

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391165 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.09

(22) Дата подачи заявки
2021.10.15

(51) Int. Cl. C07K 1/13 (2006.01)
A61K 33/24 (2019.01)
A61K 33/244 (2019.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 41/00 (2020.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(54) РАДИОАКТИВНЫЕ КОМПЛЕКСЫ АНТИ-HER2 АНТИТЕЛА И
РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

(31) 2020-174840; 2020-215740; 2021-024688

(32) 2020.10.16; 2020.12.24; 2021.02.18

(33) JP

(86) PCT/JP2021/038207

(87) WO 2022/080481 2022.04.21

(71) Заявитель:
НИХОН МЕДИ-ФИЗИКС КО., ЛТД.
(JP)

(72) Изобретатель:

Каватани Минору, Ханада Такахиса,
Тоноя Гота, Такеда Такуя (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет конъюгат, стабильность которого выше, чем у обычных конъюгатов, без снижения эффективности. Конъюгат по настоящему изобретению представляет собой конъюгат анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.

A1

202391165

202391165

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577865EA/042

РАДИОАКТИВНЫЕ КОМПЛЕКСЫ АНТИ-HER2 АНТИТЕЛА И РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

Область техники, к которой относится изобретение

[0001]

Настоящее изобретение относится к радиоконъюгату анти-HER2 антитела и радиофармацевтическому средству.

Предпосылки создания изобретения

[0002]

HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа) представляет собой рецептор фактора роста, идентифицированный как генный продукт человеческого онкогена HER2/neu, и представляет собой белок трансмембранного типа с молекулярной массой около 185 кДа.

[0003]

Трастузумаб известен в качестве анти-HER2 антитела и используется клинически в качестве противоопухолевого средства, применяемого при раке молочной железы или раке желудка со сверхэкспрессией HER2.

[0004]

Известно, что трастузумаб представляет собой антитело, используемое в имеющихся на рынке нескольких ADC (конъюгатах антител с лекарственными средствами). ADC представляет собой лекарственный препарат, в котором химиотерапевтическая полезная нагрузка (лекарство) ковалентно связана с антителом через линкер.

Лекарственные средства на основе антител обладают высокой селективностью в отношении мишеней и относительно небольшим количеством побочных эффектов, но иногда их эффективность недостаточна. Химиотерапевтические средства обладают высокой эффективностью, но их низкая селективность в отношении мишеней увеличивает минимальную эффективную дозу, необходимую для уничтожения раковых клеток, и снижает максимально переносимую дозу, поскольку дозу нельзя значительно увеличивать с точки зрения токсичности, что вызывает проблему узкого диапазона терапевтических доз.

В соответствии с ADC, более высокие количества химиотерапевтических средств могут избирательно доставляться к раковым клеткам. Ожидается, что это приведет к более широкому диапазону терапевтических доз, поскольку более низкие дозы достигают эффекта, достижение химиотерапевтическими средствами нормальных клеток уменьшается, а максимально переносимые дозы увеличиваются.

[0005]

Одним из подходов к ADC является радиоиммуноконъюгат. В радиоиммуноконъюгатах вместо полезных нагрузок используются радионуклиды.

[0006]

Например, в документах непатентной литературы 1 и 2 описываются ^{225}Ac -меченный трастузумаб, где трастузумаб рандомизированно метят ^{225}Ac путем использования 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10 тетрауксусной кислоты (DOTA) в качестве хелатирующего агента и взаимодействия изотиоцианатной группы, введенной в DOTA, с концевой аминогруппой трастузумаба.

[0007]

Кроме того, документ патентной литературы 1 описывает ^{225}Ac -меченный трастузумаб и ^{225}Ac -меченный Пертузумаб, где трастузумаб является рандомизированно меченным ^{225}Ac , в качестве анти-HER2 антител, которые получают путем рандомизированной модификации трастузумаба и пертузумаба азидной группой и осуществления их клик-реакции с DOTAGA-DBCO, меченным Ac-225.

[0008]

Кроме того, радиоиммуноконъюгаты, в которых в качестве радионуклидов используются радионуклиды, излучающие гамма-лучи и позитроны, можно использовать в медицине для радиологических исследований. Документ патентной литературы 2 описывает конъюгат пептида, который сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела и анти-HER2 антитела. Кроме того, документ патентной литературы 3 описывает, что DTPA включали в этот пептид для модификации трастузумаба и трастузумаб метили при помощи In-111 с получением ^{111}In -меченного трастузумаба, и что DFO включали в пептид для модификации трастузумаба и трастузумаб метили при помощи Zr-89 с получением ^{89}Zr -меченного трастузумаба.

Перечень ссылочных документов

Патентная литература

[0009]

[PTL 1] документ патентной литературы 1

WO2019/125982

[PTL 2] документ патентной литературы 2

WO2016/186206

[PTL 3] документ патентной литературы 3

WO2017/217347

Непатентная литература

[0010]

[NPL 1] документ непатентной литературы 1

Cancer Res.2003 Aug 15; 63(16):5084-90

[NPL 2] документ непатентной литературы 1

Clin Cancer Res.2004 Jul 1; 10(13):4489-97

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0011]

Однако из полученных авторами настоящего изобретения результатов ясно следует, что радиоконъюгат анти-HER2 антитела, который образует тиомочевинную связь посредством реакции между DOTA, в которую была введена изотиоцианатная группа, и аминок группой, имеет такие проблемы, как низкая стабильность.

[0012]

Документ патентной литературы 1 не описывает сайт-специфическую модификацию анти-HER2 антитела пептидами. Кроме того, она не раскрывает и не предполагает проблему анти-HER2 антитела, которое образует тиомочевинную связь.

Решение проблемы

[0013]

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой конъюгат анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.

[0014]

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее вышеуказанный конъюгат в качестве активного ингредиента.

[0015]

Кроме того, еще один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активных ингредиентов, где связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней.

[0016]

“Связь” в настоящем изобретении означает как непосредственное связывание, так и опосредованное связывание, если не указано иное.

Полезные эффекты изобретения

[0017]

В соответствии с настоящим изобретением представлен радиоконъюгат анти-HER2 антитела, стабильность которого выше, чем у обычных конъюгатов, без снижения эффективности.

Краткое описание чертежей

[0018]

[Фиг. 1]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолью в группе введения радиоконъюгата (Пример 1), группе введения

радиоконъюгата (Сравнительный пример 1), контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда объем опухоли во время введения каждого лекарственного средства установлен равным 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение \pm стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, “*” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой введения антитела; “**” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой введения антитела, “†” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с группой введения носителя, и “‡” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p < 0,01$) по сравнению с группой введения носителя.

[Фиг. 2]

График, показывающий изменения массы тела во времени у мышей с опухолями в группе введения радиоконъюгата (Пример 1), группе введения радиоконъюгата (Сравнительный пример 1), контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда масса тела во время введения каждого лекарственного средства установлена равной 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. На графике представлено среднее значение \pm стандартное отклонение массы тела в каждой группе.

[Фиг. 3]

График, показывающий результаты оценки антигенсвязывающих свойств радиоконъюгатов, полученных в соответствии с Примером 1 и Сравнительным примером 1. Вертикальная ось указывает значения, полученные путем нормализации значения, полученного путем деления числа отсчетов в интересующей области (ROI), установленной на используемом срезе опухоли, на площадь ROI, со значением, полученным путем деления числа отсчетов стандартного источника излучения на площадь стандартного источника излучения. Горизонтальная ось указывает тип клеток среза опухоли, используемого в каждую дату оценки. График представляет среднее значение \pm стандартное отклонение для каждого образца ($n=10$).

[Фиг. 4]

График, показывающий результаты оценки антигенсвязывающих свойств радиоконъюгатов, полученных в соответствии с Примером 4 и Сравнительным примером 4. Вертикальная ось указывает значения, полученные путем нормализации значения, полученного путем деления числа отсчетов в интересующей области (ROI), установленной на используемом срезе опухоли, на площадь ROI, со значением, полученным путем деления числа отсчетов стандартного источника излучения на площадь стандартного источника излучения. Горизонтальная ось указывает тип клеток среза опухоли, используемого в каждую дату оценки. График представляет среднее значение \pm

стандартное отклонение для каждого образца ($n=10$).

[Фиг. 5]

График, показывающий результаты оценки антигенсвязывающих свойств радиокоњугатов, полученных в соответствии с Примером 5 и Сравнительным примером 5. Вертикальная ось указывает значения, полученные путем нормализации значения, полученного путем деления числа отсчетов в интересующей области (ROI), установленной на используемом срезе опухоли, на площадь ROI, со значением, полученным путем деления числа отсчетов стандартного источника излучения на площадь стандартного источника излучения. Горизонтальная ось указывает тип клеток среза опухоли, используемого в каждую дату оценки. График представляет среднее значение \pm стандартное отклонение для каждого образца ($n=10$).

[Фиг. 6]

Изображения, демонстрирующие репрезентативные иллюстративные результаты ПЭТ-визуализации мышинной модели с подкожной опухолью из клеток SK-OV-3, которой вводили радиокоњугат, полученный в соответствии с Примером 2. Стрелки на Фиг. указывают раковую опухоль.

[Фиг. 7]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями в каждой группе введения радиокоњугата и каждой группе введения лекарственного средства ADC. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда объем опухоли во время введения каждого лекарственного средства установлен равным 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение \pm стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, “*” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p<0,05$) по сравнению с группой с низкой дозой ENHERTU (зарегистрированная товарный знак).

[Фиг. 8]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями в каждой группе введения радиокоњугата, каждой группе введения лекарственного средства ADC, контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда объем опухоли во время введения каждого лекарственного средства установлен равным 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение \pm стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, “***” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой введения антитела, и “‡” представляет момент времени, когда наблюдали значительное отличие ($p<0,01$) по сравнению с группой введения носителя.

Описание вариантов осуществления

[0019]

(1) Радиоконъюгат

Настоящее изобретение направлено на конъюгат анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь (далее также называемый радиоконъюгатом по настоящему изобретению).

[0020]

(1-1) Радионуклид металла

Радионуклид металла, содержащийся в радиоконъюгате по настоящему изобретению, представляет собой радионуклид, испускающий α -излучение, радионуклид, испускающий β -излучение, радионуклид, испускающий позитрон, или радионуклид, испускающий γ -излучение. Когда радиоконъюгат по настоящему изобретению используют для терапии рака, предпочтительно использовать радионуклид, испускающий α -излучение, или радионуклид, испускающий β -излучение. Когда радиоконъюгат по настоящему изобретению используют для диагностики или выявления рака, предпочтительно использовать радионуклид, испускающий позитрон, или радионуклид, испускающий γ -излучение. Примеры радионуклида, испускающего α -излучение, включают Bi-212, Bi-213, Ac-225 и Th-227. Примеры радионуклида, испускающего β -излучение, включают Cu-64, Y-90 и Lu-177. Примеры радионуклида, испускающего позитрон, включают Cu-64, Ga-68, Y-86 и Zr-89. Примеры радионуклида, испускающего γ -излучение, включают Tc-99m и In-111. Радионуклид металла, содержащийся в радиоконъюгате по настоящему изобретению, более предпочтительно представляет собой Ac-225, Y-90, Lu-177 или Zr-89.

[0021]

(1-2) Антитело

Антитело, содержащееся в радиоконъюгате по настоящему изобретению, представляет собой иммуноглобулин, который специфически связывается с HER2 (далее также указано как антитело, используемое в настоящем изобретении). Антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть поликлональным антителом или моноклональным антителом, предпочтительно моноклональным антителом. Происхождение антител конкретно не ограничивается, и примеры включают антитела животных, отличных от человека, млекопитающих, отличных от человека, и людей, предпочтительно человека, крысы, мыши и кролика. Когда антитело происходит от видов, отличных от человека, его предпочтительно подвергают химеризации или гуманизации с использованием хорошо известных методов. Антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть химерным антителом, гуманизированным антителом или человеческим антителом. Антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть биспецифическим антителом.

[0022]

Антитело, используемое в радиоконъюгате по настоящему изобретению, более

предпочтительно может представлять собой трастузумаб или пертузумаб.

Трастузумаб представляет собой полученное методом генной рекомбинации гуманизованное моноклональное антитело, в котором аминокислотная последовательность антигенсвязывающего сайта мышиного моноклонального антитела (4D5) генетически заменена соответствующей частью IgG₁ человека. Он состоит из определяющей комплементарность области мышиного моноклонального антитела против рецептора эпителиального фактора роста человека 2 типа (HER2), человеческой каркасной области и константной области IgG₁ человека. Трастузумаб продуцируется клетками яичников китайского хомячка.

В настоящем описании трастузумаб представляет собой антитело, описанное в японском переводе публикации заявки РСТ № Н6-508267, которое конкретно представляет собой гуманизованное антитело, содержащее аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи:

[0023]

```
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSGSRSGTDF
LTISSLQPEDFATYYCQQHNYTTPPTFGQGTKEIKR
```

(SEQ ID NO: 1)

[0024]

и аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи:

[0025]

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIDTKYIHW
VRQAPGKGLVWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA
DTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD
YWGQGTLLVTVSS
```

(SEQ ID NO: 2)

[0026]

Трастузумаб клинически используется в качестве противоопухолевого средства, применяемого при раке молочной железы с подтвержденной гиперэкспрессией HER2 или неоперабельном прогрессирующем или рецидивирующем раке желудка с подтвержденной гиперэкспрессией HER2, и доступен как Герцептин (зарегистрированная торговая марка) или различные биоэквивалентные препараты (Трастузумаб BS).

Герцептин (зарегистрированная торговая марка) и трастузумаб в качестве его биоэквивалентного препарата представляют собой гликопротеины (молекулярная масса: около 148000), состоящие из 2 молекул Н-цепи (γ1 цепь), состоящей из 450 аминокислотных остатков, и 2 молекул L-цепи (κ цепь), состоящей из 214 аминокислотных остатков.

[0027]

Пертузумаб представляет собой полученное методом генной рекомбинации

гуманизированное моноклональное антитело, в котором аминокислотная последовательность антигенсвязывающего сайта мышинового моноклонального антитела (2C4) генетически заменена соответствующей частью IgG₁ человека. Он состоит из определяющей комплементарность области мышинового моноклонального антитела против HER2, человеческой каркасной области IgG₁ и константной области IgG₁ человека. Пертузумаб продуцируется клетками яичников китайского хомячка. Пертузумаб клинически используется в качестве противоопухолевого средства, применяемого при HER2-положительном раке молочной железы, и доступен как PERJETA (зарегистрированная торговая марка). В PERJETA (зарегистрированная торговая марка) пертузумаб представляет собой гликопротеин (молекулярная масса: около 148000), состоящий из 2 молекул H-цепи (γ1 цепь), состоящей из 449 аминокислотных остатков, и 2 молекул L-цепи (κ цепь), состоящей из 214 аминокислотных остатков.

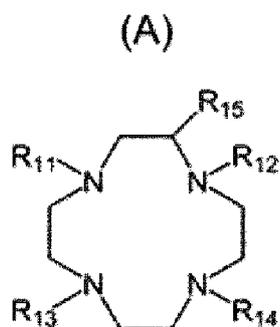
[0028]

(1-3) Хелатирующий агент

В настоящем изобретении хелатирующий агент конкретно не ограничивается при условии, что он имеет участок в своей структуре, где координируется радионуклид металла. Примеры хелатирующего агента включают СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-Тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусная кислота), СДТА (Циклогексан-транс-1,2-диамин тетрауксусная кислота), СДТРА (4-циано-4-[[[(додецилтио)тиоксометил]тио]-пентановая кислота), ДОТА (1,4,7,10-Тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), ДОТМА ((1R,4R,7R,10R)-α,α',α'',α'''-тетраметил-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), ДОТАМ (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан), ДОТА-ГА (α-(2-Карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), ДОТР (((1,4,7,10-Тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетракис(метилен))тетрафосфоновая кислота), ДОТМР (1,4,7,10-Тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновая кислота)), ДОТА-4АМР (1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновая кислота)), Д02Р (Тетраазабициклододекандиметанфосфоновая кислота), дефероксамин (ДФО), ДТРА (Глицин, N, N-бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-), СНХ-А''-ДТРА (2,2'-((2-(((1S,2R)-2-(бис(карбоксиметил)амино)циклогексил)(карбоксиметил)амино)этил)азанедиил)диуксусная кислота), ДТРА-ВМА (5,8-Бис(карбоксиметил)-11-[2-(метиламино)-2-оксоэтил]-3-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-13-овая кислота), ЕДТА (2,2',2'',2'''-(этан-1,2-диилбис(азантриил))тетрауксусная кислота), НОТА (1,4,7-Триазабициклононан-1,4,7-триуксусная кислота), НОТР (1,4,7-Триазабициклононан-1,4,7-трилтрис(метиленфосфоновая кислота)), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазабициклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовая кислота), ТЭТА (1,4,8,11-Тетраазабициклотетрадекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусная кислота), ТТНА (3,6,9,12-Тетракис(карбоксиметил)-3,6,9,12-тетраазатетрадекандиовая кислота), НЕНА (1,2,7,10,13-гексаазабициклооктадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусная кислота), 1,2-НОРО (N, N',N'',N'''-тетра(1,2-дигидро-1-гидрокси-2-оксопиридин-6-карбонил)-1,5,10,14-

тетраазатетрадекан), PEPA (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусная кислота), H4octapa (N, N'-бис(6-карбоксо-2-пиридилметил)-этилендиамин-N, N'-диуксусная кислота), H2bispa2 (6,6'-({9-гидрокси-1,5-бис(метоксикарбонил)-2,4-ди(пиридин-2-ил)-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил}бис(-метилен)) дипиколиновая кислота), H2dedpa (1,2-[[6-(карбоксо)-пиридин-2-ил]-метиламино]этан), H2macopa (6-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-N, N'-метил)пиколиновая кислота), H5decapa (N, N''-бис(6-карбоксо-2-пиридилметил)-диэтилентриамин-N, N',N''-триуксусная кислота), H6phospa (N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), HP-D03A (Гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусная кислота) и порфирин. Соединение, представленное следующей формулой (A), является предпочтительным.

[0029]



[0030]

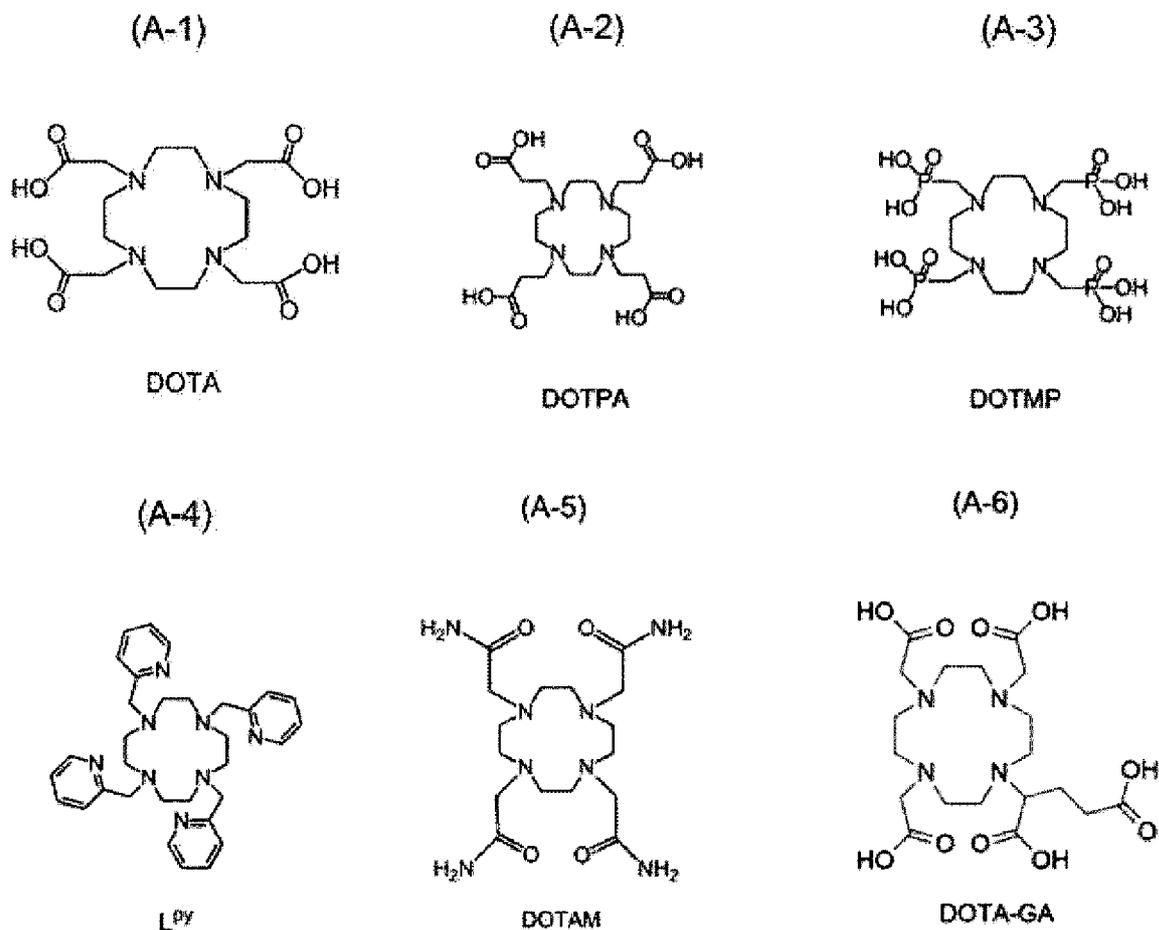
в формуле (A) R_{11} , R_{12} , R_{13} и R_{14} каждый независимо представляет собой группу, состоящую из $-(CH_2)_pCOOH$, $-(CH_2)_pC_5H_5N$, $-(CH_2)_pPO_3H_2$, $-(CH_2)_pCONH_2$ или $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, R_{15} представляет собой атом водорода, и p представляет собой целое число не менее 0 и не более 3.

[0031]

Соединение, представленное формулой (A), предпочтительно представляет собой соединение, содержащее структуру, полученную из 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA) или ее производного. В частности, соединение может содержать в своей структуре структуру, полученную из одного хелатирующего агента, выбранного из DOTA (1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTMA ((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан), DOTA-GA (α -(2-Карбоксиил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTP (((1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетракис(метилен))тетрафосфовая кислота), DOTMP (1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфовая кислота)), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфовая кислота)) и D02P (Тетраазациклододекан диметанфосфовая кислота). Более предпочтительно, могут быть указаны соединения, представленные следующими формулами (A-1)-(A-6).

Хелатирующий агент, используемый в радиоконъюгате по настоящему изобретению, также предпочтительно представляет собой DOTA-GA (соединение, представленное формулой (A-6)).

[0032]



[0033]

Хелатирующий агент, используемый в настоящем изобретении, связан с пептидом через линкер (L). В радиоконъюгате по настоящему изобретению хелатирующий агент и линкер (L) предпочтительно связаны ковалентной связью. Следовательно, в радиоконъюгате по настоящему изобретению некоторые группы в соединении вышеуказанного хелатирующего агента могут быть замещены группами, образующими ковалентные связи с линкером (L). Например, когда хелатирующий агент, используемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение, представленное формулой (A), R₁₂ или R₁₅ могут быть замещены группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L). Предпочтительно, когда R₁₂ замещен группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L), R₁₅ представляет собой атом водорода, когда R₁₂ представляет собой группу, состоящую из -(CH₂)_pCOOH, -(CH₂)_pC₅H₅N, -(CH₂)_pPO₃H₂, -(CH₂)_pCONH₂ или -(CHCOOH)(CH₂)_pCOOH, R₁₅ замещен группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L).

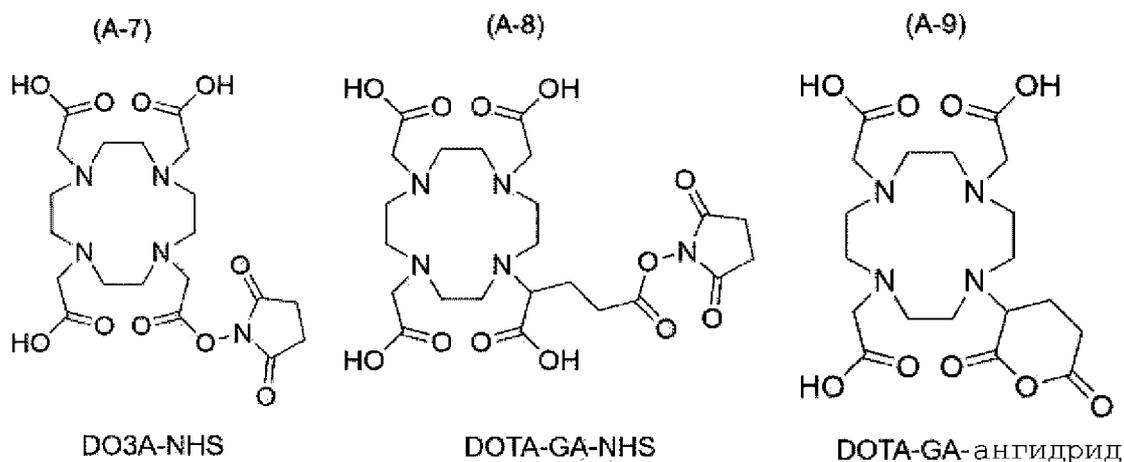
[0034]

Что касается ковалентной связи между хелатирующим агентом и линкером (L), необходимо только, чтобы она не содержала тиомочевинную связь, и она проиллюстрирована углерод-углеродной связью, амидной связью, простой эфирной связью, сложноэфирной связью и т.п.

[0035]

Связь между хелатирующим агентом и линкером (L) может быть образована, например, реакцией группы сложного эфира N-гидроксисукцинимид (NHS) следующей формулы (A-7) или (A-8), или 2,6-диоксотетрагидро-2H-пиранильной группы следующей формулы (A-9) с первичным амином линкера (L).

[0036]



[0037]

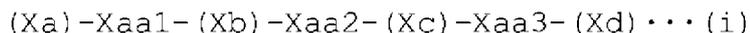
(1-4) Модифицирующий антитело пептид

В настоящем изобретении пептид конкретно не ограничивается при условии, что он модифицирует антитело сайт-специфическим образом, предпочтительно модифицирует сайт-специфическим образом Fc-область, более предпочтительно модифицирует сайт-специфическим образом лизиновый остаток в Fc-области антитела. В результате можно поддерживать активность самого антитела (действие распознавания антигена, нейтрализующее действие, комплемент-активирующее действие и/или опсонизирующее действие).

[0038]

Пептид, используемый в настоящем изобретении, может быть цепочечным пептидом или циклическим пептидом, и циклический пептид является предпочтительным. Более предпочтительно, он содержит аминокислотную последовательность, состоящую не менее чем из 13 и не более чем из 17 аминокислотных остатков, представленную следующей формулой (i) (далее также именуемый “модифицирующий антитело пептид”), и модифицирован сшивающим агентом. В пояснении формулы (i) левая сторона представленной на бумаге аминокислотной последовательности показывает N-концевую сторону, а правая сторона представленной на бумаге аминокислотной последовательности показывает C-концевую сторону.

[0039]



В формуле (i) каждый X_a , X_b , X_c и X_d представляет собой непрерывный X в количестве a , непрерывный X в количестве b , непрерывный X в количестве c и непрерывный X в количестве d , соответственно,

X представляет собой аминокислотный остаток, не содержащий ни тиольной группы, ни галоацетильной группы в боковой цепи,

a , b , c и d каждый независимо представляет собой целое число не менее единицы и не более 5 и удовлетворяет условию $a+b+c+d \leq 14$,

X_{aa1} и X_{aa3} каждый независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галоацетильную группу в боковой цепи, где либо X_{aa1} , либо X_{aa3} представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу, предпочтительно X_{aa1} и X_{aa3} связаны с образованием кольцевой структуры, и

X_{aa2} представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, предпочтительно лизиновый остаток, и X_{aa2} модифицирован сшивающим агентом.

[0040]

Примеры аминокислотного остатка, который может содержаться в X в вышеуказанной формуле (i), включают остатки, полученные из аминокислот, таких как глицин, аланин, фенилаланин, пролин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, серин, треонин, тирозин, метионин и т.п., и X может быть аминокислотным остатком, состоящим из одного и того же типа или разных типов аминокислот.

[0041]

В формуле (i) a , b , c и d конкретно не ограничиваются при условии, что они являются числами в пределах вышеуказанного диапазона. С точки зрения стабильности связывания между пептидом и анти-HER2-антителом, должно быть удовлетворено условие $a+b+c+d \leq 14$, и a предпочтительно представляет собой целое число не менее 1 и не более 3, b предпочтительно представляет собой целое число не менее 1 и не более 3, c предпочтительно представляет собой целое число не менее 3 и не более 5, и d предпочтительно представляет собой целое число не менее 1 и не более 3.

[0042]

По меньшей мере один из X_{aa1} и X_{aa3} представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и X_{aa1} и X_{aa3} могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. Примеры аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, включают цистеин и

гомоцистеин. Такие аминокислотные остатки предпочтительно связаны дисульфидной связью, или сульфидная группа предпочтительно связана с ними через структуру, представленную следующей формулой (4). В формуле (4) ломаная линия указывает на связывающую часть с сульфидной группой.

[0043]



[0044]

Вместо вышеуказанной комбинации Хаа1 и Хаа3 один из Хаа1 и Хаа3 может быть аминокислотным остатком, происходящим из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой может быть аминокислотным остатком, происходящим из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи. Они связаны тиоэфирной связью. Концевая часть галогенацетильной группы замещена галогеном, таким как йод или т.п., и галоген удаляется реакцией с тиольной группой в другой боковой цепи, в результате чего образуется тиоэфирная связь.

[0045]

Конкретные примеры аминокислотной последовательности модифицирующего антитела пептида, представленного формулой (i), включают пептиды, описанные в WO 2016/186206, WO 2017/217347 и WO 2018/230257, и они также могут использоваться.

Предпочтительно, модифицирующий антитело пептид, используемый в настоящем изобретении, представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, представленную следующей формулой:



[0046]

В этой формуле каждый X независимо представляет собой любой аминокислотный остаток отличный от цистеина,

C представляет собой цистеиновый остаток,

H представляет собой гистидиновый остаток,

Хаа1' представляет собой лизиновый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту,

G представляет собой глициновый остаток,

Хаа2' представляет собой остаток глутаминовой кислоты или аспарагиновый остаток,

L представляет собой лейциновый остаток,

V представляет собой валиновый остаток,

W представляет собой триптофановый остаток,

Хаа3' представляет собой аланиновый остаток, сериновый остаток или

треониновый остаток, и

Хаа4' представляет собой тирозиновый остаток или триптофановый остаток.

В приведенной выше формуле N-концевой или C-концевой X1-3 означает, что любые 1-3 аминокислотных остатка X, отличных от цистеина (C или Cys), являются независимыми последовательными и представляют собой последовательность, состоящую из одинаковых или разных аминокислотных остатков, предпочтительно из всех трех разных аминокислотных остатков.

[0047]

Среди них аминокислотная последовательность модифицирующего антитела пептида предпочтительно имеет любую из следующих последовательностей (1)-(14), более предпочтительно следующую последовательность (1), (2), (13) или (14). В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) (Хаа2) представляет собой лизиновый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, предпочтительно лизиновый остаток, (Хаа2) предпочтительно модифицирован сшивающим агентом, и (Хаа1) и (Хаа3) каждый представляет собой гомоцистеиновый остаток. В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) аминокислоты, отличные от (Хаа1), (Хаа2) и (Хаа3), представлены в виде однобуквенной аббревиатуры.

[0048]

- (1) DCAYH(Хаа2)GELVWCT (SEQ ID NO: 3)
- (2) GPDCAYN(Хаа2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 4)
- (3) RCAYH(Хаа2)GELVWCS (SEQ ID NO: 5)
- (4) GPRCAYN(Хаа2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 6)
- (5) SPDCAYH(Хаа2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 7)
- (6) GDDCAYN(Хаа2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 8)
- (7) GPSCAYH(Хаа2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 9)
- (8) GPDCAYN(Хаа2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 10)
- (9) GPDCAYN(Хаа2)GELVWCTHH (SEQ ID NO: 11)
- (10) GPDCAYN(Хаа2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 12)
- (11) SPDCAYH(Хаа2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 13)
- (12) SDDCAYN(Хаа2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 14)
- (13) RGNCAYN(Хаа2)GQLVWCTYH (SEQ ID NO: 15)
- (14) G(Хаа1)DCAYH(Хаа2)GELVWCT(Хаа3)H (SEQ ID NO: 16)

[0049]

Пептид, представленный вышеуказанной формулой (i), или пептид, имеющий последовательности (1)-(14), предпочтительно имеет линкер (L), введенный на N-конце, и амидирован на C-конце. Кроме того, Хаа2 этих пептидов модифицирован сшивающим агентом, что обеспечивает возможность ковалентного связывания пептидов с Fc-областью IgG человека или IgG кролика через сшивающий агент. В настоящем описании "человеческое анти-HER антитело" означает анти-HER антитело, в котором область,

способная связываться с модифицирующим антитело пептидом, является консервативной в человеческом IgG, предпочтительно анти-HER2 антитело, в котором Fc-область человеческого IgG является консервативной.

[0050]

Сшивающий агент может быть подходящим образом выбран специалистами в данной области и может представлять собой соединение, имеющее по меньшей мере два участка, способных связываться с желаемыми аминокислотами (например, лизином, цистеином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, 2-аминосубериновой кислотой, диаминопропионовой кислотой, аргинином и т.д.). Примеры включают, но не ограничиваются этим, сшивающий агент, предпочтительно содержащий две или более сукцинимидильные группы, такой как DSG (дисукцинимидилглутарат), DSS (дисукцинимидилсуберат) и т.п., сшивающий агент, предпочтительно содержащий два или более имидных кислотных фрагмента, такой как DMA (диметиладипимидат·2HCl, диметиладипимидат дигидрохлорид), DMP (диметилпимелимидат·2HCl, диметилпимелимидат дигидрохлорид), DMS (диметилсуберимидат·2HCl, диметилсуберимидат дигидрохлорид) и т.п., и сшивающий агент, имеющий SS-связь, такой как DTBP (диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат·2HCl, диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат дигидрохлорид) и DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионат)) и т.п., и SBAP (сукцинимидил 3-(бромацетиамидо)пропионат). Сшивающий агент, содержащий сукцинимидильную группу, такой как DSS или DSG, взаимодействует с первичным амином, присутствующим на N-конце. Следовательно, при блокировании N-конца и взаимодействии с DSS или DSG только аминокислотная группа Xaa2 может быть специфически модифицирована посредством DSS или DSG. Например, линкер (L) может быть предварительно введен в N-концевую часть модифицирующего антитело пептида и затем взаимодействовать с DSS или DSG. Сукцинимидильная группа DSS или DSG взаимодействует с остатком Lys248 или остатком Lys246, предпочтительно остатком Lys248, в соответствии с Eу-нумерацией, в человеческом анти-HER2 антителе (например, трастузумабе), при этом человеческое анти-HER2 антитело сайт-специфически модифицировано пептидом. Эти Lys остатки присутствуют в Fc-области человеческого IgG, и даже если антитело является анти-HER2 антителом, отличным от трастузумаба, специалисты в данной области техники могут выровнять аминокислотную последовательность антитела и идентифицировать соответствующий Lys остаток.

[0051]

(1-5) Линкер (L)

Линкер (L) конкретно не ограничивается при условии, что он может связывать хелатирующий агент и пептид в радиоконъюгате по настоящему изобретению. Линкер (L), используемый в настоящем изобретении, конкретно не ограничивается при условии, что он не содержит тиомочевинную связь. Его примеры включают замещенную или незамещенную алкильную группу, замещенную или незамещенную гетероалкильную группу, полиэтиленгликолевую (PEG) группу, пептиды, сахарную цепь, дисульфидную

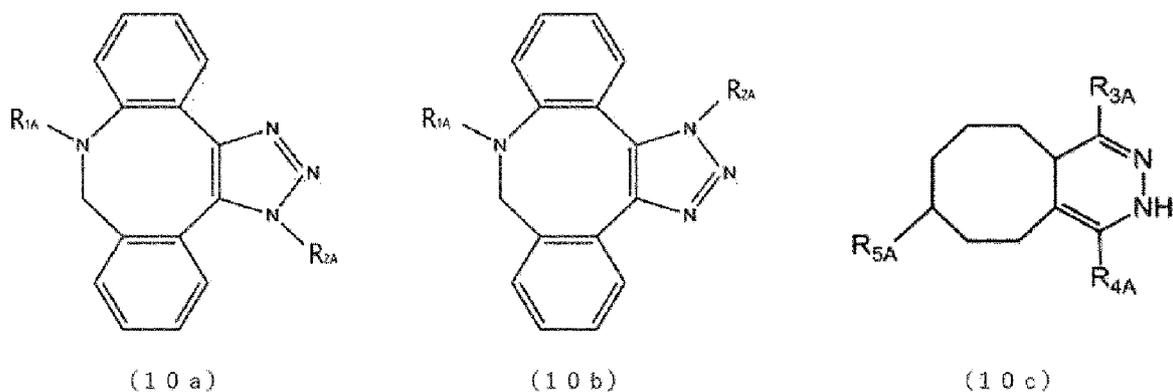
группу, амидную группу, их комбинацию и т.п.

В настоящем описании линкер (L) является общим термином для линкеров, используемых для связывания модифицированного пептидом анти-HER2 антитела и хелатирующего агента, и включает модифицирующий антитело линкер (L₁) и хелатный линкер (L₂). Модифицирующий антитело линкер (L₁), который подробно описан ниже, вводят в N-концевую часть пептида, описанного в (1-4), а хелатный линкер (L₂), который подробно описан ниже, вводят в функциональную группу хелатирующего агента, описанного в (1-3).

[0052]

Линкер (L), используемый в настоящем изобретении, может содержать сайт связывания, образованный клик-реакцией, и предпочтительно модифицирующий антитело линкер (L₁) и хелатный линкер (L₂) связаны посредством клик-реакции. В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы тиомочевинная связь не содержалась между сайтом связывания, образованным клик-реакцией, и хелатирующим агентом. Другими словами, предпочтительно, чтобы хелатный линкер (L₂) не содержал тиомочевинную связь. В контексте настоящей заявки сайт связывания, образованный клик-реакцией, предпочтительно представляет собой структуру, содержащую триазольный скелет, представленную следующей формулой (10a) или (10b), или можно рассматривать структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную следующей формулой (10c). Поскольку формула (10a) и формула (10b) являются изомерами, они могут содержаться в любом соотношении.

[0053]



[0054]

В формуле (10a) и формуле (10b) R_{1A} представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, а R_{2A} представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом. В формуле (10c), один из R_{3A} и R_{4A} представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и R_{5A} представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом. В формуле (10a), формуле (10b) и формуле (10c) сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом связан с пептидом через модифицирующий антитело линкер (L₁), и сайт связывания с

хелатирующим агентом связан с хелатирующим агентом через хелатный линкер (L_2).

[0055]

В радиоконъюгате по настоящему изобретению антитело сайт-специфически модифицировано пептидом, и пептид и хелатирующий агент связаны через линкер (L). Таким образом, одна молекула или две молекулы хелатирующего агента конъюгированы с одной молекулой анти-HER2 антитела.

[0056]

(1-6) Способ получения конъюгата

Способ получения радиоконъюгата по настоящему изобретению включает две стадии, которые представляют собой стадию конъюгации, включающую конъюгацию хелатирующего агента и анти-HER2-антитела, и стадию комплексообразования, включающую образование комплекса радионуклида металла и хелатирующего агента. Стадию конъюгации можно осуществить перед стадией комплексообразования или после стадии комплексообразования.

[0057]

На стадии конъюгации Fc-область антитела сайт-специфически модифицируют хелатирующим агентом или линкером (L), содержащим модифицирующий антитело пептид, показанный в вышеуказанной формуле (i).

[0058]

На стадии комплексообразования хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла (комплексообразование). Используемый радионуклид металла предпочтительно используют способом, обеспечивающим возможность ионизации, более предпочтительно в форме иона, с точки зрения повышения эффективности комплексообразования. На стадии комплексообразования порядок добавления радионуклида металла к хелатирующему агенту не имеет значения при условии, что может образовываться комплекс с радионуклидом металла. Например, в качестве радионуклида можно использовать раствор, в котором ионы радиоактивных металлов растворены в растворителе, состоящем в основном из воды.

После комплексообразования полученный комплекс может быть очищен с использованием фильтрующего фильтра, мембранного фильтра, колонки с различными наполнителями, хроматографии и т.п.

[0059]

В способе получения радиоконъюгата по настоящему изобретению стадию конъюгации предпочтительно осуществляют после стадии комплексообразования.

В более предпочтительном варианте осуществления на стадии комплексообразования (A) образуется комплекс между радионуклидом металла и хелатирующим агентом, содержащим первую атомную группу, способную к клик-реакции, в качестве заместителя для обеспечения образования конъюгата с антителом. Затем, на стадии конъюгации (B), с использованием модифицирующего антитело пептида, представленного вышеуказанной формулой (i), и модифицирующего антитело линкера

(L₁), содержащего вторую атомную группу, способную к клик-реакции, осуществляют клик-реакцию между модифицированным пептидом антителом, в котором Fc-область сайт-специфически модифицирована, и хелатирующим агентом с образованным комплексом, полученным на стадии (A), с получением радиокоњугата по настоящему изобретению.

Стадии (A) и (B) подробно описаны ниже.

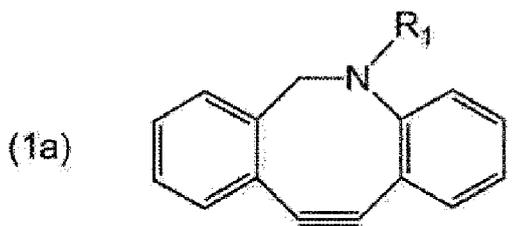
[0060]

Так как комбинация первой атомной группы и второй атомной группы способна к клик-реакции, подходящую комбинацию выбирают в соответствии с типом клик-реакции. Например, можно указать комбинацию алкина и азиды, комбинацию 1,2,4,5-тетразина и алкена и т.п. В этих атомных группах первая атомная группа имеет одну из вышеуказанных комбинаций атомных групп, а вторая атомная группа имеет одну атомную группу, которая отличается от первой атомной группы вышеуказанной комбинации атомных групп. Как для достижения стабильности хелатирующего агента и антитела, так и для повышения эффективности их связывания хелатный линкер (L₂) предпочтительно представляет собой алкин, а модифицирующий антитело линкер (L₁) предпочтительно представляет собой азид, или хелатный линкер (L₂) предпочтительно представляет собой 1,2,4,5-тетразин, а модифицирующий антитело линкер (L₁) предпочтительно представляет собой алкен. Конкретные примеры клик-реакции с использованием таких комбинаций атомных групп включают реакцию присоединения с циклизацией Хасгена, реакцию Дильса-Альдера с обратной потребностью электронов и т.п.

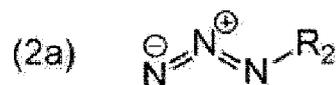
[0061]

Конкретные примеры комбинации атомных групп, способных к клик-реакции, включают, как показано в следующих формулах, комбинацию атомной группы, содержащей дибензилциклооктин (DBCO) в качестве алкина первой атомной группы (формула (1a)), и атомной группы, содержащей азидную группу в качестве азиды второй атомной группы (формула (2a)), и комбинацию атомной группы, содержащей 1,2,4,5-тетразин, в качестве первой атомной группы (формула (1b)) и атомной группы, содержащей транс-циклооктен (TCO), в качестве алкена второй атомной группы (формула (2b)). Предпочтительной является комбинация формулы (1a) и формулы (2a).

[0062]



Дибензилциклооктин

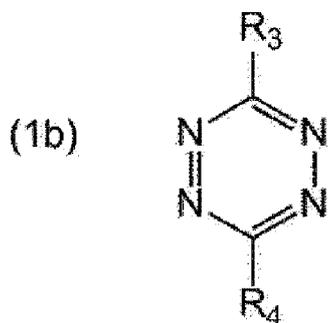


Азид

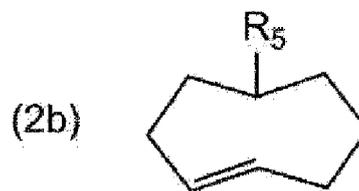
[0063]

В формуле (1a) R_1 представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и в формуле (2a) R_2 представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом.

[0064]



1,2,4,5-тетразин



транс-циклооктен

[0065]

В формуле (1b) один из R_3 и R_4 представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом или модифицирующим антитело пептидом, а другой представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу. Когда атомная группа в формуле (1b) связана с хелатирующим агентом, R_5 представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом, а когда атомная группа в формуле (1b) связана с модифицирующим антитело пептидом, R_5 представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом.

[0066]

Когда используют атомную группу, содержащую дибензилциклооктин (DBCO), представленный вышеуказанной формулой (1a), в качестве алкина первой атомной группы, можно указать различные коммерчески доступные DBCO реагенты. В частности, можно выбрать, например, DBCO-C6-Кислоту, Дибензилциклооктин-Амин, Дибензилциклооктин Малеимид, DBCO-PEG кислоту, DBCO-PEG-спирт, DBCO-PEG-амин, DBCO-PEG-NH-Вос, Карбоксиродамин-PEG-DBCO, Сульфородамин-PEG-DBCO, TAMRA-PEG-DBCO, DBCO-PEG-биотин, DBCO-PEG-DBCO, DBCO-PEG-Малеимид, TCO-PEG-DBCO, DBCO-mPEG и т.п., и предпочтительно использовать Дибензилциклооктин Малеимид.

[0067]

Более предпочтительно на стадии комплексообразования (A) используют соединение, имеющее структуру, представленную следующей формулой (ii).

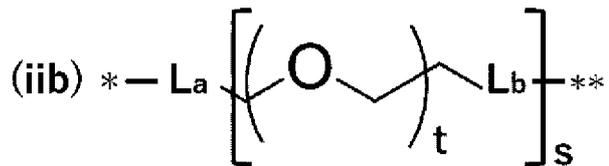


В формуле (ii) A представляет собой вышеуказанный хелатирующий агент, и общий термин B и C представляет собой хелатный линкер (L_2)

[0068]

В формуле (ii) B представлен следующей формулой (iib).

[0069]



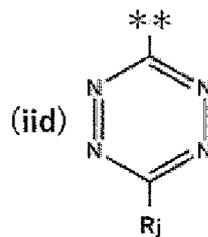
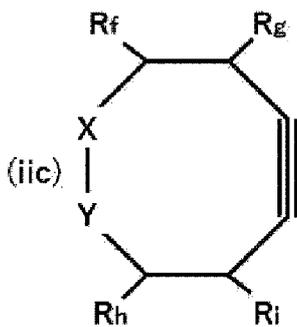
[0070]

В формуле (iib) L_a и L_b каждый независимо представляет собой связующий линкер, содержащий по меньшей мере амидную связь и не менее 1 и не более 50 атомов углерода, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, s имеет значение 0 или 1, $*$ представляет собой сайт связывания с А, и $**$ представляет собой сайт связывания с С.

[0071]

В формуле (ii) С представляет собой либо алкиновое производное, представленное следующей формулой (iic), либо тетразиновое производное, представленное формулой (iid).

[0072]



[0073]

В формуле (iic) X представляет собой $\text{CHR}_k - **$ или $\text{N} - **$, Y представляет собой CHR_k или $\text{C}=\text{O}$, R_k независимо представляет собой атом водорода или алкильную группу, содержащую не менее 1 и не более 5 атомов углерода, когда X представляет собой $\text{CHR}_k - **$ и Y представляет собой CHR_k , тогда R_k фрагменты могут быть объединены с образованием циклоалкильной группы, R_f , R_g , R_h и R_i каждый независимо представляет собой атом водорода, атом галогена или алкильную группу, содержащую не менее 1 и не более 5 атомов углерода, R_f и R_g могут быть объединены или R_h и R_i могут быть объединены с образованием углеводородного кольца, $**$ представляет собой сайт связывания с В, в формуле (iid), $**$ представляет собой сайт связывания с В, и R_j представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу.

[0074]

В качестве хелатирующего агента, используемого на стадии (А), более предпочтительным является производное DOTA вышеуказанной формулы (А), где $R_{11} - R_{14}$ представляют собой $-(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$, p имеет значение 1, R_{15} представляет собой сайт

связывания с В; или производное DO3A или производное DOTAGA, где R₁₁ - R₁₄ представляют собой -(CH₂)_pCOOH, p имеет значение 1, R₁₂ представляет собой сайт связывания (*) с В, и R₁₅ представляет собой атом водорода.

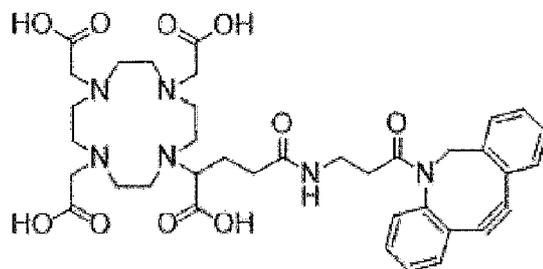
[0075]

В формуле (ii) предпочтительным является DO3A-PEGt-DBCO, где А представляет собой вышеуказанный DO3A, в В, La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s имеет значение 0 или 1, когда s имеет значение 1, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и С представляет собой алкиновое производное, представленное формулой (iic), где, в формуле (iic), X представляет собой N—**, Y представляет собой CHR_k, R_k представляет собой атом водорода, R_f и R_g объединены с образованием бензольного кольца, R_h и R_i объединены с образованием бензольного кольца, и ** представляет собой сайт связывания с В.

[0076]

В формуле (ii) предпочтительным является производное DOTAGA-PEGt-DBCO, где А представляет собой вышеуказанное производное DOTAGA, в В, La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s имеет значение 0 или 1, когда s имеет значение 1, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и С представляет собой алкиновое производное, представленное формулой (iic), где, в формуле (iic), X представляет собой N—**, Y представляет собой CHR_k, R_k представляет собой атом водорода, R_f и R_g объединены с образованием бензольного кольца, R_h и R_i объединены с образованием бензольного кольца, и ** представляет собой сайт связывания с В. Более предпочтительным является следующий DOTAGA-DBCO.

[0077]



DOTAGA-DBCO

[0078]

В молярном соотношении хелатирующего агента и радионуклида металла, представленном как хелатный центр/радионуклид металла, нижний предел предпочтительно составляет не менее 10/1, более предпочтительно не менее 100/1, еще более предпочтительно не менее 500/1, и верхний предел предпочтительно составляет не

более 10000/1, более предпочтительно не более 8000/1, еще более предпочтительно не более 7000/1. Например, предпочтительным является диапазон не менее 100/1 и не более 7000/1, а более предпочтительным является диапазон не менее 500/1 и не более 7000/1.

[0079]

Реакцию комплексообразования предпочтительно осуществляют в растворителе. В качестве растворителя можно использовать воду, физиологический раствор, буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, аммоний-ацетатный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, трис-гидроксиэтил-1-пиперазинэтансульфоокислотный буфер (HEPES-буфер), тетраметиламмоний-ацетатный буфер и т.п., и т.п.

[0080]

Хотя количество растворителя конкретно не ограничивается, с точки зрения практичности на стадии получения нижний предел в начале стадии (А) составляет не менее 0,01 мл, предпочтительно не менее 0,1 мл, более предпочтительно не менее более 1,0 мл, более предпочтительно не менее 10 мл, еще более предпочтительно не менее 100 мл, а верхний предел предпочтительно не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 10 мл, более предпочтительно не более 1,0 мл. Например, оно находится в диапазоне не менее 0,01 мл и не более 100 мл.

[0081]

Что касается концентрации хелатирующего агента в реакционной смеси реакции комплексообразования, с точки зрения выхода желаемого хелатирующего агента нижний предел в начале стадии (А) каждый независимо предпочтительно составляет не менее 0,001 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,01 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,1 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 1 мкмоль/л, а верхний предел составляет предпочтительно не более 1000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 100 мкмоль/л, более предпочтительно не более 10 мкмоль/л. Например, она находится в диапазоне не менее 1 мкмоль/л и не более 100 мкмоль/л.

[0082]

Температура реакции комплексообразования может представлять собой, например, комнатную температуру (25°C), или реакцию осуществляют в условиях нагревания. Для одновременного достижения подавления разложения хелатирующего агента и повышения эффективности комплексообразования нижний предел предпочтительно составляет не менее 20°C, более предпочтительно не менее 30°C, еще более предпочтительно не менее 35°C, еще более предпочтительно не менее 37°C, особенно предпочтительно не менее 45°C. Верхний предел составляет предпочтительно не более 150°C, более предпочтительно не более 120°C, еще более предпочтительно не более 100°C, еще более предпочтительно не более 90°C. Например, предпочтительным является диапазон не менее 30°C и не более 100°C, и более предпочтительным является диапазон не менее 35°C и не более 90°C.

[0083]

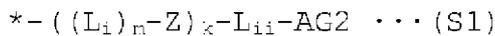
Антитело, используемое на стадии (B), представляет собой модифицированное пептидом антитело, в котором Fc-область (константная область) анти-HER2 антитела, как подробно описано в разделе “(1-2) Антитело” выше, подвергается сайт-специфической модификации с использованием модифицирующего антитело пептида, показанного в вышеуказанной формуле (i), и модифицирующего антитело линкера (L_2), имеющего вторую атомную группу, способную к клик-реакции.

[0084]

Модифицирующий антитело пептид можно получить с использованием комбинации аминокислот, независимо от того, являются они природными аминокислотами или неприродными аминокислотами, используя методы пептидного синтеза, такие как метод жидкофазного синтеза, метод твердофазного синтеза, метод автоматического пептидного синтеза, метод генной рекомбинации, метод фагового дисплея и т.п. При синтезе пептида, при необходимости, функциональные группы используемых аминокислот могут быть защищены. Эти способы можно осуществлять в соответствии со способом, описанным, например, в WO 2017/217347 и WO 2018/230257.

[0085]

Модифицирующий антитело линкер (L_2) может представлять собой линкер, в котором модифицирующий антитело пептид и линкер (L_2), представленный следующей формулой (S1), связаны.



где * представляет собой сайт связывания с N-концом или C-концом пептида,

L_i представляет собой линкерную группу полиэтиленгликоля (PEG),

m представляет собой целое число не менее 1 и не более 50,

Z представляет собой вторую линкерную группу, которая связывает $(L_i)_m$ и L_{ii} ,

k имеет значение 0 или 1,

L_{ii} представляет собой вторую PEG линкерную группу, и

AG2 представляет собой вторую атомную группу.

[0086]

В вышеуказанной формуле (S1) структура Z конкретно не ограничивается при условии, что она представляет собой линкерную структуру, которая связывает $(L_i)_m$ и L_{ii} друг с другом, и включает, например, аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 1 и не более 5 аминокислотных остатков. В этом случае аминокислотная последовательность, содержащаяся в Z , предпочтительно содержит цистеиновый остаток и более предпочтительно связана с L_2 через тиоэфирную группу, образованную связью между тиольной группой цистеинового остатка и малеимидной группой.

[0087]

В настоящем изобретении полиэтиленгликолевая (PEG) линкерная группа, составляющая L_{ii} , предпочтительно имеет структуру, представленную следующей формулой (P2). В формуле (P2) n представляет собой целое число предпочтительно не

менее 1 и не более 50, более предпочтительно не менее 1 и не более 20, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 10, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 6.

[0088]



[0089]

Один конец структуры линкерной группы PEG может быть модифицирован структурой, полученной из коммерчески доступного реагента для ПЭГилирования, или структурой, полученной из реагента, обычно используемого для ПЭГилирования. Хотя они конкретно не ограничиваются, их примеры включают структуры, полученные из дигликолевой кислоты или ее производного, и малеимида или его производного.

[0090]

В качестве способа для введения вышеуказанной второй атомной группы в модифицирующий антитело линкер (L_2) можно указать способ введения, включающий получение модифицирующего антитело пептида, имеющего желаемую аминокислотную последовательность, указанным выше способом, растворение пептида в растворе, содержащем солюбилизующий агент и восстановитель, и, при необходимости, кислоту, добавляя к этому раствору раствор атомной группы, содержащей азидную группу или транс-циклооктен (ТСО), в качестве второй атомной группы в органическом растворителе и перемешивая смесь при комнатной температуре.

[0091]

Когда атомную группу, содержащую азидную группу, вводят в качестве второй атомной группы, азидную группу непосредственно вводят на N-конце или C-конце пептида с использованием коммерчески доступного реагента для введения азидной группы в соответствии с обычным способом, или атомную группу, содержащую азидную группу, можно вводить посредством вышеуказанной линкерной структуры. Примеры используемого реагента для введения азидной группы включают силилазид, азидфосфат, алкиламмоний азид, неорганический азид, сульфонилазид, PEG азид и т.п.

[0092]

Когда атомную группу, содержащую ТСО, вводят в качестве второй атомной группы, ТСО вводят непосредственно на N-конце или C-конце пептида с использованием коммерчески доступного реагента клик-химии, содержащего ТСО, в соответствии с обычным способом, или атомную группу, содержащую ТСО, можно вводить посредством вышеуказанной линкерной структуры.

[0093]

Способ связывания модифицирующего антитело пептида с анти-HER2 антителом человека с получением модифицированного пептидом антитела можно осуществить,

например, путем диспергирования вышеуказанного модифицирующего антитело пептида, анти-HER2 антитела человека, сшивающего агента и катализатора, при необходимости, в соответствующем буфере в соответствии с описанием в WO 2016/186206. В качестве сшивающего агента можно использовать указанные выше.

[0094]

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата модифицирующего антитело пептида и человеческого анти-HER2 антитела, включающему стадию смешивания модифицирующего антитело пептида, модифицированного сшивающим агентом, и человеческого анти-HER2 антитела. На этой стадии может происходить реакция сшивания между модифицирующим антитело пептидом, модифицированным сшивающим агентом, и человеческим анти-HER2 антителом. Реакция сшивания может происходить сайт-специфически между аминокислотным остатком вышеуказанного Хаа2 модифицирующего антитело пептида и Lys248 или Lys246, предпочтительно Lys248, в соответствии с Eu-нумерацией в Fc IgG человека.

[0095]

Условия стадии смешивания конкретно не ограничиваются при условии, что происходит реакция сшивания между модифицирующим антитело пептидом и человеческим анти-HER2 антителом. Например, реакцию можно осуществить путем смешивания модифицирующего антитело пептида и человеческого анти-HER2 антитела в подходящем буфере при комнатной температуре (например, от около 15°C до 30°C). Стадию смешивания можно осуществить путем добавления при необходимости соответствующего количества катализатора, который стимулирует реакцию сшивания.

[0096]

В одном варианте осуществления добавляют растворитель, содержащий по меньшей мере воду, для растворения человеческого анти-HER2 антитела. Растворитель, отличный от воды, включает, например, диметилсульфоксид, ацетонитрил, солевой раствор и буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, аммоний-ацетатный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, Трис-буфер, HEPES буфер, тетраметиламмоний-ацетатный буфер, гистидиновый буфер и т.п. Когда используют буфер, pH при 25°C предпочтительно устанавливают на уровне 4,0 или более и 10,0 или менее, более предпочтительно 5,5 или более и 8,5 или менее, с точки зрения стабильности антитела. В начале реакции сшивания концентрацию антитела предпочтительно устанавливают равной 1,0 мкмоль/л или более в качестве нижнего предела и 1000 мкмоль/л или менее, более предпочтительно 500 мкмоль/л или менее в качестве верхнего предела.

[0097]

Затем добавляют модифицирующий антитело пептид, модифицированный сшивающим агентом, и, при необходимости, катализатор, и смесь диспергируют при 10°C или выше и 30°C или ниже.

Соотношение при смешивании модифицирующего антитело пептида и человеческого анти-HER2 антитела на стадии смешивания конкретно не ограничивается. Молярное отношение модифицирующего антитело пептида к человеческому анти-HER2 антителу может составлять, например, от 1:1 до 20:1, предпочтительно от 2:1 до 20:1 или от 5:1 до 10:1.

[0098]

В предпочтительном варианте осуществления молярное отношение модифицирующего антитело пептида к человеческому анти-HER2 антителу на вышеуказанной стадии смешивания может составлять от 0,5 до 2,2, предпочтительно от 0,8 до 1,8. Таким образом, может быть эффективно получено антитело, в котором одна молекула модифицирующего антитело пептида связана с одной молекулой человеческого анти-HER2 антитела (далее указано как “моновалентное антитело”).

[0099]

Время смешивания (время реакции) на стадии смешивания конкретно не ограничивается при условии, что происходит реакция сшивания между модифицирующим антитело пептидом и человеческим анти-HER2 антителом. Оно составляет, например, от 1 минуты до 5 часов, предпочтительно от 10 минут до 2 часов.

[0100]

Модифицированное пептидом антитело, полученное посредством описанных выше стадий, представляет собой смесь, содержащую антитело, в котором одна молекула модифицирующего антитело пептида связана с одной молекулой человеческого анти-HER2 антитела (т.е. моновалентного антитела), и антитело, в котором две молекулы модифицирующего антитело пептида связаны с одной молекулой человеческого анти-HER2 антитела (далее указано как “двухвалентное антитело”), в любом соотношении. Ее можно использовать как таковую для последующих стадий, или немодифицированное антитело, моновалентное антитело и двухвалентное антитело разделяют и очищают с использованием такого метода, как фильтрация на фильтре, мембранного фильтра, колонки с различными наполнителями, различных видов хроматографии и т.п., и только антитело, имеющее любую валентность, может быть подвергнуто последующим стадиям. Когда немодифицированное антитело не может быть отделено от антитела с другой валентностью в результате очистки, смесь, содержащую их, можно подвергнуть последующим стадиям.

Когда немодифицированное антитело, моновалентное антитело, и двухвалентное антитело разделяют и очищают, для выделения и очистки можно использовать любой из вышеуказанных способов очистки. Возможно использование колонки, заполненной различными наполнителями. Например, можно использовать колонку, заполненную наполнителем, в котором белок, такой как белок А, белок G или вышеуказанный модифицирующий антитело пептид, связан с носителем. Форма носителя для наполнителя, заполняемого в такую колонку, включает гель (например, гель для колоночной хроматографии), частицу, шарик, наночастицу, микрочастицу, макрошарик и

т.п. Материалы носителя включают магнитное вещество, латекс, агарозу, стекло, целлюлозу, сефарозу, нитроцеллюлозу, полистирол и другие полимерные материалы. Конкретным примером является колонка IgG-ВР, в которой вышеуказанный модифицирующий антитело пептид связан с гелем для колоночной хроматографии (см. WO 2021/080008).

[0101]

Колонка IgG-ВР представляет собой колонку, в которой иммобилизован IgG-связывающий пептид. Двухвалентные антитела не могут связываться с колонкой, поскольку сайты связывания уже заняты IgG-связывающими пептидами, и только моновалентные антитела проявляют аффинность к колонке. Используя колонку IgG-ВР и используя различие во взаимодействии с соответствующими модифицирующими антитело пептидами, первая композиция антител, содержащая относительно большие количества немодифицированного антитела и моновалентного антитела, и вторая композиция антител, содержащая относительно большое количество двухвалентного антитела, могут быть соответственно разделены и очищены. В одном предпочтительном варианте осуществления молярное отношение немодифицированного антитела к моновалентному антителу в первой композиции антител составляет 4-47:53-96, предпочтительно 4-30:70-96, более предпочтительно 4-20:80-96, еще более предпочтительно 4-10:90-96.

[0102]

Первую композицию антител или вторую композицию антител, разделенные и очищенные таким образом, можно использовать как таковые для клик-реакции на последующей стадии (В) или можно использовать для клик-реакции на стадии (В) после корректировки концентрации белка содержащегося модифицированного пептидом антитела.

[0103]

Клик-реакцию на стадии (В) осуществляют между способной к клик-реакции первой атомной группой, которая содержится в хелатирующем агенте, и способной к клик-реакции второй атомной группой, которая содержится в модифицированном пептидом антителе. В результате такой клик-реакции образуется связывающая группа (заместитель, способный к конъюгации с антителом), которая связывает хелатирующий агент и антитело.

[0104]

Когда модифицированное пептидом антитело и комплекс, полученный на стадии (А), способны к клик-реакции, порядок их добавления не имеет значения. Например, один из комплекса и модифицированного пептидом антитела добавляют в реакционный контейнер, содержащий растворитель, а затем добавляют другой для осуществления реакции, или один из хелатирующего агента и антитела диспергируют в растворителе, а другой добавляют к дисперсии для осуществления реакции. Альтернативно, их можно одновременно добавить в реакционный контейнер, содержащий растворитель, для

осуществления реакции.

[0105]

В качестве растворителя, используемого для клик-реакции на стадии (B), можно использовать растворитель, содержащий воду. Например, можно использовать воду, физиологический раствор, буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, аммоний-ацетатный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, Трис-буфер, HEPES-буфер, тетраметиламмоний-ацетатный буфер и т.п. Когда используют буфер, для одновременного достижения стабильности комплекса и антитела и эффективности их связывания рН при 25°C предпочтительно устанавливают на уровне не менее 4,0 и не более 10,0, более предпочтительно не менее 5,5 и не более 8,5.

[0106]

Хотя количество реакционной смеси конкретно не ограничивается, с точки зрения практичности на стадии получения нижний предел в начале стадии (B) составляет предпочтительно не менее 0,001 мл, более предпочтительно не менее 0,01 мл, еще более предпочтительно не менее 0,1 мл, еще более предпочтительно не менее 1 мл, а верхний предел составляет предпочтительно не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 10 мл, еще более предпочтительно не более 1 мл. Например, диапазон от не менее 0,001 мл до не более 1000 мл является предпочтительным, и диапазон от не менее 0,1 мл до не более 10 мл является более предпочтительным.

[0107]

Что касается концентраций хелатирующего агента и антитела в реакционной смеси, каждого независимо, нижний предел в начале стадии (B) составляет предпочтительно не менее 0,001 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,01 мкмоль/л, еще более предпочтительно не менее 0,1 мкмоль/л, еще более предпочтительно не менее 1,0 мкмоль/л, а верхний предел составляет предпочтительно не более 1000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 100 мкмоль/л. Например, диапазон от не менее 0,1 мкмоль/л до не более 1000 мкмоль/л является предпочтительным, и диапазон от не менее 1 мкмоль/л до не более 100 мкмоль/л является более предпочтительным, с точки зрения выхода желаемого конъюгата.

[0108]

Для предотвращения непреднамеренной денатурации антитела и повышения эффективности реакции верхний предел температуры клик-реакции на стадии (B) предпочтительно составляет не более 50°C, более предпочтительно не более 40°C. Нижний предел температуры реакции конкретно не ограничивается при условии, что реакция протекает, и предпочтительно составляет не менее 15°C. Время клик-реакции, при условии соответствия вышеуказанной температуре реакции, предпочтительно составляет не менее 5 минут, более предпочтительно не менее 10 минут, предпочтительно не более 24 часов, более предпочтительно не более 20 часов. Например, диапазон от не менее 5 минут до не более 24 часов является предпочтительным, и диапазон от не менее

10 минут до не более 20 часов является более предпочтительным.

[0109]

Полученный конъюгат можно использовать в том виде как он есть или очищенным, используя фильтрующий фильтр, мембранный фильтр, колонку с различными наполнителями, хроматографию или т.п.

[0110]

В конъюгате, полученном на стадиях (A) и (B), лизиновый остаток в Fc-области анти-HER2 антитела специфически модифицирован хелатирующим агентом. Этот конъюгат включает одну или две молекулы вышеуказанного хелатирующего агента на одну молекулу антитела. Хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела по настоящему изобретению через линкер (L). Линкер (L) состоит из хелатного линкера (L_2), который соединяется с хелатирующим агентом, первой атомной группы, которая соединяется с линкером (L_2), второй атомной группы, которая может осуществить клик-реакцию с первой атомной группой, и модифицирующего антитело линкера (L_1), который соединяется со второй атомной группой (включая модифицирующий антитело пептид, представленный вышеуказанной формулой (i)). Поэтому линкер (L) имеет химическую структуру, полученную из первой атомной группы и второй атомной группы. В качестве такой химической структуры можно рассматривать структуру, содержащую триазольный скелет, представленную вышеуказанной формулой (10a) или (10b), или структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную следующей формулой (10c). Поскольку формула (10a) и формула (10b) являются изомерами, они могут содержаться в любом соотношении.

[0111]

(1-7) Радиофармацевтическое средство (Радиофармацевтическое средство (1))

Радиофармацевтическое средство относится к композиции, которая содержит радиоконъюгат по настоящему изобретению и находится в форме, подходящей для введения субъекту *in vivo*. Радиофармацевтическое средство может быть, например, радиоконъюгатом, полученным способом, показанным в вышеуказанных пунктах (1-6), как таковым, или может быть получено путем его очистки и растворения в растворителе, преимущественно содержащем воду и приблизительно изотоническим с живым организмом. В этом случае радиофармацевтическое средство предпочтительно находится в форме водного раствора и при необходимости может содержать другие фармацевтически приемлемые компоненты. Эффективное количество радиофармацевтического средства вводят перорально или парентерально, например, внутривенно, подкожно, внутривентриально, внутримышечно или т.п., в живой организм и используют для лечения рака, диагностики рака, обнаружения поражения или т.п.

В контексте настоящей заявки субъект введения представляет собой человека или животное, такое как мышь, крыса, обезьяна, морская свинка, шимпанзе, овца, коза, собака, кошка, свинья, крупный рогатый скот, лошадь или т.п., но конкретно не ограничивается. Предпочтительным является человек.

Предпочтительным целевым заболеванием является рак, который сверхэкспрессирует HER2. Тип рака со сверхэкспрессией HER2, подлежащий лечению, диагностике или обнаружению, в настоящем изобретении конкретно не ограничивается при условии, что он сверхэкспрессирует HER2. Примеры включают рак слюнных желез, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак желчных путей, рак желудка и рак молочной железы. Рак со сверхэкспрессией HER2 также может быть раком любой стадии и может быть локализованным или метастатическим, первичным или рецидивирующим. В контексте настоящей заявки “сверхэкспрессия” относится к состоянию, при котором, при измерении с использованием известного метода тестирования, наблюдают значительную амплификацию гена HER2 в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью или значительное усиление экспрессии белка HER2 по сравнению с неопухолевой тканью.

В контексте настоящей заявки “эффективное количество” представляет собой количество, которое может обеспечить полезные диагностические или терапевтические эффекты у субъекта, которому его вводят. Эффективное количество, вводимое субъекту, варьируется в зависимости от типа субъекта, массы тела субъекта, лекарственной формы (таблетка, инъекция и т.д.) и пути введения (пероральное введение, парентеральное введение и т.д.), тяжести заболевания (например, рак) и т.п. Врачи и ветеринары могут учитывать эти факторы и определять подходящее эффективное количество.

[0112]

Радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению при хранении при комнатной температуре имеет радиохимическую чистоту определенного уровня или выше на момент истечения периода, кратного не менее 1 и не более 5 периодам полураспада, исходя из периода полураспада радионуклида металла, входящего в состав радиофармацевтического средства. Когда вышеуказанный радионуклид металла представляет собой β -излучающий нуклид (например, Lu-177 или Y-90), радиохимическая чистота конъюгата составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 95%, при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после получения. Когда радионуклид металла представляет собой α -излучающий нуклид (например, Ac-225), радиохимическая чистота конъюгата после хранения в течение 14 дней при комнатной температуре с момента завершения получения составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 95%. “Комнатная температура” в настоящем описании предпочтительно относится к “обычной температуре”, определенной в Японской фармакопее, которая, в частности, составляет 15-25°C.

В контексте настоящей заявки радиохимическая чистота относится к проценту радиоактивности пика (импульсы), соответствующему конъюгату, по отношению к общей радиоактивности (импульсы), обнаруженной при анализе образца при помощи коммерчески доступного детектора излучения. Для анализа радиохимической чистоты можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию и тонкослойную хроматографию, предпочтительно использовать тонкослойную хроматографию. Более предпочтительно тонкослойную хроматографию используют в условиях, описанных в

приведенных ниже Примерах.

Как описано выше, радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению предпочтительно находится в форме водного раствора. Более предпочтительно оно находится в форме буфера с точки зрения поддержания радиохимической чистоты, как описано выше. В качестве буфера можно использовать любой буфер, используемый в лекарственном средстве на основе антител, содержащем ADC анти-HER2 антитела или анти-HER2 антитело в качестве активного ингредиента. В качестве неограничивающего примера можно использовать гистидиновый буфер или сукцинатный буфер. Гистидиновый буфер состоит из гистидина и его соли, например, гистидина и его гидрохлорида или гистидина и его ацетата. Сукцинатный буфер состоит из янтарной кислоты и ее соли, например, янтарной кислоты и ее натриевой соли. Радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению может содержать любой сахар, такой как сахароза или трегалоза, а также может содержать солибулизатор, такой как полисорбат 20 и полисорбат 80.

[0113]

Радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению можно использовать для радионуклидной терапии рака путем выбора радионуклидов металлов, обладающих терапевтическим действием, в частности, радионуклида, испускающего α -лучи, или нуклида, излучающего β -лучи (предпочтительно Ac-225, Y-90, Lu-177, более предпочтительно Ac-225). В этой радионуклидной терапии радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению вводят внутривенной инъекцией или перорально, чтобы вызвать накопление радиоконъюгата по настоящему изобретению в месте поражения, таком как первичное раковое поражение или метастатическое поражение, и раковые клетки в месте поражения разрушаются излучением, испускаемым радионуклидом металла. Вводимое количество и доза радиофармацевтического средства по настоящему изобретению соответственно определяются в зависимости от эффективности активного ингредиента, способа и пути введения, стадии прогрессирования рака, типа тела, массы тела и возраста пациента, а также типа и количества терапевтического лекарственного средства, используемого в комбинации для других заболеваний.

[0114]

Кроме того, выбрав в качестве радионуклида металла радионуклид, испускающий позитроны, или радионуклид, испускающий γ -лучи (предпочтительно Zr-89), его можно использовать для диагностики рака или выявления поражений. Радиофармацевтическое средство с использованием радионуклида, испускающего позитроны, предпочтительно можно использовать для обследования методом ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), а радиофармацевтическое средство с использованием радионуклида, испускающего γ -излучение, предпочтительно можно использовать для обследования методом SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография). Это также можно использовать в сочетании с диагностикой рака или обнаружением поражений при

вышеуказанной радионуклидной терапии рака. Диагностическое радиофармацевтическое средство для диагностики рака по настоящему изобретению можно использовать для диагностики перед проведением радионуклидной терапии рака или можно использовать для диагностики после проведения радионуклидной терапии рака. При использовании радиофармацевтического средства для диагностики перед проведением радионуклидной терапии рака выбор лечения может осуществляться на основании того, следует или нет проводить радионуклидную терапию рака с использованием радиофармацевтического средства по настоящему изобретению, снабженного нуклидом металла, испускающим α -лучи. При использовании радиофармацевтического средства для диагностики после проведения радионуклидной терапии рака, кроме того, можно судить о том, эффективна или нет радионуклидная терапия рака с использованием радиофармацевтического средства по настоящему изобретению, и можно оптимизировать план лечения, включающий увеличение или уменьшение дозы и т.п.

[0115]

(2) Радиофармацевтическое средство (Радиофармацевтическое средство (2))

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее в качестве активного ингредиента конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитело, где связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, при хранении при комнатной температуре оно имеет радиохимическую чистоту определенного уровня или выше на момент истечения периода, кратного не менее 1 и не более 5 периодам полураспада, исходя из периода полураспада радионуклида металла, входящего в состав радиофармацевтического средства. Когда вышеуказанный радионуклид металла представляет собой β -излучающий нуклид (например, Lu-177 или Y-90), радиохимическая чистота вышеуказанного конъюгата составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 95%, при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после получения. Также, когда радионуклид металла представляет собой α -излучающий нуклид (например, Ac-225), радиохимическая чистота конъюгата составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 95%, при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после получения. Комнатная температура такая же, как определена для вышеуказанного радиофармацевтического средства (1).

Что касается радиофармацевтического средства (2), также можно использовать следующие способы (a)-(d) для конъюгации хелатирующего агента и анти-HER2 антитела в дополнение к способу сайт-специфической модификации с использованием пептида. Поскольку другая часть аналогична радиофармацевтическому средству (1), объяснение опущено.

(a) способ модификации сульфгидрильной (SH) группы, полученной путем частичного восстановления дисульфидной связи (SS-связи) между полипептидными цепями в шарнирном участке антитела при помощи хелатирующего агента или линкера

(L), содержащего малеимидную группу, реагирующую с SH группой

(b) способ модификации цистеина, нововведенного в антитело путем аминокислотной мутации генно-инженерным методом, при помощи хелатирующего агента или линкера (L), содержащего малеимидную группу

(c) способ модификации азидной группы азидированного лизина, нововведенного в антитело путем аминокислотной мутации генно-инженерным методом, при помощи хелатирующего агента или линкера (L), содержащего алкин (например, дибензоциклооктин: DBCO), с использованием клик-реакции

(d) способ модификации глутамина, введенного в конкретное положение антитела, при помощи хелатирующего агента или линкера (L), имеющего боковую цепь лизина, с использованием трансглутаминазы.

[0116]

В настоящем изобретении, пептид, который сайт-специфически модифицирует анти-HER2 антитело, и хелатирующий агент связаны без использования тиомочевинной связи. Следовательно, можно получить радиоконъюгат и радиофармацевтическое средство, стабильные даже при комнатной температуре. Поскольку сайт-специфическая модификация антитела может содержать моновалентное антитело или двухвалентное антитело или оба из них в любой пропорции, в отличие от случайной модификации, можно получить радиоконъюгат и радиофармацевтическое средство со стабильным качеством. Кроме того, радиоконъюгат по настоящему изобретению сохраняет эффективность, эквивалентную обычному. Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением можно обеспечить конъюгат анти-HER2 антитела и радиофармацевтическое средство на его основе более высокого качества при сохранении эффективности.

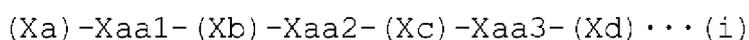
[0117]

Следующие варианты осуществления также охватываются технической идеей настоящего изобретения.

[1] Конъюгат анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где вышеуказанный хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, вышеуказанный пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и вышеуказанный линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.

[2] Конъюгат по пункту [1], где вышеуказанный хелатирующий агент представляет собой DOTAGA (α -(2-Карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту).

[3] Конъюгат по пункту [1] или [2], где вышеуказанный пептид представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков и представлен следующей формулой (i):



в формуле (i) X_a , X_b , X_c и X_d представляют собой непрерывный X в количестве a, непрерывный X в количестве b, непрерывный X в количестве c, и непрерывный X в

количестве d, соответственно,

X представляет собой аминокислотный остаток, не содержащий ни тиольной, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

a, b, c и d каждый независимо представляет собой целое число не менее единицы и не более 5 и удовлетворяют условию $a+b+c+d \leq 14$,

Хаа1 и Хаа3 каждый независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, при условии, что один из Хаа1 и Хаа3 представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи,

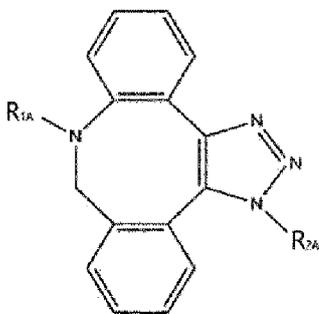
Хаа1 и Хаа3 связаны с образованием кольцевой структуры, и

Хаа2 представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, и модифицирован сшивающим агентом.

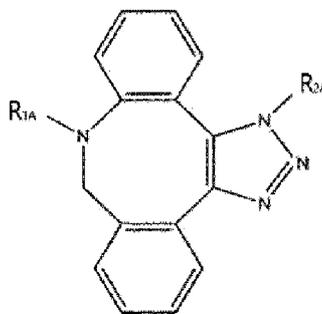
[4] Конъюгат по любому из пунктов [1]-[3], где вышеуказанный радионуклид металла представляет собой Ac-225, Y-90, Lu-177 или Zr-89.

[5] Конъюгат по любому из пунктов [1]-[4], где вышеуказанный линкер (L) включает формулу (10a), формулу (10b) или формулу (10c):

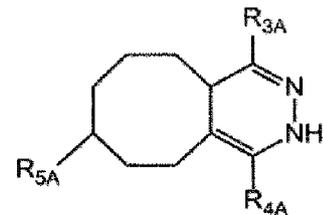
[0118]



(10 a)



(10 b)



(10 c)

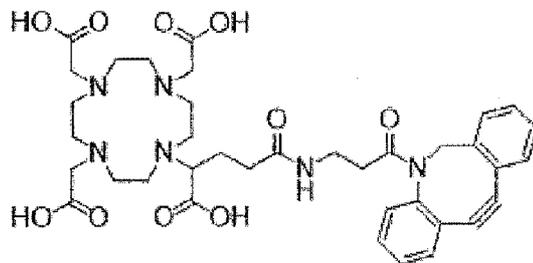
[0119]

В формуле (10a) и формуле (10b) R_{1A} представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и R_{2A} представляет собой сайт связывания с вышеуказанным пептидом. В формуле (10c) один из R_{3A} и R_{4A} представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с вышеуказанным хелатирующим агентом, и R_{5A} представляет собой сайт связывания с вышеуказанным пептидом.

[6] Радиоконъюгат по пункту [5], включающий полиэтиленгликолевую группу между сайтом связывания с вышеуказанным пептидом и вышеуказанным пептидом.

[7] Радиоконъюгат по любому из пунктов [1]-[6], который конъюгирован посредством клик-реакции анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного вышеуказанным пептидом, имеющим азидную группу, введенную на N-конце, и комплекса радиоактивного металла DOTAGA-DBCO, представленного следующей формулой:

[0120]



DOTAGA-DBCO

[0121]

[8] Конъюгат по любому из пунктов [1]-[7], где вышеуказанное анти-HER2 антитело представляет собой трастузумаб.

[9] Конъюгат по любому из пунктов [1]-[7], где вышеуказанное анти-HER2 антитело представляет собой пертузумаб.

[10] Радиофармацевтическое средство, включающее в качестве активного ингредиента конъюгат по любому из пунктов [1]-[9].

[11] Радиофармацевтическое средство по пункту [10], которое используют в радионуклидной терапии рака.

[12] Радиофармацевтическое средство по пункту [10], которое используют в диагностике рака.

[13] Радиофармацевтическое средство по пункту [12], которое используют в комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства, описанного в [11].

[14] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активного ингредиента, где связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней.

[15] Радиофармацевтическое средство по пункту [14], где вышеуказанный конъюгат представляет собой любой из [1]-[9].

[16] Радиофармацевтическое средство по пункту [15], которое используют в радионуклидной терапии рака.

[17] Радиофармацевтическое средство по пункту [15], которое используют в диагностике рака.

[18] Радиофармацевтическое средство по пункту [17], которое используют в

комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства, описанного в [16].

[19] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активного ингредиента, и удовлетворяющее следующим условиям (1) или (2), где связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь:

(1) вышеуказанный радионуклид металла представляет собой ^{177}Lu или ^{90}Y , и вышеуказанный конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней

(2) вышеуказанный радионуклид металла представляет собой ^{225}Ac , и вышеуказанный конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней.

[20] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активного ингредиента, где связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% на момент истечения периода, кратного не менее 1 и не более 5 вышеуказанным периодам полураспада, исходя из периода полураспада вышеуказанного радионуклида металла.

Примеры

[0122]

Настоящее изобретение более подробно описано ниже посредством примеров. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается примерами. В приведенных ниже таблицах графа с “-” означает отсутствие данных.

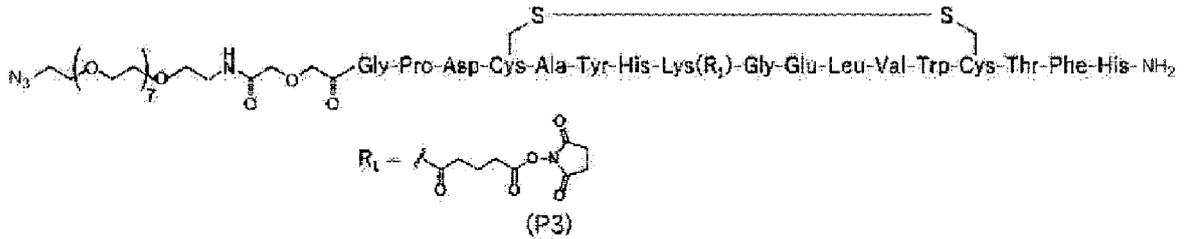
[0123]

[Пример 1] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{225}Ac -меченного DOTAGA-DBCO

(1. Стадия модификации антитела)

Пептид, содержащий 17 аминокислотных остатков, представленный следующей формулой (P3), получали способом, описанным в WO 2017/217347. Аминокислотная последовательность этого пептида была такой же, как последовательность, в которой Хаа2 из SEQ ID NO: (2) представлял собой лизиновый остаток, а концевая аминокислотная боковой цепи лизинового остатка была модифицирована структурой, показанной R₁. Кроме того, два цистеиновых остатка образуют дисульфидную связь друг с другом, а к N-концу пептида добавляется этилазид в качестве атомной группы, содержащей азидную группу, которая является второй атомной группой, через линкерную (L₁) структуру, содержащую дигликолевую кислоту и восемь групп PEG.

[0124]



[0125]

(SEQ ID NO: 17)

В формуле (P3) Gly представляет собой глицин, Pro представляет собой пролин, Asp представляет собой аспарагиновую кислоту, Cys представляет собой цистеин, Ala представляет собой аланин, Tyr представляет собой тирозин, His представляет собой гистидин, Glu представляет собой глутаминовую кислоту, Leu представляет собой лейцин, Val представляет собой валин, Trp представляет собой триптофан, Phe представляет собой фенилаланин.

[0126]

Смесь пептида и трастузумаба (герцептин (зарегистрированная торговая марка) изготовитель Roche) в 0,02 моль/л натрий-ацетатном буфере (pH 6,0) подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 мин с получением раствора, содержащего модифицированное пептидом антитело. Модифицированное пептидом антитело имеет Fc-область антитела, сайт-специфически модифицированную вышеуказанным пептидом.

[0127]

Затем раствор пропускали через колонку IgG-ВР для разделения на первую композицию антител, содержащую относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела, и вторую композицию антител, содержащую относительно большое количество двухвалентного антитела.

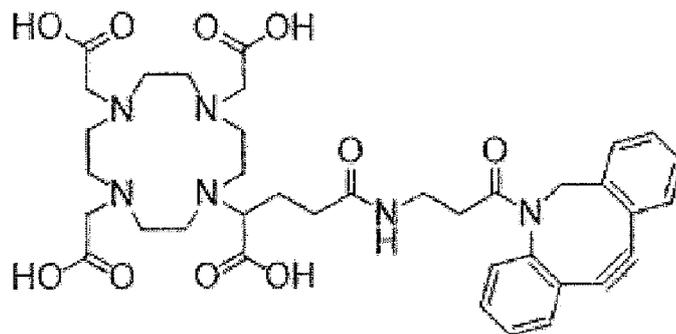
Раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело, полученное в вышеуказанной стадии, разбавляли 0,02 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0), добавляли в вышеуказанную IgG-ВР колонку, и пропускали 0,10 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 5,7), содержащего 0,15 моль/л хлорида натрия. Выделяли вторую композицию антител и регулировали концентрацию таким образом, чтобы концентрация двухвалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, составляла 15 мг/мл. После этого через колонку IgG-ВР пропускали 0,10 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 3,5), содержащего 0,15 моль/л хлорида натрия, выделяли первую композицию антител, и регулировали концентрацию таким образом, чтобы концентрация моновалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, составляла 15 мг/мл. Раствор, содержащий полученную первую композицию антител подвергали описанной ниже стадии мечения.

[0128]

(2. Стадия комплексообразования)

DOTAGA-DBCO, представленный следующей формулой, получали на основе способа, описанного в Bernhard et al. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 1,7 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,005 мл), 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0, 0,075 мл) и раствора, содержащего ион ^{225}Ac (0,2 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 320-340 МБк/мл, приготовленный из раствора, произведенного Oak Ridge National Laboratory, количество жидкости 0,005 мл) 1,6-1,7 МБк (рассчитано по ослаблению от уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент:ион ^{225}Ac =около 2500:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали на 70°C, и время нагрева устанавливали на 30 мин.

[0129]



DOTAGA-DBCO

[0130]

Радиохимическую чистоту (RCP) полученного комплекса ^{225}Ac измеряли следующим способом. Часть раствора комплекса ^{225}Ac проявляли методом тонкослойной хроматографии (изготовитель Agilent, номер модели: SGI0001, элюент: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), и затем измеряли при помощи радио-γ-ТСХ анализатора (изготовитель raytest, MODEL GITA Star). Процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи источника, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как RCP (%) комплекса ^{225}Ac . В результате RCP комплекса ^{225}Ac составила 90%. Полученный раствор комплекса ^{225}Ac использовали непосредственно на стадии мечения.

[0131]

(3. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{225}Ac , полученного на вышеуказанной стадии (2), и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело),

полученный на вышеуказанной стадии (1), добавляли каждый к 0,1 моль/л аргинин-содержащего 0,1 моль/л гистидинового буфера (pH 6,0) и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 120 мин с получением антитела, меченного комплексом ^{225}Ac . Количество комплекса ^{225}Ac и количество модифицированного пептидом антитела (моновалентное антитело) составляло каждое 85 нмоль, и молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,2. Скорость реакции (%) неочищенного антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , показана в следующей Таблице 1. В данном случае, скорость реакции (%) означает RCP (%) антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , по отношению к скорости мечения (%) на стадии комплексообразования, и скорость мечения (%) означает уровень радиоактивности (%) комплекса ^{225}Ac по отношению к уровню загруженной радиоактивности.

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (изготовитель Merck, номер модели: UFC505096). RCP и радиохимический выход (RCY) антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , после очистки показаны в следующей Таблице 1.

[0132]

Способ измерения RCP и RCY антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , был следующим. Для тонкослойной хроматографии (изготовитель Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель представлял собой смешанный раствор ацетонитрил:0,1 ммоль/л раствора EDTA (объемное соотношение 1:1)) использовали радио- γ -TCX анализатора (изготовитель raytest, MODEL GITA Star), и процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи источника, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как RCP (%). Кроме того, процент радиоактивности (уровень радиоактивности, рассчитанный по импульсам, измеренным гамма-спектрометром (Ge полупроводниковый детектор: GMX10P4-70 (изготовитель ORTEC), многоканальный анализатор: M7-000 (изготовитель SEIKO EG&G), обработка данных: Spectrum Navigator:DS-P300 (изготовитель SEIKO EG&G) и Gamma Studio:DS-P600 (изготовитель SEIKO EG&G)), определяемый после ультрафильтрационной очистки, по отношению к общей радиоактивности (аналогично вышеизложенному, уровень радиоактивности, рассчитанный на основе импульсов, измеренных гамма-спектрометром), добавляемой в начале стадии мечения, определяли как RCY (%).

[0133]

Таблица 1

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное отношение (A):(B)	скорость реакции	после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	RCP(%)	RCY(%)
Пример 1	DOTAGA	трастузумаб	1:1,2	77%	93%	71%

[0134]

[Пример 2] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{89}Zr -меченного DOTAGA-DBCO

(1. Стадия комплексообразования)

DOTAGA-DBCO диспергировали в DMSO в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,33 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,030 мл) и раствора ^{89}Zr , содержащего ион (0,1 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 181 МБк/мл, приготовленный из раствора, произведенного Nihon Medi-Physics Co., Ltd., количество жидкости 0,33 мл) 60 МБк в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{89}Zr . Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент:ион ^{89}Zr =около 250:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали на 70°C, а время нагрева устанавливали на 60 мин.

[0135]

RCP полученного комплекса ^{89}Zr измеряли следующим способом. Часть раствора комплекса ^{89}Zr проявляли при помощи тонкослойной хроматографии (изготовитель Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), и затем измеряли с использованием радио- γ -ТСХ анализатора (изготовитель raytest, MODEL GITA Star PS). Процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи источника, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как RCP (%) комплекса ^{89}Zr . В результате RCP комплекса ^{89}Zr составила 90%. Полученный раствор комплекса ^{89}Zr использовали как таковой на стадии мечения.

[0136]

(2. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{89}Zr , полученный на вышеуказанной стадии (1), и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело), полученный таким же образом, как в примере 1, добавляли без очистки к 0,1 моль/л аргинин-содержащему 0,1 моль/л гистидиновому буферу (pH 6,0) и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 120 мин с получением меченного комплексом ^{89}Zr антитела Примера 2. Количество комплекса ^{89}Zr и количество модифицированного пептидом антитела (моновалентного антитела) составляло каждое 100 нмоль, и молярное соотношение DBCO и азиды составляло около 1:1. Скорость реакции (%) неочищенного меченного комплексом ^{89}Zr антитела этого Примера показана в следующей Таблице 2. В данном случае, скорость реакции (%) означает радиохимическую чистоту (%) антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , по отношению к скорости мечения (%) на стадии комплексообразования, и RCP (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{89}Zr по отношению к количеству загруженной радиоактивности.

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , полученного реакцией

при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (изготовитель Merck, номер модели: UFC505096). RCP и RCY антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , после очистки показаны в следующей Таблице 2.

[0137]

Способ измерения RCP и RCY антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , был аналогичен способу, описанному в Примере 1.

[0138]

Таблица 2

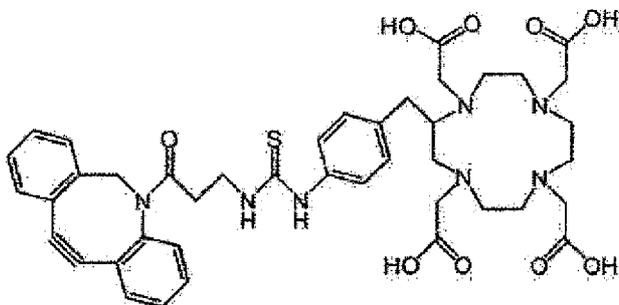
	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции	после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	RCP(%)	RCY(%)
Пример 2	DOTAGA	трастузумаб	1:1	52%	93%	43%

[0139]

[Сравнительный пример 1] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{225}Ac -меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 1, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли следующим DOTA-DBCO. Результаты представлены в Таблице 3.

[0140]



DOTA-DBCO

[0141]

Таблица 3

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции	после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	RCP(%)	RCY(%)
Сравнительный пример 1	DOTA	трастузумаб	1:1	60%	95%	34%

[0142]

[Пример 3] Стадия получения композиции

Часть каждого из радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, помещали в 0,5-мл пробирку Эппена (LoBind, произведено Eppendorf) и разбавляли буфером для хранения (смешанный раствор 19 г/л гидрата трегалозы, 0,47 г/л гидрата L-гистидин гидрохлорида, 0,30 г/л L-гистидина и 85 мг/л полисорбата 20).

[0143]

[Оценка 1] Оценка стабильности

Каждый радиоконъюгат, полученный в Примере 3, хранили при комнатной температуре (24,5-25,5°C) в течение 2 недель, и RCP, содержание агрегатов и антигенсвязывающую активность оценивали в каждой временной точке (0-й день, 1-й день, 7-й день и/или 14-й день). Следует заметить, что 14 дней после окончания получения соответствуют полураспаду примерно в 1,5 раза, когда радионуклид металла представляет собой Ac-225.

[0144]

[Оценка 1-1] Радиохимическая чистота

RCP анализировали тонкослойной хроматографией (ТСХ). Условия ТСХ были такими же, как и в Примере 1 для исследования скорости реакции.

Результаты представлены в Таблице 4.

[0145]

Таблица 4

	радиохимическая чистота (%)			
	0-й день	1-й день	7-й день	14-й день
радиоконъюгат (Пример 1)	99,98	99,91	99,93	99,84
радиоконъюгат (Сравнительный пример 1)	98,32	98,74	94,66	76,54

[0146]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 1, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 99% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. Даже при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения RCP оставалась на уровне 99%.

Радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 1, содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 90% или более, но ниже 95% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. При хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения, RCP была ниже 80%.

[0147]

[Оценка 1-2] Содержание агрегатов

Содержание агрегатов подтверждали эксклюзионной хроматографией (SEC). Используя разделительный модуль модели 2695 или разделительный модуль e2695 от

компании Waters в качестве устройства для жидкостной хроматографии и детектор UV/Vis модели 2489 от компании Waters в качестве УФ-детектора, анализ осуществляли при следующих условиях. Доля каждого компонента при хранении в течение 14 дней после завершения получения показана в Таблице 5. При хранении в течение 14 дней после завершения получения доля агрегатов радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 1 и не содержащих тиомочевинную связь, была ниже, чем доля агрегатов радиоконъюгатов, полученных как описано в Сравнительном примере 1 и содержащих тиомочевинную связь.

[0148]

Таблица 5

	доля главного пика (%)	доля пика агрегатов (%)
радиоконъюгат (Пример 1)	94,79	1,51
радиоконъюгат (Сравнительный пример 1)	93,18	3,34

[0149]

[Условия ВЭЖХ]

колонка: предколонка TSKgel SWXL от TOSOH (6 мм × 4 см), TOSOH TSKgel G3000SWXL (5 мкм, 7,8×30 см) × 2 (тандем)

температура колонки: постоянная температура около 25°C

подвижная фаза: 0,1 моль/л фосфатный буфер, содержащий 0,2 моль/л гидрохлорида аргинина (pH 6,8)

поток: 1,0 мл/мин

диапазон измерения площади: 30 мин.

длина волны детекции: 280 нм

[0150]

[Оценка 1-3] Антигенсвязывающая активность

Антигенсвязывающую активность подтверждали методом автордиографии *in vitro* (ARG) (только день получения (0-й день) и последний день хранения (14-й день)). Клетки SK-OV-3 HER2-положительной клеточной линии рака яичников человека и клетки MDA-MB-231 HER2-отрицательной клеточной линии рака молочной железы человека, которые были приобретены у ATCC (Американская коллекция типовых культур), вводили подкожно в бок самкам мышей BALB/c nu/nu в количестве 5×10^6 клеток и 1×10^7 клеток, соответственно, для получения несущих опухоль мышей. После этого опухоль SK-OV-3 и опухоль MDA-MB-231 вырезали и помещали в Tissue-Tek O.C.T. Соединение (Japanese Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) для получения замороженных срезов. Радиоконъюгаты, полученные в Примере 1 и Сравнительном примере 1, добавляли к PBS, содержащему 10% бычьего сывороточного альбумина, каждый при 1 кБк/мл, и погружали в него срез опухоли SK-OV-3 и срез опухоли MDA-MB-231. После контакта срезов с пластиной для визуализации их считывали с использованием анализатора изображений сканирующего типа для оценки уровня радиоактивности, связанной со срезами. Результаты представлены

на Фиг. 3.

Осуществляя одинаковую оценку каждого раствора с добавленным к нему трастузумабом, можно подтвердить специфичность каждого радиокопьюгата в отношении HER2.

В конечной временной точке периода хранения (день 14) активность связывания с HER2 подтверждали для всех радиокопьюгатов, полученных как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1. Оба радиокопьюгата, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, связывались только со срезом опухоли SK-OV-3, демонстрируя селективное связывание с HER2. В растворе с добавлением трастузумаба связывание со срезом опухоли SK-OV-3 ингибировалось, и была подтверждена специфичность связывания HER2. В конечной временной точке периода хранения (день 14), селективность связывания с HER2 сохранялась во всех образцах. Радиоактивность, связанная со срезом опухоли SK-OV-3, была выше в образце с использованием радиокопьюгата, полученного как описано в Примере 1, чем с использованием радиокопьюгата, полученного как описано в Сравнительном примере 1.

[0151]

[Оценка 2] Оценка эффективности

Модель подкожной опухоли из клеток SK-OV-3 получали с использованием мыши, и подтверждали противоопухолевый эффект радиокопьюгатов, полученных как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1.

Клетки SK-OV-3 HER2-положительной линии клеток рака яичников человека, приобретенные в ATCC, суспендировали в среде McCoy's 5A (Gibco) и вводили подкожно в бок 5-недельным самкам BALB/c nu/nu (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве 5×10^6 клеток для получения несущих опухоль мышей. Через три недели после лечения несущих опухоль мышей было подтверждено, что объем опухоли составляет примерно от 100 до 300 мм³, и животных с формой, подходящей для измерения диаметра опухоли, разделяли на группы случайным образом. Объем опухоли и масса тела каждой мыши на этот момент времени показаны в Таблице 6. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле.

объем опухоли (мм³) = (большая ось опухоли × (малая ось опухоли)²) × 1/2

[0152]

Таблица 6

	объем опухоли среднее значение ± стандартное отклонение (мм ³)	масса тела среднее значение ± стандартное отклонение (г)

группа введения радиоконъюгата (Пример 1)	218,1±38,1	19,8±1,6
группа введения радиоконъюгата (Сравнительный пример 1)	212,6±34,3	20,0±1,2
контрольная группа введения антитела	210,0±28,7	19,3±1,4
Группа введения носителя	207,6±32,6	20,0±1,4

[0153]

Радиоконъюгаты, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, вводили в хвостовую вену в дозе 15 кБк/мышь (50 мкг/мышь в виде трастузумаба). В качестве контрольной группы были выбраны группа, которой вводили трастузумаб с тем же количеством антитела, что и каждый радиоконъюгат (контрольная группа введения антитела), и группа введения носителя, которой вводили буфер для хранения. Каждая группа состояла из 6 мышей, и наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение периода времени 38 дней после введения. Изменения объема опухоли с течением времени показаны на Фиг. 1, и изменение массы тела с течением времени показано на Фиг. 2.

[0154]

Группы, которым вводили радиоконъюгаты, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, продемонстрировали значительное отличие противоопухолевого эффекта по сравнению с двумя контрольными группами (контрольная группа введения антитела и группа введения носителя) на 38-й день после введения ($P < 0,01$). Для определения значимой разницы осуществляли тест Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica (изготовитель Takumi Information Technology Co., Ltd.). С другой стороны, не наблюдали существенной разницы в противоопухолевом эффекте между группами, которым вводили каждый радиоконъюгат. В каждой группе не было обнаружено значительных изменений общего состояния и не наблюдали признаков токсичности, таких как значительная потеря массы тела.

[0155]

[Пример 4] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{177}Lu -меченного DOTAGA-DBCO

(1. Стадия модификации антитела)

Эту стадию осуществляли способом, аналогичным способу, описанному для стадии модификации антитела в Примере 1.

[0156]

(2. Стадия комплексообразования)

DOTAGA-DBCO получали таким же образом, как в Примере 1. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,156 моль/л натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,45 ммоль/л хелатирующего

агента. Реакционную смесь дисперсии (0,02 мл), 0,156 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 5,5, 0,02 мл), растворяющего 0,225 ммоль/л гентизиновой кислоты, и ^{177}Lu ион-содержащего раствора (0,04 моль/л водный раствор хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 516 МБк/мл, приготовленный из раствора, произведенного POLATOM, количество жидкости 0,05 мл) 25,8 МБк (рассчитано по ослаблению от уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{177}Lu . Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент:ион ^{177}Lu =около 236:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали на 70°C, а время нагрева устанавливали на 5 мин.

[0157]

RCP полученного комплекса ^{177}Lu измеряли таким же образом, как измерение RCP радиоконъюгата Примера 1. В результате, RCP комплекса ^{177}Lu составила 99%. Полученный раствор комплекса ^{177}Lu использовали непосредственно на стадии мечения.

[0158]

(3. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{177}Lu , полученный на вышеуказанной стадии (2), и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело), полученный на вышеуказанной стадии (1), добавляли каждый к содержащему 0,1 моль/л аргинина 0,1 моль/л гистидиновому буферу (рН 6,0), и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 120 мин с получением меченного комплексом ^{177}Lu антитела. Количество комплекса ^{177}Lu и количество модифицированного пептидом антитела (моновалентного антитела) составляло 8,4 нмоль и 10 нмоль, соответственно, и молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,2. Скорость реакции (%) неочищенного меченного комплексом ^{177}Lu антитела показана в следующей Таблице 7.

Кроме того, RCP и RCY меченного комплексом ^{177}Lu антитела после очистки с использованием ультрафильтрационного фильтра, которую осуществляли таким же образом, как в Примере 1, показаны в следующей Таблице 7.

[0159]

RCP и RCY меченного комплексом ^{177}Lu антитела измеряли таким же образом, как в Примере 1.

[0160]

Таблица 7

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции	после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	RCP(%)	RCY(%)
Пример 4	DOTAGA	трастузумаб	1:1,2	55%	99%	55%

[0161]

[Сравнительный пример 4] Получение конъюгата с трастузумабом с

использованием ^{177}Lu -меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 4, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на DOTA-DBCO. Результаты представлены в Таблице 8.

[0162]

Таблица 8

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции	после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	RCP(%)	RCY(%)
Сравнительный пример 4	DOTA	трастузумаб	1:1,2	81%	94%	74%

[0163]

[Пример 5] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{90}Y -меченного DOTAGA-DBCO

(1. Стадия модификации антитела)

Эту стадию осуществляли способом, аналогичным способу, описанному для стадии модификации антитела в Примере 1.

[0164]

(2. Стадия комплексообразования)

DOTAGA-DBCO получали таким же образом, как в Примере 1. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,156 моль/л натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,3 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,03 мл), 0,156 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 5,5, 0,03 мл), растворяющего 0,15 ммоль/л гентизиновой кислоты, и содержащего ион ^{90}Y раствора (0,04 моль/л водный раствор хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 3786-3943 МБк/мл, приготовленный из раствора, произведенного Eckert&Ziegler, количество жидкости 0,03 мл) 113-118 МБк (рассчитано по ослаблению от уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{90}Y . Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент: ^{90}Y ион=69-72:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали на 70°C, а время нагрева устанавливали на 5 мин.

[0165]

RCP полученного комплекса ^{90}Y измеряли таким же образом, как как измерение RCP в Примере 1. В результате RCP комплекса ^{90}Y составила 99%. Полученный раствор комплекса ^{90}Y использовали непосредственно на стадии мечения.

[0166]

(3. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{90}Y , полученный на вышеуказанной стадии (2), и

раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело), полученный на вышеуказанной стадии (1), добавляли каждый к содержащему 0,1 моль/л аргинина 0,1 моль/л гистидиновому буферу (pH 6,0) и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 120 мин с получением антитела, меченного комплексом ^{90}Y . Количество комплекса ^{90}Y и количество модифицированного пептидом антитела (моновалентное антитело) составляло 9 нмоль и 10 нмоль, соответственно, и молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,1. Скорость реакции (%) неочищенного меченного комплексом ^{90}Y антитела показана в следующей Таблице 9.

Кроме того, RCP и RCY меченного комплексом ^{90}Y антитела после очистки с использованием ультрафильтрационного фильтра, которую осуществляли таким же образом, как в Примере 1, показаны в следующей Таблице 9.

[0167]

RCP и RCY меченного комплексом ^{90}Y антитела измеряли таким же образом, как в Примере 1.

[0168]

Таблица 9

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции		после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	реакция	RCP(%)	RCY(%)
Пример 5	DOTAGA	трастузумаб	1:1,1	88%		99%	77%

[0169]

[Сравнительный пример 5] Получение конъюгата с трастузумабом с использованием ^{90}Y -меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 5, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на DOTA-DBCO. Результаты представлены в Таблице 10.

[0170]

Таблица 10

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное соотношение (A):(B)	скорость реакции		после очистки	
				37°C 2-час реакция (%)	реакция	RCP(%)	RCY(%)
Сравнительный пример 5	DOTA	трастузумаб	1:1,2	57%		92%	45%

[0171]

[Пример 6] Стабильность сохранения радиоконъюгата, полученного, как описано в Примере 4, Примере 5, Сравнительном примере 4 или Сравнительном примере 5

[0172]

(Стадия получения композиции)

Часть каждого из радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 4,

Примере 5, Сравнительном примере 4 и Сравнительном примере 5, помещали в 0,5-мл пробирку Эппена (LoBind, изготовитель Eppendorf) и разбавляли буфером для хранения (смешанный раствор 42 г/л гидрата трегалозы, 0,47 г/л гидрата гидрохлорида L-гистидина, 0,30 г/л L-гистидина и 85 мг/л полисорбата 20).

[0173]

[Оценка 3] Оценка стабильности

Каждый радиоконъюгат, полученный в Примере 6, хранили при комнатной температуре (20,6-21,8°C) в течение 2 недель и RCP и антигенсвязывающую активность оценивали в каждой временной точке (0-й день, 1-й день, 7-й день и/или 14-й день). Следует заметить, что 7 дней после окончания получения соответствуют примерно 1 периоду полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Lu-177, и примерно 2,5 периодам полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Y-90. Кроме того, 14 дней после окончания получения соответствуют примерно 2 периодам полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Lu-177, и примерно 5 периодам полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Y-90.

[0174]

[Оценка 3-1] Радиохимическая чистота

RCP анализировали методом ТСХ. Условия ТСХ были аналогичны условиям, использованным для исследования скорости реакции в Примере 1. Результаты представлены в Таблице 11.

[0175]

Таблица 11

	радиохимическая чистота (%)			
	0-й день	1-й день	7-й день	14-й день
радиоконъюгат (Пример 4)	98,5	98,2	97,9	98,0
радиоконъюгат (Сравнительный пример 4)	96,7	95,4	84,7	59,8
радиоконъюгат (Пример 5)	99,0	98,3	96,6	95,4
радиоконъюгат (Сравнительный пример 5)	92,2	87,7	72,8	62,4

[0176]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 4 или 5, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 95% или более при хранении в течение 7 дней после завершения получения. Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 4 или 5, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 90% или более при хранении в течение 14 дней после завершения получения.

Когда радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 4, хранили в течение 7 дней при комнатной температуре после завершения получения, RCP была ниже 85%, и когда радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 5, хранили в течение 7 дней при комнатной температуре после завершения

получения, RCP была ниже 75%. Когда радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 4, хранили в течение 14 дней при комнатной температуре после завершения получения, RCP была ниже 60%, и когда радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 5, хранили в течение 14 дней при комнатной температуре после завершения получения, RCP была ниже 65%.

[0177]

[Оценка 3-2] Антигенсвязывающая активность

Антигенсвязывающую активность подтверждали методом ARG *in vitro* (только в дни 0 и 14). Оценку осуществляли способом, аналогичным способу, описанному в подразделе “Оценка 1-3”. Результаты представлены на Фиг. 4, 5.

В конечной временной точке периода хранения (день 14), активность связывания с HER2 подтверждали у всех радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 4, Примере 5, Сравнительном примере 4 и Сравнительном примере 5. Все радиоконъюгаты, полученные как описано в Примере 4, Примере 5, Сравнительном примере 4 и Сравнительном примере 5, только для среза опухоли SK-OV-3 демонстрировали селективное связывание с HER2. В конечной временной точке периода хранения (день 14), селективность связывания с HER2 сохранялась во всех образцах. Радиоактивность, связанная со срезом опухоли SK-OV-3, была выше в образцах с использованием радиоконъюгатов, полученных как описано в Примерах 4 и 5, чем в образцах с использованием радиоконъюгатов, полученных как описано в Сравнительных примерах 4 и 5.

[0178]

[Оценка 4]

Модель подкожной опухоли из клеток SK-OV-3 получали с использованием мышей, и подтверждали аккумуляцию в опухоли радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 2.

Клетки SK-OV-3 HER2-положительной линии клеток рака яичников человека, приобретенные в ATCC, суспендировали в среде McCoy's 5A (Gibco) и вводили подкожно в бок 5-недельным мышам BALB/c nu/nu (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве 5×10^6 клеток для получения несущих опухоль мышей. Через четыре недели после обработки было подтверждено, что объем опухоли составляет примерно от 100 до 400 мм³.

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 2, вводили в дозе 5 МБк/мышь (n=24) в хвостовую вену. Через 60 часов после введения получали изображения в условиях, указанных в следующей Таблице, и с использованием устройства для получения изображений ПЭТ для мелких животных (PET/CT Si78, изготовитель Bruker).

Репрезентативные примеры результатов ПЭТ-визуализации показаны на Фиг. 6. В опухоли накапливался более высокий уровень радиоактивности по сравнению с другими органами, и может быть показана HER2-положительная опухоль.

[0179]

Таблица 12

Изотоп	89-Zr
время исследования	600 сек
Энергетическое окно	30% (357,7-664,3кэВ)
Реконструкция изображения	ПЭТ- MLEM GPU 32×32 0,25 (Итерации: 12)
коррекция	Рассеивание, Случайности, Распад, Частичный объем, Затухание

[0180]

[Пример 7] Сравнение эффективности меченного комплексов ^{225}Ac антитела и лекарственного препарата ADC

[Оценка 5] Оценка эффективности с использованием меченного комплексов ^{225}Ac антитела

Модель подкожной опухоли SK-OV-3 получали с использованием мыши и сравнивали противоопухолевый эффект меченного комплексов ^{225}Ac антитела, полученного как описано в Примере 1, и коммерчески доступного препарата Конъюгата Антитело-Лекарственное средство (ADC). В качестве лекарственного препарата ADC использовали трастузумаб дерукстекан (ENHERTU (зарегистрированная торговая марка), Daiichi Sankyo Company, Limited) и трастузумаб эмтансин (KADCYLA (зарегистрированная торговая марка), Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.). Антитело, используемое в качестве контроля, представляло собой трастузумаб (герцептин (зарегистрированная торговая марка), изготовитель Roch).

Способ, описанный в подразделе “Оценка 2”, использовали для получения мыши с опухолью SK-OV-3. После обработки животных подтверждали, что объем опухоли составлял от 150 до 550 мм³, и животных с формой, подходящей для измерения диаметра опухоли, разделяли на группы случайным образом. Объем опухоли и масса тела мышей каждой группы на этот момент времени показаны в Таблице 13. ENHERTU (зарегистрированная торговая марка) разделяли на группу введения низких доз и группу введения высоких доз в соответствии с дозами. В группе введения низкой дозы введение регулировали таким образом, чтобы количество вводимого антитела было на том же уровне, как в группе введения меченного комплексов ^{225}Ac антитела, а в группе введения высоких доз введение регулировали таким образом, чтобы антитело было введено в количестве, преобразованном из клинической дозы с учетом массы тела мыши.

[0181]

Таблица 13

	объем опухоли среднее значение ± стандартное отклонение (мм ³)	масса тела среднее значение ± стандартное отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 1)	342,9±57,9	19,8±1,2
группа введения герцептина (зарегистрированная торговая марка)	302,7±123,8	20,7±1,1

группа введения KADCYLA(зарегистрированная торговая марка)	270,2±23,4	20,3±1,8
группа введения низких доз ENHERTU (зарегистрированная торговая марка)	357,5±172,0	19,9±1,5
группа введения высоких доз ENHERTU (зарегистрированная торговая марка)	379,1±113,7	20,9±1,3

[0182]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 1, вводили в дозе 20 кБк/мышь (20 мкг/мышь в расчете на трастузумаб) в хвостовую вену. Кроме того, герцептин (зарегистрированная торговая марка) вводили в дозе 20 мкг/мышь, KADCYLA (зарегистрированная торговая марка) вводили в дозе 72 мкг/мышь и ENHERTU (зарегистрированная торговая марка) вводили в дозе 20 мкг/мышь в группе введения низкой дозы и вводили в дозе 108 мкг/мышь в группе введения высокой дозы, в хвостовую вену. Каждая группа состояла из 4 мышей, и наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 35 дней после введения. Изменения объема опухоли мышей в каждой группе показаны на Фиг. 7.

[0183]

Группа введения радиоконъюгата показала значительно отличающийся противоопухолевый эффект по сравнению с группой введения низкой дозы ENHERTU (зарегистрированная торговая марка) на 35-й день после введения ($P < 0,05$). Для определения значимой разницы осуществляли тест Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica. Кроме того, на 35-й день после введения было подтверждено, что противоопухолевый эффект, в основном, становится сильнее в группе введения радиоконъюгата по сравнению с группами введения лекарственного препарата ADC, отличных от группы с низкой дозой ENHERTU (зарегистрированная торговая марка), но не было обнаружено существенной разницы. В каждой группе не было обнаружено значительных изменений общего состояния и не наблюдали признаков токсичности, таких как значительная потеря массы тела.

[0184]

[Пример 8] Сравнение эффективности для каждой дозы радиоконъюгата

[Оценка 6] Оценка эффективности с использованием радиоконъюгата

Модель с подкожной опухолью SK-OV-3 получали с использованием мыши и сравнивали противоопухолевый эффект радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 1, и коммерчески доступного лекарственного препарата ADC. В качестве препарата ADC использовали трастузумаб дерукстекан (ENHERTU (зарегистрированная торговая марка), Daiichi Sankyo Company, Limited).

Мышь с опухолью SK-OV-3 получали с использованием способа, описанного в подразделе “Оценка 2”. Через три недели после обработки животных подтверждали, что объем опухоли составлял от 100 до 300 мм³, и животных с формой, подходящей для

измерения диаметра опухоли, разделяли на группы случайным образом. Объем опухоли и масса тела каждой мыши на этот момент времени показаны в Таблице 14.

[0185]

Таблица 14

	объем опухоли среднее значение \pm стандартное отклонение (мм ³)	масса тела среднее значение \pm стандартное отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 1) с высокой радиоактивностью	210,5 \pm 26,5	19,2 \pm 1,2
группа введения радиоконъюгата (Пример 1) с умеренной радиоактивностью	210,5 \pm 28,8	18,0 \pm 1,0
группа введения радиоконъюгата (Пример 1) с низкой радиоактивностью	205,4 \pm 33,6	19,0 \pm 1,8
Группа введения умеренной дозы лекарственного препарата ADC	210,9 \pm 28,0	19,1 \pm 0,4
Контрольная группа введения антитела	206,9 \pm 35,2	19,5 \pm 1,1
Группа введения носителя	209,7 \pm 30,9	18,8 \pm 1,1

[0186]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 1, вводили в хвостовую вену в дозе 20 кБк/21 г в группе введения с высокой радиоактивностью, в дозе 10 кБк/21 г в группе введения с умеренной радиоактивностью, и в дозе 5 кБк/21 г в группе введения с низкой радиоактивностью (3,57 мг/кг в расчете на трастузумаб для каждой группы). Лекарственный препарат ADC вводили в умеренной дозе 10 мг/кг в хвостовую вену. Кроме того, были установлены группа, которой вводили трастузумаб с тем же количеством антитела (3,57 мг/кг в расчете на трастузумаб), как в группе введения радиоконъюгата (контрольная группа введения антитела), и группа введения носителя, которой вводили буфер для хранения. Каждая группа состояла из 6 мышей, и наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 46 дней после введения. Изменения объема опухоли мышей в каждой группе показаны на Фиг. 8. В последний день наблюдения мышей подвергали аутопсии, выделяли и взвешивали сердце, легкие, селезенку, печень и почки.

[0187]

Каждая группа, получавшая радиоконъюгат, демонстрировала значительное отличие противоопухолевого эффекта ($P < 0,01$) через 46 дней после введения по сравнению с контрольной группой введения антитела и группой введения носителя. Кроме того, было подтверждено, что противоопухолевый эффект имеет тенденцию усиливаться в зависимости от введенной радиоактивности, что свидетельствует о том, что

противоопухолевый эффект усиливается в зависимости от введенной радиоактивности. Для определения значимой разницы осуществляли тест Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica. На 46-й день введения не было обнаружено существенного отличия противоопухолевого эффекта в группе введения радиоконъюгата с высокой радиоактивностью и в группе введения радиоконъюгата с умеренной радиоактивностью по сравнению с группой введения препарата ADC, что свидетельствует об эквивалентных противоопухолевых эффектах. В каждой группе не было обнаружено значительных изменений общего состояния и не наблюдали признаков токсичности, таких как значительная потеря массы тела. В последний день наблюдения никакой значимой разницы в массе органов, взятых при аутопсии, не наблюдали.

[0188]

[Пример 9] Получение конъюгата с пертузумабом с использованием ^{225}Ac -меченного DOTAGA-DBCO

(1. Стадия модификации антитела)

Пептид, представленный вышеуказанной формулой (P3), содержащий аминокислотный остаток, получали способом, аналогичным описанному в Примере 1.

[0189]

Смесь пептида и пертузумаба (PERJETA (зарегистрированная торговая марка), Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) в 0,02 моль/л натрий-ацетатном буфере (pH 6,0) подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 60 мин с получением раствора, содержащего модифицированное пептидом антитело. Модифицированное пептидом антитело имеет Fc-область антитела, сайт-специфически модифицированную вышеуказанным пептидом.

[0190]

Затем раствор пропускали через колонку IgG-ВР с получением композиции антител, содержащей относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела. Концентрацию регулировали консервирующим буфером (смешанный раствор 41 г/л сахарозы, 3,1 г/л L-гистидина, 0,66 г/л ледяной уксусной кислоты) (pH 6,0) таким образом, чтобы концентрация моновалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, была 14,6 мг/мл. Полученный раствор, содержащий относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела, подвергали описанной ниже стадии мечения.

[0191]

(2. Стадия комплексообразования)

DOTAGA-DBCO получали таким же образом, как в Примере 1. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,156 моль/л натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,3 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,02835 мл) и ион ^{225}Ac -содержащего раствора (0,1 моль/л водный раствор хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 259

МБк/мл, приготовленный из раствора, произведенного Rosatom State Atomic Energy Corporation, количество жидкости 0,0126 мл) 3,25 МБк (рассчитано по ослаблению от уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радионуклида металла в это время составляло хелатирующий агент:ион ^{225}Ac =около 1270:1, и условия нагревания реакционной смеси устанавливали на 70°C , время нагревания 30 мин.

[0192]

RCP полученного комплекса ^{225}Ac измеряли таким же образом, как в Примере 1. В результате RCP комплекса ^{225}Ac составляла 67%. Полученный раствор комплекса ^{225}Ac непосредственно использовали для следующей стадии мечения.

[0193]

(3. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{225}Ac , полученный на вышеуказанной стадии (2), и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело), полученный на вышеуказанной стадии (1), смешивали и подвергали клик-реакции при 37°C в течение 2 часов с получением меченного комплексом ^{225}Ac антитела. Молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,3. Скорость реакции неочищенного меченного комплексом ^{225}Ac антитела показана в следующей Таблице 15.

Кроме того, раствор меченного комплексом ^{225}Ac антитела, полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (изготовитель Merck, номер модели: UFC803096). RCP и RCY меченного комплексом ^{225}Ac антитела после очистки показаны в следующей Таблице 15. RCP и RCY меченного комплексом ^{225}Ac антитела рассчитывали на основе уровня радиоактивности, полученного способом, аналогичным описанному в Примере 1.

[0194]

Таблица 15

	хелатирующий агент (A)	антитело (B)	молярное отношение (A):(B)	скорость реакции (%)	после очистки	
				37°C 2-час реакция	RCP(%)	RCY(%)
Пример 9	DOTAGA	пертузума б	1:1,3	49	100	38

[0195]

[Пример 10] Стадия получения композиции

Часть радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 9, помещали в 0,5-мл пробирку Эппена (LoBind, изготовитель Eppendorf) и разбавляли буфером для хранения (смешанный раствор 41 г/л сахарозы, 3,1 г/л L-гистидина, 0,66 г/л ледяной уксусной кислоты и 0,2 г/л полисорбата 20).

[0196]

[Оценка 7] Оценка стабильности

Радиоконъюгат, полученный в Примере 9, хранили при комнатной температуре (24,5-25,5°C) в течение 2 недель и RCP и содержание агрегатов оценивали в каждой временной точке (0-й день, 1-й день, 7-й день и 14-й день).

[0197]

[Оценка 7-1] RCP

RCP рассчитывали по результатам анализа ТСХ. Условия ТСХ были такими же, как в Примере 1 для оценки скорости реакции. Результаты представлены в Таблице 16.

[0198]

Таблица 16

	RCP (%)			
	0-й день	1-й день	7-й день	14-й день
радиоконъюгат (Пример 9)	99,6	99,3	98,0	97,8

[0199]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 9, сохранял RCP 98% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. Даже при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения RCP оставалась на уровне 97% или более.

[0200]

[Оценка 7-2] Содержание агрегатов

Содержание агрегатов подтверждали методом SEC аналогично способу, описанному в Примере 1. Доля каждого компонента в каждый день оценки при хранении в течение 14 дней после завершения получения показана в Таблице 17. Содержание агрегатов при хранении в течение 14 дней после завершения получения составляло 1,66%.

[0201]

Таблица 17

	доля главного пика (%)	доля пика агрегатов (%)
радиоконъюгат (Пример 9), 0-й день после получения	99,77	0,23
радиоконъюгат (Пример 9), 1-й день после получения	98,68	0,25
радиоконъюгат (Пример 9), 7-й день после получения	93,28	0,47
радиоконъюгат (Пример 9), 14-й день после получения	89,51	1,66

[0202]

Настоящая заявка основана на патентной заявке № 2020-174840, поданной в Японии (дата подачи: 16 октября 2020 г.), патентной заявке № 2020-215740, поданной в Японии (дата подачи: 24 декабря 2020 г.), и патентной заявке № 2021-024688, поданной в Японии (дата подачи: 18 февраля 2021 г.), содержание которых полностью включено в

настоящую заявку.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

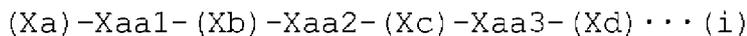
1. Конъюгат анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где

хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и

линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.

2. Конъюгат по п. 1, где хелатирующий агент представляет собой DOTAGA (α -(2-Карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту).

3. Конъюгат по п. 1, где пептид представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков, и представлен следующей формулой:



в формуле (i), Xa, Xb, Xc и Xd представляют собой непрерывный X в количестве a, непрерывный X в количестве b, непрерывный X в количестве c и непрерывный X в количестве d, соответственно,

X представляет собой аминокислотный остаток, не содержащий ни тиольной группы, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число не менее единицы и не более 5 и удовлетворяют условию $a+b+c+d \leq 14$,

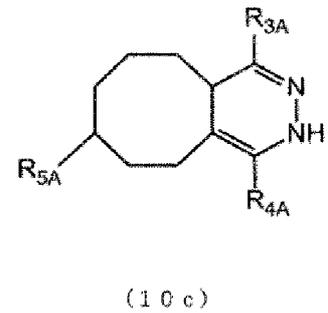
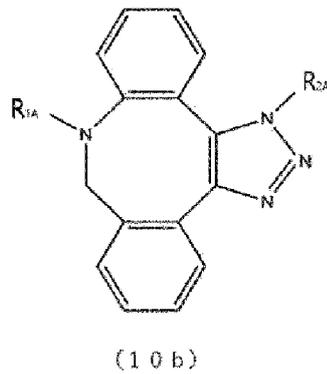
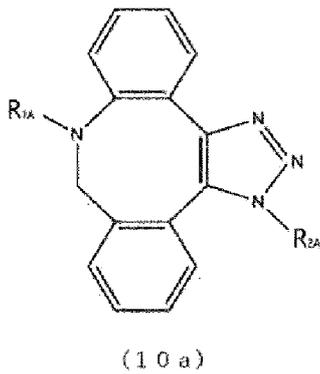
X_{aa1} и X_{aa3}, каждый независимо, представляют собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, при условии, что один из X_{aa1} и X_{aa3} представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи,

X_{aa1} и X_{aa3} связаны с образованием кольцевой структуры, и

X_{aa2} представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту и модифицирован сшивающим агентом.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где радионуклид металла представляет собой Ac-225, Y-90, Lu-177 или Zr-89.

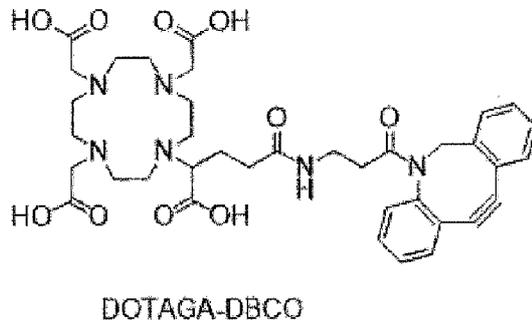
5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где линкер (L) включает формулу (10a), формулу (10b) или формулу (10c):



в формуле (10a) и формуле (10b) R_{1A} представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и R_{2A} представляет собой сайт связывания с пептидом, в формуле (10c) один из R_{3A} и R_{4A} представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и R_{5A} представляет собой сайт связывания с пептидом.

6. Конъюгат по п. 5, включающий полиэтиленгликолевую группу между сайтом связывания с пептидом и пептидом.

7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, который конъюгирован путем клик-реакции анти-HER2 антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, имеющим азидную группу, введенную в N-концевую часть, и комплекса радиоактивного металла DOTAGA-DBCO, представленного следующей формулой:



8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где анти-HER2 антитело представляет собой трастузумаб или пертузумаб.

9. Радиофармацевтическое средство, включающее конъюгат по любому из пп. 1-8 в качестве активного ингредиента.

10. Радиофармацевтическое средство по п. 9, которое используют в радионуклидной терапии рака.

11. Радиофармацевтическое средство по п. 9, которое используют в диагностике рака.

12. Радиофармацевтическое средство по п. 11, которое используют в комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства по п. 10.

13. Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего

агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активного ингредиента и удовлетворяющее следующим условиям (1) или (2), где

связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь:

(1) радионуклид металла представляет собой ^{177}Lu или ^{90}Y , и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней

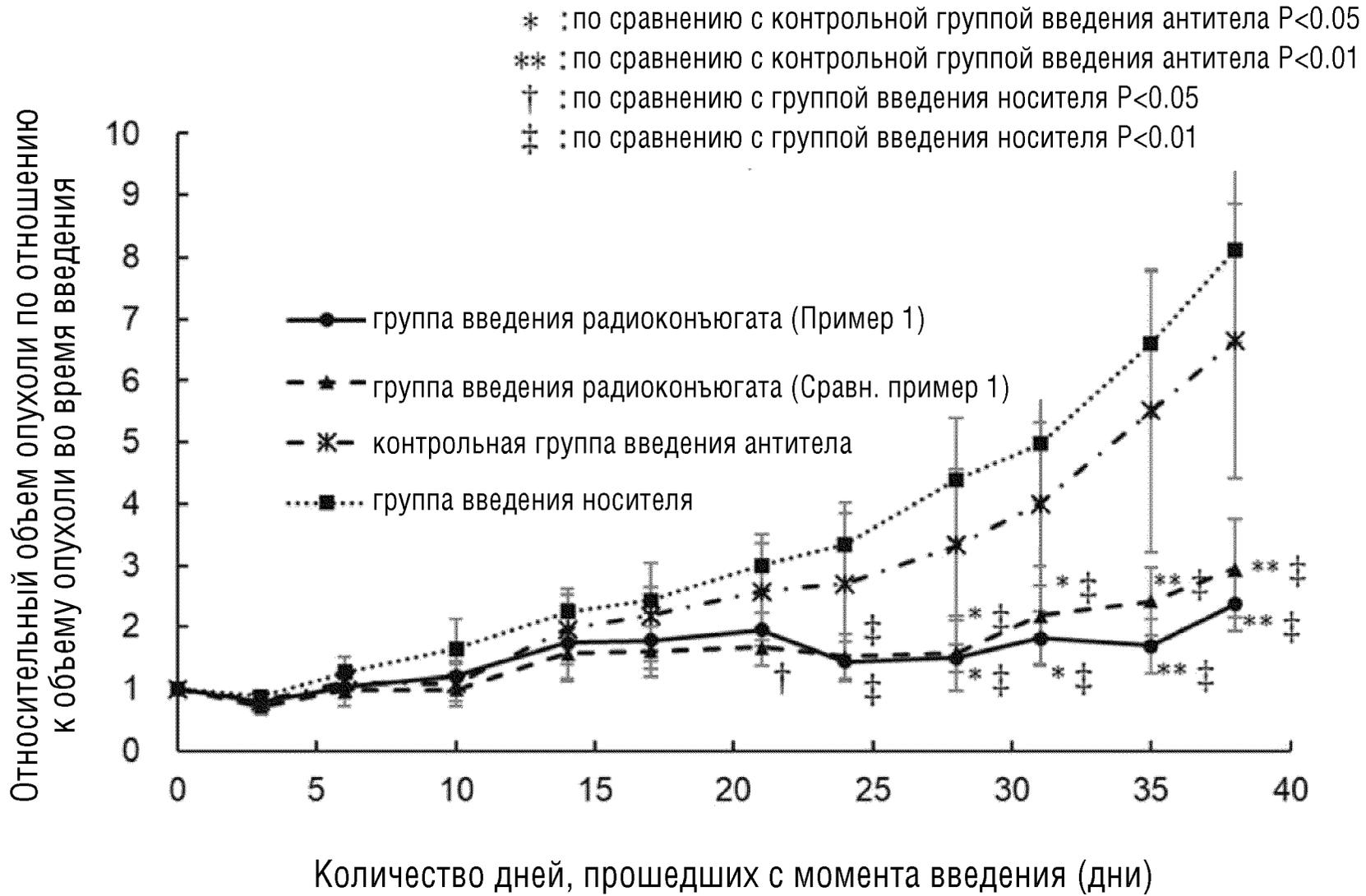
(2) радионуклид металла представляет собой ^{225}Ac , и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней.

14. Радиофармацевтическое средство, включающее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-HER2 антитела в качестве активного ингредиента, где

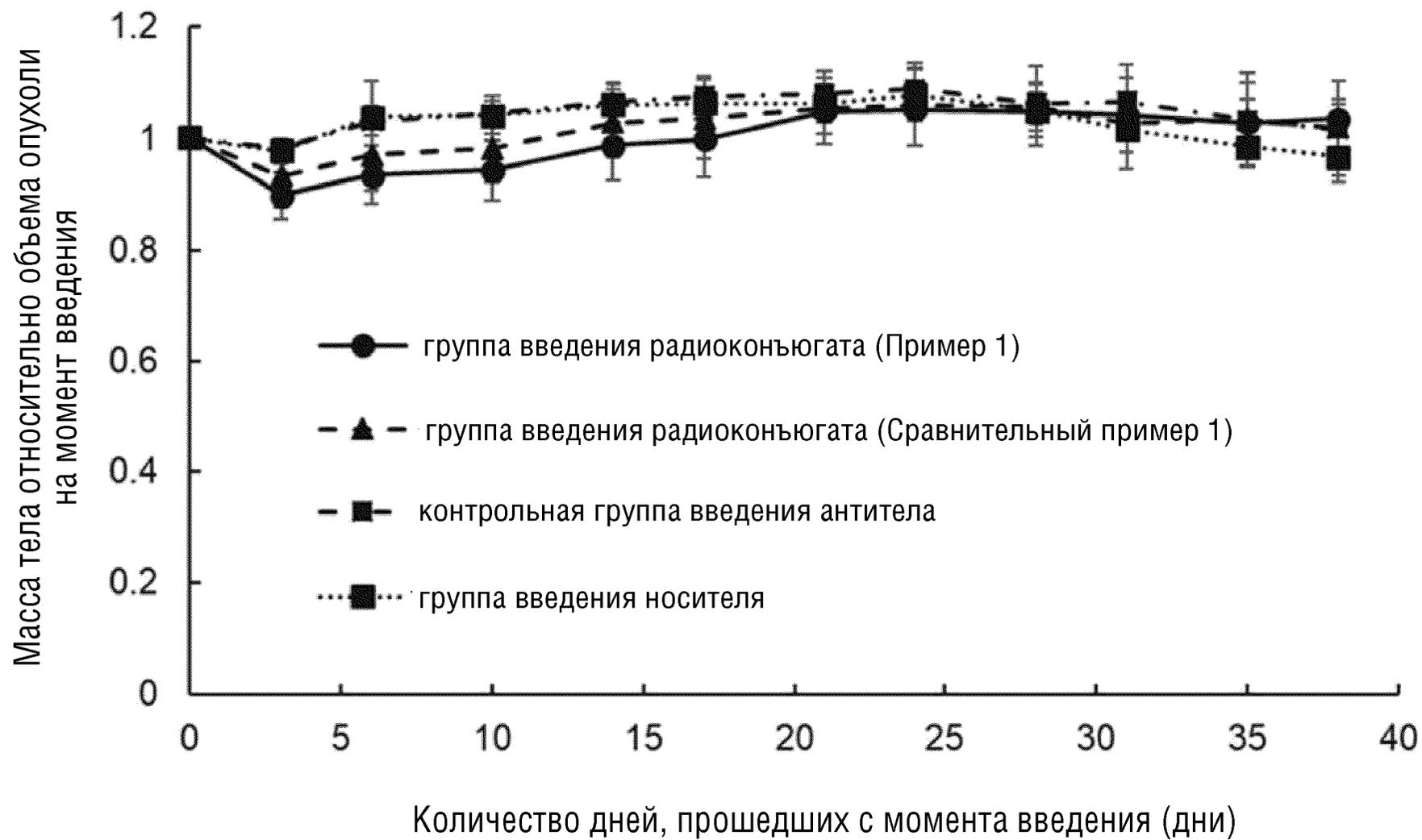
связь между анти-HER2 антителом и хелатирующим агентом не включает тиомочевинную связь, и

конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% на момент истечения периода, кратного не менее 1 и не более 5 периодам полураспада, исходя из периода полураспада радионуклида металла.

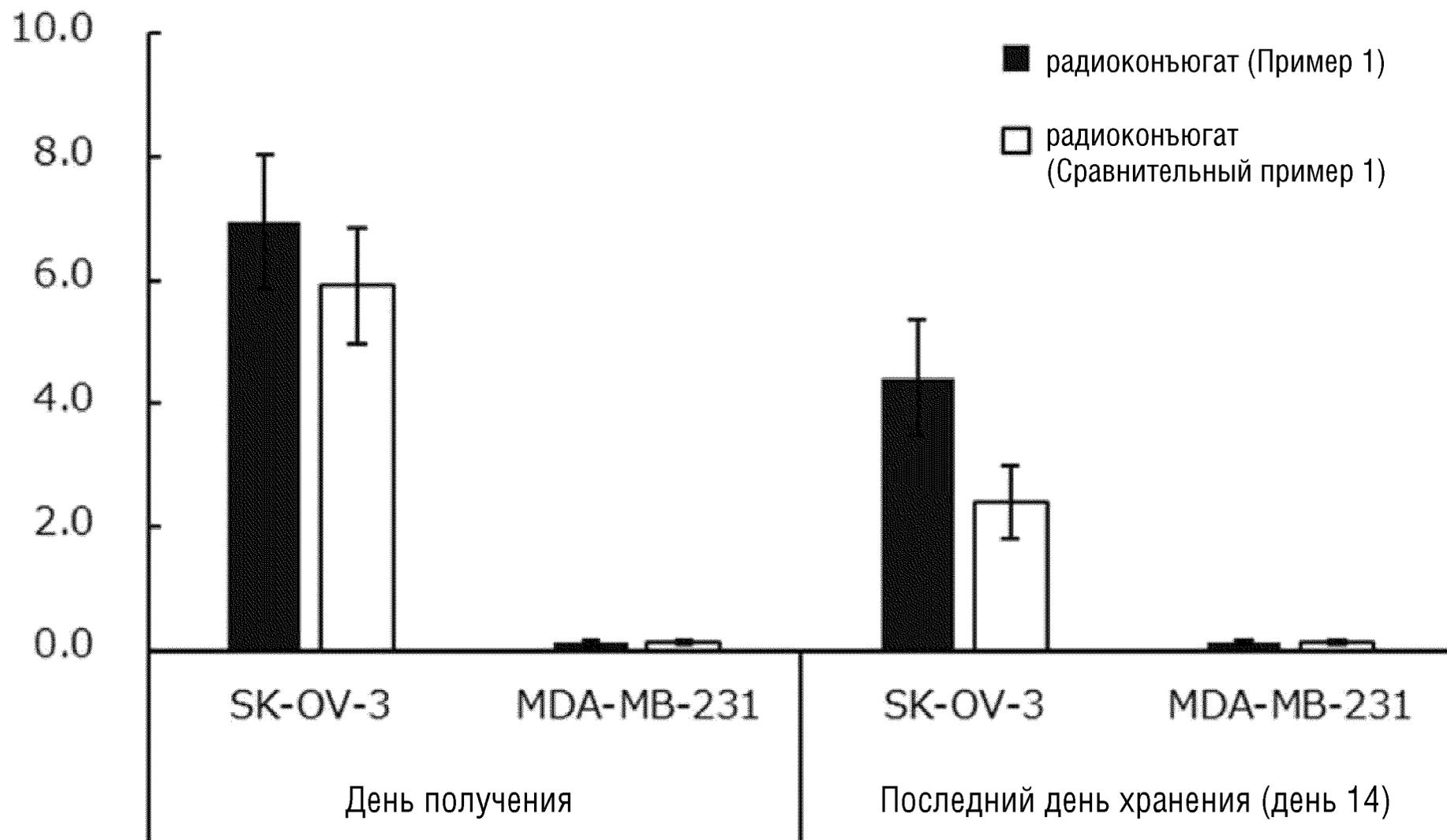
ФИГ.1



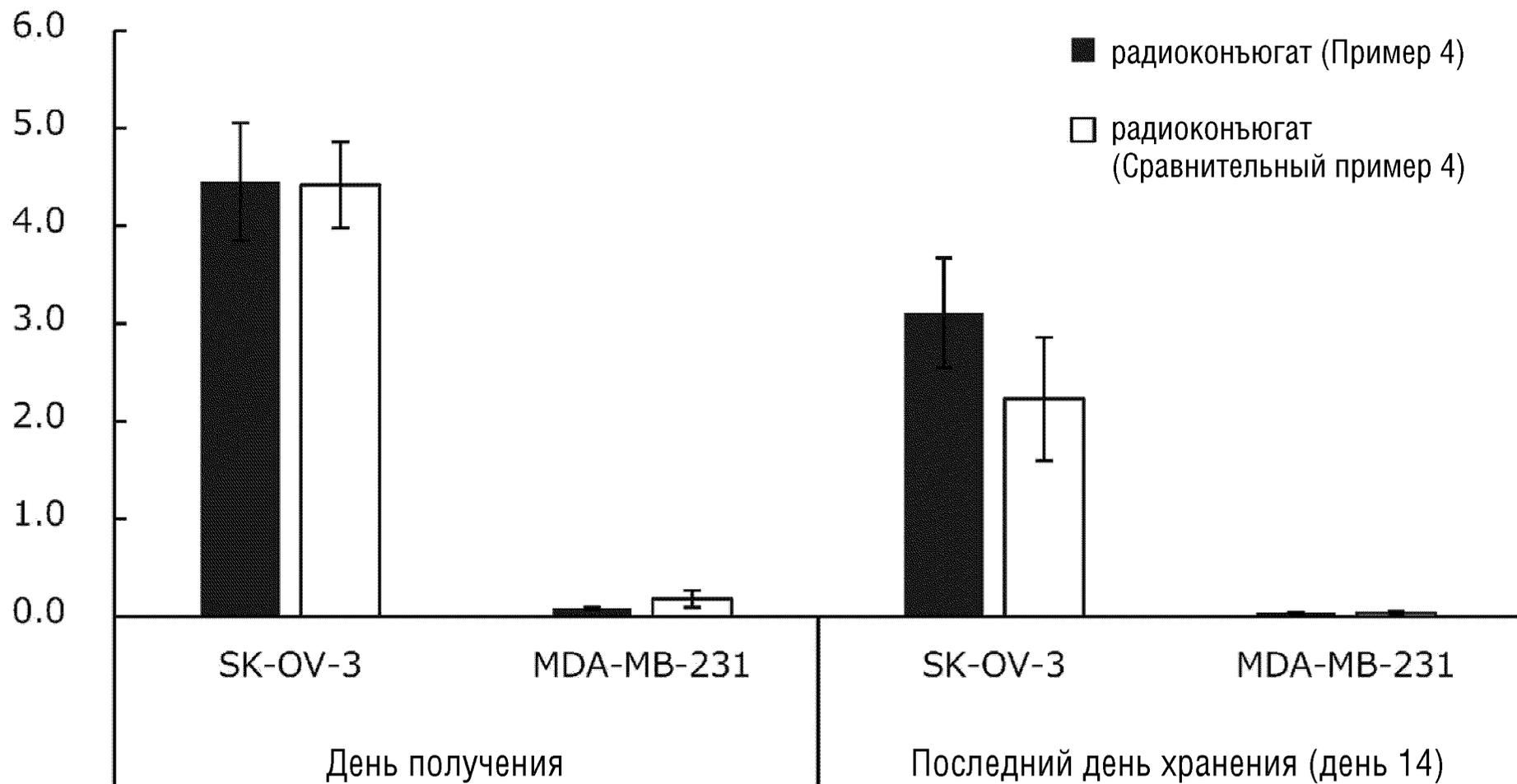
ФИГ.2



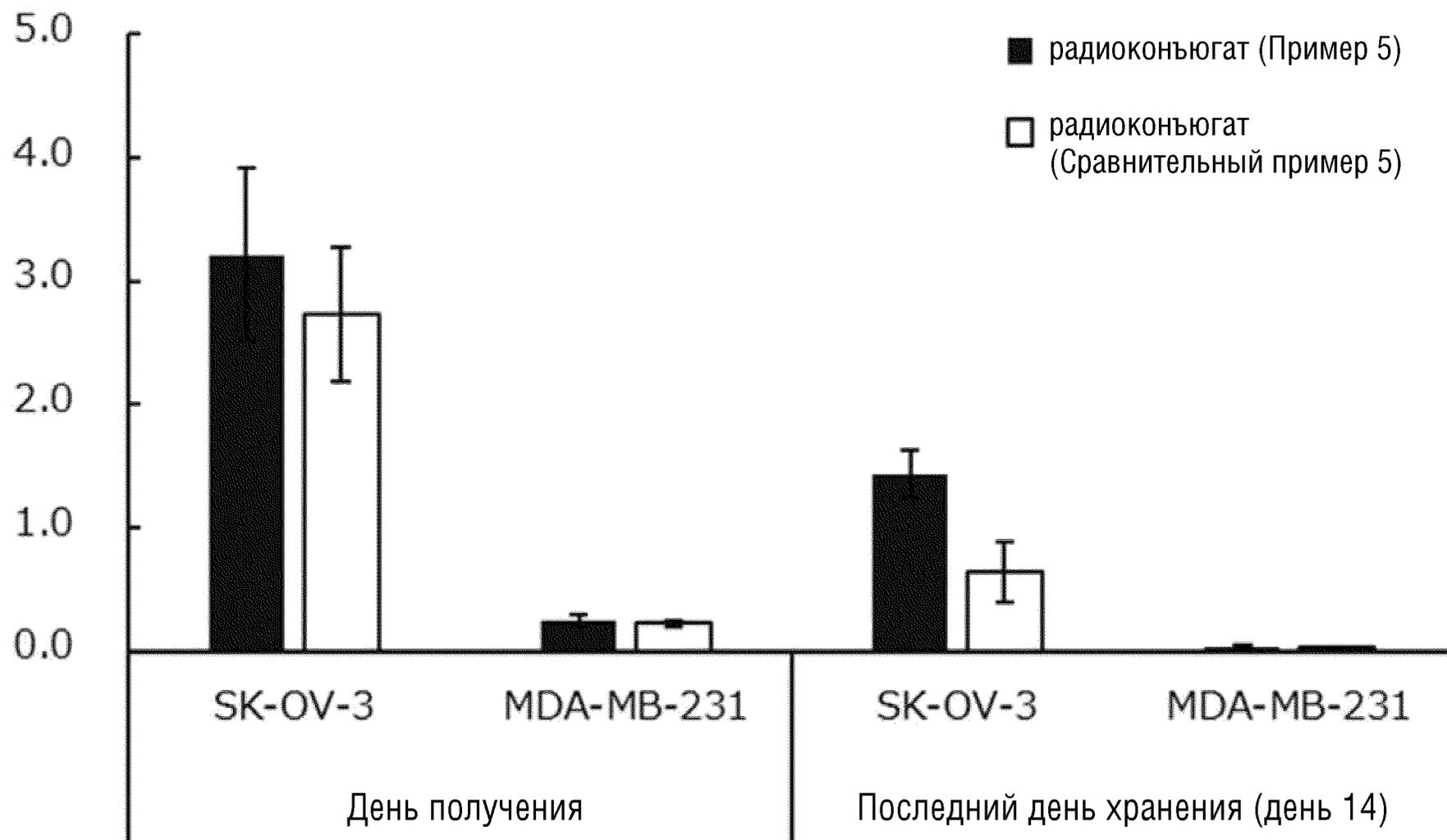
ФИГ.3



ФИГ.4



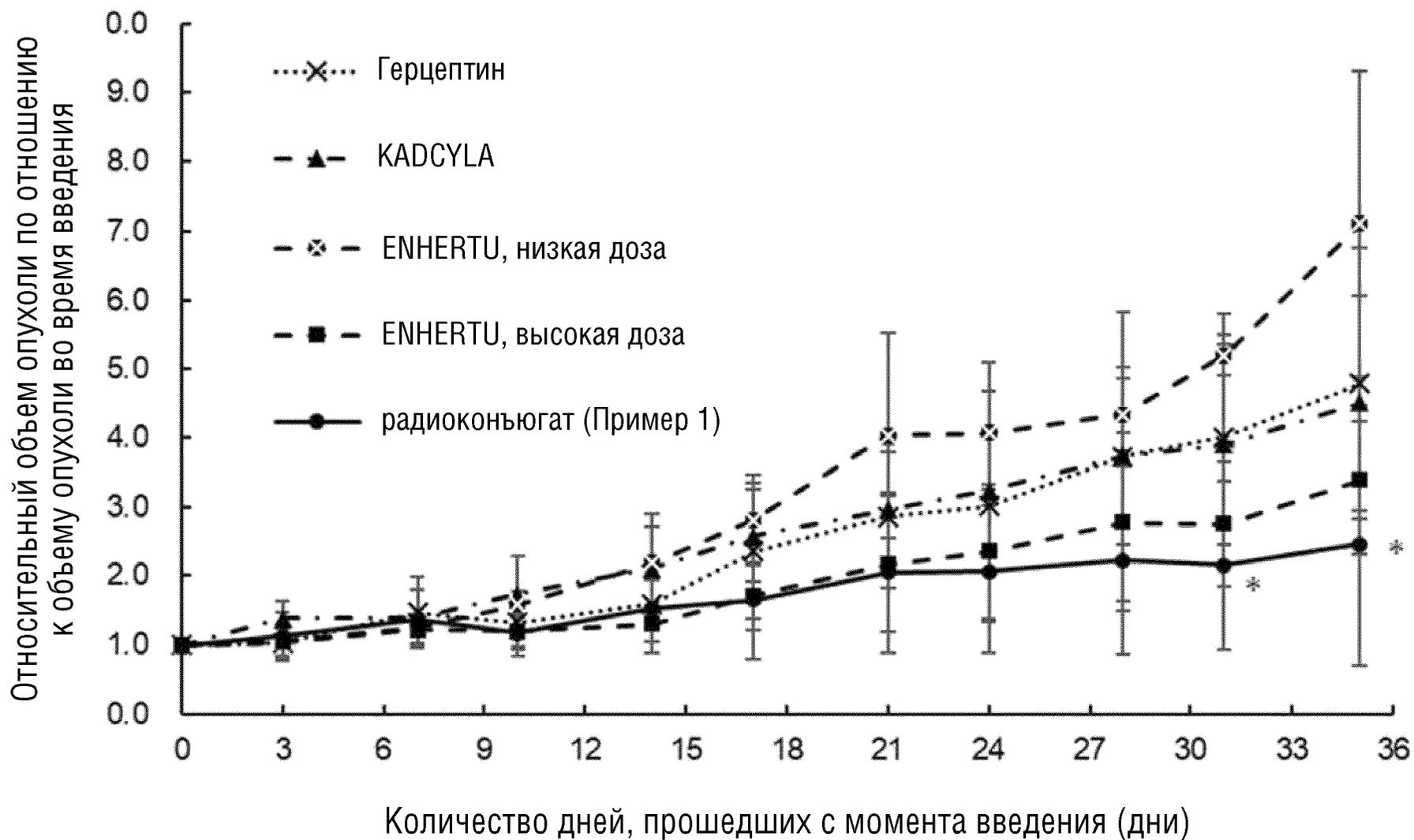
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

