



(12) PATENT

(11) 343064

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 14/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20074266	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.01.24 PCT/GB2006/000238
(22)	Inng.dag	2007.08.21	(85)	Videreføringsdag	2007.08.21
(24)	Løpedag	2006.01.24	(30)	Prioritet	2006.01.24, WO, PCT/GB06/000238
(41)	Alm.tilgj	2007.10.23			
(45)	Meddelt	2018.10.22			
(73)	Innehaver	Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Elan Pharma International Ltd, Monksland, Irland			
(72)	Oppfinner	Ruth Franks, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Andrew Grier Buchanan, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Albert George Thom, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Fraser Ewing Welsh, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Philip Antony Bland-Ward, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Matthew Alexander Sleeman, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Carl Anthony Matthews, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Celia Patricia Hart, c/o Cambridge Antibody Technology Ltd, Milstein Building, Granta Park, CB16GH CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE, Storbritannia Jon Hawkinson, c/o Elan Pharmaceuticals Inc, 800 Gateway Boulevard, CA94080 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(74)	Fullmektig	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Spesifikke bindingspartnere for NGF.
(56)	Anførte publikasjoner	WARREN SL. ET AL. Inhibition of biological activity of mouse beta-nerve growth factor by monoclonal antibody. Science. 1980, vol. 210, no. 4472, side 910-912. , WO 02096458 A, WO 0073344 A, WO 9209631 A, OKISHIO M. ET AL. Establishment of monoclonal antibodies against human nerve growth factor. Biochem Biophys Res Commun. 1993, vol. 196, no. 3, side 1474-1480., RO LS. ET AL. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. Pain. 1999, vol. 79, no. 2-3, side 265-274
(57)	Sammendrag	

Spesifikke bindingspartnere for nervevekstfaktor (NGF), mer bestemt anti-NGF-antistoffmolekylet, særlig humane antistoffmolekyler og særlig disse som nøytraliserer NGF-aktiviten. Fremgangsmåter for å anvende anti-NGF-antistoffmolekyler i diagnose og behandling av NGF-relaterte sykdommer, inkludert smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, pulmonær fibrose, andre sykdommer av luftveisinflammasjon, diabetisk neuropati, hjertearytmier, HIV, artritt, psoriasis og kreft.

Den foreliggende oppfinnelsen angår spesifikke bindingspartnere, mer bestemt anti-NGF-antistoffmolekyler, særlig humane antistoffmolekyler, og særlig disse som
5 nøytraliserer NGF-(nerve vekstfaktor) aktivitet. Den angår ytterligere metoder for å anvende anti-NGF-antistoffmolekyler i diagnostisering eller behandling av NGF-relaterte sykdommer, inkludert smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, lungefibrose, andre sykdommer fra luftveisinflammasjon, diabetisk neuropati, hjertearytmerier, HIV, artritt, psoriasis og kreft.

10

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer antistoffmolekyler verdifulle til å binde og nøytralisere NGF, og således tilveiebringes anvendelse i hvilke som helst terapeutiske behandlinger, som indikert av eksperimenteringen beskrevet heri og ytterligere ved den understøttende tekniske litteraturen.

15

Nervevektfaktor (β -NGF, vanligvis kjent som NGF) spiller en velkjent rolle i utviklingen av nervesystemet. Imidlertid, spiller NGF en mer restriktiv rolle hos en voksen person, hvor den fremmer helsen og overlevelsen til en mengde av sentrale og perifere neuroner (Huang & Reichardt, 2001). NGF medvirker også til moduleringen av
20 de funksjonelle egenskapene til disse neuronene. Som en del av denne siste prosessen, utøver NGF tonisk kontroll over sensitiviteten, eller eksitabiliteten til nociseptorer (Priestley et al., 2002; Bennett, 2001). Disse perifere neuronene sanser og overfører til sentralnervesystemet de ulike skadestimulansene som omsider gir opphav til oppfattelse av smerte (nocisepsjon). Således kan faktorer som reduserer nivåer av NGF inneha
25 anvendelse som smertestillende behandlinger.

De sosiale kostnadene fra utilstrekkelig behandling av smerte støtter ytterligere den potensielle anvendelsen av smertestillende stoffer basert på anti-NGF-aktivitet. Det er på tross av eksistensen og utstrakt bruk av ulike smertemedisiner, et klart behov for nye
30 smertestillende stoffer. Smerte er en av de mest vanlige symptomene som det søkes medisinsk assistanse for og er den primære lidelse til halvparten av pasientene som besøker en lege. De høye kostnadene forbundet med smerte i samfunnet er velkjent. For eksempel i De Forente Stater rammer kronisk smerte ca 34 millioner amerikanere. Smerte resulterer i tap av 50 millioner arbeidsdager hvert år. Direkte medisinske
35 kostnader forårsaket av ryggplager, artrittiske plager og migrene alene beløper seg til 40 billioner hver år. Det totale reseptbelagte medisinske marked i forbindelse med smerte er ca 15 billioner dollar per år (Plevry & Plevry).

Som disse statistikkene antyder, mislykkes en vesentlig prosent av de smertelidende å motta tilstrekkelig smertelindring. Som en konsekvens av dette er det fortsatt et stort medisinsk behov for sikre og effektive smertestillende stoffer med nye
5 virkningsmekanismer (Pleuvry & Pleuvry).

Terapeutiske faktorer som reduserer vevsnivåene eller inhiberer effektene av utskilt NGF har potensiale til å være akkurat slike nye smertestillende stoffer. Subkutane injeksjoner av NGF fremstiller smerte i mennesker og dyr. Således forårsaker injisert
10 NGF en rask termisk hyperalgesi etterfulgt av forsinket termisk hyperalgesi og mekanisk aldeni (Petty et al., 1994; McArthur et al., 2000). Endogent utskilt NGF er tilsvarende pro-nociseptive. Vevsskadet induisert frigivelse av NGF og dens påfølgende virkning i periferien spiller en hovedrolle i induksjonen av termisk hyperalgesi gjennom prosessen “perifer sensibilisering” (Mendell & Arvanian, 2002). Vevsskade forfremmer
15 frigivelse av pro-nociseptive og pro-inflammatoriske cytokiner, som igjen inducerer frigivelsen av NGF fra keratinocytter og fibroblaster. Den frigjorte NGF virker direkte på nociseptorer som inducerer smertefulle eller nociseptive tilstander få minutter etter den skadelige hendelsen. Denne NGF virker også indirekte til å indusere og
oppretholde nociseptive/smertetilstander. Den trigger mastcelledegranulering,
20 frigivelse av pro-nociseptive faktorer slik som histamin og serotonin og viktigst mer NGF, og kan også stimulere sympatiske nerveterminaler til å frigjøre pro-nociseptive neurotransmittere, slik som noradrenalin (Ma & Woolf, 1997).

Vevsnivået av NGF er forhøyet i CFA- og karragenaninjiserte dyr (Ma & Woolf, 1997;
25 Amann & Schuligoi, 2000). Videre har økte nivåer av NGF blitt dokumentert i pasienter som lider av reumatoid artritt (Aloe & Tuveri, 1997) eller cystitt (Lowe et al., 1997). I gnagere øker perifer nerveskade uttrykkelsen av NGF mRNA i makrofager, fibroblaster og Schwann-celler (Heumann et al., 1987). Overuttrykkelse av NGF i transgene mus resulterer i forhøyet neuropatisk smerteopplevelse etter nerveskade sammenlignet med
30 villtypemus (Ramer et al., 1998). Over timer og dager spiller forhøyede NGF-nivåer en rolle i å fornemme “sentral sensibilisering” – forhøyelsen av neurotransmisjon ved synapsene i de nociseptive veiene i ryggmargen. Sentral sensibilisering resulterer i vedvarende og kronisk hyperalgesi og alidini. Denne prosessen er antatt å involvere internalisering av komplekser med NGF og dens reseptor med høy affinitet, trkA
35 (tyrosin reseptorkinase A). Retrogradtransport av disse kompleksene til nociseptore cellekropper i det “dosale rotganglia” (DRG) potensierer utskillelse av nociseptive neuropeptider (for eksempel substans P, CGRP), PKC-aktivator og NMDA-

reseptoraktivering i det bakre horn i ryggmargen (Sah et al., 2003) – alle prosesser som forfremmer sensibiliseringen av de nociseptive veiene. NGF spiller også en rolle i oppreguleringen og redistribueringen av voltavhengig og ligandstyrte ionekanaler, inkludert natriumkanalsubtyper og kapsaicinreseptoren, VR1 (Mamet et al., 1999; Fjell et al., 1999; Priestley et al., 2002). De endrede aktivitetene og/eller uttrykkelsen av 5 transmittere, reseptorer og ionekanaler danner basis for den økte sensitiviteten og eksitabiliteten til nociseptorer assosiert med neuropatiske smertetilstander.

NGF kan også forfremme vekst av sympatiske neuroner og dannelsen av avvikende 10 innervering av nociseptive neuroner. Denne innervering er antatt å bidra til induksjonen og opprettholdelsen av kroniske nociseptive/smertetilstander, slik som sympatisk opprettholdt smerte, eller kompleks regionalt smertesyndrom (Ramer et al., 1999).

NGF-indusert nososepsjon/smerte medieres av den høye affinitet NGF-reseptoren, trkA 15 (tyrosin reseptorkinase A) (Sah, et al., 2003). Ca 40 – 45% av nociseptore cellekropper i DRG'er uttrykker trkA. Disse er de små cellekroppene i de små diameterfibrene, eller C-fibrene, som også uttrykker de utskilte pro-nociseptive peptidene, substans P og CGRP. Disse fibrene slutter i lamina I og II i det bakre hornet, hvor de overfører til sentralnervesystemet de skadelige stimulansene sanset av perifer nociseptorer. 20 Mutasjoner eller divisjoner i trkA-genet fremstiller en fenotype karakterisert ved tap av smertefornemmelse både i mennesker (Indo, 2002) og i trkA knock-outmus (de Castro et al., 1998). Uttrykkelsen av trkA er betydelig oppregulert i dyr underkastet modeller for artritt (Pozza et al., 2000) eller cystitt smerte (Qiao & Vizzard, 2002), eller den inflammatoriske smerte induisert ved injeksjon av komplett Freund's adjuvans (CFA) 25 eller karragenan i hånden (Cho et al., 1996).

NGF binder også til den p75 neurotrofinreseptoren. Rollen til p75-reseptoren er avhengig av dens cellulære omgivelse og tilstedeværelsen av andre reseptorer som er antatt å spille en delaktig eller koreseptorfunksjon. Interaksjon mellom trkA og p75- 30 reseptorene resulterer i dannelsen av bindingssteder med høy affinitet for NGF. Viktigheten av slike reseptorinteraksjoner i NGF-mediert smertesignalisering er ikke klart, men nye studier har implisert p75-reseptoren i cellulære prosesser som kan være relevant (Zhang & Nicol, 2004). Imidlertid mens p75-reseptor knockoutmusen fremviser forhøyede muskler for skadelige stimulanser, vedblir de mottagelige for de 35 hyperalgesiske effektene til NGF, som antyder at trkA-reseptorene alene er tilstrekkelig for å mediere disse effekter (Bergmann *et al.*, 1998).

Bevisene sitert over indikerer at NGF-medierte prosesser er ansvarlig for induksjonen av akutt smerte, kortvarig smerte, vedvarende nociseptin smerte og vedvarende elektronisk nevropatisk smerte. Således indikeres det at anti-NGF-faktorer har anvendelse som effektive smertestillende stoffer for å behandle pasienter som lider av en hvilken som helst eller alle av disse ulike smertetilstander.

En slik anti-NGF-faktor er trkA-Fc, som virker som et lokkemiddel eller en renovasjonsfaktor til å binde opp, og ved dette innaktiverer endogen NGF. TrkA-Fc er et fusjonsprotein bestående av NGF bindingsområde til trkA koblet til et konstant domenefragment (Fc) av et IgG-antistoff. TrkA-Fc fremstiller hypoalgesi i naïve dyr, minker noceseptore responser og minker vekst av umyelinerte smertefølede nevroner (Bennett et al., 1998).

Antiserum rettet mot NGF kan også redusere NGF-nivåer ved lokal eller systemisk injeksjon. Både anti-NGF antiserum og trkA-Fc svekker karragenan- eller CFA-indusert inflammatorisk håndsmerte (Koltzenberg et al., 1999) og betente blæteresponser i rotter (Jaggard et al., 1999). Anti-NGF antiserum blokkerer varm og kald hyperalgesi, reverserer etablert termisk hyperalgesi, og forhindrer kollateral vekst i den kroniske konstreksjonsskade (CCI) modell av nevropatisk smerte (Woolf, 1996; Ro et al., 1999). Små molekylinhibitorer for trkA-NGF-interaksjon har også blitt rapportert. I rotter reduserer NGF-trkA-inhibitoren ALE-0540 hyperalgesi i en termiskindusert inflammatorisk smertemodell og i formalintesten for akutt og vedvarende smerte (Owolabi et al., 1999). ALE-0540 reduserer også mekanisk allodeni i hoftenerveskademodellen for nevropatisk smerte (Owolabi et al., 1999).

Terapeutiske antistoffer holder fast generelt på løftet om en grad av målsektivitet innenfor en familie med nært beslektede reseptorer, reseptorligander, kanaler eller enzymer som sjelden er tilgjengelig med små molekylmedikamenter. NGF-mediert smerte er særskilt egnet for sikker og effektiv behandling med antistoffer fordi NGF-nivåer øker i periferien i respons på skadelige stimulanser og antistoffer har lav permeabilitet for blod- og hjernebarrieren. Mens polyklonale antistoffer har vist å være effektive i dyremodeller for smerte, er anti-NGF-monoklonale antistoffer antatt til å bli mer vellykket utviklet som humane medikamenter på grunn av fordelene i å fremstille og karakterisere en konsekvent, veldefinert, kjemisk helhet. Anti-nociseptive effekter fra mus anti-NGF-monoklonale antistoffer (Sammons et al., 2000) har blitt rapportert, men aminosyresekvensene til disse antistoffene var ikke tilveiebragt.

Nylig bevis antyder at NGF fremmer andre patologier innen smerte. Således kan anti-NGF-antistoffer også inneha nytte i behandling av andre NGF-medierte sykdommer, inkludert men ikke begrenset til astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, lungefibrose, andre sykdommer med luftveisinflammasjon (Hoyle, 2003; Lommatzch et al., 2003),
5 diabetisk nefropati (Yasuda et al., 2003), hjertearytmi (WO04/032852), HIV (Garaci et al., 2003), arthritt, psoriasis og kreft (Nakagawara, 2001).

WO02/096458 angår anti-NGF-antistoffer, mer bestemt mus monoklonalt antistoff 911, og anvendelse av slike antistoffer i behandlingen av ulike NGF-relaterte sykdommer,
10 inkludert smerte, astma, artritt og psoriasis. Det uttrykker at antistoffet 911 har ingen skadelige effekter på immunsystemet i en eksperimentell musemodell på allerti. Disse antistoffene ble også beskrevet av Hongo et al., 2000.

WO04/032870 beskriver den smertereduserende effekten til mus monoklonalt NGF-antistoff mab 911 og humanisert NGF-antistoff E3 i eksperimentelle modeller på post-operativ smerte. E3 er ulik fra human tung kjede γ 2a konstant område med to aminosyrer.

WO04/032852 beskriver metoder for å hindre plutselig hjertestans og for å behandle
20 hjertearytmier ved å anvende NGF-antagonister.

WO 01/78698 beskriver anvendelsen av polyklonalt antiserum mot NGF for å behandle kronisk indre smerte.

25 WARREN S. et al. beskriver inhibisjon av biologisk aktivitet av β -NGF hos mus ved monoklonalt antistoff. Inhibition of biological activity of mouse beta-nerve growth factor by monoclonal antibody. Science. 1980, vol. 210, nr. 4472, side 910-912.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer spesifikke bindingspartnere for NGF i henhold
30 til de følgende krav. En spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen kan binde human NGF eller ikke-human NGF (for eksempel ikke-human primat NGF og/eller rotte NGF og/eller muse NGF).

Spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen kan være antistoffer mot human NGF,
35 særlig humane antistoffer, som kan være kryssreaktive med ikke-human NGF, inkludert ikke-human primat-NGF og/eller mus-NGF og/eller rotte-NGF.

6

En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen nøytraliserer fortrinnsvis NGF. Nøytralisering betyr reduksjon eller inhibering av den biologiske aktivitet til NGF, for eksempel reduksjon eller inhibering av NGF-binding til en eller flere av dens reseptorer (fortrinnsvis TrkA). Reduksjonen i biologisk aktivitet kan være delvis eller total. Graden hvortil et antistoff nøytraliserer NGF refereres til som dens nøytraliserende potens. Potens kan bestemmes eller måles ved å anvende en eller flere tester kjent for en fagperson og/eller som beskrevet eller referert til heri, for eksempel:

- "FLIPR" kalsium mobiliseringstest (se her eksempel 2)
- PC12 overlevelsestest (se her eksempel 5)
- 10 - TF-1 prolifereringstest (se her eksempel 6)
- Reseptorbinding inhiberingstest (se her eksempel 9).

Tester og potenser er beskrevet mer detaljert senere.

Spesifikke bindingspartnere ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan optimaliseres for nøytraliserende potens. Generell potensoptimalisering involverer mutering av sekvensen til en utvalgt spesifikk bindingspartner (normalt den variable områdesekvensen til et antistoff) for å lage et bibliotek av spesifikke bindingspartnere, som deretter analyseres for potens og hvor de mest potente spesifikke bindingspartnere velges. Slike utvalgte "potens-optimaliserte" spesifikke bindingspartnere har ofte en høyere potens enn den spesifikke bindingspartneren som biblioteket ble laget ifra. Ikke desto mindre kan også spesifikke bindingspartnere med høy potens også erverves uten optimalisering, for eksempel kan en spesifikk bindingspartner med høy potens erverves direkte fra et initielt screen, for eksempel en biokjemisk nøytraliseringsanalyse. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer både potens-optimaliserte og ikke-optimaliserte spesifikke bindingspartnere, så vel som metoder for potensoptimalisering fra en utvalgt spesifikk bindingspartner. Den foreliggende oppfinnelsen tillater således en fagperson til å lage spesifikke bindingspartnere med høyere potens.

En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen fremviser fortrinnsvis antihyperalgesisk og/eller antialodinisisk aktivitet, for eksempel inhiberer karagenan-indusert termisk hyperalgesi.

I noen utførelsesformer omfatter en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen et antistoffmolekyl.

35

I ulike aspekter og utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er oppfinnelsesgjenstanden ifølge kravene inkludert nedenfor.

Foretrukne utførelsesformer i den foreliggende oppfinnelsen er antistoffmolekyler, enten hele antistoff (for eksempel IgG, slik som IgG4) eller antistofffragmenter (for eksempel scFv, Fab). Fortrinnsvis er et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen et humant antistoffmolekyl. Antistoffmolekyler som omfatter antistoff antigen-bindingsseter er tilveiebragt, som er antistoff VH- og VL-områder. I VH- og VL-områder er det tilveiebragt komplementære bestemmelsesområder, ("CDR'er"), og rammeverkområder, ("FR'er"), for å danne VH- eller VL-områder etter tilfelle. Et antistoff antigenbindingsete kan bestå av et antistoff VH-område og/eller et VL-område. Alle VH- og VL-sekvenser, CDR-sekvenser, sett av CDR'er og sett av HCDR'er og sett av LCDR'er som her er beskrevet representerer aspekter og utførelsesformer ifølge oppfinnelsen. Et "sett av CDR'er" omfatter CDR1, CDR2 og CDR3. Således nevnes et sett av HCDR'er HCDR1, HCDR2 og HCDR3, og et sett av LCDR'er betyr LCDR1, LCDR2 og LCDR3. Samt ikke noe annet er uttrykt inkluderer et "sett av CDR'er" HCDR'er og LCDR'er.

Eksempler på antistoff VH- og VL-områder og CDR'er i flertall i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er notert i den vedlagte sekvenslisten.

Et antall antistofflinjer er her beskrevet, definert med referanse til sekvenser, for eksempel et sett med CDR-sekvenser, eventuelt med en eller flere, for eksempel en eller to, eller to substitusjoner. Den ønskede opprinnelige linjen er 1021E5-linjen. 1021E5-linjen inkluderer det foretrukke antistoffmolekylet 1133C11 og andre antistoffmolekyler fra "1133C11-linjen", inkludert 1252A5. I den opprinnelige 1021E5-linjen er også antistoffmolekyler 1165D4, 1230H7 og 1152H5. De nåværende oppfinnerne har identifisert 1021E5, 1083H4 og særlig 1133C11-linjene, som tilveiebringer humane antistoff-antigen-bindingsseter mot NGF, som særlig verdifulle.

1133C11-linjen er definert med referanse til et sett av seks CDR-sekvenser av 1133C11 som følgende: HCDR1 SEQ ID NR.: 193, HCDR2 SEQ ID NR.: 194, HCDR3 SEQ ID NR.: 195, LCDR1 SEQ ID NR.: 198, LCDR2 SEQ ID NR.: 199 og LCDR3 SEQ ID NR.: 200. Settet av CDR'er hvor HCDR1 har aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 193, HCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 194, HCDR3 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 195, LCDR1 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 198, LCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 199 og LCDR3 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 200, refereres her til som "1133C11 settet av CDR'er". HCDR1, HCDR2 og HCDR3 i 1133C11-settet av CDR'er refereres til som

“1133C11-settet av HCDR’er” og LCDR1, LCDR2 og LCDR3 i 1133C11-settet av CDR’er refereres til som “1133C11-settet av LCDR’er”. Et sett av CDR’er med 1133C11-settet av CDR’er, 1133C11-settet av HCDR’er eller 1133C11 LCDR’er, eller en eller to substitusjoner deri, sies å være av 1133C11-linjen.

5

Andre foretrukne linjer og sett av CDR’er defineres med referanse til de analogt CDR’er som fastsatt hvor som helst heri, inkludert som foretrukne utførelsesformer settene av CDR’er beskrevet i tabell 2a (med SEQ ID NR. anvist i tabell 2b). Tabell 2a og tabell 2b viser sett av CDR’er (HCDR’er og LCDR’er) fra optimaliserte kloner avledet fra klon 1021E5, for å illustrere hvorledes CDR-sekvensene fra de optimaliserte klonene er ulike fra disse fra 1021E5. Et sett av CDR’er fra tabell 2a/2b inkluderer et sett av HCDR’er og/eller et sett av LCDR’er fra en hvilken som helst klon illustrert i tabellen, eventuelt inkludert selveste 1021E5.

15 Sett av CDR’er av disse er tilveiebragt, som indikert, som er sett av CDR’er med de beskrevde sekvensene inneholdende en eller to aminosyresubstitusjoner.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også spesifikke bindingspartnere og antistoffmolekyler som omfatter de definerte settene av CDR’er, sett av HCDR’er eller sett av LCDR’er, som beskrevet her, og sett av CDR’er med en eller to substitusjoner i det beskrevne settet av CDR’er. Det relevante settet av CDR’er er tilveiebragt i et antistoff rammeverk, som beskrevet under. For eksempel kan en eller flere CDR’er eller et sett av CDR’er av et antistoff transplanteres i et rammeverk (for eksempel humant rammeverk) for å tilveiebringe et antistoffmolekyl eller ulike antistoffmolekyler. For eksempel kan et antistoffmolekyl opmfatte CDR’er av et antistoff av 1021E5-linjen og rammeverkområder fra humane kimlinjegensegmentsekvenser. Et antistoff av en linje kan tilveiebringes med et sett av CDR’er i et rammeverk som kan underkastes ”kimbekledning”, hvor en eller flere enheter i rammeverket endres for å matche enhetene ved den tilsvarende posisjonen i den mest like humane kimlinjerammeverket (for eksempel DP10 fra VH1-familien) eller et rammeverk fra λ 1-familien for eksempel DPL5. Således er antistoff rammeverkområder fortrinnsvis kimlinje og/eller human.

Oppfinnelsen tilveiebringer et isolert humant antistoff spesifikt for NGF, som har et VH-område som omfatter et av HCDR’er i et humant kimlinjerammeverk som omfatter DP10. Den spesifikke bindingspartneren har også et VL-område som omfatter et sett av LCDR’er, fortrinnsvis i et humant kimlinjerammeverk som omfatter en V λ 1, for eksempel DPL5. Fortrinnsvis er CDR’er et sett av CDR’er som her er beskrevet.

Ved "vesentlig som anvist" betyr det at det relevante CDR eller VH eller VL-domenet ifølge oppfinnelsen enten vil være identisk eller svært lik de spesifiserte regionene som sekvensen her anvises for. Ved "svært lik" er det forutsatt at fra 1 til 5, fortrinnsvis fra 1
5 til 4 slik som 1 til 3 eller 1 eller 2, eller 3 eller 4, aminosyresubstitusjoner kan lages i CDR og/eller VH eller VL-området.

I et aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en spesifikk bindingspartner for NGF, som omfatter et antistoff antigen-bindingssete som er satt sammen av et humant
10 antistoff VH-område og et humant antistoff VL-område og som omfatter et sett av CDR'er, hvor VH-området omfatter HCDR1, HCDR2 og HCDR3 og VL-området omfatter LCDR1, LCDR2 og LCDR3, hvor HCDR1 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 193, HCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 194, HCDR3 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 195, LCDR1 har aminosyresekvensen til SEQ ID
15 NR.: 198, LCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 199 og LCDR3 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 200; eller hvor settene av CDR'er inneholder en eller to aminosyresubstitusjoner sammenlignet med dette settet av CDR'er, der

den ene eller de to substitusjoner er ved en eller to av de følgende enhetene i CDR'er i
20 VH og/eller VL-domener, ved å anvende standardnummerering ifølge Kabat (1991).

31, 34 i HCDR1

51, 55, 56, 57, 58, 65 i HCDR2

25

96 i HCDR3

26, 27, 27A, 27B, 28, 29, 30 i LCDR1

30 56 i LCDR2

90, 94 i LCDR3.

I foretrukkede utførelsesformer er en eller to substitusjoner laget ved en eller to av de
35 følgende enhetene i 1133C11-settet av CDR'er i henhold til de identifiserte gruppene av mulige substituerte enheter:

	<u>Posisjon av</u> <u>substitusjon</u>	<u>Substituert enhet</u> <u>utvalgt fra gruppenn</u> <u>bestående av</u>
5	31 i HCDR1:	A
	34 i HCDR1:	V
	51 i HCDR2:	V
	55 i HCDR2:	N
10	56 i HCDR2:	A
	57 i HCDR2:	V
	58 i HCDR2:	S
	65 i HCDR2:	D
15	96 in HCDR3:	N
	26 i LCDR1:	T
	26 i LCDR1:	G
	27 i LCDR1:	N
20	27 i LCDR1:	R
	27A i LCDR1:	T
	27A i LCDR1:	P
	27B i LCDR1:	D
	28 i LCDR1:	T
25	29 i LCDR1:	E
	30 i LCDR1:	D
	56 i LCDR2:	T
30	90 i LCDR3:	A
	94 i LCDR3:	G.

Residie 29E LCDR1 er en særlig foretrukket utførelsesform.

35 Foretrukne utførelsesformer har 1133C11 eller 1252A5, 1152H5, 1165D4 eller 1230H7 sett av CDR'er.

I en utførelsesform omfatter en isolert spesifikk bindingspartner et sett av CDR'er som inneholder 1133C11-settet av CDR'er med aminosyresekvensen FNSALIS (SEQ ID NR.: 532) eller aminosyresekvensen MISSLQP (SEQ ID NR.: 533), substituert for aminosyresekvensen til LNPSLTA (SEQ ID NR.: 531) i HCDR3.

5

Et VH-område kan tilveiebringes med et sett av HCDR'er som illustrert i tabell 2a/2b. VH-området er parvis med et VL-område, og VL-området kan deretter tilveiebringes med et sett av LCDR'er som illustrert i tabell 2a/2b. En paring av et sett av HCDR'er og et sett av LCDR'er kan være som vist i tabell 2a/2b, og tilveiebringe et antistoffantigen-bindingssete som omfatter et sett av CDR'er som vist i tabell 2a/2b.

10

VH og VL områderammeverkene omfatter rammeverkområder, en eller flere som kan være et kimbekledd rammeverkområde, normalt human kimelinje. VH-domenerammeverket er fortrinnsvis human tung kjede kimelinjerammeverk og VL-
domenerammeverket er fortrinnsvis human lett kjede kimelinjerammeverk.
Rammeverkområder av tung kjededomene kan utvelges fra VH-1 familien, og et ønskelig VH-1 rammeverk er et DP-10 rammeverk. Rammeverkområdet av den lette kjeden kan utvelges fra λ 1-familien, og et ønskelig rammeverk er DPL5.

15

En eller flere CDR'er kan tas fra 1252A5 VH eller VL-område og inkorporeres i et egnet rammeverk. Dette er ytterligere beskrevet her. 1252A5 HCDR'er 1, 2 og 3 er henholdsvis vist i SEQ ID NR.: 393, 394, 395. 1252A5 LCDR'er 1, 2 og 3 er henholdsvis vist i SEQ ID NR.: 398, 399, 400.

20

Alt dette gjelder det samme for CDR'er og sett av CDR'er som her er beskrevet, særlig for 1152H5, 1165D4 og 1230H7.

25

Antistoffsekvenser beskrevet heri inkluderer de følgende:

Et VH-domene, VL-domene, sett av HCDR'er, sett av LCDR'er, eller sett av CDR'er av: 1126F1 (VH SEQ ID NR.: 102; VL SEQ ID NR.: 107), 1126G5 (VH SEQ ID NR.: 112; VL SEQ ID NR.: 117), 1126H5 (VH SEQ ID NR.: 122; VL SEQ ID NR.: 127), 1127D9 (VH SEQ ID NR.: 132; VL SEQ ID NR.: 137), 1127F9 (VH SEQ ID NR.: 142; VL SEQ ID NR.: 147), 1131D7 (VH SEQ ID NR.: 152; VL SEQ ID NR.: 157), 1131H2 (VH SEQ ID NR.: 162; VL SEQ ID NR.: 167), 1132A9 (VH SEQ ID NR.: 172; VL SEQ ID NR.: 177), 1132H9 (VH SEQ ID NR.: 182; VL SEQ ID NR.: 187), 1133C11 (VH SEQ ID NR.: 192; VL SEQ ID NR.: 197), 1134D9 (VH SEQ ID NR.: 202; VL

35

SEQ ID NR.: 207), 1145D1 (VH SEQ ID NR.: 212; VL SEQ ID NR.: 217), 1146D7 (VH SEQ ID NR.: 222; VL SEQ ID NR.: 227), 1147D2 (VH SEQ ID NR.: 232; VL SEQ ID NR.: 237), 1147G9 (VH SEQ ID NR.: 242; VL SEQ ID NR.: 247), 1150F1 (VH SEQ ID NR.: 252; VL SEQ ID NR.: 257), 1152H5 (VH SEQ ID NR.: 262; VL SEQ ID NR.: 267), 1155H1 (VH SEQ ID NR.: 272; VL SEQ ID NR.: 277), 1158A1 (VH SEQ ID NR.: 282; VL SEQ ID NR.: 287), 1160E3 (VH SEQ ID NR.: 292; VL SEQ ID NR.: 297), 1165D4 (VH SEQ ID NR.: 302; VL SEQ ID NR.: 307), 1175H8 (VH SEQ ID NR.: 312; VL SEQ ID NR.: 317), 1211G10 (VH SEQ ID NR.: 322; VL SEQ ID NR.: 327), 1214A1 (VH SEQ ID NR.: 332; VL SEQ ID NR.: 337), 1214D10 (VH SEQ ID NR.: 342; VL SEQ ID NR.: 347), 1218H5 (VH SEQ ID NR.: 352; VL SEQ ID NR.: 357), 1230H7 (VH SEQ ID NR.: 362; VL SEQ ID NR.: 367),

1083H4 (VH SEQ ID NR.: 22; VL SEQ ID NR.: 27), 1227H8 (VH SEQ ID NR.: 372; VL SEQ ID NR.: 377) og 1230D8 (VH SEQ ID NR.: 382; VL SEQ ID NR.: 387).

15

En særlig foretrukket utførelsesform er et VH-område tilveiebragt med aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 192, hvor dette betegnes "1133C11 VH-domene".

I et ytterligere særskilt foretrukket utførelsesform er et VL-område tilveiebragt med aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 197, hvor dette betegnes "1133C11 VL-område".

20

En særlig foretrukket antistoffantigen-bindingssete tilveiebragt i henhold med den foreliggende oppfinnelsen er sammensatt av 1133C11 VH-område, SEQ ID NR.: 192, og en 1133C11 VL-område, SEQ ID NR.: 197. Dette antistoffantigen-bindingssete kan tilveiebringes i ethvert ønsket antistoffmolekylformat, for eksempel scFv, Fab, IgG, IgG4 etc., som ytterligere er diskutert et annet sted heri.

25

I en ytterligere særskilt foretrukket utførelsesform, er et VH-område tilveiebragt med aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 392, hvor dette betegnes "1252A5 VH-område".

I en ytterligere særskilt foretrukket utførelsesform er et VL-område tilveiebragt med aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 397, hvor dette betegnes "1252A5 VL-område".

30

Et særskilt foretrukket antistoffantigen-bindingssete tilveiebragt i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er sammensatt av 1252A5 VH-område, SEQ ID NR.: 392, og 1252A5 VL-område, SEQ ID NR.: 397. Dette antistoffantigen-bindingssete kan tilveiebringes i ethvert ønsket antistoffmolekylformat, for eksempel scFv, Fab, IgG, IgG4 etc., som ytterligere er beskrevet et annet sted heri.

35

I en ytterligere særskilt foretrukket utførelsesform, tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et IgG4-antistoffmolekyl som omfatter 1252A5 VH-område, SEQ ID NR.:

392 og 1252A5 VL-område, SEQ ID NR.: 397. Dette betegner her som "1252A5 IgG4".

- Andre IgG eller andre antistoffmolekyler som omfatter 1252A5 VH-område, SEQ ID NR.: 392 og/eller 1252A5 VL-område, SEQ ID NR.: 397, er tilveiebragt av den foreliggende oppfinnelsen, som er andre antistoffmolekyler som omfatter 1252A5-settet av HCDR'er (SEQ ID NR.: 393, 394 og 395) i et antistoff VH-område, og/eller 1252A5-settet av LCDR'er (SEQ ID NR.: 398, 399 og 400) i et antistoff VL-område.
- 10 Som bemerket tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en spesifikk bindingspartner som binder human NGF og som omfatter 1252A5 VH-område (SEQ ID NR.: 392) og/eller en 1252A5 VL-område (SEQ ID NR.: 397). Egenskaper til en slik spesifikk bindingspartner er beskrevet heri.
- 15 Generelt er et VH-område parret med et VL-område for å tilveiebringe et antistoffantigen-bindingssete. I en foretrukket utførelsesform er 1252A5 VH-område (SEQ ID NR.: 392) parret med 1252A5 VL-område (SEQ ID NR.: 397), slik at et antistoffantigen-bindingssete dannes som omfatter både 1252A5 VH og VL-områdene. Tilsvarende utførelsesformer tilveiebringes for de andre VH og VL-områdene som her er beskrevet. I andre utførelsesformer er 1252A5 VH parret med et annet VL-område enn 1252A5 VL. Lett kjede promiskuitet er veletablert i faget. Igjen er tilsvarende utførelsesformer tilveiebragt av oppfinnelsen for de andre VH og VL-områdene som her er beskrevet.
- 25 Ulike metoder er tilgjengelig i faget for å oppnå antistoffer mot NGF og som kan konkurrere med 1252A5 eller andre antistoffmolekyler, et antistoffmolekyl med 1252A5 eller andre sett av CDR'er, eller et antistoffmolekyl med et sett av CDR'er av 1252A5 eller andre linjer, for å binde til NGF.
- 30 En fremgangsmåte for å oppnå en eller flere spesifikke bindingspartnere som er istand til å binde antigenet, kan inkludere å bringe et bibliotek av spesifikke bindingspartnere i henhold til oppfinnelsen i kontakt med antigenet, og utvelge en eller flere spesifikke bindingspartnere i biblioteket som er istand til å binde antigenet.
- 35 Biblioteket kan fremvises på partikler eller molekylære komplekser, for eksempel replikerbare genetiske pakker slik som gjær, bakteriell eller bakteriofage (for eksempel T7) partikler, eller kovalente, ribosomale eller andre in vitro fremvisningssystemer,

hvor hver partikkel eller molekylært kompleks inneholdende nukleinsyre, som koder antistoff VH-variable områder fremvist på det, og eventuelt som også fremviser VL-området dersom tilstede.

- 5 Etter seleksjon av spesifikke bindingspartnere som er istand til å binde antigenet og fremvist på bakteriofag eller andre bibliotekspartikler eller molekylære komplekser, kan nukleinsyre erverves fra en bakteriofag eller annen partikkel eller molekylært kompleks som fremviser den utvalgte spesifikke bindingspartner. Slik nukleinsyre kan anvendes i påfølgende produksjon av en spesifikk bindingspartner eller et antistoff VH eller VL-variabelt område ved ekspresjon fra nukleinsyre med sekvensen til nukleinsyren
- 10 ervervet fra en bakteriofag eller annen partikkel eller molekylært kompleks som fremviser den utvalgte spesifikke bindingspartneren.

Mulighet for å binde NGF kan ytterligere testes, og også mulighet for å konkurrere med

15 for eksempel 1252A5 (for eksempel i scFv-format og/eller IgG-format, for eksempel IgG4) for binding til NGF. Mulighet for å nøytralisere NGF kan testes, som ytterligere beskrevet under.

En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan binde NGF

20 med affiniteten til et 1252A5 eller annet antistoffmolekyl, for eksempel scFv, eller fortrinnsvis 1252A5 eller andre IgG4, eller med en affinitet som er bedre.

En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan nøytralisere NGF med potensen til et 1252A5 eller annet antistoffmolekyl, for eksempel

25 scFv, eller fortrinnsvis 1252A5 eller annen IgG4, eller med en potens som er bedre.

Bindingsaffinitet og nøytraliseringspotens til ulike spesifikke bindingspartnere kan sammenlignes under egnede forhold.

30 Antistoffene i den foreliggende oppfinnelsen har flere fordeler i forhold til eksisterende kommersielt tilgjengelige anti-NGF-antistoffer. For eksempel tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen humane eller kimlinjeantistoffer, som er forventet å fremvise en lavere grad av immunogenisitet ved kronisk eller repeterende administrering til mennesker for terapeutisk eller diagnostisk anvendelse. Videre tilveiebringer den

35 foreliggende oppfinnelsen antistoffer som er mer kraftfulle i å nøytralisere NGF og derfor kan ønsket terapeutisk eller diagnostisk effekt oppnås ved å anvende mindre antistoffmateriale. I tillegg, i en utførelsesform ifølge oppfinnelsen, er potensen for å

inhibere NGF/TrKA reseptorinteraksjonen større enn det som observeres for inhibernig av NGF/p75 reseptorinteraksjonen. Dette kan meddele fordeler i forhold til andre tilsynelatende ikke-selektive NGF antagonistbehandlinger med hensyn på dette, enten i størrelsesorden eller naturen til den oppnådde terapeutiske effekten, eller ved å redusere uønskede bieffekter.

Oppfinnelsen tilveiebringer også heterogene preparater som omfatter anti-NGF antistoffmolekyler. For eksempel kan slike preparater være blandinger av antistoffer med fullengde tunge kjeder og tunge kjeder som mangler den C-terminale lysinen, med ulike grader av glykosilering og/eller med derivatiserte aminosyrer, slik som cyclisering av en N-terminal glutaminsyre for å danne en pyroglutaminsyreenhet.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en isolert nukleinsyre, som omfatter en sekvens, som koder en spesifikk bindingspartneri henhold til den foreliggende oppfinnelsen, og fremgangsmåter for å fremstille en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen, som omfatter å uttrykke nukleinsyren under forhold som frembringer fremstillelsen av den spesifikke bindingspartneren, og gjenvinningen av dette.

Beskrevet heri er nukleinsyre, isolert på vanlig måte, som koder et antistoff VH-variabelt område og/eller VL-variabelt område som her er beskrevet.

Også beskrevet heri er nukleinsyre, isolert på vanlig måte, som koder en VH CDR eller VL CDR-sekvens som her er beskrevet, særlig en VH CDR utvalgt fra: 1133C11 (VH CDR1 SEQ ID NR.: 193, VH CDR2 SEQ ID NR.: 194 og VH CDR3 SEQ ID NR.: 195), 1152H5 (VH CDR1 SEQ ID NR.: 263, VH CDR2 SEQ ID NR.: 264, og VH CDR3 SEQ ID NR.: 265), og 1252A5 (VH CDR1 SEQ ID NR.: 393, VH CDR2 SEQ ID NR.: 394, og VH CDR3 SEQ ID NR.: 395), eller en VL CDR valgt fra: 1133C11 (VL CDR1 SEQ ID NR.: 198, VL CDR2 SEQ ID NR.: 199, og VL CDR3 SEQ ID NR.: 200), 1152H5 (VL CDR1 SEQ ID NR.: 268, VL CDR2 SEQ ID NR.: 269, og VL CDR3 SEQ ID NR.: 270), og 1252A5 (VL CDR1 SEQ ID NR.: 398, VL CDR2 SEQ ID NR.: 399, og VL CDR3 SEQ ID NR.: 400), mest fortrinnsvis 1252A5 VH CDR3 (SEQ ID NR.: 395). Nukleinsyre som koder 1252A5-settet av CDR'er, nukleinsyre som koder 1252A5-settet av HCDR'er og nukleinsyre som koder 1252A5-settet av LCDR'er er også beskrevet, likeså er nukleinsyre som koder individuelle CDR'er, HCDR'er, LCDR'er og sett av CDR'er, HCDR'er, LCDR'er av 1252A5, 1133C11 eller 1021E5-linjen beskrevet.

Et ytterligere aspekt tilveiebringer en vertscelle transformert med en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen.

Et ennå ytterligere aspekt tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstillingen
 5 avspesifikke bindingpartnere, hvor fremgangsmåten inkluderer årsakene for ekspresjon fra kodende nukleinsyre. Slik en fremgangsmåte kan omfatte å dyrke vertsceller under forhold for fremstilling av nevnte bindingpartnere.

En fremgangsmåte for fremstilling kan omfatte trinn for isolering og/eller opprensing
 10 av produktet. En fremgangsmåte for fremstilling kan omfatte å formulere produktet i en sammensetning som inkluderer minst en tilleggskomponent, slik som en farmasøytisk akseptertbar tilsetning.

Beskrevet heri er sammensetninger som inneholder spesifikke bindingspartnere ifølge
 15 oppfinnelsen, og deres anvendelse i fremgangsmåter for å inhibere eller nøytralisere NGF, inkludert fremgangsmåter for å behandle et menneske eller dyrekroppen ved behandling.

Spesifikke bindingspartnere i henhold til oppfinnelsen kan anvendes i en
 20 behandlingsmetode eller diagnostisk metode av menneske- eller dyrekroppen, slik som en behandlingsmetode (som kan inkludere profilaktisk behandling) for en sykdom eller forstyrrelse i en pasient, som omfatter å administrere til pasienten en effektiv mengde av en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen. Forhold som kan behandles i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inkluderer en hvilken som helst hvor NGF spiller en
 25 rolle, særlig smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, purmonær fibrose, andre sykdommer fra luftveisinflammasjon, diabetisk nevropati, HIV, hjertearytmier, artritt, psoriasis og kreft.

Disse og andre aspekter ifølge oppfinnelsen er ytterligere detaljert beskrevet under.
 30

TERMINOLOGI

Det er her beleilig å poengtere at "A og/eller B" som her brukes er å bli forstått som spesifikke redegjørelser av hver av de to spesifiserte egenskapene eller komponentene med eller uten den andre. For eksempel "A og/eller B" er å bli forstått som spesifikke
 35 beskrivelser av hver av (i) A, (ii) B og (iii) A og B, akkurat som dersom hver er individuelt fastsatt heri.

NGF

NGF (også kjent som β -NGF) er nervevekstfaktor. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen, er NGF normalt humant NGF, selv om det også kan være ikke-human NGF (for eksempel ikke-humant primat NGF og/eller rotte-NGF og/eller muse-NGF).

5 NGF refereres også til på visse steder som ”antigenet”.

NGF anvendt i en test beskrevet heri er normalt humant, rotte- eller muse-NGF, men NGF fra andre ikke-humane dyr kan også anvendes, for eksempel ikke-human primat-NGF.

10

Smerte

Dette beskriver, som velkjent i faget, fornemmelse av smerte, og kan omfatte en eller flere, eller alle, av det følgende:

- hyperalgesi (overdrevet smerterespons på en normal smertestimulanse);
- 15 - allodyni (fornemmelse av smerte forårsaket av stimulans som normalt ikke er smertefull);
- spontan fornemmelse av smerte forårsaket av enhver mekanisme i fraværet av enhver tilsynelatende ytre påvirkning;
- smerte fremkalt av fysisk stimulans, slik som varme, hete, kulde, trykk,
- 20 vibrering, statisk eller dynamisk berøring, eller kroppsholdning og bevegelse;
- somatisk og viseral smerte forårsaket av enhver mekanisme, for eksempel trauma, infeksjon, inflammasjon, metabolsk sykdom, slag eller nevrologisk sykdom.

Smerte kan for eksempel være akutt smerte, korttidssmerte, vedvarende nociseptiv smerte eller vedvarende eller kronisk nevropatisk smerte.

25

Spesifikk bindingspartner

Det beskriver en partner i et par av molekyler som har bindingsspesifisitet for hverandre. Medlemmene i et spesifikt bindingspar kan avledes naturlig eller helt, eller delvis fremstilles syntetisk. Et medlem av molekylparet har et areal på sin overflate, eller en fordypning, som spesifikt binder til og der derfor komplimentær til en bestemt romlig og polar organisering av det andre medlemmet i molekylparet. Således har medlemmene i paret egenskapen med å binde spesifikt til hverandre. Eksempler på typer av spesifikke bindingspar er antigen-antistoff, biotin-avidin, hormon-

35 hormonreseptor, reseptor-ligand, enzym-substrat. Den foreliggende oppfinnelsen angår antigen-antistoff type reaksjoner.

En spesifikk bindingspartner omfatter normalt et molekyl som har et antigen-bindingssete. For eksempel kan en spesifikk bindingspartner være et antistoffmolekyl. I tillegg til antistoffsekvener og/eller et antigen-bindingssete, kan en spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen omfatte andre aminosyrer, for eksempel til å danne et peptid eller polypeptid, slik som et foldet område, eller for å tildele molekylet andre funksjonelle karakteristikk i tillegg til å kunne binde antigen. Spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen kan være et detekterbart merke, eller kan være konjugert til et toksin eller målhalvdel eller enzym (for eksempel via en peptidylbinding eller kobling). For eksempel kan en spesifikk bindingspartner omfatte et katalytisk sete (eksempel i et enzymområde) så vel som et antigen bindingssete, hvor antigenbindingssetet binder til antigenet og således målretter det katalytiske sete til antigenet. Det katalytiske setet kan inhibere biologisk funksjon til antigenet, for eksempel ved kløyving.

Strukturen for å bære en CDR eller et sett av CDR'er ifølge oppfinnelsen generelt vil være fra en antistofftung eller lett kjedesequens eller en vesentlig porasjon derav hvor CDR eller settet av CDR'er lokaliseres til en lokalisering som korresponderer til CDR eller settet av CDR'er til naturlig forekommende VH og VL-antistoffvariable områder som kodes av rearrangerte immunoglobulingener. Strukturene og lokaliseringene av immunoglobulinvariable områder kan bestemmes ved referanse til (Kabat, et al., 1987, og oppdateringer derav, nå tilgjengelig på internett (<http://immuno.bme.nwu.edu> eller finn "Kabat" ved å anvende enhver søkermotor).

Antistoffmolekyl

Dette beskriver et immunoglobulin enten naturlig eller delvis, eller fullstendig fremstilt syntetisk. Betegnelsen dekker også ethvert polypeptid eller protein som omfatter et antistoffantigen-bindingssete. Antistofffragmenter som omfatter et antistoffantigen-bindingssete er molekyler slik som Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; og diakropper.

Det er mulig å anvende monoklonale og andre antistoffer og anvende teknikker for rekombinant DNA-teknologi for å fremstille andre antistoffer eller kimere molekyler som bibeholder spesifisiteten til det originale antistoffet. Slike teknikker kan involvere og introdusere DNA, som koder immunoglobulin variable området eller CDR'er, av et antistoff til de konstante områdene, eller konstante områder pluss rammeverkområder av et annet immunoglobulin. Se for eksempel, EP-A-184187, GB 2188638A eller EP-A-239400, og en mengde av påfølgende litteratur. En hybridom eller annen celle som

produserer et antistoff kan underkastes genetisk mutasjon eller andre endringer, som kan eller kan ikke endre bindingsspesifisiteten til de fremstilte antistoffer.

Siden antistoffer kan modifiseres på ulike måter, skal betegnelsen "antistoffmolekyl" oppfattes til å dekke enhver spesifikk bindingspartner eller substans, som har et antistoffantigen-bindingssete med den påkrevde spesifisiteten. Således dekker denne betegnelse antistofffragmenter og derivater, inkludert ethvert polypeptid som omfatter et antistoffantigen-bindingssete, enten naturlig eller fullt eller delvis syntetisert. Kimere molekyler, som omfatter et antistoffantigen-bindingssete, eller tilsvarende, fusjonert til andre polypeptid er derfor inkludert. Kloning og ekspresjon av kimere antistoffer er beskrevet i EP-A-0120694 og EP-A-0125023, og en mengde påfølgende litteratur.

Ytterligere teknikker tilgjengelig i faget for antistoffteknikk har gjort det mulig å isolere humane og humaniserte antistoffer. For eksempel kan humane hybridomer lages som beskrevet av Kontermann & Dubel (2001). Fagfremvisning, som er en annen etablert teknikk for å generere spesifikke bindingspartnere har blitt detaljert beskrevet i mange publikasjoner slik som Kontermann & Dubel (2001) og WO92/01047 (ytterligere diskutert under). Transgene mus hvor museantistoffgener er inaktivert og funksjonelt erstattet med humane antistoffgener hvor andre komponenter i museimmunsystemet er intakt kan anvendes for å isolere humane antistoffer (Mendez et al., 1997).

Syntetiske antistoffmolekyler kan lages ved ekspresjon fra gener generert fra syntetiserte oligonukleotider og samlet i egnede ekspresjonsvektorer, for eksempel som beskrevet av Knappik et al. (2000) eller Krebs et al. (2001).

Det har blitt vist at fragmenter av et helt antistoff kan utføres funksjonen til bindingsantigener. Eksempler på bindingsfragmenter er (i) Fab-fragmentet bestående av VL, VH, CL og CH1-områder; (ii) Fd-fragmentet bestående av VH- og CH1-områdene; (iii) Fv-fragmentet bestående av VL- og VH-områdene til et enkelt antistoff; (iv) dAb-fragmentet (Ward, 1989; McCafferty et al., 1990; Holt et al., 2003), som består av et VH- eller et VL-område; (v) isolerte CDR-områder; (vi) F(ab')₂-fragmenter, et bivalent fragment som omfatter to koblede Fab-fragmenter (vii) enkelkjede Fv-molekyler (scFv), hvor et VH-område og et VL-område er koblet med en peptidkobling som tillater de to områdene å assosiere til å danne et antigenbindingssete (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988); (viii) bispesifikk enkeltkjedet Fv-dimere (PCT/US92/09965) og (ix) "diakropper", multivalente eller multispesifikke fragmenter fremstilt ved genfusjon (WO94/13804; Holliger et al., 1993). Fv, scFv eller diakroppmolekyler kan

stabiliseres ved å inkorporere disulfidbroer som kobler VH- og VL-områder (Reiter et al., 1996). Minikropper som omfatter en scFv koblet til et CH3-område kan også lages (Hu et al., 1996).

5

Hvor bispesifikke antistoffer skal anvendes, kan disse være konvensjonelle bispesifikke antistoffer, som kan fremstilles på ulike måter (Holliger & Winter, 1993), for eksempel fremstilles kjemisk eller fra hybridet hybridomer, eller kan være ethvert av de bispesifikke antistoffragmentene nevnt over. Eksempler på bispesifikke antistoffer inkluderer disse av BiTE™ teknologien hvor bindingsområdene til to antistoffer med ulik spesifisitet kan anvendes og direkte kobles via korte, fleksible peptider. Dette kombinerer to antistoffer på en kort enkel polypeptidkjede. Diakropper og scFv kan konstrueres uten et Fc-område, ved å anvende bare variable områder, som potensielt reduserer effektene av anti-iodotypisk reduksjon.

15

Bispesifikke diakropper, som motsatt til dispesifikke hele antistoffer, kan også særskilt være anvendelige fordi de lett kan konstrueres og uttrykkes i *E.coli*. Diakropper (og mange andre polypeptider slik som antistoffragmenter) med egnede bindingsspesifisiteter kan lett velges ved å anvende fagfremvisning til (WO94/13804) fra biblioteker. Dersom en arm av diakroppen skal holdes konstant, for eksempel, med en spesifisitet rettet mot NGF, kan deretter et bibliotek lages hvor den andre armen varieres og et antistoff med egnet spesifisitet velges. Bispesifikke hele antistoffer kan lages ved “knapper i hull”-teknikk (Ridgeway et al., 1996).

25 *Antigen-bindingssete*

Dette beskriver delen av et molekyl som binder til og er komplementær til hele eller en del av målantigenet. I et antistoffmolekyl er det referert til som antistoffantigen-bindingssete, og omfatter delen av antistoffet som spesifikt binder til og er komplementær til hele eller en del av målantigenet. Hvor et antigen er stort, kan et antistoff bare binde til en bestemt del av antigenet, hvor delen betegnes en epitope. Et antistoffantigen-bindingssete kan tilveiebringes av en eller flere antistoffvariable områder. Fortrinnsvis omfatter et antistoff antigen-bindingssete et antistofflekkjedevariabelt område (VL) og et antistofftungkjedevariabelt område (VH).

Spesifikk

35 Dette kan anvendes for å referere til situasjonen hvor en partner i et spesifikt bindingspar ikke vil vise noen signifikant binding til molekyler andre enn den spesifikke bindingspartner(e). Betegnelsen er også anvendelig hvor for eksempel et

antigen-bindingsete er spesifikk for en bestemt epitope som bæres av et antall antigener, i tilfelle hvor den spesifikke bindingspartnere som bærer antigen-bindingsete vil være i stand til å binde til ulike antigener som bærer epitopen.

5 *Isolerte*

Dette refererer til tilstanden hvor spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen, eller nukleinsyre som koder slike bindingspartnere, generelt vil være i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Isolerte partnere og isolert nukleinsyre vil være fri eller vesentlig fri for materiale, som de naturlig assosieres med slik som andre polypeptider eller nukleinsyrer som de finnes sammen med i deres naturlige omgivelse, eller i omgivelsen hvor de fremstilles (for eksempel cellekultur) når slik fremstilling er ved rekombinant DNA-teknologi utført *in vitro* eller *in vivo*. Partnere og nukleinsyre kan formuleres med fortynningsmidler eller adjuvanser, og fremdeles for praktiske formål isoleres – for eksempel vil partnerne normalt blandes med gelatin eller andre bærere dersom anvendt for å bekle mikrotiterplater for anvendelse i immunoanalyser, eller vil blandes med farmasøytiske aksepterbare bærere eller fortynningsmidler ved anvendelse i diagnose eller behandling. Spesifikke bindingspartnere kan glykosyleres, enten naturlig eller ved systemer av heterologe aukaryotiske celler (for eksempel CHO eller NS0 (ECACC 85110503) celler, eller de kan være (for eksempel dersom fremstilt ved ekspresjon i en prokaryotisk celle) uglykosylert.

DETALJERT BESKRIVELSE

Som beskrevet over vil en spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen fortrinnsvis nøytralisere NGF. Graden som et antistoff nøytraliserer NGF refereres til som dets nøytraliserende potens.

Potens uttrykkes normalt som en IC₅₀-verdi, i nM dersom ikke noe annet er bestemt. IC₅₀ er den mediale inhibitoriske konsentrasjonen til et antistoffmolekyl. I funksjonelle analyser er IC₅₀ konsentrasjonen som reduserer en biologisk respons ved 50 % av dets maksimum. I ligand-bindingstudier er IC₅₀ konsentrasjonen som reduserer reseptorbinding ved 50 % av maksimalt spesifikt bindingsnivå.

IC₅₀ kan beregnes ved å plote prosentdialogisk respons (representert for eksempel av kalsium ionemobilisering i en FLIPR-analyse, ved overlevelse i en PC12-analyse, eller ved proliferering i en TF-1 prolifereringsanalyse) eller % spesifikk reseptorbinding som en funksjon av logg av konsentrasjonen til den spesifikke bindingspartneren, og ved å anvende et softwareprogram slik som prism (GraphPad) for å tilpasse en sigmoidal

funksjon av dataene for å fremstille IC50-verdier, for eksempel som her er beskrevet i eksempel 2, 5, 6 eller 9.

En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inhiberer
5 fortrinnsvis human NGF-fremkalt intracellulær kalsiummobilisering i celler som
uttrykker TrkA-reseptor, for eksempel celler som er rekombinant transfektert med et
TrkA-gen, for eksempel HEK-celler. I en "FLIPR" kalsium mobiliseringsanalyse som
beskrevet i eksempel 2, har en spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende
oppfinnelsen en potens (IC50) for å nøytralisere human NGF på eller mindre enn 600,
10 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 eller 10 nM. Normalt har en spesifikk bindingspartner
ifølge oppfinnelsen en potens på 5 nM eller mindre, fortrinnsvis 2.5 nM eller mindre,
mer ønskelig 1 nM eller mindre. I særskilte foretrukne utførelsesformer er potensen 0.5
nM eller mindre, for eksempel 0.4 nM eller mindre; 0.3 nM eller mindre; 0.2 nM eller
mindre; eller 0.15 nM eller mindre. I noen utførelsesformer kan potensen være ca 0.1
15 nM.

Potensen kan være mellom 0.1-100 nM, 0.1-50 nM, 0.1-10 nM eller 0.1-1.0 nM. For
eksempel kan potensen være 0.1-5.0 nM, 0.2-5.0 nM, 0.3-5.0 nM eller 0.3-0.4 nM.

20 I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er den nøytraliserende potensen til en ikke-
potensoptimalisert spesifikk bindingspartner i en HEK celleanalyse som her er
beskrevet ca 1.8 til 560 nM for human NGF og/eller ca 2.9 til 620 nM for rotte-NGF. I
noen utførelsesformer er den nøytraliserende potensen til potens-optimaliserte
bindingspartnere i HEK celleanalyser som her er beskrevet ca 0.12 til 120 nM for human
25 NGF, ca 0.11 til 37 nM for rotte-NGF og ca 0.11 til 71 nM for mus NGF. Imidlertid er
dette bare eksempler og høyere potenser kan oppnås. Selv om potensoptimalisering kan
anvendes for å fremstille spesifikke bindingspartnere med en høyere potens fra en gitt
spesifikk bindingspartner er det også bemerket at spesifikke bindingspartnere med høy
potens kan erverves uten potensoptimalisering.

30 En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inhiberer
fortrinnsvis NGF-opprettholdende serumfritt PC12 celleoverlevelse. Den
nøytraliserende potensen til en spesifikk bindingspartner i den foreliggende
oppfinnelsen i en PC12 overlevelsesanalyse for human NGF som her er beskrevet i
35 eksempel 5 er generelt 1500 nM eller mindre, og er fortrinnsvis 50 nM eller mindre,
eller 10 nM eller mindre. Som forklart over og som her er demonstrert kan
potensoptimalisering anvendes for å oppnå høyere anti-NGF potenser. Fortrinnsvis har

en spesifikk bindingspartner en potens på eller mindre enn 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1.5 nM, 1 nM eller 0.5 nM. I noen utførelsesformer er potensen ca 0.1 nM eller mindre, 0.2 nM eller mindre. Således kan potensen være mellom 0.1 eller 0.2 nM og 0.5, 1.5, 5 eller 50 nM.

5

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er den nøytraliserende potensen til en potensoptimalisert spesifikk bindingspartner i en PC12 overlevelsesanalyse som her er beskrevet ca 0.2 til 670 nM for human NGF og er ca 0.2 til 54 nM for rotte-NGF.

10 En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inhiberer fortrinnsvis NGF-stimulert TF-1 celleprolifisering. Den nøytraliserende potensen til en spesifikk bindingspartner (normalt en potens-optimalisert spesifikk bindingspartner) i den foreliggende oppfinnelsen i en TF-1 prolifereringsanalyse for human NGF som her er beskrevet i eksempel 6 er generelt 5 nM eller mindre, fortrinnsvis 1 nM eller mindre.

15 Fortrinnsvis har en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen en potens på eller mindre enn 0.7, 0.6, 0.5, 0.45, 0.4, 0.3, 0.2 eller 0.1 nM for human NGF. For eksempel kan potensen være mellom 0.05 - 0.1 nM, 0.05 - 0.2 nM, 0.05 - 0.3 nM, 0.05 - 0.4 nM eller 0.05 - 0.5 nM.

20 I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er den nøytraliserende potensen til en potensoptimalisert spesifikk bindingspartner i en TF-1 prolifereringsanalyse som her er beskrevet ca 0.08 til 0.7 nM for human NGF, ca 0.07 til 1.9 nM for rotte NGF og ca 0.07 til 1.4 nM for muse-NGF.

25 En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inhiberer fortrinnsvis NGF-binding til en TrkA og/eller p75 reseptor, fortrinnsvis en human TrkA og/eller p75-reseptor. Oppfinnelsen inkluderer også mer generelt en spesifikk bindingspartner som fortrinnsvis blokkerer NGF-binding til TrkA-reseptor over NGF-binding til p75-reseptor. Den nøytraliserende potensen til en spesifikk bindingspartner
30 (normalt en potensoptimalisert spesifikk bindingspartner) i den foreliggende oppfinnelsen i en TrkA reseptorbindingsanalyse som her er beskrevet i eksempel 9 er generelt 2.5 nM eller mindre, fortrinnsvis 1 nM eller mindre for å nøytraliserere human NGF. Fortrinnsvis har en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen en potens på eller mindre enn 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 eller 0.075 nM for å nøytraliserere human NGF-
35 binding til TrkA. For eksempel kan potensen være mellom 0.05 - 0.1 nM, 0.05 - 0.2 nM, 0.05 - 0.3 nM, 0.05 - 0.4 nM eller 0.05 - 0.5 nM.

Den nøytraliserende potensen til en spesifikk bindingspartner (normalt en potens-optimalisert spesifikk bindingspartner) i den foreliggende oppfinnelsen i en p75 reseptor bindingsanalyse som her er beskrevet i eksempel 9 er generelt 1.5 nM eller mindre, fortrinnsvis 1 nM eller mindre for å nøytraliserere human NGF. Fortrinnsvis har en

5 spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen en potens på eller mindre enn 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 eller 0.1 nM for å nøytraliserere human NGF-binding til p75. For eksempel kan potensen være mellom 0.1 - 0.2 nM, 0.1 - 0.3 nM, 0.1 - 0.4 nM, 0.1 - 0.5 nM eller 0.1-0.6 nM.

10 Noen foretrukne spesifikke bindingspartnere i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inhiberer NGF (for eksempel human og/eller rotte NGF) binding til TrkA-reseptor fortrinnsvis over NGF-binding til p75 reseptor. Følgelig har en spesifikk bindingspartner i noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen en lavere bindingsinhiberingskonstant, K_i , for inhibering av NGF (for eksempel human og/eller

15 rotte-NGF) binding til TrkA enn for NGF-binding til p75. K_i kan beregnes ved å anvende formelen anvist i eksempel 9. Alternativt kan bindingsinhiberingskonstantene uttrykkes som pK_i , som kan beregnes som $-\log_{10}K_i$. Således har en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis en høyere pK_i -verdi for inhibering av NGF-binding til TrkA enn til p75.

20 Fortrinnsvis binder en spesifikk bindingspartner i henhold til oppfinnelsen human NGF og/eller rotte-NGF med en affinitet på eller mindre enn 1, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 eller 0.2 nM. For eksempel kan en spesifikk bindingspartner binde human NGF med en affinitet på ca 0.25-0.44 nM og rotte-NGF med en affinitet på ca 0.25-0.70 nM.

25 Som beskrevet over kan varianter av antistoffmolekyler som her er beskrevet fremstilles å anvendes i den foreliggende oppfinnelsen. Ved å utføre beregningskjemi for multivariable dataanalyseteknikker for sammenhengende mellom struktur/aktivitetsegenskaper (Wold, *et al.* 1984) kan kvantitative sammenhenger for

30 aktivitetsegenskaper til antistoffer avledes ved å anvende velkjente matematiske teknikker slik som statistisk regresjon, mønstergjenkjennelse og klassifisering (Norman *et al.* 1998; Kandel & Backer, 1995; Krzanowski, 2000; Witten & Frank, 1999; Denison (Ed), 2002; Ghose & Viswanadhan). Egenskapene til antistoffer kan avledes fra empiriske og teoretiske modeller (for eksempel analyse av antatte kontaktenheter

35 eller beregnet fysikokjemisk egenskap) av antistoffsekvens, funksjonell og 3-dimensjonale strukturer og disse egenskapene kan betraktes alene eller i kombinasjon.

Et antistoffantige-bindingssete sammensatt av et VH-område og et VL-område dannes av seks looper i polypeptidet: tre fra lettjedevariabelt område (VL) og tre fra tungkjedevariabelt område (VH). Analyse av antistoffer med kjent atomisk struktur har tydeliggjort slektskapet mellom sekvensen og den 3-dimensjonale strukturen til antistoffkombinerte seter (Chothia et al. 1992; Al-Lazikani, *et al.* 1997). Disse slektskapene medfører at, bortsett fra for det tredje området (loop) i VH-områder, har bindingssetelooper en av et lite antall av hovedkjedekonformasjoner: kanonikale strukturer. Den kanonikale strukturen dannet i en bestemt loop har blitt vist å kunne bestemmes ved en størrelse og tilstedeværelsen av bestemte enheter i nøkkelposisjoner i både loopen og i rammeverkområder (Chothia *et al.* and Al-Lazikani *et al.*, *supra*).

Denne analyse av sekvens-strukturslektskap kan anvendes til å forutsi enhetene i et antistoff med kjent sekvens, men med en ukjent tredimensjonal struktur, som er viktige for å opprettholde den tredimensjonale strukturen til dets CDR-loopene og således opprettholde bindingsspesifisitet. Disse antagelsene kan forsterkes ved å sammenligne med antagelsene til utbytte fra optimaliseringseksperimenter. I en strukturell tilnærming kan en modell fremstilles av antistoffmolekylet (Chothia, *et al.* 1986) ved å anvende enhver fritt tilgjengelig eller kommersiell pakke slik som WAM (Whitelegg & Rees, 2000). En proteinvisualisering og analyse softwarepakke slik som Insight II (Accelerlys, Inc.) eller Deep View (Guex & Peitsch, 1997) kan deretter anvendes for å evaluere mulige substitusjoner i hver posisjon i CDR. Denne informasjon kan deretter anvendes for å lage substitusjoner som ser ut til å ha minimal eller fordelaktig effekt på aktivitet.

Teknikker som krevers for å lage substitusjoner i aminosyresekvenser til CDR'er, antistoff VH- eller VL-områder og spesifikke bindingspartnere er generelt tilgjengelige i faget. Ulike sekvenser kan lages, med substitusjoner som kan eller ikke kan forutsettes å ha en minimal eller fordelaktig effekt på aktivitet, og testet for muligheten til å binde og/eller nøytralisere NGF- og/eller for enhver annen ønsket egenskap.

Variable domeneaminosyresekvensvarianter for enhver av VH- og VL-områdene hvor sekvensene her er spesifikt beskrevet kan anvendes i henhold til den foreliggende oppfinnelsen som diskutert. Bestemte varianter kan inkludere en eller flere aminosyresekvensendringer (i tillegg, delesjon, substitusjon og/eller insesjon av en aminosyreenhet), kan være mindre enn ca 20 endringer, mindre enn ca 15 endringer, mindre enn ca 10 endringer eller mindre enn ca 5 endringer, kanskje 5, 4, 3, 2 eller 1. Endringer kan utføres i en eller flere rammeverkområder og/eller en eller flere CDR'er.

Ønskelige endringer resulterer ikke i tap av funksjon, slik at en spesifikk bindingspartner som omfatter en således endret aminosyresekvens fortrinnsvis opprettholder muligheten til å binde og/eller nøytralisere NGF. Mer ønskelig opprettholdes den samme kvantitative binding og/eller nøytraliserende mulighet som en spesifikk bindingspartner uten en utført endring, for eksempel som målt i en analyse som her er beskrevet.

Mest ønskelig har den spesifikke bindingspartneren, som omfatter en således endret aminosyresekvens, en forbedret mulighet til å binde og nøytralisere NGF.

10

Endring kan omfatte og erstatte en eller flere aminosyreenheter med en ikke-naturlig forekommende eller ikke-standardaminosyre, og modifisere en eller flere aminosyreenheter til en ikke-naturlig forekommende eller ikke-standardform, eller å innsette en eller flere ikke-naturlig forekommende eller ikke-standardaminosyre i sekvensen. Foretrukkede antall og lokalisasjoner av endringer i sekvensene ifølge oppfinnelsen er beskrevet et annet sted. Naturlig forekommende aminosyrer inkluderer de 20 "standard" L-aminosyrer identifisert som G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E ved deres standard enkel-bokstavkoder. Ikke-standardaminosyrer inkluderer enhver annen enhet som kan inkorporeres i et polypeptidskjelett eller resultere fra modifisering av en eksisterende aminosyreenhet. Ikke-standard aminosyrer kan være naturlig forekommende eller ikke-naturlig forekommende. Flere naturlige forekommende ikke-standardaminosyrer er velkjent i faget, slik som 4-hydroksyprolin, 5-hydroksylysin, 3-metylhistidin, N-acetylserin, etc. (Voet & Voet, 1995). Aminosyreenheter som er derivatiserte på deres N- α -posisjon vil bare kunne lokaliseres til den N-terminale ende i en aminosyresekvens. I den foreliggende oppfinnelsen vil normalt en aminosyre være en L-aminosyre, men i noen utførelsesformer kan den være en D-aminosyre. Endringer kan derfor omfatte å modifisere en L-aminosyre til, eller å erstatte den med, en D-aminosyre. Metylerte, acetylte og/eller fosforylte former av aminosyrer er også kjent, og aminosyrer i den foreliggende oppfinnelsen kan underkastes en slik modifisering.

30

Aminosyresekvenser i antistoffdomener og spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen kan omfatte ikke-naturlige eller ikke-standardaminosyrer som beskrevet over. I noen utførelsesformer kan ikke-standardaminosyrer (for eksempel D-aminosyrer) inkorporeres i en aminosyresekvens iløpet av syntese, mens i andre utførelsesformer kan ikke-standardaminosyrene introduseres ved modifisering eller ved å erstatte de "originale" standardaminosyrene etter syntese av aminosyresekvensen.

35

Anvendelse av ikke-standarg og/eller ikke-naturlig forekommende aminosyrer øker den strukturelle og funksjonelle mangfoldighet, og kan således øke muligheten for å oppnå ønsket NGF-binding og nøytraliserende egenskaper i en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen. I tillegg har D-aminosyrer og analoger vist å ha bedre farmkokinetiske profiler sammenlignet med standard L-aminosyrer, i forhold til *in vivo* degradering av polypeptider som har L-aminosyrer etter administrering til et dyr.

Som beskrevet over bæres en CDR-aminosyresekvens som her er fastsatt fortrinnsvis som en CDR i et humant antistoffvariabelt område eller som en vesentlig porsjon derav. HCDR3-sekvensene som her er anvist representerer ønskelige utførelsesformer i den foreliggende oppfinnelsen og det er foretrukket at hver av disse bæres som et HCDR3 i et humant tungkjedevariabelt område eller som en vesentlig del derav.

Variable områder som anvendes ifølge oppfinnelsen kan oppnås eller avledes fra en hver kimlinje eller rearrangert humant variabelt område, eller kan være et syntetisk variabelt område basert på konsensus eller aktuelle sekvenser til kjente humane variable områder. En CDR-sekvens ifølge oppfinnelsen (for eksempel CDR3) kan introduseres i et reperdoar av variable områder som mangler en CDR (for eksempel CDR3), ved å anvende rekombinant DNA-teknologi.

For eksempel beskriver Marks *et al.* (1992) metoder for å fremstille repertoarer av antistoffvariable områder hvor konsensusprimere rettet ved eller nærliggende til 5' ende av det variable domenearelet anvendes i konjunksjon med konsensusprimere til det tredje rammeverkområdet av humane VH-gener for å fremstilles et reperdoar av VH-variable områder som mangler en CDR3. Marks et al., beskriver ytterligere hvordan dette repertoaret kan kombineres med en CDR3 i et bestemt antistoff. Ved å anvende analoge teknikker kan de CDR3-avledede sekvensene i den foreliggende oppfinnelsen omflyttes med repertoarer av VH- eller VL-områder som mangler en CDR3, og de omflyttede komplette VH- eller VL-områdene kombinert med et beslektet VL- eller VH-område for å fremstille spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen. Repertoaret kan deretter fremstilles i et egnet vertssystem slik som fagfremvisningssystemet i WO92/01047 eller ethvert annet system beskrevet i litteraturen, inkludert Kay, Winter & McCafferty (1996), således at de egnede spesifikke bindingspartnerne kan utvelges. Et reperdoar kan bestå av hva som helst fra 10^4 individuelle partnere og oppover, for eksempel fra 10^6 til 10^8 eller 10^{10} partnere. Andre egnede vertssystemer inkluderer

gjærfremvisning, bakteriell fremvisning, T7-fremvisning, ribosomfremvisning og kovalent fremvisning.

5 Analoge omflytninger eller kombinasjonsteknikker er også beskrevet av Stemmer (1994), som beskriver teknikken i henhold til et β -laktamasegen, men observerer at tilnærmingen kan anvendes for fremstillingen av antistoffer.

10 Et ytterligere alternativ er å fremstille nye VH- eller VL-områder, som bærer CDR-avledede sekvenser ifølge oppfinnelsen, ved å anvende tilfeldig mutagenisering av en eller flere utvalgte VH- og/eller VL-gener for å fremstille mutasjoner i det hele variable området. Slik teknikk er beskrevet av Gram *et al.* (1992), som anvendte feilindusert PCR. I foretrukne utførelsesformer dannes en eller to aminosyresubstitusjoner i et sett av HCDR'er og/eller LCDR'er.

15 En annen metode som kan anvendes er å rette mutagenese mot CDR-områder i VH- eller VL-gener. Slike teknikker beskrives av Barbas *et al.* (1994) og Schier *et al.* (1996).

20 Alle teknikkene beskrevet over er velkjent i faget og en faglært person vil være istand til å anvende slike teknikker for å fremstille spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen ved å anvende rutineeksperimenter i faget.

25 Et antistoffantigen-bindingssete spesifikt for NGF-antigen, kan oppnås ved fremgangsmåten som omfatter fremstillingen ved addisjon, deleksjon, substitusjon eller inserasjon av en eller flere aminosyrer i aminosyresekvensen i et VH-område som her er anvist, et VH-område, som er aminosyresekvensvariant av VH-området, ved å kombinere et VH-område således tilveiebragt med en eller flere VL-områder, og å teste VH/VL-kombinasjon eller kombinasjoner for å identifisere en spesifikk bindingspartner eller et antistoffantigen-bindingssete spesifikk for NGF-antigen og eventuelt med en eller flere foretrukne egenskaper, fortrinnsvis muligheten til å nøytralisere NGF-aktivitet. VL-området kan ha en aminosyresekvens som er anvist heri.

En analog fremgangsmåte kan anvendes hvor en eller flere sekvensvarianter av et VL-område som her er beskrevet kombineres med en eller flere VH-områder.

35 I en foretrukket utførelsesform kan 1252A5 VH-område (SEQ ID NR.: 392) underkastes mutering for å fremstille en eller flere VH-

områdeaminosyresekvensvarianter, eventuelt kombinert med 1252A5 VL (SEQ ID NR.: 397).

5 En vesentlig del av et immunoglobulint variabelt område vil omfatte minst de tre CDR-
områdene sammen med deres mellomliggende rammeverkområder. Fortrinnsvis vil
også delen inkludere minst ca 50% av enten eller både det første og fjerde
rammeverkområdet, hvor 50% er 50% C-terminalt av det første rammeverkområdet og
50% N-terminalt av det fjerde rammeverkområdet. Ytterligere enheter ved den N-
10 terminale eller C-terminale enden i den vesentlige delen av det variable området kan
være disse som normalt ikke assosieres med naturlig forekommende variable
domeneområder. For eksempel kan konstruksjon av spesifikke bindingspartnere i den
foreliggende oppfinnelsen dannet av rekombinante DNA-teknikker, resultere i
introduksjonen av N- eller C-terminale enheter kodet av koblere introdusert for å tillate
15 kloning eller andre manipuleringsstrinn. Andre manipuleringsstrinn inkluderer
introduksjonen av koblere for å sammenføre variable områder ifølge oppfinnelsen til
ytterligere proteinsekvenser, som inkluderer antistoffkonstante områder, andre variable
områder (for eksempel i fremstillingen av diakropper) eller detekterbare/funksjonelle
merkelapper som her er beskrevet mer detaljert et annet sted.

20

Spesifikke bindingspartnere ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan ytterligere
omfatte antistoffkonstante områder eller deler derav, fortrinnsvis humane
antistoffkonstante områder eller deler derav. For eksempel kan den T-terminale enden
25 til et VL-område festes til konstante områder i antistoff lettkjede, inkludert human C κ
eller C λ -kjeder, fortrinnsvis C λ -kjeder. Lignende kan en spesifikk bindingspartner
basert på et VH-område i sin C-terminale ende festes til hele eller delvis (for eksempel
et CH1-område) av en immunoglobulintung kjede avledet fra enhver antistoff isotype,
for eksempel IgG, IgA, IgE og IgM og enhver av de isotypiske subklassene, særlig IgG1
30 og IgG4. IgG4 foretrekkes. IgG4 foretrekkes fordi den ikke binder komplement og
skaper ikke effektorfunksjoner. Enhver syntetisk eller annen konstant områdevariant
som har disse egenskapene og stabiliserer variable områder er også foretrukket for
anvendelse ifølge utførelsesformer ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

35 Spesifikke bindingspartnere ifølge oppfinnelsen kan merkes med en detekterbar eller
funksjonell merkelapp. Repeterbare merkelapper inkluderer radioaktive merkelapper
slik som ^{131}I eller ^{99}Tc , som kan festes til antistoffer ifølge oppfinnelsen ved å anvende

en konvensjonell kjemi kjent i faget for antistoffavbinding. Merkelapper inkluderer også enzymerkelapper slik som horseradish peroksydase (HRP). Merkelapper kan ytterligere inkludere kjemiske halvdelar slik som biotin som kan observeres via binding til en spesifikk beslektet detekterbar halvdel, for eksempel merket avidin.

5

Spesifikke bindingspartnere i den foreliggende oppfinnelsen er fremstilt til å kunne anvendes i fremgangsmåter for å diagnostisere eller behandle mennesker eller dyr, fortrinnsvis mennesket.

- 10 Følgelig tilveiebringer ytterligere aspekter ifølge oppfinnelsen farmasøytiske sammensetninger som omfatter en slik spesifikk bindingspartner, og anvendelsen av en slik spesifikk bindingspartner i fremstillingen av et medikament for administrering, for eksempel i en fremgangsmåte for å lage et medikament eller farmasøytisk sammensetning som omfatter å formulere den spesifikke bindingspartneren med et
- 15 farmasøytisk aksepterbart tilsetningsstoff.

- Kliniske indikasjoner hvor et anti-NGF antistoff kan anvendes til å gi terapeutisk fordel inkluderer smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, pulmonær fibrose, andre sykdommer ved luftveisinflammasjon, diabetisk nevropati, artritt, psoriasis,
- 20 hjertearytmier, HIV og kreft. Som allerede forklart indikeres anti-NGF-behandling for alle disse sykdommene.

- Anti-NGF-behandling kan gis oralt, ved injeksjon (for eksempel, subkutan, intravenøs, intraperitonealt eller intramuskulært), ved inhaling, ved den intravesikulære ruten
- 25 (inndrypping i urinblæren), eller topisk (for eksempel intraokkular, intranasalt, rektalt, i sår, på hud). Administrasjonsruten kan bestemmes av fysiskokemiske egenskaper til behandlingen, særlig betraktning av sykdommen eller optimal effektivitet eller for å minimalisere bieffekter.

- 30 Det er antatt at anti-NGF-behandlingen ikke vil være begrenset til anvendelse i klinikken. Derfor foretrekkes det også subkutan injeksjon ved å anvende en nålfri anordning.

- Kombinasjonsbehandlinger kan anvendes for å tilveiebringe betydelig synergistiske
- 35 effekter, særlig kombinasjonen av dens anti-NGF-spesifikk bindingspartner med en eller flere andre medikamenter. En spesifikk bindingspartner i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan tilveiebringes i kombinasjon eller i tillegg til korttid-

eller langtidsvirkende smertestillende, anti-inflammatoriske, anti-allergi, anti-astmatisk, anti-fibrotisk, antiviralt, kjemoterapeutiske faktorer og immunoterapeutiske faktorer.

Kombinasjonsbehandling med en eller flere kort- eller langtidsvirkende
5 smertestillende og/eller anti-inflammatoriske faktorer, slik som opioider og ikke-steroider
antiinflammatoriske medikamenter (NSAID'er), kan anvendes i behandlingen av
forhold karakterisert med smerte og/eller inflammasjon for eksempel reumatoid artritt
eller post-operativ smerte. Antitoffer i den foreliggende oppfinnelsen kan også
anvendes i kombinasjon med anti-astma, anti-allergi eller anti-fibrotiske behandlinger,
10 slik som inhallerbare β -adrenoseptoragonister, steroider, cytokinantagonister eller andre
nye terapeutiske tilnærminger for behandlingen av astma, allergisk astma, andre
allergiske forhold eller ethvert forhold karakterisert av unormal fibrose. Antistoffer i
den foreliggende oppfinnelsen kan også anvendes i kombinasjon med anti-smittsomme
faktorer, for eksempel antivirale faktorer for behandlingen av HIV-infeksjon.

15

I henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan de tilveiebragte sammensetningene
administreres til individer. Administreringen er fortrinnsvis i en "terapeutisk effektiv
mengde", hvor dette er tilstrekkelig til å være fordelaktig for en pasient. Slik fordel er å
svekke minst ett symptom. Den aktuelle mengden som administreres, og hastigheten og
20 tidskurven for administrering, vil avhenge av naturen og alvorlighetsgraden på det som
skal behandles. Resept på behandling, for eksempel bestemmelse av dosering osv., er
innenfor generell praksis og kan avhenge av alvorlighetsgraden av symptomene og/eller
progresjonen av en sykdom som skal behandles. Egnede doser av antistoff er velkjent i
faget; se Ledermann et al. (1991) og Bagshawe (1991). Spesifikke doseringer som her
er indikert, eller i Physician's Desk Reference (2003) som egnet for medikamenttypen
25 som skal administreres kan anvendes. En terapeutisk effektiv mengde eller egnet dose
av en spesifikk bindingspartner ifølge oppfinnelsen kan bestemmes ved å sammenligne
dens *in vitro*-aktivitet og *in vivo*-aktivitet i en dyremodell. Metoder for ekstrapolering av
effektive doser i mus og andre dyremodeller for mennesker er kjent.

30

Den eksakte dosen vil være avhengig av et antall faktorer, inkludert om antistoffet er for
diagnose eller for behandling, størrelsen og lokaliseringen av arealet som skal
behandles, den eksakte naturen til antistoffet (for eksempel helt antistoff, fragment eller
diakraft), og naturen til enhver detekterbar merkelapp eller annet molekyl festet til
35 antistoffet. En typisk antistoffdose vil være i rekkevidden 100 μ g til 1 g for systemiske
anvendelser, og 1 μ g til 1mg for topiske anvendelser. Typisk vil antistoffet være et helt
antistoff, fortrinnsvis IgG4 isotypen. Dette er en dose for en enkeltbehandling av en

voksen pasient, som proporsjonelt kan justeres for barn og nyfødte, og også justeres for andre antistoffformater i samsvar til molekylvekt. Behandlinger kan repeteres daglig, to ganger i uken, ukentlig eller i månedlige intervaller, i diskresjon med legen. De foretrukke utførelsesformer i den foreliggende oppfinnelsen er behandlingen

5 periodisk og perioden mellom administreringene er 2 uker eller mer, fortrinnsvis ca 3 uker eller mer, mest ønskelig ca 4 uker eller mer, eller ca 1 gang per måned. I andre foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan behandlingen gis før, og/eller etter operasjon, og mer ønskelig administreres eller påføres direkte på det anatomiske setet under operasjonen.

10

Spesifikke bindingspartnere i den foreliggende oppfinnelsen vil vanligvis administreres i form av en farmasøytisk sammensetning, som kan omfatte minst en komponent i tillegg til den spesifikke bindingspartneren.

15

Slike farmasøytiske sammensetninger i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, og på anvendelse i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, kan omfatte i tillegg til aktiv ingrediens en farmasøytisk akseptert tilsetning, bærer, buffer, stabilisator eller andre materialer velkjent i faget. Slike materialer bør være ikke-toksiske og bør ikke interferere med effektiviteten til den aktive ingrediensen. Den eksakte naturen til

20 bæreren eller annet materiale vil være avhengig av administrasjonsruten, som kan være oral eller ved injeksjon, for eksempel intravenøs.

25

Farmasøytiske sammensetninger for oral administrering kan være i tablett, kapsel, pulver, væske eller semi-fast form. En tablett kan omfatte en fast bærer slik som gelatin eller en adjuvans. Farmasøytiske sammensetninger i væskeform omfatter generelt en væskebærer slik som vann, petroleum, animalske eller vegetabiliske oljer, mineralolje eller syntetisk olje. Fysiologiske saltløsninger, dekstrose eller andre sakkaridløsninger eller glykoler slik som etylenglykol, propylenglykol eller polyetylen glykol kan inkluderes.

30

For intravenøs injeksjon, eller injeksjon på det affekterte setet vil den aktive ingrediensen være i form av en parenteral akseptert vannholdig løsning som er pyrogenfri og har egnet pH, isotonisitet og stabilitet. En fagperson er i stand til å fremstille egnede løsninger ved å anvende for eksempel isotoniske vehikler slik som

35 natrium kloridinjeksjon, Ringer's injeksjon, melkeinnholdende Ringer's injeksjon. Konserveringsmidler, stabilisatorer, buffere, antioksidanter og/eller andre tilsetninger kan inkluderes dersom påkrevd.

En sammensetning kan administreres alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, enten samtidig eller sekvensielt avhengig av forholdet som skal behandles.

- 5 Spesifikke bindingspartnere i den foreliggende oppfinnelsen kan formuleres i væske, semi-fast eller faste former avhengig av de fysikokjemiske egenskapene til molekylet og leveringsruten. Formuleringer kan inkludere tilsetninger, eller kombinasjoner av tilsetninger, for eksempel: sukkere, aminosyrer og overflateaktive stoffer. Væskeformuleringer kan inkludere en rekke antistoffkonsentrasjoner og pH-verdier.
- 10 Faste formuleringer kan for eksempel fremstilles ved lyofilisering, spraytørring eller tørring ved superkritisk væsketeknologi. Formuleringer av anti-NGF vil være avhengig av den tilsiktede leveringsruten: for eksempel kan formuleringer for pulmonær avlevering bestå av partikler med fysiske egenskaper som sikrer penetrering i den dype lungen ved inhallering; topiske formuleringer kan inkludere viskositetsmodifiserende
- 15 faktorer, som forlenger oppholdstiden til medikamentet på virkningsstedet. I bestemte utførelsesformer kan den spesifikke bindingspartneren fremstilles med en bærer som vil beskytte den spesifikke bindingspartneren mot rask frigivelse, slik som en kontrollert frigjøringsformulering, inkludert implantater, transdermale plastere og mikroinnkapslede avleveringssystemer. Biodegraderbare, biokompatible polymerer kan
- 20 anvendes, slik som etylenvinylacetat, polyanhydrider, polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkesyre. Mange metoder for å fremstille slike formuleringer er velkjent i faget. Se for eksempel Robinson, 1978.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en fremgangsmåte, som omfatter å

25 forårsake eller å tillate binding av en spesifikk bindingspartner, som her er tilveiebragt, til NGF *in vitro*, for eksempel i ELISA, westernblotting, immunocytokjemi, immunopresipitering, affinitetskromatografi eller cellebaserte analyser slik som en TF-1 analyse.

- 30 Mengden av binding av en spesifikk bindingspartner til NGF kan bestemmes. Kvantitering kan relateres til mengden av antigenet i en testprøve som vil være av diagnostisk interesse.

En spesifikk bindingspartner eller antistoffmolekyl i henhold til et valgt aspekt eller

35 utførelsesform i den foreliggende oppfinnelsen, er også tilveiebragt som et kit. I slike kit kan den spesifikke bindingspartneren eller antistoffmolekylet merkes for å tillate at dets reaktivitet i en prøve kan bestemmes, for eksempel som ytterligere beskrevet under.

Komponenter i et kit er generelt sterile og i forseglede rør eller andre beholdere. Kit kan anvendes i diagnostisk analyse eller andre metoder hvor antistoffmolekylene er anvendelige. Et kit kan inneholde instruksjoner for anvendelse av komponentene i en metode, for eksempel en metode i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Tilhørende materialer for å assistere eller tillate utførelsen av en slik metode kan inkluderes i et kit.

Reaktivitetene av antistoffer i en prøve kan bestemmes ved enhver egnet måte. Radioimmunoanalyser (RIA) er en mulighet. Radioaktiv merket antigen blandes med umerket antigen (testprøven) og tillates å binde antistoffet. Bundet antigen separeres fysisk fra ubundet antigen og mengden av radioaktivt antigen bundet til antistoffet bestemmes. Jo mer antigen er i en testprøve desto mindre radioaktivt antigen vil binde antistoffet. En kompetitiv bindingsanalyse kan også anvendes med ikke-radioaktivt antigen, ved å anvende antigen eller en analog koblet til et reporter-molekyl. Reporter-molekylet kan være et fluorokrom, fosfor eller laserfarge med spektriske isolerte absorpsjons- eller emisjonskarakteristikker. Egnede fluorokromer inkluderer fluoressin, rhodamin, fykoeritrin og Texasrødt. Egnede kromogene farger inkluderer de aminobenzidiner.

Andre reportere inkluderer makromolekylære kolloidale partikler eller partikulært materiale slik som latekskuler som er farget, magnetiske eller paramagnetiske, og biologiske eller kjemiske aktive faktorer som direkte eller indirekte kan forårsake detekterbare signaler som visuelt kan observeres, elektronisk observeres eller på annen måte måles. Disse molekylene kan være enzymer, som for eksempel katalyserer reaksjoner som utvikler, eller endrer farger eller forårsaker endringer i de elektriske egenskaper. De kan være molekylært eksiterbare, slik at elektroniske overganger mellom energitilstander resulterer i karakteristiske spektrale absorpsjoner eller emisjoner. De kan inkludere kjemiske halvdelers anvendelse i konjunksjon med biosensorer. Biotin/avidin eller biotin/streptavidin og alkalinfosfatasedeteksjonssystemer kan anvendes.

Signalene fremstilt av individuelle antistoff-reporter-konjugater kan anvendes til å avlede kvantifiserbare absolutte eller relative data av den relevante antistoffbinding i prøvene (normal og test).

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelsen av en spesifikk bindingspartner som beskrevet over for å måle antigennivåer i en konkurrerende analyse, det vil si en fremgangsmåte for å måle nivået av antigen i en prøve ved å

anvende en spesifikk bindingspartner, som tilveiebragt av den foreliggende oppfinnelsen, i en konkurrerende analyse. Dette er hvor den fysiske separeringen er bundet fra ubundet antigen ikke er påkrevet. Det å koble et reportertermolekyl til den spesifikke bindingspartneren slik at en fysisk eller optisk endring skjer ved binding er mulig. Reportertermolekylet kan direkte eller indirekte frembringe detekterbare og fortrinnsvis målbare signaler. Koblingen av reportertermolekyler kan være direkte eller indirekte, kovalent, for eksempel via en peptidbinding eller ikke-kovalent. Kobling via en peptidbinding kan være et resultat av rekombinant ekspresjon av et fusjonert gen som koder antistoff og reportertermolekyl.

10

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også for å måle nivåer av antigen direkte, ved å anvende spesifikk bindingspartner i henhold til oppfinnelsen for eksempel i et biosensorsystem.

15

Måten for å bestemme binding er ikke en egenskap i den foreliggende oppfinnelsen og en fagperson vil være istand til å velge en egnet måte i henhold til deres preferanse og generelle kunnskap.

20

Konkurransen mellom bindingspartnere kan lett analyseres *in vitro*, for eksempel ved å merke et spesifikt reportertermolekyl til en bindingspartner, som kan observeres i tilstedeværelsen av andre umerkede bindingspartner(e), for å tillate identifisering av spesifikke bindingspartnere som binder til den samme epitopen eller en overlappende epitope.

25

Konkurransen kan bestemmes for eksempel ved å anvende ELISA, hvor NGF immobiliseres til en plate og en første merket bindingspartner sammen med en eller flere andre umerkede bindingspartnere tilsettes til platen. Tilstedeværelsen av en umerket bindingspartner som konkurrerer med den merkede bindingspartneren observeres ved et avtagende signal sendt fra den merkede bindingspartneren.

30

35

For å teste for konkurranse kan et peptidfragment av antigenet anvendes, særlig et peptid som inkluderer eller består esensielt av en bestemt epitope. Et peptid, som har epitopesekvensen pluss en eller flere aminosyrer og en eller begge ender anvendes. Spesifikke bindingspartnere i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan være slik at deres binding for antigen inhiberes av et peptid med eller inkludert den gitte sekvens. For å teste for dette kan et peptid med den ene eller begge sekvenser pluss en eller flere aminosyrer anvendes.

Spesifikke bindingspartnere som binder et spesifikt peptid kan for eksempel isoleres fra fagfremvisningsbibliotek ved å panorere med peptid(er).

5 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer ytterligere en isolert nukleinsyre som koder en spesifikk bindingspartner i den foreliggende oppfinnelsen. Nukleinsyre kan inkludere DNA og/eller RNA. I et foretrukket aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en nukleinsyre som koder for et CDR eller sett av CDR'er eller VH-område eller VL-område eller antistoffantigen-bindingssete eller antistoffmolekyl, for eksempel scFv eller IgG4, ifølge oppfinnelsen som definert over.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også konstrukter i form av plasmider, vektorer, transkripsjon eller ekspresjonskassetter som omfatter minst et polynukleotid som beskrevet over.

15

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også en rekombinant vertscelle som omfatter en eller flere av konstruktene over. En nukleinsyre, som koder enhver CDR eller sett av CDR'er eller VH-område eller VL-område eller antistoffantigen-bindingssete eller antistoffmolekyl, for eksempel scFv eller IgG4 som tilveiebragt, danner alene et aspekt i den foreliggende oppfinnelsen, som en metode for fremstilling av det kodede produktet, hvor metoden omfatter ekspresjon av den kodede nukleinsyre. Ekspresjon kan konvensjonelt oppnås ved å dyrke under egnede forhold rekombinante vertsceller inneholdende nukleinsyren. Etter produksjon ved ekspresjon kan et VH- eller VL-område, eller spesifikk bindingspartner isoleres og/eller renses ved å anvende enhver egnet teknikk, deretter anvendt som egnet.

25

Spesifikke bindingspartnere, VH- og/eller VL-områder, og kodende nukleinsyremolekyler og vektorer i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan tilveiebringes isolert og/eller renses, for eksempel fra deres naturlige omgivelse, i en vesentlig ren eller homogen form, eller i tilfelle av nukleinsyre fri eller vesentlig fri for nukleinsyre eller gener med annen opprinnelse enn sekvensen som koder et polypeptid med den ønskede funksjonen. Nukleinsyre i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan omfatte DNA eller RNA og kan være helt eller delvis syntetis. Referanse til en nukleotidsekvens som her er anvist omfatter et DNA-molekyl med den spesifiserte sekvensen, og omfatter et RNA-molekyl med den spesifiserte sekvensen hvor U er substituert for T, så sant ikke sammenhengen krever noe annet.

35

Systemer for å klone og uttrykke et polypeptid i ulike vertsceller er velkjent i faget. Egnede vertsceller inkluderer bakterier, mammalske celler, planteceller, gjær og bacculovirussystemer og transgene planter og dyr. Ekspresjonen av antistoffer og antistofffragmenter i prokaryote celler er vel etablert i faget. For et sammendrag se for
 5 eksempel Plückthun (1991). En vanlig foretrukket bakterievertscelle er *E. coli*.

Uttrykkelse i aukaryote celler i kultur er også tilgjengelig som en mulighet for fremstilling av en spesifikk bindingspartner for eksempel Chadd & Chamow (2001), Andersen & Krummen (2002), Larrick & Thomas (2001). Mammalske cellelinjer, som
 10 er tilgjengelig i faget for ekspresjon av et heterologt polypeptid, inkluderer kinesisk hamsterovarie (CHO) celler, HeLa-celler, baby hamster nyreceller, NS0-musmelanomaceller, YB2/0 rotte myelomaceller, humane embryoniske nyreceller, humane embryoniske retinaceller og mange andre.

Egnede vektorer kan velges eller lages, inneholdende egnede regulatoriske sekvenser, inkludert promotorsekvenser, terminatorsekvenser, polyadenyleringssekvenser, forhøyelsessekvenser, markørgener og andre sekvenser som passer. Vektorer kan være plasmider for eksempel fagmid, eller viral for eksempel "fag" som passer. For ytterligere detaljer se for eksempel Sambrook & Russell (2001). Mange kjente teknikker og
 15 protokoller for å manipulere nukleinsyre, for eksempel i fremstillingen av nukleinsyrekonstrukt, mutagenese, sekvensering, introduksjon av DNA i celler og genekspresjon, og analyse av proteiner er detaljert beskrevet i Ausubel et al., 1988 og Ausubel et al., 1999.

Således tilveiebringer et ytterligere aspekt i den foreliggende oppfinnelsen en vertscelle inneholdende nukleinsyre som her er beskrevet. En slik vertscelle kan være *in vitro* og kan være i kultur. En slik vertscelle kan være *in vivo*. *In vivo* tilstedeværelse av en vertscelle kan tillate intracellulær ekspresjon av spesifikke bindingspartnere i den foreliggende oppfinnelsen som "intrakropper" eller intracellulære antistoffer.
 25 Intrakropper kan anvendes for genterapi.

Et ytterligere aspekt tilveiebringer en fremgangsmåte som omfatter å introdusere slik nukleinsyre i en vertscelle. Introduksjonen kan anvende enhver tilgjengelig teknikk. For aukaryote celler kan egnede teknikker inkludere kalsiumfosfattransfeksjon, DEAE-
 35 Dextran, elektroporering, liposommediert transfeksjon og transduksjon ved å anvende retrovirus eller andre virus, for eksempel vaccinia eller, for insektsceller bacculovirus. For å introdusere nukleinsyre i vertscellen, ble bestemt i en aukaryotisk celle, et viralt

eller et plasmidbasert system kan anvendes. Plasmidsystemet kan opprettholdes episomalt eller kan inkorporeres i vertscellen eller i et kunstig kromosom. Inkorporering kan enten være tilfeldig eller målrettet integrering av en eller flere kopier ved et eller flere steder. For bakterielle celler kan egnede teknikker inkludere

5 kalsiumkloridtransformasjon, elektroporering og transfeksjon ved å anvende bakteriofag.

Introduksjonen kan følges av ekspresjon fra nukleinsyren, for eksempel ved å dyrke vertscellene under forhold for ekspresjon av genet.

10

I en utførelsesform er nukleinsyren ifølge oppfinnelsen integrert i genomet (for eksempel kromosom) i vertscellen. Integreringen kan fremmes ved inklusjon av sekvenser som fremmer rekombinasjon med gemonet, i henhold til standardteknikker.

15 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også en metode som omfatter anvendelsen av et konstrukt som erklært over i et ekspresjonssystem for å kunne ekspressere en spesifikk bindingspartner eller polypeptid som beskrevet over.

Aspekter og utførelsesformer i den foreliggende oppfinnelsen vil nå illustreres med

20 eksempler, med referanse til den følgende eksperimenteringen og de tilhørende tegningene hvor:

Figur 1 viser konsentrasjon-inhibernigskurver for antistoffnøytralisering av human (figur 1A) og rotte (figur 1B) NGF i den humane TrkA

25 reseptorkalsiummobiliseringsanalysen. Human IgG4 NGF antistoffer ble sammenlignet med de kommersielle NGF antistoffer G1131, Mab5260Z og MAB256 for inhibering av intracellulær kalsiummobilisering fremkalt av 1 nM NGF. Datapunkter indikerer resultatet fra et enkelt eksperiment og er middelerdi \pm standardavvik fra triplikate bestemmelser for hver antistoffkonsentrasjon.

30

Figur 2 viser inhibering av intracellulær kalsiummobilisering i HEK-293-celler som rekombinant uttrykker den humane TrkA-reseptoren. Potensoptimalisert humane IgG4 antistoffer ble evaluert for inhibering av responser fremkalt av 1 nM human (figur 2A), rotte (figur 2B) og mus (figur 2C) NGF. Datapunkter indikerer resultatet fra et enkelt

35 eksperiment og er middelerdi \pm standardavvik fra triplikate avlesninger for hver antistoffkonsentrasjon.

Figur 3 viser den inhibitoriske effekten av human IgG4 NGF antistoffer i PC12 celleoverlevelseanalysen. Celleoverlevelse ble opprettholdt ved tilstedeværelsen av 1 nM human NGF (figur 3A) eller rotte NGF (figur 3B). Datapunkter indikerer resultatet fra et enkelt eksperiment og er middelerdi ± standardavvik fra triplikate avlesninger fra et enkelt eksperiment.

Figur 4 visser inhibering av NGF-mediert TF-1 celleprolifisering av kimlinje og ikke-kimlinje humane IgG4 NGF antistoffer, og referanse NGF antistoffet, MAB256. Cellene ble stimulert med 200 pM humant NGF (figur 4A), rotte NGF (figur 4B) eller mus NGF (figur 4C). Data representerer middelerdien ± sem av triplikate avlesninger fra et enkelt eksperiment.

Figur 5 viser fraværet av kryssreaktivitet av det humane IgG4 NGF antistoffet 1252A5 med neurotrofinene BDNF, NT-3 og NT-4. 100 ng neurotrofin ble adsorbent per brønn. Hvert datapunkt representerer middelerdien ± standardavvik av triplikate avlesninger fra et enkelt eksperiment.

Figur 6 viser mettede bindingskurver for human ¹²⁵I-NGF-binding til de humane IgG4 NGF-antistoffer 1252A5 (figur 6A) og G1152H5 (figur 6B). Beregnede K_d-verdier er henholdsvis 0.35 nM og 0.37 nM og er resultat av et enkelt eksperiment.

Figur 7 viser mettede bindingskurver for rotte ¹²⁵I-NGF-binding til de humane IgG4 NGF-antistoffer 1252A5 (figur 7A) og G1152H5 (figur 7B). Beregnede K_d-verdier er henholdsvis 0.44 nM og 0.50 nM og er resultatet fra et enkelt eksperiment.

Figur 8 viser konsentrasjonsavhengig inhibering av human (figur 8A) eller rotte (figur 8B) ¹²⁵I-NGF-binding til TrkA-reseptor fusjonsprotein, ved human IgG4 eller referanseantistoffer. Konsentrasjonen av radiomerket NGF i hver analysebrønn var ca 150 pM. Data indikerer resultatet fra et enkelt eksperiment. Se også tabell 6 og 7.

Figur 9 viser konsentrasjonsavhengig inhibering av human (figur 9A) eller rotte (figur 9B) ¹²⁵I-NGF binding til p75 reseptorfusjonsprotein, ved human IgG4 eller referanseantistoffer. Konsentrasjonen av radiomerket NGF i hver analysebrønn er ca 150 pM. Data indikerer resultatet fra et enkelt eksperiment. Se også tabell 8 og 9.

Figur 10 visser doserelatert inhibering av karrageenanindusert termisk hyperalgesi i musen, 48 timer etter systemisk administrasjon av human IgG4 anti-NGF, 1252A5.

EKSEMPEL 1

Isolasjon av anti-NGF scFv

5 *ScFv antistoff repertoire*

Tre store enkeltkjedet Fv (scFv) humane antistoffbiblioteker klonet i et fagmidvektor ble anvendt for utvelgelses. Bibliotekene ble avledet fra (A) mildt lymfocytter (Hutchings, 2001), (B) en kombinasjon av perifere blodlymfocytter, mende B-celler og benmarg B-celler (Vaughan et al., 1996) og (C) de lette kjedene og VH CDR3-områder
10 av A kombinert med rammeverket av DP47 kimlinje tung kjede.

Seleksjon av scFv

Fagseleksjonsprosedyren anvendt var vesentlig som beskrevet i Hutchings, *supra*. ScFv som gjenkjenner NGF ble isolert fra fagfremvisningsbiblioteker i en serie av
15 seleksjonssykluser på human- og rotte-NGF. Kort forklart ble umodifisert antigen bekledd i Nunc Maxisorb-rør. Fag ble inkubert på antigenet i et totalvolum på 500 µl i 1 time før vask for å fjerne ubundet fag. Bundet fag ble deretter befridd som beskrevet av Vaughan *et al.*, *supra* og seleksjonsprosessen ble repetert. For å assistere isoleringen av human/gnager kryssreaktiv scFv ble alternative runder med seleksjon utført for de
20 respektive artsisoformene av NGF. Et maksimum på fire runder for seleksjon ble utført for ethvert bibliotek ved å anvende denne alternerende isoform seleksjonsstrategi. Enten ble human eller rotte β-NGF anvendt som det initielle antigenet for den første runden med seleksjon.

25 Produkter fra andre til fjerde runde ble prioritert for biokjemisk screening basert på prosenten av NGF-spesifikke kloner isolert og sekvensmangfoldigheten i disse klonene. Prosenten av NGF-spesifikke kloner ble bestemt i hvert tilfelle ved fag-ELISA. Sekvensmangfoldighet ble bestemt ved DNA-sekvensering.

30 *Fag ELISA protokoll*

Kulturer med fagtransduserte bakterier ble fremstilt i 1 ml 2 x TY-medium inneholdende 100 µg/ml ampicillin og 50 µg/ml kanamycin ved røring ved 30°C i 16 timer. Fagsupernatant ble fremstilt ved sentrifugering av kulturen (10 min ved 3000 rpm) og blokkert med 3% vekt/volum melkepulver i PBS i 1 time. Blokkert fag ble
35 deretter tilsatt til plater tidligere bekledd med (1 µg/ml) antigen eller irrelevant antigen. Plater ble vasket mellom hvert trinn tre ganger med PBS-Tween 20 (0.1% v/v) etter tre vask i PBS. Bundet fag ble bestemt ved inkubering med horseradish peroksidase

(HRP)/anti-M13 konjugat (Amersham UK) fortynnet 1:5000 i 3% vekt/volum melkepulver PBS i 1 t, og fremkalt ved å inkubere tetrametylbenzidin (TMB) substrat (Sigma). Den kolorimetriske reaksjonen ble stoppet etter en passende periode ved å tilsette 0.5 M svovelsyre. Absorbansesavlesning ble utført ved 450 nm. Kloner som spesifikt bant til antigenet ble identifisert til å ha et signal på antigenet større enn eller lik 5 ganger i forhold til det irrelevante antigenet.

DNA-sekvensering

Dobbeltrådet DNA-templat for sekvensering ble ervervet ved PCR av scFv ved å anvende primerne til FDTETSEQ24 (TTTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGT – SEQ ID NR.: 534) og PUCrevers (AGCGGATAACAATTTACACACAGG – SEQ ID NR.: 535). Overskudd av primer og dNTP'er fra den primære PCR-reaksjonen ble fjernet ved å anvende Macherey-Nagel Nucleofast 96-brønners PCR-plater (Millipore) i henhold til produsentens anbefalinger. VH-gener ble sekvensert med primer Lseq (GATTACGCCAAGCTTTGGAGC SEQ ID NR.: 536). VL-gener ble sekvensert med primer MYC Seq 10 (CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG SEQ ID NR.: 537). Hver reaksjonsblanding inneholdt 20-40 ng DNA, 3 – 20 pmol primer og 4 µl Big Dye Terminator V3.0 (Applied Biosystems, UK) i et volum på 20 µl. Sekvensreaksjoner bestod av 25 sykluser med 96°C 10s; 50°C, 5s; 60°C, 4 min. Prøvene ble kjørt og analysert med en Applied Biosystems 3700 DNA analysator. Arealer med tvetydighet ble analysert manuelt ved å anvende Continuity software utviklet i huset (Cambridge Antibody Technology, UK) og SeqEd DNA sekvensmanipulering programvare (Applied Biosystems, UK).

Biokjemisk screen for NGF-nøytraliserende scFv

Produktet fra fagseleksjonsprosessen ble ytterligere screenet for å identifisere kloner som inhiberer NGF-binding til en TrkA-reseptor ekstracellulære domenefusjonsprotein.

Ubearbeidede scFv-prøver ble fremstilt fra feriplasmiske lysater av *E.coli* TG-1 bakterier transfekterte med utvalgt fag for evaluering i bindingsanalysen. Nunc Maxisorb 96-brønners plater ble bekledd over natt med human TrkA reseptor ekstracellulært domenefusjonsprotein (R&D Systems; bekleddningskonsentrasjon; human NGF-analyse, 0.25 nM; rotte NGF-analyse, 1 nM). Analyseplater ble vasket med PBS / Tween 20, blokkert i 2 timer ved å anvende 1% bovint serumalbumin (BSA) i PBS, og vasket igjen. ScFv-prøver ble preinkubert i 30 min med 1 nM human eller rotte rekombinant β -NGF (R&D Systems) i 1% BSA. Prøver ble overført i et volum på 100 µl til analyseplater og reagert i 60 minutter ved romtemperatur. Plater ble vasket og

NGF som var bundet til platene ble merket ved å anvende 0.3 µg/ml av enten anti-human NGF-biotin (Peprotech) eller anti-rotte NGF-biotin (R&D Systems) fortynnet i 1% BSA, etterfulgt av inkubering i romtemperatur i 60 min. Biotinmerket anti-NGF ble observert ved å anvende DELFIA (Wallac) tidsoppløst fluoresensdeteksjonssystem.

5 Kort forklart ble platene vasket og 100 µl streptavidin Eu³⁺ ble tilsatt til hver brønn fortynnet 1/1000 i DELFIA analysebuffer. Platene ble inkubert for ytterligere 60 min ved romtemperatur og vasket med DELFIA vaskebuffer, etterfulgt av tilsats av 100 µl DELFIA forhøyelsesløsning til hver brønn. Platene ble lest ved å anvende en Wallac Victor fluorometrisk plateavleser (eksitasjonsbølgelengde 314 nm; emisjonsbølgelengde

10 615 nm).

Kloner som inhiberte både human- og rotte-NGF-binding med mer enn 70% som periplasmiske lysat scFv-preparater ble reevaluert som rensset scFv i bindingsanalysen. Rensede scFv-preparater ble fremstilt som beskrevet i eksempel 3 i WO01/66754.

15 Proteinkonsentrasjoner av rensset scFv-preparater ble bestemt ved å anvende BCA-metoden (Pierce). Reanalyser understreket det følgende scFv-antistoffer som var kraftfulle nøytralisatorer av human- og rotte-NGF-binding til human TrkA reseptor ekstracellulær domene fusjonsprotein:

20 1064F8 (VH SEQ ID NR.: 2; VL SEQ ID NR.: 7),
1022E3 (VH SEQ ID NR.: 12; VL SEQ ID NR.: 17),
1083H4 (VH SEQ ID NR.: 22; VL SEQ ID NR.: 27),
1021E5 (VH SEQ ID NR.: 32; VL SEQ ID NR.: 37),
1033G9 (VH SEQ ID NR.: 42; VL SEQ ID NR.: 47),
25 1016A8 (VH SEQ ID NR.: 52; VL SEQ ID NR.: 57),
1028F8 (VH SEQ ID NR.: 62; VL SEQ ID NR.: 67),
1033B2 (VH SEQ ID NR.: 72; VL SEQ ID NR.: 77),
1024C4 (VH SEQ ID NR.: 82; VL SEQ ID NR.: 87) og
1057F11 (VH SEQ ID NR.: 92; VL SEQ ID NR.: 97).

30

EKSEMPEL 2

Ekspresjon av humane IgG4-antistoffer og in vitro-funksjonell evaluering av NGF-nøytraliserende potens

De NGF-nøytraliserende scFv 1064F8, 1022E3, 1083H4, 1021E5, 1033G9, 1016A8,

35 1028F8, 1033B2, 1024C4 og 1057F11 ble reformatert som humane IgG4-antistoffer og analysert for NGF nøytraliserende potens i et helcelleanalysesystem.

IgG-omdannelse

Vektorer ble konstruert for de mest potente scFv-klonene å tillate reekspresjon som hel antistoff human IgG4, som essensielt er beskrevet av Persic *et al.* (1997). EBNA-293 celler opprettholdt i kondisjonert medium ble kotransfektet med konstrukter som uttrykker områder med tom og lett kjede. Helt antistoff ble rensset fra mediet ved å anvende protein A affinitetskromatografi (Amersham Pharmacia). De rensede antistoffpreparatene ble sterilfiltrert og lagret ved 4°C i fosfatbuffret salin (PBS) før *in vitro* potensevaluering. Proteinkonsentrasjon ble bestemt spektrofotometrisk i henhold til Mach *et al.* (1992).

10

FLIPR-analyse av intracellulær kalsiummobilisering

Potensen og effektiviteten til anti-humane IgG'er for å nøytralisere NGF ble bestemt i en cellebasert fluoroserende kalsium-mobiliseringsanalyse. Potensen til humane antistoffer ble sammenlignet med mus anti-humant NGF (MAB256; R&D Systems), rotte anti-mus-NGF (G1131; Promega) og mus anti-mus NGF (MAB5260Z; Chemicon). Anti-NGF IgG'er ble koinkubert med rekombinant human β -NGF (Calbiochem, 480275) eller rekombinant rotte β -NGF (R&D Systems, 556-NG-100). Komplekset ble deretter tilsatt til HEK293-celler som uttrykker humane rekombinante TrkA-reseptorer lastet med den kalsiumsensitive fargen, Fluo-4, og deretter ble Ca^{2+} -avhengig fluoressens målt.

20

HEK-celler (peak-S, Edge Biosystems) transfektet med rekombinant humant TrkA (ervert fra M. Chao, Skirball Institute, NY) ble grodd i Dulbecco's modifisert Eagle's Medium (MEM, Cellgro, MT10-017-CV) supplementert med 10% kalveserum (Hyclone, SH30071.03), 1.5 $\mu\text{g/ml}$ puromycin (Edge Biosystems, 80018) og 1% penicillin-streptomycin. Konfluente celler ble høstet ved å løsne cellene med Dulbecco's fosfatbuffret salin (DPBS), og deretter lastet med lastebuffer inneholdende 6 μM Fluo-4 (Molecular Probes) ved 37°C i 1.5 t i tilstedeværelsen av en anion transportinhibitor (2.5 mM probenecid i 1% FBS/MEM). Etter å ha vasket cellene en gang med analysebuffer (2.5 mM probenecid i 0.1% BSA Hank's / HEPES), ble cellene platet på poly-D-lysinbekledde 96-brønners plater med klar bunn (Costar #3904) med ca 60,000 celler/brønn i 120 μl . Cellene ble inkubert i mørket i 30 min ved romtemperatur, og platene ble deretter sentrifugert ved 1,200 rpm (290 x g) i 5 min. Før analyse ble platene forvarmet ved 35°C i 20 min. Test IgG'er ble analysert ved 7 konsentrasjoner i triplikate brønner. Trettifem mikroliter av 10X anti-NGF IgG og like mengder av 10 nM human-, rotte- eller mus 2.5S NGF ble preinkubert ved romtemperatur i ca 1 time. Plater inneholdende de prekomplekse IgG'er og plater inneholdende 100 μl /brønn med

35

analysebuffer ble forvarmet ved 35°C i 20 min før analyse med den fluorometriske avbildningsplateleseren (FLIPR; Molecular Devices). Etter tilsats av 80µl/brønn med analysebuffer til celleplaten og inkubering i 5 min ved 35°C, ble 50µl/brønn av fortynnet anti-human IgG / NGF-kompleks tilsatt til celleplaten i FLIPR med

5 kontinuerlig måling av den Ca²⁺-avhengige fluoresensen. NGF-indusert fluoresens ble beregnet som forskjellen mellom den grunnleggende fluoresensintensiteten før NGF-tilsatsen og høyeste fluoressensintensitet avlest i 2 minutter etter NGF-tilsats. Gjennomsnittet av triplikaten NGF-induserte fluoresensverdier i fraværet av antistoff ble derfinert som 100% kalsiummobilisering. I tilstedeværelsen av antistoff ble

10 gjennomsnittet ± standardavvik av triplikaten NGF-induserte fluoresensverdier beregnet som en prosent av kontroll kalsiummobilisering. Prosenten av kontroll kalsiummobiliseringsverdier ble plottet som en funksjon av log til IgG-konsentrasjonen. IC₅₀-verdier ble beregnet ved å tilpasse den sigmoidale doserespons (variabel kurve) funksjon ved å anvende Prism (GraphPad).

15

Alle antistoffer som ble testet fremviset konsentrasjonsrelatert inhibering av human NGF-fremkalt intracellulær kalsiummobilisering. Rangordenen av potens for nøytralisering av human NGF var 1064F8 > 1022E3 > 1083H4 ≥ 1033G9 ≥ 1016A8 ≥ 1028F8 ≥ 1021E5 ≥ 1033B2 >> 1024C4 >> 1057F11 (tabell 1). Fem antistoffer ble

20 ytterligere evaluert for funksjonell nøytralisering av rotte-NGF, og disse var ca ekvipotente mot begge artsisoformer (figurer 1A og 1B; tabell 1).

EKSEMPEL 3

Isolering av optimaliserte humane IgG4 NGF antistoffer

25

Ribosomfremvisning scFv potensoptimalisering

Store ribosom fremvisningsbiblioteker ble laget og valgt for scFv som spesifikt gjenkjenner rekombinant human NGF (R&D Systems), som er esensielt beskrevet i Hanes *et al.* (2000). Initielt ble klonene 1064F8, 1022E3, 1083H4, 1021E5, 1033G9,

30 1016A8, 1028F8, 1033B2 og 1024C4 konvertert til ribosomfremvisningsformat, hvor templatene ble påfølgende anvendt for biblioteklagint. Klonen 1057F11 ble ikke valgt for potensoptimalisering, og derfor ble ikke et ribosomfremvisningstemplat laget for dette antistoff. På DNA-nivået ble en T7-promoter tilsatt på den 5'-enden for effektiv transkripsjon til mRNA. På mRNA-nivået inneholdt konstruktet et prokaryotisk

35 ribosom-bindingssete (Shine-Dalgarno-sekvens). På den 3'-enden av enkeltkjeden, ble stoppkodonet fjernet og en del av gIII ble tilsatt for å fungere som et avstandsstykke (Hanes *et al.*, supra).

Ribosom fremvisningsbiblioteker avledet fra 1064F8, 1022E3, 1083H4, 1021E5, 1033G9, 1016A8, 1028F8, 1033B2 og 1024C4 ble laget ved å mutagenisere scFv HCDR3. PCR-reaksjonene ble utført med “non-proof reading *Taq* polymerase”. Affinitetsbaserte seleksjoner ble utført hvorved etterfulgt av inkubering med biblioteket, 5 biotinyllert human NGF ble koblet til streptavidin-beklede paramagnetiske kuler (Dynal M280). Bundet tertiære komplekser (mRNA-ribosom-scFv) ble samlet ved en magnetisk separasjon, mens ubundede komplekser ble vasket vekk. mRNA, som koder bundet scFv ble deretter befridd ved RT-PCR som beskrevet i Hanes *et al.*, (*supra*) og seleksjonsprosessen repetert med avtagende konsentrasjoner (100 nM - 10 pM over fem 10 runder) med biotinyllert human NGF tilstede under seleksjonen.

Feilindusert PCR ble også anvendt for å ytterligere øke bibliotekstørrelsen. En feilverdi på 7.2 mutasjoner per 1 000 bp ble anvendt (DiversifyTM, Clontech) iløpet av seleksjonsprosessen. Feilinduserte PCR-reaksjoner ble utført før seleksjonene 15 påbegynte runde tre og fire ved å anvende biotinyllerte humane NGF-konsentrasjoner på henholdsvis 1 nM og 0.1 nM.

En representativ del av scFv fra resultatet av seleksjonsrunde 3, 4 og 5 ble levert i pCantab6-vektor (Vaughan *et al.*, 1996) og klonet i TG1-stammen av *E.coli*. En prøve 20 av disse scFv bla DNA-sekvensert som beskrevet i eksempel 1 for å bekrefte sekvensmangfoldet i produktene før screening *in vitro* for NGF nøytraliserende aktivitet. Kloner ble screenet som urensset scFv i NGF / TrkA reseptor ekstracellulær domene fusjonsprotein bindingsanalysen som beskrevet i eksempel 1. Konsentrasjonen til de periplasmiske lysat scFv-preparatene i analysene ble redusert til 0.5% - 5% av det 25 endelige analysevolumet, og kloner som inhiberte både human- og rotte-NGF-binding >95% ble isolert for ytterligere analyse. På denne måten ble et panel av potensoptimaliserte, kryssreaktive NGF-nøytralisatorer isolert. Overraskende ble de mest potente NGF-nøytralisatorene avledet fra opphavsklonene 1021E5 og 1083H4, som ikke var de mest potente av opphavsantistoffene. Optimaliserte kloner ble 30 sekvensert og reanalysert som rensset scFv for å bekrefte potensen før reformatering til human IgG4 som beskrevet i eksempel 2.

Antistoffer avledet fra opphavsklonen 1021E5 (VH SEQ ID NR.: 32; VL SEQ ID NR.: 37) og omdannet til human IgG4-format var 1126F1 (VH SEQ ID NR.: 102; VL SEQ 35 ID NR.: 107), 1126G5 (VH SEQ ID NR.: 112; VL SEQ ID NR.: 117), 1126H5 (VH SEQ ID NR.: 122; VL SEQ ID NR.: 127), 1127D9 (VH SEQ ID NR.: 132; VL SEQ ID NR.: 137), 1127F9 (VH SEQ ID NR.: 142; VL SEQ ID NR.: 147), 1131D7 (VH SEQ

ID NR.: 152; VL SEQ ID NR.: 157), 1131H2 (VH SEQ ID NR.: 162; VL SEQ ID NR.: 167), 1132A9 (VH SEQ ID NR.: 172; VL SEQ ID NR.: 177), 1132H9 (VH SEQ ID NR.: 182; VL SEQ ID NR.: 187), 1133C11 (VH SEQ ID NR.: 192; VL SEQ ID NR.: 197), 1134D9 (VH SEQ ID NR.: 202; VL SEQ ID NR.: 207), 1145D1 (VH SEQ ID NR.: 212; VL SEQ ID NR.: 217), 1146D7 (VH SEQ ID NR.: 222; VL SEQ ID NR.: 227), 1147D2 (VH SEQ ID NR.: 232; VL SEQ ID NR.: 237), 1147G9 (VH SEQ ID NR.: 242; VL SEQ ID NR.: 247), 1150F1 (VH SEQ ID NR.: 252; VL SEQ ID NR.: 257), 1152H5 (VH SEQ ID NR.: 262; VL SEQ ID NR.: 267), 1155H1 (VH SEQ ID NR.: 272; VL SEQ ID NR.: 277), 1158A1 (VH SEQ ID NR.: 282; VL SEQ ID NR.: 287), 1160E3 (VH SEQ ID NR.: 292; VL SEQ ID NR.: 297), 1165D4 (VH SEQ ID NR.: 302; VL SEQ ID NR.: 307), 1175H8 (VH SEQ ID NR.: 312; VL SEQ ID NR.: 317), 1211G10 (VH SEQ ID NR.: 322; VL SEQ ID NR.: 327), 1214A1 (VH SEQ ID NR.: 332; VL SEQ ID NR.: 337), 1214D10 (VH SEQ ID NR.: 342; VL SEQ ID NR.: 347), 1218H5 (VH SEQ ID NR.: 352; VL SEQ ID NR.: 357) og 1230H7 (VH SEQ ID NR.: 362; VL SEQ ID NR.: 367).

Antistoffer avledet fra opphavsklonen 1083H4 (VH SEQ ID NR.: 22; VL SEQ ID NR.: 27) og omdannet til human IgG4-format var 1227H8 (VH SEQ ID NR.: 372; VL SEQ ID NR.: 377) og 1230D8 (VH SEQ ID NR.: 382; VL SEQ ID NR.: 387).

Germlining rammeverkområder av 1133C11 for å avlede 1252A5 og andre 1021E5-varianter

Undersøkelse av VH- og VL CDR-sekvensinformasjonen for optimaliserte kloner avledet fra 1021E5 understreket at en stor del av disse antistoffene inneholdt aminosyresekvensen LNPSLTA (SEQ ID NR.: 531) i VH CDR3 (det vi si aminosyrer 100A til 100G i henhold til Kabat nummereringssystem). Disse klonene er vist i tabell 2A, understreket hvorledes de varierer i aminosyresekvens i VH- og VL CDR-områder, sammen med et estimat på deres NGF-nøytraliserende potens ved analyse som rensset scFv. Av disse kloner er 1133C11 forskjellig i CDR-områdene fra 1021E5 bare ved 7 konsekutive aminosyrer 100A til 100G som beskrevet. Derfor ble 1133C11 valgt for kimlinje, først for å bekrefte at potensen forble med det modifiserte rammeverket, og for det andre å tillate introduksjon av påfølgende CDR-mutasjoner dersom ønskelig, for å kunne fremstille ytterligere interessant kimlinjeantistoffer fra den samme linjen.

De deriverte aminosyre VH- og VL-sekvensene fra 1133C11 ble oppstilt med kjente humane kimlinjesekvenser i VBASE-databasen (Tomlinson [1997], MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) og den nærmeste kimlinjen ble identifisert. Den

nærmeste kimlinjen for VH fra 1133C11 ble identifisert som DP10, et medlem av VH1-familien. 1133C11 VH har 5 aminosyreendringer fra DP10-kimlinjen i rammeverkområdene. Den nærmeste kimlinjen for VL fra 1133C11 ble identifisert som DPL5, et medlem i Vλ1-familien. 1133C11 VL har bare 4 endringer fra kimlinjen i rammeverkområdene. Rammeverkområder i 1133C11 ble returnert til kimlinje ved seterettet mutagenese av scFv for å avlede scFv 1252A5 (VH SEQ ID NR.: 392; VL SEQ ID NR.: 397). Dette ble omdannet til human IgG4 som beskrevet i eksempel 2. Kimlinje av andre varianter av 1021E5-avlede kloner ble oppnådd ved å introdusere CDR-mutasjoner i kimlinjen 1252A5 IgG4-skjelettet. Denne metode resulterte i fremstillingen av kimlinjeantistoffer G1152H5 (VH SEQ ID NR.: 402; VL SEQ ID NR.: 407), G1165D4 (VH SEQ ID NR.: 412; VL SEQ ID NR.: 417) og G1230H7 (VH SEQ ID NR.: 422; VL SEQ ID NR.: 427).

EKSEMPEL 4

15 Evaluering av optimaliserte humane IgG4-antistoffer i FLIPR-analysen av intracellulær kalsiummobilisering

Optimaliserte humane IgG4 NGF antistoffer ble evaluert i en analyse av NGF-fremkalt intracellulær kalsiummobilisering i celler som rekombinant utvikler den humane TrkA-reseptoren som beskrevet i eksempel 2. Antistoffer ble analysert for nøytraliserende aktivitet mot human, rotte og mus NGF (figurer 2A, 2B og 2C; tabell 3).

Intracellulær kalsiummobilisering fremkalt av 1nM NGF ble inhibert av alle de testede optimaliserte humane antistoffer. Optimaliserte antistoffer fremviset subnanomolare IC₅₀-verdier, som i de fleste tilfeller representerer større enn en hundreganger forhøyelse av NGF-nøytraliserende potens over opphavs-IgG'er (tabell 3). Nøytraliserende potenser (IC₅₀) av kimlinjet humane IgG4 antistoffer mot human, rotte og mus NGF-isoformene var henholdsvis:

1252A5 - 0.33nM, 0.29nM og 0.26nM;
 30 G1152H5 - 0.22nM, 0.27nM og 0.18nM;
 G1165D4 - 0.32nM, 0.33nM og 0.27nM;
 G1230H7 - 0.31nM, 0.34nM og 0.25nM.

Disse resultatene understreker effektiviteten og verdien av ribosomfremvisningsteknikken for antistoff potensoptimalisering. En mer konvensjonell tilnærming for antistoffoptimalisering har vært å fremstille fagfremvisningsbiblioteker av ulike scFv-antistoffer. Denne prosess er arbeidsintensiv og saktere enn

ribosomfremvisningsmetoden, som ofte betyr at bare en enkel opphavs-scFv anvendes som startpunktet for bibliotekkonstruksjon. Den relative lette fremstillingen av ribosom fremvisningsbiblioteket tillater at flere opphavs-scFv kan optimalisere samtidig og, som demonstrert i eksempel 3 kan føre til isoleringen av høyt potente antistoffer avledet fra opphavsklonene som på en annen måte kunne ha blitt oversett for optimalisering.

EKSEMPEL 5

Evaluerings av optimaliserte humane IgG4-antistoffer i en PC12 celleoverlevelsesanalyse

I PC12-analysen, opprettholder NGF overlevelsen til serumberøvede rotte PC12-celler som utvikler naturlig TrkA- og p75-reseptorer i to dager. Nøytraliserende NGF antistoffer reduserer celleoverlevelse målt med AlamarBlue.

Rat peokromocytoma PC12-celler ble grodd i RPMI 1640 (Cellgro, 18040181) supplementert med 5% fetalt kalveserum (JRH,12103-78P), 10% varmeinaktivert donor hesteserum (JRH, 12446-77P), og 1% penicillin-streptomycin. Cellene ble høstet ved triturering, og deretter vasket to ganger med serumfritt RPMI 1640 inneholdende 0.01% BSA (Sigma, A7030). Cellene ble platet ut på rottehalekollagen (Biological Technology Institute, BT-274)-beklede 96-brønners plater ved 50 000 celler/brønn i 120 µl serumfritt medium med 0.01% BSA. Seriefortynninger med 5X anti-human NGF IgG'er ble dannet ved å anvende serumfritt medium og 40 µl/brønn ble tilsatt til celleplaten. 40 µl/brønn av 0.5 nM human β-NGF (Calbiochem, 480275) eller rotte rekombinant NGF (R&D Systems, 556-NG-100) ble tilsatt til platen, og det totale volumet ble fylt til 200 µl/brønn med serumfritt medium. Maksimal celledød ble definert ved 80 µl/brønn av serumfritt medium i triplikate brønner. 100% overlevelse ble definert med 40µl/brønn med serumfritt medium og 40µl/brønn med 0.5 nM NGF i triplikate brønner. Platene ble inkubert ved 37°C i 5% CO₂ i 48 timer. For å måle levedyktigheten til cellene ble 22 µl/brønn med AlamarBlue tilsatt og platene ble lest umiddelbart for å bestemme bakgrunnsfluoresensen i hver brønn med en fluorometrisk plateleser (BMG) ved 530 nm eksitasjonsbølgelengde og 590 nm emisjonsbølgelengde. Etter en inkuberingsperiode på 6-7 t ved 37°C ble platen lest igjen for å bestemme den totale fluoressens. Alamar Blue fluoressensen ble beregnet som forskjellen mellom baktgrunns- og total fluoressensintensiteter. I tilstedeværelsen av antistoff ble gjennomsnittet ± standardavvik av triplikatet fluoressensverdier beregnet som en prosent av gjennomsnittet av triplikatet 100% overlevelsesfluoressensverdier. Prosenten av kontroll overlevelsesverdier ble plottet som funksjon av log til IgG-konsentrasjonen.

IC₅₀-verdier ble beregnet ved å tilpasse den sigmoidale dose-respons (variabel kurve) funksjon ved å anvende prism (GraphPad).

Resultatene fra PC12-analysen bekreftet ytterligere den økte potensen av optimaliserte humane IgG4 NGF-antistoffer i forhold til deres opphav IgG'er. Antistoffer inhiberte human og rotte-NGF-oppretholdende PC12 celleoverlevelse på en konsentrasjonsrelatert måte (figurer 3A og 3B; tabell 3). Hver kimlinje så ut til å redusere den NGF-nøytraliserende potens til testantistoffene, særlig mot rotte-NGF-isoformen. For eksempel var middelverdien IC₅₀ til det kimlinjede antistoffet G1152H5 for inhibering av celleoverlevelse mediert av 1 nM human- eller rotte-NGF henholdsvis 1.1 nM og 7.3 nM. I kontrast var middelverdien for IC₅₀ verdien for nøytraliserende av 1 nM human- eller rotte-NGF av 1152H5 (det vil si ikke-kimlinjeantistoff) henholdsvis 0.40 nM og 0.38 nM.

15 **EKSEMPEL 6**

NGF-nøytraliserende aktivitet i en TF-1 celleprolifereringsanalyse

TF-1 cellelinjen er en human premyloid cellelinje som kan stimuleres til å prolifereres av eksogene vekstfaktorer og cytokiner. TF-1-celler uttrykker den humane TrkA-reseptoren og prolifererer i respons på aktivering med NGF. TF-1 celleprolifereringscelleanalyse ble anvendt for ytterligere å karakterisere den in vitro-funksjonelle potens til nøytraliserende humane IgG4 NGF-antistoffer.

TF-1 celler ble ervervet fra R&D Systems og opprettholdt i henhold til vedlagte protokoller. Analysemedium bestod av RPMI-1640 med GLUTAMAX I (Invitrogen) inneholdende 5% fetalt kalveserum (Hyclone) og 1% natriumpyruvat (Sigma). Før hver analyse ble TF-1 cellene pelletert ved ssentrifugering ved 300 x g i 5 minutter, mediet ble fjernet ved aspirasjon og cellene ble resuspendert i analysemedium. Denne prosessen ble repetert tre ganger med cellene resuspendert i en sluttkonsentrasjon på 10⁵ /ml i analysemediet på 100 µl ble tilsatt til hver brønn i en 96-brønners flatbundet vevskulturanalyseplate til å gi en celledetthet til slutt på 1x10⁴/brønn. Testløsninger av antistoffer (i triplikat) ble fortynnet til å gi en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml i analysemedium og titrert 1:5 over analyseplate. Et urelevant antistoff (CAT-001) ikke rettet mot NGF, ble brukt som en negativ kontroll. I tillegg ble et referanse monoklonalt antistoff MAB256 (R&D Systems) anvendt som en positiv kontroll. 50 µl med testantistoffer ble deretter tilsatt til hver brønn etterfulgt av 50 µl av naturlig rensset mus (7S form; Invitrogen), rotte (Sigma) eller human (Sigma) NGF-fortynnet til å gi en

sluttkonsentrasjon på 200 pM. Analyseplater ble inkubert i 68 timer ved 37°C i 5% CO₂ i et fuktingskammer. Tyve mikroliter med tritsiert tymidin (5.0 µCi/ml, NEN) ble deretter tilsatt til hver analysebrønn og analyseplater ble returnert til inkubatoren for ytterligere 5 timer. Cellene ble høstet på 96 brønners glassfiberfilterplater (Perkin Elmer) ved å anvende en cellehøster. MicroScint 20TM (50 µl) ble deretter tilsatt til hver brønn i filterplaten og [³H]-tymidin innkorporering ble kvantifisert ved å anvende en Packard TopCount mikroplate væske scintillasjonsteller. I tilstedeværelsen av antistoff ble tymidininkorporering (kvantifisert som tellinger per minutt) beregnet som forskjellen mellom gjennomsnittsbakgrunne (det vil si celler som ikke var eksponert for NGF) det totale gjennomsnittet (det vil si celler stimulert med NGF). Tellinger per minutt og uttrykt som en prosent av maksimumprolifisering. Prosent av maksimumprolifisering ble plottet som en funksjon av log til IgG-konsentrasjonen. IC₅₀-verdier ble beregnet ved å tilpasse den sigmoidale dose (variabel kurve) funksjon ved å anvende GraphPad prism.

15

Humane IgG4 NGF antistoffer var potente inhibitorer for TF-1 celleprolifisering mediert av human, rotte og mus NGF-isoformer (figurer 4A, 4B og 4C). Disse resultatene demonstrerer at antistoffer avledet fra 1021E5-linjen kan stoppe NGF-signalisering mediert med aktivernig av naturlige humane NGF-reseptorer in vitro. I henhold til den observerte aktiviteten til de humane NGF-antistoffer i PC12-celleoverlevelsesanalysen (eksempel 5), var ikke-kimlinjeantistoffer mer potente enn deres kimlinjemotparter i TF-1 prolifereringsanalysen (tabell 3). Basert på middelverdi av IC₅₀-data, var rangeringsorden for potens til antistoffene testet for inhibering av proliferering mediert av 200 pM human NGF 1133C11 > 1152H5 > 1252A5 = G1152H5 >> MAB256.

25

EKSEMPEL 7

Kryssreaktivitet av anti-NGF IgG'er med andre neurotrofiner

ELISA'er ble utført for å bestemme kryssreaktiviteten til anti-NGF IgG'er for andre neurotrofiner. ELISA'er besto av beklede plater med 100 ng/brønn human NGF (R&D systemes, 256-GF), hjerneavledet neurotrofisk faktor (BDNF; R&D systemes, 248-BD), neurotrofin-3 (NT-3; R&D systemes, 257-N3) eller neurotrofin-4 (NT4; R&D systemes, 257-N4) ved romtemperatur i 5-6 t, etterfulgt av å blokkere platene med 0.25% HSA ved 4⁰C over natt. Økende konsentrasjoner av anti-NGF IgG, fra 0.03 – 10 nM, ble inkubert ved romtemperatur i 2 t for å tillate binding til hver neurotrofin. Anti-NGF IgG'er ble observert med et biotinylerert anti-humant polyklonalt antistoff (1:300)

35

(Rockland 609-1602), streptavidinkoblet alkalisk fosfatase (1:1000) og fluoreserende Substrat A. Positive kontroller, som demonstrerte neurotrofinbinding til platen, benyttet kommersielt biotinylerede anti-humane polyklonale antistoffer (R&D Systems anti-NGF BAF 256, anti-BDNF BAM 648, anti-NT-3 BAF 267, anti-NT-4 BAF 268), som ble observert direkte ved å anvende streptavidinkoblet alkalisk fosfatase og påfølgende tilsats av substrat A. Ikke-spesifikk binding ble bestemt ved å anvende brønner bekledd med BSA i stedet for neurotrofin. Produktutvikling ble fulgt over en tid fra 0 – 60 min etter tilsats av substrat A. Anti-NGF IgG 1064F8 ble anvendt for å optimalisere analysen. For 1064F8 var det en lineær produktutvikling i 15 min, som deretter minsket med tid, trolig på grunn av substratutarming. Kryssreaktiviteter ble beregnet som en prosent av den spesifikke binding til neurotrofin relativ til NGF for alle konsentrasjoner av IgG. For høyaffinitet IgG'er slik som 1064F8, ble prosentvise kryssreaktiviteter beregnet ved å anvende 15 min produkt utviklingsdata. For IgG'er med lav affinitet slik som 1016A8, ble prosentvise kryssreaktiviteter beregnet ved å anvende 60 min produktutviklingsdata.

15

Kryssreaktivitetene til syv humane IgG4 NGF antistoffer mot BDNF, NT-3 og NT-4 relativ til NGF ble bestemt. Ved de testede konsentrasjonene viste alle syv antistoffer neglisjerbar kryssreaktivitet (tabell 4). For eksempel var de høyeste observerte nivåene av kryssreaktivitet for 1252A5 med NT-3, NT-4 og BDNF henholdsvis 1.1%, 0.9% og 1.4% (figur 5).

20

EKSEMPEL 8

Bestemmelse av NGF-bindingsaffiniteten til humane NGF-antistoffer

NGF-bindingsaffiniteter til humane IgG4 NGF-antistoffer ble bestemt ved å anvende et radioligand-bindingsanalyseformat utført ved romtemperatur. Kort forklart ble flashplater (Perkin Elmer SMP200) bekledd med 100µl/brønn av 2.2µg/ml geit anti-human IgG (Sigma-Aldrich, UK) i fosfatbuffret salin (PBS) i 1 t. Brønnene ble vasket med PBS og deretter blokkert i 1 t med 200µl/brønn med PBS-inneholdende 3% vekt/volum bovinserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, UK). Brønnene ble vasket med PBS og 10 ng human NGF antistoff ble tilsatt til hver brønn i et volum på 0.1 ml PBS inneholdende 0.5% vekt/volum BSA. Etterfulgt av inkubering i en time ble platene vasket med PBS.

35

Radioionert humant og rotte-NGF ble ervervet fra Amersham UK (human ¹²⁵I-NGF, Amersham cat. no. IM286; rotte ¹²⁵I-NGF, spesial-merket rekombinant rotte β-NGF anskaffet fra R&D Systems, cat. no. 556-GF-100). Hver ¹²⁵I-NGF-isoform var fortynnet

i serier i analysebuffer (PBS inneholdende 0.5% vekt/volum BSA og 0.05% vekt/volum Tween 20) og duplikatet 100 μ l prøver ble tilsatt til analyseplaten for å gi et mål på 'total binding' over konsentrasjonsrekkevidden fra 2 pM-15 nM. Ikke-spesifikk binding (NSB) ble bestemt ved hver 125 I-NGF-konsentrasjon ved å måle binding i tilstedeværelsen av et stort overskudd av ikke-radiomerket NGF. NSB-brønner inneholdende 125 I-NGF (2 pM-15 nM) sammen med en sluttkonsentrasjon på 500 nM umerket human β -NGF (R&D Systems Cat. No. 256-GF-100) eller rotte β -NGF (R&D Systems Cat. No. 556-GF-100), som passende. Platene ble inkubert over natt, og brønnene telt i 1 minutt på en γ -teller (TopCount NXT, Perkin Elmer). Spesifikk binding ble beregnet i henhold til formelen "spesifikk binding = total binding – ikke-spesifikk binding". Bindingskurver ble plottet og bindingsparametere bestemt i henhold til et setemetningsbindingsmodell ved å anvende Prism software (GraphPad Software Inc., USA).

Human og rotte 125 I-NGF fremviste mettet, høy affinitetsbinding til de humane IgG4 NGF-antistoffer, 1252A5 og G1152H5 (figurer 6 og 7). Beregnede K_d -verdier for bindingsinteraksjonen med human 125 I-NGF var 0.35 nM for 1252A5, og 0.37 nM for G1152H5. K_d -verdier for rotte 125 I-NGF-binding var 0.44 nM for 1252A5 og 0.50 nM for G1152H5.

20

EKSEMPEL 9

Bestemmelse av K_i -verdier for inhibering av NGF-binding til humane TrkA og p75 reseptorer

Eksperimentene ble utført for å bestemme om antistoffene 1252A5 og G1152H5 fremviste differensiell inhibering av NGF-binding til TrkA og p75-reseptorer. Konkurrerende bindingseksperimenter ble formgitt for å kunne beregne bindingsinhiberingskonstant (K_i) verdier. IC_{50} 'er ble beregnet for antistoff-mediert inhibering av radiomerket human eller rotte NGF-binding til human TrkA- eller p75-reseptor fusjonsproteiner. K_i -verdier ble deretter avledet ved å anvende Cheng-Prusoff likning.

Human TrkA og p75-reseptor fusjonsproteiner (R&D Systems) ble fortynnet i Dulbecco's PBS (Gibco) til sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 10 nM og 0.6 nM. Maxisorp Nunc hvite 96 brønners mikrotiterplater (Nalge Nunc) ble bekledd over natt ved 4°C med 100 μ l/brønn av den fortynnede TrkA eller p75 reseptorløsningen. Platene ble vasket tre ganger med PBS Tween 20, og deretter blokkert med 200 μ l/brønn 3%

vekt/volum bovint serumalbumin (BSA) i PBS. Platene ble vasket ved 1 times inkubering ved romtemperatur. Testantistoffene ble fortynnet til den ønskede konsentrasjonen i analysebuffer (0.5% vekt/volum BSA og 0.05% vekt/vekt Tween 20 i PBS). Et urelevant antistoff, ikke rettet mot NGF, ble anvendt som negativ kontroll mens ikke-radiomerket NGF ble anvendt som en referanseinhibitor for radioligandbinding. Duplikate brønner ble preparert for hver konsentrasjon med testprøve. Human eller rotte ¹²⁵I-NGF (Amersham Biosciences) ble fortynnet med analysebuffer slik at sluttkonsentrasjonen i analysebrønnene blandet med testprøven var 150 pM i et totalt volum på 100 µl. Analyseplatene ble inkubert ved romtemperatur i 2 t før vask med PBS/Tween 20 for å fjerne ubundet ¹²⁵I-NGF. Bundet radioaktivitet ble kvantifisert ved tilsats av 100µl/brønn med Microscint 20 (Perkin Elmer) etterfulgt av telling ved å anvende Packard TopCount mikroplate væskescintillasjonsteller. Data ble plottet og analysert ved å anvende Graphpad Prism software for å beregne IC₅₀-verdier for hvert eksperiment, og for å avlede den korresponderende Ki i henhold til Cheng-Prusoff likningen;

$$K_i = IC_{50} / (1 + D / K_d)$$

hvor:

D = NGF-konsentrasjonen i analysen (nominelt 150 pM, men faktiske analysekonsentrasjoner ble bestemt for hvert eksperiment)

K_d = affiniteten til NGF for TrkA eller p75-reseptoren under identiske analyseforhold. Dette ble bestemt ved mettede bindingsanalyser av ¹²⁵I-NGF-binding til TrkA og p75-reseptorer i separate eksperimenter.

25

Alle antistoffene som ble evaluert, foruten den humane IgG4-kontrollen, inhiberte human og rotte ¹²⁵I-NGF-binding til humane TrkA og p75-reseptorer (figurer 8 og 9; tabell 5). Tabell 6 viser IC₅₀- og Ki-verdier beregnet fra data vist i figur 8A; tabell 7 viser IC₅₀- og Ki-verdier beregnet fra data vist i figur 8B; tabell 8 viser IC₅₀ og Ki-verdier beregnet fra data vist i figur 9A; tabell 9 viser IC₅₀- og Ki-verdier beregnet fra data vist i figur 9B. Antistoffet 1252A5 viste konsistent den største potensen for ¹²⁵I-NGF bindingsinhibering. Bindingsinhiberingskonstantverdier bestemt for 1252A5-mediert inhibering av NGF-binding til TrkA og p75 reseptorer var betydelig ulike. Således var den beregnede middelverdi for pKi for inhibering av human NGF-binding til TrkA og p75 henholdsvis 10.26 ± 0.08 og 9.85 ± 0.04 , (P<0.01, Student's T-test; begge n=3). Beregnede middelverdier for pKi for inhibering av rotte-NGF til TrkA og p75-reseptorer var henholdsvis 9.79 ± 0.04 og 9.55 ± 0.03 , (P<0.05, Student's T-test;

begge $n=3$). Dette resultatet antyder at 1252A5 er en foretrukken inhibitor for interaksjonen mellom NGF- og TrkA-reseptoren, og uforventet skaper kontrast til resultatene ervervet med G1152H5 hvor det var ingen betydelig forskjell mellom de korresponderende pK_i -verdier (tabell 5).

5

EKSEMPEL 10

Antihyperalgesisk aktivitet til humane IgG4 NGF-antistoffer

Den antihyperalgesiske aktiviteten til NGF antistoffer ble evaluert i en musemodell på karagenan-indusert termisk hypersensitivitet. Hannmus (20-25 g kroppsvekt) ble intielt
10 aklimatisert til testanordningen i to timer. Den påfølgende dagen ble bakgrunnsmålinger på mottagelighet for termisk stimulering av begge bakre poter bestemt. En fokusert varmekilde ble påført den plantare bakre poteoverflate, og latensen tilbaketrekning ble målt, i henhold til metoden til Hargreaves *et al.* (1988). Bakgrunnsverdier ble beregnet
15 som middelverdien av triplikate avlesninger for hver pote målt med 10 minutters mellomrom. Musene fikk deretter intraperitoneal injeksjon med NGF-nøytraliserende humant IgG4-antistoff eller kontroll isotype-matchet null antistoff i fosfatbuffret salin (PBS) vehikkel. 24 timer senere ble inflammatorisk hyperalgesi induert ved subplantar injeksjon av karagenan (2% vekt/volum i PBS; 30 μ l injeksjonsvolum). Etter en
20 ytterligere 24 t periode, ble igjen latens for tilbaketrekking bestemt for betente og ikke-betente bakre poter.

Termisk hyperalgesi observert 24 timer etter karagenal injeksjon ble doseavhengig inhibert ved forbehandling av mus med human IgG4 NGF-antistoff 1252A5 (figur 10).

25

REFERANSER

- Al-Lazikani, *et al.* Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
30 Aloe, L. and Tuveri, M.A. (1997) Clin Exp Rheumatol, **15**(4): 433-8.
Amann, R. and Schuligoi R. (2000) Neurosci Lett, **278**(3): 173-6.
Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4th edition 1999
35 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813

- Bennett, D.L. et al. (1998) *Eur J Neurosci*, **10**(4): 1282-91.
- Bennett, D.L. (2001) *Neuroscientist*, **7**(1): 13-7.
- Bergmann I. *et al.*, *Neurosci Lett.*, **255**(2) 87-90, 1998
- Bird et al, *Science*, 242, 423-426, 1988;
- 5 de Castro,F. et al. (1998) *Eur J Neurosci*, **10**(1): 146-52.
- Chadd HE and Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
- Cho, H.J. et al. (1996) *Brain Res*, **716**(1-2): 197-201.
- Chothia, *et al.* *Science*, 223,755-758 (1986)
- Chothia C. et al. *Journal Molecular Biology* (1992) 227, 799-817
- 10 *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1988
- Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369
- 15 Fjell, J. et al. (1999) *J Neurosci Res*, **57**(1): 39-47.
- Garaci, E. et al. (2003)*Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(15): 8927-8932.
- Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*. ISBN: 0-8247-0487-8
- 20 Gram *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**:3576-3580
- Guex, N. and Peitsch, M.C. *Electrophoresis* (1997) 18, 2714-2723
- Hanes *et al.*, *Methods in Enzymology*, 328: 24, (2000)
- Hargreaves *et al.*, *Pain*, 32: 77 (1988)
- Heumann, R. et al. (1987) *J Cell Biol*, **104**(6): 1623-31.
- 25 Holliger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449 1993
- Holliger, P. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
- Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- Hongo, J.S. et al. (2000) *Hybridoma* **19**(3): 215-227.
- Hoyle, G.W. (2003) *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**(6): 551-8.
- 30 Hu, S. et al, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.
- Huang,E.J. and Reichardt, L.F. (2001) *Ann Rev Neurosci*, **24**: 677-736.
- Huston et al, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- Hutchings, in *Antibody Engineering*, Konterman and Dubel eds., Springer, Berlin, pp. 93-108 [2001]
- 35 Indo, Y. (2002) *Clin Auton Res*, **12** Suppl 1: I20-32.
- Jagger, S.I. et al. (1999) *Br J Anaesth*, **83**(3): 442-8.

- Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987
- Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
- 5 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
- Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press.
- Knappik et al. J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86
- 10 Koltzenburg, M. et al. (1999) Eur J Neurosci, **11**(5): 1698-704.
- Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545.
- Krebs et al. Journal of Immunological Methods 254 2001 67–84
- Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective
 15 (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089
- Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418.
- Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
- Lommatzsch, M. et al. (2003) Ann NY Acad Sci, **992**: 241-9.
- 20 Lowe, E.M. et al. (1997) Br J Urol, **79**(4): 572-577.
- Ma, Q.P. and Woolf, C.J. (1997) Neuroreport, **8**(4): 807-10.
- Mach *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 200: 74, (1992)
- Mamet, J. et al. (2003) J Biol Chem, **278**(49): 48907-13.
- Marks *et al Bio/Technology*, 1992, **10**:779-783
- 25 McArthur, J.C. et al. (2000) Neurology, **54**(5): 1080-8.
- McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554
- Mendell, L.M. and Arvanian, V.L. (2002) Brain Res Rev, **40**(1-3): 230-9.
- Mendez, M. et al. (1997) Nature Genet, **15**(2): 146–156.
- Nakagawara, A. (2001) Cancer Lett, **169**(2): 107-14.
- 30 Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828
- Owolabi, J.B. et al. (1999) J Pharmacol Exp Ther, **289**(3): 1271-6.
- Persic *et al.*, *Gene*, 187: 9, (1997)
- Petty, B.G. et al. (1994) Ann Neurol, **36**(2): 244-6.
- 35 Pleuvry B. & Pleuvry A., (2000) Analgesia: Markets and Therapies, ISBN 1860674143
- Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)
- Pozza, M., et al. (2000) J Rheumatol, **27**(5): 1121-7.

- Priestley, J.V. et al. (2002) *Can J Physiol Pharmacol*, **80**(5): 495-505.
- Qiao, L.Y. and Vizzard, M.A. (2002) *J Comp Neurol*, **454**(2): 200-11.
- Ramer, M.S. et al. (1998) *Neurosci Lett*, **251**(1): 53-6.
- Ramer, M.S. et al. (1999) *Pain*, Suppl 6: S111-20.
- 5 Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- Ridgeway, J. B. B. et al, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996
- Ro, L.S. et al. (1999) *Pain*, **79**(2-3): 264-74.
- Robinson, J. R. ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- 10 Sah, D.W. et al. (2003) *Nat Rev Drug Discov*, **2**(6): 460-72.
- Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sammons, M.J. et al. (2000) *Brain Res*, **876**(1-2): 48-54.
- Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* **263**:551-567
- 15 Stemmer, *Nature*, 1994, **370**:389-391
- Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology* **14** 309-314, 1996.
- Voet & Voet, *Biochemistry*, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)
- Whitelegg, N.R.u. and Rees, A.R (2000). *Prot. Eng.*, 12, 815-824
- 20 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
- Wold, *et al.* *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics –Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht,
- 25 Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
- Woolf, C.J. (1996) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**(1338): 441-8.
- Yasuda, H. et al. (2003) *Prog Neurobiol*, **69**(4): 229-85.
- Zhang YH, Nicol GD. *Neurosci Lett*. 2004 Aug 12;366(2):187-92.

Tabell 1

Nøytraliserende potens til humane IgG4 NGF-antistoffer i kalsium mobiliseringsanalysen.

Antistoff	Human NGF IC₅₀ (nM)	Rotte-NGF IC₅₀ (nM)
Mab256	0.76 ± 0.15 ^a	0.79 ± 0.08 ^b
1064F8	2.5 ± 0.6 ^c	5.5
1022E3	18 ± 6 ^c	14
1083H4	30	61 ^e
1021E5	76	75 ^e
1033G9	55 ± 20 ^c	26
1016A8	65 ± 12 ^b	14
1028F8	73	ND
1033B2	85	ND
1024C4	410 ± 120* ^c	565*
1057F11	3700*	ND

- 5 Data indikerer middelverdi av to separate avlesninger, foruten ^an=14, ^bn=12, ^cn=3, ^dn=4 (middelverdi ± sem) og ^en=1. *Verdier bestemt ved ekstrapollering. ND = ikke bestemt.

Tabell 2a CDR'et av 1021E5-avlede optimaliserte kloner inneholdende HCDR3-sekvensen LNPSLTA (SEQ ID NR. 531)

Klone nummering	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Linker	LCDR1	LCDR2	LCDR3	scFv IC50 in hu NGF binding assay (nM)	scFv IC50 in rat NGF binding assay (nM)
LOT1021E05	T Y G I S G I I P I F D T G N S A Q S F Q G S S R I Y D Y A G G D H Y Y Y D M D V				S G S S S N I G N N Y V S D N N K R P S G T W D S S L S A W V			94	269
LOT1131H02			L N P S L T A		T			<0.01	0.09
LOT1132H09			L N P S L T A		D			0.54	0.68
LOT1133C11			L N P S L T A			T		1.93	1.24
LOT1134D09			L N P S L T A				G	0.14	0.20
LOT1146D07			L N P S L T A		T			0.23	0.02
LOT1147A03		A	L N P S L T A		G			2.38	0.14
LOT1147D02	V		L N P S L T A					<0.01	0.10
LOT1147F02			L N P S L T A					0.76	1.04
LOT1147G09	A		L N P S L T A					0.25	0.01
LOT1149D09			L N P S L T A				A	0.01	0.12
LOT1150D09			L N P S L T A		D			0.70	0.14
LOT1150F01			L N P S L T A					0.20	0.16
LOT1150G08			L N P S L T A					0.20	0.54
LOT1152D05		D	L N P S L T A					0.67	0.06
LOT1152G10			L N P S L T A		G			0.23	0.05
LOT1159G06		V S	L N P S L T A		P			0.32	1.05
LOT1160E03			L N P S L T A					0.14	0.22
LOT1165D04			L N P S L T A		N			0.11	0.29
LOT1215A06		N	L N P S L T A					1.43	0.06
LOT1218H05			L N P S L T A					<0.01	0.03
LOT1219D09		S	L N P S L T A		R			0.06	0.11

Kolonnene på høyre side i tabellen viser et estimat av NGF nøytraliserende potenser (IC50) for hver klon. Renset scFv ble analysert i en NGF-bindingsanalyse som beskrevet i eksempel 3.

Tabell 2B SEQ ID NR korresponderer til CDR-sekvensene til klonene vist i tabell 2a

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
LOT1021E05	SEQ ID NR.: 33	SEQ ID NR.: 34	SEQ ID NR.: 35	SEQ ID NR.: 38	SEQ ID NR.: 39	SEQ ID NR.: 40
LOT1131H02	SEQ ID NR.: 163	SEQ ID NR.: 164	SEQ ID NR.: 165	SEQ ID NR.: 168	SEQ ID NR.: 169	SEQ ID NR.: 170
LOT1132H09	SEQ ID NR.: 183	SEQ ID NR.: 184	SEQ ID NR.: 185	SEQ ID NR.: 188	SEQ ID NR.: 189	SEQ ID NR.: 190
LOT1133C11	SEQ ID NR.: 193	SEQ ID NR.: 194	SEQ ID NR.: 195	SEQ ID NR.: 198	SEQ ID NR.: 199	SEQ ID NR.: 200
LOT1134D09	SEQ ID NR.: 203	SEQ ID NR.: 204	SEQ ID NR.: 205	SEQ ID NR.: 208	SEQ ID NR.: 209	SEQ ID NR.: 210
LOT1146D07	SEQ ID NR.: 223	SEQ ID NR.: 224	SEQ ID NR.: 225	SEQ ID NR.: 228	SEQ ID NR.: 229	SEQ ID NR.: 230
LOT1147A03	SEQ ID NR.: 433	SEQ ID NR.: 434	SEQ ID NR.: 435	SEQ ID NR.: 438	SEQ ID NR.: 439	SEQ ID NR.: 440
LOT1147D02	SEQ ID NR.: 233	SEQ ID NR.: 234	SEQ ID NR.: 235	SEQ ID NR.: 238	SEQ ID NR.: 239	SEQ ID NR.: 240
LOT1147F02	SEQ ID NR.: 443	SEQ ID NR.: 444	SEQ ID NR.: 445	SEQ ID NR.: 448	SEQ ID NR.: 449	SEQ ID NR.: 450
LOT1147G09	SEQ ID NR.: 243	SEQ ID NR.: 244	SEQ ID NR.: 245	SEQ ID NR.: 248	SEQ ID NR.: 249	SEQ ID NR.: 250
LOT1149D09	SEQ ID NR.: 453	SEQ ID NR.: 454	SEQ ID NR.: 455	SEQ ID NR.: 458	SEQ ID NR.: 459	SEQ ID NR.: 460
LOT1150D09	SEQ ID NR.: 463	SEQ ID NR.: 464	SEQ ID NR.: 465	SEQ ID NR.: 468	SEQ ID NR.: 469	SEQ ID NR.: 470
LOT1150F01	SEQ ID NR.: 253	SEQ ID NR.: 254	SEQ ID NR.: 255	SEQ ID NR.: 258	SEQ ID NR.: 259	SEQ ID NR.: 260
LOT1150G08	SEQ ID NR.: 473	SEQ ID NR.: 474	SEQ ID NR.: 475	SEQ ID NR.: 478	SEQ ID NR.: 479	SEQ ID NR.: 480
LOT1152D05	SEQ ID NR.: 483	SEQ ID NR.: 484	SEQ ID NR.: 485	SEQ ID NR.: 488	SEQ ID NR.: 489	SEQ ID NR.: 490
LOT1152G10	SEQ ID NR.: 493	SEQ ID NR.: 494	SEQ ID NR.: 495	SEQ ID NR.: 498	SEQ ID NR.: 499	SEQ ID NR.: 500
LOT1156G06	SEQ ID NR.: 503	SEQ ID NR.: 504	SEQ ID NR.: 505	SEQ ID NR.: 508	SEQ ID NR.: 509	SEQ ID NR.: 510
LOT1160E03	SEQ ID NR.: 293	SEQ ID NR.: 294	SEQ ID NR.: 295	SEQ ID NR.: 298	SEQ ID NR.: 299	SEQ ID NR.: 300
LOT1165D04	SEQ ID NR.: 303	SEQ ID NR.: 304	SEQ ID NR.: 305	SEQ ID NR.: 308	SEQ ID NR.: 309	SEQ ID NR.: 310
LOT1215A06	SEQ ID NR.: 513	SEQ ID NR.: 514	SEQ ID NR.: 515	SEQ ID NR.: 518	SEQ ID NR.: 519	SEQ ID NR.: 520
LOT1218H05	SEQ ID NR.: 353	SEQ ID NR.: 354	SEQ ID NR.: 355	SEQ ID NR.: 358	SEQ ID NR.: 359	SEQ ID NR.: 360
LOT1219D09	SEQ ID NR.: 523	SEQ ID NR.: 524	SEQ ID NR.: 525	SEQ ID NR.: 528	SEQ ID NR.: 529	SEQ ID NR.: 530

Tabell 3 NGF-nøytraliserende potenser til optimaliserte humane IgG4-antistoffer i tre analyser av NGF-funksjon i hele celler

IgG	FLIPR kalsiummobilisering			PC12 celleoverlevelse			TF-1 celleprolifisering		
	Human NGF	Rotte NGF	IC ₅₀ (nM)	Human NGF	Rotte NGF	IC ₅₀ (nM)	Human NGF	Rotte NGF	IC ₅₀ (nM)
1021E5	-	76	75	47	1300 ^j				
1083H4	-	30 ^a	61	54	1100 ^j				
1126F1	1021E5	0.35	0.15	0.22	2.9				
1126G5	1021E5	0.23	0.16	0.16	1.50				
1126H5	1021E5	0.38	0.15	0.23	8.7				
1127D9	1021E5	0.40	0.22	0.21	0.57				
1127F9	1021E5	0.36	0.14	0.20	0.59				
1131D7	1021E5	117	37	71	670				
1131H2	1021E5	0.27	0.11	0.12	0.58				
1132A9	1021E5	0.39	0.25	0.33	0.90				
1132H9	1021E5	0.35	0.13	0.16	0.55				
1133C11	1021E5	0.45 ^a	0.30 ^a	0.28 ^a	0.53 ± 0.13 ^b	0.10 ± 0.01 ^d	0.42 ± 0.07 ^b	0.12 ± 0.02 ^d	0.10 ± 0.02 ^d
1134D9	1021E5	0.31 ^a	0.14 ^a	0.16 ^a	0.54				
1145D1	1021E5	0.36	0.17	0.24	0.66				
1146D7	1021E5	0.38	0.33	0.31	0.48				
1147D2	1021E5	0.36	0.21	0.24	0.51				
1147G9	1021E5	0.30 ± 0.04 ^b	0.21 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.76 ± 0.06 ^b	0.55 ± 0.02 ^b			
1150F1	1021E5	0.32	0.15	0.19	0.47				

Tabell 3 (forts.)

IgG	FLIPR kalsiummobilisering			PC12 celleoverlevelse			TF-1 celleprolifisering		
	Human NGF	Rotte NGF	Mus NGF	Human NGF	Rotte NGF	Human NGF	Human NGF	Rotte NGF	Mus NGF
IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
1152H5	0.22 ± 0.05 ^b	0.21 ± 0.05 ^b	0.14 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.04 ^e	0.38 ± 0.04 ^e	0.26 ± 0.25 ^d	0.08 ± 0.0 ^d	0.07 ± 0.0 ^d	
1155H1	0.35	0.18	0.18	0.59					
G1152H5	0.22	0.27	0.18	1.1 ± 0.1 ^b	7.3 ± 0.9 ^b	0.44 ± 0.17 ^d	1.44 ± 0.27 ^d	0.99 ± 0.29 ^d	
1158A1	0.34	0.12	0.11	0.48					
1160E3	0.33	0.13	0.12	0.40					
1165D4	0.26 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.04 ^b	0.41 ± 0.08 ^e	0.41 ± 0.06 ^e				
G1165D4	0.32 ^a	0.33 ^a	0.27 ^a	0.86 ± 0.04 ^b	2.63 ± 0.03 ^b				
1175H8	0.37	0.15	0.16	1.1					
1211G10	0.37	0.16	0.15	0.58					
1214A1	0.26 ^a	0.16 ^a	0.14 ^a	0.52 ± 0.07 ^b	0.43 ± 0.07 ^b				
1214D10	0.29	0.14	0.13	0.35					
1218H5	0.33	0.13	0.15	0.47					
1227H8	0.44 ^a	0.43 ^a	0.48 ^a	0.70 ± 0.15 ^b	35 ± 10 ^b				
1230D8	0.31 ^a	0.29 ^a	0.37 ^a	0.71 ± 0.14 ^b	37 ± 4 ^b				
1230H7	0.27 ± 0.04 ^b	0.18 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.10 ^c	0.32 ± 0.05 ^c				
G1230H7	0.31 ^a	0.34 ^a	0.25 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	7.5 ± 0.4 ^b				
1252A5	0.33 ± 0.03 ^c	0.29 ± 0.06 ^c	0.26 ± 0.01 ^c	0.94 ± 0.13 ^f	2.7 ± 0.6 ^f	0.42 ± .15 ^d	0.72 ± 0.40 ^d	0.55 ± 0.32 ^d	
Mab 256	0.76 ± 0.15 ^h	0.79 ± 0.08 ^g	1.4 ± 0.2 ⁱ	23 ± 1 ⁱ	44 ± 7 ^f	6 ± 4 ^d	5 ± 3 ^d	7 ± 3 ^d	

Data er n=1 foruten; ^an=2; ^bn=3; ^cn=4; ^dn=5; ^en=6; ^fn=7; ^gn=12; ^hn=14; ⁱn=15; ^jekstrapolert.

Tabell 4

Kryssreaktivitet til optimaliserte humane IgG4 NGF-antistoffer med andre neurotrofiner.

IgG	BDNF, %	NT-3, %	NT-4, %
1133C11	0.7-3.1	0.9-1.8	0-1.7
1147G9	0-1.3	0.1-0.9	0-1.3
1152H5	0-1.5	0-0.5	0.2-1.2
1165D4	0-1.3	0-0.7	0-1.5
1214A1	0-1.4	0-1.0	0-1.0
1230H7	0-1.1	0-0.8	0-0.7
1252A5	0-1.4	0-1.1	0-0.9

5

Data i kolonnene viser rekkevidden av beregnede antistoff kryssreaktiviteter. Verdier er beregnet som prosentvis av signalet observert mot hver neurotrofin, relativ til NGF-bindingssignalet ved den samme konsentrasjonen til testantistoffet. Neurotrofiner ble bekledd til analyseplatene med en konsentrasjon på 100 ng/brønn, og binding av testantistoffene ble målt over en konsentrasjonsrekkevidde på 0.03-10 nM. Data representerer resultatet fra et enkelt eksperiment.

10

Tabell 5

Sammendrag av bindingsinhiberingskonstanter bestemt for 1252A5 og G1152H5. Data representerer middelerdi \pm s.e.m. for tre uavhengige eksperimenter.

15

IgG	pKi vs human NGF		pKi vs rotte NGF	
	TrkA	p75	TrkA	p75
1252A5	10.26 \pm 0.08*	9.85 \pm 0.04	9.79 \pm 0.04**	9.55 \pm 0.03
G1152H5	9.59 \pm 0.08 [§]	9.56 \pm 0.04	9.18 \pm 0.08 [§]	9.24 \pm 0.05

* P<0.01 c.f. hu NGF / p75 interaksjon

** P<0.05 c.f. rotte NGF / p75 interaksjon

20 [§] N/S c.f. p75

Student's uporet T-test

Tabell 6

IgG	IC₅₀ (nM)	Ki (nM)
NGF	2.4	2.1
1252A5	0.068	0.061
G1152H5	0.204	0.184
MAB256	1.94	1.76
MAB5260Z	0.368	0.333

Tabell 7

5

IgG	IC₅₀ (nM)	Ki (nM)
NGF	1.3	1.2
1252A5	0.151	0.140
G1152H5	0.538	0.499
MAB256	1.48	1.38
MAB5260Z	0.310	0.288

Tabell 8

IgG	IC₅₀ (nM)	Ki (nM)
NGF	0.686	0.568
1252A5	0.188	0.155
G1152H5	0.348	0.288
MAB256	0.304	0.252
MAB5260Z	0.570	0.472

10 Tabell 9

IgG	IC₅₀ (nM)	Ki (nM)
NGF	0.783	0.710
1252A5	0.302	0.274
G1152H5	0.781	0.708
MAB256	2.94	2.67
MAB5260Z	0.587	0.532

P a t e n t k r a v

1.

Isolert spesifikk bindingspartner for nervevekstfaktor (NGF), k a r a k -
 5 t e r i s e r t v e d å omfatte et antistoffantigen-bindingssete som er
 sammensatt av et humant antistoff VH-område og et humant antistoff VL-område, og
 som omfatter et sett av CDR'er HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 og
 LCDR3, hvor VH-området omfatter HCDR 1, HCDR2, HCDR3 og et rammeverk og
 VL-området omfatter LCDR1, LCDR2, LCDR3 og et rammeverk, hvor settet av
 10 CDR'er består av et sett av CDR'er utvalgt fra gruppen bestående av:

133C11-settet av CDR'er, definert hvor HCDR1 har aminosyresekvensen til SEQ ID
 NR.: 193, HCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 194, HCDR3 har
 aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 195, LCDR1 har aminosyresekvensen til SEQ ID
 15 NR.: 198, LCDR2 har aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 199 og LCDR3 har
 aminosyresekvensen til SEQ ID NR.: 200;

et sett av CDR'er som inneholder 113C11-settet av CDR'er med aminosyresekvensen
 (SEQ ID NR.: 533 eller aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 532 substituert for
 20 aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 531 i HCDR3; og

et sett av CDR'er som inneholder en eller to aminosyresubstitusjoner sammenlignet
 med 113C11-settet av CDR'er, der den ene eller de to substitusjoner er dannet ved de
 følgende posisjonene fra de identifiserte gruppene av mulige erstattende enheter for
 25 hver posisjon, ved å anvende standardnummerering til Kabat:

<u>Posisjon for</u>	<u>Erstattende enhet</u>
<u>substitusjon</u>	<u>utvalgt fra gruppen</u>
	<u>bestående av</u>

30

31 i HCDR1: A

34 i HCDR1: V

51 i HCDR2: V

35 55 i HCDR2: N

56 i HCDR2: A

57 i HCDR2: V
 58 i HCDR2: S
 65 i HCDR2: D
 5 96 i HCDR3: N

 26 i LCDR1: T
 26 i LCDR1: G
 27 i LCDR1: N
 10 27 i LCDR1: R
 27A i LCDR1: T
 27A i LCDR1: P
 27B i LCDR1: D
 28 i LCDR1: T
 15 29 i LCDR1: E
 30 i LCDR1: D

 56 i LCDR2: T

 20 90 i LCDR3: A
 94 i LCDR3: G.

2.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 25 v e d at residie 29 i LCDR1 er E.

3.

Spesifikk bindingspartner ifølge krav 1, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d a t
 30 HCDR1 er SEQ ID NO: 163, HCDR2 er SEQ ID NO: 164, HCDR3 er SEQ
 ID NO: 165, LCDR1 er SEQ ID NO: 168, LCDR2 er SEQ ID NO: 169 og
 LCDR3 er SEQ ID NO: 170;
 HCDR1 er SEQ ID NO: 183, HCDR2 er SEQ ID NO: 184, HCDR3 er
 SEQ ID NO: 185, LCDR1 er SEQ ID NO: 188, LCDR2 er SEQ ID NO: 189 og
 35 LCDR3 er SEQ ID NO: 190

HCDR1 er SEQ ID NO: 193, HCDR2 er SEQ ID NO: 194, HCDR3 er SEQ ID NO: 195, LCDR1 er SEQ ID NO: 198, LCDR2 er SEQ ID NO: 199 og LCDR3 er SEQ ID NO: 200

5 HCDR1 er SEQ ID NO: 203, HCDR2 er SEQ ID NO: 204, HCDR3 er SEQ ID NO: 205, LCDR1 er SEQ ID NO: 208, LCDR2 er SEQ ID NO: 209 og LCDR3 er SEQ ID NO: 210

HCDR1 er SEQ ID NO: 223, HCDR2 er SEQ ID NO: 224, HCDR3 er SEQ ID NO: 225, LCDR1 er SEQ ID NO: 228, LCDR2 er SEQ ID NO: 229 og LCDR3 er SEQ ID NO: 230

10 HCDR1 er SEQ ID NO: 433, HCDR2 er SEQ ID NO: 434, HCDR3 er SEQ ID NO: 435, LCDR1 er SEQ ID NO: 438, LCDR2 er SEQ ID NO: 439 og LCDR3 er SEQ ID NO: 440

HCDR1 er SEQ ID NO: 233, HCDR2 er SEQ ID NO: 234, HCDR3 er SEQ ID NO: 235, LCDR1 er SEQ ID NO: 238, LCDR2 er SEQ ID NO: 239 og
15 LCDR3 er SEQ ID NO: 240

HCDR1 er SEQ ID NO: 443, HCDR2 er SEQ ID NO: 444, HCDR3 er SEQ ID NO: 445, LCDR1 er SEQ ID NO: 448, LCDR2 er SEQ ID NO: 449 og LCDR3 er SEQ ID NO: 450

HCDR1 er SEQ ID NO: 243, HCDR2 er SEQ ID NO: 244, HCDR3 er
20 SEQ ID NO: 245, LCDR1 er SEQ ID NO: 248, LCDR2 er SEQ ID NO: 249 og LCDR3 er SEQ ID NO: 250

HCDR1 er SEQ ID NO: 453, HCDR2 er SEQ ID NO: 454, HCDR3 er SEQ ID NO: 455, LCDR1 er SEQ ID NO: 458, LCDR2 er SEQ ID NO: 459 og LCDR3 er SEQ ID NO: 460

25 HCDR1 er SEQ ID NO: 463, HCDR2 er SEQ ID NO: 464, HCDR3 er SEQ ID NO: 465, LCDR1 er SEQ ID NO: 468, LCDR2 er SEQ ID NO: 469 og LCDR3 er SEQ ID NO: 470

HCDR1 er SEQ ID NO: 253, HCDR2 er SEQ ID NO: 254, HCDR3 er
30 SEQ ID NO: 255, LCDR1 er SEQ ID NO: 258, LCDR2 er SEQ ID NO: 259 og LCDR3 er SEQ ID NO: 260

HCDR1 er SEQ ID NO: 473, HCDR2 er SEQ ID NO: 474, HCDR3 er SEQ ID NO: 475, LCDR1 er SEQ ID NO: 478, LCDR2 er SEQ ID NO: 479 og LCDR3 er SEQ ID NO: 480

HCDR1 er SEQ ID NO: 483, HCDR2 er SEQ ID NO: 484, HCDR3 er SEQ ID NO: 485, LCDR1 er SEQ ID NO: 488, LCDR2 er SEQ ID NO: 489 og LCDR3 er SEQ ID NO: 490

5 HCDR1 er SEQ ID NO: 493, HCDR2 er SEQ ID NO: 494, HCDR3 er SEQ ID NO: 495, LCDR1 er SEQ ID NO: 498, LCDR2 er SEQ ID NO: 499 og LCDR3 er SEQ ID NO: 500

HCDR1 er SEQ ID NO: 503, HCDR2 er SEQ ID NO: 504, HCDR3 er SEQ ID NO: 505, LCDR1 er SEQ ID NO: 508, LCDR2 er SEQ ID NO: 509 og LCDR3 er SEQ ID NO: 510

10 HCDR1 er SEQ ID NO: 293, HCDR2 er SEQ ID NO: 294, HCDR3 er SEQ ID NO: 295, LCDR1 er SEQ ID NO: 298, LCDR2 er SEQ ID NO: 299 og LCDR3 er SEQ ID NO: 300

HCDR1 er SEQ ID NO: 303, HCDR2 er SEQ ID NO: 304, HCDR3 er SEQ ID NO: 305, LCDR1 er SEQ ID NO: 308, LCDR2 er SEQ ID NO: 309 og LCDR3 er SEQ ID NO: 310

HCDR1 er SEQ ID NO: 513, HCDR2 er SEQ ID NO: 514, HCDR3 er SEQ ID NO: 515, LCDR1 er SEQ ID NO: 518, LCDR2 er SEQ ID NO: 519 og LCDR3 er SEQ ID NO: 520

20 HCDR1 er SEQ ID NO: 353, HCDR2 er SEQ ID NO: 354, HCDR3 er SEQ ID NO: 355, LCDR1 er SEQ ID NO: 358, LCDR2 er SEQ ID NO: 359 og LCDR3 er SEQ ID NO: 360; eller

HCDR1 er SEQ ID NO: 523, HCDR2 er SEQ ID NO: 524, HCDR3 er SEQ ID NO: 525, LCDR1 er SEQ ID NO: 528, LCDR2 er SEQ ID NO: 529 og LCDR3 er SEQ ID NO: 530.

25

4.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et sett av CDR'er som inneholder 113C11-settet av CDR'er med aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 533 substituert for aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 531 i HCDR3.

30

5.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et sett av CDR'er som inneholder 113C11-settet av CDR'er med aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 532 substituert for aminosyresekvensen SEQ ID NR.: 531 i HCDR3.

35

6.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d å omfatte 1133C11-settet av CDR'er.

5

7.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1 til 6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at VH-området rammeverk er human tungkjede
kimlinjerammeverk og/eller VL-området rammeverk er human lettkjede

10 kimlinjerammeverk.

8.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at tungkjede kimlinjerammeverket omfatter VH1 DP10.

15

9.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge krav 7 eller 8, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at lettkjede kimlinjerammeverket omfatter VL Vλ1.

20 10.

Isolert spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1-9, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å binde rotte- eller mus-NGF.

11.

25 Isolert spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1-10, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å fortrinnsvis blokkere NGF-binding til TrkA-
reseptor i forhold til NGF-binding til p75-reseptor.

12.

30 Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-11, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å omfatte 1252A5 VH-området med aminosyresekvensen ifølge
SEQ ID NR.: 392.

13.

35 Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-12, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å omfatte 1252A5 VL-området med aminosyresekvensen ifølge
SEQ ID NR.: 397.

14.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å omfatte G1152H5 VH-området med aminosyresekvensen
5 ifølge SEQ ID NR.: 402.

15.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10 eller krav 14, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å omfatte G1152H5 VL-området med
10 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NR.: 407.

16.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å omfatte G1165D4 VH-området med aminosyresekvensen
15 ifølge SEQ ID NR.: 412.

17.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10 eller krav 16, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å omfatte G1165D4 VL-området med
20 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NR.: 417.

18.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å omfatte G1230H7 VH-området med aminosyresekvensen
25 ifølge SEQ ID NR.: 422.

19.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 8-10 eller krav 18, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å omfatte G1230H7 VL-området med
30 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NR.: 427.

20.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1-19, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den omfatter scFv antistoffmolekyl.

35

21.

Spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1-19, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et antistoffkonstant område.

5 22.

Spesifikk bindingspartner ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et helt antistoff.

23.

10 Spesifikk bindingspartner ifølge krav 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at det hele antistoffet er IgG4.

24.

15 Isolert antistoffmolekyl som binder NGF, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet omfatter et VH-område og et VL-område, der VH-områdets aminosyresekvens er SEQ ID NR: 392 og VL-områdets aminosyresekvens er SEQ ID NR: 397.

25.

20 Antistoffmolekyl ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet er IgG4.

26.

25 Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d å omfatte en spesifikk bindingspartner ifølge ett av kravene 1 – 23 eller et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller 25, og minst en tilleggskomponent.

27.

30 Sammensetning ifølge krav 26, k a r a k t e r i s e r t v e d å omfatte en farmasøytisk akseptert tilsetning, vehikkel eller bærer.

28.

35 Isolert nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d å omfatte en nukleotidsekvens som koder en spesifikk bindingspartner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 23 eller et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller .

29.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert *in vitro* med nukleinsyre i henhold til krav 28.

5 30.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert *in vitro* med

en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for VH-området til en spesifikk bindingspartner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 23 eller koder for
10 VH-området til et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller krav 25, og

en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for VL-området til en spesifikk bindingspartner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 23 eller koder for VL-området til et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller krav 25.

15 31.

Fremgangsmåte for å fremstille en spesifikk bindingspartner eller antistoffmolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter å dyrke vertsceller ifølge krav 29 eller 30 under forhold for fremstilling av den spesifikke bindingspartneren eller antistoffmolekylet.

20

32.

Fremgangsmåte ifølge krav 31, k a r a k t e r i s e r t v e d å ytterligere omfatte å isolere og/eller rense den spesifikke bindingspartneren eller antistoffmolekylet.

25

33.

Fremgangsmåte ifølge krav 31 eller 32, k a r a k t e r i s e r t v e d å ytterligere omfatte å formulere den spesifikke bindingspartneren eller antistoffmolekylet i en sammensetning som inkluderer minst en ytterligere komponent.

30

34

Fremgangsmåte, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter binding av en spesifikk bindingspartner eller antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 25 til human NGF eller et fragment av human NGF, der nevnte binding
35 finner sted *in vitro*.

35.

Fremgangsmåte ifølge krav 34, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter bestemmelse av mengden binding av spesifikk bindingspartner eller antistoffmolekyl til NGF eller et fragment av NGF.

5

36.

Anvendelse av en spesifikk bindingspartner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 23, eller et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller 25, for fremstilling av et medikament for behandling av en tilstand der NGF spiller en rolle, der tilstanden er utvalgt fra gruppen bestående av smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, pulmonær fibrose, andre sykdommer av luftveisinflammasjon, diabetisk neuropati, hjertearytmier, HIV, arthritt, psoriasis og kreft.

10

37.

Spesifikk bindingspartner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 – 23, eller et antistoffmolekyl ifølge krav 24 eller 25, for anvendelse ved behandling av en tilstand der NGF spiller en rolle, der tilstanden er utvalgt fra gruppen bestående av smerte, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, pulmonær fibrose, andre sykdommer av luftveisinflammasjon, diabetisk neuropati, hjertearytmier, HIV, arthritt, psoriasis og kreft.

20

38.

Anvendelse ifølge krav 36, eller en spesifikk bindingspartner eller antistoffmolekyl ifølge krav 37, der behandlingen er behandling av smerte.

SEQUENCE LISTING

<110> Cambridge Antibody Technology Limited

<110> Elan Pharma International Limited

<120> Specific Binding Members for NGF

<130> SMW/CP6347033

<140>

<141>

<150> US 60/645,587

<151> 2005-01-24

<160> 537

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 396

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 1064F8 VH nucleotide sequence

<400> 1

```

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgctt acacctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcgccccca tctttggttc aacaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag actcaogatt accgcggacg aattcagag cacagcccat      240
atggagctga gcagcctgac atctgcccac acggccgtat attactgtgc gggaggcagt      300
gacttatatt gtagtggttg taactgctac gggggcggtc actactacta ctacatggac      360
gtctgggggc aagggaccac ggtcaccgtc tcgagt                                     396

```

<210> 2

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 1064F8 VH amino acid sequence

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15

```

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

```

1/12

Figure 1A

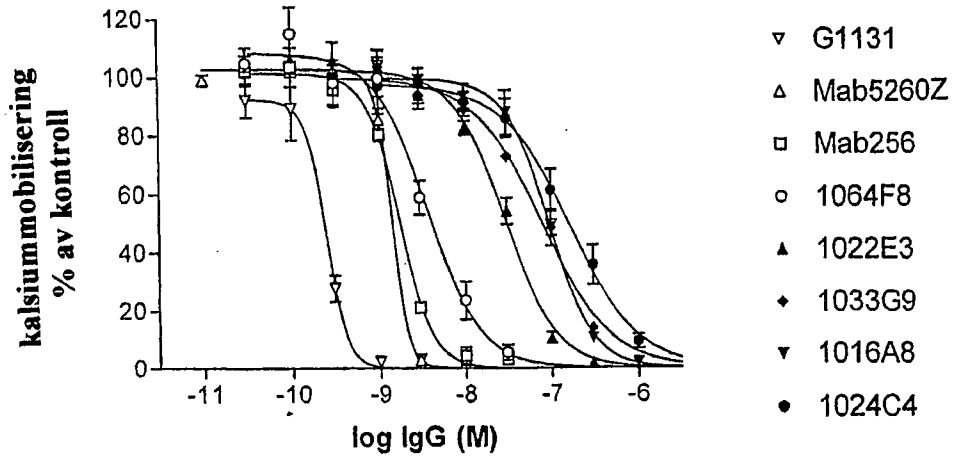


Figure 1B

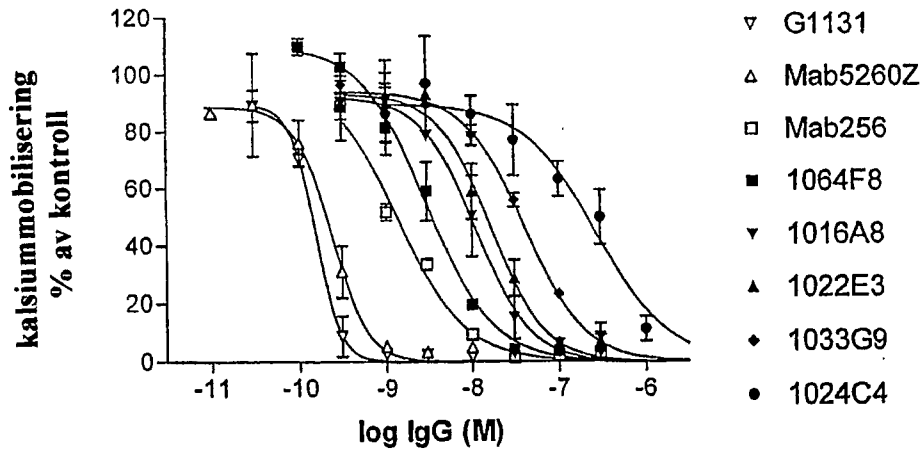


Figure 2A

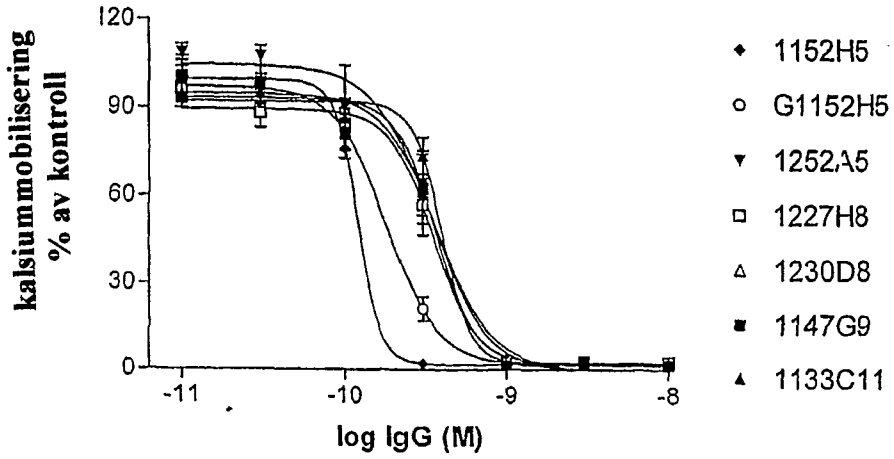


Figure 2B

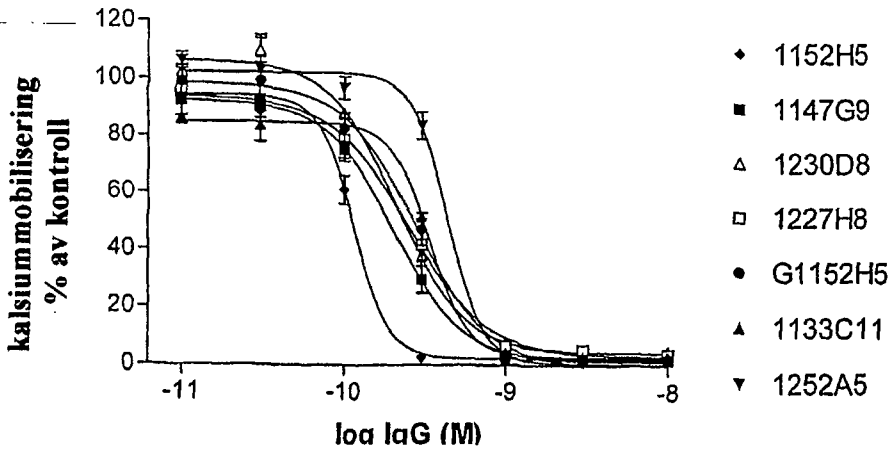
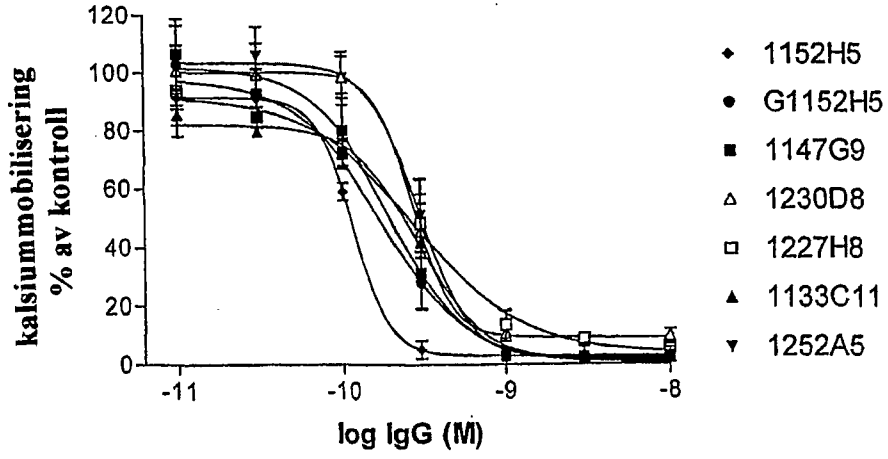


Figure 2C



4/12

Figure 3A

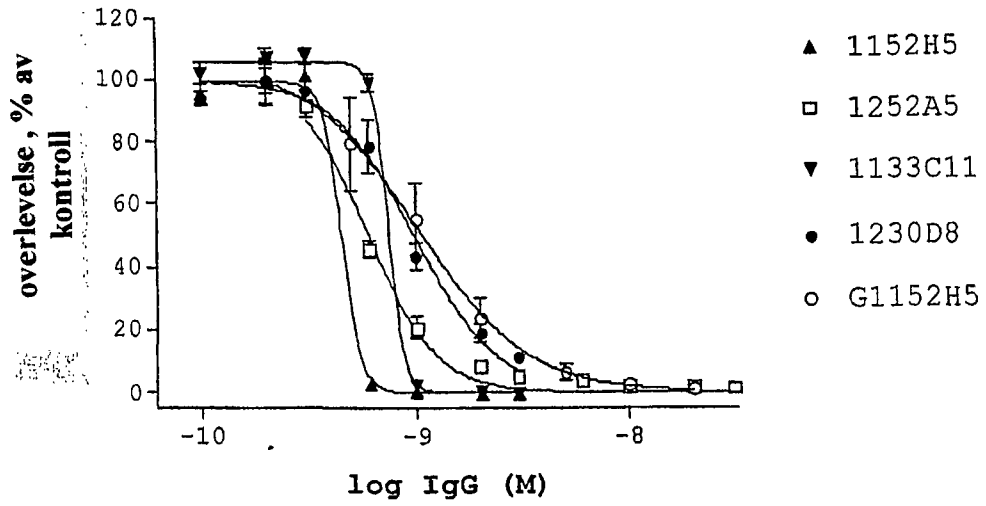
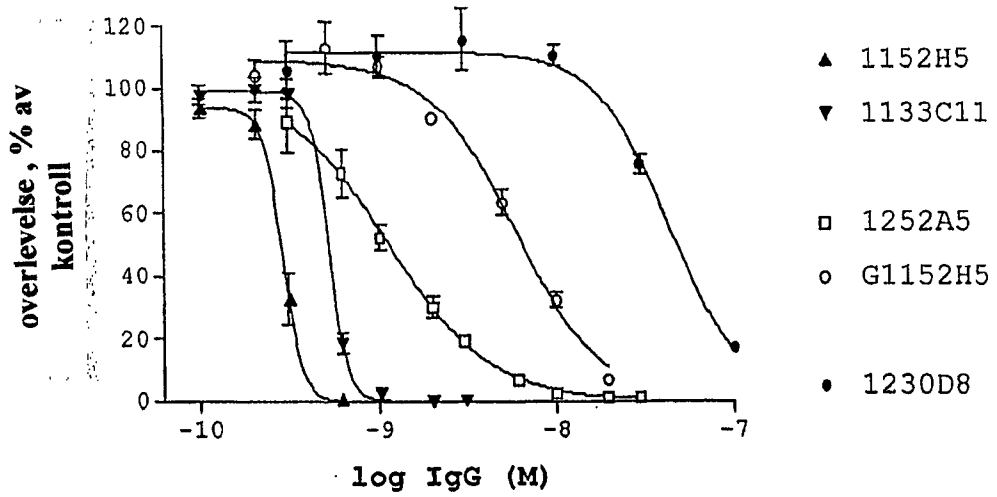


Figure 3B



5/12

Figure 4A

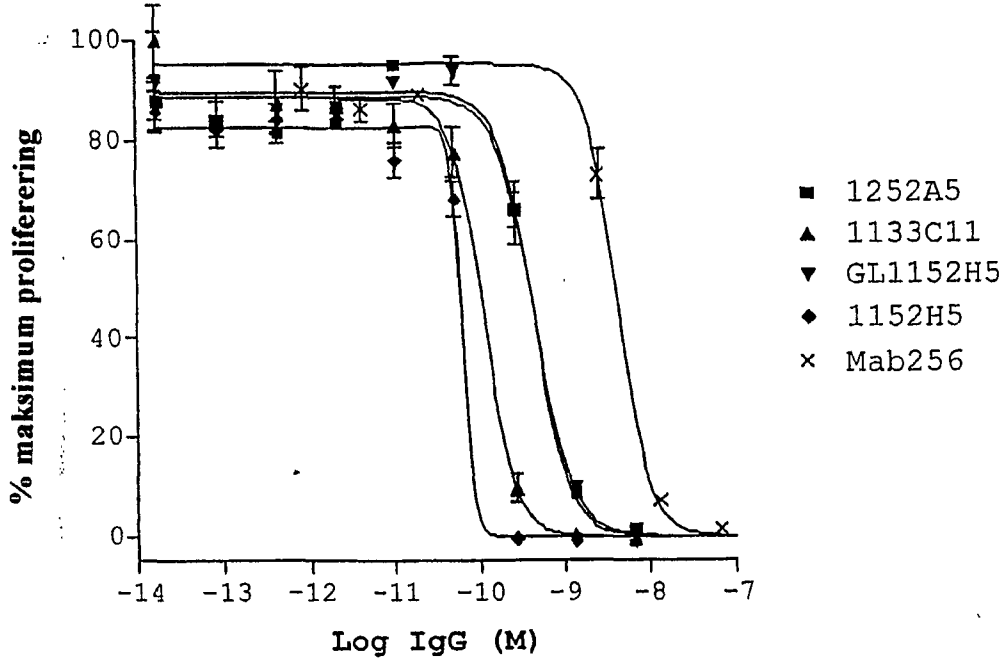
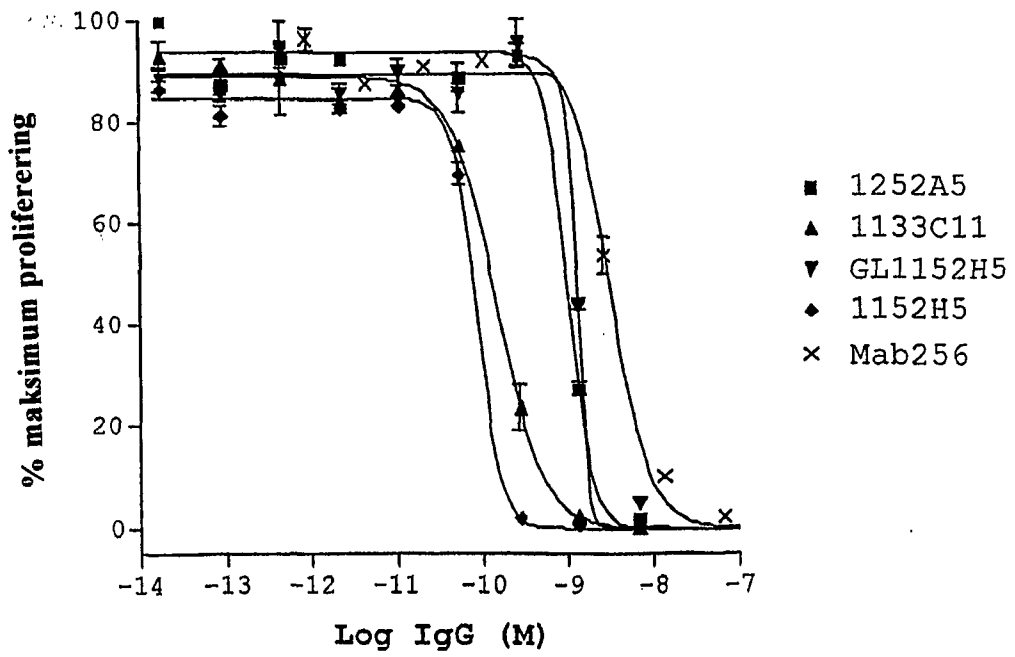
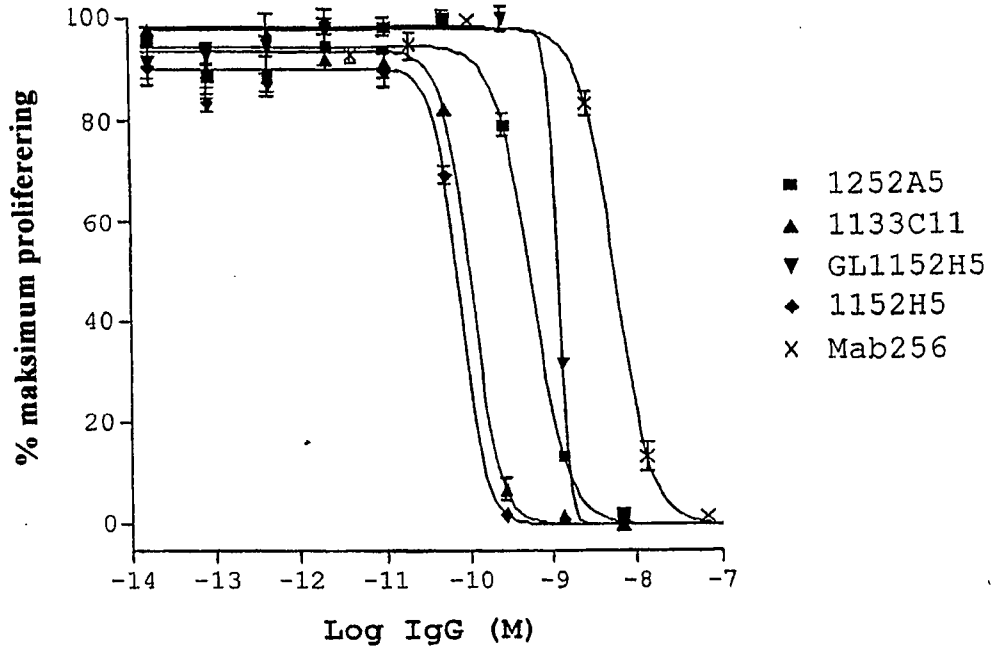


Figure 4B



6/12

Figure 4C



7/12

FIGURE 5

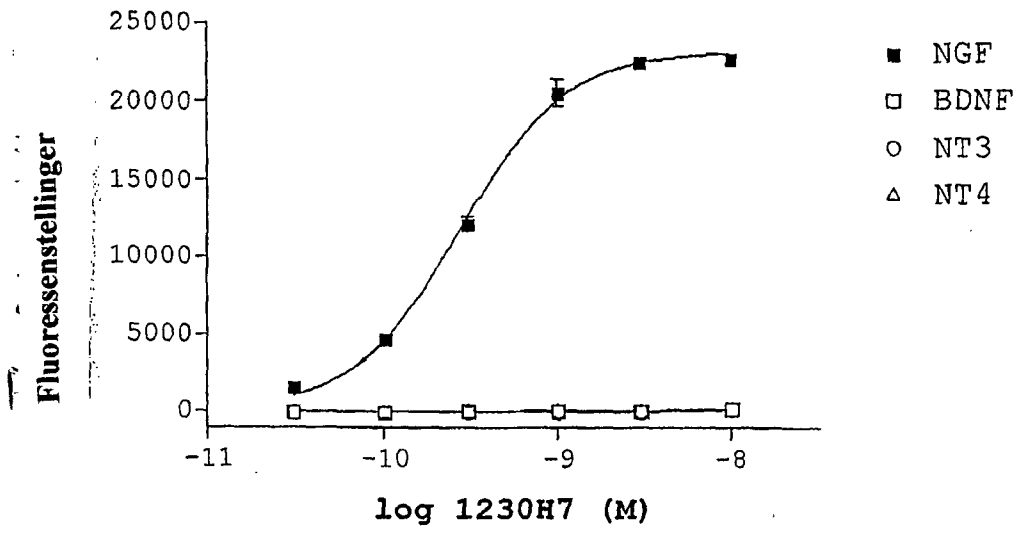


Figure 6A

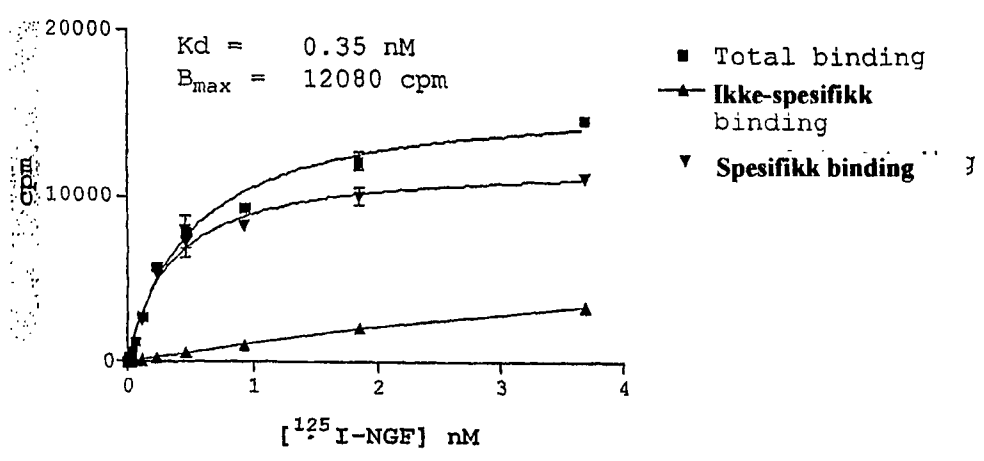
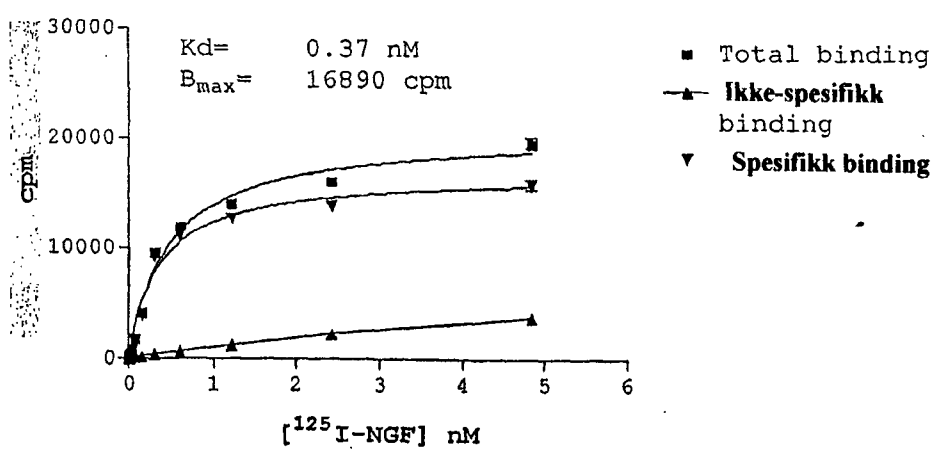


Figure 6B



9/12

Figure 7A

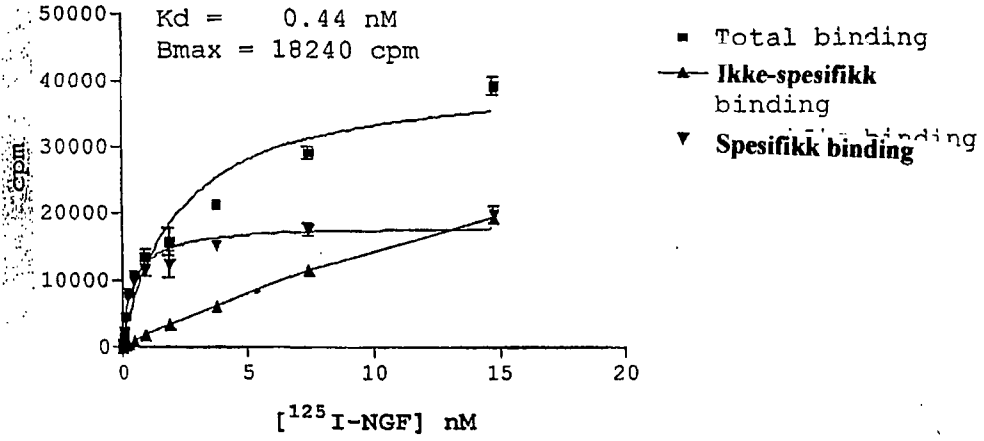


Figure 7B

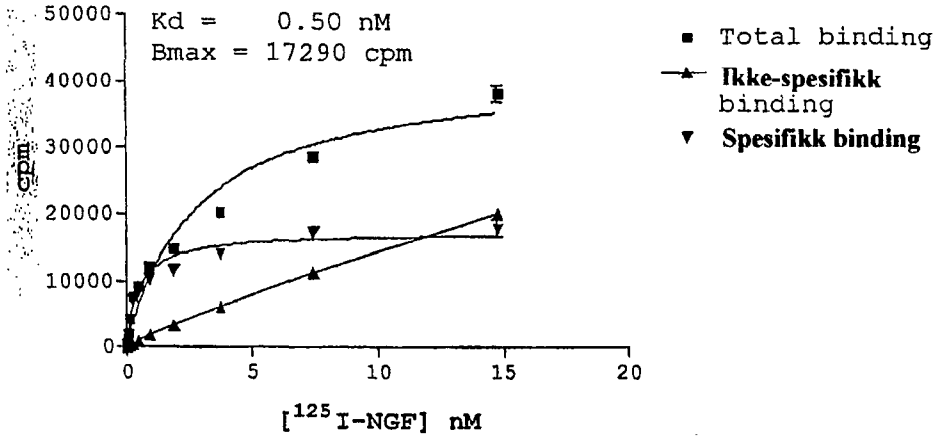


Figure 8A

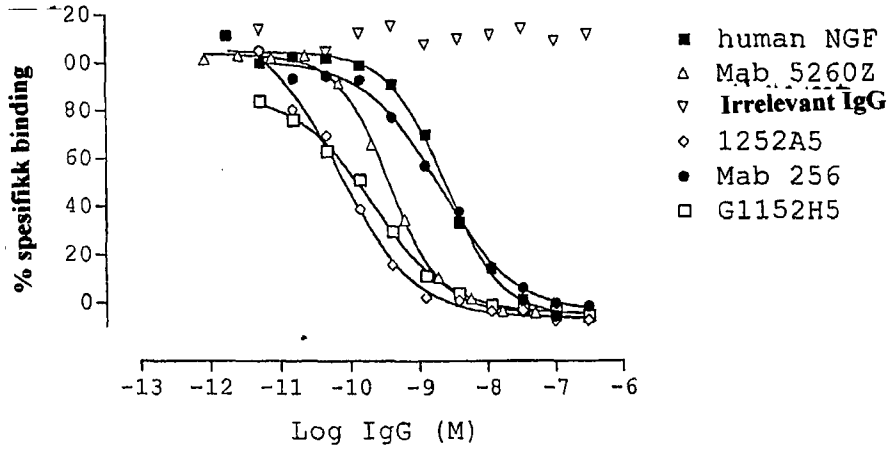
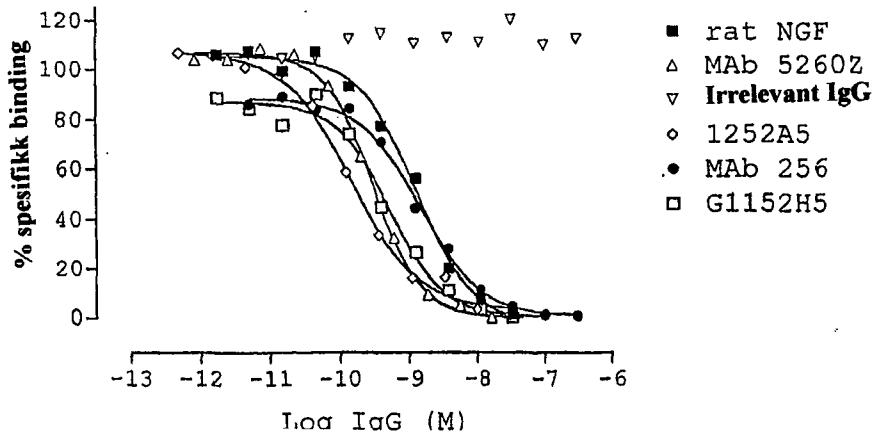


Figure 8B



11/12

Figure 9A

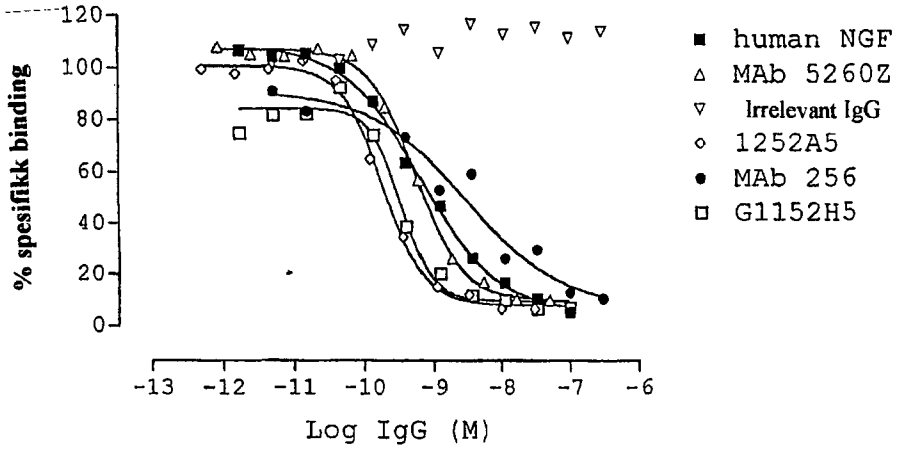
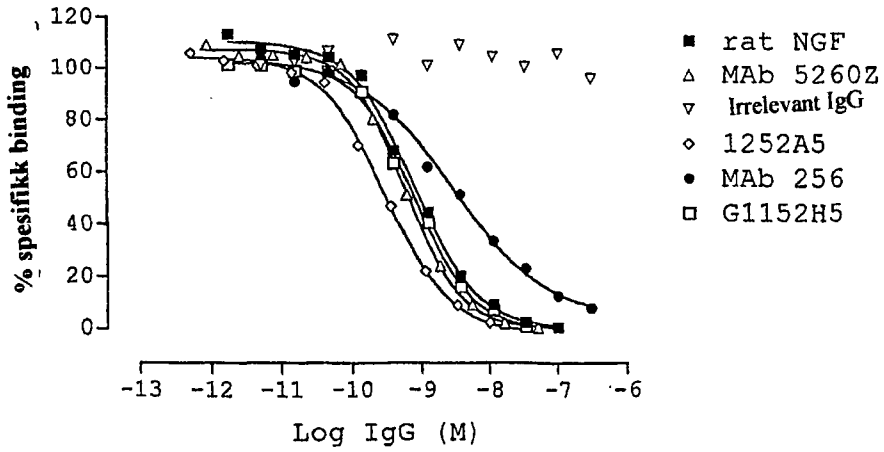
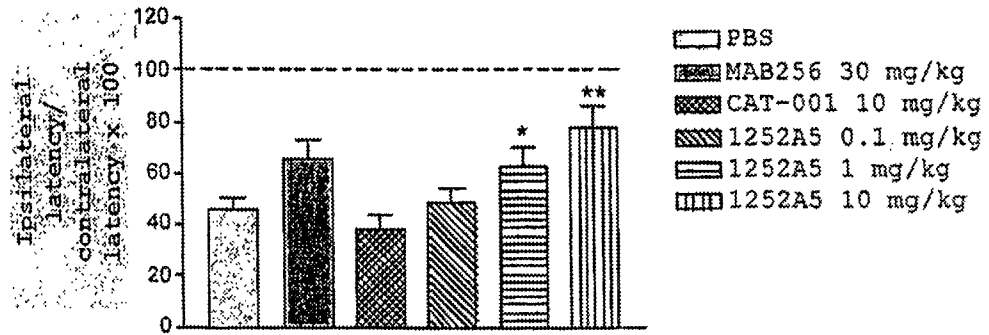


Figure 9B



12/12

FIGURE 10



* $P < 0.05$ og ** $P < 0.01$ c.f. CAT-001 null isotype antistoff
 c kontroll (n=13-16 dyr per gruppe)