



(12) PATENT

(19) NO

(11) 334490

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61M 5/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20035426	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.05 PCT/US2002/017790
(22)	Inng.dag	2003.12.05	(85)	Videreføringsdag	2003.12.05
(24)	Løpedag	2002.06.05	(30)	Prioritet	2001.06.08, US, 296961
(41)	Alm.tilgj	2004.02.03			
(45)	Meddelt	2014.03.17			
(73)	Innehaver	AbbVie Biotechnology Ltd, Clarendon House 2 Church Street, BM- HM11 HAMILTON, Bermuda			
(72)	Oppfinner	Joachim Kempeni, 75 Gimmeldinger Street, D-67433 Neustadt, Tyskland Roberta Weiss, 936 Clover Hill Road, Wynnewood, PA 19096, USA Steven A Fischkoff, 5 Canoe Brook Road, Short Hills, NJ 07078, USA			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Sammensetning omfattende anti-TNF-alfa-antistoff for anvendelse ved behandling av autoimmune sykdommer, samt forhåndsfylt sprøyte omfattende nevnte sammensetning			
(56)	Anførte publikasjoner	Rau A et al., Arthritis and Rheumatism, 1999, 42:s499, abstract 1978 "LONG-TERM TREATMENT WITH THE FULLY HUMAN ANTI-TNF-ANTIBODY D2E7 SLOWS RADIOGRAPHIC DISEASE PROGRESSION IN RHEUMATOID ARTHRITIS" KEMPENI J, ANN RHEUM DIS 2000, 59:i44-i45, "Update on D2E7: a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody". WO 1997029131 A1 SCHATTENKIRCHNER, M et al, Efficacy and Tolerability of Weekly Subcutaneous Injections of the Fully Human Anti-TNF-Antibody D2E7 in Patients with Rheumatoid Arthritis - Results of a Phase I Study, Arthritis and Rheumatism, 1998, Vol. 41(S9), side S57 SCHATTENKIRCHNER, M et al, Long-Term Use Of The Fully Human Anti-TNF Antibody D2E7 In Combination With Methotrexate In Active Rheumatoid Arthritis, Arthritis & Rheumatism, 2000, Vol 43. (S9), side S228 RAU, R. et al., Ehrfahrungen mit D2E7, Akt. Rheumatol., 2000, Vol. 25, side 83-88			
(57)	Sammendrag				

Metoder for å behandle lidelser hvor TNFa-aktivitet er skadelig via toukentlig, subkutan administrasjon av humane antistoff, fortrinnsvis rekombinante humane antistoff, som spesielt binder til human tumornekrosefaktor α (hTNFa) er beskrevet. Antistoffet kan bli administrert med eller uten metotrexat. Disse antistoff har høy affinitet for hTNFa (for eksempel $K_d = 10^{-8}$ M eller mindre), en sakte avkoblingshastighet for hTNFa dissosiasjon (for eksempel $K_{off} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$ eller mindre) og nøytraliserer hTNF(-aktivitet *in vitro* og *in vivo*). Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan være et antistoff av full lengde eller en antigenbindende del derav. Sett inneholdende en farmasøytisk sammensetning samt instruksjoner for dosering, og forhåndsfylte sprøyter inneholdende farmasøytiske sammensetninger er også omfattet av oppfinnelsen.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Tumor nekrosefaktor α (TNF α) er et cytokin dannet av flere celletyper, innbefattende monocytter og makrofager som opprinnelig ble identifisert basert på deres kapasitet til å indusere nekrose av visse musetumorer (se for eksempel Old, L. (1985) *Science* 230:630-632). Deretter ble en faktor cachectin assosiert med cachexia, vist å være det samme molekyl som TNF α . TNF α har vært implikert i å frem-
5 skaffe sjokk (se for eksempel Beutler, B. og Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518; Beutler, B. og Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655). Videre har TNF α vært implikert i patofysiologien av en rekke andre humane sykdommer og lidelser, innbefattende sepsis, infeksjoner, autoimmune sykdommer, transplantatavstøtning og transplantat mot vertssykdom (se for eksempel Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K.J. og Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503).

På grunn av den skadelige rolle av humant TNF α (hTNF α) i en mengde humane lidelser har terapeutiske strategier blitt utarbeidet til å inhibere eller motvirke hTNF α -akti-
20 vitet. Spesielt har antistoff som binder til og nøytraliserer hTNF α blitt søkt som en mulighet til å inhibere hTNF α -aktivitet. Enkelte av de tidligste av slike antistoff var monoklonale museantistoff (mAbs) utskilt av hybridomer fremstilt fra lymfocytter av mus immunisert med hTNF α (se for eksempel Hahn T; et al., (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3814-3818; Liang, C-M., et al. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:847-854; Hirai, M., et al. (1987) *J. Immunol. Methods* 96:57-62; Fendly, B.M., et al. (1987) *Hybridoma* 6:359-370; Möller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S. Patent nr. 5.231.024 til Moeller et al.; Europeisk patentpublikasjon nr. 186 833 B1 til Wallach, D.; Europeisk patentsøknad publikasjon nr. 218 868 A1 til Old et al.; Europeisk patentpublikasjon nr. 260 610 B1 til Moeller, A., et al.). Selv om disse anti-hTNF α museantistoff ofte oppviste høy affinitet for hTNF α ,

(for $K_d \leq 10^{-9}M$) og var i stand til å nøytralisere hTNF α -aktivitet, kan deres anvendelse *in vivo* være begrenset av problemet assosiert med administrasjon av museantistoff til mennesker så som kort serum halveringstid, at de er
5 ute av stand til å sette i gang visse humane effektor-funksjoner og fremskaffelse av en uønsket immunrespons mot museantistoffet i et menneske (den "human antimus anti-stoff" (HAMA)reaksjonen).

I et forsøk på å overvinne problemene assosiert med anvendelse av fullstendig murine antistoff i mennesker har
10 murine anti-hTNF α -antistoff generelt blitt manipulert til å bli mer "humanlignende". For eksempel har kimeriske antistoff hvor de variable områder av antistoffkjedene er murinavledet og de konstante områder av antistoffkjedene
15 er humanavledet, blitt fremstilt (Knight, D.M, *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:1443-1453; PCT publikasjon nr. WO 92/16553 til Daddona, P.E., *et al.*). I tillegg har humaniserte antistoff hvor de hypervariable domener av de variable områder hos antistoffet er murinavledet, men resten
20 av de variable områder og de konstante områder av antistoffet er humanavledet, også blitt fremstilt (PCT publikasjon nr. WO 92/11383 til Adair, J.R., *et al.*). Imidlertid, fordi disse kimeriske og humaniserte antistoff fremdeles har enkelte murine sekvenser, kan de fremdeles frem-
25 skaffe en uønsket immunreaksjon, den humane antikimeriske antistoff (HACA) reaksjon, spesielt når administrert over lengre perioder, f.eks. for kroniske indikasjoner, så som revmatoid artritt (se f.eks. Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet*
30 344:1105-1110).

Et foretrukket hTNF α inhibitorisk middel til murine mAbs eller derivater derav (for eksempel kimeriske eller humaniserte antistoff) ville være et fullstendig humant anti-hTNF α -antistoff siden et slikt middel ikke ville frem-
35 skaffe HAMA-reaksjonen selv om det ble brukt over lengre perioder. Humane, monoklonale autoantistoff mot hTNF α har

blitt fremstilt ved å bruke humane hybridomteknikker (Boyle, P., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 152:556-568; Boyle, P., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 152:569-581; Europeisk patentsøknad publikasjonsnr. 614 984 A2 til Boyle, et al.). Imidlertid ble disse hybridomavlede, monoklonale autoantistoff rapportert å ha en affinitet for hTNF α som var for lav å regne ut med konvensjonelle metoder, var ute av stand til å binde oppløselig hTNF α og var ute av stand til å nøytralisere hTNF α -indusert cytotoxiskitet (Se Boyle, et al.; *supra*). Videre avhenger suksessen av den humane hybridomteknikk av den naturlige tilstedeværelse i humant perifert blod av lymfocytter som danner autoantistoff som er spesifikke for hTNF α . Visse studier har påvist serum autoantistoff mot hTNF α i mennesker (Fomsgaard, A., et al. (1989) *Scand. J. Immunol.* 30:219-223; Bendtzen, K., et al. (1990) *Prog. Leukocyte Biol.* 10B:447-452), mens andre ikke har dette (Leusch, H-G., et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 139:145-147).

Alternativt til naturlig forekommende, humane anti-hTNF α -antistoff ville være rekombinante hTNF α -antistoff. Rekombinante, humane antistoff som binder hTNF α med relativt lav affinitet (det vil si $K_D \sim 10^{-7}M$) og en rask avhastighet (det vil si $K_{Off} \sim 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$) har blitt beskrevet (Griffiths, A.D., et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734). Imidlertid, på grunn av deres relativt raske dissosiasjonskinetikk behøver disse antistoff ikke være egnet for terapeutisk bruk. I tillegg har et rekombinant, humant anti-hTNF α blitt beskrevet som ikke nøytraliserer hTNF α -aktivitet, men i stedet øker binding av hTNF α til overflaten av celler og øker internaliseringen av hTNF α (Lidbury, A., et al. (1994) *Biotechnol. Ther.* 5:27-45; PCT-publikasjon nr. WO 92/03145 til Aston, R. et al.).

Rekombinante, humane antistoff som binder oppløselig hTNF α med høy affinitet og sakte dissosiasjonskinetikk og som har kapasiteten å nøytralisere hTNF α -aktivitet, innbefattende hTNF α -indusert cytotoxiskitet (*in vitro* og *in vivo*)

og hTNF α -indusert celleaktivering, har også blitt beskrevet (se U.S. patent nr. 6.090.382). Typiske metoder for å administrere antistoff blir utført intravenøst på en ukentlig basis. Ukentlig dosering med antistoff og/eller
 5 ethvert medikament kan være kostbar, tungvint og resultere i en økning i antallet bieffekter grunnet administrasjonsfrekvensen. Intravenøs administrasjon har også begrensninger ved at administrasjonen vanligvis foretas av noen med medisinsk trening.

10 Fra artikkelen «Long-term treatment with the fully human anti-TNF-antibody D2E7 slows radiographic disease progression in rheumatoid arthritis» (Rau et al., Arthritis and Rheumatism (1999), 42: s. 499, abstract 1978) er det kjent behandling av pasienter med leddgikt
 15 med TNF α antistoff (D2E7), hvor antistoffet ble gitt i to-ukers intervaller over et år.

I artikkelen «Update on D2E7: a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody» (Kempeni J, Ann Rheum Dis 2000, 59: i44-i45) finnes det en oversikt over
 20 pasientstudier som har brukt D2E7 antistoffet ved behandling av pasienter med leddgikt, og i WO 1997029131 A1 er det beskrevet at D2E7 antistoffet binder TNF α både i in vitro og i in vivo forsøk.

Oppsummering av oppfinnelsen

25 Foreliggende oppfinnelse fremskaffer sammensetninger som angitt i krav 1 for ukentlige doseringsregimer for behandlingen av TNF α -assosierte lidelser, via en subkutan rute. Ukentlig dosering har mange fordeler i forhold til ukentlig dosering, innbefattende lavere antall totale
 30 injeksjoner, minsket antall injeksjonsstedreaksjoner (for eksempel lokal smerte og hevelse), øket pasientsamarbeid (det vil si grunnet mindre hyppige injeksjoner) og mindre omkostninger for pasienten så vel som helsearbeideren. Subkutan dosering er fordelaktig fordi pasienten selv kan

administrere en terapeutisk substans, for eksempel et humant TNF α -antistoff som er passende for både pasienten og helsearbeideren.

Antistoffene som benyttes i sammensetningene ifølge oppfinnelsen og som er slike som angitt i krav 1, er særpreget ved å binde til hTNF α med høy affinitet og sen dissosiasjonskinetikk og ved å nøytralisere hTNF α -aktivitet innbefattende hTNF α -indusert cytotoksitet (*in vitro* og *in vivo*) og hTNF α -indusert cellulær aktivering.

10 Antistoffene kan være av full lengde (for eksempel et IgG1 eller IgG4 antistoff) eller kan omfatte kun en antigenbindende del (for eksempel et Fab, F(ab')₂, scFv-fragment eller enkelt domene). De mest foretrukne, rekombinante antistoff ifølge oppfinnelsen, betegnet D2E7, har et lett-

15 kjedet CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 3 og et tungkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 4 (angitt i vedlegg B). Fortrinnsvis har D2E7-antistoffet et lettkjede variabelt område (LCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr.

20 1 og et tungkjede variabelt område (HCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 2. Disse antistoff er beskrevet i U.S. patent nr. 6.090.382, innbefattet i sin helhet heri per referanse.

I en utførelsesform fremskaffer oppfinnelsen

25 sammensetninger for å behandle lidelser hvor TNF α -aktivitet er skadelig. Disse sammensetninger kan benyttes i medikamenter til å inhibere human TNF α -aktivitet med subkutan tåkentlig administrasjon av et anti-TNF α -antistoff slik at lidelsen blir behandlet. Lidelsen kan for

30 eksempel være sepsis, en autoimmun sykdom (for eksempel revmatoid artritt, allergi, multippel sklerose, autoimmun diabetes, autoimmun uveitis og nefrotisk syndrom), en infeksjonssykdom, en lidelse, transplantatavstøtning eller transplantat mot vertssykdom, en pulmonar lidelse, en ben-

35 lidelse, en tarmlidelse eller en hjertelidelse.

I en behandling kan metotrexat bli administrert sammen med sammensetningen som omfatter et anti-TNF α -antistoff. Metotrexat kan også bli administrert før administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff, eller metotrexat kan bli
5 administrert etterfølgende administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff.

Anti-TNF α -antistoffet inneholdt i sammensetningen kan bli benyttet for å behandle lidelser hvor TNF α -aktivitet er skadelig. Enda mer foretrukket opptrer behandling med
10 toukentlig subkutan administrasjon av et isolert, humant antistoff eller en antigenbindende del derav. Antistoffet eller den antigenbindende del derav, dissosierer fortrinnsvis fra human TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{Off} hastighetskonstant på 1×10^{-3} s⁻¹
15 eller mindre, begge bestemt med overflate plasmonresonans, og nøytraliserer human TNF α cytotoxisitet i et standard *in vitro* L929-assay med en IC₅₀ på 1×10^{-9} M eller mindre. Mer foretrukket nøytraliserer det isolerte, humane antistoff eller antigenbindende del derav, human
20 TNF α cytotoxisitet i et standard *in vitro* L929-assay med en IC₅₀ på 1×10^{-10} M eller mindre.

Antistoffet eller den antigenbindende del derav som benyttes i de aktuelle sammensetningene, inneholder et LCVR som har CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av
25 SEKV ID nr. 3, og med et HCVR som har et CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 4 og hvor LCVR videre har et CDR2-domene som omfatter aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 5 og HCVR har videre et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 6
30 og hvor LCVR videre har CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 7 og HCVR har et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 8.

Antistoffet eller den antigenbindende del derav i den aktuelle sammensetningen inneholder fortrinnsvis et LCVR
35 omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 1 og et HCVR

omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 2. I visse utførelsesformer har antistoffet en IgG1 tungkjede konstant område eller et IgG4 tungkjede konstant område. I enda ytterligere utførelsesformer er antistoffet et Fab-
5 fragment, et F(ab')₂-fragment eller et enkeltkjede Fv-fragment.

Enda et annet aspekt av oppfinnelsen angår en forhåndsfylt sprøyte inneholdende en formulering omfattende en aktuell farmasøytisk sammensetning som angitt i krav 3. Sprøyten
10 omfatter et slikt anti-TNF α -antistoff og et farmasøytisk akseptabelt bæremateriale. Settene inneholder instruksjoner for toukentlig subkutan dosering av den farmasøytiske sammensetning for behandling av en lidelse hvor administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff er gunstig.

15 Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1A og 1B viser the American college of Rheumatology 20 (ACR20)- og ACR50-responser for pasienter som lider av revmatoid artritt (RA) etter subkutan dosering med anti-
stoffet D2E7 hver uke over et totale på tolv uker (1A)
20 eller subkutan dosering med antistoffet D2E7 og metotrexat hver annen uke (1B) over et totale på tjuefire uker. Disse data indikerer at dosering hver annen uke er like effektiv som dosering hver uke.

Figur 2 viser ACR20-, ACR50- og ACR70-responser for pasienter som lider av RA etter subkutan dosering med anti-
25 stoffet D2E7 og metotrexat hver annen uke ved tjuefire uker.

Figur 3A og 3B viser tidsforløp av antall ømme ledd (3A) og antall ledd med hevelse (3B) over tjuefire uker for
30 pasienter som lider av RA etter subkutan dosering med D2E7 og metotrexat hver annen uke ved tjuefire uker.

Figur 4 viser resultater fra en kortform helseovervåking (SF-36) fra pasienter som lider av RA etter subkutan dosering med antistoffet D2E7 og metotrexat hver annen uke ved tjuefire uker. RP, fysisk rolle; PF, fysisk funksjon; BP, kroppssmerte; GH, generell helse; V, vitalitet; SF, sosial funksjon; RE, emosjonell rolle og ME, mental helse.

Figur 5 viser prosentdelen av ACR-reaksjon etter en enkel intravenøs injeksjon av antistoffet D2E7 og metotrexat i pasienter som lider av RA.

10 Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

For at foreliggende oppfinnelse skal bli lettere forstått blir visse uttrykk først definert.

Uttrykket "dosering" som benyttet heri, refererer til administrasjonen av en substans (for eksempel et anti-TNF α -antistoff) for å oppnå et terapeutisk mål (for eksempel behandlingen av en TNF α -assosiert lidelse).

Uttrykkene "tougentlig doseringsregime" "tougentlig dosering" og "tougentlig administrasjon" som benyttet heri, refererer til tidsforløpet av administrasjonen av en substans (for eksempel et anti-TNF α -antistoff) til et individ for å oppnå et terapeutisk mål (for eksempel behandlingen av en TNF α -assosiert lidelse). Det tougentlige doseringsregimet er ikke ment å innbefatte et ukentlig doseringsregime. Foretrukket blir substansen administrert hver 9-19. dag, mer foretrukket hver 11.-17. dag, enda mer foretrukket, hver 13.-15. dag og mest foretrukket, hver 14. dag.

Uttrykket "kombinasjonsterapi" som benyttet heri, refererer til administrasjonen av to eller flere terapeutiske substanser, for eksempel et anti-TNF α -antistoff og medikamentet metotrexat. Metotrexatet kan bli administrert sam-

tidig med, før eller etter administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff.

Uttrykket "human TNF α " (forkortet heri som hTNF α eller enkelt hTNF), som benyttet heri, er ment å referere til et
5 humant cytokin som eksisterer som en 17 kD utskilt form og en 26 kD membranassosiert form hvorav den biologiske aktive form består av en trimer av ikke kovalent bundne 17 kD-molekyler. Strukturen av TNF α er videre beskrevet i for eksempel Pennica, D., et al. (1984) *Nature* 312:724-729;
10 Davis, J.M., et al. (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326; og Jones, E.Y., et al. (1989) *Nature* 338:225-228. Uttrykket human TNF α er ment å innbefatte rekombinant human TNF α (rhTNF α), som kan bli fremstilt ved standard rekombinante ekspresjonsmetoder eller innkjøpt kommersielt (R & D
15 Systems, katalog nr. 210-TA, Minneapolis, MN).

Uttrykket "antistoff" som benyttet heri, er ment å referere til immunoglobulinmolekyler bestående av fire polypeptidkjeder, to tunge (H) kjeder og to lette (L) kjeder sammenbundet med hverandre via disulfidbindinger. Hver
20 tunge kjede består av et tungkjede variabelt område (forkortet heri som HCVR eller VH) og et tungkjede konstant område. Det tunge kjede konstante området består av tre domener, CH1, CH2 og CH3. Hver lette kjede består av et lett kjede variabelt område (forkortet heri som LCVR eller
25 VL) og et lett kjede konstant område. Det lette kjede konstante området består av at domene, CL. VH- og VL-områdene kan bli ytterligere delt i områder med hypervariabilitet betegnet komplementaritetsbestemmende områder (CDR) som er oppdelt med områder som er mer konserverte, betegnet rammeverkområder (FR). Hver VH og VL består av tre CDR og fire FR, arrangert fra aminoterminalen til karboksyterminalen i følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Uttrykket "antigenbindende del" av et antistoff (eller
35 enkelt "antistoffdel"), som benyttet heri, refererer til

en eller flere fragmenter av et antistoff som opprett-
 holder egenskapen spesifikt å binde til et antigen (for
 eksempel hTNF α). Det har blitt vist at den antigenbindende
 funksjon av et antistoff kan bli utført med fragmenter fra
 5 et full-lengdet antistoff. Eksempler på bindende frag-
 menter omfattet innenfor uttrykket "antigenbindende del"
 av et antistoff innbefatter (i) et Fab-fragment, et mono-
 valent fragment bestående av VL-, VH-, CL- og CH1-dome-
 nene, (ii) et F(ab')₂-fragment, et bivalent fragment bestå-
 10 ende av to Fab-fragmenter bundet med en disulfidbro ved
 hengselsområdet, (iii) et Fd-fragment bestående av VH- og
 CH1-domenene, (iv) et Fv-fragment bestående av VL- og VH-
 domenene av en enkel arm av et antistoff, (v) et dAb-frag-
 ment fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546) som
 15 består av et VH-domene, og (vi) et isolert komplementari-
 tetsbestemmende område (CDR). Videre, selv om de to dome-
 ner av Fv-fragmentet, VL og VH, er kodet for at separate
 gener kan de bli forbundet med hverandre ved å bruke re-
 kombinante metoder med en syntetisk linker som tillater
 20 dem å bli dannet som en enkel proteinkjede hvor VL- og VH-
 områdene pardanner for å danne monovalente molekyler
 (kjent som enkeltkjedet Fv (scFv), se for eksempel Bird et
 al. (1988) *Science* 242:423-426; og Huston et al. (1988)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Slike enkelt-
 25 kjedede antistoff er også ment å være omfattet innenfor
 området "antigenbindende del" av et antistoff. Andre
 former av enkeltkjedede antistoff, så som diastoff, er
 også omfattet. Diastoff er bivalente, bispesifikke anti-
 stoff hvor VH- og VL-domenene er uttrykt på en enkel poly-
 30 peptidkjede, men ved å bruke en linker som er for kort til
 å tillate pardannelse mellom de to domener på samme kjede,
 for derved å tvinge domenene til å pardanne med komplemen-
 taritetsdomenene av en annen kjede, og danne to antigen-
 bindende seter (se for eksempel Holliger, P., et al.
 35 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak,
 R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Enda videre kan et antistoff eller antigenbindende del derav, være del av et større immunoadhesjonsmolekyl dannet ved kovalent eller ikke kovalent assosiasjon av et antistoff eller antistoffdel med et eller flere andre proteiner eller peptider. Eksempler på slike immunoadhesjonsmolekyler innbefatter anvendelse av streptavidin kjerneområde for å danne et tetramert scFv-molekyl (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) samt anvendelse av et cysteinresiduum, et markørpeptid og en C-terminal polyhistidinmarkør for å danne bivalente og biotinylerte scFv-molekyler (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Antistoffdeler, så som Fab og F(ab')₂-fragmenter, kan bli fremstilt fra hele antistoff ved å bruke konvensjonelle teknikker, så som henholdsvis papain- eller pepsinspaltning av hele antistoff. Videre kan antistoff, antistoffdeler og immunoadhesjonsmolekyler bli fremstilt ved å bruke standard rekombinante DNA-teknikker som beskrevet heri.

Uttrykket "humant antistoff" som benyttet heri, er ment å innbefatte antistoff som har variable og konstante områder avledet fra humane kjønnselle immunoglobulinsekvenser. De aktuelle humane antistoff kan innbefatte aminosyreresiduer ikke kodet av humane kjønnselle immunoglobulinsekvenser (for eksempel mutasjoner innført ved tilfeldig eller setespesifikk mutagenese *in vitro* eller ved somatisk mutasjon *in vivo*), for eksempel i CDR og spesielt CDR3. Imidlertid er uttrykket "humant antistoff" som benyttet heri, ikke ment å innbefatte antistoff hvor CDR-sekvensene er avledet fra kjønnscellene hos en annen pattedyrart, så som en mus, har blitt podet inn i humane rammeverksekvenser.

Uttrykket "rekombinant humant antistoff" som benyttet heri, er ment å innbefatte alle humane antistoff som blir fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert på rekombinant måte, så som antistoff uttrykt ved å bruke en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert i en vertscelle (beskrevet

ytterligere i del II nedenfor), antistoff isolert fra et rekombinant, kombinatorisk humant antistoffbibliotek (beskrevet ytterligere i del III nedenfor), antistoff isolert fra et dyr (for eksempel en mus) som er transgent for humane immunoglobulingener (Taylor, L.D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) eller antistoff fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert på enhver annen måte som involverer spleising av humane immunoglobulin gensekvenser til andre DNA-sekvenser. Slike rekombinante, humane antistoff har variable og konstante områder avledet fra humane kjønnselle immunoglobulinsekvenser. I visse utførelsesformer blir imidlertid slike rekombinante, humane antistoff utsatt for *in vitro* mutagenese (eller når et dyr som er transgent for humane Ig-sekvenser, blir brukt *in vivo* somatisk mutagenese) og således er aminosyresekvensene av VH- og VL-områdene av de rekombinante antistoff sekvenser som, selv om de er avledet fra og relatert til humane kjønnselle VH- og VL-sekvenser, ikke naturlig behøver å eksistere innenfor det humane antistoff kjønnsellerepertoar *in vivo*.

Et "isolert antistoff" som benyttet heri, er ment å referere til et antistoff som i hovedsak er fritt for andre antistoff som har forskjellige antigeniske spesifisiteter (for eksempel et isolert antistoff som spesifikt binder hTNF α , er i hovedsak fritt for antistoff som spesifikt binder antigener som er forskjellige fra hTNF α). Et isolert antistoff som spesifikt binder hTNF α , kan imidlertid ha kryssreaktivitet med andre antigener, så som hTNF α -molekyler fra andre arter (diskutert i større detalj nedenfor). Videre kan et isolert antistoff i hovedsak være fritt for annet cellulært materiale og/eller kjemikalier.

Et "nøytraliserende antistoff" som benyttet heri, (eller et "antistoff som nøytraliserer hTNF α -aktivitet") er ment å referere til et antistoff hvis binding til hTNF α resulterer i inhibering av den biologiske aktivitet av hTNF α . Denne inhibering av den biologiske aktivitet av hTNF α kan

bli undersøkt ved å måle en eller flere indikatorer for biologisk hTNF α -aktivitet, så som hTNF α -indusert cytotoxicitet (enten *in vitro* eller *in vivo*), hTNF α -indusert cellulær aktivering og hTNF α -binding til hTNF α -reseptorer.

5 Disse indikatorer for biologisk hTNF α -aktivitet kan bli undersøkt med et eller flere standard *in vitro* eller *in vivo* assays som er kjent innen faget (se eksempel 4). Fortrinnsvis blir egenskapen hos et antistoff til å nøytralisere hTNF α -aktivitet undersøkt ved inhibering av

10 hTNF α -indusert cytotoxicitet på L929-celler. Som en ytterligere eller alternativ parameter av hTNF α -aktivitet, kan egenskapen til et antistoff til å inhibere hTNF α -indusert ekspresjon av ELAM-1 på HUVEC som et mål på hTNF α -indusert cellulær aktivering, bli undersøkt.

15 Uttrykket "overflate plasmonresonans" som benyttet heri, refererer til et optisk fenomen som tillater analyse av biospesifikke interaksjoner i samtid ved påvisning av endringer i proteinkonsentrasjoner innen en biosensormatrise, for eksempel ved å bruke BIAcore systemet

20 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige og Piscataway, NJ). For videre beskrivelser se eksempel 1 og Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; og Johnson, B.,

25 *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Uttrykket " K_{off} " som benyttet heri, er ment å referere til av-hastighetskonstanten for dissosiasjon av et antistoff fra antistoff/antigenkomplekset.

Uttrykket " K_d " som benyttet heri, er ment å referere til

30 dissosiasjonskonstanten av en spesiell antistoff-antigen interaksjon.

Uttrykket "nukleinsyremolekyl" som benyttet heri, er ment å innbefatte DNA-molekyler og RNA-molekyler. Et nuklein-

syremolekyl kan være enkeltkjedet eller dobbeltkjedet, men er fortrinnsvis dobbeltkjedet DNA.

Uttrykket "isolert nukleinsyremolekyl" som benyttet heri, under henvisning til nukleinsyrer som koder for antistoff eller antistoffdeler (for eksempel VH, VL, CDR3) som binder hTNF α , er ment å referere til et nukleinsyremolekyl hvor nukleotidsekvensene som koder for antistoffet eller antistoffdelen, er fri for andre nukleotidsekvenser som koder for antistoff eller antistoffdeler som binder anti-
10 gener andre enn hTNF α , hvilke andre sekvenser naturlig kan flankere nukleinsyren i humant genomisk DNA. Således inneholder en isolert nukleinsyre ifølge oppfinnelsen, som koder for et VH-område av et anti-hTNF α -antistoff ingen andre sekvenser som koder for andre VH-områder som binder
15 antigener andre enn hTNF α .

Uttrykket "vektor" som benyttet heri, er ment å referere til et nukleinsyremolekyl som er i stand til å transportere en annen nukleinsyre til hvilken den har blitt bundet. En type vektor er et "plasmid" som refererer til
20 en sirkulær dobbeltkjedet DNA-løkke i hvilken ytterligere DNA-segmen-ter kan bli ligert. En annen type vektor er en viral vektor hvor ytterligere DNA-segmen-ter kan bli ligert inn i det virale genom. Visse vektorer er i stand til autonom replikasjon i en vertscelle inn i hvilken de har
25 blitt innført (for eksempel bakterielle vektorer som har et bakterielt replikasjonsstartpunkt og episomale pattedyrvektorer). Andre vektorer (for eksempel ikke-episomale pattedyrvektorer) kan bli integrert i genomet hos en vertscelle ved introduksjon i vertscellen og blir derved
30 replikert sammen med vertsgenomet. Videre er visse vektorer i stand til å dirigere ekspresjonen av gener til hvilke de er operativt forbundet. Slike vektorer blir referert til heri som "rekombinante ekspresjonsvektorer" (eller enkelt "ekspresjonsvektorer"). Generelt er ekspresjonsvektorer som er anvendelige i rekombinante DNA-teknikker ofte i form av plasmider. I foreliggende beskri-

velse kan "plasmid" eller "vektor" bli benyttet om hverandre ettersom plasmidet er den vanligst brukte form for vektor. Imidlertid er oppfinnelsen ment å innbefatte andre slike former for ekspresjonsvektorer, så som virale vektorer (for eksempel replikasjonsdefektive retrovirus, adenovirus og adenoassosierte virus) som har tilsvarende funksjoner.

Uttrykket "rekombinant vertscelle" (eller enkelt "vertscelle") som benyttet heri, er ment å referere til en celle inn i hvilken den rekombinante ekspresjonsvektor har blitt innført. Det bør bli forstått at slike uttrykk er ment å referere ikke bare til en spesiell, aktuell celle, men til avkommet fra en slik celle. Fordi visse modifikasjoner kan inntreffe i etterfølgende generasjoner grunnet enten mutasjon eller miljømessige påvirkninger, behøver slikt avkom faktisk ikke å være identisk med opphavscellen, men er fremdeles innbefattet innenfor omfanget av uttrykket "vertscelle" som benyttet heri.

Forskjellige aspekter av oppfinnelsen er beskrevet i større detalj i de følgende avsnitt.

I. Humane antistoff som binder humant TNF α

Foretrukket dissosierer antistoffet eller den antigenbindende del derav, fra human TNF α med en K_{off} på $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre. Enda mer foretrukket dissosierer antistoffet eller den antigenbindende del derav, fra humant TNF α med en K_{off} på $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre.

I en utførelsesform fremskaffer oppfinnelsen sammensetninger som kan benyttes i medikamenter for å behandle lidelser hvor administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff er gunstig ved toulkkelig subkutan administrasjon av et isolert humant antistoff, eller en antigenbindende del derav. Antistoffet eller den antigenbindende del derav inneholdende fortrinnsvis et lett kjede

variabelt område (LCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 1 (dvs. D2E7 VL) og et tungkjede variabelt område (HCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEKV ID nr. 2 (dvs. D2E7 VH). I visse utførelsesformer omfatter anti-

5 stoffet et tungkjede konstant område, så som et IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD konstant område. Fortrinnsvis er det tungkjedet konstante område et IgG1 tungkjede konstant område eller et IgG4 tungkjede konstant område. Videre kan antistoffet omfatte et lettkjede kon-

10 stant område, enten et kappalettkjede konstant område eller et lambdalettkjede konstant område. Fortrinnsvis omfatter antistoffet et kappalettkjede konstant område. Alternativt kan antistoffdelen for eksempel være et Fab-fragment eller et enkeltkjede Fv-fragment.

15 I andre utførelsesformer fremskaffer oppfinnelsen sammensetninger som kan benyttes i medikamenter for å behandle lidelser hvor administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff er gunstig ved toukentlig subkutan administrasjon av et isolert humant antistoff, eller en

20 antigenbindende del derav. Antistoffet eller den antigenbindende del derav inneholder fortrinnsvis D2E7-relaterte VL og VH CDR3-domener, for eksempel antistoff eller antigenbindende deler derav, med et lettkjede variabelt område (LCVR) som har et CDR3-domene omfattende en aminosyresek-

25 vens valgt fra gruppen omfattende SEKV ID nr. 3, SEKV ID nr. 11, SEKV ID nr. 12, SEKV ID nr. 13, SEKV ID nr. 14, SEKV ID nr. 15, SEKV ID nr. 16, SEKV ID nr. 17, SEKV ID nr. 18, SEKV ID nr. 19, SEKV ID nr. 20, SEKV ID nr. 21, SEKV ID nr. 22, SEKV ID nr. 23, SEKV ID nr. 24, SEKV ID

30 nr. 25 og SEKV ID nr. 26 eller med et tungkjede variabelt område (HCVR) som har et CDR3-domene omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID nr. 4, SEKV ID nr. 27, SEKV ID nr. 28, SEKV ID nr. 29, SEKV ID nr. 30, SEKV ID nr. 31, SEKV ID nr. 32, SEKV ID nr. 33,

35 SEKV ID nr. 34 og SEKV ID nr. 35.

Et antistoff eller en antistoffdel kan bli derivatisert eller bundet til et annet funksjonelt molekyl (for eksempel et annet peptid eller protein). Følgelig er antistoffene og antistoffdelene ment å innbefatte
5 derivatiserte og på annen måte modifiserte former av de humane anti-hTNF α -antistoff beskrevet heri, innbefattende immuno adhesjonsmolekyler. For eksempel kan et antistoff eller en antistoffdel bli funksjonelt bundet (ved kjemisk kobling, genetisk fusjon, ikke-kovalent assosiasjon eller
10 på annen måte) til en eller flere andre molekyler enheter, så som et annet antistoff (for eksempel et bispesifikt antistoff eller et diastoff), et påviselig middel, et cytotoxisk middel, et farmasøytisk middel, og/eller et protein eller peptid som kan fremme
15 assosiasjon av antistoffet eller antistoffdelen med et annet molekyl (så som et streptavidin kjerneområde eller en polyhistidinmarkør).

En type derivatisert antistoff blir dannet ved å kryssbinde to eller flere antistoff (av samme type eller av
20 forskjellige typer, for eksempel for å danne bispesifikke antistoff). Passende kryssbinderer innbefatter slike som er heterobifunksjonelle, som har to distinkt reaktive grupper adskilt med en passende avstandsgruppe (for eksempel m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysuksimidester) eller
25 homobifunksjonell forbindelse (for eksempel disuksinimidylsberat). Slike sammenbindende bindere er tilgjengelige fra Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Anvendelige påviselige midler med hvilket et antistoff eller en antistoffdel kan bli derivatisert innbefatter
30 fluorescente forbindelser. Eksempelvis fluorescente påviselige midler innbefatter fluorescein, fluouresceinisotiocyanat, rodamin, 5-dimetylamin-1-naftalensulfonylklorid, fykoerytrin og lignende. Et antistoff kan også bli derivatisert med påviselige enzymer, så som
35 alkalinsk fosfatase, pepperrot peroksidase, glukoseoksidase og lignende. Når et antistoff er derivatisert med et

påviselig enzym, blir dette påvist ved å tilsette ytterligere reagenser som enzymet bruker for å danne et påviselig reaksjonsprodukt. For eksempel når det påviselige middel pepperrot-peroksidase er til stede, fører tilsetningen av hydrogenperoksid og diaminobenzidin til et farget reaksjonsprodukt, som er påviselig. Et antistoff kan også bli derivatisert med biotin, og påvist via indirekte måling av avidin eller streptavidinbinding.

II. Ekspresjon av antistoff

Et antistoff, eller antistoffdel kan bli fremstilt ved rekombinant ekspresjon av immunoglobulin lett- og tungkjede gener i en vertscelle. For å uttrykke et antistoff rekombinant, blir en vertscelle transfektert med en eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer som bærer DNA-fragmenter som koder for de immunoglobulin lette og tunge kjeder av antistoffer slik at de lette og tunge kjeder blir uttrykt i vertscellen og fortrinnsvis skilt ut i mediet hvor vertscellene blir dyrket, fra hvilket medium antistoffene kan bli gjenvunnet. Standard rekombinante DNA-metoder blir benyttet for å oppnå antistoff tunge- og lettekjedegener, inkorporere disse gener i rekombinante ekspresjonsvektorer og innføre vektorene i vertsceller, så som dem beskrevet i Sambrook, Fritsch og Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, annen utgave, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) og i U.S. Patent nr. 4,816,397 til Boss et al.

For å uttrykke D2E7 eller et D2E7-relatert antistoff blir DNA-fragmenter som koder for de lette- og tungekjede variable områder først fremskaffet. Disse DNA-materialene kan bli dannet ved amplifikasjon og modifikasjon av kjønns-celle lette og tunge variable kjedesequenser ved å bruke polymerasekjedereaksjonen (PCR). Kjønns-celle DNA-sequenser for humane tunge og lette variable kjedeområdegener er

kjent innen faget (se for eksempel "Vbase" human
 kjønnslinjesekvens database; se også Kabat, E.A., et al.
 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,
 femte utgave, U.S. Department of Health and Human
 5 Services, NIH publikasjon nr. 91-3242; Tomlinson, I.M., et
 al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences
 Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different
 Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; og Cox,
 J.P.L. et al. (1994) " A Directory of Human Germ-line V₇₈
 10 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J.*
Immunol. 24:827-836). For å oppnå et DNA-fragment som
 koder for et tungkjede variabelt område av D2E7, eller et
 D2E7-relatert antistoff blir et medlem av V_H3-familien av
 humane kjønnselle VH-gener amplifisert med standard PCR.
 15 Mer foretrukket blir DP-31 VH-kjønnslinjesekvensen
 amplifisert. For å oppnå et DNA-fragment som koder for det
 lette kjede variable område av D2E7, eller et D2E7-
 relatert antistoff blir et medlem av V_KI-familien av humane
 kjønnselle VL-gener amplifisert med standard PCR. Mest
 20 foretrukket blir A20 VL kjønnsellesekvensen amplifisert.
 PCR-primere er egnet for anvendelse i amplifikasjon av DP-
 31-kjønnselle VH og A20-kjønnselle VL-sekvenser kan bli
 utformet basert på nukleotidsekvensene beskrevet i
 referansene angitt ovenfor ved å bruke standard metoder.

25 Når kjønnselle VH- og VL-fragmentene er oppnådd, kan
 disse sekvenser bli mutert til å kode for D2E7 eller D2E7-
 relaterte aminosyresekvensene beskrevet heri. Aminosyre-
 sekvensene kodet av kjønnselle VH og VL DNA-sekvensene
 blir først sammenlignet med D2E7 eller D2E7-relaterte VH
 30 og VL-aminosyresekvenser for å identifisere aminosyreresi-
 duer i den D2E7 eller D2E7-relaterte sekvens som er for-
 skjellige fra kjønnselle. Derpå blir de passende nukleo-
 tider av kjønnselle DNA-sekvensene mutert slik at de
 muterte kjønnsellesekvenser koder for den D2E7- eller
 35 D2E7-relaterte aminosyresekvens, ved å bruke den genetiske
 kode til å bestemme hvilke nukleotidendringer som bør bli
 foretatt. Mutagenese av kjønnsellesekvensene utføres med

standard metoder, så som PCR-mediert mutagenese (hvor de muterte nukleotider blir inkorporert i PCR-primerne slik at PCR-produktet inneholder mutasjonene) eller seterettet mutagenese.

5 Når DNA-fragmenter som koder for D2E7 eller D2E7-relaterte VH og VL-segmenter er oppnådd (ved amplifikasjon og mutagenese av kjønnselle VH og VL-gener, som beskrevet ovenfor), kan disse DNA-fragmenter bli ytterligere manipulert med standard rekombinante DNA-teknikker, for eksempel for
10 å omdanne de variable områdegener til antistoff kjedegener av full lengde til Fab-fragmentgener eller til et scFV-gen. I disse manipulasjoner blir et VL- eller VH-kodende DNA-fragment operativt forbundet til et annet DNA-fragment som koder for et annet protein, så som et antistoff konstant område eller en fleksibel linker. Uttrykket "operativt forbundet", som benyttet til denne sammenheng, er
15 ment å bety at de to DNA-fragmenter blir føyd sammen slik at aminosyresekvensene kodet av de to DNA-fragmenter forblir i leseramme.

20 Det isolerte DNA som koder for VH-område kan bli omdannet til et tungkjedegen med full lengde ved operativt å forbinde det VH-kodende DNA til et annet DNA-molekyl som koder for tungkjede konstante områder (CH1, CH2 og CH3). Sekvensene av humane tungkjede konstante områdegener er
25 kjent innen faget (se for eksempel Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, femte utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242) og DNA-fragmenter som omfatter disse områder kan bli oppnådd med standard
30 PCR-amplifikasjon. Det tungkjede konstante område kan være et IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD konstant område, men er mest foretrukket et IgG1 eller IgG4 konstant område. For et Fab-fragment tungkjedegen kan det VH-kodende DNA bli operativt forbundet til et annet DNA-
35 molekyl som koder for kun det tungkjede CH1 konstant område.

Det isolerte DNA som koder for VL-området kan bli omdannet til et full-lengdet lettkjedegen (så vel som et Fab lettkjedegen) ved operativt å forbinde det VL-kodende DNA til et annet DNA-molekyl som koder for det lettkjede konstante område CL. Sekvensene av human lettkjede konstante områdegener er velkjent innen faget (se for eksempel Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, femte utgave*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242) og DNA-fragmenter som omfatter disse områder kan bli oppnådd med standard PCR-amplifikasjon. Det lettkjede konstante område kan være et kappa eller lambda konstant område, men er mest foretrukket et kappa konstant område.

For å danne et scFV-gen, blir de VH- og VL-kodende DNA-fragmenter operativt forbundet til et annet fragment som koder i fleksibel linker, for eksempel som koder for aminosyresekvensen (Gly₄-Ser)₃, slik at VH og VL-sekvensene kan bli uttrykt som et sammenhengende enkeltkjede protein, med VL og VH-områdene sammenbundet av den fleksible linker (se for eksempel Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554).

For å uttrykke de aktuelle antistoffene, blir DNA-sekvenser som koder for delvise eller fullengdede lette og tunge kjeder oppnådd som beskrevet ovenfor, satt i inn ekspresjonsvektorer slik at genen er operativt forbundet til transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsekvenser. I denne sammenheng er uttrykket "operativt forbundet" ment å bety at et antistoffgen er ligert inn i en vektor slik at de transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsekvenser innenfor vektoren oppfyller sin tiltenkte funksjon med å regulere transkripsjonen og translasjonen av antistoffgenet. Ekspresjonsvektoren og ekspresjonskontrollsekvensene blir valgt til å være kompatible med den anvendte uttrykkende vertscelle. Antistoff lettkjedegenet og antistoff

tungkjedegenet kan bli satt inn i separate vektorer, men blir mer typisk satt inn i samme ekspresjonsvektor. Antistoffgenene settes inn i ekspresjonsvektoren med standard metoder (for eksempel ligering av komplementære restriksjonssteder på antistoffgen-fragmentet og vektoren, eller byttendet ligering dersom ingen restriksjonssete er til stede). Før innsetning av D2E7 eller D2E7-relaterte lette eller tunge kjedesequenser, kan ekspresjonsvektoren allerede bære antistoff konstante områdesequenser. For eksempel er en tilnæringsmåte til å omdanne D2E7 eller D2E7-relaterte VH- og VL-sequenser til fullengdede antistoffgener å sette dem inn i ekspresjonsvektorer som allerede koder for henholdsvis tungkjede konstante og lettkjede konstante områder, slik at VH-segmentet er operativt forbundet til CH-segment(ene) innenfor vektoren og VL-segmentet er operativt forbundet til CL-segmentet innenfor vektoren. I tillegg eller alternativt, kan den rekombinante ekspresjonsvektor kode for et signalpeptid som letter utskillelse av antistoffkjeden fra vertscellen. Antistoff kjedegenet kan bli klonet inn i vektoren slik at signalpeptidet er bundet i leseramme til aminoterminalen av antistoff kjedegenet. Signalpeptidet kan være et immunoglobulin signalpeptid eller et heterologt signalpeptid (det vil si et signalpeptid fra et ikke-immunoglobulinprotein).

I tillegg til antistoffkjedegenene bærer de aktuelle rekombinante ekspresjonsvektorer regulatoriske sequenser som kontrollerer ekspresjonen av antistoff kjedegener i en vertscelle. Uttrykket "regulatorisk sekvens" er ment å innbefatte promoterer, forsterkere og andre ekspresjonskontrollelementer (for eksempel polyadenyleringssignaler) som kontrollerer transkripsjonen eller translasjonen av antistoffkjedegenene. Slike regulatoriske sequenser er for eksempel beskrevet i Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Det vil bli forstått av fagpersonen at utformingen av ekspresjonsvektoren, innbefattende utvelgelsen av

regulatoriske sekvenser kan avhenge av slike faktorer som valg av vertscellen som skal bli transformert, nivået av ekspresjon av det ønskede protein, etc. Foretrukne regulatoriske sekvenser for pattedyr vertscelleekspresjon innbefatter virale elementer som delegerer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller, så som promoterer og/eller forsterkere avledet fra cytomegalovirus (CMV) (så som CMV promoter/forsterker), Simian Virus 40 (SV40) (så som SV40 promoter/forsterker), adenovirus, (for eksempel adenovirus sen hovedpromoter (AdMLP)) og polyoma. For ytterligere beskrivelse av regulatoriske virale elementer, og sekvenser derav, se for eksempel US Patent nr. 5.168.062 til Stinski, U.S. Patent nr. 4.510.245 til Bell et al. og U.S. Patent nr. 4.968.615 til Schaffner et al.

I tillegg til antistoffkjedegenene og regulatoriske sekvenser, kan de aktuelle rekombinante ekspresjonsvektorer bære ytterligere sekvenser, så som sekvenser som regulerer replikasjon av vektoren i vertsceller (for eksempel replikasjons startpunkt) og utvelgbare markørgener. Det utvelgbare gen letter utvelgelse av vertsceller inn i hvilken vektoren har blitt innført (se for eksempel U.S. Patent nr. 4.399.216, 4.634.665 og 5.179.017, alle tilhørende Axel et al.). For eksempel gir typisk det utvelgbare markørgen resistens mot medikamenter, så som G418, hygromycin eller metotrexat, til en vertscelle innen hvilke vektoren har blitt innført. Foretrukne utvelgbare markørgener innbefatter dihydrofolatreduktase (DHFR) genet (for anvendelse i dhfr⁻ vertsceller med metotrexat utvelgelse/amplifikasjon) og neo-genet (for G418 utvelgelse).

For ekspresjon av lette og tunge kjeder blir ekspresjonsvektoren(e) som koder for de lette og tunge kjeder transfektert i en vertscelle med standard teknikker. De forskjellige former av uttrykket "transfeksjon" er ment å omfatte en mengde teknikker som vanligvis benyttes for innføringen av eksogent DNA i en prokaryot eller eukaryot

vertscelle, for eksempel elektorporering, kalsiumfosfatutfelling, DEAE-dekstran transfeksjon og lignende. Selv om det er teoretisk mulig å uttrykke de aktuelle antistoffene i enten prokaryote eller eukaryote vertsceller, er

5 ekspresjonen av antistoff i eukaryote celler, og mest foretrukket pattedyrvertsceller, det mest foretrukne fordi slike eukaryote celler, og spesielt pattedyrceller er mer sannsynlige enn prokaryote celler til å sette sammen og

10 skille ut et riktig foldet og immunologisk aktivt antistoff. Prokaryotekspresjon av antistoffgener har vært rapport å være ineffektivt for produksjon av høye utbytter av aktivt antistoff (Boss, M.A. og Wood. C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Foretrukne pattedyrvertsceller for ekspresjon av de

15 aktuelle rekombinante antistoff ifølge oppfinnelsen innbefatter Kinesisk Hamster ovarier (CHO-celler) (innbefattende dhfr⁻CHO-celler, beskrevet i Urlaub og Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, benyttet med en DHFR utvelgbar markør, for eksempel som

20 beskrevet i R.J. Kaufman og P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NSO-myelomceller, COS-celler og SP2-celler. Når rekombinante ekspresjonsvektorer som koder antistoffgener blir innført i pattedyrvertsceller, blir antistoffene dannet ved å dyrke vertscellene over en

25 tidsperiode som er tilstrekkelig til å tillate ekspresjon av antistoffet i vertscellene, eller mer foretrukket, utskillelse av antistoffet i dyrkningsmediet, hvori vertscellene blir dyrket. Antistoffer kan bli gjenvunnet fra dyrkningsmediet ved å bruke standard

30 proteinopprensingsmetoder.

Vertsceller kan også bli brukt for å danne deler av in-
takke antistoff, så som Fab-fragmenter eller scFV-molekyler. For eksempel kan det være ønskelig å transfektere en vertscelle med DNA som koder for enten den lette kjede

35 eller den tunge kjede (men ikke begge deler) av et aktuelt antistoff. Rekombinant DNA-teknologi kan også bli brukt

for å fjerne noe eller alt av DNA-materialet som koder for enten en eller begge av de lette og tunge kjeder som ikke er nødvendig for binding til hTNF α . I tillegg kan bifunksjonelle antistoff bli dannet hvor en tung og en
5 lett kjede er et aktuelt antistoff og den andre tunge og lette kjede er spesifikke for et antigen som er forskjellig fra hTNF α ved kryssbinding av et aktuelt antistoff til et andre antistoff med standard kjemiske kryssbindingsmetoder.

10 I et foretrukket system for rekombinant ekspresjon av et aktuelt antistoff eller antigenbindende del derav, blir en rekombinant ekspresjonsvektor som koder for både den antistoff tunge kjede og den antistoff lette kjede innført i dhfr-CHO-celler med kalsiumfosfatmediert transfeksjon.
15 Inne i den rekombinante ekspresjonsvektor er de antistoff tunge og lette kjedegener hver operativt forbundet til CMV forsterker/AdMLP-promoter regulatoriske elementer for å drive høye nivåer av transkripsjon av genene. Den rekombinante ekspresjonsvektor bærer også et DHFR-gen som
20 tillater for utvelgelse av CHO-celler som har blitt transfektert med vektoren ved å bruke metotrexatutvelgelse/-amplifikasjon. De utvalgte transformante vertsceller blir dyrket for å tillate ekspresjon av de antistoff tunge og lette kjeder og inntakt antistoff gjenvinnes fra dyrkningsmediet. Standard molekylære biologiteknikker blir brukt for å danne den rekombinante ekspresjonsvektor, transfektere vertscellene, velge ut for transformanter, dyrking av vertscellene og gjenvinning av antistoffet fra dyrkingsmediet.

30 III. Utvelgelse av rekombinante, humane antistoff

Rekombinante, humane antistoff, i tillegg til D2E7 eller en antigenbindende del derav, eller D2E7-relaterte antistoff beskrevet heri, kan bli isolert ved undersøkelse av et rekombinant, kombinatorisk antistoffbibliotek,
35 fortrinnsvis et scFv fagoppvisningsbibliotek fremstilt ved

å bruke humane VL og VH cDNA fremstilt fra mRNA avledet fra humane lymfocytter. Metoder for fremstilling og undersøkelse av slike bibliotek er kjent innen faget. I tillegg til kommersielt tilgjengelige sett for å danne

5 fagoppvisningsbibliotek (for eksempel Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, katalog nr. 27-9400-01 og Stratagene *SurfZAP™* fagoppvisningssett, katalog nr. 240612), eksempler på metoder og reagenser som er spesielt egnet for anvendelse ved dannelse og undersøkelse av anti-

10 stoff oppvisningsbibliotek, kan for eksempel bli funnet i 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;

15 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) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377;

25 Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; og Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

For å isolere humane antistoff med høy affinitet og en lav avkoblingshastighetskonstant for hTNF α blir et murint anti-hTNF α -antistoff som har en høy affinitet og en lav

30 avkoblingshastighetskonstant for hTNF α (for eksempel MAK 195 som er hybridomet som har deponeringsnummer ECACC 87 050801) først brukt til å velge ut humane tunge og lette kjedesequenser som har lignende bindingsaktivitet overfor hTNF α ved å bruke epitopmerkemethoden beskrevet i

35 Hoogenboom et al., PCT-publikasjon nr. WO 93/06213. Antistoffbibliotekene benyttet i denne metode er fortrinnsvis scFv-bibliotek fremstilt som beskrevet i

McCafferty et al., PCT-publikasjon nr. WO 92/01047,
McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; og Griffiths
et al., (1993) *EMBO J* 12:725-734. scFv anti-
stoffbibliotekene blir fortrinnsvis undersøkt med å bruke
5 rekombinant TNF α som antigenet.

Når initiale, humane VL- og VH-segenter er valgt ut, blir
"bland og tilpass" forsøkt hvor forskjellige par av de
initialt utvalgte VL- og VH-segenter blir undersøkt for
hTNF α -binding utført for å velge ut foretrukne VL/VH par-
10 kombinasjoner. I tillegg, for ytterligere å forbedre affi-
niteten og/eller senke avkoblingshastighetskonstanten for
hTNF α -binding kan VL- og VH-segmentene av de foretrukne
VL-/VH-par bli tilfeldig mutert, fortrinnsvis innen CDR3-
området av VH og/eller VL i en prosess som er analog med
15 den *in vivo* somatiske mutasjonsprosess som er ansvarlig
for affinitetsmodning av antistoff i løpet av en naturlig
immunrespons. Denne *in vitro* affinitetsmodning kan bli
oppnådd ved å amplifisere VH- og VL-områder ved å bruke
PCR-primere som er komplementære med henholdsvis VH CDR3
20 eller VL CDR3, hvilke primere har blitt "tilført" en til-
feldig blanding av de fire nukleotidbaser ved visse posi-
sjoner slik at de resulterende PCR-produkter koder for VH-
og VL-segenter inn i hvilke tilfeldige mutasjoner har
blitt innført i VH og/eller VL CDR3-områdene. Disse til-
25 feldig muterte VH- og VL-segenter kan bli undersøkt på
nytt for binding til hTNF α og sekvenser som oppviser høy
affinitet og en lav avkoblingshastighet for hTNF α -binding
kan bli valgt ut.

Etter undersøkelse og isolering av et anti-hTNF α -
30 antistoff, fra et rekombinant immunoglobulinopp-
visningsbibliotek kan nukleinsyrer som koder for utvalgte
antistoff bli gjenvunnet fra oppvisningspakken (for eksem-
pel fra fag-genomet) og subklonet i andre ekspresjonsvek-
torer med standard rekombinante DNA-teknikker. Om ønsket
35 kan nukleinsyren bli videre manipulert for å danne andre
antistoffformer, (for eksempel bundet til nukleinsyre som

koder for ytterligere immunoglobulindomener, så som ytterligere konstante områder). For å uttrykke et rekombinant, humant antistoff isolert ved utvelgelse fra et kombinatorisk bibliotek, blir det DNA som koder for antistoffet klonet inn i en rekombinant ekspresjonsvektor og innført i pattedyrvertsceller som beskrevet i ytterligere detalj i del II ovenfor.

IV. Farmasøytiske sammensetninger og farmasøytisk administrasjon

De aktuelle antistoffene og antistoffdelene kan bli inkorporert i farmasøytiske sammensetninger som er egnet for administrasjon til et individ for metodene beskrevet heri, for eksempel toukentlig subkutan dosering. Typisk omfatter den farmasøytiske sammensetning et antistoff (eller antistoffdel) som forklart ovenfor og angitt i krav 1 og eventuelt metotrexat og et farmasøytisk akseptabelt bæremateriale. Som benyttet heri innbefatter "farmasøytisk akseptabelt bæremateriale" ethvert og alle oppløsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotone og absorpsjonsforsinkende midler og lignende som er fysiologisk kompatible og er egnet for administrasjon til et individ for metodene beskrevet heri. Eksempler på farmasøytisk akseptable bærematerialer innbefatter en eller flere av vann, fysiologisk saltvann, fosfatbufret fysiologisk saltvann, dextrose, glyserol, etanol og lignende så vel som kombinasjoner derav. I mange tilfeller vil det være foretrukket å innbefatte isotone midler, for eksempel sukkere, polyalkoholer, så som mannitol, sorbitol eller natriumklorid i sammensetningen. Farmasøytisk akseptable bærematerialer kan videre omfatte mindre mengder av tilleggsstoffer, så som fuktende eller emulgerende midler, preservativer eller buffere som øker oppbevaringstiden eller effektiviteten av antistoffet eller antistoffdelen.

Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være i en mengde former. Disse innbefatter for eksempel flytende, semifaste og faste doseringsformer, så som flytende oppløsninger (for eksempel injiserbare og infuserbare oppløsninger) dispersjoner eller suspensjoner, 5 tabletter, piller, pulvere, liposomer og suppositorier. Den foretrukne form avhenger av den påtenkte administrasjonsmåte og terapeutisk applikasjon. Typiske foretrukne sammensetninger er i form av injiserbare eller infuserbare 10 oppløsninger, så som sammensetninger som ligner dem benyttet for passiv immunisering av mennesker med andre antistoff. Den foretrukne administrasjonsmåte er parenteral (for eksempel intravenøs, subkutan, intraperitoneal, intramuskulær). Antistoffet kan bli administrert ved 15 intravenøs infusjon eller injeksjon. Alternativt blir antistoffet administrert ved intramuskulær injeksjon. Helst blir antistoffet administrert ved intravenøs infusjon eller injeksjon. Alternativt blir antistoffet administrert ved intramuskulær injeksjon eller ved 20 subkutan injeksjon (for eksempel en toukentlig subkutan injeksjon).

Terapeutiske sammensetninger kan typisk være sterile og stabile under forhold ved fremstilling og lagring. Sammensetningen kan bli formulert som en oppløsning, mikroemulsjon, dispersjon, liposom eller annen ordnet struktur som 25 er egnet for høy medikamentkonsentrasjon. Sterile, injiserbare oppløsninger kan bli fremstilt ved å inkorporere den aktive forbindelse (det vil si antistoff eller antistoffdel) i den krevde mengde i et passende oppløsningsmiddel med et eller en kombinasjon av ingredienser som er 30 oppsummert ovenfor etter behov fulgt av filtrert sterilisering. Generelt blir dispersjoner fremstilt ved å inkorporere den aktive forbindelse i en steril vehikkel som inneholder et grunnleggende dispersjonsmedium og de nødvendige andre bestanddeler fra dem oppsummert ovenfor. I 35 tilfellet med sterile pulvere for fremstillingen av sterile injiserbare oppløsninger, er de foretrukne fremstil-

lingsmetoder, vakuumtørking og frysetørking som gir et pulver av den aktive bestanddel pluss enhver annen ønsket ingrediens fra en på forhånd sterilfiltrert oppløsning derav. Den passende fluiditet av en oppløsning kan bli
5 opprettholdt for eksempel ved bruken av et belegg, så som lecitin, ved fremstillingen av den ønskede partikkelstørrelse i tilfelle med dispersjon og ved anvendelse av overflateaktive midler. Forlenget absorpsjon av injiserbare sammensetninger kan bli fremskaffet ved å inkludere i sam-
10 mensetningen et middel som forsinket absorpsjon, for eksempel monostearatsalter og gelatin.

De aktuelle antistoffene og antistoffdelene kan bli administrert via en mengde metoder som er kjent innen faget, selv om den foretrukne administrasjonsrute/-måte
15 for mange terapeutiske applikasjoner er subkutan injeksjon. Slik det vil bli forstått av fagpersonen vil administrasjonsrutene og/eller måten være avhengig av de ønskede resultater. I visse utførelsesformer kan den aktive forbindelse bli fremstilt med bæremateriale som vil
20 beskytte forbindelsen mot rask frigjøring, så som en kontrollert frigjøringsformulering innbefattende transplantater, transdermale plastere og mikroinnkapslede avleveringssystemer. Bionedbrytbare biokompatible polymerer kan bli brukt, så som etylenvinylacetat, polyetylen-
25 glykol (PEG), polyanhydrider, polyglykolsyrer, kollagen, polyortoestere og polyeddiksyre. Mange metoder for fremstilling av slike formuleringer er patentert eller generelt kjent for fagpersonen. Se for eksempel *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson
30 ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

I visse utførelsesformer kan det aktuelle antistoffet eller den aktuelle antistoffdelen bli administrert oralt, for eksempel med et inert fortynningsmiddel eller et assimilerbart spiselig bæremiddel. Forbindelsen (og om
35 ønsket andre bestanddeler) kan også bli innesluttet i et hardt eller mykt gelatinkapselskall, bli sammenpresset til

tabletter eller inkorporert direkte i individets mat. For oral terapeutisk administrasjon kan forbindelsene bli inkorporert med eksipienter og benyttet i form av inntakbare tabletter, bukkale tabletter, trocheer, kapsler, 5 eliksirer, suspensjoner, siruper, vafler og lignende. For å administrere en aktuell forbindelse, med annet enn parenteral administrasjon, kan det være nødvendig å belegge forbindelsen med eller administrere samtidig, forbindelsen med et materiale for å forhindre dens inaktivering. 10

Supplementære aktive forbindelser kan også bli inkorporert i sammensetningene. I visse utførelsesformer blir et aktuelt antistoff eller antistoffdel, formulert samtidig med og/eller administrert samtidig med et eller flere 15 andre ytterligere terapeutiske midler. For eksempel kan et anti-hTNF α -antistoff eller antistoffdel bli ko-formulert og/eller ko-administrert med metotrexat, et eller flere ytterligere antistoff som binder andre målmaterialer (for eksempel antistoff som binder andre cytokiner eller som 20 binder celleoverflatemolekyler), et eller flere cytokiner, oppløselig TNF α -reseptor (se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 94/06476) og/eller et eller flere kjemiske midler som inhiberer hTNF α -produksjon eller aktivitet (så som cykloheksanylidenderivater som beskrevet i PCT-publikasjon 25 nr. WO 93/19751). Videre kan et eller flere aktuelle antistoff, bli brukt i kombinasjon med to eller flere av de foregående terapeutiske midler. Slike kombinasjonsterapier kan fortrinnsvis anvende lavere doseringer av de administrerte, terapeutiske midler for således å unngå 30 mulige toksisiteter eller komplikasjoner assosiert med de forskjellige monoterapier. Bruken av de aktuelle antistoffene eller antistoffdelene, i kombinasjon med andre terapeutiske midler, er diskutert videre i underdel IV.

35 Eksempler på terapeutiske midler for revmatoid artritt hvormed et aktuelt antistoff eller antistoffdel kan bli

kombinert, innbefatter de følgende: ikke-steroide anti-
 inflammatoriske medikament(er) (NSAIDs); cytokine
 suppressive anti-inflammatoriske medikament(er) (CSAIDs);
 CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff;
 5 Celltech/Bayer); cA2 (kimerisk anti-TNF α -antistoff;
 Centocor); 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF reseptor-IgG
 fusjonsprotein; Immunex; se for eksempel *Arthritis &*
Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996)
 Vol. 44, 235A); 55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF reseptor-IgG
 10 fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396
 (ikke-fjernende primatisert anti-CD4 antistoff;
 IDEC/SmithKline; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism*
 (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 og/eller DAB 389-IL-2
 (IL-2 fusjonsproteiner; Seragen; se for eksempel *Arthritis*
 15 *& Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); Anti-Tac (humanisert
 anti-IL-2R α ; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (anti-
 inflammatorisk cytokin; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000;
 rekombinant IL-10, anti-inflammatorisk cytokin;
 DNAX/Schering); IL-4; IL-10 og/eller IL-4 agonister (for
 20 eksempel agonist antistoff); IL-1RA (IL-1
 reseptorantagonist; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR
 (oppløselig TNF-bindende protein; se for eksempel
Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement),
 S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology*
 25 (1995) Vol. 268, s. 37-42); R973401 (fosfodiesterase Type
 IV inhibitor; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism*
 (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); MK-966 (COX-2
 Inhibitor; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996)
 Vol. 39, nr. 9 (supplement), S81); Iloprost (se for
 30 eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9
 (supplement), S82); metotrexat; talidomid (se for eksempel
Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement),
 S282) og talidomide-relaterte medikamenter (for eksempel
 Celgen); leflunomid (anti-inflammatorisk og cytokin
 35 inhibitor; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996)
 Vol. 39, nr. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research*
 (1996) Vol. 45, s. 103-107); tranexaminsyre (inhibitor for
 plasminogenaktivivering; se for eksempel *Arthritis &*

Rheumatism (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S284); T-614 (cytokin-inhibitor; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); prostaglandin E1 (se for eksempel, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); Tenidap (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S280); Naproxen (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament; se for eksempel, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, s. 1209-1213); Meloxicam (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Ibuprofen (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Piroxicam (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Diclofenac (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Indomethacin (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Sulfasalazin (se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S281); Azathioprin (se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S281); ICE inhibitor (inhibitor av enzymet interleukin-1 β konverterende enzym); zap-70 og/eller lck inhibitor (inhibitor for tyrosin kinase zap-70 eller lck); VEGF-inhibitor og/eller VEGF-R-inhibitor (inhibitorer for vaskulær endotelialcelle vekstfaktor eller vaskulær endotelialcelle vekstfaktor reseptor; inhibitorer for angiogenese); kortikosteroide anti-inflammatoriske medikamenter (for eksempel SB203580); TNF-konvertaseinhibitorer; anti-IL-12 antistoff; interleukin-11 (se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S296); interleukin-13 (se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S308); interleukin-17-inhibitorer (se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S120); gull; penicillamin; klorokin; hydroksyklorokin; klorambucil; cyklofosfamid; cyklosporin; total lymfoid bestråling; anti-tymocytglobulin; anti-CD4 antistoff; CD5-toksiner; oralt administrerte peptider og kollagen; dinatrium lobenzarit; Cytokine regulerende midler (CRAs) HP228 og HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 antisens fosforotioat oligodeoksynukleotider

(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); oppløselig komplement reseptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednison; orgotein; glycosaminoglykan polysulfat; minocyklin; anti-IL2R antistoff; marine og botaniske lipider (fiske og plantefrø fettsyrer; se for eksempel DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofin; fenylbutazon; meklofenaminsyre; flufenaminsyre; intravenøs immunglobulin; zileuton; mykofenolsyre (RS-61443); takrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); 10 amiprilose (terafektin); kladribin (2-klordeoksyadenosin); og azaribin.

Eksempler på terapeutiske midler for inflammatorisk tarmsykdom hvormed et aktuelt antistoff eller antistoffdel kan bli kombinert innbefatter de følgende: budenosid, 15 epidermal vekstfaktor, kortikosteroider, cyklosporin, sulfasalazin, aminosalicylater, 6-merkaptopurin, azatioprin, metronidazol, lipoksygenaseinhibitorer, mesalamin, olsalazin, balsalazid, antioksidanter, tromboksane inhibitorer, IL-1-reseptorantagonister, anti- 20 IL-1 β monoklonale antistoff, anti-IL-6 monoklonale antistoff, vekstfaktorer, elastaseinhibitorer, pyridinylimidazol-forbindelser, CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff, Celltech/Bayer), cA2 (kimerisk anti-TNF α antistoff; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF 25 reseptor-IgG fusjonsprotein; Immunex; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF reseptor-IgG fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche); interleukin-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; IL-10 og/eller 30 IL-4 agonister (for eksempel agonist antistoff), interleukin-11, glukuronid- eller dextran-konjugerte prodroger av prednisolon, dexametason eller budesonid, ICAM-1 antisens fosfortioat oligodeoksynukleotider (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.), oppløselig komplement reseptor 1 35 (TP10; T Cell Sciences, Inc.), saktefrigjørende mesalazin, metotrexat, antagonister av blodplateaktiverende faktor (PAF), ciprofloxacin og lignocaine.

Eksempler på terapeutiske midler for multippel sklerose med hvilket et aktuelt antistoff eller antistoffdel kan bli kombinert innbefatter de følgende: kortikosteroider, prednisolon, metylprednisolon, azatioprin, cyklofosamid, 5 cyklosporin, metotrexat, 4-aminopyridin, tizanidin, interferon- β 1a (AvonexTM; Biogen), interferon- β 1b (BetaseronTM Chiron/Berlex), kopolymer 1 (Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.), hyperbarisk oksygen, intravenøs immunoglobulin, klabribin; CDP- 10 571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff; Celltech/Bayer), cA2 (kimerisk anti-TNF α -antistoff; Centocor), 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF reseptor-IgG fusjonsprotein; Immunex; se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 15 235A), 55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF reseptor-IgG fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche), IL-10, IL-4, og IL-10 og/eller IL-4 agonister (for eksempel agonist antistoff).

Eksempler på terapeutiske midler for sepsis med hvilket et aktuelt antistoff eller antistoffdel kan bli kombinert 20 innbefatter de følgende: hypertone fysiologiske saltvannsoppløsninger, antibiotika, intravenøs gammaglobulin, kontinuerlig hemofiltrering, karbapenemer (for eksempel meropenem), agonister for cytokiner så som TNF α , IL-1 β , IL-6 og/eller IL-8, CDP-571/BAY-10-3356 25 (humanisert anti-TNF α -antistoff, Celltech/Bayer), cA2 (kimerisk anti-TNF α -antistoff, Centocor), 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF α reseptor-IgG fusjonsprotein, Immunex, se for eksempel *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295, *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A), 55 kdTNFR-IgG (55 kD 30 TNF α reseptor-IgG fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche), cytokine reguleringsmidler (CRA) HP228 og HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.), SK&F 107647 (lavmolekylpeptid, SmithKline Beecham), tetravalent guanylhydrazon CNI-1493 (Picower Institute), Tussue Factor pathway Inhibitor 35 (TFPI; Chiron), PHP (kjemisk modifisert hemoglobin; APEX Bioscience), jernchelatorer og chelater innbefattende dietylentriamin pentaeddiksyre - jern (III) kompleks (DTPA

jern (III), Molichem Medicines), lisofyllin (syntetisk småmolekylær metylxantin, Cell Therapeutics, Inc.), PGG-Glucan (vandig oppløselig β 1,3 glucan, Alpha-Beta Technology), apolipoprotein A-1 rekonstituert med lipider, 5 kirale hydroksaminsyrer (syntetiske anti-bakterielle midler som inhiberer lipid A biosyntese), anti-endotoksin antistoff, E5531 (syntetisk lipid A antagonist; Aisai America Inc.), rBPI₂₁ (rekombinant N-terminal fragment av humant baktericid/permeabilitetsøkende protein) og synte- 10 tiske anti-endotoksinpeptider (SAEP; Bios Ynth Research Laboratories).

Eksempler på terapeutiske midler for respiratorisk nødsyndrom hos voksne (ARDS) med hvilke et aktuelt antistoff eller antistoffdel kan bli kombinert innbefatter 15 de følgende: anti-IL-8 antistoff, surfaktanterstatningsterapi (CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α antistoff; Celltech/Bayer), cA2 (kimerisk anti-TNF α antistoff; Centocor), 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF reseptor-IgG fusjonsprotein; Immunex; se for eksempel 20 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A) og 55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF reseptor-IgG fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche).

De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen, kan innbefatte en "terapeutisk effektiv mengde" eller en "pro- 25 fylaktisk effektiv mengde" av et aktuelt antistoff eller antistoffdel. En "terapeutisk effektiv mengde" refererer til en mengde som er effektiv ved doser og over tidsperioder som er nødvendige for å oppnå det ønskede terapeutiske resultat. En terapeutisk effektiv mengde av 30 antistoffet eller antistoffdelen kan variere ifølge faktorer, så som sykdomsstadium, alder, kjønn og vekt av individet og egenskapen til antistoffet eller antistoffdelen til å fremskaffe en ønsket respons hos 35 individet. En terapeutisk effektiv mengde er også en hvor alle toksiske eller skadelige effekter av antistoffet eller antistoffdelen blir overskygget av de terapeutisk

gunstige resultater. En "profylaktisk effektiv mengde" refererer til en mengde som er effektiv ved dose og over slike tidsperioder som er nødvendige for å oppnå det ønskede profylaktiske resultat. Typisk, siden en profylaktisk dose blir benyttet i individer før eller ved et tidligere stadium av sykdommen, vil den profylaktisk effektive mengde være mindre enn den terapeutisk effektive mengde.

Doseringsregimer kan bli justert for å gi den optimale, ønskede respons (for eksempel en terapeutisk eller profylaktisk respons). For eksempel kan en enkel bolus bli administrert, flere oppdelte doser kan bli administrert over tid eller dosen kan bli forholdsmessig redusert eller øket som indikert av forholdene ved den terapeutiske situasjon. Det er spesielt fordelaktig å formulere parenterale sammensetninger i enhetsdoseringsform for letthet ved administrasjon og uniformitet av doseringen. Enhetsdoseform som benyttet heri, refererer til fysisk, diskrete enheter som regnet som enhetsdoser for pattedyrindividene som skal behandles hvor hver enhet inneholder en på forhånd bestemt mengde av aktiv forbindelse utregnet til å gi den ønskede, terapeutiske effekt i assosiasjon med det nødvendige farmasøytiske bæremateriale. Spesifikasjonen for enhetsdoseformene er diktert av og direkte avhengig av (a) de enestående karakteristika av den aktive forbindelse og den spesielle terapeutiske eller profylaktiske effekt som skal bli oppnådd og (b) begrensningene som er iboende innen faget for å utforme en slik aktiv forbindelse til behandling av sensitivitet i individer.

Et eksempelvis område for en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et aktuelt antistoff eller antistoffdel er 10-100 mg, mer foretrukket 20-80 mg og mest foretrukket omkring 40 mg. Det bør bli notert at doseringsverdier kan variere med type og alvorlighet av tilstanden som skal behandles. Det skal videre bli forstått at for ethvert spesielt individ bør spesielle

doseringsregimer bli justert over tid i henhold til individets behov og den profesjonelle vurdering av personen som administrerer eller overvåker administrasjonen av sammensetningene.

5 V. Anvendelser av de aktuelle antistoffene

Gitt deres egenskap å binde til hTNF α kan de aktuelle anti-hTNF α -antistoffene eller deler derav bli brukt til å påvise hTNF α (for eksempel i en biologisk prøve, så som serum eller plasma) ved å bruke et konvensjonelt
 10 immunoassay, så som et enzymtilknyttet immunosorbentassay (ELISA), eller radioimmunoassay (RIA) eller vevsimmunohistokjemi. De aktuelle antistoffer kan også brukes i en metode for å påvise hTNF α i en biologisk prøve omfattende å sette en biologisk prøve i kontakt med et
 15 slikt antistoff eller antistoffdel, og påvise enten antistoffet (eller antistoffdel) bundet til hTNF α eller ubundet antistoff (eller antistoffdel) for derved å påvise hTNF α i den biologiske prøven. Antistoffet er direkte eller indirekte merket med et påvisbart stoff for å lette
 20 påvisningen av det bundne eller ubundne antistoff. Egnede påvisbare stoff inkluderer forskjellige enzymer, prostetiske grupper, fluorescente materialer, luminisente materialer og radioaktive materialer. Eksempler på egnede enzymer inkluderer pepperrot peroksidase,
 25 alkalinfosfatase, β -galaktosidase eller acetylcholinesterase, eksempler på egnede prostetiske gruppekomplekser innbefatter streptavidin/biotin og avidin/biotin, eksempler på egnede fluorescente materialer innbefatter umbelliferon, fluorescein, fluorescein isotiocyanat,
 30 rodamin, diklortriazinylamin, fluorescein, dansyl klorid eller fykoerytrin, et eksempel på et luminiscent materiale innbefatter luminol og eksempler på egnede radioaktive materialer innbefatter ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S eller ^3H .

Alternativt til merking av antistoffet kan hTNF α bli på-
 35 vist i biologiske vesker med et konkurrerende immunoassay

som benytter rhTNF α -standarder merket med en påviselig substans og et umerket anti-hTNF α -antistoff. I dette assay blir den biologiske prøve, de merkede rhTNF α -standarder og anti-hTNF α -antistoffet kombinert og mengden av merket
5 rhTNF α -standard bundet til det umerkede antistoff blir bestemt. Mengden av hTNF α i den biologiske prøve er inverst proporsjonal med mengden av merket hTNF α -standard som er bundet til anti-hTNF α -antistoffet.

Et D2E7 antistoff kan også bli brukt til å påvise TNF α fra
10 arter andre enn mennesker, spesielt TNF α fra primater (for eksempel sjimpanser, bavianer, marmoset, cynomologer og resus), gris og mus siden D2E7 kan binde til ethvert av disse TNF α -typer.

De aktuelle antistoffene og antistoffdelene er i stand til
15 å nøytralisere hTNF α -aktivitet både *in vitro* og *in vivo* (se U.S. patent nr. 6.090.382). Videre kan minst enkelte av de aktuelle antistoffene, så som D2E7, nøytralisere hTNF α -aktivitet fra andre arter. Følgelig kan disse antistoffene og antistoffdelene bli brukt til å inhibere
20 hTNF α -aktivitet, for eksempel i en cellekultur inneholdende hTNF α i mennesker eller i andre pattedyr som har TNF α med hvilke et slikt antistoff kryssreagerer (for eksempel sjimpanse, bavian, marmoset, cynomologer og resus, gris eller mus). De aktuelle antistoffene kan
25 benyttes i en metode for å inhibere TNF α -aktivitet omfattende å sette TNF α i kontakt med et slikt antistoff eller antistoffdel, slik at TNF α -aktivitet blir inhibert. Foretrukket er TNF α -materialet human TNF α . For eksempel kan, i en cellekultur inneholdende eller mistenkt for å
30 inneholde TNF α , et slikt antistoff eller antistoffdel bli tilsatt til dyrkingsmediet for å inhibere TNF α -aktivitet i kulturen.

Som benyttet heri er uttrykket "en lidelse hvor administrasjonen av et anti-TNF α -antistoff er gunstig" ment å inn-
35 befatte sykdommer og andre lidelser hvor tilstedeværelsen

av TNF α i et individ som lider av lidelsen har blitt vist å være eller er mistenkt for å være, enten ansvarlig for patiofysiologien av sykdommen eller en faktor som medvirker til en forverring av lidelsen eller hvor det har

5 blitt vist et annet anti-TNF α -antistoff eller en biologisk aktiv del derav, har vært gunstig til å behandle sykdommen. Følgelig er en lidelse hvor TNF α -aktivitet er skadelig en lidelse hvor inhibering av TNF α -aktivitet er forventet å lette symptomene og/progresjonen av lidelsen.

10 Slike lidelser kan for eksempel bli funnet ut fra en økning i konsentrasjonen av TNF α i en biologisk væske fra individet som lider av lidelsen (for eksempel en økning i konsentrasjonen av TNF α i serum, plasma, synovialvæske, etc. hos individet) som kan bli påvist for eksempel ved å

15 bruke et anti-TNF α -antistoff som beskrevet ovenfor. Det finnes mange eksempler på lidelser hvor TNF α -aktivitet er skadelig. Bruken av de aktuelle antistoffene og antistoffdelen ved behandlingen av spesifikke lidelser er diskutert videre nedenfor:

20 A. Sepsis

Tumornekrosefaktor har en etablert rolle i patofysiologien av sepsis med biologiske effekter som innbefatter hypotensjon, myokardial suppresjon, vesikulært lekkasjesyndrom, organnekrose, stimulering av frigjøringen av toksiske sekundære mediatorer og aktivering av levringskaskaden (se for eksempel Tracey, K.J. og Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503; Russel, D og Thompson, R.C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721). Følgelig kan de

25 aktuelle humane antistoff og antistoffdeler bli brukt til å behandle sepsis i enhver av sine kliniske bakgrunner innbefattende septisk sjokk, endotoksisk sjokk, gram negativ sepsis og toksisk sjokksyndrom.

Videre, for å behandle sepsis, kan et aktuelt anti-hTNF α -antistoff eller antistoffdel bli administrert samtidig med

35 et eller flere ytterligere terapeutiske midler som

ytterligere kan lette sepsis, så som en interleukin-1-inhibitor (så som dem beskrevet i PCT-publikasjon nr. WO 92/16221 og WO 92/17583), cytokine interleukin-6 (se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 93/11793) eller en
 5 antagonist for blodplateaktiveringsfaktor (se for eksempel europeisk patentsøknad, publikasjon nr. EP 374 510).

I tillegg blir et aktuelt anti-TNF α -antistoff eller antistoffdel administrert til et menneske innenfor en undergruppe av sepsispasienter som har en serum eller
 10 plasmakonsentrasjon av IL-6 over 500 pg/ml og mer foretrukket 1000 pg/ml ved tiden for behandling (se PCT-publikasjon nr. WO 95/20978 til Daum, L., et al.).

B. Autoimmune sykdommer

Tumornekrosefaktor har blitt implikert i å spille en rolle
 15 ved patofysiologien av en rekke autoimmune sykdommer. For eksempel har TNF α blitt implikert i å aktivere vevsinflammasjon og forårsake leddødeleggelse i revmatoid artritt (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*; Arend, W.P. og Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R.A., et
 20 al. (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266). TNF α har også vært implikert i å fremme døden av øyceller og i å mediere insulinresistens i diabetes (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*; PCT-publikasjon nr. WO 94/08609). TNF α har også blitt implikert i å fremme cytotoxicitet til oligo-
 25 dendrocytter og induksjon av inflammatoriske plakker i multippel sklerose (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). Chimeriske og humaniserte murine anti-hTNF α antistoff har undergått klinisk testing for behandling av revmatoid artritt (se for eksempel Elliott, M.J., et al.
 30 (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., et al. (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E.C., et al. (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342).

De humane aktuelle antistoff og antistoffdeler kan bli brukt til å behandle autoimmune sykdommer, spesielt slike

assosiert med inflammasjon, innbefattende revmatoid artritt, revmatoid spondylitt, osteoartritt og giktisk artritt, allergi, multippel sklerose, autoimmune diabetes, autoimmune uveitis og nefrotisk syndrom. Typisk blir
 5 antistoffet eller antistoffdelen, administrert systemisk selv om for visse lidelser kan lokal administrasjon av antistoffet eller antistoffdelen ved inflammasjonsstedet være gunstig (for eksempel lokal administrering i leddene ved revmatoid artritt eller topisk applikasjon til
 10 diabetiske sår alene eller i kombinasjon med et sykloheksan-ylidenderivat som beskrevet i PCT-publikasjon nr. WO 93/19751).

C. Infeksjonssykdommer

Tumornekrosefaktor har vært implikert i å mediere biologiske effekter observert i en rekke infeksjonsdyktige sykdommer. For eksempel har TNF α blitt implikert i å fremme hjerneinflammasjon og kapillær trombose og infarkt i malaria (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). TNF α har også vært implikert i å fremme hjerneinflammasjon innbefattende nedbrytning av blod-kjerne-barrieren, igangsettning av septisk sjokksyndrom og aktivering av venøst infarkt i meningitt (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). TNF α har også blitt implikert i indusering av cachexia, stimulering av viral proliferasjon og fremming
 25 av sentralnervesystemskade i ervervet immunsviktsyndrom ((AIDS) (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). Følgelig kan de aktuelle antistoffene og antistoffdelene bli brukt ved behandlingen av infeksjonssykdommer
 innbefattende bakteriell meningitt (se for eksempel europeisk patentsøknad publikasjon nr. EP 585 705), cerebral
 30 malaria, AIDS og AIDS-relatert kompleks (ARC) (se for eksempel europeisk patentsøknad publikasjon nr. EP 230 574), så vel som cytomegalovirusinfeksjon sekundær til transplantasjon (se for eksempel Fietze, E., et al. (1994)
 35 *Transplantation* 58: 675-680). Disse antistoffene og antistoffdelene kan også bli brukt til å bedre symptomer

assosiert med infeksjonssykdommer innbefattende feber og myalgier grunnet infeksjon (så som influensa) og cachexia sekundær til infeksjon (for eksempel sekundær til AIDS eller ARC).

5 D. *Transplantasjon*

Tumornekrosefaktor har blitt implikert som en nøkkelmediator for allograftavstøtning og transplantat mot vertssykdom (GVHD) og i å fremme en skadelig reaksjon som har blitt observert når rotteantistoffet OKT3, rettet mot T-cellerreseptoren CD3-kompleks, blir brukt til å inhibere avsetning av nyretransplantater (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*, Eason, J.D., et al. (1995) *Transplantation* 59: 300-305, Suthanthiran, M. og Strom, T.B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331: 365-375). Følgelig kan de aktuelle antistoffene og antistoffdelene bli brukt til å inhibere transplantatavstøtning innbefattende avstøtninger av allografter og xenografter samt å inhibere GVHD. Selv om antistoffet eller antistoffdelen kan bli benyttet alene, blir den mer foretrukket brukt i kombinasjon med et eller flere andre midler som inhiberer immunresponsen mot allograftet eller inhiberer GVHD. For eksempel blir i en utførelsesform, et slikt antistoff eller antistoffdel brukt i kombinasjon med OKT3 til å inhibere OKT3-induserte reaksjoner. I en annen utførelsesform blir det aktuelle antistoffet eller antistoffdelen brukt i kombinasjon med et eller flere antistoff rettet mot andre mål som er involvert i å regulere immunresponser, så som celleoverflatemolekylene CD25 (interleukin-2 reseptor- α), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) og/eller CD86 (B7-2). I atter en annen utførelsesform blir det aktuelle antistoffet eller antistoffdelen brukt i kombinasjon med et eller flere generelle immunosuppressive midler, så som cyklosporin A eller FK506.

E. Ondartethet

Tumornekrosefaktor har blitt implikert i induksjon av cachexia, stimulering av tumorvekst, økning av metastatisk potensiale og mediering av cytotoxisitet i sykdommer (se
 5 for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). Følgelig kan de aktuelle antistoffene og antistoffdelene bli brukt ved behandling av sykdommer til å inhibere tumorvekst eller metastase og/eller å lette cachexia som er sekundær til sykdommer. Antistoffet eller antistoffdelen kan bli
 10 administrert systemisk eller lokalt til tumorområdet.

F. Pulmonare lidelser

Tumornekrosefaktor har blitt implikert i patofysiologien av respiratorisk nødssyndrom hos voksne, innbefattende stimulering av leukocyt-*edotelial*aktivering, dirigering
 15 av cytotoxisitet til pneumocytter og indusering av vaskulært lekkasjesyndrom (se for eksempel Tracey og Cerami, *supra*). Følgelig kan de aktuelle antistoffene og antistoffdelene bli brukt til å behandle forskjellige pulmonare lidelser innbefattende respiratorisk nødssyndrom
 20 hos voksne (se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 91/04054), sjokklunge, kronisk pulmonar inflammatorisk sykdom, pulmonar sarkoidose, pulmonar fibrose og silikose. Antistoffet eller antistoffdelen kan bli administrert systemisk eller lokalt til lungeoverflaten for eksempel som
 25 en aerosol.

G. Tarmsykdommer

Tumornekrosefaktor har blitt implikert i patofysiologien av inflammatoriske tarmsykdommer (se for eksempel Tracy, K.J., *et al.* (1986) *Science* 234:470-474; Sun, X-M., *et al.*
 30 (1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331, MacDonald, T.T., *et al.* (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:301-305). Kimeriske murine anti-hTNF α antistoff har undergått klinisk testing for behandling av Crohn's sykdom (van Dullemen, H.M., *et al.* (1995) *Gastroenterology* 109:129-135). De aktuelle

humane antistoff og antistoffdelere kan også bli brukt til å behandle tarmlidelser så som idiopatisk inflammatorisk tarmsykdom som inkluderer to syndromer, Crohn's sykdom og ulcerativ kolitt.

5 H. Hjertelidelser

De aktuelle antistoffene og antistoffdelene kan også bli brukt til å behandle forskjellige hjertelidelser innbefattende hjerteiskemi (se for eksempel europeisk patentsøknad publikasjon nr. EP 453 898) og hjerteinsuffi-
10 ciens (svækkelse av hjertemuskel) (se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 94/20139).

I. Andre

De aktuelle antistoffene og antistoffdelene kan også bli brukt til å behandle forskjellige andre lidelser hvor
15 TNF α -aktivitet er skadelig. Eksempler på andre sykdommer og lidelser hvor TNF α -aktivitet har blitt implikert i patofysiologien og som således kan behandles ved å bruke et slikt antistoff eller antistoffdel innbefatter inflammatorisk bensykdom og benresorpsjonssykdom (se for
20 eksempel Bertolini, D.R., et al. (1986) *Nature* 319:516-518, König, A., et al. (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627, Lerner, U.H. og Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8:147-155 og Shankar, G. og Stern, P.H. (1993) *Bone* 14:871-876), hepatitt, innbefattende alkoholisk hepatitt
25 (se for eksempel McClain, C.J. og Cohen, D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351, Felver, M.E., et al. (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14:255-259 og Hansen, J., et al. (1994) *Hepatology* 20:461-474) og viral hepatitt (Sheron, N., et al. (1991) *J. Hepatol.* 12:241-245 og Hussain, M.J., et al.
30 (1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115), koaguleringsforstyrrelser (se for eksempel van der Poll, T., et al. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627 og van der Poll, T., et al. (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60), brannskader (se for eksempel Giroir, B.P., et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124 og Liu, X.S., et al. (1994) *Burns*

20:40-44), reperfusjonsskade (se for eksempel Scales, W.E., et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267:G1122-1127, Serrick, C., et al. (1994) *Transplantation* 58:1158-1162 og Yao, Y.M., et al. (1995) *Resuscitation* 29:157-168),
 5 keloiddannelse (se for eksempel McCauley, R.L., et al. (1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308), arrvevdsdannelse og pyrexia.

Foreliggende oppfinnelse er ytterligere illustrert av de følgende eksempler.

10 **Eksempel 1. Behandling med et anti-TNF α -antistoff**

D2E7-effektivitet etter subkutan administrasjon

I foreliggende studium ble tjuefire pasienter med aktiv RA behandlet med ukentlige doser på 0,5 mg/kg D2E7 (n=18) eller placebo (n=6) med s.c. injeksjon over tre måneder.
 15 Pasienter som deltok i dette studium hadde en gjennomsnittlig sykdomsvarighet på 10,1 år med en sykdomsaktivitetsverdi (DAS) på 4,87 og et gjennomsnitt på 3,4 DMARD (sykdomsmodifiserende anti-revmatiske medikamenter) før studiets inngang, noe som igjen reflekterer stor sykdoms-
 20 aktivitet. De som reagerte på behandlingen fortsatte åpen etikettbehandling med D2E7, mens pasienter som ikke reagerte på 0,5 mg/kg-dosen eller som tapte en DAS-respons på 0,5 mg/kg-dosen ble opptrappet til å motta 1 mg/kg ved s.c. injeksjon etter uke 12 av studien.

25 De første pasienter som ble innskrevet mottok opptil seksti injeksjoner og var følgelig seksti uker på det undersøkte medikament. Effektiviteten med s.c. dosering var lik i.v. injeksjoner. Opptil 78 % av pasienter nådde en DAS- og ACR20-respons i løpet av de første uker av
 30 behandlingen. Subkutan D2E7 ved en dose på 0,5 mg/kg/uke reduserte en leddhevelse (SWJ)-verdi med 54 %, øm leddverdi (TJC) med 61 % og CRP med 39 % over tolv uker sammenlignet med basislinjen, mens alle parametre økte i placebogruppen. Etter avslutning av den placebokontrol-

lerte periode av dette studium fortsatte pasientene behandling i opptil fjorten måneder med vedvarende effektivitet. Disse resultater indikerer at subkutan D2E7 ved en dose på 0,5 mg/kg/uke følgelig kan bli sikkert selvadministrert med en god lokal tolerabilitet.

Administrasjon av D2E7 og metotrexat

I dette studium mottok pasienter s.c. eller i.v. placebo eller D2E7 ved en dose på 1 mg/kg i tillegg til deres pågående behandling med (metotrexat) MTX. Femtifire pasienter ble lagt inn i studiet og atten pasienter mottok i.v. D2E7 og s.c. placebo, atten pasienter mottok placebo og s.c. D2E7 og atten pasienter mottok placebo i.v. og s.c. Pasientene mottok sin andre dose kun etter at de mistet sin blindresponsstatus, ikke tidligere enn fire uker etter den første dose. Deretter mottok alle pasienter åpenetikett toukentlige s.c. injeksjoner av D2E7.

Demografiske karakteristika av studiepopulasjonen i dette studium innbefattet en gjennomsnittlig varighet av RA på 11,1 år før eksponering til et gjennomsnitt på 3,6 DMARD (andre enn MTX) og en gjennomsnittlig DAS ved en studiumsinngang på 4,81. På dag tjue hadde 72 % av i.v. D2E7-behandlede pasienter og 44 % av s.c. D2E7-behandlede pasienter oppnådd en respons per DAS-kriterium sammenlignet med kun 28 % av placebobehandlede pasienter (angitt i figur 5). Av de som reagerte i dette studium opprettholdt 28 % av placebobehandlede pasienter en ACR20-respons opp til dag 29, sammenlignet med 72 % av i.v.-behandlede D2E7-pasienter og 67 % av s.c.-behandlede D2E7-pasienter som opprettholdt sin reaksjon på mellom en og tre måneder.

Eksempel 2. Total kroppsdose av et subkutant administrert anti-TNF α -antistoff

Ukentlig, subkutan administrasjon av D2E7

Dette stadium omfattet tohundreogåttifire pasienter med RA og ble utformet til å bestemme den optimale totale kropps-

dose av subkutan administrert D2E7. Pasienter ble randomisert til å motta enten 20, 40 eller 80 mg D2E7 eller placebo ukentlig over tolv uker, hvorpå placebobehandlede pasienter ble byttet blindt til 40 mg D2E7/uke.

5 Omtrent 49 % av pasienter nådde ACR20 ved 20 mg, 55 % av pasienter nådde ACR20 ved 40 mg og 54 % av pasienter nådde ACR20 ved 80 mg, mens kun 10 % av pasienter som mottok placebo nådde ACR20 (angitt i figur 1A). Omtrent 23 % av pasienter nådde ACR50 ved 20 mg, 27 % av pasienter nådde
10 ACR50 ved 40 mg og 20 % av pasienter nådde ACR50 ved 80 mg og kun 2 % av pasienter som mottok placebo nådde ACR50. Disse data illustrerer at subkutan D2E7, spesielt ved en dose på 40 mg/uke, gir en god respons□

15 **Eksempel 3. Toukentlig, subkutan administrasjon av et anti-TNF α -antistoff**

Toukentlig, subkutan administrasjon av D2E7

De kliniske effekter, sikkerhet, immunogenisitet og toleranse av RA-pasienter med partielle responser overfor MTX etter annenhver uke subkutane (s.c.) injeksjoner av
20 placebo eller D2E7 ved flere dosenivåer opptil tjuefire uker i sammenheng med fortsatt MTX-behandling ble undersøkt.

Studiumsutforming

25 Et placebokontrollert, dobbeltblindt, randomisert, multisenter studium i pasienter med RA som hadde utilstrekkelig effektivitet eller tolerabilitet overfor MTX ble utført. I løpet av forsøksforløpet ble pasienter fortsatt på en stabil dose av MTX med doseområder angitt i inklusjonskriteriene beskrevet nedenfor.

30 Dette studium besto av to deler: **1)** en "utvaskingsperiode" på fire uker før administrasjonen av den første dose medikament under hvilken tid DMARD (bortsett fra for MTX) ble holdt tilbake, og **2)** en "placebokontrollert periode" under

hvilken tid pasienter ble randomisert til en av fire grupper på sekstisyv pasienter til å motta placebo, 20, 40 eller 80 mg D2E7 (som en total kroppsdose) gitt annenhver uke s.c. i opptil 24 uker. Hver dose av studiumsmedikament ble administrert som to s.c. injeksjoner på 1,6 mL hver. Pasientenes første dose ble administrert av medisinsk personell som del av pasientens trening. Etterfølgende doser ble selvadministrert av pasienten med studiet under direkte observasjon av trent personell i de første fire uker. Deretter ble doser administrert utenfor studieområdet av pasienten, et trent individ utpekt av pasienten eller av medisinsk personell. Medisinering i fire til fem uker ble utført etter hver kliniske undersøkelse. Pasienter ble undersøkt serielt i uke en, to, tre, fire, seks, åtte, tolv, seksten, tjue og tjuefire av studien hvor leddundersøkelser ble utført av en utenforstående vurderer uavhengig av den behandlende lege.

Dette studium inkluderte tohundreogsyttien pasienter med RA. Denne studiumspopulasjonen var representativ for den moderate til alvorlige RA-populasjon i Nord-Amerika: omtrent 70 % kvinner og i hovedsak over 40-års alder. Populasjonen ble valgt ved å bruke på forhånd bestemte inklusjons- og eksklusjonskriterier som er kjent for fagpersonen, for eksempel må en pasient ha fått en diagnose av RA som definert av de 1987-reviderte American College of Rheumatology (ACR)-kriterier (angitt i vedlegg A).

Resultater

Figur 1B og 2-4 indikerer at subkutan, ugentlig D2E7-behandling kombinert med metotrexat var vesentlig bedre enn placebo til å redusere tegnene og symptomene på RA ved tjuefire uker. Alle tre doser av D2E7 var statistisk signifikant mer effektive enn placebo gitt ukentlig. Videre hadde D2E7 ved 40 mg og 80 mg bedre effektivitet enn 20 mg dosen.

VEDLEGG A**ACR-definisjon av RA**

De tre kriterier og funksjoner for revmatoid artritt (RA) ifølge 1987-klassifiseringen

Kriterium	Definisjon
1. Artritt i 3 eller flere leddområder	Minst 3 leddområder har samtidig hatt mykvevshevelse eller væske (ikke benutvekst alene) observert av en lege. De 14 mulige leddområder er høyre eller venstre PIP, MDP, vrist, albu, kne, ankel og MTP-ledd.
2. Artritt i håndledd Vrist MCP MCP eller vrist MCP og vrist	Mykvevssvelling eller væske (ikke benutvekst alene) av det angitte område observert av en lege. Hvor 2 områder er angitt må involvering ha vært samtidig.
3. Symmetrisk hevelse (artritt)	Samtidig involvering av samme leddområde (som definert i punkt 1 på begge sider av kroppen (bilateral involvering av PIPs, MCP's eller MTPs er akseptabel uten absolutt symmetri).
4. Revmatoid serumfaktor	Demonstrasjon av abnormale mengder av revmatoid serumfaktor ved enhver metode for hvilken resultatet har vært positivt i <5 % av normale kontrollindivider.
5. Radiografiske endringer av revmatoid artritt	Radiografiske endringer som er typiske for revmatoid artritt på radiografer av postereoanterior hånd og vrist som må innbefatte erosjoner eller uttalt bendekalsifisering lokalisert i eller mest markert ved siden av de angrepne ledd (osteartrittendringer alene kvalifiserer ikke).
*En pasient er hevdet å ha RA dersom han/hun er innbefattet i en av de 5RA undersøkt opplistet i tabell 7 og har en klinisk diagnose på RA av sin lege. Kriterium 1, 2 og 3 må ha vært til stede i minst 6 uker.	

Patentkrav

1. Sammensetning omfattende mengden 40 mg av et isolert humant anti-TNF α antistoff, for anvendelse ved behandling av en autoimmun sykdom i et menneske, hvor sammensetningen skal administreres subkutant til mennesket som har behov for dette i et to-ukentlig doseringsregime hver 13-15 dager, og hvor det humane anti-TNF α antistoffet nøytraliserer human TNF α cytotoxiskitet i et standard *in vitro* L929 assay med en IC₅₀ på 1×10^{-9} M eller mindre, omfatter et lettkjede variabelt område (LCVR) omfattende et CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 3, et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 5 og et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 7, og omfatter et tungkjede variabelt område (HCVR) omfattende et CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 4, et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 6, og et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 8.
2. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte humane antistoff har et lettkjede variabelt område (LCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 1 og et tungkjede variabelt område (HCVR) omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 2.
3. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte humane antistoff er antistoffet D2E7.
4. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte humane antistoff eller antigenbindende del derav nøytraliserer human TNF α cytotoxiskitet i et standard *in vitro* L929-assay med en LC₅₀ på 1×10^{-10} M eller mindre.
5. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte humane antistoff inhiberer human TNF α -indusert ekspresjon av ELAM-1 på humane navlestrengåre endotelialceller.

6. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte humane antistoff har et IgG1 tungkjede konstant område eller hvor nevnte humane antistoff har et IgG4 tungkjede konstant område.
- 5 7. Sammensetning for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav 1 - 6, hvor sammensetningen er tilpasset til å bli administrert i et to-ukentlig doseringsregime på hver 14. dag.
8. Sammensetning for anvendelse ifølge ethvert av de
10 foregående krav 1 - 7, hvor sammensetningen er tilpasset til å bli administrert i kombinasjon med et ytterligere terapeutisk middel.
9. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 8, hvor det ytterligere terapeutiske middel er valgt fra gruppen
15 bestående av et ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament (NSAID), et cytokin anti-inflammatorisk medikament, cytokin IL-4 og cytokin IL-10.
10. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 9, hvor det aktuelle NSAID er valgt fra gruppen bestående av tenidap,
20 naproksen, meloksikam, ibuprofen, piroksikam og indometacin.
11. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 10, hvor det ytterligere terapeutiske middel er metotreksat.
12. Sammensetning for anvendelse ifølge ethvert av de
25 foregående krav 1 - 11, hvor nevnte autoimmune sykdom er valgt fra gruppen bestående av reumatoid artritt, reumatoid spondylitt, osteoartritt og giktisk artritt, spesielt reumatoid artritt, eller er valgt fra gruppen bestående av allergi, multippel sklerose, autoimmun
30 diabetes, autoimmun uveitis og nefrotisk syndrom.

13. Forhåndsfylt sprøyte omfattende en sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 - 2, samt et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel, hvor sammensetningen er for anvendelse ved behandling av en autoimmun lidelse i et
5 menneske, og er tilpasset til å bli administrert subkutant til det aktuelle menneske som har behov for dette i et to-ukentlig doseringsregime på hver 13. - 15. dag.
14. Forhåndsfylt sprøyte ifølge krav 13, hvor nevnte autoimmune sykdom er valgt fra gruppen bestående av
10 rheumatoid artritt, rheumatoid spondylitt, osteoartritt og giktisk artritt, spesielt rheumatoid artritt, eller er valgt fra gruppen bestående av en allergi, multippel sklerose, autoimmun diabetes, autoimmun uveitis og nefrotisk syndrom.
- 15 15. Forhåndsfylt sprøyte ifølge krav 13 eller 14, hvor sammensetningen er tilpasset til å bli administrert i et to-ukentlig doseringsregime på hver 14. dag.

SEKVENSLISTE

<110> Abbott Laboratories (Bermuda) Ltd. et al.

<120> METHODS OF ADMINISTERING ANTI-TNFalpha
ANTIBODIES

<130> BBI-168PC

<140> PCT/US02/17790

<141> 2002-06-05

<150> 60/296961

<151> 2001-06-08

<160> 37

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 1

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
          20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

```

          35                40                45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
  50                55                60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
  65                70                75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85                90                95
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
          100                105                110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115                120

```

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)
 <223> Xaa = Thr or Ala

<400> 3
 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)
 <223> Xaa = Tyr or Asn

<400> 4
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<400> 5
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<400> 6
 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Gly

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<400> 7
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<400> 8
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutated human antibody

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 13
Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 14
Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 15
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 16
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 17
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 18
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 19
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 20
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 21
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 22
Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 23
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 24
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 25
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 26
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 27

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 29

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 30

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated human antibody

<400> 31

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 32
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 33
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 34
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 35
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutated human antibody

<400> 36
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctgggatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatggtg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttgccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

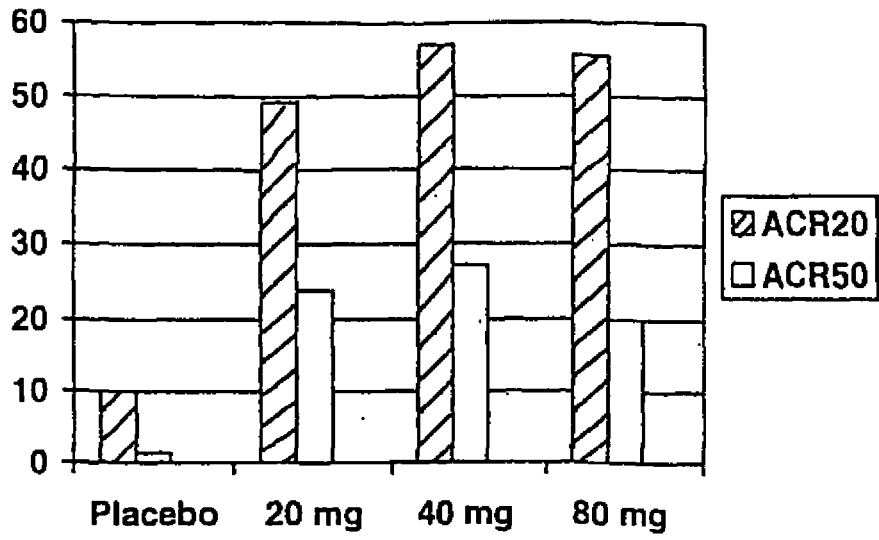
<213> Artificial Sequence

<220>

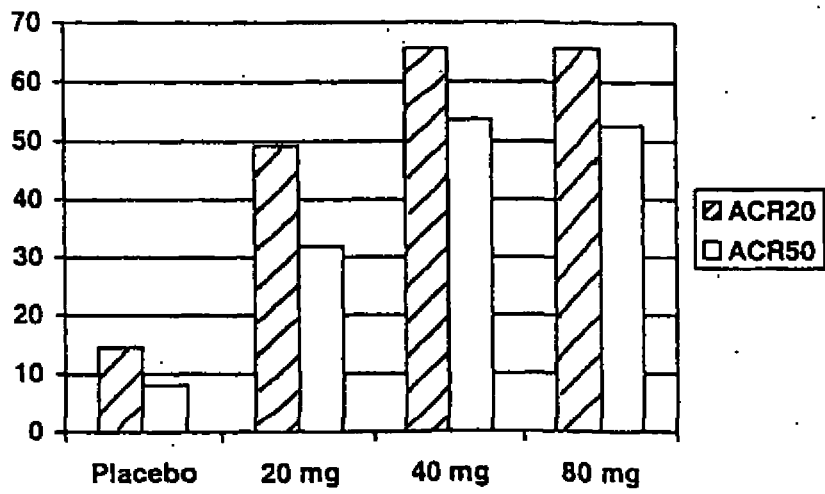
<223> mutated human antibody

<400> 37
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgagg cctctggatt caccttggat gattatgcca tgcaactgggt ccggcaagct 120
ccaggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggg atagtgggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgtctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360
agt 363

1/6

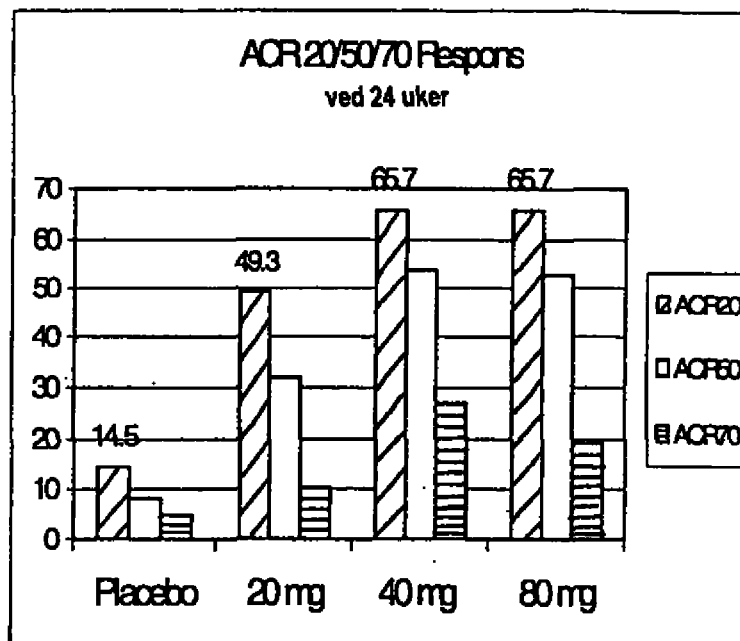


Studium DE007
Dosering hver uke



Studium DE009
Dosering annenhver uke

FIGUR 1

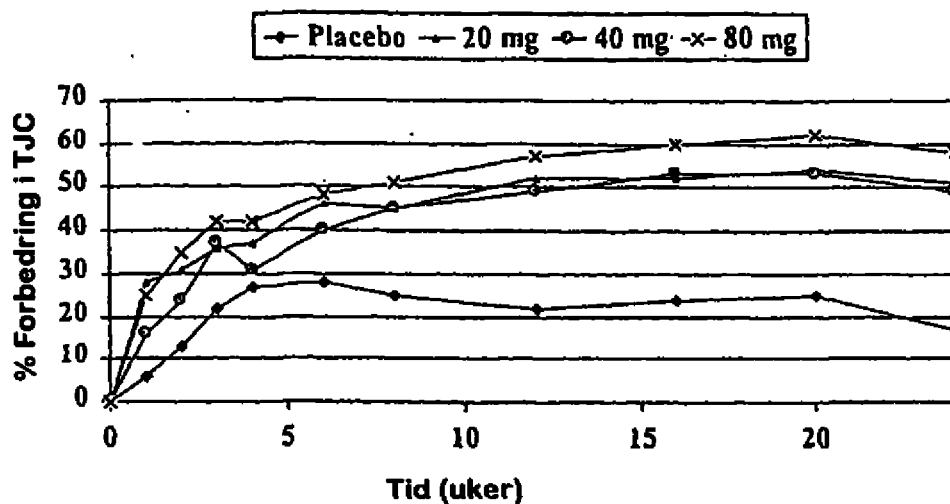


FIGUR 2

3/6

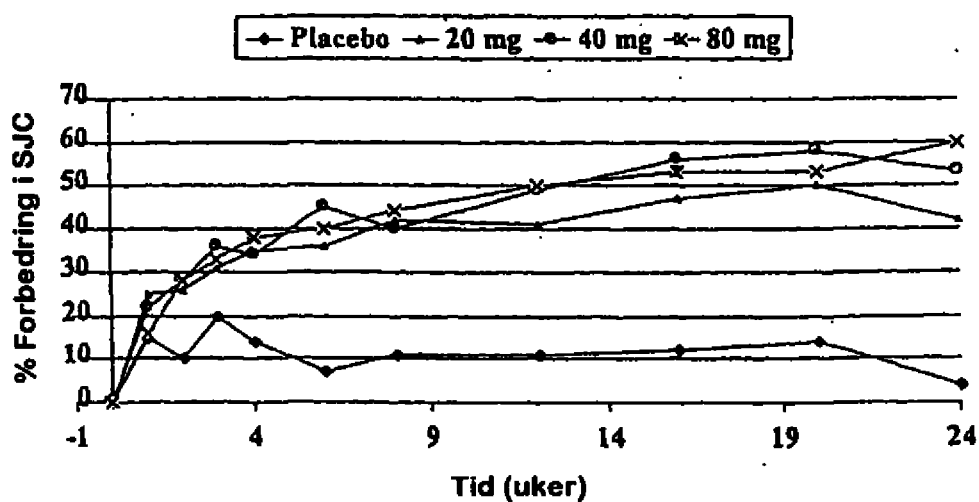
A

Forløp av antall ømme ledd over 24 timer



B

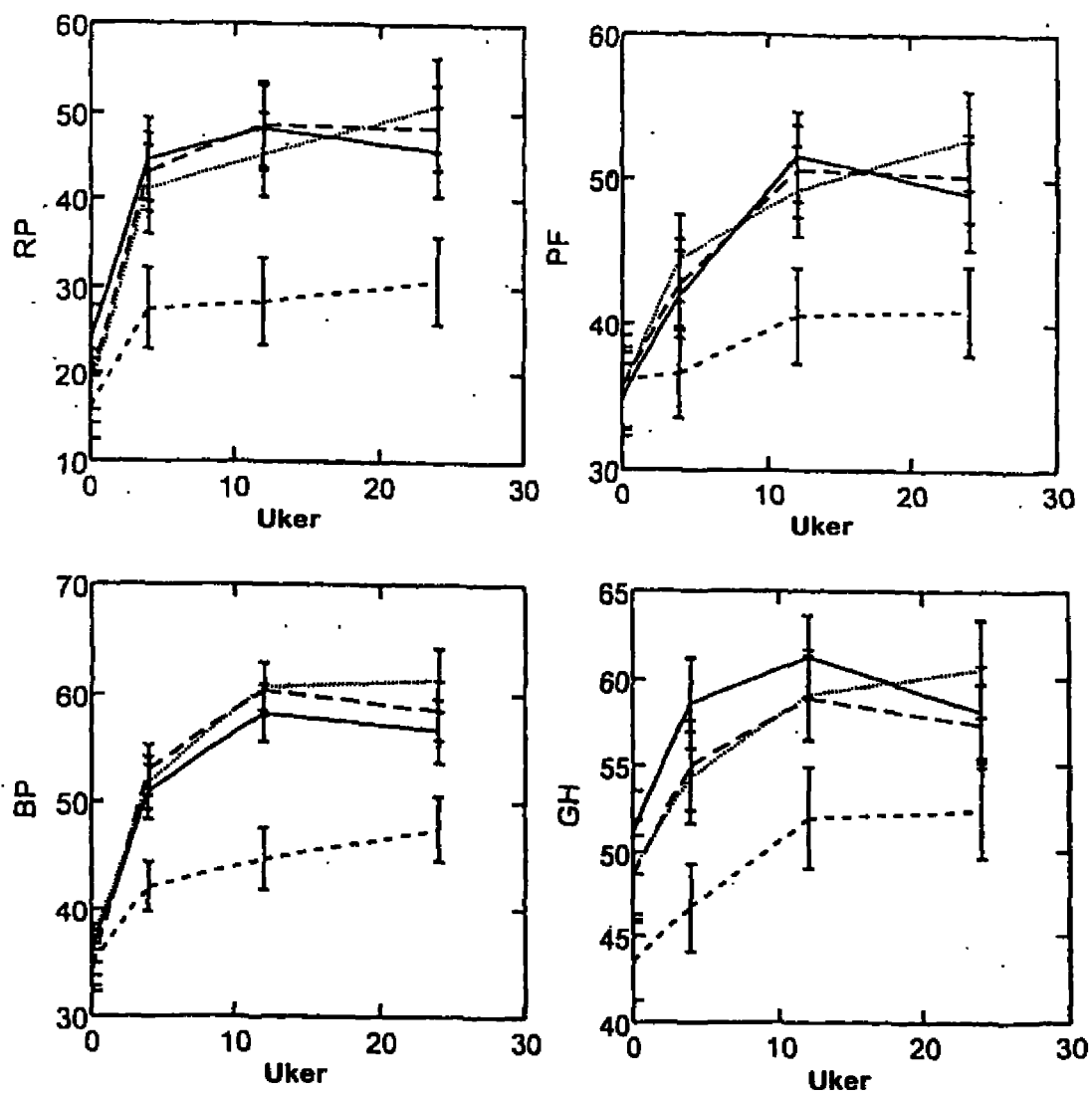
Forløp av antall ledd med hevelse over 24 uker



FIGUR 3

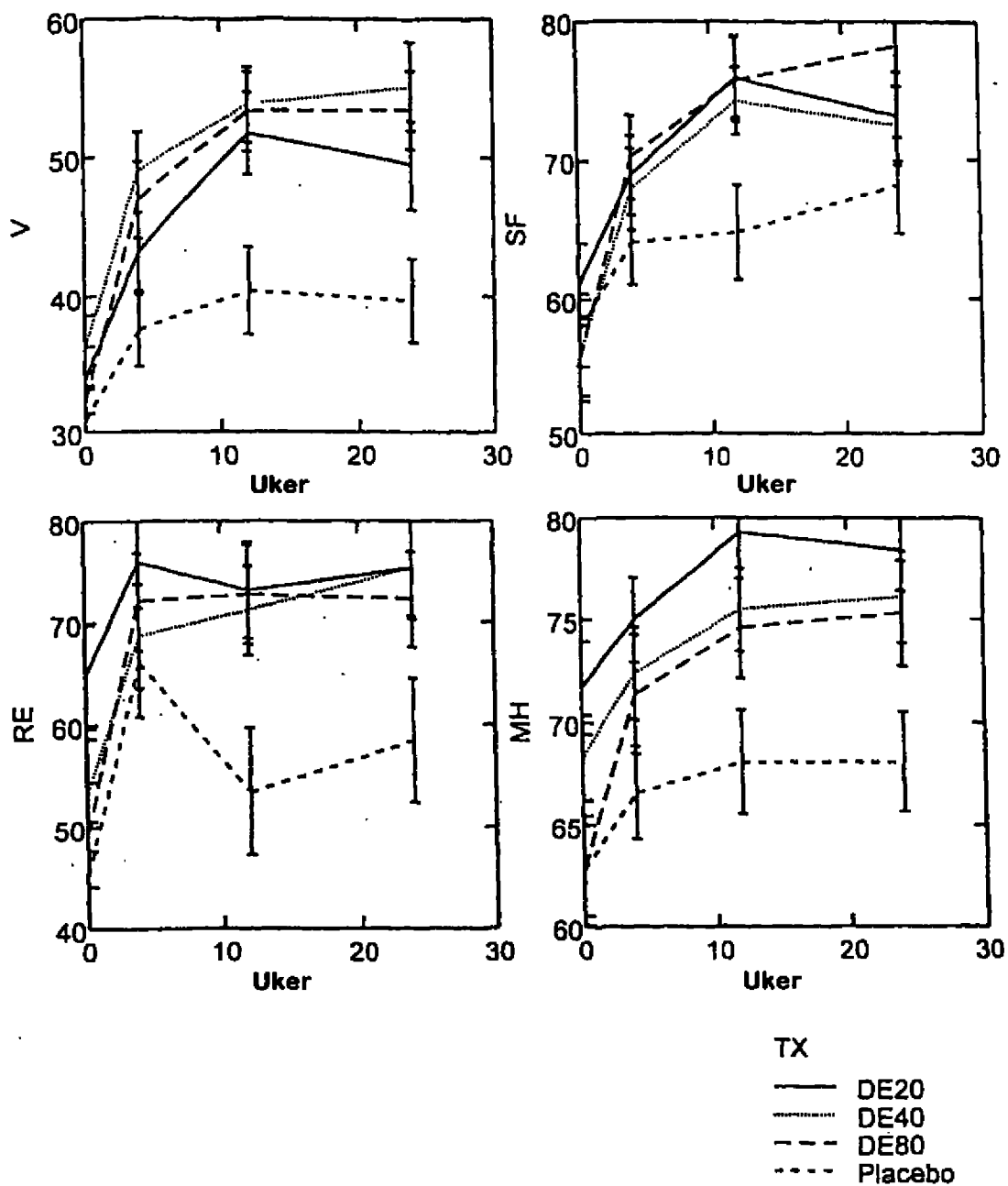
4/6

SF-36 SKALA



FIGUR 4

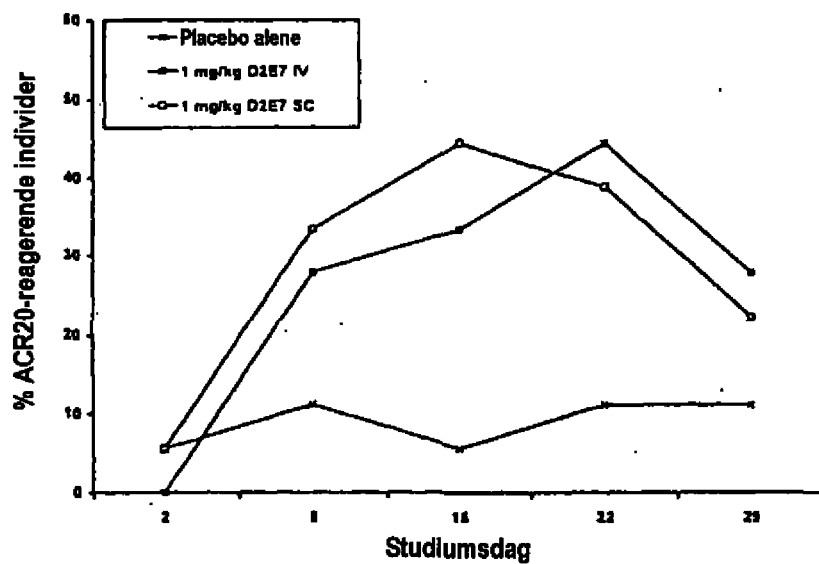
5/6



FIGUR 4

6/6

Prosentvis ACR20-reagerende individer etter en enkelt i.v.-injeksjon av D2E7 og/eller placebo (DE010)



FIGUR 5