

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0015604 (43) 공개일자 2011년02월16일
(51) Int. Cl. <i>A61K 9/51</i> (2006.01) <i>A61K 9/50</i> (2006.01) <i>A61K 47/34</i> (2006.01) <i>A61K 47/30</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-7027425 (22) 출원일자(국제출원일자) 2009년05월05일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2010년12월06일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/055435 (87) 국제공개번호 WO 2009/135852 국제공개일자 2009년11월12일 (30) 우선권주장 61/050,775 2008년05월06일 미국(US) 61/074,171 2008년06월20일 미국(US)	(71) 출원인 글락소 그룹 리미티드 영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포오드 버클리 애 비뉴 글락소 웰컴 하우스 (72) 발명자 비톤, 앤드류 영국 에스지1 2엔와이 스티븐에이지 허트포드셔 건넬스 우드 로드 글락소스미쓰클라인 캐치폴, 이안 리차드 영국 에스지1 2엔와이 스티븐에이지 허트포드셔 건넬스 우드 로드 글락소스미쓰클라인 (뒷면에 계속) (74) 대리인 남상선

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 생물학적 활성제의 캡슐화

(57) 요약

본 발명은 혈뇌장벽을 거친 전달을 위한, 캡슐화된 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질을 포함하는 미립자 담체를 제공한다. 또한, 혈뇌장벽을 거쳐 나노입자 내 단백질의 전달 방법 및 이러한 조성물의 치료에의 용도를 제공한다.

(72) 발명자

고우그, 제랄드 웨인

영국 에스지1 2엔와이 스티븐에이지 허트포드셔 건
넬스 우드 로드 글락소스미쓰클라인

파파니콜라우, 이레느

영국 에스지1 2엔와이 스티븐에이지 허트포드셔 건
넬스 우드 로드 글락소스미쓰클라인

특허청구의 범위

청구항 1

혈액으로부터 뇌까지 혈뇌장벽(blood brain barrier)을 거쳐 단백질을 전달하기 위한, 입자 형성 물질 및 단백질을 포함하는 나노입자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단백질이 항원 결합 분자인, 나노입자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 도메인을 포함하는, 나노입자.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 항체인, 나노입자.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 도메인 항체인, 나노입자.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 중추신경계에서 발견되는 표적에 결합하는, 나노입자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단백질이 NOGO, β -아밀로이드 또는 미엘린 관련 당단백질(Myelin associated glycoprotein)에 결합하는, 나노입자.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 나노입자를 포함하는 조성물로서, 개수 기준으로(by number) 상기 조성물 내의 나노입자의 90% 이상이, 동적 광 산란 기법(dynamic light scattering techniques)으로 측정시, 약 1 nm 내지 약 1000 nm의 범위 이내의 직경을 갖는, 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에서 청구된 나노입자를 포함하는 조성물로서, 개수 기준으로 상기 조성물 내의 나노입자의 90% 이상이, 동적 광 산란 기법으로 측정시, 약 1 nm 내지 약 400 nm의 범위 이내의 직경을 갖는, 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에서 청구된 나노입자를 포함하는 조성물로서, 개수 기준으로 상기 조성물 내의 나노입자의 90% 이상이, 동적 광 산란 기법으로 측정시, 약 1 nm 내지 약 150 nm의 범위 이내의 직경을 갖는, 조성물.

청구항 11

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 평균 입자 크기가 약 40 nm 내지 100 nm인, 조성물.

청구항 12

단백질을 나노입자 내에 캡슐화하고, 상기 단백질을 이를 필요로 하는 인간 또는 동물에 투여함으로써, 혈뇌장벽을 가로질러 단백질을 전달하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자 내의 단백질 대 폴리머의 비율이 약 1% w/w 이상이거나, 약 2.5% w/w 이상이거나, 약 5% w/w 이상이거나, 약 9% w/w 이상이거나, 약 14% w/w 이상인, 나노입자.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 15

중추신경계의 장애 또는 질병을 예방 또는 치료하기 위한, 제 14항의 약학적 조성물의 용도.

청구항 16

신경학적 또는 신경퇴행성 장애 또는 질병을 예방 또는 치료하기 위한, 제 15항의 약학적 조성물의 용도.

청구항 17

신경 손상(neuronal injury), 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병, 광우병(bovine spongiform encephalopathy), 웨스트 나일 바이러스 뇌염(West Nile virus encephalitis), 신경-AIDS(Neuro-AIDS), 뇌손상, 척수 손상, 뇌의 전이성 암, 또는 다발성 경화증(multiple sclerosis)을 예방 또는 치료하기 위한, 제 15항의 약학적 조성물의 용도.

명세서

배경 기술

- [0001] 수많은 약물은 뇌 또는 눈 내의 표적에서 활성을 갖는데, 이 약물은 이들의 타겟에 이르기 위해서, 생물학적 장벽, 예컨대, 혈뇌장벽을 통과해야한다. 일부 분자는 생물학적 장벽을 통과할 수 있는 반면, 이러한 장벽을 효과적으로 또는 전혀 통과하지 못하는 기타 분자가 존재한다. 많은 약물 또한 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.
- [0002] 이러한 생물학적 장벽을 통한 약물 침투를 증가시키기 위한, 수많은 접근법이 당업계에 기술되어 왔다.
- [0003] 한가지 접근법은 장벽 자체의 기능을 변형시키는 것이다. 예를 들어, 삼투성 시약(osmotic agents) 또는 콜린 자극성 아레콜린(cholinomimetic arecolines)은 혈뇌장벽의 개방 또는 침투성의 변화를 유발한다(Saija A et al, J Pharm. Pha. 42:135-138 (1990)).
- [0004] 또 다른 접근법은 약물 분자 자체의 개질에 관한 것이다. 예를 들어, 혈뇌장벽을 통해 통과를 시도하도록 한 단백질의 개질은 이러한 단백질을 글리케이팅(glycating)하거나 대안적으로는, 전구약물을 형성시킴에 의한 것을 포함한다(WO/2006/029845).
- [0005] 또 다른 접근법은 활성 성분을 매트릭스 시스템으로부터 신경 조직으로 직접적으로 방출시키는 방출 조절 폴리머의 부착(implantation)이다. 그러나, 이러한 접근법은 침습적이며, 직접적으로 뇌 또는 척수에 부착될 경우 수술적 개입을 필요로 하는데(sable et al. US patent no. 4,833,666), 환자의 수용상태에 관한 문제가 존재하고 종종 보통 매우 빠르게 빠지는 약물을 투여함으로써 뇌 안으로 집중된 전달만을 가능케한다(WO/2006/029845).
- [0006] 이러한 제한을 극복하기 위해서, 약물 단체 시스템이 사용되고 있으나, 표적화된 약물 전달의 중요 문제는 빠른 옵소닌화(opsonisation) 및 세망내피계(RES), 특히 간 및 비장 내의 대식 세포에 의한 주입된 단체의 섭취이다.
- [0007] 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, 혈뇌장벽을 통한 거대분자의 전달 방법을 발견하는 것이 요망될 것이다.

발명의 내용

[0008] **도면의 간단한 설명**

- [0009] 도 1은 동적 광 산란(DLS)을 이용해 나노입자 제형에 대해 획득한 크기 분포 데이터를 나타내며 이는 현탁액 중 중공(hollow) 방법에 의해 제조된 나노입자의 존재를 나타낸다.
- [0010] 도 1(a)는 동적 광 산란에 의한 나노 입자 현탁액의 분석 후 획득된 코렐로그램(Correlogram)을 나타낸다.
- [0011] 도 1(b)는 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0012] 도 1(c)는 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0013] 도 1(d)는 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다.
- [0014] 도 2 - SEM에 의해 분석된 나노입자.
- [0015] 도 3 - 비교를 위해 고체 PBCA 나노입자의 이미지를 중첩한, TEM에 의한 중공 나노입자의 영상.
- [0016] 도 4 - 모노클로날 IgG1(항-CD23)의 캡슐화 효율 측정.
- [0017] 도 5 - 입자의 효소성 분해 후 측정된 방출 프로파일 및 ELISA에 의한 방출된 효소의 분석.
- [0018] 도 6 - 중공 PBCA 나노입자에서 바이신코니닉산(bicinchoninic acid) 분석(BCA 분석)에 의한 도메인 항체(헨 에그 리소자임(hen-egg lysozyme) dAb)의 캡슐화 효율 측정.
- [0019] 도 7. 현탁액 중 나노입자의 존재를 나타내는, DLS에 의해 획득한 크기 데이터(Sizing data).
- [0020] 도 7(a) - 동적 광 산란에 의한 나노입자 현탁액의 분석 후 획득한 코렐로그램.
- [0021] 도 7(b) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된(plotted) 나노입자의 다모드(Multimodal) 크기 분포(파생 데이터).
- [0022] 도 7(c) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터).
- [0023] 도 7(d) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터).
- [0024] 도 8. 일반적인 입자 표면상의 흡착 방법에 의해 달성된 양과 HIP 방법을 이용해 달성된 캡슐화된 달라진(Dalargin) 양의 비교.
- [0025] 도 9 - HIP-PBCA 나노입자와의 전달 후 뇌 속의 달라진 수준. 펩티드는 입자 내에 캡슐화된 경우에만 HIP 방법을 이용하여 뇌 속에서 탐지가능하였다.
- [0026] 도 10 - HIP 방법을 이용하여 PBCA 나노입자로의 달라진의 캡슐화. 캡슐화 효율에 미치는 수성상의 pH의 영향의 측정.
- [0027] 도 11 - HIP 방법을 이용하여 PBCA 나노입자로의 항-헨 에그 리소자임(anti-hen egg lysozyme) 도메인 항체의 캡슐화. 상기 나노입자를 에드만 시퀀싱(Edman sequencing)을 이용해 분석하였다.
- [0028] 도 12 - 모노클로날 IgG1(항-CD23)의 캡슐화 효율 측정.
- [0029] 도 13 - SDS-PAGE 분석에 의해 HIP-PBCA 나노입자로의 dAbs의 캡시드화(encapsidation) 확인. 나노입자를 원심분리하여 임의의 유리 dAb를 제거하였고, 펠렛을 SDS-PAGE로 분석하여 캡시드화된 dAb를 시각화하였다.
- [0030] 도 14 - SDS-PAGE 분석에 의해 HIP-PBCA 나노입자 내 VEGF dAb(DOM15-26-593)의 로딩 측정. 나노입자 내 존재하는 dAb의 양을 정량화하기 위해, 나노입자 제형을 dAb 표준과 비교하였다. 12 mg의 초기 입력으로부터, 총 3.31 mg의 dAb를 나노입자 내 캡시드화하였다. 따라서, 로딩 효율은 27.6 %이었다. dAb 로딩은 3.31 % w/w이었다.
- [0031] 도 15 - 도메인 항체를 포함하는 HIP PBCA 나노입자의 마우스 내에서 정맥 경로를 통해 뇌로 이들의 단백질 로드를 전달하는 이들의 능력에 대한, 생체내 평가 결과. 투여 10분 후, 나노입자 내 dAb는 총 합이 8.0 ng/ml에

이르는 탐지가능한 뇌 흡수(uptake)를 유발하였다. 유리 dAb는 또한 뇌에서 3.3 ng/ml의 매우 낮은 농도(초기 데이터)로 탐지가능하였다. 따라서, 나노입자는 단백질의 뇌 흡수를 한계적으로 증가시키는 것으로 보였다(초기 데이터). 60분에, 그 반대가 관찰되었는데, 유리 dAb는 뇌안에 축적되어, 그 결과 뇌 수준이 13.5 ng/ml까지 추가적으로 증가하는 것으로 보였다. 뇌 수준을 수집하였다.

[0032] 도 16 - 정맥 경로를 통해 도메인 항체를 포함하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가로부터 유추한 dAb의 뇌 대 혈액 비율. 상기 결과는 dAb가 용액 중에서 유리상태로 주어진 경우에 비해, 나노입자와 주어진 경우, 혈액에 비해 뇌에서 더 높은 비율의 dAb가 존재했음을 나타낸다.

[0033] 도 17 - 도메인 항체를 포함하는 HIP PBCA 나노입자의, 마우스 내에서 정맥 경로를 통해 뇌로 이들의 단백질 로드를 전달하는 이들의 능력에 대한, 생체내 평가 결과. 투여 10분 후, 나노입자 그룹 내 dAb는 평균 627.60 ng/ml로, 뇌에서 높은 수준의 dAb를 나타낸다.

[0034] 도 18 - 동맥내 경로를 통해 도메인 항체를 포함하는 HIP PBCA 나노입자의 생체내 평가로부터 유추한 dAb의 뇌 대 혈액 비율. 나노입자 그룹 내 dAb는 두 시점에서 1보다 큰 뇌 대 혈액 비율을 나타내며(10분 및 60분 각각에서 1.569 및 1.845), 이는 대부분의 제형화된 dAb가 뇌에 성공적으로 도달했음을 시사한다.

[0035] 도 19 - 광학 현미경에 의한 미소구체의 생성 확인. 미소구체의 제형은 폴리카프로락톤(폴리caprolactone)을 이용하여 HIP 과정에 의해 모두 생성되었다.

[0036] (a) Vit E TPGS 2% 계면활성제 4000rpm 2분 20x mag

[0037] (b) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 20x mag

[0038] (c) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 + dAb1 20x mag

[0039] (d) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 + dAb2 20x mag

[0040] 도 20 - 레이저 회절에 의한 미소구체의 생성 확인. 미소구체의 제형은 폴리카프로락톤을 이용하여 HIP 과정에 의해 모두 생성되었다.

[0041] (a) Vit E TPGS 2% 계면활성제 4000rpm 2분 20x mag

[0042] (b) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 20x mag

[0043] (c) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 + dAb1 20x mag

[0044] (d) Vit E TPGS 2% 계면활성제 7500rpm 2분 + dAb2 20x mag

[0045] 도 21 - SDS-PAGE분석에 의해 HIP-PC 미소구체 내로의 캡시드화 확인. 미소구체를 여과시키고, (F) 원심분리하여(3k 또는 13K rpm), 임의의 유리 dAb, 상청액을 제거하고, (S), 및 펠렛, (P)를 SDS-PAGE를 이용하여 분석하여, 캡시드화된 dAb를 시각화하였다.

[0046] 도 22 - SDS-PAGE분석에 의해 HIP-PC 미소구체로부터 캡시드화된 dAb의 방출 확인. 미소구체를 세척한 뒤, 0, 20, 40 또는 60분 동안 56°C에서 열 처리하여, dAb를 방출시켰고, 부스러기를 펠렛화하고, (5분 @ 5k) 상청액, (S)를 SDS-PAGE에 의해 분석하여 캡시드화된 dAb를 시각화하였다. 분자 마커 - 씨블루 플러스(SeeBlue Plus) 2 표준 염색 전(pre-stained standard), (인비트로젠(invitrogen)), 분자량(kd), 겔은 dAbs의 방출이 일어났음을 확인시켰다. 또한 겔은 dAbs가 무손상이며, 방출과정에 의해 부서지지 않았음을 확인시켰다.

[0047] 발명의 요약

[0048] 본 발명의 일 양태에서, 미립자 담체 내 생물학적 활성제를 캡슐화하는 방법, 예컨대, 나노입자 내, 또는 내 및 위에서, 또는 나노입자와 함께 단백질 및/또는 펩티드를 캡슐화하는 방법, 및 나노입자 내, 또는 내 및 위에서, 또는 나노입자와 함께 캡슐화하여 단백질 및/또는 펩티드를 혈뇌장벽을 통해 전달하는 방법 및 미립자 담체 내, 또는 내 및 위에서, 또는 미립자 담체와 함께 캡슐화하여 눈으로 단백질 및/또는 펩티드를 전달하는 방법이 제공된다.

[0049] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 단백질 및/또는 펩티드를 혈뇌장벽을 통해 혈액에서 뇌까지 전달하기 위한, 또는 눈으로 전달하기 위한, 입자 형성 물질 및 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질 및/또는 펩티드를 포함하는 미립자 담체를 제공한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 중추 신경계 및/또는 눈의 장애 또는 질병을 치료하기 위한, 나노입자의 조성물 및 이들의 용도를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 본 발명은 입자 형성 물질 및 생물학적 활성제를 포함하는 미립자 담체 및 상기 미립자 담체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0051] 일 구체예에서, 본 발명의 나노입자는 생물학적 활성제, 예컨대, 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 이러한 단백질은 항체로 지칭되는 본원에서 사용된 바와 같은, 항원 결합 분자, 항체 단편 및 표적에 결합할 수 있는 기타 단백질 작제물일 수 있다. 항원 결합 분자는 도메인을 포함할 수 있다. "도메인"은 나머지 단백질과는 무관하게 3차 구조를 갖는 접힌(folded) 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.
- [0052] 항원 결합 분자는 한개 이상의 면역글로불린 가변 도메인을 포함할 수 있는데, 예를 들어, 이러한 분자는 항체, 도메인 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, 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, 카멜레드 또는 상어 면역글로불린 단일 가변 도메인일 수 있거나, 천연 리간드 이외의 리간드에 결합을 획득하기 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(테트라넥틴(Tetranectin)); 인간-크리스탈린 및 인간 유비퀴틴(affilins); PDZ 도메인; 인간 프로테아제 억제제의 스크피온 독소쿠니츠(toxinkunitz)형 도메인; 및 피브로넥틴(에드넥틴(adnectin))으로 이루어진 군에서 선택된 지지체(scaffold)의 유도체인 도메인일 수 있다.
- [0053] CTLA-4(세포독성 T 림프구 관련 항원 4)는 주로 CD4⁺ T-세포에서 발현된 CD28-패밀리 수용체이다. 이의 세포의 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.
- [0054] 리포칼린은 작은 소수성 분자, 예컨대, 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질을 운반하는 세포의 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.
- [0055] 에피바디는 스타필로코쿠스 아우레우스의 단백질 A로부터 유래된 골격으로, 항원에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 도메인은 대략 58개의 아미노산의 세개의 나선형 묶음으로 구성된다. 표면 잔기의 랜덤화에 의해 라이브리리가 생성되었다. 추가 상세한 설명은 문헌[Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)] 및 EP1641818A1를 참조하라.
- [0056] 아비머는 A-도메인 골격 패밀리에서 유래된 멀티도메인 단백질이다. 대략 35개의 아미노산의 천연 도메인은 정의된 이항화 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.
- [0057] 트랜스페린은 모노머 혈청 운반 당단백질이다. 트랜스페린은 허용적(permissive) 표면 루프 내에서 펩티드 서열

의 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.

[0058] 계획된 안키린 반복 단백질(Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPs)은 세포 골격에 내재성 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질의 한 패밀리인 안키린에서 유래된다. 단일 안키린 반복은 두 개의 α -나선 및 β -턴으로 이루어진 33개의 잔기 모티프(residue motif)이다. 이것은 각각의 반복의 제 1 α -나선 및 β -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.

[0059] 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.

[0060] 펩티드 압타머는 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.

[0061] 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 접힘에 영향을 미치지 않고, 최대 25개의 아미노산을 포함하도록 공학처리될 수 있는 루프를 갖는다. 공학처리된 노틴 도메인의 추가 상세한 설명은 W02008098796을 참조하라.

[0062] 다른 비 Ig 결합 도메인은 상이한 표적 항원 결합 특성을 공학처리하기 위하여 골격으로서 사용된 단백질을 포함하고, 이 단백질에는 인간-크리스탈린 및 인간 유비퀴틴(아폴린), 인간 프로테아제 저해제의 쿠니츠형 도메인, 라스(Ras)-결합 단백질 AF-6의 PDZ-도메인, 스콜피온 독소(카리브도독소(charybdoxin)), 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]. 본 발명의 비 Ig 결합 도메인은 상기 임의의 대체 단백질 도메인에서 유래될 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 분자는 중추 신경계, 예컨대, 뇌 또는 척수에서, 또는 예를 들어, 신경 조직에서 발견되는 표적에 결합한다.

[0064] 본원에 상술된 발명의 추가 구체예에서, 항원 결합 분자는 신경학적 질병 또는 장애, 예컨대, MAG(미엘린 관련 당단백질), NOGO(신경돌기 성장 억제 단백질) 또는 β -아밀로이드와 관련된 것으로 공지된 표적에 특이적으로 결합한다.

[0065] 이러한 항원 결합 분자는 NOGO, 예를 들어 항-NOGO 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명에서 이용하기 위한 항-NOGO 항체의 한 예는 SEQ ID NO 1의 중쇄 및 SEQ ID NO 2의 경쇄에서 정의된 항체이거나, 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.

[0066] 이러한 항원 결합 분자는 MAG, 예를 들어 항-MAG 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명에서 이용하기 위한 항-MAG 항체의 한 예는 SEQ ID NO 11의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO 12의 경쇄 가변 영역에서 정의된 항체이거나, 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.

[0067] 이러한 항원 결합 분자는 β -아밀로이드, 예를 들어 항- β -아밀로이드 항체에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명에서 이용하기 위한 항- β -아밀로이드 항체의 한 예는 SEQ ID NO 5의 중쇄 또는 SEQ ID NO 6의 경쇄에서 정의된 항체이거나, SEQ ID NO 5 및 7에 제시된 항체의 CDRs를 포함하는 항- β -아밀로이드 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 이러한 항체(H2L1)의 추가 상세한 설명은 본원에 참조로서 통합된, PCT 출원

WO2007113172에서 설명될 수 있다.

- [0068] 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.
- [0069] 본 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 단백질은 눈에서 발견되는 표적, 예컨대, TNF, TNFr-1, TNFr-2, TGF베타 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.
- [0070] 본 발명의 일 구체예에서, 본원에 제시된 발명의 임의의 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 150 nm, 또는 약 40 nm 내지 약 100 nm의 범위 이내이다.
- [0071] 본 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 40 nm 내지 약 250 nm의 범위 이내이다.
- [0072] 본 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 나노입자가 동적 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 40 nm 내지 약 150 nm의 범위 이내이다.
- [0073] 추가 구체예에서, 본 발명의 나노입자를 포함하는 조성물이 제공되는데, 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 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.
- [0074] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 약 40 nm 내지 약 250 nm이다.
- [0075] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 나노입자의 중간 크기는 약 40 nm 내지 약 150 nm이다.
- [0076] 본 발명의 일 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 미립자 담체 내에 생물학적 활성제를 캡슐화하는 방법이 제공된다:
- [0077] a) 소수성 이온 페어링(hydrophobic ion pairing, HIP) 시약의 존재하에서 및 유기 용매 중에서, 생물학적 활성제를 가용화(solubilising)하는 단계;
- [0078] b) (a)에서 형성된 유기상 내에 폴리머 형성 물질의 모노머 및/또는 올리고머를 용해시키는 단계;
- [0079] c) 연속 수성상 내에서 (b)에서 형성된 유기 상의 에멀전을 형성시켜 모노머가 중합되도록 하는 단계; 및
- [0080] d) 상기 에멀전으로부터 미립자 담체를 획득하는 단계.
- [0081] 본 발명의 추가 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 미립자 담체 내에 생물학적 활성제를 캡슐화하는 방법이 제공된다:
- [0082] a) 수성상 내 생물학적 활성제와 유기 용매 상 내 소수성 이온 페어링(HIP) 시약을 혼합하여 생물학적 활성제-HIP 복합체를 형성시키는 단계;
- [0083] b) 상기 복합체를 수성상으로부터 분리하는 단계;
- [0084] c) 수성상을 제거하고, 유기상과 복합체를 균질화하는 단계;
- [0085] d) (i) (c)에서 형성된 유기상 내 폴리머를 용해한 후, 연속 수성상 내에서 유기상의 에멀전을 형성시키는 단계; 또는
- [0086] (ii) (c)에서 형성된 유기상 내에 폴리머 형성 물질의 모노머 및/또는 올리고머를 용해시킨 후, 연속 수성상 내에서 유기 상의 에멀전을 형성시켜, 모노머 또는 올리고머의 중합이 일어나 폴리머를 형성하는 단계; 및
- [0087] e) 단계 (d)의 에멀전으로부터 형성된 미립자 담체를 획득하는 단계.

- [0088] 소수성 이온 페어링 시약을 이용한 이러한 방법은 생물학적 활성제, 예를 들어, 단백질의 캡슐화를 가능케 한다 (예컨대, 소수성 폴리머 입자의 코어 내에 친수성 단백질). 소수성 이온 페어링은 유기 매질로의 단백질의 추출을 가능케하므로, 이러한 방법은 단일 에멀전을 이용하여 미립자 담체의 제조가 가능하게 한다.
- [0089] 추가 구체예에서, 상기 방법에 따라 캡슐화되기 위한 생물학적 활성제는 펩티드 또는 단백질, 예컨대 항원 결합 분자이다.
- [0090] 본 발명의 일 구체예에서, 단백질은 중추신경계, 예컨대, 뇌 또는 척수, 또는 예를 들어, 신경 조직에서 발견되는 표적에 결합한다.
- [0091] 본원에 기술된 본 발명의 추가 구체예에서, 단백질은 신경학적 질병 또는 장애, 예컨대, MAG(미엘린 관련 당단백질), NOGO(신경돌기 성장 억제 단백질) 또는 β -아밀로이드와 관련된 것으로 공지된 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0092] 본원에 기술된 본 발명의 추가 구체예에서, 단백질은 NOGO에 결합하는 항체, 예를 들어, PCT 출원 W02007068750에 기술된 항-NOGO 항체 중 어느 하나, 특히 본원에 참조로서 통합된 PCT 출원 W02007068750에서 H28 L16로 지칭된 항체이다.
- [0093] 본원에 기술된 본 발명의 추가 구체예에서, 단백질은 MAG에 결합하는 항체, 예를 들어, PCT 출원 W02004014953에 기술된 항-MAG 항체 중 어느 하나, 특히 본원에 참조로서 통합된 PCT 출원 W02004014953에서 BvL1 CvL1로 지칭된 항체이다.
- [0094] 본원에 기술된 본 발명의 추가 구체예에서, 단백질은 β -아밀로이드에 결합하는 항체, 예를 들어, PCT 출원 W02007113172에 기술된 항- β -아밀로이드 항체 중 어느 하나, 특히 본원에 참조로서 통합된 PCT 출원 W02007113172에서 H2 L1로 지칭된 항체이다.
- [0095] 본 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. 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.
- [0096] 본원에 기술된 본 발명의 일 구체예에서, 생물학적 활성제는 신경학적 질병 또는 장애, 예컨대, MAG, NOGO 또는 β -아밀로이드와 관련된 것으로 공지된 표적에 특이적으로 결합한다.
- [0097] 일 구체예에서, 생물학적 활성제는 소수성 이온 페어링 시약의 존재없이, 유기상에서 불용성이다.
- [0098] 본원에 기술된 본 발명의 일 구체예에서, 단백질이 음이온인 경우, 소수성 이온 페어링 시약은 양이온 HIP 시약이다. 또 다른 구체예에서, 단백질이 양이온인 경우, 소수성 이온 페어링 시약은 음이온 HIP 시약이다. 추가 구체예에서, 음이온 HIP 시약은 알킬 4차 암모늄 양이온, 바람직하게는, 알킬 암모늄 브로마이드, 더욱 바람직하게는, 테트라부틸 암모늄 브로마이드, 테트라헥실 암모늄 브로마이드, 테트라옥틸 암모늄 프로마이드, 소듐 도데실 설페이트(SDS), 소듐 올레이트 또는 도큐세이트 나트륨(docusate sodium)(aka Aerosol OT™)으로 이루어진 군에서 선택되며, HIP 시약은 단백질 상에서 총 양전하의 수보다 더 많거나 동일한 화학량론적 양으로 존재한다. 또 다른 구체예에서, 양이온 HIP 시약은 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드(DDAB18); 1,2-디올레옥시-3-(트리메틸암모늄 프로판(DOTAP); 또는 세트리모늄 브로마이드(CTAB)로 이루어진 군에서 선택되며, HIP 시약은 단백질 상에서 총 음전하의 수보다 더 많거나 동일한 화학량론적 양으로 존재한다.
- [0099] 추가 구체예에서, 임의의 소수성 양이온 또는 음이온은 잠재적으로 HIP 시약으로서 사용되어 단백질을 가용화할 수 있다. 소수성 이온 페어링 (HIP)은 전하는 유사하나, 덜 쉽게 용매화되는 종으로의 극성 대응 이온(counter ions)의 화학량론적 대체와 관련이 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 HIP를 이용하여 단백질의 용해도 특성을 변화시켜, 유기 용매, 예컨대, 메틸렌 클로라이드로의 단백질 추출을 가능케 하는, 방법을 제공한다. 도큐세이트 나트륨(비스(2-에틸헥실) 소듐 설포숙시네이트)는 적합한 이온-페어링 시약의 한 예이다. 일 구체예에서, 도큐세이트 나트륨을 포함한 메틸렌 클로라이드는 수성 단백질 용액과 혼합된다. 이는 단백질과 도큐세이트 이온의 이온 페어링 및 후속하여 단백질의 오일상 내로의 분할(partitioning)을 야기한다. 메틸렌 클로

라이드 내에서 단백질의 용해는 단일 수중유 에멀전 방법을 통해 단백질이 나노입자 또는 미소구체 내에서 캡슐화되도록 한다.

- [0100] 본원에 기술된 본 발명의 일 구체예에서, 연속 수성상은 단백질이 음이온이고, HIP 시약이 양이온인 경우 약 7.0 이상의 pH를 갖는데, 예를 들어, pH는 약 8.0 이상 또는 약 10.0 이상 또는 약 12.0 이상일 수 있다.
- [0101] 본원에 기술된 본 발명의 대안적인 구체예에서, 연속 수성상은 단백질이 양이온이고, HIP 시약이 음이온인 경우 약 7.0 이하의 pH를 갖는데, 예를 들어, pH는 약 6.0 미만 또는 약 4.0 미만 또는 약 2.0 미만일 수 있다.
- [0102] 이러한 일 구체예에서, 단백질 대 폴리머의 중량/중량(w/w) 비율은 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% 이상, 또는 약 60% 이상, 또는 약 70% 이상, 또는 약 80% 이상, 또는 약 90% 이상이다. 예를 들어, 단백질이 펩티드인 경우, 펩티드 대 폴리머의 비율은 약 9% 이상일 수 있고, 단백질이 항체인 경우, 항체 대 폴리머의 비율은 약 2% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 도메인 항체 대 폴리머의 비율은 약 2.5% 이상일 수 있다.
- [0103] 본 발명의 일 구체예에서, 단백질 대 총 제형(폴리머+HIP 및 선택적으로 계면활성제)의 w/w 비율은 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% 이상이다. 예를 들어, 단백질이 펩티드인 경우, 펩티드 대 총 제형의 비율은 약 16% 이상일 수 있거나, 단백질이 항체인 경우, 항체 대 폴리머의 비율은 약 1% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 도메인 항체 대 총 제형의 비율은 약 9% 이상일 수 있다.
- [0104] 본 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 90% 이상일 수 있고, 단백질이 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 1% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 70% 이상일 수 있다.
- [0105] 본 발명의 일 구체예에서, 모노머 또는 올리고머는 하기로 이루어진 군에서 선택된다; 메틸메타크릴레이트, 알킬시아노아크릴레이트, 히드록시에틸메타크릴레이트, 메타크릴산, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 아크릴아미드, N, N'-비스메틸렌 아크릴아미드 및 2-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트. 추가 구체예에서, 모노머는 알킬시아노아크릴레이트, 예를 들어, 부틸시아노아크릴레이트(BCA)이다.
- [0106] 일 구체예에서, 중공 루멘 내의 수성 상 내에 생물학적 활성제를 포함하는 폴리머 미립자 담체를 제공한다.
- [0107] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 하기 단계를 포함하는, 안구 전달을 위한 미립자 담체 내에 생물학적 활성제를 캡슐화하는 방법이 제공된다:
- [0108] a) 유기 용매 중에 폴리머를 용해시켜 폴리머 용액을 형성시키는 단계;
- [0109] b) 생물학적 활성제를 포함하는 수성 용액을 상기 폴리머 용액에 첨가하여 연속 유기상 내에 수성상 액적의 1차 에멀전을 형성시키는 단계;
- [0110] c) 상기 1차 에멀전과 수성 매질을 혼합하여 W/O/W 에멀전을 형성시키는 단계; 및
- [0111] d) 상기 유기상을 증발시켜서 수성상 내 상기 생물학적 활성제를 함유하는 중공 루멘(hollow lumen)을 포함하는 미립자 담체를 획득하는 단계.
- [0112] 유기상을 증발시키는 것은 수동적이거나 활성일 수 있다. 예를 들어, 활발한 증발은 열을 이용함으로써 이뤄질 수 있다.
- [0113] 이러한 일 구체예에서, 안구 전달은 안구 주위, 예를 들어, 경공막(trans-scleral), 결막하(subconjunctival), 테논하(sub-tenon), 눈둘레(peribulbar), 국부, 구후(retrobulbar)이거나, 위, 아래 또는 외직근(lateral rectus muscle)로 전달된다. 일 구체예에서, 안구 전달은 경공막이다.
- [0114] 추가 구체예에서, 상기 방법에 따라 캡슐화되기 위한 생물학적 활성제는 펩티드 또는 단백질, 예컨대, 항원 결합 분자이다.
- [0115] 이러한 방법에서 사용된 미립자 담체는 미소구체 또는 나노입자일 수 있다. 예를 들어, 미립자 담체는 나노입자이며, 생물학적 활성제는 단백질일 수 있거나, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 펩티드일 수

있거나, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 항원 결합 분자, 예컨대, 도메인 항체 또는 항체를 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다.

- [0116] 대안적으로, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 단백질일 수 있거나, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 펩티드일 수 있거나, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 항원 결합 분자, 예컨대, 도메인 항체 또는 항체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다.
- [0117] 본 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 μ m 내지 약 100 μ m의 범위 이내의 직경을 갖는다. 추가 구체예에서, 개수로(by number) 약 90% 이상의 입자가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 1 μ m 내지 약 80 μ m, 또는 약 1 μ m 내지 약 60 μ m, 또는 약 1 μ m 내지 약 40 μ m, 또는 약 1 μ m 내지 약 30 μ m, 또는 약 1 μ m 내지 약 10 μ m의 범위 이내이다.
- [0118] 본 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 미소구체가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 1 μ m 내지 약 60 μ m의 범위 이내이다.
- [0119] 본 발명의 추가 구체예에서, 개수로 약 90% 이상의 미소구체가 저각도 레이저 광 산란 기법을 이용하여 측정시, 약 1 μ m 내지 약 30 μ m의 범위 이내이다.
- [0120] 추가 구체예에서, 본 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 μ m 미만, 예를 들어, 직경상 약 80 μ m 미만, 예를 들어, 직경상 약 60 μ m 미만, 예를 들어, 직경상 약 40 μ m 미만이다.
- [0121] 추가 구체예에서, 상기 조성물 내 미소구체의 중간 크기는 약 1 μ m 내지 약 6 μ m, 또는 1 μ m 내지 약 30 μ m이다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 치료적 양의 활성 생물학적 분자를 약 3달 또는 그 이상, 또는 최대 6개월 또는 그 이상, 또는 최대 12개월 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 계속적으로 방출한다.
- [0123] 중공 방법(본 발명의 나노입자에 제한되지 않음)
- [0124] 본 발명의 일 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 본원에 기술된 발명의 나노입자를 생산하는 방법이 제공된다:
- [0125] a) 유기 용매 중에 폴리머를 용해시켜 폴리머 용액을 형성시키는 단계;
- [0126] b) 단백질을 포함하는 수성 용액을 상기 폴리머 용액에 첨가하여 연속 유기상 내에 수성상 액적의 1차 에멀전을 형성시키는 단계;
- [0127] c) 상기 1차 에멀전과 수성 매질을 혼합하여 W/O/W 에멀전을 형성시키는 단계; 및
- [0128] d) 상기 유기상을 증발시켜서 수성상 내 상기 단백질을 함유하는 중공 루멘을 포함하는 나노입자를 획득하는 단계.
- [0129] 유기상을 증발시키는 것은 수동적이거나 활성일 수 있다. 예를 들어, 활발한 증발은 열을 이용함으로써 이뤄질 수 있다.
- [0130] 추가 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은, 상기 방법 중 어느 하나에서 이용된 폴리머는 하기에서 선택되거나 이에 제한되지 않는다: 폴리-L-락티드(PLA), 폴리(락토-코-글리콜리드)(PLG), 폴리(락티드), 폴리(카프로락톤), 폴리(히드록시부틸레이트) 및/또는 이들의 코폴리머. 적합한 입자-형성 물질은 폴리(디엔), 예컨대, 폴리(부타디엔) 등; 폴리(알켄), 예컨대, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 등; 폴리(아크릴릭), 예컨대, 폴리(아크릴산) 등; 폴리(메타크릴릭), 예컨대, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(히드록시에틸 메타크릴레이트), 등; 폴리비닐 에테르; 폴리비닐 알코올; 폴리비닐 케톤; 폴리(비닐할라이드), 예컨대, 폴리비닐 클로라이드) 등; 폴리비닐 니트릴, 폴리비닐 에스테르, 예컨대, 폴리비닐 아세테이트) 등; 폴리비닐 피리딘, 예컨대, 폴리(2-비닐 피리딘), 폴리(5-메틸-2-비닐 피리딘) 등; 폴리(스티렌); 폴리(카보네이트); 폴리(에스테르); 폴리(올쏘에스테르); 폴리(에스테르아미드); 폴리(무수물); 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 부틸레이트, 등; 다당류, 단백질, 젤라틴, 녹말, 검, 수지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리부틸시아노아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리아릴아미드, 폴리무수물, 폴리올쏘에스테르, N,N-리신디일텔레프탈레이트, 폴리무수물, 탈용매화된 생물학적 활성제 또는 탄수화물, 다당류, 폴리아크롤레인, 폴리글루타르알데히드 및 유도체, 코폴리머 및 폴리머 혼합액.

- [0131] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 하기 단계를 포함하는 미립자 담체 생성에 의한 생물학적 활성제 캡슐화 방법이 제공된다:
- [0132] a) 유기 용매 중에 폴리부틸시아노아크릴레이트(PBCA)를 용해시켜 폴리머 용액을 형성시키는 단계;
- [0133] b) 생물학적 활성제를 포함하는 수성 용액을 상기 폴리머 용액에 첨가하여 연속 유기상 내에 수성상 액적의 1차 에멀전을 형성시키는 단계;
- [0134] c) 상기 1차 에멀전과 수성 매질을 혼합하여 W/O/W 에멀전을 형성시키는 단계; 및
- [0135] d) 상기 유기상을 증발시킴으로서 수성 상 내 상기 생물학적 활성제를 함유하는 중공 루멘을 포함하는 미립자 담체를 획득하는 단계.
- [0136] 유기상을 증발시키는 것은 수동적이거나 활성일 수 있다. 예를 들어, 활발한 증발은 열을 이용함으로써 이뤄질 수 있다.
- [0137] 일 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체 또는 나노입자일 수 있다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 단백질이다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 펩티드이다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 항원 결합 분자, 예를 들어, mAb 또는 dAb, 또는 이들의 조합이다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 나노입자이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다.
- [0138] 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 단백질이다. 추가 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 펩티드이다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 항원 결합 분자, 예를 들어, mAb 또는 dAb, 또는 이들의 조합이다. 또 다른 구체예에서, 미립자 담체는 미소구체이며 생물학적 활성제는 도메인을 포함한다.
- [0139] 일 구체예에서, 단백질 대 폴리머의 w/w 비는 0.5% 내지 50%, 예를 들어 약 0.5% 이상 또는 약 1% 이상 또는 약 2% 이상 또는 약 5% 이상 또는 약 7% 이상 또는 약 10% 이상 또는 약 11% 이상 또는 약 14% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 40% 이상 또는 약 50% 이상 일 수 있다. 예를 들어, 단백질이 폴리펩티드인 경우, 상기 펩티드 대 폴리머의 비는 약 11% 이상일 수 있거나, 단백질이 항체인 경우, 상기 항체 대 폴리머의 비는 약 14% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 도메인 항체 대 폴리머의 비는 약 11% 이상일 수 있다.
- [0140] 본 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 60% 이상일 수 있으며, 단백질이 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 90% 이상일 수 있거나, 단백질이 도메인 항체인 경우, 캡슐화 효율은 약 60% 이상일 수 있다.
- [0141] 상기 방법의 추가 구체예에서, 단계 (d)는 겔 형성 폴리머를 첨가하는 단계를 추가적으로 포함한다. 추가 구체예에서, 겔 형성 폴리머는 아가로스이다.
- [0142] 본 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, 디

에틸 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, 글 리세릴/트리프로피오인, 2,2,4-트리메틸-1,3-펜탄디올 디이소부틸레이트, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 또는 디메틸설폭사이드, 사염화탄소, 클로로포름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, 디에틸 에테 르, 디메틸 포름아미드, 헵탄, 헥산 및 기타 탄화수소, 메틸-tert-부틸 에테르, 펜탄, 톨루엔, 2,2,4-트리메틸 펜탄, 1-옥타놀 및 이의 이성질체 또는 벤질 알코올을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0143] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 방법에서 사용된 용매는 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 또는 디메틸 설폭사이드, 카본 테트라클로라이드, 클로로포름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, 디에틸 에테 르, 디메틸 포름아미드, 헵탄, 헥산 및 기타 탄화수소, 메틸-tert-부틸 에테르, 펜탄, 톨루엔, 2,2,4-트리메틸 펜탄, 1-옥타놀 및 이의 이성질체 또는 벤질 알코올에서 선택될 것이다.

[0144] 본원에 기술된 본 발명의 모든 양태에서, 미립자 담체, 이들의 제작 방법 또는 이들을 포함하는 조성물은 계면 활성제, 예컨대, 하기에 제한되지는 않는 계면활성제의 첨가를 추가적으로 포함할 수 있다: 소듐 클로레이트(소 듬 클로레이트), 폴록사머 188(pluronic F68™, 또는 F127), 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리솔베이 트 80, 텍스트란, 폴록사머, 폴록사민, 다기능 알코올의 카복실산 에스테르, 알콕시화된 에테르, 알콕시화된 에 스테르, 알콕시화된 모노, 디 및 트리글리세리드, 알콕시화된 페놀 및 디페놀, 에톡시화된 에테르, 에톡시화된 에스테르, 에톡시화된 트리글리세리드, GenapoIR™ 및 BaukiR™ 시리즈 물질, 지방산의 금속염, 카복실산의 금 속염, 알코올 설페이트의 금속염, 및 지방산 알코올 설페이트의 금속염 및 설포숙시네이트의 금속염 및 상기 물 질의 두개 이상의 혼합물.

[0145] 추가 구체예에서, 상기 계면활성제는, 소듐 클로레이트, 폴록사머 188(플루로닉(pluronic) F68™), 폴리비닐 알 코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리솔베이트 80, 텍스트란에서 선택된다.

[0146] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 기술된 발명의 방법 중 어느 하나에 의해 획득가능한 생물학적 활성제를 포함하 는 미립자 담체가 제공된다.

[0147] 본 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 대 한 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 입자로부터 의 방출에 대해 생물학적 결합 분석에 의해 측정시(예를 들어, 일 구체예에서는 ELISA, Biacore로 측정된 경 우), 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. 본 발명의 조성물의 생물학적 활 성은 캡슐화된 생물학적 활성 분자의 활성을 측정하는 임의의 적합한 분석에 의해 측정될 수 있는데, 예를 들어, 생물학적 활성 분자가 VEGF dAb인 경우, 실시예 18에 기재된 분석이 이용될 수 있다.

[0148] 본 발명의 일 구체예에서, 나노입자 내 단백질의 캡슐화에 의해 생물학적 장벽, 예컨대, 혈뇌장벽을 통해 환자 에게 단백질을 전달하는 방법이 제공된다. 추가 구체예에서, 환자는 인간이다.

[0149] 본 발명의 일 구체예에서, 미립자 담체, 예컨대 미소구체내 캡슐화된 단백질을 표유류, 예를 들어 인간의 눈으 로, 전달하는 방법이 제공된다.

[0150] 또 다른 구체예에서, 상기 기술된 본 발명의 미립자 담체 내 캡슐화된 생물학적 활성제를 포함하는 약학적 조성 물이 제공된다.

[0151] 추가 구체예에서, 상기 기술된 본 발명의 나노입자 내 캡슐화된 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 추가 구체예에서, 눈의 질병을 치료 및/또는 예방하기 위해 본원에 기술된 바와 같은 안구 전달을 위한 미소구 체 내 캡슐화된 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0152] 추가 구체예에서, 본원에 기술된 본 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 다발성 경화증, 뇌졸중을 치 료 및/또는 예방하는데 이용될 수 있다.

- [0153] 추가 구체예에서, 조성물은 뇌졸중 또는 신경성 손상의 치료 및/또는 예방을 위해 항-MAG 항체를 포함할 수 있다.
- [0154] 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.
- [0155] 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- β 아밀로이드 항체를 포함할 수 있다.
- [0156] 본 발명의 일 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같이, 미립자 담체는 비경구 주사 또는 주입, 정맥 주사 또는 동맥내 투여에 의해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0157] 추가 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물은 눈의 장애 또는 질병을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 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 있다.
- [0158] 추가 구체예에서, 조성물은 AMD(노화 연관 시력 감퇴), 예를 들어, 습성 AMD, 또는 건성 AMD를 치료 및/또는 예방하기 위해 사용된다.
- [0159] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은, 의약으로 사용하기 위한, 나노입자 및/또는 미소구체 내 캡슐화된 생물학적 활성제가 제공된다.
- [0160] 본 발명의 일 구체예에서, 중추신경계의 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제(medicament)의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 알츠하이머병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 뇌졸중 또는 신경 손상을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0161] 본 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 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0162] 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용하여 중추신경계의 질병을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 추가 구체예에서, 본 발명의 조성물을 이용하여 알츠하이머병을 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물을 이용하여 뇌졸중 또는 신경 손상을 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0163] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용하여 안구 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 추가 구체예에서, 본 발명의 조성물을 이용하여 AMD를 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0164] **정의**
- [0165] 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.
- [0166] 본 명세서를 통해, 본원에서 사용된, 용어 "미립자 담체"는 나노입자와 미소구체 둘 모두를 포함하도록 사용된다. "미소구체"는 1 μ 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.
- [0167] 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.
- [0168] 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.
- [0169] 용어 "가용화"는 용매 중 개별 분자 형태로 용액의 형성 또는 액체 내 현탁된 분자의 미세한 고체 응집 형태로

액체 현탁액 중 고체의 형성으로 정의된다. 가용화 과정은 또한 충분히 용해된 분자 및 현탁된 고체 응집의 혼합물을 형성할 수 있다.

- [0170] 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.
- [0171] 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.
- [0172] 용어 "안구-주위(Peri-ocular)"는 눈의 외부 주위를 둘러싸는 위치의 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.
- [0173] "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, 널스 상어(nurse shark) 및 카멜리드(Camelid) V_H dAb). 카멜리드 V_H 는, 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 본 발명에 따른 "도메인 항체"로 간주된다. 본원에서 사용되는 경우, V_H 는 카멜리드 V_H 도메인을 포함한다.
- [0174] 본원에서 사용된, 용어 "항원 결합 분자"는 항체, 항체 단편 및 표적에 결합할 수 있는 다른 단백질 작제물을 지칭한다.
- [0175] "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.
- [0176] 본원에서 사용된 용어 "광 산란 기법"은 용액 내 작은 입자의 크기 분포 프로파일을 측정하는데 사용된 수단이다 - 예를 들어, 나노입자를 측정하기 위해 사용된 동적 광 산란 기법 및 미소구조를 측정하기 위해 사용된 정적 광 산란 또는 저 각도 광 산란.
- [0177] 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-아인슈타

인(Stokes Einstein) 방정식이 적용되어 입자의 평균 유체 역학적 직경이 산출된다.

- [0178] 다-지수(multi-exponential) 분석은 입자 분포를 생성할 수 있고, 이는 샘플 내부에 상이한 종류의 존재에 대한 통찰을 제공한다. DLS은 일반적으로 나노입자의 분석을 용인한다.
- [0179] 본 명세서를 통해 사용된 바와 같이, "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.
- [0180] 본원에서 사용된 용어 "혈뇌장벽"(BBB)은 주로 필수 대사 작용을 허용하면서, 혈액 중 화학물질로부터 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 혈액 흐름으로부터 물질의 통과를 훨씬 더 제한한다.
- [0181] 본 명세서를 통해, 퍼센트 약물 로딩(percentage drug loading)은 입자 제형에서 사용된 물질의 중량 당 약물의 중량 퍼센트로 정의된다(폴리머 중량) w/w.
- [0182] % 약물 로딩 = (약물의 중량/ 입자 제형에서 사용된 물질의 중량) x 100%.
- [0183] 본 명세서 중에서, 본 발명은 명확하고 간결하게 본 명세서가 작성될 수 있도록 하는 방법으로, 구체예를 참조하여 기술되었다. 구체예는 본 발명을 벗어나지 않고, 다양하게 결합 또는 분리될 수 있음을 인식해야 하며, 그렇게 의도된다.
- [0184] **실시예**
- [0185] 실시예 1 - BCA(부틸시아노아크릴레이트) 모노머의 폴리머화:
- [0186] 유기 용매 중 빠른 폴리머화 반응이 폴리머를 형성하기 위해 사용되었다:
- [0187] BCA 모노머(200 μ l, Vetbond, 3M)를 25 ml 비커에서 천천히 돌리면서 1 ml의 무수 에탄올에 첨가하였다. 생성된 용액을 폴리머화 반응이 시작될 때까지 서서히 혼합하였다. 폴리머화 반응은 흰색 고체 분산물(dispersion)을 형성시켰다. 분산물의 혼합을 중단하자마자, 반응 혼합물은 너무 점성이 강해 휘저을 수 없게 되었다.
- [0188] 그 다음 반응 혼합액 중의 에탄올을 적어도 1시간 동안 흡-후드(fume-hood)에서 증발시켰다. 에탄올을 증발시킨 후, 갈라진 흰색 고체 케이크를 획득하였다. 상기 고체를 수집하였고, 나노 입자 제조 과정에 사용하였다.
- [0189] 실시예 2 - 이중 에멀전 방법에 의한 중공 나노입자의 제조:
- [0190] PBCA 폴리머를 1% w/v의 농도로 디클로로메탄에 용해시키고, 하기와 같이, 이중 에멀전(수 중 유 중 수 w/o/w) 내로 유화시켜 중공 PBCA 나노입자를 제조하는데 이용하였다:
- [0191] (i) 1차 에멀전(w/o)
- [0192] 내부상(w): 물 또는 완충용액 중 5% 소듐 클로라이드(SIGMA), 혼합하여 제조됨:
- [0193] 500 μ l의 물 또는 완충용액; 및
- [0194] 500 μ l의 소듐 클로라이드(10% w/v 저장용액(stock solution)).
- [0195] 상기 내부 수성상의 총 부피는 1 ml이었다. 상기 용액을 사용할 때까지 얼음상태로 보관하였다. 각 용액을 사용 이전에 1ml의 인슐린 주사기(테르모(Terumo) 1 ml, BD 마이크로란스 바늘(microlance needle) 19G 1.5")로 끌어들었다.
- [0196] 외부 (유기) 상(o): 디클로로메탄("DCM, Fischer) 중 PBCA 폴리머(1 % w/v).
- [0197] 유기상(DCM 중 PBCA 폴리머, 6 ml)를 10ml 비커(차가운 상태를 유지하기 위해 얼음에 담)에 붓고, 균질기의 프로브를 삽입하였다(Ultra-Turrax, T25, 50ml 프로브). 상기 용액을 파라필름으로 덮고(비커 및 프로브에 부착) 로터 고정자 균질기(rotor stator homogeniser)(Ultra-Turrax T25 basic)를 이용하여 24,000 rpm의 속도로 균질화시켰다.
- [0198] 1차 에멀전의 형성:
- [0199] 균질기가 필요한 속도에 다다른 즉시, 내부 상을 프로브에 근접한 용액 내로 주입함으로써 첨가하였다. 생성된

에멀전을 2분 동안(얼음 상태) 균질화시킨 후, 유리 주사기(SGE, 25 ml, 가스 기밀, 유기 용매에 적합함, P/N 009462 25MDR-LL-GT, Batch # F06-A2190, 굵은 바늘인 5 cm 2R2 바늘, 0.7 mm ID에 맞음)로 옮겼다.

[0200] (ii) 2차 에멀전(w/o/w)

[0201] 내부상(w/o): 상기 기술된 균질화 단계로부터의 1차 에멀전

[0202] 외부상(w): 물 중 소듐 클로라이드(1.25% w/v).

[0203] 2차 에멀전의 형성:

[0204] 균질화하면서 2차 수성 상(1.25% w/v 소듐 클로라이드)에 첨가함으로써 이중 에멀전(w/o/w)을 형성하는데 1차 단일 에멀전(w/o)을 이용하였다. 소듐 클로라이드 용액(1.25 % w/v, 30 ml)을 긴 50 ml 비커(에멀전을 차갑게 유지하기 위해 얼음위에 둠)에 옮겨 담고, 실벌슨(Silverson) L4RT 균질기의 프로브(3/4 인치 프로브, 고 에멀 설 스크린(high emulsor screen))를 삽입하였다. 상기 용액을 파라필름으로 덮고(비커 및 프로브에 부착) 8,000 rpm의 속도로 균질화시켰다. 8,000 rpm 속도에 도달한 즉시, 1차 에멀전을 프로브에 근접한 용액 내로 주입하였다. 생성된 에멀전을 6분 동안 균질화시켰다.

[0205] 형성된 이중 에멀전을 짧은 50 ml 비커로 옮기고, 유기상을 3시간 동안 일정하게 저으면서(IKA 마그네틱 교반기, 세팅 4) 흠 후드에서 증발시켰다.

[0206] 원심분리에 의한 나노입자 세척:

[0207] 유기 용매의 제거 후, 형성된 나노입자를 한차례 16,200 rcf에서 원심분리하여 세척하였고, 물(10 ml)에서 재-현탁시켰다.

[0208] 실시예 3 - 동적 광 산란에 의한 나노입자 형성 확인

[0209] 나노입자의 형성을 준-탄성 광 산란(uasi-elastic light scattering, QELS)(동적 광 산란(DLS))으로도 알려짐)을 이용하여 사이징(sizing)함으로써 확인하였다. 이 입자를 제조업자에 의해 제공된 표준 절차에 따라 브룩헤븐 인스트루먼트 코퍼레이션(Brookhaven Instruments corporation) 입자 크기 분석기(BIC 90 플러스)를 이용해 분석하였다. 상기 입자 현탁액을 물에서 200x로 희석하고, 표준 크기 파라미터(25° C의 온도, 90° 의 레이저 빔 각도, 658 nm의 레이저 파장)를 이용하여 사이징하였다. 상기 입자를 각 기간마다 1분의 10 사이징 실행(sizing runs)을 수행하여 분석하였다.

[0210] 상기 기계는 표준 형태의 코렐로그래프로 미가공 데이터를 제공하였다. 이는 상이한 시간 간격으로 입자로부터의 분산된 빛 강도의 자기상관함수 $C(\tau)$ 및 자기상관(autocorrelation)이 붕괴 시간 τ 에 따라 어떻게 붕괴(decay)하는지를 나타낸다. 산란된 빛의 자기상관에서의 붕괴는 입자 직경에 의존하며, 작은 입자에서 더 빠르다. 상기 기계는 스톡스-아인슈타인 방정식을 적용함으로써, 입자 크기에 대한 정보를 유추한다. 이는 샘플 내 입자의 평균 유체 역학적 직경 및 추가로 입자 집단에 대해 유추된 데이터를 산출한다.

[0211] 동적 광 산란은 거대 입자의 존재에 매우 민감하며, 심지어 샘플의 1% 미만이 존재하는 경우에도 측정에 상당한 영향을 미친다. 그 결과, 샘플 중 거대 입자에 상당히 영향을 받는 기계가 제시하는 평균 유체 역학적 직경은 실질적으로 다를 수 있다. 그 결과, 배치 사이의 수십 나노미터의 차이가 관찰될 수 있으며, 이러한 이유로, 가장 중요한 코렐로그래프와 함께 기계가 제공하는 완벽한 데이터 세트를 살피는 것이 중요하다. 완벽한 데이터 세트를 살핌으로서, 샘플을 정확히 특징화하는 것이 가능한데, 이는 상기 기계가 거대 입자가 거의 존재하지 않음에도 불구하고, 샘플 내 존재하는 작은 입자 대부분을 쉽게 감지할 수 있기 때문이다. 코렐로그래프 그 자체의 형상은 상기 입자가 작은지 여부 및 상기 샘플이 다분산성인지 여부의 매우 명확히 표시를 제공한다. 기준 지표(baseline index) 또한 데이터의 질의 정확한 표시를 제공한다. 본원 내 모든 데이터는 5 이하에 포함되지 않는 기준 지표를 나타내며, 10은 관독의 가능한 가장 높은 품질에 대한 최대값이다.

[0212] 도 1a는 QELS에 의해 입자 현탁물질의 크기에 따라 획득된 코렐로그래프(미가공 데이터)를 나타낸다. 상기 코렐로그래프는 입자의 존재는 임의의 빛 분산을 생성하지 않을 것이기 때문에, 입자 제조 과정에 의해 나노입자 현탁물질이 생성되었음을 명확히 나타내었다. 코렐로그래프의 형상은 입자가 작고, 거대 응집체가 존재하지 않기 때문에, 상기 현탁물질이 우수한 약학적 품질임을 나타내었다. 나노입자 현탁물질의 QELS에 의한 사이징은, 262.6 nm의 나노입자의 평균 유체역학적 직경이 형성되었음을 나타내었다(도 1a). 상기 입자 집단은 또한 샘플 내 얼마나 넓은 범위의 입자 크기임을 측정하는 다분산도 지표를 이용해 0.262에서, 상대적으로 단순분산성(monodisperse)으로 관찰되었다(도 1a). 이것은 입자 제형에 대해 최대 허용가능한 값 0.300 이하이다. 일반

적으로, 상기 코렐로그래프는 이중 에멀전 과정이 우수한 품질의 PBCA 나노입자 현탁물질을 성공적으로 생성했음을 확인시켰다.

[0213] 유추된 데이터(스톡스-아인슈타인 방정식을 이용하여 기계에서 생성됨)는 대부분의 입자가 작다고 시사한다(도 1b-d). 상기 결과는 대략 87.5 %의 입자 집단이 138.19 nm 이하의 직경을 갖는다고 시사한다(도 1b). 현탁물질은 대부분의 입자 집단이 상당히 작다는 사실과 함께 거대 응집체가 존재하지 않고 직경상 506.81 nm을 초과하는 어떤 입자도 포함하지 않음이 밝혀졌다(도 1c). 더욱이, 상기 제형은 99.86 nm보다 작은 어떤 입자도 포함하지 않았다(도 1d). 따라서, 대부분의 입자는 정맥내 투여에 이상적인 크기이면서 약물 로딩이 제대로 이뤄지지 않을 정도로 너무 작지는 않은 크기인, 직경 99.86 내지 138.19 nm이다.

[0214] 도 1 - 현탁액 중에 나노입자의 존재를 나타내는 QELS에 의해 획득한 크기 데이터.

[0215] 도 1(a) 동적 광 산란에 의한 나노 입자 현탁액의 분석 후 획득된 코렐로그래프(Correlogram). 획득된 데이터에 따르면, 입자의 평균 유체 역학적 직경은 262.6 nm이며 다분산도 지표는 0.262였다.

[0216] 도 1(b) 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된(plotted) 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 대부분의 입자 집단(87.5 %)은 138.19 nm 이하의 직경을 갖는것으로 나타났다.

[0217] 도 1(c) 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 상기 데이터는 87.5%가 138.19 nm 이하의 직경을 가지며, 100%의 입자 샘플이 506.81 nm 이하의 직경을 갖음을 시사한다. 따라서, 상기 현탁물질은 거대 응집체가 존재하지 않으므로, 정맥내 투여에 적합하다고 여겨진다.

[0218] 도 1(d)는 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다. 상기 데이터는 14.9%의 입자 샘플이 99.86 nm 이하의 직경을 갖음을 시사한다.

[0219] 상기 과정은, 상이한 나노입자 제형이 제조된 경우, 유사한 나노입자 크기를 산출하는 것으로 밝혀졌다. 표 1은 4개 상이한 제형의 일련의 실행으로부터 획득한 크기 데이터를 요약한 것이다:

[0220] 표 1

제형	평균 유체역학적 직경 (nm)	다분산성 지표
1	259.6	0.164 5
2	437.6	0.281
3	319.2	0.303
4	320.6	0.248
평균	334.25	0.249

[0221]

[0222] 일반적으로, 중공 PBCA 나노입자 제조 과정은 원하는 직경 및 다분산성인 나노입자 현탁물질을 생성하는 것으로 밝혀졌다.

[0223] 실시예 4 - 나노입자의 분석 - 전자현미경에 의한 나노입자 제형 및 중공 형태의 확인

[0224] 입자가 형성되었고, 이 입자가 중공임을 확인하기 위해, 샘플을 전자 현미경으로 시각화하였다. 나노입자 현탁물질을 투과 전자 현미경(TEM)으로 실험하였다. 냉각-건조된 나노입자를 주사 전자 현미경(SEM)으로 분석하였다. 상기 두 현미경 기법에 의한 분석으로 나노입자의 형성이 확인되었다. SEM은 안정한 나노입자가 형성되었음을 나타내었다. TEM는 상기 나노입자가 PBCA 폴리머 벽으로 둘러싸인 수성 코어를 가지는, 중공임을 확인시켰다.

[0225] 도 2는 SEM에 의해 분석된 나노입자를 나타낸다.

[0226] 도 3은 비교를 위해, 고체 PBCA 나노입자의 중첩된 영상과 함께, TEM에 의한 중공 나노입자의 영상을 나타낸다.

[0227] 실시예 - 5 - 중공 PBCA 나노입자 내 모노클로날 항체(인간 항-CD23)의 캡슐화

[0228] 모노클로날 항체(W099/58679에 기재된 바와 같은, 인간 항-CD23 mAb)를 균질화 과정 중 내부 수성상에 포함시킴으로서, 나노입자의 수성 코어 내에 가두었다. 항체 용액을 1차 에멀전(w/o) 제조하는데 사용한 다음, 2차 수

성상과 함께 균질화하여 하기와 같은 이중 에멀전(w/o/w)을 형성시켰다:

(iii) 1차 에멀전(w/o)

내부상(w): W099/58679호에 기재된 바와 같은 항-CD23 mAb(5% 소듐 클로라이드 중 600 μ g(SIGMA)), 혼합에 의해 제조됨:

78 μ l의 mAb 용액(7.2 mg/ml)

344 μ l의 H₂O

500 μ l의 소듐 클로라이드 용액(10% w/v 저장 용액).

내부 수성상의 총 부피는 1 ml이었다. 상기 용액을 사용할 때까지 얼음상태로 보관하였다. 각 용액을 사용 이전에 1ml의 인슐린 주사기(테트로 1 ml, BD 마이크로란스 바늘 19G 1.5")로 끌어들이었다.

외부상(o): 디클로로메탄(Fischer) 중 PBCA 폴리머(1 % w/v).

유기상(DCM 중 PBCA 폴리머, 6 ml)를 10ml 비커(차가운 상태를 유지하기 위해 얼음에 둠)에 붓고, 균질기의 프로브를 삽입하였다(Ultra-Turrax, T25, 50ml 프로브). 상기 용액을 파라필름으로 덮고(비커 및 프로브에 부착) 24,000 rpm의 속도로 균질화시켰다.

1차 에멀전의 형성:

균질기가 최고 속도에 다다른 즉시, 내부 수성 상을 프로브에 근접한 용액 내로 주입함으로서 첨가하였다. 생성된 에멀전을 2분 동안(얼음 상태) 균질화시킨 후, 유리 주사기(SGE, 25 ml, 가스 기밀, 유기 용매에 적합함, P/N 009462 25MDR-LL-GT, Batch # F06-A2190, 굵은 바늘인 5 cm 2R2 바늘, 0.7 mm ID에 맞춤)로 옮겼다.

(iv) 2차 에멀전(w/o/w)

내부상(w/o): 상기 기술된 균질화 단계로부터의 1차 에멀전

외부상(w): 물 중 소듐 클로라이드(1.25% w/v).

2차 에멀전의 형성:

균질화하면서 2차 수성 상(1.25% w/v 소듐 클로라이드)에 첨가함으로서 이중 에멀전(w/o/w)을 형성하는데 1차, 단일 에멀전(w/o)을 이용하였다. 소듐 클로라이드 용액(1.25 % w/v, 30 ml)을 긴 50 ml 비커(에멀전을 차갑게 유지하기 위해 얼음위에 둠)에 옮겨 담고, 실벌슨 L4RT 균질기의 프로브(3/4 인치 프로브, 고 에멀설 스크린)를 삽입하였다. 상기 용액을 파라필름으로 덮고(비커 및 프로브에 부착) 8,000 rpm의 속도로 균질화시켰다. 8,000 rpm 속도에 도달한 즉시, 1차 에멀전을 프로브에 근접한 용액 내로 주입하였다. 생성된 에멀전을 6분 동안 균질화시켰다.

형성된 이중 에멀전을 짧은 50 ml 비커로 옮기고, 유기상을 3시간 동안 일정하게 저으면서(IKA 마그네틱 교반기, 세팅 4) 흠 후드에서 증발시켰다.

원심분리에 의한 나노입자 세척:

생성된 나노입자를 원심분리에 의해 펠렛화시켜 캡슐화된 항체로부터 유리상태를 분리하였다. 캡슐화 효율을 측정하기 위해, 펠렛(간힌 항체) 및 상청액(유리 항체)를 총 단백질 분석에 의해 분석하였다.

캡슐화 효율은 600 μ g 항체 총 양이 사용된 경우, 52%인 것으로 나타났다. 캡슐화의 효율은 PBCA 폴리머의 최대 허용 용량(마우스에서 50 mg/kg)을 초과하지 않고, 항체의 잠재적 치료량의 전달을 허용하도록 충분히 높은 것으로 나타났다. 더욱이, 이것은 후에 상이한 모노클로날 항체, 인간 항-IL13를 포함하는 입자를 제조하는 것이 가능하며, 이것은 상기 방법이 임의의 수용성 생물의약품에 적용가능함을 시사한다.

도 4는 캡슐화 효율 측정에서 획득된 결과를 나타낸다.

실시에 6 - 나노입자로부터 모노클로날 항체의 방출

생물의약품의 효율적 캡슐화를 달성하는 것 이외에도, 투여 후에 물질이 입자로부터 방출할 수 있고, 이의 활성을 유지하는 것이 증명될 필요가 있었다. 입자로부터 활성 항체의 방출은 초기에는 ELISA에 의한 임의의 방출된 항체의 감지 후 입자의 분해에 의해 시험관 내에서 조사되었다. 캡슐화된 항체의 방출을 위해 입자를, PBCA

폴리머의 부틸 에스테르를 절단하는 것으로 보고된, 부틸 에스테라제(폐지간에서 유래됨, SIGMA)로 처리하였다. 반응 중(링거액(Ringers solution), pH 7.0, 37° C) 상이한 시점(0, 1, 2, 3, 4 및 24시)에 샘플을 채취하였고, 활성 항체의 존재를 ELISA에 의해 분석하였다.

[0251] 도 5는 입자의 효소적 분해 후 획득된 방출 프로파일 및 방출된 효소의 ELISA에 의한 분석을 나타낸다.

[0252] 실시예 7 - 중공 PBCA 나노입자 내에 도메인 항체(항-헨 에그 리소자임 dAb)의 캡슐화

[0253] 하기 실시예에서, 시그마사로부터 획득한 BCA 키트(QBCA)를 이용하여 BCA 분석을 수행하였고 지시에 따라 수행하였다. 유리 dAb를 분석을 위해 2배 및 10배 희석하였다. 캡슐화된 dAb를 100배 희석하였다.

[0254] 도메인 항체(항-헨 에그 리소자임 dAb)를 균질화 과정 중 내부 수성상에 포함시킴으로서, 나노입자의 수성 코어 내에 가두었다. 이 과정에서, dAb의 20 mg/ml 용액 0.5 ml(10 mg 단백질)과 0.5 ml의 안정화 용액(소듐 클로라이드, 10% w/v)을 혼합하여 내부 수성상을 제조하였다. 그 다음 실시예 4에 기술된 바와 같이, 이중 에멀전 과정에 의해 나노입자를 제조하였다. 생성된 나노입자를 원심분리를 이용해 펠렛화하여 캡슐화된 항체로부터 유리형태를 분리하였다. 캡슐화 효율을 측정하기 위해, 펠렛(간힌 항체) 및 상청액(유리 항체)를 총 단백질 분석(바이신코닉산(bicinchoninic acid) 분석)에 의해 분석하였다. 분석 결과를 도 6에 나타내었다. 캡슐화된 dAb의 양은 6.66 mg로 나타났다. 유리 dAb의 양은 4.83 mg이었다. 따라서, 로딩 효율 11.1%이며, 캡슐화 효율은 약 66.6%이었다. 따라서, 이중 에멀전 방법을 이용하여 중공 PBCA 나노입자 내 밀리그램 함량의 단백질을 효과적으로 캡슐화하는 것이 가능하였다.

[0255] 실시예 8 - HIP 과정에 의한 PBCA 나노입자의 제조

[0256] 100 μ l의 BCA 모노머를 가용화된 HIP 이온(도큐세이트 나트륨, 1 ml의 디클로로메탄 중 3.058-6.1 16 % w/v)이 포함된 유기상에 첨가하여 나노입자를 제조하였다. 생성된 용액을 실벌설 L4RT 균질기를 이용하여 7,000에서 균질화하면서 수성상(1% w/v 텍스트란, 0.2 % w/v 플루로닉 F68, 10 ml, pH 7.0)으로 피펫으로 옮겼다. 수성상의 중성 pH에의 노출은 BCA 모노머의 빠른 중합반응을 유발시켜 PBCA 폴리머를 형성시킨다. 형성된 에멀전을 45초동안 균질화한 뒤, 3시간 동안 흡 후드에서 인큐베이션하여, 유기 용매가 증발되고 나노입자가 형성되도록 하였다. 생성된 나노입자 현탁물질을 4°C에서 보관하였다.

[0257] 실시예 9 - 동적 광 산란에 의한 나노입자의 확인

[0258] HIP 과정에 의한 PBCA 나노입자의 형성을 동적 광 산란(DLS)을 이용해 사이징(sizing)으로서 확인하였다. 상기 입자를 브룩헤븐 인스트루먼트 코퍼레이션(Brookhaven Instruments corporation) 입자 크기 분석기(BIC 90 플러스)를 이용해 분석하였다. 도 7은 DLS에 의해 획득된 사이징 데이터를 나타내며, 이 데이터는 현탁액 중에 나노입자의 존재를 나타낸다. DLS에 의한 사이징은 291.4 nm의 평균 유체 역학적 직경의 나노입자가 형성되었음을 나타내었다(도 7a). 상기 입자 집단은 또한 샘플 내 얼마나 넓은 범위의 입자 크기인지를 측정하는 다분산도 지표를 이용해 0.242에서, 상대적으로 단분산성(monodisperse)으로 관찰되었다(도 7a). 이것은 입자 제형에 대해 최대 허용가능한 값 0.300 이하이다. 일반적으로, 상기 코렐로그래프는 입자 제조 과정이 우수한 품질의 PBCA 나노입자 현탁물질을 성공적으로 생성했음을 확인시켰다.

[0259] 유추된 데이터는 대부분의 입자가 작다고 시사한다(도 7b-d). 상기 결과는 대략 96.3 %의 입자 집단이 201.37 nm 이하의 직경을 갖는다고 시사한다(도 7b). 현탁물질은 대부분의 입자 집단이 상당히 작다는 사실과 함께, 일반적으로 거대 응집체가 존재하지 않고 직경상 732.05 nm를 초과하는 어떤 입자도 포함한다고 나타났다(도 7c). 또한, 상기 제형은 143.38 nm보다 작은 어떤 입자도 포함하지 않는 것으로 보였다(도 7d). 따라서, 대부분의 입자는 정맥내 투여가 안전한 크기이면서 약물 로딩 효율을 감소시킬 정도로 너무 작지는 않은 크기인, 직경 143.38 내지 201.37 nm이다.

[0260] 도 7(a) - 동적 광 산란에 의한 나노 입자 현탁액의 분석 후 획득된 코렐로그래프(Correlogram). 획득된 데이터에 따르면, 입자의 평균 유체 역학적 직경은 291.4 nm이며 다분산도 지표는 0.242였다.

[0261] 도 7(b) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 이 데이터는 96.3%의 다수의 입자 집단이 201.37 nm 이하의 직경을 갖는것으로 보인다고 시사했다.

[0262] 도 7(c) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터). 상기 데이터는 96.3%의 입자 집단이 201.37nm 이하의 직경을 갖는것으로 보이며, 100%의 입자 샘플이 732.05 nm 이하의 직경을 갖음을 시사한다. 따라서, 상기 현탁물질은 거대 응집체가 존재하지 않는 것으

로 밝혀졌으므로, 정맥내 투여가 안전하다로 여겨진다.

[0263] 도 7(d) - 크기 범위에 걸쳐 입자 집단(개수)의 분포를 도시하도록 플로팅화된 나노입자의 다모드 크기 분포(파생 데이터)를 나타낸다. 상기 데이터는 6.2%의 입자 샘플이 143.38 nm 이하의 직경을 갖음을 시사한다.

[0264] 상기 과정은, 상이한 나노입자 제형이 제조된 경우, 유사한 나노입자 크기를 산출하는 것으로 밝혀졌다. 표 2은 일련의 6개 다양한 조성물의 상이한 제형으로부터 획득한 사이징 데이터를 요약한 것이다:

[0265] 표 2

제형	평균 유체역학적 직경 (nm)	다분산도 지표 10
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 15

[0266]

[0267] 일반적으로, HIP 과정은 원하는 직경 및 다분산성인 나노입자 현탁물질을 생성하는 것으로 나타났다.

[0268] 실시예 10 - HIP 과정을 이용한 유기상 내로의 펩티드의 가용화 및 PBCA 나노입자로의 캡슐화

[0269] 30-60 mg의 펩티드를 3 ml의 CaCl_2 (18.3 mM)에 용해시키고 농축된 HCl (2M)를 첨가하여 pH를 3.05까지 낮춤으로써 핵사펩티드 달라진의 용액을 제조하였다. 생성된 용액(500 μl , 10-20 mg/ml, 및 펩티드의 총량 5-10 mg)을 2 ml의 에펜도르프 튜브(ependorf tube)에서 디클로로메탄(1 ml, 3.058-6.1 16 % w/v) 중 HIP 시약 도큐세이트 나트륨의 용액에 첨가하였다. 사용된 HP 용액의 부피는 펩티드 용액의 두배였다(500 μl 의 펩티드 용액의 경우 1 ml의 HIP 용액). HIP:펩티드의 물 비는 5 mg의 펩티드 이용시 10:1, 10 mg의 펩티드 이용시 5:1이었다. 유기상 및 수성상을 최대 속도에서 1분 동안 볼텍싱하여 혼합하였다. 생성된 현탁물질을 20,817 rcf에서 50분 동안 원심분리하여 두개의 상으로 분리시켰다. 유기층(가용화된 펩티드 함유)을 수집하고, 나노입자의 제조에 이용하였다.

[0270] 상기 과정이 성공적으로 펩티드를 유기 용매로 가용화했음을 확인하기 위해, 수성상에 남은 펩티드의 양을 측정하였다. LC-MS 및 에드만 시퀀싱(Edman sequencing)에 의한 분석은 99% 이상의 펩티드가 유기상으로 성공적으로 추출되었음을 나타냈다.

[0271] 실시예 11 - PBCA 나노입자 내로의 펩티드의 캡슐화

[0272] 100 μl 의 BCA 모노머를 가용화된 펩티드 및 HIP(1 ml)을 포함하는 유기상에 첨가하여 나노입자를 제조하였다. 생성된 용액을 실벌설 L4RT 균질기(미세한 에멀설 스크린(fine emulsor screen), % 인치 프로브)를 이용하여 7,500에서 균질화하면서 수성상(1% w/v 텍스트란, 0.2 % w/v 플루로닉 F68, 10 ml, pH 7.0)으로 피펫으로 옮겼다. 수성상의 중성 pH에의 노출은 BCA 모노머의 빠른 중합반응을 유발시켜 PBCA 폴리머를 형성시켰다. 형성된 에멀전을 45초동안 균질화한 뒤, 1시간 동안 흡 후드에서 진탕하면서(IKA 마그네틱 교반기, 속도 설정 4) 인큐베이션하여, 유기 용매를 증발시켰다. 그 다음 속도 설정을 3으로 낮추고, 상기 제형을 2시간 동안 추가로 인큐베이션하여, 유기상의 증발과 나노입자 형성을 확실히 하였다. 상기 나노입자 현탁물질을 수집하고 4°C에서 보관하였다.

[0273] 생성된 나노입자를 원심분리하여 임의의 유리 펩티드를 제거하였고, 물 또는 PBS에서 재현탁시켰다.

[0274] LC-MS에 의해 입자를 분석함으로써, 캡슐화 효율을 측정하였다. 심지어 높은 펩티드 양(10mg)이 사용된 경우에도, 대략 90% 펩티드 용량이 캡슐화된 것으로 나타났다. HIP를 이용해 달성된 캡슐화된 펩티드의 양과, 입자 표면에 부착의 일반적인 방법에 의해 달성된 양과의 비교는, HIP-PBCA 과정의 우수함을 명확히 입증하였다(도 8). 부착 방법이 사용된 경우, 단지 1.5%의 펩티드 용량만이 입자로 로딩되었다. 부착 방법에 의해 달라진과 함께 로딩된 나노입자의 분석은 상이한 시점에 수행되었다. 선행기술을 평가하기 위한 수단으로서, 현재 HIP 방법 개발 이전에 크레우터(Kreuter) 흡착된 입자를 제조하고, 분석하였다. 사용된 LC/MS 방법 및 HPLC 방

법은 동등하게 민감하다.

[0275] 실시예 12 - 생체내(마우스 모델)에서의 HIP-PBCA 나노입자 운반 시스템의 평가

[0276] HIP-PBCA 나노입자가 뇌로 이들의 펩티드 로드를 운반하는 능력을 생체내, 마우스 모델에서 측정하였다. HIP 과정을 이용하여 캡슐화된 달라진을 포함하는 HIP-PBCA 나노입자를, 크레우터 등에 의해 보고된 바와 같은 입자 표면상에 부착된 펩티드를 가지는 HIP-PBCA 나노입자와 비교하였다. 상기 나노입자를 이들의 표면을 폴리솔베이트 80 계면활성제로 코팅함으로써, 정맥 경로를 통한 뇌 전달을 위해 제조하였다. 간략히, 상기 나노입자를 주입 이전에 PBS 함유 1% w/v 계면활성제에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 계면활성제는 나노입자 표면 상에서 혈청 아폴리포단백질(apolipoproteins)의 부착을 촉진함으로써, 나노입자를 뇌로 간접적으로 타겟화한다고 문헌에서 보고되고 있다. 이것은 입자가 혈뇌장벽 상의 아폴리포단백질 수용체에 결합하도록 하며, 트랜스사이토스(transcytose)하여 뇌에 도달하게 한다. 하기 제형이 비교되었다:

[0277] 1. HIP-PBCA 나노입자 단독(5:1 HIP 함량)

[0278] 2. HIP-PBCA 나노입자 단독(10:1 HIP 함량)

[0279] 3. 용액 내 달라진(2.0 mg/kg)

[0280] 4. 표면상에 부착된 달라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(제형에서 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)

[0281] 5. 캡슐화된 달라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:달라진 몰비)(제형에서 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)

[0282] 6. 캡슐화된 달라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:달라진 몰비)(제형에서 사용된 총 용량 2.0 mg/kg) - 상술된 것과 동일한 제형이나, 상기 용량의 1/10이 주입됨.

[0283] 7. 캡슐화된 달라진을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:달라진 몰비)((제형에서 사용된 총 용량 2.0 mg/kg)

[0284] 주입 20분 후 마우스를 희생시키고, 뇌와 혈액 샘플을 수집하고, LC-MS-MS에 의해 펩티드의 존재에 대해 분석하였다. 뇌의 1 그램 당 15 μ l의 혈액 오염(blood contamination)을 가정하고, 혈액 오염에 대한 뇌 데이터를 수집하였다. 획득한 결과를 도 9에 도시하였다:

[0285] 생체내 연구의 결과는 HIP 과정을 이용한 HIP-PBCA 나노입자의 코어 내의 펩티드의 캡슐화는 입자 표면상에 펩티드의 부착보다 우수함을 시사한다.

[0286] 실시예 13 - HIP-PBCA 나노입자에서 달라진의 캡슐화 효율에 미치는 pH의 영향

[0287] 선행기술에서, PBCA 나노입자는 수성상의 pH가 약 2.0(0.01 N HCl)인, 산성 유중수 에멀전에서 BCA 모노머의 느린 중합반응에 의해 형성된다. 산성 조건에서의 중합반응은 완성되기까지 3시간 이상의 시간을 필요로 한다. 그러나, 이 방법은 중성 pH를 이용하여 빠른 중합반응을 가능케 한다. 사용된 수성상은 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.2)이다. 중성 pH에서, BCA 모노머는 빠르게(수 초 이내) 중합하는 것으로 공지되어 있다. 그 결과, HIP-PBCA 나노입자의 생산은 에멀전의 매우 빠른 형성을 필요로 한다. 이것은 이 방법에서 실벌슨 L4RT 균질기를 이용해 빠른 속도(7,500 rpm 이상)로 균질화함으로써 성취된다. 중성 pH에서 더 빠른 중합반응은 펩티드를 입자 내에 빠르게 가둠으로써, 캡슐화 효율을 개선할 것이라고 가정하였다. 대조적으로, 연장된 중합반응은 에멀전으로부터 수성상으로 펩티드의 점차적 손실을 유도할 수 있다. 가설을 테스트하기 위해, BCA 모노머를 추출된 펩티드와 함께 PBCS 또는 선행 기술의 기존 매질(0.01 N HCl)에서 유화시킴으로써, HIP-PBCA 과정을 이용해, 나노입자를 제조하였다. 산성 및 중성 수성상 둘 모두는 필수 안정제(stabilisers)(0.2% 플루로닉 F68, 1% 텍스트란)를 포함하였다. 실시예 3에 기술된 절차에 따라 나노입자를 제조하였다. 제형 당 사용된 펩티드의 양은 5mg였다. 하기 제형을 제조하였다(각각 한개 제조):

[0288] 1. HIP-PBCA 나노입자 단독(35:1 HIP 함량), pH2

[0289] 2. HIP-PBCA 나노입자 단독(35:1 HIP 함량). pH7

[0290] 3. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(35:1 HIP:달라진 몰비), pH2

[0291] 4. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(35:1 HIP:달라진 몰비), pH7

[0292] 5. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:달라진 몰비), pH2

[0293] 6. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(10:1 HIP:달라진 몰비), pH7

- [0294] 7. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:달라진 몰비), pH2
- [0295] 8. 캡슐화된 달라진(5.0 mg 투입량)을 지니는 HIP-PBCA 나노입자(5:1 HIP:달라진 몰비), pH7
- [0296] 나노입자 제형을 원심분리하여 임의의 유리 펩티드를 제거시키고, 물 또는 PBS에서 재-현탁시켰다. 입자를 10 mM NaOH(실온에서 밤새 인큐베이션함)에서 분해시킨뒤, LC-MS에 의해 분석함으로써, 캡슐화 효율을 측정하였다. 획득한 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0297] 상기 결과는 중성 pH에서 PBCA 폴리머의 빠른 형성은, 선행기술의 경우와 같은 산성 pH에서 폴리머의 느린 형성 보다 높은 펩티드 캡슐화 효율을 야기할 것이라는 가설을 지지한다. NaOH로의 처리에 의한 분해로 인해, 일부 펩티드의 손실에도 불구하고, 명백히 얻어진 상기 결과는 중성 pH에서 입자의 형성에 유리한 것으로 보인다. 10:1의 HIP:달라진의 비에서, 입자가 pH 7에서 형성된 경우, 투여 펩티드의 63.23%의 나노입자에 가워졌다. pH 2에서, 캡슐화 효율은 2.36%로 상당히 낮았다. 전반적으로, 캡슐화 효율은, 입자가 pH 2에서 제조된 경우보다, 입자가 pH 7에서 제조된 경우에 더 높았다.
- [0298] 실시예 14 - HIP 과정을 이용한 PBCA 나노입자 내의 도메인 항체의 캡슐화
- [0299] 실시예 3에 기재된 절차에 따라, 도메인 항체(항-헨 에그 리소자임 dAb)를 PBCA 나노입자 내에서 제형화하였다. 제형에서 사용된 단백질의 양은 10 mg였다. 총 두개의 제형을 제조하였다. 캡슐화된 dAb의 양을 측정하기 위해, 입자를 원심분리하여 임의의 유리 단백질을 제거한 뒤, 에드만 시퀀싱을 이용해 분석하였다. 서열 정보 외에도, 에드만 시퀀싱은 또한 양적 정보를 제공하는데도 이용될 수 있다. 이 방법은 입자를 파괴하는 거친 화학적 처리에 관한 것이며, 캡슐화된 물질의 검출을 가능케 한다. 획득된 결과를 도 11에 나타내었다. 상기 결과는 거대 분자를 HIP-PBCA 과정을 이용해 캡슐화하는 것이 가능하나, 효율은 낮음을 시사한다. 그러나, 도메인 항체를 이용해 사용할 프로토콜을 최적화함으로써, 캡슐화 효율을 증가시키는 것이 가능할 수 있다. 달라진에 대해 최적화된, 현재의 프로토콜로, 사용된 10 mg 중 대략 2.56 mg을 캡슐화하는 것이 가능하였다.
- [0300] 이것은 25.6%의 캡슐화 효율에 이르며, 이 효율은 단백질이 소수성 입자 매트릭스 내로 가워진 경우, 단일 에멀전 과정에 대해서 높은 값이다.
- [0301] 실시예 15 - 중공 PBCA 나노입자 내에서의 모노클로날 항체(항-IL-13 mAb)의 캡슐화
- [0302] 모노클로날 항체(항-IL-13 mAb)를 균질화 과정 중 내부 수성상에 포함시킴으로써, 나노입자의 수성 코어 내에 가두었다. mAb의 20 mg/ml 용액 0.5 ml(10 mg 단백질)과 0.5 ml의 안정화 용액(소듐 클로라이드, 10% w/v)을 혼합하여 내부 수성상을 제조하였다. 그 다음 실시예 5에 기술된 바와 같이, 이중 에멀전 과정에 의해 나노입자를 제조하였다. 생성된 나노입자를 원심분리를 이용해 펠렛화하여 캡슐화된 항체로부터 유리형태를 분리하였다. 캡슐화 효율을 측정하기 위해, 펠렛(간힌 항체) 및 상청액(유리 항체)를 총 단백질 분석(바이신코닉스 분석)에 의해 분석하였다. 분석 결과를 도 12에 나타내었다. 캡슐화된 mAb의 양은 8.62 mg로 나타났다. 유리 mAb의 양은 1.79 mg이었다. 따라서, 로딩 효율 14.4% w/w이며, 캡슐화 효율은 86.2%이었다.
- [0303] 실시예 16 - PBCA 나노입자 내 도메인 항체의 개선된 캡슐화를 위한 HIP 과정의 최적화
- [0304] 도메인 항체의 로딩을 개선하기 위해서, 달라진 프로토콜을 추가로 최적화하였다. 최적화를 위한 시점으로서 사용된 달라진에 대한 프로토콜은 실시예 10과 11에 기재되어 있다.
- [0305] 프로토콜 개질의 목적은 항체의 유기상내로의 충분한 가용화 및 나노입자로의 효과적인 통합을 달성하는 것이었다. 이것은 유기상 내에서 HIP dAb 복합체의 현탁물질을 형성시키기 위한 추가 균질화 단계를 포함함으로써 달성되었다. 일반적으로, 달라진 프로토콜에 대해 하기 변화가 발생되었다:
- [0306] 사용된 dAb는 VEGF-myc dAb이었다. dAb의 명칭은 DOM 15-26-593이며, PCT W02008/149147에 개시되어 있다.
- [0307] dAb는 100 mg의 PBCA 폴리머 당 12 mg(0.843 μ mol)의 투입량으로 제형화되었다(12% w/w dAb / PBCA, 100 mg의 PBCA 폴리머 당 12 mg의 dAb).
- [0308] dAb는 HIP(도큐세이트 나트륨)과 82:1의 몰비로 복합체를 형성하였다. HIP 용액 농도는 30.581 mg/ml(1 ml 중 0.06879 mmol)였다.
- [0309] dAb 용액의 산성화를 점차적으로 수행하였고, 분자를 너무 낮은 pH값의 노출 및 분해로부터 보호하기 위해 일정하게 혼합하였다.
- [0310] dAb 용액의 pH를 HCl을 이용하여 pH 3.6까지 낮추었다.

- [0311] CaCl_2 는 HIP의 dAb에 대한 결합을 방해할 수 있기 때문에, 사용하지 않았다.
- [0312] 원심분리에 의해 두개의 상을 분리시킨 후, 500 μl 의 산성화된 dAb 용액(24 mg/ml, 12 mg 단백질)과 DCM(30.581 mg/ml, 3.058 %w/w) 중 1,000 μl 의 도큐세이트 나트륨을 볼텍싱 혼합함으로써, 산성화된 dAb를 수성상으로부터 추출하였다. 달라진과는 달리, dAb는 유기상 내에서 충분히 가용화되지 않는 것으로 나타났다. 대신, 이는 경계에서 흰색 침전물을 형성하였다. 이 침전물은 dAb:HIP 복합체로 이루어져 있으며, 이 복합체의 부피는 추출에 사용된 HIP 및 dAb의 양에 비례하는 것으로 보였다. 수성상의 500 μl 에서 367.76 μl 까지의(물 첨가되지 않음) 감소된 부피를 이용하여 dAb를 충분하게 추출하기 위한 시도는 500 μl 부피를 이용한 것보다 덜 성공적이었다. 일련의 실험은 높은 등전점이 유리하다고 시사했으나, 낮은 pI's(VEGF dAb-myc, 이 경우 pI=6.6)로도 dAbs를 성공적으로 침전시키는 것이 가능하였다. 원심분리 후, 수성층을 채취하고 4°C에서 저장하였다. HIP-dAb 고체 펠렛을 포함하는 유기층을 이용하여 나노입자를 제조하였다.
- [0313] 나노입자를 제조하기 위해, HIP-dAb 펠렛을 유기상에 가용화하는 것이 필요하였다. 이것은 하기 추가 균질화과정을 상기 과정에 도입시킴으로서 달성된다.
- [0314] 수성상을 제거하고, 유기상 및 dAb 침전물을 울트라-튜렉스(Ultra-Turrax) 균질기(T25 베이직, 속도 설정 1)를 이용하여 2 ml의 에펜돌프에서 균질화하였다. 상기 제형을 15초동안 균질화시켜 흰색 현탁물질을 형성시켰다.
- [0315] HIP-dAb 펠렛이 균질기 프로브에 접촉하게 하고, 즉시 혼합을 시작하는 것을 확실히 하는 것이 중요하였다. 1분의 장시간 동안의 균질화는 더 좋은 현탁물질을 제공하지만, dAb는 활성을 잃는다.
- [0316] 균질화 후, 유기상을 2 ml의 에펜돌프에 남기고, 100 μl 의 BCA 모노머를 추가하였다. 액체 모노머는 유기상과 쉽게 혼합하는 것으로 나타났다. 그 다음 유기상을 이용하여 실시예 12에 기재된 바와 같이, 나노입자를 제조하였다.
- [0317] 또한 개질된 절차를 캡시드화된 mAb를 포함하는 HIP-PBCA 나노입자의 제조에 적용하였다. 전장 모노클로날 항체(PCT W099/58679에 기재된 바와 같은 항-CD23 mAb, 150,000 Da, 100 mg PBCA 폴리머 당 12 mg, 860:1 HIP:mAb 몰비)를 dAbs에 대해 개발된 프로토콜에 따라 제형화하였다. 하기 관찰이 이뤄졌다:
- [0318] mAb(W099/58679에 기재된 바와 같은 항-CD23)는 VEGF dAb보다 높은 함량의 HCl을 필요로 함이 발견되었다. HIP 시약을 이용해 추출된 경우, mAbs는 dAbs와 유사하게 작용함이 발견되었다: 이들은 유기상에서 충분히 가용화되지 않았으며, 경계에서 흰색 침전물을 형성하였다.
- [0319] 높은 농도의 mAb 저장 용액은, 유기상으로 mAb의 충분한 추출을 달성하기 위해, 500 μl 대신에 250 μl 부피의 수성상을 이용한 실험이 가능케 하였다. 4:1의 유기상 대 수성상의 비는 덜 잘 작용하였고, 이는 mAb의 활성을 손상시키는 것으로 보였는데, 이는 mAb가 더 많은 용매에 노출되었기 때문이다. 1:1의 유기상 대 수성상의 비는 mAbs 및 dAbs 둘 모두에 명백히 바람직하였다.
- [0320] 나노입자를 제조하기 위해, dAbs와 이용되었던 동일한 균질화 방법을 통해 균질화함으로써 HIP-mAb 펠렛을 유기상으로 가용화시켰다. 균질화는 성공적인 것으로 보였으나, 현탁물질은 덜 부드러웠는데, 아마도 더 큰 크기의 HIP-mAb 복합체에 기인한 것이었다. 1분의 장시간 동안의 균질화는 더 좋은 현탁물질을 제공하였으나, mAb가 변성된 것으로 보였다. 따라서, 균질화 단계는 짧게 15초 동안 유지시켰다.
- [0321] 그 다음 상기 나노입자를 앞에서 설명한 실시예와 같이 dAb 프로토콜에 따라 제조하였다.
- [0322] 일반적으로, 펩티드보다 큰 바이오팜(biopharms)의 캡시드화는 달라진 프로토콜의 상당한 개질을 필요로 하는 것으로 나타났다.
- [0323] dAbs 및 mAbs 둘 모두는 가용화를 위해 높은 HIP:바이오팜 몰비를 필요로 하였다(각각 82:1 및 860).
- [0324] dAbs 및 mAbs 둘 모두는 유기상에서 충분히 가용화되지 않았다. 대신, 경계에서 침전물이 형성되었다. 유기상에 가용화시키기 위해, 침전물을 유기상으로 균질화하여 오일 현탁액 중 고체를 형성시켰다. 이것으로 성공적으로 입자가 형성되었다.
- [0325] 실시예 17 - 개질된 HIP 과정을 이용한 PBCA 나노입자 내 도메인 항체의 캡슐화
- [0326] 실시예 16에 기재된 바와 같은 dAbs에 대한 개질된 HIP 프로토콜을 이용하여 일련의 dAb 분자를 캡시드화시켰다. 이들의 등전점을 기초로 dAbs를 선별하였다. 상기 과정이 다목적적이며 dAbs의 범위에 적합함을 확인하기 위해, 상기 과정에 이용될 가능성이 있는 범위의 등전점(pi)을 포함하는 것을 목표로 하였다.

하기 dAbs를 실험용으로 선별하였다(표 3):

표 3

dAb	DOM 15-10-11 Vk, NT tagless	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

DOM 숫자는 W02008/149146에 개시된 도메인 항체를 지칭한다. myc는 도메인 항체 상에 myc-태그(tag)를 지칭하거나, HA는 도메인 항체 상의 HA 태그를 지칭한다. 각각의 dAb는 HIP 시약으로서 도큐세이트 나트륨을 이용하여 70:1의 물비로, 개별적으로 PBCA 나노입자로 제형화되었다.

HIP 추출에 이용된 시약은 하기 표에 나열되어 있다(표 4):

표 4

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
도큐세이트 나트륨 양 (mg) Mr = 444.55 Da	15.248	13.661	14.034
도큐세이트 나트륨 양 (μmol) Mr = 444.55 Da	34.30	30.73	31.57
도큐세이트 나트륨 용액 농도 (mg/ml)	15.248	13.661	14.034
도큐세이트 나트륨 용액의 부피 (μl)	1000	1000	1000

추출을 위해 dAb 용액을 산성화하였다.

산성화 이전에, dAb 용액을 물을 첨가하여 하기와 같이 희석하였다(표 5):

표 5

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) 부피 (μl)	2.00	5.00	3.00
최종 pH	3.4	2.5	3.0

상기 용액에 HCl(2 M)을 첨가함으로써 산성화시켰다. 모든 dAb 용액을 인디케이터 스트립(indicator strips)으

로 측정시 약 pH 3.0까지 산성화시켰다. 각각의 산성화된 용액의 최종 부피를 물을 이용해 500 μ l 까지 맞추었다.

- [0338] 그 다음, dAbs를 실시예 16에 기재된 바와 같이 유기상으로 추출하였다. 모든 dAbs는 유기상에서 충분히 가용화되지 않은 것으로 나타났으며 경계에서 침전물을 형성하였다. 태깅되지 않은(untagged) dAb (NT)는 다른 dAbs보다 훨씬 얇은 침전물을 형성하는 것으로 나타났다. dAb의 높은 등전점 및 강한 양전하는 HIP를 이용해 더 강하고 더욱 소수성인 복합체 형성을 명백히 가능케하였고, 더욱 좋은 정도의 가용화 및 유기층으로의 전달을 야기하였다.
- [0339] 수성상(상부 층)의 제거 후, 유기상 및 dAb 침전물을 균질화함으로써 가용화시켰고, 실시예 16에 기재된 바와 같이 나노입자를 제조하였다.
- [0340] dAbs의 로딩을 평가하기 위한 SDS-PAGE에 의한 나노입자의 분석.
- [0341] SDS-PAGE를 이용해 나노입자 현탁물질을 분석하기 위해, 샘플을 미세 원심분리기에서 10분 동안 13000rpm에서 회전시켰다. 상청액을 빨아들이고, 펠렛을 100 μ l의 PBS에서 재현탁시켰다. 상청액 및 펠렛 분획을 1x NuPAGE LD 및 환원제로 분열시키고, 80℃에서 4분 동안 가열하고, 상업적으로 획득한 NuPAGE 겔을 이용해 SDS PAGE에 의해 검사하였다. dAb를 포함한 중공 제형으로부터의 상청액 샘플을 또한 검사하였고, 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0342] 라인 1 및 6: 분자량 마커. 라인 2: VEGF dAb DOM15-10-11, 태깅되지 않음, HIP-PBCA 나노입자 내 캡시드화됨. 라인 3: VEGF dAb DOM15-10-11, myc 태깅됨, HIP-PBCA 나노입자 내 캡시드화됨. 라인 4: VEGF dAb DOM15-10-11, HA 태깅됨, HIP-PBCA 나노입자 내 캡시드화됨. 라인 5: VEGF dAb DOM15-10-11, 태깅되지 않음, 중공 나노입자(양성 대조군) 내 캡슐화됨. 상기 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났음을 확인시켰다. 또한 겔은 dAbs가 무손상 상태이며, 입자 제조 과정에 의해 부서지지 않았음을 확인시켰다.
- [0343] 상기 겔은 임의의 유리 dAb의 제거 후, dAb가 나노입자 펠렛과 공동-지역화(co-localised)되었기 때문에, dAb가 입자 내에 캡시드화되었음을 명확히 나타내었다(도 13).
- [0344] dAb는 분명하게 나노입자 내로 캡시드화되었는데, 이는 dAb가 입자 내 존재하기 때문에 비-변성 조건에서(본래 겔) 펠렛의 분석은 겔 상에서 어떤 밴드도 산출시키지 않았기 때문이다(결과는 도시되지 않음). 입자로부터 방출되기 위해 dAb에 변성 조건(SDS 존재하에서 열 처리)이 필요하기 때문에, 상기 입자를 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 겔 상에서 실행하는 것이 필요하였다. 캡시드화는 테스트된 모든 dAbs에 성공적인 것으로 나타났다. 이는 추가 균질화 과정이 HIP-dAb 복합체를 유기상에 성공적으로 가용화시켜, dAb를 입자 내에 가두는 것을 가능케 했음을 시사한다. 그 결과, 특히 낮은 pi dAbs를 이용한 경우와 같이, HIP-dAb 복합체가 경계에서 침전된 후 추출된다는 사실은, 입자 내에서 dAbs의 캡시드화를 손상시키지 않았다. 따라서, dAbs를 HIP-PBCA 입자 내에 캡시드화하기 위한 개질된 프로토콜은 테스트된 범위에 대한 pi에 관계없이, dAbs의 범위에 적합한 것으로 나타났다.
- [0345] 실시예 18 - 개질된 HIP 과정을 이용한 PBCA 나노입자 내 도메인 항체의 캡슐화; 로딩 효율의 측정 및 제형화된 dAb의 활성 측정
- [0346] 개질된 HIP 프로토콜이 달성할 수 있는 로딩 효율을 측정하기 위해, HIP PBCA 나노입자 제형을 W02008/149147에 개시된 툴(tool) dAb(VEGF-myc dAb, DOM 15-26-593을 이용해 제조하였다. dAb를 100 mg의 PBCA 폴리머 당 12 mg(0.843 μ mol)의 투입량으로 제형화하였다(12% w/w dAb/ PBCA, 100 mg의 PBCA 폴리머 당 12 mg dAb). 상기 제형을 실시예 16에 기재된 바와 같이 dAbs에 대해 개질된 HIP 프로토콜을 이용해 제조하였다.
- [0347] 제조 후, dAb가 무손상체로 남아있고, dAb가 입자 내로 성공적으로 가두어졌는지 확인하기 위해, 나노입자를 SDS-PAGE로 특징화하였다. SDS-PAGE에 의한 분석은 실시예 17에 기재된 바와 같이 수행되었다. 공지된 양의 dAb 표준 세트 또한 제형의 옆쪽에서 겔 상에서 분석하였고, 캡시드화된 dAb의 양을 측정하는데 이용하였다(도 14). 이것은 겔을 영상촬영하고, 랩 워크(labworks) V4.6를 이용해 표준 밴드로부터 신호 강도를 측정함으로써 달성되었다. 상기 겔을 하기와 같이 설정하였다:
- [0348] 라인 1 및 7: 분자량 마커. 라인 2-4: dAb 나노입자 제형. 라인 5: 비워진 나노입자(음성 대조군). 라인 7-10: dAb 표준(500, 125, 31.25 및 7.8 μ g/ml). 라인 11-14: dAb 표준(7.8, 31.25, 125 및 500 μ g/ml). 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났고, dAb가 무손상 상태임을 확인시켰다. 샘플 밴드 강도와 표준 밴드의 강도의 비교는 나노입자 샘플 내 dAb의 농도가 413.7 μ g/ml임을 시사하였다.

[0349] 밴드 강도를 이용해 표준 곡선을 작성하였다. 그 다음 상기 곡선을 이용해 나노입자 샘플의 밴드 강도로부터 나노입자 제형 내 dAb의 양을 계산하였다.

[0350] 상기 겔은 dAb가 입자 내에 성공적으로 가워졌으며, 캡시드화 후에도 무손상 상태를 유지하고 있음을 확인시켰다. 표준과의 비교로부터, 나노입자 제형 내 dAb의 농도는 413.7 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 나타났다. 이것은 12 mg의 투입량에서 총 3.31 mg의 나노입자 내 캡시드화된 dAb로 해석되었다. 따라서, 로딩 효율은 27.6 %이었다. dAb 로딩은 3.31 % w/w이었다.

[0351] 캡시드화된 dAb를 방출시키고, 이들의 활성을 평가하기 위해, 나노입자 샘플을 또한 열 처리하였다. 1%의 트윈 20의 존재하에서, 1시간 동안 4 내지 65°C 범위의 온도에서 인큐베이션함으로써, 나노입자로부터 dAb를 방출시켰다. 이 방법은 입자로부터 캡시드화된 dAb의 적어도 일부를 방출시키는 것으로 알려져 있으나, 이것은 또한 dAb의 활성을 일부 감소시킬 수 있다. 열 처리의 결과에 따른 dAb 활성의 손실을 최소화하기 위해, 샘플을 37°C의 낮은 온도로 55분 동안 온화한 처리를 한 후, 5분 동안 65°C에서 인큐베이션하였다.

[0352] 인큐베이션 후, 상기 샘플을 10분 동안 10,000 rcf에서 원심분리하여, 임의의 방출된 dAb를 입자로부터 분리시켰다. 방출된 dAb를 포함하는 상청액을 수집하고, 활성에 대해 ELISA로 분석하였다. 방출된 dAb를 하기와 같이 ELISA로 분석하였다:

[0353] Nunc 맥시솔브(maxisorb) 96 웰 플레이트를 0.5 $\mu\text{g/ml}$ rVEGF로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 그 다음 상기 플레이트를 세척 완충용액(PBS + 0.1% 트윈)으로 4회 세척한 후, 흔들어 주면서 억제 완충용액(PBS + 1% BSA)으로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 상기와 같이 플레이트를 세척한 뒤, 50 μl 의 3배 상청액 샘플을 상기 웰에 첨가하고, 플레이트를 상기와 같이 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 뒤, 웰 당 50 μl 의 항-myc Ab(마우스) 용액을 첨가하였고, 플레이트를 상기 기술한 바와 같이 다시 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 뒤, 웰 당 50 μl 의 항 마우스 HRP를 첨가하고, 플레이트를 상기 기술한 바와 같이 인큐베이션시켰다. 플레이트를 상기와 같이 충분히 세척한 뒤, 50 μl /웰 TMB 시약을 첨가하였다. 현상을 위해 착색이 허용되었으며, 웰 당 50 μl 의 HCl(1 M)을 첨가하여 상기 반응을 중단시켰다. 벌사맥스 플레이트 리더(Versamax plate reader) 및 소프트웨어 프로(Softmax Pro) V5.3 소프트웨어를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0354] ELISA 분석으로부터 획득한 결과를 표 6에 도시하였다:

[0355] 표 6

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

[0356]

[0357] 방출된 dAb는 활성을 가지며, 높은 온도에서 입자로부터 더 많은 양의 단백질을 방출하는 것으로 나타났다. 65 및 37°C의 두 온도에서 처리된 샘플은 가장 높은 방출된 활성 dAb를 보이는 것으로 나타났다. 제형에서 본래 수준의 활성은 측정되기 어려운데, 이는 방출 방법이 활성을 손상시키는 것으로 알려져 있기 때문이나, PAGE 결과를 고려하여, 65/37 방법은 표준 특정 활성의 대략 50%를 지니는 물질을 생산하였다.

[0358] 방출된 dAb를 활성 dAb의 판독을 제공하는 ELISA 및, 총 dAb를 검출하는 SDS-PAGE로 분석하였다. dAb를 일련의 표준 옆에서 겔 상에서 분석하였다. 그 다음 표준의 밴드 강도를 측정함으로써 작제된 표준 곡선을 이용해 dAb의 양을 측정하였다. 활성 dAb의 농도(ELISA에 의해 측정된 바와 같이, 61 $\mu\text{g/ml}$)는 총 dAb의 농도(SDS-PAGE에 의해 측정된 바와 같이, 137.89 $\mu\text{g/ml}$)의 44%로 나타났다.

[0359] 따라서, 나노입자 내 제형화된 dAb의 50% 이상이 활성인 것으로 나타났다. 이것은 매우 좋은 수준의 활성으로 여겨지며, 상기 제형화 과정이 균질화에 의한 혼합에의 노출 후, 유기상 내에서의 가용화와 관련이 있다고 여겨진다. 따라서, 상기 입자 제조 과정은 도메인 항체의 제형에 적합한 것으로 보인다.

[0360] 실시예 19 - 도메인 항체를 포함하는 HIP PBCA 나노입자의 이들의 단백질을 마우스 내 뇌로 정맥 경로를 통해 운반하는 전달 능력에 대한 생체내 평가

[0361] 실시예 18에 기술된 나노입자 제형을 마우스 모델에서 뇌로 이들의 dAb를 운반하는 전달 능력에 대해 평가하였다. 캡시드화된 VEGF dAb를 포함하는 나노입자를, 상기 입자가 유리 dAb 분자에 비해 dAb의 뇌 흡수를 증가시킬 수 있는지 여부를 측정하기 위해서, 유리 dAb와 비교하였다. 비어있는 나노입자 배치를 또한 제조하고, 음성 대조군으로서 평가하였다.

- [0362] 생체 내 연구 설계
- [0363] 상기 연구는 dAb 뇌 수준이 평가될 두개의 상이한 시점에 관련된다: 투여 후 10분 및 60분. 달라진 캡티드에서 발견된 경우와 같이, 뇌에서 dAb 농도가 주입 후 수초 내에 최고가 된 경우 전자 시점을 선택하였다. 발생할 혈액 순환으로부터 dAb의 일부 제거를 고려하여 후자 시점을 선택하였다. 혈액에 존재하는 임의의 dAb는 뇌 샘플을 오염시킬 수 있으며, 획득한 데이터를 왜곡할 수 있다. 혈액 순환에서 dAb의 짧은 반감기(20 분)는 아마도 후자 시점에서 혈액 오염을 제한할 수 있으므로, 뇌 투과의 더 명확한 관독을 가능케 한다.
- [0364] 뇌 샘플에서 혈액 오염의 보정:
- [0365] 뇌 흡수에 기인한 것이 아니라 단지 뇌 혈관 및 뇌 조직 자체가 아닌 곳(혈액 오염)에 존재하는 뇌 샘플 내 dAb의 양을 측정하기 위해, 시작-추적 연구(start-chase study)를 수행하였다. 모든 마우스는 혈액에 남아있으며 뇌를 투과하지 않는 것으로 알려진 추적 분자(chase molecule)의 용량이 투여되었다. 선택된 추적 분자는 무시할만한 뇌 흡수를 보이는, W099/58679에 기재된 항-CD23 전장 항체였다. 따라서, 뇌 샘플에서 검출된 임의의 양의 항-CD23 mAb는 오로지 뇌 조직을 오염시키는 혈액 내 이들의 존재 때문일 것이다. 추적 분자는 이들을 회생시키기 5분 전 상기 동물에게 투여되어, 항체가 혈액 내 남아있고, 조직 흡수가 신체 다른 부위에서 일어나지 않았음을 확실히 하게 하였다.
- [0366] 동물군:
- [0367] A: 대조군 입자, t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0368] B: 나노입자 내 dAb, t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0369] C: 용액 중 dAb 유리(대조군), t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0370] 상기 군을 추적 분자 투여 후 10분, 5분에 회생시켰다.
- [0371] D: 대조군 입자, t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0372] E: 나노입자 내 dAb, t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0373] F: 용액 중 dAb 유리(비제형화된 대조군), t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0374] 상기 군을 추적 분자 투여 후 60분, 5분에 회생시켰다.
- [0375] 용량의 제조.
- [0376] 추적: PCT W099/58679에 개시된 항-CD23 mAb, 2.0 mg/kg.
- [0377] 68 mg/ml mAb 저장 용액을 500 μ g/ml까지 희석시켜 용량을 제조하였다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 50 μ g 용량에 이르렀다.
- [0378] dAb를 지닌 나노입자: 1.584 mg/kg, 50 mg/kg PBCA 폴리머.
- [0379] 160 μ l 폴리솔베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600 μ l의 나노입자 현탁액에 첨가하여 주입을 위한 나노입자 현탁물질을 제조하였다. 이것으로 제형화된 dAb의 최종 농도가 396.1 μ 이 되었다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 39.6 μ g의 dAb 용량에 이르렀다.
- [0380] 빈 나노입자(음성 대조군): 50 mg/kg PBCA 폴리머.
- [0381] 160 μ l 폴리솔베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600 μ l의 나노입자 현탁액에 상기와 같이 추가하여 주입을 위한 나노입자 현탁물질을 제조하였다. 이것으로 PBCA 폴리머의 최종 농도가 1.25 mg/ml이 되었다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 125 μ g의 PBCA 용량에 이르렀다.
- [0382] 용액 중 유리 dAb(비제형화된 대조군): 1.584 mg/kg.
- [0383] 2.0 mg/ml의 저장 용액을 396.1 μ g/ml까지 희석시킴으로서, 주입을 위한 dAb 용액을 제조하였다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 39.6 μ g의 dAb 용량에 이르렀다.
- [0384] 마우스의 주입: CD1 마우스를 정맥 주사하였다(꼬리 정맥 주사). 주사 부피를 마우스의 중량을 기초로 계산하였다. 생체내 절차의 마지막에서, 뇌 및 혈청 샘플을 모든 마우스에서 수집하고, 냉각시켰다. 조직 샘플을 액체 질소에서 스냅 냉각(snap frozen)시켰다. 모든 샘플을 -80°C에서 저장하였다.

- [0385] 분석을 위한 뇌 균질화.
- [0386] 뇌를 해동하고 무게를 측정하였다. 뇌 부피의 2배 중량인 PBS의 부피를 각각의 뇌에 첨가하였다. 그 다음 뇌를 코바리스 아쿠스틱 티슈 프로세서(Covaris acoustic tissue processor)(Covaris E210)를 이용하여 균질화하였다.
- [0387] 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery, MSD)에 의한 뇌 분석
- [0388] 뇌를 균질화하고, 혈청 샘플을 MSD에 의해 분석하였다. 이것은 실시예 18에 기술된 항-VEGF ELISA 분석을 MSD 형식으로 변형함으로써 달성되었다. 혈청 샘플을 1:10,000 희석 중 1:1,000에서 분석하였다. 뇌 샘플을 1:5 희석에서 분석하였다.
- [0389] 결과
- [0390] 상기 데이터를 처리하였고, 도 15에 제시된 결과를 생성하였다. 투여 10분 후, 나노입자 내 dAb는 총 8.0 ng/ml에 이르는 검출가능한 뇌 흡수를 유발하였다. 또한, 유리 dAb는 뇌에서 3.3 ng/ml의 매우 낮은 농도(초기 데이터)에서 검출가능하였다. 초기 데이터는 혈청으로부터의 관독이 정량화하기에 너무 높았기 때문에, 혈액 오염에 대해 보정될 수 없었던, 두 동물로부터 유래한 관독을 포함하지 않았다. 일반적으로, 나노입자는 10분 시점에서 단백질의 뇌 흡수를 소폭 상승시키는 것으로 보였다.
- [0391] 그러나, 60분에서, 상황이 바뀌었다. 유리 dAb는 뇌에서 축적하여, 추가로 이의 뇌 수준을 13.5 ng/ml까지 증가시키는 것으로 보였다. 관찰된 결과는 하기와 같이 설명될 수 있다:
- [0392] 1. 혈액 순환 내에서 유리 dAb의 반감기($t^{1/2}$)는 이의 친수성 때문에, 입자의 반감기보다 더 길 가능성이 있었다. 이것은 아마도 나노입자에서 제형화된 dAb에 비해, 더 많은 유리 dAb가 뇌 흡수를 위해 이용가능했음을 의미한다.
- [0393] 2. 입자 내로의 dAb 로딩은 체순환으로부터의 빠른 제거 때문에, 제형의 손실을 상쇄시키기에 충분하지 않았다. 입자에서 약물 로딩은 3.31% w/w이었다. 달라진 제형은 45 ng/ml의 뇌수준을 생성하기 위해서 이전에 5.0 % w/w의 로딩을 필요로 했었다. 8.9 %의 높은 펩티드 로딩은 최대 833 ng/ml인 뇌 중 펩티드 농도를제공하였다. 3.31 % w/w의 로딩(특히, 높은 분자량의 바이오팜의 경우)은 유의한 뇌 전달에 충분하지 않은 것으로 보이므로, 추가적 로딩의 최적화가 필요할 것이다.
- [0394] 3. 10 및 60분 시점은 아마도 너무 늦었다. 달라진 및 로페라마이드(loperamide)를 이용한 이전 연구는, 주입 2-3분 이내로 전달이 빠름을 모두 설명하였다. 이전 연구는 또한, 뇌에서 가장 높은 약물 수준은 투여 5분 이내 또는 그 전에 달성되었음을 시사했다. 10분의 시점은 시작 추적 연구를 수행하기에 충분한 시간을 보장하기 위해 선택되었으며, 60분은 도메인 항체의 임의의 긴 지속 효과를 검출하기 위해 선택되었다.
- [0395] 4. HIP PBCA 시스템은 뇌에 대해 단지 수동적으로 타겟팅된다. 정맥 투여된 경우, 소수성 표면을 나타내는 이러한 미립자는 뇌뿐만 아니라 다수의 기관에 대해 수동적으로 타겟팅된다고 공지되어 있다. 이러한 기관은 간 및 비장을 포함한다. 정맥 투여된 경우, 나노입자는 뇌에 들어가기 전에 간 및 비장에 처음 도달할 것이다. 그 결과, 대부분의 주입된 용량은 이러한 조직에 전달될 수 있으며, 단지 뇌에 전달 가능한 일부만을 남긴다. 이것은 본 실험에서 뇌에 도달하기 위한 입자의 능력을 심하게 손상시킬 수 있다.
- [0396] 혈액 순환에서 dAb의 손실의 영향을 강조하기 위해, 뇌 대 혈액 비율 또한 계산하였다(도 16). 결과는 dAb가 용액 내 유리상태로 주어진 경우에 비해, 나노입자와 함께 주어진 경우, 혈액에 비해 dAb의 훨씬 더 많은 집단이 뇌에 존재함을 명백히 나타낸다. 사실, 제형화된 dAb는 0.04의 뇌 대 혈액 비율을 나타내며(60 분), 이는 뇌 침투하는 것으로 여겨지는 화합물의 비율보다 큰 비율이다. 유리 dAb는 이들이 분석된 임의의 시점에서 이러한 뇌 침투 임계값(threshold)을 초과하지 않았다. 따라서, 주입된 용량의 유의한 손실에도 불구하고, 혈뇌 장벽을 통과하는 전반적인 능력의 관점에서, 상기 입자는 결국 유리 dAb보다 우수할 수 있다.
- [0397] 일반적으로, 정맥 경로는 수동적으로 타겟팅된 입자, 예컨대 HIP-PBCA 시스템에 대한 투여의 가장 도전적인 경로로 알려져 있다. 따라서, 정맥 투여는 HIP-PBCA 시스템의, 혈액으로부터 BBB를 통해 약물 로드를 전달하는 능력을 평가하는 이상적인 방법은 아니다. 이러한 이유로, 동맥내 연구가 또한 수행되었다. 동맥 경로를 통한 투여는 조직, 예컨대, 간 및 비장을 통과하며, 뇌로의 더욱 직접적인 경로를 제공한다. 그 결과, 주입된 나노입자의 더 많은 용량이 뇌 전달에 이용가능하다. 유리 및 제형화된 약물 사이의 팽팽한 비교에서, 동맥 경로는 나노입자의 BBB를 극복하는 능력의 진정한 측정을 제공할 가능성이 높다.

- [0398] 실시예 20 - 도메인 항체를 포함하는 HIP-PBCA 나노입자의 이들의 단백질 로드를 동맥 경로를 통해 마우스의 뇌로 전달하는 이들의 능력에 대한 생체내 평가
- [0399] 나노입자 제형의 생체내 평가 - 동맥 투여.
- [0400] 나노입자 제형을 이들의 dAb 로드를 동맥 경로를 통해 마우스의 뇌로 전달하는 능력에 대해 평가하였다. 상기 경로를 선택하였는데, 이는 뇌로의 직접적인 길을 제공하기 때문이다. 물질이 경동맥으로 투여된 경우, 이것이는 도달하는 첫번째 조직은 뇌이다. 대조적으로, 약물이 정맥에 투여된 경우, 약물은 뇌에 도달하기 이전에, 조직, 예컨대, 간에 다다를 것이다. 이것은 약물이 조직, 예컨대, 간 및 비장에 의해서도 흡수되는 것으로 알려진 바와 같이, 뇌로 전달하는 나노입자의 능력을 제한하는 것으로 나타났다. 사실, 크레우터등은 이들의 PBCA 부착 입자를 이용해, 대부분의 주입된 빈 나노입자 용량(~60%)은, 꼬리 정맥을 통해 주입된 경우 간에 의해 흡수된다는 사실을 발견하였다.
- [0401] 일반적으로, 정맥 경로는 수동적으로 타겟팅된 전달 시스템, 예컨대, HIP-PBCA 나노입자에 대한 덜 선호적이며, 가장 도전적인 투여 경로로 잘 알려져 있다.
- [0402] 따라서, 동맥 경로가 혈뇌장벽을 극복하는 나노입자의 능력의 정확한 표시를 제공할 가능성이 더욱 높다고 생각된다.
- [0403] 생체내 연구의 설계.
- [0404] 연구 설계는 하기와 같은 차이점을 제외하고, 정맥 연구와 동일하다:
- [0405] 1. 실험하는 동안 동물을 말단 마취(terminal anaesthesia)하에 유지시켰다. 이것은 관련된 수술적 절차의 복잡성 때문에 필요하였다.
- [0406] 2. 나노입자 제형 및 유리 dAb를 수술적으로 제조된 캐놀라(cannula)를 이용해 동맥 경로를 통해 투여하였다.
- [0407] 3. 꼬리 정맥을 통해 정맥으로 추적 분자를 투여하였으나, 이전 연구와는 달리 항체를 캐놀라를 이용해 투여하였다.
- [0408] 동물군:
- [0409] A: 대조군 입자, t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0410] E: 나노입자 내 dAb, t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0411] C: 용액 중 dAb 유리(대조군), t=0에서 투여, t=5 분에서 추적이 따름.
- [0412] 상기 군을 추적 분자의 투여 10분, 5분 후 희생시켰다.
- [0413] B: 대조군 입자, t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0414] F: 나노입자 내 dAb, t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0415] D: 용액 중 dAb 유리(비제형화된 대조군), t=0에서 투여, t=55 분에서 추적이 따름.
- [0416] 상기 군을 추적 분자의 투여 60분, 5분 후 희생시켰다.
- [0417] 용량의 제조.
- [0418] 추적: PCT W099/58679에 개시된 항-CD23 mAb, 2.0 mg/kg.
- [0419] 68 mg/ml mAb 저장 용액을 500 µg/ml까지 희석시켜 용량을 제조하였다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 µl 부피 내에서 50 µg 용량에 이르렀다.
- [0420] dAb를 지닌 나노입자: 1.584 mg/kg, 50 mg/kg PBCA 폴리머.
- [0421] 160 µl 폴리솔베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600 µl의 나노입자 현탁액에 첨가하여 주입을 위한 나노입자 현탁물질을 제조하였다. 이것으로 제형화된 dAb의 최종 농도가 396.1 µ이 되었다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 µl 부피 내에서 39.6 µg의 dAb 용량에 이르렀다.
- [0422] 빈 나노입자(음성 대조군): 50 mg/kg PBCA 폴리머.
- [0423] 160 µl 폴리솔베이트 80 용액(25 % w/w)을 3,600 µl의 나노입자 현탁액에 상기와 같이 추가하여 주입을 위한

나노입자 현탁물질을 제조하였다. 이것으로 PBCA 폴리머의 최종 농도가 1.25 mg/ml이 되었다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 125 μ g의 PBCA 용량에 이르렀다.

[0424] 용액 중 유리 dAb(비제형화된 대조군): 1.584 mg/kg.

[0425] 2.0 mg/ml의 저장 용액을 396.1 μ g/ml까지 희석시킴으로서, 주입을 위한 dAb 용액을 제조하였다. 이는 25 g 마우스에 대해 100 μ l 부피 내에서 39.6 μ g의 dAb 용량에 이르렀다.

[0426] 결과

[0427] 상기 데이터를 처리하였고, 도 17에 제시된 결과를 생성하였다. 투여 10분 후, 나노입자 군 내 dAb는 평균 627.60 ng/ml로, 뇌에서 높은 수준의 dAb를 보였다. 상기 도면은 두 동물로부터의 관독을 포함하지 않기 때문에, 뇌에서 dAb의 실제 농도는 아마도 더 높을 것이다. 두 개의 샘플은, 정량화에 대해서는 지나치게 높았으나, 불행하게도 본원에 포함될 시점에 분석되지 않았던, 신호를 제공하였다. 상기 동물 중 하나는 45.45 ng/ml의 상대적으로 낮은 뇌 농도를 제공하는 명백한 예외동물이었다. 이것은 상기 군에서 발견된 매우 큰 오차를 야기시켰다. 그럼에도 불구하고, 뇌에서 제형화된 dAb의 평균 농도는 유리 dAb보다 거의 9배 높은, 71.67 ng/ml이었다.

[0428] 주사 후 60분에, 뇌 속 dAb의 수준은 146.51 ng/ml로 높게 유지되었다. 유리 dAb의 농도는 그 대신에 평균 3.17 ng/ml로 떨어졌다. 따라서, 주사 후 60분에, 나노입자 내 주어진 dAb의 뇌 농도는 아무것도 감싸지지 않은(naked) dAb를 이용해 달성된 것보다 46배 높았다.

[0429] 일반적으로, 나노입자는 동맥 경로를 통해 dAb를 뇌로 전달하는 것이 매우 성공적인 것으로 나타났다.

[0430] 이것은 상기 군에 대한 뇌 대 혈액 비율의 측정으로부터 또한 명백해졌다(도 18). 나노입자 군 내 dAb는 두 시점에서 1보다 큰 뇌 대 혈액 비를 보였으며(10분 및 60분에서 각각 1.569 및 1.845), 이것은 제형화된 dAb 대부분이 뇌에 성공적으로 도달되었음을 시사한다. 대조적으로, 유리 dAb 군은 10분 및 60분 시점에서 각각 0.012 및 0.286의 상당히 낮은 뇌 대 혈액 비로 특징화되었다.

[0431] 결론적으로, 나노입자 운반 시스템은 동맥 경로를 통해 주어진 경우, dAb의 뇌로의 전달을 상당히 개선시키는 것으로 나타났다. 이는 상기 경로가, 제형이 뇌 이외에 또한 수동적으로 타겟팅된 조직인 간 및 비장 이전에 뇌에 도달하기 때문이다. 정맥 경로는 성공적이지 않는데, 이는 dAb의 뇌 흡수를 증가시키는 일시적인 징후(transient hint)를 제공한다. 이것은 아마도 입자로의 불충분한 dAb 로딩에 기인할 뿐만 아니라, 주입된 입자의 일부분만이 뇌에 도달하도록 야기하는, 다른 조직에 의해 차지된 운반 시스템에 기인한다.

[0432] 따라서, 상기 시스템을 개선하고, 정맥 경로를 통해 뇌로의 효과적인 전달을 성취하기 위해, 나노입자로의 dAb의 로딩을 추가 개선시킬 필요가 있다. 이것은 HIP PBCA 시스템에 비해 더 큰 용량의 dAbs 로딩을 갖는것으로 공지된, 중공 PBCA 시스템을 이용하여 달성될 수 있었다. 생체 내에서 충분히 안정함을 전제로, 중공 PBCA 입자는 dAb의 뇌로의 전달에서 HIP PBCA 시스템에 비해 더욱 성공적일 수 있다. 이의 안정성을 보장하기 위해, PBCA 폴리머와 높은 분자량의 다른 폴리머, 예컨대, PLGA, PLA 또는 PCL와의 혼합물(blend)을 사용하는 것이 필요할 것이다. 상기 전달 시스템은 또한 폐길화된 코폴리머의 이용으로 유리할 수 있다. 이러한 폴리머는 혈액 내 나노입자의 순환 시간을 향상시킬 수 있으므로, 뇌 전달이 개선된다.

[0433] 전달 시스템 향상의 추가 방법은 뇌 타겟팅의 메카니즘을 변형하는 것이다. BBB상에서 표적에 결합하는 리간드를 보이는 활성적으로 타겟팅된 나노입자는 뇌 흡수를 개선시킬 가능성이 있으며, 동시에, 다른 조직에 대한 입자의 손실을 제한시킨다. 활성적인 타겟팅화를 달성하기 위해, 아마도 나노입자 표면을 광범위하게 폐길화하여 다른 기관에 대한 임의의 나노입자 타겟팅을 제한하는 것이 필요할 것이다.

[0434] 일반적으로, 본원에 기술된 나노입자 시스템은 도메인 항체의 뇌에 대한 효과적인 전달을 달성할 대단한 잠재력을 지니나, 이를 달성하기 위해서는 상당한 최적화가 여전히 필요하다.

[0435] 실시예 21 - 개질된 HIP 방법을 이용한 PCL 미소구체 내의 도메인 항체의 캡슐화.

[0436] 폴리머 폴리카프로락톤(PCL, Lactel)을 dAb 캡시드화에 대한 HIP 방법을 이용한 느린-방출 폴리머의 이용 및 미소구체의 생성에 대한 시범 사례로 이용하였다. 초기 실험은 실시예 14 및 17에 기술된 HIP 캡슐화 프로토콜의 개질을 이용하여, PCL의 이용을 빈 나노입자 및 미소구체 둘 모두를 생성하도록 조절시켰다. 초기 제형은 45초 동안 4000- 7500rpm 속도로 균질화하면서, 디클로로메탄(DCM) 중 PCL의 100mg/ml 스톡(stocks) 및 1% 플루로닉 F68(Sigma)를 계면활성제로서 이용하였으나, 매우 적은 미소구체 또는 나노입자가 생성되었다(데이터는 도시되

지 않음). 상기 과정은 상이한 계면 활성제: 또한 1% 소듐 클로라이드, (Sigma), 또는 1% 루트롤(Lutrol) F127 폴록사머 407, (BASF Corp.), 또는 1% 비타민 E TPGS, (d-ALPHA 토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트), (Peboc / Eastman)(작은 초기 개선을 지님(데이타는 도시되지 않음))를 이용함으로써 투입된 폴리머의 양이 10mg/ml로 감소될 때까지, 추가적으로 최적화되는데, 이때 20um보다 큰 거대한 부서지기 쉬운 미소구체 소수가 광학 현미경에서 관찰될 수 있었으나(데이타는 도시되지 않음), 대부분의 PCL은 유기 용매가 증발시, 거시적인 입자로서 현탁액 밖으로 나왔다(데이타는 도시되지 않음). 상기 과정은 현탁물질을 안정화시키는데 더욱 도움이 되도록 상기 기술된 실험에서 두개의 가장 유망한 계면활성제를 2%로 이용함으로써 입자 안정성 측면에서 추가적으로 개선되었다: 루트롤 F127 폴록사머 407, (BASF Corp.) 또는 비타민 E TPGS 및 45초 내지 2분 동안 7500-9000rpm의 속도로 균질화 시킴. 이러한 방법을 이용하여, 모든 경우에 약 1 μ m 크기의 입자가 생성되었으나(데이타는 도시되지 않음), 2% 비타민 E TPGS를 2분 내에 계면활성제로 선택하였다. dAbs를 캡시드화하기 위한 프로토콜을 위한 균질화를 하기에 나타내었다.

- [0437] dAb를 캡시드화하는, HIP-PCL 미소구체의 제조, (M/P).
- [0438] 상기 실시예 16의 방법론 및 하기 상술된 이 프로토콜의 임의의 변화에 따라 HIP-PCL 미소구체를 제조하였다.
- [0439] 사용된 제형:
- [0440] 4개의 PCL(폴리-e-카프로락톤) 제형을 제조하였다:
- [0441] i) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 빈 입자 - 4000 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0442] ii) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 빈 입자 - 7500 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0443] iii) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 입자 + 분석용 dAb, (dAb1) - 7500 rpm(계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0444] iv) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 입자 + 사이징용 dAb, (dAb2) - 7500 rpm(계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분
- [0445] 필요한 용액:
- [0446] (1) 추출되기 위한 dAb: 항-VEGF (WO2008/149147에 개시된 DOM 15-26-593), 배치 TB090220 1.5 mg/ml(14,246 Da) - 4 x 5ml(나노드롭 1000 분광 광도계(Thermo Scientific)를 이용한 dAb 농도의 실제 재-판독은 사실상 1.04mg/ml의 농도임을 확인시킴)가 이용됨,
- [0447] (2) 82:1 HIP 용액(1 ml, 30.58 mg/ml)
- [0448] (3) 산성화된 dAb 용액(25 mg/ml) N/A
- [0449] (4) 수성상: 1% w/v 텍스트란, PBS 중 2% w/v 계면활성제*
- [0450] (5) DCM에 용해된 PCL 폴리머
- [0451] * 스톡 10% 비타민 E[TPGS]
- [0452] DCM 중 PCL 용액의 제조.
- [0453] 목표는 제형 당 DCM에 용해된 10mg의 PCL을 제공하는 것이다 - 용해도는 DCM 중 최대 약 ~100mg/ml이었으나, @~10mg/ml로 더 용해될 수 있었다. 5개 제형에 대해 충분한 PCL가 만들어졌다(즉 5ml DCM 중 50mg). 50mg PCL을 달고(-20℃에서 실온까지 데웠을 때, 개방된 해동된 진공 데시케이터(opened thawed vacuum dessicator), 무게 측정(우수한 균형) - PCL+ 4mls DCM이 담긴 10ml 비커에서 교반함 - 유리 교반기를 이용하여 홈 후드에서 덮개를 덮고 교반함. 용해시, 유리 측정 실린더에서 측정하고, DCM로 5ml까지 채운 후, 재-혼합(비커 교반)한 후, 빠르게 이용하였다.
- [0454] dAb 용액의 농도.
- [0455] 처음에는 RT 600rpm에서 밤새도록 제조를 수행하였고, 다시 정확한 농도로 희석시켰다. 상기 용액을 비바스핀 농축기(Vivaspin concentrators)(Vivaspin 6, Sartorius, VS0691, MWCO 3,000 PES)를 이용하여 제조업자 지시에 따라 소르발 리젠드 RT 벤치 탑 (Sorvall legend RT Bench Top) 원심분리기에서 농축시켰다. 농도는 예측된 1.5 mg/ml(4 x 비바스핀 내 5ml과 같은 20.0 ml) 내지 25 mg/ml(~700 μ l)이었다. 이 과정은 1000-1500 rpm에서 2시간 및 3000 rpm에서 추가 ~1시간이 소요되었다. 75분의 1의 희석액으로 초기 dAb 400ul을 나노드롭

(Nanodrop)에 의해 0.56 mg/ml로 제공하였다 - 그 다음 25mg/ml로 760ul까지 희석시키고, 산 처리하여 pH를 ~3.7까지 낮추었다. 모의 물질을 pH ~2.5로 산처리하였다. dAb는 25mg/ml ~pH 5.0/4.5이었다 - 목표는 pH3.7로 낮추는 것임 - pH를 pH 2.5 내지 4.5의 페이퍼(paper)로 체크하였다. 380ul의 dAb를, 예를 들어, 제형 당 단지 9.5mg를 사용하였다(및 초기 투여량 농도를 1.5mg/ml이 아닌, 1 mg/ml로 맞춤).

[0456] 표 7: 산성화된 용액 제조

제형	빈(Empty) 대조군	dAb 용액
25.0mg/ml의 필요한 dAb 용액 부피 (μl)	0	760, (2x 380)
필요한 물의 부피(μl)	500.0 x 10	12.0
첨가된 2M HCl 용액의 부피 (μl)	5.0 x 10	6.0
선택적으로 첨가된 CaCl ₂ 의 부피 마지막에 첨가됨	0	0
첨가 후 pH	<=2.5	~3.7

[0457]

[0458] 표 8; HIP 추출을 위한 제형 및 시약(표준 부피 프로토콜).

[0459] (A) 유기상 dAb

제형 dAb	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

[0460]

[0461] (B) 유기상 HIP

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

[0462]

[0463] 목표는 dAb(aq):DCM/HIP의 1:2 혼합물을 제조하는 것이다 - 상기 1x 혼합물의 경우, 즉, ~500ul : 1000ul 유기상.

[0464] 표 9: 빈 대조군의 제조(유기상).

제형	빈 대조군, 82:1 HIP, 100 mg BCA
dAb 양 (mg)	산성화를 위해 HCl 20 μ l + 단지 PBS 480 μ l 사용
필요한 AOT 농도 (mg/ml)	30.58
필요한 30.58 mg/ml AOT 용액의 부피 (μ l)	1000

[0465]

[0466] 도큐세이트 나트륨을 HIP 시약으로서 이용한 dAb 또는 모의(빈 입자)의 유기상으로의 추출.

[0467] 산성화된 dAb 또는 '모의' 용액 및 유기상을 2 ml의 에펜돌프 튜브에서 혼합하였고, 수성상에 첨가하였다. 상기 혼합물을 1분 동안 최대 속도로 볼텍스-혼합시킨 뒤 벤치 탑 믹서 5432에 5분 동안 두었다. 생성된 흰색 혼합물을 최대 속도(20,817rcf, 마이크로퓨즈(microfuge)에서 14000rpm)로 50분 동안 원심분리하였다. dAb-HIP 복합체는 두꺼운 흰색 침전물을 경계에 형성시키는 것으로 보였다. 수성상을 수집하고 4℃에서 저장하였다. 상부 수성상을 제거하고, 저장하였으며, 상기 절차를 하단 유기상에 계속하였다.

[0468] HIP-dAb 복합체의 유기상으로의 균질화.

[0469] 유기상을 IKA T25 균질기(폴리트론, 속도 설정 1)를 이용하여 7-10초 동안 2ml의 에펜돌프 튜브에서 균질화시켰다. 목표는 흰색 침전물(dAb 및 HIP 복합체)의 유기상(DCM)으로의 완전한 균질화를 달성하는 것이었다. HIP-dAb 복합체를 유기상에 쉽게 가용화시켜, 균일한 것으로 보이는 에멀전을 형성시켰다. 유기상을 총 10초 동안 균질화시켰다. 균질화 및 유기상의 제거 후 튜브 내에 매우 적은 양의 침전물이 남아있었다.

[0470] 미소구체의 제조.

[0471] 균질물의 1ml의 유기상을 채취하고, DCM (100mg) 중 용해된 PCL 1 ml을 상하로 피펫팅하여 혼합하였다. 생성된 흰색 현탁물질(2ml)을 액체 표면 하에서 프로브가 도입하는 시점에 수성상(25 ml 비커 내에서, 물 중 10 ml 텍스트란 및 PBS중 2% 계면활성제 용액) 내로 피펫팅하였다. 수성상을 실벌슨 L4RT 균질기를 이용하여 7,500 rpm(M/P) 또는 4000 rpm(M/P)에서 균질화시켰다. 에멀전을 2분 동안 균질화시켰다. 그 다음 유기상을 증발시키기 위해, 제형을 흡 후드에서 3시간 동안 교반하면서(속도 설정 4) 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후 1시간에서 설정을 3으로 낮추어, 비커 표면상에서 응집체의 침전을 유발시키는, 에멀전의 과-혼합(over-mixing)을 방지하였다

[0472] 실시예 22 - 미소구체의 사이징(Sizing).

[0473] (a) 광학 현미경.

[0474] 상기 4개 제형 전부((i) 내지 (iv))를 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) E400 현미경에서 가시광선을 이용해 사이징하였다. 이러한 입자의 영상을 나타낸 데이터도 도 19에 도시하였다. 유사한 크기 범위의 가시 미소구체는 dAb를 지닌 경우 및 지니지 않은 경우 둘 모두, 4개 제형 전부에서 관찰될 수 있었다. 상기 데이터는 이 방법을 이용하여 미소구체가 dAb의 존재하에 유사하게 형성될 수 있음을 시사한다.

[0475] (b) 다-각도 정적 광 산란.

[0476] 4개 샘플 전부는 마이크로메리틱스 사턴 디지사이저(Micromeritics Saturn DigiSizer) 5200, 고화질 입자 크기 분석기(High Definition Particle Size Analyser)에서 사이징되었다.

[0477] 샘플을 상기 미세입자 사이징으로부터 사턴 디지사이저 5200에 부착된 저-부피 샘플 핸들링 유닛으로 충분한 물질을 로딩함으로써 사이징하여, 5-30%, 바람직하게는, 가스 제거된(de-gassed) PBS의 혼합물 중 15%의 암흑화(obscuration)를 허용하였다(50-100%의 제형을 필요로 함). 그 다음 샘플을 1.476의 굴절률의 실제 분할(partitioning) 및 0.0001의 굴절률의 가공 분할을 이용한, 폴리카프로락톤 분석 모델을 이용하여 분석하였다. 유속은 6L / min이었으며, 중단 빔 각도는 45 도였으며, 매질은 PBS이고, 계수는 3배로 이뤄졌다. 부피 및 수 분배 둘 모두를 보고하였고, 획득된 데이터는 누적 그래프 및 빈도 그래프의 결합 보고로서 제공하였다(방법의 상세한 설명은 [Micromeritics Saturn DigiSizer 5200 Operators Manual V1.12, (March 2007) 및 the Quick

reference guide] 참조).

[0478] 데이터를 적절한 제형에 대해 나타내었다: 입자 크기에 대한, 입자의 빈도수를 플로팅한 그래프인 도 20(a) 내지 (d)에서 (i) 내지 (iv). 이러한 그래프에 상응하는 하기 데이터를 참조하라.

[0479] 도 20 (a)

요약 보고

샘플
샘플 농도 : 0.01069%
암흑화 : 29.1%

부피 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 8			Std Dev of 8	
평균	8.355	2.926	Mode	10.00	4.017
중앙값	9.754	3.951	Std. Dev. Log.	0.382	0.047
비대칭도	-0.267	0.106	Kurtosis	-0.436	0.180

개수 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 8			Std Dev of 8	
평균	1.393	0.070	Mode	1.000	0.000
중앙값	1.033	0.009	Std. Dev. Log.	0.214	0.022
비대칭도	1.504	0.388	Kurtosis	2.001	2.445

[0480]

[0481] 도 20 (b)

요약 보고

샘플
샘플 농도 : 0.00284%
암흑화 : 16.7%

부피 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 8			Std Dev of 8	
평균	5.366	3.943	Mode	2.239	2.744
중앙값	4.304	5.816	Std. Dev. Log.	0.521	0.033
비대칭도	0.523	0.450	Kurtosis	-0.370	0.178

개수 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 8			Std Dev of 8	
평균	1.231	0.016	Mode	1.000	0.000
중앙값	1.048	0.013	Std. Dev. Log.	0.141	0.012
비대칭도	1.954	0.198	Kurtosis	4.737	1.339

[0482]

[0483] 도 20 (c)

샘플
샘플 농도 : 0.00771%
암흑화 : 21.6%

부피 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 6			Std Dev of 6	
평균	9.346	7.368	Mode	2.239	12.53
중앙값	10.45	7.174	Std. Dev. Log.	0.421	0.115
비대칭도	-0.234	0.252	Kurtosis	-0.185	3.125

개수 분포 기하학적 통계

	Std Dev of 6			Std Dev of 6	
평균	1.355	1.046	Mode	1.000	0.751
중앙값	1.048	0.731	Std. Dev. Log.	0.196	0.070
비대칭도	1.711	0.234	Kurtosis	3.196	1.059

[0484]

[0485] 도 (d)

요약 보고

샘플 샘플 농도 : 0.01069% 암흑화 : 29.1%				
부피 분포 기하학적 통계				
	Std Dev of 8			Std Dev of 8
평균	8.355	2.926	Mode	10.00
중앙값	9.754	3.951	Std. Dev. Log.	0.382
비대칭도	-0.267	0.106	Kurtosis	-0.436
	Std Dev of 8			Std Dev of 8
평균	1.393	0.070	Mode	1.000
중앙값	1.033	0.009	Std. Dev. Log.	0.214
비대칭도	1.504	0.388	Kurtosis	2.001

[0486]

[0487] 평균 입자 크기의 가장 정확한 측정은 하기 평균 입자 크기를 제공하는 기하학적 평균 개수 분포이다.

[0488] i) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 빈 입자 - 4000 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.231

[0489] ii) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 빈 입자 - 7500 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.181

[0490] iii) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 입자 + 분석용 dAb 1 - 7500 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.355

[0491] iv) M/P로서 PCL용 HIP를 이용한 입자 + 사이징용 dAb 2 - 7500 rpm (계면활성제로서 2% 비타민 E [TPGS]) - 2분 평균 입자 크기 1.393.

[0492] 결론은, 낮은 속도에도 불구하고, 약간 큰 미소구체가 생성된 이러한 조건하에서 그 영향은 상당하지 않다는 것이었다 - 7,500 rpm에서 균질화에 대해 상술된 조건은 dAb의 존재하에 이 방법으로 빈 입자보다 약간 더 큰 평균 직경 1.4 μ m의 미소구체를 생성하였다

[0493] 실시예 23 - dAb 포함 HIP-PCL 미소구체의 분석.

[0494] dAb를 포함하는 HIP PCL 미소구체를 상기 실시예 21과 같이 제조하였다. 각 제형(dAb1 및 dAb2)의 50 μ l을 채취하고,

[0495] i) 1.5ml 마이크로튜브에서 3K rpm으로 5'동안 회전시켜 상청액(S)를 생성함 - 30 μ l을 깨끗한 마이크로튜브로 이동시키고, 펠렛(P) 분획을 50 μ l PBS에서 재현탁시키고;

[0496] ii) 1.5ml 마이크로튜브에서 13K rpm으로 5'동안 회전시켜 상청액(S)를 생성함 - 30 μ l을 깨끗한 마이크로튜브로 이동시키고, 펠렛(P) 분획을 50 μ l PBS에서 재현탁시키고;

[0497] iii) 비바스핀 500(1,000,000 molecular weight cut off)에서 5K rpm으로 5'동안 회전시켜, 입자가 컬럼상에 유지되기 때문에 임의의 통합된 dAb를 제거하고, 상청액(F)로서 50 μ l PBS를 통과시키고, 수집하였다. 제조업자의 지시에 따라, 비바스핀 500(살토리우스 스테덤 바이오테크(Sartorius stedim biotech))을 이용하였다.

[0498] 21 μ l의 샘플을 8 μ l의 4x 로딩 염료(loading dye)와 3 μ l의 10x 환원제에 첨가하여 최종 부피 32 μ l을 생성시킴으로서, 로딩을 위해 샘플을 제조하여, 이중 10 μ l을 5분 동안 PCR 블록(PTC-100, MJ research Inc)에서 둔 96 웰 PCR 플레이트에서 80℃까지 가열한 뒤 로딩하였다.

[0499] 그 후 샘플을 제조업자의 지시에 따라 MES SDS(2-N 모르폴리노 에탄술폰산, 소듐 도데실 설페이트), 완충용액(인비트로젠)에서 35분 동안 겔 실행을 위해 로딩시키고, 심플리블루 세이프스테인(SimplyBlue SafeStain)프로토콜(인비트로젠)의 마이크로파 매개 버전을 이용하여 염색하였다. 비캡시드화된 dAb의 로딩 표준은 겔 상에서 또한 실행되어, 농도 계산에 도움을 주었다 - 즉, 샘플 제조에서 상기 기술된 바와 같은, 희석으로부터 3.28 μ g, 0.82 μ g, 0.21 μ g 및 0.05 μ g로서(500ng/ μ l, 125ng/ μ l, 31.25ng/ μ l 및 7.8ng/ μ l 스톡의 10 μ l 로딩). 염색된 겔의 영상을 도 21에 도시하였다.

[0500] 겔을 하기와 같이 설정하였다:

[0501] 라인 1 : 전체 dAb1 , 라인 2: dAb1 3K S, 라인 3: dAb1 3K P, 라인 4: dAb1 13K S, 라인 5: dAb1 13K P, 라인 6: dAb1 F, 라인 7: 전체 dAb2, 라인 8: dAb2 3K S, 라인 9: dAb2 3K P, 라인 10: dAb2 13K S, 라인 11 : dAb2 13K P, 라인 12: dAb2 F, 라인 13: 분자 마커 - 씨블루 플러스(SeeBlue Plus) 2 전-염색된 표준(pre-stained standard), (인비트로젠), 분자량(kd), 라인 14: 3.28 μ g dAb 표준, 라인 15: 0.82 μ g dAb 표준, 라인 16: 0.21 μ g dAb 표준, 라인 17: 0.05 μ g dAb 표준. 상기 겔은 dAbs의 캡시드화가 일어났음을 확인시켰다. 상기 겔은 또한, dAbs가 무손상이며, 입자 제조 과정에 의해 부서지지 않았음을 확인시켰다.

[0502] PCL HIP 입자의 전체 상청액 및 펠렛 분획의 물질의 양은 밴드 캡처(band capture) 및 랩워크 4.6 소프트웨어(UVP)의 1D 겔 정량화 패키지를 이용하여, dAb 1에 대해 확인되었다. 올림푸스 카메라를 이용하여 백색광에 맞추어진 비전 작업 스테이션(Vision works station)을 이용해 분석용 영상을 캡처하였다. 상기 데이터를 표 9에 도시하였다.

[0503] 표 10: PCL-HIP 미소구체에서 dAb 로딩의 측정.

라인	dAb 밴드 강도	μ g으로의dAb
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*

[0504]

[0505] 라인 1: 전체 dAb1, 라인 2: dAb1 3K S, 라인 3: dAb1 3K P, 라인 4: dAb1 13K S, 라인 5: dAb1 13K P, 라인 6: dAb1 F, 라인 7: 전체 dAb2, 라인 8: dAb2 3K S, 라인 9: dAb2 3K P, 라인 10: dAb2 13K S, 라인 11: dAb2 13K P, 라인 12: dAb2 F, 라인 13: 분자 마커 - 씨블루 플러스 2 전-염색된 표준, (인비트로젠), 분자량(kd), 라인 14: 3.28 μ g dAb 표준, 라인 15: 0.82 μ g dAb 표준, 라인 16: 0.21 μ g dAb 표준, 라인 17: 0.05 μ g dAb 표준.

[0506] dAb의 강도에 대한 겔 판독을 밴드 강도에 대한 dAb 표준 플롯을 이용하여 μ g로 dAb 양으로(표 10) 변환시켰다 (데이터는 도시되지 않음).

[0507] 평균 전체 dAb 제형은 (라인 1 및 7), $(3.5 \mu\text{g} + 4.5 \mu\text{g}) / 2 = 4 \mu\text{g}$ 로 판독되었다 - 샘플을 로딩 중 32 중 21로 희석시켜, $10 \mu\text{l}$ 중 총 dAb = $32/21 \times 4 = 6 \mu\text{g}$ 이 되도록 하였다.

[0508] dAb 1 상청액, (라인 2, 4 및 6) = $(1.0 + 0.9 + 0.73) / 3 = 0.9 \mu\text{g}$, 희석을 위한 보정시 1.4 μg 이다.

[0509] dAb1 펠렛, (라인 3 및 5) = $(3.0 + 3.1) / 2 = 3.0 \mu\text{g}$ 희석을 위한 보정시 4.6 μg 이다.

[0510] 분획은 이러한 도면을 이용하여 $6 \mu\text{g} = \text{dAb 1 상청액}(1.4 \mu\text{g}) + \text{dAb1 펠렛}(4.6 \mu\text{g})$ 으로 총 dAb로서, 캡시드화

된 dAb 퍼센트는 전체 dAb의 77%(4.6/6.0)인 것으로 계산된 것으로 보인다.

[0511] 그러나 캡시드화된 투여량 dAb의 퍼센트 - $10 \mu\text{l}$ ($9.5 \mu\text{g}$)는 $4.6/9.5 \times 100 = 48\%$ 이다.

[0512] 실시예 24 - HIP PCL 미소구체로부터 dAb의 방출

[0513] 기능적 활성의 분석을 위해 HIP PCL 입자로부터 dAb를 방출시키기 위해, $50 \mu\text{l}$ 의 약수(aliquots)의 샘플을 dAb1 및 dAb2 HIP PCL 제형으로부터 채취하고, 1.5ml 의 에펜도프에 두었다. 이것을 에펜도프 5417C 마이크로퓨즈에서 5분 동안 5000 rpm 회전시키면서, 1 ml 의 PBS로 2회 세척하였다. 펠렛을 $50 \mu\text{l}$ PBS에서 재-현탁시키고, 0, 20, 40 및 60분의 시간 경과에 따라 테킨 히팅 블록(Techn heating block)에서 56°C 에서 인큐베이션하였다. 그 다음 샘플을 5분, 5000 rpm회전으로 스핀 다운시키고, $30 \mu\text{l}$ 의 상청액(S)을 제거하고, 분석을 위해 얼음에 두었다. 그 다음, 펠렛(P)을 건조시키고 $50 \mu\text{l}$ 에서 재-현탁시켰다.

[0514] 모든 분획을 겔 분석하였다 - 방출된 상청액을 한 겔상에서 분석하고, 방출된 펠렛을 다른 겔에서 분석하였다. 상청액 겔을 도 22에 나타내고, 로딩을 도 21에서 초기 분석 겔에 대해 기술된 것과 같이 설정하였다.

[0515] PCL HIP 입자의 펠렛 분획 및 방출된 상청액 내 물질의 양을 밴드 캡처(band capture) 및 랩워크 4.6 소프트웨어(UVP)의 1D 겔 정량화 패키지를 이용하여, dAb 1 및 dAb 2에 대해 확인하였다. 올림푸스 카메라를 이용하여 백색광에 맞추어진 비전 작업 스테이션(Vision works station)을 이용해 분석용 영상을 캡처하였다.

[0516] 밴드 강도에 대한 dAb 표준의 그래프 플롯을 이용해, dAb의 강도에 대한 겔 판독을 dAb 양 ng로 변환시켰다(표 10, 컬럼 2)(데이터 도시되지 않음).

[0517] 입자 내에서 약 882-1000 ng의 펠렛 공급원으로부터(여기서 12-19%의 물질이 방출됨), 이 방법에 의해 방출된 물질의 양은 120-189 ng(데이터 도시되지 않음) 범위임을 주의하라.

[0518] PCL HIP 입자로부터 방출된 dAb의 ELISA에 의한 기능적 분석.

[0519] ELISA 분석 프로토콜은 가용성 도메인 항체(VEGF dAb)의 재조합 VEGF에 결합하는 능력을 측정하기 위한 결합 분석을 기술한다. 이 분석은 VEGF dAb를 캡처하기 위해 ELISA 플레이트(Nunc Immunosorb)의 표면에 코팅된 재조합 인간 VEGF(R&D 시스템)을 이용한다. 상기 플레이트를 세척하여 임의의 비결합 dAb를 제거한다. 그 다음에 VEGF dAb(9E10, Sigma)의 Myc 태그에 대한 항체를 이용해 결합된 dAb를 검출하였다. 과량의 항체를 세척에 의해 제거하고, 항-마우스 IgG 퍼옥시다제 컨쥬게이트(Sigma)를 이용해 결합된 항-myc 항체를 검출하였다. 이 분석은 TMB 용액을 이용해 전개되고, 산을 이용해 중단된다. 상기 분석으로부터의 신호는 dAb의 양에 비례한다.

[0520] ELISA 플레이트를 설정하여 하기 나열된 샘플 및 0초 후에 '방출된' dAb1 및 dAb 2 샘플을 분석하였다. 제거된 것으로부터, $30 \mu\text{l}$ - $21 \mu\text{l}$ 의 방출된 샘플을 SDS PAGE 분석에 이용하였고, $9 \mu\text{l}$ 를 남겨 100 중 1, 1000 중 1 및 10000 중 1의 희석액을 만들었다.

[0521] 총 방출된 dAb 및 ELISA에 의해 측정된 기능적으로 활성인 dAb의 비교를 표 11에 도시하였다.

[0522] 표 11 - 기능적으로 활성 및 총 방출된 dAb의 정량화

샘플	SDS PAGE 강도 변환으로부터 보정된 dAb ng/ μl	기능적 ELISA로부터 보정된 dAb ng/ μl	퍼센트 활성 dAb
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

[0523]

[0524] 이러한 방출 절차를 이용하여, 기능적으로 활성인 dAb는 ELISA에 의해 측정시 캡시드화된 유지 활성의 60-100%와 일치하는 범위에서, 미소구체로부터 방출된 물질로부터 검출될 수 있는 것으로 볼 수 있다. 전체 대 활성 dAb는 방출된 dAb, 가열 불활성 또는 dAb의 임의의 분해에 따라 변동될 것이나, 변동은 유의하게 상이한 것으로 여겨지지 않는다.

[0525] 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-NOGO 항체
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-아밀로이드 항체
6	성숙한 중쇄 아미노산 서열 베타-아밀로이드 항체 tibody
7	성숙한 H11 중쇄 아미노산 서열
8	성숙한 L9 경쇄 아미노산 서열
9	달라진(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-아밀로이드 항체
14	최적화된 L1 경쇄 DNA 베타-아밀로이드 항체
15	L1 전장 DNA 베타-아밀로이드 항체

[0526]

[0527]

서열

SEQ ID NO. 1: 중쇄 인간화된 작제물 H28

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHW
VRQAPGGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTA
VYYCELMQGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 2: 2A10 경쇄 인간화된 작제물 L16

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPLSNPVTLGQPVVISCRSSKSLLYKDGTKYLN
WFLQRPQQSPQLLIYLMSTRASGVPRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
QLVEYPLTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 3: 중쇄 인간화된 작제물 H28

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
TCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTGGATGC
ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATCGAAATATTAAT
CCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACCATG
ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC
TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAAGTATGATGCAGGGCTACTGGGGCCAGG
GAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC
TGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCC
TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC
GCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGCACACGAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG

[0528]

GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATGA

SEQ ID NO. 4: 2A10 경쇄 인간화된 작제물 L16

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
TCCGATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCAACCCCGTCAACCCTTGGACAG
CCGCTCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAG
ACATACTTGAATTGGTTTCTCCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT
ATTTGATGTCCACCCGTGCATCTGGGGTCCCAGACAGATTACGCGGCGGTGGG
TCAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGG
GGTTTATTACTGCCAACAACTGTAGAGTATCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGAC
CAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAA
CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
CAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO. 5: 성숙한 H2 중쇄 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKLEWVSFISNLA
YSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 6: 성숙한 경쇄 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRVSQSLLSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

[0529]

SEQ ID NO. 7: 성숙한 H11 중쇄 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKSGSFNIKVYYVHWLRQLPGKGLEWIGRIDPEN
GETIYTPKFQDKATLTVDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQGTLLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPP
CPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 8: 성숙한 L9 경쇄 아미노산 서열

DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS
NLASGVNDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLLEWTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 9: 달라진

YAGFLR

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

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGGTL
VTVSSAAAEQKLISEEDLN

SEQ ID NO. 11: C_vL1 가변 영역

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVNDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYLSSLTFGQGQTKLEIKR
TV

SEQ ID NO. 12: B_vH1 가변 영역

QVQLVQSGSELKKGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
TGEPTYADDFTRGVFSLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARNPINYGYINIEGYV
MDYWGGGTLTVSS.

SEQ ID NO. 13: H2 전장 DNA 서열

[0530]

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAAT
TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCC
AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGTGACGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGTCTTCC
CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGAATC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAT
TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
ACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGTGGAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCCTGGACAAGACAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCAATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGTAAA

SEQ ID NO. 14: 최적화된 L1 경쇄 DNA

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCTGGCGAGCC
CGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCTACA
CCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCT
ACAAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCTGATAGATTACGCGGAGCGGC
TCCGGCACCGACTTCACCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATGTGGG
CGTGTACTACTGTCTCCAGACCAGACAGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGAA
CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC
CCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGTGAA
CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGC
AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC
CTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO. 15: L1 전장

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCG
GCCTCCATCTCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCT

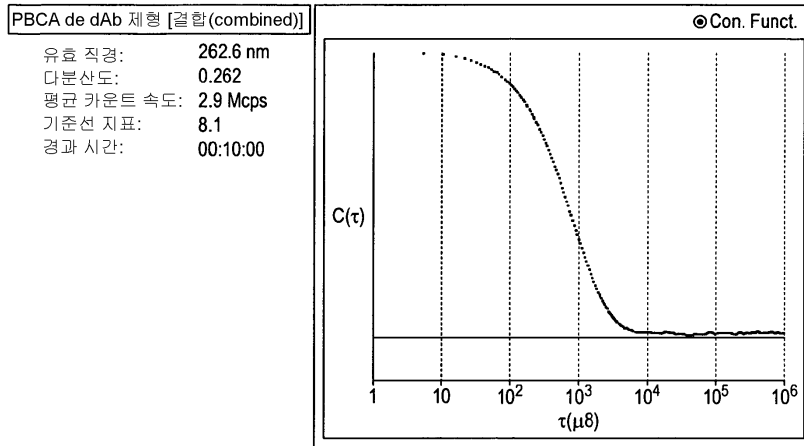
[0531]

ATTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATA
AAGTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAG
GCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTT
ATTACTGCTCTCAAAGTACATGTTCCGTACACGTTCCGCGGAGGGACCAAGG
TGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
ATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
GGGAGAGTGT

[0532]

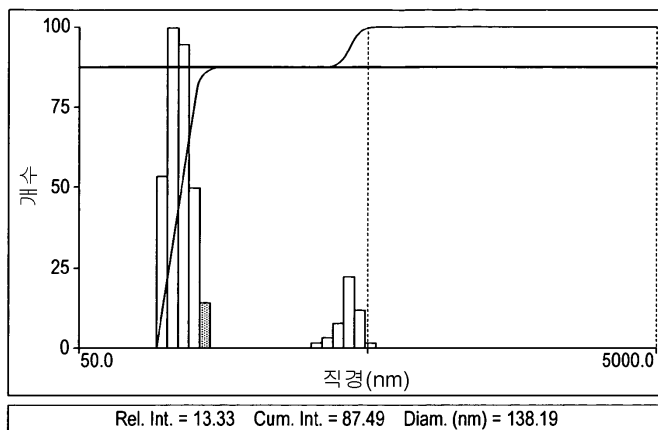
도면

도면1a

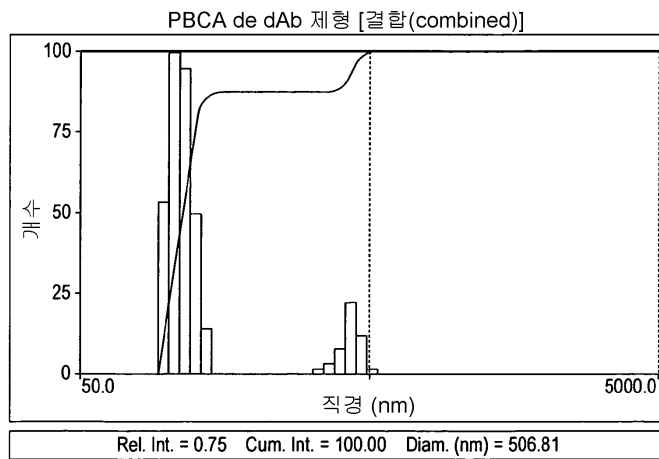


실행	유효 직경(nm)	반 폭(nm)	다분산도	기준선 지표
1	306.1	150.9	0.243	9.2
2	281.6	139.8	0.243	9.3
3	263.7	134.6	0.260	9.3
4	248.0	124.2	0.251	7.4
5	260.0	125.6	0.252	8.3
6	264.6	133.0	0.273	9.6
7	268.4	125.0	0.253	9.1
8	269.3	124.6	0.270	10.0
9	266.3	139.7	0.274	9.5
10	255.2	134.9	0.280	9.8
평균	265.4	135.1	0.260	9.2
표준 오차	5.5	2.4	0.004	0.2
결합	262.6	134.4	0.262	8.1

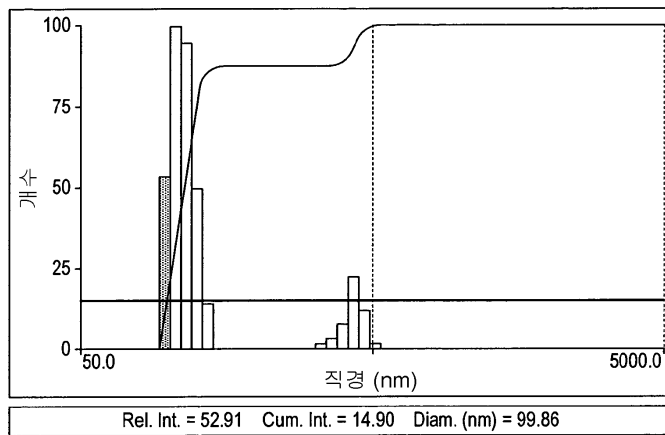
도면1b



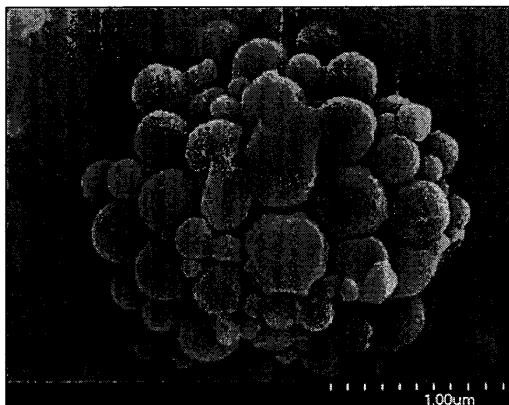
도면1c



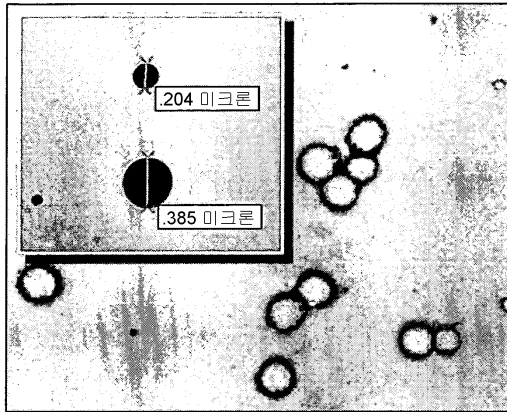
도면1d



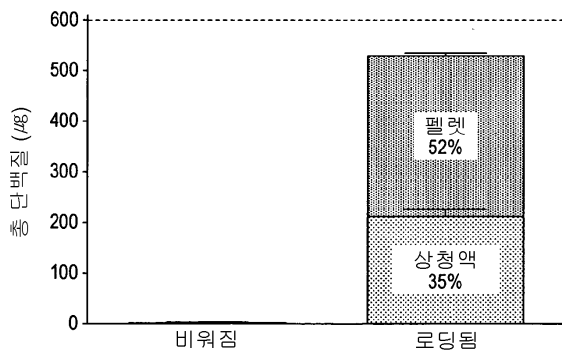
도면2



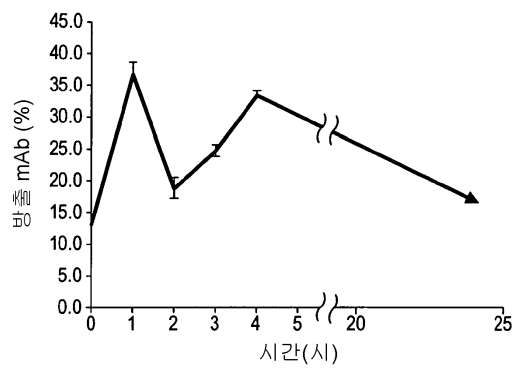
도면3



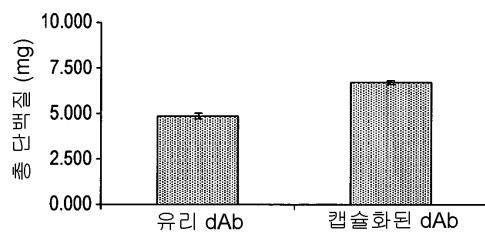
도면4



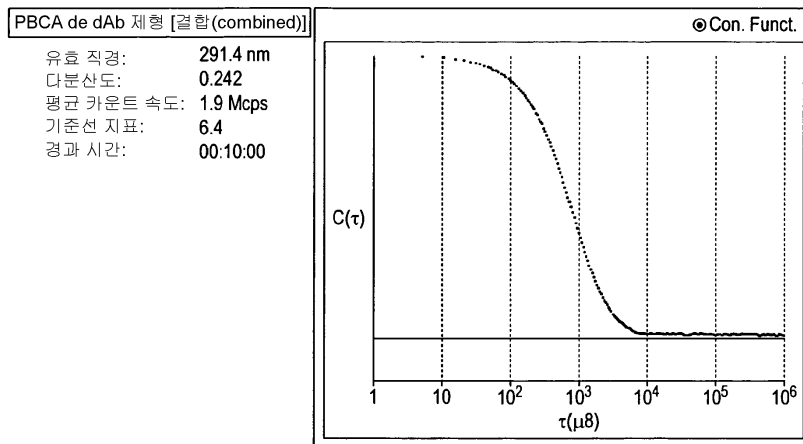
도면5



도면6

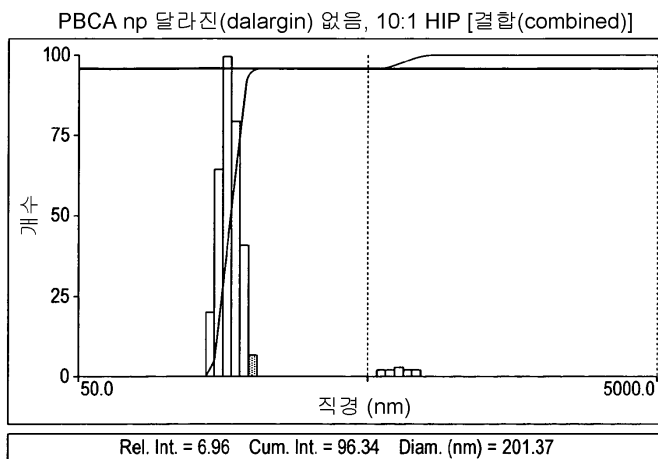


도면7a

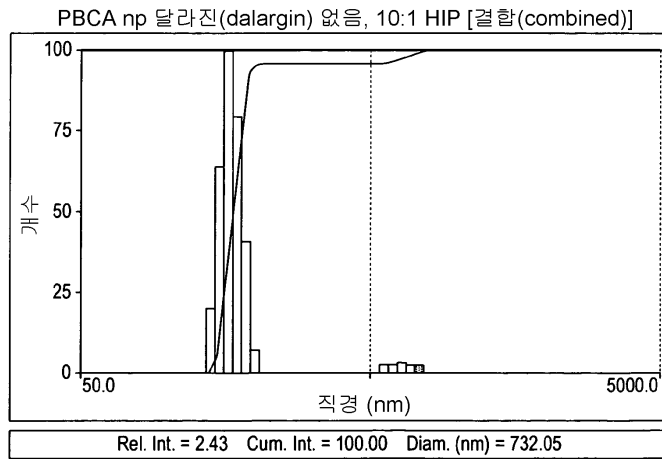


실행	유효 직경(nm)	반 폭(nm)	다분산도	기준선 지표
1	302.4	135.1	0.200	9.9
2	290.7	151.0	0.270	10.0
3	291.0	131.7	0.205	7.6
4	293.0	149.2	0.259	9.2
5	299.4	149.4	0.268	9.6
6	293.2	145.8	0.241	6.6
7	320.1	133.9	0.188	8.7
8	281.3	133.7	0.226	7.9
9	293.6	143.1	0.238	8.7
10	282.7	147.5	0.272	7.4
평균	294.3	142.6	0.237	8.5
표준 오차	3.5	2.3	0.010	0.3
결합	291.4	143.2	0.242	6.4

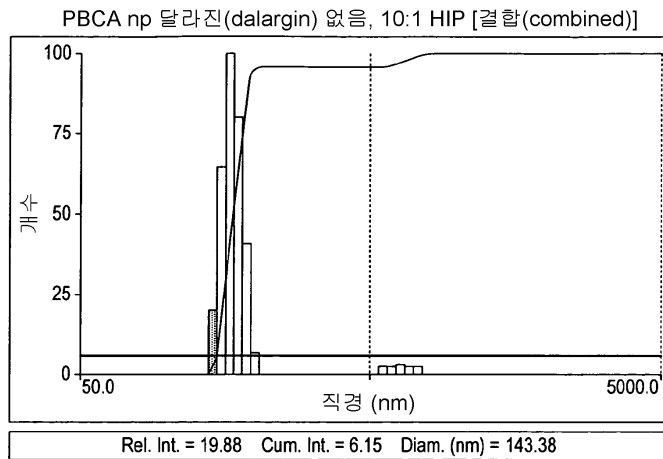
도면7b



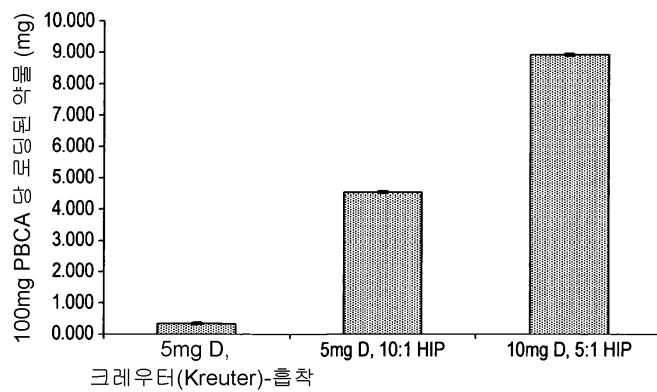
도면7c



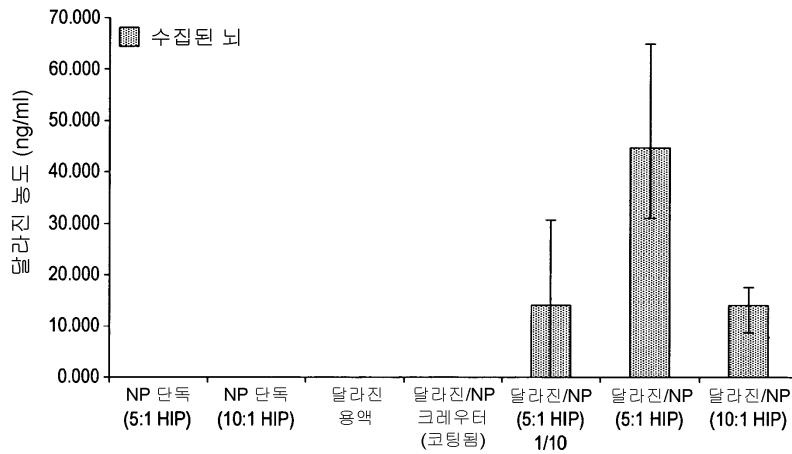
도면7d



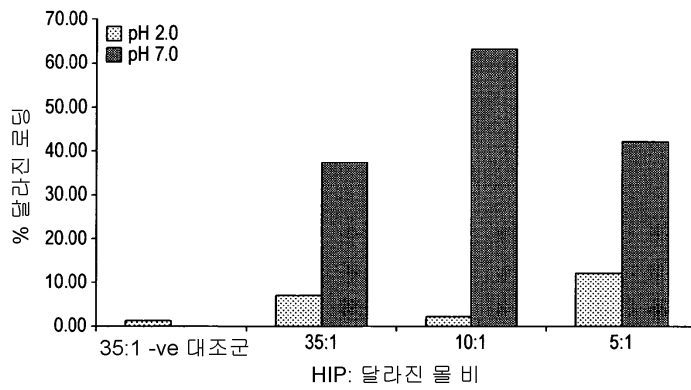
도면8



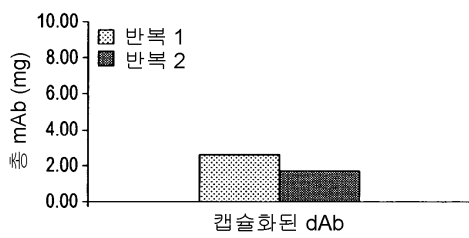
도면9



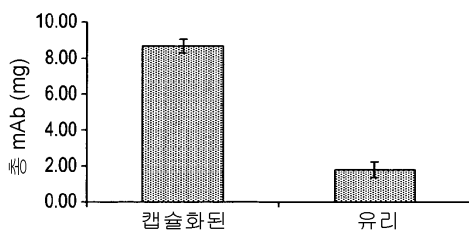
도면10



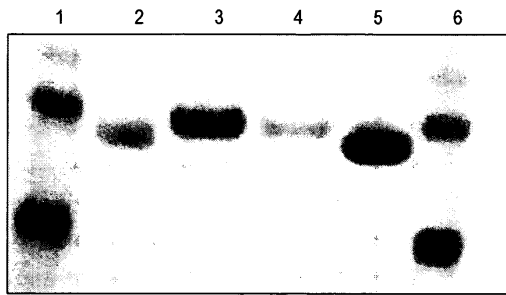
도면11



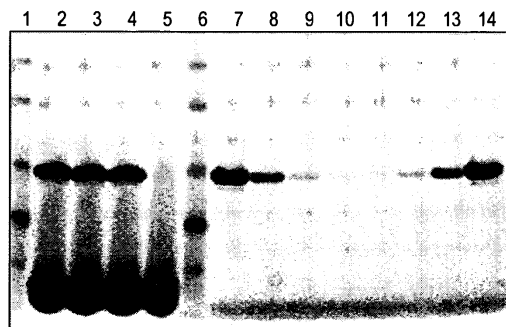
도면12



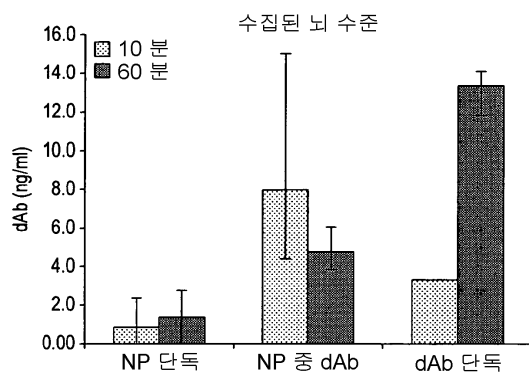
도면13



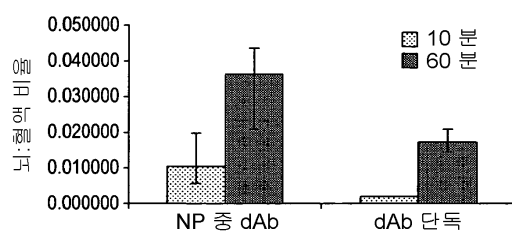
도면14



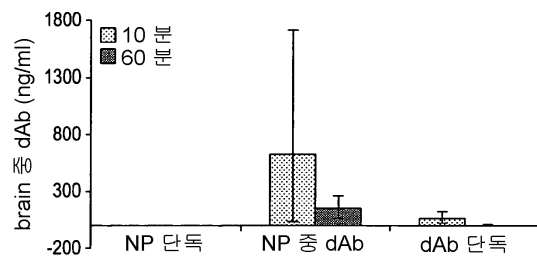
도면15



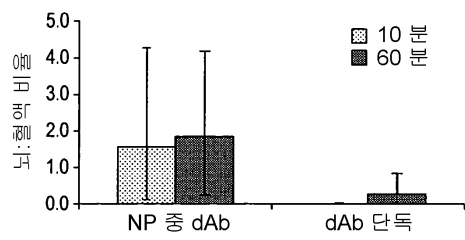
도면16



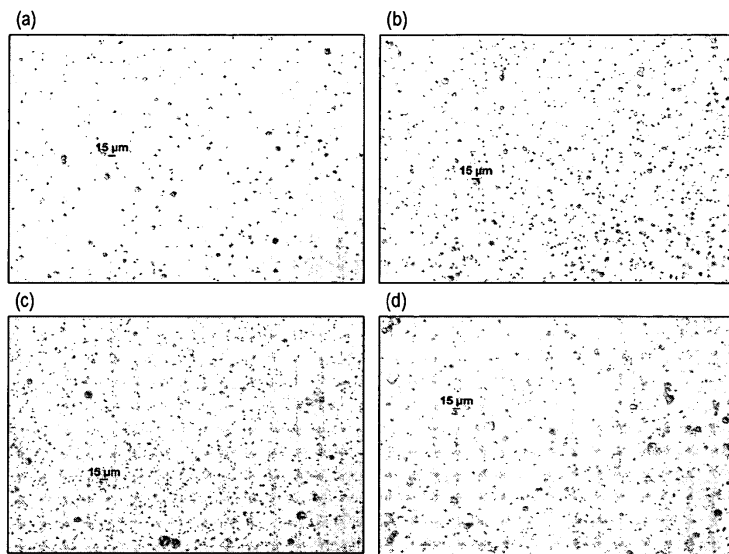
도면17



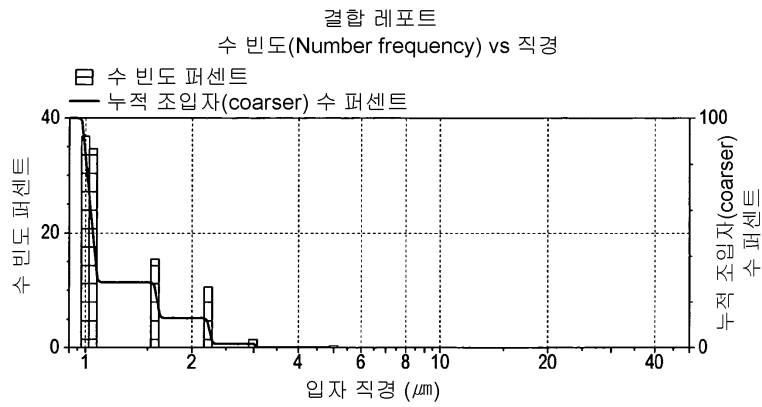
도면18



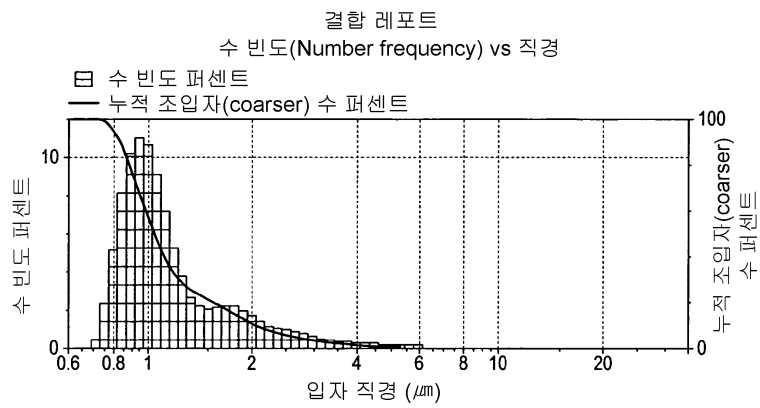
도면19



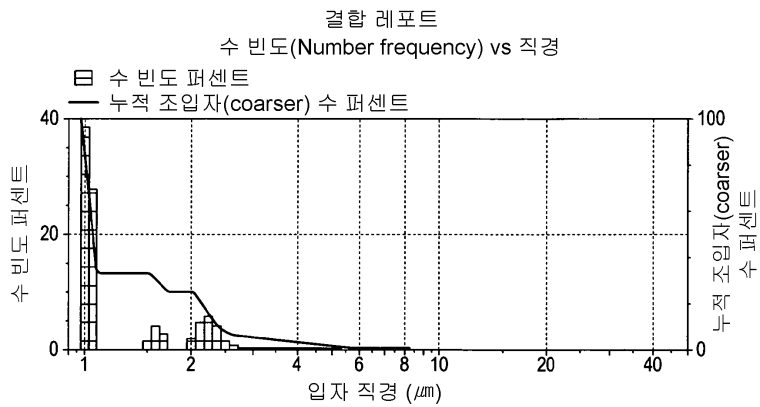
도면20a



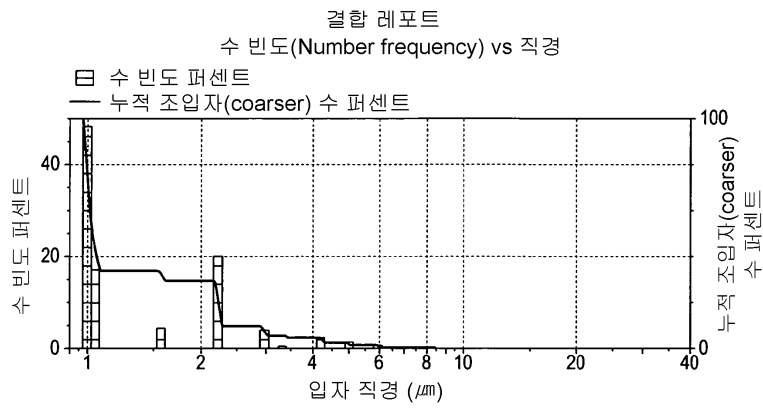
도면20b



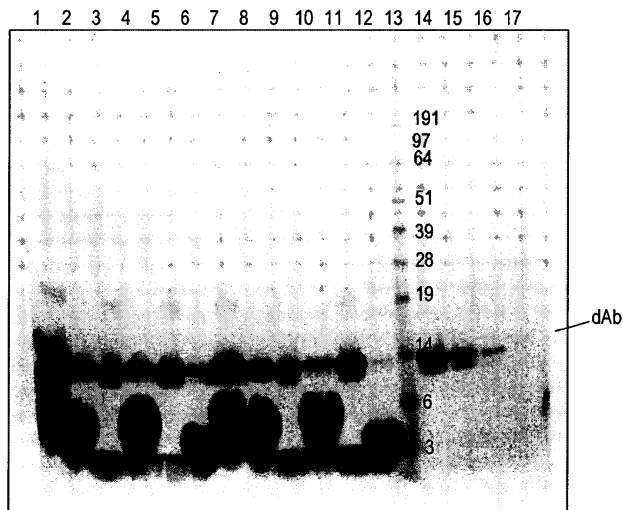
도면20c



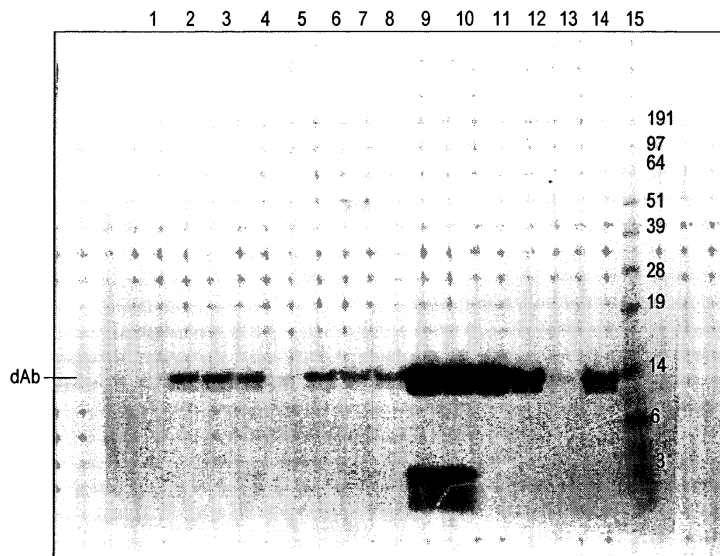
도면20d



도면21



도면22



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PAPANICOLOAU, Irene

CATCHPOLE, Ian

BEATON, Andrew

GOUGH, Gerald

<120> Encapsulation of biologically active
agents

<130> PB63618

<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 ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120

tgcaaggcat ctggatacac cttcaccagc tactggatgc actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat cggaatatatt aatcctagca atggttggtac taactacaat 240

gagaagtcca agagcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agcctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgaact gatgcagggc 360
tactggggcc agggaacact agtcacagtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420
ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcgccctt gggctgcctg 480
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
ggcgtgcaca ctttccccgc tgtctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg 600
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 660
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 720

tgcccaccgt gccacgacc tgaactcgcg ggggcaccgt cagtcttctt cttcccccca 780
aaaccaagg acacctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac 840
gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcacgttc tgcaccagga ctgggtgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac 1020
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa 1080
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200

cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctctcttctt 1260
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg 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 ccactccgat 60

attgtgatga cccagttctcc actctccaac cccgtcaccc ttggacagcc ggtctccatc 120

tcctgcaggt ctagtaagag tctctatat aaggatggga agacatactt gaattggttt 180

ctccagaggc caggccaatc tccacagctc ctaatttatt tgatgtccac ccgtgcatct 240

ggggtccag acagattcag cggcgggtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc 300

aggggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgccaac aacttgtaga gtatccgctc 360

acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgtacgg tggtgcacc atctgtcttc 420

atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggacaacgc cctccaatcg 540

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600

agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acctatcagg 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

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<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 ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag tccttgatt caccctcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
tggtttgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
actcacacat gccacacgtg cccagcacct gaactcgcgg gggcaccgtc agtcttcctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 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 accacgcctc cgtgctgga ctccgacggc 1200

ttcttcttcc tctacagcaa gtccaccgtg 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 tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccgccagc 60

atcagctgta gagtgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgcactgg 120

tatctgcaga agcctggcca gagccctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180

agcggcgtgc ctgatagatt cagcggcagc ggtccggca cgcacttcac cctgaagatc 240

agcagagtgg aggccgagga tgtggcgtg tactactgct cccagaccag acacgtgcct 300

tacacctttg gggcggaac aaaggtggag atcaagcgta cggtggccgc cccagcgtg 360

ttcatcttcc ccccgagca tgagcagctg aagagcggca ccgcccagct ggtgtgtctg 420

ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa tgccctgcag 480

agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540

agcagcacc tgaccctgag caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600

gtgaccacc 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 gccggcctec 60
atctcctgca gagttagtca gaggctttta cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct ataaagtct caaccgattt 180
tctgggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggtcgagga tgttgggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300
tacacgttcg gcggaggga caagtgga atcaaacgta cgttggtgc accatctgtc 360
ttcatctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctgga ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtga aggtggaca cgcctccaa 480
tcgggtaact ccaggagag tgctacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcga 600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacaggg agagtgt 657