(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201012490 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：098114865 (22)申請日： 中華民國 98 (2009) 年 05 月 05 日
(51)Int. Cl.： *A61K9/51 (2006.01)* *A61K47/30 (2006.01)*
A61K38/02 (2006.01)
(30)優先權：2008/05/06 美國 61/050,775
2008/06/20 美國 61/074,171
(71)申請人：葛蘭素集團有限公司 (英國) GLAXO GROUP LIMITED (GB)
英國
(72)發明人：帕巴尼可拉沃 艾琳 PAPANICOLAOU, IRENE (GR)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：22 共 133 頁

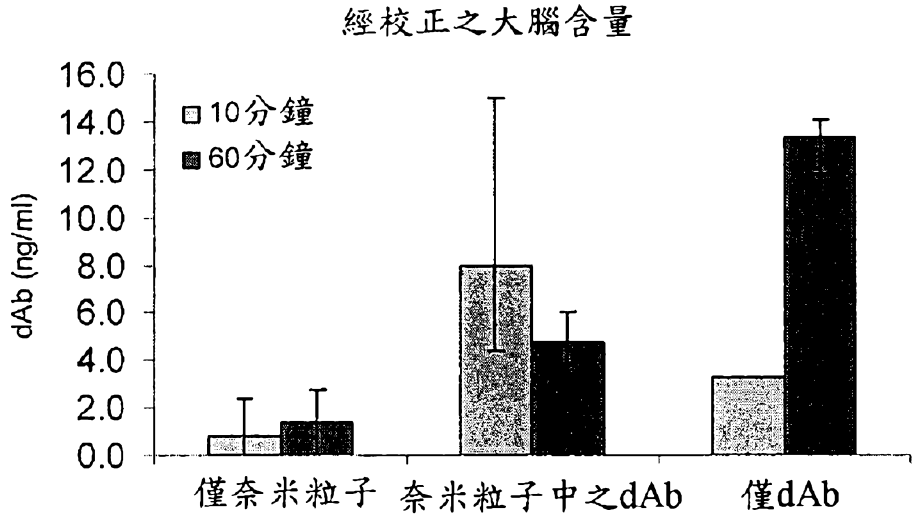
(54)名稱

生物活性劑之包囊化

ENCAPSULATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS

(57)摘要

本發明提供使用 Hip 劑將諸如蛋白質之生物活性劑包囊於諸如奈米粒子之微粒載體中之方法。本發明亦提供包含可由該等方法獲得之微粒載體的組合物，及該等組合物於治療之用途。



(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201012490 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：098114865 (22)申請日： 中華民國 98 (2009) 年 05 月 05 日
(51)Int. Cl.： *A61K9/51 (2006.01)* *A61K47/30 (2006.01)*
A61K38/02 (2006.01)
(30)優先權：2008/05/06 美國 61/050,775
2008/06/20 美國 61/074,171
(71)申請人：葛蘭素集團有限公司 (英國) GLAXO GROUP LIMITED (GB)
英國
(72)發明人：帕巴尼可拉沃 艾琳 PAPANICOLAOU, IRENE (GR)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：22 共 133 頁

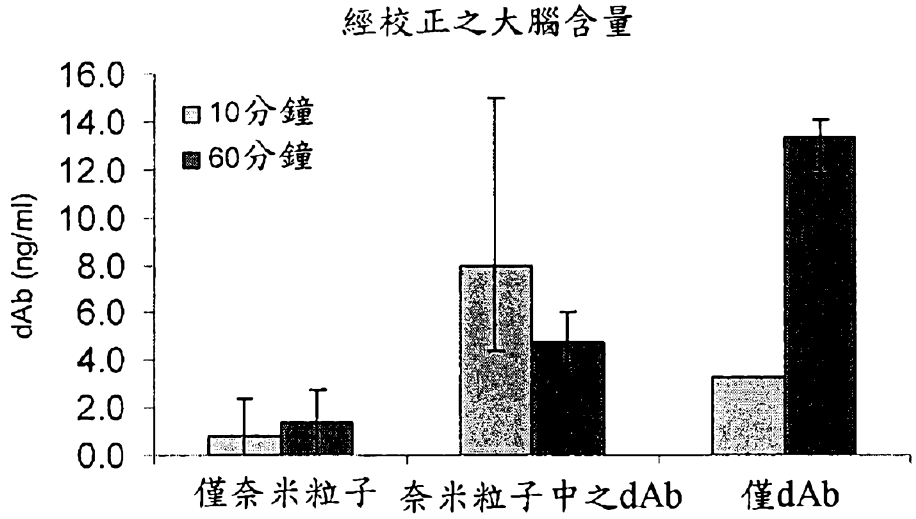
(54)名稱

生物活性劑之包囊化

ENCAPSULATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS

(57)摘要

本發明提供使用 Hip 劑將諸如蛋白質之生物活性劑包囊於諸如奈米粒子之微粒載體中之方法。本發明亦提供包含可由該等方法獲得之微粒載體的組合物，及該等組合物於治療之用途。



六、發明說明：

【先前技術】

多種藥物對大腦或眼睛中之標靶具有活性，為了達到對其標靶之此等活性，該等藥物必需通過諸如血腦障壁之生物障壁。儘管一些分子能夠跨過生物障壁，但仍有其他分子不能有效通過此等障壁或實際上根本不能通過此等障壁。許多藥物亦僅在直接給藥至標靶組織中時有效，且若不能到達此標靶組織，則藥物完全不能起作用。因此，許多潛在的有效藥物臨床上不適用，因為其不能通過該等生物障壁。

此項技術中已描述增加藥物透過此等生物障壁的多種方法。

一種方法為改變障壁本身之功能。舉例而言，滲透劑或擬膽鹼檳榔鹼(cholinomimetic arecoline)致使血腦障壁打開或滲透性改變(*Saija A*等人，*J Pharm. Pha. 42:135-138 (1990)*)。

另一種方法在於修飾藥物分子本身。舉例而言，試圖通過血腦障壁之蛋白質修飾包括糖基化該等蛋白質或形成前藥。(*WO/2006/029845*)。

另一種方法為植入控制釋放聚合物，該等聚合物自基質系統直接向神經組織中釋放活性成份。然而，此方法為侵入性的且若直接植入大腦或脊髓中則需要手術介入(sable等人美國專利第4,833,666號)，此呈現患者順應性問題且通常僅允許在大腦內之局部傳遞，所投與之藥物一般極快

速排出。(*WO/2006/029845*)。

已使用藥物載體系統來克服此等限制，然而靶向藥物傳遞之主要問題為迅速助噬作用，及經注射之載體經網狀內皮系統(RES)，尤其經肝臟及脾臟中之巨噬細胞攝取。

因此，仍需要向大腦及眼睛傳遞諸如蛋白質之巨分子的有效方式。特定言之，將需要獲得跨過血腦障壁傳遞巨分子之方法，此在進入大腦時將保留活性，且此亦可提供所要釋放動力學，保持蛋白質穩定性及活性，且能夠避免清除機制。

【發明內容】

在本發明之一態樣中提供將生物活性劑包囊於微粒載體中之方法，諸如將蛋白質及/或肽包囊於奈米粒子中，或包囊於奈米粒子中或上，或用奈米粒子包囊之方法，及藉由包囊於奈米粒子中，或包囊於奈米粒子中或上，或用奈米粒子包囊跨過血腦障壁傳遞蛋白質及/或肽之方法，及藉由包囊於奈米載體中，或包囊於奈米載體中或上，或用奈米載體包囊將蛋白質及/或肽傳遞至眼睛之方法。

在本發明之另一實施例中提供包含粒子形成物質及生物活性劑(諸如，蛋白質及/或肽)之微粒載體，其係用於自血液跨過血腦障壁向大腦傳遞蛋白質及/或肽或用於向眼睛傳遞。在本發明之另一實施例中為奈米粒子組合物及其於治療中樞神經系統及/或眼睛之病症或疾病的用途。

【實施方式】

本發明提供包含粒子形成物質及生物活性劑之微粒載

體，及該等微粒載體之製備方法。

奈米粒子

在一實施例中，本發明之奈米粒子包含諸如蛋白質或肽之生物活性劑。該等蛋白質可為抗原結合分子，其如本文所用係指能夠與標靶結合之抗體、抗體片段及其他蛋白質構築體。

抗原結合分子可包含結構域。「結構域」為具有獨立於蛋白質其餘部分之三級結構的摺疊蛋白質結構。

一般而言，結構域負責蛋白質的離散功能特性，且在許多狀況下可添加、移除或轉移至其他蛋白質而不使蛋白質及/或結構域其餘部分的功能損失。「單抗體可變域」為包含抗體可變域所特有之序列的摺疊多肽結構域。因此，其包括完整抗體可變域及經修飾可變域(例如其中一或多個環已由不為抗體可變域所特有的序列置換)，或經截斷或包含N-或C-末端延伸之抗體可變域，以及至少保留全長結構域之結合活性及特異性的可變域之摺疊片段。

抗原結合分子可包含至少一個免疫球蛋白可變域，例如該等分子可包含抗體、結構域抗體、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、ScFv、雙功能抗體、異源結合抗體。該等抗原結合分子可能會結合單個標靶，或可具有多特異性(亦即與多個標靶結合)，例如其可具有雙特異性或三特異性。在一實施例中，抗原結合分子為抗體。在另一實施例中，抗原結合分子為結構域抗體(dAb)。在另一實施例中，抗原結合分子可為抗體與抗原結合片段之組合，諸如與單株抗體連

接之一或多個dAb及/或一或多個ScFv。在另一實施例中，抗原結合分子可為抗體與肽之組合。抗原結合分子可包含至少一個非Ig結合域(諸如，獨立於不同V區或域特異性結合抗原或抗原決定基之結構域)，其可為dAb(例如人類、駱駝科或鯊免疫球蛋白單可變域)或其可為選自由以下組成之群的骨架之衍生物之結構域：CTLA-4(Evibody)；脂質運載蛋白；蛋白A產生之分子，諸如蛋白A之Z結構域(Affibody，SpA)、A結構域(Avimer/Maxibody)；熱休克蛋白，諸如GroEI及GroES；轉鐵蛋白(trans-body)；錨蛋白重複蛋白(DARPin)；肽適體；C型外源凝集素結構域(四連接素(Tetranectin))；人類晶狀體球蛋白及人類泛素(affilins)；PDZ結構域；人類蛋白酶抑制劑之蠍毒素kunitz型結構域(scorpion toxinkunitz type domain)；及纖維結合蛋白(adnectin)；已對其進行蛋白質工程改造以獲得與除天然配位體之外的配位體結合。

CTLA-4(細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為主要在CD4+ T細胞上表現之CD28家族受體。其胞外域具有可變域樣Ig摺疊。與抗體之CDR對應之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造以具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為Evibody。更多詳情參見Journal of Immunological Methods **248 (1-2)**, 31-45 (2001)。

脂質運載蛋白為傳輸諸如類固醇、後膽色素、類視色素及脂質之小疏水性分子的胞外蛋白家族。其具有在錐形結構之開放端具有多個環的剛性-摺疊二級結構，其可經工

程改造以結合不同標靶抗原。抗運載蛋白的尺寸介於160-180個胺基酸之間，且係由脂質運載蛋白產生。更多詳情參見Biochim Biophys Acta **1482**: 337-350 (2000)、US7250297B1及US20070224633。

affibody為由金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)之蛋白A產生的骨架，其可經工程改造以與抗原結合。該結構域由約58個胺基酸之三螺旋束組成。已藉由表面殘基之隨機化產生文庫。更多詳情參見Protein Eng. Des. Sel. **17**, 455-462 (2004)及EP1641818A1。

Avimer為由A結構域骨架家族產生之多結構域蛋白。約35個胺基酸之天然結構域採用經定義之二硫化物鍵結之結構。A結構域家族所展現之天然變化的改組產生多樣性。更多詳情參見Nature Biotechnology **23(12)**, 1556-1561 (2005)及Expert Opinion on Investigational Drugs **16(6)**, 909-917 (2007年6月)。

轉鐵蛋白為單體血清傳輸醣蛋白。轉鐵蛋白可藉由在容許的表面環中插入肽序列來進行基因改造以結合不同標靶抗原。經基因改造之轉鐵蛋白骨架之實例包括Trans-body。更多詳情參見J. Biol. Chem **274**, 24066-24073 (1999)。

經設計之錨蛋白重複蛋白(DARPin)係由錨蛋白產生，錨蛋白為介導整合膜蛋白與細胞骨架之連接的蛋白質家族。單個錨蛋白重複序列為由兩個螺旋及一個轉(turn)組成的33個殘基的基元。其可藉由隨機化各重複序列之第一螺旋

及一個轉中之殘基來工程改造以結合不同標靶抗原。其結合界面可藉由增加模組數而增加(一種親和力成熟法)。更多詳情參見J. Mol. Biol. **332**, 489-503 (2003), PNAS **100(4)**, 1700-1705 (2003)及J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)及US20040132028A1。

纖維結合蛋白為可經工程改造以結合抗原之骨架。Adnectin由III型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元的第10結構域之天然胺基酸序列之主鏈組成。在夾層之一端的三個環可經工程改造以使Adnectin能夠特異性辨識所關注之治療標靶。更多詳情參見Protein Eng. Des. Sel. **18**, 435-444 (2005)、US20080139791、WO2005056764及US6818418B1。

肽適體為由恆定骨架蛋白組成之組合辨識分子，該恆定骨架蛋白通常為含有在活性位點處插入之限制性可變肽環的硫氧還蛋白(TrxA)。更多詳情參見Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。

微體係由長度為25-50個胺基酸的含有3-4個半胱胺酸橋的天然存在之微蛋白產生-微蛋白之實例包括KalataB1及芋螺毒素(conotoxin)及打結素(knottin)。微蛋白具有可經工程改造以包括至多25個胺基酸而不影響微蛋白之整體摺疊之環。經工程改造之打結素結構域的更多詳情參見WO2008098796。

其他非Ig結合域包括已用作工程改造不同標靶抗原結合特性之骨架的蛋白質，包括人類晶狀體球蛋白及人類泛素(affilins)、人類蛋白酶抑制劑之kunitz型結構域、Ras-結合

蛋白AF-6之PDZ結構域、蠍毒素(卡律布德蠍毒素(charybdotoxin))、C型外源凝集素結構域(四連接素)，其評論於治療性抗體手冊(Handbook of Therapeutic Antibodies)之第7章- Non-Antibody Scaffolds (2007, Stefan Dubel編)及Protein Science **15**:14-27 (2006)中。本發明之非Ig結合域可自任何此等替代蛋白質結構域產生。

在本發明之一實施例中，抗原結合分子與中樞神經系統(諸如，大腦或脊髓，或例如神經元組織)中發現之標靶結合。

在本文所述的本發明之另一實施例中，抗原結合分子特異性結合已知與神經性疾病或病症有關的標靶，諸如MAG(髓鞘相關醣蛋白)、NOGO(神經突外生長抑制蛋白)或β-澱粉狀蛋白。

該等抗原結合分子包括能夠結合NOGO之抗原結合分子，例如抗NOGO抗體。用於本發明之抗NOGO抗體之一實例為由SEQ ID NO 1之重鏈及SEQ ID NO 2之輕鏈定義之抗體或抗NOGO抗體或其包含SEQ ID NO 1及2中所闡明之抗體的CDR之抗原結合片段。此抗體(H28 L16)之更多詳情可見於PCT申請案WO2007068750中，其以引用的方式併入本文中。

該等抗原結合分子包括能夠結合MAG之抗原結合分子，例如抗MAG抗體。用於本發明之抗MAG抗體之一實例為由SEQ ID NO 11之重鏈可變區及SEQ ID NO 12之輕鏈可變區定義之抗體或抗MAG抗體或其包含SEQ ID NO 1及2中

所闡明之抗體的CDR之抗原結合片段。此抗體(BvH1CvL1)之更多詳情可見於PCT申請案WO2004014953中，其以引用的方式併入本文中。

該等抗原結合分子包括能夠結合β-澱粉狀蛋白之抗原結合分子，例如抗β-澱粉狀蛋白抗體。用於本發明之抗β-澱粉狀蛋白抗體之一實例為由SEQ ID NO 5之重鏈及/或SEQ ID NO 6之輕鏈定義之抗體或抗β-澱粉狀蛋白抗體或其包含SEQ ID NO 1及2中所闡明之抗體的CDR之抗原結合片段。此抗體(H2L1)之更多詳情可見於PCT申請案WO2007113172中，其以引用的方式併入本文中。

該等抗體之CDR序列可由Kabat編號系統(Kabat等人；*Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987)、Chothia編號系統(Al-Lazikani等人，(1997) JMB **273**,927-948)、接觸定義法(MacCallum R.M.及Martin A.C.R.及Thornton J.M, (1996), Journal of Molecular Biology, 262 (5), 732-745)或熟習此項技術者已知用於編號抗體中之殘基及確定CDR之任何其他確定方法來確定。

在本發明之一實施例中，抗原結合蛋白與眼睛中發現之標靶結合，該標靶諸如TNF、TNFr-1、TNFr-2、TGFβ受體-2、VEGF、NOGO、MAG、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-17、CD20、β澱粉狀蛋白、FGF-2、IGF-1、PEDF、PDGF、例如C3、C5、CFD或CFI之補體因子。

在本發明之一實施例中，提供包含本發明之奈米粒子的組合物。在另一實施例中，當使用動態光散射技術量測

時，至少約90%數目之奈米粒子在約1 nm至約1000 nm之範圍內。在另一實施例中，當使用動態光散射技術量測時，至少約90%數目之奈米粒子在約1 nm至約400 nm，或約1 nm至約250 nm，或約1 nm至約150 nm，或約40 nm至約250 nm，或約40 nm至約150 nm，或約40 nm至約100 nm之範圍內。在本發明之另一實施例中，當使用動態光散射技術量測時，至少約90%數目之奈米粒子在約40 nm至約250 nm之範圍內。

在本發明之另一實施例中，當使用動態光散射技術量測時，至少約90%數目之奈米粒子在約40 nm至約150 nm之範圍內。

在另一實施例中，提供包含本發明之奈米粒子的組合物，其中當藉由光散射技術量測時，組合物中之奈米粒子的中值尺寸為直徑小於約1000 nm，例如直徑小於約400 nm，例如直徑小於約250 nm，例如直徑小於約150 nm。

在另一實施例中，組合物中之奈米粒子的中值尺寸為約40 nm至約250 nm。

在另一實施例中，組合物中之奈米粒子的中值尺寸為約40 nm至約150 nm。

在本發明之一實施例中，提供將生物活性劑包囊於微粒載體中之方法，其包含以下步驟：

a) 在疏水性離子配對(HIP)劑存在下且在有機溶劑中溶解生物活性劑；

b) 將聚合物形成物質的單體及/或寡聚物溶解於(a)中所

形成之有機相中；

c) 形成(b)中所形成之有機相在連續水相中之乳液以使單體聚合；及

d) 獲得由乳液形成之微粒載體。

在本發明之另一實施例中，提供將生物活性劑包囊於微粒載體中之方法，其包含以下步驟：

a) 將水相中之生物活性劑與有機溶劑相中之疏水性離子配對(HIP)劑混合形成生物活性劑-HIP複合物；

b) 自水相分離複合物；

c) 移除水相且使複合物與有機相均質化；

d) (i) 將聚合物溶解於(c)中所形成之有機相中且接著形成有機相於連續水相中之乳液；或

(ii) 將聚合物形成物質之單體或寡聚物溶解於(c)中所形成之有機相中，且接著形成有機相於連續水相中之乳液；使單體或寡聚物聚合形成聚合物；及

e) 獲得由步驟(d)之乳液形成之微粒載體。

此使用疏水性離子配對劑之方法允許將生物活性劑(例如，蛋白質，諸如親水性蛋白質)包囊於疏水性聚合物粒子之核心中。疏水性離子配對允許將蛋白質萃取至有機介質中，且因此該方法能夠以單乳液製備微粒載體。

在另一實施例中，有待於根據該方法包囊之生物活性劑為肽或蛋白質，諸如治療性蛋白質或抗原結合分子。

在本發明之一實施例中，蛋白質與中樞神經系統(諸如，大腦或脊髓，或例如神經元組織)中發現之標靶結

合。

在本文所述的本發明之另一實施例中，蛋白質特異性結合已知與神經性疾病或病症有關的抗原決定基，諸如MAG(髓鞘相關醣蛋白)、NOGO(神經突外生長抑制蛋白)或β-澱粉狀蛋白。

在本文所述的本發明之另一實施例中，蛋白質為與NOGO結合之抗體，例如PCT申請案WO2007068750中所述之任何抗NOGO抗體，尤其PCT申請案WO2007068750中稱作H28 L16之抗體，該案以引用的方式併入本文中。

在本文所述的本發明之另一實施例中，蛋白質為與MAG結合之抗體，例如PCT申請案WO2004014953中所述之任何抗MAG抗體，尤其PCT申請案WO2004014953中稱作BvL1 CvL1之抗體，該案以引用的方式併入本文中。

在本文所述的本發明之另一實施例中，蛋白質為與β澱粉狀蛋白結合之抗體，例如PCT申請案WO2007113172中所述之任何抗β澱粉狀蛋白抗體，尤其PCT申請案WO2007113172中稱作H2 L1之抗體，該案以引用的方式併入本文中。

在本發明之一實施例中，微粒載體可為微球或奈米粒子。在一此類實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑為蛋白質。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑為肽。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子，且生物活性劑包含例如結構域抗體或抗體之抗原結合分子。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑

包含結構域。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑為蛋白質。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑為肽。在另一實施例中，微粒載體為微球，且生物活性劑包含例如結構域抗體或抗體之抗原結合分子。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑包含結構域。

在本文所述的本發明之一實施例中，生物活性劑特異性結合已知與神經性疾病或病症有關的標靶，諸如特異性結合MAG、NOGO或β-澱粉狀蛋白。

在一實施例中，生物活性劑在不存在疏水性離子配對劑之狀況下不溶於有機相中。

在本文所述的本發明之一實施例中，當蛋白質為陰離子型時，疏水性離子配對劑為陽離子型HIP劑。在另一實施例中，當蛋白質為陽離子型時，疏水性離子配對劑為陰離子型HIP劑。在另一實施例中，陰離子型HIP劑係選自由烷基四級銨陽離子，較佳溴化烷基銨，更佳溴化四丁基銨、溴化四己基銨、溴化四辛基銨、十二烷基硫酸鈉(SDS)、油酸鈉或多庫酯鈉(docusate sodium)(aka Aerosol OT™)組成之群，且HIP劑係以等於或大於蛋白質上之淨正電荷數目的化學計量之量存在。在另一實施例中，陽離子型HIP劑係選自由溴化二甲基二(十八基)銨(DDAB18)、1,2-二油醯氧基-3-(三甲基銨)丙烷(DOTAP)或西曲溴銨(cetrimonium bromide)(CTAB)組成之群，且HIP劑係以等於或大於蛋白質上之淨負電荷數目的化學計量之量存在。

在另一實施例中，任何疏水性陽離子或陰離子可潛在用

作HIP劑以溶解蛋白質。疏水性離子配對(HIP)涉及極性抗衡離子經具有相似電荷但較不容易溶劑化之物質化學計量置換。如本文所揭示，本發明提供使用HIP改變蛋白質的溶解特性從而允許將蛋白質萃取至諸如二氯甲烷之有機溶劑中的方法。多庫酯鈉(磺基丁二酸雙(2-乙基己基)鈉)為合適離子配對劑之一實例。在一實施例中，含有多庫酯鈉之二氯甲烷與蛋白質水溶液混合。此致使多庫酯離子與蛋白質離子配對，且隨後使蛋白質分溶至油相中。蛋白質溶解於二氯甲烷中允許蛋白質包囊於經由水包油單乳液法製備之奈米粒子或微球中。

在本文所述的本發明之一實施例中，當蛋白質為陰離子型且HIP劑為陽離子型時，連續水相具有約7.0或高於7.0之pH值，例如pH值可為至少約8.0或至少約10.0或為至少約12.0。

在本文所述的本發明之一替代實施例中，當蛋白質為陽離子型且HIP劑為陰離子型時，連續水相具有約7.0或低於7.0之pH值，例如pH值可為小於約6.0或小於約4.0或小於約2.0。

在一此類實施例中，蛋白質與聚合物之重量(w/w)比可為0.5%至90%，例如為至少約0.5%，或為至少約1%，或為至少約2%，或為至少約2.5%，或為至少約5%，或為至少約9%，或為至少約10%，或為至少約15%，或為至少約20%，或為至少約40%，或為至少約50%，或為至少約60%，或為至少約70%，或為至少約80%，或為至少約

90%。舉例而言，當蛋白質為肽時，肽與聚合物之比率可為至少約9%，當蛋白質為抗體時，抗體與聚合物之比率可為至少約2%，或當蛋白質為結構域抗體時，結構域抗體與聚合物之比率可為至少約2.5%。

在本發明之一實施例中，蛋白質與總調配物(聚合物+HIP及視情況存在之界面活性劑)之重量比可為0.5%至50%，例如為至少約5%，或至少約9%，或至少約15%，或至少約16%，或至少約20%，或至少約25%。舉例而言，當蛋白質為肽時，肽與總調配物之比率可為至少約16%，或當蛋白質為抗體時，抗體與聚合物之比率可為至少約1%，或當蛋白質為結構域抗體時，結構域抗體與總調配物之比率可為至少約9%。

在本發明之一實施例中，粒子的包囊化效率為至少約1%，或為至少約2%，或為至少約10%，或為至少約20%，或為至少約40%，或為至少約50%，或為至少約60%，或為至少約70%，或為至少約80%，或為至少約90%，或為至少約95%，或為至少約97%，或為至少約99%。舉例而言，當蛋白質為肽時，包囊化效率可為至少約90%，當蛋白質為抗體時，包囊化效率可為至少約1%，或當蛋白質為結構域抗體時，包囊化效率可為至少約70%。

在本發明之一實施例中，單體或寡聚物係選自由以下組成之群：甲基丙烯酸甲酯、氰基丙烯酸烷酯、甲基丙烯酸羥乙酯、甲基丙烯酸、乙二醇二甲基丙烯酸酯、丙烯醯胺、N,N'-雙亞甲基丙烯醯胺及甲基丙烯酸2-二甲基胺基乙

酯。在另一實施例中，單體為氰基丙烯酸烷酯，例如氰基丙烯酸丁酯(BCA)。

在一實施例中提供在空心內腔中包含於水相中之生物活性劑之聚合微粒載體。

在本發明之另一實施例中提供將生物活性劑包囊於微粒載體中以供經眼傳遞之方法，其包含以下步驟：

a) 將聚合物溶解於有機溶劑中以形成聚合物溶液；

b) 向聚合物溶液中添加含有生物活性劑之水溶液以形成水相液滴於連續有機相中之初乳液；

c) 使初乳液與水性介質混合形成W/O/W乳液；及

d) 使有機相蒸發且藉此獲得包含含有於水相中之該生物活性劑之空心內腔的微粒載體。

使有機相蒸發可為被動或主動的。舉例而言，主動蒸發可藉由使用熱進行。

在一此類實施例中，經眼傳遞為眼周(例如經鞏膜、結膜下、筋膜下(sub-tenon)、眼球周圍、局部、眼球後)傳遞或傳遞至下直肌、上直肌或側直肌。在一實施例中，經眼傳遞為經鞏膜傳遞。

在另一實施例中，有待於根據該方法包囊之生物活性劑為肽或蛋白質，諸如治療性蛋白質或抗原結合分子。

該等方法所用之微粒載體可為微球或奈米粒子。舉例而言，微粒載體可為奈米粒子且生物活性劑為蛋白質，或微粒載體可為奈米粒子且生物活性劑為肽，或微粒載體可為奈米粒子且生物活性劑包含抗原結合分子，諸如結構域抗

體或抗體。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑包含結構域。

或者，微粒載體可為微球且生物活性劑為蛋白質，或微粒載體可為微球且生物活性劑為肽，或微粒載體可為微球且生物活性劑包含抗原結合分子，諸如結構域抗體或抗體或其組合。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑包含結構域。

在一個實施例中，當使用小角度雷射光散射技術測量時，至少約90%數目之粒子的直徑在約1 μm至約100 μm之範圍內。在另一實施例中，當使用小角度雷射光散射技術測量時，至少約90%數目之粒子在約1 μm至約80 μm，或約1 μm至約60 μm，或約1 μm至約40 μm，或約1 μm至約30 μm，或約1 μm至約10 μm之範圍內。

在本發明之另一實施例中，當使用小角度雷射光散射技術測量時，至少約90%數目之微球在約1 μm至約60 μm之範圍內。

在本發明之另一實施例中，當使用小角度雷射光散射技術測量時，至少約90%數目之微球在約1 μm至約30 μm之範圍內。

在另一實施例中，提供包含本發明微球的組合物，其中當藉由小角度雷射光散射技術測量時，組合物中之微球的中值尺寸為直徑小於約100 μm，例如直徑小於約80 μm，例如直徑小於約60 μm，例如直徑小於約40 μm。

在另一實施例中，組合物中之微球的中值尺寸為約1 μm至約6 μm，或1 μm至約30 μm。

在本發明之另一實施例中，微粒載體經至少3個月或更長，或長達6個月或更長，或長達12個月或更長之時段持續釋放治療量之活性生物分子。

空心法(限於本發明之奈米粒子)

在本發明之一實施例中，提供製造如本文所述之本發明奈米粒子之方法，其包含以下步驟：

a) 將聚合物溶解於有機溶劑中以形成聚合物溶液；

b) 向聚合物溶液中添加含有蛋白質之水溶液以形成水相液滴於連續有機相中之初乳液；

c) 使初乳液與水性介質混合形成W/O/W乳液；及

d) 使有機相蒸發且藉此獲得包含含有於水相中之該等蛋白質之空心內腔的奈米粒子。

使有機相蒸發可為被動或主動的。舉例而言，主動蒸發可藉由使用熱進行。

在另一實施例中，本文所述之任何方法中所用之聚合物係選自(但不限於)聚-L-丙交酯(PLA)、聚(乳糖-共-乙交酯)(PLG)、聚(丙交酯)、聚(己內酯)、聚(羥基丁酸酯)及/或其共聚物。合適粒子形成材料包括(但不限於)聚(二烯)，諸如聚(丁二烯)及其類似物；聚(烯烴)，諸如聚乙烯、聚丙烯及其類似物；聚(丙烯酸系物)，諸如聚(丙烯酸)及其類似物；聚(甲基丙烯酸系物)，諸如聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸羥乙酯)及其類似物；聚(乙烯醚)；聚(乙烯醇)；聚(乙烯酮)；聚(乙烯基鹵化物)，諸如聚(乙烯氯)及其類似物；聚(乙烯腈)；聚(乙烯酯)，諸如聚

(乙酸乙烯酯)及其類似物；聚(乙烯基吡啶)，諸如聚(2-乙烯基吡啶)、聚(5-甲基-2-乙烯基吡啶)及其類似物；聚(苯乙烯)；聚(碳酸酯)；聚(酯)；聚(原酸酯)；聚(酯醯胺)；聚(酸酐)；聚(胺基甲酸酯)；聚(醯胺)；纖維素醚，諸如甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基甲基纖維素及其類似物；纖維素酯，諸如乙酸纖維素、鄰苯二甲酸乙酸纖維素、乙酸丁酸纖維素及其類似物；聚(醣)；蛋白質；明膠；澱粉；膠；樹脂及其類似物。此等材料可單獨使用，以物理混合物(摻合物)形式使用或以共聚物形式使用。同樣，聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸丁酯、聚氰基丙烯酸烷酯、聚芳基醯胺、聚無水物、聚原酸酯、對苯二甲酸N,N-L-離胺酸二酯、聚無水物、去溶劑化生物活性劑或碳水化合物、多醣、聚丙烯醛、聚戊二醛及衍生物、共聚物及聚合物摻合物。

在本發明之另一實施例中，提供藉由製造微粒載體來包囊化生物活性劑之方法，其包含以下步驟：

a) 將聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)溶解於有機溶劑中形成聚合物溶液；

b) 向聚合物溶液中添加含有生物活性劑之水溶液以形成水相液滴於連續有機相中之初乳液；

c) 使初乳液與水性介質混合形成W/O/W乳液；及

d) 使有機相蒸發且藉此獲得包含含有於水相中之該生物活性劑之空心內腔的微粒載體。

使有機相蒸發可為被動或主動的。舉例而言，主動蒸發

可藉由使用熱進行。

在一實施例中，微粒載體可為微球或奈米粒子。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑為蛋白質。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑為肽。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子，且生物活性劑為抗原結合分子，例如mAb或dAb或其組合。在另一實施例中，微粒載體為奈米粒子且生物活性劑包含結構域。

在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑為蛋白質。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑為肽。在另一實施例中，微粒載體為微球，且生物活性劑為抗原結合分子，例如mAb或dAb或其組合。在另一實施例中，微粒載體為微球且生物活性劑包含結構域。

在一實施例中，蛋白質與聚合物之重量比可為0.5%至50%，例如為至少約0.5%，或為至少約1%，或為至少約2%，或為至少約5%，或為至少約7%，或為至少約10%，或為至少約11%，或為至少約14%，或為至少約20%，或為至少約40%，或為至少約50%。舉例而言，當蛋白質為肽時，肽與聚合物之比率可為至少約11%，或當蛋白質為抗體時，抗體與聚合物之比率可為至少約14%，或當蛋白質為結構域抗體時，結構域抗體與聚合物之比率可為至少約11%。

在本發明之一實施例中，粒子的包囊化效率為至少約1%，或為至少約2%，或為至少約10%，或為至少約20%，或為至少約40%，或為至少約50%，或為至少約60%，或

為至少約70%，或為至少約80%，或為至少約90%，或為至少約95%，或為至少約97%，或為至少約99%。舉例而言，當蛋白質為肽時，包囊化效率可為至少約60%，當蛋白質為抗體時，包囊化效率可為至少約90%，或當蛋白質為結構域抗體時，包囊化效率可為至少約60%。

在方法之另一實施例中，步驟(d)另外包含添加凝膠形成聚合物。在另一實施例中，凝膠形成聚合物為瓊脂糖。

適用於本發明方法之有機溶劑的實例包括(但不限於)水不可混溶之酯，諸如乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙酸正丙酯、乙酸異丁酯、乙酸正丁酯、異丁酸異丁酯、乙酸2-乙基己酯、乙二醇二乙酸酯；水不可混溶之酮，諸如甲基乙基酮、甲基異丁基酮、甲基異戊基酮、甲基正戊基酮、二異丁基酮；水不可混溶之醛，諸如乙醛、正丁醛、丁烯醛、2-乙基己醛、異丁基醛及丙醛；水不可混溶之醚酯，諸如3-乙氧基丙酸乙酯；水不可混溶之芳族烴，諸如甲苯、二甲苯及苯；水不可混溶之鹵代烴，諸如1,1,1三氯乙烷；水不可混溶之二醇醚酯，諸如丙二醇單甲基醚乙酸酯、乙二醇單乙基醚乙酸酯、乙二醇單丁基醚乙酸酯、二乙二醇單丁基醚乙酸酯；水不可混溶之鄰苯二甲酸酯塑化劑，諸如鄰苯二甲酸二丁酯、鄰苯二甲酸二乙酯、鄰苯二甲酸二甲酯、鄰苯二甲酸二辛酯、對苯二甲酸二辛酯、鄰苯二甲酸丁基辛酯、鄰苯二甲酸丁基苯甲酯、鄰苯二甲酸烷基苯甲酯；水不可混溶之塑化劑，諸如己二酸二辛酯、三乙二醇二2-乙基己酸酯、苯偏三酸三辛酯、三乙酸甘油

酯、甘油基/三丙酸甘油酯、2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二異丁酸酯、二氯甲烷、乙酸乙酯或二甲亞碸、四氯化碳、氯仿、環己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、乙醚、二甲基甲醯胺、庚烷、己烷及其他烴、甲基第三丁基醚、戊烷、甲苯、2,2,4-三甲基戊烷、1-辛醇及其異構體或苯甲醇。

在本發明之一實施例中，本發明方法中所用之溶劑將選自二氯甲烷、乙酸乙酯或二甲亞碸、四氯化碳、氯仿、環己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、乙醚、二甲基甲醯胺、庚烷、己烷及其他烴、甲基第三丁基醚、戊烷、甲苯、2,2,4-三甲基戊烷、1-辛醇及其異構體、苯甲醇。

如本文所述之本發明之所有態樣中的微粒載體、包含其之組合物或其製備方法可進一步包含添加界面活性劑，諸如(但不限於)：膽酸鈉、泊洛沙姆(poloxamer) 188 (pluronic F68™或F127)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚山梨醇酯80、聚葡萄糖、泊洛沙姆、保麗視明(poloxamine)、多官能醇之羧酸酯、烷氧基化醚、烷氧基化酯、烷氧基化甘油單酸酯、甘油二酸酯及甘油三酸酯、烷氧基化酚及二酚、乙氧基化醚、乙氧基化酯、乙氧基化甘油三酸酯、GenapolR™及BaukiR™系列物質、脂肪酸之金屬鹽、羧酸之金屬鹽、醇硫酸之金屬鹽，及脂肪醇硫酸之金屬鹽及磺基丁二酸之金屬鹽，及兩種或兩種以上該等物質之混合物。

在另一實施例中，界面活性劑係選自膽酸鈉、泊洛沙姆188 (pluronic F68™)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚山

梨醇酯80及聚葡萄糖。

在本發明之一實施例中，提供可藉由本文所述之任何本發明方法獲得之包含生物活性劑的微粒載體。

包囊於本發明之微粒載體及/或組合物中之生物活性劑在其自微粒載體釋放時至少保留一些生物活性，例如當該藥劑為結合劑時組合物中一定比例之分子可至少保留一些與其標靶結合之能力，且自粒子釋放生物活性劑時引起生物反應。該結合可以合適生物結合檢定量測，合適檢定之實例包括(但不限於)ELISA或Biacore™。在另一實施例中，當自粒子釋放時藉由生物結合檢定量測時，例如在一實施例中如藉由ELISA，Biacore所測定，組合物保留至少50%其對標靶之親和力，或至少70%或至少90%其對標靶之親和力(Kd)。在一實施例中，組合物將能夠在其所投與之個體中引起治療作用。可藉由任何合適檢定量測本發明組合物之生物活性，該檢定量測包囊化生物活性分子之活性，例如若生物活性分子為VEGF dAb，則可使用實例18中所述之檢定。

在本發明之一實施例中，提供藉由將蛋白質包囊於奈米粒子中來跨過生物障壁(諸如，血腦障壁)向患者傳遞蛋白質之方法。在另一實施例中，患者為人類。

在本發明之一實施例中，提供向哺乳動物(例如，人類)之眼睛中傳遞包囊於微粒載體(諸如微球)中之蛋白質的方法。

在另一實施例中，提供包含包囊於本文所述之本發明微

粒載體中之生物活性劑的醫藥組合物。

在另一實施例中，提供包含包囊於本文所述之本發明奈米粒子中之蛋白質的醫藥組合物。在另一實施例中，提供包含包囊於微球中之蛋白質的醫藥組合物，其係用於如本文所述經眼傳遞以供治療及/或預防眼病。

在另一實施例中，如本文所述之本發明組合物可用於治療及/或預防中樞神經系統之病症或疾病，例如其可用於治療及/或預防阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、牛海綿狀腦病、西尼羅河病毒性腦炎(West Nile virus encephalitis)、Neuro-AIDS、腦損傷、脊髓損傷、大腦轉移性癌或多發性硬化症、中風。

在另一實施例中，組合物可包含用於治療及/或預防中風或神經元損傷之抗MAG抗體。

在另一實施例中，組合物可包含用於治療及/或預防中風或神經元損傷或例如用於治療或預防神經退化性疾病(諸如，阿茲海默氏病)之抗NOGO抗體。

在另一實施例中，組合物可包含用於治療及/或預防中風或神經元損傷或例如用於治療或預防神經退化性疾病(諸如，阿茲海默氏病)之抗β澱粉狀蛋白抗體。

在本文所述的本發明之一實施例中，可藉由非經腸注射或輸注、靜脈內或動脈內投與向患者投與微粒載體。

在另一實施例中，本文所述之本發明組合物可用於治療及/或預防眼睛之病症或疾病。在另一實施例中，本文所

述之本發明組合物可用於治療及/或預防諸如(但不限於)以下病症：年齡相關之黃斑部變性(新生血管型/濕型)、糖尿病性視網膜病變、視網膜靜脈阻塞病、葡萄膜炎、角膜新血管生成或青光眼。

在另一實施例中，組合物係用於治療及/或預防AMD(年齡相關之黃斑部變性)，例如濕型AMD或乾型AMD。

在本發明之另一實施例中提供包囊於如本文所述之奈米粒子及/或微球中之生物活性劑，其係用於藥品中。

在本發明之一實施例中提供如本文所述之本發明組合物之用途，其係用於製造用以治療及/或預防中樞神經系統疾病的藥物。在另一實施例中提供本文所述之本發明組合物之用途，其係用於製造用以治療及/或預防阿茲海默氏病之藥物。在另一實施例中提供本文所述之本發明組合物之用途，其係用於製造用以治療及/或預防中風或神經元損傷之藥物。

在本發明之另一實施例中提供本文所述之本發明組合物之用途，其係用於製造用以治療或預防眼病之藥物，諸如用於製造用以治療及/或預防AMD的藥物。

本發明提供使用本發明組合物治療及/或預防中樞神經系統疾病之方法。在另一實施例中提供使用本發明組合物治療阿茲海默氏病之方法。在本發明之另一實施例中提供使用本發明組合物治療及/或預防中風或神經元損傷之方法。

本發明亦提供使用本發明組合物治療及/或預防眼病之

方法。在另一實施例中提供使用本發明組合物治療及/或預防AMD之方法。

定義：

如本文所用之術語「粒子形成物質」係用於描述能夠聚合之任何單體及/或寡聚物，或可在例如PBCA、PLGA之水性環境中形成不溶性粒子之聚合物。粒子形成物質當未聚合時將可溶解於有機溶劑中。

如貫穿本說明書所用之術語「微粒載體」係用於涵蓋奈米粒子及微球兩者。「微球」為由各種天然及合成材料構成的直徑大於1 μm之粒子，而如本文所用之「奈米粒子」為次微米尺寸(諸如1-1000 nm)之粒子。

在一實施例中，如本文所用之術語微粒載體、奈米粒子及微球表示生物相容且充分抵抗使用環境產生之化學及/或物理破壞使得足夠量之粒子在投與後進入人體或動物體後保持實質上完整且歷時充分時間從而能夠到達所要標靶器官或組織(例如，大腦或眼睛)的載體結構。

如本文所用之術語「生物活性劑」為用於表示分子在到達其所要標靶時必需能夠具有至少一些生物活性之術語。為了避免疑問，如貫穿本說明書所用之術語「生物活性劑」及「生物活性分子」意欲具有相同含義且能夠互換使用。

術語「溶解」定義為以溶劑中之個別分子的形式形成溶液，或以懸浮於液體中之分子的精細固體聚集體形式形成固體於液體中之懸浮液。溶解過程亦可產生完全溶解之分

子與懸浮固體聚集體之混合物。

貫穿本說明書所用之供包囊於微粒載體中之術語「蛋白質」包括分子量為至少11 kDa，或至少12 kDa，或至少50 kDa，或至少100 kDa，或至少150 kDa，或至少200 kDa之蛋白質。供包囊化之蛋白質亦可具有相當大的長度，諸如長度為至少70個胺基酸，或長度為至少100個胺基酸，或長度為至少150個胺基酸，或長度為至少200個胺基酸。

貫穿本說明書所用之供包囊於微粒載體中之術語「肽」包括分子量不超過約10 kDa，或不超過約8 kDa，或不超過約5 kDa，或不超過約2 kDa，或不超過約1 kDa，或小於1 kDa的較短胺基酸序列。供包囊化之肽之長度不超過70個胺基酸，或長度不超過50個胺基酸，或長度不超過40個胺基酸，或長度不超過20個胺基酸，或長度小於10個胺基酸。

術語「眼周」係指向眼睛外部周圍的位置局部投與且包括(但不限於)：

「結膜下」-在結膜(覆蓋鞏膜上方之眼球之澄清黏膜)下方；「筋膜下」-在包裹眼睛但處於鞏膜外之筋膜下方；「眼球周圍」-眼球下方位於眼眶中之空間；「眼球後」-眼球最後方接近視神經之空間；「脈絡膜上腔」-鞏膜下方但在進入脈絡膜上腔空間之脈絡膜外；「經鞏膜」-此術語亦可用於意謂跨過鞏膜，亦即自鞏膜外傳遞。

短語「免疫球蛋白單可變域」係指獨立於不同V區或域特異性結合抗原或抗原決定基的抗體可變域(V_H、V_{HH}、

V_L)。免疫球蛋白單可變域可以具有其他不同可變區或可變域之形式(例如，同源或異源多聚體)存在，其中該等其他可變區或可變域不為單免疫球蛋白可變域結合抗原所需(亦即，其中免疫球蛋白單可變域獨立於其他可變域結合抗原)。當用於本文時，術語「結構域抗體」或「dAb」與能夠結合抗原之「免疫球蛋白單可變域」相同。免疫球蛋白單可變域可為人類抗體可變域，但亦包括來自其他物種之單抗體可變域，諸如齧齒動物(例如，如WO 00/29004中所揭示)、護士鯊(nurse shark)及駱駝科V_{HH} dAb。駱駝科V_{HH}為自包括駱駝、美洲駝、羊駝、單峰駝及原駝之物種產生之免疫球蛋白單可變域多肽，其產生天然缺乏輕鏈之重鏈抗體。該等V_{HH}結構域可根據此項技術中可獲得之標準技術人類化，且該等結構域仍被視為本發明之「結構域抗體」。如本文所用，「V_H」包括駱駝科V_{HH}結構域。

如本文所用之術語「抗原結合分子」係指能夠與標靶結合之抗體、抗體片段及其他蛋白質構築體。

「結構域」為具有獨立於蛋白質其餘部分之三級結構的摺疊蛋白質結構。一般而言，結構域負責蛋白質的離散功能特性，且在許多狀況下可添加、移除或轉移至其他蛋白質而不使蛋白質及/或結構域其餘部分的功能損失。「單抗體可變域」為包含抗體可變域所特有之序列的摺疊多肽結構域。因此，其包括完整抗體可變域及經修飾可變域(例如其中一或多個環已由不為抗體可變域所特有之序列置換)，或經截斷或包含N-或C-末端延伸之抗體可變域，以

及至少保留全長結構域之結合活性及特異性的可變域之摺疊片段。

如本文所用之術語「光散射技術」為用於測定小粒子於溶液中之尺寸分布曲線之方法-諸如用於量測奈米粒子之動態光散射及用於量測微球之靜態光散射。

如本文所用之術語「動態光散射」(DLS)為利用粒子分散液散射之光產生關於粒子尺寸之資訊的方法。動態光散射依賴於以下事實：當在液體懸浮液中時，粒子之布朗運動(Brownian motion)取決於粒徑且粒子之布朗運動引起由粒子樣本散射之光強度波動。藉助於相關函數分析此等變動推導出粒子直徑。接著應用斯-愛氏方程式(Stokes-Einstein equation)得到粒子的平均流體動力學直徑(mean hydrodynamic diameter)。

多指數分析可產生尺寸分布，提供對樣本內部不同物質之存在的深入瞭解。DLS為分析奈米粒子之公認方法。

貫穿本說明書所用之「小角度雷射光散射」有時係指雷射繞射。雷射繞射依賴於繞射角與粒徑成反比的事實。該方法利用完全米氏理論(full Mie theory)，該理論完全解出光與物質相互作用之方程式。雷射繞射可用於分析奈米粒子及微粒(直徑為0.02至2000 μm)。

如本文所用之術語「血腦障壁」(BBB)為主要用於保護大腦不受血液中之化學物質影響，同時仍允許基本代謝功能的膜結構。該膜由極緊密堆積於腦毛細管中之腦微血管內皮細胞構成。此較高密度比身體別處之毛細管中之內皮

細胞更大程度地限制來自血流之物質通過。

貫穿本說明書，藥物負載百分比係定義為藥物重量比粒子調配物中所用材料之重量(聚合物重量)的百分比(重量/重量)。

藥物負載% = (藥物重量/粒子調配物中所用材料之重量)x100%。

在本說明書中已參考實施例以能夠編寫出清楚且簡潔之說明書的方式描述本發明。

預期且應理解實施例可在不悖離本發明之情況下以不同方式組合或分離。

實例

實例1- BCA(氰基丙烯酸丁酯)單體之聚合：

使用於有機溶劑中之迅速聚合反應形成聚合物：

在緩慢渦旋下向25 ml燒杯中之1 ml絕對乙醇中添加BCA單體(200 µl，Vetbond，3 M)。溫和混合所得溶液直至開始聚合反應。聚合反應致使形成白色固體分散液。一旦反應混合物變得太黏稠以致無法攪動，則立刻停止混合分散液。

接著在通風櫥中蒸發反應混合物中之乙醇歷時至少1小時。在蒸發乙醇後，獲得破裂之白色固體餅狀物。收集固體且用於奈米粒子製備過程中。

實例2- 藉由複乳液(double emulsion)法製備空心奈米粒子：

將PBCA聚合物以1% w/v之濃度溶解於二氯甲烷中且用於藉由如下乳化成複乳液(水包油包水，w/o/w)製備空心

PBCA奈米粒子：

(i) 初乳液(w/o)

內相(w)：水或緩衝液中之5%膽酸鈉(SIGMA)，其係藉由混合以下各物製備：

500 μl水或緩衝液；及

500 μl膽酸鈉(10% w/v儲備溶液)。

內水相之總體積為1 ml。將溶液保持於冰上直至其使用為止。在使用前將各溶液抽入1 ml胰島素注射器(Terumo 1 ml，BD microlance針，19G 1.5")中。

外(有機)相(o)：二氯甲烷(「DCM」，Fischer)中之PBCA聚合物(1% w/v)。

將有機相(DCM中之PBCA聚合物，6 ml)倒入10 ml燒杯(擱置於冰上以保持冷卻)中且插入均質器之探針(Ultra-Turrax，T25，50 ml探針)。以parafilm(與燒杯及探針附接)覆蓋溶液且使用轉子定子均質器(UIltra-Turrax T25 basic)以24,000 rpm之速度均質化。

初乳液之形成：

一旦均質器達到所要速度，則藉由在溶液內接近探針注射來添加內水相。將所得乳液均質化2分鐘(在冰上)且接著轉移至玻璃注射器(SGE，25 ml，氣密型，適於有機溶劑，P/N 009462 25MDR-LL-GT，批號F06-A2190，配備有鈍5 cm 2R2針，0.7 mm ID)。

(ii) 第二乳液(w/o/w)

內相(w/o)：來自上文所述之均質化步驟的初乳液。

外相(w)：水中之膽酸鈉(1.25% w/v)。

第二乳液之形成：

使用單初乳液(w/o)藉由添加至第二水相(1.25 w/v%膽酸鈉)中以均質化作用形成複乳液(w/o/w)。將膽酸鈉溶液(1.25 w/v%，30 ml)轉移至50 ml高燒杯(擱置於冰上以保持乳液冷卻)中且插入Silverson L4RT均質器之探針(3/4吋探針，高乳化均質頭(high emulsor screen))。以parafilm(與燒杯及探針附接)覆蓋溶液且在8,000 rpm之速度下均質化。一旦達到8,000 rpm之速度，則將初乳液接近探針注射至溶液中。將所得乳液均質化6分鐘。

將所形成之複乳液轉移至50 ml短燒杯中且在通風櫥中在恆定攪拌(IKA磁力攪拌器，設定4)下蒸發有機相歷時3小時。

藉由離心洗滌奈米粒子：

在移除有機溶劑之後，藉由在16,200 rcf下離心將所形成之奈米粒子洗滌一次且再懸浮於水(10 ml)中。

實例3- 藉由動態光散射確證奈米粒子形成

藉由使用準彈性光散射(QELS)(亦稱為動態光散射(DLS))測定尺寸來確證奈米粒子形成。使用Brookhaven儀器公司粒徑分析器(BIC 90 plus)遵循製造商提供之標準程序分析粒子。將粒子懸浮液於水中稀釋200倍且使用標準尺寸測定參數(溫度為25℃，雷射束角為90°，雷射波長為658 nm)測定尺寸。藉由進行10輪尺寸測定來分析粒子，每一輪持續時間為1分鐘。

儀器以相關圖之標準形式呈現原始數據。此描繪粒子在不同時間間隔的散射光強度的自相關函數C(τ)及自相關如何以衰變時間τ衰變。散射光之自相關的衰變取決於粒子直徑，較小粒子較迅速。儀器藉由應用斯-愛氏方程式推導出粒徑的資訊。此獲得樣本中粒子的平均流體動力學直徑及粒子群之其他推導數據。

動態光散射對大粒子的存在極敏感，甚至當大粒子佔樣本1%以下時亦可顯著影響測量。因此，儀器所示平均流體動力學直徑受樣本中之大粒子嚴重影響，可能發生實質性變化。因此，可觀測到各批之間數十奈米的尺寸差異，因此考查儀器提供之完整數據組為重要的，其中相關圖最重要。藉由考查完整數據組可正確表徵樣本，因為儘管存在極少數大粒子，儀器仍可容易地偵測樣本中存在之多數小粒子。相關圖本身之形狀極明確地指示粒子是否為小粒子，以及樣本是否為多分散性樣本。基線指數亦給予數據品質的正確表示。此文件中之所有數據展示不小於5之基線指數，10為最高可能讀數品質的最大值。

圖1a顯示藉由QELS測定粒子懸浮液尺寸所獲得之相關圖(原始數據)。該相關圖明確顯示已由粒子製備法產生奈米粒子懸浮液，因為不存在粒子不會產生任何光散射。相關圖之形狀表明懸浮液具有良好醫藥品質，因為粒子小且不存在大聚集體。藉由QELS測定奈米粒子懸浮液尺寸顯示已形成平均流體動力學直徑262.6 nm之奈米粒子(圖1a)。亦發現粒子群相對單分散，具有多分散性指數

0.262，其為樣本中粒徑範圍寬度之量度(圖1a)。此小於粒子調配物之最大可接受值0.300。一般而言，相關圖確證複乳液法已成功產生良好品質的PBCA奈米粒子懸浮液。

導出數據(藉由儀器使用斯-愛氏方程式產生)表明多數粒子為小粒子(圖1b-d)。結果表明粒子群中約87.5%具有138.19 nm或更小之直徑(圖1b)。發現懸浮液不含大聚集體且不含直徑超過506.81 nm之任何粒子，粒子群中之多數粒子顯著較小(圖1c)。此外，調配物不含任何小於99.86 nm的粒子(圖1d)。因此，多數粒子的直徑介於99.86與138.19 nm之間，此為對靜脈內投與而言理想但並非太小而有損於藥物負載之尺寸。

圖1.- 藉由QELS獲得之指示懸浮液中存在奈米粒子的尺寸測定數據。

圖1(a)藉由動態光散射分析奈米粒子懸浮液後獲得之相關圖。根據所獲得之數據，粒子的平均流體動力學直徑為262.6 nm且多分散性指數為0.262。

圖1(b)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。粒子群中之多數粒子(87.5%)似乎具有138.19 nm或更小之直徑。

圖1(c)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。數據表明87.5%具有138.19 nm或更小之直徑且100%粒子樣本具有506.81 nm或更小之直徑。因此，懸浮液不含大聚集體且因此認為適於靜脈內投與。

圖1(d)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。數據表明14.9%粒子樣本具有99.86 nm或更小之直徑。

發現該方法在製備不同奈米粒子調配物時產生類似奈米粒徑。表1概述自四次不同調配物操作系列獲得之尺寸測定數據：

表1

調配物	平均流體動力學直徑(nm)	多分散性指數
1	259.6	0.164
2	437.6	0.281
3	319.2	0.303
4	320.6	0.248
平均值	334.25	0.249

一般而言，發現空心PBCA奈米粒子製備法產生具有所要直徑及多分散性的奈米粒子懸浮液。

實例4- 奈米粒子之分析-藉由電子顯微法確證奈米粒子形成及空心形態

藉由電子顯微法觀測樣本以便確證粒子形成且確證粒子為空心的。藉由透射電子顯微法(TEM)檢驗奈米粒子懸浮液。藉由掃描電子顯微法(SEM)分析冷凍乾燥奈米粒子。藉由兩種顯微技術分析確證奈米粒子形成。SEM顯示形成穩定奈米粒子。TEM確證奈米粒子為空心的，其具有由PBCA聚合物壁包圍之水性核心。

圖2顯示藉由SEM分析之奈米粒子。

圖3顯示空心奈米粒子之TEM影像，其中重疊之實心PBCA奈米粒子影像用於比較。

實例5- 單株抗體(人類抗CD23)在空心PBCA奈米粒子內之包囊化

藉由納入均質化過程之內水相中將單株抗體(如WO99/58679中所揭示之人類抗CD 23 mAb)封包於奈米粒子的水性核心內。使用抗體之溶液製備初乳液(w/o)，接著將其與第二水相均質化形成如下複乳液(w/o/w)：

(iii) 初乳液(w/o)

內相(w)：如WO99/58679所揭示之抗CD23 mAb (600 µg於5%膽酸鈉(SIGMA)中)，其係藉由混合以下各物製備：

78 µl mAb溶液(7.2 mg/ml)

344 µl H_2O

500 µl膽酸鈉溶液(10% w/v儲備溶液)

內水相之總體積為1 ml。將溶液保持於冰上直至其使用為止。在使用前將各溶液抽入1 ml胰島素注射器(Terumo 1 ml，BD microlance針，19G 1.5")中。

外相(o)：二氯甲烷(Fischer)中之PBCA聚合物(1% w/v)。

將有機相(DCM中之PBCA聚合物，6 ml)倒入10 ml燒杯(擱置於冰上以保持冷卻)中且插入均質器之探針(Ultra-Turrax，T25，50 ml探針)。以parafilm(與燒杯及探針附接)覆蓋溶液且在24,000 rpm之速度下均質化。

初乳液之形成：

一旦均質器達到最高速度，則藉由在溶液內接近探針注射來添加內水相。將所得乳液均質化2分鐘(在冰上)且接著轉移至玻璃注射器(SGE，25 ml，氣密型，適於有機溶

劑，P/N 009462 25MDR-LL-GT，批號F06-A2190，配備有鈍5 cm 2R2針，0.7 mm ID)。

(iv) 第二乳液(w/o/w)

內相(w/o)：來自上文所述之均質化步驟的初乳液。

外相(w)：水中之膽酸鈉(1.25% w/v)。

第二乳液之形成：

使用單初乳液(w/o)藉由添加至第二水相(1.25% w/v膽酸鈉)中以均質化作用形成複乳液(w/o/w)。將膽酸鈉溶液(1.25% w/v，30 ml)轉移至50 ml高燒杯(擱置於冰上以保持乳液冷卻)中且插入Silverson L4RT均質器之探針(3/4吋探針，高乳化均質頭)。以parafilm(與燒杯及探針附接)覆蓋溶液且在8,000 rpm之速度下均質化。一旦達到8,000 rpm之速度，則將初乳液接近探針注射至溶液中。將所得乳液均質化6分鐘。

將所形成之複乳液轉移至50 ml短燒杯中且在通風櫥中在恆定攪拌(IKA磁力攪拌器，設定4)下蒸發有機相歷時3小時。

藉由離心洗滌奈米粒子：

藉由離心使所得奈米粒子團塊化以將游離抗體與經包囊化抗體分離。藉由總蛋白質檢定分析團塊(經封包抗體)及上清液(游離抗體)兩者以測定包囊化效率。

當使用總量600 μg抗體時，發現包囊化效率為52%。發現包囊化效率足夠高以允許傳遞潛在治療量之抗體而不超過PBCA聚合物之最大耐受劑量(小鼠中50 mg/kg)。此外，

隨後可製備含有不同單株抗體、人類抗IL 13之粒子，由此表明該方法可用於任何水溶性生物藥劑。

圖4顯示自包囊化效率量測獲得之結果。

實例6- 單株抗體自奈米粒子的釋放

除了實現生物藥劑之有效包囊化之外，必需證明材料在投與後可自粒子釋放且保留其活性。最初藉由粒子降解隨後藉由ELISA偵測任何釋放之抗體，在活體外研究活性抗體自粒子之釋放。為了釋放經包囊化抗體，以丁酯酶(來自豬肝臟，SIGMA)(據報導其使PBCA聚合物之丁酯裂解)處理粒子。在反應期間(林格氏溶液(Ringers solution)，pH 7.0，37℃)，在不同時間點(0、1、2、3、4及24小時)取樣且藉由ELISA分析活性抗體的存在。

圖5顯示在使粒子酶促降解且以ELISA分析所釋放之酶後獲得的釋放曲線。

實例7- 結構域抗體(抗雞卵溶菌酶dAb)在空心PBCA奈米粒子內之包囊化

在以下實例中，使用自Sigma獲得之BCA套組(QPBCA)執行BCA檢定且根據說明書進行。將游離dAb稀釋2倍及10倍以供分析。將經包囊化dAb稀釋100倍。

藉由納入均質化過程之內水相中將結構域抗體(抗雞卵溶菌酶dAb)封包於奈米粒子之水性核心內。在此狀況下，藉由混合0.5 ml 20 mg/ml dAb溶液(10 mg蛋白質)與0.5 ml穩定劑溶液(膽酸鈉，10% w/v)來製備內水相。接著如實例4中所述藉由複乳液法製備奈米粒子。藉由離心使所得

奈米粒子團塊化以將游離抗體與經包囊化抗體分離。藉由總蛋白質檢定(二喹啉甲酸檢定)分析團塊(經封包抗體)及上清液(游離抗體)兩者以測定包囊化效率。分析結果顯示於圖6中。發現經包囊化dAb的量為6.66 mg。游離dAb之量為4.83 mg。因此包囊化效率為約66.6%，負載效率為11.1%。因此可使用複乳液法將毫克量之蛋白質有效包囊於空心PBCA奈米粒子中。

實例8- 藉由HIP法製備PBCA奈米粒子

藉由向含有經溶解HIP離子之有機相(多庫酯鈉，1 ml二氯甲烷中之3.058-6.116% w/v)中添加100 μl BCA單體來製備奈米粒子。將所得溶液用吸量管吸入水相(1% w/v聚葡萄糖，0.2% w/v pluronic F68，10 ml，pH 7.0)中，同時使用Silverson L4RT均質器在7,000下均質化。曝露於水相的中性pH值致使BCA單體迅速聚合形成PBCA聚合物。將形成之乳液均質化45秒，且接著在通風櫥中培育3小時以蒸發有機溶劑且形成奈米粒子。將所得奈米粒子懸浮液儲存於4℃下。

實例9- 藉由動態光散射確證奈米粒子形成

藉由使用動態光散射(DLS)測定尺寸來確證藉由HIP法形成PBCA奈米粒子。使用Brookhaven儀器公司粒徑分析器(BIC 90 plus)分析粒子。圖7顯示藉由DLS獲得之指示懸浮液中存在奈米粒子的尺寸測定數據。藉由DLS測定尺寸顯示已形成平均流體動力學直徑為291.4 nm之奈米粒子(圖7a)。亦發現粒子群相對單分散，其中作為樣本中粒徑範

圍寬度之量度的多分散性指數為0.242(圖7a)。此小於粒子形成之最大可接受值0.300。一般而言，相關圖確證粒子製備法已成功產生良好品質的PBCA奈米粒子懸浮液。

導出數據表明多數粒子為小粒子(圖7b-d)。結果表明粒子群中約96.3%具有201.37 nm或更小之直徑(圖7b)。懸浮液亦似乎一般不含大聚集體且不含直徑超過732.05 nm之任何粒子，粒子群中之多數粒子顯著較小(圖7c)。調配物亦似乎不含任何小於143.38 nm的粒子(圖7d)。因此，多數粒子的直徑介於143.38與201.37 nm之間，此為對靜脈內投與而言安全但並非太小從而降低藥物負載效率之尺寸。

圖7(a)- 藉由動態光散射分析奈米粒子懸浮液後獲得之相關圖。根據所獲得之數據，粒子的平均流體動力學直徑為291.4 nm且多分散性指數為0.242。

圖7(b)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。數據表明粒子群的96.3%似乎具有201.37 nm或更小之直徑。

圖7(c)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。數據表明粒子群中96.3%似乎具有201.37 nm或更小之直徑且100%粒子樣本具有732.05 nm或更小之直徑。因此，發現懸浮液不含大聚集體且因此認為對於靜脈內投與而言為安全的。

圖7(d)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布。數據表明6.2%粒子樣本具有143.38 nm或更小之直徑。

發現該方法在製備不同奈米粒子調配物時產生類似奈米粒徑。表2概述自具有不同組成之六種不同調配物系列獲得之尺寸測定數據：

表2

調配物	平均流體動力學直徑(nm)	多分散性指數
1	367.7	0.280
2	291.4	0.242
3	236.3	0.259
4	244.7	0.256
5	255.4	0.213
6	269.8	0.221
平均值	294.22	0.245

一般而言，發現HIP法產生具有所要直徑及多分散性的奈米粒子懸浮液。

實例10- 使用HIP法將肽溶解於有機相中且包囊化至PBCA奈米粒子中

藉由將30-60 mg肽溶解於3 ml $CaCl_2$ (18.3 mM)中且藉由添加濃鹽酸(2 M)將pH值降至3.05來製備六肽達拉淨(dalargin)溶液。將所得溶液(500 µl，10-20 mg/ml，且肽總量為5-10 mg)添加至2 mleppendorf管中之HIP劑多庫酯鈉於二氯甲烷中之溶液(1 ml，3.058-6.116% w/v)中。所用HIP溶液之體積為肽溶液的兩倍(500 µl肽溶液，1 ml HIP溶液)。HIP：肽之莫耳比對於5 mg肽而言為10:1，且對於10 mg肽而言為5:1。藉由在最大速度下渦旋1分鐘來混合有機相及水相。接著將所得懸浮液在20,817 rcf下離心50分鐘以分離兩相。收集有機層(含有溶解之肽)且用於製備奈米粒子。為了確證該方法已成功地將肽溶解於有機相

中，測定水相中剩餘之肽的量。藉由LC-MS及埃德曼定序(Edman sequencing)分析顯示至少99%肽已成功萃取至有機相中。

實例11- 肽在PBCA奈米粒子中之包囊化

藉由將100 μl BCA單體添加至含有經溶解之肽及HIP之有機相(1 ml)中來製備奈米粒子。將所得溶液用吸量管吸入水相(1% w/v聚葡萄糖，0.2% w/v pluronic F68，10 ml，pH 7.0)中，同時使用Silverson L4RT均質器(精細乳化均質頭，¾吋探針)以在7,500下之均質化。曝露於水相的中性pH值致使BCA單體迅速聚合形成PBCA聚合物。將形成之乳液均質化45秒，且接著在通風櫥中在攪拌(IKA磁力攪拌器，速度設定4)下培育1小時以便蒸發有機相。接著將速度設定降至3且將調配物再培育2小時以確保有機相蒸發及奈米粒子形成。收集奈米粒子懸浮液且在4℃下儲存。

離心所得奈米粒子以移除任何游離肽且再懸浮於水或PBS中。

藉由LC-MS分析粒子測定包囊化效率。甚至在使用高肽量(10 mg)時，發現約90%肽劑量經包囊化。以HIP實現之包囊化肽的量與吸附至粒子表面之常用方法實現之量的比較明確顯示HIP-PBCA法的優勢(圖8)。當使用吸附法時，僅1.5%肽劑量裝載至粒子上。在不同時間執行對藉由吸附法裝載達拉淨之奈米粒子的分析。在開發當前HIP法之前製備且分析Kreuter吸附之粒子作為旨在評估先前技術之方式。所用之LC/MS法及HPLC法的靈敏性相等。

實例12- 活體內HIP-PBCA奈米粒子傳遞系統之評估(小鼠模型)

在小鼠模型中活體內測定HIP-PBCA奈米粒子將其肽負載物傳遞至大腦的能力。將含有使用HIP法包囊之達拉淨的HIP-PBCA奈米粒子與如Kreuter等人所報導已有肽吸附至粒子表面上之HIP-PBCA奈米粒子比較。藉由以聚山梨醇酯80界面活性劑塗覆表面來製備奈米粒子以便用於經靜脈內途徑大腦傳遞。簡言之，在注射之前將奈米粒子在含有1% w/v界面活性劑之PBS中培育30分鐘。在文獻中已報導界面活性劑藉由促進血清脂蛋白元吸附至奈米粒子表面上來間接地使奈米粒子靶向大腦。此使粒子與血腦障壁上之脂蛋白元受體結合且胞轉到達大腦。比較以下調配物：

1. 僅HIP-PBCA奈米粒子(5:1 HIP含量)
2. 僅HIP-PBCA奈米粒子(10:1 HIP含量)
3. 溶液中之達拉淨(2.0 mg/kg)
4. 表面上吸附有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(調配物中使用2.0 mg/kg總劑量)
5. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(5:1 HIP：達拉淨莫耳比)(調配物中使用2.0 mg/kg總劑量)
6. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(5:1 HIP：達拉淨莫耳比)(調配物中使用2.0 mg/kg總劑量)-與上文相同之調配物，但以1/10劑量注射。
7. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(10:1 HIP：達拉淨莫耳比)(調配物中使用2.0 mg/kg總劑量)

在注射後20分鐘處死小鼠，且採集大腦及血液樣本且藉由LC-MS-MS分析肽之存在。針對血液污染校正大腦數據，假定每公克大腦15 μl血液污染物。所獲得之結果顯示於圖9中。

活體內研究之結果表明使用HIP法將肽包囊於HIP-PBCA奈米粒子之核心中優於將肽吸附至粒子表面上。

實例13- pH值對達拉淨在HIP-PBCA奈米粒子中之包囊化效率的影響

在先前技術中，藉由使BCA單體在酸性油包水乳液中緩慢聚合來形成PBCA奈米粒子，其中水相之pH值為約2.0 (0.01 N HCl)。酸性條件下之聚合反應需要至少3小時之時段完成。然而，此方法採用中性pH值以允許迅速聚合。所用水相為磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS，pH 7.2)。已知BCA單體在中性pH值下迅速聚合(在數秒內)。因此，HIP-PBCA奈米粒子的產生需要極快速形成乳液。在此方法中此藉助於使用Silverson L4RT均質器在高速(7,500 rpm或更高)下均質化來實現。假設在中性pH值下的較快聚合反應將藉由快速將肽封包於粒子中來改良包囊化效率。相反，長時間之聚合可導致乳液中之肽逐漸損失至水相中。為檢驗該假設，使用HIP-PBCA法藉由以萃取之肽在PBCS或先前技術之原始介質(0.01 N HCl)中乳化BCA單體來製備奈米粒子。酸性及中性水相皆含有所要穩定劑(0.2% pluronic F68，1%聚葡萄糖)。根據實例3中所述之程序製備奈米粒子。每調配物所用肽之量為5 mg。製備以下調配物(每一

調配物一製劑)：

1. 僅HIP-PBCA奈米粒子(35:1 HIP含量)，pH 2

2. 僅HIP-PBCA奈米粒子(35:1 HIP含量)，pH 7

3. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(35:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 2

4. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(35:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 7

5. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(10:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 2

6. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(10:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 7

7. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(5:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 2

8. 包囊有達拉淨之HIP-PBCA奈米粒子(5:1 HIP：達拉淨莫耳比)(5.0 mg輸入量)，pH 7

將奈米粒子調配物離心以移除任何游離肽且再懸浮於水或PBS中。藉由將粒子溶解於10 mM NaOH(在室溫下隔夜培育)中且接著藉由LC-MS分析來測定包囊化效率。所獲得之結果顯示於圖10中。

結果支持以下假設：在中性pH值下迅速形成PBCA聚合物將使得肽包囊化效率高於如先前技術之狀況下在酸性pH值下緩慢形成聚合物。儘管由於以NaOH處理降解而損失一些肽，但所獲得之結果明確顯示在中性pH值下形成粒子之益處。在10:1之HIP：達拉淨比下，當粒子在pH 7下形

成時，63.23%輸入肽封包於奈米粒子中。在pH 2下，包囊化效率顯著降低，為2.36%。總言之，粒子在pH 7下製備時的包囊化效率高於其在pH 2下製備時的包囊化效率。

實例14- 使用HIP法將結構域抗體包囊於PBCA奈米粒子中

根據實例3中所述之程序將結構域抗體(抗雞卵溶菌酶dAb)調配於PBCA奈米粒子中。調配物中所用之蛋白質的量為10 mg。總共製備兩種調配物。為了測定經包囊化dAb之量，將粒子離心以移除任何游離蛋白質且接著藉由埃德曼定序分析。除了序列資訊之外，埃德曼定序亦可用於提供定量資訊。該方法涉及苛性化學處理，此破壞粒子且允許偵測經包囊化材料。所獲得之結果顯示於圖11中。結果表明可使用HIP-PBCA法包囊較大分子，但其效率較低。然而，可藉由使用於結構域抗體之方案最佳化來提高包囊化效率。在針對達拉淨最佳化之當前方案下，可包囊所用10 mg中之約2.56 mg。此相當於25.6%之包囊化效率，此效率對於將蛋白質封包於疏水性粒子基質中之單乳液法而言較高。

實例15- 單株抗體(抗IL-13 mAb)在空心PBCA奈米粒子內之包囊化

藉由納入均質化過程之內水相中將單株抗體(抗IL-13 mAb)封包於奈米粒子之水性核心內。藉由混合0.5 ml 20 mg/ml mAb溶液(10 mg蛋白質)與0.5 ml穩定劑溶液(膽酸鈉，10% w/v)來製備此內水相。接著如實例5中所述藉由複乳液法製備奈米粒子。藉由離心使所得奈米粒子團塊化

以將游離抗體與經包囊化抗體分離。藉由總蛋白質檢定(二喹啉甲酸檢定)分析團塊(經封包抗體)及上清液(游離抗體)兩者以測定包囊化效率。分析結果顯示於圖12中。發現經包囊化mAb的量為8.62 mg。游離mAb之量為1.79 mg。包囊化效率為86.2%，負載效率為14.4重量%。

實例16- 針對結構域抗體於PBCA奈米粒子中之改良包囊化來最佳化HIP法

為了改良結構域抗體之負載，進一步最佳化達拉淨方案。實例10及11中描述用作最佳化起點的達拉淨方案。

方案修正之目的在於實現抗體在有機相中之完全溶解及有效併入至奈米粒子中。

此藉由包括額外均質化步驟以形成HIP dAb複合物於有機相中之懸浮液來實現。一般而言，對達拉淨方案作出以下改變：

所用之dAb為VEGF-myc dAb。dAb命名為DOM15-26-593且揭示於PCT WO2008/149147中。

以每100 mg PBCA聚合物12 mg(0.843 μmol)之輸入量(12% w/w dAb/PBCA，每100 mg PBCA聚合物12 mg dAb)調配dAb。

將dAb與HIP(多庫酯鈉)以82:1之莫耳比複合。HIP溶液濃度為30.581 mg/ml(1 ml中0.06879 mmol)。

逐漸進行dAb溶液之酸化且恆定混合以防止分子曝露於過低pH值及降解。

用HCl使dAb溶液之pH值降至pH 3.6。

不使用$CaCl_2$，因為其會干擾HIP與dAb之結合。

藉由將500 μl經酸化dAb溶液(24 mg/ml，12 mg蛋白質)與1,000 μl於DCM中之多庫酯鈉(30.581 mg/ml，3.058% w/w)渦旋混合，隨後藉由離心來分離兩相，從而自水相中萃取經酸化dAb。不同於達拉淨，發現dAb未完全溶解於有機相中。而是在界面處形成白色沈澱物。沈澱物明顯由dAb:HIP複合物組成，因為其體積似乎與萃取中所用之HIP及dAb的量成比例。使用體積由500 μl減少至367.76 μl之水相(未添加水)完全萃取dAb的嘗試相較於使用500 μl體積欠佳。一系列實驗表明高等電點為適宜的，但亦可能以低pI (VEGF dAb-myc，在此狀況下pI=6.6)成功沈澱dAb。在離心後，收集水層且在4℃下儲存。使用包括HIP-dAb實心團塊之有機層製備奈米粒子。

為了製備奈米粒子，必需將HIP-dAb團塊溶解於有機相中。此舉係藉由在方法中引入以下額外均質化步驟來實現：

移除水相且使用Ultra-Turrax均質器(T25 basic，速度設定1)將有機相及dAb沈澱物在2 ml eppendorf管中均質化。將調配物均質化15秒形成白色懸浮液。

重要的是確保HIP-dAb團塊與均質器探針接觸且立即開始混合。

1分鐘之較長時間的均質化產生較佳懸浮液，但dAb損失活性。

在均質化之後，將有機相留在2 ml eppendorf管中且添

加100 μl BCA單體。發現液體單體與有機相容易地混合。接著使用有機相如實例12中所述製備奈米粒子。

亦應用改良程序來製備含有經包囊化mAb之HIP-PBCA奈米粒子。根據以下針對dAb開發之方案調配全長單株抗體(如PCT WO99/58679所揭示之抗CD23 mAb，150,000 Da，每100 mg PBCA聚合物12 mg，860:1 HIP:mAb莫耳比)。得到以下觀測結果：

發現mAb(如WO99/58679中所揭示之抗CD23)需要比VEGF dAb多的HCl量。當使用HIP劑萃取時，發現mAb具有與dAb類似的表現：其不完全溶解於有機相中且在界面處形成白色沈澱物。

高濃度之mAb儲備溶液允許使用250 μl體積水相替代500 μl進行實驗，從而實現mAb至有機相中之完全萃取。此4:1之有機相與水相的比率表現相對不佳，其似乎因為曝露於更多溶劑而損害mAb活性。1:1之有機相與水相的比率對於mAb及dAb兩者皆明顯較佳。

為了製備奈米粒子，藉助於與dAb所採用相同之均質化步驟進行均質化來將HIP-mAb團塊溶解於有機相中。發現均質化為成功的，但懸浮液較不平滑，此可能由HIP-mAb複合物之尺寸較大而引起。1分鐘之較長時間的均質化產生較佳懸浮液，但mAb似乎變性。因此，保持均質化步驟簡短(15秒)。

接著根據如此實例中先前所述之dAb方案製備奈米粒子。

一般而言，發現比肽大之生物藥劑的包囊化需要對達拉淨方案進行實質性改良。

dAb及mAb皆需要較高HIP：生物藥劑莫耳比以達成溶解(分別為82:1及860)。

發現dAb及mAb皆未完全溶解於有機相中。

而是在界面處形成沈澱物。為了溶解至有機相中，將沈澱物均質化至有機相中以在油狀懸浮液中形成固體。由此成功形成粒子。

實例17- 使用改良HIP法將結構域抗體包囊於PBCA奈米粒子中

使用如實例16中所述之用於dAb的改良HIP方案包囊一系列dAb分子。dAb係基於其等電點選擇。目的在於涵蓋將可能用於方法中以確證該方法對於一定範圍之dAb通用且適合的等電點(pI)範圍。選擇以下dAb進行實驗(表3)：

表3

dAb	DOM 15-10-11 Vk, NT無標籤	DOM 15-10-11, Vk, myc	DOM 15-10-11, Vk, HA
濃度(mg/ml)	39.734	22.585	12.523
等電點(pI)	9.0	6.8	8.2

DOM編號係指如WO2008/149146中所揭示之結構域抗體。myc係指結構域抗體上之myc標籤或HA係指結構域抗體上之HA標籤。

使用多庫酯鈉作為HIP劑以70:1之莫耳比將各dAb個別地調配至PBCA奈米粒子中。

HIP萃取中所用之試劑列於下表(表4)中：

表 4

調配物	DOM15-10-11 NT	DOM15-10-11 myc	DOM15-10-11 HA
dAb量(mg)	6.0	6.0	6.0
dAb量(μmol)	0.490	0.439	0.451
dAb溶液濃度(mg/ml)	39.734	22.585	12.523
dAb溶液體積(μl)	151.00	265.66	479.12
多庫酯鈉之量(mg) Mr=444.55 Da	15.248	13.661	14.034
多庫酯鈉之量(μmol) Mr=444.55 Da	34.30	30.73	31.57
多庫酯鈉溶液濃度(mg/ml)	15.248	13.661	14.034
多庫酯鈉溶液體積(μl)	1000	1000	1000

酸化dAb溶液以供萃取。

在酸化之前藉由如下添加水來稀釋dAb溶液(表5):

表 5

調配物	DOM15-10-11 NT	DOM15-10-11 myc	DOM15-10-11 HA
所需dAb溶液之體積(μl)	151.00	265.66	479.12
所需水之體積(μl)	328.12	213.46	0
水相之總體積	479.12	479.12	479.12
所添加HCL(2 M)之體積(μl)	2.00	5.00	3.00
最終pH值	3.4	2.5	3.0

藉由添加HCl(2 M)使溶液酸化。將所有dAb溶液酸化至如試紙所量測約3.0的pH值。用水將各經酸化溶液之最終體積補足至500 μl。

接著如實例16所述將dAb萃取至有機相中。發現所有dAb均未完全溶解於有機相中且在界面處形成沈澱物。發現未經標記之dAb(NT)產生比其他dAb之沈澱物稀薄得多的沈澱物。dAb之高等電點及強正電荷顯然允許與HIP形成更強、更具疏水性之複合物，且引起較大程度之溶解且轉移至有機層中。

在移除水相(頂層)之後，藉由均質化溶解有機相及dAb沈澱物且如實例16中所述製備奈米粒子。

藉由SDS-PAGE分析奈米粒子以評定dAb負載。

為了藉由SDS-PAGE分析奈米粒子懸浮液，將樣本在微型離心機中在13000 rpm下旋轉10分鐘。吸出上清液且將團塊再懸浮100 μl PBS中。以1xNuPAGE LD及還原劑破壞上清液及團塊分離部分，加熱至80℃歷時4分鐘，且藉由SDS PAGE使用商業獲得之NuPAGE凝膠檢驗。亦檢驗來自含有dAb之空心調配物的上清液樣本且用作陽性對照。

泳道1及6：分子量標記。泳道2：未經標記之包囊於HIP-PBCA奈米粒子中的VEGF dAb DOM15-10-11。泳道3：經myc標記之包囊於HIP-PBCA奈米粒子中的VEGF dAb DOM15-10-11。泳道4：經HA標記之包囊於HIP-PBCA奈米粒子中的VEGF dAb DOM15-10-11。泳道5：未經標記之包囊於空心奈米粒子中之VEGF dAb DOM15-10-11(陽性對照)。凝膠確證dAb之包囊化已發生。膠凝亦確證dAb為完整的且其未因粒子製備法而破碎。

凝膠明確顯示dAb已包囊於粒子中，因為在移除任何游離dAb之後其與奈米粒子團塊共同定位(圖13)。

dAb已明顯包囊於奈米粒子中，因為在非變性條件(天然凝膠)下分析團塊未在凝膠上產生任何條帶，因為dAb保留在粒子中(結果未顯示)。必需藉由SDS-PAGE分析粒子，因為需要變性條件(在SDS存在下熱處理)使dAb自粒子中釋放且在凝膠上展開(run)。發現所有經測試之dAb的包囊化

均為成功的。此表明額外均質化步驟成功地使HIP-dAb複合物溶解於有機相中以將dAb包囊於粒子中。因此，在萃取後HIP-dAb複合物在界面處沈澱(尤其在低pI dAb之狀況下)不損害dAb在粒子中之包囊化。因此，發現用於將dAb包囊於HIP-PBCA粒子中之改良方案對於所測試之範圍與pI無關且對於一定範圍之dAb為適合的。

實例18- 使用改良HIP法將結構域抗體包囊於PBCA奈米粒子中；測定負載效率及量測經調配dAb之活性

為了測定改良HIP方案可實現之負載效率，以工具dAb (VEGF-myc dAb，如WO2008/149147中所揭示之DOM15-26-593)製備HIP PBCA奈米粒子調配物。以每100 mg PBCA聚合物12 mg(0.843 μmol)之輸入量(12% w/w dAb/PBCA，每100 mg PBCA聚合物12 mg dAb)調配dAb。如實例16中所述使用用於dAb之改良HIP方案製備調配物。在製備後，藉由SDS-PAGE表徵奈米粒子以確證dAb保持完整且其已成功封包於粒子中。如實例17中所述進行SDS-PAGE分析。亦在凝膠上在調配物旁分析一組已知量之dAb標準物且用於測定經包囊化dAb之量(圖14)。此係藉由拍攝凝膠相片且使用labworks V4.6量測來自標準物條帶之信號強度來實現。凝膠係如下設置：

泳道1及7：分子量標記。泳道2-4：dAb奈米粒子調配物。泳道5：空奈米粒子(陰性對照)。泳道7-10：dAb標準物(500、125、31.25及7.8 μg/ml)。泳道11-14：dAb標準物(7.8、31.25、125及500 μg/ml)。凝膠確證dAb之包囊化已

發生且dAb為完整的。樣本條帶強度與標準物條帶強度之比較表明奈米粒子樣本中dAb之濃度為413.7 μg/ml。

使用條帶強度來建構標準曲線。接著使用該曲線由奈米粒子樣本之條帶強度計算奈米粒子調配物中dAb之量。

凝膠確證dAb已成功封包於粒子中，且其在包囊化之後保持完整。藉由與標準物比較發現奈米粒子調配物中dAb之濃度為413.7 μg/ml。此體現為在奈米粒子中12 mg輸入量中總計有3.31 mg包囊化dAb。因此，負載效率為27.6%。dAb負載為3.31% w/w。

為了釋放經包囊化dAb及評定其活性，亦對奈米粒子樣本進行熱處理。藉由在1% Tween 20存在下在4至65℃範圍內之溫度下培育1小時來使dAb自奈米粒子中釋放。已知該方法實現至少部分經包囊化dAb自粒子中釋放，然而其亦可引起一定程度的dAb活性損失。為了使熱處理引起之dAb活性損失降至最小，亦將樣本在65℃下培育5分鐘，隨後在37℃之較低溫度下較溫和處理55分鐘。

在培育之後，將樣本在10,000 rcf下離心10分鐘以將所釋放之任何dAb與粒子分離。收集含有釋放之dAb的上清液且藉由ELISA分析活性。

藉由ELISA如下分析釋放之dAb：

以0.5 μg/ml rVEGF塗覆Nunc maxisorb 96孔盤，在4℃下隔夜。接著以洗滌緩衝液(PBS+0.1% Tween)洗滌培養盤4次，且接著以阻斷緩衝液(PBS+1% BSA)在室溫下阻斷1小時，同時搖動。如上洗滌培養盤，接著向各孔中添加50 μl

一式三份的上清液樣本且如上培育培養盤。洗滌培養盤，接著添加每孔50 μl抗myc Ab(小鼠)溶液且再次如上所述培育培養盤。在洗滌培養盤之後，添加每孔50 μl抗小鼠HRP且如上培育培養盤。最終如上洗滌培養盤且接著添加每孔50 μl TMB試劑。使顏色顯現且藉由添加每孔50 μl HCl(1 M)終止反應。使用Versamax培養盤讀取器及Softmax Pro V5.3軟體量測450 nm下之吸光度。ELISA檢定獲得之結果顯示於表6中：

表6

溫度	4℃	56℃	65℃	65/37℃
濃度(μg/ml)	0.44	4.0	>50	61

發現釋放之dAb具有活性，在高溫下自粒子中釋放較大量之蛋白質。發現在兩個溫度65℃及37℃下處理之樣本展示釋放最高量之活性dAb。調配物中之初始活性水準難以估計，因為已知釋放法會損害活性，但考慮PAGE結果，65/37法產生具有標準物比活性之約50%的材料。

藉由ELISA以及SDS-PAGE分析釋放之dAb，ELISA產生活性dAb之讀數，而SDS-PAGE偵測總dAb。在凝膠上在一系列標準物旁分析dAb。接著藉助於藉由量測標準物之條帶強度建構之標準曲線測定dAb之量。發現活性dAb之濃度(61 μg/ml，藉由ELISA量測)為總dAb之濃度(137.89 μg/ml，藉由SDS-PAGE量測)的44%。

因此，發現奈米粒子中至少50%經調配dAb具有活性。此被認為是極佳的活性水準，考慮到調配法涉及溶解於有

機相中隨後藉由均質化混合。因此，粒子製備法似乎適於調配結構域抗體。

實例19- 活體內評估含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子在小鼠體內經靜脈內途徑向大腦傳遞其蛋白質負載物之能力

評估實例18中所述之奈米粒子調配物在小鼠模型中向大腦傳遞其dAb負載物之能力。

將含有經包囊化VEGF dAb之奈米粒子與游離dAb比較以判定粒子是否會相較於游離dAb分子增加dAb之大腦攝取量。亦製備一批空奈米粒子且作為陰性對照評估。

活體內研究之設計。

研究涉及欲評定dAb大腦含量之兩個不同時間點：投與後10分鐘及60分鐘。在大腦中之dAb濃度在注射後數分鐘內達到峰值的狀況下選擇該較早時間點，如達拉淨肽所見。選擇該較晚時間點以允許發生一定程度的dAb自血液循環中清除。血液中存在之任何dAb會污染大腦樣本且使所獲得之數據失真。dAb在血液循環中之短半衰期(20分鐘)可能會限制較晚時間點之血液污染，因此允許獲得大腦滲透之清楚讀數。

大腦樣本中之血液污染的校正：

為了說明大腦樣本中並非由大腦攝取而僅存在於大腦血管中且並非大腦組織中本身所存在(血液污染)之dAb量，進行開始-追蹤(start-chase)研究。所有小鼠均接受一定劑量的已知保留於血液中且不會滲透大腦之追蹤分子。所選

追蹤分子為如WO99/58679所揭示之抗CD23全長抗體，其展示可忽略之大腦攝取量。因此，大腦樣本中偵測到之任何量的抗CD23 mAb將僅係由於其存在於污染大腦組織的血液中。在處死動物之前5分鐘給予其追蹤劑，以確保抗體保留於血液中且在身體其他區域不發生組織攝取。

動物組：

A：對照粒子，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

B：奈米粒子中之dAb，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

C：溶液中之游離dAb(對照)，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

上述組在t=10分鐘，在追蹤劑投與後5分鐘處死。

D：對照粒子，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤劑。

E：奈米粒子中之dAb，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤劑。

F：溶液中之游離dAb(未經調配之對照)，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤劑。

上述組在t=60分鐘，在追蹤劑投與後5分鐘處死。

劑量的製備。

追蹤劑：如PCT WO99/58679中所揭示之抗CD23 mAb，2.0 mg/kg。

藉由將68 mg/ml mAb儲備溶液稀釋為500 μg/ml來製備

劑量。

對於25 g小鼠而言，此相當於100 µl體積中50 µg之劑量。

具有dAb之奈米粒子：1.584 mg/kg，50 mg/kg PBCA聚合物。

藉由將160 µl聚山梨醇酯80溶液(25% w/w)添加至3,600 µl奈米粒子懸浮液中來製備用於注射之奈米粒子懸浮液。此產生最終濃度為396.1 µg/ml的經調配dAb。對於25 g小鼠而言，此相當於100 µl體積中39.6 µg之dAb劑量。

空奈米粒子(陰性對照)：50 mg/kg PBCA聚合物。

藉由如上所述將160 µl聚山梨醇酯80溶液(25% w/w)添加至3,600 µl奈米粒子懸浮液中來製備用於注射之奈米粒子懸浮液。此產生最終濃度為1.25 mg/ml的PBCA聚合物。對於25 g小鼠而言，此相當於100 µl體積中125 µg之PBCA劑量。

溶液中之游離dAb(未經調配之對照)：1.584 mg/kg。

藉由將2.0 mg/ml儲備溶液稀釋為396.1 µg/ml來製備用於注射之dAb溶液。對於25 g小鼠而言，此相當於100 µl體積中39.6 µg之dAb劑量。

小鼠之注射：對CD1小鼠進行靜脈內注射(尾靜脈注射)。基於小鼠體重計算注射體積。在活體內程序結束之後，自所有小鼠採集大腦及血清樣本且冷凍。將組織樣本在液氮中瞬間冷凍。將所有樣本儲存於-80℃。

均質化大腦以供分析。

將大腦解凍及稱重。向各大腦中添加體積為大腦體積重量之兩倍的PBS。接著使用Covaris聲學組織處理器(Covaris E210)將大腦均質化。

藉由Meso Scale Discovery(MSD)分析大腦

藉由MSD分析大腦勻漿及血清樣本。此係藉由將實例18中所述之抗VEGF ELISA檢定調適於MSD格式來實現。在1:10,000倍稀釋液中以1:1,000倍分析血清樣本。在1:5倍稀釋液中分析大腦樣本。

結果

處理數據且產生圖15中所示之結果。投與後10分鐘，奈米粒子中之dAb產生總計8.0 ng/ml的可偵測大腦攝取量。在大腦中亦可偵測到3.3 ng/ml(初步數據)的略微較低濃度之游離dAb。初步數據不包括來自兩動物之不能校正血液污染之讀數，因為來自血清之讀數過高而難以定量。一般而言，奈米粒子似乎或多或少地增加10分鐘時間點之蛋白質的大腦攝取量。

然而，在60分鐘時，該狀況逆轉。游離dAb似乎在大腦中累積，使得其大腦含量進一步增加至13.5 ng/ml。可如下解釋觀測結果：

1. 游離dAb在血液循環中之半衰期(t½)可能由於其親水性而比粒子之半衰期長。此可能意謂相較於調配於奈米粒子中之dAb而言，更多游離dAb可為大腦攝取。
2. dAb至粒子中之裝載並不足夠高以抵消自體循環迅速消除所引起的調配物損失。粒子中之藥物負載為

3.31% w/w。達拉淨調配物先前需要5.0% w/w之負載以產生45 ng/ml之大腦含量。8.9%之較高肽負載在大腦中產生高達833 ng/ml的肽濃度。似乎3.31重量%之負載(尤其對於高分子量生物藥劑而言)不足以達成有效大腦傳遞，因此將必需進一步最佳化負載。

3. 10分鐘及60分鐘時間點可能過晚。先前關於達拉淨及洛哌丁胺(loperamide)的研究均已證明傳遞為迅速的(在注射2-3分鐘內)。先前研究亦已表明在投與5分鐘之內或更早實現大腦中之最高藥物含量。選擇10分鐘之時間點以確保有足夠時間進行開始追蹤研究且選擇60分鐘來偵測結構域抗體之任何持久作用。

4. HIP PBCA系統僅被動靶向大腦。當靜脈內給藥時，已知該等展示疏水性表面之微粒除大腦之外亦被動靶向多個器官。此等器官包括肝臟及脾臟。當靜脈內給藥時，奈米粒子在到達大腦之前將首先到達肝臟及脾臟。因此，所注射之多數劑量可傳遞至彼等組織，僅剩餘一部分可傳遞至大腦。在此實驗中，此會嚴重損害粒子到達大腦之能力。

為了突出dAb自血液循環中損失之影響，亦計算大腦與血液之比率(圖16)。結果明確顯示當以奈米粒子給藥時，相較於當dAb以溶液中之游離形式給藥時，大腦中存在之dAb比例相較於血液高得多。實際上，經調配之dAb展示0.04之大腦與血液之比率(60分鐘)，此高於將化合物視作大腦滲透物時的比率。游離dAb在分析的任何時間點均不

超過此大腦滲透臨限值。因此，儘管注射之劑量顯著損失，但根據滲透血腦障壁的整體能力，粒子最終可優於游離dAb。

一般而言，已知靜脈內途徑為被動靶向粒子(諸如，HIP-PBCA系統)的最具挑戰之投藥途徑。因此，靜脈內投藥並非評定HIP-PBCA系統自血液中跨過BBB傳遞其藥物負載物之能力的理想方法。因此，亦進行頸動脈內研究。經頸動脈內途徑投與繞過諸如肝臟及脾臟之組織且提供到達大腦的更直接途徑。因此，更多注射之奈米粒子劑量可用於大腦傳遞。在游離藥物與經調配藥物之間的直接比較(head to head comparison)中，頸動脈內途徑更有可能提供奈米粒子越過BBB之能力的真實量測。

實例20- 活體內評估含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子在小鼠體內經頸動脈內途徑向大腦傳遞其蛋白質負載物之能力

奈米粒子調配物之活體內評估-頸動脈內投與。

評估奈米粒子調配物在小鼠中經頸動脈內途徑向大腦傳遞其dAb負載物之能力。

選擇該途徑係因為其提供到達大腦的直接途徑。當物質給予至頸動脈中時，到達之第一組織為大腦。

相反，當藥物靜脈內給藥時，其在到達大腦之前將到達諸如肝臟之組織。發現此限制奈米粒子傳遞至大腦之能力，因為亦已知其經諸如肝臟及脾臟之組織吸收。實際上，Kreuter等人已觀測到就其PBCA吸附之粒子而言，所

注射之多數空奈米粒子劑量(約60%)在經尾靜脈給藥時經肝臟吸收。

一般而言，熟知靜脈內途徑為被動靶向傳遞系統(諸如，HIP-PBCA奈米粒子)的最不佳且最具挑戰之投藥途徑。

因此，認為頸動脈內途徑更有可能提供奈米粒子越過血腦障壁之能力的準確指示。

活體內研究之設計。

該研究設計與靜脈內研究相同，僅存在以下差異：

1. 在整個實驗期間使動物保持末端麻醉。此由於所涉及手術程序的複雜性而為必需的。
2. 藉助於手術準備之套管經頸動脈內途徑投與奈米粒子調配物及游離dAb。
3. 經尾靜脈靜脈內給予追蹤劑，但不同於先前研究，藉助於套管給予抗體。

動物組：

A：對照粒子，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

E：奈米粒子中之dAb，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

C：溶液中之游離dAb(對照)，在t=0時給予，隨後在t=5分鐘時給予追蹤劑。

上述組在t=10分鐘，在追蹤劑投與後5分鐘處死。

B：對照粒子，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤

劑。

F：奈米粒子中之dAb，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤劑。

D：溶液中之游離dAb(未經調配之對照)，在t=0時給予，隨後在t=55分鐘時給予追蹤劑。

上述組在t=60分鐘，在追蹤劑投與後5分鐘處死。

劑量的製備。

追蹤劑：如PCT WO99/58679中所揭示之抗CD23 mAb，2.0 mg/kg。

藉由將68 mg/ml mAb儲備溶液稀釋為500 μg/ml來製備劑量。

對於25 g小鼠而言，此相當於100 μl體積中50 μg之劑量。

具有dAb之奈米粒子：1.584 mg/kg，50 mg/kg PBCA聚合物。

藉由將160 μl聚山梨醇酯80溶液(25% w/w)添加至3,600 μl奈米粒子懸浮液中來製備用於注射之奈米粒子懸浮液。此產生最終濃度為396.1 μg/ml的經調配dAb。對於25 g小鼠而言，此相當於100 μl體積中39.6 μg之dAb劑量。

空奈米粒子(陰性對照)：50 mg/kg PBCA聚合物。

藉由如上所述將160 μl聚山梨醇酯80溶液(25% w/w)添加至3,600 μl奈米粒子懸浮液中來製備用於注射之奈米粒子懸浮液。此產生最終濃度為1.25 mg/ml的PBCA聚合物。對於25 g小鼠而言，此相當於100 μl體積中125 μg之PBCA劑量。

溶液中之游離dAb(未經調配之對照)：1.584 mg/kg。

藉由將2.0 mg/ml儲備溶液稀釋為396.1 μg/ml來製備用於注射之dAb溶液。對於25 g小鼠而言，此相當於100 μl體積中39.6 μg之dAb劑量。

結果

處理數據且產生圖17中所示之結果。投與後10分鐘時，奈米粒子組中之dAb展示大腦中之高dAb含量，平均值為627.60 ng/ml。大腦中dAb的實際濃度可能更高，因為上圖不包括來自兩動物之讀數。兩個樣本產生過高而難以定量之信號，但不幸地未及時分析以納入本文件中。一隻動物具有明顯異常值，其產生45.45 ng/ml的相對較低的大腦濃度。此導致該組觀測到較大誤差。然而，大腦中經調配dAb之平均濃度幾乎為游離dAb的9倍，其為71.67 ng/ml。

在注射後60分鐘，大腦中之dAb含量保持高水準，為146.51 ng/ml。而游離dAb之濃度已降至3.17 ng/ml之平均水準。

因此，在注射後60分鐘，奈米粒子產生之dAb大腦濃度為裸dAb實現之大腦濃度的46倍。

一般而言，發現奈米粒子在經頸動脈內途徑向大腦傳遞dAb時極為成功。

此亦藉由各組之大腦與血液之比率的測定來證明(圖18)。奈米粒子組中之dAb在兩個時間點皆展示大於1之大腦與血液之比率(在10分鐘及60分鐘時分別為1.569及1.845)，由此表明多數經調配dAb已成功到達大腦。相

反，游離dAb組之特徵為顯著較低之大腦與血液之比率(10分鐘及60分鐘時間點分別為0.012及0.286)。

總之，發現奈米粒子傳遞系統當經頸動脈內途徑給藥時大大改良dAb至大腦之傳遞。此係由於該途徑在到達肝臟及脾臟之前到達大腦，肝臟及脾臟為除大腦之外調配物亦被動靶向之組織。

靜脈內途徑欠佳，其提供dAb之大腦攝取量增加的短暫提示。此可能係由於粒子中負載之dAb不足，以及傳遞系統經其他組織吸收從而導致僅一部分所注射粒子到達大腦。

因此，為了改良系統且實現經靜脈內途徑至大腦的充分傳遞，需要進一步改良奈米粒子中之dAb負載。此可藉由採用已顯示具有大於HIP PBCA系統之負載dAb能力的空心PBCA系統實現。只要其在活體內足夠穩定，則空心PBCA粒子可比HIP PBCA系統更成功地向大腦傳遞dAb。為了確保穩定性，可能必需採用PBCA聚合物與具有較高分子量之其他聚合物(諸如，PLGA、PLA或PCL)之摻合物。傳遞系統亦可受益於使用聚乙二醇化共聚物。該等聚合物可改良奈米粒子在血液中之循環時間且因此改良大腦傳遞。

改良傳遞系統之額外方式為改變其靶向大腦的機制。展示與BBB上之標靶結合之配位體的主動靶向奈米粒子有可能改良大腦攝取且同時限制粒子至其他組織中之損失。為了實現主動靶向，可能必需廣泛地聚乙二醇化奈米粒子表面以限制對其他器官之任何非特異性靶向。

一般而言，本文件中所述之奈米粒子系統具有實現結構域抗體至大腦之充分傳遞的極大潛力，然而，仍需要有效最佳化以實現此目的。

實例21- 使用改良HIP法將結構域抗體包囊於PCL微球中

將聚合物聚己內酯(PCL，Lactel)用作產生微球及使用緩釋聚合物以及HIP法進行dAb包囊化之測試例。初始實驗使用實例14及17中所述之HIP包囊化方案之改良以適應使用PCL產生空奈米粒子及微球兩者。

初始調配物使用PCL於二氯甲烷(DCM)中之100 mg/ml儲備液及作為界面活性劑之1% pluronic F68 (Sigma)，均質化速度為4000-7500 rpm，歷時45秒，但製得極少微球或奈米粒子(數據未顯示)。藉由嘗試不同界面活性劑使方法進一步最佳化：亦1%膽酸鈉(Sigma)，或1% Lutrol F127泊洛沙姆407(BASF Corp.)，或1%維生素E TPGS(d-ALPHA生育酚聚乙二醇1000丁二酸酯)(Peboc/Eastman)，產生極少初始改良(數據未顯示)；直至聚合物輸入量減少至10 mg/ml，此時在光學顯微鏡下可見少量>20 μm之易碎大微球(數據未顯示)；而多數PCL在有機溶劑蒸發後即以宏觀粒子形式自懸浮液中析出(數據未顯示)。根據粒子穩定性藉由使用2%之來自上述實例之兩種最有前景的界面活性劑以助於更大程度地穩定懸浮液來進一步改良方法：Lutrol F127泊洛沙姆407(BASF Corp.)或維生素E TPGS且均質化速度為7500-9000 rpm，歷時45秒至2分鐘。使用此方法在所有狀況下均產生約1 μm尺寸之粒子(數據未顯

示)，但對下文所示之包囊dAb之方案選擇2%維生素E TPGS作為界面活性劑，使用2分鐘均質化。

包囊dAb之HIP-PCL微球(M/P)之製備。

根據上文實例16之方法及下文詳述之對此方案作出的任何改變製備HIP-PCL微球。

所用調配物：

製備四種PCL(聚-e-己內酯)調配物：

i) 具有用於PCL之HIP作為M/P的空粒子-4000 rpm (2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘

ii) 具有用於PCL之HIP作為M/P的空粒子-7500 rpm (2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘

iii) 具有用於PCL之HIP作為M/P+用於分析之dAb(dAb1)的粒子-7500 rpm (2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘

iv) 具有用於PCL之HIP作為M/P+用於測定尺寸之dAb (dAb2)的粒子-7500 rpm(2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘

所需溶液：

(1) 待萃取之dAb：抗VEGF(如WO2008/149147中所揭示之DOM15-26-593)，批號TB090220 1.5 mg/ml(14,246 Da)-使用4x5 ml(使用Nanodrop 1000分光光度計(Thermo Scientific)實際再讀取dAb濃度，確證濃度實際為1.04 mg/ml)

(2) 82:1 HIP溶液(1 ml，30.58 mg/ml)

(3) 酸化dAb溶液(25 mg/ml)N/A

(4) 水相：PBS中之1% w/v聚葡萄糖，2% w/v界面活性劑*

(5) 溶解於DCM中之PCL聚合物

*10%維生素E [TPGS]儲備液

DCM中之PCL溶液的製備。

目的在於提供每調配物10 mg溶解於DCM中之PCL-在DCM中溶解度為約100 mg/ml(最大值)，但在約10 mg/ml下可溶解更多。對於5種調配物製得足夠PCL，亦即5 ml DCM中之50 mg。稱出50 mg PCL(當自-20℃溫至室溫時打開解凍真空乾燥器)，稱重(精密天平)(在10 ml燒杯中與PCL+4 ml DCM一起攪拌)在通風櫥中在遮蓋下以玻璃攪拌器攪拌。一旦溶解，即在玻璃量筒中量測，且以DCM裝滿至5 ml，接著再混合(攪拌燒杯)，且迅速使用。

dAb溶液之濃度。

最初在室溫下在600 rpm下進行製備隔夜(O/N)，且稀釋回以校正濃度。使用Vivaspin濃縮器(Vivaspin 6, Sartorius, VS0691, MWCO 3,000 PES)且根據製造商說明書在Sorvall legend RT Bench Top離心機中濃縮溶液。濃度自預期之1.5 mg/ml(20.0 ml，在4×Vivaspin中為5 ml)至25 mg/ml(約700 µl)。該過程在1000-1500 rpm下進行2小時且在3000 rpm下再進行約1小時。初始dAb 400 µl藉由Nanodrop以1:75倍稀釋產生0.56 mg/ml-接著將其稀釋至760 µl(25 mg/ml)且酸處理以使pH值降低至約3.7。將假材料在約pH 2.5下酸處理。dAb為25 mg/ml，約pH 5.0/4.5(目的在於降至pH 3.7)

pH值係以pH 2.5至4.5試紙檢驗。使用380 μl dAb，例如每調配物僅9.5 mg(且匹配1 mg/ml而非1.5 mg/ml之初始輸入濃度)。

表7：酸化溶液之製備。

調配物	空對照	dAb溶液
所需25.0 mg/ml dAb溶液之體積(μl)	0	760, (2×380)
所需水體積(μl)	500.0×10	12.0
所添加2 M HCl溶液之體積(μl)	5.0×10	6.0
所添加1 M $CaCl_2$之體積(μl) 視情況選用 最後添加	0	0
添加後之pH值	<<=2.5	約3.7

表8：用於HIP萃取之調配物及試劑(標準體積方案)。

(A)有機相dAb

調配物 dAb	10-12.0 mg dAb，82:1 HIP， 10 mg PCL
dAb量(mg)或無dAb	約9.5.
濃度(mg/ml)	25.00
所需體積(μl)	380

(B)有機相HIP

調配物 HIP AOT	12.0 mg dAb，82:1 HIP， 10 mg PCL
所需AOT之濃度(mg/ml)	30.58
所需30.58 mg/ml AOT溶液之體積(μl)	1000

目的在於製備dAb(水溶液)：DCM/HIP之1:2混合物-上述係對於1倍混合物而言，亦即約500 μl:1000 μl有機相。

表9：空對照之製備(有機相)

調配物	空對照，82:1 HIP， 100 mg BCA
dAb量(mg)	0僅使用PBS 480 μl+20 μl HCl 來酸化
所需AOT之濃度(mg/ml)	30.58
所需30.58 mg/ml AOT溶液之體積(μl)	1000

使用多庫酯鈉作為HIP劑將dAb或假材料(空粒子)萃取至有機相中。

將酸化dAb或「假」溶液及有機相在2 ml eppendorf管中混合且添加至水相中。將混合物以最大速度渦旋混合1分鐘且接著置於Bench top混合器5432中歷時5分鐘。將所得白色混合物在最大速度(microfuge中20,817 rcf，14000 rpm)下離心50分鐘。dAb-HIP複合物似乎在界面處形成稠密白色沈澱物。收集水相且在4℃下儲存。移除頂部水相且儲存，且以底部有機相繼續進行程序。

將HIP-dAb複合物均質化至有機相中。

將有機相在2 ml eppendorf管中使用IKA T25均質器(polytron，速度設定1)均質化7-10秒。目的在於實現白色沈澱物(dAb與HIP複合物)至有機溶劑(DCM)中之完全均質化。HIP-dAb複合物容易溶解至有機相中形成呈均質之乳液。將有機相總共均質化10秒。均質化之後試管中留下極少沈澱物且移除有機相。

微球之製備。

取勻漿之1 ml有機相且藉由用吸量管上下吸取來混合溶解於DCM(100 mg)中之1 ml PCL。

將所得白色懸浮液(2 ml)在液體表面之下的探針進口點處用吸量管吸入水相(25 ml燒杯中10 ml水中之聚葡萄糖及PBS中之2%界面活性劑溶液)。使用Silverson L4RT均質器將水相在7,500 rpm(M/P)或4000 rpm(M/P)下均質化。將乳液均質化2分鐘。接著在通風櫥中在攪拌(速度設定4)下培育調配物3小時從而蒸發有機相。在培育1小時之時將設定降至3以防止乳液過度混合，因為其導致聚集體沈積於燒杯表面上。

實例22- 微球之尺寸測定

(a) 光學顯微術

將上文之所有四種調配物(i)至(iv)在Nikon Eclipse E400顯微鏡上使用可見光測定尺寸。顯示此等粒子之影像的資料展示於圖19中。具有及不具有dAb之所有四種調配物均可見相似尺寸範圍之可見微球。資料表明在dAb存在下使用此方法類似地形成微球。

(b) 多角度靜態光散射。

在Micromeritics Saturn DigiSizer 5200高清晰度粒徑分析器上測定所有四種樣本尺寸。

藉由將足夠材料自上文測定尺寸之微粒裝載至與Saturn Digisizer 5200連接之低容量樣本處理單元，以使脫氣PBS基質中之暗度(obscuration)為5-30%，較佳高於15%(此需要50-100%調配物)，從而測定樣本尺寸。接著使用聚己內酯分析模型使用折射率1.476之實分區及折射率0.0001之虛分區來分析樣本。流動速率為6 L/min，射束終止角(stop beam angle)

為45度，介質為PBS且一式三份進行計數。報導體積及數目分布兩者，所獲得之數據為組合報告(累積圖及頻率圖)，方法之詳情參見Micromeritics Saturn Digisizer 5200操作者手冊V1.12(2007年3月)及快速參考指南(Quick reference guide)。

列出相關調配物之數據：(i)至(iv)，圖20(a)至(d)中為將粒子數目頻率針對粒徑繪製曲線之圖表。參加下文對應於此等圖表之數據。

圖20a

綜合報告
樣本
樣本濃度：0.01069%
暗度：29.1%
體積分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	8.355	2.926	眾數(Mode)	10.00	4.017
中位值	9.754	3.951	標準差對數	0.382	0.047
偏度	-0.267	0.106	峰度	-0.436	0.180

數目分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	1.393	0.070	眾數	1.000	0.000
中位值	1.033	0.009	標準差對數	0.214	0.022
偏度	1.504	0.388	峰度	2.001	2.445

圖20(b)

綜合報告
樣本
樣本濃度：0.00284%
暗度：16.7%
體積分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	5.366	3.943	眾數	2.239	2.744
中位值	4.304	5.816	標準差對數	0.521	0.033
偏度	0.523	0.450	峰度	-0.370	0.178

數目分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	1.231	0.016	眾數	1.000	0.000
中位值	1.048	0.013	標準差對數	0.141	0.012
偏度	1.954	0.198	峰度	4.737	1.339

圖 20(c)

樣本

樣本濃度：0.00771%

暗度：21.6%

體積分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	9.346	7.368	眾數	2.239	12.53
中位值	10.45	7.174	標準差對數	0.421	0.115
偏度	-0.234	0.252	峰度	-0.185	3.125

數目分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	1.355	1.046	眾數	1.000	0.751
中位值	1.048	0.731	標準差對數	0.196	0.070
偏度	1.711	0.234	峰度	3.196	1.059

圖 20(d)

綜合報告

樣本

樣本濃度：0.01069%

暗度：29.1%

體積分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	8.355	2.926	眾數	10.00	4.017
中位值	9.754	3.951	標準差對數	0.382	0.047
偏度	-0.267	0.106	峰度	-0.436	0.180

數目分布幾何統計

		標準差為8			標準差為8
平均值	1.393	0.070	眾數	1.000	0.000
中位值	1.033	0.009	標準差對數	0.214	0.022
偏度	1.504	0.388	峰度	2.001	2.445

平均粒徑之最明確測定來自幾何平均數目分布，其產生以下平均粒徑：

i) 具有用於PCL之HIP作為M/P的空粒子-4000 rpm(2%維生素E[TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘，平均粒徑1.231

ii) 具有用於PCL之HIP作為M/P的空粒子-7500 rpm(2%維生素E[TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘，平均粒徑1.181

iii) 具有用於PCL之HIP作為M/P+用於分析之dAb1的粒子-7500 rpm(2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘，平均粒徑1.355

iv) 具有用於PCL之HIP作為M/P+用於測定尺寸之dAb2的粒子-7500 rpm(2%維生素E [TPGS]作為界面活性劑)-2分鐘，平均粒徑1.393

結論為儘管在此等條件下之較低速度下產生略微較大之微球，但影響不大-針對在7,500 rpm下均質化所述之條件在dAb存在下產生平均直徑為1.4 μm的微球，因此略微大於此方法中之空粒子。

實例23- 含有dAb之HIP-PCL微球的分析

根據上文實例21製備含有dAb之HIP PCL微球。各調配物取50 μl(dAb1及dAb2)，且：

i) 在1.5 ml microfuge管中在3K rpm下旋轉5'以產生上清液(S)-將30 μl移至新microfuge管中且將團塊(P)分離部分再懸浮於50 μl PBS中；

ii) 在1.5 ml microfuge管中在13K rpm下旋轉5'以產生上清液(S)-將30 μl移至新microfuge管中且將團塊(P)分離部分再懸浮於50 μl PBS中；

iii) 在Vivaspin 500(截除1,000,000分子量)中在5K rpm下旋轉5'以移除任何併入之dAb，粒子保留於管柱中且作為上清液(F)之50 μl PBS通過且將其收集。根據製造商說明書使用Vivaspin 500(Sartorius stedim biotech)。

藉由將21 μl樣本添加至8 μl 4倍裝載染料及3 μl 10倍還原劑中產生32 μl最終體積來製備用於裝載之樣本，其中在置於PCR阻斷液中之96孔PCR培養盤(PTC-100, MJ research Inc)中加熱至80℃歷時5分鐘之後裝載10 μl。

接著將樣本裝載至凝膠上，根據製造商說明書在MES SDS(2-N-嗎啉基乙烷磺酸，十二烷基硫酸鈉)緩衝液中展開35分鐘(invitrogen)，且使用微波介導型式之SimplyBlue SafeStain方案(invitrogen)染色。亦在凝膠上並排展開未包囊dAb的裝載標準物以幫助計算濃度，亦即如上文所述在樣本製備中稀釋的3.28 μg、0.82 μg、0.21 μg及0.05 μg，10μl裝載500 ng/μl、125 ng/μl、31.25 ng/μl及7.8 ng/μl儲備液。經染色凝膠之影像顯示於圖21中。

凝膠係如下設置：

泳道1：全部dAb1，泳道2：dAb1 3K S，泳道3：dAb1 3K P，泳道4：dAb1 13K S，泳道5：dAb1 13K P，泳道6：dAb1 F，泳道7：全部dAb2，泳道8：dAb2 3K S，泳道9：dAb2 3K P，泳道10：dAb2 13K S，泳道11：dAb2 13K P，泳道12：dAb2 F，泳道13：分子標記-SeeBlue Plus 2預染色標準物(invitrogen)，分子量(kd)，泳道14：3.28 μg dAb標準物，泳道15：0.82 μg dAb標準物，泳道16：0.21 μg dAb標準物，泳道17：0.05 μg dAb標準物。凝膠確證dAb之包囊化已發生。膠凝亦確證dAb為完整的且其未因粒子製備法而破碎。

使用條帶捕捉及Labworks 4.6軟體之1D凝膠定量套件

(UVP)針對dAb 1確定全部PCL HIP粒子、PCL HIP粒子之上清液及團塊分離部分中之材料量。使用裝配有Olympus攝影機之Vision工作站在白光下捕捉影像用於分析。數據展示於表10中。

表10：PCL-HIP微球中之dAb負載的測定。

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

泳道1：全部dAb1，泳道2：dAb1 3K S，泳道3：dAb1 3K P，泳道4：dAb1 13K S，泳道5：dAb1 13K P，泳道6：dAb1 F，泳道7：全部dAb2，泳道8：dAb2 3K S，泳道9：dAb2 3K P，泳道10：dAb2 13K S，泳道11：dAb2 13K P，泳道12：dAb2 F，泳道13：分子標記物- SeeBlue Plus 2預染色標準物(Invitrogen)，分子量(kd)，泳道14：3.28 μg dAb標準物，泳道15：0.82 μg dAb標準物，泳道16：0.21 μg dAb標準物，泳道17：0.05 μg dAb標準物。

使用dAb標準物對條帶強度之曲線(數據未顯示)將dAb強

度之凝膠讀數轉化成dAb量(μg)(表10)。

平均全部dAb調配物讀取為(泳道1及7)3.5 μg+4.5 μg/2=4 μg-裝載之10 μl中樣本係以21:32稀釋，所以10 μl中之總dAb=32/21x4=6 μg。

dAb 1上清液(泳道2、4及6)=1.0+0.9+0.73/3=0.9 μg，針對稀釋校正為1.4 μg

dAb1團塊(泳道3及5)=3.0+3.1/2=3.0 μg，針對稀釋校正為4.6 μg

使用此等圖，分離部分似乎符合6 μg全部dAb=dAb 1上清液(1.4 μg)+dAb1團塊(4.6 μg)，經包囊化dAb的百分比為全部dAb之77%(4.6/6.0)

然而，輸入dAb-10 μl(9.5 μg)中經包囊化dAb之百分比為4.6/9.5x100=48%。

實例24-dAb自HIP PCL微球中的釋放

為了自HIP PCL粒子中釋放dAb以便分析功能活性，自dAb1及dAb2 HIP PCL調配物取50 μl等分試樣之樣本且置於1.5 ml eppendorf管中。將此等樣品以1 ml PBS洗滌2次，在Eppendorf 5417C microfuge中在5000 rpm下旋轉5分鐘。將團塊再懸浮於50 μl PBS中且在56℃下在Techne加熱器中進行0、20、40及60分鐘之培育。接著將樣本旋轉(5分鐘5000 rpm旋轉)且移除30 μl上清液(S)且置於冰上以供分析。接著乾燥團塊(P)且再懸浮於50 μl中。

對所有分離部分進行凝膠分析-在一凝膠上分析釋放之上清液且在另一凝膠上分析釋放之團塊。上清液凝膠顯示

於圖22中，如針對圖21中之初始分析所述設置負載物。

使用條帶捕捉及Labworks 4.6軟體之1D凝膠定量套件(UVP)針對dAb 1及dAb 2確定PCL HIP粒子的所釋放上清液及團塊分離部分中之材料量。使用裝配有Olympus攝影機之Vision工作站在白光下捕捉影像用於分析。

使用dAb標準物對條帶強度之曲線圖(數據未顯示)將dAb強度之凝膠讀數轉化成dAb量(ng)(表10，第2行)。

注意此方法釋放之材料量在120-189 ng範圍內(數據未顯示)，粒子中來自團塊來源的為約882-1000 ng-其中釋放12-19%材料。

藉由ELISA對自PCL HIP粒子中釋放之dAb進行功能分析。

ELISA檢定方案描述用於量測可溶性結構域抗體(VEGF dAb)與重組VEGF結合之能力的結合檢定。該檢定使用塗覆於ELISA培養盤(Nunc Immunosorb)表面上之重組人類VEGF(R&D Systems)來捕捉VEGF dAb。洗滌培養盤移除任何未經結合之dAb。隨後使用VEGF dab之Myc標籤的抗體(9E10, Sigma)偵測經結合之dAb。藉由洗滌移除過量抗體且使用抗小鼠IgG過氧化酶結合物(Sigma)偵測經結合之抗myc抗體。使用TMB溶液使檢定物顯色且使用酸終止。來自檢定物之信號與dAb之量成比例。

設置ELISA培養盤以分析下文列出之樣本以及在0分鐘後「釋放」之dAb1及dAb 2樣本。將所移除之30 μl釋放樣本中的21 μl用於SDS PAGE分析且留下9 μl進行1:100倍、

1:1000倍及1:10000倍稀釋。

計算之總釋放dAb與藉由ELISA量測之功能活性dAb的比較顯示於表11中。

表11-功能活性dAb及總釋放dAb的定量

樣本	來自SDS PAGE強度轉化的經校正dAb ng/μl	來自功能ELISA的經校正dAb ng/μl	活性dAb%
dAb1 - 20 min	20.57143	33	約100
dAb1 - 40 min	28.8	22	76
dAb1 - 60 min	18.59048	30	約100
dAb 2 - 20 min	18.28571	14	77
dAb2 - 40 min	18.28571	11	61
dAb2 - 60 min	21.33333	17	80

可見使用此釋放程序可自微球釋放之材料中偵測到與藉由ELISA所量測之經包囊保留活性的60-100%一致的範圍內之功能活性dAb。

總dAb對活性dAb將根據所釋放之dAb，熱滅活或dAb之任何降解而變動，然而，不認為該變化顯著不同。

序列表

SEQ ID NO.	描述
1	重鏈胺基酸序列人類化構築體H28抗NOGO抗體
2	2A10輕鏈胺基酸序列人類化構築體L16抗NOGO抗體
3	重鏈人類化DNA構築體H28抗NOGO抗體
4	2A10輕鏈人類化DNA構築體L16抗NOGO抗體
5	成熟H2重鏈胺基酸序列(Fc突變之雙突變黑體)β-澱粉狀蛋白抗體
6	成熟輕鏈胺基酸序列β-澱粉狀蛋白抗體
7	成熟H11重鏈胺基酸序列
8	成熟L9輕鏈胺基酸序列
9	達拉淨六肽
10	DOM15-26-593 VEGF dAb胺基酸序列
11	CvL1可變區胺基酸序列MAG抗體
12	BvH1可變區胺基酸序列MAG抗體
13	H2全長DNA β-澱粉狀蛋白抗體
14	最佳化L1輕鏈DNA β-澱粉狀蛋白抗體
15	L1全長DNA β-澱粉狀蛋白抗體

序列表

SEQ ID NO. 1: 重鏈人類化構築體H28

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHW
VRQAPGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTA
VYYCELMQGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 2: 2A10輕鏈人類化構築體L16

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPLSNPVTLGQPVSISCRSSKSLLYKDGKTYLN
WFLQRPGQSPQLLIYLMSTRASGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
QLVEYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 3: 重鏈人類化構築體H28

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
TCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTGGATGC
ACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATCGGAAATATTAAT
CCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACCATG
ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC
TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAACTGATGCAGGGCTACTGGGGCCAGG
GAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC
TGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC
GCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG

GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATGA

SEQ ID NO. 4: 2A10輕鏈人類化構築體L16

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
TCCGATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCAACCCCGTCACCCTTGGACAG
CCGGTCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAG
ACATACTTGAATTGGTTTCTCCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT
ATTTGATGTCCACCCGTGCATCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCGGTGGG
TCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGG
GGTTTATTACTGCCAACAACTTGTAGAGTATCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGAC
CAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATC
GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
CAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO. 5: 成熟H2重鏈胺基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNLA
YSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 6: 成熟輕鏈胺基酸序列

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRVSQSLLHSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 7: 成熟H11重鏈胺基酸序列

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKGSGFNIKVYYVHWLRQLPGKGLEWIGRIDPEN
GETIYTPKFQDKATLTVDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 8:成熟L9輕鏈胺基酸序列

DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS
NLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 9:達拉淨

YAGFLR

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

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTL
VTVSSAAAEQKLISEEDLN

SEQ ID NO. 11: CvL1 可變區

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIKR
TV

SEQ ID NO. 12: BvH1可變區

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
TGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYV
MDYWGQGTLVTVSS.

SEQ ID NO. 13:H2全長DNA序列

DNAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGG
CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGG
CCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC
TGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEQ ID NO. 14: 最佳化L1輕鏈DNA
GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCTGGCGAGCC
CGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCTACA
CCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCT
ACAAGGTGTCCAACCGGTTCAGCGGCGTGCCTGATAGATTCAGCGGCAGCGGC
TCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATGTGGG
CGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACACGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGAA
CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC
CCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAA
CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGC
AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC
CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO. 15: L1全長
DNAGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAG
CCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATAC

ACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC
TATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCTCTCAAACTAGACATGTTCCGTACACGTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGT

【圖式簡單說明】

圖1顯示藉由動態光散射(DLS)獲得之奈米粒子調配物的尺寸測定數據，其指示懸浮液中存在經空心法製備之奈米粒子；

圖1(a)藉由動態光散射分析奈米粒子懸浮液後獲得之相關圖；

圖1(b)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖1(c)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖1(d)繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖2- 藉由SEM分析之奈米粒子；

圖3- 空心奈米粒子之TEM影像，其中重疊的實心PBCA奈米粒子影像用於比較；

圖4- 單株IgG1(抗CD23)之包囊化效率量測；

圖5- 在粒子酶促降解且藉由ELISA分析所釋放之酶後

獲得的釋放曲線；

圖6- 藉由二喹啉甲酸檢定(BCA檢定)進行之空心PBCA奈米粒子中結構域抗體(雞卵溶菌酶dAb)之包囊化效率的測定；

圖7.藉由DLS獲得之尺寸測定數據，其指示懸浮液中存在奈米粒子；

圖7(a)- 藉由動態光散射分析奈米粒子懸浮液後獲得之相關圖；

圖7(b)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖7(c)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖7(d)- 繪製奈米粒子之多峰尺寸分布(導出數據)曲線以描繪一定尺寸範圍之粒子群(數目)分布；

圖8.以HIP法實現之經包囊化達拉淨之量與吸附至粒子表面之常用方法實現之量的比較；

圖9- 以HIP-PBCA奈米粒子傳遞後大腦中之達拉淨含量。僅當使用HIP法包囊於粒子內時才可在大腦中偵測到該肽；

圖10.- 使用HIP法的達拉淨至PBCA奈米粒子中的包囊化。水相之pH值對包囊化效率之作用的測定；

圖11.- 使用HIP法之抗雞卵溶菌酶結構域抗體至PBCA奈米粒子中之包囊化。藉由埃德曼定序分析奈米粒子；

圖12- 單株IgG1(抗CD23)之包囊化效率量測；

圖13- 藉由SDS-PAGE分析進行之dAb至HIP-PBCA奈米粒子中之包囊化的確證。將奈米粒子離心以移除任何游離dAb且藉由SDS-PAGE分析團塊以觀測經包囊化dAb；

圖14- 藉由SDS-PAGE分析進行之VEGF dAb(DOM15-26-593)至HIP-PBCA奈米粒子中的裝載之測定。比較奈米粒子調配物與dAb標準物以定量奈米粒子中存在之dAb的量。在12 mg之起始輸入量中，總計3.31 mg dAb已包囊化至奈米粒子中。因此，負載效率為27.6%。dAb負載為3.31% w/w；

圖15- 活體內評估含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子在小鼠體內經靜脈內途徑向大腦傳遞其蛋白質負載物之能力的結果。投與後10分鐘時，奈米粒子中之dAb產生總計8.0 ng/ml的可偵測大腦攝取。在大腦中亦可偵測到3.3 ng/ml(初步數據)的略微較低濃度之游離dAb。因此，奈米粒子似乎或多或少地增加蛋白質的大腦攝取(初步數據)。在60分鐘時觀測到相反現象，因為游離dAb似乎在大腦中累積，使得其大腦含量進一步增加至13.5 ng/ml。大腦含量經校正；

圖16- 經靜脈內途徑之含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子的活體內評估產生之dAb的大腦與血液的比率。結果顯示當以奈米粒子給藥時相較於當dAb以溶液中之游離形式給藥時，大腦中相較於血液中存在較高比例之dAb；

圖17- 活體內評估含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子在小鼠體內經頸動脈內途徑向大腦傳遞其蛋白質負載物

之能力的結果。投與後10分鐘時，奈米粒子組中之dAb展示大腦中之高dAb含量，平均值為627.60 ng/ml；

圖18- 經頸動脈內途徑之含有結構域抗體之HIP PBCA奈米粒子的活體內評估產生之dAb的大腦與血液的比率。奈米粒子組中之dAb在兩個時間點皆展示大於1之大腦與血液的比率(在10分鐘及60分鐘時分別為1.569及1.845)，由此表明多數經調配dAb已成功到達大腦；

圖19- 藉由光學顯微術進行之微球產生的確證。微球調配物均藉由HIP法使用聚己內酯產生；

(a) Vit E TPGS 2%界面活性劑4000 rpm 2 min 20xmag

(b) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2 min 20xmag

(c) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2min+dAb1 20xmag

(d) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2min+dAb2 20x mag；

圖20- 藉由雷射繞射進行之微球產生的確證。微球調配物均藉由HIP法使用聚己內酯產生；

(a) Vit E TPGS 2%界面活性劑4000 rpm 2 min 20xmag

(b) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2 min 20xmag

(c) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2 min+dAb1 20xmag

(d) Vit E TPGS 2%界面活性劑7500 rpm 2 min+dAb2 20xmag；

圖21- 藉由SDS-PAGE分析進行之dAb至HIP-PC微球中之包囊化的確證。將微球過濾(F)，離心(3k或13K rpm)以移除任何游離dAb且藉由SDS-PAGE分析上清液(S)及團塊(P)以觀測經包囊化dAb；及

圖22- 藉由SDS-PAGE分析進行之經包囊化dAb自HIP-PC微球之釋放的確證。洗滌微球且接著在56℃下熱處理0、20、40或60分鐘以釋放dAb，將碎片團塊化(在5k下5分鐘)且藉由SDS-PAGE分析上清液(S)以觀測經包囊化之dAb。分子標記-SeeBlue Plus 2預染色標準物(invitrogen)，分子量(kd)。膠凝確證dAb之釋放已發生。膠凝亦確證dAb為完整的且其未因釋放過程而破碎。

序列表

<110> 英商葛蘭素集團有限公司

<120> 生物活性劑之包囊化

<130> PB63616

<140> 098114865
<141> 2009-05-05

<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> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<400> 2

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<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 cggaaatatt aatcctagca atggtggtac taactacaat 240
gagaagttca agagcaaggc caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agcctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgaact gatgcagggc 360
tactggggcc agggaacact agtcacagtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420
ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 480
```

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 660
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 720
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcgcg ggggcaccgt cagtcttcct cttccccca 780
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
ggtaaatga 1389

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

```
        195                 200                 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    210                 215                 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            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> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<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> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
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> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<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> 人工序列

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<400> 13
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag tctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
gcagacactg tgacgggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
tggtttgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcgcgg gggcaccgtc agtcttcctc 720
ttcccccaa aacccaagga cacctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 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 ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

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

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

<220>
<223> 小家鼠（mus musculus）及智人的人類化序列

<400> 15
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca gagttagtca gagccttta cacagtaatg gatacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct ataaagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300
tacacgttcg gcggagggac caaggtggaa atcaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

201012490

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：98114865

※ 申請日：98.5.5

A61K 9/51 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 47/30 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

生物活性劑之包囊化

ENCAPSULATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS

二、中文發明摘要：

本發明提供使用Hip劑將諸如蛋白質之生物活性劑包囊於諸如奈米粒子之微粒載體中之方法。本發明亦提供包含可由該等方法獲得之微粒載體的組合物，及該等組合物於治療之用途。

三、英文發明摘要：

The present invention provides methods of encapsulating biologically active agents such as proteins in particulate carriers such as nanoparticles using Hip agents. Also provided are compositions comprising particulate carriers obtainable by such methods and uses of such compositions in treatment.

七、申請專利範圍：

1. 一種將生物活性劑包囊於微粒載體中之方法，其包含以下步驟：

a) 在疏水性離子配對(HIP)劑存在下及在有機溶劑中溶解生物活性劑以形成有機相；

b) 將聚合物形成物質的單體或寡聚物溶解於(a)中所形成之有機相中；

c) 形成(b)中所形成之有機相在連續水相中之乳液以使該單體聚合；及

d) 獲得由該乳液形成之微粒載體。

2. 一種將生物活性劑包囊於微粒載體中之方法，其包含以下步驟：

a) 將水相中之生物活性劑與有機溶劑相中之疏水性離子配對(HIP)劑混合形成生物活性劑-HIP複合物；

b) 自該水相分離該複合物；

c) 移除該水相且使該複合物與該有機相均質化；

d) (i) 將聚合物溶解於(c)中所形成之有機相中，接著形成該有機相於連續水相中之乳液；或

(ii) 將聚合物形成物質之單體或寡聚物溶解於(c)中所形成之有機相中，接著形成該有機相於連續水相中之乳液；使該單體或寡聚物聚合形成聚合物；及

e) 獲得由步驟(d)之乳液形成之微粒載體。

3. 如請求項1或2之方法，其中該單體包含氰基丙烯酸烷酯(ACA)。

4. 如請求項3之方法，其中該單體包含氰基丙烯酸丁酯(BCA)。

5. 如請求項1或請求項2之方法，其中該聚合物包含聚-L-丙交酯(lactide)(PLA)、聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)或聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)或聚(己內酯)、聚(羥基丁酸酯)及/或其共聚物。

6. 如請求項5之方法，其中該聚合物包含聚(己內酯)。

7. 如請求項5之方法，其中該聚合物包含聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)。

8. 如請求項5之方法，其中該聚合物包含聚-L-丙交酯(PLA)。

9. 如請求項3之方法，其中該連續水相具有約6或高於6之pH。

10. 如請求項1或2之方法，其中該微粒載體為奈米粒子。

11. 如請求項1或2之方法，其中該生物活性劑為蛋白質或肽。

12. 如請求項11之方法，其中該生物活性劑為抗原結合分子。

13. 如請求項12之方法，其中該抗原結合分子包含結構域(domain)。

14. 如請求項12之方法，其中該抗原結合分子為抗體。

15. 如請求項12之方法，其中該抗原結合分子為結構域抗體。

16. 如請求項1或2之方法，其中該生物活性劑在疏水性離子

配對劑不存在下不溶於該有機相中。

17. 如請求項1或2之方法，其中當該生物活性劑為陽離子時，該HIP劑為陰離子HIP劑。

18. 如請求項17之方法，其中該HIP劑為多庫酯鈉(docusate sodium)。

19. 如請求項1或2之方法，其中當該生物活性劑為陰離子時，該HIP劑為陽離子HIP劑。

20. 如請求項19之方法，其中該HIP劑為溴化二甲基二(十八基)銨(DDAB18)；1,2-二油醯氧基-3(三甲基銨)丙烷(DOTAP)；或西曲溴銨(cetrimonium bromide)(CTAB)。

21. 一種微粒載體，其包含可由如請求項1至20中任一項之方法獲得之包囊化生物活性劑。

22. 如請求項21之微粒載體，其中該蛋白質與聚合物之比率為至少約1.0% w/w，或為至少約2.5% w/w，或為至少約5% w/w。

23. 如請求項21之微粒載體，其中該肽與聚合物之比率為至少約5% w/w，或為至少約9% w/w。

24. 如請求項21之微粒載體，其中該抗體與聚合物之比率為至少約1% w/w，或為至少約2.5% w/w。

25. 如請求項21之微粒載體，其中該奈米粒子中該結構域抗體與聚合物之比率為至少約5% w/w。

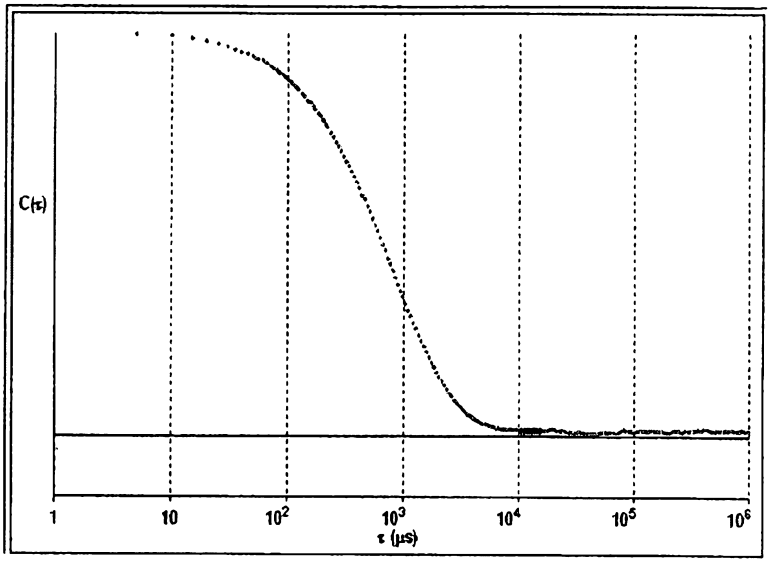
26. 一種醫藥組合物，其包含如請求項21至25中任一項之微粒載體。

27. 如請求項26之醫藥組合物，其係用於預防或治療疾病。

八、圖式：

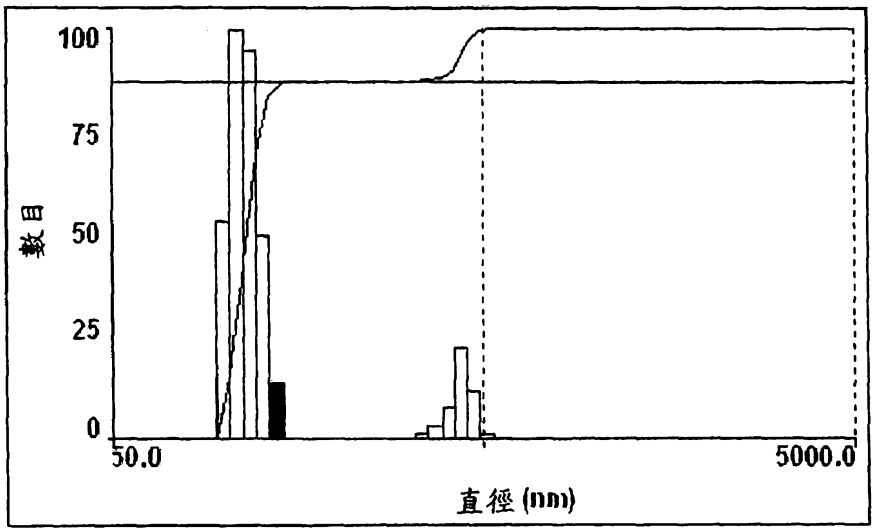
PBCA de dAb調配物（組合）

有效直徑:	262.6 nm
多分散性:	0.262
平均計數速率:	2.9 Mcps
基線指數:	8.1
耗時:	00:10:00



輪	有效直徑(nm)	半寬度(nm)	多分散性	基線指數
1	306.1	150.9	0.243	9.2
2	281.6	138.8	0.243	9.3
3	263.7	134.5	0.260	9.3
4	248.0	124.2	0.251	7.4
5	250.0	125.5	0.252	8.3
6	254.5	133.0	0.273	9.6
7	268.4	135.0	0.253	9.1
8	259.3	134.6	0.270	10.0
9	266.9	139.7	0.274	9.5
10	255.2	134.9	0.280	9.8
平均值	265.4	135.1	0.260	9.2
標準誤差	5.5	2.4	0.004	0.2
組合	262.6	134.4	0.262	8.1

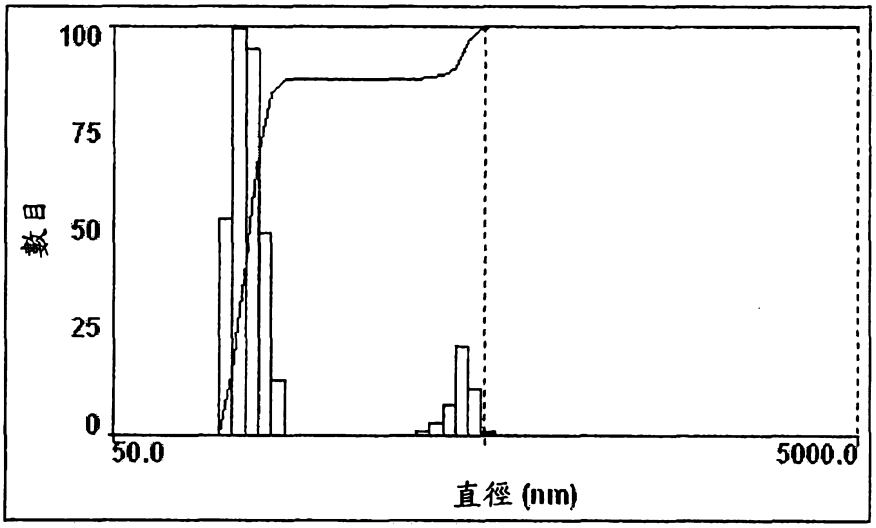
圖1(a)



相對強度= 13.33 累積強度= 87.49 直徑(nm) = 138.19

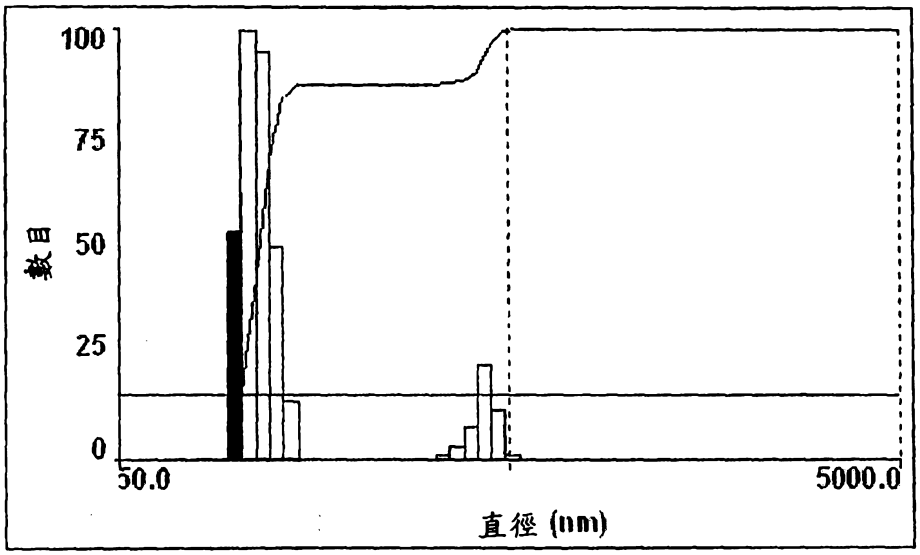
圖1(b)

PBCA de dAb調配物（組合）



相對強度= 0.75　累積強度= 100.00　直徑(nm) = 506.81

圖1(c)



相對強度= 52.91	累積強度= 14.90	直徑 (nm) = 99.86

圖1(d)

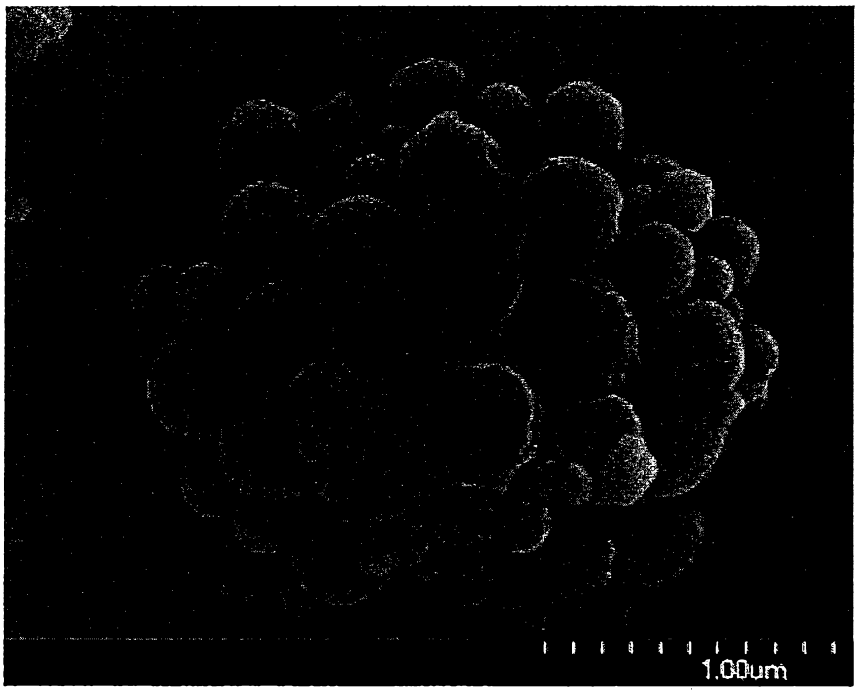


圖 2

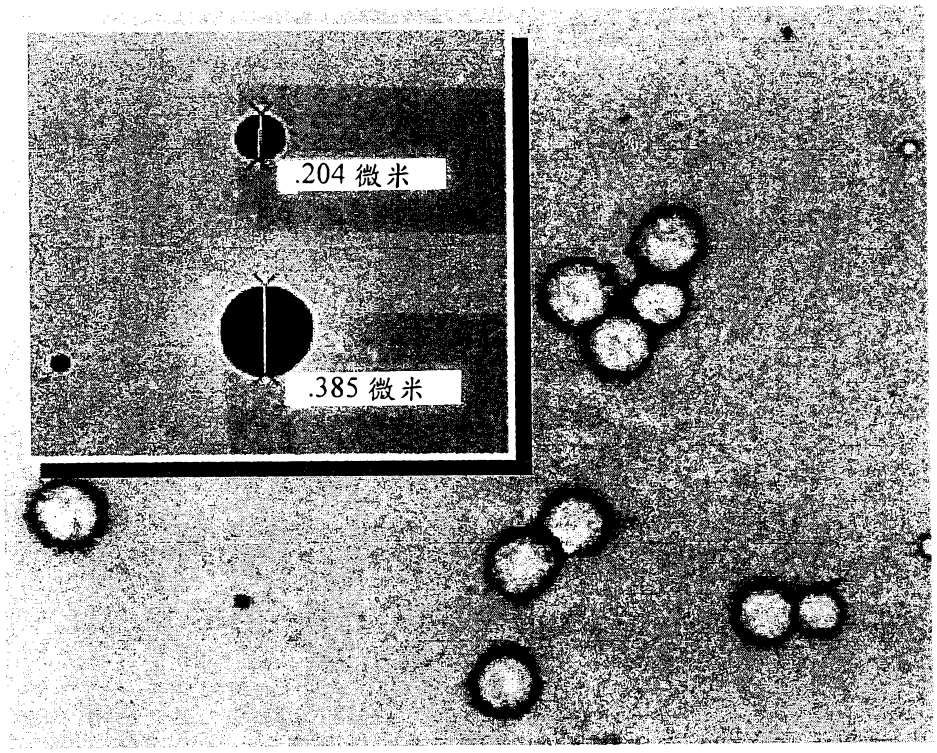


圖 3

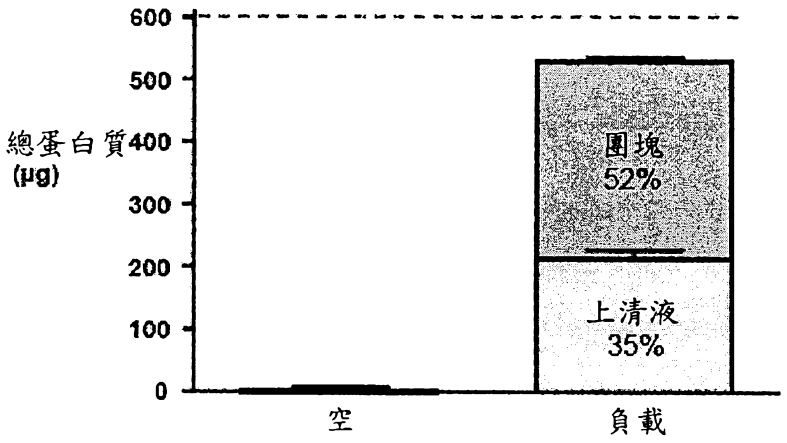


圖4

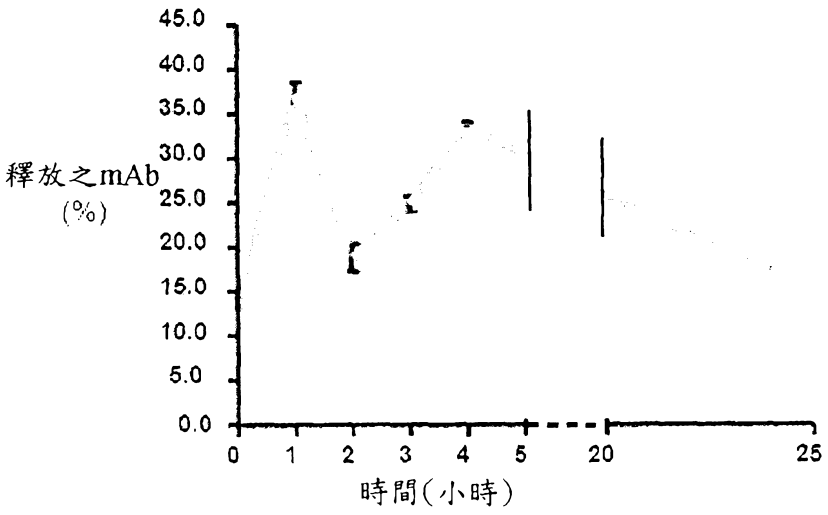


圖5

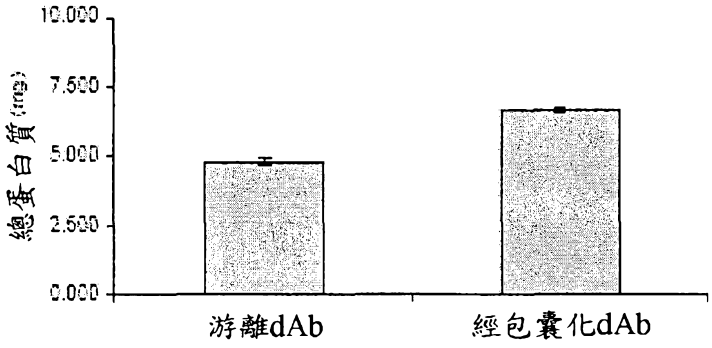
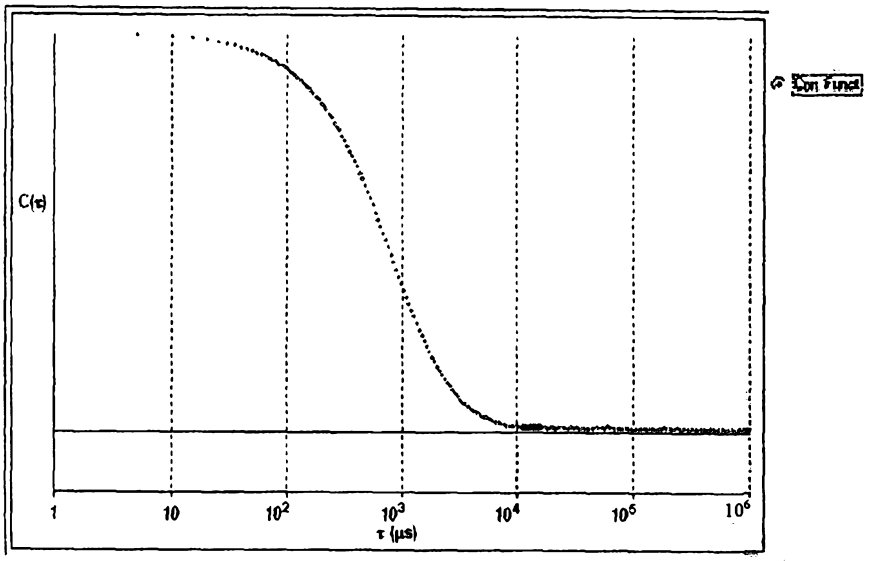


圖6

無連拉淨之PBCA奈米粒子，10:1 HIP（組合）

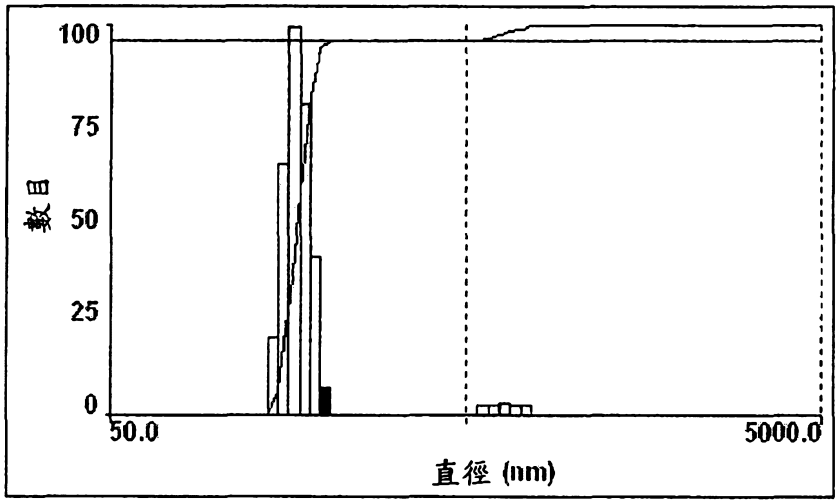
有效直徑:	291.4 nm
多分散性:	0.242
平均計數速率:	1.9 Mcps
基線指數:	6.4
耗時:	00:10:00



輪	有效直徑(nm)	半寬度(nm)	多分散性	基線指數
1	302.4	135.1	0.200	8.9
2	290.7	151.0	0.270	10.0
3	291.0	131.7	0.205	7.6
4	293.1	149.2	0.259	9.2
5	288.4	149.4	0.268	9.5
6	299.2	146.8	0.241	6.6
7	320.1	138.9	0.188	8.7
8	281.3	133.7	0.226	7.9
9	293.6	143.1	0.238	8.7
10	282.7	147.5	0.272	7.4
平均值	294.3	142.6	0.237	8.5
標準誤差	3.5	2.3	0.010	0.3
組合	291.4	143.2	0.242	6.4

圖7(a)

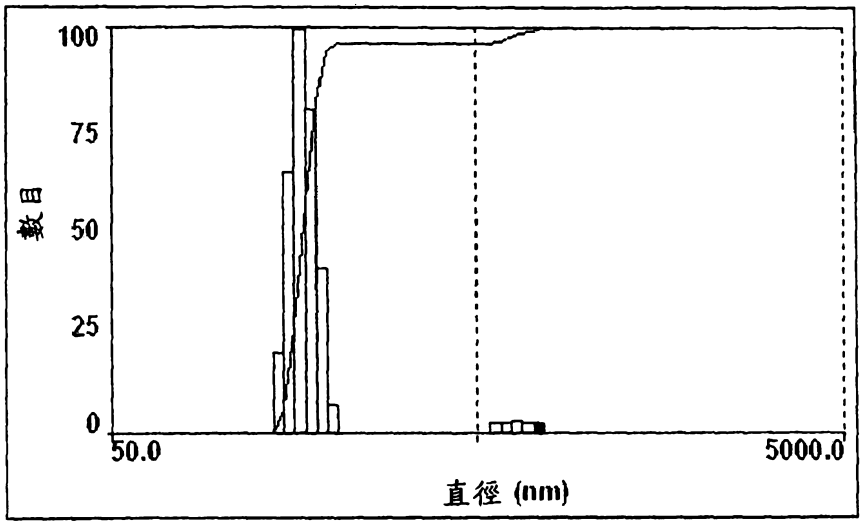
無達拉淨之PBCA奈米粒子，10:1 HIP（組合）



相對強度= 6.96　累積強度= 96.34　直徑 (nm) = 201.37

圖7(b)

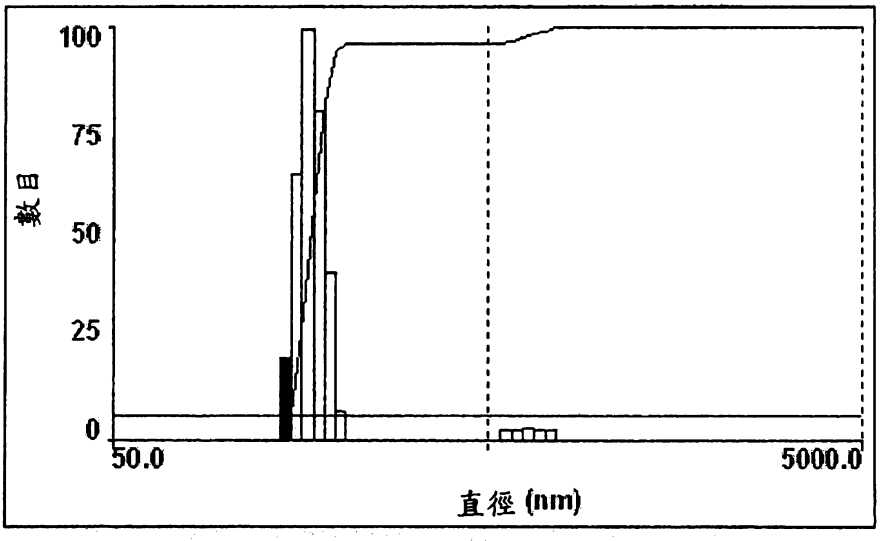
無達拉淨之PBCA奈米粒子，10:1 HIP（組合）



相對強度= 2.43　累積強度 = 100.00　直徑(nm) = 732.05

圖7(c)

無達拉淨之PBCA奈米粒子，10:1 HIP（組合）



相對強度= 19.88 累積強度= 6.15 直徑(nm) = 143.38

圖7(d)

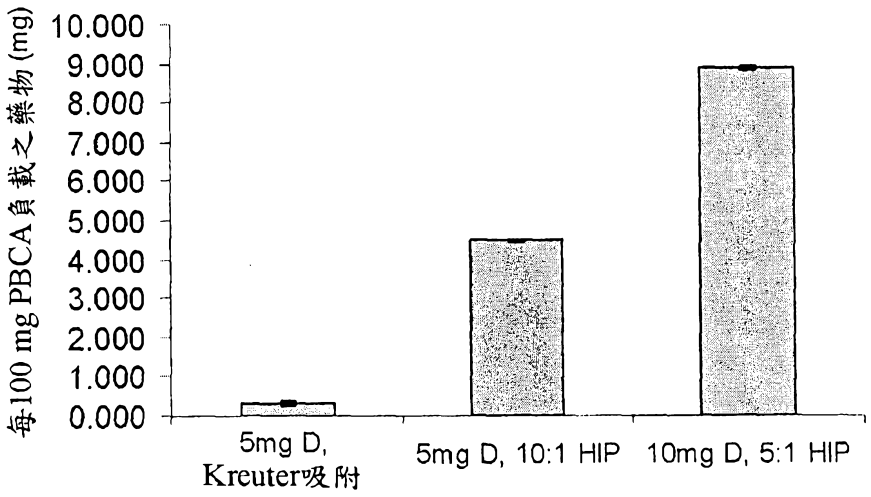

每100 mg PBCA負載之藥物 (mg)
10.000
9.000
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
5mg D, Kreuter吸附
5mg D, 10:1 HIP
10mg D, 5:1 HIP

圖8

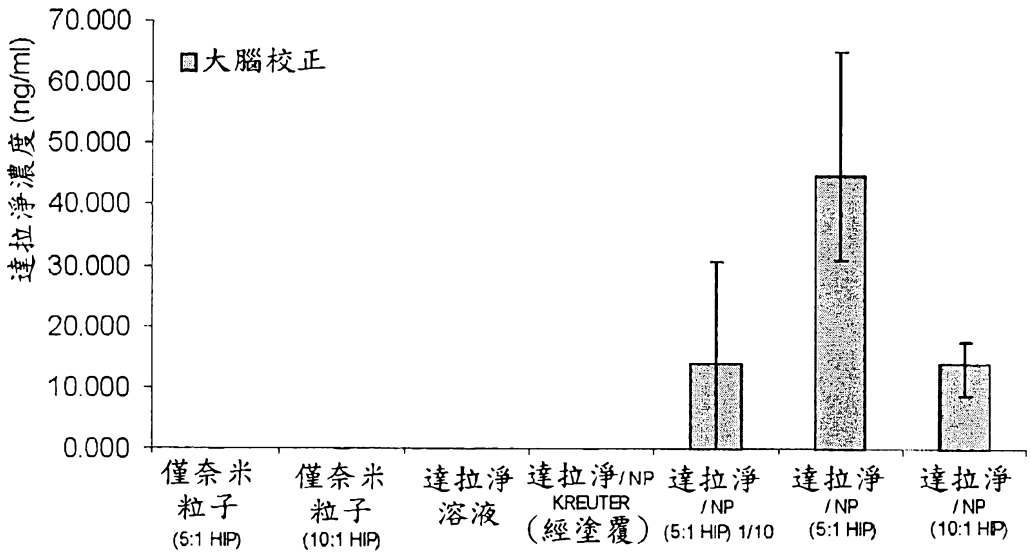

達拉淨濃度 (ng/ml)
70.000
60.000
50.000
40.000
30.000
20.000
10.000
0.000
大腦校正
僅奈米粒子 (5:1 HIP)
僅奈米粒子 (10:1 HIP)
達拉淨溶液
達拉淨/NP KREUTER (經塗覆)
達拉淨/NP (5:1 HIP) 1/10
達拉淨/NP (5:1 HIP)
達拉淨/NP (10:1 HIP)

圖9

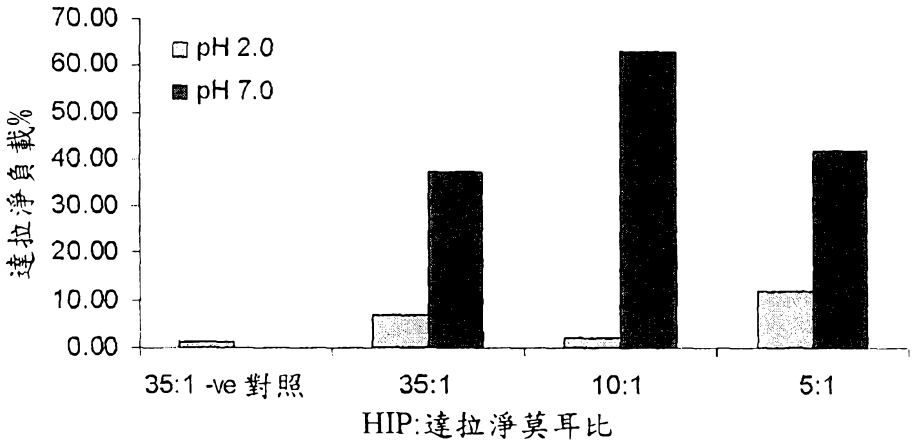

70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
□ pH 2.0
■ pH 7.0
達拉淨負載%
35:1 -ve 對照
35:1
10:1
5:1
HIP:達拉淨莫耳比

圖10

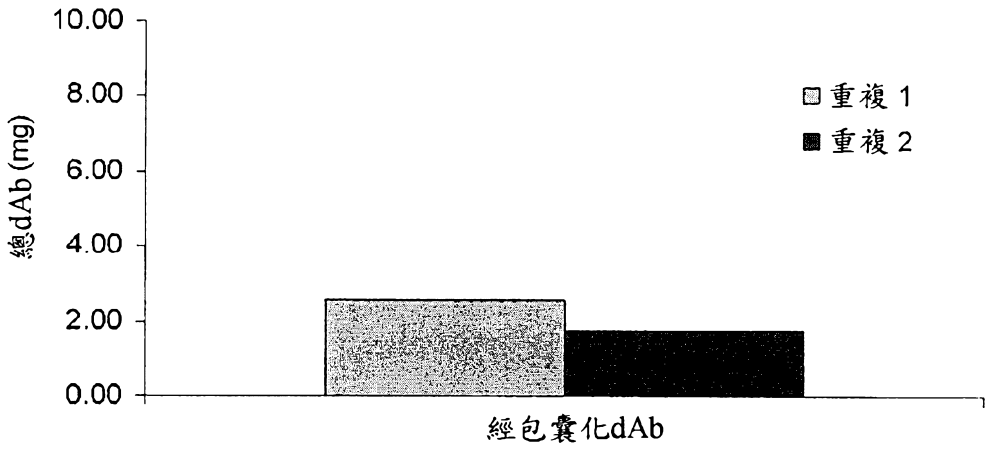


圖11

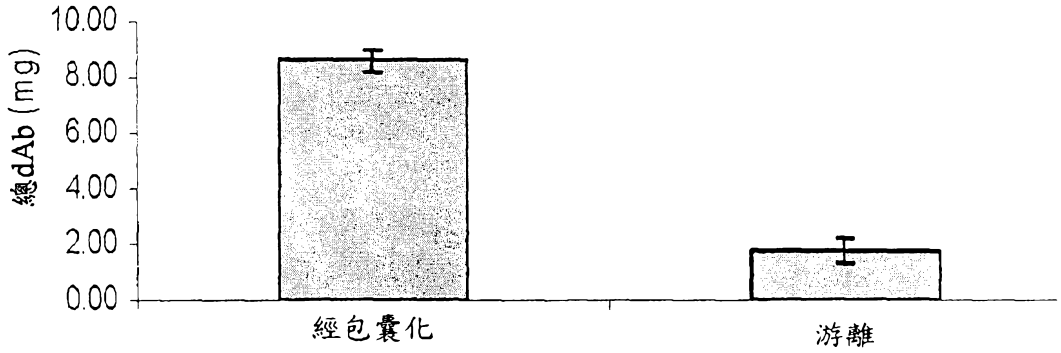


圖12

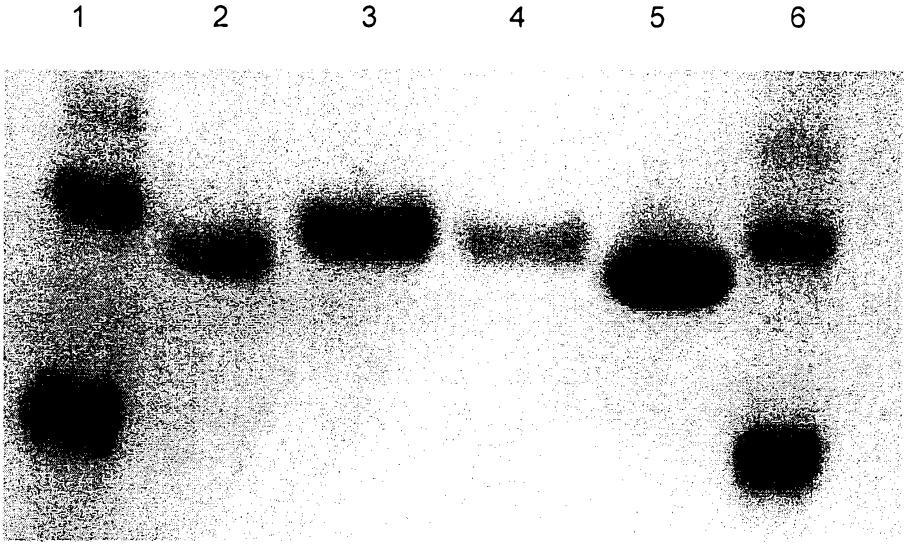


圖 13

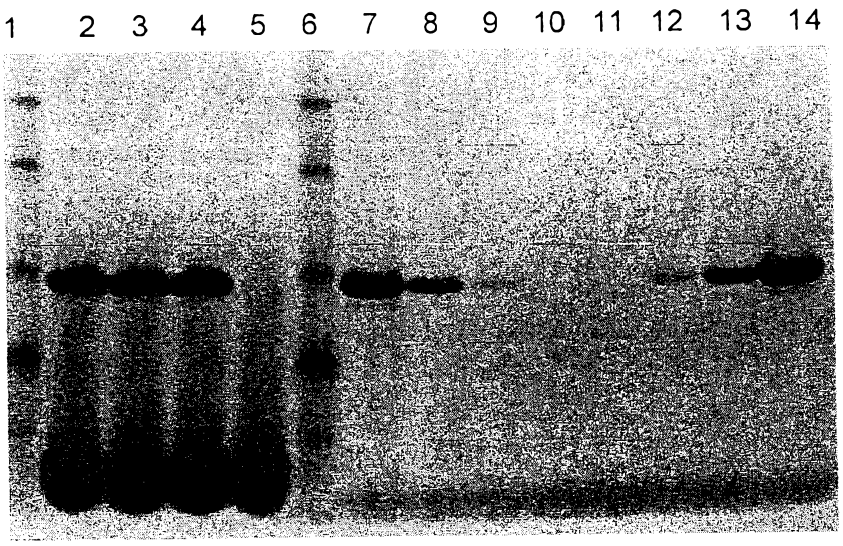


圖 14

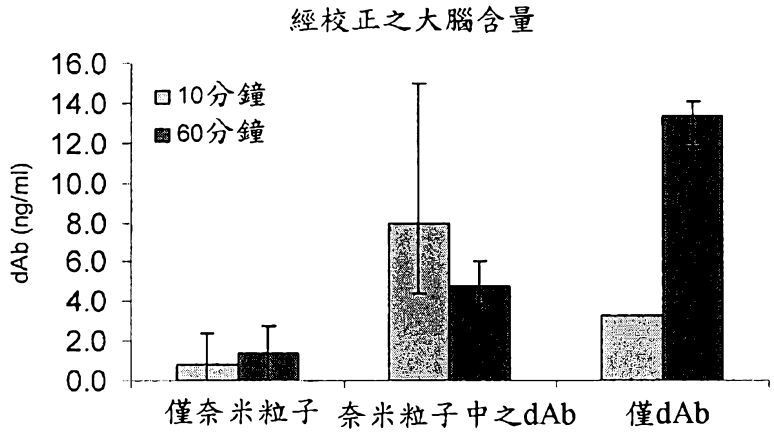

經校正之大腦含量
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
dAb (ng/ml)
10分鐘
60分鐘
僅奈米粒子
奈米粒子中之dAb
僅dAb

圖15

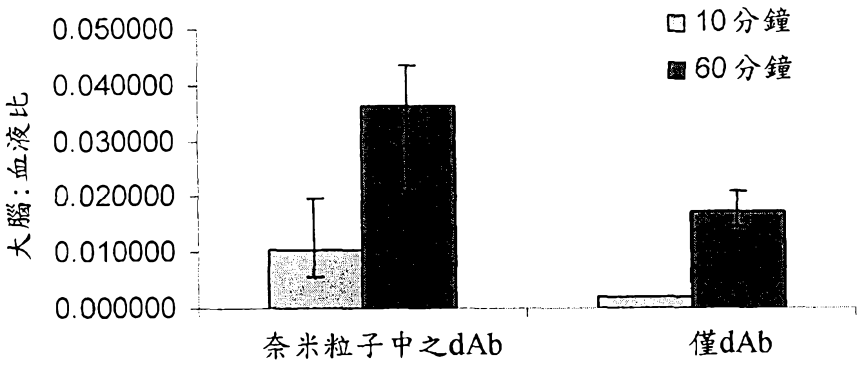

0.050000
0.040000
0.030000
0.020000
0.010000
0.000000
大腦：血液比
10分鐘
60分鐘
奈米粒子中之dAb
僅dAb

圖16

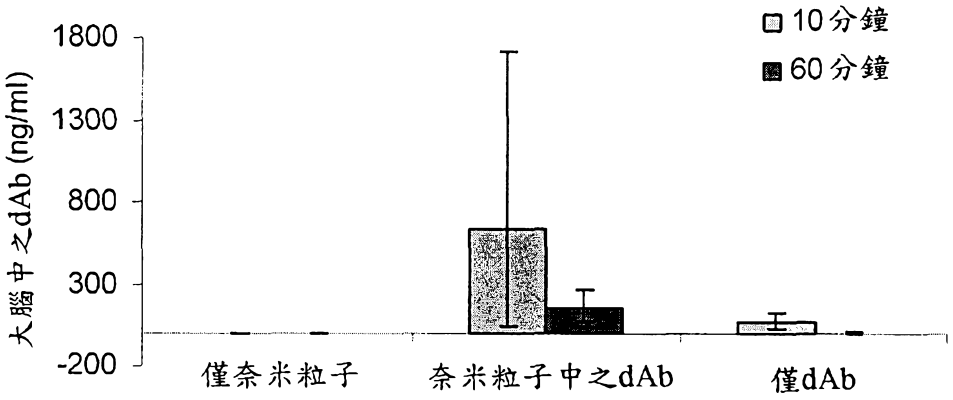

10分鐘
60分鐘
大腦中之dAb (ng/ml)
1800
1300
800
300
-200
僅奈米粒子
奈米粒子中之dAb
僅dAb

圖17

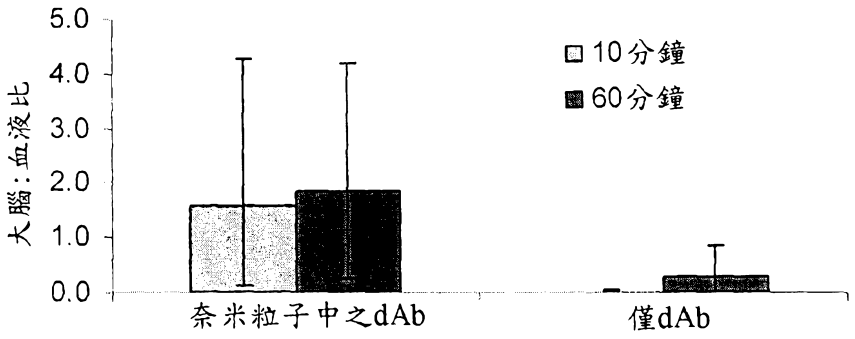


圖18

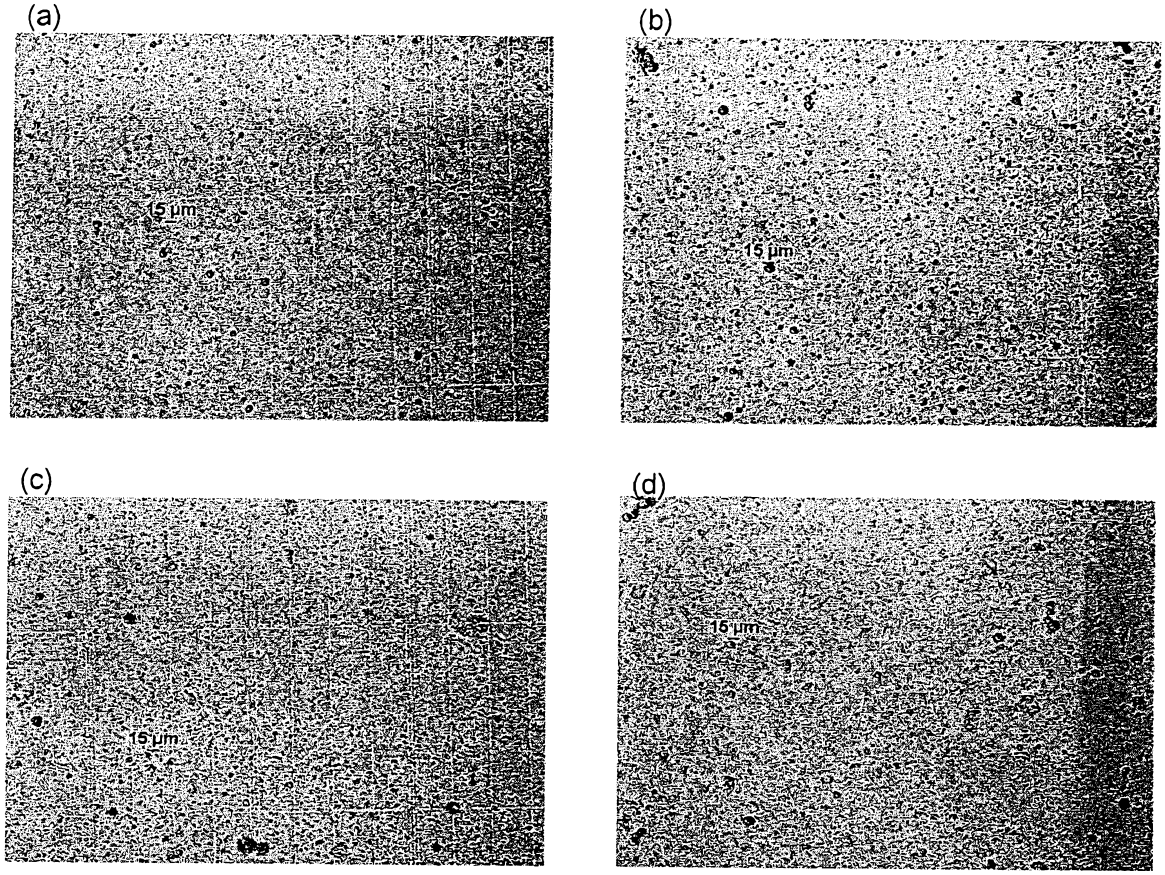


圖 19

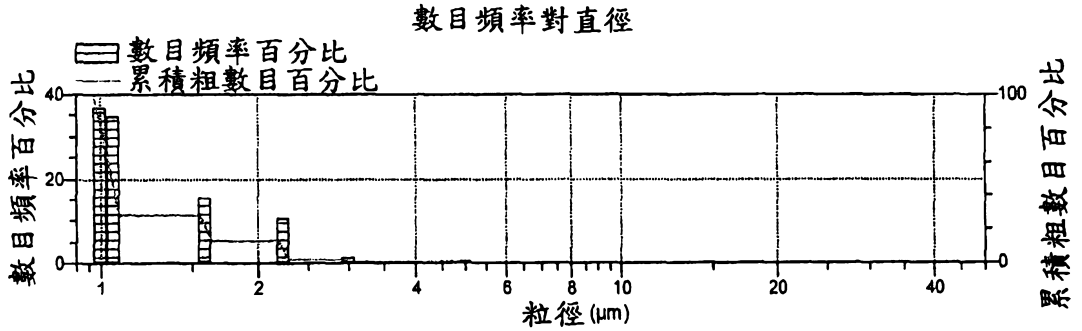

數目頻率對直徑
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
40
20
0
100
0
1
2
4
6
8
10
20
40
粒徑(μm)

圖20(a)

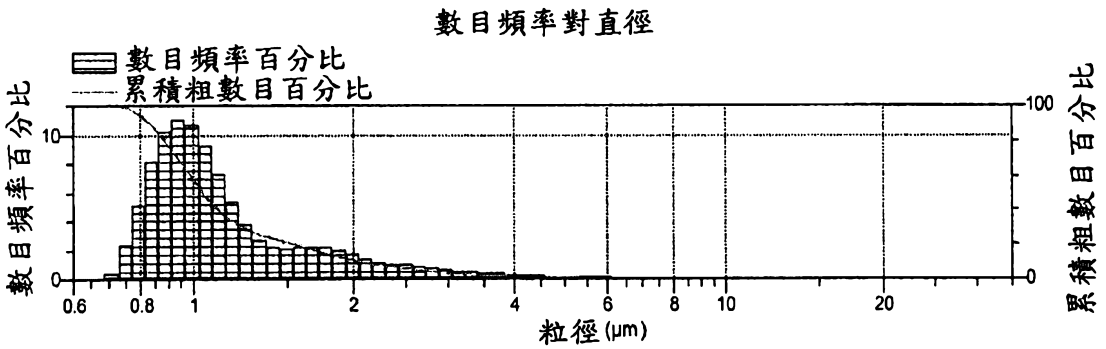

數目頻率對直徑
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
10
0
100
0
0.6
0.8
1
2
4
6
8
10
20
粒徑(μm)

圖20(b)

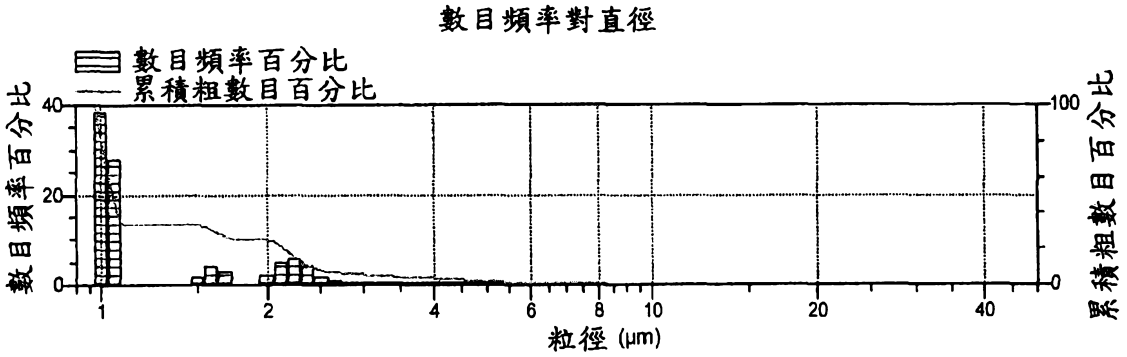

數目頻率對直徑
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
40
20
0
100
0
1
2
4
6
8
10
20
40
粒徑 (μm)

圖20(c)

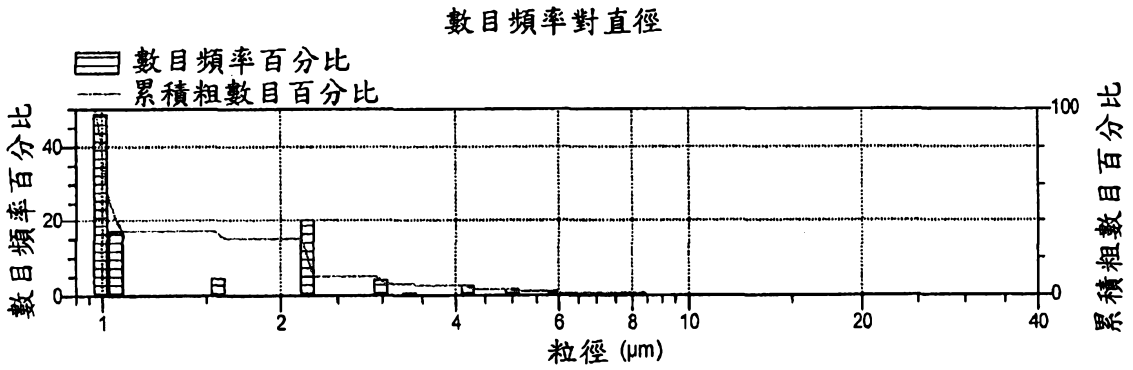

數目頻率對直徑
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
數目頻率百分比
累積粗數目百分比
粒徑 (μm)
0
20
40
100
0
1
2
4
6
8
10
20
40

圖20(d)

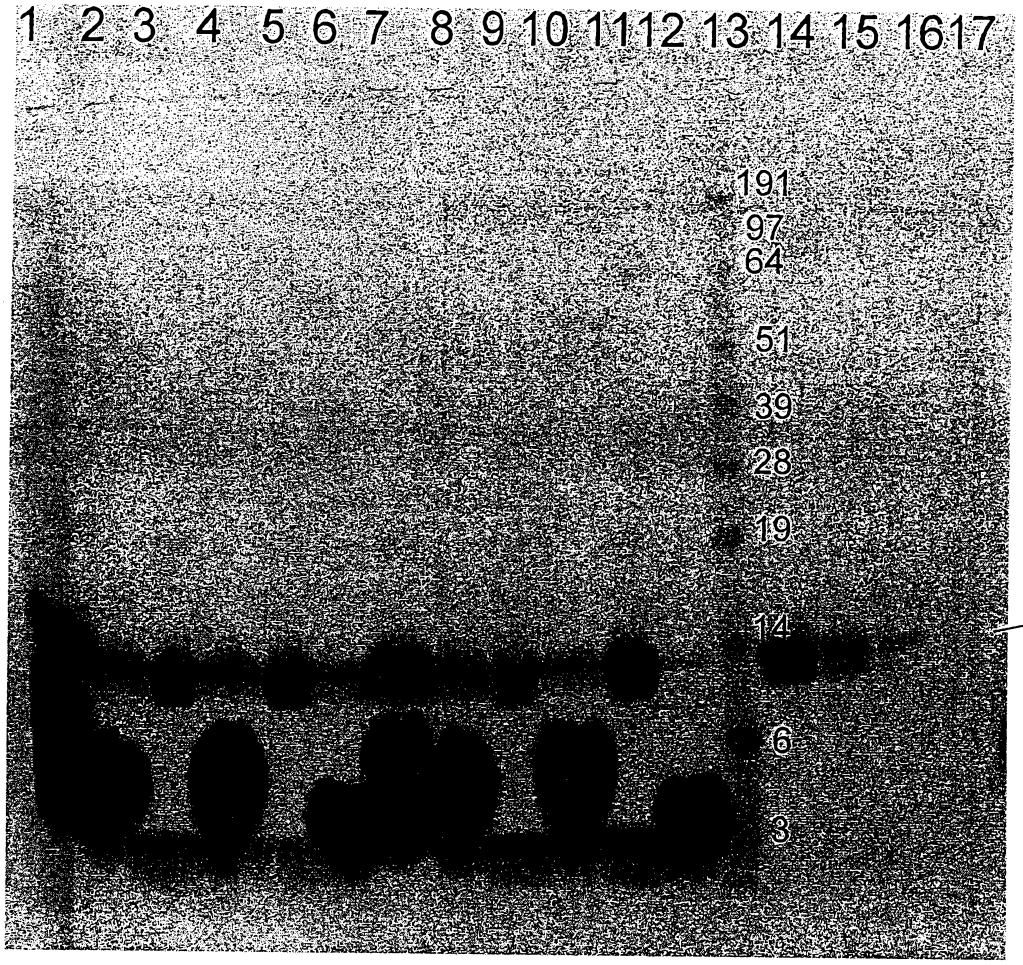


圖 21

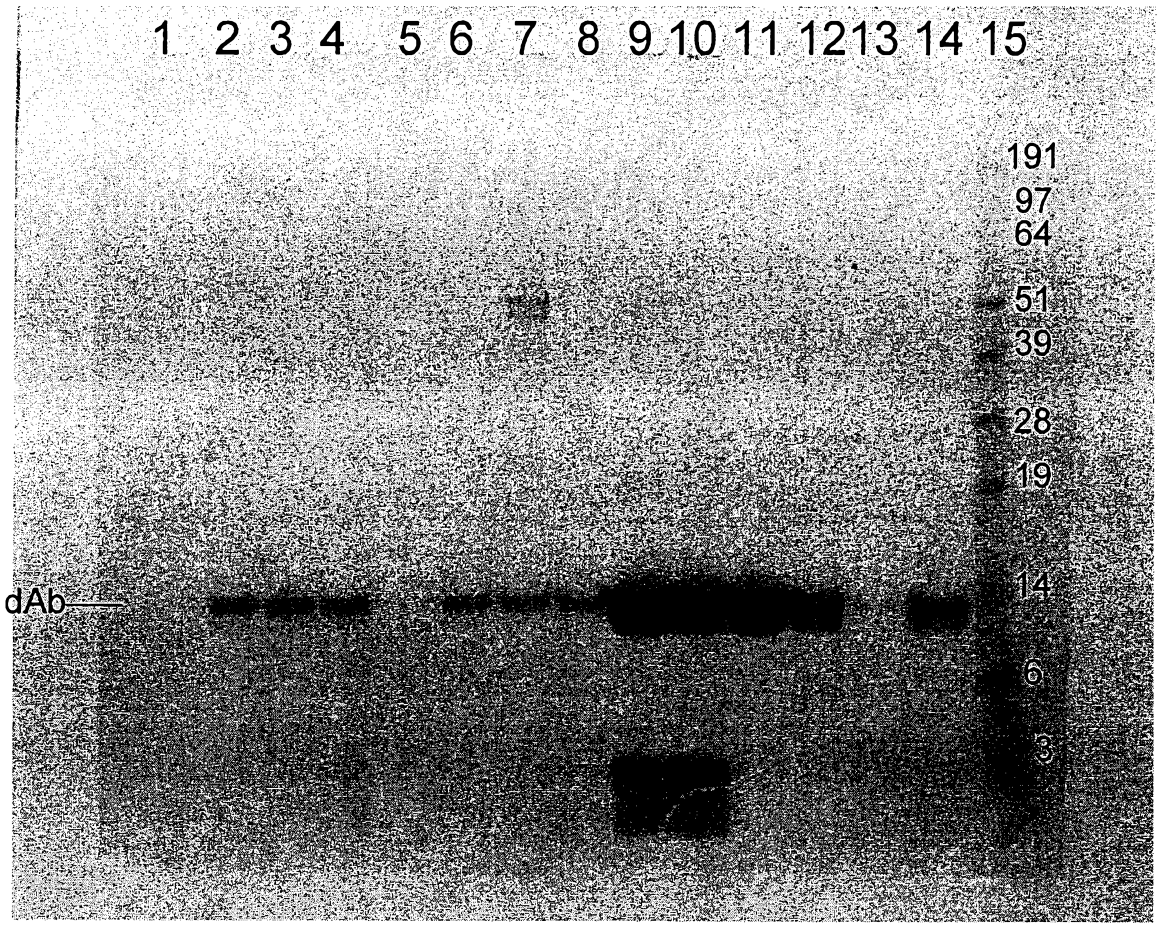


圖 22

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(15)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)