



NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.03.09
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.10.15
(86)	Europeisk søknadsnr	08866346.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.12.07
(30)	Prioritet	2007.12.20, US, 15633 P 2008.06.06, US, 59378 P 2008.09.08, US, 95191 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 MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	XOMA (US) LLC, 2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, US-USA
(72)	Oppfinner	SOLINGER, Alan M., 6895 Elverton Drive, Oakland, California 94611, US-USA
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge
(54)	Benevnelse	Metoder fo behandling av gikt
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-03/010282 WO-A-2007/002261 WO-A-2007/077261 WO-A-2008/077145 SIMON P L ET AL: "Mapping of neutralizing epitopes and the receptor binding site of human interleukin 1 beta" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 268, no. 13, 5 May 1993 (1993-05-05), pages 9771-9779, XP002487368 ISSN: 0021-9258 DINARELLO CHARLES A: "Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation" CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 4, no. 4, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 378-385, XP002357660 ISSN: 1471-4892 POPE RICHARD M ET AL: "The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout - Implications for therapy" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 56, no. 10, October 2007 (2007-10), pages 3183-3188, XP002524014 ISSN: 0004-3591 NISHIMURA AKITO ET AL: "Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8" JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 62, no. 4, 1997, pages 444-449, XP002524015 ISSN: 0741-5400 ROSEFF R ET AL: "THE ACUTE PHASE RESPONSE IN GOUT", JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, JOURNAL OF RHEUMATOLOGY PUBLISHING COMPANY, CA, vol. 14, no. 5, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 974-977, XP009160390, ISSN: 0315-162X W. J. Taylor ET AL: "Toward a valid definition of gout flare: Results of consensus exercises using delphi methodology and cognitive mapping", Arthritis & Rheumatism, vol. 61, no. 4, 15 April 2009 (2009-04-15), pages 535-543, XP055030314, ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/art.24166

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Oppfinnelsen angår IL-1 β -antistoffer og fragmenter derav for anvendelse ved behandling og/eller forebygging av gikt. Slike antistoffer eller fragmenter kan anvendes for å behandle et individ som lider av gikt eller for å forhindre forekomst av det samme hos et risikoindivid.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Foreliggende beskrivelse angår IL-1 β -antistoffer og fragmenter derav for anvendelse ved behandling og/eller forebygging av gikt hos et individ. Slike antistoffer eller fragmenter kan anvendes for å behandle et pattedyr (f.eks., et menneske)-individ som lider av gikt eller for å forebygge forekomst av det samme hos et risikoindivid.

Gikt er en form for akutt artritt som forårsaker kraftig smerte og hevelse i leddene. Urinsyregikt sto for anslått 3,9 millioner visitter av poliklinikkpasienter i USA i 2002. I motsetning til andre revmatiske sykdommer, er etiologien for gikt godt karakterisert, dens patofysiologi er godt forstått, og sykdommen blir enkelt diagnostisert. For mange pasienter er behandling med ikke-steroid antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) eller kortikosteroider for akutte anfall og forebygging av tilbakevendende med midler som reduserer serum-urinsyrenivåer svært effektive. Imidlertid er ikke disse behandlingene tilstrekkelig for mange pasienter med akutt, kronisk eller refraktær gikt på grunn av deres mangel på tilstrekkelig klinisk effekt, assosiert toksisitet, eller på grunn av komorbide sykdommer.

Gikt er utfelling av krystaller i vev, vanligvis i og omkring ledd, og fører oftest til tilbakevendende akutt eller kronisk artritt.

Sykdommen er kjennetegnet ved utfelling av mononatriumurat (MSU)-krystaller i vev, vanligvis i og omkring ledd og i synovialvæsken og kanten, og vanligvis en overskytende mengde av urinsyre i blodet. Intens leddinflammasjon oppstår idet hvite blodlegemer omslutter urinsyrekrySTALLene, og forårsaker smerte, varme og rødhet av leddvevene. Urinsyregikt skyldes mononatriumuratkrySTALL-indusert frigivelse av proinflammatoriske cytokiner fra leukocytter. Blant de mange cytokinene implisert kan IL-1 ha en spesiell rolle i det inflammatoriske nettverket, ettersom MSU-krystaller stimulerer frigjøring av IL-1 ved monocytter og synovial mononukleære celler. Akutte anfall av gikt kommer vanligvis plutselig, forsvinner etter 5 til 10 dager, og kan fortsette å dukke opp igjen.

IL-1 β er et proinflammatorisk cytokin utskilt av flere ulike celletyper inkludert monocytter og makrofager. Når de frigjøres som del av en inflammatorisk reaksjon frembringer IL-1 β en rekke biologiske effekter, hovedsakelig mediert gjennom induksjon av andre inflammatoriske mediatorer slik som kortikotropin, blodplatefaktor 4, prostaglandin E2 (PGE2), IL-6 og IL-8. IL-1 β induserer både lokale og systemiske inflammatoriske effekter gjennom aktivering av IL-1-reseptoren funnet på nesten alle celletyper. Interleukin-1 (IL-1)-familien av cytokiner har vært innblandet i flere sykdomstilstander. Medlemmer av IL-1-familien omfatter IL-1 α , IL-1 β og IL-1Ra. Selv om de er beslektet ved deres evne til å binde til IL-1-reseptorer (IL-1R1 og IL-1R2), er hvert av disse cytokinene forskjellige, de blir uttrykt av ulike gener og har ulik primær aminosyresekvens. Videre kan de fysiologiske aktivitetene av disse cytokinene skjelles fra hverandre.

Forsøk som angir åpenbar involvering av IL-1 β og andre inflammatoriske mediatorer i gikt har blitt publisert (se for eksempel, Petrilli et al., *Joint Bone Spine* (2007) 74:571-576; Pope et al., *Arthritis Rheum.* (2007) 56:3183-3188; Chen et al., *J. Clin. Invest.* (2006) 116:2073-2075; Akahoshi, T., et al., *Curr. Opin. Rheumatol.* (2007) 19:146-150; Martinon, F., et al., *Nature* (2006) 440:237-241; og Cronstein et al., *Arthritis Res. Ther.* (2006) 8, Suppl. 1:S3). So et al., *Arthritis Res. Ther.* (2007) 9(2):R28 beskriver anvendelse av en rekombinant IL-1 reseptor-antagonist (IL-1Ra, anakinra) i en åpen studie for behandling av akutt gikt, utført med daglig dosering av 100 mg subkutan i 3 dager. McGonagle, et al., *Ann. Rheum. Dis.* (2007) 66:1683-1684 beskriver anvendelse av en rekombinant IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra, anakinra) for behandling av gikt hos en pasient som mottar kontinuerlige daglige subkutane doser på 100 mg. Den daglige doseringen av injiserbar medisinsk behandling er generelt ikke ønsket og kan føre til problemer med pasientens etterlevelse med regimet, hvilket derved reduserer effektiviteten av denne behandlingmodaliteten/ eller begrenser dens ønskelighet. Følgelig er det fortsatt behov for effektive midler for behandling av gikt, spesielt behandlings-sammensetninger og fremgangsmåter som ikke krever hyppige (f.eks., daglige) injeksjoner.

WO 2007/077261 A1 beskriver inhibitorer av NALP3-inflammasomet for anvendelse ved behandling av gikt.

WO 2007/002261 A1 beskriver *inter alia* spesifikke IL-1 β -antistoffer.

WO03/010282 A1 beskriver *inter alia* spesifikke IL-1 β -antistoffer.

WO 2008/077145 A2 beskriver IL-1 β -antistoffer derav *inter alia* for anvendelse ved behandling av type 2-diabetes.

Simon et al., *Journal of Biological Chemistry* (1993), 268 (13), 9771-9779 beskriver kartlegging av nøytraliserende epitoper av IL-1 β -antistoffer.

Dinarelo et al., *Current Opinion in Pharmacology* (2004), 4 (4), 378-385, beskriver terapeutiske strategier for å redusere IL-1-aktivitet ved behandling av lokal og systemisk inflammasjon ved anvendelse av IL-1 β oppfangings molekyler.

Pope et al., *Arthritis & Rheumatism* (2007), 56 (10), 3183-3188, beskriver rollen for interleukin-1 og inflammasomet ved gikt.

Nishimura et al., *Journal of Leukocyte Biology* (1997), 62 (4), 444-449, beskriver interleukin 8-antistoffer for anvendelse ved behandling av gikt.

På grunn av problemene med gjeldende behandlinger, er nye behandlinger for behandling av gikt nødvendig for å erstatte eller komplettere tilgjengelige farmasøytiske metoder. Foreliggende beskrivelse tilveiebringer sammensetninger og fremgangsmåter for behandling av gikt (f.eks., akutt gikt, kronisk gikt, refraktær gikt). Fremgangsmåtene beskrevet heri omfatter, for eksempel, å administrere et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav. Fremgangsmåter som direkte målretter IL-1 β -liganden med et antistoff, spesielt antistoffer som fremviser høy affinitet, gir fordeler fremfor andre potensielle fremgangsmåter for behandling, slik som IL-1 β reseptorantagonister (f.eks., IL-1Ra, Anakinra). Utfordringen med IL-1-reseptorantagonist-baserte terapeutika er kravet om at slike terapeutika må okkupere et stort antall reseptorer, hvilket er en formidabel oppgave siden disse reseptorene blir omfattende uttrykt på alle celler med unntak av røde blodlegemer (Dinarelo, *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:378-385, 2004). I de fleste immunmedierte sykdommer, slik som sykdommene beskrevet heri, er mengden av IL-1 β cytokin som er målbar i kroppsvæsker eller assosiert med aktiverte celler relativt lav. Følgelig skulle en fremgangsmåte for behandling og/eller forebygging som direkte målretter IL-1 β -liganden tilveiebringe en bedre strategi, spesielt ved administrering av et IL-1 β -antistoff med høy affinitet.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse angår et anti-IL-1 β antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling og/eller forebygging av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6. Slike antistoffer eller fragmenter derav kan anvendes for behandling av et mammalsk individ (f.eks., et menneske) som lider av gikt eller har risiko for å få gikt. Antistoffene eller fragmentene derav kan også anvendes for å forebygge forekomst av gikt hos et risikoindivid.

I én utførelsesform av oppfinnelsen er gikten kronisk gikt. I en annen utførelsesform er gikten akutt gikt. I enda en annen utførelsesform er gikten refraktær gikt.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti IL-1 β antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ (f.eks., et menneske), hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, anvendelsen omfatter å administrere (f.eks. i en terapeutisk effektiv mengde) anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori dosen av antistoffet eller fragmenter er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte. I én utførelsesform er anti- IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav tilstrekkelig til å oppnå 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.

I et annet aspekt av oppfinnelsen er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 20 % reduksjon av nivåer av C-reaktivt protein (CRP), minst 30 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 60 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 70 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 80 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 90 % reduksjon av CRP-nivåer. I en foretrukket utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte og minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 30 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 60 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 70 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 80 % reduksjon av CRP-nivåer, og/eller minst 90 % reduksjon av CRP-nivåer.

I et annet aspekt av oppfinnelsen er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 20 % reduksjon av erythrocytt sedimentasjonsrate (ESR), minst 40 % reduksjon av ESR, minst 50 % reduksjon av ESR, minst 60 % reduksjon av ESR, minst 70 % reduksjon av ESR, minst 80 % reduksjon av ESR, minst 90 % reduksjon av ESR. I en foretrukket utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte og minst 20 % reduksjon av ESR, minst 40 % reduksjon av ESR, minst 50 % reduksjon av ESR, minst 60 % reduksjon av ESR, minst 70 % reduksjon av ESR, minst 80 % reduksjon av ESR, og/eller minst 90 % reduksjon av ESR.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ (f.eks. et menneske), hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere (f.eks. i en terapeutisk effektiv mengde) anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I én utførelsesform er dosen av antistoffet eller

fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 30 % reduksjon av CRP-nivåer og 30 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 40% reduksjon av CRP-nivåer og 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti IL-1 β -antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 50 % reduksjon av ESR. I enda en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 50 % reduksjon av ESR.

Anti-IL-1 β -antistoffene eller antistoff-fragmentene for anvendelse ved fremgangsmåtene beskrevet heri binder generelt til IL-1 β med høy affinitet. I én foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ (f.eks., et menneske), hvor antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere (f.eks. i en terapeutisk effektiv mengde) anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori antistoffet eller fragmentet binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på omtrent 1 pM eller mindre.

I et annet aspekt av oppfinnelsen er anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet et nøytraliserende antistoff. I et annet aspekt av oppfinnelsen binder anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet til en IL-1 β epitop slik at det bundne antistoffet eller fragmentet hovedsakelig tillater binding av IL-1 β til IL-1-reseptor I (IL-1RI). I et annet aspekt av oppfinnelsen binder anti-IL-1 β -antistoffet eller antistoff-fragmentet til IL-1 β , men forhindrer ikke i vesentlig grad det bundne IL-1 β fra å binde til IL-1 reseptor I (IL-1RI). I et annet aspekt av oppfinnelsen binder ikke antistoffet eller antistoff-fragmentet detekterbart til IL-1 α , IL-1R eller IL-1Ra. I enda et annet aspekt av oppfinnelsen binder antistoffet eller antistoff-fragmentet til en epitop inneholdt i sekvensen ESDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1). I et annet aspekt av

oppfinnelsen konkurrerer antistoffet eller fragmentet derav med binding av et antistoff som har lett kjede regionen ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6.

I enda et annet aspekt av oppfinnelsen binder antistoffet eller antistofffragmentet til aminosyrene 1-34 av den N-terminale enden av IL-1 β . Foretrukket er antistoffet eller antistofffragmentet humant konstruert, humanisert eller humant.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av et individ (f.eks., mammalsk, humant) som fremviser symptomer på, eller er med risiko for å utvikle, gikt, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet i én eller flere doser.

I et annet aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes et anti IL-1 β antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ (f.eks., mammalsk, humant), hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til mennesket, hvori administrering av en initiell dose av IL-1 β antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser. I én utførelsesform blir administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet fulgt av administrering av to eller flere etterfølgende doser. I en annen utførelsesform blir administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori nevnte ene eller flere etterfølgende doser er i en mengde som er omtrent lik eller mindre enn den initielle dosen. I en annen utførelsesform blir administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori minst én av de etterfølgende dosene er i en mengde som større enn den initielle dosen. I enda en annen utførelsesform finner administrering av antistoffet eller antistofffragmentet sted én gang for hver episode av akutt gikt. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:6 til IL-1 β .

I én utførelsesform blir to eller flere, tre eller flere, fire eller flere, fem eller flere, seks eller flere, sju eller flere, åtte eller flere, ni eller flere, ti eller flere eller elleve eller flere etterfølgende doser av antistoffet administrert. I en annen utførelsesform blir administrering av den initielle dosen og hver av én eller flere etterfølgende doser atskilt

fra hverandre med et intervall på minst omtrent to uker, minst omtrent tre uker, minst omtrent én måned, minst omtrent to måneder, minst omtrent tre måneder, minst omtrent fire måneder, minst omtrent fem måneder, minst omtrent seks måneder, minst omtrent sju måneder, minst omtrent åtte måneder, minst omtrent ni måneder, minst omtrent ti måneder, minst omtrent elleve måneder, eller minst omtrent tolv måneder. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I en annen utførelsesform blir antistoffet eller fragmentet administrert i én eller flere doser på 5 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 3 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 2 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 1 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,75 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,5 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,3 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,1 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,03 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,01 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,003 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment eller 0,001 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment. Foretrukket blir, i hver av de tidligere nevnte utførelsesformene, antistoffet eller fragmentet administrert i én eller flere doser på minst 0,01 mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,01 mg/kg antistoff eller fragment, eller minst 0,03 mg/kg antistoff eller fragment. Foretrukket blir antistoffet eller fragmentet administrert i én eller flere doser på 0,001 mg/kg til 1 mg/kg, 0,001 mg/kg til 0,3 mg/kg, 0,003 mg/kg til 1 mg/kg, 0,003 mg/kg til 0,3 mg/kg. De ovennevnte doseringsmengdene refererer til mg (antistoff eller fragment)/kg (vekten av individet som skal behandles). I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I en annen utførelsesform er den initielle dosen og én eller flere etterfølgende doser av antistoff eller fragment derav hver på fra omtrent 0,01 mg/kg til omtrent 10 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,03 til omtrent 1 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,03 til omtrent 0,3 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,05 til omtrent 5 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,05 mg/kg til omtrent 3 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 3 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 1 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 0,5 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,3 mg/kg til omtrent 5 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,3 mg/kg til omtrent 3 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,3 mg/kg til omtrent 1

mg/kg antistoff, fra omtrent 0,5 mg/kg til omtrent 5 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,5 mg/kg til omtrent 3 mg/kg antistoff, fra omtrent 0,5 mg/kg til omtrent 1 mg/kg antistoff, fra omtrent 1 mg/kg til omtrent 5 mg/kg antistoff, eller fra omtrent 1 mg/kg til omtrent 3 mg/kg antistoff. I visse utførelsesformer blir to eller flere, tre eller flere, fire eller flere, fem eller flere, seks eller flere, sju eller flere, åtte eller flere, ni eller flere, ti eller flere eller elleve eller flere etterfølgende doser av antistoffet eller fragmentet administrert. De ovennevnte doseringsmengdene refererer til mg (antistoff eller fragment)/kg (vekt av individet som skal behandles). Det samme gjelder i det følgende dersom en doseringsmengde blir nevnt. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ (f.eks., et menneske), hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet som en initiell dose på omtrent 5 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 3 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 2 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 1 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,75 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,5 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,3 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, 0,1 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, eller 0,03 mg/kg eller mindre av antistoff eller fragment, og en rekke etterfølgende doser av antistoff eller fragment i en mengde omtrent lik eller mindre enn den initielle dosen. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

Foretrukket er, i de tidligere nevnte utførelsesformene hvori antistoffet eller fragmentet blir administrert som en initiell dose og en rekke etterfølgende doser, dosen av antistoff eller fragment minst 0,001 mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,003 mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,01 mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,03 mg/kg antistoff eller fragment, minst 0,05 mg/kg antistoff eller fragment, eller minst 0,09 mg/kg antistoff eller fragment. I disse utførelsesformene kan det anvendes, for eksempel, et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff

eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I enda et annet aspekt av oppfinnelsen blir antistoffet eller fragmentet administrert som en fastsatt dose, uavhengig av en dose per individ vektforhold. I én utførelsesform blir antistoffet eller fragmentet administrert i én eller flere faste doser på 1000 mg eller mindre av antistoff eller fragment, 750 mg eller mindre av antistoff eller fragment, 500 mg eller mindre av antistoff eller fragment, 250 mg eller mindre av antistoff eller fragment, 100 mg eller mindre av antistoff eller fragment, omtrent 25 mg eller mindre av antistoff eller fragment, omtrent 10 mg eller mindre av antistoff eller fragment eller omtrent 1,0 mg eller mindre av antistoff eller fragment. I en annen utførelsesform, blir antistoffet eller fragmentet administrert i én eller flere faste doser på minst omtrent 0,1 mg antistoff eller fragment, minst omtrent 1 mg antistoff eller fragment, minst omtrent 5 mg antistoff eller fragment, eller minst omtrent 10 mg antistoff eller fragment. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I visse utførelsesformer er den faste dosen fra omtrent 1 mg til omtrent 10 mg, omtrent 1 mg til omtrent 25 mg, omtrent 10 mg til omtrent 25 mg, omtrent 10 mg til omtrent 50 mg, omtrent 10 mg til omtrent 100 mg, omtrent 25 mg til omtrent 50 mg, omtrent 25 mg til omtrent 100 mg, omtrent 50 mg til omtrent 100 mg, omtrent 50 mg til omtrent 150 mg, omtrent 100 mg til omtrent 150 mg, omtrent 100 mg til omtrent 200 mg, omtrent 150 mg til omtrent 200 mg, omtrent 150 mg til omtrent 250 mg, omtrent 200 mg til omtrent 250 mg, omtrent 200 mg til omtrent 300 mg, omtrent 250 mg til omtrent 300 mg, omtrent 250 mg til omtrent 500 mg, omtrent 300 mg til omtrent 400 mg, omtrent 400 mg til omtrent 500 mg, omtrent 400 mg til omtrent 600 mg, omtrent 500 mg til omtrent 750 mg, omtrent 600 mg til omtrent 750 mg, omtrent 700 mg til omtrent 800 mg, omtrent 750 mg til omtrent 1000 mg. I en foretrukket utførelsesform blir den faste dosen administrert i én eller flere doser på omtrent 0,1 mg til omtrent 100 mg, omtrent 1,0 mg til omtrent 100 mg eller omtrent 1,0 mg til omtrent 50 mg. I en annen foretrukket utførelsesform blir den faste dosen valgt fra gruppen bestående av omtrent 1 mg til omtrent 10 mg, omtrent 1 mg til omtrent 25 mg, omtrent 10 mg til omtrent 25 mg, omtrent 10 mg til omtrent 100 mg, omtrent 25 mg til omtrent 50 mg, omtrent 50 mg til omtrent 100 mg, omtrent 100 mg til omtrent 150 mg, omtrent 150 mg til omtrent 200 mg, omtrent 200 mg til omtrent 250 mg. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et

nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistoff-fragment hos mennesket tillates å reduseres til under et nivå på omtrent 0,1 ug/ml for et tidsrom lengre enn omtrent 1 uke og mindre enn omtrent 6 måneder mellom administreringer under et behandlingsforløp med nevnte initielle dose og én eller flere etterfølgende doser. I én utførelsesform tillates plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistofffragment å reduseres til under et nivå på omtrent 0,07 ug/ml, omtrent 0,05 ug/ml, omtrent 0,03 ug/ml eller omtrent 0,01 ug/ml i et tidsrom lengre enn omtrent 1 uke og mindre enn omtrent 5 måneder, omtrent 4 måneder, omtrent 3 måneder, omtrent 2 måneder, omtrent 1 måned, omtrent 3 uker, eller omtrent 2 uker mellom administreringer. I én utførelsesform refererer disse plasmaverdiene til verdier oppnådd for et individ som blir behandlet med antistoffet eller fragment i overensstemmelse med oppfinnelsen. I én utførelsesform kan et slikt individ være en pasient som lider av gikt. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

Oppfinnelsen angår at anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet for anvendelse som beskrevet heri, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, kan administreres i hvilke som helst av de tidligere nevnte doseringsmengdene, antall etterfølgende administreringer, og doseringsintervaller mellom administreringer, og at hvilke som helst av de beskrevne doseringsmengdene, antall etterfølgende administreringer, og doseringsintervaller mellom administreringer kan kombineres med hverandre i alternative regimer for å modulere den terapeutiske nytten. I visse utførelsesformer er den ene eller de flere etterfølgende dosene i en mengde som er omtrent lik eller mindre enn den første dosen administrert. I en annen utførelsesform er

den ene eller de flere etterfølgende dosene i en mengde som er tilnærmedesvis større enn den første dosen administrert. Foretrukket blir anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet administrert ved subkutan, intramuskulær eller intravenøs injeksjon. Oppfinnelsen angår at hver dose av antistoff eller fragment kan administreres ved ett eller flere steder. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I én utførelsesform blir anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, administrert i kombinasjon med minst én annen alminnelig anerkjent medisinsk behandling for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen. I en annen utførelsesform blir den minst ene andre alminnelig anerkjente medisinske behandlingen for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen redusert eller stanset, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir opprettholdt ved et konstant doseringsregime. I en annen utførelsesform blir den minst ene andre alminnelig anerkjente medisinske behandlingen for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen redusert eller stanset, og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert. I en annen utførelsesform blir den minst ene andre alminnelig anerkjente medisinske behandlingen for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen redusert eller stanset, og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet økes. I enda en annen utførelsesform blir den minst ene andre alminnelig anerkjente medisinske behandlingen for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen opprettholdt, og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert eller stanset. I enda en annen utførelsesform blir den minst ene andre alminnelig anerkjente medisinske behandlingen for sykdommen, lidelsen eller komplikasjonen og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet redusert eller stanset. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt er anti-IL-1 β -antistoff eller fragment, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, for anvendelser tilveiebrakt heri i forbindelse med minst én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter å administrere minst ett farmasøytisk preparat omfattende et aktivt middel

annet enn IL-1 β antistoffet eller fragmentet. I enda et annet aspekt forhindrer eller forsinker anvendelsene behovet for minst én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter å administrere minst ett farmasøytisk preparat omfattende et aktivt middel annet enn IL-1 β antistoffet eller fragmentet. I enda et annet aspekt reduserer anvendelsene mengden, hyppigheten eller varigheten av minst én ytterligere behandlingsmetode, hvor nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter å administrere minst ett farmasøytisk preparat omfattende et aktivt middel annet enn IL-1 β antistoffet eller fragmentet. I enda en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet opprettholdt. I en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet redusert eller stanset, mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir opprettholdt ved et konstant doseringsregime. I en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet redusert eller stanset og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert. I en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet redusert eller stanset, og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir økt. I enda en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet opprettholdt og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert eller stanset. I enda en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet og behandling med anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet redusert eller stanset. I konteksten til disse utførelsesformene er det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori plasmakonsentrasjonen av nevnte antistoff eller antistoff-fragment hos mennesket opprettholdes ved et nivå på minst omtrent 0,03 ug/ml, minst omtrent 0,05 ug/ml, minst omtrent 0,08 ug/ml, minst omtrent 0,1 ug/ml, minst omtrent 0,15 ug/ml, minst omtrent 0,2 ug/ml, minst omtrent 0,25 ug/ml, minst omtrent 0,3 ug/ml, minst omtrent 0,4 ug/ml, minst omtrent 0,5 ug/ml, minst omtrent 0,6 ug/ml, minst omtrent 0,8 ug/ml, minst omtrent 1 ug/ml, minst omtrent 1,5 ug/ml, minst omtrent 2 ug/ml, minst omtrent 3 ug/ml, minst omtrent 4 ug/ml, eller minst omtrent 5 ug/ml under et behandlingsforløp med nevnte initielle dose

og én eller flere etterfølgende doser. I én utførelsesform refererer disse plasmaverdiene til verdier oppnådd for et individ som blir behandlet med antistoffet eller fragmentet i overensstemmelse med oppfinnelsen. I én utførelsesform kan et slikt individ være en pasient som lider av gikt. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lavere IC₅₀ enn en IL-1 β -reseptorantagonist i en human helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én utførelsesform har antistoffet eller fragmentet en IC₅₀ som er mindre enn omtrent 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % av IC₅₀ for en IL-1 β -reseptor-antagonist i en human helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I en ytterligere utførelsesform har antistoffet eller fragmentet en IC₅₀ som er mindre enn omtrent 40 %, 30 %, 20 %, 10 % av IC₅₀ for en IL-1 β -reseptor-antagonist i en human helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I en foretrukket utførelsesform har antistoffet eller fragmentet en IC₅₀ som er mindre enn omtrent 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % av IC₅₀ for en IL-1 β reseptor-antagonist i en human helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én utførelsesform er IL-1 β -reseptor-antagonisten anakinra (dvs., Kineret®). I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av nevnte anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvori antistoffet eller fragmentet derav tilveiebringer *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 hos mus sammenlignet med et kontrollantistoff ved anvendelse av en analyse som er beskrevet av Economides et al., *Nature Med.*, 9:47-52

(2003). I én utførelsesform tilveiebringer antistoffet eller fragmentet *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 i mus på minst omtrent 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % sammenlignet med kontrollantistoffet. I en ytterligere utførelsesform tilveiebringer antistoffet eller fragmentet *in vivo* inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-6 i mus på minst omtrent 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % sammenlignet med kontrollantistoffet. I én utførelsesform er kontrollantistoffet et isotype kontrollantistoff. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et anti IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti-IL-1 β antistoffet eller fragmentet derav til individet, hvori antistoffet eller fragmentet derav inhiberer *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod sammenlignet med en kontroll hvor det ikke anvendes noe antistoff. I én utførelsesform tilveiebringer antistoffet eller fragmentet et høyere nivå av inhibering av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod på minst omtrent 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % sammenlignet med kontrollen. I en ytterligere utførelsesform tilveiebringer antistoffet eller fragmentet et høyere nivå av inhibering av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod på minst omtrent 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % sammenlignet med kontrollen. I én utførelsesform er de inhiberte cytokinene IL-1 β , IL-1a, IL-6, IL-8, IL-1Ra, TNF α eller IFN γ . I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt beskriver oppfinnelsen et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, og som har en lavere IC₅₀ enn en IL-1 β -reseptor-antagonist i en humant helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8. I én utførelsesform er IL-1 β reseptor-antagonisten anakinra (dvs., Kineret®). I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistofffragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre

enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt av oppfinnelsen er et medikament for anvendelse ved behandling eller forebygging av gikt omfattet, omfattende et IL-1 β -antistoff eller fragment derav, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6. I hvilke som helst av disse anvendelsene kan medikamentet koordineres med behandling ved anvendelse av et andre aktivt middel. En annen utførelsesform av oppfinnelsen angår en synergistisk kombinasjon av antistoffet ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling av en pasient som fremviser symptomer på at den er med risiko for å utvikle en sykdom eller lidelse som beskrevet heri, hvori medikamentet blir koordinert med behandling ved anvendelse av et andre aktivt middel. Utførelsesformer ifølge hvilke som helst av de tidligere nevnte anvendelsene er medregnet hvori mengden av det IL-1 β -bindende antistoffet eller fragmentet i medikamentet er i en dose effektiv for å redusere dosen av andre aktivt middel nødvendig for å oppnå en terapeutisk effekt. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I enda et annet aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremstillingsartikkel, omfattende en beholder, en sammensetning inne i beholderen inneholdende et anti-IL-1 β antistoff eller fragment derav, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, og et pakningsvedlegg inneholdende instruksjoner for å administrere antistoffet eller fragmentet til et menneske med behov for behandling i henhold til de tidligere nevnte fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. I én utførelsesform omfatter beholderen videre en farmasøytisk passende bærer, hjelpestoff eller fortynningsmiddel. I en beslektet utførelsesform omfatter sammensetningen inne i beholderen videre et andre aktivt middel. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

Sett er også omfattet av foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform omfatter et sett en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et anti-IL-1 β antistoff eller fragment, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge

SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, pakket i en beholder, slik som et hetteglass eller en flaske, og videre omfattende et merke festet til eller pakket sammen med beholderen, hvor merket beskriver innholdet i beholderen og tilveiebringer indikasjoner og/eller instruksjoner angående anvendelse av innholdet av beholderen for behandling eller forebygging av en sykdom eller lidelse i henhold til de tidligere nevnte fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. I én utførelsesform omfatter beholderen videre en farmasøytisk passende bærer, hjelpestoff eller fortynningsmiddel. I en relatert utførelsesform inneholder beholderen videre et andre aktivt middel. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I én utførelsesform er fremstillingsartikkelen, settet eller medikamentet for anvendelse ved behandling eller forebygging av gikt hos et individ. I en annen utførelsesform omfatter instruksjonene fra et pakningsvedlegg fra en fremstillingsartikkel eller merket fra et sett instruksjoner for administrering av antistoffet eller fragmentet i henhold til hvilke som helst av de tidligere nevnte doseringsmengdene, antall av etterfølgende administreringer, og doseringsintervaller mellom administreringer, så vel som hvilken som helst kombinasjon av doseringsmengder antall etterfølgende administreringer, og doseringsintervaller mellom administreringer beskrevet heri. I konteksten til enda en annen utførelsesform, som er beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse, er beholderen av settet eller fremstillingsartikkelen en forhåndsfylt sprøyte. I disse utførelsesformene kan det anvendes, for eksempel, et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

I et annet aspekt av oppfinnelsen er det beskrevet et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av mononatriumurat (MSU)-krystall-indusert frigjøring av et proinflammatorisk cytokin hos et individ (f.eks., humant individ), hvor antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6; hvor nevnte anvendelse omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet derav til individet. I én utførelsesform er det proinflammatoriske cytokinet IL-1 β . I en annen utførelsesformer det proinflammatoriske cytokinet IL-6. I konteksten til disse utførelsesformene blir det beskrevet et antistoff eller antistoff-fragment (f.eks., et nøytraliserende antistoff) som binder til IL-1 β med en dissosiasjonskonstant på mindre

enn 100 pM. Et slikt antistoff eller fragment derav kan konkurrere med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β .

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

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 produksjon av IL-8.

Fig. 2A er et diagram som viser resultatene av et *in vitro* 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 frigjøring av IL-6, og sammenligner inhibering av human (panel A) versus mus (panel B) IL-1 β .

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

Fig. 4 er et diagram som viser serumkonsentrasjoner etter administrering av 0,3 eller 3 mg/kg av et anti-IL-1 β -antistoff i cynomolgus-aper.

Fig. 5 er et diagram som modell for plasmakonsentrasjonsprofiler for et anti-IL-1 β antistoff i cynomolgus-aper etter fem månedlige doser på 0,1, 0,3, 1 eller 3 mg/kg.

Fig. 6 er en tabell som viser reduksjon av *Staphylococcus epidermidis*-indusert cytokinproduksjon i humant helblod ved behandling med et anti-IL-1 β -antistoff.

Fig. 7 er et diagram som viser farmakokinetikken for AB7 hos mennesker etter administrering av en dose på 0,01 mg/kg antistoff.

Fig. 8 er et diagram som viser serumkonsentrasjoner etter administrering av 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 eller 1,0 mg/kg av et anti-IL-1 β -antistoff hos humane individer med type 2-diabetes.

Figur 9 er et diagram som viser median prosent endring i CRP ved dag 28 etter administrering av 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 eller 1,0 mg/kg av et anti-IL-1 β -antistoff til humane individer med type 2-diabetes.

Fig. 10A og 10B er diagrammer som viser effekt av et anti-IL-1 β -antistoff i en musemodell av MSU-krystallindusert akutt gikt.

DETALJERT BESKRIVELSE

Foreliggende oppfinnelse angår et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt (f.eks. akutt gikt, kronisk gikt, refraktær gikt) hos et individ, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvor anvendelsen omfatter å administrere til individet én eller flere doser av et anti-IL-1 β antistoff eller fragment derav. På grunn av problemene med gjeldende behandlinger, er nye behandlinger for behandling av gikt nødvendig for å erstatte eller komplettere tilgjengelige farmasøytiske tilnærminger. Anvendelsene beskrevet heri omfatter, for eksempel, administrering av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6. Anvendelser som direkte målretter IL-1 β -liganden med et antistoff, spesielt antistoffer som oppviser høy affinitet, tilveiebringer fordeler fremfor andre potensielle fremgangsmåter for behandling, slik som IL-1 β reseptor-antagonister (f.eks., IL-1Ra, Anakinra, Kineret®). Utfordringen med IL-1 reseptorantagonist-baserte terapeutika er kravet om at slike terapeutika må okkupere et stort antall reseptorer, hvilket er en formidabel oppgave siden disse reseptorene blir omfattende uttrykt på alle celler unntatt røde blodlegemer (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). I de fleste immunmedierte sykdommer, slik som sykdommene beskrevet heri, er mengden av IL-1 β -cytokin som er målbar i kroppsvæsker eller forbundet med aktiverte celler relativt lav. Som illustrert i eksemplene nedenfor, har vi overraskende funnet at antistoffer, slik som de beskrevet heri, kan anvendes for å oppnå det ønskede aktivitetsnivået over et bredt spekter av doser, inkludert ved svært lave doser. Følgelig skulle en fremgangsmåte for behandling og/eller forebygging som direkte målretter IL-1 β -liganden tilveiebringe en overlegen strategi.

IL-1 β er et proinflammatorisk cytokin utskilt av flere forskjellige celletyper inkludert monocytter og makrofager. Når det frigjøres som del av en inflammatorisk reaksjon, frembringer IL-1 β en rekke biologiske effekter, hovedsakelig mediert gjennom induksjon av andre inflammatoriske mediatorer slik som kortikotropin, blodplatefaktor-4, prostaglandin E2 (PGE2), IL-6 og IL-8. IL-1 β induserer både lokale og systemiske inflammatoriske effekter gjennom aktivering av IL-1-reseptoren funnet på nesten alle celletyper.

Interleukin-1 (IL-1)-familien av cytokiner har blitt implisert i atskillige sykdomstilstander slik som revmatoid artritt (RA), osteoartritt, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt (UC), septisk sjokk, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), astma, transplantat-mot-vert-sykdom, aterosklerose, adult T-celleleukemi, multippelt myelom, multippel sklerose, slag og Alzheimers sykdom. Medlemmer av IL-1-familien omfatter IL-1 α , IL-1 β og IL-1Ra. Selv om de er beslektet ved deres evne til å binde til IL-1-reseptorer (IL-1R1, IL-1R2), blir hvert av disse cytokinene uttrykt av et ulikt gen og har ulik primær aminsyresekvens. Videre kan den fysiologiske aktiviteten av disse cytokinene skjelles fra hverandre.

Forbindelser som avbryter IL-1-reseptor-signalering har blitt undersøkt som terapeutiske midler for behandling av IL-1-medierte sykdommer, slik som for eksempel noen av de tidligere nevnte sykdommene. Disse forbindelsene omfatter rekombinant IL-1Ra (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), IL-1-reseptor "trap"-peptid (Regeneron Inc., Tarrytown, NY), så vel som animalsk avledete IL-1 β -antistoffer og rekombinante IL-1 β -antistoffer og fragmenter derav.

Som angitt ovenfor har IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra) polypeptid blitt foreslått for anvendelse ved behandling av gikt (So et al., 2007, *ibid*; McGonagle et al., 2007, *ibid*), men det er fortsatt behov for effektive midler for behandling av gikt, spesielt slike som ikke krever daglige, gjentatte injeksjoner. En ytterligere utfordring for IL-1-reseptorantagonist-baserte terapeutiske midler er kravet om at slike terapeutika må okkupere et stort antall reseptorer, hvilket er en formidabel oppgave siden disse reseptorene blir omfattende uttrykt på alle celler unntatt røde blodlegemer (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). I de fleste immunmedierte sykdommer, slik som sykdommene beskrevet heri, er mengden av IL-1 β -cytokin som er målbar i kroppsvæsker eller forbundet med aktiverte celler relativt lav. Følgelig er en fremgangsmåte for behandling og/eller forebygging som direkte målretter IL-1 β -liganden en bedre strategi, spesielt ved administrering av et IL-1 β -antistoff med høy affinitet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav for anvendelse ved behandling og/eller forebygging av gikt hos et individ (f.eks. mammalsk, humant), hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6.

Som vist i eksempel 1 nedenfor, har vi overraskende funnet at et slikt antistoff (f.eks., med svært høy affinitet) kan være en mye mer potent inhibitor av IL-1 reaksjonsveien enn IL-1Ra (f.eks., Kineret[®]), og tilveiebringer en mulighet til å oppnå en terapeutisk effekt ved en lavere dose og/eller med mindre hyppig administrering enn nødvendig for andre medikamenter, slik som rekombinant IL-1Ra.

Slike anvendelser beskrevet heri med et IL-1 β -antistoff eller fragment kan omfatte behandling av et individ som lider av gikt (f.eks., akutt gikt, kronisk gikt,

refraktær gikt). Anvendelsene kan også omfatte forebygging av forekomsten av gikt (f.eks., akutt gikt, kronisk gikt, refraktær gikt) hos et risikoindivid.

Antistoffer, humaniserte antistoffer og humane konstruerte antistoffer

IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffer beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse kan tilveiebringes som polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer (mAbs), rekombinante antistoffer, kimære antistoffer, CDR-podede antistoffer, fullstendig humane antistoffer, enkeltkjede antistoffer, og/eller bispesifikke antistoffer, så vel som fragmenter, inkludert varianter og derivater derav, tilveiebrakt ved kjente teknikker, inkludert, men ikke begrenset til enzymatisk kløyving, peptidsyntese eller rekombinante teknikker.

Antistoffer omfatter generelt to tung kjede polypeptider og to lett kjede polypeptider, selv om enkelt-domene antistoffer som har én tung kjede og én lett kjede, og tung kjede antistoffer uten lette kjeder også er omfattet. Det finnes fem typer av tunge kjeder, betegnet alfa, delta, epsilon, gamma og mu, basert på aminosyresekvensen av det tung kjede konstante domenet. Disse forskjellige typene av tunge kjeder gir opphav til fem klasser av antistoffer, IgA (inkludert IgA₁ og IgA₂), IgD, IgE, IgG og IgM, henholdsvis, inkludert fire subklasser av IgG, det vil si IgG₁, IgG₂, IgG₃ og IgG₄. Det finnes også to typer av lette kjeder, kalt kappa (κ) eller lambda (λ) basert på aminosyresekvensen av de konstante domener. Et fullengde antistoff omfatter et konstant domene og et variabelt domene. Den konstante regionen trenger ikke å være til stede i et antigenbindende fragment av et antistoff. Antigenbindende fragmenter av et antistoff beskrevet heri kan omfatte Fab, Fab', F(ab')₂ og F(v) antistoff-fragmenter. Som diskutert mer detaljert nedenfor, omfatter IL-1 β -bindende fragmenter antistoff-fragmenter og antigenbindende polypeptider som vil binde IL-1 β .

Hver av de tung kjede og lett kjede-sekvensene av et antistoff, eller antigenbindende fragment derav, omfatter en variabel region med tre komplementaritetsbestemmende regioner (CDR'er) så vel som ikke-CDR rammeverk-regioner (FR). Betegnelsene "tung kjede" og "lett kjede", som anvendt heri, betyr tung kjede variabel region og lett kjede variabel region, henholdsvis, dersom ikke annerledes angitt. Tung kjede CDR'er er referert til heri som CDR-H1, CDR-H2 og CDR-H3. Lett kjede CDR'er er referert til heri som CDR-L1, CDR-L2 og CDR-L3. Variable regioner og CDR'er i en antistoffsekvens kan identifiseres (i) i henhold til generelle regler som er utviklet på området eller (ii) ved sammenstilling av sekvensene mot en database med kjente variable regioner. Metoder for identifisering av disse regionene er beskrevet i Kontermann og Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001, og Dinarello et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley og Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Databaser med antistoffsekvenser er beskrevet i og kan oppnås tilgang til gjennom

"The Kabatman" database ved www.bioinf.org.uk/abs (opprettet ved A.C. Martin i Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, London, England) og VBASE2 ved www.vbase2.org, som beskrevet i Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33(Database issue): D671-D674 (2005). "Kabatman"-database-nettsiden omfatter også generelle tommelfingerregler for identifisering av CDR'er. Betegnelsen "CDR," som anvendt heri, er som definert i Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, dersom ikke annerledes angitt.

Polyklonale antistoffer blir foretrukket fremkalt i dyr ved multiple subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigenet og en adjuvans. En forbedret antistoffrespons kan oppnås ved å konjugere det relevante antigenet til et protein som er immunogent i artene som skal immuniseres, f.eks., keyhole limpet hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin, eller soyatrypsin inhibitor ved anvendelse av et bifunksjonelt eller derivatiseringsmiddel, for eksempel, maleimidobenzoyl-sulfosuksinimidester (konjugasjon gjennom cysteinrester), N-hydroksysuksinimid (gjennom lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid eller andre midler kjent på området.

Monoklonale antistoff refererer til et antistoff oppnådd fra en populasjon av hovedsakelig homogene antistoffer. Monoklonale antistoffer er generelt høyst spesifikke, og kan være rettet mot et enkelt antigen sete, i motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffpreparater som typisk omfatter forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper). I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige ved at de syntetiseres av den homogene kulturen, ikke kontaminert av andre immunoglobuliner med ulike spesifisiteter og egenskaper.

Monoklonale antistoffer som skal anvendes i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved hybridom-metoden først beskrevet av Kohler et al., (*Nature*, 256:495-7, 1975), eller kan fremstilles ved rekombinant DNA-metoder (se, f.eks., U.S. Patent nr. 4,816,567). De monoklonale antistoffene kan også isoleres fra fag-antistoffbibliotekene ved anvendelse av teknikkene beskrevet i, for eksempel, Clackson et al., (*Nature* 352:624- 628, 1991) og Marks et al., (*J Mol. Biol.* 222:581-597, 1991).

Ved hybridom-metoden blir en mus eller annet passende vertsdyr, slik som en hamster eller makakeape, immunisert som heri beskrevet for å fremkalle lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som vil binde spesifikt til proteinet anvendt for immunisering. Alternativt kan lymfocytter immuniseres *in vitro*. Lymfocytter blir deretter fusjonert med myelomceller ved anvendelse av et passende fusjonerings-middel, slik som polyetylen glykol, for å danne en hybridomcelle (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, s. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Hybridomcellene fremstilt på denne måten blir sådd ut og dyrket i et egnet kulturmedium som foretrukket inneholder én eller flere substanser som hemmer vekst eller overlevelse av de ufusjonerte parentale myelomcellene. For eksempel dersom de parentale myelomcellene mangler enzymet hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HGPRT eller HPRT), vil dyrkingsmediet for hybridomene typisk omfatte hypoxantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), hvilke substanser forhindrer vekst av HGPRT-deficitte celler.

Foretrukne myelomceller er slike som fusjonerer effektivt, støtter stabil høynivå produksjon av antistoff ved de utvalgte antistoffproduserende cellene, og er følsomme for et medium. Humane myelom og mus-human heteromyelom cellelinjer har også blitt beskrevet for produksjon 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 myelom cellelinjer omfatter de avledet fra MOP-21 og M.C.-11 mus-tumorer tilgjengelig fra SaIk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, og SP-2 eller X63-Ag8-653-celler tilgjengelig fra American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.

Dyrkingsmedium i hvilket hybridomceller vokser blir analysert for produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Foretrukket blir bindingsspesifisiteten av monoklonale antistoffer produsert av hybridomceller bestemt ved immunpresipitering eller ved en *in vitro* bindingsanalyse, slik som radioimmunoassay (RIA) eller ELISA ("enzyme-linked immunoabsorbent assay"). Bindingsaffiniteten for det monoklonale antistoffet kan, for eksempel, bestemmes ved Scatchard analyse (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Etter at det er identifisert hybridomceller som produserer antistoffer med den ønskede spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved begrensende fortynningsmetoder og dyrkes ved standardmetoder (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, s. 59-103 (Academic Press, 1986)). Egnede kulturmedier for dette formål omfatter, for eksempel, DMEM eller RPMI-1640-medium. I tillegg kan hybridomcellene dyrkes *in vivo* som ascites tumorer i et dyr. De monoklonale antistoffene sekretet av subklonene blir hensiktsmessig separert fra dyrkingsmediet, ascitesvæske, eller serum ved konvensjonelle metoder for immunglobulinrensning slik som for eksempel, protein A-Sepharose, hydroksylapatitt-kromatografi, gelelektroforese, dialyse, eller affinitetsromatografi.

Det er videre omfattet at antistoffer ifølge oppfinnelsen kan anvendes som mindre antigenbindende fragmenter av antistoffet velkjent på området og beskrevet heri.

Foreliggende oppfinnelse angår IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffer som omfatter to fullengde tunge kjeder og to fullengde lette kjeder. Alternativt kan de IL-1 β -bindende antistoffene konstrueres slik som enkeltkjede antistoffer eller "mini" antistoffer

som bibeholder bindingsaktivitet til IL-1 β . Slike konstruksjoner kan fremstilles ved metoder kjent på området slik som for eksempel PCR-mediert kloning og sammensetting 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 type konstruksjon blir de variable delene av de tunge og lette kjedene av et antistoffmolekyl PCR-amplifisert fra cDNA. De resulterende amplicon blir deretter satt sammen, for eksempel, i et andre PCR-trinn, gjennom et linker-DNA som koder for en fleksibel protein-linker sammensatt av aminosyrene Gly og Ser. Denne linkerens tillater folding av de variable tunge og lett kjede-delene på en slik måte at den antigenbindende lomme regenereres og antigen bindes med affiniteter som ofte er sammenlignbare med det parentale fullengde dimeriske immunoglobulinmolekylet.

De IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter varianter av de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene beskrevet heri. Varianter omfatter peptider og polypeptider omfattende én eller flere aminosyresekvens-substitusjoner, delesjoner og/eller addisjoner som har samme eller hovedsakelig samme affinitet og spesifisitet av epitopbinding som ett eller flere av de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene beskrevet heri. Følgelig omfatter varianter peptider og polypeptider omfattende én eller flere aminosyresekvens-substitusjoner, delesjoner og/eller addisjoner til de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene beskrevet heri hvor slike substitusjoner, delesjoner og/eller addisjoner ikke fører til vesentlige endringer 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 antistoffet eller fragmentet har samme eller hovedsakelig samme affinitet og spesifisitet av epitopbinding som utgangsekvensen. Varianter kan være naturlig forekommende, slik som alleliske eller splice-varianter, eller kan være kunstig konstruert. Varianter kan fremstilles fra de korresponderende nukleinsyremolekylene som koder for 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* konstruksjon av native sekvenser ved anvendelse av rekombinant DNA-teknikker. Naturlig forekommende varianter omfatter "somatiske" varianter som er dannet *in vivo* i de tilsvarende kjønnselle-nukleotidsekvensene under generering av en antistoffrespons mot et fremmed antigen.

Varianter av IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffer og bindende fragmenter kan også fremstilles ved mutageneseteknikker. For eksempel kan aminosyreendringer innføres tilfeldig gjennom en hel antistoffkodende region og de resulterende varianter kan screenes for bindingsaffinitet for IL-1 β eller for en annen egenskap. Alternativt kan

aminosyreendringer innføres i utvalgte regioner av et IL-1 β -antistoff, slik som i de lett og/eller tung kjede CDR'er, og/eller i rammeverk-regionene, og de resulterende antistoffene kan screenes for binding til IL-1 β eller for en annen aktivitet.

Aminosyreendringer omfatter én eller flere aminosyresubstitusjoner i en CDR, som varierer fra en enkelt aminosyreforskjell til innføring av flere permutasjoner av aminosyrer innenfor i en gitt CDR, slik som CDR3. I en annen metode kan bidraget av hver rest innenfor en CDR til IL-1 β -binding vurderes ved å erstatte minst én rest innenfor 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. Også omfattet er varianter dannet ved insersjon av aminosyrer for å øke størrelsen av en CDR, slik som CDR3. For eksempel er de fleste lett kjede CDR3-sekvenser ni aminosyrer i lengde. 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 "kjede-stokking" 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 populasjonen blir screenet for en ønsket aktivitet, slik som binding til IL-1 β . Dette muliggjør screening av en større prøve av forskjellige tunge (eller lette) kjeder i kombinasjon med en enkelt lett (eller tung) kjede enn det som er mulig med biblioteker omfattende repertoarer av både tunge og lette kjeder.

De IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter derivater av de eksemplifiserte antistoffene, fragmentene og sekvensene beskrevet heri. Derivater omfatter polypeptider eller peptider, eller varianter, fragmenter eller derivater derav, som har blitt kjemisk modifisert. Eksempler omfatter kovalent binding av én eller flere polymerer, slik som vannløselige polymerer, N-bundne eller O-bundne karbohydrater, sukker, fosfater, og/eller andre slike molekyler. Derivatene er modifisert på en måte som er forskjellig fra naturlig forekommende eller utgangspeptid eller polypeptider, enten i type eller lokalisering av de tilkoblede molekylene. Derivater omfatter videre delesjon av én eller flere kjemiske grupper som er naturlig til stede på peptidet eller polypeptidet.

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være bispesifikke. Bispesifikke antistoffer eller fragmenter kan ha flere konfigurasjoner. For eksempel kan bispesifikke antistoffer likne enkle antistoffer (eller antistoff-fragmenter) men har to ulike antigenbindende seter (variable regioner). Bispesifikke antistoffer kan fremstilles ved kjemiske teknikker (Kranz *et al.* (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5807), ved "polydoma"-teknikker (U.S. Pat. nr. 4,474,893) eller ved rekombinant DNA-teknikker. Bispesifikke antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse

kan ha bindingsspesifisiteter for minst to ulike epitoper, av hvilke 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) bundet sammen, hvor hvert antistoff eller fragment har ulik spesifisitet.

Teknikker for å frembringe rekombinante DNA-versjoner av de antigenbindende regionene av antistoffmolekylene som omgår genereringen av monoklonale antistoffer er omfattet for de foreliggende IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffer og fragmenter. DNA blir klonet inn i et bakterielt ekspresjonssystem. Ett eksempel på en slik teknikk egnet for utøvelse av foreliggende oppfinnelse anvender et bakteriofag lambda vektorsystem som har en ledersekvens som får det uttrykte Fab-proteinet til å migrere til det periplasmatiske rom (mellom den bakterielle cellemembranen og celleveggen) eller til å bli utskilt. En kan hurtig danne og screene et stort antall funksjonelle Fab-fragmenter for de som binder IL-1 β . Slike IL-1 β -bindende midler (Fab-fragmenter med spesifisitet for et IL-1 β -polypeptid) er spesielt omfattet innenfor 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 humane konstruerte antistoffer. Som anvendt heri er et humanisert antistoff, eller antigenbindende fragment derav, et rekombinant polypeptid som omfatter en del av et antigenbindende sete fra et ikke-humant antistoff og en del av rammeverk-regionene og/eller konstante regioner av et humant antistoff. Et humant konstruert antistoff eller antistoff-fragment er et ikke-humant (f.eks., mus) antistoff som har blitt konstruert ved modifikasjon (f.eks., delesjon, insersjon eller substitusjon) av aminosyrer ved spesifikke posisjoner for derved å redusere eller fjerne enhver detekterbar immunogenisitet av det modifiserte antistoffet hos et menneske.

Humaniserte antistoffer omfatter kimære antistoffer og CDR-podede antistoffer. Kimære antistoffer er antistoffer som omfatter en ikke-humant antistoff variabel region koblet til en human konstant region. I kimære antistoffer, er den variable regionen følgelig overveiende ikke-human, og den konstante regionen er human. Kimære antistoffer og metoder for fremstilling derav er beskrevet i Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6841- 6855 (1984), Boulianne, et al., *Nature*, 312: 643-646 (1984), og i PCT søknad med publikasjonsnr. WO 86/01533. Selv om de kan være mindre immunogene enn et mus monoklonalt antistoff, har administreringer av kimære antistoffer vært forbundet med humane anti-mus antistoffresponser (HAMA) mot den ikke-humane delen av antistoffene. Kimære antistoffer kan også fremstilles ved spleising av genene fra et mus antistoffmolekyl med formålstjenlig antigenbindende spesifisitet sammen med gener fra et humant antistoffmolekyl med passende biologisk aktivitet, slik som evnen til å aktivere humant komplement og mediere ADCC. Morrison et al. (1984),

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

CDR-podede antistoffer er antistoffer som omfatter CDR'ene fra et ikke-humant "donor" antistoff bundet til rammeverk-regionen fra et humant "resipient" antistoff. Generelt omfatter CDR-podede antistoffer flere humane antistoffsekvenser enn kimære antistoffer fordi de omfatter både konstant region-sekvenser og variabel region rammeverk-sekvenser fra humane antistoffer. Følgelig kan, for eksempel, et CDR-graftet humanisert antistoff ifølge oppfinnelsen omfatte en tung kjede som omfatter en sammenhengende aminosyresekvens (f.eks., omtrent 5 eller flere, 10 eller flere, eller til og med 15 eller flere sammenhengende aminosyrerester) fra rammeverk-regionen fra et humant antistoff (f.eks., FR-1, FR-2, eller FR-3 fra et humant antistoff) eller, eventuelt, det meste av eller hele rammeverk-regionen av et humant antistoff. CDR-podede antistoffer og metoder for fremstilling derav er beskrevet i, Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), og Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)). Metoder som kan anvendes for fremstilling av humaniserte antistoffer er også beskrevet i U.S. patenter 4,816,567, 5,721,367, 5,837,243 og 6,180,377. CDR-podede antistoffer er ansett mindre tilbøyelige enn kimære antistoffer til å indusere en immunreaksjon mot ikke-humane antistoffdeler. Det har imidlertid blitt rapportert at rammeverk-sekvenser fra donor-antistoffene er nødvendig for bindingsaffiniteten og/eller spesifisiteten av donor-antistoffet, trolig fordi disse rammeverk-sekvensene påvirker foldingen av den antigenbindende delen av donor-antistoffet. Når ikke-humane CDR-donorsekvenser er graftet til uendrede humane rammeverk-sekvenser, kan det resulterende CDR-podede antistoffet derfor, i noen tilfeller, oppvise tap av bindingsaviditet i forhold til det opprinnelige ikke-humane donor-antistoffet. Se, f.eks., Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), og Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

Humane konstruerte antistoffer omfatter for eksempel "veneered" antistoffer og antistoffer fremstilt ved anvendelse av HUMAN ENGINEERING™ teknologi (se for eksempel, U.S. patenter 5,766,886 og 5,869,619). HUMAN ENGINEERING™ teknologi er kommersielt tilgjengelig, og omfatter endring av et ikke-humant antistoff eller antistoff-fragment, slik som et mus eller kimært antistoff eller antistoff-fragment, ved å foreta spesifikke endringer av aminosyresekvensen av antistoffet slik at det fremstilles et modifisert antistoff med redusert immunogenisitet i et menneske, men som likevel bibeholder de ønskede bindingsegenskapene til de opprinnelige ikke-humane antistoffene. Generelt omfatter teknikken klassifisering av aminosyrerester av et ikke-humant (f.eks., mus) antistoff som rester med "lav risiko", "moderat risiko" eller "høy risiko". Klassifiseringen foretas ved anvendelse av en global risiko/nytte beregning som evaluerer de forventede fordeler ved å foreta bestemte substitusjoner (f.eks., for

immunogenisitet i mennesker) mot risikoen for at substitusjonen vil påvirke det resulterende antistoffets folding og/eller antigenbindende egenskaper. En lav risiko-posisjon er en posisjon hvor en substitusjon forutses å være fordelaktig fordi de forventes å redusere immunogenisitet uten i vesentlig grad å påvirke antigenbindende egenskaper. En moderat risiko-posisjon er en posisjon for hvilken en substitusjon er predikert å redusere immunogenisitet, men som mer sannsynlig påvirker proteinfolding og/eller antigenbinding. Høy risiko-posisjoner inneholder rester som mest sannsynlig vil være involvert i riktig folding eller antigenbinding. Generelt blir lav risiko-posisjoner i et ikke-humant antistoff substituert med humane rester, høy risiko-posisjoner blir sjeldent substituert og humaniserende substitusjoner i moderat risiko-posisjoner foretas iblant, men ikke vilkårlig. Posisjoner med proliner i den ikke-humane antistoff variabel region-sekvensen er vanligvis klassifisert som i det minste moderat risiko-posisjoner.

Den bestemte humane aminosyreresten som skal substitueres ved en gitt lav eller moderat risiko-posisjon av en ikke-human (f.eks., mus) antistoffsekvens kan selekteres ved sammenstilling av en aminosyresekvens fra det ikke-humane antistoffets variable regioner med den tilsvarende regionen av en spesifikk eller konsensus human antistoffsekvens. Aminosyrerestene i lave eller moderate risikoposisjoner i den ikke-humane sekvensen kan erstattes med den tilsvarende resten i den humane antistoffsekvensen i henhold til sammenstillingen. Teknikker for fremstilling av humane konstruerte proteiner er beskrevet mer detaljert i Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), U.S. patenter 5,766,886, 5,770,196, 5,821,123 og 5,869,619, og PCT-søknad publikasjon WO 93/11794.

"Veneered" antistoffer er ikke-humane eller humaniserte (f.eks., kimære eller CDR- podede antistoffer) antistoffer som er konstruert for å erstatte visse løsningsmiddeleksponerte aminosyrerester for derved å ytterligere redusere deres immunogenisitet eller forsterke deres funksjon. Siden overflaterester av et kimært antistoff antas å ha mindre tendens til å påvirke riktig folding av antistoff og mer sannsynlig fremkaller en immunreaksjon, kan "veneering" av et kimært antistoff omfatte, for eksempel, å identifisere løsningsmiddeleksponerte rester i den ikke-humane rammeverk-regionen av et kimært antistoff og erstatte minst én av dem med de tilsvarende overflaterester fra en human rammeverk-region. "Veneering" kan oppnås ved hvilken som helst egnet manipuleringssteknikk, inkludert anvendelse av den ovenfor beskrevne HUMAN ENGINEERING™ teknologien.

I en annen metode kan gjenervervelse av bindingsaviditet oppnås ved "dehumanisering" av et CDR-graftet antistoff. De-humanisering kan omfatte gjenopprettelse av rester fra donor-antistoffets rammeverk-regioner til det CDR-podede antistoffet, for derved å gjenopprette riktig folding. Tilsvarende kan "de-humanisering" oppnås ved (i) å inkludere deler av "donor" rammeverk-regionen i "resipient"-antistoffet

eller (ii) poding av deler av "donor" antistoff rammeverk-regionen i resipient-antistoffet (sammen med de podede donor-CDR'ene).

For ytterligere diskusjon angående antistoffer, humaniserte antistoffer, humane konstruerte, og metoder for fremstilling derav, se Kontermann og Dubel, red., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001.

Eksempler på humaniserte eller humane konstruerte antistoffer omfatter IgG, IgM, IgE, IgA og IgD-antistoffer. Foreliggende antistoffer kan være av hvilken som helst klasse (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, osv.) eller isotype og kan omfatte en kappa eller lambda lett kjede. For eksempel kan et humant antistoff omfatte en IgG tung kjede eller definert fragment, slik som 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.

Foreliggende antistoffer og fragmenter kan være humane antistoffer, slik som antistoffer som binder IL-1 β -polypeptider og kodes for av nukleinsyresekvenser som er naturlig forekommende somatiske varianter av human kjønnselle immunglobulin nukleinsyresekvens, og fragmenter, syntetiske varianter, derivater og fusjoner derav. Slike antistoffer kan fremstilles ved hvilken som helst metode kjent på området, slik som ved anvendelse av transgene dyr (slik som transgene mus) i hvilke det native immunglobulinrepertoaret er erstattet med humane V-gener i pattedyrets kromosom. Slike pattedyr synes å utføre VDJ-rekombinasjon og somatisk hypermutasjon av de humane kjønnselle-antistoffgenene på normal måte, hvorved de produserer høyaffinitetsantistoffer med fullstendig humane sekvenser.

Humane antistoffer mot mål-protein kan også fremstilles ved anvendelse av transgene dyr som ikke har noen endogen immunglobulinproduksjon og er konstruert til å inneholde humane immunglobulin-loci. For eksempel beskriver WO 98/24893 transgene dyr som har et humant Ig-lokus hvori dyrene ikke produserer funksjonelle endogene immunglobuliner som følge av inaktivering av endogene tung og lett kjede loci. WO 91/00906 beskriver også transgene ikke-primate mammalske verter i stand til å fremkalle en immunrespons mot et immunogen, hvori antistoffene har primatens konstante og/eller variable regioner, og hvori de endogene immunglobulin-kodende loci er substituert eller inaktivert. WO 96/30498 og US Patent nr. 6,091,001 beskriver anvendelse av Cre/Lox-systemet for modifisering av immunglobulin-lokus i et pattedyr, slik som for å erstatte hele eller en del av den konstante eller variable regionen for å danne et modifisert antistoffmolekyl. WO 94/02602 beskriver ikke-humane pattedyrverter som har inaktiverte endogene Ig-loci og funksjonelle humane Ig-loci. U.S. patent nr. 5,939,598 beskriver metoder for fremstilling av transgene mus i hvilke musene mangler endogene tunge kjeder, og uttrykker et eksogent immunglobulin-lokus

omfattende én eller flere xenogene konstante regioner. Se også, U.S. patenter nr. 6,114,598 6,657,103 og 6,833,268.

Ved anvendelse av et transgent dyr beskrevet ovenfor, kan det fremkalles en immunrespons mot et utvalgt antigen molekyl, og antistoffproduserende celler kan fjernes fra dyret og anvendes for fremstilling av hybridomer som sekreterer humane monoklonale antistoffer. Immuniseringsmetoder, adjuvanser, og lignende er kjent på området, og blir anvendt ved immunisering av, for eksempel, en transgen mus som beskrevet i WO 96/33735. Denne publikasjonen beskriver monoklonale antistoffer mot mange forskjellige antigene molekyler inkludert IL-6, IL-8, TNFa, human CD4, L-selektin, gp39, og tetanustoksin. De monoklonale antistoffene kan testes for evnen til å inhibere eller nøytralisere den biologiske aktiviteten eller fysiologiske effekten av det korresponderende proteinet. WO 96/33735 beskriver at monoklonale antistoffer mot IL-8, avledet fra immunceller fra transgene mus immunisert med IL-8, blokkerte IL-8-induserte funksjoner av nøytrofiler. Humane monoklonale antistoffer med spesifisitet for antigenet anvendt for å immunisere transgene dyr er også beskrevet i WO 96/34096 og U.S. patentsøknad nr. 20030194404; og U.S. patentsøknad nr. 20030031667.

Ytterligere transgene dyr anvendelige for fremstilling av monoklonale antistoffer omfatter Medarex HuMAb-MOUSE®, beskrevet i U.S. Pat. nr. 5,770,429 og Fishwild, et al. (*Nat. Biotechnol.* 14:845-851, 1996), som inneholder gensekvenser fra ikke-rearrangerte humane antistoffgener som koder for de tunge og lette kjedene av humane antistoffer. Immunisering av en HuMAb-MOUSE® muliggjør produksjon av fullstendig humane monoklonale antistoffer mot mål-protein.

I tillegg beskriver Ishida et al. (*Cloning Stem Cells.* 4:91-102, 2002) TransChromo Mouse (TCMOUSE™) som omfatter megabase-store segmenter av humant DNA og som inkorporerer de fullstendige humane immunglobulin (hIg)-loci. TCMOUSE™ har et fullstendig diverst repertoar av hIg, inkludert alle subklassene av IgG (IgG1-G4). Immunisering av TC MOUSE™ med forskjellige humane antigener frembringer antistoffresponser omfattende humane antistoffer.

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. pat. nr. 5,591,669, U.S. patent nr. 5,589,369, U.S. patent nr. 5,545,807; og U.S. patentpublikasjon nr. 20020199213. U.S. patentpublikasjon nr. 20030092125 beskriver fremgangsmåter for å påvirke immunresponsen til et dyr i retning av den ønskede epitopen. Humane antistoffer kan også fremkalles ved *in vitro* aktiverte B-celler (se U.S. pat. nr. 5,567,610 og 5,229,275).

Humane antistoffer kan også fremkalles gjennom *in vitro* screening av antistoff display-biblioteker. Se Hoogenboom et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 227: 381; og Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222: 581. Forskjellige antistoff-inneholdende fagdisplay-biblioteker

har blitt beskrevet og kan lett fremstilles. Biblioteker kan inneholde et mangfold av humane antistoffsekvenser, slik som humane Fab, Fv, og scFv-fragmenter, som kan screenes mot et passende mål. Fagdisplay-biblioteker kan omfatte peptider eller proteiner andre enn antistoffer som kan screenes for å identifisere selektive bindende midler av IL-1 β .

Utviklingen av teknologier for fremstilling av repertoarer av rekombinante humane antistoffgener, og fremvisning av de kodede antistoff-fragmentene på overflaten av filamentøse bakteriofag, har gitt en fremgangsmåte for direkte fremstilling av humane antistoffer. Antistoffene fremstilt ved fag-teknologi blir fremstilt som antigenbindende fragmenter -vanligvis Fv eller Fab-fragmenter- i bakterier og mangler følgelig effektorfunksjoner. Effektorfunksjoner kan innføres ved én av to strategier: Fragmentene kan konstrueres enten til komplette antistoffer for ekspresjon i pattedyrceller, eller til bispesifikke antistoff-fragmenter med et andre bindingssete i stand til å utløse en effektorfunksjon.

Oppfinnelsen omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av målspesifikt antistoff eller antigenbindende del derav omfattende trinnet med å syntetisere et bibliotek av humane antistoffer på fag, screene biblioteket med mål-protein eller en del derav, isolere fag som binder målet, og oppnå antistoffet fra fagen. Som et eksempel omfatter én fremgangsmåte for fremstilling av biblioteket av antistoffer for anvendelse i fagdisplay-teknikker trinnene med immunisering av et ikke-humant dyr omfattende humane immunoglobulin-loci med mål-antigen eller en antigen del derav for å frembringe en immunrespons, ekstrahere antistoffproduserende celler fra det immuniserte dyret; isolere RNA fra de ekstraherte cellene, underlegge RNA'et revers transkripsjon for fremstilling av cDNA, amplifisere cDNA ved anvendelse av en primer, og insertere cDNA inn i en fagdisplay-vektor slik at antistoffer blir uttrykt på fagen. Rekombinante mål-spesifikke antistoffer ifølge oppfinnelsen kan oppnås på denne måten.

Fagdisplay-prosesser etterligner immunseleksjon gjennom fremvisning av antistoffrepertoarer på overflaten av filamentøse bakteriofag, og etterfølgende seleksjon av fag ved deres binding til et valgt antigen. En slik teknikk er beskrevet i WO 99/10494, som beskriver isolering av høyaffinitets og funksjonelle agonistiske antistoffer for MPL- og msk-reseptorer ved anvendelse av en slik fremgangsmåte. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan isoleres ved screening av et rekombinant kombinatorisk antistoff-bibliotek, foretrukket et scFv fagdisplay-bibliotek, fremstilt ved anvendelse av humant V_L og V_H cDNA fremstilt fra mRNA avledet fra humane lymfocytter. Metoder for fremstilling og screening av slike biblioteker er kjent på området. Se f.eks., U.S. patent nr. 5,969,108. Det finnes kommersielt tilgjengelige sett for fremstilling av fagdisplay-biblioteker (f.eks., Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, katalog nr. 27-9400-01; og Stratagene SurfZAP.TM. phage display kit, katalog nr. 240612). Det finnes også

andre metoder og reagenser som kan anvendes ved fremstilling og screening av antistoff display-biblioteker (se, f.eks., Ladner et al. U.S. patent nr. 5,223,409; Kang et al. PCT publikasjon nr. WO 92/18619; Dower et al. PCT publikasjon nr. WO 91/17271; Winter et al. PCT publikasjon nr. WO 92/20791; Markland et al. PCT publikasjon nr. WO 92/15679; Breitling et al. PCT publikasjon nr. WO 93/01288; McCafferty et al. PCT publikasjon nr. WO 92/01047; Garrard et al. PCT publikasjon nr. 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., *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) *Nucl Acid Res* 19:4133-4137; og Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982.

For å isolere humane antistoffer spesifikke for mål-antigenet med de ønskede egenskapene blir, i én utførelsesform, et humant V_H og V_L -bibliotek screenet for å selektere for antistoff-fragmenter med den ønskede spesifisiteten. Antistoffbibliotekene anvendt i denne fremgangsmåten er foretrukket scFv-biblioteker fremstilt og screenet som beskrevet heri og på området (McCafferty et al., PCT publikasjon nr. WO 92/01047, McCafferty et al., (*Nature* 348:552-554, 1990); og Griffiths et al., (*EMBO J* 12:725-734, 1993). scFv-antistoffbiblioteker blir foretrukket screenet ved anvendelse av mål-protein som antigenet.

Alternativt blir Fd-fragmentet (V_H-C_{H1}) og lett kjede (V_L-C_L) av antistoffer separat klonet ved PCR og rekombinert tilfeldig i kombinatoriske fagdisplay-biblioteker, som deretter kan selekteres for binding til et bestemt antigen. Fab-fragmentene blir uttrykt på fagoverflaten, dvs., fysisk koblet til genene som koder for dem. Seleksjon av Fab ved antigenbinding ko-selekterer følgelig for de Fab-kodende sekvensene, som deretter kan amplifiseres. Gjennom flere runder av antigenbinding og reamplifisering, en metode som betegnes panning, anrikes Fab spesifikt for antigenet og blir til slutt isolert.

I 1994 ble det beskrevet en metode for humanisering av antistoffer, kalt "guided selection". Guided selection gjør bruk av kraften i fagdisplayteknikken for humaniseringen av mus monoklonalt antistoff (Se Jespers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). For dette kan Fd-fragmentet av det mus monoklonale antistoffet fremvises i kombinasjon med et human lett kjede-bibliotek, og det resulterende hybrid Fab-biblioteket kan deretter selekteres med antigen. Mus Fd-fragmentet tilveiebringer derved et templat for å styre seleksjonen. Deretter blir de selekterte humane lette kjedene kombinert med et humant Fd-fragmentbibliotek. Seleksjon av det resulterende biblioteket gir fullstendig human Fab.

Mange forskjellige fremgangsmåter har blitt beskrevet for å oppnå humane antistoffer fra fagdisplay-biblioteker (Se for eksempel, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); U.S. patenter nr. 5,565,332 og 5,573,905; Clackson, T., og Wells, J. A., *TIBTECH* 12, 173-184 (1994)). Spesielt har *in vitro* seleksjon og utvikling av antistoffer avledet fra fagdisplay-biblioteker blitt et kraftfullt 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. patent publikasjon nr. 20020004215 og WO 92/01047; U.S. patent publikasjon nr. 20030190317; og U.S. patenter nr. 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. patent publikasjon nr. 20030044772, publisert 6. mars, 2003, beskriver metoder for screening av fag-uttrykte antistoffbiblioteker eller andre bindende molekyler ved "capture lift", en metode som omfatter immobilisering av kandidat-bindingsmolekyler til en fast bærer.

Fv-fragmenter blir fremvist på overflaten av fag, ved assosiasjon av én kjede uttrykt som en fagproteinfusjon (f.eks., med M13 gen III) med den komplementære kjeden uttrykt som et løselig fragment. Det er omfattet at fagen kan være en filamentøs fag slik som én fra klasse I-fagene: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff og én fra klasse II-fagene Xf, Pf1 og Pf3. Fagen kan være M13, eller fd eller et derivat derav.

Når de initielle humane V_L og V_H -segmentene er selektert, utføres "mix og match"-forsøk, i hvilke forskjellige par av de initielt selekterte V_L og V_H -segmentene blir screenet for mål-binding, for å selektere foretrukne V_L/V_H -kombinasjoner. For å ytterligere forbedre kvaliteten av antistoffet, kan V_L og V_H -segmentene av de foretrukne V_L/V_H -par bli tilfeldig mutert, foretrukket innenfor hvilken som helst av CDR1-, CDR2- eller CDR3-regionen av V_H og/eller V_L , i en prosess analog med den *in vivo* somatiske mutasjonsprosessen ansvarlig for affinitetsmodning av antistoffer under en naturlig immunrespons. Denne *in vitro* affinitetsmodningen kan oppnås ved amplifisering av V_L og V_H -regioner ved anvendelse av PCR-primere komplementære med V_H CDR1, CDR2 og CDR3, eller V_L CDR1, CDR2 og CDR3, henholdsvis, og hvor primere er blitt "spiked" med en tilfeldig blanding av de fire nukleotidbasene ved visse posisjoner slik at de resulterende PCR-produktene koder for V_L og V_H -segmenter inn i hvilke tilfeldige mutasjoner har blitt innført i V_H og/eller V_L CDR3-regionene. Disse tilfeldig muterte V_L og V_H -segmentene kan underlegges ny screening for binding til mål-antigen.

Etter screening og isolering av et mål-spesifikt antistoff fra et rekombinant immunglobulin display-bibliotek, kan nukleinsyre som koder for det selekterte antistoffet gjenvinnes fra display-pakken (f.eks., fra fag-genomet) og subklones inn i andre ekspresjonsvektorer ved standard rekombinant DNA-teknikker. Om ønsket kan

nukleinsyren manipuleres ytterligere for å danne andre antistoff-former ifølge oppfinnelsen, som beskrevet nedenfor. For å uttrykke et rekombinant humant antistoff isolert ved screening av et kombinatorisk bibliotek, blir DNA som koder for antistoffet klonet inn i en rekombinant ekspresjonsvektor og innført i en mammalsk vertscelle, som beskrevet heri.

Det er omfattet at fagdisplay-metoden kan utføres i en mutatorstamme av bakterier eller vertscelle. En mutatorstamme er en vertscelle som har en genetisk defekt som fører til at DNA replikert i denne blir mutert med hensyn til dens parentale DNA. Eksempler på mutatorstammer er NR9046mutD5 og NR9046mutT1.

Det er også omfattet at fagdisplay-metoden kan utføres ved anvendelse av en hjelper-fag. Dette er en fag som anvendes for å infisere celler inneholdende et defekt fag-genom og som bevirker komplementering av defekten. Det defekte fag-genomet kan være et fagmid eller en fag hvor noen funksjonskodende gensekvenser er fjernet. Eksempler på hjelperfag er M13K07, M13K07 gen III nr. 3; og fag som fremviser eller koder for et bindingsmolekyl fusjonert til et kapsidprotein.

Antistoffer blir også frembrakt via fagdisplay screeningsmetoder ved anvendelse av den hierarkiske dobbelt kombinatoriske tilnærming som beskrevet i WO 92/01047 i hvilken en individuell koloni inneholdende enten en H- eller L-kjede-klon blir anvendt for å infisere et fullstendig bibliotek av kloner som koder for den andre kjeden (L eller H) og det resulterende to-kjedede spesifikke bindingselementet blir selektert i henhold til fagdisplay-teknikker slik som de beskrevet deri. Denne teknikken er også beskrevet i Marks et al, (*Bio/Technology*, 10:779-783, 1992).

Metoder for fremvisning av peptider på overflaten av gjær og mikrobielle celler har også blitt anvendt for å identifisere antigenspesifikke antistoffer. Se for eksempel U.S. patent nr. 6,699,658. Antistoffbiblioteker kan være bundet til gjærproteiner, slik som agglutinin, som effektivt etterligner celleoverflate-display av antistoffer ved B-celler i immunsystemet.

I tillegg til fagdisplay-metoder kan antistoffer isoleres ved anvendelse av ribosom mRNA display-metoder og mikrobiell celle-displaymetoder. Seleksjon av polypeptid ved anvendelse av ribosom-display er beskrevet i Hanes et al., (*Proc. Natl Acad Sci USA*, 94:4937-4942, 1997) og U.S. pat. nr. 5,643,768 og 5,658,754 utstedt til Kawasaki. Ribosom-display er også anvendelig for hurtig storskala mutasjonsanalyse av antistoffer. Den selektive mutagenese-metoden tilveiebringer også en metode for fremstilling av antistoffer med forbedret aktivitet som kan selekteres ved anvendelse av ribosomale display-teknikker.

De IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffene og fragmentene kan omfatte én eller flere deler som ikke binder IL-1 β men i stedet er ansvarlig for andre funksjoner, slik som sirkulerende halveringstid, direkte cytotoxisk effekt, detekterbar merking eller aktivering

av mottagerens endogene komplementkaskade eller endogene cellulære cytotoxicitet. Antistoffene eller fragmentene kan omfatte hele eller en del av den konstante regionen og kan være av hvilken som helst isotype, inkludert IgA (f.eks., IgA1 eller IgA2), IgD, IgE, IgG (f.eks. IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4), eller IgM. I tillegg til, eller i stedet for, å omfatte en konstant region, kan antigenbindende komponenter ifølge oppfinnelsen omfatte en epitop-tag, en "rednings-" reseptor-epitop, en merkingsdel for diagnostiske formål eller for rensing, eller en cytotoksisk gruppe slik som et radionuklid eller toksin.

Den konstante regionen (når den er til stede) av foreliggende antistoffer og fragmenter kan være av γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2, eller δ eller ϵ -typen, foretrukket av γ -typen, mer foretrukket av γ -typen, mens den konstante delen av en human lett kjede kan være av κ eller λ -type (som omfatter λ ₁, λ ₂ og λ ₃ subtypene) men er foretrukket av κ -typen.

Varianter omfatter også antistoffer eller fragmenter omfattende en modifisert Fc-region, hvori den modifiserte Fc-regionen omfatter minst én aminosyremodifikasjon i forhold til en villtype Fc-region. Den varierte Fc-regionen kan være utformet, i forhold til et sammenlignbart molekyl omfattende 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 en modifisert Fc-region. Fc-region refererer til naturlig forekommende eller syntetiske polypeptider homologe med IgG C-terminalt domene som dannes ved papainklyvning av IgG. IgG Fc has en molekylvekt på omtrent 50 kD. I de foreliggende antistoffene og fragmentene kan det anvendes en hel Fc-region, eller kun en del som forlenger halveringstiden. I tillegg er mange modifikasjoner i aminosyresekvensen akseptable siden nativ aktivitet ikke i alle tilfeller er nødvendig eller ønskelig.

Fc-regionen kan være mutert, om ønsket, for å hemme dens evne til å fikserer komplement og binde Fc-reseptoren med høy affinitet. For murin IgG Fc, gjør erstatning av Glu 318, Lys 320 og Lys 322 med Ala-rester proteinet ute av stand til å dirigere ADCC. Erstatning av Leu 235 med Glu inhiberer proteinets evne til å binde Fc-reseptoren med høy affinitet. Forskjellige mutasjoner for human IgG også er kjent (se, f.eks., Morrison et al., 1994, *The Immunologist* 2: 119 124 og Brekke et al., 1994, *The Immunologist* 2: 125).

I noen utførelsesformer tilveiebringes foreliggende antistoffer eller fragmenter med en modifisert Fc-region hvor en naturlig forekommende Fc-region er modifisert for å øke halveringstiden av antistoffet eller fragmentet i et biologisk miljø, for eksempel serumhalveringstiden eller en halveringstid målt ved en *in vitro* analyse. Metoder for endring av den opprinnelige formen av en Fc-region av et IgG er også beskrevet i U.S. patent nr. 6,998,253.

I visse utførelsesformer kan det være ønskelig å modifisere antistoffet eller fragmentet for å øke dets serumhalveringstid, for eksempel ved å addere molekyler slik som PEG eller andre vannløselige polymerer, inkludert polysakkaridpolymerer, til antistoff-fragmenter for å øke halveringstiden. Dette kan også oppnås, for eksempel, ved inkorporering av en "rednings-" reseptor-bindende epitop i antistoff-fragmentet (f.eks., ved mutasjon av den passende region i antistoff-fragmentet eller ved å inkorporere epitopen i en peptid-tag som deretter fusjoneres til antistoff-fragmentet ved den ene enden eller i midten, f.eks., ved DNA eller peptidsyntese) (se, internasjonal publikasjon nr. WO96/32478). "Rednings"-reseptor-bindende epitop refererer 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-molekylet.

En "rednings"-reseptor-bindingsepitop kan omfatte en region hvori hvilken som helst eller flere aminosyrerester fra én eller to sløyfer av et Fc-domenet overføres til en analog posisjon av antistoff-fragmentet. Enda mer foretrukket blir tre eller flere rester fra én eller to sløyfer av Fc-domenet overført. Enda 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 mer 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 97/34631 og WO 96/32478 som beskriver Fc-varianter og deres interaksjon med "rednings"-reseptoren.

Mutasjon av rester innen Fc-reseptor bindingssteder kan resultere i endret effektorfunksjon, slik som endret ADCC eller CDC-aktivitet, eller endret halveringstid. Potensielle mutasjoner omfatter insersjon, delesjon eller substitusjon av én eller flere rester, inkludert substitusjon med alanin, en konservativ substitusjon, en ikke-konservativ substitusjon, eller erstatning med en tilsvarende aminosyrerest ved samme posisjon fra en ulik IgG subklasse (f.eks. erstatning av en IgG1-rest med en tilsvarende IgG2-rest ved denne posisjonen). For eksempel har det vært rapportert at mutasjon av serin ved aminosyreposisjon 241 i IgG4 til prolin (funnet ved denne posisjonen i IgG1 og IgG2) førte til produksjon av et homogent antistoff, så vel som å forlenge serumhalveringstid og forbedre vevsdistribusjon sammenlignet med det opprinnelige kimære IgG4. (Angal et al, *Mol Immunol.* 30:105-8, 1993).

Antistoff-fragmenter er deler av et intakt fullengde antistoff, slik som en antigenbindende eller variabel region av det intakte antistoffet. Eksempler på antistoff-fragmenter omfatter Fab, Fab', F(ab')₂, og Fv-fragmenter; diabodies; lineære antistoffer; enkeltkjede antistoffmolekyler (f.eks., scFv); multispesifikke antistoff-fragmenter slik 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} -innholdende antistoffer; og hvilke som helst andre polypeptider dannet fra antistoff-fragmenter.

Foreliggende oppfinnelse omfatter IL-1 β -bindende antistoff-fragmenter omfattende hvilke som helst av de førnevnte tung eller lett kjede-sekvenser og som binder IL-1 β . Betegnelsen fragmenter som anvendt heri refererer til hvilke som helst 3 eller flere sammenhengende aminosyrer (f.eks., 4 eller flere, 5 eller flere 6 eller flere, 8 eller flere, eller til og med 10 eller flere sammenhengende aminosyrer) av antistoffet og omfatter Fab, Fab', F(ab')₂, og F(v)-fragmenter, eller de individuelle lett eller tung kjede variable regioner eller deler derav. IL-1 β -bindende fragmenter omfatter, for eksempel, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv og scFv. Disse fragmentene mangler Fc-fragmentet av et intakt antistoff, utskilles hurtigere fra sirkulasjonen, og kan ha mindre uspesifikk vevsbinding enn et intakt antistoff. Se Wahl et al. (1983), J. Nucl. Med., 24: 316-25. Disse fragmentene kan fremstilles fra intakte antistoffer ved anvendelse av velkjente metoder, for eksempel ved proteolytisk kløyving med enzymer slik som papain (for fremstilling av Fab-fragmenter) eller pepsin (for fremstilling av F(ab')₂-fragmenter).

In vitro og cellebaserte analyser er beskrevet på området for anvendelse ved bestemmelse av binding av IL-1 β til IL-1 reseptortype I (IL-1R1), inkludert analyser som bestemmer i nærvær av molekyler (slik som antistoffer, antagonister eller andre inhibitorer) som binder til IL-1 β eller IL-1R1. (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; Fredericks 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, inkludert human IL-1 reseptortype I, for slike analyser er lett tilgjengelig fra mange forskjellige 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 anvendelse av standard molekylærbiologi- og transfeksjonsteknikker kjent på området. Den uttrykte IL-1 reseptortype I kan deretter isoleres og renses for anvendelse i bindingsanalyser, eller alternativt anvendes direkte i en celleassosiert form.

For eksempel kan binding av IL-1 β til IL-1 reseptortype I bestemmes ved å immobilisere et IL-1 β -bindende antistoff, bringe IL-1 β i kontakt med det immobiliserte antistoffet og bestemme hvorvidt IL-1 β ble bundet til antistoffet, og bringe en løselig form av IL-1RI i kontakt med det bundne IL-1 β /antistoffkomplekset og bestemme

hvorvidt det løselige IL-1RI er bundet til komplekset. Fremgangsmåten kan også innbefatte å bringe det løselige IL-1RI i kontakt med det immobiliserte antistoffet før kontakten med IL-1 β , for å bekrefte at det løselige IL-1RI ikke binder til det immobiliserte antistoffet. Denne fremgangsmåten kan gjennomføres ved anvendelse av et Biacore[®] instrument for kinetisk analyse av bindingsinteraksjoner. En slik fremgangsmåte kan også anvendes for å bestemme hvorvidt et antistoff eller annet molekyl tillater eller blokkerer bindingen av IL-1 β til IL-1 reseptortype I.

For andre IL-1 β /IL-1RI bindingsanalyser 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 -bindende fragmenter derav. Blokkering blir identifisert i analyseavlesningene som en angitt reduksjon av IL-1 β -binding til IL-1 reseptortype I i nærvær av anti-IL-1 β antistoffer eller IL-1 β -bindende fragmenter derav, sammenlignet med en kontrollprøve som inneholder den tilsvarende bufferen eller fortynningsmidlet men ikke et IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav. Analyseavlesningen kan kvalitativt anses å indikere tilstedeværelse eller fravær av blokkering, eller kan kvantitativt anses å indikere en prosent eller ganger reduksjon i binding som følge av tilstedeværelse av antistoffet eller fragmentet.

Alternativt eller i tillegg, når et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende fragment hovedsakelig blokkerer IL-1 β -binding til IL-1RI, blir IL-1 β -bindingen til IL-1RI redusert minst 10 ganger, alternativt minst omtrent 20 ganger, alternativt minst omtrent 50 ganger, alternativt minst omtrent 100 ganger, alternativt minst omtrent 1000 ganger, alternativt minst omtrent 10000 ganger, eller mer, sammenlignet med binding av samme konsentrasjoner av 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 hovedsakelig tillater IL-1 β -binding til IL-1RI, er IL-1 β binding til IL-1RI minst omtrent 90 %, alternativt minst omtrent 95 %, alternativt minst omtrent 99 %, alternativt minst omtrent 99,9 %, alternativt minst omtrent 99,99 %, alternativt minst omtrent 99,999 %, alternativt minst omtrent 99,9999 %, alternativt hovedsakelig identisk med binding av samme konsentrasjoner av IL-1 β og IL-1RI i fravær av antistoffet eller fragmentet.

I konteksten til foreliggende oppfinnelse er det beskrevet IL-1 β -bindende antistoffer eller IL-1 β -bindende fragmenter som binder til samme epitop eller hovedsakelig samme epitop som ett eller flere av de eksemplifiserte antistoffene beskrevet heri. Alternativt eller i tillegg konkurrerer de IL-1 β -bindende antistoffene eller IL-1 β -bindende fragmentene med binding av et antistoff som har variabel region sekvenser ifølge AB7, beskrevet i US søknad nummer 11/472813 eller WO 2007/002261 (sekvenser vist nedenfor). Som et eksempel, når et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende fragment konkurrerer med binding av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:6, kan binding

av et antistoff som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6 til IL-1 β bli redusert minst omtrent 2 ganger, alternativt minst omtrent 5 ganger, alternativt minst omtrent 10 ganger, alternativt minst omtrent 20 ganger, alternativt minst omtrent 50 ganger, alternativt minst omtrent 100 ganger, alternativt minst omtrent 1000 ganger, alternativt minst omtrent 10000 ganger, eller mer, dersom binding blir målt i nærvær av det IL-1 β -bindende antistoffet eller IL-1 β -bindende fragmentet. Det IL-1 β -bindende antistoffet eller IL-1 β -bindende fragmentet kan være til stede i overskudd av antistoffet som har lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO:6, for eksempel et overskudd på minst omtrent 2 ganger, alternativt minst omtrent 5 ganger, alternativt minst omtrent 10 ganger, alternativt minst omtrent 20 ganger, alternativt minst omtrent 50 ganger, alternativt minst omtrent 100 ganger, alternativt minst omtrent 1000 ganger, alternativt minst omtrent 10000 ganger. Alternativt eller i tillegg angår foreliggende oppfinnelse IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter som binder til en epitop inneholdt i aminosyresekvensen ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), en epitop som antistoffene betegnet AB5 og AB7 (US søknad nummer 11/472813, WO 2007/002261) binder til. Som angitt heri kan det lett bestemmes om et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment binder til samme epitop eller hovedsakelig samme epitop som ett eller flere av de eksemplifiserte antistoffene, slik som for eksempel antistoffet betegnet AB7, ved anvendelse av hvilke som helst av flere kjente metoder på området.

For eksempel kan nøkkel-aminosyrerestene (epitop) bundet av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment bestemmes ved anvendelse av en peptid "array", som for eksempel, en PepSpot™ peptid "array" (JPT Peptide Technologies, Berlin, Tyskland), hvor en skanning av tolv aminosyre peptider, som spenner over hele IL-1 β -aminosyresekvensen, hvor hvert peptid overlapper det foregående med 11 aminosyrer, blir syntetisert direkte på en membran. Membranen som bærer peptidene blir deretter probet med antistoffet som det søkes epitop-bindingsinformasjon om, for eksempel ved en konsentrasjon på 2 μ g/ml, i 2 t ved romtemperatur. Binding av antistoff til membranbundne peptider kan detekteres ved anvendelse av et sekundært HRP-konjugert geit anti-humant (eller mus, når passende) antistoff, etterfulgt av kjemiluminiscens (ECL) ("enhanced chemiluminescence"). Peptidflekkene som tilsvarende bestemte aminosyrerester eller sekvenser av det modne IL-1 β -proteinet, og som skårer positivt for antistoffbinding, indikerer epitopen bundet av det bestemte antistoffet.

Alternativt eller i tillegg kan det utføres antistoff konkurranseforsøk og slike analyser er velkjent på området. For eksempel for å bestemme om et antistoff eller fragment binder til en epitop inneholdt i en peptidsekvens omfattende aminosyrene ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), som svarer til restene 83-105 av det

modne IL-1 β -proteinet, kan et antistoff med ukjent spesifisitet sammenlignes med hvike som helst av de eksemplifiserte antistoffene (f.eks., AB7) ifølge foreliggende oppfinnelse som er kjent å binde til en epitop inneholdt i denne sekvensen. Bindingskonkurransforsøk kan utføres, for eksempel, ved anvendelse av et Biacore[®]-instrument for kinetisk analyse av bindingsinteraksjoner eller ved ELISA. I et slikt forsøk blir antistoffet med ukjent epitop-spesifisitet evaluert med hensyn til dets evne til å konkurrere om binding mot det kjente komparator-antistoffet (f.eks., AB7). Konkurrans om binding til en bestemt epitop blir bestemt gjennom en reduksjon i binding til IL-1 β -epitopen på minst omtrent 50 %, eller minst omtrent 70 %, eller minst omtrent 80 %, eller minst omtrent 90 %, eller minst omtrent 95 %, eller minst omtrent 99 % eller omtrent 100 % for det kjete komparator-antistoffet (f.eks., AB7) og indikerer binding til hovedsakelig samme epitop.

Med henblikk på identifiseringen i foreliggende beskrivelse av IL-1 β -bindende regioner i eksemplifiserte antistoffer og/eller epitoper gjenkjent av de beskrevne antistoffene, er det forventet at ytterligere antistoffer med lignende bindingsegenskaper og terapeutisk eller diagnostisk anvendelighet kan utvikles og som svarer til utførelsesformene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Antigenbindende fragmenter av et antistoff omfatter fragmenter som bibeholder evnen til å spesifikt binde til et antigen, generelt ved å beholde den antigenbindende delen av antistoffet. Det er godt dokumentert at den antigenbindende funksjonen av et antistoff kan utføres av fragmenter av et fullengde antistoff. Eksempler på antigenbindende deler omfatter (i) et 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 forbundet ved en disulfidbro ved hengselsregionen; (iii) et Fd-fragment som er VH- og CH1-domenene; (iv) et Fv-fragment som er VL- og VH-domenene av en enkelt arm 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 er også omfattet innenfor betegnelsen antigenbindende del av et antistoff. De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også monovalente eller multivalente, eller monomere eller multimere (f.eks. tetramere), CDR-avledete bindingsdomener med eller uten en skaffold, (for eksempel, protein eller karbohydrat "skaffolding").

De foreliggende IL-1 β -bindende antistoffene eller fragmentene kan være del av et større immunadhesjonsmolekyl, dannet ved kovalent eller ikke-kovalent assosiasjon av antistoffet eller antistoffdelen med ett eller flere andre proteiner eller peptider.

Eksempler på slike immunadhesjonsmolekyler omfatter anvendelse av streptavidin-kjerneregionen for fremstilling av et tetramert scFv-molekyl (Kipriyanov, S. M., et al.

(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) og anvendelse av en cysteinrest, et markørpeptid og en C-terminal polyhistidin-tag for å fremstille bivalente og biotinylerte scFv-molekyler (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

Antistoffer og fragmenter omfattende immunadhesjonsmolekyler kan oppnås ved anvendelse av standard rekombinant DNA-teknikker, som beskrevet heri. Foretrukne antigenbindende deler er komplette domener eller par av komplette domener.

De IL-1 β -bindende antistoffene 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-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også diabodies, som er bivalente antistoffer i hvilke V_H og V_L-domenene er uttrykt på en enkelt polypeptidkjede, men ved bruk av en linker som er for kort til å muliggjøre pardannelse mellom de to domenene på samme kjede, og som derve tvinger domener til pardannelse med komplementære domener fra 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.

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 en antistoff tung kjede variabel region (V_H) operabelt bundet til en antistoff lett kjede variabel region (V_L) hvori den tunge kjede variable regionen og den lette kjede variable regionen, sammen eller individuelt, danner et bindingssete som binder IL-1 β . En scFv kan omfatte en V_H-region ved den aminoterminale enden og en V_L-region ved den karboksyterminale enden. Alternativt kan scFv omfatte en V_L-region ved den aminoterminale enden og en V_H-region ved den karboksyterminale enden. Selv om de to domenene av Fv-fragmentet, V_L og V_H, kodes for av separate gener, kan de forenes, ved anvendelse av rekombinante metoder med en syntetisk linker slik at de kan fremstilles som en enkelt proteinkjede i hvilken V_L- og V_H-regionene danner par for slik å danne monovalente molekyler (kjent som enkeltkjede Fv (scFv); se f.eks., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; og Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).

En scFv kan eventuelt videre omfatte en polypeptidlinker mellom den tunge kjede variable region og den lette kjede variable region. Slike polypeptidlinkere omfatter generelt mellom 1 og 50 aminosyrer, alternativt mellom 3 og 12 aminosyrer, alternativt 2 aminosyrer. Et eksempel på et linkerpeptid for sammenkobling av tunge og lette kjeder i en scFv omfatter den 5 aminosyrer lange sekvensen Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Andre eksempler omfatter én eller flere tandemrepetisjoner av denne sekvensen (for eksempel, et polypeptid som omfatter to til fire repetisjoner av Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2) for å danne linkere.

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse omfatter også tung kjede antistoffer (HCAb). Unntak fra H₂L₂-strukturen av konvensjonelle antistoffer forekommer i noen isotyper av immunoglobulinene funnet i kamelider (kameler, dromedaries 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 flekket havmus (Nguyen, et al, "Heavy-kjede antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," 2002 *Immunogenetics* 54(1): 39-47). Disse antistoffene kan tilsynelatende danne antigenbindende regioner ved å benytte kun tung kjede variable regioner, ved at disse funksjonelle antistoffene er dimerer av kun tunge kjeder (referert til som "tung kjede antistoffer" eller "HCAs"). Følgelig kan noen utførelsesformer ifølge foreliggende IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter være tung kjede antistoffer som spesifikt binder til IL-1 β . For eksempel blir tung kjede antistoffer som er en klasse av IgG og mangler lette kjeder produsert av dyr av slekten *Camelidae* som omfatter kameler, dromedarer og lamaer (Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)). HCAb har en molekylvekt på omtrent 95 kDa i stedet for omtrent 160 kDa som er molekylvekten av konvensjonelle IgG-antistoffer. Deres bindingsdomener består kun av de tunge kjede variable domenenene, ofte referert til som V_{HH} for å skjelne dem fra konvensjonelle V_H. Muyldermans et al, *J. Mol. Recognit.* 12:131-140 (1999). Det variable domenet av tung kjede-antistoffene blir noen ganger referert til som en nanobody (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853- 57, 2004). Et nanobody-bibliotek kan dannes fra en immunisert dromedar som beskrevet i Conrath et al., (*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) eller ved anvendelse av rekombinante metoder.

Siden det første konstante domenet (C_{H1}) mangler (spleiset ut under mRNA-prosessering på grunn av tap av et konsensusignal for spleising), er det variable domenet (V_{HH}) umiddelbart etterfulgt av hengselsregionen, C_{H2}- og C_{H3}-domenenene (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-Casterman et al., supra). For eksempel er lama-IgG1 en konvensjonell (H₂L₂) antistoff isotype i hvilken 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 som mangler CH1-domener og som ikke inneholder lette kjeder.

Selv om HCAs mangler lette kjeder har de et antigenbindende repertoar. Den genetiske fremstillingsmekanisme for HCAb er omtalt i oversikt ved Nguyen et al. *Adv. Immunol* 79:261-296 (2001) og Nguyen et al., *Immunogenetics* 54:39-47 (2002). Haier,

inkludert 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 omtrent 15 kDa, 118-136 rester). Kamelid V_{HH} -domener har blitt funnet 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 sammenlignbar med de for Fab- og scFv-fragmenter. V_{HH} er høyst løselige og mer stabile enn de korresponderende derivatene av scFv- og Fab-fragmenter. V_H -fragmenter har vært relativt vanskelig å fremstille i løselig form, men forbedringer av løselighet og spesifikk binding kan oppnås når rammeverk-rester endres til å være mer V_{HH} -lignende. (Se for eksempel, Reichman *et al.*, *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38.) V_{HH} har aminosyresubstitusjoner som gjør dem mer hydrofile og forhindrer langvarig interaksjon med BiP (immunglobulin tungkjede-bindende protein), som vanligvis binder til H-kjeden i det endoplasmatiske retikulum (ER) under folding og sammensetning, inntil det fortreges av L-kjeden. På grunn av den økte hydrofiliteten av V_{HH} forbedres sekresjon fra ER.

Funksjonelle V_{HH} kan oppnås ved proteolytisk kløyving 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} , eller fra naive eller syntetiske biblioteker. V_{HH} med ønsket antigenspesifisitet kan også oppnås gjennom fagdisplay-metodikk. Bruk av V_{HH} i fagdisplay er mye enklere og mer effektivt sammenlignet med Fabs eller scFvs, siden det er nødvendig å klonere og uttrykke kun ett domene for å oppnå et funksjonelt antigenbindende fragment. Muyltermans, *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). Metoder for å frembringe antistoffer som har kamelid tunge kjeder er også beskrevet i U.S. patentpublikasjoner nr. 20050136049 og 20050037421.

Ribosom-display-metoder kan anvendes for å identifisere og isolere scFv og/eller V_{HH} -molekyler som har ønskelig bindingsaktivitet og affinitet. Irving *et al.*, *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001). Ribosom-display og seleksjon har potensiale til å generere og fremvise store biblioteker (10^{14}).

Andre utførelsesformer tilveiebringer V_{HH} -lignende molekyler fremstilt gjennom prosessen med kamelisering, ved å modifisere ikke-*Camelidae* V_H , slik som human V_{HH} , for å forbedre deres løselighet og forhindre uspesifikk binding. Dette oppnås ved å erstatte rester på V_L -siden av V_H med V_{HH} -lignende rester, for derved å etterligne de mer løselige V_{HH} -fragmentene. Kameliserte V_H -fragmenter, spesielt de basert på det humane rammeverk, er forventet å fremvise en strekt redusert immunrespons ved administrering *in vivo* til en pasient, og forventes følgelig å ha signifikante fordeler for terapeutisk 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 Riechmann et al, Immunol. Methods 231:25-38 (1999).

Et stort utvalg av ekspresjonssystemer er tilgjengelig for produksjon av IL-1 β -fragmenter inkludert Fab-fragmenter, scFv og V_{HH}. For eksempel kan ekspresjonssystemer av både prokaryot og eukaryot opprinnelse anvendes for storskalaproduksjon av antistoff-fragmenter og antistoff-fusjonsproteiner. Spesielt fordelaktig er ekspresjonssystemer som muliggjør sekresjon av store mengder av antistoff-fragmenter til dyrkingsmediet.

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 blir et scFv-molekyl fusjonert til én eller begge av V_L-CL (L) og V_H-CH₁ (Fd)-kjedene, f.eks., for å fremstille en tribody blir to scFv fusjonert til den C-terminale enden av Fab mens i en bibody blir én scFv fusjonert til den C-terminale enden av Fab. En "minibody" bestående av scFv fusjonert til CH₃ via en peptidlinker (uten hengsel) eller via en IgG-hengsel er beskrevet i Olafsen, et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004 Apr;17(4):315-23.

Intrabodies er enkeltkjede 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 cellesignalsekvenser 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 i hvilke et protein-transduksjonsdomener (PTD) er fusjonert med enkeltkjede variabelt fragment (scFv) antistoffer Heng et al, (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005).

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse omfatter også antistoffer som er SMIP eller bindingsdomene-immunglobulin-fusjonsproteiner spesifikke for målprotein. Disse konstruksjonene er enkeltkjede polypeptider som omfatter antigenbindende domener fusjonert til immunglobulindomener nødvendige for å utføre antistoff-effektorfunksjoner. Se f.eks. WO03/041600, U.S. patentpublikasjon 20030133939 og US patentpublikasjon 20030118592.

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse omfatter også immunadhesiner. En eller flere CDR'er kan inkorporeres i et molekyl enten kovalent eller ikke-kovalent for å danne et immunadhesin. Et immunadhesin kan inkorporere én eller flere CDR som del av en større polypeptidkjede, kan kovalent koble én eller flere CDR til en annen polypeptidkjede, eller

kan inkorporere én eller flere CDR ikke-kovalent. CDR'ene beskrevet heri tillater immunadhesinet å spesifikt binde til IL-1 β .

De IL-1 β -bindende antistoffene og fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også antistoff-mimetika omfattende én eller flere IL-1 β -bindende deler bygget på et organisk eller molekylært skaffold (slik som et protein eller karbohydrat-skaffold). Proteiner som har relativt definerte tredimensjonale strukturer, vanligvis referert til som proteinskjelett, kan anvendes som reagenser for utforming av antistoff-mimetika. Disse skjelettene inneholder typisk én eller flere regioner som er mottagelige for spesifikk eller tilfeldig sekvensvariasjon, og slik sekvensrandomisering blir ofte foretatt for å fremstille biblioteker av proteiner fra hvilke ønskede produkter kan selekteres. For eksempel kan et antistoff-mimetikum omfatte et kimært ikke-immunglobulin-bindende polypeptid som har et immunglobulin-lignende domene inneholdende skjelett som har to eller flere løsningsmiddel-eksponerte sløyfer inneholdende en CDR forskjellig fra et parentalt antistoff insertert inn i hver av sløyfene og som oppviser selektiv bindingsaktivitet mot en ligand bundet av det parentale antistoffet. Ikke-immunglobulin proteinskjeletter har vært foreslått for å oppnå proteiner med nye bindingsegenskaper. (Tramontano et al., *J. Mol. Recognit.* 7:9, 1994; McConnell og Hoess, *J. Mol. Biol.* 250:460, 1995). Andre proteiner har blitt testet som rammeverk og har blitt anvendt for å fremvise randomiserte rester på alfaheliks-overflater (Nord et al., *Nat. Biotechnol.* 15:772, 1997; Nord et al., *Protein Eng.* 8:601, 1995), sløyfer mellom alfahelikser i alfaheliksbunter (Ku og Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6552, 1995), og sløyfer i spenn med disulfid-broer, slik som de for de små proteaseinhibitorene (Markland et al., *Biochemistry* 35:8045, 1996; Markland et al., *Biochemistry* 35:8058, 1996; Rottgen og Collins, *Gene* 164:243, 1995; Wang et al., *J. Biol. Chem.* 270:12250, 1995). Metoder for anvendelse av skjeletter for antistoff-mimetika er beskrevet i US patent 5,770,380 og US patentpublikasjoner 2004/0171116, 2004/0266993 og 2005/0038229.

I konteksten til foreliggende oppfinnelse er det beskrevet IL-1 β -antistoffer eller antistoff-fragmenter for anvendelse i overensstemmelse med oppfinnelsen som generelt binder til human IL-1 β med høy affinitet (f.eks., som bestemt med BIACORE), slik som for eksempel med en bindings-dissosiasjonskonstant (K_D) ved likevekt for IL-1 β på omtrent 10 nM eller mindre, omtrent 5 nM eller mindre, omtrent 1 nM eller mindre, omtrent 500 pM eller mindre, eller mer foretrukket omtrent 250 pM eller mindre, omtrent 100 pM eller mindre, omtrent 50 pM eller mindre, omtrent 25 pM eller mindre, omtrent 10 pM eller mindre, omtrent 5 pM eller mindre, omtrent 3 pM eller mindre omtrent 1 pM eller mindre, omtrent 0,75 pM eller mindre, omtrent 0,5 pM eller mindre, eller omtrent 0,3 pM eller mindre. Dissosiasjonskonstanten kan måles ved anvendelse av Biacore (GE Healthcare), og måling ved anvendelse av Biacore kan være foretrukket når dissosiasjonskonstanten er større enn omtrent 10 pM. Alternativt eller i tillegg kan

dissosiasjonskonstanten måles ved anvendelse av KinExA (Sapidyne Instruments, Inc), og måling ved anvendelse av KinExA kan være foretrukket når dissosiasjonskonstanten er mindre enn omtrent 10 pM.

Antistoffer eller fragmenter beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse kan, for eksempel, binde til IL-1 β med en IC₅₀ på omtrent 10 nM eller mindre, omtrent 5 nM eller mindre, omtrent 2 nM eller mindre, omtrent 1 nM eller mindre, omtrent 0,75 nM eller mindre, omtrent 0,5 nM eller mindre, omtrent 0,4 nM eller mindre, omtrent 0,3 nM eller mindre, eller til og med omtrent 0,2 nM eller mindre, som bestemt ved ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"). Foretrukket kryssreagerer ikke antistoffet eller antistoff-fragmentet ifølge foreliggende oppfinnelse med noe annet mål enn IL-1. For eksempel kan antistoffene og fragmentene beskrevet i konteksten til foreliggende oppfinnelse binde til IL-1 β , men binder ikke detekterbart til IL-1 α , eller har minst omtrent 100 ganger (f.eks., minst omtrent 150 ganger, minst omtrent 200 ganger, eller til og med minst omtrent 250 ganger) større selektivitet i deres binding av IL-1 β i forhold til deres binding av IL-1 α . Antistoffer eller fragmenter beskrevet i henhold til foreliggende oppfinnelse kan, i visse utførelsesformer, inhibere IL-1 β -indusert ekspresjon av serum-IL-6 i et dyr med minst 50 % (f.eks., minst 60 %, minst 70 %, eller til og med 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 hovedsakelig tillate binding av den bundne IL-1 β -liganden til IL-1 reseptortype I (IL-1RI). I motsetning til mange kjente IL-1 β -bindende antistoffer som blokkerer eller hovedsakelig interferer med binding av IL-1 β til IL-1RI binder antistoffene betegnet AB5 og AB7 (US søknad nummer 11/472813, WO 2007/002261) selektivt til IL-1 β -liganden, men tillater binding av den bundne IL-1 β -liganden til IL-1RI. For eksempel binder antistoffet betegnet AB7 til en IL-1 β -epitop men tillater fortsatt den bundne IL-1 β å binde til IL-1RI. I visse utførelsesformer kan antistoffet redusere affiniteten av interaksjon av bundet IL-1 β til å binde til IL-1RI. Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen, i et relatert aspekt, anvendelse av et IL-1 β -bindende antistoff eller IL-1 β -bindende antistoff-fragment som har minst én av de tidligere nevnte egenskapene. Hvilke som helst av de førnevnte antistoffene, antistoff-fragmentene, eller polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan være humaniserte eller humane konstruerte, som beskrevet heri.

Ifølge oppfinnelsen kan AB7 (US søknad nummer 11/472813, WO2007/002261) anvendes i henhold til oppfinnelsen. US søknad nummer 11/472813 og WO2007/002261 beskriver også AB5. Variabel region-sekvenser fra AB5 og AB7 (også referert til som XOMA 052) er som følger:

AB5*LETT KJEDE*

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHS
 GVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCLQGKMLPWTFGGGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 3)

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

TUNG KJEDE

QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWW
DGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARNRYDPPWFVD
 WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

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

AB7*LETT KJEDE*

DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLH
SGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLOGKMLPWTFGQGTTKLEIK
 (SEQ ID NO: 5)

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

TUNG KJEDE

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIW
WDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFV
DWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

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

Antistoffene og antistoff-fragmentene beskrevet heri kan fremstilles ved hvilken som helst passende metode. Egnede metoder for fremstilling av slike antistoffer og antistoff-fragmenter er kjent på området. Andre metoder for fremstilling av antistoffene og antistoff-fragmenter er som beskrevet heri som del av oppfinnelsen. Antistoffet, antistoff-fragmentet, eller polypeptidet ifølge oppfinnelsen, som beskrevet heri, kan isoleres eller renses til hvilken som helst grad. Som anvendt heri er en isolert forbindelse en forbindelse som har blitt fjernet fra dens naturlige omgivelser. En rensed forbindelse er en forbindelse som har høyere renhet, slik at forbindelsen eksisterer i en form som er

renere enn den som den finnes (i) i dens naturlige omgivelser eller (ii) når den initielt syntetiseres og/eller amplifiseres under laboratoriebetingelser, hvori "renhet" er en relativ betegnelse og ikke nødvendigvis betyr "absolutt renhet".

Farmasøytiske sammensetninger

IL-1 (f.eks., IL-1 β)-bindende antistoffer og antistoff-fragmenter for anvendelse i henhold til foreliggende oppfinnelse kan formuleres i sammensetninger, spesielt farmasøytiske sammensetninger, for anvendelse i fremgangsmåtene heri. Slike sammensetninger omfatter 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 farmasøytisk akseptabelt middel. IL-1 β -bindende antistoffer og antistoff-fragmenter ifølge oppfinnelsen er typisk tilstrekkelig rensset for administrering til et dyr før formulering i en farmasøytisk sammensetning.

Farmasøytisk akseptable midler omfatter bærere, hjelpestoffer, fortynningsmidler, antioksidanter, konserveringsmidler, fargestoffer, aromastoffer og fortynningsmidler, emulgeringsmidler, suspenderingsmidler, løsningsmidler, fyllstoff, volumøkende midler, buffere, leveringskonstituent, tonisitetjusterende middel, ko-løsningsmidler, fuktemidler, komplekseringsmidler, buffermidler, antimikrobielle midler og surfaktanter.

Nøytralt bufret saltløsning eller saltløsning blandet med albumin er eksempler på passende bærere. De farmasøytiske sammensetningene kan omfatte antioksidanter slik som askorbinsyre; lavmolekylære polypeptider; proteiner, slik som serumalbumin, gelatin, eller immunglobuliner; hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon; aminosyrer slik som glysin, glutamin, asparagin, arginin eller lysin; monosakkarider, disakkarider, og andre karbohydrater inkludert glukose, mannose, eller dekstriner; kelateringsmidler slik som EDTA; sukkeralkoholer slik som mannitol eller sorbitol; saltdannende motioner slik som natrium; og/eller ikke-ioniske surfaktanter slik som Tween, pluronics eller polyetylglykol (PEG). I tillegg omfatter, som eksempel, egnede tonisitetjusterende midler alkalimetallhalogenider (foretrukket natrium eller kaliumklorid), mannitol, sorbitol, og lignende. Egnede konserveringsmidler omfatter benzalkoniumklorid, timerosal, fenetylalkohol, metylparaben, propylparaben, klorheksidin, sorbinsyre og lignende. Hydrogenperoksid kan også anvendes som konserveringsmiddel. Egnede ko-løsningsmidler omfatter glyserin, propylenglykol, og PEG. Egnede komplekseringsmidler omfatter koffein, polyvinylpyrrolidon, beta-cyklodekstrin eller hydroksy-propyl-beta-cyklodekstrin. Egnede surfaktanter eller fuktemidler omfatter sorbitanestere, polysorbater slik som polysorbat 80, trometamin, lecitin, kolesterol, tyloksapal, og lignende. Bufferne kan være konvensjonelle buffere slik som acetat, borat, sitrat, fosfat, bikarbonat eller Tris-HCl. Acetatbuffer kan ha ca. pH 4-5,5, og Trisbuffer kan ha omtrent pH 7-8,5. Ytterligere farmasøytiske midler er angitt i

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, red., Mack Publishing Company, 1990.

Sammensetningen kan være i flytende form eller i en lyofilisert eller frysetørket form og kan omfatte én eller flere lyoprotektanter, hjelpestoffer, surfaktanter, høymolekylære strukturelle additiver og/eller fyllmidler (se for eksempel US patenter 6,685,940, 6,566,329, og 6,372,716). I én utførelsesform er en lyoprotektant omfattet, hvilken er et ikke-reduserende sukker slik som sukrose, laktose eller trehalose. Mengden av lyoprotektant omfattet er generelt slik at den resulterende formuleringen etter rekonstituering vil være isoton, selv om hypertoniske eller svakt hypotoniske formuleringer også kan være egnet. I tillegg skulle mengden av lyoprotektant være tilstrekkelig til å forhindre uakseptabel grad av degradering og/eller aggregering av proteinet ved lyofilisering. Eksempler på lyoprotektant-konsentrasjoner for sukkere (f.eks., sukrose, laktose, trehalose) i den pre-lyofiliserte formuleringen er fra omtrent 10 mM til omtrent 400 mM. I en annen utførelsesform er en surfaktant inkludert, slik som for eksempel, ikke-ioniske surfaktanter og ioniske surfaktanter slik 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-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, eller isostearamidopropyl-betain (f.eks. lauroamidopropyl); myristarnidopropyl-, palmidopropyl-, eller isostearamidopropyl- dimetylamin; natriummetylcocoyl-, eller dinatriummetylofeyl-aurate; og MONAQUAT™-seriene (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polyetylglykol, polypropylglykol, og kopolymerer av etylen og propylenglykol (f.eks. Pluronic, PF68 osv). Eksempler på mengder av surfaktant som kan være til stede i den pre-lyofiliserte formuleringen er fra omtrent 0,001-0,5 %. Høymolekylære strukturelle additiver (f.eks. fyllstoff, bindemidler) kan omfatte for eksempel, akasie, albumin, alginsyre, kalsiumfosfat (dibasisk), cellulose, karboksymetylcellulose, karboksymetylcellulosenatrium, hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, mikrokrySTALLINSK cellulose, dekstran, dekstrin, dekstrater, sukrose, tylose, pregelatinisert stivelse, kalsiumsulfat, amylose, glysin, bentonitt, maltose, sorbitol, etylcellulose, dinatriumhydrogenfosfat, dinatriumfosfat, dinatriumpyrosulfitt, polyvinylalkohol, gelatin, glukose, guar gummi, flytende glukose, kompressibelt sukker, magnesiumaluminumsilikat, maltodekstrin, polyetylenoksid, polymetakrylater, povidon, natriumalginat, tragant, mikrokrySTALLINSK cellulose, stivelse og zein. Eksempler på konsentrasjoner av høymolekylære strukturelle additiver er fra 0,1 vekt-% til 10 vekt-%. I andre utførelsesformer kan et fyllmiddel (f.eks., mannitol, glysin) være inkludert.

Sammensetninger kan være egnet for parenteral administrering. Eksempler på sammensetninger er egnet for injeksjon eller infusjon inn i et dyr ved hvilken som helst administreringsvei tilgjengelig for fagfolk på området, slik som intraartikulær, subkutan, intravenøs, intramuskulær, intraperitoneal, intracerebral (intraparenkymal), intracerebroventrikulær, intramuskulær, intraokulær, intraarteriell, intralesjonal, intrarektal, transdermal, oral, og som inhalasjon. En parenteral formulering vil typisk være en steril, pyrogenfri, isotonisk vandig løsning, eventuelt inneholdende farmasøytisk akseptable konserveringsmidler.

Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylen glykol, vegetabiliske oljer slik som olivenolje og injiserbare organiske estere slik som etyloleat. Vandige bærere omfatter vann, alkoholiske/vandige løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inkludert saltløsninger og bufferholdige medier. Parenterale konstituenten omfatter natriumkloridløsning, Ringers dekstrose, dekstrose og natriumklorid, laktatholdig Ringers eller faste oljer. Intravenøse konstituenten omfatter væske- og næringssupplementer, elektrolytt-supplementer, slik som de basert på Ringers dekstrose, og lignende. Konserveringsmidler og andre additiver kan også være til stede, slik som, for eksempel, antimikrobielle midler, antioksidanter, kelateringsmidler, inerte gasser og lignende. Se generelt Remington's Pharmaceutical Science, 16. utg., Mack red., 1980.

Farmasøytiske sammensetninger beskrevet heri kan formuleres for kontrollert eller vedvarende levering på en måte som gir lokal konsentrasjon av produktet (f.eks., bolus, depoteffekt) vedvarende frigivelse og/eller økt stabilitet eller halveringstid i et bestemt lokalt miljø. Oppfinnelsen omfatter at slike sammensetninger i visse utførelsesformer kan omfatte en betydelig større mengde av antistoff eller fragment i det initiale depotet, mens den effektive mengden av antistoff eller fragment som faktisk frigjøres og er tilgjengelig ved ethvert tidspunkt er i overensstemmelse med beskrivelsen heri en mengde mye lavere enn det initiale depotet. Sammensetningene kan omfatte formuleringen av IL-1 β -bindende antistoffer, antistoff-fragmenter, nukleinsyrer, eller vektorer ifølge oppfinnelsen med bestemte preparater av polymere forbindelser slik som polymelkesyre, polyglykolsyre, osv., så vel som agenser slik som en biodegraderbar matriks, injiserbare mikrokuler, mikrokapsulære partikler, mikrokapsler, bioeroderbare kulepartikler, liposomer, og implanterbare leveringsanordninger som gir den kontrollerte eller vedvarende frigjøringen av det aktive midlet som deretter kan avleveres som en depot-injeksjon. Teknikker for formulering av slike midler med vedvarende - eller kontrollert avlevering er kjent og mange forskjellige polymerer er utviklet og anvendt for kontrollert frigjøring og levering av medikamenter. Slike polymerer er typisk bionedbrytbare og biokompatible. Polymere hydrogeler, inkludert de som dannes ved kompleksing av enantiomere polymer- eller polypeptid-segmenter, og hydrogeler med temperatur eller pH-følsomme egenskaper, kan være ønskelige for å gi medikamentet

depot-effekt på grunn av de milde og vandige betingelsene involvert i oppfangingen av bioaktive proteinmidler (f.eks., antistoffer). Se for eksempel beskrivelsen av porøse polymere mikropartikler med kontrollert frigjøring for levering av farmasøytiske sammensetninger i PCT-søknad publikasjon WO 93/15722.

Egnede materialer for dette formål omfatter polylaktider (se, f.eks., U.S. patent 3,773,919), polymerer av poly-(α -hydroksykarboksylysyre), slik som poly-D(-)-3-hydroksystemørsyre (EP 133,988A), kopolymerer av L-glutaminsyre og gamma etyl-L-glutamat (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poly (2-hydroksyetylmetakrylat) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981), og Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etylenvinylacetat, eller poly-D(-)-3-hydroksystemørsyre. Andre bionedbrytbare polymerer omfatter poly(laktoner), poly(acetaler), poly(ortoestere), og poly(ortokarbonater). Sammensetninger med vedvarende frigjøring kan også omfatte liposomer, som kan fremstilles ved hvilke som helst av flere metoder kjent på området (se, f.eks., Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-92 (1985)). Bæreren i seg selv, eller dens nedbrytningsprodukter, bør ikke være giftige i målvevet og bør ikke forverre tilstanden ytterligere. Dette kan bestemmes ved rutinemessig screening i dyremodeller av lidelsen eller, dersom slike modeller ikke er tilgjengelig, i normale dyr.

Mikroinnkapsling av rekombinante proteiner for vedvarende frigjøring har vært foretatt med hell med humant veksthormon (rhGH), interferon- (γ), interleukin-2 og MN rgp120. 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," i *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell og Newman, red., (Plenum Press: New York, 1995), s. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; og U.S. pat. nr. 5,654,010. Formuleringene med vedvarende frigjøring av disse proteinene ble utviklet ved anvendelse av polymelkesyre-koglykolsyre- (PLGA)-polymer på grunn av dens biokompatibilitet og brede spekter av bionedbrytbare egenskaper. Nedbrytningsprodukter av PLGA, melkesyre og glykolsyre kan hurtig utskilles i menneskekroppen. Videre kan nedbrytbarheten av denne polymeren være avhengig av dens molekylvekt og sammensetning. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", i: M. Chasin og R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), s. 1-41. Ytterligere eksempler på sammensetninger med vedvarende frigjøring omfatter, for eksempel, EP 58,481 A, U.S. pat. nr. 3,887,699, EP 158,277 A, kanadisk patent nr. 1176565, U. Sidman et al., *Biopolymerer* 22, 547 [1983], R. Langer et al., *Chem. Tech.* 12, 98 [1982], Sinha et al., *J. Control. Release* 90, 261 [2003], Zhu et al., *Nat. Biotechnol.* 18, 24 [2000], og Dai et al., *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 117 [2005].

Bioadhesive polymerer er også omfattet for anvendelse i eller med sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse. Bioadhesiver er syntetiske og naturlig forekommende materialer i stand til å adherere til biologiske substrater over lengre tidsrom. For eksempel er Carbopol og polycarbophil begge syntetiske kryssbundne derivater av poly(akrylsyre). Bioadhesive leveringssystemer basert på naturlig forekommende substanser omfatter for eksempel hyaluronsyre, også kjent som hyaluronan. Hyaluronsyre er et naturlig forekommende mukopolysakkarid bestående av rester av D-glukuronic og N-acetyl-D-glukosamin. Hyaluronsyre finnes i den ekstracellulære vevsmatriks i hvirveldyr, inkludert i bindevev så vel som i synovialvæske og i øyets glasslegeme og vandige væske. Foretrede derivater av hyaluronsyre har vært benyttet for fremstilling av mikrokuler for anvendelse ved avlevering som er biokompatible og biodnedbrytbare (se for eksempel, Cortivo et al., *Biomaterials* (1991) 12:727-730; Europeisk publikasjon nr. 517,565; internasjonal publikasjon nr. WO 96/29998; Illum et al., *J. Controlled Rel.* (1994) 29:133-141). Eksempler på hyaluronsyre-holdige sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en hyaluronsyreesterpolymer i en mengde på omtrent 0,1 % til omtrent 40 % (vekt/vekt) av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment til hyaluronsyrepolymer.

Både bionedbrytbare og ikke-bionedbrytbare polymermatrikser kan anvendes for å avgi sammensetninger i overensstemmelse med oppfinnelsen, og slike polymermatrikser kan omfatte naturlige eller syntetiske polymerer. Bionedbrytbare matrikser er foretrukket. Det tidsrom som frigjøring skjer over er basert på valget av polymer. Typisk er frigjøring over et tidsrom varierende fra mellom noen få timer og tre til tolv måneder mest ønskelig. Eksempler på syntetiske polymerer som kan anvendes for å danne det bionedbrytbare leveringssystemet omfatter: polymerer av melkesyre og glykolsyre, polyamider, polykarbonater, polyalkylener, polyalkylenglykoler, polyalkylenoksider, polyalkylen-tereftalater, polyvinylalkoholer, polyvinyletere, polyvinylestere, polyvinylhalogenides, polyvinylpyrrolidon, polyglykolider, polysiloksaner, polyanhydrider, polyuretaner og kopolymerer derav, poly(butic syre), poly(valeriansyre), alkylcellulose, hydroksyalkylcelluloser, celluloseetere, celluloseestere, nitrocelluloser, polymerer av akryl og metakrylestere, metylcellulose, etylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropyl-metylcellulose, hydroksybutyl-metylcellulose, celluloseacetat, cellulosepropionat, celluloseacetatbutyrat, celluloseacetatftalat, karboksyletylcellulose, celluloseetriacetat, cellulosesulfat-natriumsalt, poly(metyl-metakrylat), poly(etylmetakrylat), poly(butylmetakrylat), poly(isobutylmetakrylat), poly(heksylmetakrylat), poly(isodecyl metakrylat), poly(laurylmetakrylat), poly(fenyl metakrylat), poly(metylakrylat), poly(isopropylakrylat), poly(isobutylakrylat), poly(oktadekyl-akrylat), polyetylen, polypropylen, poly(etylen glykol), poly(etylenoksid), poly(etylentereftalat), poly(vinylalkoholer), polyvinylacetat, polyvinylklorid, polystyren og

polyvinylpyrrolidon. Eksempler på naturlige polymerer omfatter alginat og andre polysakkarider omfattende dekstran og cellulose, kollagen, kjemiske derivater derav (substitusjoner, addisjoner av kjemiske grupper, for eksempel, alkyl, alkylen, hydroksyleringer, oksydasjoner og andre modifikasjoner som rutinemessig foretas av fagfolk på området), albumin og andre hydrofile proteiner, zein og andre prolaminer og hydrofobe proteiner, kopolymerer og blandinger derav. Generelt nedbrytes 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 omtrent 90 % av deres vekt i vann og videre eventuelt er kryssbundet med flervalente ioner eller andre polymerer.

Avleveringssystemer omfatter også ikke-polymere systemer som er lipider, inkludert steroler slik som kolesterol, kolesterolestere og fettsyrer eller nøytralt fett slik som mono- di- og triglyserider; hydrogelfrigjøringsystemer; silastinsystemer; peptidbaserte systemer; voksbelegg; pressede tabletter som gjør bruk av konvensjonelle bindemidler og hjelpestoffer; partielt fusjonerte implantater; og lignende. Spesifikke eksempler omfatter, men er ikke begrenset til: (a) eroderbare systemer hvor produktet er inneholdt i en form i en matris slik som de beskrevet i U.S. patenter nr. 4,452,775, 4,675,189 og 5,736,152 og (b) diffusjonssystemer i hvilke et produkt permeerer ved en kontrollert hastighet fra en polymer slik som beskrevet i U.S. pat. nr. 3,854,480, 5,133,974 og 5,407,686. Liposomer inneholdende produktet kan fremstilles ved kjente metoder, slik 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. pat. nr. 4,485,045 og 4,544,545; og EP 102,324).

En farmasøytisk sammensetning omfattende et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment kan formuleres for inhalasjon, slik som for eksempel et tørt pulver. Inhalasjonsløsninger kan også formuleres i et flytende drivmiddel for aerosol levering. I enda en annen formulering kan løsningene nebuliseres. Ytterligere farmasøytiske sammensetninger for pulmonal administrering omfatter de beskrevet, for eksempel, i PCT-søknad publikasjon WO 94/20069, som beskriver pulmonal avlevering av kjemisk modifiserte proteiner. For pulmonal levering skulle partikkelstørrelsen være egnet for levering til den distale lunge. For eksempel kan partikkelstørrelsen være fra 1 μm til 5 μm , men større partikler kan imidlertid anvendes, for eksempel dersom hver partikkel er relativt porøs.

Visse formuleringer inneholdende IL-1 β -bindende antistoffer eller antistoff-fragmenter kan administreres oralt. Formuleringer administrert på denne måten kan formuleres med eller uten de bærerne som vanligvis benyttes ved blanding av faste

doseringsformer slik som tabletter og kapsler. For eksempel kan en kapsel være utformet slik at den frigjør den aktive delen av formuleringen ved det punkt i magetarmkanalen hvor biotilgjengeligheten er maksimert og presystemisk nedbrytning er minimalisert. Ytterligere midler kan inkluderes for å lette absorpsjon av et selektivt bindemiddel. Fortynningsmidler, aromastoffer, lavtsmeltende voks, vegetabiliske oljer, glattemidler, suspenderingsmidler, tablett desintegrasjonsmidler, og bindemidler kan også anvendes.

Et annet preparat kan omfatte en effektiv mengde av et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment i en blanding med ikke-giftige hjelpestoffer som er egnet for fremstilling av tabletter. Ved å oppløse tablettene i sterilt vann, eller eller annen passende konstituent, kan løsninger fremstilles i enhetsdoseform. Egnede hjelpestoffer omfatter, men er ikke begrenset til, inerte fortynningsmidler, slik som kalsiumkarbonat, natriumkarbonat eller bikarbonat, laktose, eller kalsiumfosfat; eller bindemidler slik som stivelse, gelatin, eller akasie; eller glattemidler slik som magnesiumstearat, stearinsyre, eller talkum.

Egnede og/eller foretrukne farmasøytiske formuleringer kan bestemmes i lys av foreliggende beskrivelse og generell kunnskap om formuleringsteknologi, avhengig av den tiltenkte administreringsveien, avleveringsformat, og ønsket dosering. Uavhengig av administreringsveien, kan en effektiv dose beregnes i henhold til pasientens kroppsvekt, kroppsoverflate eller organstørrelse. Ytterligere forbedring av beregningene for bestemmelse av passende dose for behandling som angår hver av formuleringene beskrevet heri gjøres rutinemessig på området og er innenfor det oppgavefelt som rutinemessig foretas på området. Passende doseringer kan sikres ved anvendelse av passende dose-responsdata.

Ytterligere formuleringer vil være innlysende i lys av foreliggende beskrivelse, inkludert formuleringer som involverer IL-1 β -bindende antistoffer og fragmenter i kombinasjon med ett eller flere andre terapeutiske midler. For eksempel blir, i noen formuleringer, et IL-1 β -bindende antistoff, antistoff-fragment, nukleinsyre, eller vektor ifølge oppfinnelsen formulert med en andre inhibitor av en IL-1 signaleringsvei. Representative andre inhibitorer omfatter, men er ikke begrenset til, antistoffer, antistoff-fragmenter, peptider, polypeptider, forbindelser, nukleinsyres, vektorer og farmasøytiske sammensetninger, slik 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 sammensetning omfatte et IL-1 β -bindende antistoff, antistoff-fragment, nukleinsyre, eller vektor ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med et annet IL-1 β -bindende antistoff, fragment, eller en nukleinsyre eller vektor som koder for et slikt antistoff eller fragment.

De farmasøytiske sammensetningene kan omfatte IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter i kombinasjon med andre aktive midler. Slike kombinasjoner er de som er

anvendelige for deres tiltenkte formål. Kombinasjonene som er del av foreliggende oppfinnelse kan være IL-1 β -antistoffer og fragmenter, slik som for eksempel de beskrevet heri, og minst ett ytterligere middel. Eksempler på aktive midler som kan anvendes i kombinasjonen angitt nedenfor er illustrerende for formålet og er ikke ment å vær begrensende. Kombinasjonen kan også omfatte mer enn ett ytterligere middel, f.eks., to eller tre ytterligere midler dersom kombinasjonen er slik at den dannede sammensetningen kan utføre sin tiltenkte funksjon.

Oppfinnelsen omfatter videre at farmasøytiske sammensetninger omfattende ett eller flere andre aktive midler kan administreres separat fra de IL-1 β -bindende antistoffene eller fragmentene, og slike separate administreringer kan foretas på samme tidspunkt eller ved ulike tidspunkter, slik som for eksempel på samme dag eller forskjellige dager. Administrering av de andre aktive midlene kan finne sted i henhold til medisinsk standard praksis kjent på området, eller administreringen kan være modifisert (f.eks., lengre intervaller, mindre doser, forsinket initiering) når anvendt i sammenheng med administrering av IL-1 β -bindende antistoffer eller fragmenter, slik som beskrevet heri.

Aktive midler eller kombinasjoner med foreliggende antistoffer eller fragmenter omfatter indometacin, ikke-steroide antiinflammatoriske medikamenter (NSAID'er) slik som aspirin, ibuprofen, og andre propionsyrederivater (alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic syre, carprofen, fenbufen, fenoprofen, fluprofen, flurbiprofen, indoprofen, ketoprofen, miroprofen, naproksen, oxaprozin, pirprofen, pranoprofen, suprofen, tiaprofensyre og tioxaprofen), eddiksyrederivater (indometacin, acemetacin, alklofenak, klidanak, diklofenak, fenklofenak, fenklozinsyre, fentiazak, fuirofenac, ibufenak, isoxepac, okspinak, sulindak, tiopinac, tolmetin, zidometacin og zomepirak), fenamsyrederivater (flufenaminsyre, meklofenaminsyre, mefenaminsyre, nifluminsyre og tolfenaminsyre), bifenyلكarboksylysyrederivater (diflunisal og flufenisal), oksikamer (isoksikam, piroksikam, sudoksikam og tenoksikan), salisylater (acetylsalisylsyre, sulfasalazin) og pyrazoloner (apazon, bezpiperylon, feprazon, mofebutazon, oksyfenbutazon, fenylbutazon). Andre kombinasjoner omfatter syklooksygenase-2 (COX-2)-inhibitorer, aquaretics, orale glukokortikoider, intra-artikulære glukokortikoider, kolchicin, xantin-oksidase-hemmere, allopurinol, urikosuriske midler, sulfinpyrazon, febuxostat, probenecid, fenofibrat, benemid, angiotensin II reseptor-antagonister, losartan, tiazider, PEG-urikase, natriumbikarbonat, etylendiamintetraeddiksyre. Andre aktive midler for kombinasjon omfatter steroider slik som prednisolon, prednison, metylprednisolon, betametason, deksametason eller hydrokortison. En slik kombinasjon kan være spesielt fordelaktig siden én eller flere bivirkninger av steroidet kan reduseres eller til og med elimineres ved å minske steroiddosen som kreves i kombinasjon med foreliggende antistoffer og fragmenter ved behandling av pasienter.

Det er videre omfattet at et IL-1 β -antistoff eller fragment administrert til et individ i overensstemmelse med oppfinnelsen kan administreres i kombinasjon med behandling med minst ett ytterligere aktivt middel, slik som for eksempel hvilke som helst av de tidligere nevnte aktive midlene. I én utførelsesform opprettholdes behandling med det nevnte minst ene aktive midlet. I en annen utførelsesform blir behandling med nevnte minst ene aktive middel redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt) under forløpet av IL-1 β -antistoffbehandling (f.eks., med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet opprettholdt ved et konstant doseringsregime). I en annen utførelsesform blir behandling med nevnte minst ene aktive middel redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I en annen utførelsesform blir behandling med nevnte minst ene aktive middel redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet økes (f.eks., høyere dose, hyppigere dosering, lengre behandlingsregime). I enda en annen utførelsesform blir behandling med det minst ene aktive midlet opprettholdt og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert eller seponert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I enda en annen utførelsesform blir behandling med nevnte minst ene aktive middel og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet redusert eller seponert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime).

De farmasøytiske sammensetningene anvendt i oppfinnelsen kan omfatte en terapeutisk effektiv mengde eller en profylaktisk effektiv mengde av de IL-1 β -bindende antistoffene eller fragmentene. En terapeutisk effektiv mengde refererer til en mengde effektiv ved doser og i tidsrom nødvendig for å oppnå det ønskede terapeutiske resultatet. En terapeutisk effektiv mengde av antistoffet eller antistoffdelen kan variere i henhold til faktorer slik som sykdomstilstanden, alder, kjønn og vekt av individet, og antistoffets eller antistoffdelens evne til å fremkalle en ønsket respons hos individet. En terapeutisk effektiv mengde er også en i hvilken eventuelle toksiske eller skadelige effekter av antistoffet eller antistoffdelen oppveies av de terapeutisk fordelaktige effektene. En profylaktisk effektiv mengde refererer til en mengde effektiv, ved doser og i tidsrom nødvendig for å oppnå det ønskede profylaktiske resultatet.

En terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av en farmasøytisk sammensetning omfattende et IL-1 β -bindende antistoff eller fragment vil avhenge, for eksempel, av de terapeutiske formål slik som indikasjonen som sammensetningen anvendes for, administreringsveien, og individets tilstand. Farmasøytiske sammensetninger blir administrert i en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde for å behandle en IL-1-relatert tilstand.

Bruksmåter

Anti-IL-1 β -antistoffer eller fragmenter som tilveiebrakt heri, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, er for anvendelse ved behandling og/eller forebygging av gikt hos et individ. Slike tilnærminger kan anvendes for å behandle et mammalsk individ (f.eks., et menneske) som lider av gikt eller for å forhindre forekomst av dette hos et risokoindivid.

Betegnelsene "forhindring", "forhindre", "forebygging", "suppressjon", "undertrykke", "undertrykkelse", "inhibere" og "inhibering" som anvendt heri refererer til en handlemåte (slik som administrering av en forbindelse eller farmasøytisk sammensetning) initiert på en måte (f.eks., før debut av et klinisk symptom på en sykdomstilstand eller lidelse) for å forebygge, undertrykke eller redusere, enten midlertidig eller permanent, debut av en klinisk manifestasjon av sykdomstilstanden eller lidelsen. Slik forebygging, undertrykking eller reduksjon trenger ikke å være fullstendig for å være nyttig.

Betegnelsene "behandling" og "behandle" som anvendt heri refererer til en handlemåte (slik som administrering av en forbindelse eller farmasøytisk sammensetning) initiert etter debut av et klinisk symptom på en sykdomstilstand eller lidelse for å eliminere, redusere, undertrykke eller forbedre, enten midlertidig eller permanent, en klinisk manifestasjon eller progresjon av sykdomstilstanden eller lidelsen. Slik behandling trenger ikke å være fullstendig for å være nyttig.

Betegnelsen "med behov for behandling" som anvendt heri refererer til en vurdering som foretas av en pleier om at en pasient trenger eller vil ha fordel av behandling. Denne vurderingen gjøres på grunnlag av mange forskjellige faktorer som ligger innenfor pleierens ekspertise, men som inkluderer kjennskap til at pasienten vil være syk, eller vil bli syk, som resultat av en lidelse som kan behandles ved en fremgangsmåte eller forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsen "med behov for forebygging" som anvendt heri refererer til en vurdering som foretas av en pleier om at en pasient trenger eller vil ha fordel av forebygging. Denne vurderingen gjøres på grunnlag av mange forskjellige faktorer som ligger innenfor pleierens ekspertise, men som inkluderer kjennskap til at pasienten vil være syk, eller vil bli syk, som resultat av en lidelse som kan forebygges ved en fremgangsmåte eller forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsen "terapeutisk effektiv mengde" som anvendt heri refererer til en mengde av en forbindelse (f.eks., antistoff), enten alene eller som en del av en farmasøytisk sammensetning, som er i stand til å ha hvilken som helst detekterbar, positiv effekt på hvilket som helst symptom, aspekt, eller karakteristika for en

sykdomstilstand eller lidelse når den administreres til en pasient (f.eks., som én eller flere doser). Slik effekt trenger ikke å være fullstendig for å være nyttig.

I én utførelsesform blir anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, administrert til et individ med gikt og individet mottar også minst én annen medisinsk akseptert behandling (f.eks., medisiner, medikament, terapeutikum, aktivt middel) for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen. I en annen utførelsesform blir nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt), mens behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet opprettholdes ved et konstant doseringsregime. I en annen utførelsesform blir nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I en annen utførelsesform blir nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen redusert eller seponert (f.eks., når individet er stabilt), og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir økt (f.eks., høyere dose, mindre hyppig dosering, lengre behandlingsregime). I enda en annen utførelsesform blir den minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen opprettholdt og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir redusert eller seponert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime). I enda en annen utførelsesform blir nevnte minst ene andre medisinsk aksepterte behandling for sykdommen, tilstanden eller komplikasjonen og behandling med anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet redusert eller seponert (f.eks., lavere dose, mindre hyppig dosering, kortere behandlingsregime).

I foretrukne anvendelser for behandling eller forebygging av gikt blir anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, administrert til individet i henhold til de tidligere nevnte antall doser, mengder per dose og/eller intervaller mellom doser. Alternativt kan anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet administreres som én eller flere initielle doser av de tidligere nevnte mengdene som er lavere enn én eller flere etterfølgende doseringsmengder. Ved å gi de(n) initielle dosen(e) i en lavere mengde kan effektiviteten og/eller tolererbarheten av behandlingen økes. For eksempel kan, i en ikke-begrensende utførelsesform ifølge oppfinnelsen, én eller flere initielle doser (f.eks., 1, 2, 3, 4, 5) med en mengde av antistoff eller fragment ≤ 1 mg/kg (f.eks., $\leq 0,9$ mg/kg, $\leq 0,8$ mg/kg, $\leq 0,7$ mg/kg, $\leq 0,6$ mg/kg, $\leq 0,5$ mg/kg, $\leq 0,4$ mg/kg, $\leq 0,3$ mg/kg, $\leq 0,2$ mg/kg, $\leq 0,1$ mg/kg, $\leq 0,05$ mg/kg, $\leq 0,03$ mg/kg, $\leq 0,01$

mg/kg) administreres, etterfulgt av én eller flere etterfølgende doser i en mengde større enn de(n) initielle dosen(e) (f.eks., $\geq 0,01$ mg/kg, $\geq 0,03$ mg/kg, $\geq 0,1$ mg/kg, $\geq 0,3$ mg/kg $\geq 0,5$ mg/kg, $\geq 0,6$ mg/kg, $\geq 0,7$ mg/kg, $\geq 0,8$ mg/kg, $\geq 0,9$ mg/kg, $\geq 1,0$ mg/kg, $\geq 1,5$ mg/kg, ≥ 2 mg/kg, $\geq 2,5$ mg/kg, ≥ 3 mg/kg, $\geq 3,5$ mg/kg, ≥ 4 mg/kg, $\geq 4,5$ mg/kg, ≥ 5 mg/kg). Oppfinnelsen omfatter at hver dose av antistoff eller fragment kan administreres ved ett eller flere seter.

Anvendelser for behandling eller forebygging av en sykdom eller lidelse i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan anvende en forhåndsbestemt eller "rutinemessig" plan for administrering av antistoffet eller fragmentet. Som anvendt heri refererer en "rutinemessig" plan til et forhåndsbestemt angitt tidsrom mellom administrering av doser. Den "rutinemessige" planen kan omfatte tidsrom som er identiske eller som varierer i lengde, så lenge planen er forhåndsbestemt. En bestemt kombinasjon vil være dekket av den "rutinemessige" planen så lenge det på forhånd er bestemt at den bestemte planen omfatter administrering på en viss dag.

Oppfinnelsen omfatter videre at IL-1 β -antistoffer eller fragmenter, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, anvendt i overensstemmelse med oppfinnelsen gitt heri, kan administreres i forbindelse med mer tradisjonelle behandlingsmetoder og farmasøytiske sammensetninger (f.eks., aktive midler). Slike sammensetninger kan omfatte for eksempel, ikke-steroide antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) kortikosteroider, adrenokortikotrop hormon og kolchiciner. I visse utførelsesformer kan antistoffene og fragmentene anvendt i overensstemmelse med oppfinnelsen avverge eller forsinke behovet for ytterligere behandlingsmetoder eller farmasøytiske sammensetninger. I andre utførelsesformer kan antistoffene eller fragmentene redusere mengden, hyppigheten eller varigheten av ytterligere behandlingsmetoder eller farmasøytiske sammensetninger.

Alternativt kan anvendelser for behandling eller forebygging av en sykdom eller lidelse i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse anvende en plan for administrering av antistoffet eller fragmentet som er basert på tilstedeværelse av sykdomssymptomer og/eller endringer i hvilke som helst av vurderingene heri som et middel for å bestemme når det skal administreres én eller flere etterfølgende doser. Tilsvarende kan denne tilnærmingen anvendes som et middel for å bestemme hvorvidt en etterfølgende dose skulle økes eller reduseres, basert på effekten av en tidligere dose.

Diagnostisering av slike sykdommer eller lidelser hos pasienter, eller alternativt risikoen for å utvikle slike sykdommer eller lidelser kan være i henhold til standard medisinsk praksis kjent på området. Etter administrering av et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment er klinisk vurdering av en behandling eller forebyggende effekt på gikt velkjent på området og kan anvendes som et middel til å overvåke effektiviteten av

fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen. For eksempel kan respons på behandling av gikt vurderes basert på en klinisk vurdering av den akutte episoden av gikt som omfatter en leges vurdering som vurderer rødhet, ømhet og hevelse (hvor ingen av disse kan tilskrives andre årsaker), en leges globale vurdering, individets selvvrdring av smerte, en pasients globale vurdering og/eller en HAQ. I én utførelsesform blir effekt av behandling vurdert ved en reduksjon av leddsmerte på minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, eller omtrent 100 %. I en annen utførelsesform inntreffer reduksjonen av leddsmerte på mindre enn omtrent 48 timer, mindre enn omtrent 36 timer, mindre enn omtrent 24 timer. Den kliniske vurderingen av akutt gikt kan omfatte én eller flere av følgende komponenter:

Legens vurderinger:

- Legens globale vurdering (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av erytem (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av varme (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av opphovning (10 punkts analog skala)

Individets vurderinger:

- Pasientens globale vurdering (10 punkts analog skala)
- Smerte ved hvile (10 punkts analog skala)
- Smerte ved vektbelastning/bevegelse (10 punkts analog skala)
- Spørreskjema helsevurdering ("Health Assessment Questionnaire") (HAQ)

Ett eller flere sekundære endepunkt, slik som for eksempel C-reaktivt protein (CRP)-nivå og/eller erythrocytt sedimentasjonsrate (ESR) kan også bestemmes for å vurdere effekt av behandlingen. En reduksjon av 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 er en reduksjon på > 20 %, > 30 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 %, > 95 % fra nivåer før behandling indikativ for terapeutisk effekt. En reduksjon av ESR på > 20 %, > 30 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 %, > 95 %, > 98 % fra nivåer før behandling indikativ for terapeutisk effekt. Beskrivelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for behandling av gikt hos et individ (f.eks., et menneske), hvor fremgangsmåten omfatter å administrere (f.eks., i en terapeutisk effektiv mengde) et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte og minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 30 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 60 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 70 % reduksjon av CRP-nivåer, minst 80 % reduksjon av CRP-nivåer og/eller minst 90 % reduksjon av CRP-nivåer. I en

foretrukket utførelsesform er dosen av antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte og minst 20 % reduksjon av ESR, minst 40 % reduksjon av ESR, minst 50 % reduksjon av ESR, minst 60 % reduksjon av ESR, minst 70 % reduksjon av ESR, minst 80 % reduksjon av ESR, og/eller minst 90 % reduksjon av ESR.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en anvendelse for behandling av gikt hos et individ (f.eks., menneske), hvor anvendelsen omfatter å administrere (f.eks., i en terapeutisk effektiv mengde) et anti-IL-1 β -antistoff eller fragment derav til individet, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I én utførelsesform er dosen av antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 30 % reduksjon av CRP-nivåer og 30 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon av leddsmerte, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer og 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 60 % reduksjon av leddsmerte, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 50 % reduksjon av ESR. I enda en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 20 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 20 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 40 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 40 % reduksjon av ESR. I en annen utførelsesform er dosen av anti-IL-1 β -antistoff eller fragment tilstrekkelig til å oppnå minst 70 % reduksjon av leddsmerte, minst 50 % reduksjon av CRP-nivåer og minst 50 % reduksjon av ESR. I én utførelsesform kan CRP-nivåer måles ved en ultrasensitiv CRP ELISA test. I en annen utførelsesform kan ESR måles ved en Westergren ESR testmetode.

EKSEMPLER

De følgende eksemplene er kun ment å ytterligere illustrere utøvelsen av

foreliggende oppfinnelse, men skulle ikke på noen måte oppfattes som begrensende for dennes omfang.

EKSEMPEL 1

Inhibering av IL-1 β ved anvendelse av et høyaffinitets IL-1 β -antistoff i en *in vitro* cellebasert analyse, med IL-1-indusert produksjon av IL-8 som en avlesning

Den inhibitoriske effekten av det IL-1 β -spesifikke antistoffet ble sammenlignet med en ikke-antistoff inhibitor av IL-1 reaksjonsveien, Kineret[®] (anakinra), som er en rekombinant IL-1-reseptorantagonist (IL-1Ra). Ferskt, heparinisert perifert blod ble oppsamlet fra friske donorer. 180 μ l helblod ble platet ut i en 96-brønns plate og inkubert med ulike konsentrasjoner av antistoffet AB7 (US søknad nummer 11/472,813, WO 2007/002261) og 100 pM 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. Helblod celler ble deretter lysert med 50 μ l 2,5 % Triton X-100. Konsentrasjonen av interleukin-8 (IL-8) i rensede lysater ble vurdert 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 oppsummert i Tabell 6. IC₅₀ er konsentrasjonen av antistoff nødvendig 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* potensen av AB7, som målt ved inhibering av IL-1 β -stimulert frigjøring av IL-8. Resultatene som viser høyere potens sammenlignet med Kineret[®] indikerer at antistoffet vil ha IL-1 β -inhiberende effekt *in vivo*.

EKSEMPEL 2

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

For å bekrefte *in vivo*-effekten av AB7 ble dets evne til å blokkere den biologiske aktiviteten av human IL-1 β testet på mus. Detaljer angående analysen er beskrevet i

Economides et al., *Nature Med.*, 9: 47-52 (2003). I korthet ble C57/B16 hannmus (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) injisert intraperitonealt med titrerte doser av AB7, et annet IL-1 β -antistoff, AB5, eller et kontrollantistoff. Tjuefire timer etter antistoffinjeksjon, ble mus injisert subkutan med rekombinant human IL-1 β (rhIL-1 β) (fra PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) ved en dose på 1 μ g/kg. To timer etter rhIL-1 β -injeksjon (maksimal IL-6 responstid) ble musene avlivet og blod ble oppsamlet og bearbeidet for serum. Serum IL-6-nivåene ble analysert ved ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) i henhold til produsentens protokoll. Prosent inhibering ble beregnet fra forholdet mellom IL-6 påvist i forsøksdyrets serum og IL-6 påvist i kontrolldyrenes serum (multiplisert med 100).

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

Et lignende forsøk ble utført for ytterligere å demonstrere den evne AB7 har til å nøytralisere mus IL-1 β *in vivo*, for å understøtte anvendelsen av dette antistoffet i musemodeller av sykdom. Det ble bestemt at AB7 har en affinitet for human IL-1 β som er ~ 10000 ganger høyere enn affiniteten for mus IL-1 β , og en *in vitro* potens i D10.G4.1-analysen som er ~ 1000 ganger høyere enn den for mus IL-1 β . I C57BL/6 musemodellen med IL-6-avlesning, ble musene injisert AB7 (3 eller 300 μ g) eller PBS-konstituentkontroll i.p. 24 timer før en s.c. injeksjon av human (Figur 2B, panel A) eller mus (Figur 2B, panel B) IL-1 β (20 ng). Blod ble tatt 2 timer senere og serumprøver ble analysert med hensyn til IL-6-nivåer ved ELISA. Disse data viser maksimal suppresjon av IL-6-nivåer (~ 75 %) induert ved human IL-1 β ved 3 μ g (panel A), mens submaksimal suppresjon av IL-6-nivåer (~ 50 %) induert av mus IL-1 β ble demonstrert med 300 μ g (panel B). Disse resultatene er overensstemmende med observasjonen av betydelig høyere affinitet og *in vitro* potens av AB7-antistoffet for human IL-1 β , sammenlignet med mus IL-1 β . I tillegg indikerer dataene at dette antistoffet kan anvendes for mus *in vivo* sykdomsmodeller med en passende høyere dose enn nødvendig for behandling av humane individer, hvor antistoffet har betydelig høyere affinitet og potens. Når det gjelder andre IL-1 β -antistoffer, slik som for eksempel andre antistoffer beskrevet og/eller angitt heri, som ikke oppviser betydelig lavere affinitet og *in vitro* potens for mus IL-1 β , behøver høyere dosejusteringer i musemodeller ikke være nødvendig.

EKSEMPEL 3

Farmakokinetikk for et anti-IL-1 β -antistoff etter administrering av en enkelt intravenøs eller subkutan dose til rotter

For å undersøke den farmakokinetiske profilen ble et IL-1 β -antistoff betegnet AB7 administrert til voksne hannrotter som en intravenøs (IV) bolus inn i halevenen ved doser på 0,1, 1,0, eller 10 mg/kg (Gruppe 1, 2 og 3 henholdsvis) eller en subkutan (SC) dose mellom skulderbladene på 1,0 mg/kg (Gruppe 4). Blodprøver ble oppsamlet via halsvenekanylen eller det retro-orbitale sinus til fastsatte tidspunkter i opptil 91 dager etter dosering. Blodprøver ble sentrifugert for å oppnå serum. Prøver ble analysert for konsentrasjonen av anti-IL-1 β -antistoff ved anvendelse av en alkalisk fosfatase-basert ELISA analyse som følger.

IL-1 β (Preprotech) ble fortynnet til 0,5 μ g/ml i PBS og 50 μ l av denne løsningen ble tilsatt til brønner i Nunc-Immuno Maxisorp mikrotiterplater (VWR) og inkubert over natten ved 2-8 °C. Antigenløsningen ble fjernet 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 1 time ved romtemperatur. Etter blokkering ble brønnene vasket tre ganger med vaskebuffer (1X PBS, inneholdende 0,05 % Tween 20). 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 to ganger seriefortynninger fra 2000 til 0,24 ng/ml. Hvert gjentak og fortynninger av standarder, prøver og kontroller (50 μ l) ble overført til de blokkerte mikrotiterplatene og inkubert i 1 time ved 37 °C. Etter inkubasjon ble brønnene vasket 3 ganger med vaskebuffer. Alkalisk fosfatase-konjugert geit anti-humant 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). Femti μ l av det fortyndede konjugatet ble tilsatt til alle brønnene bortsett fra BLANK-brønnene som mottok kun 50 μ l konjugat-fortynningsmiddel. Platene ble inkubert i 1 time ved 37 °C og deretter ble alle brønnene vasket 3 ganger med vaskebuffer og 3 ganger med avionisert vann. Substratet p-nitrofenylfosfat (1 mg/ml i 10 % dietanolaminbuffer, pH 9,8) ble tilsatt til alle brønnene og fargeutvikling fikk pågå i 1 time ved romtemperatur, hvorefter 50 μ l 1N NaOH ble tilsatt for å stanse reaksjonen. Absorbansen ved 405 nm ble bestemt ved anvendelse av en SPECTRAMax M2 plateleser (Molecular Devices, Menlo Park, CA) og en standardkurve ble deretter trukket opp som A_{405} versus ng/ml av antistoffstandard. Det ble foretatt en regresjonsanalyse og konsentrasjoner ble bestemt for prøver og kontroller ved interpolering fra standardkurven. Kvantifiseringsgrensen var 40 ng/ml.

Som vist i Figur 3, avtok serumkonsentrasjoner bi-eksponentielt blant IV dose-gruppene. En kompartmental analyse 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 $0,189 \pm 0,094$ 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 1 mg/kg subkutan dose av AB7 økte serumnivåer 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.

EKSEMPEL 4

Farmakokinetikk for et anti-IL-1 β -antistoff etter administrering av en enkelt intravenøs dose til cynomolgusaper

Voksne hann og hunn cynomolgusaper mottok anti-IL-1 β -antistoffet betegnet AB7 som en intravenøs (IV) enkelt bolusinjeksjon ved doser på 0,3, 3,0 eller 30 mg/kg. Blodprøver ble oppsamlet fra dyr før dose, 5 minutter, 4 og 8 timer etter dosering på dag 1, og dagene 2, 4, 8, 11, 15, 22, 29, 43 og 56. Prøver ble analysert med hensyn til konsentrasjonen av IL-1 β -antistoff ved anvendelse av en alkalisk fosfatase-basert ELISA-analyse som følger.

IL-1 β -løsning ble fortynnet til 0,5 $\mu\text{g/ml}$ i PBS og 50 μl av denne løsningen ble tilsatt til brønner av Nunc-Immuno Maxisorp mikrotiterplater (VWR) og inkubert over natten ved 2-8 °C. Antigenløsningen ble fjernet og 200 μl blokkeringsbuffer [1% bovint serumalbumin (BSA) i 1X PBS inneholdende 0,05 % Tween 20] ble tilsatt til alle brønnene og deretter inkubert i 1 - 4 timer ved romtemperatur. Etter blokkering ble brønnene av hver plate vasket tre ganger med vaskebuffer (1X PBS, inneholdende 0,05 % Tween 20). Standarder, prøver og kontroller ble fortynnet i prøve-fortynningsmiddel (2 % Normal Cynomolgus Serum (NCS) i 1X PBS inneholdende 1 % BSA og 0,05 % Tween 20). Anti-IL-1 β standardløsninger ble fremstilt to ganger seriefortynninger fra 8000 ng/ml. Hvert replikat og fortynning av standarder, prøver og kontroller (50 μl) ble overført til de blokkerte mikrotiterplatene og inkubert i 1 time ved 37 °C. Etter den primære inkubasjonen ble brønnene vasket 3 ganger med vaskebuffer og 50 μl biotinylert rhIL-1 β ble tilsatt til alle brønnene. Platene ble deretter inkubert i 1 time ved 37 °C. Brønnene ble vasket 3 ganger med vaskebuffer og en tredje inkubasjon med femti μl fortynnet alkalisk fosfatase-konjugert streptavidin ble tilsatt til alle brønnene bortsett fra BLANK-brønnene, som kun mottok 50 μl fortynningsmiddel. Platene ble inkubert i 30 minutter ved 37 °C, og deretter ble alle brønnene vasket 3 ganger med vaskebuffer og 3 ganger med avionisert vann. Substratet p-nitrofenylfosfat (1 mg/ml i 10 % dietanolaminbuffer, pH 9,8) ble tilsatt til alle brønnene. Fargeutvikling fikk pågå i mørke i 1 time ved romtemperatur, hvorefter 50 μl 1N NaOH ble tilsatt for å stanse reaksjonen.

Absorbansen ved 405 nm ble bestemt for alle brønnene ved anvendelse av en SPECTRAMax M2 Plateleser (Molecular Devices, Menlo Park, CA). En standardkurve ble deretter trukket opp som A_{405} versus ng/ml av anti-IL-1 β standard. Det ble foretatt en 4-parameter regresjonsanalyse og konsentrasjoner ble bestemt for prøver og kontroller ved interpolering fra standardkurven. Kvantifiseringsgrensen var 40 ng/ml.

For enkeltdose 0,3 og 3 mg/kg-gruppene avtok serumnivåene av anti-IL-1 β -antistoff med en gjennomsnittlig alfafase halveringstid på $9,40 \pm 2,00$ timer, fulgt av en betafase halveringstid på $13,3 \pm 1,0$ dager (Figur 5). I cynomolgusaper som mottar en enkelt IV injeksjon på 30 mg/kg, avtok serumnivåer av antistoff hurtigere, med alfafase halveringstid på $10,9 \pm 3,2$ timer, fulgt av en betafase halveringstid på $7,54 \pm 1,79$ dager. Utforming av plasmakonsentrasjon-tid-profiler for doser på 0,1, 0,3, 1 og 10 mg/kg administrert ved fem månedlige intervaller ble også foretatt og er vist i Figur 5.

Eksempel 5

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

Måling av cytokiner i blod under en sykdom eller behandling av en sykdom kan være anvendelig for bestemmelse av alvorlighetsgrad av sykdom eller respons på en behandling. Vanligvis blir cytokinnivåer målt i serum, men denne fremgangsmåten måler ikke nødvendigvis totale cytokiner. Mange cytokiner kan være inne i celler (intracellulære). I tillegg kan en celledes evne til å produsere et cytokin være mer nyttig informasjon enn nivået av sirkulerende cytokin.

En fremgangsmåte for stimulering av helblod ble anvendt 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, og deretter ble 250 μ l av helblodet tilsatt til hvert 4 ml Orange top Corning sterile kryorør som følger:

Kontrollserier

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

Testserier

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

Alle rørene ble grundig blandet ved anvendelse av en 10 sekunders vortex-risting. Kontrollserie-rørene A1-10 ble deretter tilsatt ytterligere 100 μ l RPMI, ble vortex-ristet i

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

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

Som vist i Figur 6 var høyaffinitets anti-IL-1 β -antistoffet AB7 svært effektivt med hensyn til å inhibere produksjonen av IL-1 β i humant blod. I et gjennomsnitt av tre humane prøver inhiberte antistoffet produksjon av IL-1 β induisert av *Staphylococcus epidermidis* med 50 % ved 0,1 pM og med 75 % ved 3 pM. Ved 100 pM var inhiberingen 100 %. Interferon gamma (IFN γ) ble induisert med *Staphylococcus epidermidis*, og AB7 reduserte IFN γ induisert av *Staphylococcus epidermidis* med 75 % ved 100 pM.

Eksempel 6

Farmakokinetikk for et anti-IL-1 β -antistoff etter administrering av en enkelt intravenøs dose til mennesker

Farmakokinetikk til et IL-1 β -antistoff som har de ovennente egenskapene ble demonstrert i en fase I human klinisk studie. Nærmere bestemt ble det foretatt en dobbelt-blindet, placebokontrollert human klinisk studie hos type 2-diabetespasienter og data initielt oppnådd fra fem pasienter som mottok IL-1 β -antistoffet betegnet AB7 (beskrevet ovenfor) ved en dose på 0,01 mg/kg via intravenøs infusjon ved konstant hastighet ble anvendt for å undersøke farmakokinetikk.

På dag 1 av studien ble antistoff administrert enten ved en 30 minutters intravenøs infusjon ved konstant hastighet. Sikkerhetsvurderinger, inkludert registrering av bivirkninger, fysisk undersøkelse, vitale tegn, kliniske laboratorietester (f.eks., blodkjemi, hematologi, urinalyse), plasmacytokin-nivåer og elektrokardiogrammer (ECG) ble foretatt ved anvendelse av medisinsk standardpraksis kjent på området. Blodprøver

ble oppsamlet 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 etter administrering for å bestemme IL-1 β -antistoffnivåer (farmakokinetikk). Preliminær analyse av farmakokinetikken til IL-1 β -antistoffet i individer som mottar en enkelt IV dose på 0,01 mg/kg viste serumkonsentrasjon-tid-profiler med en endelig halveringstid på 22 dager, clearance på 2,9 ml/dag/kg og distribusjonsvolum i det sentrale kompartiment på 50 ml/kg, svært likt serumvolum (Figur 7).

Interim-analyse av farmakokinetiske data etter IV administrering av en enkeltdose av AB7 (XOMA 052) til individer i 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 eller 1,0 mg/kg dosegruppene bekreftet ytterligere at serumkonsentrasjon-tid-profilene med en terminal halveringstid på 22 dager, clearance på 2,54 ml/dag/kg og distribusjonsvolum i det sentrale kompartiment på 41,3 ml/kg, var svært likt serumvolum (Figur 8).

Eksempel 7

Effekter av et IL-1 β -antistoff på CRP i humane individer med type 2-diabetes

C-reaktivt protein (CRP), som blir frigjort av leveren i respons til forskjellige stress-triggere, inkludert IL-6, produsert i respons til IL-1, ble også målt i serum til de samme tidspunkter som PK-prøvene for å bestemme aktiviteten av antistoffet i mennesker. En enkelt dose av XOMA 052 reduserte ultrasensitivt C-reaktivt protein (usCRP)-nivåer, et standardmål på systemisk inflammasjon assosiert med multiple sykdommer og en indikator på hjerterisiko, i alle doseringsgruppene behandlet sammenlignet med placebo. Som vist i Figur 9 var median prosent reduksjon i usCRP 28 dager etter en enkeltdose av XOMA 052, lik 33, 46, 47, 36 og 26 for henholdsvis 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 og 1,0 mg/kg dosegruppene, sammenlignet med 4 prosent for placebo. Aktiviteten som var et resultat av en enkelt administrering av antistoff bed en dose på 0,01 mg/kg indikerer at til og med lavere doser kan anvendes.

Eksempel 8

Anvendelse av et IL-1 β -antistoff ved behandling av gikt i en dyremodell

Effekt av et IL-1 β -antistoff, slik som et antistoff som har de tidligere nevnte egenskapene eller som beskrevet heri, ble evaluert i en akutt musemodell av gikt. Den akutte musemodellen av gikt evaluerer evnen av et terapeutisk middel til å blokkere mononatriumurat (MSU) krystall-indusert akutt peritonitt (Martinon et al., 2006, Nature 440:237-241). Nærmere bestemt ble peritonitt induisert ved injeksjon av 0,5 mg MSU-krystaller inn i peritonealhulen hos Balb/c-mus. Musene var behandlet 2 timer tidligere med intraperitoneal injeksjon av isotype kontrollantistoff eller anti-IL-1 β -antistoff XOMA

052 (også referert til som AB7 heri, beskrevet ovenfor) ved 10 mg/kg. For sammenligning mottok én gruppe mus Anakinra ved 30 mg/kg samtidig som MSU-injeksjonen. Etter 6 timer ble peritoneal lavage utført og lavage-væsken ble sentrifugert for å oppsamle cellene. Celler ble tellet og en fraksjon ble anvendt for cytopsin og leukocytt differensiell telling. Peritonitt ble målt ved å beregne antall nøytrofiler i lavage væsken. Antall nøytrofiler blir bestemt ved å multiplisere det totale celledetallet i lavagen med prosent av nøytrofiler i den differensielle tellingen. Som vist i Figurene 8 A og 8B var XOMA 052-antistoffet i stand til å blokkere nøytrofil og makrofag infiltrasjon, og redusere peritonitt induisert av MSU-krystallene i forhold til PBS og isotype-kontrollene ($p < 0,05$, uparet t-test). Det var ingen signifikant forskjell mellom behandling med 10 mg/kg XOMA 052 og 30 mg/kg Anakinra i musemodellen.

Eksempel 9

Anvendelse av et IL-1 β -antistoff ved behandling av gikt

IL-1 β -antistoffer eller fragmenter, slik som de som har de tidligere nevnte egenskapene eller beskrevet heri, kan administreres til et individ (f.eks., human pasient) for terapeutisk behandling og/eller forebygging av gikt. Nærmere bestemt blir, i ett eksempel, et IL-1 β -antistoff XOMA 052 (også kjent som AB7, beskrevet ovenfor) anvendt for den terapeutiske behandlingen av pasienter som viser tegn og symptomer på gikt. Sikkerhet og effektivitet av IL-1 β -antistoffet for gikt er vist i én eller flere humane kliniske studier, inkludert for eksempel et forsøk med følgende design hos individer med tilbakevendende akutt gikt.

Individer kan inkluderes i studien dersom de oppfyller alle de følgende kriteriene:

- Akutt gikt diagnostisert ved at den oppfyller kriteriene fra 1977 "Criteria for the Classification of Acute Arthritis of Primary Gout" (American Rheumatism Association, ACR). En diagnose på akutt gikt bekreftes ved a) tilstedeværelse av karakteristiske uratkrystaller i leddvæsken; b) en tofus bevist eller mistenkt å inneholde uratkrystaller ved mikroskopering med polarisert lys; eller c) tilstedeværelse av minst 7 av de følgende 12 kliniske, laboratorie- eller radiografiske fenomenene:

- Mer enn ett anfall av akutt artritt i løpet av livet
- Maksimal inflammasjon utviklet i løpet av 1 dag
- Anfall av monoartikulær artritt
- Observert rødhet i ledd
- Første metatarsofalangeal (MTP) ledd smertefullt eller hovent
- Unilateral første MTP ledd anfall
- Unilateralt tarsal anfall i ledd

- Tofus (påvist eller mistenkt)
- Hyperurikemi
- Asymmetrisk opphovning av et ledd ved røntgen/undersøkelse
- Subcortikale cyster uten erosjoner ved røntgen
- Leddvæske-kultur negativ for organismer under anfall

- Minst to akutte giktanfall i løpet av det foregående året

- Debut av nåværende akutte episode må ha oppstått ikke mer enn 48 timer før

administrering av studiemedikament på dag 0 og symptomene på det akutte anfallet må ikke ha avtatt i betydelig grad før dosering av studiemedikament.

En fase 1/2, dobbelt-blindet, placebo-kontrollert, parallell-gruppe, enkeltdose studie av sikkerhet og farmakokinetikk av XOMA 052-antistoff utført på individer som erfarer akutte anfall av gikt. Individer i parallelle doseringsgrupper med seks individer hver (multiple aktivt medikament-grupper og én placebo-gruppe) blir inkludert til å motta en enkelt IV-infusjon av studiemedikament (IL-1 β -antistoff eller placebo) ved doserings-nivåer vist i tabellen nedenfor.

Doserings-gruppe	Antall individer	Doseringsregime
A	6	Enkelt IV infusjon av antistoff ved 0,03 mg/kg
B	6	Enkelt IV infusjon av antistoff ved 0,1 mg/kg
C	6	Enkelt IV infusjon av antistoff ved 0,3 mg/kg
D	6	Enkelt IV infusjon av antistoff ved 1,0 mg/kg
E	6	Enkelt IV infusjon av antistoff ved 3,0 mg/kg
F	6	Enkelt IV infusjon av placebo

Individer som oppfyller alle valgbarhetskriteriene blir inkludert, randomisert i én av doseringsgruppene, og dosert på dag 0 med studiemedikament (antistoff eller placebo). Individer må doseres i løpet av 48 timer etter debut av det nye anfallet av akutt gikt. Et nytt anfall er definert som ett som følger minst 28 dager hvor individet er fritt for symptomer på akutt gikt.

Ukentlige vurderinger blir utført helt til dag 28, fulgt av vurderinger annenhver uke helt til dag 56. Sikkerhet blir vurdert ved serielle målinger før og etter behandling av vitale tegn, kliniske laboratorievurderinger, og registrering av kliniske bivirkninger. PK-data blir oppsamlet og analysert ved tidspunktene vist nedenfor.

Farmakokinetisk vurdering

Serumprøver blir oppsamlet på dag 0 (baselinje) før administrering av studiemedikament, og ved valgte tidspunkter etter administrering av studiemedikamentet for måling av serumkonsentrasjoner av IL-1 β -antistoff.

Fra disse serumkonsentrasjonene blir egnede farmakokinetiske parametere beregnet. Disse beregningene er forventet å anvende kompartmentale og ikke- kompartmentale farmakokinetiske metoder for å anslå følgende parametre: maksimal konsentrasjon, serum clearance, halveringstider, distribusjonsvolumer og gjennomsnittlig residensid. Populasjon PK og PD-analysemetoder kan anvendes for å bedre forstå PK/PD karakteristika for IL-1 β -antistoffet i denne populasjonen.

IL-1 β -antistoff farmakokinetikken blir evaluert med hensyn til korrelasjon med biologiske markører og kliniske resultater. I tillegg blir det utført en vurdering av korrelasjon mellom medikament-eksponering og hvilket som helst bevis for toksisitet av medikament.

Biologisk og klinisk aktivitet

Som mål for den biologiske aktiviteten av IL-1 β -antistoff hos individer med akutt tilbakevendende gikt, blir CRP og ESR oppsamlet som inflammatoriske markører. Den kliniske status for gikten, inkludert smertenivå og tidsforløp, blir målt ved periodisk legevurdering og individets selvurdering. Klinisk vurdering av den akutte giktepisoden omfatter en leges vurdering av rødhet, ømhet og hevelse (hvor ingen av disse kan tilskrives andre årsaker), en leges globale vurdering, og et individs selvurdring av smerte, en pasients globale vurdering, og en HAQ. Individer blir gitt en diett og blir bedt om å rapportere sine symptomer annenhver time under våken tid i de første 24 timer etter dosering, fulgt av to ganger per dag inntil dag 7, én gang per dag inntil dag 14, og kun når symptomer dukker opp igjen deretter.

Den kliniske vurderingen av akutt gikt omfatter følgende komponenter:

Legens vurderinger:

- Legens globale vurdering (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av erytem (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av varme (10 punkts analog skala)
- Legens vurdering av opphovning (10 punkts analog skala)

Individets vurderinger:

- Pasientens globale vurdering (10 punkts analog skala)
- Smerte ved hvile (10 punkts analog skala)

- Smerte ved vektbelastning/bevegelse (10 punkts analog skala)
- Spørreskjema helsevurdering ("Health Assessment Questionnaire") (HAQ)

I tillegg ble de følgende vurderinger foretatt ved ulike tidspunkter for oppsamling av prøver:

- Serum oppsamlet ved forskjellige tidspunkter blir anvendt for å vurdere nivåer av adipokiner og cytokiner som kan være produsert av betent fettvev hos gikt pasienter. Slike adipokiner/cytokiner omfatter, for eksempel, adiponektin, resistin, leptin, visfatin, PAI 1, TNF α , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES og MCP-1.
- En helblodprøve blir oppsamlet og analysert for cytokiner som kan omfatte, for eksempel, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8 og IL-1 α .

PK prøvetakingsplan

Tidspunkt	Alle grupper
Dag 0	
Før infusjon	X
EOI	X
EOI + 30 \pm 5 min	X
EOI + 4 t \pm 15 min	X
Dag 1 (24 \pm 2 t etter EOI)	X
Dag 2 (48 \pm 2 t etter EOI)	X
Dag 3 (72 \pm 3 t etter EOI)	X
Dag 4 (96 \pm 3 t etter EOI)	X
Dag 7	X
Dag 9	X
Dag 11	X
Dag 14	X
Dag 21	X
Dag 28	X
Dag 42	X
Dag 56	X

Adipokiner/cytokiner er analysert ved anvendelse av prøver oppsamlet ved noen av eller alle PK tidspunktene. Målte adipokiner/cytokiner kan omfatte, for eksempel, adiponektin, resistin, leptin, visfatin, PAI-1, TNF α , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES og MCP-1. EOI = "End Of Infusjon"

Basert på resultater oppnådd fra den første kliniske studien blir ytterligere kliniske forsøk utført. Slike forsøk kan omfatte én eller flere av de ovennevnte dosene og doseringsregimene, så vel som eller alternativt én eller flere andre doser av IL-1 β -antistoff, lengre behandling og/eller observasjonsperioder og høyere antall pasienter per gruppe (f.eks., minst omtrent 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000).

Anvendelse av betegnelsene "en" og "et" og "den" og lignende referanser i sammenheng med beskrivelsen av oppfinnelsen (spesielt i sammenheng med de etterfølgende kravene) skal oppfattes å omfatte både entall og flertall dersom ikke annerledes angitt heri eller det klart motsies av konteksten. Betegnelsene "omfattende," "har", "inkludert", og "inneholdende" skal oppfattes som åpne betegnelser (dvs., i betydningen "inkludert, men ikke begrenset til,") dersom ikke annerledes angitt. Der hvor det er benyttet en åpen betegnelse for å beskrive et trekk eller element av oppfinnelsen, er det spesifikt tenkt at et lukket begrep kan anvendes i stedet for det åpne uten å gå utover oppfinnelsens idé og omfang. Oppregning av områder for verdier heri er kun ment å tjene som en stenografisk metode for individuelt å referere til hver separat verdi som faller innenfor området, dersom ikke annerledes angitt heri, og hver separat verdi er inntatt i beskrivelsen som om den var individuelt angitt heri. Alle fremgangsmåter beskrevet heri kan utføres i hvilken som helst passende rekkefølge dersom ikke annerledes angitt heri eller det klart motsies av konteksten. Anvendelsen av ethvert eksempel, eller vendinger (f.eks., "slik som") som her er angitt, er kun ment å bedre belyse oppfinnelsen.

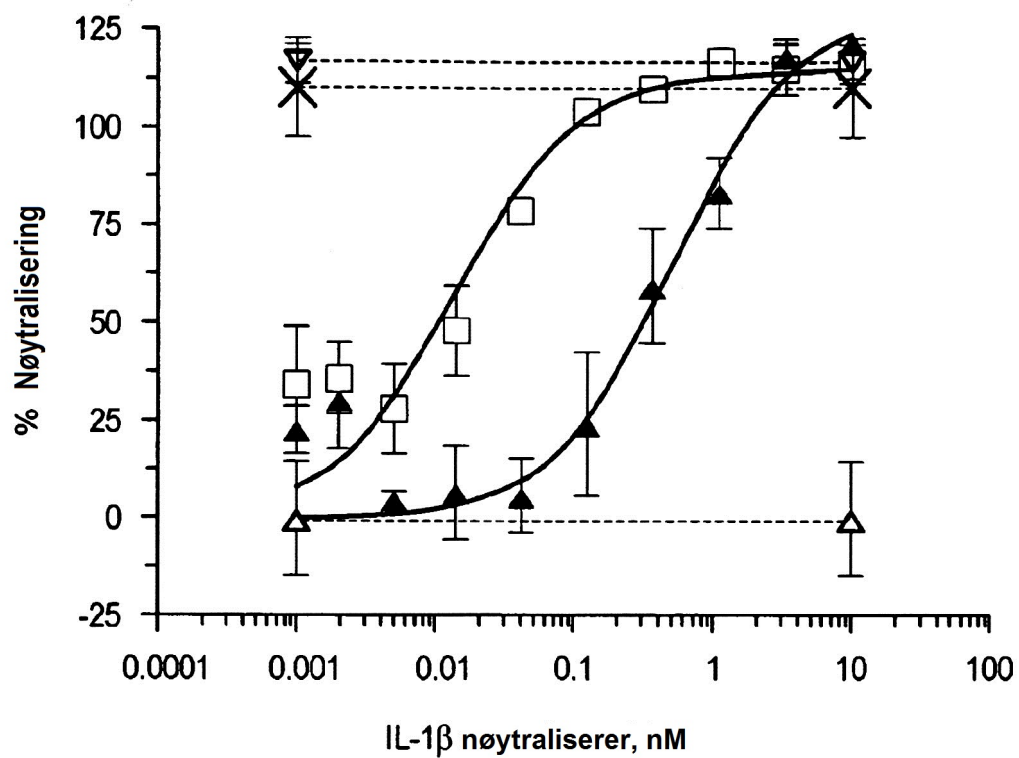
Foretrukne utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet i konteksten av beskrivelsen av oppfinnelsen, omfattende den beste måte kjent for oppfinnerene for utøvelse av oppfinnelsen. Variasjoner av de foretrukne utførelsesformene kan synes åpenbare for fagfolk etter lesing av den foregående beskrivelsen. Oppfinnerene forventer at fagfolk gjør bruk av slike variasjoner som passende.

Patentkrav

- 1.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ved behandling av gikt, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lett kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 5 og en tung kjede variabel region ifølge SEQ ID NO: 6.
- 2.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge krav 1, hvori gikten er kronisk eller akutt gikt.
- 3.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge krav 1-2, hvori antistoffet eller antistoff-fragmentet blir administrert i én eller flere doser på 1 mg/kg eller mindre av antistoff eller antistoff-fragment.
- 4.** Anti IL-1 β antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge krav 3, hvori den ene eller de flere dosene er minst 0,001 mg/kg av antistoff eller fragment.
- 5.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-4, hvori anti-IL-1 β -antistoffet eller fragmentet blir administrert ved subkutan, intravenøs eller intramuskulær injeksjon.
- 6.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-5, hvori administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser.
- 7.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-5, hvori administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori nevnte én eller flere etterfølgende doser er i en mengde som er omtrent lik eller mindre enn den initielle dosen.
- 8.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-5, hvori administrering av en initiell dose av antistoffet eller antistoff-fragmentet blir fulgt av administrering av én eller flere etterfølgende doser, og hvori minst én av de etterfølgende dosene er i en mengde som er større enn den initielle dosen.

- 9.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-8, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon i leddsmerte.
- 10.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-9, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 20 % reduksjon i CRP-nivåer.
- 11.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge krav 1-10, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 20 % reduksjon i ESR.
- 12.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-9, hvori dosen av antistoffet eller fragmentet er tilstrekkelig til å oppnå minst 50 % reduksjon i leddsmerte, minst 20 % reduksjon i CRP og minst 20 % reduksjon i ESR.
- 13.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-12, hvori nevnte fremgangsmåte er i forbindelse med minst én ytterligere behandlingsmetode, hvori nevnte ytterligere behandlingsmetode omfatter å administrere minst ett farmasøytisk preparat omfattende et aktivt middel annet enn et IL-1 β -antistoff eller fragment.
- 14.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge krav 13, hvori nevnte minst ene farmasøytiske preparat omfattende et aktivt middel annet enn et IL-1 β -antistoff eller fragment er valgt fra gruppen bestående av et ikke-steroid antiinflammatorisk medikament (NSAID), et kortikosteroid, et adrenokortikotropt hormon, og et kolchicin.
- 15.** Anti-IL-1 β -antistoff eller IL-1 β -bindende fragment derav for anvendelse ifølge kravene 1-4, hvori antistoffet eller fragmentet derav har en lavere IC₅₀ enn en IL-1 β reseptorantagonist i en human helblod IL-1 β inhiberingsanalyse som måler IL-1 β -indusert produksjon av IL-8.

FIG. 1



□ Ab7

▲ Kineret

---X--- Ab7 alene, 10nM

---▽--- Kineret alene, 10nM

---△--- KLH8-G2 10nM

FIG. 2

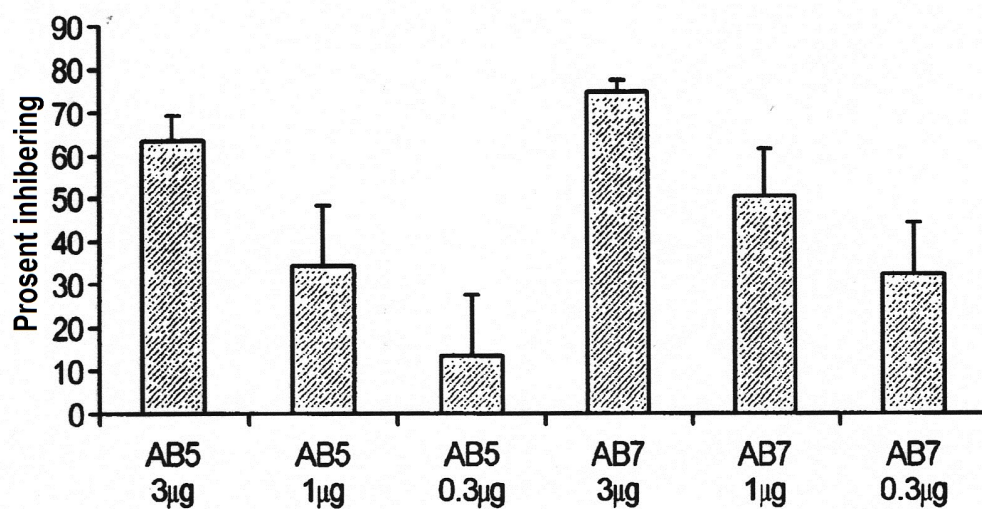


FIG. 2B

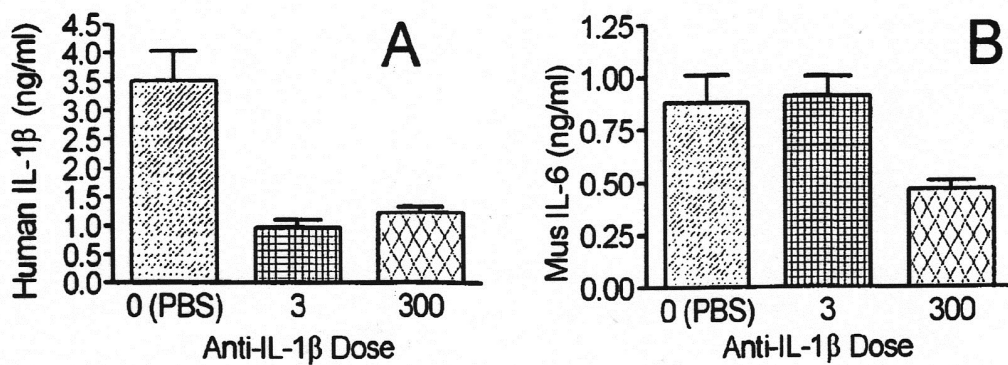


FIG. 3

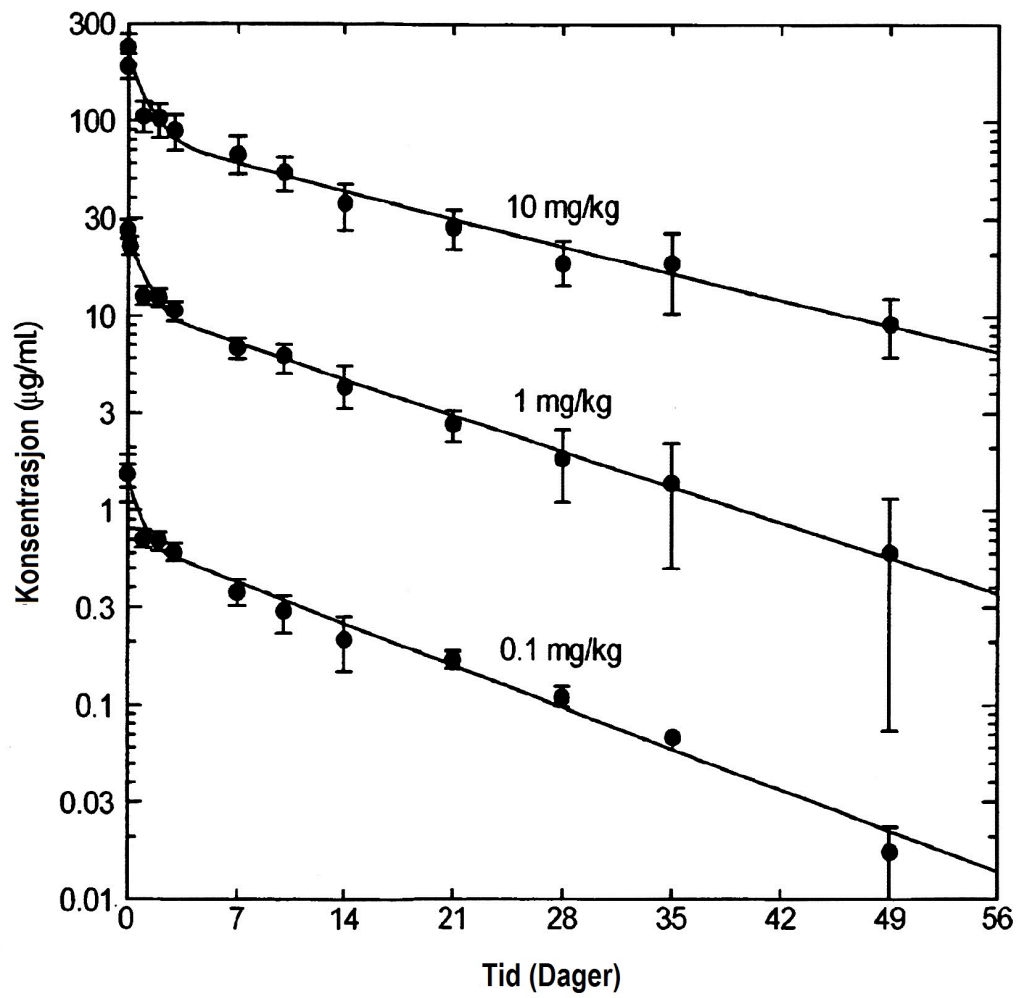


FIG. 4

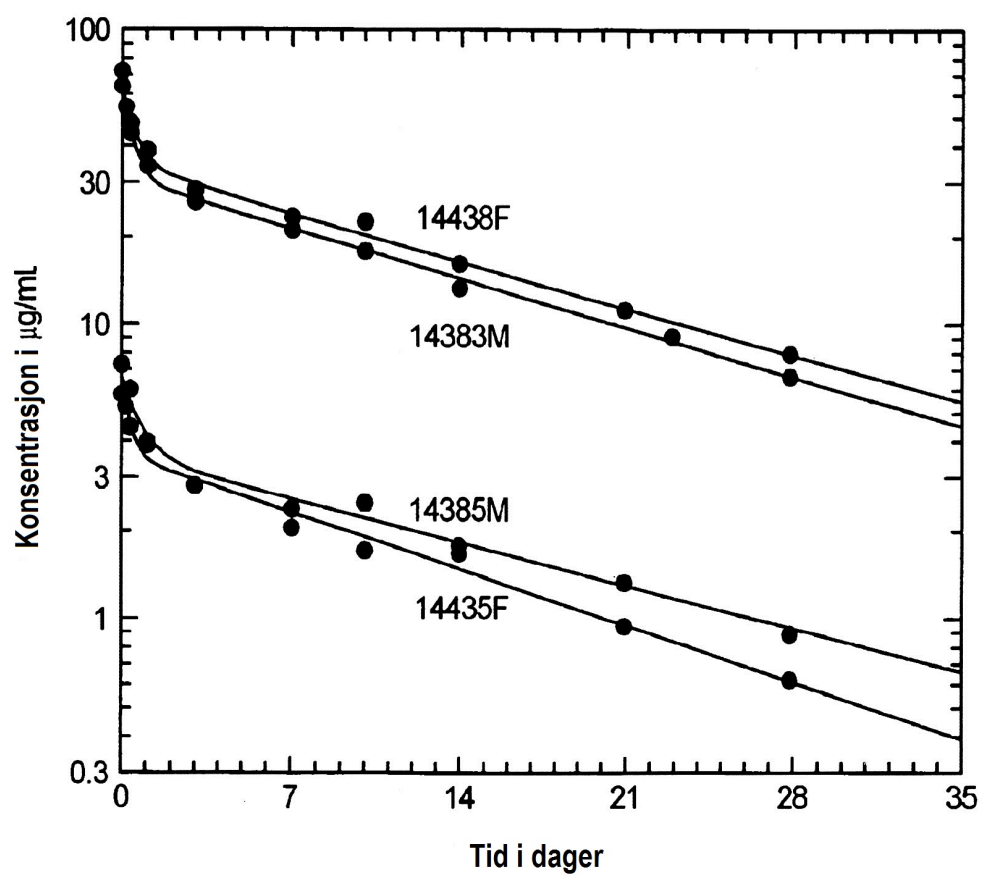


FIG. 5

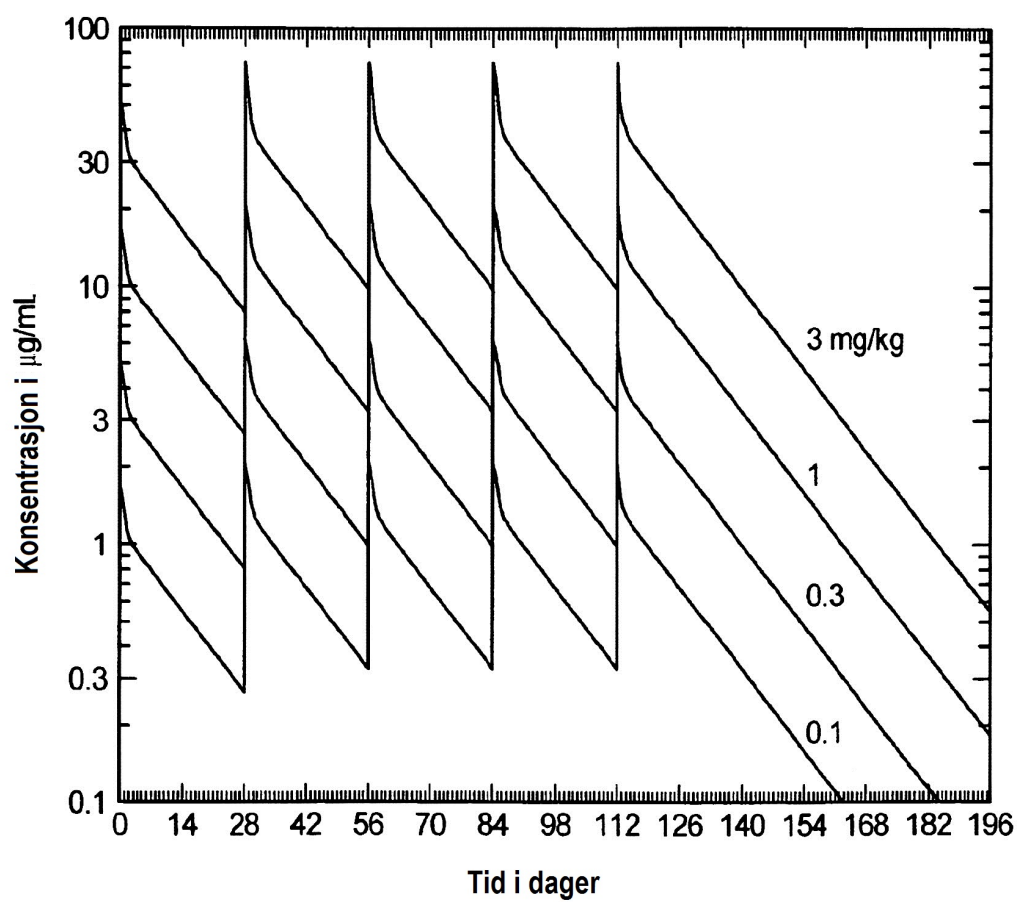


FIG. 7

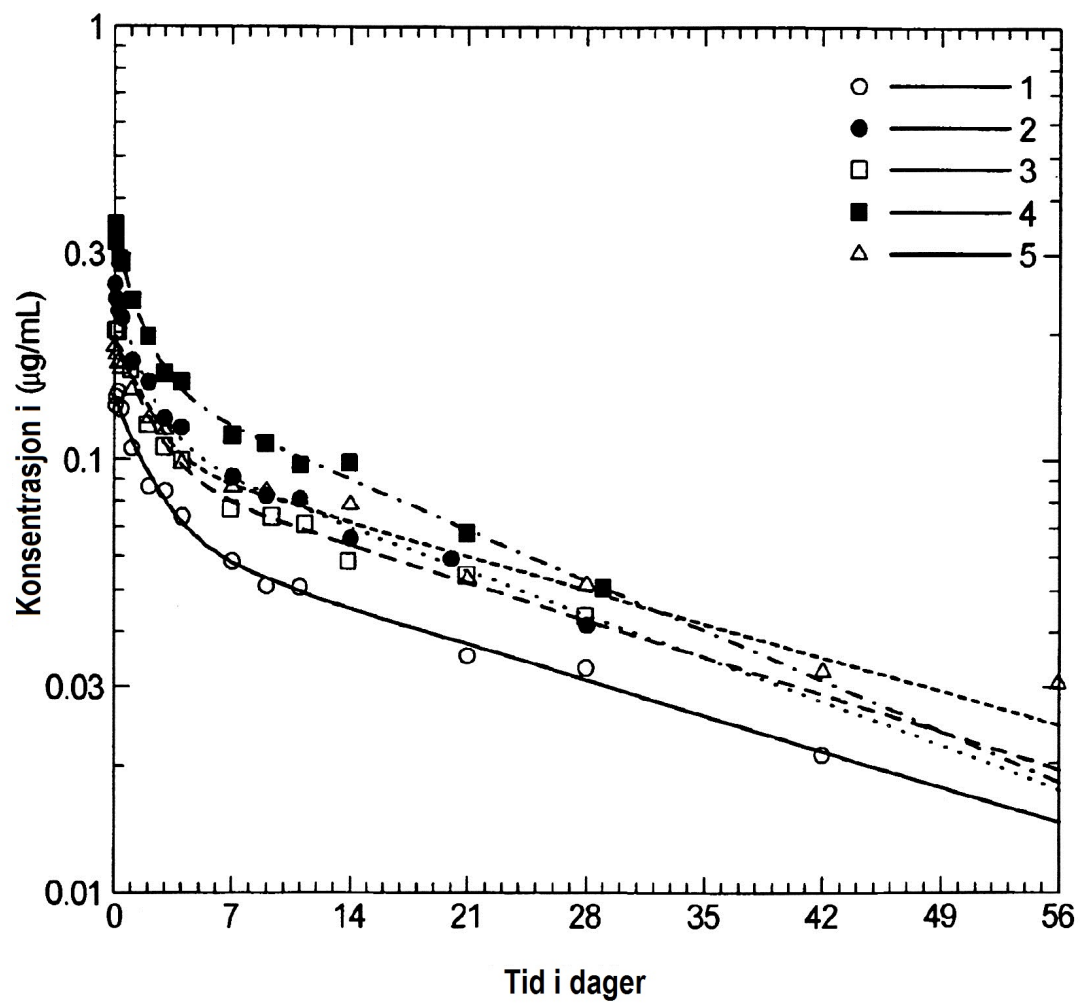
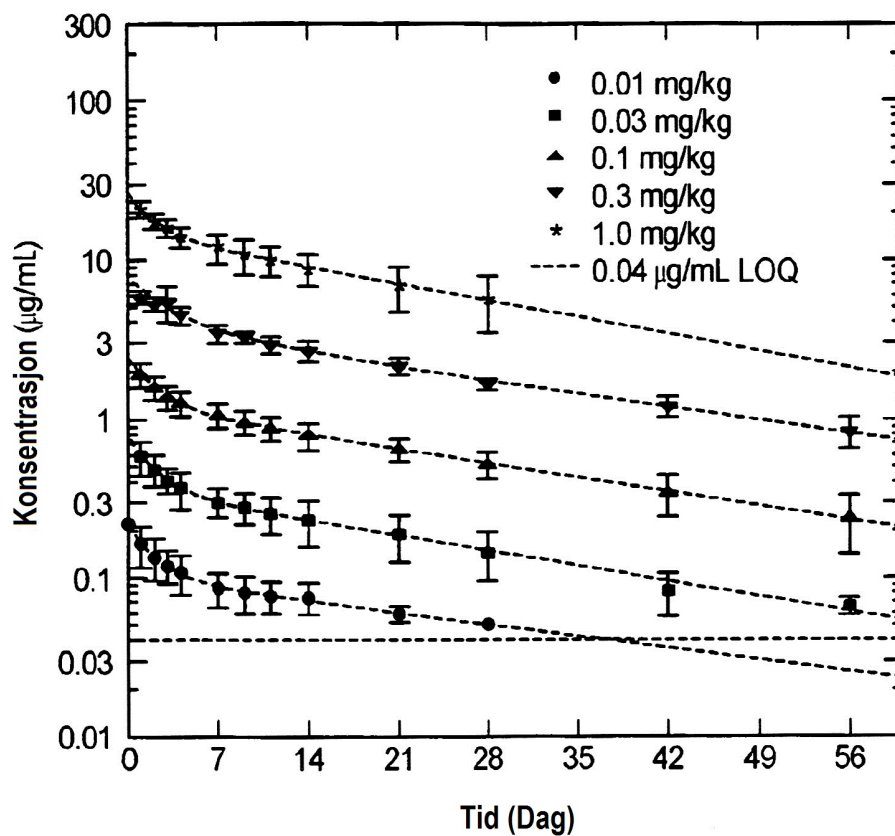


FIG. 8



$T_a = 1.42$ dager
 $T_B = 22.0$ dager
 $CL = 2.54$ ml/dag/kg
 $V_c = 41.3$ ml/kg
 $F_{\alpha} = 0.061$

LOQ = Kvantifiseringsgrense

FIG. 9

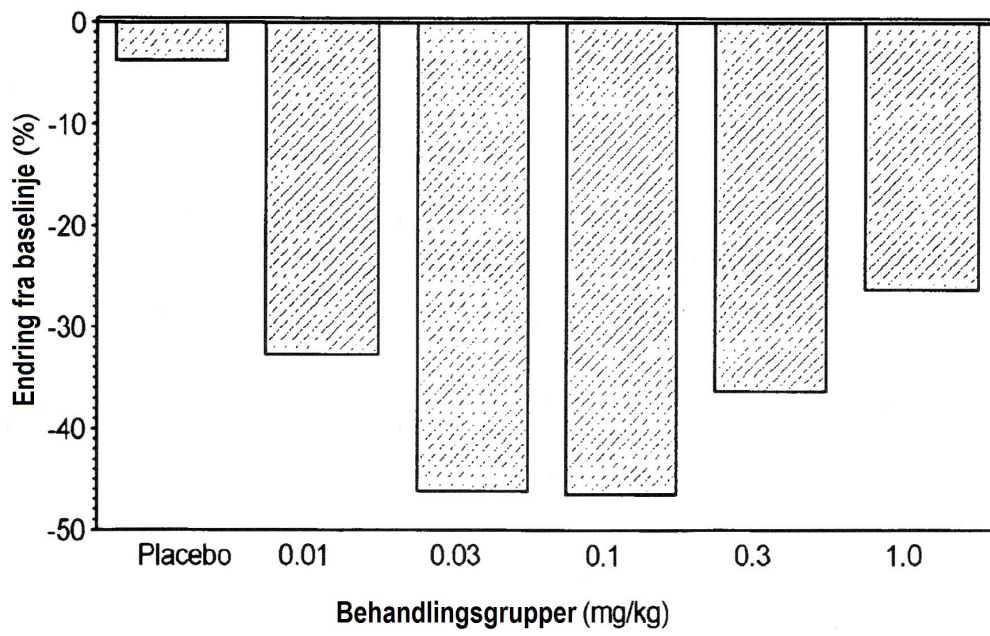


FIG. 10A

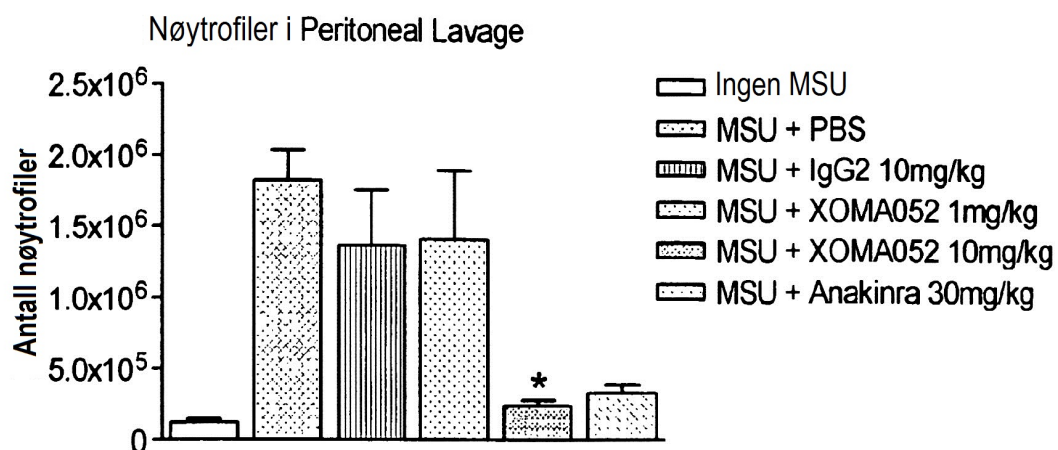


FIG. 10B

