 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2011-0010760 <b>(43) 공개일자</b> 2011년02월07일
<p>(51) Int. Cl.  <i>A61K 47/30</i> (2006.01) <i>A61K 9/51</i> (2006.01)  <i>A61K 9/50</i> (2006.01) <i>A61K 9/16</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7027449</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년05월05일          심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년12월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/055438</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/135855          국제공개일자 2009년11월12일</p> <p>(30) 우선권주장          61/050,775 2008년05월06일 미국(US)          61/074,171 2008년06월20일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인          글락소 그룹 리미티드          영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포오드 버클리 애          비뉴 글락소 웰컴 하우스</p> <p>(72) 발명자          파파니콜라우, 이레느          영국 에스지1 2엔와이 스티븐에이지 허트포드셔          건넬스 우드 로드 글락소스미스클라인</p> <p>(74) 대리인          남상선</p>

전체 청구항 수 : 총 27 항

#### (54) 생물학적 활성제의 캡슐화

#### (57) 요약

본원 발명은 HIP 작용제를 사용하여 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질을 미립자 담체, 예컨대, 나노입자내에 캡슐화시키는 방법을 제공한다. 또한 본원 발명은 본원 발명의 방법에 의해 획득가능한 미립자 담체를 포함하는 조성물 및 이 조성물의 치료 용도를 제공한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 단계들을 포함하는 미립자 담체에 생물학적 활성제를 캡슐화시키는 방법:

- a) 소수성 이온쌍형성(hydrophobic ion pairing, HIP) 작용제의 존재하에서 유기 용매에 생물학적 활성제를 가용해화(solubilisation)시켜 유기상을 형성시키는 단계;
- b) 단계 a)에서 형성된 상기 유기상에서 폴리머 형성 물질의 모노머 또는 올리고머를 용해시키는 단계;
- c) 단계 b)에서 형성된 상기 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시켜 상기 모노머의 중합체화를 일으키는 단계; 및
- d) 상기 에멀전으로부터 형성된 미립자 담체를 수득하는 단계.

### 청구항 2

하기 단계들을 포함하는 미립자 담체에 생물학적 활성제를 캡슐화시키는 방법:

- a) 수성상 중의 생물학적 활성제와 유기 용매상 중의 소수성 이온쌍형성(HIP) 작용제를 혼합하여 생물학적 활성제-HIP 복합체를 형성시키는 단계;
- b) 상기 수성상으로부터 상기 복합체를 분리시키는 단계;
- c) 상기 수성상을 제거하고 상기 복합체와 상기 유기상을 균질화시키는 단계;
- d) (i) 단계 c)에서 형성된 상기 유기상에 폴리머를 용해시키고 난 다음 상기 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시키거나;
- (ii) 단계 c)에서 형성된 상기 유기상에, 폴리머 형성 물질의 모노머 또는 올리고머를 용해시키고 난 다음, 상기 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시켜, 상기 모노머 또는 올리고머의 중합체화를 일으켜 폴리머를 형성시키는 단계; 및
- e) 단계 d)의 상기 에멀전으로부터 형성된 미립자 담체를 수득하는 단계.

### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 모노머가 알킬시아노아크릴레이트[alkylcyanoacrylate, ACA]를 포함하는, 방법.

### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 모노머가 부틸시아노아크릴레이트[butylcyanoacrylate, BCA]를 포함하는, 방법.

### 청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리-L-락티드[poly-L-lactide, PLA], 폴리 부틸시아노아크릴레이트[poly butylcyanoacrylate, PBCA] 또는 폴리(락티드-코-글리콜리드)[poly(lactide-co-glycolide, PLG)], 또는 폴리(카프로락톤)[poly(caprolactone)], 폴리(히드록시부티레이트) 및/또는 이들의 코폴리머를 포함하는, 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리(카프로락톤)을 포함하는, 방법.

### 청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLG)를 포함하는, 방법.

### 청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리-L-락티드(PLA)를 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제 3항 또는 제 4항에 있어서, 상기 연속 수성상이 약 6 이상의 pH를 지니는, 방법.

#### 청구항 10

제 1항 내지 제 9항중 어느 한 항에 있어서, 상기 미립자 담체가 나노입자인, 방법.

#### 청구항 11

제 1항 내지 제 10항중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제가 단백질 또는 펩티드인, 방법.

#### 청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 생물학적 활성제가 항원 결합 분자인, 방법.

#### 청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 도메인을 포함하는, 방법.

#### 청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 항체인, 방법.

#### 청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 도메인 항체인, 방법.

#### 청구항 16

제 1항 내지 제 15항중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제가 소수성 이온쌍형성 작용제의 부재시 상기 유기상에 불용성인, 방법.

#### 청구항 17

제 1항 내지 제 16항중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제가 양이온성인 경우, 상기 HIP 작용제가 음이온성 HIP 작용제인, 방법.

#### 청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 HIP 작용제가 도쿠세이트 소듐인, 방법.

#### 청구항 19

제 1항 내지 제 16항중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제가 음이온성인 경우, 상기 HIP 작용제가 양이온성 HIP 작용제인, 방법.

#### 청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 HIP 작용제가 디메틸디옥타데실-암모늄브로마이드[dimethyldioctadecyl-ammonium bromide, DDAB18]; 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모늄)프로판[1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propane, DOTAP]; 또는 세트리모늄 브로마이드[cetrimonium bromide, CTAB]인, 방법.

#### 청구항 21

제 1항 내지 제 20항중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 획득가능한 캡슐화된 생물학적 활성제를 포함하는 미립자 담체.

#### 청구항 22

제 21항에 있어서, 폴리머에 대한 단백질 비율이 약 1.0% w/w 이상, 또는 약 2.5% w/w 이상, 또는 약 5% w/w 이상인, 미립자 담체.

#### 청구항 23

제 21항에 있어서, 폴리머에 대한 펩티드 비율이 약 5% w/w 이상, 또는 약 9% w/w 이상인, 미립자 담체.

#### 청구항 24

제 21항에 있어서, 폴리머에 대한 항체 비율이 약 1% w/w 이상, 또는 약 2.5% w/w 이상인, 미립자 담체.

#### 청구항 25

제 21항에 있어서, 나노입자내의 폴리머에 대한 도메인 항체 비율이 약 5% w/w 이상인, 미립자 담체.

#### 청구항 26

제 21항 내지 제 25항중 어느 한 항에 기재된 미립자 담체를 포함하는 약제 조성물.

#### 청구항 27

제 26항에 있어서, 질병의 예방 또는 치료를 위한, 약제 조성물.

### 명세서

### 기술분야

[0001]

#### 배경

[0002]

수많은 약물은 뇌 또는 눈 내의 표적에서 활성을 갖는데, 이 약물은 이들의 타겟에 이르기 위해서, 생물학적 장벽, 예컨대, 혈액 뇌 장벽을 통과해야한다. 일부 분자는 생물학적 장벽을 통과할 수 있는 반면, 이러한 장벽을 효과적으로 또는 전혀 통과하지 못하는 기타 분자가 존재한다. 또한 많은 약물이 직접적으로 표적 조직내로 주어진 경우에만 효과적이며, 이러한 표적 조직에 도달되지 못한 경우, 약물은 단순히 작용할 수 없다. 따라서, 잠재적으로 효능 있는 많은 약물이 이러한 생물학적 장벽의 통과에 무능하기 때문에 임상적으로 유용하지 않다.

### 배경 기술

[0003]

이러한 생물학적 장벽을 통한 약물 침투를 증가시키기 위한, 수많은 접근법이 당업계에 개시되었다.

[0004]

한 가지 접근법은 장벽 자체의 기능을 변형시키는 것이다. 예를 들어, 삼투성 시약(osmotic agents) 또는 콜린 자극성 아레콜린(cholinomimetic arecolines)은 혈액 뇌 장벽의 개방 또는 침투성의 변화를 유발한다(Saija A *et al.*, J Pharm. Pha. 42:135-138 (1990)).

[0005]

또 다른 접근법은 약물 분자 자체의 개질에 관한 것이다. 예를 들어, 혈액 뇌 장벽을 통해 통과를 시도하도록 한 단백질의 개질은 이러한 단백질을 글리케이팅(glycating)하거나 대안적으로는, 전구약물을 형성시킴에 의한 것을 포함한다(WO/2006/029845).

[0006]

또 다른 접근법은 활성 성분을 매트릭스 시스템으로부터 신경 조직으로 직접적으로 방출시키는 방출 조절 폴리머의 이식(implantation)이다. 그러나, 이러한 접근법은 침습적이며, 직접적으로 뇌 또는 척수에 부착될 경우 수술적 개입을 필요로 하는데(sable *et al.* US 특허 제 4,833,666호), 환자의 수용상태에 관한 문제가 존재하고 종종 보통 매우 빠르게 빠지는 약물을 투여함으로써 뇌 안으로 집중된 전달만을 가능케한다(WO/2006/029845).

[0007]

이러한 제한을 극복하기 위해서, 약물 단체 시스템이 사용되고 있으나, 표적화된 약물 전달의 중요 문제는 빠른 옵소닌화(opsonisation) 및 세망내피계(reticuloendothelial system, RES), 특히 간 및 비장 내의 대식 세포에 의한 주입된 담체의 흡취(uptake)이다.

[0008]

따라서, 거대분자, 예컨대 단백질을 뇌 및 눈으로 전달하는 효과적이고 효율적인 방법의 필요성이 여전히 존재한다. 특히, 뇌 안으로 진입시에 활성을 유지하며, 또한 요망되는 방출 동역학을 제공할 수 있으며, 단백질 안정성 및 활성을 유지하고, 제거 메카니즘(clearance mechanisms)을 회피하는 능력을 갖는, 혈액 뇌 장벽을 통한 거대분자의 전달 방법을 발견하는 것이 요망될 것이다.

[0009]

#### 도면의 간단한 설명

[0010]

도 1은 현탁액 중의 나노입자의 존재를 제시하는 DLS(dynamic light scattering)로 획득한 사이징(sizing) 데

이터를 보여준다.

- [0011] 도 1 (a) - 동적 광 산란에 의한 나노입자 현탁액의 분석 후 획득된 코렐로그래프(코렐로그래프)을 나타낸다.
- [0012] 도 1 (b) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된(plotted) 나노입자의 다모드(multimodal) 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0013] 도 1 (c) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0014] 도 1 (d) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0015] 도 2. 입자 표면으로의 일반적인 흡착 방법에 의해 달성된 캡슐화된 다라진(Dalargin) 양과 대비한 HIP 방법으로 달성된 캡슐화된 다라진 양의 비교
- [0016] 도 3. - HIP-PBCA 나노입자로의 전달 후 뇌내 다라진 수준. 캡티드는 HIP 방법을 이용하여 입자 내에 캡슐화된 경우에만 뇌에서 검출가능하였다.
- [0017] 도 4. - HIP 방법을 이용한 PBCA 나노입자내로의 다라진의 캡슐화. 캡슐화 효율에 관한 수성상의 pH의 효과에 대한 측정.
- [0018] 도 5. - HIP 방법을 이용한 PBCA 나노입자내로의 항-계란 리소자임 도메인 항체의 캡슐화. 나노입자는 에드만(Edman) 시퀀싱으로 분석하였다.
- [0019] 도 6 - SDS-PAGE 분석에 의한 HIP-PBCA 나노입자내로의 dAbs의 캡시드화의 확증. 나노입자를 원심분리하여 임의의 유리 dAb를 제거하고 펠렛을 SDS-PAGE로 분석하여 캡시드화된 dAb를 현출시켰다.
- [0020] 도 7 - SDS-PAGE 분석에 의한 HIP-PBCA 나노입자내로의 VEGF dAb (DOM15-26-593)의 로딩에 대한 확인. 나노입자내에 존재하는 dAb의 양을 정량하기 위해 나노입자 제형을 dAb 표준(표준물질)과 비교하였다. 12 mg의 출발 인풋 중에서 총 3.31 mg의 dAb가 나노입자내에서 캡시드화되었다. 따라서, 로딩 효율은 27.6 %이었다. dAb 로딩은 3.31 % w/w이었다.
- [0021] 도 8 - 정맥내 경로를 통해 마우스의 뇌로 이들의 단백질 로드를 전달하는 이들의 활성화에 관하여 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가로부터 얻은 결과. 투여후 10 분에, 나노입자 중의 dAb는 8.0 ng/ml 에 달하는 양으로 검출가능한 뇌 흡취로 귀결되었다. 유리 dAb는 또한 3.3 ng/ml (예비 데이터)의 조금 더 낮은 농도로 뇌에서 검출가능하였다. 따라서, 나노입자는 단백질의 뇌 흡취를 미미하게 증가시키는 것으로 드러났다(예비 데이터). 60 분에, 유리 dAb는 뇌내에 축적되는 것으로 나타났기 때문에 역전이 관찰되었고, 그 결과 이의 뇌 수준은 13.5 ng/ml로 추가 증가가 야기되었다. 뇌 수준은 보정되었다.
- [0022] 도 9 - 정맥내 경로를 통해 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가에서 유래된 dAb의 뇌 내 혈(혈액) 비율. 결과는, 용액중의 유리 상태로 dAb가 주어진 경우와 대비하여 나노입자로 주어진 경우, 혈액에 비해 뇌 내에 더 높은 비율의 dAb가 존재함을 제시한다.
- [0023] 도 10 - 경동맥내(intracarotid) 경로를 통해 마우스의 뇌로 이들 단백질 로드를 전달하는 이들의 활성화에 관한 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가로부터 얻은 결과. 투여후 10분에, 나노입자 그룹 중의 dAb는 뇌에서, 평균 627.60 ng/ml로, 높은 수준의 dAb를 나타내었다.
- [0024] 도 11 - 경동맥내 경로를 통해 마우스의 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가로부터 유래된 dAb의 뇌 대 혈액 비율. 나노입자 중의 dAb는 두 시점에서(각각, 10분에서 1.569 및 60분에서 1.845) 1을 초과하는 뇌 대 혈액 비를 나타내었는데, 이는 제형화된 dAb의 대부분이 성공적으로 뇌에 도달되었음을 제시한다.
- [0025] 도 12 - 광 현미경에 의한 마이크로스피어의 생성의 확인. 마이크로스피어의 제형 모두를 폴리카프로락톤을 이용한 HIP 방법으로 제조하였다. (a) Vit E TPGS 2% 상청액 4000rpm 2 min 20 x mag (b) Vit E TPGS 2% 상청액 7500rpm 2min 20x mag (c) Vit E TPGS 2% 상청액 7500rpm 2min + dAb1 20x mag (d) Vit E TPGS 2% 상청액 7500rpm 2min + dAb2 20x mag
- [0026] 도 13 - 레이저 회절에 의한 마이크로스피어의 생성의 확인. 마이크로스피어의 제형은 모두 폴리카프로락톤을 이용한 HIP 방법으로 제조되었다. (a) Vit E TPGS 2% 상청액 4000rpm 2 min 20x mag (b) Vit E TPGS 2% 상청

액 7500rpm 2min 20x mag (c) Vit E TPGS 2% 상청액 7500rpm 2min + dAb1 20x mag (d) Vit E TPGS 2% 상청액 7500rpm 2min + dAb2 20x mag

[0027] 도 14 - SDS-PAGE 분석에 의한 HIP-PC 마이크로스피어내로의 dAbs의 캡시드화의 확인. 마이크로스피어를 여과하고, (F) 원심분리시켜, (3k 또는 13K rpm) 임의의 유리 dAb를 제거하고, 상청액(S)과, 펠렛(P)을 SDS-PAGE로 분석하여 캡시드화된 dAb를 현출시켰다.

[0028] 도 15 - SDS-PAGE 분석에 의한 HIP-PC 마이크로스피어로부터의 캡시드화된 dAb의 방출의 확인. 마이크로스피어를 세척하고 난 다음 56℃에서 0, 20, 40 또는 60분 동안 열로 처리하여 dAb를 방출시키고, 파편(debris)을 펠렛화하고(5 mins @ 5k), 상청액(S)을 SDS-PAGE로 분석하여 캡시드화된 dAb를 현출시켰다. 분자 마커 - SeeBIue Plus 2 사전-염색 표준(invitrogen), 분자량(kd). 겔은 dAb의 방출이 일어났음을 확인시켰다. 또한 겔은 dAbs가 온전하였고 이들이 방출 과정으로 인해 단편화되지 아니하였음을 확인시켰다.

#### [0029] **발명의 요약**

[0030] 본원 발명의 일 양태에서, 미립자 담체 내에 생물학적 활성제를 캡슐화하는 방법, 예컨대, 나노입자 내에, 또는 내 및 위에, 또는 나노입자와 함께 단백질 및/또는 펩티드를 캡슐화하는 방법, 및 나노입자 내에, 또는 내 및 위에, 또는 나노입자와 함께 캡슐화하여 단백질 및/또는 펩티드를 혈액 내 장벽을 통해 전달하는 방법 및 미립자 담체 내에, 또는 내 및 위에, 또는 미립자 담체와 함께 캡슐화하여 눈으로 단백질 및/또는 펩티드를 전달하는 방법이 제공된다.

[0031] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 단백질 및/또는 펩티드를 혈액 내 장벽을 통해 혈액에서 뇌까지 전달하기 위한, 또는 눈으로 전달하기 위한, 입자 형성 물질 및 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질 및/또는 펩티드를 포함하는 미립자 담체를 제공한다. 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 중추 신경계 및/또는 눈의 장애 또는 질병을 치료하기 위한, 나노입자의 조성물 및 이들의 용도를 제공한다.

#### **발명의 내용**

##### [0032] **발명의 상세한 설명**

[0033] 본원 발명은 입자 형성 물질 및 생물학적 활성제를 포함하는 미립자 담체와, 상기 미립자 담체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0034] 본원 발명의 일 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 미립자 담체내에 생물학적 활성제를 캡슐화시키는 방법이 제공된다:

[0035] a) 소수성 이온쌍형성(hydrophobic ion pairing, HIP) 작용제의 존재하에 생물학적 활성제를 유기 용매에 가용해화(solubilisation)시키는 단계;

[0036] b) 폴리머 형성 물질의 단량체 및/또는 올리고머를 단계 a)에서 형성된 유기상에 용해시키는 단계;

[0037] c) 단계 b)에서 형성된 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시켜 상기 모노머의 중합체화를 발생시키는 단계; 및

[0038] d) 상기 에멀전으로부터 형성된 미립자 담체를 수득하는 단계.

[0039] 본원 발명의 추가 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 미립자 담체내에 생물학적 활성제를 캡슐화시키는 방법이 제공된다:

[0040] a) 수성상 중의 생물학적 활성제와 유기 용매상 중의 소수성 이온쌍형성(HIP) 작용제를 혼합하여 생물학적 활성제-HIP 복합체를 형성시키는 단계;

[0041] b) 상기 수성상으로부터 상기 복합체를 분리시키는 단계;

[0042] c) 상기 수성상을 제거하고 상기 유기상과 상기 복합체를 균질화시키는 단계;

[0043] d) (i) 단계 c)에서 형성된 상기 유기상에 폴리머를 용해시키고 난 다음 상기 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시키거나;

[0044] (ii) 단계 c)에서 형성된 상기 유기상에, 폴리머 형성 물질의 모노머 또는 올리고머를 용해시키고 난 다음, 상기 유기상의 에멀전을 연속 수성상으로 형성시켜, 상기 모노머 또는 올리고머의 중합체화를 일으켜 폴리머를 형



성시키는 단계; 및

- [0045] e) 단계 d)의 에멀전으로부터 형성된 미립자 담체를 수득하는 단계.
- [0046] 소수성 이온쌍형성 작용제를 사용하는 이 방법은 소수성 폴리머 입자의 코어 내부에 생물학적 활성제, 예를 들어, 친수성 단백질과 같은, 단백질의 캡슐화를 가능케한다. 소수성 이온쌍형성은 유기 매질내로의 단백질의 분리(추출)를 가능케 하고 그에 따라 이 방법은 단일 에멀전으로 미립자 담체의 제조를 가능케한다.
- [0047] 추가 구체예에서, 본원 발명의 미립자 담체는 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 이러한 단백질은 본원에서 사용된 바와 같이, 표적에 결합할 수 있는, 항체, 항체 단편 및 기타 단백질 작체물로 지칭되는, 항원 결합 분자일 수 있다. 항원 결합 분자는 도메인을 포함할 수 있다. "도메인"은 나머지 단백질과는 관계없이 3차 구조를 갖는, 접힌 단백질 구조이다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 분리된 기능적 특성을 담당하며, 많은 경우에, 나머지 단백질 및/또는 나머지 도메인의 기능 손실 없이, 다른 단백질에 첨가되거나, 제거되거나 또는 전달될 수 있다. "단일 항체 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 서열 특성을 포함하는, 접힌 폴리펩티드 도메인이다. 따라서, 이는 완전한 항체 가변 도메인 및 예를 들어 하나 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특성이 아닌 서열에 의해 대체된, 개질된 가변 도메인 또는 N- 또는 C-말단 연장부를 포함하거나 트렁케이팅된(truncated) 된 항체 가변 도메인을 비롯하여 적어도 결합 활성 및 전장 도메인의 특이성을 유지하는 가변 도메인의 접힌 단편을 포함한다.
- [0048] 항원 결합 분자는 한개 이상의 면역글로불린 가변 도메인을 포함할 수 있는데, 예를 들어, 이러한 분자는 항체, 도메인 항체, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, ScFv, 디아바디, 헤테로콘주게이트 항체를 포함할 수 있다. 이러한 항원 결합 분자는 단일 표적에 결합할 수 있거나, 다특이적일 수 있는데(즉, 다수의 표적에 결합), 예를 들어, 이것은 이중특이적 또는 삼중특이적일 수 있다. 일 구체예에서, 항원 결합 분자는 항체이다. 또 다른 구체예에서, 항원 결합 분자는 도메인 항체(dAb)이다. 또 다른 구체예에서, 항원 결합 분자는 항체 및 항원 결합 단편의 조합, 예컨대, 예를 들어, 하나 이상의 dAbs 및/또는 모노클로날 항체에 부착된 하나 이상의 ScFvs일 수 있다. 추가 구체예에서, 항원 결합 분자는 항체 및 펩티드의 조합일 수 있다. 항원 결합 분자는 하나 이상의 비-Ig 결합 도메인, 예컨대, 상이한 V 영역 또는 도메인에 관계없이 특이적으로 항원 또는 에피토프에 결합하는 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 dAb, 예를 들어, 인간, 카멜리드 또는 상어 면역글로불린 단일 가변 도메인일 수 있거나, 천연 리간드 이외의 리간드에 결합을 수득하기 위해 단백질 공학처리(engineering)된, CTLA-4(에비바디(Evibody)); 리포칼린; 단백질 A 유래 분자, 예컨대, 단백질 A의 Z-도메인(에피바디(Affibody), SpA), A-도메인(Avimer/Maxibody); 열 충격 단백질, 예컨대, GroEI 및 GroES; 트랜스페린(트랜스-바디); 안키린 반복 단백질(DARPin); 펩티드 압타머; C-형 렉틴 도메인(테트라렉틴(Tetranectin)); 인간-크리스탈린 및 인간 유비퀸틴(affilins); PDZ 도메인; 인간 프로테아제 억제제의 스킨피온 독소쿠니츠(toxinkunitz)형 도메인; 및 피브로넥틴(애드넥틴(adnectin))으로 이루어진 군에서 선택된 지지체(scaffold)의 유도체인 도메인일 수 있다.
- [0049] CTLA-4(세포독성 T 림프구 관련 항원 4)는 주로 CD4<sup>+</sup> T-세포에서 발현된 CD28-패밀리 수용체이다. 이의 세포외 도메인은 가변 도메인-유사 Ig 폴드(fold)를 갖는다. 항체의 CDRs에 상응하는 루프는 이중 서열로 대체되어 상이한 결합 특성을 부여할 수 있다. 상이한 결합 특이성을 갖도록 공학처리된 CTLA-4 분자는 에비바디(Evibodies)로도 공지되어 있다. 추가 상세한 설명은 문헌[Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)]을 참조하라.
- [0050] 리포칼린은 작은 소수성 분자, 예컨대, 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질을 운반하는 세포외 단백질의 패밀리이다. 리포칼린은 원뿔형 구조의 개구부 끝에 다수의 루프를 지닌 단단한-시트 구조를 가졌는데, 이는 상이한 표적 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 안티칼린은 크기상 160-180개의 아미노산이며, 리포칼린으로부터 유래된다. 추가 상세한 설명은 문헌[Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)], US7250297B1 및 US20070224633를 참조하라.
- [0051] 에피바디는 스타필로코쿠스 아우레우스의 단백질 A로부터 유래된 골격으로, 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 도메인은 대략 58개의 아미노산의 세개의 나선형 묶음으로 구성된다. 표면 잔기의 랜덤화에 의해 라이브러리가 생성되었다. 추가 상세한 설명은 문헌[Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)] 및 EP1641818A1를 참조하라.
- [0052] 아비머는 A-도메인 골격 패밀리에서 유래된 멀티도메인 단백질이다. 대략 35개의 아미노산의 천연 도메인은 정의된 이황화 결합된 구조를 채택하였다. A-도메인의 패밀리에 의해 나타난 자연적 변이체의 뒤섞임에 의해 다양성이 생성된다. 추가 상세한 설명은 문헌[Nature Biotechnology 23(12), 1556 -1561 (2005)] 및 Expert Opinion

on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)]을 참조하라.

- [0053] 트랜스페린은 모노머 혈청 운반 당단백질이다. 트랜스페린은 허용적(permissive) 표면 루프 내에서 펩티드 서열의 삽입에 의해 상이한 표적 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 공학처리된 트랜스페린 골격의 예는 트랜스-바디를 포함한다. 추가 상세한 설명은 문헌[J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)]을 참조하라.
- [0054] 설계된 안키린 반복 단백질(Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPins)은 세포 골격에 내재성 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질의 한 패밀리인 안키린에서 유래된다. 단일 안키린 반복은 두 개의  $\alpha$ -나선 및  $\beta$ -턴으로 이루어진 33개의 잔기 모티프(residue motif)이다. 이것은 각각의 반복의 제 1  $\alpha$ -나선 및  $\beta$ -턴 중 잔기를 랜덤화함에 의해 상이한 표적 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 이들의 결합 인터페이스는 모듈의 수를 증가시킴에 의해 증가될 수 있다(친화도 성숙(affinity maturation)법). 추가 상세한 설명은 문헌[J. Mol. Biol. **332**, 489-503 (2003), PNAS **100**(4), 1700-1705 (2003) 및 J. Mol. Biol. **369**, 1015-1028 (2007) 및 US20040132028A1]을 참조하라.
- [0055] 피브로넥틴은 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있는 골격이다. 애드넥틴은 인간 피브로넥틴 유형 III(FN3)의 15 반복 단위의 10번째 도메인의 천연 아미노산 서열의 백본으로 이루어져 있다. 샌드위치의 한 말단에서 세 개의 루프는 애드넥틴이 흥미로운 치료적 표적을 특이적으로 인식할 수 있도록 공학처리될 수 있다. 추가 상세한 설명은 문헌[Protein Eng. Des. Sel. **18**, 435-444(2005), US20080139791, W02005056764 및 US6818418B1]을 참조하라.
- [0056] 펩티드 애타머는 불변 골격 단백질, 활성 부위에 삽입된 제약적 가변 펩티드 루프를 포함하는 전형적인 티오레독신(TrxA)으로 이루어진 조합적 인식 분자이다. 추가 상세한 설명은 문헌[Expert Opin. Biol. Ther. **5**, 783-797 (2005)]을 참조하라.
- [0057] 미소체는 3-4개의 시스테인 브릿지를 포함하는, 길이상 25-50개의 아미노산의 자연적으로 발생한 마이크로단백질에서 유래된다 - 마이크로단백질의 예는 카라타B1(KalataB1) 및 코노독소(conotoxin) 및 노틴(knottins)을 포함한다. 상기 마이크로단백질은 상기 마이크로단백질의 전반적인 접합에 영향을 미치지 않고, 최대 25개의 아미노산을 포함하도록 공학처리될 수 있는 루프를 갖는다. 공학처리된 노틴 도메인의 추가 상세한 설명은 W02008098796을 참조하라.
- [0058] 다른 비 Ig 결합 도메인은 상이한 표적 항원 결합 특성을 공학처리하기 위하여 골격으로서 사용된 단백질을 포함하고, 이 단백질에는 인간-크리스탈린 및 인간 유비퀴틴(아플린), 인간 프로테아제 저해제의 쿠니즈형 도메인, 라스(Ras)-결합 단백질 AF-6의 PDZ-도메인, 스콜피온 독소(카리브도독소(charybdotoxin)), C-형 렉틴 도메인(테트라렉틴)이 포함된다 - [Non-Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies(2007, Stefan Dubel 출판)의 제 7장 및 Protein Science **15**:14-27 (2006)에 개관되어 있음]. 본원 발명의 비 Ig 결합 도메인은 상기 임의의 대체 단백질 도메인에서 유래될 수 있다.
- [0059] 본원 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 분자는 중추 신경계, 예컨대, 뇌 또는 척수에서, 또는 예를 들어, 신경 조직에서 발견되는 표적에 결합한다.
- [0060] 본원에 상술된 발명의 추가 구체예에서, 항원 결합 분자는 신경학적 질병 또는 장애, 예컨대, MAG(미엘린 관련 당단백질), NOGO(신경돌기 성장 억제 단백질) 또는  $\beta$ -아밀로이드와 관련된 것으로 공지된 표적에 특이적으로 결합한다.
- [0061] 이러한 항원 결합 분자는 NOGO, 예를 들어 항-NOGO 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본원 발명에서 이용하기 위한 항-NOGO 항체의 한 예는 SEQ ID NO 1의 중쇄 및 SEQ ID NO 2의 경쇄에서 정의된 항체인거나, SEQ ID NO 1 및 2에 제시된 항체의 CDRs를 포함하는 항-NOGO 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 이러한 항체(H28 L16)의 추가 상세한 설명은 본원에 참조로서 통합된, PCT 출원 W02007068750에서 설명될 수 있다.
- [0062] 이러한 항원 결합 분자는 MAG, 예를 들어 항-MAG 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본원 발명에서 이용하기 위한 항-MAG 항체의 한 예는 SEQ ID NO 11의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO 12의 경쇄 가변 영역에서 정의된 항체인거나, SEQ ID NO 1 및 2에 제시된 항체의 CDRs를 포함하는 항-MAG 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 이러한 항체(BvH1 CvL1)의 추가 상세한 설명은 본원에 참조로서 통합된, PCT 출원 W02004014953에서 설명될 수 있다.
- [0063] 이러한 항원 결합 분자는  $\beta$ -아밀로이드, 예를 들어 항- $\beta$ -아밀로이드 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본원 발명에서 이용하기 위한 항- $\beta$ -아밀로이드 항체의 한 예는 SEQ ID NO 5의 중쇄 또는 SEQ ID NO



6의 경쇄에서 정의된 항체인거나, SEQ ID NO 5 및 6에 제시된 항체의 CDRs를 포함하는 항- $\beta$ -아밀로이드 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 이러한 항체(H2L1)의 추가 상세한 설명은 본원에 참조로서 통합된, PCT 출원 WO2007113172에서 설명될 수 있다. 본원 발명에서 이용하기 위한 대안적인 항- $\beta$ -아밀로이드 항체는 SEQ ID NO 7의 중쇄 및/또는 SEQ ID NO 8의 경쇄에서 정의된 항체인거나, SEQ ID NO 7 및 8에 제시된 항체의 CDRs를 포함하는 항- $\beta$ -아밀로이드 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

- [0064] 이러한 항체의 CDR 서열은 카벳 계수 시스템(Kabat numbering system)(Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987), 초티아 계수 시스템(Chothia numbering system)(Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948), 접촉 정의 방법(the contact definition method)(MacCallum R.M., and Martin A.C.R. and Thornton J. M, (1996), Journal of Molecular Biology, 262 (5), 732-745), 또는 당업자에게 공지된 CDR 측정 및 항체에 잔여물 계수에 대한 임의의 다른 확립된 방법으로 측정될 수 있다.
- [0065] 본원 발명의 추가 구체예에서, 항원 결합 단백질은 눈에서 발견되는 표적, 예컨대, TNF, TNFr-1, TNFr-2, TGF $\beta$  베타 수용체-2, VEGF, NOGO, MAG, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, CD20, 베타 아밀로이드, FGF-2, IGF-1, PEDF, PDGF 또는 보체인자, 예를 들어, C3, C5, C5aR, CFD, CFH, CFB, CFI, sCR1 또는 C3에 결합한다.
- [0066] 본원 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 단백질은 VEGF에 결합한다. 본원 발명의 대안적 구체예에서, 항원 결합 단백질은  $\beta$ -아밀로이드에 결합한다.
- [0067] 본원 발명의 일 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체(microspheres) 또는 나노입자일 수 있다. 이러한 한가지 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며, 생물학적 활성제는 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 펩티드이다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 단백질이다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 펩티드이다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 항원 결합 분자, 예를 들어, 도메인 항체 또는 항체를 포함한다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다.
- [0068] 본원 발명의 일 구체예에서, 본원에 제시된 본원 발명의 방법에 따른 나노입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가 구체예에서, 개수로(by number) 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법(dynamic light scattering techniques)을 이용하여 측정시, 약 1 nm 내지 약 1000 nm의 범위 이내이다. 추가 구체예에서, 개수로(by number) 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 1 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 250 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 150 nm, 또는 약 40 nm 내지 약 250 nm, 또는 약 40 nm 내지 약 100 nm의 범위 이내이다.
- [0069] 본원 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 40 nm 내지 약 250 nm의 범위 이내이다.
- [0070] 본원 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 40 nm 내지 약 150 nm의 범위 이내이다.
- [0071] 추가 구체예에서, 본원 발명의 나노입자를 포함하는 조성물이 제공되는데, 상기 조성물 내 나노입자의 중앙값 크기(median size)는 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 직경상 약 1000 nm 미만, 예를 들어, 직경상 약 400 nm 미만, 예를 들어, 직경상 약 250 nm 미만, 예를 들어, 직경상 약 150 nm 미만이다.
- [0072] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 약 40 nm 내지 약 250 nm이다.
- [0073] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 약 40 nm 내지 약 150 nm이다.
- [0074] 본원 발명의 일 구체예에서, 본원에 제시된 발명의 임의의 방법에 따른 미소구체를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 미소구체가 저각도 레이저 광 산란 기법(Low angle laser light scattering techniques)을 이용하여 측정시, 약 1 $\mu$ m 내지 약 100 $\mu$ m의 범위 이내의 직경을 갖는다. 추가 구체예에서, 개수로(by number) 약 90% 이상의 입자가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 1  $\mu$ m 내지 약 80 $\mu$ m, 또는 약 1  $\mu$ m 내지 약 60 $\mu$ m, 또는 약 1 $\mu$ m 내지 약 40 $\mu$ m, 또는 약 1 $\mu$ m 내지 약 30 $\mu$ m, 또는 약 1 $\mu$ m 내지 약 10 $\mu$ m의 범위 이내이다.
- [0075] 본원 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 미소구체가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정

시, 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 60  $\mu\text{m}$ 의 범위 이내이다.

- [0076] 본원 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 미소구체가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정 시, 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 30  $\mu\text{m}$ 의 범위 이내이다.
- [0077] 추가 구체예에서, 본원 발명의 미소구체를 포함하는 조성물이 제공되는데, 상기 조성물 내 미소구체의 중간 크기는 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 직경상 약 100  $\mu\text{m}$  미만, 예를 들어, 직경상 약 80  $\mu\text{m}$  미만, 예를 들어, 직경상 약 60  $\mu\text{m}$  미만, 예를 들어, 직경상 약 40  $\mu\text{m}$  미만이다.
- [0078] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 미소구체의 중간 크기는 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 6  $\mu\text{m}$ , 또는 1  $\mu\text{m}$  내지 약 30  $\mu\text{m}$ 이다.
- [0079] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 치료적 양의 활성 생물학적 분자를 약 3개월 또는 그 이상, 또는 최대 6개월 또는 그 이상, 또는 최대 12개월 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 계속적으로 방출한다.
- [0080] 일 구체예에서, 생물학적 활성제는 이온쌍형성 작용제 부재시 유기상에서 불용성이다.
- [0081] 본원에 기재된 것과 같은 본원 발명의 일 구체예에서, 소수성 이온쌍형성 작용제는 상기 단백질이 음이온성인 경우 양이온성 HIP 작용제이다. 또 다른 구체예에서, 소수성 이온쌍형성 작용제는 상기 단백질이 양이온성인 경우 음이온성 HIP 작용제이다. 추가 구체예에서, 음이온성 HIP 작용제는 알킬 4차 암모늄양이온, 바람직하게는 알킬 암모늄브로마이드, 더 바람직하게는 테트라부틸 암모늄브로마이드, 테트라헥실 암모늄브로마이드, 테트라옥틸 암모늄브로마이드, 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 소듐 올레이트 또는 도쿠세이트(docusate) 소듐(aka Aerosol OT™)으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 HIP 작용제는 해당 단백질의 순 양전하의 수와 동일하거나 이를 초과하는 화학량론적 양(stoichiometric amounts)으로 존재한다. 또 다른 구체예에서, 상기 양이온성 HIP 작용제는 디메틸디옥타데실-암모늄브로마이드 (DDAB18); 1,2-디올레옥시-3-트리메틸암모늄프로판(DOTAP); 또는 세트리모늄 브로마이드(CTAB)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 HIP 작용제는 해당 단백질의 순 음전하의 수와 동일하거나 이를 초과하는 화학량론적 양으로 존재한다.
- [0082] 추가 구체예에서, 임의의 소수성 양이온 또는 음이온은 단백질의 용해도를 높이기 위해 HIP 작용제로서 유력하게 사용될 수 있다. 소수성 이온쌍 형성(HIP)은 유사한 전하를 지니나 덜 용이하게 용매화되는 종으로 극성 카운터 이온의 화학량론적 대체를 포함한다. 본원에 개시한 바와 같이, 본원 발명은 단백질의 용해도 특성을 변화시키기 위해 HIP를 사용하는 방법을 제공하는데, 이는 상기 단백질의 유기 용매, 예컨대, 메틸렌 클로라이드의 추출을 가능케한다. 도쿠세이트 소듐(Bis(2-에틸헥실)소듐 설포석시네이트)는 적합한 이온쌍형성 작용제의 일예이다. 일 구체예에서, 도쿠세이트 소듐을 함유하는 메틸렌 클로라이드는 수성 단백질 용액과 혼합된다. 이것은 도쿠세이트 이온과 단백질의 이온쌍 형성과 오일 상 내로의 단백질의 연이은 분할(partitioning)을 야기시킨다. 메틸렌 클로라이드에 단백질의 용해는 단백질을 단일의 수중유 에멀전 방법을 통해 제조된 나노입자 또는 마이크로스피어로 캡슐화되게 한다.
- [0083] 본원에 기재된 본원 발명의 일 구체예에서, 연속 수성상은 단백질이 음이온성이고 HIP 작용제가 양이온성인 경우 약 7.0 또는 이보다 높은 pH를 가지는데, 예를 들어, pH가 약 8.0 이상 또는 약 10.0 이상일 수 있거나 약 12.0 이상이다.
- [0084] 본원에 기재된 본원 발명의 대안적 구체예에서, 연속 수성상은 단백질이 양이온성이고 HIP 작용제가 음이온성인 경우 약 7.0 또는 이보다 낮은 pH를 가지는데, 예를 들어, pH가 약 6.0 이하 또는 약 4.0 이하 또는 약 2.0 이하일 수 있다.
- [0085] 그러한 한 구체예에서, 폴리머에 대한 단백질의 중량/중량(w/w) 비는 0.5% 내지 90%일 수 있는데, 예를 들어, 약 0.5% 이상 또는 약 1% 이상 또는 약 2% 이상 또는 약 2.5% 이상 또는 약 5% 이상 또는 약 9% 이상 또는 약 10% 이상 또는 약 15% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 40%, 이상 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70% 이상 또는 약 80% 이상 또는 약 90% 이상이다. 예를 들어, 단백질이 펩티드인 경우, 폴리머에 대한 펩티드 비는 약 9% 이상일 수 있거나, 단백질이 항체인 경우, 폴리머에 대한 항체 비는 약 2% 이상 일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 폴리머에 대한 도메인 항체 비는 약 2.5% 이상일 수 있다.
- [0086] 본원 발명의 일 구체예에서, 총 제형에 대한 단백질의 w/w 비(폴리머 + HIP 및 임의로 상청액)은 0.5% 내지 50% 일 수 있는데, 예를 들어, 약 5% 이상 또는 약 9% 이상 또는 약 15% 이상 또는 약 16% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 25% 이상일 수 있다. 예를 들어, 단백질이 펩티드인 경우, 총 제형에 대한 펩티드 비는 약 16% 이상일

수 있거나, 단백질이 항체인 경우, 폴리머에 대한 항체 비는 약 1% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 총 제형에 대한 도메인 항체 비는 약 9% 이상일 수 있다.

[0087] 본원 발명의 일 구체예에서, 입자의 캡슐화 효율은 약 1% 이상 또는 약 2% 이상 또는 약 10% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 40% 이상 또는 약 50% 이상 또는 약 60% 이상 또는 약 70% 이상 또는 약 80% 이상 또는 약 90% 이상 또는 약 95% 이상 또는 약 97% 이상 또는 약 99% 이상이다. 예를 들어, 단백질이 펩티드인 경우, 캡슐화 효율은 약 1% 이상일 수 있으며, 단백질이 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 90% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 70% 이상일 수 있다.

[0088] 본원 발명의 일 구체예에서, 모노머 또는 올리고머는 메틸메타크릴레이트, 알킬시아노아크릴레이트, 히드록시메타크릴레이트, 메타크릴산, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 아크릴아미드, N,N'-비스메틸렌 아크릴아미드 및 2-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택된다. 추가 구체예에서, 모노머는 알킬시아노아크릴레이트, 예를 들어, 부틸시아노아크릴레이트(BCA)이다.

[0089] 추가 구체예에서, 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에 사용되는 폴리머는 하기한 것들 중에서 선택되나, 이로만 국한되는 것은 아니다: 폴리-L-락티드 (PLA), 폴리(락토-코-글리콜리드)(PLG), 폴리(락티드), 폴리(카프로락톤), 폴리(히드록시부티레이트) 및/또는 이들의 코폴리머. 적합한 입자-형성 물질은 폴리(디엔), 예컨대, 폴리(부타디엔) 등; 폴리(알켄), 예컨대, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등; 폴리(아클릴), 예컨대, 폴리(아크릴산) 등; 폴리(메타크릴), 예컨대, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(히드록시에틸 메타크릴레이트) 등; 폴리(비닐 에테르); 폴리(비닐 알코올); 폴리(비닐 케톤); 폴리(비닐할라이드), 예컨대, 폴리(비닐 클로라이드) 등; 폴리(비닐 니트릴), 폴리(비닐 에스테르), 예컨대, 폴리(비닐 아세테이트) 등; 폴리(비닐 피리딘), 예컨대, 폴리(2-비닐 피리딘), 폴리(5-메틸-2-비닐 피리딘) 등; 폴리(스티렌); 폴리(carbonates); 폴리(에스테르); 폴리(오르쏘에스테르); 폴리(에스테르아미드); 폴리(안히드라이드); 폴리(우레탄); 폴리(아미드); 셀룰로오스 에테르, 예컨대, 메틸 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 등; 셀룰로오스 에스테르, 예컨대, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트 등; 폴리(사카라이드), 단백질, 젤라틴, 전분, 검(gums), 레진 등을 포함하나, 이로만 국한되는 것은 아니다. 이러한 물질들은 단독으로, 물리적 혼합물(블렌드)로써, 또는 코폴리머로써 사용될 수 있다. 또한 폴리(아크릴레이트), 폴리메타크릴레이트, 폴리부틸시아노아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리(아릴아미드), 폴리(안히드라이드), 폴리(오르쏘에스테르), N,N'-리신디테레프탈레이트, 폴리(안히드라이드), 용매제거된(desolvated) 생물학적 활성제 또는 탄수화물, 폴리(사카라이드), 폴리(아크로레인(polyacrolein)), 폴리글루타르알데히드 및 유도체, 코폴리머 및 폴리머 블렌드.

[0090] 본원 발명의 방법에 이용하기 적합한 유기 용매의 예는 물과 섞이지 않는(water-immiscible) 에스테르, 예컨대, 에틸 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, n-프로필 아세테이트, 이소부틸 아세테이트, n-부틸 아세테이트, 이소부틸 이소부틸레이트, 2-에틸헥실 아세테이트, 에틸렌 글리콜 디아세테이트; 물과 섞이지 않는 케톤, 예컨대, 메틸 에틸 케톤, 메틸 이소부틸케톤, 메틸 이소아밀 케톤, 메틸 n-아밀 케톤, 디이소부틸케톤; 물과 섞이지 않는 알데히드, 예컨대, 아세트알데히드, n-부틸알데히드, 크로톤알데히드, 2-에틸헥사알데히드, 이소부틸알데히드 및 프로피온알데히드; 물과 섞이지 않는 에테르 에스테르, 예컨대, 에틸 3-에톡시프로피오네이트; 물과 섞이지 않는 방향족 탄화수소, 예컨대, 톨루엔 크실렌 및 벤젠; 물과 섞이지 않는 할로탄화수소, 예컨대 1,1,1 트리클로로에탄; 물과 섞이지 않는 글리콜 에테르 에스테르, 예컨대, 프로필렌 글리콜 모노메틸 에테르 아세테이트, 에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 아세테이트, 에틸렌 글리콜 모노부틸 에테르 아세테이트, 디에틸렌 글리콜 모노부틸 에테르 아세테이트; 물과 섞이지 않는 프탈레이트 가소제(plasticisers), 예컨대, 디부틸 프탈레이트, 디에틸 프탈레이트, 디메틸 프탈레이트, 디옥틸 프탈레이트, 디옥틸 테레프탈레이트, 부틸 옥틸 프탈레이트, 부틸 벤질 프탈레이트, 알킬 벤질 프탈레이트; 물과 섞이지 않는 가소제, 예컨대, 디옥틸 아디페이트(adipate), 트리(에틸렌 글리콜 디-2-에틸헥사노에이트, 트리옥틸 트리멜리테이트(trimellitate), 글리세릴 트리아세테이트, 글리세릴/트리프로피오닌, 2,2,4-트리메틸-1,3-펜탄디올 디이소부틸레이트, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 또는 디메틸설폭사이드, 사염화탄소, 클로로포름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 포름아미드, 헵탄, 헥산 및 기타 탄화수소, 메틸-tert-부틸 에테르, 헵탄, 톨루엔, 2,2,4-트리메틸헵탄, 1-옥타놀 및 이의 이성질체 또는 벤질 알코올을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본원 발명의 일 구체예에서, 본원 발명의 방법에서 사용된 용매는 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 또는 디메틸설폭사이드, 카본 테트라클로라이드, 클로로포름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 포름아미드, 헵탄, 헥산 및 기타 탄화수소, 메틸-tert-부틸 에테르, 헵탄, 톨루엔, 2,2,4-트리

메틸펜탄, 1-옥탄올 및 이의 이성질체 또는 벤질 알코올에서 선택될 것이다.

- [0092] 본원에 기술된 본원 발명의 모든 양태에서, 미립자 담체, 이들의 제작 방법 또는 이들을 포함하는 조성물은 계면활성제, 예컨대, 하기에 제한되지는 않는 계면활성제의 첨가를 추가적으로 포함할 수 있다: 소듐 클로레이트 (소듐 클로레이트), 폴록사머 188(pluronic F68™, 또는 F127), 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리솔베이트 80, 텍스트란, 폴록사머, 폴록사민, 다기능 알코올의 카복실산 에스테르, 알콕시화된 에테르, 알콕시화된 에스테르, 알콕시화된 모노, 디 및 트리글리세리드, 알콕시화된 페놀 및 디페놀, 에톡시화된 에테르, 에톡시화된 에스테르, 에톡시화된 트리글리세리드, Genapol™ 및 BaukiR™ 시리즈 물질, 지방산의 금속염, 카복실산의 금속염, 알코올 설페이트의 금속염, 및 지방산 알코올 설페이트의 금속염 및 설포숙시네이트의 금속염 및 상기 물질의 두개 이상의 혼합물.
- [0093] 추가 구체예에서, 상기 계면활성제는, 소듐 클로레이트, 폴록사머 188(플루로닉(pluronic) F68™), 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리솔베이트 80, 텍스트란에서 선택된다.
- [0094] 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 기술된 발명의 방법 중 어느 하나에 의해 획득가능한 생물학적 활성제를 포함하는 미립자 담체가 제공된다.
- [0095] 본원 발명의 조성물 및/또는 미립자 담체가 캡슐화된 생물학적 활성제는 미립자 담체로부터의 방출에 대한 적어도 일부 생물학적 활성을 보유하는데, 예를 들어, 상기 활성제가 결합제(binding agent)일 경우, 조성물 내 분자의 일부는 적어도 이들의 표적에 결합하는 일부 능력을 보유할 수 있고, 입자로부터 생물학적 활성제의 방출에 대한 생물학적 반응을 유도할 수 있다. 이러한 결합은 적합한 생물학적 결합 분석으로 측정될 수 있는데, 적합한 분석의 예는 ELISA 또는 Biacore™를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 추가 구체예에서, 조성물은 입자로부터의 방출에 대해 생물학적 결합 분석에 의해 측정시(예를 들어, 일 구체예에서, ELISA, Biacore로 측정된 경우), 타겟에 대해 50% 이상의 친화력, 또는 70% 이상 또는 90% 이상의 친화력(Kd)을 보유한다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 피검체에 투여된 경우 치료적 효과를 유도할 수 있을 것이다. 본원 발명의 조성물의 생물학적 활성은 캡슐화된 생물학적 활성 분자의 활성을 측정하는 임의의 적합한 분석에 의해 측정될 수 있는데, 예를 들어, 상기 생물학적 활성 분자가 VEGF dAb인 경우, 실시예 18에 기재된 검정법이 사용될 수 있다.
- [0096] 또 다른 구체예에서, 본원에 기재한 것과 같은 본원 발명의 미립자 담체에 캡슐화된 생물학적 활성제를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.
- [0097] 추가 구체예에서, 본원에 기재한 것과 같은 본원 발명의 나노입자내에 캡슐화된 단백질을 포함하는 약제 조성물을 제공한다.
- [0098] 본원 발명의 추가 구체예에서, 본원 발명의 조성물은 장애 또는 질병의 치료 및/또는 예방하는데 사용할 수 있는데, 미립자 담체가 혈뇌장벽을 가로지르는 것을 포함한다.
- [0099] 추가 구체예에서, 본원에 기술된 본원 발명의 조성물은 중추 신경계의 장애 또는 질병을 치료 및/또는 예방하는데 이용될 수 있는데, 예를 들어, 조성물은 알츠하이머병, 헌팅턴병, 광우병, 웨스트 나일 바이러스 뇌염(West Nile virus encephalitis), 신경-AIDS, 뇌손상, 척수 손상, 뇌의 전이성 암, 또는 다중 경화증, 뇌졸중을 치료 및/또는 예방하는데 이용될 수 있다.
- [0100] 추가 구체예에서, 조성물은 뇌졸중 또는 신경성 손상의 치료 및/또는 예방을 위해 항-MAG 항체를 포함할 수 있다.
- [0101] 또 다른 구체예에서, 조성물은 뇌졸중 또는 신경성 손상의 치료 및/또는 예방을 위해, 또는 예를 들어, 신경퇴행성 질병, 예컨대 알츠하이머병의 치료 또는 예방을 위해, 항-NOGO 항체를 포함할 수 있다.
- [0102] 또 다른 구체예에서, 조성물은 뇌졸중 또는 신경성 손상의 치료 및/또는 예방을 위해, 또는 예를 들어, 신경퇴행성 질병, 예컨대 알츠하이머병의 치료 또는 예방을 위해, 항- $\beta$  아밀로이드 항체를 포함할 수 있다.
- [0103] 본원 발명의 일 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같이, 미립자 담체는 비경구 주사 또는 주입, 정맥 주사 또는 동맥내 투여에 의해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0104] 추가 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물은 눈의 장애 또는 질병을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물은 장애, 예컨대, 노화 연관 황반 변성(신생혈관/습성), 당뇨 망막 병증, 망막 정맥 폐쇄성 질환, 포도막염, 각막 신혈관형성(corneal neovascularisation) 또는 녹내장(이에 제한되지는 않음)을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있



다.

- [0105] 추가 구체예에서, 조성물은 AMD(노화 연관 시력 감퇴), 예를 들어, 습성 AMD, 또는 건성 AMD를 치료 및/또는 예방하기 위해 사용된다.
- [0106] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은, 의약으로 사용하기 위한, 나노입자 및/또는 미소구체 내 캡슐화된 생물학적 활성제가 제공된다.
- [0107] 본원 발명의 일 구체예에서, 중추신경계의 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제(medicament)의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 알츠하이머병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 뇌졸중 또는 신경 손상을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0108] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 안구 질환의 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조, 예컨대, AMD의 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본원 발명의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0109] 본원 발명은 본원 발명의 조성물을 이용하여 중추신경계의 질병을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 추가 구체예에서, 본원 발명의 조성물을 이용하여 알츠하이머병을 치료하는 방법이 제공된다. 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 본원 발명의 조성물을 이용하여 뇌졸중 또는 신경 손상을 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0110] 또한, 본원 발명은 본원 발명의 조성물을 이용하여 안구 질병을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 추가 구체예에서, 본원 발명의 조성물을 이용하여 AMD를 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0111] **정의**
- [0112] 본원에서 사용된, 용어 "입자 형성 물질"은 폴리머화할 수 있는 모노머 및/또는 올리고머 또는 수성 환경, 예를 들어, PBCA, PLGA에서 불용성 입자를 형성할 수 있는 폴리머를 상술하기 위해 사용된다. 상기 입자 형성 물질은 폴리머화되지 않을 경우, 유기 용매에 용해될 것이다.
- [0113] 본 명세서를 통해, 본원에서 사용된, 용어 "미립자 담체"는 나노입자와 미소구체 둘 모두를 포함하도록 사용된다. "미소구체"는 1 $\mu$ m보다 큰 직경을 갖는, 다양한 천연 및 합성 물질로 구성되는 입자인 반면, 본원에서 사용된 "나노입자"는 예컨대, 1-1000 nm의 서브마이크론(submicro)의 크기의 입자이다.
- [0114] 일 구체예에서, 본원에서 사용된 용어 미립자 담체, 나노입자 및 미소구체는 투여 후에 충분한 양의 입자가 인간 또는 동물의 체내로 들어간 후, 및 원하는 표적 기관 또는 조직, 예를 들어, 뇌 또는 눈에 도달할 수 있도록 충분한 시간 동안, 실질적으로 무손상을 유지하도록, 생체적합적이며, 사용 환경에 의한 화학적 및/또는 물리적 파괴에 충분히 견딜 수 있는 담체 구조를 나타낸다.
- [0115] 본원에서 사용된 용어 "생물학적 활성제"는 분자가 이들의 원하는 표적에 도달한 경우, 적어도 일부 생물학적 활성을 가질 수 있어야 하는 분자를 나타낸다. 의심의 소지를 없애기 위해, 본 명세서를 통해 이용된, 용어 "생물학적 활성제" 및 "생물학적 활성 분자"는 동일한 의미를 갖도록 의도되었고 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0116] 용어 "가용해화(solubilisation)"는 용매 중 개별 분자 형태로 용액의 형성 또는 액체 내 현탁된 분자의 미세한 고체 응집 형태로 액체 현탁액 중 고체의 형성으로 정의된다. 가용해화 과정은 또한 충분히 용해된 분자 및 현탁된 고체 응집의 혼합물을 형성할 수 있다.
- [0117] 미립자 담체 내 캡슐화에 대해 본 명세서를 통해 사용된 용어 "단백질"은 11kDa 이상, 또는 12kDa 이상, 또는 50kDa 이상, 또는 100kDa 이상, 또는 150kDa 이상, 또는 200kDa 이상의 분자량을 갖는 단백질을 포함한다. 캡슐화를 위한 단백질은 또한 상당한 길이, 예컨대, 길이상 70개 이상의 아미노산 또는 길이상 100개 이상의 아미노산 또는 길이상 150개 이상의 아미노산 또는 길이상 200개 이상의 아미노산일 수 있다.
- [0118] 미립자 담체 내 캡슐화에 대해 본 명세서를 통해 사용된 용어 "펩티드"는 약 10 kDa 이하, 또는 약 8 kDa 이하, 또는 약 5 kDa 이하, 또는 약 2 kDa 이하, 또는 약 1 kDa 이하, 또는 약 1 kDa 미만의 분자량을 가지는 아미노산의 짧은 서열을 포함한다. 캡슐화를 위한 펩티드는 길이상 70개 이하의 아미노산 또는 길이상 50개 이하의 아미노산 또는 길이상 40개 이하의 아미노산 또는 길이상 20개 이하의 아미노산 또는 길이상 10개 미만의 아미노산이다.

- [0119] 용어 "안구-주위(Peri-ocular)"는 눈의 외부 주위를 둘러싸는 위치에의 국부 투여를 지칭하며, 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다: "결막하" - 결막의 아래 - 공막을 걸쳐 안구를 덮는 맑은 점액 막; "테논 하" - 공막 외부이나 눈을 감싸는 테논 막의 아래; "눈둘레" - 안구 구멍(eye socket) 내 적합한 안구의 구체 아래 공간; "구후(retrobulbar)" - 안구의 구체의 매우 뒤쪽 공간, 시신경에 근접함; "맥락막 위(supra-choroidal)" - 공막 아래이나 맥락막 위 공간에 대해 맥락막의 외부; "트랜스-공막(trans-scleral)" - 이 용어는 또한 즉, 공막의 외부로부터가로지르는 전달을 의미하는데 이용될 수 있다.
- [0120] "면역글로불린 단일 가변 도메인"이란 어구는 상이한 V 영역 또는 도메인과 무관하게 항원 또는 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체 가변 도메인( $V_H$ ,  $V_{H1}$ ,  $V_L$ )을 지칭한다. 면역글로불린 단일 가변 도메인은, 다른 영역 또는 도메인이 단일 면역글로불린 가변 도메인에 의한 항원 결합을 위해 필요하지 않는 경우(즉, 면역글로불린 단일 가변 도메인이 추가의 가변 도메인들과 무관하게 항원과 결합하는 경우), 상기 다른, 상이한 가변 영역들 또는 가변 도메인들과 형태(format)(예를 들어, 동종다합체(homo-multimer) 또는 이종다합체(hetero-multimer)) 형태로 존재할 수 있다. "도메인 항체" 또는 "dAb"는 이러한 용어가 본원에서 사용되는 경우 항원에 결합할 수 있는 "면역글로불린 단일 가변 도메인"과 동일하다. 면역글로불린 단일 가변 도메인은 인간 항체 가변 도메인일 수 있지만, 또한 설치류와 같은 다른 종으로부터의 단일 항체 가변 도메인을 포함한다(예를 들어, WO 00/29004에 기재된 바와 같은, 닐스 상어(nurse shark) 및 카멜리드(Camelid)  $V_H$  dAb). 카멜리드  $V_H$  도메인은, 본래 경쇄가 없는 중쇄 항체를 생성시키는, 낙타, 라마(llama), 알파카(alpaca), 단봉낙타(dromedary) 및 과나코(guanaco)를 포함하는 종으로부터 유래된 면역글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩티드이다. 이러한  $V_H$  도메인은 당 분야에서 이용가능한 표준 기술에 따라 인간화(humanised)될 수 있고, 이러한 도메인은 여전히 본원 발명에 따른 "도메인 항체"로 간주된다. 본원에서 사용되는 경우,  $V_H$ 는 카멜리드  $V_H$  도메인을 포함한다.
- [0121] 본원에서 사용된, 용어 "항원 결합 분자"는 항체, 항체 단편 및 표적에 결합할 수 있는 다른 단백질 작제물을 지칭한다.
- [0122] "도메인"은 접힌 단백질 구조를 지칭하는데, 이러한 구조는 단백질의 나머지 부분과 무관한 3차 구조를 지닌다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 구별된 기능적 특성을 담당하고, 많은 경우에 그러한 단백질 및/또는 도메인의 잔여 부분의 기능 상실없이 다른 단백질로 첨가되거나 이동되거나 전달될 수 있다. "단일 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 특징이 되는 서열을 포함하는 접힌 폴리펩티드 도메인이다. 따라서, 이는 완전한 항체 가변 도메인 및 변형된 가변 도메인, 예를 들어 하나 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특징이 아닌 서열에 의해 대체된 가변 도메인, 또는 트렁케이션되거나 N- 또는 C-말단 연장부를 포함하는 항체 가변 도메인 뿐만 아니라 적어도 전장 도메인의 결합 활성 및 특이성을 보유하는 가변 도메인의 접힌 단편을 포함한다.
- [0123] 본원에서 사용된 용어 "광 산란 기법"은 용액 내 작은 입자의 크기 분포 프로파일을 측정하는데 사용된 수단이다 - 광 산란 기법 중 한가지 예는 나노입자를 측정하기 위해 사용될 수 있는 동적 광 산란 기법이며, 광 산란의 또 다른 예는 미소구체를 측정하기 위해 사용될 수 있는 정적 광 산란 또는 저 각도 광 산란이다.
- [0124] 본원에서 사용된 용어 "동적 광 산란"(DLS)은 입자의 크기에 대한 정보를 유추하기 위해 입자 분산에 의해 산란된 광을 이용하는 방법이다. 동적 광 산란은 액체 현탁액에서 사용되는 경우, 입자의 브라운 운동이 입자 크기에 의존하며, 입자의 브라운 운동은 입자 샘플로부터 산란된 빛의 강도의 변동을 발생시킨다는 사실에 의존한다. 입자의 직경은 상관 함수에 의한 이러한 변동을 분석함으로써 유추된다. 그 다음 스톡스-아인슈타인(Stokes Einstein) 방정식이 적용되어 입자의 평균 유체 역학적 직경이 산출된다.
- [0125] 다-지수(multi-exponential) 분석은 입자 분포를 생성할 수 있고, 이는 샘플 내부에 상이한 종류의 존재에 대한 통찰을 제공한다. DLS는 일반적으로 나노입자의 분석을 용인한다.
- [0126] 본 명세서를 통해 상호교환적으로 사용된 "정적 광 산란" 또는 "저각도 레이저 광 산란"은 때때로 레이저 회절로 지칭된다. 레이저 회절은 회절 각도가 입자의 크기에 반비례한다는 사실에 의존한다. 이 방법은 빛과 물질의 상호작용에 대한 방정식을 완벽히 해결하는 풀 미 이론(full Mie theory)을 이용한다. 레이저 회절은 나노입자 및 미세입자(직경 상 0.02 내지 2000 마이크로미터)의 분석에 이용될 수 있다.
- [0127] 본원에서 사용된 용어 "혈액 뇌 장벽"(BBB)은 주로 필수 대사 작용을 허용하면서, 혈액 중 화합물로부터 뇌를 보호하는 역할을 하는 막구조이다. 이것은 뇌 모세혈관 내에서 타이트하게 패킹된, 대뇌 미세혈관 상피 세포로 구성된다. 이러한 높은 밀도는 신체 내 다른 모세혈관 내 상피세포보다 훨씬 더 혈액흐름으로부터 물질의 통과를 제한한다.



[0128] 본 명세서를 통해, 퍼센트 약물 로딩(percentage drug loading)은 입자 제형에서 사용된 물질의 중량 당 약물의 중량 퍼센트로 정의된다(폴리머 중량) w/w.

[0129] % 약물 로딩 = (약물의 중량/ 입자 제형에서 사용된 물질의 중량) x 100%.

[0130] 본 명세서 중에서, 본원 발명은 명확하고 간결하게 본 명세서가 작성될 수 있도록 하는 방법으로, 구체예를 참조하여 기술되었다. 구체예는 본원 발명을 벗어나지 않고, 다양하게 결합 또는 분리될 수 있음을 인식해야 하며, 그렇게 의도된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0131] **실시예**

[0132] 실시예 1 - HIP 방법에 의한 PBCA 나노입자의 제조

[0133] 나노입자를 가용해화된 HIP 이온을 함유하는 유기상에 100  $\mu$ l BCA 모노머를 첨가하여 제조하였다(1 ml 디클로메탄 중의 도쿠세이트 소듐, 3.058-6.116 % w/v). 그 결과 얻은 용액을 수성상(1% w/v 텍스트란, 0.2 % w/v 플루로닉 F68, 10 ml, pH 7.0)에서 피펫팅시키고 Silverson L4RT 균질화기를 사용하여 7,000에서 균질화시켰다. 수성상의 중성 pH에 대한 노출로 BCA 모노머의 급속한 중합화가 야기되어 PBCA 폴리머가 형성되었다. 형성된 에멀전을 45초 동안 균질화시키고 난 다음 흡 후드(fume hood)에서 3시가 동안 인큐베이션하여 유기 용매를 증발시키고 나노입자를 형성시켰다. 그 결과 수득한 나노입자 현탁액을 4℃에 보관하였다.

[0134] 실시예 2 - 동적 광 산란에 의한 나노입자 형성의 확인

[0135] HIP 방법에 의한 PBCA 나노입자의 형성을 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 사이징함으로써 확인하였다. 입자를 브룩하벤 인스트루먼트(Brookhaven Instruments) 코포레이션 입자 크기 분석기(BIC 90 plus)를 사용하여 분석하였다. 도 1은 현탁액 중의 나노입자의 존재를 제시하는 DLS에 의해 획득된 사이징 데이터를 보여준다. DLS에 의한 사이징은 291.4 nm의 평균 수력학 직경(mean hydrodynamic 직경)을 지니는 나노입자가 형성되었음을 보여주었다(도 1a). 또한 입자 집단은 비교적 단분산(monodisperse)되어 있는 것으로 확인되었으며, 샘플 중의 입자 크기의 범위가 얼마나 넓은지에 대한 척도인 다분산도 지수(다분산도 index)는 0.242이다(도 1a). 이것은 입자 제형의 최대 허용 값인 0.300 미만인 값이다. 일반적으로, 코렐로그래프는 입자 제조 방법이 양호한 품질의 PBCA 나노입자 현탁액을 성공적으로 생성시켰음을 확인시켰다.

[0136] 파생 데이터는 입자의 대부분이 작다는 것을 제시한다(도 1b-d). 이 결과는 입자 집단의 대략 96.3%가 201.37 nm 또는 이보다 적은 직경을 지녔음을 제시한다(도 1b). 또한 현탁액은 일반적으로 거대 회합체(aggregates)가 결여되어 있으며 직경 732.05 nm를 초과하는 임의의 입자를 포함하지 않는 것으로 드러났으며, 입자 집단의 대부분은 상기 직경 보다 상당히 더 작았다(도 1c). 또한 제형은 143.38 nm보다 더 작은 임의의 입자를 함유하지 않는 것으로 드러났다(도 1d). 따라서, 입자의 대부분은 143.38 내지 201.37 nm의 직경을 지녔는데, 이 크기는 정맥내 투여에 안전하며 약물 로딩 효율을 감소시킬 정도로 너무 작지는 않는 크기이다.

[0137] 도 1(a) - 동적 광 산란에 의한 나노입자 현탁액의 분석 후 획득한 코렐로그래프. 획득한 데이터에 따르면, 입자의 평균 수력학 직경은 291.4 nm이었고 다분산도 지수는 0.242이었다.

[0138] 도 1(b) - 소정 범위의 크기를 초과하는 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 데이터는 입자 집단의 96.3%가 201.37 nm 또는 이보다 작은 직경을 지니는 것으로 드러났음을 제시한다.

[0139] 도 1(c) - 소정 범위의 크기를 초과하는 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 데이터는 입자의 96.3%가 201.37nm 또는 이보다 작은 직경을 지니며 입자 샘플의 100%가 732.05 nm 또는 이보다 작은 직경을 지니는 것으로 나타났음을 제시한다. 따라서, 현탁액은 거대 회합체가 결여되어 있는 것으로 확인되었고 그에 따라 정맥내 투여에 안전한 것으로 간주되었다.

[0140] 도 1(d) - 소정 범위의 크기를 초과하는 입자 집단(개수)의 분포를 도시하기 위해 작도된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 데이터는 입자 샘플의 6.2%가 143.38 nm 또는 이보다 작은 직경을 지닌다는 것을 제시한다.

[0141] 방법은 상이한 나노입자 제형을 제조하였을 때 유사한 나노입자 크기가 양산되었음이 확인되었다. 표 1은 일련의 6개의 상이한 제형의 다양한 조성물로부터 획득한 사이징 데이터를 요약한 것이다:

표 1

제형	평균 수력학 직경 (nm)	다분산도 지수
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
평균	294.22	0.245

일반적으로, HIP 방법은 요망되는 직경 및 다분산도를 지니는 나노입자 현탁액을 생성시키는 것으로 확인되었다.

실시예 3 - HIP 방법을 사용한 유기상내로의 펩티드의 가용성화 및 PBCA 나노입자내로의 캡슐화.

헥사펩티드 다라진의 용액을 3 ml의  $\text{CaCl}_2$  (18.3 mM)에 30-60 mg의 펩티드를 용해시키고 진한 HCl (2 M)을 첨가하여 pHFMF 3.05로 낮춤으로써 제조하였다. 그 결과 수득한 용액(500  $\mu\text{l}$ , 10-20 mg/ml, 및 펩티드 총량 5-10 mg)을 2 ml 에펜도르프 튜브의 HIP 작용제 디클로로메탄 중의 도쿠세이트 소듐(1 ml, 3.058-6.116 % w/v) 용액에 첨가하였다. 사용한 HIP 용액의 부피는 펩티드 용액 부피의 2배이었다(500  $\mu\text{l}$  펩티드 용액에 대해 1 ml HIP 용액). HIP:펩티드의 몰비는 5 mg 펩티드의 경우 10:1이었고, 10 mg 펩티드의 경우 5:1이었다. 유기 및 수성상을 1분 동안 최대 속도로 볼텍싱하여 혼합하였다. 그런 다음 그 결과 수득한 현탁액을 50분 동안 20,817 rcf로 원심분리시켜 2개이 상으로 분리시켰다. 유기층(가용해화된 펩티드 함유)을 취합하고 나노입자를 제조하는데 사용하였다. 방법이 유기상내에 펩티드를 가용해화시킬 때 성공적이었는지를 확인하기 위해, 수성상내에 남아있는 펩티드의 양을 측정하였다. LC-MS와 에드만 시퀀싱에 의한 분석은 펩티드의 99% 이상이 유기상에서 성공적으로 추출되었음을 보여주었다.

실시예 4 - PBCA 나노입자내로의 펩티드의 캡슐화.

나노입자를 가용해화된 펩티드와 HIP(1 ml)를 함유하는 유기상에 100  $\mu\text{l}$  BCA 모노머를 첨가하여 제조하였다. 그 결과 수득한 용액을 수성상(1 % w/v 텍스트란, 0.2 % w/v 플루로닉 F68, 10 ml, pH 7.0)에서 피펫팅하고 7,500에서 Silverson L4RT 균질화기(미세 에멀서 스크린(fine emulsor screen), 3/4 인치 프로브)을 사용하여 균질화시켰다. 수성상의 중성 pH에 대한 노출로 BCA 모노머의 급속한 중합화가 야기되어 PBCA 폴리머가 형성되었다. 형성된 에멀전을 45초 동안 균질화시키고 난 다음 흡 후드(fume hood)에서 교반(IKA 자석 스테러, 스피드 세팅 4)하면서 3시간 동안 인큐베이션하여 유기 용매를 증발시켰다. 그런 다음 스피드 세팅을 3으로 낮추고 유기상의 증발과 나노입자 형성을 보장하기 위해 제형을 추가 2시간 동안 인큐베이션하였다. 나노입자 현탁액을 취합하고 4°C에 보관하였다.

그 결과 수득한 나노입자를 원심분리시켜 임의의 유리 펩티드를 제거하고 물 또는 PBS에 재현탁시켰다.

캡슐화 효율을 LC-MS로 입자를 분석함으로써 결정하였다. 심지어 많은 펩티드 양(10mg)을 사용하였을 때조차, 대략 90%의 펩티드 용량이 캡슐화되었음을 확인하였다. 통상의 입자 표면상의 흡착 방법에 의해 달성된 캡슐화된 펩티드의 양과 HIP로 달성된 캡슐화된 펩티드의 양의 비교는 HIP-PBCA 방법의 우수성을 명백하게 입증하였다(도 2). 흡착 방법을 사용한 경우, 펩티드 용량의 단지 1.5%가 입자상에 로딩되었다. 흡착 방법에 의한 다라진으로 로딩된 나노입자의 분석을 상이한 시간에 실시하였다. Kreuter 흡착 입자를 제조하고 본원 발명의 HIP 방법의 개발에 앞서 종래 기술의 평가를 겨냥한 수단으로써 분석하였다. 사용한 LC/MS 방법과 HPLC 방법은 민감도에 있어 동일하다.

실시예 5 - 생체내 HIP-PBCA 나노입자 전달 시스템의 평가(마우스 모델).

뇌로 HIP-PBCA 나노입자의 펩티드 로드를 전달하는 HIP-PBCA 나노입자의 활성을 마우스 모델의 생체내에서 측정하였다. HIP 방법을 이용하여 캡슐화된 다라진을 함유하는 HIP-PBCA 나노입자를 문헌[Kreuter et al]에 보고된 것과 같은 입자 표면에 흡착된 펩티드를 지니는 HIP-PBCA 나노입자와 비교하였다. 나노입자를 폴리소르베이트

80 상청액으로 이들의 표면을 코팅함으로써 정맥내 경로를 통한 뇌 전달용으로 제조하였다. 요약하면, 나노입자를 주입에 앞서 30분 동안 1% w/v 상청액을 함유하는 PBS에서 인큐베이션하였다. 상청액은 나노입자 표면에 혈청 아포리포단백질의 흡착을 촉진함으로써 뇌로의 나노입자를 간접적으로 표적화시키는 것으로 문헌에 보고되었다. 이것은 입자가 혈뇌 장벽상의 아포리포단백질 리포터에 결합되게 하며 세포통과세포외배출(transcytosis)시켜 뇌에 도달되게 한다. 하기 제형을 비교하였다:

- [0153] 1. HIP-PBCA 나노입자 단독(5:1 HIP 함량)
- [0154] 2. HIP-PBCA 나노입자 단독(10:1 HIP 함량)
- [0155] 3. 용액 중의 다라진(2.0 mg/kg)
- [0156] 4. 표면에 흡착된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(제형에 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)
- [0157] 5. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:다라진 몰비)(제형에 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)
- [0158] 6. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:다라진 몰비)(제형에 사용된 총 용량 2.0 mg/kg) - 상기한 것과 동일한 제형이나, 1/10의 용량으로 주입함.
- [0159] 7. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:다라진 몰비)(제형에 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)
- [0160] 마우스를 주사후 20분 경과시 절명시키고, 뇌와 혈액 샘플을 수입하고 펩티드의 존재를 LC-MS-MS로 분석하였다. 뇌 데이터를 뇌 그램 당 15  $\mu$ l의 혈액 오염을 추정하여 혈액 오염에 관하여 보정하였다. 획득한 결과는 도 3에 제시되어 있다:
- [0161] 생체내 연구 결과는 HIP 방법을 사용한 HIP-PBCA 나노입자의 코어 내부의 펩티드의 캡슐화가 입자 표면 상의 펩티드 흡착에 비해 우수함을 제시한다.
- [0162] 실시예 6 - HIP-PBCA 나노입자에서 다라진 캡슐화 효율에 대한 pH의 영향
- [0163] 종래 기술에서, PBCA 나노입자는 오일 에멀전 중의 산성 물 중의 BCA 모노머의 느린 중합체화에 의해 형성되며, 여기서 수성상의 pH는 약 2.0(0.01 N HCl)이다. 산성 조건하에서 중합체화 반응은 완료에 이르기까지 3시간 이상의 기간을 요한다. 그러나, 본원 발명의 반응은 빠른 중합체화를 가능하도록 하기 위해 중성 pH를 채택한다. 사용되는 수성상은 인산염 완충된 염수(PBS, pH 7.2)이다. 중성 pH에서, BCA 모노머는 급속하게(수초 이내)에 중합체화되는 것으로 알려져 있다. 그 결과, HIP-PBCA 나노입자의 생산은 매우 빠른 에멀전의 형성을 요한다. 이것은 당해 방법에서 Silverson L4RT 균질화기를 사용하여 고속(7,500 rpm 또는 이보다 빠른 속도)에서 균질화를 통해 달성된다. 중성 pH에서 더 빠른 중합체화 반응은 입자내에 펩티드를 재빨리 포획(entrapping)시킴으로써, 캡슐화 효율을 개선시킬 수 있는 것으로 가정되었다. 대조적으로, 지연된 중합체화는 에멀전으로부터 수성상내로의 펩티드의 점진적 손실을 야기시킬 수 있다. 상기 가정을 시험하기 위해, HIP-PBCA 방법을 사용하여, PBCS 또는 종래 기술의 본래 매질(0.01 N HCl) 중의 추출된 펩티드로 BCA 모노머를 에멀전화시킴으로써, 나노입자를 제조하였다. 상기 산성 및 중성 수성상 둘 모두는 필요한 안정화제(0.2% 플루로닉 F68, 1% 텍스트란)을 함유하였다. 실시예 3에 기재된 절차에 따라 나노입자를 제조하였다. 제형 당 사용한 펩티드의 양은 5 mg이었다. 하기 제형을 제조하였다(각각 1개씩 제조):
- [0164] 1. HIP-PBCA 나노입자 단독(35:1 HIP 함량), pH 2
- [0165] 2. HIP-PBCA 나노입자 단독(35:1 HIP 함량). pH 7
- [0166] 3. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(35:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 2
- [0167] 4. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(35:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 7
- [0168] 5. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 2
- [0169] 6. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 7
- [0170] 7. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 2
- [0171] 8. 캡슐화된 다라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:다라진 몰비)(5.0 mg 인풋), pH 7
- [0172] 나노입자 제형을 원심분리시켜 임의의 유리 펩티드를 제거하고 물 또는 PBS에 재현탁시켰다. 캡슐화 효율을 10 mM NaOH(실온에서 밤새 인큐베이션)에서 입자를 과쇄시키고 난 다음 LS-MS로 분석함으로써 측정하였다. 획득한

결과를 도 4에 제시하였다.

- [0173] 결과는 중성 pH에서 PBCA 폴리머의 급속한 형성이 종래 기술이 경우에서와 같이 산성 pH에서 폴리머의 느린 형성보다 더 높은 펩티드 캡슐화 효율을 야기시킬 수 있다는 가정을 뒷받침한다. NaOH 처리에 의한 변성으로 인한 펩티드 중 일부의 손실에도 불구하고, 획득된 결과는 중성 pH에서 입자를 형성하는 것의 장점을 명백하게 보여주었다. 10:1의 HIP:다라진 비에서, 입자가 pH 7에서 형성되었을 때, 63.23%의 인풋 펩티드가 나노입자내에 포획되었다. pH 2에서, 캡슐화 효율은 2.36%로 유의하게 저하되었다. 전반적으로, 캡슐화 효율은 입자가 pH 2에서 제조되었을 때보다 pH 7에서 제조되었을 때 더 높았다.
- [0174] 실시예 7 - HIP 방법을 사용한 PBCA 나노입자에 도메인 항체의 캡슐화.
- [0175] 도메인 항체(항-계란 리소자임 dAb)를 실시예 3에 기재된 절차에 따라 PBCA 나노입자에서 제형화하였다. 제형에 사용된 단백질의 양은 10 mg이었다. 총 2가지 제형을 제조하였다. 캡슐화된 dAb의 양을 측정하기 위해, 입자를 원심분리시켜 임의의 유리 단백질을 제거하고 난 다음 에드만 시퀀싱으로 분석하였다. 서열 정보와 더불어, 에드만 시퀀싱은 또한 정량적 정보를 제공하는데 사용될 수 있다. 방법은 입자를 파괴시키고 캡슐화된 물질의 검출을 가능케 하는 혹독한 화학적 처리를 포함한다. 획득한 결과를 도 10에 제시하였다. 결과는 HIP-PBCA 방법을 사용하여 더 큰 분자를, 더 낮은 효율로, 캡슐화시키는 것이 가능함을 제시한다. 그러나, 도메인 항체와 함께 사용하기 위한 프로토콜을 최적화시킴으로써 캡슐화의 효율을 증가시키는 것이 가능할 수 있다. 다라진에 대해 최적화된, 본원의 프로토콜을 이용하여, 사용된 10 mg 중 대략 2.56 mg을 캡슐화시킬 수 있었다. 이것은 25.6%의 캡슐화 효율에 해당하는 양인데, 단백질이 소수성 입자 매트릭스 내부에 포획되는 단일 에멀전 방법의 경우보다 높다.
- [0176] 실시예 8 - PBCA 나노입자에 도메인 항체의 개선된 캡슐화를 위한 HIP 방법의 최적화
- [0177] 도메인 항체의 로딩을 개선시키기 위해, 다라진 프로토콜을 추가로 최적화하였다. 최적화를 위한 출발점으로써 사용한 다라진에 대한 프로토콜은 실시예 3과 4에 기재되어 있다.
- [0178] 프로토콜 수정은 유기상내에 항체의 완전한 가용해화 및 나노입자내로의 효율적인 통합을 달성하는 것을 목표로 하였다.
- [0179] 이것은 유기상 중의 HIP dAb 복합체의 현탁액을 형성시키는 추가의 균질화 단계를 포함시킴으로써 달성되었다. 전체적으로, 다라진 프로토콜을 하기와 같이 변형시켰다:
- [0180] 사용된 dAb는 VEGF-myc dAb이었다. dAb는 DOM15-26-593로 명명되어 있고, PCT WO2008/149147에 개시되어 있다.
- [0181] dAb를 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg(0.843  $\mu$ mol)의 인풋 양으로 제형화시켰다(12% w/w dAb/PBCA, 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg dAb).
- [0182] 82:1의 물비로 dAb와 HIP(도쿠세이트 소듐)의 복합체를 형성시켰다. HIP 용액 농도는 30.581 mg/ml(1 ml 중의 0.06879 mmol)이었다.
- [0183] dAb 용액의 산성화를 너무 낮은 pH에 분자가 노출되고 파괴되는 것을 막기 위해 일정한 혼합과 더불어 점진적으로 실시하였다.
- [0184] dAb 용액의 pH를 HCl로 pH 3.6으로 낮추었다.
- [0185] dAb에 대한 HIP의 결합을 저해할 수 있기 때문에  $\text{CaCl}_2$ 를 사용하지 않았다.
- [0186] 500  $\mu$ l의 산성화된 dAb 용액(24 mg/ml, 12 mg 단백질)과 DCM 중의 1,000  $\mu$ l 도쿠세이트 소듐(30.581 mg/ml, 3.058 %w/w)을 볼텍스 혼합한 후 원심분리로 2개의 상을 분리시켜 수성상에서 산성화된 dAb를 추출하였다. 다라진과 달리, dAb는 유기상내에서 완전히 가용해화되지 않는 것으로 확인되었다. 그 대신, 이것은 인터페이스에서 흰색 침전물을 형성하였다. 침전물은 명백하게 dAb:HIP 복합체로 구성되어었는데, 이의 부피는 추출에 사용한 HIP와 dAb의 양에 비례하는 것으로 생각되었다. 500  $\mu$ l에서 367.76  $\mu$ l까지(물 첨가하지 않음) 감소된 부피의 수성상을 사용하여 dAb를 완전히 추출하려는 시도는 500  $\mu$ l 부피를 사용한 경우에 비해 덜 성공적이었다. 일련의 실험은 높은 등전점이 선호될 수 있으나, 또한 낮은 pi 값을 지니는 dAbs(VEGF dAb-myc, 이 경우에 pi = 6.6)를 성공적으로 침전시키는 것이 가능하였음을 제시하였다. 원심분리 후, 수성층을 취합하고 4°C에 저장하였다. HIP-dAb 고체 펠렛을 포함하는, 유기층을 사용하여 나노입자를 제조하였다.



- [0187] 나노입자를 제조하기 위해, HIP-dAb 펠렛을 유기상에서 가용해화시키는 것이 필요하였다. 이것은 방법에 하기, 추가의 균질화 단계를 도입함으로써 달성되었다:
- [0188] 수성상을 제거하고 유기상과 dAb 침전물을 Ultra-Turrax 균질화기(T25 기본, 속도 세팅 1)를 사용하여 2 ml 에 펜도르프에서 균질화시켰다. 제형을 15초 동안 균질화시켜 흰색 현탁액을 형성시켰다.
- [0189] HIP-dAb 펠렛이 균질화기 프로브와 접촉되고 즉각적으로 혼합이 개시되는 것을 명확하게 하는 것이 중요하였다.
- [0190] 1분의 더 긴 기간 동안의 균질화로 더 나은 현탁액이 획득되었으나, dAb는 활성을 상실하였다.
- [0191] 균질화 후, 유기상을 2 ml 에펜도르프에 남겼고 100  $\mu$ l BCA 모노머를 첨가하였다. 액체 모노머가 유기상과 용이하게 혼합된다는 것을 확인하였다. 이후 유기상을 사용하여 실시예 1에 기재된 대로 나노입자를 제조하였다.
- [0192] 또한 수정된 절차를 캡시드화된 mAb를 함유하는 HIP-PBCA 나노입자의 제조에 적용하였다. 전장 길이 모노클로날 항체(PCT W099/58679에 개시된 항-CD23 mAb, 150,000 Da, 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg, 860:1 HIP:mAb 몰비)를 dAbs에 관해 개발된 프로토콜에 따라 제형화하였다. 하기 관찰 관찰이 이루어졌다:
- [0193] mAb(W099/58679에 개시된 항-CD23)는 VEGF dAb 보다 더 많은 양의 HCl를 필요로 하는 것으로 확인되었다. HIP 작용제를 사용하여 추출한 경우, mAbs는 dAbs와 유사하게 행동하는 것으로 확인되었다: 이들은 유기상에서 완전히 가용해화되지 못하였으며 인터페이스에서 흰색 침전물을 형성하였다.
- [0194] 고농도의 mAb 표준 용액(stock solution)은 유기상에서 mAb의 완전한 추출을 달성되도록 하기 위해 500  $\mu$ l 대신 250  $\mu$ l 부피의 수성상을 사용하여 실험할 수 있게 하였다. 4:1의 수성상에 대한 유기상 비율은 덜 작용하였는데, 이것은 mAb가 더 많은 용매에 노출되었기 때문에 mAb의 활성이 저하되는 것으로 드러났다. 1:1의 수성상에 대한 유기상의 비율이 mAbs와 dAbs 둘 모두에 더 바람직할 수 있다는 것이 명백하였다.
- [0195] 나노입자를 제조하기 위해, HIP-mAb 펠렛을 dAbs에 채용하였던 것과 동일한 균질화 단계를 사용하여 균질화시킴으로써 유기상내에서 가용해화시켰다. 균질화는 성공적인 것으로 확인되었으나, 현탁액은 덜 부드러웠는데, 아마도 더 큰 크기의 HIP-mAb 복합체 때문인 것으로 추정된다. 1 분의 더 긴 기간 동안의 균질화는 더 나은 현탁액을 생성시켰으나, mAb는 변성되는 것으로 드러났다. 따라서, 균질화 단계는 15초로 잠시 동안 유지하였다.
- [0196] 이후 나노입자를 이 실시예에서 앞에 기재된 dAb 프로토콜에 따라 제조하였다.
- [0197] 일반적으로, 펩티드 보다 더 큰 생물약품(biopharms)의 캡시드화는 다라진 프로토콜의 실질적인 수정을 필요로 하는 것으로 확인되었다.
- [0198] dAbs와 mAbs 둘 모두는 가용해화의 경우 더 높은 HIP:생물약품 몰비를 요구하였다(각각 82:1 및 860).
- [0199] dAbs와 mAbs 둘 모두는 유기상에서 완전히 가용해화되지 않는 것으로 확인되었다.
- [0200] 그 대신, 인터페이스에서 침전물이 형성되었다. 유기상을 가용해화시키기 위해, 침전물을 유기상에서 균질화시켜 오일 현탁액 중의 고체를 형성시켰다. 이것은 성공적인 입자 형성을 야기시켰다.
- [0201] 실시예 9 - 수정된 HIP 방법을 사용한 PBCA 나노입자 중의 도메인 항체의 캡슐화.
- [0202] 실시예 8에 기재된 dAb에 대한 수정된 HIP 프로토콜을 사용하여 일련의 dAb 분자를 캡시드화시켰다. dAbs를 이들의 등전점에 기초하여 선별하였다. 목적은 당해 방법이 소정 범위의 dAbs에 대하여 다목적으로 사용되며 적합하다는 것을 확인하기 위해 당해 방법에 사용될 수 있는 소정 범위의 등전점(pi)를 커버하는 것이었다. 하기 dAbs를 실험용으로 선별하였다(표 2):

[0203] 표 2

dAb	DOM 15-10-11 Vk, NT 태그없음	DOM 15-10-11, Vk, myc	DOM 15-10-11, Vk, HA
농도 (mg/ml)	39.734	22.585	12.523
등전점 (pI)	9.0	6.8	8.2

[0204]

[0205] DOM 번호는 W02008/149146에 개시된 도메인 항체를 지칭한다. myc는 도메인 항체 상의 myc-태그(tag)를 지칭하거나 HA는 도메인 항체 상의 HA 태그를 지칭한다.

[0206] 각각의 dAb를 70:1의 몰비로 HIP 작용제로써 도쿠세이트 소듐을 사용하여 PBCA 나노입자에서 개별적으로 제형화시켰다.

[0207] HIP 추출에 사용된 시약들은 하기 표에 나열되어 있다(표 3):

[0208] 표 3

제형	DOM15-10-11 NT	DOM15-10-11 myc	DOM15-10-11 HA
dAb 양 (mg)	6.0	6.0	6.0
dAb 양 (μmol)	0.490	0.439	0.451
dAb 용액 농도 (mg/ml)	39.734	22.585	12.523
dAb 용액의 부피 (μl)	151.00	265.66	479.12
도쿠세이트 소듐의 양 (mg) Mr = 444.55 Da	15.248	13.661	14.034
도쿠세이트 소듐의 양 (μmol) Mr = 444.55 Da	34.30	30.73	31.57
도쿠세이트 소듐 용액 농도 (mg/ml)	15.248	13.661	14.034
도쿠세이트 소듐 용액의 부피 (μl)	1000	1000	1000

[0209]

[0210] 추출을 위한 dAb 용액의 산성화.

[0211] dAb 용액을 산성화시키기 위해 앞서 다름과 같이 물을 첨가하여 희석시켰다(표 4):

[0212] 표 4

제형	DOM15-10-11 NT	DOM15-10-11 myc	DOM15-10-11 HA
필요한 dAb 용액의 부피 (μl)	151.00	265.66	479.12
필요한 물의 부피 (μl)	328.12	213.46	0
수성상의 총 부피	479.12	479.12	479.12
첨가된 HCL (2 M)의 부피 (μl)	2.00	5.00	3.00
최종 pH	3.4	2.5	3.0

[0213]

[0214] 용액을 HCL(2 M)을 첨가하여 산성화시켰다. 모든 dAb 용액을 인디케이터 스트립으로 측정하여 약 3.0의 pH로 산성화시켰다. 각각이 산성화된 용액의 최종 부피는 물로 최대 500 μl까지 맞추었다.

[0215] 이후 dAbs를 실시예 16에 기재된 대로 유기상에서 추출하였다.

[0216] 모든 dAbs가 유기상에서 완전히 가용해화되며 인터페이스에서 침전물을 형성하는 것을 확인하였다. 태깅되지 않은 dAb(NT)는 다른 dAbs의 침전물보다 훨씬 더 얇은 침전물을 양산하는 것을 확인하였다. dAb의 높은 등전점



과 강한 양전하는 HIP와의 더 강하고, 더 소수성의 복합체의 형성을 명백히 허용하였고, 훨씬 높은 가용해화도와 유기층으로의 전이를 야기시켰다.

- [0217] 수성상(상부층)의 제거후, 유기상과 dAb 침점물을 균질화로 가용해화시키고, 나노입자를 실시예 8에 기재된 대로 제조하였다.
- [0218] dAbs의 로딩을 평가하기 위해 SDS-PAGE에 의한 나노입자의 분석.
- [0219] SDS-PAGE에 의한 나노입자 현탁액을 분석하기 위해, 샘플을 마이크로-센트리퓨즈에서 10분 동안 13000 rpm에서 진탕시켰다. 상청액을 흡입시키고 펠렛을 100  $\mu$ l의 PBS에 재현탁시켰다. 상청액과 펠렛 분획을 1x NuPAGE LD 와 환원제로 파괴하고, 4분 동안 80℃로 가열하고, 시중에서 구입한 NuPAGE 겔을 사용하여 SDS PAGE로 시험하였다. 또한 dAb를 함유하는 중공(hollow) 제형으로부터의 상청액 샘플을 시험하고 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0220] 레인 1과 6: 분자량 마커. 레인 2: VEGF dAb DOM15-10-11, 태깅되지 않음, HIP-PBCA 나노입자내에 캡시드화됨. 레인 3: VEGF dAb DOM15-10-11, myc 태깅됨, HIP-PBCA 나노입자내에 캡시드화됨. 레인 4: VEGF dAb DOM15-10-11, HA 태깅됨, HIP-PBCA 나노입자내에 캡시드화됨. 레인 5: VEGF dAb DOM15-10-11, 태깅되지 않음, 중공 나노입자(양성 대조군)내에 캡슐화됨. 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났음을 입증하였다. 또한 겔은 dAbs가 온전하였고 이들은 입자 제조 방법으로 인해 단편화되지 아니하였음을 입증하였다.
- [0221] 겔은 임의의 유리 dAbs의 제거후 dAbs가 나노입자 펠렛과 동일위치점유(co-localisation)하였기 때문에, 상기 dAb가 입자 내부에 캡시드화되었음을 명백하게 보여주었다(도 6).
- [0222] 비변성 조건(네이티브 겔) 하의 펠렛 분석이 dAb가 입자내에 유지됨에 따른 겔 상의 임의의 밴드를 양산하지 않았기 때문에, dAb는 명확하게 나노입자내부에 캡시드화되었다(결과 미제시). dAb가 입자로부터 방출되게 하고 겔 상에 전개되도록 하기 위한 변성 조건(SDS의 존재하의 열 처리)이 요구되었기 때문에, SDS-PAGE로 입자를 분석하는 것이 필요하였다. 캡시드화는 시험된 모든 dAbs에 대해 성공적이었음을 확인하였다. 이것은 추가의 균질화 단계가 HIP-dAb 복합체가 유기상내에 성공적으로 가용해화시켜 dAb의 입자내로의 포획(entrapment)을 가능하게 하였음을 제시한다. 그 결과, HIP-dAb 복합체가 추출후 인터페이스에 침전되었다는 사실은, 본원 발명의 케이스가 특히 낮은 pi dAbs로 실시되었으므로, 입자내의 dAbs의 캡시드화를 저하시키지 아니하였다. 따라서, HIP-PBCA 입자내로의 dAbs의 캡시드화를 위한 수정된 프로토콜이 시험된 범위의 pi와는 독립적이었으며 소정 범위의 dAbs에 대해 적합하였음을 확인하였다.
- [0223] 실시예 10 - 수정된 HIP 방법을 사용한 PBCA 나노입자내의 도메인 항체의 캡슐화; 로딩 효율의 측정 및 제형화된 dAb의 활성 평가.
- [0224] 수정된 HIP 프로토콜이 성공할 수 있는지 로딩 효율을 측정하기 위해, HIP PBCA 나노입자 제형을 툴(tool) dAb(VEGF-myc dAb, W02008/149147에 개시된 DOM15-26-593)를 이용하여 제조하였다. 상기 dAb를 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg(0.843  $\mu$ mol)의 인풋 양으로 제형화하였다(12% w/w dAb/PBCA, 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg dAb). 제형을 실시예 9에 기재된 dAbs에 관한 수정된 HIP 프로토콜을 사용하여 제조하였다.
- [0225] 제조 후, dAb가 온전한 상태로 유지되었는지 여부 및 상기 dAb가 입자 내에 성공적으로 포획되었는지 여부를 확인하기 위해 SDS-PAGE로 나노입자를 특성결정하였다. SDS-PAGE에 의한 분석을 실시예 9에 기재된 대로 실시하였다. 또한 공지된 양의 dAb 표준물질 세트를 제형과 동시에 겔상에서 분석하였고 캡시드화된 dAb의 양을 결정하는데 사용하였다(도 7). 이것은 겔을 사진촬영하고 랩웍스(labworks) V4.6을 사용하여 상기 표준물질의 밴드로부터의 신호 강도를 측정함으로써 이루어졌다.
- [0226] 겔을 다음과 같이 설정하였다:
- [0227] 레인 1과 7: 분자량 마커. 레인 2-4: dAb 나노입자 제형. 레인 5: 공(empty) 나노입자(음성 대조군). 레인 7-10: dAb 표준물질(500, 125, 31.25 및 7.8  $\mu$ g/ml). 레인 11-14: dAb 표준물질(7.8, 31.25, 125 및 500  $\mu$ g/ml). 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났고 dAb가 온전하였음을 확신했다. 표준물질의 밴드 강도에 대한 샘플 밴드 강도의 비교는 나노입자 샘플내 dAb의 농도가 413.7  $\mu$ g/ml이었음을 제시하였다.
- [0228] 밴드 강도를 표준 곡선을 작도하는데 사용하였다. 이후 곡선을 나노입자 샘플의 밴드의 강도로부터 나노입자 제형내 dAb의 양을 계산하는데 사용하였다.
- [0229] 겔은 dAb가 입자내에 성공적으로 포획되었고 캡시드화후 온전하게 유지되었음을 확신했다. 표준물질과의 비교로부터, 나노입자 제형내 dAb의 농도는 413.7  $\mu$ g/ml인 것으로 확인하였다. 이것은 12 mg의 인풋에서 총

3.31 mg의 dAb가 나노입자 내에 캡시드화된 것으로 해석되었다. 따라서, 로딩 효율은 27.6 %이었다. dAb 로딩은 3.31 % w/w이었다.

[0230] 캡시드화된 dAb를 방출시키고 이의 활성을 평가하기 위해, 나노입자 샘플을 또한 열 처리를 겪게 하였다. 1% Tween 20 존재하여 1시간 동안 4 내지 65℃ 범위의 온도에서 인큐베이션하여 나노입자로부터 dAb를 방출시켰다. 이 방법은 입자로부터 캡시드화된 dAb의 적어도 일부의 방출을 일으키는 것으로 공지되어 있으나, 이것은 또한 dAb 활성의 일부 손실을 야기시킬 수 있다. 열 처리 결과로서 dAb 활성의 손실을 최소화하기 위해, 샘플을 5분 동안 65℃에서 인큐베이션하고 난 다음, 후속하여 55분 동안 37℃의 더 낮은 온도에서 유순하게 처리하였다.

[0231] 인큐베이션 후, 샘플을 10분 동안 10,000 rcf로 원심분리시켜 입자로부터 임의의 방출된 dAb를 분리시켰다. 방출된 dAb를 함유한, 상청액을 취합하고 ELISA로 활성에 대하여 분석하였다.

[0232] 방출된 dAb를 다음과 같이 ELISA로 분석하였다:

[0233] Nunc maxisorb 96 웰 플레이트를 4℃에서 밤새 0.5 µg/ml rVEGF로 코팅시켰다. 이후 플레이트를 세척 완충액(PBS + 0.1% Tween)으로 4회 세척하고 난 다음, 로킹(rocking)시키면서 블로킹 완충액(PBS + 1% BSA)으로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 플레이트를 상기한 것과 같이 세척하고 난 다음 50 µl의 트리플리케이트(triplicate) 상청액 샘플을 웰에 첨가하고 플레이트를 상기한 대로 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 난 다음, 웰 당 50 µl의 항i-myc Ab(마우스) 용액을 첨가하고 플레이트를 다시 상기한 대로 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 후, 웰 당 50 µl의 항-마우스 HRP를 첨가하고, 플레이트를 상기한 대로 인큐베이션하였다. 플레이트를 최종적으로 상기한 대로 세척하고 난 다음 50 µl/웰 TMB 시약을 첨가하였다.

[0234] 색을 발색시키고 반응을 웰 당 50 µl의 HCl(1 M)dmf 첨가하여 중단시켰다. 흡광도를 Versamax 플레이트 판독기 Softmax Pro V5.3 소프트웨어를 사용하여 450 nm에서 판독하였다.

[0235] ELISA 검정으로 획득한 결과는 표 5에 제시되어 있다:

[0236] 표 5

온도	4℃	56℃	65℃	65/37℃
농도 (µg/ml)	0.44	4.0	>50	61

[0237]

[0238] 방출된 dAb는 활성을 보유하는 것으로 확인하였으며, 높은 온도는 입자로부터 훨씬 더 많은 양의 단백질을 방출시켰다. 65와 37℃의 2가지 온도에서 처리된 샘플은 가장 많은 양의 방출된 활성 dAb를 나타냄을 확인하였다. 제형의 본래 활성 수준은 방출 방법이 활성을 저하시키는 것으로 알려져 있기 때문에 평가하기가 어려웠으나, PAGE 결과를 고려할 때, 65/37 방법은 표준물질의 특정 활성의 대략 50%를 지니는 물질을 생산하였다.

[0239] 방출된 dAb를, 활성 dAb의 판독을 제공하는 ELISA를 비롯한, 총 dAb의 검출을 제공하는 SDS-PAGE로 분석하였다. dAb를 일련의 표준물질과 동시에 겔 상에서 분석하였다. 이후 dAb의 양을 표준물질의 밴드 강도를 측정함으로써 구현된 표준 곡선을 이용하여 결정하였다. 활성 dAb의 농도(ELISA로 측정할 때, 61 µg/ml)는 총 dAb 농도(SDS-PAGE로 측정할 때, 137.89 µg/ml)의 44%이었음을 확인하였다.

[0240] 따라서, 나노입자 내의 제형화된 dAb의 50% 이상이 활성을 지님을 확인하였다. 이것은 제형화 방법이 유기상에서의 가용해화에 후속하여 균질화에 의한 혼합에 대한 노출을 포함함을 고려할 때, 매우 양호한 수준의 활성인 것으로 간주하였다. 따라서, 입자 제조 방법은 도메인 항체의 제형에 적합한 것으로 드러났다.

[0241] 실시예 11 - 정맥내 경로를 통한 뇌로의 도메인 항체 단백질 로드를 전달하는 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 활성에 관한 상기 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가.

[0242] 실시예 10에 기재된 나노입자 제형을 마우스 모델에서 뇌로 이의 dAb 로드를 전달하는 이의 활성에 관해 평가하였다.

[0243] 나노입자가 유리 dAb 분자의 뇌 흡취와 비교하여 dAb의 뇌 흡취를 증가시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 캡시드화된 VEGF dAb를 함유하는 나노입자를 유리 dAb와 비교하였다. 또한 공 나노입자 배치를 제조하였고 음성 대조군으로써 평가하였다.

[0244] 생체내 연구의 설계.

[0245] 해당 연구는 dAb 뇌 수준을 평가하기 위해 2개의 상이한 시점을 포함하였다: 투여후 10분 및 60분. 다라진 펩

티드로 확인하였던 대로, 뇌 내의 dAb 농도가 주입후 수분 이내에 최고점에 도달하는 경우, 상기 더 이른 시점을 선택하였다. 혈액 순환으로부터 dAb의 일부 제거(clearance)가 일어나도록 하기 위해, 상기 더 늦은 시점을 선택하였다. 혈액 중에 존재하는 임의의 dAb는 뇌 샘플을 오염시키고 획득한 데이터를 왜곡시킬 수 있다. 혈액 순환에서 dAb의 짧은 반감기(20분)는 아마도 상기 더 늦은 시점에 혈액 오염을 제한할 수 있고, 그에 따라 뇌 투과에 관한 더 명백한 판독을 가능하게 할 수 있다.

[0246] 뇌 샘플에서 혈액 오염의 보정:

[0247] 뇌 흡취에서 기인되는 것이 아니고, 단순히 뇌 혈관에 존재하고 뇌 조직 그 자체에 존재하지 않는 뇌 샘플 중의 dAb의 양을 설명하기 위해(혈액 오염), 스타트-체이스(start-chase) 연구를 실시하였다. 모든 마우스에 혈액 중에 유지되고 뇌를 투과하지 못하는 것으로 공지된 1회 용량의 체이스 분자를 투여하였다. 선택된 상기 체이스 분자는 무시할 수 있는 뇌 흡취를 나타내는 W099/58679에 개시된 전장 길이의 항-CD23 항체이었다. 따라서, 뇌 샘플에서 검출되는 항-CD23 mAb의 임의 양은 오직 뇌 조직을 오염시키는 혈액 중의 임의 존재 때문일 수 있다. 상기 체이스를 상기 동물에 주입하고 5분 경과 후 상기 동물을 절명시켜 항체가 혈액 내에 남아있고, 조직 흡취가 다른 신체 영역에서 일어 나지 않도록 보장하였다.

[0248] 동물 그룹:

[0249] A: 대조군 입자, t = 0에 투여, 후속하여 t = 5분에 체이스 투여.

[0250] B: 나노입자 중의 dAb, t = 0에 투여, 후속하여 t = 5분에 체이스 투여.

[0251] C: 용액 중에 유리된 dAb(대조군), t = 0에 투여, 후속하여 t = 5분에 체이스 투여.

[0252] 상기 그룹을 상기 체이스 투여후 5분 경과시, t = 10분에 절명시켰다.

[0253] D: 대조군 입자, t = 0에 투여, 후속하여 t = 55분에 체이스 투여.

[0254] E: 나노입자 중의 dAb, t = 0에 투여, 후속하여 t = 55분에 체이스 투여.

[0255] F: 용액 중에 유리된 dAb(비제형화된 대조군), t = 0에 투여, 후속하여 t = 55분에 체이스 투여.

[0256] 상기 그룹을 상기 체이스 투여후 5분 경과시, t = 60분에 절명시켰다.

[0257] 용량의 제조.

[0258] 체이스: PCT W099/58679에 개시된 항-CD23 mAb, 2.0 mg/kg. 해당 용량을 68 mg/ml의 mAb 표준 용액을 500  $\mu$ g/ml로 희석시켜 제조하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 50  $\mu$ g 용량에 달하였다.

[0259] dAb를 지니는 나노입자: 1.584 mg/kg, 50 mg/kg PBCA 폴리머. 상기 나노입자 현탁액을 160  $\mu$ l 폴리소르베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600  $\mu$ l 나노입자 현탁액에 첨가함으로써 주사용으로 제조하였다. 이것은 결과적으로 제형화된 dAb의 최종 농도가 396.1  $\mu$ g/ml이 되게 하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 39.6  $\mu$ g의 dAb 용량에 달하였다.

[0260] 공 나노입자(음성 대조군): 50 mg/kg PBCA 폴리머. 상기 나노입자 현탁액을 상기한 바와 같이 160  $\mu$ l 폴리소르베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600  $\mu$ l 나노입자 현탁액에 첨가함으로써 주사용으로 제조하였다. 이것은 결과적으로 PBCA 폴리머의 최종 농도가 1.25 mg/ml이 되게 하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 125  $\mu$ g의 PBCA 용량에 달하였다.

[0261] 용액 중의 유리 dAb(비제형화된 대조군): 1.584 mg/kg. 2.0 mg/ml의 표준 용액을 396.1  $\mu$ g/ml로 희석시켜 해당 dAb 용액을 주사용으로 제조하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 39.6  $\mu$ g의 dAb 용량에 달하였다.

[0262] 마우스에 주사: CD1 마우스에 정맥내로 주사하였다(꼬리 정맥 주사). 주사 부피를 마우스 체중에 기초하여 계산하였다. 생체내 절차의 종결 이후에, 뇌와 혈청 샘플을 모든 마우스에서 수집하고 동결시켰다. 조직 샘플을 액체 질소에서 즉시 동결시켰다. 모든 샘플을 -80℃에 저장하였다.

[0263] 분석용 뇌의 균질화.

[0264] 뇌를 해동시키고 계량하였다. 뇌 부피 무게의 2배의 PBS의 부피를 각각의 뇌에 첨가하였다. 이후 뇌를 Covaris 어쿠스틱 티슈 프로세서(Covaris E210)를 사용하여 균질화시켰다.

- [0265] MSD(Meso Scale Discovery)에 의한 뇌 분석.
- [0266] 뇌 균질체와 혈청 샘플을 MSD로 분석하였다. 이 분석은 실시예 18에 기재된 항-VEGF ELISA 검정을 MSD 포맷으로 적합화시켜 실행하였다. 혈청 샘플을 1:1,000에서 1:10,000 희석비로 분석하였다. 샘플을 1:5 희석비로 분석하였다.
- [0267] **결과**
- [0268] 데이터를 가공하고 도 8에 제시된 결과를 얻었다. 투여후 10분에, 나노입자 중의 dAb는 8.0 ng/ml에 달하는 검출가능한 뇌 흡취를 가져왔다. 또한 유리 dAb를 3.3 ng/ml의 조금 더 낮은 농도로 뇌에서 검출가능하였다(예비 데이터). 상기 예비 데이터는 혈액 오염에 관하여 보정될 수 없었던 동물 2마리로부터의 판독을 포함하지 아니하였는데, 혈청으로부터의 판독치가 너무 높아 정량화될 수 없었기 때문이다. 일반적으로, 나노입자는 시점 10분에 단백질의 뇌 흡취를 미미하게 증가시키는 것으로 드러났다.
- [0269] 그러나, 60분에, 상황은 역전되었다. 유리 dAb는 뇌 내에 축적되는 것으로 나타났으며, 결과적으로 이의 뇌 수준에서 13.5 ng/ml로의 추가 증가를 초래하였다.
- [0270] 관찰된 결과를 다음과 같이 설명할 수 있다:
- [0271] 1. 혈액 순환 내 유리 dAb의 반감기(VA)는 이의 친수성 때문에 입자의 반감기보다 더 길 가능성이 있었다. 이것은 추정컨대 더 많은 유리 dAb가 나노입자에 제형화된 dAb에 비해 뇌 흡취에 이용될 수 있음을 의미하였다.
- [0272] 2. 입자로의 dAb의 로딩은 전신 순환으로부터의 급속한 제거로 인해 제형의 손실을 오프셋하기에 충분히 높지 아니하였다. 입자 내의 약물 로딩은 3.31% w/w이었다. 다라진 제형은 뇌 levels of 45 ng/ml의 뇌 수준을 생성시키기 위해 5.0 % w/w의 로딩을 미리 필요로 하였다. 8.9 %의 더 높은 펩티드 로딩은 최대 833 ng/ml에 달하는 뇌 내 해당 펩티드 농도를 초래하였다. 특히 고 분자량 생물약품의 경우, 3.31 % w/w의 로딩은 유의한 뇌 전달에 충분치 아니하였으며, 그에 따라 로딩의 추가 최적화가 필요할 수 있는 것으로 생각되었다.
- [0273] 3. 시점 10분 및 60분은 너무 느린 것으로 추정되었다. 다라진과 로퍼마미드(loperamide)로의 이전 연구들은 모두 주입 2-3분 이내에, 급속한 전달이 이루어짐을 설명하였다. 또한 이전 연구들은 뇌 내의 가장 높은 약물 수준은 투여 5분 이내 또는 이보다 더 이른 시점에 도달되었음을 제시하였다. 10분의 시점은 스타트 체이스 연구를 실시하는데 충분한 시간을 보장하기 위해 선택하였고, 60분의 시점은 도메인 항체의 임의의 장기 지속 효과를 검출하기 위해 선택하였다.
- [0274] 4. HIP PBCA 시스템은 뇌로 단지 수동적으로 표적화된다. 정맥내로 주어진 경우, 소수성 표면을 제시하는 그러한 미립자는 다수의 장기를 비롯한 뇌로 수동적으로 표적화되는 것으로 공지되어 있다. 이러한 장기들은 간과 지라를 포함한다. 정맥내로 주어진 경우, 나노입자는 간과 지라에 제일 먼저 도달될 것이고, 이후 이들은 뇌와 조우하게 된다. 그 결과, 주입된 용량의 대부분은, 뇌로의 전달에 가용한 일부분(fraction)만을 남겨 두고서, 상기 조직들에 전달될 수 있다. 이것은 해당 실험에서 뇌에 도달되는 입자의 활성을 극심하게 저하시킬 수 있다.
- [0275] 혈액 순환으로부터 dAb의 손실이 영향을 강조하기 위해, 혈액에 대한 뇌의 비율을 또한 계산하였다(도 9). 결과는 dAb를 용액 중의 유리 dAb로 주입한 경우와 비교하여 나노입자로 주입하였을 때, 혈액에 비해 뇌에 훨씬 더 높은 비율의 dAb가 존재함을 명백하게 제시하였다. 사실상, 제형화된 dAb는 0.04(60 분)의 혈액에 대한 뇌의 비율을 나타내었는데, 이것은 화합물이 뇌를 관통하는 것으로 고려되는 그러한 비율을 초과하는 비율이다. 유리 dAb는 분석한 임의의 시점에 이러한 뇌 관통 역치(threshold)를 초과하지 못하였다. 따라서, 혈액 뇌 장벽을 관통하는 전반적인 활성의 측면에서, 주입된 용량의 유의한 손실에도 불구하고, 입자는 궁극적으로 유리 dAb를 능가할 수 있다.
- [0276] 일반적으로, 정맥내 경로는 수동적으로 표적화된 입자, 예컨대, HIP-PBCA 시스템에 관한 가장 도전적인 투여 경로인 것으로 공지되어 있다. 그러므로, 정맥내 투여는 HIP-PBCA 시스템의 약물 로드를 혈액으로부터 BBB를 가로질러 전달하는 상기 HIP-PBCA 시스템을 평가하는 이상적인 방법이 아니었다. 이러한 이유 때문에, 경동맥내(intracarotid) 연구가 또한 진행되었다. 조직, 예컨대, 간과 지라를 우회하여 경동맥내 경로를 통한 투여는 뇌로의 더 직접적인 경로를 제공한다. 결과로서, 주입된 나노입자 용량 중 더 많은 용량이 뇌 전달에 가용하다. 유리 약물과 제형화된 약물 간의 헤드 투 헤드 비교에서, 경동맥내 경로는 BBB를 극복하는 나노입자의 활성에 대한 진정한 값을 제공할 가능성이 더 높다.
- [0277] 실시예 12 - 경동맥내 경로를 통한 마우스 뇌로의 도메인 항체 단백질 로드를 전달하는 도메인 항체를 함유하는



HIP PBCA 나노입자의 활성화에 관한 상기 도메인 항체를 함유하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가.

- [0278] 나노입자 제형의 생체내 평가 - 경동맥내 투여. 경동맥내 경로를 통한 마우스 뇌로의 나노입자의 dAb 로드를 전달하는 나노입자 제형의 활성화에 관하여 상기 나노입자 제형을 평가하였다.
- [0279] 뇌에 대한 직접적인 진입(avenue)을 제공하기 때문에 상기 경로를 선택하였다. 물질을 경동맥내로 주입한 경우, 도달되는 첫 번째 조직은 뇌이다.
- [0280] 대조적으로, 약물을 정맥내로 주입한 경우, 이것은 조직, 예컨대, 간을 조우하고 난 후 뇌에 도달하게 될 것이다. 이것은 뇌로 전달되는 나노입자의 활성을 제한하는 것으로 확인되었는데, 이들이 또한 조직, 예컨대, 간과 지라에 의해 흡취되는 것으로 공지되어 있다. 사실상, 크레우터 등(Kreuter et al)은, 이들의 PBCA 흡착된 입자로, 꼬리 정맥을 통해 주입한 경우, 주입된 공 나노입자 용량(~ 60%)이 간에 의해 흡취되었음을 관찰하였다.
- [0281] 일반적으로, 정맥내 경로는 수동적으로 표적화되는 전달 시스템, 예컨대, HIP-PBCA 나노입자를 위한 가장 덜 선호되며 가장 도전적인 투여 경로인 것으로 잘 알려져 있다.
- [0282] 따라서, 경동맥내 경로는 혈뇌 장벽을 극복하도록 하는 나노입자의 활성화에 대한 정확한 지표를 제공할 가능성이 높은 것으로 생각되었다.
- [0283] 생체내 연구의 설계.
- [0284] 연구 설계는, 하기한 차이점을 제외하고, 정맥내 연구에서의 설계와 동일하였다:
- [0285] 1. 동물을 실험 내내 말기 마취(terminal anaesthesia)하에 유지하였다. 이러한 마취는 포함된 외과적 절차의 복잡성 때문에 요구되었다.
- [0286] 2. 나노입자 제형과 유리 dAb를 외과적으로 준비된 캐놀라를 사용하여 경동맥내 경로를 통해 투여하였다.
- [0287] 3. 체이스를 이전 연구와 달리 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 주입하였으며, 항체를 캐놀라를 통해 주입하였다.
- [0288] 동물 그룹:
- [0289] A: 대조군 입자,  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 5$ 분에 체이스 투여.
- [0290] E: 나노입자 중의 dAb,  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 5$ 분에 체이스 투여.
- [0291] C: 용액 중의 유리된 dAb(대조군),  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 5$ 분에 체이스 투여.
- [0292] 상기 그룹을 상기 체이스 투여후 5분 경과시,  $t = 10$ 분에 절명시켰다.
- [0293] B: 대조군 입자,  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 55$ 분에 체이스 투여.
- [0294] F: 나노입자 중의 dAb,  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 55$ 분에 체이스 투여.
- [0295] D: 용액 중의 유리된 dAb(비제형화된 대조군),  $t = 0$ 에 투여, 후속하여  $t = 55$ 분에 체이스 투여.
- [0296] 상기 그룹을 상기 체이스 투여후 5분 경과시,  $t = 60$ 분에 절명시켰다.
- [0297] 용량의 제조.
- [0298] 체이스: PCT W099/58679에 개시된 항-CD23 mAb, 2.0 mg/kg. 해당 용량을 68 mg/ml의 mAb 표준 용액을 500  $\mu$ g/ml로 희석시켜 제조하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 50  $\mu$ g 용량에 달하였다.
- [0299] dAb를 지니는 나노입자: 1.584 mg/kg, 50 mg/kg PBCA 폴리머. 상기 나노입자 현탁액을 160  $\mu$ l 폴리소르베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600  $\mu$ l 나노입자 현탁액에 첨가함으로써 주사용으로 제조하였다. 이것은 결과적으로 제형화된 dAb의 최종 농도가 396.1  $\mu$ g/ml이 되게 하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 39.6  $\mu$ g의 dAb 용량에 달하였다.
- [0300] 공 나노입자(음성 대조군): 50 mg/kg PBCA 폴리머. 상기 나노입자 현탁액을 상기한 바와 같이 160  $\mu$ l 폴리소르베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600  $\mu$ l 나노입자 현탁액에 첨가함으로써 주사용으로 제조하였다. 이것은 결과적으로 PBCA 폴리머의 최종 농도가 1.25 mg/ml이 되게 하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 125  $\mu$ g의 PBCA 용량에 달하였다.
- [0301] 용액 중의 유리 dAb(비제형화된 대조군): 1.584 mg/kg. 2.0 mg/ml의 표준 용액을 396.1  $\mu$ g/ml로 희석시켜 해당 dAb 용액을 주사용으로 제조하였다. 이것은 25 g 마우스의 경우 100  $\mu$ l 부피 중의 39.6  $\mu$ g의 dAb 용량에

달하였다.

[0302] **결과**

[0303] 데이터를 가공하였고 도 9에 제시된 결과를 얻었다. 투여후 10분에, 나노입자 중의 dAb는 높은 수준의 뇌 내 dAb(평균 627.60 ng/ml)를 나타내었다. 뇌 내 dAb의 실제 농도는, 상기 도면이 2마리의 동무로부터의 관독치를 포함하고 있지 않기 때문에, 더 높을 것으로 추정되었다. 2개의 샘플은 정량에 관하여 너무 높은 신호를 주었고, 불행하게도 본원에 통합을 위한 시간내에 분석하지 못하였다. 상기 동물들 중 1마리는 명백한 이상값(clear outlier)을 나타냈는데, 45.45 ng/ml의 비교적 낮은 뇌 농도를 제공하였다. 이것은 결과적으로 해당 그룹에서 관찰된 거대 오차를 초래하였다. 그럼에도 불구하고, 뇌 중의 제형화된 dAb의 평균 농도는 유리 dAb의 농도(71.67 ng/ml이었음) 보다 거의 9배 더 높았다.

[0304] 주입 후 60분에, 뇌 중의 dAb의 수준은 146.51 ng/ml로 높게 유지되었다. 유리 dAb의 농도는 평균 3.17 ng/ml로 떨어졌다. 따라서, 주입후 60분에, 나노입자로 주어진 dAb의 뇌 농도는 네이키드(naked) dAb로 도달되는 농도보다 46배 더 높았다.

[0305] 일반적으로, 나노입자가 경동맥내 경로를 통해 dAb를 매우 성공적으로 뇌로 전달한다는 것을 확인하였다.

[0306] 또한 이것은 상기 그룹에 대하여 혈액에 대한 뇌 비율을 측정한 결과로부터도 명백하였다(도 11). 나노입자 그룹 중의 dAb는 두 시점(10분과 60분에, 각각, 1.569와 1.845)에 1을 초과하는 혈액에 대한 뇌 비율을 나타내었으며, 이는 제형화된 dAb의 대부분이 성공적으로 뇌에 도달하였음을 제시한다. 대조적으로, 유리 dAb 그룹은 10분과 60분에, 각각, 0.012와 0.286로, 상당히 더 낮은 혈액에 대한 뇌 비율을 나타내는 것으로 특성결정되었다.

[0307] 결론적으로, 나노입자 전달 시스템은 경동맥내 경로를 통해 주어진 경우 dAb의 뇌로의 전달을 월등하게 개선시키는 것을 확인하였다. 이것은 상기 경로가 뇌에 도달된 후, 제형이 또한 뇌 이외에 수동적으로 표적화되는 조직인, 간과 지라에 도달되기 때문이었다.

[0308] 정맥내 경로는 성공적인 경로로 여겨지지 않았는데, 이는 dAb의 뇌 흡취에서의 증가에 대한 일시적인 힌트를 제공한다. 이것은 입자로의 불충분한 dAb 로딩과, 뿐만 아니라, 주입된 입자들의 단지 일부분만의 뇌로의 도달을 야기시키는 기타 조직들에 의해 흡취되는 전달 시스템에 기인하는 것으로 추정되었다.

[0309] 따라서, 시스템을 개선하고 정맥내 경로를 통한 뇌로의 효율적 전달을 달성하기 위해, 나노입자내로의 dAb의 로딩을 추가로 개선시키는 것이 필요하다. 이러한 개선은, dAb의 로딩에 관하여 HIP PBCA 시스템보다 월등한 용량을 지니는 것으로 드러난, 중공 PBCA 시스템을 채용함으로써 달성될 수 있다. 생체내에서 충분히 안전하다는 것을 가정할 때, 중공 PBCA 입자는 dAb의 뇌로의 전달에 있어서, HIP PBCA 시스템보다 더 성공적일 수 있다. 이들의 안정성을 보장하기 위해, 더 높은 분자량의 다른 폴리머, 예컨대, PLGA, PLA 또는 PCL와 PBCA의 블렌드를 채용하는 것이 필요할 수 있다. 전달 시스템은 폐길화된(pegylated) 코폴리머의 사용으로 혜택을 얻을 수 있다. 그렇나 폴리머는 혈액 중의 나노입자의 순환 시간을 개선시키고 그에 따라 뇌 전달을 개선시킬 수 있다.

[0310] 전달 시스템을 개선시키는 추가 수단은 뇌 표적화에 관한 이의 메커니즘을 변형시키는 것이다. BBB 상의 표적에 결합하는 리간드를 나타내는 능동적으로 표적화된 나노입자는 뇌 흡취를 개선시키고 부수적으로 기타 조직들에 대한 입자의 소실을 제한할 가능성이 있다. 능동적 표적화를 달성하기 위해, 아마도 나노입자 표면을 광범위하게 폐길화시켜 기타 장기들에 대한 임의의 비특이적 표적화를 제한시킬 필요가 있을 것이다.

[0311] 일반적으로, 본원에 기재된 나노입자 시스템은 뇌로의 도메인 항체의 효율적 전달을 달성시키는 우수한 잠재력을 지니고 있으나, 이러한 유의한 최적화는 여전히 달성될 필요가 있다.

[0312] 실시예 13 - 수정된 HIP 방법을 사용한 PCL 마이크로스피어 중의 도메인 항체의 캡슐화.

[0313] 폴리머 폴리카프로락톤(PCL, Lactel)을 dAb 캡시드화를 위한 HIP 방법으로 마이크로스피어의 생성 및 서방형 폴리머의 사용 둘 모두를 위한 시험 케이스로써 사용하였다. 초기 시험은 공 나노입자와 마이크로스피어 둘 모두를 생성시키기 위해 PCL의 사용을 수용하기 위해 실시예 7과 8에 기재된 수정된 HIP 캡슐화 프로토콜을 사용하였다.

[0314] 초기 제형은 45초 동안 4000-7500rpm의 균질화 속도를 사용하여 상청액으로써 디클로로메탄(DCM) 중의 PCL과, 1% 플루로닉 F68(Sigma)의 100mg/ml 표준 용액을 사용하였으나, 드문 마이크로스피어 또는 나노입자가 만들어졌다(데이터 미제시). 상이한 상청액을 시도하여 해당 방법을 추가로 최적화하였다: 1% 소듐 클레이트(Sigma),



또는 1% 루트롤(Lutrol) F127 폴록사머(Poloxamer) 407(BASF Corp.), 또는 1% 비타민 E TPGS, (d-ALPHA 토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 석시네이트(Peboc/Eastman)(데이터 미제시), 초기의 것을 약간 개선하였으며, 인포폴리머의 양이 10mg/ml로 감소될 때까지, > 20um의 소수의 깨지기 쉬운 거대 마이크로스피어를 광학 현미경하에서 관찰할 수 있었을 때(데이터 미제시), PCL의 대부분은 일단 유기 용매가 증발되었을 때 육안으로 보이는 입자로서 현탁액에서 산출되었다(데이터 미제시). 현탁액을 더 안정화시키기 위해 상기한 실험들로부터 2개의 가장 전도유망한 상청액을 사용함으로써 2%에서 입자 안정성 측면에서 해당 방법을 추가로 개선하였다: 루트롤 F127 폴록사머 407(BASF Corp.) 또는 비타민 E TPGS 및 45초 내지 2분 동안 7500-9000rpm의 균질화 속도. 이 방법을 사용하여, 1  $\mu$ m로 사이징된 입자가 모든 경우에 생성되었고(데이터 미제시), 그러나 아래에 제시한 dAb를 캡시드화하기 위한 프로토콜을 위하여 2분의 균질화와 함께 2% 비타민 E TPGS를 상청액으로써 선택하였다.

- [0315] dAb를 캡시드화시키는, HIP-PCL 마이크로스피어(M/P)의 제조.
- [0316] HIP-PCL 마이크로스피어를 상기 실시예 13의 방법학에 따라 제조하였고 이 프로토콜에 대한 임의의 변형은 아래에 상세히 기술하였다.
- [0317] 사용한 제형:
- [0318] 4개의 PCL(poly-e-caprolactone) 제형을 제조하였다:
- [0319] i) M/P로써 PCL용 HIP를 지니는 공 입자 - 4000 rpm (상청액으로써 2% 비타민 E [TPGS]) - 2 분
- [0320] ii) M/P로써 PCL용 HIP를 지니는 공 입자 - 7500 rpm (상청액으로써 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0321] iii) M/P로써 PCL용 HIP + 분석용 dAb(dAb1)를 지니는 입자 - 7500 rpm (상청액으로써 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0322] iv) M/P로써 PCL용 HIP + 사이징용 dAb(dAb2)를 지니는 입자 - 7500 rpm (상청액으로써 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0323] 필요한 용액:
- [0324] (1) 추출되는 dAb: 항-VEGF(W02008/149147에 개시된 DOM15-26-593.), 배치 TB090220 1.5 mg/ml(14,246 Da) - 4 x 5ml로 사용함(Nanodrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific)를 사용하여 dAb 농도의 실제 재-판독, 실제 농도는 1.04mg/ml로 확정됨)
- [0325] (2) 82:1 HIP 용액(1 ml, 30.58 mg/ml)
- [0326] (3) 산성화된 dAb 용액 (25 mg/ml) N/A
- [0327] (4) 수성상: PBS 중의 1% w/v 텍스트란, 2% w/v 상청액
- [0328] (5) PCL 폴리머를 DCM 중에 용해시킴
- [0329] \*표준 원액 10% 비타민 E [TPGS]
- [0330] DCM 중의 PCL 용액의 제조.
- [0331] 제형 당 DCM에 용해시킨 PCL 10mg을 제공하는 것이 목적이었다 - 용해도는 최대로 약 DCM 중에서 ~100mg이었으나, (S) ~10mg/ml로 더 용해될 수 있었다. 5가지 제형에 대해 충분한 PCL(즉 5ml DCM 중의 50mg)을 제조하였다. 50mg PCL을 계량하여 덜어내고, (실온 - 20°C -으로 가온되었을 때 진공 데시케이터를 개방하고 해동시킴), 계량하고(정밀 저울) - 10 ml 비이커에서 PCL + 4mls DCM을 교반하고 - 커버를 씌운 상태에서 흡 후드에서 유리 스티러와 함께 교반하였다. 용해가 완료되면, 유리 메스실린더에서 측정하고, DCM으로 최대 5ml까지 채우고 난 다음 재-혼합하고(비이커를 교반함), 신속하게 사용하였다.
- [0332] dAb 용액의 농도.
- [0333] 제조를 처음에 RT에서 600rpm으로 밤새(O/N) 실시하고 농도를 보정하기 위해 다시 희석시켰다. 용액을 Vivaspin 농축기(Vivaspin 6, Sartorius, VS0691, MWCO 3,000 PES)를 사용하여 농축시키고 Sorvall legend RT Bench Top 원심분리기의 제조업자의 사용설명서에 따랐다. 농도는 예상된 1.5 mg/ml(4 x Vivaspin에서 5ml로서 20.0 ml)로부터 25 mg/ml(-700  $\mu$ l)까지 변동되었다. 당해 방법은 1000-1500 rpm에서 2시간 및 3000 rpm에서 추가 ~ 1시간 소요되었다. 1 대 75의 희석율의 초기 dAb 400uI는 Nanodrop에 의해 0.56 mg/ml를 제공하였다 - 이후 이것을 25mg/ml로 760uI까지 희석시키고 산을 처리하여 pH를 ~3.7로 감소시켰다. 시제 물질(mock

material)에 산을 처리하여 pH ~2.5로 만들었다. dAb는 25mg/ml, pH ~ 5.0/4.5이었다 - 목적은 pH 3.7로 내리는 것이다 - pH를 pH 2.5 내지 4.5 pH 중이로 확인하였다. 380ul의 dAb를 사용하였고, 예를 들어, 제형 당 9.5mg만을 사용하였다(그리고 1.5mg/ml이 아닌 1 mg/ml의 초기 인풋 농도로 조정하였다).

**표 6. 산성화된 용액의 제조**

제형	공 대조군	dAb 용액
필요한 25.0 mg/ml dAb 용액의 부피 (μl)	0	760, (2x 380)
필요한 불의 부피 (μl)	500.0 x 10	12.0
첨가된 2M HCl 용액의 부피 (μl)	5.0 x 10	6.0
첨가된 1M CaCl <sub>2</sub> 의 부피 (μl) , 임의적, 마지막에 첨가	0	0
첨가후 pH	<=2.5	~3.7

**표 7. HIP 추출액에 관한 제형 및 시약(표준 부피 프로토콜)**

(A) 유기상 dAb

dAb 제형	10-12.0mg dAb, 82:1 HIP, 10 mg PCL
dAb 양 (mg) 또는 w/o dAb	~9.5.
농도 (mg/ml)	25.00
필요한 부피 (μl)	380

(B) 유기상 HIP

HIP AOT 제형	12.0 mg dAb, 82:1 HIP, 10 mg PCL
필요한 AOT 의 농도 (mg/ml)	30.58
필요한 30.58 mg/ml AOT 용액의 부피 (μl)	1000

목적은 dAb(aq):DCM/HIP의 1:2 혼합물을 제조하는 것이었다 - 상기 프로토콜은 1x 혼합물, 즉 ~500ul에 관한 것이다: 1000ul 유기상.

[0342] 표 8: 공 대조군의 제조(유기상).

제형	공 대조군, 82:1 HIP, 100 mg BCA
dAb 양 (mg)	0 단지 PBS 480μl + 산성화를 위한 20μl의 HCl 만 사용
필요한 AOT 농도 (mg/ml)	30.58
필요한 30.58 mg/ml AOT 용액의 부피 (μl)	1000

[0343]

[0344] HIP 작용제로서 도쿠세이트 소듐을 사용한 유기상에서 dAb 또는 시제물(공 입자)의 추출.

[0345] 산성화된 dAb 또는 '시제물' 용액 및 유기상을 2 ml 에펜도르프 튜브에서 혼합하고 수성상에 첨가하였다. 혼합물을 1분 동안 최대 속도로 볼텍스-혼합하였고 이후 5분 동안 Bench 탑 믹서 5432에 두었다. 그 결과 얻은 흰색 혼합물을 50분 동안 최대 속도로 원심분리시켰다(마이크로퓨즈에서 20,817 rcf, 14000rpm). dAb-HIP 복합체는 인터페이스에서 두꺼운 흰색 침전물을 형성하는 것으로 드러났다. 수성상을 취합하고 4°C에 보관하였다. 상부 수성상을 제거하였으며, 보관하였고, 하부 유기상에 당해 절차를 계속하여 적용하였다.

[0346] 유기상에서 HIP-dAb 복합체의 균질화.

[0347] 7-10초 동안 IKA T25 균질화기(폴리트론, 속도 설정)를 사용하여 유기상을 2 ml 에펜도르프 튜브에서 균질화시켰다. 이의 목적은 흰색 침전물(dAb와 HIP 복합체)을 유기 용매(DCM)에서 완전히 균질화시키는 것이었다. HIP-dAb 복합체를 유기상에서 용이하게 가용해화시켜 균질한 것으로 드러난 에멀전을 형성시켰다. 유기상을 총 10초 동안 균질화시켰다. 균질화 및 유기상의 제거후 상기 튜브내에 약간의 침전물이 남아있었다.

[0348] 마이크로스피어의 제조.

[0349] 1 ml 유기상의 균질물을 채취하고 1 m의 DCM(100mg) 중의 PCL을 업 다운 피펫팅으로 혼합하였다. 액체 표면 아래에서 프로브 투입(entry) 시점에 그 결과 얻은 흰색 현탁액(2ml)을 수성상(25 ml 비이커내의 물 중의 10 ml 텍스트란 및 PBS 중의 2% 상청액 용액)에서 피펫팅하였다. Silverson L4RT 균질화기를 사용하여 7,500 rpm(M/P) 또는 4000 rpm(M/P)에서 수성상을 균질화시켰다. 에멀전을 2분 동안 균질화시켰다. 이후 제형을 3시간 동안 교반(속도 설정 4)하면서 홈 후드에서 인큐베이션하여 유기상을 증발시켰다. 상기 속도 설정을 1시간 경과시 3으로 낮추어 인큐베이션하여 에멀전의 과-혼합을 방지하였는데, 이는 상기 과-혼합이 결과적으로 비이커의 표면 상에 회합체의 침착을 초래하기 때문이었다.

[0350] 실시예 14 - 마이크로스피어의 사이징.

[0351] (a) 광 현미경.

[0352] 상기 (i) 내지 (iv)의 모두 4가지 제형을 가시 광선을 사용하여 Nikon Eclipse E400 현미경에서 사이징하였다. 이들 입자들의 이미지를 보여주는 데이터는 도 12에 제시되어 있다. 유사한 크기 범위를 갖는 육안관찰가능한 마이크로스피어는 4가지 제형 모두, dAb를 지니는 그러한 제형 및 dAb를 지니지 않는 그러한 제형 둘 모두에서 관찰가능하였다. 데이터는 마이크로스피어가 이 방법을 사용하여 dAb의 존재시 유사하게 형성됨을 제시한다.

[0353] (b) 다각도 정지 광 산란(Multi-angle static light scattering).

[0354] 모두 4가지 샘플을 Micromeritics Saturn DigiSizer 5200, 고 해상력 입자 크기 분석기(High Definition Particle Size Analyser)에서 사이징하였다.

[0355] 탈기된 PBS의 매트릭스에서(which needs 50-100%의 제형을 요구함) 5-30%, 바람직하게는 15% 초과와 옅페(obscuration)를 이루기 위해 상기 마이크로-입자 사이징으로부터의 충분한 물질을 Saturn DigiSizer 5200에 장착된 저-부피 샘플 처리 유닛으로 로딩함으로써 샘플을 사이징하였다. 이후 샘플을 1.476의 굴절 지수의 실제 공간분할(partitioning) 및 0.0001의 굴절 지수의 가상 공간분할을 사용하여 폴리카프로락톤 분석 모델을 사용하여 분석하였다. 유속은 6L/분이었고, 정지 빔 각도는 45° 이었으며, 매질(media)은 PBS이었고, 카운트는 3회 반복하여 실행하였다. 부피와 개수 분포 둘 모두를 기록하였고, 종합 기록, 누적 그래프 및 빈도 그래프로서

데이터를 획득하였으며, 당해 방법에 관한 상세한 사항은 Micromeritics Saturn Digisizer 5200 Operators Manual V1.12(March 2007)과 Quick 레퍼런스 가이드를 참조하라.

[0356] 데이터는 적절한 제형에 관하여 제시되어 있다: 입자 크기에 대한 입자 개수의 빈도를 작도한 그래프로서 도 13(a) 내지 (d)의 (i) 내지 (iv)에 제시되어 있음. 이러한 그래프에 상응하는 하기 데이터를 참조하라.

도 13 a

요약 기록					
샘플					
샘플 농도 : 0.01059 %					
입페 : 28.1 %					
부피 분포 기하 통계					
평균	8.355	표준 편차	2.928	모드	19.00
중앙값	9.754		3.951	표준 편차 로그	0.382
비대칭도	-0.257		0.108	첨예도	-0.435
				표준 편차	4.917
					0.047
					0.180
개수 분포 기하 통계					
평균	1.383	표준 편차	0.079	모드	1.000
중앙값	1.033		0.009	표준 편차 로그	0.214
비대칭도	1.594		0.388	첨예도	2.001
					2.445

[0357]

도 13

(b)

요약 기록					
샘플					
샘플 농도 : 0.00284 %					
입페 : 16.7 %					
부피 분포 기하 통계					
평균	8.368	표준 편차	2.943	모드	2.239
중앙값	9.304		3.819	표준 편차 로그	0.521
비대칭도	0.523		0.459	첨예도	-0.379
					0.178
개수 분포 기하 통계					
평균	1.231	표준 편차	0.018	모드	1.000
중앙값	1.040		0.013	표준 편차 로그	0.141
비대칭도	1.354		0.198	첨예도	4.737
					1.309

[0358]

도 13 (c)

요약 기록					
샘플					
샘플 농도 : 0.00771 %					
입페 : 21.6 %					
부피 분포 기하 통계					
평균	9.248	표준 편차	7.288	모드	2.239
중앙값	10.45		7.174	표준 편차 로그	0.421
비대칭도	-0.224		0.252	첨예도	-0.185
					3.125
개수 분포 기하 통계					
평균	1.255	표준 편차	1.046	모드	1.000
중앙값	1.048		0.731	표준 편차 로그	0.198
비대칭도	1.711		0.234	첨예도	3.195
					1.059

[0359]

도 13 (d)

요약 기록					
샘플					
샘플 농도 : 0.01000 %					
염색 : 20.1 %					
부피 분포 기하 통계					
평균	8.355	표준 편차	2.328	모드	10.30
중앙값	9.754		3.854	표준 편차 로그	0.382
비대칭도	-0.287		0.186	첨예도	-0.438
				표준 편차	4.917
					0.047
					0.189
개수 분포 기하 통계					
평균	1.003	표준 편차	0.070	모드	1.000
중앙값	1.003		0.000	표준 편차 로그	0.214
비대칭도	1.504		0.288	첨예도	2.091
				표준 편차	0.000
					0.022
					2.445

평균 입자 크기의 가장 명확한 측정은 하기 평균 입자 크기를 제공하는 기하 평균 개수 분포로부터 얻어진다:

i) M/P로서 PCL용 HIP를 지니는 공 입자 - 4000 rpm(상청액으로서 2% 비타민 E[TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.231

ii) M/P로서 PCL용 HIP를 지니는 공 입자 - 7500 rpm(상청액으로서 2% 비타민 E[TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.181

iii) M/P로서 PCL용 HIP + 분석용 dAb를 지니는 입자 - 7500 rpm(상청액으로서 2% 비타민 E[TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.355

iv) M/P로서 PCL용 HIP + 사이징용 dAb2를 지니는 입자 - 7500 rpm(상청액으로서 2% 비타민 E[TPGS])- 2분 평균 입자 크기 1.393

이러한 조건하에서 더 낮은 속도가 조금 더 큰 마이크로스피어를 생성시켰지만, 영향은 크지 않았다는 결론을 내렸다 - 7,500 rpm에서 균질화에 관하여 기재된 조건은 dAb의 존재시 1.4  $\mu$ m의 평균 직경을 지니는 마이크로스피어를 생성시켰는데, 이것은 이 방법에서 공 입자 보다 조금 더 큰 크기이었다.

실시에 15 - dAb를 함유하는 HIP-PCL 마이크로스피어의 분석.

dAb를 함유하는 HIP PCL 마이크로스피어를 상기 실시에 13에 기재한 대로 제조하였다. 각 제형(dAb1 및 dAb2) 50  $\mu$ l를 채취하였고, 하기한 것 중 어느 하나를 실시하였다:

i) 3K rpm으로 5' 동안 1.5ml 마이크로퓨즈 튜브에서 진탕시켜 상청액(S)을 생성시킴 - 30  $\mu$ l를 새로운 마이크로퓨즈 튜브에 옮기고 펠렛(P) 분획을 50  $\mu$ l PBS에 재현탁시킴;

ii) 13K rpm으로 5' 동안 1.5ml 마이크로퓨즈 튜브에서 진탕시켜 상청액(S)을 생성시킴 - 30  $\mu$ l를 새로운 마이크로퓨즈 튜브에 옮기고 펠렛(P) 분획을 50  $\mu$ l PBS에 재현탁시킴;

iii) 입자가 컬럼내에 그대로 존재하기 때문에 5K rpm으로 5' 동안 Vivaspin 500(1,000,000 분자량 컷오프)에서 진탕시켜 임의의 통합된 dAb를 제거시키고 상청액(F)으로서 50  $\mu$ l PBS를 통과시키고, 취합함. Vivaspin 500(Sartorius stedim biotech)을 제조업자의 사용설명서에 따라 사용하였다.

21  $\mu$ l의 샘플을 8  $\mu$ l의 4x 로딩 안료 내지 3  $\mu$ l의 10x 환원제에 첨가하여 32  $\mu$ l의 최종 부피를 생성시킴으로써 로딩용 샘플을 제조하였으며, 상기 최종 부피에서 10  $\mu$ l를 5분 동안 PCR 블록(PTC-100, MJ research Inc)에 장치된 96웰 PCR 플레이트에서 80℃로 가열한 후 로딩시켰다.

이후 샘플을 제조업자의 사용설명서에 따라 35분 동안 MES SDS(2-N 몰포리노 에탄설폰산, 소듐 도데실 설페이트) 완충액(invitrogen) 중에서 전개 겔에 로딩하고, SimplyBlue SafeStain 프로토콜(invitrogen)의 마이크로웨이브 매개 버전을 이용하여 염색시켰다. 또한 캡시드화되지 않은 dAb의 로딩 표준물질들, 즉 샘플 제조에서 상기한 것과 같이, 희석된, 500ng/ $\mu$ l, 125ng/ $\mu$ l, 31.25ng/ $\mu$ l 및 7.8ng/ $\mu$ l의 10  $\mu$ l 로딩물로부터의 3.28  $\mu$ g, 0.82  $\mu$ g, 0.21  $\mu$ g 및 0.05  $\mu$ g로서, 상기 겔 상에서 동시에 전개시켜 농도 계산을 용이하게 하였다. 염색된 겔의 이미지는 도 14에 제시되어 있다.

겔을 아래와 같이 세팅하였다:

[0375] 레인 1: 전체 dAb1, 레인 2: dAb1 3K S, 레인 3: dAb1 3K P, 레인 4: dAb1 13K S, 레인 5: dAb1 13K P, 레인 6: dAb1 F, 레인 7: 전체 dAb2, 레인 8: dAb2 3K S, 레인 9: dAb2 3K P, 레인 10: dAb2 13K S, 레인 11: dAb2 13K P, 레인 12: dAb2 F, 레인 13: 분자 마커 - SeeBlue Plus 2 사전-염색된 표준물질(invitrogen), 분자량(kd), 레인 14: 3.28 µg dAb 표준물질, 레인 15: 0.82 µg dAb 표준물질, 레인 16: 0.21 µg dAb 표준물질, 레인 17: 0.05 µg dAb 표준물질. 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났음을 입증하였다. 또한 겔은 dAbs가 온전하였고, 이들은 입자 제조 과정으로 인해 단편화되지 않았음을 입증하였다.

[0376] 상기 전체, 상청액 및 PCL HIP 입자의 펠렛 분획 중의 상기 양을 밴드 캡처 및 Labworks 4.6 software (UVP)의 1D 겔 정량화 패키지를 사용하여 dAb1에 관해 알아내었다. 분석용 이미지를 흰색 광 아래에서 Olympus 카메라에 적합화된 비전 워크 스테이션(Vision works station)을 사용하여 캡처하였다. 데이터는 표 9에 제시되어 있다.

[0377] 표 9. PCL-HIP 마이크로스피어 중의 dAb 로딩의 결정

레인	dAb 밴드 강도	dAb (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*

[0378]

[0379] 레인 1: 전체 dAb1, 레인 2: dAb1 3K S, 레인 3: dAb1 3K P, 레인 4: dAb1 13K S, 레인 5: dAb1 13K P, 레인 6: dAb1 F, 레인 7: 전체 dAb2, 레인 8: dAb2 3K S, 레인 9: dAb2 3K P, 레인 10: dAb2 13K S, 레인 11: dAb2 13K P, 레인 12: dAb2 F, 레인 13: 분자 마커 - SeeBlue Plus 2 사전-염색된 표준물질(Invitrogen), 분자량(kd), 레인 14: 3.28 µg dAb 표준물질, 레인 15: 0.82 µg dAb 표준물질, 레인 16: 0.21 µg dAb 표준물질, 레인 17: 0.05 µg dAb 표준물질.

[0380] dAb의 강도에 관한 겔 판독치를 밴드 강도(데이터 미제시)에 대한 dAb 표준물질의 작도를 이용하여 µg 단위의 dAb 양으로 전환하였다(표 9).

[0381] 평균 전체 dAb 제형(레인 1과 7)을  $3.5 \mu\text{g} + 4.5 \mu\text{g} / 2 = 4 \mu\text{g}$ 로 판독하였다 - 샘플을 상기 로딩에서 21/32로 희석시켰고, 그에 따라  $10 \mu\text{l}$  중의 총 dAb =  $32/21 \times 4 = 6 \mu\text{g}$  이었다.

[0382] dAb1 상청액(레인 2, 4 및 6) =  $1.0 + 0.9 + 0.73 / 3 = 0.9 \mu\text{g}$ , 희석에 관해 보정된 값은  $1.4 \mu\text{g}$

[0383] dAb1 펠렛(레인 3 및 5) =  $3.0 + 3.1 / 2 = 3.0 \mu\text{g}$ , 희석에 관해 보정된 값은  $4.6 \mu\text{g}$ .

[0384] 이러한 도면을 이용하여 분획은  $6 \mu\text{g}$ 에서 전체 dAb = dAb1 상청액( $1.4 \mu\text{g}$ ) + dAb1 펠렛( $4.6 \mu\text{g}$ )과 완전히 동일한 것으로 드러났으며, 캡시드화된 dAb의 백분율은 전체 dAb의 77%이었다( $4.6/6.0$ ).



- [0385] 그러나, 캡시드화된 인풋 dAb - 10  $\mu$ l (9.5  $\mu$ g)의 백분율은  $4.6/9.5 \times 100 = 48\%$ 이었다.
- [0386] 실시예 16 - HIP PCL 마이크로스피어로부터의 dAb의 방출.
- [0387] 기능적 활성의 분석을 위한 HIP PCL 입자로부터 dAb를 방출시키기 위해 - 50  $\mu$ l 분취액의 샘플을 dAb1 및 dAb2 HIP PCL 제형에서 취득하고 1.5ml 에펜도르프에 담았다. 이들을 1 ml의 PBS로 2회(x) 세척하고, 에펜도르프 5417C 마이크로퓨즈에서 5분간 5000 rpm으로 진탕시켰다. 펠렛을 50  $\mu$ l PBS에 재현탁시키고 Techn 가열 블록에서 56℃에서 0, 20, 40 및 60분의 시간 경과로 인큐베이션하였다. 샘플을 이후 5분간 5000 rpm으로 진탕시켜 가라 앉히고 30  $\mu$ l의 상청액(S)을 옮기고 분석을 위해 얼음에 두었다. 이후 펠렛(P)을 건조시키고 50  $\mu$ l로 재현탁시켰다.
- [0388] 모든 분획을 겔 분석에 적용하였다 - 방출된 상청액을 한 겔상에서 분석하고, 방출된 펠렛을 또 다른 겔 상에서 분석하였다. 상청액 겔은 도 15에 도시되어 있다. 로딩을 도 14의 초기 분석 겔에 대하여 기재한 것과 같이 설정하였다.
- [0389] 방출된 상청액 및 PCL HIP 입자의 펠렛 분획 중의 물질의 양을 밴드 캡처 및 Labworks 4.6 software (UVP)의 1D 겔 정량화 패키지를 사용하여 dAb1 및 dAb2에 대해 알아내었다. 분석용 이미지를 흰색 광 아래에서 Olympus 카메라에 적합화된 비전 워크 스테이션을 사용하여 캡처하였다.
- [0390] dAb의 강도에 고나한 겔 판독치를 ng 단위의 dAb 양으로 전환하였는데(표 10, 컬럼 2), 밴드 강도(데이터 메시지)에 대한 dAb 표준물질의 그래프 플롯을 사용하였다.
- [0391] 입자 중의 약 882-1000 ng의 펠렛 공급원으로부터, 이 과정에 의해 방출된 물질의 양은 120-189 ng(데이터 메시지)이었음을 주목하라 - 여기서 12-19%의 물질이 방출되었다.
- [0392] ELISA에 의한 PCL HIP 입자로부터 방출된 dAb의 기능적 분석.
- [0393] ELISA 검정 프로토콜은 재조합 VEGF에 결합하는 가용성 도메인 항체(VEGF dAb)의 활성을 측정하기 위한 결합 검정을 기술한다. 이 검정은 VEGF dAb를 포획하기 위해 ELISA 플레이트(Nunc Immunosorb)의 표면에 코팅된 재조합 인간 VEGF (R&D Systems)를 사용한다. 플레이트를 세척하여 임의의 비결합된 dAb를 제거하였다. 결합된 dAb는 VEGF dAb(9E10, Sigma)의 Myc 태그에 대한 항체를 사용하여 후속하여 검출된다. 과량의 항체를 세척에 의해 제거하고 결합된 항-myc 항체를 항-마우스 IgG 퍼옥시다아제 컨주게이트(Sigma)를 사용하여 검출하였다. 이 검정을 TMB 용액을 사용하여 진행시키고 산을 사용하여 중단시켰다. 이 검정으로부터 얻은 신호는 dAb의 양에 비례하였다.
- [0394] ELISA 플레이트를 아래에 나열된 샘플과 또한 0분후 '방출된' dAb1과 dAb 2 샘플을 분석하기 위해 설정하였다. 옮겨진 방출된 샘플로부터 30  $\mu$ l - 21  $\mu$ l의 샘플을 SDS PAGE 분석용으로 사용하였고 9  $\mu$ l를 1/100, 1/1000 및 1/10000의 희석물을 제조하기 위해 남겨 두었다.

[0395] 계산된 총 방출된 dAb와 ELISA로 측정한 기능적으로 활성있는 dAb의 비교가 표 10에 제시되어 있다.

[0396] 표 10 - 기능적 활성 및 총 방출 dAb의 정량

샘플	SDS PAGE 강도 전환으로부터 보정된 dAb ng/ $\mu$ l	기능적 ELISA로부터 보정된 dAb ng/ $\mu$ l	활성 dAb 백분율
dAb1 - 20 분	20.57143	33	~100
dAb1 - 40 분	28.8	22	76
dAb1 - 60 분	18.59048	30	~100
dAb 2 - 20 분	18.28571	14	77
dAb2 - 40 분	18.28571	11	61
dAb2 - 60 분	21.33333	17	80

- [0397]
- [0398] 이러한 방출 절차를 이용하여 ELISA로 측정할 때 캡시드화된 보유 활성의 60-100%와 일치하는 범위에서 마이크로스피어로부터 방출된 물질로부터 기능적 활성 dAb를 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0399] 총 dAb 대 활성 dAb는 방출된 dAb, 열 불활성화 또는 임의의 dAb의 파괴에 따라 유동적일 수 있지만, 변이

(variance)는 유의한 차이인 것으로 고려되지 아니한다.

[0400] 서열 목록.

SEQ ID NO.	세부사항
1	중쇄 아미노산 서열 인간화된 작제물 H28 항- NOGO 항체
2	2A10 경쇄 아미노산 서열 인간화된 작제물 L16 항-NOGO항체
3	중쇄 인간화된 DNA 작제물 H28 항-NOGO 항체
4	2A10 경쇄 인간화된 DNA 작제물 L16 항-NOGO 항체
5	성숙한 H2 중쇄 아미노산 서열 , (Fc 돌연변이된 이중 돌연변이 볼드(bold))베타-아말로이드 항체
6	성숙한 경쇄 아미노산 서열 베타-아말로이드 항체
7	성숙한 H11 중쇄 아미노산 서열
8	성숙한 L9 경쇄 아미노산 서열
9	다라진(Dalargin) 헥사펩티드
10	DOM15-26-593 VEGF dAb 아미노산 서열
11	CvL1 가변 영역 아미노산 서열 MAG 항체
12	BvH1 가변 영역 아미노산 서열 MAG 항체
13	H2 전장 DNA 베타-아말로이드 항체
14	최적화된 L1 경쇄 DNA 베타-아말로이드 항체
15	L1 전장 DNA 베타-아말로이드 항체

[0401]

[0402]

서열

SEQ ID NO. 1: 중쇄 인간화된 작제물 H28

MGWSCIIFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHW  
VRQAPGGQLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTA  
VYYCELMQGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 2: 2A10 경쇄 인간화된 작제물 L16

MGWSCIIFLVATATGVHSDIVMTQSPLSNPVTLGQPVSISCRSSKSLLYKDGKTYLN  
WFLQRPGSQPLLIIYLMSTRASGVDPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ  
QLVEYPLTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 3: 중쇄 인간화된 작제물 H28

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC  
TCCCAGGTGCAGCTGGTGCACTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT  
CAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTACCAGCTACTGGATGC  
ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATCGAAATATTAAT  
CCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACCATG  
ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC  
TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAAGTGTGACAGGGCTACTGGGGCCAGG  
GAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
TGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCC  
TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT  
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC  
ATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG  
CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATC

[0403]

GCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT  
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAG  
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT  
CCTCACCGTCTTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG  
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG  
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG  
ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGA  
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC  
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA  
ATGA

SEQ ID NO. 4: 2A10 경쇄 인간화된 작제물 L16

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC  
TCCGATATTGTATGACCCAGTCTCCACTCTCCAACCCCGTCACCCTTGGACAG  
CCGGTCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAG  
ACATACTTGAATTGGTTTCTCCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT  
ATTTGATGTCCACCCGTGCATCTGGGGTCCCAGACAGATTACGCGCGGTGGG  
TCAGGCATGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGG  
GGTTTATTACTGCCAACAACCTTGTAGAGTATCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGAC  
CAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC  
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCTGTGAATAA  
CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATC  
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA  
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC  
TACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT  
CAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO. 5: 성숙한 H2 중쇄 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKLEWVSFISNLA  
YSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTC  
PPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 6: 성숙한 경쇄 아미노산 서열

[0404]

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRVSQSLLHSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGKTKEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 7: 성숙한 H11 종채 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKSGSFNIKVVYVHWLRQLPGKGLEWIGRIDPEN  
GETIYTPKFQDKATLTVDSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGLTVTS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 8: 성숙한 L9 경채 아미노산 서열

DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS  
NLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 9: 다라진( Dalargin )

YAGFLR

SEQ ID NO. 10: DOM15-26-593 VEGF dAb 서열:

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKLEWVSEISPSG  
SYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLT  
VTVSSAAAEQKLISEEDLN

SEQ ID NO. 11: C<sub>v</sub>L1 가변 영역

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW  
ASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYLSLTFGQGTKLEIKR  
TV

SEQ ID NO. 12: B<sub>v</sub>H1 가변 영역

[0405]

QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGGLEWMGWINTY  
TGEPTYADDFTRFVFLSDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYV  
MDYWGGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO. 13: H2 전장 DNA 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAAT  
TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCC  
AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG  
GACACGGCTGTGTATTACTGTGTGACGGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA  
GGGCACACTAGTACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC  
CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG  
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCG  
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC  
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC  
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT  
TGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA  
ACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC  
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC  
GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA  
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  
GCGTCTCACCCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC  
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGA  
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCA  
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA  
GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT  
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA  
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG  
GGTAAA

SEQ ID NO. 14: 최적화된 L1 경쇄 DNA

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCCGTACCCCTGGCGAGCC  
CGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCTACA  
CCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCT  
ACAAGGTGTCCAACCGTTTCAGCGGCGTGCCTGATAGATTACGCGGCAGCGGC  
TCCGGCACCGGACTTCAACCTGAAGATCAGCAGAGTGAGGCGCGAGGATGTGGG  
CGTGTACTACTGCTCCAGACCAGACAGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGAA  
CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC  
CCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAA  
CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGC  
AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC  
CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA

AGGTGTACGCCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG  
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO. 15: L1 전장

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCG  
GCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCT  
ATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATA  
AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG  
GCACAGATTTTACACTGAAATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTT  
ATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACAGTTCGGCGGAGGGACCAAGG  
TGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTTCCCGCATCTG  
ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA  
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTA  
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
CTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA  
GGGGAGAGTGT

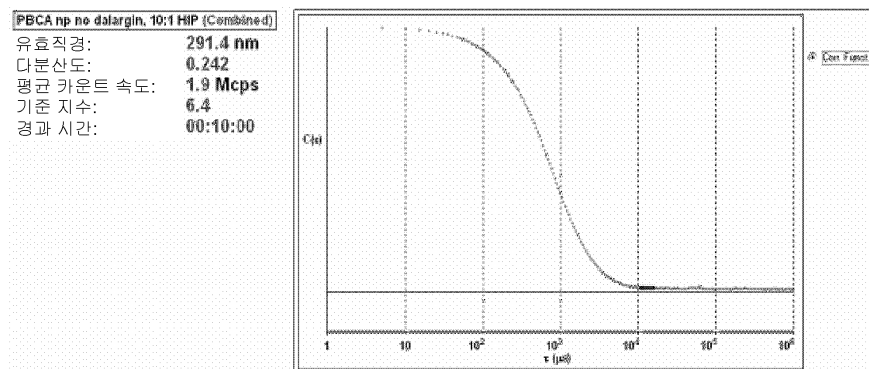
[0406]

[0407]



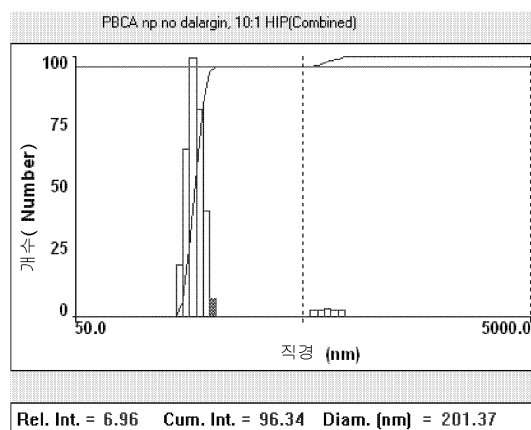
# 도면

## 도면1a

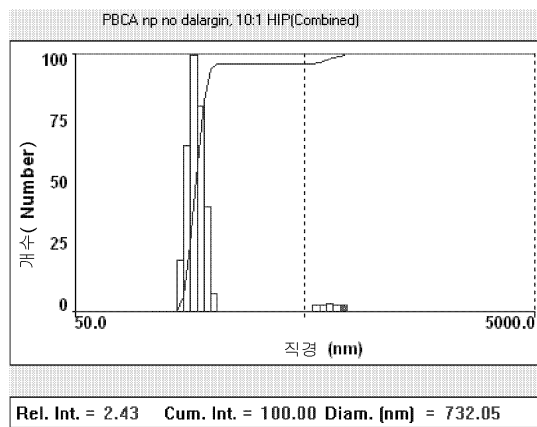


시행	유효 직경	Half width (nm)	다분산도	기준 지수
1	302.4	135.1	0.200	8.9
2	290.7	151.0	0.270	10.0
3	291.0	131.7	0.205	7.6
4	293.1	149.2	0.209	6.2
5	288.4	149.4	0.260	8.5
6	289.2	146.8	0.241	6.6
7	320.1	138.9	0.188	6.7
8	281.3	133.7	0.256	7.9
9	293.6	143.1	0.238	6.7
10	282.7	147.5	0.272	7.4
Mean	294.3	142.6	0.237	8.5
Std. Error	3.5	2.3	0.010	0.2
Combined	291.4	143.2	0.242	6.4

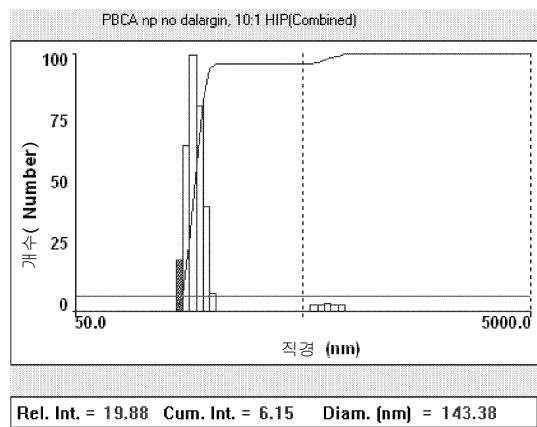
## 도면1b



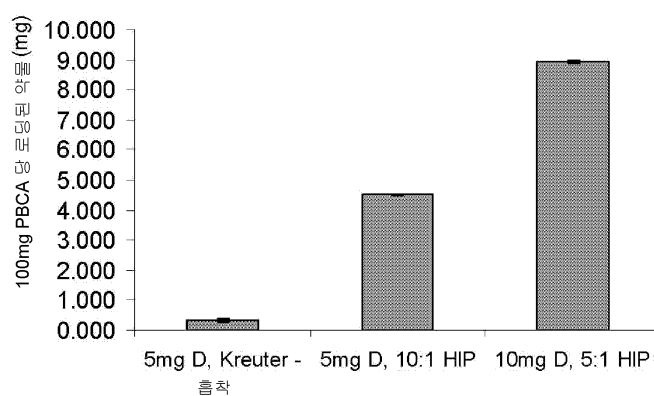
도면1c



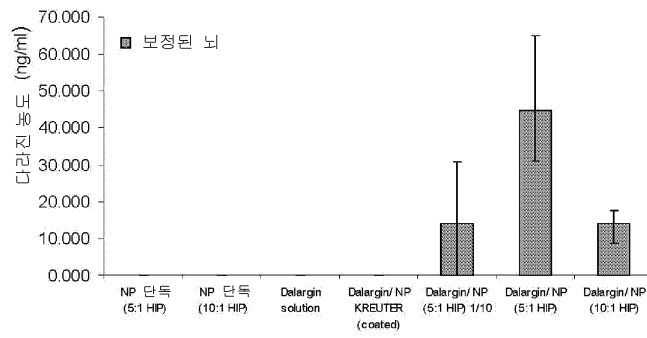
도면1d



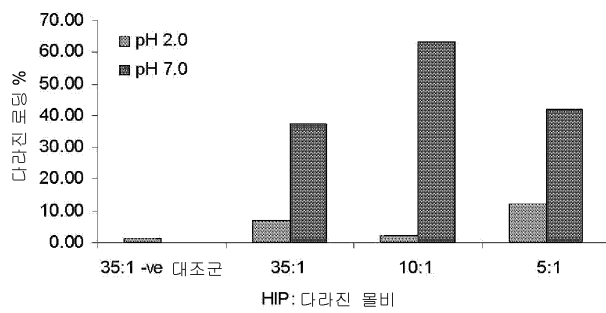
도면2



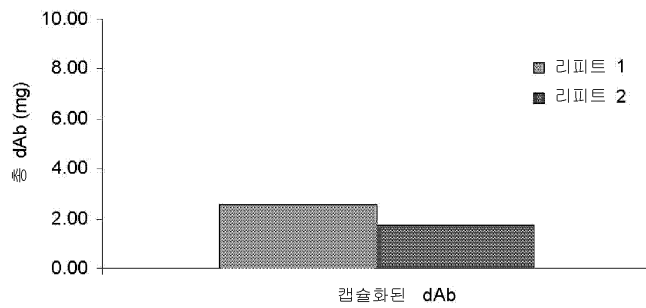
도면3



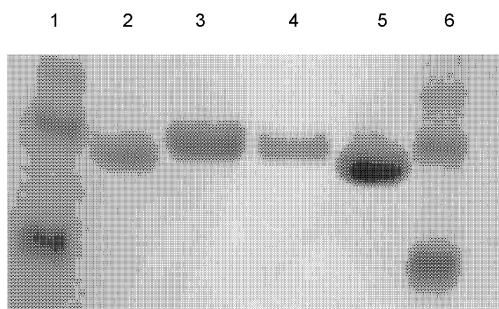
도면4



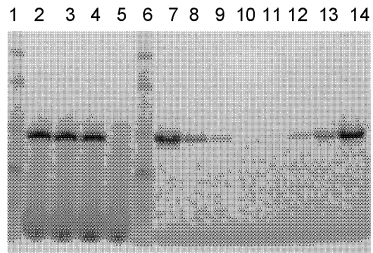
도면5



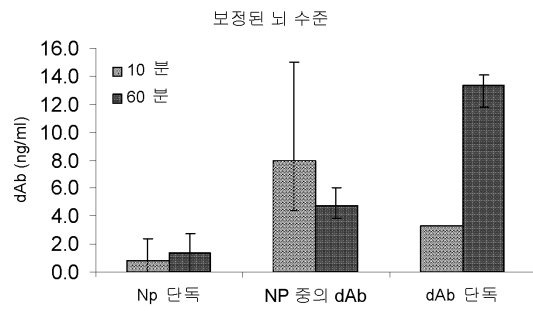
도면6



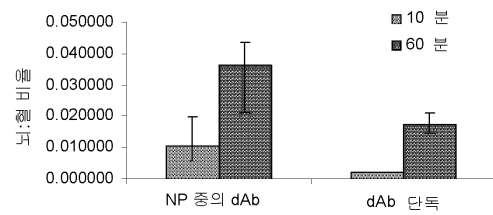
도면7



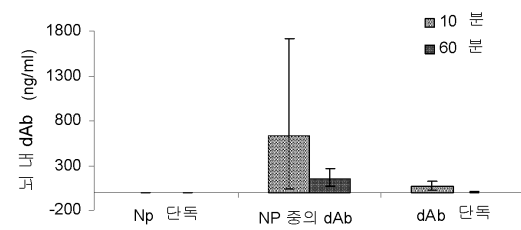
도면8



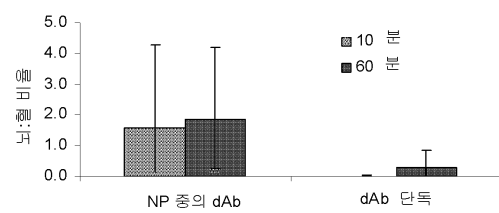
도면9



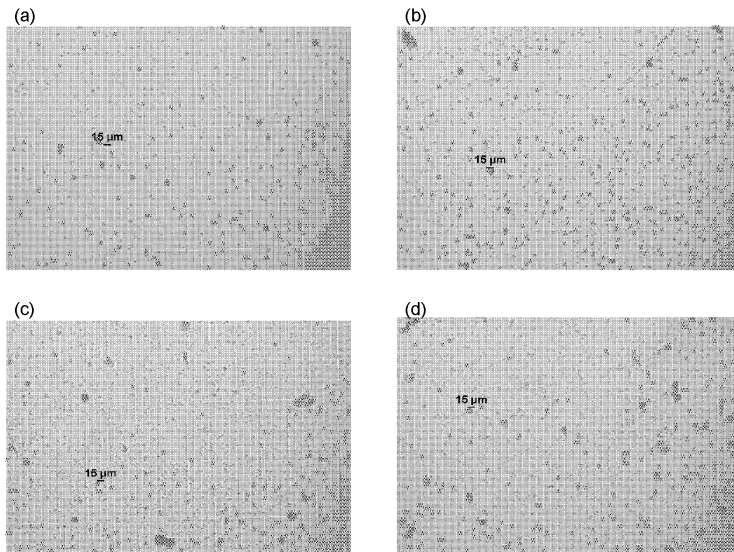
도면10



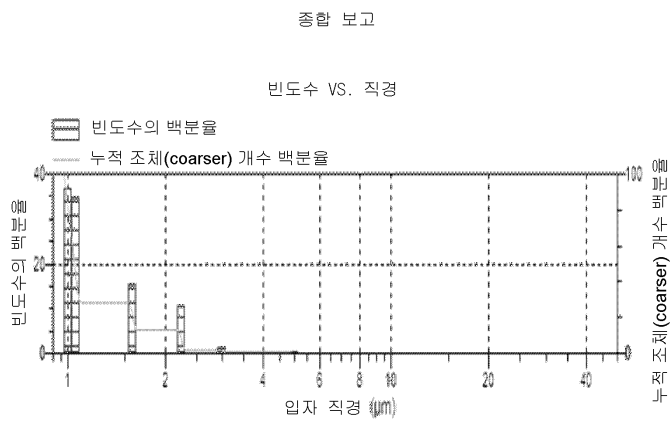
도면11



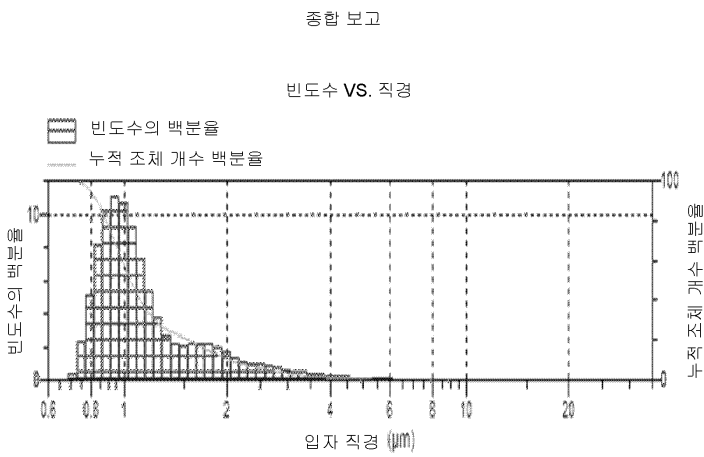
도면12



도면13a



도면13b

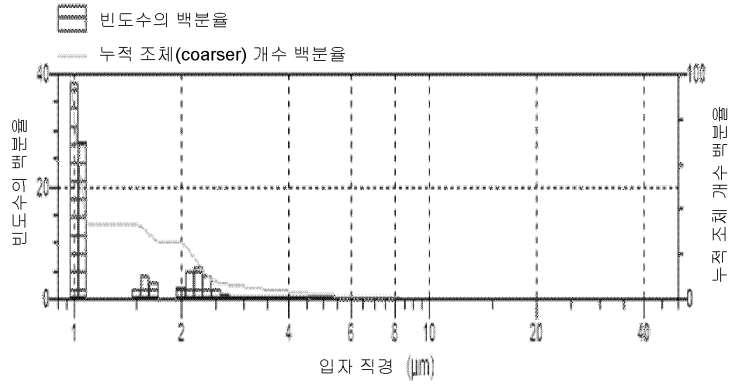




도면13c

종합 보고

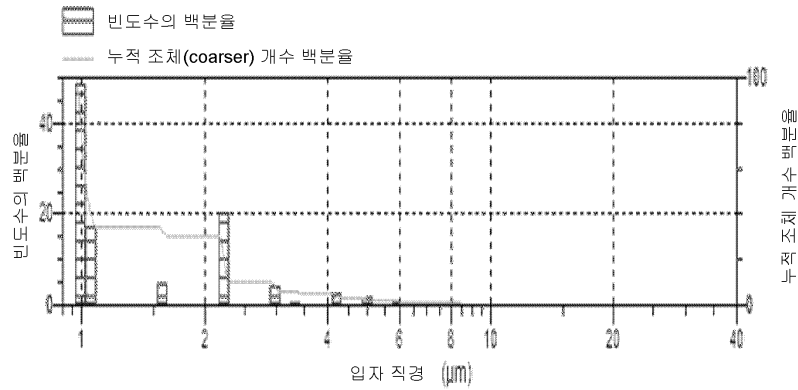
빈도수 VS. 직경



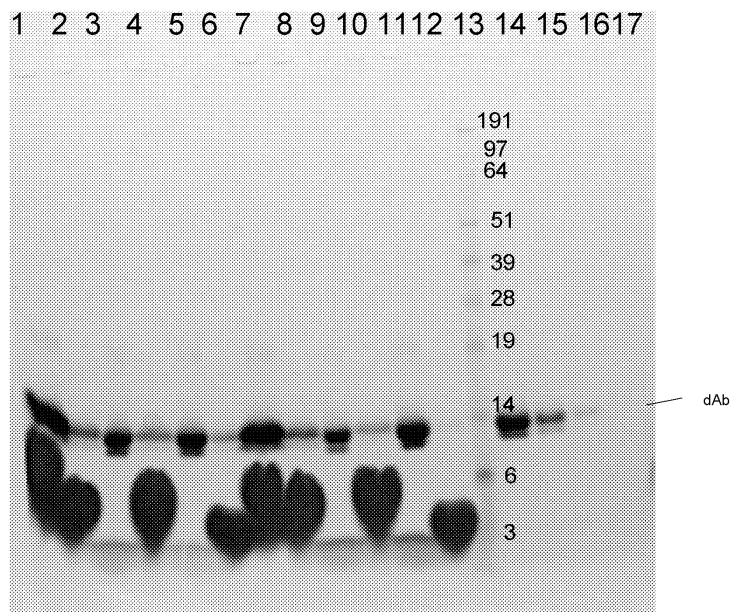
도면13d

종합 보고

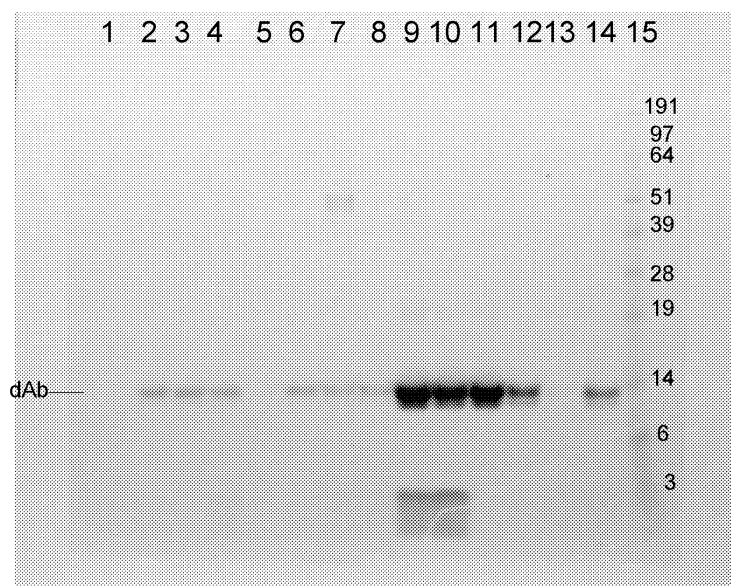
빈도수 VS. 직경



도면14



도면15



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> PAPANICOLAOU, Irene

<120> Encapsulation of biologically active  
agents

<130> PB63616

<150> US61/050775

<151> 2008-05-06

<150> US61/074171

<151> 2008-06-20

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo sapiens

<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  
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 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> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens  
 <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



130 135 140  
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165 170 175  
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 180 185 190  
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 195 200 205  
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220  
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235  
 <210> 3  
 <211> 1389  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Humanised sequence of mus musculus and homo  
 sapiens

<400> 3  
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120  
 tgcaaggcat ctggatacac cttcaccagc tactggatgc actgggtgcg acaggccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat cggaaatatt aatcctagca atggtgtgtac taactacaat 240  
 gagaagttca agagcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agcctacatg 300  
  
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgaact gatgcagggc 360  
 tactggggcc agggaacact agtcacagtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420  
 ttccccctgg caccctcttc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggtgcctg 480  
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540  
 ggcggtgcaca cttccccgcg tgtctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg 600  
 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 720  
tgcccaccgt gccagcacc tgaactcgcg ggggcaccgt cagtcttcct cttccccca 780

aaaccaagg acacctcat gatctcccgg accctgagg tcacatgctg ggtggtggac 840  
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900  
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 960  
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac 1020  
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctcaaag ccaaaggga gccccgagaa 1080  
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1140  
acctgcctgg tcaaaggttt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200  
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320  
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380  
ggtaaatga 1389

<210> 4

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<400> 4

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgat 60  
attgtgatga ccagctctcc actctccaac cccgtcacc ttggacagcc ggtctccatc 120  
tcctgcaggt ctagtaagag tctctatat aaggatggga agacatactt gaattggttt 180

ctccagagge caggccaate tccacagctc ctaatttatt tgatgtccac ccgtgcatct 240  
ggggtcccag acagattcag cggcgggtggg tcaggcactg attcacact gaaaatcagc 300  
agggtggagg ctgaggatgt tgggttttat tactgccaac aacttgtaga gtatccgctc 360  
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgtacgg tggtgcacc atctgtcttc 420  
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480  
aataacttct atccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggacaacgc cctccaatcg 540  
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600

agcacccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag 717

<210> 5

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<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  
 260                      265                      270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 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  
 385                      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> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<400> 6

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

1 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

65 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



145                      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  
                                  180                      185                      190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                                  195                      200                      205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                                  210                      215

<210> 7

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo  
                                  sapiens

<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			
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  
 385 390 395 400  
 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<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

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<400> 9

Tyr Ala Gly Phe Leu Arg

1 5

<210> 10

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo sapiens

<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

50                      55                      60  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65                      70                      75                      80  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95  
Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110  
Arg Thr Val

115

<210> 12

&lt;211&gt; 126

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo sapiens

<400> 12

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr

20					25					30						
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
35					40					45						
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
50					55					60						
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	

85                  90                  95

Ala Arg Asn Pro Ile Asn Tyr Tyr Gly Ile Asn Tyr Glu Gly Tyr Val

100                  105                  110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser



115	120	125
-----	-----	-----

<210> 13

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo sapiens

<400> 13

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag tctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180

gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcggggacc 300

tggtttgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgagcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct gtcctacagt cctcaggact ctactcctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660

actcacat gccaccgtg cccagcacct gaactcgcgg gggcacccgc agtcttcctc 720

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac tggtgtaatg gcaaggagta caagtcaag 960

gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctctc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 14

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<400> 14

gacatcgtga tgacccagag ccccttgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccgccagc 60  
atcagctgta gaggtagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgcactgg 120  
tatctgcaga agcctggcca gagccctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180  
agcggcgtgc ctgatatgatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240  
agcagagtgg aggccgagga tgtgggcgtg tactactgct cccagaccag acacgtgcct 300  
tacacctttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgta cggtagccgc cccagcgtg 360  
ttcatcttcc ccccagcga tgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420

ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa tgcctgcag 480  
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540  
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600  
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 15

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanised sequence of mus musculus and homo

sapiens

<400> 15

gatatgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60  
atctcctgca gaggtagtca gagcctttta cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 120  
  
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180  
tctgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatcttac actgaaaatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tggtgggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300

tacacgttcg gcggaggac caagtgga atcaaacta cggggctgc accatctgc 360  
 ttcatttc ccgcatctga tgagcagtg aaatctgga ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggacaa cgcctccaa 480  
 tcgggtaact ccgaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657