



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2293816 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.03.25
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.11.07
(86)	Europeisk søknadsnr	09759528.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.06.05
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.03.16
(30)	Prioritet	2008.06.06, US, 59711 P 2008.09.08, US, 95232 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	XOMA Technology Ltd., 2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, USA
(72)	Oppfinner	SOLINGER, Alan, M., C/o XOMA (US) LLC2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, USA OWYANG, Alexander, C/o XOMA (US) LLC2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, USA
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåter for behandling av reumatoid artritt
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A2-02/16436 WO-A2-03/010282 WO-A2-2007/002261 WO-A2-2007/050607 ALETAHA DANIEL ET AL: "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.", ARTHRITIS AND RHEUMATISM SEP 2010 LNKD- PUBMED:20872595, vol. 62, no. 9, September 2010 (2010-09), pages 2569-2581, ISSN: 1529-0131 ALTEN RIEKE; GRAM HERMANN; JOOSTEN LEO A; BERG WIM B VAN DEN; SIEPER JOACHIM; WASSENBERG SIEGFRID; BURMESTER GERD; VAN RIEL PIET;; "The human anti-IL-1 β monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis" ARTHRITIS RESEARCH AND THERAPY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 3, 5 June 2008 (2008-06-05), pages 1-9, XP021041234 ISSN: 1478-6354 BOISSIER M G; BERIN-MAGHIT S; CAPINI C; CHOMILLIER J; MULLER S; THERWATH A; ZAGURY J; BESSIS N: "PROTECTION OF COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS WITH ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST PEPTIDES OF INTERLEUKIN-1 (IL-1) BETA INDUCING SELF ANTI-IL-1 BETA ANTIBODIES" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, vol. 64, no. SUP. 3, 8 June 2005 (2005-06-08), XP008077941 ISSN: 0003-4967 GEIGER T; TOWBIN H; COSENTI-VARGAS A; ZINGEL O; ARNOLD J; RORDORF C; GLATT M; VOSBECK K: "NEUTRALIZATION OF INTERLEUKIN-1 BETA ACTIVITY IN VIVO WITH A MONOCLONAL ANTIBODY ALLEVIATES COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IN DBA/1 MICE AND PREVENTS THE ASSOCIATED ACUTE-PHASE RESPONSE" CLINICAL AND

EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, PACINI, PISA, IT, vol. 11, no. 5, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 515-522, XP009081237 ISSN: 0392-856X
MEYER KATHLEEN; DER KENNETH; MA JEREMY; ESPINOZA YERO; CAO LICHING;
GASPER CAROLYN; BAUER ROBERT; BECHTEL CHARLES; TICHENOR STEVEN:
"Nonclinical Safety Evaluation of XOMA 052, a Monoclonal Antibody Targeting IL-1 beta, in 4- and 13-Week Repeat-Dose Toxicity Studies in Cynomolgus Monkeys" INTERNATIONAL JOURNAL OF TOXICOLOGY, vol. 28, no. 1, January 2009 (2009-01), pages 60-61, XP008111116 & 29TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-TOXICOLOGY; TUCSON, AZ, USA; NOVEMBER 09 -12, 2008
OWYANG A M; ESPOSITO L; VANEGAS S; GROSS L; MASAT L; CORBIN J; ROELL M; HORWITZ A; HAAK-FRENDSCHO M; KANTAK S: "Efficacy of XOMA 052 anti-IL-1.beta. antibody in the DBA/1 mouse collagen-induced arthritis model" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 58, no. 9 Suppl. S, 1 September 2008 (2008-09-01), page S265, XP008111143 ISSN: 0004-3591

OPPFINNELSESOMRÅDE

Foreliggende beskrivelse vedrører fremgangsmåter for behandling og/eller forebyggelse av reumatoid artritt. Slike fremgangsmåter kan benyttes til å behandle et individ som lider av dette eller til å forhindre forekomst hos et risikoindivid.

5

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot fremgangsmåter for behandling og/eller forebyggelse av reumatoid artritt (RA) i et individ. Slike fremgangsmåter kan benyttes til behandling av et pattedyr, som for eksempel et menneske, som lider av reumatoid artritt, eller til å forhindre forekomst av lidelsen hos et risikoindivid. RA er en kronisk multisystem autoimmun sykdom som kan være svekkende og redusere levetiden. Kjennetegnet på sykdommen er en vedvarende inflammatorisk artritt, vanligvis av perifere ledd, som kan føre til bruskødeleggelse, benerosjon og tap av leddintegritet. I tillegg til funnene i ledd ved RA, presenterer pasienten seg ofte med ekstraartikulære manifestasjoner av sykdommen, inklusivt subkutane reumatoide knuter, muskelsvekkelse og atrofi, vaskulitt og pleuritt. Forløpet av RA er ganske variabelt ved at enkelte pasienter opplever dens destruktive potensiale og oppviser en markert funksjonssvekkelse, mens andre pasienter opplever en mild sykdom av kort varighet.

Mikroskopisk undersøkelse av synovialhinnen fra leddene til RA-pasienter viser en akutt og kronisk inflammatorisk tilstand som kjennetegnes ved infiltrasjon med hovedsakelig CD4+ T-lymfocytter. Tømming av T-celler ved drenasje av brystgangen, lymfoid bestråling eller cytotoksiske medikamenter har vært angitt å ha effekt ved behandling av RA. T-cellene produserer en rekke cytokiner som fremmer B-celleproliferasjon og differensiering til antistoff-dannende/antigen-presenterende celler. Et vanlig, om ikke spesifikt, funn i to tredjedeler av pasientene er forekomsten av reumatoide faktorer, autoantistoffer rettet mot IgG. Produksjonen av reumatoide faktorer kan føre til immunkompleksdannelse, medfølgende komplementaktivering og forverring av den inflammatoriske prosess (Lipsky, 1998). Ved RA synes sykdomsmekanismen å involvere aktivering av T-lymfocytter av hittil ukjente antigener. Disse antigenene kan være infeksiose agens eller andre endogene molekyler som ikke lenger gjenkjennes som selv-molekyler. Antigenaktiverte CD4+ T-celler stimulerer monocytter, makrofager og synoviale fibroblaster til å produsere cytokinene IL-1, IL-6 og TNF- α . Disse proinflammatoriske cytokinene anses som ansvarlige for langvarigheten av den inflammatoriske prosess i leddet, inklusivt bruskdestruksjon og erosjon av periartikulært benvev. Inhibering av både TNF α og IL-1 har vist seg å redusere inflammasjonen og nedsette ledd-destruksjonen (Keystone & Strond, 2005).

35

IL-1 er et proinflammatorisk cytokin som utskilles av en rekke forskjellige celletyper, inklusivt monocytter og makrofager. IL-1-genfamilien omfatter agonist-cytokinene IL-1-alfa (IL-1 α og IL-1 β , og den naturlige reseptorantagonist IL-1Ra). IL-1 α og IL-1 β produseres som forløpere. ProIL-1 α er funksjonelt aktiv og forblir i cytoplasmaet på grunn av mangel av lederpeptid, mens ProIL-1 β er inaktivt og utskilles og blir aktivt etter spaltning med en spesifikk intracellulær protease. Ved sykdom finnes IL-1 β i kretsløpet, mens IL-1 α sjeldent påvises; det frigjøres bare ved alvorlige sykdomstilstander, mest sannsynlig som følge av celledød (Dinarello, 1996). Ved frigjøring som del av en inflammatorisk reaksjon frembringer IL-1 β en rekke biologiske effekter, hovedsakelig gjennom induksjonen av andre inflammatoriske mediatorer, så som kortikotropin, blodplatefaktor 4, prostaglandin E2 (PGE-2), IL-6 og IL-8. IL-1 β induserer både lokale og systemiske inflammatoriske effekter gjennom aktiveringen av IL-1-reseptoren som finnes i nesten alle kjerneholdige celletyper (Dinarello, 2005). IL-1 β binder IL-1-reseptoren (IL-1R), og innfører en konformasjonell endring som muliggjør binding av det aksessoriske protein til IL-1 β /IL-1R-komplekset. Dannelsen av dette kompleks induserer derved intracellulær signalisering igjennom IL-1R (Dinarello, 1996).

IL-1 forekommer i det synoviale vev og vevsvæsker hos pasienter med reumatoid artritt og stimulerer produksjonen av mediatorer som prostaglandin E(2), nitrogenoksyd, cytokiner, kjemokiner og adhesjonsmolekyler som er involvert i leddinflammasjon. Dessuten stimulerer IL-1 syntesen og aktiviteten av matriksmetalloproteinaser og andre enzymer involvert i bruskdestruksjon ved reumatoid artritt og osteoartritt. Effekten av IL-1 inhiberes in vitro og in vivo av naturlige inhibitorer så som IL-1-reseptorantagonist (IL-1Ra) og løselige reseptorer. IL-1Ra tilhører IL-1-familien av cytokiner og binder til IL-1-reseptorer, men induserer ikke noen intracellulær respons. IL-1Ra inhiberer effekten av IL-1 ved å blokkere dens interaksjon med celleoverflatereseptorer. IL-1-inhibitorer som har vært benyttet i forsøksmodeller på reumatoid artritt, underbygger den rolle IL-1 har i sykdommens patogenese.

Anakinra er en rekombinant form av den naturlig forekommende IL-1-blokker, IL-1Ra. Anakinra har hatt utstrakt anvendelse for den godkjente indikasjon av RA, og også vist signifikant klinisk aktivitet ved systemisk juvenil idiopatisk artritt (sJIA), og i mindre grad, i andre subtyper av juvenil idiopatisk artritt (JIA). Nyere litteratur har også vist aktivitet av Anakinra i andre systemiske IL-1-medierte sykdommer

- (Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease [NOMID], Muckle-Wells sykdom og familiær kuldeindusert autoinflammatorisk syndrom), så vel som kne-osteoartritt (Goupille, et al., 2003). Den hyppige dosering av injiserbare medikamenter, så som Anakinra, er imidlertid uønsket og kan resultere i problemer med pasientetterlevelse, som derved ytterligere minsker effektiviteten av denne behandlingsmodalitet/ eller gjør den mindre ønsket. Det gjenstår således et behov for effektive midler til behandling av RA, særlig behandlingsblandinger og fremgangsmåter som ikke fordrer hyppige (f.eks. daglige) injeksjoner.
- Dagens sykdomsmodifiserende antireumatiske medikamenter (DMARD) er effektive til kontroll av inflammatoriske symptomer. De nyere biologiske responsmodifiserende midler (BRM) byr på forbedringer med hensyn til sykdomskontroll, men med større risiko. Slike risiki øker med mer langvarig bruk, og enkelte av disse BRM taper effektivitet over tid. En nylig survey av 500 RA-pasienter foretatt ved Arthritis Foundation, fant at to tredjedeler av RA-pasientene fremdeles opplever daglig smerte, stivhet, eller tretthet på tross av behandling med DMARD eller BRM (Gruver, 2004). Det eksisterer fortsatt et utilfredsstillt behov for RA-terapi som er trygge og gir langtidskontroll av sykdommen.
- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer blandinger og fremgangsmåter for behandling av reumatoid artritt. Fremgangsmåtene som her beskrives, omfatter for eksempel administrering av et høyaffinitets anti-IL-1 β -antistoff eller fragmenter derav, under doseringsregimer som her angitt. Fremgangsmåter som direkte målsøker IL-1 β -liganden med et antistoff, særlig antistoffer som oppviser høy affinitet, kan gi fordeler fremfor andre potensielle behandlingsmåter, så som IL-1 β -reseptorantagonister (f.eks. Anakinra). En utfordring for IL-1-reseptor antagonistbaserte terapeutika er behovet for at slike terapeutika okkuperer et stort antall reseptorer, noe som er en formidabel oppgave siden disse reseptorene er sterkt uttrykt på alle celler, bortsett fra røde blodceller (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). For de fleste immunmedierte sykdommer, så som de sykdommer som omtales her, er den mengde IL-1 β -cytokin som er målbar i kroppsvæsker eller assosiert med aktiverte celler, relativt liten. En fremgangsmåte for behandling og/eller forebyggelse som direkte målsøker IL-1 β -liganden skulle derfor by på en bedre strategi, særlig ved administrering av et IL-1 β -antistoff med høy affinitet. Alten et al., Arthritis Research & Therapy, 2008, 10(3), 1-9 nevner humant anti-IL-1 β monoklonalt antistoff ACZ885 i sammenheng med leddinflammasjonsmodeller i mus og en «proof-of-concept»-studie av pasienter med reumatoid artritt.

WO 2007/050807 A2 nevner også anti-IL-1 β -antistoff ACZ885 i sammenheng med behandling av autoinflammatoriske syndromer inklusivt reumatoid artritt.

- 5 Geiger et al., Clinical and Experimental Rheumatology, 1993, 11, 515-522 beskriver anti-IL-1 β -antistoffer i sammenheng med kollagenindusert artritt i DBA/1-mus.

WO 03/010282 A2 nevner monoklonale anti-IL-1 β -antistoffer i sammenheng med behandling av reumatoid artritt.

10

WO 2007/002261 A2 beskriver blant annet høyaffinitets anti-IL-1 β -antistoffer.

WO 02/16436 A2 beskriver anti-IL-1 β -antistoffer ved behandlingen av en IL-1-mediert sykdom eller lidelse, så som inflammatoriske artritter.

15

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende beskrivelse er rettet mot fremgangsmåter og relaterte artikler om fremstilling for behandlingen og/eller forebyggelse av reumatoid artritt hos et individ. Slike fremgangsmåter kan benyttes til behandling av et pattedyr (f.eks. menneske) som lider av eller risikerer reumatoid artritt. Fremgangsmåtene kan også benyttes til å forhindre forekomsten av reumatoid artritt hos et risikoindivid. Beskrivelsen vurderer videre anvendelsen av slike fremgangsmåter for ytterligere sykdommer eller tilstander, som for eksempel systemisk juvenil idiopatisk artritt. Som illustrert i eksemplene nedenfor har vi gjort det overraskende funn at antistoffer, så som de her beskrevne, kan benyttes for å oppnå den ønskede grad av aktivitet over et bredt doseringsområde, ved meget lave doser.

20

25

I henhold til ett aspekt av beskrivelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor administrering av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet etterfølges av administreringen av én eller flere påfølgende doser, og hvor initialdosen og hver av den ene eller flere påfølgende doser administreres i et intervall på en gang per uke til en gang hver sjettede måned. I henhold til én utførelsesform administreres initialdosen og hver av den ene eller flere påfølgende doser i et intervall på én annenhver uke til én hver tredje måned. I henhold til en annen utførelsesform administreres initialdosen og hver ene eller flere påfølgende doser i et intervall på én annenhver uke til én hver

30

35

andre måned. I en annen utførelsesform administreres initialdosen og hver ene eller flere påfølgende doser i et intervall på én gang per måned til én gang tredje hver måned. I en annen utførelsesform administreres initialdosen og hver ene eller flere påfølgende doser i et intervall på én gang hver måned til én gang annenhver måned. I
 5 nok en annen utførelsesform administreres initialdosen og hver ene eller flere påfølgende doser i et intervall på én gang hver måned til én gang tredje hver måned eller sjeldnere.

Anti-IL-1 β -antistoffene eller antistoff-fragmentene (f.eks. bindingsfragmenter)
 10 benyttet i fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse binder generelt til IL-1 β med høy affinitet. De foretrukne utførelsesformer binder antistoffet eller antistoff-fragmentet til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på cirka 10nM eller mindre, cirka 5nM eller mindre, cirka 1nM eller mindre, cirka 500pM eller mindre, cirka 250pM eller mindre, cirka 100pM eller mindre, cirka 50pM eller mindre eller cirka 25pM eller
 15 mindre. I særlig foretrukne utførelsesformer binder antistoffet eller antistoff-fragmentet til humant IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på cirka 500pM eller mindre, cirka 250pM eller mindre, cirka 100pM eller mindre, cirka 50pM eller mindre, cirka 10pM eller mindre, cirka 5pM eller mindre, cirka 3pM eller mindre, cirka 1pM eller mindre, cirka 0,75pM eller mindre, cirka 0,5pM eller mindre, cirka 0,3pM eller
 20 mindre, cirka 0,2pM eller mindre eller cirka 0,1pM eller mindre.

I henhold til et annet aspekt ved oppfinnelsen er anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet et nøytraliserende antistoff. I henhold til et annet aspekt binder anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet til en IL-1 β -epitop slik at det bundne antistoff
 25 eller fragment i det vesentlige tillater bindingen av IL-1 β til IL-1-reseptor I (IL-1RI). I henhold til et annet aspekt binder anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet til IL-1 β , men forhindrer ikke vesentlig bindingen IL-1 β fra binding til IL-1-reseptor I (IL-1RI). I henhold til et annet aspekt binder antistoffet eller antistoff-fragmentet seg ikke påviselig til IL-1 α , IL-1R eller IL-1Ra. I henhold til nok et annet aspekt av oppfinnelsen
 30 binder antistoffet eller antistoff-fragmentet seg til en epitop som inngår i sekvensen ESVDPKNYPKMKMEKRFVFNKIE (SEKV.ID.NR:1). I henhold til et annet aspekt konkurrerer antistoffet eller fragmentet derav med bindingen av et antistoff som har den lette kjedes variable region av SEKV.ID.NR:5 og den tunge kjedes variable region av SEKV.ID.NR:6.

35

I henhold til en utførelsesform omfatter antistoffet eller antistoff-fragmentet 1, 2 eller 3 av CDR-sekvensene av SEKV.ID.NR.3, SEKV.ID.NR.4, SEKV.ID.NR.5 eller

SEKV.ID.NR.6. I henhold til annen utførelsesform omfatter antistoffet eller antistoff-fragmentet en lett kjedes variable regionsekvens av SEKV.ID.NR.3 eller

SEKV.ID.NR.5. I henhold til en annen utførelsesform omfatter antistoffet eller antistoff-fragmentet en tung kjedes variable regionsekvens av SEKV.ID.NR.4 eller

5 SEKV.ID.NR.6. I én utførelsesform omfatter antistoffet eller fragmentet derav en lett kjedes variable region av SEKV.ID.NR.5 og den tunge kjedes variable region av SEKV.ID.NR.6. I henhold til et annet aspekt av oppfinnelsen binder antistoffet eller antistoff-fragmentet seg til en epitop som inkorporerer Glu64 av IL-1 β . I henhold til nok et annet aspekt av oppfinnelsen binder antistoffet eller antistoff-fragmentet seg til
10 aminosyrene 1-34 av N-terminalen av IL-1 β . Fortrinnsvis er antistoffet eller antistoff-fragmentet humant manipulert, humanisert eller humant.

I henhold til et annet aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ (f.eks. pattedyr, menneske) hvor frem-
15 gangsmåten omfatter administrering av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til mennesket, hvor administrering av en initialdose av IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet etterfølges av administrering av én eller flere påfølgende doser. I én utførelsesform etterfølges administrering av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet av administreringen av to eller flere påfølgende doser. I en annen
20 utførelsesform etterfølges administreringen av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet av administreringen av en eller flere påfølgende doser, og hvor nevnte ene eller flere påfølgende doser er i en mengde som er tilnærmet den samme eller mindre enn initialdosen. I henhold til en annen utførelsesform etterfølges administreringen av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet av
25 administreringen av én eller flere påfølgende doser, og hvor i det minst én av de påfølgende doser er i en mengde som er større enn initialdosen.

I én utførelsesform administreres to eller flere, tre eller flere, fire eller flere, fem eller flere, seks eller flere, syv eller flere, åtte eller flere, ni eller flere, ti eller flere, elleve
30 eller flere påfølgende doser av antistoffet. I en annen utførelsesform er administreringen av initialdosen og hver ene eller flere påfølgende doser adskilt fra hverandre med et intervall på minst cirka to uker, minst cirka tre uker, minst cirka en måned, minst cirka to måneder, minst cirka tre måneder, minst cirka fire måneder, minst cirka fem måneder, minst cirka seks måneder, minst cirka syv måneder, minst
35 cirka åtte måneder, minst cirka ni måneder, minst cirka ti måneder, minst cirka elleve måneder eller minst cirka tolv måneder.

I henhold til en annen utførelsesform administreres antistoffet eller fragmentet i én eller flere doser på 5mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 3mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 2mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 1mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,75mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,5mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,3mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,1mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,03mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,01mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,003mg/kg eller mindre antistoff eller fragment eller 0,001mg/kg eller mindre antistoff eller fragment. I henhold til hver av de ovennevnte utførelsesformer administreres antistoffet eller fragmentet fortrinnsvis i én eller flere doser på minst 0,01mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,01mg/kg antistoff eller fragment eller minst 0,03mg/kg antistoff eller fragment. Fortrinnsvis administreres antistoffet eller fragmentet i én eller flere doser på 0,001mg/kg til 1mg/kg, 0,001mg/kg til 0,3mg/kg, 0,003mg/kg til 1mg/kg, 0,003mg/kg til 0,3mg/kg. Ovennevnte doseringsmengder refererer seg til mg (antistoff eller fragment)/kg (vekt av individet som skal behandles).

I henhold til en annen utførelsesform er initialdosen og én eller flere påfølgende doser av antistoff eller fragment fra cirka 0,01mg/kg til cirka 10mg/kg antistoff, fra cirka 0,03 til cirka 1mg/kg antistoff, fra cirka 0,03 til cirka 0,3mg/kg antistoff, fra cirka 0,05 til cirka 5mg/kg antistoff, fra cirka 0,05mg/kg til cirka 3mg/kg antistoff, fra cirka 0,1mg/kg til cirka 3mg/kg antistoff, fra cirka 0,1mg/kg til cirka 1mg/kg antistoff, fra cirka 0,1mg/kg til cirka 0,5mg/kg antistoff, fra cirka 0,3mg/kg til cirka 5mg/kg antistoff, fra cirka 0,3mg/kg til cirka 3mg/kg antistoff, fra cirka 0,3mg/kg til cirka 1mg/kg antistoff, fra cirka 0,5mg/kg til cirka 5mg/kg antistoff, fra cirka 0,5mg/kg til cirka 3mg/kg antistoff, fra cirka 0,5mg/kg til cirka 1mg/kg antistoff, fra cirka 1mg/kg til cirka 5mg/kg antistoff eller fra cirka 1mg/kg til cirka 3mg/kg antistoff. I enkelte utførelsesformer administreres to eller flere, tre eller flere, fire eller flere, fem eller flere, seks eller flere, syv eller flere, åtte eller flere, ni eller flere, ti eller flere, elleve eller flere påfølgende doser av antistoffet. Ovennevnte doseringsmengde refererer seg til mg (antistoff eller fragment)/kg (vekt av individet som skal behandles). Det samme gjelder heretter dersom det er nevnt en doseringsmengde.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer beskrivelsen en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ (f.eks. mennesket), hvor fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet som en initialdose på cirka 5mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 3mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 2mg/kg

eller mindre antistoff eller fragment, 1mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,75mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,5mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,3mg/kg eller mindre antistoff eller fragment, 0,1mg/kg eller mindre antistoff eller fragment eller 0,03mg/kg eller mindre antistoff eller fragment og en
 5 flerhet av påfølgende doser av antistoff eller fragment i en mengde som er omtrent den samme eller mindre enn initialdosen.

I de ovennevnte utførelsesformer hvor antistoffet eller fragmentet administreres som en initialdose og en flerhet påfølgende doser, er dosen av antistoff eller fragment
 10 minst 0,001mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,003mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,01mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,03mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,05mg/kg antistoff eller fragment eller minst 0,09mg/kg antistoff eller fragment.

I henhold til et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse administreres antistoffet eller fragmentet som en fast dose, uavhengig av vektforholdet dose per individ. I én utførelsesform administreres antistoffet eller fragmentet i én eller flere faste doser på 1000mg eller mindre antistoff eller fragment, 750mg eller mindre antistoff eller fragment, 500mg eller mindre antistoff eller fragment, 250mg eller mindre antistoff eller fragment, 100mg eller mindre antistoff eller fragment, cirka 25mg eller mindre antistoff eller fragment, cirka 10mg eller mindre antistoff eller fragment eller cirka 1,0mg eller mindre antistoff eller fragment. I henhold til en annen utførelsesform administreres antistoffet eller fragmentet i én eller flere faste doser på minst cirka 0,1mg antistoff eller fragment, minst cirka 1mg antistoff eller fragment, minst cirka 5mg antistoff eller fragment eller minst cirka 10mg antistoff eller fragment.
 25

I enkelte utførelsesformer er den faste dosen fra cirka 1mg til cirka 10mg, cirka 1mg til cirka 25mg, cirka 10mg til cirka 25 mg, cirka 10mg til cirka 50mg, cirka 10mg til cirka 100mg, cirka 25mg til cirka 50mg, cirka 25mg til cirka 100mg, cirka 50mg til cirka 100mg, cirka 50mg til cirka 150mg, cirka 100mg til cirka 150mg, cirka 100mg til cirka 200mg, cirka 150mg til cirka 200mg, cirka 150mg til cirka 250mg, cirka 200mg til cirka 250mg, cirka 200mg til cirka 300mg, cirka 250mg til cirka 300mg, cirka 250mg til cirka 500mg, cirka 300mg til cirka 400mg, cirka 400mg til cirka 500mg, cirka 400mg til cirka 600mg, cirka 500mg til cirka 750mg, cirka 600mg til cirka 750mg, cirka 700mg til cirka 800mg, cirka 750mg til cirka 1000mg. I henhold til en foretrukket utførelsesform administreres den faste dose i én eller flere doser på cirka 0,1mg til cirka 100mg, cirka 1,0mg til cirka 100mg eller cirka 1,0mg til cirka 50mg. I
 35

en annen foretrukket utførelsesform velges den faste dose fra gruppen bestående av cirka 1mg til cirka 10mg, cirka 1mg til cirka 25mg, cirka 10mg til cirka 25mg, cirka 10mg til cirka 100mg, cirka 25mg til cirka 50mg, cirka 50mg til cirka 100mg, cirka 100mg til cirka 150mg, cirka 150mg til cirka 200mg, cirka 200mg til cirka 250mg.

5

I henhold til ett aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes en ovenfor nevnt fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor dosen antistoff eller fragment er tilstrekkelig til å oppnå en forbedring av ett eller flere av ACR-kjerne-responskriteriene. I henhold til et annet aspekt er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 50% reduksjon av leddsmerte, minst 60% reduksjon av leddsmerte, minst 70% reduksjon av leddsmerte, minst 80% reduksjon av leddsmerte, minst 90% reduksjon av leddsmerte, minst 95% reduksjon av leddsmerte eller 100% reduksjon av leddsmerte.

10

15

I henhold til et annet aspekt ved oppfinnelsen er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 20% forbedring i ACR 50-skåre, minst 30% forbedring i ACR 50-skåre, minst 40% forbedring i ACR 50-skåre eller minst 50% forbedring i ACR 50-skåre.

20

I henhold til én utførelsesform er ovennevnte forbedring i 3 måneder eller lenger, 4 måneder eller lenger, 5 måneder eller lenger, 6 måneder eller lenger, 9 måneder eller lenger eller 12 måneder eller lenger.

25

I henhold til et annet aspekt er dosen antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå enhver av de ovennevnte forbedringer og minst én av følgende: minsket inflammatorisk infiltrasjon, minsket tap av brusk, minsket benresorpsjon, forbedring i radiografisk skåre. I henhold til én utførelsesform bestemmes forbedringen i radiografisk skåre ved røntgen. I henhold til en annen utførelsesform er forbedringen en langsommere forverringshastighet. I henhold til en annen utførelsesform er forbedringen en ikke påviselig forverring.

30

35

I henhold til en annen utførelsesform er dosen av antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 20% nedgang i CRP-nivåer, minst 30% nedgang i CRP-nivåer, minst 40% nedgang i CRP-nivåer, minst 50% nedgang i CRP-nivåer, minst 60% nedgang i CRP-nivåer, minst 70% nedgang i CRP-nivåer, minst 80% nedgang i CRP-nivåer, minst 90% nedgang i CRP-nivåer. I henhold til en annen utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 20% nedgang i ESR, minst

40% nedgang i ESR, minst 60% nedgang i ESR, minst 70% nedgang i ESR, minst 80% nedgang i ESR, minst 90% nedgang i ESR.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for
 5 behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå en forbedring i ACR-skåre, minst 20% nedgang i CRP og minst 20% nedgang i ESR. I henhold til én utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå en forbedring i
 10 ACR-skåre, minst 30% nedgang i CRP og en 30% nedgang i ESR. I en annen utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå en forbedring i ACR-skåre, minst en 40% nedgang i CRP og en 40% nedgang i ESR.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for
 15 behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor administrering av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet etterfølges av administrering av én eller flere påfølgende doser, og hvor plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistoff-fragment i
 20 mennesket får synke til under et nivå på cirka 0,1 μ g/mL i et tidsrom på mer enn cirka en uke og mindre enn cirka 6 måneder mellom administreringer under forløpet av behandling med nevnte initialdose og én eller flere påfølgende doser. I én utførelsesform tillates plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistoff-fragment å synke til under et nivå på cirka 0,07 μ g/mL, cirka 0,05 μ g/mL, cirka 0,03 μ g/mL eller
 25 cirka 0,01 μ g/mL i løpet av et tidsrom lenger enn cirka 1 uke og mindre enn cirka 5 måneder, cirka 4 måneder, cirka 3 måneder, cirka 2 måneder, cirka 1 måned, cirka 3 uker eller cirka 2 uker mellom administreringer. I én utførelsesform refererer disse plasmaverdiene seg til verdier oppnådd for et individ som behandles med antistoffet eller fragmentet i overensstemmelse med beskrivelsen. I én utførelsesform kan et slikt
 30 individ være en pasient som lider av reumatoid artritt.

Etter foreliggende beskrivelse kan det tenkes at et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment benyttet i henhold til de her beskrevne fremgangsmåter, kan administreres i enhver
 35 av de ovennevnte doseringsmengder, antallet av påfølgende administreringer og doseringsintervaller mellom administreringer og at enhver av de angitte doseringsmengder, antallet av påfølgende administreringer og doseringsintervaller mellom administreringer kan kombineres med hverandre i alternative regimer for å modulere

den terapeutiske gevinst. I enkelte utførelsesformer er den ene eller flere påfølgende doser i en mengde som tilnærmet er den samme eller mindre enn den først administrerte dose. I en annen utførelsesform er den ene eller de flere påfølgende doser i en mengde som tilnærmet er større enn den først administrerte dose. For-

5 trinnvis administreres anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet ved subkutan, intramuskulær eller intravenøs injeksjon. Man ser for seg at hver dose antistoff eller fragment kan administreres på ett eller flere steder.

I én utførelsesform administreres anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet i kombinasjon

10 med minst én annen medisinsk akseptert behandling av sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen. I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres den minst ene andre medisinsk aksepterte behandling av sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen, mens behandlingen med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet opprettholdes på et konstant doseringsregime. Etter en annen utførelsesform

15 reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen, og behandlingen med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres. Etter en annen utførelsesform reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen, og behandlingen med anti-IL-1 β -antistoffet eller

20 fragmentet økes. Etter nok en annen utførelsesform opprettholdes nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling av sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen, og behandlingen med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres eller seponeres. I nok en annen utførelsesform reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling av sykdommen, tilstanden

25 eller komplikasjonen og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet.

I henhold til annet aspekt inngår de her angitte fremgangsmåter sammen med én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter administrering av minst én farmasøytisk blanding som inneholder et annet virkestoff

30 enn et IL-1 β -antistoff eller et fragment. I henhold til ytterligere et aspekt overflødiggjør eller utsetter fremgangsmåtene behovet for minst én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode består i å administrere minst én farmasøytisk blanding som omfatter et annet virkestoff enn et IL-1 β -antistoff eller fragment. I henhold til nok et aspekt reduserer fremgangsmåtene mengde, hyppighet

35 eller varighet av minst én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter administrering av minst én farmasøytisk blanding som omfatter et annet virkestoff enn IL-1 β -antistoff eller fragment. I henhold til nok en

annen utførelsesform opprettholdes behandling med nevnte minst ene virkestoff. I henhold til en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med det minst ene virkestoff, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet opprettholdes i et konstant doseringsregime. I henhold til en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres. I henhold til en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet økes. I henhold til nok en annen utførelsesform opprettholdes behandling med nevnte minst ene virkestoff, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres eller seponeres. I henhold til nok en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor administrering av en initialdose av antistoffet eller antistoff-fragmentet etterfølges av administrering av én eller flere påfølgende doser, og hvor plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistoff-fragment i mennesket holdes på et nivå på minst cirka 0,03ug/mL, minst cirka 0,05ug/mL, minst cirka 0,08ug/mL, minst cirka 0,1ug/mL, minst cirka 0,15ug/mL, minst cirka 0,2ug/mL, minst cirka 0,25ug/mL, minst cirka 0,3ug/mL, minst cirka 0,4ug/mL, minst cirka 0,5ug/mL, minst cirka 0,6ug/mL, minst cirka 0,8ug/mL, minst cirka 1ug/mL, minst cirka 1,5ug/mL, minst cirka 2ug/mL, minst cirka 3ug/mL, minst cirka 4ug/mL eller minst cirka 5ug/mL i løpet av et behandlingsforløp med nevnte initialdose og én eller flere påfølgende doser. I henhold til én utførelsesform refererer disse plasmaverdiene seg til verdier oppnådd for et individ som behandles med antistoffet eller fragmentet i overensstemmelse med denne beskrivelse. I én utførelsesform kan et slikt individ være en pasient som lider av reumatoid artritt.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et annet IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor antistoffet eller fragmentet derav har en lavere IC₅₀ enn en IL-1 β -reseptorantagonist i en IL-1 β -inhiberingstest av humant helblod som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én utførelsesform har antistoffet eller

fragmentet en IC_{50} som er mindre enn cirka 90%, 80%, 70%, 60%, 50% av IC_{50} av en IL-1 β -reseptorantagonist i en IL-1 β -inhiberingstest av humant helblod, som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én ytterligere utførelsesform har antistoffet eller fragmentet en IC_{50} som er mindre enn cirka 40%, 30%, 20%, 10% av IC_{50} av en IL-1 β -reseptorantagonist i en IL-1 β -inhiberingstest av humant helblod, som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I en foretrukket utførelsesform har antistoffet eller fragmentet en IC_{50} som er mindre enn cirka 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% av IC_{50} av en IL-1 β -reseptorantagonist i en IL-1 β -inhiberingstest av humant helblod, som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én utførelsesform er IL-1 β -reseptorantagonisten Anakinra (dvs. Kineret®).

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåtene omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor antistoffet eller fragmentet derav gir *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 i mus, sammenlignet med et kontrollantistoff ved bruk av en test som er beskrevet av Economides et al., Nature Med., 9:47-52 (2003) som med hele sitt innhold herved inkorporeres ved referanse. I én utførelsesform gir antistoffet eller fragmentet *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 i mus og minst cirka 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, sammenlignet med kontrollantistoffet. I en ytterligere utførelsesform gir antistoffet eller fragmentet *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 i mus på minst cirka 60%, 70%, 80%, 90%, 95% sammenlignet med kontrollantistoffet. I én utførelsesform er kontrollantistoffet et isotype-kontrollantistoff.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av reumatoid artritt hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvor antistoffet eller fragmentet inhiberer *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod sammenlignet med en kontroll hvor antistoff ikke inngår. I én utførelsesform gir antistoffet eller fragmentet et høyere inhiberingsnivå av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod på minst cirka 10%, 20%, 30%, 40%, 50% sammenlignet med kontrollen. I en ytterligere utførelsesform gir antistoffet eller fragmentet en høyere inhiberingsgrad av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod på minst cirka 60%, 70%, 80%, 90%, 95% sammenlignet med kontrollen. I

én utførelsesform er de inhiberte cytokiner IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-1Ra, TNF α eller IFN γ .

5 I henhold til et annet aspekt angir beskrivelsen anvendelse av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav som har en lavere IC₅₀ enn en IL-1 β -reseptorantagonist i en IL-1 β -inhiberingstest av humant helblod, som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8, ved fremstillingen av en blanding for bruk til behandlingen av reumatoid artritt. I én utførelsesform er IL-1 β -reseptorantagonisten Anakinra (dvs. Kineret®).

10 I henhold til et annet aspekt av oppfinnelsen tenkes anvendelse av IL-1 β -antistoffene eller bindingsfragmentene anvendt ved fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av en sykdom eller tilstand som her angitt. I hvilken som helst av anvendelsene kan medikamentet koordineres med behandling med et andre virkestoff. I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er det tenkt på
15 anvendelsen av en synergistisk kombinasjon av et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse for fremstilling av et medikament for behandling av en pasient som oppviser symptomer på, eller risiko for, utvikling av en sykdom eller tilstand som her beskrevet, hvor medikamentet koordineres med behandling under bruk av et andre virkestoff. Utførelsesformer av hvilken som helst av de ovennevnte anvendelser, hvor
20 mengden av det IL-1 β -bindende antistoff eller fragment i medikamentet er i en dose som effektivt reduserer doseringen av det andre virkestoff som trengs for å oppnå en terapeutisk effekt, kan være aktuell.

I henhold til nok et annet aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes en produksjons-
25 artikkel som omfatter en beholder, en blanding i beholderen som inneholder et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav og et pakningsvedlegg som inneholder bruksanvisninger for administrering av antistoffet eller fragmentet til et menneske med behov for behandling i henhold til de overfor beskrevne metoder. I henhold til én utførelsesform omfatter beholderen ytterligere en farmasøytisk akseptabel bærer, et
30 hjelpestoff eller fortynningsmiddel. I en beslektet utførelsesform inneholder blandingen i beholderen ytterligere et andre virkestoff.

Preparatsett omfattes også av foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform omfatter
35 et sett en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment, pakket i en beholder, som f.eks. en ampulle eller flaske, og som dessuten omfatter en merkelapp festet til eller pakket sammen med beholderen, hvor merkelappen beskriver beholderinnholdet og gir indikasjoner og/eller instruksjoner med

hensyn til bruk av innholdet i beholderen til behandling eller forebyggelse av en sykdom eller tilstand i henhold til de ovenfor beskrevne metoder. I én utførelsesform omfatter beholderen dessuten en farmasøytisk egnet bærer, hjelpestoff eller fortynningsmiddel. I henhold til en beslektet utførelsesform inneholder beholderen
 5 dessuten et andre virkestoff.

I én utførelsesform er produksjonsartikkelen, settet eller medikamentet for behandlingen eller forebyggelsen av reumatoid artritt hos et individ. I en annen utførelsesform omfatter instruksjonene i et pakningsvedlegg til en produksjonsartikkel
 10 eller en merkelapp for et sett, instruksjon for administrering av antistoffet eller fragmentet i henhold til hvilken som helst av de ovennevnte doseringsmengder, antall påfølgende administreringer og doseringsintervaller mellom administreringer så vel som enhver kombinasjon av antall doseringer av påfølgende administreringer og doseringsintervaller mellom her beskrevne administreringer. I henhold til nok en
 15 annen utførelsesform er beholderen eller settet eller produksjonsartikkelen en ferdig fylt sprøyte.

Det er underforstått at der hvor foreliggende beskrivelse nevner fremgangsmåter for behandlinger som gjør bruk av antistoffer eller fragmenter derav med bestemte
 20 egenskaper (så som Kd-verdier eller IC₅₀-verdier), er dette også ment å inkorporere anvendelsen av slike antistoffer eller fragmenter derav ved fremstillingen av et medikament for bruk i henhold til disse metodene. Beskrivelsen omfatter også antistoffer eller fragmenter derav som har disse egenskapene så vel som farmasøytiske blandinger som inneholder disse antistoffene eller fragmentene derav for bruk i hen-
 25 hold til de her omtalte behandlingsmåter.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Fig. 1 er et diagram som viser resultatene av et *in vitro* IL-1 β -inhiberingsforsøk for antistoffet betegnet AB7 og for Kineret[®] som involverer IL-1-indusert
 30 produksjon av IL-8.

Fig. 2A er et diagram som viser resultatene av et *in vivo* IL-1 β -inhiberingsforsøk for antistoffene betegnet AB5 og AB7 som involverer IL-1-stimulert frigjøring av IL-6.

Fig. 2B er et diagram som viser resultatene av et *in vivo* IL-1 β -inhiberingsforsøk for antistoffene betegnet AB7 som involverer IL-1-stimulert
 35 frigjøring av IL-6 og sammenligning av inhibering av humant (rute A) versus mus (rute B) IL-1 β .

Fig. 3 er et diagram som viser serumkonsentrasjoner etter administrering av 0,1, 1 eller 10mg/kg av et anti-IL-1 β -antistoff.

Fig. 4 er et diagram som viser modeller av plasmakonsentrasjonsprofiler av et anti-IL-1 β -antistoff etter fem månedlige doser på 0,1, 0,3, 1 eller 3 mg/kg.

5 Fig. 5 er en tabell som viser reduksjon av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod, ved behandling med et anti-IL-1 β -antistoff.

Fig. 6 er et diagram som viser farmakokinetikken for AB7 i mennesker etter administrering av en dose på 0,01mg/kg antistoff.

10 Fig. 7A er et diagram som viser serumkonsentrasjoner etter iv. administrering av 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 eller 1,0mg/kg anti-IL-1 β -antistoff til mennesker.

Fig. 7B er et diagram som viser serumkonsentrasjoner etter SC-administrering av 0,03; 0,1 og 0,3mg/kg anti-IL-1 β -antistoff til mennesker.

15 Fig. 8 er et diagram som viser den mediane prosent endring i CRP på dag 28 etter administrering av 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 eller 1,0mg/kg av et anti-IL-1 β -antistoff til mennesker.

Fig. 9 er et diagram som viser beskyttelsen av mus fra kollagenindusert artritt ved å benytte XOMA 052 antistoffet.

20 Fig. 10 er et diagram som viser beskyttelsen av mus fra kollagenindusert artritt ved bruk av XOMA 052 antistoffet.

Fig. 11A er et diagram som viser beskyttelsen av mus fra kollagenindusert artritt etter sykdomsinntrreden ved bruk av XOMA 052 antistoffet.

Fig. 11B er et diagram som viser beskyttelsen av mus fra kollagenindusert artritt etter sykdomsinntrreden ved bruk av XOMA 052 antistoffet.

25 Fig. 12 er et diagram som viser at antistoffet XOMA 052 forhindrer benpatologi i en musemodell på kollagenindusert artritt.

Fig. 13 er en avbildning som viser at antistoffet XOMA 052 forhindrer inflammasjon og ben- og bruskdestruksjon i en musemodell på kollagenindusert artritt.

30

DETALJERT BESKRIVELSE

IL-1 β er et proinflammatorisk cytokin som utskilles av en rekke forskjellige celletyper, inklusivt monocytter og makrofager. Når det frigjøres som del av en inflammatorisk reaksjon frembringer IL-1 β en rekke biologiske effekter, hovedsakelig mediert
35 gjennom induksjon av andre inflammatoriske mediatorer så som kortikotropin, blodplatefaktor-4, prostaglandin E2 (PGE2), IL-6 og IL-8. IL-1 β induserer både lokale

og systemiske inflammatoriske effekter gjennom aktiveringen av den IL-1-reseptor som finnes på nesten alle celletyper.

Interleukin-1-(IL-1)-familien av cytokiner har vært implisert i diverse sykdoms-
 5 tilstander så som reumatoid artritt (RA), osteoartritt, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt (UC), septisk sjokk, kronisk obstruktiv lungesykdom (COPD), astma, transplantat-
 mot-vert sykdom, aterosklerose, adult T-celleleukemi, multiple myelomer, multippel
 sklerose, slag og Alzheimers sykdom. Medlemmer av IL-1-familien inkluderer IL-1 α ,
 IL-1 β og IL-1Ra. Selv om de er beslektet gjennom deres evne til å binde IL-1 β -
 10 reseptorer (IL-1R1, IL-1R2) uttrykkes hver av disse cytokinene av ulike gener og har
 en forskjellig primær aminosyresekvens. De fysiologiske virkningene av disse
 cytokinene kan dessuten skjelles fra hverandre.

Forbindelser som avbryter IL-1-reseptorsignalisering har vært undersøkt som
 15 terapeutiske midler for å behandle IL-1-medierte sykdommer, som for eksempel noen
 av de ovennevnte sykdommer. Disse forbindelsene innbefatter rekombinant IL-1Ra
 (Amgen Inc., Thousand Oaks, (CA), IL-1-reseptor «TRAP» peptid (Regeneron Inc.,
 Tarrytown NY) så vel som animalsk avledede IL-1 β -antistoffer og rekombinante IL-1 β -
 antistoffer og fragmenter derav.

20 Som angitt ovenfor har IL-1-reseptorantagonist (IL-1RA) polypeptid vært benyttet ved
 behandlingen av reumatoid artritt (RA), men det er fremdeles behov for mer effektive
 måter å behandle RA på, særlig de som ikke fordrer hyppig (f.eks. daglig) gjentatte
 injeksjoner. En ytterligere utfordring for IL-1-reseptorantagonist-baserte
 25 terapeutika er behovet for slike terapeutika til å okkupere et stort antall reseptorer,
 som er en formidabel oppgave siden disse reseptorene er sterkt uttrykt på alle celler
 bortsett fra røde blodceller (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). Ved
 de fleste immunmedierte sykdommer er den mengde IL-1 β -cytokin som er målbar i
 kroppsvæsker eller assosiert med aktiverte celler, relativt liten. En fremgangsmåte for
 30 behandling og/eller forebyggelse som direkte målrettes mot IL-1 β -liganden er en
 bedre strategi særlig ved administrering av et IL-1 β -antistoff med høy affinitet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter og relaterte blandinger og
 produktartikler for behandlingen og/eller forebyggelsen av reumatoid artritt i et individ
 35 (f.eks. pattedyr, menneske) ved å benytte et antistoff eller fragment derav som er
 spesifikk for IL-1 β . Som det fremgår nedenfor kan antistoffer med høy affinitet være
 langt mer potent inhibitor av IL-1-veien enn IL-1Ra (f.eks. Anakinra, Kineret®) og

benyttes til å oppnå en terapeutisk effekt ved en lavere dose og/eller med mindre hyppig administrering enn hva som er nødvendig med andre medikamenter så som rekombinant IL-1Ra.

- 5 Slike fremgangsmåter som her beskrevet med et IL-1 β -antistoff eller fragment kan innbefatte behandlingen av et individ som lider av RA. Fremgangsmåten kan også inkludere forebyggelse av forekomsten av RA hos et risikoindivid.

Antistoffer, humaniserte antistoffer og manipulerte humane antistoffer

- 10 De IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffene eller fragmenter derav kan ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringes som polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer (mAbs), rekombinante antistoffer, kimære antistoffer, CDR-transplanterte antistoffer, fullstendig humane antistoffer, enkeltkjedede antistoffer og/eller bispesifikke antistoffer, så vel som fragmenter, inklusivt varianter og derivater derav, 15 frembrakt etter kjente teknikker, inklusivt, men ikke begrenset til, enzymatisk spaltning, peptidsyntese eller rekombinante teknikker.

- Antistoffer omfatter generelt to tung kjede polypeptider og to lett kjede polypeptider, selv om enkeltdomene-antistoffer som har én tung kjede og én lett kjede, og tung- 20 kjede antistoffer som mangler lette kjeder også er aktuelle. Det finnes fem typer tunge kjeder, betegnet alfa, delta, epsilon, gamma og my basert på aminosyre-sekvensen av den tunge kjedes konstante domene. Disse forskjellige typene av tunge kjeder fører til fem klasser antistoffer, henholdsvis IgA (inklusivt IgA₁ og IgA₂), IgD, IgE, IgG, og IgM, inklusivt fire subclasser av IgG, nemlig IgG₁, IgG₂, IgG₃, og IgG₄. Det 25 finnes også to typer lette kjeder, betegnet kappa (κ) eller lambda (λ) basert på aminosyresekvensen av de konstante domener. Et full-lengde antistoff inkluderer et konstant domene og et variabelt domene. Den konstante region trenger ikke inngå i et antigen-bindingsfragment av et antistoff. Antigen-bindingsfragmenter av et her angitt antistoff kan omfatte Fab, Fab' F(ab')₂ og F(v) antistoff-fragmenter. Som omtalt mer 30 detaljert nedenfor omfatter IL-1 β -bindingsfragmenter antistoff-fragmenter og antigen-bindende polypeptider som vil binde IL-1 β .

- Hver tung kjede- og lett kjede-sekvens av et antistoff, eller antigenbindende fragment derav, innbefatter en variabel region med tre komplementaritetsbestemmende 35 regioner (CDR) så vel som ikke-CDR framework-regioner (FR). Betegnelsene «tung kjede» og «lett kjede» betyr i denne sammenheng henholdsvis den tunge kjedes variable region og den lette kjedes variable region om intet annet er angitt. Tung

kjede CDR refererer seg her til CDR-H1, CDR-H2 og CDR-H3. Lett kjedes CDR omtales her som CDR-L1, CDR-L2 og CDR-L3. Variable regioner og CDR i en antistoffsekvens kan påvises (i) i henhold til de generelle regler som er utviklet på området eller (ii) ved å forskyvningstilpasse sekvensene mot en database av kjente variable regioner.

5 Fremgangsmåter for identifisering av disse regioner er beskrevet i Kontermann & Dubel, red., Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001 og Dinarello et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ 2000. Databaser over antistoffsekvenser er beskrevet i, og kan oppsøkes gjennom «Kabatman»-databasen, www.bioinf.org.uk/abs (vedlikeholdt av A.C. Martin i

10 Department of Biochemistry & Molecular Biology, University College London, London, England) og VBASE2 og www.vbase2.org, beskrevet i Retter et al., Nucl. Acides Res., 33 (Database utg.): D671-D674 (2005). «Kabatman» database nettstedet omfatter også generelle tommelfingerregler for identifisering av CDR. Betegnelsen «CDR» er i denne sammenheng definert som i Kabat et al., Sequences of Immunological Interest,

15 5. utg., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, om intet annet er angitt.

Polyklonale antistoffer utvikles fortrinnsvis i dyr ved gjentatte subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigen og en adjuvant. En bedre

20 antistoffrespons kan oppnås ved å konjugere det relevante antigen med et protein som er immunogent i den art som skal immuniseres, f.eks. keyhole limpet hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyatrypsin-inhibitor ved bruk av et bifunksjonelt eller derivatiserende middel, for eksempel maleimidobenzoyl-sulfosuccinimidester (konjugering gjennom cysteinrester), N-hydroksysuccinimid

25 (gjennom lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid eller andre midler kjent på området.

Dyr immuniseres mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved å kombinere f.eks. 100µg eller 5µg av proteinet eller konjugatet (henholdsvis for

30 kaniner eller mus) med 3 volumer Freund's komplette adjuvant, hvorpå løsningen injiseres intradermalt på flere steder. En måned senere gis dyrene en boosterdose med 1/5 til {fraksjon (1/10)} av den opprinnelige mengde peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvant, ved subkutan injeksjon på flere steder. 7-14 dager etter boosterinjeksjonen tas blod fra dyrene og serum analyseres med henblikk på antistoff-

35 titer. Dyrene gis boosterinjeksjoner inntil konstant titerverdi. Fortrinnsvis gis dyrene boosterinjeksjoner med konjugatet av det samme i antigen, men konjugert til et annet protein og/eller gjennom et forskjellig krysskoblende reagens. Konjugatet kan også

dannes i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner. Aggregerende midler som f.eks. alum benyttes også hensiktsmessig for å forsterke immunresponsen.

5 Monoklonale antistoff refererer seg til et antistoff oppnådd fra en populasjon av tilnærmet homogene antistoffer. Monoklonale antistoffer er i alminnelighet høyt spesifikke og kan rettes mot et enkelt antigensete, i motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffpreparater som i alminnelighet inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper). I tillegg til deres spesifisitet er monoklonale antistoffer fordelaktige ved at de syntetiseres av den homogene kulturen uten
10 kontaminering med andre immunglobuliner med forskjellige spesifisiteter og karakteristika.

Monoklonale antistoffer for bruk i henhold til foreliggende oppfinnelse kan fremstilles etter den hybridom-metode som først ble beskrevet av Kohler et al., (Nature, 256-
15 495-7, 1975) eller ved hjelp av rekombinante DNA-metoder (se f.eks. U.S. patent 4.816.567). De monoklonale antistoffene kan også isoleres fra fag-antistoffbibliotek ved å benytte de teknikker som er beskrevet for eksempel i Clackson et al., (Nature 352:624-628, 1991) og Marks et al., (J. Mol. Biol. 222:581-597), 1991).

20 Etter hybridom-metoden immuniseres en mus eller et annet egnet vertsdyr, som f.eks. en hamster eller makake ape, som her beskrevet for å utløse lymfocytter som produserer eller kan produsere antistoffer som spesifikt vil binde til det protein som benyttes for immunisering. Alternativt kan lymfocytter immuniseres in vitro. Lymfocytter fusjoneres deretter med myelomceller ved å benytte et egnet fusjonerings-
25 middel så som polyetylenglykol, for å danne en hybridomcelle (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic Press, 1986)).

De således fremstilte hybridomcellene utsås og dyrkes i et passende kulturmedium som fortrinnsvis inneholder én eller flere substanser som inhiberer veksten eller levedyktigheten av de ufusjonerte, parentale myelomcellene. Dersom for eksempel de
30 parentale myelomcellene mangler enzymet hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HGPRT eller HPRT), vil dyrkningsmediet for hybridomene typisk inkludere hypoxantin, aminopterin og tymidin (HAT medium), substanser som forhindrer veksten av HGPRT-manglende celler.

35 Foretrukne myelomceller er slike som fusjoneres effektivt, underholder stabil høygradig produksjon av antistoff av de valgte antistoffproduserende celler og er

følsomme overfor et medium. Humane myelom- og mus-humane heteromyelom-cellelinjer har også vært beskrevet for produksjonen av humane monoklonale antistoffer (Kozbor, J. Immunol., 133:3001) (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, s. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York 1987)). Eksempler på murine myelomlinjer er de som er avledet fra MOP-21 og M.C.-11 musetumorer tilgjengelige fra Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, og SP-2 eller X63-Ag8-653-celler tilgjengelige fra American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.

Kulturmediet som hybridomcellene dyrkes i testes på produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Fortrinnsvis bestemmes bindingsspesifisiteten av monoklonale antistoffer produsert av hybridomceller, ved immunpresipitasjon eller ved en *in vitro* bindingstest, så som radioimmunoassay (RIA) eller ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay). Bindingsaffiniteten av det monoklonale antistoff kan for eksempel bestemmes ved Scatchard-analyse (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)).

Etter at det er identifisert hybridomceller som produserer antistoffer av den ønskede spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved begrensende forfynningsprosedyrer og dyrkes etter standardmetoder (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic Press, 1986)). Egnede kulturmedier for dette formål er for eksempel DMEM eller RPMI-1640 medium. Dessuten kan hybridomcellene dyrkes *in vivo* som ascitestumorer i et dyr. De monoklonale antistoffene som utskilles av subklonene separeres hensiktsmessig fra kulturmediet, ascitesvæske eller serum ved hjelp av konvensjonelle prosedyrer for immunoglobulinrensing, som for eksempel protein A-Sepharose, hydroksylapatitt-kromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

Det regnes også med at antistoffer ifølge oppfinnelsen kan benyttes som mindre antigenbindende fragmenter av antistoffet, velkjent på området og her beskrevet.

Foreliggende beskrivelse omfatter IL-1 (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer som inkluderer to full lengde tunge kjeder og to full lengde lette kjeder. Alternativt kan IL-1 β -bindingsantistoffene konstrueres slik at enkeltkjedede antistoffer eller «mini»-antistoffer bibeholder bindingsaktivitet til IL-1 β . Slike konstruksjoner kan fremstilles etter kjente metoder, som f.eks. PCR-mediert kloning og sammensetning av enkeltkjede antistoffer for ekspresjon i E.coli (som beskrevet i Antibody Engineering, The

practical approach series, J. McCafferty, H.R. Hoogenboom og D.J. Chiswell, redaktører, Oxford University Press, 1996). I denne konstruksjonstype PCR-amplifiseres de variable deler av de tunge og lette kjeder av antistoffmolekylet fra cDNA. De resulterende amplicon settes deretter sammen, for eksempel i et andre

5 PCR-trinn, gjennom en linker-DNA som koder for en fleksibel protein-linker sammensatt av aminosyrene Gly og Ser. Denne linkerens lar de tunge og lette kjededeler foldes på en slik måte at den antigenbindende løkke regenereres og antigenet bindes med affiniteter som ofte er sammenlignbare med det parentale full-lengde dimere immunoglobulinmolekyl.

10

De IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter varianter av de eksemplifiserte antistoffer, fragmenter og sekvenser som her er omtalt. Varianter inkluderer peptider og polypeptider som omfatter én eller flere aminosyresekvens-substitusjoner, delesjoner og/eller

15 addisjoner som har den samme eller tilnærmet den samme affinitet og spesifisitet av epitopbinding som ett eller flere av de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene som her er angitt. Varianter inkluderer således peptider og polypeptider som omfatter én eller flere aminosyresekvens substitusjoner, delesjoner og/eller addisjoner til de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene som her er

20 angitt, hvor slike substitusjoner, delesjoner og/eller addisjoner ikke forårsaker vesentlig endring i affinitet og spesifisitet av epitopbinding. For eksempel kan en variant av et antistoff eller fragment være resultat av én eller flere endringer av et antistoff eller fragment, hvor det endrede antistoff eller fragment har den samme eller tilnærmet den samme affinitet og spesifisitet av epitopbinding som utgangssekvensen.

25 Varianter kan være naturlig forekommende, så som alleliske varianter eller spleise-varianter eller kan være kunstig konstruert. Varianter kan fremstilles fra de tilsvarende nukleinsyremolekyler som koder for de nevnte varianter. Varianter av foreliggende antistoffer og IL-1 β -bindende fragmenter kan ha endringer i lett og/eller tung kjede aminosyresekvenser som er naturlig forekommende eller er innført ved *in vitro*

30 manipulering av native sekvenser ved å benytte rekombinant DNA-teknikk. Naturlig forekommende varianter innbefatter «somatiske» varianter som utvikles *in vivo* i den tilsvarende kimlinje-nukleotidsekvens under genereringen av en antistoffrespons på et fremmed antigen.

35

Varianter av IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og bindingsfragmenter kan også fremstilles ved mutageneseteknikker. For eksempel kan aminosyre-endringer innføres tilfeldig gjennom en antistoffkodende region, og de resulterende varianter kan under-

kastes screening for bindingsaffinitet for IL-1 β eller for en annen egenskap. Alternativt kan aminosyre-endringer innføres i utvalgte regioner av et IL-1 β -antistoff, så som i den lette og/eller tunge kjedes CDR og/eller i framework-regionene, og de resulterende antistoffer kan underkastes screening med henblikk på binding til IL-1 β eller annen aktivitet. Aminosyre-endringer omfatter én eller flere aminosyre-substitusjoner i en CDR, som varierer fra en enkelt aminosyreforskjell til innføringen av flere permutasjoner av aminosyrer i en gitt CDR, så som CDR3. Etter en annen metode kan bidraget av hver rest innen en CDR til IL-1 β -binding bestemmes ved å erstatte minst én rest innen CDR med alanin. Lewis et al. (1995), Mol. Immunol. 32:1065-72. Rester som ikke er optimale for binding til IL-1 β kan deretter endres for å bestemme en mer optimal sekvens. Varianter frembrakt ved insersjon av aminosyrer for å øke størrelsen av en CDR, så som CDR3, inngår også. For eksempel har de fleste lett kjede CDR-sekvenser en lengde på ni aminosyrer. Lett kjede sekvenser i et antistoff som er kortere enn ni rester, kan optimaliseres for binding til IL-1 β ved insersjon av passende aminosyrer for å øke lengden av denne CDR.

Varianter kan også fremstilles ved «chain shuffling» av lette eller tunge kjeder. Marks et al. (1992), Biotechnology 10:779-83. En enkelt lett (eller tung) kjede kan kombineres med et bibliotek som har et repertoar av tunge (eller lette) kjeder og den resulterende populasjon underkastes screening med henblikk på ønsket aktivitet så som binding til IL-1 β . Dette muliggjør screening av et større utvalg av forskjellige tunge (eller lette) kjeder i kombinasjon med en enkelt lett (eller tung) kjede enn det som er mulig med bibliotek som omfatter repertoarer av både tunge og lette kjeder.

De IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter derivater av de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene som her er angitt. Derivater inkluderer polypeptider eller peptider, eller varianter, fragmenter eller derivater derav, som er blitt modifisert kjemisk. Eksempler er kovalent tilkobling av en eller flere polymerer, så som vannløselige polymerer, N-koblede eller O-koblede karbohydrater, sukkerer, fosfater og/eller andre slike molekyler. Derivatene modifiseres på en måte som er forskjellig fra naturlig forekommende eller utgangs-peptider eller polypeptider, enten i type eller lokalisering av de tilkoblede molekyler. Derivater inkluderer videre delesjon av én eller flere kjemiske grupper som er naturlig forekommende på peptidet eller polypeptidet.

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være bispesifikke. Bispesifikke antistoffer eller fragmenter kan ha diverse

konfigurasjoner. For eksempel kan bispesifikke antistoffer ligne enkle antistoffer (eller antistoff-fragmenter), men ha to forskjellige antigenbindings seter (variable regioner). Bispesifikke antistoffer kan fremstilles etter kjemiske teknikker (Kranz et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5807), ved «polydoma»-teknikker (U.S. patent 4.474.893) eller ved rekombinant DNA-teknikk. Bispesifikke antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha bindings-spesifisiteter for minst to forskjellige epitoper, hvorav minst én er en epitop av IL-1 β . De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene kan også være heteroantistoffer. Heteroantistoffer er to eller flere antistoffer, eller antistoffbindende fragmenter (Fab) koblet sammen, hvor hvert antistoff eller fragment har ulik spesifisitet.

Teknikker for å frembringe rekombinante DNA-versjoner av de antigenbindende regioner av antistoffmolekyler som går utenom utviklingen av monoklonale antistoffer kan være aktuelle for foreliggende IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og fragmenter. DNA kloner inn i et bakterielt ekspresjonssystem. Ett eksempel på en slik teknikk egnet for gjennomføring av foreliggende oppfinnelse, gjør bruk av et bakteriofag-lambda vektorsystem som har en ledersekvens som får det uttrykte Fab-protein til å migrere til det periplasmatiske rom (mellom bakteriecellemembranen og celleveggen) eller å utskilles. Man kan hurtig generere og utsortere et stort antall funksjonelle Fab-fragmenter for dem som binder IL-1 β . Slike IL-1 β -bindende midler (Fab-fragmenter med spesifisitet for et IL-1 β -polypeptid) omfattes spesifikt i de IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse.

De foreliggende IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffene og fragmentene kan være humaniserte eller manipulerede humane antistoffer. I denne sammenheng er et humanisert antistoff, eller antigenbindende fragmenter derav, et rekombinant polypeptid som omfatter en del av et antigenbindings sete fra et ikke-humant antistoff og en del av framework og/eller de konstante regioner av et humant antistoff. Et manipulert humant antistoff eller antistoff-fragment er et ikke-humant (f.eks. mus) antistoff som er blitt manipulert ved å modifisere (f.eks. ved delesjon, insersjon eller substitusjon) aminosyrer i bestemte posisjoner for å redusere eller eliminere enhver påvisbar immunogenitet av det modifiserte antistoff i et menneske.

Humaniserte antistoffer inkluderer kimære antistoffer og CDR-transplanterte antistoffer. Kimære antistoffer er antistoffer som inkluderer en ikke-human antistoff variabel region koblet til en human konstant region. I kimære antistoffer er den variable region således for det meste ikke-human og den konstante region human.

Kimære antistoffer og fremgangsmåter for fremstilling av disse er beskrevet i Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6841-6855 (1984), Boulianne et al., Nature, 312:643-646 (1984) og PCT Application Publication WO 86/01533. Selv om de kan være mindre immunogene enn et mus-monoklonalt antistoff har administrering av

5 kimære antistoffer vært assosiert med humane anti-mus antistoffresponser (HAMA) på den ikke-humane del av antistoffene. Kimære antistoffer kan også fremstilles ved å spleise genene fra et muse-antistoffmolekyl med riktig antigenbindende spesifisitet, sammen med gener fra et humant antistoffmolekyl av passende biologisk aktivitet så som evnen til å aktivere humant komplement og mediere ADCC. Morrison et al.,

10 (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851; Neuberger et al. (1984), Nature, 312:604. Ett eksempel er erstatningen av en Fc-region med én av en ulik isotype.

CDR-transplanterte antistoffer er antistoffer som inkluderer CDR fra et ikke-humant «donor» antistoff koblet til framework-regionen fra et humant «recipient» antistoff.

15 Generelt omfatter CDR-transplanterte antistoffer flere humane antistoffsekvenser enn kimære antistoffer fordi de inkluderer både konstant regionsekvenser og variabel region- (framework) sekvenser fra humane antistoffer. Et CDR-transplantert humanisert antistoff i henhold til oppfinnelsen kan således for eksempel omfatte en tung kjede som omfatter en sammenhengende aminosyresekvens (f.eks. cirka 5 eller

20 flere, cirka 10 eller flere eller endog 15 eller flere sammenhengende aminosyrerester) fra framework-regionen av et humant antistoff (f.eks. FR-1, FR-2 eller FR-3 av et humant antistoff) eller eventuelt, det meste eller hele framework-regionen av et humant antistoff. CDR-transplanterte antistoffer og fremgangsmåter for fremstilling av disse er beskrevet i Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann et al.,

25 Nature, 332:323-327 (1988) og Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)). Metoder som kan benyttes for å produsere humaniserte antistoffer er også beskrevet i U.S. patent 4.816.567; 5.721.367; 5.837.243 og 6.180.377. CDR-transplanterte antistoffer er ansett mindre tilbøyelige enn kimære antistoffer til å indusere en immunreaksjon mot ikke-humane antistoffdelers. Det har imidlertid vært rapportert at

30 framework-sekvenser fra donor-antistoffer fordres for bindingsaffiniteten og/eller spesifisiteten av donor-antistoffet, antagelig fordi disse framework-sekvensene påvirker foldingen den antigenbindende del av donor-antistoffet. Når ikke-humane CDR-donorsekvenser transplanteres til uendrede humane framework-sekvenser kan det resulterende CDR-transplanterte antistoff derfor i enkelte tilfeller, oppvise tap av

35 bindingsaviditet i forhold til det originale ikke-humane donor-antistoff. Se f.eks. Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988), og Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988).

Humane manipulerte antistoffer inkluderer for eksempel «finerte» antistoffer og antistoffer fremstilt ved å benytte HUMAN ENGINEERING® teknologi (se for eksempel U.S. patent 5.766.886 og 5.869.619). HUMAN ENGINEERING® teknologi er kommersielt tilgjengelig og involverer endring av et ikke-humant antistoff eller antistoff-fragment så som et mus eller kimært antistoff eller antistoff-fragment, ved å gjøre spesifikke endringer av aminosyresekvensen til antistoffet slik at det produseres et modifisert antistoff med redusert immunogenitet i et menneske, men som likevel bibeholder de ønskelige bindingsegenskapene til de opprinnelige ikke-humane antistoffene. Generelt involverer teknikken klassifisering av aminosyrerester av et ikke-humant (f.eks. mus) antistoff som «lav risiko», «moderat risiko» eller «høy risiko» rester. Klassifiseringen foretas ved å benytte en global risiko/nytte beregning som evaluerer de forventede fordeler ved å gjøre bestemte substitusjoner (f.eks. for immunogenitet i mennesker) mot den risiko at substitusjonen vil påvirke det resulterende antistoffs folding og/eller antigenbindende egenskaper. En lav risikoposisjon er således en posisjon hvor en substitusjon forutses å være fordelaktig, idet den forventes å redusere immunogenitet uten i vesentlig grad å påvirke antigenbindingsegenskaper. En moderat risikoposisjon er en posisjon hvor en substitusjon forventes å redusere immunogenitet, men som mer sannsynlig påvirker proteinfolding og/eller antigenbinding. Høy risikoposisjoner inneholder rester som mest sannsynlig vil være involvert i riktig folding eller antigenbinding. Generelt erstattes lav risikoposisjoner i et ikke-humant antistoff med humane rester, høy risikoposisjoner erstattes sjelden og humaniserende substitusjoner i moderate risikoposisjoner foretas i blant, men ikke kritikkøst. Posisjoner med proliner i den ikke-humane antistoffs variable regionsekvens klassifiseres vanligvis som i det minste moderate risikoposisjoner.

Den bestemte humane aminosyrerest som erstattes i en gitt lav eller moderat risikoposisjon av en ikke-human (f.eks. mus) antistoffsekvens kan selekteres ved å tilpasse en aminosyresekvens fra de ikke-humane antistoffenes variable regioner med den tilsvarende region av en spesifikk eller konsensus human antistoffsekvens. Aminosyre-restene i lave eller moderate risikoposisjoner i den ikke-humane sekvens kan erstattes med den tilsvarende rest i den humane antistoffsekvens i henhold til tilpasningsjusteringen. Teknikker for fremstilling av manipulerte humanproteiner er beskrevet mer detaljert i Studnicka et al., Protein Engineering, 7:805-814 (1994), U.S. patent 5.766.886; 5.770.196; 5.821.123 og 5.869.619 og PCT Application Publication WO 93/11794.

«Finerte» antistoffer er ikke-humane eller humaniserte (f.eks. kimære eller CDR-transplanterte antistoffer) antistoffer som er manipulert for å erstatte disse løsningsmiddeleksponte aminosyrerester for ytterligere å redusere deres immunogenitet eller forsterke deres funksjon. Siden overflaterester av et kimært antistoff antas mindre sannsynlig å påvirke riktig antistoff-folding og mer sannsynlig å utløse en immunreaksjon, kan «finering» av et kimært antistoff eksempelvis inkludere identifisering av løsningsmiddeleksponte rester i den ikke-humane framework-region til et kimært antistoff og erstatte i det minste én av disse med den tilsvarende overflaterest fra en human framework-region. Finering kan oppnås etter en hvilken som helst egnet manipuleringssteknikk, inklusivt anvendelsen av den ovenfor beskrevne HUMAN ENGINEERING® teknologi.

Etter en annen tilnærming kan gjenvinning av bindingsaviditet oppnås ved «de-humanisering» av et CDR-transplantert antistoff. De-humanisering kan innbefatte gjenopprettelse av rester fra donorens antistoffs framework-regioner til det CDR-transplanterte antistoff og derved gjenopprette riktig folding. Tilsvarende kan «de-humanisering» oppnås ved (i) å inkludere deler av «donor»-framework-regionen i «resipient»-antistoffet eller (ii) transplantere deler av «donor» antistoff-framework-regionen i resipient-antistoffet (sammen med de transplanterte donor-CDR).

20

Angående av ytterligere diskusjon av antistoffer, humanisert antistoffer, manipulerte antistoffer og fremgangsmåter for fremstilling av disse, se Kontermann & Dubel, red., Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001.

Eksempler på humaniserte eller humane manipulerte antistoffer er IgG-, IgM-, IgE-, IgA- og IgD-antistoffer. De foreliggende antistoffene kan være av enhver klasse (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc) eller av isotype og kan omfatte en kappa eller lambda lett kjede. For eksempel kan et humant antistoff omfatte en IgG tung kjede eller et definert fragment, som f.eks. minst én av isotypene IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4. Som et ytterligere eksempel kan foreliggende antistoffer eller fragmenter omfatte en IgG1 tung kjede og en IgG1 lett kjede.

De foreliggende antistoffer og fragmenter kan være humane antistoffer, så som antistoffer som binder IL-1 β -polypeptider og kodes av nukleinsyresekvenser som er naturlig forekommende somatiske varianter av human kimlinje-immunglobulin, nukleinsyresekvens, og fragmenter, syntetiske varianter, derivater og fusjoner derav. Slike antistoffer kan fremstilles etter enhver metode kjent på området, som f.eks.

35

gjennom anvendelsen av transgene pattedyr (så som transgene mus) hvor det native immunglobulin-repertoar er erstattet med humane V-gener i pattedyrets kromosom. Slike pattedyr synes å foreta VDJ-rekombinasjon og somatisk hypermutasjon av de humane kimlinje-antistoffgenene på normal måte, hvorved de produserer høyaffinitets antistoffer med komplette humansekvenser.

Humane antistoffer for målsøking av proteiner kan også fremstilles ved å benytte transgene dyr som ikke har noen endogen immunglobulinproduksjon og er manipulert til å inneholde alle immunglobulin loci. For eksempel omtaler WO 98/24893 transgene dyr som har et humant Ig-locus hvor dyret ikke produserer funksjonelle endogene immunglobuliner som følge av inaktiveringen av endogene tung og lett kjede loci. WO 91/00906 omtaler også transgene ikke-primate pattedyrverter som kan utløse en immunrespons mot et immunogen, hvor antistoffene har primatens konstante og/eller variable regioner og hvor de endogene immunglobulin-kodende loci er substituert eller inaktivert. WO 96/30498 og U.S. patent 6.091.001 omtaler anvendelsen av Cre/Lox-systemet for modifisering av immunglobulin-locus i et pattedyr, så som å erstatte alle eller en del av den konstante eller variable region for å danne et modifisert antistoffmolekyl. WO 94/02602 omtaler ikke-humane pattedyrverter som har inaktivert endogene Ig-loci og funksjonelle humane Ig-loci. U.S. patent 5.939.598 omtaler fremgangsmåter for fremstilling av transgene mus, hvor musene mangler endogene tunge kjeder og uttrykker et eksogent immunglobulin-locus som omfatter én eller flere xenogene konstante regioner. Se også U.S. patent 6.114.598; 6.657.103 og 6.833.268.

Ved å benytte et transgent dyr som beskrevet ovenfor, kan en immunrespons frembringes for et valgt antigenmolekyl, og antistoffproduserende celler kan tas fra dyret og benyttes til fremstilling av hybridomer som utskiller humane monoklonale antistoffer. Immuniseringsprotokoller, adjuvanter og lignende er kjent på området og benyttes ved immunisering for eksempel av en transgen mus som beskrevet i WO 96/33735. Denne publikasjonen omtaler monoklonale antistoffer mot en rekke antigene molekyler, inklusivt IL-6, IL-8, TNFa, human CD4, L-selektin, gp39 og tetanustoksin. De monoklonale antistoffene kan testes på deres evne til å inhibere eller nøytralisere den biologiske aktivitet eller fysiologiske effekt av det tilsvarende protein. WO 96/33735 angir at monoklonale antistoffer mot IL-8, avledet fra immunceller i transgene mus, immunisert med IL-8, blokkerte IL-8-induserte funksjoner av nøytrofiler. Humane monoklonale antistoffer med spesifisitet for det

antigen som benyttes til å immunisere transgene dyr er også omtalt i WO 96/34096 og i U.S. patentsøknad nr. 20030194404 og U.S. patentsøknad nr. 20030032667.

Ytterligere transgene dyr som er anvendelige for å fremstille monoklonale antistoffer er Medarex HuMAb-MOUSE®, beskrevet i U.S. patent 5.770.429 og Fishwild et al., (Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996) som inneholder gensekvenser fra ikke omleirede humane antistoffgener som koder for de tunge og lette kjeder i humane antistoffer. Immunisering av en HuMAb-MOUSE® muliggjør produksjonen av fullstendig humane monoklonale antistoffer til målproteinet.

10

Dessuten beskriver Ishida et al. (Cloning Stem Cells 4:91-102, 2002) TransChromo Mouse (TCMOUSE™) som omfatter megabase-store segmenter av human DNA og som inkorporerer hele det humane immunglobulin (hIg) loci. TCMOUSE™ har et fullt diversert repertoar av hIg, inklusivt alle subklassene av IgG (IgG1-G4). Immunisering av TCMOUSE™ med forskjellige antigener frembringer antistoffresponser som omfatter humane antistoffer.

15

Se også Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993) og U.S. patent 5.591.669; U.S. patent 5.589.369; U.S. patent 5.545.807 og U.S. patentpublikasjon 20020199213. U.S. Patentpublikasjon 20030092125 beskriver fremgangsmåter for å påvirke immunresponsen til et dyr i retning av den ønskede epitop. Humane antistoffer kan også utvikles av *in vitro* aktiverte B-celler (se U.S. patent 5.567.610 og 5.229.275).

25

Humane antistoffer kan også utvikles gjennom *in vitro* screening av antistoff display-bibliotek. Se Hoogenboom et al., (1991) J. Mol. Biol. 227:381 og Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581. Forskjellige antistoffholdige fag med displaybibliotek har vært beskrevet og kan lett fremstilles. Bibliotek kan inneholde et mangfold av humane antistoffsekvenser, så som humane Fab-, Fv- og scFv-fragmenter som kan underkastes screening mot et passende mål. Fag-displaybibliotek kan omfatte andre peptider eller proteiner enn antistoffer som kan underkastes screening for å identifisere selektive bindende midler av IL-1β.

30

Utviklingen av teknologier for fremstilling av repertoarer av rekombinante humane antistoffgener, og display av de kodede antistoff-fragmentene på overflaten av filamentøse bakteriofag, har ført til en måte for direkte fremstilling av humane

35

antistoffer. Antistoffene produsert ved fag-teknologi, produseres som antigenbindende fragmenter – vanligvis Fv- eller Fab-fragmenter – i bakterier og mangler således effektorfunksjoner. Effektorfunksjoner kan innføres etter én av to strategier: Fragmentene kan manipuleres enten til komplette antistoffer for ekspresjon i patte-
 5 dyrceller eller til bispesifikke antistoff-fragmenter med et andre bindingssete som kan utløse en effektorfunksjon.

Beskrivelsen vurderer en fremgangsmåte for fremstilling av målspesifikt antistoff eller antigenbindende del derav, som omfatter de trinn å syntetisere et bibliotek av
 10 humane antistoffer på fag, foreta screening av biblioteket med målprotein eller en del derav, isolere fag som binder målet og oppnå antistoffet fra fagen. Som eksempel omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av biblioteket av antistoff for bruk innen fag-display-teknikker de trinn å immunisere et ikke-humant dyr som inneholder humane immunglobulin-loci, med målantigen eller en antigen del derav for å
 15 frembringe en immunrespons, ekstrahere antistoffproduserende celler fra det immuniserte dyr; isolere RNA fra de ekstraherte cellene, revers-transkribere RNA for å produsere cDNA, amplifisere cDNA ved å benytte en primer, og innsette cDNA i en fag-display-vektor, slik at antistoffene uttrykkes på fagen. Rekombinante målspesifikke antistoffer ifølge oppfinnelsen kan oppnås på denne måte.

20

Fag-display-prosesser etterligner immunseleksjon gjennom display av antistoff-repertoaret på overflaten av filamentøse bakteriofag og påfølgende seleksjon av fag om deres binding til valgt antigen. En slik teknikk er beskrevet i WO 99/10494, som beskriver isoleringen av høyaffinitet og funksjonelle agonistiske antistoffer for MPL- og
 25 msk-reseptorer ved bruk av en slik fremgangsmåte. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan isoleres ved screening av et rekombinant kombinatorisk antistoff-bibliotek, fortrinnsvis et csFv fag-display-bibliotek, fremstilt ved å benytte humane V_L og V_H cDNA fremstilt fra mRNA avledet fra humane lymfocytter. Metodikk for fremstilling og screening av slike bibliotek er kjent på området. Se f.eks. U.S. patent 5.969.108. Det finnes
 30 kommersielt tilgjengelige sett for utvikling av fag-display-bibliotek (f.eks. the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System katalog nr. 27-9400-01 og Stratagene SurfZAP.TM. fag-display-settet katalog nr. 240612). Det finnes også andre fremgangsmåter og reagenser som kan benyttes til generering og screening av antistoff-display-bibliotek (se f.eks. Ladner et al. U.S. patent. 5.223.409; Kang et al.
 35 PCT Publication No. WO 92/18619; Dower et al. PCT Publication No. WO 91/17271; Winter et al. PCT Publication No. WO 92/20791; Markland et al. PCT Publication No.

WO 92/15679; Breitling et al. PCT Publication No. WO 93/01288; McCafferty et al. PCT Publication No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT Publication No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al.,
 5 Nature (1990) 348:552-554, Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137 og Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.

10 For å isolere humane antistoffer spesifikke for målantigenet med de ønskede karakteristika, underkastes i én utførelsesform, screening av et humant V_H og V_L bibliotek for å selektere for antistoff-fragmentet som har den ønskede spesifisitet. Antistoff-bibliotekene benyttet for denne metode er fortrinnsvis scFv-bibliotek fremstilt
 15 og underkastet screening som beskrevet her og forøvrig på området (McCafferty et al., PCT Publication No. WO 92/01047, McCafferty et al. (Nature 348:552-554, 1990) og Griffiths et al. (EMBO J 12:725-734, 1993). Disse scFv antistoff-bibliotekene underkastes fortrinnsvis screening ved bruk av målrettet protein som antigenet. Alternativt kloner Fd-fragmentet (V_H - C_H1) og lett kjede (V_L - C_L) av antistoffer separat
 20 ved PCR og rekombineres tilfeldig i kombinatoriske fag-display-bibliotek som deretter kan selekteres for binding til et bestemt antigen. Fab-fragmentene uttrykkes på fagoverflaten, dvs. fysisk koblet til de gener som koder for disse. Seleksjon av Fab ved antigenbinding ko-selekterer derfor for de Fab-kodende sekvenser som deretter kan amplifiseres. Gjennom flere runder av antigenbinding og reamplifisering, en prosedyre
 25 som betegnes panning, anrikes Fab spesifikt for antigenet og isoleres til slutt.

I 1994 ble det beskrevet en fremgangsmåte for humanisering av antistoffer, kalt «guided selection». Guided selection gjør bruk av kraften i fag-display-teknikken for humaniseringen av mus-monoklonalt antistoff (se Jespers, L. S. et al., Bio/Technology
 30 12, 899-903 (1994). For dette kan Fd-fragmentet av det mus-monoklonale antistoff underkastes display i kombinasjon med et humant lett kjede bibliotek, og det resulterende hybrid Fab-bibliotek deretter selekteres med antigen. Mus-Fd-fragmentet gir derved et templat for å lede seleksjonen. Deretter kombineres de selekterte humane lette kjeder med et humant Fd-fragment-bibliotek. Seleksjon av de
 35 resulterende bibliotek fører til fullstendig human Fab.

Et utvalg prosedyrer for å oppnå humane antistoffer fra fag-display-bibliotek har vært beskrevet (se for eksempel Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); U.S. Patent 5.565.332 og 5.573.905; Clackson, T. og Wells, J.A. TIBTECH 12, 173-184 (1994)). Særlig har *in vitro* seleksjon og utvikling av antistoffer avledet fra fag-display-bibliotek blitt et kraftig hjelpemiddel (se Burton, D.R. og Barbas III, C.F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); U.S. patentpublikasjon 20020004215 og WO 92/01047; U.S. patentpublikasjon 20030190317 og U.S. patent 6.054.287 og 5.877.293.

Watkins «Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift», «Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002), og U.S. patentpublikasjon nr. 20030044772, publisert 6. mars 2003, beskriver metoder for screening av fag-uttrykte antistoff-bibliotek eller andre bindingsmolekyler ved «capture lift», en fremgangsmåte som involverer immobilisering av kandidat-bindingsmolekylene på en fast bærer.

Fv-fragmenter oppvises på overflaten av fag, ved assosiasjonen av én kjede uttrykt som en fag-proteinfusjon (f.eks. med M13 gen III) med den komplementære kjede uttrykt som et løselig fragment. Det kan tenkes at fagen kan være en filamentøs fag, så som én av klasse I-fagene: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff og en av klasse II-fagene Xf, Pf1 og Pf3. Fagen kan være M13 eller fd eller et derivat derav.

Etter at initiale humane V_L - og V_H -segmenter er selektert, foretas «mix and match»-forsøk, hvor forskjellige par av de initialt valgte V_L - og V_H -segmenter er underkastet screening for målbinding for å selektere foretrukne V_L/V_H -parkombinasjoner. For ytterligere å forbedre kvaliteten av antistoffet kan V_L - og V_H -segmentene av de foretrukne V_L/V_H -par dessuten muteres tilfeldig, fortrinnsvis innen hvilke som helst av CDR1-, CDR2- eller CDR3-regionen av V_H og/eller V_L , etter en prosess som er analog med den *in vivo* somatiske mutasjonsprosess som er ansvarlig for affinitetsmodning av antistoffer under en naturlig immunrespons. Denne affinitetsmodning *in vitro* kan oppnås ved amplifisering av V_L - og V_H -regioner under bruk av PCR-primere som er komplementære til henholdsvis V_H CDR1, CDR2 og CDR3 eller V_L CDR1, CDR2 og CDR3, hvor primerne er blitt «spiked» med en tilfeldig blanding av de fire nukleotid-basene i visse posisjoner, slik at de resulterende PCR-produktene koder for V_L - og V_H -segmenter som det er innført tilfeldige mutasjoner i, i V_H - og/eller V_L -CDR3-regionene.

Disse tilfeldig muterte V_L - og V_H -segmentene kan underkastes ny screening med henblikk på binding til målantigenet.

Etter screening og isolering av et målspesifikt antistoff fra et rekombinant immun-
 5 globulin-display-bibilotek, kan nukleinsyre som koder for det selekterte antistoff
 gjenvinnes fra display-pakken (f.eks. fra fag-genomet) og subklones inn i andre
 ekspresjonsvektorer etter standard rekombinante DNA-teknikker. Om ønskelig kan
 nukleinsyren manipuleres ytterligere for å danne andre antistoff-former ifølge
 oppfinnelsen, som beskrevet nedenfor. For å uttrykke et rekombinant humant
 10 antistoff, isolert ved screening av et kombinatorisk bibliotek, klones den DNA som
 koder for antistoffet inn i en rekombinant ekspresjonsvektor og innføres i en pattedyr-
 vertscelle, som her beskrevet.

Det kan tenkes at fag-display-metoden kan foretas i en mutatorstamme av bakterier
 15 eller vertscelle. En mutatorstamme er en vertscelle som har en genetisk defekt som
 bevirker at DNA replikert i denne, muteres med hensyn til dens parentale DNA.
 Eksempler på mutatorstammer er NR9046mutD5 og NR9046mutT1.

Det kan også tenkes at fag-display-metoden kan foretas ved bruk av en hjelper-fag.
 20 Dette er en fag som benyttes til å infisere celler inneholdende et defekt fag-genom og
 som bevirker utfylling av defekten. Det defekte fag-genom kan være en fagemid eller
 en fag med en funksjon som koder for fjernede gensekvenser. Eksempler på hjelper-
 fag er M13K07, M13K07-gen III no.3; og fag som oppviser eller koder for et bindings-
 molekyl fusjonert til et kapsidprotein.

25 Antistoffer utvikles også via fag-display screeningmetoder ved bruk av den hierarkiske
 dobbelt kombinatoriske tilnærming som omtalt i WO 92/01047, hvor en individuell
 koloni som inneholder enten en H- eller L-kjede-klon benyttes til å infisere et full-
 stendig bibliotek av kloner som koder for den andre kjede (L eller H) og det
 30 resulterende to-kjedede spesifikke bindingselement er selektert i henhold til fag-
 display-teknikker som de som der er beskrevet. Denne teknikk er også angitt i Marks
 et al. (Bio/Technology, 10:779-783, 1992).

Metoder for display av peptider på overflaten av gjær og mikrobielle celler har også
 35 vært benyttet til å identifisere antigenspesifikke antistoff. Se for eksempel U.S. patent
 6.699.658. Antistoff-bibliotek kan være festet til gjærproteiner så som agglutinin, som
 effektivt etterligner celleoverflate-display av antistoffer ved B-celler i immunsystemet.

- I tillegg til fag-displaymetoder kan antistoffer isoleres ved å benytte ribosom mRNA display-metoder og mikrobielle celle-display-metoder. Seleksjon av polypeptid som gjør bruk av ribosom-display er beskrevet i Hanes et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942, 1997) og i U.S. patent 5.643.768 og 5.658.754 utstedt til Kawasaki.
- 5 Ribosom-display er også egnet for hurtig storskala mutasjonsanalyse av antistoffer. Den selektive mutagenesetilnærming tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av antistoffer med forbedrede aktiviteter, som kan selekteres ved bruk av ribosomale display-teknikker.
- 10 IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og fragmenter kan omfatte én eller flere deler som ikke binder IL-1 β , men i stedet er ansvarlig for andre funksjoner, så som sirkulerende halveringstid, direkte cytotoksisk effekt, påviselig merking eller aktivering av resipientens endogene komplementkaskade eller endogene cellulære cytotoxicitet. Antistoffene eller fragmentene kan omfatte hele eller en del av den konstante region
- 15 og kan være av en hvilken som helst isotype, inklusivt IgA (f.eks. IgA1 eller IgA2), IgD, IgE, IgG (f.eks. IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4) eller IgM. Dessuten, eller i stedet for å inneholde en konstant region, kan antigenbindende forbindelser ifølge oppfinnelsen inkludere en epitop-tag, en «salvage»-reseptorepitop, en merkingsdel for diagnostiske formål eller for rensing eller en cytotoksisk del så som en radionuklide
- 20 eller et toksin.

Den konstante region (når den forefinnes) av de foreliggende antistoffer og fragmenter kan være av γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2 eller δ - eller ϵ -type, fortrinnsvis av γ -typen, mer foretrukket av γ -type, hvor den konstante del av en human lett kjede kan

25 være av κ - eller λ -type (som inkluderer λ 1-, λ 2- og λ 3-subtyper) men fortrinnsvis er av κ -typen.

Varianter inkluderer også antistoffer eller fragmenter som omfatter en modifisert Fc-region, hvor den modifiserte Fc-region omfatter minst én aminosyremodifikasjon i

30 forhold til en villtype Fc-region. Den varierte Fc-region kan være formet, i forhold til et sammenlignbart molekyl som omfatter villtype Fc-regionen, slik at den binder Fc-reseptorer med større eller mindre affinitet.

For eksempel kan de foreliggende IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter omfatte

35 en modifisert Fc-region. Fc-regionen refererer seg til naturlig forekommende eller syntetiske polypeptider homologe med det IgG C-terminale domene som dannes etter papainoppslutning av IgG. IgG Fc har en molekylvekt på tilnærmet 50kD. I de fore-

liggende antistoffer og fragmenter kan det benyttes en hel Fc-region eller bare en halveringstidsforlengende del. Dessuten er mange modifikasjoner i aminosyresekvens akseptable siden nativ aktivitet ikke i alle tilfeller er nødvendig eller ønskelig.

5 Fc-regionen kan muteres, dersom det er ønskelig, for å inhibere dens evne til å fiktere komplement og binde Fc-reseptoren med høy affinitet. For murint IgG Fc gjør erstatning av Glu 218, Lys 320 og Lys 322 med Ala-rester proteinet ute av stand til å styre ADCC. Erstatning av Leu 235 med Glu inhiberer proteinets evne til å binde Fc-reseptoren med høy affinitet. Forskjellige mutasjoner for human IgG er også kjent (se
10 f.eks. Morrison et al., 1994, The Immunologist 2:119-124 og Brekke et al., 1994, The Immunologist 2:125).

I enkelte utførelsesformer tilveiebringes antistoffer eller fragmenter med en modifisert Fc-region hvor en naturlig forekommende Fc-region er modifisert for å øke halverings-
15 tiden av antistoffet eller fragmentet i et biologisk miljø, for eksempel serumhalveringstiden eller en halveringstid målt med en *in vitro* test. Metoder for å endre den opprinnelige form av en Fc-region av et IgG er også beskrevet i U.S. patent 6.998.253.

I enkelte utførelsesformer kan det være ønskelig å modifisere antistoffet eller
20 fragmentet for å øke dets serumhalveringstid, for eksempel addere molekyler som f.eks. PEG eller andre vannløselige polymerer, inklusivt polysakkaridpolymerer, til antistoff-fragmenter for å øke halveringstiden. Dette kan også oppnås ved for eksempel inkorporering av en «salvage»-reseptor-bindingsepitop i antistoff-fragmentet (f.eks. ved mutasjon av den passende region i antistoff-fragmentet eller
25 ved å inkorporere epitopen i en peptid-tag som deretter fusjoneres til antistoff-fragmentet i den ene ende eller i midten, f.eks. ved DNA- eller peptidsyntese) (se International Publication No. WO 96/32478). «Salvage»-reseptor-bindingsepitop refererer seg til en epitop av Fc-regionen av et IgG-molekyl (f.eks. IgG₁, IgG₂, IgG₃ eller IgG₄) som er ansvarlig for økning av *in vivo* serumhalveringstiden av IgG-
30 molekylet.

En «salvage»-reseptor-bindingsepitop kan inkludere en region hvor hvilken som helst av flere aminosyrerester fra én eller to sløyfer av et Fc-domene overføres til en analog posisjon av antistoff-fragmentet. Enda mer foretrukket overføres tre eller flere rester
35 fra en eller to sløyfer av Fc-domenet. Ytterligere mer foretrukket tas epitopen fra CH2-domenet av Fc-regionen (f.eks. av en IgG) og overføres til CH1, CH3 eller V_H-regionen, eller flere enn én slik region, av antistoffet. Alternativt tas epitopen fra CH2-

domenet av Fc-regionen og overføres til C_L-regionen eller V_L-regionen, eller til begge, av antistoff-fragmentet. Se også internasjonale søknader WO 97/34632 og WO 96/32478 som beskriver Fc-varianter og deres interaksjon med «salvage»-reseptoren.

5

Mutasjon av rester innen Fc-reseptor bindingsseter kan resultere i endret effektor-funksjon, så som endret ADCC- eller CDC-aktivitet eller endret halveringstid. Potensielle mutasjoner inkluderer insersjon, delesjon eller substitusjon av én eller flere rester, inklusivt substitusjon med alanin, en konservativ substitusjon, en ikke-konservativ substitusjon eller erstatning med en tilsvarende aminosyrerest i den samme posisjon fra en ulik IgG-subklasse (f.eks. erstatning av en IgG1-rest med en tilsvarende IgG2-rest i denne posisjon). For eksempel har det vært rapportert at mutering av serinet i aminosyreposisjon 241 i IgG4 til prolin (som finnes i den posisjon i IgG1 og IgG2) førte til produksjon av et homogent antistoff, så vel som å forlenge serumhalveringstid og forbedre vevsfordeling sammenlignet med det opprinnelige kimære IgG4. (Angal et al., Mol. Immunol. 30:105-8, 1993).

10

15

20

25

Antistoff-fragmenter er deler av et intakt full lengde antistoff, så som en antigen-bindende eller variabel region av det intakte antistoff. Eksempler på antistoff-fragmenter er Fab, Fab', F(ab')₂ og Fv-fragmenter; «diabodies», lineære antistoffer; enkeltkjede antistoffmolekyler (f.eks. scFv); multispesifikke antistoff-fragmenter, så som bispesifikke, trispesifikke, og multispesifikke antistoffer (f.eks. diabodies, triabodies, tetrabodies); minibodies; kelaterende rekombinante antistoffer; tribodies eller bibodies; intrabodies; nanobodies; små modulære immunfarmasøytika (SMIP), «adnektiner», bindingsdomene immunglobulin-fusjonsproteiner; kameliserte antistoffer; V_{HH}-holdige antistoffer og ethvert annet polypeptid dannet fra antistoff-fragmenter.

30

35

Foreliggende oppfinnelse inkluderer IL-1β-bindende antistoff-fragmenter som omfatter hvilken som helst av de foregående tunge eller lette kjedesequenser og som binder IL-1β. Betegnelsen fragmenter refererer seg i denne sammenheng til enhver 3 eller flere sammenhengende aminosyrer (f.eks. 4 eller flere, 5 eller flere, 6 eller flere, 8 eller flere eller endog 10 eller flere sammenhengende aminosyrer) av antistoffet og omfatter Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og F(v)-fragmenter eller de individuelle lett- eller tungkjedes variable regioner eller deler derav. IL-1β-bindende fragmenter inkluderer for eksempel Fab, Fab', F(ab')₂ Fv og scFv. Disse fragmentene mangler Fc-fragmentet til et intakt antistoff, utskilles hurtigere fra kretsløpet og kan ha mindre uspesifikk vevs-

binding enn et intakt antistoff. Se Whal et al. (1983), J. Nucl. Med., 24:316-25. Disse fragmentene kan fremstilles fra intakte antistoffer ved å benytte velkjente metoder, for eksempel ved proteolytisk spaltning med enzymer som f.eks. papain (for å produsere Fab-fragmenter) eller pepsin (for å produsere F(ab')₂-fragmenter).

5

In vitro og cellebaserte tester for bruk ved bestemmelse av binding av IL-1 β til IL-1-reseptortype 1 (IL-1RI) inklusivt tester som bestemmer i nærvær av molekyler (så som antistoffer, antagonist eller andre inhibitorer som binder til IL-1 β eller IL-1RI, er beskrevet på området (se for eksempel Evans et al., (1995), J. Biol. Chem. 270:11477-11483; Vigers et al., (2000), J. Biol. Chem. 275:36927-36933; Yanofsky et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7381-7386; Fredricks et al., (2004), Protein Eng. Des. Sel. 17:95-106; Slack et al., (1993). J. Biol. Chem. 268:2513-2524; Smith et al., (2003), Immunity 18:87-96; Vigers et al. (1997), Nature 386:190-194; Ruggiero et al., (1997), J. Immunol. 158:3881-3887; Guo et al., (1995), J. Biol. Chem. 270:27562-27568; Svenson et al., (1995), Eur. J. Immunol. 25:2842-2850; Arend et al., (1994), J. Immunol. 153:4766-4774). Rekombinant IL-1-reseptortype I, inklusivt human IL-1-reseptortype I, for slike tester er lett tilgjengelig fra en rekke kommersielle kilder (se for eksempel R&D Systems, SIGMA). IL-1-reseptortype I kan også uttrykkes fra en ekspresjonskonstruksjon eller vektor innført i en passende vertscelle, ved å benytte standard molekylære biologi- og transfeksjonsteknikker som er kjent på området. Den uttrykket IL-1-reseptortype I kan deretter isoleres og renses for bruk i bindingstester eller alternativt benyttes direkte i en celleassosiert form.

10

15

20

25

30

For eksempel kan bindingen av IL-1 β til IL-1-reseptortype I bestemmes ved å immobilisere et IL-1 β -bindende antistoff, kontakte IL-1 β med det immobiliserte antistoff og bestemme hvorvidt IL-1 β ble bundet til antistoffet, og kontakte en løselig form av IL-1RI med det bundne IL-1 β /antistoffkompleks og bestemme hvorvidt det løselige IL-1RI er bundet til komplekset. Denne protokoll kan også innbefatte kontakting av det løselige IL-1RI med det immobiliserte antistoff før kontakten med IL-1 β , for å bekrefte at det løselige IL-1RI ikke bindes til det immobiliserte antistoff. Denne protokoll kan gjennomføres ved å benytte et Biacore[®] instrument for kinetisk analyse av bindingsinteraksjoner. En slik protokoll kan også benyttes for å bestemme hvorvidt et antistoff eller annet molekyl tillater eller blokkerer bindingen av IL-1 β til IL-1-reseptortype I.

35

For andre IL-1 β /IL-1RI-bindingstester kan tillatelse eller blokkering av IL-1 β -binding til IL-1-reseptortype I bestemmes ved å sammenligne bindingen av IL-1 β til IL-1RI i

nærvær eller fravær av IL-1 β -antistoffer eller IL-1 β -bindingsfragmenter derav. Blokkering påvises i testavlesingen som en klar reduksjon av IL-1 β -binding til IL-1-reseptortype I i nærvær av anti-IL-1 β -antistoffer eller IL-1 β -bindingsfragmenter derav, sammenlignet med en kontrollprøve som inneholder den tilsvarende buffer eller

5 fortynningsmiddel, men ikke et IL-1 β -antistoff eller et IL-1 β -bindende fragment derav. Testavlesningen kan kvalitativt anses som indikasjon på nærvær eller fravær av blokkering, eller kan kvantitativt anses som indikasjon på en prosentuell- eller foldings-reduksjon i binding som følge av nærværet av antistoffet eller fragmentet.

10 Alternativt eller tillegg, når et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende fragment i det vesentlige blokkerer IL-1 β -binding til IL-1RI, er IL-1 β -bindingen til IL-1RI redusert minst 10 ganger, alternativt minst cirka 20 ganger, alternativt minst cirka 50 ganger, alternativt minst cirka 100 ganger, alternativt minst cirka 1000 ganger, alternativt minst cirka 10 000 ganger, eller mer, sammenlignet med bindingen av de samme

15 konsentrasjoner IL-1 β og IL-1RI i fravær av antistoffet eller fragmentet. Som et annet eksempel når et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende fragment i det vesentlige tillater IL-1 β -binding til IL-1RI, er IL-1 β -bindingen til IL-1RI minst cirka 90%, alternativt minst cirka 95%, alternativt minst cirka 99%, alternativt minst cirka 99,9%, alternativt minst cirka 99,99%, alternativt minst cirka 99,999%, alternativt

20 minst cirka 99,9999%, alternativt i det vesentlig identisk til binding av de samme konsentrasjoner av IL-1 β og IL-1RI i fravær av antistoffet eller fragmentet.

Foreliggende oppfinnelse kan i enkelte utførelsesformer omfatte IL-1 β -bindende antistoffer eller IL-1 β -bindingsfragmenter som binder til den samme epitop eller til

25 nærmet samme epitop som ett eller flere av de eksempler på antistoffer som her er beskrevet. Alternativt eller i tillegg konkurrerer de IL-1 β -bindende antistoffer eller IL-1 β -bindende fragmenter med bindingen av et antistoff som har variable region-sekvenser av AB7, som er beskrevet i U.S. søknad nummer 11/472813 eller WO 2007/002261 (sekvenser vist nedenfor). Alternativt eller i tillegg, omfatter fore-

30 liggende oppfinnelse IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter som binder til en epitop som inngår i aminosyresekvensen ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEKV.ID.NR:1), en epitop som antistoffene betegnet av AB5 og AB7 (U.S. søknad nummer 11/472813, WO 2007/002261) binder til. Som vurdert av søkerne, kan man lett bestemme om et IL-1 β -bindende antistoff eller et fragment binder til den samme epitop eller tilnærmet

35 den samme epitop som ett eller flere av de eksemplifiserte antistoffer, som for eksempel antistoffet betegnet AB7, ved å benytte hvilken som helst av flere kjente metoder.

For eksempel kan nøkkel-aminosyrerestene (epitop) bundet av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment, bestemmes ved å benytte en peptid «array» som for eksempel en PepSpot[®] peptid «array» (JPT Peptide Technologies, Berlin, Tyskland),

5 hvor en skanning av tolv aminosyrepeptider, som spenner over hele IL-1 β -aminosyre-sekvensen, hvor hvert peptid overlapper det foregående med 11 aminosyrer, syntetiseres direkte på en membran. Membranen som bærer peptidene probe-undersøkes deretter med det antistoff som det søker epitop-bindingsinformasjon om, for eksempel i en konsentrasjon på 2 μ g/mL, i 2 timer ved romtemperatur. Binding av

10 antistoff til membranbundne peptider kan påvises ved å benytte et andre HRP-konjugert geit-antihumant (eller mus, om det passer) antistoff, etterfulgt av ECL (enhanced chemiluminescence). De peptidflekker som tilsvarer de bestemte aminosyrerestene eller sekvensene av det modne IL-1 β -protein, og som skårer positivt for antistoffbinding, indikerer epitopen bundet av det bestemte antistoff.

15 Alternativt eller i tillegg kan det foretas antistoff-konkurransetest, og slike tester er velkjent på området. For å bestemme om et antistoff eller fragment binder til en epitop som inngår i en peptidsekvens som omfatter aminosyrene ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEKV.ID.NR:1), som tilsvarer restene 83-105 av det

20 modne IL-1 β -protein, kan et antistoff av ukjent spesifisitet, for eksempel sammenlignes med hvilket som helst av de eksempler på antistoffer som (f.eks. AB7) av foreliggende oppfinnelse som er kjent for å binde en epitop som denne sekvens inneholder. Bindingskonkurransetest kan foretas for eksempel ved å benytte et

25 Biacore[®] instrument for kinetisk analyse av bindingsinteraksjoner eller ved ELISA. I en slik test evalueres antistoffet av ukjent epitopspesifisitet med henblikk på dets evne til å konkurrere om binding mot det kjente komparator-antistoff (f.eks. AB7).

Konkurransen om binding til en bestemt epitop bestemmes gjennom en reduksjon i binding til IL-1 β -epitopen på minst cirka 50%, eller minst cirka 70%, eller minst cirka 80% eller minst cirka 90% eller minst cirka 95%, eller minst cirka 99% eller cirka

30 100% for det kjente komparator-antistoff (f.eks. AB7) og indikerer binding til tilnærmet den samme epitop.

Siden identifiseringen i henhold til denne beskrivelse av IL-1 β -bindende regioner i eksempler på antistoffer og/eller epitoper gjenkjent av de beskrevne antistoffer, kan

35 det tenkes at ytterligere antistoffer med lignende bindingskarakteristika og terapeutisk eller diagnostisk nytte kan utvikles og således utgjøre en parallell til utførelsesformene i henhold til denne oppfinnelse.

Antigenbindende fragmenter av et antistoff inkluderer fragmenter som bibeholder evnen til spesifikt å binde til et antigen, i alminnelighet ved å beholde den antigenbindende del av antistoffet. Det er godt dokumentert at den antigenbindende funksjon av et antistoff kan utføres av fragmenter av et full-lengde antistoff. Eksempler på antigenbindende deler er (i) Fab-fragment, som er et monovalent fragment bestående av VL-, VH-, CL- og CH1-domenene; (ii) et F(ab')²-fragment, som er et bivalent fragment omfattende to Fab-fragmenter sammenkoblet med en disulfidbro i hengsel-regionen; (iii) et Fd-fragment som er VH- og CH1-domenene; (iv) et Fv-fragment som er VL- og VH-domenene av en enkeltarm av et antistoff, (v) et dAb-fragment (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), som er et VH-domene og (vi) en isolert komplementaritetsbestemmende region (CDR). Enkeltkjede antistoffer omfattes også av betegnelsen antigenbindende del av et antistoff. De IL-1β-bindende antistoffer og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også monovalente eller multivalente eller monomere eller multimere (f.eks. tetramere), CDR-avledede bindingsdomener med eller uten «scaffold» (for eksempel protein eller karbohydrat «scaffolding»).

De foreliggende IL-1β-bindende antistoffer eller fragmenter kan være del av et større immunadhesjonsmolekyl, formet ved kovalent eller ikke-kovalent assosiasjon av antistoffet eller antistoffdelen med ett eller flere andre proteiner eller peptider. Eksempler på slike immunadhesjonsmolekyler er anvendelse av streptavidin-kjerneregionen for å lage et tetramert scFv-molekyl (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) og bruk av en cysteinrest, et markørpeptid og C-terminal polyhistidin-tag for å danne bivalente og biotinylerte scFv-molekyler (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Antistoffer og fragmenter som omfatter immunadhesjonsmolekyler, kan oppnås ved å benytte standard rekombinant DNA-teknikk slik som her beskrevet. Foretrukne antigenbindende deler er komplette domener eller par av komplette domener.

De IL-1β-bindende antistoffer og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også domene-antistoff- (dAb) fragmenter (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) som består av et V_H-domene. De IL-1β-bindende antistoffer og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også diabodies, som er bivalente antistoffer hvor V_H- og V_L-domener uttrykkes på en enkel polypeptidkjede, men ved bruk av en linker som er for kort til å muliggjøre pardannelse mellom de to domenene på den samme kjede og som derfor tvinger domenene til pardannelse med komplementære

domener i en annen kjede og danne to antigenbindende seter (se f.eks. EP 404.097; WO 93/11161; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, og Poljak et al., Structure 2:1121-1123, 1994). Diabodies kan være bispesifikke eller monospesifikke.

5

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også enkeltkjede antistoff-fragmenter (scFv) som binder til IL-1 β . En scFv omfatter et antistoffs tunge kjede variable region (V_H) operativt koblet til et antistoffs lett kjede variable region (V_L) hvor den tunge kjedes variable region og den lette kjedes variable region, sammen eller hver for seg, danner et bindingssete som binder IL-1 β . En scFv kan omfatte en V_H-region ved aminoterminalen og en V_L-region ved karboksyterminalen. Alternativt kan scFv omfatte en V_L-region i den aminoterminalende og en V_H-region i den karboksyterminalende. Selv om de to domenene av Fv-fragmentet, V_L og V_H kodes av separate gener, kan de forenes ved bruk av rekombinante metoder med en syntetisk linker slik at de kan danne en enkel protein-

10

15

20

25

En scFv kan eventuelt ytterligere omfatte en polypeptidlinker mellom den tunge kjedes variable region og den lette kjedes variable region. Slike polypeptidlinkere består i alminnelighet av mellom 1 og 50 aminosyrer, alternativt mellom 3 og 12 aminosyrer, alternativt 2 aminosyrer. Et eksempel på et linkerpeptid for å sammenkoble tunge og lette kjeder i en scFv omfatter 5-aminosyresekvensen Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEKV.ID.NR:2). Andre eksempler omfatter én eller flere tandemrepetisjoner av denne sekvens (for eksempel et polypeptid som omfatter to til fire repetisjoner av Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEKV.ID.NR:2) for å danne linkere.

30

35

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også omfatte tung kjede antistoffer (HCAb). Unntak fra H₂L₂-strukturen av konvensjonelle antistoffer forekommer i enkelte isotyper av de immunglobuliner som finnes i kamelider (kameler, dromedarer og lamaer; Hamers-Casterman et al., 1993 Nature 363:446; Nguyen et al., 1998, J. Mol. Biol. 275:413), wobbegong-haier (Nuttall et al., Mol. Immunol. 38:313-26, 2001), ammehaier (Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995; Roux et al., 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:11804) og i den flekkede havmus (Nguyen et al., «Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation» 2002 Immunogenetics 54(1):39-47). Disse antistoffene kan

åpenbart danne antigenbindende regioner ved å benytte kun tunge kjeder fra den variable region ved at disse funksjonelle antistoffene er dimerer av kun tunge kjeder (referert til som «tung kjede antistoffer» eller «HCAbs»). Enkelte utførelsesformer av foreliggende IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter kan følgelig være tung kjede antistoffer som spesifikt binder til IL-1 β . For eksempel produseres tung kjede antistoffer som er en klasse av IgG og mangler lette kjeder, av dyr av genus *Camelidae* som inkluderer kameler, dromedarer og lamaer (Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)). HCAbs har en molekylvekt på cirka 95 kDa i stedet for cirka 160 kDa molekylvekt til konvensjonelle IgG-antistoffer. Deres bindingsdomener består kun av de variable domener på den tunge kjede, ofte omtalt som V_{HH} for å skjelne dem fra konvensjonell V_H. Muyldermans et al., J. Mol. Recognit. 12:131-140 (1999). Det variable domene av tung kjede antistoffer omtales iblant som et «nanobody» (Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004). Et nanobody-bibliotek kan utvikles fra en immunisert dromedar som beskrevet i Conrath et al., (Antimicrob Agents Chemother 45:2807-12, 2001) eller ved å benytte rekombinant teknikk.

Siden det første konstante domene (C_{H1}) mangler (spleiset ut under mRNA-prosessering som følge av tap av et speise-konsensussignal) er det variable domenet (V_{HH}) umiddelbart etterfulgt av hengselregionen, C_{H2}- og C_{H3}-domenene (Nguyen et al., Mol. Immunol. 36:515-524 (1999); Woolven et al., Immunogenetics 50:98-101 (1999)). Kamelid-V_{HH} rekombineres angivelig med IgG2 og IgG3 konstante regioner som inneholder hengsel-, CH2- og CH3-domener og mangler et CH1-domene (Hamers-Castermann et al., supra). For eksempel er lama-IgG1 en konvensjonell (H₂L₂) antistoff-isotype, hvor V_H rekombineres med en konstant region som inneholder hengsel-, CH1-, CH2- og CH3-domener, mens lama-IgG2 og IgG3 er isotyper med kun tung kjede og som mangler CH1-domener og som ikke inneholder lette kjeder.

Selv om disse HCAb mangler lette kjeder, har de et antigenbindende repertoar. Den genetiske genereringsmekanisme for HCAb er omtalt i oversikt av Nguyen et al. Adv. Immunol 79:261-296 (2001) og Nguyen et al., Immunogenetics 54:39-47 (2002). Haier inklusivt ammehai, oppviser lignende antigen-reseptorholdige enkle monomere V-domener. Irving et al., J. Immunol. Methods 248:31-45 (2001); Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11804 (1998).

V_{HH} omfatter små intakte antigenbindende fragmenter (for eksempel fragmenter som er cirka 15 kDa, 118-136 rester). Kamelid-V_{HH}-domenet har vist seg å binde til antigen med høy affinitet (Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001), med V_{HH}-

affiniteter typisk i det nanomolare området og sammenligbar med de for Fab- og scFv-fragmenter. V_{HH} er godt løselige og mer stabile enn de tilsvarende derivater av scFv- og Fab-fragmenter. V_H -fragmenter har vært relativt vanskelige å produsere i løselig form, men forbedring i løselighet og spesifikk binding kan oppnås når framework-
 5 rester endres til å være mer V_{HH} -lignende. (Se for eksempel Reichmann et al., J. Immunol. Methods 1999, 231:25-38). V_{HH} bærer aminosyresubstitusjoner som gjør disse mer hydrofile og forhindrer mer langvarig interaksjon med BiP (immunglobulin tung kjede bindingsprotein), som normalt binder seg til H-kjeden i det endo-
 10 plasmatiske retikulum (ER) under folding og sammensetning, inntil det fortrenses av L-kjeden. På grunn av den økte hydrofilitet av disse V_{HH} forbedres sekresjon fra ER.

Funksjonelle V_{HH} kan oppnås ved proteolytisk spaltning av HCAb av et immunisert kamelid ved direkte kloning av V_{HH} -gener fra B-celler av et immunisert kamelid, hvilket resulterer i rekombinant V_{HH} fra naive eller syntetiske bibliotek. V_{HH} med ønsket
 15 antigenspesifisitet kan også oppnås gjennom fag-displaymetodikk. Bruk av V_{HH} i fag-display er betydelig enklere og mer effektivt enn Fab eller scFv siden bare ett domene trenger å klones og uttrykkes for å oppnå et funksjonelt antigenbindende fragment. Muyldermans, Biotechnol. 74:277-302 (2001); Ghahroudi et al., FEBS Lett. 414:521-526 (1997); og van der Linden et al., J. Biotechnol. 80:261-270 (2000). Fremgangsmåter for utvikling av antistoffer som har kamelid tunge kjeder, er også beskrevet i
 20 U.S. patentpublikasjon 20050136049 og 20050037421.

Ribosom-displaymetoder kan benyttes for å identifisere og isolere scFv- og/eller V_{HH} -molekyler som har den ønskelige bindingsaktivitet og affinitet. Irving et al., J.
 25 Immunol. Methods 248:31-45 (2001). Ribosom-display og seleksjon har evne til å generere og oppvise store biblioteker (10^{14}).

Andre utførelsesformer gir V_{HH} -lignende molekyler generert gjennom kamelisasjonsprosessen ved å modifisere ikke-*Camelidae* V_H , så som humane V_{HH} , for å forbedre
 30 deres løselighet og forhindre uspesifikk binding. Dette oppnås ved å erstatte rester på V_L siden av V_H med V_{HH} -lignende rester, hvorved de mer løselige V_{HH} -fragmentene etterlignes. Kameliserte V_H -fragmenter, særlig de som er basert på det humane framework, forventes å oppvise en sterkt redusert immunrespons ved administrering in vivo til en pasient, og forventes følgelig å ha klare fordeler for terapeutisk
 35 anvendelse. Davies et al., FEBS Lett. 339:285-290 (1994); Davies et al., Protein Eng. 9:531-537 (1996); Tanha et al., J. Biol. Chem. 276:24774-24780 (2001) og Reichmann et al., Immunol. Methods 231:25-38(1999).

Et stort utvalg av ekspresjonssystemer er tilgjengelig for produksjonen av IL-1 β -fragmenter, inklusivt Fab-fragmenter scFv og V_{HH}. For eksempel kan ekspresjonssystemet av både prokaryot og eukaryot opprinnelse benyttes for storskalaproduksjon av antistoff-fragmenter og antistoff-fusjonsproteiner. Særlig fordelaktig er ekspresjonssystemer som muliggjør sekresjonen av store mengder antistoff-fragmenter til kulturmediet.

Produksjon av bispesifikk Fab-scFv («bibody») og trispesifikk Fab-(scFv)(2)(«tribody») er beskrevet i Schoonjans et al. (J. Immunol. 165:7050-57, 2000) og Willems et al. (J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). For bibodies eller tribodies fusjoneres et scFv-molekyl til én eller begge av VL-CL(L) og VH-CH₁(Fd) kjedene, slik at f.eks. for å fremstille et tribody fusjoneres to scFv til C-terminalen av Fab mens i et bibody fusjoneres ett scFv til C-terminalen av Fab. Et «minibody» bestående av scFv fusjonert til CH3 via en peptidlinker (hengselfri) eller via et IgG-hengsel har vært beskrevet i Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4):315-23.

Intrabodies er enkeltkjedede antistoffer som oppviser intracellulær ekspresjon og kan manipulere intracellulær proteinfunksjon (Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:17616-21, 2004). Intrabodies som omfatter celledesignsekvenser som bibeholder antistoff-konstruksjonen i intracellulære regioner kan fremstilles som beskrevet i Mhashilkar et al. (EMBO J. 14:1542-51, 1995) og Wheeler et al. (FASEB J, 17:1733-5, 2003). Transbodies er celle-permeable antistoffer hvor et protein-transduksjonsdomene (PTD) er fusjonert med enkeltkjedede variabelt fragment- (scFv) antistoffer (Heng et al., Med. Hypotheses 64:1105-8, 2005).

IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også antistoffer som er SMIP eller bindingsdomene-immunglobulin-fusjonsproteiner spesifikke for målprotein. Disse konstruksjoner er enkeltkjedede polypeptider som omfatter antigenbindende domener fusjonert til immunglobulindomener nødvendige for å utføre antistoff-effektorfunksjoner. Se f.eks. WO 03/041600, U.S. patentpublikasjon 20030133939 og US patentpublikasjon 20030118592.

IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også immuno-adhesiner. Ett eller flere CDR kan inkorporeres i et molekyl enten kovalent

eller ikke-kovalent for å danne et immuno-adhesin. Et immuno-adhesin kan inkorporere CDR som del av en større peptidkjede, kan kovalent koble en eller flere CDR til en annen polypeptidkjede eller inkorporere en eller flere CDR ikke-kovalent. De CDR som her er angitt tillater immuno-adhesinet spesifikt å binde til IL-1 β .

5

De IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også antistoff-mimetika som består av én eller flere IL-1 β -bindende deler bygget på et organisk eller molekylært skjelett (så som et protein- eller karbohydratskjelett).

10

Proteiner som har relativt definerte tredimensjonale strukturer, vanligvis omtalt som proteinskjeletter, kan benyttes som reagenser for design av antistoff-mimetika. Disse skjelettene inneholder typisk én eller flere regioner som er mottagelige for spesifikk eller tilfeldig sekvensvariasjon, og slik sekvensrandomisering foretas ofte for å fremstille bibliotek av proteiner som ønskede produkter kan velges fra. For eksempel kan et antistoff-mimetikum omfatte et kimært ikke-immunglobulin-bindende polypeptid som har et immunglobulin-lignende domene som inneholder skjelett som har to eller flere løsningsmiddel-eksponerte sløyfer inneholdende en forskjellig CDR fra et parentalt antistoff innsatt i hver av sløyfene og som oppviser selektiv bindingsaktivitet overfor en ligand bundet av det parentale antistoff. Ikke-immunglobulin protein-skjeletter har vært foreslått for å oppnå proteiner med nye bindingsegenskaper.

20

(Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994; McConnell and Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995). Andre proteiner har vært testet som framework og har vært benyttet for å oppvise randomiserte rester på alfa-heliksoverflater (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995), sløyfer mellom alfa-helikser i alfa-heliks bunter (Ku & Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6552, 1995), og sløyfer i spenn med disulfidbroer, så som de for de små proteaseinhibitorene (Markland et al., Biochemistry 35:8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164:243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270:12250, 1995).

25

Fremgangsmåter for å benytte skjeletter for antistoff-mimetika er omtalt i US patent 5.770.380 og US patentpublikasjon 2004/0171116, 2004/0266993 og 2005/0038229.

30

Foretrukne IL-1 β -antistoffer eller antistoff-fragmenter for bruk i henhold til oppfinnelsen bindes i alminnelighet til humant IL-1 β med høy affinitet (f.eks. som bestemt ved BIACORE og/eller Kinexa), som for eksempel med en bindings-dissosiasjonskonstant (K_D) ved likevekt for IL-1 β cirka 10nM eller mindre, cirka 5nM eller mindre, cirka 1nM eller mindre, cirka 500pM eller mindre, eller mer foretrukket cirka 250pM eller mindre, cirka 100pM eller mindre, cirka 50pM eller mindre, cirka 25pM eller mindre, cirka 10pM eller mindre, cirka 5pM eller mindre, cirka 3pM eller mindre, cirka

35

1pM eller mindre, cirka 0,75pM eller mindre, cirka 0,5pM eller mindre eller cirka 0,3pM eller mindre.

Antistoffer eller fragmenter ifølge foreliggende oppfinnelse kan for eksempel binde til
 5 IL-1 β med en IC₅₀ på cirka 10nM eller mindre, cirka 5nM eller mindre, cirka 2nM eller mindre, cirka 1nM eller mindre, cirka 0,75nM eller mindre, cirka 0,5nM eller mindre, cirka 0,4nM eller mindre, cirka 0,3nM eller mindre eller endog cirka 0,2nM eller mindre, bestemt ved ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Fortrinnsvis kryssreagerer ikke antistoffet eller antistoff-fragmentet ifølge foreliggende oppfinnelse
 10 med noe annet mål enn IL-1. For eksempel kan de foreliggende antistoffer og fragmenter binde til IL-1 β , men ikke binde påvisbart til IL-1 α eller ha minst cirka 100 ganger (f.eks. minst cirka 150 ganger, minst cirka 200 ganger eller endog minst 250 ganger) større selektivitet i deres binding av IL-1 β i forhold til deres binding av IL-1 α . Antistoffer eller fragmenter benyttet i henhold til oppfinnelsen kan, i enkelte
 15 utførelsesformer, inhibere IL-1 β induisert ekspresjon av serum-IL-6 i et dyr med minst 50% (f.eks. minst 60%, minst 70% eller endog minst 80%) sammenlignet med nivået av serum-IL-6 i et IL-1 β -stimulert dyr som ikke er blitt administrert et antistoff eller fragment ifølge oppfinnelsen. Antistoffer kan binde IL-1 β , men tillate eller i det vesentlige tillate, bindingen av den bundne IL-1 β -ligand til IL-1-reseptortype I (IL-
 20 1RI). I motsetning til mange kjente IL-1 β -bindende antistoffer som blokkerer eller vesentlig interfererer med binding av IL-1 β til IL-1RI binder antistoffene betegnet AB5 og AB7 (U.S. søknad nummer 11/472813, WO 2007/002261) selektivt til IL-1 β -liganden, men tillater bindingen av den bundne IL-1 β -ligand til IL-1RI. For eksempel binder antistoffet betegnet AB7, til en IL-1 β -epitop, men tillater fremdeles det bundne
 25 IL-1 β til å binde til IL-1RI. I enkelte utførelsesformer kan antistoffet minske affiniteten av interaksjon av bundet IL-1 β til binding til IL-1RI. Oppfinnelsen tilveiebringer følgelig, etter et relatert aspekt, bruk av et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende antistoff-fragment som har minst én av de ovennevnte egenskaper. Hvilken som helst av de ovennevnte antistoffer, antistoff-fragmenter eller polypeptider ifølge
 30 oppfinnelsen kan være humaniserte eller humane manipulerter som her beskrevet.

En rekke IL-1- (f.eks. IL-1 β) antistoffer og fragmenter som er kjent på området, kan benyttes i henhold til de fremgangsmåter som her er angitt, inklusivt for eksempel antistoffer beskrevet i, eller oppnådd ved, bruk av metoder beskrevet i de følgende
 35 patenter og patentsøknader: US 4.935.343; US 2003/0026806; US 2003/0124617; WO 2006/081139; WO 03/034984; WO 95/01997; WO 02/16436; WO 03/010282; WO 03/073982; WO 2004/072116; WO 2004/067568; EP 0 267 611 B1; EP 0 364 778

B1 og US søknad nummer 11/472813. Som et ikke-begrensende eksempel kan anti-stoffene AB5 og AB7 (US søknad nummer 11/472813; WO 2007/002261) benyttes i henhold til oppfinnelsen. Variabel-regionsekvenser av AB5 og AB7 er som følger:

5 AB5

LETT KJEDE

DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCLQ GKMLPWTFGGGKLEIK (SEKV.ID.NR:3).

De understrekede sekvensene viser (fra venstre mot høyre) CDR1, 2 og 3.

10

TUNG KJEDE

QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPS
LKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSS
(SEKV.ID.NR:4).

15

De understrekede sekvensene viser (fra venstre mot høyre) CDR1, 2 og 3.

AB7

LETT KJEDE

DIQMTQSTSSLSASVGDRVITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHS
GVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQ GKMLPWTFGQGTKLEIK (SEKV.ID.NR:5)

20

De understrekede sekvensene viser (fra venstre mot høyre) CDR1, 2 og 3.

TUNG KJEDE

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNP
25 SLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSS
(SEKV.ID.NR:6)

25

De understrekede sekvenser viser (fra venstre mot høyre) CDR1, 2 og 3.

30

De her beskrevne antistoffer og antistoff-fragmenter kan fremstilles etter enhver passende metode. Egnede metoder for fremstilling av slike antistoffer og antistoff-fragmenter er kjent på området. Andre fremgangsmåter for fremstilling av anti-stoffene og antistoff-fragmentene som her er beskrevet, er del av oppfinnelsen. Antistoff, antistoff-fragment eller polypeptid ifølge oppfinnelsen, som her beskrevet, kan isoleres eller renses til en hvilken som helst grad. I denne sammenheng er en isolert forbindelse en forbindelse som er tatt ut fra dens naturlige omgivelser. En renseset forbindelse er en forbindelse som har høyere renhet, slik at forbindelsen foreligger i en form som er renere enn den den eksisterer (i) i dens naturlige omgivelser

35

eller (ii) når den initialt syntetiseres og/eller amplifiseres under laboratoriebetingelser, hvor «renhet» er en relativ betegnelse og ikke nødvendigvis betyr «absolutt renhet».

Farmasøytiske blandinger

5 IL-1- (f.eks. IL-1 β) bindende antistoffer og antistoff-fragmenter for bruk i henhold til foreliggende oppfinnelse, kan formuleres i blandinger, spesielt farmasøytiske blandinger, for bruk etter her angitte metoder. Slike blandinger inneholder en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et IL-1 β -bindende antistoff eller antistoff-fragment ifølge oppfinnelsen i blanding med en egnet bærer, f.eks. et
10 farmasøytisk akseptabelt middel. Typisk er IL-1 β -bindende antistoffer og antistoff-fragmenter ifølge oppfinnelsen tilstrekkelig rensset for administrering til et dyr før formulering i en farmasøytisk blanding.

Farmasøytisk akseptable midler innbefatter bærere, hjelpestoffer, fortynningsmidler,
15 antioksydanter, konserveringsmidler, fargestoffer, aromastoffer og fortynningsmidler, emulgeringsmidler, suspenderingsmidler, løsningsmidler, fyllstoffer, volumøkende midler, buffere, konstituenten, tonisiterende midler, med-løsningsmidler, fuktemidler, komplekseringsmidler, buffermidler, antimikrobielle midler og surfaktanter.

20

Nøytralt bufret saltvann eller salt blandet med albumin er eksempler på passende bærere. De farmasøytiske blandinger kan innbefatte antioksydanter, så som askorbinsyre; lavmolekylære polypeptider; proteiner så som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner; hydrofile polymerer så som polyvinylpyrrolidon; aminosyrer
25 som f.eks. glycin, glutamin, asparagin, arginin eller lysin; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater, inklusivt glukose, mannose eller dekstriner; kelateringsmidler som EDTA; sukkeralkoholer, mannitol eller sorbitol; saltdannende midler som natrium; og/eller ikke-ioniske surfaktanter som Tween, pluronics eller polyetylglykol (PEG). Fremdeles som eksempel, innbefatter egnede tonisiterende midler alkalimetallhalogenider (fortrinnsvis natrium- eller kaliumklorid),
30 mannitol, sorbitol og lignende. Egnede konserveringsmidler er benzalkoniumklorid, timerosal, fenetylalkohol, metylparaben, propylparaben, klorheksidin, sorbinsyre og lignende. Hydrogenperoksyd kan også benyttes som konserveringsmiddel. Egnede med-løsningsmidler er glycerol, propylenglykol og PEG. Egnede komplekseringsmidler er koffein, polyvinylpyrrolidon, beta-cyklodekstrin eller hydroksypropyl-beta-cyklodekstrin. Egnede surfaktanter eller fuktemidler er sorbitanestere, polysorbater så
35 som polysorbat 80, trometamin, lecitin, kolesterol, tyloksapal og lignende. Bufferne

kan være konvensjonelle buffere som acetat, borat, citrat, fosfat, bikarbonat eller Tris-HCL. Acetatbuffere kan ha cirka pH4-5,5 og Tris-buffere kan ha ca.pH7-8,5. Ytterligere farmasøytiske midler er angitt i Remington´s Pharmaceutical Sciences, 18. utg. A. R. Gennaro, red. Mack Publishing Company, 1990.

5

Blandingen kan være i flytende form eller i en lyofilisert eller frysetørket form og kan inkludere en eller flere lyoprotektanter, hjelpestoffer, surfaktanter, høymolekylære strukturelle additiver og/eller volumøkende midler (se for eksempel US patent 6.685.940; 6.566.329 og 6.372.716). I én utførelsesform inkluderes en lyoprotektant, som er et ikke-reduserende sukker, så som sukrose, laktose eller trehalose. Mengden lyoprotektant er i alminnelighet slik at den resulterende formulering etter rekonstituering vil være isoton, selv om hypertoniske eller svakt hypertoniske formuleringer også kan være egnet. Dessuten bør mengden av lyoprotektant være tilstrekkelig til å forhindre uakseptabel grad av nedbrytning og/eller aggregasjon av proteinet etter lyofilisering. Eksempler på lyoprotektant-konsentrasjoner for sukkere (f.eks. sukrose, laktose, trehalose) i den pre-lyofiliserte formulering er fra cirka 10mM til cirka 400mM. I henhold til en annen utførelsesform inkluderes en surfaktant som for eksempel ikke-ioniske surfaktanter og ioniske surfaktanter så som polysorbater (f.eks. polysorbat 20, polysorbat 80); poloxamerer (f.eks. poloxamer 188); poly(etylenglykol)-fenyletere (f.eks. triton); natriumdodekylsulfat (SDS); natrium-laurylsulfat; natrium-oktylglykosid; lauryl-, myristyl-, linoleyl- eller stearyl-sulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- eller stearyl-sarkosin; linoleyl-, myristyl- eller cetylbetain; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamido-propyl-, palmidopropyl- eller isostearamidopropylbetain (f.eks. lauroamidopropyl); myristarnidopropyl-, palmidopropyl- eller isostearamidopropyl-dimetylamin; natrium-metylcocoyl- eller dinatriummetylofeyl-taurate og MONAQUAT™ seriene (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polyetylenglykol, polypropylglykol og kopolymerer av etylen og propylenglykol (f.eks. Pluronic, PF68, etc.). Eksempler på mengder surfaktant som kan inngå i de pre-lyofiliserte formuleringene er fra cirka 0,001-0,5%.

Høymolekylære strukturelle additiver (f.eks. fyllstoffer, bindemidler) kan inkludere for eksempel akacie, albumin, alginsyre, kalsiumfosfat (dibasisk), cellulose, karboksymetylcellulose, karboksymetylcellulose-natrium, hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, mikrokrystallinsk cellulose, dekstran, dekstrin, dekstrater, sukrose, tylose, pregelatinisert stivelse, kalsiumsulfat, amylose, glycin, bentonitt, maltose, sorbitol, etylcellulose, dinatrium-hydrogenfosfat, dinatriumfosfat, dinatrium-pyrosulfitt, polyvinylalkohol, gelatin, glukose, guar gummi, flytende glukose, kompressibelt sukker, magnesiumaluminiumsilikat, maltodekstrin, poly-

35

etylenoksyd, polymetakrylater, povidon, natriumalginat, tragant, mikrokrystallinsk cellulose, stivelse og zein. Eksempel på konsentrasjoner av høymolekylære struktur-additiver er fra 0,1% til 10 vekt%. I andre utførelsesformer kan det inkluderes et volumøkende middel (f.eks. mannitol, glycin).

5

Blandingene kan være egnet for parenteral administrering. Eksempler på blandinger egnet for injeksjon eller infusjon i et dyr etter en hvilken som helst tilgjengelig administrasjonsmåte, så som intraartikulært, subkutant, intravenøst, intramuskulært, intraperitonealt, intracerebralt (intraparenkymalt), intracerebroventrikulært, intra-

10

muskulært, intraokulært, intraarterielt, intralesjonalt, intrarektalt, transdermalt, oralt og som inhalasjon. En parenteral formulering vil i alminnelighet være en steril, pyrogenfri, isotonisk vandig løsning, eventuelt inneholdende farmasøytisk akseptable konserveringsmidler.

15

Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylen glykol, vegetabiliske oljer som olivenolje og injiserbare organiske estere så som etyloleat.

Vandige bærere inkluderer vann, alkoholiske/vandige løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inklusivt saltvann og bufferholdige midler. Parenterale bærere

20

inkluderer natriumkloridløsning, Ringers dekstrose, dekstrose og natriumklorid,

laktatholdig Ringers eller fikserte oljer. Intravenøse bærere inkluderer væske- og næringssupplementer, elektrolytt-supplementer, som de basert på Ringers dekstrose og lignende. Konserveringsmidler og andre additiver kan også inngå som for eksempel antimikrobielle midler, antioksydanter, kelateringsmidler, inerte gasser og lignende.

Se generelt Remingtons Pharmaceutical Science, 16. utg. Mack. Red. 1980, som her inkorporeres ved referanse.

25

Farmasøytiske blandinger som her er beskrevet kan formuleres for kontrollert eller vedvarende avgivelse på en måte som gir en lokal konsentrering av produktet (f.eks. bolus, depoteffekt) vedvarende frigjøring og/eller økt stabilitet eller halveringstid i et

30

bestemt lokalt miljø. I enkelte utførelsesformer kan slike blandinger inkludere en betydelig større mengde antistoff eller fragment initialt, mens den effektive mengden antistoff eller fragment som faktisk frigjøres og er tilgjengelig på ethvert tidspunkt forefinnes i meget lavere mengde enn initialt. Blandingene kan inkludere

35

formuleringen av IL-1 β -bindende antistoffer, antistoff-fragmenter, nukleinsyrer eller vektorer i henhold til beskrivelsen med bestemte tilberedninger av polymere forbindelser så som polymelkesyre, polyglykolsyre, etc. så vel som en biodegraderbar matriks, injiserbare mikrokuler, mikrokapsulære partikler, mikrokapsler, bioeroderbare

kulepartikler, liposomer og implanterbare vehikler som gir den kontrollerte eller vedvarende frigjøring av virkestoffet som deretter kan avleveres som en depot-injeksjon. Teknikker for formulering av slike midler med vedvarende – eller kontrollert avgivelse, er kjent og en rekke polymerer er utviklet og benyttet for den kontrollerte frigjøring og avgivning av medikamenter. Slike polymerer er typisk bionedbrytbare og bioforlikelige. Polymere hydrogeler, inklusivt de som dannes ved kompleksing av enantiomere polymer- eller polypeptidsegmenter, og hydrogeler med temperatur eller pH-følsomme egenskaper, kan være ønskelige for å gi medikamentet depoteffekt på grunn av de milde og vandige betingelsene som er involvert i oppfangingen av bio-aktive proteinmidler (f.eks. antistoffer). Se for eksempel beskrivelsen av porøse polymere mikropartikler med kontrollert frigjøring for avgivning av de farmasøytiske blandingsene i PCT Application Publication WO 93/15722.

Egnede materialer for dette formål er polymelkesyre (se f.eks. U.S. patent 3.773.919), polymerer av poly-(α -hydroksykarboksylysyrer), så som poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133.988A), kopolymerer av L-glutaminsyre og gamma-etyl-L-glutamat (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poly-(2-hydroksyetyl-metakrylat) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) og Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), etylenvinylacetat eller poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Andre bionedbrytbare polymerer er poly(laktoner), poly(asetaler), poly(ortoestere) og poly(ortokarbonater). Blandinger med vedvarende frigjøring kan også inkludere liposomer som kan fremstilles etter én av flere metoder som er kjent på området (se f.eks. Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-92 (1985)). Selve bæreren, eller dens nedbrytningsprodukter, må være ugiftige i målvevet og må ikke forverre tilstanden ytterligere. Dette kan bestemmes ved rutinemessig screening i dyremodeller av lidelsen eller, dersom slike modeller ikke forefinnes, i normale dyr.

Mikroinnkapsling av rekombinante proteiner for vedvarende frigjøring har vært foretatt med hell med humant veksthormon (rhGH), interferon-(rhIFN-), interleukin-2 og MNrgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology* 8:755-758 (1990); Cleland, «Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems» in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, red. (Plenum Press: New York, 1995), s. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 og U.S. patent 5.654.010. Formuleringene med vedvarende frigjøring av disse proteinene ble utviklet ved bruk av polymelkesyre-koglykolsyre-polymer (PLGA) som følge av dets bioforlikelighet og

vide område av bionedbrytbare egenskaper. Nedbrytningsproduktene av PLGA, melkesyre og glykolsyre kan hurtig utskilles i menneskekroppen. Dessuten kan degraderbarheten av denne polymer være avhengig av dens molekylvekt og sammen-

5 i: M. Chasin & R. Langer (red.) Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), s. 1-41. Ytterligere eksempler på blandinger med vedvarende frigjøring er for eksempel EP 58.481A. U.S. patent 3.887.699, EP 158.277A. Kanadisk patent 1176565, U. Sidman et al., Biopolymers 22.547 [1983], R. Langer et al., Chem. Tech. 12, 98 [1982], Sinha et al., J. Control. Release 90, 261

10 [2003], Zhu, et al., Nat. Biotechnol. 18, 24 [2000] og Dai et al., Colloids surf B Biointerfaces 41, 117 [2005].

Bioadhesive polymerer kan også tenkes anvendt i eller med blandinger ifølge fore-

15 liggende oppfinnelse. Bioadhesiver er syntetiske og naturlig forekommende materialer som kan adherere til biologiske substrater over lenger tidsrom. For eksempel er Carbopol og Polycarbofil begge syntetiske krysskoblede derivater av poly(akrylsyre). Bioadhesive avleveringssystemer basert på naturlig forekommende substanser er for eksempel hyaluronsyre, også kjent som hyaluronan. Hyaluronsyre er et naturlig forekommende mukopolysakkarid bestående av rester av D-glukuronsyre og N-acetyl-

20 D-glukosamin. Hyaluronsyre finnes i den ekstracellulære vevsmatriks i hvirveldyr, inklusivt i bindevev så vel som i synovialvæske og i øyets glasslegeme og vandige væske. Forestrede derivater av hyaluronsyre har vært benyttet til fremstilling av mikrokuler for bruk til avlevering som er biokompatible og bionedbrytbare (se for eksempel Cortivo et al., Biomaterials (1991) 12:727-730; European Publication No. 517.565; International Publication No. WO 96/29998; Illum et al., J. Controlled Rel. (1994) 29:133-141). Eksempler på hyaluronsyre-holdige blandinger ifølge fore-

25 liggende oppfinnelse er en hyaluronsyre-esterpolymer i en mengde på tilnærmet 0,1% til cirka 40% (vekt/vekt) av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment til hyaluronsyrepolymer.

30 Både bionedbrytbare og ikke-bionedbrytbare polymermatriser kan benyttes for å avgi blandinger i henhold til oppfinnelsen, og slike polymermatriser kan omfatte naturlige eller syntetiske polymerer. Bionedbrytbare matriser er å foretrekke. Det tidsrom som frigjøring skjer over, er basert på valget av polymer. Mest ønskelig er frigjøring over

35 et tidsrom varierende fra mellom noen få timer og tre til tolv måneder. Eksempler på syntetiske polymerer som kan benyttes for å danne det bionedbrytbare avleverings-system er: polymerer av melkesyre og glykolsyre, polyamider, polykarbonater, poly-

alkylen, polyalkylenglykoler, polyalkylenoksyder, polyalkylen-tereftalater, polyvinyl-alkoholer, polyvinyletere, polyvinylestere, polyvinylhalogenider, polyvinylpyrrolidon, polyglykolider, polysiloksaner, polyanhydrid, polyuretaner og kopolymerer derav, poly(smørsyre), poly(valeriansyre), alkylcellulose, hydroksysalkylcelluloser, celluloseetere, celluloseestere, nitrocelluloser, polymerer av akryl- og metakrylestere, metylcellulose, etylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropyl-metylcellulose, hydroksybutyl-metylcellulose, celluloseacetat, cellulosepropionat, celluloseacetat-butyrat, celluloseacetat-ftalat, karboksyletylcellulose, celluloseetriacetat, cellulose-sulfat-natriumsalt, poly(metylmetakrylat), poly(etylmetakrylat), poly(butylmetakrylat), poly(isobutylmetakrylat), poly(heksylmetakrylat), poly(isodekylmetakrylat), poly(laurylmetakrylat), poly(fenylmetakrylat), poly(metylakrylat), poly(isopropylakrylat), poly(isobutylakrylat), poly(oktadekylakrylat), polyetylen, polypropylen, poly(etylen-glykol), poly(etylenoksyd), poly(etylentereftalat), poly(vinylalkoholer), polyvinylacetat, polyvinylklorid, polystyren og polyvinylpyrrolidon. Eksempler på naturlige polymerer er alginat og andre polysakkarider, inklusivt dekstran og cellulose, kollagen, kjemiske derivater derav (substitusjoner, addisjoner av kjemiske grupper, for eksempel, alkyl, alkyl, hydroksyleringer, oksydasjoner og andre modifikasjoner som rutinemessig foretas av fagmannen), albumin og andre hydrofile proteiner, zein og andre prolaminer og hydrofobe proteiner, kopolymerer og blandinger derav. Generelt ned- brytes disse materialene enten ved enzymatisk hydrolyse eller eksponering for vann in vivo, ved overflate eller bulk-erosjon. Polymeren er eventuelt i form av en hydrogel (se for eksempel WO 04/009664; WO 05/087201; Sawhney et al., *Macromolecules* 1993, 26, 581-587), som kan absorbere opptil 90% av deres vekt av vann, og dessuten eventuelt er krysskoblet med multivalente ioner eller andre polymerer.

Avleveringssystemer inkluderer også ikke-polymere systemer som er lipider, herunder steroler så som kolesterol, kolesterolestere og fettsyrer eller nøytralfett, så som mono- di- og triglycerider; hydrogel-friggjoringssystemer; silastinsystemer; peptidbaserte systemer; voksbelegg; pressede tabletter som gjør bruk av konvensjonelle bindemidler og hjelpestoffer; «partially fused» implantater og lignende. Spesifikke eksempler innbefatter, men er ikke begrenset til: (a) eroderbare systemer hvor produktet inngår i en form i en matriks, så som de beskrevet i U.S. patent 4.452.775; 4.675.189 og 5.736.152 og (b) diffusjonssystemer hvor et produkt permeerer med kontrollert hastighet fra en polymer, som f.eks. beskrevet i U.S. patent 3.854.480; 5.133.974 og 5.407.686. Liposomer som inneholder produktet kan fremstilles etter kjente fremgangsmåter, som for eksempel (DE 3.218.121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Japansk patentsøknad 83-118008; U.S. patent 4.485.045 og 4.544.545 og EP 102.324).

5 En farmasøytisk blanding som omfatter et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment kan formuleres for inhalasjon, som for eksempel som et tørt pulver. Inhalasjonsløsninger kan også formuleres i et flytende drivmiddel for aerosol avgivelse. I ytterligere en annen formulering kan løsningene nebuliseres. Ytterligere farmasøytiske blandinger for pulmonal administrering inkluderer de som er beskrevet for eksempel i PCT

10 Application Publication WO 94/20069, som beskriver pulmonal avlevering av kjemisk modifiserte proteiner. For pulmonal avlevering må partikkelstørrelsen være egnet for avlevering til den distale lunge. For eksempel kan partikkelstørrelsen være fra 1 μ m til 5 μ m, men større partikler kan imidlertid benyttes, for eksempel dersom hver partikkel er ganske porøs.

15 Enkelte formuleringer som inneholder IL-1 β -bindende antistoffer eller antistoff-fragmenter kan administreres oralt. Formuleringer administrert på denne måte kan formuleres med eller uten de bærerne som vanligvis benyttes ved sammensetningen av faste doseringsformer som tabletter og kapsler. For eksempel kan en kapsel være

20 utformet slik at den frigir formuleringsvirkestoff på det punkt i gastrointestinaltrakten hvor biotilgjengeligheten er maksimalisert og presystemisk nedbrytning er minimalisert. Ytterligere midler kan inkluderes for å lette absorpsjon av et selektivt bindemiddel. Fortynningsmidler, aromastoffer, lavtsmeltende voks, vegetabiliske oljer, smøremidler, suspenderingsmidler, tablettsprenningsmidler og bindemidler kan også

25 benyttes.

En annen tilberedning kan involvere en effektiv mengde av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment i blanding med ugiftige hjelpestoffer som er egnet for fremstillingen av tabletter. Ved å løse tablettene i sterilt vann, eller annen passende bærer, kan

30 løsninger fremstilles i enhetsdoseform. Egnede hjelpestoffer omfatter, men er ikke begrenset til, inerte fortynningsmidler så som kalsiumkarbonat, natriumkarbonat eller -bikarbonat, laktose eller kalsiumfosfat; eller bindemidler som stivelse, gelatin eller akasie; eller glidemidler så som magnesiumstearat, stearinsyre eller talk.

35 Egnede og/eller foretrukne farmasøytiske formuleringer kan bestemmes ut fra foreliggende beskrivelse og generell kunnskap om formuleringsteknologi, avhengig av den tiltenkte administrasjonsmåte, avleveringsformat og ønsket dosering. Uavhengig av

administrasjonsmåten kan en effektiv dose beregnes ut fra pasientens kroppsvekt, kroppsoverflate eller organstørrelse. Ytterligere forbedring av beregningene for bestemmelse av den passende dose for behandling som involverer hver av de formuleringer som her er beskrevet, gjøres rutinemessig på området og ligger
5 innenfor det oppgavefelt som rutinemessig foretas på området. Passende doseringer kan sikres gjennom anvendelse av passende dose-responsdata.

Ytterligere formuleringer vil være åpenbare i lys av foreliggende beskrivelse, inklusivt formuleringer som involverer IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter i kombinasjon
10 med ett eller flere andre terapeutiske midler. I enkelte formuleringer for eksempel formuleres et IL-1 β -bindende antistoff, antistoff-fragment, nukleinsyre eller vektor ifølge oppfinnelsen, med en andre inhibitor av en IL-1 β -signalvei. Representative andre inhibitorer innbefatter, men er ikke begrenset til, antistoffer, antistoff-fragmenter, peptider, polypeptider, forbindelser, nukleinsyrer, vektorer og farma-
15 søytiske blandinger, som for eksempel de beskrevet i US 6899878; US 2003022869; US 20060094663; US 20050186615; US 20030166069; WO/04022718; WO/05084696; WO/05019259. For eksempel kan en blanding omfatte et IL-1 β -bindende antistoff, antistoff-fragment, nukleinsyre eller vektor ifølge beskrivelsen i kombinasjon med et annet IL-1 β -bindende antistoff, fragment eller en nukleinsyre
20 eller vektor som koder for et slikt antistoff eller fragment.

De farmasøytiske blandinger kan omfatte IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter i kombinasjon med andre virkestoffer. Slike kombinasjoner er de som er egnet for deres tiltenkte formål. De kombinasjoner som utgjør del av denne oppfinnelse kan
25 være IL-1 β -antistoffer og fragmenter som for eksempel de som her er beskrevet, og minst ett ytterligere middel. Eksempler på virkestoffer som kan benyttes i kombinasjonen angitt nedenfor er illustrerende for formålet og ikke ment å være begrensende. Kombinasjonen kan også inkludere mer enn ett ytterligere middel, f.eks. to eller tre ytterligere midler dersom kombinasjonen er slik at den formede blanding
30 kan bevirke dens tiltenkte funksjon.

I henhold til oppfinnelsen kan de farmasøytiske blandinger som omfatter ett eller flere virkestoff administreres separat fra de IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter, og slike separate administreringer kan foretas til samme eller forskjellig
35 tidspunkt, som for eksempel på den samme eller på forskjellige dager. Administrering av det andre virkestoff kan være i henhold til medisinsk standardpraksis kjent på området, eller administreringen kan modifiseres (f.eks. lengre intervaller, mindre

doser, forsinket initiering) når det benyttes i sammenheng med administrasjon av IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter, slik som her beskrevet.

Virkestoffer eller kombinasjoner med foreliggende antistoffer eller fragmenter inkluderer indometacin, ikke-steroide antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) så som aspirin, ibuprofen og andre propionsyrederivater (alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen, fenbufen, fenoprofen, fluprofen, flurbiprofen, indoprofen, ketoprofen, miroprofen, naproksen, oxaprozin, piroprofen, pranoprofen, surprofen, tiaprofensyre og tioxaprofen), eddiksyrederivater (indometacin, acemetacin, 10 alclofenac, clidanac, diklofenak, fenclofenac, fenclozic acid, fentiazac, fuiofenac, ibufenak, isoxepac, oxpinac, sulindak, tiopinac, tolmetin, zidometacin og zomepirac), fenamsyrederivater (flufenamsyre, meklofenamsyre, mefenamsyre, nifluminsyre og tolfenamsyre), bifenyلكarboksyisyrederivater (diflunisal og flufenisal), oxicamer (isoxicam, piroksikam, sudoxicam og tenoxicam), salisylater (acetylsalisylsyre, 15 sulfasalazin) og pyrazolonene (apazone, bezpiperylon, feprazone, mofebutazone, oxyphenbutazone, fenylobutazon). Andre kombinasjoner inkluderer metotreksat, cyklooksygenase-2- (COX-2) inhibitorer, anti-TNF-midler (f.eks. adalimumab, etanercept, infliximab) og anti-IL-1, -15, -18 og -21-midler. Andre virkestoffer for kombinasjon er glukokortikoider eller steroider så som prednisolon, prednison, 20 metylprednisolon, betametason, deksametason eller hydrokortison. En slik kombinasjon kan være spesielt fordelaktig siden én eller flere bivirkninger av steroidet kan reduseres eller endog elimineres ved å minske den steroiddose som fordres i kombinasjon med de foreliggende antistoffer og fragmenter ved behandling av pasienter.

25 Det kan videre være aktuelt at anti-IL-1 β -antistoff eller fragment administrert til et individ i henhold til beskrivelsen, kan administreres i kombinasjon ved behandling med minst et ytterligere virkestoff, som for eksempel hvilken som helst av de ovennevnte virkestoffene. I én utførelsesform opprettholdes behandling med nevnte minst ene virkestoff. I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med 30 nevnte minst ene virkestoff (f.eks. når individet er stabilt) i løpet av IL-1 β -antistoff-behandlingen (f.eks. med IL-1 β -antistoff eller fragment) holdt på et konstant doseringsregime. I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff (f.eks. når individet er stabilt) og behandling med anti-IL- 35 1 β -antistoffet eller fragmentet er redusert (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff (f.eks. når individet er stabilt) og

behandling med det andre anti-IL-1 β -antistoff eller fragment økes (f.eks. høyere dose, hyppigere dosering, lengre behandlingsregime). I nok en annen utførelsesform opprettholdes behandling med nevnte minst ene virkestoff og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres eller seponeres (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I nok en annen utførelsesform reduseres eller seponeres behandling med nevnte minst ene virkestoff og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime).

De farmasøytiske blandinger benyttet i henhold til oppfinnelsen kan innbefatte en terapeutisk effektiv mengde eller en profylaktisk effektiv mengde av de IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter. En terapeutisk effektiv mengde refererer seg til en mengde som er effektiv i doser og i tidsrom som er nødvendige for å oppnå det ønskede terapeutiske resultat. En terapeutisk effektiv mengde av antistoffet eller antistoffdelen kan variere med slike faktorer så som sykdomstilstanden, alder, kjønn og vekt av individet og evnen antistoffet eller antistoffdelen har til å utløse en ønsket respons i individet. En terapeutisk effektiv mengde er også en mengde hvor enhver toksisk eller skadelig effekt av antistoffet eller antistoffdelen oppveies av de terapeutisk fordelaktige effekter. En profylaktisk effektiv mengde refererer seg til en mengde som er effektiv i doser og i tidsrom nødvendige for å oppnå det ønskede profylaktiske resultat.

En terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av en farmasøytisk blanding som omfatter et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment, vil for eksempel avhenge av de terapeutiske formål, så som indikasjonen som blandingen benyttes for, administrasjonsmåten og pasientens tilstand. Farmasøytiske blandinger administreres i en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde til å behandle en IL-1 β -relatert tilstand.

Bruksmåter

Anti-IL-1 β -antistoffer som her er tilveiebrakt, kan benyttes for behandling og/eller forebyggelsen av reumatoid artritt hos et individ. Slike metoder kan benyttes til å behandle et pattedyr (f.eks. menneske) som lider av reumatoid artritt eller til å forhindre forekomst av dette hos et risikoindivid. Slike metoder kan også benyttes for behandlingen og/eller forebyggelsen av (NOMID/CINCA) Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disorder), systemisk juvenil idiopatisk artritt, osteoartritt, aterosklerose,

myastenia gravis, CIAS1-assosiert periodisk syndrom (CAPS), Stills sykdom eller Muckle-Wells syndrom.

Betegnelsene «forhindring», «forhindre», «forebygging», «suppresjon»,
 5 «undertrykke», «undertrykkelse», «inhibere» og «inhibering» refererer seg i denne sammenheng til en aksjon (så som administrering av en forbindelse eller farmasøytisk blanding) initiert på en måte (f.eks. før inntreden av et klinisk symptom av en sykdomstilstand eller kondisjon) for å forhindre, undertrykke eller redusere, enten forbigående eller permanent, inntreden av en klinisk manifestasjon av sykdoms-
 10 tilstanden eller kondisjonen. Slik forebyggelse, undertrykkelse eller reduksjon behøver ikke være absolutt for å være til nytte.

Betegnelsen «behandling» og «behandle» refererer seg i denne sammenheng til en aksjon (så som administrering av en forbindelse eller farmasøytisk blanding) initiert
 15 etter inntreden av et klinisk symptom på en sykdomstilstand eller kondisjon for å eliminere, redusere, undertrykke eller lindre, enten forbigående eller permanent, en klinisk manifestasjon eller progresjon av sykdomstilstanden eller kondisjonen. Slik behandling trenger ikke være absolutt for å være til nytte.

Betegnelsen «med behov for behandling» refererer seg i denne sammenheng til en vurdering som foretas av en pleier om at en pasient trenger eller vil ha fordel av
 20 behandling. Denne vurdering gjøres på grunnlag av en rekke faktorer som ligger innenfor pleierens ekspertise, hvilket inkluderer kjennskapet til at pasienten er syk eller vil bli syk, som resultat av en tilstand som lar seg behandle ved metoden eller
 25 forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsen «med behov for forebyggelse» refererer seg i denne sammenheng til en vurdering foretatt av en pleier om at en pasient fordrer eller vil ha fordel av fore-
 byggelse. Denne vurdering gjøres på grunnlag av en rekke faktorer som ligger
 30 innenfor pleierens ekspertise, men det inkluderer kjennskapet til at pasienten vil bli syk eller kan bli syk, som resultat av en tilstand som kan forhindres etter en fremgangsmåte eller forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsen «terapeutisk effektiv mengde» refererer seg i denne sammenheng til en
 35 mengde av en forbindelse (f.eks. antistoff), enten alene eller som del av en farmasøytisk blanding, som er i stand til å ha enhver påviselig positiv effekt på et hvilket som helst symptom, aspekt eller karakteristika ved en sykdomstilstand eller

kondisjon når den administreres til en pasient (f.eks. som én eller flere doser). En slik effekt behøver ikke være absolutt for å være til nytte.

I en utførelsesform administreres anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet til et individ med reumatoid artritt, og individet mottar også minst en annen medisinsk akseptert behandling (f.eks. medisiner, medikament, terapeutikum, virkestoff) for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen. I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen (f.eks. når individet er stabilt), mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet opprettholdes på et konstant doseringsregime. I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen (f.eks. når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I en annen utførelsesform reduseres eller seponeres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen (f.eks. når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet økes (f.eks. høyere dose, mer hyppig dosering, lengre behandlingsregime). I nok en annen utførelsesform opprettholdes nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen, og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres eller seponeres (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregimer). I nok en annen utførelsesform reduseres nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet reduseres eller seponeres (f.eks. lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregimer).

I foretrukne fremgangsmåter for behandling eller forebyggelse av reumatoid artritt administreres anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet i henhold til ovennevnte antall doser, mengder per doser og/eller intervaller mellom dosering. Alternativt kan anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet administreres som én eller flere initialdoser av ovennevnte mengder som er lavere enn én eller flere påfølgende doser. Ved å gi initialdosen(e) i en lavere mengde kan effektiviteten og/eller tolererbarheten av behandlingen forbedres. I en ikke-begrensende utførelsesform av oppfinnelsen kan for eksempel én eller flere initialdoser (f.eks. 1, 2, 3, 4, 5) av en mengde antistoff eller fragment $\leq 1\text{mg/kg}$ (f.eks. $\leq 0,9\text{ mg/kg}$, $\leq 0,8\text{ mg/kg}$, $\leq 0,7\text{mg/kg}$, $\leq 0,6\text{ mg/kg}$, $\leq 0,5\text{ mg/kg}$, $\leq 0,4\text{ mg/kg}$, $\leq 0,3\text{ mg/kg}$, $\leq 0,2\text{ mg/kg}$).

$\leq 0,1\text{mg/kg}$, $\leq 0,05\text{ mg/kg}$, $\leq 0,03\text{ mg/kg}$, $\leq 0,01\text{mg/kg}$) administreres etterfulgt av én eller flere påfølgende doser i en mengde større enn initialdosen(e) (f.eks. $\geq 0,01\text{mg/kg}$, $\geq 0,03\text{ mg/kg}$, $\geq 0,1\text{mg/kg}$, $\geq 0,3\text{mg/kg}$, $\geq 0,5\text{mg/kg}$, $\geq 0,6\text{mg/kg}$, $\geq 0,7\text{mg/kg}$, $\geq 0,8\text{mg/kg}$, $\geq 0,9\text{mg/kg}$, $\geq 1,0\text{mg/kg}$, $\geq 1,5\text{mg/kg}$, $\geq 2\text{mg/kg}$, $\geq 2,5\text{mg/kg}$, $\geq 3\text{mg/kg}$, $\geq 3,5\text{mg/kg}$, $\geq 4\text{mg/kg}$, $\geq 4,5\text{mg/kg}$, $\geq 5\text{mg/kg}$). I henhold til oppfinnelsen kan hver dose antistoff eller fragment administreres på ett eller flere steder.

Metoder for behandling under forebyggelse av en sykdom eller tilstand i henhold til foreliggende oppfinnelse kan benytte en forutbestemt eller «rutine» plan for administrering av antistoffet eller fragmentet. I denne sammenheng refererer en rutineplan seg til et forutbestemt angitt tidsrom mellom doseadministreringer. Rutineplanen kan omfatte et tidsrom som er likt eller som varierer i lengde, så lenge planen er forutbestemt. En bestemt kombinasjon vil være dekket gjennom rutineplanen så lenge det på forhånd er bestemt at angjeldende plan involverer administrering på en viss dag.

I henhold til oppfinnelsen kan IL-1 β -antistoffer eller fragmenter benyttet i henhold til de metoder som her er gitt, administreres sammen med mer tradisjonelle behandlingsmetoder og farmasøytiske blandinger (f. eks. virkestoffer). Slike blandinger kan for eksempel inkludere enhver godkjent behandlingsmetode for sykdomsindikasjonen. I enkelte utførelsesformer kan antistoffene og fragmentene benyttet i henhold til oppfinnelsen, forhindre eller forsinke behovet for ytterligere behandlingsmetoder eller farmasøytiske blandinger. I andre utførelsesformer kan antistoffene eller fragmentene redusere mengden, hyppigheten eller varigheten av ytterligere behandlingsmetoder eller farmasøytiske blandinger.

Alternativt kan metoder for behandling eller forebyggelse av en sykdom eller tilstand i henhold til foreliggende oppfinnelse, benytte en plan for administrering av antistoffet eller fragmentet som er basert på forekomsten av sykdomssymptomer og/eller endringer i enhver av disse vurderinger som en måte å bestemme når det skal administreres én eller flere påfølgende doser. Tilsvarende, kan denne måten benyttes som et middel til å bestemme hvorvidt den påfølgende dose bør økes eller minskes, basert på effekten av en tidligere dose.

Diagnostisering av slike sykdommer eller tilstander i pasienter, eller alternativt risikoen for utvikling av slike sykdommer eller tilstander, kan være i henhold til kjent standard medisinsk praksis. Etter administrering av at anti-IL-1 β -antistoff eller

fragment er klinisk vurdering av en behandling eller forebyggende effekt av reumatoid artritt velkjent på området og kan benyttes som middel til å overvåke effektiviteten av metoder i henhold til oppfinnelsen. For eksempel kan respons på behandling av RA vurderes på basis av en klinisk vurdering som for eksempel ACR-kjernerrespons-

5 kriteriene som et middel til å vurdere sykdomstatus. ACR-kjernerresponskriteriene innbefatter følgende komponenter: tall for ømme og hovne ledd, subjektiv smertevurdering, subjektiv global vurdering, legens globale vurdering, selvvardert funksjonshemming ved bruk av HAQ [Health Assessment Questionnaire] og akutfase-reaktant (ESR eller CRP). ACR-kjernerresponskriterie-komponentene kan analyseres både ved å

10 benytte ACR-responskriterier, (dvs. ACR20, ACR50 og ACR70) og sykdomsaktivitets-skåre (DAS)28-CRP. I én utførelsesform bestemmes behandlingseffekt ut fra en reduksjon i leddsmerte på minst 50%, minst 60%, minst 70%, minst 80%, minst 90% eller cirka 100%. I en annen utførelsesform skjer reduksjonen av leddsmerte mindre enn cirka 48 timer, mindre enn cirka 36 timer, mindre enn cirka 24 timer.

15

Ett eller flere sekundære endepunkter, som for eksempel C-reaktivt protein- (CRP)nivåer og/eller erytrocytt-sedimenteringshastighet (ECR) kan også bestemmes for å vurdere behandlingseffekten. En nedgang i CRP-nivåer på $\geq 0,2$; $\geq 0,4$; $\geq 0,6$; $\geq 0,8$; $\geq 1,0$; $\geq 1,4$; $\geq 1,8$; $\geq 2,2$; $\geq 2,6$; $\geq 3,0$ mg/L; alternativt en nedgang i CRP på

20 $> 20\%$, $> 30\%$, $> 40\%$, $> 50\%$, $> 60\%$, $> 70\%$, $> 80\%$, $> 90\%$, $> 95\%$ fra nivåer før behandling, indikerer en terapeutisk effekt. En nedgang i ESR på $> 20\%$, $> 30\%$, $> 40\%$, $> 50\%$, $> 60\%$, $> 70\%$, $> 80\%$, $> 90\%$, $> 95\%$, $> 98\%$ fra nivåene før behandling, indikerer en terapeutisk effekt.

25

EKSEMPLER

De følgende eksempler er kun ment ytterligere å illustrere praktiseringen av foreliggende oppfinnelse, men må ikke på noen måte oppfattes som begrensende for denne.

30

Eksempel 1

Inhibering av IL-1 β ved å benytte et høyaffinitets IL-1 β -antistoff i en *in vitro* cellebasert test med IL-1-indusert produksjon av IL-8 som utlesning

Den inhiberende effekt av det IL-1 β -spesifikke antistoff ble sammenlignet med en ikke-antistoffinhibitor av IL-1-veien, Kineret[®] (Anakinra), som er en rekombinant IL-1-reseptorantagonist (IL-1Ra). Ferskt, heparinisert perifert blod ble tatt fra friske

35 donorer. 180 μ L helblod ble utplatet i en 96 brønns plate og inkubert med forskjellige konsentrasjoner av antistoffet AB7 (US søknad nummer 11/472.813, WO

2007/002261) og 100pM rhIL-1 β . For Kineret[®]-behandlede prøver ble Kineret[®] og rhIL-1 β kombinert 1:1 før blanding med blod. Prøver ble inkubert i 6 timer ved 37°C med 5% CO₂. Helblodceller ble deretter lysert med 50 μ L 2,5% Triton X-100. Konsentrasjonen av interleukin-8 (IL-8) i klarnede lysater ble bestemt ved ELISA (Quantikine human IL-8 ELISA kit, R&D Systems) i henhold til produsentens instruksjoner. IL-8-konsentrasjoner i AB7- og Kineret[®]-behandlede prøver ble sammenlignet med en kontrollprøve behandlet med anti-KLH-kontroll. Resultatene er vist i Fig. 1 og sammenfattet i Tabell 6. IC₅₀ er den konsentrasjon av antistoff som fordres for å inhibere 50% av IL-8 frigitt ved IL-1 β -stimulering.

Tabell 1

	IC ₅₀ (pM)
AB7	1,9 pM
Kineret [®]	53,4 pM

Disse resultatene viser *in vitro* styrken av AB7, målt ved inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-8. Resultatene som viser større styrke enn Kineret[®] indikerer at antistoffet vil ha IL-1 β -inhiberende effekt *in vivo*.

Eksempel 2

***In vivo* inhibering av den biologiske aktivitet av human IL-1 β ved bruk av IL-1 β -spesifikke antistoffer, som målt ved innvirkningen på IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6.**

For å bekrefte *in vivo* effektiviteten av AB7 ble dets evne til å blokkere den biologiske aktivitet av human IL-1 β testet på mus. Detaljer angående testene er beskrevet i Economides et al., Nature Med., 9:47-52 (2003). I korthet ble C/57/B16 hannmus (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) intraperitonealt injisert titrerte doser av AB7, et annet IL-1 β -antistoff, AB5 eller et kontroll-antistoff. Tjuefire timer etter antistoff-injeksjon ble musene subkutan injisert rekombinant human IL-1 β (rhIL-1 β) fra (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) i en dose på 1 μ g/kg. To timer etter rhIL-1 β -injeksjon (maksimal IL-6 responstid) ble musene avlivet og blod oppsamlet og serum uttatt. Serum IL-6-nivåene ble bestemt ved ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) i henhold til produsentens protokoll. Prosentuell inhibering ble beregnet fra forholdet mellom IL-6 påvist i forsøksdyrets serum, og IL-6 påvist i kontrolldyrenes serum (multiplisert med 100).

Resultatene er angitt i Figur 2A. Evnen til å inhibere *in vivo* aktiviteten av IL-1 β ble bestemt som funksjon av IL-1 β -stimulerte IL-6-nivåer i serum. Som illustrert i Figur 2A var AB7- og AB5-antistoffene effektive til inhibering av *in vivo* aktiviteten av human IL-1 β . Disse resultatene viser også at en enkeltinjeksjon av AB7 eller AB5 kan
 5 blokkere den systemiske virkning for IL-1 β -stimulering og at slike antistoffer er anvendelige for inhiberingen av IL-1 β -aktivitet *in vivo*.

Et lignende forsøk ble foretatt for ytterligere å demonstrere den evne AB7 har til å nøytralisere mus IL-1 β *in vivo*, for å understøtte anvendelsen av dette antistoff i
 10 musemodeller av sykdom. Det ble bestemt at AB7 har en affinitet for human IL-1 β som er ~10.000 ganger større enn affiniteten for mus-IL-1 β og en *in vitro* styrke i D10.G4.1-testen som er ~1000 ganger høyere enn den for mus-IL-1 β . I C57BL/6-musemodellen med IL-6-utlesning ble musene injisert AB7 (3 eller 300 μ g) eller PBS-bærerkontroll i.p. 24 timer før en s.c. injeksjon av human (Figur 2B, rute A) eller mus-
 15 (Figur 2B, rute B) IL-1 β (20ng). Blod ble tatt 2 timer senere og serumprøver analysert med henblikk på IL-6-nivåer ved ELISA. Disse dataene viser maksimal suppresjon av IL-6-nivåer (~75%) induisert med human IL-1 β som 3 μ g (rute A), mens submaksimal suppresjon av IL-6-nivåer (~50%) induisert med mus-IL-1 β ble demonstrert ved 300 μ g (rute B). Disse resultatene stemmer overens med
 20 observasjonen av betydelig høyere affinitet og *in vitro* styrke av AB7-antistoffet for human IL-1 β , sammenlignet med mus IL-1 β . Dessuten indikerer dataene at dette antistoff kan benyttes for *in vivo* sykdomsmodeller på mus med en passende høyere dose enn hva som ville trengs for behandling av et menneske, hvor antistoffet har betydelig høyere affinitet og styrke. Når det gjelder andre IL-1 β -antistoffer, som for
 25 eksempel andre antistoffer angitt og/eller sitert her, som ikke oppviser signifikant lavere affinitet og *in vitro* styrke for mus-IL-1 β , behøver høyere dosejusteringer i musemodeller ikke være nødvendig.

Eksempel 3

30 **Farmakokinetikk for et anti-IL-1 β -antistoff**

For å undersøke den farmakokinetiske profil ble et IL-1 β -antistoff betegnet AB7, administrert til voksne hannrotter som en intravenøs (IV) bolus i halevenen i doser på 0,1, 1,0 eller 10mg/kg (grupper henholdsvis 1, 2 og 3) eller en subkutan (SC) dose mellom skulderbladene på 1,0mg/kg (gruppe 4). Blodprøver ble tatt via halsvene-
 35 kanylen eller det retro-orbitale sinus til fastsatte tider i opptil 91 dager etter dosering. Blodprøver ble sentrifugert for å oppnå serum. Prøver ble analysert med henblikk på

konsentrasjonen av anti-IL-1 β -antistoff ved bruk av en alkalisk fosfatasebasert ELISA-test, som følger:

- IL-1 β (Preprotech) ble fortynnet til 0,5 μ g/mL i PBS, og 50 μ L av denne løsningen ble
- 5 tilsatt til brønner i Nunc-Immuno Maxisorp mikrotiterplater (VWR) og inkubert over natten ved 2-8°C. Antigenløsningen ble uttatt og 200 μ L blokkeringsbuffer [1% bovint serumalbumin (BSA) i 1X PBS inneholdende 0,05% Tween 20] ble tilsatt til alle brønnene og inkubert i en time ved romtemperatur. Etter blokkering ble brønnene vasket tre ganger med vaskebuffer (1X PBS, inneholdende 0,05% Tween 20).
- 10 Standarder, prøver og kontroller ble fortynnet i prøvefortynningsmiddel (25% rotteserum i 1X PBS inneholdende 1% BSA og 0,05% Tween 20). Anti-IL-1 β -antistoff standardløsninger ble fremstilt som 2 gangers seriefortynninger fra 2000 til 0,24ng/mL. Hvert gjentak og fortynning av standarder, prøver og kontroller (50 μ L) ble overført til de blokkerte mikrotiterplatene og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter
- 15 inkubering ble brønnene vasket 3 ganger med vaskebuffer. Alkalisk fosfatase-konjugert «geit» antihumant IgG (H+L) antistoff (Southern Biotech Associates Inc, Birmingham, AL) ble fortynnet 1/1000 i konjugat-fortynningsmiddel (1% BSA i 1X PBS inneholdende 0,05% Tween 20). 50 μ L av det fortynnete konjugat ble tilsatt til samtlige brønner bortsett fra BLANK-brønnene som bare fikk 50 μ L konjugat-
- 20 fortynningsmiddel. Platene ble inkubert i 1 time ved 37°C, hvorpå alle brønnene ble vasket 3 ganger med vaskebuffer og 3 ganger med deionisert vann. Substratet p-nitrofenylfosfat (1mg/mL i 10% dietanolaminbuffer, pH 9,8) ble tilsatt til alle brønnene og fargeutviklingen fikk pågå i 1 time ved romtemperatur, hvorpå 50 μ L i 1N NaOH ble tilsatt for å stanse reaksjonen. Absorbansen ved 405nm ble bestemt ved å benytte en
- 25 SPECTRAMax M2 plateleser (Molecular Devices, Menlo Park, CA) og en standardkurve ble deretter trukket opp som A₄₀₅ versus ng/mL antistoffstandard. Det ble foretatt en regresjonsanalyse, og konsentrasjoner ble bestemt for prøver og kontroller ved interpolering fra standardkurven. Kvantifiseringsgrensen var 40ng/mL.
- 30 Som vist i Figur 3 avtok serumkonsentrasjonene bi-eksponentielt blant IV dose-gruppene. En kompartmental analyse ble foretatt på de individuelle forsøksdyrdata og resulterende farmakokinetiske parametere gjennomsnittsberegnet for hver dose-gruppe med unntak av de dyr hvor det var utløst en RAHA-respons. Serumnivåene av anti-IL-1 β -antistoff avtok med en gjennomsnittlig alfafase halveringstid på
- 35 0,189 $\pm$ 0,094 til 0,429 $\pm$ 0,043 dager (4,54 til 10,3 timer) og en betafase halveringstid på 9,68 $\pm$ 0,70 til 14,5 $\pm$ 1,7 dager. Hos rotter som fikk en 1mg/kg subkutan dose av

AB7 økte serumnivåene til et maksimum på $4,26 \pm 0,065 \mu\text{g/mL}$ etter 2-3 dager og avtok med en halveringstid på $2,59 \pm 0,25$ dager.

Farmakokinetikk ble også evaluert i cynomolgus-aper som fikk anti-IL-1 β -antistoffet som en intravenøs (IV) enkelt bolusinjeksjon. For enkeltdose 0,3 og 3mg/kg gruppene avtok serum-anti-IL-1 β -antistoffnivåene med en gjennomsnittlig alfafase halveringstid på $9,40 \pm 2,00$ timer, etterfulgt av en betafase halveringstid på $13,3 \pm 1,0$ dager (Figur 3). I cynomolgus-aper som fikk en enkelt (IV) injeksjon av 30mg/kg avtok serumnivåene av antistoff hurtigere med alfafase halveringstid på $10,9 \pm 3,2$ timer, etterfulgt av en betafase halveringstid på $7,54 \pm 1,79$ dager. Modellering av plasma-konsentrasjon/tid-profiler av 0,1, 0,3, 1 og 10mg/kg doser administrert i fem månedlige intervaller ble også foretatt og er vist i Figur 4.

Eksempel 4

Inhibering av cytokinproduksjon i humant helblod med et IL-1 β -antistoff

Måling av cytokiner i blod under en sykdom eller behandlingen av en sykdom kan være nyttig for å bestemme sykdommens alvor eller respons på en terapi. Vanligvis måles cytokinnivåer i serum, men denne metoden måler ikke nødvendigvis totalt cytokin. Mange cytokiner kan være inne i selve cellene (intracellulært). En celledes evne til å produsere et cytokin kan dessuten være nyttigere informasjon enn nivået av sirkulerende cytokin.

En metode for å stimulere helblod ble benyttet for å bestemme cytokinproduksjon og effekten av behandling med et anti-IL-1 β -antistoff. Blod ble tatt fra pasienter og overført til sterile hepariniserte rør, hvoretter 250uL av helblodet ble tilsatt til hvert sitt 4mL Orange top Corning sterile kryorør som følger:

Kontrollserie

Alle rørene ble på forhånd tilsatt 550uL RPMI. Til rør 1 (kontroll) ble det tilsatt 200uL RPMI og til rørene 2-10 ble det tilsatt ytterligere 100uL RPMI. Hvert av rørene 2-10 ble tilsatt 100uL fortyninger av et anti-IL-1 β -antistoff (AB7).

Testserier

En lignende serie antistoff-fortynninger ble satt opp som detaljert angitt ovenfor.

35

Alle rørene ble grundig blandet ved å benytte en 10 sekunders vortex-risting.

Kontrollserie-rør A1-10 fikk deretter ytterligere 100uL RPMI, ble vortex-ristet i 10

sekunder, skrukapslene tett tilskrudd og rørene anbrakt i inkubator. Testseriene, rørene B1-10, ble tilsatt 100uL varmedrepte *Staphylococcus epidermidis* (sluttkonsentrasjon på 1:1000 av stammløsning resulterte i et bakterie:hvite blodcelle-forhold på 10:1, rørene ble deretter vortex-ristet i 10 sekunder, kapslet og anbrakt i 37°C inkubator. Etter inkubering i 24 timer ble alle kulturene lysert med Triton X (0,5% sluttkonsentrasjon) for å frigi celleinnholdet, hvorpå lysatene ble nedfrys-
 5 Etter lysering av helblodkulturene ble rørene utsatt for fryse/tine-sykluser, og cytokinnivåene ble målt ved standard ELISA cytokinbestemmelser for humant TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8, IL-1 α , IL-1Ra og IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN).

10 Cytokiner målt i kontrollserierørene som kun inneholdt sterilt kulturmedium og antistoff (hvor angitt), gjenspeiler det spontane stimuleringsnivå. I friske individer finnes meget lave nivåer av de ulike cytokinene ved måling etter 24 timers inkubering. I pasienter med ubehandlede sykdommer kan nivåene være høyere. Rørene i test-
 15 seriene inneholdt ytterligere en definert mengde av varmedrepte *Staphylococcus epidermidis* som stimulerte produksjon av en rekke cytokiner. Dersom anti-IL-1 β -antistoff-behandlingen er effektiv, vil dette reflekteres gjennom redusert cytokin-produksjon.

Som vist i Figur 5 var høyaffinitets-anti-IL-1 β -antistoffet AB7 meget effektivt til å
 20 inhibere produksjonen av IL-1 β i humanblod. I et gjennomsnitt av tre humanprøver inhiberte antistoffet produksjonen av IL-1 β induert av *Staphylococcus epidermidis* med 50% ved 0,1pM og med 75% ved 3pM. Ved 100pM var inhiberingen 100%. Interferon gamma (IFN γ) ble induert med *Staphylococcus epidermidis*, og AB7 reduserte IFN γ induert av *Staphylococcus epidermidis* med 75% ved 100pM.

Eksempel 5

Farmakokinetikk for et anti-IL-1 β -antistoff etter administrering til mennesker

Farmakokinetikken til et anti-IL-1 β -antistoff som har de ovennevnte egenskaper, ble demonstrert i en fase I humanklinisk studie. Nærmere bestemt ble det foretatt en
 30 dobbelt-blind, placebokontrollert humanklinisk studie (i Type 2 diabetespasienter) og data fra fem pasienter som fikk IL-1 β -antistoff, betegnet AB7 (beskrevet ovenfor) i en dose på 0,01mg/kg via intravenøs infusjon ved konstant hastighet, ble benyttet for å undersøke farmakokinetiske forhold.

35 På Dag 1 av studien ble antistoff administrert ved en 30 minutters intravenøs infusjon ved konstant hastighet. Sikkerhetsvurderinger, inklusivt registreringen av uheldige hendelser, fysisk undersøkelse, vitaltegn, kliniske laboratorietester (f.eks. blodkjemi,

hematologi, urinalyse), plasmacytokin-nivåer og elektrokardiogrammer (ECG) ble foretatt ved bruk av kjent medisinsk standardpraksis. Blodprøver ble tatt før dose-administrering og på dagene 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9±1, 11±1, 14±1, 21±2, 28±2, 42±3 og 56±3 post-administrering for å bestemme IL-1 β -antistoffnivåer (farmakokinetikk).

5 Preliminær analyse av farmakokinetikken til IL-1 β -antistoffet hos individer som fikk en enkelt VI-dose på 0,01mg/kg, viste serumkonsentrasjon-tidsprofiler med en endelig halveringstid på 22 dager, clearance på 2,9mL/dag/kg og distribusjonsvolum i det sentrale kompartment på 50mL/kg meget likt serumvolum (Figur 6).

10 Interrim-analyse av farmakokinetiske data etter IV-administrering av en enkelt dose AB7 (XOMA 052) til individer i 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 eller 1,0mg/kg dosegruppene bekreftet ytterligere at serumkonsentrasjon/tid-profilene med en terminal halveringstid på 22 dager, clearance på 2,54mL/dag/kg og distribusjonsvolum i det sentrale kompartment på 41,3mL/kg var meget likt serumvolum (Figur 7).

15 Tilsvarende ble prøver analysert for enkeltdose SC-administrasjonsgruppene. Som vist i Figur 2 førte administrering av antistoffet som 0,03, 0,1 og 0,3mg/kg dosenivåer til profiler med terminal halveringstid på 22,7 dager, clearance på 2,4mL/dag/kg og volumdistribusjon av det sentrale kompartment på 40,7mL/kg.

20

Eksempel 6

Effekter av et IL-1 β -antistoff på CRP hos mennesker

C-reaktivt protein (CRP) ble også målt i serum til de samme tidspunkter som PK-prøvene for å bestemme aktiviteten av antistoffet i mennesker. En enkelt IV-dose av
 25 XOMA 052 reduserte ultrasensitivt C-reaktive protein- (usCRP) nivåer, et standardmål på systemisk inflammasjon assosiert med multiple sykdommer og en indikator på hjerterisiko, i alle doseringsgruppene sammenlignet med placebo. Som vist i Figur 8 var den mediane prosentuelle reduksjon i usCRP 28 dager etter en enkeltdose XOMA 052, lik 33, 46, 47, 36 og 26 for henholdsvis 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 og 1,0 mg/kg
 30 doseringsgruppene, sammenlignet med 4% for placebo. Den aktivitet som resulterte av en enkelt administrering av antistoff i en dose på 0,01mg/kg tyder på at selv lavere doser kan benyttes.

Eksempel 7

Beskyttelse mot kollagenindusert artritt i en musemodell på RA

35 IL-1 β -antistoffer eller fragmenter som har de ovennevnte egenskaper kan administreres til et individ for terapeutisk behandling og/eller forebyggelse av RA. I ett

eksempel ble et IL-1 β -antistoff, XOMA 052, testet for dets evne til å forhindre induksjonen av kollagenindusert artritt (CIA), en musemodell på reumatoid artritt. DBA/1-hannmus ble behandlet ved intraperitoneal injeksjon av isotype kontroll-antistoff eller XOMA 052 før sykdomsinduksjon (Dag -1). Antistoffer ble administrert to ganger ukentlig fra Dag -1 til avslutning av studien (7-8 uker).

Sykdom ble indusert i mus på Dag 0 ved subkutan immunisering ved 100 μ g bovint Type II kollagen, emulgert i Freund's komplette adjuvant. På Dag 21 ble en booster-immunisering administrert med 50 μ g bovint Type II kollagen i Freund's ukomplette adjuvant. Kroppsvekt og sykdomsprogresjon ble overvåket to ganger ukentlig. En sykdomsskåre på 0-4 ble gitt for hver pote ved å benytte kriteriene angitt i Tabell 2. En artrittisk indeks på 0-16 ble gitt til hvert dyr ved å legge sammen sykdomsskåre for alle fire poter.

Tabell 2

CIA sykdomsskåre

Skåre	Definisjon
0	Normalt, ikke-artrittisk pote
1	Erytem med hevelse begrenset til midtre pote og/eller involvering av én eller flere tær
2	Moderat erytem og hevelse av midtre pote opp til tarsalregionen og/eller involvering av én eller flere tær
3	Betydelig erytem og hevelse av midtre pote og tarsalregionen og/eller involvering av én eller flere tær
4	Alvorlig erytem og alvorlig hevelse omfattende midtre pote, tarsalregionen og forbi (proksimalt til) ankelen og/eller involvering av én eller flere tær

XOMA 052 administrert som 1mg/kg, 5mg/kg og 15mg/kg undertrykket signifikant sykdom som målt ved artrittisk indeks (Figur 9). Midlere artrittisk skåre ble undertrykket opptil 67% i forhold til isotype-kontrollen ($p < 0,05$, ANOVA etterfulgt av Tukey's test). XOMA 052 administrert som 0,3mg/kg hadde en målbar, men ikke statistisk signifikant, effekt på sykdom. På dag 52 hvor den midlere artrittiske indeks av kontroll-IgG2-behandlede mus er større enn 10, forbedret XOMA 052 signifikant sykdomsskåre med 66% ved en dose på 1, 5 og 15 mg/kg (Figur 10). I tillegg til å forhindre sykdom med start på Dag -1 (profylaktisk dosering) forhindret XOMA 052 også artritt ved etablert CIA (terapeutisk dosering). Når XOMA 052 administrering ble

utsatt inntil inntreden av symptomer, ble sykdomsskåre fremdeles redusert signifikant (Figur 11A, 11B).

Inflammasjon ved RA induserer osteoklastogenese og benresorpsjon. For å evaluere effekten av XOMA 052 på benpatologi ble bakpoter tatt fra mus på slutten av den profylaktiske CIA-studien. Analyse av radiografibilder viste at XOMA 052 kunne forhindre benerosjon og periosteal benproliferasjon forårsaket av CIA (Figur 12). De samme potene ble behandlet videre og snitt ble farget med hematoksylin-floksinsafrafran (HPS) eller safranin O (Figur 13). Poter fra mus behandlet med isotype kontroll-antistoff oppviste massiv inflammatorisk infiltrasjon (Figur 13B) og brusktap (Figur 13E) i artrittiske ledd. Dette ble i stor grad forhindre ved behandling med XOMA 052 (Figur 13C, 13F).

Eksempel 8

Bruk av et IL-1 β -antistoff ved behandlingen av reumatoid artritt

IL-1 β -antistoffer eller fragmenter som har ovennevnte egenskaper kan administreres til et individ (f.eks. human pasient) for terapeutisk behandling og/eller forebyggelse av reumatoid artritt (RA). I et eksempel (beskrevet ovenfor) benyttes et IL-1 β -antistoff, XOMA 052, for den terapeutiske behandling av pasienter som oppviser tegn og symptomer på RA. Sikkerhet og effektivitet av IL-1 β -antistoffet for RA er demonstrert i én eller flere humankliniske studier, inklusivt for eksempel forsøk etter følgende opplegg i individer med moderat til alvorlig RA.

En dobbeltblind, placebokontrollert, dose-eskalerende studie av sikkerhet og PK av XOMA 052 foretas i individer med aktiv, stabil, moderat til alvorlig RA. Individer i parallelle doseringsgrupper på seks individer i hver (flere virkestoffgrupper og en placebogruppe) innrulleres for å få en enkelt IV-infusjon av testmedikament (IL-1 β -antistoff eller placebo) i dosenivåer vist i tabellen nedenfor.

Doseringsgruppe	Antall individer	Doseringsregime
A	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av 0,03 mg/kg antistoff
B	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av 0,1 mg/kg antistoff
C	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av 0,3 mg/kg antistoff
D	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av 1,0 mg/kg antistoff
E	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av 3,0 mg/kg antistoff

F	6	Fire ukentlige IV-infusjoner av placebo
---	---	---

Individer som oppfyller alle utvelgelseskriterier innrulleres, randomiseres i én av doseringsgruppene og doseres med start på Dag 0 med testmedikament (antistoff eller placebo). I ett klinisk forsøksopplegg kan individet for eksempel inkluderes dersom de oppfyller alle ACR-diagnosekriterier for RA, hvor fire av de følgende syv kriterier må foreligge:

- Morgenstivhet ≥ 1 time (forekommende i minst 6 uker)
- Artritt i tre eller flere av de følgende ledd (forekommende i minst 6 uker):
høyre eller venstre PIP, MCP, vrist, albue, kne, ankel, MTP-ledd
- Artritt av vrist, MCP eller PIP-ledd (forekommende minst 6 uker)
- Symmetrisk involvering av ledd (forekommende i minst 6 uker)
- Reumatiske knuter over benprominesenser eller ekstensorflater eller i
juxta-artikulære regioner
- Positiv serum reumatoid faktor
- Radiografiske endringer, inklusivt erosjoner eller dekalsifisering av ben
lokalisert i eller nær inntil de involverte ledd

Dessuten defineres pasienter med moderat til alvorlig sykdom som følger:

- Minst seks ømme og seks hovne ledd (28 joint count; se Appendix 6), og
- ESR >28 mm/time eller CRP $> 1,0$ mg/dL

Alternativt foretas en dobbeltblind, placebokontrollert, dose-eskaleringsstudie av sikkerhet og PK av antistoffet i individer med aktiv, stabil, moderat til alvorlig RA (f.eks. tilsvarende som ovenfor). Studien er i to deler.

I Del 1 får ni individer (seks virkestoff og tre placebo) en enkelt dose av testmedikament administrert intravenøst (IV) som 0,3mg/kg. I Del 2 får individer i tre doseringsgrupper på syv individer i hver (fem virkestoff og to placebo) fire ukentlige IV-infusjoner av testmedikament i doseringsnivåer bestemt etter eksaminering av data fra studiens Del 1 og fra andre understøttende studier, som for eksempel det ovenfor. Utgangsdosen i Del 2 er lavere enn dosen administrert i Del 1. Doseringsregimene for studien er sammenfattet i den følgende tabell, og en lignende studie kan foretas ved bruk av SC-administrering av antistoff.

Studiedoseringsgrupper og regimer

Del	Doserings-gruppe	Antall individer	Doseringsregime
1	A	6 aktive, 3 placebo	En enkelt 0,3 mg/kg IV-infusjon
2	B	5 aktive, 2 placebo	Fire ukentlige IV-infusjoner av de tre laveste doseringsnivåer valgt etter vurdering av studiens Del 1 og fra to pågående T2D-studier.
	C	5 aktive, 2 placebo	Fire ukentlige IV-infusjoner av de tre nest laveste doseringsnivåer valgt etter vurdering av studiens Del 1 og fra to pågående T2D-studier.
	D	5 aktive, 2 placebo	Fire ukentlige IV-infusjoner av de tre høyeste doseringsnivåer ($\leq 3\text{mg/kg}$ valgt etter vurdering av studiens Del 1 og fra to pågående T2D-studier.

Individer i en enkeltdosegruppe (Gruppe A) utvelges og doseres IV på dag 0 med oppfølgingsvurderinger til og med Dag 56. Sikkerhet bestemmes ved pre- og post-behandlings-seriemålinger av vitale tegn, klinisk laboratorievurdering og registrering av uheldige kliniske hendelser. PK-data samles og analyseres periodisk. Etter at det siste individ i doseringsgruppe A har fullført undersøkelsesprosedyren til og med dag 28 vil, dersom ikke mer enn ett individ som får XOMA 052 i doseringsgruppe A har opplevd en dosebegrensende toksisitet (DLT) og DSMB ikke ser noe klinisk signifikant sikkerhetsproblem, DSMB anbefale tre eskalerende IV-doser for bruk i Del 2 av studien og innrulleringen kan begynne.

Individet i flerdosegrupper (f.eks. doseringsgruppene B, C og D) får fire ukentlige IV-infusjoner av XOMA 052 i én av tre suksessivt høyere dosenivåer. Monitorering vil skje som i Del 1 bortsett fra at individer i en doseringsgruppe, før opptrapping til den neste høyere dose, må fullføre studieprosedyrene gjennom henholdsvis enten dag 35 eller dag 49 avhengig av hvorvidt ingen individ eller ett individ i en doseringsgruppe har erfart en dosebegrensende toksisitet (DLT). Alle individer i flerdosegrupper vil følges opp til dag 77. Som ved Del 1 bestemmes sikkerhet ved pre- og post-behandlings-seriemålinger av vitale tegn, kliniske laboratorievurderinger og registrering av uheldige kliniske hendelser. PK-data samles og analyseres til forskjellige tidspunkter.

For å vurdere den biologiske aktivitet av antistoffbehandling i RA-individer måles CRP og ESR som inflammatoriske markører og den aksepterte medisinske standard American College of Rheumatology (ACR) kjernerresponskriterier benyttes som middel for å måle sykdomsstatus etter behandling. ACR-kjernekriterie-bedømmelsene foretas ved screening og på dagene 0 (pre-dose), 7, 14, 21, 28, 42 og 56.

ACR-kjernekritierier for bedømmelse av RA-sykdomsstatus inkluderer følgende vurderinger:

- Ømme ledd-tall (28 ledd)
- Hovne ledd-tall (28 ledd)
- Subjektiv smertevurdering
- Subjektiv totalvurdering
- Legens totalvurdering
- Subjektiv selv-vurdering av funksjonshemming i henhold til PROMIS HAQ®
- Akutfase-reaktant (ESR/CPR)

Tall for ømme ledd og tall for hovne ledd er basert på standard Fuchs 28-ledds indeks. Subjektiv smertevurdering, subjektiv totalvurdering og legens totalvurdering gjør bruk av en 100mm visuell analog skala. PROMIS HAQ® er et akseptert helsevurderings-spørreskjema. Akutfase-reaktant (ESR og CRP) bestemmes begge ved hver visitt med start på Dag 0.

ACR-kjernekriterie-komponentene analyseres ved å benytte både standard ACR-responskriteriene (dvs. ACR20, ACR50 og ACR70) og DAS28-CRP. DAS- (Disease-Activity Score) 28 kalkulatoren er en validert forkortelse av den opprinnelige DAS-beregningsmodellen benyttet til måling av alvorlighet og aktivitet av reumatoid artritt. Studien kan benytte en versjon av DAS28 (DAS 28-CRP) som inkorporerer CRP i stedet for ECR-resultater i beregningen. DAS28-CRP er basert på den vektete skåre av følgende fire variabler:

- (TEN28): Antall smertefulle ledd av 28 ledd
- (SW28): Antall hovne ledd av 28 ledd
- (CRP): CRP måling i mg/L
- (GH): Subjektiv totalvurdering av sykdomsaktivitet etter en 100mm visuell analog skala (VAS)

For å bestemme sykdomsaktivitet etter DAS28-CRP-metoden bestemmer legen antallet smertefulle og/eller hovne ledd ved å benytte Fuchs 28 ledd-indeksen (se Appendix 6). CRP-nivåer bestemmes ved laboratorietesten. Den generelle status av individets sykdom vurderes ved å benytte en 100mm VAS. Resultatene av disse testene legges deretter inn i følgende ligning:

$$0,56*\text{sqrt}(\text{TEN28})+0,28*\text{sqrt}(\text{SW28})+0,36*\text{Ln}(\text{CRP}+1)+0,014*\text{GH}+0,96$$

hvor:

	sqrt =	kvadratrot
10	TEN28 =	antall smertefulle ledd
	SW28 =	antall hovne ledd
	Ln =	naturlig logaritme
	CRP =	CRP-måling i mg/L
15	GH =	individets totalvurdering av sykdomsaktivitet etter en 100mm VAS

Kilde: Ligninger fra http://www.das-score.nl/www.das-score.nl/DAS_CRP.html

DAS28-CRP-resultater strekker seg fra 1 til 10, hvor en skåre lavere enn 2,6 indikerer remisjon, skåre mellom 2,6 og 3,2 representerer en lav grad av sykdomsaktivitet og skåre over 5,1 indikerer høy sykdomsaktivitet.

Dessuten tas helblodprøver som bestemmes med henblikk på cytokiner som kan inkludere, men ikke er begrenset til, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, $\text{IFN}\gamma$, IL-8 og IL- 1α .

Midlertidige data fra tre individer, hvor to fikk 0,3mg/kg antistoff og en fikk placebo, viste en vedvarende og langvarig forbedring i akutfase-reaktantene (f.eks. CRP) hos antistoffbehandlede individer, mens placeboindividet ikke gjorde det. Dessuten viste begge de antistoffbehandlede individene indikasjon på behandlingseffekt under ACR-skåringskriteriene, hvor ett individ oppfylte ACR70-kriteriene på de senere tidspunktene.

Basert på resultatene oppnådd fra den første kliniske studien kan det foretas ytterligere kliniske forsøk. Slike forsøk kan inkludere en eller flere av de ovennevnte doseringer og doseringsregimer, så vel som, eller alternativt, én eller flere andre doseringer av IL- 1β -antistoff, alternative administrasjonsmåter, lengre behandlings- og/eller observasjons-perioder og større antall pasienter per gruppe (f.eks. minst cirka 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000).

Alle referanser, inklusivt publikasjoner, patentsøknader og patenter som her er sitert inkorporeres herved ved referanse i samme grad som om hver referanse var individuelt og spesifikt angitt inkorporert ved referanse.

5

Anvendelsen av betegnelsene «en» og «ett» og «den» og lignende referanser i sammenheng med beskrivelsen av oppfinnelsen (spesielt i sammenheng med de etterfølgende krav) er å oppfatte som dekkende for både entall og flertall om intet annet her er angitt eller klart motsies av konteksten. Betegnelsene «omfatter», «har», «inkluderer» og «inneholder» er å oppfatte som åpne begreper (dvs i betydningen «inklusivt, men ikke begrenset til») om intet annet er angitt. Der hvor det er benyttet et åpent begrep for å beskrive et trekk eller element ved oppfinnelsen, er det spesifikt tenkt at et lukket begrep kan benyttes i stedet for det åpne uten å gå ut over oppfinnelsens ramme. Oppregning av verdiområder er her kun ment å tjene som en stenografisk metode for individuelt å referere til hver separat verdi som faller innenfor området, om intet annet her er angitt, og hver separat verdi er inkorporert i beskrivelsen som om den var individuelt angitt her. Alle her beskrevne fremgangsmåter kan utføres i enhver passende rekkefølge, om intet annet her er angitt, eller klart strider mot sammenhengen. Anvendelsen av ethvert eksempel eller vendinger (f.eks. "så som") som her er angitt, er kun ment å bedre belyse oppfinnelsen og utgjør ikke noen begrensning av oppfinnelsens ramme.

Foretrukne utførelsesformer av denne oppfinnelse er beskrevet her, inklusivt den etter oppfinnernes oppfatning beste måte å gjennomføre oppfinnelsen på. Variasjoner av de foretrukne utførelsesformer kan synes åpenbare for fagmannen etter lesning av den forutgående beskrivelse. Oppfinnerne forventer at fagmannen gjør bruk av slike passende variasjoner.

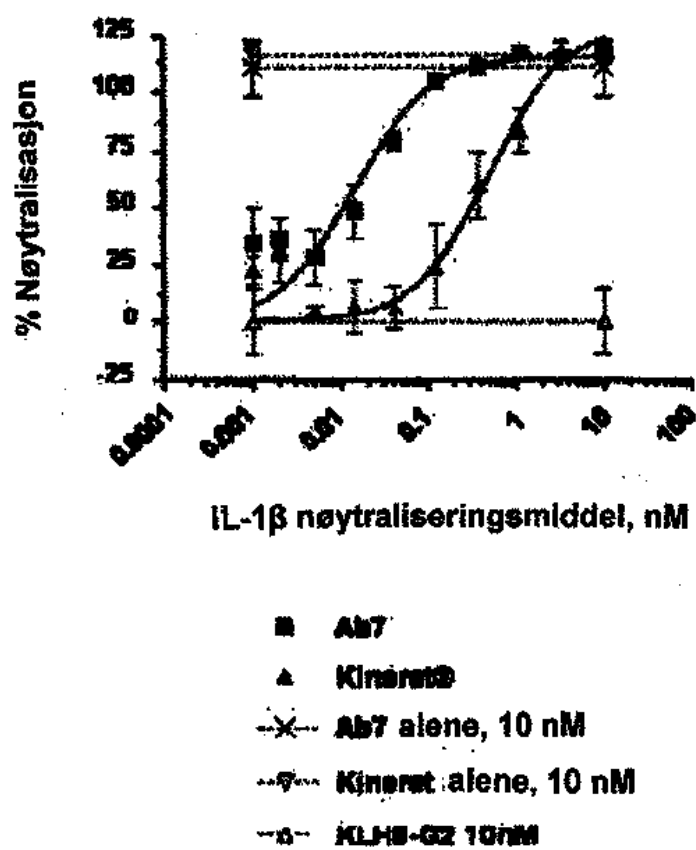
25

Patentkrav

1. Farmasøytisk blanding som omfatter et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment
derav, for bruk ved behandlingen av reumatoid artritt, hvor antistoffet eller antistoff-
5 fragmentet binder til humant IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på 1pM eller mindre,
hvor antistoffet eller fragmentet derav konkurrerer om bindingen av et antistoff som
har den lette kjedes variable region av SEKV.ID.NR:5 og den tunge kjedes variable
region av SEKV.ID.NR:6, hvor administrering av en initialdose av antistoffet eller
antistoff-fragmentet etterfølges av administreringen av en eller flere påfølgende doser,
10 hvor initialdosen og hver nevnte ene eller flere påfølgende doser administreres i et
intervall på en gang ukentlig til to ganger hver sjette måned, og hvor antistoffet eller
antistoff-fragmentet skal administreres i en dose på minst 0,01mg/kg til 1mg/kg
antistoff eller fragment derav.
- 15 2. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1, hvor antistoffet eller
fragmentet skal administreres som en fast dose, uavhengig av en dose per
individvekt-forhold.
3. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-2, hvor anti-IL-1 β -
20 antistoffet eller fragmentet skal administreres ved subkutan, intravenøs eller intra-
muskulær injeksjon.
4. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-3, hvor administreringen
av nevnte ene eller flere påfølgende doser er i en doseringsmengde som er den
25 samme, mindre eller større enn initialdosen.
5. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-4, hvor dosen av anti-
stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå en forbedring av ett eller flere av
ACR-kjerneresponskriteriene.
30
6. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-5, hvor dosen av anti-
stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst en 20% forbedring av ACR 50
skåre.
- 35 7. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 5-6, hvor forbedringen er i 3
måneder eller lengre.

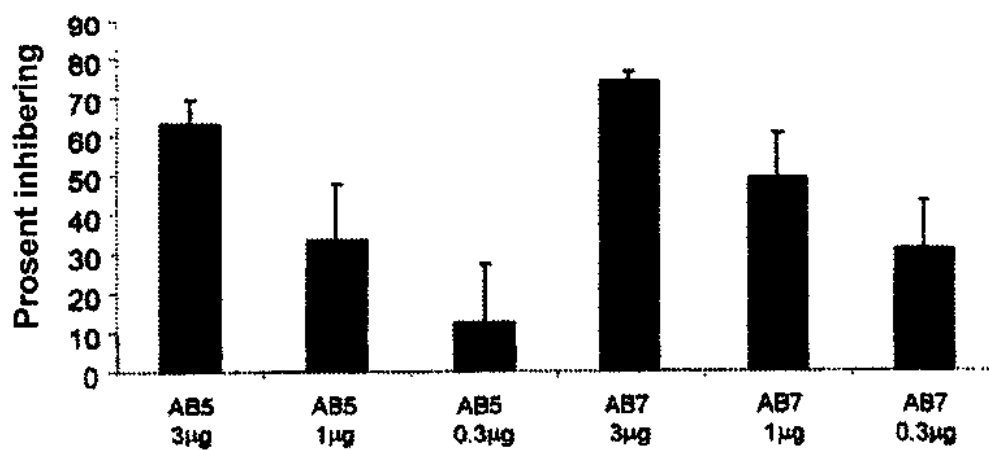
8. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-7, hvor dosen av antistoff eller fragment er tilstrekkelig til å oppnå en nedgang i inflammatorisk infiltrasjon.
- 5 9. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-7, hvor dosen av antistoff eller fragment er tilstrekkelig til å oppnå en nedgang i brusktap.
10. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-7, hvor dosen av antistoff eller fragment er tilstrekkelig til å oppnå en nedgang i benresorpsjon.
- 10 11. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-7, hvor dosen av anti-stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå en forbedring i radiografisk skåre.
12. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-11, hvor dosen av anti-stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 20% nedgang i CRP-nivåer.
- 15 13. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-11, hvor dosen av anti-stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå en minst 20% nedgang i ESR.
14. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-11, hvor dosen av anti-stoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå en minst 20% nedgang i CRP og minst en 20% nedgang i ESR.
- 20 15. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge krav 1-14, hvor nevnte fremgangsmåte skjer sammen med minst én ytterligere behandlingsmåte, hvor nevnte ytterligere behandlingsmåte omfatter administrering av minst en farmasøytisk blanding som omfatter et annet virkestoff enn et IL-1 β -antistoff eller fragment.
- 25 16. Farmasøytisk blanding for anvendelsen ifølge hvilket som helst av kravene 1-15, hvor antistoffet eller fragmentet derav omfatter en lett kjedes variable region av SEKV.ID.NR:5 og den tunge kjedes variable region av SEKV.ID.NR:6.
- 30

1/15

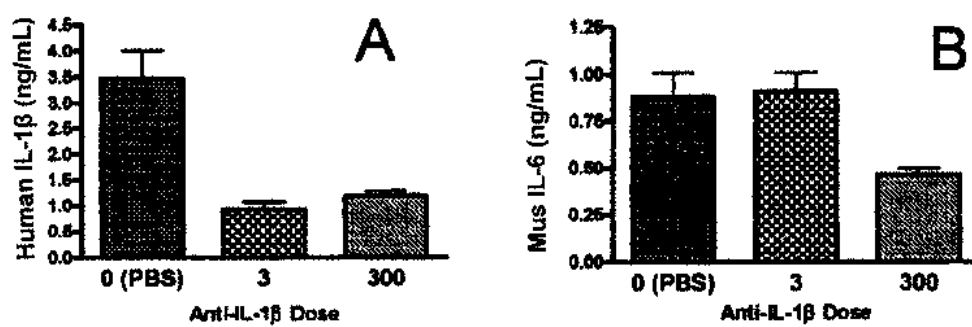


Figur 1

2/15

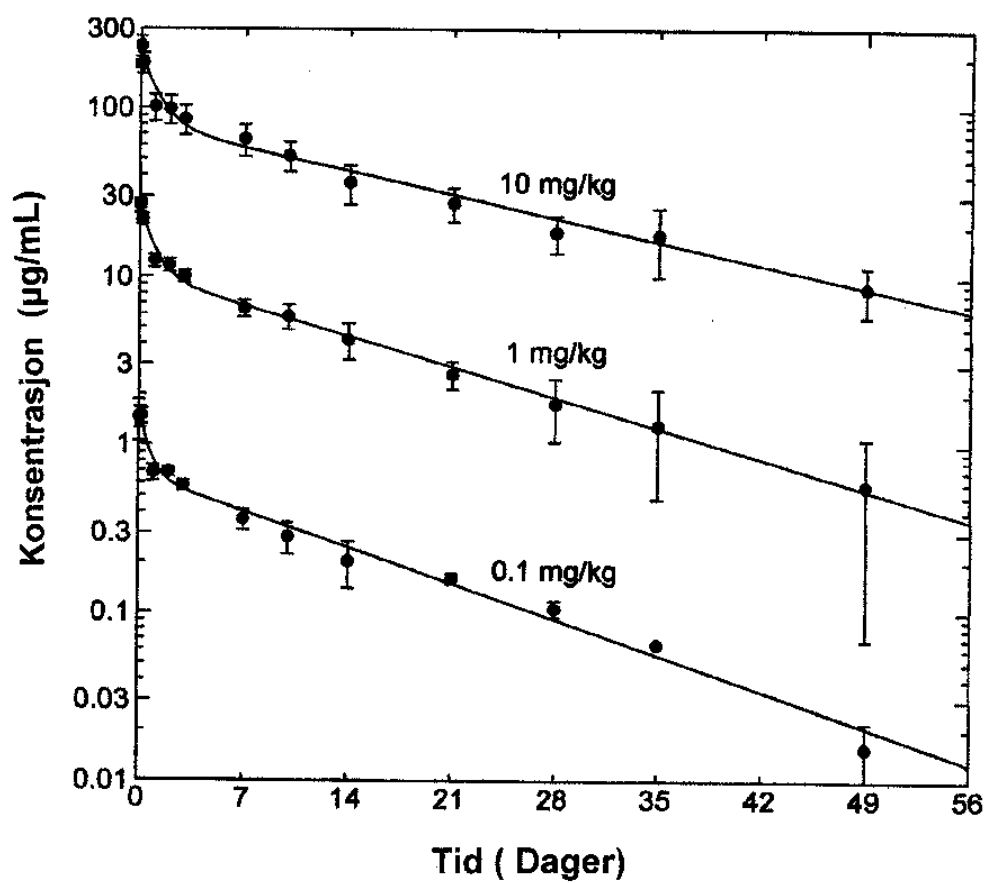


Figur 2



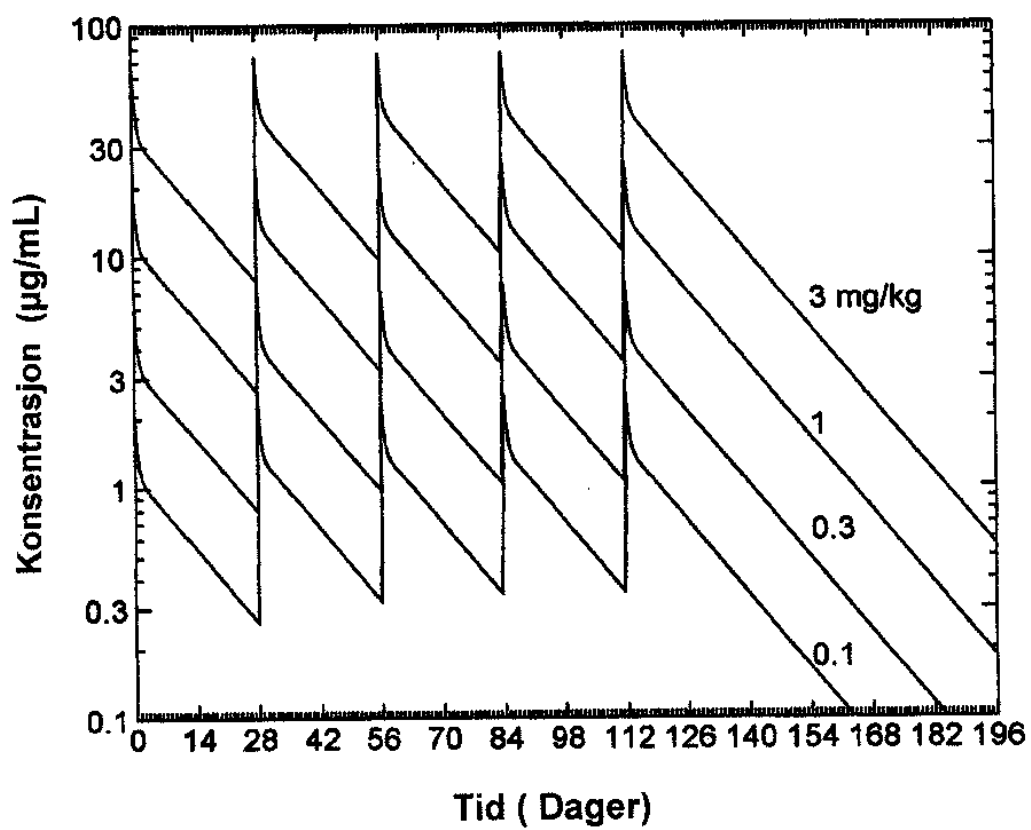
Figur 2B

3/15



Figur 3

4/15



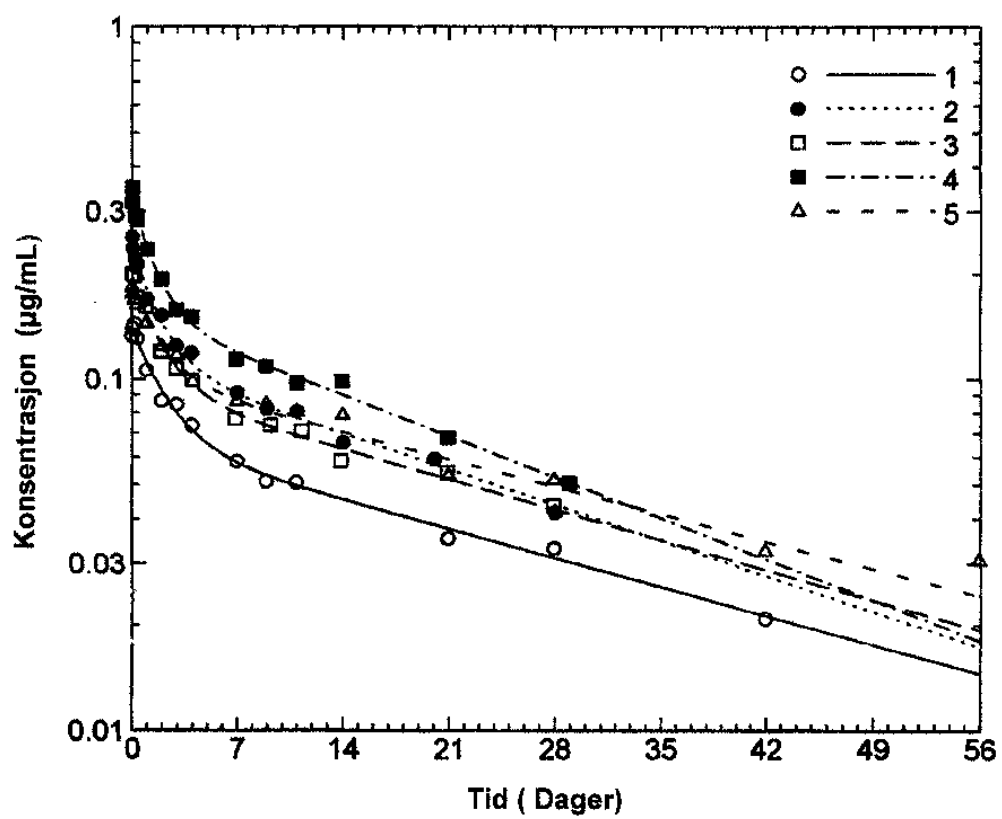
Figur 4

5/15

Stimulant	Ab	IL-1 β	IL-1a	IL-6	IL-8	IL-1Ra	TNF α	IFN γ
RPMI	0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	1.1
RPMI	10000	0.0	0.0	0.0	13.4	22.0	0.0	0.8
Staph	10000	0.0	31.7	45.6	93.6	79.7	52.6	22.1
Staph	1000	0.0	30.7	49.4	85.9	94.8	74.0	26.7
Staph	100	0.9	40.8	74.1	97.1	92.6	69.5	34.9
Staph	10	18.4	46.9	80.4	97.9	93.3	94.9	36.9
Staph	3	23.8	41.1	71.3	93.7	101.2	97.3	43.8
Staph	1	26.4	49.6	69.8	98.0	95.7	96.1	48.7
Staph	0.1	56.1	63.3	75.1	103.6	102.5	101.0	54.8
Staph	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

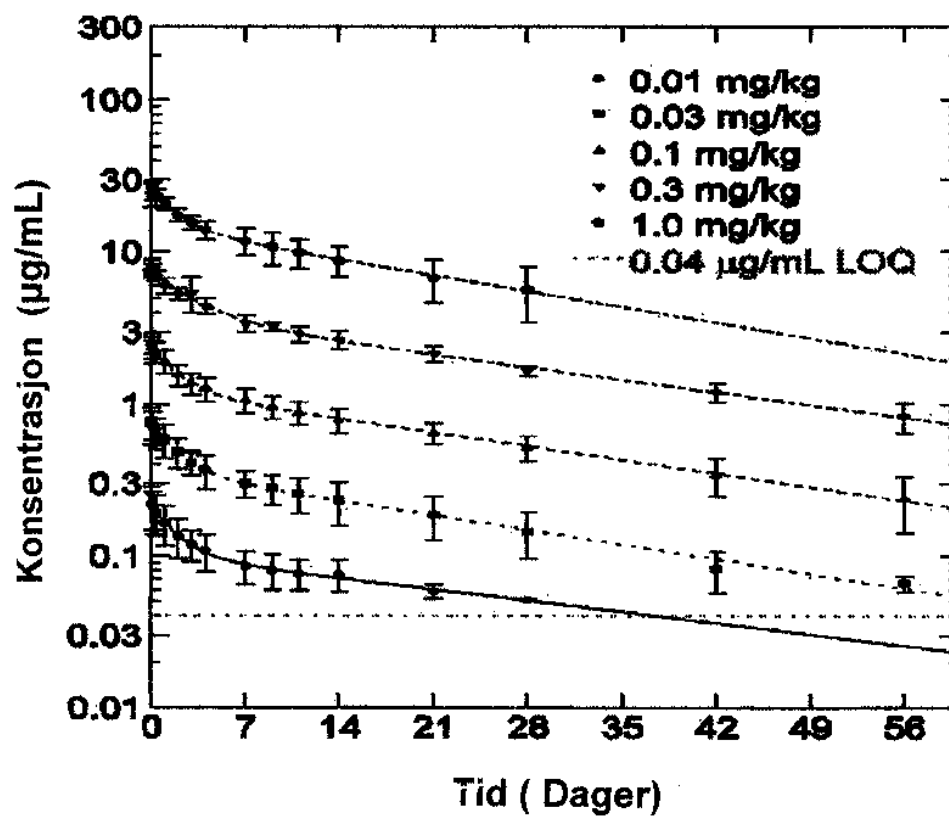
Figur 5

6/15



Figur 6

7/15

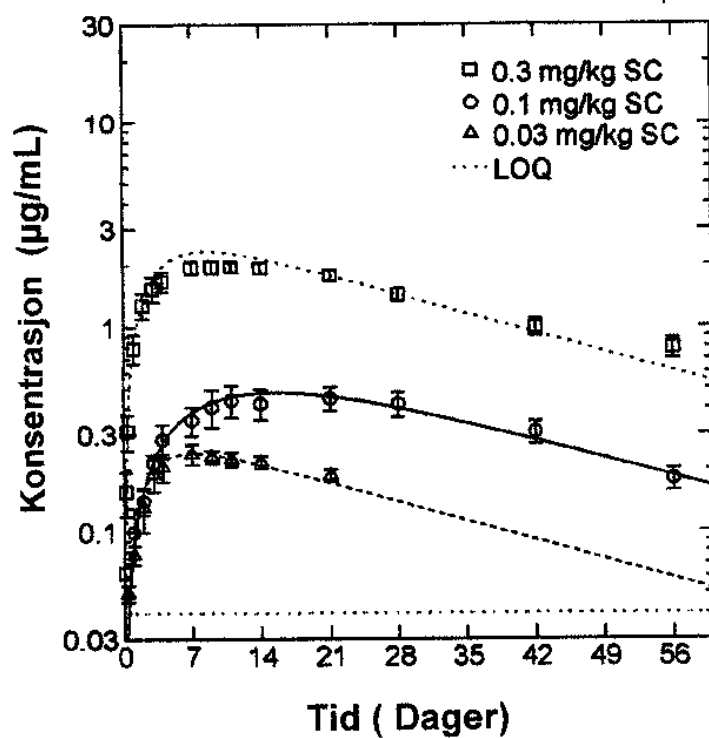


$T_{\alpha} = 1,42$ dager
 $T_{\beta} = 22,0$ dager
 $CL = 2,54$ mL/dag/kg
 $V_c = 41,3$ mL/kg
 $F_{\text{alfa}} = 0,061$

LOQ = Kvantifiseringsgrense

Figur 7A

8/15

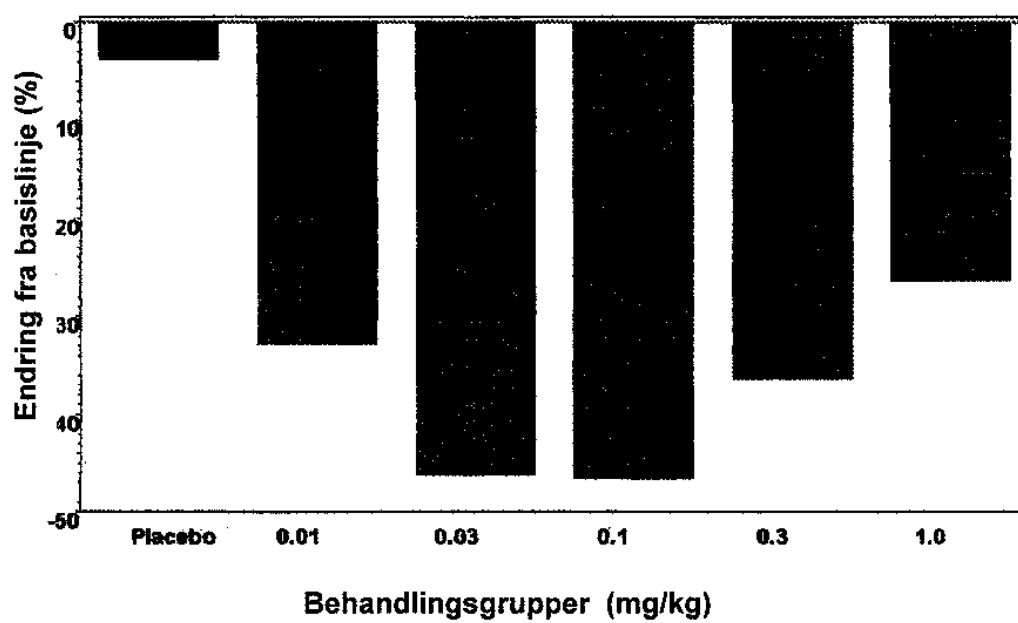


$T_{\alpha} = 1,6$ dager
 $T_{\beta} = 22,7$ dager
 $CL = 2,4$ mL/dag/kg
 $V_c = 40,7$ mL/kg
 $F_{\text{alfa}} = 0,068$

LOQ = Kvantifiseringsgrense

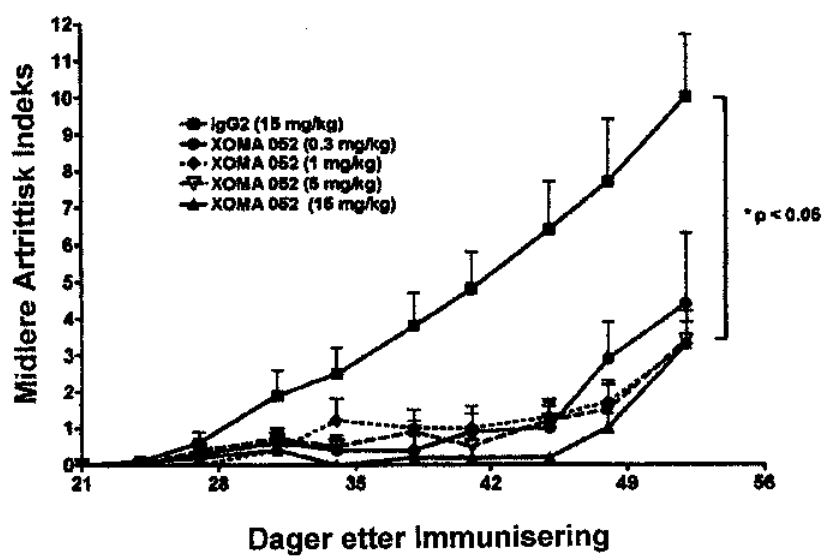
Figur 7B

9/15



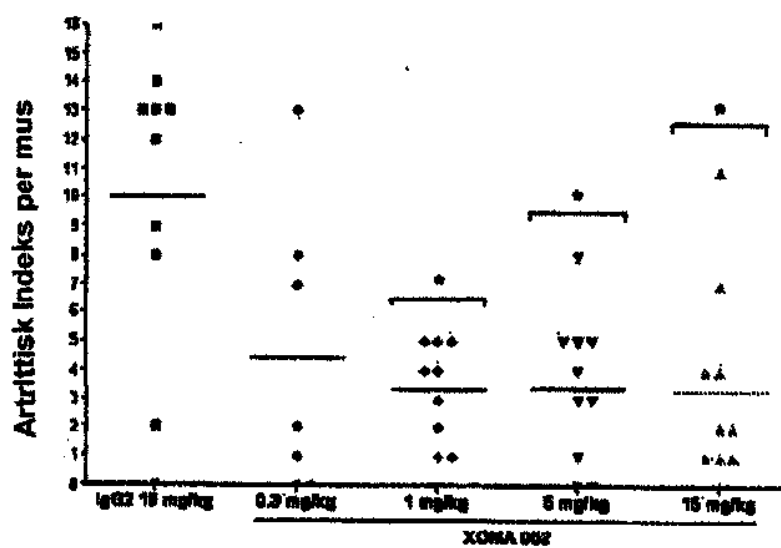
Figur 8

10/15



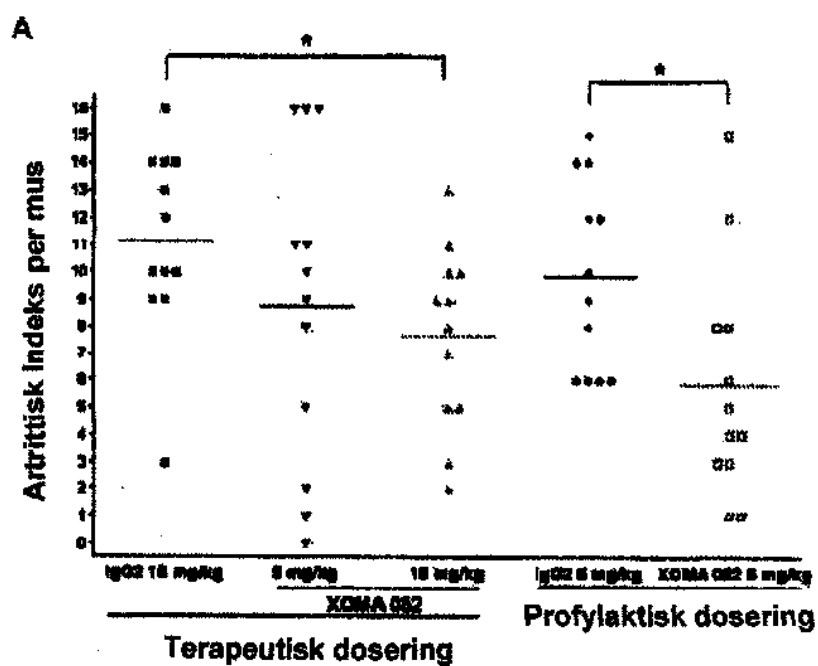
Figur 9

11/15



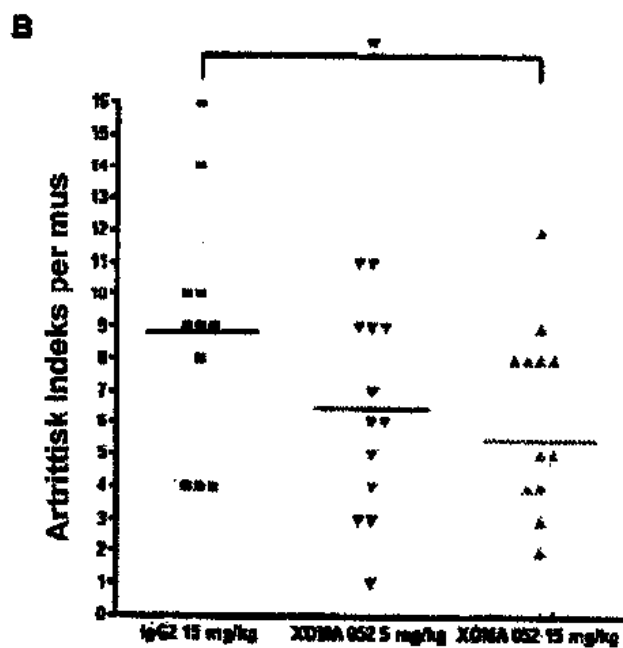
Figur 10

12/15



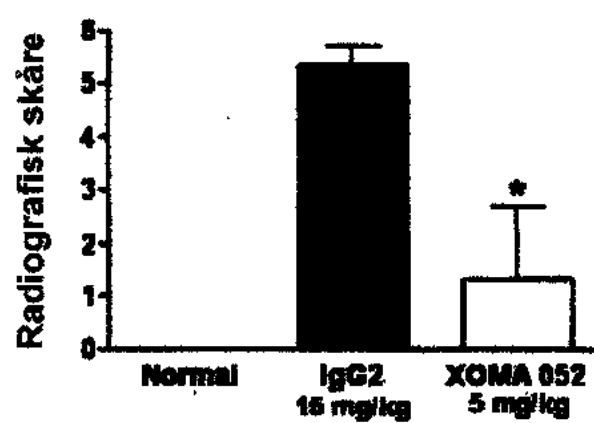
Figur 11A

13/15



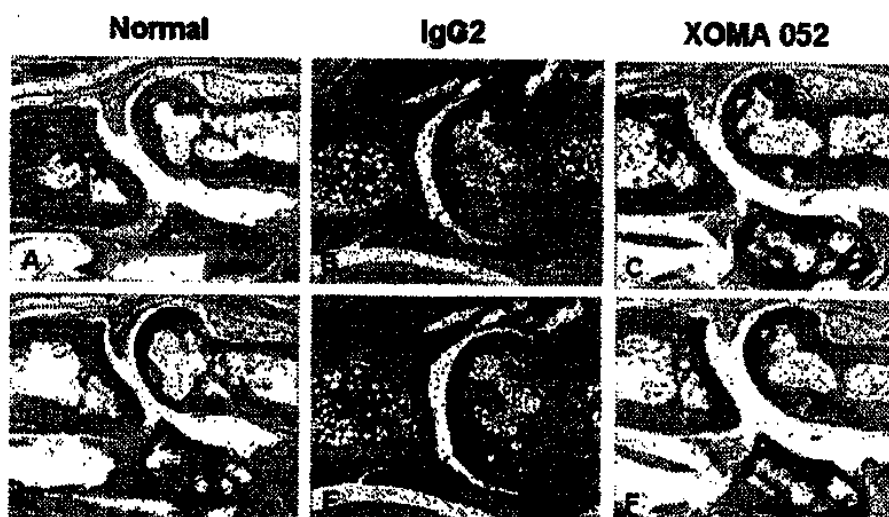
Figur 11B

14/15



Figur 12

15/15



Figur 13