



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 319955

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 39/395, G 01 N 33/53, C 07 K 16/24

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20026202	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.02.10 PCT/US97/02219
(22)	Inng.dag	2002.12.23	(85)	Videreføringsdag	2002.12.23
(24)	Løpedag	1997.02.10	(30)	Prioritet	1996.02.09, US, 599226 1996.11.25, US, 031476
(41)	Alm.tilgj	1998.10.07			
(45)	Meddelt	2005.10.03			
(73)	Innehaver	BASF AG, Carl-Bosch-Strasse 36, 67056 LUDWIGSHAFEN, DE			
(72)	Oppfinner	Jochen G Salfeld, 177 Old Westboro Road, North Grafton, MA 01536, US			
		Deborah J Allen, 143 A Shelbourne Road, London N17 9YD, England, GB			
		Hendricus R J M Hoogenboom, Muggenstraat 45 Bus 12, B-3500 Hasselt, BE			
		Zehra Kaymakcalan, 4 Piccadilly Way, Westboro, MA 01581, US			
		Boris Labkovsky, 1630 Worcester Road, Apartment 532, Framingham, MA 01701, US			
		John A Mankovich, 416 Lowell Street, Andover, MA 01810, US			
		Brian T McGuinness, 22 The Lane, Hauxton, Cambridge CB2 5HP, England, GB			
		Andrew J Roberts, 15 Cavendish Road, Cambridge CB1 3AE, England, GB			
		Paul Sakorafas, 6114 Arbor Drive, Shrewsbury, MA 01545, US			
		David Schoenhaut, 55 East Ninth Street, Clifton, NJ 07011, US			
		Tristan J Vaughan, 9 Villa Road, Impington, Cambridge CB4 4NZ, England, GB			
		Michael White, 30 Angelica Drive, Framingham, MA 01701, US			
		Alison Jane Wilton, 46 Huntingdon Road, Cambridge, Cambridgeshire CB3 0HH, England, GB			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av isolert human-antistoff som binder human-TNF-alfa, fremgangsmåte for inhibering av TNF-alfa-aktivitet in vitro, samt isolert human-antistoff som binder human-TNF-alfa og farmasøytisk blanding som omfatter nevnte antistoff.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP A2 0614984, 1994., Griffith et al., 1993, The EMBO Journal, Vol. 12, No. 2, p. 725-734. WO A1 9306213			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives en fremgangsmåte for inhibering av human TNF α aktivitet in vitro omfattende å kontakte human TNF α med et antistoff slik at human TNF α aktivitet inhiberes, kjennetegnet ved at antistoffet er et isolert human antistoff, eller en antigen-bindingsdel derav, som dissosierer fra human TNF α med en K_d på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{off} hastighets-konstant på $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflate-plasmonresonans og nøytraliserer human TNF α cytotoxicitet i et standard in vitro L929-forsøk med en IC50 på 1×10^{-7} M eller mindre.

Tumor-nekrosefaktor α (TNF α) er et cytokin produsert av en rekke celletyper, inkludert monocytter og makrofager, som opprinnelig ble identifisert basert på dets kapasitet til å fremkalle nekrose av visse musetumorer (se *f.eks.* Old, L. (1985) *Science* 230:630-632). En faktor betegnet kakektin, knyttet til kakeksi, ble deretter vist å være det samme molekyl som TNF α . TNF α er implisert i mediering av sjokk (se *f.eks.* Beutler, B. og Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518; Beutler, B. og Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655). Videre er TNF α implisert i patofysiologien til en rekke andre human-sykdommer og lidelser, inkludert sepsis, infeksjoner, autoimmune sykdommer, transplantat-avvisning og «graft-versus-host» sykdom (se *f.eks.* Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S.-patent nr. 5,231,024 til Moeller *et al.*; europeisk patentpublikasjon nr. 260 610 B1 til Moeller, A., *et al.* Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K.J. og Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503).

På grunn av den skadelige rollen til human-TNF α (hTNF α) ved en rekke lidelser hos mennesker, er terapeutiske strategier laget for å hemme eller motvirke hTNF α -aktivitet. Spesielt er det søkt etter antistoffer som binder til og nøytraliserer hTNF α , som et middel for å hemme hTNF α -aktivitet. Noen av de tidligste av slike antistoffer var mus-monoklonale antistoffer (mAb), utskilt av hybridomer produsert av lymfocytter fra mus immunisert med hTNF α (se *f.eks.* Hahn T; *et al.*, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3814-3818; Liang, C-M., *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:847-854; Hirai, M., *et al.* (1987) *J. Immunol. Methods* 96:57-62; Fendly, B.M., *et al.* (1987) *Hybridoma* 6:359-370; Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S.-patent nr. 5,231,024 til Moeller *et al.*; europeisk patent- publikasjon nr. 186 833 B1 av Wallach, D.; europeisk patentsøknad publikasjon nr. 218 868 A1 av Old *et al.*; europeisk patentpublikasjon nr. 260 610 B1 av Moeller, A., *et al.*). Selv om disse mus-anti-hTNF α -antistoffer ofte viser høy affinitet for hTNF α (*f.eks.* Kd $\leq 10^{-9}$ M) og er i stand til å nøytralisere hTNF α -aktivitet, kan anvendelse av dem *in vivo* være begrenset av problemer forbundet med administrering av mus-antistoffer til mennesker, så som kort serum-halveringstid, en manglende evne til å utløse visse human-effektorfunksjoner og fremkalling av uønsket

immunrespons mot mus-antistoff hos et menneske ("human-anti-mus-antistoff"- (HAMA) reaksjon).

I et forsøk på å overkomme problemene forbundet med anvendelse av fullt murine antistoffer på mennesker, er murine anti-hTNF α -antistoffer blitt konstruert genetisk for å bli mer "human-lignende." For eksempel er kimære antistoffer, hvor de variable områdene i antistoffkjedene er murin-avledet og de konstante områdene av antistoffkjedene er human-avledet, blitt fremstilt (Knight, D.M, *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:1443-1453; PCT- publikasjon nr. WO 92/16553 av Daddona, P.E., *et al.*). Dessuten er også humaniserte antistoffer, hvor de hypervariable domeneene av antistoffvariabel-områdene er murin-avledet, mens de resterende variabel-områder og antistoffets konstante områder er human-avledet, fremstilt (PCT-publikasjon nr. WO 92/11383 av Adair, J.R., *et al.*). Fordi disse kimære og humaniserte antistoffer fremdeles beholder noen murin-sekvenser, kan de imidlertid fortsatt utløse en uønsket immunreaksjon, en human anti-kimær antistoff- (HACA) reaksjon, spesielt når de blir administrert over lenger tid, f.eks. ved kroniske indikasjoner, så som revmatoid artritt (se f.eks. Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1105-1110).

Et foretrukket hTNF α -hemmende middel for murine mAb eller derivater derav (f.eks. kimære eller humaniserte antistoffer) vil være et fullstendig human-anti-hTNF α -antistoff, ettersom et slikt middel ikke vil utløse en HAMA-reaksjon, selv om det anvendes over lengere tid. Human-monoklonale autoantistoffer mot hTNF α er blitt fremstilt ved anvendelse av human-hybridomteknikker (Boyle, P., *et al.* (1993) *Cell. Immunol.* 152:556-568; Boyle, P., *et al.* (1993) *Cell. Immunol.* 152:569-581; europeisk patentsøknad, publikasjon nr. 614 984 A2 av Boyle, *et al.*). Imidlertid er disse hybridomavlede monoklonale autoantistoffer rapportert å ha en affinitet for hTNF α som var for lav til å beregne ved konvensjonelle metoder, de var ikke i stand til å binde oppløselig hTNF α og var ikke i stand til å nøytralisere hTNF α -fremkalt cytotoxicitet (se Boyle, *et al.*; *supra*). Dessuten avhenger suksessen av human-hybridomteknikken av naturlig tilstedeværelse av lymfocytter som produserer autoantistoffer spesifikke for hTNF α i humant perifert blod. Visse undersøkelser har detektert serum-autoantistoffer mot hTNF α hos mennesker (Fomsgaard,

A., *et al.* (1989) *Scand. J. Immunol.* 30:219-223; Bendtzen, K., *et al.* (1990) *Prog. Leukocyte Biol.* 10B:447-452), mens andre har ikke (Leusch, H-G., *et al.* (1991) *J. Immunol. Methods* 139:145-147).

Et alternativ til naturlig forekommende human-anti-hTNF α -antistoffer ville
 5 være et rekombinant hTNF α -antistoff. Rekombinante human-antistoffer som
 binder til hTNF α med relativt lav affinitet (dvs. $K_D \sim 10^{-7}M$) og rask
 frigjøringshastighet (dvs. $K_{off} \sim 10^{-2} \text{ sek}^{-1}$) er beskrevet (Griffiths, A.D., *et al.*
 (1993) *EMBO J.* 12:725-734). På grunn av deres relativt hurtige dissosiasjons-
 kinetikk, vil imidlertid disse antistoffer ikke være egnet for terapeutisk
 10 anvendelse. Videre er en rekombinant human anti-hTNF α beskrevet, som ikke
 nøytraliserer hTNF α -aktivitet, men heller forsterker binding av hTNF α til
 overflaten av celler og forsterker internalisering av hTNF α (Lidbury, A., *et al.*
 (1994) *Biotechnol. Ther.* 5:27-45; PCT- publikasjon nr. WO 92/03145 av Aston,
 R. *et al.*)

15 Følgelig er det fortsatt et behov for anvendelse av human-antistoffer, så
 som rekombinante human-antistoffer som binder oppløselig hTNF α med høy
 affinitet og langsom dissosiasjons-kinetikk og som har kapasitet til å
 nøytraliserer hTNF α -aktivitet, omfattende hTNF α -fremkalt cytotoxicitet (*in vitro*
 og *in vivo*) og hTNF α -fremkalt celleaktivering.

20 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelse av human-antistoffer,
 fortrinnsvis rekombinante human-antistoffer, som spesifikt binder til human-
 TNF α . Antistoffene er karakterisert ved binding til hTNF α med høy affinitet og
 langsom dissosiasjonskinetikk og ved nøytralisering av hTNF α -aktivitet,
 omfattende hTNF α -fremkalt cytotoxicitet (*in vitro* og *in vivo*) og hTNF α -fremkalt
 25 cellulær aktivering. Antistoffer anvendt ifølge oppfinnelsen er videre
 karakterisert ved binding til hTNF α , men ikke til hTNF β (lymfotoksin) og ved at
 de har evnen til å binde til annet primat TNF α og ikke-primat TNF α i tillegg til
 human-TNF α .

Antistoffene som anvendes ifølge oppfinnelsen kan ha full lengde (*f.eks.*
 30 et IgG1- eller IgG4-antistoff) eller kan omfatte bare en antigen-bindingsdel
 (*f.eks.* et Fab-, F(ab')₂- eller scFv-fragment). Det rekombinante antistoff ifølge
 oppfinnelsen, betegnet D2E7, har et lettkjede CDR3-domene omfattende

aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 og et tungkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4. Fortrinnsvis har D2E7-antistoffet en lettjede variabel-region (LCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 og en tungkjede variabel-region (HCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et isolert human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, som dissosierer fra human-TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflate-plasmonresonans og nøytraliserer human-TNF α -cytotoksisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-7} M eller mindre i fremstillingen av et medikament for behandling av en lidelse hvor TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes. Det anvendte isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav, kan dissosiere fra human-TNF α med en K_{off} på $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre eller enda mer foretrukket, med en K_{off} på $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre. Det isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav som anvendes, kan nøytralisere human-TNF α -cytotoksisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-8} M eller mindre, enda mer foretrukket med en IC_{50} på 1×10^{-9} M eller mindre og spesielt foretrukket med en IC_{50} på 5×10^{-10} M eller mindre.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et isolert human-antistoff eller en antigenbindingsdel derav med de følgende karakteristika: a) dissosierer fra human-TNF α med en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, bestemt ved overflateplasmonresonans; b) har et lettjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 eller modifisert fra SEKV ID NR: 3 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 1, 3, 4, 6, 7, 8 og/eller 9; c) har et tungkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4 eller modifisert fra SEKV ID NR: 4 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 2, 3, 4, 5,

6, 8, 9, 10, 11 og/eller 12, for fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

Antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav kan dissosiere fra human-TNF α med en K_{off} på $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre. Foretrukket dissosierer antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav, fra human-TNF α med en K_{off} på $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre.

Ved enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et isolert antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, med en lett kjede variabel region (LCRV) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 og en tungkjede variabel region (HCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2, i fremstillingen av et medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

5 I visse utførelsesformer anvendes antistoff med en IgG1-tungkjede konstant-region eller en IgG4-tungkjede konstant-region. Ved enda andre utførelsesformer anvendes antistoff med et Fab-fragment, et F(ab')₂-fragment eller et enkelkjede Fv-fragment.

Ved enda andre aspekter tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av antistoffet D2E7 i fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

10 Foretrukne anvendelser ifølge foreliggende oppfinnelse er i fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse som er en autoimmun sykdom, revmatoid artritt, revmatoid spondylitt, osteoartritt, giktisk artritt, allergi, multippel sklerose, autoimmun diabetes, autoimmun uveitt, nefrotisk syndrom, en infeksøs sykdom, intestinal lidelse, transplantatavvisning eller transplantat-mot-vert-sykdom, en ondartet sykdom, en pulmonal lidelse, en hjertelidelse, 15 sepsis, inflammatoriske benlidelser, benresorpsjonssykdom, alkoholisk hepatitt, viral hepatitt, fulminant hepatitt, koaguleringsforstyrrelser, brannså, reperfusjonsskade, keloid-dannelse, arvevdsdannelse, pyrexi, tannsykdom, fedme, strålingsgiftighet, septisk sjokk, endotoksisk sjokk, gramnegativ sepsis, toksisk sjokksyndrom, malaria, kakeksi, meningitt, AIDS, bakteriell meningitt og

AIDS-relatert kompleks (ACR). En spesielt foretrukket anvendelse er der hvor lidelsen er cerebral malaria.

Andre foretrukne anvendelser ifølge foreliggende oppfinnelse er dem hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av cytomegalovirusinfeksjon sekundær til transplantasjon, feber og myalgi forårsaket av infeksjon og kakeksi sekundær til infeksjon, allogene transplantatavvisning, stimulering av tumorvekst, forsterkning av metastatisk potensiale og mediering av cytotoxiskitet i ondartede sykdommer, inhibering av tumorvekst eller metastaser, voksen respiratorisk nødsyndrom, sjokklunge, kronisk pulmonær inflammatorisk sykdom, pulmonær sarkoidose, pulmonær fibrose, silikose, inflammatorisk tarmsykdom, idiopatisk inflammatorisk tarmsykdom, Chrons sykdom, ulcerøs kolitt, hjerteischemi, hjertesvikt og hepatitt.

I én utførelsesform av oppfinnelsen anvendes et isolert human-antistoff eller en antigenbindingsdel derav som angitt i kravene 1-4, i fremstilling av et medikament for administrering til et menneskeindivid sammen med cytokinet interleukin-6 (IL-6) eller for administrering til et menneskeindivid med en serum- eller plasmakonsentrasjon av IL-6 over 500 pg/ml.

Ved enda en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et isolert human-antistoff eller antigen-bindingsdel derav, som nøytraliserer aktiviteten til human-TNF α , men ikke human-TNF β (lymfotoksin). Ved en foretrukket utførelsesform nøytraliserer det anvendte human-antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav, aktiviteten til human-TNF α , sjimpanse TNF α og minst én ytterligere primat-TNF α valgt fra gruppen bestående av bavian-TNF α , marmosett-TNF α , cynomolgus-TNF α og rhesus-TNF α . Fortrinnsvis nøytraliserer det anvendte antistoffet også aktiviteten til minst én ikke-primat-TNF α . Ved én underutførelsesform nøytraliserer for eksempel det anvendte isolerte human-antistoff eller antigenbindingsdelen derav også aktiviteten til hund-TNF α . Ved en annen under-utførelsesform nøytraliserer det anvendte isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav, også aktiviteten til gris-TNF α . Ved enda en annen underutførelsesform nøytraliserer det anvendte isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav også aktiviteten til mus-TNF α .

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er fremgangsmåte for inhibering av human-TNF α -aktivitet *in vitro* omfattende å kontakte human-TNF α med et antistoff slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes, kjennetegnet ved at antistoffet er et isolert human-antistoff, eller en antigenbindingsdel derav, som dissosierer fra human-TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflateplasmonresonans og nøytraliserer human-TNF α -cytotoksisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-7} M eller mindre.

Enda et annet aspekt ved oppfinnelsen angår isolert human-antistoff som binder human-TNF α og antistoffet er D2E7, eller en antigenbindende del derav.

Videre omfatter oppfinnelsen farmasøytisk blanding som omfatter isolert humant antistoff ifølge oppfinnelsen, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

5 Den farmasøytiske blandingen ifølge oppfinnelsen, kan foretrukket ytterligere omfatte i det minste ett tilleggs-terapeutisk middel.

Foretrukket tilleggs-terapeutisk middel er valgt fra gruppen bestående av ikke-steroidale anti-inflammatoriske legemidler, cytokin suppressive anti-inflammatoriske legemidler, CDP-571/BAY-10-3356, cA2, 75 kDTNFR-IgG, 55 kDTNFR-IgG, IDEC-CE9.1/SB 210396, DAB 486-IL-2, DAB 389-IL-2, Anti-Tac, IL-4, IL-10, IL-4-agonister, IL-10-agonister, IL-1RA, TNF-bp/s-TNFR, S284, R973401, MK-966, Iloprost, metotreksat, thalidomid, thalidomid-relaterte legemidler, leflunomid, traneksaminsyre, T-614, prostaglandin E1, Tenidap, Naproxen, Meloxicam, Piroxicam, Diclofenac, Indomethacin, Sulfasalazine, Azathioprine, ICE-inhibitorer, zap-70-inhibitorer, lck-inhibitorer, VEGF-inhibitorer, VEGF-R-inhibitorer, kortikosteroider, TNF-konvertaseinhibitorer, anti-IL-12-antistoffer, interleukin-11, interleukin-13, interleukin-17-inhibitorer, gull, penicillamin, klorokin, hydroksyklorokin, klorambucil, cyklofosfamid, cyklosporin, anti-tymocytglobulin, anti-CD4-antistoffer, CD5-toksiner, oralt administrerte peptider, kollagen, lobenzarit-disodium, cytokinregulerende midler HP228 og HP466, ICAM-1-antisens-fosforotioat-oligodeoksynukleotider, løselig komplementreseptor 1, predinon, orgotein, glykosaminoglykan-polysulfat, minocyklin, anti-IL2R-antistoffer, marine lipider, botaniske lipider, auranofin, fenybutazon, meklofenaminsyre, flufenaminsyre, intravenøs immunglobulin, zileuton, mykofenolsyre, takrolimus, sirolimus, amiprilose, kladribin, azabrin,

budenosid, epidermal vekstfaktor, aminosalicylater, 6-merkaptopurin, metronidazol, lipoksygenaseinhibitorer, mesalamin, olsalazin, balsalazid, antioksidanter, tromboksaninhibitorer, IL-1-reseptorantagonister, anti-IL-1 β -monoklonale antistoffer, anti-IL-6-monoklonale antistoffer, vekstfaktorer, elastaseinhibitorer, pyridinyl-imidazolforbindelser, glukuronid-konjugerte prolegemidler av prednisolon, deksametason eller budesonid, dekstran-konjugerte prolegemidler av prednisolon, deksametason eller budesonid, løselig komplementreseptor 1, langsom-friggjørende mesalazin, antagonister av plate-aktiverende faktor (PAF), ciprofloksacin, lignokain, prednisolon, metylprednisolon, cyklofosfamin, 4-aminopyridin, tizanidin, interferon- β 1a, interferon- β 1b, kopolymer 1, hyperbarisk oksygen, intravenøs immunglobulin, klabribin, hypertoniske saltløsninger, antibiotika, kontinuerlig hemofiltrering, karbapenemer, antagonister av cytokiner slik som TNF α , IL-1 β , IL-6 og/eller IL-8, SK&F 107647, tetravalent guanylhydrazon CNI-1493, vevsfaktorreaksjonsveihemmer, PHP, jern-chelatorer og chelater, inkludert dietyltriampentaeddiksyre-jern(III)kompleks, lisofyllin, PGG-glukan, apolipoprotein A-1 rekonstituert med lipider, kirale hydroksaminsyrer, anti-endotoksinantistoffer, E5531, rBPI₂₁, syntetiske anti-endotoksinpeptider, overflate-erstatningsterapi og anti-IL-8.

Kort beskrivelse av tegningene

Figurene 1A og 1B viser aminosyresekvenser i lettkjede variabel-regionen til D2E7 (D2E7 VL; også vist i SEKV ID NR: 1), alanin-scan-mutanter av D2E7 VL (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 og LD2E7*.A8), lettkjede variabel-regionen til det D2E7-beslektede antistoff 2SD4 (2SD4 VL; også vist i SEKV ID NR: 9) og andre D2E7-beslektede lettkjede variabel-regioner (EP B12, VL10E4, VL100A9, VL100D2, VL10F4, LOE5, VLLOF9, VLL0F10, VLLOG7, VLLOG9, VLLOH1, VLLOH10, VL1B7, VL1C1, VL1C7, VL0,1F4, VL0,1H8, LOE7, LOE7.A og LOE7.T). Figur 1A viser FR1-, CDR1-, FR2- og CDR2-domener. Figur 1B viser FR3-, CDR3- og FR4-domener. Lettkjede CDR1- ("CDR L1"), CDR2- ("CDR L2") og CDR3- ("CDR L3") domener er innrammet.

Figurene 2A og 2B viser aminosyresekvenser av tungkjede variabel-regionen av D2E7 (D2E7 VH; også vist i SEKV ID NR: 2), alanin-scan-mutanter av D2E7 VH (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 og HD2E7*.A9), tungkjede variabel-
5 regionen av det D2E7-beslektede antistoff 2SD4 (2SD4 VH; også vist i SEKV ID NR: 10) og andre D2E7-beslektede tungkjede variabel-regioner (VH1B11, VH1D8, VH1A11, VH1B12, VH1-D2, VH1E4, VH1F6, VH1G1, 3C-H2, VH1-D2.N og VH1-D2.Y). Figur 2A viser FR1-, CDR1-, FR2- og CDR2-domenene. Figur 2B viser FR3-, CDR3- og FR4-domenene. Tungkjede CDR1- ("CDR H1"),
10 CDR2- ("CDR H2") og CDR3- ("CDR H3") domenenene er innrammet.

Figur 3 er en kurve som viser hemning av $\text{TNF}\alpha$ -fremkalt L929 cytotoxiskitet med human-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet D2E7, sammenlignet med det murine anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet MAK 195.

Figur 4 er en kurve som viser hemning av rh $\text{TNF}\alpha$ -binding til h $\text{TNF}\alpha$ -reseptorer på U-937-celler av human-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet D2E7,
15 sammenlignet med murint anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet MAK 195.

Figur 5 er en kurve som viser hemning av $\text{TNF}\alpha$ -fremkalt ELAM-1-ekspressjon på HUVEC av human-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet D2E7, sammenlignet med murin-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet MAK 195.

Figur 6 er et stolpediagram som viser beskyttelse mot $\text{TNF}\alpha$ -fremkalt dødelighet hos D-galaktosamin-sensibiliserte mus ved administrering av human-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet D2E7 (sorte stolper), sammenlignet med murin-anti-h $\text{TNF}\alpha$ -antistoffet MAK 195 (skraverte stolper).
20

Figur 7 viser nukleotidsekvensen av lett-kjede variabel-regionen av D2E7, med den forutsatte aminosyresekvens nedenfor nukleotidsekvensen. CDR L1-,
25 CDR L2- og CDR L3-regionene er understreket.

Figur 8 viser nukleotidsekvensen av tungkjede variabel-regionen i D2E7, med den forutsatte aminosyresekvens nedenfor nukleotidsekvensen. CDR H1-, CDR H2- og CDR H3-regionene er understreket.

Figur 9 er en kurve som viser virkningen av D2E7-antistoff-behandling på gjennomsnittlig ledd-størrelse hos Tg197 transgene mus som en polyartritt modell.
30

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av isolerte human-antistoffer eller antigen-bindingsdeler derav, som binder til human-TNF α med høy affinitet, lav frigjøringshastighet og høy nøytraliseringskapasitet for fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse hvor TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes. Forskjellige aspekter av oppfinnelsen angår fremgangsmåte for inhibering av human-TNF α *in vitro*, antistoffet D2E7 eller en antigenbindende del derav og farmasøytiske preparater som omfatter disse.

For at foreliggende oppfinnelse lettere skal forstås, er visse betegnelser
5 først definert.

Betegnelsen "human-TNF α " (forkortet her som hTNF α eller ganske enkelt hTNF), som anvendt her, skal referere til et human-cytokin som eksisterer som en 17 kD sekretert form og en 26 kD membran-assosiert form, idet den biologisk aktive form av denne består av en trimer av ikke kovalent
10 bundne 17 kD molekyler. Strukturen til hTNF α er videre beskrevet i for eksempel Pennica, D., *et al.* (1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J.M., *et al.* (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326; og Jones, E.Y., *et al.* (1989) *Nature* 338:225-228. Betegnelsen human-TNF α skal omfatte rekombinant human-TNF α (rhTNF α), som kan fremstilles ved standard rekombinante ekspresjons-
15 metoder eller anskaffes kommersielt (R & D Systems, Katalog Nr. 210-TA, Minneapolis, MN).

Betegnelsen "antistoff", som anvendt her, skal referere til immunoglobulinmolekyler bestående av fire polypeptidkjeder, to tung- (H) kjeder og to lett- (L) kjeder inter-forbundet med disulfidbindinger. Hver tungkjede består av
20 en tungkjede variabel-region (forkortet her som HCVR eller VH) og en tungkjede konstant-region. Tungkjede konstant-regionen består av tre domener, CH1, CH2 og CH3. Hver lettkjede består av en lettkjede variabel-region (forkortet her som LCVR eller VL) og en lettkjede konstant-region. Lettkjede konstant-regionen består av ett domene, CL. VH- og VL-regionene
25 kan være ytterligere underoppdelt i regioner av hypervariabilitet, betegnet komplementaritets-bestemmende regioner (CDR), innflettet med regioner som er mer konserverte, betegnet rammeverk-regioner (FR). Hver VH og VL er sammensatt av tre CDR og fire FR, arrangert fra amino-terminus til karboksy-

terminus i den følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Betegnelsen "antigen-bindingsdel" av et antistoff (eller enkelt "antistoffdel"), som anvendt her, angir ett eller flere fragmenter av et antistoff som opprettholder evnen til spesifikt å binde til et antigen (*f.eks.* hTNF α). Det er vist at antigen-bindingsfunksjonen til et antistoff kan utføres med fragmenter av et full-lengde antistoff. Eksempler på bindingsfragmenter omfattet av betegnelsen "antigen-bindingsdel" av et antistoff omfatter (i) et Fab-fragment, et monovalent fragment bestående av VL-, VH-, CL- og CH1-domener; (ii) et F(ab')₂-fragment, et bivalent fragment omfattende to Fab-fragmenter lenket av en disulfid-bro i hengsel-regionen; (iii) et Fd-fragment bestående av VH- og CH1-domener; (iv) et Fv-fragment bestående av VL- og VH-domener av en enkel arm av et antistoff, (v) et dAb-fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), som består av et VH-domene; og (vi) en isolert komplementaritets-bestemmende region (CDR). Videre, selv om de to domener av Fv-fragmentet, VL og VH, er kodet for av separate gener, kan de forbindes, ved anvendelse av rekombinante metoder, med en syntetisk linker som lar dem fremstilles som en enkel proteinkjede hvor VL- og VH-regionene pares for å danne monovalente molekyler (kjent som enkel-kjede Fv (scFv); se *f.eks.* Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; og Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Slike enkel-kjede antistoffer skal også omfattes av betegnelsen "antigen-bindingsdel" av et antistoff. Andre former for enkel-kjede antistoffer, så som "diabodies" omfattes også. "Diabodies" er bivalente, bispesifikke antistoffer hvor VH- og VL-domener er uttrykt på en enkel polypeptidkjede, men har en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domener på samme kjede, for derved å tvinge domenene til å pare med komplementære domener i en annen kjede og skape to antigen-bindingssteder (se *f.eks.* Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Videre kan et antistoff eller antigen-bindingsdel derav være del av større immuno adhesjonsmolekyler, dannet ved kovalent eller ikke-kovalent tilknytning av antistoffet eller antistoffdelen til ett eller flere andre proteiner eller peptider. Eksempler på slike immuno adhesjonsmolekyler omfatter anvendelse av

streptavidin-kjerneregionen for å fremstille et tetramert scFv-molekyl (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) og anvendelse av en cystein-rest, et markør-peptid og et C-terminalt polyhistidin-merke for å fremstille bivalente og biotinylerede scFv-molekyler (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Antistoffdeler, så som Fab- og F(ab')₂-fragmenter, kan fremstilles fra hele antistoffer ved anvendelse av konvensjonelle teknikker, så som henholdsvis papain- eller pepsin-fordøyelse av hele antistoffer. Videre kan antistoffer, antistoffdeler og immuno adhesjonsmolekyler oppnås ved anvendelse av standard rekombinante DNA-teknikker, som beskrevet her.

Betegnelsen "human-antistoff", som anvendt her, skal omfatte antistoffer som har variable og konstante regioner avledet fra human-kimlinje-immunoglobulinsekvenser. Human-antistoffene ifølge oppfinnelsen kan omfatte aminosyrerester som ikke kodes for av human-kimlinje-immunoglobulinsekvenser (*f.eks.* mutasjoner innført ved tilfeldig eller sete-spesifikk mutagenese *in vitro* eller ved somatisk mutasjon *in vivo*), for eksempel i CDR og spesielt CDR3. Imidlertid skal betegnelsen "human-antistoff", som anvendt her, ikke omfatte antistoffer hvor CDR-sekvenser avledet fra kimlinje fra en annen pattedyrart, så som en mus, er podet i human-rammeverksekvenser.

Betegnelsen "rekombinant human-antistoff", som anvendt her, skal omfatte alle human-antistoffer som blir fremstilt, uttrykt, skapt eller isolert ved rekombinante metoder, så som antistoffer uttrykt ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert i en vertscelle (ytterligere beskrevet i Seksjon II, nedenfor), antistoffer isolert fra et rekombinant, kombinatorisk human-antistoff-bibliotek (ytterligere beskrevet i Seksjon III nedenfor), antistoffer isolert fra et dyr (*f.eks.* en mus) som er transgent for human-immunoglobulin-gener (se *f.eks.* Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) eller antistoffer fremstilt, uttrykt, skapt eller isolert ved hvilke som helst andre metoder som involverer spleising av human-immunoglobulin-gensekvenser med andre DNA-sekvenser. Slike rekombinante human-antistoffer har variable og konstante regioner avledet fra human-kimlinje-immunoglobulinsekvenser. Ved visse utførelsesformer blir imidlertid slike rekombinante human-antistoffer underkastet *in vitro* mutagenese (eller når et dyr transgent for human-Ig-sekvenser blir anvendt, *in vivo* somatisk

mutagenese) og aminosyresekvensene i VH- og VL-regionene av de rekombinante antistoffer er således sekvenser som, selv om de er avledet fra og relatert til human-kimlinje-VH- og VL-sekvenser, ikke kan eksistere naturlig i human-antistoff kimlinje-repertoar *in vivo*.

5 Et "isolert antistoff", som anvendt her, skal referere til et antistoff som er i alt vesentlig fritt for andre antistoffer som har forskjellig antigen-spesifitet (*f.eks.* er et isolert antistoff som spesifikt binder til hTNF α , i det vesentlige fritt for antistoffer som spesifikt binder til antigener forskjellig fra hTNF α). Et isolert antistoff som spesifikt binder til hTNF α kan imidlertid ha kryssreaktivitet til andre
10 antigener, så som TNF α -molekyler fra andre arter (beskrevet mer detaljert nedenfor). Videre kan et isolert antistoff være i alt vesentlig fritt for annet cellulært materiale og/eller kjemikalier.

Et "nøytraliserende antistoff", som anvendt her (eller et "antistoff som nøytraliserer hTNF α -aktivitet"), skal referere til et antistoff hvis binding til hTNF α
15 resulterer i hemning av den biologiske aktiviteten til hTNF α . Denne hemning av den biologiske aktiviteten til hTNF α kan bestemmes ved måling av én eller flere indikatorer for hTNF α biologisk aktivitet, så som hTNF α -fremkalt cytotoksisitet (enten *in vitro* eller *in vivo*), hTNF α -fremkalt cellulær aktivering og hTNF α -binding til hTNF α -reseptorer. Disse indikatorer for hTNF α biologisk aktivitet kan
20 bedømmes ved én eller flere av mange standard *in vitro*- eller *in vivo*-forsøk kjent på området (se Eksempel 4). Fortrinnsvis blir evnen til et antistoff til å nøytraliserer hTNF α -aktivitet bedømt ved hemning av hTNF α -fremkalt cytotoksisitet av L929-celler. Som en ytterligere eller alternativ parameter for hTNF α -aktivitet, kan evnen til et antistoff til å hemme hTNF α -fremkalt
25 ekspresjon av ELAM-1 på HUVEC, som et mål på hTNF α -fremkalt cellulær aktivering, bestemmes.

Betegnelsen "overflate plasmonresonans", som anvendt her, angir et optisk fenomen som tillater analyse av sanntids biospesifikke interaksjoner ved deteksjon av endringer i proteinkonsentrasjoner i en biosensor-matriks, for
30 eksempel ved anvendelse av BIAcore-systemet (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige og Piscataway, NJ). For ytterligere beskrivelser, se Eksempel 1 og Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.*

(1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; og Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Betegnelsen " K_{off} ", som anvendt her skal referere til frigjøringskonstanten for dissosiering av et antistoff fra antistoff/antigenkomplekset.

5 Betegnelsen " K_d ", som anvendt her, skal referere til dissosiasjonskonstanten for en spesiell antistoff-antigen-interaksjon.

Betegnelsen "nukleinsyremolekyl", som anvendt her, skal omfatte DNA-molekyler og RNA-molekyler. Et nukleinsyremolekyl kan være enkeltrådet eller dobbeltrådet, men er fortrinnsvis dobbeltrådet DNA.

10 Betegnelsen "isolert nukleinsyremolekyl", som anvendt her i forbindelse med nukleinsyrer som koder for antistoffer eller antistoffdeler (*f.eks.* VH, VL, CDR3) som binder til hTNF α , skal angi et nukleinsyremolekyl hvor nukleotidsekvenser som koder for antistoffet eller antistoffdelen er fri for andre nukleotidsekvenser som koder for antistoffer eller antistoffdeler som binder til
15 antigener forskjellig fra hTNF α , hvilke andre sekvenser naturlig kan flankere nukleinsyren i humant genomisk DNA. For eksempel inneholder en isolert nukleinsyre ifølge oppfinnelsen som koder for en VH-region av et anti-TNF α -antistoff således ingen andre sekvenser som koder for andre VH-regioner som binder til antigener forskjellig fra TNF α .

20 Betegnelsen "vektor", som anvendt her, skal referere til et nukleinsyremolekyl som kan transportere en annen nukleinsyre til hvilken den er lenket. En type vektor er et "plasmid", som angir en sirkulær dobbeltrådet DNA-løkke til hvilken ytterligere DNA-segmenter kan være ligert. En annen type vektor er en viral vektor, hvor ytterligere DNA-segmenter kan være ligert i det virale genom.
25 Visse vektorer er i stand til autonom replikasjon i en vertscelle i hvilken de er innført (*f.eks.* bakterielle vektorer som har bakteriell replikasjonsopprinnelse og episomale pattedyr-vektorer). Andre vektorer (*f.eks.* ikke-episomale pattedyr-vektorer) kan integreres i genomet til en vertscelle ved innføring i vertscellen og blir derved replikert sammen med vertsgenomet. Videre er visse vektorer i
30 stand til å dirigere uttrykket av gener som de er operativt bundet til. Slike vektorer er referert til her som "rekombinante ekspresjonsvektorer" (eller enklere, "ekspresjonsvektorer"). Generelt er ekspresjonsvektorer som er nyttige ved rekombinante DNA-teknikker ofte i form av plasmider. I

foreliggende beskrivelse kan "plasmid" og "vektor" anvendes om hverandre, ettersom plasmidet er den mest vanlig anvendte form av vektor. Imidlertid skal oppfinnelsen omfatte slike andre former for ekspresjonsvektorer, så som virale vektorer (*f.eks.* replikasjonsdefekte retrovirus, adenovirus og adeno-assosierte virus), som tjener ekvivalente funksjoner.

Betegnelsen "rekombinant vertscelle" (eller enklere "vertscelle"), som anvendt her, skal referere til en celle i hvilken en rekombinant ekspresjonsvektor er innført. Det skal forstås at slike betegnelser skal angi ikke bare den spesielle aktuelle celle men også avkommet til en slik celle. Fordi visse modifikasjoner kan forekomme i påfølgende generasjoner på grunn av enten mutasjon eller påvirkning fra omgivelsene, trenger ikke slikt avkom i realiteten være identisk med modercellen, men omfattes allikevel av betegnelsen "vertscelle" som anvendt her.

Forskjellige aspekter ved oppfinnelsen er beskrevet mer detaljert i de følgende underavsnitt.

I. Human-antistoffer som binder human-TNF α

Foreliggende oppfinnelse anvender isolerte human-antistoffer eller antigen-bindingsdeler derav, som binder til human-TNF α med høy affinitet, lav frigjøringshastighet og høy nøytraliserings-kapasitet. Fortrinnsvis er human-antistoffene som anvendes ifølge oppfinnelsen rekombinante, nøytraliserende human-anti-hTNF α - antistoffer. Det mest foretrukne rekombinante, nøytraliserende antistoff som anvendes ifølge oppfinnelsen er referert til her som D2E7 og har VL- og VH-sekvenser som vist i henholdsvis Figur 1A, 1B og Figur 2A, 2B (aminosyresekvensen til D2E7 VL-regionen er også vist i SEKV ID NR: 1; aminosyresekvensen til D2E7 VH-regionen er også vist i SEKV ID NR: 2). Bindingsegenskapene til D2E7, sammenlignet med det murine anti-hTNF α MAK 195 mAb som oppviser høy affinitet og langsom dissosiasjons-kinetikk og et annet human-anti-hTNF α -antistoff-beslektet i sekvens med D2E7, 2SD4, er oppsummert nedenfor:

Antistoff	K_{off} sek ⁻¹	K_{on} M ⁻¹ sek ⁻¹	K_d M	Støkiometri
D2E7 IgG1	$8,81 \times 10^{-5}$	$1,91 \times 10^5$	$6,09 \times 10^{-10}$	1,2
2SD4 IgG4	$8,4 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^5$	$2,00 \times 10^{-8}$	0,8
MAK 195 F(ab') ₂	$8,70 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^5$	$4,60 \times 10^{-10}$	1,4

D2E7-antistoffet og beslektede antistoffer har også stor kapasitet til å nøytralisere hTNF α -aktivitet, som bestemt ved flere *in vitro*- og *in vivo*-forsøk (se Eksempel 4). For eksempel nøytraliserer disse antistoffer hTNF α -fremkalt cytotoksitet av L929-celler med IC₅₀-verdier i området omtrent 10⁻⁷ M til omtrent 10⁻¹⁰ M. D2E7, når det er uttrykt som et full-lengde IgG1-antistoff, nøytraliserer hTNF α -fremkalt cytotoksitet av L929-celler med IC₅₀ på omtrent 1,25 x 10⁻¹⁰ M. Dessuten blir den nøytraliserende kapasiteten til D2E7 opprettholdt når antistoffet er uttrykt som et Fab-, F(ab')₂- eller scFv-fragment.

D2E7 hemmer også TNF α -fremkalt cellulær aktivering, som målt ved hTNF α -fremkalt ELAM-1-ekspressjon på HUVEC (IC₅₀ = omtrent 1,85 x 10⁻¹⁰ M) og binding av hTNF α til hTNF α -reseptorer på U-937-celler (IC₅₀ = omtrent 1,56 x 10⁻¹⁰ M). Når det gjelder sistnevnte, hemmer D2E7 binding av hTNF α til både p55 og p75 hTNF α -reseptorer. Videre hemmer antistoffet hTNF α -fremkalt dødelighet *in vivo* hos mus (ED₅₀ = 1-2,5 mg/mus).

Når det gjelder bindingsspesifisiteten av D2E7, binder dette antistoffet til human-TNF α i forskjellige former, omfattende oppløselig hTNF α , transmembran- hTNF α og hTNF α bundet til cellulære reseptorer. D2E7 binder ikke spesifikt til andre cytokiner, så som lymfotoksin (TNF β), IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN γ og TGF β . Imidlertid oppviser ikke D2E7 kryssreaktivitet til tumornekrose-faktorer fra andre arter. For eksempel nøytraliserer antistoffet aktiviteten til minst fem primat TNF α (sjimpanse, bavian, marmosett, cynomolgus og rhesus) med omtrent ekvivalente IC₅₀-verdier som for nøytralisering av hTNF α (se Eksempel 4, underavsnitt E). D2E7 nøytraliserer også aktiviteten til mus-TNF α , selv om det er omtrent 1000-ganger mindre godt

enn human-TNF α (se Eksempel 4, underavsnitt E). D2E7 binder også til hund- og gris-TNF α .

Ved ett aspekt angår oppfinnelsen D2E7-antistoffer og antistoffdeler, Andre D2E7-beslektede antistoffer og antistoffdeler og andre human-antistoffer og antistoffdeler med ekvivalente egenskaper til D2E7, så som høy affinitet ved binding til hTNF α med lav dissosiasjonskinetikk og høy nøytraliserende kapasitet kan anvendes. Det beskrives et isolert human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, som dissosierer fra human-TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{Off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflate-plasmonresonans og nøytraliserer human-TNF α -cytotoksisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-7} M eller mindre. Mer foretrukket dissosierer det isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav, fra human-TNF α med en K_{Off} på $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre eller enda mer foretrukket, med en K_{Off} på $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre. Mer foretrukket nøytraliserer det isolerte human-antistoff eller antigen-bindingsdelen derav, human-TNF α -cytotoksisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-8} M eller mindre, enda mer foretrukket med en IC_{50} på 1×10^{-9} M eller mindre og spesielt foretrukket med en IC_{50} på 5×10^{-10} M eller mindre. Ved en foretrukket utførelsesform anvendes et isolert humant rekombinant antistoff eller en antigen-bindingsdel derav. Ved en annen foretrukket utførelsesform nøytraliserer også antistoffet som anvendes TNF α -fremkalt cellulær aktivering, som bedømt ved anvendelse av en standard *in vitro*-testanalyse med TNF α -fremkalt ELAM-1-ekspresjon på human umbilikalvene-endotelceller (HUVEC).

Overflate-plasmonresonans-analyse for bestemmelse av K_D og K_{Off} kan utføres som beskrevet i Eksempel 1. En standard *in vitro* L929-testanalyse for bestemmelse av IC_{50} -verdier er beskrevet i Eksempel 4, underavsnitt A. En standard *in vitro*-testanalyse for TNF α -fremkalt ELAM-1-ekspresjon på human-umbilikalvene-endotelceller (HUVEC) er beskrevet i Eksempel 4, underavsnitt C. Eksempler på rekombinante human-antistoffer som imøtekommer eller er forventet å imøtekomme, ovennevnte kinetiske og nøytraliserende kriterier

omfatter antistoffer som har de følgende [VH/VL] par; sekvensene for hvilke er vist i Figurene 1A, 1B, 2A og 2B (se også Eksempler 2, 3 og 4 for kinetikk- og nøytraliserings-analyser): [D2E7 VH/D2E7 VL]; [HD2E7*.A1/D2E7 VL], [HD2E7*.A2/D2E7 VL], [HD2E7*.A3/D2E7 VL], [HD2E7*.A4/D2E7 VL], [HD2E7*.A5/D2E7 VL], [HD2E7*.A6/D2E7 VL], [HD2E7*.A7/D2E7 VL], [HD2E7*.A8/D2E7 VL], [HD2E7*.A9/D2E7 VL], [D2E7 VH/LD2E7*.A1], [D2E7 VH/LD2E7*.A4], [D2E7 VH/LD2E7*.A5], [D2E7 VH/LD2E7*.A7], [D2E7 VH/LD2E7*.A8], [HD2E7*.A9/LD2E7*.A1], [VH1-D2/LOE7], [VH1-D2.N/LOE7.T], [VH1-D2.Y/LOE7.A], [VH1-D2.N/LOE7.A], [VH1-D2/EP B12] og [3C-H2/LOE7].

Det er velkjent på området at antistoff-tung- og lettkjede CDR3-domener spiller en viktig rolle i bindingsspesifisitet/affinitet av et antistoff for et antigen. Følgelig angår oppfinnelsen ved et annet aspekt anvendelse av human-antistoffer som har langsom dissosiasjons-kinetikk for assosiering med hTNF α og som har lett- og tungkjede CDR3-domener som strukturelt er identiske med eller beslektet med de til D2E7. Som vist i Eksempel 3, kan stilling 9 av D2E7 VL CDR3 være okkupert av Ala eller Thr uten i særlig grad å påvirke K_{off} .

Følgelig omfatter et konsensus-motiv for D2E7 VL CDR3, aminosyresekvensen: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEKV ID NR: 3). Videre kan stilling 12 i D2E7 VH CDR3 være okkupert av Tyr eller Asn, uten i særlig grad å påvirke K_{off} .

Følgelig omfatter et konsensusmotiv for D2E7 VH CDR3 aminosyresekvensen: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEKV ID NR: 4). Videre, som demonstrert i Eksempel 2, er CDR3-domenet av D2E7 tung- og lettkjeder mottagelig for substitusjon med en enkel alaninrest (i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 i VL CDR3 eller i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 i VH CDR3) uten i særlig grad å påvirke K_{off} . Videre vil fagfolk på området forstå at, gitt mottageligheten til D2E7 VL- og VH-CDR3- domener for substitusjoner med alanin, kan substitusjon av andre aminosyrer i CDR3- domenene være mulig mens den lave frigjøringshastighetskonstanten til antistoffet opprettholdes, spesielt substitusjoner med konservative aminosyrer. En "konservativ aminosyre-substitusjon", som anvendt her, er én hvor én aminosyrerest blir erstattet med en annen aminosyrerest som har en lignende sidekjede. Familier av aminosyrerester som har lignende sidekjerder er definert i litteraturen,

omfattende basiske sidekjeder (*f.eks.* lysin, arginin, histidin), sure sidekjeder (*f.eks.* asparaginsyre, glutaminsyre), uladete polare sidekjeder (*f.eks.* glycin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein), ikke-polare sidekjeder (*f.eks.* alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin, tryptofan),
 5 beta-forgrenede sidekjeder (*f.eks.* treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (*f.eks.* tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Fortrinnsvis blir ikke mer enn én til fem konservative aminosyresubstitusjoner utført i D2E7 VL- og/eller VH-CDR3-domener. Mer foretrukket blir ikke mer enn én til tre konservative aminosyresubstitusjoner utført i D2E7 VL- og/eller VH-CDR3-
 10 domener. Videre bør ikke konservative aminosyresubstitusjoner gjøres i aminosyrestillinger som er kritiske for binding til hTNF α . Som vist i Eksempel 3 synes stillingene 2 og 5 i D2E7-VL-CDR3 og stillinger 1 og 7 i D2E7-VH-CDR3 å være kritiske for interaksjon med hTNF α og konservative aminosyre-
 15 substitusjoner blir således fortrinnsvis ikke gjort i disse stillinger (selv om en alaninsubstitusjon i stilling 5 av D2E7-VL-CDR3 er godtagbar, som beskrevet ovenfor).

Ved en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende anvendelse av et isolert human-antistoff eller antigen-bindingsdel derav, med de følgende karakteristika:

- 20 a) dissosierer fra human-TNF α med en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, som bestemt ved overflate-plasmonresonans;
- b) har et lettjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 eller modifisert fra SEKV ID NR: 3 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 eller ved én til fem konservative
 25 aminosyresubstitusjoner i stillingene 1, 3, 4, 6, 7, 8 og/eller 9;
- c) har et tungjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4 eller modifisert fra SEKV ID NR: 4 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 eller ved én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11
 30 og/eller 12.

Mer foretrukket dissosierer det anvendte antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav, fra human-TNF α med en K_{off} på $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre.

Enda mer foretrukket dissosierer det anvendte antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav, fra human-TNF α med en K_{off} på $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eller mindre.

Ved enda en annen utførelsesform anvendes et isolert human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, med en lett kjede variabel-region (LCVR) som har et CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 eller modifisert fra SEKV ID NR: 3 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 og med en tungkjede variabel-region (HCVR) som har et CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4 eller modifisert fra SEKV ID NR: 4 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11. Fortrinnsvis har LCVR ytterligere et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 5 (dvs. D2E7 VL CDR2) og HCVR har ytterligere et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 6 (dvs. D2E7 VH CDR2). Enda mer foretrukket har LCVR ytterligere et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 7 (dvs. D2E7 VL CDR1) og HCVR har et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 8 (dvs. D2E7 VH CDR1). Rammeverkregioner for VL er fortrinnsvis fra $V_{\kappa 1}$ human kimlinjefamilie, mer foretrukket fra A20 human kimlinje V_{κ} -gen og mest foretrukket fra D2E7 VL-rammeverksekvensene vist i Figurene 1A og 1B. Rammeverkregionene for VH er fortrinnsvis fra V_{H3} human-kimlinjefamilien, mer foretrukket fra DP-31 human kimlinje VH-gen og mest foretrukket fra D2E7 VH-rammeverksekvensene vist i Figurene 2A og 2B.

Ved enda en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et isolert human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, med en lett kjede variabel-region (LCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 (dvs. D2E7 VL) og en tungkjede variabel-region (HCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2 (dvs. D2E7 VH). I visse utførelsesformer omfatter antistoffet en tungkjede konstant-region, så som en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD konstant-region. Fortrinnsvis er tungkjede konstant-regionen en IgG1 tungkjede konstant-region eller en IgG4 tungkjede konstant-region. Videre kan antistoffet omfatte en lett kjede konstant-region, enten en kappa lett kjede konstant-region eller en lambda lett kjede konstant-region. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en kappa lett kjede konstant-

region. Alternativt kan antistoffdelen for eksempel være et Fab-fragment eller et enkel-kjede Fv-fragment.

Det beskrives et isolert human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, som har D2E7-beslektede VL- og VH- CDR3-domener, for eksempel antistoffer eller antigen-bindingsdeler derav, med en lettkjede variabel-region (LCVR) som har et CDR3-domene omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR: 3, SEKV ID NR: 11, SEKV ID NR: 12, SEKV ID NR: 13, SEKV ID NR: 14, SEKV ID NR: 15, SEKV ID NR: 16, SEKV ID NR: 17, SEKV ID NR: 18, SEKV ID NR: 19, SEKV ID NR: 20, SEKV ID NR: 21, SEKV ID NR: 22, SEKV ID NR: 23, SEKV ID NR: 24, SEKV ID NR: 25 og SEKV ID NR: 26 eller med en tungkjede variabel-region (HCVR) som har et CDR3-domene omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR: 4, SEKV ID NR: 27, SEKV ID NR: 28, SEKV ID NR: 29, SEKV ID NR: 30, SEKV ID NR: 31, SEKV ID NR: 32, SEKV ID NR: 33, SEKV ID NR: 34 og SEKV ID NR: 35.

Det beskrives et rekombinant human-antistoff eller en antigen-bindingsdel derav, som nøytraliserer aktiviteten til human-TNF α men ikke human-TNF β . Fortrinnsvis nøytraliserer antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav også aktiviteten av sjimpanse-TNF α og minst én ytterligere primat-TNF α valgt fra gruppen bestående av bavian-TNF α , mamosett-TNF α , cynomolgus-TNF α og rhesus-TNF α . Fortrinnsvis nøytraliserer antistoffet eller antigen-bindingsdelen derav, human-, sjimpanse- og/eller ytterligere primat-TNF α i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC₅₀ på 1×10^{-8} M eller mindre, mer foretrukket 1×10^{-9} M eller mindre og enda mer foretrukket 5×10^{-10} M eller mindre. I én subutførelsesform nøytraliserer antistoffet som anvendes også aktiviteten til hund-TNF α , fortrinnsvis i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC₅₀ på 1×10^{-7} M eller mindre, mer foretrukket 1×10^{-8} M eller mindre og enda mer foretrukket 5×10^{-9} M eller mindre. I en annen subutførelsesform nøytraliserer antistoffet som anvendes også aktiviteten til gris-TNF α , fortrinnsvis med en IC₅₀ på 1×10^{-5} M eller mindre, mer foretrukket 1×10^{-6} M eller mindre og enda mer foretrukket 5×10^{-7} M eller mindre. Ved enda en annen utførelsesform nøytraliserer antistoffet som anvendes også aktiviteten til mus-

TNF α , fortrinnsvis med en IC₅₀ på 1×10^{-4} M eller mindre, mer foretrukket 1×10^{-5} M eller mindre og enda mer foretrukket 5×10^{-6} M eller mindre.

Et antistoff eller en antistoffdel som anvendes ifølge oppfinnelsen kan derivatiseres eller knyttes til et annet funksjonelt molekyl (f.eks. et annet peptid eller protein). Følgelig skal antistoffene og antistoffdelene som anvendes ifølge oppfinnelsen omfatte derivatiserte og på annen måte modifiserte former av human-anti-hTNF α -antistoffene beskrevet her, omfattende immuno-adhesjonsmolekyler. For eksempel kan et antistoff eller en antistoffdel som anvendes ifølge oppfinnelsen være funksjonelt bundet (ved kjemisk kobling, genetisk kondensering, ikke-kovalent assosiering eller på annen måte) til én eller flere andre molekylgrupper, så som et annet antistoff (f.eks. et bispesifikt antistoff eller et "diabody"), et detekterbart middel, et cytotoxisk middel, et farmasøytisk middel og/eller et protein eller peptid som kan mediere tilknytning av antistoffet eller antistoffdelen til et annet molekyl (så som en streptavidin-kjerneregion eller et polyhistidinmerke).

En type derivatisert antistoff blir produsert ved kryssbinding av to eller flere antistoffer (av samme type eller av forskjellige typer, f.eks. for å danne bispesifikke antistoffer). Egnede kryssbindingsmidler omfatter de som er heterobifunksjonelle, som har to distinkte reaktive grupper separert av en passende spacer (f.eks. m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysuccinimid-ester) eller homobifunksjonelle (f.eks. disuccinimidyl-suberat). Slike linkere er tilgjengelig fra Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Nyttige detekterbare midler med hvilke et antistoff eller en antistoffdel ifølge oppfinnelsen kan være derivatisert, omfatter fluorescerende forbindelser. Eksempler på fluorescerende detekterbare midler omfatter fluorescein, fluorescein-isotiocyanat, rhodamin, 5-dimetylamino-1-naftalensulfonylklorid, fykoerytrin og lignende. Et antistoff kan også derivatiseres med detekterbare enzymer, så som alkalisk fosfatase, pepperrot-peroksydase, glukose-oksydase og lignende. Når et antistoff er derivatisert med et detekterbart enzym, blir det detektert ved tilsetning av ytterligere reagenser som enzymet anvender for å produsere et detekterbart reaksjonsprodukt. Når for eksempel det detekterbare middel pepperrot-peroksydase er til stede, fører tilsetning av hydrogenperoksyd og diaminobenzidin til et farget reaksjonsprodukt, som er detekterbart. Et

antistoff kan også derivatiseres med biotin og detekteres gjennom indirekte måling av avidin- eller streptavidin-binding.

II. Ekspresjon av antistoffer

5 Et antistoff eller en antistoffdel ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved rekombinant ekspresjon av immunoglobulin lett- og tungkjede-gener i en vertscelle. For å uttrykke et antistoff rekombinant, blir en vertscelle transfektert med én eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer som bærer DNA-fragmenter som koder for immunoglobulin lett- og tungkjeder av antistoffet slik
10 at lett- og tungkjedene blir uttrykt i vertscellen og, fortrinnsvis, utskilt i det medium hvor vertscellene blir dyrket, fra hvilket medium antistoffene kan gjenvinnes. Standard rekombinante DNA-metoder blir anvendt for å oppnå antistoff tung- og lettkjedegener, innføre disse gener i rekombinante ekspresjonsvektorer og innføre vektorene i vertsceller, så som de beskrevet i
15 Sambrook, Fritsch og Maniatis (ed.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, (1989) og i U.S.-patent nr. 4,816,397 av Boss et al.

For å uttrykke D2E7 ifølge oppfinnelsen eller et D2E7-beslektet antistoff,
20 blir DNA-fragmenter som koder for lett- og tungkjedevariable regioner først oppnådd. Disse DNAer kan oppnås ved amplifisering og modifikasjon av kimlinje lett- og tungkjedevariable sekvenser ved anvendelse av polymerase kjede-reaksjon (PCR). Kimlinje DNA-sekvenser for human-tung- og lettkjede variabel-region gener er kjent på området (se f.eks. "Vbase" human kimlinje
25 sekvens database; se også Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publikasjon Nr. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; og
30 Cox, J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_k Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; idet innholdet av hver av disse inntas her ved referanse). For å oppnå et DNA-fragment som koder for den tungkjedevariable region av D2E7 eller et D2E7-

beslektet antistoff, blir et medlem av V_H3 - familien human-kimlinje VH-gener amplifisert ved standard PCR. Mest foretrukket blir DP-31 VH-kimlinje-sekvensen amplifisert. For å oppnå et DNA- fragment som koder for lettkjede variabel-regionen i D2E7 eller et D2E7-beslektet antistoff, blir et medlem av V_{kl} -

5 familien av human-kimlinje VL-gener amplifisert ved standard PCR. Mest foretrukket amplifiseres A20 VL-kimlinje-sekvensen. PCR-primere egnet for anvendelse ved amplifisering av DP-31 kimlinje VH- og A20 kimlinje VL-sekvenser kan konstrueres på basis av nukleotidsekvensene beskrevet i referansene referert til ovenfor, ved anvendelse av standard metoder.

10 Når kimlinje VH- og VL-fragmenter blir oppnådd, kan disse sekvenser muteres til å kode for D2E7 eller D2E7-beslektede aminosyresekvenser beskrevet her. Aminosyresekvenser kodet for av kimlinje VH- og VL-DNA-sekvenser blir først sammenlignet med D2E7 eller D2E7-beslektede VH- og VL-aminosyresekvenser for å identifisere aminosyrerestene i D2E7 eller den D2E7-

15 beslektede sekvens som skiller seg fra kimlinjen. Deretter blir de passende nukleotider i kimlinje DNA-sekvenser mutert slik at den muterte kimlinje-sekvens koder for D2E7 eller en D2E7-beslektet aminosyresekvens, ved anvendelse av den genetiske koden for å bestemme hvilke nukleotid-endringer som skal gjøres. Mutagenese av kimlinje-sekvenser blir utført ved standard

20 metoder, så som PCR-mediert mutagenese (hvor de muterte nukleotider blir innført i PCR-primere slik at PCR-produktet inneholder mutasjonene) eller sete-styrt mutagenese.

Videre skal det bemerkes at hvis "kimlinje"-sekvenser oppnådd ved PCR-amplifisering koder for aminosyreforskjeller i rammeverkregioner fra den riktige kimlinje-konfigurasjon (dvs. forskjeller i den amplifiserte sekvens sammenlignet

25 med den riktige kimlinjesekvens, for eksempel som et resultat av somatisk mutasjon), kan det være ønskelig å endre disse aminosyreforskjeller tilbake til de riktige kimlinje-sekvenser (dvs. "tilbakemutasjon" av rammeverkrester til kimlinje-konfigurasjon).

30 Når DNA-fragmenter som koder for D2E7 eller D2E7-beslektede VH- og VL- segmenter er oppnådd (ved amplifisering og mutagenese av kimlinje VH- og VL- gener, som beskrevet ovenfor), kan disse DNA-fragmenter ytterligere manipuleres ved standard rekombinante DNA-teknikker, for eksempel for å

omdanne variabel-regioner til full-lengde antistoffkjede-gener, til Fab-fragment-gener eller til et scFv-gen. Ved disse manipulasjonene blir et VL- eller VH-kodende DNA-fragment operativt lenket til et annet DNA-fragment som koder for et annet protein, så som en antistoff konstant-region eller en fleksibel linker. Betegnelsen "operativt lenket", som anvendt i denne sammenheng skal bety at de to DNA-fragmenter er knyttet sammen slik at aminosyresekvenser som kodes av de to DNA-fragmenter forblir i rammen.

Det isolerte DNA som koder for VH-regionen kan omdannes til et full-lengde tungkjede gen ved operativ lenking av VH-kodende DNA til et annet DNA-molekyl som koder for tungkjede konstante regioner (CH1, CH2 og CH3). Sekvensene av humane tungkjede konstant-regioner er kjent i litteraturen (se f.eks. Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publikasjon Nr. 91-3242) og DNA-fragmenter som omfatter disse regioner kan oppnås ved standard PCR-amplifisering. Tungkjede konstant-regionen kan være en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD konstant-region, men er mest foretrukket en IgG1 eller IgG4 konstant-region. For et Fab-fragment tungkjede gen, kan VH-kodende DNA være operativt lenket til et annet DNA-molekyl som koder for bare tungkjede CH1-konstant-regionen.

Det isolerte DNA som koder for VL-regionen kan omdannes til et full-lengde lettkjede gen (så vel som et Fab-lettkjede gen) ved operativ lenking av VL-kodende DNA til et annet DNA-molekyl som koder for lettkjede konstant-regionen, CL. Sekvenser av human lettkjede konstant-regioner er kjent på området (se f.eks. Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publikasjon nr. 91-3242) og DNA-fragmenter som omfatter disse regioner kan oppnås ved standard PCR-amplifisering. Lettkjede konstant-regionen kan være en kappa- eller lambda-konstant-region, men mest foretrukket er den en kappa-konstant-region.

For å danne et scFv-gen, blir VH- og VL-kodende DNA-fragmenter operativt lenket til et annet fragment som koder for en fleksibel linker, f.eks. som koder for aminosyresekvensen (Gly₄-Ser)₃, slik at VH- og VL-sekvenser kan uttrykkes som et tilstøtende enkel-kjede protein, med VL- og VH-regioner knyttet sammen av en fleksibel linker (se f.eks. Bird et al. (1988) *Science*

242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).

For å uttrykke antistoffene eller antistoffdelene, blir DNA som koder for partielle eller full-lengde lette og tunge kjeder, oppnådd som beskrevet ovenfor, innført i ekspresjonsvektorer slik at genene blir operativt lenket til transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsekvenser. I denne sammenheng skal betegnelsen "operativt lenket" bety at et antistoffgen er ligert i en vektor slik at transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsekvenser innen vektoren tjener deres tiltenkte funksjon av regulering av transkripsjon og translasjon av antistoffgenet. Ekspresjonsvektor- og ekspresjonskontrollsekvenser er valgt slik at de er kompatible med den anvendte ekspresjonsvertscelle. Antistoff-lettkjede genet og antistoff-tungkjede genet kan innføres i separate vektorer eller, mer typisk, begge gener blir innsatt i den samme ekspresjonsvektor. Antistoffgener blir innsatt i ekspresjonsvektoren ved standard metoder (*f.eks.* ligering av komplementære restriksjonssteder på antistoffgenfragment og vektor eller butt-ende ligering hvis ingen restriksjonssteder er til stede). Før innføring av D2E7 eller D2E7-beslektede lett- eller tungkjedesekvenser, kan ekspresjonsvektoren allerede bære antistoff-konstant-regionsekvenser. For eksempel er en metode for omdannelse av D2E7 eller D2E7-beslektede VH- og VL-sekvenser til full-lengde antistoffgener å innføre dem i ekspresjonsvektorer som allerede koder for henholdsvis tungkjede konstante og lettkjede konstante regioner, slik at VH-segmentet er operativt lenket til CH-segment(er) i vektoren og VL-segmentet er operativt lenket til CL-segmentet i vektoren. I tillegg eller alternativt kan den rekombinante ekspresjonsvektor kode for et signalpeptid som letter sekresjon av antistoff-kjeden fra en vertscelle. Antistoffkjedegenet kan klones i vektoren slik at signal-peptidet blir lenket innen rammen til amino-terminus i antistoffkjedegenet. Signalpeptidet kan være et immunoglobulin-signalpeptid eller et heterologt signalpeptid (dvs. et signalpeptid fra et ikke-immunoglobulin-protein).

I tillegg til antistoffkjedegener, bærer de rekombinante ekspresjonsvektorer ifølge oppfinnelsen regulerende sekvenser som kontrollerer ekspresjon av antistoffkjedegener i en vertscelle. Betegnelsen "regulerende sekvens" skal omfatte promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer (*f.eks.* polyadenyleringssignaler) som kontrollerer transkripsjon eller translasjon av

antistoffkjedegener. Slike regulerende sekvenser er for eksempel beskrevet i Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Det vil forstås av fagfolk på området at design av ekspresjonsvektor, omfattende seleksjon av regulerende

5 sekvenser, kan avhenge av slike faktorer som valget av vertscelle som skal transformeres, det ønskede nivå av ekspresjon av protein, *etc.* Foretrukne regulerende sekvenser for pattedyrvertscelleekspresjon omfatter virale elementer som styrer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller, så som promotere og/eller enhancere avledet fra cytomegalovirus (CMV) (så som CMV-

10 promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (så som SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (*f.eks.* adenovirus siste hoved-promoter (AdMLP)) og polyoma. For videre beskrivelse av virale regulerende elementer og sekvenser derav, se *f.eks.* U.S.-patent nr. 5,168,062 av Stinski, U.S.-patent nr. 4,510,245 av Bell *et al.* og U.S.-patent nr. 4,968,615 av Schaffner *et al.*

15 I tillegg til antistoffkjedegener og regulerende sekvenser, kan de rekombinante ekspresjonsvektorer bære ytterligere sekvenser, så som sekvenser som regulerer replikasjon av vektoren i vertsceller (*f.eks.* replikasjons-opprinnelser) og selekterbare markørgener. Det selekterbare markørgen letter utvelgelse av vertsceller i hvilke vektoren blir innført (se *f.eks.*

20 U.S.-patenter nr. 4,399,216, 4,634,665 og 5,179,017, alle til Axel *et al.*). For eksempel gir typisk det selekterbare markørgen resistens for medikamenter, så som G418, hygromycin eller methotrexat, til en vertscelle i hvilken vektoren er innført. Foretrukne selekterbare markørgener omfatter dihydrofolat-reduktase-(DHFR) gen (for anvendelse i dhfr⁻vertsceller med methotrexat-seleksjon/-

25 amplifisering) og *neo*-gen (for G418 seleksjon).

For ekspresjon av lett- og tungkjeder, blir ekspresjonsvektor(er) som koder for tung- og lettkjeder transfektert i en vertscelle ved standard teknikker. De forskjellige former av betegnelsen "transfeksjon" skal omfatte en rekke forskjellige teknikker som er vanlig anvendt for innføring av exogent DNA i en

30 prokaryot eller eukaryot vertscelle, *f.eks.* elektroforering, kalsiumfosfat-felling, DEAE-dextran-transfeksjon og lignende. Selv om det teoretisk er mulig å uttrykke antistoffene ifølge oppfinnelsen i enten prokaryote eller eukaryote vertsceller, er ekspresjon av antistoffer i eukaryote celler og mest foretrukket pattedyrvertsceller, mest foretrukket fordi slike eukaryote celler og spesielt

pattedyrceller, mer sannsynlig enn prokaryote celler, vil sette sammen og sekretere et riktig foldet og immunologisk aktivt antistoff. Prokaryot ekspresjon av antistoffgener er angitt å være ineffektiv for produksjon av høye utbytter av aktivt antistoff (Boss, M.A. og Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

5 Foretrukne pattedyrvertsceller for ekspresjon av de rekombinante antistoffer omfatter Chinese Hamster Ovary (CHO-celler) (omfattende dhfr-CHO-celler, beskrevet i Urlaub og Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, anvendt med en DHFR selekterbar markør, f.eks. som beskrevet i R.J. Kaufman og P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NS0-myelom-
10 celler, COS-celler og SP2-celler. Når rekombinante ekspresjonsvektorer som koder for antistoffgener blir innført i pattedyrvertsceller, blir antistoffene produsert ved dyrkning av vertscellene i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å tillate ekspresjon av antistoffet i vertscellene eller, mer foretrukket, sekresjon av antistoffet i kulturmediet hvor vertscellene blir dyrket. Antistoffer kan gjenvinnes
15 fra dyrkningsmediet ved anvendelse av standard proteinrensningsmetoder.

Vertsceller kan også anvendes for å produsere deler av intakte antistoffer, så som Fab-fragmenter eller scFv-molekyler. Det vil forstås at variasjoner av metodene ovenfor er mulig. For eksempel kan det være ønskelig å transfektere en vertscelle med DNA som koder for enten lett-kjeden eller
20 tung-kjeden (men ikke begge) av et antistoff. Rekombinant DNA-teknologi kan også anvendes for å fjerne noe eller alt DNA som koder for en eller begge lett- og tungkjedene som ikke er nødvendig for binding til hTNF α . Molekylene uttrykt fra slike avkortede DNA-molekyler er også omfattet av antistoffene anvendt ifølge oppfinnelsen. I tillegg kan bifunksjonelle antistoffer produseres hvor én
25 tung- og én lett-kjede er et antistoff anvendt ifølge oppfinnelsen og den andre tung- og lett-kjede er spesifikk for et antigen forskjellig fra hTNF α ved kryssbinding av et antistoff anvendt ifølge oppfinnelsen til et andre antistoff ved standard kjemiske kryssbindingsmetoder.

I et foretrukket system for rekombinant ekspresjon av et antistoff eller en
30 antigen-bindingsdel derav anvendt ifølge oppfinnelsen, blir en rekombinant ekspresjonsvektor som koder for både antistoff-tungkjeden og antistoff-lett-kjeden innført i dhfr-CHO-celler ved kalsiumfosfat-mediert transfeksjon. I den rekombinante ekspresjonsvektor, blir antistoff-tung- og lett-kjede-gener hver operativt lenket til enhancer/promoter regulerende elementer (f.eks. avledet fra

SV40, CMV, adenovirus og lignende, så som et CMV-enhancer/AdMLP-promoter regulerende element eller et SV40-enhancer/AdMLP-promoter regulerende element) for å fremme høye nivåer av transkripsjon av genene. Den rekombinante ekspresjonsvektor bærer også et DHFR-gen, som tillater
5 seleksjon av CHO-celler som er transfektert med vektoren ved anvendelse av methotrexat- seleksjon/amplifisering. De valgte transformant-vertsceller blir dyrket for å tillate ekspresjon av antistoff-tung- og lettkjeder og intakt antistoff blir gjenvunnet fra dyrkningsmediet. Standard molekylærbiologi-teknikker blir anvendt for å fremstille den rekombinante ekspresjonsvektor, transfektere
10 vertscellene, velge transformanter, dyrke vertscellene og gjenvinne antistoffet fra dyrkningsmediet.

Nukleotidsekvensen som koder for D2E7-lettkjede variabel-regionen er vist i Figur 7 og SEKV ID NR: 36. CDR1-domenet til LCVR omfatter nukleotidene 70-102, CDR2- domenet omfatter nukleotidene 148-168 og CDR3-
15 domenet omfatter nukleotidene 265-291. Nukleotidsekvensen som koder for D2E7-tungkjede variabel-regionen er vist i Figur 8 og SEKV ID NR: 37. CDR1-domenet til HCVR omfatter nukleotidene 91-105, CDR2-domenet omfatter nukleotidene 148-198 og CDR3-domenet omfatter nukleotidene 295-330. Det vil forstås av fagfolk på området at nukleotidsekvenser som koder for D2E7-
20 relaterte antistoffer eller deler derav (*f.eks.* et CDR-domene, så som et CDR3-domene), kan avledes fra nukleotidsekvenser som koder for D2E7 LCVR og HCVR ved anvendelse av den genetiske kode og standard molekylærbiologi-teknikker.

Ved én utførelse tilveiebringes en isolert nukleinsyre som koder for et
25 lettkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 (dvs. D2E7 VL CDR3) eller modifisert fra SEKV ID NR: 3 med en enkel alaninsubstitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 1, 3, 4, 6, 7, 8 og/eller 9. Denne nukleinsyre kan kode bare for CDR3-regionen eller, mer foretrukket, for en hel
30 antistoff-lettkjede variabel-region (LCVR). For eksempel kan nukleinsyren kode for en LCVR som har et CDR2-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 5 (dvs. D2E7 VL CDR2) og et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 7 (dvs. D2E7 VL CDR1).

Ved en annen utførelse tilveiebringes en isolert nukleinsyre som koder for et tungkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4 (dvs. D2E7 VH CDR3) eller modifisert fra SEKV ID NR: 4 med en enkel alaninsubstitusjon i stillingene 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillinger 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 og/eller 12. Denne nukleinsyre kan kode bare for CDR3- regionen eller mer foretrukket, for en hel antistoff-tungkjede variabel-region (HCVR). For eksempel kan nukleinsyren kode for en HCVR som har et CDR2- domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 6 (dvs. D2E7 VH CDR2) og et CDR1-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 8 (dvs. D2E7 VH CDR1).

Ved enda en annen utførelse tilveiebringes isolerte nukleinsyrer som koder for et D2E7-relatert CDR3-domene, *f.eks.* omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av: SEKV ID NR: 3, SEKV ID NR 4, SEKV ID NR: 11, SEKV ID NR: 12, SEKV ID NR: 13, SEKV ID NR: 14, SEKV ID NR: 15, SEKV ID NR: 16, SEKV ID NR: 17, SEKV ID NR: 18, SEKV ID NR: 19, SEKV ID NR: 20, SEKV ID NR: 21, SEKV ID NR: 22, SEKV ID NR: 23, SEKV ID NR: 24, SEKV ID NR: 25, SEKV ID NR: 26, SEKV ID NR: 27, SEKV ID NR: 28, SEKV ID NR: 29, SEKV ID NR: 30, SEKV ID NR: 31, SEKV ID NR: 32, SEKV ID NR: 33, SEKV ID NR: 34 og SEKV ID NR: 35.

Ved enda en annen utførelse tilveiebringe en isolert nukleinsyre som koder for en antistoff-lettkjede variabel-region omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 (dvs. D2E7 LCVR). Fortrinnsvis omfatter denne nukleinsyren nukleotidsekvensen med SEKV ID NR: 36, selv om fagfolk på området vil forstå at på grunn av degenerasjon av den genetiske koden kan andre nukleotidsekvenser kode for aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1. Nukleinsyren kan kode bare for LCVR eller kan også kode for en antistoff-lettkjede konstant-region, operativt lenket til LCVR. Ved én utførelsesform er denne nukleinsyren i en rekombinant ekspresjonsvektor.

Ved enda en annen utførelse tilveiebringe en isolert nukleinsyre som koder for en antistoff-tungkjede variabel-region omfattende denne aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2 (dvs. D2E7 HCVR). Fortrinnsvis omfatter denne nukleinsyren nukleotidsekvensen med SEKV ID NR: 37, selv om fagfolk på området vil forstå at på grunn av degenerasjon av den genetiske

koden, kan andre nukleotidsekvenser kode for aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2. Nukleinsyren kan kode bare for HCVR eller kan også kode for en tungkjede konstant-region, operativt lenket til HCVR. For eksempel kan nukleinsyren omfatte en IgG1- eller IgG4-konstant-region. Ved én

5 utførelsesform er denne nukleinsyren i en rekombinant ekspresjonsvektor.

Det tilveiebringes også rekombinante ekspresjonsvektorer som koder for både en antistoff-tungkjede og en antistoff-lettkjede. Ved en utførelsesform tilveiebringes for eksempel en rekombinant ekspresjonsvektor som koder for:

a) en antistoff-lettkjede som har en variabel-region omfattende

10 aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 (dvs. D2E7 LCVR); og

b) en antistoff-tungkjede som har en variabel-region omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2 (dvs. D2E7 HCVR).

Det tilveiebringes også vertsceller i hvilke én eller flere av de rekombinante ekspresjonsvektorer ifølge søknadens beskrivelse er innført.

15 Fortrinnsvis er vertscellen en pattedyrvertscelle, mer foretrukket er vertscellen en CHO-celle, en NS0-celle eller en COS-celle.

Det beskrives videre en metode for syntetisering av et rekombinant human-antistoff ved dyrkning av en vertscelle i et egnet dyrkningsmedium inntil et rekombinant human-antistoff er syntetisert. Metoden kan videre omfatte

20 isolering av det rekombinante human-antistoff fra dyrkningsmediet.

III. Seleksjon av rekombinante human-antistoffer

Rekombinante human-antistoffer, i tillegg til D2E7-antistoffer eller D2E7-antigenbindende deler derav ifølge oppfinnelsen, kan isoleres ved screening av

25 et rekombinant kombinatorisk antistoff-bibliotek, fortrinnsvis et scFv-fagdisplay-bibliotek, fremstilt ved anvendelse av human VL- og VH-cDNA fremstilt fra mRNA avledet fra human-lymfocytter. Metoder for fremstilling og screening av slike biblioteker er kjent på området. I tillegg til kommersielt tilgjengelige sett for generering av fag-display-biblioteker (*f.eks.* the Pharmacia *Recombinant Phage*

30 *Antibody System*, katalog nr. 27-9400-01; og Stratagene *SurfZAPTM* fag display-testsett, katalog nr. 240612), kan eksempler på metoder og reagenser spesielt egnet for anvendelse for generering og screening av antistoff display-biblioteker, for eksempel finnes i Ladner *et al.* U.S.-patent nr. 5,223,409; Kang *et al.* PCT- publikasjon nr. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT-publikasjon nr. WO

91/17271; Winter *et al.* PCT-publikasjon nr. WO 92/20791; Markland *et al.* PCT-publikasjon nr. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT-publikasjon nr. WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT-publikasjon nr. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT-publikasjon nr. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; og Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

Ved en foretrukket utførelsesform for å isolere human-antistoffer med høy affinitet og en lav frigjøringskonstant for hTNF α , blir et murint anti-hTNF α -antistoff som har høy affinitet og lav frigjøringshastighetskonstant for hTNF α (f.eks. MAK 195, hvis hybridoma har deponeringsnummer ECACC 87 050801) først anvendt for å velge human-tung- og lett kjedesekvenser som har lignende bindingsaktivitet mot hTNF α , ved anvendelse av epitop-avtrykk eller styrt seleksjon, hvilke metoder er beskrevet i Hoogenboom *et al.*, PCT-publikasjon nr. WO 93/06213. Antistoff-biblioteker anvendt ved denne metoden er fortrinnsvis scFv-biblioteker fremstilt og screenet som beskrevet i McCafferty *et al.*, PCT-publikasjon nr. WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *sNature* (1990) 348:552-554; og Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J* 12:725-734. scFv-antistoff-bibliotekene blir fortrinnsvis screenet ved anvendelse av rekombinant human-TNF α som antigen.

Når de initielle human-VL- og VH-segenter er valgt, blir "mix og match"-forsøk, hvor forskjellige par av de initielt valgte VL- og VH-segenter blir screenet for hTNF α -binding, utført for å velge foretrukne VL/VH-par-kombinasjoner. Videre, for ytterligere å forbedre affiniteten og/eller nedsette frigjøringshastighetskonstanten for hTNF α -binding, kan VL- og VH-segenter av det (de) foretrukne VL/VH-par muteres tilfeldig, fortrinnsvis i CDR3-regionen av VH og/eller VL, ved en fremgangsmåte analog med den *in vivo* somatiske mutasjonsprosess som er ansvarlig for affinitetsmodning av antistoffer under en naturlig immunrespons. Denne *in vitro* affinitetsmodning

kan oppnås ved amplifisering av VH- og VL-regioner ved anvendelse av PCR-primere komplementære med henholdsvis VH CDR3 eller VL CDR3, hvilke primere er "sprittet opp" med en tilfeldig blanding av de fire nukleotidbaser i visse stillinger slik at de resulterende PCR-produkter koder for VH- og VL-segmenter i hvilke tilfeldige mutasjoner er innført i VH- og/eller VL-CDR3-regionene. Disse tilfeldig muterte VH- og VL-segmenter kan screenes påny for binding til hTNF α og sekvenser som oppviser høy affinitet og en lav frigjøringshastighet for hTNF α - binding kan velges.

Aminosyresekvensene i valgte antistoff-tung- og lettkjeder kan sammenlignes med kimlinje-tung- og lettkjede aminosyresekvenser. I tilfeller hvor visse rammeverkrester i de valgte VL- og/eller VH-kjeder skiller seg fra kimlinje-konfigurasjonen (*f.eks.* som et resultat av somatisk mutasjon av immunoglobulingenene anvendt for å fremstille fag-biblioteket), kan det være ønskelig å "tilbakemutere" de endrede rammeverkrester i de valgte antistoffer til kimlinje-konfigurasjonen (dvs. endring av rammeverk-aminosyresekvenser i de valgte antistoffer slik at de blir de samme som kimlinje-rammeverk-aminosyresekvensene). Slik "tilbakemutering" (eller "kimlinjedannelse") av rammeverkrester kan oppnås ved standard molekylærbiologiske metoder for innføring av spesifikke mutasjoner (*f.eks.* sete-styrt mutagenese; PCR-mediert mutagenese og lignende).

Etter screening og isolering av et anti-hTNF α -antistoff ifølge oppfinnelsen fra et rekombinant immunoglobulin-display-bibliotek, kan nukleinsyre som koder for det valgte antistoff gjenvinnes fra display-pakken (*f.eks.* fra fag-genomet) og subklones i andre ekspresjonsvektorer ved standard rekombinante DNA-teknikker. Om ønsket kan nukleinsyren manipuleres videre for å danne andre antistoff-former ifølge oppfinnelsen (*f.eks.* lenket til nukleinsyre som koder for ytterligere immunoglobulin-domener, så som ytterligere konstante regioner). For å uttrykke et rekombinant human-antistoff isolert ved screening av et kombinatorisk bibliotek blir DNA som koder for antistoffet klonet i en rekombinant ekspresjonsvektor og innført i pattedyrvertsceller, som beskrevet mer detaljert i Seksjon II ovenfor.

IV. Farmasøytiske preparater og farmasøytisk administrering

Antistoffene og antistoffdelene kan innføres i farmasøytiske preparater egnet for administrering til et individ. Typisk omfatter det farmasøytiske preparatet et antistoff eller en antistoffdel og en farmasøytisk godtagbar bærer. Som anvendt her omfatter "farmasøytisk godtagbar bærer" hvilke som helst og alle oppløsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjons-forsinkende midler og lignende som er fysiologisk kompatible. Eksempler på farmasøytisk godtagbare bærere omfatter én eller flere av vann, saltvann, fosfatbufret saltvann, dekstrose, glycerol, etanol og lignende, så vel som kombinasjoner derav. I mange tilfeller vil det være foretrukket å inkludere isotoniske midler, for eksempel sukkerer, polyalkoholer så som mannitol, sorbitol eller natriumklorid i preparatet. Farmasøytisk godtagbare bærere kan videre omfatte mindre mengder av hjelpestoffer, så som fukte- eller emulgeringsmidler, konserveringsmidler eller buffere, som forbedrer lagringstiden eller effektiviteten av antistoffet eller antistoffdelen.

Preparatene ifølge søknadens beskrivelse kan være i en rekke former. Disse omfatter for eksempel flytende, halvfaste og faste doseformer, så som flytende løsninger (f.eks. injiserbare og infuserbare løsninger), dispersjoner eller suspensjoner, tabletter, piller, pulvere, liposomer og suppositorier. Den foretrukne form avhenger av den tilsiktede administreringsmetode og terapeutiske anvendelse. Typiske foretrukne preparater er i form av injiserbare eller infuserbare løsninger, så som preparater lignende de som anvendes for passiv immunisering av mennesker med andre antistoffer. Den foretrukne administreringsmetode er parenteral (f.eks. intravenøs, subkutan, intraperitoneal, intramuskulær). Ved en foretrukket utførelsesform blir antistoffet administrert ved intravenøs infusjon eller injeksjon. Ved en annen foretrukket utførelsesform blir antistoffet administrert ved intramuskulær eller subkutan injeksjon.

Terapeutiske preparater må typisk være sterile og stabile under fremstillings- og lagringsbetingelsene. Preparatet kan formuleres som en løsning, mikroemulsjon, dispersjon, liposom eller annen ordnet struktur egnet for høy medikament-konsentrasjon. Sterile injiserbare løsninger kan fremstilles ved innføring av den aktive forbindelse (dvs. antistoff eller antistoffdel) i den

nødvendige mengde i et passende oppløsningsmiddel med én eller en kombinasjon av bestanddelene angitt ovenfor, som nødvendig, fulgt av filtrersterilisering. Generelt blir dispersjoner fremstilt ved innføring av den aktive forbindelse i en sterile bærer som inneholder et basisk dispersjonsmedium og de nødvendige andre bestanddeler angitt ovenfor. I tilfellet av sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger, er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuumpulverisering og frysetørring som gir et pulver av den aktive bestanddel pluss hvilken som helst ytterligere ønsket bestanddel fra en tidligere steril-filtrert løsning derav. Den passende fluiditet av en løsning kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av et belegg så som lecitin, ved opprettholdelse av den ønskede partikkelstørrelse i tilfellet av dispersjon og ved anvendelse av overflateaktive midler. Forlenget absorpsjon av injiserbare preparater kan tilveiebringes ved å inkludere i preparatet et middel som forsinket absorpsjon, for eksempel monostearatsalter og gelatin.

Antistoffene og antistoffdelene kan administreres ved en rekke metoder kjent på området, selv om for mange terapeutisk anvendelser, den foretrukne vei/metode for administrering er intravenøs injeksjon eller infusjon. Som det vil forstås av fagfolk på området vil veien og/eller metoden for administrering variere avhengig av de ønskede resultater. Ved visse utførelsesformer kan den aktive forbindelse fremstilles med en bærer som vil beskytte forbindelsen mot rask frigjøring, så som et kontrollert frigjøringspreparat, omfattende implantater, transdermale plasterykker og mikroinnkapslede avleverings-systemer. Bionedbrytbare, biokompatible polymerer kan anvendes, så som etylenvinylacetat, polyanhydrider, polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkesyre. Mange metoder for fremstilling av slike preparater er patentert eller generelt kjent for fagfolk på området. Se f.eks. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Ved visse utførelsesformer kan et antistoff eller en antistoffdel administreres oralt, for eksempel med et inert fortynningsmiddel eller en assimilerbar spiselig bærer. Forbindelsen (og om ønsket andre bestanddeler) kan også innføres i en hard eller myk gelatinkapsel, presses til tabletter eller innføres direkte i individets diett. For oral terapeutisk administrering kan forbindelsene blandes med tilsetningsmidler og anvendes i form av svelgbare tabletter, buckale tabletter, pastiller, kapsler, eliksirer, suspensjoner, siruper,

kjeks og lignende. For å administrere en forbindelse ifølge oppfinnelsen ved en annen metode enn parenteral administrering, kan det være nødvendig å belegge forbindelsen med eller sam-administrere forbindelsen med, et materiale for å hindre inaktivering.

5 Supplerende aktive forbindelser kan også innføres i preparatene. Ved visse utførelsesformer formuleres et antistoff eller en antistoffdel som er D2E7 eller en antigenbindende del derav ifølge foreliggende oppfinnelse, sammen med og/eller administreres sammen med ett eller flere ytterligere terapeutiske midler som er nyttige for behandling av lidelser hvor $TNF\alpha$ -aktivitet er skadelig.

10 For eksempel kan et anti- $hTNF\alpha$ -antistoff eller en antistoffdel formuleres sammen med og/eller administreres sammen med ett eller flere ytterligere antistoffer som binder til andre mål (f.eks. antistoffer som binder til andre cytokiner eller som binder til celleoverflatemolekyler), ett eller flere cytokiner, oppløselig $TNF\alpha$ -reseptor (se f.eks. PCT-publikasjon nr. WO 94/06476) og/eller

15 ett eller flere kjemiske midler som hemmer $hTNF\alpha$ -produksjon eller -aktivitet (så som cykloheksan-yliden-derivater som beskrevet i PCT-publikasjon nr. WO 93/19751). Videre kan ett eller flere antistoffer anvendes i kombinasjon med to eller flere av de foregående terapeutiske midler. Slike kombinasjonsterapier kan fordelaktig anvende lavere doser av de administrerte terapeutiske midler,

20 og således unngå eventuelle toksisiteter eller komplikasjoner forbundet med de forskjellige monoterapiene.

Ikke-begrensende eksempler på terapeutiske midler mot revmatoid artritt med hvilke et antistoff eller en antistoffdel oppfinnelse kan kombineres, omfatter de følgende: ikke-steroide anti-inflammatoriske medikament(er) (NSAID);

25 cytokin-suppressive anti-inflammatoriske medikament(er) (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti- $TNF\alpha$ -antistoff; Celltech/Bayer); cA2 (kimært anti- $TNF\alpha$ -antistoff; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF reseptor-IgG-fusjonsprotein; Immunex; se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF

30 reseptor-IgG-fusjons-protein; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9,1/SB 210396 (ikke-reduserende primatisert anti-CD4-antistoff; IDEC/SmithKline; se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 og/eller DAB 389-IL-2 (IL-2 fusjonsproteiner; Seragen; se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1993)

Vol. 36, 1223); Anti-Tac (humanisert anti-IL-2Ra; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (anti-inflammatorisk cytokin; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; rekombinant IL-10, anti-inflammatorisk cytokin; DNAX/Schering); IL-4-; IL-10- og/eller IL-4-agonister (*f.eks.* agonist-antistoffer); IL-1RA (IL-1 reseptor-antagonist; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (oppløselig TNF-bindingsprotein; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, s. 37-42); R973401 (fosfodiesterase Type IV-inhibitor; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); MK-966 (COX-2-inhibitor; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S81); Iloprost (se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S82); methotrexat; thalidomid (se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282) og thalidomid-beslektede medikamenter (*f.eks.* Celgen); leflunomid (anti-inflammatorisk og cytokin-inhibitor; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107); tranexaminsyre (inhibitor av plasminogen-aktivering; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284); T-614 (cytokin-inhibitor; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); prostaglandin E1 (se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S282); Tenidap (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S280); Naproxen (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament; se *f.eks. Neuro Report* (1996) Vol. 7, s. 1209-1213); Meloxicam (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Ibuprofen (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Piroxicam (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Diclofenac (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Indomethacin (ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament); Sulfasalazin (se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S281); Azatioprin (se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S281); ICE-inhibitor (inhibitor av enzymet interleukin-1 β -omdannende enzym); zap-70 og/eller lck- inhibitor (inhibitor av tyrosin-kinasen zap-70 eller lck); VEGF-inhibitor og/eller VEGF-R-inhibitor (inhibitorer av vaskulær endotelcelle-vekstfaktor eller vaskulær endotelcelle-vekstfaktorreseptor; inhibitorer av angiogenese); kortikosteroid anti-inflammatoriske

medikamenter (f.eks. SB203580); TNF-konvertase-inhibitorer; anti-IL-12-antistoffer; interleukin-11 (se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S296); interleukin-13 (se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S308); interleukin-17-inhibitorer (se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr. 9 (supplement), S120); gull; penicillamin; klorokin; hydroksyklorokin; klorambucil; cyklofosamid; cyklosporin; total lymfoid bestråling; anti-tymocyt-globulin; anti-CD4-antistoffer; CD5-toksiner; oralt-administrerte peptider og kollagen; lobenzarit-dinatrium; cytokinregulerende midler (CRA) HP228 og HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1-antisense-fosfortioat-oligodeoksynukleotider (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); oppløselig komplement-reseptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednison; orgotein; glykosaminoglykan-polysulfat; minocyklin; anti-IL2R-antistoffer; marine og botaniske lipider (fiske- og plantefrø-fettsyrer; se f.eks. DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofin; fenylbutazon; meclofenaminsyre; flufenaminsyre; intravenøst immunoglobulin; zileuton; mycofenolsyre (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); amiprilose (therafectin); cladribine (2-klordeoksyadenosin); og azaribine.

Ikke-begrensede eksempler på terapeutiske midler mot inflammatorisk tarmsykdom med hvilke et antistoff eller en antistoffdel kan kombineres, omfatter de følgende: budenosid; epidermal vekstfaktor; kortikosteroider; cyklosporin, sulfasalazin; aminosalicylater; 6-merkaptopurin; azatioprin; metronidazol; lipoksygenase-inhibitorer; mesalamin; olsalazin; balsalazid; antioksydasjonsmidler; tromboksan-inhibitorer; IL-1-reseptor-antagonister; anti-IL-1 β monoklonale antistoffer; anti-IL-6-monoklonale antistoffer; vekstfaktorer; elastase-inhibitorer; pyridinyl-imidazol-forbindelser; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff; Celltech/Bayer); cA2 (kimært anti-TNF α -antistoff; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Immunex; se f.eks. *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche); interleukin-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; IL-10 og/eller IL-4-agonister (f.eks. agonist-antistoffer); interleukin-11; glukuronid- eller dekstran-konjugerte prodrug for prednisolon, deksametason eller budesonid; ICAM-1-antisense-fosfortioat-oligodeoksynukleotider (ISIS

2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); oppløselig komplement-reseptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); langsomt-frigjørende mesalazin; methotrexat; antagonister for blodplate-aktiverende factor (PAF); ciprofloxacin; og lignokain.

Ikke-begrensede eksempler på terapeutiske midler mot multippel
 5 sklerose med hvilke et antistoff eller en antistoffdel kan kombineres, omfatter de følgende: kortikosteroider; prednisolon; metylprednisolon; azatioprin; cyklofosamid; cyklosporin; metotreksat; 4-aminopyridin; tizanidin; interferon- β 1a (Avonex™; Biogen); interferon- β 1b (Betaseron™; Chiron/Berlex); kopolymer 1 (Cop-1; Copaxon™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);
 10 hyperbarisk oksygen; intravenøst immunoglobulin; clabribin; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff; Celltech/Bayer); cA2 (kimært anti-TNF α -antistoff; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Immunex; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein;
 15 Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; og IL-10 og/eller IL-4-agonister (*f.eks.* agonist-antistoffer).

Ikke-begrensede eksempler på terapeutiske midler mot sepsis med hvilke et antistoff eller en antistoffdel kan kombineres, omfatter de følgende: hypertonske saltvannsløsninger; antibiotika; intravenøst gamma-globulin;
 20 kontinuerlig hemofiltrering; karbapenemer (*f.eks.* meropenem); antagonister for cytokiner så som TNF α , IL-1 β , IL-6 og/eller IL-8; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff; Celltech/Bayer); cA2 (kimært anti-TNF α -antistoff; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Immunex; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein;
 25 Hoffmann-LaRoche); Cytokin-regulerende midler (CRA) HP228 og HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (lav-molekylært peptid; SmithKline Beecham); tetravalent guanylhydrazon CNI-1493 (Picower Institute); Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI; Chiron); PHP (kjemisk modifisert
 30 hemoglobin; APEX Bioscience); jern-chelatorer og chelater, omfattende dietylntriamin-pentaeddiksyre - jern(III)-kompleks (DTPA jern(III); Molichem Medicines); lisofyllin (syntetisk småmolekyl metylxantin; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-Glucan (vandig oppløselig β 1,3glukan; Alpha-Beta Technology);

apolipoprotein A-1 rekonstituert med lipider; kirale hydroksamsyrer (syntetiske antibakterielle midler som hemmer lipid A-biosyntese); anti-endotoksin-antistoffer; E5531 (syntetisk lipid A-antagonist; Eisai America, Inc.); rBPI₂₁ (rekombinant N-terminal-fragment av human-baktericid/permeabilitets-økende protein); og syntetiske anti-endotoksin-peptider (SAEP; BiosYnth Research Laboratories);

Ikke-begrensede eksempler på terapeutiske midler mot voksen respiratorisk lidelsessyndrom (ARDS) med hvilke et antistoff eller en antistoffdel ifølge oppfinnelsen kan kombineres, omfatter de følgende: anti-IL-8-antistoffer; surfaktant-erstatningsterapi; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisert anti-TNF α -antistoff; Celltech/Bayer); cA2 (kimært anti-TNF α -antistoff; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Immunex; se *f.eks. Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); og 55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF-reseptor-IgG-fusjonsprotein; Hoffmann-LaRoche).

Anvendelse av antistoffene eller antistoffdelene i kombinasjon med andre terapeutiske midler er ytterligere beskrevet i underavsnitt V.

De farmasøytiske preparater kan omfatte en "terapeutisk effektiv mengde" eller en "profylaktisk effektiv mengde" av et antistoff eller en antistoffdel. En "terapeutisk effektiv mengde" angir en mengde som ved doser og i den nødvendige tidsperiode er effektiv for å oppnå det ønskede terapeutiske resultat. En terapeutisk effektiv mengde av antistoffet eller antistoffdelen kan variere i henhold til faktorer så som sykdomstilstanden, alder, kjønn og vekt til individet og evnen til antistoffet eller antistoffdelen til å utløse en ønsket respons hos individet. En terapeutisk effektiv mengde er også én hvor hvilke som helst toksiske eller skadelige effekter av antistoffet eller antistoffdelen blir oppveiet av de terapeutisk fordelaktige effekter. En "profylaktisk effektiv mengde" angir en mengde som ved doser og i nødvendige tidsperioder er effektiv for å oppnå det ønskede profylaktiske resultat. Typisk vil, ettersom en profylaktisk dose blir anvendt hos individer før eller på et tidlig stadium av en sykdom, den profylaktisk effektive mengde være mindre enn den terapeutisk effektive mengde.

Doseregimer kan reguleres for å gi den optimale ønskede respons (*f.eks.* en terapeutisk eller profylaktisk respons). For eksempel kan en enkel bolus administreres, flere oppdelte doser kan administreres over tid eller dosen kan reduseres eller økes proporsjonalt i henhold til hva som kreves etter den terapeutiske situasjon. Det er spesielt fordelaktig å formulere parenterale preparater i en doseenhetsform som letter administrering og jevnhet av dosen. Doseenhetsform som anvendt her betyr fysisk adskilte enheter egnet som enhetsdoser for pattedyret som skal behandles; idet hver enhet inneholder en forutbestemt mengde av aktiv forbindelse beregnet å gi den ønskede terapeutiske effekt sammen med den nødvendige farmasøytiske bærer. Spesifikasjonen av doseenhetsformer er diktert av og direkte avhengig av (a) de unike karakteristika av den aktive forbindelse og den spesielle terapeutiske eller profylaktiske effekt som skal oppnås og (b) de iboende begrensningene for formulering av en slik aktiv forbindelse for behandling av sensitivitet hos individer.

Et ikke-begrensende eksempel på en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et antistoff eller en antistoffdel er 0,1-20 mg/kg, mer foretrukket 1-10 mg/kg. Det skal bemerkes at dose-verdier kan variere med typen og alvorlighetsgraden av lidelsen som skal lindres. Det vil videre forstås at for et hvilket som helst spesielt individ, bør det spesifikke doseregime reguleres over tid i henhold til det individuelle behov og den profesjonelle bedømmelse av personen som administrerer eller overvåker administreringen av preparatene og at doseområdene angitt her bare er eksempler og skal ikke begrense omfanget eller anvendelsen av det aktuelle preparat.

25

V. Anvendelser av antistoffene ifølge oppfinnelsen

Gitt deres evne til å binde til hTNF α , kan anti-hTNF α -antistoffer eller deler derav anvendt ifølge oppfinnelsen, anvendes for å detektere hTNF α (*f.eks.* i en biologisk prøve, så som serum eller plasma), ved anvendelse av et konvensjonelt immunoforsøk, så som "enzyme linked immunosorbent assays" (ELISA), et radioimmunoforsøk (RIA) eller vev-immunhistokjemi. Oppfinnelsen tilveiebringer en metode for deteksjon av hTNF α i en biologisk prøve som omfatter å bringe en biologisk prøve i kontakt med et antistoff eller en

30

antistoffdel og deteksjon av enten antistoffet (eller antistoffdelen) bundet til hTNF α eller ubundet antistoff (eller antistoffdel), for derved å detektere hTNF α i den biologiske prøven. Antistoffet er direkte eller indirekte merket med et detekterbart stoff for å lette deteksjon av bundet eller ubundet antistoff. Egnede
5 detekterbare stoffer omfatter forskjellige enzymer, protetiske grupper, fluorescerende materialer, luminescerende materialer og radioaktive materialer. Eksempler på egnede enzymer omfatter pepperrot-peroksydase, alkalisk fosfatase, β -galaktosidase eller acetylcholinesterase; eksempler på egnede protetiske komplekser omfatter streptavidin/biotin og avidin/biotin; eksempler på
10 egnede fluorescerende materialer omfatter umbelliferon, fluorescein, fluorescein-isotiocyanat, rhodamin, diklortriazinylamin-fluorescein, dansylklorid eller fykoerytrin; et eksempel på et luminescerende materiale omfatter luminol; og eksempler på egnede radioaktive materialer omfatter ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S eller ^3H .

15 Alternativt til merking av antistoffet, kan hTNF α undersøkes i biologiske væsker ved et konkurranse-immunoforsøk ved anvendelse av rhTNF α -standarder merket med et detekterbart stoff og et umerket anti-hTNF α -antistoff. I dette forsøket, kombineres den biologiske prøven, de merkede rhTNF α -standarder og anti-hTNF α -antistoff, og mengden av merket rhTNF α -standard
20 bundet til det umerkede antistoff blir bestemt. Mengden av hTNF α i den biologiske prøve er omvendt proporsjonal med mengden av merket rhTNF α -standard bundet til anti-hTNF α -antistoffet.

Et D2E7-antistoff ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å detektere TNF α fra andre arter enn mennesker, spesielt TNF α fra primater (*f.eks.*
25 sjimpanse, bavian, marmosett, cynomolgus og rhesus), gris og mus, ettersom D2E7 kan binde til hver av disse TNF α (ytterligere beskrevet i Eksempel 4, underavsnitt E).

Antistoffene og antistoffdelene kan nøytralisere hTNF α -aktivitet både *in vitro* og *in vivo* (se Eksempel 4). Videre kan minst noen av antistoffene, så som
30 D2E7, nøytralisere TNF α -aktivitet fra andre arter. Følgelig kan antistoffene og antistoffdelene ifølge oppfinnelsen anvendes for å hemme TNF α -aktivitet, *f.eks.* i en cellekultur inneholdende hTNF α , hos mennesker eller andre pattedyr som

har TNF α med hvilke et antistoff kryssreagerer (*f.eks.* sjimpanse, bavian, marmosett, cynomolgus og rhesus, gris eller mus). Ved én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en *in vitro*-metode for hemning av human-TNF α -aktivitet som omfatter å bringe TNF α i kontakt med et antistoff eller antistoffdel
5 ifølge oppfinnelsen, slik at TNF α -aktivitet blir hemmet. For eksempel kan, i en cellekultur som inneholder eller mistenkes for å inneholde hTNF α , et antistoff eller en antistoffdel settes til kulturmediet for å hemme hTNF α -aktivitet i kulturen.

TNF α er implisert ved patofysiologien til en rekke forskjellige lidelser (se
10 *f.eks.* Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S.- patent nr. 5,231,024 til Moeller *et al.*; europeisk patent-publikasjon nr. 260 610 B1 av Moeller, A.). Det beskrives metoder for TNF α -aktivitet hos et individ som har en slik lidelse, hvilken metode omfatter administrering til individet av et antistoff eller en antistoffdel slik at TNF α -aktivitet hos individet blir hemmet. Fortrinnsvis er
15 TNF α human-TNF α og individet et menneske. Alternativt kan individet være et pattedyr som uttrykker en TNF α med hvilken et antistoff kryssreagerer. Videre kan individet være et pattedyr i hvilket hTNF α er innført (*f.eks.* ved administrering av hTNF α eller ved ekspresjon av et hTNF α -transgen). Et antistoff kan administreres til et menneske for terapeutiske formål (ytterligere
20 beskrevet nedenfor). Videre kan et antistoff administreres til et ikke-humant pattedyr som uttrykker en TNF α med hvilken antistoffet kryssreagerer (*f.eks.* en primat, gris eller mus) for veterinærformål eller som en dyremodell av en human sykdom. Når det gjelder sistnevnte, kan slike dyremodeller være nyttige for evaluering av den terapeutiske effektivitet til antistoffene (*f.eks.* ved testing av
25 doser og tidsforløp for administrering).

Som anvendt her skal betegnelsen "en lidelse hvor TNF α -aktivitet er ugunstig" omfatte sykdommer og andre lidelser hvor tilstedeværelse av TNF α hos et individ som har lidelsen er vist å være eller mistenkt å være enten
30 ansvarlig for patofysiologien til lidelsen eller en faktor som bidrar til å forverre lidelsen. Følgelig er en lidelse hvor TNF α -aktivitet er ugunstig, en lidelse hvor hemning av TNF α -aktivitet er forventet å lindre symptomene og/eller utvikling av lidelsen. Slike lidelser kan for eksempel vises ved en økning i konsentrasjonen

av TNF α i en biologisk væske hos et individ som har lidelsen (*f.eks.* en økning i konsentrasjonen av TNF α i serum, plasma, leddvæske *etc.* hos individet), som for eksempel kan detekteres ved anvendelse av et anti-TNF α -antistoff som beskrevet ovenfor. Det er en rekke eksempler på lidelser hvor TNF α -aktivitet er
5 skadelig. Anvendelse ifølge oppfinnelsen av antistoffene og antistoffdelene til fremstilling av et medikament ved behandling av spesifikke lidelser er beskrevet mer omfattende nedenfor:

A. Sepsis

10 Tumor-nekrosefaktor har en etablert rolle i patofysiologien til sepsis, med biologiske effekter som omfatter hypotensjon, myokardial suppresjon, vaskulær lekkasjesyndrom, organ-nekrose, stimulering av frigjøring av toksiske sekundære mediatorer og aktivering av styrknings-kaskaden (se *f.eks.* Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S.-patent nr. 5,231,024 til Moeller *et al.*;
15 europeisk patent-publikasjon nr. 260 610 B1 av Moeller, A.; Tracey, K.J. og Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; Russell, D og Thompson, R.C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721). Følgelig kan human-antistoffene og antistoffdelene anvendes for behandling av sepsis i hvilken som helst av dens kliniske former, omfattende septisk sjokk, endotoksisk sjokk, gram-negativ
20 sepsis og toksisk sjokksyndrom.

For behandling av sepsis kan videre et anti-hTNF α -antistoff eller antistoffdel administreres sammen med ett eller flere ytterligere terapeutiske midler som ytterligere kan lindre sepsis, så som en interleukin-1-inhibitor (så som de beskrevet i PCT-publikasjonene nr. WO 92/16221 og WO 92/17583),
25 cytokinet interleukin-6 (se *f.eks.* PCT-publikasjon nr. WO 93/11793) eller en antagonist for blodplate-aktiverende faktor (se *f.eks.* europeisk patentsøknad, publikasjon nr. EP 374 510). Andre kombinasjons-terapier for behandling av sepsis er ytterligere beskrevet i underavsnitt III.

Videre, ved en foretrukket utførelsesform, blir anvendelse av et anti-
30 TNF α -antistoff eller antistoffdel ifølge oppfinnelsen benyttet i fremstilling av et medikament og administrert til et menneske innen en undergruppe av sepsis-pasienter som har en serum- eller plasma-konsentrasjon av IL-6 over 500 pg/ml

og mer foretrukket 1000 pg/ml ved tidspunktet for behandling (se PCT-publikasjon nr. WO 95/20978 av Daum, L., *et al.*).

B. Autoimmune sykdommer

5 Tumornekrosefaktor er implisert i patofysiologien til en rekke autoimmune sykdommer. For eksempel har TNF α vært implisert i aktivering av vev-inflammasjon og forårsaking av ledd-destruksjon ved revmatoid artritt (se *f.eks.* Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; U.S.-patent nr. 5,231,024 til Moeller *et al.*; europeisk patent-publikasjon nr. 260 610 B1 av Moeller, A.;
10 Tracey og Cerami, *supra*; Arend, W.P. og Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R.A., *et al.* (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266). TNF α har også vært implisert i å fremme død av γ -celler og i mediering av insulin-resistens ved diabetes (se *f.eks.* Tracey og Cerami, *supra*; PCT-publikasjon nr. WO 94/08609). TNF α har også vært implisert i mediering av cytotoxicitet til
15 oligodendrocytter og induksjon av inflammatorisk plakk ved multipel sklerose (se *f.eks.* Tracey og Cerami, *supra*). Kimære og humaniserte murine anti-hTNF α -antistoffer har vært underkastet klinisk testing for behandling av revmatoid artritt (se *f.eks.* Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E.C., *et al.* (1995) *Br.*
20 *J. Rheumatol.* 34:334-342).

Human-antistoffene og antistoffdelene kan anvendes for å behandle autoimmune sykdommer, spesielt de som er forbundet med inflammasjon, omfattende revmatoid artritt, revmatoid spondylitt, osteoartritt og giktisk artritt, allergi, multipel sklerose, autoimmun diabetes, autoimmun uveitt og nefrotisk
25 syndrom. Typisk blir antistoffet eller antistoffdelen administrert systemisk, selv om lokal administrering av antistoffet eller antistoffdelen på stedet for inflammasjonen kan være fordelaktig for visse lidelser (*f.eks.* lokal administrering i leddene ved revmatoid artritt eller topisk påføring ved diabetiske
30 ulcere, alene eller i kombinasjon med et cykloheksanyliden-derivat som beskrevet i PCT-publikasjon nr. WO 93/19751). Et antistoff eller en antistoffdel ifølge oppfinnelsen kan også administreres med ett eller flere ytterligere terapeutiske midler som er nyttige ved behandling av autoimmune sykdommer, som ytterligere beskrevet i underavsnitt III.

C. *Infeksiøse sykdommer*

Tumornekrosefaktor har vært implisert i mediering av biologiske effekter observert ved en rekke infeksiøse sykdommer. For eksempel har TNF α vært implisert i mediering av hjerne-inflammasjon og kapillær trombose og infarkt ved malaria. TNF α har også vært implisert i mediering av hjerne-inflammasjon, idet den fremkaller nedbrytning av blod-hjerne-barrieren, utløsning av septisk sjokk-syndrom og aktivering av venøst infarkt ved meningitt. TNF α har også vært implisert i fremkalling av kakeksi, stimulering av viral proliferasjon og mediering av sentralnervesystem-skade ved ervervet immun-svikt syndrom (AIDS). Følgelig kan antistoffene og antistoffdelene anvendes ved fremstilling av et medikament for behandling av infeksiøse sykdommer, omfattende bakteriell meningitt (se *f.eks.* europeisk patentsøknad, publikasjon nr. EP 585 705), cerebral malaria, AIDS og AIDS-relatert kompleks (ARC) (se *f.eks.* europeisk patentsøknad, publikasjon nr. EP 230 574), så vel som cytomegalovirus-infeksjon etter transplantasjon (se *f.eks.* Fietze, E., *et al.* (1994) *Transplantation* 58:675-680). Antistoffene og antistoffdelene kan også anvendes for å fremstille et medikament for å lindre symptomer forbundet med infeksiøse sykdommer, innbefattet feber og myalgier på grunn av infeksjon (så som influenza) og kakeksi etter infeksjon (*f.eks.* etter AIDS eller ARC).

D. *Transplantasjon*

Tumornekrosefaktor har vært implisert som en nøkkel-mediator ved "allotransplantat"-avvisning og "transplantat-mot-vert"-sykdom (GVHD) og ved mediering av en ugunstig reaksjon som har vært observert når rotte-antistoff OKT3, rettet mot T-cellereseptor-CD3-kompleks, blir anvendt for å hemme avvisning av nyre-transplantater (se *f.eks.* Eason, J.D., *et al.* (1995) *Transplantation* 59:300-305; Suthanthiran, M. og Strom, T.B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:365-375). Følgelig kan antistoffene og antistoffdelene anvendes for å hemme transplantat-avvisning, omfattende avvisning av "allo-transplantater" og "xenotransplantater" og for å hemme GVHD. Selv om antistoffet eller antistoffdelen kan anvendes alene, er det mer foretrukket at det blir anvendt i kombinasjon med ett eller flere andre midler som hemmer

immunrespons mot transplantatet eller hemmer GVHD. For eksempel blir i én utførelse et antistoff eller en antistoffdel anvendt ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med OKT3 for å hemme OKT3-fremkalt reaksjoner. Ved en annen utførelse blir et antistoff eller en antistoffdel anvendt ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med ett eller flere antistoffer rettet mot andre mål som er involvert i regulering av immunresponser, så som celleoverflatemolekylene CD25 (interleukin-2-reseptor- α), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) og/eller CD86 (B7-2). Ved enda en annen utførelse blir et antistoff eller en antistoffdel anvendt ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med ett eller flere generelle immunosuppressive midler, så som cyklosporin A eller FK506.

E. Ondartet sykdom

Tumornekrosefaktor har vært implisert i fremkalling av kakeksi, stimulering av tumorvekst, forsterkning av metastatisk potensiale og mediering av cytotoksisitet ved ondartede sykdommer. Følgelig kan antistoffene og antistoffdelene anvendes ifølge oppfinnelsen ved behandling av ondartede sykdommer, for å hemme tumorvekst eller metastase og/eller for å bedre kakeksi etter en ondartet sykdom. Antistoffet eller antistoffdelen kan administreres systemisk eller lokalt til tumorstedet.

F. Pulmonale lidelser

Tumornekrosefaktor har vært implisert i patofysiologien til voksen respiratorisk nødsyndrom (ARDS), som omfatter stimulering av leukocyt-
endotel-aktivering, dirigering av cytotoksisitet til pneumocytter og fremkalling av vaskulært lekkasjesyndrom. Følgelig kan antistoffene og antistoffdelene anvendes for å behandle forskjellige pulmonale lidelser, omfattende voksen respiratorisk lidelsessyndrom (se f.eks. PCT-publikasjon nr. WO 91/04054), sjokk-lunge, kronisk pulmonal inflammatorisk sykdom, pulmonal sarkoidose, pulmonal fibrose og silikose. Antistoffet eller antistoffdelen kan administreres systemisk eller lokalt til lungeoverflaten, for eksempel som en aerosol. Et antistoff eller en antistoffdel kan også administreres med ett eller flere ytterligere terapeutiske midler nyttige ved behandling av pulmonale lidelser, som ytterligere beskrevet i underavsnitt III.

G. Intestinale lidelser

Tumornekrosefaktor har vært implisert i patofysiologien til inflammatoriske tarm-lidelser (se *f.eks.* Tracy, K.J., *et al.* (1986) *Science* 5 234:470-474; Sun, X-M., *et al.* (1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331; MacDonald, T.T., *et al.* (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:301-305). Kimære murine anti-hTNF α -antistoffer har vært underkastet klinisk testing for behandling av Crohn's sykdom (van Dullemen, H.M., *et al.* (1995) *Gastroenterology* 109:129-135). Human-antistoffene og antistoffdelene kan også anvendes for å behandle 10 intestinale lidelser, så som idiopatisk inflammatorisk tarmsykdom, som omfatter to syndromer, Crohn's sykdom og ulcerativ kolitt. Et antistoff eller en antistoffdel kan også administreres med ett eller flere ytterligere terapeutiske midler nyttige ved behandling av intestinale lidelser, som ytterligere beskrevet i underavsnitt III.

15

H. Hjertelidelser

Antistoffene og antistoffdelene kan også anvendes for å behandle forskjellige hjertelidelser, omfattende ischemi i hjertet (se *f.eks.* europeisk patentsøknad, publikasjon nr. EP 453 898) og hjertesvikt (svakhhet ved 20 hjertemuskel)(se *f.eks.* PCT-publikasjon nr. WO 94/20139).

I. Andre

Antistoffene og antistoffdelene kan også anvendes for å behandle forskjellige andre lidelser hvor TNF α -aktivitet er ugunstig. Eksempler på andre 25 sykdommer og lidelser hvor TNF α -aktivitet har vært implisert i patofysiologien og således kan behandles ved anvendelse av et antistoff eller antistoffdel, omfatter inflammatoriske benlidelser og benresorpsjonssykdom (se *f.eks.* Bertolini, D.R., *et al.* (1986) *Nature* 319:516-518; Konig, A., *et al.* (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627; Lerner, U.H. og Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 30 8:147-155; og Shankar, G. og Stern, P.H. (1993) *Bone* 14:871-876), hepatitt, omfattende alkoholisk hepatitt (se *f.eks.* McClain, C.J. og Cohen, D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351; Felver, M.E., *et al.* (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14:255-259; og Hansen, J., *et al.* (1994) *Hepatology* 20:461-474), viral hepatitt

(Sheron, N., *et al.* (1991) *J. Hepatol.* 12:241-245; og Hussain, M.J., *et al.* (1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115) og fulminant hepatitt; koaguleringsforstyrrelser (se *f.eks.* van der Poll, T., *et al.* (1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; og van der Poll, T., *et al.* (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60), forbrenning (se *f.eks.* Giroir, B.P., *et al.* (1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124; og Liu, X.S., *et al.* (1994) *Burns* 20:40-44), reperfusjonsskade (se *f.eks.* Scales, W.E., *et al.* (1994) *Am. J. Physiol.* 267:G1122-1127; Serrick, C., *et al.* (1994) *Transplantation* 58:1158-1162; og Yao, Y.M., *et al.* (1995) *Resuscitation* 29:157-168), keloiddannelse (se *f.eks.* McCauley, R.L., *et al.* (1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308),
 10 arreveisdannelse; pyrexi; periodontal sykdom; obesitet og strålingstoksitet.

Foreliggende oppfinnelse illustreres videre av de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1: Kinetisk analyse av binding av human-antistoffer til hTNF α

15 Sanntids bindingsinteraksjoner mellom ligand (biotinyleret rekombinant human-TNF α (rhTNF α) immobilisert på en biosensor-matriks) og analytt (antistoffer i løsning) ble målt ved overflate-plasmonresonans (SPR) ved anvendelse av BIAcore-systemet (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Systemet anvender de optiske egenskapene til SPR til å detektere endringer i
 20 proteinkonsentrasjoner i en dekstran-biosensor-matriks. Proteiner blir kovalent bundet til dekstran-matriksen i kjente konsentrasjoner. Antistoffer blir injisert gjennom dekstran-matriksen og spesifikk binding mellom injiserte antistoffer og immobilisert ligand resulterer i en øket matriks-proteinkonsentrasjon og resulterende endring i SPR-signalet. Disse endringer i SPR-signal blir registrert
 25 som resonansenheter (RU) og blir vist i forhold til tiden på y-aksen av et sensorgram.

For å lette immobilisering av biotinyleret rhTNF α på biosensor-matriksen, blir streptavidin kovalent bundet via frie amingrupper til dekstran-matriksen ved først å aktivere karboksylgrupper på matriksen med 100 mM N-
 30 hydroksysuccinimid (NHS) og 400 mM N-etyl-N'-(3-dietylaminopropyl)-karbodiimid-hydroklorid (EDC). Deretter blir streptavidin injisert i den aktiverte matriks. 35 mikroliter streptavidin (25 mg/ml), fortynnet i natriumacetat, pH 4,5, blir injisert gjennom den aktiverte biosensor og frie aminer på proteinet blir

bundet direkte til de aktiverte karboksylgrupper. Uomsatte matriks-EDC-estere blir deaktivert ved injeksjon av 1 M etanolamin. Streptavidin-koblede biosensor-chips er også kommersielt tilgjengelige (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ).

5 Biotinylert rhTNF α ble fremstilt ved først å oppløse 5,0 mg biotin (D-biotinyl- ϵ -aminokapronsyre-N-hydroksysuccinimid-ester; Boehringer Mannheim Kat. Nr. 1008 960) i 500 μ l dimetylsulfoksyd for å fremstille en 10 mg/ml løsning. 10 mikroliter biotin ble tilsatt pr. ml rhTNF α (i 2,65 mg/ml) for et 2:1 molforhold av biotin til rhTNF α . Reaksjonsblandingen ble forsiktig blandet og inkubert i to
10 timer ved romtemperatur i mørke. En PD-10 kolonne, Sephadex G-25M (Pharmacia Katalog Nr. 17-0851-01) ble ekvilibrert med 25 ml kald PBS og lastet med 2 ml rhTNF α -biotin pr. kolonne. Kolonnen ble eluert med 10 x 1 ml kald PBS. Fraksjoner ble oppsamlet og lest ved OD280 (1,0 OD = 1,25 mg/ml). De passende fraksjoner ble samlet og lagret ved -80° C før anvendelse.
15 Biotinylert rhTNF α er også kommersielt tilgjengelig (R & D Systems Katalog Nr. FTA00, Minneapolis, MN).

Biotinylert rhTNF α som skal immobiliseres på matriksen via streptavidin ble fortynnet i PBS løpende buffer (Gibco Kat. No. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY) supplert med 0,05% (BIAcore) surfaktant P20 (Pharmacia
20 BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). For å bestemme kapasiteten til rhTNF α -spesifikke antistoffer til å binde til immobilisert rhTNF α , ble et bindingsforsøk utført som følger. Alikvoter av biotinylert rhTNF α (25 nM; 10 μ l alikvoter) ble injisert gjennom den streptavidin-koblede dekstranmatriks med en strømningshastighet på 5 μ l/min. Før injeksjon av proteinet og
25 umiddelbart etterpå, ble bare PBS-buffer strømmet gjennom hver strømningscelle. Nettodifferansen i signal mellom baselinje og omtrent 30 sek. etter fullføring av biotinylert rhTNF α -injeksjon ble tatt for å representere bindingsverdien (omtrent 500 RU). Direkte rhTNF α -spesifikk antistoff-binding til immobilisert biotinylert rhTNF α ble målt. Antistoffer (20 μ g/ml) ble fortynnet i
30 PBS løpende buffer og 25 ml alikvoter ble injisert gjennom de immobiliserte proteinmatrikser med en strømningshastighet på 5 μ l/min. Før injeksjon av antistoff og umiddelbart etter, ble bare PBS-buffer strømmet gjennom hver strømningscelle. Nettodifferansen i baselinje-signal og signal etter fullføring av

antistoff-injeksjon ble antatt å representere bindingsverdien av den spesielle prøven. Biosensormatriser ble regenerert ved anvendelse av 100 mM HCl før injeksjon av neste prøve. For å bestemme frigjøringshastigheten (K_{off}), bindingshastigheten (K_{on}), assosieringshastighets- (K_a) og dissosierings-
 5 hastighet- (K_d) konstanter, ble BIAcore kinetisk evalueringssoftware (versjon 2,1) anvendt.

Representative resultater av D2E7 (IgG4 full-lengde antistoff) som binder til biotinyleret rhTNF α , sammenlignet med mus mAb MAK 195 (F(ab') $_2$ fragment), er vist nedenfor i Tabell 1.

10

Tabell 1: Binding av D2E7 IgG4 eller MAK 195 til biotinyleret rhTNF α

Antistoff	[Ab], nM	rhTNF α , bundet RU	Ab, bundet, RU	rhTNF α /Ab	K_{off} , sek $^{-1}$, (Avg)
D2E7	267	373	1215	1,14	$8,45 \times 10^{-5}$
	133	420	1569	1,30	$5,42 \times 10^{-5}$
	67	434	1633	1,31	$4,75 \times 10^{-5}$
	33	450	1532	1,19	$4,46 \times 10^{-5}$
	17	460	1296	0,98	$3,47 \times 10^{-5}$
	8	486	936	0,67	$2,63 \times 10^{-5}$
	4	489	536	0,38	$2,17 \times 10^{-5}$
	2	470	244	0,18	$3,68 \times 10^{-5}$
					$(4,38 \times 10^{-5})$
MAK 195	400	375	881	1,20	$5,38 \times 10^{-5}$
	200	400	1080	1,38	$4,54 \times 10^{-5}$
	100	419	1141	1,39	$3,54 \times 10^{-5}$
	50	427	1106	1,32	$3,67 \times 10^{-5}$
	25	446	957	1,09	$4,41 \times 10^{-5}$
	13	464	708	0,78	$3,66 \times 10^{-5}$
	6	474	433	0,47	$7,37 \times 10^{-5}$
	3	451	231	0,26	$6,95 \times 10^{-5}$
					$(4,94 \times 10^{-5})$

Ved en andre serie eksperimenter ble de molekylære kinetiske
 15 interaksjoner mellom en IgG1 full-lengde-form av D2E7 og biotinyleret rhTNF

kvantitativt analysert ved anvendelse av BIAcore teknologi, som beskrevet ovenfor og kinetiske hastighetskonstanter ble avledet, som oppsummert i Tabellene 2, 3 og 4.

5 Tabell 2: Åpenbare dissosiasjonshastighetskonstanter for interaksjon mellom D2E7 og biotinyleret rhTNF

<u>Eksperiment</u>	K_d (s^{-1})
1	$9,58 \times 10^{-5}$
2	$9,26 \times 10^{-5}$
3	$7,60 \times 10^{-5}$
Gjennomsnitt	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$

10 Tabell 3: Åpenbare assosiasjonshastighetskonstanter for interaksjon mellom D2E7 og biotinyleret rhTNF

<u>Eksperiment</u>	K_a (M^{-1}, s^{-1})
1	$1,33 \times 10^5$
2	$1,05 \times 10^5$
3	$3,36 \times 10^5$
Gjennomsnitt	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$

15 Tabell 4: Åpenbare kinetisk hastighets- og affinitetskonstanter for D2E7 og biotinyleret rhTNF

<u>Eksperiment</u>	K_a (M^{-1}, s^{-1})	K_d (s^{-1})	K_d (M)
1	$1,33 \times 10^5$	$9,58 \times 10^{-5}$	$7,20 \times 10^{-10}$
2	$1,05 \times 10^5$	$9,26 \times 10^{-5}$	$8,82 \times 10^{-10}$
3	$3,36 \times 10^5$	$7,60 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-10}$
Gjennomsnitt	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$	$6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10}$

Dissosiasjons- og assosiasjonshastighetskonstanter ble beregnet ved analysing av dissosiasjons- og assosiasjonsregioner av sensorgrammene ved BIA-analyse-software. Konvensjonell kjemisk reaksjonskinetikk ble antatt for interaksjon mellom D2E7 og biotinylerth rhTNF-molekyl: en nullte orden
 5 dissosiasjon og første orden assosiasjons-kinetikk. For analysen ble interaksjon bare mellom én arm av det bivalente D2E7-antistoff og én enhet av det trimere biotinylerth rhTNF tatt i betraktning ved valg av molekyl-modeller for analyse av de kinetiske data. Tre uavhengige eksperimenter ble utført og resultatene ble analysert separat. Gjennomsnittlig åpenbar dissosiasjons-
 10 hastighetskonstant (k_d) av interaksjonen mellom D2E7 og biotinylerth rhTNF var $8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ og gjennomsnittlig åpenbar assosiasjonshastighetskonstant, k_a var $1,91 \pm 1,26 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Den åpenbare reelle dissosiasjonskonstant (K_d) ble deretter beregnet ved formelen: $K_d = k_d / k_a$. Således var
 15 gjennomsnittlig K_d av D2E7 antistoff for rhTNF avledet fra kinetiske parametere $6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10} \text{ M}$. Mindre differanser i de kinetiske verdier for IgG1-formen av D2E7 (presentert i Tabellene 2, 3 og 4) og IgG4-formen av D2E7 (presentert i Tabell 1 og i Eksemplene 2 og 3) er ikke antatt å være riktige differanser som er et resultat av tilstedeværelse av enten IgG1 eller IgG4 konstante regioner,
 20 men er heller antatt å skyldes mer nøyaktige antistoff-konsentrasjonsmålinger anvendt for den IgG1 kinetiske analyse. Følgelig er de kinetiske verdier for IgG1-formen av D2E7 presentert her antatt å være de mest nøyaktige kinetiske parametere for D2E7-antistoffet.

25 **EKSEMPEL 2: Alanin-scanning-mutagenese av D2E7 CDR3-domener**

En serie av enkle alanin-mutasjoner ble innført ved standard metoder i CDR3-domenet av D2E7 VL- og D2E7 VH-regioner. Lettkjede mutasjoner er illustrert i Figur 1B (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5,
 LD2E7*.A7 og LD2E7*.A8, som har en alanin-mutasjon i henholdsvis stilling 1,
 30 3, 4, 5, 7 eller 8, av D2E7 VL-CDR3-domenet). Tungkjede mutasjoner er illustrert i Figur 2B (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4,
 HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 og HD2E7*.A9, som har en alanin-mutasjon i henholdsvis stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11, av D2E7 VH

CDR3-domenet). Kinetikken av rhTNF α -interaksjon med et antistoff sammensatt av villtype D2E7 VL og VH ble sammenlignet med den til antistoffer sammensatt av 1) en villtype D2E7 VL paret med en alaninsubstituert D2E7 VH; 2) en villtype D2E7 VH paret med en alaninsubstituert D2E7 VL; eller 3) en alaninsubstituert D2E7 VL paret med en alaninsubstituert D2E7 VH. Alle antistoffer ble testet som full-lengde, IgG4-molekyler.

Kinetikken til interaksjonen av antistoffer med rhTNF α ble bestemt ved overflate-plasmonresonans som beskrevet i Eksempel 1. K_{off} -hastigheter for de forskjellige VH/VL-par er oppsummert nedenfor i Tabell 5:

Tabell 5: Binding av D2E7 alanin-scan-mutanter til Biotinyleret rhTNF α

VH	VL	K_{off} (sec ⁻¹)
D2E7 VH	D2E7 VL	$9,65 \times 10^{-5}$
HD2E7*.A1	D2E7 VL	$1,4 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A2	D2E7 VL	$4,6 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A3	D2E7 VL	$8,15 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A4	D2E7 VL	$1,8 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A5	D2E7 VL	$2,35 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A6	D2E7 VL	$2,9 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A7	D2E7 VL	$1,0 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A8	D2E7 VL	$3,1 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	D2E7 VL	$8,1 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A1	$6,6 \times 10^{-5}$
D2E7 VH	LD2E7*.A3	IKKE DETEKTERBAR
D2E7 VH	LD2E7*.A4	$1,75 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A5	$1,8 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A7	$1,4 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A8	$3,65 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	$1,05 \times 10^{-4}$

Disse resultater demonstrerer at hoveddelen av stillingene av CDR3-domener i D2E7 VL-regionen og VH-regionen er mottagelige for substitusjon med en enkel alaninrest. Substitusjon av et enkelt alanin i stilling 1, 4, 5 eller 7 av D2E7 VL-CDR3-domenet eller i stilling 2, 5, 6, 8, 9 eller 10 av D2E7 VH-

CDR3-domenet påvirker ikke i særlig grad frigjøringshastigheten av hTNF α -binding sammenlignet med villtype parentalt D2E7 antistoff. Substitusjon av alanin i stilling 8 av D2E7 VL-CDR3 eller i stilling 3 av D2E7 VH-CDR3 gir en 4-ganger raskere K_{off} og en alaninsubstitusjon i stilling 4 eller 11 av D2E7 VH-CDR3 gir en 8-ganger raskere K_{off} , hvilket indikerer at disse stillinger er mer kritiske for binding til hTNF α . Imidlertid resulterer fortsatt en enkel alaninsubstitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 av D2E7 VL-CDR3 domenet eller i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 av D2E7 VH-CDR3-domenet i et anti-hTNF α -antistoff som har en K_{off} på $1 \times 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$ eller mindre.

10

EKSEMPEL 3: Bindingsanalyse av D2E7-beslektede antistoffer

En serie antistoffer beslektet i sekvens med D2E7 ble analysert for deres binding til rhTNF α , sammenlignet med D2E7, ved overflate-plasmonresonans som beskrevet i Eksempel 1. Aminosyresekvensene av de testede VL-regioner er vist i Figurene 1A og 1B. Aminosyresekvensene av de testede VH-regioner er vist i Figurene 2A og 2B. K_{off} -hastigheter for forskjellige VH/VL-par (i det angitte format, enten som et full-lengde IgG1- eller IgG4-antistoff eller som en scFv) er oppsummert nedenfor i Tabell 6:

20 Tabell 6: Binding av D2E7-beslektede antistoffer til biotinylerert rhTNF α

VH	VL	Format	$K_{off} \text{ (sek}^{-1}\text{)}$
D2E7 VH	D2E7 VL	IgG1/IgG4	$9,65 \times 10^{-5}$
VH1-D2	LOE7	IgG1/IgG4	$7,7 \times 10^{-5}$
VH1-D2	LOE7	scFv	$4,6 \times 10^{-4}$
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	$2,1 \times 10^{-5}$
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	$2,7 \times 10^{-5}$
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	$3,2 \times 10^{-5}$
VH1-D2	EP B12	scFv	$8,0 \times 10^{-4}$
VH1-D2	2SD4 VL	scFv	$1,94 \times 10^{-3}$

3C-H2	LOE7	scFv	$1,5 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	LOE7	scFv	$6,07 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	$1,37 \times 10^{-2}$
VH1A11	2SD4 VL	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
VH1B12	2SD4 VL	scFv	$1,01 \times 10^{-2}$
VH1B11	2SD4 VL	scFv	$9,8 \times 10^{-3}$
VH1E4	2SD4 VL	scFv	$1,59 \times 10^{-2}$
VH1F6	2SD4 VL	scFv	$2,29 \times 10^{-2}$
VH1D8	2SD4 VL	scFv	$9,5 \times 10^{-3}$
VH1G1	2SD4 VL	scFv	$2,14 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	EP B12	scFv	$6,7 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL10E4	scFv	$9,6 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL100A9	scFv	$1,33 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL100D2	scFv	$1,41 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL10F4	scFv	$1,11 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	$1,16 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0F9	scFv	$6,09 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VLL0F10	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG7	scFv	$1,56 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG9	scFv	$1,46 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH1	scFv	$1,17 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH10	scFv	$1,12 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1B7	scFv	$1,3 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C1	scFv	$1,36 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C7	scFv	$2,0 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0,1F4	scFv	$1,76 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0,1H8	scFv	$1,14 \times 10^{-2}$

De langsomme frigjøringshastigheter (dvs. $K_{\text{off}} \leq 1 \times 10^{-4} \text{ sek}^{-1}$) for full-lengde-antistoffer (dvs. IgG-format) som har en VL valgt fra D2E7, LOE7, LOE7.T og LOE7.A, som har enten treonin eller alanin i stilling 9, indikerer at stilling 9 i D2E7 VL-CDR3 kan være okkupert av hvilken som helst av disse to rester uten i særlig grad å påvirke K_{off} . Følgelig omfatter et konsensus-motiv for D2E7 VL-CDR3 aminosyresekvensen: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEKV ID NR: 3). Videre indikerer de langsomme frigjøringshastigheter (dvs. $K_{\text{off}} \leq 1 \times 10^{-4} \text{ sek}^{-1}$) for antistoffer som har en VH valgt fra D2E7, VH1-D2.N og VH1-D2.Y, som har enten tyrosin eller asparagin i stilling 12, at stilling 12 av D2E7 VH-CDR3 kan være okkupert av hvilken som helst av disse to rester uten i særlig grad å påvirke K_{off} . Følgelig omfatter et konsensus-motiv for D2E7 VH-CDR3 aminosyresekvensen: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEKV ID NR: 4).

Resultatene vist i Tabell 6 demonstrerer at i scFv format oppviser antistoffer inneholdende 2SD4 VL- eller VH-CDR3-regionen en raskere K_{off} (dvs. $K_{\text{off}} \geq 1 \times 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$) sammenlignet med antistoffer inneholdende D2E7 VL- eller VH-CDR3-regionen. I VL-CDR3 skiller 2SD4 seg fra D2E7 i stillingene 2, 5 og 9. Som beskrevet ovenfor, kan imidlertid stilling 9 være okkupert av Ala (som i 2SD4) eller Thr (som i D2E7) uten i særlig grad å påvirke K_{off} . Ved sammenligning av 2SD4 og D2E7, kan således stillingene 2 og 5 i D2E7 VL-CDR3, begge argininer, identifiseres som kritiske for assosieringen av antistoffet med hTNF α . Disse restene kan være direkte involvert som kontakt-rester på antistoff-bindingssetet eller kan kritisk bidra til å opprettholde stillas-arkitekturen til antistoff-molekylet i denne regionen. Når det gjelder betydningen av stilling 2, akselererer erstatning av Arg (i LOE7, som har samme VL-CDR3 som D2E7) med Lys (i EP B12) frigjøringshastigheten med en faktor på to. Når det gjelder betydningen av stilling 5, akselererer også erstatning av Arg (i D2E7) med Ala (i LD2E7*.A5), som beskrevet i Eksempel 2 frigjøringshastigheten to ganger. Videre, uten Arg i begge stillinger 2 og 5 (i 2SD4), blir frigjøringshastigheten fem ganger raskere. Imidlertid skal det bemerkes at selv om stilling 5 er viktig for forbedret binding til hTNF α , kan en endring i denne stilling oppheves ved endringer i andre stillinger, som det sees i VLLOE4, VLLOH1 eller VL0,1H8.

I VH-CDR3, skiller 2SD4 seg fra D2E7 i stillingene 1, 7 og 12. Som angitt ovenfor, kan imidlertid stilling 12 være okkupert av Asn (som i 2SD4) eller Tyr (som i D2E7) uten i særlig grad å påvirke K_{off} . Ved sammenligning av 2SD4 og D2E7, kan således stillingene 1 og 7 i D2E7 VH-CDR3 identifiseres som kritiske for binding til hTNF α . Som beskrevet ovenfor kan disse rester være direkte involvert som kontakt-rester på antistoff-bindingssetet eller kritisk bidra til å opprettholde stillas-arkitekturen til antistoff-molekylet i denne region. Begge stillinger er viktige for binding til hTNF α , ettersom når 3C-H2 VH-CDR3 (som har en valin til alanin endring i stilling 1 i forhold til D2E7 VH-CDR3) blir anvendt, har scFv en 3 ganger raskere frigjøringshastighet enn når D2E7 VH-CDR3 blir anvendt, men denne frigjøringshastigheten er enda fire ganger langsommere enn når 2SD4 VH-CDR3 blir anvendt (som har endringer i begge stillingene 1 og 7 i forhold til D2E7 VH-CDR3).

15 **EKSEMPEL 4: Funksjonell aktivitet av D2E7**

For å undersøke den funksjonelle aktiviteten til D2E7 ble antistoffet anvendt i flere forsøk som måler evnen til antistoffet til å hemme hTNF α -aktivitet, enten *in vitro* eller *in vivo*.

20 **A. Nøytralisering av TNF α -fremkalt cytotoksisitet i L929-celler**

Human-rekombinant TNF α (rhTNF α) forårsaker cellecytotoksisitet hos murine L929-celler etter en inkuberingsperiode på 18-24 timer. Human-anti-hTNF α -antistoffer ble bedømt i L929-testanalyse ved medinkubering av antistoffer med rhTNF α og cellene som følger. En 96-brønn mikrotiterplate inneholdende 100 μ l anti-hTNF α Ab ble serielt fortynnet 1/3 nedover platen i duplikater ved anvendelse av RPMI-medium inneholdende 10% føtalt bovint serum (FBS). 50 mikroliter rhTNF α ble tilsatt for en endelig konsentrasjon på 500 pg/ml i hver prøve-brønn. Platene ble deretter inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter ble 50 μ l TNF α -sensitive L929 muse-fibroblastceller tilsatt for en endelig konsentrasjon på 5×10^4 celler pr. brønn, omfattende 1 mg/ml Actinomycin-D. Kontroller omfattet medium pluss celler og rhTNF α pluss celler. Disse kontroller og en TNF α -standardkurve, fra 2 ng/ml til 8,2 pg/ml, ble

anvendt for å bestemme kvaliteten av forsøket og gi et nøytralitetsperspektiv. Platene ble deretter inkubert natten over (18-24 timer) ved 37° C i 5% CO₂.

Ett hundre mikroliter av medium ble fjernet fra hver brønn og 50 µl 5 mg/ml 3,(4,4-dimetyltiazol-2-yl)2,5-difenyl-tetrazoliumbromid (MTT; kommersielt tilgjengelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i PBS ble tilsatt. Platene ble deretter inkubert i 4 timer ved 37° C. Femti mikroliter 20% natrium- dodecyl-sulfat (SDS) ble deretter satt til hver brønn, og platene ble inkubert natten over ved 37° C. Den optiske densitet ved 570/630 nm ble målt, kurver ble plottet for hver prøve og IC₅₀ ble bestemt ved standard metoder.

Representative resultater for human-antistoffer som har forskjellige VL- og VH-par, sammenlignet med det murine MAK 195 mAb, er vist i Figur 3 og i Tabell 7 nedenfor.

Tabell 7: Nøytralisering av TNF α -fremkalt L929-cytotoksisitet

<u>VH</u>	<u>VL</u>	<u>Struktur</u>	<u>IC₅₀, M</u>
D2E7	D2E7	scFv	1,1 x 10 ⁻¹⁰
D2E7	D2E7	IgG4	4,7 x 10 ⁻¹¹
2SD4	2SD4	scFv/IgG1/IgG4	3,0 x 10 ⁻⁷
2SD4	LOE7	scFv	4,3 x 10 ⁻⁸
VH1-D2	2SD4	scFv	1,0 x 10 ⁻⁸
VH1-D2	LOE7	scFv/IgG1/IgG4	3,4 x 10 ⁻¹⁰
VH1.D2.Y	LOE7.T	IgG4	8,1 x 10 ⁻¹¹
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	1,3 x 10 ⁻¹⁰
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2,8 x 10 ⁻¹¹
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	6,2 x 10 ⁻¹¹
MAK 195	MAK 195	scFv	1,9 x 10 ⁻⁸
MAK 195	MAK195	F(ab') ₂	6,2 x 10 ⁻¹¹

Resultatene i Figur 3 og Tabell 7 demonstrerer at D2E7 human-anti-hTNF α -antistoff og forskjellige D2E7-beslektede antistoffer, nøytraliserer TNF α -fremkalt

L929-cytotoksisitet med en kapasitet omtrent ekvivalent med den til murint anti-hTNF α mAb MAK 195.

Ved en annen serie eksperimenter ble evnen til IgG1-formen av D2E7 til å nøytralisere TNF α -fremkalt L929-cytotoksisitet undersøkt som beskrevet ovenfor. Resultatene fra tre uavhengige eksperimenter og gjennomsnittet av disse er oppsummert nedenfor i Tabell 8:

Tabell 8: Nøytralisering av TNF α -fremkalt L929-cytotoksisitet med D2E7 IgG1

<u>Eksperiment</u>	<u>IC₅₀ [M]</u>
1	1,26 x 10 ⁻¹⁰
2	1,33 x 10 ⁻¹⁰
3	1,15 x 10 ⁻¹⁰
Gjennomsnitt	1,25 ± 0,01 x 10 ⁻¹⁰

Denne serie av eksperimenter bekreftet at D2E7, i full-lengde IgG1-form, nøytraliserer TNF α -fremkalt L929-cytotoksisitet med en gjennomsnittlig IC₅₀ [M] på 1,25 ± 0,01 x 10⁻¹⁰.

B. Hemning av TNF α -binding til TNF α -reseptorer på U-937-celler

Evnen til human-anti-hTNF α -antistoffer til å hemme binding av hTNF α til hTNF α -reseptorer på overflaten av celler ble undersøkt ved anvendelse av U-937-cellelinje (ATCC No. CRL 1593), en human histiocyttisk cellelinje som uttrykker hTNF α -reseptorer. U-937-celler ble dyrket i RPMI 1640-medium supplert med 10% føtalt bovint serum (Hyclone A-1111, Hyclone Laboratories, Logan, UT), L-glutamin (4 nM), HEPES-buffer-løsning (10 mM), penicillin (100 μ g/ml) og streptomycin (100 mg/ml). For å undersøke aktiviteten til full-lengde IgG-antistoffer, ble U-937-celler preinkubert med PBS supplert med 1 mg/ml human IgG (Sigma I-4506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i 45 minutter på is og deretter ble cellene vasket tre ganger med bindingsbuffer. For reseptorbindingsforsøk ble U-937-celler (5 x 10⁶ celler/brønn) inkubert i en bindingsbuffer (PBS supplert med 0,2% bovint serum-albumin) i 96-brønn

mikrotiter-plater (Costar 3799, Costar Corp., Cambridge, MA) sammen med ^{125}I -merket $\text{rhTNF}\alpha$ (3×10^{-10} M; 25 $\mu\text{Ci/ml}$; anskaffet fra NEN Research Products, Wilmington, DE), med eller uten anti- $\text{hTNF}\alpha$ -antistoffer, i et totalt volum på 0,2 ml. Platene ble inkubert på is i 1,5 timer. Deretter ble 75 μl av hver prøve overført til 1,0 ml test-rør (Sarstedt 72,700, Sarstedt Corp., Princeton, NJ) inneholdende dibutylftalat (Sigma D-2270, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) og dinonylftalat (ICN 210733, ICN, Irvin, CA). Testrørene inneholdt en 300 μl blanding av dibutylftalat og dinonylftalat, i henholdsvis et volumforhold på 2:1. Fritt (dvs. ubundet) ^{125}I -merket $\text{rhTNF}\alpha$ ble fjernet ved mikrosentrifugering i fem minutter. Deretter ble hver testrør-ende inneholdende en cellepellet kuttet ved hjelp av en mikrorør-saks (Bel-Art 210180001, Bel-Art Products, Pequannock, NJ). Cellepelleten inneholder ^{125}I -merket $\text{rhTNF}\alpha$ bundet til p60 eller p80 $\text{TNF}\alpha$ -reseptor, mens den vandige fasen ovenfor oljeblandingen inneholder overskudd av fritt ^{125}I -merket $\text{rhTNF}\alpha$. Alle cellepellets ble oppsamlet i et tellerør (Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) og tellet i en scintillasjonsteller.

Representative resultater er vist i Figur 4. IC_{50} -verdien for D2E7-hemning av $\text{hTNF}\alpha$ -binding til $\text{hTNF}\alpha$ -reseptorer på U-937-celler er omtrent 3×10^{-10} M i disse eksperimentene. Disse resultater demonstrerer at D2E7 human-anti- $\text{hTNF}\alpha$ -antistoff hemmer $\text{rhTNF}\alpha$ -binding til $\text{hTNF}\alpha$ -reseptorer på U-937-celler i konsentrasjoner omtrent ekvivalente med de til murint anti- $\text{hTNF}\alpha$ mAb MAK 195.

Ved en annen serie av eksperimenter ble evnen til IgG1-formen av D2E7 til å hemme $\text{rhTNF}\alpha$ -binding til $\text{hTNF}\alpha$ -reseptorer på U-937-celler undersøkt som beskrevet ovenfor. Resultatene fra tre uavhengige eksperimenter og gjennomsnittet derav, er oppsummert nedenfor i Tabell 9:

Tabell 9: Hemning av TNF-reseptorbinding på U-937-celler av D2E7-IgG1

<u>Eksperiment</u>	IC ₅₀ [M]
1	1,70 x 10 ⁻¹⁰
2	1,49 x 10 ⁻¹⁰
3	1,50 x 10 ⁻¹⁰
Gjennomsnitt	1,56 ± 0,12 x 10 ⁻¹⁰

Denne serie av eksperimenter bekreftet at D2E7, i full-lengde IgG1-form, hemmer TNF-reseptorbinding på U-937-celler med en gjennomsnittlig IC₅₀ [M] på 1,56 ± 0,12 x 10⁻¹⁰.

For å undersøke den hemmende kapasiteten til D2E7 for binding av ¹²⁵I-rhTNF som binder til individuelle p55- og p75-reseptorer, ble et fast fase radioimmunoforsøk utført. For å måle IC₅₀-verdiene for D2E7 for separate TNF-reseptorer ble varierende konsentrasjoner av antistoffet inkubert med 3 x 10⁻¹⁰ konsentrasjon av ¹²⁵I-rhTNF. Blandingen ble deretter testet på separate plater inneholdende enten p55- eller p75-TNF-reseptorer på en doseavhengig måte. Resultatene er oppsummert nedenfor i Tabell 10:

Tabell 10: Hemning av TNF-reseptorbinding til p55- og p75-TNFR av D2E7-IgG1

<u>Reagens</u>	IC ₅₀ [M]	
	p55 TNFR	p75 TNFR
D2E7	1,47 x 10 ⁻⁹	1,26 x 10 ⁻⁹
rhTNF	2,31 x 10 ⁻⁹	2,70 x 10 ⁻⁹

Hemning av ¹²⁵I-rhTNF-binding til p55- og p75-TNF-reseptorer på U937-celler av D2E7 fulgte en enkel S-formet kurve, hvilket indikerer lignende IC₅₀-verdier for hver reseptor. I fast-fase radioimmunoforsøks- (RIA) eksperimenter med

rekombinante TNF-reseptorer, ble IC₅₀-verdier for hemning av ¹²⁵I-rhTNF-binding til p55- og p75-reseptorer av D2E7, beregnet som henholdsvis 1,47 x 10⁻⁹ og 1,26 x 10⁻⁹ M. Reduksjonen av IC₅₀-verdier i den faste fasen var sannsynligvis på grunn av høyere densitet av reseptorer i RIA-formatet, ettersom umerket rhTNF også hemmet med lignende IC₅₀-verdier. IC₅₀-verdiene for hemning av ¹²⁵I-rhTNF-binding til p55- og p75-reseptorer av umerket rhTNF var henholdsvis 2,31 x 10⁻⁹ og 2,70 x 10⁻⁹ M.

C. Hemning av ELAM-1-ekspressjon på HUVEC

Human-navlevene-endotelceller (HUVEC) kan fås til å uttrykke endotelcelle-leukocyt-adhesjonsmolekyl 1 (ELAM-1) på deres celleoverflate ved behandling med rhTNF α , hvilket kan detekteres ved å reagere rhTNF α -behandlet HUVEC med et mus-anti-human-ELAM-1-antistoff. Evnen til human-anti-hTNF α -antistoffer til å hemme denne TNF α -fremkalt ekspressjon av ELAM-1 på HUVEC ble undersøkt som følger: HUVEC (ATCC Nr. CRL 1730) ble platet ut i 96-brønn-plater (5 x 10⁴ celler/brønn) og inkubert natten over ved 37 °C. Den følgende dag ble seriefortynninger av human-anti-hTNF α -antistoff (1:10) fremstilt i en mikrotiter-plate, ved å starte med 20-100 μ g/ml antistoff. En lager-løsning av rhTNF α ble fremstilt med 4,5 ng/ml, alikvoter av rhTNF α ble satt til hver antistoff-inneholdende brønn, og innholdet ble godt blandet. Kontroller omfattet medium alene, medium pluss anti-hTNF α -antistoff og medium pluss rhTNF α . HUVEC-platene ble fjernet fra inkuberingen natten over ved 37° C, og mediet ble forsiktig aspirert fra hver brønn. To hundre mikroliter av antistoff-rhTNF α -blandingen ble overført til hver brønn i HUVEC-platene. HUVEC-platene ble deretter videre inkubert ved 37° C i 4 timer. Deretter ble et murint anti-ELAM-1-antistoff-lager fortynt 1:1000 i RPMI. Mediet i hver brønn av HUVEC-platen ble forsiktig aspirert, 50 μ l/brønn av anti-ELAM-1-antistoffløsning ble tilsatt og HUVEC-platene ble inkubert 60 minutter ved romtemperatur. En ¹²⁵I-merket anti-mus-Ig- antistoffløsning ble fremstilt i RPMI (omtrent 50,000 cpm i 50 μ l). Mediet i hver brønn av HUVEC-platene ble forsiktig aspirert, brønnene ble vasket to ganger med RPMI og 50 μ l av ¹²⁵I-

merket anti-mus-Ig-løsning ble satt til hver brønn. Platene ble inkubert i én time ved romtemperatur og deretter ble hver brønn vasket tre ganger med RPMI. 180 mikroliter 5% SDS ble satt til hver brønn for å lyse cellene. Celle-lysate fra hver brønn ble deretter overført til et rør og tellet i en scintillasjons-teller.

5 Representative resultater er vist i Figur 5. IC_{50} -verdien for D2E7-hemming av hTNF α -fremkalt ekspresjon av ELAM-1 på HUVEC er omtrent 6×10^{-11} M i disse eksperimenter. Disse resultater demonstrerer at D2E7 human-anti-hTNF α -antistoff hemmer hTNF α -fremkalt ekspresjon av ELAM-1 på HUVEC i konsentrasjoner omtrent ekvivalente med de til murint anti-hTNF α mAb MAK 195.

Ved en annen serie av eksperimenter ble evnen til IgG1-formen av D2E7 til å hemme hTNF α -fremkalt ekspresjon av ELAM-1 på HUVEC undersøkt som beskrevet ovenfor. Resultatene fra tre uavhengige eksperimenter og gjennomsnittet derav, er oppsummert nedenfor i Tabell 11:

15

Tabell 11: Hemning av TNF α -fremkalt ELAM-1-ekspresjon av D2E7-IgG1-reseptor

Eksperiment	IC_{50} [M]
1	$1,95 \times 10^{-10}$
2	$1,69 \times 10^{-10}$
3	$1,90 \times 10^{-10}$
Gjennomsnitt	$1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$

20 Denne serien av eksperimenter bekreftet at D2E7, i full-lengde IgG1-form, hemmer TNF α -fremkalt ELAM-1-ekspresjon på HUVEC med en gjennomsnittlig IC_{50} [M] på $1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$.

Nøytraliserings-kapasiteten av D2E7-IgG1 ble også undersøkt for rhTNF-fremkalt ekspresjon av to andre adhesjonsmolekyler, ICAM-1 og VCAM-1. Etersom rhTNF-titreringskurven for ICAM-1-ekspresjon etter 16 timer var
25 meget lignende kurven for ELAM-1-ekspresjon, ble samme konsentrasjon av rhTNF anvendt i antistoff-nøytraliseringseksperimenter. HUVEC ble inkubert

med rhTNF i nærvær av varierende konsentrasjoner av D2E7 i en 37°C CO₂-inkubator i 16 timer og ICAM-1-ekspressjon ble målt ved mus-anti-ICAM-1-antistoff fulgt av ¹²⁵I-merket sau-anti-mus-antistoff. To uavhengige eksperimenter ble utført og IC₅₀-verdier ble beregnet. Et ubeslektet human-IgG1-antistoff hemmet ikke ICAM-1-ekspressjon.

Den eksperimentelle metoden for å teste hemning av VCAM-1-ekspressjon var den samme som metoden for ELAM-1-ekspressjon, bortsett fra at anti-VCAM-1 MAb ble anvendt istedenfor anti-ELAM-1 MAb. Tre uavhengige eksperimenter ble utført og IC₅₀-verdier ble beregnet. Et ubeslektet human-IgG1-antistoff hemmet ikke VCAM-1-ekspressjon.

Resultatene er oppsummert nedenfor i Tabell 12:

Tabell 12: Hemning av ICAM-1- og VCAM-1-ekspressjon av D2E7 IgG1

ICAM-1-hemning		IC ₅₀ [M]	
Eksperiment	IC ₅₀ [M]	Eksperiment	IC ₅₀ [M]
1	1,84 x 10 ⁻¹⁰	1	1,03 x 10 ⁻¹⁰
2	2,49 x 10 ⁻¹⁰	2	9,26 x 10 ⁻¹¹
		3	1,06 x 10 ⁻¹⁰
Gjennomsnitt	2,17 ± 0,46 x 10 ⁻¹⁰	Gjennomsnitt	1,01 ± 0,01 x 10 ⁻¹⁰

15

Disse eksperimenter demonstrerte at behandling av primære human-navlevene-endotelceller med rhTNF fører til optimal ekspressjon av adhesjonsmolekyler:

ELAM-1 og VCAM-1 etter fire timer og maksimum opp-regulert ekspressjon av ICAM-1 etter 16 timer. D2E7 var i stand til å hemme ekspressjon av de tre adhesjonsmolekyler på en doseavhengig måte. IC₅₀-verdiene for hemning av ELAM-1, ICAM-1 og VCAM-1 var henholdsvis 1,85 x 10⁻¹⁰, 2,17 x 10⁻¹⁰ og 1,01 x 10⁻¹⁰ M. Disse verdier er meget like, hvilket indikerer lignende krav til dose av rhTNF-aktiveringssignal for å fremkalle ELAM-1-, ICAM-1- og VCAM-1-ekspressjon. Interessant var D2E7 tilsvarende effektivt i det lenger inhiberings-

25

forsøk for ICAM-1-ekspressjon. ICAM-1-inhiberingsforsøk krevet 16 timer sam-inkubering av rhTNF og D2E7 med HUVEC i motsetning til 4 timer som var nødvendig for ELAM-1- og VCAM-1-inhiberingsforsøkene. Etersom D2E7 har en langsom frigjøringshastighet for rhTNF, antas det at under den 16 timer lange sam-inkuberingsperioden var det ingen konkurranse av betydning av TNF- reseptorer på HUVEC.

D. In vivo nøytralisering av hTNF α

Tre forskjellige *in vivo*-systemer ble anvendt for å demonstrere at D2E7 er effektiv for hemning av hTNF α -aktivitet *in vivo*.

I. Hemning av TNF-fremkalt-dødelighet hos D-galaktosamin-sensibiliserte mus

Injeksjon av rekombinant human-TNF α (rhTNF α) til D-galaktosamin-sensibiliserte mus forårsaker død innenfor en periode på 24 timer. TNF α -nøytraliserende midler er vist å forhindre dødelighet ved denne modellen. For å undersøke evnen til human-anti-hTNF α -antistoffer til å nøytralisere hTNF α *in vivo* i denne modellen, ble C57Bl/6 mus injisert med varierende konsentrasjoner av D2E7-IgG1 eller et kontrollprotein, i PBS intraperitonealt (i.p.). Musene ble utfordret 30 minutter senere med 1 μ g rhTNF α og 20 mg D-galaktosamin i PBS i.p. og observert 24 timer senere. Disse mengder av rhTNF α og D-galaktosamin var tidligere funnet å gi 80-90% dødelighet i disse musene.

Representative resultater, angitt som et stolpediagram av % overlevelse mot antistoff-konsentrasjon, er vist i Figur 6. De sorte stolpene representerer D2E7, mens de skraverte stolpene representerer MAK 195. Injeksjon av 2,5-25 μ g D2E7 antistoff pr. mus beskyttet dyrene fra TNF α -fremkalt død. ED₅₀-verdien er omtrent 1-2,5 μ g/mus. Det positive kontroll-antistoff, MAK 195, hadde tilsvarende beskyttelsessevne. Injeksjon av D2E7 i fravær av rhTNF α hadde ikke noen skadelig virkning på musene. Injeksjon av et ikke-spesifikt human-IgG1-antistoff ga ikke noen beskyttelse mot TNF α -fremkalt dødelighet.

Ved et andre eksperiment ble 49 mus delt inn i 7 like grupper. Hver gruppe mottok varierende doser av D2E7 30 minutter før de fikk en LD₈₀-dose av en rhTNF/D-galaktosamin-blanding (1,0 mg rhTNF og 20 mg D-galaktosamin

pr. mus. Kontroll-gruppe 7 fikk normalt human-IgG1-kappa-antistoff i en 25 µg/mus dose. Musene ble undersøkt 24 timer senere. Overlevelse for hver gruppe er oppsummert nedenfor i Tabell 13.

5 Tabell 13: 24 timers overlevelse etter behandling med D2E7

<u>Gruppe</u>	<u>Overlevelse</u> <u>(levende/total)</u>	<u>Overlevelse (%)</u>
1 (intet antistoff)	0/7	0
2 (1 µg)	1/7	14
3 (2,6 µg)	5/7	71
4 (5,2 µg)	6/7	86
5 (26 µg)	6/7	86
6 (26 µg; intet rhTNF)	7/7	100
7 (25 µg Hu IgG1)	1/7	14

II. Hemning av TNF-fremkalt kanin-pyrexi

Effektiviteten av D2E7 til å hemme rhTNF-fremkalt pyrexirespons hos

10 kaniner ble undersøkt. Grupper på tre NZW-hunnkaniner som veide omtrent 2,5 kg hver ble injisert intravenøst med D2E7, rhTNF og immunkomplekser av D2E7 og rhTNF. Rektale temperaturer ble målt med termistor-sonder på en Kaye varmeregistratør hvert minutt i omtrent 4 timer. Rekombinant human-TNF i saltvann, injisert med 5 µg/kg, frembragte en temperaturøkning over 0,4°C

15 omtrent 45 minutter etter injeksjonen. Antistoffpreparatet selv, i saltvann i en dose på 138 µg/kg, frembragte ikke en temperaturøkning hos kaninene opptil 140 minutter etter administrering. Ved alle andre eksperimenter ble D2E7 eller kontrollreagenser (human IgG1 eller en saltvannbærer) injisert i.v. i kaninene, 15 minutter senere fulgt av en injeksjon av rhTNF i saltvann med 5 µg/kg i.v.

20 Representative resultater fra flere eksperimenter er oppsummert nedenfor i Tabell 14:

Tabell 14: Hemning av rhTNF-fremkalt pyrexi med D2E7 i kaniner

D2E7 dose (µg/kg)	Temp.stignin*, °C		% Inhib.**	Mol-forhold	Topp- temp.
	rhTNF	rhTNF + D2E7		D2E7: rhTNF	minutter etter rhTNF
14	0,53	0,25	53	1	60
24	0,43	0,13	70	1,6	40
48	0,53	0,03	94	3,3	50
137	0,53	0,00	100	9,5	60
792	0,80	0,00	100	55	60

*=Topp-temperatur

5 **=% inhibering=(1-{temperatur-stigning med rhTNF & D2E7/temperatur-stigning med rhTNF alene}) x 100.

Intravenøs forbehandling med D2E7 i en dose på 14 µg/kg hemmet delvis den pyrogene respons, sammenlignet med kaninger for-behandlet med saltvann alene. D2E7 administrert med 137 µg/kg undertrykket fullstendig den
10 pyrogene respons på rhTNF i samme eksperiment. Ved et andre eksperiment undertrykket D2E7 administrert med 24 µg/kg også delvis den pyrogene respons, sammenlignet med kaniner forbehandlet med saltvann alene. Molforholdet av D2E7 til rhTNF var 1/6:1 i dette eksperiment. Ved et tredje eksperiment undertrykket D2E7 injisert i.v. med 48 µg/kg (mol-forhold
15 D2E7:rhTNF = 3,3:1) fullstendig den pyrogene respons, sammenlignet med kaniner forbehandlet med kontroll-human IgG1 i saltvann med 30 µg/kg. I det endelige eksperiment, utviklet kaniner forbehandlet med D2E7 (792 µg/kg) i et meget høyt molforhold til rhTNF (55:1) ikke noen temperatur-stigning på noe tidspunkt innenfor 4 timers observasjon. Behandling av kaniner med immun-
20 komplekser dannet fra en blanding av D2E7 og rhTNF inkubert ved 37°C i 1 time med et molforhold på 55:1, uten påfølgende rhTNF-administrering frembragte heller ingen temperaturstigning ved det samme eksperiment.

III. Forhindring av polyartritt i Tg197 transgene mus

Virkningen av D2E7 på sykdomsutvikling ble undersøkt i en transgen murin modell av artritt. Transgene mus (Tg197) er frembragt som uttrykker human villtype TNF (modifisert i 3'-regionen etter de kodende sekvenser) og disse mus utvikler kronisk polyartritt med 100% forekomst, 4-7 uker gamle (se *EMBO J* (1991) 10:4025-4031 for ytterligere beskrivelse av Tg197-modellen av polyartritt).

Transgene dyr ble identifisert med PCR da de var 3 dager gamle. Kull med transgene mus ble delt inn i seks grupper. Transgene mus ble verifisert ved "slot-blot" hybridiseringsanalyse da de var 15 dager gamle. Behandlingsprotokollene for de seks grupper var som følger: Gruppe 1= ingen behandling; Gruppe 2=saltvann (bærer); Gruppe 3=D2E7 med 1,5 µg/g; Gruppe 4=D2E7 med 15 µg/g; Gruppe 5=D2E7 med 30 µg/g; og Gruppe 6=IgG1-isotype-kontroll med 30 µg/g. Et kull med ikke-transgene mus ble også inkludert i undersøkelsen for å tjene som kontroll (Gruppe 7 - ikke-transgene; ingen behandling). Hver gruppe mottok tre i.p. injeksjoner pr. uke av de angitte behandlinger. Injeksjonene ble fortsatt i 10 uker. Hver uke ble makroskopiske endringer i ledd-morfologi registrert for hvert dyr. Etter 10 uker ble alle musene avlivet og muse-vev ble oppsamlet i formalin. Mikroskopisk undersøkelse av vevet ble utført.

Dyrevekt i gram ble notert for hver mus ved begynnelsen av hver uke. På samme tid ble målinger av leddstørrelse (i mm) også registrert, som en måling av alvorlighetsgraden av sykdommen. Leddstørrelsen ble bestemt som et gjennomsnitt av tre målinger av høyre bakankel ved anvendelse av en mikrometer-anordning. Artrittisk score ble registrert hver uke som følger: 0 = Ingen artritt, (normalt utseende og fleksjon); + = mild artritt (ledd-distorsjon); ++ = moderat artritt (hevelse, ledd-deformasjon) og +++ = sterk artritt (ankylose detektert på fleksjon og alvorlig svekket bevegelse). Histopatologisk scoring basert på hematoksylin/eosin-merking av ledd-seksjoner var basert som følger: 0 = ingen detekterbar sykdom; 1 = proliferasjon av synovial-membranen; 2 = sterk synovial-fortykning 3 = brusk-destruksjon og benerosjon.

Virkningen av D2E7-behandling på den gjennomsnittlige leddstørrelsen hos Tg197 transgene artrittiske mus er vist i kurven på Figur 9. Histopatologisk

og artrittisk scoring for Tg197 transgene mus, 11 uker gamle, er oppsummert nedenfor i Tabell 15:

Tabell 15: Effekt av D2E7 på histopatologisk og artrittisk scoring hos i Tg197

5 Mus

Gruppe	Behandling	Histopatologisk scoring	Artrittisk scoring
1	ingen	3 (7/7)	+++ (7/7)
2	saltvann	3 (8/8)	+++ (8/8)
6	IgG1 kontroll	3 (9/9)	+++ (7/9)
3	D2E7 at 1,5 µg/g	0 (6/8)	0 (8/8)
4	D2E7 at 15 µg/g	0 (7/8)	0 (8/8)
5	D2E7 at 30 µg/g	0 (8/8)	0 (8/8)

10 Dette eksperimentet demonstrerte at D2E7-antistoffet har en klar gunstig effekt på transgene mus som uttrykker villtype human-TNF (Tg197) uten noen påvist artritt etter undersøkelsesperioden.

E. D2E7-nøytralisering av TNF α fra andre arter

15 Bindingsspesifisitet til D2E7 ble undersøkt ved å måle dets evne til å nøytralisere tumornekrosefaktor fra forskjellige primat-arter og fra mus, ved anvendelse av et L929-cytotoksisitetsforsøk (som beskrevet i Eksempel 4, underavsnitt A, ovenfor). Resultatene er oppsummert i Tabell 16 nedenfor:

Tabell 16: Evne til D2E7 til å nøytralisere TNF fra forskjellige arter i L929-testanalyseet

20

<u>TNFα*</u>	<u>Kilde</u>	<u>IC₅₀ for D2E7 nøytralisering (M)**</u>
Human	Rekombinant	7,8 x 10 ⁻¹¹
Sjimpanse	LPS-stimulert PBMC	5,5 x 10 ⁻¹¹

bavian	Rekombinant	$6,0 \times 10^{-11}$
marmosett	LPS-stimulert PBMC	$4,0 \times 10^{-10}$
cynomolgus	LPS-stimulert PBMC	$8,0 \times 10^{-11}$
rhesus	LPS-stimulert PBMC	$3,0 \times 10^{-11}$
hund	LPS-stimulert WBC	$2,2 \times 10^{-10}$
gris	Rekombinant	$1,0 \times 10^{-7}$
mus	Rekombinant	$>1,0 \times 10^{-7}$

Resultatene i Tabell 16 demonstrerer at D2E7 kan nøytralisere aktiviteten til fem primat-TNF α omtrent ekvivalent med human-TNF α og, videre, kan nøytralisere aktiviteten til kanint TNF α (omtrent ti-ganger mindre bra enn human-TNF α) og porcint og murint TNF α (omtrent ~1000-ganger mindre bra enn human-TNF α). Videre ble binding av D2E7 til løsningsfase rhTNF α ikke hemmet av andre cytokiner, så som lymfotoksin (TNF β), IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN γ og TGF β , hvilket indikerer at D2E7 er meget spesifikk for dens ligand TNF α .

10

F. Mangel på cytokin-frigjøring av menneske-fullblod inkubert med D2E7

I dette eksemplet ble evnen til D2E7 til selv å bevirke at normale human-blodceller utskiller cytokiner eller sprer celleoverflatemolekyler undersøkt. D2E7 ble inkubert med fortynnet fullblod fra tre forskjellige normale donorer i varierende konsentrasjoner i 24 timer. En LPS-positiv kontroll ble kjørt samtidig, i en konsentrasjon som tidligere var funnet å stimulere immunokompetente blodceller til å utskille cytokiner. Supernatantene ble høstet og testet i et panel på ti oppløselige cytokin-, reseptor- og adhesjonsmolekyl-ELISA-sett: IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptor-antagonist, IL-6, IL-8, TNF α , oppløselig TNF-reseptor I, oppløselig TNF reseptor II, oppløselig ICAM-1 og oppløselig E-selektin. Ingen betydelige mengder av cytokiner eller spredde celleoverflatemolekyler ble målt som et resultat av D2E7-antistoff sam-inkubering, ved konsentrasjoner opptil 343 $\mu\text{g/ml}$. Kontrollkulturer uten tilsetning av antistoffet ga heller ikke noen målbare mengder av cytokiner, mens LPS sam-kulturkontrollen ga forhøyede verdier i området høy pikogram til lav nanogram. Disse

25

resultater indikerer at D2E7 ikke får fullblodceller til å skille ut cytokiner eller spre celleoverflateproteiner over normale nivåer i *ex vivo*-kulturer.

Den følgende sekvensliste utgjør del av foreliggende beskrivelse, og innholdet er oppsummert i tabellen nedenfor:

5

SEKV ID NR:	ANTISTOFF-KJEDE	REGION	SEKVENSTYPE
1	D2E7	VL	aminosyre
2	D2E7	VH	aminosyre
3	D2E7	VL-CDR3	aminosyre
4	D2E7	VH-CDR3	aminosyre
5	D2E7	VL-CDR2	aminosyre
6	D2E7	VH-CDR2	aminosyre
7	D2E7	VL-CDR1	aminosyre
8	D2E7	VH-CDR1	aminosyre
9	2SD4	VL	aminosyre
10	2SD4	VH	aminosyre
11	2SD4	VL-CDR3	aminosyre
12	EP B12	VL-CDR3	aminosyre
13	VL10E4	VL-CDR3	aminosyre
14	VL100A9	VL-CDR3	aminosyre
15	VLL100D2	VL-CDR3	aminosyre
16	VLL0F4	VL-CDR3	aminosyre
17	LOE5	VL-CDR3	aminosyre
18	VLLOG7	VL-CDR3	aminosyre
19	VLLOG9	VL-CDR3	aminosyre
20	VLL0H1	VL-CDR3	aminosyre
21	VLL0H10	VL-CDR3	aminosyre
22	VL1B7	VL-CDR3	aminosyre
23	VL1C1	VL-CDR3	aminosyre
24	VL0,1F4	VL-CDR3	aminosyre
25	VL0,1H8	VL-CDR3	aminosyre

26	LOE7.A	VL-CDR3	aminosyre
27	2SD4	VH-CDR3	aminosyre
28	VH1B11	VH-CDR3	aminosyre
29	VH1D8	VH-CDR3	aminosyre
30	VH1A11	VH-CDR3	aminosyre
31	VH1B12	VH-CDR3	aminosyre
32	VH1E4	VH-CDR3	aminosyre
33	VH1F6	VH-CDR3	aminosyre
34	3C-H2	VH-CDR3	aminosyre
35	VH1-D2.N	VH-CDR3	aminosyre
36	D2E7	VL	nukleinsyre
37	D2E7	VH	nukleinsyre

SEKVENSLISTE

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:1:

5 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 107 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

10 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR:1:

15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

25 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

30 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:2:

40 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 121 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

45 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR:2:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

60

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:3:

20 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 25 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 (ix) EGENSKAPER:
 30 (A) NAVN/KODE: Modifisert-sete
 (B) PLASSERING I SEKVENNS: 9
 (D) ANNEN INFORMASJON: /note= "Xaa er Thr eller Ala"
 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:3:
 35 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

40 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:4:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 12 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 45 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 50 (ix) EGENSKAPER:
 (A) NAVN/KODE: Modifisert-sete
 (B) PLASSERING I SEKVENNS: 12
 (D) ANNEN INFORMASJON: /note= "Xaa er Tyr eller Asn"
 55 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:4:
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
 1 5 10
 60

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:5:

5 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 7 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

10 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:5:

15 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:6:

20 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 17 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

25 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:6:

30 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 35 Gly

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:7:

40 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 11 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

45 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

50 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:7:

55 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:8:

60 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 5 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

5 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR:8:

10 Asp Tyr Ala Met His
1 5

15 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:9:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 107 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
20 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

25 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR:9:

30 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

45 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

50 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:10:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 121 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
55 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

60 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR:10:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 10 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 15 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 25 115 120

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:11:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 30 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 35 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:11:
 40 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:12:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 45 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 50 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 55 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:12:
 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

60

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:16:

5 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:17:

10 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

15 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:17:

20 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

25 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:18:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
30 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

35 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
40 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:19:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
45 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

50 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:19:

55 Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:20:

60 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 5 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:20:
 10 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
 1 5
- (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:21:
 15 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 20 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 25 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:21:
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
 1 5
- (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:22:
 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 35 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 40 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:22:
 Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
 45 1 5
- (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:23:
 50 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 55 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:23:
 60 Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:24:

5 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
10 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:24:
15 Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

20 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:25:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
25 (D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
(v) FRAGMENT-TYPE: indre
30 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:25:
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
35 1 5

40 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:26:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
45 (D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid
(v) FRAGMENT-TYPE: indre
50 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:26:
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
55 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:27:

60 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 12 aminosyrer

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:30:

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

5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:31:

10 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 12 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

15 (ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

20 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:31:

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

25 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:32:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 12 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

35 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:32:

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

40

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:33:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 12 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

45

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

50 (v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:33:

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

55

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:34:

60 (i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
 (A) LENGDE: 12 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

5

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:34:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:35:

15

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 12 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

20

(ii) MOLEKYL-TYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

25 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:35:

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

30

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR:36:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:
(A) LENGDE: 321 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) BESKAPFENHET: dobbel
(D) TOPOLOGI: lineær

35

(ii) MOLEKYL-TYPE: cDNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:36:

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC 60

45

ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA
120

GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT
50 180

50

CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT
240

GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG
55 300

55

GGGACCAAGG TGAAATCAA A

321

60

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NR 37:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- 5 (A) LENGDE: 363 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: dobbel
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYL-TYPE: cDNA

10

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NR:37:

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC
60

15

TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT
120

20

CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT
180

GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAT
240

25

CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG
300

TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG
360

30

AGT
363

PATENTKRAV

1. Anvendelse av isolert human-antistoff eller en antigenbindingsdel derav som dissosierer fra human-TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflate-plasmonresonans og nøytraliserer human-TNF α -cytotoxisitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-7} M eller mindre i fremstillingen av et medikament for behandling av en lidelse hvor TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

2. Anvendelse av et isolert human-antistoff eller en antigenbindingsdel derav med de følgende karakteristika:
 - a) dissosierer fra human-TNF α med en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, bestemt ved overflateplasmonresonans;
 - b) har et lettkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 3 eller modifisert fra SEKV ID NR: 3 med en enkel alanin-substitusjon i stilling 1, 4, 5, 7 eller 8 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 1, 3, 4, 6, 7, 8 og/eller 9;
 - c) har et tungkjede CDR3-domene omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 4 eller modifisert fra SEKV ID NR : 4 med en enkel alanin-substitusjon i stilling 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 eller 11 eller med én til fem konservative aminosyresubstitusjoner i stillingene 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 og/eller 12, for fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

3. Anvendelse av et isolert human-antistoff eller en antigenbindingsdel derav med en lettkjede variabel region (LCRV) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 1 og en tungkjede variabel region (HCVR) omfattende aminosyresekvensen med SEKV ID NR: 2, i fremstillingen av et

medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.

4. Anvendelse av antistoffet D2E7 i fremstilling av et medikament for behandling av en lidelse i hvilken TNF α -aktivitet er skadelig, hvor antistoffet administreres til et individ slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes.
5. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er en autoimmun sykdom.
6. Anvendelse ifølge krav 5, hvor den autoimmune lidelsen er valgt fra gruppen bestående av revmatoid artritt, revmatoid spondylitt, osteoartritt eller giktisk artritt.
7. Anvendelse ifølge krav 5, hvor den autoimmune lidelsen er valgt fra gruppen bestående av allergi, multippel sklerose, autoimmun diabetes, autoimmun uveitt og nefrotisk syndrom.
8. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av en infeksjøs sykdom, intestinal lidelse, transplantatavvisning eller transplantat-mot-vert-sykdom, en ondartet sykdom, en pulmonal lidelse eller en hjertelidelse.
9. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er sepsis.
10. Anvendelse ifølge krav 9, hvor antistoffet blir administrert til et menneskeindivid sammen med cytokinet interleukin-6 (IL-6) eller blir administrert til et menneskeindivid med en serum- eller plasmakonsentrasjon av IL-6 over 500 pg/ml.
11. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av inflammatoriske benlidelser, benresorpsjonssykdom, alkoholisk hepatitt, viral hepatitt, fulminant hepatitt,

koaguleringsforstyrrelser, brannså, reperfusjonsskade, keloid-dannelse, arrvevsdannelse, pyrexi, tannsykdom, fedme og strålingsgiftighet.

12. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor det isolerte human-antistoffet er kombinert med en farmasøytisk akseptabel bærer.

13. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor individet er menneske.

14. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av septisk sjokk, endotoksisk sjokk, gramnegativ sepsis, toksisk sjokksyndrom, malaria, kakeksi, meningitt, AIDS, bakteriell meningitt og AIDS-relatert kompleks (ARC).

15. Anvendelse ifølge krav 14, hvor lidelsen er cerebral malaria.

16. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av cytomegalovirusinfeksjon sekundær til transplantasjon, feber og myalgi forårsaket av infeksjon og kakeksi sekundær til infeksjon, og allogen transplantatavvisning.

17. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av stimulering av tumorvekst, forsterkning av metastatisk potensiale og mediering av cytotoksisitet i ondartede sykdommer, og inhibering av tumorvekst eller metastaser.

18. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av voksen respiratorisk nødsyndrom, sjokklunge, kronisk pulmonær inflammatorisk sykdom, pulmonær sarkoidose, pulmonær fibrose og silikose.

19. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er valgt fra gruppen bestående av inflammatorisk tarmsykdom, idiopatisk inflammatorisk tarmsykdom, Chrons sykdom og ulcerøs kolitt.

20. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor lidelsen er hjerteischemi, hjertesvikt og hepatitt.
21. Fremgangsmåte for inhibering av human-TNF α -aktivitet *in vitro* omfattende å kontakte human-TNF α med et antistoff slik at human-TNF α -aktivitet inhiberes, karakterisert ved at antistoffet er et isolert human-antistoff, eller en antigenbindingsdel derav, som dissosierer fra human-TNF α med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre og en K_{off} -hastighetskonstant på $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ eller mindre, begge bestemt ved overflateplasmonresonans og nøytraliserer human-TNF α -cytotoxiskitet i en standard *in vitro* L929-testanalyse med en IC_{50} på 1×10^{-7} M eller mindre.
22. Isolert humant antistoff som binder human-TNF α og er antistoffet D2E7, eller en antigenbindende del derav.
23. Farmasøytisk blanding som omfatter isolert humant antistoff ifølge krav 22, og en farmasøytisk akseptabel bærer.
24. Farmasøytisk blanding ifølge krav 23, som ytterligere omfatter i det minste ett tilleggs-terapeutisk middel.
25. Farmasøytisk blanding ifølge krav 24, hvor det ytterligere terapeutiske middelet er valgt fra gruppen bestående av ikke-steroidale anti-inflammatoriske legemidler, cytokin suppressive anti-inflammatoriske legemidler, CDP-571/BAY-10-3356, cA2, 75 kdTNFR-IgG, 55 kdTNFR-IgG, IDEC-CE9.1/SB 210396, DAB 486-IL-2, DAB 389-IL-2, Anti-Tac, IL-4, IL-10, IL-4-agonister, IL-10-agonister, IL-1RA, TNF-bp/s-TNFR, S284, R973401, MK-966, Iloprost, metotreksat, thalidomid, thalidomid-relaterte legemidler, leflunomid, traneksaminsyre, T-614, prostaglandin E1, Tenidap, Naproxen, Meloxicam, Piroxicam, Diclofenac, Indomethacin, Sulfasalazine, Azathioprine, ICE-inhibitorer, zap-70-inhibitorer, Ick-inhibitorer, VEGF-inhibitorer, VEGF-R-inhibitorer, kortikosteroider, TNF-

konvertaseinhibitorer, anti-IL-12-antistoffer, interleukin-11, interleukin-13, interleukin-17-inhibitorer, gull, penicillamin, klorokin, hydroksyklorokin, klorambucil, cyklofosfamid, cyklosporin, anti-tymocytglobulin, anti-CD4-antistoffer, CD5-toksiner, oralt administrerte peptider, kollagen, lobenzaritt-disodium, cytokinregulerende midler HP228 og HP466, ICAM-1-antisens-fosforotioat-oligodeoksynukleotider, løselig komplementreseptor 1, predinon, orgotein, glykosaminoglykan-polysulfat, minocyclin, anti-IL2R-antistoffer, marine lipider, botaniske lipider, auranofin, fenybutazon, mæklufenaminsyre, flufenaminsyre, intravenøs immunglobulin, zileuton, mykofenolsyre, takrolimus, sirolimus, amiprilose, kladribin, azabrin, budenosid, epidermal vekstfaktor, aminosalicylater, 6-merkaptopurin, metronidazol, lipoksygenaseinhibitorer, mesalamin, olsalazin, balsalazid, antioksidanter, tromboksaninhibitorer, IL-1-reseptorantagonister, anti-IL-1 β -monoklonale antistoffer, anti-IL-6-monoklonale antistoffer, vekstfaktorer, elastaseinhibitorer, pyridinyl-imidazolforbindelser, glukuronid-konjugerte prolegemidler av prednisolon, deksametason eller budesonid, dekstran-konjugerte prolegemidler av prednisolon, deksametason eller budesonid, løselig komplementreseptor 1, langsom-friggjørende mesalazin, antagonister av plateaktiverende faktor (PAF), ciprofloksacin, lignokain, prednisolon, metylprednisolon, cyklofosfamin, 4-aminopyridin, tizanidin, interferon- β 1a, interferon- β 1b, kopolymer 1, hyperbarisk oksygen, intravenøs immunglobulin, kladribin, hypertoniske saltløsninger, antibiotika, kontinuerlig hemofiltrering, karbapenemer, antagonister av cytokiner slik som TNF α , IL-1 β , IL-6 og/eller IL-8, SK&F 107647, tetravalent guanylhydrazon CNI-1493, vevsfaktor-reaksjonsveihinhibitor, PHP, jern-chelatorer og chelater, inkludert dietyltriampentaeddiksyre-jern(III)kompleks, lisofyllin, PGG-glukan, apolipoprotein A-1 rekonstituert med lipider, kirale hydroksaminsyrer, anti-endotoksin-antistoffer, E5531, rBPI₂₁, syntetiske anti-endotoksinpeptider, overflate-erstatningsterapi og anti-IL-8.

	CDR L1		CDR L2
2SD4 VL	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY
EP B12
VL10E4
VL100A9
VL100D2
VL10F4
LOE5
VLL0F9
VLL0F10
VLL0G7
VLL0G9
VLL0H1
VLL0H10
VLL1B7
VLL1C1
VLL1C7
VL0.1F4
VL0.1H8
LOE7
LOE7.A
LOE7.T
D2E7 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC		WYQQKPGKAPKLLIY
LD2E7*.A1
LD2E7*.A3
LD2E7*.A4
LD2E7*.A5
LD2E7*.A7
LD2E7*.A8

FIGUR 1A

	CDR L3		
2SD4 VL	GVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	123456789	FGQGTKVEIK
EP B12	QKYN SAPYA
VL10E4R.....
VL100A9QR...T
VL100D2S.....
VL10F4A.....
LOE5R...T
VLL0F9R...Y
VLL0F10R...T
VIL0G7P.....
VIL0G9N.....
VIL0H1T...T
VIL0H10R...N
VL1B7R...A
VL1C1S.....
VL1C7Q...D
VL0.1F4T...T
VL0.1H8I...T
LOE7R...T
LOE7.AR...T
LOE7.TR...T
D2E7 VL	GVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	QRYNRAPYT	FGQGTKVEIK
LD2E7*.A1	A.....
LD2E7*.A3A.....
LD2E7*.A4A.....
LD2E7*.A5A.....
LD2E7*.A7A.....
LD2E7*.A8A.....

FIGUR 1B

	CDR H1		CDR H2
2SD4 VH	QVQLVESGGGLVQPGRSLRRLSCAASGFTFD		AITWNSGHIDYADSVEG
VH1B11
VH1D8
VH1A11
VH1B12
VH1-D2
VH1E4
VH1F6
VH1G1
3C-H2
VH1-D2.N
VH1-D2.Y
D2E7 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRRLSCAASGFTFD		AITWNSGHIDYADSVEG
HD2E7*.A1
HD2E7*.A2
HD2E7*.A3
HD2E7*.A4
HD2E7*.A5
HD2E7*.A6
HD2E7*.A7
HD2E7*.A8
HD2E7*.A9

FIGUR 2A

FIG. 3

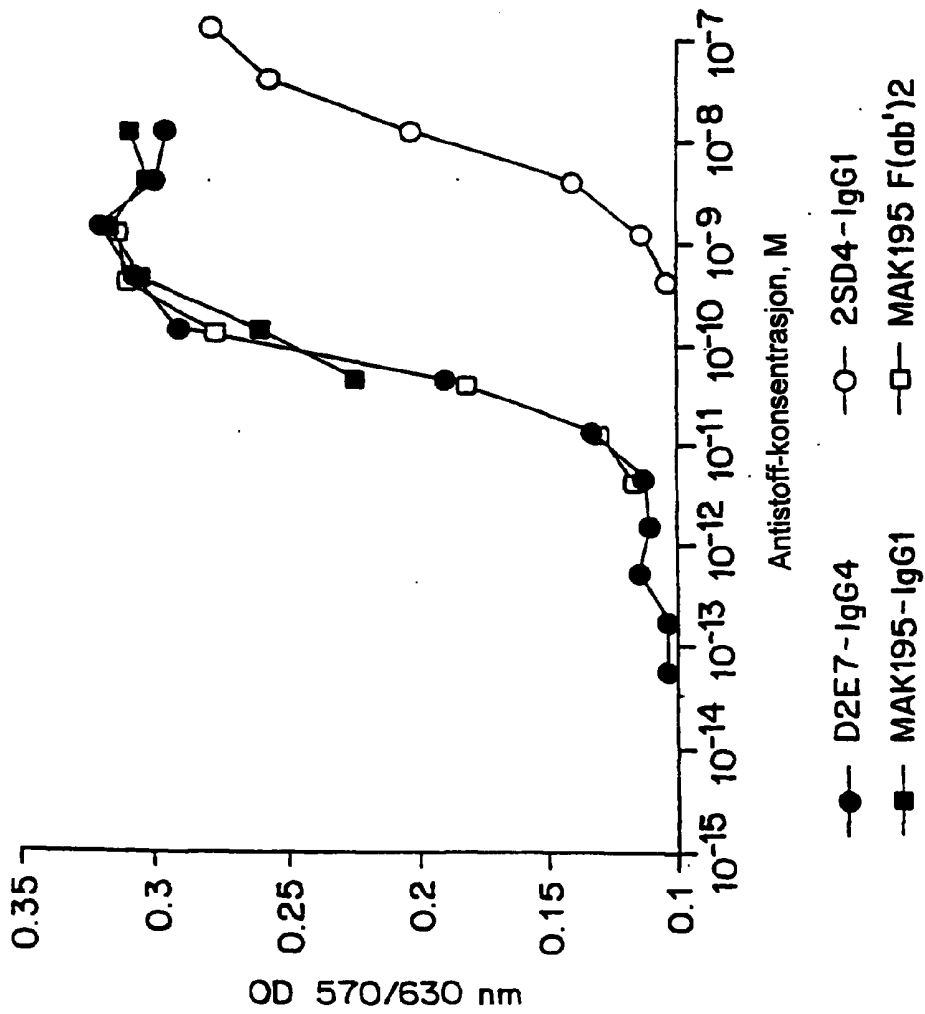


FIG. 4

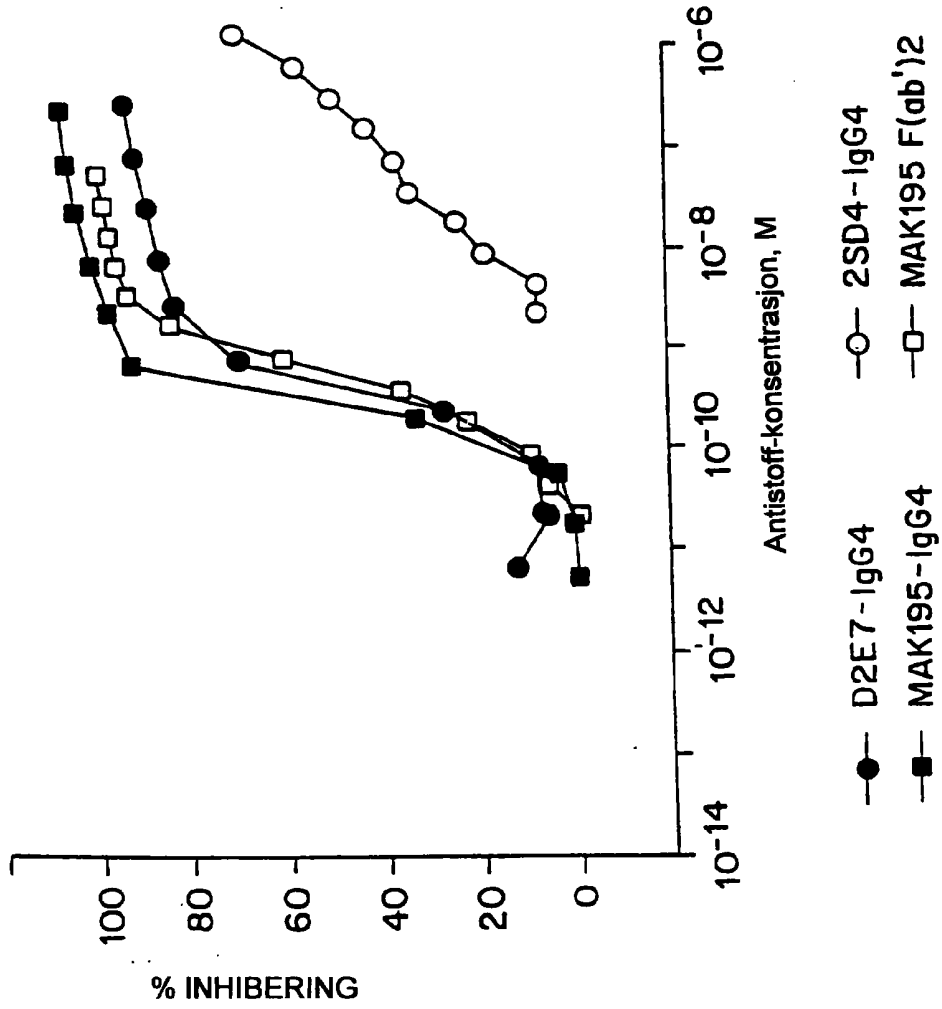


FIG. 5

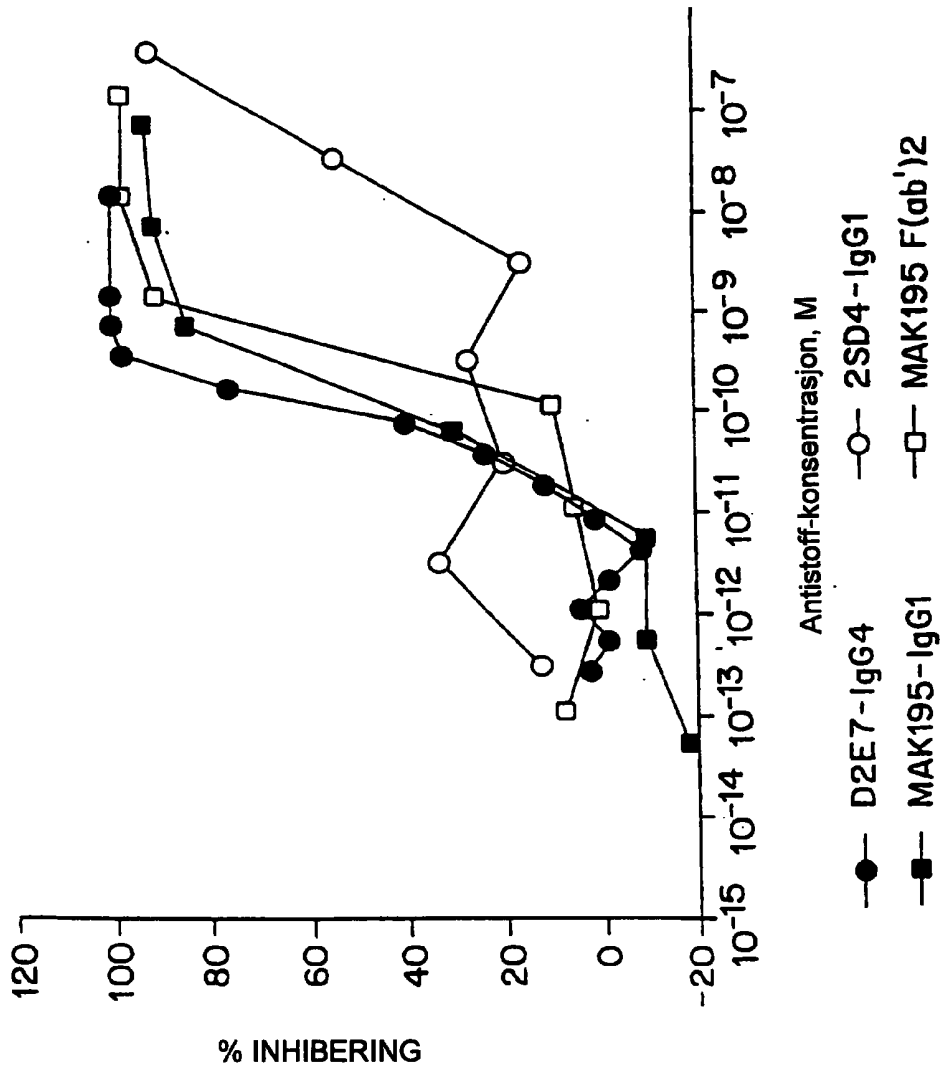
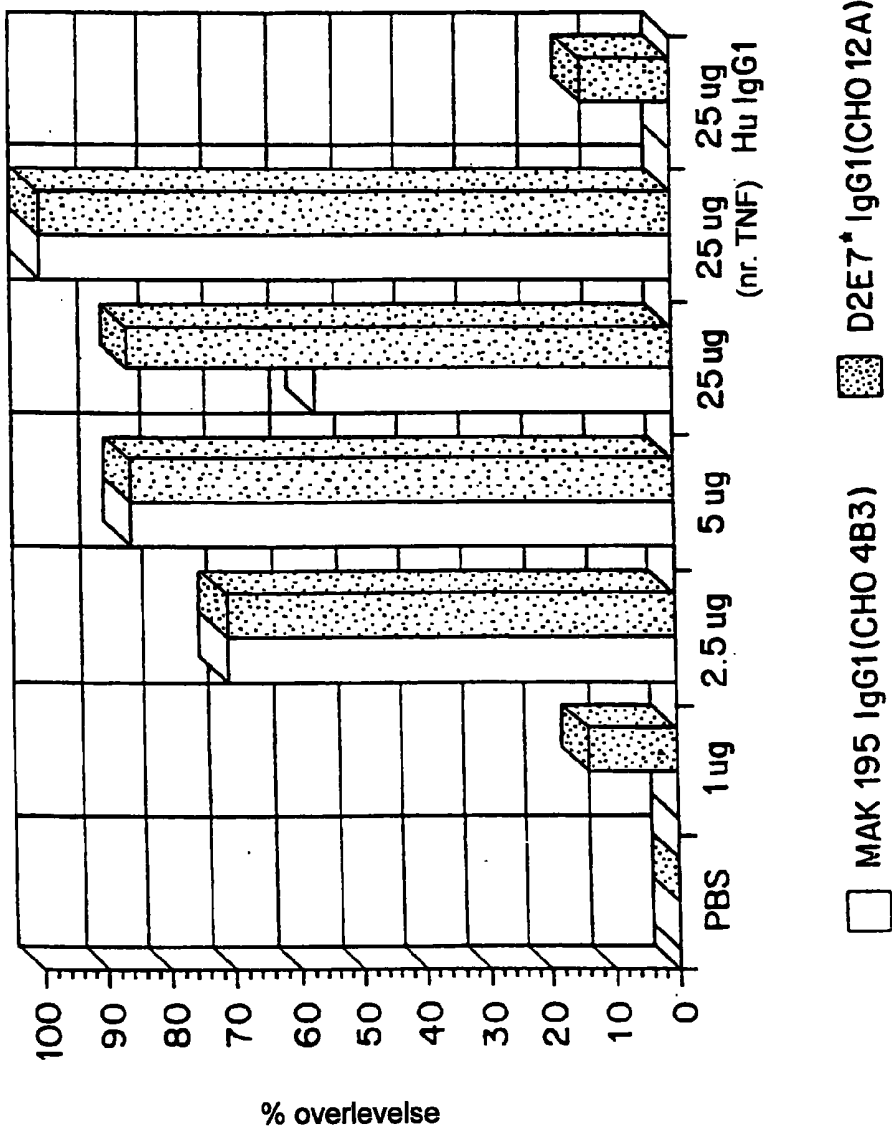


FIG. 6



□ MAK 195 IgG1(CHO 4B3) ▨ D2E7* IgG1(CHO 12A)

9/11

D2E7 VL

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
D I Q M T Q S P S S L S A S V

CDR L1

GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG GGC ATC AGA
G D R V T I T C R A S Q G I R

AAT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K

CDR L2

CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA TCT
L L I Y A A S T L Q S G V P S

CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
R F S G S G S G T D F T L T I

AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AGG
S S L Q P E D V A T Y Y C Q R

CDR L3

TAT AAC CGT GCA CCG TAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA
Y N R A P Y T F G Q G T K V E

ATC AAA
I K

FIGUR 7

10/11

D2E7 VH

GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCC GGC
E V Q L V E S G G G L V Q P G

AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT
R S L R L S C A A S G F T F D

CDR H1

GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG
D Y A M H W V R Q A P G K G L

CDR H2

GAA TGG GTC TCA GCT ATC ACT TGG AAT AGT GGT CAC ATA GAC TAT
E W V S A I T W N S G H I D Y

GCG GAC TCT GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
A D S V E G R F T I S R D N A

AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAT
K N S L Y L Q M N S L R A E D

CDR H3

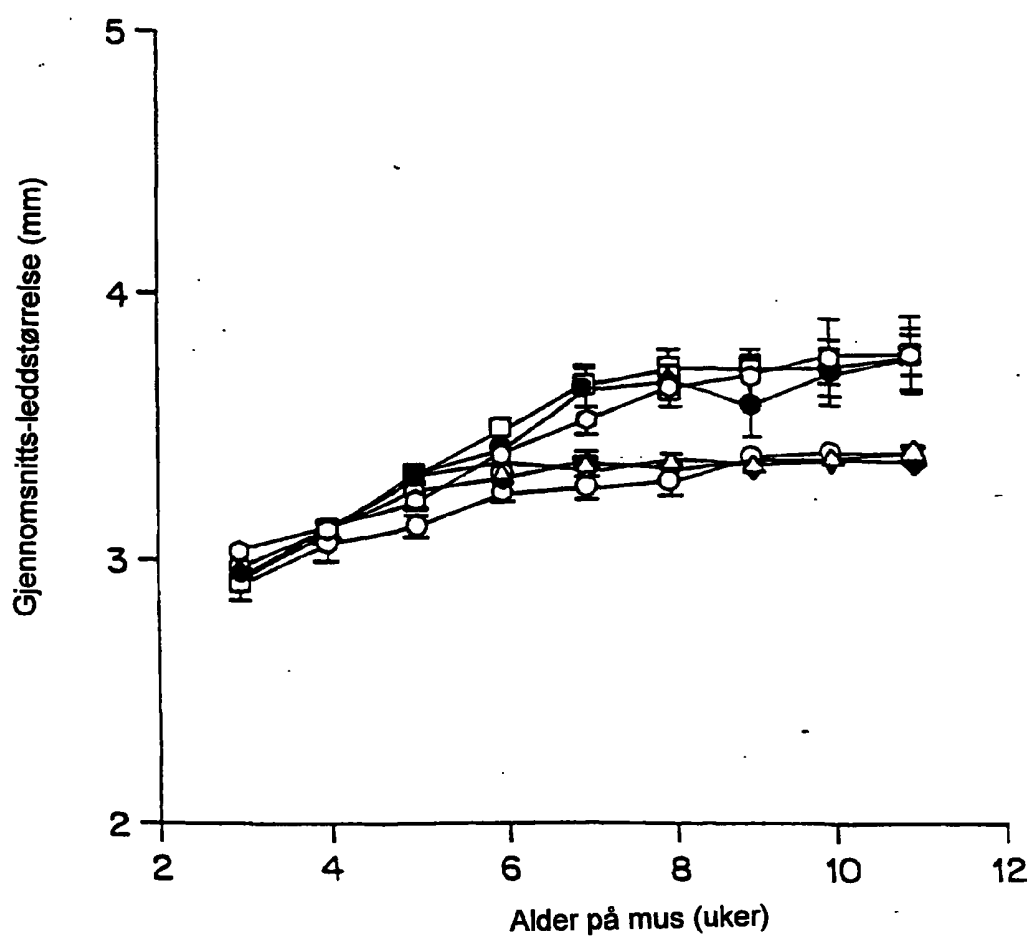
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GTC TCG TAC CTT AGC ACC GCG
T A V Y Y C A K V S Y L S T A

TCC TCC CTT GAC TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCG
S S L D Y W G Q G T L V T V S

AGT
S

FIGUR 8

FIG. 9



- gruppe 7: ikke-transgen
- gruppe 1: ingen behandling
- gruppe 2: saltvann
- gruppe 6: Ab isotype kontroll 30 lg/g
- △ gruppe 3: Ab 1,5 lg/g
- ▽ gruppe 4: Ab 15 lg/g
- ◆ gruppe 5: Ab 30 lg/g