



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102215830 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980126814. 7

A61K 9/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 05

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/050775 2008. 05. 06 US

61/074171 2008. 06. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055438 2009. 05. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/135855 EN 2009. 11. 12

(71) 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

(72) 发明人 I·帕帕尼科劳乌

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘辛 刘健

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 40 页

序列表 10 页 附图 13 页

(54) 发明名称

生物活性剂的囊封方法

(57) 摘要

本发明提供使用 Hip 试剂将生物活性剂(如蛋白)囊封在微粒载体(如纳米粒子)中的多种方法。本发明还提供包括利用这些方法可得到的微粒载体的组合物以及这些组合物在治疗中的用途。

1. 一种在微粒载体中囊封生物活性剂的方法,包括以下步骤:
 - a) 在疏水离子配对 (HIP) 试剂存在下使生物活性剂在有机溶剂中溶解以形成有机相;
 - b) 使聚合物形成物质的单体或寡聚体溶解于 (a) 中形成的有机相中;
 - c) 在连续水相中形成在 (b) 中形成的有机相的乳液,以使单体聚合;以及
 - d) 得到从乳液中形成的微粒载体。
2. 一种在微粒载体中囊封生物活性剂的方法,包括以下步骤:
 - a) 使在水相中的生物活性剂与在有机溶剂相中的疏水离子配对 (HIP) 试剂混合,以形成生物活性剂-HIP 复合物;
 - b) 从水相中分离复合物;
 - c) 除去水相,并使复合物与有机相均化;
 - d) (i) 使聚合物溶解于 (c) 中形成的有机相,然后在连续水相中形成有机相的乳液;或者
(ii) 使聚合物形成物质的单体或寡聚体溶解于 (c) 中形成的有机相中,然后在连续水相中形成有机相的乳液,以允许单体或寡聚体聚合形成聚合物;以及
 - e) 得到从步骤 (d) 中的乳液中形成的微粒载体。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述的单体包含氰基丙烯酸烷基酯 (ACA)。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述的单体包含氰基丙烯酸丁酯 (BCA)。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述的聚合物包括:聚-L-交酯 (PLA)、聚氰基丙烯酸丁酯 (PBCA) 或聚(丙交酯-乙交酯)共聚物 (PLG) 或聚己酸内酯、聚羟基丁酸酯和/或其共聚物。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述的聚合物包括聚己酸内酯。
7. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述的聚合物包括聚(丙交酯-乙交酯)共聚物 (PLG)。
8. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述的聚合物包括聚-L-交酯 (PLA)。
9. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其特征在于,所述连续水相的 pH 为约 6 或更高。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,所述的微粒载体是纳米粒子。
11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其特征在于,所述的生物活性剂是蛋白或肽。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述的生物活性剂是抗原结合分子。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于,所述的抗原结合分子包括域。
14. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于,所述的抗原结合分子是抗体。
15. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于,所述的抗原结合分子是域抗体。
16. 根据前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述的生物活性剂在没有疏水离子配对试剂存在的条件下不溶于有机相中。
17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其特征在于,当生物活性剂是阳离子时,所述的 HIP 试剂是阴离子 HIP 试剂。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述的 HIP 试剂是多库酯钠。
19. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其特征在于,当生物活性剂是阴离子时,

所述的 HIP 试剂是阳离子 HIP 试剂。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述的 HIP 试剂是二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB18)、1,2-二油酰基氧基-3-三甲铵丙烷(DOTAP)、或十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。

21. 一种微粒载体,其特征在于,该微粒载体包括由前述任意一项权利要求所述的方法可得到的囊封的生物活性剂。

22. 根据权利要求 21 所述的微粒载体,其特征在于,所述的蛋白与聚合物的比例至少是约 1.0% w/w,或至少约 2.5% w/w 或者至少是约 5% w/w。

23. 根据权利要求 21 所述的微粒载体,其特征在于,所述的肽与聚合物的比例至少是约 5% w/w,或至少约 9% w/w。

24. 根据权利要求 21 所述的微粒载体,其特征在于,所述的抗体与聚合物的比例至少是约 1% w/w,或至少约 2.5% w/w。

25. 根据权利要求 21 所述的微粒载体,其特征在于,纳米粒子中所述的域抗体与聚合物的比例至少是约 5% w/w。

26. 一种药物组合物,其特征在于,所述的组合物包括权利要求 21-25 中任一项所述的微粒载体。

27. 根据权利要求 26 所述的药物组合物在治疗或预防疾病中的用途。

生物活性剂的囊封方法

背景技术

[0001] 很多药物在大脑或眼中的靶标处具有活性,为了使这些药物到达它们的靶标,它们必须穿过生物屏障,如血脑屏障。虽然一些分子能够通过生物屏障,但是还有一些不能有效或事实上根本不能穿过这些屏障的其它分子。许多药物也仅仅当直接进入靶标组织时才有效,且如果不能到达这个靶标组织,药物实际上也不能起作用。因此,由于不能穿过这样的生物屏障,很多可能有效的药物不能在临床上使用。

[0002] 现有技术中已记述了很多方法以增强药物穿透这些生物屏障的能力。

[0003] 一种方法是改变屏障本身的功能。例如,渗透剂或拟胆碱药物槟榔碱类(cholinomimetic arecolines),其能打开血脑屏障或者改变血脑屏障的穿透性(Saija A 等人, J Pharm. Pha. 42 :135-138(1990))。

[0004] 其它的方法是修饰药物分子本身。例如,修饰蛋白以试图穿过血脑屏障,包括使这些蛋白糖基化或者形成前药(WO/2006/029845)。

[0005] 还有另一方法是植入可控制释放的聚合物,其从基质系统直接将活性成分释放进入神经组织。然而,如果直接植入大脑或骨髓,这种方法是侵入性的且需要外科手术介入(sable 等人,美国专利 4,833,666),这存在的问题是需要病人的同意,且通常仅仅是在大脑内随给予的药物一起进行定位输送,通常很快被排出(WO/2006/029845)。

[0006] 为了克服这些局限,人们使用了药物载体系统,然而,靶标的药物传输的主要问题是网状内皮系统(RES)尤其是通过肝和脾的巨噬细胞的注射的载体的快速调理(opsonisation)和摄取。

[0007] 因此,仍然需要一种有效的方法,以将大分子(如蛋白质)输送到大脑和眼中。具体而言,需要找到一种将大分子穿过血脑屏障的方法,所述大分子在进入大脑时仍能保留活性,以及还能提供所需要的释放动力学,保持蛋白质的稳定和活性,且能够回避清除机制。

附图说明

[0008] 图 1 所示为通过动态光散射(DLS)获得的粒度数据,表明悬液中纳米粒子的存在。

[0009] 图 1(a) 所示为通过动态光散射对纳米粒子悬液分析之后获得的相关图。

[0010] 图 1(b) 所示为纳米粒子的多模态粒度分布(导出数据),绘图以说明相对于粒度范围的粒子群(数量)的分布。

[0011] 图 1(c) 所示为所示为纳米粒子的多模态粒度分布(导出数据),绘图以说明相对于粒度范围的粒子群(数量)的分布。

[0012] 图 1(d) 所示为所示为纳米粒子的多模态粒度分布(导出数据),绘图以说明相对于粒度范围的粒子群(数量)的分布。

[0013] 图 2 所示为用 HIP 方法获得的囊封的亮啡肽类似物(Dalargin)的量与通过普通方法在粒子表面吸收得到的量的对比。

[0014] 图 3 所示为在输送 HIP-PBCA 纳米粒子之后脑中的亮啡肽类似物水平。仅当使用

HIP 方法在微粒中囊封时所述肽是可测量的。

[0015] 图 4 所示为使用 HIP 方法在 PBCA 纳米粒子中对亮啡肽类似物的囊封。测定水相的 pH 对囊封效率的影响。

[0016] 图 5 所示为使用 HIP 方法在 PBCA 纳米粒子中对抗鸡蛋溶菌酶结构域抗体的囊封。通过 Edman 测序分析纳米粒子。

[0017] 图 6 所示通过 SDS-PAGE 分析以确认在 HIP-PBCA 纳米粒子中的 dAb 壳体化。将纳米粒子离心分离以除去任何游离的 dAb 并用 SDS-PAGE 分析颗粒以观察壳体化的 dAb。

[0018] 图 7 所示为通过 SDS-PAGE 分析以确认 VEGA dAb (DOM15-26-593) 载入 HIP-PBCA 纳米粒子。将纳米粒子制剂与 dAb 标准进行比较,以便确定在纳米粒子中存在的 dAb 的量。起始输入的 12mg 中总计 3.31mg dAb 已经在纳米粒子中壳体化。因此,载入效率为 27.6%。dAb 载入率为 3.31% w/w。

[0019] 图 8 所示为小鼠中含有域抗体的 HIP PBCA 纳米粒子通过静脉途径将它们载入的蛋白输送到脑中的能力的体内评估结果。在给药后 10 分钟,纳米粒子中的 dAb 形成可检测的脑吸收物,其量为 8.0ng/ml。游离的 dAb 在脑中也可以检测到,其浓度较低,为 3.3ng/ml (初始数据)。因此,纳米粒子似乎少量增加蛋白的脑吸收 (初始数据)。在 60 分钟时,观察到相反的现象,因为游离的 dAb 似乎聚集在脑中,导致其脑水平进一步增加到 13.5ng/ml。校正了脑水平。

[0020] 图 9 所示为通过静脉途径从含有域抗体的 HIP PBCA 纳米粒子的体内评估中得到的 dAb 在脑和血液中的比例。结果显示,当和纳米粒子一起给予与给予在溶液中的游离 dAb 相比时,脑中存在的 dAb 比血液中的 dAb 的比例高。

[0021] 图 10 所示为小鼠中含有域抗体的 HIP PBCA 纳米粒子通过静脉途径将它们载入的蛋白输送到大脑中的能力的体内评估结果。给药后 10 分钟,纳米粒子组中的 dAb 在脑中显示出高水平的 dAb,平均值为 627.60ng/ml。

[0022] 图 11 所示为通过颈动脉途径从含有域抗体的 HIP PBCA 纳米粒子的体内评估中得到的 dAb 在脑和血液中的比例。纳米粒子组中的 dAb 显示了在两个时间点 (在 10 和 60 分钟分别为 1.569 和 1.845) 处,脑与血液的比例大于 1,表明大多数制备的 dAb 已成功地到达脑。

[0023] 图 12 所示为通过光学显微镜对产生的微球体的确认。所有的微球体制剂都使用聚己酸内酯通过 HIP 方法生成。

[0024] (a) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 4000rpm 2 分钟 20x mag

[0025] (b) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 20x mag

[0026] (c) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 +dAb1 20x mag

[0027] (d) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 +dAb2 20x mag

[0028] 图 13 所示为所示为通过激光衍射对产生的微球体的确认。所有的微球体制剂都使用聚己酸内酯通过 HIP 方法形成。

[0029] (a) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 4000rpm 2 分钟 20x mag

[0030] (b) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 20x mag

[0031] (c) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 +dAb1 20x mag

[0032] (d) 维生素 E TPGS 2%表面活性剂 7500rpm 2 分钟 +dAb2 20x mag

[0033] 图 14 所示为通过 SDS-PAGE 分析对进入 HIP-PC 微球体的 dAb 壳体化的确认。过滤微球体, (F) 离心过滤 (3k 或 13k rpm) 以除去游离的 dAb 和上清液 (S), 以及小球 (P), 并通过 SDS-PAGE 分析, 以观察壳体化的 dAb。

[0034] 图 15 所示为通过 SDS-PAGE 分析对壳体化的 dAb 从 HIP-PC 微球体中的释放的确认。清洗微球体, 接着在 56°C 下加热处理 0、20、40 或 60 分钟, 以释放 dAb、碎片小球 (5 分钟 @5k) 和上清液 (S), 通过 SDS-PAGE 进行分析, 以观察壳体化的 dAb。

[0035] 分子标记 - 参见 Blue Plus 2 预染色标准 (invitrogen), 分子量 (kd), 凝胶确认了已经有 dAb 释放出来。凝胶还确认了 dAb 是完整的, 且由于释放方法, 它们没有片段化。

发明内容

[0036] 在本发明的一个方面中, 提供一种在微粒载体中囊封生物活性剂的方法, 如在纳米粒子中, 或纳米粒子中和上, 或用纳米粒子囊封蛋白和 / 或肽的方法, 和通过在纳米粒子中, 或纳米粒子中和上, 或用纳米粒子囊封以输送蛋白和 / 或肽穿过血脑屏障的方法, 以及通过在微粒载体中, 或微粒载体中和上, 或用微粒载体囊封以将蛋白和 / 或肽输送到眼中的方法。

[0037] 在本发明的另一实施方式中, 提供一种微粒载体, 其包括粒子形成物质和生物活性剂如蛋白和 / 或肽, 以将蛋白和 / 或肽从血液穿过血脑屏障输送到脑或输送到眼中。在本发明的再一实施方式中, 提供纳米粒子的组合物以及它们在治疗中枢神经系统和 / 或眼的疾病或病症中的用途。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明提供包括粒子形成物质和生物活性剂的微粒载体, 以及所述微粒载体的制备方法。

[0040] 在一个实施方式中, 本发明提供一种在微粒载体中囊封生物活性剂的方法, 包括以下步骤:

[0041] a) 在疏水离子配对 (HIP) 试剂存在下使生物活性剂在有机溶剂中溶解;

[0042] b) 使聚合物形成物质的单体和 / 或寡聚体溶解于 (a) 中的有机相中;

[0043] c) 在连续水相中形成在 (b) 中形成的有机相的乳液, 以使单体聚合; 以及

[0044] d) 得到从乳液中形成的微粒载体。

[0045] 在本发明的另一个实施方式中, 本发明提供一种在微粒载体中囊封生物活性剂的方法, 包括以下步骤:

[0046] a) 使在水相中的生物活性剂与在有机溶剂相中的疏水离子配对 (HIP) 试剂混合, 以形成生物活性剂-HIP 复合物;

[0047] b) 从水相中分离复合物;

[0048] c) 除去水相, 并使复合物与有机相均化;

[0049] d) (i) 使聚合物溶解于 (c) 中形成的有机相, 然后在连续水相中形成有机相的乳液; 或者

[0050] (ii) 使聚合物形成物质的单体或寡聚物溶解于 (c) 中形成的有机相, 然后在连续水相中形成有机相的乳液, 以允许单体或寡聚体聚合形成聚合物; 以及

[0051] e) 得到从步骤 (d) 中的乳液中形成的微粒载体。

[0052] 使用疏水离子配对试剂的这种方法允许生物活性剂如蛋白（如亲水蛋白）在疏水聚合物粒子的中心中囊封。疏水离子配对允许萃取出蛋白进入有机介质，因此，这种方法能用单乳液制备微粒载体。

[0053] 在另一个实施方式中，本发明的微粒载体包含生物活性剂如蛋白或肽。所述蛋白可以是抗原结合分子，本文中使用的抗原结合分子是指抗体、抗体片段和能够结合靶标的其它蛋白结构。

[0054] 抗原结合分子可包括域（domain）。“域”是折叠的蛋白结构，具有独立于余下的蛋白的三级结构。

[0055] 一般地，域负责蛋白的离散的功能特性，在很多的情况下可加入、移除或转移到其它的蛋白上，而不会损失该蛋白和/或域的余下部分的功能。“单抗体可变域”是折叠的多肽域，其包括抗体可变域的序列特征。因此，它包括完整的抗体可变域和修饰的可变域，例如，其中的一个或多个环已经被非特征性的抗体可变域的序列取代，或者被截短或包括 N 或 C 末端延伸部分的抗体可变域取代，以及被可变域的折叠片段取代，所述折叠片段至少保留全长域的结合活性和特异性。

[0056] 抗原结合分子可包括至少一个免疫球蛋白可变域，例如，这些分子可包括抗体、域抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFv、双特异抗体、异源结合抗体。这些抗原结合分子能结合单个的靶标，或可以是多特异性的，即结合多个靶标，如它们可以是双特异性的或三特异性的。在一个实施方式中，所述抗原结合分子是抗体。在另一实施方式中，所述抗原结合分子是域抗体（dAb）。在又一实施方式中，所述抗原结合分子可以是抗体和抗原结合片段的组合物，例如连接到单克隆抗体的一个或多个 dAb 和/或一个或多个 ScFv。在又一实施方式中，所述抗原结合分子可以是抗体和肽的组合物。抗原结合分子可包括至少一个非 Ig 结合域，例如特异性地结合独立于不同 V 区或域的抗原或表位的域，这可以是 dAb，例如人、骆驼或鲨鱼的免疫球蛋白单可变域，或者它可以是这样的域，其选自以下的支架的衍生物：CTLA-4（Evibody）、脂笼蛋白（Lipocalin）、蛋白 A 衍生的分子如蛋白 A 的 Z-域（亲和蛋白体，SpA）、A-域（Avimer/Maxibody）、热休克蛋白如 GeoEI 和 GroES、转铁蛋白（穿膜抗体）、锚蛋白重复蛋白（DARPin）、肽适体、C 型凝集素域（四连接素）、人晶体蛋白和人泛素（亲和物）、PDZ 域、人蛋白酶抑制剂的的蝎毒 kunitz 型域、以及纤连蛋白（adnectin）；其已经用于蛋白工程，以便使其与配体而非与天然的配体结合。

[0057] CTLA-4（细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4）是主要在 CD4⁺T 细胞上表达的 CD28 家族受体。它的胞外域是可变域状的 Ig 折叠。对应于抗体的 CDR 的环可用异源序列取代，以赋予不同的结合特性。业已知道，经工程改造成具有不同结合特性的 CTLA-4 分子是 Evibody。进一步详细的内容请参见免疫学方法杂志 248(1-2)，31-45(2001)。

[0058] 脂笼蛋白是转运小疏水分子如类固醇、后胆色素、类视黄醇和脂质的胞外蛋白家族。它们具有刚性折叠的二极结构，其在圆锥形结构的开始端具有很多的环，可以经工程改造以结合不同的靶标抗原。Anticalin 的大小在 160-180 个氨基酸之间，并源自脂笼蛋白。进一步详细的内容参见 Biochim Biophys Acta 1482:337-350(2000)，US7250297B1 和 US20070224633。

[0059] 亲和体是源自能经工程改造以结合抗原的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的蛋白 A 的支架。该域由三螺旋束的约 58 个氨基酸组成。通过表面残基的随机化产

生库。进一步详细的内容参见 Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462(2004) 和 EP1641818A1。

[0060] Avimer 是源自 A- 域支架家族的多域蛋白。约 35 个氨基酸的天然域采用限定的二硫化物键合结构。通过慢慢移动由 A 域家族展现的天然变异可产生多种变化。进一步详细的内容参见 Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561(2005) 和 Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917(2007 年 6 月)。

[0061] 转铁蛋白是单体血清转运糖蛋白。通过在允许的表面环中插入肽序列, 转铁蛋白可以经工程改造以结合不同的靶标抗原。工程改造的转铁蛋白支架的例子包括穿膜抗体 (trans-body)。进一步详细的内容参见 J. Biol. Chem 274, 24066-24073(1999)。

[0062] 设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin) 源自锚蛋白, 其为一种蛋白家族, 用于将整合膜蛋白的附属部分介导至细胞骨架上。单个的锚蛋白重复是由双螺旋和 α 转角组成的 33 个残基基序。通过随机化每个重复的第一螺旋和 α - 转角中的残基, 它们可经改造以结合不同的靶标蛋白。通过增加单元的数量 (亲和力成熟的方法), 可增加结合界面。进一步详细的内容参见 J. Mol. Biol. 332, 489-503(2003), PNAS 100(4), 1700-1705(2003) 和 J. Mol. Biol. 369, 1015-1028(2007) 以及 US20040132028A1。

[0063] 纤连蛋白是一种能改造以结合抗原的支架。Adnectin 由人的 III 型纤连蛋白 (FN3) 的 15 个重复单元的第十域的天然氨基酸序列的主链组成。夹心结构的一端的三个环可改造成使 Adnectin 特异性地识别感兴趣的治疗靶标。进一步详细的内容参见 Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444(2005)、US20080139791、W02005056764 和 US6818418B1。

[0064] 肽适体是由连续的支架蛋白组成的组合识别分子, 一般是含有在活性位点插入的限制性的可变肽环的硫氧还蛋白 (TrxA)。进一步详细的内容参见 Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797(2005)。

[0065] 微体源自天然生成的长度为 25-50 个氨基酸的微蛋白, 包含 3-4 个半胱氨酸桥, 微蛋白的例子包括 KalataB1 和芋螺毒素 (conotoxin) 和结蛋白 (knottins)。微蛋白具有能够改造成包括多达 25 个氨基酸的环, 且不影响微蛋白的整体折叠。改造的结蛋白域的进一步详细内容, 参见 W02008098796。

[0066] 其它的非 Ig 结合域包括已用作支架以改造不同靶标抗原结合特性的蛋白, 包括人晶体蛋白和人泛素 (亲和结合体), 人蛋白酶抑制剂的 kunitz 型域、Ras- 结合蛋白 AF-6 的 PDZ 域、蝎毒素 (北非蝎毒素), C 型凝集素域 (四连蛋白), 其在 Non-Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies(2007, Stefan Dubel 编辑) 的第 7 章和 Protein Science 15:14-27(2006) 中有综述。本发明的非 Ig 结合域可源自任意的这些可替代的蛋白域。

[0067] 在本发明的一个实施方式中, 所述抗原结合分子结合到在中枢神经系统中发现的靶标中, 例如脑或脊髓中或者例如神经组织中。

[0068] 在本文描述的本发明的再一实施方式中, 抗原结合分子特异性地结合到已知与神经疾病或病症相关的靶标中, 例如 MAG (髓鞘相关糖蛋白)、NOMO (神经突起生长抑制蛋白) 或 β - 淀粉样蛋白。

[0069] 这些抗原结合分子包括能够结合 NOMO (如抗 -NOMO 抗体) 的抗原结合分子。用于本发明的抗 -NOMO 抗体的一个例子是由 SEQ ID NO 1 的重链和 SEQ ID NO 2 的轻链限定的抗体, 或包含 SEQ ID NO 1 和 2 所示的抗体的 CDR 的抗 -NOMO 抗体或其抗原结合片段。该

抗体 (H28L16) 的进一步详细的内容可在 PCT 申请 W02007068750 中找到,其内容纳入本文中作为参考。

[0070] 这种抗原结合分子包括能够结合 MAG (如抗 -MAG 抗体) 的抗原结合分子。用于本发明的抗 -MAG 抗体的一个例子是由 SEQ ID NO 11 的重链可变区和 SEQ ID NO 12 的轻链可变区限定的抗体,或包含 SEQ ID NO 1 和 2 所示的抗体的 CDR 的抗 -MAG 抗体或其抗原结合片段。该抗体 (BvH1CvL1) 的进一步详细的内容可在 PCT 申请 W02004014953 中找到,其内容纳入本文中作为参考。

[0071] 这种抗原结合分子包括能够结合 β -淀粉样蛋白 (如抗 β -淀粉样蛋白抗体) 的抗原结合分子。用于本发明的抗 β -淀粉样蛋白抗体的一个例子是由 SEQ ID NO 5 的重链和 / 或 SEQ ID NO 6 的轻链限定的抗体,或包含 SEQ ID NO 5 和 6 所示的抗体的 CDR 的抗 - β -淀粉样蛋白抗体或其抗原结合片段。该抗体 (H2L1) 的进一步详细的内容可在 PCT 申请 W02007113172 中找到,其内容纳入本文中作为参考。用于本发明的可替代的抗 β -淀粉样蛋白抗体是由 SEQ ID NO 7 的重链和 / 或 SEQ ID NO 8 的轻链限定的抗体,或包含 SEQ ID NO 7 和 8 所示的抗体的 CDR 的抗 - β -淀粉样蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0072] 这种抗体的 CDR 序列可由以下方法确定:Kabat 编号系统 (Kabat 等人;Sequences of proteins of Immunological Interest NIH,1987)、Chothia 编号系统 (Al-Lazikani 等人,(1997) JMB 273,927-948)、接触定义方法 (MacCallum R.M.,和 Martin A.C.R. 和 Thornton J.M.,(1996), Journal of Molecular Biology,262(5),732-745) 或本领域的技术人员已知的对抗体的残基编号并确定 CDR 的任何其它确定的方法。

[0073] 在本发明的一个实施方式中,该抗原结合蛋白结合到眼中的靶标中,例如 TNF、TNFr-1、TNFr-2、TGF β 受体 -2、VEGF、NOGO、MAG、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-17、CD20、 β -淀粉样蛋白、FGF-2、IGF-1、PEDF、PDGF 或补体因子,如 C3、C5、C5aR、CFD、CFH、CFB、CFI、sCRI 或 C3。

[0074] 在本发明的另一实施方式中,该抗原结合蛋白结合 VEGF。在本发明的另一个可替代的实施方式中,该抗原结合蛋白结合 β -淀粉样蛋白。

[0075] 在本发明的一个实施方式中,所述微粒载体可以是微球体或纳米粒子。在一个这样的实施方式中,所述微粒载体是纳米粒子,且生物活性剂是蛋白。在另一实施方式中,所述微粒载体是纳米粒子,且生物活性剂是肽。在又一实施方式中,所述微粒载体是纳米粒子,且生物活性剂包含抗原结合分子,如域抗体或抗体。在又一实施方式中,所述微粒载体是纳米粒子,且生物活性剂包含域。在另一实施方式中,所述微粒载体是微球体,且生物活性剂是蛋白。在又一实施方式中,所述微粒载体是微球体,且生物活性剂是肽。在又一实施方式中,所述微粒载体是微球体,且生物活性剂包含抗原结合分子,如域抗体或抗体。在再一实施方式中,所述微粒载体是微球体,且生物活性剂包含域。

[0076] 在本发明的一个实施方式中,其提供包括本发明所述的方法制备的纳米粒子的组合物。在另一实施方式中,当用动态光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的纳米粒子在约 1nm- 约 1000nm 之间的范围内。在又一实施方式中,当用动态光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的纳米粒子在约 1nm- 约 400nm 之间,或约 1nm- 约 250nm 之间,或约 1nm- 约 150nm 之间,或约 40nm- 约 250nm 之间,或约 40nm- 约 150nm 之间,或约 40nm- 约 100nm 之间的范围内。

[0077] 在本发明的又一实施方式中,当用动态光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的纳米粒子在约 40nm- 约 250nm 之间的范围内。

[0078] 在本发明的又一实施方式中,当用动态光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的纳米粒子在约 40nm- 约 150nm 之间的范围内。

[0079] 在本发明的又一实施方式中,其提供一种包括本发明的纳米粒子的组合物,其中当用动态光散射技术测量时,组合物中的纳米粒子的粒径中间值小于约 1000nm,例如粒径小于约 400nm,例如粒径小于约 250nm,例如粒径小于约 150nm。

[0080] 在另一实施方式中,组合物中的纳米粒子的粒度中间值为约 40nm- 约 250nm。

[0081] 在另一实施方式中,组合物中的纳米粒子的粒度中间值为约 40nm- 约 150nm。

[0082] 在本发明的一个实施方式中,其提供包括本发明所述的任一种方法制备的微球体的组合物。在另一实施方式中,当用小角激光光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的微球体的直径在约 1 μ m- 约 100 μ m 之间的范围内。在又一实施方式中,当用小角激光光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的粒子在约 1 μ m- 约 80 μ m 之间,或在约 1 μ m- 约 60 μ m 之间,或在约 1 μ m- 约 40 μ m 之间,或在约 1 μ m- 约 30 μ m 之间,或在约 1 μ m- 约 10 μ m 之间的范围内。

[0083] 在另一实施方式中,当用小角激光光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的微球体在约 1 μ m- 约 60 μ m 之间的范围内。

[0084] 在另一实施方式中,当用小角激光光散射技术测量时,数量上至少约 90% 的微球体在约 1 μ m- 约 30 μ m 之间的范围内。

[0085] 在本发明的又一实施方式中,其提供一种包括本发明的微球体的组合物,其中当用小角激光光散射技术测量时,组合物中的微球体的粒径中间值小于约 100 μ m,例如粒径小于约 80 μ m,例如粒径小于约 60 μ m,例如粒径小于约 40 μ m。

[0086] 在另一实施方式中,组合物中微球体的粒度中间值为约 1 μ m- 约 6 μ m 或 1 μ m- 约 30 μ m。

[0087] 在本发明的另一实施方式中,所述微粒载体在超过至少 3 个月或更长的时间内,或长达 6 个月或更长的时间或者长达 12 个月或更长的时间内持续释放治疗量的活性生物分子。

[0088] 在一个实施方式中,在没有疏水离子配对试剂存在时,所述生物活性剂不溶于有机相。

[0089] 在本文所述的本发明的一个实施方式中,当蛋白是阴离子时,疏水离子配对试剂是阳离子 HIP 试剂。在另一实施方式中,当蛋白是阳离子时,疏水离子配对试剂是阴离子 HIP 试剂。在又一实施方式中,阴离子 HIP 试剂选自:烷基季铵盐阳离子,优选烷基溴化铵,更优选四丁基溴化铵、四己基溴化铵、四辛基溴化铵、十二烷基硫酸钠 (SDS)、油酸钠或多库脂钠 (aka Aerosol OT™),且 HIP 试剂以化学计量等于或大于蛋白上的净正电荷的数量的量存在。在另一实施方式中,阳离子 HIP 试剂选自:二甲基二(十八烷基)溴化铵 (DDAB18)、1,2-二油酰基氧基-3-三甲铵丙烷 (DOTAP)、或十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB),且 HIP 试剂以化学计量的量等于或大于蛋白上的净负电荷的量存在。

[0090] 在进一步的实施方式中,任何疏水阳离子或阴离子可潜在地用作 HIP 试剂以溶解蛋白。疏水离子配对 (HIP) 包含带有类似电荷种类,但是不容易被溶剂化的极性平衡离子

的化学计量取代。如本文所述,本发明提供一种使用 HIP 改变蛋白溶解性的方法,这允许萃取蛋白进入有机溶剂中,例如二氯甲烷中。多库脂钠(双(2-乙己基)琥珀酸酯磺酸钠)是合适的离子配对试剂的一个例子。在一个实施方式中,使含有多库脂钠的二氯甲烷与水性蛋白溶液混合。这导致多库酸酯离子与蛋白形成离子对,并随后隔开蛋白进入油相。蛋白分散于二氯甲烷中使得蛋白被囊封在通过单水包油乳化法制备的纳米粒子或微球体中。

[0091] 在本文所述的本发明的一个实施方式中,当蛋白是阴离子型,而 HIP 试剂是阳离子型时,连续水相的 pH 为约 7.0 或更高,例如,pH 可以是至少约 8.0 或至少约 10.0 或至少约 12.0。

[0092] 在本文所述的本发明的另一个替代性的实施方式中,当蛋白是阳离子型,而 HIP 试剂是阴离子型时,连续水相的 pH 为约 7.0 或更低,例如,pH 可以是小于约 6.0 或小于约 4.0 或小于约 2.0。

[0093] 在这样的一个实施方式中,蛋白与聚合物的重量/重量比(w/w)可以是 0.5% -90%,例如是至少约 0.5%,或至少约 1%,或至少约 2%,或至少约 2.5%,或至少约 5%,或至少约 9%,或至少约 10%,或至少约 15%,或至少约 20%,或至少约 40%,或至少约 50%,或至少约 60%,或至少约 70%,或至少约 80%或至少约 90%。例如,当蛋白是肽时,该肽与聚合物的比率可以是至少约 9%,当蛋白是抗体时,该抗体与聚合物的比率可以至少是约 2%,或当蛋白是域抗体时,该域抗体与聚合物的比率可以至少是约 2.5%。

[0094] 在本发明的一个实施方式中,蛋白与总制剂(聚合物+HIP 和可选的表面活性剂)的 w/w 比可以是 0.5% -50%,例如是至少约 5%,或至少约 9%,或至少约 15%,或至少约 16%,或至少约 20%或至少约 25%。例如,当蛋白是肽时,该肽与总制剂的重量比可以是至少约 16%,或蛋白是抗体时,抗该体与聚合物的重量比可以是至少约 1%,或当蛋白是域抗体时,该域抗体与总制剂的重量比可以是至少约 9%。

[0095] 在本发明的一个实施方式中,粒子的囊封效率是至少约 1%,或至少约 2%,或至少约 10%,或至少约 20%,或至少约 40%,或至少约 50%,或至少约 60%,或至少约 70%,或至少约 80%,或至少约 90%,或至少约 95%,或至少约 97%,或至少约 99%。例如,当蛋白是肽时,囊封效率可以是至少约 90%,当蛋白是抗体时,囊封效率可以是至少约 1%,或当蛋白是域抗体时,囊封效率可以是至少约 70%。

[0096] 在本发明的一个实施方式中,单体或寡聚体选自:甲基丙烯酸甲酯、氰基丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸、二甲基丙烯酸乙二醇酯、丙烯酰胺、N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺和甲基丙烯酸 2-二甲胺乙酯。在进一步的实施方式中,该单体是氰基丙烯酸烷基酯,如氰基丙烯酸丁酯(BCA)。

[0097] 在又一实施方式中,用于本文所述的任一方法中的聚合物选自但不限于以下物质:聚-L-交酯(PLA)、聚(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLG)、聚交酯、聚己酸内酯、聚羟基丁酸酯和/或其共聚物。合适的粒子形成物质包括但不限于:聚二烯烃如聚丁二烯等;聚烯烃类如聚乙烯、聚丙烯等;聚丙烯酸类如聚丙烯酸等;聚甲基丙烯酸类如聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸羟乙酯等;聚乙烯醚类、聚乙烯醇类、聚乙烯酮类、聚乙烯基卤化物如聚氯乙烯等;聚乙烯腈类;聚乙烯酯类如聚乙酸乙烯酯等;聚乙烯吡啶类如聚(2-乙基-吡啶)、聚(5-甲基-2-乙基吡啶)等;聚苯乙烯类;聚碳酸酯类;聚酯类;聚原酸酯类;聚酯酰胺类(polyesterarnides);聚酸酐类;聚氨酯类;聚酰胺类;纤维素醚类如甲基纤维素、

羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素等；纤维素酯类如醋酸纤维素、邻苯二甲酸醋酸纤维素、醋酸丁酸纤维素等；多糖、蛋白质、凝胶、淀粉、胶、树脂等等。这些材料可单独使用，作为物理混合物（共混物）或作为共聚物使用。还共混聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丁基氰基丙烯酸酯、聚烷基氰基丙烯酸酯、聚芳基酰胺、聚酸酐、聚原酸酯、N,N-L-赖氨酸二基对苯二甲酸酯、聚酸酐、去溶剂化的生物活性剂或碳水化合物、多糖、聚丙烯醛、聚戊二醛及其衍生物、共聚物和聚合物。

[0098] 适合用于本发明的方法的有机溶剂的例子包括但不限于：不溶于水的酯如乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丙酯、乙酸异丁酯、乙酸正丁酯、异丁酸异丁酯、2-乙基乙酸己酯、乙二醇二乙酸酯；不溶于水的酮如甲基乙基酮、甲基异丁基酮、甲基异戊基酮、甲基正戊基酮、二异丁基酮；不溶于水的醛如乙醛、正丁醛、巴豆醛、二乙基己醛、异丁醛和丙醛；不溶于水的醚酯如 3-乙氧基丙酸乙酯；不溶于水的芳香烃如甲苯二甲苯和苯；不溶于水的卤代烃如 1,1,1-三氯乙烷；不溶于水的乙醇醚酯如丙二醇单甲醚醋酸酯、乙二醇单乙醚醋酸酯、乙二醇单丁醚醋酸酯、二乙二醇单丁醚醋酸酯；不溶于水的邻苯二甲酸增塑剂如邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二辛酯、对苯二甲酸二辛酯、辛基邻苯二甲酸丁酯、邻苯二甲酸丁基苄酯、邻苯二甲酸烷基苄酯；不溶于水的增塑剂如己二酸二辛酯、乙二醇二-2-乙基己酸三乙烯酯、偏苯三酸三辛酯、三醋酸甘油酯、甘油基/三丙酸菌素 (glyceryl/tri propionin)、2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯、二氯甲烷、乙酸乙酯或二甲基亚砷、四氯化碳、氯仿、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、二乙醚、二甲基甲酰胺、庚烷、己烷或其它的烃；甲基叔丁基醚、戊烷、甲苯、2,2,4-三甲基戊烷、1-辛醇及其异构体或苯甲醇。

[0099] 在本发明的一个实施方式中，用于本发明的方法的溶剂选自：二氯甲烷、乙酸乙酯或二甲基亚砷、四氯化碳、氯仿、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、二乙醚、二甲基甲酰胺、庚烷、己烷或其它的烃；甲基叔丁基醚、戊烷、甲苯、2,2,4-三甲基戊烷、1-辛醇及其异构体或苯甲醇。

[0100] 本文所述的本发明的所有方面的微粒载体、包含它们的组合物或它们的制备方法可进一步包括加入表面活性剂，其例如但不限于：胆酸钠、泊洛沙姆 188 (poloxamer) (pluronic F68™, 或 F127)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚山梨醇酯 80、葡聚糖、泊洛沙姆、poloxamines、多功能醇的羧酸酯类、烷氧基化醚类、烷氧基酯类、烷氧基化甘油单、二、三酯类、烷氧基酚类以及联苯酚类、乙氧基醚类、乙氧基酯类、乙氧基甘油三酸酯类、GenapolR™ 和 BaukiR™ 系列的物质、脂肪酸的金属盐、羧酸金属盐、醇硫酸金属盐以及脂肪醇硫酸金属盐和磺基琥珀酸金属盐以及两种或更多种上述物质的混合物。

[0101] 在又一实施方式中，所述表面活性剂选自：胆酸钠、泊洛沙姆 188 (pluronic F68™)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚山梨醇酯 80 和葡聚糖。

[0102] 在本发明的一个实施方式中，其提供包含生物活性剂的微粒载体，其可由本文所述的本发明的任意方法制备。

[0103] 囊封在本发明的微粒载体和 / 或组合物内的生物活性剂在它从微粒载体释放时保留至少一些生物活性，例如，当药剂是结合的药剂并对生物活性剂从粒子中释放产生生物应答时，该组合物中的一些比例的分子可保留至少一些结合它们的靶标的能力。可用合适的生物结合测定测量这样的结合，合适的测定的例子包括但不限于 ELISA 或 Biacore™。

在另一实施方式中,当通过生物活性测定对粒子的释放进行测量时,例如在一个实施方式中通过 ELISA、Biacore 测量时,组合物保留至少 50%它对靶标的亲和力,或对靶标保留至少 70%或至少 90%的亲和力 (Kd)。在一个实施方式中,组合物能够在给药的对象中引出治疗效果。本发明的组合物的生物活性可通过任意合适的测定进行测量,其测量的是囊封的生物活性分子的活性,例如当生物活性分子是 VEGF dAb 时,可使用实施例 18 记载的测定。

[0104] 在另一个实施方式中,其提供一种包含囊封在本文所述的本发明的微粒载体中的生物活性剂的药物组合物。

[0105] 在另一个实施方式中,其提供一种包含囊封在本文所述的本发明的纳米粒子中的蛋白的药物组合物。

[0106] 在另一个实施方式中,本发明的组合物可用来治疗和 / 或预防涉及微粒载体穿过血脑屏障的疾病或病症。

[0107] 在另一个实施方式中,本文所述的本发明的组合物可用来治疗和 / 或预防中枢神经系统的疾病或病症,例如可用来治疗和 / 或预防阿尔茨海默病、亨廷顿舞蹈症、牛海绵状脑病、西尼罗河病毒性脑炎、神经艾滋病、脑损伤、脊髓损伤、转移性脑癌、多发性硬化、中风。

[0108] 在另一个实施方式中,所述组合物可包含抗 MAG- 抗体,以治疗和 / 或预防中风或神经损伤。

[0109] 在另一个实施方式中,所述组合物可包含抗 -NOGO- 抗体,以治疗和 / 或预防中风或神经损伤,或者例如治疗或预防神经退化性疾病如阿尔茨海默病。

[0110] 在另一个实施方式中,所述组合物可包含抗 - β - 淀粉样蛋白抗体,以治疗和 / 或预防中风或神经损伤,或者例如治疗或预防神经退化性疾病如阿尔茨海默病。

[0111] 在本文所述的本发明的一个实施方式中,所述微粒载体可通过肠胃外注射或输注、静脉或动脉给药的方式给予患者。

[0112] 在另一个实施方式中,本文所述的本发明的组合物可用来治疗和 / 或预防眼睛疾病或病症。在另一个实施方式中,本文所述的本发明的组合物可用来治疗和 / 或预防疾病,其例如但不限于年龄相关的黄斑变性 (新生血管 / 湿的)、糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉闭塞症、葡萄膜炎、角膜新生血管形成或青光眼。

[0113] 在另一个实施方式中,所述组合物可用来治疗和 / 或预防 AMD (年龄相关的黄斑变性),例如湿性 AMD 或干性 AMD。

[0114] 在本发明的另一个实施方式中,其提供一种囊封在本文所述的纳米粒子和 / 或微球体中的生物活性剂,用作药物。

[0115] 在本发明的一个实施方式中,其提供本文所述的本发明的组合物在制备治疗和 / 或预防中枢神经系统疾病的药物中的用途。在另一个实施方式中,本发明提供本文所述的本发明的组合物在制备治疗和 / 或预防阿尔茨海默病的药物中的用途。在又一个实施方式中,本发明提供本文所述的本发明的组合物在制备治疗和 / 或预防中风或神经损伤的药物中的用途。

[0116] 在本发明另一个实施方式中,提供本文所述的本发明的组合物在制备治疗或预防眼病的药物 (如在制备治疗和 / 或预防 AMD 的药物) 中的用途。

[0117] 本发明提供使用本发明的组合物治疗和 / 或预防中枢神经系统疾病的方法。在另

一个实施方式中,本发明提供使用本发明的组合物治疗阿尔茨海默病的方法。在另一个实施方式中,本发明提供使用本发明的组合物治疗和 / 或预防中风或神经损伤的方法。

[0118] 本发明还提供使用本发明的组合物治疗和 / 或预防眼病的方法。在另一个实施方式中,本发明提供使用本发明的组合物治疗和 / 或预防 AMD 的方法。

[0119] 定义

[0120] 本文使用的术语“粒子形成的物质”用来描述任意的能够聚合的单体和 / 或寡聚体,或能形成不溶于水性环境中的粒子的聚合物,如 PBCA、PLGA。在未聚合时,该粒子形成物质可溶于有机溶剂中。

[0121] 本说明书全文使用的术语“微粒载体”用于包含纳米粒子和微球体。“微球体”是由直径大于 $1\ \mu\text{m}$ 的各种天然和合成的材料组成的粒子,而本文使用的“纳米粒子”是亚微米级的粒子,如 1-1000nm。

[0122] 在一个实施方式中,本文使用的术语微粒载体、纳米粒子和微球体具有载体结构,其具有生物相容性且足以抵抗使用环境导致的化学和 / 或物理损坏,以至于在给药进入人或动物体之后,足量的粒子基本上保持完整,并能保持足够的时间,以便能够到达所需要的靶器官或组织,如脑或眼睛。

[0123] 本文所使用的术语“生物活性剂”是用于表示当到达它们应到的靶标时,该分子必须能够至少部分具有生物活性的术语。为避免术语“生物活性剂”和“生物活性分子”在本说明书全文中重复使用表示歧义,两个术语表示相同的含义,且能够互换。

[0124] 术语“溶解”定义为形成溶剂中的单独分子形式的溶液,或形成液体悬液中的固体,其形式为分子微小固体聚集块悬浮于液体中。溶解过程也可以得到完全溶解的分子和悬浮的固体聚集块的混合物。

[0125] 整份说明书中所使用的用于在微粒载体中囊封的术语“蛋白”包括分子量至少为 11kDa、或至少 12kDa、或至少 50kDa、或至少 100kDa、或至少 150kDa 或至少 200kDa 的蛋白。囊封用的蛋白也可以有很长的长度,例如至少为 70 个氨基酸的长度或至少为 100 个氨基酸的长度或至少为 150 个氨基酸的长度或至少为 200 个氨基酸的长度。

[0126] 整份说明书中所使用的用于在微粒载体中囊封的术语“肽”包括较短序列的氨基酸,其分子量不大于约 10kDa、或不大于约 8kDa、或不大于约 5kDa、或不大于约 2kDa 或不大于约 1kDa 或小于 1kDa。囊封用的肽的长度不超过 70 个氨基酸的长度或不超过 50 个氨基酸的长度或不超过 40 个氨基酸的长度、或不超过 20 个氨基酸的长度、或小于 10 个氨基酸的长度。

[0127] 术语“眼周”是指局部给药至眼外周的位置,其包括但不限于:“结膜下”- 结膜的下面 - 在巩膜上覆盖整个眼球的清澈的黏液膜;“筋膜下”- 包裹眼睛的筋膜的下面但在巩膜外面;“眼球周围”- 眼球下的空间,其中眼球位于眼框中;“眼球后”- 眼球正后方的空间,邻近视神经;“脉络膜上层”- 巩膜的下面,但在脉络膜进入脉络膜上层空间的外部;“经巩膜”- 该术语也用来指输送通过,即从巩膜的外部通过。

[0128] 短语“免疫球蛋白单可变域”是指特异性地结合到独立于不同 V 区或域的抗原或表位的抗体可变域 (V_H 、 V_{HH} 、 V_L)。免疫球蛋白单可变域可以与其它不同的可变区或可变域的形式(例如同源或异源多聚体)存在,其中,通过单个免疫球蛋白可变域的抗原结合不需要所述的其它的区或域(即免疫球蛋白单可变域独立于其它的可变域结合抗原)。“域抗体”

或“dAb”与本文所使用的术语能够结合抗原的“免疫球蛋白单可变域”一致。免疫球蛋白单可变域可以是人抗体可变域,但也包括其它物种的单抗体可变域,如啮齿目动物(例如在WO 00/29004中揭示的铰口鲨和骆驼 V_{Hd} dAbs)。骆驼 V_{Hd} 是源自包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和骆马的物种的免疫球蛋白单可变域多肽,其产生天然地缺少轻链的重链抗体。这种 V_{Hd} 域可根据本领域中的标准技术进行人源化处理,根据本发明,这种域仍然被认为是“域抗体”。本文使用的“ V_H 包括骆驼 V_{Hd} 域”。

[0129] 本文使用的术语“抗原结合分子”是指抗体、抗体片段和能够结合到靶标的其它蛋白结构。

[0130] “域”是折叠蛋白结构,具有独立于余下的蛋白的三级结构。一般地,域负责蛋白的离散的功能特性,在很多的情况下可加入、移除或转移到其它的蛋白上,而不损失该蛋白和/或域的余下部分的功能。“单抗体可变域”是折叠的多肽域,其包括抗体可变域的序列特征。因此,它包括完整的抗体可变域和修饰的可变域,例如,其中的一个或多个环已经被非特征性的抗体可变域的序列取代,或者被截短或包括N或C末端延伸部分的抗体可变域,以及可变域的折叠片段取代,所述折叠片段至少保留结合活性和全长域的特异性。

[0131] 本文使用的术语“光散射技术”是指用来确定溶液中的小粒子的粒度分布特征的方法-光散射技术的一个例子是可用于测量纳米粒子的动态光散射,光散射的另一例子是可用于测量微球体的静态光散射或小角度光散射。

[0132] 本位使用的术语“动态光散射”(DLS)是使用通过粒子分散利用散射光以得出粒度的信息的方法。动态光散射取决于这样的事实,即当在液体悬液中时,粒子的Browian运动依赖粒度,且粒子的Browian运动使来自粒子样品的散射光的强度产生波动。通过相关的函数分析这些波动,以得出粒径。接着利用斯托克斯-爱因斯坦方程算出粒子的平均流体力学直径。

[0133] “多指数分析”可得出粒度分布,可确定不同样品内部的不同物种的存在。DLS通常可用于纳米粒子的分析。

[0134] 整份说明书中可换用的术语“静态光散射”或“小角度激光光散射”有时是指激光衍射。激光衍射依赖的是衍射角与粒度成反比的事实。该方法使用全米氏理论,其完全解答了光与物质的相互作用的方程。激光衍射可用于分析纳米粒子和微粒子(直径为0.02-2000微米)。

[0135] 本文使用的术语“血脑屏障”(BBB)是指主要保护脑不受血液中的化学物质影响,但仍允许基础代谢功能的膜结构。它由脑微血管内皮细胞组成,其在脑毛细血管中紧密聚集。与身体其它任何部位的毛细血管的内皮细胞相比,这种较高的密度更能限制物质从血流通过。

[0136] 在整篇说明书中,药物载入的百分比定义为在粒子制剂中使用的每份物料的重量(聚合物重量)中含有的药剂的重量百分比 w/w 。

[0137] 药物载入 $\% = (\text{药物重量} / \text{粒子制剂中使用的物料重量}) \times 100\%$ 。

[0138] 在整篇说明书中,参考多个实施方式以清楚简洁的语言描述了本发明。应该理解的是,在不脱离本发明的范围内实施方式可有多种组合或者分开使用。

实施例

[0139] 实施例 1 通过 HIP 方法制备 PBCA 纳米粒子

[0140] 通过在含有溶解的 HIP 离子（在 1ml 二氯甲烷中的多库酯钠，3.058-6.116% w/v）的有机相中加入 100 μ l BCA 单体以制备纳米粒子。将得到的溶液经移液器移入水相（1% w/v 葡聚糖，0.2% pluronic F68, 10ml, pH7.0）中，使用 Silveron L4RT 均化器以 7000 的速度进行均化处理。接触中性 pH 的水相使 BCA 单体快速聚合形成 PBCA 聚合物。将形成的乳液均化处理 45 秒，接着在通风橱中孵育 3 小时，使有机相蒸发并形成纳米粒子。将得到的纳米粒子悬液在 4°C 下储存。

[0141] 实施例 2 通过动态光散射确认纳米粒子形成

[0142] 使用动态光散射 (DLS) 通过测量粒度来确认经 HIP 方法形成的 PBCA 纳米粒子。使用 Brookhaven 仪器公司微粒粒度分析仪 (BIC 90plus) 来分析粒子。图 1 所示为经 DLS 得到的粒度数据，表明悬液中有纳米粒子存在。通过 DLS 得到的粒度表明形成了平均流体力学直径为 291.4nm 的纳米粒子（图 1a）。也发现粒子群是相对单分散的，而测量样品中的粒度范围有多宽的多分散指数为 0.242（图 1a）。这低于粒子制剂的最大的可接受值 0.300。一般而言，该相关图确认了粒子制备方法已经成功地产生了高质量的 PBCA 纳米粒子悬液。

[0143] 得到的数据表明大多数的粒子是小的（图 1b-d）。结果表明，约 96.3% 的粒子群的直径为 210.37nm 或更小（图 1b）。还发现悬液似乎也没有大的聚集块，且不含有直径大于 732.05nm 的任何粒子，大多数的粒子群显然更小（图 1c）。此外，该制剂看来还不含直径小于 143.38nm 的任何粒子（图 1d）。因此，大多数粒径在 143.38nm-210.37nm 之间，一种静脉给药的安全粒度，但不是非常的小，以至于减小药物加载的效率。

[0144] 图 1(a) - 通过动态光散射对纳米粒子悬液分析后获得的相关图。根据得到的数据，粒子的平均流体力学直径为 291.4nm，多分散指数为 0.242。

[0145] 图 1(b) - 纳米粒子的多模态粒度分布（得到的数据），绘图以描述粒子群（数量）相对于粒度范围的分布。数据表明 96.3% 的粒子群的直径似乎为 201.37nm 或更小。

[0146] 图 1(c) - 纳米粒子的多模态粒度分布（得到的数据），绘图以描述粒子群（数量）相对于粒度范围的分布。数据表明 96.3% 的直径为 201.37nm 或更小，100% 的粒子样品的直径为 732.05nm 或更小。因此，悬液中没有发现大的聚集块，且因而认为对静脉给药是安全的。

[0147] 图 1(d) - 纳米粒子的多模态粒度分布（得到的数据），绘图以描述粒子群（数量）相对于粒度范围的分布。数据表明 6.2% 的粒子样品直径为 143.38nm 或更小。

[0148] 当制备不同的纳米粒子制剂时，还发现该方法得到了相似的纳米粒子粒度。表 1 总结了一系列的从 6 个不同的组合物制剂得到的粒度数据：

[0149]

制剂	平均流体力学直径 (nm)	多分散指数
1	367.7	0.280
2	291.4	0.242
3	236.3	0.259
4	244.7	0.256
5	255.4	0.213
6	269.8	0.221
平均值	294.22	0.245

[0150] 一般而言,业已发现 HIP 方法制备了具有所需要的粒径和多分散性的纳米粒子悬液。

[0151] 实施例 3 使用 HIP 方法将肽溶于有机相中并囊封入 PBCA 纳米粒子中

[0152] 通过将 30-60mg 的肽溶于 3ml CaCl_2 (18.3mM) 中并加入浓盐酸 (2M) 将 pH 降至 3.05, 以制备六肽亮啡肽类似物溶液。将得到的溶液 (500 μl , 10-20mg/ml, 肽的总量为 5-10mg) 加入装在 2ml 埃彭道夫管中的在二氯甲烷中的 HIP 试剂多库酯钠的溶液中 (1ml, 3.058-6.116% w/v)。所用的 HIP 溶液的体积是肽溶液的 2 倍 (1ml HIP 相对于 500 μl 肽溶液)。5mg 肽时, HIP : 肽的摩尔比为 10 : 1, 10mg 肽时, 为 5 : 1。以最大的速度将有机相和水相涡旋混合 1 分钟。接着以 20817rcf 离心分离得到的悬液, 以分离两相, 进行 50 分钟。收集有机层 (含有溶解的肽) 并用来制备纳米粒子。

[0153] 为了确认所述的方法将溶解的肽成功地融入有机相中, 测定在水相中剩余的肽的量。经 LC-MS 分析和 Edman 测序表明至少 99% 的肽已经成功地萃取进入有机相中。

[0154] 实施例 4 在 PBCA 纳米粒子中囊封肽

[0155] 通过将 100 μl BCA 单体加入含有溶解的肽和 HIP (1ml) 的有机相中制备纳米粒子。将得到的溶液转移到有机相 (1% w/v 葡聚糖, 0.2% w/v pluronic F68, 10ml, pH7.0) 中, 使用 Silveron LART 均化器以 7500 的速度进行均化处理 (精细乳化筛, 3/4 英寸探针)。接触中性 pH 的水相将使 BCA 单体快速聚合形成 PBCA 聚合物。将形成的乳液均化处理 45 秒, 接着在通风橱中孵育并搅拌 (IKA 磁搅拌棒, 速度设为 4) 1 小时, 以蒸发有机相。接着将设定的速度降到 3, 进一步将制剂孵育 2 小时, 以确保有机相的蒸发和纳米粒子的形成。收集纳米粒子悬液并在储存在 4°C 下。

[0156] 将得到的纳米粒子离心分离以除去任何游离的肽并重新悬浮在水中或 PBS 中。

[0157] 通过 LC-MS 分析粒子以确定囊封效率。发现即使使用较高的肽量 (10mg) 时, 也有近 90% 的肽的剂量被囊封。将用 HIP 方法得到的囊封的肽的量与在粒子表面吸收的普通方法得到的那些量进行比较, 清楚地表明 HIP-PBCA 方法的优越性 (图 2)。当使用吸收方法时, 仅 1.5% 的肽剂量被加载到粒子上。在不同的时间使用吸收法分析亮啡肽类似物 (dalargin) 加载的纳米粒子。在开发当前 HIP 方法作为评估现有技术的手段之前, 制得并

分析 Kreuter 吸收的粒子。使用的 LC/MS 法和 HPLC 法具有相同的敏感度。

[0158] 实施例 5 HIP-PBCA 纳米粒子体内输送系统的评估 (小鼠模型)

[0159] 在小鼠模型中体内确定 HIP-PBCA 纳米粒子将它们加载的肽输送脑中的能力。将使用 HIP 方法制得的含有囊封的亮啡肽类似物的 HIP-PBCA 纳米粒子与如 Kreuter 报道的在纳米粒子表面上具有吸收的肽的 HIP-PBCA 纳米粒子进行比较。通过用聚山梨醇酯 80 表面活性剂包覆它们的表面制备经静脉途径输送至脑的纳米粒子。简而言之,在注射之前,将所述纳米粒子在含有 1% w/v 的表面活性剂的 PBS 中孵育 30 分钟。文献中业已报道,通过促使血清载脂蛋白在纳米粒子表面的吸收,表面活性剂间接地将纳米粒子靶标到脑。这允许粒子结合到血脑屏障上的载脂蛋白受体上并胞吞转运到脑。比较以下的制剂:

[0160] 1、单独的 HIP-PBCA 纳米粒子 (5 : 1HIP 含量)

[0161] 2、单独的 HIP-PBCA 纳米粒子 (10 : 1HIP 含量)

[0162] 3、溶液中的亮啡肽类似物 (2.0mg/kg)

[0163] 4、含有在表面上吸收的亮啡肽类似物 (制剂中使用的总剂量为 2.0mg/kg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子

[0164] 5、含有囊封的亮啡肽类似物 (制剂中使用的总剂量为 2.0mg/kg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 5 : 1)

[0165] 6、含有囊封的亮啡肽类似物 (制剂中使用的总剂量为 2.0mg/kg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 5 : 1),与前一个相同,但是以 1/10 剂量注射

[0166] 7、含有囊封的亮啡肽类似物 (制剂中使用的总剂量为 2.0mg/kg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 10 : 1)

[0167] 注射 20 分钟后,处死小鼠,收集大脑和血液样品,并经 LC-MS-MS 分析肽的存在。假设血液污染为 $15 \mu\text{g}/\text{g}$ 大脑,校正由于血液污染得到的大脑数据。得到的数据参见图 3:

[0168] 体内研究的结果表明,使用 HIP 方法使肽在 HIP-PBCA 纳米粒子核中的囊封优于肽在粒子表面的吸收。

[0169] 实施例 6 pH 对亮啡肽类似物在 HIP-PBCA 纳米粒子中的囊封效率的影响

[0170] 根据现有技术,通过在酸性油包水乳液中缓慢聚合 BCA 单体以形成 PBCA 纳米粒子,其中,水相的 pH 约为 2.0 (0.01N HCL)。酸性条件下的聚合反应需要至少 3 小时的一段时间才能完成反应。然而,这种方法使用中性的 pH 以实现快速聚合。使用的水相是磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.2)。在中性 pH,已知 BCA 单体是快速聚合的 (数秒内)。结果是 HIP-PBCA 纳米粒子的制备需要乳液很快形成。在这个方法中,其通过使用 Silveron L4RT 均化器进行高速 (7500rpm 或更高) 均化处理来实现。假设通过快速捕获粒子中的肽,在中性 pH 下,更快的聚合反应将提高囊封效率。而相反,延长的聚合过程将导致肽从乳液进入水相的逐渐损失。为验证这个假设,使用 HIP 方法通过使用在 PBCS 或现有技术的初始介质 (0.01N HCL) 中萃取的肽来乳化 BCA 单体,以制备纳米粒子。酸性和中性水相都含有需要的稳定剂 (0.2% pluronic F68, 1% 葡聚糖)。根据实施例 3 中描述的方法制备纳米粒子。每种制剂中使用的肽的量为 5mg。制备了以下的制剂 (各配一种制剂):

[0171] 1、单独的 HIP-PBCA 纳米粒子 (35 : 1 HIP 含量), pH2

[0172] 2、单独的 HIP-PBCA 纳米粒子 (35 : 1 HIP 含量), pH7

[0173] 3、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽

类似物的摩尔比为 35 : 1), pH2

[0174] 4、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 35 : 1), pH7

[0175] 5、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 10 : 1), pH2

[0176] 6、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 10 : 1), pH7

[0177] 7、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 5 : 1), pH2

[0178] 8、含有囊封的亮啡肽类似物 (输入 5.0mg) 的 HIP-PBCA 纳米粒子 (HIP 与亮啡肽类似物的摩尔比为 5 : 1), pH7

[0179] 离心分离纳米粒子制剂,除去任何游离的肽,并重新悬浮在水或 PBS 中。通过在 10mM NaOH(室温下孵育过夜)中打碎粒子,接着用 LC/MS 分析,以确定囊封效率。得到的结果示于图 4 中。

[0180] 该结果支持了上述假设,即在中性 pH 下 PBCA 聚合物快速形成将导致肽囊封效率比现有技术的酸性 pH 中缓慢形成聚合物的效率要高。尽管由于用 NaOH 处理而导致的降解会损失一些肽,但得到的结果清楚地显示,在中性 pH 下形成粒子的益处。在 HIP : 亮啡肽类似物的比例为 10 : 1 的情况下,在 pH7 时,输入的肽的 63.23% 被捕捉进入纳米粒子中。在 pH2 时,囊封效率明显低于 2.36%。总体而言,在 pH7 下制备粒子比 pH2 下制备粒子的囊封效率高。

[0181] 实施例 7 在使用 HIP 方法制备的 PBCA 纳米粒子中的域抗体囊封

[0182] 根据实施例 3 所述的方法在 PBCA 纳米粒子中制备域抗体 (抗鸡蛋溶菌酶 dAb)。制剂中使用的蛋白的量为 10mg。一共制备了两种制剂。为确定囊封的 dAb 的量,离心分离粒子以除去任何游离的蛋白,然后用 Edman 测序进行分析。除了序列信息,Edman 测序也可用于提供定量信息。所述的方法包括严格的化学处理,其破坏该粒子并可检测囊封材料。得到的结果示于图 10 中。该结果表明,使用 HIP-PBCA 方法有可能囊封较大的分子,但是效率较低。然而,也有可能通过优化以域抗体使用的方法来提高囊封效率。使用当前对亮啡肽类似物已经优化的方法,有可能囊封使用的 10mg 中的约 2.56mg。囊封效率为 25.6% 的这一量对于单乳化法是较高的,其中,蛋白被疏水粒子基质捕获。

[0183] 实施例 8 HIP 方法优化,以改善域抗体在 PBCA 纳米粒子中的囊封

[0184] 为了提高域抗体的载入量,进一步优化亮啡肽类似物方法。作为优化起始点的亮啡肽类似物的方法在实施例 3 和 4 中有描述。

[0185] 校正方法的目的在于获得抗体在有机相中完全溶解,并有效地并入纳米粒子中。

[0186] 这是通过另外的均化步骤来完成的,从而在有机相中形成 HIP dAb 复合物的悬液。一般而言,对亮啡肽类似物方法做如下改动:

[0187] 使用的 dAb 是 VEGF-myc dAb。该 dAb 名为 DOM15-26-593 且在 PCT W02008/149147 中有描述;

[0188] 以每 100mg PBCA 聚合物 (12% w/w dAb/PBCA) 输入 12mg (0.843 μ mol) 的量制备 dAb (12mg dAb/100mgPBCA, 每 100mg PBCA 聚合物含 12mg dAb)。

[0189] 以摩尔比为 82 : 1 使 dAb 与 HIP (多库酯钠) 复合。该 HIP 溶液浓度为 30.581mg/ml (在 1ml 中 0.06879mmol)。

[0190] 逐渐使 dAb 溶液酸化, 并持续混合以防止与很低的 pH 值接触并降解。使用 HCl 将 dAb 溶液的 pH 降到 pH3.6。

[0191] 不使用 CaCl_2 , 因为它会干扰 HIP 与 dAb 的结合。

[0192] 通过涡旋混合 500 μl 酸化的 dAb 溶液 (24mg/ml, 12mg 蛋白) 和在 DCM 中的 1000 μl 多库酯钠 (30.581mg/ml, 3.058% w/w) 以从水相中萃取酸化的 dAb, 接着进行离心分离两相。与亮啡肽类似物不同, 发现 dAb 没有完全溶于有机相中。取而代之的是, 它在分界面形成了白色沉淀。显然, 该沉淀是由 dAb:HIP 复合物组成的, 因为它的体积似乎与在萃取中使用的 HIP 和 dAb 的量成比例。将水相的体积从 500 μl 减少到 367.76 μl (不加水) 以试图完全地萃取 dAb, 这种成功的可能性比使用 500 μl 体积时要小。一系列的实验表明, 高的等电点是有益的, 但是也有可能成功地用低 pI (VEGF dAb-myc, 在这种情况下 pI = 6.6) 沉淀 dAb。离心分离后, 收集水层并储存在 4°C 下。使用包括 HIP-dAb 固体小球的有机层来制备纳米粒子。

[0193] 为制备纳米粒子, 有必要将 HIP-dAb 小球溶于有机相中。这通过在所述的方法中引入以下额外的均化步骤来实现:

[0194] 除去水相, 使用 Ultra-Turrax 均化器 (基本的 T25, 速度设为 1 级) 在 2ml 埃彭道夫管使有机相和 dAb 沉淀进行均化处理。该制剂均化处理 15 秒以形成白色的悬液。

[0195] 重要的是确保 HIP-dAb 小球与均化器接探针触, 并立即开始混合。

[0196] 1 分钟较长时间的均化处理会得到更好的悬液, 但是 dAb 会失去活性。

[0197] 均化之后, 将有机相留在 2ml 埃彭道夫管中, 并加入 100 μl BCA 单体。发现液态单体能容易地与有机相混合。接着将有机相用来制备实施例 1 所述的纳米粒子。

[0198] 校正后的方法也用来制备含有壳体化的 mAb 的 HIP-PBCA 纳米粒子。通过以下开发的用于 dAb 的方法来制备全长的单克隆抗体 (如 PCT W099/58679 公开的抗 CD23mAb, 150000Da, 12mg/100mgPBCA 聚合物, HIP 与 mAb 的摩尔比为 860 : 1)。进行以下的观察:

[0199] 发现 mAb (W099/58679 公开的抗 CD23) 比 VEGF dAb 需要更多量的 HCl。当使用 HIP 试剂萃取时, 发现 mAb 与 dAb 的表现相似: 它们没有完全溶解进入有机相中, 并在分界面形成白色沉淀。

[0200] 使用 250 μl 体积的水相代替 500 μl 的水相与高浓度的 mAb 储备溶液进行试验, 以达到 mAb 完全萃取进入有机相中。有机相: 水相 = 4 : 1 的比例得到的结果不是很好, 看起来 mAb 的活性有所降低, 这是由于它接触更多的溶剂。显然, 对于 mAb 和 dAb, 有机相: 水相 = 1 : 1 的比例是最佳的。

[0201] 为制备纳米粒子, 通过使用与用于 dAb 的相同的均化步骤经过均化处理将 HIP-mAb 颗粒溶于有机相中。发现均化处理是成功的, 但是悬液不太均匀, 可能是由于 HIP-mAb 复合物的粒度较大。1 分钟较长时间的均化处理得到更好的悬液, 但是 mAb 似乎有变性。因此, 将均化步骤缩短为 15 秒。

[0202] 接着根据此实施例前述的 dAb 方法制备纳米粒子。

[0203] 一般而言, 发现比肽大的生物药品的壳体化需要对亮啡肽类似物方法进行基本的校正。

[0204] dAb 和 mAb 都需要较高的 HIP : 生物药品的摩尔比例来溶解 (分别为 82 : 1 和 860)。

[0205] 也发现 dAb 和 mAb 都未完全溶解进入有机相中。取而代之的是,在界面形成了沉淀。为了溶解入有机相,将该沉淀进行均化处理以进入有机相,形成在油性悬液中的固体。这成功地形成了粒子制剂。

[0206] 实施例 9 使用校正的 HIP 方法在 PBCA 纳米粒子中囊封域抗体

[0207] 实施例 8 中所述的用于 dAb 的校正的 HIP 方法用来使一系列的 dAb 分子壳体化。基于它们的等电点来选择 dAb。目的是覆盖有可能用于该方法中的等电点 (pI) 范围,以确认该方法是通用的,并适合于大范围的 dAb。选择以下的 dAb 进行试验 (表 2)

[0208] 表 2

[0209]

dAb	DOM 15-10-11 VK, NT 无标签	DOM 15-10-11 VK, myc	DOM 15-10-11 VK, HA
浓度 (mg/ml)	39.734	22.585	12.523
等电点 (pI)	9.0	6.8	8.2

[0210] DOM 编号是指 W02008/149146 中描述的域抗体。myc 是指域抗体上的 myc- 标签或 HA 是指域抗体上的 HA 标签。

[0211] 使用摩尔比为 70 : 1 的多库酯钠作为 HIP 试剂使每种 dAb 单独地配制进入 PBCA 纳米粒子。

[0212] HIP 萃取中使用的试剂列于以下的表中 (表 3) :

[0213] 表 3

[0214]

制剂	DOM 15-10-11 NT	DOM 15-10-11 myc	DOM 15-10-11 HA
dAb 的量 (mg)	6.0	6.0	6.0
dAb 的量 (μmol)	0.490	0.439	0.451
dAb 溶液的浓度 (mg/ml)	39.734	22.585	12.523
dAb 溶液的体积 (μl)	151.00	265.66	479.12
多库酯钠的量 (mg) Mr=444.55Da	15.248	13.661	14.034
多库酯钠的量 (μmol) Mr=444.55Da	34.30	30.73	31.57
多库酯钠溶液的 浓度 (mg/ml)	15.248	13.661	14.034
多库酯钠的体积 (μl)	1000	1000	1000

[0215] 使 dAb 溶液酸化以用于萃取。

[0216] 在通过加入水进行酸化之前,该 dAb 溶液稀释如下(表 4):

[0217] 表 4

[0218]

制剂	DOM 15-10-11 NT	DOM 15-10-11 myc	DOM 15-10-11 HA
需要的 dAb 溶液 的体积 (μl)	151.00	265.66	479.12
需要的水的体积 (μl)	328.12	213.46	0
水相总体积	479.12	479.12	479.12
加入的 HCl (2M) 的体积 (μl)	2.00	5.00	3.00
最终 pH	3.4	2.5	3.0

[0219] 通过加入 HCl (2M) 酸化溶液。将所有的 dAb 溶液酸化到 pH 约为 3.0,用酸度指示条来确定。用水将每种酸化后的溶液的最终体积加到 500 μl 。

[0220] 接着如实施例 16 所述的将 dAb 萃取进入有机相中。发现所有的 dAb 都未在有机相完全溶解,并在界面形成沉淀。发现未标记的 dAb(NT)形成的沉淀比其它的 dAb 的沉淀要薄很多。dAb 的高的等电点和强的正电荷已明显使得与 HIP 形成更强的、更具疏水性的复合物,引起溶解度明显增大且转移进入有机相中。

[0221] 在除去水相(上层)之后,使有机相和 dAb 沉淀通过均化处理溶解,并根据实施例 8 制备纳米粒子。

[0222] 通过 SDS-PAGE 分析纳米粒子,以评估 dAb 的载入量。

[0223] 为通过 SDS-PAGE 分析纳米粒子悬液,将样品在微量离心机中以 13000rpm 旋转 10 分钟。吸出上清液并使小球重新悬浮在 100 μ l PBS 中。使用 1xNuPAGE LD 和还原剂破坏上清液和小球片段,加热到 80°C,保持 4 分钟,并使用商售的 NuPAGE 凝胶通过 SDS PAGE 进行检测。也同时检测含有 dAb 的空心制剂的上清液的样品,用作正对照。

[0224] 1 和 6 道:分子量标记。2 道:VEGF dAb DOM 15-10-11,未标记的,在 HIP-PBCA 纳米粒子中壳体化。3 道:VEGF dAb DOM 15-10-11,myc 标记的,在 HIP-PBCA 纳米粒子中壳体化。4 道:VEGF dAb DOM 15-10-11,HA 标记的,在 HIP-PBCA 纳米粒子中壳体化。5 道:VEGF dAb DOM 15-10-11,未标记的,在空心 HIP-PBCA 纳米粒子中(阳性对照)壳体化。该凝胶确认发生了 dAb 壳体化。该凝胶还确认 dAb 是完整的,且由于粒子的制备方法,它们没有片段化。

[0225] 该凝胶清楚地表明 dAb 在粒子中已被壳体化,因为在除去任何游离的 dAb 之后,它们与纳米粒子小球共同定位(图 6)。

[0226] 显然,dAb 已在纳米粒子中壳体化,在非变性条件下(天然凝胶)对小球的分析并没有在凝胶上产生任何条带,这是因为 dAb 保留在粒子中(结果未示)。有必要通过 SDS-PAGE 来分析粒子,因为 dAb 从粒子中释放出来并在凝胶上进行分析需要变性的条件(在 SDS 存在下的热处理)。对于所有测试的 dAb,发现壳体化是成功的。这表明额外的均化步骤成功地将 HIP-dAb 复合物溶解进入有机相中,使 dAb 被捕捉后进入粒子中。结果,在萃取之后,HIP-dAb 复合物在界面上沉淀,尤其是在使用低的 pI 的 dAb 的情况下,这并没有使 dAb 在粒子中的壳体化受到损害。因此,业已发现,用于将 dAb 在 HIP-PBCA 中壳体化的校正方法在测试的范围内独立于 pI,并适合一系列的 dAb。

[0227] 实施例 10 使用校正的 HIP 方法将域抗体囊封在 PBCA 纳米粒子中;载入效率的测定和制备的 dAb 的活性的测量

[0228] 为了确定校正的 HIP 方法能达到的载入效率,用工具 dAb(VEGF-myc dAb,即 W02008/149147 公开的 DOM15-26-593)制备 HIP PBCA 纳米粒子制剂。以输入量为 12mg(0.843 μ mol)/100mg PBCA 聚合物(12% w/w dAb/PBCA,12mg dAb/100mg PBCA 聚合物)制备所述的 dAb。使用实施例 9 所述的用于 dAb 的校正的 HIP 方法制备该制剂。

[0229] 制备之后,通过 SDS-PAGE 表征纳米粒子,以便确认 dAb 保持完整,以及它在粒子中被成功地捕捉。如实施例 9 所述的方法进行 SDS-PAGE 分析。还在凝胶上制剂的旁边分析已知量的一组 dAb 标准品,并将其用来确定壳体化的 dAb 的量(图 7)。这通过对凝胶拍照并使用 labworks v4.6 测量标准品条带的信号强度达到。

[0230] 以如下方式设定凝胶:

[0231] 1 道和 7 道:分子量标记。2-4 道:dAb 纳米粒子制剂。5 道:空心纳米粒子(阴性

对照)。7-10 道 :dAb 标准品 (500、125、31.25 和 7.8 $\mu\text{g/ml}$)。11-14 道 :dAb 标准品 (7.8、31.25、125 和 500 $\mu\text{g/ml}$)。该凝胶确认已经发生了 dAb 的壳体化,以及 dAb 是完整的。样品条带的强度与标准品条带的强度对比表明 dAb 在纳米粒子样品中的浓度为 413.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0232] 条带强度用来形成标准曲线。接着根据纳米粒子样品条带的强度,将该曲线用来计算在纳米粒子制剂中的 dAb 的量。

[0233] 该凝胶确认 dAb 已在粒子内被成功地捕获,且在壳体化之后 dAb 保持完整。与标准品比较后,发现 dAb 在纳米粒子制剂中的浓度为 413.7 $\mu\text{g/ml}$ 。这转化后得出:输入 12mg 的 dAb,纳米粒子中壳体化的 dAb 总量为 3.31mg。因此,载入效率为 27.6%。dAb 载入为 3.31% w/w。

[0234] 为了释放壳体化的 dAb 并评估其活性,也将纳米粒子样品进行热处理。在 1% Tween20 存在下,在 4°C -65°C 的范围内孵育 1 小时后,dAb 从纳米粒子中释放出来。已知该方法能实现至少部分壳体化的 dAb 从纳米粒子中释放,然而,这样也会损失 dAb 的一些活性。为使热处理后 dAb 的活性损失最小化,也将样品在 65°C 下孵育 5 分钟,接着在 37°C 的较低温度下温和地处理 55 分钟。

[0235] 孵育之后,以 10000rcf 的速度将该样品离心处理 10 分钟,以从粒子中分开任何释放的 dAb。收集含有释放的 dAb 的上清液,并经 ELISA 分析其活性。

[0236] 通过以下的 ELISA 分析释放的 dAb :

[0237] 4°C 下,用 0.5 $\mu\text{g/ml}$ rVEGF 将 Nunc maxisorb 96 孔板涂层,过夜。接着用缓冲液 (PBS+0.1% Tween) 将该板清洗 4 次,接着用封闭液 (PBS+1% BSA) 在室温下封闭 1 小时,同时摇动。以前述方式清洗该板,接着在孔中加入 50 μl 一式三份上清液样品,并将该板以前述的方式孵育。清洗该板,接着在每个孔中加入 50 μl 抗 -myc Ab (小鼠) 溶液,再以前述的方式将该板进行孵育。清洗该板之后,接着在每个孔中加入 50 μl 抗小鼠 HRP,再以前述的方式将该板进行孵育。最后再以前述方式清洗该板,接着在每个孔中加入 50 μl TMB 试剂。显色,通过每个孔中加入 50 μl HCl (1M) 使反应停止。使用 Versamax 板阅读器和 Softmax Pro V5.3 软件,在 450nm 处测定吸光度。

[0238] 从 ELISA 实验得到的结果示于表 5 中 :

[0239] 表 5

[0240]

温度	4°C	56°C	65°C	65/37°C
浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.44	4.0	> 50	61

[0241] 发现释放的 dAb 有活性,且温度越高,从粒子中释放的蛋白的量越多。在 65 和 37°C 两个温度下对样品进行处理时,发现样品释放的活性 dAb 的量最多。制剂中的活性的初始水平很难估计,因为已知释放方法对活性有损害,然而,考虑到 PAGE 的结果,65/37 方法得到具有标准品的大约 50% 的特异性活性的物质。

[0242] 通过 ELISA 分析释放的 dAb,得到有活性的 dAb 的读数,也用 SDA-PAGE 进行分析,测出总的 dAb。将该 dAb 和一组标准品一起在凝胶上进行分析。然后 dAb 的量通过标准曲线确定,所述的曲线通过测量标准品的条带强度形成。业已发现有活性的 dAb 的浓度 (61 $\mu\text{g/ml}$, 经 ELISA 测出) 是总的 dAb (137.89 $\mu\text{g/ml}$, 经 SDS-PAGE 测出) 的 44%。

[0243] 因此,发现至少 50%的在纳米粒子中制备的 dAb 是有活性的。考虑到制备方法涉及在有机相中的溶解以及随后通过均化处理进行的混合,这认为是非常好的活性水平。因此,粒子制备方法看来适合于域抗体的制备。

[0244] 实施例 11 在小鼠模型中对含有域抗体的 HIP PBCA 纳米粒子通过静脉途径将它们载入的蛋白输送到脑中的能力的体内评估

[0245] 在小鼠模型中评估实施例 10 中描述的纳米粒子制剂将它载入的 dAb 输送到脑中的能力。

[0246] 将含有壳体化的 VEGF dAb 的纳米粒子与游离的 dAb 进行比较,以确定粒子与游离的 dAb 分子相比,是否能够提高脑对 dAb 的吸收。还制备一批空的纳米粒子,并作为阴性对照进行评估。

[0247] 体内研究的设计

[0248] 该研究包括两个不同的时间点,在此时间点上评估 dAb 脑水平:给药后 10 分钟和 60 分钟。如果在注射后几分钟内 dAb 在脑中达到峰值,如用亮啡肽类似物肽所发现的一样,则选择较早的时间点。为了从血液循环中清除一些 dAb,选择较晚的时间点。在血液中存在任何的 dAb 将会污染脑样品,并使得到的数据失真。dAb 在血液循环中的短的半衰期(20 分钟)可能限制在较晚的时间点的血液污染,因此使脑渗透的读数更清楚。

[0249] 在脑样品中校正血液污染

[0250] 为了计算不是由于脑吸收而是仅仅在脑血管中存在且未在脑组织本身(血液污染)中的脑样品中 dAb 的量,进行了 start-chase 研究。所有的小鼠都接受一剂量的 chase 分子,已知该分子留在血液中并不会穿透脑。选择的所述的 chase 分子是 W099/58679 公开的抗-CD23 全长抗体,其显示可忽略不计的脑吸收。因此,在脑样品中检测到的任意量的抗 CD-23mAb 将仅仅因为它在血液中的存在污染了脑组织。在处死动物之前 5 分钟将所述的 chase 给予动物,以确保该抗体保留在血液中,且在身体的其它部位没有组织吸收。

[0251] 动物组

[0252] A:对照粒子,给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0253] B:在纳米粒子中的 dAb,给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0254] C:溶液中游离的 dAb(对照),给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0255] 在 $t = 10$ 分钟时,即在给予 chase 之后 5 分钟时处死上述组的动物。

[0256] D:对照粒子,给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase;

[0257] E:在纳米粒子中的 dAb,给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase;

[0258] F:溶液中游离的 dAb(未配制的对照),给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase。

[0259] 在 $t = 60$ 分钟时,即在给予 chase 之后 5 分钟时处死上述组的动物。

[0260] 剂量的制备

[0261] Chase:在 PCT W099/58679 公开的抗 CD-23mAb, 2.0mg/kg

[0262] 通过将 68mg/ml mAb 储备液稀释到 500 μ g/ml 制备剂量。

[0263] 对于 25g 的小鼠,在 100 μ l 体积中总计有 50 μ g 的剂量。

[0264] 含有 mAb 的纳米粒子:1.584mg/kg, 50mg/kg PBCA 聚合物。

[0265] 通过将 160 μ l 聚山梨醇酯 80 溶液(25% w/w) 加入到 3600 μ l 纳米粒子悬液中制

备纳米粒子悬液,以供注射。配制的 dAb 的最终浓度为 396.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对于 25g 的小鼠,在 100 μl 体积中总计有 39.6 μg 的 dAb 剂量。

[0266] 空的纳米粒子(阴性对照):50mg/kg PBCA 聚合物

[0267] 如上通过将 160 μl 聚山梨醇酯 80 溶液(25% w/w) 加入到 3600 μl 纳米粒子悬液中制备纳米粒子悬液,以供注射。PBCA 聚合物的最终浓度为 1.25mg/ml。对于 25g 的小鼠,在 100 μl 体积总计中有 125 μg 的 PBCA 剂量。

[0268] 溶液中游离的 dAb(未配制的对照):1.584mg/kg。

[0269] 通过将 2.0mg/ml 储备溶液稀释到 396.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以制备 dAb 溶液,以供注射。对于 25g 的小鼠,在 100 μl 体积中总计有 39.6 μg 的 dAb 剂量。

[0270] 小鼠的注射:静脉方式注射(尾静脉注射)CD1 小鼠。基于小鼠的重量计算注射的体积。体内步骤结束之后,从所有的小鼠中收集脑和血清样品并冷冻。将组织样品在液态氮中快速冷冻。将所有的样品保存在 -80°C 下。

[0271] 将脑均化处理以备分析:

[0272] 将脑解冻并称重。在每个脑中加入体积是该脑体积的重量的 2 倍的 PBS。接着使用 Covaris 声组织处理器(Covaris E210)对脑进行均化处理。

[0273] 通过 Meso Scale Discovery(MSD)对脑的分析

[0274] 通过 MSD 分析脑的均化物和血清样品。这通过将实施例 18 所述的抗-VEGF ELISA 测定改变成 MSD 模式完成。在 1:10000 的稀释液中以 1:1000 分析血清样品。在 1:5 的稀释液中分析脑样品。

[0275] 结果

[0276] 处理数据,得到图 8 所示的结果。在给药后 10 分钟,在脑中吸收的在纳米粒子中的 dAb 是可检测的,其量为 8.0ng/ml。脑中游离的 dAb 也是可检测的,其浓度稍低,为 3.3ng/ml(初始数据)。初始数据不包括血液污染不能校正的两个动物的读数,因为该血清的读数太高,而不能定量。总体而言,在第 10 分钟的时间点,纳米粒子似乎少量增加脑对蛋白的吸收。

[0277] 然而,在第 60 分钟时,观察到相反的情况。游离的 dAb 似乎聚集在脑中,导致脑水平进一步增加到 13.5ng/ml。观察到的结果可进行如下的解释:

[0278] 1、由于其亲水性,血液循环中游离的 dAb 的半衰期($t_{1/2}$)比粒子的 dAb 半衰期可能更长。这可能是指与在纳米粒子中配制的 dAb 相比,有更多游离的 dAb 供大脑吸收。

[0279] 2、载入粒子的 dAb 的量不足以高至抵消由于全身循环的快速消除所形成的制剂的损失。载入粒子中的药剂为 3.31% w/w。亮啡肽类似物制剂之前需要的载入量为 5.0% w/w,以得到 45ng/ml 的脑水平。8.9% 的较高的肽载入量在脑中得到的肽的浓度高达 833ng/ml。似乎 3.31% w/w 的载入量,尤其对于高分子量的生物药品,对基本脑输送是不够的,因此必需进一步优化载入量。

[0280] 3、也许第 10 和 60 分钟的时间点太晚。之前使用亮啡肽类似物和洛哌丁胺(loperamide)的研究均证明输送是较快的,即在注射后的 2-3 分钟内。之前的研究也表明,脑中最高的药物水平在给药后 5 分钟内或更早达到。选择 10 分钟的时间点确保有足够的时间进行 start chase 研究,并选择 60 分钟以检测域抗体的任何长时间的持续效应。

[0281] 4、HIP PBCA 系统仅是被动地靶标到脑。当静脉给药时,已知表现出疏水表面的这

些微粒被动靶标到除了脑以外的很多器官。这些器官包括肝和脾。当静脉给药时,纳米粒子在进入脑之前将首先到达肝和脾。其结果是大部分的注射剂量将会输送到那些组织,只剩下一部分可供输送到脑。这将严重损害粒子在该试验中到达脑的能力。

[0282] 为强调从血液循环中损失 dAb 的影响,还计算脑与血液的比例(图 9)。其结果清楚地表明,当 dAb 和纳米粒子一起给予时与当给予在溶液中游离的 dAb 时相比,在脑中比在血液中有更高比例的 dAb 存在。事实上,配制的 dAb 显示脑与血液的比例是 0.04(60 分钟),该数值高于以下比例,在此比例下认为化合物是脑渗透剂。游离的 dAb 在任何的时间点都没有超过分析的脑渗透临界值。因此,尽管注射的剂量损失较多,就穿透血脑屏障的整体能力而言,则该粒子可最终优于游离的 dAb。

[0283] 一般而言,已知静脉途径是对被动靶标粒子(如 HIP-PBCA 系统)最具挑战的给药途径。因此,对评估 HIP-PBCA 系统将其载入的药物从血液输送穿过 BBB,静脉途径不是理想的方法。为此,还进行了颈动脉研究。经颈动脉途径的给药绕过组织如肝和脾,并为输送到脑提供更直接的途径。结果是多数注射的纳米粒子剂量可供脑输送。在游离的和配制的药剂之间的正面直接比较中,颈动脉途径更可能为纳米粒子克服 BBB 的能力提供真实的量度。

[0284] 实施例 12 在鼠模型中对含有域抗体的 HIP-PBCA 纳米粒子通过颈动脉途径将它们载入的蛋白输送到脑中的能力的体内评估

[0285] 体内评估纳米粒子制剂-颈动脉给药。

[0286] 在鼠中评估纳米粒子制剂通过颈动脉途径输送其 dAb 到脑中的能力。

[0287] 之所以选择这样的途径,是因为它提供通往脑的直接的路径。当物质从颈动脉给予时,第一个到达的组织是脑。相反,当静脉给药时,在到达脑之前会先到达一些组织,如肝。据发现这限制纳米粒子输送到大脑中的能力,因为业已知道它们是通过组织吸收的,例如肝和脾。事实上, Kreuter 等人已发现,当经过尾静脉给药,大多数注射的空的纳米粒子剂量(~60%)与它们的 PBCA 吸收的粒子被肝吸收。

[0288] 一般而言,对于被动式靶标输送系统如 HIP-PBCA 纳米粒子,已知静脉途径是最不合适的,且是最具挑战性的给药途径。

[0289] 因此,对于纳米粒子克服血脑屏障的能力,颈动脉途径被认为更可能提供确切的指示。

[0290] 体内研究的设计

[0291] 该研究的设计与对静脉途径的研究相同,唯一的区别在于以下:

[0292] 1、在整个实验中,动物都保持终端麻醉。鉴于涉及的外科手术方法的复杂性,这是必须的。

[0293] 2、通过颈动脉途径经外科准备的插管给予纳米粒子制剂和游离的 dAb。

[0294] 3、通过尾静脉从静脉给予 chase,但与前述研究不同,抗体通过插管给予。

[0295] 动物组

[0296] A:对照粒子,给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0297] E:在纳米粒子中的 dAb,给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0298] C:溶液中游离的 dAb(对照),给定 $t = 0$,接着在 $t = 5$ 分钟时给予 chase;

[0299] 在 $t = 10$ 分钟时,即在给予 chase 之后 5 分钟时处死上述组的动物。

- [0300] B:对照粒子,给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase ;
- [0301] F:在纳米粒子中的 dAb,给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase ;
- [0302] D:溶液中游离的 dAb(未配制的对照),给定 $t = 0$,接着在 $t = 55$ 分钟时给予 chase。
- [0303] 在 $t = 60$ 分钟时,即在给予 chase 之后 5 分钟时处死上述组的动物。
- [0304] 剂量的制备
- [0305] Chase:在 PCT W099/58679 公开的抗 CD-23mAb, 2.0mg/kg
- [0306] 通过将 68mg/ml mAb 储备液稀释到 $500 \mu\text{g/ml}$ 制备该剂量。
- [0307] 对于 25g 的小鼠,在 $100 \mu\text{l}$ 体积中总计有 $50 \mu\text{g}$ 的剂量。
- [0308] 含 mAb 的纳米粒子:1.584mg/kg, 50mg/kg PBCA 聚合物。
- [0309] 通过将 $160 \mu\text{l}$ 聚山梨醇酯 80 溶液 (25% w/w) 加入到 $3600 \mu\text{l}$ 纳米粒子悬液中制备纳米粒子悬液,以供注射。得到的配制 dAb 的最终浓度为 $396.1 \mu\text{g/ml}$ 。对于 25g 的小鼠,在 $100 \mu\text{l}$ 体积中总计有 $39.6 \mu\text{g}$ 的 dAb 剂量。
- [0310] 空的纳米粒子(阴性对照):50mg/kg PBCA 聚合物
- [0311] 如上通过将 $160 \mu\text{l}$ 聚山梨醇酯 80 溶液 (25% w/w) 加入到 $3600 \mu\text{l}$ 纳米粒子悬液中制备纳米粒子悬液,以供注射。PBCA 聚合物的最终浓度为 1.25mg/ml 。对于 25g 的小鼠,在 $100 \mu\text{l}$ 体积中总计有 $125 \mu\text{g}$ 的 PBCA 剂量。
- [0312] 溶液中游离的 dAb(未配制的对照):1.584mg/kg。
- [0313] 通过将 2.0mg/ml 储备溶液稀释到 $396.1 \mu\text{g/ml}$ 以制备 dAb 溶液,以供注射。对于 25g 的小鼠,在 $100 \mu\text{l}$ 体积中总计有 $39.6 \mu\text{g}$ 的 dAb 剂量。
- [0314] 结果
- [0315] 处理该数据,得到图 9 所示的结果。在给药后 10 分钟,纳米粒子组中的 dAb 在脑中表现出高水平的 dAb,平均值为 627.60ng/ml 。大脑中 dAb 的实际浓度可能更高,因为上述数字未包括两个动物的读数。这两个样品给出的信号数值太高,而不能定量,但不幸的是,也未及时进行分析,引入本文件中。其中的一个动物为清楚的异常值,其为相当低的脑浓度 45.45ng/ml 。这导致在组中观察到较大的误差。然而,脑中形成的 dAb 的平均浓度近乎游离 dAb 的 9 倍,游离 dAb 的浓度为 71.67ng/ml 。
- [0316] 在注射后 60 分钟,大脑的 dAb 的水平依然较高,为 146.51ng/ml 。而游离 dAb 的浓度降到平均值为 3.17ng/ml 。因此,注射后 60 分钟,纳米粒子中的 dAb 的脑浓度是裸 dAb 达到的数值的 46 倍。
- [0317] 一般而言,业已发现,通过颈动脉途径,纳米粒子能成功地将 dAb 输送到脑。
- [0318] 这也从确定动物组中脑与血液的比例得到证实(图 11)。纳米粒子组中的 dAb 所显示的脑与血液的比例在两个时间点均大于 1(在第 10 和 60 分钟分别为 1.569 和 1.854),表明大多数配制的 dAb 已成功地到达脑。相反,游离的 dAb 组的特征是大脑与血液的比例显著偏低,在第 10 和 60 分钟分别为 0.012 和 0.286。
- [0319] 总之,业已发现,通过颈动脉途径给予时,纳米粒子输送系统显著改善 dAb 到脑的输送。这是因为该途径在到达肝和脾之前到达脑,所述的肝和脾是除了脑以外制剂也被动标靶的组织。
- [0320] 静脉途径没有如此成功,这提供了在大脑中增加 dAb 的吸收的瞬时线索。这可能

是因为载入粒子 dAb 不足,以及因为输送系统被其它组织吸收,导致仅一部分注射粒子到达脑。

[0321] 因此,为改善系统并实现经静脉途径有效输送到脑,有必要进一步提高 dAb 至纳米粒子的载入。这可以通过使用空心 PBCA 系统实现,其已表明比 HIP/PBCA 系统具有更高的载入 dAb 的能力。在其在体内足够稳定的条件下,对于将 dAb 输送到脑,空心 PBCA 粒子比 HIP/PBCA 系统更成功。为确保它们的稳定性,有必要将 PBCA 聚合物与其它高分子量的的聚合物如 PLGA、PLA 或 PCL 共混。使用聚乙二醇化的共聚物也使输送系统受益。这些聚合物可延长纳米粒子在血液中的循环时间,藉此改善脑的输送。

[0322] 改善输送系统的其它方法是改变其脑靶标的机制。表现具有结合 BBB 上的靶标的配体的主动靶标的纳米粒子可能改善脑的吸收,并同时限制粒子损失在其它组织中。为实现主动靶标,有可能必需广泛地将纳米粒子表面聚乙二醇化,以限制任何非特异性地靶标到其它器官。

[0323] 一般而言,本文件中描述的纳米粒子具有很大的潜力实现将抗体有效输送到脑中,然而,为了达到此目的,仍然需要将方法进行显著的优化。

[0324] 实施例 13 使用校正的 HIP 方法在 PCL 微球体中囊封抗体

[0325] 将聚合物聚己酸内酯 (PCL, lactel) 用作试验例子,以测试使用 dAb 壳体化的 HIP 方法的微球体生成和缓释聚合物的用途。初始的实验使用实施例 7 和 8 所述的 HIP 囊封方法的校正方法,以允许使用 PCL 得到空心纳米粒子和微球体。

[0326] 初始的制剂使用 100mg/ml 在二氯甲烷 (DCM) 中的 PCL 储备液和 1% pluronic F68 (Sigma) 作为表面活性剂,以 4000-7500rpm 的速度均化处理 45 秒钟,但仅制得很少量的微球体或纳米粒子 (数据未示)。通过使用以下不同的表面活性剂进一步优化所述的方法:还是 1% 胆酸钠 (Sigma),或 1% Lutrol F127 泊洛沙姆 407 (BASF 公司),或 1% 维生素 E TPGS (d-ALPHA 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯), (Peboc/Eastman),但对初始的改进甚微 (数据未示),直到输入的聚合物的量降到 10mg/ml,在光学显微镜下可观察到 $> 20 \mu\text{m}$ 的少量的大且易碎的微球体 (数据未示),但是一旦蒸发掉有机溶剂,大多数的 PCL 以肉眼可见的粒子从悬液中出来 (数据未示)。鉴于粒子的稳定性,通过使用 2% 的上述试验中的两种最有希望的表面活性剂来帮助更好地稳定悬液,以进一步改进所述的方法:Lutrol F127 泊洛沙姆 407 (BASF 公司) 或维生素 E TPGS,并以 7500-9000rpm 的速度均化处理 45 秒-2 分钟。使用所述的方法,所有情况下都得到粒度约 $1 \mu\text{m}$ 的粒子 (数据未示),但是选择 2% 维生素 E TPGS 作为步骤中的 2 分钟均化处理的表面活性剂,以使如下所示的 dAb 壳体化。

[0327] 使 dAb 壳体化的 HIP-PCL 微球体 (M/P) 的制备

[0328] 通过上述实施例 13 的方法学制备 HIP-PCL 微球体,对此方法的任何变化如下详述:

[0329] 使用的制剂:

[0330] 制备 4 种 PCL (聚 -e- 己酸内酯) 制剂

[0331] i) PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的空粒子 -4000rpm (2% 维生素 E [TPGS] 作为表面活性剂) -2 分钟

[0332] ii) PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的空粒子 -7500rpm (2% 维生素 E [TPGS] 作为表面活性剂) -2 分钟

[0333] iii) PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的粒子 + 分析用的 dAb, (dAb1)-7500rpm(2% 维生素 E[TPGS] 作为表面活性剂)-2 分钟

[0334] iv) PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的粒子 + 测粒度用的 dAb, (dAb2)-7500rpm(2% 维生素 E[TPGS] 作为表面活性剂)-2 分钟

[0335] 需要的溶液:

[0336] (1) 待萃取的 dAb : 抗 VEGF (WO2008/149147 公开的 DOM15-26-593)、批号 TB090220 1.5mg/ml(14246Da)-使用 4x5ml(使用 Nanodrop 1000 分光光度计,Thermo Scientific 再次读取 dAb 的实际浓度,确认的浓度事实上为 1.04mg/ml)

[0337] (2) 82 : 1 HIP 溶液 (1ml, 30.58mg/ml)

[0338] (3) 酸化的 dAb 溶液 (25mg/ml) N/A

[0339] (4) 水相 : 1% w/v 葡聚糖, 2% w/v 在 PBS 中的表面活性剂 *

[0340] (5) 溶解于 DCM 中的 PCL 聚合物

[0341] * 储备的 10% 维生素 E[TPGS]

[0342] 在 DCM 中的 PCL 溶液的制备

[0343] 目的是提供每个制剂在 DCM 中溶解的 10mg PCL-在 DCM 中的溶解度为约 ~ 100mg/ml, 为最大值, 但是 @ ~ 10mg/ml 可溶解更多。为 5 种制剂准备足够的 PCL, 即在 5ml DCM 中 50mg。称出 50mg PCL, (当从 -20°C 加热到室温时, 打开解冻的真空干燥器), 称重 (精确平衡)-在 10ml 装有 PCL+4ml DCM 的烧杯中搅拌-在有盖的通风橱中用玻璃搅拌器搅拌。一溶解就在玻璃测量筒中测量, 并以 DCM 使容积加到 5ml, 接着再次混合 (搅拌烧杯), 再快速使用。

[0344] dAb 溶液的浓度

[0345] 开始在室温下 0/N, 以 600rpm 制备制剂, 并稀释至校正浓度。根据在 Sorvall legend RT Bench Top centrifuge 中的生产商的说明, 使用 Vivaspin 浓缩器 (Vivaspin6, Sartorius, VS0691, MWC03000PES) 浓缩溶液。浓度从期望的 1.5mg/ml (20.0ml, 在 4x Vivaspin, 5ml) 至 25mg/ml (~ 700 μ l)。所述的方法以 1000-1500rpm 进行 2 小时, 并以 3000rpm 再进行 ~ 1 小时。通过 Nanodrop 测得初始的 dAb 400 μ l 在 75 倍稀释液中得到的浓度为 0.56mg/ml, 接着以 25mg/ml 的浓度稀释到 760 μ l, 再用酸处理, 使 pH 降低至 ~ 3.7。以 pH ~ 2.5 的酸对模拟材料进行酸处理。dAb 为 25mg/ml, ~ pH5.0/4.5-目的是使 pH 降低至 3.7-用 pH2.5-4.5 的试纸检查 pH。使用 380 μ l dAb, 例如, 仅为 9.5mg/制剂, (且拟合初始的输入 1mg/ml 的浓度, 而非 1.5mg/ml)。

[0346] 表 6 酸化溶液的制备

[0347]

制剂	空对照	dAb 溶液
需要 25.0mg/ml dAb 溶液的体积 (μl)	0	760, (2x380)
需要水的体积 (μl)	500.0x10	12.0
加入的 2M HCl 溶液的体积 (μl)	5.0x10	6.0
选择加入的 1M CaCl_2 的体积 (μl), 最后加入	0	0
加入后的 pH	≤ 2.5	~ 3.7

[0348] 表 7 HIP 萃取的制剂和试剂 (标准体积方法)。

[0349] (A) 有机相 dAb

[0350]	制剂 dAb	10-12.0mg dAb, 82: 1 HIP 10mg PCL
	dAb 的量 (mg) 或 w/o dAb	~ 9.5
	浓度 (mg/ml)	25.00
	需要的体积 (μl)	380

[0351] (B) 有机相 HIP

[0352]	制剂 HIP AOT	12.0mg dAb, 82: 1 HIP, 10mg PCL
	需要的 AOT 的浓度 (mg/ml)	30.58
	需要的 30.58mg/ml 的 AOT 溶液的体积 (μl)	1000

[0353] 目的是制得 dAb(aq) :DCM/HIP 为 1 : 2 的混合物 - 前述是 1x 混合物, 即 $\sim 500 \mu\text{l}$: $1000 \mu\text{l}$ 有机相

[0354] 表 8 :空对照的制备 (有机相)

[0355]

制剂	空对照, 82: 1 HIP, 100mg BCA
dAb 的量 (mg)	使用 0, 仅 PBS 480 μ l+20 μ l HCl, 进行酸化
需要 AOT 的浓度 (mg/ml)	30.58
需要的 30.58mg/ml 的 AOT 溶液的体积(μ l)	1000

[0356] 使用多库酯钠作为 HIP 试剂将 dAb 或模拟液 (空粒子) 萃取进入有机相。

[0357] 在 2ml 埃彭道夫管中将酸化的 dAb 或模拟溶液和有机相混合, 并加入到水相中。以最大的速度涡旋混合混合物 1 分钟, 接着置于 Bench top 混合器 5432 中 5 分钟。以最大的速度 (20817rcf, 14000rpm, 在微量离心机中) 将得到的白色混合物离心分离 50 分钟。dAb-HIP 复合物似乎在界面上形成厚的白色沉淀。收集水相, 并储存在 4°C 下。除去上面的水相并储存, 再用下面的有机相继续进行实验。

[0358] 将 HIP-dAb 复合物均化处理进入有机相

[0359] 使用 IKA T25 均化器 (polytron, 速度设为 1 级), 将有机相在 2ml 埃彭道夫管中均化处理 7-10 秒。目的是达到将白色沉淀 (dAb 和 HIP 复合物) 完全均化进入有机相 (DCM) 中。HIP-dAb 复合物容易地溶解在有机相中形成看起来均质的乳液。将有机相进行总共 10 秒钟的均化处理。在均化处理和除去有机相之后, 只有很少的沉淀留在管中。

[0360] 微球体的制备

[0361] 取出 1ml 均质物的有机相, 并使用移液管吸入和排出将其与溶解在 DCM (100mg) 中的 1ml PCL 进行混合。

[0362] 在探针进入液面下的点时, 将得到的白色悬液 (2ml) 移入水相 (在水中的 10ml 葡聚糖, 和在 PBS 中的 2% 表面活性剂溶液, 装在 25ml 烧杯中) 中。使用 Silverson L4RT 均化器以 7500rpm (M/P) 或 4000rpm (M/P) 将该水相均化处理。将乳液均化处理 2 分钟。接着将制剂在通风橱中搅拌 (速度设为 4 级) 孵育 3 小时, 以蒸发掉有机相。将速度降低至 3 级孵育 1 小时, 以防止乳液的过度混合, 因为过度混合导致在烧杯的表面块状物沉积。

[0363] 实施例 14 微球体的粒度测量

[0364] (a) 光学显微镜

[0365] 使用可见光在 Nikon Eclipse E400 显微镜上测量上述四种制剂 (i)-(iv) 的粒度。表示这些粒子的图像的数据示于图 12 中。从那些含有或不含有 dAb 的四种制剂中都能观察到相似粒度范围的可见的微球体。这些数据表明使用该方法在 dAb 存在的条件下类似地形成了微球体。

[0366] (b) 多角度静态光散射

[0367] 将所有的四种样品均在 Micromeritics Saturn DigiSizer 5200, 高分辨率粒度分

析仪上进行粒度测定。

[0368] 以这样的方式测定样品粒度：通过将来自上述微粒粒度内的足够量的材料载入固定在 Saturn Digisizer 5200 上的小体积样品处理单元中，以允许在排气的 PBS 的基质中遮光 5-30%，优选超过 15%（其需要 50-100% 的制剂）。接着使用聚己酸内酯模型的分析来分析样品，使用的实际的分层的折射指数为 1.476，想象的分层的折射指数为 0.0001。流速为 6L/分，停止的光束角度为 45 度，介质是 PBS，并进行 3 次计数。报告体积和数量分布，得到的数据是组合的报告、累积图和频率图，所述方法的详细内容参见 Micromeritics Saturn Digisizer 5200 操作手册 V1.12 (2007 年 3 月) 和快速入门。

[0369] 图 13(a)-(d) 展示的相关制剂 (i)-(iv) 的数据，图形描述的是粒子的数量的频率与粒度。参见以下的对应于这些图的数据。

[0370] 图 13(a)

[0371]	总的报告					
[0372]	样品					
[0373]	样品浓度 :0.01069%					
[0374]	遮光率 :29.1%					
[0375]	体积分布几何统计					
[0376]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0377]	平均值	8.355	2.926	模式	10.00	4.017
[0378]	中间值	9.754	3.951	标准偏差 Log	0.382	0.047
[0379]	偏度	-0.267	0.106	峰度	-0.436	0.180
[0380]	数量分布几何统计					
[0381]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0382]	平均值	1.393	0.070	模式	1.000	0.000
[0383]	中间值	1.033	0.009	标准偏差 . Log	0.214	0.022
[0384]	偏度	1.504	0.388	峰度	2.001	2.445

[0385] 图 13(b)

[0386]	总的报告					
[0387]	样品					
[0388]	样品浓度 :0.00284%					
[0389]	遮光率 :16.7%					
[0390]	体积分布几何统计					
[0391]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0392]	平均值	5.366	3.943	模式	2.239	2.744
[0393]	中间值	4.304	5.816	标准偏差 . Log	0.521	0.033
[0394]	偏度	0.523	0.450	峰度	-0.370	0.178
[0395]	数量分布几何统计					
[0396]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0397]	平均值	1.231	0.016	模式	1.000	0.000
[0398]	中间值	1.048	0.013	标准偏差 . Log	0.141	0.012

[0399]	偏度	1.954	0.198	峰度	4.737	1.339
[0400]	图 13(c)					
[0401]	总的报告					
[0402]	样品					
[0403]	样品浓度 :0.00771%					
[0404]	遮光率 :21.6%					
[0405]	体积分布几何统计					
[0406]	标准偏差 6			标准偏差 6		
[0407]	平均值	9.346	7.368	模式	2.239	12.53
[0408]	中间值	10.45	7.174	标准偏差 . Log	0.421	0.115
[0409]	偏度	-0.234	0.252	峰度	-0.185	3.125
[0410]	数量分布几何统计					
[0411]	标准偏差 6			标准偏差 6		
[0412]	平均值	1.355	1.046	模式	1.000	0.751
[0413]	中间值	1.048	0.731	标准偏差 . Log	0.196	0.070
[0414]	偏度	1.711	0.234	峰度	3.196	1.059
[0415]	图 13(d)					
[0416]	总的报告					
[0417]	样品					
[0418]	样品浓度 :0.01069%					
[0419]	遮光率 :29.1%					
[0420]	体积分布几何统计					
[0421]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0422]	平均值	8.355	2.926	模式	10.00	4.017
[0423]	中间值	9.754	3.951	标准偏差 . Log	0.382	0.047
[0424]	偏度	-0.267	0.106	峰度	-0.436	0.180
[0425]	数量分布几何统计					
[0426]	标准偏差 8			标准偏差 8		
[0427]	平均值	1.393	0.070	模式	1.000	0.000
[0428]	中间值	1.033	0.009	标准偏差 . Log	0.214	0.022
[0429]	偏度	1.504	0.388	峰度	2.001	2.445
[0430]	平均粒度的最清楚的测定值来自几何平均数量分布,其给出以下的平均粒度:					
[0431]	i)PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的空粒子 -4000rpm(2%维生素 E[TPGE] 作为表面活性剂)-2 分钟,平均粒度 1.231					
[0432]	ii)PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的空粒子 -7500rpm(2%维生素 E[TPGE] 作为表面活性剂)-2 分钟,平均粒度 1.181					
[0433]	iii)PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的粒子 + 分析用的 dAb1-7500rpm(2%维生素 E[TPGE] 作为表面活性剂)-2 分钟,平均粒度 1.355					
[0434]	iv)PCL 作为 M/P 的 HIP 方法制备的粒子 + 测粒度用的 dAb2-7500rpm(2%维生素					

E[TPGE] 作为表面活性剂)-2 分钟,平均粒度 1.393

[0435] 结论是尽管在这些条件下以较低的速度得到了稍微大的微球体,但影响是不大的-所述的 7500rpm 的均化条件在 dAb 存在下得到的微球体的平均直径为 1.4 μ m,比该方法中的空粒子稍大。

[0436] 实施例 15 含有 dAb 的 HIP-PCL 微球体的分析

[0437] 如以上述实施例 13 所述的那样制备含有 dAb 的 HIP PCL 微球体。

[0438] 每种制剂取出 50 μ l (dAb1 和 dAb2), 各 :-

[0439] i) 在 1.5ml 微量离心管中以 3k rpm 旋转 5 分钟,产生上清液 (S)- 移出 30 μ l 到干净的微量离心管中,小球 (P) 碎片重新悬在 50 μ l PBS 中 ;

[0440] ii) 在 1.5ml 微量离心管中以 13k rpm 旋转 5 分钟,产生上清液 (S)- 移出 30 μ l 到干净的微量离心管中,小球 (P) 碎片重新悬在 50 μ l PBS 中 ;

[0441] iii) 在 Vivaspin500 (1000000 分子量的截断值) 以 5k rpm 旋转 5 分钟,以除去任何结合的 dAb,粒子保留在柱和作为穿过的上清液 (F) 的 50 μ l PBS 中,并收集。

[0442] 根据生产商的用户指南使用 Vivaspin500 (Sartorius stedim biotech)。

[0443] 制备样品,以通过加入 21 μ l 样品到 8 μ l 的 4x 加载染料中,加到 3 μ l 的 10x 还原剂中,得到的最终体积为 32 μ l,将其中的 10 μ l 在加热到 80°C 之后载入置于 PCR 仪 (PTC-100, MJ 研究公司) 的 96 孔 PCR 板的孔中,保持 5 分钟。

[0444] 接着根据生产商的指示,将样品载入在 MES SDS 中的 (2-N 吗啉代乙磺酸,十二烷基硫酸钠) 电泳胶上,缓冲 35 分钟 (invitrogen),并使用微波调节形式的 Simplyblue SafeStain 方法染色 (invitrogen),也在凝胶上加载未壳体化的 dAb 标准品并电泳,以协助计算浓度,即如上述样品制备所述的稀释的 3.28 μ g、0.82 μ g、0.21 μ g 和 0.05 μ g,10 μ l 分别加载了 :500ng/ μ l、125ng/ μ l、31.25ng/ μ l 和 7.8ng/ μ l 储备液。染色的凝胶的图像示于图 14 中。

[0445] 凝胶设置如下 :

[0446] 1 道 :全部 dAb1,2 道 :dAb1 3k S,3 道 :dAb1 3k P,4 道 :dAb1 13k S,5 道 :dAb1 13k P,6 道 :dAb1 F,7 道 :全部 dAb2,8 道 :dAb2 3k S,9 道 :dAb2 3k P,10 道 :dAb2 13k S,11 道 :dAb2 13k P,12 道 :dAb2 F,13 道 :分子标记物 - 参见 Blue Plus 2 预染色标准 (invitrogen),分子量 (kd),14 道 :3.28 μ g dAb 标准品,15 道 :0.82 μ g dAb 标准品,16 道 :0.21 μ g dAb 标准品,17 道 :0.05 μ g dAb 标准品,该凝胶确认发生了 dAb 的壳体化。该凝胶还确认 dAb 是完整的,且由于粒子的制备方法,它们没有产生片段。

[0447] 使用 Labworks 4.6 软件 (UVP) 的条带捕获和 1D 凝胶定量套装来核实 dAb1 在 PCL HIP 的全部,上清液和小球片段中的材料的量。使用配有奥林巴斯摄像头的 Vision 工作站在白光下捕获图像以供分析。数据示于表 9 中。

[0448] 表 9 :载入 PCL-HIP 微球体中加载的 dAb 的测定结果

[0449]

道	dAb 条带强度	dAb 的量(μg)
1	997.63	3.5
2	277.54	1.0
3	865.5	3.0
4	241.3	0.9
5	927.56	3.1
6	214.26	0.73
7	1225.4	4.5
8	317.93	nd
9	628.75	nd
10	126.42	nd
11	1056	nd
12	23.896	nd
14	925.94	3.28*
15	272.34	0.82*
16	40.492	0.21*
17	6.7923	0.05*

[0450] 1道:全部 dAb1, 2道:dAb1 3k S, 3道:dAb1 3k P, 4道:dAb1 13k S, 5道:dAb1 13k P, 6道:dAb1 F, 7道:全部 dAb2, 8道:dAb2 3k S, 9道:dAb2 3k P, 10道:dAb2 13k S, 11道:dAb2 13k P, 12道:dAb2F, 13道:分子标记物-参见 Blue Plus 2 预染色标准 (invitrogen), 分子量 (kd), 14道:3.28 μg dAb 标准品, 15道:0.82 μg dAb 标准品, 16道:0.21 μg dAb 标准品, 17道:0.05 μg dAb 标准品。

[0451] 使用 dAb 标准品相对于条带强度作图 (数据未示), 将 dAb 强度的凝胶读数转化成 μg 形式的 dAb 的量 (表 9)。

[0452] 平均全部 dAb 制剂读作:(1道和7道), $3.5\mu\text{g}+4.5\mu\text{g}/2=4\mu\text{g}$ -在载入 $10\mu\text{l}$ 后, 样品从 21 稀释到 32, 所以 $10\mu\text{l}$ 中的总 dAb = $32/21 \times 4 = 6\mu\text{g}$ 。

[0453] dAb1 上清液, (2道、4道和6道) = $1.0+0.9+0.73/3 = 0.9\mu\text{g}$, 稀释校正后为 $1.4\mu\text{g}$ 。

[0454] dAb1 小球, (3道和5道) = $3.0+3.1/2 = 3.0\mu\text{g}$, 稀释校正后为 $4.6\mu\text{g}$ 。

[0455] 使用这些图, 分数计算如下: $6\mu\text{g}$ 的全部 dAb = dAb1 上清液 ($1.4\mu\text{g}$) + dAb1 小球 ($4.6\mu\text{g}$), 壳体化的 dAb 的百分比为全部 dAb 的 77% ($4.6/6.0$)。

[0456] 然而, 输入的 dAb 的百分比-壳体化的 $10\mu\text{l}$ ($9.5\mu\text{g}$) 为 $4.6/9.5 \times 100\% = 48\%$ 。

[0457] 实施例 16-dAb 从 HIP PCL 微球体中的释放

[0458] 为了从HIP PCL粒子中释放dAb以分析功能活性 - 从dAb1和dAb2HIP PCL制剂中取出50 μ l等分样品,并放在1.5ml 埃彭道夫管中。用1ml PBS清洗2次,并在Eppendorf 5417C微量离心机中以5000rpm旋转5分钟。将小球重新悬浮在50 μ l PBS中,并在Techne加热箱中,在56°C下分别孵育0、20、40和60分钟。然后以5000rpm将样品旋转离心沉淀5分钟,除去30 μ l上清液(S),并置于冰上,以供分析。接着干燥小球(P)并重新悬浮于50 μ l中。

[0459] 将所有的部分都进行凝胶分析 - 在一块凝胶上分析释放的上清液,在另一块凝胶上分析释放的小球。上清液凝胶的分析示于图15中,其中,根据图14的初始分析的凝胶设置加载物。

[0460] 对于dAb1和dAb2,使用条带捕获和Labworks 4.6软件(UVP)的1D凝胶定量套装来核实在释放PCL HIP粒子的上清液和小球片段中的材料的量。使用装有奥林巴斯摄像头的Vision工作站在白光下捕获图像,以供分析。

[0461] 采用dAb标准品与条带强度为参数作曲线图(数据未示),将dAb强度的凝胶读数转换成ng形式的dAb的量(表10第2列)。

[0462] 需要注意的是,采用这个方法从粒子中约882-1000ng的小球源中释放的材料的量的范围为120-189ng之间(数据未示) - 其中12-19%的材料释放。

[0463] 通过ELISA对从PCL HIP粒子中释放的dAb进行功能分析。

[0464] ELISA方法描述了一种结合测定,以测量可溶的域抗体(VEGF dAb)结合重组VEGF的能力。所述的测定使用涂层到ELISA板(Nunc Immunosorb)表面的重组人VEGF(R&D Systems)来捕获VEGF dAb。将该板清洗以除去任何未结合的dAb。接着使用VEGF dab(9E10, Sigma)的Myc标记的抗体来检测结合的dAb。清洗除去过剩的抗体,并使用抗-小鼠IgG过氧化物酶缀合物(Sigma)以检测结合的抗-myc抗体。采用TMB溶液使该测定显色,再用酸停止显色。测定的信号与dAb的量成比例。

[0465] 设置ELISA板以分析以下列出的样品,还分析0分钟后“释放”的dAb1和dAb2样品。在30 μ l清除的释放样品中 - 使用其中的21 μ l进行SDS PAGE分析,剩下的9 μ l用来制备1 : 100、1 : 1000和1 : 10000的稀释液。

[0466] 表10所述的是计算的总的释放的dAb与经ELISA测量的功能活性dAb的比较结果。

[0467] 表10 功能活性和总的释放的dAb的定量。

[0468]

样品	从 SDS PAGE 强度转化后校正的 dAb ng/ μ l	从功能 ELISA 校正的 dAb ng/ μ l	活性 dAb 的百分比
dAb1-20 分钟	20.57143	33	~ 100
dAb1-40 分钟	28.8	22	76
dAb1-60 分钟	18.59048	30	~ 100
dAb2-20 分钟	18.28571	14	77
dAb2-40 分钟	18.28571	11	61
dAb2-60 分钟	21.33333	17	80

[0469] 可以看出,使用这种释放方法,可从微球体中释放的材料中检测到功能活性的 dAb,其范围与通过 ELISA 测量出的 60-100% 的壳体化保留活性一致。

[0470] 根据释放的 dAb、热失活或任何的 dAb 的降解,总 dAb 与活性 dAb 的比值会波动,但是该变化被认为不会有显著的差别。

[0471] 序列表

[0472]

SEQ ID NO.	描述
1	重链氨基酸序列人源化构建体 H28 抗-NOGO 抗体
2	2A10 轻链氨基酸序列人源化构建体 L16 抗-NOGO 抗体
3	重链人源化 DNA 构建体 H28 抗-NOGO 抗体
4	2A10 轻链人源化 DNA 构建体 L16 抗-NOGO 抗体
5	成熟的 H2 重链氨基酸序列(Fc 突变双突变粗体) β -淀粉样蛋白抗体
6	成熟的轻链氨基酸序列 β -淀粉样蛋白抗体
7	成熟的 H11 重链氨基酸序列
8	成熟的 L9 轻链氨基酸序列
9	亮啡肽类似物六肽
10	DOM15-26-593 VEGF dAb 氨基酸序列
11	CvL1 可变区氨基酸序列 MAG 抗体

[0473]

12	BvH1 可变区氨基酸序列 MAG 抗体
13	H2 全长 DNA β - 淀粉样蛋白抗体
14	优化的 L1 轻链 DNA β - 淀粉样蛋白抗体
15	L1 全长 DNA β - 淀粉样蛋白抗体

[0474] 序列

[0475] SEQ ID NO. 1 :重链人源化构建体 H28

[0476] MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTSYWMHW

[0477] VRQAPGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTA

[0478] VYYCELMQGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

[0479] EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS

[0480] NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

[0481] DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

[0482] KCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI

[0483] AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL

[0484] HNHYTQKSLSLSPGK

[0485] SEQ ID NO. 2 :2A10 轻链人源化构建体 L16

[0486] MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPVSNPVTLGQPVSI SCRSSKSLLYKDGKTYLN

[0487] WFLQRPGQSPQLLIYLMSTRASGVPDFRFSGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ

[0488] QLVEYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

[0489] QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL

[0490] SSPVTKSFNRGEC

[0491] SEQ ID NO. 3 :重链人源化构建体 H28

[0492] ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC

[0493] TCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT

[0494] CAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTACCAGCTACTGGATGC

[0495] ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATCGGAAATATTAAT

[0496] CCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACCATG

[0497] ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC

[0498] TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAACTGATGCAGGGCTACTGGGGCCAGG

[0499] GAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC

[0500] TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCT

[0501] GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCC

[0502] TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACT

[0503] CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC

[0504] ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAG

[0505] CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC

- [0506] GCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCAT
[0507] GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
[0508] ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
[0509] AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
[0510] CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGG
[0511] TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAAAG
[0512] GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG
[0513] ACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
[0514] CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCA
[0515] CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACC
[0516] GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
[0517] TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
[0518] ATGA
[0519] SEQ ID NO. 4 :2A10 轻链人源化构建体 L16
[0520] ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
[0521] TCCGATATTGTGATGACCCAGTCTCCA CTCTCCAACCCCGTCACCCTTGGACAG
[0522] CCGGTCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAG
[0523] ACATACTGAATTGGTTTCTCCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT
[0524] ATTTGATGTCCACCCGTGCATCTGG GGTCCCAGACAGATTCAGCGGCGGTGGG
[0525] TCAGGCACTGATTTCACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGG
[0526] GGTTTATTACTGCCAACAACTTGTAGAGTATCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGAC
[0527] CAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCC
[0528] ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
[0529] CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATC
[0530] GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
[0531] GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
[0532] TACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
[0533] CAACAGGGGAGAGTGTTAG
[0534] SEQ ID NO. 5 :成熟的 H2 重链氨基酸序列
[0535] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNLA
[0536] YSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFA YWGQGLV
[0537] TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
[0538] FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTC
[0539] PPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
[0540] EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
[0541] KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP
[0542] PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[0543] SEQ ID NO. 6 :成熟的轻链氨基酸序列
[0544] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRVSSQLLHSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS

- [0545] NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCSQTRHVPYTFGGGKVEIKR
- [0546] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
- [0547] EQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0548] SEQ ID NO. 7 :成熟的 H11 重链氨基酸序列
- [0549] QVQLVQSGAEVKEPGASVKVCKGSGFNIVVYVHWLRQLPGKLEWIGRIDPEN
- [0550] GETIYTPKFQDKATLTVDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQGLTLVTS
- [0551] SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
- [0552] VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP
- [0553] CPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
- [0554] HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
- [0555] QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
- [0556] LDSDGSAFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0557] SEQ ID NO. 8 :成熟的 L9 轻链氨基酸序列
- [0558] DIVMTQSPLSNPVTGPASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS
- [0559] NLAGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCAQNLLELWTFGGGKVEIKRT
- [0560] VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
- [0561] QDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0562] SEQ ID NO. 9 :亮啡肽类似物
- [0563] YAGFLR
- [0564] SEQ ID NO. 10 :DOM15-26-593VEGF dAb 序列 :
- [0565] EVQLLVSGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGGLEWVSEISPSG
- [0566] SYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLT
- [0567] VTVSSAAAEQKLISEEDLN
- [0568] SEQ ID NO. 11 :CvL1 可变区
- [0569] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
- [0570] ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCHQYLSSLTFGGGKLEIKR
- [0571] TV
- [0572] SEQ ID NO. 12 :BvH1 可变区
- [0573] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGGLEWGMWINTY
- [0574] TGEPTYADDFTRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARNPINYGINYEGYV
- [0575] MDYWGQGLVTVSS.
- [0576] SEQ ID NO. 13 :H2 全长 DNA 序列
- [0577] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
- [0578] TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGT
- [0579] GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAAT
- [0580] TTGGCATATAGTATCGACTACGACAGACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCC
- [0581] AGAGACAATGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
- [0582] GACACGGCTGTGTATTACTGTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGTACTGGGGCCA
- [0583] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC

[0584] CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
[0585] CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCG
[0586] CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTC
[0587] TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
[0588] CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGT
[0589] TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
[0590] ACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCC
[0591] TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
[0592] GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
[0593] TGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
[0594] GCGTCTCACCGTCTTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
[0595] AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCC
[0596] AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA
[0597] GCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
[0598] GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAA
[0599] GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCT
[0600] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
[0601] TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
[0602] GGTA
[0603] SEQ ID NO. 14 :优化的 L1 轻链 DNA
[0604] GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCTGGCGAGCC
[0605] CGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCTACA
[0606] CCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCT
[0607] ACAAGGTGTCCAACCGGTTGAGCGGCGTGCTGATAGATTCAGCGGCAGCGGC
[0608] TCCGGCACCGACTTACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATGTGGG
[0609] CGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACAGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGAA
[0610] CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTTCATCTTCCCC
[0611] CCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAA
[0612] CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGC
[0613] AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC
[0614] CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA
[0615] AGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
[0616] AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
[0617] SEQ ID NO. 15 :L1 全长
[0618] GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCG
[0619] GCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCT
[0620] ATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATA
[0621] AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAG
[0622] GCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTT

[0623] ATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
[0624] TGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
[0625] ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
[0626] TCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTA
[0627] ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
[0628] AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGC
[0629] CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACA
[0630] GGGGAGAGTGT

[0001]

序列表

<110> PAPANICOLAU, Irene

<120> 生物活性剂的囊封

<130> PB63616

<150> US61/050775

<151> 2008-05-06

<150> US61/074171

<151> 2008-06-20

<160> 15

<170> FastSEQ, Windows 版本4.0

<210> 1

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工系列

<220>

<223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 1

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
          50           55           60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
          65           70           75           80
Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
          85           90           95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Glu Leu Met Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          115          120          125
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
          130          135          140
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
          145          150          155          160
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
          165          170          175
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
          180          185          190
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
          195          200          205
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
          210          215          220
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

```

[0002]

```

225          230          235          240
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
          245          250          255
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
          260          265          270
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
          275          280          285
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          290          295          300
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305          310          315          320
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
          325          330          335
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
          340          345          350
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
          355          360          365
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          370          375          380
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385          390          395          400
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp
          405          410          415
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          420          425          430
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
          435          440          445
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450          455          460

```

<210> 2
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠和智人的人源化序列

```

<400> 2
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val
          20          25          30
Thr Leu Gly Gln Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
          35          40          45
Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50          55          60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser
65          70          75          80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
          100          105          110
Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
          115          120          125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

```

[0003]

130	135	140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
145	150	155
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn		
	165	170
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser		
	180	185
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala		
	195	200
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly		
	210	215
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

<210> 3
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 3

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
tgcaaggcat ctggatacac cttcaccagc tactggatgc actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat cggaaatatt aatcctagca atggtggtac taactacaat 240
gagaagttca agagcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agcctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgaact gatgcagggc 360
tactggggcc agggaacact agtcacagtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420
ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggcctt gggctgcctg 480
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg 600
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 660
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagccaaat cttgtgacaa aactcacaca 720
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcgcg ggggcaccgt cagtcttct cttcccccca 780
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
cagccggaga acaactacaa gaccacgect cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
ggtaaatga
    
```

<210> 4
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

[0004]

<400> 4
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgat 60
 attgtgatga cccagtctcc actctccaac cccgtcaccc ttggacagcc ggtctccatc 120
 tcctgcaggt ctagtaagag tctctatat aaggatggga agacatactt gaattggttt 180
 ctccagaggc caggccaatc tccacagctc ctaatttatt tgatgtccac ccgtgcatct 240
 ggggtcccag acagattcag cggcgggtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc 300
 aggggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgccaac aacttgtaga gtatccgctc 360
 acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgtacgg tggetgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgectgetg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggacaacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag 717

<210> 5
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

[0005]

Phe	Asn	Trp	260	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	265	Glu	Val	His	Asn	Ala	270	Lys	Thr	Lys
			275						280						285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu			
			290				295					300						
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys			
			305		310					315					320			
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys			
				325					330						335			
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser			
			340						345						350			
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys			
			355				360								365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln			
			370			375					380							
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
					390					395					400			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln			
				405					410						415			
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn			
			420					425					430					
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			435				440					445						

<210> 6

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 6

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly			
				5					10						15			
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Val	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser			
			20					25						30				
Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser			
			35				40						45					
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro			
			50			55					60							
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
				70						75					80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Thr			
				85					90						95			
Arg	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100						105						110			
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu			
			115					120						125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe			
			130			135					140							
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln			
					150					155					160			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser			
				165					170						175			
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu			

[0006]

Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		180						185					190		
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	210					215									

<210> 7
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 7

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Glu	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Val	Tyr
		20					25						30		
Tyr	Val	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Leu	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Thr	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
		115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
	130					135					140				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				165					170					175	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
			180					185					190		
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
		195					200					205			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			245						250					255	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
			260					265					270		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		275					280					285			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	290					295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly

[0007]

```

          325          330          335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
          340          345          350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          355          360          365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          370          375          380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          385          390          395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          405          410          415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
          420          425          430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440

```

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 8

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
  1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
          20           25           30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
          85           90           95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130          135          140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
          145          150          155          160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 9

[0008]

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 9
 Tyr Ala Gly Phe Leu Arg
 1 5

<210> 10
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 115 120 125
 Leu Asn
 130

<210> 11
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 11
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser His Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0009]

aatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	aagaaagtgtg	agcccaaate	ttgtgacaaa	660
actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	gaactcgcgg	gggcaccgtc	agtcttcctc	720
ttcccccaa	aacccaagga	caccctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	780
gtgggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	840
gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	960
gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1020
ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	1080
gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggett	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1140
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	1200
tccttcttc	tctacagcaa	gctcaccgtg	gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	1260
ttctcatget	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	1320
ctgtctccgg	gtaaa					1335

<210> 14
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

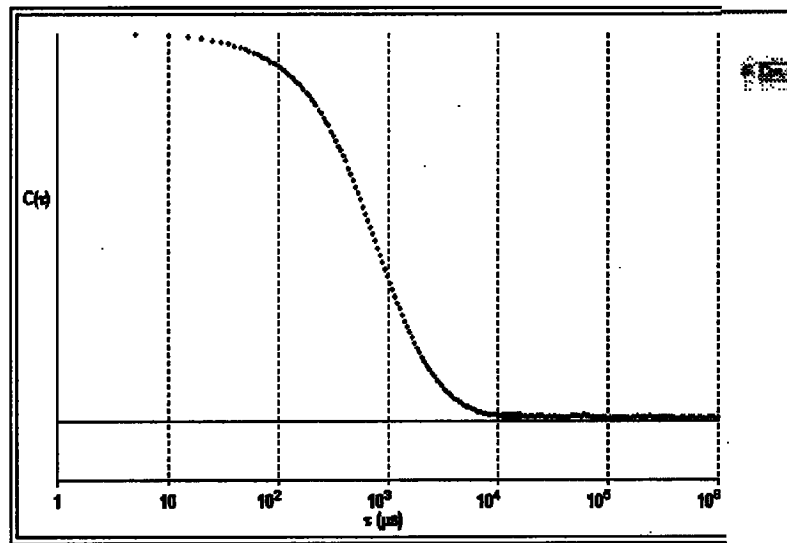
<400> 14						
gacatcgtga	tgaccagag	ccccctgagc	ctgcccgtga	cccctggcga	gcccgccagc	60
atcagctgta	gagttagcca	gagcctgctg	cacagcaacg	gctacaccta	cctgcactgg	120
tatctgcaga	agcctggcca	gagccctcag	ctgctgatct	acaaggtgtc	caaccggttc	180
agcggcgtgc	ctgatagatt	cagcggcagc	ggctccggca	ccgacttcac	cctgaagatc	240
agcagagtgg	aggccgagga	tgtgggcgtg	tactactgct	cccagaccag	acacgtgcct	300
tacacctttg	gcggcggaac	aaaggtggag	atcaagcgta	cggtggccgc	ccccagcgtg	360
ttcatcttcc	ccccagcga	tgagcagctg	aagagcggca	ccgccagcgt	ggtgtgtctg	420
ctgaacaact	tctacccccg	ggaggccaag	gtgcagtgga	aggtggacaa	tgccctgcag	480
agcggcaaca	gccaggagag	cgtgaccgag	caggacagca	aggactccac	ctacagcctg	540
agcagcacc	tgaccctgag	caaggccgac	tacgagaagc	acaaggtgta	cgctgtgag	600
gtgaccacc	agggcctgtc	cagccccgtg	accaagagct	tcaaccgggg	cgagtgc	657

<210> 15
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小家鼠和智人的人源化序列

<400> 15						
gatattgtga	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccctggaga	gccggcctcc	60
atctcctgca	gagttagtca	gagcctttta	cacagtaatg	gatacaccta	tttacattgg	120
tacctgcaga	agccagggca	gtctccacag	ctcctgatct	ataaagtttc	caaccgattt	180
tctgggtcc	ctgacagggt	cagtggcagt	ggatcaggca	cagattttac	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgttggggtt	tattactgct	ctcaaactag	acatgttccg	300
tacacgttcg	gcggagggac	caaggtggaa	atcaaacgta	cggtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgectctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtgga	aggtggacaa	cgccctccaa	480
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaagtctta	cgctgcgaa	600
gtcaccatc	agggcctgag	ctcggccgtc	acaagagct	tcaacgggg	agagtgt	657

PBCA np no dalagrin, 10:1 HIP (组合的)
 有效直径 : **291.4 nm**
 多分散性 : **0.242**
 平均计数率 : **1.9 Mcps**
 基线指数 : **6.4**
 耗用时间 : **00:10:00**



次数	有效直径 [nm]	一半宽度 [nm]	多分散性	基线指数
1	302.4	135.1	0.200	8.9
2	290.7	151.0	0.270	10.0
3	291.0	131.7	0.205	7.6
4	293.1	149.2	0.259	9.2
5	288.4	149.4	0.268	9.5
6	299.2	146.8	0.241	6.6
7	320.1	138.9	0.188	8.7
8	281.3	133.7	0.226	7.9
9	293.6	143.1	0.238	8.7
10	282.7	147.5	0.272	7.4
平均值	294.3	142.6	0.237	8.5
标准误差	3.5	2.3	0.010	0.3
组合的	291.4	143.2	0.242	6.4

图 1a

(1b)

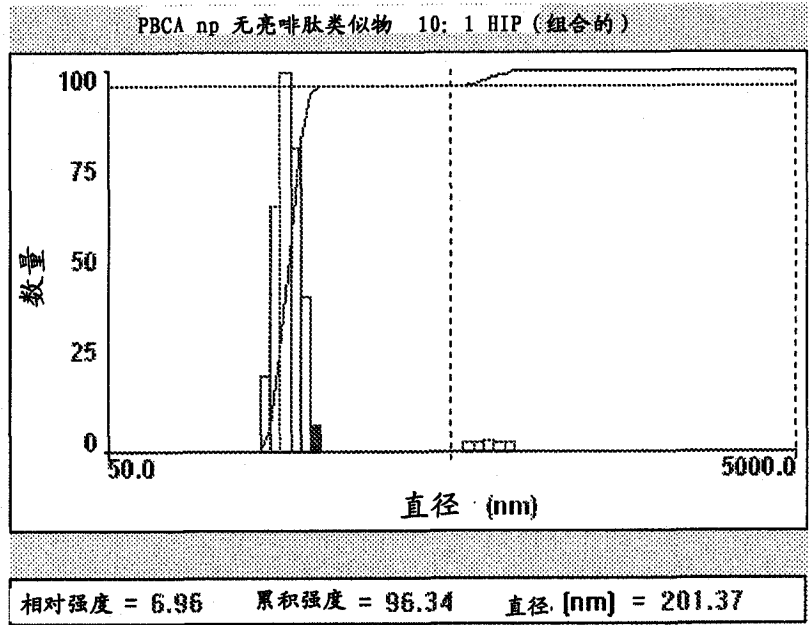


图 1b

1c

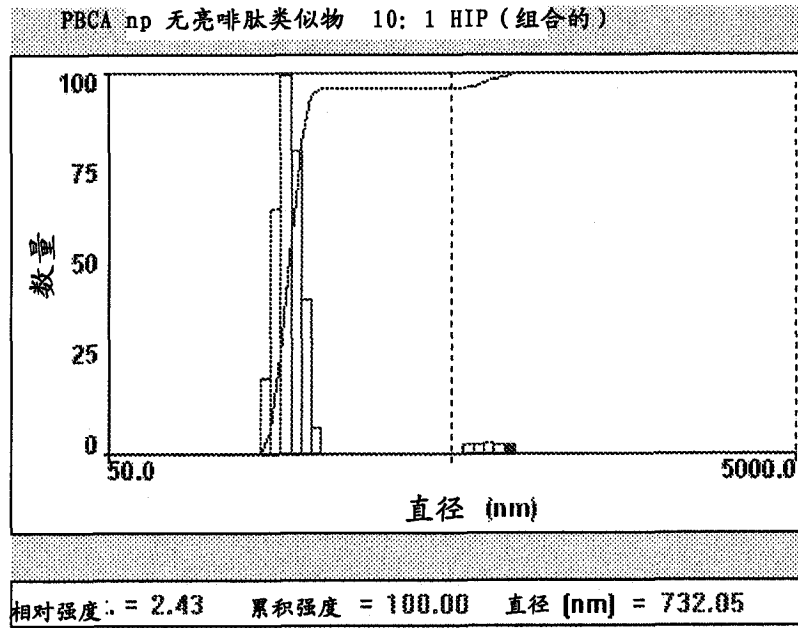


图 1c

1d

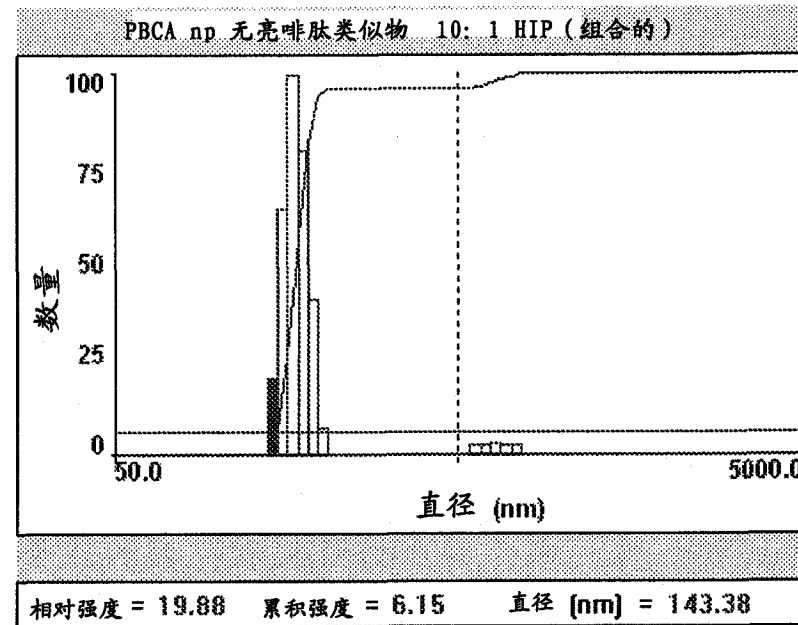


图 1d

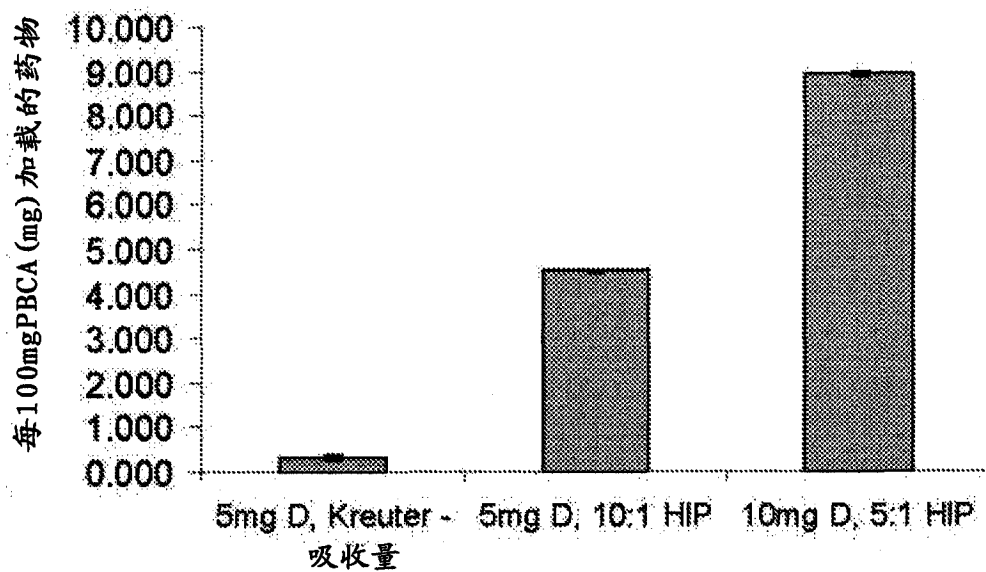


图 2

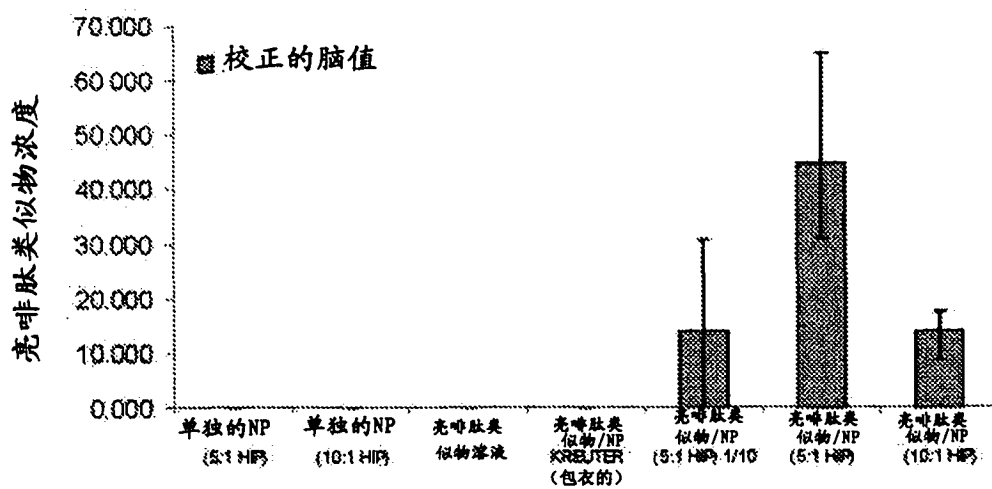


图 3

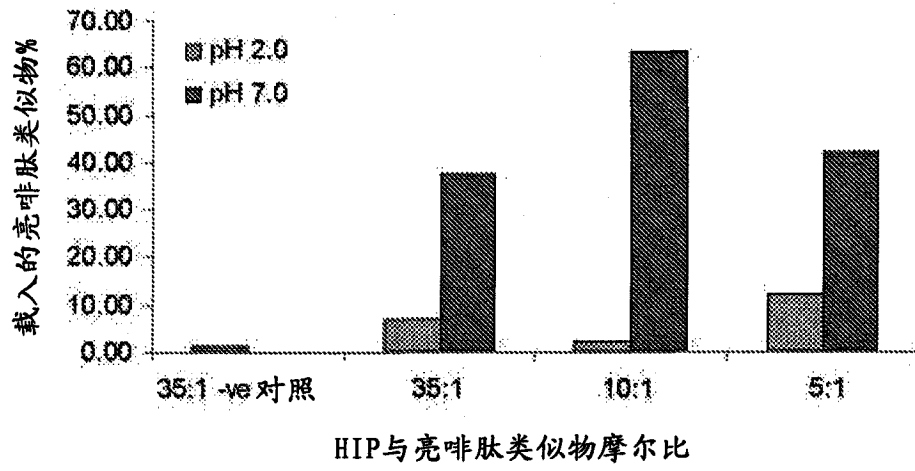


图 4

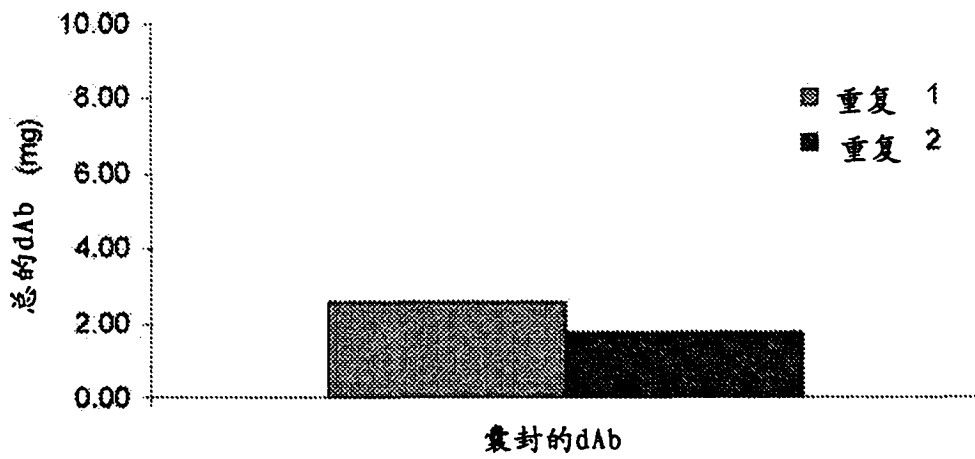


图 5

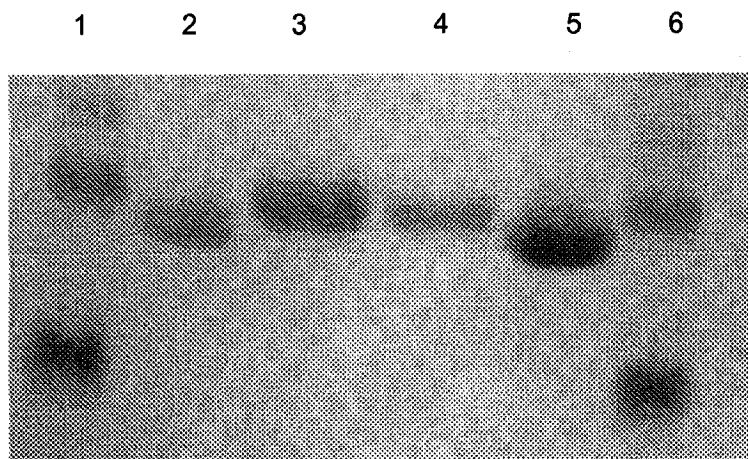


图 6

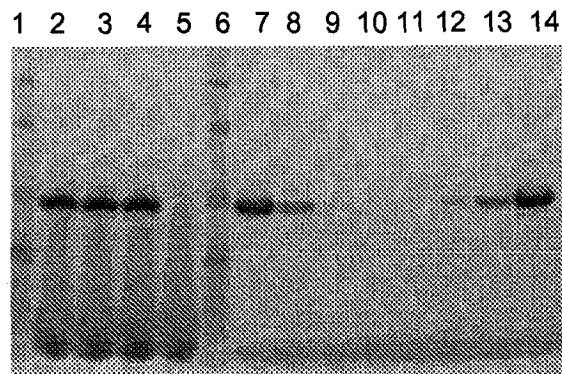


图 7

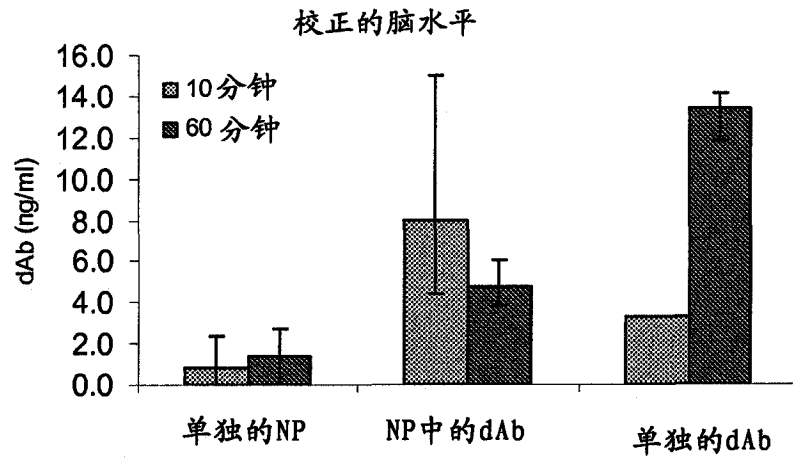


图 8

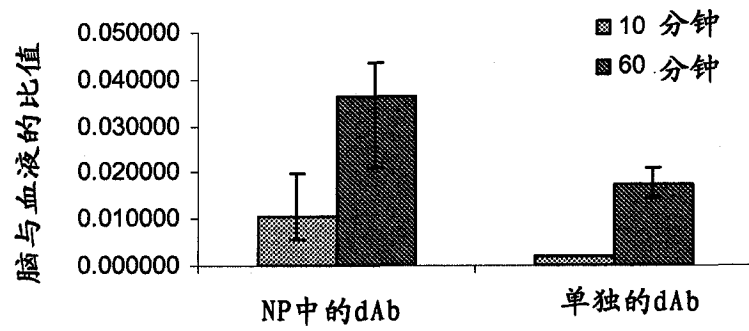


图 9

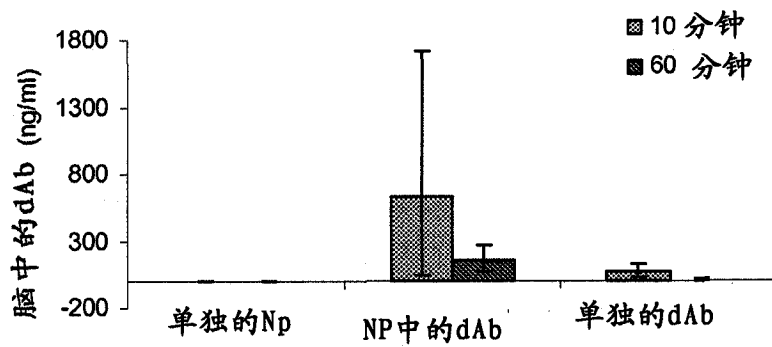


图 10

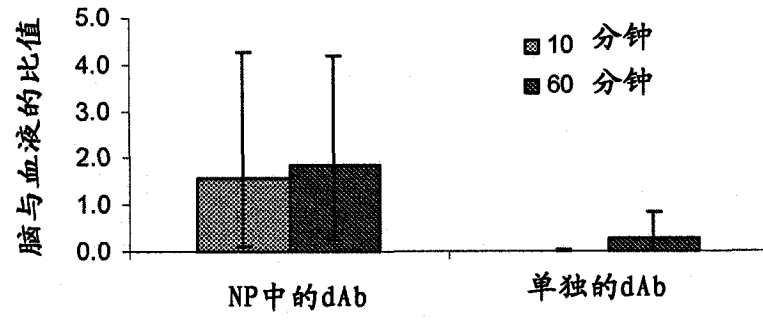


图 11

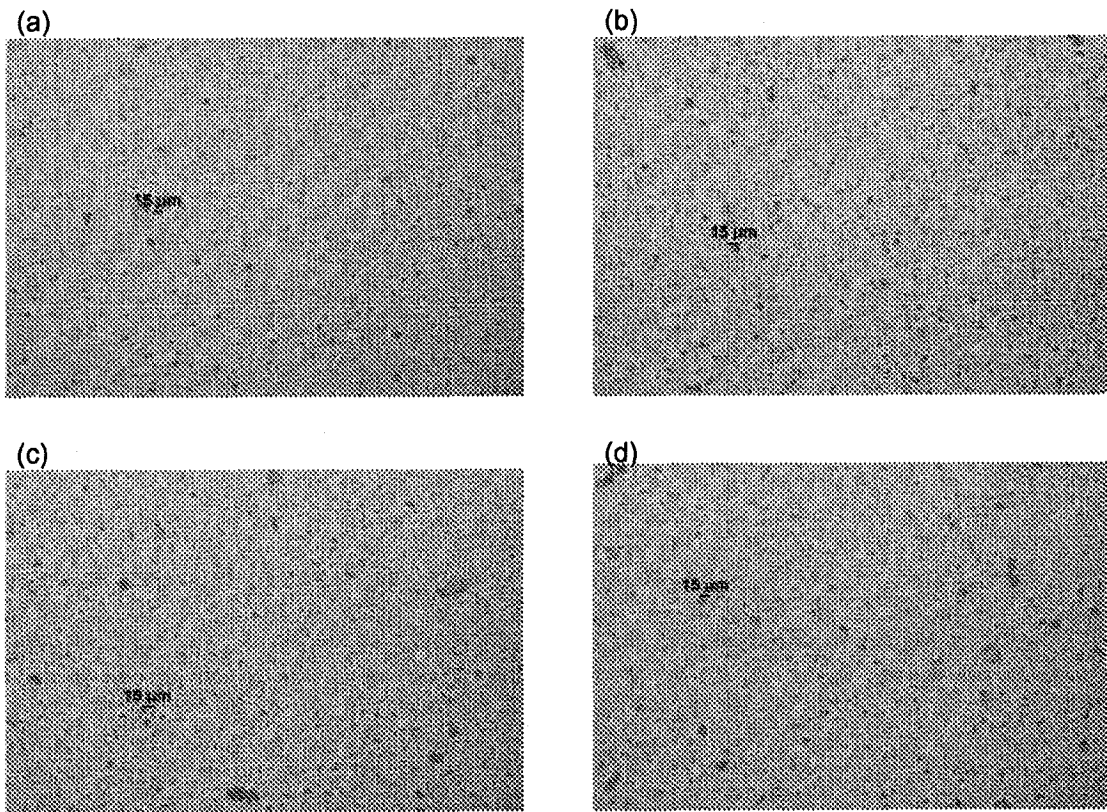


图 12

(a)

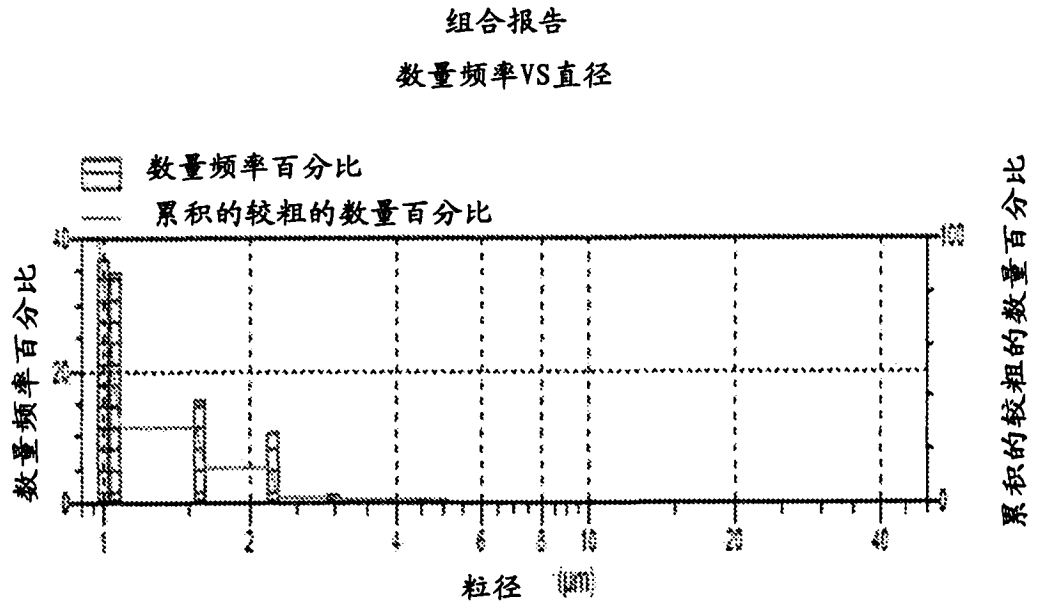


图 13

(b)

组合报告
数量频率VS直径

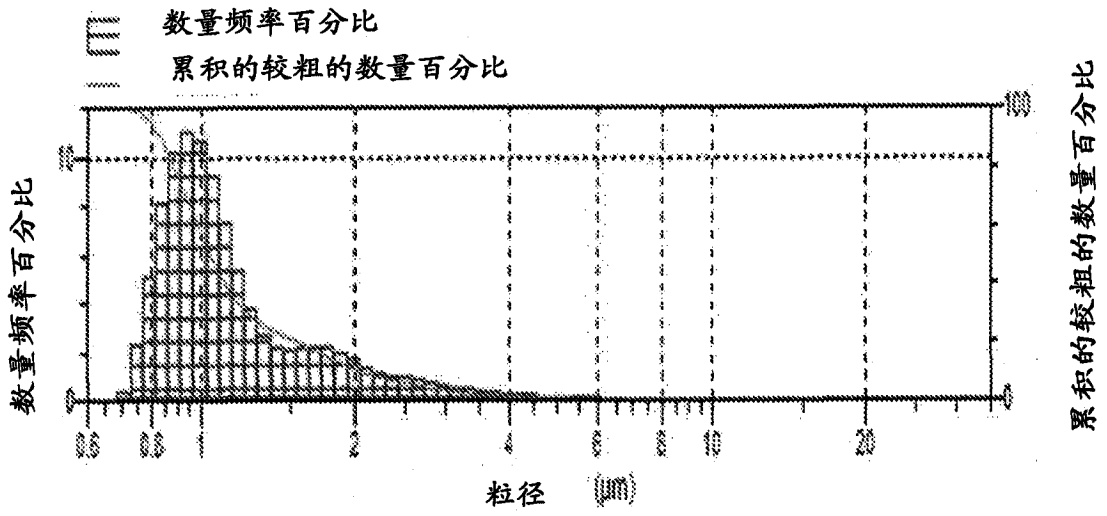


图 13

(c)

组合报告
数量频率VS直径

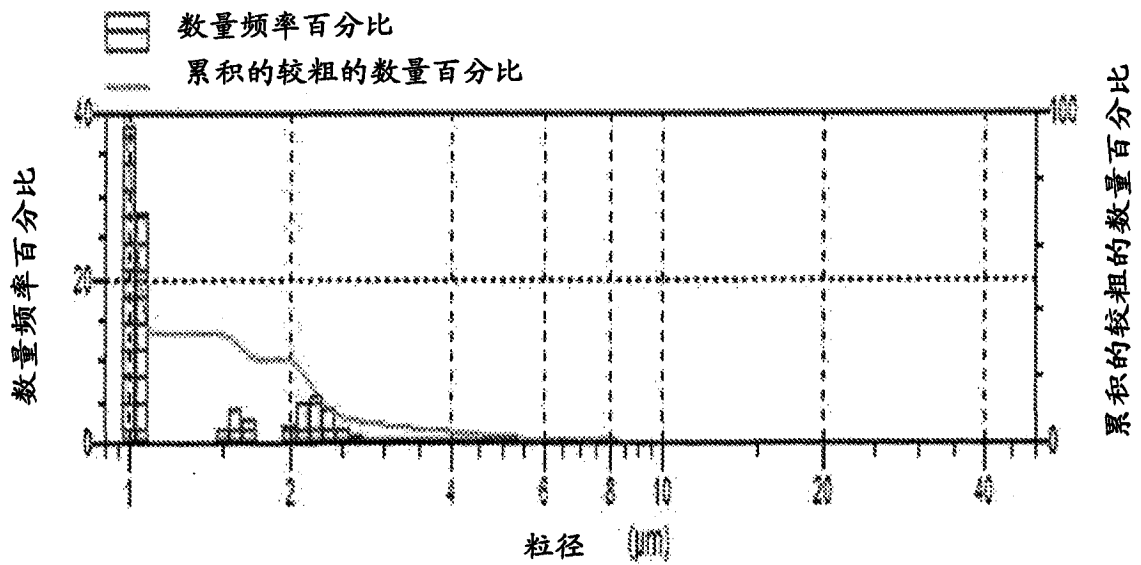


图 13

(d)

组合报告
数量频率VS直径

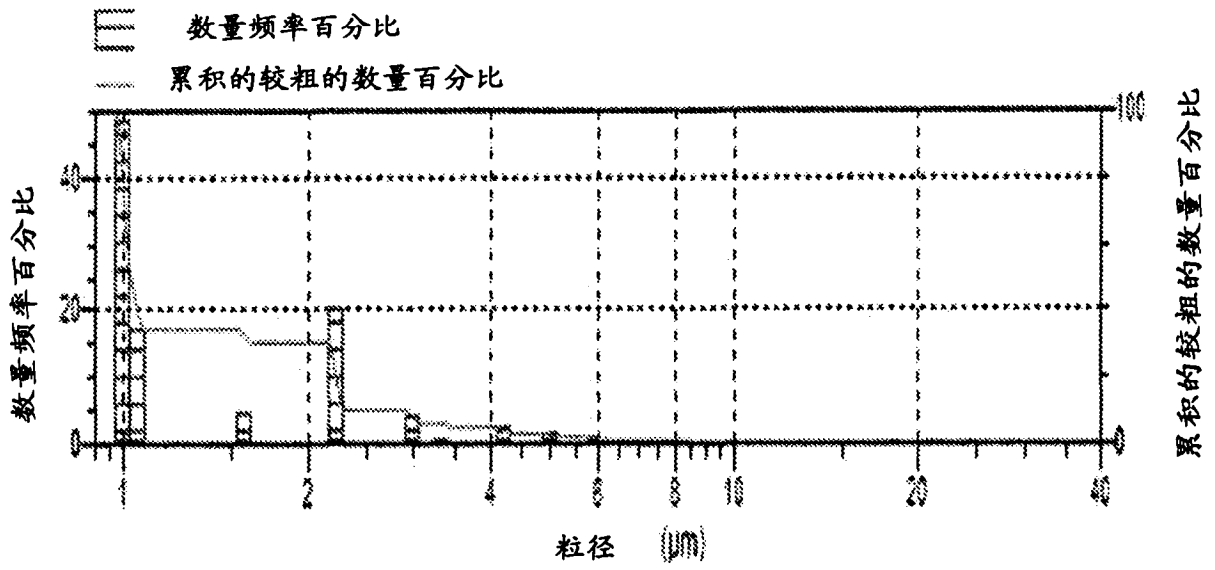


图 13

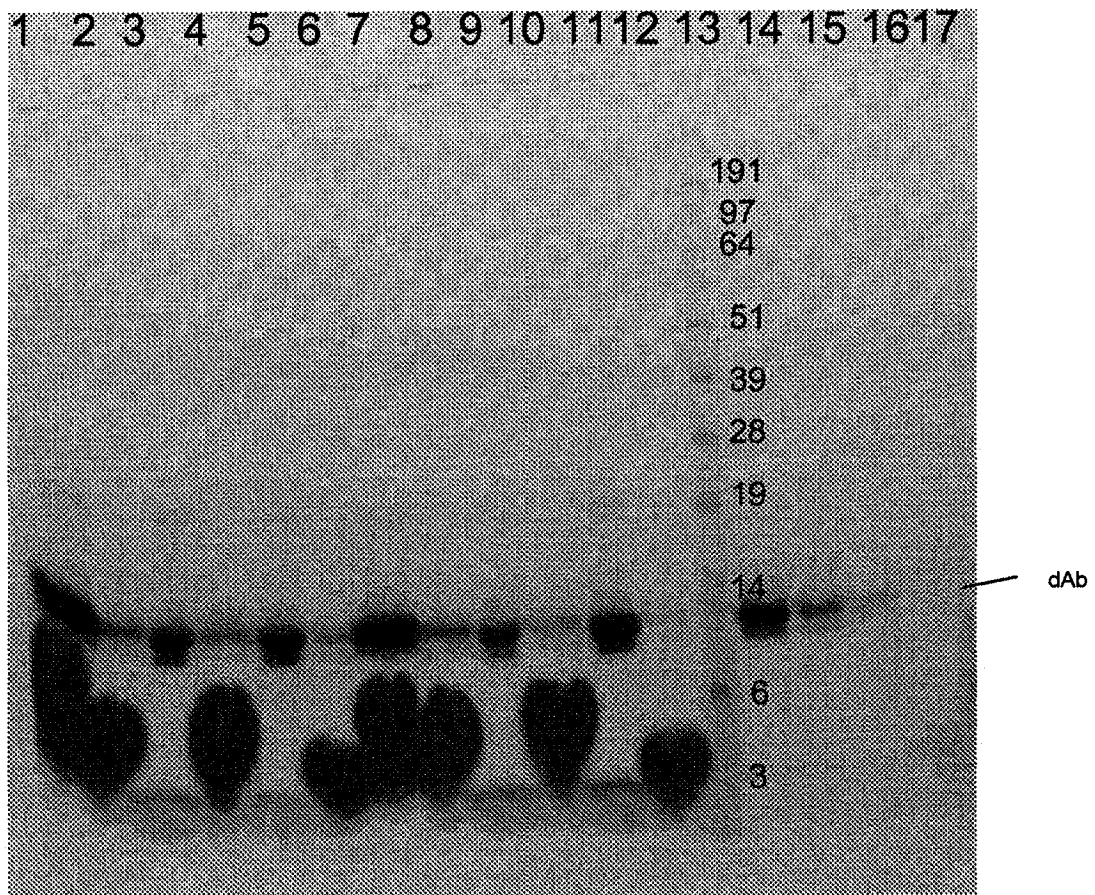


图 14

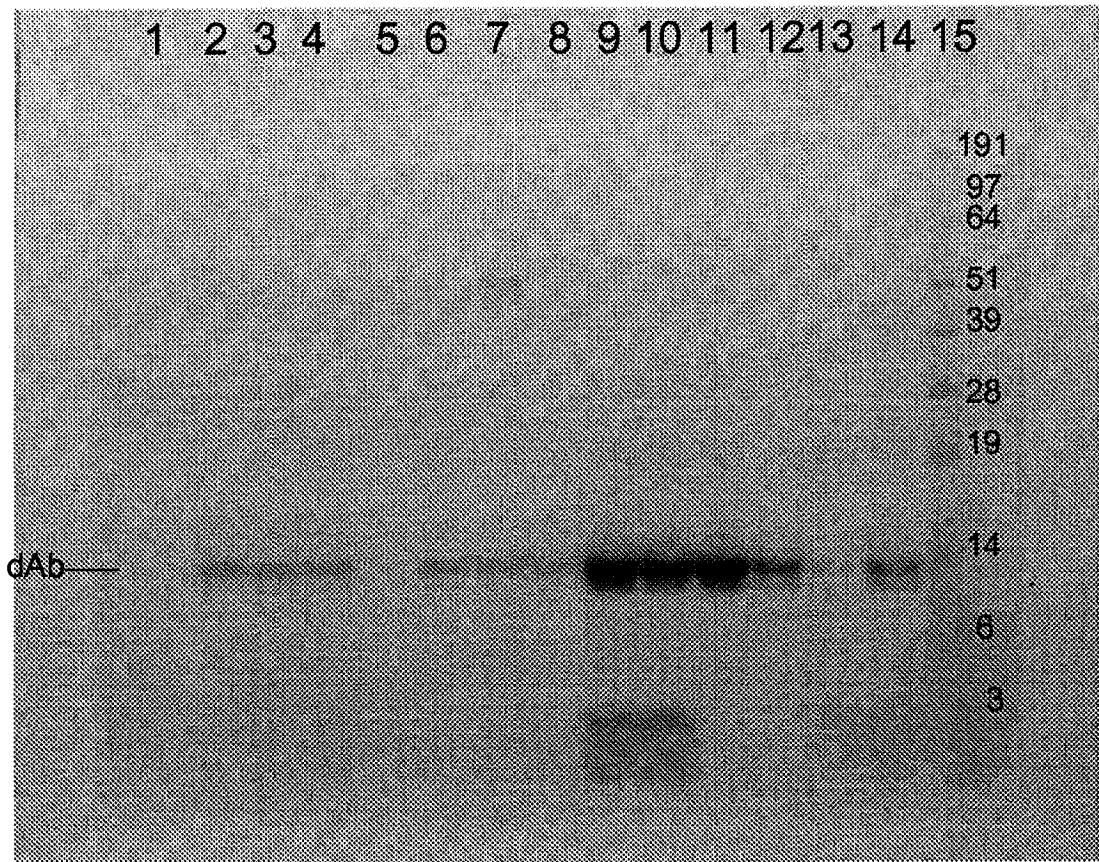


图 15