

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291181** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.07.06

(51) Int. Cl. *A61K 51/10* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(54) **RI-МЕЧЕННОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО**

(31) 2019-191562

(72) Изобретатель:

(32) 2019.10.18

Наката Норихито, Кобаси Нобуя,

(33) JP

Сояма Йосинари, Матоно Мицухиро,

(86) PCT/JP2020/039074

Отиан Ясуси, Мураками Такаюки (JP)

(87) WO 2021/075544 2021.04.22

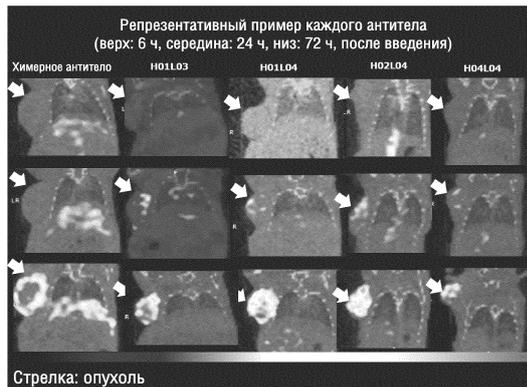
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

НИХОН МЕДИ-ФИЗИКС КО., ЛТД.;
СУМИТОМО ФАРМА КО., ЛТД. (JP)

(57) RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело по настоящему изобретению представляет собой конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела (вышеупомянутый радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицу или позитрон, а вышеупомянутое антитело представляет собой гуманизированное антитело, специфически связывающееся с MUC5AC) и является превосходным по специфичности в отношении MUC5AC и накоплению в опухоли. Следовательно, оно чрезвычайно полезно для лечения и/или диагностики заболеваний, при которых сверхэкспрессируется MUC5AC, особенно онкологических заболеваний.



A1

202291181

202291181

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573142EA/071

РИ-МЕЧЕННОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО

[Область техники]

[0001]

Настоящее изобретение относится к конъюгату хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и гуманизированного антитела, специфичного к муцину подтипа 5AC, к содержащему его радиофармацевтическому средству и их применению.

[Уровень техники]

[0002]

Муцин является основным компонентом слизи, выделяемой эпителиальными клетками и т. п. животных, и представляет собой гликопротеин, содержащий большое количество сахара с молекулярной массой 1-10 миллионов. Муцин включает секреторный муцин, продуцируемый эпителиальной клеткой и т. п., и мембраносвязанный муцин, который имеет гидрофобный трансмембранный участок и существует, будучи связанным с клеточной мембраной. Основные муциновые белки в совокупности называются MUC, и известно, что существует не менее 20 типов генов, кодирующих основные белки. Один из них, муцин подтипа 5AC (MUC5AC), относится к секреторному муцину.

[0003]

MUC5AC экспрессируется в желудке и трахее в нормальных тканях, и сообщалось о сверхэкспрессии при раке поджелудочной железы. О сверхэкспрессии также сообщалось при раке щитовидной железы, раке печени, колоректальном раке, раке желудка, раке уротелия, раке молочной железы, раке шейки матки, раке яичников, раке эндометрия и раке желчных протоков. В качестве антител к MUC5AC использовали антитело мыши (непатентный документ 1), полученное с использованием в качестве антигена фракции муцина рака поджелудочной железы, очищенной из ксенотрансплантата клеточной линии рака поджелудочной железы человека SW1990, химерные антитела (патентные документы 1, 2, непатентные документы 2, 3) и гуманизированные антитела (патентные документы 3, 4), полученные на их основе.

[0004]

Антитело используется в качестве реагента для обнаружения молекулы-мишени, диагностического агента или фармацевтического продукта для лечения заболевания за счет использования специфичности антитела к молекуле-мишени. Для дальнейшего улучшения характеристик обнаружения и терапевтического эффекта проводятся исследования антител, связанных с радионуклидами и лекарствами. В непатентном документе 1 сообщается о радиоиммунотерапии мышей с моделью карциномы поджелудочной железы с использованием мышинового антитела, меченного ^{131}I , который представляет собой нуклид, испускающий β -лучи. В непатентном документе 3 сообщается об SPECT-визуализации пациентов с раком поджелудочной железы с использованием химерного антитела, меченного ^{111}In , который представляет собой нуклид, излучающий гамма-

излучение. Патентные документы 3 и 4 описывают MUC5AC-специфическое гуманизированное антитело, которое мечено ^{90}Y , ^{111}In и т.д.

[Список документов]

[Патентные Документы]

[0005]

Патентный документ 1: JP-A-H7-203974.

Патентный документ 2: JP-A-H11-5749.

патентный документ 3: WO 2013/157102.

патентный документ 4: WO 2013/157105.

[Непатентные Документы]

[0006]

Непатентный документ 1: Japanese Journal of Cancer Research, 87, 977-984, 1996

непатентный документ 2: Japanese Journal of Clinical Medicine vol. 64 extra issue 1, 2006, p274-278

Непатентный документ 3: Japanese Journal of Cancer Research, 90, 1179-1186, 1999

[Сущность изобретения]

[0007]

Настоящее изобретение направлено на получение гуманизированного анти-MUC5AC антитела, меченного радионуклидом, которое является исключительным по специфичности к муцину подтипа 5AC (MUC5AC) и накапливается в опухоли.

[0008]

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования с учетом вышеупомянутых проблем. В результате им удалось получить конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, который представляет собой нуклид металла, и гуманизированного анти-MUC5AC антитела, состоящего из специфической аминокислотной последовательности, и было обнаружено, что конъюгат является исключительным по специфичности к MUC5AC и накапливается в опухоли, и авторы подтвердили эффекты конъюгата, что привело к завершению настоящего изобретения.

[0009]

В одном воплощении настоящего изобретения в качестве конъюгата предлагается конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицу или позитрон, а гуманизированное антитело специфически связывается с MUC5AC.

[0010]

В соответствии с настоящим изобретением может быть предложено гуманизированное анти-MUC5AC антитело, меченное радионуклидом и являющееся исключительным по специфичности к MUC5AC, которое накапливается в опухоли, и применение этого антитела.

[Краткое Описание Чертежей]

[0011]

На Фиг. 1 представлены результаты SPECT-СТ с использованием соответствующих антител, меченных ^{111}In . Показаны SPECT-изображения антитела, меченого ^{111}In .

На Фиг. 2 представлены графики, показывающие результаты VOI-анализа (объем интереса, трехмерная ROI) опухоли и печени в каждый момент времени на SPECT-изображениях соответствующих антителам, меченым ^{111}In .

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий результаты биораспределения и пути выведения через 168 часов после введения соответствующих антител, меченных ^{111}In .

Фиг. 4 представляет собой изображение, показывающее результаты связывающей способности соответствующих антител, меченных ^{111}In , с помощью ARG *in vitro*.

На Фиг. 5 представлены графики, показывающие результаты количественной оценки связывающей способности соответствующих антител, меченных ^{111}In , с помощью ARG *in vitro*.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий изменения объема опухоли в зависимости от времени у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий изменение в зависимости от времени массы тела мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , что показано в относительных значениях с массой тела до введения, равной 1,0.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий результаты гепатотоксичности и почечной токсичности у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий результаты токсичности крови (количество лейкоцитов, количество тромбоцитов) у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 10 представляет собой график, показывающий изменения объема опухоли во времени у мышей с опухолями после введения высокой дозы моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий изменение в зависимости от времени массы тела мышей с опухолями после введения высокой дозы моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , что показано в относительных значениях с массой тела до введения, равной 1,0.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий результаты подтверждения гепатотоксичности и почечной токсичности у мышей с опухолями после введения высокой дозы антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий результаты подтверждения токсичности в крови (количество лейкоцитов, количество тромбоцитов) у мышей с опухолями после введения высокой дозы антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий изменение в зависимости от времени объема опухоли у мышей с опухолью после введения моновалентного антитела,

меченого ^{225}Ac , или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий изменения в зависимости от времени массы тела мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac , что показано в относительных значениях с массой тела до введения, равной 1,0.

Фиг. 16 представляет собой график, показывающий результаты гепатотоксичности у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий результаты почечной токсичности у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий результаты токсичности в крови (количество лейкоцитов) у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий результаты токсичности в крови (количество тромбоцитов) у мышей с опухолями после введения моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , или бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac .

Фиг. 20 представляет собой график, показывающий результаты количества радиоактивности на единицу массы (%ID/г) в каждом органе при биологическом распределении через 20, 68 и 188 часов после введения меченого ^{111}In моновалентного или бивалентного антитела.

Фиг. 21 представляет собой график, показывающий изменения в зависимости от времени уровня радиоактивности в опухоли, крови, выделяемой моче, выделяемом кале и общего количества выделяемой мочи и выделяемого кала в биораспределении через 20, 68 и 188 часов после введения моновалентного или бивалентного антитела, меченого ^{111}In .

На Фиг. 22А оценивается стабильность гуманизованного анти-MUC5AC антитела, меченого ^{89}Zr , в плазме человека (—■—, …■…) и плазме мыши (—●—, …●…). Различные антитела, меченные ^{89}Zr , смешивали с плазмой человека или мыши и инкубировали при 37°C . На графике показаны изменения радиохимической чистоты в зависимости от времени в каждой временной точке. На верхней панели показаны результаты для гуманизованного анти-MUC5AC антитела, меченого ^{89}Zr , полученного с использованием DOTA-Bn-DBCO (через 24, 48, 168 и 378 часов после инкубации), а на нижней панели показаны результаты гуманизованного анти-MUC5AC антитела, меченого ^{89}Zr , полученные с использованием ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO (24 часа, 168 часов и 336 часов после инкубации).

На Фиг. 22В оценивается стабильность гуманизованного анти-MUC5AC антитела, меченого ^{225}Ac , в плазме человека (—■—, …■…) и плазме мыши (—●—, …●…). Различные антитела, меченные ^{89}Zr , смешивали с плазмой человека или мыши и

инкубировали при 37°C. На графике показаны изменения радиохимической чистоты в зависимости от времени в каждой временной точке. На верхней панели показаны результаты для гуманизированного анти-MUC5AC антитела, меченного ^{225}Ac , полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTA-Bn-DBCO (через 21 час, 115 часов, 140 часов и 168 часов после инкубации), а на нижней панели показаны результаты гуманизированного анти-MUC5AC антитела, меченного ^{225}Ac , полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO (через 48, 168 и 336 часов после инкубации).

Фиг. 23 представляет собой изображение, показывающее результаты связывающей способности каждого ^{89}Zr -меченого антитела с помощью ARG *in vitro*.

Фиг. 24 представляет собой изображение, показывающее результаты связывающей способности ^{225}Ac -меченого антитела с помощью ARG *in vitro*.

Фиг. 25 представляет собой изображение, показывающее результаты визуализации PET-СТ через 48 часов после введения каждого ^{89}Zr -меченого антитела.

На Фиг. 26 представлены графики, показывающие результаты VOI-анализа (объем интереса, трехмерная ROI) опухоли (верхняя фигура), сердца (средняя фигура) и печени (нижняя фигура) в каждый момент времени (12, 48, 84, 168 и 252 ч) на изображениях СPECT соответствующих ^{89}Zr -меченым антителам, полученных с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO ($-\blacksquare-$) и ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO ($\cdots\bullet\cdots$).

Фиг. 27 представляет собой график, показывающий результаты расчета соотношения опухоль-печень по накоплению в каждый момент времени (12, 48, 84, 168 и 252 ч) в опухоли и печени после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, полученных с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO ($-\bullet-$) и ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO ($\cdots\bullet\cdots$).

На фиг. 28А представлены графики, показывающие результаты количества радиоактивности на единицу массы (%ID/g) в каждом органе при биораспределении через 20, 68 и 188 часов после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, приготовленных с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO ($-\blacksquare-$) и ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO ($\cdots\bullet\cdots$). Верхняя панель показывает результаты опухоли, а нижняя панель показывает гематологические результаты.

На Фиг. 28В представлены графики, показывающие результаты количества накопленной радиоактивности на единицу массы (%ID/g) в каждом органе при биораспределении через 20, 68 и 188 часов после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, приготовленных с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO ($-\blacksquare-$) и ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO ($\cdots\bullet\cdots$). Верхняя панель показывает результаты для печени, а нижняя панель показывает результаты для почек.

На Фиг. 28С представлены графики, показывающие результаты количества радиоактивности на единицу массы (%ID/г) в каждом органе при биораспределении через 20, 68 и 188 часов после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, приготовленных с использованием ^{89}Zr -меченых DOTA-Bn-DBCO (—■—) и ^{89}Zr -меченых DOTAGA-DBCO (···●···). Верхняя панель показывает результаты для сердца, а нижняя панель показывает результаты для легких.

На Фиг. 28D представлены графики, показывающие результаты количества радиоактивности на единицу массы (%ID/г) в каждом органе при биораспределении через 20, 68 и 188 часов после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, приготовленных с использованием ^{89}Zr -меченых DOTA-Bn-DBCO (—■—) и ^{89}Zr -меченых DOTAGA-DBCO (···●···). Соответственно показаны результаты для селезенки и поджелудочной железы.

На Фиг. 29 представлен график, показывающий изменения во времени уровня накопленной радиоактивности (%ID) выделяемого кала (—□—, ···○···) и выделяемой мочи (—■—, ···●···) после введения соответствующих ^{89}Zr -меченых антител, приготовленных с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO (—■—, —□—) и ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO (···●···, ···○···).

На Фиг. 30 представлены графики, показывающие изменение в зависимости от времени объема опухоли (А) и массы тела (В) после введения ^{225}Ac -меченого антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO, мышам с опухолями при введенной радиоактивности 5 кБк/мышь или 10 кБк/мышь.

Фиг. 31 представляет собой график, показывающий результаты токсичности крови (количество лейкоцитов) у мышей с опухолями после введения ^{225}Ac -меченого антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO.

Фиг. 32 представляет собой график, показывающий результаты токсичности крови (количество тромбоцитов) у мышей с опухолями после введения ^{225}Ac -меченого антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO.

Фиг. 33 представляет собой график, показывающий результаты гепатотоксичности (ALT, AST) у мышей с опухолями после введения ^{225}Ac -меченого антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO.

Фиг. 34 представляет собой график, показывающий результаты почечной токсичности (BUN) у мышей с опухолями после введения ^{225}Ac -меченого антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO.

На Фиг. 35 показаны результаты визуализации СPECT-СТ с течением времени с использованием гуманизированного антитела [^{89}Zr]Random-DFO-anti-MUC5AC.

Фиг. 36 представляет собой график, показывающий результаты VOI-анализа (объем

интереса, трехмерная ROI) опухоли ($-\bullet-$), сердца (кровь) ($\cdots\blacksquare\cdots$) и печени ($\cdots\Delta\cdots$) в каждый момент времени на изображениях SPECT для гуманизованного антитела [^{89}Zr]Random-DFO-anti-MUC5AC.

[Описание вариантов осуществления]

[0012]

Если не указано иное, термины, используемые в настоящем описании, могут использоваться в значении, обычно используемом в данной области техники.

[0013](1) Конъюгат 1

Настоящее изобретение относится к конъюгату хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом (далее также называемого хелатирующим агентом по настоящему изобретению), и антитела, где вышеупомянутый радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицу, и вышеупомянутое антитело представляет собой гуманизованное антитело, специфически связывающееся с MUC5AC (далее также называемый конъюгатом по настоящему изобретению).

[0014] (1-1) Радионуклид

Радионуклид, содержащийся в конъюгате по настоящему изобретению, представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицы. Нуклид металла может быть любым нуклидом, испускающим α -частицы в процессе распада радиоактивного металла. В частности, предпочтительно используются ^{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 (актиний-225).

Нуклид металла, испускающий α -частицы, в настоящем изобретении может быть получен известным способом с использованием ускорителя, такого как циклотрон, линейный ускоритель и т. п. Например, ^{225}Ac можно получить в результате ядерной реакции (p, 2n) путем облучения мишени ^{226}Ra протоном с использованием циклотрона. Полученный нуклид металла, испускающий α -частицы, может быть очищен путем отделения и очистки от мишени. Например, очищенный ^{225}Ac можно получить путем растворения мишени, содержащей ^{225}Ac , в кислоте или т. п., путем добавления щелочи к раствору для осаждения соли, содержащей ^{225}Ac , и выделения и очистки соли. Нуклид, испускающий α -частицы, очищенный таким образом, может быть использован для мечения ВСП, подвергая нуклид химической обработке, необходимой для получения химической формы, подходящей для мечения ВСП.

[0015](1-2) Антитело

Антитело, содержащееся в конъюгате по настоящему изобретению, представляет собой гуманизованное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC (далее также упоминается как гуманизованное антитело, используемое в настоящем изобретении). Антитело ничем конкретно не ограничено, если оно представляет собой гуманизованное антитело, обладающее способностью специфически связываться с MUC5AC. Антитело предпочтительно имеет стабильные физические свойства и превосходно накапливается в

опухоли. Антитело можно использовать в качестве его антигенсвязывающего фрагмента, и такой вариант осуществления также охватывается настоящим изобретением. В частности, он содержит конкретную переменную область тяжелой цепи и конкретную переменную область легкой цепи, описанные ниже, и, при желании, может содержать соответствующую константную область тяжелой цепи и соответствующую константную область легкой цепи. В настоящем описании «антигенсвязывающий фрагмент» означает фрагмент антитела, состоящий из части гуманизированного антитела, используемого в настоящем изобретении, и обладающий способностью связываться с MUC5AC. Количество аминокислот, содержащихся в полипептиде, составляющем антигенсвязывающий фрагмент, конкретно не ограничено, пока он обладает способностью связываться с MUC5AC.

[0016]

Аминокислотная последовательность, предпочтительная в качестве переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела, используемого в настоящем изобретении, показана ниже. Переменная область 1 тяжелой цепи (H01), переменная область 2 тяжелой цепи (H02), переменная область 3 тяжелой цепи (H03) и переменная область 4 тяжелой цепи (H04) соразмерно соответствуют SEQ ID NO: 1-4 из Перечня последовательностей, прилагаемого к настоящему описанию. Подчеркнутая часть представляет собой сайт CDR.

[0017]

[heavy chain variable region 1 (H01)]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTALYYCTRHLLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[heavy chain variable region 2 (H02)]

LVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWIR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCTRHLLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[heavy chain variable region 3 (H03)]

LVQLVESGGGVVQPPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVATISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHLLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[heavy chain variable region 4 (H04)]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNTRLRAEDTAVYYCTRHLLDYANYDAMDYWGQG
TPVTVSS

[0018]

Аминокислотная последовательность, предпочтительная в качестве переменной области легкой цепи гуманизированного антитела, используемого в настоящем изобретении, показана ниже. Переменная область 1 легкой цепи (L01), переменная область 2 легкой цепи (L02), переменная область 3 легкой цепи (L03) и переменная область 4 легкой цепи (L04) соразмерно соответствуют SEQ ID NO: 5-8 из Перечня последовательностей, прилагаемого к настоящему описанию. Подчеркнутая часть представляет собой сайт CDR.

[0019]

[light chain variable region 1 (L01)]

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSSGSGSGTDF
 LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[light chain variable region 2 (L02)]

DVVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPSRFSSGSGSGTDF
 LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK

[light chain variable region 3 (L03)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGKSPKLLIYLASNLESGVPSRFSSGSGSGTDF
 LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[light chain variable region 4 (L04)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVTTSDFSYLN
 WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSSGSGSGTDF
 LTIS SLQAEDVAVYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK

[0020]

Другими словами, переменная область тяжелой цепи гуманизованного антитела, предпочтительного в настоящем изобретении, состоит из аминокислотной последовательности, показанной в любой из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 4, а переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, показанной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8. То есть гуманизованное антитело, используемое в настоящем изобретении, состоит из комбинации вышеупомянутых четырех переменных областей тяжелой цепи (H01-H04) и четырех переменных областей легкой цепи (L01-L04).

[0021]

Предпочтительное гуманизованное антитело по настоящему изобретению имеет переменную область тяжелой цепи H01, H03 или H04 и любую из L01-L04 в качестве переменной области легкой цепи.

[0022]

Наиболее предпочтительное гуманизованное антитело по настоящему изобретению имеет переменную область тяжелой цепи H01 и переменную область легкой цепи L03.

[0023]

Переменная область тяжелой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению не ограничена аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и также включает варианты, сохраняющие функции. То есть мутантный переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90%, предпочтительно не менее 95%, еще более предпочтительно не менее 98%, наиболее предпочтительно не менее 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, также используется в качестве переменной области тяжелой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, при условии, что она может связываться с MUC5AC в сочетании с переменной областью легкой цепи в настоящем изобретении.

[0024]

В настоящем описании идентичность аминокислотной последовательности относится к идентичности аминокислотных последовательностей между двумя представляющими

интерес белками и выражается процентом (%) аминокислотных остатков, которые совпадают при оптимальном выравнивании аминокислотных последовательностей, проведенном с использованием математических алгоритмов, известных в соответствующей области техники. Идентичность аминокислотной последовательности можно определить путем визуального осмотра и математических вычислений, а также можно рассчитать с помощью программы поиска гомологии (например, BLAST, FASTA) или программы выравнивания последовательностей (например, ClustalW), известной специалистам в данной области или программного обеспечения для обработки генетической информации (например, GENETYX [зарегистрированная торговая марка]) и т. п. В частности, идентичность аминокислотной последовательности в настоящем описании можно определить с помощью программы систематического анализа ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>), опубликованной на веб-сайте DDBJ (Банк данных ДНК Японии) по начальным параметрам настройки (Версия 2.1, Тип выравнивания: медленный, Матрица сравнения нуклеотидов: Gonnet, штраф за открытие разрыва: 10, штраф за продолжение разрыва: 0,1).

[0025]

Кроме того, в качестве вариательной области тяжелой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, используется мутированная вариательная область тяжелой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, где не более чем 10, предпочтительно не более чем 8, еще более предпочтительно не более чем 5, наиболее предпочтительно не более чем 3, аминокислоты удаляются, замещаются или замещаются, также используется в качестве вариательной области тяжелой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении при условии, что эта область может связываться с MUC5AC в сочетании с вариательной областью легкой цепи по настоящему изобретению.

[0026]

Вариательная область легкой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, не ограничивается аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, и также включает варианты, сохраняющие функции. То есть мутантная вариательная область легкой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90%, предпочтительно не менее 95%, еще более предпочтительно не менее 98%, наиболее предпочтительно не менее 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, также используется в качестве вариательной области легкой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, при условии, что эта область может связываться с MUC5AC в сочетании с вариательной областью тяжелой цепи по настоящему изобретению.

[0027]

Кроме того, в качестве вариательной области легкой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, мутантная вариательная область легкой цепи,

состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, в которой не более 10, предпочтительно не более 8, еще более предпочтительно не более 5, наиболее предпочтительно не более 3 аминокислот удалены, замещены или замещены, также включена в переменную область легкой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении при условии, что данная область может связываться с MUC5AC в сочетании с переменной областью тяжелой цепи по настоящему изобретению.

[0028]

Гуманизованное антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть получено способом, обычно применяемым в данной области, или способом, аналогичным ему. В частности, могут быть выполнены следующие стадии.

Поскольку аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, раскрыты в SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 8, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, на основе информации об аминокислотной последовательности конструируют и встраивают в подходящий экспрессирующий вектор. Экспрессирующий вектор может необязательно содержать в дополнение к нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизованное антитело, используемое в настоящем изобретении, последовательность Козак для повышения эффективности трансляции, сигнальную последовательность, которая способствует секреции гуманизованного антитела, используемого в настоящем изобретении, в среду при введении в хозяина, промоторную последовательность и т. п. Вектор, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть выбран из тех, которые обычно используются в соответствующей области техники, и предпочтительным является плазмидный вектор pcDNA3.4. Введение экспрессирующего вектора в клетку-хозяина особо ничем не ограничено. В качестве способа введения гена в клетку можно использовать способ, обычно используемый в соответствующей области техники, например, может быть использован способ, известный специалистам в данной области, такой как способ с фосфатом кальция, способ электропорации, способ липофекции и способ с DEAE-декстраном. Способ введения с использованием способа липофекции является особенно предпочтительным, как показано в следующем примере. В качестве клетки-хозяина, используемой для этой цели, могут быть использованы клетки, которые обычно используются в соответствующей области техники. Примеры таких клеток-хозяев включают клетки CHO, клетки 293, *Escherichia coli*, дрожжи *Pichia*, клетки Sf9 и т. п. В настоящее время также коммерчески доступен набор экспрессирующей системы для экспрессии интересующего белка. Система Exp1CHO (Thermo Fisher Scientific), используемая в следующем примере, особенно предпочтительна для быстрой и надежной экспрессии представляющего интерес белка.

[0029]

Гуманизованное антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть получено путем вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованное антитело,

используемое в настоящем изобретении, в экспрессирующей вектор, введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин с помощью экспрессирующего вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, культивирование клетки-хозяина после введения нуклеиновой кислоты и получение гуманизированного антитела по настоящему изобретению из культуральной надосадочной жидкости с помощью средств очистки, таких как хроматография и т. п. В этом способе гуманизированное антитело, используемое в настоящем изобретении, секретируется в культуральную надосадочную жидкость при культивировании клетки-хозяина. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены из культуральной надосадочной жидкости с использованием средств очистки, таких как хроматография и т. п. В качестве средств для хроматографии могут быть использованы различные средства, известные в соответствующей области техники, такие как аффинная хроматография, ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография и т. п. Особенно предпочтительна аффинная хроматография на колонке с протеином А, используемая в следующем примере.

[0030]

Кроме того, упомянутое выше гуманизированное антитело может представлять собой поликлональное антитело или моноклональное антитело.

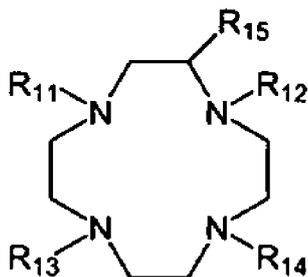
[0031](1-3) Хелатирующий агент

В настоящем изобретении хелатирующий агент ничем конкретно не ограничен, если агент имеет участок в своей структуре, в котором координируется радионуклид. Предпочтительно агент имеет заместитель, который делает возможным образование конъюгата антитела с хелатным участком, который является участком, в котором координируется радионуклид. Примеры хелатного участка включают СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусную кислоту), СДТА (циклогексан-транс-1,2-диаминтетрауксусную кислоту), СДТРА (4-циано-4-[[додецилтио]тиоксометил]тио]-пентановую кислоту), ДОТА (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), ДОТМА ((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), ДОТАМ (1,4,7,10-тетраакис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан), ДОТА-GA (α -(2-карбоксиил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), ДОТР (((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетраакис(метилен))тетрафосфоновую кислоту), ДОТМР (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраакис(метиленфосфоновую кислоту)), ДОТА-4АМР (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраакис(ацетамидометиленфосфоновую кислоту), D02P (тетраазациклододекандиметанфосфоновую кислоту), дефероксамин (DFO), ДТРА (глицин, N, N-бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-), ДТРА-ВМА (5,8-бис(карбоксиметил)-11-[2-(метиламино)-2-оксоэтил]-3-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-13-овую кислоту), ЕДТА (2,2',2'',2'''-(этан-1,2-диилбис(азантриил))тетрауксусную кислоту), NОТА (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту), NОТР (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триилтрис(метиленфосфоновую кислоту), ТЕТРА (1,4,8,11-

тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовую кислоту), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту), ТТНА (3,6,9,12-тетракис(карбоксиметил)-3,6,9,12-тетраазатетрадекандиовую кислоту), НЕНА (1,2,7,10,13-гексаазациклооктадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусную кислоту), 1,2-НОРО (N, N',N'',N'''-тетра(1,2-дигидро-1- гидроксид-2-оксопиридин-6-карбонил)-1,5,10,14-тетраазатетрадекан), РЕРА (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусную кислоту), Н4октапа (N, N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-этилендиамин-N, N'-диуксусную кислоту), Н2биспа2 (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))дипиколиновую кислоту), Н2дедпа (1,2-[{6-(карбокси)-пиридин-2-ил}-метиламино]этан), Н2макропа (6-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-N, N'-метил)пиколиновую кислоту), Н5декапа (N, N''-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-диэтилентриамин-N, N',N''-триуксусную кислоту), Н6фосфа (N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), НР-D03А (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусную кислоту) и порфирин. Предпочтительно иметь структуру, производную от соединения, представленного следующей формулой (А).

[0032]

(A)



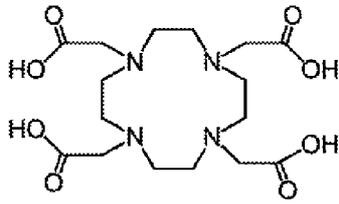
[0033] где в формуле (А) каждый из R11, R13 и R14 независимо представляет собой группу, состоящую из $-(CH_2)_pCOOH$, $-(CH_2)_pC_5H_5N$, $-(CH_2)_pPO_3H_2$, $-(CH_2)_pCONH_2$ или $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, один из R12 и R15 представляет собой атом водорода, карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, имеющую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой заместитель для конъюгации с указанным выше антителом, р представляет собой целое число, от не менее 0 до не более 3, R15 представляет собой атом водорода, когда R12 представляет собой заместитель для конъюгации с вышеупомянутым антителом, и R15 представляет собой заместитель для конъюгации с вышеупомянутым антителом, когда R12 не является заместителем для конъюгации с вышеупомянутым антителом.

[0034]

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

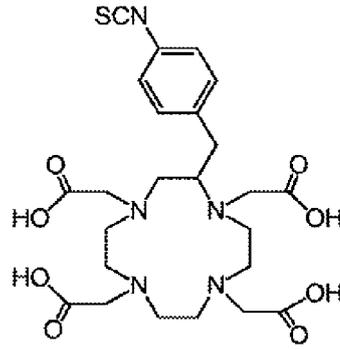
[0035]

(A-1)



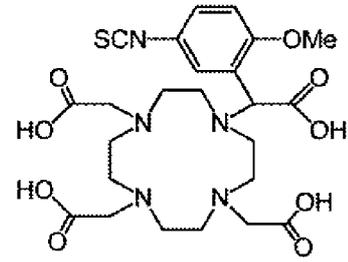
DOTA

(A-2)



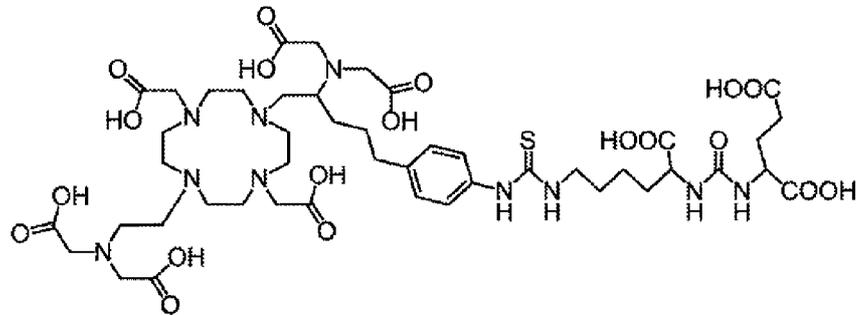
p-SCN-Bn-DOTA

(A-3)



MeO-DOTA-NCS

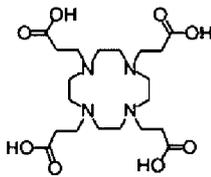
(A-4)



EuK-106

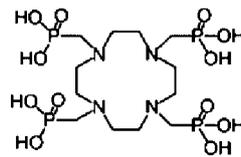
[0036]

(A-5)



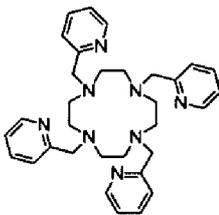
DOTPA

(A-6)



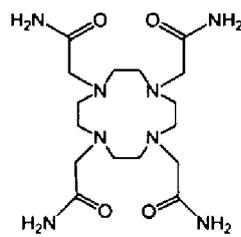
DOTMP

(A-7)



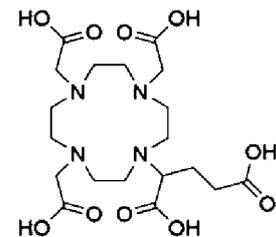
Lpy

(A-8)



DOTAM

(A-9)



DOTA-GA

[0037]

более предпочтительно в области Fc, через линкер. В этом случае линкер содержит пептид, состоящий не менее чем из 13 и не более чем из 17 аминокислотных остатков, представленный следующей формулой (i) (далее также именуемый «пептид для модификации антитела»), и может быть использован пептид образованный реакцией сшивки между пептидом для модификации антитела, с помощью модифицированного сшивающего агента, и антителом. В пояснении формулы (i) левая сторона поверхности бумаги аминокислотной последовательности указывает N-концевую сторону, а правая сторона поверхности бумаги аминокислотной последовательности указывает C-концевую сторону. Когда хелатирующий агент соединен с антителом через пептид для модификации антитела, в качестве линкера, положение, в котором связываются хелатирующий агент и пептид для модификации антитела, ничем особо не ограничено. Например, агент может быть прямо или косвенно связан с N-концом или C-концом пептида для модификации антитела, предпочтительно с N-концом. Кроме того, C-конец пептида для модификации антитела, может быть модифицирован, например, амидированием или т. п. для повышения его стабильности и т. п.

[0042]

(Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd) ... (i)

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

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

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

Каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, или

один аминокислотный остаток 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 Xaa1 и Xaa3 связаны, и

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

[0043]

Примеры аминокислотного остатка, который может содержаться в X в вышеупомянутой 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 аминокислот того же типа или из аминокислот разных типов.

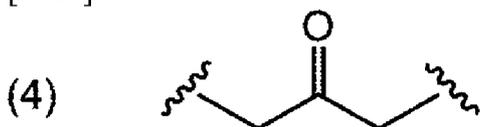
[0044]

В формуле (i) a, b, c и d ничем конкретно не ограничены, если они являются числами в пределах вышеупомянутого диапазона. С точки зрения стабильности связывания между пептидом и антителом должны удовлетворяться условия $a+b+c+d \leq 14$, и a предпочтительно представляет собой целое число от не менее 1 до не более 3, b предпочтительно представляет собой целое число от не менее 1 до не более 3, c предпочтительно представляет собой целое число от не менее 3 до не более 5, а d предпочтительно представляет собой целое число от не менее 1 до не более 3.

[0045]

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.

[0046]



[0047]

Вместо вышеупомянутой 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, имеющей галоацетильную группу в боковой цепи. Они связаны тиоэфирной связью. Конец галоацетильной группы замещен галогеном, таким как йод или т. п., и галоген удаляется реакцией с тиоловой группой в другой боковой цепи, в результате чего образуется тиоэфирная связь.

[0048]

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

[0049]

Среди них аминокислотная последовательность пептида для модификации антитела, предпочтительно имеет любую из следующих последовательностей (1)-(14), более предпочтительно следующие последовательности (1), (2), (13) или (14). В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) (Хаа2) представляет собой остаток лизина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминопробиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, и каждый из (Хаа1) и (Хаа3) представляет собой остаток гомоцистеина. В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) аминокислоты, отличные от (Хаа1), (Хаа2) и (Хаа3),

обозначены однобуквенными сокращениями.

[0050]

- (1) DCAYH(Xaa2)GELVWCT (SEQ ID NO: 9)
- (2) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 10)
- (3) RCAYH(Xaa2)GELVWCS (SEQ ID NO: 11)
- (4) GPRCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 12)
- (5) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 13)
- (6) GDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 14)
- (7) GPSCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 15)
- (8) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 16)
- (9) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTHH (SEQ ID NO: 17)
- (10) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 18)
- (11) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 19)
- (12) SDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 20)
- (13) RGNCAZH(Xaa2)GQLVWCTYH (SEQ ID NO: 21)
- (14) G(Xaa1)DCAYH(Xaa2)GELVWCT(Xaa3)H (SEQ ID NO: 22)

[0051](1-4) Способ получения конъюгата

Способ получения конъюгата по настоящему изобретению включает две стадии, которые представляют собой стадию конъюгации, заключающуюся в конъюгации хелатирующего агента и антитела, и стадию комплексообразования, заключающуюся в образовании комплекса радионуклида и хелатирующего агента. Стадию конъюгации можно проводить перед стадией образования комплекса или после стадии образования комплекса.

[0052]

На стадии конъюгации используются различные способы химической модификации антитела. В частности, можно упомянуть способы (a)-(f):

(a) способ связывания с амином (способ модификации аминогруппы остатка лизина антитела с использованием хелатирующего агента или хелата, имеющего карбоксильную группу, активированную группой N-гидроксисукцимидила (NHS))

(b) способ модификации сульфгидрильной (SH) группы, полученной путем частичного восстановления дисульфидной связи (SS-связи) между полипептидными цепями в шарнирном участке антитела с помощью хелатирующего агента или линкера, имеющего группу малеимида, реагирующую с SH-группой

(c) способ модификации цистеина, вновь введенного в антитело, путем аминокислотной мутации с помощью генной инженерии с помощью хелатирующего агента или линкера, содержащего малеимидную группу

(d) способ модификации азидной группы азид лизина, недавно введенного в антитело путем аминокислотной мутации с помощью генной инженерии с помощью хелатирующего агента или линкера, содержащего алкин (например, дибензилциклооктен: DBCO), с использованием клик-реакции

(e) способ модификации глутамина, введенного в конкретное положение антитела, с помощью хелатирующего агента или линкера, имеющего боковую цепь лизина, с использованием трансглутаминазы

(f) способ сайт-специфической модификации Fc-области антитела с помощью хелатирующего агента или линкера, содержащего модифицирующий антитело пептид, показанный в вышеупомянутом (i)

[0053]

На стадии комплексообразования хелатирующий агент хелатируется с радионуклидом (комплексообразование). Используемый в данном документе радионуклид предпочтительно используют способом, допускающим ионизацию, более предпочтительно в форме иона, с точки зрения повышения эффективности комплексообразования. На стадии комплексообразования порядок добавления радионуклида к хелатирующему агенту не имеет значения, если с радионуклидом может образоваться комплекс. Например, в качестве радионуклида можно использовать раствор, в котором ионы радиоактивных металлов растворены в растворителе, состоящем в основном из воды.

После комплексообразования полученный комплекс можно очистить с помощью фильтрующего фильтра, мембранного фильтра, колонки с различными наполнителями, хроматографии и т. п.

[0054]

В способе получения конъюгата по настоящему изобретению стадию конъюгации предпочтительно проводят после стадии комплексообразования.

В более предпочтительном воплощении на стадии комплексообразования (A) образуется комплекс между радионуклидом и хелатирующим агентом, имеющим первую атомную группу, способную к клик-реакции, в качестве заместителя, обеспечивающего образование конъюгата с антителом. Затем на стадии конъюгации (B) с использованием пептида, модифицирующего антитело, показанного выше (i), и линкера, модифицирующего антитело, имеющего вторую атомную группу, способную к клик-реакции, проводят клик-реакцию между антителом, модифицированным пептидом, в котором Fc-область сайт-специфически модифицирована, а хелатирующий агент образует комплекс, который получают на стадии (A) для получения конъюгата по настоящему изобретению.

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

[0055]

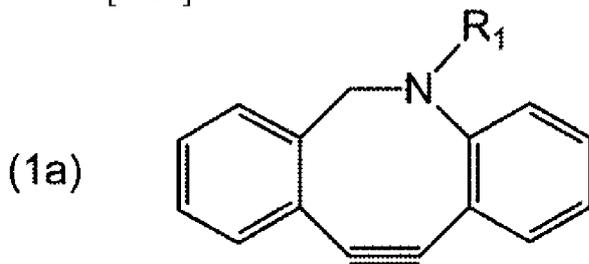
Так как комбинация первой атомной группы и второй атомной группы способна к клик-реакции, подходящая комбинация выбирается в соответствии с типом клик-реакции. Например, можно упомянуть комбинацию алкина и азиды, комбинацию 1,2,4,5-тетразина и алкена и т. п. В этих атомных группах первая атомная группа имеет одну из вышеупомянутых комбинаций атомных групп, а вторая атомная группа имеет одну атомную группу, которая отличается от первой атомной группы из вышеупомянутой комбинации атомных групп. Для достижения как стабильности хелатирующего агента и антитела, так и повышения эффективности их связывания хелатный линкер

предпочтительно представляет собой алкин, а линкер для модификации антитела предпочтительно представляет собой азид, или хелатный линкер предпочтительно представляет собой 1,2,4,5-тетразин, а линкер для модификации антитела предпочтительно представляет собой алкен. Конкретные примеры клик-реакции с помощью таких комбинаций атомных групп включают реакцию присоединения циклизации Хасгена, реакции Дильса-Алдера с обращенными электронными требованиями и т. п.

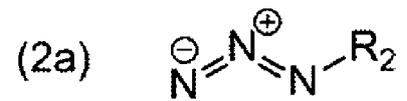
[0056]

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)), и комбинацию атомной группы, содержащей 1,2,4,5-тетразин в качестве первой атомной группы (формула (1b)) и атомной группы, содержащей транс-циклооктен (TCO) в качестве алкина второй атомной группы (формула (2b)). Предпочтительной является комбинация формулы (1a) и формулы (2a).

[0057]



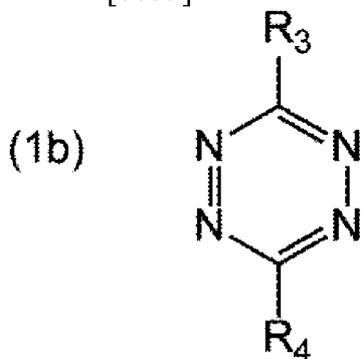
ДИБЕНЗИЛЦИКЛООКТИН



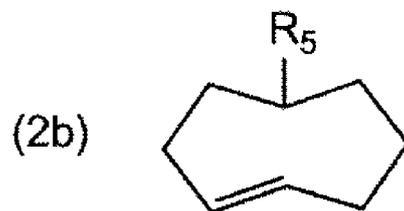
АЗИД

[0058] где R1 представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, а R2 представляет собой сайт связывания с пептидом для модификации антитела, в антителе.

[0059]



1,2,4,5-тетразин



trans-ЦИКЛООКТЕН

[0060] где один из R3 и R4 представляет собой сайт связывания с любым одним хелатирующим агентом или пептидом для модификации антитела, в антителе, а другой представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или

пиридильную группу, и R5 представляет собой сайт связывания с любым одним хелатирующим агентом или пептидом для модификации антитела, в зависимости от R3 или R4.

[0061]

Когда используют атомную группу, содержащую дибензилциклооктин (DBCO), представленный вышеупомянутой формулой (1a), в качестве алкина первой атомной группы, можно упомянуть различные коммерчески доступные реагенты DBCO. В частности, например, могут быть выбраны DBCO-С6-кислота, дибензилциклооктин-амин, дибензилциклооктинмалеимид, DBCO-PEG кислота, сложный эфир DBCO-PEG-NHS, DBCO-PEG-спирт, DBCO-PEG-амин, DBCO-PEG-NH-Вос, карбоксиродамин-PEG-DBCO, сульфородамин-PEG-DBCO, ТАМРА-PEG-DBCO, DBCO-PEG-биотин, DBCO-PEG-DBCO, DBCO-PEG-малеимид, TCO-PEG-DBCO, DBCO-mPEG и т. п., а предпочтительно используют дибензилциклооктинмалеимид.

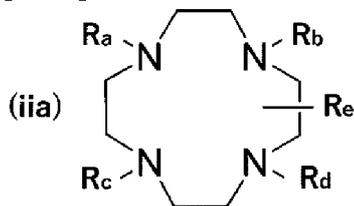
[0062]

На стадии (A) более предпочтительно используют хелатирующий агент, имеющий структуру, представленную следующей формулой (ii).

A-B-C ... (ii)

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

[0063]

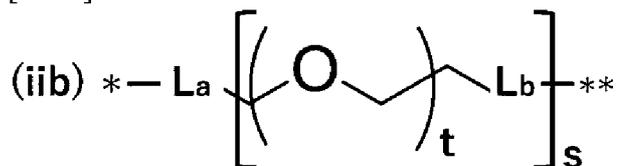


[0064]

В формуле (iia) каждый из Ra, Rb и Rc 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 от 0 до 3, один из Rd и Re представляет собой сайт связывания (*) с B, а другой 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).

[0065]



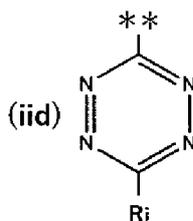
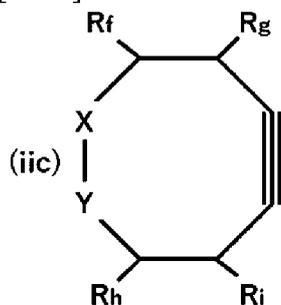
[0066]

В формуле (iib) La и Lb, каждый независимо представляет 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 от не менее 0 до не более 30, s равно 0 или 1, * представляет собой сайт связывания с А, а ** представляет собой сайт связывания с С.

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

[0067]



[0068]

В формуле (iic) X представляет собой CHR_k—** или N—**, Y представляет собой CHR_k или C=O, R_k независимо представляет собой атом водорода или алкильную группу, содержащую не менее 1 и не более 5 атомов углерода, когда X представляет собой CHR_k—**, а Y представляет собой CHR_k, тогда фрагменты R_k могут быть соединены с образованием циклоалкильной группы, R_f, R_g, R_h и R_i, каждый 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 В, в формуле (iid), ** представляет собой связывание сайт с В, и R_j представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу.

[0069]

В качестве хелатирующего агента, используемого на стадии (А), производное DOTA вышеуказанной формулы (iia), где Ra-Rd представляют собой -(CH₂)_pCOOH, p равно 1, Re представляет собой сайт связывания с В; или производное DO3A, или производное DOTAGA, где от Ra до Rc представляют собой -(CH₂)_pCOOH, p равно 1, Rd представляет собой сайт связывания (*) с В, и Re представляет собой атом водорода, что является более предпочтительным.

[0070]

В формуле (ii) производное DOTA-PEG_t-DBCO, где А представляет собой вышеупомянутое производное DOTA, в В La представляет собой связующий линкер, содержащий тиомочевинную связь и содержащий 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 С представляет собой производное алкина, представленное формулой (iic), где в формуле (iic) X представляет собой N**, Y

представляет собой CHRk, Rk представляет собой атом водорода, Rf и Rg соединены с образованием бензольного кольца, Rh и Ri соединены с образованием бензольного кольца, и ** представляет собой сайт связывания с В; или производное DOTA-PEGt-Tz, где в В La представляет собой связующий линкер, содержащий связь тиомочевины 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 от не менее 0 до 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 С представляет собой производное тетразина, представленное формулой (iid), что является еще более предпочтительным.

[0071]

В формуле (ii) производное DO3A-PEGt-DBCO, где А представляет собой вышеупомянутое производное DO3A, в В, 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 и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и С представляет собой производное алкина, представленное формулой (iic), где в формуле (iic) X представляет собой N**, Y представляет собой CHRk, Rk представляет собой атом водорода, Rf и Rg соединены с образованием бензольного кольца, Rh и Ri соединены с образованием бензольного кольца, а ** представляет собой сайт связывания с В, что является еще более предпочтительным.

[0072]

В формуле (ii) производное DOTAGA-PEGt-DBCO, где А представляет собой вышеупомянутое производное DOTAGA, в В, 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 С представляет собой производное алкина, представленное формулой (iic), где в формуле (iic) X представляет собой N**, Y представляет собой CHRk, Rk представляет собой атом водорода, Rf и Rg соединены с образованием бензольного кольца, Rh и Ri соединены с образованием бензольного кольца, а ** представляет собой сайт связывания с В, что является еще более предпочтительным.

[0073]

В молярном соотношении хелатирующий агент и радионуклид в виде хелатного сайта/радионуклида нижний предел предпочтительно составляет не менее 10/1, более предпочтительно не менее 100/1, еще более предпочтительно не менее 500/1, а верхний предел предпочтительно не более 10000/1, более предпочтительно не более 8000/1, еще более предпочтительно не более 7000/1. Например, предпочтительным является диапазон не менее 100/1 и не более 7000/1, а более предпочтительным является не менее 500/1 и не более 7000/1.

[0074]

Реакцию комплексообразования предпочтительно проводят в растворителе. В качестве растворителя можно использовать воду, солевой раствор, буферы, такие как ацетатно-натриевый буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, трис-гидроксиметиламинометановый буфер (трис-буфер), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислотный буфер (HEPES-буфер), тетраметиламмонийацетатный буфер и т. п., и т. п.

[0075]

Хотя количество растворителя ничем конкретно не ограничено, с точки зрения практичности на стадии производства нижний предел в начале стадии (А) составляет не менее 0,01 мл, предпочтительно не менее чем 0,1 мл, более предпочтительно не менее чем 1,0 мл, более предпочтительно не менее чем 10 мл, еще более предпочтительно не менее чем 100 мл, и верхний предел предпочтительно не более чем 1000, более предпочтительно не более чем 100 мл, еще более предпочтительно не более чем 10 мл, еще более предпочтительно не более чем 1,0 мл. Например, количество растворителя находится в пределах не менее чем 0,01 мл и не более чем 100 мл.

[0076]

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

[0077]

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

[0078]

Что касается времени реакции, то должна соблюдаться вышеупомянутая температура реакции, и нижний предел 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 45 мин, а верхний предел предпочтительно составляет не более 180 мин, более предпочтительно не более 150 мин, еще более предпочтительно не более 120 мин, еще более предпочтительно не более 90 мин, особенно предпочтительно не более 60 мин. Например, диапазон не менее 10 мин и не более 150 мин является предпочтительным, а диапазон не менее 10 мин и не более 60 мин является более предпочтительным.

[0079]

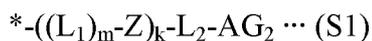
Антитело, используемое на стадии (B), представляет собой модифицированное пептидом антитело, в котором Fc-область (константная область) гуманизированного антитела, подробно описанная в вышеупомянутом «(1-2) антителе», сайт-специфически модифицирована с использованием пептида для модификации антитела, показанного в вышеупомянутом (i), и линкера для модификации антитела, имеющего вторую атомную группу, способную к клик-реакции.

[0080]

Пептид для модификации антитела может быть получен с использованием комбинации аминокислот, как природных аминокислот, так и неприродных аминокислот, путем применения способов синтеза пептидов, таких как процесс жидкофазного синтеза, процесс твердофазного синтеза, способ автоматического синтеза пептидов, способ генной рекомбинации, способ фагового дисплея и т. п. При синтезе пептида, при необходимости, функциональные группы используемых аминокислот могут быть защищены. Эти способы можно осуществлять по способу, описанному, например, в WO 2017/217347 и WO 2018/230257.

[0081]

Линкер для модификации антитела может представлять собой линкер, в котором пептид для модификации антитела и линкер, представленный следующей формулой (S1), связаны.



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

L1 представляет собой линкерный фрагмент полиэтиленгликоля (PEG),

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

Z представляет собой второй линкерный фрагмент, который связывает (L1)_m и L2, k равно 0 или 1,

L2 представляет собой второй линкерный фрагмент PEG, и

AG2 представляет собой вторую атомную группу.

[0082]

В вышеупомянутой формуле (S1) структура Z ничем конкретно не ограничена, при условии, что она представляет собой линкерную структуру, которая связывает (L1)_m и L2 друг с другом, и включает, например, аминокислотную последовательность, состоящую не менее чем 1 и не более 5 аминокислотных остатков. В этом случае аминокислотная последовательность, содержащаяся в Z, предпочтительно содержит остаток цистеина и более предпочтительно связана с L2 через тиоэфирную группу, образованную связью

между тиоловой группой цистеинового остатка и малеимидной группой.

[0083]

В настоящем изобретении линкерный фрагмент PEG, составляющий L2, предпочтительно имеет структуру, представленную следующей формулой (P2). В формуле (P2) n представляет собой целое число, предпочтительно не менее 1 и не более 50, более предпочтительно не менее 1 и не более 20, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 10, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 6.

[0084]



[0085]

Один конец структуры линкерного фрагмента PEG может быть модифицирован структурой, полученной из коммерчески доступного реагента для PEG-илирования, или структурой, полученной из реагента, обычно используемого для PEG-илирования. Хотя это ничем особо не ограничено, их примеры включают структуры, полученные из дигликолевой кислоты или ее производного, и малеимида или его производного.

[0086]

В качестве способа введения вышеупомянутой второй атомной группы в линкер для модификации антитела, способ введения включает получение пептида для модификации антитела, имеющего желаемую аминокислотную последовательность, вышеупомянутым 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 транс-циклооктен (ТСО) в качестве второй атомной группы, и можно упомянуть перемешивание смеси при комнатной температуре.

[0087]

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 вышеупомянутой линкерной структуры. Примеры используемого реагента, вводящего азидную группу, включают силилазид, азидфосфат, азид алкиламмония, неорганический азид, сульфонилазид, азид PEG и т. п.

[0088]

Когда атомную группу, содержащую ТСО, вводят в качестве второй атомной группы, ТСО вводят непосредственно в N-конец или C-конец пептида с использованием имеющегося в продаже реагента клик-химии, содержащего ТСО, в соответствии с обычным способом, или атомная группа, содержащая ТСО, может быть введена через вышеупомянутую линкерную

структуру.

[0089]

Способ связывания пептида для модификации антитела, с антителом для получения антитела, модифицированного пептидом, может быть осуществлен с использованием, например, сшивающего агента. Сшивающий агент представляет собой химическое вещество для связывания ковалентной связью пептида для модификации антитела, и антитела. Примеры такого агента 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 т. п. или его соль, сшивающий агент, состоящий из соединения, имеющего дисульфидную связь, такого как диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат, дитиобиссукцинимидилпропионовая кислота и т. п., или их соли и т. п. Используя такой сшивающий агент, можно вызвать реакцию сшивки между аминокислотным остатком Хаа2 в пептиде для модификации антитела, и антителом. Когда, например, в качестве антитела используют гуманизированное антитело по настоящему изобретению, реакция перекрестного связывания в антителе происходит сайт-специфично между аминокислотным остатком Хаа2 и остатком Lys252 в соответствии с нумерацией Eu в гуманизированном антителе данного изобретения. Эти остатки Lys присутствуют в Fc-области гуманизированного антитела по настоящему изобретению.

[0090]

Способ связывания пептида для модификации антитела, с антителом можно осуществить, например, путем диспергирования вышеупомянутого пептида для модификации антитела, антитела, сшивающего агента и катализатора, если это необходимо, в подходящем буфере при температуре не ниже 10°C и не более 30°C. Время реакции может составлять от не менее чем 10 минут до 2 часов. Молярное соотношение во время реакции пептида и антитела предпочтительно составляет не менее 1/5, более предпочтительно не менее 1/3, еще более предпочтительно не менее 1/1,5 в качестве нижнего предела соотношения антитело/пептид, и верхний предел предпочтительно составляет не более 20/1, более предпочтительно не более 10/1, еще более предпочтительно не более 5/1, еще более предпочтительно не более 1/1, особенно предпочтительно не более 1/1,7. Например, предпочтительным является диапазон не менее 1/5 и не более 20/1, а более предпочтительным является не менее 1/1,5 и не более 1/1,7.

[0091]

Модифицированное пептидом антитело, полученное с помощью вышеуказанных стадий, представляет собой смесь, содержащую антитело, в котором одна молекула пептида для модификации антитела связана с одной молекулой антитела (далее именуемого «моновалентным антителом»), и антитело, в котором две молекулы пептида для модификации антитела, связаны с одной молекулой антитела (далее именуемого «бивалентным антителом») в любом соотношении. Его можно использовать как есть для

последующих стадий, или немодифицированное антитело, моновалентное антитело и бивалентное антитело разделяют и очищают с помощью таких способов, как фильтрационный фильтр, мембранный фильтр, колонка, заполненная различными наполнителями, различные хроматографии и т. п., 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 бивалентное антитело разделяют и очищают, для выделения и очистки можно использовать любой из вышеупомянутых способов очистки. Предпочтительно использовать колонку, заполненную различными наполнителями, и более предпочтительно использовать колонку, заполненную наполнителем, подходящим для разделения и очистки белка, такого как антитело и т. п.

[0092]

Наполнитель, подходящий для выделения и очистки белка, такого как антитело и т. п., ничем конкретно не ограничен, при условии, что он представляет собой наполнитель, в котором иммуноглобулин-связывающий белок иммобилизован на носителе, состоящем из водонерастворимого субстрата, и который специфически связывается с антителом. Примеры иммуноглобулин-связывающего белка включают протеин А, протеин G, протеин L и т. п. Эти иммуноглобулин-связывающие белки могут быть генетически сконструированными рекомбинантами. Примеры рекомбинантного иммуноглобулин-связывающего белка включают генетически сконструированный протеин А, генетически сконструированный протеин G и объединенные домен протеина А и домен протеина G. В настоящем изобретении в качестве наполнителя, подходящего для разделения и очистки по меньшей мере моновалентного антитела и бивалентного антитела, более предпочтительным является протеин А, и более предпочтительным является генетически сконструированный протеин А. Используемый в данном документе протеин А и протеин G представляют собой белковые молекулы, которые могут специфически связываться с молекулой антитела IgG, и классифицируются как протеин А (*Staphylococcus aureus*) или протеин G (стрептококк: род *Streptococcus*) в зависимости от различия в происхождении выделенных микроорганизмов. Генетически сконструированный протеин А представляет собой протеин А, в котором по меньшей мере одна аминокислотная мутация была введена в аминокислотный остаток любого из доменов связывания IgG (домены E, D, A, B и C) протеина А. В настоящем изобретении, генетически сконструированный протеин А, в котором домен, в который была введена по меньшей мере одна аминокислотная мутация, является мультимеризованным, является предпочтительным, генетически сконструированный протеин А, в котором домен А, B или C содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную мутацию мультимеризован, является более предпочтительным, и генетически сконструированный протеин А, мультимеризован не менее чем в виде димера и не более чем в виде пентамера. Аминокислотная мутация может быть выбрана из любой

мутации, такой как замена, делеция, вставка и т. п. аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную, на стадии транскрипционной трансляции гена. Их примеры, которые ничем конкретно не ограничены, включают генетически сконструированный протеин А, описанный в WO 2003/080655, WO 2011/118699 и т. п.

[0093]

Примеры водонерастворимого субстрата, на котором иммобилизованы иммуноглобулин-связывающие белки, включают неорганические носители, такие как стеклянные гранулы, силикагель и т. п., органические носители, такие как синтетические полимеры (например, сшитый поливиниловый спирт, сшитый полиакрилат, сшитый полиакриламид, сшитый полистирол) и полисахариды (например, кристаллическая целлюлоза, сшитая целлюлоза, сшитая агароза, сшитый декстран) и органо-органические, органо-неорганические сопряженные носители и т. п., полученные из их комбинаций, и т. п.

[0094]

Колонка, заполненная вышеупомянутым генетически сконструированным протеином А в качестве наполнителя, коммерчески доступна, например, как серия KanCap (зарегистрированная торговая марка) (предварительно упакованная колонка KANEKA KanCapA) от KANEKA CORPORATION, серия HiTrap (зарегистрированная торговая марка) (HiTrap Mabselect, HiTrap Mabselect SuRe, HiTrap Mabselect Xtra) компании GE Healthcare, серии HiScreen (HiScreen Mabselect SuRe) компании GE Healthcare, серии TOYOPEARL (зарегистрированная торговая марка) (TOYOPEARL AF-rProtein A-650F) компании Tosoh Corporation и т. п.

[0095]

Разделение и очистка модифицированного пептидом антитела, используемого для клик-реакции на стадии (B), поясняется ниже в качестве примера.

Модифицированное пептидом антитело подвергают клик-реакции на стадии (B) после стадии модификации антитела, на которой модифицированное антитело получают путем сайт-специфической модификации Fc-области антитела линкером, снабженным пептидом для модификации антитела (линкер для модификации антитела), и стадию очистки антитела, на которой модифицированное антитело очищают с использованием вышеупомянутого носителя с иммобилизованным на нем иммуноглобулин-связывающим белком. Кроме того, стадия очистки антител дополнительно включает стадию удерживания модифицированного антитела, оставшегося на носителе, стадию промывки модифицированного антитела, не оставшегося на носителе, и стадию элюирования, состоящую из элюирования модифицированного антитела, оставшегося на носителе стадии удерживания.

Более конкретно, на стадии модификации антитела модифицированное антитело получают в виде смеси, содержащей немодифицированное антитело, не модифицированное линкером для модификации антитела, моновалентное антитело и бивалентное антитело, а на стадии

очистки антитела первую композицию антитела, содержащую относительно большие количества немодифицированного антитела и моновалентного антитела, и композицию второго антитела, содержащую относительно большое количество бивалентного антитела, соответственно элюируют, используя разницу во взаимодействии немодифицированного антитела, моновалентного антитела и бивалентного антитела со связывающими иммуноглобулин белками. То есть на стадии удерживания и стадии промывки среди стадий очистки антител элюируют вторую композицию антител, содержащую относительно большое количество модифицированного пептидом антитела (бивалентного антитела), имеющего низкую степень взаимодействия с иммуноглобулин-связывающими белками, и, на стадии элюирования среди стадий очистки антител элюируют первую композицию антител, содержащую относительно большое количество модифицированного пептидом антитела (немодифицированного антитела и моновалентного антитела), имеющего высокую степень взаимодействия с иммуноглобулин-связывающими белками. Используемый в данном документе термин «содержащий относительно большое количество немодифицированного антитела и моновалентного антитела» означает, что общее количество немодифицированного антитела и моновалентного антитела, содержащихся в первой композиции антител, больше, чем количество бивалентного антитела, содержащегося в композиции антитела, предпочтительно, чтобы общее количество немодифицированного антитела и моновалентного антитела составляло не менее 55%, не менее 63%, не менее 70%, не менее 80% или не менее 90% от общего количества (100%) немодифицированного антитела и модифицированного антитела, содержащихся в композиции антитела. Кроме того, «содержащий относительно большое количество бивалентного антитела» означает, что количество бивалентного антитела, содержащегося во второй композиции антитела, больше, чем количество моновалентного антитела, содержащегося в композиции антитела, предпочтительно, чтобы количество бивалентного антитела было не менее чем 55%, не менее чем 63%, не менее чем 70%, не менее чем 80% или не менее чем 90% от общего количества (100%) немодифицированного антитела и модифицированного антитела, содержащихся в композиции антитела.

[0096]

На стадии удерживания раствор, содержащий смесь немодифицированного антитела, моновалентного антитела и бивалентного антитела, полученного на стадии модификации антитела, добавляют в колонку, и немодифицированное антитело и моновалентное антитело, удерживаемые на носителе, остаются на колонке, а бивалентный антитело, не удерживаемое на носителе, проходит через колонку. Раствор, прошедший через стадию удерживания, составляет часть второй композиции антител. Чтобы облегчить удержание немодифицированного антитела и моновалентного антитела на колонке и предотвратить их агрегацию или денатурацию, предпочтительно разбавляют смешанный раствор антитела, модифицированного пептидом, подходящим растворителем для разведения и добавляют его в колонку. Растворитель для разведения ничем особо не ограничивается при условии, что модифицированное пептидом антитело растворяется и

легко не агрегирует или не денатурирует в растворителе, а также в воде, солевом растворе, буферах, таких как ацетатно-натриевый буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, 2-амино-2-(гидроксиэтил)пропан-1,3-диоловый (трис) буфер, 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил]этансульфонокислотный (HEPES) буфер и т. п., и т. п. может быть использовано. Предпочтительно используется любой из вышеупомянутых буферов, более предпочтительно натрий-ацетатный буфер. Когда буфер используется в качестве растворителя для разбавления, концентрация буферного агента составляет не менее 10 ммоль/л, предпочтительно не менее 15 ммоль/л, более предпочтительно не менее 20 ммоль/л в качестве нижнего предела, и не более 1000 ммоль/л, предпочтительно не более 500 ммоль/л, более предпочтительно не более 100 ммоль/л в качестве верхнего предела. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания бивалентного антитела и пептида для модификации антитела, с носителем колонки элюирующий растворитель может содержать добавку, такую как хлорид натрия, хлорид калия и т. п. Концентрация добавки, содержащейся в элюирующем растворителе, ничем особо не ограничена и может составлять, например, 0,15 моль/л.

[0097]

На стадии промывки модифицированное антитело, оставшееся в колонке, элюируют из колонки с использованием промывочного растворителя. Раствор, прошедший через колонку на вышеупомянутой стадии удерживания, и раствор, элюированный из колонки на стадии промывки, содержат относительно большое количество бивалентного антитела, и, следовательно, их можно объединить и использовать в качестве второй композиции антител.

Растворитель для промывки ничем особо не ограничивается при условии, что антитело, модифицированное пептидом, растворяется и не агрегирует или не денатурирует легко в растворителе, и это буфер, имеющий подходящую буферную способность по pH, и можно использовать такие буферы, как ацетатно-натриевый буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер, 2-амино-2-(гидроксиэтил)пропан-1,3-диоловый (трис) буфер, 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил]этансульфонокислотный (HEPES) буфер и т. п., и т. п. Предпочтительно используется любой из вышеупомянутых буферов, более предпочтительно натрий-ацетатный буфер. Концентрация буферного агента, используемого в качестве промывочного растворителя, составляет не менее 20 ммоль/л, предпочтительно не менее 30 ммоль/л в качестве нижнего предела и не более 200 ммоль/л, предпочтительно не более 70 ммоль/л в качестве верхнего предела. pH промывочного растворителя составляет не менее 4,0, предпочтительно не менее 4,5, более предпочтительно не менее 4,8 в качестве нижнего предела и не более 7,4, предпочтительно не более 6,0, более предпочтительно не более 5,2 в качестве верхнего предела. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания бивалентного антитела и пептида для модификации антитела с носителем колонки элюирующий растворитель может содержать добавку, такую как хлорид натрия, хлорид калия и т. п. Концентрация добавки, содержащейся в элюирующем растворителе, ничем особо не ограничена и может

составлять, например, 0,15 моль/л.

[0098]

На стадии элюирования модифицированное антитело, оставшееся на носителе, элюируют из колонки с использованием элюирующего растворителя. То есть первую композицию антител, содержащую относительно большое количество немодифицированного антитела и моновалентного антитела, элюируют из колонки с использованием растворителя для элюирования.

В качестве элюирующего растворителя можно использовать буфер, такой как ацетатно-натриевый буфер, ацетатно-аммонийный буфер, цитратный буфер и т. п. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания с линкером для модификации антител, немодифицированным антителом и носителем колонки с модифицированным антителом, элюирующий растворитель может содержать добавку, такую как хлорид натрия, хлорид калия и т. п. Концентрация добавки, содержащейся в элюирующем растворителе, ничем особо не ограничена и может составлять, например, 0,15 моль/л.

Когда элюирующий растворитель содержит буферный агент, концентрация буферного агента составляет не менее 20 ммоль/л, предпочтительно не менее 30 ммоль/л в качестве нижнего предела и не более 200 ммоль/л, предпочтительно не более 70 ммоль/л в качестве верхнего предела. Кроме того, для ослабления взаимодействия между немодифицированным антителом и моновалентным антителом и иммуноглобулин-связывающим белком, а также для предотвращения денатурации и агрегации антител рН элюирующего растворителя должно составлять не менее рН 3,0 в качестве нижнего предела, и не более рН 4,2 в качестве верхнего предела.

[0099]

Композицию первого антитела или композицию второго антитела, полученную на стадии очистки антител, можно использовать в том виде, в каком она есть, для клик-реакции на последующей стадии (В) или ее можно использовать для клик-реакции на стадии (В) после корректировки концентрации белка модифицированного пептидом антитела.

[0100]

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

[0101]

Когда антитело, модифицированное пептидом, и комплекс, полученный на стадии (А), способны к клик-реакции, порядок их добавления не имеет значения. Например, одно из числа комплекса и модифицированного пептидом антитела добавляют в реакционный контейнер, содержащий растворитель, а затем добавляют другое для проведения реакции, или одно из числа хелатирующего агента и антитела диспергируют в растворителе и другое

добавляют к дисперсии для проведения реакции. Альтернативно, они могут быть одновременно добавлены в реакционный контейнер, содержащий растворитель, для проведения реакции.

[0102]

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

[0103]

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

[0104]

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

[0105]

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

более предпочтительным.

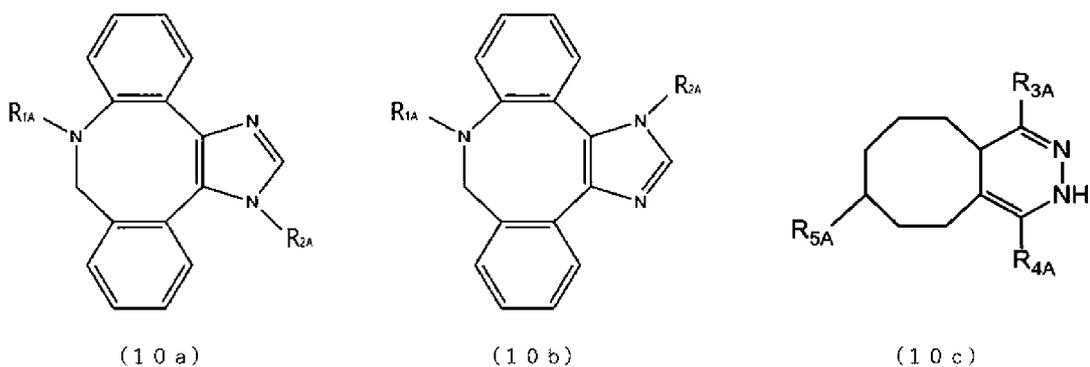
[0106]

Полученный конъюгат можно использовать в чистом виде или очистить с помощью фильтрующего фильтра, мембранного фильтра, колонки с различными наполнителями, хроматографии и т. п.

[0107]

В конъюгате, полученном на стадиях (А) и (В), специфический сайт гуманизованного антитела, который специфически связывается с MUC5AC (например, остаток лизина в Fc-области антитела), специфически модифицируют хелатирующим агентом. Этот конъюгат содержит одну или две молекулы вышеупомянутого хелатирующего агента на одну молекулу антитела. Хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела по настоящему изобретению через линкер. Линкер состоит из хелатного линкера, который соединяется с хелатирующим агентом, первой атомной группы, которая соединяется с линкером, второй атомной группы, которая может осуществлять клик-реакцию с первой атомной группой, и линкера для модификации антитела, который соединяется со второй атомной группой (включая пептид для модификации антитела, представленный вышеупомянутой формулой (i)). Следовательно, линкер имеет химическую структуру, производную от первой атомной группы и второй атомной группы. В качестве такой химической структуры можно рассматривать структуру, содержащую триазольный скелет, представленную указанной ниже формулой (10a) или (10b), или структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную указанной ниже формулой (10c). Поскольку формула (10a) и формула (10b) являются изомерами, они могут содержаться в любом соотношении.

[0108]



[0109]

В формуле (10a) и формуле (10b) R1A представляет собой сайт связывания с хелатным линкером, а R2A представляет собой сайт связывания с линкером, модифицирующим антитело. В формуле (10c) один из R3A и R4A представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридинильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с хелатным линкером, а R5A представляет собой сайт

связывания с линкером для модификации антитела.

[0110]

(1-5) Радиофармацевтическое соединение

Конъюгаты, полученные указанными выше способами (1-4), также можно использовать как есть или после очистки для получения радиофармацевтических соединений, содержащих конъюгат в качестве активного ингредиента. Радиофармацевтическое соединение относится к композиции, содержащей конъюгат по настоящему изобретению, а именно гуманизированное анти-MUC5AC антитело, меченное радионуклидом (нуклид металла, испускающий α -частицы) или его производным, и в форме, подходящей для введения в организм объекта. Радиофармацевтическое соединение может быть получено, например, путем растворения конъюгата по настоящему изобретению, полученного вышеупомянутым способом, в растворителе, состоящем в основном из воды и по существу изотоническом с живым организмом. В этом случае радиофармацевтическое средство предпочтительно находится в форме водного раствора и при необходимости может содержать другие фармацевтически приемлемые компоненты. Эффективное количество радиофармацевтического средства вводят перорально или парентерально, например, внутривенно, подкожно, внутривентриально, внутримышечно и т. п., вводят в живой организм и используют для лечения заболевания, диагностики заболевания, обнаружения поражения, или т. п.

В контексте настоящего документа объектом введения является человек или животное, такое как мышь, крыса, обезьяна, морская свинка, шимпанзе, овца, коза, собака, кошка, свинья, крупный рогатый скот, лошадь и т. п., но объект ничем конкретно не ограничен. Предпочтительным является человек.

В качестве предпочтительного целевого заболевания можно указать онкологическое заболевание. Примеры онкологического заболевания, подлежащего обработке и диагностике с помощью настоящего изобретения, включают рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак печени, колоректальный рак, рак желудка, уротелиальный рак, рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичников и карциному эндометрия, и, в частности, применение к раку поджелудочной железы является предпочтительным.

[0111]

Примеры онкологического заболевания, подлежащего лечению и диагностике по настоящему изобретению, также включают рак желчных протоков.

[0112]

Имеется множество сообщений о том, что MUC5AC является носителем антигена для CA19-9 (PLoS ONE (December 2011, Volume 6, Issue 12, e29180, p1-10)). Следовательно, примеры онкологического заболевания, подлежащего обработке по настоящему изобретению, также включают рак желчевыводящих путей, рак матки, рак легких и рак пищевода со сверхэкспрессией CA19-9, и их можно эффективно обрабатывать.

[0113]

Используемый в данном документе термин «эффективное количество» представляет

собой количество, которое может обеспечить полезные терапевтические эффекты у объекта, которому его вводят. Эффективное количество, вводимое объекту, варьирует в зависимости от типа объекта, массы тела объекта, лекарственной формы (таблетка, инъекция и т. п.) и пути введения (пероральное введение, парентеральное введение и т. д.), тяжести заболевания (например, онкологическое заболевание) и т. п. Врачи и ветеринары могут учитывать эти факторы и определять подходящее эффективное количество.

[0114]

Путем выбора радионуклида, обладающего терапевтическим эффектом, конъюгат по настоящему изобретению может быть использован для направленной радионуклидной терапии (внутренняя RI-терапия). При внутренней RI-терапии радиофармацевтическое средство вводят внутривенно или перорально, это радиофармацевтическое средство накапливается в месте поражения, таком как первичное злокачественное поражение или метастатическое поражение, и злокачественные опухолевые клетки в месте поражения разрушаются излучением, испускаемым радиофармацевтическим соединением. Следовательно, конъюгат по настоящему изобретению можно предпочтительно использовать для внутренней RI-терапии онкологического заболевания. В этом случае количество вводимой радиоактивности и дозу фармацевтического соединения подбирают соответствующим образом в зависимости от эффективности активного ингредиента, формы и пути введения, стадии прогрессирования заболевания (в частности, онкологического заболевания), формы тела, массы тела, возраста пациента, а также вида и количества другого терапевтического агента, используемого в комбинации для лечения заболевания. Как правило, его можно вводить в дозе не более 250 кБк/кг однократно. Эффект может проявляться даже при дозе не более 80 кБк/кг однократно.

[0115]

Кроме того, в качестве другого воплощения настоящего изобретения радиофармацевтическое средство, содержащий вышеупомянутый конъюгат, в котором только радионуклид заменен на, из числа нуклидов, излучающих α -частицы, радионуклиды (^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{111}In), испускающим позитрон или γ -излучение в качестве активного ингредиента может быть приготовлено и использовано для диагностики онкологического заболевания в вышеупомянутой внутренней RI-терапии онкологического заболевания. Радиофармацевтическое средство для диагностики онкологических заболеваний по настоящему изобретению может быть использовано для диагностики перед проведением внутренней RI-терапии онкологического заболевания или может быть использовано для диагностики после проведения внутренней RI-терапии онкологического заболевания. При использовании для диагностики перед проведением внутренней RI-терапии онкологического заболевания средство можно использовать для определения выбора обработки, следует ли проводить внутреннюю RI-терапию онкологического заболевания с использованием конъюгата по настоящему изобретению с нуклидом металла, испускающим α -частицы. Кроме того, при использовании для диагностики после проведения внутренней RI-терапии онкологического заболевания средство может быть

использовано для определения эффекта внутренней RI-терапии онкологического заболевания с использованием конъюгата по настоящему изобретению с нуклидом металла, испускающим α -частицу, и для оптимизации плана обработки, такого как увеличение или уменьшение дозы и т. п.

[0116]

(2) Конъюгат 2

В другом воплощении настоящее изобретение обеспечивает конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где указанный выше радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий позитрон, а указанное выше антитело представляет собой гуманизированное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC.

[0117]

Применяется то же определение, что и в вышеупомянутом «(1) Конъюгате 1», за исключением того, что радионуклид в хелатирующем агенте представляет собой нуклид металла, испускающий позитрон.

Нуклид металла, испускающий позитрон, может быть нуклидом, испускающим положительно заряженный электрон (позитрон) в процессе распада радиоактивного металла. В частности, предпочтительно используются ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{89}Zr и т. п., и более предпочтительным является ^{89}Zr (цирконий-89). Антитело, меченное нуклидом, испускающим позитроны, можно использовать для исследований с помощью PET (позитронно-эмиссионной томографии).

Кроме того, конъюгат 2, использующий испускающий позитрон нуклид в качестве радионуклида, также может быть использован в качестве радиофармацевтического средства для диагностики онкологического заболевания для внутренней RI-терапии с использованием вышеупомянутого конъюгата 1, использующего нуклид, излучающий α -частицы, в качестве радионуклида. В этом случае доза фармацевтического средства ничем особо не ограничено, если она является необходимой и достаточной для изображения очага заболевания (в частности, онкологического заболевания) при PET-исследовании. Доза предпочтительно подбирается в соответствии со стадией прогрессирования заболевания (в частности, онкологического заболевания), формой тела, массой тела, возрастом пациента, а также видом и количеством другого терапевтического агента, используемого в комбинации для лечения заболевания.

[0118]

В соответствии с воплощением настоящего изобретения, описанным выше, обеспечивается анти-MUC5AC антитело, в частности, гуманизированное антитело, меченное радионуклидом, в частности нуклидом, испускающим α -частицы, который превосходит по специфичности в отношении MUC5AC и накоплению в опухоли.

Кроме того, в соответствии с воплощением настоящего изобретения предлагается анти-MUC5AC антитело, меченное RI, которое позволяет диагностировать онкологическое заболевание и/или обрабатывать онкологическое заболевание для достижения тераностики.

[0119]

Вышеупомянутый вариант осуществления настоящего изобретения включает следующие технические идеи.

[1] Конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицы, а антитело представляет собой гуманизованное антитело, специфически связывающееся с MUC5AC.

[2] Конъюгат указанного выше [1], где антитело представляет собой гуманизованное антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, состоящую из

- (1) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01),
 - (2) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (H01),
 - (3) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 (H03), или
 - (4) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 (H03), или
- переменной области легкой цепи, состоящей из
- (5) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 (H01),
 - (6) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (H01),
 - (7) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (H03), или
 - (8) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 (L04).

[3] Конъюгат вышеупомянутого [2], где антитело представляет собой гуманизованное антитело, имеющее

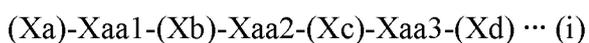
- (1) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01), и
- (7) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (L03).

[4] Конъюгат любого из вышеупомянутых [1]-[3], где нуклид металла, испускающий α -частицу, представляет собой актиний-225.

[5] Конъюгат любого из указанных выше [1]-[4], содержащий не менее 1 молекулы и не более 8 молекул хелатирующего агента на 1 молекулу антитела.

[6] Конъюгат любого из вышеупомянутых [1]-[5], где хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела через линкер.

[7] Конъюгат указанного выше [6], где линкер содержит пептид для модификации антитела, состоящий не менее чем из 13 и не более чем из 17 аминокислотных остатков и представленный следующей формулой (i);



где Xa, Xb, Xc и Xd каждый представляет собой непрерывный X в количестве a, непрерывный X в количестве b, непрерывный X в количестве c и непрерывный X в количестве d, соответственно,

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

a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число от не менее единицы

и не более 5 и удовлетворяют требованиям $a+b+c+d \leq 14$,

Каждый из Хаа1 и Хаа3 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-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту.

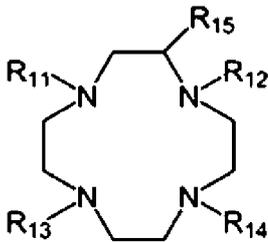
[8] Конъюгат указанного выше [7], где пептид для модификации антитела, представляет собой пептид формулы (i), где Хаа2 представляет собой остаток лизина.

[9] Конъюгат в соответствии с указанными выше [7] или [8], где пептид для модификации антитела, содержит пептид для модификации антитела, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 (где Хаа2 представляет собой лизиновый остаток).

[10] Конъюгат любого из вышеупомянутых [1]-[9], где хелатирующий агент имеет структуру, производную от соединения, представленного следующей формулой (A), или его соли:

[0120]

(A)



[0121]

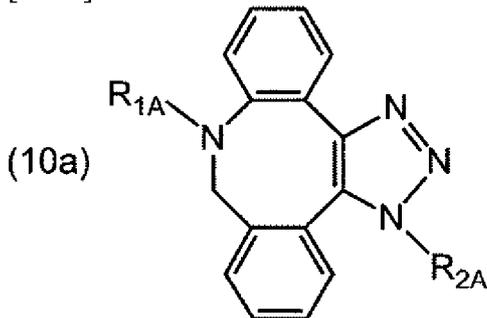
где в формуле (A) каждый из R11, R13 и R14 независимо представляет собой группу, состоящую из $-(CH_2)_pCOOH$, $-(CH_2)_pC_5H_5N$, $-(CH_2)_pPO_3H_2$, $-(CH_2)_pCONH_2$ или $-(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$, один из R12 и R15 представляет собой атом водорода, карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, имеющую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, p представляет собой целое число не менее 0 и не больше 3, R15 представляет собой атом водорода, когда R12 представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, и R15 представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, когда R12 не является заместителем для конъюгации с антителом.

[11] Конъюгат любого из вышеупомянутых [6]-[10], в котором хелатирующий агент

сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела через линкер, линкер имеет связанную группу, образованную клик-реакцией.

[12] Конъюгат по вышеуказанному [11], где линкер имеет хелатный линкер, который соединяет хелатирующий агент и связанную группу, образованную клик-реакцией, и линкер для модификации антитела, который соединяет антитело и связанную группу, образованную клик-реакцией, и связанная группа, образованная клик-реакцией, содержит структуру, содержащую триазольный скелет, представленную следующей формулой (10a), или структуру, содержащую пиридазиновый скелет:

[0122]



[0123]

где R1A представляет собой сайт связывания с хелатным линкером, а R2A представляет собой сайт связывания с линкером, модифицирующим антитело.

[13] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат любого из вышеупомянутых [1]-[12] в качестве активного ингредиента.

[14] Радиофармацевтическое средство из вышеупомянутого [13], которое используется для внутренней RI-терапии онкологического заболевания.

[15] Радиофармацевтическое средство из вышеперечисленных [14], которое вводят объекту в дозе не более 250 кБк/кг однократно при внутренней RI-терапии.

[16] Радиофармацевтическое средство указанного выше [15], где доза не более 80 кБк/кг однократно.

[17] Радиофармацевтическое средство для диагностики онкологических заболеваний при внутренней RI-терапии с использованием радиофармацевтического средства по любому из вышеупомянутых [14]-[16], которое представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитело, где антитело представляет собой гуманизованное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC.

[18] Конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий позитрон, а антитело представляет собой гуманизованное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC.

[19] Конъюгат указанного выше [18], где антитело представляет собой гуманизованное антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, состоящую из (1) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01),

- (2) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (H01),
- (3) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 (H03), или
- (4) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 (H03), или
вариабельной области легкой цепи, состоящей из
- (5) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 (H01),
- (6) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (H01),
- (7) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (H03), или
- (8) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 (L04).

[20] Конъюгат вышеупомянутого [19], где антитело представляет собой гуманизированное антитело, имеющее

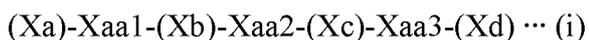
- (1) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01), и
- (7) вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (L03).

[21] Конъюгат любого из вышеупомянутых [18]-[20], где нуклид металла, испускающий позитрон, представляет собой цирконий-89.

[22] Конъюгат любого из указанных выше [18]-[21], содержащий 1-8 молекул хелатирующего агента на 1 молекулу антитела.

[23] Конъюгат любого из вышеупомянутых [18]-[21], где хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела через линкер.

[24] Конъюгат указанного выше [23], где линкер содержит пептид для модификации антитела, состоящий не менее чем из 13 и не более чем из 17 аминокислотных остатков и представленный следующей формулой (i);



где Xa, Xb, Xc и Xd каждый представляет собой непрерывный X в количестве a, непрерывный X в количестве b, непрерывный X в количестве c и непрерывный X в количестве d, соответственно,

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

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

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 галоацетильную 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.

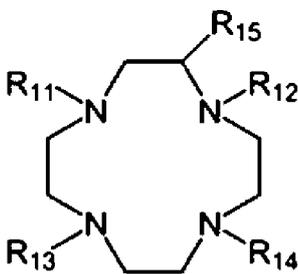
[25] Конъюгат указанного выше [24], где пептид для модификации антитела, представляет собой пептид формулы (i), где Хаа2 представляет собой остаток лизина.

[26] Конъюгат вышеупомянутых [24] или [25], где пептид для модификации антитела, содержит пептид для модификации антитела, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 (где Хаа2 представляет собой лизиновый остаток).

[27] Конъюгат любого из вышеупомянутых [18]-[26], где хелатирующий агент имеет структуру, полученную из соединения, представленного следующей формулой (A), или его соли:

[0124]

(A)



[0125]

где в формуле (A) каждый из R11, R13 и R14 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 R12 и R15 представляет собой атом водорода, карбоксильную группу или карбоксиалкильную группу, имеющую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, p представляет собой целое число не менее 0 и не больше 3, R15 представляет собой атом водорода, когда R12 представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, и R15 представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, когда R12 не является заместителем для конъюгации с антителом.

[28] Радиофармацевтическое средство, содержащий конъюгат любого из вышеупомянутых [18]-[27] в качестве активного ингредиента.

[29] Способ получения конъюгата любого из вышеупомянутых [1]-[12] и [18]-[27], включающий стадию конъюгации хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и анти-MUC5AC антитело для получения конъюгата хелатирующего агента и анти-MUC5AC антитела.

[30] Способ получения, указанный выше [29], где хелатирующий агент соединен с хелатным линкером, причем анти-MUC5AC антитело имеет Fc-область, специально модифицированную линкером для модификации антитела, снабженным пептидом для модификации антитела, а хелатный линкер и линкер для модификации антитела, соединяются путем проведения клик-реакции на стадии конъюгации.

[31] Модифицированное антитело с Fc-областью антитела, специфически модифицированное линкером для модификации антитела, снабженным пептидом для модификации антитела, где антитело представляет собой анти-MUC5AC антитело, а линкер для модификации антитела имеет атомную группу для соединения с хелатным линкером хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом с помощью клик-реакции.

[32] Способ получения модифицированного антитела, где Fc-область антитела специфически модифицирована линкером для модификации антитела, снабженным пептидом для модификации антитела, включающий

стадию модификации антитела, заключающуюся в сайт-специфической модификации Fc-области антитела с помощью линкера, снабженного пептидом для модификации антитела, с получением модифицированного антитела, и

стадию очистки антитела, заключающаяся в очистке антитела с использованием носителя с иммобилизованным на нем иммуноглобулин-связывающим белком, где антитело представляет собой анти-MUC5AC антитело.

[33] Способ получения, указанный выше [32], где иммуноглобулин-связывающий белок представляет собой протеин А или генетически модифицированный протеин А.

[34] Способ получения в соответствии с указанными выше пунктами [32] или [33], где стадию очистки антител проводят с использованием колонки, заполненной носителем.

[35] Способ получения любого из вышеупомянутых [32]-[34], где стадия очистки антитела включает стадию удержания модифицированного антитела на носителе, и стадию элюирования модифицированного антитела, оставшегося на носителе.

[36] Способ получения по вышеуказанному [35], где модифицированное антитело получают в виде смеси, содержащей немодифицированное антитело, не модифицированное линкером для модификации антитела, моновалентное антитело, модифицированное одной молекулой линкера для модификации антитела относительно одной молекуле антитела, и бивалентное антитело, модифицированное двумя молекулами линкера для модификации антитела относительно одной молекуле антитела на стадии модификации антитела, и

первую композицию антител, содержащую относительно большие количества немодифицированного антитела и моновалентного антитела, и вторую композицию антител, содержащую относительно большое количество бивалентного антитела, соответственно получают используя разницу во взаимодействии немодифицированного антитела, моновалентного антитела и бивалентного антитела с иммуноглобулин-связывающими белками на стадии очистки антитела.

[37] Способ получения конъюгата, включающий стадию получения модифицированного антитела, заключающуюся в выполнении способа получения по любому из вышеупомянутых [32]-[36] для получения модифицированного антитела, и стадию конъюгирования, заключающуюся в конъюгировании модифицированного антитела и хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, для получения конъюгата хелатирующего агента и модифицированного антитела.

[38] Способ получения по вышеуказанному [37], где первая композиция антитела, в

которой доля общего количества немодифицированного антитела, не модифицированного линкером для модификации антитела, и моновалентного антитела, модифицированного одной молекулой линкера для модификации антитела, относительно одной молекулы антитела, больше, чем у бивалентного антитела, модифицированного двумя молекулами линкера для модификации антитела относительно одной молекулы антитела, получена на стадии получения модифицированного антитела, и

конъюгат хелатирующего агента и моновалентного антитела образуется на стадии конъюгации.

[39] Способ получения по вышеуказанному пункту [37], где вторая композиция антитела, в которой доля бивалентного антитела, модифицированного двумя молекулами линкера для модификации антитела, по отношению к одной молекуле антитела превышает общее количество немодифицированного антитела, не модифицированного линкером для модификации антитела, и моновалентного антитела, модифицированного одной молекулой линкера для модификации антитела, относительно одной молекулы антитела, получена на стадии получения модифицированного антитела, и

конъюгат хелатирующего агента и бивалентного антитела образуется на стадии конъюгации.

[40] Способ получения любого из вышеупомянутых [37]-[39], где хелатирующий агент соединяется с хелатным линкером, а хелатный линкер и линкер для модификации антитела соединяются путем проведения клик-реакции на стадии конъюгации.

[41] Набор для получения конъюгата хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, включающий (1) хелатирующий агент, способный хелатировать радионуклид, и (2) анти-MUC5AC антитело, где конъюгат представляет собой конъюгат любого из вышеупомянутых [1]-[12] и [18]-[27].

[42] Набор по [41], дополнительно содержащий (1) первую атомную группу, способную к клик-реакции, и (2) вторую группу атомов, способную к клик-реакции.

[43] Набор по [41], дополнительно содержащий радионуклид, способный к хелатированию с хелатирующим агентом.

[0126]

В соответствии с радиофармацевтическим соединением по вышеупомянутому [14], поскольку в качестве активного ингредиента содержится конъюгат, содержащий гуманизированное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC, и нуклид металла, испускающий α -частицу, при использовании для внутренней RI-терапии онкологического заболевания, соединение накапливается специфически в опухолях, экспрессирующих MUC5AC, и может облучать α -частицами специфически опухолевые клетки, не затрагивая нормальные клетки, благодаря чему достигается более высокая безопасность и более высокий терапевтический эффект.

В соответствии с радиофармацевтическим соединением по вышеупомянутому [28], поскольку соединение содержит конъюгат, содержащий гуманизированное антитело, которое специфически связывается с MUC5AC, и нуклид металла, испускающий позитрон,

в качестве активного ингредиента, оно подходит для PET-исследования. Кроме того, поскольку оно обладает тем же свойством накопления, что и радиофармацевтическое соединение, используемое для внутренней RI-терапии по вышеупомянутому [14], оно может быть эффективно использовано в качестве диагностического радиофармацевтического соединения для внутренней RI-терапии онкологического заболевания, экспрессирующего MUC5AC.

В соответствии с вышеупомянутым способом получения конъюгата по вышеупомянутому [29], поскольку способ включает стадию образования конъюгата при конъюгировании хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и анти-MUC5AC антитела, конъюгат может быть эффективно получен путем предотвращения денатурации антитела, не подвергая анти-MUC5AC антитело стадии хелатирования, что является более тяжелым состоянием для антитела.

В соответствии с вышеупомянутым способом получения конъюгата по вышеупомянутому [30], поскольку клик-реакция включена в стадию образования конъюгата, конъюгат может быть получен в буферном растворе в чрезвычайно мягких условиях комнатной температуры, и конъюгат может быть получен эффективно без денатурации анти-MUC5AC антитела.

В соответствии с модифицированным антителом по вышеупомянутому [31], поскольку Fc-область анти-MUC5AC антитела специфически модифицирована линкером для модификации антитела, модифицированное антитело можно использовать в клик-реакции относительно хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, не нарушая антигенсвязывающей способности анти-MUC5AC антитела.

В соответствии со способом получения модифицированного антитела в соответствии с указанным выше [32], поскольку способ включает стадию модификации антитела, заключающуюся в сайт-специфической модификации Fc-области анти-MUC5AC антитела с помощью линкера, снабженного пептидом для модификации антитела, для получения модифицированного антитела, и стадию очистки антитела, заключающийся в очистке вышеупомянутого антитела с использованием носителя с иммобилизованным на нем иммуноглобулин-связывающим белком, чистота модифицированного антитела может быть дополнительно повышена.

В соответствии со способом получения конъюгата по вышеупомянутому [38] или [39], поскольку стадия образования конъюгата осуществляется с использованием конъюгата антитела, в котором доля либо моновалентного антитела, либо бивалентного антитела выше, чем доля другого, количество хелатирующих агентов, которые связываются с анти-MUC5AC антителом, можно регулировать в соответствии с целью, и конъюгат, имеющий желаемую валентность, может быть получен с более высокой чистотой.

В соответствии с набором по вышеупомянутому [41], поскольку конъюгат любого из [1]-[12] и [18]-[27] может быть приготовлен во время использования путем взаимодействия конъюгата хелатирующего агента, способного хелатировать радионуклид и антитело с радионуклидом в требуемый временной период, эффективная обработка или

диагностика возможны без ухудшения как периода полураспада радионуклида, так и активности антител.

В соответствии с набором по вышеупомянутому [42], поскольку конъюгат, содержащий хелатирующий агент, способный хелатировать радионуклид, и атомную группу для клик-реакции, и конъюгат, содержащий антитело, и атомную группу для клик-реакции, предоставляются отдельно, конъюгат любого из [1]-[12] и [18]-[27] может быть приготовлен во время использования путем хелатирования радионуклида хелатирующим агентом и его клик-реакции в требуемый временной период, а эффективная обработка или диагностика возможны без ухудшения как периода полураспада радионуклида, так и активности антител.

[0127]

Настоящее изобретение подробно поясняется далее со ссылками на Примеры и т. п. Настоящее изобретение не ограничивается этим.

[Пример]

[0128]

Пример получения 1: Получение гуманизированного анти-MUC5AC антитела

Аминокислотные последовательности различных переменных областей, к которым была добавлена сигнальная последовательность, и аминокислотные последовательности различных константных областей были преобразованы в последовательности оснований с учетом использования кодонов, пригодных для экспрессии в клетках CHO. Последовательность Козак была добавлена к сайту иницирующего кодона сигнальной последовательности, а стоп-кодон был добавлен к С-концевой стороне константной области. Кроме того, сайты рестрикционных ферментов были добавлены выше последовательности Козак и ниже стоп-кодона, чтобы их можно было ввести в сайт переноса экспрессирующего гена экспрессирующей плазмиды для клеток млекопитающих (pcDNA3.4). Каждый сконструированный таким образом фрагмент ДНК был получен путем химического синтеза. Фрагмент ДНК, содержащий переменную область, представляющую собой желаемую Н-цепь и желаемую L-цепь, и фрагмент ДНК, содержащий константную область, лигировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами.

[0129]

Полученные гены различных антител подвергали обработке ферментами рестрикции, а затем очищали. Аналогично, плазмиду для транзиторной экспрессии в клетках млекопитающих (pcDNA3.4) также обрабатывали тем же рестрикционным ферментом и затем очищали. Оба фрагмента смешивали в соответствующем соотношении и лигировали. Раствор реакции лигирования смешивали с компетентными клетками *Escherichia coli* DH5 α для проведения трансформации. Полученные трансформанты подвергали ПЦР для отбора колоний, выделению одиночных колоний, мелкомасштабной экстракции плазмиды из культуральной среды и секвенированию нуклеотидов части вставки. Отбирали плазмиду (клон *Escherichia coli*), в которую сконструированный

полноразмерный ген антитела был правильно вставлен в предполагаемом направлении с помощью сконструированной последовательности (клон *Escherichia coli*). Отобранный клон *Escherichia coli* подвергали крупномасштабному культивированию и проводили экстракцию и очистку плазмиды, включая стадию удаления эндотоксина. Концентрацию очищенной плазмиды рассчитывали путем измерения оптической плотности при 260 нм.

[0130]

Транзиторную экспрессию клетками CHO осуществляли с использованием системы ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific). Из каждой из полученных экспрессирующих плазмид с Н-цепью и из каждой полученной экспрессирующей плазмиды с L-цепью отбирали одну Н-цепь и одну L-цепь для получения желаемой комбинации, трансфицировали способом липофекции, культивировали и поддерживали. Через 7-13 дней после трансфекции культуральную среду извлекали. Культуральные надосадочные жидкости после центрифугирования и фильтрации добавляли в колонку с протеином А и антитело очищали с помощью колоночной аффинной хроматографии (промывание после адсорбции, элюирование кислым буфером, нейтрализация элюата). Концентрацию очищенного антитела рассчитывали путем измерения поглощения при 280 нм.

[0131]

Следующие гуманизированные анти-MUC5AC антитела получали с использованием способа, описанного выше. Номера антител, присвоенные комбинациям варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, показаны ниже.

антитело 1: H01L03

антитело 2: H01L04

антитело 3: H02L04

антитело 4: H04L04

В данном контексте H01, H02 и H04 представляют собой варибельные области тяжелой цепи, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, L03 и L04 представляют собой варибельные области легкой цепи, соответственно представленные в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8. Антитела, использованные в следующих примерах, представляли собой комбинации константной области 1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 25) и константной области 1 легкой цепи (SEQ ID NO: 26), и варибельная область тяжелой цепи и варибельная область легкой цепи вышеупомянутого антитела 1 к антителу 4.

[0132]

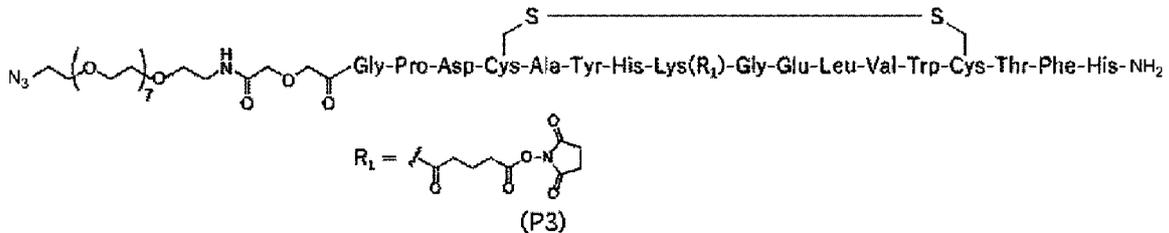
Пример получения 2: Сайт-специфическая модификация антитела пептидным линкером

(1) стадия модификации антител

Пептид для модификации антитела получали 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 Xaa2 из SEQ ID NO: 10

представлял собой остаток лизина, а концевая аминогруппа боковой цепи остатка лизина была модифицирована со структурой, показанной в R1. Кроме того, два остатка цистеина образуют дисульфидную связь друг с другом, и 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 PEG.

[0133]



[0134]

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.

[0135]

Смесь пептида и гуманизированного анти-MUC5AC антитела (антитело 1), полученного в примере получения 1 в натрий-ацетатном буфере (pH 6,0), подвергли реакции при комнатной температуре в течение 30 минут с получением раствора, содержащего антитело, модифицированное пептидом. Модифицированное пептидом антитело имеет Fc-область антитела, сайт-специфически модифицированного вышеуказанным пептидом.

[0136]

(2) Стадия разделения антител, модифицированных пептидами

Модифицированное пептидом антитело разводили 1 моль/л натрий-ацетатным буфером (pH 6,0), добавляли в колонку с протеином А (производства GE Healthcare, HiTrap MabSelect SuRe) и пропускали 0,05 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 5,7), содержащего 0,15 моль/л хлорида натрия. Модифицированное пептидом антитело (далее также называемое «бивалентное антитело»), в котором были модифицированы две молекулы пептида, было выделено, и концентрация была скорректирована таким образом, чтобы концентрация бивалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, составляла 15 мг/мл. После этого пропускали 0,05 моль/л ацетатно-натриевого буфера (pH 3,5), содержащего 0,15 моль/л хлорида натрия, извлекали модифицированное пептидом антитело (далее также именуемое «моновалентное антитело»), которое было модифицировано одной молекулой пептида, и концентрацию корректировали таким образом, чтобы концентрация моновалентного антитела, содержащегося в извлеченной

фракции, составляла 15 мг/мл.

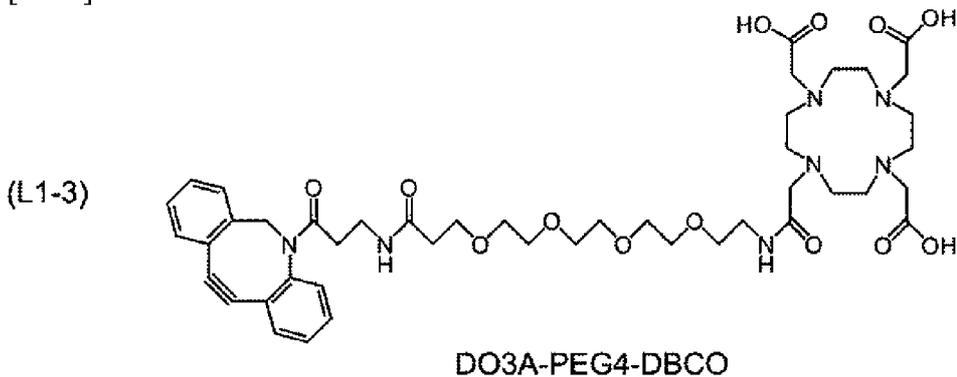
[0137]

Пример 1: Получение ^{225}Ac -меченного гуманизированного анти-MUC5AC антитела (^{225}Ac -меченного моновалентного антитела) - 1

(1) стадия синтеза хелатирующего агента

Структура хелатного сайта (производства Iris Biotech GmbH), используемого в этом примере, представлена следующей формулой (L1-3). Хелатный сайт растворяли в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 6,0), используемого в качестве растворителя с получением раствора, содержащего 1,7 ммоль/л хелатного сайта. Реакционная смесь раствора (0,005 мл) и раствора, содержащего ион ^{225}Ac (0,2 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 300 МБк/мл, приготовленная из смеси, произведенной Окриджской национальной лабораторией, количество жидкости: 0,005 мл) 1,5 МБк (рассчитано по аттенюации на основе количества радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла, вступала в реакцию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение хелатного сайта к иону радиоактивного металла составляло хелатный сайт:ион ^{225}Ac =около 2000:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 90 мин.

[0138]



[0139]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}Ac измеряли следующим способом. А именно, часть раствора комплекса ^{225}Ac проявляли с помощью тонкослойной хроматографии (произведено Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), а затем измеряли радиоанализатором γ -TLC (производства Raytest, MODEL GITA Star). Процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи начала координат, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как радиохимическую чистоту (%) комплекса ^{225}Ac . В результате радиохимическая чистота комплекса ^{225}Ac составила 86%. Полученный комплексный раствор ^{225}Ac непосредственно использовали для следующей стадии мечения.

[0140]

(2) Стадия радиоактивного мечения

Элюат моновалентного антитела, полученного в Примере получения 2, и раствор комплекса ^{225}As , полученный на вышеупомянутой стадии (1), добавляли каждый к 0,02 моль/л (20 мМ) буфера, содержащего 0,09 моль/л аскорбиновой кислоты, ацетата натрия, и клик-реакцию при 37°C в течение 120 мин с получением моновалентного антитела, меченного ^{225}As . Количество комплекса ^{225}As и количество модифицированного пептидом антитела составляли 44 мкмоль и 46 мкмоль, соответственно, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляло около 1:1.

Кроме того, раствор моновалентного антитела, меченного ^{225}As , полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием фильтра для ультрафильтрации (производства Merck, номер модели: UFC505096) и подвергали последующим экспериментам. Радиохимическая чистота моновалентного антитела, меченного ^{225}As , после очистки (количество радиоактивности, рассчитанное путем аттенюации из количества радиоактивности на дату и время испытания: 0,303 МБк) составляла 93%, а радиохимический выход составлял 39%. Используемый в данном документе термин «радиохимическая чистота» представляет собой отношение (%) количества радиоактивности пика, соответствующего моновалентному антителу, меченному ^{225}As , к общему количеству радиоактивности тонкослойного планшета при анализе с помощью тонкослойной хроматографии, а радиохимический выход равен отношению (%) количества радиоактивности, рассчитанного по количеству радиоактивности меченного ^{225}As моновалентного антитела, к количеству радиоактивности, рассчитанному по количеству радиоактивности в начале процесса мечения, измеренному с помощью гамма-спектрометра (полупроводниковый детектор Ge: GMX10P4- 70 (производство ORTEC), многоканальный анализатор: M7-000 (производство SEIKO EG&G), обработка данных: Spectrum Navigator: DS-P300 (производство SEIKO EG&G) и Gamma Studio: DS-P600 (производство SEIKO EG&G)).

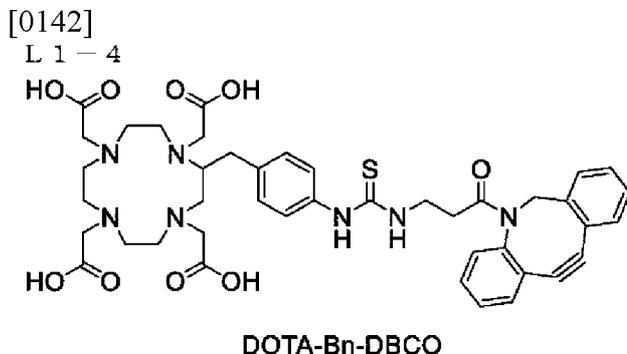
[0141]

Пример 2: Получение меченого ^{225}As гуманизованного анти-MUC5AC антитела (моновалентного антитела, меченного ^{225}As)-2

(1) стадия синтеза хелатирующего агента

Структура хелатного сайта, использованного в этом примере, представлена следующей формулой (L1-4). DOTA-Bn-DBCO, представленный формулой (L1-4), получали 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). Хелатный сайт растворяли в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0), используемого в качестве растворителя с получением раствора, содержащего 1,7 ммоль/л хелатного сайта. Реакционная смесь раствора (0,0025 мл) и раствора, содержащего ионы ^{225}As (0,2 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 432 МБк/мл, производства Oak Ridge National Laboratory, количество жидкости: 0,0025 мл) 1,08 МБк (рассчитанное по аттенюации по количеству радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла, и 0,1 моль/л буфера ацетата

натрия (рН 6,0, 0,0375 мл) вступала в реакцию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение хелатного сайта к иону радиоактивного металла составляло хелатный сайт:ион ^{225}Ac =около 2000:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C , а время нагревания устанавливали равным 90 мин.



[0143]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}Ac измеряли следующим способом. А именно, часть раствора комплекса ^{225}Ac проявляли с помощью тонкослойной хроматографии (произведено Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), а затем измеряли радиоанализатором γ -TLC (производства Raytest, MODEL GITA Star). Процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи начала координат, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как радиохимическую чистоту (%) комплекса ^{225}Ac . В результате радиохимическая чистота комплекса ^{225}Ac составила 98%. Полученный комплексный раствор ^{225}Ac непосредственно использовали для следующей стадии мечения.

[0144]

(2) Стадия радиоактивного мечения

Элюат моновалентного антитела, полученного в примере получения 2, и раствор комплекса ^{225}Ac , полученного на вышеупомянутой стадии (1), подвергали клик-реакции при 37°C в течение 120 минут с получением моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac . Количество комплекса ^{225}Ac и количество модифицированного пептидом антитела составляли 44 мкмоль и 46 мкмоль, соответственно, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляло около 1:1.

Кроме того, к раствору ^{225}Ac -меченого моновалентного антитела, полученного реакцией при 37°C в течение 120 мин, добавляли 90 ммоль/л натрий-ацетатного буфера, содержащего 20 ммоль/л аскорбиновой кислоты (рН 6,0), и смесь очищали с помощью фильтра для ультрафильтрации (производства Merck, номер модели: UFC505096) и подвергали последующим экспериментам. Радиохимическая чистота моновалентного антитела, меченого ^{225}Ac , после очистки (количество радиоактивности, рассчитанное путем аттенюации из количества радиоактивности на дату и время испытания: 0,231 МБк) составляла 86%, а радиохимический выход составлял 21%. Используемый в данном

документе термин «радиохимическая чистота» представляет собой отношение (%) количества радиоактивности пика, соответствующего ^{225}Ac -меченному моновалентному антителу, к общему количеству радиоактивности тонкослойного планшета при анализе с помощью тонкослойной хроматографии, а радиохимический выход равен соотношению (%) количества радиоактивности, рассчитанного по подсчету радиоактивности ^{225}Ac -меченого антитела, к количеству радиоактивности, рассчитанному по подсчету радиоактивности в начале вышеупомянутой стадии (1), измеренному с помощью спектрометра гамма-излучения (полупроводниковый детектор Ge: GMX10P4-70 (производство ORTEC), многоканальный анализатор: M7-000 (производство SEIKO EG&G), обработка данных: Spectrum Navigator: DS-P300 (производство SEIKO EG&G) и Gamma Studio: DS-P600 (производство SEIKO EG&G)).

[0145]

Пример 3: Получение меченого ^{225}Ac гуманизированного анти-MUC5AC антитела (бивалентного антитела, меченого ^{225}Ac)

Таким же образом, как в примере 2, за исключением того, что элюат бивалентного антитела, полученного в примере получения 2, использовали вместо элюата моновалентного антитела, получали ^{225}Ac -меченное бивалентное антитело. Полученная радиохимическая чистота ^{225}Ac -меченого бивалентного антитела (количество радиоактивности, рассчитанное путем аттенюации из количества радиоактивности на дату и время испытания: 0,168 МБк), составила 99%, а радиохимический выход составил 20%.

[0146]

Пример 4: Скрининг гуманизированного антитела с использованием In-111(^{111}In)-меченого антитела

Пример 4-1: Получение ^{111}In -меченого антитела

Чтобы найти анти-MUC5AC антитело с высокой способностью накапливаться в опухоли и высокой максимально переносимой дозой, различные антитела метили ^{111}In , вводили мышам с опухолью и выполняли визуализацию СPECT-СТ. Кумулятивное количество радиоактивности и поглощенная доза были рассчитаны и сопоставлены с использованием полученных изображений.

Используемые антитела представляли собой 4 типа гуманизированных анти-MUC5AC антител, полученных в примере получения 1, и 1 тип химерного анти-MUC5AC антитела, раскрытого в патентном документе 1, и они были помечены ^{111}In .

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно) химерного антитела, раскрытого в патентном документе 1, представлены ниже.

Мечение ^{111}In проводили на комплексах предшественника мечения, имеющего структуру, представленную следующей формулой, и различных антител.

[0147]

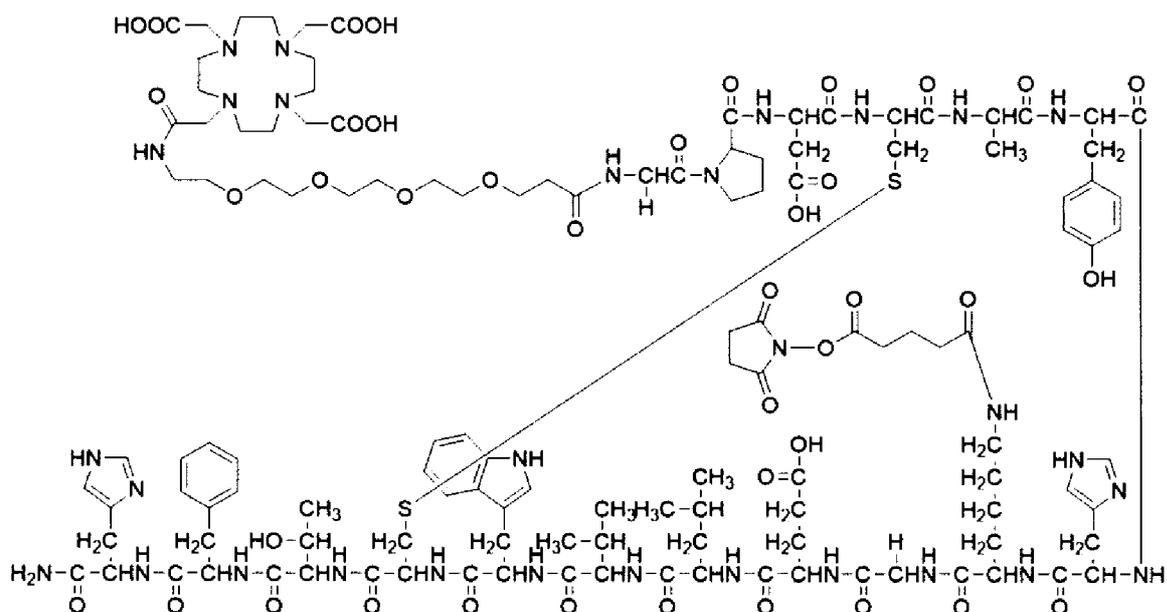
[вариабельная область тяжелой цепи]

EVKLVESGGVLVKSGGSLKLSCAVSGFTTFSNYGMSWVR
 QTRPKRLWVATISNSGRYTYFPDSVKGPFAISRDNAK
 NNIYLQMSLRSADTALYYCTRHLDYANYDAMDYWGQC
 TSVTVSS

[вариабельная область легкой цепи]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGQPPKLLLYLASNLESGVPDRFSGSGSGYDFY
 LNIPRVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK

[0148]



[0149]

Вышеупомянутый меченый предшественник имел структуру, в которой DOTA в качестве хелатного сайта связан с N-концом пептида для модификации антитела (пептид, содержащий 17 аминокислотных остатков, имеющих ту же последовательность, что и последовательность SEQ ID NO: 10 в которой Хаа2 представляет собой остаток лизина) через 8 полиэтиленгликолей, и связан с 252-м остатком лизина по нумерации EU в различных антителах через группу N-гидроксисукцинимидоэфира в структуре.

Этот меченый предшественник (450 мкг) растворяли в 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислотном буфере (pH 5,5) в качестве растворителя при концентрации 100 ммоль/л. Этот раствор смешивали с раствором, содержащим ионы ^{111}In (инъекция хлорида индия (^{111}In), производства Nihon Medi-Physics Co., Ltd.) в качестве источника радиоактивного металла при 10 МБк в качестве радиоактивного количества, и проводили реакцию мечения при 45°C в течение 120 мин.

[0150]

Радиохимический выход, радиохимическая чистота и количество радиоактивности, введенной животному различных антител, меченных ^{111}In , показаны в Таблице 1. Радиохимический выход в данном документе относится к количеству радиоактивности меченного ^{111}In антитела по отношению к количеству используемой радиоактивности ^{111}In .

Для измерения радиоактивности использовали калибратор дозы радиоизотопов (производства CAPINTEC, номер модели: CRC-15R). Радиохимическая чистота относится к отношению (%) пикового количества радиоактивности, соответствующего ^{111}In -меченому антителу, к общему количеству радиоактивности фильтровальной бумаги, которое анализируется с помощью хроматографии на фильтровальной бумаге. Для хроматографии на фильтровальной бумаге был разработан фильтр: производства ADVANTEC, номер модели: № 590, проявляющий растворитель: 0,01% EDTA, 50 мМ водный раствор лимонной кислоты и цитрата натрия, и количество радиоактивности определяли с помощью радиоанализатора γ -TLC (производства Raytest, МОДЕЛЬ GITA Star).

[0151]

Таблица 1

Информация о мечении ^{111}In (среднее \pm стандартное отклонение, n=4)

Название антитела	Химерное антитело	Гуманизированное антитело			
		H01L03	H01L04	H02L04	H04L04
Радиохимический выход (%)	99,0	96,3	93,6	91,0	94,0
Радиохимическая чистота(%)	100				
Введенное количество радиоактивности (МБк)	5,3 \pm 1,0	5,5 \pm 0,1	4,7 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 1,3

[0152]

Пример 4-2: Биораспределение с использованием мышей с опухолями

[0153]

(Способ получения мышей с опухолями)

Линию клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 ($0,7 \times 10^7$ клеток) вводили подкожно голым мышам Balb/c (самцам) от бока к спине.

Когда через 14 дней после трансплантации SW1990 размер опухоли достигал около 150-300 мм³, через хвостовую вену мышей вводили различные меченные ^{111}In антитела, полученные в примере 4-1. Объем опухоли рассчитывали по следующей расчетной формуле.

$$\text{объем опухоли} = (\text{малая ось опухоли}^2 \times \text{большая ось опухоли}) / 2$$

[0154]

Таблица 2

Информация о животных (при введении каждого меченого ^{111}In антитела)

Название антитела	Химерное антитело	Гуманизированное антитело			
		H01L03	H01L04	H02L04	H04L04

Объем опухоли (мм ³)	203±110	201±45	285±24	209±83	193±80
Масса тела (г)	23,2±1,3	23,4±0,6	23,5±0,7	22,1±1,7	21,2±1,8

(среднее±стандартное отклонение, n=4)

[0155]

(Способ оценки)

SPECT-СТ (аппарат SPECT-СТ для мелких животных: FX-3000, производства Trifoil) выполняли в условиях, указанных в таблице ниже. Временными точками для визуализации были 1, 6, 24, 48, 72 и 168 часов после введения. Реконструкцию изображения проводили способом OSEM для SPECT и способом FBP для СТ. Был выполнен анализ VOI (объем интереса, трехмерная ROI) опухоли и печени в каждый момент времени. Число импульсов на объем органа корректировали до %ID/г, физический период полураспада преобразовывали из ¹¹¹In в ²²⁵Ac, корректировали разницу в физическом периоде полураспада и получали временную кривую активности с добавлением биологического периода полураспада. Кумулятивное количество радиоактивности рассчитывали по интегрированному значению этой временной кривой активности, а поглощенную дозу рассчитывали в сферической модели (OLINDA/EXM ver2.0), и это сравнивали и исследовали для каждого антитела. Однако для H01L03 снижение кривой времени активности не наблюдалось через 168 часов после введения. Таким образом, биологический период полураспада не учитывался, а добавлялся только физический период полураспада.

[0156]

Таблица 3

Условия визуализации SPECT

Изотоп	Индий-111 средняя +высокая энергия
Коллиматор	MMP952
Радиус вращения	50 мм
Предел проекции	150 сек
Количество проекций	16
Угол вращения	90 градусов

[0157]

[Таблица 4]

Условия визуализации СТ

Количество проекций	207 полей зрения
Усредненные кадры	1 кадр
Привязка детектора	2×2
рентгеновская трубка, сила тока	270 мкА

рентгеновская трубка, напряжение	60 кВ
Время экспонирования	230 ms
Увеличение	2,0

[0158]

(результаты)

Результаты выполнения SPECT-СТ представлены на Фиг. 1. Результаты VOI-анализа опухоли и печени в каждый момент времени показаны на Фиг. 2. График, показывающий результаты подтверждения биораспределения и пути выведения после завершения визуализации SPECT-СТ через 168 часов после введения, показан на Фиг. 3.

Накопление в опухоли было самым высоким при введении гуманизированного антитела (H01L03) и самым низким при введении химерного антитела. Накопление в печени было самым высоким при введении химерного антитела и низким при введении любого гуманизированного антитела по сравнению с химерным антителом. Когда вводили гуманизированное антитело (H01L03), экскреция была самой медленной, а задержка в крови была высокой. Независимо от того, какое антитело было введено, накопление в печени и селезенке было высоким среди нормальных органов, за которым следовало накопление в легких и почках.

[0159]

Когда пороговая доза для печени была принята равной 30 Гр, максимально переносимая доза оценивалась как 3,90 МБк для гуманизированного антитела (H01L03) и 0,43 МБк для химерного антитела. Максимально переносимая доза (МБк) рассчитывалась как пороговая доза (Гр)/поглощенная доза (Гр/МБк).

[0160]

Пример 4-3: Авторадиография in vitro

Результаты изображений, оценивающих свойство связывания и специфичность различных антител к MUC5AC с помощью авторадиографии in vitro (ARG) с использованием различных ¹¹¹In-меченных антител, полученных в примере 4-1, показаны на Фиг. 4. Кроме того, на Фиг. 5 показан график численных значений плотности радиоактивности (Бк/мм²) в области исследования, рассчитанный путем задания области исследования (англ. region of interest, ROI) на всем разрезе.

Срез толщиной 10 мкм готовили с помощью криостата (производства Leica) из замороженного блока, полученного путем замораживания опухоли с высокой экспрессией MUC5AC (опухолевая ткань с трансплантацией SW1990) или опухоли с низкой экспрессией MUC5AC (опухолевая ткань с трансплантированной MIAPaCa2) в жидком азоте и используется для in vitro ARG.

Срез, хранившийся при -80°C, возвращали к комнатной температуре, высушивали в течение 30 минут или дольше, погружали в фосфатно-солевой буфер на 30 минут, а затем в фосфатно-солевой буфер, содержащий 1% по объему бычьего сывороточного альбумина, на 30 минут, в силу чего срез гидрофилизуется.

Гидрофилизированный криосрез погружали в фосфатно-солевой буфер с 1% по объему бычьего сывороточного альбумина, содержащий 5 кБк/мл различных антител, меченных ^{111}In , на 30 мин каждый. Затем срез промывали путем погружения на 5 минут в каждый из фосфатно-солевого буфера с 1% по объему бычьего сывороточного альбумина, фосфатно-солевого буфера и фосфатно-солевого буфера в указанном порядке. Срез после промывания высушивали на воздухе, экспонировали на пластине для визуализации (BAS-SR2040, производства Fujifilm Corporation) в течение около 15 часов и получали автордиограмму с использованием анализатора флюорографических изображений (Typhoon FLA 7000 IP, производства GE Healthcare). С помощью программного обеспечения для анализа «Image Quant TL», прилагаемого к анализатору флюорографических изображений, по полученной автордиограмме устанавливали область исследования по всему срезу и рассчитывали плотность радиоактивности (Бк/мм²) в области исследования.

Было подтверждено, что все гуманизированные антитела, меченные ^{111}In , сохраняли свойство связывания и специфичность в отношении MUC5AC (Фиг. 5, данные опухоли с высокой экспрессией MUC5AC). Было подтверждено, что различные гуманизированные антитела обладают меньшим неспецифическим связыванием по сравнению с химерным антителом (Фиг. 5, данные для опухоли с низким уровнем MUC5AC, неэкспрессирующей опухолью).

Из результатов примеров 4-2 и 4-3 следует, что гуманизированное антитело имеет более высокую специфичность в отношении MUC5AC, чем химерное антитело, и характеризуется высокой аккумуляцией в опухоли и низкой аккумуляцией в нормальных органах, таких как печень и т. п. Было выяснено, что оно обеспечивает более совершенную технику доставки, связанную с антителами, мечеными RI.

[0161]

Результаты этого примера суммированы в Таблице ниже. В Таблице объем опухоли рассчитан исходя из 150 мм³ поглощенной дозы СPECT. Поглощенную дозу печени рассчитывали на основе среднего ($1,15 \pm 0,14$ г, $n=19$) массы мышины печени, использованного в этом примере. Численное значение биораспределения выражали как среднее \pm стандартное отклонение $n=4$ (однако $n=3$ для H02L04).

[0162]

Таблица 5

		Название антитела				
		Химерное антитело	Гуманизированное антитело			
			H01L03	H01L04	H02L04	H04L04
SPECT	опухоль	9,5	35,0	15,3	13,7	15,0
Абсорбиро	(Гр/МБк)					
ванная	опухоль	70,1	7,7	33,4	27,0	35,4
доза	(Гр/МБк)					

Биораспределение при 168 ч после введения	опухоль (%ID/г)	11,6±0,9	24,2±3,9	12,9±2,6	15,6±6,2	17,2±4,2
	печень (%ID/г)	7,9±1,9	3,6±1,7	3,1±0,9	2,7±0,7	3,9±1,4
	селезенка (%ID/г)	5,0±1,8	5,4±0,8	3,8±1,2	4,0±3,0	3,4±0,3
	почка (%ID/г)	1,8±0,3	2,5±0,4	1,1±0,3	1,4±1,0	1,6±0,2
	кровь (%ID/г)	2,2±0,6	5,3±1,3	2,1±0,8	2,6±2,3	3,8±0,7

[0163]

Пример 5: Оценка моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , с использованием мышей с опухолями

Использовали меченное ^{225}Ac моновалентное антитело (H01L03), полученное в соответствии с Примером 1. Мышей с опухолями разделили на 3 группы: группу введения 2,5 кБк, группу введения 5 кБк и группу введения 10 кБк в соответствии с введенным уровнем радиоактивности моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , и сравнили с группой, которой вводили гуманизированное антитело (H01L03), полученное в примере получения 1 (контрольная группа антител). В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли проводили в течение 4 недель после введения. Используемых для оценки мышей с опухолями, готовили по той же процедуре, что и в Примере 4-2, и проводили эксперимент, когда размер опухоли достигал около 200 мм³ через 10 дней после трансплантации SW1990. Информация о животных каждой группы приведена ниже.

[0164]

Таблица 6

Информация о животных (при введении каждого моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac)

	Группа контрольного антитела	группа ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела		
		2,5	5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	2,5	5	10
Объем опухоли (мм ³)	194±61	197±51	184±53	192±72

Масса тела (г)	20,8±1,1	20,1±0,7	20,4±0,7	21,4±2,1
----------------	----------	----------	----------	----------

среднее±стандартное отклонение, n=6

[0165]

Изменения объема опухоли во времени показаны на Фиг. 6, а относительное соотношение объема опухоли в последний день периода наблюдения, когда объем опухоли до введения равен 1,0, показано в следующей таблице. Моновалентное антитело, меченное ^{225}Ac , проявляло дозозависимый эффект ингибирования роста опухоли и статистически значимо подавляло рост опухоли при всех дозах.

[0166]

Таблица 7

Относительное отношение объема опухоли в последние сутки периода наблюдения к объему опухоли до введения

	Группа контрольного антитела	группа ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела		
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	2,5	5	10
Относительное соотношение (соотношение)	10,9	5,6	3,5	2,5

[0167]

Вскрытие проводили в последний день периода наблюдения, собирали и взвешивали опухоли. Результаты сравнения массы опухоли показаны в таблице ниже. Было обнаружено, что масса опухоли для моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , была низкой дозозависимым образом, и что масса опухоли была статистически значимо ниже во всех группах, которым вводили моновалентное антитело, меченное ^{225}Ac , по сравнению с группой контрольного антитела.

[0168]

Таблица 8.

Сравнение массы опухоли

	Группа контрольного антитела	группа ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела		
Количество введенной	-	2,5	5	10

радиоактивности (кБк)				
Масса опухоли (г)	2,13±0,65	1,07±0,39*	0,71±0,23*	0,57±0,21*

среднее±стандартное отклонение, n=6 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольного антитела

[0169]

Относительная величина изменения массы тела во времени показана на Фиг. 7. Потеря массы тела на 10% и более по сравнению с массой тела до введения не наблюдалась ни в одной группе. Соответственно, было показано, что введение моновалентного антитела, меченного ²²⁵Ac, может не оказывать или оказывать достаточно слабое влияние на общее состояние.

[0170]

Вскрытие проводили в последний день периода наблюдения, собирали и взвешивали печень, почки и селезенку. Результаты сравнения массы каждого органа показаны в таблице ниже. Было подтверждено, что масса печени в группе, которой вводили 2,5 кБк меченного ²²⁵Ac моновалентного антитела, была статистически значимо ниже, чем в контрольной группе с антителом; однако, поскольку зависимости от дозы не наблюдалось, это считалось случайным результатом. Статистически значимой разницы не наблюдалось в почках или селезенке, или в печени при других дозах по сравнению с группой контрольного антитела, что показывает возможность отсутствия или достаточно слабого воздействия на печень, почки и селезенку.

[0171]

[Таблица 9]

сравнение массы нормального органа

	Группа контрольного антитела	группа ²²⁵ Ac-меченного моновалентного антитела		
Количество введенной радиоактивности (кБк)	—	2,5	5	10
Масс печени (г)	1,00±0,05	0,86±0,05*	0,95±0,03	0,90±0,16
Масса почки (г)	0,31±0,03	0,26±0,03	0,30±0,02	0,30±0,05
Масса селезенки (г)	0,07±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01	0,05±0,02

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольного антитела

[0172]

Использование образцов крови, собранных в конце периода наблюдения,

токсичность для почек (измерение креатинина в плазме с помощью набора для анализа креатинина (производства Cayman Chemical Company)), токсичность для печени (измерение аланинаминотрансферазы (ALT) в плазме с помощью набора для определения активности ALT (производства Bio Vision)) и токсичность крови (измерение количества лейкоцитов и количества тромбоцитов с использованием автоматического устройства для измерения клеток крови (модель: thinka CB-1010, производство ARKRAY, Inc.)) оценивали вторично. Для каждого измеренного значения использовали Stat PreClinica (производства Takumi Information Technology Co., Ltd.) для подтверждения гомоскедастичности измеренных значений. При обнаружении гомоскедастичности проводили анализ по способу Даннетта параметрического критерия, а при отсутствии гомоскедастичности проводили анализ по способу Стил непараметрического критерия.

[0173]

Результаты гепатотоксичности и почечной токсичности показаны на Фиг. 8. Во всех группах введения моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , не наблюдалось статистически значимой разницы при уровне значимости 5% по сравнению с группой контрольного антитела. Результаты токсичности крови представлены на Фиг. 9. Статистически значимой разницы не наблюдалось при уровне значимости 5% по отношению к контрольной группе антител в каждой дозовой группе моновалентного антитела, меченного ^{225}Ac , в каждый момент времени взятия образцов крови.

[0174]

В этом примере был подтвержден эффект, ингибирующий рост опухоли, для ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела. Ингибирующий эффект был дозозависимым и проявлял статистически значимый ингибирующий эффект на уровне значимости 5% при всех дозах (2,5, 5, 10 кБк). Кроме того, не наблюдалось потери массы тела на 10% и более по сравнению с массой тела до введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, а также была предложена возможность низкой гепатотоксичности, низкой токсичности для почек и низкой токсичности для крови из-за ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела. Из этих результатов было выяснено, что ^{225}Ac -меченное моновалентное антитело обладает очень сильным противоопухолевым действием, исключительно безопасно и является очень полезным терапевтическим средством против онкологического заболевания.

[0175]

Пример 6: Оценка высокой дозы ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела с использованием мышей с опухолями

Таким же образом, как и в примере 5, за исключением того, что количество введенной радиоактивности было установлено на уровне 25 кБк/мышь (в 10 раз меньше самой низкой дозы в примере 5), оценивали ^{225}Ac -меченное моновалентное антитело (группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела). Кроме того, была сформирована группа, которой вводили раствор только антитела (H01L03), полученного в примере получения 1, растворенного в 0,1 М ацетатном буфере, содержащем 20 мМ аскорбиновую кислоту (контрольная группа антител). Антитело, использованное в этом

примере, было получено тем же способом, что и в примере 5. Мышей с опухолями, использованных для оценки, готовили таким же образом, как в примере 4-2. Каждая группа состояла из 5 мышей, и наблюдение за общим состоянием, измерение массы тела и объема опухоли проводили в течение 4 недель после введения. Информация о животных каждой группы приведена ниже.

[0176]

Таблица 10.

	Группа контрольного антитела	группа ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела
Количество введенной радиоактивности (кБк)	—	25
Объем опухоли (мм ³)	215±54	249±67
Масса тела (г)	20,2±1,2	20,8±1,3

среднее±стандартное отклонение, n=5

[0177]

Результаты изменения объема опухоли во времени показаны на Фиг. 10. В группе введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела значимый рост опухоли был статистически подавлен, и был подтвержден ингибирующий рост опухоли эффект введения высокой дозы ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела.

[0178]

Вскрытие проводили в последний день периода наблюдения, собирали и взвешивали опухоли. Результаты сравнения массы опухоли показаны в таблице ниже. Было обнаружено, что масса опухоли была статистически значимо ниже в группе моновалентных антител, меченных ^{225}Ac , по сравнению с группой контрольного антитела.

[0179]

Таблица 11

Сравнение массы опухоли

	Группа контрольного антитела	группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	25
Масса опухоли (г)	2,48±0,45	0,56±0,20*

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с

группой контрольного антитела

[0180]

Результаты изменения массы тела от времени показаны на Фиг. 11. В группе введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела снижение массы тела было обнаружено на ранней стадии введения; однако в относительном соотношении оно не было ниже 0,9.

[0181]

Вскрытие проводили в последний день периода наблюдения, собирали и взвешивали печень, почки и селезенку. Результаты сравнения опухоли показаны в таблице ниже. Было обнаружено, что только масса селезенки статистически значима ниже в группе введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела по сравнению с группой контрольного антитела.

[0182]

Таблица 12.

Сравнение нормальной массы органов

	Группа контрольного антитела	группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	25
печень (г)	0,99±0,12	1,08±0,03
почка (г)	0,31±0,03	0,31±0,02
селезенка (г)	0,07±0,03	0,04±0,01*

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольного антитела

[0183]

Результаты гепатотоксичности и почечной токсичности показаны на Фиг. 12. Поскольку статистически значимой разницы по сравнению с группой, получавшей контрольные антитела, не наблюдалось, было высказано предположение, что эта доза не вызывает гепатопатию или ренопатию. Результаты токсичности крови представлены на Фиг. 13. Поскольку статистически значимой разницы по сравнению с группой контрольного антитела не наблюдалось, было высказано предположение, что эта доза не вызывает токсичности в крови.

[0184]

На основании этих результатов было также высказано предположение, что ^{225}Ac -меченное моновалентное антитело обладает очень сильным противоопухолевым действием, очень безопасно и является очень полезным терапевтическим агентом против онкологического заболевания.

[0185]

В качестве способа преобразования дозы для мыши в дозу для человека можно

упомануть способ, использующий следующую формулу.

Доза для животных в мг/кг \times (масса животного в кг/массы человека в кг) \times 0,33

В соответствии с этой формулой введение мышам 25 кБк/20 г в этом примере соответствует введению 89,0 кБк/кг (человек).

[0186]

Пример 7: Оценка ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела и ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела с помощью мышей с опухолями

С помощью мышей с опухолями, оценивали свойства каждого антитела из числа ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела и ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела. ^{225}Ac -меченное моновалентное антитело, полученное в соответствии с Примером 2, вводили мышам с опухолями, полученным таким же образом, как в примере 4-2, при вводимой дозе радиоактивности 5 кБк/мышь или 10 кБк/мышь (группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела). ^{225}Ac -меченное бивалентное антитело, полученное в соответствии с примером 3, вводили мышам с опухолями, полученным таким же образом, как в примере 4-2, при вводимой дозе радиоактивности 5 кБк/мышь или 10 кБк/мышь (группа введения ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела). Как и в примерах 5 и 6, была сформирована группа контрольных антител. В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли проводили в течение 4 недель после введения. Информация о животных каждой группы приведена ниже.

[0187]

Таблица 13

	Группа контрольного антитела	группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела		группа введения ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела	
		5	10	5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	—	5	10	5	10
Объем опухоли (мм ³)	194±40	209±21	203±31	192±38	188±50
Масса тела (г)	21,0±1,2	21,5±0,9	21,9±1,1	21,3±1,6	21,0±1,2

среднее±стандартное отклонение, n=6

[0188]

Результаты изменения объема опухоли в зависимости от времени показаны на Фиг. 14. Объем опухоли в последний день периода наблюдения и относительное соотношение, когда объем опухоли до введения равен 1,0, показаны в таблице ниже. В группе введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, рост опухоли был статистически значимо

подавлен, и был подтвержден эффект ингибирования роста опухоли в зависимости от дозы. В группе введения ^{225}Ac -меченных бивалентных антител наблюдалась тенденция к подавлению роста опухоли.

[0189]

Таблица 14

Относительное отношение объема опухоли в последние сутки периода наблюдения к объему опухоли до введения

	Группа контрольного антитела	группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела		группа введения ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела	
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10	5	10
Объем опухоли (мм ³)	2156±737	858±357*	654±310*	1267±194	1406±166
Относительное соотношение (соотношение)	11,1	4,11	3,22	6,59	7,48

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольных антител

[0190]

Мышей подвергали эвтаназии путем обескровливания под изофлурановой анестезией в последний день периода наблюдения, а опухоли собирали и взвешивали. Результаты сравнения массы опухоли показаны в таблице ниже. Было обнаружено, что масса опухоли в группе введения ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, была статистически значимо ниже по сравнению с группой контрольного антитела, и было подтверждено дозозависимое ингибирующее действие на рост опухоли. В группе введения ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела масса опухоли была низкой по сравнению с группой контрольного антитела, но статистически значимой разницы обнаружено не было.

[0191]

Таблица 15.

Сравнение массы опухоли

	Группа контрольного антитела	группа введения ^{225}Ac -меченного моновалентного	группа введения ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела

		антитела			
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10	5	10
Объем опухоли (мм ³)	1,96±0,51	0,86±0,2 5*	0,66±0,23 *	1,41±0,19	1,39±0,29

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольного антитела

[0192]

Результаты изменения массы тела в зависимости от времени показаны на Фиг. 15. Среднее значение относительного отношения было не ниже 0,9. Кроме того, относительное соотношение каждой особи было не ниже 0,8.

[0193]

Мышей подвергали эвтаназии путем обескровливания под изофлурановой анестезией и вскрытие проводили в последний день периода наблюдения. В результате вскрытия аномалий не обнаружено. Кроме того, собирали и взвешивали печень, почки и селезенку. Результаты сравнения массы нормальных органов показаны в таблице ниже. Статистически значимого снижения массы органа не наблюдалось ни в одной из групп, получавших ²²⁵Ac-меченое антитело, по сравнению с группой, получавшей контрольное антитело.

[0194]

Таблица 16.

Сравнение массы нормального органа

	Группа контрольного антитела	группа введения ²²⁵ Ac-меченного моновалентного антитела		группа введения ²²⁵ Ac-меченного бивалентного антитела	
		5	10	5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10	5	10
печень (г)	1,10±0,14	1,13±0,13	1,14±0,14	0,97±0,09	1,01±0,10
почка (г)	0,32±0,05	0,30±0,03	0,32±0,04	0,28±0,03	0,30±0,04
селезенка (г)	0,077±0,012	0,065±0,017	0,068±0,010	0,060±0,011	0,061±0,013

среднее±стандартное отклонение, n=6

[0195]

Результаты гепатотоксичности ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, и ^{225}Ac -меченного бивалентного антитела показаны на Фиг. 16. Результаты почечной токсичности показаны на Фиг. 17. Поскольку статистически значимого увеличения значения по сравнению с группой контрольного антитела не наблюдалось, было высказано предположение, что эта доза не вызывает гепатотоксичности или токсичности для почек. Что касается токсичности для крови, результаты подсчета лейкоцитов через 1 неделю после введения и через 4 недели после введения показаны на Фиг. 18. Кроме того, результаты подсчета тромбоцитов через 1 неделю после введения и через 4 недели после введения показаны на Фиг. 19. Что касается количества лейкоцитов, через 1 неделю после введения в группе введения моновалентных антител (5 кБк и 10 кБк) и группе введения бивалентных антител (10 кБк) наблюдалась статистически значимая разница по сравнению с группой контрольных антител, но количество восстановилось через 4 недели после введения. В группе введения бивалентных антител (5 кБк), которая показала статистически значимое отличие от группы контрольных антител через 4 недели после введения, разница не зависела от дозы. Количество тромбоцитов не опускалось ниже 500×10^9 клеток/л (нижняя граница нормального диапазона) ни в один момент времени, за исключением одного человека. Исходя из этого, было высказано предположение, что эта доза не вызывает токсичности в крови.

[0196]

Пример 8: Сравнение фармакокинетики с использованием In-111(^{111}In)-меченного моновалентного антитела и ^{111}In -меченного бивалентного антитела

Пример 8-1: Получение каждого меченого ^{111}In антитела

Для сравнения фармакокинетики моновалентного антитела и бивалентного антитела моновалентное антитело и бивалентное антитело метили ^{111}In , вводили мышам с опухолями, проводили эксперименты по биораспределению через 20, 68 и 188 часов после введения, сравнивали фармакокинетику моновалентного антитела и бивалентные антитела.

(1) производство каждого антитела, введенного с хелатором

Антитело получали таким же образом, как в примере получения 1 и примере получения 2, и получали моновалентное антитело и бивалентное антитело из модифицированного пептидом гуманизированного антитела H01L03.

Буфер 0,1 моль/л ацетата натрия (pH 6,0), содержащий 34 нмоль хелатного сайта (структурная формула: L1-4), и 0,1 моль/л аргининсодержащий буфер, 0,1 моль/л гистидина (pH 6,0), содержащий 34 нмоль одновалентного антитела или бивалентного антитела, вступал в реакцию при 37°C в течение 120 мин с получением антитела с введенным хелатором.

Его пропускали через колонку для обессоливания (номер модели: PD-10, производства GE Healthcare) и извлекали фракцию, содержащую антитела с введенным хелатором. Извлеченную фракцию дополнительно очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (производства Merck, номер модели: UFC505096).

Концентрация очищенного моновалентного антитела составляла 7,13 мг/мл, а концентрация бивалентного антитела составляла 5,07 мг/мл.

[0197]

(2) радиоактивное мечение каждого антитела с помощью ^{111}In

Используя раствор, ^{111}In ион-содержащий (индий (^{111}In) хлорид для инъекций, производства Nihon Medi-Physics Co., Ltd.) в качестве источника радиоактивного металла при радиоактивном количестве 91-92 МБк, добавляли каждое антитело с введенным хелатором (0,05 мл) и хорошо перемешивали. С помощью индикаторной бумаги для измерения pH (производства Merck) было подтверждено, что значение pH равно 4. Эту реакцию проводили при 45°C в течение 120 мин.

Реакционную смесь очищали с использованием фильтра для ультрафильтрации (производства Merck, номер модели: UFC505096), а растворитель дополнительно заменяли буфером с 20 ммоль/л аскорбиновой кислоты, содержащим 90 ммоль/л ацетата натрия.

[0198]

Радиохимический выход каждого ^{111}In -меченого антитела составлял 55% для моновалентного антитела и 59% для бивалентного антитела. Радиохимическая чистота моновалентного антитела составляла 97%, а бивалентного антитела - 98%. Количество радиоактивности, введенной животному, показано в таблице 17. Радиохимический выход представляет собой соотношение (%) количества радиоактивности ^{111}In -меченого моновалентного/бивалентного антитела к количеству радиоактивности, рассчитанному на основании количества радиоактивности в начале стадии (1). Для измерения радиоактивности использовали калибратор дозы радиоизотопов (производства CAPINTEC, номер модели: CRC-15R). Радиохимическая чистота относится к отношению (%) пикового количества радиоактивности, соответствующего ^{111}In -меченому антителу, к общему количеству радиоактивности тонкослойного планшета, проанализированной тонкослойной хроматографией на фильтре. Проявляли тонкослойную хроматографию (тонкослойная пластина: производства Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: 100 ммоль/л раствор EDTA (pH 5,0)/смешанный раствор ацетонитрила (объемное соотношение 1:1), и детектировали импульсы радиоактивности с помощью радио анализатора γ -TLC (производства raytest, MODEL GITA Star).

[0199]

Таблица 17.

Информация о мечении ^{111}In

	^{111}In -меченное моновалентное антитело			^{111}In -меченное бивалентное антитело		
Временная точка (группа)	20 ч после введения	68 ч после введения	188 ч после введения	20 ч после введения	68 ч после введения	188 ч после введения
Радиохимических выход (%)	55			59		
Радиохимическая чистота (%)	97			98		
Количество введенной радиоактивности (МБк)	4.76±0.10	5.02±0.08	4.85±0.04	4.95±0.22	4.91±0.18	4.89±0.14

[0200]

Пример 8-2: Биораспределение с использованием мышей с опухолями

[0201]

Линию клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 ($0,5 \times 10^7$ клеток) вводили подкожно голым мышам Balb/c (самцам) от бока к спине. Когда объем опухоли достиг примерно 300 мм³, ¹¹¹In-меченные моновалентное антитело и бивалентное антитело, приготовленные в примере 8-1, вводили в хвостовую вену.

[0202]

(способ оценки)

Мышей с опухолями выращивали в метаболической клетке после введения каждого ¹¹¹In-меченного антитела и собирали кал и мочу, выделяемые в каждой временной точке (20, 68, 188 часов после введения). Мышей с опухолями подвергали эвтаназии в каждый момент времени путем обескровливания под изофлюрановой анестезией. Опухоль, кровь и нормальные органы (включая остальную часть тела) собирали и взвешивали. Измеряли количество радиоактивности в выделяемом кале и выделяемой моче в дополнение к взвешенным органам (сцинтилляционный измерительный прибор для гамма-излучения: JDC-1712, производства Hitachi Aloka Medical, Ltd.). Скорость накопления радиоактивности (%ID) по отношению к дозе рассчитывали по количеству радиоактивности (импульсы) каждого органа (включая выделяемый кал и выделяемую мочу), а количество накопленной радиоактивности (%ID/g) рассчитывали как скорость накопления радиоактивности на массу органа.

[0203]

(результаты)

Результаты, показывающие изменения количества радиоактивности, накопленной в каждом органе с течением времени, представлены на Фиг. 20. Результаты, показывающие скорость накопления радиоактивности выделяемого кала и выделяемой мочи, а также изменения общей скорости накопления радиоактивности с течением времени, показаны на Фиг. 21.

Количество радиоактивности, накопленной в крови, было выше для моновалентных антител, чем для бивалентных антител в любой момент времени. Из этого было подтверждено, что моновалентное антитело обладает более высокой способностью удерживать кровь, чем бивалентное антитело. Количество радиоактивности, накопленной в опухоли, было выше для моновалентного антитела, чем для бивалентного антитела в любой момент времени. Подтверждено, что тенденция накопления радиоактивности в нормальных органах была выше в селезенке, печени, легких и почках для моновалентных антител. Было подтверждено, что бивалентное антитело показало значительно более высокие значения в печени и селезенке и более высокие значения в яичках, сердце, почке и бедренной кости. Было подтверждено, что накопление радиоактивности в каждом нормальном органе со временем уменьшается. Количество экскреции для бивалентного антитела было выше, чем для моновалентного антитела в любой момент времени, и было

подтверждено, что скорость клиренса для бивалентного антитела была выше. В случае моновалентного антитела количество экскреции с калом и мочой был одинаковым. С другой стороны, было подтверждено, что экскреция с мочой была выше, чем экскреция с калом при использовании бивалентных антител, и что они выводятся в основном через почечную систему мочевыводящих путей.

[0204]

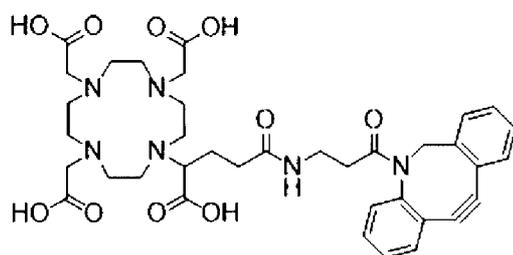
Пример 9: Получение ^{225}Ac -меченого гуманизированного анти-MUC5AC антитела с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO

(1. стадия синтеза хелатирующего агента)

Структура хелатного сайта (DOTAGA-DBCO), используемого в этом примере, представлена следующей формулой (L1-5). DOTAGA-DBCO, представленный формулой (L1-5), получали в соответствии со способом, описанным Bernhard et al. A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841. Хелатный сайт диспергировали в 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 1,7 ммоль/л хелатного сайта. Реакционная смесь раствора (0,004 мл) и раствора, содержащего ионы ^{225}Ac (0,2 моль/л водного раствора соляной кислоты, концентрация радиоактивности 1225 МБк/мл, приготовлена из раствора, произведенного Окриджской национальной лабораторией, количество жидкости: 0,004 мл) 4,9 МБк (рассчитано по аттенюации радиоактивности на дату и время испытания) и 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (pH 6,0, 0,06 мл) в качестве источника радиоактивного металла вступала в реакцию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{225}Ac . Молярное соотношение хелатного сайта и иона радиоактивного металла составляло хелатный сайт:ион ^{225}Ac =около 670:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C, а время нагревания устанавливали равным 30 мин.

[0205]

L1-5



DOTAGA-DBCO

[0206]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}Ac измеряли так же, как в Примере 1. В результате радиохимическая чистота комплекса ^{225}Ac составила 86%. Полученный комплексный раствор ^{225}Ac непосредственно использовали для следующей стадии мечения.

[0207]

(2. стадия радиоактивного мечения)

Раствор комплекса ^{225}Ac , полученный в вышеупомянутом (1. стадия синтеза хелатирующего агента) и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело; H01L03), полученное таким же образом, как в примере получения 2, за исключением того, что реакцию проводили при комнатной температуре в течение 60 минут, смешивали неочищенными и подвергали клик-реакции при 37°C в течение 2 часов с получением антитела, меченного комплексом ^{225}Ac . Количество хелатного сайта или хелатного сайта, содержащего ^{225}Ac -меченый комплекс, и модифицированного пептидом антитела (моновалентного антитела) составляли 68 нмоль и 80 нмоль, соответственно, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляла около 1:1,2.

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{225}Ac , полученного реакцией при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (производства Merck, номер модели: UFC505096). Радиохимическая чистота ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, после очистки составила 96%, а радиохимический выход составил 68%. Способ измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода ^{225}Ac -меченного моновалентного антитела, был аналогичен способу в Примере 1.

[0208]

Пример 10: Получение (очистка ВЭЖХ) ^{89}Zr -меченого гуманизированного анти-MUC5AC антитела с использованием ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO

(1-1. стадия синтеза хелатирующего агента)

В этом примере использовали хелатный сайт, такой же, как хелатный сайт, представленный вышеупомянутой формулой (L1-5). Этот хелатный сайт диспергировали в растворе DMSO с получением дисперсии, содержащей 2,0 ммоль/л хелатного сайта. Реакционная смесь дисперсии (0,150 мл) и раствора, содержащего ионы ^{89}Zr (0,1 моль/л водный раствор соляной кислоты, концентрация радиоактивности 1335 МБк/мл, приготовленная из раствора производства Nihon Medi-Physics Co., Ltd., количество жидкости: 0,100 мл) 134 МБк и 780 ммоль/л ацетатного буфера, содержащего 300 ммоль/л гентизиновой кислоты (0,050 мл) в качестве источника радиоактивного металла, вступала в реакцию в условиях нагревания с получением раствора комплекса ^{89}Zr . Молярное соотношение хелатного сайта и иона радиоактивного металла составляло хелатный сайт:ион ^{89}Zr =около 3333:1, и температуру нагревания реакционной смеси устанавливали равной 70°C , а время нагревания устанавливали равным 60 мин.

[0209]

Радиохимическую чистоту полученного комплекса ^{225}Ac измеряли следующим способом. А именно часть раствора комплекса ^{89}Zr проявляли с помощью тонкослойной хроматографии (производства Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)), а затем измеряли радиоанализатором γ -TLC (производства Raytest, MODEL GITA Star PS). Процент

радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи начала координат, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как радиохимическую чистоту (%) комплекса ^{225}Ac . В результате радиохимическая чистота комплекса ^{89}Zr составила 98%.

[0210]

(1-2. стадия очистки комплекса ^{89}Zr)

Раствор комплекса ^{89}Zr , полученный в вышеупомянутой стадии (1-1. стадия синтеза хелатирующего агента) собирали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и удаляли непрореагировавший DOTAGA-DBCO. Растворитель выпаривали из полученного собранного раствора примерно до 30 мкл раствора, и раствор использовали на стадии мечения. Способ измерения радиохимического выхода (степень восстановления HPLC) на стадии удаления непрореагировавшего вещества антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , был как представленный ниже. А именно, процентное содержание радиоактивности в собранном растворе определяли как скорость извлечения ВЭЖХ (%) на стадии удаления непрореагировавшего вещества по отношению к количеству радиоактивности, загруженной в начале этой стадии.

Условия ВЭЖХ были как представлено ниже, и собирали фракции со временем удержания около 27 мин.

<Условия ВЭЖХ>

детектор: ультрафиолетовый абсорбционный спектрофотометр (длина волны измерения: 220 нм, 254 нм)/сцинтилляционный детектор

колонка: XBridge C18 3,5 мкм, 4,6×100 мм, производитель Waters

скорость потока: 0,5 мл/мин, диапазон измерений: 45 мин после ввода образца

подвижная фаза А: 10 ммоль/л гистидинового буфера (pH 6,5)

подвижная фаза В: ацетонитрил для жидкостной хроматографии

подвижная фаза С: смешанный раствор ацетонитрил/вода (1:1)

Подача подвижной фазы: градиент концентрации контролировали путем изменения соотношения смешивания подвижной фазы А, подвижной фазы В и подвижной фазы С следующим образом.

[0211]

Таблица 18.

время (мин) после инъекции	Мобильная фаза А (об%)	Мобильная фаза В (об%)	Мобильная фаза С (об%)
0,0-40,0	90→50	10→50	0
40,0-40,1	50→1	50→99	0
40,1-45,0	1	99	0
45,1-46,0	1→0	99→10	0→90
46,0-50,0	0	10	90
50,0-50,1	0→90	10	90→0
50,1-55,0	90	10	0

[0212]

(2. стадия радиоактивного мечения)

Раствор комплекса ^{89}Zr , полученного на каждой из вышеупомянутых стадий, и раствор, содержащий модифицированное пептидом антитело (моновалентное антитело; H01L03), полученное таким же образом, как в примере получения 2, смешивали и подвергали клик-реакции при 37°C в течение 1,5 часов для получения антитела, меченного комплексом ^{89}Zr . Количества хелатного сайта, содержащего ^{89}Zr -меченый комплекс, и модифицированного пептидом антитела (моновалентного антитела) составляли 73 пмоль и 50 нмоль, соответственно, а молярное соотношение первой атомной группы (DBCO) и второй атомной группы (азид) составляло около 1:685.^o

Кроме того, раствор антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , полученного реакцией при 37°C в течение 1,5 ч, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (производства Merck, номер модели: UFC505096). Радиохимическая чистота антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , после очистки составила 95%, а радиохимический выход составил 50%. Способ измерения радиохимической чистоты и радиохимического выхода антитела, меченного комплексом ^{89}Zr , был следующим. А именно тонкослойную хроматографию (производство Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель представлял собой смешанный раствор ацетонитрила:0,1 ммоль/л раствора EDTA (объемное соотношение 1:1)) измеряли с помощью радиоанализатора γ -TLC (производства raytest, MODEL GITA Star PS), а процент радиоактивности (импульсы) пика, обнаруженного вблизи начала координат, к общей обнаруженной радиоактивности (импульсы) определяли как радиохимическую чистоту (%). Кроме того, процент радиоактивности, извлеченной после ультрафильтрационной очистки, по отношению к общей радиоактивности, добавленной в начале стадии мечения, определяли как радиохимический выход (%).

[0213]

Пример 11: Оценка стабильности каждого гуманизованного анти-MUC5AC антитела, меченного ^{89}Zr или ^{225}Ac , в плазме человека или мыши

^{89}Zr -меченое гуманизованное анти-MUC5AC антитело, приготовленное с использованием меченого ^{89}Zr DOTAGA-DBCO, получали в соответствии с Примером 10. ^{89}Zr -меченое гуманизованное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием меченого DOTAGA-Bn-DBCO, получали в соответствии с примером 10, за исключением того, что в качестве хелатного сайта использовали хелатный сайт, представленный вышеупомянутой формулой (L1-4).

^{225}Ac -меченое гуманизованное анти-MUC5AC антитело, приготовленное с использованием меченого DOTAGA-Bn-DBCO, получали согласно примеру 2. ^{225}Ac -меченое гуманизованное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием меченого DOTAGA-DBCO, получали в соответствии с Примером 9.

В качестве растворителя во всех случаях использовали 0,1 М натрий-ацетатный буфер (pH 6,0).

[0214]

Различные антитела, меченные ^{89}Zr , и антитела, меченные ^{225}Ac , смешивали с плазмой человека или мыши, и стабильность в каждый прошедший момент времени во время инкубации при 37°C оценивали с помощью электрофореза на мембране из ацетата целлюлозы. Кроме того, для оценки продуктов деградации в плазме, отличных от антитела, меченного ^{89}Zr , и антитела, меченного ^{225}Ac , проводили электрофорез на мембране из ацетата целлюлозы путем отдельного смешивания каждого соединения с каждой плазмой, предполагая удаление ^{89}Zr или ^{225}Ac из каждого хелатирующего агента и расщепление каждого линкерного сайта. Электрофорез на мембране из ацетата целлюлозы проводили с использованием каждого образца плазмы, собранного в каждый момент времени инкубации, и мембрану из ацетата целлюлозы помещали на планшет для визуализации после завершения электрофореза. Экспонированную пластину для визуализации считывали с помощью анализатора изображений сканирующего типа (производства GE Healthcare, номер модели: Turphoon-7000), а радиохимическую чистоту различных антител, меченных ^{89}Zr , и антител, меченных ^{225}Ac , определяли количественно и оценивали с помощью программного обеспечения для анализа изображений (производство GE Healthcare, название программного обеспечения: ImageQuant). Композиции оценочных образцов показаны в Таблице 19. Процент радиоактивности (импульсы) пика, соответствующего каждому меченому антителу, по отношению к обнаруженной общей радиоактивности (импульсы) определяли как радиохимическую чистоту (%).

[0215]

Таблица 19

Гуманизированное RI-меченное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием RI-меченного DOTA-Bn-DBCO

Оценочное соединение (радиохимическая чистота %)	Смешанный образец	Концентрация радиоактивности в начале инкубации
^{89}Zr -меченное антитело (94%)	Плазма мыши	2,7 МБк/мл
	Плазма человека	3,4 МБк/мл
^{225}Ac -меченное антитело (77%)	Плазма мыши	2 кБк/мл
	Плазма человека	

n=3

[0216]

[Таблица 20]

Гуманизированное RI-меченное анти-MUC5AC антитело (n=3), полученное с использованием RI-меченного DOTAGA-DBCO

Оценочное соединение (радиохимическая чистота %)	Смешанный образец	Концентрация радиоактивности в начале инкубации
^{89}Zr -меченное антитело	Плазма мыши	0.4 МБк/мл

(94%)	Плазма человека	1.6 кБк/мл
²²⁵ Ac-меченное антитело (100%)	Плазма мыши	
	Плазма человека	

n=3

[0217]

Что касается RI-меченого гуманизированного анти-MUC5AC антитела, полученного с использованием RI-меченого DOTA-Bn-DBCO, радиохимическая чистота образцов плазмы, отобранных сразу после инкубации для оценки стабильности и измеренная с помощью тонкослойной хроматографии, составила 94% в плазме мыши и 95% в плазме человека. Наконец, радиохимическая чистота при инкубации в течение 378 ч для обоих была не менее 70%. График, показывающий результаты, представляет собой верхнюю часть Фиг. 22А.

Радиохимическая чистота ²²⁵Ac-меченого антитела, подвергнутого этой оценке, составила 77%, что свидетельствует об отличии от радиохимической чистоты образцов плазмы, взятых сразу после инкубации для оценки стабильности и измеренных с помощью тонкослойной хроматографии (мышь: 90%, человек: 80%). Считалось, что какой-то твердый компонент остался в источнике и полученная радиохимическая чистота была ниже актуального значения. Наконец, радиохимическая чистота при инкубации в течение 168 ч для обоих была не менее 70%. График, показывающий результаты, представляет собой верхнюю часть Фиг. 22В.

[0218]

Что касается RI-меченого гуманизированного анти-MUC5AC антитела, полученного с использованием RI-меченого DOTAGA-DBCO, радиохимическая чистота ⁸⁹Zr-меченого антитела, подвергнутого этой оценке, составляла 94%, и значения в целом были такими же, как и радиохимическая чистота (мышь: 99%, человек: 99%) образца плазмы, измеренная сразу после времени инкубации для оценки стабильности. Наконец, радиохимическая чистота при инкубации в течение 336 ч для обоих была не менее 70%. График, показывающий результаты, представлен в нижней части Фиг. 22А.

Радиохимическая чистота ²²⁵Ac-меченого антитела, подвергнутого этой оценке, составляла 100%, и значения, как правило, были такими же, как радиохимическая чистота (мышь: 97%, человек: 100%) образца плазмы, измеренная сразу после периода инкубации для оценки стабильности. Наконец, радиохимическая чистота при инкубации в течение 336 ч для обоих была не менее 80%. График, показывающий результаты, представлен в нижней части Фиг. 22В.

[0219]

Пример 12: Свойства связывания и специфичность гуманизированного RI-меченого анти-MUC5AC антитела к MUC5AC

RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием ²²⁵Ac- или ⁸⁹Zr-меченого DOTAGA-DBCO, получали в соответствии с

Примером 9 и Примером 10. RI-меченое гуманизированное анти-MUC5AC антитело, приготовленное с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO, получали в соответствии с Примером 11. С использованием этих RI-меченных гуманизированных анти-MUC5AC антител, свойство связывания и специфичность каждого RI-меченого антитела к MUC5AC оценивали с помощью ARG in vitro. Оценку специфичности проводили в соответствии с примерами 4-3, за исключением того, что в качестве тестируемого вещества использовали вышеупомянутое RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело. Изображения результатов для ^{89}Zr -меченого антитела показаны на Фиг. 23, а результаты для ^{225}Ac -меченого антитела показаны на Фиг. 24. При использовании ^{89}Zr -меченого антитела, ROI устанавливали для каждого целого участка MUC5AC-положительного среза опухоли и отрицательного среза опухоли, а измеренное значение в ROI использовали для расчета отношения связывания с MUC5AC-положительной опухолью и отрицательной опухолью. Когда использовали ^{225}Ac -меченое антитело, множество небольших областей интереса определяли в опухолевых тканях MUC5AC-положительного среза опухоли и отрицательного среза опухоли, и среднее значение использовали для расчета отношения связывания с MUC5AC-положительной опухолью и отрицательной опухолью. В результате RI-меченое гуманизированное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO, показало 6,5-кратное соотношение связывания. RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO, показало 138-кратное соотношение связывания. RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO, показало 151-кратное соотношение связывания. Было подтверждено, что гуманизированное анти-MUC5AC антитело, меченное ^{89}Zr или ^{225}Ac , полученное с использованием ^{89}Zr - или ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO, и ^{89}Zr -меченое гуманизированное анти-MUC5AC антитело, полученное с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO, сохраняли свойство связывания и специфичность к MUC5AC.

[0220]

Пример 13: PET-СТ-визуализация ^{89}Zr -меченых гуманизированных анти-MUC5AC антител, полученных с использованием ^{89}Zr -меченных DOTA-Bn-DBCO и DOTAGA-DBCO

^{89}Zr -меченые антитела получали с использованием ^{89}Zr -меченных DOTA-Bn-DBCO и DOTAGA-DBCO, и в соответствии с Примером 10, каждое из них вводили мышам с опухолью и проводили оценку с помощью визуализации PET-СТ.

Линию клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 ($0,7 \times 10^7$ клеток), которая представляет собой линию опухолевых клеток с высокой экспрессией MUC5AC, вводили подкожно голым мышам Balb/c (самцам) от бока к спине. Когда объем опухоли после трансплантации достигал около 150-300 мм³, ^{89}Zr -меченые гуманизированные анти-MUC5AC антитела вводили мышам через хвостовую вену. Объем опухоли рассчитывали по следующей расчетной формуле.

$$\text{объем опухоли} = (\text{малая ось опухоли}^2 \times \text{большая ось опухоли}) / 2$$

Радиохимическая чистота и информация о животных для введенных ^{89}Zr -меченных гуманизированных анти-MUC5AC антител показаны в Таблице 21.

[0221]

Таблица 21

Введенное количество радиоактивности и информация о животных (при введении ^{225}Ac -меченных антител)

Название антитела	^{89}Zr -меченое анти-MUC5AC гуманизированное антитело	
	DOTA—Bn	DOTAGA
Объем опухоли (мм ³)	337±142	335±129
Масса тела (г)	21,6±1,2	22,1±0,8
Радиохимическая чистота (%)	92%	94%
Количество введенной радиоактивности (МБк)	4,6±0,2	4,6±0,0

(среднее±стандартное отклонение, n=4)

[0222]

РЕТ-СТ (устройство РЕТ-СТ для мелких животных: Si78, производства Bruker) выполняли в условиях, указанных в таблице ниже. Временные точки для визуализации РЕТ и СТ составляли 12, 48, 84, 168, 252 часа после введения. Реконструкцию изображения проводили методом MLEM для РЕТ и методом FBP для СТ. Выполняли VOI-анализ для SUV (стандартизированное значение поглощения) опухоли и сердца (кровь), печени в каждый момент времени, и профиль SUV сравнивали с помощью кривой временной активности.

[0223]

Таблица 22

Условия визуализации и реконструкции РЕТ

Изотоп	^{89}Zr
время экспозиции	600 сек
Энергетическое окно	30% (357,7-664,3keV)
Реконструкция РЕТ-изображения	MLEM GPU 32×32 0,25 (Итерации: 12)
коррекция	Разброс, Случайные числа, Затухание, Парциальный объем, Ослабление

[0224]

Таблица 23.

Условия визуализации СТ

Режим сбора данных	Статистический
Режим сканирования	Непрерывный (7 град/с)
Фильтр источника рентгеновского излучения	AL-1,0 мм

Размер пикселя	50 мкм
Сила тока рентгеновской трубки	771 мкА
Напряжение рентгеновской трубки	65 кВ

[0225]

Результаты выполнения PET-CT через 48 часов после введения ^{89}Zr -меченного антитела, показаны на Фиг. 25. Результаты VOI-анализа опухоли и сердца (кровь), печени в каждый момент времени представлены на Фиг. 26. Кроме того, результаты соотношения опухоли к печени в каждый момент времени показаны на Фиг. 27.

Максимальное значение накопления в опухоли составило не менее 2,8 в виде SUV, а максимальное значение отношения опухоли к печени через 84 ч после введения составило 3,6 для ^{89}Zr -меченого антитела, полученного с использованием ^{89}Zr -меченого DOTA-Bn-DBCO, и 3,4 для ^{89}Zr -меченого антитела, полученного с использованием ^{89}Zr -меченого DOTAGA-DBCO. Статистически значимая разница в каждом значении обнаружена не была.

Подтверждено, что накопление ^{89}Zr -меченых антител в сердце (кровь) со временем уменьшалось и практически исчезало из крови через 252 ч после введения. Кроме того, не было обнаружено статистически значимой разницы в накоплении в сердце (кровь) в каждый момент времени среди ^{89}Zr -меченных антител. Точно так же было подтверждено, что накопление ^{89}Zr -меченых антител в печени и мышцах со временем уменьшалось, и не было обнаружено статистически значимой разницы в накоплении в каждой ткани в каждый момент времени между ^{89}Zr -мечеными антителами.

[0226]

Пример 14: Эксперимент по биораспределению ^{89}Zr -меченных гуманизированных анти-MUC5AC антител, полученных с использованием ^{89}Zr -меченных DOTA-Bn-DBCO и DOTAGA-DBCO

Для подтверждения более подробной фармакокинетики, ^{89}Zr -меченые антитела, приготовленные с использованием ^{89}Zr -меченых DOTA-DBCO и DOTAGA-DBCO, вводили мышам с опухолями и проводили эксперимент по биораспределению через 20, 68, 188 часов после введения. ^{89}Zr -меченые антитела получали согласно Примеру 10, как и в Примере 13.

[0227]

Для эксперимента по биораспределению ^{89}Zr -меченые антитела вводили в хвостовую вену мышам с опухолью, приготовленным способом, аналогичным способу, описанному в примере 4-2. Радиохимическая чистота и информация о животных для введенных ^{89}Zr -меченных гуманизированных анти-MUC5AC антител показаны в Таблице 24. Всем группам вводили дозу радиоактивности около 5 МБк.

[0228]

[Таблица 24]

Введенное количество радиоактивности и информация о животных (при введении ^{225}Ac -меченных антител)

Название антитела	^{89}Zr -меченное анти-MUC5AC гуманизированное антитело
-------------------	--

Временная точка (ч)	DOTA—Bn			DOTAGA		
	20	68	188	20	68	188
Объем опухоли (мм ³)	409 ±78	441 ±150	484 ±149	482 ±124	513 ±206	505 ±155
Масса тела (г)	21,5 ±1,2	22,0 ±0,5	22,7 ±1,4	21,2 ±1,1	22,5 ±0,7	22,4 ±1,2
Радиохимическая чистота (%)	97%			95%		

(среднее±стандартное отклонение, n=4)

[0229]

Мышей с опухолями выращивали в метаболической клетке после введения ⁸⁹Zr-меченых антител и собирали кал и мочу, выделяемые до каждого временного момента (20, 68, 188 часов после введения). Мышей с опухолями подвергали эвтаназии в каждый момент времени путем обескровливания под изофлюрановой анестезией. Опухоль, кровь и нормальные органы (включая остальную часть тела) собирали и взвешивали. Измеряли количество радиоактивности в выделяемом кале и выделяемой моче в дополнение к взвешенным органам (сцинтилляционный измерительный прибор для гамма-излучения: JDC-1712, производства Hitachi Aloka Medical, Ltd.). Скорость накопления радиоактивности (%ID) по отношению к дозе рассчитывали по количеству радиоактивности (импульсы) каждого органа (включая выделяемый кал и выделяемую мочу), а количество накопленной радиоактивности (%ID/г) рассчитывали как скорость накопления радиоактивности на массу органа. Результаты, показывающие изменения количества радиоактивности, накопленной в опухолевой ткани и каждом органе с течением времени, показаны на Фиг. 28 А-D. Скорость накопления радиоактивности (%ID) по отношению к дозе рассчитывали из накопления радиоактивности (импульсы) в выделяемом кале и выделяемой моче, а результаты, показывающие изменения с течением времени, показаны на Фиг. 29.

[0230]

Количество радиоактивности, накопленной в опухоли, было самым высоким через 188 часов после введения ⁸⁹Zr-меченого антитела, приготовленного с использованием ⁸⁹Zr-меченого DOTA-Bn-DBCO, и самым высоким через 68 часов после введения ⁸⁹Zr-меченого антитела, приготовленного с использованием ⁸⁹Zr-меченого DOTAGA-DBCO. Количество накопленной в это время радиоактивности составляло не менее 20%ID/г. Изменение во времени накопления радиоактивности в крови имело тенденцию к снижению аналогично для ⁸⁹Zr-меченых антител, и можно судить о том, что клиренс из крови находится на том же уровне. Что касается экскреции, скорость накопления радиоактивности в кале и моче составляла не менее 65%ID через 188 ч после введения. Радиоактивность, накопленная в нормальных тканях, была максимальной через 20 часов после введения, и накопление радиоактивности имело тенденцию к снижению через 20 часов. Нормальными тканями с высоким накоплением радиоактивности через 20 ч после введения были печень, легкое и селезенка в этом порядке.

[0231]

Пример 15: Оценка эффективности ^{225}Ac -меченного гуманизованного анти-MUC5AC антитела, полученного с использованием ^{225}Ac -меченного DOTAGA-DBCO

^{225}Ac -меченое антитело, полученное с использованием ^{225}Ac -меченого DOTAGA-DBCO, вводили мышам с опухолями и проводили исследование для подтверждения ингибирующего действия на рост опухоли. ^{225}Ac -меченое антитело получали в соответствии с Примером 9. Мышей с опухолями готовили так же, как в примере 4-2.

^{225}Ac -меченое антитело вводили мышам с опухолями при уровне радиоактивности 5 кБк/мышь или 10 кБк/мышь и оценивали свойства ^{225}Ac -меченого антитела. Кроме того, была предоставлена группа (группа контрольного антитела), которой вводили раствор, содержащий только гуманизованное анти-MUC5AC антитело, растворенное в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 6,0). Каждая группа состояла из 6 мышей, и наблюдение за общим состоянием, измерение массы тела и объема опухоли проводили в течение 4 недель после введения. Результаты приведены в Таблице 25.

[0232]

Таблица 25.

Введенное количество радиоактивности и информация о животных (при введении ^{225}Ac -меченных антител)

	Группа контрольного антитела	Группа введения ^{225}Ac -меченного анти-MUC5AC гуманизованного антитела	
		5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10
Объем опухоли (мм ³)	165±43	161±36	161±29
Масс тела (г)	20,7±0,7	20,8±1,0	21,3±1,2

[0233]

Результат подтверждения изменения объема опухоли в зависимости от времени показано на Фиг. 30 (А). Рост опухоли был статистически значимо подавлен при любой дозе в группе введения ^{225}Ac -меченого антитела по сравнению с группой контрольного антитела, и был подтвержден ингибирующий рост опухоли эффект введения ^{225}Ac -меченого антитела.

[0234]

В последний день периода наблюдения проводили вскрытие, опухоли собирали и взвешивали. Результаты сравнения массы опухоли показаны в Таблице 26. Было обнаружено, что масса опухоли была статистически значимо ниже во всех группах введения ^{225}Ac -меченных антител, по сравнению с группой контрольного антитела.

[0235]

Таблица 26.

Сравнение массы опухоли

	Группа контрольного антитела	Группа введения ^{225}Ac -меченного анти-MUC5AC гуманизованного антитела	
		5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10

масса опухоли (г)	2,06±0,42	0,75±0,36*	0,36±0,15*
-------------------	-----------	------------	------------

среднее±стандартное отклонение, n=5 уровень значимости: *P<0,05 по сравнению с группой контрольного антитела

[0236]

Результаты подтверждения изменения массы тела с течением времени показаны на Фиг. 30(В). В группе введения 10 кБк в группе введения всех ²²⁵Ac-меченых антител в ранние сроки наблюдения было обнаружено снижение массы тела; однако в относительном соотношении соотношение не было ниже 0,9. В позднем периоде наблюдения масса тела восстанавливалась примерно до значения до введения.

[0237]

Вскрытие проводили в последний день периода наблюдения, брали и взвешивали печень, почки и селезенку. Во всех группах введения ²²⁵Ac-меченных антител не было обнаружено статистически значимого снижения массы ткани по сравнению с группой контрольного антитела.

[0238]

Таблица 27

Сравнение массы ткани

	Группа контрольного антитела	Группа введения ²²⁵ Ac-меченного анти-MUC5AC гуманизированного антитела	
		5	10
Количество введенной радиоактивности (кБк)	-	5	10
печень (г)	0,98±0,09	1,02±0,06	1,18±0,10
почка (г)	0,30±0,02	0,34±0,03	0,35±0,03
селезенка (г)	0,068±0,012	0,073±0,008	0,078±0,007

[0239]

Результаты гепатотоксичности и почечной токсичности соответственно показаны на Фиг. 33 и 34. Поскольку статистически значимой разницы по сравнению с группой контрольного антитела не наблюдалось, было высказано предположение, что эта доза не вызывает гепатотоксичности или токсичности для почек. Результаты токсичности крови представлены на Фиг. 31 и 32. Поскольку статистически значимой разницы по сравнению с группой контрольного антитела не наблюдалось, было высказано предположение, что эта доза не вызывает гемотоксичности.

[0240]

Пример 16: Получение гуманизированного анти-MUC5AC антитела случайно меченного ⁸⁹Zr (гуманизированное антитело [⁸⁹Zr]Random-DFO-anti-MUC5AC)

Модифицированное пептидом антитело, полученное таким же образом, как в примере получения 2 (моновалентное антитело; H01L03) (0,1 мг, 0,7 нмоль), и 1-(4-изотиоцианатофенил)-3-[6,17-дигидрокси-7,10,18,21-тетраоксо-27-(N-ацетилгидроксиламино)-6,11,17,22-тетраазагептаикозин] тиомочевину (p-SCN-Bn-DFO,

макроциклы) (0,26 мг, 0,35 мкмоль) смешивали с буфером на основе 0,1 М гидрокарбоната натрия и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 120 мин. После завершения реакции смесь очищали ультрафильтрацией, а растворитель заменяли 50 ммоль гистидинового буфера (pH 6,1), содержащего 100 ммоль аргинин (далее RH-буфер) с получением гуманизированного анти-MUC5AC антитела, в котором DFO случайным образом связано с аминогруппой гуманизированного анти-MUC5AC антитела (далее «гуманизированное антитело Random-DFO-anti-MUC5AC»). В результате измерения концентрации белка с помощью NanoDrop2000 (ThermoFisher) концентрация белка в растворе гуманизированного антитела Random-DFO-anti-MUC5AC составила 1,12 мг/мл. Полученный раствор гуманизированного антитела Random-DFO-anti-MUC5AC (89,6 мкл, 0,1 мг, 0,67 мкмоль) смешивали с 10 мкл (11,8 МБк) раствора $^{89}\text{ZrCl}_3$ и 301,6 мкл буфера RH для ускорения реакции комплексообразования. После образования комплекса очистку проводили ультрафильтрацией с получением гуманизированного антитела ^{89}Zr Random-DFO-анти-MUC5AC. Радиохимическую чистоту рассчитывали так же, как в примере 10, и радиохимическая чистота составила 97,3%. Кроме того, радиохимический выход рассчитывали на основе радиоактивности в начале реакции, и радиохимический выход составил 43,0%.

[0241]

Пример 17: PET-CT-визуализация гуманизированного антитела ^{89}Zr Random-DFO-anti-MUC5AC

Гуманизированное антитело ^{89}Zr Random-DFO-anti-MUC5AC, полученное в примере 16, разводили буфером RH и доводили до концентрации 1,27 МБк/22,5 мкг белка/100 мкл/мышь, вводили мышам с опухолями (n= 3) производили таким же образом, как в примере 4-2, и оценку с помощью визуализации PET-CT проводили через 19, 42, 86, 158 часов после введения. Объем опухоли животного, подвергнутого этой оценке, рассчитывали таким же образом, как в Примере 4-2. В результате средний объем опухоли составил $60,0 \pm 20,0 \text{ мм}^3$. Условия PET-визуализации и способ реконструкции изображения соответствовали тем, что были в Примере 13. Выполняли VOI-анализ для SUV опухоли и сердца (кровь), печени в каждый момент времени и сравнивали профиль SUV с использованием кривой временной активности.

[0242]

Результаты выполнения PET-CT представлены на Фиг. 35. Результаты VOI-анализа опухоли, сердца и печени в каждый момент времени показаны на Фиг. 36. По результатам VOI-анализа в опухоли было обнаружено накопление со временем, среднее значение SUV было не менее 2,7 в любой момент времени, а максимальное среднее значение SUV составило 5,1 через 158 часов. Было подтверждено, что SUV в других органах (сердце (кровь), печень), кроме опухоли, со временем уменьшается. Отношение SUV к опухоли и печени через 158 часов после введения составляло 3,7.

[0243]

Пример 18: Эксперимент по биораспределению гуманизированного антитела

[⁸⁹Zr]Random-DFO-anti-MUC5AC

После завершения визуализации ПЕТ-СТ через 158 часов в примере 17 мышей подвергали эвтаназии путем обескровливания под анестезией изофлураном. Опухоль, кровь и нормальные органы (включая остальную часть тела) собирали и взвешивали. Кроме того, с помощью сцинтилляционного измерительного прибора для гамма-излучения (JDC-1712, Hitachi Aloka Medical, Ltd.) измеряли уровень радиоактивности каждого органа. Скорость накопления радиоактивности (%ID) по отношению к дозе рассчитывали по количеству радиоактивности (импульсы) каждого органа (включая выделяемый кал и выделяемую мочу), а количество накопленной радиоактивности (%ID/г) рассчитывали как скорость накопления радиоактивности на массу органа.

[0244]

Результаты оценки биораспределения после завершения визуализации ПЕТ-СТ представлены в Таблице 28. Скорость распределения радиоактивности опухоли через 158 часов после введения составила $5,1 \pm 2,3\%$ ID, а скорость распределения радиоактивности на единицу массы составила $49,5 \pm 5,2\%$ ID. Подтверждено высокое распределение радиоактивности в печени, скорость распределения радиоактивности в печени составила $5,1\%$ ID, а скорость распределения радиоактивности на единицу массы составила $10,4\%$ ID/г. Нормальными органами с высокой скоростью распространения радиоактивности, за исключением опухоли, были печень, почка и легкое, в этом порядке.

[0245]

Таблица 28.

	Скорость распределения радиоактивности (%ID)	Скорость распределения радиоактивности на единицу массы (%ID/г)
кровь	4,30	5,25
сердце	0,41	3,68
легкое	1,01	7,76
селезенка	0,64	14,68
Поджелудочная железа	0,13	0,90
печень	12,86	10,40
почка	1,47	4,06
опухоль	5,06	49,52
Остальная часть организма	29,17	6,23
Выделяемое вещество	44,21	-

[0246]

Хотя настоящее изобретение было описано выше со ссылкой на воплощения, настоящее изобретение не ограничено вышеупомянутыми воплощениями. 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 данном документе, включая патенты и патентные заявки, настоящим включено во всей своей полноте ссылкой в том объеме, в котором оно было раскрыто в данном документе.

[Промышленная Применимость]

[0247]

RI-меченное гуманизированное анти-MUC5AC антитело по настоящему изобретению обладает превосходной специфичностью и накоплением в опухоли. Следовательно, оно чрезвычайно полезно для лечения и/или диагностики заболеваний, при которых сверхэкспрессируется MUC5AC, особенно онкологических заболеваний.

[0248]

Эта заявка основана на патентной заявке № 2019-191562, поданной в Японии (дата подачи: 18 октября 2019 г.), содержание которой полностью включено в настоящий документ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицу или позитрон, и антитело представляет собой гуманизированное антитело, специфически связывающееся с муцином подтипа 5AC.

2. Конъюгат по п. 1, где антитело представляет собой гуманизированное антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, состоящую из

- (1) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01),
 - (2) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (H01),
 - (3) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 (H03), или
 - (4) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 (H03), и
- переменную область легкой цепи, состоящую из
- (5) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 (H01),
 - (6) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (H01),
 - (7) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (H03), или
 - (8) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 (L04).

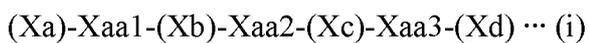
3. Конъюгат по п. 2, где антитело представляет собой гуманизированное антитело, имеющее (1) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (H01), и (7) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (L03).

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где нуклид металла, испускающий α -частицы, представляет собой актиний-225, и нуклид металла, испускающий позитрон, представляет собой Zr-89.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, содержащий не менее 1 молекулы и не более 8 молекул хелатирующего агента на 1 молекулу антитела.

6. Конъюгат по любому из пп. 1-5, где хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела через линкер.

7. Конъюгат по п. 6, где линкер содержит пептид, состоящий из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков, образован реакцией сшивки между пептидом, модифицированным сшивающим агентом, и антителом и представлен следующей формулой (i);



где Xa, Xb, Xc и Xd, каждый представляет собой непрерывный X в количестве a, непрерывный X в количестве b, непрерывный X в количестве c и непрерывный X в количестве d, соответственно,

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

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

каждый из Xaa1 и Xaa3 независимо представляет собой аминокислотный остаток,

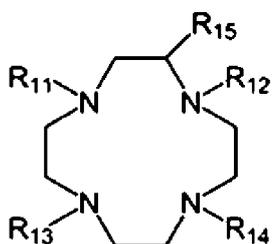
полученный из аминокислоты, имеющей тиольную группу в боковой цепи, или

один аминокислотный остаток 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 Хаа1 и Хаа3 связаны, и

Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток аргинина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, модифицированные сшивающим агентом.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где хелатирующий агент имеет структуру, полученную из соединения, представленного следующей формулой (A), или его соли:

(A)



где 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, имеющую 2 или 3 атома углерода, другой представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, p представляет собой целое число не менее 0 и не более 3, R_{15} представляет собой атом водорода, когда R_{12} представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, и R_{15} представляет собой заместитель для конъюгации с антителом, когда R_{12} не является заместителем для конъюгации с антителом.

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

10. Радиофармацевтическое средство по п. 9, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий α -частицы, и лекарственное средство используется для внутренней RI-терапии онкологического заболевания.

11. Радиофармацевтическое средство по п. 10, которое вводят пациенту в дозе не более 250 кБк/кг однократно при внутренней RI-терапии.

12. Радиофармацевтическое средство по п. 11, где доза составляет не более 80 кБк/кг однократно.

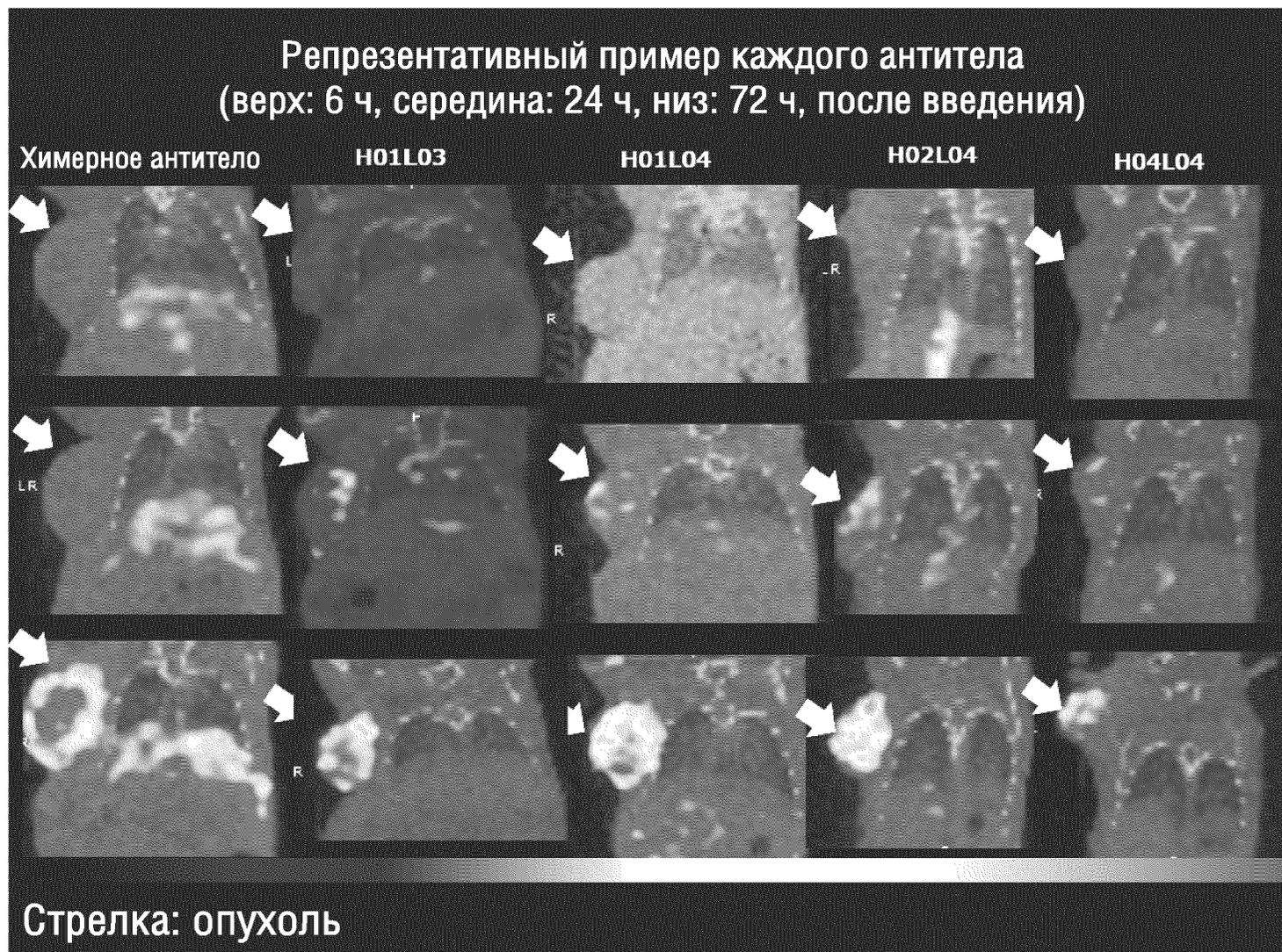
13. Радиофармацевтическое средство по п. 9, где радионуклид представляет собой нуклид металла, испускающий позитрон, и лекарственное средство используется для диагностики онкологического заболевания.

14. Радиофармацевтическое средство для диагностики онкологического заболевания

при внутренней RI-терапии с использованием радиофармацевтического средства по любому из пп. 10-12, которое представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом, и антитела, где антитело представляет собой гуманизированное антитело, специфически связывающееся с муцином подтипа 5AC.

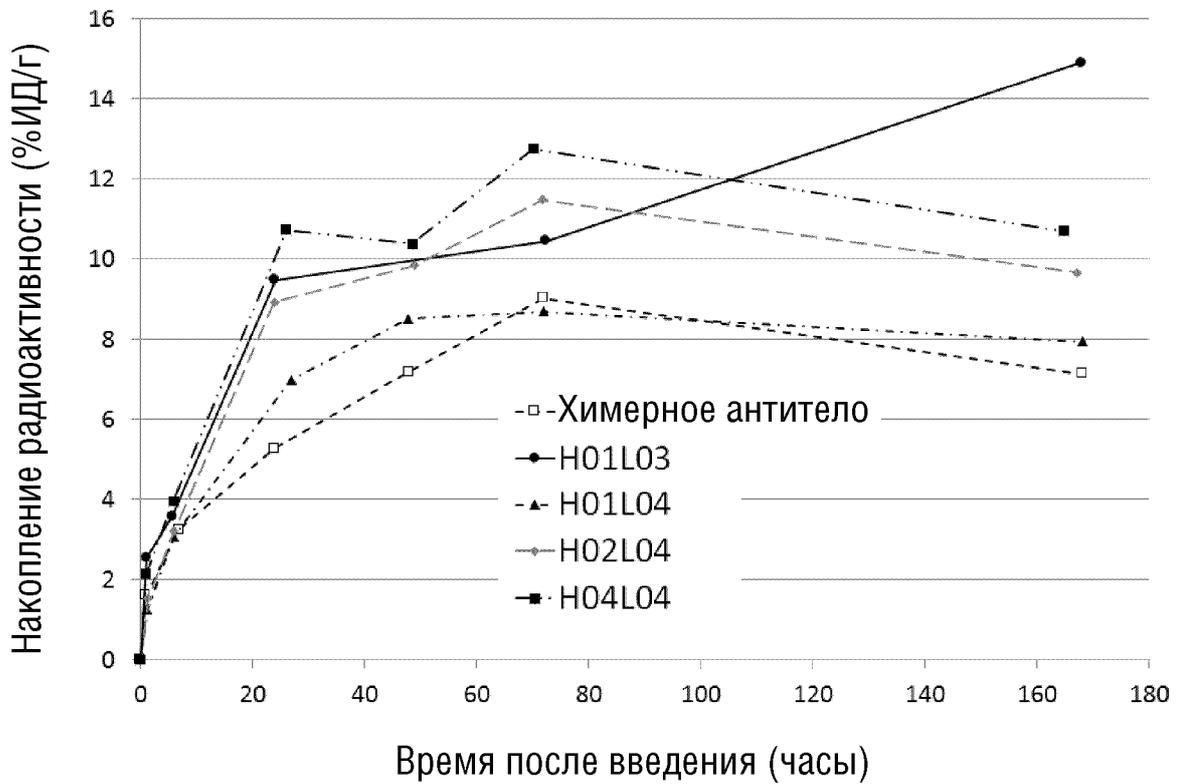
По доверенности

ФИГ.1

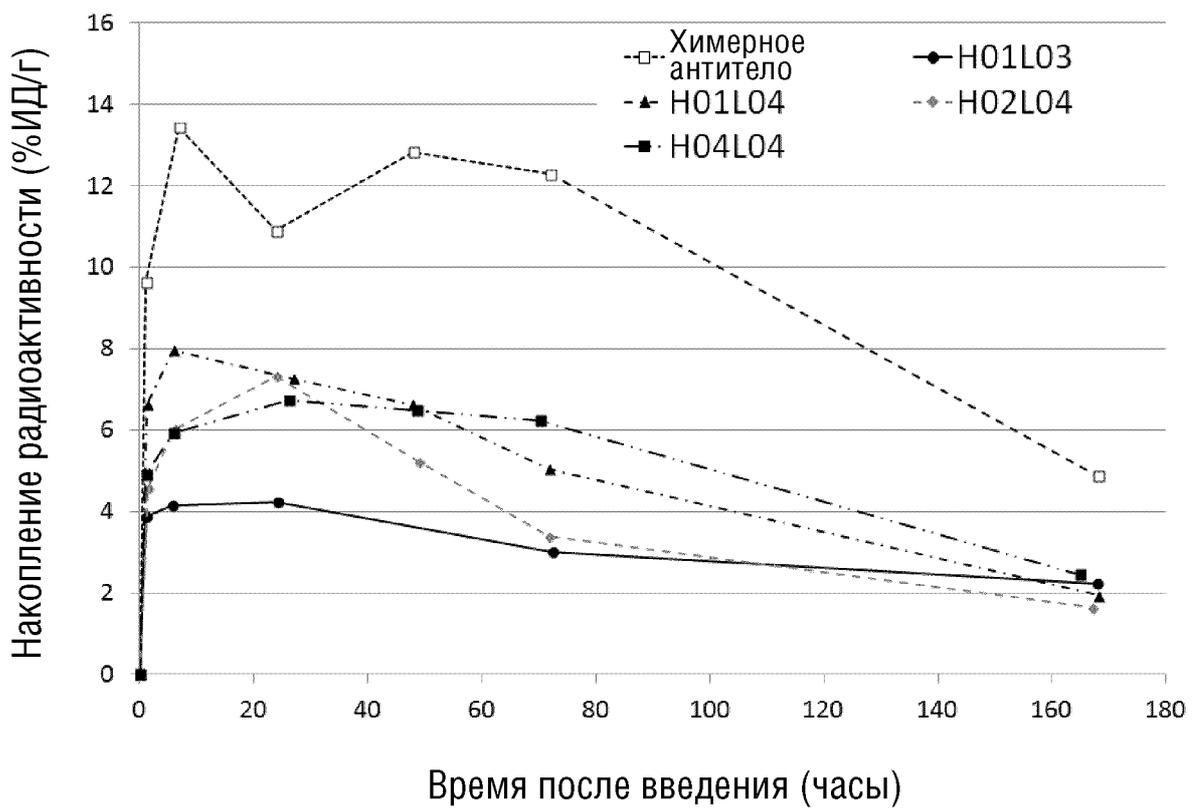


ФИГ.2

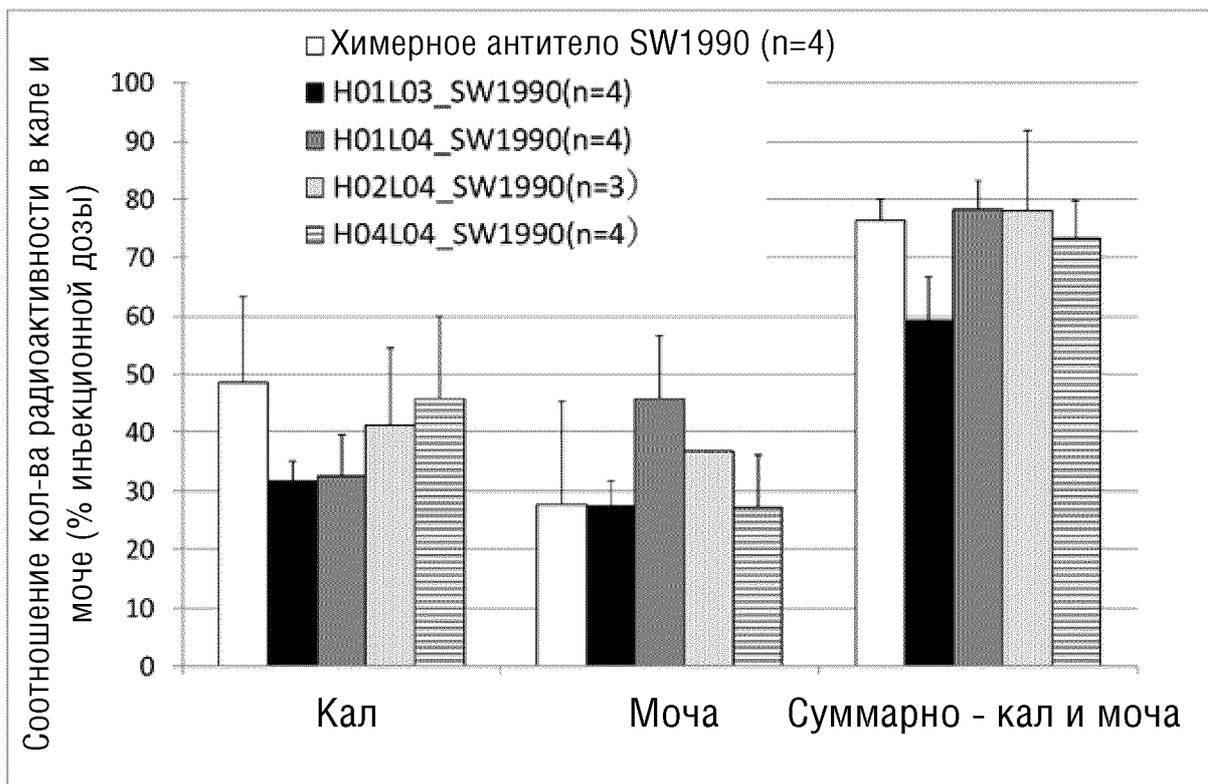
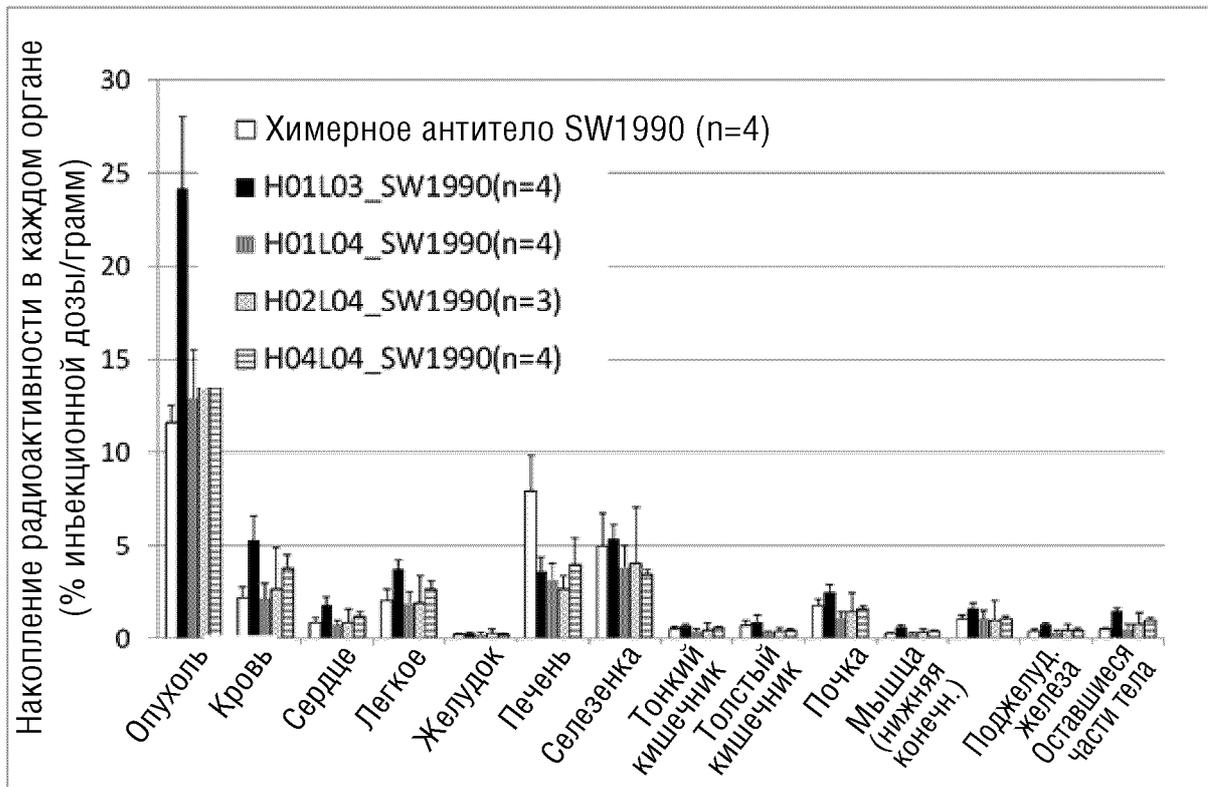
(Опухоль)



(Печень)



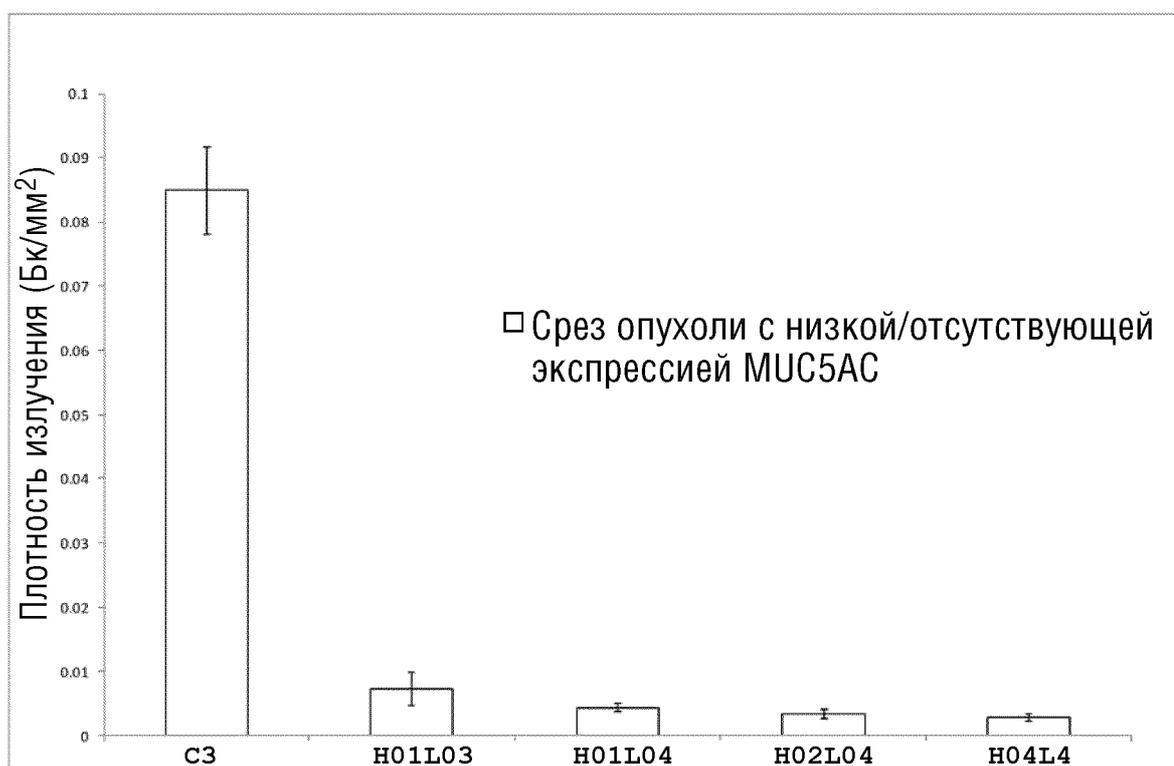
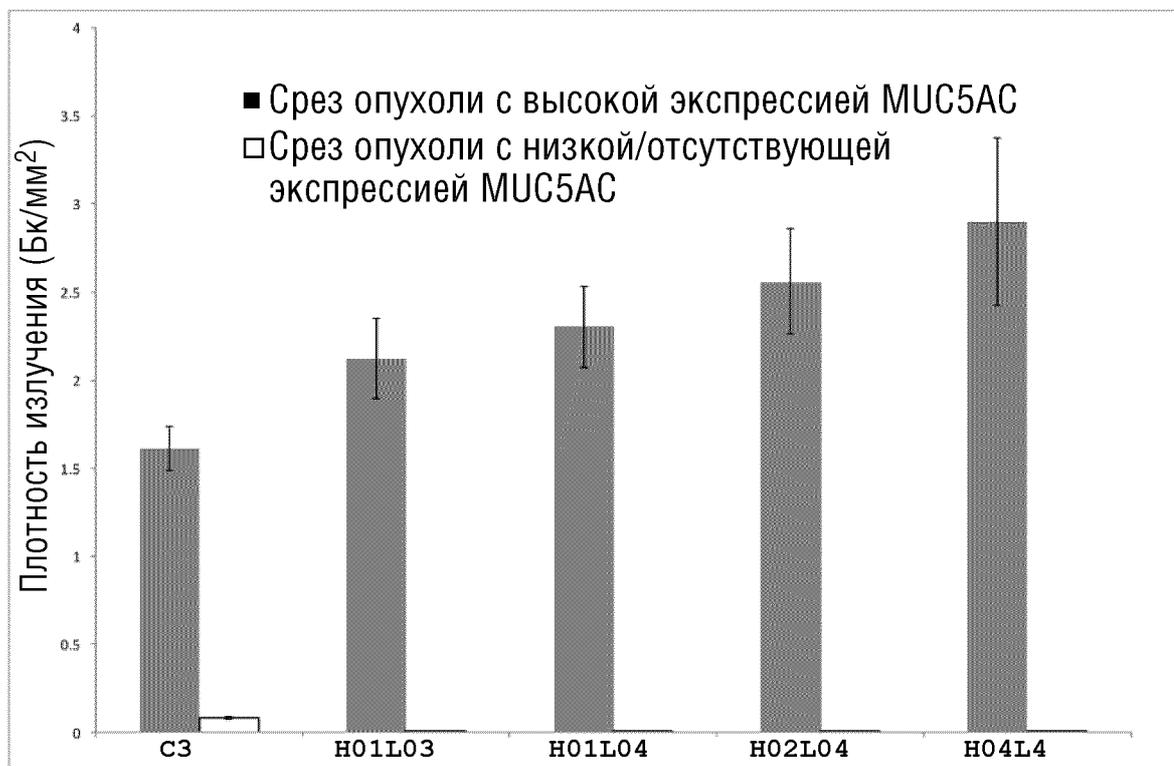
ФИГ.3



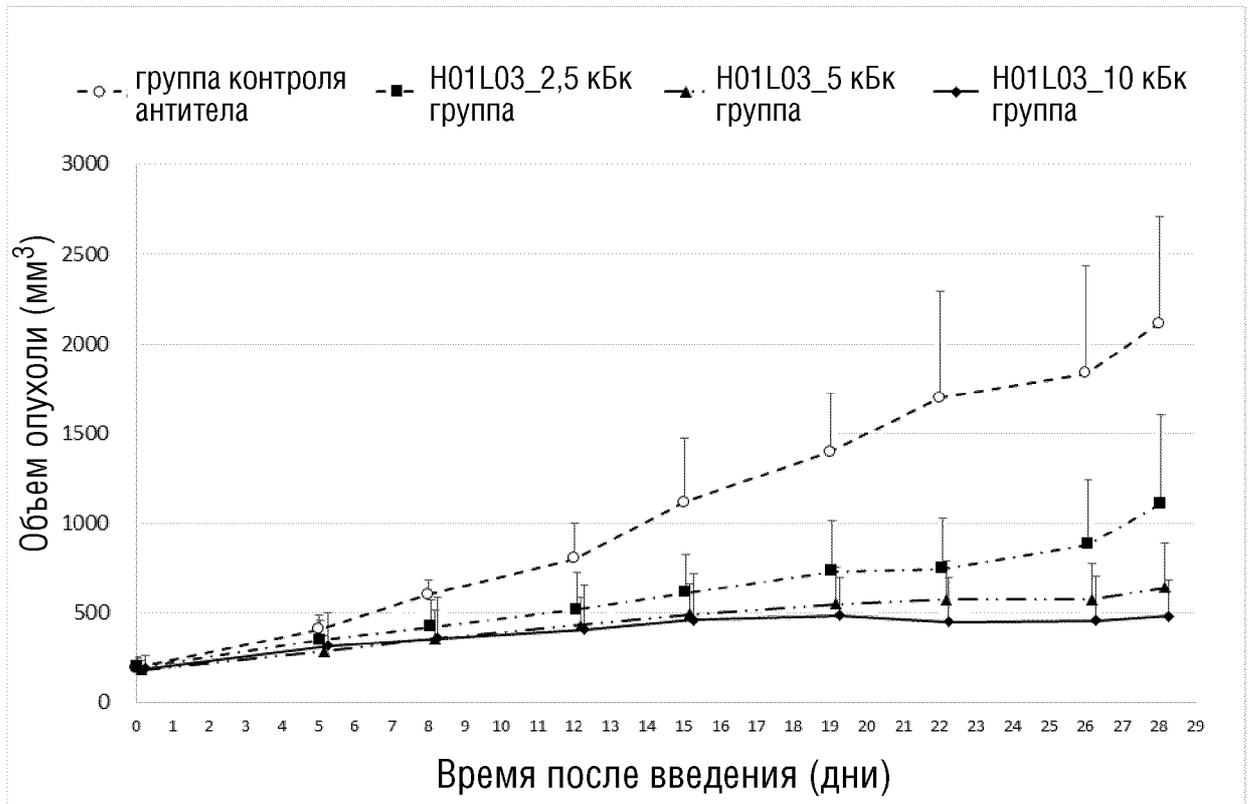
ФИГ.4



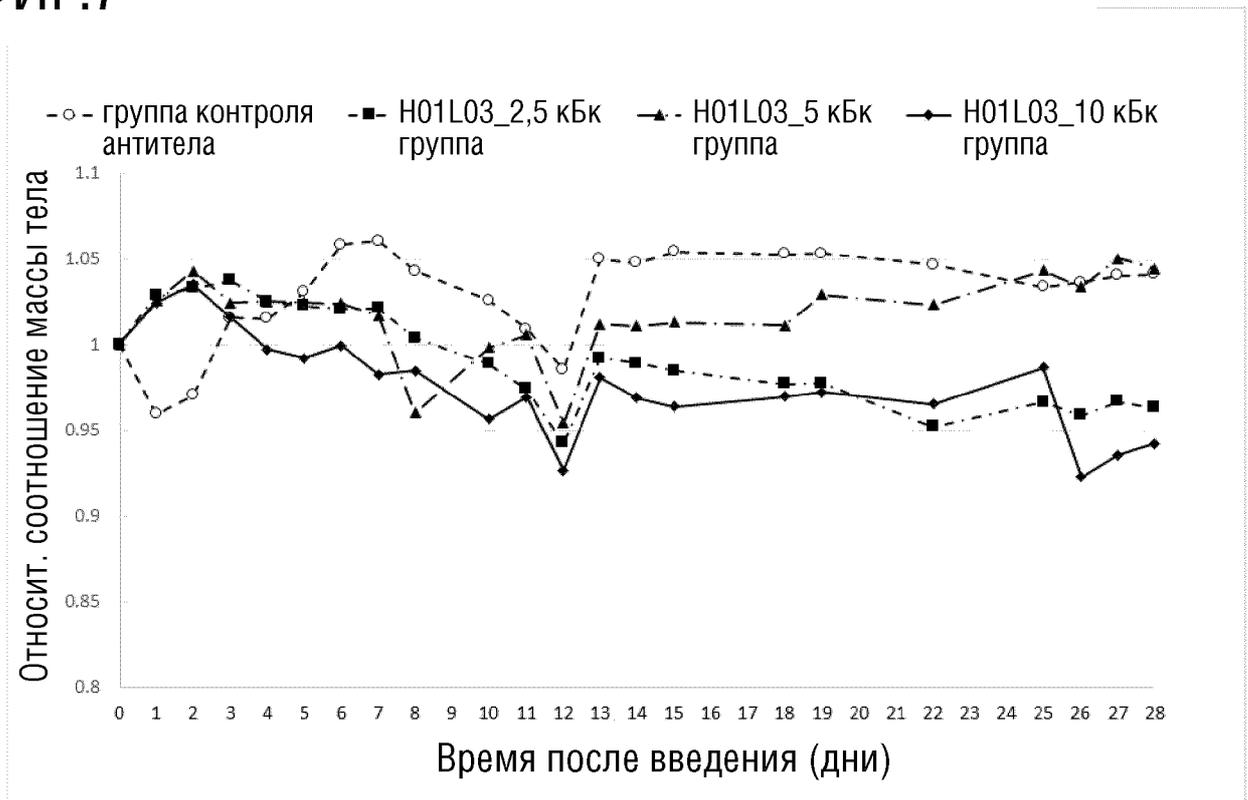
ФИГ.5



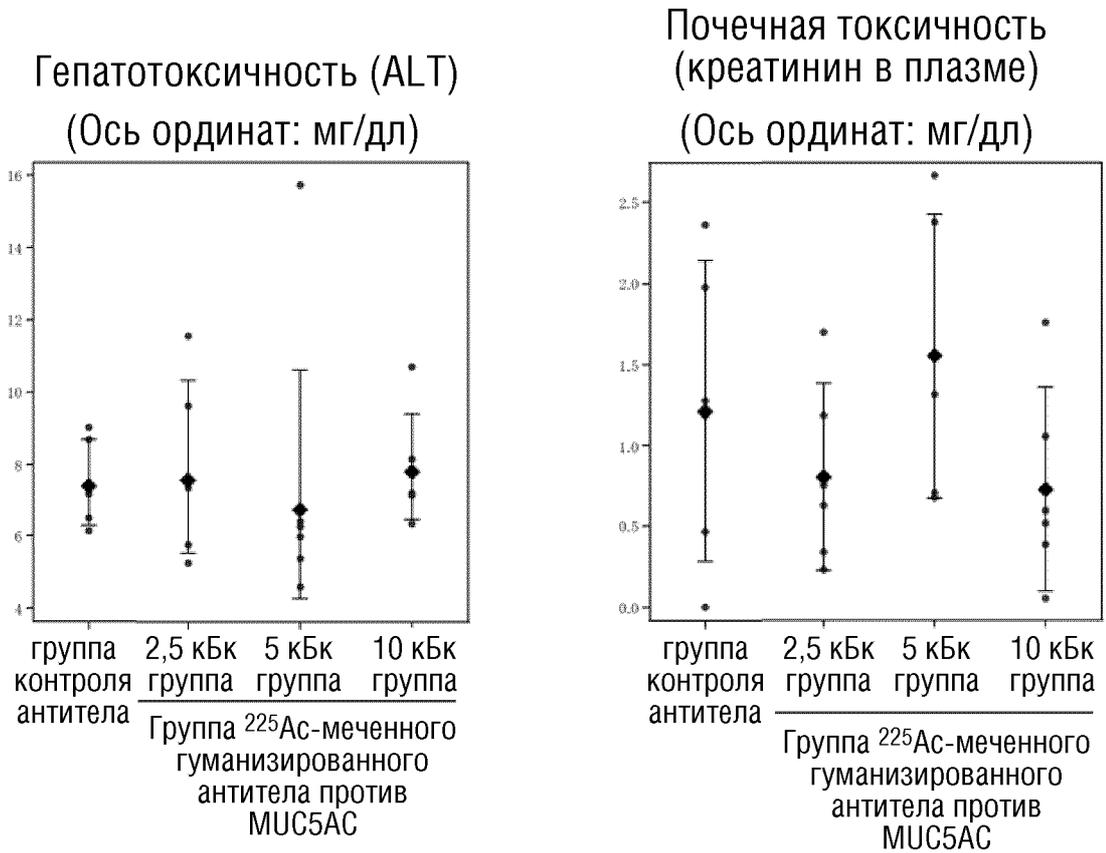
ФИГ.6



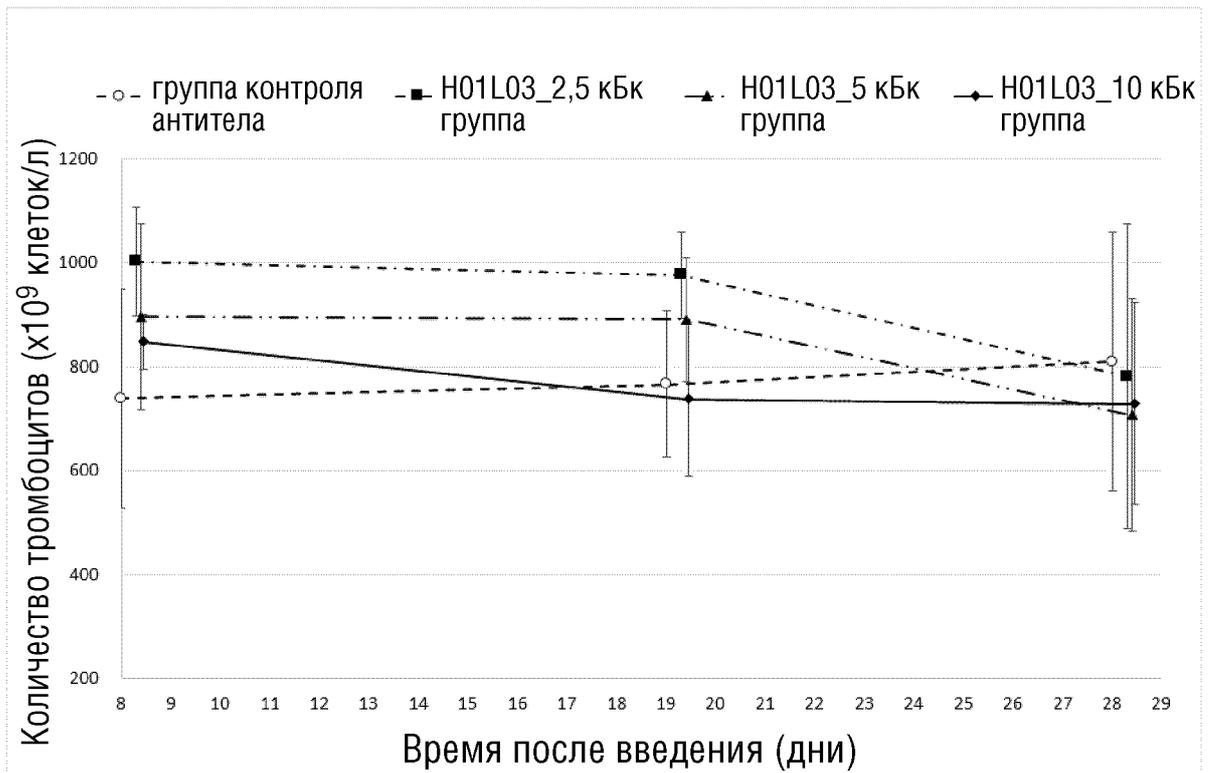
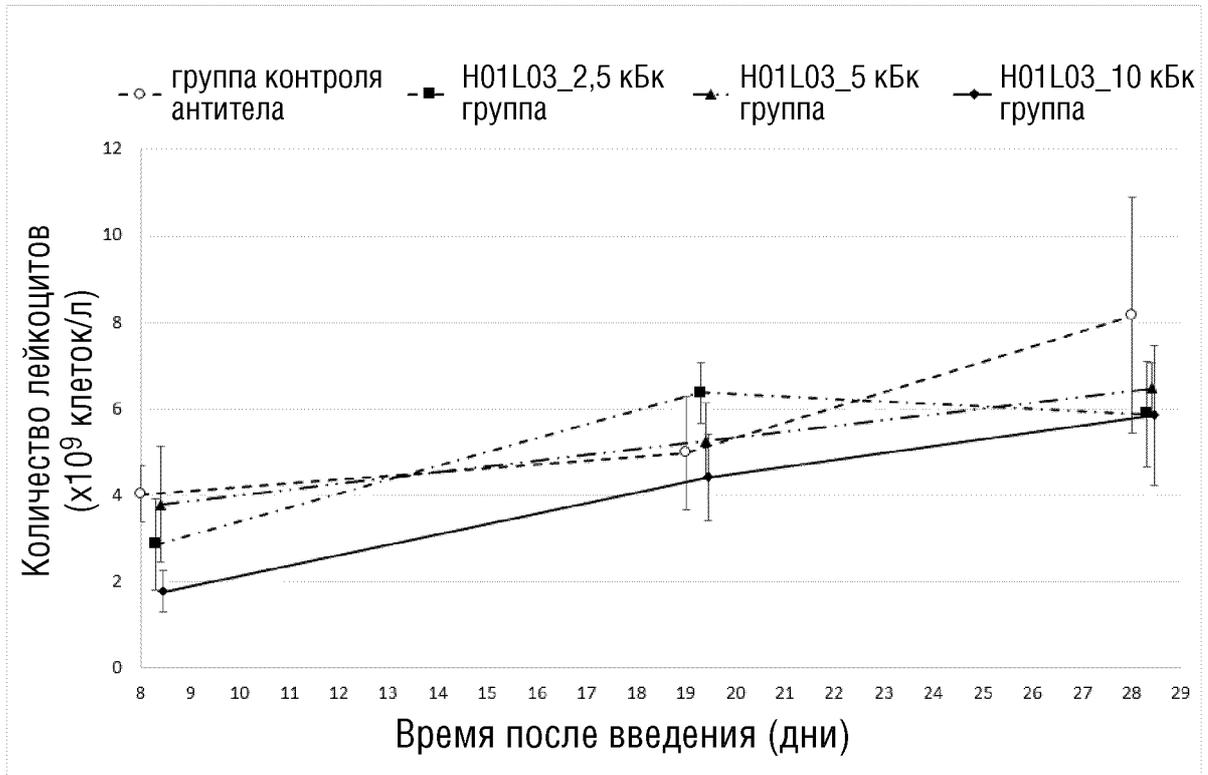
ФИГ.7



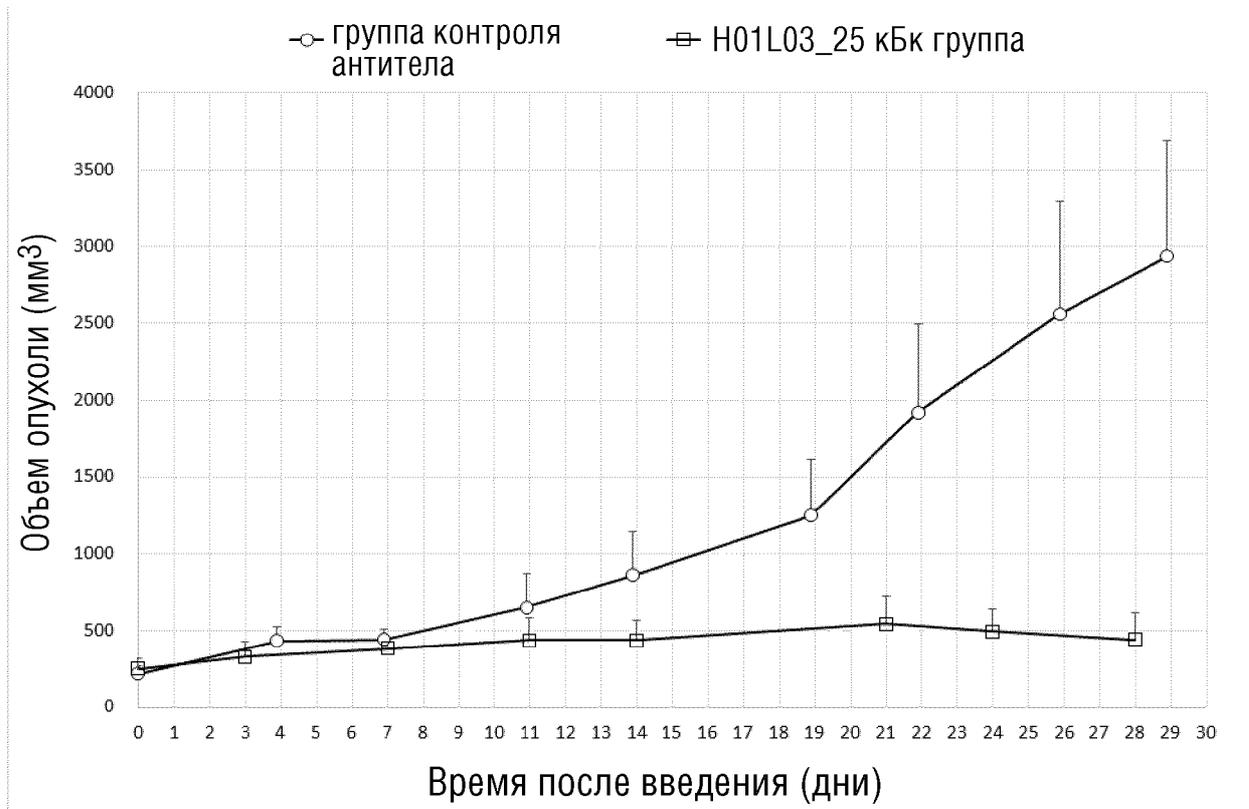
ФИГ.8



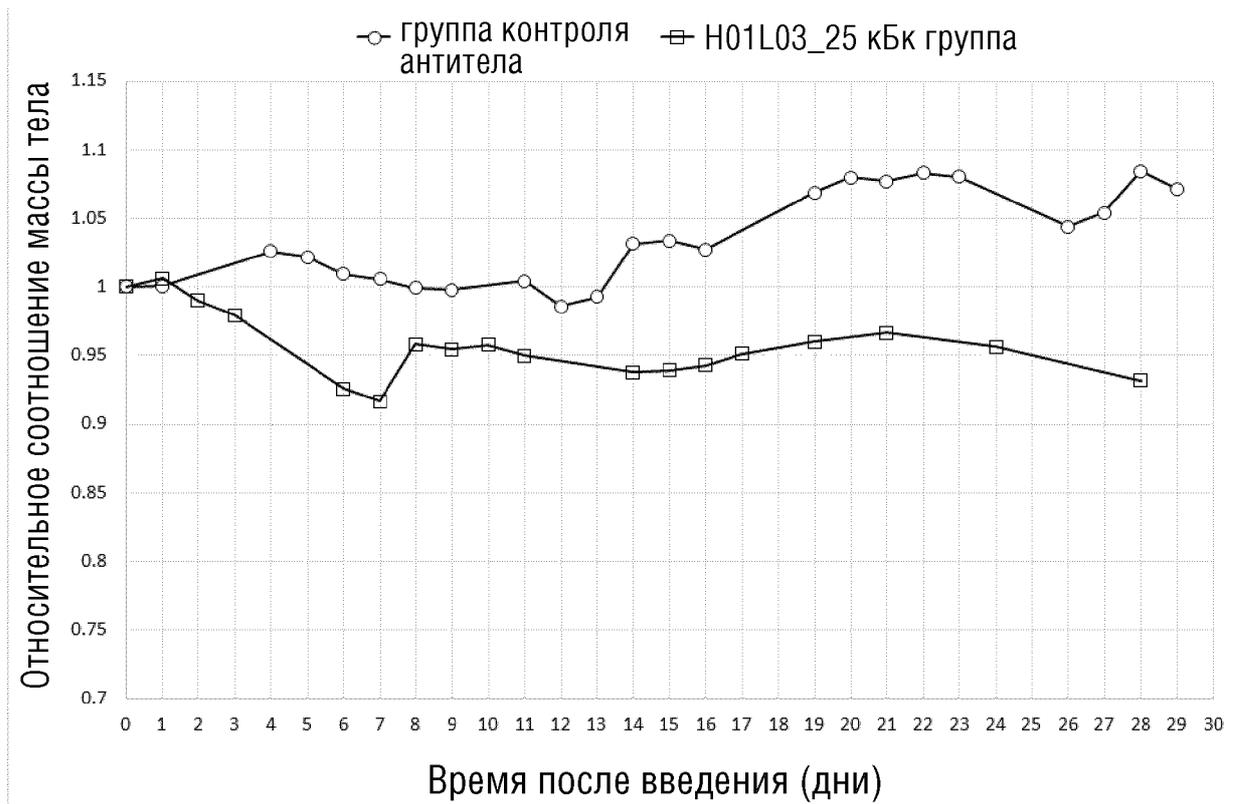
ФИГ.9



ФИГ.10

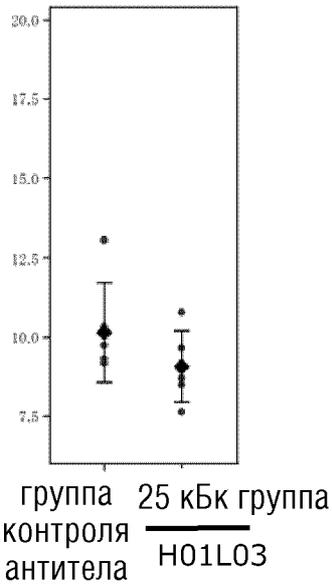


ФИГ.11

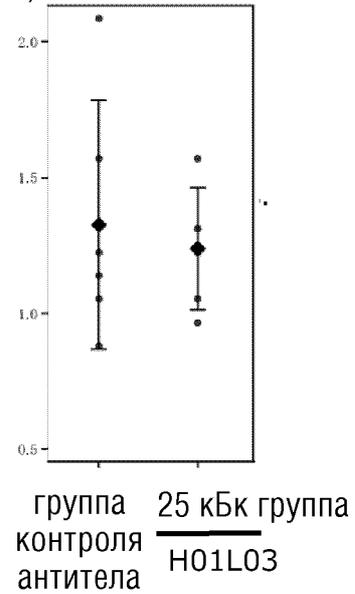


ФИГ.12

Гепатотоксичность (ALT)
(Ед/л)

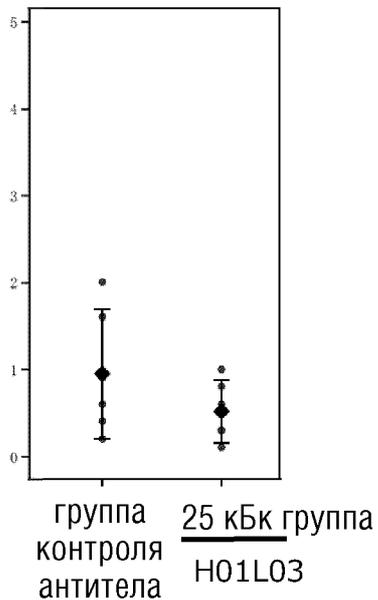


Почечная токсичность
(креатинин в плазме)
(мг/дл)

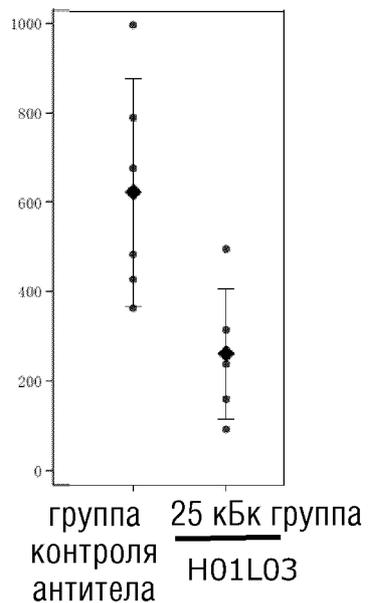


ФИГ.13

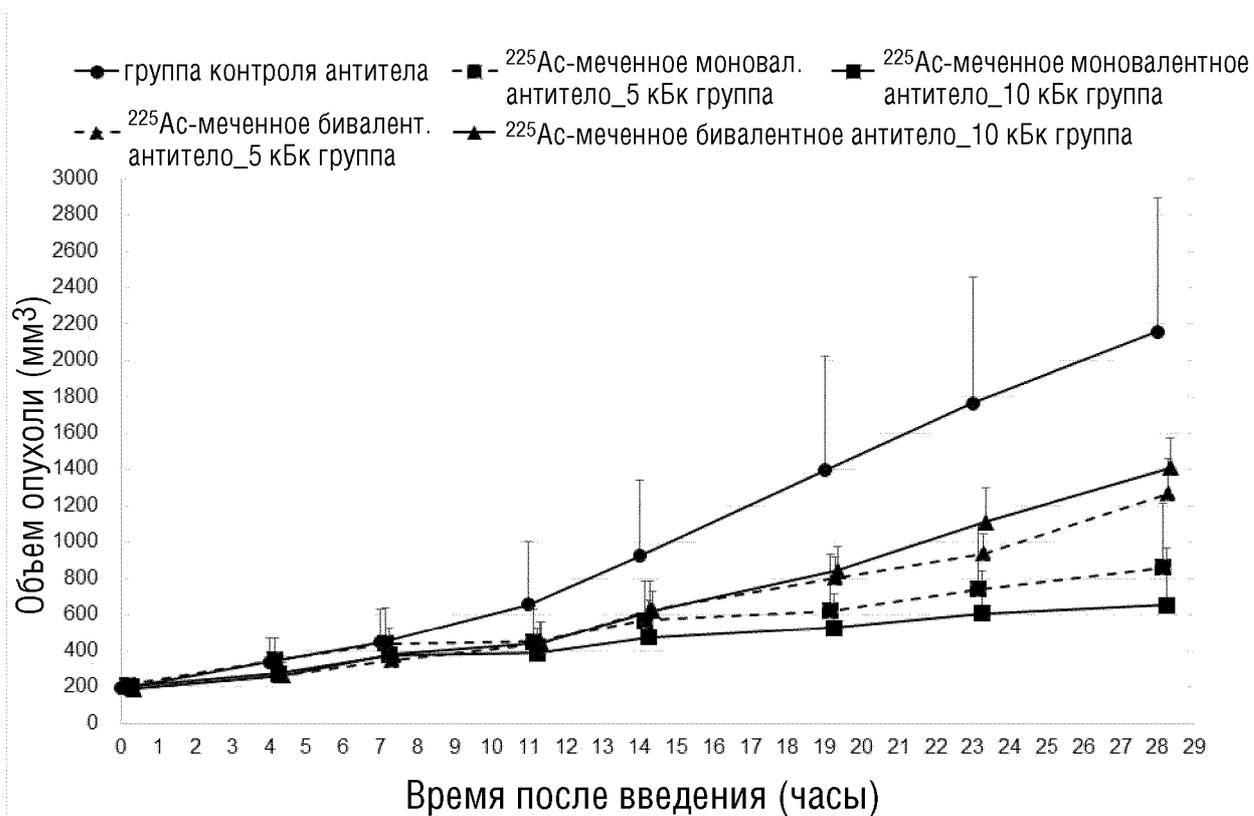
Количество лейкоцитов
($\times 10^9$ клеток/л)



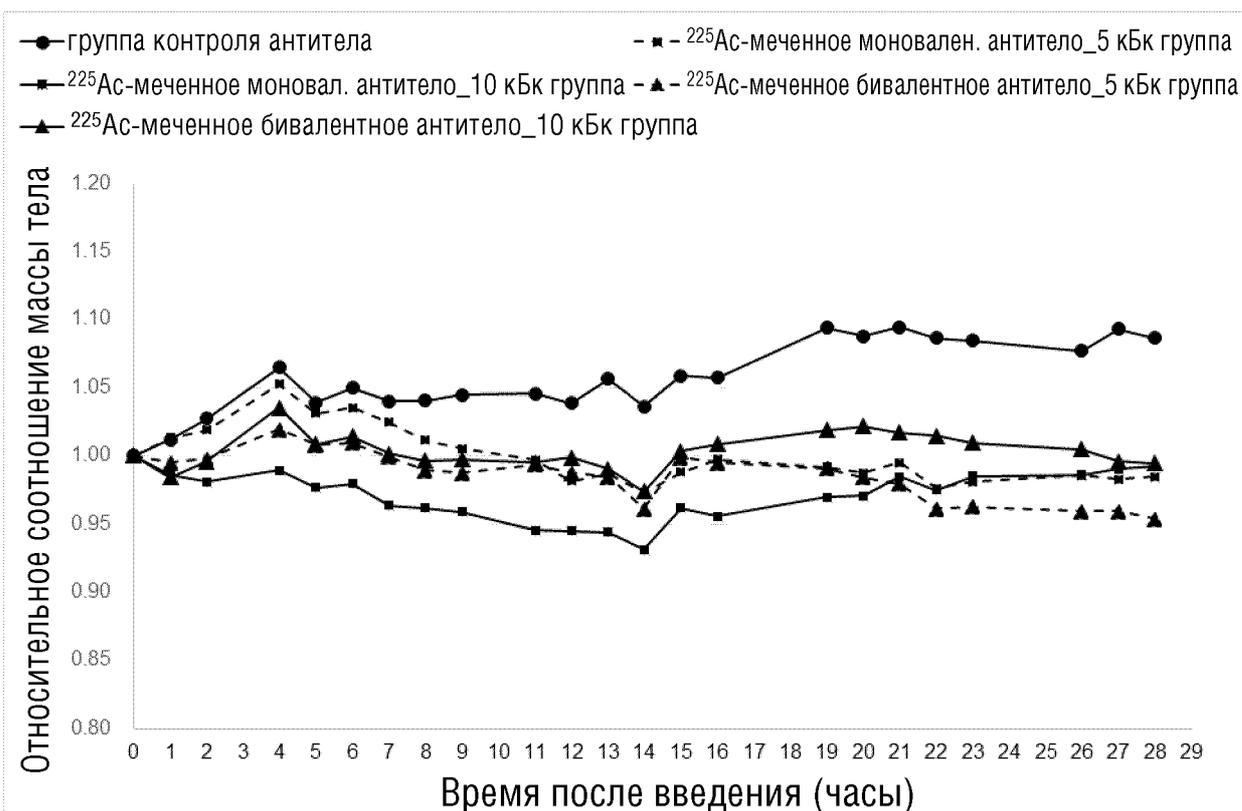
Количество тромбоцитов
($\times 10^9$ клеток/л)



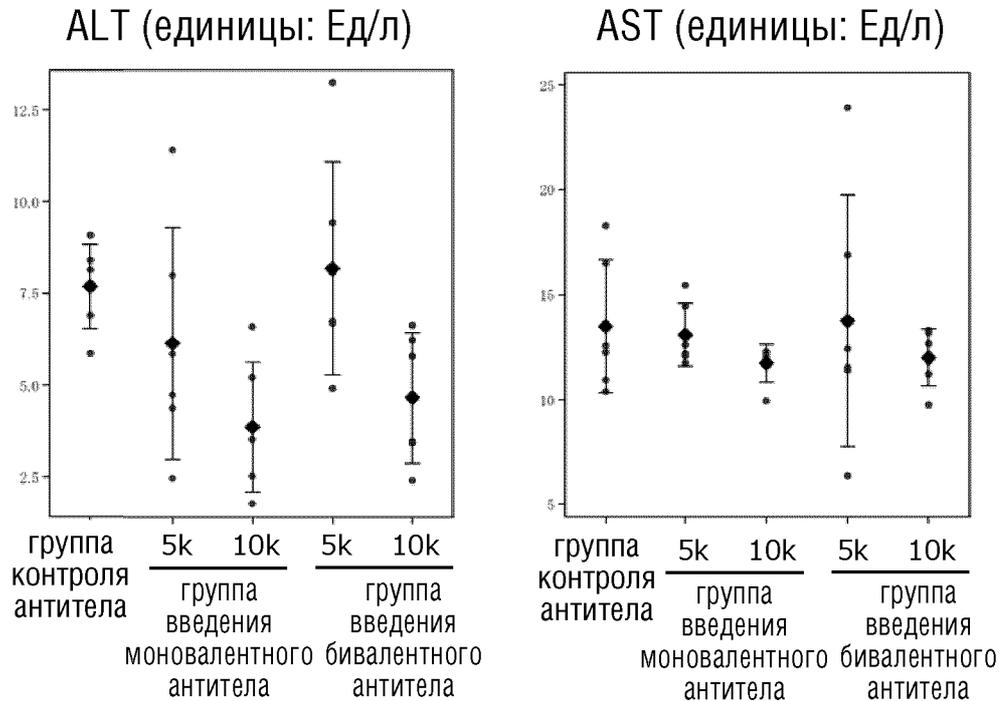
ФИГ.14



ФИГ.15

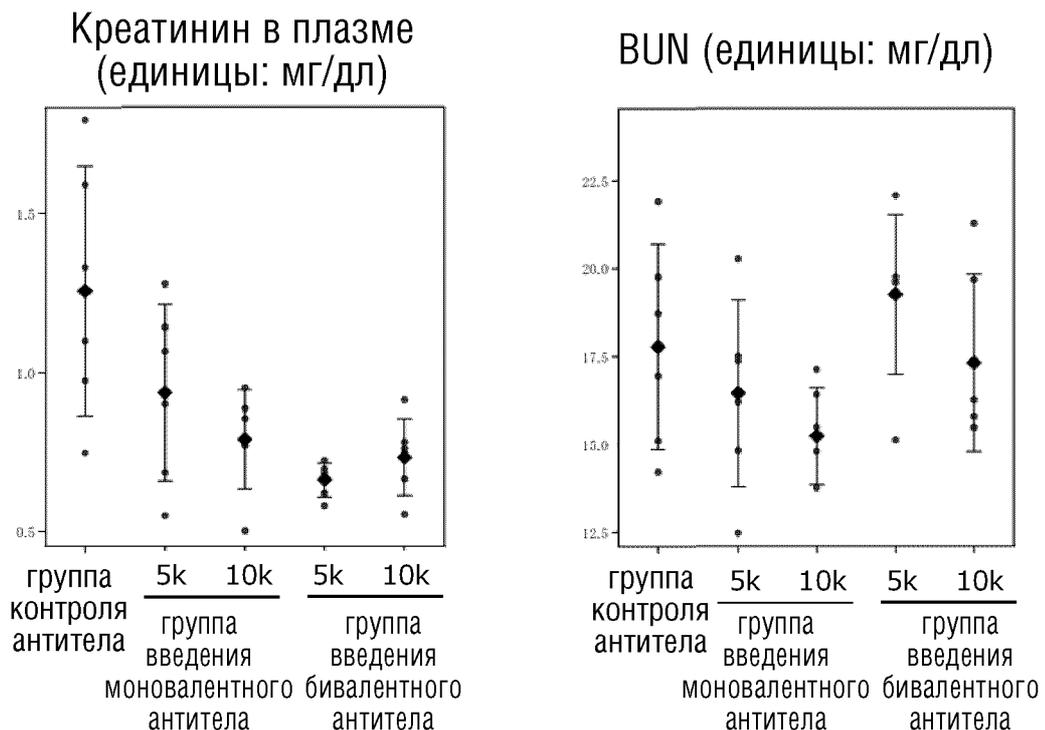


ФИГ.16



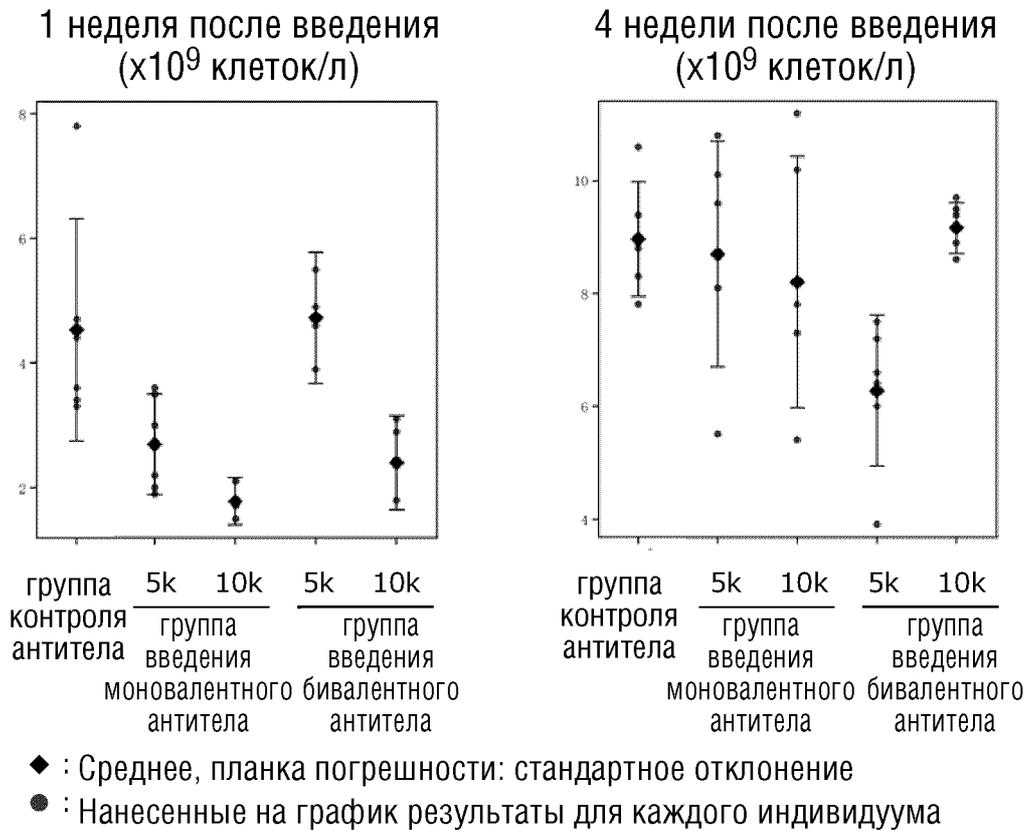
- ◆ : Среднее, планка погрешности: стандартное отклонение
- : Нанесенные на график результаты для каждого индивидуума

ФИГ.17

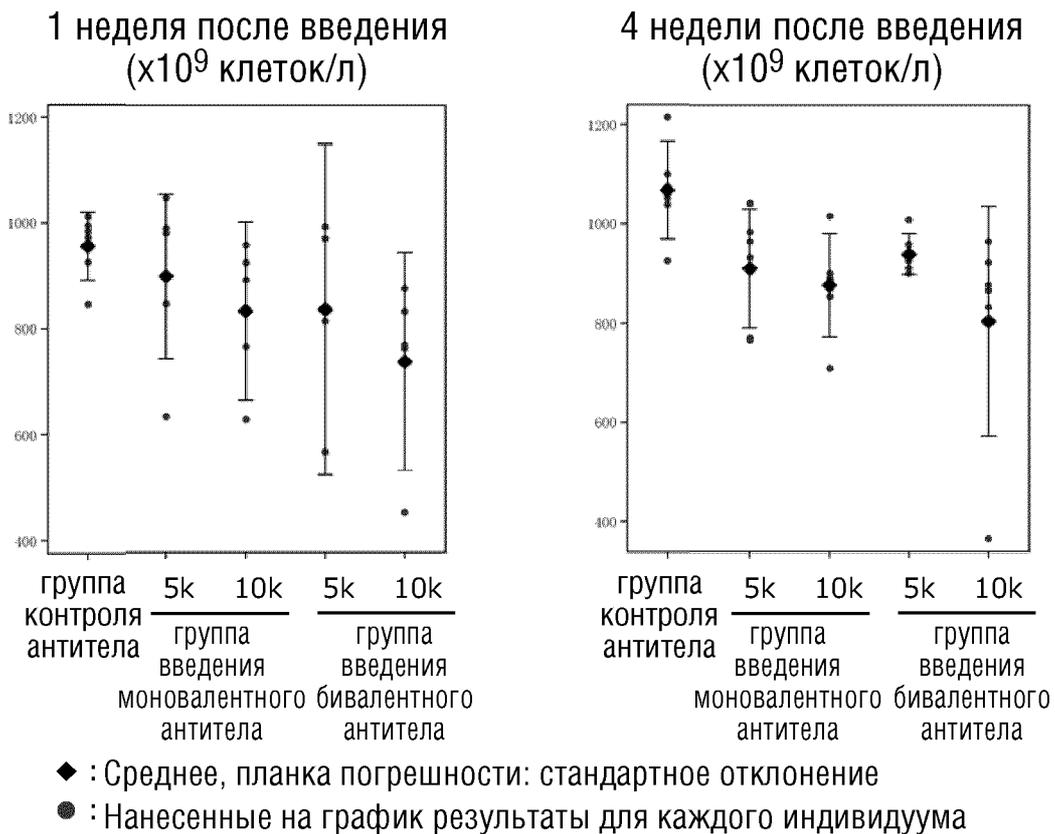


- ◆ : Среднее, планка погрешности: стандартное отклонение
- : Нанесенные на график результаты для каждого индивидуума

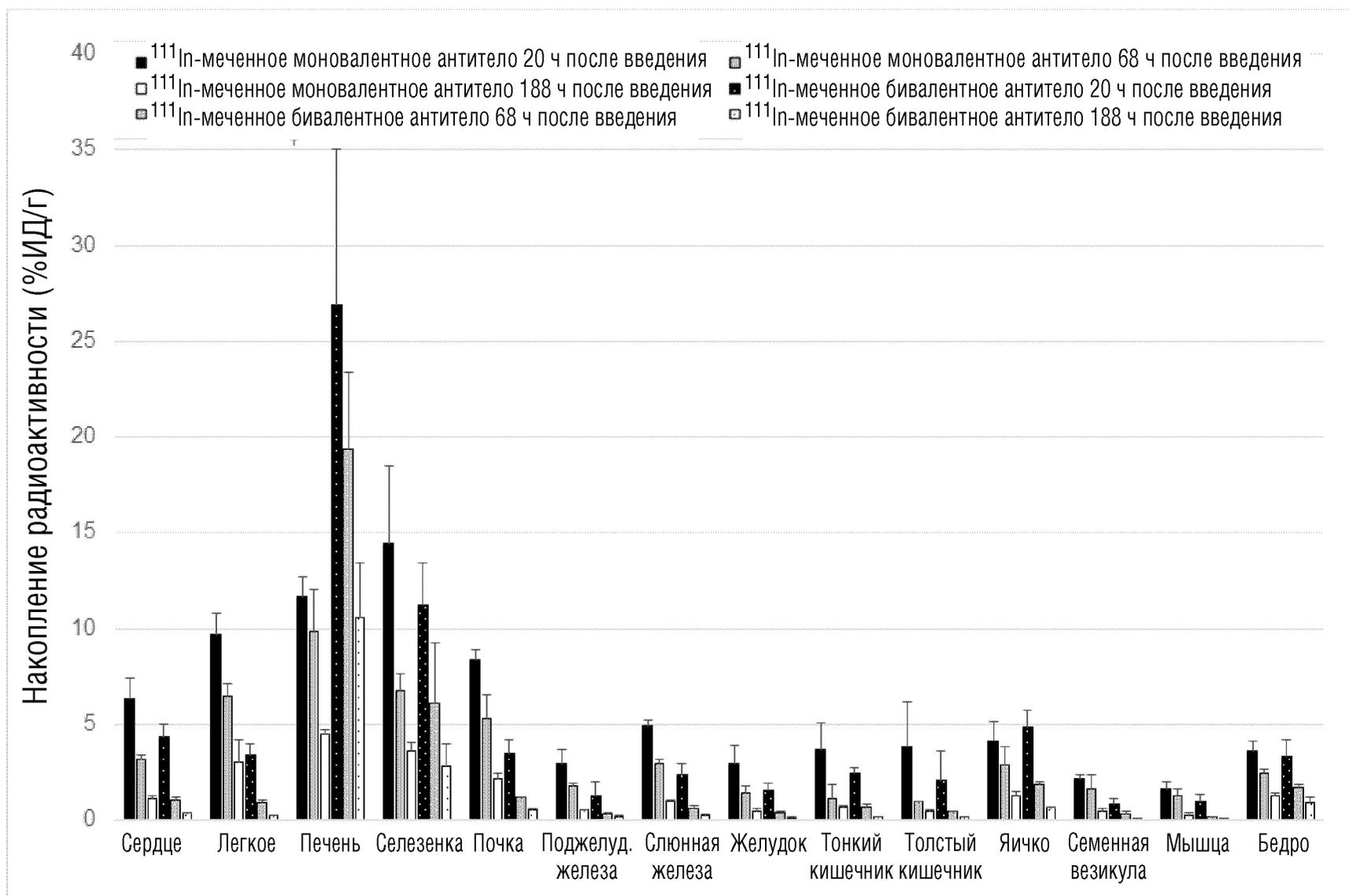
ФИГ.18



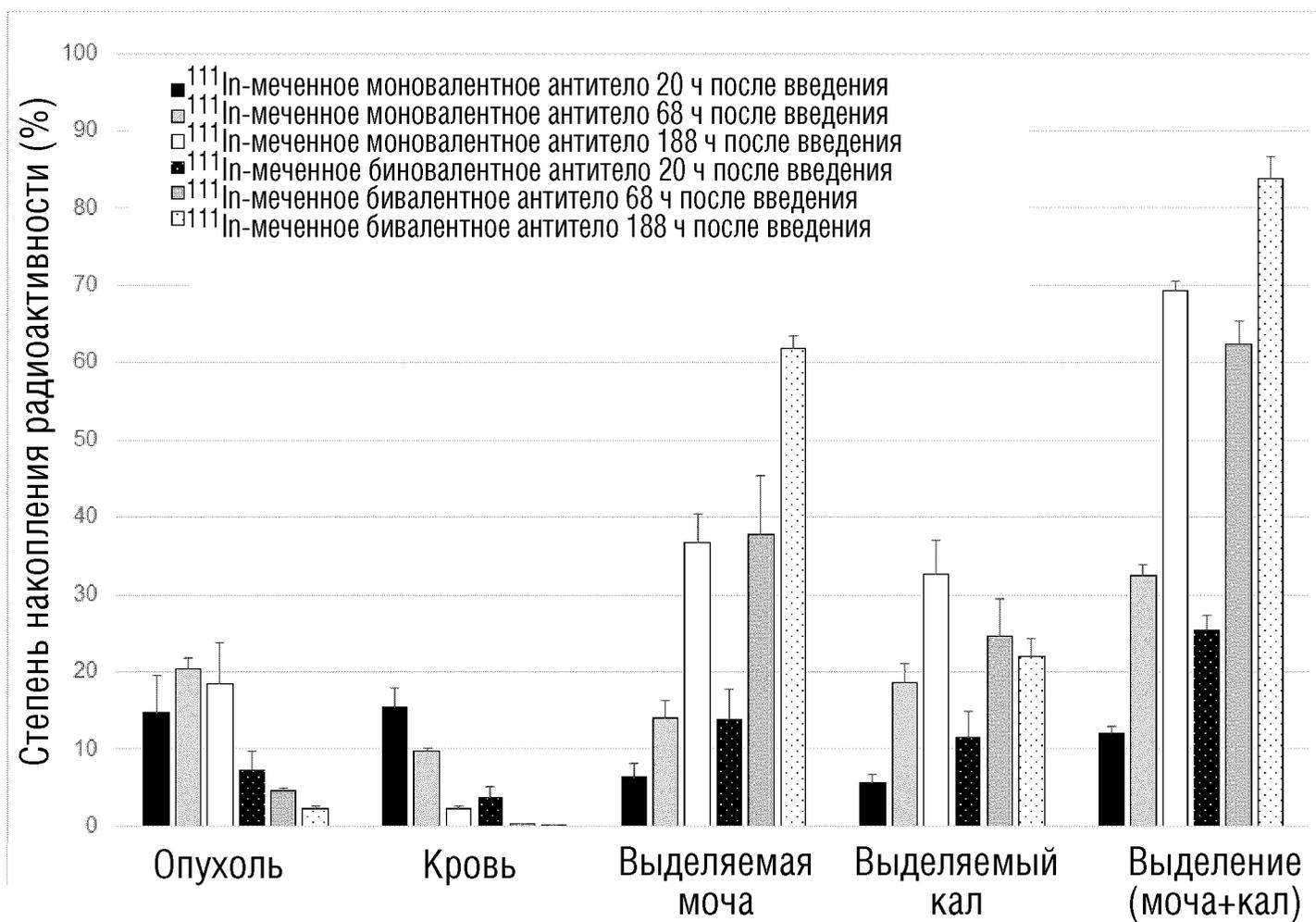
ФИГ.19



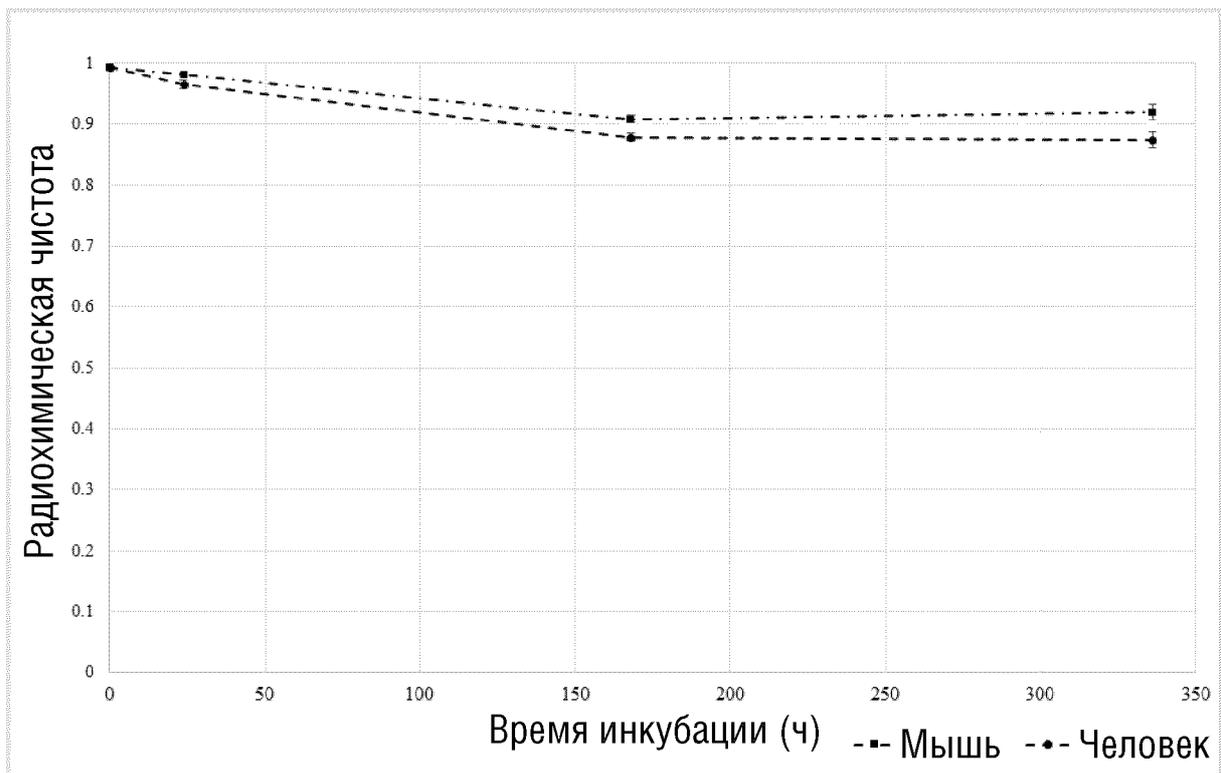
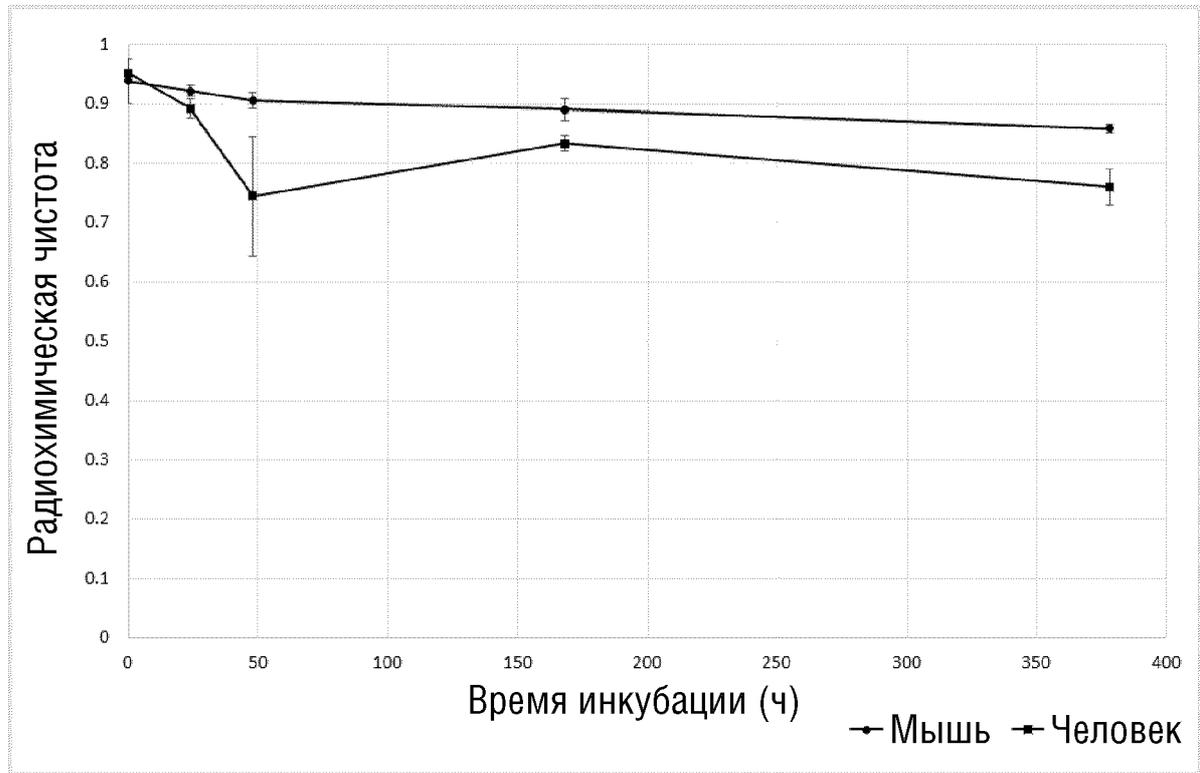
ФИГ.20



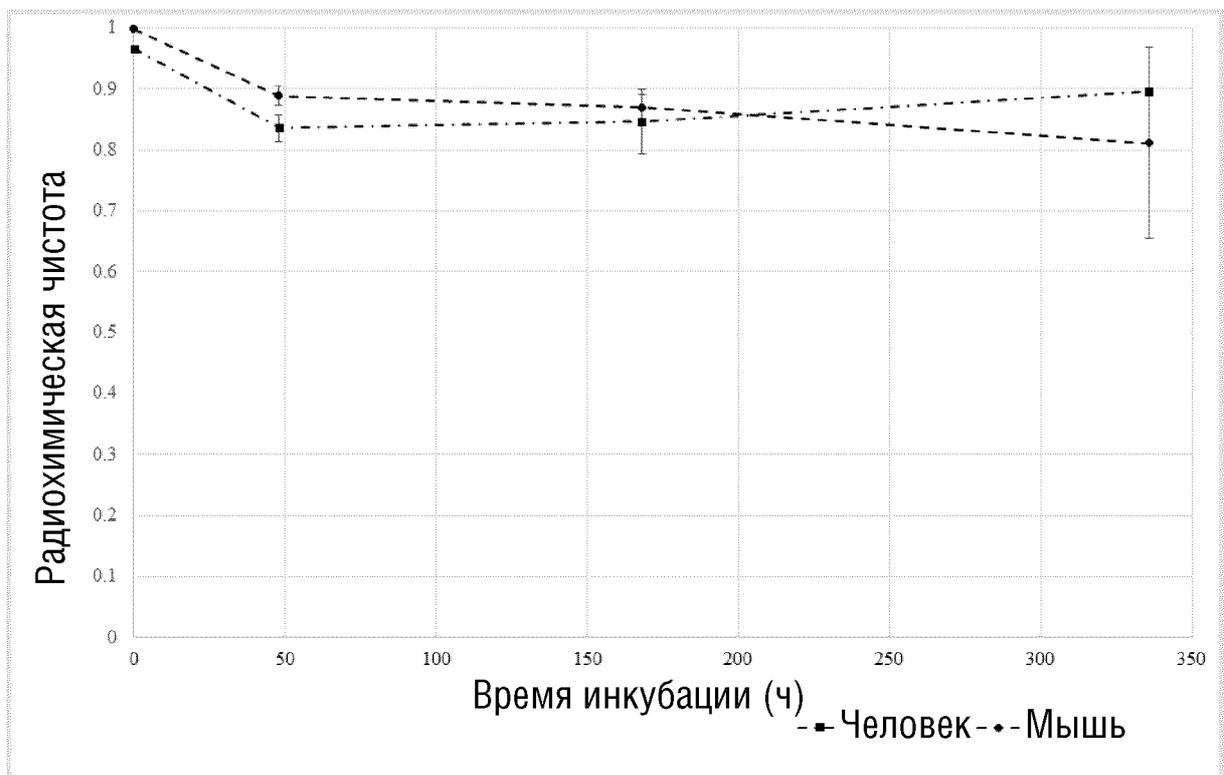
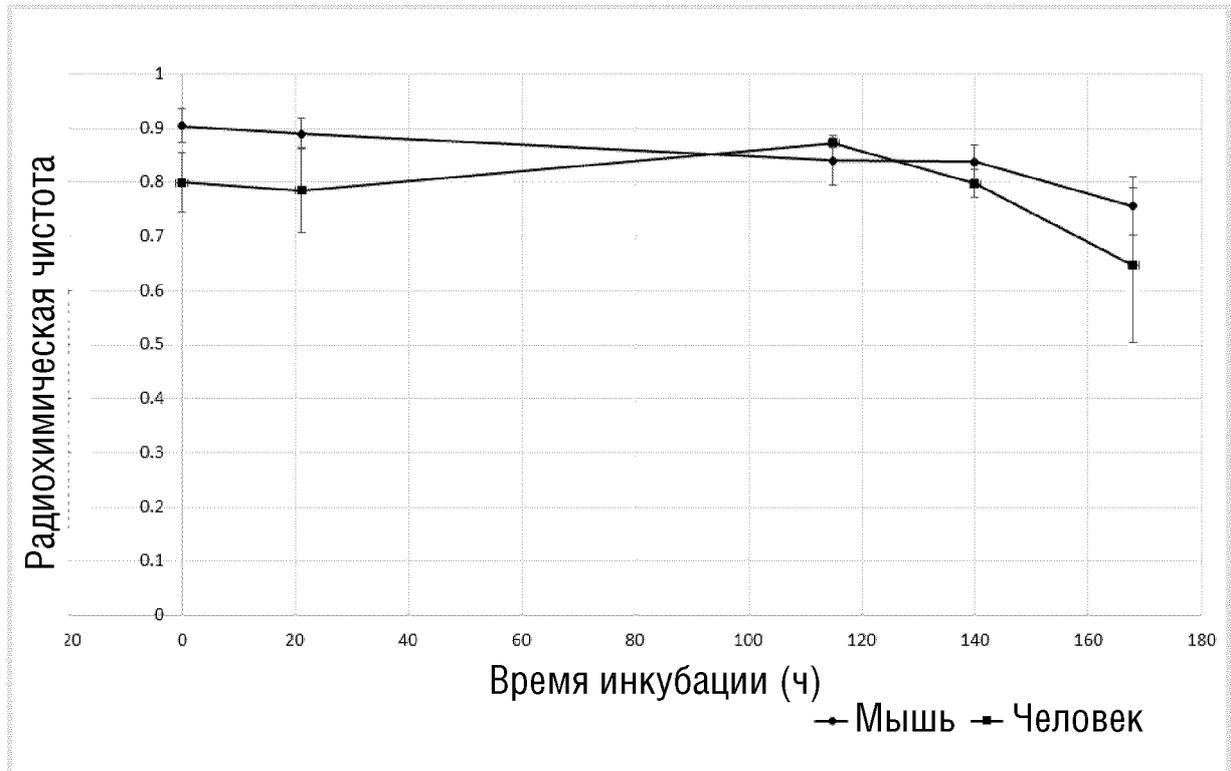
ФИГ.21



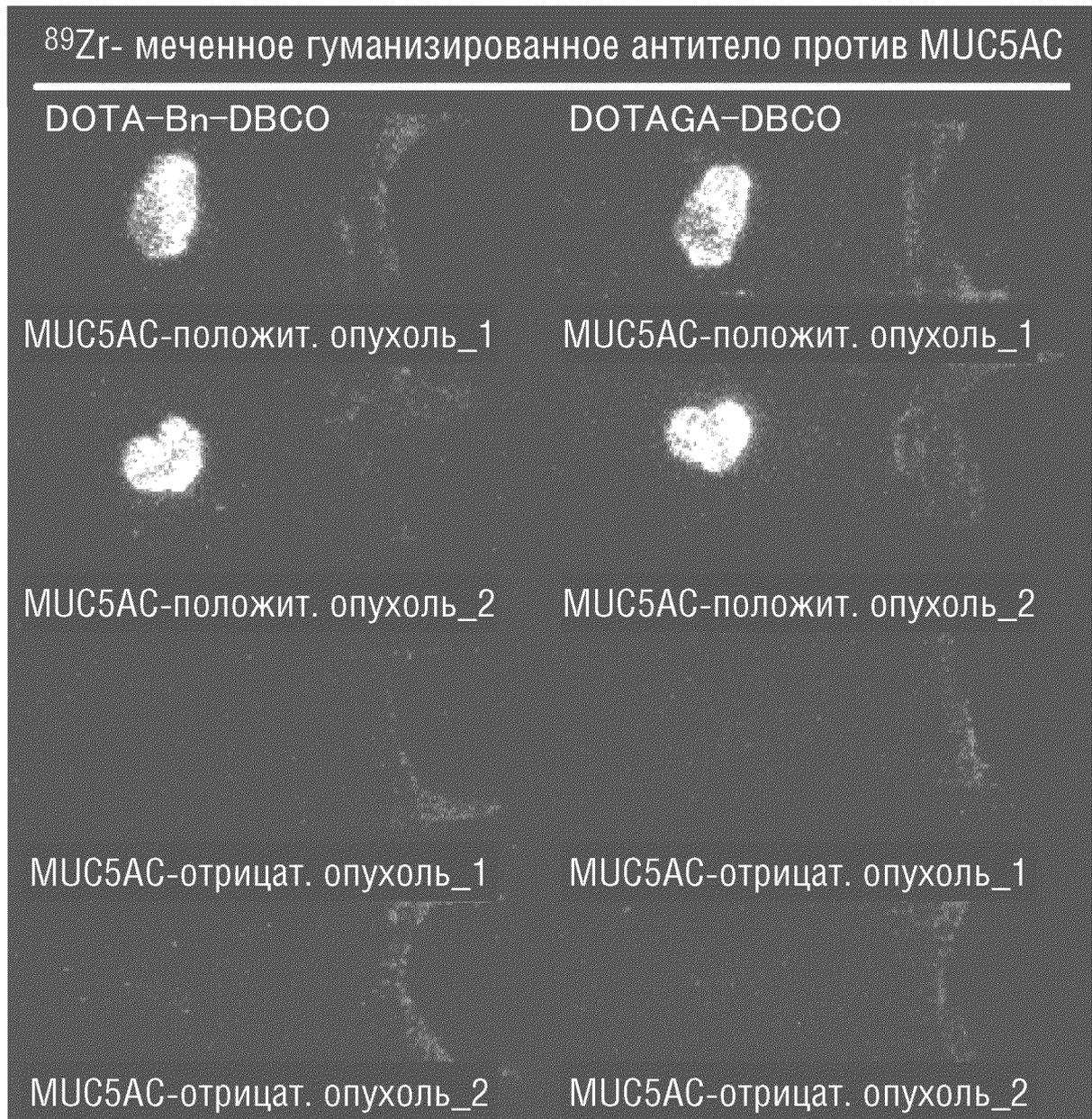
ФИГ.22А



ФИГ.22В



ФИГ.23



ФИГ.24

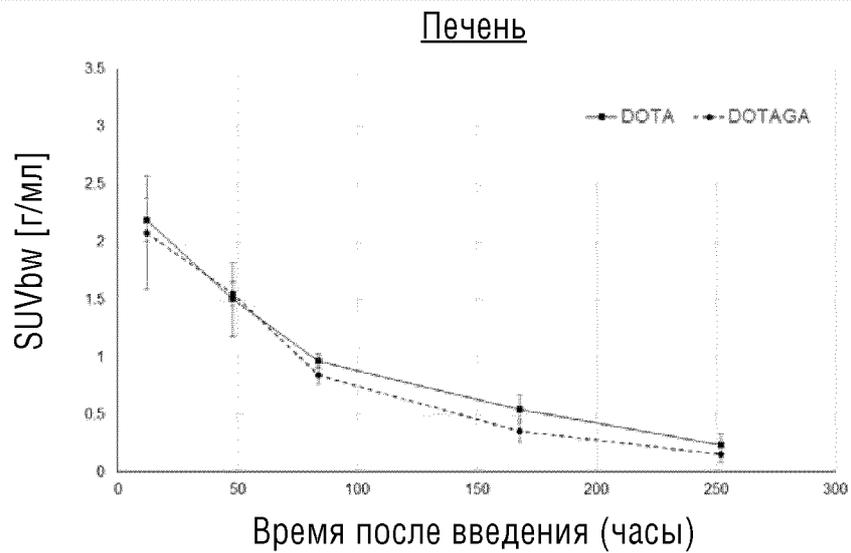
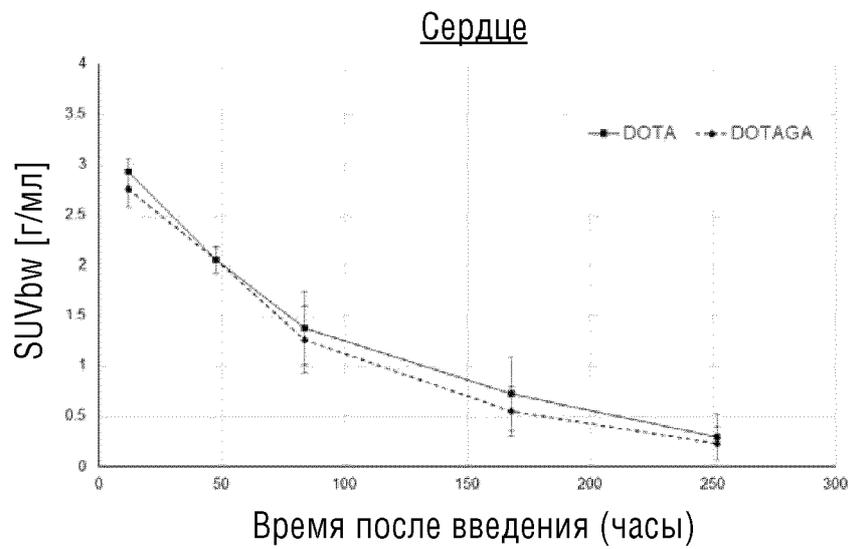
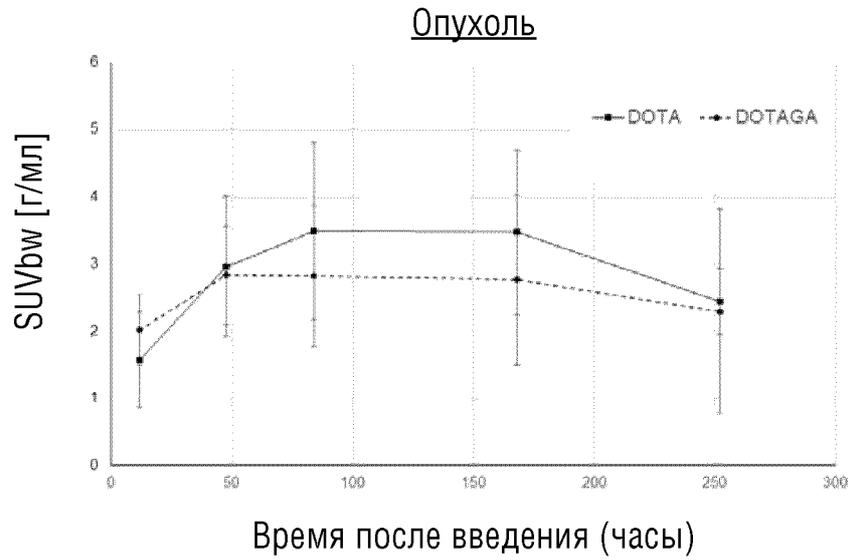
^{225}Ac -меченное гуманизированное антитело против MUC5AC
(DBCO-DOTAGA)



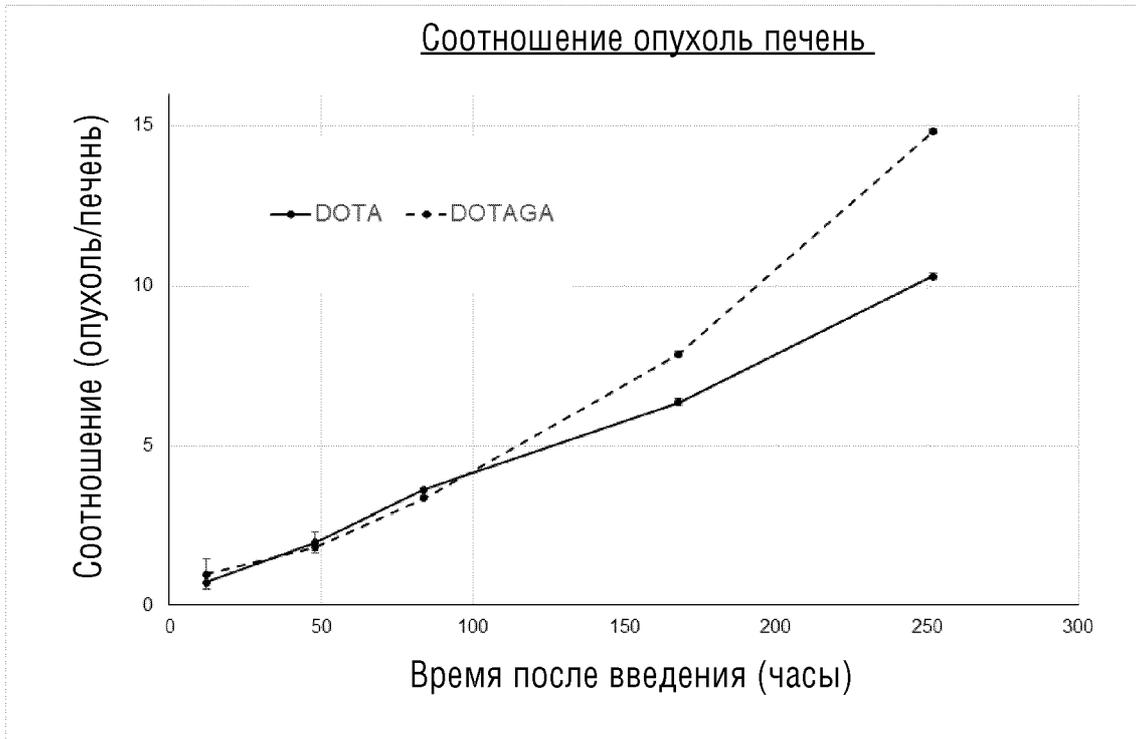
ФИГ.25



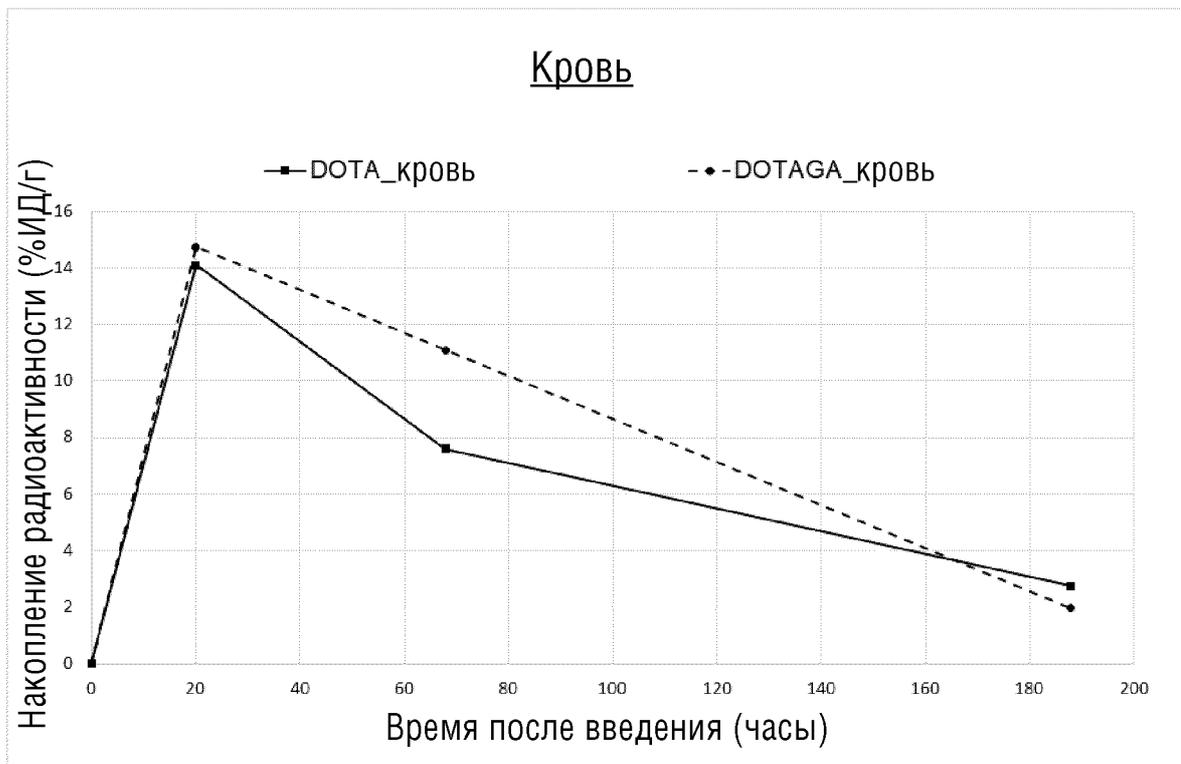
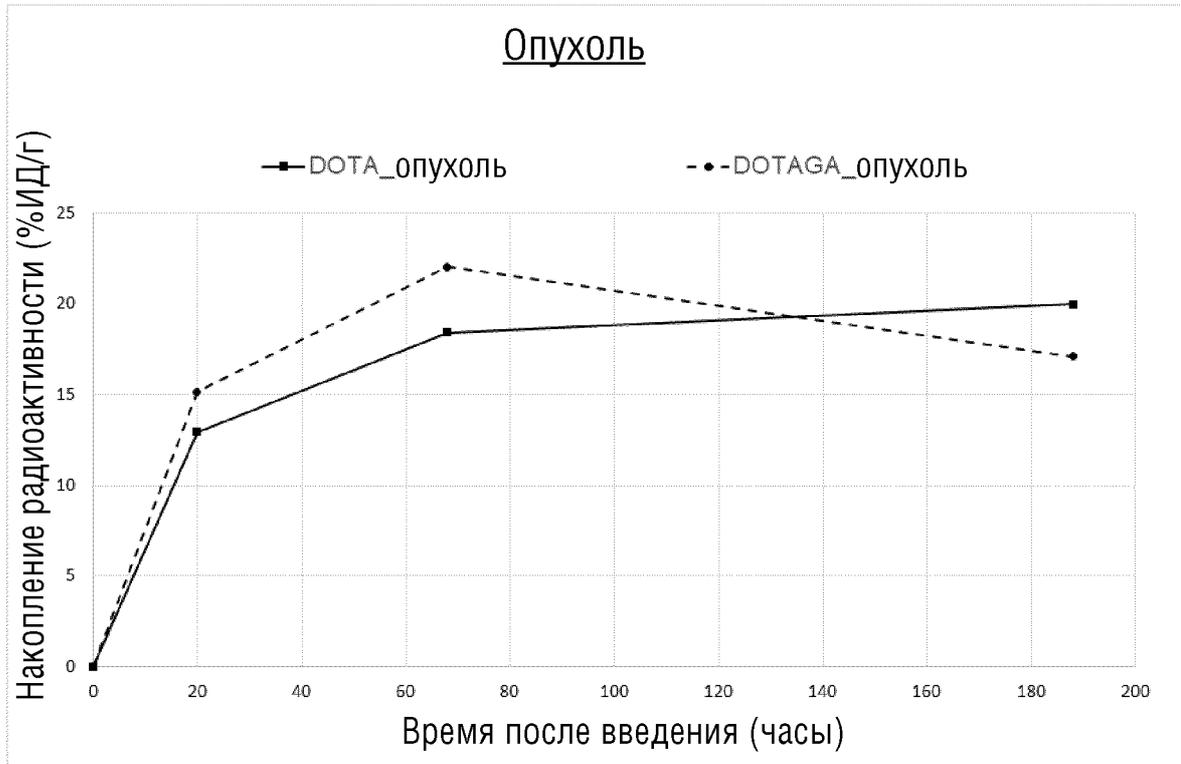
ФИГ.26



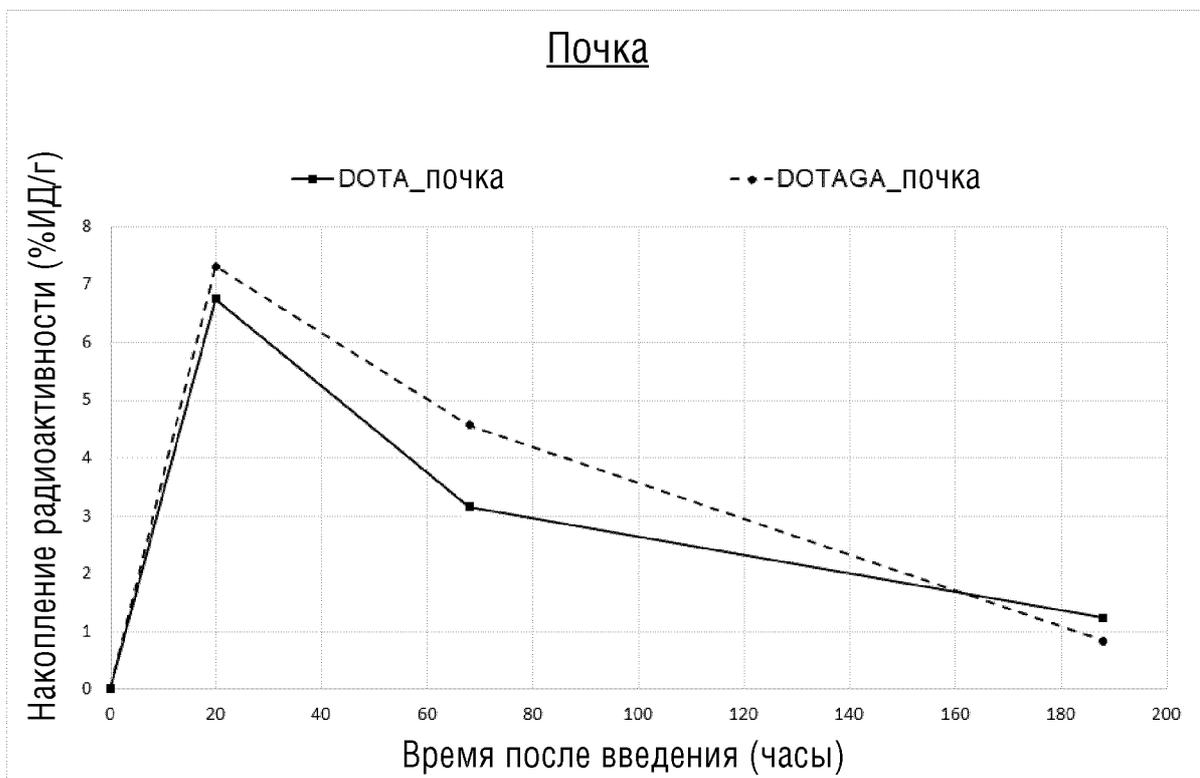
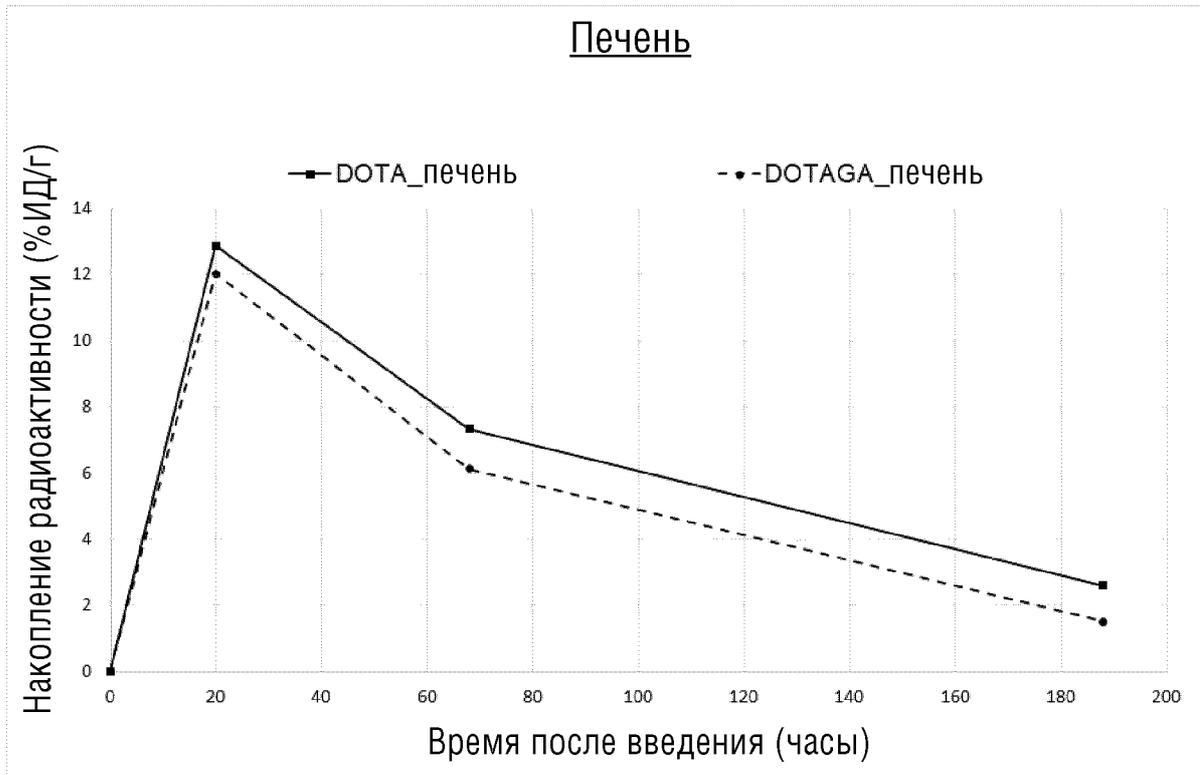
ФИГ.27



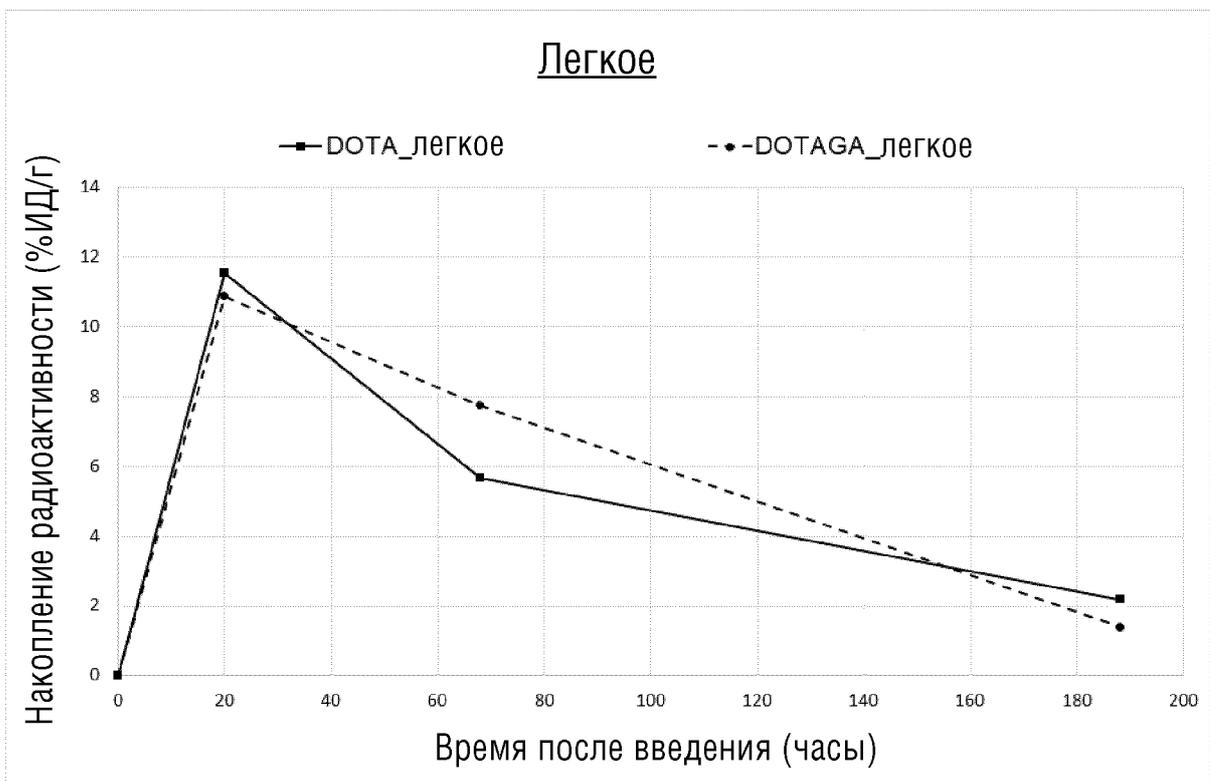
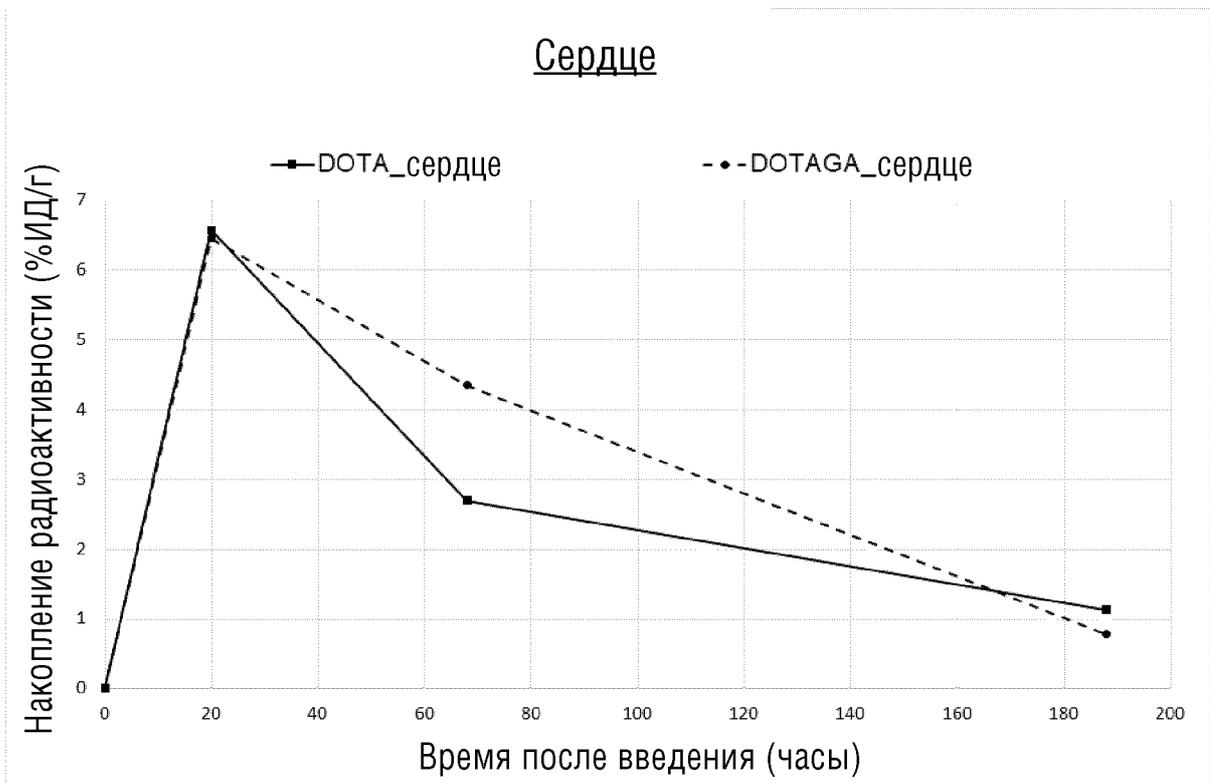
ФИГ.28А



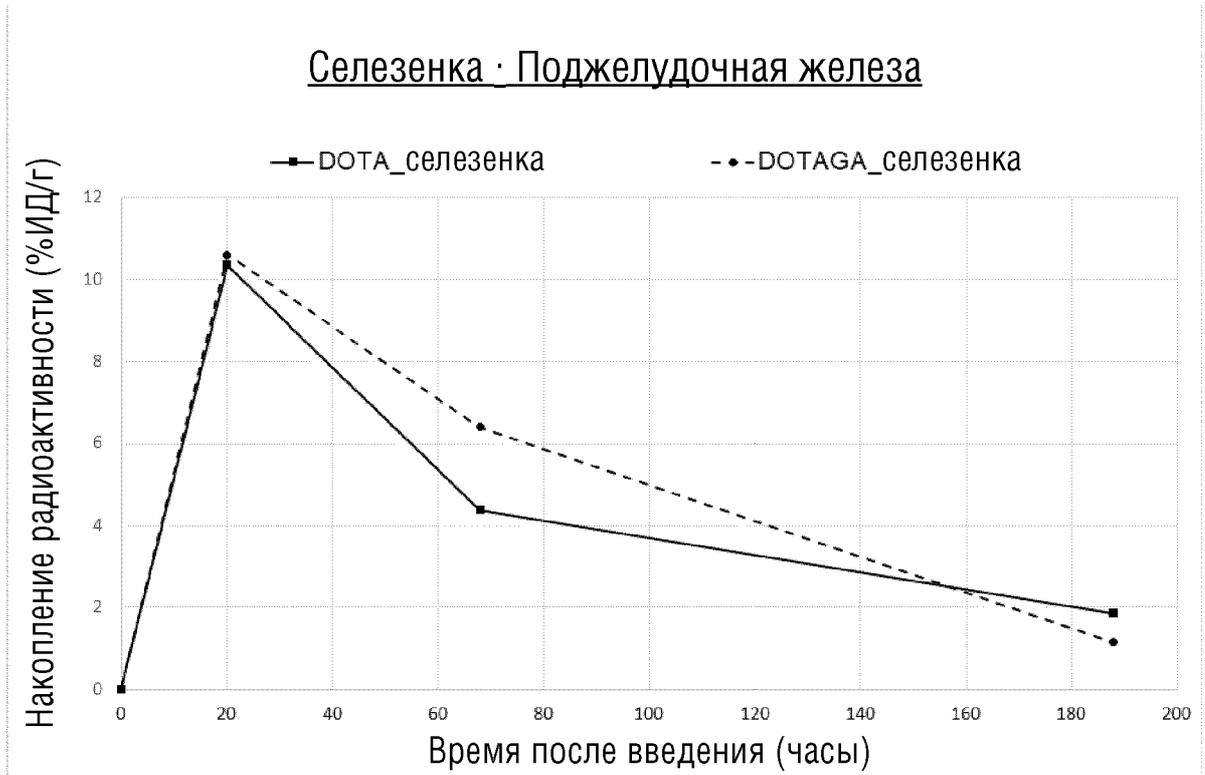
ФИГ.28В



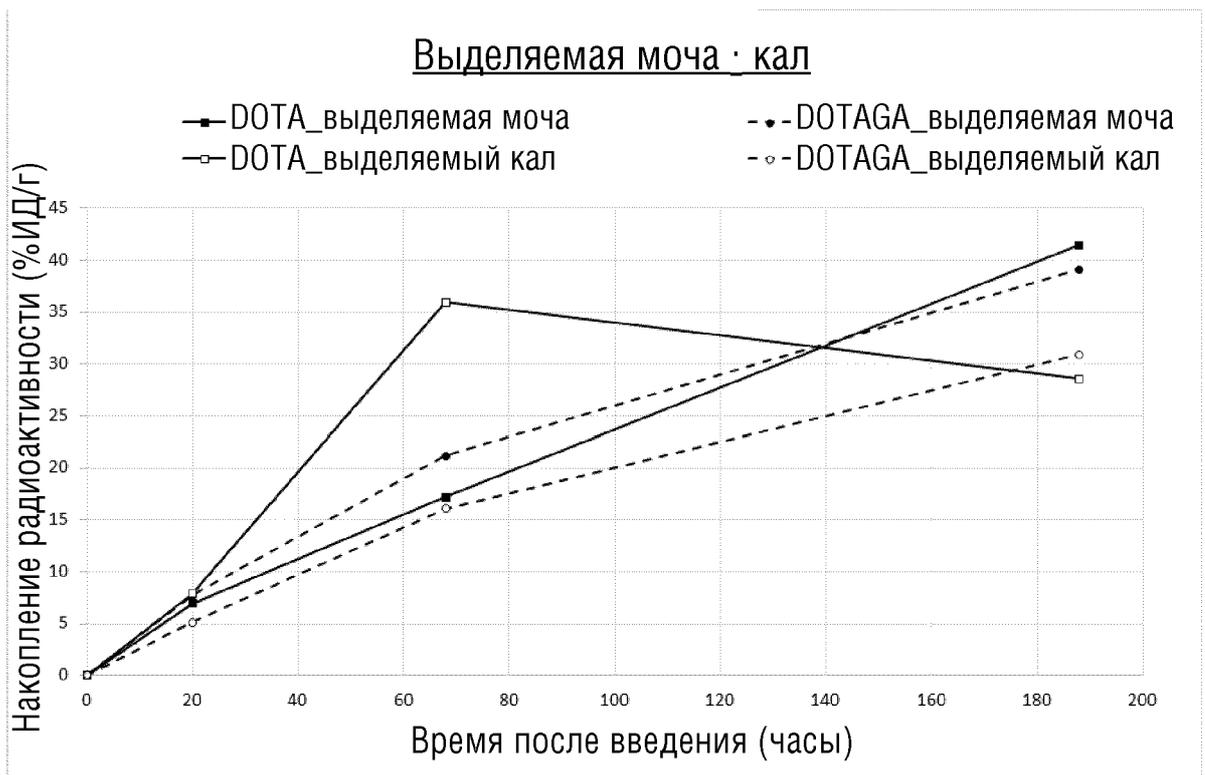
ФИГ.28С



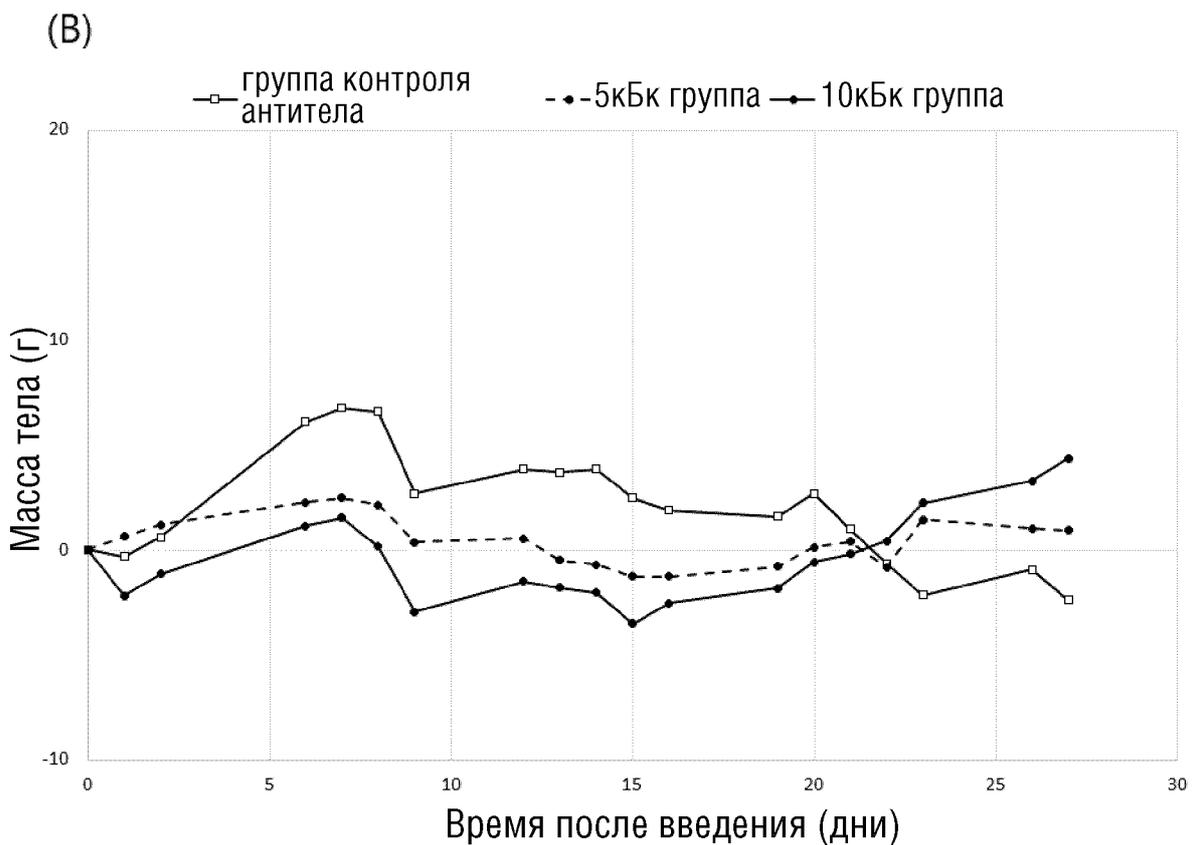
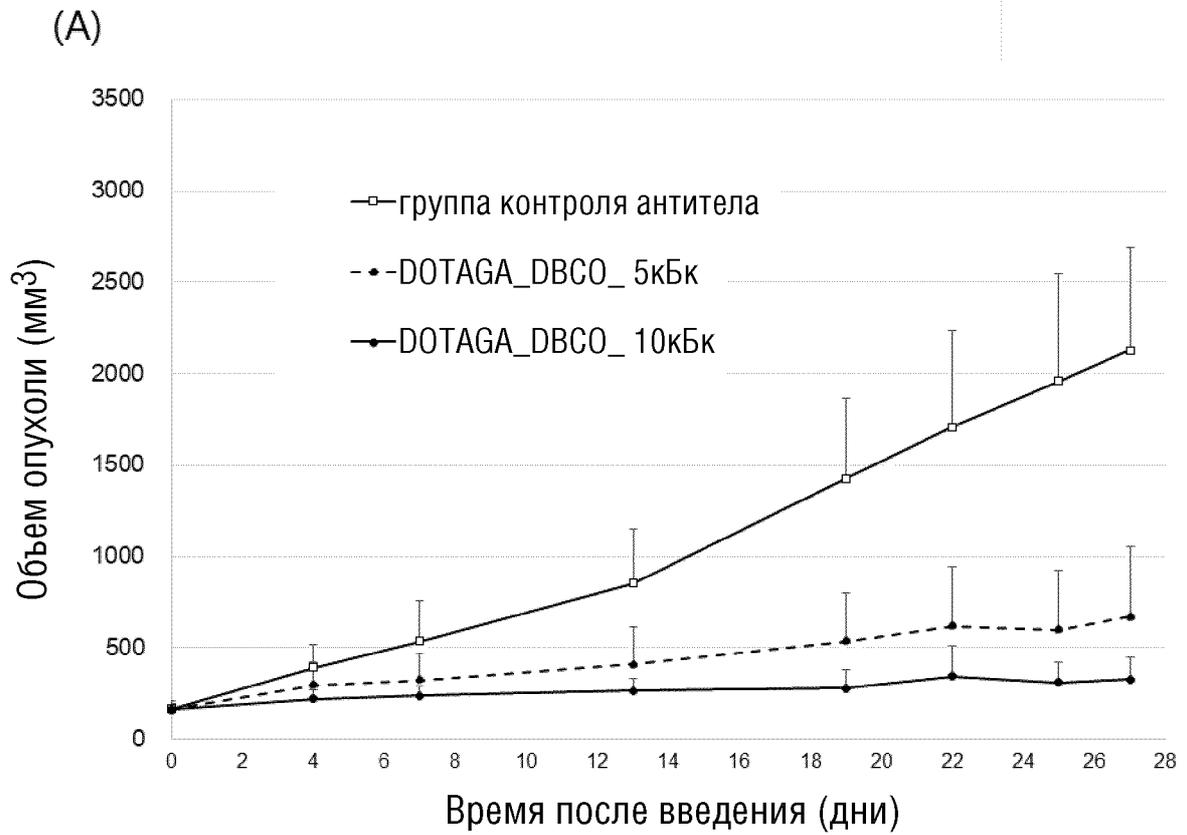
ФИГ.28D



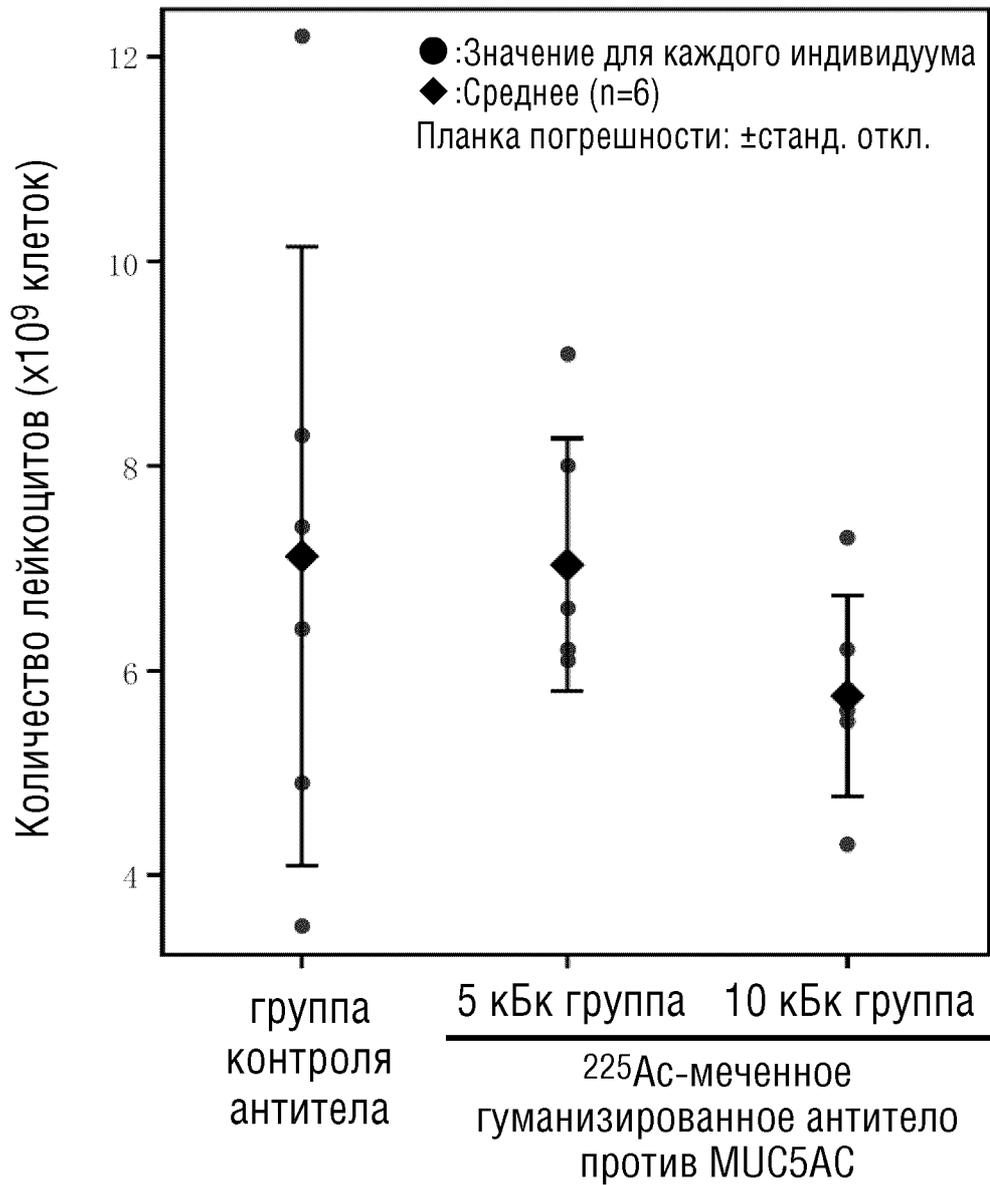
ФИГ.29



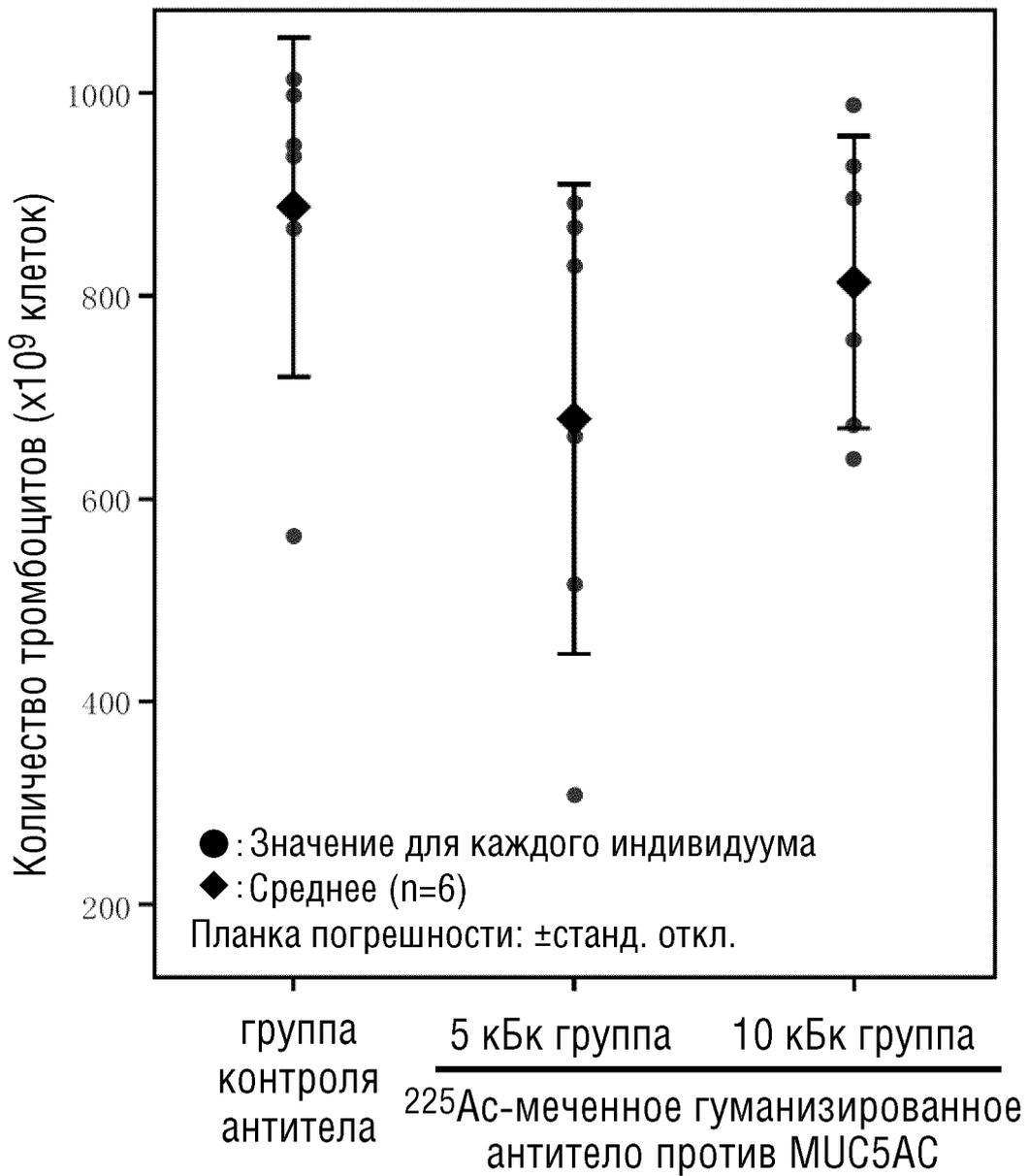
ФИГ.30



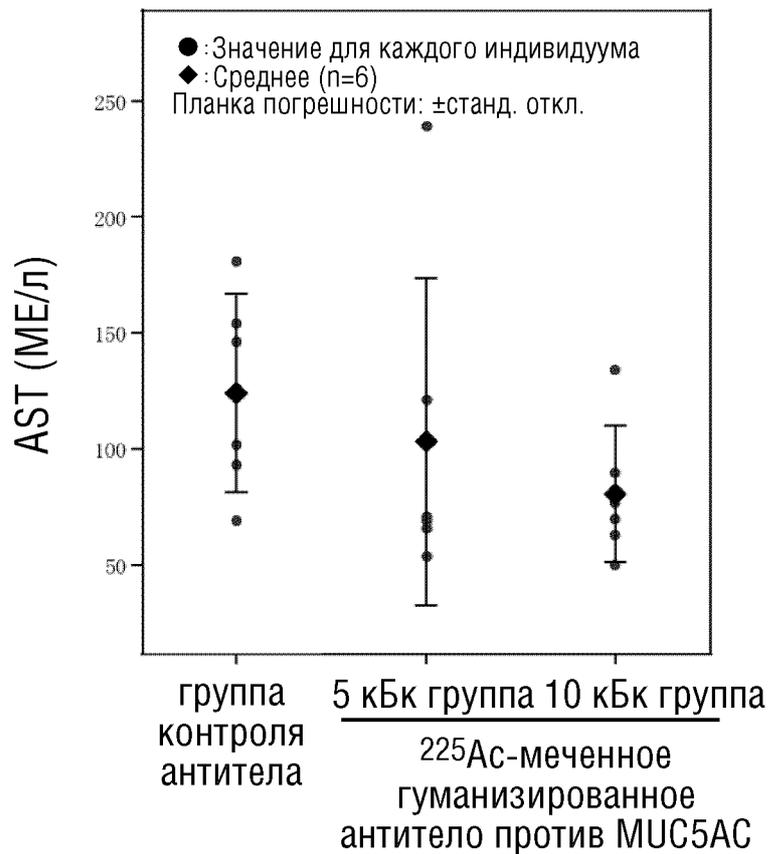
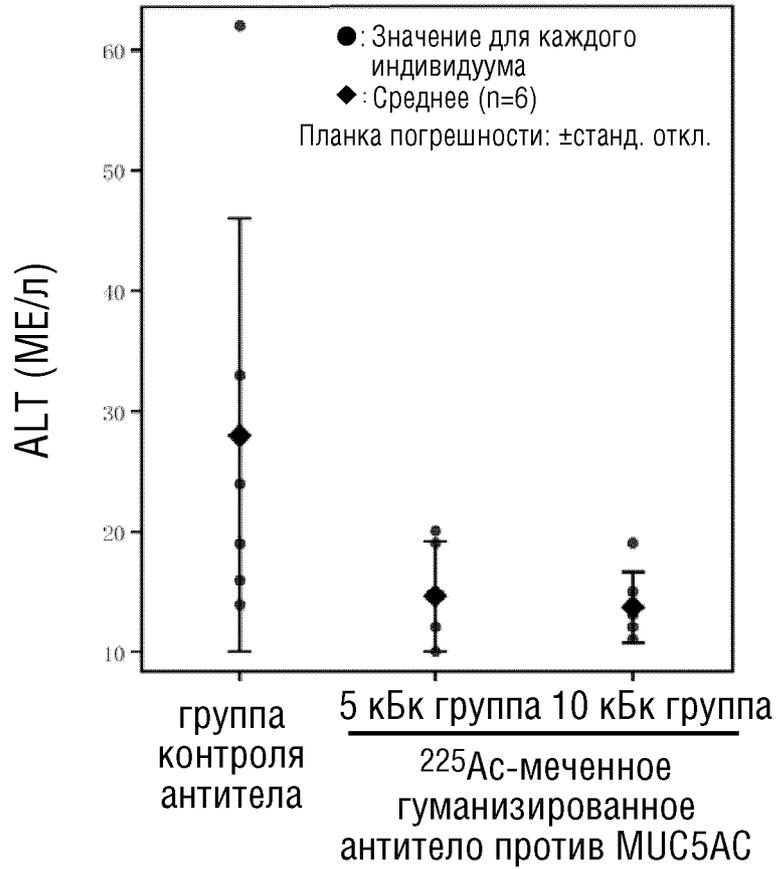
ФИГ.31



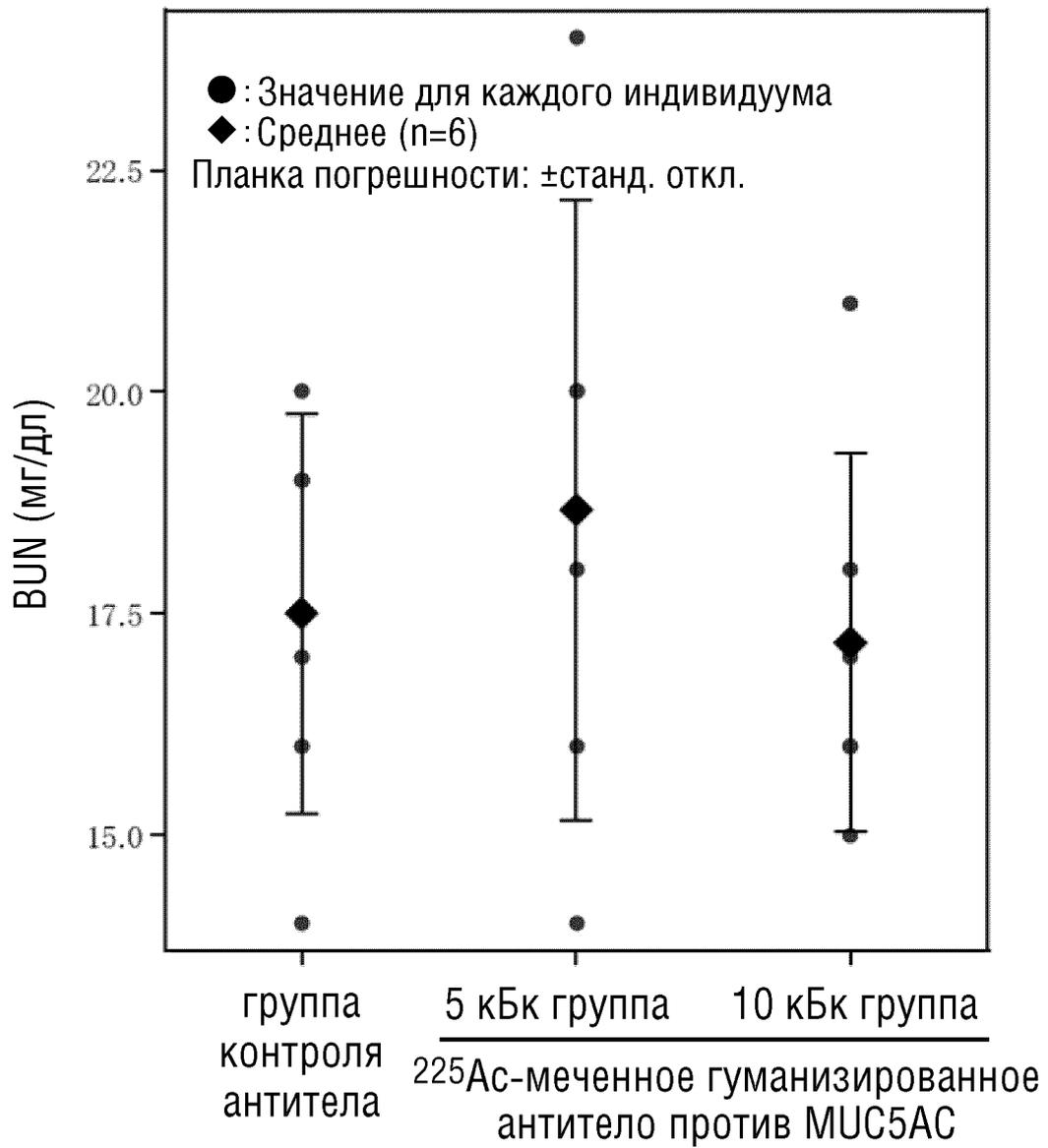
ФИГ.32



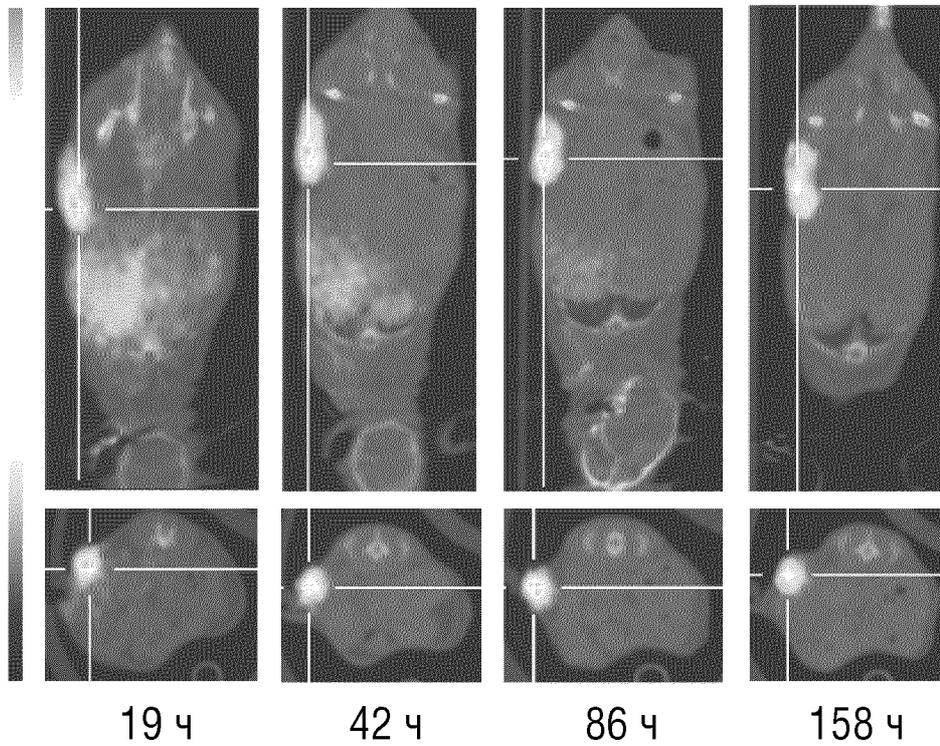
ФИГ.33



ФИГ.34



ФИГ.35



ФИГ.36

