Source segment

Target segment

TITLE OF THE INVENTION

発明の名称

EGFR Antibody Conjugates

ＥＧＦＲ抗体コンジュゲート▼Anti-EGFR antibodyとEGFR antibodyが混在している。本来はAnti-EGFR antibodyが正だが、原文通りにEGFR antibodyは「抗EGFR」とする▼

Abstract

要約

A maytansinoid is covalently linked through a non-cleavable linker to an EGFR antibody that is a full EGFR antagonist, such as cetuximab or panitumumab.

メイタンシノイドは、非切断型リンカーを介してセツキシマブ又はパニツムマブ等のＥＧＦＲ完全アンタゴニストであるＥＧＦＲ抗体と共有結合している。

The result is an anti-cancer agent having cytotoxicity that is potentiated in cancer cells but not normal cells.

その結果、腫瘍細胞においては増強されるが、正常細胞においては増強されない細胞毒性を有する抗癌剤が得られる。

This benefit is not seen with EGFR antibodies that are partial antagonists, or with toxins that are not processed by lysosomes.

この利点は、部分アンタゴニスト又はリソソームで処理されない毒素を含むＥＧＦＲ抗体では見られないものである。

FIELD OF THE INVENTION

【技術分野】

The present invention relates to an immunoconjugate that targets EGFR-expressing cancer cell populations and comprises an anti-EGFR antibody, such as panitumumab or cetuximab, conjugated to a microtubule damaging agent such as a maytansinoid.

本発明は、ＥＧＦＲ発現癌細胞集団を標的とし、メイタンシノイド等の微小管障害剤とコンジュゲートしたパニツムマブ又はセツキシマブ等の抗ＥＧＦＲ抗体を含む、イムノコンジュゲートに関する。

BACKGROUND TO THE INVENTION

【背景技術】

The conjugation of cell-binding proteins, such as antibodies, to potent cell-killing agents to enhance their anti-cancer activity, and provide the so-called "magic bullets" has had mixed clinical results.

抗体等の細胞結合タンパク質の、強力な殺細胞剤とのコンジュゲーションは、抗体の抗癌活性を高めいわゆる「魔法の弾丸」を提供し、様々な臨床成績をもたらしている。

Relative to naked antibodies, immunoconjugates often show enhanced cell-killing potency, and this increases their activity against cancer cells expressing the antibody- targeted antigen.

裸の抗体（naked antibody)と比較して、イムノコンジュゲートはしばしば殺細胞能の増強を示し、これにより抗体標的抗原が発現している癌細胞に対するイムノコンジュゲートの活性が増加する。

The same increase in potency is also seen, however, in normal cells that express that same antigen.

しかしながら、薬効の同様の増強はまた、同一の抗原を発現している正常細胞においても見られる。

Of particular concern is the increased cytotoxicity against the rapidly proliferating tissues, such as skin.

特に懸念されるのは、皮膚等の増殖の早い組織に対する細胞毒性の増強である。

For example, a CD44v6-targeting immunoconjugate consisting of a maytansinoid and CD44v6 antibody was very active against cancer cells but was discontinued because of severe skin toxicities, such as toxic epidermal necrolysis, which occurred as a result of enhanced activity of the immunoconjugate against skin cells also expressing CD44v6 (Tijink et ai, Clin Cancer Res, 2006, 12:6064).

例えば、メイタンシノイドとＣＤ４４ｖ６抗体からなるＣＤ４４ｖ６を標的とするイムノコンジュゲートは、癌細胞に対し非常に活性があったが、ＣＤ４４ｖ６が同様に発現している皮膚細胞に対するイムノコンジュゲートの活性が増強された結果として生じた、中毒性表皮壊死症等の重度の皮膚毒性によって中止となった(Tijink et ai, Clin Cancer Res, 2006, 12:6064)。Another cell surface protein, epidermal growth factor receptor, or EGFR, is an attractive target for the development of anti-cancer immunoconjugates because of the antigen's expression by many tumors and its rapid internalization.

別の細胞表面タンパク質である、上皮成長因子受容体すなわちＥＧＦＲは、多くの腫瘍で抗原が発現しており、また迅速に取り込まれることから、抗癌性のイムノコンジュゲートの開発にとって魅力的な標的である。

However, because EGFR is also expressed by skin tissues, EGFR-targeting agents, such as the antibodies cetuximab and panitumumab, also show levels of skin toxicities that either demand dose reduction or in some cases are so severe as to warrant discontinuation of treatment.

しかし、ＥＧＦＲは皮膚組織においても同様に発現するため、セツキシマブ、パニツムマブ抗体等のＥＧＦＲ標的剤もまた、投与量の減量が必要なレベル又は場合によっては治療中止の理由となる程度の重度の皮膚毒性を示す。

With immunoconjugates, the toxicity of these antibodies is amplified through conjugation to a potent cell toxin.

イムノコンジュゲートを用いると、これらの抗体の毒性は強力な細胞毒とのコンジュゲーションを介して増幅される。

This exacerbates the problem for antibodies that are already inherently toxic to normal cells.

このことは、正常細胞に対して本質的に毒性のある抗体に関する問題を一層悪化させる。

For instance, conjugation with a toxic maytansinoid caused severe toxicity against skin cells when delivered via a CD44v6 antibody.

例えば、毒性を有するメイタンシノイドとのコンジュゲーションは、ＣＤ４４ｖ６抗体を介して送達された際に、皮膚細胞に対して重度の毒性を引き起こした。

As a result, development of anti-EGFR immunoconjugates based on approved anti-EGFR antibodies has not been pursued because of concerns over enhanced skin toxicity of such immunoconjugates.

その結果、既承認の抗ＥＧＦＲ抗体に基づいた抗ＥＧＦＲイムノコンジュゲートの開発は、そのようなイムノコンジュゲートにおける皮膚毒性の増強に関する懸念のため、進んでいない。

Alternative strategies are being pursued for the development of anti- EGFR immunoconjugates.

抗ＥＧＦＲイムノコンジュゲートの開発のために、代替的戦略が進められている。

Anti-EGFR immunoconjugates are now being designed specifically to address these safety concerns.

現在、抗ＥＧＦＲイムノコンジュゲートは、特にこれらの安全性の懸念に対処するように設計がなされている。

These conjugates are based on antibodies that target a mutated but naturally occurring version of EGFR, known as EGFRvlII, or on conformational forms of the EGFR, both of which predominate on tumour cells and not on skin cells [0008] (US 7628986, and US 7589180, respectively).

これらのコンジュゲートは、ＥＧＦＲｖⅢとして公知の、突然変異であるが自然発生するＥＧＦＲの変異体又はＥＧＦＲのコンフォメーション形態を標的とする抗体をベースとしており、双方とも腫瘍細胞上で優位で、皮膚細胞上では優位ではない（それぞれ、米国特許第７６２８９８６号及び米国特許第７５８９１８０号）。

For example, anti-EGFR antibody MAb806 is an antibody that targets an EGFR epitope found only on cancer cells, and potentially offers an advantage over the current EGFR antibodies, which all display significant binding to normal organs such as skin in humans.

例えば、抗ＥＧＦＲ抗体ＭＡｂ８０６は、癌細胞上のみで見られるＥＧＦＲエピトープを標的とした抗体であり、その全てでヒトにおける皮膚等の正常臓器への顕著な結合を示す現行のＥＧＦＲ抗体と比較して、潜在的な利点を提供する。

With this specificity, it is recognized that "the most important advantage of MAb 806 compared to current EGFR antibodies, is that MAb 806 can be directly conjugated to cytotoxic agents", an approach not feasible with other EGFR antibodies since the "cytotoxic conjugation would almost certainly induce severe toxicity" (US 7589180).

この特異性によって、「現行のＥＧＦＲ抗体と比較したＭＡｂ８０６の最も重要な利点は、ＭＡｂ８０６が細胞傷害性薬剤と直接コンジュゲートできることである」と認識されており、「細胞毒性のあるコンジュゲーションはほぼ確実に重度の毒性を誘発するであろう」ことから、他のＥＧＦＲ抗体では実現不可能なアプローチである（米国特許第７５８９１８０号）。

An immunoconjugate comprising EGFR MAb 806 linked to an anti-microtubule payload is currently in phase I clinical testing in patients with advanced solid tumours.

抗微小管ペイロードに結合したＥＧＦＲ　ＭＡｂ　８０６を含むイムノコンジュゲートは現在、進行性固形腫瘍の患者において第Ｉ相臨床試験が行われている。

Efforts continue through screening for naked anti-EGFR antibodies, and immunoconjugates thereof, to identify those with partial antagonistic activity against EGFR and reduced activity against keratinocytes (see US 2012/0156217), immunoconjugates based on "masked" anti-EGFR antibodies that are preferentially activated in the tumour microenvironment (WO 2009/025846), and immunoconjugates based on antibodies with medium affinity that preferentially accumulate in the tumor and not normal tissues (WO 2012/100346).

取り組みは、裸の抗ＥＧＦＲ抗体のためのスクリーニング及びそれらのイムノコンジュゲート、ＥＧＦＲに対する部分アンタゴニスト活性及びケラチノサイトに対する軽減された活性を有するそれらの同定（米国公開特許公報第２０１２／０１５６２１７号）、腫瘍微小環境内で優先的に活性化される「マスクされた」抗ＥＧＦＲ抗体をベースとしたイムノコンジュゲート（ＰＣＴ国際公開特許第２００９／０２５８４６号）、正常組織ではなく腫瘍組織に優先的に集積する、中等度の結合性を有する抗体をベースとしたイムノコンジュゲート（ＰＣＴ国際公開特許２０１２／１００３４６号）を通じて続けられている。

All of these strategies are aimed at reducing toxicities toward skin and other organs expressing EGFR, because currently approved anti-EGFR antibodies were deemed unsuitable for development as immunoconjugates.

既承認の現行の抗ＥＧＦＲ抗体はイムノコンジュゲートとしての開発には不適当であると考えられていることから、これらの戦略の全ては、ＥＧＦＲを発現している皮膚及び他の臓器に対する毒性の軽減を目的としている。

An object of the present invention is to provide an immunoconjugate useful to treat EGFR+ disease cells including EGFR+ cancer cells and tumours comprising them.

本発明の１つの目的は、ＥＧＦＲ陽性癌細胞及びそれらを含む腫瘍を含む、ＥＧＦＲ陽性疾患細胞の治療に有用なイムノコンジュゲートを提供することである。

Another object of the present invention is to provide a method for potentiating the cytotoxicity of an EGFR antibody toward disease cells selectively.

本発明の他の目的は、疾患細胞へのＥＧＦＲ抗体の細胞毒性を選択的に増強するための方法を提供することである。

By this method, potentiation of toxicity toward normal cells is essentially avoided.

この方法により、正常細胞への毒性の増強は実質的に回避される。

SUMMARY OF THE INVENTION

【課題を解決するための手段】

The present invention draws from the unexpected initial finding that conjugation of the anti-EGFR antibody cetuximab to a toxic maytansinoid through a non-cleavable linker yields an immunoconjugate that displays enhanced cytotoxicity against cancer cells without a corresponding increase in cytotoxicity against skin cells.

本発明は、抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブと毒性を有するメイタンシノイドの非切断型リンカーを介したコンジュゲーションは、癌細胞に対する細胞毒性の増強を示し、皮膚細胞に対してはそれに対応する毒性の増加のないイムノコンジュゲートをもたらす、という予期せぬ新発見より生み出されたものである。

The inventor demonstrates that the activity of some anti-EGFR antibodies against both cancer and keratinocytes is strongly potentiated by linking to maytansinoids and other cell-killing agents, whereas the activity of maytansinoid-conjugated cetuximab is potentiated only against cancer cells and not against keratinocytes.

本発明者は、癌及びケラチノサイトの双方に対するいくつかの抗ＥＧＦＲ抗体の活性は、メイタンシノイド及び他の殺細胞剤と結合することによって強力に増強されるが、他方、メイタンシノイドとコンジュゲートしたセツキシマブの活性は、癌細胞のみに対して増強され、ケラチノサイトに対しては増強されないことを証明している。

In these studies, conjugates of cetuximab with cell-killing agents other than anti-microtubule toxins, such as saporin, were found, as expected, to have an attendant and significantly enhanced toxicity toward keratinocytes.

これらの試験では、サポリン等の抗微小管毒素以外の殺細胞剤とセツキシマブとのコンジュゲートは、予想通り、ケラチノサイトに対して顕著に増強された付随する毒性を有することが明らかになった。

It is further demonstrated that another antibody having full antagonist activity at EGFR, i.e. panitumumab, also demonstrates selective potentiation at EGFR+ cells when conjugated to an anti-microtubule payload such as a maytansinoid, in showing toxicity to EGFR+ cancer cells while sparing EGFR+ normal cells such as keratinocytes.

試験は更に、ＥＧＦＲにおける完全アンタゴニスト活性を有する別の抗体、すなわちパニツムマブもまた、メイタンシノイド等の抗微小管ペイロードとコンジュゲートした場合、ＥＧＦＲ陽性細胞において選択的増強を示し、ＥＧＦＲ陽性癌細胞への毒性を示す一方、ケラチノサイト等のＥＧＦＲ陽性正常細胞は毒性を免れることを示している。

On the basis of these and other findings herein disclosed, the present invention enables the selection of components essential to yield an immunoconjugate that comprises an EGFR antibody and a toxic payload that potentiates antibody activity toward cancer cells but not toward normal cells such as keratinocytes.

これらの及び本明細書に記載の他の知見に基づき、本発明はＥＧＦＲ抗体及び癌細胞に対する抗体活性を増強し、ケラチノサイト等の正常細胞へは増強しない毒性ペイロードを含むイムノコンジュゲートをもたらすために不可欠な構成要素の選択を可能にする。

Immunoconjugates having this property require the selection of an EGFR antibody that is a full antagonist, a toxin that is an anti-microtubule agent, and a linker that most desirably is not cleavable.

この特性を有するイムノコンジュゲートは、完全アンタゴニストであり、毒素は抗微小管剤であり、かつリンカーは最も望ましくは非切断型であるＥＧＦＲ抗体を選択する必要がある。

By applying these criteria, there is provided an EGFR antibody-based immunoconjugate that has significant therapeutic activity against EGFR+ cancer cells without a corresponding increase in toxicity against EGFR+ normal cells including skin cells such as keratinocytes.

これらの基準を適用することにより、ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対する顕著な治療活性を有し、ケラチノサイト等の皮膚細胞を含むＥＧＦＲ陽性正常細胞に対してはそれに対応する毒性の増加のない、ＥＧＦＲ抗体をベースとしたイムノコンジュゲートが提供される。

Lack of additional potentiation of the toxicity against skin cells is critical because naked EGFR-targeting antibodies are already characterized by high prevalence dermatologic toxicities and it is beneficial not to potentiate these side effects.

ＥＧＦＲを標的とする裸の抗体は、罹患率の高い皮膚毒性であることが既に明らかにされており、これらの副作用を増強しないことは有益であることから、皮膚細胞に対する付加的な毒性の増強のないことは非常に重要である。

Accordingly, in a general aspect, there is provided an immunoconjugate comprising an antibody having full antagonist activity at EGFR, and a toxin conjugated therewith through a non-cleavable linker, the immunoconjugate having a cytotoxic effect relative to a naked form of the antibody that is essentially not potentiated with respect to EGFR+ keratinocytes.

したがって、一般的な態様において、ＥＧＦＲにおいて完全アンタゴニスト活性を有する抗体及び非切断型リンカーを介して抗体とコンジュゲートしている毒素を含むイムノコンジュゲートが提供され、裸の形態の抗体と比較して細胞毒性効果を有するイムノコンジュゲートは、ＥＧＦＲ陽性ケラチノサイトに対して実質的に増強されない。

The cytotoxic effect of the immunoconjugate with respect to EGFR+ cancer cells desirably is potentiated.

ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対するイムノコンジュゲートの細胞毒性効果は、増強されることが望ましい。The toxic payload desirably is an anti-microtubule toxin.

毒性ペイロードは抗微小管毒素であることが望ましい。

Also in a general aspect, there is provided a method useful to potentiate the anti-cancer activity of an EGFR antibody without potentiating the effect thereof on normal EGFR+ cells, the method comprising:

また、一般的な態様において、ＥＧＦＲ陽性正常細胞への抗癌作用の効果を増強させずに、ＥＧＦＲ抗体の抗癌作用を増強させるために有用な方法であって、●を含む方法を提供する。

(i) selecting, for conjugation, an EGFR antibody that is a full EGFR antagonist and competes with cetuximab for binding to EGFR;

（ｉ）コンジュゲーションのために、ＥＧＦＲ完全アンタゴニストでありＥＧＦＲとの結合に関してセツキシマブと競合するＥＧＦＲ抗体を選択するステップと、

(ii) selecting, for delivery by the EGFR antibody, an anti-microtubule toxin;

（ｉｉ）ＥＧＦＲ抗体によって送達するための抗微小管毒素を選択するステップと、

(iii) selecting, for coupling the selected EGFR antibody and the anti- microtubule toxin, a linker; and

（ｉｉｉ）選択したＥＧＦＲ抗体と抗微小管毒素とを結合するためのリンカーを選択するステップと、

producing an immunoconjugate that incorporates the linker between the antibody and the toxin, thereby providing an immunoconjugate having a cytotoxicity that is potentiated against EGFR+ disease cells and essentially not potentiated against normal EGFR+ keratinocyte cells.

抗体と毒素の間にリンカーを導入してイムノコンジュゲートを作製し、それによりＥＧＦＲ陽性疾患細胞に対しては増強され、ＥＧＦＲ陽性の正常ケラチノサイト細胞に対しては実質的に増強されない細胞毒性作用を有するイムノコンジュゲートを提供するステップ●

In one particular aspect, there is provided an immunoconjugate comprising cetuximab and a toxin conjugated therewith, the immunoconjugate having a cytotoxic effect relative to naked cetuximab that is (1) enhanced with respect to EGFR+ cancer cells, and (2) substantially not enhanced with respect to EGFR+ keratinocytes, wherein the immunoconjugate comprises cetuximab and an anti-microtubule toxin such as maytansinoid DM-1 conjugated by a non-cleavable linker.

ある特定の態様では、セツキシマブ及びセツキシマブとコンジュゲートした毒素を含むイムノコンジュゲートが提供され、該イムノコンジュゲートは、（１）ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対して増強され、（２）ＥＧＦＲ陽性ケラチノサイトに対しては実質的に増強されない、裸のセツキシマブと比較して細胞毒性効果を有するイムノコンジュゲートであって、該イムノコンジュゲートは、セツキシマブ及び非切断型リンカーでコンジュゲートされたメイタンシノイドＤＭ－１等の抗微小管毒素を含む。

In alternative embodiments, the cetuximab is an equivalent of cetuximab, such as an EGFR-binding fragment of cetuximab, or an EGFR-binding variant of cetuximab that incorporates one or two or more benign substitutions in the antibody constant region or framework region without affecting the antibody binding to the receptor or antibody conjugate-mediated cell killing.

代替実施形態では、セツキシマブは、受容体に結合する抗体又は抗体コンジュゲート媒介殺細胞性に影響を及ぼすことなく、抗体の定常領域又はフレームワーク領域に１つ、２つ又はそれ以上の良性の置換を導入する、セツキシマブのＥＧＦＲ結合断片又はＥＧＦＲと結合するセツキシマブの変異体等のセツキシマブ相当物である。▼benign substitutions：あとで「Such substitutions are benign in the sense that　do not reduce cytotoxicity relative to cetuximab per se」とあり。殺細胞性に影響を与えない置換と理解。当初「無害な」としていたが、「benign」についてあとで定義されるので「良性」にする。「良性」には「性質のよい」という一般的な意味もあるがやはり病気の良性/悪性に取られるので「無害な」「影響を与えない」の方がよいとは思うが、benignの範囲を超えていると感じる▼

For example, chimeric cetuximab can be further humanized using standard methods to create a more human-like version of the antibody.

例えば、キメラであるセツキシマブを標準的な方法を用いて更にヒト化させて、よりヒトに類似した型の抗体を作製することができる。

Alternatively, a fully human anti- EGFR antibody, such as necitumumab also known as IMC-1 1F8, which is considered to be functionally equivalent to cetuximab can be developed by screening of a human Fab library for an antibody that can bind and strongly inhibit EGFR and competes with cetuximab for receptor binding (Li S., Kussie P., Fergusson KM, Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-1 1F8. Structure. 2008 Feb;16(2):216-27).

あるいは、機能的にセツキシマブと同等であると考えられている、ＩＭＣ－１　１Ｆ８として公知のネシツムマブ等の完全ヒト抗ＥＧＦＲ抗体は、ＥＧＦＲに結合し強力に阻害することが可能で、受容体結合に関してセツキシマブと競合可能な抗体のためのヒトＦａｂライブラリーのスクリーニングによって開発することができる(Li S., Kussie P., Fergusson KM, Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-1 1F8. Structure. 2008 Feb;16(2):216-27）。

In another particular aspect, there is provided an immunoconjugate comprising panitumumab and a toxin conjugated therewith, the immunoconjugate having a cytotoxic effect relative to naked panitumumab that is (1) enhanced with respect to EGFR+ cancer cells, and (2) substantially unaltered with respect to EGFR+ keratinocytes, wherein the immunoconjugate comprises panitumumab and an anti-microtubule toxin such as maytansinoid DM-1 conjugated by a non-cleavable linker.

別の特定の態様では、パニツムマブ及びパニツムマブとコンジュゲートした毒素を含むイムノコンジュゲートが提供され、該イムノコンジュゲートは、（１）ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対して増強され、（２）ＥＧＦＲ陽性ケラチノサイトに対しては実質的に増強されない、裸のパニツムマブと比較して細胞毒性効果を有するイムノコンジュゲートであって、該イムノコンジュゲートは、パニツムマブ及び非切断型リンカーでコンジュゲートされたメイタンシノイドＤＭ－１等の抗微小管毒素を含む。★ＤＭ－１とＤＭ１の揺らぎが見られる。原則、コンジュゲート（セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）はＤＭ１で単体の場合はＤＭ－１としているようだが例外もある。原文通りにする★

In alternative embodiments, the panitumumab is an EGFR-binding fragment of panitumumab, or is a variant of panitumumab that incorporates one, two, or more benign substitutions yet maintains EGFR binding and inhibitory characteristics of the panitumumab parent.

代替実施形態では、パニツムマブは１つ、２つ又はそれ以上の良性の置換を導入してもなお、ＥＧＦＲとの結合性及び親パニツムマブの阻害特性を保持する、パニツムマブのＥＧＦＲ結合断片又はパニツムマブの変異体である。

In preferred embodiments, conjugation of the antibody and toxin is achieved using a non- cleavable linker.

好ましい実施形態では、抗体と毒素とのコンジュゲーションは非切断型リンカーを用いて実現する。

With non-cleavable linkers, release of the cytotoxic payload occurs by intracellular destruction of the drug conjugate by lysosomes.

非切断型リンカーを用いると、細胞毒性のあるペイロードの放出は、リソソームによる薬物コンジュゲートの細胞内破壊によって生じる。

A non-cleavable linker is substantially resistant to acid-induced cleavage, light-induced cleavage, peptidase- induced cleavage, esterase-induced cleavage, or disulfide bond cleavage, whereas cleavable linkers, which can be used optionally but less desirably, are linkers that can be cleaved by one or more of these recited cleaving agents.

非切断型リンカーは実質的に酸誘発開裂、光誘発開裂、ペプチダーゼ誘発開裂、エステラーゼ誘発開裂、又はジスルフィド結合の開裂に対して抵抗性であり、他方、切断型リンカーは、任意に使用できるがあまり望ましくはなく、１つ又はそれ以上の列挙した開裂剤によって開裂しうる。

Examples of such non-cleavable linkers include those that are or can be derived from a haloacetyl-based moiety selected from the group consisting of N-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate (SIAB), N- succinimidyl iodoacetate (SIA), N-succinimidyl bromoacetate (SBA), and N- succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate (SBAP).

そのような非切断型リンカーの例としては、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノ安息香酸エステル（ＳＩＡＢ）、ヨード酢酸　Ｎ－スクシンイミジル（ＳＩＡ）、ブロモ酢酸　Ｎ－スクシンイミジル（ＳＢＡ）、及びＮ－スクシンイミジル　３－（ブロムアセトアミド）プロピオン酸（ＳＢＡＰ）からなる群から選択される、ハロアセチルベースの部分又はそこから誘導可能なものが挙げられる。

Alternatively, the non-cleavable linker is or is derived from a maleimido-based moiety selected from the group consisting of N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC), N- succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane- 1 -carboxy-(6-amidocaproate) (LC- SMCC), K-maleimidoundecanoic acid N-succinimidyl ester (KMUA), γ- maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester (GMBS), ε-maleimidcaproic acid N- hydroxysuccinimide ester (EMCS), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), N-(a-maleimidoacetoxy)-succinimide ester (AMAS), succinimidyl-6-(P- maleimidopropionamido)hexanoate (SMPH), N-succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)- butyrate (SMPB), and N-(p-maleimidophenyl)isocyanate (PMPI); another non-cleavable linker is maleimidocaproyl. (See US 2005/0169933; , Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979), and Doronina et al,. Bioconjugate Chem., 2006 Jan- Feb;17(l): l 14-24 for additional details.)

あるいは、非切断型リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸（ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロン酸塩）（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、Ｋ－マレイミドウンデカノン酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、γ－マレイミドブチル酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸（maleimidcaproic）Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（ａ－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（Ｐ－マレイミドプロピオンアミド）(P- maleimidopropionamido)ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（ｐ－マレイミドフェニル）－酪酸塩（ＳＭＰＢ）及びＮ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアン酸塩（ＰＭＰＩ）からなる群から選択される、マレイミドベースの部分又はそこから誘導可能なものがあり、別の非切断型リンカーとしては、マレイミドカプロイルがある（更なる詳細については、米国公開特許公報第2005/0169933号; , Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979), and Doronina et al,. Bioconjugate Chem., 2006 Jan- Feb;17(l): l 14-24 を参照のこと)。★maleimidcaproic→Maleimidocaproic 、P- maleimidopropionamido→p-maleimidopropionamido★

In a preferred embodiment, conjugation is achieved using a non-cleavable cross-linking reagent as linker such as succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-l- carboxylate (SMCC).

好ましい実施形態では、コンジュゲーションはスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸（ＳＭＣＣ）等の非切断型の架橋剤をリンカーとして用いて達成される。★上記ででてきたＳＭＣＣと化学式名が若干違うが原文通りにする★

Other useful forms of non-cleavable linkers include N- Succinimidyl iodoacetate (SIA), sulfo-SMCC, m-maleimidobenzoyl-N- hydroxysuccinimide ester (MBS), sulfo-MBS and succinimidyl-iodoacetate, as described in the literature, which introduce 1-10 reactive groups, (see, Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979)).

非切断型リンカーの他の有用な形態には、ヨード酢酸 Ｎ－スクシンイミジル（ＳＩＡ）、スルホ－ＳＭＣＣ、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、スルホ－ＭＢＳ及びヨード酢酸－スクシンイミジルがあり、文献に記載されているように、１～１０個の反応性基を導入する（Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979)を参照のこと）。

Particularly useful for linking auristatins as anti-microtubule toxin are the non-cleavable maleimidocaproyl linkers described by Doronina et al, in Bioconjugate Chem., 2006 Jan-Feb;17(l):l 14-24).

アウリスタチンを抗微小管毒素として結合するために特に有用なのは、Doronina et al, in Bioconjugate Chem., 2006 Jan-Feb;17(l): 1 14-24に記載されている非切断型のマレイミドカプロイルリンカーである。

In another aspect, there is provided a pharmaceutical composition comprising the present EGFR antibody-based immunoconjugate in an amount cytotoxic to EGFR+ cancer cells, and a pharmaceutically acceptable carrier.

別の態様では、ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対して細胞毒性である量の、本発明のＥＧＦＲ抗体をベースとしたイムノコンジュゲート及び薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物を提供する。

In a further aspect, there is provided the use of the present pharmaceutical composition for the treatment of EGFR+ cancer cells.

更なる態様では、ＥＧＦＲ陽性癌細胞の治療のための本発明の医薬組成物の使用を提供する。

In a related aspect, there is provided a method for treating a subject presenting with an EGFR+ cancer cell, comprising administering the present immunoconjugate to the subject in an amount cytotoxic to the EGFR+ cancer cell.

関連する態様では、本発明のイムノコンジュゲートを、ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対して細胞毒性である量で対象へ投与することを含む、ＥＧＦＲ陽性癌細胞を呈する対象を治療するための方法を提供する。

These and other aspects of the present invention are now described in greater detail with reference to the accompanying drawings in which:

本発明のこれらの態様及び他の態様は、これより添付図面を参照して更に詳細に記載される。

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

【図面の簡単な説明】

Figure 1 is a graph showing cytotoxic activity against keratinocytes of naked anti-EGFR antibodies and maytansinoid conjugates thereof.

【図１】裸の抗ＥＧＦＲ抗体及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体の、ケラチノサイトに対する細胞毒性を示すグラフである。

About 2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 5 days at 37°C.

約２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で５日間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined by WST-8 based colorimetric assay.

残存細胞の生存能を、ＷＳＴ－８をベースとした比色分析で測定した。

Figure 2 is a graph showing cytotoxic activity against cancer cell line of naked anti- EGFR antibodies and maytansinoid conjugates thereof.

【図２】裸の抗ＥＧＦＲ抗体及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体の、癌細胞株に対する細胞毒性を示すグラフである。

About 2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 5 days at 37°C.

約２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で５日間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined by WST-8 based colorimetric assay.

残存細胞の生存能を、ＷＳＴ－８をベースとした比色分析で測定した。

Figures 1 and 2 herein are reproductions of figures presented in US 2012/0156217.

本明細書において、図１及び図２は米国公開特許公報第２０１２／０１５６２１７号で示された図の複写物である。

Figure 3 is a graph showing cytotoxic activity against H226 cancer cell line of naked anti- EGFR antibody cetuximab and maytansinoid conjugates thereof.

【図３】裸の抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブの、Ｈ２２６癌細胞株に対する細胞毒性を示すグラフである。

About 2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 72 h at 37°C.

約２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で７２時間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figure 4 is a graph showing cytotoxic activity against A431 cancer cell line of naked anti- EGFR antibody cetuximab and maytansinoid conjugates thereof.

【図４】裸の抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブの、Ａ４３１癌細胞株に対する細胞毒性を示すグラフである。

About 2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 72 h at 37°C.

約２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で７２時間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figure 5 is a graph showing the cytotoxic activity of naked anti-EGFR antibody cetuximab and maytansinoid conjugates thereof against normal keratinocyte cell line HaCaT.

【図５】裸の抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブの、正常ケラチノサイト細胞株ＨａＣａＴに対する細胞毒性を示すグラフである。

About 2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 5 days at 37°C.

約２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で５日間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figure 6 is a graph showing the cytotoxic activity of naked anti-EGFR antibody cetuximab and maytansinoid conjugates thereof against primary keratinocytes.

【図６】裸の抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブの、初代ケラチノサイトに対する細胞毒性を示すグラフである。

2-3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 72 h or 5 days at 37°C.

２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で７２時間又は５日間、種々の濃度でインキュベートした。★「２～３，０００」にAboutがこれ以降ついていない★

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figure 7 is a graph showing the cytotoxic activity of naked anti-EGFR antibody panitumumab and maytansinoid conjugates thereof against primary keratinocytes.

【図７】裸の抗ＥＧＦＲ抗体パニツムマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体パニツムマブの、初代ケラチノサイトに対する細胞毒性を示すグラフである。

2- 3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 72 h or 5 days at 37°C.

２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で７２時間又は５日間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figure 8 is a graph showing the cytotoxic activity of naked anti-EGFR antibody panitumumab and maytansinoid conjugates thereof against primary keratinocytes.

【図８】裸の抗ＥＧＦＲ抗体パニツムマブ及びメイタンシノイドがコンジュゲートした抗ＥＧＦＲ抗体パニツムマブの、初代ケラチノサイトに対する細胞毒性を示すグラフである。

2- 3,000 cells/well were seeded in a flat bottom 96-well tissue culture plate, and incubated with various concentrations of test article in culture media for 72 h or 5 days at 37°C.

２～３，０００細胞／ウェルを、９６ウェル平底組織培養プレートに播種し、被験物質を培地中で３７℃で７２時間又は５日間、種々の濃度でインキュベートした。

Viability of the remaining cells was determined via alamar blue cell viability assay.

残存細胞の生存能を、アラマーブルー細胞生存アッセイで測定した。

Figures 9-13 show results with immunoconjugates that incorporate elements not selected according to the criteria prescribed herein, as discussed in Example 4.

【図９～図１３】実施例４で説明されるように、本明細書で定めた基準に従って選択されていない要素を導入したイムノコンジュゲートの結果を示す。

Figure 9 shows that panitumumab and cetuximab are very strong EGFR activation blockers and thus will not be potentiated on normal keratinocytes by conjugation, whereas partially antagonistic antibodies such as J2898A is potentiated (See Figure 10, and 1 1).

【図９】パニツムマブ及びセツキシマブは非常に強力なＥＧＦＲ活性化阻害剤であり、このためコンジュゲーションによって正常ケラチノサイトは増強されないが、他方Ｊ２８９８Ａ等の部分アンタゴニスト抗体は増強されることを示す（図１０及び図１１を参照のこと）。

Figure 10 shows that partially antagonistic anti-EGFR antibody by IMGN (J2989A) is potentiated by conjugation (IMGN289) on normal keratinocytes (see also Setiady et al, Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2013;73(8 Suppl): Abstract nr 5463).

【図１０】ＩＭＧＮ（Ｊ２９８９Ａ）による部分アンタゴニスト抗ＥＧＦＲ抗体は、正常ケラチノサイト上でコンジュゲーション（ＩＭＧＮ２８９）によって増強されることを示す（Setiady et al, Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2013;73(8 Suppl): Abstract nr 5463もまた参照のこと）。

Figure 11 shows the toxicity of cetuximab mutant antibody, 6-LC, (having reduced affinity to make it a partially antagonistic against EGFR) is potentiated by conjugation to payload via non-cleavable linker (6LC-DM1).

【図１１】セツキシマブ変異体抗体である６－ＬＣ（ＥＧＦＲと部分的に拮抗するように親和性を低減させている）の毒性は、非切断型リンカー（６ＬＣ－ＤＭ１）を介したペイロードへのコンジュゲーションにより増強されることを示す。

Figure 12 shows panitumumab, and panitumumab-DMl effects on keratinocytes, and reveals that conjugation of panitumumab via non-cleavable linker to DM1 (Avid300- DM1) does not increase its activity against normal cells; 2C9-DM1 is cetuximab-DMl conjugate used as a control.

【図１２】パニツムマブ及びパニツムマブーＤＭ１はケラチノサイトに影響を及ぼし、非切断型リンカーを介したパニツムマブのＤＭ１とのコンジュゲーション（Ａｖｉｄ３００－ ＤＭ１）は、正常細胞に対するその活性を増加させないことを明らかに示す。２Ｃ９－ＤＭ１は、対照として使用されるセツキシマブ－ＤＭ１コンジュゲートである。

Figure 13 shows that conjugation of cetuximab to MMAE anti-microtubule payload by a cleavable linker (valine-citruline) potentiates its toxicity against both normal cells and MDA-MB-468 cancer cells (Cetux 2C9-MMAE), whereas conjugation via non-cleavable linker (SMCC) only (Cetux2C9-DMl) potentiates anti-cancer activity, thus demonstrating a favorable therapeutic window.

【図１３】切断型リンカー（バリン－シトルリン）によるセツキシマブと抗微小管ペイロードＭＭＡＥとのコンジュゲーションは、正常細胞及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８癌細胞（Ｃｅｔｕｘ　２Ｃ９－ＭＭＡＥ）双方に対しその毒性を増強するが、他方、非切断型リンカー（ＳＭＣＣ）を介したコンジュゲーション（Ｃｅｔｕｘ２Ｃ９－ＤＭ１）は抗癌活性のみを増強することから、好適な治療濃度域を示していることを示す。

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

好適な実施形態の詳細な説明

The present immunoconjugates are based on antibodies that bind to the human epidermal growth factor receptor (hEGFR), a protein that is presented on the surface of many different cell types including particularly skin cells such as keratinocytes.

本発明のイムノコンジュゲートは、特にケラチノサイト等の皮膚細胞を含む多くの異なる細胞型の表面に存在するタンパク質である、ヒト上皮成長因子受容体（ｈＥＧＦＲ）と結合する抗体をベースとする。

As used herein, the term "hEGFR" refers to any protein that comprises the expressed and processed product of the human her-1 gene, wherein the protein is designated as UniProtKB/Swiss-Prot P00533.

本明細書で使用する場合、「ｈＥＧＦＲ」という用語は、ヒトｈｅｒ－１遺伝子の発現産物及び生産物を含む任意のタンパク質を意味し、該タンパク質はＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　Ｐ００５３３として示される。

The term EGFR is used generically herein, and refers to the wild type protein and all naturally occurring variants thereof.

ＥＧＦＲという用語は、本明細書において総称的に用いられ、野生型タンパク質及び自然発生するそれらの全ての変異体を指す。

The term "wtEGFR" is used more specifically with reference only to the wild type form of human EGFR.

「ｗｔＥＧＦＲ」という用語は、より具体的に野生型のヒトＥＧＦＲのみに関して用いられる。

The term "EGFRvIII" refers to the EGFR variant protein that comprises the expressed and processed product of a variant of the her-1 gene lacking exons 2-7, and thus includes only the polypeptide sequence encoded by exons 1 and 8 of her-1.

「ＥＧＦＲｖⅢ」という用語は、エクソン２～７が欠失したｈｅｒ－１遺伝子変異体の発現産物及び生産物を含むＥＧＦＲ変異体のタンパク質を指し、したがって、ｈｅｒ－１のエクソン１及びエクソン８によってコードされたポリペプチド配列のみを含む。

The term "domain III" is not related to EGFRvIII, and instead refers to a location within EGFR, and represents an extracellular site that is key for EGF ligand binding, and binding of highly antagonistic antibodies cetuximab and panitumumab (Voigt et al, 2012 November; 14(11): 1023— 1031).

「ドメインⅢ」という用語は、ＥＧＦＲｖⅢと関連するものではなく、代わりにＥＧＦＲ内の位置に関し、ＥＧＦリガンドの結合並びに拮抗性の高い抗体であるセツキシマブ及びパニツムマブの結合の鍵となる、細胞外の場所を意味する(Voigt et al, 2012 November; 14(11):1023— 1031)。

The present immunoconjugates comprise an EGFR antibody that is a full antagonist at the EGFR.

本発明のイムノコンジュゲートは、ＥＧＦＲにおける完全アンタゴニストであるＥＧＦＲ抗体を含む。

An EGFR antibody that is a "full antagonist" is an antibody that blocks completely or nearly so the transmission of a signal that is stimulated, in the normal course, by the EGF ligand through wtEGFR to the wtEGFR-coupled tyrosine kinase.

「完全アンタゴニスト」であるＥＧＦＲ抗体とは、ＥＧＦリガンドによって、ｗｔＥＧＦＲからｗｔＥＧＦＲ結合型チロシンキナーゼを通じて正常な経路で刺激されたシグナルの伝達を、完全に又はほぼ阻害する抗体である。

EGFR antibodies that are full antagonists are particularly EGFR antibodies that bind directly to EGFR domain III.

完全アンタゴニストのＥＧＦＲ抗体は、特に、ＥＧＦＲドメインⅢに直接結合するＥＧＦＲ抗体である。

EGFR antibodies having these properties and an EGFR binding affinity of 5 nanomolar (nM) or less are particularly preferred for inclusion in the present immunoconjugates.

これらの特性及び５ナノモル濃度（ｎＭ）未満のＥＧＦＲ結合親和性を有するＥＧＦＲ抗体は、本発明のイムノコンジュゲートに含めるのに特に好ましい。

By this measure, and as shown in Figure 9, at least the following known antibodies are not suitable for use in the present immunoconjugates:

この基準により、及び図９に示す通り、少なくとも以下の公知の抗体は、本発明のイムノコンジュゲートへの使用には不適である。

J2898A, intellimab 6-LC (a cetuximab variant taught in WO 2012/100346), nimotuzumab, and matuzumab.

Ｊ２８９８Ａ、インテリマブ（ｉｎｔｅｌｌｉｍａｂ）　６－ＬＣ（ＰＣＴ国際公開特許第２０１２／１００３４６号で教示されるセツキシマブ変異体）、ニモツズマブ及びマツズマブ。

It is found that when a full antagonist EGFR antibody is selected to deliver a toxic payload, the killing effect is potentiated only on EGFR+ cancer cells and not on EGFR+ normal cells such as keratinocytes.

ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体を毒性ペイロードの送達のために選択した場合、殺傷効果はＥＧＦＲ陽性癌細胞上のみで増強され、ケラチノサイト等のＥＧＦＲ陽性正常細胞上では増強されないことが明らかとなっている。

This is not the case when the EGFR antibody is a partial antagonist, i.e., an antibody that allows transmission of some EGF-mediated signal.

これは、ＥＧＦＲ抗体が部分アンタゴニスト、すなわちＥＧＦ媒介シグナルをいくらか送達させる抗体である場合は該当しない。

When conjugated to a toxin, these partial antagonist antibodies show a potentiation of the killing effect at both normal cells that are EGFR+ and cancer cells that are EGFR+.

毒素と結合した際、これらの部分アンタゴニスト抗体は、ＥＧＦＲ陽性正常細胞及びＥＧＦＲ陽性癌細胞の双方において殺傷効果の増強を示す。

The present immunoconjugates are based more particularly, and in one embodiment, on the hEGFR antibody known as cetuximab, now commercially available from Eli Lilly and Company under the trade name Erbitux®.

本発明のイムノコンジュゲートは、更に詳細には、及び一実施形態では、アービタックス（登録商標）の商品名でイーライリリー・アンド・カンパニーから現在市販されており、セツキシマブとして公知のｈＥＧＦＲ抗体をベースとしたものである。

Cetuximab is a recombinant, human/mouse chimeric IgGl antibody that binds specifically to the extracellular domain of wtEGFR.

セツキシマブは遺伝子組換え型の、ｗｔＥＧＦＲの細胞外ドメインに特異的に結合するヒト／マウスキメラ型ＩｇＧ１抗体である。

The amino acid sequences of the CDRs for both the heavy chain of cetuximab (SEQ ID Nos.1-3) and the light chain of cetuximab (SEQ ID Nos. 4-6) are listed herein.

セツキシマブの重鎖（配列ＩＤ番号１～３）及びセツキシマブの軽鎖（配列ＩＤ番号４～６）双方のＣＤＲのアミノ酸配列は、本明細書に列挙されている。

Also listed are the amino acid sequences of the heavy chain variable region (SEQ ID No.7) and of the light chain variable region (SEQ ID No.8) of cetuximab, together with the amino acid sequences of the complete heavy chain (SEQ ID No. 9) and complete light chain (SEQ ID No.10) of cetuximab.

セツキシマブの重鎖可変領域（配列ＩＤ番号７）及び軽鎖可変領域（配列ＩＤ番号８）のアミノ酸配列もまた、セツキシマブの全重鎖（配列ＩＤ番号９）及び全軽鎖（配列ＩＤ番号１０）のアミノ酸配列番号と共に列挙されている。

Cetuximab variants useful herein are highly antagonistic EGFR-binding agents that compete with cetuximab for binding to human EGFR.

本明細書において有用なセツキシマブ変異体は、セツキシマブとヒトＥＧＦＲとの結合を競合する、拮抗性の高いＥＧＦＲ結合型薬剤である。

Useful cetuximab variants have been mentioned hereinabove, and include fragments of cetuximab comprising the EGFR binding sites of cetuximab, such as all of the light chain and heavy chain CDRs herein recited.

有用なセツキシマブ変異体は前述したが、本明細書に列挙された全ての軽鎖及び重鎖のＣＤＲ等の、セツキシマブのＥＧＦＲ結合部位を含むセツキシマブの断片を含む。

Other cetuximab variants useful here in are cetuximab variants that incorporate one, two or more substitutions outside the antigen binding domains, such as in the framework region or in the constant region (Fc).

本明細書において有用な他のセツキシマブ変異体は、フレームワーク領域内又は定常領域（Ｆｃ）内等の抗原結合ドメイン外に、１つ、２つ又はそれ以上の置換を導入したセツキシマブ変異体である。★here in →hereinと見る★

Such substitutions are benign in the sense that they do not reduce cytotoxicity relative to cetuximab per se.

そのような置換は、セツキシマブ自体に関する毒性を軽減しないという意味において、良性である。

In another embodiment, the present immunoconjugates are based on the EGFR antibody known as panitumumab, now commercially available and sold under the trade name Vectibix®.

別の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートは、現在ベクティビックス（登録商標）の商品名で市販されているパニツムマブとして公知のＥＧＦＲ抗体をベースとしている。

Panitumumab is a recombinant, fully human IgG2 antibody that binds specifically to the extracellular domain of wtEGFR.

パニツムマブは遺伝子組換え型の、ｗｔＥＧＦＲの細胞外ドメインに特異的に結合する完全ヒトＩｇＧ２抗体である。

The amino acid sequences of the heavy and light chains of panitumumab are listed in US 6,235,883 and US 7,807,798.

パニツムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、米国特許第６，２３５，８８３号及び米国特許第７，８０７，７９８号に列挙されている。

A useful alternative to panitumumab is an EGFR binding variant thereof that competes with panitumumab for EGFR binding, such as a fragment of panitumumab that incorporates its antigen binding sites but has an otherwise lost or altered constant region.

有用なパニツムマブの代替案としては、パニツムマブとＥＧＦＲとの結合を競合するパニツムマブのＥＧＦＲ結合変異体があり、例えば、その抗原結合部位を導入するが他の欠損した又は改変された定常領域を有する、パニツムマブの断片である。

The present immunoconjugates can also be based on still other EGFR antibodies provided they show full antagonist activity as defined above, such as EGFR antibodies that bind selectively to domain III of EGFR, and any other EGFR antibodies that compete with EGF and block fully or nearly so the transmission of EGF-stimulated downstream signalling.

本発明のイムノコンジュゲートはまた、ＥＧＦＲのドメインⅢへ選択的に結合するＥＧＦＲ抗体及びＥＧＦと競合し、ＥＧＦ刺激による下流シグナルの伝達を完全に又はほぼ阻害する他の任意のＥＧＦＲ抗体等が、上述の完全アンタゴニスト活性を示す限り、更に他のＥＧＦＲ抗体をベースにすることもできる。

In the present immunoconjugates, the full antagonist EGFR antibody, such as cetuximab or panitumumab, is conjugated to an anti-microtubule toxin such as maytansinoid toxin.

本発明のイムノコンジュゲートにおいて、セツキシマブ又はパニツムマブ等のＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体は、メイタンシノイド毒素などの抗微小管毒素にコンジュゲートする。

By "anti-microtubule toxin" is meant an agent having cell toxicity mediated by interference with the microtubule structures important for cell mitosis, such as by inhibiting the formation of tubulin or by inhibiting the organization thereof.

抗微小管毒素とは、チューブリンの形成阻害又はその組織の阻害等によって、細胞の有糸分裂に重要である微小管構造体に干渉することにより媒介される細胞毒性を有する薬剤を意味する。

Included within this toxin family are the maytansinoids and auristatins, and many other agents developed more recently and having the same mechanism of action.

この毒素のファミリーに含まれるものとしては、メイタンシノイド及びアウリスタチン並びにより近年に開発された、同一の作用機序を有する他の多くの薬剤が挙げられる。

The auristatins in particular block cell replication by inhibiting polymerization of tubulin and are thus anti-mitotic.

特に、アウリスタチンはチューブリンの重合を阻害することにより細胞の複製を妨害するため、抗有糸分裂性である。

The structure of an auristatin useful herein and known as MMAE, or vedotin, is shown belo

本明細書において有用であり、ＭＭＡＥ又はベドチンとして公知のアウリスタチンの構造を以下に示す。

There are various forms of maytansinoids that are useful.

有用なメイタンシノイドの形態は様々である。

These are all based on the complex structure of a natural molecule, maytansine.

これらは全て、天然分子メイタンシンの複合体構造をベースとしている。

Particularly useful are the maytansinoids including DM-1 and DM-4.

特に有用なメイタンシノイドには、ＤＭ－１及びＤＭ－４がある。

In a specific embodiment, the toxin coupled to the EGFR MAb is DM-1 having the structure shown infra.

ある特定の実施形態では、ＥＧＦＲ　ＭＡｂに結合した毒素は以下に示す構造を有するＤＭ－１である。

Also useful as anti-microtubule toxins are dolostatins, auristatins, tubulysins and cryptophycins.

更に、抗微小管毒素として有用なものとして、ドロスタチン（dolostatin）、アウリスタチン、ツブリシン（tubulysin）、クリプトフィシンがある。★dolostatin→dolastatin（ドラスタチン）か。https://www.namiki-s.co.jp/compound/compound\_detail.php?code=HY-15580。以降のdolostatinも同様★

Specific examples of useful species within each genus include dolostatin 10, monomethyl dolostatin 10, auristatin E, monomethyl auristatin E (MMAE), auristatin F, monomethyl auristatin F, HTI-286, tubulysin M, as well as the tubulin binders such as tubulysin IM-1, tubulysin IM-2, tubulysin IM-3, colchicine DA, and maytansinoids AP-3, DM-1 and DM-4.

各属中の有用な種の具体例としては、ドロスタチン１０、モノメチルドロスタチン１０、アウリスタチンＥ、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、アウリスタチンＦ、モノメチルアウリスタチンＦ、ＨＴＩ－２８６、ツブリシンＭ、並びにチューブリン結合剤（例えばツブリシンＩＭ－１、ツブリシンＩＭ－２、ツブリシンＩＭ－３、コルヒチンＤＡ）、メイタンシノイドＡＰ－３、ＤＭ－１及びＤＭ－４がある。

Conjugates of a full antagonist EGFR antibody such as cetuximab or panitumumab, and an anti-microtubule toxin such as a maytansinoid or auristatin can be formed using any technique presently known or later developed that couples a linker that is "non- cleavable".

セツキシマブ又はパニツムマブ等のＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体と、メイタンシノイド又はアウリスタチン等の抗微小管毒素とのコンジュゲートは、現在公知の又は今後開発される、「非切断型」のリンカーを結合する任意の技術を用いて作製することができる。

These linkers remain intact, and retain the antibody and toxin in covalent association, throughout conditions normally encountered following administration to a subject, including extracellular environments.

これらのリンカーは、細胞外環境を含む、対象へ投与後に通常遭遇する全ての状態において損傷を受けず、抗体と毒素の共有結合を保持する。

More specifically, non-cleavable linkers result in ADC constructs for which release of the cytotoxic payload is achieved by destruction of the antibody by intracellular lysosomes.

より具体的には、細胞毒性のあるペイロードを放出するためのＡＤＣの構造をもたらす非切断型リンカーは、細胞内のリソソームで抗体が破壊されることにより実現する。

Methods of linker integration are described for instance in US 5,208,020; US 8,088,387; and US 6,441,163.

リンカーの組み込み方法は、例えば米国特許第５，２０８，０２０号、米国特許第８，０８８，３８７号及び米国特許第６，４４１，１６３号に記載されている。

A preferred method is to modify the EGFR antibody, e.g., cetuximab, with succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-l-carboxylate (SMCC) to introduce maleimido groups followed by reaction of the modified antibody with a thiol- containing maytansinoid to give a thioether-linked conjugate.

好ましい方法はＥＧＦＲ抗体、例えばセツキシマブをスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸塩（ＳＭＣＣ）を用いて修飾しマレイミド基を導入して、続いてチオール含有メイタンシノイドを用いて修飾した抗体を反応させ、チオエーテル結合コンジュゲートを得る方法である。

The resulting chemical structures are shown below.

得られた化学構造を以下に示す。

Conjugates with 1 to 10 drug molecules per antibody molecule result.

抗体分子あたり、１～１０個の薬物分子とのコンジュゲートが生じる。

Other useful forms of non-cleavable linkers include N-Succinimidyl iodoacetate (SIA), sulfo-SMCC, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester(MBS), sulfo-MBS and succinimidyl-iodoacetate, as described in the literature, to introduce 1-10 reactive groups, (see, Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979)).

非切断型リンカーの他の有用な形態には、ヨード酢酸 Ｎ－スクシンイミジル（ＳＩＡ）、スルホ－ＳＭＣＣ、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、スルホ－ＭＢＳ及びヨード酢酸－スクシンイミジルがあり、文献に記載されているように、１～１０個の反応性基を導入する（Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); and Liu et al, 18 690-697 (1979)を参照のこと）。

Particularly useful for linking auristatins as anti-microtubule toxin are the non-cleavable maleimidocaproyl linkers described by Doronina et al, in Bioconjugate Chem., 2006 Jan-Feb;17(l): l 14-24).

アウリスタチンを抗微小管毒素として結合するために特に有用なのは、Doronina et al, in Bioconjugate Chem., 2006 Jan-Feb;17(l): 1 14-24に記載されている非切断型のマレイミドカプロイルリンカーである。

In a specific embodiment, the immunoconjugate comprises cetuximab linked to DM-1 by an SMCC linker.

ある特定の実施形態では、イムノコンジュゲートはＳＭＣＣリンカーによってＤＭ－１に結合したセツキシマブを含む。

In another specific embodiment, the immunoconjugate comprises panitumumab linked to DM-1 by an SMCC linker.

別の特定の実施形態では、イムノコンジュゲートはＳＭＣＣリンカーによってＤＭ－１に結合したパニツムマブを含む。

Thus, in a general aspect, the invention provides a method useful to potentiate the anticancer activity of an EGFR antibody without potentiating the effect thereof on normal EGFR+ cells, the method comprising:

したがって、一般的な態様において、本発明はＥＧＦＲ陽性正常細胞への抗癌作用の効果を増強させずに、ＥＧＦＲ抗体の抗癌作用を増強させるために有用な方法であって、●を含む方法を提供する

(i) selecting, for conjugation, an EGFR antibody that is a full EGFR antagonist;

（ｉ）コンジュゲーションのために、ＥＧＦＲ完全アンタゴニストであるＥＧＦＲ抗体を選択するステップと、

(ii) selecting, for delivery by the EGFR antibody, an anti-microtubule toxin;

（ｉｉ）ＥＧＦＲ抗体によって送達するための抗微小管毒素を選択するステップと、

(iii) selecting, for coupling the selected EGFR antibody to the anti-microtubule toxin, a linker that is non-cleavable; and

（ｉｉｉ）選択したＥＧＦＲ抗体を抗微小管毒素に結合するための、非切断型のリンカーを選択するステップと、

incorporating the linker between the antibody and the toxin to provide an immunoconjugate having a cytotoxic activity that is potentiated against EGFR+ disease cells but not against normal EGFR+ cells.

抗体と毒素の間にリンカーを導入して、ＥＧＦＲ陽性の疾患細胞に対しては増強され、ＥＧＦＲ陽性正常細胞に対しては増強されない細胞毒性作用を有するイムノコンジュゲートを提供するステップ●。

As will be appreciated from the preceding disclosure, the full antagonist EGFR antibody is preferably cetuximab or panitumumab.

先行開示から理解されるように、ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体は好ましくはセツキシマブ又はパニツムマブである。

The anti-microtubule toxin is preferably an auristatin or a maytansinoid, and is most preferably DM-1.

抗微小管毒素は好ましくはアウリスタチン又はメイタンシノイドであり、最も好ましくはＤＭ－１である。

The non-cleavable linker is preferably SMCC.

非切断型リンカーは、好ましくはＳＭＣＣである。

In another specific embodiment, there is the proviso that the full antagonist EGFR antibody is not cetuximab.

別の特定の実施形態では、ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体はセツキシマブではないことが条件である。

In a further specific embodiment, there is the proviso that the full antagonist EGFR antibody is not panitumumab.

更なる特定の実施形態では、ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体はパニツムマブではないことが条件である。

Therapeutic formulations of the conjugate are prepared for therapeutic use directly or for storage by mixing the conjugate having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 th edition, Osol, A. Ed. [1980]), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions.

該コンジュゲートの治療用製剤を、直接治療用途に使用するために又は貯蔵のために、薬学的に許容できる任意の担体、賦形剤又は安定剤を含む(Remington's　Pharmaceutical Sciences, 16 edition, Osol, A. Ed. [1980])、所望の純度の程度を有するコンジュゲートを混合することによって、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製する。

Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl, or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins such as serum, albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagines, histidine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN, PLURONICS or polyethylene glycol (PEG).

許容できる担体、賦形剤又は安定剤はレシピエントに対して無害な用量及び濃度で使用され、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾール）；低分子量（約１０未満の残基）ポリペプチド；血清、アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖、二糖及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；塩化ナトリウム等の塩を形成するカウンターイオン；金属錯体（例えば、亜鉛－タンパク質錯体）；及び／又はＴＷＥＥＮ、プルロニック若しくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

The active ingredients to be used for in vivo administration must be sterile.

ｉｎ　ｖｉｖｏ投与で使用される有効成分は、無菌でなければならない。

This is readily accomplished by filtration through sterile membranes.

これは、滅菌メンブレンを通して濾過することで容易に実現できる。

Sustained-release preparations may be prepared.

徐放性製剤を調製してもよい。

Suitable examples of sustained-release include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the conjugate, which matrices are in the form of shapes articles, e.g., films or microcapsules.

徐放性の適切な例としては、コンジュゲートを含む固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスがあり、マトリックスはフィルム又はマイクロカプセル等の有形物品（shapes articles）形態である。★form of shapes articles、sustained-release（+preparations/dosage forms？)では★

Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly (2- hydroxyethyl-methacrylate), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L- glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

徐放性のマトリックスの例としては、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル-メタクリル酸）、ポリ乳酸（米国特許第３,７７３,９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とエチル－Ｌ－グルタミン酸塩のコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア等の分解性乳酸－グリコール酸コポリマー並びにポリＤ（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

エチレン酢酸ビニル及び乳酸－グリコール酸等のポリマーは１００日以上にわたり分子を放出可能であるが、ある種のハイドロゲルはより短い期間、タンパク質を放出する。

The conjugates are useful to treat EGFR+ disease cells.

該コンジュゲートは、ＥＧＦＲ陽性疾患細胞の治療に有用である。

Such treatment results in a reduction in the number, size or distribution of such disease cells in subjects presenting with them.

この治療によって、疾患細胞が存在する対象におけるその疾患細胞の数量、サイズ又は分布の減少が生じる。

In embodiments, the conjugates are used to treat EGFR+ disease cells that are EGFR+ cancer cells and tumours comprising them.

実施形態では、コンジュゲートは、ＥＧＦＲ陽性癌細胞であるＥＧＦＲ陽性疾患細胞及びそれらを含む腫瘍の治療に用いられる。

Such treatment results preferably in a reduction in the number, size, volume or distribution of such cancer cells and tumours comprising them, or at least in a reduction in the rat© at which such disease cells increase in number, size, volume or distribution of such cells and tumours in subjects presenting with them.

そのような治療は、癌細胞及び癌細胞を含む腫瘍の数量、サイズ、体積若しくは分布の減少をもたらすか、又は少なくとも、癌細胞及び癌細胞を含む腫瘍を呈する対象内で、それらの疾患細胞における、それらの細胞又は腫瘍の数量、サイズ、体積若しくは分布の増加速度の減少をもたらすことが好ましい。★rat©→rateの文字化けとみなして訳出。★▼当初（ｃ）はゴミでrat（ラット）だと思ったが文脈が合わない。「rat」というブランド名の実験装置かなにかかと思ったが存在しない。”in the rat© at whichで検索してサジェストされてようやくrateだとわかった。▼

Subjects presenting with EGFR+ cancer cells can be identified with the aid of assays that detect the receptor, as protein or as nucleic acid precursor (DNA or RNA) in physiological samples such as biopsied tissue.

ＥＧＦＲ陽性癌細胞を呈している対象は、生検組織等の生理学的試料内のタンパク質又は核酸前駆体（ＤＮＡ又はＲＮＡ）として受容体を検出するアッセイを用いて同定できる。

A suitable test for EGFR protein is the commercially available and FDA approved Dako EGFR pharmDx® test kit.

ＥＧＦＲタンパク質に適した検査は、市販されておりＦＤＡに認可されている、ＤａＫｏ　ＥＧＦＲ　ｐｈａｒｍＤｘ（登録商標）検査キットである。

For the treatment of subjects presenting with EGFR+ cancer cells, the appropriate dosage of the conjugate will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the agent is administered for preventative or therapeutic purposes, previous therapy, the patients clinical history and response to the agent, and the discretion of the attending physician.

ＥＧＦＲ陽性癌細胞を呈している対象の治療のためのコンジュゲートの適切な投与量は、上述した治療を受ける疾患の種類、疾患の重症度及び経過、薬剤が予防目的又は治療目的のいずれで投与されたか、前治療、患者の既往歴及び薬剤に対する応答、並びに主治医の判断に依存する。

The agent is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

該薬剤は、１回で又は一連の治療にわたって患者に適切に投与できる。

For example, depending on the type and severity of the disease, about 1 μg/kg to 15 mg/kg (e.g., 0.1-20 mg/kg) of conjugate is a candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion.

例えば、疾患の重症度及び経過に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例として０．１－２０ｍｇ／ｋｇ）のコンジュゲートが、例えば１回又はそれ以上の分割投与であっても持続点滴であっても、患者へ投与する候補用量である。

A typical daily dosage might range from about 1 g/kg to 500 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above.

典型的な１日用量は、上述の要因によって、約１μｇ／ｋｇ～５００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上の範囲となることもあり得る。

For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs.

数日以上にわたる反復投与に関しては、状態により、治療は所望の疾患症状の抑制が生じるまで維持される。

However, other dosage regimens may be useful.

しかしながら、他の投与レジメンが有用な場合がある。

The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

この治療の経過は、従来技術及びアッセイにより容易にモニタリングされる。

It will thus be appreciated that an effective amount of the immunoconjugate is an amount effective alone or as part of a treatment regimen that retards or inhibits the rate of growth or proliferation of EGFR+ disease cells.

したがって、イムノコンジュゲートの有効量は、単独で有効な量又はＥＧＦＲ陽性疾患細胞の成長速度若しくは増殖速度を遅延若しくは阻害する、投与レジメンの一部としての量であることが理解されるであろう。

An EGFR+ disease cell is a disease cell that presents EGFR on its surface as detectable for instance by EGFR antibody binding, or by detection of intracellular niRNA encoding her-1.

ＥＧＦＲ陽性疾患細胞は、例えば、ＥＧＦＲ抗体の結合又はｈｅｒ－１をコードする細胞内ｍＲＮＡの検出によって、その表面にＥＧＦＲを検出可能な状態で呈する疾患細胞である。

Particular EGFR+ disease cells include those having on their surface an abnormally high density and/or activity of EGFR molecules, or the presence of the EGFRvIII variant of EGFR.

特定のＥＧＦＲ陽性疾患細胞は、その表面に異常に高密度の及び／若しくは高活性のＥＧＦＲ分子を有するか又はＥＧＦＲ変異体であるＥＧＦＲｖⅢを呈しているものを含む。

It may be useful to administer to administer the present conjugates by intravenous infusion first as loading dose, followed by maintenance dose, such as at an initial dose of 4mg/kg over 90 minutes, then 2 mg/kg over 30 minutes, once weekly for as many as 52 weeks, with follow up as required.

投与には、本発明のコンジュゲートをまず初回負荷量として点滴静注し、続いて維持量を投与することが有用である場合がある。例えば、初回投与量４ｍｇ／ｋｇを９０分間で、続いて２ｍｇ／ｋｇを３０分間で、最大５２週間、１週間に１回、必要に応じて経過観察する。In the specific case of the panitumumab conjugate, dosing might be based on that utilized for panitumumab per se, which comprises 6mg/kg given once every two weeks as a one hour infusion.

パニツムマブコンジュゲートの特定の場合には、投与は、２週間に１回、６ｍｇ／ｋｇを１時間の点滴として行うことを含む、パニツムマブ自体の利用に基づく場合がある。

The conjugates are useful in the treatment of a variety of cancers, to inhibit the growth or proliferation of EGFR+ cancer cells and tumours comprising them, including hematopoietic cell cancers and solid tumours.

該コンジュゲートは、様々な癌の治療に利用でき、造血細胞癌及び固形腫瘍を含むＥＧＦＲ陽性疾患細胞及びそれを含む腫瘍の成長又は増殖の阻害を阻害する。Conditions or disorders to be treated include benign or malignant tumors (e.g., renal, liver, kidney, bladder, breast, gastric, ovarian, colorectal, prostate, pancreatic, lung, vulva, and thyroid); hepatic carcinomas; sarcomas; glioblastomas; and various head and neck tumors; leukemias and lymphoid malignancies.

治療される状態又は障害には、良性又は悪性腫瘍（例えば、腎臓（renal）、肝臓、腎臓（kidney）、膀胱、乳房、胃、卵巣、結腸直腸、前立腺、膵臓、肺、外陰及び甲状腺）；肝癌；肉腫；神経膠芽腫；及び種々の頭頸部腫瘍；白血病及びリンパ性腫瘍が挙げられる。★renal　tumorsとkidney　tumorsに違いはない★

In particular embodiments, the antibody or bivalent fragment are used in the treatment of such cancer cells that express EGFRvIII, as determined by the screening assays herein described.

特定の実施形態では、抗体又は２価の断片は、本明細書に記載のスクリーニングアッセイにより特定される、ＥＧＦＲｖⅢが発現しているこのような癌細胞の治療に用いられる。In particular embodiments, the cancer cells are EGFR+- presenting cancer cells that include head and neck cancers and especially squamous cell carcinoma of the head and neck, colorectal cancers, gastrointestinal cancers, brain tumours including glioblastomas, and tumours of the lung including non-small-cell lung carcinoma, and of the breast, pancreas, esophagus, kidney, ovary, cervix and prostate.

特定の実施形態では、癌細胞はＥＧＦＲ陽性を呈する癌細胞であり、頭頸部癌、特に頭頸部扁平上皮細胞癌、結腸直腸癌、消化器癌、神経膠芽腫を含む脳腫瘍、非小細胞肺癌を含む肺腫瘍、乳房腫瘍、膵臓腫瘍、食道腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍を含む。

In specific embodiments, the EGFR+ cancer is one for which cetuximab has received FDA marketing approval, such as squamous cell carcinoma of the head and neck and colorectal cancers.

特定の実施形態では、ＥＧＦＲ陽性癌は、頭頸部扁平上皮細胞癌及び結腸直腸癌等の、セツキシマブがＦＤＡの販売承認を受けたものである。

It will be appreciated that subjects who could benefit from the present method include mammals including humans as well as livestock, and pets.

本発明の方法から得られるベネフィットを享受できる対象には、ヒト並びに家畜及びペットを含む哺乳動物が含まれることが理解できるであろう。

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the conjugates of the instant invention.

他の治療レジメンを、本発明のコンジュゲートの投与と組み合わせてもよい。

For example, the patient to be treated may also receive radiation therapy, such as external beam radiation.

例えば、治療対象の患者は外部放射線照射等の放射線療法を受けてもよい。

Alternatively, or in addition, a chemotherapeutic agent may be administered to the patient.

代わりに、又は追加で、化学療法剤を患者に投与してもよい。

Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner.

そのような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは、製造業者の指示に従うか又は当業者によって経験的に決定し使用してよい。

Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

そのような化学療法のための調製及び投与スケジュールはまた、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)に記載されている。

The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration or the conjugate or may be given simultaneously therewith.

化学療法剤はコンジュゲートの投与前若しくは投与後、又はコンジュゲートと同時に投与してもよい。★or the conjugate→of the conjugateとみなす★

The conjugate may be combined with any anti-cancer toxins, or any other suitable drug particularly including irinotecan (CPT-11), cisplatin, cyclophosphamide, melphalan, dacarbazine, doxorubicin, daunorubicin, and topotecan, as well as tyrosine kinase inhibitors, including particularly EGFR kinase inhibitors such as AG1478 ((4-(3- chloroanilino-6,7-dimethoxyquinazoline), gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tykerb®), canertinib (PD183805, Pfizer), PKI-166 (Novartis), PD158780 and pelitinib.

コンジュゲートは任意の抗癌毒素（anti-cancer toxins）又は他の適当な薬剤と併用してもよく、特にイリノテカン（ＣＰＴ－１１）、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、ダカルバジン、ドキソルビシン、ダウノルビシン及びトポテカン、並びにチロシンキナーゼ阻害剤、特にＥＧＦＲキナーゼ阻害剤（例えば、ＡＧ１４７８（（４－（３－クロロアニリノ－６，７－ジメトキシキナゾリン）、ゲフィチニブ（イレッサ（登録商標））、エルロチニブ（タルセバ（登録商標））、ラパチニブ（タイケルブ（登録商標））、カネルチニブ（ＰＤ１８３８０５、ファイザー）、ＰＫＩ－１６６（ノバルティス）、ＰＤ１５８７８０及びペリチニブ等）が挙げられる。

It may also be desirable to administer antibodies or conjugates against other tumor associated antigens or their ligands, such as antibodies which bind to the ErbB2 (including trastuzumab marketed as Herceptin®, and pertuzumab marketed as Omnitarg®), ErbB3, ErbB4, or vascular endothelial factor (VEGF), and/or antibodies that bind to EGF or TGFa.

他の抗原若しくはそれらのリガンドに結合する他の腫瘍に対する抗体若しくはコンジュゲート、例えば、ＥｒｂＢ２（ハーセプチン（登録商標）として市販されているトラスツズマブ及びオムニターグ（登録商標）として市販されているペルツズマブを含む）、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４若しくは血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）に結合する抗体、及び／又はＥＧＦ若しくはＴＧＦａに結合する抗体を投与することも望ましい。

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing conjugate in an amount useful for the treatment of the disorders described herein is provided.

本発明の別の実施形態では、コンジュゲートを、本発明に記載の障害を治療するために有効な量で含む製品が提供される。

The article of manufacture comprises a container and a label.

製品には容器及びラベルを含む。

Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes.

好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、注射器及び試験管が挙げられる。

The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic.

容器はガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成されてよい。

The container holds a composition which is effective for treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle).

容器は、状態を治療するために有効な組成物を収容しており、無菌のアクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿刺可能な栓を有するバイアルでよい）。

The label on or associated with the container indicates that the composition is used for treating a cancer condition.

容器上の又は容器に付属のラベルは、該組成物が癌状態の治療用に使用されることを表示している。

The article of manufacture may further compromise a second container compromising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution.

物品は更に、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液等の薬学的に許容される緩衝液を含む（compromising）第２の容器を含んでも（compromise）よい。★compromise/compromisingはcomprise/comprisingの誤りとみなす★

It may further include other matters desirable from a commercial and use standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

物品は更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、注射器及び取扱説明書を含む添付文書等の、商業上及び使用上の観点から望ましい他の物質を含んでもよい。

An anti-cancer immunoconjugate according to the invention may be administered with a pharmaceutically-acceptable diluent, carrier, or excipient, in unit dosage form.

本発明による抗癌性のイムノコンジュゲートは、単一剤形中の薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤とともに投与してもよい。

Unit doses of the conjugate are suitably 50mgs, lOOmgs, 150mgs, 200mgs, 250mgs, 300mgs and 400mgs.

コンジュゲートの１回用量は、５０ｍｇ、１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇｓ及び４００ｍｇが好適である。

The drug can be formulated in single use vials at a concentration such as 20mg/mL, for instance lOOmg in 5mL vehicle such as 0.9% saline, 200mg in lOmL or 400mg in 20mL.

薬剤は２０ｍｇ／ｍＬの濃度などで、例えば、１００ｍｇを０．９ ％食塩水等のビヒクル５ｍＬで、２００ｍｇを１０ｍＬで又は４００ｍｇを２０ｍＬで、単回使用のバイアル製剤とすることが可能である。

Any appropriate route of administration can be employed, for example, parenteral, intravenous, subcutaneous, intramuscular, intracranial, intraorbital, ophthalmic, intraventricular, intracapsular, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, pulmonary, or oral administration.

任意の適切な投与経路を用いることができ、例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、心室内、関節内、脊髄内、大槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、肺内、又は経口投与である。

Example 1 - Preparation of Cetuximab-SMCC-DMl conjugate (A-H)

実施例１　セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートの調製（Ａ～Ｈ）

A. PREPARATION AND MEASUREMENT OF CETUXIMAB ANTIBODY

Ａ．　抗体セツキシマブの調製及び測定

Cetuximab is obtained from the open market, or is produced as described in WO 2012/100346, for conjugation to DM1 using the non-cleavable heterobifunctional cross- linking reagent SMCC.

セツキシマブは、非切断型の異種２官能性架橋剤であるＳＭＣＣを用いてＤＭ１とコンジュゲートするために、市販のものを入手するか、又はＰＣＴ国際公開特許第２０１２／１００３４６号に記載の通りに製造した。

Cetuximab antibody was then buffer exchanged into 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride, 2 mM EDTA; pH 6.5 buffer (Buffer A).

その後、抗体セツキシマブを、５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ塩化ナトリウム、２ｍＭ　ＥＤＴＡのｐＨ６．５バッファー（バッファーＡ）でバッファー交換した。

All buffers in this experiment were tested to be free of endotoxin using a chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) method (Cambrex).

本実験の全てのバッファーを、発色性リムルスアメボサイトライセート（ＬＡＬ）法（Ｃａｍｂｒｅｘ）を用いて、エンドトキシンフリーであることを検査した。

The concentration of antibody was measured using an extinction coefficient of 1.45 mL/mg/cm at 280 nm and a molecular weight of 145,781g.

抗体濃度を、２８０ｎｍで吸光係数１．４５ｍＬ／ｍｇ／ｃｍ及び分子量１４５，７８１ｇを用いて測定した。

B. PREPARATION AND MEASUREMENT OF SMCC STOCK SOLUTION

Ｂ．　ＳＭＣＣ原液の調製及び測定

A 20 mM solution of SMCC (6.69 mg/mL) (Concortis Biosystems Corp.) was prepared in DMSO.

２０ｍＭ　ＳＭＣＣ溶液（６．６９ｍｇ／ｍＬ）（Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）をＤＭＳＯ中で調製した。

The solution was diluted 1/40 in Assay Buffer and the absorbance of the samples was measured at 302 nm.

溶液をアッセイバッファー中に１／４０倍に希釈し、３０２ｎｍで試料の吸光度を測定した。

The concentration of the stock solution was calculated using a molar extinction coefficient of 602/M/cm.

原液の濃度を、モル吸光係数６０２／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

C. PREPARATION AND MEASUREMENT OF DM1 STOCK SOLUTION

Ｃ．　ＤＭ１原液の調製及び測定

A 10 mM solution of DM1 (free thiol form; Concortis Biosystems Corp.) was prepared in DMA (7.37 mg/mL).

１０ｍＭ　ＤＭ１溶液（遊離チオール型、Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）をＤＭＡ（７．３７ｍｇ／ｍＬ）中で調製した。

The absorbance of dilutions of the stock solution in ethanol was measured at 280 nm.

エタノール中で、原液希釈物の吸光度を２８０ｎｍで測定した。

The concentration of stock DM1 was calculated by using a molar extinction coefficient of 5700/M/cm at 280 nm.

ＤＭ１原液の濃度を、２８０ｎｍでモル吸光係数５７００／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

The concentration of free— SH in the stock DM1 preparation was measured using Elman's reagent (DTNB).

ＤＭ１原液製剤中の遊離－ＳＨの濃度を、エルマン試薬（Elman's reagent）（ＤＴＮＢ）を用いて測定した。★Elman's reagent→Ellman's reagent★

Dilutions of the stock solution were prepared in Assay buffer made to 3% (v/v) DMA, and then 100 mM DTNB in DMSO (1/100th volume) was added.

原液を希釈した液を　３％（ｖ／ｖ）ＤＭＡとしたアッセイバッファー中で調製し、次いでＤＭＳＯ（１／１００の量）中に１００ｍＭ　ＤＴＮＢを添加した。

The increase in absorbance at 412 nm was measured against a reagent blank and the concentration was calculated using an extinction coefficient of 14150/M/cm.

試薬ブランクに対し、４１２ｎｍにおける吸光度の増加を計測し、濃度を吸光係数１４１５０／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

The concentration of — SH resulting from the Elman's assay was used to represent the DM1 stock concentration in calculations for conjugation conditions.

エルマンアッセイから得られた－ＳＨの濃度は、コンジュゲーション条件の計算におけるＤＭ１原液濃度を示すために用いた。

D. MODIFICATION OF CETUXIMAB WITH SMCC CROSSLINKER

Ｄ．ＳＭＣＣクロスリンカーを用いたセツキシマブの修飾

The antibody was modified using a 7.5-fold molar excess of SMCC at 20 mg/mL antibody.

抗体を、２０ｍｇ／ｍＬの抗体に対し７．５倍モル過剰のＳＭＣＣを用いて、修飾した。

The reaction was carried out in Buffer A (95% v/v) with DMSO (5% v/v) for 2 hours at room temperature with stirring.

反応を、ＤＭＳＯ（５ｖ／ｖ％）を含むバッファーＡ（９５ｖ／ｖ％）中で、室温で２時間、攪拌しながら実施した。

E. G25 CHROMATOGRAPHY TO REMOVE EXCESS SMCC

Ｅ．　Ｇ２５クロマトグラフィーによる過剰なＳＭＣＣの除去

The cetuximab-SMCC reaction mixture was gel-filtered through a 1.5x4.9 cm pre-packed column of Sephadex G25 resin equilibrated in Buffer A.

セツキシマブとＳＭＣＣの反応による混合物を、バッファーＡで平衡させたレジンであるセファデックスＧ２５の１．５ｘ４．９ｃｍプレパックカラムを介してゲル濾過した。

The load and elution volumes were according to manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

充填体積及び溶出体積は製造会社（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の指示に従った。

The concentration of the modified antibody solution was assayed spectrophotometrically using the extinction co-efficient described above.

修飾した抗体の溶液濃度は、上述の吸光係数を用いて分光光度的に分析した。

F. CONJUGATION OF CETUXIMAB-SMCC WITH DM 1

Ｆ．　セツキシマブ－ＳＭＣＣとＤＭ１とのコンジュゲーション

The modified antibody was reacted with a 1.7-fold excess of DM1 over linker (assuming 5 linkers per antibody).

修飾した抗体を、リンカーに対し１．７倍過剰なＤＭ１（１抗体あたり５リンカーと仮定）と反応させた。

The reaction was carried out at 10 mg/mL antibody concentration in Buffer A (94% v/v) with DMA (6% v/v).

反応を、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で、ＤＭＡ（６ｖ／ｖ％）を含むバッファーＡ（９４ｖ／ｖ％）中で実施した。

After addition of DM1, the reaction was incubated at room temperature for 16.5 hours with stirring.

ＤＭ１を添加後、室温で１６．５時間、攪拌しながら反応をインキュベートした。

G. CONJUGATION PURIFICATION BY G25 CHROMATOGRAPHY

Ｇ　Ｇ２５クロマトグラフィーによるコンジュゲートの精製

The conjugation reaction mixture was gel-filtered through a 1.5x4.9 cm pre-packed column of Sephadex G25 resin equilibrated in 1 χ phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5 (Buffer B).

コンジュゲーション反応による混合物を、１χリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）・ｐＨ６．５（バッファーＢ）で平衡させたレジンであるセファデックスＧ２５１．５ｘ４．９ｃｍプレパックカラムを介してゲル濾過した。

The load and elution volumes were according to manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

充填体積及び溶出体積は製造会社（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の指示に従った。

The number of DM1 molecules linked per mole of cetuximab was determined by measuring absorbance at both 252 nm and 280 nm of the eluted material.

セツキシマブ１モル当たりの結合したＤＭ１分子の数は、溶出した物質の２５２ｎｍ及び２８０ｎｍ双方における吸光度を測定することにより決定した。

The DM1 /antibody ratio was found to be 2 and 4.

ＤＭ１／抗体比は２及び４であった。

The resulting conjugate was analyzed for binding and cytotoxicity.

得られたコンジュゲートの結合性及び細胞毒性を分析した。

H. TESTING OF CETUXIMAB-SMCC-DMl

Ｈ．　セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の試験

The cell lines used in these studies have the following characteristics:

これらの試験に使用される細胞株は下記の性質を有する。

A431 : human epithelial carcinoma of vulva cell line; available from ATCC; plated at 4000 cells/well in DMEM-10%FBS, 100µl/well in 96 well plate.

Ａ４３１：ヒト外陰上皮癌の細胞株、ＡＴＣＣより入手可能であり、９６ウェルプレートに、１００μｌ／ウェルで入れたＦＢＳ１０％含有ＤＭＥＭに、４０００細胞／ウェルで播種した。

H226: lung squamous cell carcinoma cell line; available at ATCC; plated at 4000 cells/well in RPMI-10%FBS, 100µl/well in 96-well culture plate.

Ｈ２２６：肺扁平上皮細胞癌の細胞株、ＡＴＣＣより入手可能であり、９６ウェル培養プレートに１００μｌ／ウェルで入れたＦＢＳ１０％含有ＲＰＭＩに、４０００細胞／ウェルで播種した。

MDA-MB-468: mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion; available from ATCC; plated at 4000 cells/well in ATCC-formulated Leibovitz's L-15 Medium (Catalog No. 30-2008) with added fetal bovine serum to a final concentration of 10%; 100µl/well in 96 well plate.

ＭＤＡ－ＭＢ－４６８：乳腺／胸部、転移性部位：胸水に由来、ＡＴＣＣより入手可能であり、ウシ胎児血清を最終濃度が１０％となるように添加した、ＡＴＣＣが配合したライボビッツＬ－１５培地（カタログＮｏ．３０－２００８）に、９６ウェルプレートに１００μｌ／ウェル、４０００細胞／ウェルで播種した。

HaCaT: in vitro spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin; available from Chinese Center for Type Culture Collection of Wuhan University; plated at 2000 cells/well in DMEM-10%FBS, 100µl/well /well in 96-well culture plate.

ＨａＣａＴ：組織学的に正常な皮膚より入手した、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで自然形質転換したケラチノサイトであり、武漢大学中国典型培養物保蔵センター（Chinese Center for Type Culture Collection）より入手可能であり、９６ウェルプレートに１００μｌ／ウェルで入れたＦＢＳ１０％含有ＤＭＥＭに、２０００細胞／ウェルで播種した。

HEKa: Normal Human Primary Epidermal Keratinocytes, adult; available from PromoCell GmbH; plated at 4000cells/well in EpiLife media 100µl/well, EpiLife medium #MEP1500CA, Invitrogen +HKGS human keratinocyte growth supplement (#S-001-5)

ＨＥＫａ： 正常成人ヒト表皮ケラチノサイトであり、ＰｒｏｍｏＣｅｌｌＧｍｂＨ社から入手可能であり、ＥｐｉＬｉｆｅ培地１００μｌ／ウェルに４０００細胞／ウェルで播種し、ＥｐｉＬｉｆｅ培地＃ＭＥＰ１５００ＣＡ（インビトロゲン社）にＨＫＧＳヒトケラチノサイト増殖サプリメント（＃Ｓ－００１－５）を添加した。

Binding studies showed that the conjugation of antibody to DM1 did not affect the KD; both naked cetuximab antibody and cetuximab-SMCC-DMl conjugate had the same binding affinity to EGFR by surface plasmon resonance (-0.3 nM, Table 1).

結合性試験は、抗体のＤＭ１とのコンジュゲーションはＫＤに影響を及ぼさないことを示し、表面プラズモン共鳴（－０．３ｎＭ、表１）では、裸の抗体セツキシマブ及びセツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートはいずれもＥＧＦＲに対して同様の結合親和性を有していた。

Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the sample showed that the cetuximab-SMCC-DMl conjugate is significantly more cytotoxic compared to cetuximab against cancer cell lines (Figs 3&4), but that surprisingly cetuximab-SMCC-DMl and naked cetuximab have the same cytotoxic activity against keratinocytes (Figs 5&6).

試料のｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞毒性の評価は、セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートは、セツキシマブと比較して癌細胞株に対して極めて細胞毒性が高いが（図３及び図４）、驚くべきことに、セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及び裸のセツキシマブは、ケラチノサイトに対しては同様の細胞毒性活性を有していることを示した（図５及び図６）。

Table 1: effects of conjugation to DM1 on cetuximab KD

表１：ＤＭ１とのコンジュゲーションがセツキシマブのＫＤへ与える影響

The effect of DM1 conjugation on different EGFR MAbs (huML66 and huEGFR-7R) is demonstrated in ImmunoGen's published US patent application 2012/0156217, and Figures 1 and 2 herein are reproductions of figures appearing in that application.

異なるＥＧＦＲ　ＭＡｂ（ｈｕＭＬ６６及びｈｕＥＧＦＲ－７Ｒ）におけるＤＭ１のコンジュゲーションの効果は、ＩｍｍｕｎｏＧｅｎの米国公開特許出願第２０１２／０１５６２１７号にて示されており、本明細書の図１及び図２は、該出願において示された図の複製である。

More particularly, as shown in Figure 1, conjugation of anti-EGFR antibodies huML66-SMCC- DM1 and huEGFR-7R to maytansinoids to create huML66-SMCC-DMl and huEGFR- 7R-SMCC-DM1 immunoconjugates increases cytotoxic activity of against normal keratinocytes.

更に詳細には、図１に示されるように、ｈｕＭＬ６６－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及びｈｕＥＧＦＲ－７Ｒ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のイムノコンジュゲートを生成するための、抗ＥＧＦＲ抗体ｈｕＭＬ６６－ＤＭ１及びｈｕＥＧＦＲ－７Ｒのメイタンシノイドとのコンジュゲーションは、正常ケラチノサイトに対する細胞毒性活性を高める。

Similarly, and as expected, conjugation of anti-EGFR antibodies huML66 and huEGFR-7R to maytansinoids to create huML66-SMCC-DMl and huEGFR-7R- SMCC-DM1 immunoconjugates significantly potentiates cytotoxic activity of the antibodies against H226 cancer cell line (Figure 2).

同様に、予想通り、ｈｕＭＬ６６－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及びｈｕＥＧＦＲ－７Ｒ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のイムノコンジュゲートを生成するための、抗ＥＧＦＲ抗体ｈｕＭＬ６６及びｈｕＥＧＦＲ－７Ｒのメイタンシノイドとのコンジュゲーションは、抗体のＨ２２６細胞株に対する細胞毒性活性を著しく増強する（図２）。

As shown in Figures 3 and 4, DM1 conjugation of anti-EGFR antibody cetuximab (HC- LC) to create cetuximab-SMCC-DMl immunoconjugate (HC-LC/DM1) significantly potentiates cytotoxic activity of the antibody against cancer cells, as expected and shown in Figure 3.

図３及び図４に示す通り、セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１イムノコンジュゲート（ＨＣ－ＬＣ／ＤＭ１）を生成するための、抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ（ＨＣ－ＬＣ）のＤＭ１とのコンジュゲーションは、予期した通り、及び図３に示す通りに抗体の癌細胞株に対する細胞毒性活性を著しく増強する。

As shown in Figure 4, and also as expected, conjugation of anti-EGFR antibody cetuximab (HC-LC) to maytansinoids to create cetuximab-SMCC-DMl immunoconjugate (HC-LC/DM1) significantly potentiates cytotoxic activity of the antibody against cancer cells.

図４に示すように、また予想通り、セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１イムノコンジュゲート（ＨＣ－ＬＣ／ＤＭ１）を生成するための、抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ（ＨＣ－ＬＣ）のメイタンシノイドとのコンジュゲーションは、抗体の癌細胞に対する細胞毒性活性を著しく増強する。

However, and quite surprisingly, as shown in Figures 5 and 6, conjugation of anti-EGFR antibody cetuximab (HC-LC) to maytansinoids to create cetuximab-SMCC-DMl immunoconjugate (HC-LC/DM1) did not increase cytotoxicity against the keratinocytes as is reflected in substantially the same IC50 values for these agents (IC50 of 0.8269 for conjugate vs. IC50 of 0.4324 for naked antibody; Fig 5, HaCaT - normal human keratinocytes cell line & IC50 of 2.210 for conjugate vs. IC50 of 0.9348 for naked antibody, Fig 6; HEKa- primary human keratinocyte cells).

しかしながら、そして非常に驚くべきことに、図５及び図６に示す通り、セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１イムノコンジュゲート（ＨＣ－ＬＣ／ＤＭ１）を作製するための、抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブ（ＨＣ－ＬＣ）とメイタンシノイドとのコンジュゲーションは、これらの薬剤に対して実質的に同様のＩＣ５０値を示しているように、ケラチノサイトに対する細胞毒性を増強しなかった。（コンジュゲートのＩＣ５０は０．８２６９、対して裸の抗体のＩＣ５０は０．４３２４。図５、ＨａＣａＴ－ヒト正常ケラチノサイト細胞株。コンジュゲートのＩＣ５０は２．２１０、対して裸の抗体のＩＣ５０は０．９３４８。図６、ＨＥＫａ－正常ヒト成人表皮ケラチノサイト。）

As used herein, IC50 refers to the concentration of drug required to kill 50% of cells.

本明細書で使用する場合、ＩＣ５０は５０％の細胞を殺傷するために必要な薬剤の濃度を指す。

The measure of whether cytotoxicity is increased or not is determined above by comparing IC50 values produced using the alamar blue cell viability assay (each experiment performed in triplicates in a 96-well plate).

細胞毒性が増強したか否かの基準は、アラマーブルー細胞生存アッセイを使用して得られるＩＣ５０値を比較することにより上記で決定する（各実験は９６ウェルプレート中にて３回実施する）。

A difference within one log order is deemed not significant and is considered to reveal no change in cytotoxicity, whereas a difference greater than one log order reveals a significant change in cytotoxicity.

対数１桁内の差は有意ではないとみなし細胞毒性に変化がないことが明らかであると考え、他方、差が対数１桁より大きい場合は細胞毒性に顕著な差があることを明らかに示している。

Example 2 - Evaluation in Primates

実施例２　霊長類における評価

Cynomolgus monkey species has been previously demonstrated to be a valuable and highly predictive model for evaluating anti-EGFR antibodies toxicities, including dermatologic side-effects.

カニクイザル種は、皮膚の副作用を含む抗ＥＧＦＲ抗体の毒性評価にとって、有用で予測性の高いモデルであることが既に確認されている。

The high level of correlation between Cynomolgus monkey and human toxicity data for EGFR-targeting antibodies is in part due high homology between the monkey and human EGFR receptors that results in very similar KD values for the antibodies:

ＥＧＦＲを標的とする抗体に関する、カニクイザルとヒトにおける毒性データの高レベルの相関は、非常に類似した抗体のＫＤ値をもたらすサルとヒトのＥＧＦＲ受容体における高い相同性に、ある程度は起因する。

Table 1:

表１：

Binding affinity of cetuximab and panitumumab to human and cynomologus EGFR is consistent across the species.

セツキシマブ及びパニツムマブのヒト及びカニクイザル（cynomologus）のＥＧＦＲへの結合親和性は種間で一致している。★cynomologusはカニクイザル系統、という大きなくくり。動物名のカニクイザルはCynomolgus、「across the species」だからこちらを使っているのか。スペルミスでなく。https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\_res\_det.cgi?RNO=JCRB1164★

Apparent antibody affinity defined as the antibody concentration (picomolar, pM) required to achieve half-maximal binding in ELISA with recombinant extracellular domains of human EGFR (huEGFR), and Cynomolgus monkey EGFR (cyEGFR).

見かけの抗体親和性は、ＥＬＩＳＡでヒトＥＧＦＲ（ｈｕＥＧＦＲ）及びカニクイザルＥＧＦＲ（ｃｙＥＧＦＲ）の組換え細胞外ドメインとの最大半量の結合性を達成するために必要とされる抗体濃度（ピコモル濃度、ｐＭ）として定義される。

Adapted from Koefoed et al, MABs. 2011 Nov-Dec; 3(6):584-595.

Koefoed et al, MABs. 2011 Nov-Dec; 3(6):584-595.より適用した。

The cetuximab-SMCC-DMl immunoconjugate was tested in primates particularly to identify any significant potentiation of antibody side-effects by the conjugated toxin on normal cells.

セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１イムノコンジュゲートを、特に正常細胞におけるコンジュゲートされた毒素による抗体の副作用の顕著な増強を同定するために、霊長類で試験した。

In particular, close attention was paid to dermatologic side-effects that are qualitatively different and/or significantly exacerbated relative to what is expected with the naked fully antagonistic anti-EGFR antibody.

特に、完全アンタゴニストである裸の抗ＥＧＦＲ抗体で予期される副作用と比較して、質的に異なるか又は顕著に悪化させる、あるいはその双方である皮膚の副作用に対してとりわけ注目した。

The study initially made use of two Cynomolgus macaques, all males that were sedated with ketamine and anesthetized with isoflurane to facilitate IV administration of the antibody-drug conjugate administered at 10mg/kg.

試験は、初めに２匹のマカク属カニクイザルを用いて行われ、いずれも、１０ｍｇ／ｋｇで投与される抗体－薬物コンジュゲートの静脈内投与を容易にするために、ケタミンで鎮静化しイソフルランで麻酔したオスであった。

Animals were then observed for 5 days prior to sacrifice for general signs of acute toxicity, and examined further.

動物を、急性毒性の一般状態について屠殺前の５日間観察し、更に調査を行った。

The detailed histopathology analysis revealed no severe dermatologic toxicities or other severe and qualitatively new dermatologic side-effects other than those that are expected as a result of naked cetuximab treatment.

詳細な病理組織学的分析により、裸のセツキシマブによる治療の結果として予期されているもの以外で、重度の皮膚毒性又は他の重度及び質的に新しい皮膚の副作用は認められないことが明らかとなった。

Also, no other severe on-target toxicities were observed in these animals demonstrating safety of ADCs of present invention and absence of significant exacerbation of the naked antibody toxicities.

また、これらの動物において、他の重度のオンターゲット毒性は観察されず、本発明のＡＤＣの安全性及び裸の抗体の毒性の顕著な悪化がないことを示している。

Subsequent to successful completion of the acute primate study, repeat-dose safety study has been initiated in additional animals.

霊長類の急性試験（acute primate study）の成功裏の完了に続いて、追加の動物による反復投与安全性試験を開始した。★acute primate studyということばはほぼこの明細書のみ。霊長類による急性毒性試験と理解するが、訳文は原文通りとする★

The ADC was administered once every three weeks at 10mg/kg dose over 4 cycles.

ＡＤＣを３週間に１度、１０ｍｇ／ｋｇの用量で、４サイクルにわたり投与した。

This dose and schedule was selected based on dosing schedules commonly used with other ADCs in primates and humans (Poon KA et al, Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DMl): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Dec 1 ;273(2):298-313; FDA Package Insert for Kadcyla™, accessed February 24, 2014: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/label/2013/1254271bl.pdf).

この用量及びスケジュールは、霊長類及びヒトにおける他のＡＤＣで一般的に使用される投与スケジュールに基づいて選択した（Poon KA et al, Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DMl): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Dec 1 ;2013 Dec 1 ;273(2):298-313; FDA Package Insert for Kadcyla™, accessed February 24, 2014: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/label/2013/1254271bl.pdf).

With the exception of reversible liver enzyme elevations which is an expected class side- effect of ADCs, no other severe and/or qualitatively new dermatologic or other on-target side-effects other than those that are already expected as a result of naked cetuximab treatment (cetuximab cynomolgus monkey data available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/bla/2004/125084\_ERBITUX\_PHARMR \_P3.PDF) have been observed in the ongoing study to date.

ＡＤＣ共通の副作用として予期された可逆的な肝酵素の上昇を除いて、裸のセツキシマブによる治療の結果として既に予期されているもの以外に（セツキシマブのカニクイザルにおけるデータは http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/bla/2004/125084\_ERBITUX\_PHARMR \_P3.PDFで入手可能である）、これまでに進行中の試験で認められたその他の重度の及び／又は質的に新しい皮膚若しくは他のオンターゲット副作用は存在しない。

Severe skin toxicity and toxic epidermal necrolysis previously reported with anti-CD44v6 ADC (which also uses SMCC-DM1 payload technology and targets an antigen expressed by normal keratinocytes) has not been observed in this study (Tijink et al., Clin Cancer Res, 2006, 12:6064).

以前、抗ＣＤ４４ｖ６　ＡＤＣ（同様にＳＭＣＣ－ＤＭ１のペイロード技術を使用しており、正常ケラチノサイトに発現している抗原を標的とする）で報告された重度の皮膚毒性及び中毒性表皮壊死症は、本試験では観察されなかった。（Tijink et al., Clin Cancer Res, 2006, 12:6064)。

These safety data further validates in vitro results that on-target toxicities of fully antagonist naked anti-EGFR antibodies is not significantly potentiated as result of conjugation to the cytotoxic payloads.

これらの安全性データは、完全アンタゴニストである裸の抗ＥＧＦＲ抗体のオンターゲット毒性は、細胞毒性のペイロードとのコンジュゲーションの結果、顕著には増強されないというｉｎ　ｖｉｔｒｏの結果を更に確認するものである。

Example 3 - Preparation of Panitumumab-SMCC-DM1conjugate (A-H)

実施例３　パニツムマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートの調製（Ａ～Ｈ）

A DM-1 conjugated panitumumab was prepared essentially as described above for the cetuximab counterpart.

ＤＭ－１をコンジュゲートしたパニツムマブを、基本的にセツキシマブの対応物について前述した通りに調製した。

More particularly,

更に詳細には、（以下の通りである）

A. PREPARATION AND MEASUREMENT OF PANITUMUMAB ANTIBODY

Ａ．　抗体パニツムマブの調製及び測定

Panitumumab is obtained from the open market, or is produced as described in US 6,235,883 or US 7,807,798 for conjugation to DM1 using the non-cleavable heterobifunctional cross-linking reagent SMCC.

パニツムマブは、非切断型の異種２官能性架橋剤であるＳＭＣＣを用いてＤＭ１とコンジュゲートするために、市販のものを入手するか、又は米国特許第６，２３５，８８３号若しくは米国特許第７，８０７，７９８号に記載の通りに生産した。

Panitumumab antibody was then buffer exchanged into 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride, 2 mM EDTA; pH 6.5 buffer (Buffer A).

その後、抗体パニツムマブを、５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ塩化ナトリウム、２ｍＭ　ＥＤＴＡのｐＨ６．５バッファー（バッファーＡ）でバッファー交換した。

All buffers in this experiment were tested to be free of endotoxin using a chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) method (Cambrex).

本実験の全てのバッファーを、発色性リムルスアメボサイトライセート（ＬＡＬ）法（Ｃａｍｂｒｅｘ）を用いて、エンドトキシンフリーであることを検査した。

The concentration of antibody was measured using an extinction coefficient of 1.45 mL/mg/cm at 280 nm and a molecular weight of 145,781g.

抗体濃度を、２８０ｎｍで吸光係数１．４５ｍＬ／ｍｇ／ｃｍ及び分子量１４５，７８１ｇを用いて測定した。

B. PREPARATION AND MEASUREMENT OF SMCC STOCK SOLUTION

Ｂ．　ＳＭＣＣ原液の調製及び測定

A 20 mM solution of SMCC (6.69 mg/mL) (Concortis Biosystems Corp.) was prepared in DMSO.

２０ｍＭ　ＳＭＣＣ溶液（６．６９ｍｇ／ｍＬ）（Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）をＤＭＳＯ中で調製した。

The solution was diluted 1/40 in Assay Buffer and the absorbance of the samples was measured at 302 nm.

溶液をアッセイバッファー中に１／４０倍に希釈し、３０２ｎｍで試料の吸光度を測定した。

The concentration of the stock solution was calculated using a molar extinction coefficient of 602/M/cm.

原液の濃度を、モル吸光係数６０２／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

C. PREPARATION AND MEASUREMENT OF DM1 STOCK SOLUTION

Ｃ．　ＤＭ１原液の調製及び測定

A 10 mM solution of DM1 (free thiol form; Concortis Biosystems Corp.) was prepared in DMA (7.37 mg/mL).

１０ｍＭ　ＤＭ１溶液（遊離チオール型、Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）をＤＭＡ（７．３７ｍｇ／ｍＬ）中で調製した。

The absorbance of dilutions of the stock solution in ethanol was measured at 280 nm.

エタノール中で、原液希釈物の吸光度を２８０ｎｍで測定した。

The concentration of stock DM1 was calculated by using a molar extinction coefficient of 5700/M/cm at 280 nm.

ＤＭ１原液の濃度を、２８０ｎｍでモル吸光係数５７００／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

The concentration of free— SH in the stock DM1 preparation was measured using Elman's reagent (DTNB).

ＤＭ１原液製剤中の遊離－ＳＨの濃度を、（ＤＴＮＢ）を用いて測定した。

Dilutions of the stock solution were prepared in Assay buffer made to 3% (v/v) DMA, and then 100 mM DTNB in DMSO (1/100th volume) was added.

原液を希釈した液を　３％（ｖ／ｖ）ＤＭＡとしたアッセイバッファー中で調製し、次いでＤＭＳＯ（１／１００の量）中に１００ｍＭ　ＤＴＮＢを添加した。

The increase in absorbance at 412 nm was measured against a reagent blank and the concentration was calculated using an extinction coefficient of 14150/M/cm.

試薬ブランクに対し、４１２ｎｍにおける吸光度の増加を計測し、濃度は吸光係数１４１５０／Ｍ／ｃｍを用いて計算した。

The concentration of — SH resulting from the Elman's assay was used to represent the DM1 stock concentration in calculations for conjugation conditions.

エルマンアッセイから得られた－ＳＨの濃度は、コンジュゲーション条件の計算におけるＤＭ１原液濃度を示すために用いた。

D. MODIFICATION OF PANITUMUMAB WITH SMCC CROSSLINKER

Ｄ．ＳＭＣＣクロスリンカーを用いたパニツムマブの修飾

The antibody was modified using a 7.5-fold molar excess of SMCC at 20 mg/mL antibody.

抗体を、２０ｍｇ／ｍＬの抗体に対し７．５倍モル過剰のＳＭＣＣを用いて、修飾した。

The reaction was carried out in Buffer A (95% v/v) with DMSO (5% v/v) for 2 hours at room temperature with stirring.

反応を、ＤＭＳＯ（５ｖ／ｖ％）を含むバッファーＡ（９５ｖ／ｖ％）中で、室温で２時間、攪拌しながら実施した。

E. G25 CHROMATOGRAPHY TO REMOVE EXCESS SMCC

Ｅ．　Ｇ２５クロマトグラフィーによる過剰なＳＭＣＣの除去

The panitumumab-SMCC reaction mixture was gel-filtered through a 1.5x4.9 cm prepacked column of Sephadex G25 resin equilibrated in Buffer A.

パニツムマブとＳＭＣＣの反応による混合物を、バッファーＡで平衡させたレジンであるセファデックスＧ２５の１．５ｘ４．９ｃｍプレパックカラムを介してゲル濾過した。

The load and elution volumes were according to manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

充填体積及び溶出体積は製造会社（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の指示に従った。

The concentration of the modified antibody solution was assayed spectrophotometrically using the extinction co-efficient described above.

修飾した抗体の溶液濃度は、上述した吸光係数を用いて分光光度的に分析した。

F. CONJUGATION OF PANITUMUMAB-SMCC WITH DM1

Ｆ．　パニツムマブ－ＳＭＣＣとＤＭ１とのコンジュゲーション

The modified antibody was reacted with a 1.7-fold excess of DM1 over linker (assuming 5 linkers per antibody).

修飾した抗体を、リンカーに対し１．７倍過剰なＤＭ１（１抗体あたり５リンカーと仮定）と反応させた。

The reaction was carried out at 10 mg/mL antibody concentration in Buffer A (94% v/v) with DMA (6% v/v).

反応を、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で、ＤＭＡ（６ｖ／ｖ％）を含むバッファーＡ（９４ｖ／ｖ％）中で実施した。

After addition of DM1 , the reaction was incubated at room temperature for 16.5 hours with stirring.

ＤＭ１を添加後、室温で１６．５時間、攪拌しながら反応をインキュベートした。

G. CONJUGATION PURIFICATION BY G25 CHROMATOGRAPHY

Ｇ．　Ｇ２５クロマトグラフィーによるコンジュゲートの精製

The conjugation reaction mixture was gel-filtered through a 1.5x4.9 cm pre-packed column of Sephadex G25 resin equilibrated in l x phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5 (Buffer B).

コンジュゲーション反応による混合物を、１χリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）・ｐＨ６．５（バッファーＢ）で平衡させたレジンであるセファデックスＧ２５の１．５ｘ４．９ｃｍプレパックカラムを介してゲル濾過した。

The load and elution volumes were according to manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

充填体積及び溶出体積は製造会社（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の指示に従った。

The number of DM1 molecules linked per mole of panitumumab was determined by measuring absorbance at both 252 nm and 280 nm of the eluted material.

パニツムマブ１モル当たりの結合したＤＭ１分子の数は、溶出した物質の２５２ｎｍ及び２８０ｎｍ双方における吸光度を測定することにより決定した。

The DMl/antibody ratio was found to be 2 and 4.

ＤＭ１／抗体比は２及び４であった。

The resulting conjugate was analyzed for binding and cytotoxicity.

得られたコンジュゲートの結合性及び細胞毒性を分析した。

H. TESTING OF PANITUMUMAB-SMCC-DM1

Ｈ．　パニツムマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の試験

The cell lines used in these studies have the following characteristics:

これらの試験に使用される細胞株は下記の性質を有する。

MDA-MB-468: mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion; available from ATCC; plated at 4000 cells/well in ATCC-formulated Leibovitz's L-15 Medium (Catalog No. 30-2008) with added fetal bovine serum to a final concentration of 10%; 100µl/well in 96 well plate.

ＭＤＡ－ＭＢ－４６８：乳腺／胸部、転移性部位：胸水に由来、ＡＴＣＣより入手可能であり、ウシ胎児血清を最終濃度が１０％となるように添加した、ＡＴＣＣが配合したライボビッツＬ－１５培地（カタログＮｏ．３０－２００８）に、９６ウェルプレートに１００μｌ／ウェル、４０００細胞／ウェルで播種した。

HaCaT: in vitro spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin; available from Chinese Center for Type Culture Collection of Wuhan University; plated at 2000 cells/well in DMEM-10%FBS, 100µl/well in 96-well culture plate.

ＨａＣａＴ：組織学的に正常な皮膚より入手した、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで自然形質転換したケラチノサイトであり、武漢大学中国典型培養物保蔵センター（Chinese Center for Type Culture Collection）より入手可能であり、９６ウェルプレートに１００μｌ／ウェルで入れたＦＢＳ１０％含有ＤＭＥＭに、２０００細胞／ウェルで播種した。

In vitro studies with keratinocytes demonstrate that conjugation of panitumumab to an anti-microtubule toxin via non-cleavable linker does not potentiate the toxicity of the antibody.

ケラチノサイトを用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験は、非切断型リンカーを介したパニツムマブと抗微小管毒素のコンジュゲーションは、抗体の毒性を増強しないことを立証している。

The resulting ADC has a similar safety profile on keratinocytes as the naked panitumumab, as well as another ADC based on a fully antagonistic antibody, cetuximab.

得られたＡＤＣは、裸のパニツムマブ及び完全アンタゴニスト抗体であるセツキシマブをベースとした他のＡＤＣと類似の、ケラチノサイトにおける安全性プロファイルを有している。

On MDA-MB-468 cancer cells, significant potentiation of anticancer activity of panitumumab is observed as a result of conjugating the antibody to anti-microtubule toxin via non-cleavable linker.

ＭＤＡ－ＭＢ－４６８癌細胞において、非切断型リンカーを介した抗体と抗微小管毒素とのコンジュゲーションの結果、パニツムマブの抗癌活性の顕著な増強が観察される。

Similar to toxicity observations, panitumumab-based ADC was similarly active as cetuximab-based ADC.

毒性所見と同様に、パニツムマブをベースとしたＡＤＣは、セツキシマブをベースとしたＡＤＣと同様の活性を有する。

Example 4 - Results with partial antagonist EGFR MAb conjugates

実施例４　ＥＧＦＲ部分アンタゴニストＭＡｂのコンジュゲーションの結果

The effect of selecting immunoconjugate components different from those recommended herein is shown in accompanying drawings.

本明細書で推奨している要素と異なるイムノコンジュゲートの構成要素を選択することの作用を、添付図面に示す。

Figure 9 shows that a partial antagonist EGFR antibody, designated J2989A has an activity that is potentiated on normal keratinocytes when conjugated to DM-1.

図９は、Ｊ２９８９Ａと示されたＥＧＦＲ部分アンタゴニスト抗体が、ＤＭ－１とコンジュゲートした際に正常ケラチノサイトで増強される活性を有することを示す。★図ではＪ２８９８Ａとなっている★

Figure 10 shows, similarly, that another partial antagonist antibody, designated 6-LC (a substitution variant of cetuximab having lower relative affinity for EGFR) has an activity that is also potentiated at normal keratinocytes when conjugated to DM-1.

図１０は同様に、６－ＬＣと示された部分アンタゴニスト抗体（相対的に低いＥＧＦＲへの親和性を有するセツキシマブの置換変異体）もまた、ＤＭ－１とコンジュゲートした際に正常ケラチノサイトで増強される活性を有することを示す。★図１１の誤り★

Figure 11 shows that the effect of panitumumab of keratinocytes is not potentiated on keratinocytes when conjugated to DM1, while the anticancer effect of the conjugate is potentiated dramatically (Figure 12).

図１１は、ケラチノサイトにおけるパニツムマブの効果は、ＤＭ－１とコンジュゲートした際にケラチノサイト上では増強されないが、一方で該コンジュゲートの抗癌効果は劇的に増強されることを示す（図１２）。★図１１→図１２の誤り★

And, Figure 13 shows that conjugation of cetuximab to MMAE by a cleavable linker (valine-citrulline) potentiates its toxicity against normal cells and MDA-MB-468 cancer cells, whereas conjugation via non-cleavable linker (SMCC) potentiates anti-cancer activity.

更に、図１３は切断型リンカー（バリン－シトルリン）によるセツキシマブとＭＭＡＥとのコンジュゲーションは、正常細胞及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８癌細胞に対する毒性を増強するが、一方で非結合型リンカー（ＳＭＣＣ）を介したコンジュゲーションは、抗癌活性を増強することを示す。

Thus, in these studies, only fully antagonistic anti-EGFR antibodies were not potentiated on normal cells by payload conjugation via non-cleavable linkers, whereas toxicity against normal cells of partial antagonist EGFR antibodies was potentiated by the conjugation.

したがって、これらの試験において、非切断型リンカーを介したペイロードのコンジュゲーションによって、完全アンタゴニスト抗ＥＧＦＲ抗体のみが正常細胞における増強を認めず、一方でＥＧＦＲ部分アンタゴニスト抗体の正常細胞に対する毒性は、コンジュゲーションにより増強された。

Moreover, we subsequently tested the effect on this activity profile of the cleavable vs. non-cleavable linkers, while maintaining payload mechanism of action the same (i.e. anti-microtubule agent).

更に、我々は続いて、ペイロードの作用機序は同一のままとし（すなわち、抗微小管剤）、非切断型リンカーに対する切断型リンカーの、この活性プロファイルへの影響を試験した。

The antibodies were conjugated via cleavable linker to anti-microtubule payload, MMAE as described by Doronina et al, Nature Biotechnology Nov 7, 2003, Vol 21 : pp 778-784.

抗体を、切断型リンカーを介してDoronina et al, Nature Biotechnology Nov 7, 2003, Vol 21 : pp 778-784.に記載の抗微小管ペイロードであるＭＭＡＥとコンジュゲートした。

Cleavable linker data demonstrate that when the fully antagonistic antibodies are conjugated to their payloads via cleavable linkers, their toxicity against normal cells is potentiated.

切断型リンカーのデータは、完全アンタゴニスト抗体が切断型リンカーを介してそれらのペイロードとコンジュゲートした場合、正常細胞に対する完全アンタゴニスト抗体の毒性が増強されることを立証している。

Thus, a safe anti-EGFR ADC should incorporate a strongly antagonistic anti-EGFR antibody linked to an anti-microtubule payload by a non-cleavable linker.

したがって、安全な抗ＥＧＦＲ　ＡＤＣは、非切断型リンカーを介して抗微小管ペイロードと結合している、強力に拮抗する抗ＥＧＦＲ抗体を導入すべきである。

The scope of the claims should not be limited by the preferred embodiments set forth in the examples, but should be given the broadest interpretation consistent with the description as a whole.

特許請求の範囲は、本実施例に記載の好ましい実施態様によって限定されるべきではなく、総じて本詳細の説明と一致する最も広い解釈がなされるべきである。

Referenced Sequences

参照配列

SEP ID No. Description

ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．　説明

Cetuximab heavy chain CDR1

セツキシマブ重鎖ＣＤＲ１

NYGVH

NYGVH

2 Cetuximab heavy chain CDR2

VIWSGGNTDYNTPFTS

VIWSGGNTDYNTPFTS

3 Cetuximab heavy chain CDR3

セツキシマブ重鎖ＣＤＲ３

ALTYYDYEFAY

ALTYYDYEFAY

4 Cetuximab light chain CDR1

セツキシマブ軽鎖ＣＤＲ１

RASQSIGTNIH

RASQSIGTNIH

5 Cetuximab light chain CDR2

セツキシマブ軽鎖ＣＤＲ２

ASESIS

ASESIS

6 Cetuximab light chain CDR3

セツキシマブ軽鎖ＣＤＲ３

QQNNNWPTT

QQNNNWPTT

7 Cetuximab heavy chain variable region (VR)

セツキシマブ重鎖可変領域（ＶＲ）

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA

8 Cetuximab light chain variable region (VL)

セツキシマブ軽鎖可変領域（ＶＬ）

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK

9 Cetuximab complete heavy chain

セツキシマブ全重鎖

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 Cetuximab complete light chain

セツキシマブ全軽鎖

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

WE CLAIM:

特許請求の範囲：

1.

【請求項１】

A method useful to potentiate the cytotoxicity of an EGFR antibody or an EGFR- binding fragment thereof on EGFR+ disease cells without potentiating the cytotoxicity thereof on normal EGFR+ cells, the method comprising:

ＥＧＦＲ陽性疾患細胞上のＥＧＦＲ抗体又はそのＥＧＦＲ結合断片の細胞毒性を、ＥＧＦＲ陽性正常細胞上のそれらの細胞毒性を増強することなしに増強するために有用な方法であって、●を含む方法。

(i) selecting, for conjugation, an EGFR antibody that is a full EGFR antagonist and competes with cetuximab for binding to EGFR, or an EGFR-binding fragment of said antibody;

（ｉ）コンジュゲーションのために、ＥＧＦＲ完全アンタゴニストでありＥＧＦＲ又は前記抗体のＥＧＦＲ結合断片との結合に関してセツキシマブと競合するＥＧＦＲ抗体を選択するステップと、

(ii) selecting, for delivery by the EGFR antibody or fragment thereof, an anti- microtubule toxin;

（ｉｉ）前記ＥＧＦＲ抗体又はその断片によって送達するための抗微小管毒素を選択するステップと、

(iii) selecting, for coupling the selected EGFR antibody and the anti-microtubule toxin, a linker; and

（ｉｉｉ）選択した前記ＥＧＦＲ抗体と前記抗微小管毒素とを結合するためのリンカーを選択するステップと、

producing an immunoconjugate that incorporates the linker between the antibody and the toxin, thereby providing an immunoconjugate having a cytotoxicity that is potentiated against EGFR+ disease cells and essentially not potentiated against EGFR+ keratinocyte cells.

前記抗体と前記毒素との間に前記リンカーを導入してイムノコンジュゲートを作製し、それによりＥＧＦＲ陽性疾患細胞に対しては増強され、ＥＧＦＲ陽性ケラチノサイト細胞に対しては実質的に増強されない細胞毒性作用を有するイムノコンジュゲートを提供するステップと、●

2.

【請求項２】

The method according to claim 1, wherein the selected full antagonist EGFR antibody is cetuximab or panitumumab.

選択した前記ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体がセツキシマブ又はパニツムマブである、請求項１に記載の方法。

3.

【請求項３】

The method according to claim 1 or claim 2, wherein the selected anti- microtubule toxin is a maytansinoid.

選択した前記抗微小管毒素がメイタンシノイドである、請求項１又は２に記載の方法。

4.

【請求項４】

The method according to claims 1, 2 or 3, wherein the selected linker is a non- cleavable linker, preferably SMCC.

選択した前記リンカーが非切断型リンカーであり、好ましくはＳＭＣＣである、請求項１、２又は３に記載の方法。

5.

【請求項５】

An immunoconjugate comprising (i) a full antagonist EGFR antibody that binds to an EGFR epitope to which cetuximab binds, or an EGFR binding fragment of said antibody or single chain polypeptide based on said antibody, and (ii) an anti-microtubule toxin conjugated therewith, the immunoconjugate having a cytotoxic effect relative to a naked form of said antibody that is (1) potentiated with respect to EGFR+ cancer cells, and (2) substantially unaltered with respect to EGFR+ keratinocytes, wherein the antibody and toxin are conjugated by a linker.

（ｉ）セツキシマブが結合するＥＧＦＲエピトープへ結合する、ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体又は前記抗体のＥＧＦＲ結合断片若しくは前記抗体をベースとした単鎖ポリペプチドと、（ｉｉ）それらにコンジュゲートした抗微小管毒素と、を含むイムノコンジュゲートであって、前記抗体の裸の形態と比較して、（１）ＥＧＦＲ陽性癌細胞に対して増強され、（２）ＥＧＦＲ陽性ケラチノサイトに対して実質的に変化しない細胞毒性効果を有し、前記抗体と毒素はリンカーによってコンジュゲートされる、イムノコンジュゲート。

6.

【請求項６】

The immunoconjugate according to claim 5, wherein the antibody is cetuximab or cetuximab variant comprising one, two or more benign substitutions in the constant region.

前記抗体が定常領域に１つ、２つ又はそれ以上の無害な置換を含むセツキシマブ又はセツキシマブ変異体を含む、請求項５に記載のイムノコンジュゲート。

7.

【請求項７】

The immunoconjugate according to claim 5, wherein the antibody is panitumumab.

前記抗体がパニツムマブである、請求項５に記載のイムノコンジュゲート。

8.

【請求項８】

The immunoconjugate according to claims 5, 6 or 7 wherein the anti-microtubule toxin is a maytansinoid.

前記抗微小管毒素がメイタンシノイドである、請求項５、６又は７に記載のイムノコンジュゲート。

9.

【請求項９】

The immunoconjugate according to claim 8, wherein the anti-microtubule toxin is DM-1.

前記抗微小管毒素がＤＭ－１である、請求項８に記載のイムノコンジュゲート。

10.

【請求項１０】

The immunoconjugate according to claims 5-9, wherein the linker is a non- cleavable linker, preferably succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-l- carboxylate (SMCC).

前記リンカーが非切断型リンカーであり、好ましくは、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸塩（ＳＭＣＣ）である、請求項５～９に記載のイムノコンジュゲート。

1 1.

【請求項１１】

The immunoconjugate according to claim 5, which is cetuximab-SMCC-DMl .

セツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１である、請求項５に記載のイムノコンジュゲート。

12.

【請求項１２】

The immunoconjugate according to claim 5, which is panitumumab-SMCC-DMl .

パニツムマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１である、請求項５に記載のイムノコンジュゲート。

13.

【請求項１３】

A pharmaceutical composition comprising the immunoconjugate of claims 5-12 in an amount cytotoxic to EGFR+ disease cells, and a pharmaceutically acceptable carrier.

ＥＧＦＲ陽性疾患細胞に対して細胞毒性となる量の請求項５～１２に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容できる担体とを含む、医薬組成物。

14.

【請求項１４】

A method for producing an anti-cancer composition, comprising the step of combining a pharmaceutically acceptable carrier, and an EGFR antibody that is conjugated to an anti-microtubule toxin to form an immunoconjugate, the immunoconjugate having an effect on cancer cells that is potentiated and an effect on keratinocytes that is essentially not potentiated, relative to the effects of the naked antibody on such cells.

抗癌組成物を作製するための方法であって、薬学的に許容できる担体と、抗微小管毒素にコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを形成するＥＧＦＲ抗体とを結合するステップを含み、前記イムノコンジュゲートが、前記裸の抗体における癌細胞及びケラチノサイトに対する前記効果と比較して、癌細胞に対して増強される効果と、ケラチノサイトに対して実質的に増強されない効果とを有するイムノコンジュゲートである、方法。15.

【請求項１５】

The use of a pharmaceutical composition according to claim 13, for the treatment of EGFR+ disease cells.

ＥＧＦＲ陽性疾患細胞の治療のための、請求項１３に記載の医薬組成物の使用。16.

【請求項１６】

A method for treating a subject presenting with an EGFR+ disease cell, comprising administering to the subject an amount an immunoconjugate according to claims 5-12 that is cytotoxic to the EGFR+ disease cell.

ＥＧＦＲ陽性疾患細胞を呈する対象を治療するための方法であって、前記ＥＧＦＲ陽性疾患細胞に対し細胞毒性である請求項５～１２に記載のイムノコンジュゲートを、ある量で前記対象に投与するステップを含む、方法。★an amount an immunoconjugate →an amout ofとみなして訳す★

＜公開訳＞

【請求項１６】EGFR+疾患細胞を呈する対象を治療するための方法であって、該対象に、EGFR+疾患細胞に対して細胞毒性である量の請求項5～12のいずれか一項記載のイムノコンジュゲートを投与する段階を含んでなる、方法。

17.

【請求項１７】

The method according to claim 16, wherein the EGFR+ disease cell is an EGFR+ cancer cell, such as a head and neck or colorectal cancer cell.

前記ＥＧＦＲ陽性疾患細胞が、頭頸部癌細胞又は結腸直腸癌細胞等のＥＧＦＲ陽性癌細胞である、請求項１６に記載の方法。

18.

【請求項１８】

A method for potentiating the effect of a full antagonist EGFR antibody on EGFR+ disease cells without potentiating the effect thereof on normal EGFR+ cells, comprising linking the antibody to an anti-microtubule toxin by a non-cleavable linker.

前記ＥＧＦＲ陽性疾患細胞に対するＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体の前記効果を、ＥＧＦＲ陽性正常細胞への影響を増強させずに増強させる方法であって、前記抗体と抗微小管毒素とを非切断型リンカーで結合するステップを含む、方法。

19.

【請求項１９】

In a method for treating a subject presenting with a tumour that responds to treatment with a full antagonist EGFR antibody, wherein treatment therewith elicits an EGFR antibody-mediated adverse response by keratinocytes, the improvement comprising treating said subject with the full antagonist EGFR antibody in a form conjugated with an anti-microtubule toxin, whereby the tumour response to treatment with conjugated antibody is enhanced essentially without enhancing the adverse keratinocyte response to treatment, relative to treatment with naked antibody alone.

ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体による治療に反応する腫瘍を呈する対象を治療するための方法であって、その治療がケラチノサイトによるＥＧＦＲ抗体媒介性の有害反応を誘発し、その改善が、前記対象を抗微小管毒素とコンジュゲートした形態の前記ＥＧＦＲ完全アンタゴニスト抗体で治療するステップを含み、裸の抗体単独による治療と比較して、ケラチノサイトの治療に対する前記有害反応を増強せずに、コンジュゲートした抗体による治療に対する腫瘍反応が実質的に増強される改善を含む、方法。▼the improvementが何を指しているのかつかめない。コンジュゲートしたことで正常細胞への有害反応は増強されない＋腫瘍に対しては増強される＝治療効果がある、この全体の、抗体医薬品としての改善をさしているのか。上の方にもimprovementは出てこない。▼

＜公開訳＞

【請求項１９】完全アンタゴニストEGFR抗体を用いた治療に応答する腫瘍を呈する対象を治療するための方法であって、該抗体を用いた治療が、角化細胞によるEGFR抗体媒介性の有害応答を誘発するものであり、その改良が、微小管阻害毒素にコンジュゲートされた形態の完全アンタゴニストEGFR抗体を用いて該対象を治療することを含み、それによって、裸の抗体単独による治療に比べて、コンジュゲートされた抗体による治療に対する腫瘍応答が、治療に対する角化細胞の有害応答を本質的に増強することなく、増強される、方法。