



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2021-0141990  
(43) 공개일자 2021년11월23일

- |   |   |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br><b>C07K 16/24</b> (2006.01)<br>(52) CPC특허분류<br><b>C07K 16/244</b> (2013.01)<br><b>C07K 2317/22</b> (2013.01)<br>(21) 출원번호 <b>10-2021-7032815</b><br>(22) 출원일자(국제) <b>2020년03월12일</b><br>심사청구일자 <b>없음</b><br>(85) 번역문제출일자 <b>2021년10월12일</b><br>(86) 국제출원번호 <b>PCT/IB2020/052247</b><br>(87) 국제공개번호 <b>WO 2020/183418</b><br>국제공개일자 <b>2020년09월17일</b><br>(30) 우선권주장<br>62/818,359 2019년03월14일 미국(US) | (71) 출원인<br><b>얀센 바이오테크 인코포레이티드</b><br>미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브 800/850<br>(72) 발명자<br><b>만트하우스, 크리스토퍼</b><br>미국 펜실베이니아 19355 펠버링 그레이트 벨리 파크웨이 200<br><b>강굴리, 수비나이</b><br>미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400<br>(뒷면에 계속)<br>(74) 대리인<br><b>특허법인한성</b> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 21 항

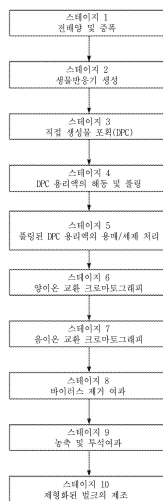
(54) 발명의 명칭 **항-IL12/IL23 항체 조성물을 생성하기 위한 제조 방법**

**(57) 요약**

CHO에서 항-IL-12/IL-23p40 항체, 예를 들어 항-IL-12/IL-23p40 항체 우스테키누맙, 및 상기 항체의 특정 약제학적 조성물을 생성하기 위한 제조 방법은 다양한 질병을 치료하는 데 유용하다.

**대표도** - 도1

제조 공정의 개요 - 공정 스테이지



(52) CPC특허분류

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

(72) 발명자

**그로엔이펠드, 마틴**

네덜란드 사우스 홀랜드 씨비 레이덴 2333 아인슈타인웨이 101

**로페즈, 제이알., 마누엘 에이.**

미국 펜실베이니아 19355 멜버른 그레이트 벨리 파크웨이 200

**네드베드, 마이클**

미국 펜실베이니아 19355 멜버른 그레이트 벨리 파크웨이 200

**스미스, 케빈 디.**

미국 펜실베이니아 19130 필라델피아 그린 스트리트 2125

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단리된 항-IL-12/IL-23p40 항체로서,

(i) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); (ii) 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 및 (iii) 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열, 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)에서 발현되는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하진된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 추가로 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %가 > 70.0%인, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 환원된 질량 분석(Reduced Mass Analysis, RMA)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발현되는 동일한 아미노산 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 후속 생물학적 제제(follow-on biologic)를 포함하는, 항-IL-12/IL-23p40 항체.

#### 청구항 8

(i) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); (ii) 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 및 (iii) 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열, 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 생성하기 위한 제조 방법으로서,

- a. 항-IL-12/IL-23p40 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드와 함께 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)를 배양하는 단계;
- b. 상기 CHO 세포에서 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체를 발현시키는 단계; 및

c. 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하는, 제조 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 추가로 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하는, 제조 방법.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %가 > 70.0%인, 제조 방법.

**청구항 12**

제9항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 환원된 질량 분석(RMA)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않는, 제조 방법.

**청구항 13**

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발현되는 동일한 아미노산 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖는, 제조 방법.

**청구항 14**

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 후속 생물학적 제제인, 제조 방법.

**청구항 15**

항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함하는 조성물로서,  
 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 (i) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); (ii) 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 및 (iii) 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열, 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)에서 발현되는, 조성물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하는, 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 추가로 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하는, 조성물.

**청구항 18**

제16항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %가 > 70.0%인, 조성물.

**청구항 19**

제16항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않는, 조성물.

**청구항 20**

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발현되는 동일한 아미노산 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖는, 조성물.

**청구항 21**

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 후속 생물학적 제제인, 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 언급

[0002]

본 출원은 파일명이 "JBI6056WOPCT1SEQLIST.txt"이고, 작성일이 2020년 3월 5일이며, 크기가 14,000 바이트인 ASCII 포맷 서열 목록으로서 EFS-웹을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. EFS-웹을 통해 제출된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 항-IL-12/IL-23p40 항체, 예를 들어 항-IL-12/IL-23p40 항체 우스테키누맵, 및 상기 항체의 특정 약 제학적 조성물을 생성하기 위한 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005]

인터류킨 (IL)-12는 대략적인 분자량에 따라 p35 및 p40으로 명명된 2개의 이황화물-연결된 글리코실화 단백질 하위단위로 이루어진 분비형 이종이량체성 사이토카인이다. IL-12는 항원-제시 세포에 의해 주로 생성되며, T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포의 표면 상에서 발현되는 2-사슬 수용체 복합체에 결합함으로써 세포-매개 면역을 유도한다. IL-12 수용체 베타-1 (IL-12Rβ1) 사슬은 IL-12의 p40 하위단위에 결합하여, IL-12와 이의 수용체 사이의 주요 상호작용을 제공한다. 그러나, 세포내 신호전달 (예를 들어, STAT4 인산화) 및 수용체-보유 세포 (문헌[Presky et al, 1996])의 활성화를 부여하는 것은 제2 수용체 사슬 IL-12Rβ2의 IL-12p35 라이게이션이다. 항원 제시를 동반한 IL-12 신호전달은 인터페론 감마 (IFN-γ) 생성을 특징으로 하는, 보조 T 1 (Th1) 표현형으로의 T 세포 분화를 일으키는 것으로 생각된다 (문헌[Trinchieri, 2003]). Th1 세포는 일부 세포내 병원체에 대한 면역을 촉진하고, 보체-고정(complement-fixing) 항체 동종형을 생성하며, 중앙 면역감시 (immunosurveillance)에 기여하는 것으로 여겨진다. 따라서, IL-12는 숙주 방어 면역 기전의 중요한 성분인 것으로 생각된다.

[0006]

IL-12의 p40 단백질 하위단위는 또한 p19로 명명된 별개의 단백질 하위단위와 결합하여 신규한 사이토카인 IL-23을 형성할 수 있음이 밝혀졌다 (문헌[Oppman et al, 2000]). IL-23은 또한 2-사슬 수용체 복합체를 통해 신호를 전달한다. p40 하위단위는 IL-12와 IL-23 사이에 공유되므로, 결론적으로 IL-12Rβ1 사슬이 또한 IL-12와 IL-23 사이에 공유된다. 그러나, IL-23 특이적 세포내 신호전달(예를 들어, STAT3 인산화) 및 T 세포에 의한 후속 IL-17 생성을 부여하는 것은 IL-23 수용체 복합체 IL-23R의 제2 성분의 IL-23p19 라이게이션이다(문헌[Parham et al, 2002]; 문헌[Aggarwal et al, 2003]). 2개의 사이토카인 사이의 구조적 유사성에도 불구하고, IL-23의 생물학적 기능은 IL-12의 것과는 구별된다는 것이 최근의 연구에서 입증되었다(문헌[Langrish et al, 2005]).

[0007]

항체에 의한 IL-12의 중화가 건선, 다발성 경화증(MS), 류마티스성 관절염, 염증성 장 질병, 인슐린-의존성(1형) 당뇨병, 및 포도막염의 동물 모델을 치료함에 있어서 효과적이므로, IL-12 및 Th1 세포 집단의 비정상적인 조절은 많은 면역-매개 질병과 관련되어 왔다(문헌[Leonard et al, 1995]; 문헌[Hong et al, 1999]; 문헌[Malfait et al, 1998]; 문헌[Davidson et al, 1998]). IL-12는 또한 전신 홍반성 루푸스의 2개의 독립적인 마우스 모델에서 SLE의 발병기전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Kikawada et al, 2003]; 문헌[Dai et al, 2007]).

[0008]

전신 홍반성 루푸스(SLE)는, 거의 모든 기관계에 영향을 줄 수 있고, 점점 심해졌다가 점점 약해지는(waxing and waning) 질병 과정을 따르는 미지의 병인의 복잡하고 만성인 이종성 자가면역 질병이다. 전신 홍반성 루푸스는 남성보다 여성에서 훨씬 더 종종 일어나서 일부 연구에서는 최대 9배 더 빈번하게 일어나며, 종종 15세 내

지 45세 사이의 임신가능한 시기 동안 나타난다. 이 질병은 아프리카계 카리브해인, 아시아, 및 히스패닉계 인구에서 더 많이 보여진다. SLE에서는, 면역 시스템이 신체의 세포 및 조직을 공격하여, 그 결과 염증 및 조직 손상을 초래하고, 이것은 심장, 관절, 피부, 폐, 혈관, 간, 신장 및 신경계에 해를 미칠 수 있다. SLE로 진단된 대상체의 약 절반은 기관-위협성 질병을 나타내지만, 기관 침범을 나타내지 않는 대상체를 진단하는 데에는 수 년이 걸릴 수 있다. 새로 진단된 루푸스 환자의 주요 호소증상들 중 일부는 관절통(62%) 및 피부 증상(새로운 광과민증; 20%), 그리고 이에 뒤따르는 지속성 발열 및 권태이다. 추정된 연간 루푸스 발생률은 100,000명당 사례가 1.8 내지 7.6건으로 다양하며, 전세계적 유병률은 100,000명당 사례가 14 내지 172건의 범위이다. 경도 질병을 갖는 환자는 대부분 피부 발진 및 관절 통증을 가지며 덜 공격적인 요법을 필요로 하며; 계획 (regimen)은 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 항말라리아제(예를 들어, 하이드록시클로로퀸, 클로로퀸, 또는 퀴나크린) 및/또는 저용량 코르티코스테로이드를 포함한다. 더 중증인 질병의 경우, 환자는 침범된 기관계에 따라 다양한 심각한 상태를 겪을 수 있는데, 이러한 상태에는 잠재적인 신부전을 동반하는 루푸스 신염, 심내막염 또는 심근염, 간질성 폐렴, 임신 합병증, 뇌졸중, 신경학적 합병증, 출혈 또는 감염의 위험과 관련된 혈관염 및 혈구감소증이 포함된다. 더 중증인 질병에 대한 일반적인 치료제는 면역조절제, 예컨대 메토트렉세이트(MTX), 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 고용량 코르티코스테로이드, 생물학적 B 세포 세포독성제 또는 B 세포 조절제, 및 다른 면역조절제를 포함한다. 심각한 SLE를 가진 환자는, 대체로 표준 치료 요법과 관련된 이 질병의 합병증, 및/또는 가속된 죽상경화증으로 인해 평균 수명(life expectancy)이 10 내지 30년만쯤 단축된다. 게다가, SLE는 삶의 질, 작업 생산성, 및 건강관리 지출에 실질적인 영향을 미친다. SLE에 대한 기존의 요법은 일반적으로 세포독성 또는 면역조절이며, 현저한 안전성 위험을 가질 수 있다. SLE에 대한 더 새로운 치료제는 표준 치료 요법에 비해 단지 약간의 이익만을 제공하였다. 따라서, 높은 안전성 위험을 초래함이 없이 이 질병에서 유의한 이익을 제공할 수 있는 새로운 대안적인 치료제에 대한 충족되지 않은 큰 요구가 존재한다.

**발명의 내용**

- [0009] 본 발명의 실시 형태는 본 명세서에 첨부된 독립항 및 종속항에 의해 각각 정의되어 있으며, 이들은 간략함을 위하여 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명의 다양한 태양의 다른 실시 형태, 특징 및 이점이 첨부 도면과 관련하여 취해진 하기의 상세한 설명으로부터 명백하다.
- [0010] 소정 실시 형태에서, 본 발명은 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)에서 발견되는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 제공한다. 본 발명에 의해 정의된 "항-IL-12/IL-23p40 항체"는 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)에서 발견되는, (i) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); (ii) 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 및 (iii) 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열, 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함한다.
- [0011] 소정 실시 형태에서, 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함한다. 다른 실시 형태에서, (i) 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0%, 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%, 및 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하고/하거나; (ii) 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하고, 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 번째 %가 > 70.0%이고/이거나; (iii) 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 환원된 질량 분석(Reduced Mass Analysis, RMA)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않고/않거나; (iv) 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발견되는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖고/갖거나; (v) 항-IL-12/IL-23p40 항체는 우스테키누맙(Janssen Biotech, Inc.에 의해 Stelara®로서 시판됨)에 대한 후속 생물학적 제제(우스테키누맙의 규제 승인 및/또는 우스테키누맙에 대해 생성된 데이터에 의존하는 항체)이다.
- [0012] 소정 실시 형태에서, 본 발명은 항-IL-12/IL-23p40 항체를 생성하기 위한 제조 방법을 제공하며, 상기 제조 방법은 a. 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)를 배양하는 단계; b. 상기 CHO 세포에서 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체를 발현시키는 단계; 및 c. 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체를 정제하는 단계를 포함하며, (i) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하고/하거나; (ii) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0%, 총 하

전된 올리고당 중 < 1.0%, 및 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하고/하거나; (iii) 상기 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하고, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %가 > 70.0%이고/이거나; (iv) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 환원된 질량 분석(RMA)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않고/않거나; (v) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발현되는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖고/갖거나; (vi) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 우스테키누맵에 대한 후속 생물학적 제제이다.

[0013] 소정 실시 형태에서, 본 발명은 항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, (i) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하고/하거나; (ii) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0%, 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%, 및 개별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함하고/하거나; (iii) 상기 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중 > 99.0% 및 총 하전된 올리고당 중 < 1.0%를 포함하고, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %가 > 70.0%이고/이거나; (iv) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 환원된 질량 분석(RMA)에 의해 결정되는 바와 같이 다이시알화된 글리칸 중을 갖지 않고/않거나; (v) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 Sp2/0 세포에서 발현되는 항-IL-12/IL-23p40 항체와 대비하여 더 긴 반감기를 갖고/갖거나; (vi) 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체는 우스테키누맵에 대한 후속 생물학적 제제이다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 우스테키누맵 제조 공정의 10개의 스테이지의 개요를 나타낸다.  
 도 2는 공정중 제어(in-process control) 및 공정 모니터링 시험을 포함한, 전배양 및 증폭 단계에 대한 스테이지 1 제조 공정의 공정 흐름도를 나타낸다.  
 도 3은 공정중 제어 및 공정 모니터링 시험을 포함한, 스테이지 2 제조 공정의 공정 흐름도를 나타낸다.  
 도 4는 Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누맵의 올리고당 분석을 위한 대표적인 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.  
 도 5는 Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누맵의 IRMA 분석을 위한 대표적인 디컨볼루션된(deconvoluted) 질량 스펙트럼을 나타낸다.  
 도 6은 Sp2/0 세포에서 발현된 우스테키누맵의 대표적인 cIEF 전기영동도 프로파일을 나타낸다. cIEF 피크와 감소하는 음전하/시알화도(degree of sialylation) 사이의 일반적인 관계를 나타낸 그래프가 또한 나타나 있으며, 피크 A, B, 1, 2, 3, 및 C가 표시되어 있다.  
 도 7은 우스테키누맵 IgG 내의 1차 N-연결 올리고당 중의 일부의 개략도를 나타낸다. 글리코실화 성숙 과정에서의 효소들 중 일부의 역할 및 일부 2가 양이온의 역할(예를 들어, 보조인자로서의  $Mn^{2+}$  및 GalTI의 억제인자로서의  $Cu^{2+}$ )이 또한 나타나 있다(예를 들어, 문헌[Biotechnol Bioeng. 2007 Feb 15;96(3):538-49]; 문헌[Curr Drug Targets. 2008 Apr;9(4):292-309]; 문헌[J Biochem Mol Biol. 2002 May 31;35(3):330-6] 참조). 말단 시알산을 갖는 종(S1 및 S2)은 하전된 종이고, 말단 시알산이 결여된 종(G0F, G1F, 및 G2F)은 중성 종이지만, 하전된 종의 발생은 GalT1 효소에 의해 부가되는 G1F 및 G2F 내의 갈락토스의 존재에 의존한다는 점에 유의한다.  
 도 8은 CHO 세포에서 생성된 우스테키누맵의 올리고당 분석을 위한 대표적인 HPLC 크로마토그램을 나타낸다. 헤시 마크는 분석용 소프트웨어에 의해 확인된 기저선 위의 모든 피크를 나타내고, 표지를 갖는 괄호는 총 중성 올리고당 종, 총 하전된 올리고당 종, 및 모노시알화된 올리고당 종을 나타내는 피크들의 그룹을 나타낸다.  
 도 9는 CHO 세포에서 발현된 우스테키누맵의 대표적인 cIEF 전기영동도 프로파일을 나타낸다. cIEF 피크와 감소하는 음전하/시알화도 사이의 일반적인 관계를 나타낸 그래프가 또한 나타나 있으며, 피크 1, 2, 3, 및 C가 표시되어 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "항-IL-12 항체", "항-IL-23 항체", "항-IL-12/23p40 항체", "항-IL-12/IL-23p40 항체", "IL-12/23p40 항체", "IL-12/IL-23p40 항체", "항체 부분", 또는 "항체 단편" 및/또는 "항체 변

이체" 등은 중쇄 또는 경쇄의 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역 또는 이의 임의의 부분, 또는 IL-12 및/또는 IL-23 수용체 또는 결합 단백질의 하나 이상의 부분과 같으나 이에 한정되지 않는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함하며, 이는 본 발명의 항체 내로 도입될 수 있다. 이러한 항체는 선택적으로 특정 리간드에 추가로 영향을 주는데, 비제한적인 예로서, 이러한 항체는 시험관내 (in vitro)에서, 원위치 (in situ)에서 및/또는 생체내 (in vivo)에서 적어도 하나의 IL-12/23 활성 또는 결합, 또는 IL-12/23 수용체 활성 또는 결합을 조절, 감소, 증가, 길항작용, 효능화, 완화, 경감, 차단, 억제, 소실 및/또는 방해한다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 적합한 항-IL-12/23p40 항체, 특정 부분 또는 변이체는 하나 이상의 IL-12/23 분자 또는 이의 특정 부분, 변이체 또는 도메인에 결합할 수 있다. 적합한 항-IL-12/23p40 항체, 특정 부분 또는 변이체는 또한 선택적으로 RNA, DNA 또는 단백질 합성, IL-12/23 방출, IL-12/23 수용체 신호전달, 막 IL-12/23 절단, IL-12/23 활성, IL-12/23 생성 및/또는 합성과 같으나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 IL-12/23 활성 또는 기능에 영향을 줄 수 있다.

[0016] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 BPCI Act(Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009) 및 전세계적으로 유사한 법칙 및 규제 하에서 승인된 바이오시밀러(biosimilar) 항체 분자를 포함한다. BPCI Act 하에서는, 데이터가, 임상적으로 불활성인 성분에 있어서의 미미한 차이에도 불구하고, 항체가 참조 제품과 "고도로 유사하다"는 것을 보여주고, 안전성, 순도 및 효력의 관점에서 참조 제품과 동일한 임상 결과를 생성할 것으로 "예상되는" 경우에 그러한 항체는 바이오시밀러인 것으로 입증될 수 있다(문헌[*Endocrine Practice*: February 2018, Vol. 24, No. 2, pp. 195-204]). 이들 바이오시밀러 항체 분자는 단축된 승인 경로로 제공되며, 그럼으로써 본 출원인은 규제 승인을 확보하기 위하여 이노베이터 참조 제품의 임상 데이터에 의존한다. 성공적인 임상 시험에 기초하여 FDA 승인된 원래의 이노베이터 참조 항체와 대비하여, 바이오시밀러 항체 분자는 본 명세서에서 "후속 생물학적 제제(follow-on biologic)"로 지칭된다. 본 명세서에 제시된 바와 같이, STELARA®(우스테키누맵)는 성공적인 임상 시험에 기초하여 FDA 승인된 원래의 이노베이터 참조 항-IL-12/23p40 항체이다. 우스테키누맵은 2009년 이래로 미국에서 판매되어 왔다.

[0017] 용어 "항체"는 추가로 항체, 이의 분해 단편, 특정 부분 및 변이체를 포함하고자 하며, 항체 모방체(mimetic)를 포함하거나, 단일쇄 항체 및 이의 단편을 포함하는, 항체 또는 이의 특정 단편 또는 부분의 구조 및/또는 기능을 모방하는 항체의 부분을 포함한다. 기능성 단편은 포유류 IL-12/23에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, Fab (예를 들어, 파파인 분해에 의해), Fab' (예를 들어, 펩신 분해 및 부분적인 환원에 의해), 및 F(ab')<sub>2</sub> (예를 들어, 펩신 분해에 의해), facb (예를 들어, 플라스민 분해에 의해), pFc' (예를 들어, 펩신 또는 플라스민 분해에 의해), Fd (예를 들어, 펩신 분해, 부분적인 환원 및 재응집에 의해), Fv 또는 scFv (예를 들어, 분자생물학 기술에 의해) 단편을 포함하지만 이로 한정되지 않는, IL-12/23 또는 이의 일부분에 결합할 수 있는 항체 단편이 본 발명에 포함된다 (예를 들어, 상기 문헌[Colligan, Immunology] 참조).

[0018] 그러한 단편들은 당업계에 알려져 있는 바와 같은, 그리고/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 효소적 절단, 합성 또는 제조법 기법에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 절단된(truncated) 형태로 생성될 수 있다. 예를 들어, 중쇄의 C<sub>H1</sub> 도메인 및/또는 힌지 영역을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하도록, F(ab')<sub>2</sub> 중쇄 부분을 인코딩하는 조합 유전자를 설계할 수 있다. 항체의 다양한 부분은 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 연결될 수 있거나, 유전 공학 기술을 사용하여 연속 단백질로서 제조될 수 있다.

[0019] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 단백질의 실질적으로 모든 부분(예를 들어, CDR, 프레임워크, C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> 도메인(예를 들어 C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>), 힌지, (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>))이, 단지 사소한 서열 변화 또는 변형만을 가지면서, 인간에서 실질적으로 비면역원성인 항체를 지칭한다. "인간 항체"는 또한 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래되거나 이와 거의 일치하는 항체일 수 있다. 인간 항체는 생식세포계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내에서의 랜덤 또는 부위-특이적 돌연변이 생성에 의해 또는 생체내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 종종, 이는 인간 항체가 인간에서 실질적으로 비면역원성을 의미한다. 인간 항체는 이들의 아미노산 서열 유사성에 기초하여 그룹으로 분류된다. 따라서, 서열 유사성 검색을 사용하여, 유사한 선형 서열을 갖는 항체를 주형으로 선택하여 인간 항체를 생성할 수 있다. 유사하게, 영장류(원숭이, 개코원숭이, 침팬지 등), 설치류(마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 햄스터 등) 및 다른 포유동물에 지정된 항체는 그러한 중, 아속, 속, 아과, 및 과 특이적 항체를 지정한다. 추가로, 키메라 항체는 상기의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 이러한 변화 또는 변이는 선택적으로 그리



고 바람직하게는, 변형되지 않은 항체에 비해 인간 또는 다른 종에서의 면역원성을 유지시키거나 감소시킨다. 따라서, 인간 항체는 키메라 또는 인간화 항체와 구별된다.

[0020] 인간 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비인간 동물 또는 원핵 또는 진핵세포에 의해 생성될 수 있다는 점이 주목된다. 또한, 인간 항체가 단일쇄 항체일 때, 인간 항체는 천연 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는 중쇄의 가변 영역 및 경쇄의 가변 영역을 연결시키는 링커 펩티드, 예를 들어 2 내지 약 8개의 글리신 또는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 링커 펩티드는 인간 기원인 것으로 간주된다.

[0021] 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 항-IL-12/23p40 항체 (또한 IL-12/23p40 항체로 명명함) (또는 IL-23에 대한 항체)는 선택적으로 IL-12/23p40에 대한 (또는 IL-23에 대한) 높은 친화도 결합 및 선택적으로 그리고 바람직하게는 낮은 독성을 특징으로 할 수 있다. 특히, 개별 성분, 예를 들어 가변 영역, 불변 영역 및 프레임워크가 개별적으로 및/또는 공동으로, 선택적으로 그리고 바람직하게는 낮은 면역원성을 갖는 본 발명의 항체, 특정 단편 또는 변이체가 본 발명에서 유용하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 항체는 선택적으로 측정가능한 정도로 증상을 완화하고, 낮고/낮거나 허용가능한 독성을 보이면서 장기간 동안 환자를 치료할 수 있는 능력을 특징으로 한다. 낮거나 허용가능한 면역원성 및/또는 높은 친화도뿐만 아니라 다른 적합한 특성이 달성되는 치료 결과에 기여할 수 있다. 본 명세서에서 "낮은 면역원성"은 치료한 환자의 약 75% 미만, 또는 바람직하게는 약 50% 미만에서 유의한 HAHA, HACA, 또는 HAMA 반응을 야기하고/하거나 치료한 환자에서 낮은 역가(이중 항원 효소 면역검정으로 측정할 때, 약 300 미만, 바람직하게는 약 100 미만)를 야기하는 것으로 정의된다 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Elliott *et al.*, *Lancet* 344:1125-1127 (1994)]). "낮은 면역원성"은 또한 항-IL-12 항체로 치료한 환자에서 항-IL-12 항체에 대한 항체의 적정 수준의 발생률이 치료 기간 동안 권장 치료 과정에서 권장 용량으로 치료한 환자의 25% 미만, 바람직하게는 치료한 환자의 10% 미만으로 발생하는 것으로 정의될 수 있다.

[0022] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 단백질의 실질적으로 모든 부분(예를 들어, CDR, 프레임워크, C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> 도메인(예를 들어 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, 및 CH3), 힌지, (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>))이, 단지 사소한 서열 변화 또는 변형만을 가지면서, 인간에서 실질적으로 비면역원성인 항체를 지칭한다. 유사하게, 영장류(원숭이, 개코원숭이, 침팬지 등), 설치류(마우스, 래트, 토끼, 기니 피그, 햄스터 등) 및 다른 포유동물에 지정된 항체는 그러한 종, 아속, 속, 아과, 및 과 특이적 항체를 지칭한다. 추가로, 키메라 항체는 상기의 임의의 조합을 포함한다. 이러한 변화 또는 변이는 선택적으로 그리고 바람직하게는, 변형되지 않은 항체에 비해 인간 또는 다른 종에서의 면역원성을 유지시키거나 감소시킨다. 따라서, 인간 항체는 키메라 또는 인간화 항체와 구별된다. 인간 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비인간 동물 또는 원핵 또는 진핵세포에 의해 생성될 수 있다는 점이 주목된다. 또한, 인간 항체가 단일쇄 항체일 때, 인간 항체는 천연 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는 중쇄의 가변 영역 및 경쇄의 가변 영역을 연결시키는 링커 펩티드, 예를 들어 2 내지 약 8개의 글리신 또는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 링커 펩티드는 인간 기원인 것으로 간주된다.

[0023] 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 단일클론, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체인 이중특이성(bispecific)(예를 들어, DuoBody®), 이종특이성(heterospecific), 이형접합성(heteroconjugate), 또는 유사한 항체 또한 사용할 수 있다. 이중특이성 항체를 제조하는 방법은 본 기술 분야에 알려져 있다. 통상적으로, 이중특이성 항체의 재조합 생성은 2개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는, 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시 발현에 기초한다(문헌[Milstein and Cuello, *Nature* 305:537(1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이러한 하이브리도마(쿼드로마(quadroma))는 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생성한다. 일반적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 실행되는 정확한 분자의 정제는 번거롭고 생성물 수율이 낮을 수 있으며, 이중특이성 항체 생산을 용이하게 하기 위한 상이한 전략이 개발되어 왔다.

[0024] 전장 이중특이성 항체는, 예를 들어 2개의 단일특이성 2가 항체들 사이에서의 Fab 아암 교환(또는 하프 분자 교환)을 사용하여 생성될 수 있는데, 이는 공발현을 사용하거나 또는 무세포 환경에서의 시험관내에서, 각각의 하프 분자 내의 중쇄 CH3 계면에 치환을 도입하여 별개의 특이성을 갖는 2개의 항체 하프 분자의 이중이량체 형성을 유리하게 함으로써 행해진다. Fab 아암 교환 반응은 이황화물-결합 이성질화 반응 및 CH3 도메인의 해리-회합의 결과이다. 모 단일특이성 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 이황화물 결합은 환원된다. 모 단일특이성 항체들 중 하나의, 생성된 유리 시스템은, 제2 모 단일특이성 항체 분자의 시스템 잔기와 중쇄간 이황화물 결합을

형성하고, 동시에 모 항체의 CH3 도메인이 해리-회합에 의해 방출 및 재형성된다. Fab 아암의 CH3 도메인은 동종이량체화에 비하여 이종이량체화에 유리하도록 조작될 수 있다. 생성된 산물은, 각각이 별개의 에피토프와 결합할 수 있는 2개의 Fab 아암 또는 하프 분자를 갖는 이종특이성 항체이다.

[0025] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "동종이량체화"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "동종이량체"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이종이량체화"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이종이량체"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0027] "노브-인-홀(knob-in-hole)" 전략(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2006/028936호 참조)이 전장 이종특이성 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 간략하게 말해서, 인간 IgG 내에 CH3 도메인의 계면을 형성하는 선택된 아미노산이 CH3 도메인 상호작용에 영향을 주는 위치에서 돌연변이화되어 이종이량체 형성을 촉진할 수 있다. 작은 측쇄(홀)를 갖는 아미노산이 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입되고, 큰 측쇄(노브)를 갖는 아미노산이 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입된다. 2개의 항체의 공발현 후에, "홀"을 갖는 중쇄와 "노브"를 갖는 중쇄의 우선적인 상호작용의 결과로서 이종이량체가 형성된다. 노브와 홀을 형성하는 예시적인 CH3 치환 쌍은 다음과 같다(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S 및 T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

[0028] 하나의 CH3 표면에서 양성 하전된 잔기 및 제2의 CH3 표면에서 음성 하전된 잔기를 치환함으로써 정전기 상호작용을 사용하여 중쇄 이종이량체화를 촉진하는 것과 같은 다른 전략이 사용될 수 있으며, 이는 미국 특허 출원 공개 US2010/0015133호; 미국 특허 출원 공개 US2009/0182127호; 미국 특허 출원 공개 US2010/028637호, 또는 미국 특허 출원 공개 US2011/0123532호에 기재된 바와 같다. 다른 전략에서는, 미국 특허 출원 공개 제 2012/0149876호 또는 미국 특허 출원 공개 제2013/0195849호에 기재된 바와 같이 하기의 치환(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨)에 의해 이종이량체화가 촉진될 수 있다: L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F, 또는 T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W.

[0029] 전술된 방법에 더하여, 이종특이성 항체는, 2개의 단일특이성 동종이량체성 항체의 CH3 영역 내에 비대칭 돌연변이를 도입시키고, 이황화물 결합 이성질화를 가능하게 하는 환원성 조건에서 2개의 모 단일특이성 동종이량체성 항체로부터 이종특이성 이종이량체성 항체를 형성함으로써 무세포 환경에서 시험관내에서 생성될 수 있는데, 이는 국제 특허 출원 공개 WO2011/131746호에 기재된 방법에 따른 것이다. 상기 방법에서, 제1 단일특이성 2가 항체 및 제2 단일특이성 2가 항체는 이종이량체 안정성을 촉진하는 CH3 도메인에서의 소정 치환을 갖도록 조작되며; 항체는 힌지 영역의 시스테인이 이황화물 결합 이성질화를 거치기에 충분한 환원 조건 하에서 함께 인큐베이션되어; 그럼으로써 Fab 아암 교환에 의해 이종특이성 항체를 생성한다. 인큐베이션 조건은 비환원성 상태로 최적으로 회복될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 환원제는 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 다이티오프로판올(DTT), 다이티오에리트ريت(DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토에탄올이며, 바람직하게는 환원제는 2-메르캅토에틸아민, 다이티오프로판올 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, pH 5 내지 8에서, 예를 들어 pH 7.0에서 또는 pH 7.4에서 적어도 25 mM 2-MEA의 존재 하에서 또는 적어도 0.5 mM 다이티오프로판올의 존재 하에서 20°C 이상의 온도에서 90분 이상 동안의 인큐베이션이 사용될 수 있다.

[0030] 용량, 투여 계획, 치료, 또는 방법과 관련하여 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "효능" 및 "효과적인"은 특정 용량, 투여량, 또는 치료 계획의 유효성을 지칭한다. 효능은 본 발명의 작용제에 반응하는 질병 경과와 변화에 기초하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-IL12/23p40 또는 항-IL23 항체(예를 들어, 항-IL12/23p40 항체인 우스텍키누맙)는 개선, 바람직하게는 치료되는 장애의 중증도를 반영하는 하나 이상의 지표의 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양으로 그리고 그러한 시간 동안 환자에게 투여된다. 치료의 양 및 시간이 충분한지 여부를 결정하기 위해 대상체의 병, 질병, 또는 질환의 정도를 반영하는 다양한 지표를 평가할 수 있다. 이러한 지표는, 예를 들어 문제의 장애의 질병 중증도, 증상, 또는 징후의 임상적으로 인정한 지표를 포함한다. 개선의 정도는 일반적으로 의사에 의해 결정되며, 의사는 징후, 증상, 생검체, 또는 다른 검사 결과

에 기초하여 이러한 결정을 할 수 있고, 또한 의사는 대상체에게 제공되는 설문지, 예컨대 주어진 질병에 대해 개발된 삶의 질 설문지를 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 항-IL12/23p40 또는 항-IL23 항체(예를 들어, 항-IL12/23p40 항체 우스테키누맵)를 이용한 용량, 투여 계획, 치료 또는 방법에 관련될 때, 용어 "안전한"은, 표준 치료 또는 다른 비교기준물과 대비하여, 치료-유발 유해 사건(AE 또는 TEAE로 지칭됨)의 허용가능한 빈도 및/또는 허용가능한 중증도를 갖는 유리한 위험:효과 비를 지칭한다. 유해 사건은 의약품을 투여한 환자에서의 바람직하지 않은 의료 사건이다. 특히, 본 발명의 항-IL12/23p40 또는 항-IL23 항체를 이용한 용량, 투여 계획, 또는 치료와 관련하여 "안전한"은, 속성이 항-IL12/23p40 또는 항-IL23 항체의 사용으로 인한 것일 가능성이 있거나, 개연성이 있거나, 가능성이 매우 높은 것으로 간주되는 경우에 항체의 투여와 관련된 유해 사건의 허용가능한 빈도 및/또는 허용가능한 중증도를 갖는 것을 지칭한다.

[0032] **유용성**

[0033] 본 발명의 단리된 핵산은 적어도 하나의 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체 또는 이의 특정 변이체의 생성을 위해 사용될 수 있는데, 이는 면역 장애 또는 질병, 심혈관 장애 또는 질병, 감염성, 악성 및/또는 신경성 장애 또는 질병, 또는 다른 알려지거나 명시된 IL-12/23 관련 질환 중 적어도 하나로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는, 하나 이상의 IL-12/23 질환을 진단하거나, 모니터링하거나, 조절하거나, 치료하거나, 경감하거나, 이의 발병의 예방을 돕거나, 이의 증상을 감소하기 위해 세포, 조직, 기관 또는 동물 (포유류 및 인간을 포함함)에서 측정하거나 작용하는 데 사용될 수 있다.

[0034] 이러한 방법은 이러한 증상, 효과 또는 기전의 조절, 치료, 경감, 예방 또는 감소를 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재되거나 관련 기술 분야에 알려진 바와 같이, 알려진 방법을 사용하여 수행하고 측정된 유효량은 단일 (예를 들어, 볼루스(bolus)), 다회 또는 연속 투여당 약 0.001 내지 500 mg/kg의 양, 또는 단일, 다회 또는 연속 투여당 0.01 내지 5000 µg/ml 혈청 농도의 혈청 농도를 달성하는 양, 또는 그 안의 임의의 유효 범위 또는 값을 포함할 수 있다.

[0035] **인용**

[0036] 구체적으로 지정되는지 여부에 관계 없이 본 명세서에서 인용된 모든 간행물 또는 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되며, 이는 그들이 본 발명의 시점에서의 최신의 기술을 보여주고/주거나 본 발명의 설명 및 용이성을 제공하기 때문이다. 간행물은 임의의 학술 간행물 또는 특허 간행물, 또는 모든 기록 형식, 전자 형식 또는 인쇄 형식을 포함하는 임의의 매체 형식으로 이용가능한 또 다른 정보를 가리킨다. 하기 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다: 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)].

[0037] **본 발명의 항체 - 생성 및 생산**

[0038] 본 발명의 방법에 사용되는 적어도 하나의 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23)은 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 세포주, 혼합 세포주, 불멸화(immortalized) 세포 또는 불멸화 세포의 클론 집단에 의해 선택적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)]을 참조하며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0039] 바람직한 항-IL-12/23p40 항체는 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 갖고, 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열; 및 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 갖는 우스테키누맵(STELARA®)이다. 바람직한 항-IL-23 항체는 구셀쿠맵(CNTO1959로도 지칭됨)이다. 다른 항-IL-23 항체는 그 전체 내용이 본 명세서에 참고로

포함된 미국 특허 제7,935,344호에 기재되고 본 명세서에 열거된 서열을 갖는다.

- [0040] 단리된 IL-12/23p40 단백질, IL-23 단백질 및/또는 이의 일부분 (합성 펩티드와 같은 합성 분자를 포함함)과 같은 적절한 면역원성 항원에 대해 인간 IL-12/23p40 또는 IL-23 단백질, 또는 이의 단편에 특이적인 인간 항체를 발생시킬 수 있다. 다른 특이적 또는 일반적 포유류 항체를 유사하게 발생시킬 수 있다. 면역원성 항원의 제조 및 단일클론 항체 생성은 임의의 적합한 기술을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0041] 한 방법에서, 하이브리도마(hybridoma)는 적합한 불멸화 세포주 (예를 들어, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO 2A 등과 같으나 이에 한정되지 않는 골수종 세포주, 또는 이종골수종(heteromyeloma), 이의 융합 산물, 또는 이로부터 유도되는 임의의 세포 또는 융합 세포, 또는 본 기술 분야에 알려진 임의의 다른 적합한 세포주) (예를 들어, www. atcc.org, www. lifetech.com. 등 참조)를, 내인성 또는 이종 핵산으로서, 재조합 또는 내인성 바이러스, 세균, 조류, 원핵생물, 양서류, 곤충, 파충류, 어류, 포유동물, 설치류, 말, 양(ovine), 염소, 양, 영장류, 진핵생물, 계놈 DNA, cDNA, rDNA, 미토콘드리아 DNA 또는 RNA, 염색체 DNA 또는 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 단일, 이중 또는 삼중 가닥, 혼성화된 것 등, 또는 이들의 임의의 조합으로서, 단리되거나 클로닝된 비장, 말초 혈액, 림프선, 편도선, 또는 다른 면역 세포 또는 B 세포 함유 세포, 또는 중쇄 또는 경쇄 불변 또는 가변 또는 프레임워크 또는 CDR 서열을 발현하는 임의의 다른 세포와 같으나 이에 한정되지 않는 항체 생성 세포와 융합시켜 생성된다. 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 문헌[Ausubel, 상기 문헌] 및 문헌[Colligan, Immunology, 상기 문헌, 챕터 2]을 참조한다.
- [0042] 항체 생성 세포는 또한, 목적 항원으로 면역화된 인간 또는 다른 적합한 동물의 말초 혈액, 또는 바람직하게는 비장 또는 림프절로부터 얻을 수 있다. 임의의 다른 적합한 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 항체, 이의 특정 단편 또는 변이체를 인코딩하는 이중 또는 내인성 핵산을 또한 발현할 수 있다. 융합된 세포 (하이브리도마) 또는 재조합 세포는 선택적 배양 조건 또는 다른 적합한 공지 방법을 사용하여 단리될 수 있고, 제한 희석 또는 세포 분류, 또는 다른 공지의 방법에 의해 클로닝될 수 있다. 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 세포를 적합한 검정 (예를 들어, ELISA)에 의해 선별할 수 있다.
- [0043] 필요한 특이성을 갖는 항체를 생성하거나 단리하는 다른 적합한 방법이 사용될 수 있으며, 이러한 방법에는 펩티드 또는 단백질 라이브러리(예를 들어, 박테리오파지, 리보솜, 올리고뉴클레오티드, RNA, cDNA 등의 디스플레이 라이브러리를 포함하지만 이로 한정되지 않으며; 이들은, 예를 들어 영국 캠브리지셔 소재의 Cambridge antibody Technologies; 독일 마르틴스레이드/플라네그 소재의 MorphoSys; 영국 스코틀랜드 아버딘 소재의 Biovation; 스웨덴 룬드 소재의 BioInvent; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; 캘리포니아주 버클리 소재의 Xoma; Ixsys, 예를 들어, EP 368,684호, PCT/GB91/01134호; PCT/GB92/01755호; PCT/GB92/002240호; PCT/GB92/00883호; PCT/GB93/00605호; US 08/350260(5/12/94)호; PCT/GB94/01422호; PCT/GB94/02662호; PCT/GB97/01835호 (CAT/MRC); WO90/14443호; WO90/14424호; WO90/14430호; PCT/US94/1234호; WO92/18619호; WO96/07754호 (Scripps); WO96/13583호, WO97/08320호(MorphoSys); WO95/16027호(BioInvent); WO88/06630호; WO90/3809호(Dyax); US 4,704,692호(Enzon); PCT/US91/02989호(Affymax); WO89/06283호; EP 371 998호; EP 550 400호; (Xoma); EP 229 046호; PCT/US91/07149호(Ixsys)를 참조함; 또는 추계적으로 생성된 펩티드 또는 단백질 - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689(Ixsys, Applied Molecular Evolution(AME)의 전신, 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨))로부터 재조합 항체를 선택하는 방법, 또는 당업계에 알려지고/알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자도입(transgenic) 동물(예를 들어, SCID 마우스, 문헌[Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997)]; 문헌[Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996)]; 문헌[Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998)], 관련 특허 및 출원과 더불어 각각 전체적으로 참고로 포함됨)의 면역화에 의존하는 방법을 포함할 수 있지만 이로 한정되지 않는다. 그러한 기법은 리보솜 디스플레이(문헌[Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997)]; 문헌[Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)]); 단세포 항체 생성 기술(예를 들어, 선택된 림프구 항체 방법("SLAM")(미국 특허 제5,627,052호, 문헌[Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987)]; 문헌[Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)]); 겔 마이크로소적 및 유세포추정(문헌[Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990)]; 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 One Cell Systems; 문헌[Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995)]; 문헌[Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)]); B-세포 선택(문헌[Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994)]; 문헌[Jonak

et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)]을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

- [0044] 또한, 비인간 또는 인간 항체를 유전자 조작하거나 인간화하는 방법이 사용될 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화되거나 유전자 조작된 항체는, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 비인간 영장류 또는 다른 포유동물과 같지만 이로 한정되지 않는 비인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는 종종 "유입(import)" 잔기로 지칭되고, 전형적으로 공지의 인간 서열의 "유입" 가변, 불변 또는 기타 도메인으로부터 취한 잔기로 대체된다.
- [0045] 기지의 인간 Ig 서열은, 예를 들어
- [0046] [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi);
- [0047] [www.ncbi.nih.gov/igblast](http://www.ncbi.nih.gov/igblast);
- [0048] [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html);
- [0049] [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php);
- [0050] [www.kabatdatabase.com/top.html](http://www.kabatdatabase.com/top.html); [ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nih.gov/repository/kabat);
- [0051] [www.sciquest.com](http://www.sciquest.com);
- [0052] [www.abcam.com](http://www.abcam.com);
- [0053] [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);
- [0054] [www.public.iastate.edu/~pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html);
- [0055] [www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm);
- [0056] [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab);
- [0057] [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html);
- [0058] [www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html);
- [0059] [www.immunologylink.com](http://www.immunologylink.com); [pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html);
- [0060] [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com);
- [0061] [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody);
- [0062] [www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html);
- [0063] [www.biodesign.com](http://www.biodesign.com);
- [0064] [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org);
- [0065] [www.biotech.ufl.edu](http://www.biotech.ufl.edu);
- [0066] [www.isac-net.org](http://www.isac-net.org); [baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html);
- [0067] [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu);
- [0068] [www.mrc-cpe.cam.ac.uk](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk);
- [0069] [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html); <http://>
- [0070] [www.bioinf.org.uk/abs](http://www.bioinf.org.uk/abs); [antibody.bath.ac.uk](http://antibody.bath.ac.uk);
- [0071] [www.unizh.ch](http://www.unizh.ch);
- [0072] [www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s](http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s);
- [0073] [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html);
- [0074] [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html);

- [0075] [www. ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html);
- [0076] [www. biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html);
- [0077] [www. jerini.de](http://www.jerini.de);
- [0078] 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)]에 개시되어 있으며, 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0079] 이러한 유입된 서열은 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화도, 결합 속도(on-rate), 해리 속도(off-rate), 결합력(avidity), 특이성, 반감기, 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나, 변형시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적이고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 준다. 따라서, 가변 및 불변 영역의 비인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체될 수 있는 반면에, 비인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부가 유지된다.
- [0080] 항체는 또한 선택적으로 항원에 대한 높은 친화도와 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화 또는 인간 항체로 유전자 조작될 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 인간화 (또는 인간) 항체는 선택적으로 모(parental) 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적(conceptual) 인간화 생성물을 분석하는 과정에 의해 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 구매가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이에 대한 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 가능성이 있는 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원과 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 프레임워크(FR) 잔기가 컨센서스 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명의 방법에 사용되는 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 특이적 항체는 인간 생식세포계열 경쇄 프레임워크를 포함할 수 있다. 특정 실시 형태에서, 경쇄 생식세포계열 서열은 A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 및 O8을 포함하지만 이에 한정되지 않는 인간 VK 서열로부터 선택된다. 소정 실시 형태에서, 이러한 경쇄 인간 생식세포계열 프레임워크는 V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 및 V5-6으로부터 선택된다.
- [0082] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 사용되는 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 특이적 항체는 인간 생식세포계열 중쇄 프레임워크를 포함할 수 있다. 특정 실시 형태에서, 이러한 중쇄 인간 생식세포계열 프레임워크는 VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 및 VH7-81로부터 선택된다.
- [0083] 특정 실시 형태에서, 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역은 프레임워크 영역 또는 프레임워크 영역의 적어도 일부 (예를 들어, 2 또는 3개의 하위영역, 예컨대 FR2 및 FR3을 함유함)를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 적어도 FRL1, FRL2, FRL3 또는 FRL4는 완전 인간이다. 다른 실시 형태에서, 적어도 FRH1, FRH2, FRH3 또는 FRH4는 완전 인간이다. 일부 실시 형태에서, 적어도 FRL1, FRL2, FRL3 또는 FRL4는 생식세포계열 서열 (예를 들어, 인간 생식세포계열)이거나, 특정 프레임워크에 대한 인간 공통 서열 (상술한 공지의 인간 Ig 서열의 공급원에서 용이하게 입수가능함)을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 적어도 FRH1, FRH2, FRH3 또는 FRH4는 생식세포계열 서열 (예를 들어, 인간 생식세포계열)이거나, 특정 프레임워크에 대한 인간 공통 서열을 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 프레임워크 영역은 완전 인간 프레임워크 영역이다.
- [0084] 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Winter](문헌[Jones et al., Nature 321:522 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; 문헌[Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)], 문헌[Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)], 문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 미국 특허 제5723323호, 제5976862호, 제5824514호, 제5817483호, 제5814476호, 제5763192호, 제5723323호, 제5,766886호, 제5714352호, 제6204023호, 제6180370호, 제5693762호, 제5530101호, 제

5585089호, 제5225539호; 제4816567호, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, 그 안에 인용된 참고 문헌에 기재된 것들과 같지만 이로 한정되지 않는 임의의 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 항체의 인간화 또는 유전자 조작을 수행할 수 있다.

[0085] 소정 실시 형태에서, 항체는 변경된 (예를 들어, 돌연변이된) Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, Fc 영역을 변경하여 항체의 이펙터 기능을 감소시키거나 향상시킨다. 일부 실시 형태에서, Fc 영역은 IgM, IgA, IgG, IgE 또는 다른 동종형으로부터 선택된 동종형이다. 대안적으로 또는 추가적으로, 아미노산 변형을 IL-23 결합 분자의 Fc 영역의 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 기능을 변경하는 하나 이상의 추가의 아미노산 변형과 조합하는 데 유용할 수 있다. 특정 목적 출발 폴리펩티드는 C1q에 결합하여, 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 것일 수 있다. 기존의 C1q 결합 활성, 선택적으로 CDC를 매개하는 능력을 추가로 가진 폴리펩티드는 변형되어, 이러한 활성의 하나 또는 둘 모두가 향상될 수 있다. C1q를 변경하고/하거나 이의 보체 의존성 세포독성 기능을 변형시키는 아미노산 변형이, 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함되는, WO0042072에 기재되어 있다.

[0086] 상기 개시된 바와 같이, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 Fc $\gamma$ R 결합을 변형시킴으로써, 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성 및/또는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성을 변화시켜, 변경된 이펙터 기능을 갖는 본 발명의 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 특이적 항체의 Fc 영역이 고안될 수 있다. "이펙터 기능"은 (예를 들어, 대상체에서) 생물학적 활성을 활성화하거나 감소시키는 것을 담당한다. 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 이러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과의 조합될 것을 필요로 할 수 있으며, 다양한 검정(예를 들어, Fc 결합 검정, ADCC 검정, CDC 검정 등)을 사용하여 평가할 수 있다.

[0087] 예를 들어, 개선된 C1q 결합 및 개선된 Fc $\gamma$ RIII 결합을 갖는 (예를 들어, 개선된 ADCC 활성 및 개선된 CDC 활성을 갖는) 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체의 변이체 Fc 영역이 생성될 수 있다. 대안적으로, 이펙터 기능이 감소되거나 제거되기를 원하는 경우, 변이체 Fc 영역을 감소된 CDC 활성 및/또는 감소된 ADCC 활성으로 유전자 조작할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 이러한 활성 중 하나만을 증가시킬 수 있고, 선택적으로, 다른 활성도 감소시킬 수 있다 (예를 들어, 개선된 ADCC 활성을 갖지만 감소된 CDC 활성을 가지거나, 그 반대의 경우인 Fc 영역 변이체를 생성하기 위해).

[0088] Fc 돌연변이는 또한 유전자 조작(engineer)에 도입되어, 이들과 신생아 Fc 수용체 (FcRn)의 상호작용을 변경하고, 이들의 약동학적 특성을 개선할 수 있다. FcRn에 대한 개선된 결합을 갖는 인간 Fc 변이체들의 수집이 기재되어 있다(문헌[Shields et al., (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc $\gamma$ R, (J. Biol. Chem. 276:6591-6604)]).

[0089] 다른 유형의 아미노산 치환은 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 특이적 항체의 Fc 영역의 글리코실화 패턴을 변경하는 역할을 한다. Fc 영역의 글리코실화는 전형적으로 N-결합 또는 O-결합이다. N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티(moiety)의 부착을 지칭한다. O-결합 글리코실화는 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 또한 사용될 수 있지만, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌인 하이드록시아미노산에 대한 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭한다. 아스파라긴 측쇄 펩티드 서열에 대한 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열은 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌이며, 이때 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. 따라서, 폴리펩티드에서 이러한 펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다.

[0090] 예를 들어, 폴리펩티드에서 발견되는 하나 이상의 글리코실화 부위(들)를 제거하고/하거나 폴리펩티드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하여 글리코실화 패턴을 변경할 수 있다. 인간 IL-23 특이적 항체의 Fc 영역에 글리코실화 부위를 부가하는 것은, 그것이 상기 기재된 트라이펩티드 서열 중 하나 이상을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 수행된다(N-결합 글리코실화 부위의 경우). 예시적인 글리코실화 변이체는 중쇄의 잔기 Asn 297의 아미노산 치환을 갖는다. (O-결합 글리코실화 부위의 경우) 변경은 원래 폴리펩티드의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가에 의해 또는 이에 의한 치환에 의해 또한 이루어질 수 있다. 추가로, Asn 297의 Ala로의 변경은 글리코실화 부위 중 하나를 제거할 수 있다.

[0091] 소정 실시 형태에서, 본 발명의 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 특이적 항체는 베타 (1,4)-N-아세틸글루

코사미닐트랜스페라아제 III (GnT III)를 발현하는 세포에서 발현되어, GnT III가 인간 항-IL-12/23p40(또는 항-IL-23) 항체에 GlcNAc를 부가한다. 이러한 방식으로 항체를 생성하는 방법이 WO/9954342, WO/03011878, 특허출원 공개 제20030003097A1호, 및 문헌[Umaña et al., Nature Biotechnology, 17:176-180, Feb. 1999]에 제공되며; 이들 모두는 전체적으로 본 명세서에 참고로 구체적으로 포함된다.

[0092] 또한 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체는 본 명세서에 기재되고/되거나 당업계에서 알려진 바와 같이, 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자도입 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 비인간 영장류 등)의 면역화에 의해 선택적으로 생성될 수 있다. 인간 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체를 생성하는 세포는 본 명세서에 기재된 방법과 같은 적합한 방법을 사용하여 상기 동물로부터 단리되고, 불멸화될 수 있다.

[0093] 인간 항원에 결합하는 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자도입 마우스는 알려진 방법(비제한적인 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, Lonberg 등에게 허여된 미국 특허 제5,770,428호, 제5,569,825호, 제5,545,806호, 제5,625,126호, 제5,625,825호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 및 제5,789,650호; Jakobovits 등의 WO 98/50433, Jakobovits 등의 WO 98/24893, Lonberg 등의 WO 98/24884, Lonberg 등의 WO 97/13852, Lonberg 등의 WO 94/25585, Kucherlapate 등의 WO 96/34096, Kucherlapate 등의 EP 0463 151 B1, Kucherlapate 등의 EP 0710 719 A1, Surani 등의 미국 특허 제5,545,807호, Bruggemann 등의 WO 90/04036, Bruggemann 등의 EP 0438 474 B1, Lonberg 등의 EP 0814 259 A2, Lonberg 등의 GB 2 272 440 A, 문헌[Lonberg et al. Nature 368:856-859 (1994)], 문헌[Taylor et al., Int. Immunol. 6(4):579-591 (1994)], 문헌[Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994)], 문헌[Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997)], 문헌[Taylor et al., Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992)], 문헌[Tuaille et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993)], 문헌[Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995)], 및 문헌[Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851(1996)]에 의해 생성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 마우스는 기능적으로 재배열되거나, 기능적으로 재배열될 수 있는 하나 이상의 인간 면역글로불린 유전자좌로부터의 DNA를 포함하는 하나 이상의 도입유전자(transgene)를 포함한다. 상기 마우스에서 내인성 면역글로불린 유전자좌는 파괴되거나 결실되어, 내인성 유전자에 의해 인코딩되는 항체를 생성하는 동물의 능력을 제거할 수 있다.

[0094] 통상적으로 펩티드 디스플레이 라이브러리를 사용하여 유사한 단백질 또는 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 스크리닝할 수 있다. 이러한 방법은 원하는 기능 또는 구조를 갖는 개별 구성원에 대하여 거대 펩티드 집단을 스크리닝하는 것을 포함한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리의 항체 스크리닝은 당업계에 잘 알려져 있다. 디스플레이된 펩티드 서열의 길이는 3 내지 5000개 이상의 아미노산, 종종 5 내지 100개의 아미노산, 종종 약 8 내지 25개의 아미노산일 수 있다. 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 직접적인 화학적 합성 방법 외에도, 여러 가지 제조법 DNA 방법이 기재되어 있다. 하나의 유형은 박테리오파지 또는 세포의 표면 상에 펩티드 서열을 디스플레이하는 것을 포함한다. 각각의 박테리오파지 또는 세포는 특정 디스플레이된 펩티드 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이러한 방법이 PCT 특허 공개 91/17271호, 91/18980호, 91/19818호 및 93/08278호에 기재되어 있다.

[0095] 펩티드의 라이브러리를 생성하는 다른 시스템은 시험관내에서의 화학적 합성 및 제조법 방법 모두의 태양을 포함한다. PCT 특허 공개 92/05258호, 92/14843호 및 96/19256호를 참조한다. 또한 미국 특허 제5,658,754호; 및 제5,643,768호를 참조한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터, 및 스크리닝 키트는 Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재) 및 Cambridge Antibody Technologies(영국 캠브리지셔 소재)와 같은 공급처로부터 구매가능하다. 예를 들어, Enzon에 양도된 미국 특허 제4704692호, 제4939666호, 제4946778호, 제5260203호, 제5455030호, 제5518889호, 제5534621호, 제5656730호, 제5763733호, 제5767260호 및 제5856456호; Dyax에 양도된 제5223409호, 제5403484호, 제5571698호, 제5837500호, Affymax에 양도된 제5427908호, 제5580717호; Cambridge antibody Technologies에 양도된 제5885793호; Genentech에 양도된 제5750373호, Xoma, Colligan에 양도된 제5618920호, 제5595898호, 제5576195호, 제5698435호, 제5693493호, 제5698417호, 상기 문헌; 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조하며, 상기 특허 및 간행물 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0096] 이들의 우유에 이러한 항체를 생성하는 유전자도입 동물 또는 포유류, 예를 들어 염소, 소, 말, 양 토끼 등을 제공하기 위해 적어도 하나의 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체를 인코딩하는 핵산을 사용하여 본 발명의 방법에 사용되는 항체를 또한 제조할 수 있다. 이러한 동물은 알려진 방법을 사용하여 제공할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,827,690호; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 제5,304,489호 등을 참조하지만, 이로 한정되지 않으며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.



[0097] 추가로, 식물 부분, 또는 그로부터 배양된 세포에서 이러한 항체, 특정 부분 또는 변이체를 생성하는 유전자도입 식물 및 배양된 식물 세포 (예를 들어, 담배 및 옥수수과 같지만 이로 한정되지 않음)를 제공하기 위해 적어도 하나의 항-IL-12/23p40 (또는 항-IL-23) 항체를 인코딩하는 핵산을 사용하여 본 발명의 방법에 사용되는 항체를 제조할 수 있다. 비제한적인 예로서, 재조합 단백질을 발현하는 유전자도입 담배 잎이, 예를 들어 유도성 프로모터를 사용하여 다량의 재조합 단백질을 제공하는 데 성공적으로 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 또한, 유전자도입 옥수수는 다른 재조합 시스템에서 생성되거나, 천연 공급원으로부터 정제된 것과 동등한 생물학적 활성으로, 상업 생산 수준으로 포유류 단백질을 발현하는 데 사용되어 왔다. 예를 들어, 문헌[Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 항체는 또한 항체 단편, 예를 들어 단일쇄 항체 (scFv's)를 포함하는, 유전자도입 식물 종자, 예를 들어 담배 종자 및 감자 덩이줄기 (potato tuber)로부터 다량으로 생성되었다. 예를 들어, 문헌[Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 따라서, 본 발명의 항체는 또한 알려진 방법에 따라 유전자도입 식물을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999)], 문헌[Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995)]; 문헌[Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995)]; 문헌[Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994)]; 및 그 안에 인용된 참고문헌을 또한 참조한다. 상기 참고문헌 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0098] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 광범위한 친화도 ( $K_D$ )로 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 결합할 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 인간 mAb는 고친화도로 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 선택적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 인간 mAb는 약  $10^{-7}$  M 이하, 비제한적인 예로서 0.1 내지 9.9 (또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값)  $\times 10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값의  $K_D$ 로 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 결합할 수 있다.

[0099] 항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합력은 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984)]; 문헌[Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법을 참조한다). 특정 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정된다면 변동될 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 파라미터(예를 들어,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ )의 측정은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충액, 예컨대 본 명세서에 기재된 완충액을 사용하여 행해진다.

[0100] **핵산 분자**

[0101] 본 명세서에 제공된 정보를 사용하여, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 다른 서열 중에서 본 명세서에 기재된 경쇄 또는 중쇄 가변 또는 CDR 영역 중 하나 이상의 연속 아미노산의 70 내지 100% 이상을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 이의 특정 단편, 변이체, 또는 공통 서열, 또는 이들 서열 중 하나 이상을 포함하는 기탁된 (deposited) 벡터, 하나 이상의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 인코딩하는 본 발명의 핵산 분자를, 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 방법을 사용하여 얻을 수 있다.

[0102] 본 발명의 핵산 분자는 RNA 형태, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태 또는 cDNA 및 클로닝에 의해 얻어지거나 합성에 의해 생성된 게놈 DNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 삼중가닥, 이중가닥 또는 단일가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 한 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로도 알려진 코딩 가닥일 수 있거나, 안티-센스 가닥으로도 언급되는 비코딩 가닥일 수 있다.

[0103] 본 발명의 방법에 사용되는 단리된 핵산 분자는, 선택적으로 하나 이상의 인트론을 갖는 개방 해독틀(ORF: open reading frame)을 포함하는 핵산 분자, 비제한적인 예를 들어, 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 특정 부분, 예컨대 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3; 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 또는 가변 영역에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 상기 기재된 것들과는 실질적으로 상이하지만 유전자 코드의 축퇴로 인해 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 하나 이상의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 여전히 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전 코드는 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 방법에서 사용되는 특정 항-IL-12/IL-23p40 또는

IL-23 항체를 코딩하는 이러한 축퇴 핵산 변이체를 생성하는 것은 당업자에게 통상적일 것이다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al. 상기 문헌]을 참조하며, 이러한 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다. 단리된 핵산 분자의 비제한적인 예에는 각각 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3을 인코딩하는 핵산이 포함된다.

[0104] 본 명세서에 나타난 바와 같이 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 분자는, 그 자체로 항체 단편의 아미노산 서열을 인코딩하는 것들; 전체 항체 또는 이의 일부에 대한 코딩 서열; 항체, 단편, 또는 부분에 대한 코딩 서열뿐만 아니라, 추가의 서열, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호(예를 들어, mRNA의 리보솜 결합 및 안정성)를 포함하는, 전사, mRNA 프로세싱에서 역할을 담당하는 전사되고 번역되지 않는 서열과 같은 비-코딩 5' 및 3' 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가의 비-코딩 서열과 함께, 하나 이상의 인트론과 같은, 전술한 추가의 코딩 서열이 있거나 없는, 하나 이상의 신호 리더 또는 융합 펩티드의 코딩 서열; 추가의 작용기를 제공하는 것들과 같은, 추가의 아미노산을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 따라서, 항체를 인코딩하는 서열은 항체 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 항체의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 인코딩하는 서열과 같은 마커 서열에 융합될 수 있다.

[0105] **본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드**

[0106] 본 발명의 방법은 선택적인 혼성화 조건 하에서 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 단리된 핵산을 사용한다. 따라서, 이러한 실시 형태의 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 단리하고/하거나, 검출하고/하거나, 정량화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장의 클론을 동정하거나, 단리하거나, 증폭하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 단리된 cDNA 서열 또는 게놈이거나, 그렇지 않으면 인간 또는 포유류의 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 상보성이다.

[0107] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80%의 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%의 전장 서열, 보다 바람직하게는 적어도 95%의 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 체시를 증가시키도록 정규화될 수 있다. 낮거나 중등의 엄격성 혼성화 조건은 전형적이지만 비배타적으로, 상보성 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중등 및 높은 엄격성 조건은 동일성이 더 큰 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮게 엄격한 조건은 약 70%의 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적인 혼성화를 허용하고 동원성(orthologous) 또는 이원성(paralogous) 서열을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0108] 선택적으로, 폴리뉴클레오티드는 항체의 적어도 일부를 인코딩할 것이다. 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하기 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 문헌[Colligan, 상기 문헌]을 참조한다.

[0109] **핵산의 작제**

[0110] 단리된 핵산은 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술 및/또는 (d) 이들의 조합을 사용하여 제조될 수 있다.

[0111] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 외에도 서열을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위는 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 핵산 내로 삽입될 수 있다. 또한, 번역가능한 서열은 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 핵사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 코딩 서열을 제외하는 본 발명의 핵산은 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터 또는 링커이다.

[0112] 추가의 서열은 클로닝 및/또는 발현에서 이들의 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕거나, 세포 내로의 폴리뉴클레오티드의 도입을 개선하기 위해 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 부가될 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용이 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다)

[0113] **핵산 작제를 위한 재조합 방법**

[0114] RNA, cDNA, 게놈 DNA, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 단리된 핵산 조성물을 본 기술 분야의 당업자에게 알려진 임의의 수의 클로닝 방법을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 엄격한

조건 하에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하기 위해 사용된다. RNA의 단리 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 작제가 당업자에게 잘 알려져 있다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다)

**[0115] 핵산 스크리닝 및 단리 방법**

**[0116]** cDNA 또는 게놈 라이브러리는 본 명세서에 개시된 것과 같이, 본 발명의 방법에 사용되는 폴리뉴클레오티드의 서열에 기초한 프로브를 사용하여 스크리닝될 수 있다. 프로브를 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 혼성화하여, 동일하거나 상이한 유기체 내의 상동 유전자를 단리하는 데 사용할 수 있다. 다양한 정도의 혼성화 엄격성이 검정에 사용될 수 있으며; 혼성화 배지 또는 세척 배지가 엄격할 수 있음을 당업자는 인정할 것이다. 혼성화 조건이 더 엄격해지면, 이중체(duplex)를 형성하기 위해 프로브와 표적 사이의 상보성 정도가 더 커야 한다. 엄격성 정도는 온도, 이온강도, pH 및 포름아미드와 같은 부분 변성 용매의 존재 중 하나 이상에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 혼성화 엄격성은 예를 들어, 포름아미드 농도를 0% 내지 50%의 범위 내에서 조정하여, 반응 용액의 극성을 변경하여 편리하게 변동된다. 검출가능한 결합에 필요한 상보성 정도(서열 동일성)는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 엄격성에 따라 변동될 것이다. 상보성 정도는 최적으로 100%, 또는 70 내지 100%, 또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머에서의 작은 서열 변화는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 엄격성을 감소시켜 보상될 수 있음을 이해해야 한다.

**[0117]** RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있고, 과도한 실험을 실시하지 않으면서, 본 명세서에 제시된 교시 및 지침을 기초로 하여 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

**[0118]** 알려진 DNA 또는 RNA 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 및 관련 증폭 과정(예를 들어, Mullis 등의 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 제4,800,159호, 제4,965,188호; Tabor 등의 제4,795,699호 및 제4,921,794호; Innis의 제5,142,033호; Wilson 등의 제5,122,464호; Innis의 제5,091,310호; Gyllensten 등의 제5,066,584호; Gelfand 등의 제4,889,818호; Silver 등의 제4,994,370호; Biswas의 제4,766,067호; Ringold의 제4,656,134호 참조) 및 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭(Malek 등의 미국 특허 제5,130,238호, 상표명 NASBA)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이들 참고 문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다)

**[0119]** 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술은 본 발명의 방법에 사용되는 폴리뉴클레오티드 서열 및 관련 유전자를 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 또한, PCR 및 다른 시험관 내 증폭 방법은, 예를 들어 발현되는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 클로닝하고, 샘플 내의 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하는 핵산을 제조하거나, 핵산 서열분석 또는 기타 목적에 유용할 수 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 당업자를 지도하기에 충분한 기술의 예는 문헌[Berger, 상기 문헌], 문헌[Sambrook, 상기 문헌], 및 문헌[Ausubel, 상기 문헌]뿐만 아니라 Mullis 등의 미국 특허 제4,683,202호(1987); 및 문헌[Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)]에서 확인된다. 게놈 PCR 증폭을 위한 시판용 키트가 본 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech)를 참조한다. 추가로, 예를 들어, T4 유전자 32 단백질(Boehringer Mannheim)은 긴 PCR 생성물의 수율을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

**[0120] 핵산 작제를 위한 합성 방법**

**[0121]** 본 발명의 방법에 사용되는 단리된 핵산은 또한 알려진 방법에 의해 직접적인 화학적 합성으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel 등, 상기 문헌] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하는데, 이는 상보성 서열과의 혼성화에 의해 또는 단일 가닥을 주형으로서 사용하여 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 당업자라면 DNA의 화학적 합성이 약 100개 이상의 염기의 서열로 제한될 수 있는 반면, 더 긴 서열은 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 얻어질 수 있음을 인식할 것이다.

**[0122] 재조합 발현 카세트**

**[0123]** 본 발명은 핵산을 포함하는 재조합 발현 카세트를 사용한다. 본 발명의 방법에 사용되는 핵산 서열, 예를 들어 항체를 인코딩하는 cDNA 또는 게놈 서열이 적어도 하나의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 재조합 발현 카세트 작제에 사용될 수 있다. 재조합 발현 카세트는 전형적으로 원하는 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 유도하는 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 이중성

프로모터 및 비이종성(즉, 내인성) 프로모터 둘 모두가 핵산의 발현을 유도하는 데 사용될 수 있다.

- [0124] 일부 실시 형태에서, 프로모터, 인핸서 또는 기타 요소로서 작용하는 단리된 핵산이 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향조절하거나 하향조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 비이종성 형태의 적절한 위치(상류, 하류 또는 인트론 내)에 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내 (*in vivo*)에서 또는 시험관내(*in vitro*)에서 변경될 수 있다.
- [0125] **벡터 및 숙주 세포**
- [0126] 본 발명은 또한, 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 재조합 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포, 및 재조합 기술에 의한 하나 이상의 항-IL-23 항체의 생성에 관한 것이다. 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]; 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌]을 참조한다.
- [0127] 폴리뉴클레오티드는 숙주 내에서의 증식을 위해 선택가능한 마커를 함유하는 벡터에 선택적으로 결합될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터가 침전물, 예를 들어 인산칼슘 침전물 내에, 또는 하전된 지질과의 복합체 내에 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 적합한 패키징(packaging) 세포주를 사용하여 시험관내에서 패키징된 후, 숙주 세포 내로 형질도입될 수 있다.
- [0128] DNA 삽입물은 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 작제물은 전사 개시를 위한 부위, 종결을 위한 부위 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사물의 코딩 부분은 바람직하게는 번역될 mRNA의 시작부에서 개시하는 번역 개시 코돈 및 그의 말단부에 적절하게 위치한 종료 코돈(예를 들어, UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 것이며, 포유류 또는 진핵 세포 발현에는 UAA 및 UAG가 바람직하다.
- [0129] 발현 벡터는 바람직하게는 그러나 선택적으로 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함할 것이다. 그러한 마커는, 예를 들어, 진핵 세포 배양을 위한 메토티렉세이트(MTX), 다이하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR, 미국 특허 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 제5,179,017호), 암피실린, 네오마이신(G418), 마이코페놀산, 또는 글루타민 신테타제(GS)(미국 특허 제5,122,464호; 5,770,359; 제5,827,739호) 저항성 유전자, 및 *E. coli* 및 다른 세균 또는 원핵세포에서의 배양을 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 저항성 유전자를 포함하지만 이로 한정되지 않는다(상기 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 전술된 숙주 세포에 적절한 배양 배지 및 조건이 당업계에 알려져 있다. 적절한 벡터는 당업자에게 명백할 것이다. 숙주 세포 내로의 벡터 작제물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 이러한 방법은 문헌[Sambrook, 상기 문헌, 챕터 1-4 및 16-18]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 1, 9, 13, 15, 16]과 같이 당업계에 기재되어 있다.
- [0130] 본 발명의 방법에 사용되는 적어도 하나의 항체는 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있고, 분비 신호뿐만 아니라 추가의 이종성 기능 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 정제 동안, 또는 후속 취급 및 저장 동안 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선하기 위해 항체의 N-말단에 부가될 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티가 정제를 용이하게 하기 위해 본 발명의 항체에 부가될 수 있다. 그러한 영역은 항체 또는 적어도 하나의 이의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Sambrook, 상기 문헌, 챕터 17.29-17.42 및 18.1-18.74]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, 챕터 16, 17, 및 18]에 기재되어 있다.
- [0131] 당업자는 본 발명의 방법에 사용되는 단백질을 인코딩하는 핵산의 발현에 이용가능한 많은 발현 시스템에 대해 잘 알고 있다. 대안적으로, 핵산은 항체를 인코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포 내에서 (조작에 의해) 턴온(turn on)하여 숙주 세포 내에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호 및 제5,733,761호에 기재되어 있는 바와 같이 당업계에 알려져 있다.
- [0132] 항체, 이의 특정 부분 또는 변이체의 생성에 유용한 세포는 포유류 세포를 포함한다. 포유류 세포 시스템은 종종 세포의 단층의 형태로 배양될 것이지만, 세포는 또한, 예를 들어 진탕 플라스크 또는 생물반응기 내에서, 부유 상태로 성장하도록 조정될 수 있다. 온전한 글리코실화 단백질을 발현할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당업계에 개발되어 있고, 예를 들어 COS-1(예를 들어, ATCC® CRL1650), COS-7(예를 들어, ATCC® CRL-1651), HEK293, BHK21(예를 들어, ATCC® CCL-10), BSC-1(예를 들어, ATCC® CCL-26), 중국 햄스터 난소(CHO),

Hep G2, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, HeLa 세포 등을 포함하며, 이들은, 예를 들어 미국 버지니아주 매나서스 소재의 American Type Culture Collection(www. atcc.org)으로부터 용이하게 입수가 가능하다. 소정 실시 형태에서, 숙주 세포는 CHO 세포 및 림프계 기원 세포, 예컨대 골수종 및 림프종 세포, 예를 들어 CHO-K1 세포, P3X63Ag8.653 세포(ATCC® CRL-1580) 및 Sp2/0-Ag14 세포(ATCC® CRL-1581)를 포함한다.

[0133] 이들 세포에 대한 발현 벡터는 하기 발현 제어 서열 중 하나 이상, 비제한적인 예로서 복제 기점; 프로모터(예를 들어, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 5,168,062; 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 제5,266,491호), 하나 이상의 인간 면역글로불린 프로모터; 인헨서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예를 들어, SV40 라지 T Ag 폴리 A 부가 부위), 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., 상기 문헌]; 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]을 참조한다. 본 발명의 핵산 또는 단백질 생성에 유용한 다른 세포가 알려져 있고/있거나, 예를 들어 세포주 및 하이브리도마의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 카탈로그 (www.atcc.org) 또는 다른 공지의 또는 상업 공급원으로부터 이용가능하다.

[0134] 진핵 숙주 세포가 사용될 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결자 서열은 전형적으로 벡터에 통합된다. 종결자 서열의 예는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사물의 정확한 스플라이싱을 위한 서열이 또한 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40으로부터의 VP1 인트론이다 (문헌[Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)]). 추가로, 당업계에서 알려진 바와 같이, 숙주 세포 내의 복제를 조절하는 유전자 서열은 벡터 내로 도입될 수 있다.

[0135] **CHO 세포주**

[0136] 몇몇 다른 포유류 세포주의 이용가능성에도 불구하고, 오늘날 생성되는 대다수의 재조합 치료용 단백질은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 제조된다(문헌[Jayapal KP, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem Eng Prog.* 2007; 103:40-47]; 문헌[Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(8):3451-61]). 이들의 장점은, 예를 들어 부착성 세포로서의 또는 부유 상태로의 견고한 성장, 무혈청 및 화학적으로 한정된 배지에 대한 적응성, 높은 생산성, 및 치료용 재조합 단백질 생성을 위한 규제 승인의 확립된 이력을 포함한다. 이들은 또한 유전자 변형에 매우 적합하며, 세포 형질감염, 재조합 단백질 발현, 및 클론 선택에 대한 방법이 모두 잘 특징규명되어 있다. CHO 세포는 또한 인간-적합성 번역후 변형(human-compatible post-translational modification)을 제공할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "CHO 세포"는, 예를 들어 CHO-DG44, CHO-K1, CHO-M, CHO-S, CHO GS 녹아웃(knockout), 및 이들의 변형 및 유도체를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0137] **CHO 세포에서의 클로닝 및 발현.**

[0138] CHO 세포에서의 발현을 위해 통상적으로 사용되는 하나의 벡터는 pC4이다. 플라스미드 pC4는 플라스미드 pSV2-dhfr(ATCC® 37146)의 유도체이다. 이 플라스미드는 SV40 초기 프로모터의 제어 하에서 마우스 DHFR 유전자를 함유한다. 이들 플라스미드로 형질감염된, 다이하이드로폴레이트 활성이 결여된 중국 햄스터 난소 세포 또는 다른 세포가 화학요법제 메토티렉세이트로 보충된 선택 배지(예를 들어, 알파 마이너스 MEM, 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재의 Life Technologies)중에서 세포를 성장시킴으로써 선택될 수 있다. 메토티렉세이트(MTX)에 대해 저항성인 세포에서 DHFR 유전자의 증폭은 잘 문서화되어 있다(예를 들어, 문헌[F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978)]; 문헌[J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990)]; 및 문헌[M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)] 참조). 증가하는 농도의 MTX 중에서 성장된 세포는 DHFR 유전자의 증폭 결과물로서의 표적 효소인 DHFR을 과다생성함으로써 약물에 저항성을 발현한다. 제2 유전자가 DHFR 유전자에 연결되어 있으면, 그것은 통상 동시증폭되고 과 발현된다. 증폭된 유전자(들)의 1,000개 초과 카피를 운반하는 세포주를 개발하는 데 이 접근법이 사용될 수 있음이 당업계에 알려져 있다. 후속으로, 메토티렉세이트가 추출될 때, 숙주 세포의 하나 이상의 염색체(들)에 통합된 증폭된 유전자를 함유하는 세포주가 수득된다.

[0139] 플라스미드 pC4는 관심 유전자를 발현하기 위하여 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus)의 긴 말단 반복부(LTR)의 강한 프로모터(문헌[Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)]) + 인간 거대세포바이러스(CMV)의 전초기 유전자의 인헨서로부터 단리된 단편(문헌[Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)])을 함유한다. 프로모터의 하류에는 유전자의 통합을 가능하게 하는 BamHI, XbaI, 및 Asp718 제한 효소 절단 부위가 있다. 이들 클로닝 부위 뒤에, 플라스미드는 래트 프리프로인술린 유전자의 3' 인트론 및 폴리아데닐화 부위를 함유한다. 또한, 다른 고효율 프로모터, 예를 들어 인간 베타-액틴 프로모터, SV40 초기 또는 후기 프로

모터, 또는 다른 레트로바이러스, 예를 들어 HIV 및 HTLV1로부터의 긴 말단 반복부가 발현을 위해 사용될 수 있다. Clontech의 Tet-Off 및 Tet-On 유전자 발현 시스템 및 유사한 시스템이 또한 포유류 세포에서 조절되는 방식으로 단백질을 발현하는 데 사용될 수 있다(문헌[M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)]). mRNA의 폴리아데닐화를 위해, 예를 들어 인간 성장 호르몬 또는 글로빈 유전자로부터의 다른 신호가 마찬가지로 사용될 수 있다. 염색체에 통합된 관심 유전자를 운반하는 안정한 세포주가 또한 선택가능한 마커, 예컨대 gpt, G418, 또는 하이그로마이신으로의 동시-형질감염 시에 선택될 수 있다. 초기에 하나 초과 선택가능한 마커, 예를 들어 G418 + 메토타렉세이트를 사용하는 것이 유리하다.

[0140] **항체의 정제**

[0141] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하지만 이에 한정되지 않는 잘 알려진 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 ("HPLC")도 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 문헌 [Colligan, *Current Protocols in Immunology*] 또는 문헌[*Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 예를 들어, 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10]을 참조한다.

[0142] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 천연 정제된 생성물, 화학적 합성 절차의 생성물, 및 예를 들어 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함하는 진핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물을 포함한다. 재조합 생성 절차에 사용된 숙주에 따라, 항체는 글리코실화되거나 비-글리코실화될 수 있고, 글리코실화가 바람직하다. 이러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Sambrook, *상기 문헌*, 섹션 17.37-17.42]; 문헌 [Ausubel, *상기 문헌*, 챕터 10, 12, 13, 16, 18, 및 20], 문헌[Colligan, *Protein Science*, *상기 문헌*, 챕터 12-14]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0143] **항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체**

[0144] 본 발명에 따른 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 면역글로불린 분자의 적어도 일부, 비제한적인 예로서, 하나 이상의 리간드 결합 부분 (LBP), 비제한적인 예로서, 중쇄 또는 경쇄의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 프레임워크 영역 (예를 들어, FR1, FR2, FR3, FR4 또는 이의 단편, 선택적으로 하나 이상의 치환, 삽입 또는 결실을 추가로 포함함), 중쇄 또는 경쇄 불변 영역 (예를 들어, 하나 이상의 C<sub>H</sub>1, 힌지1, 힌지2, 힌지3, 힌지4, C<sub>H</sub>2 또는 C<sub>H</sub>3, 또는 이의 단편을 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 치환, 삽입 또는 결실을 추가로 포함함), 또는 이의 임의의 부분을 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함하며, 이는 항체 내로 도입될 수 있다. 항체는 인간, 마우스, 토끼, 래트, 설치류, 영장류, 또는 이의 임의의 조합 등과 같으나 이에 한정되지 않는 임의의 포유류를 포함하거나 이로부터 유래될 수 있다.

[0145] 본 발명의 방법에 사용되는 단리된 항체는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는, 본 명세서에 개시된 항체 아미노산 서열, 또는 임의의 단리되거나 제조된 항체를 포함한다. 바람직하게는, 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 결합하고, 이에 의해 부분적으로 또는 실질적으로 단백질의 하나 이상의 생물학적 활성을 중화시킨다. 하나 이상의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 단백질 또는 단편의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 바람직하게는 실질적으로 중화시키는 항체, 이의 특정 부분, 또는 변이체는 단백질 또는 단편에 결합함으로써, IL-12 및/또는 IL-23 수용체에 대한 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23의 결합을 통해 또는 다른 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23-의존성 또는 매개 기전을 통해 매개되는 활성을 억제할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중화 항체"는 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23-의존성 활성을 검정에 따라 약 20 내지 120%, 바람직하게는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 또는 그 이상으로 억제할 수 있는 항체를 말한다. IL-12/IL-23p40 또는 IL-23-의존성 활성을 억제하는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체의 능력은 바람직하게는 본 명세서에 기재되고/되거나 당업계에 알려진 바와 같이, 하나 이상의 적합한 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 단백질 또는 수용체 검정에 의해 평가된다. 인간 항체는 임의의 종류 (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등) 또는 동종형일 수 있고, 카파 또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 인간 항체는 IgG 중쇄 또는 정의된 단편, 예를 들어, 동종형, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 하나 이상을 포함한다 (예를 들어,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3,  $\gamma$ 4). 이러한 유형의 항체는, 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 하나 이상의 인간 경쇄 (예를 들어, IgG, IgA 및 IgM) 도입유전자를 포함하는 유전자도입 마우스 또는 다른 유전자도입 비인간 포유류를 사용

함으로써 제조될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 항-IL-23 인간 항체는 IgG1 중쇄 및 IgG1 경쇄를 포함한다.

- [0146] 항체는 하나 이상의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 단백질, 하위단위는, 단편, 부분, 또는 이들의 임의의 조합에 특이적인 하나 이상의 특정 에피토프에 결합한다. 하나 이상의 에피토프는 단백질의 적어도 하나의 부분을 포함하는 하나 이상의 항체 결합 영역을 포함하고, 에피토프는 바람직하게는 상기 단백질의 하나 이상의 세포외, 가용성, 친수성, 외부 또는 세포질 부분으로 이루어진다.
- [0147] 일반적으로, 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 적어도 하나의 중쇄 가변 영역의 적어도 하나의 인간 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 또는 변이체 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역의 적어도 하나의 인간 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 또는 변이체를 포함하는 항원-결합 영역을 포함할 것이다. CDR 서열은 인간 생식세포 계열 서열로부터 유래되거나, 인간 생식세포 계열 서열과 거의 일치할 수 있다 예를 들어, 원래 비인간 CDR로부터 유래된 합성 라이브러리로부터의 CDR을 사용할 수 있다. 이러한 CDR은 원래 비인간 서열로부터의 보존적 치환의 도입에 의해 형성될 수 있다. 다른 특정 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 부분 또는 변이체는 상응하는 CDR 1, 2 및/또는 3의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 경쇄 CDR(즉, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3)의 적어도 일부분을 포함하는 항원-결합 영역을 가질 수 있다.
- [0148] 그러한 항체는, 종래의 기법을 사용하여 항체의 다양한 부분들(예를 들어, CDR, 프레임워크)을 함께 화학적으로 연결하거나, 제조용 DNA 기술의 종래 기법을 사용하여 항체를 인코딩하는 (하나 이상의) 핵산 분자를 제조하고 발현시키거나, 임의의 다른 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0149] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체는 정의된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시 형태에서, 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함한다. 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체는 또한 정의된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시 형태에서, 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함한다. 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 결합하고 정의된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체는 적합한 방법, 예컨대 파지 디스플레이(문헌[Katsube, Y., et al., *Int J Mol. Med*, 1(5):863-868 (1998)]) 또는 당업계에 공지되고/되거나 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자도입 동물을 사용하는 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 도입유전자 및 기능적으로 재배열될 수 있는 인간 면역글로불린 경쇄 유전자로부터의 DNA를 포함하는 도입유전자를 포함하는 유전자도입 마우스를 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 또는 이의 단편으로 면역화하여 항체의 생성을 유도할 수 있다. 필요한 경우, 항체 생성 세포가 단리될 수 있고, 하이브리도마 또는 다른 불멸화 항체-생성 세포는 본 명세서에 기재된 및/또는 당업계에 알려진 바와 같이 제조될 수 있다. 대안적으로, 항체, 특정 부분 또는 변이체는 적합한 숙주 세포에서 코딩 핵산 또는 이의 일부를 사용하여 발현될 수 있다.
- [0150] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항체, 항원-결합 단편, 면역글로불린 사슬 및 CDR에 관한 것이다. 바람직하게는, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편 및 이러한 사슬 또는 CDR을 포함하는 항체는 고친화도(예를 들어, 약  $10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ )로 인간 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23에 결합할 수 있다. 본 명세서에 기재된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환 및 아미노산 결실 및/또는 삽입을 포함하는 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 제1 아미노산의 것과 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성 (예를 들어, 전하, 구조, 극성, 소수성/친수성)을 갖는 제2 아미노산에 의한 제1 아미노산의 대체를 말한다. 보존적 치환은 하기 그룹의 하나의 아미노산의 다른 아미노산에 의한 대체를 제한 없이 포함한다: 라이신 (K), 아르기닌 (R) 및 히스티딘 (H); 아스파르테이트 (D) 및 글루타메이트 (E); 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q), 세린 (S), 트레오닌 (T), 티로신 (Y), K, R, H, D 및 E; 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 아이소류신 (I), 프롤린 (P), 페닐알라닌 (F), 트립토판 (W), 메티오닌 (M), 시스테인 (C) 및 글리신 (G); F, W 및 Y; C, S 및 T.
- [0151] **아미노산 코드**
- [0152] 본 발명의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 구성하는 아미노산은 종종 약어로 표시된다. 아미노산 표기는 본 기술 분야에서 잘 이해되는 바와 같이 아미노산을 이의 1-문자 코드, 이의 3-문자 코드, 명칭, 또는 3 뉴클레오티드 코돈(들)에 의해 지정함으로써 표시될 수 있다 (문헌[Alberts, B., et al., *Molecular Biology of*

The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994] 참조):

1-문자 코드	3-문자 코드	명칭	3 뉴클레오티드 코돈(들)
A	Ala	알라닌	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	시스테인	UGC, UGU
D	Asp	아스파르트산	GAC, GAU
E	Glu	글루탐산	GAA, GAG
F	Phe	페닐알라닌	UUC, UUU
G	Gly	글리신	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	히스티딘	CAC, CAU
I	Ile	아이소류신	AUA, AUC, AUU
K	Lys	라이신	AAA, AAG
L	Leu	류신	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	메티오닌	AUG
N	Asn	아스파라긴	AAC, AAU
P	Pro	프롤린	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	글루타민	CAA, CAG
R	Arg	아르기닌	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	세린	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	트레오닌	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	발린	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	트립토판	UGG
Y	Tyr	티로신	UAC, UAU

[0153]

[0154] 서열

[0155] 예시적인 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 중쇄 1(CDRH1)의 아미노산 서열 - STELARA®(우스테키누맙)

[0156] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 중쇄 1(CDRH1)의 아미노산 서열: (서열 번호 1)

[0157] TYWLG

[0158] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 중쇄 2(CDRH2)의 아미노산 서열: (서열 번호 2)

[0159] IMSPVSDIRYSPSFQG

[0160] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 중쇄 3(CDRH3)의 아미노산 서열: (서열 번호 3)

[0161] RRPQGQYFDF

[0162] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 경쇄 1(CDRL1)의 아미노산 서열: (서열 번호 4)

[0163] RASQGISSWLA

[0164] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 경쇄 2(CDRL2)의 아미노산 서열: (서열 번호 5)

[0165] AASSLQS

[0166] 항-IL-12/IL-23p40 항체 상보성 결정 영역 경쇄 3(CDRL3)의 아미노산 서열: (서열 번호 6)

[0167] QQYNIYPYT



- [0168] 항-IL-12/IL-23p40 항체 가변 중쇄 영역의 아미노산 서열(CDR은 밑줄 쳐져 있음): (서열 번호 7)
- [0169] 1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
- [0170] 61 SPSFQGVQTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFWG QGTLVTVSS
- [0171] 항-IL-12/IL-23p40 항체 가변 경쇄 영역의 아미노산 서열(CDR은 밑줄 쳐져 있음): (서열 번호 8)
- [0172] 1 DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS
- [0173] 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKR
- [0174] 항-IL-12/IL-23p40 항체 중쇄의 아미노산 서열(CDR은 밑줄 쳐져 있음): (서열 번호 10)
- [0175] 1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
- [0176] 61 SPSFQGVQTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFWG QGTLVTVSSS
- [0177] 121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSVH TFPVAVLQSSG
- [0178] 181 LYSLSVTV PSSSLGTQTY ICNVNPKPSN TKVDRKVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP
- [0179] 241 SVFLPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
- [0180] 301 TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL
- [0181] 361 TKNQVSLTCL VKGFPYSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
- [0182] 421 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSLSPGK
- [0183] 항-IL-12/IL-23p40 항체 경쇄의 아미노산 서열(CDR은 밑줄 쳐져 있음): (서열 번호 11)
- [0184] 1 DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS
- [0185] 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP
- [0186] 121 SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
- [0187] 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN
- [0188] **아미노산 서열 IL-12**
- [0189] 알파 및 베타 하위단위를 갖는 인간 인터류킨(IL)-12의 아미노산 서열: (서열 번호 9)
- [0190] 1 RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTFEY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV
- [0191] 61 EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN
- [0192] 121 AKLLMDPKRQ IFLDQNLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF
- [0193] 181 RIRAVTIDRV MSYLNASIWE LKQDVYVVEL DWYPDAPGEM VVLTCDTPEE DGITWTLDQS
- [0194] 241 SEVLGSGKTL TIQVKEFGDA GQYTCHKGGE VLSHSLLLH KKEDGIWSTD ILKDQKEPKN
- [0195] 301 KTFRLRCEAKN YSGRFTCWWL TTISTDLTFS VKSSRGSSDP QGVTCGAATL SAERVRGDNK
- [0196] 361 EYEYSVECQE DSACPAEES LPIEVMVDAV HMKLYENYTS SFFIRDI IKP DPPKNLQLKP
- [0197] 421 LKNSRQVEVS WEYPDTWSTP HSYFSLTFCV QVQGKSKREK KDRVFTDKTS ATVICRKNAS
- [0198] 481 ISVRAQDRYY SSSWSEWASV PCS
- [0199] 본 발명의 방법에서 사용되는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 본 명세서에 특정된 바와 같이 천연 돌연변이 또는 인간에 의한 조작된 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다.
- [0200] 숙련자에 의해 생성되는 아미노산 치환의 수는 상기 기재된 것을 포함하는 다수의 인자에 따라 달라진다. 일반적으로 말하면, 임의의 주어진 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체, 단편 또는 변이체에 대한 아미노산 치환, 삽입 또는 결실의 수는 본 명세서에 특정된 바와 같이 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1개 이하, 예를 들어 1 내지 30개 또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값일

것이다.

- [0201] 기능에 필수적인 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체 내의 아미노산을 본 기술 분야에 알려진 방법, 예컨대 부위 지정 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌, 챕터 8, 15]; 문헌[Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989)])에 의해 확인할 수 있다. 후자의 절차는 분자 내의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이어서, 생성된 돌연변이 분자를 하나 이상의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 중화 활성과 같으나 이에 한정되지 않는 생물학적 활성에 대해 시험한다. 항체 결합에 결정적인 부위를 또한 결정화, 핵자기 공명 또는 광친화도 표지화 (문헌[Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992)] 및 문헌[de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)])와 같은 구조 분석에 의해 확인할 수 있다.
- [0202] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 또는 11 중 적어도 하나의 연속 아미노산 중 5개 내지 전부로부터 선택되는 하나 이상의 부분, 서열 또는 조합을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0203] IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 또는 특정 부분 또는 변이체는, 상기 서열 번호의 3 내지 5개 이상의 연속 아미노산; 상기 서열 번호의 5 내지 17개의 연속 아미노산, 상기 서열 번호의 5 내지 10개의 연속 아미노산, 상기 서열 번호의 5 내지 11개의 연속 아미노산, 상기 서열 번호의 5 내지 7개의 연속 아미노산; 상기 서열 번호의 5 내지 9개의 연속 아미노산으로부터 선택된 하나 이상의 부분, 서열, 또는 조합을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0204] 선택적으로, 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 상기 서열 번호의 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119, 108, 449, 또는 214개의 연속 아미노산의 70 내지 100% 중 하나 이상의 폴리펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 면역글로불린 사슬, 또는 이의 일부분(예를 들어 가변 영역, CDR)의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 중 하나 이상의 상응하는 사슬의 아미노산 서열에 대해 약 70 내지 100%의 동일성(예를 들어, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)을 갖는다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 상기 서열 번호의 서열과 비교될 수 있거나, 중쇄 CDR3의 아미노산 서열은 상기 서열 번호와 비교될 수 있다. 바람직하게는, 70 내지 100% 아미노산 동일성(즉, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)은 당업계에 공지된 바와 같이 적합한 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정된다.
- [0205] 당업계에 알려진 바와 같은 "동일성"은 서열을 비교하여 결정되는, 둘 이상의 폴리펩티드 서열 또는 둘 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 관계이다. 당업계에서, "동일성"은 또한 이러한 서열의 스트링 사이의 매치에 의해 결정되는, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 서열 관련도를 의미한다. "동일성" 및 "유사성"은 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; 문헌[Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993]; 문헌[Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; 문헌[Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987]; 및 문헌[Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]; 및 문헌[Carillo, H., and Lipman, D., Siam J. Applied Math., 48:1073 (1988)]에 기재된 것들을 포함하지만 이로 한정되지 않는 알려진 방법에 의해 용이하게 계산할 수 있다. 또한, 동일성 백분율 값은 벡터 NTI 스위트 8.0(Vector NTI Suite 8.0) (미국 메릴랜드주 프레데릭 소재의 Informax)의 얼라인엑스(AlignX) 요소에 대한 디폴트 설정치를 이용하여 생성된 아미노산 및 뉴클레오티드 서열 정렬로부터 얻을 수 있다.
- [0206] 동일성을 결정하는 바람직한 방법은 시험한 서열 사이에서 가장 큰 매치를 제공하도록 설계된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램에 코딩되어 있다. 2개의 서열 사이의 동일성 및 유사성을 결정하는 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCG 프로그램 패키지(문헌[Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)]), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA(문헌[Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)])를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. BLAST X 프로그램은 NCBI 및 다른 공급원으로부터 공개적으로 입수가능하다(문헌[BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI/NIH Bethesda, Md. 20894]; 문헌[Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]). 또한, 잘 알려진 스미스 워트만(Smith Waterman) 알고리즘을 사용하여 동일성을 결정할 수 있다.
- [0207] 폴리펩티드 서열 비교에 바람직한 파라미터는 하기를 포함한다:

- [0208] (1) 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970)] 비교 매트릭스: 문헌 [Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 89:10915-10919 (1992)]으로부터의 BLOSSUM62.
- [0209] 갭 페널티: 12
- [0210] 갭 길이 페널티: 4
- [0211] 이들 파라미터에 유용한 프로그램은 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Genetics Computer Group으로부터의 "갭" 프로그램으로서 공개적으로 입수가 가능하다. 전술한 파라미터는 펩티드 서열 비교를 위한 디폴트 파라미터이다 (말단 갭에 대한 페널티가 없음과 더불어).
- [0212] 폴리뉴클레오티드 비교에 바람직한 파라미터는 하기를 포함한다:
- [0213] (1) 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970)]
- [0214] 비교 매트릭스: 일치=+10, 불일치= 0
- [0215] 갭 페널티: 50
- [0216] 갭 길이 페널티: 3
- [0217] 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Genetics Computer Group으로부터의 "갭" 프로그램으로서 입수가 가능하다. 이들은 핵산 서열 비교를 위한 디폴트 파라미터이다.
- [0218] 예로서, 폴리뉴클레오티드 서열은 다른 서열과 동일할 수 있거나 (즉, 100% 동일), 참조 서열과 비교하여 소정 개수의 뉴클레오티드 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 전이 및 전환을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 변경은 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 발생하거나, 참조 서열 내의 하나 이상의 연속 그룹에서 또는 참조 서열 내의 뉴클레오티드 중에 개별적으로 산재된 이러한 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 뉴클레오티드 변경의 수는 서열 내의 뉴클레오티드의 총수에 각각의 % 동일성의 수치 %를 곱하고(100으로 나눔), 그 곱을 서열 내의 뉴클레오티드의 총수로부터 감산함으로써, 또는 하기 식에 의해 결정된다:
- [0219]  $n.\text{sub}.n.\text{ltorsim}.x.\text{sub}.n -(x.\text{sub}.n.y)$ ,
- [0220] 여기서,  $n.\text{sub}.n$ 은 뉴클레오티드 변경의 수이고,  $x.\text{sub}.n$ 은 서열 내의 뉴클레오티드의 총수이며,  $y$ 는, 예를 들어, 70%에 대해 0.70, 80%에 대해 0.80, 85%에 대해 0.85, 90%에 대해 0.90, 95%에 대해 0.95 등이고, 여기서  $x.\text{sub}.n$ 과  $y$ 의 임의의 비-정수 곱은  $x.\text{sub}.n$ 으로부터 감산하기 전에 가장 가까운 정수로 내림한다.
- [0221] 상기 서열 번호를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변경은 이 코딩 서열에서 넌센스, 미스센스, 또는 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)를 생성함으로써 이러한 변경 후에 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 변경할 수 있다. 유사하게, 폴리펩티드 서열은 상기 서열 번호의 참조 서열과 동일할 수 있거나(즉, 100% 동일함), % 동일성이 100% 미만이도록 참조 서열에 비교하여 그것이 소정 정수 이하의 아미노산 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 하나 이상의 아미노산 결실, 보존적 및 비보존적 치환을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 변경은 참조 폴리펩티드 서열의 아미노- 또는 카르복시 말단 위치에서 발생하거나, 참조 서열 내의 하나 이상의 연속 그룹에서 또는 참조 서열 내의 아미노산 사이에 개별적으로 산재된 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 주어진 % 동일성에 대한 아미노산 변경의 수는 상기 서열 번호의 아미노산의 총수를 각각의 % 동일성의 수치 % (100으로 나눈 값)와 곱한 다음, 상기 서열 번호의 아미노산의 총수로부터 곱을 감산함으로써, 또는 하기 식에 의해 결정된다:
- [0222]  $n.\text{sub}.a.\text{ltorsim}.x.\text{sub}.a-(x.\text{sub}.a.y)$
- [0223] 여기서,  $n.\text{sub}.a$ 는 아미노산 변경의 수이고,  $x.\text{sub}.a$ 는 상기 서열 번호의 아미노산의 총수이며,  $y$ 는 예를 들어, 70%에 대해서는 0.70, 80%에 대해서는 0.80, 85%에 대해서는 0.85 등이고, 정수가 아닌  $x.\text{sub}.a$  및  $y$ 의 곱은  $x.\text{sub}.a$ 로부터 감산하기 전에 가장 가까운 정수로 내림한다.
- [0224] 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 이의 일부분이 상기 서열 번호에 제공된다. 본 발명의 항체 또는 이의 특정 변이체는 본 발명의 항체로부터의 임의의 수의 연속 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며, 그 수는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 내의 10 내지 100%의 연속 잔기의 수로 이루어진 정수의 군으로부터 선택된다. 선택적으로, 연속된 아미노산들의 이러한 하위서열(subsequence)은 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250개 또는 그 이상

의 아미노산 길이 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값이다. 또한, 그러한 하위서열의 개수는 1 내지 20, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 정수일 수 있다.

[0225] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 생물학적으로 활성인 항체를 포함한다. 생물학적으로 활성인 항체는 천연(비-합성) 내인성이거나 관련되고 공지된 항체의 적어도 20%, 30%, 또는 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 또는 70%, 가장 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 또는 95% 내지 100%, 또는 그 이상 (제한 없이 최대 10배의 비활성도(specific activity)를 포함함)의 비활성도를 갖는다. 효소 활성 및 기질 특이성을 검정하는 방법 및 정량화하는 수단이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0226] 다른 태양에서, 본 발명은 유기 모이어티의 공유 부착에 의해 변형된, 본 명세서에 기재된 인간 항체 및 항원-결합 단편에 관한 것이다. 이러한 변형은 약동학적 특성이 개선된 (예를 들어, 생체내 혈청 반감기 증가) 항체 또는 항원-결합 단편을 생성할 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지형 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 친수성 중합체기는 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있으며, 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르기는 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0227] 본 명세서에 정의된 바와 같이, 용어 "반감기"는 약물(예를 들어, 치료적 항-IL-12/IL-23p40 항체 우스텍키누맙)의 혈장 농도가 1 회의 제거 반감기 후에 절반이 됨을 나타낸다. 따라서, 각각의 후속 반감기에 서, 더 적은 약물이 제거된다. 1 회의 반감기 후에는 체내에 남아 있는 약물의 양은 50%이고 2 회의 반감기 후에는 25% 등이다. 약물의 반감기는 그의 제거 및 분포 부피에 따라 달라진다. 제거 반감기는 체내의 약물의 양에 독립적인 것으로 간주된다.

[0228] 변형된 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접 또는 간접적으로 공유결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 결합되는 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산"은 모노-카르복실산 및 다이-카르복실산을 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "친수성 중합체기"는 옥탄 중에서 보다 물 중에서 더 가용성인 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리아이신은 옥탄 중에서보다 물 중에서 더 가용성이다. 따라서, 폴리아이신의 공유 부착에 의해 변형된 항체가 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체의 변형에 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 예를 들어 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등), 탄수화물 (예를 들어, 텍스트란, 셀룰로스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예를 들어, 폴리아이신, 폴리아르기닌, 폴리아스파르테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 (예를 들어, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 실체(entity)로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 예를 들어, PEG<sub>5000</sub> 및 PEG<sub>20,000</sub> (이때, 아래첨자는 중합체의 평균 분자량 (달톤)임)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체기는 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환된 친수성 중합체를 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 아민기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트와 커플링될 수 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트(예를 들어, N,N-카르보닐 다이이미다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 하이드록실기와 커플링될 수 있다.

[0229] 본 발명의 항체의 변형에 적합한 지방산과 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나, 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 발명의 항체를 변형시키기에 적합한 지방산은, 예를 들어 n-도데카노에이트(C<sub>12</sub>, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C<sub>14</sub>, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C<sub>18</sub>, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C<sub>20</sub>, 아라키데이트), n-도코사노에이트(C<sub>22</sub>, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트(C<sub>30</sub>), n-테트라콘타노에이트(C<sub>40</sub>), 시스-Δ<sup>9</sup>-옥타데카노에이트(C<sub>18</sub>, 올레에이트), 모든 시스-Δ<sup>5,8,11,14</sup>-에이코사테트라에노에이트(C<sub>20</sub>, 아라키도네이트), 옥탄다이오산, 테트라데칸다이오산, 옥타데칸다이오산, 도코산다이오산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르에는 선형 또는 분지형 저급 알킬기 포함하는 다이카르복실산의 모노-에스테르가 포함된다. 저급 알킬기는 1 내지 약 12개, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0230] 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "변형제"는 활성화기를 포함하는 적합한 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 지칭한다. "활성화기"는 적절한 조건 하에 제2 화학과 반응

하여 변형제와 제2 화학기 사이의 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화기에는 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시석신 이미딜 에스테르 (NHS) 등과 같은 친전자성 기가 포함된다. 티올과 반응할 수 있는 활성화기에는, 예를 들어 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴롤일, 피리딜 다이설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등이 포함된다. 알데하이드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자와 커플링될 수 있고, 아지드기는 3가 인산기와 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포리미드 결합을 형성할 수 있다. 활성화기를 분자 내로 도입하기에 적합한 방법은 본 기술 분야에 알려져 있다 (예를 들어, 문헌[Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]을 참조한다). 활성화기는 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접 결합되거나, 링커 모이어티, 예를 들어 2가 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>12</sub> 기 (이때, 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 또는 황과 같은 헤테로원자에 의해 대체될 수 있음)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티에는, 예를 들어, 테트라에틸렌 글리콜,  $-(CH_2)_3-$ ,  $-NH-(CH_2)_6-NH-$ ,  $-(CH_2)_2-NH-$  및  $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 가 포함된다. 예를 들어, 모노-Boc-알킬다이아민 (예를 들어, 모노-Boc-에틸렌다이아민, 모노-Boc-다이아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이이미드 (EDC)의 존재 하에 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 링커 모이어티를 포함하는 변형제를 제조할 수 있다. 기재된 바와 같이, 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나, 말레산 무수물과 반응시키고 생성되는 생성물을 환화하여 지방산의 활성화 말레이미도 유도체를 제조할 수 있는 1차 아민을 노출시키기 위해, 트라이플루오로아세트산 (TFA)으로 처리함으로써 생성물로부터 Boc 보호기를 제거할 수 있다. (예를 들어, 전체 교시 내용이 본 명세서에 참고로 포함되는, 국제특허 공개 WO 92/16221호 (Thompson 등)를 참조한다.)

[0231] 변형된 항체는 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 변형제와 반응시켜 제조될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민-반응성 변형제, 예를 들어 PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 부위 비특이적 방식으로 항체에 결합될 수 있다. 변형된 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 이황화물 결합 (예를 들어, 사슬내 이황화물 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편을 티올-반응성 변형제와 반응시켜 본 발명의 변형된 항체를 제조할 수 있다. 본 발명의 항체의 특이적인 부위에 결합하는 유기 모이어티를 포함하는 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예컨대 역 단백질 분해(reverse proteolysis)(문헌[Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992)]; 문헌[Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994)]; 문헌[Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997)]; 문헌[Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996)]; 문헌[Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)], 및 문헌[Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0232] 본 발명의 방법은 또한 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 그 이상 포함하는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 조성물을 사용하며, 이는 비-천연 발생 조성물, 혼합물 또는 형태로 제공된다. 이러한 조성물은 상기 서열 번호의 연속 아미노산의 70 내지 100%, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체로 이루어진 균으로부터 선택되는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 아미노산 서열의 1개 또는 2개 이상의 전장 C- 및/또는 N-말단 결실 변이체, 도메인, 단편, 또는 특정 변이체를 포함하는 비-천연 발생 조성물을 포함한다. 바람직한 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 조성물은 본 명세서에 기재된 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 서열의 하나 이상의 CDR 또는 LBP 함유 부분으로서 1개 또는 2개 이상의 전장, 단편, 도메인, 또는 변이체, 예를 들어, 상기 서열 번호의 70 내지 100%, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체를 포함한다. 추가로 바람직한 조성물은, 예를 들어, 상기 서열 번호 등의 70 내지 100%, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체 중 하나 이상의 40 내지 99%를 포함한다. 이러한 조성 비율은 당업계에 공지되거나 본 발명에 기재된 바와 같이, 액체 또는 무수 용액, 혼합물, 현탁액, 에멀전, 입자, 분말 또는 콜로이드로서 중량, 부피, 농도, 몰농도, 몰랄 농도를 기준으로 한 것이다.

[0233] 치료적으로 활성인 성분을 추가로 포함하는 항체 조성물

[0234] 본 발명의 방법에 사용되는 항체 조성물은 선택적으로 항감염약, 심혈관 (CV)계 약물, 중추신경계 (CNS) 약물, 자율신경계 (ANS) 약물, 기도 약물, 위장 (GI)관 약물, 호르몬 약물, 체액 또는 전해질 균형을 위한 약물, 혈액 약물, 항신생물제, 면역조절 약물, 눈, 귀 또는 코 사용을 위한 약물, 국소 약물, 영양제 약물 등 중의 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물 또는 단백질의 유효량을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 제시

된 각각에 대한 제형, 적응증, 용법, 및 투여를 포함하여, 이러한 약물은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001]; 문헌[Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ]; 문헌[Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT] 참조, 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).

[0235] 본 발명의 방법의 항체와 배합할 수 있는 약물의 예로서, 항-감염성 약물은 살아메바제 또는 적어도 하나의 항원충제, 구충제, 항진균제, 항말라리아제, 항결핵제 또는 적어도 하나의 항나병약, 아미노글리코시드, 페니실린, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 설펜아미드, 플루오로퀴놀론, 항바이러스제, 마크롤리드 항감염제 및 기타 항감염제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 호르몬 약물은 코르티코스테로이드, 안드로겐, 적어도 하나의 단백동화 스테로이드, 에스트로겐 또는 적어도 하나의 프로게스틴, 생식선자극호르몬, 항당뇨병 약물 또는 적어도 하나의 글루카곤, 갑상선 호르몬, 갑상선 호르몬 길항제, 뇌하수체 호르몬 및 부갑상선-유사 약물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 세팔로스포린은 세파클로르, 세파드록실, 세파졸린 나트륨, 세프디나르, 세페피메 염산염, 세픽시메, 세프메타졸 나트륨, 세포니시드 나트륨, 세포페라존 나트륨, 세포탁심 나트륨, 세포테탄 이나트륨, 세폭시틴 나트륨, 세프포독심 프록세틸, 세프프로질, 세프타지딤, 세프티부텐, 세프티죽심 나트륨, 세프트리악손 나트륨, 세푸록심 악세틸, 세푸록심 나트륨, 세팔렉신 염산염, 세팔렉신 1수화물, 세프라딘 및 로라카르베프로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0236] 적어도 하나의 코르티코스테로이드는 베타메타손, 베타메타손 아세테이트 또는 베타메타손 나트륨 인산염, 베타메타손 나트륨 인산염, 코르티손 아세테이트, 텍사메타손, 텍사메타손 아세테이트, 텍사메타손 나트륨 인산염, 플루드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 시피오네이트, 하이드로코르티손 나트륨 인산염, 하이드로코르티손 나트륨 석시네이트, 메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 아세테이트, 프레드니솔론 나트륨 인산염, 프레드니솔론 테부테이트, 프레드니손, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드 및 트리암시놀론 다이아세테이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 안드로겐 또는 단백동화 스테로이드는 다나졸, 플루옥시메스테론, 메틸테스토스테론, 난드로론 데카노에이트, 난드로론 펜프로피오네이트, 테스토스테론, 테스토스테론 시피오네이트, 테스토스테론 에난테이트, 테스토스테론 프로피오네이트 및 테스토스테론 경피 시스템으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0237] 적어도 하나의 면역억제제는 아자티오프린, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙, 림프구 면역 글로불린, 뮤로모납-CD3, 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀레이트 모페틸 염산염, 시롤리무스, 6-메르캅토프린, 메토티렉세이트, 미조리빈, 및 타크롤리무스로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0238] 적어도 하나의 국소 항-감염제는 아시클로비르, 암포테리신 B, 아젤라산 크림, 바시트라신, 부토코나졸 니트레이트, 클린다마이신 인산염, 글로트리마졸, 에코나졸 니트레이트, 에리트로마이신, 겐타마이신 설페이트, 케토코나졸, 마페니드 아세테이트, 메트로니다졸 (국소용), 미코나졸 니트레이트, 무피로신, 나프티핀 염산염, 네오마이신 설페이트, 니트로푸라존, 니스타틴, 실버 설파디아진, 테르비나핀 염산염, 테르코나졸, 테트라사이클린 염산염, 티오코나졸 및 톨나프테이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 용약 또는 이살충제는 크로타미톤, 린단, 퍼메트린 및 피레트린으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 국소용 코르티코스테로이드는 베타메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 클로베타솔 프로피오네이트, 데소니드, 데속시메타손, 텍사메타손, 텍사메타손 나트륨 인산염, 디플로라손 다이아세테이트, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오시노니드, 플루란드레놀리드, 플루티카손 프로피오네이트, 할시오니드, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 부티레이트, 하이드로코르티손 발레레이트, 모메타손 푸로에이트 및 트리암시놀론 아세토니드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 1098-1136]을 참조한다.)

[0239] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 조성물은 이러한 조절, 치료 또는 요법이 필요한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 접촉되거나 투여되는 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 포함하고, 선택적으로 적어도 하나의 TNF 길항제 (TNF 화학물질 또는 단백질 길항제, TNF 단일클론 또는 다클론 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 (예를 들어, p55, p70 또는 p85) 또는 단편, 이의 융합 폴리펩티드, 또는 소분자 TNF 길항제, 예를 들어 TNF 결합 단백질 I 또는 II (TBP-I 또는 TBP-II), 네렐리몬맙, 인플릭시맙, 에테르나셉트, CDP-571, CDP-870, 아펠리모맙, 레네르셉트 등과 같으나 이에 한정되지 않음), 항류마티즘제 (예를 들어, 메토티렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 티오말레이트, 하이

드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노마이드, 설과살진), 면역제, 면역글로불린, 면역억제제 (예를 들어, 바실릭 시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택되는 적어도 하나를 추가로 포함하는 적어도 하나의 조성물 또는 약제학적 조성물의 임의의 적합하고 유효한 양을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 사이토카인의 비제한적인 예에는 IL-1 내지 IL-23 등 (예를 들어, IL-1, IL-2 등) 중 하나가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 적합한 투여량은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR *Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket *Pharmacopoeia* 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]을 참조하며, 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0240] 본 발명의 방법에 사용되는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 화합물, 조성물 또는 조합물은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 방부제, 애주번트(adjutant) 등과 같지만 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 임의의 적합한 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 보조제가 바람직하다. 이러한 무균 용액의 비제한적인 예 및 제조 방법은 문헌[Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990]과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 문헌에 기재된 바와 같이 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 본 기술 분야에 잘 알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 항-IL-23 항체, 단편, 또는 변이체 조성물의 투여 방식, 용해도, 및/또는 안정성에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 일상적으로 선택될 수 있다.

[0241] 본 조성물에 유용한 약제학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예를 들어, 당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당류를 포함하는 당; 유도체화된 당, 예컨대 알디톨, 알도산, 에스테르화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하지만 이로 한정되지 않으며, 이는 단독으로 또는 조합하여 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%를 차지하면서 개별적으로 또는 조합하여 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 혈청 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴, 카제인 등을 포함한다. 완충 용량에서도 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 바람직한 아미노산은 글리신이다.

[0242] 본 발명에 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는, 예를 들어, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토텍스트린, 텍스트란, 전분 등과 같은 다당류; 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨), 미오이노시톨 등과 같은 알디톨을 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스 및 라피노스이다.

[0243] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 조성물은 완충제 또는 pH 조절제를 또한 포함할 수 있으며; 전형적으로, 완충제는 유기산 또는 유기 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 석신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산 염; 트리스, 트로메타민 염산염 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 발명의 조성물에서 사용하기 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기산 염이다.

[0244] 추가로, 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 조성물은 폴리비닐피롤리돈, 피콜 (중합 당), 텍스트레이트 (예를 들어, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향료, 향미생물제, 감미제, 향산화제, 대전방지제, 계면활성제 (예를 들어, "트윈(TWEEN) 20" 및 "트윈 80"과 같은 폴리소르베이트), 지질 (예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드 (예를 들어, 콜레스테롤) 및 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)와 같은 중합체 부형제/첨가제를 포함할 수 있다.

[0245] 본 발명에 따른 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체, 부분, 또는 변이체 조성물에 사용하기에 적합한 이들 및 추가의 알려진 약제학적 부형제 및/또는 첨가제는, 예를 들어 문헌["*Remington: The Science & Practice of Pharmacy*", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995)], 및 문헌["*Physician's Desk Reference*", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)]에 열거된 바와 같이 본 기술 분야에 알려져 있으며, 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물 (예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제 (예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체 물질이다. 예시적인 담체 분자에는 뮤코다당류, 하이알루론산이 있으며, 이는 관절내 전달에 유용할 수 있다.

[0246] 제형

[0247] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 안정적인 제형을 제공하며, 이는 바람직하게는 염수 또는 선택된 염을 포함하는 인산염 완충제뿐만 아니라, 보존된 용액 및 방부제를 함유하는 제형과, 약제학적 또는 수의학적 용도에 적합한 다용도의 보존된 제형을 포함하고, 약제학적으로 허용되는 제형 내에 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 포함한다. 보존된 제형은 하나 이상의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐머큐릭 니트라이트, 페녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘 (예를 들어, 6수화물), 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 테하이드로아세트산나트륨 및 티메로살, 또는 수성 희석제 중의 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 하나 이상의 공지의 방부제를 함유한다. 임의의 적합한 농도 또는 혼합물, 예를 들어 0.001 내지 5%, 또는 그 범위 내의 임의의 범위 또는 값, 예를 들어 0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 그 범위 내의 임의의 범위 또는 값 (이에 한정되지 않음)이 본 기술 분야에 알려진 바대로 사용될 수 있다. 비제한적인 예는 방부제를 포함하지 않거나, 0.1 내지 2%의 m-크레졸 (예를 들어, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1 내지 3%의 벤질 알코올(예를 들어, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001 내지 0.5%의 티메로살(예를 들어, 0.005, 0.01), 0.001 내지 2.0%의 페놀(예를 들어, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005 내지 1.0%의 알킬파라벤(들)(예를 들어, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 등을 포함한다.

[0248] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 방법은 포장 재료, 및 선택적으로 수성 희석제 중의 규정된 완충제 및/또는 방부제와 함께 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체의 용액을 포함하는 적어도 하나의 바이알을 포함하는 제조 물품을 사용하며, 상기 포장 재료는 이러한 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있음을 표시하는 라벨을 포함한다. 본 발명은 포장 재료, 및 동결건조된 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 포함하는 제1 바이알, 및 규정된 완충제 또는 방부제의 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알을 포함하는 제조 물품을 추가로 사용하고, 상기 포장 재료는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 수성 희석제 중에 재구성하여 24시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있는 용액을 형성하도록 환자에게 지시하는 라벨을 포함한다.

[0249] 본 발명에 따라 사용되는 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 포유류 세포 또는 유전자도입 체제로부터의 것을 포함하는 제조할 수단에 의해 제조될 수 있거나, 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.

[0250] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체의 범위는 재구성시에, 습윤/건조 시스템의 경우, 약 1.0 µg/ml 내지 약 1000 mg/ml 농도를 생성하는 양을 포함하지만, 더 낮거나 높은 농도가 사용가능하고 의도하는 전달 비히클에 좌우되는데, 예를 들어 용액 제형은 경피 패치, 폐, 경점막, 또는 삼투압 또는 마이크로 펌프 방법과는 상이할 것이다.

[0251] 바람직하게는, 선택적으로 수성 희석제는 약제학적으로 허용되는 방부제를 추가로 포함한다. 바람직한 방부제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 테하이드로아세트산나트륨 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함한다. 제형 내에 사용되는 방부제의 농도는 항-미생물 효과를 내기에 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택된 방부제에 좌우되며, 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0252] 다른 부형제, 예를 들어 등장화제, 완충제, 산화방지제 및 보존성 인헨서가 선택적으로 그리고 바람직하게 희석제에 첨가될 수 있다. 글리세린과 같은 등장화제는 공지의 농도에서 통상 사용된다. 생리학적으로 허용되는 완충제는 바람직하게는 향상된 pH 제어를 제공하기 위해 첨가된다. 제형은 약 pH 4 내지 약 pH 10과 같은 넓은 범위의 pH를 포함할 수 있고, 바람직한 범위는 약 pH 5 내지 약 pH 9이며, 가장 바람직한 범위는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 바람직하게는 본 발명의 제형은 약 6.8 내지 약 7.8의 pH를 갖는다. 바람직한 완충제는 인산염 완충제, 가장 바람직하게는 인산나트륨, 특히 인산염 완충 식염수 (PBS)를 포함한다.

[0253] 약제학적으로 허용되는 가용화제, 예를 들어 트윈 20 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레이트), 플루로닉(Pluronic) F68 (폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG (폴리에틸렌 글리콜) 또는 폴



리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉® 폴리올과 같은 비이온성 계면활성제, 다른 블록 공중합체, 및 EDTA 및 EGTA 같은 킬레이트제와 같은 다른 첨가제가 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 선택적으로 첨가될 수 있다. 이러한 첨가제는 펌프 또는 플라스틱 용기가 제형을 투여하기 위해 사용될 경우에 특히 유용하다. 약제학적으로 허용되는 계면활성제의 존재는 단백질 응집 성향을 완화시킨다.

[0254] 제형은 수성 희석제 중의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 데하이드로아세트산나트륨 및 티메로살 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방부제와 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중의 방부제와 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체를 혼합하는 단계를 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 실행한다. 적합한 제형을 제조하기 위해, 예를 들어 완충액 중의 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체의 측정된 양을 원하는 농도의 단백질 및 방부제를 제공하기에 충분한 양의 완충액 중의 원하는 방부제와 배합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0255] 제형은 투명한 용액으로서, 또는 물, 방부제 및/또는 부형제, 바람직하게는 인산염 완충제 및/또는 염수 및 선택된 염을 수성 희석제 중에 함유하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 계획을 제공할 수 있다.

[0256] 본 발명의 제조 물품은 즉시 내지 24시간 또는 그 이상의 범위의 기간에 걸쳐 투여하는 데 유용하다. 따라서, 본 발명에서 청구되는 제조 물품은 환자에게 상당한 이점을 준다. 본 발명의 제형은 선택적으로 약 2°C 내지 약 40°C의 온도에서 안전하게 저장하고 장기간 동안 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있으며, 따라서 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96시간 이상의 기간에 걸쳐 용액이 유지 및/또는 사용될 수 있음을 패키지에 표시하는 것이 가능하다. 보존된 희석제가 사용된 경우, 상기 라벨은 1 내지 12달, 반년, 1년 반 및/또는 2년의 사용을 포함할 수 있다.

[0257] 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체의 용액은 수성 희석제에 적어도 하나의 항체를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 혼합을 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 희석제를 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충액 중의 측정된 양의 적어도 하나의 항체를, 원하는 농도의 단백질 및 선택적으로 방부제 또는 완충제를 제공하기에 충분한 양으로 배합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0258] 청구되는 제품은 투명한 용액으로서, 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알을 이용하여 재구성되는, 동결건조된 하나 이상의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 계획을 제공한다.

[0259] 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알을 이용하여 재구성되는, 동결건조된 하나 이상의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알, 또는 투명한 용액을 약국, 병원, 또는 다른 이러한 기관 및 시설에 제공함으로써, 청구되는 제품을 환자에게 간접적으로 제공할 수 있다. 이 경우 투명한 용액은 1리터 또는 그보다 훨씬 더 큰 크기일 수 있는데, 소량의 적어도 하나의 항체 용액을 1회 또는 다회 회수하여 소량의 바이알에 옮기고, 약국 또는 병원을 통해 고객 및/또는 환자에게 제공할 수 있는 큰 저장고를 제공한다.

[0260] 단일 바이알 시스템을 포함하는 승인된 장치는 용액 전달을 위한 펜-주입기(pen-injector device), 예를 들어 BD Pens, BD Autojector, Humaject, NovoPen, B-D Pen, AutoPen 및 OptiPen, GenotropinPen, Genotronorm Pen, Humatro Pen, Reco-Pen, Roferon Pen, Biojector, Iject, J-tip Needle-Free Injector, Intraject, Medi-Ject, Smartject; 예를 들어, Becton Dickenson (미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, www.bectondickenson.com), Disetronic (스위스 부르그도르프 소재, www.disetronic.com); Bioject (미국 오리건주 포틀랜드 소재, www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (영국 피터보로우 소재, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (미국 미네소타주 미네아폴리스 소재, www.mediject.com)로부터 제조되거나 개발된 것, 및 유사하게 적합한 장치를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 승인된 장치는 HumatroPen® 과 같은 재구성된 용액의 전달을 위한 카트리지에 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜-인젝터 시

시스템을 포함한다. 적합한 다른 장치의 예에는 사전 충전 시린지, 자동 주사기, 니들이 없는 주사기 및 니들이 없는 IV 주입 세트가 포함된다.

- [0261] 상기 제품은 포장 재료를 포함할 수 있다. 포장 재료는 규제 당국이 요구하는 정보 이외에 제품을 사용할 수 있는 조건을 제공한다. 본 발명의 포장 재료는, 적용가능한 경우, 2개의 바이알, 습윤/건조 제품에 대하여 적어도 하나의 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체를 수성 희석제에 재구성하여 용액을 형성하고, 용액을 2 내지 24시간, 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 사용하기 위한 설명서를 환자에게 제공한다. 단일 바이알, 용액 제품, 사전 충전 시린지, 또는 자동 주사기의 경우, 라벨은 상기 용액을 2 내지 24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용할 수 있음을 나타낸다. 제품은 인간의 의약품 용도로 유용하다.
- [0262] 본 발명의 방법에 사용되는 제형은 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체 및 선택된 완충제, 바람직하게는 염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제와 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중에 완충제와 항-IL-23 항체를 혼합하는 단계는 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 실행된다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 적어도 하나의 항체를, 원하는 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기 충분한 양의 수중의 원하는 완충제와 배합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.
- [0263] 본 발명의 방법은 인간 또는 동물 환자에게 투여하기에 유용하고 허용가능한 다양한 제형을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 이러한 약제학적 조성물은 희석제로서 "표준 상태"에서의 물을 그리고 당업자에게 잘 알려진 통상의 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 완충 성분, 예컨대 히스티딘 및 히스티딘 모노하이드로클로라이드 수화물이 먼저 제공된 후, 적절한 비최종 부피의 "표준 상태"에서의 물 희석제, 수크로스 및 폴리소르베이트 80이 첨가될 수 있다. 이어서, 단리된 항체가 첨가될 수 있다. 마지막으로, 약제학적 조성물의 부피는 물을 희석제로 사용하여 "표준 상태" 조건 하에서 원하는 최종 부피로 조정된다. 약제학적 조성물의 제조에 적합한 다수의 다른 방법을 당업자는 인지할 것이다.
- [0264] 약제학적 조성물은 물의 단위 부피당 각 성분의 지시된 질량을 포함하거나, "표준 상태"에서 지시된 pH를 갖는 수용액 또는 현탁액일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "표준 상태"는 25°C +/- 2°C의 온도 및 1 기압의 압력을 의미한다. 용어 "표준 상태"는 당업계에서 기술이 인정한 단일의 온도 또는 압력의 세트를 지칭하기 위해 사용되는 것이 아니라, 대신 기준 "표준 상태" 조건 하에서 특정 조성을 갖는 용액 또는 현탁액을 기술하기 위해 사용되는 온도 및 압력을 명시하는 기준 상태이다. 이는 용액의 부피가 부분적으로 온도와 압력의 함수이기 때문이다. 여기에 개시된 것과 동등한 약제학적 조성물이 다른 온도 및 압력에서 생성될 수 있음을 당업자는 인지할 것이다. 이러한 약제학적 조성물이 여기에 개시된 것과 동등한지 여부는 상기 정의된 "표준 상태" 조건 (예를 들어 25°C +/- 2°C 및 1 기압의 압력) 하에서 결정되어야 한다.
- [0265] 중요하게는, 이러한 약제학적 조성물은 약제학적 조성물 단위 부피당 "약" 소정 값 (예를 들어 "약 0.53 mg의 L-히스티딘")의 성분 질량을 함유할 수 있거나, 약 소정 값의 pH 값을 가질 수 있다. 단리된 항체가 약제학적 조성물에 존재하는 동안, 또는 단리된 항체가 약제학적 조성물로부터 제거된 후에(예를 들어, 희석에 의해), 약제학적 조성물에 존재하는 단리된 항체가 펩티드 사슬에 결합할 수 있는 경우, 약제학적 조성물에 존재하는 성분의 질량 또는 pH 값은 주어진 수치 값에 대해 "약"이다. 달리 말하면, 약제학적 조성물에 단리된 항체를 배치한 후 단리된 항체의 결합 활성이 유지되고 검출될 수 있는 경우, 성분의 질량 값 또는 pH 값과 같은 값은 주어진 수치 값에 대해 "약"이다.
- [0266] 경쟁 결합 분석을 수행하여, IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 mAb가 유사하거나 상이한 에피토프에 결합하는지 및/또는 서로 경쟁하는지를 확인할 수 있다. Ab를 ELISA 플레이트 상에 개별적으로 코팅한다. 경쟁 mAb를 첨가한 후, 비오틴화 hrIL-12 또는 IL-23을 첨가한다. 양성 대조군의 경우, 코팅을 위해 동일한 mAb를 경쟁 mAb로서 사용할 수 있다 ("자기-경쟁"). 스트렙타비딘을 사용하여 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 결합을 검출한다. 이러한 결과는 mAb가 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 상에서 유사하거나 부분적으로 중첩되는 에피토프를 인지하는지 여부를 보여준다.
- [0267] 본 발명의 방법의 일 태양은 하기를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여한다:
- [0268] 약제학적 조성물의 일 실시 형태에서, 단리된 항체 농도는 약제학적 조성물 1 ml 당 약 77 내지 약 104 mg이다. 약제학적 조성물의 다른 실시 형태에서, pH는 약 5.5 내지 약 6.5이다.
- [0269] 안정하거나 보존된 제형은 투명한 용액으로서, 또는 수성 희석제 중에 방부제 또는 완충제 및 부형제를 함유하

는 제2 바이알을 이용하여 재구성되는, 동결건조된 하나 이상의 항-IL-23 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 계획을 제공한다.

[0270] 항-IL-23 항체를 안정화시키는 다른 제형 또는 방법은, 항체를 포함하는 동결건조된 분말의 투명한 용액 이외의 것을 유발할 수 있다. 투명하지 않은 용액 중에는 미립자 현탁액을 포함하는 제형이 있으며, 상기 미립자는 가변 치수의 구조 내에 항-IL-23 항체를 함유하는 조성물이고, 마이크로구체, 마이크로입자, 나노입자, 나노구체, 또는 리포솜으로서 다양하게 알려져 있다. 활성제를 함유하는 상대적으로 균질하고 본질적으로 구형인 이러한 미립자 제형은 미국 특허 제4,589,330호에 교시된 바와 같이, 활성제 및 중합체를 함유하는 수성 상과 비수성 상을 접촉시킨 후, 비수성 상을 증발시켜 수성 상으로부터 입자를 응결시켜 형성될 수 있다. 다공성 마이크로입자는 미국 특허 제4,818,542호에 교시된 바와 같이 연속 용매 중에 분산되어 있는 활성제 및 중합체를 포함하는 제1 상을 사용하고, 동결-건조 또는 희석-추출-침전에 의해 현탁액으로부터 상기 용매를 제거하여 제조될 수 있다. 이러한 제조에 바람직한 중합체는 천연 또는 합성 공중합체 또는 중합체이고, 이는 젤라틴 아가, 전분, 아라비노갈락탄, 알부민, 콜라겐, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산), 폴리(β-하이드록시 부티르산), 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌, 폴리(알킬-2-시아노아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트), 폴리아미드, 폴리(아미노산), 폴리(2-하이드록시에틸 DL-아스파르트amid), 폴리(에스테르 우레아), 폴리(L-페닐알라닌/에틸렌 글리콜/1,6-다이아아소시아나토핵산) 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 중합체는 폴리에스테르, 예를 들어 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산) 및 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산)이다. 중합체 및/또는 활성 물질의 용해에 유용한 용매는 물, 헥사플루오로아이소프로판올, 메틸렌클로라이드, 테트라하이드로푸란, 헥산, 벤젠 또는 헥사플루오로아세톤 세스퀴수화물을 포함한다. 제2 상과 함께 활성 물질을 함유하는 상을 분산시키는 방법은 노즐 내 오리피스를 통해 상기 제1 상에 압력을 가하여 소적 형성에 영향을 주는 단계를 포함할 수 있다.

[0271] 건조 분말 제형은 동결건조 이외의 공정, 예를 들어, 결정질 조성물을 분무 건조시키거나 증발시키거나 침전에 의해 용매를 추출한 후, 수성 또는 비수성 용매를 제거하는 하나 이상의 단계에 의해 수득될 수 있다. 분무 건조된 항체 제제의 제조가 미국 특허 제6,019,968호에 교시되어 있다. 항체-기반 건조 분말 조성물은 흡입할 수 있는 건조 분말을 제공하기 위한 조건 하에서 용매 중의 항체 및 선택적으로 부형제의 용액 또는 슬러리를 분무 건조시켜 제조될 수 있다. 용매는 용이하게 건조될 수 있는 극성 화합물, 예를 들어 물 및 에탄올을 포함할 수 있다. 산소의 부재 하에, 예를 들어, 질소 블랭킷(nitrogen blanket) 하에 또는 건조 기체로서 질소를 사용하여 분무 건조법을 수행하여 항체 안전성을 증진시킬 수 있다. 상대적으로 건조한 다른 제형은 국제특허 공개 WO9916419호에 교시된 바와 같이 전형적으로 하이드로플루오로알칸 추진제를 포함하는 현탁 매질 중에 분산된 복수의 천공된 미세구조물의 분산물이다. 안정화된 분산물을 정량 흡입기를 사용하여 환자의 폐로 투여할 수 있다. 분무 건조된 약제의 상업적 제조에 유용한 장치는 부치 리미티드(Buchi Ltd.) 또는 니로 코포레이션(Niro Corp.)에 의해 제작된다.

[0272] 본 명세서에 기재된 안정하거나 보존된 제형 또는 용액 중의 항-IL-23 항체는 SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 임플란트, 삼투압 펌프, 카트리지, 마이크로펌프, 또는 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 당업자가 인정하는 다른 수단을 포함하는 다양한 전달 방법을 통해 본 발명에 따라 환자에게 투여될 수 있다.

[0273] **치료적 응용**

[0274] 본 발명은 또한, 본 기술 분야에 알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 IL-23 항체를 사용하여, 예를 들어 치료적 유효량의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 특이적 항체를 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 투여하거나 접촉시켜 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 루푸스를 조절 또는 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0275] 본 발명의 임의의 방법은 항-IL-23 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 이러한 조절, 치료, 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 선택적으로 이러한 질병 또는 장애의 치료를 위한 병용 투여 또는 조합 요법을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 하나 이상의 항-IL-23 항체, 이의 특정 부분 또는 변이체를 투여하는 단계는 하나 이상의 TNF 길항제(비제한적인 예를 들어, TNF 화학물질 또는 단백질 길항제, TNF 단일클론 또는 다중클론 항체 또는

단편, 가용성 TNF 수용체(예를 들어, p55, p70, 또는 p85) 또는 이의 단편, 융합 폴리펩티드, 또는 소분자 TNF 길항제, 예를 들어 TNF 결합 단백질 I 또는 II(TBP-I 또는 TBP-II), 네렐리몬맵, 인플릭시맵, 에테르나셉트(Enbrel™), 아달리물랍(Humira™), CDP-571, CDP-870, 아펠리모맵, 레네르셉트 등), 항류머티즘제(예를 들어, 메토트렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노마이드, 설과살진), 근육 이완제, 마약류(narcotic), 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근육 차단제, 항미생물제(예를 들어, 아미노글리코시드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 설펜아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 건선치료제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 작용제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해제, 구토방지제, 항궤양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴(예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티뮴(예를 들어, G-CSF, Neupogen), 사르그라모스티뮴(GM-CSF, Leukine), 면역화, 면역글로불린, 면역억제제(예를 들어, 바실릭시맵, 사이클로스포린, 다클리주맵), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병약, 불안 완화제, 수면제, 교감신경흥분제, 흥분제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파(Pulmozyme), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택되는 하나 이상을 투여하기 전에, 그와 동시에, 및/또는 그 후에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 적합한 투여량은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]; 문헌[Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001]; 문헌[Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ]을 참조하며, 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0276] **치료적 치료**

[0277] 전형적으로, 항-IL-12/23p40 또는 항-IL-23 항체 조성물의 유효량 또는 유효 투여량을 투여하여 루푸스의 치료를 수행하며, 조성물에 함유된 활성제의 비활성도에 따라, 상기 유효량 또는 유효 투여량은 합계가 평균적으로 투여당 항-IL-12/23p40 또는 항-IL-23 항체 약 0.01 내지 500 밀리그램 이상/환자의 킬로그램, 바람직하게는 단일 또는 다중 투여당 항체 약 0.1 내지 100 밀리그램 이상/환자의 킬로그램이다. 대안적으로, 유효 혈청 농도는 단일 또는 다중 투여당 0.1 내지 5000 µg/ml 혈청 농도를 포함할 수 있다. 적합한 투여량이 임상외에게 알려져 있으며, 물론 특정 질병의 상태, 투여되는 조성물의 특정 활성 및 치료할 특정 환자에 따라 달라질 것이다. 일부의 경우, 요구되는 치료량을 달성하기 위해, 반복 투여, 즉 요구되는 일일 용량 또는 효과가 달성 될 때까지 특정 모니터링 또는 계량 용량의 개별적인 투여를 반복하는 것이 필요할 수 있다.

[0278] 바람직한 용량은 선택적으로 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 및/또는 100 내지 500 mg/kg/투여, 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 부분을 포함할 수 있거나, 단일 또는 다중 투여당 혈청 농도 0.1, 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5, 2.9, 3.0, 3.5, 3.9, 4.0, 4.5, 4.9, 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 20, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14.0, 14.5, 4.9, 5.0, 5.5., 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 12, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14, 14.5, 15, 15.5, 15.9, 16, 16.5, 16.9, 17, 17.5, 17.9, 18, 18.5, 18.9, 19, 19.5, 19.9, 20, 20.5, 20.9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 및/또는 5000 µg/ml, 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 부분의 혈청 농도를 달성하도록 하는 양을 포함할 수 있다.

[0279] 대안적으로, 투여되는 투여량은 알려진 인자, 예컨대 특정 작용제의 약력학적 특징, 및 그의 투여 방식 및 경로; 수용자의 연령, 건강, 및 체중; 증상의 성질 및 정도, 병행 치료의 종류, 치료의 빈도, 및 원하는 효과에 따라 변동될 수 있다. 일반적으로, 활성 성분의 투여량은 체중 1 킬로그램당 약 0.1 내지 100 밀리그램일 수

있다. 통상적으로, 0.1 내지 50, 바람직하게는, 0.1 내지 10 밀리그램/킬로그램/투여 또는 지속 방출 형태가 원하는 결과를 얻는 데 효과적이다.

[0280] 비제한적인 예로서, 인간 또는 동물의 치료는 본 발명의 적어도 하나의 항체 0.1 내지 100 mg/kg, 예를 들어 1 일당 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg의 1회 또는 주기적 투여량 으로서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40일 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 또는 추가 적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 또 는 52주 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 또는 추가적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20년 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합에 단일, 주입 또는 반복 용량을 사용 하여 제공될 수 있다.

[0281] 체내 투여에 적합한 투여형(조성물)은 일반적으로 단위 또는 용기당 약 0.001 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유한다. 이러한 약제학적 조성물에서, 활성 성분은 대체로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5 내지 99.999 중량%의 양으로 존재할 것이다.

[0282] 비경구 투여의 경우, 항체는 약제학적으로 허용되는 비경구 비히클과 함께 또는 별도로 제공되는 용액, 현탁액, 에멀전, 입자, 분말 또는 동결건조 분말로서 제형화될 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스 트로스 용액 및 1 내지 10% 인간 혈청 알부민이다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예를 들어 고정유가 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조 분말은 등장성 (예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성 (예를 들어, 완충제 및 방부제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형을 알려진 기술 또는 적합한 기술에 의해 살균시킨다.

[0283] 적합한 약제학적 담체는 본 분야의 표준 참고문헌인 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol]의 최신판에 기재되어 있다.

[0284] **대안적 투여**

[0285] 알려지고 개발된 많은 방식이 본 발명에 따라 약제학적 유효량의 항-IL-23 항체의 투여에 사용될 수 있다. 폐 투여가 하기 설명에서 사용되며, 다른 투여 방식이 적합한 결과를 보이면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체는 흡입 또는 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 다른 방식에 의한 투여에 적합한 임의의 다양한 장치 및 방법을 사용하여, 용액, 에멀전, 콜로이드 또는 현탁액, 또 는 건조 분말로서 담체 중에 전달될 수 있다.

[0286] **비경구 제형 및 투여**

[0287] 비경구 투여를 위한 제형은 통상적인 부형제로서 멸균수 또는 염수, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리 콜, 식물 기원의 오일, 수소화 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사를 위한 수성 또는 유성 현탁액은 알려진 방법에 따라 적당한 유화제 또는 습윤화제 및 현탁제를 사용하여 제조될 수 있다. 주사를 위한 약제는 용매 중 의 수용액, 멸균 주사용 용액 또는 현탁액과 같은 비독성의 비경구 투여가능 희석제일 수 있다. 사용가능한 비 히클 또는 용매로서, 물, 링거액, 등장성 염수 등이 허용되며; 통상의 용매 또는 현탁 용매로서, 멸균 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 천연 또는 합성 또는 반합성 지방 오일 또는 지방산; 천연 또는 합성 또는 반합성 모노- 또는 다이- 또는 트라이-글리세라이드를 포함하는 임의의 종류의 비휘발성 오일 및 지 방산이 사용될 수 있다. 비경구적 투여는 당업계에서 공지되어 있으며, 미국 특허 제5,851,198호에 기재된 기체 가압 무-바늘 주사 장치, 및 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제5,839,446호에 기재된 레이 저 천공 장치와 같은 통상적인 주사 수단을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0288] **대안적 전달**

[0289] 본 발명은 또한 비경구, 피하, 근내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소 뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐 내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질내, 직장, 협측, 설 하, 비강내, 또는 경피 수단에 의한 항-IL-12/IL-23p40 또는 IL-23 항체의 투여에 관한 것이다. 항-IL-12/IL- 23p40 또는 IL-23 항체 조성물은, 특히 액체 용액 또는 현탁액 형태로 비경구(피하, 근육내, 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여에 사용하기 위해; 특히 크림 및 좌약과 같으나 이에 한정되지 않는 반고체 형태로 질 또는 직

장 투여에 사용하기 위해; 정제 또는 캡슐의 형태와 같으나 이에 한정되지 않는 구강 또는 설하; 또는, 분말, 점비제(nasal drop), 또는 에어로졸 또는 소정 작용제의 형태와 같으나 이에 한정되지 않는 비강내; 또는 피부 구조를 변형시키거나 경피 패치 내의 약물 농도를 증가시키기 위한 다이메틸 설펍사이드와 같은 화학적 인핸서를 갖거나(전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement;"Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 Marcel Dekker, Inc. New York 1994]), 단백질 및 펩티드를 함유하는 제형의 피부 상의 적용을 가능하게 하는 산화제(WO 98/53847), 또는 전기천공과 같이 일시적 수송 경로를 생성하거나 이온영동법과 같이 피부를 통해 하전된 약물의 이동성을 증가시키기 위한 전기장의 적용, 또는 음과영동과 같은 초음파의 적용(미국 특허 제4,309,989호 및 제4,767,402호)을 갖는, 겔, 연고, 로션, 현탁액, 또는 패치 전달 시스템과 같지만 이로 한정되지 않는 경피 투여를 위해 제조될 수 있다(상기 간행물 및 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).

[0290] 본 발명을 일반적으로 설명하였지만, 본 발명은 예시를 위해 제공되고 본 발명을 제한하는 것으로서 간주되지 않는 하기 실시예를 참고하여 보다 쉽게 이해될 것이다. 본 발명의 추가의 세부사항이 하기 비제한적인 실시예에 의해 예시된다. 본 명세서의 모든 인용문의 개시 내용은 본 명세서에 참고로 명백히 포함된다.

[0291] **실시예: STELARA®(우스테키누맙)를 생성하기 위한 제조 공정**

[0292] **배경**

[0293] STELARA®(우스테키누맙)는 높은 친화도 및 특이성으로 인간 인터류킨(IL)-12 및 IL-23 사이토카인의 공유 p40 하위단위에 결합하는 완전 인간 G1 카파 단일클론 항체이다. 우스테키누맙은 서열 번호 10의 아미노산 서열의 중쇄 및 서열 번호 11의 아미노산 서열의 경쇄; 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열; 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함한다. IL-12/23p40 하위단위에 대한 우스테키누맙의 결합은 자연 살해 세포 및 CD4<sup>+</sup> T 세포의 표면 상의 IL-12Rβ1 수용체에 대한 IL-12 또는 IL-23의 결합을 차단하여, IL-12- 및 IL-23-특이적 세포내 신호전달 및 후속 활성화 및 사이토카인 생성을 억제한다. IL-12 및 IL-23의 비정상적인 조절은 다수의 면역-매개 질병과 관련되어 있다.

[0294] 지금까지, 우스테키누맙은, 만성 중등도 내지 중도 관상형 건선 및/또는 활성 건선성 관절염, 크론병(CD), 및 궤양성 대장염(UC)을 가진 자들을 포함한 성인 환자의 치료를 위해, 북아메리카, 유럽, 남아메리카, 및 아시아-태평양 지역 내에 있는 국가들을 포함하여 전세계적으로 판매 승인을 받아 왔다. 또한, 우스테키누맙은 활성 전신 홍반성 루푸스(SLE)의 치료를 위한 3상 연구에서 평가된다.

[0295] **제조 공정 개요**

[0296] STELARA®(우스테키누맙)를 연속 관류 세포 배양 후 정제를 포함하는 10-스테이지 공정으로 제조한다. 제조 공정의 개요가 도 1에 제공되어 있다.

[0297] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "배양물", "배양하는", "배양된", 및 "세포 배양물"은 세포 집단의 생존 및/또는 성장에 적합한 조건 하에서 배지 중에 현탁된 세포 집단을 지칭한다. 문맥으로부터 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 명세서에 사용될 때 이들 용어는 또한 세포 집단 및 그러한 집단이 현탁된 배지를 포함하는 조합을 지칭한다. 세포 배양물은, 예를 들어, 배치식, 유가식(fed-batch) 또는 관류 세포 배양 방법 등에 의해 성장된 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 세포 배양물은 포유류 세포 배양물이다.

[0298] 본 발명에 사용하기 위한 세포주는 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포), 인간 배아 신장 세포(HEK 세포), 새끼 햄스터 신장 세포(BHK 세포), 마우스 골수종 세포(예를 들어, NS0 세포 및 Sp2/0 세포), 및 인간 망막 세포(예를 들어, PER.C6 세포)를 포함하지만 이로 한정되지 않는 포유류 세포주를 포함한다.

[0299] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "화학적으로 한정된 배지", "화학적으로 한정된 배지들", "화학적으로 한정된 하이브리도마 배지", 또는 "화학적으로 한정된 하이브리도마 배지들"은 모든 성분들의 정체 및 농도가 알려진 합성 성장 배지를 지칭한다. 화학적으로 한정된 배지는 세균, 효모, 동물, 또는 식물 추출물, 동물 혈청 또는 혈장을 함유하지 않지만, 이들은 개별 식물 또는 동물-유래 성분(예를 들어, 단백질, 폴리펩티드 등)을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 화학적으로 한정된 배지는 성장을 지원하는 데 필요한 무기 염, 예컨대 인산염, 황산염 등을 함유할 수 있다. 탄소원은 한정되며, 통상 당, 예컨대 글루코스, 락토스, 갈락토스 등, 또는 다른 화합물, 예컨대 글리세롤, 락테이트, 아세테이트 등이다. 소정의 화학적으로 한정된 배지는 또한 완충액으로서 인산염을 사용하지만, 시트르산염, 트라이에탄올아민 등과 같은 다른 완충액이 사용될 수

있다. 구매가능한 화학적으로 한정된 배지의 예에는 ThermoFisher의 CD 하이브리도마 배지(Hybridoma Medium) 및 CD 하이브리도마 AGT™ 배지, 다양한 돌베코 변형 이글(Dulbecco's Modified Eagle, DME) 배지(Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), 햄의 영양 혼합물(Ham's Nutrient Mixture) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), 이들의 조합 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 화학적으로 한정된 배지를 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,171,825호 및 제6,936,441호, 국제 특허 출원 공개 WO 2007/077217호, 및 미국 특허 출원 공개 제2008/0009040호 및 제2007/0212770호에 알려져 있다.

[0300] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "생물반응기"는 세포 배양물의 성장에 유용한 임의의 베셀(vessel)을 지칭한다. 생물반응기는 세포의 배양에 유용한 한 임의의 크기일 수 있다. 소정 실시 형태에서, 그러한 세포는 포유류 세포이다. 전형적으로, 생물반응기는 적어도 1 리터일 것이며, 10, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000 리터 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 부피일 수 있다. pH 및 온도를 포함하지만 이로 한정되지 않는 생물반응기의 내부 조건은 배양 기간 동안 선택적으로 제어된다. 생물반응기는 본 발명의 배양 조건 하에서 배지 중에 현탁된 포유류 세포 배양물을 유지하기에 적합한 임의의 재료로 구성될 수 있으며, 이러한 재료에는 유리, 플라스틱 또는 금속이 포함된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "생성용 생물반응기(production bioreactor)"는 관심 폴리펩티드 또는 당단백질의 생성에 사용되는 최종 생물반응기를 지칭한다. 생성용 생물반응기의 부피는 전형적으로 적어도 500 리터이며, 1,000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000 리터 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 부피일 수 있다. 당업자는 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적합한 생물반응기를 인식할 것이며 선택할 수 있을 것이다.

[0301] 우스테키누맙의 전배양, 증폭, 및 생성이 스테이지 1 및 스테이지 2에서 수행된다. 스테이지 1에서는, 우스테키누맙의 HC 및 LC 서열을 발현하는 형질감염된 Sp2/0 세포의 하나 이상의 작업 세포 배양 탱크 바이알로부터 전배양을 개시하고, 배양 플라스크, 일회용 배양 백, 및 100 L 시드 생물반응기에서 증폭시킨다. 500 L 생성용 생물반응기의 접종에 필요한 세포 밀도 및 부피가 얻어질 때까지 세포를 배양한다. 스테이지 2에서는, 세포 배양물을 교번 접선 유동(alternating tangential flow, ATF) 중공 섬유 필터 세포 채류 시스템을 사용하는 500 L 생성용 생물반응기에서 관류시킨다. 세포 배양 투과물(수확물(harvest))을 ATF 시스템으로부터 수집하며, 한편 세포는 생물반응기 내에 채류시키고, 배양물을 신선한 배지로 보충한다. 스테이지 3에서는, 하나 이상의 500 L 생성용 생물반응기로부터의 수확물을 합할 수 있다. 수확물을 MabSelect 단백질 A 수지 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제한다. 생성된 직접 생성물 포획(DPC) 용리액을 추가의 처리 시까지 동결시킨다.

[0302] DPC로부터의 우스테키누맙의 정제를 스테이지 4부터 스테이지 8까지에서, 이온 교환 크로마토그래피 단계 및 잠재적인 바이러스 오염을 불활성화시키거나 제거하는 다른 단계(용매/세제[S/D] 처리 및 바이러스 제거 여과)에 의해 수행한다. 스테이지 4에서는, DPC 용리액을 해동시키고, 폴딩하고, 여과하고, 스테이지 5에서는 트라이-n-부틸 포스페이트(TNBP) 및 폴리소르베이트 80 S/D 처리제와 함께 인큐베이션하여, 존재하는 임의의 지질-외피 보유 바이러스를 불활성화시킨다. 스테이지 6에서는, TNBP 및 폴리소르베이트 80 시약, 응집제, 및 불순물을 SPXL® 세파로스 양이온 교환 수지 크로마토그래피를 사용하여 우스테키누맙으로부터 제거한다. 스테이지 7에서는, 우스테키누맙을 QXL® 세파로스 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하여 DNA, 바이러스, 및 불순물을 제거한다. 스테이지 8에서는, 정제된 우스테키누맙을 회석시키고, 바이러스 채류용 필터(virus retentive filter)(NFP®)를 통해 여과한다.

[0303] 스테이지 9 및 스테이지 10에서는 각각 우스테키누맙 예비제형화된 벌크(PFB) 및 제형화된 벌크(FB)의 제조를 수행한다. 스테이지 9에서, 한외여과 단계는 우스테키누맙을 농축시키고, 투석여과 단계는 제형화 부형제를 첨가하여 공정중 완충액 염을 제거한다. 스테이지 10에서는, 폴리소르베이트 80을 우스테키누맙 PFB에 첨가하여 FB를 얻는다. FB를 동결 저장을 위해 폴리카르보네이트 용기 내로 여과한다. 동결된 FB를 약물 제품 제조 현장으로의 수송을 위해 드라이 아이스를 갖는 단열 용기 내에 패키징한다.

[0304] **대규모 제조 공정에서의 세포 배양에 대한 상세한 설명**

[0305] **스테이지 1**

[0306] **전배양 및 증폭**

[0307] 우스테키누맙의 생성에서의 제1 스테이지는 우스테키누맙의 HC 및 LC 서열을 발현하는 형질감염된 Sp2/0 세포의 작업 세포 배양 탱크(WCB) 바이알로부터의 전배양의 개시 및 배양 플라스크, 일회용 배양 백, 및 100 L 시드 생물반응기 내에서의 증폭이다. 500 L 생성용 생물반응기의 접종에 필요한 세포 밀도 및 부피가 얻어질 때까지 세포를 배양한다. 전배양 및 증폭 공정을 나타낸 흐름도가 도 2에 제공되어 있다.

[0308] **제조 절차**

[0309] WCB의 하나 이상의 동결보존된 바이알을 해동시키고, 6 mM L-글루타민, 0.5 mg/L 마이코페놀산, 2.5 mg/L 하이포잔틴, 및 50 mg/L 잔틴이 보충된 CD(화학적으로 한정된) 하이브리도마 배지(CDH-A)로 희석시킨다. 배양 생존력은  $\geq 45\%$ 이어야 한다. 세포를 배양 플라스크 내의 CDH-A를 사용하여 0.2 내지  $0.5 \times 10^6$ 개의 생존가능 세포(VC)/mL의 시딩 밀도로 추가로 희석시킨다. 전배양물은 가슴된 CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 유지되는데, 이때 온도, CO<sub>2</sub> 농도, 및 교반은 배치 기록에 규정된 범위 이내로 제어된다. 전배양물을  $\geq 0.6 \times 10^6$ 개의 VC/mL의 최소 세포 밀도 및  $\geq 50\%$ 의 배양 생존력이 얻어질 때까지  $\leq 3$ 일 동안 인큐베이션한다. 전배양물을 일련의 배양 플라스크, 및 이어서 100 L 시드 생물반응기의 접종을 위해 스케일 업하기 위한 메커니즘으로서의 배양 백 내에서 순차적으로 증폭시킨다. 배양 증폭 단계 동안, 매 인큐베이션 단계마다 계대배양 조건을 달성하는 데  $\leq 3$ 일의 시간이 걸리며, 이때 계대배양 조건은  $\geq 0.6 \times 10^6$ 개의 VC/mL의 세포 밀도 및  $\geq 80\%$ 의 배양 생존력을 필요로 한다. 각각의 계대배양물에 대한 시딩 밀도는 배양 플라스크에서는 0.2 내지  $0.5 \times 10^6$ 개의 VC/mL이고, 배양 백에서는 0.2 내지  $0.6 \times 10^6$ 개의 VC/mL이다. 매 계대마다 계대배양물을 생존가능 세포 밀도(VCD), 배양 생존력, 및 현미경 검사를 위해 샘플링한다. 100 L 시드 생물반응기의 접종 전에, 전배양물을 생물부하(bioburden)를 위해 샘플링한다.

[0310] 전배양 증폭물은 해동후 최대 30일 동안 유지될 수 있다. 30일 이내에 사용되지 않은 전배양물은 폐기한다. 진술된 바와 같이 증폭되고, 1차 전배양물과 동일한 공정중 모니터링, 제어 시험, 및 공정 파라미터 하에 둔 백업 전배양물이 유지되고, 필요에 따라 다른 100 L 시드 생물반응기에 접종하는 데 사용될 수 있다.

[0311] 전배양물이 접종물 기준을 충족시킬 때, 배양 백(들)의 내용물을  $\geq 0.3 \times 10^6$ 개의 VC/mL의 시딩 밀도를 목표로 하여, CDH-A가 담긴 100 L 시드 생물반응기에 옮긴다. 시드 생물반응기의 배양 pH, 온도, 및 용존 산소 농도는 배치 기록에 규정된 범위 이내로 제어된다. 배양물을  $\geq 1.5 \times 10^6$ 개의 VC/mL의 세포 밀도 및  $\geq 80\%$  이상의 배양 생존력이 얻어질 때까지 증폭시킨다. 배양물을 시드 생물반응기 공정 전체에 걸친 VCD, 배양 생존력, 및 현미경 검사를 위해 샘플링한다. 500 L 생성용 생물반응기의 접종 전에, 배양물을 생물부하를 위해 샘플링한다.

[0312] 시드 생물반응기 배양물의 VCD가  $\geq 1.5 \times 10^6$ 개의 VC/mL에 도달할 때, 배양물은 500 L 생성용 생물반응기에 접종하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 배양물의 일부분이 100 L 시드 생물반응기로부터 인출될 수 있고, 남아 있는 배양물은 신선한 배지를 사용하여 희석될 수 있다. 이러한 "인출 및 채움" 공정 후에는, 배양물을 500 L 생성용 생물반응기에 접종하기에 충분한 세포 밀도로 증폭되게 한다. 100 L 시드 생물반응기 배양물의 최대 지속시간은 접종후 9일이다.

[0313] **스테이지 2**

[0314] **생물반응기 생성**

[0315] 스테이지 2에서는, 세포 배양물을 교반 접선 유동 중공 섬유 필터 세포 체류 시스템(ATF 시스템)을 사용하는 500 L 생성용 생물반응기에서 연속적으로 관류시킨다. 세포 배양 투과물(수확물(harvest))을 ATF 시스템으로부터 수집하며, 한편 세포는 생물반응기로 반환시키고, 배양물을 신선한 배지로 보충한다. 생물반응기 생성 공정을 나타낸 흐름도가 도 3에 제공되어 있다.

[0316] **제조 절차**

[0317] 500 L 생성용 생물반응기의 접종은 100 L 시드 생물반응기의 내용물을 6 mM L-글루타민, 0.5 mg/L의 마이코페놀산, 2.5 mg/L 하이포잔틴, 및 50 mg/L 잔틴이 보충된 CD(화학적으로 한정된) 하이브리도마 배지(CDH-A)가 담긴 500 L 생성용 생물반응기 내로 옮김으로써 수행된다. 옮겨진 부피는  $\geq 0.3 \times 10^6$ 개의 생존가능 세포(VC)/mL의 시딩 밀도를 목표로 하기에 충분하여야 한다. 배양물을 34 내지 38°C의 온도, 6.8 내지 7.6의 pH, 및 1 내지 100%의 용존 산소(DO) 농도로 유지한다.

[0318] 연속 관류를 개시하고, 500 L 생물반응기로부터 ATF 시스템 내로 배양물을 인출하여 투과물로부터 세포를 분리시킨다. 투과물을 0.2  $\mu$ m ATF 필터를 통해 여과하고, 생물공정 용기(BPC) 내에 수확물로서 수집한다. 세포를 생물반응기로 반환시키고, 신선한 CDH-A를 공급하여 일정한 배양 부피를 유지한다. 생존가능 세포 밀도(VCD),



배양 생존력, pH, DO, 온도 및 면역글로불린 G(IgG) 함량을 생성 실행 동안 모니터링한다. 하루당 대략 1의 생물반응기 부피의 목표 속도에 도달할 때까지 VCD에 비례하여 관류 속도를 점진적으로 증가시킨다. 관류 속도는 하루당 1.20 생물반응기 부피를 초과하지 않도록 제어된다. ATF 시스템의 체류를 모니터링하여, ATF 필터 전체에 걸친 IgG 체류가 50%를 초과하기 전에 ATF 필터의 첫다운을 가능하게 한다.

[0319] 500 L 생물 반응기 내의 VCD가  $8.0 \times 10^6$ 개의 VC/mL에 도달할 때이거나 일수 10에서는, 어느 것이든 먼저 일어나는 경우, pH 목표를 7.2 내지 7.1로 낮춘다. 일수 20에서 또는  $12.0 \times 10^6$ 개의 VC/mL의 VCD에 도달할 때, 어느 것이든 먼저 일어나는 경우, 바이오매스 제거를 개시한다. 바이오매스를 하루당 최대 20% 생물반응기 부피의 속도로 500 L 생성용 생물반응기로부터 BPC 내로 취출한다. 각각의 수확물을 생물부하를 위해 샘플링한다.

[0320] 500 L 생성용 생물반응기에서의 연속 관류 세포 배양 작업은 접종 후 최대 46일 동안 계속된다. 생성 종료 시점에서, 배양물을 마이코플라즈마 및 외래성 바이러스 시험을 위해 샘플링한다. 수확물은 생물반응기로부터의 분리 후 2 내지 8°C에서 30일 이하 동안 저장될 수 있다.

[0321] **CHO 세포에서 발현되는 우스테키누맙의 소규모 생성에 대한 설명**

[0322] **우스테키누맙을 발현하는 CHO 세포의 생성**

[0323] CHO 세포주를 원래는 성체 중국 햄스터의 난소로부터 T.T. Puck에 의해 생성하였다. CHO-K1(ATCC® CCL-61)은 프롤린 합성 유전자가 결여된 모 CHO 세포주의 하위클론이다. CHO-K1은 또한 ECACC(European Collection of Cell Cultures)에 CHO-K1(ECACC 85051005)로 예치해 두었다. CHO-K1, 024 M의 마스터 세포 은행(MCB)를 Celltech Biologics(현재 Lonza Biologics)에서 확립하고, 현탁 배양물 및 무혈청 배지에 대한 CHO-K1의 적응화에 사용하였다. 적응화된 세포주는 CHOK1SV로 명명하였다. CHOK1SV 세포주는 무단백질 배지에서 추가로 적응화되어, 269-M으로 지칭되는 세포들의 MCB를 생성하였다. 269-M MCB로부터 유래된 세포를 하기에 기재된 바와 같이 형질감염시켜 우스테키누맙을 발현하는 CHO 세포주를 생성하였다.

[0324] 세포 배양 플레이트 및 진탕 플라스크를 사용하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 가슴된 인큐베이터 내에서 세포주를 생성하고, 증폭시키고, 유지하였다. 진탕 플라스크에서의 일상적인 시딩 밀도는 mL당  $3 \times 10^5$ 개의 생존가능 세포(vc/mL)였다. 모든 진탕 플라스크 배양물은 25 mm 궤도로 130 rpm(분당 회전수)으로 유지하였고, 96-딥웰(deepwell)(DW, 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 Thermo Scientific, Cat. #278743) 배양물은 3 mm 궤도로 800 rpm으로 유지하였다.

[0325] 우스테키누맙을 발현하는 CHO 클론을 CHO 세포 배양을 위해 사내 개발된 화학적으로 한정된 배지인 MACH-1로 확인된 배지를 사용하여 생성하였다. CHO 숙주 세포주의 일상적인 계대배양을 위한 기본 배지는 6 mM L-글루타민(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen, Cat. #25030-081)이 보충된 MACH-1이었다. 글루타민 신테타제(GS) 유전자로 형질감염된 CHO 세포는 달리 언급되지 않는 한, 글루타민 신테타제 기능을 억제하기 위해 MACH-1 + MSX 중에서 성장시켰는데, 이는 25 μM L-메티오닌 설폭시딘(MSX, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma, Cat. #M5379-1G)이 보충된 MACH-1이다. 블루스 유가식 진탕 플라스크 및 생물반응기 실험에 있어서, 세포 성장 및 항체 생성을 추가로 지지하기 위하여 세포를 MACH-1 + F8 중에서 배양하였는데, 이는 8 g/kg의 F8(독점적 성장 향상제의 보충제)이 보충된 MACH-1이다. 독점적 공급 배지를 진탕 플라스크 및 생물반응기 실험에 사용하였다.

[0326] 관심 유전자를 인코딩하는 DNA를 글루타민-신테타제(GS) 이중 유전자 발현 플라스미드(Lonza Biologics) 내로 클로닝하였다. 중쇄(HC) 및 경쇄(LC) 유전자의 발현을 별개의 인간 거대세포바이러스(hCMV-MIE) 프로모터에 의해 구동시켰다. 유인원 바이러스(Simian Virus) SV40 프로모터에 의해 구동되는 GS 유전자 선택 마커는 MSX의 존재 하에서 무글루타민 배지 중에서 형질감염된 세포의 선택을 가능하게 한다.

[0327] 매 형질감염마다 그에 앞서, 우스테키누맙의 HC 코딩 영역 및 LC 코딩 영역 둘 모두를 함유하는 1 분취물의 플라스미드 DNA를 제한 효소 분해에 의해 선형화하였다. 선형화된 15 μg DNA 분취물을 BTX ECM 830 Electro Cell Manipulator(미국 매사추세츠주 홀리스트 소재의 Harvard Apparatus)를 사용하여  $1 \times 10^7$ 개의 세포의 분취물 내로 형질감염시켰다. 세포를 4 mm 갭 큐벳(gap cuvette) 내에서 15 밀리초 펄스 길이 및 5초 펄스 간격으로 250 볼트에서 3회 전기천공하였다. 형질감염된 세포를 진탕 플라스크 내의 MACH-1 + L-글루타민에 옮기고, 1일 동안 인큐베이션하였다. 형질감염물을 원심분리하고, 이어서 선택을 위하여 MACH-1 + 25 μM MSX 중에 재현탁하고, 진탕 플라스크에 옮겨서 6일 동안 인큐베이션하였다.

[0328] 화학적 선택 후에, 세포를 돌베코 변형 이글 배지(DMEM) 기본 배지 중 2.5% (w/v) 메틸셀룰로스를 함유하는 주 문형 무글루타민 Methocult 배지(Methocult, 캐나다 브리티시 컬럼비아주 밴쿠버 소재의 StemCell Technologies, Inc., Cat. #03899) 중에서 단세포 현탁액으로 플레이팅하였다. 작업 용액은 또한 30% (v/v) 감마-조사된 투석된 소태아 혈청(dFBS, IR, 미국 유타주 로건 소재의 Hyclone, Cat. #SH30079.03), 1x GS 보충제(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 SAFC, Cat. #58672-100M), 1.5 mg 동물 성분-무함유 단백질 G Alexa Fluor 488 접합체(단백질 G, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen, Cat. #C47010), 25 μM MSX, F12를 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM/F12, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Gibco/Invitrogen, Cat. #21331-020), 및 세포 현탁액을 함유하였다.

[0329] 단백질 G는 인간 단일클론 항체를 인식하고, 세포에 의해 분비되는 IgG에 결합한다. 단백질 G는 형광 표지 Alexa Fluor 488에 접합되어, 가장 많은 항체를 분비하는 세포 콜로니가 최고 수준의 형광을 보여주게 될 것이다. 12 내지 18일 동안 인큐베이션 후, ClonePix FL 콜로니 선별(picking) 기기(미국 캘리포니아주 서니베일 소재의 Molecular Devices)를 사용하여 최고의 형광 수준을 갖는 콜로니를 선별하여 96웰 플레이트 내의 100 μL 페놀 레드-함유 MACH-1 + MSX 내로 넣고, 5 내지 7일 동안 진탕 없이 인큐베이션하였다. 5 내지 7일 후에, 96웰 플레이트로부터의 세포를 96DW 플레이트(미국 매사추세츠주 월섬 소재의 Thermo Scientific, Cat. #278743) 내의 50 내지 100 μL 페놀 레드-함유 MACH-1 + MSX에 첨가함으로써 증폭시키고, 3 mm 케도로 800 rpm으로 진탕하였다. 96DW 플레이트를 공급하고, 96DW 시딩 후 7일째에 Octet(미국 캘리포니아주 멘로 파크 소재의 ForteBio)을 통해 적정하였다. 최고 배치(batch) 96DW 과성장 역가(overgrow titer)에 상응하는 상위 10개의 배양물을 진탕 플라스크 내의 MACH-1 + MSX 중에서 증폭시키고, 10% DMSO를 함유하는 MACH-1 + MSX 배지 중에 현탁된 세포로 냉동된 세포 배크를 생성하였다.

[0330] **소규모 생성을 위한 세포 배양**

[0331] Sp2/0 세포에서 발현되는 우스테키누맙의 대규모 생성에서와 마찬가지로, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)에서 발현되는 우스테키누맙의 소규모 생성을 위한 스테이지 1 및 스테이지 2에서 전배양, 세포 증폭, 및 세포 생성을 수행한다. 스테이지 1에서는, 우스테키누맙의 HC 및 LC 서열을 발현하는 형질감염된 CHO 세포의 단세포 배크 바이알로부터 전배양을 개시하고, 세포를 배양 플라스크 내에서 증폭시킨다. 10 L 생성용 생물반응기의 접종에 필요한 세포 밀도 및 부피가 얻어질 때까지 세포를 배양한다. 스테이지 2에서는, 세포 배양물을 10 L 생성용 생물반응기 내에서 유가 방식으로 전개시킨다. 15일간의 생물반응기 작동의 지속기간 동안, 배양물에는 필요에 따라 농축된 글루코스-기반 및 아미노산-기반 공급물이 공급된다. 생성용 생물반응기 작동의 완료 시점에서, 세포 배양 수확물을 청정화하여 바이오매스를 제거하고 추가의 처리를 위해 여과한다.

[0332] **소규모 생성을 위한 정제**

[0333] 우스테키누맙의 소규모 생성을 위한 정제 단계는, 스테이지 8 바이러스 여과 단계를 소규모 생성에 대해 생략한 것을 제외하고는, 대규모 제조 공정과 동일하였다. 간단히 말해서, 소규모 생성의 경우, 세포 배양 수확물로부터의 우스테키누맙의 정제를 스테이지 3부터 스테이지 7까지에서, 친화성 크로마토그래피 단계 및 이온 교환 크로마토그래피 단계의 조합 및 잠재적인 바이러스 오염을 불활성화시키거나 제거하는 단계(용매/세제 처리 및 바이러스 제거)에 의해 수행한다. 스테이지 3에서는, 수확물 및/또는 폴링된 수확물을 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 청정화하고 정제한다. 생성된 직접 생성물 포획(DPC) 용리액을 추가의 처리 시까지 동결시킨다. 스테이지 4에서는, 해동 후에 DPC 용리액을 여과하고 폴링하고, 후속으로 스테이지 5에서는, 트라이-n-부틸 포스페이트(TNBP) 및 폴리소르베이트 80(PS 80)으로 처리하여 잠재적으로 존재하는 임의의 지질-외피보유 바이러스를 불활성화시킨다.

[0334] 스테이지 6에서는, 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 우스테키누맙 생성물로부터 TNBP 및 PS 80 시약 및 불순물을 제거한다. 스테이지 7에서는, 우스테키누맙 생성물을 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하여 DNA, 잠재적으로 존재하는 바이러스, 및 불순물을 제거한다. 상기 언급된 바와 같이, 스테이지 8의 바이러스 체류용 필터를 통한 여과는 CHO 유래 우스테키누맙 생성물 정제 공정으로부터 생략하였다.

[0335] 스테이지 9 및 스테이지 10(대규모 스테이지 참조)에서는 각각 우스테키누맙 예비제형화된 벌크(PFB) 및 제형화된 벌크(FB)의 최종 제조를 수행한다. 스테이지 9에서, 한외여과 단계는 우스테키누맙 생성물을 농축시키고, 투석여과 단계는 제형화 부형제를 첨가하여 공정중 완충액 염을 제거한다. 스테이지 10에서는, 폴리소르베이트 80을 우스테키누맙 PFB에 첨가하여 FB를 얻고, FB를 동결 저장을 위해 폴리카르보네이트 용기 내로 여과한다.

[0336] **방법**

[0337] **생존가능 세포 밀도(VCD) 및 % 생존력을 결정하기 위한 방법**

[0338] 총 세포수/ml, 생존가능 세포수/ml(VCD), 및 % 생존력은 전형적으로 제조자 제공 프로토콜, 소프트웨어 및 시약을 사용하여 Beckman Coulter Vi-CELL-XR 세포 생존력 분석기에 의해 결정된다. 대안적으로, CEDEX 자동화 세포 계수 시스템이 또한 사용되어 왔다. 그러나, VCD 및 % 생존력을 결정하기 위한 다른 방법이 당업자에 의해 잘 알려져 있음에 또한 유의해야 하며, 이에는, 예를 들어 혈구계(hemocytometer) 및 트리판 블루 배제(trypan blue exclusion)를 사용하는 방법이 있다.

[0339] **생물활성 검정**

[0340] 우스테키누맙의 생물활성은 IL-12-반응성 인간 자연 살해 세포주, NK-92MI(ATCC® CRL-2408)에 의한 IL-12 유도 인터페론-감마(IFN- $\gamma$ ) 생성의 증화에 의해 결정된다. 우스테키누맙은 IL-12의 p40 하위단위에 결합하여 NK 세포의 세포 표면 상의 IL-12R $\beta$ 1과의 상호작용을 방해한다. 이는 IL-12 매개 IFN- $\gamma$  생성의 차단을 가져온다(문헌[Aggeletopoulou I, et al. Interleukin 12/interleukin 23 pathway: Biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(36):4093-4103]). 간략하게 말하면, 이러한 검정 방법은 NK-92MI 세포를 재조합 인간 IL-12(rhIL-12)와 함께 인큐베이션하는 단계 및 우스테키누맙의 존재 하에서 세포에 의해 분비되는 IFN- $\gamma$ 의 수준과 그의 부재 하에서의 IFN- $\gamma$ 의 수준을 비교하는 단계를 포함한다. IFN- $\gamma$ 의 수준을 항-IFN- $\gamma$  항체를 사용하여 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)으로 정량화한다(예를 들어, 문헌[Jayanthi S, et al. Modulation of Interleukin-12 activity in the presence of heparin. *Sci Rep.* 2017;7(1):5360] 참조).

[0341] **올리고당 조성을 결정하기 위한 방법**

[0342] **HPLC에 의한 올리고당 조성**

[0343] 우스테키누맙의 N-연결 올리고당 조성은 Chemstation/Chemstore 소프트웨어와 함께 Agilent 1100/1200 시리즈 HPLC 시스템을 사용하여, 형광 검출을 구비한 순상 음이온 교환 HPLC 방법으로 결정된다. 글리칸들의 상대량을 정량화하기 위하여, N-연결 올리고당들을 먼저 N-글리카나제(PNGase F)를 사용하여, 환원되고 변성된 시험 대상물로부터 절단한다. 방출된 글리칸들을 안트라닐산을 사용하여 표지하고, 0.45  $\mu$ m 나일론 필터를 사용하여 여과에 의해 정제하고, 형광 검출을 사용하여 HPLC에 의해 분석한다. HPLC 크로마토그램은 샘플 내에 존재하는 N-연결 올리고당들의 상대량을 확인하고 정량화하는 데 사용될 수 있는 맵으로서의 역할을 한다. 글리칸들은 광범위한 특성화로부터의 이력 결과에 따라 체류 시간에 의해 그리고 올리고당 표준물질과의 공용리(co-elution)에 의해 확인된다. 우스테키누맙에 대한 대표적인 HPLC 크로마토그램이 도 4에 나타나 있다.

[0344] 각각의 글리칸의 양은 피크 면적 적분에 의해 정량화되고, 총 글리칸 피크 면적의 백분율(피크 면적 %)로서 표현된다. 결과는 G0F, G1F, G2F, 총 중성 글리칸, 및 총 하전된 글리칸에 대해 보고되어 있다. 다른 중성 글리칸은 G0F, G1F 및 G2F에 상응하는 피크들을 제외하고, 17분과 35분 사이의 모든 적분된 피크들의 합이다. 총 중성 글리칸은 G0F, G1F, G2F 및 나머지 다른 중성 글리칸들의 합이다. 총 하전된 글리칸은 42분과 55분 사이에서 용리되는 모든 모노-시알화된 글리칸 피크와 78분과 90분 사이에서 용리되는 모든 다이-시알화된 글리칸 피크의 합이다.

[0345] 올리고당 표준물질(G0F, G2F, G2F + N-아세틸뉴라민산(NANA) 및 G2F + 2NANA)의 혼합물이 표지화 반응을 위한 양성 대조군으로서, 피크 확인을 위한 표준물질로서, 그리고 시스템 적합성의 척도로서 병렬 분석된다. Prozyme 으로부터의 재구성된 올리고당인 G0F(카탈로그 번호 GKC-004301), G2F(카탈로그 번호 GKC-024301), SA1F(카탈로그 번호 GKC-124301), 및 SA2F(카탈로그 번호 GKC-224301), 또는 등가물이 참조 표준물질로서 사용된다. 방법 블랭크(method blank) 음성 대조군 및 사전표지된 G0F 표준물질이 또한 시스템 적합성 목적을 위해 실시된다. 하기의 시스템 적합성 및 검정(시험 대상물) 허용 기준은 유효한 결과를 산출하기 위하여 올리고당 맵핑 절차의 수행 동안 적용된다:

[0346] **시스템 적합성 기준:**

- [0347] • 올리고당 표준물질에서 G0F 피크와 G2F 피크 사이의 분해능(USP)은 3.0 이상이어야 한다.
- [0348] • 올리고당 표준물질에서의 G0F 피크의 이론적 플레이트 카운트(접선 방법)는 5000 이상이어야 한다.
- [0349] • 우스테키누맙 기준 표준물질에 대한 총 글리칸 피크 면적은 사전표지된 G0F의 주 글리칸 피크 면적의 1.5배 이

상이어야 한다.

- [0350]
    - 임의의 기준 표준물 글리칸 피크가 측정한계를 벗어난(off-scale) 경우, 기준 표준물은 더 적은 주입 부피로 재주입된다.
  - [0351]
    - 우스टे키누맙 기준 표준물에서의 GOF 피크의 체류 시간은 올리고당 표준물에서의 GOF 체류 시간의 0.4분 이내여야 한다.
  - [0352] **검정 허용 기준:**
  - [0353]
    - 방법 블랭크(method blank)는 우스टे키누맙에서 배정된 올리고당 피크와 공유리되는 검출가능한 피크를 갖지 않아야 한다.
  - [0354]
    - 각각의 시험 대상물의 총 글리칸 피크 면적은 사전표지된 GOF 표준물의 주 글리칸 피크 면적의 1.5배 이상이어야 한다.
  - [0355]
    - 임의의 샘플 글리칸 피크가 측정한계를 벗어난 경우, 그러한 샘플은 사전표지된 GOF, 올리고당 표준물, 방법 블랭크 및 기준 표준물 - 정상 부피를 가짐 - 과 함께, 더 적은 주입 부피로 재주입된다.
  - [0356]
    - 각각의 시험 대상물에서의 GOF 피크에 대한 체류 시간은 올리고당 표준물에서의 GOF 피크에 대한 체류 시간의 0.4분 이내여야 한다.
  - [0357]
    - 검정이 임의의 허용 기준을 충족시키지 못하는 경우, 검정은 무효화된다.
  - [0358] **IRMA에 의한 올리고당 조성**
  - [0359] IdeS-RMA(IRMA) 방법은 Genovis AB(SKU: A0-FR1-050)로부터 입수가능한 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*)의 IgG 분해 효소(IdeS)인 FabRICATOR®에 의한 면역글로불린 G(IgG)의 효소적 처리 후에 환원된 질량 분석(RMA)에 의해 주 당형(glycoform)들 사이의 구별을 가능하게 한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 제7,666,582호를 참조한다. 환원된 질량 분석(RMA)은 항체의 이황화물 결합 환원 후 항체의 중쇄 및 그의 부착된 글리칸 모이어티의 원형(intact) 질량 분석을 포함한다. 일부 항체는 피로글루타메이트 형성 및 카르복실화와 같은 N-말단 변형의 존재로 인해 큰 이중성 정도를 나타낸다. 결과적으로, 이황화물 환원 및 중쇄 질량 측정은 디콘볼루션된 피크의 복잡한 패턴을 생성한다. 따라서, 일부 응용에서는, 다이티오트레이틀 (DTT)과 같은 환원제를 사용하여 경쇄 및 중쇄의 생성에 걸쳐 항체 단편의 단백질 분해적 생성이 요구된다. 전통적으로, 파파인 및 펩신이 항체 단편을 생성하는 데 사용되는데, 이들 모두는 수고스러운 과정이다. 펩신에 의한 IgG의 절단은 광범위한 최적화를 필요로 하며, 이는 낮은 산성 pH에서 행해진다. 파파인은 활성화제를 필요로 하고 F(ab')<sub>2</sub> 및 Fab 둘 모두가 반응 조건에 따라 얻어질 수 있으며, 그 결과 단편들의 불균질한 풀(pool)이 생성될 수 있다. 이러한 결점은 신규한 효소, FabRICATOR®를 사용함으로써 피할 수 있다. 절단 절차는 매우 신속하고, 간단하며, 중요한 점은 최적화가 필요하지 않다는 것이다. 이것은 중성 pH에서 수행되어 정확한 F(ab')<sub>2</sub> 및 Fc 단편을 생성하게 된다. 펩신 또는 파파인과 같은 다른 단백질 분해 효소와 일반적으로 관련된 바와 같은 추가의 분해 또는 과다분해(over-digestion)가 관찰되지 않는다. 중요한 점은, FabRICATOR®는 중쇄에서 이황화물 가교의 단지 C-말단만을 절단하기 때문에, 환원 단계가 필요하지 않고, 온전한 F(ab')<sub>2</sub> 및 2개의 잔류 Fc 단편이 얻어진다는 것이다.
- [0360] **정의**
- [0361]
  - H: 헥소스(만노스, 글루코스, 및 갈락토스)
- [0362]
  - Man5: 만노스 5
- [0363]
  - N: N-아세틸헥소사민(N-아세틸글루코사민 및 N-아세틸갈락토사민)
- [0364]
  - F: 푸코스
- [0365]
  - S: 시알산(N-아세틸뉴라민산(NANA) 및 N-글리콜릴뉴라민산(NGNA))

- [0366] • G0: 아시알로-아갈락토-아푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0367] • G0F: 아시알로-아갈락토-푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0368] • G1: 아시알로-모노갈락토실화된-아푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0369] • G1F: 아시알로-모노갈락토실화된-푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0370] • G2: 아시알로-다이갈락토실화된-아푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0371] • G2F: 아시알로-다이갈락토실화된-푸코실화된 바이안테나리 올리고당
- [0372] • GlcNAc: N-아세틸-D-글루코사민
- [0373] • Lys: 라이신
- [0374] • -Lys: 절단된 중쇄(C-말단 라이신 잔기가 존재하지 않음)
- [0375] • +Lys: C-말단 라이신을 함유하는 중쇄
- [0376] • ppm: 백만분율
- [0377] **장비**
- [0378] • Thermo Scientific Q Exactive (Plus) 질량 분석계
- [0379] • Agilent 1200 HPLC 시스템
- [0380] • Applied Biosystems POROS R2/10 2.1 mmD 100 mL 컬럼
- [0381] • Thermo Scientific Q Exactive Tune 소프트웨어
- [0382] • Thermo Scientific Protein Deconvolution 소프트웨어
- [0383] • 0.01 mg까지 칭량 가능한 분석용 저울
- [0384] • 와동 혼합기, 임의의 적합한 모델
- [0385] • 수조 또는 가열 블록, 임의의 적합한 모델
- [0386] • 보정된 온도계 - 10 내지 110°C, 임의의 적합한 모델
- [0387] • 보정된 피펫
- [0388] • 마이크로원심분리기, 임의의 적합한 모델
- [0389] **절차**
- [0390] **샘플의 IdeS 분해**
- [0391] • 샘플(50  $\mu$ g의 IgG와 동일).
- [0392] • 1  $\mu$ l(50 단위)의 IdeS 효소를 50  $\mu$ g의 IgG에 첨가하고, 짧게 와동시키고, 스핀 다운하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다(100  $\mu$ l당 5000 단위의 스톱 효소. 1 단위의 효소는 37°C에서 30분만에 1  $\mu$ g의 IgG를 완전히 분해한다).
- [0393] • 샘플을 스핀 다운하고 LC-MS 바이알에 옮기고, 샘플 바이알을 Agilent 1200 오토샘플러 내로 로딩한다.

[0394] LC-MS 방법

[0395] 용액 제조

[0396] • 이동상 A(초순수 중 0.1% 포름산(FA)) - 999 mL의 초순수를 1 L HPLC 이동상 병에 첨가하고, 1 mL의 FA를 첨가하고 교반한다. 이 용액은 2개월 동안 실온에서 저장될 수 있다.

[0397] • 이동상 B(0.1% FA, 99.9% 아세트니트릴) - 999 mL의 아세트니트릴을 1 L HPLC 이동상 병에 첨가하고, 1 mL의 FA를 첨가하고 교반한다. 이 용액은 2개월 동안 실온에서 저장될 수 있다.

[0398] LC 방법

[0399] • 컬럼: Applied Biosystems POROS R2/10 2.1 mmD ×100 mmL

[0400] • 컬럼 온도: 60°C

[0401] • 오토샘플러 온도: 4°C

[0402] • 유량: 300 μL/분

[0403] • 주입 부피: 5 μL

[0404] • 이동상 A: 초순수 중 0.1% FA

[0405] • 이동상 B: 아세트니트릴 중 0.1% FA

[0406] [표 1]

LC 구배 표

시간 (분)	% 이동상 B
0.0	10
6.0	30
11.9	42
12.0	95
15.9	95
16.0	10
21.0	10

[0407]

[0408] MS 방법

[0409] 스캔 파라미터:

[0410] • 스캔 유형: 전체 MS

[0411] • 스캔 범위: 700 내지 3500 m/z

[0412] • 단편화: 소스 내(in-source) CID 35.0 eV

[0413] • 분해능: 17500

[0414] • 극성: 양성

[0415] • 잠금 질량(lock mass): 온(On), m/z 445.12002

[0416] • AGC 타겟: 3e6

[0417] • 최대 주입 시간: 250

[0418] HESI 공급원:

[0419] 시스(sheath) 가스 유량: 32

[0420] 보조 가스 유량: 7

[0421] 스위프 가스 유량: 0

[0422] 분무 전압(|kV|): 4.20

[0423] 모세관 온도(°C): 280

[0424] S-렌즈 RF 레벨: 55.0

[0425] 히터 온도(°C): 80

[0426] 데이터 분석

[0427] 각각의 검출된 글리칸 종의 상대 함량은 디컨볼루션된 질량 스펙트럼의 분석에 기초하여 기록된다. 도 5는 Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말의 IRMA 분석을 위한 대표적인 디컨볼루션된 질량 스펙트럼을 나타낸다. IRMA 분석에 의해 결정된 주요 구조는, 예를 들어 G0(H3N4), G0F(H3N4F1), G1F-G1cNAc(H4N3F1), H5N3, G1(H4N4), H5N3F1, G1F(H4N4F1), G2(H5N4), G2F(H5N4F1), G1FS(H4N4F1S1), H6N4F1, G2FS(H5N4F1S1), H7N4F1, H6N4F1S1, G2FS2(H5N4F1S2)를 포함한다. 이들 구조 각각의 백분율을 모니터링한다. 측정된 피크 강도는 정규화 후의 각각의 구조의 백분율(배정된 전체의 %)을 나타낸다. 관찰된 질량이 100 ppm 질량 편차 역치 밖에 있는 글리칸은 계산에 포함되지 않는다(예를 들어, (\*G1F-G1cNAc-Lys, \*H5N3-Lys, \*G1-Lys, \*H5N3F1-Lys, 및 \*G2-Lys)). 언급된 바와 같이, 이들은 별표("\*")로 표시된다. 또한, Man5-Lys는 매우 낮은 강도를 갖기 때문에 스펙트럼에서 항상 검출되는 것은 아니지만, 그럼에도 불구하고 그것은 존재할 때 고려되고 계산에 포함된다. 글리칸의 백분율은 말단 라이신을 갖는 상태 및 이것을 갖지 않는 상태의 Fc 단편의 두 아이소형(isoform) 모두에 대해 검출될 때 계산되며, 예를 들어 G0F의 백분율은 (%G0F -Lys + %G0F +Lys)이다. 중쇄 아이소형들 중 단지 하나에서만 검출된 구조는 이중 별표("\*\*"), 예를 들어 \*\*G1F-G1cNAc -Lys, \*\*H5N3 -Lys, \*\*H5N4 -Lys, 및 \*\*H5N3F1 +Lys로 표시된다. 이들 구조 대부분은 낮은 존재비를 가지며, 더 높은 강도를 갖는 인접 피크들로부터 분할될 수 없거나 본 방법의 검출 능력 아래에 있다.

[0428] \* 주: HPLC 방법과 IRMA 방법 사이의 차이(예를 들어, 하기 표 2 참조)가 발생될 수 있는데, 이는, HPLC에서의 중쇄의 공유리 및 가능하게는, 강도들 중 일부가 IRMA 방법의 검출 능력 한계에 너무 근접해 있기 때문으로 인한 IRMA에 의한 일부 시알화된 종의 과소평가로부터 기인된다.

[0429] [표 2]

Sp2/0 세포에서 생성된 대표적인 우스테키누말 샘플에 대한 IRMA 및 HPLC에 대한 글리칸 존재비 비교

글리칸 그룹	IRMA %	HPLC %
G0F	21.6	25.0
G1F	28.5	33.2
G2F	9.2	7.8
기타 중성 올리고당	11.4	5.9
총 중성 올리고당	70.7	71.9
모노시알화	25.0	25.9
다이시알화	4.3	2.2
총 하전된 올리고당	29.3	28.1

[0430]

[0431] 모세관 등전 집속

[0432] 모세관 등전 집속(cIEF)은 전체 전하 또는 등전점(pI)에 기초하여 단백질들을 분리한다. 상기 방법은 우스테키

누말에서 전하-기반 아이소형들의 분포를 모니터링하는 데 사용된다. 겔-기반 IEF 절차와 달리, cIEF는 존재하는 하전된 종의 정량적 척도를 제공한다. 게다가, cIEF는 겔-기반 방법에 비하여 증가된 분해능, 감도, 및 재현성을 나타낸다. 이 검정은 30°C 이하의 주위 환경에서 샘플 온도를 10.5°C 이하로 유지할 수 있는 오토샘플러, 예컨대 Alcott 오토샘플러(GP Instruments, Inc.)가 구비된 구매가능한 이미징 cIEF 분석기 상에서 수행된다. 이 분석은 전체 컬럼 검출을 가능하게 하도록 외벽 폴리이미드 코팅 없는 내벽-코팅된 실리카 모세관을 사용한다. 게다가, 묽은 인산과 메틸셀룰로스의 애노드액 용액, 수산화나트륨과 메틸셀룰로스의 캐소드액 용액, 및 넓은 범위(pH 3 내지 10) 및 좁은 범위(pH 8 내지 10.5)의 양쪽성 전해질(ampholyte)들의 정의된 혼합물이 사용된다. 이 검정은 카르복시펩티다제 B(CPB)에 의한 시험 대상물 및 기준 표준물(RS) 둘 모두의 전처리를 사용하는데, 이는 중쇄 C-말단 라이신을 제거하고 다수의 C-말단 변이체의 존재에 의해 도입된 모호성을 없애준다. Sp2/0 세포에서 발현된 우스테키누말의 대표적인 cIEF 전기영동도가 도 6에 나타나 있으며, CHO 세포에서 발현된 우스테키누말의 대표적인 cIEF 전기영동도가 도 9에 나타나 있다.

[0433] 매 분석마다 그에 앞서, 오토샘플러 온도 설정점을 4°C로 설정하고, 오토샘플러를 적어도 30분 동안 예비냉각시키고, 실험실의 주위 실온을 30°C 이하로 유지한다. 전처리된 시험 대상물 및 RS, 샘플 바이알, 바이알 삽입물, 정제수를 포함한 이 검정에 사용되는 시약, N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED)(이는 모세관 내에서의 집속을 최적화함)을 함유하는 모 용액, 양쪽성 전해질, 내부 표준물 및 메틸셀룰로스(MC)를 위한 pI 7.6 및 9.5 마커는 샘플 제조를 시작하기 전에 적어도 30분 동안 얼음 상에 유지된다. 샘플을 얼음 상에 준비해 두고, 모 용액의 첨가 시간을 기록하고, TEMED에 대한 노출을 제어한다. 이 검정은 이 첨가 후 180분 이내에 완료되어야 한다. 시스템 적합성 대조군을 1회 주입하고, 시험 대상물 및 RS를 하기 서열 표에 따라 2회 주입한다(표 3):

[0434] [표 3]

샘플 전개 순서

샘플명	샘플 바이알 위치	주입 횟수
시스템 적합성	1	1
블랭크	2	1
CPB 대조군	3	1
CPB 처리된 RS	4	2
CPB 처리된 샘플 1	5	2
CPB 처리된 RS	6	2

[0435] 샘플을 시린지 펌프에 의해 모세관 내로 주입한 후, 8분 동안 모세관을 가로질러 전기장(3 kV)을 인가하여 pH 구배를 형성하고, 우스테키누말의 전하-기반 아이소형을 그들의 등전점(pI)에 따라 분리한다. 모세관 내의 단백질 아이소형은 280 nm에서 전체 모세관을 이미징함으로써 검출되며, 데이터는 pI 값 vs. A280의 함수로서 전기영동도의 형태로 제시된다. 기기 소프트웨어를 사용하여 내부 pI 표준물(pI 7.6 및 9.5)과 대비하여 pI에 대한 값을 배정하고, 표준 데이터 획득 소프트웨어를 사용하여 전기영동도로부터 피크 면적을 결정한다. LOD 이상의 모든 피크의 2회 반복 주입으로부터의 평균 pI 및 평균 피크 면적 백분율, 기준 표준물 대비 ΔpI 값, 및 % 면적 피크가 보고된다.

[0437] 제조 제어 전략에 대한 소개

[0438] 대규모 상업적 생산 동안, 올리고당 프로파일에 관하여 치료용 단백질(예를 들어, 우스테키누말과 같은 치료용 항체)의 약물 물질(drug substance, DS) 및 약물 제품(drug product, DP) 특성, 생물활성(효력), 및/또는 DS 및 DP의 다른 특성(예를 들어, 표 4 및 표 5에서 확인되는 특성 참조)을 일관되게 유지하기 위한 제조 제어 전략을 개발한다. 예를 들어, 평균 % 총 중성 올리고당, % 총 하전된 올리고당, 및 % 개별 중성 올리고당 중, G0F, G1F, 및 G2F에 대한 상부 및 하부 사양에 의해, 제조 공정의 스테이지 10에서 제형화된 벌크(FB)에 대한 공정중 제어로서 우스테키누말 글리코실화를 모니터링한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약물 물질"("DS"로 약칭됨) 및 "약물 제품"("DP"로 약칭됨)은 상업적 약물로서 사용하기 위한, 예를 들어 임상 시험에 또는 시판 약물로서 사용하기 위한 조성물을 지칭한다. DS는 질병의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방에 있어서 약리학적 활성 또는 다른 직접적인 효과를 제공하거나 인체의 구조 또는 임의의 기능에 영향을 주는 것으로 의도된 활성 성분이다. 제조 공정에서 생성된 제형화된 벌크(FB)는 약물 물질(DS)이다. DP(의약 제품,



의약품, 의약, 또는 약제로도 지칭됨)는 질병의 진단, 치유, 완화, 치료, 또는 예방에 사용되거나 인체의 구조 또는 임의의 기능에 영향을 주기 위해 사용되는 약물이다. DP는 환자에 대한 판매 및/또는 투여를 위한 의약 제품으로서 제조된 DS이다.

[0439] 표 4에 나타난 바와 같이, Sp2/0 세포와 CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙은 % 단량체, % 순도, 및 % 생물활성에 있어서는 단지 매우 작은 차이가 있을 뿐이다. 그러나, cIEF 프로파일에 있어서는 실질적인 차이가 있는데, 이는 Sp2/0 세포와 CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙의 올리고당 프로파일의 차이에 의해 주로 야기된다. Sp2/0 세포와 CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙에 대한 cIEF 프로파일의 비교를 위해, 예를 들어 도 6 및 도 9를 또한 참조한다.

[0440] [표 4]

Sp2/0 세포와 CHO 세포에서 발현된 선택된 우스테키누맙 특성의 대표적인 비교

시험	파라미터	Sp2/0 세포	CHO 세포
DW-SE-HPLC	% 단량체	99.75%	99.40%
	% 응집체	0.23%	0.57%
	% 단편	<LOD	<LOD
환원된 cSDS	% 순도	98.9%	98.2%
비환원된 cSDS	% 순도	98.9%	97.3%
생물활성	% 생물활성	NA	96% <sup>a</sup>
cIEF	피크 A	0.6%	<LOD
	피크 B	3.9%	<LOD
	피크 1	12.6%	5.5%
	피크 2	28.7%	15.8%
	피크 3	53.6%	76.9%
	피크 C	0.8%	1.7%
<LOD - 검출 한계 미만 NA - Sp2/0 세포에서 생성된 참조 물질에 대해서는 적용 불가능 <sup>a</sup> Sp2/0 세포에서 발현된 기준 물질과 대비함			

[0441]

[0442] **우스테키누맙의 올리고당 프로파일**

[0443] 우스테키누맙은 각각의 중쇄 상의 단일 부위에서, 즉 아스파라긴 299 상에서 N-글리코실화된다. 이들 N-연결된 올리고당 구조는 아스파라긴 잔기의 1차 아민을 통해 이 단백질에 연결된 바이안테나리 올리고당 구조의 군 내의 임의의 것일 수 있지만, 우스테키누맙 상에서, 이들은 바이안테날 코어-푸코실화된 종으로 주로 구성되며, 갈락토스 및 시알산 이중성을 갖는다. 주요 개별 올리고당 종은, 예를 들어 아시알로, 아갈락토 코어-푸코실화된 바이안테나리 글리칸인 "G0F", 아시알로, 모노-갈락토 코어-푸코실화된 바이안테나리 글리칸인 "G1F", 및 아시알로, 다이-갈락토 코어-푸코실화된 바이안테나리 글리칸인 "G2F"를 포함한다. 우스테키누맙 IgG 내의 1차 N-연결 올리고당 종의 일부의 개략도가 도 7에 도시되어 있다. 글리코실화 성숙 과정에서의 효소들 중 일부의 역할이 또한, 이들 효소 과정에서 일부 2가 양이온(예를 들어, Mn<sup>2+</sup> 및 Cu<sup>2+</sup>)의 역할을 포함하여 나타나 있다.

[0444] HPLC는 제조 방법 동안 우스테키누맙의 글리코실화를 분석하도록 전개되는 분석 절차이다. HPLC에 의한 분석에 있어서는, 먼저 글리칸을 중쇄로부터 효소적으로 절단하고, 이어서 검출을 가능하게 하는 형광 표지로 표지한다. 이 방법에서는, G0F, G1F 및 G2F에 대한 비하전된 피크들뿐만 아니라 더 작은 중성 피크들의 하위 세트가 구별될 수 있다. 더욱이, 차등적으로 시알화된 물질에 대한 피크가 또한 관찰될 수 있다(도 4). 올리고당 분석을 위한 다른 방법은 IRMA로서, 이는 IgG의 효소적 처리 후에 주요 당형들 사이의 구별을 가능하게 하는 스트렙토코쿠스 피오게네스의 면역글로불린 G(IgG) 분해 효소(IdeS)를 사용하는 환원된 질량 분석(RMA) 방법이다. 도 5는 Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누맙의 IRMA 분석을 위한 대표적인 디컨볼루션된 질량 스펙트럼을 나타낸다. 우스테키누맙의 경우, 또한, cIEF, IRMA, 또는 HPLC에 의해 결정된 바와 같이 전하 이질성과 올리고

당 구조 상에서의 시알화도 사이에 직접적인 관계가 있다(예를 들어, 도 4, 도 5, 도 6, 도 8, 및 도 9 참조).

[0445] **올리고당 프로파일의 제어**

[0446] 재조합 단일클론 항체의 올리고당 프로파일의 변화가 항체의 생물학적 기능에 유의하게 영향을 줄 수 있기 때문에 올리고당 프로파일의 제어는 중요하다. 예를 들어, 생물학적 연구는 Fc 영역 상에의 상이한 당형들의 분포가 항체 효능, 안정성, 및 이펙터 기능에 유의하게 영향을 줄 수 있음을 보여주었다(문헌[J. Biosci. Bioeng. 2014 117(5):639-644]; 문헌[Bio-Process Int. 2011, 9(6):48-53]; 문헌[Nat. Rev. Immunol. 2010, 10(5):345-352]). 특히, 아푸코실화(문헌[J. Mol. Biol. 368:767-779]) 및 갈락토실화(문헌[Biotechnol. Prog. 21:1644-1652])는 항체가 면역 기능을 통해 표적 세포를 사멸하는 것을 매개하는 2가지 중요한 기전인 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)에서 큰 역할을 할 수 있다. 게다가, 높은 만노스 수준은 항체의 클리어런스를 증가시킴으로써 효능에 불리한 영향을 주는 것으로 밝혀졌으며(문헌[Glycobiology. 2011, 21(7):949-959]), 시알산 함량은 항염증 활성에 영향을 줄 수 있다(문헌[Antibodies. 2013 2(3):392-414]). 올리고당 프로파일의 변화로부터의 이들 생물학적 영향의 결과로서, 규제 기관은 일관되고 안전하고 효과적인 제품에 대한 출하 승인 규격(lot release specification)에 대한 준수를 보장하기 위해 항체 글리코실화 패턴의 제어를 필요로 한다.

[0447] **올리고당 프로파일 - 상이한 세포들에서의 발현으로부터의 효과**

[0448] 항체의 재조합 발현을 위해 일반적으로 사용되는 2가지 설치류 숙주 세포주는 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 및 마우스 골수종 세포(예를 들어, Sp2/0 세포)이다. CHO 세포는, 시알산 글리칸이 사실상 없으며 글리칸은 최대 99%까지 푸코실화될 수 있는 재조합 항체를 발현한다. 대조적으로, 마우스 골수종 세포는, 최대 50%까지 시알산을 함유할 수 있고 일반적으로 더 적은 푸코스를 가질 수 있는 재조합 항체를 발현한다. 이들 차이는 생체내에서의 항체 활성에 대해 유의한 효과를 가질 수 있는데, 예를 들어 그러한 차이는 분자의 Fc-부분의 구조에 영향을 줄 수 있으며, 그럼으로써 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)과 같은 항체 이펙터 기능을 변경시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, 미국 특허 US8975040호 참조). 예를 들어, 감소된 ADCC 활성이 증가된 시알화된(하전된) Fc 글리칸에 대해 기재되어 있으며(문헌[Scallan et al., Mol Immunol 2007; 44:1524-34]), 증가된 ADCC 활성이 푸코스가 결핍된 항체에 대해 보고되어 있다(문헌[Shields et al., J Biol Chem. 2002;277:26733-26740]; 문헌[Shinkawa et al., J Biol Chem. 2003;278:3466-3473]).

[0449] 게다가, CHO 세포와 Sp2/0 세포에서 생성된 항체는 2개의 글리칸 에피토프, 즉, 갈락토스- $\alpha$ -1,3-갈락토스( $\alpha$ -gal) 및 시알화된 N-글리칸 Neu5Gc- $\alpha$ -2-6-갈락토스(Neu5Gc)의 수준에서 유의한 차이를 가질 수 있다. 예를 들어, CHO 세포는 검출 불가능한 수준 또는 단지 미소한 수준의  $\alpha$ -Gal 및 Neu5Gc를 갖는 항체를 발현할 수 있는 반면, Sp2/0 세포는 훨씬 더 높은 수준의 2개의 글리칸 구조를 발현할 수 있는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Yu et al., Sci Rep. 2016 Jan 29; 7:20029]). 대조적으로, 인간은  $\alpha$ -gal을 생합성하기 위한 유전자가 유전자적으로 결핍되어 있으며, Neu5Gc의 생성을 담당하는 유전자는 모든 인간에서 비가역적으로 돌연변이된다. 그 결과,  $\alpha$ -Gal 및 Neu5Gc는 인간에서 생성되지 않는다. 더욱이, 치료용 항체 상의 이들 비인간 글리칸 에피토프의 존재는  $\alpha$ -Gal 및 Neu5Gc에 대한 더 높은 수준의 기존의 항체로 인해 소정 인간 집단에서 바람직하지 않은 면역 반응을 야기할 수 있다. 예를 들어, 항- $\alpha$ -gal IgE 매개 아나필락시 반응이 세톡시맵에 대해 보고되어 있으며(문헌[Chung, C. H. et al., N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1109-17]), 순환 항-Neu5Gc 항체의 존재는 세톡시맵의 클리어런스를 촉진하는 것으로 보고되어 있다(문헌[Ghaderi et al., Nat Biotechnol. 2010 Aug;28(8):863-7]).

[0450] 또한, Sp2/0 세포에서 발현된 우스테키누맵은 다수의 다른 항체와 대비하여 더 높은 수준의 Neu5Gc를 함유하는 것으로 보고되어 있다. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석은, 항-Neu5Gc 항체 제제가 우스테키누맵에 결합된 Neu5Gc에 대해서는 고도로 단일특이적이지만, N-글리칸의 거의 100%를 제거하는 PNGase F로 처리된 우스테키누맵에 대해서는 그렇지 않다는 것을 보여주었다(문헌[Yu et al., Sci Rep. 2016 Jan 29;7:20029]). 추가의 분석은 또한 항-Neu5Gc 항체 제제가 단지 하나의 Neu5Gc만을 갖는(하나의 Fc 영역 상에서 모노-시알화된) 우스테키누맵에는 결합할 수 없지만 2 내지 4개의 Neu5Gc를 갖는 항체에는 결합할 수 있음을 보여주었다. 항-Neu5Gc 항체가 (두 Fc 영역 모두 상에서 모노시알화된) 동일한 항체의 2개의 상이한 Fc 영역 상에 위치한 2개의 Neu5Gc에 결합할 수 있는지, 또는 항체의 하나의 Fc 영역 상의 다이시알화된 N-글리칸에만 결합할 수 있는지는 결정되지 않았지만, 그들의 분포에 관계없이, 적어도 2개의 Fc Neu5Gc 잔기가 항-Neu5Gc 항체에 대한 결합에 필요한 것으로 결정되었다.

[0451] **Sp2/0 세포 및 CHO 세포에서 발현된 우스테키누맵의 올리고당 프로파일**

[0452] 우스테키누말의 다수의 상업적 생산 실시로부터의 컴파일링된 HPLC 데이터는 Sp2/0 세포에서 생성된 DS 또는 DP가 총 중성 올리고당 중  $\geq 64.8\%$  내지  $\leq 85.4\%$ , 총 하전된 올리고당 중  $\geq 14.4\%$  내지  $\leq 35.6\%$ , 및 개별 중성 올리고당 중 G0F  $\geq 11.5\%$  내지  $\leq 40.2\%$ , G1F  $\geq 29.9\%$  내지  $\leq 40.6\%$ , 및 G2F  $\geq 4.1\%$  내지  $\leq 11.3\%$ 를 포함함을 보여주었다. 더욱이, Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %는  $\geq 39.8\%$  내지  $\leq 64.4\%$ 이다. 표 5 및 표 6에 나타난 바와 같이, IRMA 또는 HPLC 분석에 기초하여, CHO 세포에서 생성된 우스테키누말은 총 중성 올리고당 중, 총 하전된 올리고당 중, 및 개별 중성 올리고당 중 G0F, G1F, 및 G2F에 있어서, Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말과 대비하여 매우 상이한 올리고당 프로파일을 갖는다. 이들 차이는, 각각 도 4 및 도 8에 나타난 바와 같이, Sp2/0 세포 및 CHO 세포에서 생성된 우스테키누말에 대한 대표적인 HPLC 크로마토그램에서 명백하다. Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말과 대비하여, CHO 세포에서 생성된 우스테키누말에 대한 올리고당 프로파일은 매우 낮은 수준의 하전된 글리칸 및 더 높은 수준의 중성 글리칸을 향해 이동되며, 이는 주로 G0F이다. CHO 세포에서 생성된 우스테키누말에 대한 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 중  $> 99.0\%$ , 총 하전된 올리고당 중  $< 1.0\%$ , 및 개별 중성 올리고당 중 G0F  $> 70.0\%$ , G1F  $< 20.0\%$ , 및 G2F  $< 5.0\%$ 를 포함한다. CHO 세포에서 생성된 우스테키누말의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %는  $> 70.0\%$ 이다. 더욱이, CHO 세포에서 생성된 우스테키누말에 대해서는 IRMA에 의하면 또는 HPLC에 의하면 어떠한 다이시알화된 글리칸 중도 검출되지 않았으며, 모노시알화된 글리칸 중은 HPLC 분석에 기초하여 매우 낮은 수준이었으며, IRMA 분석에 의하면 검출 불가능하였다(예를 들어, 표 5 및 도 8 참조).

[0453] [표 5]

Sp2/0 세포 및 CHO 세포에서 생성된 우스테키누말에 대한 총 중성 올리고당 중, 총 하전된 올리고당 중, 및 기타 선택된 올리고당 중의 IRMA 및 HPLC 분석에 대한 대표적인 결과

글리칸	IRMA		HPLC	
	Sp2/0	CHO	Sp2/0	CHO
G0F	26.7	71.0	25.0	78.0
G1F	29.2	13.3	33.2	15.2
G2F	8.6	1.5	7.8	2.2
기타 중성 글리칸 중	11.0	14.2	5.9	4.2
<b>총 중성 글리칸 중</b>	<b>75.5</b>	<b>100.0</b>	<b>71.9</b>	<b>99.6</b>
모노시알화	20.9	0.0	25.9	0.4
다이시알화	3.5	0.0	2.2	<LOD
<b>총 하전된 글리칸 중</b>	<b>24.5</b>	<b>0.0</b>	<b>28.1</b>	<b>0.4</b>
<LOD - 검출 한계 미만 숫자는 전체의 %이다.				

[0454]

[0455] [표 6]

Sp2/0 세포 및 CHO 세포에서 생성된 우스테키누맵에 대한 개별 올리고당 종의 IRMA 분석에 대한 대표적인 결과

글리칸	Sp2/0 세포 배정된 전체의 %	CHO 세포 배정된 전체의 %
G0F	26.7	71.0
G1F	29.2	13.3
G2F	8.6	1.5
G0	2.9	10.1
G1FS	9.7	0.0
H6N4F1	1.6	0.0
G2FS	7.4	0.0
H7N4F1	0.9	0.0
H6N4F1S1	3.9	0.0
G2FS2	3.5	0.0
*Man5 +Lys	0.7	0.9
*G1F-G1cNAc +Lys	1.1	0.6
*H5N3 +Lys	0.8	0.8
*G1 +Lys	1.5	1.2
*G2 +Lys	0.4	0.2
**G1F-G1cNAc -Lys	0.0	0.0
**H5N3 -Lys	0.0	0.0
**G1 -Lys	0.0	0.0
**H5N4 -Lys	0.0	0.5
**H5N3F1 +Lys	1.0	0.0

[0456]

[0457] **결론**

[0458]

따라서, 상기에 기재된 바와 같이, 올리고당 프로파일에 관하여 치료용 단백질의 약물 물질(DS) 및 약품 제품(DP) 특성 및/또는 DS 또는 DP(예를 들어, 치료용 항체 우스테키누맵을 포함하는 DS 및/또는 DP)의 다른 특성을 일관되게 유지하기 위한 제조 제어 전략을 개발한다. 특히, 치료용 항체의 올리고당 프로파일을 제어하는 것이 중요한데, 그 이유는, 올리고당 프로파일의 변화가 항체 생물학적 기능에 유의하게 영향을 줄 수 있기 때문이다. 치료용 항체의 올리고당 프로파일에 대한 제어의 포인트는 치료용 항체의 발현을 위한 세포 숙주의 선택이다. 본 명세서에 제시된 바와 같이, Sp2/0 세포에서 발현되는 우스테키누맵은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열; 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함하며, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 종  $\geq 64.8\%$  내지  $\leq 85.4\%$ , 총 하전된 올리고당 종  $\geq 14.4\%$  내지  $\leq 35.6\%$ , 및 개별 중성 올리고당 종 G0F  $\geq 11.5\%$  내지  $\leq 40.2\%$ , G1F  $\geq 29.9\%$  내지  $\leq 40.6\%$ , 및 G2F  $\geq 4.1\%$  내지  $\leq 11.3\%$ 를 포함한다. 더욱이, Sp2/0 세포에서 생성된 항-IL-12/IL-23p40 항체의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %는  $\geq 39.8\%$  내지  $\leq 64.4\%$ 이다.

[0459]

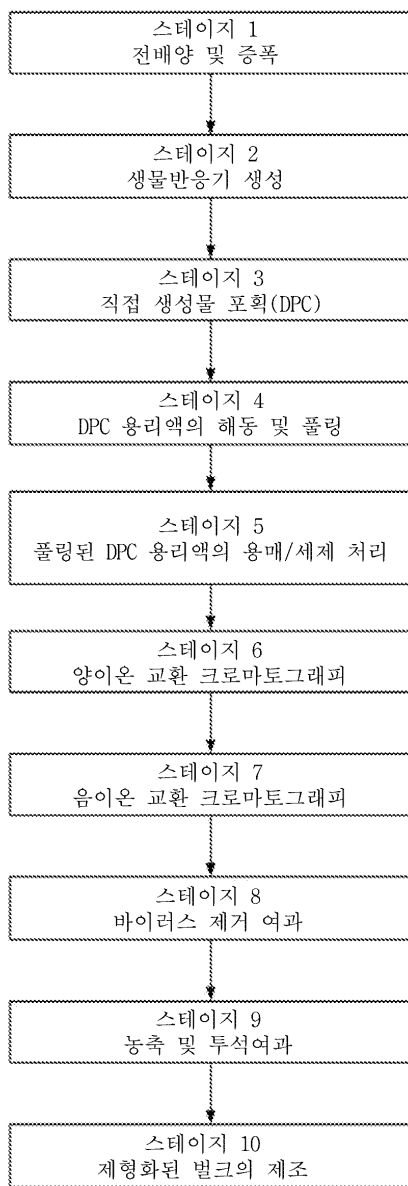
대조적으로, CHO 세포에서 생성된 우스테키누맵에 대하여, 올리고당 프로파일은 매우 낮은 수준의 하전된 글리칸 및 더 높은 수준의 중성 글리칸을 향해 이동되며, 이는 주로 G0F이다. CHO 세포에서 생성된 우스테키누맵에 대한 올리고당 프로파일은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); 서열 번호 7의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열; 서열 번호 1, 서열 번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR 아미노산 서열; 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-IL-12/IL-23p40 항체를 포함하며, 상기 항-IL-12/IL-23p40 항체의 올리고당 프로파일은 총 중성 올리고당 종  $> 99.0\%$ , 총 하전된 올리고당 종  $< 1.0\%$ , 및 개

별 중성 올리고당 중 G0F > 70.0%, G1F < 20.0%, 및 G2F < 5.0%를 포함한다. CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙의 모세관 등전 집속(cIEF) 전기영동도의 피크 3 면적 %는 > 70.0%이다. 더욱이, CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙에 대해서는 IRMA에 의하면 또는 HPLC에 의하면 어떠한 다이시알화된 글리칸 종도 검출되지 않았으며, 모노시알화된 글리칸 종은 HPLC 분석에 기초하여 매우 낮은 수준이었고, IRMA 분석에 의하면 검출 불가능하였다. CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙에 대해 일반적으로는 시알화된 종의 감소, 그리고 구체적으로는 Neu5Gc의 감소는 인간에게 투여될 때 바람직하지 않은 면역원성 반응을 감소시킴으로써 이익을 제공할 수 있다. 예를 들어, 감소된 수준의 Neu5Gc는 클리어런스를 감소시킬 수 있으며, 이로써 CHO 세포에서 생성된 항-IL-12/23p40 항체는, 특히 더 높은 수준의 항-Neu5Gc 항체를 갖는 환자 집단의 경우에, Sp2/0 세포에서 발견되는 항-IL-12/23p40 항체에 비하여 더 긴 반감기를 갖게 될 것이다.

**도면**

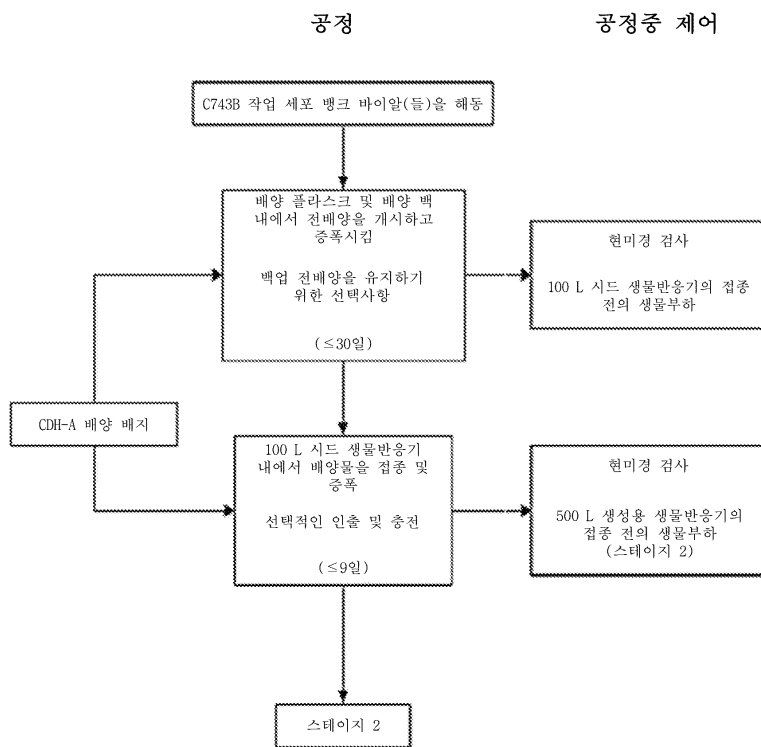
**도면1**

**제조 공정의 개요 - 공정 스테이지**



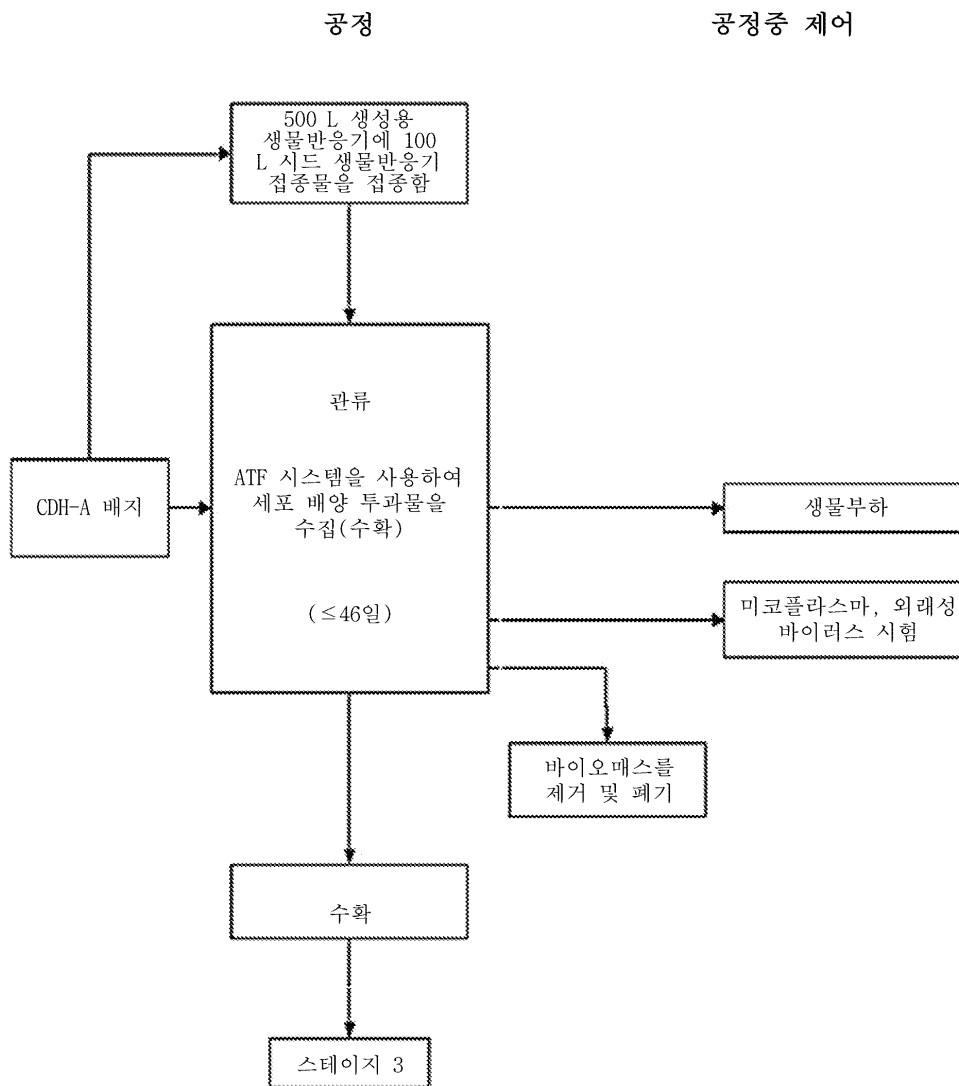
도면2

세포의 전배양 및 증폭을 위한 스테이지 1 공정 흐름도



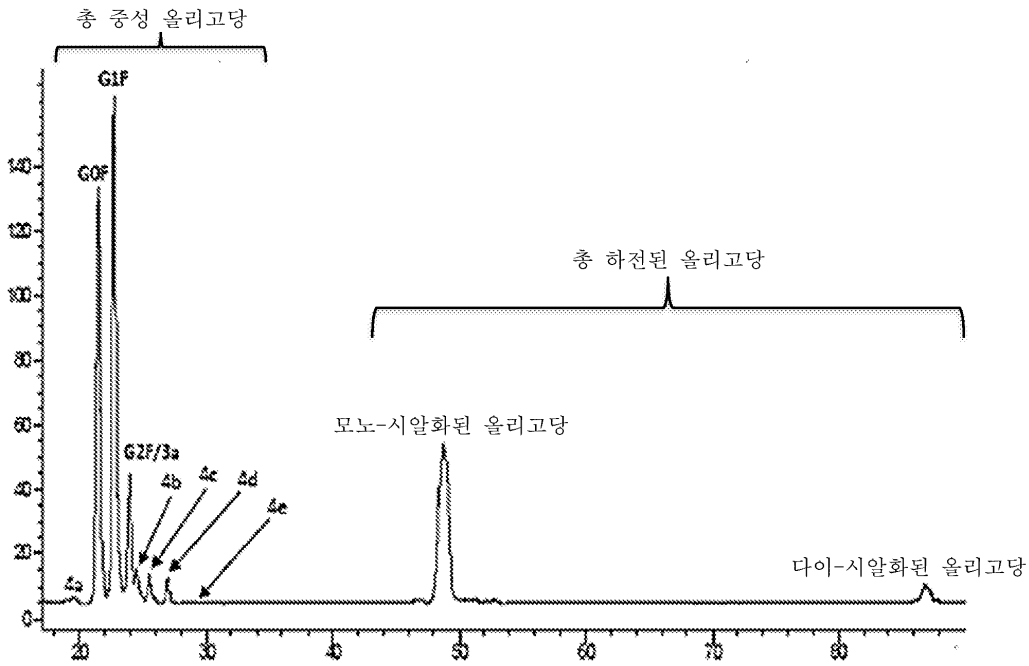
도면3

스태이지 2 공정 흐름도



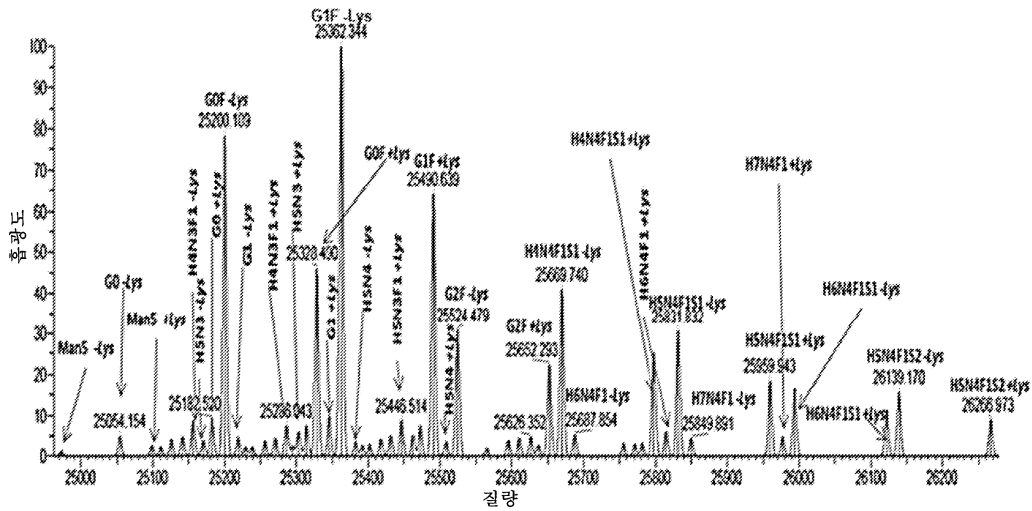
도면4

Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말의 올리고당 분석을 위한 대표적인 HPLC 크로마토그램



도면5

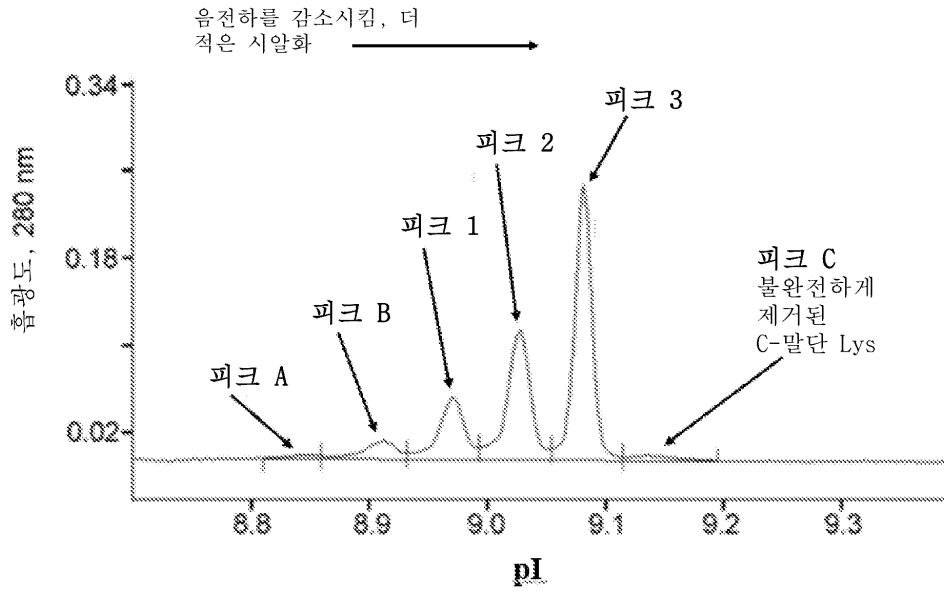
Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말의 IRMA 분석을 위한 대표적인 디온블류션된 질량 스펙트럼





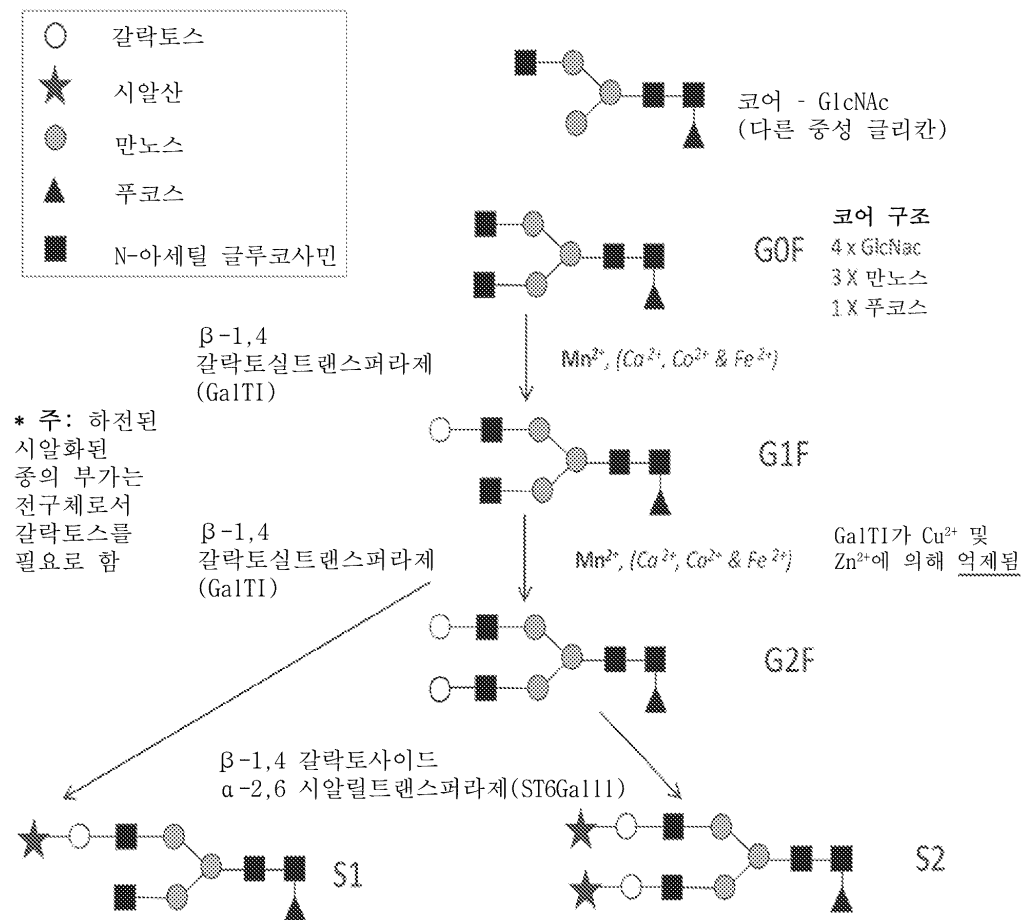
도면6

Sp2/0 세포에서 생성된 우스테키누말에 대한  
대표적인 cIEF 전기영동도 프로파일



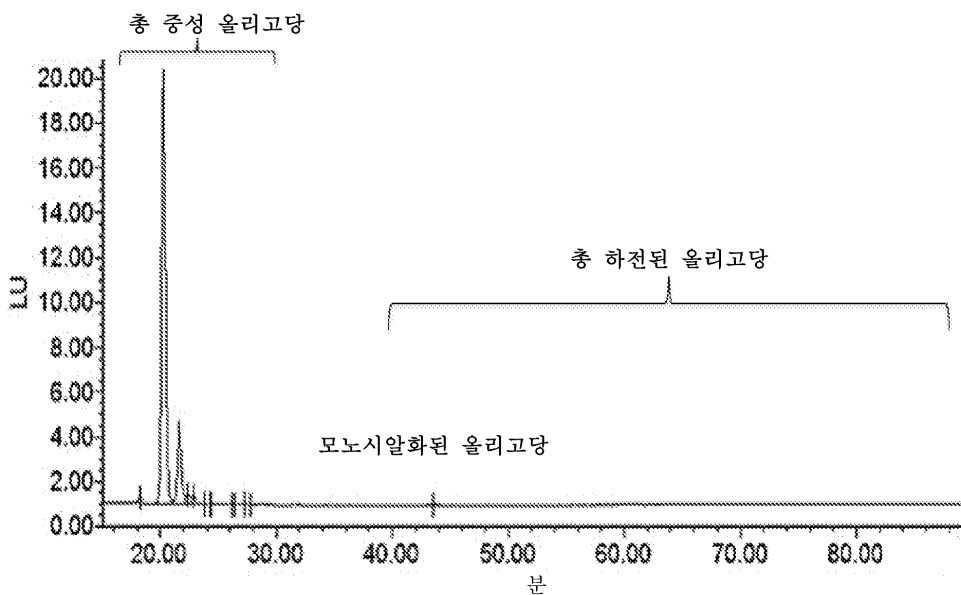
도면7

우스테키누맵 IgG에서의 1차 N-연결 올리고당 중의 다이어그램



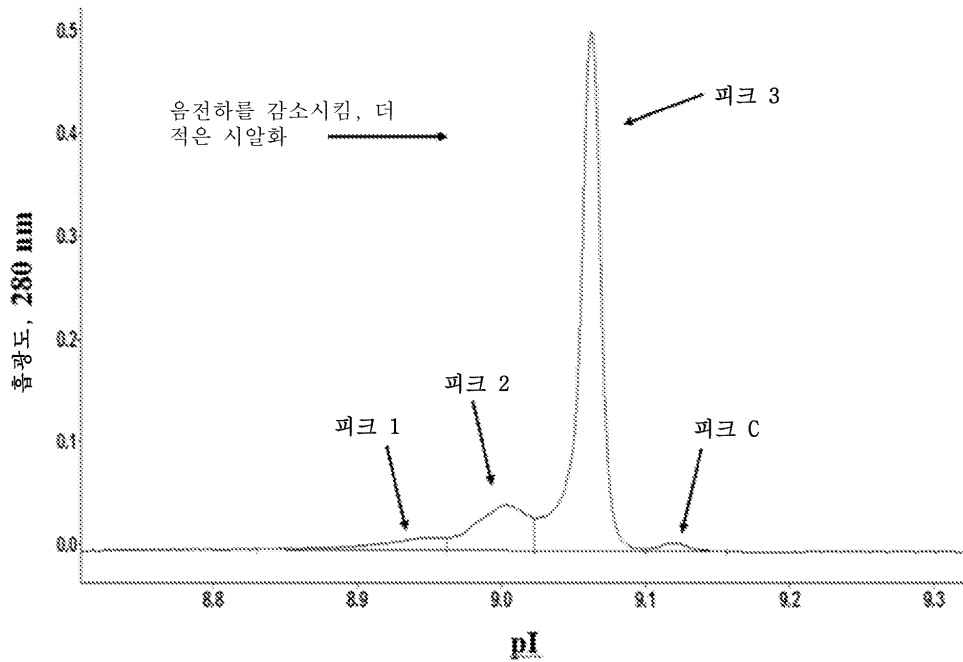
도면8

CHO 세포에서 생성된 우스테키누맵의 올리고당 분석을 위한 대표적인 HPLC 크로마토그램



도면9

CHO 세포에서 생성된 우스테키누맙에 대한 대표적인 cIEF 전기영동도 프로파일



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

Kristopher Barnthouse

Subinay Ganguly

Maarten Groeneveld

Manuel Lopez

Michael Nedved

Kevin D. Smith

<120> MANUFACTURING METHODS FOR PRODUCING ANTI-IL12/IL23 ANTIBODY

COMPOSITIONS

<130> JBI6056WOPCT1

<140> To Be Assigned

<141> 2014-03-14

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly

1                    5

<210> 2

<211

> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe

1                    5                    10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1                    5                    10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20                    25                    30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35                    40                    45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr

85                    90                    95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100                    105

<210> 9

<211> 503

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu

1                    5                    10                    15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys

20                    25                    30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp

35                    40                    45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu

50                    55                    60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr

65                    70                    75                    80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe



Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala  
 340 345 350  
 Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys  
 355 360 365  
 Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu  
 370 375 380  
 Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu  
 405 410 415  
 Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu  
 420 425 430  
 Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe  
 435 440 445  
 Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val  
 450 455 460  
 Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser  
 465 470 475 480  
 Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu  
 485 490 495  
 Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser  
 500  
 <210> 10  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30



Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn



