを用いずに薬物動態を評価する方法が用いられている。そのような方法としては、例えば、蛍光 (fluorescent) 標識した候補物質を用いる方法が知られている。

[0007] また候補物質を標識せずに評価する方法として、LC-MSや免疫アッセイ (immunoassay) を用いる方法が知られている。血液中の候補物質の濃度は、一般的に免疫アッセイで測定されている。免疫アッセイでは、通常、酵素標識抗体、蛍光標識抗体などが使用され、化学発光または蛍光を測定して候補物質の血液中の濃度が定量される。またユーロピウム、サマリウム、テルビウム、ジスプロシウムなどの金属や金コロイドで標識した抗体による免疫アッセイ方法も報告されている (特許文献1および2、非特許文献2および3)。この方法では、金属の検出にICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometry) が用いられ、検出感度が高いため、臨床検査でも採用されている。

[0008] ICP-MSは、金属元素を中心とする多くの無機元素について、超微量分析 (pptレベル) を可能にする技術である。この技術は、多元素を同時に分析可能であり、同位体比の測定が可能であり、しかも分析を高精度且つ迅速に実行可能であるといった多くの特長を有し、半導体などの材料産業、地質学や環境などの分野において広く応用されている (特許文献3)。ICP-MSは、医薬品中の元素不純物の個別定量法としても用いられている。また、金属コロイドを生体に投与し、金属の体内動態をICP-MSで高感度に

評価した例も報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：US 2004/0072250 A1

特許文献2：US 7767407 B2

特許文献3：特許第4585069号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Glassman et al., The Journal of Clinical Pharmacology Vol 55 No.53 (2015), 529-538

非特許文献2：J. Anal. At. Spectrom., 2001, 16, 1393-1396

非特許文献3：Mass Spec Rev 29:326-348, 2010

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] RIを用いた薬物動態の評価方法には、上述のとおり様々なデメリットがある。特に、薬物動態に基づくスクリーニングを医薬品開発の初期段階に行うことは、RIの使用量の制限が存在することから困難であった。したがって、RIを用いずに薬物動態を評価する方法には大きなニーズがある。しかしながら、従来から知られている方法は、RIを用いた方法に代わるものではなかった。例えば、蛍光標識を利用する場合、組織や血液中に含まれるマトリックスの影響を受けるため、生体試料から測定対象物を抽出する操作が必要となる。抽出効率は100%とはなり得ず、測定対象物の一部が失われることとなり、RIを用いた方法と同程度に正確な分析を行うことは困難であった。

一方、非放射性物質で測定対象物を標識し、ICP-MSなどにより非放射性物質を定量することで、測定対象物の薬物動態を評価することができれば、上記のような抽出操作を行う必要はない。しかしながら、測定対象物を非放射性物質で標識し、それを動物に投与し、非放射性物質の動態を追うこ

とによって、測定対象物の薬物動態を評価した例は、これまでに存在しなかった。その理由としては、測定対象物に取り込まれなかった非放射性物質を取り除くことが難しいなど、薬物動態評価に適した標識物を調製することが困難であることが挙げられる。

本発明の目的は、１）非放射性物質で、抗体など医薬品候補物質となる薬剤を標識する方法、２）当該方法により非放射性物質で標識された薬剤の薬物動態を測定する方法、３）所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法などを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、鋭意研究した結果、薬物動態評価に適した形で非放射性物質により薬剤を標識することができる、新規方法を見出した。従来、R Iで薬剤を標識する場合には、薬剤にキレート剤を結合させたのちにR Iをキレートさせていた。本発明者らは、この標識方法を非放射性物質に適用した場合、生体中の非放射性物質の含有量に基づいて薬剤の薬物動態を評価しようとしても正確な結果が得られないことを見出した。それに対して、予想外にも、非放射性物質をキレート剤にキレートさせたのちに当該キレート剤を薬剤に結合させた場合には、薬剤の薬物動態を正確に評価することができた。本発明者らは、これらの知見に基づきさらに研究を重ねることにより、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明は、以下の発明を提供する。

[1] 薬剤の標識方法であって、

(i) 反応基を有するキレート剤に、非放射性物質をキレートさせる工程、および

(i i) 工程 (i) で非放射性物質をキレートさせたキレート剤を、前記反応基を介して薬剤に結合させる工程を含み、

該方法は、薬物動態の評価において使用するための方法である、前記方法。

〔2〕非放射性物質が、金属である、〔1〕に記載の方法。

〔3〕非放射性物質が、リチウム、ベリリウム、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、カリウム、カルシウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ガリウム、ルビジウム、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、インジウム、スズ、セシウム、バリウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀、タリウム、鉛、ビスマス、またはトリウムである、〔2〕に記載の方法。

〔4〕非放射性物質が、インジウムまたはユウロピウムである、〔3〕に記載の方法。

〔5〕非放射性物質がインジウムである、〔4〕に記載の方法。

〔6〕反応基を有するキレート剤が、配位基としてアミノ基またはカルボキシル基を有するキレート剤である、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕反応基を有するキレート剤が、DOTA、EDTA、HEDTA、DHEDDA、1,3-PDTA、DTPA、TTHA、NTA、グルコン酸、HIMDA、ASDA、NTMP、HEDP、3-ヒドロキシー-2,2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、およびポルフィリンから選択されるいずれかの化合物に反応基を導入したキレート剤である、〔6〕に記載の方法。

〔8〕反応基を有するキレート剤が、反応基を導入したDOTAである、〔7〕に記載の方法。

〔9〕薬剤が、抗体、ペプチド化合物、細胞、または核酸である、〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕反応基が、アミノ基またはチオール基と反応して化学結合を形成し

得る基である、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11] 反応基が、NHSエステル、ITC基、またはマレイミド基である、[10]に記載の方法。

[12] 反応基がITC基である、[11]に記載の方法。

[13] 薬剤の薬物動態を測定する方法であって、

(i) [1]～[12]のいずれかに記載の方法により、非放射性物質で薬剤を標識する工程、

(ii) 工程(i)で標識された薬剤を、非ヒト動物に投与する工程、および

(iii) 工程(ii)の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程

を含む、前記方法。

[14] 工程(i)において、それぞれ異なる非放射性物質で2種類以上の薬剤を標識し、

工程(ii)において、工程(i)で標識された2種類以上の薬剤を、単一の非ヒト動物に投与する、[13]に記載の方法。

[15] 非放射性物質の含有量を、分光分析または質量分析により測定する、[13]または[14]に記載の方法。

[16] 非放射性物質の含有量を質量分析により測定する、[15]に記載の方法。

[17] 質量分析が、プラズマイオン化質量分析、電子イオン化(EI)質量分析、化学イオン化(CI)質量分析、大気圧化学イオン化(APCI)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析、レーザー脱離質量分析(LDMS)、二次イオン質量分析(SIMS)、スパークソース質量分析(SSMS)、または表面電離質量分析(TIMS)である、[16]に記載の方法。

[18] 質量分析が、プラズマイオン化質量分析である、[17]に記載の方法。

〔19〕質量分析が、誘導結合プラズマ(ICP)質量分析、マイクロ波誘導プラズマ(MIP)質量分析、またはグロー放電(GD)質量分析である、〔18〕に記載の方法。

〔20〕非ヒト動物が、実験動物である、〔13〕～〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕非ヒト動物が、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットである、〔20〕に記載の方法。

〔22〕非ヒト動物がマウスである、〔21〕に記載の方法。

〔23〕マウスが、担癌マウス、病態モデルマウス、またはトランスジェニックマウスである、〔22〕に記載の方法。

〔24〕工程(i i)における薬剤の投与が、静脈内投与(i.v.)、皮下投与(s.c.)、経口投与(p.o.)、腹腔内投与(i.p.)、筋肉内投与(i.m.)、腫瘍投与(i.t.)、経肺投与、または経鼻投与である、〔13〕～〔23〕のいずれかに記載の方法。

〔25〕薬物動態が臓器への分布であり、

生体試料が臓器であり、

(i v) 工程(i i i)で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の臓器への分布を決定する工程

をさらに含む、〔13〕～〔24〕のいずれかに記載の方法。

〔26〕(v) 工程(i v)で決定した分布に基づき、薬物動態を数値化する工程

をさらに含む、〔25〕に記載の方法。

〔27〕臓器が、血液、血漿、精巢、回腸、大腸、空腸、胃、肝臓、肺、腎臓、脾臓、心臓、大腿筋、および皮膚からなる群から選択される少なくとも1つである、〔25〕または〔26〕に記載の方法。

〔28〕薬物動態が血中濃度推移であり、

生体試料が血液、血漿、または血清であり、

工程(i i i)が、工程(i i)の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料

を経時的に2回以上採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程であり、

(i v) 工程 (i i i) で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の血中濃度推移を決定する工程

をさらに含む、[13] ~ [24] のいずれかに記載の方法。

[29] (v) 工程 (i v) で決定した血中濃度推移に基づき、薬物動態を数値化する工程

をさらに含む、[28] に記載の方法。

[30] 所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(i) 2つ以上の候補薬剤について、[13] ~ [29] のいずれかに記載の方法により薬物動態を測定する工程、および

(i i) 工程 (i) で測定した候補薬剤の薬物動態を比較し、所望の薬物動態を示す薬剤を選択する工程、

を含む、前記方法。

[31] [1] ~ [30] のいずれかに記載の方法により薬剤を非放射性物質で標識することを含む、非放射性物質で標識された薬剤を含む薬物動態評価用組成物の製造方法。

[32] [31] に記載の方法で製造された、薬物動態評価用組成物。

[0014] また本発明は、以下の発明を提供する。

[A1] 薬物動態評価用組成物であって、

キレート剤が結合した薬剤を含み、

前記キレート剤に非放射性物質がキレートされている、前記組成物。

[A2] 非放射性物質が、金属である、[A1] に記載の組成物。

[A3] 非放射性物質が、リチウム、ベリリウム、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、カリウム、カルシウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ガリウム、ルビジウム、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、インジウム

、スズ、セシウム、バリウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀、タリウム、鉛、ビスマス、またはトリウムである、[A 2] に記載の組成物。

[A 4] 非放射性物質が、インジウムまたはユウロピウムである、[A 3] に記載の組成物。

[A 5] 非放射性物質がインジウムである、[A 4] に記載の組成物。

[A 6] キレート剤が、配位基としてアミノ基またはカルボキシル基を有するキレート剤である、[A 1] ～ [A 5] のいずれかに記載の組成物。

[A 7] キレート剤が、DOTA、EDTA、HEDTA、DHEDDA、1,3-PDTA、DTPA、TTHA、NTA、グルコン酸、HIMDA、ASDA、NTMP、HEDP、3-ヒドロキシー-2, 2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、およびポルフィリンから選択されるいずれかの化合物である、[A 6] に記載の組成物。

[A 8] キレート剤がDOTAである、[A 7] に記載の組成物。

[A 9] 薬剤が、抗体、ペプチド化合物、細胞、または核酸である、[A 1] ～ [A 8] のいずれかに記載の組成物。

[A 10] キレート剤が、薬剤のアミノ基またはチオール基との化学結合により、薬剤に結合している、[A 1] ～ [A 9] のいずれかに記載の標識化薬剤。

[0015] また本発明は、以下の発明を提供する。

[B 1] 薬剤の薬物動態を測定する方法であって、

(i) 非放射性物質で標識された薬剤を、非ヒト動物に投与する工程、および

(ii) 工程(i)の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程

を含む、前記方法。

〔B 2〕工程（i）において、それぞれ異なる非放射性物質で標識した２種類以上の薬剤を単一の非ヒト動物に投与する、〔B 1〕に記載の方法。

〔B 3〕非放射性物質の含有量を、分光分析または質量分析により測定する、〔B 1〕または〔B 2〕に記載の方法。

〔B 4〕非放射性物質の含有量を質量分析により測定する、〔B 3〕に記載の方法。

〔B 5〕質量分析が、プラズマイオン化質量分析、電子イオン化(EI)質量分析、化学イオン化(CI)質量分析、大気圧化学イオン化(APCI)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析、レーザー脱離質量分析(LDMS)、二次イオン質量分析(SIMS)、スパークソース質量分析(SSMS)、または表面電離質量分析(TIMS)である、〔B 4〕に記載の方法。

〔B 6〕質量分析が、プラズマイオン化質量分析である、〔B 5〕に記載の方法。

〔B 7〕質量分析が、誘導結合プラズマ(ICP)質量分析、マイクロ波誘導プラズマ(MIP)質量分析、またはグロー放電(GD)質量分析である、〔B 6〕に記載の方法。

〔B 8〕非ヒト動物が、実験動物である、〔B 1〕～〔B 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 9〕非ヒト動物が、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットである、〔B 8〕に記載の方法。

〔B 10〕非ヒト動物がマウスである、〔B 9〕に記載の方法。

〔B 11〕マウスが、担癌マウス、病態モデルマウス、またはトランスジェニックマウスである、〔B 10〕に記載の方法。

〔B 12〕工程（i）における薬剤の投与が、静脈内投与（i.v.）、皮下投与（s.c.）、経口投与（p.o.）、腹腔内投与（i.p.）、筋肉内投与（i.m.）、腫瘍投与（i.t.）、経肺投与、または経鼻投与である、〔B 1〕～〔B 11〕のいずれかに記載の方法。

[B 1 3] 薬物動態が臓器への分布であり、

生体試料が臓器であり、

(i i i) 工程 (i i) で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の臓器への分布を決定する工程

をさらに含む、[B 1] ~ [B 1 2] のいずれかに記載の方法。

[B 1 4]

(i v) 工程 (i i i) で決定した分布に基づき、薬物動態を数値化する工程

をさらに含む、[B 1 3] に記載の方法。

[B 1 5] 臓器が、血液、血漿、精巣、回腸、大腸、空腸、胃、肝臓、肺、腎臓、脾臓、心臓、大腿筋、および皮膚からなる群から選択される少なくとも1つである、[B 1 3] または [B 1 4] に記載の方法。

[B 1 6] 薬物動態が血中濃度推移であり、

生体試料が血液、血漿、または血清であり、

工程 (i i) が、工程 (i) の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を経時的に2回以上採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程であり、

(i i i) 工程 (i i) で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の血中濃度推移を決定する工程

をさらに含む、[B 1] ~ [B 1 2] のいずれかに記載の方法。

[B 1 7]

(i v) 工程 (i i i) で決定した血中濃度推移に基づき、薬物動態を数値化する工程

をさらに含む、[B 1 6] に記載の方法。

[B 1 8] 所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(i) 2つ以上の候補薬剤について、[B 1] ~ [B 1 7] のいずれかに記載の方法により薬物動態を測定する工程、および

(i i) 工程 (i) で測定した候補薬剤の薬物動態を比較し、所望の薬物動態を示す薬剤を選択する工程、
を含む、前記方法。

発明の効果

[0016] 本発明の方法では、測定対象物である薬剤を R I で標識する必要がない。そのため本発明の方法には、R I で標識された薬剤を用いた方法のような、R I の使用量制限に由来する測定可能な検体数の制限や実施場所の制限がなく、R I の専門知識を有する研究者を確保する必要もない。したがって、本発明によれば、医薬品の開発段階初期において、簡便に、高精度で、多数の候補物質の薬物動態を評価することが可能となる。

さらに本発明の方法によれば、標識に用いる非放射性物質の種類を変えた複数の候補物質を一匹の動物に投与し、それぞれを測り分けることができる。したがって、本発明は、薬物動態試験における動物の使用数削減に貢献することができる。

また本発明は、放射性物質を封じ込めるための専用設備を設置および維持するための資源の削減、放射性廃棄物の削減、および測定に携わる者の放射線への被ばくのリスクをなくすことに貢献することができる。

さらに本発明は、所望の薬物動態を有する薬剤を効率よくスクリーニングする方法を提供することにより、より薬理効果の高い医薬品の開発に貢献することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]実施例 1 で調製したIn-DOTA標識セツキシマブの、Ligand-Binding Assay (LBA) またはICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定の結果を示す。各点是一群 (n=3) の平均値で、エラーバーはS.D.を示す。

[図2]実施例 2 で調製したIn-DOTA標識セツキシマブの、投与24時間後のマウス組織中の濃度を示す。各点是一群 (n=3) の平均値で、エラーバーはS.D.を示す。

[図3]比較例 1 で調製したIn標識DTPA-セツキシマブの、LBAまたはICP-MSを用

いたマウス血漿中濃度測定の結果を示す。各点是一群 (n=3) の平均値で、エラーバーはS.D.を示す。

[図4]実施例3で調製したIodogen法により標識されたヨウ素標識デノスマブの、LBAまたはICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定の結果を示す。各点是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図5]実施例4で調製したヨウ素標識デノスマブおよびインジウムD0TA標識デノスマブの、投与後7日目におけるマウス組織中の濃度を示す。各バー是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図6]実施例4で調製したヨウ素標識デノスマブおよびインジウムD0TA標識デノスマブの、ICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定値、およびLBAを用いたマウス血漿中デノスマブ濃度測定値を用量正規化(dose normalized)した結果を示す。各点是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図7]実施例5で調製した4種の金属標識抗体の、投与7日後のマウス組織中の濃度を示す。各バー是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図8]実施例5で調製したインジウムD0TA標識セツキシマブ、テルビウムD0TA標識セツキシマブ、イットリウムD0TA標識セツキシマブ、およびホルミウムD0TA標識セツキシマブの、ICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定値、およびLBAを用いたマウス血漿中セツキシマブ濃度測定値を用量正規化(dose normalized)した結果を示す。各点是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図9]実施例6で調製したインジウムD0TA標識抗体の投与7日後のサル組織中の濃度を示す。各バー是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

[図10]実施例6で調製したインジウムD0TA標識抗体の、LBAまたはICP-MSを用いたサル血漿中濃度測定の結果を示す。各点是一群(n=3)の平均値で、エラーバーはS.Dを示す。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものではなく、記述した範囲内で種々の変形を加えた態様で実施できるものである。なお、本明細書において特記しない限り、数値範

囲を表す「A～B」は、「A以上（Aを含みかつAより大きい）、B以下（Bを含みかつBより小さい）」を意味する。また、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

[0019] Ⅰ．薬剤の標識方法

本発明の第一の態様は、薬剤の標識方法であって、

（i）反応基を有するキレート剤に、非放射性物質をキレートさせる工程、および

（i i）工程（i）で非放射性物質をキレートさせたキレート剤を、前記反応基を介して薬剤に結合させる工程

を含み、

該方法は、薬物動態の評価において使用するための方法である、前記方法に関する（以下、本発明の方法Ⅰとも称する）。

[0020] 本発明において「薬剤」は、反応基を介してキレート剤が結合でき、かつ薬物動態の評価対象となり得るものであれば特に限定されない。「薬剤」には、医薬品およびその候補品が含まれ、例えば、ペプチド化合物、核酸、抗体などのタンパク質、細胞などが挙げられる。キレート剤に対して十分に大きい分子や細胞などの薬剤においては、キレート剤が結合してもその薬物動態に影響が表れにくいと考えられる。そのような観点から、本発明の薬剤がペプチド化合物、核酸、タンパク質などの分子である場合、その分子量は、500以上であることが好ましい。好ましい態様において、薬剤は、ペプチド化合物、核酸、抗体、または細胞であり、特に好ましくは抗体である。

[0021] 本発明において「ペプチド化合物」とは、アミノ酸がアミド結合あるいはエステル結合して形成される化合物をいう。本発明において、ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」は、「天然アミノ酸」、または「アミノ酸類縁体」であり得る。「アミノ酸」、「天然アミノ酸」、および「アミノ酸類縁体」はそれぞれ、「アミノ酸残基」、「天然アミノ酸残基」、および「アミノ酸類縁体残基」ということがある。

[0022] ペプチド化合物を構成するアミノ酸は、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、ま

たは γ -アミノ酸であり得る。 α -アミノ酸の場合、L型アミノ酸でもD型アミノ酸でもよく、 α , α -ジアルキルアミノ酸でもよい。アミノ酸側鎖の選択は特に制限を設けないが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基から自由に選択される。それぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も例えば、N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子、P原子を含む任意の官能基の中から自由に選択される（すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基など）。

[0023] 本発明において天然アミノ酸とは、 α -アミノカルボン酸（ α -アミノ酸であり、天然に存在するタンパク質に含まれる20種類のアミノ酸、具体的にはGly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg、およびProを指す。

[0024] 「アミノ酸類縁体」は、非天然型アミノ酸（例えば、非天然型の α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸）を含む。 α -アミノ酸の場合、D型アミノ酸でもよく、 α , α -ジアルキルアミノ酸でもよい。 β -または γ -アミノ酸の場合も、 α -アミノ酸と同様に、任意の立体配置が許容される。アミノ酸類縁体の側鎖（主鎖メチレン）は特に制限されないが、水素原子の他にも例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはシクロアルキルを有し得る。それぞれは1つ以上の置換基を有していてもよく、それら置換基は例えば、ハロゲン原子、N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子、P原子を含む任意の官能基の中から選択することができる。アミノ酸類縁体の主鎖アミノ基は、非置換（ NH_2 基）でもよく、置換（即ち、 NHR 基：Rは置換基を有していてもよいアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはシクロアルキルを示し、またプロリンのようにN原子に結合した炭素鎖と α 位の炭素原子とが環を形成していてもよい。該置換基は、側鎖の置換基

と同様であり、例えば、ハロゲン、オキシ、ヒドロキシなどが挙げられる。
）されていてもよい。また、「アミノ酸類縁体」には、「アミノ酸」のアミノ基が水酸基に置き換わった、ヒドロキシカルボン酸も含まれる。当該ヒドロキシカルボン酸は、他のアミノ酸類縁体と同様に、様々な置換基を有していてもよい。ヒドロキシカルボン酸の立体配置はアミノ酸のL型、D型のいずれに対応するものでもよい。その側鎖は特に制限されないが、例えば置換されていてもよいアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、シクロアルキルなどの中から選択される。「アミノ酸類縁体」は、当業者に知られているものを利用することができ、例えば、WO 2017/150732が参照される。

[0025] ペプチド化合物の分子形は、直鎖状、環状、あるいは直鎖部を有する環状のものであり得る。

[0026] ペプチド化合物中のアミド結合あるいはエステル結合の数（アミノ酸残基の数・長さ）は特に限定されないが、例えば、分子量500以上であって、抗体などのタンパク質の分子量未満となる任意の数であり得る。ペプチド化合物を構成するアミノ酸の数は、環状部と直鎖部を合わせて、例えば50残基以下であり得、30残基以下が好ましく、13残基以下であることがより好ましい。またペプチド化合物を構成するアミノ酸の数は、例えば5残基以上であり得、高い代謝安定性を獲得するためには、9残基以上であることがより好ましい。ペプチド化合物が環状部を有する場合には、環状部を構成するアミノ酸の数は5～12残基であることが好ましく、より好ましくは5～11残基であり、さらに好ましくは7～11残基であり、特に好ましくは9～11残基である。直鎖部のアミノ酸の数は、0～8残基であることが好ましく、より好ましくは0～3残基である。

[0027] 本発明において「核酸」とは、DNA、RNA、それらの類縁体をいい、天然の核酸であっても合成された核酸であってもよい。類縁体としては、PNA、LNA等の人工核酸が挙げられる。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。また核酸は、修飾体であってもよい。修飾体としては、ヌクレオシド間

結合、塩基および／または糖において化学的に修飾されたもの、5'末端および／または3'末端に修飾基を有するものなどが挙げられる。ヌクレオシド間結合の修飾としては、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、メチルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合、およびメチルホスホノチオエート結合のいずれか、またはそれらの組み合わせへの変更が挙げられる。塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシル、2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。糖の修飾としては、2'-フルオロリボース、2'-O-メチルリボースへなどへの変更が挙げられる。

核酸は、その機能または用途に応じて、siRNA、アンチセンスRNA、miRNA、shRNA、リボザイム、またはアプタマーと呼ばれることもある。核酸には、Toll様受容体9（TLR9）に作用して自然免疫を活性化させるCpGオリゴヌクレオチドなどの、アジュバント効果を有するオリゴヌクレオチドも含まれる。

核酸の長さは、反応基を介してキレート剤が結合できれば特に制限されず、例えば、4～100塩基長、10～50塩基長、10～40塩基長、または10～30塩基長の範囲であり得る。

[0028] 本発明における薬剤としての「タンパク質」とは、ペプチド結合を介して連結されたアミノ酸の長鎖ポリマーであり、ペプチド化合物も含まれ得る。タンパク質は、天然に存在するものであっても、組換えタンパク質などの天然に存在しないものであってもよい。タンパク質としては、例えば、サイトカイン、生理活性ペプチド、生体酵素、抗体、またはそれらの変異体が挙げられる。

[0029] 本発明において「抗体」とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンまたはその抗原結合性断片をいう。抗体は、それが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては、免疫グロブリンのアイソタイプ（すなわちIgG、IgA、IgD、IgE

、およびIgM) およびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のサブクラスが知られている。好ましい態様において、本発明の方法Iにおける薬剤としての抗体は、IgGであり得る。

[0030] 抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また本発明においては、異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体などであってもよい。また抗体は、二重特異性抗体（バイスペシフィック抗体）や多重特異性抗体であってもよい。

[0031] 抗体は、「抗原結合ドメイン」を含む限り、抗体の断片、すなわち抗原結合性断片であってもよい。抗体の断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFvやVHH）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。抗体における「抗原結合ドメイン」は、目的とする抗原に結合するドメインであればよく、例えば、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域である。

[0032] また、本発明の一実施態様において、抗体は、抗原結合ドメインと、抗原結合ドメインの抗原結合活性を抑制する抑制ドメインを有する運搬部分とを含み、かつ単独で存在する抗原結合ドメインより長い半減期を有するポリペプチドであり得る（WO 2019/107380参照）。この実施態様に係るポリペプチドでは、抗原結合ドメインがポリペプチドから遊離することで、抗原結合活性が遊離前より高くなる。言い換えれば、抗原結合ドメインがポリペプチドから遊離していない状態では、その抗原結合活性は抑制ドメインにより抑制された状態にある。抗原結合ドメインの抗原結合活性が抑制ドメインにより抑制されることを確認する方法として、FACS (fluorescence activated cell sorting)、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)、ECL (electrogenerated chemiluminescence、電気化学発光法)、SPR (Surface Plasmon Resonance、表面プラズモン共鳴) 法 (Biacore)、BLI (Bio-Layer

r Interferometry) 法 (Octet) 等の方法がある。この実施態様に係るポリペプチドでは、抗原結合ドメインがポリペプチドから遊離していない状態における結合活性に比べて、抗原結合ドメインがポリペプチドから遊離した状態における抗原結合活性は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、または3000倍以上の値となる。この実施態様に係る特定のポリペプチドでは、遊離前の抗原結合ドメインは、前記方法中から選ばれる一つの方法で抗原結合ドメインの抗原結合活性の測定を行うとき、抗原結合ドメインと抗原との結合が見られない。

またこの実施態様に係るポリペプチドでは、ポリペプチド中の運搬部分は切断サイトを介して抗原結合ドメインと連結されていてもよい。この場合、切断サイトが切断されることによって抗原結合ドメインがポリペプチドから遊離可能になるので、このような態様における抗原結合活性の比較は、ポリペプチドの切断前後の抗原結合活性を比較することにより行うことができる。即ち、未切断のポリペプチドを用いて測定した抗原結合活性に比べて、切断後のポリペプチドを用いて測定した抗原結合活性は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、または3000倍以上の値となる。この実施態様に係る特定のポリペプチドでは、未切断のポリペプチドは、前記方法中から選ばれる一つの方法で抗原結合活性の測定を行うとき、抗原結合ドメインと抗原との結合が見られない。

さらにこの実施態様に係るポリペプチドでは、前記切断サイトはプロテアーゼにより切断され得る。この場合、抗原結合活性の比較は、ポリペプチドのプロテアーゼ処理前後の抗原結合活性を比較することにより行うことができる。即ち、プロテアーゼ処理を行っていないポリペプチドを用いて測定した抗原結合活性に比べて、プロテアーゼ処理後のポリペプチドを用いて測定

した抗原結合活性は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、または3000倍以上の値となる。この実施態様に係る特定のポリペプチドでは、プロテアーゼ未処理のポリペプチドは、前記方法中から選ばれる一つの方法で抗原結合活性の測定を行うとき、抗原結合ドメインと抗原との結合が見られない。

これらの抗体を作製する方法は当業者に公知である（例えば、WO 2019/107380、WO 2013/081143など参照）。

[0033] また抗体には、1つまたは複数の細胞傷害剤（例えば化学療法剤または化学療法薬、増殖阻害剤、または毒素（例えば細菌、真菌、植物もしくは動物起源のタンパク質毒素、酵素的に活性な毒素、もしくはそれらの断片））にコンジュゲートされた抗体などのイムノコンジュゲートも含まれる。

[0034] 一態様において、イムノコンジュゲートは、抗体が、これらに限定されるものではないが以下を含む1つまたは複数の薬剤にコンジュゲートされた、抗体-薬剤コンジュゲート(antibody-drug conjugate: ADC)である：メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、および欧州特許第0,425,235号B1参照）；例えばモノメチルオーリスタチン薬剤部分DEおよびDF（MMAEおよびMMAF）（米国特許第5,635,483号および第5,780,588号および第7,498,298号参照）などのオーリスタチン；ドラスタチン；カリケアマイシンまたはその誘導体（米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、および第5,877,296号；Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)；ならびにLode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998) 参照）；ダウノマイシンまたはドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)；King et al.

l., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002) ; および米国特許第6,630,579号参照) ; メトトレキサート ; ビンデシン ; ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセルなどのタキサン ; トリコテセン ; ならびにCC1065。

[0035] 別の態様において、イムノコンジュゲートは、これらに限定されるものではないが以下を含む酵素的に活性な毒素またはその断片にコンジュゲートされた抗体を含む : ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖 (緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来) 、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) タンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S) 、ツルレイシ (*Momordica charantia*) 阻害剤、クルシン (curcin)、クロチン、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコテセン。

[0036] 抗体および細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質連結剤を用いて作製され得る。例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、アジプイミド酸ジメチルHCl) 、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル) 、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド) 、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン) 、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン) 、ジイソシアネート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート) 、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) である。例えば、リシン免疫毒素は、Vittetta et al., Science 238:1098 (1987) に記載されるようにして調製され得る。イムノコンジュゲートは、抗体と細胞傷害剤との間にリンカーを含み得る。リンカーは、細胞内での細胞傷害薬の放出を促進する「切断可能なり

ンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992) ; 米国特許第5,208,020号) が使用され得る。

[0037] 本明細書のイムノコンジュゲートまたはADCは、(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから) 市販されているBMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびにSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート) を含むがこれらに限定されない架橋試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に考慮するが、これらに限定されない。

[0038] 本発明における薬剤としての「細胞」は、薬物動態の評価対象となり得るものであれば特に限定されないが、例えば、幹細胞移植、養子細胞免疫療法などの細胞療法に用いられる細胞が含まれる。そのような細胞としては、例えば、各種の幹細胞 (間葉系幹細胞、造血幹細胞、ES細胞、iPS細胞など)、キメラ抗原受容体発現T細胞 (CAR-T細胞)、T細胞受容体発現T細胞 (TCR-T細胞) などが挙げられる。

[0039] 本発明において「薬物動態」 (Pharmacokinetics、PKともいう) とは、薬剤が投与された後の生体内で吸収、分布、代謝、および排泄という一連の過程を経た、生体内の当該薬剤の濃度 (量) の推移をいう。

薬剤が投与された後、生体内では、吸収 (absorption)、分布 (distribution)、代謝 (metabolism)、および排泄 (excretion) の過程が並行して進行する。これらの過程を分解して記述するための基本的なPKパラメータとして、(1) バイオアベイラビリティ (bioavailability: F)、(2) 分布容積 (volume of distribution: VdまたはV)、(3) 血中非結合形分率 (fraction unbound in blood: fuB)、(4) クリアランス (clearance: CL)、および (5) 尿中排泄率 (cumulative amount of drug excreted in urine: Ae) が確立されている (計量生物学 Vol. 36, Special Issue, S 3-S 18 (2015))

）。バイオアベイラビリティの指標として、血中濃度－時間曲線下面積（AUC）、最高血中濃度（C_{max}）、最高血中濃度到達時間（T_{max}）などが知られている。分布容積の指標として、定常状態における分布容積（V_{ss}）などが知られている。その他のPKパラメータとして、血中濃度半減期（t_{1/2}）、平均滞留時間（MRT）などが知られている。

[0040] 本発明の方法Ⅰは、薬物動態の評価において使用するための方法である。本発明において、薬剤は薬物動態の評価対象であり、薬物動態の評価のために非放射性物質で標識される。すなわち、本発明の方法によって得られる標識された薬物は、薬物動態の評価において使用される。薬物動態の評価は、例えば、「非臨床試験薬物動態試験ガイドライン」（医薬審第496号 平成10年6月26日）などの公知の方法に従って適宜実施することができ、また後述の本発明の方法ⅠⅠに従って実施することもできる。

[0041] 本発明において「キレート剤」は、医薬品の分野において使用され得るものであれば特に限定されず、例えば、当業者が通常用いるキレート剤の中から適宜選択することができる。キレート剤としては、例えば、DOTA（1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸）、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、HEDTA（N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-三酢酸）、DHEDDA（ジヒドロキシエチルエチレンジアミン二酢酸）、1,3-PDTA（1,3-プロパンジアミン四酢酸）、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）、TTHA（トリエチレントトラミン-N,N,N',N'',N''',N'''-六酢酸）、NTA（ニトリロ三酢酸）、グルコン酸、HIMDA（ヒドロキシエチルイミノ二酢酸）、ASDA（L-アスパラギン酸二酢酸）、NTMP（ニトリロトリスメチレンホスホン酸）、HEDP（1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸）、3-ヒドロキシ-2,2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、フェナントロリン、ポルフィリン、クラウンエーテルなどが挙げられる。

[0042] 好ましい態様において、反応基を有するキレート剤は、配位基としてアミノ基またはカルボキシル基を有するキレート剤であり、例えばDOTA、E

DTA、HEDTA、DHEDDA、1, 3-PDTA、DTPA、TTTA、NTA、グルコン酸、HIMDA、ASDA、NTMP、HEDP、3-ヒドロキシー-2, 2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、およびポルフィリンから選択されるいずれかの化合物に反応基を導入したキレート剤であり得、より好ましくは反応基を導入したDOTAまたはDTPAである。

[0043] キレート剤における「反応基」は、薬剤との共有結合を形成し得る基であり、薬剤の種類および薬剤とキレート剤との結合に使用する反応の種類に応じて、適宜選択することができる。薬剤とキレート剤との結合は、生体内で容易に切断されないものであることが好ましい。

例えば、薬剤に含まれるアミノ基（NH₂基）に結合できる反応基としては、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHSエステル）、イソチオシアノ基（ITC基）、スルホン酸クロリド、カルボン酸クロリド、エチレンオキシド、アルキルクロリド、アルデヒド基、カルボン酸無水物などが挙げられ、好ましくはNHSエステルまたはITC基であり、より好ましくはITC基である。

例えば、薬剤に含まれるチオール基（SH基）に結合できる反応基としては、マレイミド基、ブromoアセトアミド基などが挙げられ、好ましくはマレイミド基である。

[0044] 薬剤が核酸である場合には、例えば、カルボジイミド架橋剤（例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）、N',N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）など）、光反応性架橋剤（例えば、フェニルアジド、ソラレンなど）を用いて、非放射性物質をキレートさせた、反応基を有するキレート剤を薬剤に結合させることができる。カルボジイミド架橋剤を用いる場合、反応基はアミノ基である。光反応性架橋剤を用いる場合、反応基は、求核性基または活性水素基である。Bioconjugate Chem., vol.1, No.3, 1990, 165-187参照。非放射性物質をキレートさせた、反応基を有するキレート剤を、薬剤を構成するヌクレオチドに結合させたのちに、薬剤である核酸を合成することも、本発明の方法Iに含まれる。

また薬剤が核酸である場合には、キレート剤を結合させたヌクレオチド（反応基を有するキレート剤に該当する）に非放射性物質をキレートさせたのち、それをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、T4 RNA リガーゼ、DNAポリメラーゼなどの酵素により核酸に取り込ませることで、反応基を有するキレート剤を薬剤に結合させることもできる。この場合、反応基は、ヌクレオチドに含まれている。

薬剤がRNAである場合には、過ヨウ素酸酸化によりリボースのジオールを開裂させ、生成した反応性アルデヒド基を利用して、反応基を有するキレート剤を薬剤に結合させることもできる。この場合、反応基はヒドラジド基である。

[0045] 反応基を導入したキレート剤は、化学合成法による合成などの当業者に公知の方法により作製することができる。

[0046] 好ましい態様において、薬剤がアミノ基を有する場合、反応基を有するキレート剤は、反応基を有するDOTAであり、反応基はITC基であり得る。また薬剤が核酸である場合、反応基としてアミノ基を有するキレート剤をカルボジイミド架橋剤を用いて薬剤のカルボキシル基に結合させることが好ましい。

[0047] 本発明において「非放射性物質」とは、キレート剤によってキレートされ得る、放射性を有しない物質をいう。非放射性物質は、典型的には金属である。金属としては、リチウム、ベリリウム、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、カリウム、カルシウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ガリウム、ルビジウム、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、インジウム、スズ、セシウム、バリウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、

金、水銀、タリウム、鉛、ビスマス、およびトリウムが挙げられる。好ましい態様において、非放射性物質は、インジウムまたはユウロピウムであり、より好ましくはインジウムである。

[0048] 工程（i）では、反応基を有するキレート剤に非放射性物質をキレートさせる。通常、非放射性物質とキレート剤とを適当な溶媒中で接触させることにより、この反応を行うことができる。非放射性物質およびキレート剤の濃度、使用する溶媒、pH、接触時間、温度などのキレート反応の条件は、非放射性物質およびキレート剤の種類に応じて適宜設定することができる。

[0049] 好ましい態様において、キレート反応ののち、非放射性物質をキレートさせたキレート剤は精製され得る。それにより、キレートされなかった非放射性物質が除去される。精製には、当業者に一般的に知られた技術を用いることができ、例えば、カラムクロマトグラフィー、再結晶などによる精製が挙げられる。

[0050] 工程（ii）では、工程（i）で非放射性物質をキレートさせたキレート剤を、前記反応基を介して薬剤に結合させる。この結合反応の条件は、反応基と薬剤との組み合わせに応じて適宜設定することができる。薬剤の濃度は、0.01 mg/mLよりも高いことが好ましい。例えば、反応基がITC基であり、薬剤がアミノ基を含む場合、反応基を有するキレート剤と薬剤とをリン酸緩衝生理食塩水などのバッファー中で混合し、室温で静置することにより、キレート剤と薬剤とを結合させることができる。

[0051] 好ましい態様において、結合反応ののち、キレート剤が結合した薬剤（すなわち非放射性物質で標識された薬剤）は精製され得る。それにより、薬剤に結合しなかったキレート剤が除去される。精製には、当業者に一般的に知られた技術を用いることができ、例えば、脱塩カラム、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過、透析などによる精製が挙げられる。

[0052] 本発明の方法Iにより非放射性物質で標識された薬剤を含む組成物は、RIを使用しない薬物動態の評価に用いられる。したがって、別の側面において、本発明は、本発明の方法Iにより薬剤を非放射性物質で標識することを

含む、非放射性物質で標識された薬剤を含む薬物動態評価用組成物の製造方法、および該方法により製造された薬物動態評価用組成物を提供する。当該薬物動態評価用組成物を用いれば、生体試料中の薬剤濃度を分光分析または質量分析（例えばICP-MSなど）によって正確に測定することができ、薬物動態を適切に評価することができる。

[0053] 薬物動態評価用組成物は、非放射性物質で標識された薬剤のほか、適切な溶媒を含み得る。そのような溶媒としては、例えばリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、20 mM His-HCl, 150mM NaCl, pH6.0 バッファー、20 mM histidine-aspartate buffer containing 150 mM arginine-aspartate and 0.5 mg/mL kolliphor P188, pH 6.0、Hank's平衡塩溶液(HBSS)、10% DMSO/60% PEG300 in salineなどが挙げられる。薬剤が抗体またはペプチド化合物である場合には、溶媒に0.05% tween 20を含有させてもよい。

[0054] 薬物動態評価用組成物には、薬学的に許容される担体が添加されていてもよい。薬学的に許容される担体とは、薬剤の投与対象に対して無毒な、薬剤以外の成分を意味する。薬学的に許容される担体としては、例えば、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を挙げることができる。

[0055] 1.1. 薬剤の薬物動態を測定する方法

本発明の第二の態様は、薬剤の薬物動態を測定する方法であって、

(i) 本発明の方法1により、非放射性物質で薬剤を標識する工程、

(ii) 工程(i)で標識された薬剤を、非ヒト動物に投与する工程、および

(iii) 工程(ii)の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程

を含む、前記方法に関する（以下、本発明の方法1とも称する）。

[0056] 工程(i)は、上記1の記載に従って行われる。

[0057] 工程(ii)における非ヒト動物への投与のために、工程(i)において非放射性物質で標識された薬剤は、適切な溶媒に溶解される。そのような溶媒としては、例えばリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、20 mM H

is-HCl, 150mM NaCl, pH6.0 バッファー、20 mM histidine-aspartate buffer containing 150 mM arginine-aspartate and 0.5 mg/mL kolliphor P188, pH 6.0、Hank's平衡塩溶液(HBSS)、10% DMSO/60% PEG300 in salineなどが挙げられる。抗体またはペプチド化合物の投与時には、溶媒に0.05% tween 20を含有させてもよい。溶媒には、緩衝液、賦形剤、安定化剤、保存剤等の薬学的に許容される担体が添加されていてもよい。

[0058] 工程 (i i) における非ヒト動物は、ヒト以外の動物であって、薬物動態の評価に用いられ得るものであれば特に限定されず、例えば、ヒトを除く哺乳類（サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、モルモットなど）が挙げられる。好ましい態様において、非ヒト動物はマウスであり得る。マウスは、例えば、担癌マウス（例えば、ヒトがん細胞株を免疫不全マウスに移植した異種移植 (xenograft transplantation) マウス、マウスがん細胞を免疫系を完全に保持している同系マウスに移植した同種移植 (syngeneic transplantation) マウスなど）、病態モデルマウス、またはトランスジェニックマウスであってもよい。非ヒト動物として、市販されているものを使用してもよい。

[0059] 工程 (i i) における「投与」は、薬剤の種類に応じて適宜選択することができ、例えば、静脈内投与 (i.v.)、皮下投与 (s.c.)、経口投与 (p.o.)、腹腔内投与 (i.p.)、筋肉内投与 (i.m.)、腫瘍投与 (i.t.)、経肺投与、経鼻投与などを挙げることができる。好ましい態様において、薬剤が抗体である場合、薬剤の投与は静脈内投与であり得る。薬剤の投与は、単回投与であってもよく、必要に応じて複数回反復して行ってもよい。また投与量および投与間隔は、薬剤の種類に応じて適宜調整することができる。

[0060] 工程 (i i i) では、薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取する。生体試料には、任意の組織および臓器が含まれ、例えば、血液、血漿、血清、胆汁、尿、糞、脳、精巣、卵巣、肺、心臓、胃、回腸、大腸、空腸、腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、筋肉、皮膚などが挙げられる。生体試料の採取は、その種類に応じて通常使用される方法により行うことができる。例えば、血液

は、非ヒト動物から静脈採血によって採取され得る。血清は、抗凝固剤の入っていない採血管で採血した後、血餅を凝集させ、遠心分離により血餅を除去することにより調製することができる。血漿は、ヘパリンなどの抗凝固剤の入った採血管で採血した後、遠心分離により血球成分を除去することにより調製することができる。固体組織または固体臓器は、穿刺針を用いた方法、外科的に切開して得る方法などにより採取され得る。

[0061] 生体試料は、薬剤を投与した後、一定の時間が経過した後に採取される。薬剤投与から採取までの時間は、薬剤の種類、評価する薬物動態などに応じて適宜設定することができ、例えば数分間～数日間に設定することができる。例えば、抗体については5分～28日間、ペプチド化合物については2分～7日間、核酸については2分～14日間、細胞については5分～14日間に設定することができる。生体試料の採取の回数は、評価する薬物動態に応じて適宜設定され、単回であっても複数回であってもよい。例えば、特定の組織または臓器における薬剤の存在量の推移（例えば血中濃度推移）を測定する場合には、経時的に複数回、生体試料が採取される。また、組織または臓器における薬剤の分布を測定する場合には、通常、薬剤の投与後の特定の時点で生体試料が単回採取される。

[0062] 生体試料中の非放射性物質の含有量は、無機分析の分野において一般的に使用される方法により測定することができる。測定効率などの観点から、分光分析または質量分析により測定することが好ましい。

[0063] 分光分析としては、例えば、原子吸光分析法、ICP発光分光分析法、蛍光X線分析法などが挙げられる。

[0064] 質量分析におけるイオン化法は、非放射性物質の種類、試料の形態などに応じて適宜選択することができ、例えば、プラズマイオン化、電子イオン化（EI）、化学イオン化（CI）、大気圧化学イオン化（APCI）、エレクトロスプレーイオン化（ESI）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）などが挙げられる。プラズマイオン化には、例えば、誘導結合プラズマ（ICP）によるイオン化、マイクロ波誘導プラズマ（MIP

）によるイオン化、グロー放電（GD）によるイオン化などが含まれる。

質量分析としては、例えば、プラズマイオン化質量分析、電子イオン化（EI）質量分析、化学イオン化（CI）質量分析、大気圧化学イオン化（APCI）質量分析、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析、レーザー脱離質量分析（LDMS）、二次イオン質量分析（SIMS）、スパークソース質量分析（SSMS）、表面電離質量分析（TIMS）などが挙げられる。好ましい態様において、質量分析は、プラズマイオン化質量分析であり、より好ましくは、誘導結合プラズマ（ICP）質量分析、マイクロ波誘導プラズマ（MIP）質量分析、またはグロー放電（GD）質量分析であり、最も好ましくは、ICP質量分析である。

[0065] 生体試料には、含有量の測定に使用する方法及び装置に応じて、前処理を施してもよい。前処理としては、無機分析において一般的に使用される処理を用いることができ、例えば、酸分解、マイクロ波処理、燃焼、加圧酸分解、アルカリ溶融、乾式灰化、抽出、溶出、共沈などの化学的処理が挙げられる。例えば、ICP質量分析により含有量を測定する場合、前処理は、生体試料に硝酸を加え、マイクロ波処理することにより行われ得る。

[0066] 生体試料中の非放射性物質の含有量から、薬剤の相対的な含有量、例えば異なる臓器における薬剤の分布などを知ることができ、それにより薬剤の薬物動態を測定および評価し得る。

[0067] あるいは、非放射性物質の薬剤への標識効率を算出し、それにより非放射性物質の含有量を薬剤の含有量に換算することで、薬物の絶対的な含有量を知ることができる。それにより薬物動態を測定および評価し得る。したがって、好ましい態様において、工程（i）において非放射性物質で標識された薬剤について、非放射性物質の薬剤への標識効率が測定され得る。標識効率は、薬剤が分子である場合には薬剤1分子あたりに結合した非放射性物質の分子数の百分率であり、薬剤が細胞である場合には薬剤1個あたりに結合した非放射性物質の物質質量（mol）である。非放射性物質で標識した薬剤を含む

溶液について、非放射性物質の濃度および薬剤の濃度をそれぞれ測定し、標識効率を算出する。薬剤が分子である場合の標識効率は、溶液中の非放射性物質標識濃度 (mol/L) / 薬剤濃度 (mol/L) × 100 の値 (%) を算出することにより決定される。薬剤が細胞である場合の標識効率は、溶液中の非放射性物質標識濃度 (mol/L) / 薬剤濃度 (個/L) の値 (mol/個) を算出することにより決定される。非放射性物質の濃度は、工程 (iii) と同様の方法により測定することができる。薬剤の濃度は、薬剤の種類に応じて適切な方法を用いて測定することができる。例えば、薬剤が抗体などのタンパク質である場合には、BCA法、Bradford法、Lowry法、紫外吸光光度法などの方法を用いることができる。薬剤がペプチド化合物である場合には、アミノ酸分析、紫外吸光光度法などの方法を用いることができる。薬剤が核酸である場合には、吸光分析、蛍光分析などの方法を用いることができる。薬剤が細胞である場合には、FACS、セルカウントなどの方法を用いることができる。

[0068] 本発明の方法 I I において、薬物動態を評価するために、薬物動態を数値化する工程をさらに含み得る。「薬物動態を数値化する」ことには、上記 I に記載のいずれかの PK パラメータを算出することが含まれ、それらの算出方法は当業者に周知である。

[0069] 工程 (ii) における投与、工程 (iii) における生体試料の採取、ならびに薬物動態の測定および評価は、「非臨床試験薬物動態試験ガイドライン」(医薬審第 496 号 平成 10 年 6 月 26 日) などの公知のガイドラインに従って行うことができる。

[0070] 一実施形態において、本発明の方法 I I では、それぞれ異なる非放射性物質で 2 種類以上の薬剤を標識し、それらを単一の非ヒト動物に投与することができる。それにより、2 つ以上の薬剤の薬物動態を測定する際に使用する実験動物の数を削減することができる。上記の分光分析または質量分析は、異なる非放射性物質を同時に測定することができる方法であり、生体試料中の異なる非放射性物質の含有量を一度に測定することができる。薬剤は非ヒト動物に同時に投与することができ、ここで「同時に投与する」ことには、

薬剤の投与から生体試料の採取までの期間に対して十分に短い時間、例えば 1 分間～数時間（例えば 5 分間、10 分間、30 分間、1 時間など）の間に、別々に投与することも含まれる。

[0071] 本発明の方法 11 の好ましい態様において、薬物動態は、臓器への分布であり得る。この場合、生体試料は臓器であり、

（iv）工程（iii）で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の臓器への分布を決定する工程、をさらに含む（以下、本発明の方法 11-1 ともいう。）。

[0072] 本発明の方法 11-1 において、臓器は、本発明の方法 11 に関して記載したとおりであり、例えば、血液、血漿、赤血球、唾液腺、甲状腺、食道、回腸、大腸、空腸、胃、腋窩リンパ節、胸腺、肺、心臓、大動脈、肝臓、脾臓、脾臓、副腎、白色脂肪、腸間膜リンパ節、精巣、前立腺、膀胱、腎臓、筋肉、坐骨神経、骨髓、皮膚、褐色脂肪、ハーダー腺、眼、小脳、大脳、延髄、脳下垂体、脊髄、無腺胃、腺胃、小腸、乳腺、卵巣、子宮、胎盤、羊水、胎児、および（皮下移植担癌マウスの）ガンからなる群から選択される少なくとも 1 つ（例えば、2 つ以上）が挙げられ、好ましくは、血液、血漿、精巣、回腸、大腸、空腸、胃、肝臓、肺、腎臓、脾臓、心臓、大腿筋、および皮膚からなる群から選択される少なくとも 1 つ（例えば、2 つ以上）である。

[0073] 工程（iv）では、非放射性物質の含有量から推定した薬剤の含有量、または標識効率を用いて換算した薬剤の含有量から、薬剤の臓器への分布を決定する。それにより、所望の臓器分布を有する薬剤を選択するための指標が提供され得る。

[0074] 本発明の方法 11-1 は、（v）工程（iv）で決定した分布に基づき、薬物動態を数値化する工程をさらに含んでもよい。ここで数値化は、上記薬物動態のパラメータに関する数値を算出することを意味し、例えば、全身の薬物の分布パターンを表すために各臓器または組織における分布量を投与量で除した値を百分率で表した値（「% of Dose」で表される）を算出すること

、各臓器または組織の単位重量当たりの分布量を表すために各臓器または組織における分布量を当該臓器または組織の重量で除した濃度（例えば「 $\mu\text{g/g}$ tissue」で表される）を算出すること、血中濃度に対する臓器または組織における濃縮の程度を評価するために臓器または組織における濃度を血中濃度で除した値「Tissue/Plasma ratio」を算出すること、短期間の経時的な取り込み量を評価するためにインテグレーションプロットにより取り込みクリアランスを算出すること、生理学的薬物動態（PBPK）モデルにあてはめ臓器または組織中の投与物の濃度から臓器または組織への移行性を表す組織－血漿間分配係数（Kp）を算出することなどが含まれる。これらのパラメータは、当該技術分野において公知の方法に従って算出される。

[0075] また本発明の方法 11 の別の好ましい態様において、薬物動態は、血中濃度推移であり得る。この場合、生体試料は、血液、血漿、または血清であり、工程（i i i）は、工程（i i）の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を経時的に 2 回以上採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程であり、

（i v）工程（i i i）で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の血中濃度推移を決定する工程、をさらに含む（以下、本発明の方法 11-2 ともいう。）。

[0076] 本発明の方法 11-2 において、生体試料は、好ましくは血漿である。

[0077] また工程（i i）における薬剤の投与は、通常 1 回のみ行われる。

[0078] 工程（i i i）において、生体試料を採取する回数は、薬剤の種類などに応じて適宜調整することができ、例えば 3 回以上、4 回以上、5 回以上、6 回以上であり得る。また各採取の間隔は、薬剤の種類などに応じて適宜調整することができ、例えば数分～数日に設定することができ、一定でなくてもよい。

[0079] 工程（i v）では、非放射性物質の含有量から推定した薬剤の含有量、または標識効率を用いて換算した薬剤の含有量から、薬剤の血中濃度推移を決定する。それにより、所望の血中濃度推移を有する薬剤を選択するための指

標が提供され得る。

[0080] 本発明の方法ⅠⅠ－2は、(v)工程(i v)で決定した血中濃度推移に基づき、薬物動態を数値化する工程をさらに含んでもよい。ここで数値化には、血中濃度推移に基づきPKパラメータ、例えば、クリアランス(CL)、分布容積(VdまたはV)、血中濃度－時間曲線下面積(AUC)、最高血中濃度(Cmax)、最高血中濃度到達時間(Tmax)、血中濃度半減期($t_{1/2}$)などを算出することが含まれる。これらのパラメータは、当該技術分野において公知の方法に従って算出される。

[0081] 本発明の方法ⅠⅠによれば、RⅠを使用することなく、RⅠを使用した場合と同等に、薬剤の薬物動態の評価を正確に行うことが可能となる。

[0082] ⅠⅠⅠ. 所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法

本発明の第三の態様は、所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(i) 2つ以上の候補薬剤について、本発明の方法ⅠⅠにより薬物動態を測定する工程、および

(i i) 工程(i)で測定した候補薬剤の薬物動態を比較し、所望の薬物動態を示す薬剤を選択する工程、

を含む、前記方法に関する(以下、本発明の方法ⅠⅠⅠとも称する)。

[0083] 工程(i)は、上記ⅠおよびⅠⅠに従って行うことができる。工程(i)において、2つ以上の候補薬剤は、それぞれ上記Ⅰに記載した薬剤から選択される。

[0084] 工程(i i)における所望の薬物動態を示す薬剤の選択には、薬物動態を数値化した上で、各薬剤の数値を比較することにより行うことができる。また、薬物動態が臓器への分布である場合には、最も薬理効果を発揮すると予想される臓器分布を示す薬剤を選択することができる。

[0085] 一実施形態において、本発明の方法ⅠⅠⅠでは、2つ以上の候補薬剤をそれぞれ異なる非放射性物質で標識し、それらを単一の非ヒト動物に投与することができる。それにより、スクリーニングに使用する実験動物の数を削減

することができる。上記ⅠⅠに記載の分光分析または質量分析は、異なる非放射性物質を同時に測定することができる方法であり、生体試料中の異なる非放射性物質の含有量を一度に測定することができる。薬剤は同時に投与することができる、ここで「同時に投与する」ことには、薬剤の投与から生体試料の採取までの期間に対して十分に短い時間、例えば1分間～数時間（例えば5分間、10分間、30分間、または1時間）の間に、別々に投与することも含まれる。

[0086] 本発明の方法ⅠⅠⅠによれば、多数の候補薬剤の中から所望の薬物動態を有するものを、RⅠを使用せずに効率よく選択することができる。

[0087] ⅠⅤ. 薬物動態評価用組成物

本発明の第四の態様は、薬物動態評価用組成物であって、
キレート剤が結合した薬剤を含み、
前記キレート剤に非放射性物質がキレートされている、前記組成物に関する（以下、本発明の組成物ⅠⅤとも称する。）。

[0088] 薬物動態評価に適した形で非放射性物質により薬剤を標識する方法はこれまでに知られておらず、本発明の組成物ⅠⅤのように非放射性物質で標識された薬剤を含む組成物を薬物動態評価に用いた例もこれまでに知られていない。本発明により、非放射性物質で標識された薬剤を含む薬物動態評価用組成物を提供することが初めて可能となる。

[0089] 本発明の組成物ⅠⅤにおける「薬物動態」、「キレート剤」、「薬剤」、および「非放射性物質」については、本発明の方法Ⅰに関する上記記載が援用される。

[0090] キレート剤と薬剤との結合は、共有結合であって、薬剤の種類および薬剤とキレート剤との結合に使用する反応の種類に応じて、適宜選択される。当該結合は、生体内で容易に切断されないものであることが好ましい。そのような結合の例としては、本発明の方法Ⅰに関して記載したものが挙げられる。好ましい態様において、キレート剤は、薬剤のアミノ基またはチオール基との化学結合により、薬剤に結合していてもよい。そのような結合としては

、例えば、薬剤に含まれるアミノ基とキレート剤に導入されたNHSエステルまたはITC基、より好ましくはITC基との結合、あるいは薬剤に含まれるチオール基とキレート剤に導入されたマレイミド基との結合が挙げられる。また薬剤が核酸である場合、アミノ基が導入されたキレート剤と核酸の有するカルボキシル基とをカルボジイミド架橋剤を用いて結合させることが好ましい。この場合、キレート剤と核酸とはアミド結合により結合している。

[0091] 本発明の組成物ⅠⅤに含まれる非放射性物質がキレートされているキレート剤が結合した薬剤は、特に限定されないが、例えば、本発明の方法Ⅰに従って調製することができる。

[0092] 薬物動態評価用組成物は、非放射性物質で標識された薬剤のほか、適切な溶媒を含み得る。そのような溶媒としては、例えばリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、20 mM His-HCl, 150mM NaCl, pH6.0 バッファー、20 mM histidine-aspartate buffer containing 150 mM arginine-aspartate and 0.5 mg/mL kolliphor P188, pH 6.0、Hank's平衡塩溶液(HBSS)、10% DMSO/60% PEG300 in salineなどが挙げられる。薬剤が抗体またはペプチド化合物である場合には、溶媒に0.05% tween 20を含有させてもよい。

[0093] 薬物動態評価用組成物には、薬学的に許容される担体が添加されていてもよい。薬学的に許容される担体とは、薬剤の投与対象に対して無毒な、薬剤以外の成分を意味する。薬学的に許容される担体としては、例えば、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を挙げることができる。

[0094] 本発明の組成物ⅠⅤは、本発明の方法ⅠⅠに関して記載したような薬物動態の測定、本発明の方法ⅠⅠⅠに関して記載したような所望の薬物動態を有する薬剤のスクリーニングなどに使用することができる。

[0095] V. 薬剤の薬物動態を測定する方法

本発明の第五の態様は、薬剤の薬物動態を測定する方法であって、

(i) 非放射性物質で標識された薬剤を、非ヒト動物に投与する工程、および

(i i) 工程 (i) の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程

を含む、前記方法に関する（以下、本発明の方法Ⅴとも称する。）。

[0096] 本発明の方法Ⅴにおける「薬物動態」および「薬剤」については、本発明の方法Ⅰに関する上記記載が援用される。

[0097] 本発明の方法Ⅴにおける「非放射性物質」は、放射性を有しない物質であって、分光分析または質量分析により含有量が測定され得るものをいい、金属、非金属、および半金属が含まれる。金属としては、リチウム、ベリリウム、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、カリウム、カルシウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ガリウム、ルビジウム、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、インジウム、スズ、セシウム、バリウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀、タリウム、鉛、ビスマス、およびトリウムが挙げられる。非金属としては、リン、硫黄、セレン、およびヨウ素が挙げられる。半金属としては、ホウ素、ケイ素、ゲルマニウム、ヒ素、アンチモン、およびテルルが挙げられる。好ましい態様において、非放射性物質は、金属であり、より好ましくはインジウムまたはユウロピウムであり、より最も好ましくはインジウムである。

[0098] 非放射性物質による薬剤の標識には、非放射性物質および薬剤の種類に応じて、当該技術分野において知られた方法を適宜用いることができる。そのような方法としては、本発明の方法Ⅰのようなキレート剤を用いる方法の他、放射性同位体による標識に用いられる方法などの当該技術分野において公知の方法を用いることができる。例えば、薬剤をヨウ素で標識する場合、放射性ヨウ素による標識に用いられる、クロラミン-T法、IODO-GEN

法、Bolton-Hunter法、ラクトパーオキシダーゼ法など（例えば、臨床化学、第2巻、第4号（1974）379-385など参照）を用いることができる。また薬剤がタンパク質である場合、システインをセレノシステインに置き換えたタンパク質を作製することにより、薬剤をセレンで標識することができる（例えば、WO 2003/029469など参照）。

[0099] 本発明の方法Vにおける工程（i）の非ヒト動物への投与に関する説明については、本発明の方法Iにおける工程（ii）に関する上記記載が援用される。また本発明の方法Vにおける工程（ii）は、本発明の方法Iにおける工程（iii）に対応しており、本発明の方法Iに関する上記記載が援用される。

[0100] 本発明の方法Vの好ましい態様において、薬物動態は、臓器への分布であり得る。この場合、生体試料は臓器であり、

（iii）工程（ii）で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の臓器への分布を決定する工程、をさらに含む（以下、本発明の方法V-1ともいう。）。本発明の方法V-1は、本発明の方法I-1に対応しており、その記載が援用される。

[0101] 本発明の方法Vの別の好ましい態様において、薬物動態は、血中濃度推移であり得る。この場合、生体試料は、血液、血漿、または血清であり、工程（ii）は、工程（i）の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を経時的に2回以上採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程であり、

（iii）工程（ii）で測定した非放射性物質の含有量に基づき、薬剤の血中濃度推移を決定する工程、をさらに含む（以下、本発明の方法V-2ともいう。）。本発明の方法V-2は、本発明の方法I-2に対応しており、その記載が援用される。

[0102] V I . 所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法

本発明の第六の態様は、所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(i) 2つ以上の候補薬剤について、本発明の方法Vにより薬物動態を測定する工程、および

(ii) 工程(i)で測定した候補薬剤の薬物動態を比較し、所望の薬物動態を示す薬剤を選択する工程、

を含む、前記方法に関する(以下、本発明の方法V Iとも称する。)。本発明の方法V Iは、工程(i)において本発明の方法I Iではなく本発明の方法Vを用いる点以外は、本発明の方法I I Iに対応しており、その記載が援用される。

[0103] 本発明の方法I I、I I I、V、およびV Iにおいて、試料中の非放射性物質の含有量を定量するために、内部標準を使用することもできる。

内部標準法は、標準試料と未知試料のそれぞれに内部標準物質を一定量ずつ添加し、目的成分と内部標準物質の濃度比の関係を基に目的成分の濃度を求める定量方法である。この方法を用いることで、分析機器への注入量の誤差や、血漿や臓器を測定用試料として調製する際の誤差などを補正することができる。

[0104] 内部標準は、非放射性物質の含有量を測定するための分析方法に応じて、当該非放射性物質とは異なる物質の中から適宜選択することができる。内部標準としては、大気中に含まれていないか、または大気中に含まれていても測定試料に添加する濃度を考慮すればその影響が無視できる物質を使用することができる。内部標準として使用される元素の例としては、ベリリウム、リチウム、コバルト、ビスマス、タリウム、ホルミウム、インジウム、ロジウム、スカンジウム、テルビウム、およびイットリウムが挙げられる。

[0105] 内部標準法による測定は、例えば、以下のように行うことができる。非放射性物質で標識された薬剤(インジウムで標識した抗体デノスマブなど)を含み、非放射性物質の濃度があらかじめ定量された試料を標準試料とし、非放射性物質で標識された薬剤を含み、非放射性物質の濃度が測定されていない試料を未知試料とする。これらにそれぞれ一定量ずつ内部標準物質を添加する。検量線作成のため、異なる濃度の複数の標準試料を調製し、これらを

分析することで、内部標準物質に対する非放射性物質の濃度比およびピーク面積比についての検量線が得られる。そして、標準試料と同量の内部標準物質を添加した未知試料についてピーク面積比を測定し、それを上記検量線にあてはめることより、未知試料における非放射性物質の濃度を得ることができる。

[0106] 本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。

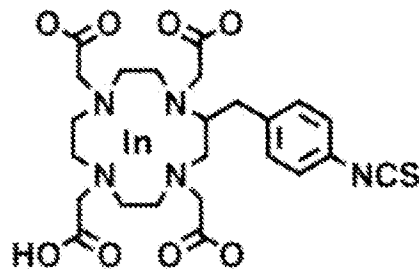
実施例

[0107] [実施例 1] 血中濃度推移の測定

1. 標識試薬の合成

In-p-SCN-Bn-DOTAをMacrocyclics, Inc.より委託合成にて入手した。

[0108] [化1]



[0109] 2. ラベル化

Zeba spin desalting column (87768、Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ（アービタックス注射液，メルクバイオフーマ）の溶媒をPBS(Phosphate buffered saline)に置換した。セツキシマブ0.01 μmol を含む溶液に、DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 0.53 μmol を添加し、攪拌後室温で4時間静置した。得られた反応液から、標識されたセツキシマブ（In-DOTA標識セツキシマブ）をゲルろ過カラムで精製した。溶出液にはPBSを使用した。

[0110] 3. ICP-MSを用いた標識効率の算出

上記2で調製したIn-DOTA標識セツキシマブに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分

析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。試料溶液の測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。また試料溶液中の抗体濃度を分光光度計を用いて測定した。インジウム濃度 (mol/L) / 抗体濃度 (mol/L) × 100 により算出される値 (%) を標識効率とした。標識効率は45%であった。

[0111] 4. 動物投与および採血

上記2で調製したIn-DOTA標識セツキシマブを、C57BL6Jマウスに尾静脈より1 mg/kgで単回静脈内投与した。投与後5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。得られた血液を遠心分離し、血漿を分離した。血漿は、測定まで-20℃以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0112] 5. ICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定

マウス血漿サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置 (ETHOS1、Milestone) にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、検量線を作成した。試料溶液の測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。標識効率とインジウム濃度から、マウス血漿サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0113] 6. LBAを用いたマウス血漿中濃度測定

マウス血漿サンプル2 μLをTBS-Tで100倍希釈し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するためにIn-DOTA標識セツキシマブを1%(v/v)血漿/TBS-T (インジウムDOTA標識セツキシマブを投与していないマウスの血漿を1% (体積%) になるようにTBS-Tで希釈したもの) で希釈し、In-DOTA標識セツキシマブの濃度2500, 833.3, 277.8, 92.6, 30.9, 10.3, 3.4 ng/mLの標準液を調製した。固相抗体としてビオチン標識抗ヒトκ抗体(AS76-B、Antibody Solutions)を用いた。検出抗体として、マウス抗ヒトFc抗体 (9040-01、SouthernBiotech) をAlexa647で標識した抗体を用いた。各溶液を自動ELISA装置Gyrolab xP workstationにセットし、Bioaffy 200 CD (Gyros AB.) にインジェクショ

ンして、測定用血漿サンプル中のIn-DOTA標識セツキシマブの含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0114] 7. 結果

結果を図1に示す。ICP-MSおよびLBAで測定したIn-DOTA標識セツキシマブの血漿中抗体濃度推移は同等であった。血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表1に示す。クリアランス（表1中、「Clearance」）は、LBAで14.3 mL/day/kg、ICP-MSで16.9 mL/d/kgであった。このことから、In-DOTA標識セツキシマブが投与されたマウスの血漿中インジウム濃度をICP-MSで測定することで、セツキシマブの血漿中濃度推移を評価できることが示唆された。

[0115] [表1]

血漿中抗体濃度推移のNCAパラメータ

		LBA		ICP-MS	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.
Vss	mL/kg	88.8	1.7	111	15.6
Clearance	mL/day/kg	14.3	0.5	16.9	0.2

[0116] [実施例2] 臓器分布の測定

1. ラベル化

Zeba spin desalting columnを用いて、セツキシマブ（アービタックス注射液，メルクバイオファーマ）の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 0.81 μmol をセツキシマブ0.016 μmol を含む溶液に添加し、攪拌後室温で4時間静置した。得られた反応液から、標識されたセツキシマブ（In-DOTA標識セツキシマブ）をゲルろ過カラムを用いて精製した。溶出液にはPBS-Tを使用した。

[0117] 2. ICP-MSを用いた標識効率の算出

上記1で調製したIn-DOTA標識セツキシマブについて、実施例1と同様に標識効率を算出した。標識効率は108%であった。

[0118] 3. 動物投与

上記1で調製したIn-DOTA標識セツキシマブを、C57BL6Jマウスに尾静脈より

1 mg/kgで単回静脈内投与した。投与後24時間にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から全採血し、その後組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、大腿筋、皮膚、胃、空腸、回腸、大腸、および精巣）を摘出した。得られた血液は遠心分離し、血漿を分離した。すべての臓器、血液、および血漿は、測定まで-20℃以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0119] 4. ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中濃度測定

マウス血液、血漿、および組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、大腿筋、皮膚、胃、空腸、回腸、大腸、および精巣）サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。試料溶液の測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。標識効率とインジウム濃度から、マウス血液および血漿サンプル中の抗体濃度を算出した。標識効率、インジウム濃度および組織重量から、マウス各臓器サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0120] 5. 結果

結果を図2に示す。血液および血漿だけでなく各組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、大腿筋、皮膚、胃、空腸、回腸、大腸、および精巣）のいずれにおいてもインジウムが検出され、組織中抗体濃度を算出することができた。このことから、In-DOTA標識セツキシマブが投与されたマウスの臓器中の抗体濃度をICP-MSで評価できることが示唆された。

[0121] [比較例1] 従来の方法によりインジウムで標識した抗体の血中濃度推移の測定

1. ラベル化

セツキシマブ0.03 μmol を含む溶液にDMSOに溶解したDTPA anhydride 0.3 μmol を添加し、攪拌後室温で30分静置した。得られた反応液から、DTPAが結合したセツキシマブ（DTPA-セツキシマブ）をゲルろ過カラムで精製した。溶出液には0.1 M acetate buffer+0.05% tween20(pH6.0)を使用した。DTPA-セ

ツキシマブ $0.028\ \mu\text{mol}$ に 1M acetate buffer及び生理食塩水に溶解した塩化インジウム $0.084\ \mu\text{mol}$ を添加した。攪拌後室温で30分静置した。反応液に $0.1\ \text{M}$ acetate bufferに溶解したEDTA（エチレンジアミン四酢酸） $0.084\ \mu\text{mol}$ を添加した。攪拌後室温で30分静置した。得られた反応液から、インジウムで標識されたDTPA-セツキシマブ（In標識DTPA-セツキシマブ）をゲルろ過カラムで精製した。溶出液にはPBS-Tを使用した。

[0122] 2. ICP-MSを用いた標識効率の算出

上記1で調製したIn標識DTPA-セツキシマブについて、実施例1と同様に標識効率を算出した。標識効率は182%であった。

[0123] 3. 動物投与および採血

上記1で調製したIn標識DTPA-セツキシマブをC57BL6Jマウスに尾静脈より $10\ \text{mg/kg}$ で単回静脈内投与した。投与後5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。得られた血液を遠心分離し、血漿を分離した。血漿は、測定まで -20°C 以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0124] 4. ICP-MSを用いたマウス血漿中濃度測定

マウス血漿サンプルを硝酸で処理し、次いで過酸化水素で処理することにより分解し、蒸発乾固した。乾固物を硝酸で加温溶解したものを試料溶液として、溶液中のインジウムをICP質量分析法（内部標準法）により測定した。また、インジウム濃度が異なる標準液を複数調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。試料溶液の測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。標識効率とインジウム濃度から、マウス血漿サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0125] 5. LBAを用いたマウス血漿中濃度測定

マウス血漿サンプル $2\ \mu\text{L}$ をTBS-Tで25倍希釈し、さらに4%血漿/TBS-Tで16倍希釈（最終：400倍希釈）し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するためにIn標識DTPA-セツキシマブを4%(v/v)血漿/TBS-Tで希釈し、In標識DTPA-セツキシマブの濃度2500, 833.3, 277.8, 92.6, 30.9, 10.3, 3.4 ng/mLの標準液を調製した。固相抗体としてビオチン標識抗ヒト κ 抗体(AS76-B、Anti

body Solutions)を用いた。検出抗体としてマウス抗ヒトFc抗体(9040-01、SouthernBiotech)をAlexa647で標識した抗体を用いた。各溶液を自動ELISA装置 Gyrolab xP workstationにセットし、Bioaffy 200 CD (Gyros AB.) にインジェクションして、測定用血漿サンプル中のIn標識DTPA-セツキシマブの含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0126] 6. 結果

結果を図3に示す。ICP-MSで測定したIn標識DTPA-セツキシマブの血漿中濃度は、LBAで測定したIn標識DTPA-セツキシマブの血漿中濃度より速い消失を示した。血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表2に示す。クリアランスはLBAで20.5 mL/d/kg、ICP-MSで41.4 mL/d/kgであり、大きく乖離していた。

[0127] [表2]

血漿中抗体濃度推移のNCAパラメータ

		LBA		ICP-MS	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.
Vss	mL/kg	118	10.1	142	12.0
Clearance	mL/day/kg	20.5	0.95	41.4	2.77

[0128] [実施例3] 野生型マウスにおけるヨウ素標識デノスマブのPK

1. 標識条件検討

(1) ラベル化

Zeba Spin Desalting Column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、デノスマブ（ランマーク皮下注，第一三共）の溶媒をPBSに置換した。ヨウ素標識の方法として、Iodogen法およびBolton-Hunter法を検討した。

A. Iodogen: Iodination Tube (Pierce製) に、1 mM 水酸化ナトリウム水溶液に溶解したヨウ化ナトリウム28 nmolおよびTris bufferを添加して攪拌したのち室温で6分反応させた。得られた反応液をデノスマブ1.33 nmolを含む溶液に添加し、攪拌後室温で6分間反応させた。得られた反応液をPD-10 (Cytiva製) を用いて精製した。溶出液にはPBSを使用した。

B. Bolton-Hunter: DMSOに溶解したSulfo-SHPP 27 nmolに、1 mM水酸化ナトリウム水溶液に溶解したヨウ化ナトリウム267nmol、PBSに溶解したChloramine-Tを添加して攪拌した。得られた混合液にデノスマブ1.33 nmolを含む溶液を添加して攪拌後、氷上で30分静置した。得られた反応液をPD-10 (Cytiva製) を用いて精製した。溶出液にはPBS+0.2 Mアルギニンを使用した。

[0129] (2) ICP-MSを用いた標識効率の算出

標識抗体サンプルに次亜塩素酸ナトリウムを添加したのち、溶液中のヨウ素をICP質量分析法により測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中のヨウ素濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。ヨウ素濃度 (mol/L) / 抗体濃度 (mol/L) × 100により算出される値 (%) を標識効率とした。各条件での標識効率を表3に示す。

[表3]

2つのヨウ素標識方法での標識効率

	標識方法	標識試薬等量 (等量)	標識効率
A	Iodogen	21	2072%
B	Bolton-Hunter	20	5568%

[0130] 2. Iodogen法によりヨウ素標識されたデノスマブのPKの評価

(1) ラベル化

Zeba Spin Desalting Column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、デノスマブ (ランマーク皮下注, 第一三共) の溶媒をPBSに置換した。Iodination Tube (Pierce製) に、1 mM NaOH水溶液に溶解したヨウ化ナトリウム2.8 μmolおよびTris bufferを添加して攪拌したのち室温で6分反応させた。得られた反応液をデノスマブ13.3 nmolを含む溶液に添加し、攪拌後室温で6分間反応させた。得られた反応液をPD-10 (Cytiva製) を用いて精製した。溶出液にはPBS+0.2 Mアルギニンを使用した。

[0131] (2) ICP-MSを用いた標識効率の算出

標識抗体サンプルに次亜塩素酸ナトリウムを添加したのち、溶液中のヨウ素をICP質量分析法により測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中のヨウ素濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。標識効率は4161%であった。

[0132] (3) 動物投与および採血

上記(1)で標識した抗体をC57BL6Jマウスに尾静脈より10 mg/kgで単回静脈内投与した。投与後5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。得られた血液から、遠心分離により血漿を分離した。血漿は、測定まで、-20℃以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0133] (4) ICP-MSを用いたマウス血漿中ヨウ素濃度測定および抗体濃度算出

マウス血漿サンプルに次亜塩素酸ナトリウムを加え、超純水で定容したのち、溶液中のヨウ素をICP質量分析法により測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。標識効率とマウス血漿サンプル中ヨウ素濃度から、サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0134] (5) LBAを用いたマウス血漿中抗体濃度測定

マウス血漿サンプルを1% BSA含有PBS-Tで100倍希釈し、さらに1% 血漿/1% BSA含有PBS-Tで10倍希釈（最終：1000倍希釈）し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するために、ヨウ素標識デノスマブを1% 血漿/1% BSA含有PBS-Tで希釈し、1024、512、256、128、64、32、および16 ng/mLの希釈液を調製した。Sectorプレート（Meso scale discovery）に固相抗体として抗ヒトIgG抗体（Bethyl）を添加した。検出抗体としてビオチン標識抗ヒト抗体（SouthernBiotech）を添加しインキュベーション後、Sulfo-tag標識ストレプトアビジン（Meso scale discovery）を添加した。インキュベーション後にRead bu

ffer (Meso scale discovery)を添加し、被験物質の含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0135] (6) 結果

C57BL6Jマウスにおけるヨウ素標識デノスマブの平均血漿中濃度推移をICP-MSおよびLBAで測定した結果を図4に示す。ICP-MSで測定した際のヨウ素標識デノスマブの血漿中濃度推移はLBAで測定した際のヨウ素標識デノスマブの平均血漿中濃度推移と同等だった。

さらに、血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表4に示す。クリアランスはLBAで8.23 mL/d/kg、ICP-MSで5.47 mL/d/kgであり、同等だった。

これらの結果は、ヨウ素標識した薬剤の薬物動態を本発明の方法Vにより評価可能であることを示す。

[表4]

マウス PK 試験における NCA 解析パラメータ

		LBA		ICP-MS	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.
V _{ss}	mL/kg	76.0	13.6	87.1	13.0
Clearance	mL/d/kg	8.23	0.11	5.47	1.21

[0136] [実施例4] インジウムDOTA標識デノスマブおよびヨウ素標識デノスマブの同時投与 (Cassette-dosing) による野生型マウスにおけるPK (Cassette-dosing PK of indium-DOTA-labeled and iodine-labeled denosumab in WT mice)

1. ラベル化

インジウムDOTA標識デノスマブ (Indium-DOTA-labeled denosumab) の作製: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、デノスマブ (ランマーク皮下注, 第一三共) の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 0.58 μ molをデノスマブ溶液11.6 nmolに添加し、室温で4時間攪拌した。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとし

てSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

ヨウ素標識デノスマブ (Iodine-labeled denosumab) の作製: Zeba Spin Desalting Column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、デノスマブ (ランマーク皮下注, 第一三共) の溶媒をPBSに置換した。Iodination Tube (Pierce製) に、1mM NaOH水溶液に溶解したヨウ化ナトリウム0.1 μmol およびTris bufferを添加して攪拌したのち室温で6分反応させた。得られた反応液をデノスマブ溶液20 nmolに添加し、攪拌後室温で6分間反応させた。得られた反応液をPD-10 (Cytiva製) を用いて精製した。溶出液にはPBS-Tを使用した。

[0137] 2. ICP-MSを用いた標識効率の算出

インジウム標識抗体サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中のインジウム濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。標識効率は48%であった。

ヨウ素標識抗体サンプルに次亜塩素酸ナトリウムを添加したのち、溶液中のヨウ素をICP質量分析法により測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中のヨウ素濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。標識効率は542%であった。

[0138] 3. 動物投与および採血

上記1で標識した抗体を、インジウムDOTA標識デノスマブは1 mg/kg、ヨウ素標識デノスマブは10 mg/kgで、抗体として計11 mg/kgを同時に、C57BL6Jマウスに尾静脈より単回静脈内投与した。投与後5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。投与後7日目にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から全採血し、その後組織 (肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋)

を抽出した。得られた血液の一部を遠心分離することにより、血漿を分離した。すべての臓器、血液、および血漿は、測定まで、 -20°C 以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0139] 4. ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中の抗体濃度の評価

(1) ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中ヨウ素濃度測定および抗体濃度算出

マウス血液および血漿サンプルに次亜塩素酸ナトリウムを加え、超純水で定容したのち、溶液中のヨウ素をICP質量分析法により測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、前記検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。標識効率とマウス血液および血漿サンプル中ヨウ素濃度から、サンプル中の抗体濃度を算出した。

マウス組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、および大腿筋）サンプルに水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）を加え、 60°C の恒温槽で3時間保持し分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、ヨウ素標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中のヨウ素濃度を算出した。標識効率とヨウ素濃度から、マウス組織サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0140] (2) ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中インジウム濃度測定および抗体濃度算出

マウス血液、血漿、および組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。試料溶液の測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。各サンプルおよび標準液に内部標準溶液としてロジウム溶液を添加し、内部標準法で各サンプル中のインジウム濃度を算出することも

可能である。標識効率とインジウム濃度から、マウス血液および血漿サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0141] (3) 結果

投与7日後における臓器中抗体濃度の測定結果を図5に示す。血液および血漿だけでなく各組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、および大腿筋）のいずれにおいてもヨウ素およびインジウムが検出され、組織中抗体濃度を算出することができた。このことから、ヨウ素標識デノスマブおよびインジウムDOTA標識デノスマブが投与されたマウスの臓器中の抗体濃度をICP-MSで評価できることが示唆された。

[0142] 5. ICP-MSを用いた測定結果とLBAを用いた測定結果の比較

(1) LBAを用いたマウス血漿中抗体濃度測定

マウス血漿サンプルを1% BSA含有PBS-Tで100倍希釈し、さらに1% 血漿/1% BSA含有PBS-Tで30または900倍希釈（最終：3000 - 90000倍希釈）し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するためにヨウ素標識デノスマブおよびインジウムDOTA標識デノスマブを10対1で混合した溶液を1% 血漿/ 1% BSA含有PBS-Tで希釈し、50、20、10、5、2、1、および0.5 ng/mLの希釈液を調製した。Sectorプレート（Meso scale discovery）に固相抗体として抗ヒトIgG抗体（Bethyl）を添加した。検出抗体としてビオチン標識抗ヒト抗体（SouthernBiotech）を添加しインキュベーション後、Sulfo-tag標識ストレプトアビジン（Meso scale discovery）を添加した。インキュベーション後にRead buffer（Meso scale discovery）を添加し、被験物質の含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0143] (2) 結果

ヨウ素標識デノスマブおよびインジウムDOTA標識デノスマブを投与したC57BL6Jマウスにおける、ICP-MSおよびLBAで測定した血漿中抗体濃度を、1 mg/kgに用量正規化（dose-normalized）して表した数値をプロットしたグラフを図6に示す。

C57BL6Jマウスでは、ICP-MSで測定したヨウ素標識デノスマブおよびインジ

ウムDOTA標識デノスマブの血漿中濃度推移は、LBAで測定した血漿中抗体濃度推移と同等であった。

さらに、血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表5に示す。クリアランスはLBAで9.0 mL/d/kg、ICP-MSによるヨウ素濃度測定で5.9 mL/d/kg、ICP-MSによるインジウム濃度測定で6.1 mL/d/kgであった。このことは、ヨウ素標識デノスマブおよびインジウムDOTA標識デノスマブが投与されたマウスの血漿中ヨウ素およびインジウム濃度をICP-MSで測定することで、異なる元素で標識した抗体の血漿中濃度推移を同時に評価できたことを示す。本実施例の結果は、異なる非放射性物質で標識された2種類以上の薬剤を単一の動物に投与して、それらの薬剤の血漿中濃度推移を同時に評価することができることを示唆する。

[表5]

マウス PK 試験における血漿中抗体濃度推移の NCA パラメータ

		LBA		ICP-MS_インジウム		ICP-MS_ヨウ素	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.	平均値	S.D.
V _{ss}	mL/kg	133	15.4	115	11.3	102	2.2
Clearance	mL/d/kg	9.0	1.90	6.1	0.43	5.9	0.39

[0144] [実施例5] 4種の異なる金属 (In、Tb、Y、およびHo) で標識されたセツキシマブの野生型マウスにおけるPK(In, Tb, Y, Ho-labeled-cetuximab PK in WT mice)

1. ラベル化試薬

Tb-p-SCN-Bn-DOTA、およびY-p-SCN-Bn-DOTAをMacrocyclics, Inc.より委託合成にて入手した。これらは、In-p-SCN-Bn-DOTAにおけるInがそれぞれTb、およびYに置き換わった構造を有する。

Ho-p-SCN-Bn-DOTAは、Macrocyclics, Inc.より入手した。

[0145] 2. ラベル化

(1) Y-labeled Cetuximab: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ (アービタックス注射液, メルクバイオフーマ) の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したY-p-SCN-Bn-D

OTA 0.73 μmol をセツキシマブ溶液14.6 nmolに添加し、室温で4時間攪拌した。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとしてSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

(2) Tb-labeled Cetuximab: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ（アービタックス注射液，メルクバイオファーマ）の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したTb-p-SCN-Bn-DOTA 0.75 μmol をセツキシマブ溶液15.1 nmolに添加し、室温で4時間攪拌した。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとしてSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

(3) In-labeled Cetuximab: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ（アービタックス注射液，メルクバイオファーマ）の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 6.2 μmol をセツキシマブ溶液0.12 μmol に添加し、室温で4時間攪拌した。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとしてSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

(4) Ho-labeled Cetuximab: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ（アービタックス注射液，メルクバイオファーマ）の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したHo-p-SCN-Bn-DOTA(Macrocylics, Inc.) 0.73 μmol をセツキシマブ溶液14.6 nmolに添加し、室温で4時間攪拌した。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとしてSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

[0146] 3. ICP-MSを用いた標識効率の算出

標識抗体サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また

、インジウム、テルビウム、イットリウム、ホルミウムの各標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中の金属元素濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中の金属元素濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。金属元素濃度 (mol/L) / 抗体濃度 (mol/L) × 100 により算出される値 (%) を標識効率とした。各金属標識での標識効率を表6に示す。

[表6]

	標識金属	標識効率
1	インジウム	53%
2	テルビウム	143%
3	イットリウム	153%
4	ホルミウム	47%

[0147] 4. 動物投与

上記2で標識したインジウムD0TA、イットリウムD0TAおよびホルミウムD0TA標識抗体を各1 mg/kgずつ、テルビウムD0TA標識抗体を0.94 mg/kg、抗体として計3.94 mg/kgを同時に、C57BL6Jマウスに尾静脈より単回静脈内投与した。5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。投与後7日目にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から全採血し、その後組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）を摘出した。得られた血液の一部を遠心分離することにより、血漿を分離した。すべての臓器、血液、および血漿は、測定まで、-20℃以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0148] 5. ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中の抗体濃度の評価

(1) ICP-MSを用いたマウス血液、血漿および組織中金属濃度測定および抗体濃度算出

マウス血液、血漿、および組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。インジウム、テルビウム、イットリウム、およびホルミウムの各標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。各サンプルおよび

標準液に内部標準溶液としてロジウム溶液を添加し、内部標準法で各サンプル中のインジウム、テルビウム、イットリウム、およびホルミウム濃度を算出することも可能である。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中の金属元素濃度を算出した。標識効率と各種金属濃度から、マウス血液、血漿および組織サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0149] (2) 結果

投与7日後における臓器中抗体濃度の測定結果を図7に示す。血液および血漿だけでなく各組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）のいずれにおいてもインジウム、テルビウム、イットリウムおよびホルミウムが検出され、組織中抗体濃度を算出することができた。このことから、インジウムDOTA、テルビウムDOTA、イットリウムDOTAおよびホルミウムDOTA標識セツキシマブが投与されたマウスの臓器中の抗体濃度をICP-MSで評価できることが示唆された。

[0150] 6. ICP-MSを用いた測定結果とLBAを用いた測定結果の比較

(1) LBAを用いたマウス血漿中抗体濃度測定

マウス血漿サンプルを1% BSA含有PBS-Tで100倍希釈し、さらに1% 血漿/1% BSA含有PBS-Tで30倍希釈（最終：3000倍希釈）し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するためにインジウムDOTA標識抗体、テルビウムDOTA標識抗体、イットリウムDOTA標識抗体およびホルミウムDOTA標識抗体を1対0.94対1対1で混合した溶液を1% 血漿/ 1% BSA含有PBS-Tで希釈し、49.3、19.7、9.85、4.93、1.97、0.985、および0.493 ng/mLの希釈液を調製した。Sectorプレート（Meso scale discovery）に固相抗体として抗ヒトIgG抗体（Bethyl）を添加した。検出抗体としてビオチン標識抗ヒト抗体（SouthernBiotech）を添加しインキュベーション後、Sulfo-tag標識ストレプトアビジン（Meso scale discovery）を添加した。インキュベーション後にRead buffer（Meso scale discovery）を添加し、被験物質の含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0151] (2) 結果

インジウムDOTA、テルビウムDOTA、イットリウムDOTAおよびホルミウムDOT

A標識セツキシマブを投与したC57BL6Jマウスにおける、ICP-MSおよびLBAで測定した血漿中抗体濃度を、それぞれ1 mg/kgに用量正規化 (dose-normalized) して表した数値をプロットしたグラフを図8に示す。

C57BL6Jマウスでは、ICP-MSで測定した各金属元素標識抗体の血漿中推移とLBAで測定したTotalヒトIgGの血漿中濃度推移とは同等であった。

さらに、血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表7に示す。クリアランスはLBAで8.00 mL/d/kg、ICP-MSでインジウムDOTA標識抗体について10.7 mL/d/kg、テルビウムDOTA標識抗体について7.68 mL/d/kg、イットリウムDOTA標識抗体について8.99 mL/d/kg、ホルミウムDOTA標識抗体について8.45 mL/d/kgであった。このことから、インジウムDOTA標識抗体、テルビウムDOTA標識抗体、イットリウムDOTA標識抗体およびホルミウムDOTA標識抗体が投与されたマウスの血漿中インジウム、テルビウム、イットリウムおよびホルミウム濃度をICP-MSで測定することで、各抗体の血漿中濃度推移を分離定量できることが示された。

[表7]

マウス PK 試験における血漿中抗体濃度推移の NCA パラメータ

		LBA		ICP-MS_インジウム		ICP-MS_テルビウム		ICP-MS_イットリウム		ICP-MS_ホルミウム	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.	平均値	S.D.	平均値	S.D.	平均値	S.D.
Vss	mL/kg	119	22.0	117	6.9	86.5	6.43	100	8.83	107	4.46
Clearance	mL/d/kg	8.00	3.98	10.7	1.58	7.68	1.27	8.99	1.26	8.45	1.49

[0152] [実施例6] インジウムDOTA標識セツキシマブのカニクイザルにおけるPK(In dium-labeled cetuximab PK in cynomolgus monkey)

1. ラベル化

In-labeled Cetuximab: Zeba spin desalting column (40K, 2mL, Thermo Fisher Scientific) を用いて、セツキシマブ (アービタックス注射液, メルクバイオファーマ) の溶媒をPBSに置換した。DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 5.8 μ molをセツキシマブ溶液0.12 μ molに添加し、室温で4時間攪拌した

。得られた反応液をZeba spin desalting columnを用いて簡易精製したのち、AKTA explorer 10S(Cytiva)にてカラムとしてSuperdex200increase 10/300 GL(Cytiva)を使用してゲルろ過精製した。

[0153] 2. ICP-MSを用いた標識効率の算出

標識抗体サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。濃度既知の標識抗体溶液中のインジウム濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。標識効率は39%であった。

[0154] 3. 動物投与および採血

上記1に記載の方法で標識した抗体および非標識の抗体を、それぞれ1.5 mg/kgおよび3.5 mg/kg、抗体として計5 mg/kgで同時に、カニクイザルに撓側皮静脈より単回静脈内投与した。投与後5分後から7日後にわたり、経時的に複数回血液を採取した。投与後7日目にケタミン塩酸塩および塩酸メデトミジンの併用麻酔下で放血安楽死させ、その後組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）を摘出した。得られた血液の一部を遠心分離することにより、血漿を分離した。すべての臓器、血液、および血漿は、測定まで、 -70°C 以下に設定されたフリーザーに保存した。

[0155] 4. ICP-MSを用いたサル血液、血漿および組織中の抗体濃度の評価

(1) ICP-MSを用いたサル血液、血漿および組織中インジウム濃度測定および抗体濃度算出

サル血液、血漿、および組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）サンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。インジウム標準液を調製してICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。各サンプルおよび標準液に内部標準溶液としてロジウム溶液を添加し、内部標準法で各サンプル中のインジウム濃度を算出することも可能である。得

られた測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。標識効率とインジウム濃度から、サル血液、血漿および組織サンプル中の抗体濃度を算出した。

[0156] (2) 結果

投与7日後における臓器中抗体濃度の測定結果を図9に示す。血液および血漿だけでなく各組織（肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓および大腿筋）のいずれにおいてもインジウムが検出され、組織中抗体濃度を算出することができた。このことから、インジウムDOTA標識セツキシマブが投与されたサルの臓器中の抗体濃度をICP-MSで評価できることが示唆された。

[0157] 5. ICP-MSを用いた測定結果とLBAを用いた測定結果の比較

(1) LBAを用いたサル血漿中抗体濃度測定

サル血漿サンプルを1% BSA含有PBS-Tで100倍希釈し、さらに1% 血漿/1% BSA含有PBS-Tで20-200倍希釈（最終：2000-20000倍希釈）し、測定用血漿サンプルとした。検量線を作成するために非標識セツキシマブを1% BSA含有PBS-Tで希釈し、50、20、10、5、2、1、および0.5 ng/mLの希釈液を調製した。Sectorプレート（Meso scale discovery）に固相抗原としてヒトEGFR（Sino Biological）を添加した。検出抗体としてsTag標識抗ヒト抗体（Meso scale discovery）を添加しインキュベーション後、Read buffer（Meso scale discovery）を添加し、被験物質の含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。

[0158] (2) 結果

インジウムDOTA標識セツキシマブを投与したカニクイザルにおける、ICP-MSおよびLBAで測定した血漿中抗体濃度の推移を図10に示す。

カニクイザルでは、ICP-MSで測定したインジウムDOTA標識セツキシマブの血漿中濃度推移とLBAで測定した血漿中抗体濃度推移とは同等であった。

さらに、血漿中抗体濃度推移をノンコンパートメント解析した結果を表8に示す。クリアランスはLBAで28.0 mL/d/kg、ICP-MSで24.8 mL/d/kgであった。このことから、インジウムDOTA標識セツキシマブが投与されたカニクイザルの血漿中インジウム濃度をICP-MSで測定することで、セツキシマブの血漿

中濃度推移を評価できることが示唆された。

[表8]

サル PK 試験における血漿中抗体濃度推移の NCA パラメータ

		LBA		ICP-MS	
		平均値	S.D.	平均値	S.D.
Vss	mL/kg	72.5	16.1	69.8	12.6
Clearance	mL/day/kg	28.0	3.43	24.8	1.15

[0159] [実施例 7] 抗体以外の分子形での適用例 (Application examples in non-antibody modalities)

1. 中分子 (ペプチド) ラベル化

Bacitracin (Fujifilm Wako) 15 μmol をDMSOに溶解し、DMSOに溶解したIn-p-SCN-Bn-DOTA 18 μmol およびDMA 200 μL を添加して攪拌した。Diisopropylethylamine 76 μmol を添加して室温で30分攪拌した。反応溶液を自動精製分取装置Isolera One(Biotage)にてBiotage(登録商標) Sfar C18(Biotage)を用いて精製し、凍結乾燥により溶媒を除去した。

[0160] 2. ICP-MSを用いた中分子の標識効率の算出

標識ペプチドサンプルに硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置にて分解した。超純水で定容したものを試料溶液としてICP質量分析装置で測定した。また、インジウム標準液を調製して、ICP-MS分析を行い、得られたデータを基に検量線を作成した。得られた測定値を、検量線と比較して、溶液中のインジウム濃度を算出した。濃度既知の標識ペプチド溶液中のインジウム濃度を測定し、その結果から標識効率を算出した。標識効率は46%であった。

このようにして調製したインジウムDOTA標識Bacitracinを用いて、上述の実施例と同様に、BacitracinのPKを評価することができる。

産業上の利用可能性

[0161] 本発明によれば、医薬品開発候補品の実験動物における薬物動態の測定を、RIを使用せずに行うことができ、薬物動態試験を開発初期段階から行うことができるようになる。また本発明は、実験動物の使用数削減、より薬理効果の高い医薬品の開発などに貢献することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 薬剤の標識方法であって、
- (i) 反応基を有するキレート剤に、非放射性物質をキレートさせる工程、および
- (ii) 工程(i)で非放射性物質をキレートさせたキレート剤を、前記反応基を介して薬剤に結合させる工程
- を含み、
- 該方法は、薬物動態の評価において使用するための方法である、前記方法。
- [請求項2] 非放射性物質が、金属である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 非放射性物質が、リチウム、ベリリウム、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、カリウム、カルシウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ガリウム、ルビジウム、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、インジウム、スズ、セシウム、バリウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀、タリウム、鉛、ビスマス、またはトリウムである、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 反応基を有するキレート剤が、配位基としてアミノ基またはカルボキシル基を有するキレート剤である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 反応基を有するキレート剤が、DOTA、EDTA、HEDTA、DHEDDA、1,3-PDTA、DTPA、TTHA、NTA、グルコン酸、HIMDA、ASDA、NTMP、HEDP、3-ヒドロキシー-2,2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、およびポ

ルフィリンから選択されるいずれかの化合物に反応基を導入したキレート剤である、請求項4に記載の方法。

[請求項6] 薬剤が、抗体、ペプチド化合物、細胞、または核酸である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 反応基が、アミノ基またはチオール基と反応して化学結合を形成し得る基である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 薬剤の薬物動態を測定する方法であって、
(i) 請求項1～7のいずれか一項に記載の方法により、非放射性物質で薬剤を標識する工程、
(ii) 工程(i)で標識された薬剤を、非ヒト動物に投与する工程、および
(iii) 工程(ii)の薬剤投与後の非ヒト動物より生体試料を採取し、生体試料中の非放射性物質の含有量を測定する工程を含む、前記方法。

[請求項9] 工程(i)において、それぞれ異なる非放射性物質で2種類以上の薬剤を標識し、
工程(ii)において、工程(i)で標識された2種類以上の薬剤を、単一の非ヒト動物に投与する、請求項8に記載の方法。

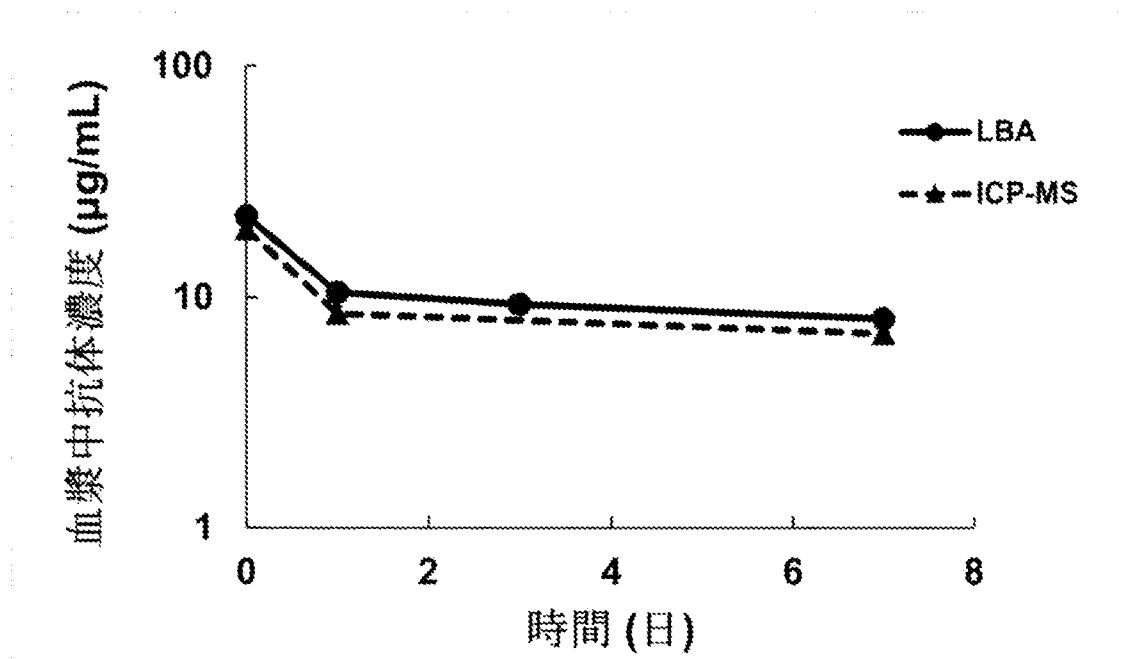
[請求項10] 非放射性物質の含有量を質量分析により測定する、請求項8または9に記載の方法。

[請求項11] 質量分析が、プラズマイオン化質量分析、電子イオン化(EI)質量分析、化学イオン化(CI)質量分析、大気圧化学イオン化(APCI)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析、レーザー脱離質量分析(LDMS)、二次イオン質量分析(SIMS)、スパークソース質量分析(SSMS)、または表面電離質量分析(TIMS)である、請求項10に記載の方法。

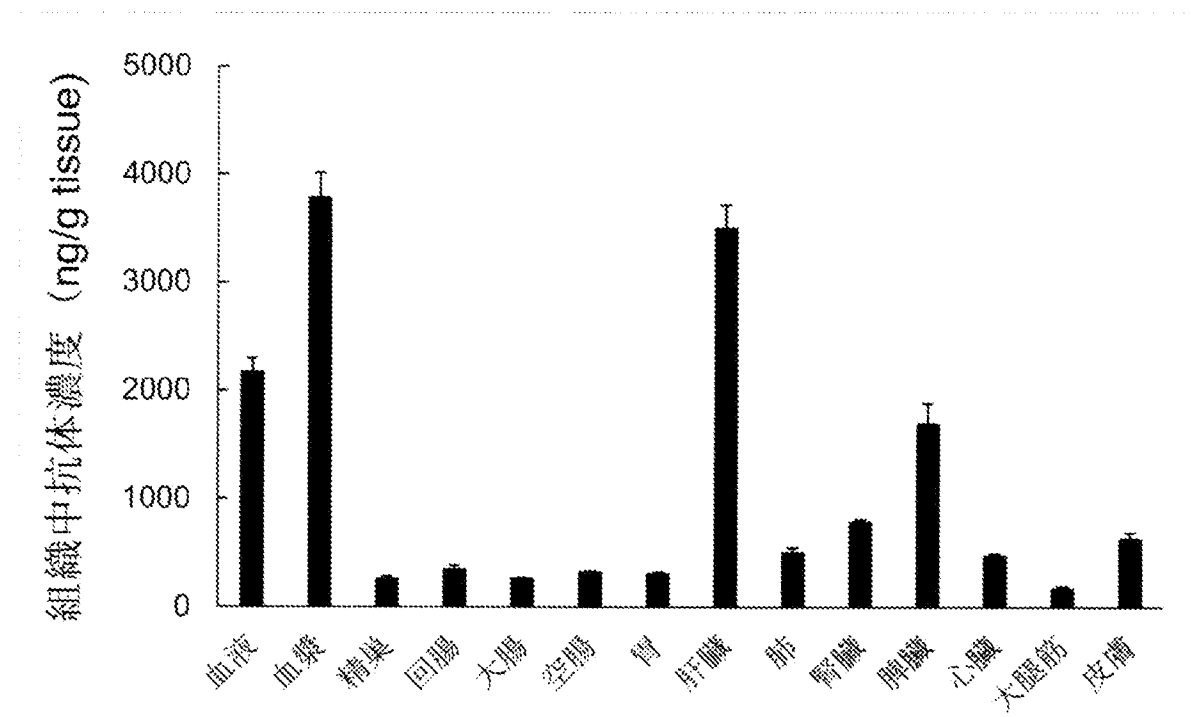
[請求項12] 質量分析が、プラズマイオン化質量分析である、請求項11に記載の方法。

- [請求項13] 非ヒト動物が、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットである、請求項8～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] 工程（i i）における薬剤の投与が、静脈内投与（i.v.）、皮下投与（s.c.）、経口投与（p.o.）、腹腔内投与（i.p.）、筋肉内投与（i.m.）、腫瘍投与（i.t.）、経肺投与、または経鼻投与である、請求項8～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 所望の薬物動態を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、
（i）2つ以上の候補薬剤について、請求項8～14のいずれか一項に記載の方法により薬物動態を測定する工程、および
（i i）工程（i）で測定した候補薬剤の薬物動態を比較し、所望の薬物動態を示す薬剤を選択する工程、
を含む、前記方法。

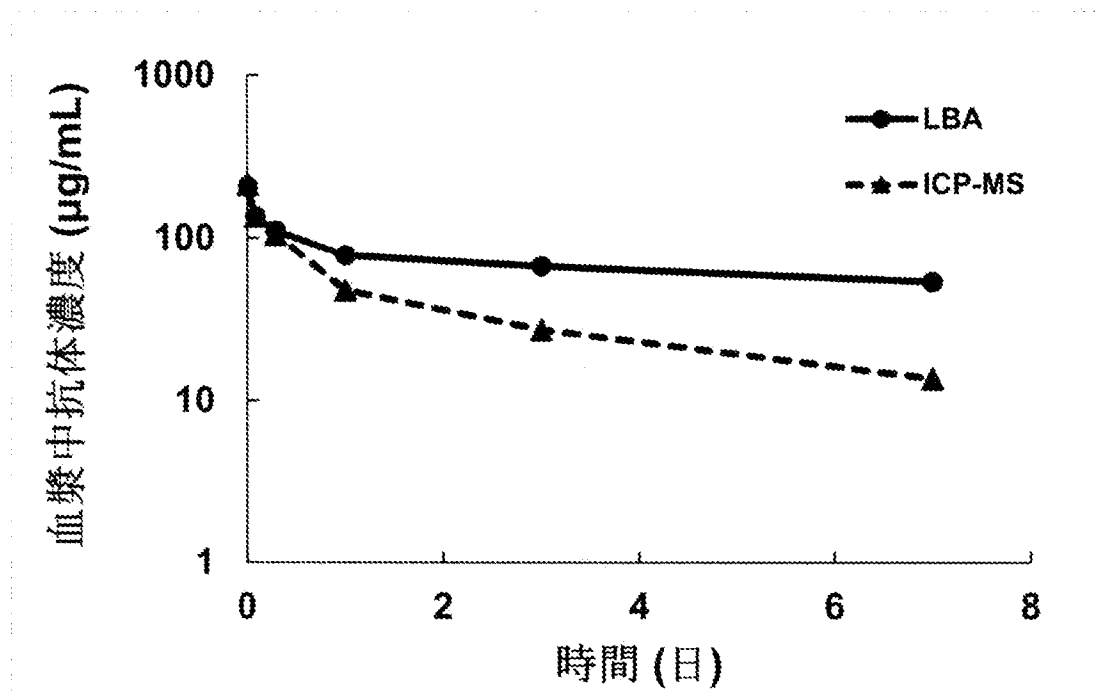
[図1]



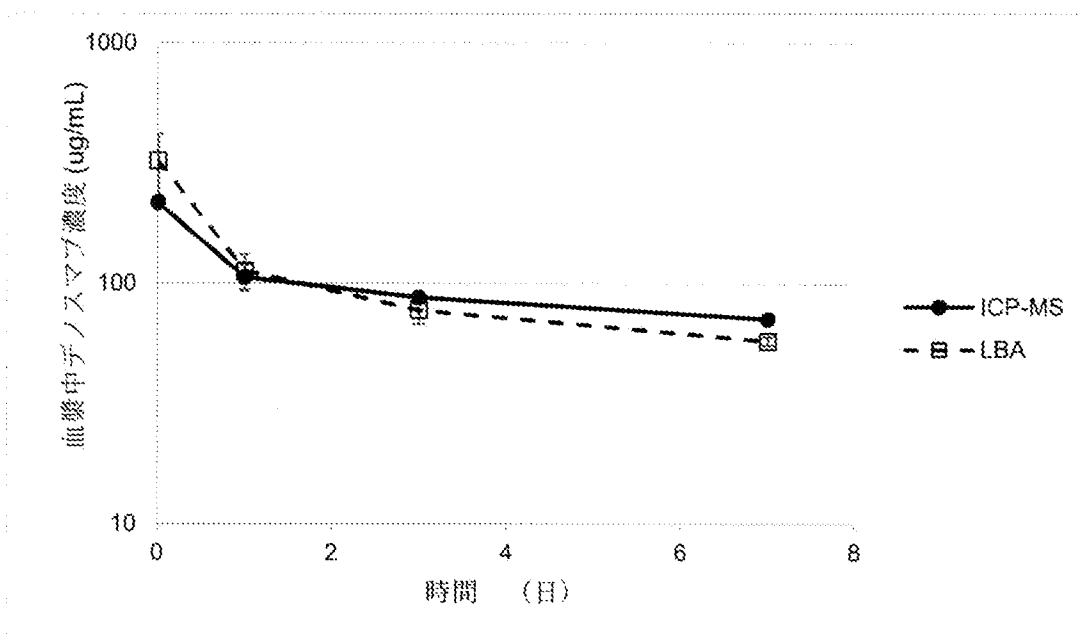
[図2]



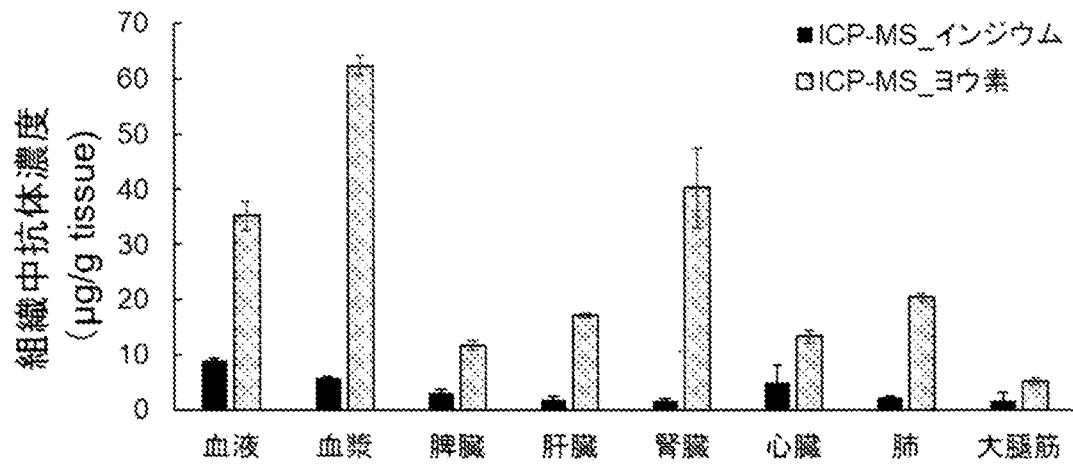
[図3]



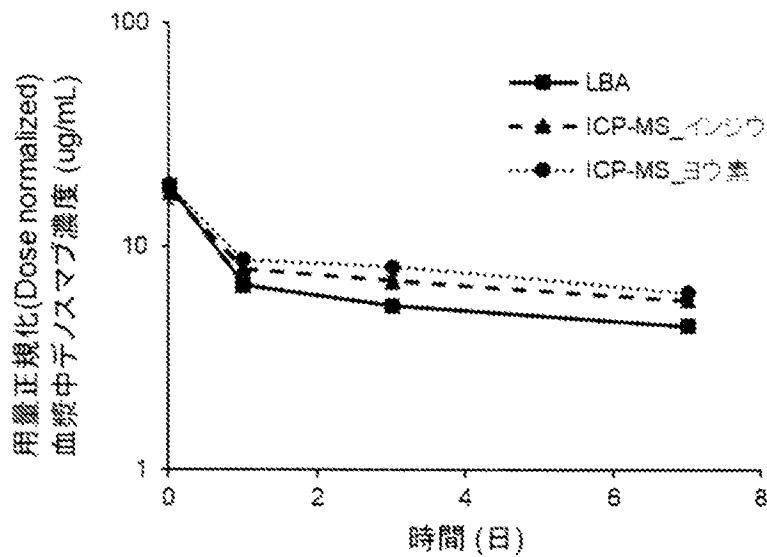
[図4]



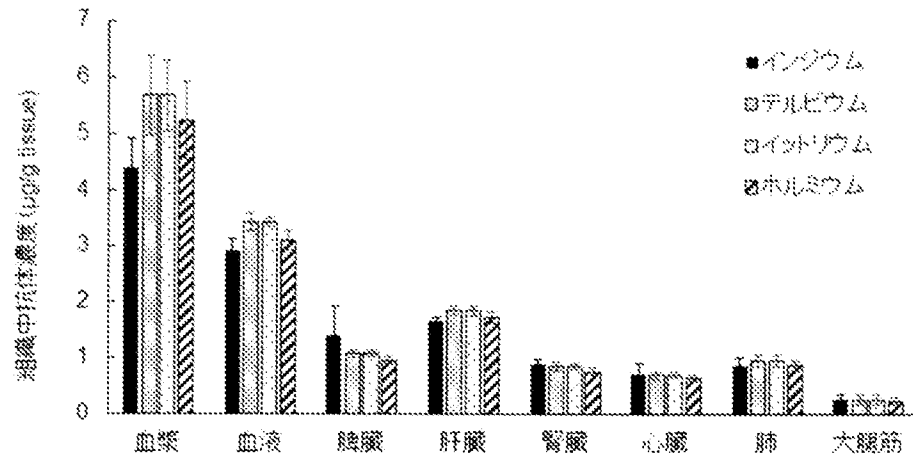
[図5]



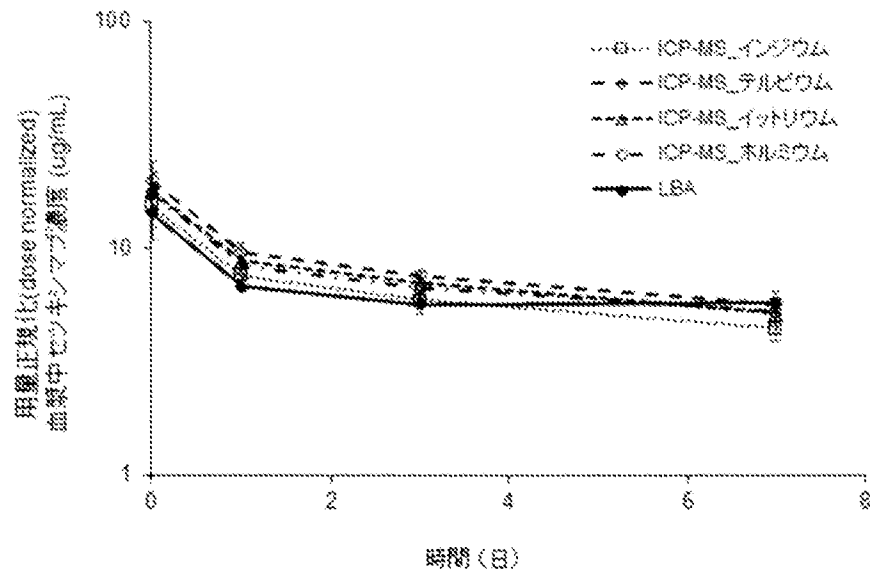
[図6]



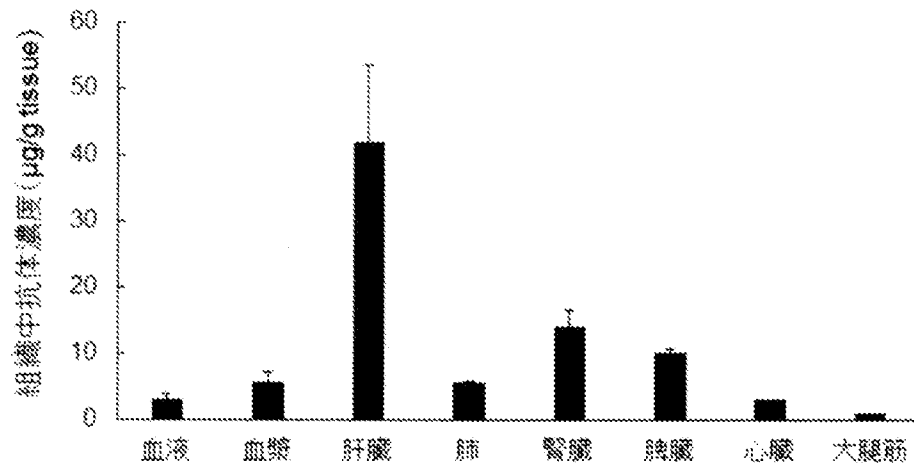
[図7]



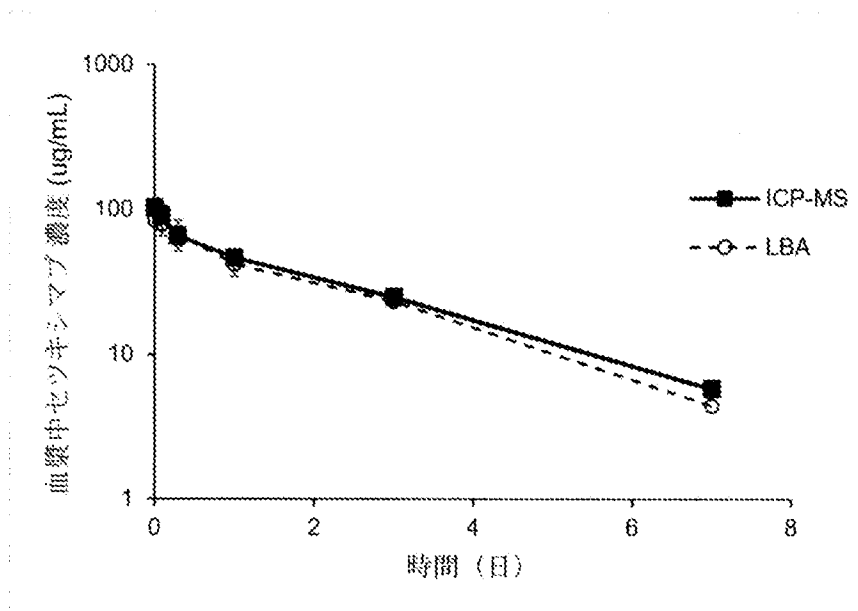
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/028099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 14/00</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/07</i> (2010.01)i; <i>C12N 15/11</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/15</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/50</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/58</i> (2006.01)i; <i>G01N 27/62</i> (2021.01)i FI: G01N33/15 Z; G01N27/62 V; G01N33/58 Z; G01N33/50 Z; C07K14/00; C12N15/11 Z; C12N5/07; C07K16/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/00; C07K16/00; C12N5/07; C12N15/11; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/58; G01N27/62 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>BOROS, Eszter. Metabolite profiling with HPLC-ICP-MS as a tool for in vivo characterization of imaging probes. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry, 22 January 2018, vol. 3, no. 1, pp. 1-10 abstract, fig. 1</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GLASSMAN, Patrick M., Assessments of antibody biodistribution. Journal of clinical pharmacology. March 2015, vol. 55, suppl 3, pp. S29-S38 abstract, p. S33, right column</td> <td>1-9, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2005/023906 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 March 2005 (2005-03-17) (example 4-4) 薬物動態試験によるステルス性評価, (Stealth evaluation by pharmacokinetic studies)</td> <td>1-9, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>袁景利, 蛍光性希土類錯体の機能化とバイオテクノロジー分野への応用, BUNSEK KAGAKU, 1999, vol. 48, no. 12, pp. 1077-1083, (YUAN, Jing Li. Functionalization of fluorescent lanthanide complexes and their applications to biotechnology) abstract</td> <td>1-9, 13-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	BOROS, Eszter. Metabolite profiling with HPLC-ICP-MS as a tool for in vivo characterization of imaging probes. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry, 22 January 2018, vol. 3, no. 1, pp. 1-10 abstract, fig. 1	1-15	Y	GLASSMAN, Patrick M., Assessments of antibody biodistribution. Journal of clinical pharmacology. March 2015, vol. 55, suppl 3, pp. S29-S38 abstract, p. S33, right column	1-9, 13-15	Y	WO 2005/023906 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 March 2005 (2005-03-17) (example 4-4) 薬物動態試験によるステルス性評価, (Stealth evaluation by pharmacokinetic studies)	1-9, 13-15	Y	袁景利, 蛍光性希土類錯体の機能化とバイオテクノロジー分野への応用, BUNSEK KAGAKU, 1999, vol. 48, no. 12, pp. 1077-1083, (YUAN, Jing Li. Functionalization of fluorescent lanthanide complexes and their applications to biotechnology) abstract	1-9, 13-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	BOROS, Eszter. Metabolite profiling with HPLC-ICP-MS as a tool for in vivo characterization of imaging probes. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry, 22 January 2018, vol. 3, no. 1, pp. 1-10 abstract, fig. 1	1-15															
Y	GLASSMAN, Patrick M., Assessments of antibody biodistribution. Journal of clinical pharmacology. March 2015, vol. 55, suppl 3, pp. S29-S38 abstract, p. S33, right column	1-9, 13-15															
Y	WO 2005/023906 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 March 2005 (2005-03-17) (example 4-4) 薬物動態試験によるステルス性評価, (Stealth evaluation by pharmacokinetic studies)	1-9, 13-15															
Y	袁景利, 蛍光性希土類錯体の機能化とバイオテクノロジー分野への応用, BUNSEK KAGAKU, 1999, vol. 48, no. 12, pp. 1077-1083, (YUAN, Jing Li. Functionalization of fluorescent lanthanide complexes and their applications to biotechnology) abstract	1-9, 13-15															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 07 October 2021		Date of mailing of the international search report 26 October 2021															
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.															

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	MEHANNA, Stephanie. Rapid quantification of ruthenium(ii) polypyridyl anti-cancer drugs using a selective ligand dissociation LC-MS/MS method. Analytical Methods, 25 August 2020, vol. 12, no. 37, pp. 4517-4525 abstract	1-15
A	荒野 泰, 連載 “DDS研究・開発に有用な試薬”, 第14回金属キレート試薬, Drug Delivery System, 2018, vol. 33, no. 1, pp. 51-53, (ARANO, Yasushi, [Serial] “Reviews on useful reagents for DDS research and development”, The 14th Bifunctional Chelating Agent) 1. Introduction	1-15
A	平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業「微生物培養による窒素安定同位体元素で標識した有用化学物質の製造技術の開発」研究開発成果等報告書 [online], March 2013 [retrieved on: 07 October 2021], pp. 1-37, Internet <URL:https://www.chusho.meti.go.jp/keiei/sapoin/portal/seika/2010/22130819172.pdf>, non-official translation (2012 Strategic Basic Technology Advancement Support Project “Development of Manufacturing Technology for Useful Chemical Substances Labeled with Stable Nitrogen Isotopes by Microbial Culture” Research and Development Results Report) p. 2, lines 16-20	1-15
A	LIU, Y., Radiolabeling of monoclonal antibodies with metal chelates, Pure and Applied Chemistry, March 1991, vol. 63, no. 3, pp. 427-463 abstract	1-15
A	JP 2004-516490 A (MDS INC., DOING BUSINESS AS MDS SCIEX) 03 June 2004 (2004-06-03) abstract	1-15
A	JP 2020-518673 A (FUSION PHARMACEUTICALS INC.) 25 June 2020 (2020-06-25) abstract	1-15
A	CN 111228521 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 05 June 2020 (2020-06-05) abstract	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/028099

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2005/023906	A1	17 March 2005	EP	1666518	A1
				paragraph [0120]		
				EP	1683812	A1
				EP	1790665	A1
				US	2007/0031503	A1
				US	2007/0134334	A1
				US	2009/0148534	A1
				US	2012/0183567	A1
				US	2014/0011991	A1
				WO	2005/054301	A1
				WO	2005/054302	A1
				WO	2006/028110	A1
				KR	10-2006-0065689	A
				TW	200524959	A
				KR	10-2006-0132581	A
				TW	200526253	A
				KR	10-2007-0105302	A
				TW	200612991	A
JP	2004-516490	A	03 June 2004	WO	2002/054075	A1
				abstract		
				US	2002/0086441	A1
				US	2004/0072250	A1
				US	2008/0176334	A1
				US	2014/0070092	A1
				EP	1348127	A1
JP	2020-518673	A	25 June 2020	WO	2018/204869	A1
				abstract		
				US	2019/0030194	A1
				EP	3619191	A1
				KR	10-2020-0006087	A
				CN	111263747	A
CN	111228521	A	05 June 2020	(Family: none)		

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/00(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i; G01N 27/62(2021.01)i FI: G01N33/15 Z; G01N27/62 V; G01N33/58 Z; G01N33/50 Z; C07K14/00; C12N15/11 Z; C12N5/07; C07K16/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K14/00; C07K16/00; C12N5/07; C12N15/11; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/58; G01N27/62		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	BOROS Eszter, Metabolite profiling with HPLC-ICP-MS as a tool for in vivo characterization of imaging probes, EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry, 2018.01.22, Vol.3 No.1, Page.1-10 Abstract Fig.1	1-15
Y	GLASSMAN Patrick M, Assessments of antibody biodistribution, Journal of clinical pharmacology, 2015.03, Vol. 55 Suppl 3, Page.S29-S38 Abstract S33ページ右欄	1-9, 13-15
Y	WO 2005/023906 A1 (中外製薬株式会社) 17.03.2005 (2005-03-17) (実施例4-4) 薬物動態試験によるステルス性評価	1-9, 13-15
Y	袁景利, 蛍光性希土錯体の機能化とバイオテクノロジー分野への応用, BUNSEI KAGAKU, 1999, Vol.48 No.12, Page.1077-1083 要旨	1-9, 13-15
P, A	MEHANNA Stephanie, Rapid quantification of ruthenium(ii) polypyridyl anti-cancer drugs using a selective ligand dissociation LC-MS/MS method, Analytical Methods, 2020.08.25, Vol.12 No.37, Page.4517-4525 Abstract	1-15
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.10.2021		国際調査報告の発送日 26.10.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 三木 隆 2J 3312 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	荒野 泰, 連載 “DDS 研究・開発に有用な試薬” 第14回 金属キレート試薬, Drug Delivery System, 2018, Vol.33 No.1, Page.51-53 1. はじめに	1-15
A	平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業 「微生物培養による窒素安定同位体元素で標識した有用化学物質の製造技術の開発」 研究開発成果等報告書 [オンライン], 2013.03 [検索日 2021.10.07], Page.1-37, インターネット<URL: https://www.chusho.meti.go.jp/keiei/sapoin/portal/seika/2010/22130819172.pdf > 2ページ16-20行	1-15
A	LIU Y, Radiolabeling of monoclonal antibodies with metal chelates, Pure and Applied Chemistry, 1991.03, Vol.63 No.3, Page.427-463 Abstract	1-15
A	JP 2004-516490 A (エムディーエス・インコーポレーテッド・ドゥーイング・ビジネス・アズ・エムディーエス・サイエックス) 03.06.2004 (2004 - 06 - 03) [要約]	1-15
A	JP 2020-518673 A (フュージョン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド) 25.06.2020 (2020 - 06 - 25) [要約]	1-15
A	CN 111228521 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 05.06.2020 (2020 - 06 - 05) 摘要	1-15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/028099

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2005/023906	A1	17.03.2005	EP	1666518	A1	
				[0120]			
				EP	1683812	A1	
				EP	1790665	A1	
				US	2007/0031503	A1	
				US	2007/0134334	A1	
				US	2009/0148534	A1	
				US	2012/0183567	A1	
				US	2014/0011991	A1	
				WO	2005/054301	A1	
				WO	2005/054302	A1	
				WO	2006/028110	A1	
				KR	10-2006-0065689	A	
				TW	200524959	A	
				KR	10-2006-0132581	A	
				TW	200526253	A	
				KR	10-2007-0105302	A	
				TW	200612991	A	
JP	2004-516490	A	03.06.2004	WO	2002/054075	A1	
				Abstract			
				US	2002/0086441	A1	
				US	2004/0072250	A1	
				US	2008/0176334	A1	
				US	2014/0070092	A1	
				EP	1348127	A1	
JP	2020-518673	A	25.06.2020	WO	2018/204869	A1	
				Abstract			
				US	2019/0030194	A1	
				EP	3619191	A1	
				KR	10-2020-0006087	A	
				CN	111263747	A	
CN	111228521	A	05.06.2020	(ファミリーなし)			