

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-516636

(P2006-516636A)

(43) 公表日 平成18年7月6日(2006.7.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-503199 (P2006-503199)	(71) 出願人	504333972 メディミュン、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 20878 メリーランド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミュン ウェイ
(86) (22) 出願日	平成16年1月30日 (2004.1.30)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月29日 (2005.9.29)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/002701	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02004/066957	(72) 発明者	アラン、クリスチャン、ビー、 アメリカ合衆国 20833、メリーランド州、ブルックビル、グレッグ ロード 4401
(87) 国際公開日	平成16年8月12日 (2004.8.12)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/443,777		
(32) 優先日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/443,810		
(32) 優先日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体製剤及びその用途

## (57) 【要約】

本発明は、インテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの液体製剤であって、安定性を示し、抗体の断片化が検出不可能から低いレベルであり、凝集が検出不可能から低いレベルであり、さらに長期保存中でさえ、抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤に関する。特に、本発明は、界面活性剤、無機塩及び/又は他の賦形剤を実質的に含まない、インテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの液体製剤に関する。本発明は、本発明の液体製剤を用いて、炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $v_3$  の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害並びに癌を予防、治療、管理又は改善する方法にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水性担体、ヒスチジン、及び 50 mg/ml 以上のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含み、界面活性剤又は無機塩を実質的に含まない抗体製剤。

## 【請求項 2】

無菌である、請求項 1 記載の製剤。

## 【請求項 3】

水性担体が蒸留水である、請求項 1 記載の製剤。

## 【請求項 4】

製剤が 5.0 ~ 7.0 の範囲の pH を有する、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 5】

抗体又は抗体フラグメントが少なくとも 95 mg/ml の濃度である、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 6】

抗体又は抗体フラグメントが少なくとも 100 mg/ml の濃度である、請求項 5 記載の製剤。

## 【請求項 7】

抗体又は抗体フラグメントが少なくとも 150 mg/ml の濃度である、請求項 6 記載の製剤。

## 【請求項 8】

約 1 ~ 約 10 mM の範囲の濃度のグリシンをさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 9】

ヒスチジンが約 5 ~ 約 25 mM の範囲の濃度である、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 10】

インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントが高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) で測定した場合に少なくとも 15 日間の 40 °C の貯蔵期間において安定である、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 11】

インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントが HPSEC で測定した場合に少なくとも 6 ヶ月間の周囲温度での貯蔵期間において安定である、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 12】

インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントが HPSEC で測定した場合に少なくとも 1.5 年間の 4 °C での貯蔵期間において安定である、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

## 【請求項 13】

抗体又は抗体フラグメントの 5% 未満が HPSEC で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 10 記載の製剤。

## 【請求項 14】

抗体又は抗体フラグメントの 5% 未満が HPSEC で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 11 記載の製剤。

## 【請求項 15】

抗体又は抗体フラグメントの 5% 未満が HPSEC で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 12 記載の製剤。

## 【請求項 16】

抗体又は抗体フラグメントの 2% 未満が HPSEC で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 13 記載の製剤。

## 【請求項 17】

抗体又は抗体フラグメントの 2% 未満が HPSEC で測定した場合に貯蔵期間に凝集体

10

20

30

40

50

を形成する、請求項 14 記載の製剤。

【請求項 18】

抗体又は抗体フラグメントの 2%未満が H P S E C で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 15 記載の製剤。

【請求項 19】

抗体又は抗体フラグメントの 1%未満が H P S E C で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 16 記載の製剤。

【請求項 20】

抗体又は抗体フラグメントの 1%未満が H P S E C で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 17 記載の製剤。

10

【請求項 21】

抗体又は抗体フラグメントの 1%未満が H P S E C で測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項 18 記載の製剤。

【請求項 22】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 80%を保持する、請求項 10 記載の製剤。

【請求項 23】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 80%を保持する、請求項 11 記載の製剤。

【請求項 24】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 80%を保持する、請求項 12 記載の製剤。

20

【請求項 25】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 85%を保持する、請求項 22 記載の製剤。

【請求項 26】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 85%を保持する、請求項 23 記載の製剤。

【請求項 27】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 85%を保持する、請求項 24 記載の製剤。

30

【請求項 28】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 90%を保持する、請求項 25 記載の製剤。

【請求項 29】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 90%を保持する、請求項 26 記載の製剤。

【請求項 30】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 90%を保持する、請求項 27 記載の製剤。

40

【請求項 31】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 95%を保持する、請求項 28 記載の製剤。

【請求項 32】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 95%を保持する、請求項 29 記載の製剤。

【請求項 33】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体をあらゆる基準抗体と比較してインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>への結合能力の少なくとも 95%を保持する、請求項 30 記載の製剤。

【請求項 34】

50

賦形剤をさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の製剤。

【請求項 35】

賦形剤が糖である、請求項 34 記載の製剤。

【請求項 36】

賦形剤がポリオールである、請求項 34 記載の製剤。

【請求項 37】

抗体又は抗体フラグメントが M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) 又 は M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) の 抗 原 結 合 フ ラ グ メ ン ト で あ る 、 請 求 項 2 記 載 の 製 剤 。

【請求項 38】

抗体又は抗体フラグメントが M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) 又 は M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) の 抗 原 結 合 フ ラ グ メ ン ト で あ る 、 請 求 項 5 記 載 の 製 剤 。

【請求項 39】

好適な容器に請求項 2 又は 37 記載の抗体製剤を含む、ヒトへの非経口投与に適した医薬投与単位剤形。

【請求項 40】

抗体製剤が静脈内、皮下又は筋肉内投与される、請求項 39 記載の医薬投与単位剤形。

【請求項 41】

好適な容器に請求項 2 又は 37 記載の抗体製剤を含む、ヒトへのエアロゾル投与に適した医薬投与単位剤形。

【請求項 42】

抗体製剤が鼻内投与される、請求項 41 記載の医薬投与単位剤形。

【請求項 43】

請求項 1、2 又は 37 記載の水性抗体製剤を凍結乾燥することにより製造される抗体製剤。

【請求項 44】

請求項 1、2、3 又は 37 記載の製剤を含む密封容器。

【請求項 45】

請求項 43 記載の製剤を含む密封容器。

【請求項 46】

薬学的に許容される担体での再構成に十分な容量を有する、請求項 45 記載の密封容器。

【請求項 47】

担体が注射用水、USP 又は生理食塩水である、請求項 46 記載の密封容器。

【請求項 48】

容器が無菌環境を維持し、無菌を損なうことなく製剤の再構成を行うことが可能なものである、請求項 47 記載の密封容器。

【請求項 49】

1 以上の容器に、水性担体、ヒスチジン、及び 50 mg/ml 以上のインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む抗体製剤、並びに製剤の使用のための説明書を含むキットであって、該製剤が界面活性剤又は無機塩を実質的に含まないものである、上記キット。

【請求項 50】

製剤が無菌である、請求項 49 記載のキット。

【請求項 51】

水性担体が蒸留水である、請求項 49 記載のキット。

【請求項 52】

抗体又は抗体フラグメントが M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) 又 は M E D I - 5 2 2 ( V i t a x i n ( 登 録 商 標 ) ) の 抗 原 結 合 フ ラ グ メ ン ト で あ る 、 請 求 項

10

20

30

40

50

49又は50記載のキット。

【請求項53】

製剤が水性抗体製剤の凍結により製造される、請求項49又は50記載のキット。

【請求項54】

製剤が水性抗体製剤の凍結により製造される、請求項52記載のキット。

【請求項55】

抗体又は抗体フラグメントが95mg/mlの濃度である、請求項49記載のキット。

【請求項56】

炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌、あるいはその1以上の症候を予防、管理、治療又は改善する方法であって、その必要のある被験体に、請求項2記載の抗体製剤の予防又は治療有効量を投与することを含む、上記方法。

【請求項57】

炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌、あるいはその1以上の症候を予防、管理、治療又は改善する方法であって、その必要のある被験体に、請求項37記載の抗体製剤の予防又は治療有効量を投与することを含む、上記方法。

【請求項58】

製剤が5.0~7.0の範囲のpHを有する、請求項56又は57記載の方法。

【請求項59】

抗体又は抗体フラグメントが少なくとも95mg/ml、100mg/ml、125mg/ml、又は150mg/mlの濃度である、請求項56記載の方法。

【請求項60】

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ と免疫特異的に結合するMEDI-522又はそのフラグメントが少なくとも95mg/ml、100mg/ml、125mg/ml、又は150mg/mlの濃度である、請求項57記載の方法。

【請求項61】

約1~約10mMの範囲の濃度のグリシンをさらに含む、請求項56又は57記載の方法。

【請求項62】

ヒスチジンが約5~約25mMの範囲の濃度である、請求項56又は57記載の方法。

【請求項63】

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントが高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)で測定した場合に少なくとも15日間の40°Cでの貯蔵期間において安定である、請求項56記載の方法。

【請求項64】

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に免疫特異的に結合するMEDI-522又は抗体フラグメントがHPSECで測定した場合に少なくとも15日間の40°Cでの貯蔵期間において安定である、請求項57記載の方法。

【請求項65】

抗体又は抗体フラグメントの5%未満がHPSECで測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項63記載の方法。

【請求項66】

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に免疫特異的に結合するMEDI-522又は抗体フラグメントの5%未満がHPSECで測定した場合に貯蔵期間に凝集体を形成する、請求項64記載の方法。

【請求項67】

抗体又はそのフラグメントが貯蔵前の抗体又は抗体フラグメントをあらわす基準抗体と

比較してインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  への結合能力の少なくとも 80% を保持する、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 8】

インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に免疫特異的に結合する M E D I - 5 2 2 又は抗体フラグメントが貯蔵前の M E D I - 5 2 2 又はフラグメントをあらゆる基準抗体と比較してインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  への結合能力の少なくとも 80% を保持する、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 9】

さらに賦形剤を含む、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 7 0】

賦形剤が糖又はポリオールである、請求項 6 9 記載の方法。

10

【請求項 7 1】

製剤が非経口的に投与される、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 7 2】

製剤が筋肉内、皮下又は静脈内投与される、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】

再構成製剤が経口又は鼻内投与される、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 7 4】

被験体に、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の予防薬又は治療薬の予防又は治療有効量を投与することをさらに含む、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

20

【請求項 7 5】

予防薬又は治療薬が、抗炎症剤、免疫調節剤、骨代謝調節作用を有する薬剤、抗血管形成剤、又は抗癌剤である、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

抗炎症剤が抗 T N F 薬剤である、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

癌が前立腺癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、大腸癌又はメラノーマである、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 7 8】

癌が骨に転移したものである、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

30

【請求項 7 9】

炎症性疾患が関節炎、肺線維症、変形性関節症、又は炎症性骨溶解である、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 8 0】

自己免疫疾患が関節リウマチ又はクローン病である、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 8 1】

異常な骨代謝に関連する疾患が骨粗鬆症である、請求項 5 6 又は 5 7 記載の方法。

【請求項 8 2】

炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  の異常な発現及び / 又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌、あるいはその 1 以上の症候を予防、管理、治療又は改善する方法であって、

40

( a ) 凍結抗体製剤を、抗体又は抗体フラグメント濃度が 5 0 m g / m l 以上となるように薬学的に許容される担体で再構成するステップであって、該凍結抗体製剤が、水性担体、ヒスチジン、及び 5 0 m g / m l 以上のインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む水性抗体製剤を凍結することにより製造されたものであり、該水性抗体製剤は界面活性剤又は無機塩を実質的に含まないものである、上記ステップ、並びに

( b ) 必要がある被験体に、予防又は治療有効量の再構成抗体製剤を投与するステップであって、該再構成抗体製剤は水性担体、ヒスチジン、及び 5 0 m g / m l 以上の抗体又は抗体フラグメントを含み、かつ再構成抗体製剤は界面活性剤又は無機塩を実質的に含まず

50

、無菌である、上記ステップ、  
を含む、上記方法。

【請求項 8 3】

炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン  $\alpha_3$  の異常な発現及び / 又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌、あるいはその 1 以上の症候を予防、管理、治療又は改善する方法であって、

( a ) 凍結抗体製剤を、抗体又は抗体フラグメント濃度が 5 0 m g / m l 以上となるように薬学的に許容される担体で再構成するステップであって、該凍結抗体製剤が、水性担体、ヒスチジン、及び 5 0 m g / m l 以上のインテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する M E D I - 5 2 2 ( V I T A X I N ( 登録商標 ) ) 又はそのフラグメントを含む水性抗体製剤を凍結することにより製造されたものであり、該水性抗体製剤は界面活性剤又は無機塩を実質的に含まないものである、上記ステップ、並びに

10

( b ) 必要がある被験体に、予防又は治療有効量の再構成抗体製剤を投与するステップであって、該再構成抗体製剤は水性担体、ヒスチジン、及び 5 0 m g / m l 以上のインテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する M E D I - 5 2 2 又はそのフラグメントを含み、かつ再構成抗体製剤は界面活性剤又は無機塩を実質的に含まず、無菌である、上記ステップ、

を含む、上記方法。

【請求項 8 4】

薬学的に許容される担体が注射用水、U S P 又は生理食塩水である、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

20

【請求項 8 5】

再構成抗体製剤が非経口投与される、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【請求項 8 6】

再構成抗体製剤が筋肉内、皮下又は静脈内投与される、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 7】

再構成製剤が経口又は鼻内投与される、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【請求項 8 8】

インテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の予防薬又は治療薬を投与することをさらに含む、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

30

【請求項 8 9】

癌が前立腺癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、大腸癌又はメラノーマである、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【請求項 9 0】

癌が骨に転移したものである、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【請求項 9 1】

炎症性疾患が関節炎、肺線維症、変形性関節症、又は炎症性骨溶解である、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【請求項 9 2】

自己免疫疾患が関節リウマチ又はクローン病である、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

40

【請求項 9 3】

異常な骨代謝に関連する疾患が骨粗鬆症である、請求項 8 2 又は 8 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

1 . 導入

本発明は、インテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの高濃度液体製剤であって、安定性を示し、抗体の断片化が検出不可能から低いレベルであり、凝集が検出不可能から低いレベルであり、さらに長期保存中でさえ、抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤に関する。特に、

50

本発明は、界面活性剤、無機塩又は両方を実質的に含まない、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの液体製剤に関する。本発明は、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの高濃度液体製剤を用いて、炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害並びに癌を予防、治療、管理又は改善する方法にも関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

本出願は、2003年1月30日出願の米国仮出願第60/443,777号、及び2003年1月30日出願の米国仮出願第60/443,810号に基づく優先権を有し、かつこれを主張する。また、この米国仮出願を参照によりその全体を本明細書に組み入れる。

10

#### 【0003】

### 2. 発明の背景

現在、多くの抗体が凍結乾燥製剤として提供されている。抗体の凍結乾燥製剤には、凍結乾燥のプロセスが長いこと、この結果製造コストが高くなっていることを含めて、多くの制限がある。さらに、凍結乾燥製剤は、患者に投与する前に医療関係者によって、無菌かつ正確に再構成されなければならない。再構成ステップはそれ自体、ある特定の操作手順を必要とする。すなわち、(1)無菌希釈剤(すなわち、静脈内投与用水、及び筋肉内投与用5%ブドウ糖水溶液)を、凍結乾燥抗体を含有するバイアルに、無菌的にゆっくり添加し、バイアルは、泡立たないように、極めて穏やかに30秒間回転させなければならない；(2)再構成した抗体は、溶液が透明になるまで、最低20分間、室温に静置する必要がある；さらに(3)再構成した製剤は、再構成後6時間以内に投与しなければならない。このような再構成の操作手順は扱いが難しく、さらに、再構成後の時間制限があることによって、適切に再構成されなかったり、又は再構成された用量が6時間以内に使用されなかった場合、廃棄しなければならないため、相当な無駄が生じ、この製剤を患者に投与する際に、非常に不便になる可能性がある。

20

#### 【0004】

したがって、投与前に製剤を再構成する必要がないように、凍結乾燥製剤と同程度か、あるいはより高濃度の、抗体(特に抗インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  抗体)の液体製剤が必要である。これによって、医療関係者が患者に抗体を投与するのが、はるかに迅速かつ簡便となる。

30

#### 【0005】

従来の液体抗体製剤は有効期間が短く、保存中に、化学的不安定性及び物理的不安定性によって、抗体の生物学的活性を失う可能性がある。化学的不安定性は、脱アミド、光学不活性化、加水分解、酸化、脱落又はジスルフィド交換によって引き起こされる可能性があり、また、物理的不安定性は、抗体変性、凝集、沈殿又は吸着によって引き起こされる可能性がある。これらの中で、凝集、脱アミド、及び酸化は、抗体分解の最も一般的な原因であることが知られている(Wangら、1988年、J. of Parenteral Science & Technology 42(Suppl):S4-S26;Clelandら、1993年、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4):307-377)。したがって、抗体の安定な液体製剤、特に安定な液状抗インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  抗体が必要とされている。

40

#### 【発明の開示】

#### 【0006】

### 3. 発明の概要

本発明は、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの高濃度液体製剤であって、界面活性剤及び/又は無機塩の非存在下において、製造、調製、輸送、及び保存中に、安定であり、抗体フラグメント化及び/又は凝集が検出不可能から低いレベルであり、該抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われなかつほとんど失われなかつ製剤の開発の一部に基づいている。本発明の液体製剤は、炎症性疾患及び

50

自己免疫疾患に関連する1以上の症候、例えば限定されるものではないが、関節リウマチ、肩関節周囲炎、多発性硬化症、乾癬、重症筋無力症、脈管炎、尋常性天疱瘡、潰瘍性大腸炎、クローン病、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、骨溶解、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、及びシューグレン症候群などの予防、治療、管理、及び/又は改善のための、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの投与を容易にする。本発明の液体製剤はまた、癌、例えば限定されるものではないが、膠芽細胞腫、骨癌、乳癌及び大腸癌などに関連する1以上の症候の予防、治療、管理及び改善のための、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの投与を容易にする。本発明の液体製剤はまた、異常な骨代謝に関連する1以上の症候、例えば限定されるものではないが、変性関節疾患(変形性関節症)、痛風性関節炎、軟骨石灰化症、並びに骨の腫瘍及び腫瘍様損傷(非限定的な例としては、骨の原発腫瘍、骨の二次又は転移腫瘍、神経性関節症及びサルコイドーシス関節症)などの予防、治療、管理及び改善のための、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの投与を容易にする。特に、本発明の液体製剤により、凍結乾燥投与剤形で必要とされたような、投与前の抗体又は抗体フラグメントの正確かつ無菌的な再構成を必要とせず、無菌投与剤形のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを、医療従事者が迅速に投与することが可能となる。

10

#### 【0007】

本発明は、界面活性剤及び/又は無機塩を実質的に含まない液体製剤であって、ヒスチジンと、濃度50mg/ml以上のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントとを含む製剤を提供する。本発明は、界面活性剤及び/又は無機塩を実質的に含まない液体製剤であって、pHが約5.0~約7.0の範囲、好ましくは約6.0であり、ヒスチジンと、濃度50mg/ml以上のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントとを含む製剤も提供する。本発明の液体製剤はまた、糖、アミノ酸(例えばアルギニン、リジン及びメチオニン)、並びにポリオールなどの1以上の賦形剤をさらに含んでもよい。好ましい実施形態においては、本発明の液体製剤は、ヒスチジンと、濃度95mg/ml以上のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントとを含む製剤であって、界面活性剤及び塩を実質的に含まない製剤を含む。

20

#### 【0008】

本発明は、V i t a x i n (登録商標)(例えばWuら、1998, PNAS USA 95(11):6037-6042参照)の安定な液体製剤であって、製造、調製、輸送、及び長期保存中に、抗体の凝集及び/又は断片化が検出不可能から低いレベルであり、V i t a x i n (登録商標)の生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤を含む。本発明は、既知の抗体(例えばV i t a x i n (登録商標)など)に比べて、i n v i v o半減期が長くなっているインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体の安定な液体製剤であって、抗体の凝集及び/又は断片化が検出不可能から低いレベルであり、該抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤を含む。本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントであって、L M 6 0 9又はV I T A X I N (登録商標)のV H及び/又はV Lドメインのアミノ酸配列を有する可変重(V H)及び/又は可変軽(V L)ドメインを含む抗体の安定な液体製剤であって、抗体の凝集及び/又は断片化が検出不可能から低いレベルであり、該抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤を含む。本発明はさらに、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントであって、表1に挙げられる1以上のV H C D R及び/又はV L C D Rのアミノ酸配列を有する1以上のV H相補性決定領域(C D R)及び/又は1以上のV L C D Rを含む抗体又は抗体フラグメントの安定な液体製剤であって、抗体の凝集及び/又は断片化が検出不可能から低いレベルであり、該抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われない製剤を含む。

30

40

【表 1】

CDR	配列	配列番号
VH1	SYDMS	1
VH2	KVSSGGG	2
VH3	HNYGSFAY	3
VL1	QASQISNHLH	4
VL2	YRSQIS	5
VL3	QQSGSWPHT	6

10

## 【0009】

本発明は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの液体製剤であって、高性能サイズ排除クロマトグラフィー（H P S E C）で評価した際、38 ~ 42 で安定である製剤を含む。本発明の液体製剤は、H S P E Cで評価した際、38 ~ 42 の温度範囲で少なくとも15日間であるが25日以内、20 ~ 24 の範囲で少なくとも6ヶ月であるが1.5年以内、そして2 ~ 8 の範囲（特に4）で少なくとも1.5年、少なくとも2年、少なくとも2.5年、又は少なくとも3年にわたり安定である。本発明は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの液体製剤であって、H P S E Cで測定した際、抗体の凝集が検出不可能から低いレベルである製剤も含む。好ましい実施形態では、本発明の液体製剤は、38 ~ 42 で少なくとも15日間安定であり、かつH P S E Cで測定した際、抗体凝集が検出不可能から低いレベルであり、さらに、例えばE L I S Aなど、抗体結合アッセイで測定した際、基準抗体と比較して、製剤の抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性が全く失われないかほとんど失われないものである。

20

## 【0010】

本発明は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの液体製剤を調製する方法であって、抗体の精製分画を、適当な分子量（MW）カットオフ値（例えば、完全抗体分子及びF（a b '）<sub>2</sub>フラグメントには30 k Dカットオフ；また、F a bフラグメントなどの抗体フラグメントには、10 k Dカットオフ）を有する半透膜を用いて、最終抗体濃度約15 mg / ml、約20 mg / ml、約30 mg / ml、約40 mg / ml、約50 mg / ml、約60 mg / ml、約70 mg / ml、約80 mg / ml、約90 mg / ml、約100 mg / ml、約150 mg / ml、約175 mg / ml、又は約200 mg / mlに濃縮すること、及び同じ膜を用いて濃縮抗体分画を製剤緩衝液中で透析ろ過することを含む方法を提供する。本発明の製剤緩衝液は、約1 mMから約100 mMまで、好ましくは約5 mMから約50 mM、より好ましくは約10 mMから約25 mMの濃度でヒスチジンを含む。製剤のpHは、約5.0 ~ 約7.0、好ましくは5.5 ~ 約6.5、より好ましくは約5.8 ~ 約6.2の範囲、最も好ましくは約6.0でありうる。特定の抗体にとって適切なpHを得るためには、まず、所望のpHより高いpHの緩衝水溶液が得られるように、ヒスチジン（及び、グリシンが添加されている場合には、グリシンも）を水に溶解し、その後H C lを添加して、pHを所望の値まで低下させるのが好ましい。このようにすれば、無機塩の形成（例えば、ヒスチジンの供給源に塩酸ヒスチジンを用い、N a O Hを添加することでpHを所望の値に引き上げた際のN a C l形成）を避けることができる。

30

40

## 【0011】

本発明の液体製剤は、0.2  $\mu$ フィルターを用いて、無菌ろ過によって無菌化してもよい。本発明の無菌液体製剤は、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは活

50

性に関連する障害、癌、又は1以上のその症候を予防、治療、管理又は改善するために、被験体に投与することができる。本発明の液体製剤は、他の治療（例えば、インテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する抗体以外の予防薬又は治療薬、例えば抗炎症剤、抗癌剤、骨代謝調節剤、免疫調節剤、及び抗血管形成剤など）と組み合わせて投与してもよい。

本発明は、例えば、医療従事者が用いるためのインテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの液体製剤を含むキットも提供する。本発明はさらに、本発明の液体製剤を投与することによって、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、並びに癌を予防、治療、管理、又は改善する方法を提供する。本発明の液体製剤は、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現及び/若しくは活性に関連する障害、又は癌を予防、治療、管理又は改善するために非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）、又は経口投与で被験体に投与しうる。

10

#### 【0012】

本発明の液体製剤はまた、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現に関連する障害、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、及び癌の診断、検出又はモニターのために用いることも可能である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

#### 3.1 用語

本明細書において、インテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する抗体及び/又は抗体フラグメントのすべての液体製剤は、集合的に、「本発明の液体製剤」、「本発明の抗体液体製剤」、「本発明の抗体製剤」、「インテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントの液体製剤」又は「抗インテグリン $\nu_3$ 抗体の液体製剤」と称する。

20

#### 【0014】

本明細書において使用する用語「異常」とは、標準、例えば平均的な健常被験体及び/又は平均的な健常被験体の集団からの逸脱を意味する。本明細書で使用する用語「異常な発現」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団による遺伝子産物（例えばRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド）の異常な発現をいう。かかる異常な発現は遺伝子の増幅の結果でありうる。特定の実施形態において、用語「異常な発現」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団による遺伝子産物の発現と比較して、細胞又は被験体によるインテグリン $\nu_3$ の異常な発現をいい、細胞又は被験体内の通常ではない位置におけるインテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物の発現、細胞又は被験体内での改変レベルでのインテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物の発現、変異型インテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物の発現、あるいはこれらの組み合わせを含む。別の実施形態において、「異常な発現」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団によるインテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物の発現と比較して、細胞又は被験体によるインテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物及び/又はインテグリン $\nu_3$ 遺伝子産物の過剰発現を意味する。この実施形態によれば、過剰発現は遺伝子増幅の結果でありうる。本明細書において使用する用語「異常な活性」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団と比較して、細胞又は被験体における遺伝子産物の改変されたレベル、遺伝子産物による活性の増大、又は遺伝子産物の結合の欠損を意味する。特定の実施形態において、「異常な活性」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団に通常見出されるものから逸脱するインテグリン $\nu_3$ 活性を意味する。別の実施形態において、用語「異常な活性」とは、正常な健常細胞若しくは被験体、又は正常な健常細胞若しくは被験体の集団に通常見出される活性と比較した場合のインテグリン $\nu_3$ 活性の増大を意味する。インテグリン $\nu_3$ 活性の例としては、限定されるものではないが、血小板凝集及びECMタンパク質への内皮細胞接着を媒介し、血管真性を促進する、フィブリ

30

40

50

ノーゲン、フィブロネクチン、フォンウィルブランド因子、ビトロネクチン、T s p (トロンボスポンジン)、オステオポンチン、及びB s p 1 (骨シアロタンパク質1)の受容体が含まれる。特定の実施形態において、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>は、異常な活性、例えば限定されるものではないが、そのリガンドとのより強い結合の形成などの活性を示す。インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>リガンドの例としては、限定されるものではないが、ビトロネクチン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、エキスタチン(echistatin)、R G D含有ペプチド、R G D擬似体及び阻害性抗体などが含まれる(例えば、Dresner-Pollakら、J. C ell Biochem. 56(3):323-30; Duongら、Front. Biosci. 1(3):d757-68参照)。

#### 【0015】

本明細書において、所定の数値又は範囲に関して使用する用語「約」とは、所定の値又は範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内の値又は範囲である。

#### 【0016】

本明細書において用いる用語「血管形成」とは、新しい血管の成長(増殖)を意味する。従って、「正常ではない血管形成」又は「異常な血管形成」とは、血管形成の活性の改変(例えば増大又は低減)、すなわち正常な血管形成過程から逸脱した血管形成を意味し、例えば限定するものではないが、体内での血管形成活性の増大、体内の異常な位置での血管形成などである。疾患又は障害は、異常な血管形成により完全に引き起こされるものであってもよいし、又は異常な血管形成によって悪化したものであってもよい。過剰な血管形成に起因する異常な血管形成に関連する疾患又は障害としては、限定されるものではないが、癌、腫瘍、関節リウマチ、乾癬、酒さ、及び癌細胞の転移が含まれる。不十分な血管形成に起因する異常な血管形成に関連する疾患又は障害としては、限定されるものではないが、冠動脈疾患、卒中及び創傷治癒の遅延が含まれる。いくつかの実施形態においては、「異常な血管形成」とは、血管形成の増大した又は過剰な活性を意味する。

#### 【0017】

本明細書に使用される、タンパク質性薬剤(例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び抗体)に関する用語「類似体」は、第2のタンパク質性薬剤と類似した又は同じ機能を保持する(しかし必ずしも第2のタンパク質性薬剤と類似した又は同じアミノ酸配列を含むのでない)タンパク質性薬剤又は第2のタンパク質性薬剤と類似した又は同じ構造を保持するタンパク質性薬剤を意味する。類似したアミノ酸配列を有するタンパク質性薬剤は、次の3つの条件:(a)タンパク質性薬剤が第2のタンパク質性薬剤のアミノ酸配列と、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を有すること;(b)タンパク質性薬剤が、第2のタンパク質性薬剤の少なくとも5個の連続アミノ酸残基、少なくとも10個の連続アミノ酸残基、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、少なくとも20個の連続アミノ酸残基、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、少なくとも40個の連続アミノ酸残基、少なくとも50個の連続アミノ酸残基、少なくとも60個の連続アミノ酸残基、少なくとも70個の連続アミノ酸残基、少なくとも80個の連続アミノ酸残基、少なくとも90個の連続アミノ酸残基、少なくとも100個の連続アミノ酸残基、少なくとも125個の連続アミノ酸残基、又は少なくとも150個の連続アミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされること;及び(c)タンパク質性薬剤が第2のタンパク質性薬剤をコードするヌクレオチド配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされることのうち少なくとも1つの条件を満たす第2のタンパク質性薬剤を意味する。第2のタンパク質性薬剤と類似した又は同じ構造を保有する

タンパク質性薬剤は、第2のタンパク質性薬剤と類似した二次、三次又は四次構造をもつタンパク質性薬剤を意味する。タンパク質性薬剤の構造は当業者に公知の方法により決定することができ、かかる方法として、限定されるものでないが、ペプチドのアミノ酸配列決定、X線結晶学、核磁気共鳴、円偏光二色性、及び結晶学的電子顕微鏡が挙げられる。

【0018】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するには、最適な比較のために配列同士をアラインメントする（例えば、第2のアミノ酸又は核酸配列との最適なアラインメントのために第1のアミノ酸又は核酸配列の配列中にギャップを導入することができる）。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められている場合、それらの分子はその位置で同一となる。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 重なり合う同一位置の数 / 位置の総数 × 100%）。ある実施形態では、2つの配列が同じ長さである。

10

【0019】

2つの配列間の同一性パーセントはまた、数学的アルゴリズムを使っても決定することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好適な非限定的な例は、Karlin及びAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268に記載され、Karlin及びAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877において改変されたアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403に記載のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターセット（例えば、スコア = 100、ワード長 = 12）を用いて行うことにより、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラムパラメーターセット（例えば、スコア = 50、ワード長 = 3）を用いて行うことにより、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的でギャップを挿入したアラインメントを得るためには、Gapped BLASTをAltschulら, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載のように使用する。あるいはまた、PSI-BLASTを用いて、分子間の遠い関係を検出する反復検索を行うこともできる（同上）。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLAST及びNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用してもよい（例えば、NCBIウェブサイトを参照のこと）。配列比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers及びMiller, 1988, CABIOS 4:11-17に記載のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列の比較のためにALIGNプログラムを利用する場合は、PAM120加重残基表（weight residue table）、ギャップ長ペナルティー12、及びギャップペナルティー4を使用してもよい。

20

30

【0020】

2つの配列間の同一性パーセントは、上述したものと類似の技法を用いて、ギャップを挿入して又は挿入しないで決定することができる。同一性パーセントを計算するには、典型的には、正確な一致（マッチ）だけを数える。

40

【0021】

本明細書中で用いる、非タンパク質性類似体に関する用語「類似体」は、第1の有機若しくは無機分子と類似した又は同じ機能を有し、かつ第1の有機若しくは無機分子と構造上類似している第2の有機若しくは無機分子を意味する。

【0022】

本明細書において用いる用語「抗体フラグメント」とは、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体のフラグメントを意味する。抗体フラグメントは、当業者に公知の任意の技法により作製しうる。例えば、Fab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、パバ

50

因 ( F a b フラグメント作製用 )、又はペプシン ( F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント作製用 ) などの酵素を用いて、免疫グロブリン分子のタンパク質切断により作製しうる。F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントは完全な軽鎖と、可変領域、重鎖の C H 1 領域及びヒンジ領域を含有する。抗体フラグメントはまた、組換え D N A 技術により作製することも可能である。抗体フラグメントは、抗体の 1 以上の相補性決定領域 ( C D R )、又は抗体の 1 以上の抗原結合フラグメントでありうる。

【 0 0 2 3 】

本明細書中で用いる用語「抗体」は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖 F v ( s c F v )、一本鎖抗体、ジスルフィド連結 F v ( s d F v )、及び抗イディオタイプ ( 抗 I d ) 抗体 ( 例えば、本発明の抗体に対する抗 I d 抗体を含む ) を意味する。特に、抗体は免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント ( すなわち、抗原結合部位を含む分子 ) を含む。免疫グロブリン分子はいずれのタイプ ( 例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 及び I g Y )、クラス ( 例えば、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、I g A<sub>1</sub> 及び I g A<sub>2</sub> ) 又はサブクラスのものであってもよい。

10

【 0 0 2 4 】

本明細書で用いる「インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント」及び類似の用語は、インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> ポリペプチド又はインテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> ポリペプチドの断片に特異的に結合し、他のポリペプチドには特異的に結合しない抗体又は抗体フラグメントを意味する。好ましくは、インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> ポリペプチド又はその断片に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、他の抗原と交差反応しない。インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> ポリペプチド又はその断片に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、例えば、イムノアッセイ又は当業者に公知のほかの技術により同定しうる。例えば、抗体の特異性に関する議論については Paul 編、1989, Fundamental Immunology, 2<sup>nd</sup> ed., Raven Press, New York at pages 332-336 を参照されたい。好ましくは、インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> ポリペプチド又はその断片に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、インテグリン  $\nu$ <sub>3</sub> にのみ拮抗し、他の活性、例えば  $\nu$  を含むが  $\nu$ <sub>3</sub> は含まないインテグリン ( 例えばフィブロネクチンの受容体である、インテグリン  $\nu$ <sub>1</sub> ) の活性などには有意には拮抗しない。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書中で用いる、タンパク質性薬剤 ( 例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び抗体 ) に関する用語「誘導体」は、アミノ酸残基の置換、欠失及び / 又は付加の導入により改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質性薬剤を意味する。本明細書中で用いる用語「誘導体」はまた、任意のタイプの分子のタンパク質性薬剤との共有結合により修飾されたタンパク質性薬剤も意味する。例えば、限定されるものでないが、抗体は、グリコシル化、アセチル化、ペグ ( P E G ) 化、リン酸化、アミド化、誘導体化 ( 公知の保護基 / ブロッキング基による )、タンパク質加水分解による切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質との結合などによって修飾することができる。タンパク質性薬剤の誘導体は当業者に公知の技法を用いて化学的修飾により調製することができ、例えば、限定されるものでないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などが含まれる。さらに、タンパク質性薬剤の誘導体は 1 個以上の非古典的アミノ酸を含んでいてもよい。タンパク質性薬剤の誘導体はそれが誘導された元来のタンパク質性薬剤と類似の又は同一の機能を保持している。

30

40

【 0 0 2 6 】

本明細書中で用いられる、非タンパク質性誘導体に関する用語「誘導体」は、第 1 の有機又は無機分子の構造に基づいて形成された第 2 の有機又は無機分子を意味する。有機分子の誘導体には、限定されるものでないが、例えば、ヒドロキシル、メチル、エチル、カルボキシル又はアミノ基の付加又は欠失により修飾された分子が含まれる。有機分子はまた、エステル化、アルキル化及び / 又はリン酸化されていてもよい。

【 0 0 2 7 】

50

本明細書中で用いられる用語「障害」又は「疾患」は互換的に用いられ、被験体の状態を意味する。特に「自己免疫疾患」という用語は、「自己免疫障害」と互換的に用いられ、被験体自身の細胞、組織及び/又は器官に対する被験体の免疫学的反応によって引き起こされる細胞、組織及び/又は器官の傷害を特徴とする被験体の症状を指す。「炎症性疾患」という用語は、「炎症性障害」と互換的に用いられ、炎症、好ましくは慢性炎症を特徴とする被験体の症状を指す。自己免疫障害は、炎症と関連していても又は関連していなくてもよい。さらに、炎症は、自己免疫障害により引き起こされるものであっても又は引き起こされるものでもなくともよい。ある症状は1を超える障害に特徴的なものであり得、例えば、ある特定の疾患は自己免疫障害及び炎症性障害の両方を特徴としうる。

【0028】

本明細書中で治療に関して用いる用語「有効量」は、疾患若しくは障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは活性に関連する障害、又は癌）又はその症候の重篤度及び/又は期間を低減するか又は改善し、該疾患若しくは障害の進行を防止し、該疾患若しくは障害の退行を導き、該疾患若しくは障害に関連する症候群の再発、発症又は発達を防止し、あるいは別の治療（例えば予防薬又は治療薬）の予防効果又は治療効果を増大又は改善するために十分な治療薬の量を意味する。

【0029】

本明細書においてインテグリン  $\nu_3$  の発現を検出することに関して使用する、用語「有効量」は、インテグリン  $\nu_3$  の発現を検出するために十分な抗体、抗体フラグメント、又は抗体若しくは抗体フラグメントを含む製剤の量である。

【0030】

本明細書中で用いる用語「エピトープ」は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの体内で抗原性又は免疫原活性を有するインテグリン  $\nu_3$  ポリペプチドの部分の意味する。免疫原活性を有するエピトープは、動物の体内で抗体応答を引き出すインテグリン  $\nu_3$  ポリペプチドの部分である。抗原活性のあるエピトープは、当業者に公知の方法（例えば、本明細書に記載のイムノアッセイ（セクション5.4.3参照））で測定したとき、抗体が免疫特異的に結合するインテグリン  $\nu_3$  ポリペプチドの部分である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

【0031】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、タンパク質安定性の増大、タンパク質溶解性の増大及び粘性の低減などの製剤の有利な物理学的性質を発揮する、薬物用の希釈剤、賦形剤の例としては、ビヒクル、保存剤、結合剤、又は安定剤として一般的に用いられる不活性物質のことをいう。タンパク質（例えば、血清アルブミン）、アミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、グリシン、ヒスチジン）、界面活性剤（例えば、SDS、ポリソルベート、非イオン表面活性剤）、糖（例えば、グルコース、スクロース、マルトース、トレハロースなど）、ポリオール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、脂肪酸及びリン脂質（例えば、スルホン酸アルキル、カプリル酸）が含まれるが、これらに限定されるものではない。賦形剤についてのさらなる情報に関しては、Remington's Pharmaceutical Sciences (Joseph P. Remington, 第18版、Mack Publishing Co., Easton, PA) も参照のこと。この文献を、参照によりその全体を本明細書に組み入れる。

【0032】

本明細書において、「フラグメント」という用語は、別のポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続したアミノ酸残基、少なくとも10個の連続したアミノ酸残基、少なくとも15個の連続したアミノ酸残基、少なくとも20個の連続したアミノ酸残基、少なくとも25個の連続したアミノ酸残基、少なくとも40個の連続したアミノ酸残基、少なくとも50個の連続したアミノ酸残基、少なくとも60個の連続したアミノ基、少なくとも70個の連続したアミノ酸残基、少なくとも80個の連続したアミノ酸残基；少なくとも90個の連続したアミノ酸残基、少なくとも100個の連続したア

10

20

30

40

50

ミノ酸残基、少なくとも125個の連続したアミノ酸残基、少なくとも150個の連続したアミノ酸残基、少なくとも175個の連続したアミノ酸残基、少なくとも200個の連続したアミノ酸残基、又は少なくとも250個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質（抗体を含む）を指す。特定の実施形態では、タンパク質又はポリペプチドのフラグメントは、タンパク質又はポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。別の実施形態では、タンパク質又はポリペプチドのフラグメントは、タンパク質又はポリペプチドの少なくとも2、3、又は4つの機能を保持する。免疫特異的にインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に結合する抗体のフラグメントは、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に対する結合能を保持することが好ましい。「機能性フラグメント」は、タンパク質又はポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する断片である。

10

**【0033】**

本明細書において、「融合タンパク質」という用語は、第1のタンパク質、ポリペプチド又は機能性フラグメント、これらの類似体又は誘導体のアミノ酸配列と、異種タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列（すなわち、第1のタンパク質又は機能性フラグメント、これらの類似体又は誘導体とは異なる第2のタンパク質、ポリペプチド又は機能性フラグメント、これらの類似体又は誘導体、あるいは第1のタンパク質、ポリペプチド又は機能性フラグメント、これらの類似体又は誘導体と天然ではコンジュゲートしていない第2のタンパク質、ポリペプチド又は機能性フラグメント、これらの類似体又は誘導体）とを含むポリペプチド又はタンパク質のことをいう。一実施形態では、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチド又はペプチドに融合した予防薬又は治療薬を含む。この実施形態によると、これらの異種タンパク質、ポリペプチド又はペプチドは、予防薬又は治療薬と異なる種類であってもよいし、なくてもよい。

20

**【0034】**

本明細書において使用する、「高濃度」と及び「濃縮抗体」という用語は、抗体製剤中の、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントに関して、50 mg/ml 又はそれより高い、好ましくは95 mg/ml 又はそれより高い濃度のことをいう。

**【0035】**

本明細書において、「宿主細胞」という用語には、核酸分子でトランスフェクト又は形質転換された被験体の細胞、及びそのような細胞の子孫又は潜在的子孫が含まれる。そのような細胞の子孫は、世代の継承中に起こりうる変異若しくは環境的影響のため、又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みのため、核酸分子でトランスフェクトした親細胞と同一ではない可能性がある。

30

**【0036】**

本明細書中で用いる「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、お互いに少なくとも30%（好ましくは少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%）同一性を有するヌクレオチド配列同士が、典型的にはお互いとハイブリダイズしたまま残る、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を記載する。そのようなストリンジェントな条件は当業者に公知であり、「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。一般的に、ストリンジェントな条件は、特定のイオン強度 pH として特異的配列についての熱融解点 ( $T_m$ ) よりも約5~10 低くなるように選択される。 $T_m$  は、（特定のイオン強度、pH 及び核酸濃度の条件下で）標的に対して相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリダイズする温度である（標的配列が過剰に存在するため、その  $T_m$  では、プローブの50%が平衡状態で占有される）。ストリンジェントな条件とは、塩濃度が約1.0 M 未満のナトリウムイオンであり、典型的には pH 7.0~8.3 において約0.01~1.0 M ナトリウムイオン濃度（又は他の塩）であり、温度が、短いプローブ（例えば10~50ヌクレオチド）の場合には少なくとも約30、長いプローブ

40

50

(例えば50ヌクレオチド以上)の場合には少なくとも約60の条件である。ストリンジентな条件はまた、例えばホルムアミドなどの脱安定化剤の添加により達成しうる。選択的又は特異的ハイブリダイゼーションについては、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2倍、好ましくは10倍である。

【0037】

一つの非限定的な例では、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中の約45でのハイブリダイゼーション、続いて、0.1×SSC、0.2%SDS中の約68での1回以上の洗浄からなる。好ましい非限定的な例では、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、6×SSC中の約45でのハイブリダイゼーション、続いて、0.2×SSC、0.1%SDS中の約50~65での1回以上の洗浄(すなわち、50、55、60又は65での1回以上の洗浄)からなる。本発明の核酸は、これらの条件下で、A又はTヌクレオチドだけから構成されるヌクレオチド配列と専らハイブリダイズする核酸分子を含まないことが判る。

10

【0038】

本明細書中で用いる「免疫調節薬」なる用語及びその複数形、「免疫調節剤」又は「イミュノモジュラント」を含むがそれに限らない変形語は、宿主の免疫系を調節する薬剤(作用薬)をさす。特定の実施形態において、免疫調節薬は被験体の免疫応答の一態様をソフトさせる薬剤である。ある実施形態において、免疫調節薬は被験体の免疫系を抑制又は低下させる薬剤(すなわち免疫抑制薬)である。他の特定の実施形態では、免疫調節薬は被験体の免疫系を活性化又は上昇させる薬剤(すなわち免疫刺激薬)である。本発明によれば、本発明の併用療法で用いる免疫調節薬にはインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体が含まれない。免疫調節薬としては、限定するものではないが、小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸(例えば、限定するものではないがアンチセンスヌクレオチド配列、トリプルヘリックス、及び生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNA及びRNAヌクレオチド)、抗体、合成若しくは天然の無機分子、擬似薬剤、及び合成若しくは天然の有機分子が挙げられる。

20

【0039】

本明細書において、「併用(組み合わせ)」という用語は、複数の治療(例えば、予防薬及び/又は治療薬)を使用することをいう。「併用(組み合わせ)」という用語の使用においては、疾患又は障害(例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/若しくは活性に関連する障害、又は癌)を有する被験体に治療(例えば、予防薬及び/又は治療薬)を投与する順序が限定されない。第1の治療(例えば、予防薬又は治療薬)は、第2の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の投与の前(例えば、5分間、15分間、30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前)に、同時に、後(例えば、5分間、15分間、30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間後)に、疾患又は障害(例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/若しくは活性に関連する障害、又は癌)を有する被験体に投与することができる。

30

40

【0040】

本明細書において、「無機塩」という用語は、酸の水素又は酸の一部又はすべてを、金属又は金属同様に作用する基で置換することで生じる、炭素を含有していない任意の化合物を指し、生物材料の医薬組成物中及び調製物中で、張度調整化合物として用いられることもある。最も一般的な無機塩は、NaCl、KCl、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>などである。

【0041】

50

本明細書中で用いる「 $v_3$ 」又は「インテグリン  $v_3$ 」なる用語は、インテグリンサブユニット  $v$  及びインテグリンサブユニット  $3$  のヘテロ二量体を意味し、そのヘテロ二量体のサブユニットの類似体、誘導体若しくは断片、及びヘテロ二量体インテグリン  $v_3$ 、ヘテロ二量体のサブユニットの類似体、誘導体若しくは断片を含む融合タンパク質をいう。インテグリン  $v_3$  はいかなる種由来のものであっても良い。インテグリン  $v_3$  のヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列は、文献中又は公共のデータベースに見出すことができ、あるいはヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列は、当業者に公知のクローニング及び配列決定技術を用いて決定することができる。例えば、ヒトインテグリン  $v_3$  のヌクレオチド配列は、GenBankデータベース中に見つけることができる（例えば  $v$  について登録番号No. NM\_002210、 $3$  について登録番号No. L28832を参照のこと）。ヒト  $v_3$  のアミノ酸配列はGenBankデータベース中に見つけることができる（例えば  $v$  について登録番号No. AAA61631、 $3$  について登録番号No. S44360を参照のこと）。好ましい実施形態において、インテグリン  $v_3$  はヒトインテグリン  $v_3$ 、その類似体、誘導体又は断片である。融合タンパク質であるインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、二量体インテグリン  $v_3$ 、その類似体、誘導体又は断片を含む融合タンパク質の一部と結合する。

#### 【0042】

タンパク質性薬剤（例えば、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、又は抗体）に関して本明細書中で用いる用語「単離された」又は「精製された」は、それが由来する細胞又は組織源からの細胞性物質又は混入タンパク質を実質的に含まないか、又は化学前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないタンパク質性薬剤を意味する。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、タンパク質性薬剤が細胞から単離されるか又は組換えで生産されたものであって、細胞の細胞成分から分離されているタンパク質性薬剤の調製物を意味する。従って、細胞性物質を実質的に含まないタンパク質性薬剤は、約30%、20%、10%、5%、1%、0.5%、又は0.1%（乾燥重量基準）未満の量の異種タンパク質、ポリペプチド、ペプチド又は抗体（本明細書では「混入タンパク質」ともいう）を含有するタンパク質性薬剤の調製物を含む。タンパク質性薬剤が組換えにより生産されたものであるときは、培地をも実質的に含まないことが好ましく、すなわち、培地はタンパク質調製物の体積の約20%、10%、5%、1%、0.5%、又は0.1%未満となるようにする。タンパク質性薬剤が化学合成により調製されたものであるときは、化学前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことが好ましく、すなわちタンパク質性薬剤の合成に伴う化学前駆体又は他の化学物質から分離される。したがって、そのようなタンパク質性薬剤の調製物は、約30%、20%、10%、5%、1%、0.5%、又は0.1%（乾燥重量基準）未満の化学前駆体又は目的のタンパク質性薬剤以外の化合物を含有する。好ましい実施形態においては、本発明の抗体が単離される。特定の実施形態において、タンパク質性薬剤（例えば、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、又は抗体）は、図1に示されるステップを適用することにより、他の物質からタンパク質性薬剤を分離し、「精製される」。

#### 【0043】

核酸分子に関して本明細書中で用いる用語「単離された」又は「精製された」は、その核酸分子の天然源中に存在する他の核酸分子から分離されている核酸分子を意味する。さらに、cDNA分子のような「単離された」核酸分子は、組換え法により生産された場合には他の細胞性物質若しくは培地を実質的に含まず、また、化学的に合成された場合には化学前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない。好ましい実施形態においては、本発明の抗体をコードする核酸分子が単離される。

#### 【0044】

タンパク質性薬剤又は核酸以外の有機又は無機分子（小分子又は高分子のいずれも）に関して本明細書中で用いる用語「単離された」又は「精製された」は、異なる有機又は無機分子を実質的に含まない有機又は無機分子を意味する。好ましくは、有機又は無機分子

は、第2の異なる有機又は無機分子を60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、99.9%、又は100%含まないものである。好ましい実施形態において、有機及び/又は無機分子は単離又は精製されている。

【0045】

本明細書において、「凝集が検出不可能から低いレベル」という句は、高性能サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)で測定されるタンパク質重量において、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満、及び最も好ましくは0.5%未満の凝集物を含有する試料のことをいう。

【0046】

本明細書において、「断片化が検出不可能から低いレベル」という用語は、総タンパク質の80%、85%、90%、95%、98%、又は99%に等しいかまたそれより多いタンパク質を、例えば、HPSECで測定した際に、単一ピークに含み、あるいは、還元キャピラリーゲル電気泳動(rCGE)で2つピーク(重鎖と軽鎖)に含み(これらは、非分解抗体又はその非分解フラグメントを示す)、かつそれぞれの総タンパク質の5%を超える、4%を超える、3%を超える、2%を超える、1%を超える、又は0.5%を超えるタンパク質を有する他の単一ピークを含まない試料のことをいう。本明細書において、「還元キャピラリーゲル電気泳動法(CGE)」という用語は、抗体又はそのフラグメントにおけるジスルフィド結合を還元するのに十分な還元条件下におけるキャピラリーゲル電気泳動法のことをいう。

【0047】

本明細書中で用いる用語「管理する」及び「管理」は、被験体に、疾患の治癒をもたらさない治療(例えば、予防薬若しくは治療薬)から引き出す有益な効果を意味する。ある特定の実施形態において、障害の進行又は悪化を防止するために、障害を「管理する」ための1種以上の治療(例えば、予防薬若しくは治療薬)を被験体に投与する。

【0048】

本明細書中で用いる用語「非応答性」及び「不応性」は、疾患又は障害(例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌)のための現在利用可能な治療(例えば限定されるものではないが、予防薬若しくは治療薬)であって、臨床上、該疾患又は障害に関連する1以上の症候を緩和するのに十分でない上記予防薬若しくは治療薬を用いて治療された患者を意味する。典型的には、そのような患者は重症の持続的活動性の疾患を患っており、疾患又は障害に関連する症候又はその症状を改善するために更なる治療を必要とする。

【0049】

本明細書において、「薬学的に許容される」という用語は、動物での使用、及び特にヒトにおける使用に関して、連邦政府又は州政府の監督官庁によって承認されているか、米国薬局方協会、欧州薬局方協会又は他の広く認知されている薬局方協会においてリストに記載されていることを意味する。

【0050】

本明細書において、「ポリオール」という用語は、通常の糖と比較して、多くの-OH基を含有する糖のことをいう。

【0051】

本明細書において、「予防薬」という用語は、疾患又は障害(例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、若しくは癌)又はその1以上の症候の予防に用いられるいかなる薬剤のことともいう。ある実施形態では、「予防薬」という用語は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(例えばVITAXIN(登録商標))のことをいう。これらの実施形態によると、この抗体又は抗体フラグメントを、本発明の液体製剤の成分とすることもできる。他のある実施形態では、「予防薬」という用語は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(例えばVITAXIN(登録商標))のことを

10

20

30

40

50

意味しない。予防薬は、疾患又は障害（例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、又は異常な血管形成を特徴とする障害）の発症、発現、進行、及び/又は重症度を防止又は妨害するのに有用であると知られているか、かつて使用されたか、又は現在使用されている薬剤であることが好ましい。予防薬は、*in vitro* 及び/又は *in vivo* において有する1以上の効果に基づいて異なる薬剤であると特徴付けられ得る。例えば、抗血管形成剤はまた、免疫調節剤としても特徴付けられる。

【0052】

本明細書中で用いる「予防する」及び「予防」なる用語は、治療（例えば予防薬若しくは治療薬）の投与、又は併用療法（例えば予防薬の組み合わせの投与）の投与により結果的に生じる、被験体における疾患又は障害（例えば、自己免疫障害、炎症性障害、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の異常な発現及び/若しくは活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）又はその1以上の症候の再発、発達又は発症の防止を意味する。

10

【0053】

本明細書において、「予防上有効な量」という用語は、疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）又はその1以上の症候の発現、再発、発症又は進行の予防、あるいは他の治療（例えば予防薬）の予防効果の増大又は改善をもたらすのに十分な治療（例えば、予防薬（例えばインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  と免疫特異的に結合する抗体若しくはフラグメント、又は該抗体若しくは抗体フラグメントを含む本発明の液体製剤）の量のことをいう。

20

【0054】

本明細書において、「糖」という用語は、多価アルコールの誘導体である分子クラスのことをいう。糖は、一般的に炭水化物と呼ばれ、例えば、単糖、二糖、及び多糖など、異なる量の糖（サッカライド）単位を含有することができる。

【0055】

本明細書中で用いる「副作用」とは、予防薬又は治療薬の望ましくない不利な作用を包含する。不利な作用は常に望まれていないが、望まれない作用が必ずしも不利とは限らない。予防薬又は治療薬からの不利な作用は有害であったり、不快であったり、危険であったりする。

30

【0056】

レミケード（REMICADE<sup>TM</sup>）の投与により生じる副作用としては、限定するものではないが、重症の感染症及び過敏性反応の危険性がある。その他の副作用は、発熱や寒気、かゆみや蕁麻疹、胸痛、低血圧、高血圧、呼吸困難などの心肺反応といった非特異的な症状から、熱性筋肉痛及び/又は関節痛、発疹、顔、頭若しくは唇の浮腫、嚥下障害、咽喉炎、及び頭痛までの範囲に及ぶ。さらに他の副作用として、限定するものではないが、腹部ヘルニア、脾臓梗塞、巨脾腫症、めまい、上位運動神経損傷、エリテマトーデス症候群、リウマチ様小結節、耳垢過剰分泌、腹痛、下痢、胃潰瘍、腸閉塞、腸穿孔、腸狭窄、悪心、膵炎、吐き気、背中の痛み、骨折、腱の損傷若しくは障害、心不全、心筋虚血、リンパ腫、血小板減少症、蜂巣炎、不安、錯乱、せん妄、抑うつ、傾眠、自殺願望、貧血、膿瘍、細菌感染、及び敗血症がある。

40

【0057】

エンブレル（ENBREL<sup>TM</sup>）の投与により生じる副作用としては、限定するものではないが、重症の感染症及び死を招くことのある敗血症の危険がある。不利な副作用は、重症の感染症、例えば、腎盂腎炎、気管支炎、敗血症性関節炎、腹部膿瘍、蜂巣炎、骨髄炎、創傷感染症、肺炎、足膿瘍、脚潰瘍、下痢、副鼻腔炎、敗血症、頭痛、悪心、鼻炎、めまい、咽頭炎、咳、無力症、腹痛、発疹、末梢浮腫、呼吸障害、消化不良、副鼻腔炎、吐き気、口腔潰瘍、脱毛及び肺炎から、他の頻度の低い副作用、例えば、心不全、心筋梗塞、心筋虚血、大脳虚血、高血圧、低血圧、膵炎、胃腸出血、滑液包炎、抑うつ、呼吸困

50

難、深部静脈血栓、肺塞栓症、膜性糸球体腎炎、多発性筋炎及び血栓性静脈炎までの範囲に及ぶ。メトトレキサートの投与により生じる副作用としては、限定するものではないが、致命的でありうる重症の毒性反応、例えば、予想外に重症の骨髄抑制、胃腸毒性、肝臓毒性、長期使用後の線維症及び肝硬変、肺疾患、下痢及び潰瘍性口内炎、悪性リンパ腫、及び死を招く可能性がある重症の皮膚反応がある。

#### 【0058】

化学療法の副作用としては、限定するものではないが、初期及び後期の下痢 (early and late forming diarrhea) 及び膨満、悪心、嘔吐、食欲不振、白血球減少症、貧血、好中球減少症、無力症、腹部の痙攣、熱、痛み、体重減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、めまい感、粘膜炎、口内乾燥症、及び腎不全、並びに便秘、神経及び筋肉作用、腎臓及び膀胱への一時的又は永久的損傷、フルー様症状、流体停滞、及び一時的又は永久的不妊症が挙げられる。放射線治療の副作用としては、限定するものではないが、疲労、口内乾燥、及び食欲減退が挙げられる。他の副作用としては、限定するものではないが、初期及び後期の下痢、及び膨満等の胃腸毒性、悪心、嘔吐、食欲不振、白血球減少症、貧血、好中球減少症、無力症、腹部の痙攣、熱、痛み、体重減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、めまい感、粘膜炎、口内乾燥症、及び腎不全が挙げられる。生物学的治療/免疫療法の副作用としては、限定するものではないが、投与部位における発疹又は腫脹、熱、悪寒及び疲労等のフルー様症状、消化管の問題及びアレルギー反応が挙げられる。ホルモン治療の副作用としては、限定するものではないが、悪心、受精能の問題、抑うつ症、食欲減退、眼の問題、頭痛、及び体重変動が挙げられる。治療を受けた患者が典型的に経験するさらなる望まれない作用が当分野において知られている。その多くはPhysicians' Desk Reference (第56版、2002年、第57版、2003年)に記載されている。

10

20

#### 【0059】

「小分子」という用語及び類似の用語には、ペプチド、ペプチド擬似体、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、モルあたり約10000グラム未満の分子量をもつ有機又は無機化合物(すなわち、異種有機化合物及び/又は有機金属化合物を含む)、モルあたり約5000グラム未満の分子量をもつ有機又は無機化合物、モルあたり約1000グラム未満の分子量をもつ有機又は無機化合物、並びに塩、エステル、及びこれらの化合物の薬学的に許容される他の形態が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

#### 【0060】

本明細書において、「安定性」及び「安定」という用語は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含む液体製剤に関して、所与の製造、調製、輸送、及び保存条件下における、分解又は断片化に対する製剤中の該抗体又は抗体フラグメントの耐性のことをいう。上記抗体又は抗体フラグメントの安定性は、HPSECにより測定した場合の、基準製剤と比較した分解又は断片化の程度により評価される。基準製剤は、150mM NaClを含有するヒスチジン-HClバッファー(pH6.0)中の10mg/mlの抗体又は抗体フラグメント(例えばVITAXIN(登録商標))からなる、-70で凍結した基準標準であり、この基準製剤は通常、HPSECにより単一のモノマーピーク(97%以上の領域)を示す。あるいは、基準製剤は、ヒスチジン-HClバッファー(pH6.0)中の10mg/mlの抗体又は抗体フラグメント(例えばVITAXIN(登録商標))からなる、-70で凍結した基準標準であり、この基準製剤は通常、HPSECにより単一のモノマーピーク(97%以上の領域)を示す。インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含む製剤の総合的な安定性は、例えば、単離されたインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>分子又はそれを発現する細胞を用いたELISA及びラジオイムノアッセイを含めた様々な免疫学的アッセイによって評価することができる。

40

#### 【0061】

本明細書において、「被験体」及び「患者」という用語は、互換性を持って用いられる

50

。本明細書において、「被験体」という用語は、動物、好ましくは非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット、及びマウス）、及び霊長類（例えば、チンパンジー、マカクザルなどのサル、及びヒト）を含めた哺乳動物、並びに、より好ましくはヒトのことをいう。一実施形態において、被験体は、免疫不全状態又は免疫抑制状態の哺乳動物、好ましくはヒト（例えばHIV患者）である。別の実施形態において、被験体は、リンパ球数が約500細胞/mm<sup>3</sup>以下の哺乳動物、好ましくはヒトではない。別の実施形態において、被験体は、1以上のTNF-アンタゴニストで処置されている又は既に処置された哺乳動物、好ましくはヒトである。別の実施形態において、被験体は、1以上のTNF-アンタゴニスト及びメトトレキサートで処置されている又は既に処置された哺乳動物、好ましくはヒトである。別の実施形態において、被験体は、TNF-アンタゴニスト又はメトトレキサートで現在は処置されていない哺乳動物、好ましくはヒトである。別の実施形態において、被験体は、TNF-アンタゴニスト、非ステロイド系抗炎症剤又はメトトレキサート単独での処置に不応性の炎症性障害又は自己免疫障害を有する哺乳動物、好ましくはヒトである。また別の実施形態において、被験体は、1以上の化学療法剤及び/又は放射線療法での処置に不応性の癌を有する哺乳動物、好ましくはヒトである。好ましい実施形態において、被験体はヒトである。

10

## 【0062】

本明細書において、「界面活性剤を実質的に含まない」という用語は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの製剤であって、0.0005%未満、0.0003%未満、又は0.0001%未満の界面活性剤を含有する製剤のことをいう。

20

## 【0063】

本明細書において、「無機塩を実質的に含まない」という用語は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの製剤であって、0.0005%未満、0.0003%未満、又は0.0001%未満の無機塩を含有する製剤のことをいう。

## 【0064】

本明細書中で用いる用語「相乗作用」は、2以上の単一治療の相加作用よりも効果的である治療の組み合わせ（例えば、予防薬若しくは治療薬の使用）を意味する。例えば、予防薬若しくは治療薬の組み合わせの相乗作用により、1以上の薬剤の投与量を少なくすることができ、並びに/あるいは疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）を有する被験体への上記薬剤の投与回数を減らすことが可能である。予防薬若しくは治療薬の投与量を少なくし、かつ/又は上記薬剤の投与回数を減らすことができるということは、薬剤の被験体への投与に伴う毒性を減らし、しかも疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）の予防、管理又は治療における上記薬剤の効力を低下させることがない。その上、相乗作用により、疾患又は障害（炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌）の予防又は治療における治療の効力を改善することができる。最後に、治療（例えば、予防薬若しくは治療薬）の組み合わせの相乗作用により、単一療法の使用に伴う有害な又は望ましくない副作用を回避し又は軽減することができる。

30

40

## 【0065】

本明細書中で用いる「治療薬」とは、疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）又はその1以上の症候の治療、管理又は改善（緩和）に使用することができる薬剤を意味する。特定の実施形態において、「治療薬」という用語はインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は

50

そのフラグメント（例えばVITAXIN（登録商標））を指す。これらの実施形態によれば、抗体又は抗体フラグメントは、本発明の液体製剤の成分でありうる。特定の他の実施形態では、「治療薬」という用語はインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメント（例えばVITAXIN（登録商標））を意味しない。好ましくは、治療薬は疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）又はその1以上の症候を治療又は改善するために、有用であることが知られているか、使用されていたか、あるいは現在使用されている薬剤である。治療薬は、*in vitro*及び/又は*in vivo*で該薬剤が有する1以上の効果に基づいて、別の薬剤として特性付けされることがある。例えば、抗炎症剤は、免疫調節剤として特性付けることもできる。

10

## 【0066】

本明細書中で用いる「治療有効量」とは、疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）の重篤度を低減するか、疾患又は障害の持続期間を低減するか、疾患又は障害に関連する1以上の症候を改善するか、疾患又は障害の進行を防止するか、疾患又は障害の退行を引き起こすか、あるいは他の治療（例えば他の治療薬、例えばインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体若しくはそのフラグメント、又は該抗体若しくは抗体フラグメントを含む本発明の液体製剤）の治療効果を増大若しくは改善するのに十分な治療（例えば治療薬）の量をいう。

20

## 【0067】

本明細書中で用いる「治療（therapies又はtherapy）」とは、医療関係者（例えば医師又は看護師）又は当分野における熟練した研究者に公知の疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）又はその1以上の症候の予防、治療、管理又は改善において使用できる任意のプロトコル、方法及び/又は薬剤をいうことができる。特定の実施形態において、用語「治療」とは、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、生物学的療法、並びに/あるいは、医療従事者に公知の、疾患又は障害（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）の治療に有用な他の治療を意味する。

30

## 【0068】

本明細書中で用いる「治療する」及び「治療」とは1以上の治療（例えば限定されるものではないが、1以上の治療薬又は予防薬の投与、放射線療法、ホルモン療法、外科手術、物理学的療法、及び使用しうる他の任意の方法又は薬剤）により生じる疾患又は障害（炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝を特徴とする障害、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現及び/又は活性を特徴とする障害、異常な血管形成を特徴とする障害、又は癌）の進行、重篤度、及び/若しくは持続期間の低減又は改善、又は該疾患若しくは障害の1以上の症候の改善をさす。特定の実施形態において、上記用語は、自己免疫障害又は炎症性障害に罹患した被験体への1以上の予防薬又は治療薬の投与により生じる、自己免疫障害又は炎症性障害と関連した1以上の関節、臓器若しくは組織の腫れの改善、又は痛みの改善を意味する。他の実施形態において、かかる用語は、ヒトのPASIスコアの低減を意味する。別の実施形態において、かかる用語は、ヒトの全身評価スコアの改善を意味する。他の実施形態において、かかる用語は、癌細胞の増殖の阻害又は低減、腫瘍細胞の拡大（転移）の阻害又は低減、癌に関連する1以上の症候の発症、発現又は進行の阻害又は低減、あるいは腫瘍サイズの低減を意味する。他の実施形態において、かかる用語は、骨の欠損又は骨吸収の阻害又は低減をいう。また別の実施形態においては、かかる用語は、異常な血管形成の阻害又は低減を意味する。

40

## 【0069】

50

本明細書において、「生物学的活性が全く失われていないかほとんど失われていない」という用語は、限定されるものではないが、E L I S A 及びラジオイムノアッセイを含めた様々な免疫学的アッセイによって測定される、インテグリン  $\nu_3$  に対する抗体若しくはそのフラグメントの特異的結合能を含めた抗体活性のことをいう。一実施形態では、本発明の製剤の抗体又は抗体フラグメントは、インテグリン  $\nu_3$  (すなわちピトロネクチンレセプター) に免疫特異的に結合する能力を、当業者に公知か、又は本明細書に記載した免疫学的アッセイによって測定した場合、基準抗体又は抗体フラグメント(例えば V I T A X I N (登録商標))と比較して、約 50%、好ましくは 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は 98% 保持する。例えば、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体若しくは抗体フラグメントの能力を、V I T A X I N (登録商標) 基準標準と比較するのに、E L I S A に基づくアッセイを用いることができる。このアッセイでは、V n R 結合 E L I S A と称されるが、プレートをヒト胎盤から単離されたインテグリン  $\nu_3$  によってコーティングし、設定した濃度の V I T A X I N (登録商標) 基準標準の結合シグナルを、同じ濃度の試験抗体又は抗体フラグメントの結合シグナルと比較する。本明細書において用いる「基準標準」とは、150 m M N a C l を含有するヒスチジン - H C l バッファー (p H 6 . 0) 中の 10 m g / m l の抗体又は抗体フラグメント(例えば V I T A X I N (登録商標))からなる、- 70 で凍結した抗体又は抗体フラグメント(例えば V I T A X I N (登録商標))を指し、また通常 H P S E C により、単一のモノマーピーク (97% 以上の領域) を示す。

10

20

【0070】

#### 4. 図面の簡単な説明

図 1 は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する精製抗体を調製する概要を示す概略図である。

【0071】

#### 5. 発明の詳細な説明

本発明の液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの即時使用できる製剤を提供する。この液体製剤は、被験体に投与するために、正確かつ無菌的に製剤を再構成する必要がなく、また、製剤を被験体に施す前に、しばらく溶液が透明になるまで待つこともない。これは医療従事者が製剤を被験体に投与する操作手順を簡便化する。その上、保存中の安定性が高いため、本発明の製剤は、長期貯蔵中のタンパク質凝集及び/又は断片化によって、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性へ悪影響を引き起こすことなく、約 15 m g / m l から約 300 m g / m l の範囲の濃度で、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含有することができる。そのような安定性により、上記抗体又は抗体フラグメントの有効性が確実となるだけでなく、被験体への有害な作用を引き起こす潜在的な危険も低減する。またさらに、製剤中の成分をより少なく使用することにより、混入物質のリスクも少なくなる。さらに、本発明の液体製剤の製造プロセスは、簡便化されており、液体製剤の製造の全段階が水溶液中で行われ、凍結乾燥やフリーズドライなどの乾燥プロセスを必要としないため、凍結乾燥形態の製造プロセスより効率的である。したがって、この製剤は費用効率でもよりすぐれている。

30

40

【0072】

##### 5.1 抗体製剤

本発明の液体製剤は、界面活性剤、無機塩、及び/又は他の賦形剤を実質的に含まず、なお長期保存中に高い安定性を示す抗体製剤を提供する。特定の実施形態では、そのような抗体製剤は均質である。本発明の製剤は、ヒスチジンと、約 15 m g / m l から約 300 m g / m l の濃度のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントとを含む。一実施形態では、本発明の製剤は、水又は適当な溶剤以外の他の成分を含まない。特定の実施形態において、本発明の液体製剤に含まれるインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは V I T A X I N (登録商標) 又はその抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、本発明の液体製剤に含まれるイ

50

ンテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは V I T A X I N (登録商標) 又はその抗原結合フラグメントではない。好ましい実施形態において、本発明の液体製剤に含まれるインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、前述の表 1 に示される 1 以上の V H C D R 及び / 又は 1 以上の V L C D R を含む抗体又は抗体フラグメントである。別の実施形態において、本発明の液体製剤に含まれるインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、別の部分、例えば限定されるものではないが、異種ポリペプチド、別の抗体若しくは抗体フラグメント、マーカー配列、診断薬、治療薬、放射性金属イオン、ポリマー、アルブミン及び固体支持体などにコンジュゲートされた抗体又は抗体フラグメントである。またさらに別の実施形態において、本発明の液体製剤は、インテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する 2 以上の抗体又は抗体フラグメントを含み、この抗体又は抗体フラグメントの少なくとも 1 つが V I T A X I N (登録商標) 又はその抗原結合フラグメントである。

#### 【0073】

本発明の液体製剤に含まれているインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの濃度は、少なくとも 15 mg / ml、少なくとも 20 mg / ml、少なくとも 25 mg / ml、少なくとも 30 mg / ml、少なくとも 35 mg / ml、少なくとも 40 mg / ml、少なくとも 45 mg / ml、少なくとも 50 mg / ml、少なくとも 55 mg / m、少なくとも 60 mg / ml、少なくとも 65 mg / ml、少なくとも 70 mg / ml、少なくとも 75 mg / ml、少なくとも 80 mg / ml、少なくとも 85 mg / ml、少なくとも 90 mg / ml、少なくとも 95 mg / ml、少なくとも 100 mg / ml、少なくとも 105 mg / ml、少なくとも 110 mg / ml、少なくとも 115 mg / ml、少なくとも 120 mg / ml、少なくとも 125 mg / ml、少なくとも 130 mg / ml、少なくとも 135 mg / ml、少なくとも 140 mg / ml、少なくとも 150 mg / ml、少なくとも 175 mg / ml、少なくとも 200 mg / ml、少なくとも 250 mg / ml、少なくとも 275 mg / ml、又は少なくとも 300 mg / ml である。特定の実施形態において、本発明の液体製剤に含まれているインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの濃度は、約 75 mg / ml、約 100 mg / ml、約 125 mg / ml、約 150 mg / ml、約 175 mg / ml、約 200 mg / ml、約 225 mg / ml、約 250 mg / ml、約 275 mg / ml、又は約 300 mg / ml である。別の実施形態において、本発明の液体製剤に含まれているインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの濃度は、15 ~ 500 mg / ml、50 ~ 300 mg / ml、50 ~ 250 mg / ml、50 ~ 200 mg / ml、50 ~ 175 mg / ml、50 ~ 150 mg / ml、50 ~ 125 mg / ml、又は 50 ~ 100 mg / ml である。

#### 【0074】

本発明の液体製剤に含まれているヒスチジンの濃度は、1 mM から 100 mM、好ましくは 5 mM から 50 mM、より好ましくは 10 mM から約 25 mM の範囲である。特定の実施形態においては、本発明の液体製剤に含まれているヒスチジンの濃度は、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、又は 50 mM である。ヒスチジンは、L - ヒスチジン、D - ヒスチジン、又はこれらの混合物、の形態であることができるが、L - ヒスチジンが最も好ましい。ヒスチジンは、水和物の形態であってもよい。ヒスチジンは、塩酸塩 (例えば、一塩酸塩及び二塩酸塩)、臭化水素塩、硫酸塩、酢酸塩など、薬学的に許容される塩の形態で用いられてもよい。ヒスチジンの純度は少なくとも 98%、好ましくは少なくとも 99%、及び最も好ましくは少なくとも 99.5% であるべきである。本明細書においてヒスチジンに関して用いる用語「純度」とは、当技術分野で理解される、ヒスチジンの化学的純度を意味し、例えば The Merck Index、第13版、0'Neilら編 (Merck & Co., 2001) に記載されている。

#### 【0075】

製剤の pH は、製剤中で用いる特定の抗体又は抗体フラグメントの等電点 (例えば V I T A X I N (登録商標) の等電点は 8.65 ~ 8.89 の範囲) とは異なっているべきで

あり、約 5.0 ~ 約 7、好ましくは約 5.5 ~ 約 6.5、より好ましくは約 5.8 ~ 約 6.2 の範囲でもよく、最も好ましくは約 6.0 である。

【0076】

ヒスチジン及びインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントに加えて、本発明の製剤は、150 mM未満、100 mM未満、75 mM未満、50 mM未満、25 mM未満、10 mM未満、5.0 mM未満、又は2.0 mM未満の濃度でさらにグリシンを含むことができる。特定の実施形態においては、本発明の製剤は、1 ~ 150 mM、1 ~ 100 mM、1 ~ 75 mM、1 ~ 50 mM、1 ~ 25 mM、1 ~ 10 mM、1 ~ 5.0 mM、又は1 ~ 2.0 mMの濃度でグリシンをさらに含むことができる。製剤中のグリシンの量は、抗体がその等電点において沈殿するのを避けるため、有意の緩衝作用が起きないようにするべきである。グリシンは、塩酸塩、臭化水素塩、硫酸塩、酢酸塩などの薬学的に許容される塩の形態で用いてもよい。グリシンの純度は、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは99.5%であるべきである。本明細書においてグリシンに関して用いる用語「純度」とは、当技術分野で理解される、グリシンの化学的純度を意味し、例えばThe Merck Index、第13版、O'Neilら編 (Merck & Co., 2001) に記載されている。特定の実施形態では、グリシンは本発明の液体製剤に含まれていない。

10

【0077】

任意選択で、本発明の製剤は、糖（例えば、スクロース、マンノース、トレハロースなど）やポリオール（例えば、マンニトール、ソルビトールなど）など、さらに他の賦形剤を含んでもよい。一実施形態では、他の賦形剤は糖である。特定の実施形態では、糖はスクロースであり、その濃度範囲は約1%と約20%の間、好ましくは約5%と約15%の間、より好ましくは約8%と10%の間である。別の実施形態において、糖はスクロースであり、その濃度は製剤の1%、3%、5%、8%、10%、15%、又は20%である。別の実施形態では、他の賦形剤はポリオールである。しかし、本発明の液体製剤は、マンニトールを含有しないことが好ましい。特定の実施形態では、ポリオールはポリソルベート（例えば、Tween 20）であり、その濃度範囲は製剤の約0.001%と約1%の間、好ましくは約0.01%と約0.1%の間である。特定の実施形態において、ポリオールはポリソルベート（例えばTween 20）であり、その濃度は製剤の0.001%、0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.08%、0.1%、0.5%、又は1%である。

20

30

【0078】

本発明の液体製剤は、高性能サイズ排除クロマトグラフィー（HPSEC）で測定したとき、38 ~ 42 の温度領域で少なくとも15日間安定であり、ただしある実施形態では、これは25日間以上ではなく、20 ~ 24 では、少なくとも6ヶ月、2 ~ 8（特に4）では、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年間、少なくとも1.5年間、少なくとも2年間、少なくとも2.5年間、少なくとも3年間、又は少なくとも4年間、さらに-20 では、少なくとも2年間、少なくとも3年間、少なくとも4年間、又は少なくとも5年間にわたり安定である。すなわち、本発明の液体製剤は、上記に詳述した特定の期間の保存の後、本明細書の定義において、凝集及び/又は断片化が検出不能又は低レベルである。好ましくは、上記に詳述した特定期間の保存後、HPSECで測定したとき、抗体又は抗体フラグメントの5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、及び最も好ましくは0.5%以下が凝集を形成する。さらに、本発明の液体製剤は、上記の条件での長期保存中、例えばインテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの能力を測定する酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）及びラジオイムノアッセイなどが含まれる様々な免疫学的アッセイによって評価した場合に、抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性をほとんど失わない。本発明の液体製剤は、上記特定期間の保存後に、保存前の初期の生物学的活性（例えばインテグリン  $\nu_3$  との結合能力）の80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、又は99.5%以上を保持する。いくつかの実施形態においては、本発明の液体製剤は、上記

40

50

特定期間の保存後に、保存前の抗体を表わす基準抗体と比較して、その生物学的活性（例えばインテグリン  $\nu_3$  との結合能力）の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%以上、又は少なくとも99.5%を保持する。

【0079】

本発明の液体製剤は、単位投与剤形として調製することができる。例えば、1バイアルあたりの1単位用量は、濃度約15mg/mlから約300mg/ml、約50mg/mlから約300mg/ml、約75mg/mlから約300mg/ml、約95mg/mlから約300mg/ml、約100mg/mlから約300mg/ml、約150mg/mlから約300mg/ml、約200mg/mlから約300mg/ml、約100mg/mlから約200mg/ml、約100mg/mlから約150mg/ml、約100mg/mlから約175mg/mlの範囲にある、種々の濃度の、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、又は20ml含有してもよい。必要なら、無菌希釈剤を各バイアルに添加することによって、望ましい濃度にこれらの調製を調整することができる。

【0080】

本発明は、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する単一の抗体又は抗体フラグメントを含む安定な液体製剤を包含する。本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する2以上の抗体又は抗体フラグメントを含む安定な液体製剤を包含する。特定の実施形態においては、本発明の安定な液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合するVITAXIN（登録商標）又はそのフラグメントを含む。別の実施形態において、本発明の安定な液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する2以上の抗体又は抗体フラグメントを含み、該抗体又は抗体フラグメントの1つはVITAXIN（登録商標）又はその抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、本発明の安定な液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する2以上の抗体又は抗体フラグメントを含み、ここで該抗体又は抗体フラグメントはVITAXIN（登録商標）又はその抗原結合フラグメントではない。

【0081】

5.1.1 インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的な抗体

インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合しかつアンタゴニストとして機能する抗体が当技術分野で知られていることを理解されたい。インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する公知の抗体の例は、限定するものではないが、11D2（Searle）、マウスモノクローナルLM609（Scripps；本明細書中に参照によりその全文が組み入れられる、国際公開WO89/015155号及び米国特許第5,753,230号）、ヒト化モノクローナル抗体MEDI-522（VITAXIN（登録商標）、MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD）としても知られる；Wuら, 1998, PNAAS USA 95(11):6037-6042；国際公開WO90/33919号及びWO00/78815号、これらはそれぞれ本明細書中に参照によりその全文が組み入れられる）、17661-37E及び17661-37E-1-5（US Biological）、MON2032（CalTag）、ab7166（BV3）及びab7167（BV4）（Abcam）、及びWOW-1（Kiosses et al., Nature Cell Biology 3:316-320）が挙げられる。

【0082】

インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体は、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fv（scFv）、一本鎖抗体、ジスルフィド連結Fv（sdFv）、及び抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む）を意味する。特に、抗体は免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント（すなわち、抗原結合部位を含む分子）を含む。特に、本発明の抗体には、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわ

ちインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子が含まれる。本発明の免疫グロブリン分子はいずれのタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>）又はサブクラスのものであってもよい。好ましい実施形態において、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、インテグリン  $\nu_3$  のアンタゴニストである。一実施形態において、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントはインテグリン  $\nu_1$ 、インテグリン  $\nu_5$ 、インテグリン  $\nu_6$ 、又はインテグリン  $\nu_8$  のアンタゴニストではない。別の好ましい実施形態において、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは血管形成を阻害又は低減する。一実施形態において、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、当業者に公知のアッセイ、例えばニワトリ絨毛尿膜（CAM）血管形成アッセイ（例えばNguyenら、Microvascular Res. 1994, 47:31-40参照）及びマトリゲルプラグアッセイ（例えばKraghら、International J. of Oncology, 22:305-311 (2003)参照）を用いて陰性対照と比較して少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、又は少なくとも5%の血管形成を阻害又は低減する。

#### 【0083】

インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、鳥類及び哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、又はニワトリ）を含むいずれの動物起源のものであってもよい。好ましくは、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体はヒト又はヒト化モノクローナル抗体である。本明細書に使用される「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、また、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された又はヒト遺伝子から抗体を発現するマウスから単離された抗体を含む。

#### 【0084】

インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性又はさらに多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は、インテグリン  $\nu_3$  の様々なエピトープに特異的であっても、インテグリン  $\nu_3$  エピトープと異種エピトープ（異種ポリペプチド又は固相支持体物質など）の両方に特異的であってもよい。例えば、国際公開WO93/17715号、WO92/08802号、WO91/00360号、及びWO92/05793号；Tuttら、J. Immunol. 147:60-69 (1991)；米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号、及び第5,601,819号；並びにKostelnyら、1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照されたい。

#### 【0085】

本発明は、インテグリン  $\nu_3$  に対して高い結合親和性を有する抗体及び抗体フラグメントを包含する。特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの結合速度定数すなわち  $k_{on}$  速度（抗体（Ab）+抗原（Ag） $\xrightarrow{k_{on}}$  Ab-Ag）は、少なくとも  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は少なくとも  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である。好ましい実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの  $k_{on}$  は、少なくとも  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は少なくとも  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である。

#### 【0086】

他の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの  $k_{off}$  速度（抗体（Ab）+抗原（Ag） $\xrightarrow{k_{off}}$  Ab-Ag）は、

$10^{-1} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-1} s^{-1}$  未満、 $10^{-2} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-2} s^{-1}$  未満、 $10^{-3} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$  未満、 $10^{-4} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $10^{-5} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$  未満、 $10^{-6} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$  未満、 $10^{-7} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$  未満、 $10^{-8} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$  未満、 $10^{-9} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  未満、又は  $10^{-10} s^{-1}$  未満である。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの  $k_{on}$  速度は、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $10^{-5} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$  未満、 $10^{-6} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$  未満、 $10^{-7} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$  未満、 $10^{-8} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$  未満、 $10^{-9} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  未満、又は  $10^{-10} s^{-1}$  未満である。

10

【0087】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの親和性定数すなわち  $K_a$  ( $k_{on} / k_{off}$ ) は、少なくとも  $10^2 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^3 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^4 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^5 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^6 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{15} M^{-1}$ 、又は少なくとも  $5 \times 10^{15} M^{-1}$  である。さらに他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの解離定数すなわち  $K_d$  ( $k_{off} / k_{on}$ ) は、 $10^{-2} M$  未満、 $5 \times 10^{-2} M$  未満、 $10^{-3} M$  未満、 $5 \times 10^{-3} M$  未満、 $10^{-4} M$  未満、 $5 \times 10^{-4} M$  未満、 $10^{-5} M$  未満、 $5 \times 10^{-5} M$  未満、 $10^{-6} M$  未満、 $5 \times 10^{-6} M$  未満、 $10^{-7} M$  未満、 $5 \times 10^{-7} M$  未満、 $10^{-8} M$  未満、 $5 \times 10^{-8} M$  未満、 $10^{-9} M$  未満、 $5 \times 10^{-9} M$  未満、 $10^{-10} M$  未満、 $5 \times 10^{-10} M$  未満、 $10^{-11} M$  未満、 $5 \times 10^{-11} M$  未満、 $10^{-12} M$  未満、 $5 \times 10^{-12} M$  未満、 $10^{-13} M$  未満、 $5 \times 10^{-13} M$  未満、 $10^{-14} M$  未満、 $5 \times 10^{-14} M$  未満、 $10^{-15} M$ 、又は  $5 \times 10^{-15} M$  である。

20

30

【0088】

特定の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、LM609 又はその抗原結合フラグメント（例えば、LM609 の 1 以上の相補性決定領域 (CDR)）である。LM609 は、例えば国際公開 WO 89/05155 号（本明細書に参照によりその全文が組み入れられる）に開示されたアミノ酸配列、又は American Type Culture Collection (ATCC (登録商標)) (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209) に受託番号 HB9537 として寄託されている細胞系が産生するモノクローナル抗体のアミノ酸配列を有する。別の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体は LM609 又は LM609 の抗原結合フラグメントでない。

40

【0089】

好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体は、VITAXIN (登録商標) 又はその抗原結合フラグメント（例えば、VITAXIN (登録商標) の 1 以上の CDR) である。VITAXIN (登録商標) は、例えば、国際公開 WO 98/33919 号、WO 00/78815 号及び WO 02/070007 号、米国特許出願第 09/339,222 号に開示されていて、これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全文が組み入れられる。別の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体は VITAXIN (登録商標) 又は VITAXIN (登録商標)

50

)の抗原結合フラグメントではない。

【0090】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、LM609又はVITAXIN(登録商標)の可変重鎖(VH)ドメインのアミノ酸配列を有するVHドメインを含む上記抗体及び抗体フラグメントを包含する。本発明はまた、上記表1に掲げたいずれか1つのVH CDRのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントの使用も包含する。

【0091】

一実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号1のアミノ酸配列を有するVH CDR1を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列を有するVH CDR2を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、配列番号3のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号1のアミノ酸配列を有するVH CDR1と配列番号2のアミノ酸配列を有するVH CDR2との組み合わせを含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、配列番号1のアミノ酸配列を有するVH CDR1と配列番号3のアミノ酸配列を有するVH CDR3との組み合わせを含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列を有するVH CDR2と配列番号3のアミノ酸配列を有するVH CDR3との組み合わせを含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するVH CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び配列番号3のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む。

【0092】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、LM609又はVITAXIN(登録商標)の可変軽鎖(VL)ドメインのアミノ酸配列を有するVLドメインを含む上記抗体及び抗体フラグメントの使用を包含する。本発明はまた、表1に掲げたいずれか1つのVL CDRのアミノ酸配列を有するVL CDRを含む、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを包含する。

【0093】

一実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、及び配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、及び配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列を

有するV L C D R 3を含む。

【0094】

本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、本明細書に開示したV Hドメインを、本明細書に開示したV Lドメイン又は他のV Lドメインと組み合わせて含む上記抗体及び抗体フラグメントを包含する。本発明はさらに、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、本明細書に開示したV Lドメインを、本明細書に開示したV Hドメイン又は他のV Hドメインと組み合わせて含む上記抗体及び抗体フラグメントを包含する。

【0095】

本発明はまた、表1に掲げた1以上のV H C D R及び1以上のV L C D Rを含む、  
 インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを包含する。特  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100  
 101  
 102  
 103  
 104  
 105  
 106  
 107  
 108  
 109  
 110  
 111  
 112  
 113  
 114  
 115  
 116  
 117  
 118  
 119  
 120  
 121  
 122  
 123  
 124  
 125  
 126  
 127  
 128  
 129  
 130  
 131  
 132  
 133  
 134  
 135  
 136  
 137  
 138  
 139  
 140  
 141  
 142  
 143  
 144  
 145  
 146  
 147  
 148  
 149  
 150  
 151  
 152  
 153  
 154  
 155  
 156  
 157  
 158  
 159  
 160  
 161  
 162  
 163  
 164  
 165  
 166  
 167  
 168  
 169  
 170  
 171  
 172  
 173  
 174  
 175  
 176  
 177  
 178  
 179  
 180  
 181  
 182  
 183  
 184  
 185  
 186  
 187  
 188  
 189  
 190  
 191  
 192  
 193  
 194  
 195  
 196  
 197  
 198  
 199  
 200  
 201  
 202  
 203  
 204  
 205  
 206  
 207  
 208  
 209  
 210  
 211  
 212  
 213  
 214  
 215  
 216  
 217  
 218  
 219  
 220  
 221  
 222  
 223  
 224  
 225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231  
 232  
 233  
 234  
 235  
 236  
 237  
 238  
 239  
 240  
 241  
 242  
 243  
 244  
 245  
 246  
 247  
 248  
 249  
 250  
 251  
 252  
 253  
 254  
 255  
 256  
 257  
 258  
 259  
 260  
 261  
 262  
 263  
 264  
 265  
 266  
 267  
 268  
 269  
 270  
 271  
 272  
 273  
 274  
 275  
 276  
 277  
 278  
 279  
 280  
 281  
 282  
 283  
 284  
 285  
 286  
 287  
 288  
 289  
 290  
 291  
 292  
 293  
 294  
 295  
 296  
 297  
 298  
 299  
 300  
 301  
 302  
 303  
 304  
 305  
 306  
 307  
 308  
 309  
 310  
 311  
 312  
 313  
 314  
 315  
 316  
 317  
 318  
 319  
 320  
 321  
 322  
 323  
 324  
 325  
 326  
 327  
 328  
 329  
 330  
 331  
 332  
 333  
 334  
 335  
 336  
 337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342  
 343  
 344  
 345  
 346  
 347  
 348  
 349  
 350  
 351  
 352  
 353  
 354  
 355  
 356  
 357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375  
 376  
 377  
 378  
 379  
 380  
 381  
 382  
 383  
 384  
 385  
 386  
 387  
 388  
 389  
 390  
 391  
 392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411  
 412  
 413  
 414  
 415  
 416  
 417  
 418  
 419  
 420  
 421  
 422  
 423  
 424  
 425  
 426  
 427  
 428  
 429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435  
 436  
 437  
 438  
 439  
 440  
 441  
 442  
 443  
 444  
 445  
 446  
 447  
 448  
 449  
 450  
 451  
 452  
 453  
 454  
 455  
 456  
 457  
 458  
 459  
 460  
 461  
 462  
 463  
 464  
 465  
 466  
 467  
 468  
 469  
 470  
 471  
 472  
 473  
 474  
 475  
 476  
 477  
 478  
 479  
 480  
 481  
 482  
 483  
 484  
 485  
 486  
 487  
 488  
 489  
 490  
 491  
 492  
 493  
 494  
 495  
 496  
 497  
 498  
 499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525  
 526  
 527  
 528  
 529  
 530  
 531  
 532  
 533  
 534  
 535  
 536  
 537  
 538  
 539  
 540  
 541  
 542  
 543  
 544  
 545  
 546  
 547  
 548  
 549  
 550  
 551  
 552  
 553  
 554  
 555  
 556  
 557  
 558  
 559  
 560  
 561  
 562  
 563  
 564  
 565  
 566  
 567  
 568  
 569  
 570  
 571  
 572  
 573  
 574  
 575  
 576  
 577  
 578  
 579  
 580  
 581  
 582  
 583  
 584  
 585  
 586  
 587  
 588  
 589  
 590  
 591  
 592  
 593  
 594  
 595  
 596  
 597  
 598  
 599  
 600  
 601  
 602  
 603  
 604  
 605  
 606  
 607  
 608  
 609  
 610  
 611  
 612  
 613  
 614  
 615  
 616  
 617  
 618  
 619  
 620  
 621  
 622  
 623  
 624  
 625  
 626  
 627  
 628  
 629  
 630  
 631  
 632  
 633  
 634  
 635  
 636  
 637  
 638  
 639  
 640  
 641  
 642  
 643  
 644  
 645  
 646  
 647  
 648  
 649  
 650  
 651  
 652  
 653  
 654  
 655  
 656  
 657  
 658  
 659  
 660  
 661  
 662  
 663  
 664  
 665  
 666  
 667  
 668  
 669  
 670  
 671  
 672  
 673  
 674  
 675  
 676  
 677  
 678  
 679  
 680  
 681  
 682  
 683  
 684  
 685  
 686  
 687  
 688  
 689  
 690  
 691  
 692  
 693  
 694  
 695  
 696  
 697  
 698  
 699  
 700  
 701  
 702  
 703  
 704  
 705  
 706  
 707  
 708  
 709  
 710  
 711  
 712  
 713  
 714  
 715  
 716  
 717  
 718  
 719  
 720  
 721  
 722  
 723  
 724  
 725  
 726  
 727  
 728  
 729  
 730  
 731  
 732  
 733  
 734  
 735  
 736  
 737  
 738  
 739  
 740  
 741  
 742  
 743  
 744  
 745  
 746  
 747  
 748  
 749  
 750  
 751  
 752  
 753  
 754  
 755  
 756  
 757  
 758  
 759  
 760  
 761  
 762  
 763  
 764  
 765  
 766  
 767  
 768  
 769  
 770  
 771  
 772  
 773  
 774  
 775  
 776  
 777  
 778  
 779  
 780  
 781  
 782  
 783  
 784  
 785  
 786  
 787  
 788  
 789  
 790  
 791  
 792  
 793  
 794  
 795  
 796  
 797  
 798  
 799  
 800  
 801  
 802  
 803  
 804  
 805  
 806  
 807  
 808  
 809  
 810  
 811  
 812  
 813  
 814  
 815  
 816  
 817  
 818  
 819  
 820  
 821  
 822  
 823  
 824  
 825  
 826  
 827  
 828  
 829  
 830  
 831  
 832  
 833  
 834  
 835  
 836  
 837  
 838  
 839  
 840  
 841  
 842  
 843  
 844  
 845  
 846  
 847  
 848  
 849  
 850  
 851  
 852  
 853  
 854  
 855  
 856  
 857  
 858  
 859  
 860  
 861  
 862  
 863  
 864  
 865  
 866  
 867  
 868  
 869  
 870  
 871  
 872  
 873  
 874  
 875  
 876  
 877  
 878  
 879  
 880  
 881  
 882  
 883  
 884  
 885  
 886  
 887  
 888  
 889  
 890  
 891  
 892  
 893  
 894  
 895  
 896  
 897  
 898  
 899  
 900  
 901  
 902  
 903  
 904  
 905  
 906  
 907  
 908  
 909  
 910  
 911  
 912  
 913  
 914  
 915  
 916  
 917  
 918  
 919  
 920  
 921  
 922  
 923  
 924  
 925  
 926  
 927  
 928  
 929  
 930  
 931  
 932  
 933  
 934  
 935  
 936  
 937  
 938  
 939  
 940  
 941  
 942  
 943  
 944  
 945  
 946  
 947  
 948  
 949  
 950  
 951  
 952  
 953  
 954  
 955  
 956  
 957  
 958  
 959  
 960  
 961  
 962  
 963  
 964  
 965  
 966  
 967  
 968  
 969  
 970  
 971  
 972  
 973  
 974  
 975  
 976  
 977  
 978  
 979  
 980  
 981  
 982  
 983  
 984  
 985  
 986  
 987  
 988  
 989  
 990  
 991  
 992  
 993  
 994  
 995  
 996  
 997  
 998  
 999  
 1000  
 1001  
 1002  
 1003  
 1004  
 1005  
 1006  
 1007  
 1008  
 1009  
 1010  
 1011  
 1012  
 1013  
 1014  
 1015  
 1016  
 1017  
 1018  
 1019  
 1020  
 1021  
 1022  
 1023  
 1024  
 1025  
 1026  
 1027  
 1028  
 1029  
 1030  
 1031  
 1032  
 1033  
 1034  
 1035  
 1036  
 1037  
 1038  
 1039  
 1040  
 1041  
 1042  
 1043  
 1044  
 1045  
 1046  
 1047  
 1048  
 1049  
 1050  
 1051  
 1052  
 1053  
 1054  
 1055  
 1056  
 1057  
 1058  
 1059  
 1060  
 1061  
 1062  
 1063  
 1064  
 1065  
 1066  
 1067  
 1068  
 1069  
 1070  
 1071  
 1072  
 1073  
 1074  
 1075  
 1076  
 1077  
 1078  
 1079  
 1080  
 1081  
 1082  
 1083  
 1084  
 1085  
 1086  
 1087  
 1088  
 1089  
 1090  
 1091  
 1092  
 1093  
 1094  
 1095  
 1096  
 1097  
 1098  
 1099  
 1100  
 1101  
 1102  
 1103  
 1104  
 1105  
 1106  
 1107  
 1108  
 1109  
 1110  
 1111  
 1112  
 1113  
 1114  
 1115  
 1116  
 1117  
 1118  
 1119  
 1120  
 1121  
 1122  
 1123  
 1124  
 1125  
 1126  
 1127  
 1128  
 1129  
 1130  
 1131  
 1132  
 1133  
 1134  
 1135  
 1136  
 1137  
 1138  
 1139  
 1140  
 1141  
 1142  
 1143  
 1144  
 1145  
 1146  
 1147  
 1148  
 1149  
 1150  
 1151  
 1152  
 1153  
 1154  
 1155  
 1156  
 1157  
 1158  
 1159  
 1160  
 1161  
 1162  
 1163  
 1164  
 1165  
 1166  
 1167  
 1168  
 1169  
 1170  
 1171  
 1172  
 1173  
 1174  
 1175  
 1176  
 1177  
 1178  
 1179  
 1180  
 1181  
 1182  
 1183  
 1184  
 1185  
 1186  
 1187  
 1188  
 1189  
 1190  
 1191  
 1192  
 1193  
 1194  
 1195  
 1196  
 1197  
 1198  
 1199  
 1200  
 1201  
 1202  
 1203  
 1204  
 1205  
 1206  
 1207  
 1208  
 1209  
 1210  
 1211  
 1212  
 1213  
 1214  
 1215  
 1216  
 1217  
 1218  
 1219  
 1220  
 1221  
 1222  
 1223  
 1224  
 1225  
 1226  
 1227  
 1228  
 1229  
 1230  
 1231  
 1232  
 1233  
 1234  
 1235  
 1236  
 1237  
 1238  
 1239  
 1240  
 1241  
 1242  
 1243  
 1244  
 1245  
 1246  
 1247  
 1248  
 1249  
 1250  
 1251  
 1252  
 1253  
 1254  
 1255  
 1256  
 1257  
 1258  
 1259  
 1260  
 1261  
 1262  
 1263  
 1264  
 1265  
 1266  
 1267  
 1268  
 1269  
 1270  
 1271  
 1272  
 1273  
 1274  
 1275  
 1276  
 1277  
 1278  
 1279  
 1280  
 1281  
 1282  
 1283  
 1284  
 1285  
 1286  
 1287  
 1288  
 1289  
 1290  
 1291  
 1292  
 1293  
 1294  
 1295  
 1296  
 1297  
 1298  
 1299  
 1300  
 1301  
 1302  
 1303  
 1304  
 1305  
 1306  
 1307  
 1308  
 1309  
 1310  
 1311  
 1312  
 1313  
 1314  
 1315  
 1316  
 1317  
 1318  
 1319  
 1320  
 1321  
 1322  
 1323  
 1324  
 1325  
 1326  
 1327  
 1328  
 1329  
 1330  
 1331  
 1332  
 1333  
 1334  
 1335  
 1336  
 1337  
 1338  
 1339  
 1340  
 1341  
 1342  
 1343  
 1344  
 1345  
 1346  
 1347  
 1348  
 1349  
 1350  
 1351  
 1352  
 1353  
 1354  
 1355  
 1356  
 1357  
 1358  
 1359  
 1360  
 1361  
 1362  
 1363  
 1364  
 1365  
 1366  
 1367  
 1368  
 1369  
 1370  
 1371  
 1372  
 1373  
 1374  
 1375  
 1376  
 1377  
 1378  
 1379  
 1380  
 1381  
 1382  
 1383  
 1384  
 1385  
 1386  
 1387  
 1388  
 1389  
 1390  
 1391  
 1392  
 1393  
 1394  
 1395  
 1396  
 1397  
 1398  
 1399  
 1400  
 1401  
 1402  
 1403  
 1404  
 1405  
 1406  
 1407  
 1408  
 1409  
 1410  
 1411  
 1412  
 1413  
 1414  
 1415  
 1416  
 1417  
 1418  
 1419  
 1420  
 1421  
 1422  
 1423  
 1424  
 1425  
 1426  
 1427  
 1428  
 1429  
 1430  
 1431  
 1432  
 1433  
 1434  
 1435  
 1436  
 1437  
 1438  
 1439  
 1440  
 1441  
 1442  
 1443  
 1444  
 1445  
 1446  
 1447  
 1448

ミノ酸配列を有するV L C D R 1を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列を有するV H C D R 2及び配列番号5のアミノ酸配列を有するV L C D R 2を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列を有するV H C D R 2及び配列番号6のアミノ酸配列を有するV L C D R 3を含む。

【0098】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号3のアミノ酸配列を有するV H C D R 3及び配列番号4のアミノ酸配列を有するV L C D R 1を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号3のアミノ酸配列を有するV H C D R 3及び配列番号5のアミノ酸配列を有するV L C D R 2を含む。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、配列番号3のアミノ酸配列を有するV H C D R 3及び配列番号6のアミノ酸配列を有するV L C D R 3を含む。

10

【0099】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントをコードする、一般的には単離された、核酸分子を包含する。特定の実施形態においては、単離された核酸分子はインテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、L M 6 0 9又はV I T A X I N（登録商標）のアミノ酸配列を有する上記抗体をコードする。一実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、L M 6 0 9又はV I T A X I N（登録商標）のV Hドメインのアミノ酸配列を有するV Hドメインを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、A T C C（登録商標）に受託番号H B 9 5 3 7として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のV Hドメインのアミノ酸配列を有するV Hドメインを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。別の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、L M 6 0 9又はV I T A X I N（登録商標）のV Lドメインのアミノ酸配列を有するV Lドメインを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、A T C C（登録商標）に受託番号H B 9 5 3 7として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のV Lドメインのアミノ酸配列を有するV Lドメインを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表1に掲げたV L C D R 1のアミノ酸配列を有するV L C D R 1を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体であって、表1に掲げたV L C D R 2のアミノ酸配列を有するV L C D R 2を含む上記抗体をコードする。

20

30

40

【0100】

本発明は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表1に掲げたV H C D Rのいずれかのアミノ酸配列を有するV H C D Rを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする単離された核酸分子を包含する。特に本発明は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表1に掲げたV H C D Rのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3、4、5、又はそれ以上のV H C D Rを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする単離された核酸分子を包含する。一実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表1に掲げたV H C D R 1のアミノ酸配列を有するV H C D R 1を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコ

50

ードする。別の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V H C D R 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。さらに他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V H C D R 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。

#### 【0101】

本発明は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V L C D R のいずれかのアミノ酸配列を有する V L C D R を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする単離された核酸分子を包含する。特に本発明は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V L C D R のいずれかのアミノ酸配列を有する 1、2、3、又はそれ以上の V L C D R を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする単離された核酸分子を包含する。一実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V L C D R 1 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。別の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V L C D R 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。さらに他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、表 1 に掲げた V L C D R 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。

#### 【0102】

他の実施形態においては、単離された核酸分子は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントであって、L M 6 0 9 又は V I T A X I N (登録商標) の V H ドメインのアミノ酸配列を有する V H ドメインと、L M 6 0 9 又は V I T A X I N (登録商標) の V L ドメインのアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む上記抗体又は抗体フラグメントをコードする。他の実施形態においては、単離された核酸分子は、表 1 に掲げたアミノ酸配列を有する V H C D R 1、V L C D R 1、V H C D R 2、V L C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 3 ; 又はそれらのいずれかの組合せを含むインテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントをコードする。

#### 【0103】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する本明細書に記載した V H ドメイン、V H C D R、V L ドメイン、又は V L C D R の誘導体を含む上記抗体及び抗体フラグメントの使用を包含する。当業者に公知の標準技術を使用して、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列に、例えばアミノ酸置換をもたらす位置指定突然変異誘発及び P C R 媒介突然変異誘発を含めて、突然変異 (例えば付加、欠失及び / 又は置換) を導入することができる。好ましくは、該誘導体は、元の分子と比較して 25 個未満のアミノ酸置換、20 個未満のアミノ酸置換、15 個未満のアミノ酸置換、10 個未満のアミノ酸置換、5 個未満のアミノ酸置換、4 個未満のアミノ酸置換、3 個未満のアミノ酸置換又は 2 個未満のアミノ酸置換を含む。好ましい実施形態においては、該誘導体は、1 以上のの推定される非必須アミノ酸残基 (すなわち、抗体がインテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合するために重要でないアミノ酸残基) においてなされた保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を類似した電荷の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換える置換のことである。類似した電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

10

20

30

40

50

、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分枝側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)をもつアミノ酸が挙げられる。あるいは、突然変異を、飽和突然変異誘発などによりコード配列の全体又は部分に沿って無作為に導入し、得られる突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングして活性を保持する突然変異体を同定してもよい。突然変異誘発の後、コードされた抗体又は抗体フラグメントを発現させて、抗体又は抗体フラグメントの活性を確認することができる。

#### 【0104】

本発明は、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、可変軽鎖(VL)ドメイン及び/又は可変重鎖(VH)ドメインに1以上のアミノ酸残基置換をもつLM609又はVITAXIN(登録商標)のアミノ酸配列を含む上記抗体及び抗体フラグメントを包含する。本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、1以上のVL CDR及び/又は1以上のVH CDRに1以上のアミノ酸残基置換をもつLM609又はVITAXIN(登録商標)のアミノ酸配列を含む上記抗体及び抗体フラグメントを包含する。LM609又はVITAXIN(登録商標)のVHドメイン、VH CDR、VLドメイン及び/又はVL CDRに置換を含むように操作された抗体又は抗体フラグメントは、例えば、そのインテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する能力について(例えば、限定するものではないが、ELISA及びBIACOREを含むイムノアッセイにより)、又はその炎症性障害、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、若しくは癌、又はその症候を予防、管理、治療又は改善する能力について、*in vitro*及び*in vivo*で試験することができる。

#### 【0105】

特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC(登録商標)に受託番号HB9537として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列に、ストリンジентな条件下(例えば、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションと、これに続く0.2×SSC/0.1%SDS中約50~65での1回以上の洗浄)、高度にストリンジентな条件下(例えば、6×SSC中約45でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションと、これに続く0.1×SSC/0.2%SDS中約68での1回以上の洗浄)、又はその他の当業者に公知のストリンジентなハイブリダイゼーション条件下(例えば、Ausubel, F. M.ら, 編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの6.3.1-6.3.6及び2.10.3頁を参照)でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。

#### 【0106】

特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジентな条件下(例えば、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションと、これに続く0.2×SSC/0.1%SDS中約50~65での1回以上の洗浄)、高度にストリンジентな条件下(例えば、6×SSC中約45でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションと、これに続く0.1×SSC/0.2%SDS中約68での1回以上の洗浄)、又はその他の当業者に公知のストリンジентなハイブリダイゼーション条件下(例えば、Ausubel, F. M.ら, 編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの6.3.1-6.3.6及び2.10.3頁を参照)でLM609又はVITAXIN(登録商標)をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。

#### 【0107】

10

20

30

40

50

特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.2 \times$  SSC /  $0.1\%$  SDS 中約 50 ~ 65 での 1 回以上の洗浄）、高度にストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  SSC 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.1 \times$  SSC /  $0.2\%$  SDS 中約 68 での 1 回以上の洗浄）、又はその他の当業者に公知のストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下（例えば、Ausubel, F. M.ら, 編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York の 6.3.1-6.3.6 及び 2.10.3 頁を参照）で LM 609 又は VITAXIN (登録商標) の VH 及び / 又は VL ドメインをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる VH ドメインのアミノ酸配列又は VL ドメインのアミノ酸配列を含む。

#### 【0108】

別の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.2 \times$  SSC /  $0.1\%$  SDS 中約 50 ~ 65 での 1 回以上の洗浄）、高度にストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  SSC 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.1 \times$  SSC /  $0.2\%$  SDS 中約 68 での 1 回以上の洗浄）、又はその他の当業者に公知のストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で表 1 に挙げる VH CDR 又は VL CDR の 1 以上をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる VH CDR のアミノ酸配列又は VL CDR のアミノ酸配列を含む。

#### 【0109】

別の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.2 \times$  SSC /  $0.1\%$  SDS 中約 50 ~ 65 での 1 回以上の洗浄）、高度にストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  SSC 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.1 \times$  SSC /  $0.2\%$  SDS 中約 68 での 1 回以上の洗浄）、又はその他の当業者に公知のストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で、ATCC (登録商標) に受託番号 HB 9537 として寄託されている細胞系によって産生されるモノクローナル抗体の VH CDR 又は VL CDR のいずれか一つをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる VH CDR のアミノ酸配列又は VL CDR のアミノ酸配列を含む。

#### 【0110】

別の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.2 \times$  SSC /  $0.1\%$  SDS 中約 50 ~ 65 での 1 回以上の洗浄）、高度にストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  SSC 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く  $0.1 \times$  SSC /  $0.2\%$  SDS 中約 68 での 1 回以上の洗浄）、又はその他の当業者に公知のストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で表 1 に挙げる VH CDR 及び VL CDR のいずれか一つをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる VH CDR のアミノ酸配列及び VL CDR のアミノ酸配列を含む。

#### 【0111】

別の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ストリンジेंटな条件下（例えば、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナ

トリウム (SSC) 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く 0.2 × SSC / 0.1 % SDS 中約 50 ~ 65 での 1 回以上の洗浄)、高度にストリンジェントな条件下 (例えば、6 × SSC 中約 45 でのフィルター結合 DNA とのハイブリダイゼーションと、これに続く 0.1 × SSC / 0.2 % SDS 中約 68 での 1 回以上の洗浄)、又はその他の当業者に公知のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ATCC (登録商標) に受託番号 HB 9537 として寄託されている細胞系によって産生されるモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる VH CDR のアミノ酸配列及び VL CDR のアミノ酸配列を含む。

#### 【0112】

特定の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC (登録商標) に受託番号 HB 9537 として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のアミノ酸配列と、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体は、VITAXIN (登録商標) のアミノ酸配列と、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。2 つのアミノ酸配列間の同一性 % の決定は、BLAST タンパク質サーチを含む、当業者に公知の任意の方法によって決定することができる。

#### 【0113】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、VITAXIN (登録商標) の VH ドメインと、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一である VH ドメインのアミノ酸配列を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC (登録商標) に受託番号 HB 9537 として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体の VH ドメインと、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一である VH ドメインのアミノ酸配列を含む。

#### 【0114】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、表 1 に掲げた VH CDR の 1 以上と、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一である 1 以上の VH CDR のアミノ酸配列を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC (登録商標) に受託番号 HB 9537 として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体の VH CDR のいずれか 1 つと、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一である 1 以上の VH CDR のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

## 【0115】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、VITAXIN（登録商標）のVLDドメインと、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるVLDドメインのアミノ酸配列を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC（登録商標）に受託番号HB9537として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のVLDドメインと、

10

## 【0116】

他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、表1に掲げたVLCDRのいずれかと、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一である1以上のVLCDRのアミノ酸配列を含む。他の実施形態においては、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、ATCC（登録商標）に受託番号HB9537として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のVLCDRのいずれか1つと、

20

## 【0117】

本発明は、インテグリン  $v_3$  との結合について本明細書に記載した抗体及び抗体フラグメントと競合する抗体を包含する。特定の実施形態においては、本発明は、インテグリン  $v_3$  との結合についてLM609又はその抗原結合フラグメントと競合する抗体及び抗体フラグメントを包含する。好ましい実施形態においては、インテグリン  $v_3$  との結合についてVITAXIN（登録商標）又はその抗原結合フラグメントと競合する抗体及び抗体フラグメントを包含する。

30

## 【0118】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  との結合について、LM609若しくはVITAXIN<sup>TM</sup>のVHドメイン、又はLM609若しくはVITAXIN<sup>TM</sup>のVHドメインを含む（あるいはからなる）タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドと競合するVHドメインを含む複数のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドを包含する。本発明はまた、インテグリン  $v_3$  との結合について、LM609若しくはVITAXIN<sup>TM</sup>のVLDドメイン、又はLM609若しくはVITAXIN<sup>TM</sup>のVLDドメインを含む（あるいはからなる）タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドと競合するVLDドメインを含む複数のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドを包含する。

40

## 【0119】

本発明はまた、インテグリン  $v_3$  との結合について、表1に掲げたVHCDR、又は表1に掲げたVHCDRを含む少なくとも1つのVHCDRを含む（あるいはからなる）タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドと競合する少なくとも1つのVHCDRを含む複数のタンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、あるいはインテグリン  $v_3$  との結合についてATCC<sup>TM</sup>に受託番号HB9537として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体のVHCDRと競合するVHCDRを包含する。本発

50

明はまた、インテグリン  $\nu_3$  との結合について表 1 に掲げた V L C D R、又は表 1 に掲げた V L C D R を含む V H C D R を含む (あるいはからなる) タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドと競合する V H C D R を含む複数のタンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、あるいはインテグリン  $\nu_3$  との結合について A T C C (登録商標) に受託番号 H B 9 5 3 7 として寄託された細胞系が産生するモノクローナル抗体の V L C D R と競合する少なくとも 1 つの V L C D R を含む複数のタンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドを包含する。

【0120】

インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、改変された、すなわち、いずれかのタイプの分子と抗体との共有結合により、改変された誘導体を含む。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解切断、細胞リガンド若しくは他のタンパク質との連結、その他により改変されている抗体又は抗体フラグメントが含まれる。多数の化学的改変のいずれも、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含めて、公知技術により実施することができる。さらに、上記誘導体は 1 種以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

10

【0121】

本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体であって、当業者に公知のフレームワーク領域を含む上記抗体フラグメントも提供する。非限定的な例として、フレームワーク領域は、当技術分野で公知の方法を用いて、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いて、ヒト生殖系免疫グロブリン配列から作製するか又はそれに由来するものとすることができる。ヒト生殖系免疫グロブリン配列は、例えば N C B I ウェブサイト (Kawasaki ら、2001, Eur. J. Immunol. 31:1017-1028; Schable and Zachau, 1993, Biol. Chem. Hoppe Seyler 374:1001-1022; Matsuda ら、1998, J. Exp. Med., 188:1973-1975 も参照のこと) に見出すことができる。好ましくは、本発明の抗体のフラグメント領域はヒトである。特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体は V I T A X I N (登録商標) のフレームワーク領域を含む。

20

【0122】

本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、フレームワーク領域に 1 以上の突然変異 (例えば、1 以上のアミノ酸残基置換) をもつ V I T A X I N (登録商標) のアミノ酸配列を含む上記抗体も包含する。ある特定の実施形態においては、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、V H 及び/又は V L ドメインのフレームワークに 1 以上のアミノ酸残基置換をもつ V I T A X I N (登録商標) のアミノ酸配列を含む。

30

【0123】

本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、可変部及びフレームワーク領域に、1 以上の突然変異 (例えば、1 以上のアミノ酸残基置換) をもつ V I T A X I N (登録商標) のアミノ酸配列を含む上記抗体及び抗体フラグメントも包含する。

40

【0124】

本発明はまた、当業者に公知の定常領域を含む、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを包含する。例えば、Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233; Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212; 国際公開 W O 8 6 / 0 5 8 0 7 号; 国際公開 W O 8 9 / 0 1 0 3 6 号; 及び米国特許第 5, 1 2 2, 4 6 4 号を参照のこと。好ましくは、本発明の抗体の定常領域はヒトである。

【0125】

本発明はまた、インテグリン  $\nu_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントと異種ポリペプチドを含む融合タンパク質を包含する。好ましくは、抗体又は抗体フラグメントと融合させる異種ポリペプチドは、抗体又は抗体フラグメントを血小板、単球、

50

マクロファージ、内皮細胞、破骨細胞、活性化T細胞、及び/又はB細胞にターゲティングするために有用である。

【0126】

5.1.1.1. インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に対して免疫特異的な抗体を同定する方法

本発明は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に対して免疫特異的な抗体及び抗体フラグメント、特に、VITAXIN（登録商標）及び/又はLM609と同じエピトープに特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを同定するための方法を提供する。ヒト<sub>3</sub>鎖の171、173及び/又は174番目の残基の変異は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> ヘテロダイマーに対するVITAXIN（登録商標）抗体及び/又はLM609抗体の結合を破壊することが見出されている。VITAXIN（登録商標）及びLM609はマウスインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> に結合しないが、VITAXIN（登録商標）及びLM609は、ヒト<sub>3</sub>鎖のアミノ酸164~202に対応するマウス<sub>3</sub>鎖の領域がヒト<sub>3</sub>鎖のアミノ酸164~202で置換された改変マウスインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> には結合することが見出されている。特定の実施形態において、アミノ酸置換は、例えば、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> のリガンド特異性を変化させるため及び/又はこれらのサブユニット鎖のヘテロダイマー化を破壊するために、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> のサブユニット中でなされる。好ましくは、このインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> はヒトである。特定の実施形態において、このようなアミノ酸置換は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> の特定のアンタゴニストと特定のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> エピトープとの特異的相互作用を破壊する。好ましい実施形態において、これらのアミノ酸置換は、リガンド結合特異性、好ましくはLM609及び/又はVITAXIN（登録商標）のリガンド結合特異性を付与するインテグリンサブユニットの領域内、特にヒト<sub>3</sub>の164~202番目の残基でなされる。あるいは、ヒト<sub>3</sub>鎖の164~202番目の残基に対応するマウス<sub>3</sub>鎖残基が、ヒト<sub>3</sub>の164~202番目の残基で置換される。このようなマウス-ヒトキメラは、ヒト<sub>3</sub>の領域164~202に結合するがマウスインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> には結合しないアンタゴニストについてスクリーニングするために使用することができる。

【0127】

好ましい実施形態において、これらのアミノ酸置換は、<sub>3</sub>サブユニット中でなされる。特定の実施形態において、ヒト<sub>3</sub>残基は、表2中に記載されるようにラット残基で置換される。一実施形態において、位置171におけるヒト残基Gluのラット残基Glnへの置換（「変異A」）は、LM609へのインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> の結合を破壊する。この同じ変化は、VITAXIN（登録商標）への結合を破壊する。別の実施形態において、それぞれ位置173及び位置174におけるヒト残基Leu及びGluのラット残基Ile及びLysへの置換（「変異B」）は共に、VITAXIN（登録商標）への結合を破壊し、抗ラット<sub>3</sub>抗体への結合を増大させる。なお別の実施形態において、それぞれ位置179及び位置182におけるヒト残基Asp及びThrのラット残基Thr及びSerへの置換（「変異C」）は、抗ラット<sub>3</sub>抗体に対する結合特異性を付与する。変異A及び変異Cの組み合わせ（3つの置換された残基）は、マウス抗ラット<sub>3</sub>抗体に対する結合特異性を付与し、VITAXIN（登録商標）に対する結合を破壊する。特定の好ましい実施形態において、アミノ酸171、173及び174は、VITAXIN（登録商標）に対する結合を破壊するために置換することができる。代替的な好ましい実施形態において、アミノ酸171、173、174、179及び182は、LM609及びヒト化抗インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>抗体（例えば、VITAXIN（登録商標））に対するインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の結合を破壊するために置換することができる。このような置換は好ましい例であり、限定ではない。このような置換されたサブユニットは例示に過ぎず限定するものではない。抗体結合を担うと同定された任意のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>領域が、種々の抗体の結合特異性を特徴付けるため及び同じ類似の結合特異性を有する抗体についてスクリーニングするために、置換された残基、欠失された残基又は挿入された残基によって変更することができる。

【0128】

インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub> のアミノ酸置換されたサブユニットは、野生型インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>

3 に結合するが改変形態には結合しないモノクローナル抗体、又はヒト  $v_3$  由来の対応する領域で置換された領域を有するマウス  $v_3$  インテグリンに結合するが野生型マウスインテグリン  $v_3$  には結合しないモノクローナル抗体を同定することによって、特定のエピトープに対する特異的親和性を有する抗体をスクリーニングするために使用することができる。さらに、本発明は、ヘテロダイマー化した  $v_3$  に結合するが、ヘテロダイマー中に含まれていない場合には  $v$  鎖にも  $3$  鎖にも結合しないモノクローナル抗体を同定するための方法を提供する。このようなスクリーニングは、例えば、変異体  $v_3$  又は個々の  $v$  鎖若しくは  $3$  鎖を組換え的に発現するために野生型インテグリン  $v_3$  を発現しない細胞システムを使用して、当該分野で公知の抗体特異性をアッセイするための任意の慣用的な方法によって達成することができる。このようなスクリーニング方法から同定された抗体は、インテグリン  $v_3$  媒介性の疾患及び障害、例えば限定されるものではないが、炎症性疾患、自己免疫疾患、骨代謝に関連する障害、血管形成に関連する障害、 $v_3$  の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、及び癌などの予防、管理及び治療のために有用であり得る。このような抗体が、本発明によって企図される方法及び組成物において使用することができることもまた企図される。好ましくは、これらの抗体は、LM609でもVITAXIN(登録商標)でも、1以下、2以下、5以下、8以下又は10以下のアミノ酸の置換、欠失又は挿入を有するLM609又はVITAXIN(登録商標)のCDR(すなわち、CDRの1つ、2つ、3つ、4つ若しくは5つ又は重鎖のCDR3)を有する抗体でも、それらの抗原結合部位でもない。

10

20

【表2】

ヒト $\beta 3$	変異A	変異B		変異C	
変異体	(Glu-Gln)	(Leu-Ile),(Glu-Lys)		(Asp-Thr),(Thr-Ser)	
A1(A,C)	E171Q			D179T	T182S
A6	E171Q				
B1		L173 I	E174K		
C14				D179T	T182S
C16				D179T	T182S
ABC17	E171Q	L173 I	E174K	D179T	T182S

30

## 【0129】

5.1.1.2 増加した半減期を有する、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体

本発明は、長い *in vivo* 半減期を有する、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを提供する。特に、本発明は、インテグリン  $v_3$  と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントであって、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおいて、3日より長い、7日より長い、10日より長い、好ましくは15日より長い、25日より長い、30日より長い、35日より長い、40日より長い、45日より長い、2ヶ月より長い、3ヶ月より長い、4ヶ月より長い、又は5ヶ月より長い半減期を有する上記抗体及び抗体フラグメントを提供する。

40

## 【0130】

抗体(例えば、モノクローナル抗体、及び一本鎖抗体)又は抗体フラグメント(例えば、Fabフラグメント)の *in vivo* 血清循環を延長させるために、例えば、高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などの不活性ポリマー分子を、多機能リンカーを用いて又は用いないで、PEGと抗体のN若しくはC末端との位置指定コンジュゲーションを介して又はリシン残基に存在する - アミノ基を介して、抗体と結合させることができる。生物学的活性の低下を最小限に抑える直鎖又は分枝鎖ポリマー誘導体化を利用しうる。コンジュゲーションの程度をSDS-PAGE及び質量分析により綿密にモニターして、PEG分子と抗体との適切なコンジュゲーションを確保することができる。未反応PEGは、サイズ排除又はイオン交換クロマトグラフィーにより抗体-PEGコンジュゲートから分離することができる。PEG誘導体化抗体又は抗体フラグメントは、結合活性並び

50

に *in vivo* 効力について、当業者に公知の方法を用いて、例えば、本明細書に記載のイムノアッセイにより試験することができる。

【0131】

増加した *in vivo* 半減期を有する抗体はまた、1以上のアミノ酸改変（すなわち、置換、挿入若しくは欠失）を IgG 定常ドメイン又はその FcRn 結合フラグメント（好ましくは、Fc 又はヒンジ-Fcドメインフラグメント）中に導入して作製することもできる。例えば、国際公開 WO 98/23289 号及び WO 97/34631 号；及び米国特許第 6,277,375 号を参照されたい（これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全文が組み入れられる）。

【0132】

更に、抗体又は抗体フラグメントを *in vivo* でより安定にする、あるいは *in vivo* における半減期をより長くするために、抗体又は抗体フラグメントをアルブミンにコンジュゲートすることができる。その技術は当分野において周知である。例えば、それぞれ参照によりその全体を本明細書中に組み入れる、国際公開 WO 93/15199 号、WO 93/15200 号、及び WO 01/77137 号、及びヨーロッパ特許 EP 413,622 号を参照のこと。

【0133】

5.1.1.3 抗体コンジュゲート

本発明は、1以上の部分、例えば限定されるものではない、ペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、擬似薬剤、合成薬剤、無機分子、及び有機分子などにコンジュゲートさせた抗体又は抗体フラグメントの使用を包含する。

【0134】

本発明は、抗体又はそのフラグメントを、異種ポリペプチド若しくはタンパク質（又はその断片、好ましくは、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個又は少なくとも100個のアミノ酸のポリペプチド）と組換えにより融合させた、又は化学的にコンジュゲートさせた（共有結合及び非共有結合によるコンジュゲーションを含む）、抗体又は抗体フラグメントの使用を包含する。融合は、直接的である必要は必ずしもないが、リンカー配列を介して生じ得る。例えば、抗体又は抗体フラグメントは、該抗体又は抗体フラグメントを特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合又はコンジュゲートすることにより、*in vitro* 又は *in vivo* のいずれかで特定の細胞型に異種ポリペプチドを標的化しうる。異種ポリペプチドに融合又はコンジュゲートさせた抗体又は抗体フラグメントはまた、*in vitro* イムノアッセイ、当技術分野で公知の方法を用いた精製方法において用いることも可能である。例えば国際公開 WO 93/21232 号；欧州特許第 EP 439,095 号；Naramuraら、1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99；米国特許第 5,474,981 号；Gilliesら、1992, *PNAS* 89:1428-1432；Fellら、1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452を参照のこと（これらはその全体を参照により本明細書に組み入れる）。

【0135】

本発明は、抗体フラグメントに融合させた又はコンジュゲートさせた異種タンパク質、ペプチド又はポリペプチドを含む組成物をさらに含む。例えば、異種ポリペプチドは、抗体の抗原結合フラグメント（例えば Fab フラグメント、Fd フラグメント、Fv フラグメント、F(ab)<sub>2</sub> フラグメント、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、VL CDR、又はそのフラグメント）に融合させる又はコンジュゲートさせうる。ポリペプチドを抗体又は抗体フラグメントに融合又はコンジュゲートさせるための方法は当分野で公知である。例えば米国特許第 5,336,603 号、5,622,929 号、5,359,046 号、5,349,053 号、5,477,851 号、及び 5,112,946 号；ヨーロッパ特許 EP 307,434 号及び EP 367,166 号；国際公開 WO 96/04388 号及び WO 91/06570 号；Ashkenaziら、1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539；Zhengら、1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600；Vilら、1992, P

10

20

30

40

50

roc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (これらの文献を参照によりその全体を組み入れる)を参照のこと。

【0136】

例えばVITAXIN(登録商標)又は抗インテグリン $\nu_3$ 抗体若しくは抗体フラグメントの更なる融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソンシャフリング、及び/又はコドンシャフリング(まとめて「DNAシャフリング」という)の技術を用いて生成することができる。DNAシャフリングを用いて、本発明の抗体(例えばより高い親和性及びより低い解離速度を有する抗体又は抗体フラグメント)の活性を変えることができる。概説として、米国特許第5,605,793号、5,811,238号、5,830,721号、5,834,252号及び5,837,458号、及びPattenら, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hanssonら, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; Lorenzo及びBlasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313(これらの特許及び発表を参照によりその全体を本明細書に組み入れる)を参照のこと。抗体若しくはそのフラグメント、又はコードされた抗体若しくはそのフラグメントを、組み換え前にエラープロードPCR、ランダムヌクレオチド挿入、又は他の方法によるランダム突然変異誘発に供することによって変えることができる。インテグリン $\nu_3$ と免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドの1以上の部分を、1以上の異種分子の1以上の成分、モチーフ、切片(section)、部分、ドメイン、断片等と組み換えることができる。

10

【0137】

さらに、抗体又は抗体フラグメントは、精製を容易にするためにペプチドなどのマーカール配列と融合させることができる。特定の実施形態においては、マーカールアミノ酸配列は、市販される多数のものの中で、とりわけpQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)で提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。Gentzら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されるように、例えば、ヘキサヒスチジンペプチドは、融合タンパク質の精製にとって好都合である。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定するものではないが、インフルエンザ・ヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応するヘマグルチニン「HA」タグ(Wilsonら, 1984, Cell 37: 767)、及び「flag」タグが挙げられる。

20

【0138】

別の実施形態において、本発明の抗体又は抗体フラグメント(その変異型を含む)を、診断剤又は検出可能な薬剤にコンジュゲートさせる。こうした抗体は、特定の治療の効力を決定する等の、臨床試験手順の一部として、炎症性疾患、自己免疫疾患、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌の発症、発現、進行及び/又は重篤度をモニター又は予知するのに有用であり得る。こうした診断及び検出は、限定するものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼ等の種々の酵素; 限定するものではないが、ストレプトアビジン/ビオチン、及びアビジン/ビオチン等の人工(prosthetic)基; 限定するものではないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド又はフィコエリトリン等の蛍光物質; 限定するものではないが、ルミノール等の発光物質; 限定するものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン等の生物発光物質; 限定するものではないが、ヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、硫黄( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、インジウム( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、及びテクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム( $^{201}\text{Tl}$ )、ガリウム( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^3$

30

40

50

<sup>2</sup>P、<sup>153</sup>Gd、<sup>169</sup>Yb、<sup>51</sup>Cr、<sup>54</sup>Mn、<sup>75</sup>Se、<sup>113</sup>Sn、及び<sup>117</sup>Ti等の放射性物質；種々の陽電子放射断層撮影法を用いた陽電子放射金属、非放射性常磁性金属イオン、及び特定の放射性同位体に放射標識される、又はコンジュゲートされる分子、を含むが、これらに限定されない検出可能な物質に抗体又は抗体フラグメントをカップリングさせることによって達成することができる。

【0139】

本発明はさらに、治療用部分にコンジュゲートした抗体又は抗体フラグメントの使用も包含する。抗体又は抗体フラグメントは、例えば、細胞毒、例えば、細胞増殖抑制剤、若しくは細胞破壊薬、治療薬、又は放射性金属イオン、例えば、放射体などの治療用部分に結合することができる。細胞毒又は細胞毒性薬剤には、細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。これらの例には、パクリタクセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポサイド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジオキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロ試験ステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン、並びにこれらの類似体又はホモログが含まれる。治療用部分には、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、及び6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロエタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びシスジクロロジアミン、プラチナ（II）（DDP）、シスプラチン）；アントラサイクリン系（例えば、ダウノルピシン（以前ダウノマイシン）、ドキシソルピシン）；抗生物質類（例えば、ダクチノマイシン（以前アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン（AMC））；アウリスタチン分子（例えば、アウリスタチンPHE、プリオスタチン1、ソラスタチン10（Woykeら、Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8(2002), Woykeら、Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4(2001), Mohammadら、Anticancer Drugs 12:735-40(2001), Wallら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80(1999), Mohammadら、Int. J. Oncol. 15:367-72(1999)）を参照。これらすべてを参照により本明細書に組み入れる）；有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチン及びピンブラスチン）；ホルモン（例えば、糖質コルチコイド、プロジェスタチン、アンドロゲン、及びエストロゲン）；DNA修復酵素阻害剤（例えば、エトポシド又はトポテカン）；キナーゼ阻害剤（例えば、化合物ST1571、メシル酸イマチニブ（Kantarjianら、Clin Cancer Res. 8(7):2167-76(2002)）、並びに、米国特許第6,245,759号、第6,399,633号、第6,383,790号、第6,335,156号、第6,271,242号、第6,242,196号、第6,218,410号、第6,218,372号、第6,057,300号、第6,034,053号、第5,985,877号、第5,958,769号、第5,925,376号、第5,922,844号、第5,911,995号、第5,872,223号、第5,863,904号、第5,840,745号、第5,728,868号、第5,648,239号、及び第5,587,459号に開示された化合物）、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、R115777、BMS214662、並びに米国特許第6,458,935号、第6,451,812号、第6,440,974号、第6,436,960号、第6,432,959号、第6,420,387号、第6,414,145号、第6,410,541号、第6,410,539号、第6,403,581号、第6,399,615号、第6,387,905号、第6,372,747号、第6,369,034号、第6,362,188号、第6,342,765号、第6,342,487号、第6,300,501号、第6,268,363号、第6,265,422号、第6,248,756号、第6,239,140号、第6,232,338号、第6,228,865号、第6,228,856号、第6,225,322号、第6,218,406号、第6,211,193号、第6,187,786号、第6,169,096

10

20

30

40

50

号、第6,159,984号、第6,143,766号、第6,133,303号、第6,127,366号、第6,124,465号、第6,124,295号、第6,103,723号、第6,093,737号、第6,090,948号、第6,080,870号、第6,077,853号、第6,071,935号、第6,066,738号、第6,063,930号、第6,054,466号、第6,051,582号、第6,051,574号、及び第6,040,305号に開示された化合物)；トポイソメラーゼ阻害剤(例えば、カンプトテシン、イリノテカン、SN38、トポテカン、9アミノカンプトテシン、GG211(GI147211)、DX8951f、IST622、ルピテカン、ピラゾロアクリジン、XR5000、サントピン、UCE6、UCE1022、TAN1518A、TAN1518B、KT6006、KT6528、ED110、NB506、ED110、NB506、レベッカマイシン、及びブルガレイン)、ヘキスト色素33342及びヘキスト色素33258、ニチジン(nitidine)、ファガロニン(fagaronine)、エピベルベリン(epiberberine)、コラリン(coraline)、ベータラパコン、BC-4-1、ビスホスフォネート(例えば、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、チルドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルバンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート)；HMG-CoAレダクターゼ阻害剤(例えば、ロバスタチン、シムバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、セリバスタチン、レスコール、ルピトール、ロスバスタチン及びアトルバスタチン)；アンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、米国特許第6,277,832号、第5,998,596号、第5,885,834号、第5,734,033号及び第5,618,709号に開示された)；アデノシンデアミナーゼ阻害剤(例えば、フルダラビンリン酸(Fludarabine phosphate)及び2-クロロデオキシアデノシン)；イブリツモマブ・チウキセタン(ibritumomab tiuxetan)(Zevalin(登録商標))；トシツモマブ(BEXXAR(登録商標))並びにそれらの製薬上許容される塩、溶媒和化合物、包接化合物、及びプロドラッグが挙げられる。

#### 【0140】

さらに、抗体は、所与の生物学的反応を改変する治療用部分又は薬剤部分にコンジュゲートさせてもよい。治療用部分又は薬剤部分は、解釈を古典的な化学治療薬に限定すべきではない。例えば、薬剤部分は、望ましい生物学的活性を保持するタンパク質、ポリペプチド又はペプチドであってもよい。そのようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、プソイドモナスエキソトキシン、コレラトキシン、又はジフテリアトキシンなどの毒素、TNF、インターフェロン、インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベータ、アポトーシス薬、例えば、TNF-、TNF-、AIMI(国際公開WO97/33899号参照)、AIMII(国際公開WO97/34911号参照)、Fasリガンド(Takahashiら, 1994, J. Immunol., 6:1567-1574)、VEGF(国際公開WO99/23105号参照)、抗血管形成薬、例えばアンギオスタチン、エンドスタチン又は凝血経路の一成分(例えば、組織因子)、又は、例えば、リンフォカイン(例えば、インターロイキン- (「IFN-」)インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-5(「IL-5」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、インターロイキン-7(「IL-7」)、インターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-12(IL-12)、インターロイキン-15(「IL-15」)、インターロイキン-23(「IL-23」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、及び顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、又は増殖因子(例えば、成長ホルモン(「GH」))などの生物反応調節剤、あるいは血液凝固剤(例えば、カルシウム、ビタミンK、組織因子、例えば、限定されるものでないが、ハーゲマン因子(第XII因子)、高分子量キニノーゲン(HMWK)、プレカリクレイン(PK)、血液凝固タンパク質第II因子(プロトロンビン)、第V因子、第XIIa因子、第VII因子、第XIIIa因子、第XIII因子、第XIIIa因子、第XIII因子、第XIIIa因子、第XIII因子、リン

脂質、フィブリノーゲンの及び鎖由来の線維素ペプチドA及びB、フィブリンモノマー)であってもよい。

【0141】

さらに、放射性金属イオン、例えば、 $^{213}\text{Bi}$ などの放射体、又は、限定されるものではないが、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{131}\text{Lu}$ 、 $^{131}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{Ho}$ 、 $^{131}\text{Sm}$ を含む放射性金属イオンをポリペプチドに結合するのに有用な大環状キレート化剤などの治療用部分に、抗体又は抗体フラグメントを結合することができる。ある実施形態では、大環状キレート化剤は、リンカーを介して抗体に結合可能な1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''四酢酸(DOTA)である。そのようなリンカー分は、一般的に当技術分野で公知であり、Denardoら、1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Petersonら、1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; 及び Zimmermanら、1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。これらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れる。

【0142】

抗体又は抗体フラグメントに治療用部分を結合する技法は周知であり、例えば、Arnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら編、243-56(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、"Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery第2版 Robinsonら編、623-53(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら編、475-506(1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら編、303-16(Academic Press 1985), 及び Thorpeら、1982, Immunol. Rev. 62:119-58を参照。

【0143】

あるいは、Segalによって、米国特許第4,676,980号(この全体を参照により本明細書に組み入れる)に記載されるように、二次抗体に抗体又は抗体フラグメントを結合させて、抗体異種コンジュゲートを形成させることもできる。

【0144】

抗体及び抗体フラグメントはまた、固相担体に結合させてもよく、これは特に、標的抗原のイムノアッセイ又は精製に有用である。そのような固相担体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニール又はポリプロピレンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0145】

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントにコンジュゲートされる治療用部分又は薬剤は、被験体における特定の障害に望ましい予防効果又は治療効果を達成するように選ばれるべきである。どの治療用部分又は薬剤にインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントに結合するかを決める際、臨床医又は他の医学専門家は、疾患の性質、疾患の重篤度及び被験体の状態を考慮するべきである。

【0146】

5.2. 抗体製剤の調製方法

本発明は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ と免疫特異的に結合する抗体、又はその誘導體、類似体若しくはフラグメントの液体製剤を調製する方法を提供する。図1は精製抗インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 抗体を調製する概要を示す概略図である。本発明の液体製剤を調製する方法は、ならし培地(培養物の単一のロット又はプールされたロットのいずれか)から抗体又は抗体フラグメントを精製するステップ、並びに、抗体又は抗体フラグメントを含有する分画を、最終抗体濃度が約15mg/ml、約20mg/ml、約30mg/ml、約40mg/ml、約50mg/ml、約60mg/ml、約70mg/ml、約80mg/ml、約90mg/ml、約100mg/ml、約150mg/ml、約200mg/ml

、約250mg/ml、又は約300mg/mlとなるように濃縮するステップ、並びに同じ膜を用いて濃縮抗体分画を製剤緩衝液中で透析ろ過するステップを含む。インテグリン $\alpha_3$ と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含有するならし培地はCUNOろ過に供し、ろ過抗体をHS50カチオン交換クロマトグラフィーに供する。HS50カチオン交換クロマトグラフィーからの分画は、続いてrProteinAアフィニティクロマトグラフィーに供し、続いて低pH処理を行う。低pH処理の後、抗体又は抗体フラグメントの分画をsuper Q650アニオン交換クロマトグラフィーに供し、その後ナノろ過を行う。ナノろ過後に得られる抗体又は抗体フラグメントの分画は、続いてディアフィルトレーションに供して、抗体又は抗体フラグメントの分画を濃縮し、同じ幕を用いて製剤緩衝液とする。

10

## 【0147】

本発明の製剤緩衝液は、約1mMから約100mM、約5mMから約50mM、約10mMから約30mM、又は約10mMから約25mMの濃度でヒスチジンを含む。特定の実施形態においては、本発明の製剤緩衝液は、約10mM、約12mM、約15mM、約20mM、又は約25mMの濃度でヒスチジンを含む。製剤は、さらに濃度150mM未満、100mM未満、75mM未満、50mM未満、10mM未満、3.0mM未満、又は2.0mM未満のグリシンを含むことができる。製剤中のグリシンの量は、抗体がその等電点において沈殿するのを避けるため、有意な緩衝作用が起きないようにすべきである。製剤のpHは、約5.0~約7.0、好ましくは約5.5~約6.5、より好ましくは約5.8~約6.2の範囲でよく、そして、最も好ましくは約6.0である。特定の抗体にとって適切なpHを得るためには、まず、所望のpHより高いpHの緩衝水溶液が得られるように、ヒスチジン（及び、グリシンが添加されている場合には、グリシンも）を水に溶解し、その後HClを添加して、pHを所望の値まで低下させるのが好ましい。このようにして、無機塩の形成（例えば、ヒスチジンの供給源に塩酸ヒスチジンを用い、NaOHを添加することでpHを所望の値に引き上げた際のNaCl形成）を避けることができる。

20

## 【0148】

本発明の液体製剤は、1回の使用のための液体製剤を1アリコート含むバイアルを調製することによって、単位投与剤形として調製することができる。例えば、1バイアルあたりの1単位用量は、濃度約15mg/mlから約300mg/mlの範囲にある、異な

30

## 【0149】

本発明の液体製剤は、無菌ろ過、放射線照射などを含めた、様々な滅菌方法で無菌化できる。最も好ましい実施形態では、透析ろ過された抗体製剤を、あらかじめ滅菌してある0.2 $\mu$ mのマイクロフィルターを用いて、ろ過滅菌する。本発明の滅菌液体製剤は、疾患又は障害（例えば、炎症性障害、自己免疫障害、異常な骨代謝に関連する障害、インテグリン $\alpha_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌）、又はその1以上の症候を、予防、治療、又は改善するために、被験体に投与することができる。

40

## 【0150】

本発明は凍結乾燥されていない液体製剤を対象としているが、均等物の目的として、所望であれば本発明の製剤を凍結乾燥してもよいことに注意すべきである。したがって、そのような凍結乾燥した製剤は好ましくないが、本発明は、本発明の製剤の凍結乾燥した形態も包含する。

## 【0151】

## 5.3 抗体の作製方法

抗原と免疫特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントは、抗体を合成するための当技

50

術分野で公知の任意の方法により、特に化学合成又は好ましくは組換え発現技術により製造することができる。

【0152】

抗原に対して免疫特異的なポリクローナル抗体は、当技術分野で公知の様々な方法により製造することができる。例えば、ヒト抗原を、限定されるものでないが、ウサギ、マウス、ラットその他を含む様々な宿主動物に投与して、ヒト抗原に対して特異的なポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘導することができる。宿主種に依存して様々なアジュバントを使用して、免疫応答を増加させてもよく、かかるアジュバントとしては、限定されるものでないが、フロイントのアジュバント（完全及び不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、及びBCG（カルメット・ゲラン桿菌（*bacille Calmette-Guerin*））及びコリネバクテリウム・パルブム（*corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられる。かかるアジュバントもまた当技術分野では公知である。

10

【0153】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、及びファージディスプレイ技術、又はそれらの組合せの利用を含む、当技術分野で公知の多種多様な技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であって、例えば、Harlowら、「Antibodies: A Laboratory Manual」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988）；Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas」563-681（Elsevier, N.Y., 1981）、及びHarlowら、「Using Antibodies: A Laboratory Manual」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999）（前記参考文献は、参照によりその全文が組み入れられる）に教示される方法をはじめとするハイブリドーマ技術を利用して製造することができる。本明細書に用いる用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術によって製造される抗体に限定されるものではない。用語「モノクローナル抗体」は、それを製造する方法ではなく、任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンを含む単クローンから得られる抗体を意味する。

20

【0154】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を製造しスクリーニングする方法は、当技術分野では日常的に利用されかつ公知である。簡単に説明すると、マウスを、非マウス抗原を用いて免疫感作することができ、そして免疫応答が一度検出されれば（例えば、その抗原に特異的な抗体がマウス血清中に検出されれば）、マウス脾臓を採取して脾細胞を単離する。次いでその脾細胞を公知の技術により任意の適当な骨髄腫細胞、例えばATCCから入手しうる培養細胞株SP20由来の細胞と、融合する。ハイブリドーマを選択し、限定希釈によりクローン化する。さらに、RIMMS（反復免疫複数部位）技法を用いて動物を免疫してもよい（Kilpatrickら、1997, Hybridoma 16:381-9、参照によりその全体を組み入れる）。次いで、ハイブリドーマクローンを、当技術分野で公知の方法により、本発明のポリペプチドと結合できる抗体を分泌する細胞についてアッセイする。一般的に高レベルの抗体を含有する腹水液は、マウスを陽性ハイブリドーマクローンをを用いて免疫感作することにより生成することができる。

30

40

【0155】

本発明は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することによりモノクローナル抗体を作製する方法、並びに該方法により作製される抗体を提供するものであり、好ましくは、上記方法におけるハイブリドーマは、非マウス抗原を用いて免疫感作したマウスから単離した脾細胞を骨髄腫細胞と融合し、次いで融合から得たハイブリドーマを、その抗原と結合しうる抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることにより作製されるものである。

【0156】

特異的な特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、当業者に公知のいかなる技術により作製してもよい。例えば、本発明のFab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、

50

パペイン（F a bフラグメントを生成する）又はペプシン（F（a b'）2フラグメントを生成する）などの酵素を用いて、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により生成することができる。F（a b'）2フラグメントは可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のC H 1ドメインを含有する。さらに、本発明の抗体はまた、当技術分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することができる。

#### 【0157】

ファージディスプレイ法においては、機能性抗体ドメインが、同ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面に提示される。特に、V H及びV LドメインをコードするDNA配列を、動物c DNAライブラリー（例えば、罹患組織のヒト又はマウスc DNAライブラリー）から増幅する。V H及びV LドメインをコードするDNAをPCRによりs c F vリンカーと一緒に組換えて、ファージミドベクター中にクローニングする。そのベクターを大腸菌中にエレクトロポレーションして大腸菌をヘルパーファージに感染させる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、f d及びM 13を含む繊維状ファージであり、V H及びV Lドメインを通常、組換え法によりファージ遺伝子I I I又は遺伝子V I I Iのいずれかに融合させる。特定の抗原と結合する抗原結合ドメインを発現するファージを、抗原により、例えば、標識した抗原又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕獲された抗原を用いて、選択又は同定することができる。本発明の抗体を作製するために利用しうるファージディスプレイ法の例としては、Brinkmanら、1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Amesら、1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleboroughら、1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persicら、1997, Gene 187:9-18; Burtonら、1994, Advances in Immunology 57:191-280; 国際出願第P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4号; 国際公開W O 9 0 / 0 2 8 0 9号、W O 9 1 / 1 0 7 3 7号、W O 9 2 / 0 1 0 4 7号、W O 9 2 / 1 8 6 1 9号、W O 9 3 / 1 1 2 3 6号、W O 9 5 / 1 5 9 8 2号、W O 9 5 / 2 0 4 0 1号、及びW O 9 7 / 1 3 8 4 4号; 並びに米国特許第5, 698, 426号、第5, 223, 409号、第5, 403, 484号、第5, 580, 717号、第5, 427, 908号、第5, 750, 753号、第5, 821, 047号、第5, 571, 698号、第5, 427, 908号、第5, 516, 637号、第5, 780, 225号、第5, 658, 727号、第5, 733, 743号、第5, 969, 108号、第6, 333, 187号、第5, 824, 529号、第5, 702, 892号に開示された方法が挙げられ、これらはそれぞれ参照によりその全文が本明細書に組み入れられる。

#### 【0158】

以上の参考文献に記載の通り、ファージ選択の後、ファージからの抗体コード領域を単離し、さらにそれを使用して、ヒト抗体を含む全抗体、又は任意の他の所望の抗原結合フラグメントを作製し、それらを、例えば以下に記載のようにして、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む任意の所望の宿主にて発現させることができる。組換え法によりF a b、F a b'及びF（a b'）2フラグメントを製造する技術はまた、国際公開W O 9 2 / 2 2 3 2 4号; Mullinaxら、1992, BioTechniques 12 (6):864-869; Sawaiら、1995, AJRI 34:26-34; 並びにBetterら、1988, Science 240:1041-1043（上記参考文献は参照によりその全文が組み入れられる）に開示された方法などの当技術分野で公知の方法を用いて、使用することができる。

#### 【0159】

完全抗体を作製するために、V H又はV Lヌクレオチド配列、制限酵素切断部位、及び制限酵素切断部位を保護するフランキング配列を含むPCRプライマーを用いて、s c F vクローン中のV H又はV L配列を増幅することができる。当業者に公知のクローニング技術を利用して、PCR増幅されたV HドメインをV H定常領域、例えば、ヒト 4定常領域を発現するベクター中にクローニングし、また、PCR増幅したV LドメインをV L定常領域、例えばヒト 若しくは 定常領域を発現するベクター中にクローニングすることができる。好ましくは、V H又はV Lドメインを発現するベクターは、E F - 1 プロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン、定常ドメイン及びネオマイシンなどの選択マー

カーに対するクローニング部位を含む。VH及びVLドメインを、必要な定常領域を発現する1つのベクター中にクローニングすることもできる。次いで、重鎖変換ベクター及び軽鎖変換ベクターを培養細胞株中に共トランスフェクトし、当業者に公知の技術を用いて、全長抗体、例えばIgGを発現する安定した一過性の培養細胞株を作製する。

【0160】

ヒトにおける抗体の*in vivo*使用、及び*in vitro*検出アッセイを含む複数の用途について、ヒト化抗体又はキメラ抗体を使用することが好ましい場合がある。完全なヒト抗体及びヒト化抗体は、ヒト被験体の治療のためには特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いる上記のファージディスプレイ法を含む、当技術分野で公知の様々な方法により作製することができる。米国特許第4, 444, 887号及び第4, 716, 111号、;並びに国際公開WO98/46645号、WO98/50433号、WO98/24893号、WO98/16654号、WO96/34096号、WO96/33735号、及びWO91/10741号も参照のこと;これらはそれぞれ参照によりその全文が本明細書に組み入れられる。

10

【0161】

ヒト抗体はまた、機能性の内因性免疫グロブリンを発現できないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて製造することもできる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、無作為に又は相同組換えによりマウス胚幹細胞中に導入してもよい。あるいは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、及び多様性領域を、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。相同組換えによりヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入して、マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子を別々に又は同時に非機能化してもよい。特に、JH領域のホモ接合性欠失は内因性抗体産生を妨げる。改変した胚幹細胞を増殖させ、胚盤胞中にマイクロインジェクションしてキメラマウスを作る。次いでキメラマウスを交配し、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を作る。そのトランスジェニックマウスを、通常的方式で、選択した抗原、例えば本発明のポリペプチドの全体若しくは部分を用いて、免疫感作する。その抗原に対するモノクローナル抗体を、免疫感作したトランスジェニックマウスから通常のハイブリドーマ技術を利用して得ることができる。トランスジェニックマウスによって保持されるヒト免疫グロブリントランスジーンはB細胞分化の際に再配列し、その後、クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。従って、かかる技術を利用して、治療上有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を製造することが可能である。ヒト抗体を製造するためのこの技術の総括については、Lonberg及びHuszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を製造するためのこの技術並びにかかる抗体を製造するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる、国際公開WO98/24893号、WO96/34096号、及びWO96/33735号;及び米国特許第5, 413, 923号、第5, 625, 126号、第5, 633, 425号、第5, 569, 825号、第5, 661, 016号、第5, 545, 806号、第5, 814, 318号、及び第5, 939, 598号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 及びGenpharm (San Jose, CA) などの会社と、選択した抗原に対するヒト抗体を上記と類似の技術を利用して提供する契約を結ぶことができる。

20

30

40

【0162】

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる免疫グロブリンに由来する分子である。キメラ抗体を製造する方法は当技術分野で公知である。例えば、Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oiら, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gilliesら, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 並びに米国特許第5, 807, 715号、第4, 816, 567号、第4, 816, 397号、及び第6, 331, 415号(これらは本明細書に参照によりその全文が組み入れられる)を参照のこと。

【0163】

ヒト化抗体は、所定の抗原と結合することができ、そして実質的にヒト免疫グロブリン

50

のアミノ酸配列を有するフレームワーク及び実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するCDRを含む抗体又はその変異体若しくはそのフラグメントである。ヒト化抗体は、実質的に少なくとも1つの、そして典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv)を含み、ここでCDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のCDR領域と対応しかつフレームワーク領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である。好ましくは、ヒト化抗体はまた、少なくとも免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部を含む。通常、抗体は軽鎖並びに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有するであろう。抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、及びCH4域を含んでもよい。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含む免疫グロブリンのいずれのクラス、及びIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>を含むいずれのイソ型から選択してもよい。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞傷害活性を示すことが所望される補体固定定常ドメインであり、かつクラスは典型的にはIgG<sub>1</sub>である。かかる細胞傷害活性が所望でない場合、定常ドメインはIgG<sub>2</sub>クラスである。ヒト化抗体は1以上のクラス又はイソ型からの配列を含んでもよく、そして所望のエフェクター機能を最適化するための特定の定常ドメインの選択は当技術分野の通常の技術に包含されている。ヒト化抗体のフレームワーク及びCDR領域は正確に親配列に対応する必要はなく、例えば、ドナーCDR又はコンセンサスフレームワークは少なくとも1つの残基の置換、挿入又は欠失により突然変異されていてその部位におけるCDR又はフレームワーク残基がコンセンサス又はインポート抗体に対応しないようにしてもよい。しかしかかる突然変異は広汎なものではないであろう。通常、親フレームワーク及びCDR配列の残基と対応しうるヒト化抗体残基は、少なくとも75%、さらにしばしば90%、そして最も好ましくは95%超であろう。ヒト化抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて製造することができ、そのような技術としては、限定されるものでないが、CDRグラフト(欧州特許EP 239,400号;国際公開WO 91/09967号;及び米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、第5,585,089号)、ベニアリング(veneering)又は再表面形成(resurfacing)(欧州特許EP 592,106;EP 519,596;Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnickaら, 1994, Protein Engineering 7(6):805-814;及びRoguskaら, 1994, PNAS 91:969-973)、及びチェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)、並びに、例えば、米国特許第6,407,213号、第5,766,886号、WO 93/17105号、Tanら, J. Immunol. 169:1119-25(2002)、Caldasら, タンパク質 Eng. 13(5):353-60(2000)、Moreaら, Methods 20(3):267-79(2000)、Bacaら, J. Biol. Chem. 272(16):10678-84(1997)、Roguskaら, タンパク質 Eng. 9(10):895-904(1996)、Coutoら, Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s(1995)、Coutoら, Cancer Res. 55(8):1717-22(1995)、Sandhu JS, Gene 150(2):409-10(1994)、及びPedersenら, J. Mol. Biol. 235(3):959-73(1994)に開示された技術が挙げられる。しばしば、フレームワーク領域のフレームワーク残基を、CDRドナー抗体由来の対応する残基によって置換して、抗原結合を改変し、好ましくは改良する。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、CDRとフレームワーク残基の相互作用をモデル化して抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定し、さらに配列比較により特定位置の異常なフレームワーク残基を同定することによって確認する(例えば、本明細書に参照によりその全文が組み入れられる、Queenら, 米国特許第5,585,089号;及びRiechmannら, 1988, Nature 332:323を参照)。

#### 【0164】

単一ドメイン抗体、例えば、軽鎖を欠損する抗体を、当技術分野で公知の方法により作製することができる。Riechmannら, 1999, J. Immunol. 231:25-38; Nuttallら, 2000, Curr. Pharm. Biotechnol. 1(3):253-263; Muijderman, 2001, J. Biotechnol. 74(4):2773-2782; 米国特許第6,005,079号;及び国際公開WO 94/04678号、WO 94/25591号、及びWO 01/44301号を参照されたい(それぞれ、本明細書に参

照により組み入れられる)。

【0165】

さらに、今度は、抗原(例えば、インテグリン $\nu_3$ )と免疫特異的に結合する抗体を使用し、当業者に公知の技術を用いて、抗原を「模倣する」抗イディオタイプ抗体を作製することができる(例えば、Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7 (5):437-444; 及び Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438を参照)。

【0166】

5.3.1 抗体をコードするポリヌクレオチド配列

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、例えば、先に規定したよ 10  
うな、高いストリンジェンシー、中度の若しくは低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件のもとで、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

【0167】

ポリヌクレオチドを得て、当技術分野で公知のいずれかの方法によりポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。所望の抗原に対して免疫特異的な抗体のヌクレオチド配列は、例えば、文献又はGenBankなどのデータベースから得ることができる。VITAXIN(登録商標)のアミノ酸配列は既知であるので、これらの抗体をコードするヌクレオチド配列を、当技術分野で公知の方法を利用して(すなわち、特定の 20  
アミノ酸をコードすることが知られるヌクレオチドコドン、抗体をコードする核酸を生成するように組み立てて)決定することができる。抗体をコードするかかるポリヌクレオチドは、化学合成したオリゴヌクレオチドから組み立てることができ(例えば、Kutmeierら, 1994, BioTechniques 17:242に記載の通り)、これは、簡単に説明すると、抗体をコードする配列の一部を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、次いでライゲートしたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を伴う。

【0168】

あるいは、抗体又は抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドを、好適な起源由来の核酸から作製することができる。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが 30  
入手できなくても、その抗体分子の配列が既知であれば、その免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成することができるし、あるいは、適当な起源(例えば、抗体cDNAライブラリー若しくはそれから作製したcDNAライブラリー、それから単離した核酸、好ましくはポリA+RNA、本発明の抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞などの、抗体を発現する任意の組織若しくは細胞)からその配列の3'及び5'末端にハイブリダイズする合成プライマーを用いるPCR増幅によるか、又は、特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、例えばcDNAライブラリーから前記抗体をコードするcDNAクローンを同定してクローニングすることにより、取得することができる。PCRにより作製された増幅核酸は、次いで、当技術分野で公知の方法を用いて複製可能なクローニングベクター中にクローニングすることができる。

【0169】

抗体又は抗体フラグメントのヌクレオチド配列が一度決定されると、抗体又は抗体フラグメントのヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列の遺伝子操作に関する当技術分野で公知の方法、例えば組換えDNA技術、位置指定突然変異、PCRなど(例えば、Sambrook 40  
ら, 1990, 「分子クローニング、研究室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、及びAusubelら, 編, 1998, 「分子生物学の現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons, NY、に記載の技術を参照、これらの文献は本明細書に参照によりその全文が組み入れられる)を用いて遺伝子操作して、異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し、例えばアミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を創出することができる。

10

20

30

40

50

## 【0170】

特定の実施形態においては、1以上のCDRを、慣用される組換えDNA技術を利用してフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は、天然又はコンセンサスフレームワーク領域であってもよく、好ましくはヒトフレームワーク領域である（例えば、ヒトフレームワーク領域の列挙については、Chothiaら、1998、J. Mol. Biol. 278:457-479を参照）。好ましくは、フレームワーク領域とCDRの組合せにより作製されたポリヌクレオチドは、特定の抗原と免疫特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上述したように、1以上のアミノ酸置換をフレームワーク領域内で引き起こしてもよく、かつ好ましくはそのアミノ酸置換は抗体のその抗原との結合を改良するものである。さらに、かかる方法を利用して、鎖内ジスルフィド結合に参加する1以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換若しくは欠失を引き起こし、1以上の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を作製してもよい。ポリヌクレオチドに対するその他の改変は本発明により包含されかつ当技術分野の範囲内にある。

10

## 【0171】

## 5.3.2 抗体の組換え発現

本発明の抗体、その誘導體、類似体又はフラグメント（例えば、本発明の抗体の重鎖若しくは軽鎖、又は本発明の一本鎖抗体）の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。本発明の抗体分子、抗体の重鎖若しくは軽鎖、又はその一部（好ましくは、重鎖又は軽鎖の可変ドメインを含むが、必ずしも必要ではない）をコードするポリヌクレオチドが一度得られると、抗体分子を製造するためのベクターは、当技術分野で公知の技術を利用して組換えDNA技術により作製することができる。例えば、本明細書に参照によりその全文が組み入れられる、米国特許第6,331,415号を参照のこと。そこで、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を製造する方法を本明細書に記載する。当業者に公知の方法を利用して、抗体コード配列及び適当な転写及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、及び*in vivo*遺伝子組換えが挙げられる。本発明は、従って、本発明の抗体分子、抗体の重鎖若しくは軽鎖、抗体の重鎖若しくは軽鎖可変ドメイン又はそれらの部分、あるいは重鎖若しくは軽鎖のCDRをコードし、プロモーターと機能しうる形で連結されたヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。かかるベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列（例えば、国際公開WO86/05807号；WO89/01036号；及び米国特許第5,122,464号を参照）を含んでもよく、また抗体の可変ドメインをかかると同時にクローニングして重鎖全体、軽鎖全体、又は重鎖全体と軽鎖全体の両方を発現させてもよい。

20

30

## 【0172】

発現ベクターを通常の技術により宿主細胞に導入し、次いでトランスフェクトした細胞を通常の技術により培養して、本発明の抗体を製造する。従って、本発明は、本発明の抗体若しくはそのフラグメント、あるいはその重鎖若しくは軽鎖又はそれらの一部分、あるいは本発明の一本鎖抗体をコードし、異種プロモーターと機能しうる形で連結されたポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。2本鎖抗体を発現させるための好ましい実施形態においては、以下に詳しく説明するように、重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞において同時発現させ、免疫グロブリン分子全体を発現させることができる。

40

## 【0173】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させることができる（例えば、米国特許第5,807,715号を参照）。かかる宿主発現系は、本発明のコード配列を作製し次いで精製するために用いられる運搬体を意味するのみならず、適当なヌクレオチドコード配列を用いて形質転換又はトランスフェクトすると、本発明の抗体分子を*in situ*で発現することができる細胞も意味する。これらとしては、限定されるものでないが、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミド

50

DNA又はコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換した細菌などの微生物（例えば、大腸菌及び枯草菌）；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換した酵母（例えば、サッカロミセス・ピキア）；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、パキウウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染したか若しくは抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）を用いて形質転換した植物細胞系；又は、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）若しくは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保持する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NSO、及び3T3細胞）が挙げられる。好ましくは、大腸菌などの細菌細胞を、そしてさらに好ましくは、特に組換え抗体分子全体を発現させるために真核細胞を使用して、組換え抗体分子を発現させる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞などの哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと一緒に使うと、抗体の有効な発現系である（Foeckingら、1986、Gene 45:101；及びCockettら、1990、Bio/Technology 8:2）。特定の実施形態においては、インテグリン $\alpha_3$ と免疫特異的に結合する抗体をコードするヌクレオチド配列の発現を、構成的プロモーター、誘導プロモーター又は組織特異的プロモーターにより調節する。

#### 【0174】

細菌系においては、様々な発現ベクターを、発現される抗体分子に対して意図される用途に依存して有利に選択することができる。例えば、抗体分子の医薬組成物を作製するために大量のかかる抗体を生産する場合には、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指令するベクターが望ましい。かかるベクターとしては、限定されるものではないが、抗体コード配列を個々にlacZコード領域とイン・フレームとなるようにベクター中にライゲートして融合タンパク質を産生させうる大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherら、1983、EMBO 12:1791）；pINベクター（Inouye & Inouye、1985、Nucleic Acids Res. 13:3101-3109；Van Heeke & Schuster、1989、J. Biol. Chem. 24:5503-5509）などが挙げられる。pGEXベクターを利用して、外来ポリペプチドをグルタチオン-5-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させることもできる。一般的に、かかる融合タンパク質は可溶であり、マトリックスであるグルタチオンアガロースビーズへの吸着及び結合と、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターを、トロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計し、クローニングした標的遺伝子産物をGST部分から遊離させることができる。

#### 【0175】

昆虫系においては、オートグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス（AcNPV）を、外来遺伝子を発現するベクターとして利用する。該ウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞で増殖する。抗体コード配列を個々にそのウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）中にクローニングしてAcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置くことができる。

#### 【0176】

哺乳動物宿主細胞においては、様々なウイルスに基づく発現系を使用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして利用する場合、目的の抗体コード配列を、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及びトリパーティット（tripartite）リーダー配列とライゲートしてもよい。次いでこのキメラ遺伝子を、*in vitro*又は*in vivo*組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1又はE3）への挿入により、感染宿主において生存可能でかつ抗体分子を発現しうる組換えウイルスを得ることができる（例えば、Logan & Shenk、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照）。特定の開始

シグナルも、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳に必要でありうる。これらのシグナルとしてはA T G開始コドン及び隣接配列が挙げられる。さらに、開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと同期していて全インサートの翻訳を保証しなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の両方の様々な起源のものであってよい。発現効率は、適当な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなど（例えば、Bittnerら, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544を参照）を組み入れることにより増強することができる。

#### 【0177】

さらに、挿入された配列の発現をモジュレートするか、又は所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾及びプロセシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のかかる修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能にとって重要でありうる。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセシング及び修飾のための特有かつ特定の機構を有する。適当な細胞系又は宿主系を選んで、発現された外来タンパク質の正しい修飾とプロセシングを保証することができる。この目的のために、適切な一次転写のプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化及びリン酸化のための細胞機構を持つ宿主真核細胞を使用することができる。かかる哺乳動物宿主細胞としては、限定されるものでないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D、NSO（内因的に全く免疫グロブリン鎖を産生しないマウス骨髄腫培養細胞株）、CRL7030及びHsS78Bst細胞が挙げられる。

#### 【0178】

組換えタンパク質の長期間にわたる高収量の生産のためには、安定した発現が好ましい。例えば、安定して抗体分子を発現する培養細胞株を遺伝子操作によって作ることができる。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを用いるのではなく、宿主細胞を、適当な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）により制御したDNA、及び選択マーカーを用いて形質転換することができる。外来DNAの導入後、遺伝子操作した細胞を、1～2日間富栄養培地で増殖させ、次いで選択培地に切り換えてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをその染色体中に安定的に組み込み、増殖して細胞巣を形成することを可能にするので、これを次にクローニングして培養細胞株に拡大することができる。この方法を利用して抗体分子を発現する細胞系を遺伝子操作により有利に作製することができる。かかる遺伝子操作で作製した培養細胞株は、抗体分子と直接又は間接に相互作用する組成物をスクリーニングしたり評価したりするのに特に有用である。

#### 【0179】

様々な選択系を利用することができ、限定されるものでないが、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら, 1977, *Cell* 11:223）、ヒポキサンチン-グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202）、及びアデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら, 1980, *Cell* 22:8-17）遺伝子が挙げられ、これらはそれぞれtk-、hgprt-又はaprt-細胞において使用することができる。また、以下の遺伝子については代謝拮抗物質耐性を選択の基礎として利用することができる：メトトレキセート耐性を付与するdhfr（Wiglerら, 1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357; O'Hareら, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527）；ニコフェノール酸耐性を付与するgpt（Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072）；アミノグリコシドG-418耐性を付与するneo（Wu及びWu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932；並びにMorgan及びAnderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11 (5):155-215）；並びにハイグロマイシン耐性を付与するhygro（Santerreら, 1984, *Gene* 30:147）。当技術分野で公知の組換えDNA技法を慣用的に適用して所望の組換えクローンを選択することができ、

かかる方法は、例えば、Ausubelら（編）、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, 「Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual」、Stockton Press, NY (1990); 及び Dracopoliら（編）、「Current Protocols in Human Genetics」、John Wiley & Sons, NY (1994)の第12章及び第13章; Colberrre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1 (これらは参照により本明細書にその全文が組み入れられる)に記載されている。

【0180】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅により増加させることができる（総説については、Bebbington及びHentschel, 「The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning」、Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能であれば、宿主細胞培養中に存在するインヒビターレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させうる。増幅される領域は、抗体遺伝子と関連しているので、抗体の産生も増加しうる（Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257）。 10

【0181】

宿主細胞を、本発明の2つの発現ベクター、すなわち、重鎖由来のポリペプチドをコードする第1ベクターと軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2ベクターとを用いて共トランスフェクトすることができる。その2つのベクターは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択マーカーを含有してもよい。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードしかつ発現できる単一ベクターを利用して 20

かかるとは重鎖の前に軽鎖を配置して、毒性である遊離の重鎖が過剰になることを避けなければならない（Proudfoot, 1986, Nature 322:52; 及びKohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197）。重鎖と軽鎖のコード配列はcDNA又はゲノムDNAを含んでいてもよい。

【0182】

本発明の抗体分子が組換え発現により一旦産生されれば、抗体分子は、免疫グロブリン分子を精製するための当技術分野で公知の任意の方法により、例えば、クロマトグラフィ（例えば、イオン交換、アフィニティー、特に、プロテインAの後の特異的抗原に対する親和性、及びサイズ分離カラムクロマトグラフィ）により、遠心分離、溶解度差（differential solubility）により、又はタンパク質を精製する他の任意の標準技術により、 30

精製することができる。さらに、本発明の抗体又はそのフラグメントを、精製を容易にする本明細書に記載されているか又はさもなくば当技術分野で公知の異種ポリペプチド配列と融合させてもよい。

【0183】

5.4. 抗体製剤の安定性及び凝集をモニターする方法

抗体製剤を含めた、タンパク質製剤の安定性を評価する様々な方法が利用可能であり、タンパク質の物理的、化学的構造に基づいた方法や、タンパク質の生物学的活性に基づいた方法がある。例えば、タンパク質の変性を検討するためには、電荷移動吸収、熱分析、蛍光分光法、円偏光二色性、NMR、HPSECなどの方法が利用可能である。例えば、Wangら, 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(supp):S4-S26を参照のこと 40

【0184】

rCGE及びHPSECは、タンパク質凝集、タンパク質分解、及びタンパク質断片化の形成を評価する、最も一般的で、かつ最も単純な方法である。したがって、本発明の液体製剤の安定性は、これらの方法で評価することができる。

【0185】

例えば、本発明の液体製剤の安定性は、HPSEC又はrCGEによって評価することができ、この場合、ピークの領域占有率が、分解されていない抗体又は分解されていない抗体フラグメントを表す。詳細には、約250µgのインテグリン<sub>v3</sub>と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（約10mg/mlの抗体又は抗体フラグメントを 50

含む液体製剤約25 $\mu$ l)を、TASK SW x1ガードカラム(6.0mm x 4.0cm)に取り付けたTOSOH TSK G3000 SW<sub>xL</sub>カラム(7.8mm x 30cm)に注入する。抗体又は抗体フラグメントは、流速0.8~1.0ml/分にて、0.1M硫酸ナトリウム及び0.05%アジ化ナトリウムを含有する0.1Mリン酸水素二ナトリウムで、定組成溶出する。溶出するタンパク質は、280nmにおけるUV吸光度を用いて検出する。VITAXIN(登録商標)標準基準試料をコントロールとしてアッセイに含め、結果は、製品のモノマーが示すピーク領域の比率として、約12~14分に観測されるボリュームピークを除いた他の全てのピークとの比較において示される。モノマーピークより早く溶出するピークは、凝集比率として記録される。

#### 【0186】

本発明の液体製剤は、HPSEC又はRCGEで測定した場合に、凝集が検出不可能から低いレベルであり、すなわち、凝集が、タンパク質重量あたり5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、そして、最も好ましくは0.5%以下であり、かつ断片化が検出不可能から低いレベルであり、すなわち、完全抗体又はそのフラグメントを表すピーク領域が全ピーク領域の80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上、又は99.5%以上である。SDS-PAGEの場合には、放射性同位元素で標識されたか、又は染色された各バンドの密度又は放射能が測定でき、分解されていない抗体又は抗体フラグメントを表す、バンドの%密度又は%放射能を得ることができる。

#### 【0187】

本発明の液体製剤の安定性は、製剤中の抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性を測定するいかなるアッセイでも評価できる。抗体又は抗体フラグメントの生物学的活性には、限定されるものではないが、抗原結合活性、補体活性化活性、Fc受容体結合活性などが含まれる。抗体又は抗体フラグメントの抗原結合活性は、限定されるものではないがELISA、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロットなどを含む、当業者に公知のいかなる方法によっても測定することができる。補体活性化活性は、補体成分の存在下にて、インテグリン $\alpha_3$ と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを、インテグリン $\alpha_3$ を発現している細胞と反応させる系において、C3a/C4aアッセイを行うことによって、測定できる。Harlowら、Antibodies:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988年)も参照されたい。(この文献を参照により、その全体を本明細書に組み入れる)。ELISAに基づくアッセイを用いて、抗体又は抗体フラグメントがインテグリン $\alpha_3$ と免疫特異的に結合する活性を、VITAXIN(登録商標)標準基準試料と比較することができる。このアッセイでは、VnR結合ELISAと称され、プレートをヒト胎盤から単離したインテグリン $\alpha_3$ でコーティングし、設定した濃度のVITAXIN(登録商標)標準基準試料が示す結合シグナルを、同じ濃度の試験抗体又は試験抗体フラグメントが示す結合シグナルと比較する。

#### 【0188】

本発明の抗体液体製剤の純度は、例えば、HPSECなど、当業者に周知のいかなる方法で測定されてもよい。抗体液体製剤の滅菌は以下の通りにして評価できる。試験抗体液体製剤を通常の0.45 $\mu$ m孔系をもつ滅菌フィルターを通して過することによって、滅菌大豆カゼイン消化物培養液及び液状チオグリコレート培養液に接種する。Sterisure(商標)又はSteritest(商標)メソッドを用いる場合、滅菌操作によって各フィルター装置を、約100mlの滅菌大豆カゼイン消化物培養液又は液状チオグリコレート培養液で満たす。在来の方法を用いる場合には、曝露されたフィルターを滅菌操作で100mlの滅菌大豆カゼイン消化物培養液又は液状チオグリコレート培養液に移す。培養液を適当な温度でインキュベートし、14日間にわたって3回、細菌又は真菌が増殖している証拠があるか観察する。

#### 【0189】

### 5.5 抗体製剤の予防用途及び治療用途

本発明はまた、被験体(好ましくはヒト)に、炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン

10

20

30

40

50

ン  $\nu_3$  の異常な発現及び / 若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌あるいはそれに関連する症候を予防、治療、管理又は緩和するための本発明の液体抗体製剤を投与するステップを含む、抗体に基づく治療に関する。本発明の液体製剤は、ヒスチジンを含む溶液中に約 15 mg / ml ~ 約 300 mg / ml の濃度で抗体又はそのフラグメントを含み、この抗体又はその抗体フラグメントは、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する。本発明の液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する単一の抗体又はそのフラグメント（例えば、VITAXIN（登録商標））を含み得る。本発明の液体製剤はまた、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する2種以上の抗体又は抗体フラグメントを含み得る。特定の実施形態において、このような液体製剤中に含まれる抗体又は抗体フラグメントのうち1種は、VITAXIN（登録商標）又はそのフラグメントである。別の実施形態において、このような液体製剤中に含まれる抗体又は抗体フラグメントのうち1種は、VITAXIN（登録商標）又はそのフラグメントではない。なお別の実施形態において、本発明の液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含み、この抗体又は抗体フラグメントはまた、別の部分（異種のタンパク質、ペプチド又はポリペプチド、別の抗体又は抗体フラグメント、マーカー配列、診断剤、治療薬、放射性金属イオン及び固体支持体が含まれるがこれらに限定されない）に結合される。

#### 【0190】

本発明の液体製剤は、治療薬として身体中で局所的又は全身的に使用することができる。特に、本発明の液体製剤は、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び / 又は異常な活性に関連する疾患又は障害の予防、治療、管理及び緩和において使用することができる。本発明の製剤は、インテグリン  $\nu_3$  を発現する細胞の活性を調節するために使用することができる。特定の実施形態において、本発明の製剤は、血管形成、骨代謝及び免疫機能が含まれるがこれらに限定されない身体の種々の活性を調節するために使用される。本発明の製剤はまた、1種又は複数の他の治療（例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬）、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び / 若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、癌又はそれらの1以上の症候の治療、予防、管理又は緩和において有用な治療と組み合わせて有利に利用することができる。1種又は複数の他の治療（例えば、予防薬又は治療薬）が使用される場合、これらは、任意の適した形態で任意の適切な経路によって別々に投与することができる。

#### 【0191】

本発明の液体製剤は、哺乳動物（好ましくはヒト）に、1種又は複数の他の治療（例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬）、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び / 若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、癌又はそれらの1以上の症候の予防、治療、管理又は緩和において有用な治療と同時に投与することができる。用語「同時に」は、正確に同時の予防薬又は治療薬 / 治療の投与に限定されず、むしろこれは、本発明の液体製剤及び他の薬剤 / 治療が、次々と同じ時間間隔内で哺乳動物に投与され、その結果、この液体製剤中に含まれるインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントが、それらが他の方法で投与された場合よりも増大した利益を提供するために、他の薬剤 / 治療と一緒に作用し得ることを意味する。例えば、本発明の液体製剤、並びに炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び / 若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な1種又は複数の他の予防薬又は治療薬は、同時に投与することができ、又は遅れずに異なる時点で任意の順序で連続的に投与することができる。しかし、同時に投与されない場合、これらは、所望の治療効果又は予防効果を提供するように、遅れずに十分に接近して投与されるべきである。

#### 【0192】

種々の実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療（例えば、

1種又は複数の他の予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、1時間未満間隔、約1時間間隔、約1時間~約2時間間隔、約2時間~約3時間間隔、約3時間~約4時間間隔、約4時間~約5時間間隔、約5時間~約6時間間隔、約6時間~約7時間間隔、約7時間~約8時間間隔、約8時間~約9時間間隔、約9時間~約10時間間隔、約10時間~約11時間間隔、約11時間~約12時間間隔、24時間以下間隔、又は48時間以下の間隔で投与される。好ましい実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、同じ患者の来院内に投与される。他の実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、約2日間~約4日間間隔、約4日間~約6日間間隔、約1週間間隔、約1週間~約2週間間隔、又は2週間を超える間隔で投与される。好ましい実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、両方の薬剤がなお活性である時間枠において投与される。当業者は、投与された薬剤の半減期を決定することによって、このような時間枠を決定し得る。

#### 【0193】

特定の実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、被験体に周期的に投与される。周期的治療は、一定の時間期間にわたる第1の薬剤の投与と、その後の一定の時間期間にわたる第2の薬剤及び/又は第3の薬剤の投与と、この連続投与を反復するステップとを含む。周期的治療は、1種又は複数の治療に対する抵抗性の発生を低下させ得、これらの治療のうち1種の副作用を回避若しくは低下させ得、及び/又はこの治療の効力を改善し得る。

#### 【0194】

特定の実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、1種又は複数の他の予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、約3週間未満、2週間毎に約1回、10日毎に約1回、又は毎週約1回の周期で投与される。1回の周期は、周期毎に約90分間、周期毎に約1時間、周期毎に約45分間にわたる注入による治療薬又は予防薬の投与を含み得る。各周期は、少なくとも1週間の休止、少なくとも2週間の休止、少なくとも約3週間の休止を含み得る。投与される周期の数は、約1周期~約12周期であり、より典型的には約2周期~約10周期であり、より典型的には約2周期~約8周期である。

#### 【0195】

他の実施形態において、本発明の液体製剤並びに1種又は複数の他の治療(例えば、予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $\nu_3$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療は、長期にわた

る休止期間のない連続注入又は高頻度の投与のいずれかによって、メトロノーム様 (metronomic) 投薬方法で投与される。このようなメトロノーム様投与は、休止期間のない一定間隔で投薬するステップを含み得る。典型的に、この予防薬又は治療薬 (特に細胞傷害性剤) は、より低い用量で使用される。このような投薬方法は、延長された時間期間にわたる相対的に低い用量の慢性的な毎日の投与を包含する。好ましい実施形態において、より低い用量の使用は、毒性副作用を最小化し、休止期間を排除することができる。特定の実施形態において、この予防薬及び治療薬は、約24時間から約2日間まで、約1週間まで、約2週間まで、約3週間まで、約1ヶ月間まで、約2ヶ月間まで、約3ヶ月間まで、約4ヶ月間まで、約5ヶ月間まで、約6ヶ月間までの範囲の慢性的な低用量又は連続注入によって送達される。

10

**【0196】**

一実施形態において、本発明の液体製剤は、 $V_{\beta 3}$  に対して免疫特異的な抗体又は抗体フラグメントの血漿濃度を、インテグリン  $V_{\beta 3}$  活性を継続的に遮断する所望のレベル (例えば、約  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 約  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) に維持する投薬方法で投与される。特定の実施形態において、この抗体又は抗体フラグメントの血漿濃度は、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$  又は  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  に維持される。被験体において所望される血漿濃度は、疾患又は障害の性質、疾患又は障害の重篤度及び被験体の状態を含むがこれらに限定されないいくつかの因子に依存して変動する。このような投薬方法は、慢性疾患又は慢性障害の予防、治療、管理及び緩和において特に有益である。

20

**【0197】**

一実施形態において、本発明の液体製剤  $V_{\beta 3}$  は、インテグリン  $V_{\beta 3}$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの血漿濃度を、骨吸収の少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%を遮断するレベルに維持する投薬方法を使用して、異常な骨代謝に関連する疾患又は障害を有する被験体に投与される。特定の実施形態において、インテグリン  $V_{\beta 3}$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの血漿濃度は、異常な骨代謝に関連する疾患又は障害を有する被験体において、約  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 約  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  に維持される。

30

**【0198】**

いくつかの実施形態において、本発明の液体製剤は被験体に断続的に投与され、ここで、この液体製剤は、部分 (例えば、治療薬又は毒素) に結合された抗体又は抗体フラグメントを含む。

**【0199】**

炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $V_{\beta 3}$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な他の治療 (例えば、予防薬及び/又は治療薬) と組み合わせて使用される場合、本発明の液体製剤及び他の治療は、相加的に、又はより好ましくは相乗的に作用し得る。本発明は、同じ投与経路又は異なる投与経路 (例えば、経口及び非経口) による、他の治療 (例えば、予防薬又は治療薬)、好ましくは炎症性障害、自己免疫障害、インテグリン  $V_{\beta 3}$  の異常な発現及び/若しくは異常な活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害又は癌の予防、治療、管理又は緩和に有用な治療と組み合わせた本発明の液体製剤の投与を企図する。特定の実施形態において、本発明の液体製剤が、有害な副作用 (毒性が含まれるがこれらに限定されない) を潜在的に生じる1種又は複数の治療 (例えば、予防薬又は治療薬) と同時に投与される場合、これらの治療 (例えば、予防薬又は治療薬) は、有害な副作用が排除される閾値未満に入る用量で有利に投与することができる。

40

50

## 【0200】

## 5.5.1. 異常な血管形成に関連する障害の治療

本発明の液体製剤は、異常な血管形成に関連する疾患若しくは障害又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、異常な血管形成に関連する疾患若しくは障害又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。このような治療の非限定的な例には、抗炎症剤（例えば、非ステロイド系抗炎症薬及びステロイド系薬）、ビスホスフォネート、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、免疫調節剤及び抗血管形成剤が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、単独又は別の治療（例えば、予防薬又は治療薬）と組み合わせて本発明の液体製剤が投与される被験体は、異常な血管形成に関連する特定の障害についての従来の治療に対して不応性である。

10

## 【0201】

特定の実施形態において、本発明は、異常な血管形成に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、異常な血管形成に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

20

## 【0202】

本発明の液体製剤は、異常な血管形成に関連する障害についての治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、このような疾患についての従来の治療に対して不応性の被験体において、異常な血管形成に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような疾患についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、異常な血管形成に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、治療されている被験体にとって従来の治療があまりに毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる）ことを証明したか証明し得る場合の、異常な血管形成に関連する障害の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、液体製剤を投与することにより治療されているか又は疾患活性を有さない患者において異常な血管形成に関連する障害の再発を予防するための方法を提供する。特定の実施例において、単独又は別の治療（例えば、予防薬又は治療薬）と組み合わせて本発明の液体製剤が投与される被験体は、異常な血管形成に関連する特定の疾患又は障害についての従来の治療に対して不応性である。

30

40

## 【0203】

異常な血管形成に関連する疾患又は障害には以下が含まれるがこれらに限定されない：新生物疾患（非限定的な例は、腫瘍の転移及び白血病である）；眼の血管形成の疾患（非限定的な例は、加齢関連黄斑変性、糖尿病性網膜症及び未熟児網膜症、脈管再狭窄である）；皮膚疾患（非限定的な例は、幼児血管腫、尋常性疣贅、乾癬、基底細胞及び扁平細胞の癌腫、皮膚黒色腫、カポージー肉腫、神経線維腫症、劣性栄養障害型表皮剥離水疱症である）；関節炎（非限定的な例は、慢性関節リウマチ、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス（systemic lupus）、乾癬性関節症、ライター症候群及びシェーグレン症候群である）；婦人科学疾患（非限定的な例は、子宮内膜症、妊娠中の妊娠中毒症（

50

pre eclampsia)、卵巣、子宮内膜及び頸部の癌腫である)；並びに心血管疾患(非限定的な例は、アテローム硬化症プラークの形成、アテローム硬化症及び冠状動脈疾患である)。

#### 【0204】

##### 5.5.2. 異常な骨代謝に関連する障害の治療

本発明の液体製剤は、骨代謝を調節するため、あるいは異常な骨代謝に関連する疾患若しくは障害又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために使用することができる。本発明の液体製剤はまた、異常な骨代謝に関連する疾患若しくは障害又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。このような治療の非限定的な例には、以下のセクション5.5.2.1に列挙されるものが含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明は、異常な骨代謝に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、異常な骨代謝に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

10

20

#### 【0205】

本発明の液体製剤は、異常な骨代謝に関連する障害についての治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、このような疾患についての従来の治療に対して不応性の被験体において、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような疾患についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、異常な骨代謝に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、治療されている被験体にとって従来の治療があまりに毒性である(すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる)ことを証明したか証明し得る場合の、異常な骨代謝に関連する障害の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、液体製剤を投与することによって治療されているか又は疾患活性を有さない患者において異常な骨代謝に関連する障害の再発を予防するための方法を提供する。特定の実施例において、単独又は別の治療(例えば、予防薬又は治療薬)と組み合わせて本発明の液体製剤が投与される被験体は、異常な骨代謝に関連する特定の疾患又は障害についての従来の治療に対して不応性である。本明細書中で使用する場合、用語「異常な骨代謝」は、「正常ではない骨代謝」と相互交換可能に使用され、その正常なプロセスから逸脱した骨代謝(例えば、骨組織の吸収及び骨細胞の異常な増殖であるがこれらに限定されない)をいう。

30

40

#### 【0206】

異常な骨代謝に関連する疾患又は障害には以下が含まれるがこれらに限定されない：くる病及び骨軟化症；原発性副甲状腺機能亢進症(例えば、孤立性腺腫、多発性内分泌腺腫症)、リチウム治療、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症、転移を有する固形腫瘍(例えば、乳癌)、高カルシウム血症の体液性媒介を有する固形腫瘍(例えば、肺癌又は腎臓癌)、血液学的悪性腫瘍(例えば、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病)、ビタミンD中毒、類肉腫症及び他の肉芽腫性疾患、新生児の特発性高カルシウム血症、甲状腺機能亢進症、ビタミンA中毒、アルミニウム中毒、ミルク-アルカリ症候群及び腎不全(これら

50

に限定されない)によって引き起こされ得る高カルシウム血症; 遺伝性副甲状腺機能低下症、後天性副甲状腺機能低下症、慢性腎不全、ビタミンD欠乏症、腫瘍溶解、横紋筋融解症及び副甲状腺切除術後の線維性骨炎(これらに限定されない)によって引き起こすることができる低カルシウム血症; 骨粗鬆症; 成人における一般化された骨粗鬆症のリスクの増大に関連する疾患(ターナー症候群、クラインフェルター症候群、神経性無食欲症、視床下部性無月経、高プロラクチン血症、原発性又は二次的な性腺機能低下(hypogonadal)状態、クッシング症候群、副甲状腺機能亢進症、甲状腺中毒症、インスリン依存性糖尿病、末端肥大症、副腎機能不全、栄養失調、非経口的栄養法、吸収不良症候群、胃切除術、重篤な肝臓疾患、悪性貧血、慢性関節リウマチ、強直性脊椎炎、慢性中耳炎(真珠腫により誘導される骨吸収)、肥大性肺性骨関節炎(HPOA)、ゴースム-スタウト病、多発性骨髄腫、リンパ腫及び白血病、悪性腫瘍関連の副甲状腺ホルモン関連産生、肥満細胞症、血友病、サラセミア、骨形成不全症、マルファン症候群、血色素症、低ホスファターゼ症、糖原病、ホモシスチン尿症、エーラース-ダンロス症候群、ポルフィリン症、メンケス病、表皮水疱症、慢性閉塞性肺疾患、脊柱側彎症、多発性硬化症、類肉腫症及びアミロイドーシスが含まれるが、これらに限定されない); グルココルチコイド、シクロスポリン、細胞傷害性薬物、抗癌薬、過度のチロキシン、アルミニウム、性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト、ヘパリン及びリチウム(これらに限定されない)によって引き起こすることができる薬物関連の骨粗鬆症; 骨パジェット病; 大理石骨病(Albers-Schoenberg骨病); 濃化異骨症; 骨髄硬化症(osteomyelosclerosis); 遺伝性高ホスファターゼ症(hyperphosphatasia); 進行性骨幹異形成(Camurati-Engelmann病); メロレオストーシス(melorheostosis); オステオポイキローシス(osteopoikilosis); 内前頭過骨症(hyperostosis frontalis interna); 線維性骨異形成(McCune-Albright症候群); 脊椎骨端異形成; 軟骨無形成症; 内軟骨腫症; 並びに骨軟骨腫症(osteocondromatosis)。

#### 【0207】

本発明の液体製剤はまた、歯周疾患又はその1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。歯周疾患には、歯肉炎及び歯周炎が含まれるがこれらに限定されない。本発明の液体製剤はまた、歯周疾患又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和するために、1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。このような治療の非限定的な例には以下が含まれるがこれらに限定されない: Mistoral I、葉酸、緑茶抽出物、アロエベラゲル、ハチプロポリス、ビタミンK1、ビタミンE、カモミール、コエンザイムQ10、口腔衛生の改善、抗生物質(例えば、PERIOSTAT(商標)(ドキシサイクリン(doxycycline hyclate))、CO<sub>2</sub>レーザー治療、歯石除去、根面平滑化及び手術。特定の実施形態において、本発明は、歯周疾患又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、歯周疾患又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

#### 【0208】

本発明の液体製剤は、歯周疾患についての治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、このような疾患についての従来の治療に対して不応性の被験体において、歯周疾患又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような疾患についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、歯周疾患又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の

液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、治療されている被験体にとって従来の治療があまりに毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる）ことを証明したか証明し得る場合の、歯周疾患の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、液体製剤を投与することによって治療され、かつ疾患活性を有さない患者において歯周疾患の再発を予防するための方法を提供する。

**【0209】**

本発明の液体製剤はまた、関節置換（例えば、股関節若しくは膝の置換）の無菌的弛緩又はその1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、関節置換の無菌的弛緩又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和するために、1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。このような治療の非限定的な例には、抗炎症剤、ビスホスホネート、ビタミンD化合物、抗凝固剤、手術及び身体的治療が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明は、関節置換の無菌的弛緩又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、関節置換の無菌的弛緩又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

10

20

**【0210】**

本発明の液体製剤は、関節置換の無菌的弛緩についての治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、このような疾患についての従来の治療に対して不応性の被験体において、関節置換の無菌的弛緩又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような疾患についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、関節置換の無菌的弛緩又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、治療されている被験体にとって従来の治療があまりに毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる）ことを証明したか証明し得る場合の、関節置換の無菌的弛緩の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、液体製剤を投与することによって治療され、及び疾患活性を有さない患者において関節置換の無菌的弛緩の再発を予防するための方法を提供する。

30

40

**【0211】**

本発明の液体製剤は、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和するために、1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。このような治療の非限定的な例には、性ホルモン（例えば、エストロゲン）、ビスホスホネート（例えば、アレンドロネート、エチドロネート、クロドロネート、イバンドロネート、パミドロネート、リセドロネート、チルドロネート（tiludronate）及びゾレドロネート）、カルシトニン及び運動プログラムが含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明は、異常な

50

骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

#### 【0212】

本発明の液体製剤は、異常な骨吸収に関連する障害についての治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、このような疾患についての従来の治療に対して不応性の被験体において、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような疾患についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、異常な骨吸収に関連する障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又はそのフラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、治療されている被験体にとって従来の治療があまりに毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる）ことを証明したか証明し得る場合の、異常な骨吸収に関連する障害の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、液体製剤を投与することによって治療されているか又は疾患活性を有さない患者において異常な骨吸収に関連する障害の再発を予防するための方法を提供する。

#### 【0213】

異常な骨吸収に関連する障害には以下が含まれるがこれらに限定されない：副甲状腺関連の障害（非限定的な例は、原発性副甲状腺機能亢進症、リチウム治療及び家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症である）；悪性腫瘍関連障害（非限定的な例は、転移を有する固形腫瘍、高カルシウム血症の体液性媒介を有する固形腫瘍及び血液学的悪性腫瘍である）；ビタミンD関連障害（非限定的な例は、ビタミンD中毒、類肉腫症及び他の肉芽腫性疾患、新生児の特発性高カルシウム血症である）；並びに高い骨ターンオーバーに関連する他の疾患又は障害（非限定的な例は、甲状腺機能亢進症、不動化、チアジド及びビタミンA中毒である）。

#### 【0214】

##### 5.5.2.1. 骨代謝を調節する際に使用する薬剤

本発明は、異常な骨代謝に関連する疾患若しくは障害又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和する方法を提供し、この方法は、本発明の液体製剤及びインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。治療薬又は予防薬には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、低分子、模倣剤、合成薬物、無機分子及び有機分子が含まれるがこれらに限定されない。骨代謝を調節するために有用であることが既知であるか、そのために使用されてきたか、又はそのために現在使用されている任意の薬剤又は治療が、本明細書中に記載される発明に従って、本発明の液体製剤と組み合わせて使用することができる。このような薬剤又は治療の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：ホスフェート、水酸化アルミニウム、炭酸アルミニウムゲル、マグネシウム、ビタミンD、カルシトリオール、ビタミンD<sub>2</sub>（エルゴカルシフェロール）、ビタミンD<sub>3</sub>（コレカルシフェロール）、カルシウム、リチウム、グルココルチコイド、ビスホスホネート又はそれらの薬学的に許容される塩若しくはエステル（非限定的な例は、アレンドロネート、クロドロネート、エチドロネ

ート、イバンドロネート、パミドロネート、リセドロネート、チルドロネート及びゾレドロネートである)、カルシトニン、プリカマイシン(ミトラマイシン)、硝酸ガリウム、エストロゲン、プロゲスチン、エストロゲンアンタゴニスト(例えばタモキシフェン)、エストロゲンレセプターモジュレータ、アンドロゲンレセプターモジュレータ、細胞傷害性剤又は抗増殖剤、マトリックスメタロプロテインゼインヒビター、表皮由来増殖因子、線維芽細胞由来増殖因子又は血小板由来増殖因子のインヒビター、VEGFのインヒビター、増殖因子又は増殖因子レセプターに対する抗体、Flk-1/KDR、Flt-1、Tck/Tie-2又はTie-1のインヒビター、カテプシンKインヒビター、破骨細胞プロトンATPaseのインヒビター、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ(u-PA)のインヒビター、腫瘍特異的抗体-インターロイキン-2融合タンパク質、HMG-CoAレダクターゼのインヒビター(非限定的な例は、プレニル化インヒビター(非限定的な例は、ロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、シムバスタチン、セリバスタチン、レスコール、リピトール、ロバスタチン及びアトルバスタチンである)、ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼインヒビター又は二重ファルネシル/ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼインヒビターである)、副甲状腺ホルモン又は副甲状腺ホルモンフラグメント(非限定的な例は、外因性PTHアナログ、1-34 PTHである)、成長ホルモン、米国特許第6,472,402号及び同第6,482,411号に開示される分子、腎透析、手術、あるいはそれらの組合せ。

10

#### 【0215】

20

異常な骨代謝に関連する障害についての治療並びにそれらの投薬量、投与経路及び推奨される用法は当該分野で公知であり、Physician's Desk Reference(第56版、2002及び第57版、2003)のような文献中に記載されている。

#### 【0216】

##### 5.5.3. 癌治療

本発明の液体製剤は、癌又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、癌又はそれらの1以上の症候を予防、治療、管理又は緩和するために、1種又は複数の治療(好ましくは、癌の予防、管理又は治療に有用な治療(例えば限定するものではないが、以下のセクション5.5.3.1に例示する予防薬又は治療薬など))と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。特定の実施形態において、本発明は、癌又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、癌又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

30

#### 【0217】

本発明の液体製剤は、癌治療の第1、第2、第3又は第4のラインとして使用することができる。本発明は、癌についての従来の治療に対して不応性の被験体において、癌又はその1以上の症候を治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。癌は、癌細胞の少なくともある程度の有意な部分が死滅していない又はその細胞分裂が治療にตอบสนองして停止している場合には治療手段に不応性と決定されうる。そのような決定は、このような場合に「不応性」についての当該分野で許容されている意味を用いて、癌細胞に対する治療の有効性をアッセイするための当該技術分野で公知の任意の方法により、in vivo又はin vitroのいずれかで行いうる。特定の実施形態において、癌は、癌細胞の数が有意に低減しないか又は増大する場合に不応性である。

40

#### 【0218】

50

本発明は、癌についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、癌又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\nu_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、他の治療に対して不応性であり、もはやこれらの治療を行っていない患者に対して他の治療（例えば放射線療法、化学療法又は手術）と組み合わせて本発明の液体製剤を投与することによる、癌の管理、治療又は改善方法を提供する。本発明はまた、以前に他の癌治療法を受けたために免疫抑制状態となっている癌患者の管理又は治療方法を提供する。本発明は、治療対象の被験体にとって、化学療法、放射線療法、ホルモン療法及び/又は生物学的療法/免疫療法が毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じる）ことを証明したか証明し得る場合の、癌又は1以上のその症候の管理、治療又は改善のための別の方法を提供する。さらに、本発明は、本発明の液体製剤を投与することにより治療されているか又は疾患活性を有さない患者において癌の再発を予防するための方法を提供する。

10

#### 【0219】

本発明に係る方法により治療しうる癌には以下が含まれるがこれらに限定されない：新生物、腫瘍、転移、又は制御できない細胞増殖を特徴とする任意の疾患又は障害。癌は、原発又は転移癌でありうる。癌は、インテグリン  $\nu_3$  を発現してもよいし又は発現しなくてもよい。好ましい実施形態において、本発明の方法に従って管理、治療又は改善の対象となる癌は、骨に転移した、インテグリン  $\nu_3$  を発現する癌である。本発明に係る方法により治療可能な癌の例としては、限定されるものではないが、頭部、頸部、眼、口、舌、食道、胸部、骨、肺、大腸、直腸、前置腺、乳、卵巣、腎臓、肝臓、膵臓及び脳が挙げられる。さらなる癌としては、以下が挙げられるが限定されるものではない：白血病、例えば、限定されるものでないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病性白血病（erythroleukemia leukemias）および脊髄形成異常症候；慢性白血病、例えば、限定されるものでないが、慢性骨髄球性（顆粒球）白血病、慢性リンパ性白血病、毛様細胞白血病；赤血球増加症（polycythemia vera）；リンパ腫、例えば、限定されるものでないがホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、例えば、限定されるものでないが、くすぶり型（smoldering）多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、プラズマ細胞白血病、単生プラズマ細胞腫および延髄外プラズマ細胞腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；意味未確定の単クローン性高ガンマグロブリン血症；良性モノクローナル免疫グロブリン血症；重鎖疾患；骨および結合組織肉腫、例えば限定されるものでないが、骨肉腫（bone sarcoma）、骨髄骨疾患、骨肉腫（osteosarcoma）、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、骨のパジェット病、悪性巨細胞腫瘍、骨の線維肉腫、軟骨、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管肉腫（hemangiosarcoma）、線維肉腫、カポージ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫；脳腫瘍、例えば限定されるものでないが、神経膠腫、星細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣細胞腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体腫、松果体芽細胞腫、原発脳リンパ腫；乳癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、小葉（小細胞）癌、腺管内癌、髄様乳癌、粘液性乳癌、管状腺乳癌、乳頭状乳癌、パジェット病（若年性パジェット病を含む）、および炎症性乳癌；副腎癌、例えば、限定されるものでないが、褐色細胞腫および副腎皮質性癌；甲状腺癌、例えば、限定されるものでないが乳頭または濾胞性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および未分化甲状腺癌；膵臓癌、例えば、限定されるものでないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍；下垂体癌、例えば、限定されるものでないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症、および尿崩症；眼癌、例えば、限定されるものでないが、眼黒色腫、例えば虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、および毛様体黒色腫、および網膜芽細胞腫；膣癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、腺癌、および黒色腫；外陰部癌、

20

30

40

50

例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびバジレット病；頸癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、および腺癌；子宮癌、例えば、限定されるものでないが、子宮内膜癌および子宮肉腫；卵巣癌、例えば、限定されるものでないが、卵巣上皮癌、境界型腫瘍、生殖細胞腫瘍、および間質腫瘍；食道癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘液性類表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、プラズマ細胞腫、いぼ状癌、および燕麦細胞（小細胞）癌；胃癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、肉芽腫性（ポリープ状）、潰瘍性、表在拡大型、広汎拡大型、悪性リンパ腫、リポ肉腫、線維肉腫、および癌肉腫；大腸癌；直腸癌；肝臓癌、例えば、限定されるものでないが、肝細胞性癌および肝芽腫、胆嚢癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌；胆管癌、例えば、限定されるものでないが、乳頭状癌、結節型および広汎型；肺癌、例えば、限定されるものでないが、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌；精巣癌、例えば、限定されるものでないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化、古典的（典型的）、精母細胞、非精上皮腫、胚性癌、テラトーマ癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）、前立腺癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫；陰茎癌；口腔癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌；基底癌；唾液腺癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、粘膜表皮性癌、およびアデノイド嚢胞癌；咽頭癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、およびいぼ状；皮膚癌、例えば、限定されるものでないが、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌および黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節型黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端部黒子黒色腫；腎臓癌、例えば、限定されるものでないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行細胞癌（腎盂および/または子宮）；ウィルムス腫瘍；膀胱癌、例えば、限定されるものでないが、移行細胞癌、扁平上皮細胞癌、腺癌、癌肉腫。さらに、癌としては、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、骨膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原生癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌が挙げられる（かかる障害の総括については、Fishmanら、1985、Medicine、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia、およびMurphyら、1997、「十分な情報に基づく決定：癌診断、治療、および回復の全書（Informed Decisions：The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery）」、Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照）。また、本発明の方法及び組成物によりアポトーシスの異常により引き起こされる癌を治療しうることを意図している。そのような癌としては、限定されるものではないが、濾胞性リンパ腫、p53変異を有する癌腫、乳、前立腺及び卵巣のホルモン依存性癌、家族性大腸腺腫症などの前癌性損傷、及び骨髓異形成症候群が挙げられる。

#### 【0220】

好適な実施形態において、本発明の方法により予防、管理、治療、または改善される癌は、前立腺癌、乳癌、骨癌、黒色腫、肺癌、および卵巣癌である。別の実施形態において本発明の方法により予防、管理、治療、または改善される癌は、転移性腫瘍であり、特に限定されないが骨まで転移したかまたは転移する可能性のある腫瘍（非限定例は、骨まで転移したかまたは転移する可能性のある前立腺癌、乳癌および肺癌である）、肺まで転移したかまたは転移する可能性のある腫瘍、脳まで転移したかまたは転移する可能性のある腫瘍、および被験体の他の臓器または組織まで転移したかまたは転移する可能性のある腫瘍がある。

#### 【0221】

##### 5.5.3.1. 抗癌療法

本発明は、癌又は1以上のその症候を予防、管理、治療又は改善する方法を提供し、該方法は、その必要がある被験体に対し、本発明の液体製剤と、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1以上の治療（例えば予防薬又は治療薬）を投与することを含む。治療薬又は予防薬の例としては、限定されるものでないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、擬似薬剤、合成薬剤、無機分子及び有機分子が挙げられる。癌又はその1以上の症候に有用で

あると知られているか、又はその予防、治療、管理若しくは改善に使用されていた若しくは現在使用されている、任意の薬剤又は治療（例えば、化学療法、放射線療法、ホルモン療法及び/又は生物学的療法/免疫療法）を、本明細書に記載する本発明に従って本発明の液体製剤と組み合わせて用いることができる。かかる薬剤（すなわち抗癌剤）の例としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる：血管形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、及び免疫調節剤（化学療法剤）、及び非治療用免疫調節剤、例えば限定されるものではないが以下のものを含む：抗T細胞受容体抗体（例えば、抗CD4抗体（例えば、cM-T412（Boeringer）、IDEC-CE9.1（登録商標）（IDEC及びSKB）、mAB 4162W94、オルソクロン、及びOKTcdr4a（Janssen-Cilag））、抗CD3抗体（例えば、ヌビオン（Nuvion）（Product Design Labs）、OKT3（Johnson & Johnson）、又はリツキサン（IDEC））、抗CD5抗体（例えば、抗CD5リシン結合免疫複合体）、抗CD7抗体（例えば、CHH-380（Novartis））、抗CD8抗体、抗CD40リガンドモノクローナル抗体（例えば、IDEC-131（IDEC））、抗CD52抗体（例えば、CAMPATH 1H（Ilex））、抗CD2抗体、（例えば、MEDI-507（メディミューン社（MedImmune Inc.）、国際公開WO02/098370号、及びWO02/069904号））、抗CD11a抗体（例えば、ザネリム（Xanelim）（Genentech））、及び抗B7抗体（例えば、IDEC-114（IDEC））、抗サイトカイン受容体抗体、（例えば、抗IFN受容体抗体、抗IL-2受容体抗体（例えば、ゼナパックス（Protein Design Labs））、抗IL-4受容体抗体、抗IL-6受容体抗体、抗IL-10受容体抗体、抗IL-12受容体抗体）、及び抗サイトカイン抗体（例えば、抗IFN抗体、抗TNF-抗体、抗IL-1抗体、抗IL-6抗体、抗IL-8抗体（例えば、ABX-IL-8（Abgenix））、抗IL-12抗体；CTLA4-免疫グロブリン；LFA-3TIP（Biogen, 国際公開WO93/08656号及び米国特許第6,162,432号）；可溶性サイトカイン受容体（例えば、TNF-受容体細胞外ドメイン又はその抗原結合性フラグメント、IL-1受容体細胞外ドメイン又はその抗原結合性フラグメント、及びIL-6受容体細胞外ドメイン又はその抗原結合性フラグメント）、サイトカイン又はそのフラグメント（例えば、インターロイキンIL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-23、TNF-、TNF-、インターフェロン（IFN）-、IFN-、IFN-、及びGM-CSF）、並びに抗サイトカイン抗体（例えば、抗IL-2抗体、抗IL-4抗体、抗IL-6抗体、抗IL-10抗体、抗IL-12抗体、抗IL-15抗体、抗TNF-抗体、抗IFN-）、並びに腫瘍関連抗原に免疫特異的に結合する抗体（例えばハーセプチン（登録商標）。

#### 【0222】

血管形成阻害剤（すなわち抗血管形成剤）の例としては、限定されるものでないが、アンジオスタチン（プラスミノゲン断片）；抗血管形成抗トロンピンIII；アンジオザイム（Angiozyme）；ABT-627；Bay 12-9566；ベネフィン（Benefin）；ベバシズマブ（Bevacizumab）；BMS-275291；軟骨由来阻害剤（CDI）；CAI；CD59補体断片；CEP-7055；Col 3；コンプレスタチン（Combretastatin）A-4；エンドスタチン（Endostatin）（コラーゲンXVIII断片）；フィブロネクチン断片；グロベータ（Gro-beta）；ハロフギノン（halofuginone）；ヘパリナーゼ；ヘパリン六糖断片；HMV833；ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）；IM-862；インターフェロン / / ；インターフェロン誘導性タンパク質（IP-10）；インターロイキン-12；クリングル5（プラスミノゲン断片）；マリマスタット（marimastat）；メタロプロテイナーゼ阻害剤（TIMP）；2-メトキシエストラジオール；MMI 270（CGS 27023A）；MoAb IMC-1C11；ネオバスタット（Neovastat）；NM-3；パンゼム（Panzem）；PI-88；胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤；プラスミノゲンアクチベーター阻害剤；血小板因子-4（PF4）；プリノマスタット（Prinomastat）；プロラクチン16KD断片；プロリフェリン（Proliferin）関連タンパク質（PRP）；PTK 787/ZK 222594；レチノイド；ソリマスタット（Solimastat）；スクワラミン（Squalamine）；SS 3304；SU 5416；SU66

68 ; SU11248 ; テトラヒドロコルチゾール-S ; テトラチオモリブデン酸塩 ; サリドマイド ; トロンボスポンジン-1 (TSP-1) ; TNP-470 ; トランスフォーミング増殖因子- (TGF-b) ; バスキュロスタチン (vasculostatin) ; バソスタチン (vasostatin) (カルレティキュリン断片) ; ZD 6126 ; ZD 6474 ; HMG-CoAレダクターゼ阻害剤 (3-ヒドロキシ-3-メチル-グラタリルコエンザイムAレダクターゼ阻害剤)、例えば限定されるものではないが、ロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、シムバスタチン、及びアトルバスタチン ; ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) ; およびビスホスホネート、例えば限定されるものではないが、アレンドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、パミドロネート、リセドロネート、チルドロネート、及びゾレンドロネートが挙げられる。特定の実施形態において、抗血管形成剤は、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含むものではない。

10

## 【0223】

本発明の方法において利用しうる抗癌剤の具体的な例は、限定されるものでないが、アシビシン (acivicin) ; アクラルピシン (acralvicin) ; アコダゾール塩酸塩 (acodazole hydrochloride) ; アクロニン (acronine) ; アドゼレシン (adozelesin) ; アルデスロイキン (aldesleukin) ; アルトレタミン (altretamine) ; アンボマイシン (ambomycin) ; アメタントロン酢酸塩 (ametantrone acetate) ; アミノグルテチミド (aminogluthimide) ; アムサクリン (amsacrine) ; アナストロゾール (anastrozole) ; アントラマイシン (anthramycin) ; アスパラギナーゼ (asparaginase) ; アスペルリン (asperlin) ; アザシチジン (azacitidine) ; アゼテパ (azetepa) ; アゾトマイシン (azotomycin) ; バチマスタット (batimastat) ; ベンゾデパ (benzodepa) ; ビカルタミド (bicalutamide) ; ビスアントレン塩酸塩 (bisantrene hydrochloride) ; ビスナフィドジメシラート (bisnafide dimesylate) ; ビゼレシン (bizelesin) ; プレオマイシン硫酸塩 (bleomycin sulfate) ; プレキナルナトリウム (brequinar sodium) ; プロピリミン (bropirimine) ; ブスルファン (busulfan) ; カクチノマイシン (cactinomycin) ; カルステロン (calusterone) ; カラセミド (caracemide) ; カルベチマー (carbetimer) ; カルボプラチン (carboplatin) ; カルムスチン (carmustine) ; カルピシン塩酸塩 (carubicin hydrochloride) ; カルゼルシン (carzelesin) ; セデフィンゴール (cedefingol) ; クロラムブシル (chlorambucil) ; シロレマイシン (cirolemycin) ; シスプラチン (cisplatin) ; クラドリピン (cladribine) ; クリスナトールメシラート (crisnatol mesylate) ; シクロホスファミド (cyclophosphamide) ; シタラビン (cytarabine) ; デカルバジン (dacarbazine) ; ダクチノマイシン (dactinomycin) ; ダウノルビシン塩酸塩 (daunorubicin hydrochloride) ; デシタビン (decitabine) ; デキソルマプラチン (dexormaplatin) ; デザグアニン (dezaguanine) ; デザグアニンメシラート (dezaguanine mesylate) ; ジアジコン (diaziquone) ; ドセタキセル (docetaxel) ; ドキソルビシン (doxorubicin) ; ドキソルビシン塩酸塩 (doxorubicin hydrochloride) ; ドロキシフェン (droloxifene) ; ドロキシフェンクエン酸塩 (droloxifene citrate) ; ドロモスタノロンプロピオン酸塩 (dromostanolone propionate) ; デュアゾマイシン (duazomycin) ; エダトレキセート (edatrexate) ; エフロルニチン塩酸塩 (eflornithine hydrochloride) ; エルサミトルシン (elsamitrucin) ; エンロプラチン (enloplatin) ; エンプロメート (enpromate) ; エピプロピジン (epipropidine) ; エピルビシン塩酸塩 (epirubicin hydrochloride) ; エルプロゾール (erbulozole) ; エソルビシン塩酸塩 (esorubicin hydrochloride) ; エストラムスチン (estramustine) ; エストラムスチン燐酸ナトリウム (estramustine phosphate sodium) ; エタニダゾール (etanidazole) ; エトポシド (etoposide) ; エトポシド燐酸塩 (etoposide phosphate) ; エトプリン (etoprine) ; ファドロゾール塩酸塩 (fadrozole hydrochloride) ; ファザラビン (fazarabine) ; フェンレチニド (fenretinide) ; フロキシウリジン (floxuridine) ; フルダラビン燐酸塩 (fludarabine phosphate) ; フルオロウラシル (fluorouracil) ; フルロシタビン (flurocitabine) ; フォスキドン (fosquidone) ; フォストリエシンナトリウム (fostriecin sodium) ; ゲムシタビン (gemcitabine) ; ゲムシタビン塩酸塩 (gemcitabine hydrochloride)

20

30

40

50

) ; ヒドロキシウレア ( hydroxyurea ) ; イダルビシン塩酸塩 ( idarubicin hydrochloride ) ; イフォスファミド ( ifosfamide ) ; イルモフォシン ( ilmofosine ) ; インターロイキンII ( 組換えインターロイキンII、またはrIL2を含む )、インターフェロン -2a ; インターフェロン -2b ; インターフェロン -n1 ; インターフェロン -n3 ; インターフェロン -1a ; インターフェロン -1b ; イプロプラチン ( iproplatin ) ; イリノテカン塩酸塩 ( irinotecan hydrochloride ) ; ランレオチド酢酸塩 ( lanreotide acetate ) ; レトロゾール ( letrozole ) ; ロイプロリド酢酸塩 ( leuprolide acetate ) ; リアロゾール塩酸塩 ( liarozole hydrochloride ) ; ロメトレキソールナトリウム ( lometrexol sodium ) ; ロムスチン ( lomustine ) ; ロソキサントロン塩酸塩 ( losoxantrone hydrochloride ) ; マソプロコール ( masoprocol ) ; メイタンシン ( maytansine ) ; メクロレタミン塩酸塩 ( mechlorethamine hydrochloride ) ; メゲストロール酢酸塩 ( megestrol acetate ) ; メレンゲストロール酢酸塩 ( melengestrol acetate ) ; メルファラン ( melphalan ) ; メノガリル ( menogaril ) ; メルカプトプリン ( mercaptopurine ) ; メトトレキセート ( methotrexate ) ; メトトレキセートナトリウム ( methotrexate sodium ) ; メトプリン ( metoprine ) ; メツレデパ ( meturedpa ) ; ミチンドミド ( mitindomide ) ; ミトカルシン ( mitocarcin ) ; ミトクロミン ( mitocromin ) ; ミトギリル ( mitogillin ) ; ミトマルシン ( mitomalcin ) ; ミトマイシン ( mitomycin ) ; ミトスパー ( mitosper ) ; ミトタン ( mitotane ) ; ミトキサントロン塩酸塩 ( mitoxantrone hydrochloride ) ; ミコフェノール酸 ( mycophenolic acid ) ; ノコダゾール ( nocodazole ) ; ノガラマイシン ( nogalamycin ) ; オルマプラチン ( ormaplatin ) ; オキシスラン ( oxisuran ) ; パクリタキセル ( paclitaxel ) ; ペガスバルガーゼ ( pegaspargase ) ; ペリオマイシン ( peliomycin ) ; ペンタムスチン ( pentamustine ) ; ペプロマイシン硫酸塩 ( peplomycin sulfate ) ; ペルホスファミド ( perfosfamide ) ; ピボプロマン ( pipobroman ) ; ピプロスルファン ( piposulfan ) ; ピロキサントロン塩酸塩 ( piroxantrone hydrochloride ) ; プリカマイシン ( plicamycin ) ; プロメスタン ( plomestane ) ; ポルフィマーナトリウム ( porfimer sodium ) ; ポルフィルマイシン ( porfiromycin ) ; プレドニムスチン ( prednimustine ) ; プロカルバジン塩酸塩 ( procarbazine hydrochloride ) ; プューロマイシン ( puromycin ) ; プューロマイシン塩酸塩 ( puromycin hydrochloride ) ; ピラゾフリル ( pyrazofurin ) ; リボプリン ( riboprime ) ; ログレチミド ( rogletimide ) ; サフィンゴル ( safinabol ) ; サフィンゴル塩酸塩 ( safinabol hydrochloride ) ; セムスチン ( semustine ) ; シムトラゼン ( simtrazene ) ; スパルフォセートナトリウム ( sparfosate sodium ) ; スパルソマイシン ( sparsomycin ) ; スピロゲルマニウム塩酸塩 ( spirogermanium hydrochloride ) ; スピロムスチン ( spiromustine ) スピロプラチン ; ( spiroplatin ) ; ストレプトニグリン ( streptonigrin ) ; ストレプトゾシン ( streptozocin ) ; スルフェヌル ( sulofenur ) ; タリソマイシン ( talisomycin ) ; テコガランナトリウム ( tecogalan sodium ) ; テガフル ( tegafur ) ; テロキサントロン塩酸塩 ( teloxantrone hydrochloride ) ; テモポルフィン ( temoporfin ) ; テニポシド ( teniposide ) ; テロキシロン ( teroxirone ) ; テストラクトン ( testolactone ) ; チアミプリン ( thiamiprine ) ; チオグアニン ( thioguanine ) ; チオテパ ( thiotepa ) ; チアゾフリル ( tiazofurin ) ; チラパザミン ( tirapazamine ) ; トレミフェンクエン酸塩 ( toremifene citrate ) ; トレストロン酢酸塩 ( trestolone acetate ) ; トリシリピンリン酸塩 ( triciribine phosphate ) ; トリメトレキセート ( trimetrexate ) ; トリメトレキセートグルクロン酸塩 ( trimetrexate glucuronate ) ; トリプトレリン ( triptorelin ) ; ツプロゾール塩酸塩 ( tubulozole hydrochloride ) ; ウラシルムスタード ( uracil mustard ) ; ウレデパ ( uredepa ) ; バプレオチド ( vapreotide ) ; ベルテポルフィン ( verteporfin ) ; ビンブラスチン硫酸塩 ( vinblastine sulfate ) ; ビンクリスチン硫酸塩 ( vincristine sulfate ) ; ビンデシン ( vindesine ) ; ビンデシン硫酸塩 ( vindesine sulfate ) ; ビネピジン硫酸塩 ( vinepidine sulfate ) ; ビングリシネート硫酸塩 ( vinglycinate sulfate ) ; ビンロイロシン硫酸塩 ( vinleurosine sulfate ) ; ビノレルビン酒石酸塩 ( vinorelbine tartrate ) ; ビンロシジン硫酸塩 ( vinrosidine sulfate ) ; ビンゾリジン硫酸塩 ( vinzolidine sulfate ) ; ボロゾール ( vorozole

10

20

30

40

50

) ; ゼニプラチン (zeniplatin) ; ジノスタチン (zinostatin) ; ゾルピシン塩酸塩 (zo-  
 rubicin hydrochloride) が挙げられる。他の抗癌薬としては、限定されるものでないが  
 、 20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD3 ; 5-エチニルウラシル ; アビラテロン (abiratero-  
 ne) ; アクラルピシン (aclarubicin) ; アシルフルベン (acylfulvene) ; アデシペノー  
 ル (adecyphenol) ; アドゼレシン (adozelesin) ; アルデスロイキン (aldesleukin) ;  
 全TK拮抗薬 ; アルトレタミン (altretamine) ; アンバムスチン (ambamustine) ; アミド  
 ックス (amidox) ; アミフォスチン (amifostine) ; アミノレブリン酸 (aminolevulini-  
 c acid) ; アンルピシン (amrubicin) ; アンサクリン (amsacrine) ; アナグレリド (an-  
 agrelide) ; アナストロゾール (anastrozole) ; アンドログラホリド (andrographolide)  
 ) ; 血管新生阻害剤 ; 拮抗薬D ; 拮抗薬G ; アントラレリックス (antarelix) ; 抗背方化  
 形態発生タンパク質-1 (anti-dorsalizing morphogenic protein-1) ; 抗アンドロゲン、  
 前立腺癌薬、 ; 抗エストロゲン ; アンチネオプラストン (antineoplaston) ; アンチセン  
 スオリゴヌクレオチド ; アフィディコリングリシン酸塩 (aphidicolin glycinate) ; ア  
 ポトーシス遺伝子モジュレーター ; アポトーシスレギュレーター ; アプリン酸 ; ara-CDP-  
 DL-PTBA ; アルギニンデアミナーゼ ; アスラクリン (asulacriner) ; アタメスタン (atame-  
 stane) ; アトリムスチン (atrimustine) ; アキシナスタチン1 (axinastatin 1) ; アキ  
 シナスタチン2 (axinastatin 2) ; アキシナスタチン3 (axinastatin 3) ; アザステロン  
 (azasetron) ; アザトキシシン (azatoxin) ; アザチロシン (azatyrosine) ; バッカチン  
 (baccatin) III誘導体 ; バラノール (balanol) ; パチマスタット (batimastat) ; BCR/  
 ABL拮抗薬 ; ベンゾクロリン (benzochlorins) ; ベンゾイルスタウロスポリン (benzoyls-  
 taurosporine) ; ラクタム誘導体 ; アレチン (-alethine) ; クラマイシンB (be-  
 taclamycin B) ; ベツリン酸 ; bFGF阻害剤 ; ビカルタミド (bicalutamide) ; ビスアント  
 レン (bisantrene) ; ビスアジリジニルスペルミン (bisaziridinylspermine) ; ビスナ  
 フィド (bisnafide) ; ビストラテンA (bistratene A) ; ビゼルシン (bizelesin) ; ブ  
 レフラート (breflate) ; プロピリミン (bropirimine) ; ブドチタン (budotitane) ;  
 ブチオニンスルホキシミン (buthionine sulfoximine) ; カルシポトリオール (calcipo-  
 triol) ; カルホスチンC (calphostin C) ; カンプトテシン誘導体 ; カナリポックス (ca-  
 narypox) IL-2 ; カペシタピン (capecitabine) ; カルボキサミド-アミノ-トリアゾール  
 ; カルボキシアミドトリアゾール ; CaRest M3 ; CARN 700 ; 軟骨抽出阻害剤 ; カルゼレシ  
 ン (carzelesin) ; カゼインキナーゼ阻害剤 (ICOS) ; カスタノスペルミン (castanospe-  
 rmine) ; セクロピンB (cecropin B) ; セトロレリックス (cetorelix) ; クロリン (c-  
 hlors) ; クロロキノキサリンスルホンアミド ; シカプロスト (cicaprost) ; cis-ポル  
 フィリン ; クラドリピン ; クロミフェン類似体 ; クロトリアゾール ; コリスマイシン (co-  
 llismycin) A ; コリスマイシン (collismycin) B ; コンプレタスタチンA4 ; コンプレタス  
 タチン類似体 ; コナゲニン ; クランベシジン (crambescidin) 816 ; クリスナトール (cri-  
 snatol) ; クリプトフィシン (cryptophycin) 8 ; クリプトフィシンA誘導体 ; キュラシン  
 A ; シクロペントアントラキノン (cyclopentantraquinone) ; シクロプラタム (cyclopl-  
 atam) ; シペマイシン (cypemycin) ; シタラビンオクホスファート (cytarabine ocfosf-  
 ate) ; 細胞溶解性因子 ; サイトスタチン (cytostatin) ; ダクリキシマブ (dacliximab-  
 ) ; デシタピン (decitabine) ; デヒドロジデムニン (dehydrodidemnin) B ; デスロレリ  
 ン (deslorelin) ; デキサメタゾン (dexam-  
 e) ; デキシホスファミド (dexifosfamide) ; デキスラゾキサシン (dexrazoxane)  
 ) ; デキスベラパミル (dexverapamil) ; ジアジコン (diaziquone) ; ディデムニン (dide-  
 mnin) B ; ジドックス (didox) ; ジエチルノルスペルミン ; ジヒドロ-5-アザシチジン ;  
 ジヒドロタキソール、9- ; ジオキサマイシン (dioxamycin) ; ジフェニルスピロムスチン  
 ; ドセタキセル ; ドコサノール ; ドラステロン (dolasetron) ; ドキシフルリジン ; (dr-  
 oloxafene) ; ドロナビノール (dronabinol) ; デュオカルマイシン (duocarmycin) SA ;  
 エベスレン (ebeslen) ; エコムスチン (ecomustine) ; エデルホシン (edelfosine) ;  
 エドレコロマブ (edrecolomab) ; エフロルニチン (eflornithine) ; エレメン (elemen-  
 e) ; エミテフル (emitefur) ; エピルピシン (epirubicin) ; エプリステリド (epriste-  
 10  
 20  
 30  
 40  
 50

ride) ; エストラムスチン (estramustine) 類似体 ; エストロゲン作動薬 ; エストロゲン拮抗薬 ; エタニダゾール (etanidazole) ; エトポシド (etoposide) 燐酸塩 ; エキセメスタン (exemestane) ; ファドロゾール (fadrozole) ; ファザラビン (fazarabine) ; フェンレチニド (fenretinide) ; フィルグラスチン (filgrastim) ; フィナステリド (finasteride) ; フラボピリドール (flavopiridol) ; フレゼラスチン (flezelastine) ; フルアステロン (fluasterone) ; フルダラビン (fludarabine) ; フルオロダウノルニシン塩酸塩 (fluorodaunorubicin hydrochloride) ; ホルフェニメキス (forfenimex) ; ホルメスタン (formestane) ; ホストリエシン (fostriecin) ; ホテムスチン (fotemustine) ; ガドリニウムテキサヒドリン (gadolinium texaphyrin) ; 硝酸ガリウム (gallium nitrate) ; ガロシタビン (galocitabine) ; ガニレリックス (ganirelix) ; ゼラチナーゼ阻害剤 ; ゲムシタビン (gemcitabine) ; グルタチオン阻害剤 ; ヘプスルファム (hep sulfam) ; ヘルグリン (heregulin) ; ヘキサメチレンビスアセタミド ; ヒペリシン (hypericin) ; イバンドロン酸 (ibandronic acid) ; イダルビシン (idarubicin) ; イドキシフェン (idoxifene) ; イドラマントン (idramantone) ; イルモフェシン (ilmofosine) ; イロマスタット (ilomastat) ; イミダゾアクリドン (imidazoacridones) ; イミキモド (imiquimod) ; 免疫刺激性ペプチド ; インスリン様増殖因子-1受容体阻害剤 ; インターフェロン作動薬 ; インターフェロン ; インターロイキン ; イオベングアン (iobenguane) ; ヨードドキシソルビシン (iododoxorubicin) ; イポメアノール (ipomeanol, 4-) ; イロプラクト (iroplact) ; イルソグラジン (irosogladine) ; イソベンガゾール (isobengazole) ; イソホモハリコンドリン (isohomohalicondrin) B ; イタセトロン (itasetron) ; ジャスプラキノリド (jasplakinolide) ; カハラリド (kahalalide F) ; ラメラリン-N-トリアセタート (lamellarin-N triacetate) ; ランレオチド (lanreotide) ; レイナマイシン (leinamycin) ; レノグラスチン (lenograstim) ; レンチナン硫酸塩 (lentinan sulfate) ; レプトールスタチン (leptolstatin) ; レトロゾール (letrozole) ; 白血病抑制因子 ; 白血球 インターフェロン ; ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン ; ロイプロレリン (leuprorelin) ; レバミソール (levamisole) ; リラロゾール (liarozole) ; 直鎖ポリアミン類似体 ; 親油性二糖ペプチド ; 親油性白金化合物 ; リソクリナミド (lissoclinamide) 7 ; ロバプラチン (lobaplatin) ; ロンブリシン (lombricine) ; ロメトレキソール (lometrexol) ; ロニダミン (lonidamine) ; ロソキサントロン (losoxantrone) ; ロバスタチン (lovastatin) ; ロキソリビン (loxoribine) ; ルルトテカン (lurtotecan) ; ルテチウムテキサフィリン (lutetium texaphyrin) ; リソフィリン (lysofylline) ; 溶解性ペプチド ; マイトンシン (maitansine) ; マンノスタチン (mannostatin) A ; マリマスタット (marimastat) ; マソプロコル (masoprocol) ; マスピン (maspin) ; マトリリシン (matrilysin) 阻害剤 ; マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤 ; メノガリル (menogaril) ; メルバロン (merbarone) ; メテレリン (meterelin) ; メチオニナーゼ (methioninase) ; メトクロプラミド (metoclopramide) ; MIF阻害剤 ; ミフェプリストーン (mifepristone) ; (miltefosine) ; ミリモスチム (mirimostim) ; ミスマッチ2本鎖RNA ; ミトグアゾン (mitoguazone) ; ミトラクトール (mitolactol) ; マイトマイシン (mitomycin) 類似体 ; ミトナフィド (mitonafide) ; ミトトキシシン繊維芽細胞増殖因子-サポリン (mitotoxin fibroblast growth factor-saporin) ; ミトキサントロン (mitoxantrone) ; モファロテン (mofarotene) ; モルグラモスチン (molgramostim) ; モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン ; モノホスホリル脂質A+マイコバクテリウム細胞壁 (sk) ; モピダモール (mopidamol) ; 多剤耐性遺伝子阻害剤 ; 多発性腫瘍サプレッサ-1に基づく治療法 ; マスタード抗癌薬 ; マイカペルオキシド (mycaperoxide) B ; マイコバクテリア細胞壁抽出物 ; ミリアポロン (myriaporone) ; N-アセチルジナリン ; N-置換ベンズアミド ; ナファレリン (nafarelin) ; ナグレスチブ (nagrestip) ; ナロキソン+ペンタゾシン (naloxone+pentazocine) ; ナパビン (napavin) ; ナフテルピン (naphterpin) ; ナルトグラスチム (nartograstim) ; ネダプラチン (nedaplatin) ; ネモルビシン (nemorubicin) ; ネリドロン酸 (neridronic acid) ; 中性エンドペプチダーゼ ; ニルタミド (nilutamide) ; ニサマイシン (nisamycin) ; 一酸化

10

20

30

40

50

窒素モジュレーター；窒素酸化物抗酸化薬；ニトルリン (nitrullyn)；O6-ベンジルグ  
 アニン (O6-benzyl guanine)；オクトレチド (octreotide)；オキセノン (okicenone  
 )；オリゴヌクレオチド；オナプリストン (onapristone)；オンダセトロン (ondanset  
 ron)；オンダセトロン (ondansetron)；オラシン (oracin)；経口サイトカインインデ  
 ユーサー；オルマプラチン (ormaplatin)；オサテロン (osaterone)；オキサリプラチ  
 ン (oxaliplatin)；オキサウノマイシン (oxaunomycin)；パクリタキセル (paclitaxel  
 )；パクリタキセル類似体；パクリタキセル誘導体；パラウアミン (palauamine)；パル  
 ミトイルリゾキシシン (palmitoylrhizoxin)；パミドロン酸 (pamidronic acid)；パナキ  
 シトリオール (panaxytriol)；パノミフェン (panomifene)；パラバクチン (parabact  
 in)；パゼリプチン (pazelliptine)；ペガスパルガーゼ (pegaspargase)；ペルデシン 10  
 (peldesine)；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントスタチン (pentostatin)；ペン  
 トロゾール (pentrozole)；ペルフルブロン (perflubron)；ペルホスファミド (perfos  
 famide)；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン (phenazinomycin)；酢酸フェニル  
 ；ホスファターゼ阻害剤；ピシバニル (picibanil)；ピロカルピン塩酸塩 (pilocarpine  
 hydrochloride)；ピラルピシン (pirarubicin)；ピリトレキシム (piritrexim)；プ  
 ラセチン (placetin) A；プラセチン (placetin) B；プラスミノゲンアクチベーター阻  
 害剤；白金錯体；白金化合物；白金-トリアミン錯体；ポルフィマーナトリウム (porfime  
 r sodium)；ポルフィロマイシン (porfiromycin)；プレドニゾン (prednisone)；プロ  
 ピルビスアクリドン (propyl bis-acridone)；プロスタグランジンJ2；プロテアソーム  
 阻害剤；プロテインAに基づく免疫調節薬；プロテインキナーゼC阻害剤；プロテインキ 20  
 ナーゼC阻害剤 (微細藻類の)；プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌク  
 レオシドホスホリラーゼ阻害剤；プルプリン (purpurin)；ピラゾロアクリジン；ピリド  
 キシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン複合体；raf拮抗薬；ラルチトレキセド (ralti  
 trexed)；ラモセトロン (ramosetron)；rasファルネシルプロテイントランスフェラー  
 ゼ阻害剤 (ras farnesyl protein transferase inhibitors)；ras阻害剤；ras-GAP阻害  
 剤；脱メチル化レテルリプチン (retelliptine demethylated)；レニウムRe 186エチド  
 ロン酸塩 (rhenium Re 186 etidronate)；リゾキシシン (rhizoxin)；リボザイム；R11レ  
 チンアミド (R11 retinamide)；ログレチミド (rogletimide)；ロヒツキン (rohitukin  
 e)；ロムルチド (romurtide)；ロキニメキス (roquinimex)；ルビギノンBL (rubigino  
 ne BL)；ルボキシル (ruboxyl)；サフィンゴル (safingol)；セントピン (saintopin 30  
 )；SarCNU；サルコフィトール (sarcophytol) A；サルグラモスチン (sargramostim)；  
 Sdi 1ミメチックス (Sdi 1 mimetics)；セムスチン (semustine)；老化由来阻害剤 (s  
 enescence derived inhibitor) 1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達阻害剤；シ  
 グナル伝達モジュレーター；1本鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン (sizofiran)；  
 ソブゾキサソ (sobuzoxane)；ナトリウムボロカプテイト (sodium borocaptate)；フェ  
 ニル酢酸ナトリウム；ソルベロール (solverol)；ソマトメジン (somatomedin) 結合タ  
 ンパク質；ソネルミン (sonermin)；スパルフォシン酸 (sparfosic acid)；スピカマイ  
 シン (spicamycin) D；スピロムスチン (spiromustine)；スプレノペンチン (splenopen  
 tin)；スポンジスタチン (spongistatin) 1；スクアラミン (squalamine)；幹細胞阻害  
 剤；幹細胞分裂阻害剤；スチピアミド (stipiamide)；ストロメライシン阻害剤；スルフ 40  
 イノシン (sulfinosine)；超活性血管作用性腸ペプチド拮抗薬；スラジスタ (suradista  
 )；スラミン (suramin)；スワイソニン (swainsonine)；合成グリコサミノグリカン；  
 タリムスチン (tallimustine)；5-フルオロウラシル；ロイコボリン；タモキシフェン  
 メチオジド (tamoxifen methiodide)；タウロムスチン (tauromustine)；タザロテン (t  
 azarotene)；テコガランナトリウム；テガフル (tegafur)；テルルラピリリウム (t  
 ellurapyrylium)；テロメラゼ阻害剤；テモポルフィン (temoporfin)；テモゾロミド  
 (temozolomide)；テニポシド (teniposide)；テトラクロロデカオキシド (tetrachlor  
 odecaxoxide)；テトラゾミン (tetrazomine)；サリブラチン (thaliblastine)；チオコ  
 ラリン (thiocoraline)；トロンボポエチン；トロンボポエチンミメチック；サイマルフ  
 アシン (thymalfasin)；サイモポエチン受容体作動薬；サイモトリナン (thymotrinan) 50

; 甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone); スズエチルエチオプルプリン (tin ethyl etiopurpurin); チラパザミン (tirapazamine); 二塩化チタノセン; トプセンチン (topsentin); トレミフェン (toremifene); 全能性幹細胞因子 (totipotent stem cell factor); 翻訳阻害剤; トレチノイン (tretinoin); トリアセチルウルジン; トリシリピン (triciribine); トリメトレキセート (trimetrexate); トリプトレリン (triptorelin); トロピセトロン (tropisetron); ツロステライド (turosteride); チロシンキナーゼ阻害剤; チロホスン (tyrphostins); UBC阻害剤; ウベニメックス (ubenimex); 泌尿生殖器洞誘導増殖阻害剤因子 (urogenital sinus-derived growth inhibitory factor); ウロキナーゼ受容体拮抗薬; パプレオチド (vapreotide); パリオリン (variolin) B; ベクター系、赤血球遺伝子療法; ベラレゾル (velaresol); ベラミン (veramine); ベルジン (verdins); ベルテポルフィン (verteporfin); ビノレルピン (vinorelbine); ビンキササルチン (vinoxaltine); ビタキシン (vitaxin); ボロゾール (vorozole); ザノテロン (zanoterone); ゼニプラチン (zeniplitin); ジラスコルブ (zilascorb); およびジノスタチンスチマラマー (zinostatin stimalamer) が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0224】

本発明はまた、 $\alpha$ 線、 $\beta$ 線及び他の放射線源を用いて癌細胞を破壊することを含む放射線療法と組み合わせて本発明の液体製剤を投与することを含む。好ましい方法において、放射線療法は、放射線が遠隔操作源から導かれる外部ビーム放射線療法又は遠隔療法として適用される。他の好ましい実施形態において、放射線療法は、放射活性源が癌細胞又は腫瘍塊に近接するよう体内に配置される内部療法又は近接照射療法として適用される。

#### 【0225】

具体的な実施形態において乳癌患者は、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤を、乳癌治療に有用な予防又は治療有効量の1つ以上の他の物質(特に限定されないが、ドキソルピシン、エピルピシン、ドキソルピシンとシクロスポリンの併用(AC)、シクロスポリン、ドキソルピシンおよび5-フルオロウラシルの併用(CAF)、シクロスポリン、エピルピシンおよび5-フルオロウラシルの併用(CDF)、Herceptin(登録商標)、タモキシフェン、タモキシフェンと細胞障害性化学療法の併用を含む)を併用して投与される。ある実施形態において転移乳癌患者は、予防又は治療有効量の1つ以上の本発明の液体製剤を、有効量のタキサン類(例えば、ドセタキセルとパクリタキセル)の投与と併用して、投与される。他の実施形態において、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤は、節陽性乳癌の補助療法のために、予防又は治療有効量のタキセンと、それに加えて標準的なドキソルピシン及びシクロホスファミドの投与と組み合わせて投与する。

#### 【0226】

具体的な実施形態において前立腺癌患者は、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤を、前立腺癌治療に有用な予防又は治療有効量の1つ以上の他の物質(特に限定されないが、外部放射線療法、ラジオアイソトープ(すなわち、 $^{125}\text{I}$ 、パラジウム、イリジウム)の組織間挿入、ロイプロリドもしくは他のLHRHアゴニスト、非ステロイド抗アンドロゲン(フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド)、ステロイド抗アンドロゲン(シプロテロンアセテート)、ロイプロリドとフルタミドの併用、エストロゲン、例えばDES、クロロトリアニセン、エチニルエストラジオール、結合エストロゲンU.S.P.、DES-ジホスフェート、ラジオアイソトープ(例えばストロンチウム-89)、外部放射線療法とストロンチウム-89の併用、第2の手段としてのホルモン療法、例えばアミノグルテチミド、ヒドロコチゾン、フルタミド停止、プロゲステロン、およびケトコナゾール、低用量プレドニソン、または症状の主観的改善とPSAレベルの低下を引き起こすと報告されている他の化学療法処方(ドセタキセル、パクリタキセル、エストラムスチン/ドセタキセル、エストラムスチン/エトポシド、エストラムスチン/ビンブラスチン、およびエストラムスチン/パクリタキセルがある)を併用して投与される。具体的な実施形態において卵巣癌患者は、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤を、卵巣癌治療に有用な予防又は治療有効量の1つ以上の他の物質(特に限定されないが、腹腔内放射線療法、例えばP32療法、全腹部および

骨盤放射線療法、シスプラチン、パクリタキセル (Taxol) またはタキセル (Taxotere) とシスプラチンまたはカーボプラチンの併用、シクロホスファミドとシスプラチンの併用、シクロホスファミドとカーボプラチンの併用、5-FUとロイコボリン、エトポシド、リポソームドキソルビシン、ゲムシタピンまたはトポテカンの併用) と併用して投与される。白金抵抗性疾患を有する患者のために、本発明の液体製剤の予防的または治療的有効量を、タキソール投与と組み合わせて投与する。白金抵抗性の疾患患者にイホスファミド、シスプラチンベースの併用処方失敗後のサルベージ化学療法としてヘキサメチルメラミン (HMM)、およびその腫瘍上に検出可能なレベルの細胞質エストロゲン受容体を有する患者のタモキシフェン、の投与を含む抵抗性卵巣癌患者の治療が包含される。具体的な実施形態において、骨肉腫の患者は、予防または治療有効量の本発明の液体製剤を、予防または治療有効量の骨肉腫に有用な1つ以上の他の物質 (特に限定されないが、ドキソルビシン、イホスファミド、シスプラチン、高用量メソトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ピンクリスチン、ダクチノマイシン、および手術を含む) と併用して投与される。具体的な実施形態において、骨転移した癌患者は、予防または治療有効量の本発明の液体製剤を、骨転移腫瘍の治療に有用な予防または治療有効量の1つ以上の物質 (特に限定されないが、基礎悪性腫瘍の治療に使用される薬剤または治療 (非限定例は、骨に転移した前立腺癌または乳癌のホルモン阻害剤、および手術である)、および放射線療法 (非限定例は、ストロンチウム89とサマリウム153であり、これらは、抗腫瘍作用を示し症状を緩和する向骨性の放射性核種である)) と併用して投与される。

10

**【0227】**

より具体的な実施形態において、本発明はまた、1以上の治療の投与と組み合わせた本発明の液体製剤の投与を含み、そのような治療としては、限定されるものではないが、表3に示される抗癌剤が挙げられ、上述した乳癌、骨癌、卵巣癌及び前立腺癌の予防、管理、治療又は改善のために好ましい。

20

【表 3】

治療薬	用量/投与/製剤		
塩酸ドキシルピシン (アトリアマイシン RDF®及 びアトリアマイシン PFS®)	静脈内	第 1 日に 60-75mg/m <sup>2</sup>	21 日間隔
塩酸エピルピシン (Ellence™)	静脈内	各周期の第 1 日に 100-120mg/m <sup>2</sup> 、又は 周期の第 1~8 日に等量分割して投与	3~4 週周期
フルオウラシル	静脈内	供給法:5mL~10mL ハイアル(それぞれ フルオウラシル 250mg 及び 500mg 含有)	10
トセタキセル (Toxotere®)	静脈内	1 時間かけて 60-100mg/m <sup>2</sup>	3 週間に 1 回
パクリタキセル (Taxol®)	静脈内	3 時間かけて 175mg/m <sup>2</sup>	4 回の過程につい て 3 週間ごと(ドキ ルピシン含有併用化 学療法に続いて投 与する)
クエン酸タモキシフェン (Nolvadex®)	経口 (錠剤)	20-40mg 20mg を超える用量は分割用量で投与する (朝晩)	20 毎日
注射用ロイコホリンカルシウム	静脈内又は 筋肉内注射	供給方法:350mg ハイアル	用量はテキスト PDR3610 からは 不明である
酢酸ルプロリド (Lupron®)	単回皮下 注射	1mg(0.2mL~20 単位(unit mark))	30 一日 1 回
フルタミド (Eulexin®)	経口 (カプセル剤)	250mg (各カプセルはフルタミド 125mg を含有)	一日 3 回 8 時間 おき(合計日用量 750mg)
ニルタミド (Nilandron®)	経口 (錠剤)	300mg 又は 150mg (各錠剤はニルタミド 50 又は 150mg 含有)	一日 1 回 300mg で 30 日間後、 一日 1 回 150mg
ビカルタミド (Casodex®)	経口 (錠剤)	50mg (各錠剤はビカルタミド 50mg を含有)	40 一日 1 回
プロゲステロン	注射	ゴマ油中 USP 50mg/mL	
ケトナゾール (Nizoral®)	クリーム剤	症状に応じて 2%クリーム剤を ・日 1 回又は 2 回塗布	
プレドニゾン	経口 (錠剤)	開始用量は、治療対象の特定の疾患の性 質に応じて一日当たり 5mg-60mg で変動	

エストラムスチンリン酸ナトリウム (Emcyt®)	経口 (カプセル剤)	14mg/体重 kg(すなわち、体重 10kg 又は 22lb について 140mg カプセル剤を 1 つ)	一日 3 又は 4 回 の分割量投与	
エトポシド又は VP-16	静脈内	5mL の 20mg/mL 溶液(100mg)		
ダカルバジン (DTIC-Dome®)	静脈内	2-4.5mg/kg	一日 1 回で 10 日 間、4 週間間隔で 反復してもよい	10
ホリフェプロサン 20 カルムスチンインプラント含有 (BCNU) (ニトロソウレア) (Gliadel®)	切除腔に ウエハー配置	8 ウエハー、各 7.7mg のカルムスチン含有、 計 61.6mg 切除腔のサイズ及び形状が可能		
シスプラチン	注射	[PDR861 中 n/a] 供給法:50mL 及び 100mL の多用量バイ アル中に 1mg/mL の溶液		
マイトマイシン	注射	5mg 及び 20mg バイアルで供給 (5mg および 20mg マイトマイシン含有)		20
ゲムシタビン HCl (Gemzar®)	静脈内	NSCLC-2 について処方が開発され、最適 処方は決定されていない。 4週間処方-30 分かけて 1000mg/m <sup>2</sup> で 静脈内投与 3週間処方-30 分かけて 1250mg/m <sup>2</sup> で Gemzar 静脈内投与	4 週間処方-各 28 日周期で第 1、 8 及び 15 日 Gemzar の注入後 第 1 日にシスプラチン を 100mg/m <sup>2</sup> で静 脈内投与 3 週間処方-各 21 日周期で第 1 及び 8 日 Gemzar の注入後 第 1 日にシスプラチン を 100mg/m <sup>2</sup> 用量 で静脈内投与	30
カルボプラチン (Paraplatin®)	静脈内	単一薬剤療法: 第 1 日に 360mg/m <sup>2</sup> を静脈内投与 (注入を 15 分以上持続) 他の用量の計算: シクロホスファミドとの併用療法、用量の調整の 推奨、慣用の用量など。		40
イフェキサド (Ifex®)	静脈内	日用量 1.2g/m <sup>2</sup>	連続 5 日間 3 週毎又は血液毒 性からの回復後に 反復	

塩酸トポテカン (Hycamtin®)	静脈内	一日 30 分かけて静脈内注入により 1.5mg/m <sup>2</sup>	21 日過程の第 1 E に開始して連続 5 日間
ビスホスフォネート パミドロネート	静脈内	癌患者における高カルシウム血症を補正す るため 4~24 時間にわたり 60mg 又は 90mg の単回注入	
アレンドロネート	経口	骨吸収を防止又は制御するため 2 年にわ たり 5mg/日を毎日、続いて 9 ヶ月にわたり 10mg/日	
リセドロネート	経口、6~8oz の水で服用	骨吸収を防止又は制御するため 5.0mg	
ロバスタチン (Mevacor™)	経口	単回又は2回分割用量で 10~80mg/日	

10

## 【 0 2 3 0 】

癌治療及びその投与量、投与経路及び推奨用法は当技術分野で公知であり、Physician's Desk Reference (第56版、2002年、第57版、2003年)などの文献に記載されている。

20

## 【 0 2 3 1 】

## 5 . 5 . 4 . 炎症性疾患の治療

本発明の液体製剤は、炎症性障害又はその 1 以上の症候の予防、管理、治療又は改善のために被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、1 以上の他の治療、好ましくは炎症性疾患の予防、管理、治療又は改善に有用な治療(例えば限定されるものではないが、以下のセクション 5 . 5 . 4 . 1 に例示される予防薬若しくは治療薬など)と組み合わせて、炎症性疾患又はその 1 以上の症候の予防、管理、治療又は改善が必要な被験体に投与しうる。特定の実施形態において、本発明は、炎症性疾患又はその 1 以上の症候の予防、管理、治療又は改善の方法を提供し、該方法は、その必要のある被験体に、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量を投与することを含む。別の実施形態において、本発明は、炎症性疾患又はその 1 以上の症候の予防、管理、治療又は改善の方法を提供し、該方法は、その必要のある被験体に、予防又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量と、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の 1 以上の他の治療(例えば予防薬若しくは治療薬など)の予防又は治療有効量の用量を投与することを含む。

30

## 【 0 2 3 2 】

本発明は、このような炎症性障害についての従来の治療(例えば、メトトレキサート及び TNF - アンタゴニスト、例えば REMICADE™ 又は ENBREL™) に対して不応性の被験体において、炎症性障害の 1 以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような炎症性障害についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、炎症性障害の 1 以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の 1 種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、他の治療に対して不応性であることを証明したことがあるがこれらの治療に対してもはや不応性ではない患者に、任意の他の治療と組み合わせて本発明の液体製剤を投与することによる、炎症性障害を管理又は治療するための方法を提供する。本発明はまた、治療されている被験体にとって別の治療があまりに毒性である(すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じるか

40

50

) ことを証明したか証明し得る場合の、炎症性障害の治療のための代替的方法を提供する。例えば、本発明の液体製剤は、TNFアンタゴニスト又はメトトレキセートに対して不応性の被験体に投与することができる。さらに、本発明は、本発明の液体製剤を投与することにより治療されているか又は疾患活性を有さない患者において炎症性障害の再発を予防するための方法を提供する。

#### 【0233】

本発明に包含される方法により治療しうる炎症性疾患としては、限定されるものではないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー障害、敗血症ショック、肺繊維症、未分化脊椎関節炎、未分化関節炎、関節炎、骨関節炎、脊椎関節症(例えば、乾癬関節炎、強直性脊椎炎、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性骨溶解、ウィルソン病、および慢性のウイルスもしくは細菌感染症により生じる慢性炎症が挙げられる。本明細書のセクション3.1に記載するように、いくつかの自己免疫障害が炎症の症状と関連している。

10

#### 【0234】

抗炎症療法並びにそれらの投薬量、投与経路及び推奨される用法は当該分野で公知であり、Physician's Desk Reference(第56版、2002及び第57版、2003)のような文献中に記載されている。

#### 【0235】

##### 5.5.4.1. 抗炎症治療

本発明は、炎症性障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、本発明の液体製剤及びインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。炎症性障害又はその1以上の症候の予防、管理、治療又は緩和のために有用であることが既知であるか、そのために使用されてきたか、又はそのために現在使用されている任意の薬剤又は治療が、本明細書中に記載される発明に従って、本発明の液体製剤と組み合わせて使用することができる。このような薬剤の例には、免疫調節剤、抗血管形成剤、抗炎症剤及びTNF-アンタゴニストが含まれるがこれらに限定されない。

20

#### 【0236】

本発明の液体製剤と組み合わせて炎症性障害を有する被験体に投与することができる免疫調節剤の特定の例には以下が含まれるがこれらに限定されない:メトトレキセート、レフルナミド、シクロホスファミド、サイトキサン(cytoxan)、Immuran、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質(例えば、FK506(タクロリムス)、メチルプレドニゾロン(MP)、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン(シロリムス)、ミゾリピン、デオキシスパーガリン(deoxyspergualin)、ブレキナル(brequinar)、マロノトリロアミド(malononitriloamide)(例えばレフルナミド)、抗T細胞レセプター抗体(例えば、抗CD4抗体(例えば、cM-T412(Boeringer)、IDEC-CE9.1(登録商標)(IDEC and SKB)、mAB 4162W94、Orthoclone及びOKTcdr4a(Janssen-Cilag))、抗CD3抗体(例えば、Nuviion(Product Design Labs)、OKT3(Johnson & Johnson)又はRituxan(IDEC))、抗CD5抗体(例えば、抗CD5リシン連結イムノコンジュゲート)、抗CD7抗体(例えば、CHH-380(Novartis))、抗CD8抗体、抗CD40リガンドモノクローナル抗体(例えば、IDEC-131(IDEC))、抗CD52抗体(例えば、CAMPATH 1H(Ilex))、抗CD2抗体(例えば、MEDI-507(MedImmune, Inc.、国際公開第WO 02/098370号及び同第WO 02/069904号)、抗CD11a抗体(例えば、Xanelim(Genentech))及び抗B7抗体(例えば、IDEC-114)(IDEC));抗サイトカインレセプター抗体(例えば、抗IFNレセプター抗体、抗IL-2レセプター抗体(例え

30

40

50

ば、Zenapax (Protein Design Labs)、抗IL-4レセプター抗体、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-10レセプター抗体及び抗IL-12レセプター抗体)、抗サイトカイン抗体(例えば、抗IFN抗体、抗TNF-抗体、抗IL-1抗体、抗IL-6抗体、抗IL-8抗体(例えば、ABX-IL-8(Abgenix))及び抗IL-12抗体);CTLA4-免疫グロブリン;LFA-3TIP(Biogen、国際公開第WO 93/08656号及び米国特許第6,162,432号);可溶性サイトカインレセプター(例えば、TNF-レセプターの細胞外ドメイン又はそのフラグメント、IL-1レセプターの細胞外ドメイン又はそのフラグメント及びIL-6レセプターの細胞外ドメイン又はそのフラグメント);サイトカイン又はそのフラグメント(例えば、インターロイキン(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、TNF-、TNF-、インターフェロン(IFN)-、IFN-、IFN-及びGM-CSF);並びに抗サイトカイン抗体(例えば、抗IL-2抗体、抗IL-4抗体、抗IL-6抗体、抗IL-10抗体、抗IL-12抗体、抗IL-15抗体、抗TNF-抗体及び抗IFN-抗体)。

#### 【0237】

本発明の液体製剤と組み合わせて炎症性障害を有する被験体に投与することができる血管形成剤の非限定的な例には以下が含まれる:エンドスタチン、アンジオスタチン、アポミグレン(apomigren)、抗血管形成アンチトロンピンIII、フィブロンネクチンの29kDaのN末端及び40kDaのC末端のタンパク質分解フラグメント、uPAレセプターアンタゴニスト、プロラクチンの16kDaのタンパク質分解フラグメント、血小板第4因子の7.8kDaのタンパク質分解フラグメント、血小板第4因子の抗血管形成性の24アミノ酸のフラグメント、13.40と称される抗血管形成性因子、トロンボスポンジンIの抗血管形成性の22アミノ酸のペプチドフラグメント、SPARCの抗血管形成性の20アミノ酸のペプチドフラグメント、RGD含有ペプチド及びNGR含有ペプチド、ラミニン、フィブロンネクチン、プロコラーゲン及びEGFの小さい抗血管形成性ペプチド、酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)アンタゴニスト、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)アンタゴニスト、血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニスト並びにVEGFレセプター(VEGFR)アンタゴニスト(例えば、抗VEGFR抗体)。

#### 【0238】

本発明の液体製剤と組み合わせて炎症性障害を有する被験体に投与することができるTNF-アンタゴニストの非限定的な例には以下が含まれる:タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、TNF-に免疫特異的に結合する抗体のような抗体(例えば、ヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、Fv、ScFv、Fabフラグメント、F(ab)<sub>2</sub>フラグメント及びそれらの抗原結合フラグメント)、核酸分子(例えば、アンチセンス分子又は三重螺旋)、有機分子、無機分子、並びにTNF-の機能、活性及び/又は発現を遮断、低下、阻害又は中和する低分子。種々の実施形態において、TNF-アンタゴニストは、TNF-の機能、活性及び/又は発現を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)のようなコントロールと比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%低下させる。TNF-に免疫特異的に結合する抗体の例には以下が含まれるがこれらに限定されない:インフリキシマブ(REMICADE(商標);Centacor)、D2E7(Abbott Laboratories/Knoll Pharmaceuticals Co., Mt.Olive, N.J.)、HUMICADE(商標)としても公知のCDP571及びCDP-870(共にCelltech/Pharmacia, Slough, U.K.のもの)、並びにTN3-19.12(Williamsら、1994、Proc.NatI.Acad.Sci.USA 91:2762-2766;Thorbeckeら、1992、Proc.NatI.Acad.Sci.USA 89:7375-7379)。本発明はまた、本発明の組成物及び方法における、以下の米国特許において開示

されたTNF- $\alpha$ に免疫特異的に結合する抗体の使用を包含する：米国特許第5,136,021号；同第5,147,638号；同第5,223,395号；同第5,231,024号；同第5,334,380号；同第5,360,716号；同第5,426,181号；同第5,436,154号；同第5,610,279号；同第5,644,034号；同第5,656,272号；同第5,658,746号；同第5,698,195号；同第5,736,138号；同第5,741,488号；同第5,808,029号；同第5,919,452号；同第5,958,412号；同第5,959,087号；同第5,968,741号；同第5,994,510号；同第6,036,978号；同第6,114,517号及び同第6,171,787号（これらは各々、本明細書中でその全体が参考として援用される）。可溶性TNF- $\alpha$ レセプターの例には以下が含まれるがこれらに限定されない：sTNF-R1（Amgen）、エタネルセプト（ENBREL（商標）；Immunex）及びそのラットホモログRENBREL（商標）、TNFrI、TNFrII由来のTNF- $\alpha$ の可溶性インヒビター（Kohnoら、1990、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:8331-8335）、並びにTNF- $\alpha$ Inh（Seckingerら、1990、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:5188-5192）。

#### 【0239】

本発明によって包含される他のTNF- $\alpha$ アンタゴニストには以下が含まれるがこれらに限定されない：インターフェロン- $\gamma$ 活性化マクロファージを介したTNF- $\alpha$ 産生を遮断することが公知のIL-10（Oswaldら、1992、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:8676-8680）、TNFR-IgG（Ashkenaziら、1991、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539）、マウス産物TBP-1（Serono/Yeda）、ワクチンCytoTAb（Protherics）、アンチセンス分子104838（ISIS）、ペプチドRDP-58（SangStat）、サリドマイド（Celgene）、CDC-801（Celgene）、DPC-333（Dupont）、VX-745（Vertex）、AGIX-4207（AtheroGenics）、ITF-2357（Italfarmaco）、NPI-13021-31（Nereus）、SCIO-469（Scios）、TACEターゲッター（Immunix/AHP）、CLX-120500（Calyx）、Thiazolopyrim（Dynavax）、オーラノフィン（Ridaura）（SmithKline Beecham Pharmaceuticals）、キナクリン（メパクリンジクロロハイドレート（mepacrine dichlorohydrate））、テニダップ（tenidap）（Enablex）、Melanin（Large Scale Biological）及びUriachによる抗p38MAPK剤。

#### 【0240】

本発明の液体製剤と組み合わせて炎症性障害を有する被験体に投与される抗炎症剤の非限定的な例には、非ステロイド性抗炎症薬物（NSAID）、ステロイド性抗炎症薬物、 $\alpha$ -アゴニスト、抗コリン剤及びメチルキサンチンが含まれる。NSAIDの例には以下が含まれるがこれらに限定されない：アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ（CELEBREX（商標））、ジクロフェナク（VOLTAREN（商標））、エトドラク（LODINE（商標））、フェノプロフェン（NALFON（商標））、インドメタシン（INDOCIN（商標））、ケトラク（TORADOL（商標））、オキサプロジン（DAYPRO（商標））、ナブメトン（RELAFEN（商標））、スリンダク（CLINORIL（商標））、トルメチン（TOLECTIN（商標））、ロフェコキシブ（VIOXX（商標））、ナプロキセン（ALEVE（商標）、NAPROSYN（商標））、ケトプロフェン（ACTRON（商標））及びナブメトン（RELAFEN（商標））。このようなNSAIDは、シクロオキシゲナーゼ酵素（例えば、COX-1及び/又はCOX-2）を阻害することによって機能する。ステロイド性抗炎症薬物の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：グルココルチコイド、デキサメタゾン（DECADRON（商標））、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン（DELTAZONE（商標））、プレドニゾロン、トリアムシノロン、アザルフィジン及びエイコサノイド（例えば、プロスタグランジン、トロンボキサン及びロイコトリエン）。

#### 【0241】

特定の実施形態において、骨関節炎を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定さ

れない、骨関節炎の予防、治療、管理又は緩和のために有用な他の薬剤又は治療と組み合わせ、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：鎮痛剤（非限定的な例は、4000 mg / dまでの用量のアセトアミノフェン；フェナセチン；及び200 mg ~ 300 mgの範囲内の1日用量のトラマドールである）；NSAID（非限定的な例には、アスピリン、ジフルニサル、ジクロフェナク、エトドラク、フェナメート（fenamate）、フェノプロフェン、フルビプロフェン（flurbiprofen）、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、サリチル酸メチル、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリダク及びトルメチンが含まれるがこれらに限定されず、低用量のNSAID（例えば、1200 mg / dのイブプロフェン、500 mg / dのナプロキセン）が好ましく、胃粘膜保護剤（例えば、ミソプロストール、ファモチジン又はオメプラゾール）をNSAIDと同時に使用することが好ましい）；非アセチル化サリチレート（サルサラートが含まれるがこれに限定されない）；シクロオキシゲナーゼ（Cox）-2特異的インヒビター（CSI）（セレコキシブ及びロフェコキシブが含まれるがこれらに限定されない）；デボーグルココルチコイド調製物の関節内注射又は関節周囲注射；ヒアルロン酸の関節内注射；カプサイシンクリーム；フィブリン、軟骨破片及び他の細片を洗い流すための骨関節炎の膝の多数の灌注；並びに関節置換手術。本発明の液体製剤はまた、骨関節炎の予防、治療、管理及び緩和において、以下が含まれるがこれらに限定されない他の非薬理的測定と組み合わせ使用することができる：関節負荷の低下（非限定的な例は、劣った姿勢の矯正であり、過度の腰部脊椎前彎症について支持し、関与した関節の過度の負荷を回避し、延長された直立、横倒し（keeling）及びしゃがみこみを回避する）；罹患した関節への熱の適用；有酸素運動及び他の身体的治療。

10

20

#### 【0242】

特定の実施形態において、慢性関節リウマチを有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、慢性関節リウマチの予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせ、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：NSAID（非限定的な例には、アスピリン、ジフルニサル、ジクロフェナク、エトドラク、フェナメート、フェノプロフェン、フルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、サリチル酸メチル、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリダク及びトルメチンが含まれるがこれらに限定されない）；鎮痛剤（非限定的な例は、アセトアミノフェン、フェナセチン及びトラマドールである）；CSI（セレコキシブ及びロフェコキシブが含まれるがこれらに限定されない）；グルココルチコイド（好ましくは、低用量経口グルココルチコイド（例えば、< 7.5 mg / dのプレドニゾン）又は高用量グルココルチコイドによる毎月のパルス又は関節内グルココルチコイド）；疾患修飾性抗リウマチ薬物（DMARD）（メトトレキサート（好ましくは、1週間に1回、低用量（例えば、7.5 mg ~ 30 mg）で断続的に与えられる）、金化合物（例えば金塩）、D-ペニシラミン、抗マラリア剤（例えばクロロキン）及びスルファサラジンが含まれるがこれらに限定されない）；TNF-中和剤（エタネルセプト及びインフリキシマブが含まれるがこれらに限定されない）；免疫抑制剤及び細胞傷害性剤（例としては、アザチオプリン、レフルナミド、シクロスポリン及びシクロホスファミドが含まれるがこれらに限定されない）、並びに手術（例としては、関節形成術、総関節置換、手の再建手術、開放滑膜切除術又は関節鏡滑膜切除術、及び手首の早期腱滑膜切除術（tenosynovectomy）が含まれるがこれらに限定されない）。本発明の液体製剤はまた、慢性関節リウマチの予防、治療、管理及び緩和において、以下を含むがこれらに限定されない他の測定と組み合わせ使用することができる：安静、炎症を起こした関節の望まない動きを減少させるための副子、運動、種々の矯正デバイス及び補助デバイスの使用、並びに他の身体的治療。本発明の液体製剤はまた、慢性関節リウマチの予防、治療、管理及び緩和において、以下を含むがこれらに限定されないいくつかの非伝統的なアプローチと組み合わせ使用することができる：食餌（例えば、食肉中に見出される食餌 - 6 必須脂肪酸を特定の魚油中に見出される - 3 脂肪酸（例えば、エイコ

30

40

50

サペンタエン酸)で置換したもの)、ワクチン、ホルモン及び局所的調製物。

【0243】

特定の実施形態において、慢性閉塞性肺疾患(COPD)を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、COPDの予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：気管支拡張剤(短期作用性及び長期作用性の $\beta_2$ -アドレナリン作用性アゴニスト(短期作用性 $\beta_2$ アゴニストの例には、アルブテロール、ピルブテロール(pirbuterol)、テルブタリン及びメタプロテレノール(metaproterenol)が含まれるがこれらに限定されず；長期作用性 $\beta_2$ アゴニストの例には、経口徐放性アルブテロール及び吸入されたサルメテロールが含まれるがこれらに限定されない)、抗コリン剤(例として、臭化イプラトロピウムが含まれるがこれに限定されない)並びにテオフィリン及びその誘導体(テオフィリンについての治療的範囲は、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 20\mu\text{g}/\text{mL}$ である)が含まれるがこれらに限定されない)；グルココルチコイド；外因性 $\beta_1$ AT(例えば、 $60\text{mg}/\text{kg}$ の毎週用量で静脈内投与される、プールされたヒト血漿に由来する $\beta_1$ AT)；酸素；肺移植；肺容量減少手術；気管内挿管、換気支持；毎年のインフルエンザワクチン及び23価多糖体を用いた肺炎球菌ワクチン接種；運動；並びに喫煙停止。

10

【0244】

特定の実施形態において、肺線維症を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、有効量の肺線維症治療に有用な1種又は複数の他の薬剤と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：酸素；コルチコステロイド(非限定的な例は、6週間にわたり $1\text{mg}/\text{kg}/\text{d} \sim 1.5\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ ( $100\text{mg}/\text{d}$ まで)で開始して、 $0.25\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ の最小維持用量まで3ヶ月～6ヶ月かけてゆっくりと次第に減じる、毎日のプレドニゾン投与することである)；細胞傷害性薬物(非限定的な例は、1日1回の $100\text{mg} \sim 120\text{mg}$ の経口シクロホスファミド、及び1日1回の $3\text{mg}/\text{kg}$ から $200\text{mg}$ までの経口アザチオプリンである)；気管支拡張剤(非限定的な例は、短期作用性及び長期作用性の $\beta_2$ -アドレナリン作用性アゴニスト、抗コリン剤並びにテオフィリン及びその誘導体)；並びに抗ヒスタミン剤(非限定的な例は、ジフェンヒドラミン及びドキシラミンである)。

20

【0245】

特定の実施形態において、喘息を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、有効量の喘息治療に有用な1種又は複数の他の薬剤と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：アドレナリン作用性刺激剤(例としては、カテコールアミン(例えば、エピネフリン、イソプロテレノール及びイソエタリン(isotharine))；レゾルシノール(例えば、メタプロテレノール、テルブタリン及びフェノテロール)；並びにサリゲニン(saligenin)(例えば、サルブタモール)が含まれるがこれらに限定されない)。吸入は、アドレナリン作用性刺激剤のために好ましい投与経路である；メチルキサンチン(テオフィリン及びその種々の塩が含まれるがこれらに限定されない)；抗コリン剤(硫酸アトロピン、硝酸メチルアトロピン及び臭化イプラトロピウムが含まれるがこれらに限定されない)；グルココルチコイド(例としては、全身若しくは経口ステロイド及び吸入されたグルココルチコイドが含まれるがこれらに限定されない)；肥満細胞安定化剤(例としては、クロモリンナトリウム及びネドクロミルナトリウムが含まれるがこれらに限定されない)；ロイコトリエン改変剤(例としては、Zileuton、ザフィルカスト及びモンテルカストが含まれるがこれらに限定されない)；免疫抑制剤(例としては、メトトレキサート及び金塩が含まれるがこれらに限定されない)；並びに粘膜溶解剤(例としては、アセチルシステインが含まれるがこれに限定されない)。

30

40

【0246】

特定の実施形態において、アレルギーを有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、有効量のアレルギー治療に有用な1種又は複数の他の薬剤と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：クロモリン；抗メディエータ薬物(例としては、抗ヒスタミン剤が含まれるがこれらに限定されない、表4を参照のこ

50

と) ; 交感神経作用薬物 (例としては、 - アドレナリン作用性薬物及び - アドレナリン作用性薬物が含まれるがこれらに限定されない) ; テオフィリン及びその誘導体 ; グルココルチコイド ; 並びに免疫療法 (例としては、アレルゲンの長期反復注射、短い過程の脱感作及び毒免疫療法が含まれるがこれらに限定されない) 。

【表 4】

表4. H<sub>1</sub>抗ヒスタミン剤

化学物質のクラスおよび代表的薬物	通常の日投薬量
エタノールアミン ジフェンヒドラミン クレマスチン	4時間～6時間毎に25mg～50mg 12時間毎に0.34mg～2.68mg
エチレンジアミン トリペレナミン	4時間～6時間毎に25mg～50mg
アルキルアミン ブロムフェニラミン (Brompheniramine) クロルフェニラミン トリプロリジン(1.25mg/5ml)	4時間～6時間毎に4mg;または8時間～12時間毎に8mg～12mgのSR形態 4時間～6時間毎に4mg;または8時間～12時間毎に8mg～12mgのSR形態 4時間～6時間毎に2.5mg
フェノチアジン プロメタジン	就寝時に25mg
ピペラジン ヒドロキシジン	6時間～8時間毎に25mg
ピペリジン アステミゾール(非鎮静性) アザタジン(Azatadine) セチリジン シプロヘプタジン フェキソフェナジン(非鎮静性) ロラタジン(非鎮静性)	10mg/d 12時間毎に1mg～2mg 10mg/d 6時間～8時間毎に4mg 12時間毎に60mg 24時間毎に10mg

10

20

30

【 0 2 4 7 】

#### 5 . 5 . 5 . 自己免疫障害の治療

本発明の液体製剤は、自己免疫障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和するために、それを必要とする被験体に投与することができる。本発明の液体製剤はまた、自己免疫障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和するために、1種又は複数の他の治療 (好ましくは、自己免疫障害の予防、管理又は治療のために有用な治療 (本明細書中以下のセクション5 . 5 . 5 . 1に列挙される予防薬又は治療薬が含まれるがこれらに限定されない) ) と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することができる。特定の実施形態において、本発明は、自己免疫障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、本発明は、自己免疫障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療 (例えば、予防薬又は治療薬) の用量を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

40

50

## 【0248】

本発明は、このような自己免疫障害についての従来の治療に対して不応性の被験体において、自己免疫障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量をこの被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、このような自己免疫障害についての既存の単一の薬剤治療に対して不応性の被験体において、自己免疫障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供し、この方法は、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤の用量、及び予防有効量又は治療有効量のインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の用量を、この被験体に投与するステップを含む。本発明はまた、他の治療に対して不応性であることを証明したことがあるがこれらの治療に対してもはや不応性ではない患者に、任意の他の治療と組み合わせて本発明の液体製剤を投与することによる、自己免疫障害又はその1以上の症候を管理、治療又は緩和するための方法を提供する。本発明はまた、治療されている被験体にとって別の治療があまりに毒性である（すなわち、許容できない副作用又は我慢できない副作用を生じるか）ことを証明したか証明し得る場合の、自己免疫障害の管理又は治療のための代替的方法を提供する。特に、本発明は、患者が他の治療に対して不応性である場合の、自己免疫疾患の管理又は治療のための代替的方法を提供する。さらに、本発明は、本発明の液体製剤を投与することにより治療されているか又は疾患活性を有さない患者において自己免疫障害の再発を予防するための方法を提供する。

10

20

## 【0249】

自己免疫障害において、その免疫系は、外来物質が存在しない場合に免疫応答を闘うように誘発し、身体の正常な保護的免疫系は、自己を誤って攻撃することによって自分自身の組織に損傷を引き起こす。異なる方法で身体を侵す多数の異なる自己免疫障害が存在する。例えば、脳は多発性硬化症を有する個体において侵され、腸はクローン病を有する個体において侵され、種々の関節の滑膜、骨及び軟骨は、慢性関節リウマチを有する個体において侵される。自己免疫障害は、1種又は複数のタイプの身体組織の破壊を進行させるので、器官の異常な増殖又は器官機能の変化が生じ得る。自己免疫障害は、1種の器官又は組織のタイプのみを侵すか、又は複数の器官及び組織を侵すことがある。自己免疫障害によって一般に侵される器官及び組織には、赤血球、血管、結合組織、内分泌腺（例えば、甲状腺又は膵臓）、筋肉、関節及び皮膚が含まれる。本発明の方法によって治療することができる自己免疫障害の例としては以下が含まれるがこれらに限定されない：円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎及び自己免疫性精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックブルー皮膚炎（celiac sprue-dermatitis）、慢性疲労免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャグ-ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、円盤状エリテマトーデス（discoid lupus）、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋肉痛-線維筋炎、糸球体腎炎、Graves病、ギラン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病（ITP）、IgA神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型糖尿病又は免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、慢性関節リウマチ、類肉腫症、強皮症、シェーグレン症候群、stiff-man症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎（例えば、疱疹状皮膚炎血管炎）、白斑並びにウェグナー肉芽腫症。

30

40

## 【0250】

自己免疫治療並びにそれらの投薬量、投与経路及び推奨される用法は当該分野で公知で

50

あり、Physician's Desk Reference (第56版、2002及び第57版、2003)のような文献中に記載されている。

【0251】

5.5.5.1. 他の治療

本発明は、自己免疫障害又はその1以上の症候を予防、管理、治療又は緩和する方法を提供し、この方法は、本発明の液体製剤及びインテグリン  $v_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント以外の1種又は複数の治療(例えば、予防薬又は治療薬)を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。自己免疫障害又はその1以上の症候の予防、管理、治療又は緩和のために有用であることが既知であるか、そのために使用されてきたか、又はそのために現在使用されている任意の薬剤又は治療が、本明細書中に記載される発明に従って、本発明の液体製剤と組み合わせて使用することができる。このような薬剤の例には、免疫調節剤、抗炎症剤及びTNF-アンタゴニストが含まれるがこれらに限定されない。自己免疫障害の予防、管理、治療又は緩和のために本発明の液体製剤と組み合わせて使用することができる免疫調節剤、抗炎症剤及びTNF-アンタゴニストの特定の例は、本明細書中上記で開示される。

10

【0252】

特定の実施形態において、多発性硬化症(MS)を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、MSの予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：IFN-1b (Betaseron) (例えば、8百万国際単位(MIU)が、1日おきに皮下注射によって投与される)；IFN-1a (Avonex) (例えば、6.0MIUが、毎週1回筋内注射によって投与される)；酢酸グラチラマー(Copaxone) (例えば、20mgが、毎日皮下注射によって投与される)；ミトキサントロン(例えば、12mg/m<sup>2</sup>が、3ヶ月毎に静脈内注入によって投与される)；アザチオプリン(例えば、体重1kg当たり2mg~3mgが、各日に経口投与される)；メトトレキセート(例えば、7.5mgが、各週に1回経口投与される)；シクロホスファミド；静脈内免疫グロブリン(例えば、体重1kg当たり0.15g~0.2gが、2年間までにわたって毎月投与される)；グルココルチコイド；メチルプレドニゾロン(例えば、高用量で隔月の周期で投与される)；2-クロロデオキシアデノシン(クラドリピン)；バクロフェン(例えば、分割された用量で15mg/d~80mg/d、又は240mg/dまでのより高い用量で経口的に、又は留置カテーテルを介して髄腔内的に(intrathecally))；塩酸シクロエンザプリン(cycloenzaprine) (例えば、5mg~10mgを1日2回又は1日3回)；クロナゼパム(例えば、0.5mg~1.0mgを1日3回、就寝時用量を含む)；塩酸クロニジン(例えば、0.1mg~0.2mgを1日3回、就寝時用量を含む)；カルバマゼピン(例えば、分割された漸増する用量で100mg/d~1200mg/d)；ガバペンチン(例えば、300mg/d~3600mg/d)；ジランチン(dilantin) (例えば、300mg/d~400mg/d)；アミトリプチリン(例えば、25mg/d~150mg/d)；バクロフェン(例えば、10mg/d~80mg/d)；プリミドン(例えば、125mg~250mgを1日2回又は1日3回)；オンダンセトロン(例えば、4mg~8mgを1日2回又は1日3回)；イソニアジド(例えば、分割された用量で1200mgまで)；オキシブチニン(例えば、5mgを1日2回又は1日3回)；トルテロジン(tolterodine) (例えば、1mg~2mgを1日2回)；プロパンテリン(例えば、7.5mg~15mgを1日4回)；ベタネコール(例えば、10mg~50mgを1日3回又は1日4回)；塩酸テラゾシン(例えば、就寝時に1mg~5mg)；クエン酸シルデナフィル(例えば、50mg~100mgを必要に応じて経口的に)；アマンタジン(例えば、100mgを1日2回)；ペモリン(例えば、37.5mgを1日2回)；高用量のビタミン；カルシウムオロテート(calcium orotate)；ガンシクロピル；抗生物質；並びに血漿交換。

20

30

40

【0253】

特定の実施形態において、乾癬を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されな

50

い、乾癬の予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：局所的なステロイドのクリーム又は軟膏；タール（例としては、Estar、Psorigel、Fototarクリーム、及びNutraderm口内中又はトリアムシノロン0.1%クリームと直接混合した10%のLCDが含まれるがこれらに限定されない）；閉塞；局所的ビタミンDアナログ（非限定的な例は、カルシポトリエン（calcipotriene）軟膏である）；紫外線光；PUVA（ソラレン＋紫外線A）；メトトレキセート（例えば、1週間に1回25mgまで又は1週間に1回3用量について12時間毎に分割された用量で）；合成レチノイド（非限定的な例は、例えば、0.5mg/kg/d～1mg/kg/dの投薬量のエトレチナートである）；免疫調節治療（非限定的な例はシクロスポリンである）；スルファサラジン（例えば、1日3回1gの投薬量で）。

#### 【0254】

特定の実施形態において、クローン病を有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、クローン病の予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：止瀉薬（非限定的な例は、1日4回までのロペラミド2mg～4mg、1日4回までのアトロピン1錠を伴うジフェノキシレート（diphenoxylate）、1日4回までのアヘンチンキ8滴～15滴、1日1回又は2回のコレステラミン2g～4g又はコレステポール（colestipol）5gである）；抗痙攣薬（非限定的な例は、プロパンテリン15mg、ジシクロミン（dicyclomine）10mg～20mg又は食前に与えられるヒヨスチアミン（hyoscyamine）0.125mgである）；5-アミノサリチル酸剤（非限定的な例は、1日2回のスルファサラジン1.5g～2g、特に高い投薬量（例えば、1日4回のPentasa 1g及び1日4回のAsacol 0.8g～1.2g）での、メサラミン（mesalamine）（Asacol）及びその徐放形態（Pentasa）である）；コルチコステロイド；免疫調節薬物（非限定的な例は、アザチオプリン（1MG/KG～2MG/KG）、メルカプトプリン（50MG～100MG）、シクロスポリン及びメトトレキセートである）；抗生物質；TNFインヒビター（INFLIXMABが含まれるがこれに限定されない）；免疫抑制剤（タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル及びサリドマイドが含まれるがこれらに限定されない）；抗炎症性サイトカイン（IL-10及びIL-11が含まれるがこれらに限定されない）；栄養療法；成分栄養を用いた経腸療法（例えば、4週間にわたるVIVONEX）；並びに完全静脈栄養（total parenteral nutrition）。

#### 【0255】

特定の実施形態において、エリテマトーデスを有する患者に、以下が含まれるがこれらに限定されない、エリテマトーデスの予防、治療、管理及び緩和において有用な他の薬剤又は治療と組み合わせて、予防有効量又は治療有効量の本発明の液体製剤が投与される：抗マラリア剤（ヒドロキシクロロキンが含まれるがこれに限定されない）；グルココルチコイド（例えば、低用量、高用量又は高用量の静脈内＋使用することができる治療）；免疫抑制剤（シクロホスファミド、クロラムブシル及びアザチオプリンが含まれるがこれらに限定されない）；細胞傷害性剤（メトトレキセート及びミコフェノール酸モフェチルが含まれるがこれらに限定されない）；アンドロゲン様ステロイド（ダナゾールが含まれるがこれに限定されない）；及び抗凝固剤（ワルファリンが含まれるがこれに限定されない）。

#### 【0256】

### 5.6. 抗体製剤の投与方法

本発明は、有効量の本発明の液体製剤を被験体に投与することによって、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、若しくは癌、又はその1以上の症候を治療、予防、及び改善する方法を提供する。様々な送達系が既知であり、本発明の液体製剤、又は治療薬若しくは予防薬を投与するのに使用可能である。本発明の抗体液体製剤又は治療（予防薬若しくは治療薬）を投与する方法には、非経口投与（例えば、皮

内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、及び皮下投与)、硬膜外投与、局所投与、肺内投与及び、粘膜投与(例えば、鼻腔内経路及び経口経路)が含まれるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態では、本発明の液体製剤を、筋肉内投与、静脈内投与、又は皮下投与する。好ましい実施形態において、本発明の液体製剤は皮下投与する。この製剤は、好都合などな経路で投与してもよく、例えば、注入又はボーラス注入によって、上皮細胞層又は粘膜皮膚細胞層(例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、及び腸粘膜)を介した吸収によって投与できるし、また、生物学的活性を有する他の薬剤と共に投与してもよい。全身投与することも、又は局所投与することもできる。特定の実施形態において、本発明の液体製剤は、腫瘍内又は炎症部位に投与する。

【0257】

一般に、本発明の液体製剤に含まれるインテグリン  $\alpha_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、本発明の液体製剤のレシピエントと同じ種の起源又は種反応性のものである。従って、好ましい実施形態において、本発明の液体製剤に含まれるインテグリン  $\alpha_3$  と免疫特異的に結合するヒト又はヒト化抗体を含む本発明の液体製剤は、治療又は予防のためにヒト患者に投与される。

【0258】

本発明は、本発明の液体製剤を、抗体又は抗体フラグメントの量を表示した、アンプル及びサシェ(sachette)などの密封容器に包装することを提供する。本発明の液体製剤は、抗体又は抗体フラグメントの量及び濃度を表示した密封容器中に存在することが好ましい。本発明の液体製剤は、少なくとも15 mg/ml、20 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml、175 mg/ml、200 mg/ml、250 mg/ml、又は300 mg/mlの濃度で、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml、7 ml、8 ml、9 ml、10 ml、15 ml、又は20 mlの量、そして最も好ましくは1.2 mlの量でインテグリン  $\alpha_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを密閉容器に入れて供給することが好ましい。本発明の特定の実施形態において、本発明の液体製剤は、静脈内注射用には、少なくとも15 mg/ml、20 mg/ml、25 mg/ml、50 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml、175 mg/ml、200 mg/ml、250 mg/ml、又は300 mg/mlの濃度でインテグリン  $\alpha_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(例えば、VITAXIN(登録商標)又はその抗原結合フラグメント)を、また反復皮下投与用には、少なくとも15 mg/ml、20 mg/ml、50 mg/ml、80 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml、175 mg/ml、200 mg/ml、250 mg/ml、又は300 mg/mlの濃度でインテグリン  $\alpha_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(例えば、VITAXIN(登録商標)又はその抗原結合フラグメント)を密閉容器に入れて供給することが好ましい。

【0259】

炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、インテグリン  $\alpha_3$  の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌、あるいはその1以上の症候を予防、治療、管理又は改善するのに有効な本発明の液体製剤の量は、当技術分野で周知の又は本明細書に記載する標準的な臨床技法で決定することができる。この製剤において用いられるべき正確な用量は、投与経路と炎症性障害、自己免疫障害又は癌の重症度に応じて異なり、医師の判断と、各患者の病状とに従って決定されるべきものである。有効量は、*in vitro*モデル又は動物モデルの試験系から得られる用量応答曲線から推定することもできる。

【0260】

本発明に包含される抗体、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、及び融合タンパク質に関しては、患者に投与される用量は、通常、患者の体重あたり約0.0001 mg/kgから100 mg/kgである。患者に投与される用量は、好ましくは患者の体重あたり15 mg/kgから50 mg/kgであり、より好ましくは患者の体重あたり5 mg/kg

10

20

30

40

50

g から 25 mg / kg 又は 5 mg / kg から 15 mg / kg である。特定の実施形態において、患者への投与量は、患者の体重あたり 5 mg / kg、8 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg、20 mg / kg、25 mg / kg、30 mg / kg 又は 50 mg / kg である。外来ポリペプチドに対する免疫応答のため、概してヒト抗体は、他の生物種からの抗体よりヒト体内における半減期が長い。したがって、ヒト抗体の投与は、より少ない用量において、かつより少ない頻度で行うことが可能である。さらに、本発明の液体製剤の投与の用量、体積、及び頻度は、この製剤中の抗体又は抗体フラグメントの濃度を増大させること、抗体又は抗体フラグメントの親和性及び / 又は結合活性を増強すること、並びに / あるいは抗体又は抗体フラグメントの半減期を長くすることによって減少させることもできる。

10

## 【0261】

小分子の用量の例には、被験体又は試料の重さ 1 キログラムあたりの小分子量で、ミリグラム量又はマイクログラム量（例えば、1 キログラムあたり約 1 マイクログラムから 1 キログラムあたり約 500 ミリグラム、1 キログラムあたり約 100 マイクログラムから 1 キログラムあたり約 5 ミリグラム、又は、1 キログラムあたり約 1 マイクログラムから 1 キログラムあたり約 50 マイクログラム）が含まれる。

## 【0262】

特定の実施形態において、本発明の液体製剤におけるインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  と免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（例えば VITAXIN（登録商標）又はそのフラグメント）を、0.1~20mg/kg/週、好ましくは 1~15mg/kg/週、より好ましくは 2~8mg/週、よりさらに好ましくは 3~7mg/kg/週、最も好ましくは 4~6mg/kg/週で、炎症性障害、自己免疫障害又は癌を有する被験体に投与する。別の実施形態において、本発明の液体製剤の予防有効量又は治療有効量の 1 以上の用量を被験体に投与し、ここで予防又は治療有効量は各用量で同じではない。

20

## 【0263】

具体的な実施形態において、本発明の液体製剤は、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的な抗体の血漿濃度を、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  活性を連続的に阻止する、好ましいレベル（例えば、約 0.1~約 100 mg / kg）に維持する投与処方投与される。具体的な実施形態において抗体の血漿濃度は、0.2  $\mu$ g / ml、0.5  $\mu$ g / ml、1  $\mu$ g / ml、2  $\mu$ g / ml、3  $\mu$ g / ml、4  $\mu$ g / ml、5  $\mu$ g / ml、6  $\mu$ g / ml、7  $\mu$ g / ml、8  $\mu$ g / ml、9  $\mu$ g / ml、10  $\mu$ g / ml、15  $\mu$ g / ml、20  $\mu$ g / ml、25  $\mu$ g / ml、30  $\mu$ g / ml、35  $\mu$ g / ml、40  $\mu$ g / ml、45  $\mu$ g / ml、または 50  $\mu$ g / ml で維持される。被験体で好ましい血漿濃度は、いくつかの要因（特に限定されないが、疾患または障害の性質、疾患または障害の重症度、および被験体の状態を含む）に依存する。そのような投与処方は、慢性疾患または障害の予防、治療、管理、および改善に特に有益である。

30

## 【0264】

別の実施形態において、本発明の液体製剤は、骨吸収の少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% を阻止するレベルに、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的な抗体又は抗体フラグメントの血漿濃度を維持する投与処方を使用して、異常な骨代謝に関連する疾患または障害の被験体に投与される。特定の実施形態において、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的な抗体又は抗体フラグメントは、異常な骨代謝に関連する疾患又は障害を有する患者において約 0.1  $\mu$ g / ml ~ 約 100  $\mu$ g / ml で維持される。

40

## 【0265】

具体的な実施形態において、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  に免疫特異的に結合するコンジュゲートされた抗体または抗体フラグメントを含む液体製剤は、間欠的に投与される。本明細書において「コンジュゲート抗体または抗体フラグメント」は、他の残基（特に限定されないが、異種ペプチド、ポリペプチド、他の抗体または抗体フラグメント、マーカー配列

50

、診断物質、治療薬、放射性金属イオン、ポリマー、アルブミン、および固体支持体を含む)に結合される抗体または抗体フラグメントを意味する。

【0266】

別の実施形態において、被験体、好ましくはヒトは、本発明の液体製剤中のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する予防的又は治療有効量の抗体又は抗体フラグメント(例えば、VITAXIN(登録商標)又はその抗原結合フラグメント)の1以上の用量を投与され、ここで、該被験体に投与される本発明の液体製剤中の予防的又は治療有効量の抗体又は抗体フラグメントの用量は、治療が進行するに連れて、例えば0.01 μg/kg、0.02 μg/kg、0.04 μg/kg、0.05 μg/kg、0.06 μg/kg、0.08 μg/kg、0.1 μg/kg、0.2 μg/kg、0.25 μg/kg、0.5 μg/kg、0.75 μg/kg、1 μg/kg、1.5 μg/kg、2 μg/kg、4 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg、15 μg/kg、20 μg/kg、25 μg/kg、30 μg/kg、35 μg/kg、40 μg/kg、45 μg/kg、50 μg/kg、55 μg/kg、60 μg/kg、65 μg/kg、70 μg/kg、75 μg/kg、80 μg/kg、85 μg/kg、90 μg/kg、95 μg/kg、100 μg/kg、又は125 μg/kgだけ増加する。

10

【0267】

別の実施形態において、被験体、好ましくはヒトは、本発明の液体製剤中のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>に免疫特異的に結合する予防的又は治療有効量の抗体又は抗体フラグメント(例えば、VITAXIN(登録商標)又はそのフラグメント)の1以上の用量を投与され、ここで、該被験体に投与される本発明の液体製剤中の予防的又は治療有効量の抗体又は抗体フラグメントの用量は、治療が進行するに連れて、例えば0.01 μg/kg、0.02 μg/kg、0.04 μg/kg、0.05 μg/kg、0.06 μg/kg、0.08 μg/kg、0.1 μg/kg、0.2 μg/kg、0.25 μg/kg、0.5 μg/kg、0.75 μg/kg、1 μg/kg、1.5 μg/kg、2 μg/kg、4 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg、15 μg/kg、20 μg/kg、25 μg/kg、30 μg/kg、35 μg/kg、40 μg/kg、45 μg/kg、50 μg/kg、55 μg/kg、60 μg/kg、65 μg/kg、70 μg/kg、75 μg/kg、80 μg/kg、85 μg/kg、90 μg/kg、95 μg/kg、100 μg/kg、又は125 μg/kgだけ増加する。

20

30

【0268】

予防薬又は治療薬の用量は、Physician's Desk Reference(第56版、2002、第57版、2003)に記載されている。

【0269】

5.7. 生物学的アッセイ

本発明の液体製剤のいくつかの態様は、好ましくはin vitro、細胞培養系、および動物モデル生物(例えば、げっ歯類動物モデル系)で、所望の治療活性について試験された後に、ヒトで使用される。例えば、本発明の液体製剤の投与が適応となるかどうかを決定するために使用できるアッセイには、細胞培養アッセイがあり、ここでは、患者の組織サンプルが培養で増殖され、本発明の液体製剤に暴露されるかまたは接触され、組織サンプルへのそのような組成物の作用が観察される。組織サンプルは、生検により患者から得られる。この試験は、各患者について治療的に最も有効な予防薬または治療薬の同定を可能にする。種々の具体的な実施形態において、自己免疫疾患、炎症性疾患、インテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>の異常な発現および/または活性に関連する障害、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、または癌に関連する種類の細胞の代表的細胞(例えば、内皮細胞、癌細胞、活性化T細胞、破骨細胞、およびB細胞)を用いて、本発明の液体製剤がそのような種類の細胞に所望の効果を有するかどうかを決定するために、アッセイを行うことができる。接触した細胞の増殖または生存が低レベルは、本発明の液体製剤が患者の症状を治療、管理、予防、または改善するのに有効であることを示す。あるいは患者の細胞を培養する代わりに、腫瘍または悪性腫瘍細胞株または内皮細胞株の細胞を使用して

40

50

、本発明の液体製剤をスクリーニングしてもよい。そのような生存および/または増殖を評価するのに、当該分野で標準的な多くのアッセイを使用することができる：例えば、3H-チミジン取り込みを測定することにより、直接的細胞計測により、既知の遺伝子（例えば、fosおよびmyc）の転写活性または細胞サイクルマーカーの変化を検出することにより、細胞増殖を測定することができる。細胞生存能力は、トリパンブルー染色により評価することができる、分化は、形態などの変化に基づき視覚的に評価することができる。

#### 【0270】

本発明の液体製剤の抗体または抗体フラグメントの結合特異性、親和性および機能活性は、当該分野で公知の種々の *in vitro* 結合および細胞接着アッセイで解析することができる、例えば特に限定されないが、国際特許公報 W000/78815 および W002/070007、US Patent No. 6,248,326、US Patent No. 6,472,403、Pecherら、The FASEB J. 16(10):1266-8 (2002)、Almedら、The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50:1371-1379 (2002)（これらのすべては参照することにより本明細書に組み込まれる）に開示されているものがある。

#### 【0271】

本発明の液体製剤の抗体または抗体フラグメントの結合特異性は、 $\alpha_v\beta_3$  への結合、および他の  $\alpha_v$ -または  $\beta_3$ -含有インテグリンとの交差反応性を測定することにより、評価することができる。特に結合特異性は、 $\alpha_{11b}\beta_3$ （血小板上で発現される主要なインテグリン）、および  $\alpha_v\beta_5$ （内皮細胞や結合組織の細胞に一般的に存在するインテグリン）への結合を測定することにより、評価することができる。簡単に説明すると、交差反応性を調べるためには、インテグリンをELISAプレート上に被覆し、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  と他のインテグリンに対する抗体結合活性について測定される。インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  および  $\alpha_v\beta_5$  は、当該分野で公知の方法、例えば Cheresh, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6471-6475、および Cheresh と Spiro, 1987, J. Biol. Chem. 262:17703-17711 に記載のような親和性クロマトグラフィーにより単離することができる。具体的な実施形態において、抗  $\alpha_v\beta_3$  抗体親和性カラムを使用して、オクチルグルコシドヒト胎盤溶解物から  $\alpha_v\beta_3$  が単離され、抗  $\alpha_v$  親和性カラムを使用して、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  欠失カラムフロースルーから  $\alpha_v\beta_5$  が単離される。抗体結合活性は、ヤギ抗ヒトIgG-アルカリホスファターゼコンジュゲートを使用してELISAにより評価される。精製したヒトIgG<sub>1</sub>抗体を、対照として使用することができる。

#### 【0272】

別の実施形態において、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に対する親抗インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  抗体又は抗体フラグメントとの競合的結合アッセイで、結合親和性と特異性が評価される。競合的結合はELISAアッセイにより測定される。抗体の結合は、増加する濃度の抗体競合物質の存在下で測定される。あるいは、対照の競合抗体はステロイド抗炎症剤ヒトIgG<sub>1</sub>である。

#### 【0273】

別の実施形態において、フィブリノゲンへのインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  結合に及ぼす抗体又は抗体フラグメントの阻害活性を測定することにより、結合親和性と特異性が評価される。簡単に説明すると、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  がELISAプレート上に蒔かれる。抗体又は抗体フラグメントの阻害活性は、増加する濃度の抗体または対照抗体の存在下で結合ピオチン化フィブリノゲンの量を測定することにより定量することができる。結合したフィブリノゲンを検出するのに、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼが使用される。

#### 【0274】

別の実施形態において、細胞接着アッセイでインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  結合の阻害により抗体又は抗体フラグメントの結合の特異性が評価される。内皮細胞接着事象は血管形成プロセスの重要な成分であり、 $\alpha_v\beta_3$  の阻害は腫瘍の血管新生を低下させ、従って腫瘍基速度を低下させることが知られている。これらのアッセイにおける抗インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  抗体による  $\alpha_v\beta_3$  介在細胞付着の阻害は、この抗体が *in situ* または *in vivo* で使用される時、阻害活性を示す。簡単に説明すると10% FBS含有RPMI中で増殖させたインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  陽性M21黒色腫細胞が、これらの細胞結合アッセイで使用される。トリプシン処理により培

10

20

30

40

50

養プレートから細胞が放出され、接着バッファー中に  $4 \times 10^5$  細胞/mlの濃度で再懸濁される。抗体と対照抗体は、250  $\mu$ lの接着バッファー（ヘブスバッファー化した食塩水pH7.4中10mMヘブス、2 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.2mM MnCl<sub>2</sub>、および1% BSA）で所望の濃度まで希釈され、フィブリノゲンをあらかじめ被覆した48ウェルプレートに加えらる。各ウェルは10  $\mu$ g/ml濃度の200  $\mu$ lフィブリノゲンで37℃で1時間被覆される。アッセイのために、等量の抗体またはイソタイプが一致した対照抗体を含有する細胞（250  $\mu$ l）がウェルのそれぞれに加えられ、静かに攪拌して混合され、37℃で20分インキュベートされる。BSA単独で被覆した対照ウェルに残る細胞がなくなるまで、接着バッファーを洗浄して非結合細胞を除去した。結合細胞は、クリスタルバイオレットで染色して、これを次に100  $\mu$ lの酢酸（10%）で抽出し、可溶化された色素の吸光度を560nmで測定して定量する。

10

## 【0275】

別の実施形態において、インテグリン  $\alpha_5\beta_3$ に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントの阻害活性は、内皮細胞遊走アッセイで試験される。この点で、内皮細胞遊走を阻害するVitaxinの能力を評価するのに、Transwell細胞遊走アッセイが使用される（Choiら、1994, J. Vascular Surg. 19:125-134およびLeaveslyら、1993, J. Cell. Biol. 121:163-170）。簡単に説明すると、対数期で低継代数のヒト臍帯静脈内皮細胞を静かにトリプシン処理して採取し、洗浄し、1% BSAを含有する37℃ HBS（20mMヘブス、150mM NaCl、1.8mM MgCl<sub>2</sub>、1.8mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、および5 mMグルコース、pH7.4）で  $2 \times 10^6$  細胞/mlの濃度で再懸濁する。ストック溶液のために抗体を10  $\mu$ g/mlに希釈する。抗体を細胞に1:1希釈（抗体の最終濃度 = 5  $\mu$ g/ml；細胞の最終濃度 =  $1 \times 10^6$  細胞/ml）し、氷上で10~30分インキュベートする。次に細胞/抗体懸濁液（各コンパートメントに200  $\mu$ l）をTranswell細胞培養チャンの上のコンパートメントに加え、その下のコンパートメントは0.5mlの10  $\mu$ g/mlピトロネクチン（HBS中）で被覆されている。ピトロネクチンは内皮細胞の化学誘引物質として作用する。チャンパーを37℃に4時間入れて、細胞の遊走を起こさせる。細胞遊走の視覚化は、まず綿スワブで上のコンパートメントの残存細胞を除去して行う。挿入体の下側に遊走した細胞をクリスタルバイオレットで30分間染色され、次に酢酸中で可溶化し、色素の吸光度を波長550nmで測定する。吸光度の量は、上のチャンパーから下のチャンパーに遊走した細胞の数に正比例する。

20

## 【0276】

好適な実施形態において、インテグリン  $\alpha_5\beta_3$ への抗体または抗体フラグメントの結合オンとオフ速度を測定するために、BIAcore速度分析が使用される。BIAcore速度分析は、その表面に抗体またはその断片が固定化されたチップからの、インテグリン  $\alpha_5\beta_3$ の結合および解離を分析することを含む。

30

## 【0277】

in vitroアッセイのさらなる例、例えばウェスタンブロット解析、フローサイトメトリック分析、皮質骨および細胞外マトリックスタンパク質への細胞接着アッセイ、細胞遊走アッセイ、細胞侵入アッセイ、および細胞増殖アッセイは、Pecherら The FASEB J. 16(10):1266-8 (2002)（この本文全体は参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されている。

## 【0278】

本発明の液体製剤は、適当な動物モデル系で試験された後にヒトで使用される。そのような動物モデル系には、特に限定されないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどがある。当該分野で公知の任意の動物系を使用することができる。本発明の具体的な実施形態において、本発明の液体製剤はマウスモデル系で試験される。そのようなモデル系は広く使用され当業者に公知であり、例えば、マウスインテグリン  $\alpha_5\beta_3$ がヒトインテグリン  $\alpha_5\beta_3$ で置換されたSCIDマウスモデルまたはトランスジェニックマウス、ヒト異種移植片を有するヌードマウス、インテグリン  $\alpha_5\beta_3$ に免疫特異的に結合する抗体またはその断片がVITAXIN（登録商標）と同じ標的を認識する動物モデル、例えばハムスター、ウサギなどが公知であり、「抗癌剤開発のための腫瘍モデルの関連（Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development）」（1999, FiebigとBurge

40

50

r編) ; 「腫瘍学への貢献 (Contributions to Oncology) 」 (1999, Karger) ; 「腫瘍学研究におけるヌードマウス (The Nude Mouse in Oncology Research) 」 (1991, BovenとWinograd編) ; および「抗癌剤開発ガイド (Anticancer Drug Development Guide) 」 (1997, Teicher編) (参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。本発明の液体製剤は、繰り返し投与することができる。操作のいくつかの様子は変化し得る。

#### 【0279】

標的の疾患または障害 (例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝および/または異常な血管形成に関連する障害、又は癌) に関連する当該分野で公知の種々の動物モデルを使用することができ、特に限定されないが、国際特許公報W000/78815、US Patent No. 6,248,326、US Patent No. 6,472,403、Pechaurら、The FASEB J. 16(10):1266-8 (2002)、Almedら、The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50:1371-1379 (2002) (これらのすべては参照することにより本明細書に組み込まれる) に開示のものがある。

#### 【0280】

ある実施形態において本発明の液体製剤による腫瘍増殖の阻害は、2つの動物モデルで試験される。最初のモデルは、ヒヨコ漿尿膜 (CAM) 中の血管形成を測定する。このアッセイは、全組織の血管新生が起きているため、*in vivo*血管形成の充分認識されたモデルである。特にこのアッセイは、増殖因子に浸漬したフィルターディスクに向かって、またはCAM上で増殖した組織への、ヒヨコCAM血管の増殖因子誘導性血管形成を測定する。血管新生の阻害は、新しい血管増殖の量と程度に基づくか、またはCAM上の組織の増殖阻害に基づく。このアッセイは、他の研究者により詳細に記載され、血管新生ならびに腫瘍組織の血管新生を測定するのに使用されている (Ausprunkら、1980, Am. J. Physiol. 79:597-618 (1975); Ossonskiら、Cancer Res.40:2300-2309; Brooksら、1994, Science 264:569-571、およびBrooksら、1994, Cell 79:1157-1164。簡単に説明すると、増殖因子誘導性血管形成のために、#1 Whatman Qualitative Circlesから皮膚生検パンチを使用して、フィルターディスクを打ち抜く。まずディスクを紫外線に暴露して滅菌し、無菌条件下で種々の濃度のTNF または陰性対照としてのHBSSで飽和させる (少なくとも1時間)。飽和したフィルターディスクをCAM上に蒔いて、血管形成を誘導する。種々の量のvitaxinと対照 (抗体または精製したヒトIgG<sub>1</sub>) を用いて胚を処理して、血管形成の阻害を行う。処理は静脈内注射により、ディスクを置いた後約24時間行う。48時間後、CAMを解剖し、血管形成に1~4のスケールでスコアを付ける。HBSS飽和フィルターディスクは陰性対照として使用され、CAMを調製するのに組織損傷に反応して起きる血管形成を示し、これらのCAMの値をバックグラウンドとして引く。VITAXIN (登録商標) はヒトIgG<sub>1</sub> サブクラスであるため、精製したヒトIgG<sub>1</sub> は、注射の陰性対照として使用される。

#### 【0281】

増殖因子誘導性血管形成を使用する上記CAMアッセイ以外に、腫瘍誘導性血管新生を使用してさらなるアッセイを行うことができる。これらのアッセイについて、 $v_3$ 陰性腫瘍断片をCAM中に移植して血管形成が誘導される。 $v_3$ 陰性腫瘍断片の使用は、腫瘍増殖の阻害が、CAM由来の内皮細胞による $v_3$ 介在血管新生の阻害のためであって、腫瘍上に存在する $v_3$ に介在される接着事象ではないことを確実にする。腫瘍増殖の阻害は、FG ( $8 \times 10^6$  細胞、膀胱癌) とHep-3細胞 ( $5 \times 10^5$  細胞、咽頭癌) の単細胞懸濁液を30 $\mu$  ICAM上に置いて評価される。1週間後、腫瘍を取り出し、約50mgの断片に切断し、この時これらを新しいCAM上に置く。第2回目に置いた24時間後、胚に、Vitaxinまたは陰性対照としてのヒトIgG<sub>1</sub>を静脈内注射する。腫瘍を約7日間増殖させ、次にこれを取り出し重さを測定する。

#### 【0282】

第2の動物モデルでは、ウサギにおけるVx2癌細胞の阻害を、本発明の液体製剤の腫瘍に対する阻害作用の尺度として使用する。Vx2癌は、Shopeウイルス誘導性パピローマ由来の移植可能な癌である。これは1940年に初めて記載され、以来、腫瘍侵入、腫瘍-宿主相互作用および血管形成に関する研究で広く使用されている。Vx2癌は本来繊維性であり、

10

20

30

40

50

攻撃性が強く、未分化型の癌の特徴を示す。Vx2腫瘍の増殖は、ドナーウサギ中で連続的に移植することにより達成される。皮下移植に続いて、初期の炎症性反応後、宿主の修復機序が2～4日に始まると報告されている。この修復機序は、新しい結合組織の生成と新しい毛細管の産生が特徴である。新に形成される毛細管は4日目までは修復ゾーンに限定されているが、8日目までには腫瘍の外部領域まで広がっている。本発明の液体製剤のこれらの特徴と薬物動態を使用して、初期用量とこれらの実験のための処置スケジュールを決定することができる。

#### 【0283】

上記動物モデル中のVx2腫瘍の増殖は、Vx2癌を皮下移植したウサギで原発性腫瘍の増殖に対する、早期投与後の本発明の液体製剤の作用を調べるのに使用される。簡単に説明すると、Vx2腫瘍(50mg)が、皮膚と筋肉の切り込みを介してウサギの大腿内側に移植される。原発性腫瘍の測定は、25日までの実験中行う。

10

#### 【0284】

別の実施形態において、Balb/c nu/nuマウスを動物モデルとして使用して、異なる疾患、特に異常な骨代謝および/または異常な血管形成に関連するものを調べる。種々の型の $v_3$ を発現する異なる細胞株(例えば、CHO、または乳癌細胞のような癌細胞の種類)を、ヌードマウスに静脈内注射することができる。Pecheruら(前述)を参照されたい。例えば、CHO細胞を $v_3$ の種々のcDNA構築体(例えば、野生型、または変異型)でトランスフェクトし、ヌードマウスに静脈内注射する。 $v_3$ (変異のために種々のレベルの活性を有する)と $v_3$ 抗体の骨転移への作用は、例えば骨組織の放射線写真、組織学的観察または統計解析により評価することができる。

20

#### 【0285】

別の実施形態において、宇宙環境(例えば、スペースシャトル)中の動物(健康ですでに構築された動物モデル)を使用して、本発明の抗体を評価することができる。長期間宇宙飛行をしている宇宙飛行士は、骨粗鬆症患者に似ているが、地球の重力の利点を有するヒトよりは10倍早く、骨密度が減少することが証明されているため、宇宙環境中の動物は、骨粗鬆症または異常な骨代謝および/または異常な血管形成に関連する疾患に及ぼす本発明の抗体または抗体フラグメントの作用を測定するための理想的な骨粗鬆症モデルである。

#### 【0286】

別の実施形態において、皮下移植されたヒト骨断片を有するSCIDマウス(SCID-ヒト-骨モデル)を動物モデルとして使用して、異常な骨代謝および/または異常な血管形成に関連する疾患への、本発明の抗体または抗体フラグメントの作用を評価する。例えば、動物モデルのヒト骨断片中に直接癌細胞(例えば、ヒト前立腺癌細胞)を注入する。同時に抗体処理を開始する。骨転移または血管形成に対する本発明の抗体または抗体フラグメントの作用は、対照群と比較することにより評価することができる。Nemethら、2002, *Clinical & Experimental Metastasis*, 19(別冊1):47を参照されたい。

30

#### 【0287】

本発明の液体製剤の抗炎症活性は、当該分野で公知でかつCrofford L.J.とWilder R.L.、「関節炎と関連症状：リウマチ学の教科書(*Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*)」中の「*Arthritis and Autoimmunity in Animals*」、McCartyら(編)、第30章(LeeとFebiger、1993)に記載の、種々の実験動物モデルを使用して測定することができる。炎症性関節炎と自己免疫性リウマチ疾患の実験的および自発的動物モデルはまた、本発明の液体製剤の抗炎症活性を評価するのに使用することができる。

40

#### 【0288】

当該分野で公知で広く使用されている関節炎または炎症性疾患の主要な動物モデルには以下がある：アジュバント誘導性関節炎ラットモデル、コラーゲン誘導性関節炎ラットおよびマウスモデル、および抗原誘導性関節炎ラット、ウサギおよびハムスターモデル、すべてCrofford L.J.とWilder R.L.、「関節炎と関連症状：リウマチ学の教科書(*Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*)」中の「*Arthritis and Autoi*

50

mmunity in Animals」、McCartyら（編）、第30章（LeeとFebiger、1993）に記載されている（これは参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0289】

本発明の液体製剤の抗炎症活性は、カラゲニン誘導関節炎ラットモデルを使用して評価することができる。カラゲニン誘導関節炎は、慢性関節炎または炎症の研究にウサギ、イヌおよびブタで使用されている。治療効果を決定するために定量組織形態学的評価が使用される。そのようなカラゲニン誘導関節炎ラットモデルを使用するための方法は、Hansra P.ら、「ラットのカラゲニン誘導関節炎」、*Inflammation*, 24(2):141-155 (2000)。当該分野で公知に記載されているようにザイモサン誘導性炎症動物モデルも一般的に使用されている。

10

【0290】

本発明の液体製剤の抗炎症活性はまた、ラットのカラゲニン誘導足蹠浮腫の阻害を、Winter C.A.ら、1962、「抗炎症剤のアッセイとしてラットの後ろ足のカラゲニン誘導足蹠浮腫」、*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-547に記載の方法の修飾を使用して、評価することができる。このアッセイは、ほとんどのNSAIDの抗炎症活性の1次in vivoスクリーニングとして使用されており、ヒトでの効果を予測すると考えられる。本発明の液体製剤の抗炎症活性は、ビヒクル投与対照群と比較して、試験群の後足の重量の増加のパーセント阻害として発現される。

【0291】

使用される実験的動物モデルがアジュバント誘導性関節炎ラットモデルである本発明の具体例において、本発明の液体製剤の抗炎症活性を測定するために、対照群と比較して体重を測定することができる。あるいは、本発明の液体製剤の効果を、骨喪失を測定するアッセイを使用して評価することができる。卵巣摘出誘導性骨吸収マウス、ラットおよびウサギモデルのような動物モデルは、骨形成の動的パラメータを得るために当該分野で知られている。YositateらまたはYamamotoらが記載したような方法を使用して、マイクロコンピュータ断層撮影分析と骨組織学的形態分析により骨容量をin vivoで測定する。Yositateら、1999、「オステオポンチン欠損マウスは卵巣摘出誘導性骨吸収に対して抵抗性である」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8156-8160; Yamamotoら、1998、「インテグリンリガンドであるEchistatinは卵巣摘出マウスとラットの骨喪失を防ぐ」、*Endocrinology* 139(3):1411-1419（いずれも参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

30

【0292】

さらに炎症性腸疾患の動物モデルもまた、本発明の液体製剤の効果を評価するのに使用することができる（Kimら、1992, *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30 (12 Suppl); 3S-10S)。潰瘍性大腸炎とクローン病は、動物で誘導できるヒトの炎症性腸疾患である。硫酸化多糖（特に限定されないが、アミロペクチン、カラゲニン、硫酸アミロペクチン、およびデキストラン硫酸を含む）または化学刺激物質（特に限定されないが、トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS））および酢酸）を、動物に経口投与して炎症性腸疾患を誘導することができる。

【0293】

喘息の動物モデルを用いて、本発明の液体製剤の効力を評価することができる。そのようなモデルの例は、TH1又はTH2レシピエントマウスの空気アレルギー誘発により気道にTFエフェクター細胞が遊走し、強力な好中球（TH1）及び好酸球（TH2）肺粘膜炎症応答に関連する、マウス養子免疫伝達モデルである（Cohnら、1997, *J. Exp. Med.* 186:1747-1761）。

40

【0294】

自己免疫疾患の動物モデルはまた、本発明の組成物と併用療法の効果を評価するのに使用することができる。自己免疫疾患（例えば、I型糖尿病、甲状腺自己免疫、全身性エリテマトーデス、および糸球体腎炎）の動物モデルが開発されている（Flandersら、1999, *Autoimmunity* 29:235-246; Kroghら、1999, *Biochimie* 81:511-515; Foster, 1999, *Semi*

50

n. Nephrol. 19:12-24)。

【0295】

さらに当業者に公知の任意のアッセイを使用して、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝または異常な血管形成に関連する障害、および/又は癌について本明細書に開示された本発明の液体製剤の予防的または治療的有用性を評価することができる。当技術分野で公知のアッセイ（例えば上述のアッセイ）を使用して、1以上の他の治療と組み合わせた場合の本発明の液体製剤の予防的及び/又は治療的有用性を評価することができる。

【0296】

末梢血リンパ球に及ぼす本発明の液体製剤の作用は、当業者に公知の標準的方法を使用して追跡/評価することができる。被験体の末梢血リンパ球数は、例えば該被験体から末梢血サンプルを得て、フィコール-ハイパック（ファルマシア（Pharmacia））勾配遠心分離を使用して末梢血リンパ球の他の成分（例えば血漿）からリンパ球を分離し、トリパンブルーを使用してリンパ球を数えることにより定量することができる。被験体の末梢血T細胞数は、例えば該被験体から末梢血サンプルを得て、フィコール-ハイパック（ファルマシア（Pharmacia））勾配遠心分離を使用して末梢血リンパ球の他の成分（例えば血漿）からリンパ球を分離し、FITCまたはフィコエリトリに結合したT細胞抗原に対する抗体（例えば、CD3、CD4およびCD8）を用いてT細胞を標識し、FACSによりT細胞の数を測定することにより定量することができる。

【0297】

本発明の予防および/または治療プロトコルの毒性および/または効果は、細胞培養物または実験動物で標準的薬剤学的方法により、例えばLD<sub>50</sub>（集団の50%に致死的な用量）およびED<sub>50</sub>（集団の50%に治療的有効な用量）により測定することができる。毒性作用と治療効果の用量比は治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>として表される。治療指数の大きい本発明の液体製剤が好ましい。毒性の副作用を示す本発明の液体製剤が使用されることがあるが、非感染細胞への傷害の可能性を小さくし、こうして副作用を低下させるために、そのような物質を患部組織部位に標的化する送達系を設計するように注意すべきである。

【0298】

細胞培養物アッセイと動物試験から得られたデータは、ヒトで使用するための予防および/または治療薬の用量範囲を調製するのに使用することができる。そのような物質の用量は、好ましくはほとんどまたは全く毒性の無いED<sub>50</sub>を含む循環濃度範囲にある。用量は、使用される剤形および使用される投与経路により、この範囲内で変化する。本発明の方法で使用される任意の物質について、治療的有効用量はまず、細胞培養物アッセイから推定することができる。用量は、細胞培養物で決定されたようなIC50（すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルで調製される。そのような情報は、ヒトでの有用な用量を正確に決定するために使用される。血漿レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定される。

【0299】

5.8. インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  発現の分析における液体製剤の使用

本発明の液体製剤を用いて、細胞又は細胞系、及び組織切片及び生検におけるインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の発現を可視化することができる。特定の実施形態において、組織サンプル及び生検の分析には、凍結組織の使用が必要である。好ましい実施形態において、組織サンプル及び生検は、標準的な方法を用いて、組織の処理及びパラフィン包理のために調製するが、得られるパラフィン包理組織におけるインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の免疫組織化学的染色が可能となる。本発明により、かかる方法は、臨床試験、動物モデル及び生検からの組織サンプルにおけるインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の発現の分析が容易となりうる。

【0300】

本発明の液体製剤を用いて、細胞又は細胞系及び組織切片及び生検におけるインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の発現及び/又は活性レベルを測定することにより、癌（例えば肺癌、乳癌、前立腺癌又は卵巣癌）の転移可能性を評価することも可能である。

【0301】

10

20

30

40

50

標識された抗体、そのフラグメント、誘導体及び類似体を含む本発明の液体製剤は、種々の疾患及び障害（例えば限定するものではないが、炎症性疾患、自己免疫疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、又は癌）を検出、診断又はモニターするための診断目的のために使用することができる。そのような診断技法は当技術分野で公知である（例えば、Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; and Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096参照）。タンパク質遺伝子発現の検出に有用な他の抗体に基づく方法としては、イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及びラジオイムノアッセイ（RIA）がある。公的な抗体アッセイの標識は当技術分野で公知であり、例えば、酵素標識、例えばグルコースオキシダーゼ；放射性同位体、例えばヨウ素（ $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{121}\text{In}$ ）及びテクネチウム（ $^{99}\text{Tc}$ ）；発光標識、例えばルミノール；並びに経口標識、例えばフルオレセイン及びローダミン、及びビオチンなどが含まれる。当技術分野で公知の他の診断技法としては、限定されるものではないが、以下の文献に記載のものが挙げられる：国際公開WO 01/58483号、米国特許第6,248,326号、Pecher et al., The FASEB J. 16(10):1266-8 (2002), Ahmed et al., The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50:1371-1379 (2002)（これらの全文を参照により本明細書に組み入れる）。好ましい実施形態において、インテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントは、疾患又は障害を検出、診断又はモニターするための診断目的のために使用される。疾患又は障害の検出又は診断は、当業者に周知の技術を使用して、*in vitro*アッセイ又は*in vivo*アッセイにおいて有効量（すなわち、インテグリン  $\alpha_3$  の発現を検出し得るのに有効な量）の本発明の液体製剤を利用して実施することができる。好ましい実施形態において、疾患又は障害は、被験体、好ましくは哺乳動物被験体、最も好ましくはヒト被験体において、当業者に公知の標準的な画像化技術において有効量の本発明の液体製剤を利用して検出される。

10

20

30

40

50

#### 【0302】

本発明は、疾患又は障害を検出又は診断する方法を包含し、この方法は以下のステップ：a) インテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する標識された抗体又は抗体フラグメントを含む本発明の液体製剤の有効量を被験体に投与するステップ；b) 標識された抗体又は抗体フラグメントが被験体における任意の所望の部位（例えば、癌部位）で選択的に濃縮することを可能にするため（及び未結合の標識された抗体又は抗体フラグメントがバックグラウンドレベルまでクリアランスされるのを可能にするため）に、上記投与するステップの後に一定の時間間隔にわたって待機するステップ；c) バックグラウンドレベルを決定するステップ；及びd) この被験体において標識された分子を検出するステップを含み、その結果、バックグラウンドレベルを上回る標識された抗体又は抗体フラグメントの検出がその疾患の存在を示すステップ。

#### 【0303】

本発明は、疾患又は障害を検出又は診断又はモニターする方法を包含し、この方法は以下のステップ：a) インテグリン  $\alpha_3$  に免疫特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含む本発明の液体製剤の有効量を被験体に投与するステップ；b) 本発明の液体製剤の抗体又は抗体フラグメントを認識する第2の標識された抗体又は抗体フラグメントを投与するステップ；c) 標識された抗体又は抗体フラグメントが被験体における任意の所望の部位（例えば、癌部位）で選択的に濃縮することを可能にするため（及び未結合の標識された抗体又は抗体フラグメントがバックグラウンドレベルまでクリアランスされるのを可能にするため）に、上記投与するステップの後に一定の時間間隔にわたって待機するステップ；d) バックグラウンドレベルを決定するステップ；及びe) この被験体において標識された抗体又は抗体フラグメントを検出するステップであって、その結果、バックグラウンドレベルを上回る標識された抗体又は抗体フラグメントの検出がその疾患の存在を示すステップ。

#### 【0304】

いくつかの実施形態において、本発明の方法に従って分析する組織は、外科手術の際に得られた癌患者由来の組織である。Ahmed et al., The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50:1371-1379 (2002)を参照のこと。たとえば、外科手術で得られた卵巣癌患者由来の組織を分割し、ドライアイス中で冷却したイソペンタンに浸漬することにより凍結切片封入培地(OC T)のシリンダー中で凍結する。凍結組織切片は、5 μm厚に切断し、使用しない場合にはすぐに-20℃に保存する。染色に関しては、切片を冷アセトン中で15分かけて固定し、Trisバッファー(100 mM, pH 7.6)中に保持する。内因性ペルオキシダーゼ活性をメタノール中3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて除去し、内因性ビオチン活性を一連の希釈卵白(蒸留水中5%)及びスキムミルク粉末(蒸留水中5%)を用いて全て10分かけてブロッキングする。切片はTrisバッファー(100 mM, pH 7.6)中で $\nu_3$  Mabと共に1時間インキュベートする。ビオチン及びストレプトアビジンHRPを用いてそれぞれ15分かけて抗体の結合を増幅し、複合体をジアミノベンジジン(DAB)を用いて可視化する。核はメイヤーヘマトキシリンで明るく染色し、切片をのせ、カバーガラスをのせる。アイソタイプIgG1は、適切に希釈し、陰性対照として抗体と置き換えることができる。切片は、訓練した生理学者により陽性DAB染色について顕微鏡で評価し、 $\nu_3$ 発現の染色の程度は盲目試験で評点をつける。

10

#### 【0305】

本発明は、疾患又は障害を診断又は検出するための方法を包含し、この方法は、インテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する標識された抗体又は抗体フラグメントを含む本発明の液体製剤の有効量を被験体に投与するステップの後に一定の時間間隔で被験体を画像化するステップを含み、この時間間隔は、標識された抗体又は抗体フラグメントがこの被験体における特定の部位(例えば、癌部位)で選択的に濃縮することを可能にするのに十分な時間間隔であり、この被験体中のこの部位に局在化した標識された抗体又は抗体フラグメントの検出は、その疾患又は障害の存在を示す。

20

#### 【0306】

いくつかの実施形態において、疾患又は障害のモニターは、この疾患又は障害を診断するための方法を、例えば、最初の診断の1ヵ月後、最初の診断の6ヵ月後及び最初の診断の1年後に反復することによって実施される。本発明の特定の実施形態において、腫瘍の密度によって、本発明の方法に従って抗インテグリン $\nu_3$ 抗体を用いて腫瘍を検出することが容易となる。

30

#### 【0307】

標識抗体又は抗体フラグメントの存在は、*in vivo*スキャンのための当該分野で公知の方法を使用して患者において検出することができる。これらの方法は、使用される標識の種類に依存する。当業者は、特定の標識を検出するために適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において使用することができる方法及びデバイスには以下が含まれるがこれらに限定されない：コンピュータ断層撮影(CT)、陽電子放射断層撮影(PET)のような全身スキャン、磁気共鳴画像化(MRI)及び超音波断層撮影。特定の実施形態において、抗体又は抗体フラグメントは、放射性同位体で標識され、放射線応答性の外科的装置を使用して患者において検出される(Thurstonsら、米国特許第5,441,050号)。別の実施形態において、抗体又は抗体フラグメントは蛍光化合物で標識され、蛍光応答性のスキャン装置を使用して患者において検出される。別の実施形態において、抗体又は抗体フラグメントは陽電子放射金属で標識され、陽電子放射断層撮影を使用して患者において検出される。なお別の実施形態において、抗体又は抗体フラグメントは常磁性標識で標識され、磁気共鳴画像化(MRI)を使用して患者において検出される。

40

#### 【0308】

##### 5.9. キット

本発明は本発明の液体製剤を入れた1又は複数の容器を含む薬剤パック又はキットを提供する。特定の実施形態では、本発明の液体製剤は、限定されるものではないが、異種タンパク質、非相同ポリペプチド、非相同ペプチド、大分子、小分子、マーカ配列、検出

50

可能な診断用薬剤、治療成分、薬物成分、放射性金属イオン、二次抗体、及び固相担体を含む別の成分と、組換えによって融合されているか、又は化学的に結合されている抗体又は抗体フラグメントを含む。本発明はまた、本発明の液体製剤を入れた1以上の第1の容器と、炎症性疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、自己免疫疾患、又は癌の予防、管理又は治療のために有用な1以上のほかの予防薬又は治療薬を入れた1以上の第2の容器とを含む薬剤パック又はキットを提供する。場合によっては、そのような容器は、医薬品又は生物製剤の製造、使用又は販売の規制を行う政府機関が規定した形態における、ヒトに投与のための製造、使用又は販売がこの政府機関によって承認されていることを示す通知を伴うことがある。

10

#### 【0309】

本発明は上記の方法に使用可能なキットを提供する。一実施形態では、キットは、1又は複数の容器の中に、本発明の液体製剤を含む。別の実施形態では、キットは、1又は複数の容器の中に本発明の液体製剤を含み、さらに、他の1又は複数の容器の中に、炎症性疾患、異常な骨代謝に関連する障害、異常な血管形成に関連する障害、インテグリン $\nu_3$ の異常な発現及び/又は活性に関連する障害、自己免疫疾患、又は癌の予防、管理又は治療に有用な他の1又は複数の予防薬又は治療薬を含む。特定の実施形態において、上記液体製剤に含まれる抗体又は抗体フラグメントは、VITAXIN(登録商標)又は抗原結合フラグメントである。また別の実施形態において、上記液体製剤に含まれる抗体又は抗体フラグメントは、VITAXIN(登録商標)又は抗原結合フラグメントではない。

キットはさらに、疾患を予防、治療、管理、又は改善する(例えば、本発明の液体製剤を単独で使用するか、又は別の予防薬若しくは治療薬と併用する)ための説明書や、投与方法に関わる副作用情報及び用量情報を含むことが好ましい。

20

#### 【0310】

##### 均等物

当業者であれば、本明細書に記載の特定の実施形態に対する多数の均等物を理解しうるか又はさらに慣用的実験を行うことなく確認できるであろう。かかる均等物は添付の特許請求の範囲に包含されると考える。

#### 【0311】

本明細書に記述した全ての公開文献、特許及び特許出願は、あたかもそれぞれの個々の公開文献、特許又は特許出願が特定してかつ個々に参照により本明細書に組み入れられると示されたのと同じように、参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

30

#### 【0312】

本明細書の参照文献の引用及び説明は、それらが本発明の先行技術であることを認めたものと解釈されるべきではない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0313】

【図1】インテグリン $\nu_3$ に免疫特異的に結合する精製抗体を調製する概要を示す概略図である。

#### 【配列表】

40

## SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune, Inc.  
 Allan, Christian

<120> USE OF ANTI-INTEGRIN ALPHA-v-BETA-3 ANTIBODY FORMULATIONS

<130> 10271-124-228

<140>  
 <141>

<150> 60/443,777  
 <151> 2003-01-30

<150> 60/443,810  
 <151> 2003-01-30

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 1

Ser Tyr Asp Met Ser  
 1                    5

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 2

Lys Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 1                    5

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 3

His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr  
 1                    5

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 4

10

20

30

40

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn His Leu His  
1 5 10

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

<400> 5

Tyr Arg Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

<400> 6

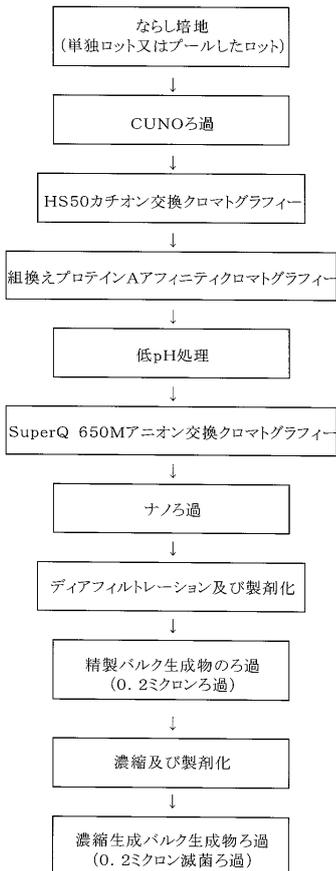
Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro His Thr  
1 5

10

20

【 図 1 】

精製プロセスのフローチャート



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/02701
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/28 US CL : 424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 152.1; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.2, 388.22 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 152.1; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.2, 388.22 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2001/0016645 A1 (HUSE et al.) 23 August 2001 (23.08.2001), see entire document.	1-93
Y	US 6,267,958 B1 (ANDYA et al.) 31 July 2001 (31.07.2001), see entire document, including Isotonic and Hypetonic Formulation on column 30.	1-93
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 December 2004 (11.12.2004)		Date of mailing of the international search report 07 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P. O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Phillip Gambel <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US04/02701

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST  
search terms: allan, vitran, im609, alphavbeta3, histidine, treat?, therap?, bone metabolism, osteoporosis

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 47/22</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/18	
<b>A 6 1 K 47/26</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/22	
<b>A 6 1 K 47/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/26	
<b>A 6 1 P 29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/10	
<b>A 6 1 P 37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	
<b>A 6 1 P 19/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
<b>A 6 1 P 9/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 19/08	
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 P 19/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 19/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	1 0 1
		A 6 1 P 1/04	
		A 6 1 P 19/10	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C076 AA12 AA16 AA29 BB13 BB15 BB16 BB25 CC01 CC04 CC07  
 CC09 CC11 CC16 CC21 CC27 DD38A DD51A DD60A DD67A FF02  
 FF04  
 4C085 AA13 AA14 CC02 CC03 CC04 CC05 DD22 DD61 EE03