

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291176** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.06

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(51) Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛА, МЕЧЕННОГО РАДИОАКТИВНЫМ МЕТАЛЛОМ

(31) 2019-191561

(32) 2019.10.18

(33) JP

(86) PCT/JP2020/039076

(87) WO 2021/075546 2021.04.22

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

(72) Изобретатель:
Идзава Акихиро, Огава Ю, Итикава
Хироаки, Каватани Минору,
Такемори Хидеаки, Окумура Юки
(JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по настоящему изобретению включает стадию проведения клик-реакции комплекса радиоактивного металла и антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, с получением антитела, меченного радиоактивным металлом. Клик-реакцию осуществляют между первой атомной группой комплекса радиоактивного металла и второй атомной группой, прямо или косвенно связанной с пептидом. Вторая атомная группа представляет собой атомную группу, содержащую азидную группу, или атомную группу, содержащую транциклооктен.

202291176

A1

A1

202291176

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574152EA/085

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛА, МЕЧЕННОГО РАДИОАКТИВНЫМ МЕТАЛЛОМ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001]

Настоящее изобретение относится к способу получения антитела, меченного радиоактивным металлом.

Уровень техники

[0002]

Антитело используют в качестве реагента для детектирования молекулы-мишени, диагностического агента или фармацевтического продукта для лечения заболевания за счет использования специфичности антитела к молекуле-мишени. Для дальнейшего улучшения характеристик детектирования и терапевтического эффекта проводятся исследования антител, связанных с радионуклидами и лекарственными средствами.

[0003]

Патентная литература 1 описывает пептид, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков и способный связываться с человеческим антителом. В настоящем документе также описано, что вышеуказанный пептид может быть модифицирован метящим веществом, таким как комплекс, содержащий радиоизотоп, или лекарственное средство, такое как противоопухолевое средство, и что может быть образован комплекс пептида и антитела.

[0004]

Патентная литература 2 описывает конъюгат антитела и пептида, модифицированный комплексом DTPA 111In, который представляет собой радиоактивный металл. Также описано, что этот конъюгат антитела специфически связывается с молекулой-мишенью, экспрессируемой в опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

[0005]

Патентная литература 1: WO 2016/186206.

Патентная литература 2: WO 2017/217347.

Патентная литература 3: WO 2019/125982.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006]

При получении антитела, связанного с комплексом радиоактивного металла, может оказаться необходимым нагревание реакционной системы, чтобы повысить эффективность образования комплекса, в зависимости от используемой комбинации лиганда и радиоактивного металла. Однако в этих условиях целевое антитело не может быть получено, так как антитело денатурируется при нагревании. В Патентной литературе 1 и 2

не исследуют условия реакции для решения такой проблемы.

[0007]

Таким образом, задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, с превосходной эффективностью мечення антитела радиоактивным металлом даже в мягких условиях реакции.

[0008]

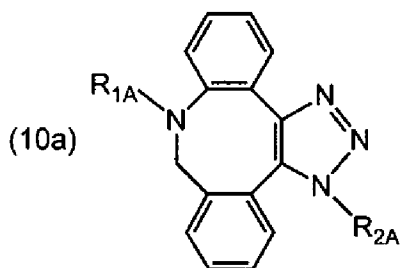
Настоящее изобретение относится к способу получения антитела, меченного радиоактивным металлом, включающему стадию проведения клик-реакции комплекса радиоактивного металла и антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, для получения меченного радиоактивным металлом антитела, где клик-реакцию проводят между первой атомной группой комплекса радиоактивного металла и второй атомной группой, прямо или косвенно связанной с пептидом, причем вторая атомная группа представляет собой атомную группу, содержащую азидную группу, или атомную группу, содержащую транс-циклооктен.

[0009]

Кроме того, в настоящем изобретении предложено антитело, меченное радиоактивным металлом, сайт-специфически модифицированное пептидом,

где комплекс радиоактивного металла прямо или косвенно связан с пептидом, и структура, содержащая триазольный скелет, представленная следующей формулой (10a), присутствует между пептидом и комплексом радиоактивного металла, или структура, содержащая скелет пиридазина, присутствует между пептидом и комплексом радиоактивного металла:

[0010]



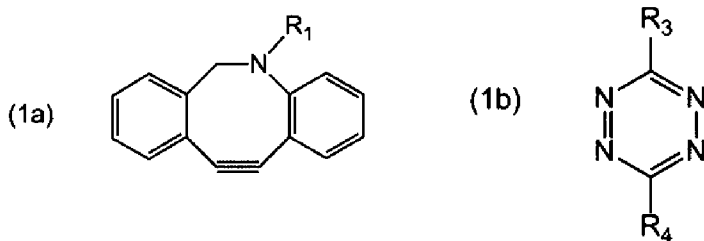
[0011]

где R_{1A} представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а R_{2A} представляет собой сайт связывания с пептидом.

[0012]

Кроме того, в настоящем изобретении предложен хелатный линкер, содержащий хелатный сайт, координированный с радиоактивным металлом, и модифицированный сайт, имеющий первую атомную группу, способную к клик-реакции, где первая атомная группа представляет собой атомную группу, представленную следующим формула (1a) или (1b):

[0013]

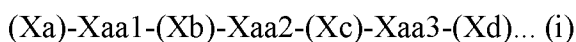


[0014]

в формуле (1a) R_1 представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а в формуле (1b) один из R_3 и R_4 представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а другой представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу.

[0015]

Кроме того, в настоящем изобретении предложено пептид-модифицированное антитело, представленное следующей формулой (i), и сайт-специфически модифицированное пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, где антитело содержит вторую атомную группу, способную к клик-реакции на N-конце или C-конце пептида, где вторая атомная группа представляет собой атомную группу, представленную следующей формулой (2a) или (2b):



где 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, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

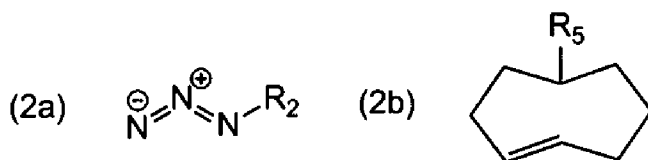
a, b, c и d, каждая независимо представляет собой целое число не менее единицы и не более 5 и удовлетворяет требованию $a+b+c+d \leq 14$,

каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и они связаны дисульфидной связью, или их сульфидные группы связаны через линкер, или

один представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, и они связаны тиоэфирной связью, и

Xaa2 представляет собой остаток лизина, остаток аргинина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту,

[0016]



[0017]

в формуле (2a) R_2 представляет собой сайт связывания с N-концом или C-концом пептида, а в формуле (2b) R_5 представляет собой сайт связывания с N-концом или C-концом пептида.

[0018]

Согласно настоящему изобретению эффективность мечения радиоактивным металлом антитела выше даже в мягких условиях реакции.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0019]

Далее способ получения меченного радиоактивным металлом антитела по настоящему изобретению объясняется на основе его предпочтительных вариантов осуществления.

[0020]

Способ получения по настоящему изобретению включает стадию получения антитела, меченного радиоактивным металлом (стадия мечения), путем клик-реакции комплекса радиоактивного металла и антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом (далее также просто называется «пептид-модифицированное антитело»). Детали радиоактивного металла и его комплекса, а также пептида описаны позже.

[0021]

Комплекс радиоактивного металла и пептид-модифицированное антитело имеют атомную группу, способную к клик-реакции, и эти атомные группы реагируют друг с другом, позволяя комплексу радиоактивного металла и пептид-модифицированному антителу связываться друг с другом. То есть клик-реакция на этой стадии осуществляется между первой атомной группой, содержащейся в комплексе радиоактивного металла, и второй атомной группой, прямо или косвенно связанной с пептидом в пептид-модифицированном антителе.

[0022]

«Прямо или косвенно» относится к тому, присутствует ли линкерная структура, описанная ниже, между второй атомной группой и пептидом. «Прямо» означает отсутствие линкерной структуры и, более конкретно, означает, что вторая атомная группа связана с N-концом или C-концом пептида не через линкерную структуру. «Косвенно» означает наличие линкерной структуры и, более конкретно, означает, что вторая атомная группа связана с N-концом или C-концом пептида через линкерную структуру. Как в «прямом», так и в «косвенном» варианте осуществления вторая атомная группа предпочтительно связана с N-концевой стороной пептида.

[0023]

Вышеупомянутая линкерная структура представлена следующей формулой (S1).



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

L_1 представляет собой линкерный сайт полиэтиленгликоля (ПЭГ),

m - целое число не менее 1 и не более 50,

Z представляет собой второй линкерный сайт, который связывает $(L_1)_m$ и L_2 ,

k равно 0 или 1,

L_2 представляет собой второй линкерный сайт ПЭГ, и

AG_2 представляет собой вторую атомную группу.

[0024]

В вышеуказанной формуле (S1) структура Z конкретно не ограничивается при условии, что она представляет собой линкерную структуру, которая связывает $(L_1)_m$ и L_2 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 остаток цистеина и более предпочтительно связана с L_2 через тиоэфирную группу, образованную связью между тиольной группой цистеинового остатка и малеимидной группой.

[0025]

В настоящем изобретении линкерный сайт ПЭГ, составляющий L_2 , предпочтительно имеет структуру, представленную следующей формулой (P1). В формуле (P1) 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.

[0026]



[0027]

Один конец структуры линкерного сайта ПЭГ может быть модифицирован структурой, полученной из коммерчески доступного реагента для ПЭГилирования, или структурой, полученной из реагента, обычно используемого для ПЭГилирования. Хотя это особо не ограничивается, их примеры включают структуры, полученные из дигликолевой кислоты или ее производного, и малеимида или его производного.

[0028]

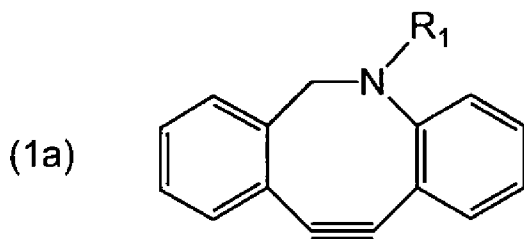
На данной стадии в качестве комбинации атомных групп, способных к клик-реакции, выбирается подходящая комбинация в соответствии с типом клик-реакции. Например, можно упомянуть комбинацию алкина и азиды, комбинацию 1,2,4,5-тетразина и алкена и т. п. В этих атомных группах достаточно, если первая атомная группа имеет одну из вышеуказанных атомных групп, а вторая атомная группа имеет атомную группу, являющуюся комбинацией с первой атомной группой. Для достижения как стабильности

комплекса радиоактивного металла и пептид-модифицированного антитела, так и повышения эффективности их связывания первая атомная группа предпочтительно представляет собой алкин, а вторая атомная группа предпочтительно представляет собой азид, или первая атомная группа предпочтительно представляет собой 1,2,4,5-тетразин, а вторая атомная группа предпочтительно представляет собой алкен. Конкретные примеры клик-реакции с помощью таких комбинаций атомных групп включают реакцию присоединения циклизации Huisgen, реакцию Дильса-Альдера с обратной потребностью электронов и т. п.

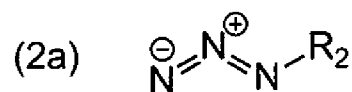
[0029]

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 атомную группу, содержащую азидную группу в качестве азиды второй атомной группы (формула (2a)), или еще комбинацию атомной группы, содержащую 1,2,4,5-тетразин в качестве первой атомной группы (формула (1b)) и атомную группу, содержащую транс-циклооктен (TCO) в качестве алкена второй атомной группы (формула (2b)).

[0030]



дибензилциклооктин

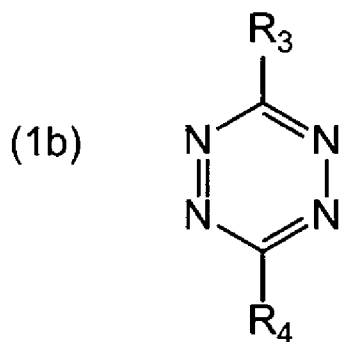


азид

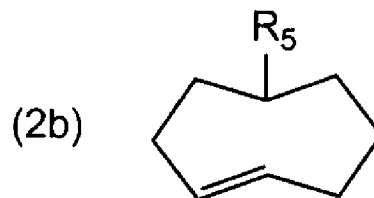
[0031]

(в формуле (1a) R₁ представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а в формуле (2a) R₂ представляет собой сайт связывания пептида антитела с модифицированным пептидом.)

[0032]



1, 2, 4, 5-тетразин



транс-циклооктен

[0033]

(в формуле (1b) один из R_3 и R_4 представляет собой сайт связывания с другой структурой, а другой представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу, а в формуле (2b), R_5 представляет собой сайт связывания с другой структурой.)

[0034]

На этой стадии, когда комплекс радиоактивного металла и пептид-модифицированное антитело способны к клик-реакции, порядок их добавления не имеет значения. Например, один из комплекса радиоактивного металла и пептид-модифицированного антитела добавляют в реакционный контейнер, содержащий растворитель, а затем добавляют другой для проведения реакции, или один из комплекса радиоактивного металла и пептид-модифицированного антитела диспергируют в растворителе, а другой добавляют к дисперсии для проведения реакции. Альтернативно, они могут быть одновременно добавлены в реакционный контейнер, содержащий растворитель, для проведения реакции.

[0035]

В качестве растворителя, используемого на этой стадии, можно использовать растворители, содержащие воду. Например, может быть использована вода, физиологический раствор или буфер, такой как натрий-ацетатный буфер, аммоний-ацетатный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, трис-гидроксиметиламинометановый буфер (в дальнейшем называемый просто «трис-буфер»), буфер 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфонокислоты (в дальнейшем называемый просто «HEPES буфер»), тетраметиламмонийацетатный буфер или тому подобное. При использовании буфера для одновременного достижения как стабильности комплекса и антитела, так и эффективности их связывания нижний предел pH при 25°C предпочтительно составляет не менее 3,5, более предпочтительно не менее 4, еще более предпочтительно не менее 4,5, еще более предпочтительно не менее 5, особенно предпочтительно не менее 5,5, верхний предел предпочтительно не более 10, более предпочтительно не более 9,5, еще более предпочтительно не более 9, еще более предпочтительно не более 8,5, особенно предпочтительно не более 8, а предпочтительный диапазон составляет не менее 4 и не более 10, более предпочтительно не менее 5,5 и не более 8,5.

[0036]

Чтобы повысить эффективность связывания между комплексом радиоактивного металла и пептид-модифицированным антителом и при этом избежать непреднамеренной денатурации пептид-модифицированного антитела, верхний предел температуры клик-реакции на этой стадии предпочтительно составляет не более 120°C, более предпочтительно не более 90°C, еще более предпочтительно не более 50°C, еще более предпочтительно не более 40°C. Нижний предел температуры реакции особо не ограничивается при условии, что это температура, при которой может быть осуществлена клик-реакция. Предпочтительно она составляет не менее 10°C, более предпочтительно не

менее 15°C, еще более предпочтительно не менее 20°C, еще более предпочтительно не менее 30°C, особенно предпочтительно не менее 35°C. При условии, что применяется вышеуказанная температура реакции, нижний предел времени клик-реакции предпочтительно составляет не менее 5 мин, более предпочтительно не менее 10 мин, еще более предпочтительно не менее 20 мин, еще более предпочтительно не менее 30 мин, особенно предпочтительно не менее 60 мин, и верхний предел предпочтительно составляет не более 36 ч, более предпочтительно не более 24 ч, еще более предпочтительно не более 20 ч, особенно предпочтительно не более 15 ч, и предпочтительный диапазон составляет не менее 5 минут и не более 24 часов, более предпочтительно не менее 10 минут и не более 20 часов.

[0037]

Количество реакционного раствора особо не ограничено. С точки зрения практичности на стадии производства нижний предел предпочтительно составляет не менее 0,01 мл, более предпочтительно не менее 0,1 мл, еще более предпочтительно не менее 1 мл, а верхний предел предпочтительно составляет не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 10 мл в начале этой стадии. Например, предпочтительно не менее 0,1 мл и не более 10 мл. Кроме того, концентрации в начале реакции каждого, комплекса радиоактивного металла и пептид-модифицированного антитела, в реакционном растворе независимо друг от друга составляют не менее 0,01 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,1 мкмоль/л, еще более предпочтительно не менее 1 мкмоль/л в качестве нижнего предела и предпочтительно не более 10000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 1000 мкмоль/л, еще более предпочтительно не более 100 мкмоль/л в качестве верхнего предела. Например, она предпочтительно составляет не менее 1 мкмоль/л и не более 100 мкмоль/л с точки зрения выхода целевого антитела, меченного радиоактивным металлом.

[0038]

Полученное антитело, меченное радиоактивным металлом, можно использовать в чистом виде или его можно очистить с помощью фильтра фильтрации, мембранного фильтра, колонки, заполненной различными наполнителями, хроматографии и т. п.

[0039]

В соответствии со способом получения по настоящему изобретению, включающим вышеуказанные стадии, комплекс радиоактивного металла и пептид-модифицированное антитело связывают в мягких условиях реакции с получением антитела, меченного радиоактивным металлом, с высоким выходом. Поскольку полученное меченое антитело может быть специфически помечено в сайте, который не ингибирует антигенную специфичность антитела, антигенная специфичность самого антитела сохраняется. В частности, на вышеуказанной стадии реакция связывания между комплексом радиоактивного металла и пептид-модифицированным антителом может протекать в достаточной степени и за короткое время без проведения тепловой обработки для стимулирования реакции связывания между комплексом и антителом. Следовательно, даже

при использовании радиоактивного металла с коротким периодом полураспада, такого как позитрон-излучающий нуклид, меченое антитело, имеющее высокую радиохимическую чистоту и высокий радиохимический выход, может быть получено за короткое время.

[0040]

Способ получения по настоящему изобретению предпочтительно включает стадию (стадия образования комплекса) реакции лиганда с радиоактивным металлом с образованием комплекса радиоактивного металла перед стадией мечения, так что радиоактивный металл, используемый для мечения, может быть использован согласно применению и цели меченого антитела без конкретных ограничений. Лиганд, используемый на этой стадии, предпочтительно имеет первую атомную группу. Кроме того, с точки зрения повышения эффективности комплексообразования, радиоактивный металл на этой стадии предпочтительно используют в форме ионизируемого соединения радиоактивного металла, еще более предпочтительно в форме иона радиоактивного металла (далее эти варианты осуществления вместе называются в качестве «источника радиоактивного металла»).

[0041]

С точки зрения повышения эффективности образования комплекса радиоактивного металла, независимо от комбинации лиганда и радиоактивного металла, предпочтительно нагревать и проводить реакцию лиганда и радиоактивного металла на стадии образования комплекса. Комплексообразование может плохо протекать в условиях отсутствия нагревания в зависимости от комбинации лиганда и радиоактивного металла. Однако путем образования в условиях нагревания комплекса с координированным в нем ионом радиоактивного металла образование комплекса может быть эффективно осуществлено независимо от комбинации лиганда и радиоактивного металла.

[0042]

На стадии образования комплекса, когда может образоваться комплекс с ионом радиоактивного металла, порядок добавления лиганда и источника радиоактивного металла не имеет значения. Например, один из лиганда и источника радиоактивного металла добавляют в реакционный контейнер, содержащий растворитель, а затем добавляют другой для проведения реакции, или один из лиганда и источника радиоактивного металла диспергируют в растворителе и другой добавляют к дисперсии для проведения реакции. Альтернативно, они могут быть одновременно добавлены в реакционный контейнер, содержащий растворитель, для проведения реакции.

[0043]

В качестве условий реакции на стадии комплексообразования, например, могут быть приняты следующие условия. В качестве растворителя, используемого на этой стадии, можно использовать воду, солевой раствор или буфер, такой как натрийацетатный буфер, аммонийацетатный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, трис-буфер, буфер HEPES или тетраметиламмонийацетатный буфер, или водорастворимый органический растворитель, такой как спирт с числом атомов углерода не менее одного и не более 5,

ацетонитрил, N, N-диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, ацетон и т. п., или смесь этих растворителей. Температура реакции может быть, например, комнатной (25°C), или реакцию проводят в условиях нагревания. Для одновременного подавления разложения лиганда и повышения эффективности образования комплекса верхний предел предпочтительно составляет не более 120°C, более предпочтительно не более 90°C, еще более предпочтительно не более 50°C, более предпочтительно не более 40°C. Нижний предел особо не ограничивается при условии, что это температура, при которой может быть осуществлена клик-реакция. Предпочтительно она составляет не менее 0°C, более предпочтительно не менее 10°C, еще более предпочтительно не менее 15°C, еще более предпочтительно не менее 20°C, еще более предпочтительно не менее 30°C, особенно предпочтительно не менее 35°C. Нагревание осуществляют предпочтительно при температуре не менее 30°C и не более 100°C, еще более предпочтительно не менее 37°C и не более 90°C. При условии, что применяется вышеуказанная температура реакции, нижний предел времени реакции предпочтительно составляет не менее 5 мин, более предпочтительно не менее 10 мин, еще более предпочтительно не менее 20 мин, еще более предпочтительно не менее 30 мин, особенно предпочтительно не менее 60 мин, а верхний предел предпочтительно составляет не более 300 мин, более предпочтительно не более 150 мин, еще более предпочтительно не более 120 мин, особенно предпочтительно не более 60 мин. Предпочтительно оно составляет не менее 10 мин и не более 150 мин, еще более предпочтительно не менее 30 мин и не более 60 мин.

[0044]

В качестве источника радиоактивного металла на стадии комплексообразования можно использовать, например, раствор иона радиоактивного металла, диспергированного или растворенного в растворителе, в основном содержащем воду.

[0045]

Количество реакционного раствора особо не ограничено. С точки зрения практичности на стадии производства нижний предел предпочтительно составляет не менее 0,01 мл, более предпочтительно не менее 0,1 мл, еще более предпочтительно не менее 1 мл, а верхний предел предпочтительно составляет не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 10 мл, для обоих в начале этой стадии. Например, предпочтительно не менее 0,01 мл и не более 100 мл. Кроме того, концентрации в начале этой стадии каждого, лиганда и радиоактивного иона металла, в реакционном растворе независимо друг от друга предпочтительно составляют не менее 0,01 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,1 мкмоль/л, еще более предпочтительно не менее 1 мкмоль/л в качестве нижнего предела и предпочтительно не более 10000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 1000 мкмоль/л, еще более предпочтительно не более 100 мкмоль/л в качестве верхнего предела. Например, она предпочтительно составляет не менее 1 мкмоль/л и не более 100 мкмоль/л с точки зрения выхода целевого комплекса радиоактивного металла. Молярные отношения лиганда и иона радиоактивного металла варьируются в зависимости от типа используемого лиганда и иона радиоактивного металла.

Для лиганда/иона радиоактивного металла нижний предел предпочтительно составляет не менее 10/1, более предпочтительно не менее 100/1, не менее 200/1, еще более предпочтительно не менее 300/1, еще более предпочтительно не менее 500/1, а верхний предел предпочтительно составляет не более 10000/1, более предпочтительно не более 9000/1, еще более предпочтительно не более 8000/1, еще более предпочтительно не более 7000/1. Предпочтительно соотношение находится в диапазоне не менее 200/1 и не более 10000/1, особенно предпочтительно не менее 500/1 и не более 7000/1.

[0046]

Полученный комплекс радиоактивного металла можно использовать в чистом виде или его можно очистить с помощью фильтра фильтрации, мембранного фильтра, колонки с различными наполнителями, хроматографии и т. п. В частности, на этой стадии, даже при использовании низкоэнергетического излучения, которое трудно обнаружить, или нуклида радиоактивного металла, испускающего α -излучение, комплексообразование протекает хорошо, и выход полученного продукта высок. Таким образом, комплекс, содержащий нуклид радиоактивного металла, может быть предпочтительно подвергнут последующим стадиям в неочищенном состоянии.

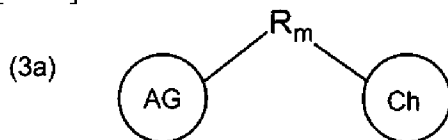
[0047]

С точки зрения повышения эффективности реакции между лигандом и ионом радиоактивного металла и повышения эффективности клик-реакции между полученным комплексом и пептид-модифицированным антителом предпочтительно, чтобы лиганд имел хелатный сайт, где координируется ион радиоактивного металла, и модифицированный сайт, связанный с первой атомной группой.

[0048]

Как показано в следующей формуле (3a), модифицированный сайт (R_m в формуле (3a)) связан с вышеуказанным хелатным сайтом (Ch в формуле (3a)), а также связан с вышеуказанной первой атомной группой (AG в формуле (3a)). В формуле (3a) R_m представляет собой замещенную или незамещенную атомную группу с прямой или разветвленной цепью, имеющую общее число атомов углерода не менее 10 и не более 50.

[0049]



[0050]

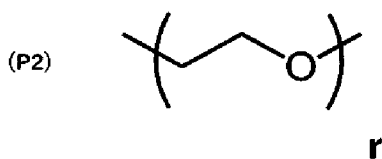
Модифицированный сайт R_m не имеет особых ограничений в способе связывания с хелатным сайтом Ch при условии, что может образовываться комплекс между лигандом и ионом радиоактивного металла. С точки зрения эффективного образования комплекса между лигандом и ионом радиоактивного металла предпочтительно, чтобы модифицированный сайт R_m и хелатный сайт Ch образовывали тиомочевинную связь и связывались друг с другом, или чтобы модифицированный сайт R_m и хелатный сайт Ch

образовывали амидную связь и связывались друг с другом. С точки зрения увеличения эффективности мечения комплекса радиоактивного металла и антитела, модифицированный сайт Rm также предпочтительно связан с R₁, и R₃ или R₄, представленными вышеуказанными формулами (1a) и (1b), в первой атомной группе.

[0051]

С точки зрения дальнейшего повышения эффективности мечения комплекса радиоактивного металла и антитела предпочтительно, чтобы структура, представленная следующей формулой (P2), была связана с модифицированным сайтом структуры, представленной Rm в формуле (3a). Структура формулы (P2) получена из этиленгликоля, и в формуле (P2) r предпочтительно представляет собой целое число не менее 2 и не более 50, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 30.

[0052]

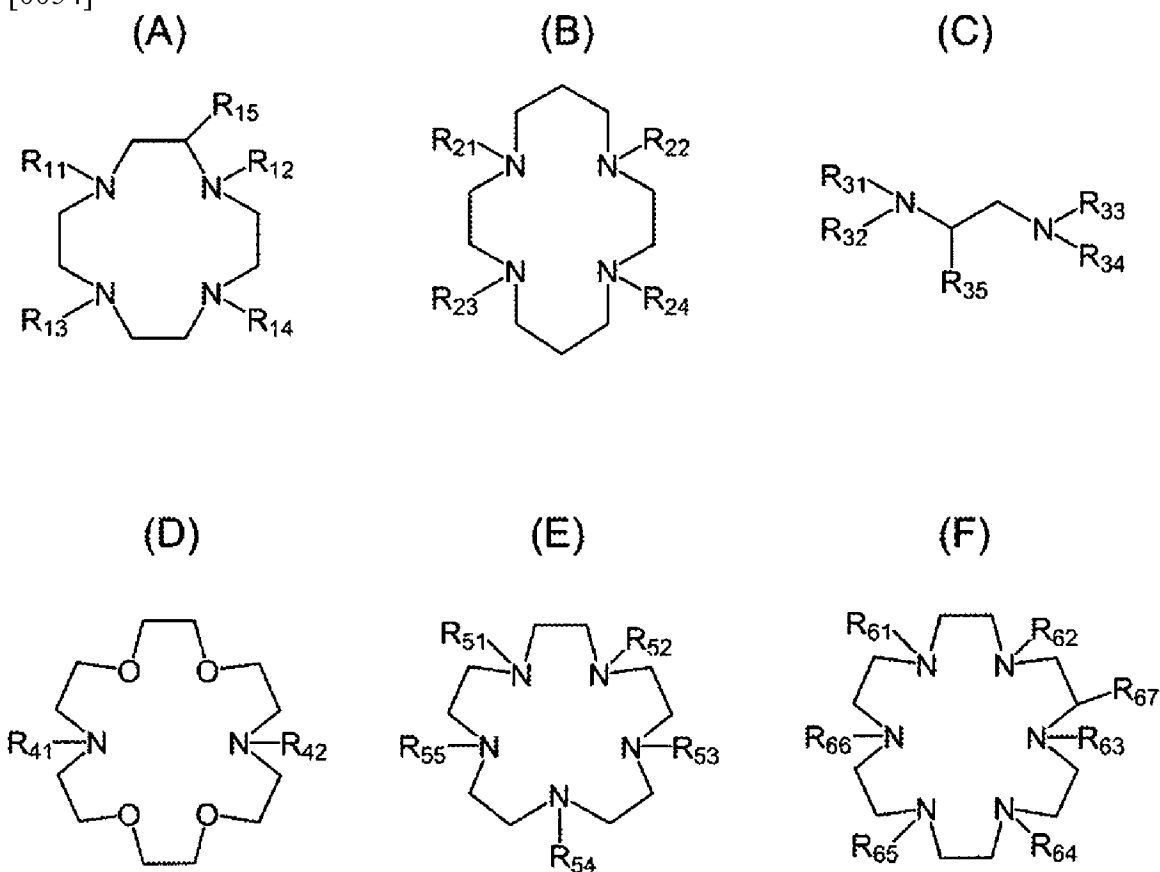


[0053]

Хелатный центр особо не ограничен при условии, что он имеет в своей структуре сайт, где координируется радиоактивный металл. Предпочтительно он представлен с помощью СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусная кислота), CDТА (циклогексан-транс-1,2-диаминтетрауксусная кислота), CDTPA(4-циано-4-[[[(додecilтио)тиоксометил]тио]-пентановая кислота), DOTA(1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTMA((1R,4R,7R,10R)-α,α',α'',α'''-тетраметил-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), ДОТАМ(1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан), ДОТА-GA(α-(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), ДОТР((((1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетракис(метилен))тетрафосфоновая кислота), DOTMP (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновая кислота)), ДОТА-4AMP(1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновая кислота), D02P(тетраазаациклододекадиметанфосфоновая кислота), Дефероксамин (DFO), DTPA (глицин, N, N-бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-), DTPA-BMA(5,8-бис(карбоксиметил)-11-[2-(метиламино)-2-оксоэтил]-3-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-13-овая кислота), ЭДТА(2,2',2'',2'''-(этан-1,2-диилбис(азантриил))тетрауксусная кислота), NOTA(1,4,7-триазаациклононан-1,4,7-триуксусная кислота), NOTP(1,4,7-триазаациклононан-1,4,7-триилтрис (метиленфосфоновая кислота), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовая кислота), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-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-гексаазаациклооктадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусная кислота), 1,2-НОРО(N, N',N'',N'''-

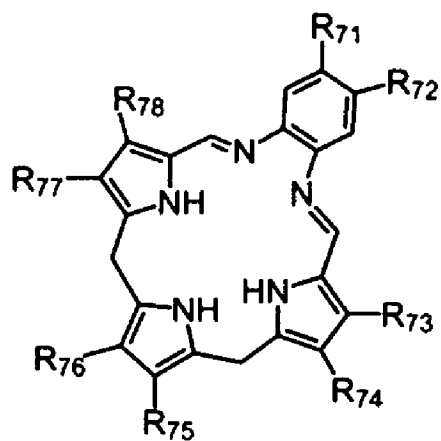
тетра(1,2-дигидро-1-гидрокси-2- оксопиридин-6-карбонил)-1,5,10,14-тетраазатетрадекан), РЕРА(1,4,7,10,13-пентаазазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусная кислота), H4octapa(N, N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-этилендиамин-N, N'-диуксусная кислота), H2bispa2(6,6'-({9-гидрокси- 1,5-бис(метоксикарбонил)-2,4-ди(пиридин-2-ил)-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил}бис(-метилен))дипиколиновая кислота), H2dedpa(1,2- [{6-(карбокси)-пиридин-2-ил}-метиламино]этан), H2масгора(6-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазазациклооктадекан-N, N'-метил)пиколиновая кислота), H5decapa(N, N''-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-диэтилентриамин-N, N',N''-триуксусная кислота), H6phospha(N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), HP-D03A (гидроксипропилтетраазазациклододекантриуксусная кислота) или порфирин, или любой из следующих формул (A)-(K). Эти структуры могут быть соответствующим образом выбраны в соответствии с типом радиоактивного металла, как описано ниже. Эффект настоящего изобретения в достаточной степени достигается при использовании любого хелатного сайта.

[0054]

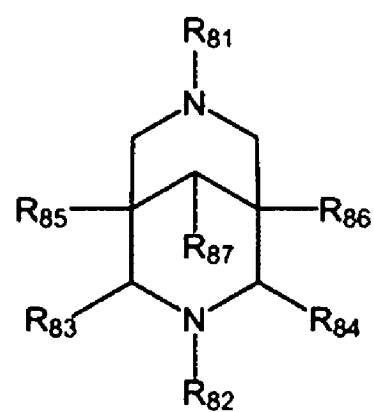


[0055]

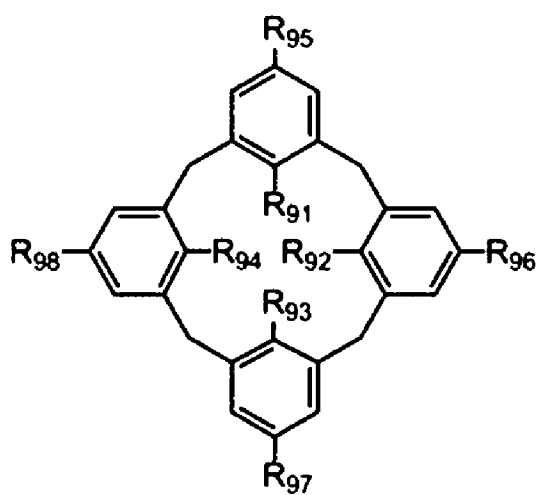
(G)



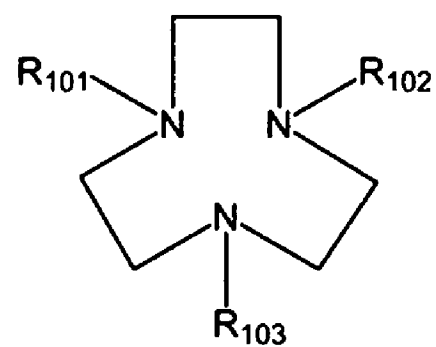
(H)



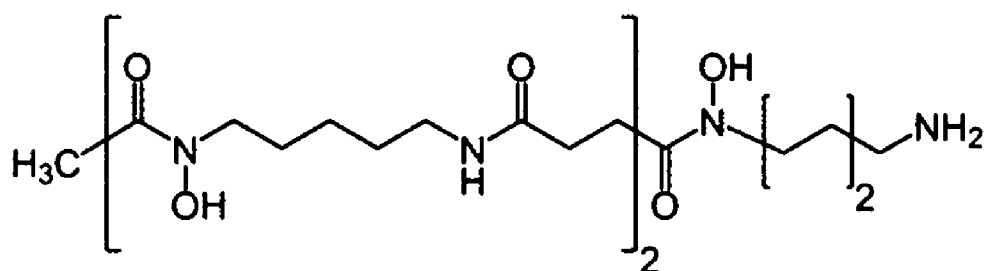
(I)



(J)



(K)



[0056]

В формуле (A) каждый из R₁₁, R₁₃ и R₁₄ независимо представляет собой группу,

состоящую из $-(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{PO}_3\text{H}_2$, $-(\text{CH}_2)_p\text{CONH}_2$ или $-(\text{CHCOOH})(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$, один из R_{12} и R_{15} представляет собой атом водорода, карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой группу, связанную с вышеуказанным модифицированным сайтом, и p представляет собой целое число не менее 0 и не более 3.

[0057]

В формуле (B) каждый из R_{21} , R_{22} , R_{23} и R_{24} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, и любая группа из R_{21} , R_{22} , R_{23} или R_{24} связана с вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0058]

В формуле (C) каждый из R_{31} , R_{32} , R_{33} и R_{34} независимо представляет собой группу, состоящую из атомной группы, содержащей атом водорода и не менее 2 и не более 10 атомов углерода, и необязательно содержащую атом азота или атом кислорода, и R_{35} представляет собой группу, связанную с вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0059]

В формуле (D) один из R_{41} и R_{42} представляет собой группу, состоящую из атомной группы, содержащей атом водорода и не менее 5 и не более 20 атомов углерода, и содержащую один или более видов, выбранных из атома азота, атом кислорода и атом серы, а другой представляет собой группу, связанную с вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0060]

В формуле (E) R_{51} , R_{52} , R_{53} , R_{54} и R_{55} , каждый независимо, представляют собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, и любая одна группа из R_{51} , R_{52} , R_{53} , R_{54} или R_{55} связана с вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0061]

В формуле (F) каждый из R_{61} , R_{62} , R_{63} , R_{64} , R_{65} и R_{66} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, а R_{67} представляет собой группу, связанную с указанным вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0062]

В формуле (G) R_{71} и R_{72} представляют собой $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ (n представляет собой целое число не менее 1 и не более 5), R_{73} , R_{75} , R_{76} и R_{78} , каждый независимо, представляет собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, одна из R_{74} и R_{77} представляет собой гидроксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, а другой представляет собой группу, связанную с указанным вышеуказанным модифицированным сайтом.

[0063]

В формуле (H) R_{81} и R_{82} , каждый независимо, представляют собой алкильную

группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, конец алкильной группы может быть замещен пиридильной группой, замещенной одной или более карбоксильными группами, R_{87} представляет собой $-\text{CHOH}$ или $-\text{C}=\text{O}$, любая группа из R_{81} , R_{82} или R_{87} представляет собой группу, связанную с указанным выше модифицированным сайтом, R_{83} и R_{84} представляют собой необязательно замещенные пиридиновые группы, R_{85} и R_{86} представляют собой независимо $-\text{COORa}$, и Ra представляет собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5.

[0064]

В формуле (I) каждый из R_{91} , R_{92} , R_{93} и R_{94} независимо представляет собой $-\text{OCH}_2\text{COOH}$, любая группа из R_{91} , R_{92} , R_{93} или R_{94} представляет собой группу, связанную с вышеуказанным модифицированным сайтом, и R_{95} , R_{96} , R_{97} и R_{98} , каждый независимо, представляет собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 6.

[0065]

В формуле (J) каждый из R_{101} , R_{102} и R_{103} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, или по меньшей мере один из R_{101} , R_{102} и R_{103} в формуле (J) представляет собой группу, связанную с вышеуказанным модифицированным сайтом, а другая группа представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3.

[0066]

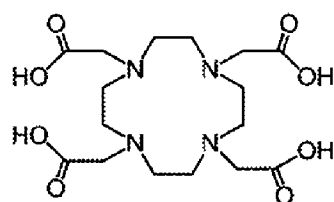
В вышеуказанных формулах (A)-(J) «группа, связанная с модифицированным сайтом», представляет собой структуру, полученную из карбоксильной группы, аминогруппы, группы N-гидроксисукцинимидоэфира (NHS), 2,6-диоксотетрагидро-2H-пиридинной группы, изоцианатной группы, или структуру изотиоцианатной группы, связанную с модифицированным сайтом.

[0067]

Примеры конкретной структуры, представленной формулой (A), включают структуры, полученные из соединений, представленных следующими формулами (A-1)-(A-12).

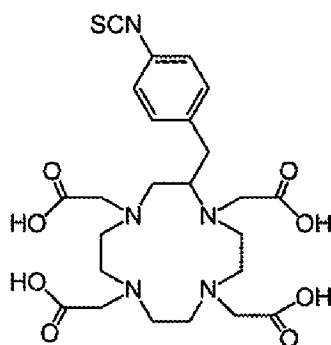
[0068]

(A-1)



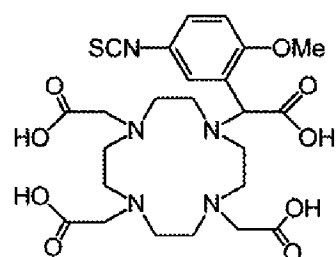
DOTA

(A-2)



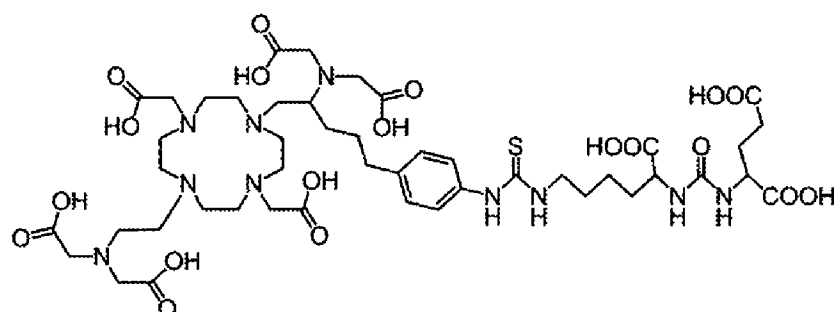
p-SCN-Bn-DOTA

(A-3)



MeO-DOTA-NCS

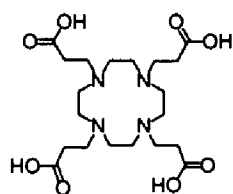
(A-4)



EuK-106

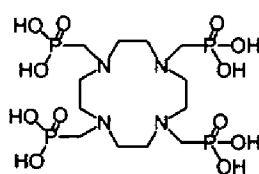
[0069]

(A-5)



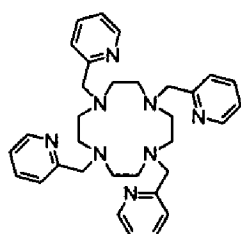
DOTPA

(A-6)

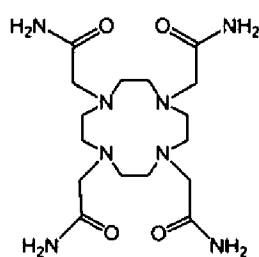


DOTMP

(A-7)

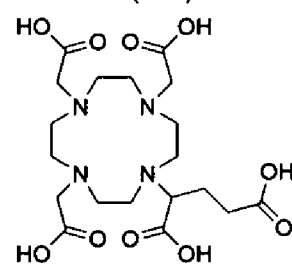
L^{py}

(A-8)



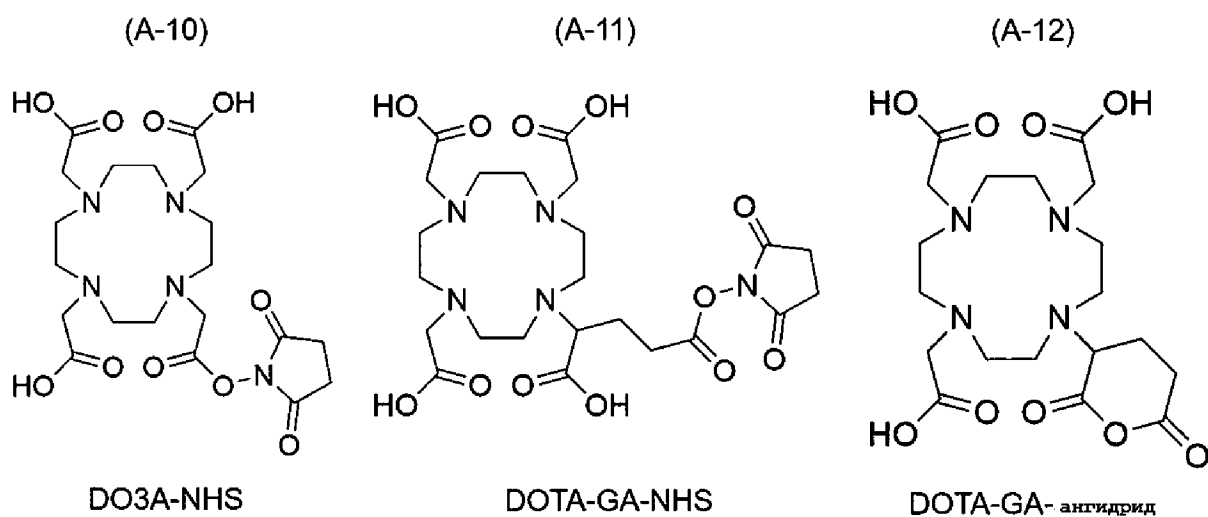
DOTAM

(A-9)



DOTA-GA

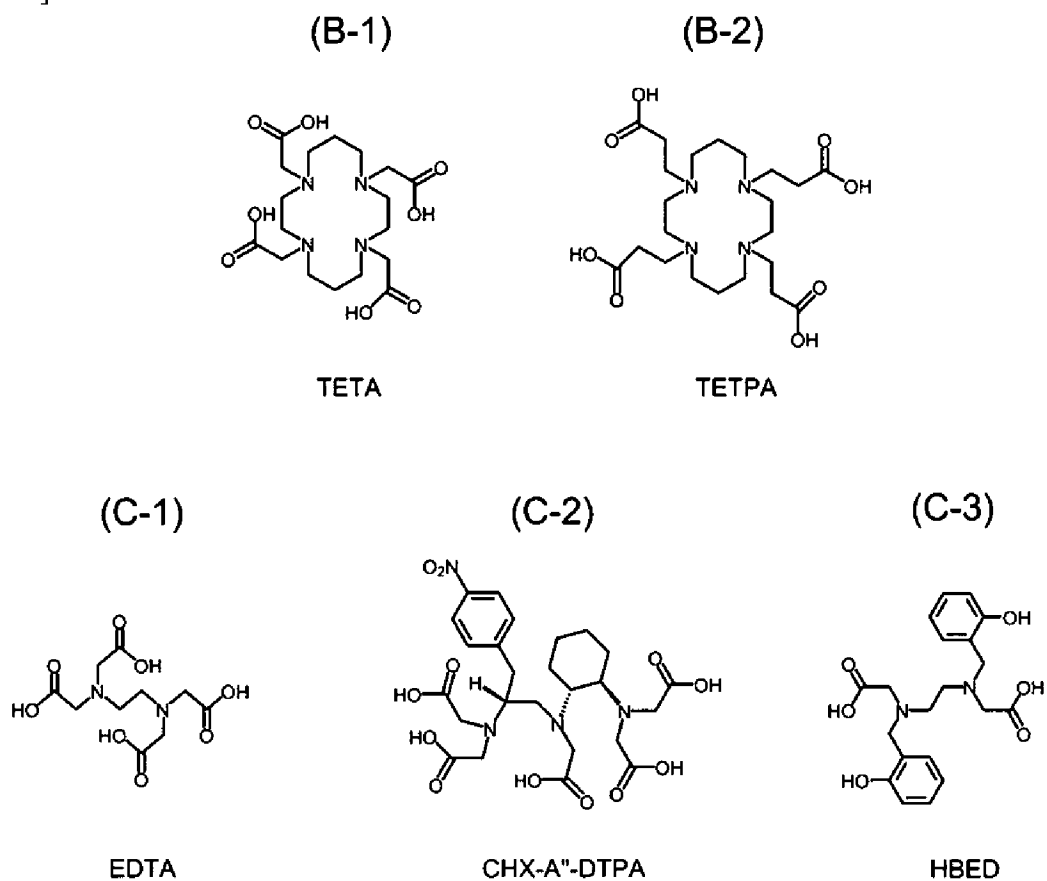
[0070]



[0071]

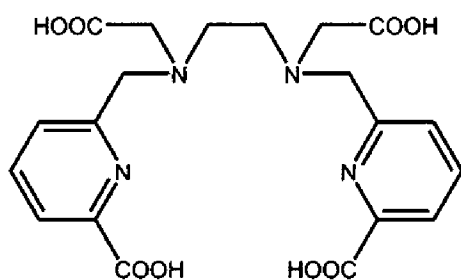
Примеры конкретной структуры, представленной формулой (B) или (C), включают структуры, полученные из соединения, представленного следующими формулами (B-1)-(B-2) или (C-1)-(C-5).

[0072]

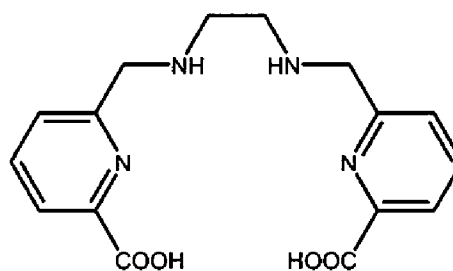


[0073]

(C-4)

 $H_4octapa$

(C-5)

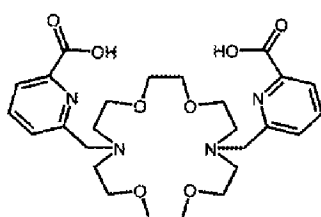
 H_2dedpa

[0074]

Примеры конкретной структуры, представленной формулой (D) или (E), включают структуры, полученные из соединения, представленного следующими формулами (D-1)-(D-3) или (E-1).

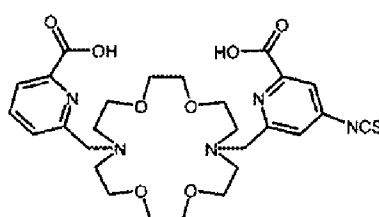
[0075]

(D-1)



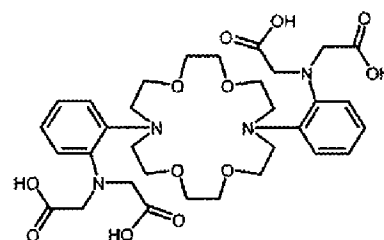
macropa

(D-2)



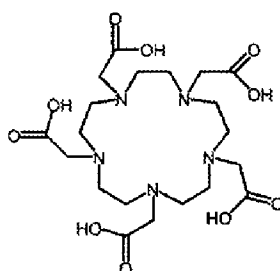
macropa-NCS

(D-3)



macropid

(E-1)



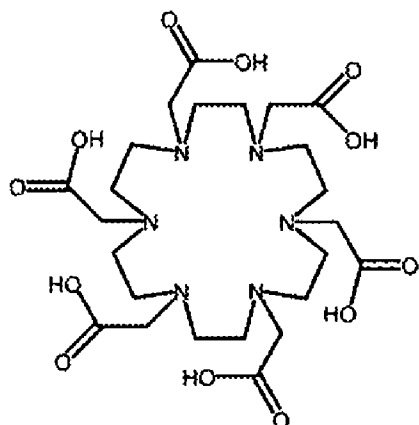
PEPA

[0076]

Примеры конкретной структуры, представленной формулой (F) или (G), включают структуры, полученные из соединения, представленного следующими формулами (F-1)-(F-2) или (G-1).

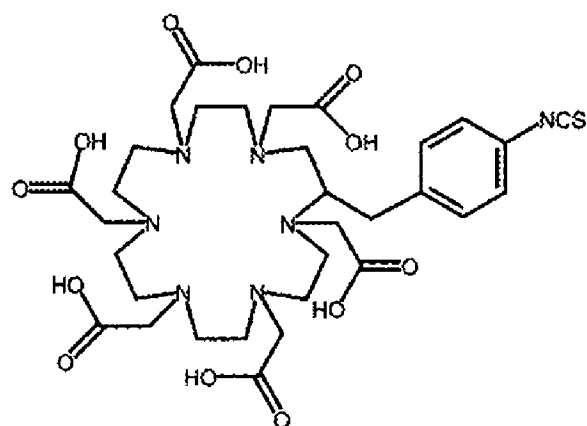
[0077]

(F-1)



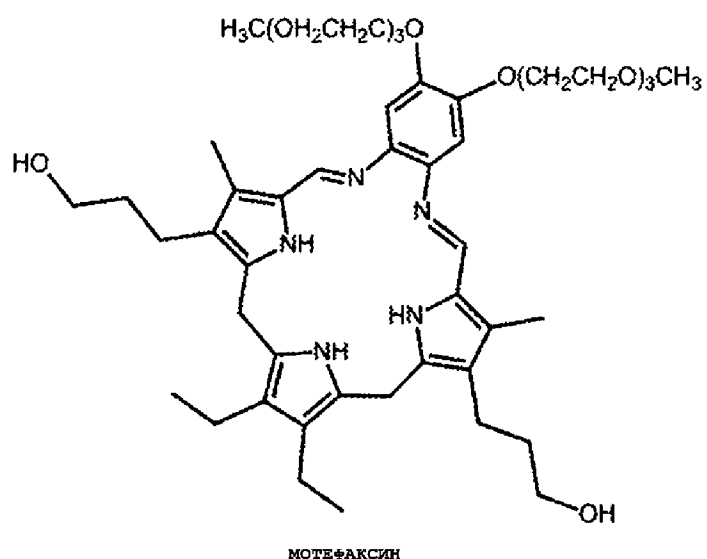
HEHA

(F-2)



HEHA-NCS

(G-1)

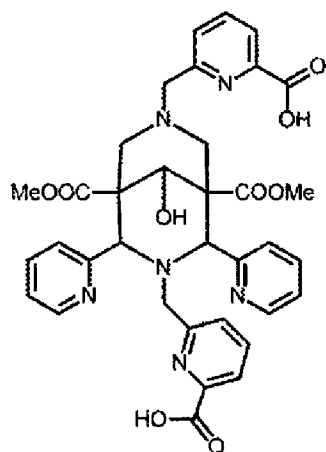


[0078]

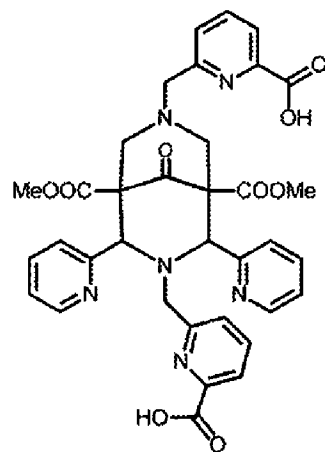
Примеры конкретной структуры, представленной формулой (H) или (I), включают структуры, полученные из соединения, представленного следующими формулами (H-1)-(H-4) или (I-1).

[0079]

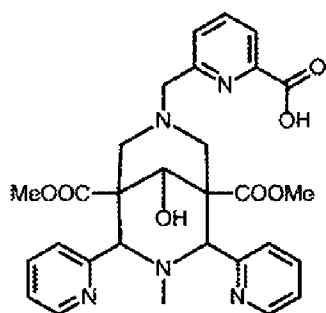
(H-1)

bispa²

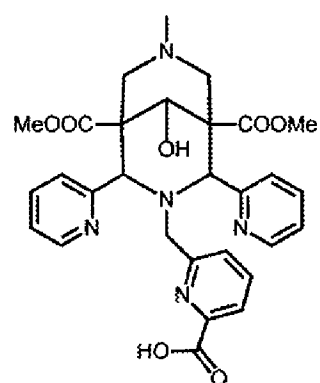
(H-2)

N₂py₄

(H-3)

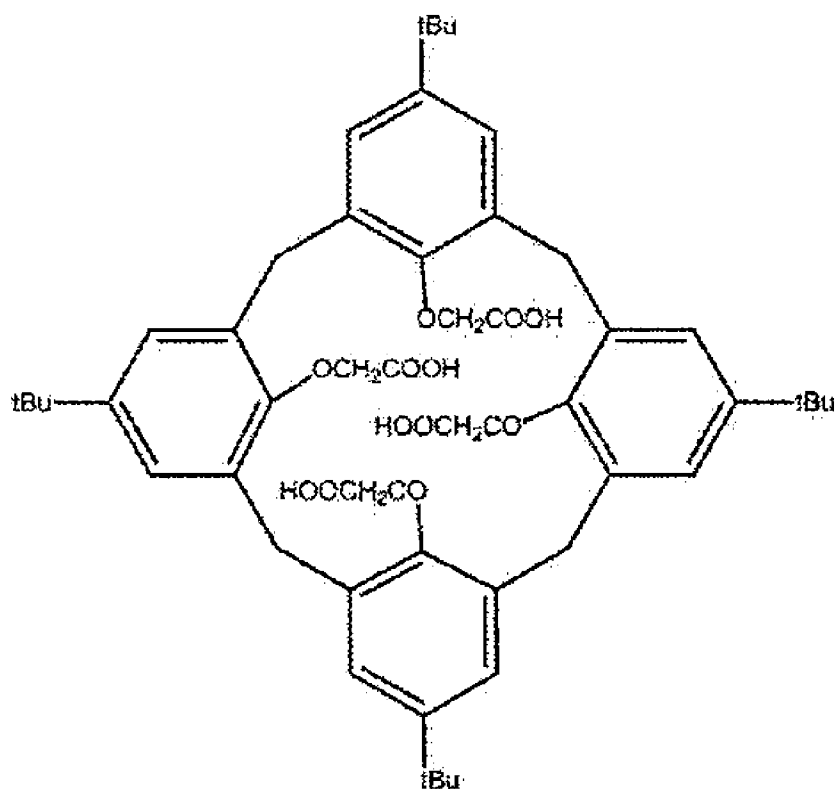
Hbispa^{1a}

(H-4)

Hbispa^{1b}

[0080]

(I-1)



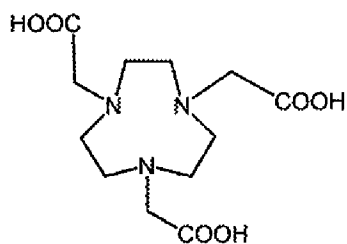
t-Bu-каликс[4]арен-тетракарбоновая кислота

[0081]

Примеры конкретной структуры, представленной формулой (J), включают структуры, полученные из соединения, представленного следующими формулами (J-1)-(J-5).

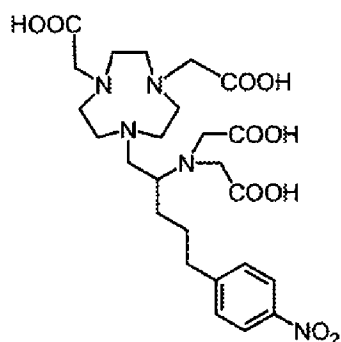
[0082]

(J-1)



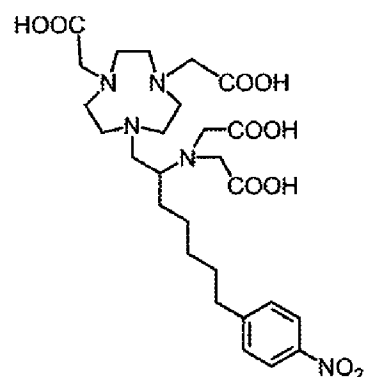
NOTA

(J-2)

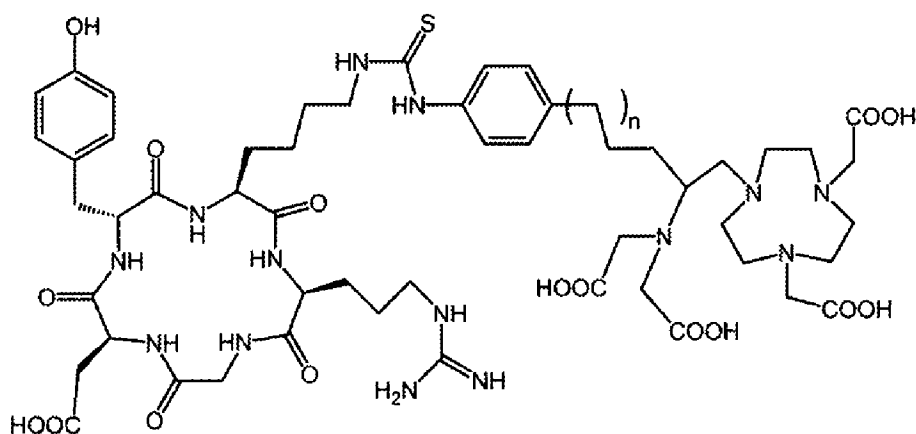


3p-C-NETA

(J-3)



5p-C-NETA



(J-4) 3p-C-NETA-c(RGDyK) (n=1)

(J-5) 5p-C-NETA-c(RGDyK) (n=3)

[0083]

Сайт связывания между хелатным сайтом и модифицированным сайтом предпочтительно представляет собой амидную связь или тиомочевинную связь, как указано выше, более предпочтительно амидную связь с точки зрения выхода.

[0084]

Амидная связь может быть образована, например, реакцией карбоксильной группы соединения вышеуказанной формулы (B-1) с (B-2), (G-1), (H-1) до (H-4), (I-1), (J-1) до (J-3), группы N-гидроксисукцинимидоэфира (NHS) вышеуказанной формулы (A-10) или (A-11), или 2,6-диоксотетрагидро-2H-пиранильной группы вышеуказанного (A-12) с первичным амином. В качестве альтернативы амидная связь может быть образована, например, реакцией аминогруппы на правом конце соединения, представленного формулой (K), и реагента, содержащего гидроксильную группу, карбоксильную группу или группу NHS. . Когда реагент, содержащий гидроксильную группу, вступает в реакцию,

гидроксильная группа перед использованием превращается в карбоксильную группу. Связь тиомочевины может быть образована реакцией изотиоцианатной группы соединения вышеуказанной формулы (A-2), (A-3), (D-2) или (F-2) с первичным амином или с малеимидной группой.

[0085]

Модифицированный сайт может быть образован путем различного выбора из коммерчески доступных реагентов, содержащих первичный амин, или коммерчески доступных реагентов, способных образовывать амидную связь или тиомочевинную связь, со всеми из которых связана целевая первая атомная группа.

В качестве такого реагента, когда дибензилклокинин (DBCO), представленный вышеуказанной формулой (1a), используется в качестве первой атомной группы, могут быть выбраны DBCO-амин, DBCO-малеимид, DBCO-ПЭГ-NHS сложный эфир, DBCO-ПЭГ-спирт, DBCO-ПЭГ-амин, DBCO-PEG-малеимид и т.п., предпочтительно DBCO-амин, DBCO-малеимид, DBCO-ПЭГ-амин, DBCO-ПЭГ-малеимид.

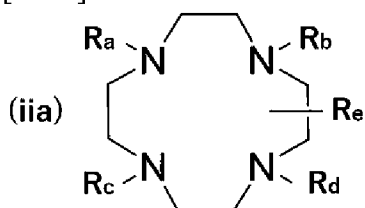
[0086]

Комплекс радиоактивного металла особо не ограничивается, если он образуется в результате реакции радиоактивного металла с лигандом, имеющим структуру, состоящую из подходящим образом выбранных из вышеуказанной первой атомной группы, хелатного центра и модифицированного сайта. Комплекс радиоактивного металла предпочтительно образуется путем взаимодействия лиганда, имеющего структуру, представленную следующей формулой (ii), с радиоактивным металлом.

A-B-C $\cdots$ (ii)

В формуле (ii) A представляет собой хелатный сайт, представленный следующей формулой (iia).

[0087]

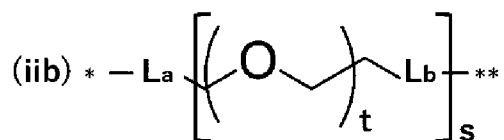


[0088]

В формуле (iia) Ra, Rb и Rc, 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 $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, p представляет собой целое число не менее 0 и не более 3, одна из Rd и Re представляет собой сайт связывания (*) с B, а другая представляет собой атом водорода или группу, состоящую из $-(CH_2)_pCOOH$, $-(CH_2)_pC_5H_5N$, $-(CH_2)_pPO_3H_2$, $-(CH_2)_pCONH_2$ или $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, и p представляет собой целое число от 0 до 3.

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

[0089]



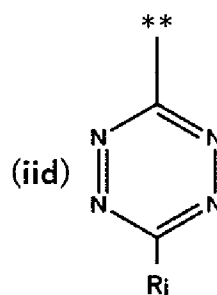
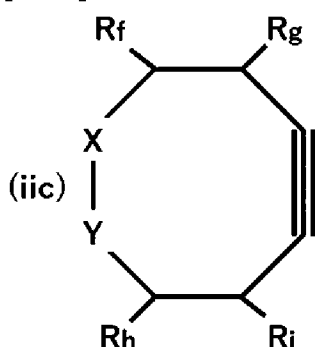
[0090]

В формуле (iib) La и Lb, каждая независимо, представляют собой связующий линкер, содержащий по меньшей мере амидную связь или тиомочевинную связь и не менее 1 и не более 50 атомов углерода, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, s равно 0 или 1, * - сайт связывания с A, ** - сайт связывания с C.

[0091]

В формуле (ii) C представляет собой либо производное алкина, представленное следующей формулой (iic), либо производное тетразина, представленное формулой (iid).

[0092]



[0093]

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

[0094]

В качестве лиганда для A используется производное DOTA вышеуказанной формулы (iia), где Ra до Rd представляют собой $-(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$, p равно 1, Re представляет собой сайт связывания с B; или производное DO3A, или производное DOTAGA, где Ra - Rc представляют собой $-(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$, p равно 1, Rd представляет собой сайт связывания (*) с B, и Re представляет собой атом водорода, что является более предпочтительным.

[0095]

В формуле (ii) производное DOTA-PEGt-DBCO, где A представляет собой вышеуказанное производное DOTA, в B La представляет собой связующий линкер,

содержащий тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s равно 0 или 1, когда s равно 1, t равно целому числу не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и C представляет собой производное алкина, 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 соединены с образованием бензольного кольца, R_h и R_i соединены с образованием бензольного кольца, a^{**} представляет собой сайт связывания с B ; или производное DOTA-PEGt-Tz, где в B La представляет собой связующий линкер, содержащий тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s равно 0 или 1, когда s равно 1, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и содержащий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и C представляет собой производное тетразина, представленное формулой (iid), является еще более предпочтительным.

[0096]

В формуле (ii) производное DO3A-PEGt-DBCO, где A представляет собой вышеуказанное производное DO3A, в B La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s равно 0 или 1, когда s равно 1, t равно целому числу от 0 до не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и C представляет собой производное алкина, 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 соединены с образованием бензольного кольца, R_h и R_i соединены с образованием бензольного кольца, a^{**} представляет собой сайт связывания, причем B является еще более предпочтительным.

[0097]

В формуле (ii) производное DOTAGA-PEGt-DBCO, где A представляет собой вышеуказанное производное DOTAGA, в B La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s равно 0 или 1, когда s равно 1, t равно целому числу не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь или тиомочевинную связь и имеющий не менее от 1 до не более 50 атомов углерода, и C представляет собой производное алкина, 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 соединены с образованием бензольного кольца, R_h и R_i соединены с образованием бензольного кольца, a^{**} представляет собой сайт связывания, причем B является еще более предпочтительным.

[0098]

Вопросы, общие для каждого из вышеуказанных вариантов осуществления, описаны

ниже. В пептид-модифицированном антителе, используемом в настоящем изобретении, конкретный сайт антитела специфически модифицирован пептидом, предпочтительно специфически модифицирована Fc-область (константная область) антитела, и особенно предпочтительно остаток лизина в Fc-области антитела сайт-специфически модифицирован. То есть в настоящем изобретении стадия реакции пептида с антителом для получения пептид-модифицированного антитела (стадия модификации антитела) может быть предусмотрена до стадии мечения.

[0099]

Антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть полипептидом, содержащим Fc-область, и может быть моноклональным антителом или поликлональным антителом. Предпочтительно моноклональное антитело. Моноклональное антитело также включает искусственно модифицированные генетически модифицированные антитела, такие как варианты антител (химерное антитело, гуманизированное антитело и т. д.).

[0100]

Пептид, используемый в настоящем изобретении, может быть цепочечным пептидом или циклическим пептидом при условии, что он модифицирует Fc-область антитела сайт-специфическим образом, и предпочтительно является циклическим пептидом. Он предпочтительно включает аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, представленную следующей формулой (i). В последующем описании аминокислотной последовательности на левой стороне страницы для аминокислотной последовательности указана N-концевая сторона, а на правой стороне страницы для аминокислотной последовательности указана C-концевая сторона. Положение связывания второй атомной группы, связанной с пептидом, особо не ограничено, при условии, что может происходить клик-реакция с первой атомной группой. С точки зрения повышения реакционной способности N-конец или C-конец пептида предпочтительно имеет вторую атомную группу, и более предпочтительно N-конец пептида имеет вторую атомную группу.

[0101]

$(Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd) \cdots (i)$

В вышеуказанной 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, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

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

Каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и они связаны дисульфидной связью, или их сульфидные группы связаны через линкер, или

один представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты,

имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, и они связаны тиоэфирной связью, и

Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток аргинина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосамбериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, предпочтительно модифицированный сшивающим агентом.

[0102]

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 аминокислоты одного и того же типа или различных типов аминокислот.

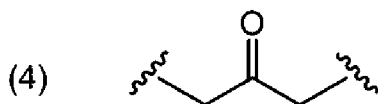
[0103]

Числа a, b, c и d в формуле (i) особо не ограничены, пока они находятся в пределах вышеуказанного диапазона. С точки зрения стабильности связывания между пептидом и антителом, $a+b+c+d \leq 14$ представляет собой состояние, при котором 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, а d предпочтительно представляет собой целое число не менее 1 и не более 3.

[0104]

Хаа1 и Хаа3 представляют собой аминокислотные остатки, полученные из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и могут быть одинаковыми или разными. 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 линкер, представленный следующей формулой (4). В формуле (4) пунктирная линия указывает на связывающую часть с сульфидной группой.

[0105]



[0106]

Вместо вышеуказанной комбинации Хаа1 и Хаа3 один из Хаа1 и Хаа3 может быть аминокислотным остатком, полученным из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой может быть аминокислотным остатком, полученным из аминокислоты с галогенацетильной группой в боковой цепи. Они связаны тиоэфирной связью. Конец галогенацетильной группы замещен галогеном, таким как йод или т. п., и

галоген удаляется реакцией с тиольной группой в другой боковой цепи, в результате чего образуется тиоэфирная связь.

[0107]

Конкретная аминокислотная последовательность пептида, представленного формулой (i), представляет собой, например, пептид, описанный в WO 2016/186206, WO 2017/217347 или WO 2018/230257, и их также можно использовать.

[0108]

Среди них аминокислотная последовательность пептида предпочтительно имеет любую из следующих последовательностей (1)-(14), более предпочтительно следующую последовательность (1), (2), (13) или (14). Присутствие такой аминокислотной последовательности может повысить аффинность связывания между пептидом и антителом (например, IgG человека). В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) (Xaa2) представляет собой остаток лизина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту и предпочтительно модифицированный сшивающим агентом. (Xaa1) и (Xaa3), оба демонстрируют остатки гомоцистеина. В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) аминокислоты, отличные от (Xaa1), (Xaa2) и (Xaa3), обозначены однобуквенными сокращениями.

[0109]

- (1) DCAYH(Xaa2)GELVWCT
- (2) GPDCA YH(Xaa2)GELVWCTFH
- (3) RCAYH(Xaa2)GELVWCS
- (4) GPRCA YH(Xaa2)GELVWCSFH
- (5) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH
- (6) GDDCA YH(Xaa2)GELVWCTFH
- (7) GPSCAYH(Xaa2)GELVWCTFH
- (8) GPDCA YH(Xaa2)GELVWCSFH
- (9) GPDCA YH(Xaa2)GELVWCTHH
- (10) GPDCA YH(Xaa2)GELVWCTFY
- (11) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY
- (12) SDDCA YH(Xaa2)GELVWCTFY
- (13) RGNCA YH(Xaa2)GQLVWCTYH
- (14) G(Xaa1)DCAYH(Xaa2)GELVWCT(Xaa3)H

[0110]

Пептид, используемый в настоящем изобретении, может быть получен с использованием комбинации аминокислот независимо от природных аминокислот и неприродных аминокислот, путем применения методов синтеза пептидов, таких как процесс жидкофазного синтеза, процесс твердофазного синтеза, автоматический метод синтеза пептидов, метод рекомбинантных генов, метод фагового дисплея и т. п. При синтезе пептида, при необходимости, функциональные группы используемых аминокислот могут

быть защищены. Эти методы можно осуществлять по способу, описанному, например, в WO 2017/217347 и WO 2018/230257.

[0111]

В качестве способа введения вышеуказанной второй атомной группы в пептид по настоящему изобретению, может быть упомянут способ введения, включающий получение пептида, имеющего целевую аминокислотную последовательность, вышеуказанным способом, растворение пептида в растворе, содержащем солибилизирующий агент и восстанавливающий агент и, при необходимости, кислоту, добавление в раствор раствора органического растворителя атомной группы, содержащей азидную группу или TCO в качестве второй атомной группы, и перемешивание смеси при комнатной температуре.

[0112]

Когда атомную группу, содержащую азидную группу, вводят в качестве второй атомной группы, азидную группу вводят непосредственно на N-конец или C-конец пептида с использованием имеющегося в продаже реагента для введения азидной группы в соответствии с обычным способом, или атомная группа, содержащая азидную группу, может быть введена посредством вышеуказанной линкерной структуры. Примеры используемого реагента, вводящего азидную группу, включают силилазид, азидфосфат, азид алкиламмония, неорганический азид, сульфонилазид, азид ПЭГ и т. п.

[0113]

Когда атомную группу, содержащую TCO, вводят в качестве второй атомной группы, TCO непосредственно вводят в N-конец или C-конец пептида с использованием имеющегося в продаже реагента клик-химии, содержащего TCO, в соответствии с обычным способом, или атомная группа, содержащая TCO, может быть введена посредством вышеуказанной линкерной структуры.

[0114]

Способ связывания пептида с антителом для получения антитела, модифицированного пептидом, может быть осуществлен с использованием, например, сшивающего агента. Сшивающий агент представляет собой химическое вещество для связывания пептида и антитела ковалентной связью. Его примеры включают сшивающий агент, предпочтительно содержащий две или более сукцинимидильные группы, такие как дисукцинимидилглутарат (DSG), дисукцинимидилсуберат (DSS) и т. п., сшивающий агент, состоящий из соединения, содержащего две или более групп имидиновой кислоты, такого как диметиладипимидат и подобное или его соль, сшивающий агент, состоящий из соединения, имеющего дисульфидную связь, такого как диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат, дитиобиссукцинимидилпропионовая кислота и т. п., или их соль и т. п. С помощью такого сшивающего агента можно вызвать реакцию сшивки между аминокислотным остатком Хаа2 в пептиде и антителом. Когда в качестве антитела используется IgG человека (например, трастузумаб), сайт-специфическое связывание происходит через перекрестно-сшитую структуру между аминокислотным остатком Хаа2 и по меньшей мере одним из остатка Lys246 и остатка Lys248 в соответствии с нумерацией

Eu в трастузумабе. Эти остатки Lys присутствуют в Fc-области IgG человека, и даже если антитело отличается от трастузумаба, специалисты в данной области техники могут выровнять аминокислотную последовательность антитела и идентифицировать соответствующий остаток Lys.

[0115]

Способ связывания пептида с антителом может быть осуществлен, например, путем диспергирования вышеуказанного пептида, антитела, сшивающего агента и катализатора в соответствующем буфере при температуре не менее 10°C и не более 30°C. Время реакции может составлять от примерно не менее 10 минут до примерно 2 часов. Молярное соотношение во время реакции пептида и антитела предпочтительно находится в диапазоне 1:1-20:1 как пептид:антитело.

[0116]

В пептид-модифицированном антителе, полученном с помощью вышеуказанных стадий, по меньшей мере не менее одной молекулы пептида может быть связано с одной молекулой антитела (предпочтительно антитела с IgG в качестве класса иммуноглобулинов). Для поддержания активности самого антитела (действие распознавания антигена, нейтрализующее действие, действие активации комплемента, действие опсонина) пептид предпочтительно сайт-специфически связывается с Fc-областью (константной областью) антитела. В пептид-модифицированном антителе по настоящему изобретению одна или две молекулы пептида предпочтительно связываются на одну молекулу антитела.

[0117]

Вышеуказанное пептид-модифицированное антитело, полученное с помощью вышеуказанных стадий, представляет собой смесь, содержащую антитело, где одна молекула пептида связана с одной молекулой антитела (далее именуемое «моновалентное антитело»), и антитело, где две молекулы пептида связаны с одной молекулой антитела (далее именуемого «двухвалентное антитело») при любом соотношении. Его можно использовать как есть для последующих стадий, или немодифицированное антитело, моновалентное антитело и двухвалентное антитело разделяют и очищают с помощью таких методов, как фильтрация на фильтре, мембранный фильтр, колонка, заполненная различными наполнителями, различные хроматографии и подобное, и только антитело, имеющее какую-либо валентность, может быть подвергнуто последующим стадиям. Когда немодифицированное антитело не может быть отделено от антитела с другой валентностью в результате очистки, смесь, содержащая их, может быть подвергнута последующим стадиям.

Когда немодифицированное антитело, моновалентное антитело и двухвалентное антитело разделяют и очищают, для выделения и очистки можно использовать любой из вышеуказанных способов очистки. Предпочтительно использовать колонку, заполненную различными наполнителями, и более предпочтительно использовать колонку, заполненную наполнителем, пригодным для разделения и очистки белка, такого как антитело и т. п.

[0118]

В качестве радиоактивного металла, координированного в ионном состоянии с комплексом радиоактивного металла, можно использовать нуклид металла, который испускает α -излучение, β -излучение, γ -излучение или их комбинацию. Примеры такого нуклида радиоактивного металла включают щелочной металл, щелочноземельный металл, лантаноид, актинид, переходный металл и радиоизотоп металлов, отличных от этих металлов. Из них с точки зрения коммерческой доступности и улучшения комплексообразования ^{44}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{103}Ru , ^{111}In , ^{153}Sm , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{201}Tl , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{227}Th или ^{225}Ac предпочтительно используют в качестве нуклида радиоактивного металла. Эти радиоактивные металлы могут быть получены обычным способом, и предпочтительно их получают в виде раствора, содержащего радиоактивный металл в ионизированном состоянии.

[0119]

Когда антитело, меченное радиоактивным металлом, используется для лечения заболевания, в качестве радиоактивного металла предпочтительно используют нуклид, испускающий α -излучение, или нуклид, излучающий β -излучение, чтобы усилить лечебный эффект. Нуклид, испускающий α -излучение, может быть любым нуклидом, который испускает α -излучение в процессе распада радиоактивного металла. В частности, предпочтительно используют ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{227}Th , ^{225}Ac и т. п. Более предпочтительным является ^{227}Th или ^{225}Ac , а еще более предпочтительным является ^{225}Ac . Испускающий β -излучение нуклид может быть любым нуклидом, который испускает β -излучение в процессе распада радиоактивного металла. В частности, предпочтительно используют ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{103}Ru , ^{153}Sm , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{203}Hg , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb и т. п., более предпочтительно, ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{90}Y или ^{177}Lu .

[0120]

Когда антитело, меченное радиоактивным металлом, используется для диагностики заболевания или детектирования поражения, то для повышения эффективности диагностики в качестве радиоактивного металла предпочтительно используют нуклид, испускающий β^+ -излучение, нуклид распада электронного захвата или нуклид, испускающий γ -излучение. Нуклид, испускающий β^+ -излучение, может быть любым нуклидом, который испускает позитрон в процессе распада радиоактивного металла, и предпочтительно используются ^{44}Sc , ^{58}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr и т. п., и более предпочтительны ^{64}Cu или ^{89}Zr . Нуклид распада электронного захвата может быть любым нуклидом, который испускает Оже-электрон или характеристическое рентгеновское излучение в процессе распада радиоактивного металла, а также предпочтительно используются ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{111}In , ^{186}Re , ^{201}Tl , ^{197}Hg и т. п. Нуклид, испускающий γ -излучение, может быть любым нуклидом, который испускает γ -излучение в результате γ -распада. В качестве нуклида, испускающего γ -излучение при γ -распаде, предпочтительно используют $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga или ^{201}Tl .

[0121]

Например, когда радиоактивный металл, координированный в ионном состоянии с комплексом радиоактивного металла, выбирается на основе ионного радиуса, радиоактивный металл с ионным радиусом примерно 70-130 мкм включает ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{103}Ru , ^{111}In , ^{153}Sm , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{201}Tl , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac и т. п. Они могут предпочтительно образовывать комплекс радиоактивного металла с лигандом, имеющим хелатный центр со структурой, представленной вышеуказанными формулами (A)-(K).

[0122]

Например, когда антитело, меченное радиоактивным металлом, используется для лечения заболевания, а ^{225}Ac , ^{177}Lu или ^{90}Y используются в качестве радиоактивного металла, предпочтительно использовать лиганд, имеющий хелатный сайт со структурой, представленной любой из вышеуказанных формул (A) или (D)-(I), более предпочтительно использовать лиганд, имеющий хелатный сайт со структурой, представленной вышеуказанной формулой (A), (D) или (F), и также предпочтительно использовать лиганд, имеющий хелатный сайт со структурой, представленной вышеуказанной формулой (A). Когда антитело, меченное радиоактивным металлом, используется для диагностики заболевания или детектирования поражения, а ^{89}Zr или ^{111}In используется в качестве радиоактивного металла, предпочтительно использовать лиганд, имеющий хелатный сайт со структурой, представленной любой из вышеуказанных формул (A), (C) и (K), и дополнительно предпочтительно использовать лиганд, имеющий хелатный сайт со структурой, представленной вышеуказанной формулой (A).

[0123]

В качестве класса иммуноглобулина антитела, используемого в настоящем изобретении, можно использовать IgG любого класса, IgA, IgM, IgD или IgE без особых ограничений. Среди них предпочтительно использовать IgG, поскольку он является основным классом вторичного иммунного ответа, наиболее распространен в крови и демонстрирует высокую специфичность распознавания антигенов. Кроме того, предпочтительным является IgG млекопитающих, и конкретные примеры млекопитающих включают приматов, таких как человек, шимпанзе и т. п.; экспериментальных животных, таких как крыса, мышь, кролик и т. п.; домашних животных, таких как свиньи, крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы и т. п.; и домашних животных, таких как собака и кошка и т. п. Кроме того, более предпочтительными являются IgG человека или IgG кролика, и еще более предпочтительным является IgG человека. Подкласс этих антител конкретно не ограничен. Например, когда используется IgG человека, это может быть по меньшей мере один из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, причем IgG1, IgG3 или IgG4 являются предпочтительными.

[0124]

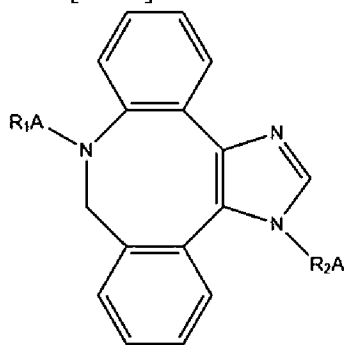
В антителе, меченном радиоактивным металлом, полученном вышеуказанным способом получения, специфический сайт антитела специфически модифицирован

пептидом. Комплекс радиоактивного металла прямо или косвенно связан с пептидом и предпочтительно имеет сайт связывания, который образуется в результате клик-реакции, между пептидом и комплексом радиоактивного металла. Сайт связывания предпочтительно представляет собой химическую структуру, полученную из первой атомной группы, которую имеет комплекс радиоактивного металла, и второй атомной группы, связанной с пептидом. В качестве такой химической структуры, например, сайт связывания может иметь структуру, содержащую замещенный триазольный скелет, или структуру, содержащую замещенный пиридазиновый скелет. В качестве структуры, содержащей вышеуказанный замещенный скелет, например, может быть упомянута структура, в которой структура, содержащая по меньшей мере один из заместителя, алифатического кольца и ароматического кольца, связана с триазольным скелетом или пиридазиновым скелетом и которая имеет сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом и сайтом связывания с пептидом.

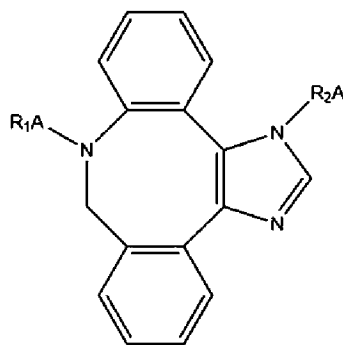
[0125]

В качестве структуры специфического сайта связывания, например, когда первая атомная группа и вторая атомная группа представляют собой комбинацию атомной группы, содержащей DBCO, и атомной группы, содержащей азидную группу, образуется структура, содержащая триазольный скелет следующей формулы (10a) или формулы (10b), в зависимости от используемого реакционного реагента. Поскольку это изомеры, они могут содержаться в любом соотношении. Когда первая атомная группа и вторая атомная группа представляют собой комбинацию атомной группы, содержащей 1,2,4,5-тетразин, и атомной группы, содержащей TCO, то может образовываться структура, содержащая пиридазиновый скелет, представленный следующей формулой (10c), в зависимости от используемого реагента реакции. В формуле (10a) и формуле (10b) R1A представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, R2A представляет собой сайт связывания с пептидом. В формуле (10c) один из R3A и R4A представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридилную группу, а другой представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а R5A представляет собой сайт связывания с пептидом.

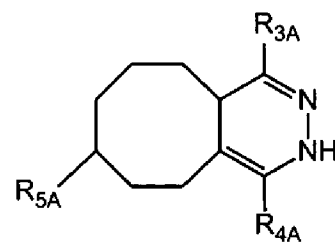
[0126]



(10a)



(10b)



(10c)

[0127]

Антитело, меченное радиоактивным металлом, можно также использовать в чистом виде или после очистки для приготовления радиоактивной фармацевтической композиции, содержащей меченое радиоактивным металлом антитело в качестве активного ингредиента. Радиоактивная фармацевтическая композиция относится к композиции, содержащей антитело, меченное радиоактивным металлом, или его производное, и в форме, подходящей для введения в живой организм. Радиоактивную фармацевтическую композицию можно получить, например, путем растворения антитела, меченного радиоактивным металлом, полученного вышеуказанным способом, в растворителе, состоящем в основном из воды и по существу изотоническом с живым организмом. В этом случае радиоактивная фармацевтическая композиция предпочтительно находится в форме водного раствора и при необходимости может содержать другие фармацевтически приемлемые компоненты. Радиоактивную фармацевтическую композицию вводят в живой организм перорально или парентерально, например, внутривенно, подкожно, внутривентриально, внутримышечно и т. п., и используют для лечения заболевания, диагностики заболевания, выявления поражения или т. п.

[0128]

Примеры заместителя, который можно использовать для замены вышеуказанных формул (A)-(J), структуры, содержащей триазольный скелет, и структуры, содержащей пиридазиновый скелет, включают атом галогена, насыщенную или ненасыщенную алкильную группу, гидроксильную группу, альдегидную группу, карбоксильную группу, ацильную группу, аминогруппу, нитрогруппу, сложноэфирную группу, изотиоцианатную группу, тиоксигруппу, цианогруппу, амидную группу, имидную группу, фосфатную группу, фенильную группу, бензильную группу, пиридилную группу и т. п. Один из этих заместителей может быть использован отдельно для замещения, или два или более из этих заместителей могут быть использованы в комбинации.

ПРИМЕР

[0129]

Далее настоящее изобретение описано более подробно посредством примеров. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается примерами. В приведенных ниже таблицах столбец со знаком «-» указывает на отсутствие производительности.

[0130]

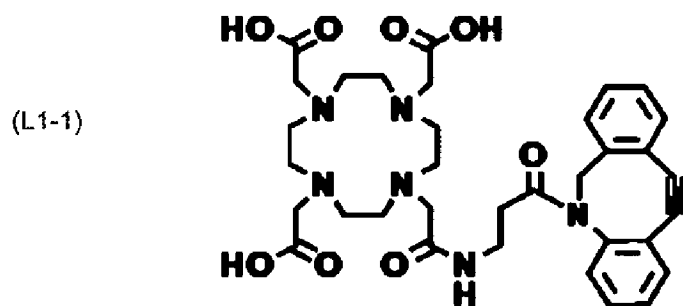
[Примеры 1-4]

(1-1. Стадия образования комплекса)

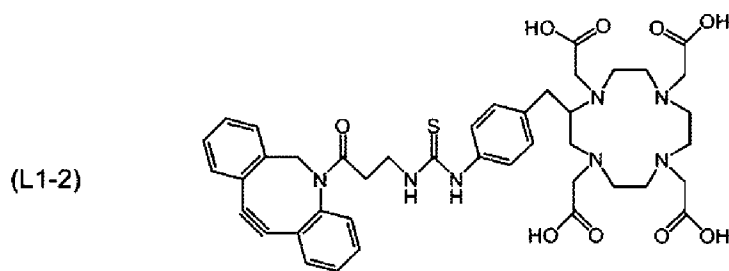
Структуры лигандов, используемых в этих Примерах, представлены в следующих формулах (L1-1)-(L1-3). DO3A-DBCO, представленный формулой (L1-1), синтезировали в соответствии со способом, описанным Liang Y, Jiang X, Yuan R, Zhou Y, Ji C, Yang L et al. *Metabolism-Based Click-Mediated Platform for Specific Imaging and Quantification of Cell Surface Sialic Acids*. *Anal Chem*. Jan 3; 89(1): 538-543. (2017). DOTA-DBCO, представленный формулой (L1-2), синтезировали в соответствии со способом, описанным Wang H, Wang R, Cai K, He H, Liu Y, Yen J et al. *Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer*

targeting. Nat Chem Biol. Apr; 13(4): 415-424.(2017). В качестве DO3A-PEG4-DBCO, представленного формулой (L1-3), использовали коммерчески доступный продукт, производимый Iris Biotech GmbH. Эти лиганды диспергировали в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6) в качестве растворителя с получением дисперсий, содержащих 1,7 ммоль/л лиганда. Реакционную смесь дисперсии (0,0025 мл) и раствора, содержащего ионы ^{225}Ac (0,2 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 160 МБк/мл, приготовленная из смеси производства национальной лаборатории Oak Ridge, количество жидкости 0,0025 мл) 0,4 МБк (рассчитывали по ослаблению на основе количества радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали реакции в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение лиганда и радиоактивного иона металла составляло лиганд:ион ^{225}Ac =3000:1, а температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 90 мин.

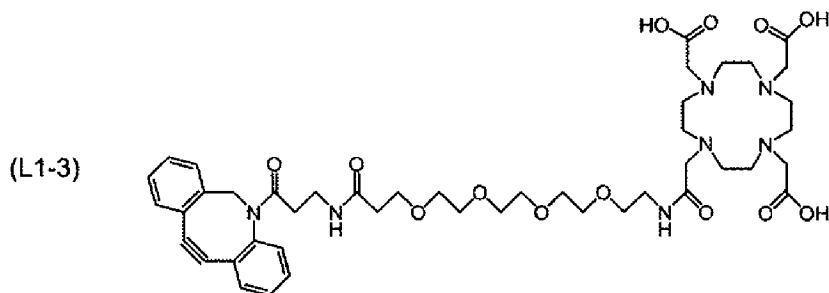
[0131]



DO3A-DBCO



DOTA-DBCO



DO3A-PEG4-DBCO

[0132]

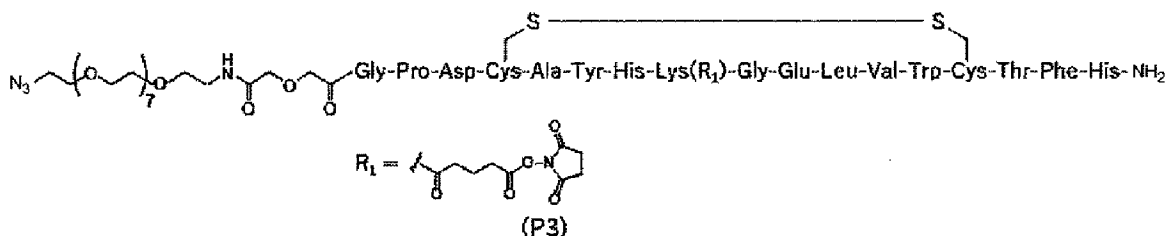
Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}As измеряли следующим методом. То есть часть раствора комплекса ^{225}As проявляли с помощью тонкослойной хроматографии (производство Agilent, номер модели: SGI0001, элюент: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), а затем измеряли с помощью анализатора радио- γ -ТСХ (производства Raytest, МОДЕЛЬ GITA Star). Процент радиоактивности (счет) пика, детектируемого вблизи начала координат, по отношению к детектируемой общей радиоактивности (счет) определяли как радиохимическую чистоту (%) комплекса ^{225}As . В результате радиохимическая чистота комплекса ^{225}As составила 89-99%. Полученный раствор комплекса ^{225}As использовали непосредственно на стадии мечения.

[0133]

(1-2. Стадия модификации антитела)

Отдельно получали пептид способом, описанным в WO 2017/217347, с получением пептида, содержащего 17 аминокислотных остатков, представленного следующей формулой (P3). Аминокислотная последовательность этого пептида была такой же, как последовательность, в которой Хаа2 SEQ ID NO: (2) представлял собой остаток лизина, а концевая аминогруппа боковой цепи остатка лизина была модифицирована с помощью структуры, представленной R1. Кроме того, два остатка цистеина образуют дисульфидную связь друг с другом, а к N-концу пептида добавляется этилазид в виде атомной группы, содержащей азидную группу, которая является второй атомной группой, через линкерную структуру, имеющую дигликолевую кислоту и восемь ПЭГ.

[0134]



[0135]

где 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.

[0136]

Смесь пептида и антитела IgG человека (ритуксимаб; производство Roche или трастузумаб; производство Roche) в ацетатно-натриевом буфере (pH 6) реагировала при комнатной температуре в течение 30 мин с получением раствора, содержащего пептид-

модифицированное антитело. Пептид-модифицированное антитело имеет Fc-область антитела, модифицированную сайт-специфическим образом вышеуказанным пептидом.

[0137]

(2. Стадия разделения пептид-модифицированных антител)

Вышеуказанное пептид-модифицированное антитело разводили 1 моль/л натрий-ацетатным буфером (pH 6), добавляли в колонку с Протеином А (производства GE Healthcare, HiTrap MabSelect SuRe) и 0,05 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 5,7), содержащего хлорид натрия 0,15 моль/л. Извлекали раствор, содержащий двухвалентное антитело, и доводили концентрацию таким образом, чтобы концентрация двухвалентного антитела, содержащегося в восстановленной фракции, составляла 15 мг/мл. После этого пропускали 0,05 моль/л натрий-ацетатный буфер (pH 3,5), содержащий 0,15 моль/л хлорида натрия, извлекали раствор, содержащий моновалентное антитело, и доводили концентрацию таким образом, чтобы концентрация немодифицированного антитела и моновалентного антитела, содержащихся в восстановленной фракции, составляла 17-40 мг/мл.

[0138]

(3. Стадия мечения)

Раствор комплекса ^{225}As , полученный на каждой из вышеуказанных стадий, и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), добавляли без очистки к 0,02 моль/л буфера, содержащего 0,09 моль/л аскорбиновой кислоты, и ацетата натрия, и клик-реакцию проводили при 37°C в течение 120 мин с получением антител, меченных комплексом ^{225}As , из Примеров 1-4. Количество комплекса ^{225}As и количество пептид-модифицированного антитела (моновалентного антитела) составляли 43 мкмоль и 46 мкмоль (Пример 1) соответственно или оба 100 мкмоль (Примеры 2-4), а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляло примерно 1:1. Скорость реакции (%) неочищенного меченого комплексом ^{225}As антитела Примера представлена в следующей Таблице 1. Здесь скорость реакции (%) означает радиохимическую чистоту (%) антитела, меченного комплексом ^{225}As , по отношению к скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, а скорость мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{225}As по отношению к заряженному количеству радиоактивности.

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

[0139]

Метод измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода антитела, меченного комплексом ^{225}As , был следующим. То есть тонкослойную хроматографию (производство Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель представлял

собой смешанный раствор ацетонитрила:0,1 ммоль/л раствора ЭДТА (объемное соотношение 1:1)) измеряли с помощью анализатора γ -излучения для ТСХ (производства raytest, МОДЕЛЬ GITA Star), а процент радиоактивности (счет) пика, детектируемого вблизи начала координат, к общей детектируемой радиоактивности (счет) определяли как радиохимическую чистоту (%). Кроме того, процент радиоактивности (уровень радиоактивности, рассчитанный по количеству, измеренному гамма-спектрометром (полупроводниковый детектор Ge: GMX10P4-70 (производство ORTEC), многоканальный анализатор: M7-000 (производство SEIKO EG&G), обработка данных: Spectrum Navigator: DS-P300 (производства SEIKO EG&G) и Gamma Studio: DS-P600 (производства SEIKO EG&G)) восстановленный после ультрафильтрационной очистки по отношению к общей радиоактивности (аналогично вышеуказанному, уровень радиоактивности рассчитывали на основании счета, измеренного гамма-спектрометром), добавленной в начале стадии мечения, определяли как радиохимический выход (%).

[0140]

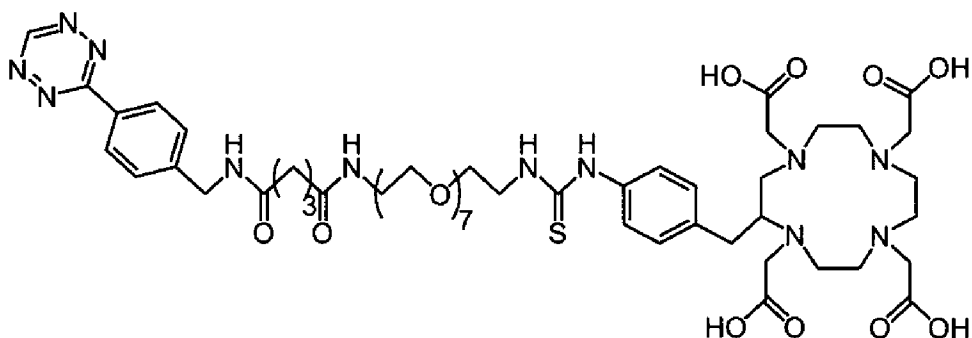
[Пример 5]

(1-1. Стадия образования комплекса)

В этом Примере раствор комплекса ^{225}Ac получали таким же образом, как в Примере 1, за исключением того, что использовали лиганд со структурой, показанной следующей формулой (L2). DOTA-PEG7-Tz, представленный формулой (L2), синтезировали в соответствии со способом, описанным Poty S., Membreno R., Glaser JM, Ragupathi A., Scholz WW, Zeglis BM et al. The inverse electron-demand Diels-Alder reaction as a new methodology for the synthesis of ^{225}Ac -labelled radioimmunoconjugates. Chem Commun (Camb). Mar 8; 54(21):2599-2602. (2018).

[0141]

(L2)



DOTA-PEG7-Tz

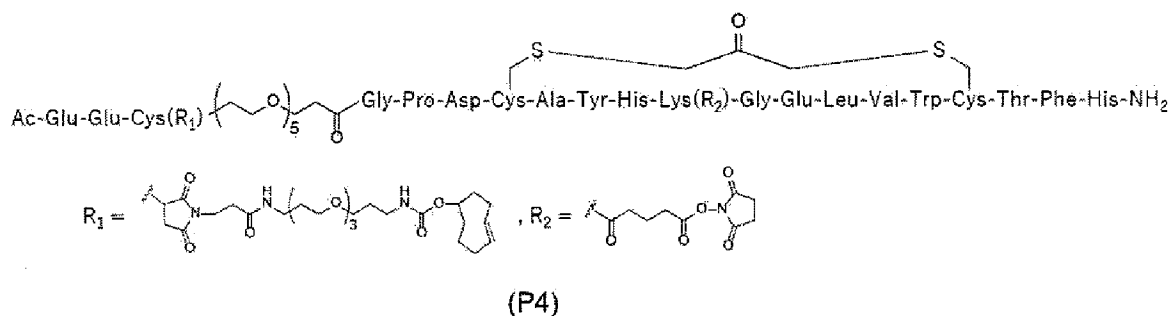
[0142]

(1-2. Стадия модификации антитела)

Пептид, использованный в этом Примере, представлял собой пептид, содержащий 17 аминокислотных остатков, представленный следующей формулой (P4).

Аминокислотная последовательность этого пептида была такой же, как последовательность, в которой Xaa2 SEQ ID NO: (2) представлял собой остаток лизина, а концевая аминогруппа боковой цепи остатка лизина была модифицирована с помощью структуры, представленной R2. Кроме того, тиольные группы двух остатков цистеина связаны друг с другом линкером, представленным вышеуказанной формулой (4), а N-конец пептида имеет линкерную структуру, включающую 5 ПЭГ, остаток цистеина замещен структурой, показанной R1, в которой остаток тиольной группы боковой цепи содержит вторую атомную группу TCO, два остатка глутаминовой кислоты и ацетильную группу в таком порядке, если смотреть с N-концевой стороны.

[0143]



[0144]

где в формуле (P4) 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.

[0145]

Смесь пептида и антитела IgG человека (трастузумаб; производства Roche) в натрий-ацетатном буфере (pH 6) подвергали реакции при комнатной температуре в течение 30 минут с получением раствора, содержащего пептид-модифицированное антитело.

[0146]

(2. Стадия мечения)

Клик-реакцию проводили так же, как в Примере 1, с получением антитела, меченного комплексом ^{225}Ac . Количество комплекса ^{225}Ac и количество пептид-модифицированного антитела составляли 100 мкмоль, а молярное соотношение первой атомной группы (1,2,4,5-тетразин) и второй атомной группы (TCO) составляло 1:1. Скорость реакции (%) неочищенного меченого комплексом ^{225}Ac антитела Примера представлена в следующей Таблице 1. Здесь скорость реакции (%) означает радиохимическую чистоту (%) антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , по отношению к скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, а скорость мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{225}Ac по отношению к заряженному количеству радиоактивности. Кроме того, радиохимическая чистота (RCP) и

радиохимический выход (RCY) антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , после очистки с использованием фильтра ультрафильтрации таким же образом, как в Примере 1, представлены в следующей Таблице 1.

[0147]

[Таблица 1]

	Лиганд (А), содержащи й первую атомную группу	Антитело	Вторая атомная группа (В)	Молярное соотношени е (А):(В)	Скорость реакции				После очистки	
					Реакция при комнатное температуре в течение 10 мин (%)	Реакция при 37°С в течение 15 мин (%)	Реакция при комнатное температуре в течение 1 ч (%)	Реакция при 37°С в течение 2 ч (%)	RCP (%)	RCY (%)
Пр. 1	DO3A- PEG4- DBCO	Ритуксимаб	Азид	1:1	-	-	-	49	94	36
Пр. 2	DO3A- PEG4- DBCO	Трастузумаб	Азид	1:1	-	54	-	62	99	54
Пр. 3	DO3A- DBCO	Трастузумаб	Азид	1:1	-	14	-	19	93	12
Пр. 4	DOTA- DBCO	Трастузумаб	Азид	1:1	-	53	-	54	99	54
Пр. 5	DOTA- PEG7-Tz	Трастузумаб	ТСО	1:1	65	-	65	-	98	45

[0148]

Как показано в Таблице 1, ясно, что в Примерах, в которых комплекс и антитело реагировали после стадии образования комплекса, реакция мечения, протекавшая в мягких условиях без чрезмерного нагревания антитела и радиоактивного металла, была превосходной по эффективности мечения антител.

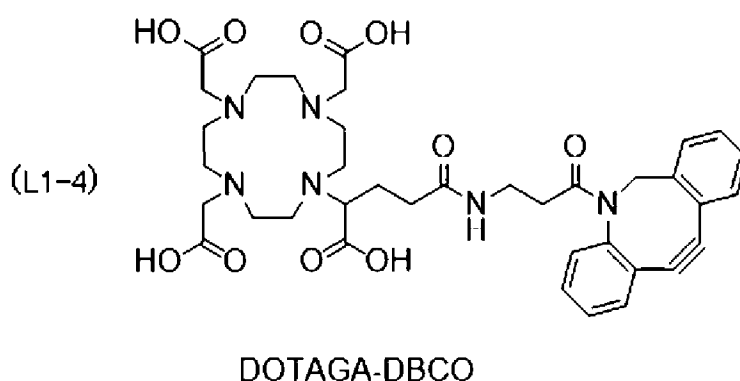
[0149]

[Примеры 6 и 7] Получение Tmab, Rmab с использованием меченного ^{225}Ac DOTAGA-DBCO

(1. Стадия образования комплекса)

Структура лиганда, использованного в этом Примере, представлена следующей формулой (L1-4). DOTAGA-DBCO, представленный формулой (L1-4), был получен на основе метода, описанного Bernhard et al. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841. Эти лиганды диспергировали в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 1,7 ммоль/л лиганда. Реакционная смесь дисперсии (0,005 мл) и раствора, содержащего ионы ^{225}Ac (0,2 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 320-340 МБк/мл, приготовленного из раствора производства Oak Ridge National Laboratory, количество жидкости: 0,005 мл) 1,6-1,7 МБк (рассчитано по ослаблению на основании уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла реагировала в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение лиганда и иона радиоактивного металла составляло лиганд:ион ^{225}Ac =примерно 2500:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 30 мин.

[0150]



[0151]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}Ac измеряли так же, как в Примере 1. В результате радиохимическая чистота составила 90%. Полученный раствор комплекса ^{225}Ac непосредственно использовали для следующей стадии мечения.

[0152](2. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{225}Ac , полученного на вышеуказанной стадии (1),

и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное таким же образом, как в Примере 1, добавляли каждый к 0,1 моль/л аргининсодержащего 0,1 моль/л гистидинового буфера (pH 6) и клик-реакцию проводили при 37°C в течение 120 мин с получением антитела, меченного комплексом ^{225}Ac . Количество комплекса ^{225}Ac и количество пептид-модифицированного антитела (моновалентного антитела) составляло 85 нмоль и 100 нмоль (Примеры 6 и 7), соответственно, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составило примерно 1:1,2. Скорость реакции (%) неочищенного антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , показана в следующей Таблице 2. Здесь скорость реакции (%) означает радиохимическую чистоту (%) антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , по отношению к скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, а скорость мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{225}Ac по отношению к заряженному количеству радиоактивности.

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

[0153]

Метод измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , был аналогичен методу, описанному в Примере 1.

[0154]

[Таблица 2]

	лиганд (А), содержащи й первую атомную группу	антитело	Вторая атомная группа (В)	Молярн ое соотно шение (А): (В)	Скорость реакции	После очистки	
					Реакция при 37°C в течение 2 ч (%)	RCP (%)	RCY (%)
Пр. 6	DOTAGA- DBCO	Трастузумаб	Азид	1:1.2	77%	93%	71%
Пр. 7	DOTAGA- DBCO	ритуксимаб	Азид	1:1.2	77%	95%	73%

[0155]

[Пример 8] Получение Tmab с использованием меченого ^{89}Zr DOTAGA-DBCO
(1. Стадия образования комплекса)

Структура лиганда, используемого в этом примере, такая же, как и в вышеуказанной формуле (L1-4). Этот лиганд диспергировали в ДМСО в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,33 ммоль/л лиганда. Реакционную смесь дисперсии (0,030 мл) и раствора, содержащего ионы ^{89}Zr (0,1 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 181 МБк/мл, приготовленного из кислоты

производства Nihon Medi-Physics Co., Ltd. количество 0,33 мл) 60 МБк в качестве источника радиоактивного металла подвергали реакции в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{89}Zr . Молярное соотношение лиганда и иона радиоактивного металла составляло лиганд:ион ^{89}Zr =примерно 250:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 60 мин.

[0156]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{89}Zr измеряли следующим методом. То есть часть раствора комплекса ^{89}Zr проявляли с помощью тонкослойной хроматографии (производство Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), а затем измеряли анализатором γ -излучения TCX (производства Raytest, МОДЕЛЬ GITA Star PS). Процент радиоактивности (счет) пика, детектируемой вблизи начала координат, по отношению к детектируемой общей радиоактивности (счет) определяли как радиохимическую чистоту (%) комплекса ^{89}Zr . В результате радиохимическая чистота комплекса ^{89}Zr составила 90%. Полученный раствор комплекса ^{89}Zr использовали таким, каким он был на стадии мечения.

[0157]

(2. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса ^{89}Zr , полученного на вышеуказанной стадии (1), и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное таким же образом, как в Примере 1, добавляли без очистки к 0,1 моль/л аргинин-содержащего 0,1 моль/л гистидинового буфера (pH 6), и проводили клик-реакцию при 37°C в течение 120 минут с получением меченного комплексом ^{89}Zr антитела Примера 8. Количество комплекса ^{89}Zr и количество пептид-модифицированного антитела (моновалентное антитело) составляло каждое по 100 нмоль, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляло примерно 1:1. Скорость реакции (%) неочищенного антитела, меченного комплексом ^{89}Zr из примера, представлена в следующей Таблице 3. Здесь скорость реакции (%) означает радиохимическую чистоту (%) антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , по отношению к скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, а скорость мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{89}Zr по отношению к заряженному количеству радиоактивности.

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием фильтра ультрафильтрации (производства Merck, номер модели: UFC505096). Радиохимическая чистота (RCP) и радиохимический выход (RCY) антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , после очистки представлены в следующей Таблице 3.

[0158]

Метод измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , был аналогичен методу, описанному в Примере 8.

[0159]

[Таблица 3]

	лиганд (А), содержащи й первую атомную группу	антитело	Вторая атомная группа (В)	Молярное соотноше ние (А): (В)	Скорость реакции	После очистки	
					Реакция при 37°C в течение 2 ч (%)	RCP (%)	RC Y (%)
Пр. 8	DOTAGA- DBCO	Трастузумаб	Азид	1:1	52%	93%	43%

[0160]

[Пример 9] Получение Ttab с использованием меченого ^{89}Zr DOTA-DBCO

(1-1. Стадия образования комплекса)

Структура лиганда, используемого в этом Примере, такая же, как и в вышеуказанной формуле (L1-2). Этот лиганд диспергировали в ДМСО в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 1 ммоль/л лиганда. Реакционная смесь дисперсии (0,1 мл) и раствора, содержащего ионы ^{89}Zr (0,1 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 450 МБк/мл, приготовлена из кислоты, произведенной в Университете Окаяма, количество жидкости 0,1 мл) 45 МБк в качестве источника радиоактивного металла реагировала в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{89}Zr . Молярное соотношение лиганда и радиоактивного иона металла составляло лиганд:ион ^{89}Zr =примерно 10000:1, а температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 60 мин.

[0161]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{89}Zr измеряли в соответствии с Примером 1. В результате радиохимическая чистота комплекса ^{89}Zr составила 99%.

[0162]

(1-2. Стадия удаления непрореагировавшего вещества)

Полученный раствор комплекса ^{89}Zr собирали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и удаляли непрореагировавший DOTA-DBCO. Условия ВЭЖХ были следующими. детектор: спектрофотометр ультрафиолетового поглощения (длина волны измерения: 254 нм)/сцинтилляционный детектор, колонка: XBridge C18 3,5 мкм, 4,6×100 мм; производства Waters, подвижная фаза А: 10 ммоль/л гистидинового буфера, pH 6,5, подвижная фаза В: ацетонитрил для жидкостной хроматографии, подача подвижной фазы: соотношение смешивания подвижной фазы А и подвижной фазы В было изменено следующим образом для контроля градиента концентрации (А:В=90:10(0 мин)→50:50(40 мин) (об.%/об.%), поток: 0,5 мл/мин, время удерживания пика сбора: примерно 32 мин. Растворитель выпаривали из полученного собранного раствора примерно до 20 мкл раствора, и раствор использовали на стадии мечения. Радиохимический выход (степень извлечения ВЭЖХ) на стадии удаления непрореагировавшего вещества антитела, меченого комплексом ^{89}Zr , представлен в следующей Таблице 4. В методе измерения радиохимического выхода (степень извлечения ВЭЖХ) процент радиоактивности в

собранном растворе определяли как степень извлечения ВЭЖХ (%) на стадии удаления непрореагировавшего вещества по отношению к количеству радиоактивности, загруженной в начале этой стадии.

[0163]

(2. Стадия мечения)

Раствор комплекса ^{89}Zr , полученного на каждой из вышеуказанных стадий, и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное таким же образом, как в Примере 1, добавляли каждый к 0,1 моль/л аргинин-содержащего 0,1 моль/л. гистидинового буфера (pH 6), и клик-реакцию проводили при 37°C в течение 120 мин с получением антитела, меченного комплексом ^{89}Zr . Скорость реакции стадии мечения (%) неочищенного антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , из Примера, представлена в следующей Таблице 4. Здесь скорость реакции на стадии мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса ^{89}Zr по отношению к радиоактивности собранного раствора ВЭЖХ.

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием фильтра ультрафильтрации (производства Merck, номер модели: UFC505096). Радиохимическая чистота (RCP) и радиохимический выход (RCY) антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , после очистки представлены в следующей Таблице 4.

[0164]

Метод измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , соответствовал методу, описанному в Примере 1.

[0165]

[Таблица 4]

	лиганд (A), содержащий первую атомную группу	Степень извлечен ия после HPLC	антитело	Вторая атомная группа (B)	Скорость реакции стадии мечения	После очистки	
					Реакция при 37°C в течение 2 ч (%)	RCP (%)	RC Y (%)
Пр. 9	DOTA- DBCO	57%	Трастузумаб	Азид	73%	98%	39%

[0166]

Хотя настоящее изобретение было описано выше со ссылкой на варианты осуществления, настоящее изобретение не ограничено вышеуказанными вариантами осуществления. Различные изменения, понятные специалистам в данной области техники, могут быть внесены в структуру и детали настоящего изобретения в рамках объема настоящего изобретения.

Содержание, раскрытое в любой публикации, цитируемой в настоящем описании, включая патенты и патентные заявки, настоящим включено в полном объеме в качестве ссылки в той степени, в которой оно было раскрыто в настоящем описании.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

[0167]

Согласно настоящему изобретению, высокая эффективность мечения радиоактивных металлов для антител может быть достигнута даже в мягких условиях реакции.

[0168]

Настоящая заявка основана на патентной заявке № 2019-191561, поданной в Японии (дата подачи: 18 октября 2019 г.), содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание.

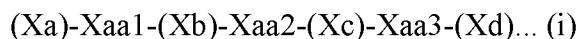
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, включающий стадию проведения клик-реакции комплекса радиоактивного металла и пептид-модифицированного антитела, которое сайт-специфически модифицировано пептидом с получением антитела, меченного радиоактивным металлом, где

клик-реакцию осуществляют между первой атомной группой комплекса радиоактивного металла и второй атомной группой, прямо или косвенно связанной с пептидом, и

вторая атомная группа представляет собой атомную группу, содержащую азидную группу, или атомную группу, содержащую транс-циклооктен.

2. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по п. 1, где пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную следующей формулой (i) и состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, и имеет вторую атомную группу на N-конце или C-конце пептида:



где 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, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

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

каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и они связаны дисульфидной связью, или их сульфидные группы связаны через линкер, или

один представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, и они связаны тиоэфирной связью, и

Xaa2 представляет собой остаток лизина, остаток аргинина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту.

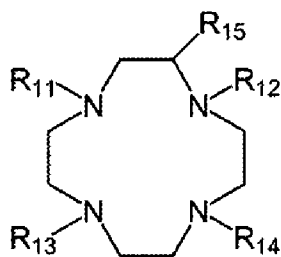
3. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по п. 1 или 2, дополнительно включающий стадию реакции лиганда с радиоактивным металлом с образованием комплекса радиоактивного металла.

4. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по п. 3, где лиганд и радиоактивный металл реагируют при нагревании.

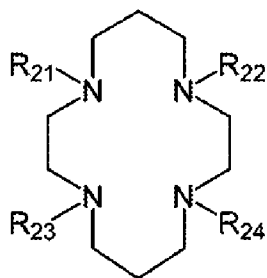
5. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по п. 3 или 4, где лиганд содержит хелатный сайт, координированный с радиоактивным металлом, и модифицированный сайт, с которым связана первая атомная группа.

6. Способ получения по п. 5, где хелатный сайт представлен любой из следующих формул (A)-(K):

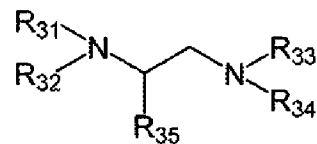
(A)



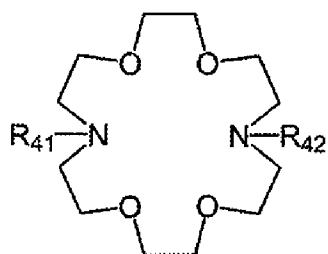
(B)



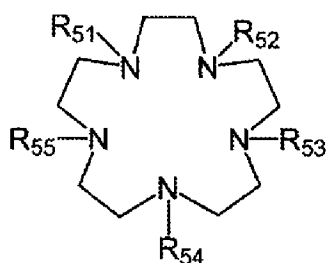
(C)



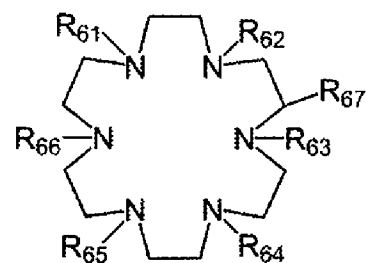
(D)



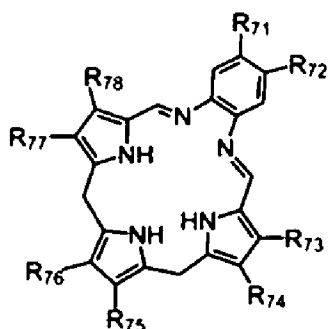
(E)



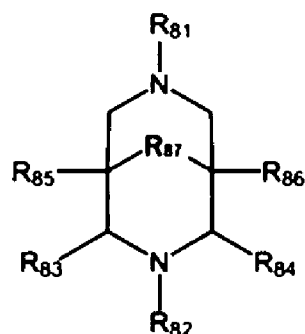
(F)



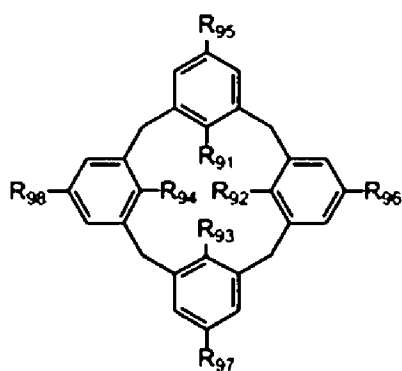
(G)



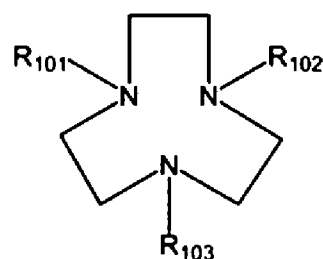
(H)



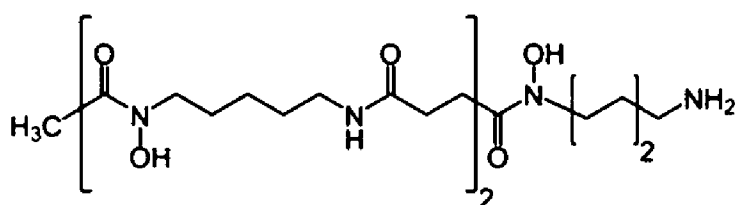
(I)



(J)



(K)



в формуле (A) каждый из R_{11} , R_{13} и R_{14} независимо представляет собой группу, состоящую из $-(CH_2)_pCOOH$, $-(CH_2)_pC_5H_5N$, $-(CH_2)_pPO_3H_2$, $-(CH_2)_pCONH_2$ или $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, один из R_{12} и R_{15} представляет собой атом водорода, карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом, и p представляет собой целое число не менее 0 и не более 3,

в формуле (B) каждый из R_{21} , R_{22} , R_{23} и R_{24} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, и любая группа из R_{21} , R_{22} , R_{23} или R_{24} связана с модифицированным сайтом,

в формуле (C) каждый из R_{31} , R_{32} , R_{33} и R_{34} независимо представляет собой группу,

состоящую из атомной группы, содержащей атом водорода и не менее 2 и не более 10 атомов углерода, и необязательно содержащей атом азота или атом кислорода, и R_{35} представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом,

в формуле (D) одна из R_{41} и R_{42} представляет собой группу, состоящую из атомной группы, содержащей атом водорода и не менее 5 и не более 20 атомов углерода, и содержащей один или более видов, выбранных из атома азота, атома кислорода и атома серы, а другая представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом,

в формуле (E) каждый из R_{51} , R_{52} , R_{53} , R_{54} и R_{55} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, и любая группа из R_{51} , R_{52} , R_{53} , R_{54} или R_{55} связана с модифицированным сайтом,

в формуле (F) каждый из R_{61} , R_{62} , R_{63} , R_{64} , R_{65} и R_{66} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, и R_{67} представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом,

в формуле (G) R_{71} и R_{72} представляют собой $-O(CH_2CH_2O)_nCH_3$ (n представляет собой целое число не менее 1 и не более 5), R_{73} , R_{75} , R_{76} и R_{78} , каждая независимо, представляют собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, одна из R_{74} и R_{77} представляет собой гидроксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, а другая представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом,

в формуле (H) R_{81} и R_{82} каждая независимо представляет собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5, конец алкильной группы может быть замещен пиридилной группой, замещенной одной или более карбоксильными группами, R_{87} представляет собой $-CHON$ или $-C=O$, любая группа из R_{81} , R_{82} или R_{87} представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом, R_{83} и R_{84} представляют собой необязательно замещенные пиридинильные группы, R_{85} и R_{86} каждая независимо представляет собой $-COORa$, и Ra представляет собой алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 5,

в формуле (I) каждый из R_{91} , R_{92} , R_{93} и R_{94} независимо представляет собой $-OCH_2COOH$, любая группа из R_{91} , R_{92} , R_{93} или R_{94} представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом, и каждый из R_{95} , R_{96} , R_{97} и R_{98} представляет собой независимо алкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве не менее 1 и не более 6, и

в формуле (J) каждый из R_{101} , R_{102} и R_{103} независимо представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3, или по меньшей мере одна из R_{101} , R_{102} и R_{103} в формуле (J) представляет собой группу, связанную с модифицированным сайтом, а другая группа представляет собой карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, содержащую атомы углерода в количестве 2 или 3.

7. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по любому из

пп. 1-6, где радиоактивный металл представляет собой ^{44}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{103}Ru , ^{111}In , ^{153}Sm , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{201}Tl , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{227}Th или ^{225}Ac .

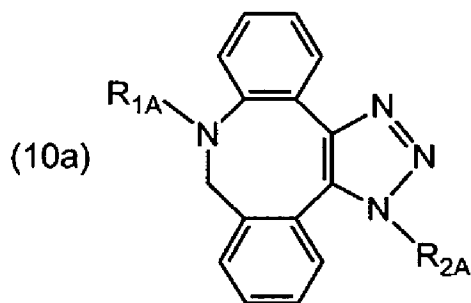
8. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по п. 7, где радиоактивный металл представляет собой нуклид, испускающий α -излучение.

9. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по любому из пп. 1-8, где клик-реакцию проводят при 50°C или ниже.

10. Способ получения антитела, меченного радиоактивным металлом, по любому из пп. 1-9, где пептид-модифицированное антитело сайт-специфически модифицировано 1 молекулой или 2 молекулами пептида на 1 молекулу антитела.

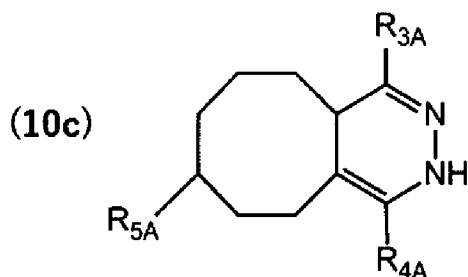
11. Меченое радиоактивным металлом антитело, сайт-специфически модифицированное пептидом, где

комплекс радиоактивного металла прямо или косвенно связан с пептидом, и структура, содержащая триазольный скелет, представленная следующей формулой (10a), присутствует между пептидом и комплексом радиоактивного металла, или структура, содержащая скелет пиридазина, присутствует между пептидом и комплексом радиоактивного металла:



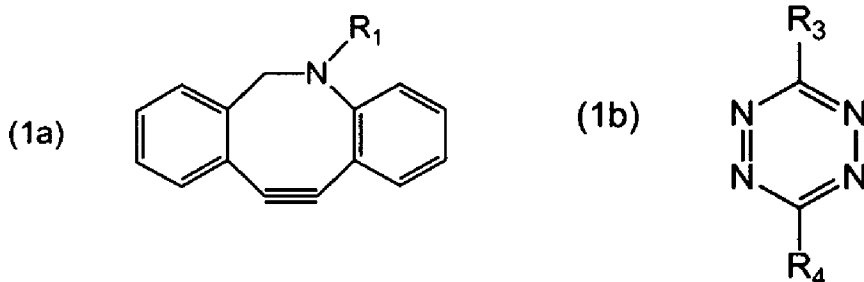
где R_{1A} представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, и R_{2A} представляет собой сайт связывания с пептидом.

12. Меченое радиоактивным металлом антитело по п. 11, содержащее структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную следующей формулой (10c), между пептидом и комплексом радиоактивного металла:



где одна из R_{3A} и R_{4A} представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридилную группу, а другой представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, и R_{5A} представляет собой сайт связывания с пептидом.

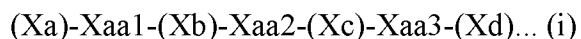
13. Хелатный линкер, содержащий хелатный сайт, координированный с радиоактивным металлом, и модифицированный сайт, с которым связана первая атомная группа, способная к клик-реакции, где первая атомная группа представляет собой атомную группу, представленную следующей формулой (1a) или (1b):



в формуле (1a) R_1 представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, и в формуле (1b) одна из R_3 и R_4 представляет собой сайт связывания с модифицированным сайтом или хелатным сайтом, а другая представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу.

14. Пептид-модифицированное антитело, представленное следующей формулой (i), и сайт-специфически модифицированное пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, где антитело, содержащее

вторую атомную группу, способную к клик-реакции, связано с N-концом или C-концом пептида, где вторая атомная группа представляет собой атомную группу, представленную следующей формулой (2a) или (2b):



где 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,

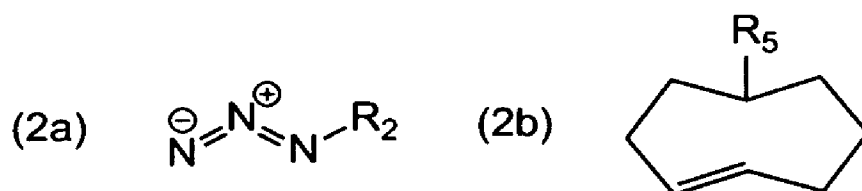
X представляет собой аминокислотный остаток, не содержащий ни тиольной, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

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

каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, и они связаны дисульфидной связью, или их сульфидные группы связаны через линкер, или

один представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, а другой представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, и они связаны тиоэфирной связью, и

Xaa2 представляет собой остаток лизина, остаток аргинина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту,



в формуле (2a) R_2 представляет собой сайт связывания с N-концом или C-концом пептида, и в формуле (2b) R_5 представляет собой сайт связывания с N-концом или C-концом пептида.

15. Антитело по п. 14, где пептид-модифицированное антитело сайт-специфически модифицировано 1 молекулой или 2 молекулами пептида на 1 молекулу антитела.

По доверенности