



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110691588 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201880036493.0

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限

(22)申请日 2018.04.03

公司 11713

(30)优先权数据

代理人 康健 王思琪

62/480,710 2017.04.03 US

(51)Int.Cl.

A61K 9/50(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 47/69(2006.01)

2019.12.02

C07K 16/24(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/025913 2018.04.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/187344 EN 2018.10.11

(71)申请人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72)发明人 W·墨菲 A·克莱门茨

C·张伯伦 R·范德比

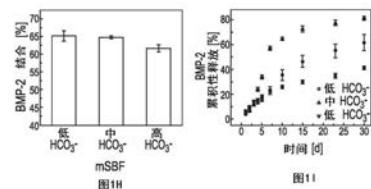
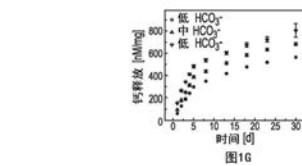
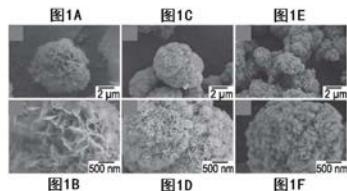
权利要求书3页 说明书23页 附图27页

(54)发明名称

用于持续递送生物活性分子的矿物质涂覆  
微粒

(57)摘要

公开了用于提供活性剂的制剂。制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体，其中活性剂吸附到所述矿物质。其他制剂包括包含矿物质涂覆微粒的载体，其中矿物质涂覆微粒包含活性剂。还公开了持续递送活性剂的方法和使用提供持续递送活性剂的制剂治疗炎性疾病的方法。



1. 一种用于提供活性剂的制剂,其包括:
  - 载体,其中所述载体包括
  - 至少第一种活性剂;和
  - 矿物质涂覆微粒,其包含矿物质涂层;和至少第二种活性剂。
2. 权利要求1的制剂,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层。
3. 权利要求1的制剂,其中所述第二种活性剂与所述载体中的第一种活性剂相同。
4. 权利要求1的制剂,其中吸附到所述矿物质涂层的所述第二种活性剂不同于所述载体中的活性剂。
5. 权利要求1的制剂,其中所述第一种活性剂和第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层。
6. 权利要求1的制剂,其中所述第一种活性剂和所述第二种活性剂是IL-1拮抗剂、IL-1F2拮抗剂、IL-1F3拮抗剂、IL-1F4拮抗剂、IL-1F5拮抗剂、IL-1F6拮抗剂、IL-1F7拮抗剂、IL-1F8拮抗剂、IL-1F9拮抗剂、IL-1F10拮抗剂、IL-1F11拮抗剂、IL-1R拮抗剂、阿巴西普、利妥昔单抗、托珠单抗、阿那白滞素、阿达木单抗、依那西普、英夫利昔单抗、塞妥珠单抗、戈利木单抗、及其组合。
7. 权利要求6的制剂,其中所述IL-1拮抗剂是重组IL-1拮抗剂。
8. 权利要求1的制剂,其中所述矿物质涂层包含钙、磷酸盐、碳酸盐及其组合。
9. 权利要求1的制剂,其中所述矿物质涂层还包含卤素。
10. 权利要求9的制剂,其中所述卤素选自氟、氯、溴、碘、砹及其组合。
11. 权利要求1的制剂,其中所述矿物涂覆微粒包含选自聚合物、陶瓷、金属、玻璃及其组合的核。
12. 权利要求1的制剂,其中所述第二种活性剂被掺入所述矿物质涂层中。
13. 权利要求1的制剂,其中所述载体包含所述第一种活性剂或所述第二种活性剂中的至少一种。
14. 权利要求1的制剂,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层、被掺入到所述矿物质涂层中、及其组合。
15. 权利要求1的制剂,其中所述矿物质涂覆微粒包含多层矿物质涂层。
16. 权利要求15的制剂,其中所述矿物质涂层的层具有相同的矿物质组成。
17. 权利要求15的制剂,其中所述矿物质涂层的层具有不同的矿物质组成。
18. 权利要求15的制剂,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层的层、被掺入所述矿物质涂层的层中、及其组合。
19. 一种用于持续递送至少一种活性剂的方法,所述方法包括:
  - 施用包含载体的制剂,其中所述载体包含
  - 至少第一种活性剂;和
  - 矿物质涂覆微粒,其包含矿物质涂层;和至少第二种活性剂。
20. 权利要求19的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层。
21. 权利要求19的方法,其中吸附到所述矿物质涂层的所述第二种活性剂与所述载体中的活性剂相同。
22. 权利要求19的方法,其中吸附到所述矿物质涂层的所述第二种活性剂不同于所述

载体中的第一种活性剂。

23. 权利要求19的方法,其中所述第一种活性剂和所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层。

24. 权利要求19的方法,其中所述第一种活性剂和所述第二种活性剂是IL-1拮抗剂、IL-1F2拮抗剂、IL-1F3拮抗剂、IL-1F4拮抗剂、IL-1F5拮抗剂、IL-1F6拮抗剂、IL-1F7拮抗剂、IL-1F8拮抗剂、IL-1F9拮抗剂、IL-1F10拮抗剂、IL-1F11拮抗剂、IL-1R拮抗剂、阿巴西普、利妥昔单抗、托珠单抗、阿那白滞素、阿达木单抗、依那西普、英夫利昔单抗、塞妥珠单抗、戈利木单抗、及其组合。

25. 权利要求24的方法,其中所述IL-1拮抗剂是重组IL-1拮抗剂。

26. 权利要求19的方法,其中所述矿物质涂层包括钙、磷酸盐、碳酸盐及其组合。

27. 权利要求19的方法,其中所述矿物质涂层还包括卤素。

28. 权利要求19的方法,其中所述矿物质涂覆微粒包括选自聚合物、陶瓷、金属、玻璃及其组合的核。

29. 权利要求19的方法,其中所述第二种活性剂被掺入所述矿物质涂层内。

30. 权利要求19的方法,其中所述载体包括所述第一种活性剂和第二种活性剂中的至少一个。

31. 权利要求19的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层、被掺入到所述矿物质涂层中、及其组合。

32. 权利要求19的方法,其中所述矿物质涂覆微粒包括多层矿物质涂层。

33. 权利要求32的方法,其中所述矿物质涂层的层具有相同的矿物质组成。

34. 权利要求32的方法,其中所述矿物质涂层的层具有不同的矿物质组成。

35. 权利要求32的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层的层、被掺入所述矿物质涂层的层中、及其组合。

36. 一种治疗有需要的受试者中的炎性疾病的方法,该方法包括:

向所述受试者施用制剂,其中所述制剂包含载体,其中所述载体包含至少第一种活性剂;和

矿物质涂覆微粒,其包括

矿物质涂层;和

至少第二种活性剂。

37. 权利要求36的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层。

38. 权利要求36的方法,其中所述第二种活性剂和所述第一种活性剂是相同的活性剂。

39. 权利要求36的方法,其中所述第二种活性剂和所述第一种活性剂是不同的。

40. 权利要求36的方法,其中所述第一种活性剂和所述第二种活性剂选自IL-1拮抗剂、IL-1F2拮抗剂、IL-1F3拮抗剂、IL-1F4拮抗剂、IL-1F5拮抗剂、IL-1F6拮抗剂、IL-1F7拮抗剂、IL-1F8拮抗剂、IL-1F9拮抗剂、IL-1F10拮抗剂、IL-1F11拮抗剂、IL-1R拮抗剂、阿巴西普、利妥昔单抗、托珠单抗、阿那白滞素、阿达木单抗、依那西普、英夫利昔单抗、塞妥珠单抗、戈利木单抗、及其组合。

41. 权利要求40的方法,其中所述IL-1拮抗剂是重组IL-1拮抗剂。

42. 权利要求36的方法,其中所述矿物质涂层包括钙、磷酸盐、碳酸盐及其组合。

43. 权利要求36的方法,其中所述矿物质涂层还包括卤素。
44. 权利要求36的方法,其中所述矿物质涂覆微粒包含选自聚合物、陶瓷、金属、玻璃及其组合的核。
45. 权利要求36的制剂,其中所述第二种活性剂被掺入所述矿物质涂层中。
46. 权利要求36的制剂,其中所述载体包含一种或多种活性剂。
47. 权利要求36的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层、被掺入到所述矿物质涂层中、及其组合。
48. 权利要求36的方法,其中所述矿物质涂覆微粒包括多层矿物质涂层。
49. 权利要求48的方法,其中所述矿物质涂层的层具有相同的矿物质组成。
50. 权利要求48的方法,其中所述矿物质涂层的层具有不同的矿物质组成。
51. 权利要求48的方法,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层的层、被掺入所述矿物质涂层的层中、及其组合。
52. 一种矿物质涂覆微粒,其包含活性剂,其中所述活性剂被吸附到所述矿物质、被掺入所述矿物质中、及其组合。
53. 权利要求52的矿物质涂覆微粒,进一步包含核。
54. 权利要求52的矿物质涂覆微粒,其中所述核选自聚合物、陶瓷、金属、玻璃及其组合。
55. 权利要求52的矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂层包括钙、磷酸盐、碳酸盐及其组合。
56. 权利要求52的矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂层还包含卤素。
57. 权利要求52的矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂覆微粒包括多层矿物质涂层。
58. 权利要求57的矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂层的层具有相同的矿物组成。
59. 权利要求57的矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂层的层具有不同的矿物组成。
60. 权利要求57的矿物质涂覆微粒,其中所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质涂层的层、被掺入所述矿物质涂层的层中、以及它们的组合。
61. 一种治疗有此需要的受试者中的手术后炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用制剂,其中所述制剂包括载体,所述载体包括活性剂和矿物质涂覆微粒,其中所述矿物质涂覆微粒包括活性剂。
62. 权利要求61的方法,其中所述活性剂选自IL-1拮抗剂、IL-1F2拮抗剂、IL-1F3拮抗剂、IL-1F4拮抗剂、IL-1F5拮抗剂、IL-1F6拮抗剂、IL-1F7拮抗剂、IL-1F8拮抗剂、IL-1F9拮抗剂、IL-1F10拮抗剂、IL-1F11拮抗剂、IL-1R拮抗剂、阿巴西普、利妥昔单抗、托珠单抗、阿那白滞素、阿达木单抗、依那西普、英夫利昔单抗、塞妥珠单抗、戈利木单抗、及其组合。

## 用于持续递送生物活性分子的矿物质涂覆微粒

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年4月3日提交的美国临时申请62/480,710的优先权，其全部公开内容通过引用合并于此。

### [0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的HL093282政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

### [0005] 背景

[0006] 本发明涉及用于提供活性剂的制剂。制剂包括载体，所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中活性剂吸附到矿物质涂层。还公开了持续递送活性剂的方法和使用提供活性剂持续递送的制剂治疗炎性疾病的方法。

[0007] 活性剂的递送策略包括局部递送和持续递送策略。在局部递送中，活性剂仅在目标部位具有活性，并限制了对目标部位以外区域的影响。例如，在载体系统(凝胶，支架，微粒)中的封装用于局部递送，其中所述药剂在局部起作用但是限制进入循环的药剂量。持续递送系统递送利用各种平台通过随着时间可控地释放所述药剂来维持全身或局部的治疗性浓度范围。先前已经探索的持续递送策略可导致活性剂活性降低，需要更大剂量才能提供治疗效果。

[0008] 骨关节炎(OA)和类风湿关节炎(RA)是重要的临床问题。在美国，关节炎是导致残疾的主要原因，影响了超过5千万人。尽管OA费用昂贵，但患者的生活质量仍然很差。在美国，RA的患病率为1-2%，每名美国患者每年的医疗费用为60,000至120,000美元。两者都是慢性和进行性的，都涉及炎症过程，但是两种情况之间的区别是，OA被认为是局部的，而RA被认为是全身性疾病。OA经常导致关节置换，而1/3的RA患者严重残疾。关节炎使关节软骨退化，该组织保护了双指关节中的骨骼免受集中的承载力和运动引起的摩擦的影响。关节软骨具有有限的再生能力。一旦受损，正反馈环将释放基质蛋白酶，该基质蛋白酶可产生驱动慢性发病机理的分子产物。内源性信号传导经由滑膜中炎症信号的上调而增强，所述炎症信号包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )，白介素-1(IL-1)，白介素-6(IL-6)和干扰素- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )。

[0009] 当前，除了非甾体抗炎药以外，很少有疗法可用于治疗OA。在关节置换之前，可以使用各种外科手术方法促进软骨修复。这些提供了暂时的缓解，但是会产生组成不良、机械性能较差并随时间而被破坏的修复组织。对于RA，通常使用甲氨蝶呤，但这种治疗对于50%的患者无效。然后采用TNF抑制剂。TNF抑制剂很昂贵，但对于许多患者仍然无效。对于OA和RA患者，IL-1抑制剂都显示出很有希望，并且可能会填补重要的治疗空白。然而，通过持续递送在体内维持治疗浓度是一个巨大的问题，可能会限制其临床应用。基因递送是维持IL-1抑制剂水平的新策略。这个概念虽然具有科学吸引力，但需要收集自体滑膜细胞，对其进行病毒转染以使其过表达IL-1Ra，然后将其重新植入患者的滑膜关节，这引起了人们对临床可行性和安全性的担忧。

[0010] 白介素-1(IL-1)是许多炎性疾病中的主要炎症介质，所述炎性疾病包括慢性炎性

疾病(例如类风湿性关节炎,骨关节炎和2型糖尿病),神经病理疾病(例如中风,阿尔茨海默氏病,帕金森氏病和癫痫),以及更多局部炎症情况(例如皮肤和韧带伤口愈合)。当白介素-1与其受体相互作用时,促炎信号传导级联反应会在多种细胞类型中启动,包括淋巴细胞,内皮细胞,巨噬细胞,成纤维细胞和软骨细胞。白介素-1受体拮抗剂(IL-Ra)是促炎白介素-1(IL-1)诱导的炎症的天然存在拮抗剂,其与IL-1受体结合但不引发炎症级联反应。IL-Ra的重组形式已被临床批准用于治疗类风湿性关节炎。它也已用于其他临床适应症的核准标示外使用。IL-Ra具有独特而理想的特性,使其成为控制炎症的理想候选者,与其他潜在治疗性蛋白质相比,它具有与IL-1受体的高结合亲和力和靶标特异性,低毒性和低分子量(17kD)。已经将其作为与IL-1表达相关的许多炎症情况的可能治疗策略进行了研究。

[0011] 短的体内半衰期(4-6小时)和抑制IL-1活性所需的高剂量(1mg/kg)IL-Ra是限制了IL-Ra治疗对于许多疾病的有效性的挑战,并产生了繁重的治疗方案,例如每天大剂量(100mg)皮下注射。先前已经开发了递送策略以延长IL-Ra的半衰期,包括IL-Ra与不同的蛋白质和肽伴侣的融合。IL-Ra与蛋白质和肽伴侣的融合可通过防止酶降解和肾脏过滤来延长其体内半衰期。与其他肽伴侣的融合改善了IL-Ra的半衰期,延长可达20倍,但某些融合物的活性却比IL-Ra低100-500倍。研究人员还将IL-Ra与聚乙二醇(PEG)融合成聚乙二醇化IL-Ra并延长其半衰期。聚乙二醇化后,IL-Ra-PEG与IL-1受体的结合活性显著降低。尽管对IL-Ra结构的改变已成功改善了IL-Ra的半衰期,但IL-Ra结构的改变和对IL-1受体结合的干扰可能会限制其在临床中的使用。除了将IL-Ra与其他分子融合外,研究人员还试图通过将IL-Ra包裹在聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球中来持续且局部化地递送IL-Ra。在BALB/c小鼠中通过皮下注射给予PLGA微球时,血清IL-Ra的水平持续升高8天,这与皮下团注的IL-Ra相比是显著增加,后者在24小时后未检测到IL-Ra。然而,在同一项研究中,还表明在包封过程中IL-Ra的生物活性受到极大损害,据估计,只有6%的被包埋的IL-Ra保留了生物学活性。由于严苛的加工环境,封装所需的溶剂的使用以及密集的蛋白质堆积引起的蛋白质聚集,聚合物微球的封装通常不利于蛋白质的生物活性。

[0012] 延长具有短半衰期的活性剂的益处的策略已经导致活性降低和/或需要更高的剂量。因此,需要能够提供生物活性分子的持续递送和/或局部递送的替代递送系统。

### [0013] 发明简述

[0014] 一方面,本发明涉及用于提供活性剂的制剂。所述制剂包含载体,其中所述载体包含至少第一种活性剂;和包括矿物质涂层的矿物质涂覆微粒;和至少第二种活性剂。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被掺入所述矿物质中。在一个实施方案中,所述第二种活性剂既被吸附到所述矿物质又被掺入所述矿物质中。

[0015] 在一方面,本发明涉及用于提供活性剂的制剂。该制剂包括载体,其中所述载体包括矿物质涂覆微粒,该微粒包含吸附到所述矿物的活性剂。

[0016] 在一方面,本发明涉及用于可持续递送活性剂的制剂。该制剂包括具有第一种活性剂的溶液;和与第一种活性剂一起添加到溶液中的矿物质涂覆微粒。在一个实施方案中,所述活性剂在添加到包含第一种活性剂的溶液中时吸附到所述矿物质涂覆微粒。在另一个实施方案中,将第二种活性剂掺入所述矿物质涂覆微粒,然后将矿物质涂覆微粒添加到第一种活性剂的溶液中。

[0017] 在一个方面,本发明涉及一种包含活性剂的矿物质涂覆微粒。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被掺入所述矿物质中。在一个实施方案中,所述第二种活性剂既被吸附到所述矿物质又被掺入所述矿物质中。

[0018] 在一个方面,本发明涉及一种矿物质涂覆微粒,该矿物质涂覆微粒包括层状矿物质涂层和吸附在矿物质涂层的至少一层上的至少一种活性剂。

[0019] 在一个方面,本发明涉及一种用于立即和持续递送活性剂的方法。该方法包括向有需要的个体提供制剂,该制剂包含含有至少第一种活性剂的载体;和包含矿物质涂层的矿物质涂覆微粒;和至少第二种活性剂。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被掺入所述矿物质中。在一个实施方案中,所述第二种活性剂既被吸附到所述矿物质又被掺入矿物质中。

[0020] 在一个方面,本发明涉及一种用于在有此需要的受试者中治疗炎性疾病的方法。该方法包括向所述受试者施用制剂,其中所述制剂包含含有至少第一种活性剂的载体;和包含矿物质涂层的矿物质涂覆微粒;和至少第二种活性剂。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被吸附到所述矿物质。在一个实施方案中,所述第二种活性剂被掺入所述矿物质中。在一个实施方案中,所述第二种活性剂既被吸附到所述矿物质又被掺入所述矿物质中。

[0021] 在另一方面,本发明内容涉及一种在有需要的受试者中治疗手术后炎症的方法。该方法包括向受试者施用制剂,其中所述制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体,其中所述矿物质涂覆微粒含有活性剂。

#### [0022] 附图简述

[0023] 图1A是低倍率SEM,其显示了在4.2mM(低)碳酸盐改性的模拟体液(mSBF)中形成的矿物质涂覆微粒的板状形态。图1B是高倍率SEM,其显示了在4.2mM(低)碳酸盐mSBF中形成的矿物质涂覆微粒的板状形态。图1C是低倍率SEM,其显示了在25mM(中)碳酸盐mSBF中形成的矿物质涂覆微粒的球晶状形态。图1D是高倍率SEM,其显示了在25mM(中)碳酸盐mSBF中形成的矿物质涂覆微粒的球晶状形态。图1E是低倍率SEM,其显示了在100mM(高)碳酸盐mSBF中形成的矿物质涂覆微粒的球晶状形态。图1F是高倍率SEM,其显示了在100mM(高)碳酸盐mSBF中形成的矿物质涂覆微粒的球晶状形态。图1G图示了由用低 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(●)、中 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(▲)和高 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(▼)形成的矿物质涂覆微粒的钙释放。图1H图示了BMP-2与用低 $\text{HCO}_3^-$ mSBF,中 $\text{HCO}_3^-$ mSBF和高 $\text{HCO}_3^-$ mSBF形成的矿物质涂覆微粒的结合。图1I图示了由用低 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(■)、中 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(●)和高 $\text{HCO}_3^-$ mSBF(▲)形成的矿物质涂覆微粒释放BMP-2。

[0024] 图2A图示了IL-Ra与矿物质涂覆微粒的不同制剂(例如,高碳酸盐微粒和低碳酸盐微粒)和在温育溶液中不同浓度的活性剂的结合。

[0025] 图2B图示了温育溶液中高碳酸盐微粒和低碳酸盐微粒与不同浓度的活性剂的IL-Ra结合效率。

[0026] 图3图示了矿物质涂覆微粒在7天内持续释放IL-Ra。

[0027] 图4A图示了从矿物质涂覆微粒释放的IL-Ra具有活性并抑制IL-1刺激的巨噬细胞产生IL-6。示出与4.2mM含IL-Ra的矿物质涂覆微粒、100mM含IL-Ra的矿物质涂覆微粒、可溶性IL-Ra、未负载的微粒和无IL-Ra温育12小时的巨噬细胞在用IL-1刺激后产生的IL-6的培养基浓度。

[0028] 图4B图示了从矿物质涂覆微粒释放的IL-Ra具有活性并抑制IL-1刺激的巨噬细胞产生IL-6。示出与4.2mM含有IL-Ra的矿物质涂覆微粒、100mM含有IL-Ra的矿物质涂覆微粒、可溶性IL-Ra、未负载的微粒以及无IL-Ra温育24小时的巨噬细胞在用IL-1刺激后产生的IL-6的培养基浓度。

[0029] 图5图示了当小鼠接受单次皮下注射PBS、未负载的微粒、可溶性IL-Ra、或IL-Ra微粒(在可溶性IL-Ra中温育的MP)时对IL-1诱导的体内IL-6产生的抑制。

[0030] 图6图示了从微粒释放的IL-Ra减少IL-1诱导的小鼠T淋巴细胞增殖的生物学活性。

[0031] 图7是大鼠MCL愈合的时间图,其由3个重叠阶段组成:炎性阶段,增殖阶段和重塑阶段。炎性阶段从损伤之日持续到损伤后的第5天,在此阶段炎性细胞浸润韧带并且IL-1水平升高。

[0032] 图8A是磁共振图像(MRI),其使用T2加权MRI显示了肌内注射的SPIO标记的矿物质涂覆微粒的不同浓度,证明了低强度面积随着微粒浓度的降低而下降。

[0033] 图8B是磁共振图像(MRI),显示了在损伤后进行注射时在愈合期大鼠MCL中SPIO标记的MCM。

[0034] 图8C是磁共振图像(MRI),显示出注射后MCM在MCL中保持局部化至少15天。

[0035] 图9A图示了在损伤后7天,肉芽组织中MCM对M1巨噬细胞的上调,而在损伤后14天不引起慢性炎症。

[0036] 图9B是光学显微照片,其显示注射后7天MCM在MCL中如钙的茜素红染色所示保持局部化,但不影响韧带结构或引起额外的水肿。

[0037] 图9C是光学显微照片,显示在注射后21天MCM不再存在于MCL中并且对韧带形态或组织钙化没有显示影响。

[0038] 图10A-10D显示了可以调节结合至MP的IL-Ra的量,并且MP以持续的方式释放IL-Ra。图10A是IL-Ra制备的示意图,其包括向包含IL-Ra的溶液中添加微粒,然后温育1小时。图10B描绘了当在负载期间在降低的IL-Ra浓度中温育时,每mg MP结合的IL-Ra的量降低。图10C描绘了在加载期间中,IL-Ra与MP的结合效率随着IL-Ra浓度的降低而增加。图10D示出在14天中模拟体液中IL-Ra从MP的累积释放显示持续释放至少14天。数据代表平均值+标准误。

[0039] 图11A-11E描绘了从MP释放的IL-Ra在体外具有生物活性。图11A显示了用IL-1处理D10.G4.1小鼠T淋巴细胞后,细胞浓度增加,并且未负载的MP不影响IL-1诱导的细胞浓度增加。图11B显示,与用可溶性IL-Ra或PBS处理的细胞相比,IL-1Ra MP在IL-1刺激D10.G4.1小鼠T淋巴细胞后细胞浓度显著降低。图11C描绘了与IL-Ra MP相比,用可溶性IL-Ra处理的培养基中的D10.G4.1小鼠T淋巴细胞培养基中IL-Ra的浓度显著更高,并且在PBS处理的培养基中无法检测到。图11D是在跨孔(transwell)细胞培养系统中具有未负载的MP或IL-Ra MP的THP-1培养的示意图。处理6小时后,将IL-1加入培养基中。图11E描绘了与未负载MP相比,用IL-Ra MP处理显著降低了处理后18和30小时IL-6在IL-1刺激的THP-1细胞培养物中的培养基浓度。数据代表平均值±标准差。不同字母表示组之间的显著差异(ANOVA, p<0.05),\*表示比较处理之间的显著差异(Student T-Test, p<0.05)。

[0040] 图12A-12C图示出IL-Ra MP增加IL-Ra的血清浓度持续14天并抑制IL-1体内活性。

图12A是IL-Ra MP体内治疗的示意图,其涉及向IL-Ra溶液中添加微粒,然后将其注射。图12B图示出在治疗后1、3、5、7和14天收集的血清中IL-Ra的浓度保持升高14天。图12C显示血清IL-6相对于在IL-1刺激2小时后收集的PBS处理动物中IL-6的血清浓度进行标准化。低于1的值表示IL-1诱导的血清IL-6降低。不同字母表示组之间的显著差异( $p<0.05$ ) ;\*代表治疗与PBS对照之间的显著差异( $p<0.05$ ) 。N.D.表示不可检测。

[0041] 图13A-13E描绘了IL-Ra涂层的MP结合更多的IL-Ra,以较慢的速率释放IL-Ra,具有较低的爆发释放,并且在延长的持续时间中抑制体内IL-1活性。图13A是层状IL-Ra MP制造的示意图。图13B显示了层状IL-Ra MP与IL-Ra MP相比,每mg MP结合更多的IL-Ra。图13C显示,与IL-Ra MP相比,层状IL-Ra MP在1天后释放了较低百分比的负载的IL-Ra,并且以持续方式释放IL-Ra至少14天。图13D显示了层状IL-Ra MP将血清IL-Ra升高至上述可检测水平达10天。图13E显示在IL-1刺激至少14天后,与PBS对照相比,层状IL-Ra MP降低了血清IL-6浓度。

[0042] 图14A-14C描绘了微粒涂层的形成和IL-Ra负载。图14A示出了在较低(顶部)和较高(底部)放大率下的未涂覆的B-TCP核材料的SEM。图14B显示了在较低(顶部)和较高(底部)放大率下在mSBF中涂覆7天后的微粒的SEM。图14C是微粒涂层形成和IL-Ra负载的示意图。

[0043] 图15A-15C描绘了微粒对IL-Ra的局部递送。图15A描绘了均质化的MCL中IL-Ra的组织浓度。图15B描绘了IL-Ra的血清浓度。图15C描绘了在治疗后7和14天的MCL内MP的茜素红染色。图代表平均值±标准误,\*代表可溶性IL-Ra和IL-Ra MP之间的 $p<0.05$ ,\*\*代表第7天IL-Ra MP和第14天IL-Ra MP之间 $p<0.05$ ,ND代表“不可检出”。

[0044] 图16A-16C描绘了IL-Ra MP的抗炎活性。图16A描绘了损伤后7天(深色条)和14天(浅色条)的MCL肉芽组织内的M1巨噬细胞浓度。图代表平均值±标准误,\*代表与PBS处理的对照相比 $p<0.05$ 。图16B描绘了损伤后7天和14天,MCL肉芽组织内的ED1染色的M1巨噬细胞(棕色)。比例尺代表100μm。图16C描绘了损伤后7天和14天在未负载MP和IL-Ra MP周围的ED1染色的M1巨噬细胞。比例尺代表20μm。

[0045] 图17A和17B描绘了MCL内的局部炎性蛋白浓度。图17A描绘了IL-1α的浓度,图17A描绘了IL-1α的浓度。图17B描绘了治疗后7和14天相对于总蛋白浓度标准化的IL-1β浓度。图表示平均值±标准误,\*表示 $p<0.05$ ,而#表示所示组之间的 $p<0.15$ 。

[0046] 图18A-18C描绘了对微粒的体内反应。图18A描绘了损伤后7天和14天的MCL切片的H&E染色。比例尺代表500μm。图18B描绘了损伤后7天和14天肉芽组织内的T淋巴细胞浓度。图代表平均值±标准误,\*代表所示组之间的 $p<0.05$ 。图18C描绘了微粒周围的组织的H&E染色。比例尺代表100μm。

#### [0047] 发明详述

[0048] 本发明涉及用于提供活性剂的制剂。在一些实施方案中,制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体,其中活性剂吸附到矿物质涂层。在一些实施方案中,制剂包括包含活性剂的载体和矿物质涂覆微粒,其中将活性剂掺入矿物质涂层中。在一些实施方案中,制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体,其中活性剂被掺入矿物质涂层中,并且活性剂被吸附到矿物质涂层。所述载体中包含的活性剂在给药后提供快速作用,而吸附到矿物质涂层的活性剂和/或掺入矿物质涂层中的活性剂随着矿物质涂层的降解而提供持续的递

送。还公开了持续释放活性剂的方法和使用提供持续释放活性剂的制剂治疗炎性疾病的方法。

[0049] 一方面，本发明涉及用于提供活性剂的制剂。

[0050] 在一个实施方案中，所述制剂包含载体，其中所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中所述矿物质涂覆微粒包括核；所述核上的矿物质涂层；以及吸附到矿物质涂层的活性剂。

[0051] 在一个实施方案中，所述制剂包含载体，其中所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中所述矿物质涂覆微粒包括核；所述核上的矿物质涂层；和所述矿物质涂层中的活性剂。

[0052] 在一个实施方案中，所述制剂包含载体，其中所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中所述矿物质涂覆微粒包括核；所述核上的矿物质涂层；所述矿物质涂层中的至少一种活性剂和吸附到所述矿物质涂层的至少一种活性剂。

[0053] 在一个实施方案中，所述制剂包含载体，其中所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中所述矿物质涂覆微粒包括核，在所述核上的第一层矿物质涂层，吸附到第一层矿物质涂层的活性剂，第二层矿物质涂层和吸附到第二层矿物质涂层的第二种活性剂。

[0054] 在一个实施方案中，所述制剂包含载体，其中所述载体包含活性剂和矿物质涂覆微粒，其中矿物质涂覆微粒包括核，多层矿物质涂层，和活性剂。如本文所述矿物质涂层的层可以是相同的涂层配方。如本文所述矿物质涂层的层也可以是不同的涂层制剂。如本文所述制备每层矿物质涂层之后，可以将所述活性剂吸附到矿物质涂层的层上。如本文所述，可在矿物质形成期间将所述活性剂掺入矿物质涂层的层中。如本文所述所述的活性剂可以是相同的活性剂。如本文所述的活性剂可以是不同的活性剂。

[0055] 如本文所用，术语制剂通常表示有益剂和矿物质包衣的微粒被配制，混合，添加，溶解，悬浮，增溶，配制成溶液，以肠胃外给药可接受的物理化学形式在流体中或由流体携带和/或类似方式。

[0056] 在一个实施方案中，所述吸附到矿物质涂层的活性剂与载体中的活性剂相同。在另一个实施方案中，所述吸附到矿物质涂层的活性剂不同于载体中的活性剂。在另一方面，至少两种不同的活性剂被吸附到矿物质涂层。预期的实施方案还包括吸附到矿物质涂层的3、4、5或更多种不同活性剂。在一实施方案中，所述掺入矿物质涂层中的活性剂与载体中的活性剂相同。在另一个实施方案中，所述掺入矿物质涂层中的活性剂不同于载体中的活性剂。在另一方面，将至少两种不同的活性剂掺入矿物质涂层中。预期的实施方案还包括将3、4、5或更多种不同的活性剂掺入矿物质涂层中。在另一方面，可以将活性剂掺入矿物质涂层中与将活性剂吸附到矿物质涂层的进行组合。制剂包括在载体溶液中的3、4、5或更多种不同的活性剂。

[0057] 特别合适的活性剂可以是IL-1拮抗剂；IL-1受体拮抗剂；阿巴西普；利妥昔单抗；托珠单抗；阿那白滞素；阿达木单抗；依那西普；英夫利昔单抗；塞妥珠单抗；戈利木单抗；及其组合。特别合适的IL-1拮抗剂是重组IL-1拮抗剂。阿巴西普(Abatacept)是一种融合蛋白，由CTLA-4的胞外域与IgG1的铰链、CH2和CH3域组成，目前被批准用于类风湿关节炎人群。利妥昔单抗是针对CD20的单克隆抗体，该CD20主要存在于免疫系统B细胞的表面，用于治疗自身免疫性疾病和癌症类型。利妥昔单抗也已获批准与甲氨蝶呤(MTX)组合使用，以减

轻中度至重度活动性类风湿关节炎(RA)的成年患者的体征和症状。托珠单抗(Tocilizumab)是一种免疫抑制药物,主要用于治疗类风湿关节炎(RA)和系统性幼年特发性关节炎,这是儿童的一种严重形式的关节炎。它是针对白介素6受体(IL-6R)的人源化单克隆抗体。阿那白滞素(Anakinra)是白介素1(IL1)受体拮抗剂,用于治疗类风湿关节炎。阿达木单抗是一种TNF抑制性抗炎单克隆抗体,用于治疗类风湿性关节炎,银屑病关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病,溃疡性结肠炎,慢性牛皮癣,化脓性汗腺炎和青少年特发性关节炎。依那西普(Etanercept)是TNF受体和IgG1抗体恒定端的融合蛋白,可抑制TNF,可用于治疗类风湿性关节炎,青少年类风湿性关节炎和牛皮癣性关节炎,斑块状牛皮癣和强直性脊柱炎。英夫利昔单抗是一种与TNF- $\alpha$ 结合的嵌合单克隆抗体,用于治疗克罗恩氏病,溃疡性结肠炎,牛皮癣,银屑病关节炎,强直性脊柱炎和类风湿性关节炎。塞妥珠单抗(Certolizumab)(和Certolizumab pegol,人源化TNF抑制剂单克隆抗体的PEG化Fab'片段)是特异性针对肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的单克隆抗体的片段,用于治疗克罗恩氏病,类风湿性关节炎,银屑病关节炎和强直性脊柱炎。戈利木单抗(Golimumab)是靶向肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF-alpha)的人单克隆抗体,因此是TNF抑制剂,用于治疗类风湿性关节炎,银屑病关节炎,强直性脊柱炎和溃疡性结肠炎。

[0058] 其他合适的活性剂可以是细胞因子IL-1家族的拮抗剂。IL-1家族是11种细胞因子的组,可诱导促炎性细胞因子的复杂网络并调节和引发炎症反应。这11种细胞因子包括IL-1 $\alpha$ (IL-1F1),IL1b(IL-1F2),IL-Ra(IL-1F3),IL-18(IL-1F4),IL-36Ra(IL-1F5),IL-36 $\alpha$ (IL-1F6),IL-37(IL-1F7),IL-36 $\beta$ (IL-1F8),IL36 $\gamma$ (IL-1F9),IL-38(IL-1F10)和IL-33(IL-1F11)。

[0059] 其他合适的活性剂可以是白介素-1受体(IL-1R)家族的拮抗剂。IL-1R受体家族的特征是细胞外免疫球蛋白样结构域和细胞内Toll/白介素-1R(TIR)结构域。它是一组结构同源的蛋白质,见于从植物到哺乳动物的所有物种中,在所有物种中都是保守的。IL-1R参与免疫宿主防御和造血作用。I型IL-1R(IL-1RI)(也称为CD121a)是IL-1 $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 和IL-RA的受体。IL-1R家族成员包括IL-1R1,IL-18Ra,IL-Rrp2和ST2。IL-1RII主要在淋巴样和髓样细胞上表达。IL-1RII是能够结合IL-1 $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 和IL-1RI的表面受体,并且还形成可溶性形式的sIL-1RII。

[0060] 当包含在载体中的未结合的活性剂和吸附于矿物质涂覆微粒的活性剂配制成一种制剂时所具有的作用曲线与当未结合的活性剂和吸附在矿物质涂覆微粒的活性剂在分开的制剂中给药时的作用曲线是相同或基本相同的。因此,未结合的活性剂作为药团结给药(bolus administration)具有快速或即刻型作用曲线,而结合的活性剂(吸附到矿物质涂覆微粒)则具有持续释放作用曲线。

[0061] 如本文所用,有效量,治疗有效量,预防有效量和诊断有效量是给药后引起期望的生物反应所需的未结合的活性剂和吸附到矿物质涂覆微粒的活性剂的量。

[0062] 合适的载体包括水,盐水,等渗盐水,磷酸盐缓冲盐水,林格氏乳酸盐等。

[0063] 制剂还可以包括其他组分,例如表面活性剂,防腐剂和赋形剂。表面活性剂可以减少或防止所述活性剂和所述矿物质涂覆微粒的表面诱导的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。用量通常为制剂重量的约0.001%至约4%。药学上可接受的防腐剂包括,例如苯酚,邻甲酚,间甲酚,对甲酚,

对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯,2-苯氧基乙醇,对羟基苯甲酸丁酯,2-苯基乙醇,苄醇,氯丁醇,硫柳汞,溴苯酚,苯甲酸,丙二脲,氯己定,脱氢乙酸钠,氯甲酚,对羟基苯甲酸乙酯,苄索氯铵,氯苯磺酸(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)及其混合物。防腐剂可以约0.1mg/ml至约20mg/ml的浓度存在,包括约0.1mg/ml至约10mg/ml。在药物组合物中使用防腐剂是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见,参考《雷明顿:药学的科学和实践》,1995年第19版。制剂可以包括合适的缓冲液,例如乙酸钠,甘氨酰甘氨酸,HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)和磷酸钠。赋形剂包括通常在药物制剂制备中使用的用于张力调节的组分,抗氧化剂和稳定剂。其他非活性成分包括,例如,L-组氨酸,L-组氨酸一盐酸盐一水合物,山梨糖醇,聚山梨酯80,柠檬酸钠,氯化钠和EDTA二钠。

[0064] 可以将任何合适的材料用作在其上形成矿物质涂层的核。特别合适的核材料(core material)是已知对人和动物无毒的那些材料。特别合适的核材料还包括已知能在人和动物中降解和/或溶解的那些材料。合适的核材料包括 $\beta$ -磷酸三钙,羟基磷灰石,PLGA及其组合。 $\beta$ -磷酸三钙核特别适用,因为 $\beta$ -磷酸三钙可降解。在其他实施方案中,可以在形成矿物质涂层之后溶解核的材料。在其他实施方案中,所述核的材料是不可降解的。

[0065] 矿物质涂层包括钙,磷酸盐,碳酸盐及其组合。为了制备矿物质涂覆微粒,将核材料在改良的模拟体液中温育。改性的模拟体液包括钙和磷酸盐,它们在核的表面形成矿物质涂层,从而形成矿物质涂覆微粒。通过改变钙,磷酸盐和碳酸盐的含量和比例可以实现不同的矿物质涂层形态。不同的矿物质涂层形态包括例如板状结构,球晶状结构。高碳酸盐浓度导致具有板状结构的矿物质涂层。低碳酸盐浓度导致具有球晶状结构的矿物质涂层。矿物质涂层的形态也影响活性剂的吸附。

[0066] 在其上形成矿物质涂层的合适的核材料包括聚合物,陶瓷,金属,玻璃及其颗粒形式的组合。合适的颗粒可以是例如琼脂糖珠,乳胶珠,磁性珠,聚合物珠,陶瓷珠,金属珠(包括磁性金属珠),玻璃珠及其组合。所述微粒包括陶瓷(例如羟基磷灰石, $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP, $\beta$ -TCP),磁铁矿,钕),塑料(例如聚苯乙烯,聚己内酯),水凝胶(例如聚乙二醇;聚乳酸-羟基乙酸共聚物),以及类似物质,及其组合。特别合适的核材料是在体内可溶解的那些,例如 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP, $\beta$ -TCP)。

[0067] 合适的微粒尺寸的直径范围可以是约1 $\mu\text{m}$ 至约100 $\mu\text{m}$ 。可以通过本领域技术人员已知的方法来测量微粒直径诸如,例如,从显微图像(包括光和电子显微图像)测量,通过尺寸选择基板的过滤,等等诸如此。

[0068] 核的基底可以例如首先涂覆聚( $\alpha$ -羟基酯)膜。特别合适的聚( $\alpha$ -羟基酯)可以是例如聚(L-丙交酯),聚(丙交酯-共-乙交酯),聚( $\epsilon$ -己内酯)及其组合。应该理解的是,当制备以上膜的任何组合时,通常将膜在本领域已知的合适的有机溶剂中混合。此外,在本领域中也应考虑并理解分子量,结晶速率,玻璃化转变温度,粘度等的差异,以防止相分离和最终基材缺乏均匀性。通过改变基材中使用的膜的混合比例,可以进一步避免相分离和不均匀性。

[0069] 在基底上制备聚( $\alpha$ -羟基酯)膜之后,在碱性条件下将膜涂层的表面水解以产生具有COOH和OH基团的表面。表面水解后,将所述底物在包含合适的矿物质形成材料的模拟体液中温育,以形成矿物质涂层。合适的矿物形成材料可以是例如钙,磷酸盐,碳酸盐及其组合。

[0070] 用于本发明内容的方法的模拟体液(SBF)通常包含约5mM至约12.5mM钙离子,包括约7mM至约10mM钙离子,并且包括约8.75mM钙离子;从约2mM至约12.5mM磷酸根离子,包括从约2.5mM至约7mM磷酸根离子,和包括从约3.5mM至约5mM磷酸根离子;和约4mM至约100mM碳酸根离子。

[0071] 在一些实施例中,SBF可包括约141mM氯化钠,约4mM氯化钾,约0.5mM硫酸镁,约1mM氯化镁,约5mM氯化钙,约2mM磷酸钾和约4mM碳酸氢钠,并缓冲至约6.8的pH。

[0072] 在一些实施例中,SBF可进一步包含约145mM的钠离子,约6mM至约9mM的钾离子,约1.5mM的镁离子,约150mM至约175mM的氯离子,约4mM的 $\text{HCO}_3^-$ 和约0.5mM的 $\text{SO}_4^{2-}$ 离子。

[0073] SBF的pH通常可以在约4至约7.5的范围内,包括约5.3至约6.8,包括约5.7至约6.2,并且包括约5.8至约6.1。

[0074] 合适的SBF可以包括例如:约145mM钠离子,约6mM到约9mM钾离子,约5mM到约12.5mM钙离子,约1.5mM镁离子,约150mM到约175mM氯离子,约4.2mM  $\text{HCO}_3^-$ ,约2mM至约5mM  $\text{HPO}_4^{2-}$ 离子和约0.5mM  $\text{SO}_4^{2-}$ 离子。模拟体液的pH可为约5.3至约7.5,包括约6至约6.8。

[0075] 在一个实施方案中,SBF可以包括例如:约145mM钠离子,约6mM至约17mM钾离子,约5mM至约12.5mM钙离子,约1.5mM镁离子,约150mM至约175mM氯离子,约4.2mM至约100mM  $\text{HCO}_3^-$ ,约2mM至约12.5mM磷酸根离子和约0.5mM  $\text{SO}_4^{2-}$ 离子。模拟体液的pH可以为约5.3至约7.5,包括约5.3至约6.8。

[0076] 在另一个实施方案中,SBF包括:约145mM钠离子,约6mM至约9mM钾离子,约5mM至约12.5mM钙离子,约1.5mM镁离子,约60mM至约175mM氯离子,约4.2mM至约100mM  $\text{HCO}_3^-$ ,约2mM至约5mM磷酸根离子,约0.5mM  $\text{SO}_4^{2-}$ 离子,且pH值为约5.8至约6.8,包括约6.2至约6.8。

[0077] 在另一个实施方案中,SBF包括:约145mM钠离子,约9mM钾离子,约12.5mM钙离子,约1.5mM镁离子,约172mM氯离子,约4.2mM的 $\text{HCO}_3^-$ ,约5mM至约12.5mM磷酸根离子,约0.5mM的 $\text{SO}_4^{2-}$ 离子,约4mM至约100mM  $\text{CO}_3^{2-}$ 和pH值为约5.3至约6.0。

[0078] 在包括层状矿物质涂层的实施方案中,将核在改良的(modified)模拟体液的制剂中温育。在几分钟到几天的潜伏期中在核上形成矿物质涂层的层。在核上形成矿物质涂层的初始层之后,可以从改良的模拟体液中去除矿物质涂层的微粒并进行清洗。为了形成多层矿物质涂层,将矿物质涂覆微粒在第二,第三,第四等改良的模拟体液中温育,直到获得所需数目的矿物质涂层。在每个温育期间,在前一层上会形成一层新的矿物质涂层。重复这些步骤,直到获得所需的矿物质涂层层数为止。

[0079] 在矿物质形成期间,可以将活性剂包括在改性的模拟体液中,以在矿物质形成期间将活性剂掺入矿物质涂层中。在形成每一层矿物之后,将所述矿物质涂覆微粒在包含至少一种活性剂的载体中温育,以将所述活性剂吸附到所述矿物质涂层上。在将活性剂掺入矿物质涂层的层中和/或将活性剂吸附到矿物质涂层的层之后,可以通过将微粒在改性的模拟体液的另一种制剂中温育来形成另一层矿物质涂层。如果需要,所述矿物质涂层的层可以在矿物中掺入活性剂,各层可以具有吸附到矿物层上的活性剂,可以在不掺入活性剂或不吸附活性剂的情况下形成矿物质涂层的层,及其组合它们。可以通过以下方式来制备具有不同层次的矿物质涂层的矿物质涂覆微粒:使用一种改良的模拟体液制剂形成一层矿物质,然后在另一种改良的模拟体液制剂中温育矿物质涂覆微粒。因此,可以将矿物质涂覆微粒制备为具有多层矿物质涂层,其中每一层都是不同的。还考虑了包括相同的两层或多

层矿物质涂层与不同的一层或多层矿物质涂层组合的实施方案。

[0080] 在不同层中规定矿物质涂层的组成有利地允许一种或多种活性剂从矿物质涂层的每一层的规定的释放动力学。

[0081] 在需要在矿物质涂层内掺入一种或多种活性剂的实施方案中,所述活性剂包括在SBF中。当形成矿物质时,所述活性剂掺入矿物质涂层。

[0082] 在其他实施例中,磁性材料可以掺入到矿物质涂层中。例如,可以将与牛血清白蛋白连接的超顺磁性氧化铁掺入矿物质涂层中。连接的蛋白质(例如牛血清白蛋白)可吸附到矿物质涂层上以将磁性材料与矿物质涂层结合。

[0083] 在一些实施方案中,所述矿物质涂层还包括掺杂剂。合适的掺杂剂包括卤素离子,例如氟离子,氯离子,溴离子和碘离子。可以将掺杂剂加入SBF的其他组分中,然后将底物在SBF中温育以形成矿物质涂层。

[0084] 在一个实施方式中,所述卤素离子包括氟离子。合适的氟离子可以由含氟离子的试剂提供,所述含氟离子的试剂例如水溶性氟盐,包括例如碱和铵氟化物盐。

[0085] 所述含氟离子的试剂通常包含在SBF中,以提供达100mM的量的氟离子,包括约0.001mM至100mM,包括约0.01mM至约50mM,包括约0.1mM至约15mM,并包括约1mM氟离子。

[0086] 已经发现,在SBF中包含一种或多种掺杂剂导致形成卤素掺杂的矿物质涂层,其显著增强了生物分子向细胞的递送效率。

[0087] 在其他实施方案中,包括磁铁矿,掺杂磁铁矿的塑料和钕的磁性材料被用作微粒核材料。包括磁性材料导致MCM的形成,从而能够通过施加磁力来进行MCM的定位和/或移动/定位。磁性微粒核材料的替代使用可以对在培养系统中发生生物分子传递的位置进行空间控制,例如在分析生物分子对细胞的影响时。

[0088] 矿物质涂层可以通过在约37°C的温度将基板与SBF一起温育约3天至约10天的时间来形成。

[0089] 在完成矿物质涂层的制备之后,可以分析矿物质涂层以确定矿物质涂层的形态和组成。矿物质涂层的组成可以通过能量色散X射线光谱法,傅立叶变换红外光谱法,X射线衍射法及其组合来分析。合适的X射线衍射峰可以在例如26°和31°处,分别对应于羟基磷灰石矿物相的(0 0 2)平面,(2 1 1)平面,(1 1 2)平面和(2 0 2)平面。特别合适的X射线衍射峰可以在例如26°和31°处,分别对应于碳酸盐取代的羟基磷灰石的(0 0 2)平面,(1 1 2)平面和(3 0 0)平面。其他合适的X射线衍射峰可以是例如在16°、24°和33°处,其对应于磷酸八钙矿物相。通过傅立叶变换红外光谱分析获得的合适光谱可以是例如在450–600cm<sup>-1</sup>处的峰,其对应于O-P-O弯曲,以及在900–1200cm<sup>-1</sup>处的峰,其对应于非对称P-O延长以及羟基磷灰石PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>基团。通过傅里叶变换红外光谱分析获得的特别合适的光谱峰可以是例如在876cm<sup>-1</sup>、1427cm<sup>-1</sup>和1483cm<sup>-1</sup>处的峰,其对应于碳酸盐(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)基团。HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的峰可通过调节用于制备矿物质涂层的SBF的钙和磷酸根离子浓度来影响。例如,可以通过增加SBF的钙和磷酸盐浓度来增加HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>峰。或者,可以通过降低SBF的钙和磷酸盐浓度来降低HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>峰。通过傅立叶变换红外光谱分析获得的另一个合适的峰可以是,例如,磷酸八钙矿物相在1075cm<sup>-1</sup>处获得的峰,该峰可以通过调整用于制备矿物质涂层的模拟体液中的钙和磷酸盐离子浓度来影响。例如,通过增加用于制备矿物质涂层的模拟体液中的钙离子和磷酸根离子浓度,可以使1075cm<sup>-1</sup>峰更清晰。或者,可通过降低用于制备矿物质涂层的模拟体液中的钙离子和磷

酸根离子浓度,使 $1075\text{cm}^{-1}$ 峰的清晰度降低。

[0090] 能量色散X射线光谱分析也可以用于确定矿物质涂层的钙/磷酸盐比。例如,可以通过降低SBF中的钙和磷酸根离子浓度来增加钙/磷酸根比例。或者,可以通过增加SBF中的钙和磷酸根离子浓度来降低钙/磷酸根比例。通过能量色散X射线光谱分析矿物质涂层,可以确定碳酸盐( $\text{CO}_3^{2-}$ )取代 $\text{PO}_4^{3-}$ 的水平以及将 $\text{HPO}_4^{2-}$ 掺入矿物质涂层中的程度。通常,SBF包括钙和磷酸根离子,其比例为约10:1至约0.2:1,包括约2.5:1至约1:1。

[0091] 此外,矿物质涂层的形态可以通过例如扫描电子显微镜分析。扫描电子显微镜可用于可视化所得矿物质涂层的形态。所得的矿物质涂层的形态可以是例如球状的微结构,板状的微结构和/或网状的微结构。球状微结构的球晶的合适的平均直径可以在例如约 $2\mu\text{m}$ 至约 $42\mu\text{m}$ 的范围内。球状微结构的球晶的特别合适的平均直径可以在例如约 $2\mu\text{m}$ 至约 $4\mu\text{m}$ 的范围内。在另一个实施方案中,球状微结构的球晶的特别合适的平均直径可以在例如约 $2.5\mu\text{m}$ 至约 $4.5\mu\text{m}$ 的范围内。在另一个实施方案中,球状微结构的球晶的特别合适的平均直径可以在例如约 $16\mu\text{m}$ 至约 $42\mu\text{m}$ 的范围内。

[0092] 矿物质涂覆微粒可被保存以供以后使用,洗涤并被保存以供以后使用,被洗涤并立即用于吸附步骤,或不经洗涤而立即用于吸附步骤。

[0093] 为了将活性剂吸附到矿物质涂覆微粒上,使矿物质涂覆微粒与含有活性剂的溶液接触。如本文所用,“活性剂”是指生物活性材料。可以使用本领域已知的任何方法使活性剂与矿物质涂覆微粒接触。例如,可以将活性剂的溶液移液,倾倒或喷雾到矿物质涂覆微粒上。或者,可以将矿物质涂覆微粒浸入包含活性剂的溶液中。所述活性剂通过活性剂与矿物质涂覆微粒的矿物质涂层之间的静电相互作用吸附到矿物质涂层上。合适的活性剂包括生物分子。特别合适的活性剂包括白介素-1(IL-1; IL1F1)拮抗剂;和IL-1F2拮抗剂;IL-1F3拮抗剂;IL-1F4拮抗剂;IL-1F5拮抗剂;IL-1F6拮抗剂;IL-1F7拮抗剂;IL-1F8拮抗剂;IL-1F9拮抗剂;IL-1F10拮抗剂;IL-1F11拮抗剂;阿巴西普;利妥昔单抗;托珠单抗;阿那白滞素;阿达木单抗;依那西普;英夫利昔单抗;塞妥珠单抗;戈利木单抗;及其组合。具体合适的IL-1拮抗剂是IL-1受体拮抗剂(IL-Ra),其是促炎性IL-1的天然拮抗剂。具体合适的IL-Ra包括阿那白滞素(例如KINERET®),其为美国食品和药物管理局(FDA)批准的IL-Ra的重组形式,用于治疗全身性慢性炎症。

[0094] 可以通过改变矿物质成分(例如高碳酸盐和低碳酸盐微球),通过改变与活性剂一起温育的矿物质涂覆微粒的量,通过改变温育溶液中活性剂的浓度及其组合来规定矿物质涂覆微粒对活性剂的吸附。

[0095] 随着矿物质涂层的降解,吸附到矿物质涂覆微粒的矿物质涂层上的活性剂被释放。可以控制矿物降解,以使矿物质涂层可以快速或缓慢降解。矿物质涂层的溶解速率可以通过改变矿物质涂层的组成来控制。例如,具有较高碳酸盐取代度的矿物涂料降解得更快。具有较低碳酸盐取代度的矿物质涂层降解得更慢。掺入诸如氟离子的掺杂剂也可能改变溶解动力学。矿物质涂层组成的改变可以通过在涂层形成过程中改变改良模拟体液中的离子浓度来实现。具有较高碳酸盐浓度(例如100mM碳酸盐)的改良模拟体液导致涂层的降解比具有生理碳酸盐浓度(4.2mM碳酸盐)的改良模拟体液中形成的涂层降解更快。

[0096] 为了将活性剂掺入矿物质涂覆微粒内,在矿物质涂覆过程中将活性剂包括在模拟体液中。具体合适的活性剂包括白介素-1(IL-1; IL1F1)拮抗剂;和IL-1F2拮抗剂;IL-1F3拮

抗剂;IL-1F4拮抗剂;IL-1F5拮抗剂;IL-1F6拮抗剂;IL-1F7拮抗剂;IL-1F8拮抗剂;IL-1F9拮抗剂;IL-1F10拮抗剂;IL-1F11阿巴西普;利妥昔单抗;托珠单抗;阿那白滞素;阿达木单抗。依那西普;英夫利昔单抗;塞妥珠单抗;戈利木单抗;及其组合。特别合适的IL-1拮抗剂是IL-1受体拮抗剂(IL-Ra),其是促炎性IL-1的天然拮抗剂。具体合适的IL-Ra包括阿那白滞素(例如KINERET®),是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗全身性慢性炎症的IL-Ra的重组形式。

[0097] 为了在矿物质涂覆微粒的不同层上吸附活性剂,在每一层形成之后,将矿物质涂覆微粒在含有活性剂的溶液中温育。一些层可能没有吸附在表面上的活性剂。具体合适的活性剂包括白介素-1(IL-1;IL1F1)拮抗剂;和IL-1F2拮抗剂;IL-1F3拮抗剂;IL-1F4拮抗剂;IL-1F5拮抗剂;IL-1F6拮抗剂;IL-1F7拮抗剂;IL-1F8拮抗剂;IL-1F9拮抗剂;IL-1F10拮抗剂;IL-1F11阿巴西普;利妥昔单抗;托珠单抗;阿那白滞素;阿达木单抗。依那西普;英夫利昔单抗;塞妥珠单抗;戈利木单抗;及其组合。特别合适的IL-1拮抗剂是IL-1受体拮抗剂(IL-Ra),其是促炎性IL-1的天然拮抗剂。具体合适的IL-Ra包括阿那白滞素(例如KINERET®),是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗全身性慢性炎症的IL-Ra的重组形式。

[0098] 本发明的制剂可然后通过将载体添加到具有吸附到矿物质涂层上的活性剂的矿物质涂覆微粒中来制备。在一个实施方案中,可以将包含活性剂的载体添加到具有吸附到矿物质涂层上的活性剂的矿物质涂覆微粒中,以制备包括结合的活性剂(吸附到矿物质涂覆微粒上的活性剂)和未结合的活性剂的制剂。在另一个实施方案中,可以将不包含活性剂的载体加入具有吸附到所述矿物质的活性剂的矿物质涂覆微粒中,以制备包含结合的活性剂的制剂。

[0099] 在具体合适的制剂实施方案中,所述制剂包括结合的和未结合的活性剂。不受理论的束缚,据信包括注射具有结合的活性剂和未结合的活性剂的矿物质涂覆微粒的制剂允许未结合的活性剂提供即刻效果,而结合的活性剂则通过其吸附到矿物被覆的微粒上而螯合,并且当矿物质涂层降解并释放活性剂时,可提供持续的作用。

[0100] 在一个实施方案中,所述载体是药学上可接受的载体。如本领域技术人员所理解的,从与制剂的其他成分相容的意义上讲,药学上可接受的载体以及任选的其他治疗和/或预防成分必须是“可接受的”,并且不会对其接受者有害。合适的药学上可接受的载体溶液包括水,盐水,等渗盐水,磷酸盐缓冲盐水,林格氏乳酸盐等。本发明的组合物可以本身作为治疗剂,作为彼此的混合物或以药物制剂的形式施用于动物,优选施用于哺乳动物,特别是施用于人,并且作为活性成分包含有效剂量的所述活性剂,以及常规的药学上无害的赋形剂和添加剂。

[0101] 用于肠胃外给药(例如通过注射,例如大剂量注射或连续输注)的制剂可以以单位剂量形式存在于安瓿,预填充注射器,小体积输注中或在具有和不具有添加防腐剂的多剂量容器中。所述制剂可以采取诸如在油性或水性媒介物中的悬浮液,溶液或乳液的形式,并且可以包含制剂剂,例如悬浮剂,稳定剂和/或分散剂。可选地,具有活性剂的矿物质涂覆微粒可以是粉末形式,例如通过从溶液中冻干获得,在使用之前以合适的载体例如无菌、无热原的水溶解。

[0102] 在一个方面,本发明内容涉及一种矿物质涂覆微粒,其包含掺入矿物质涂层内的至少一种活性剂和吸附到矿物质涂层上的至少一种活性剂。

[0103] 如本文所公开的,为了在矿物质涂覆微粒内掺入活性剂,在矿物质涂覆过程中将活性剂包括在模拟的体液中。具体合适的活性剂包括本文所述的那些。

[0104] 如本文所述,所述活性剂可以被吸附到矿物质涂层上。如本文所述,所述活性剂也可掺入矿物质涂覆微粒的矿物内。如本文所述,所述活性剂可以进一步吸附到矿物质涂层并掺入矿物质涂覆微粒的矿物中。如本文中也描述的,不同的活性剂可以被吸附到所述矿物质涂层或掺入其中。

[0105] 在另一方面,本发明内容涉及用于即刻和持续递送活性剂的方法。该方法包括向有需要的个体提供制剂,该制剂包括载体,其中载体包含至少第一种活性剂;和矿物质涂覆微粒,其包含至少一种吸附到矿物质涂层上的第二种活性剂。

[0106] 在一个实施方案中,吸附到矿物质涂层上的活性剂与载体中的活性剂相同。在另一个实施方案中,吸附到矿物质涂层上的活性剂不同于载体中的活性剂。在另一方面,至少两种不同的活性剂被吸附到矿物质涂层。

[0107] 本发明制剂的合适的施用方法是通过肠胃外(例如,IV, IM, SC或IP)途径,并且通常施用的制剂包括有效量的产品以及可接受的稀释剂,载体和/或佐剂。标准稀释剂例如人血清白蛋白,以及标准载体例如盐水,都可考虑用于本发明的药物组合物。

[0108] 可以确定活性剂的持续递送以获得模仿活性剂的建立的治疗水平的活性剂释放值。可以预先计算出在一段时间内递送期望浓度的活性剂所需的矿物质涂覆微粒(吸附有活性剂)的质量。例如,通过获得从矿物质涂覆微粒的活性剂释放值,可以在期望的时间段内持续地递送提供期望的治疗效果的活性剂单次团注。然后,可以计算出递送所述活性剂所需的矿物质涂覆微粒的质量以提供所需时间段的治疗效果。局部且持续的递送平台提供了所述活性剂在损伤部位持续保持在治疗水平而无需多次注射的好处。

[0109] 预期有效剂量将根据所使用的一种或多种活性剂和所治疗的具体疾病、病症或病状而明显变化。由于本发明内容的制剂中包含的活性剂的快速和持续递送,预期合适的剂量小于通过团注递送(bolus injection)的活性剂的有效剂量。如本文所述,可以制备矿物质涂覆微粒以在数天的过程中递送有效量的活性剂。因此,本申请的制剂的给药提供了具有快速效应的未结合活性剂的药团结药(bolus administration)以及在矿物质涂覆微粒的矿物质涂层降解期间活性剂的持续释放使得可持续释放所述活性剂从而根据需要在数小时至数天的时间内保持效果。

[0110] 本发明的制剂可以给予有需要的受试者。如本文所用,“受试者”(也可互换地称为“个体”和“患者”)是指包括人类和非人类动物的动物。因此,本文公开的组合物,装置和方法可用于人和兽医应用,特别是人和兽医医疗应用。合适的受试者包括温血哺乳动物宿主,包括人,伴侣动物(例如狗,猫),牛,马,小鼠,大鼠,兔,灵长类和猪,优选人类患者。

[0111] 如本文所用,“需要其的受试者”(在本文中也与“需要其的患者”互换使用)是指对特定疾病,病症或病状易感或处于风险中的受试者。本文公开的方法可以用于易患炎性疾病和病症或患炎性疾病和病症的风险增加的受试者的亚组。本发明所述一些方法的实施方案涉及已鉴定受试者的特定亚组或亚类(即“需要”协助解决本文所述的一或多种特定疾病的受试者的亚组或亚类),因此对于本发明所述的某些疾病、病症或病状而言,并非所有对

象都会落入所述的受试者的亚组或亚类。

[0112] 在另一方面，本发明涉及一种在有需要的受试者中治疗炎性疾病的方法。该方法包括向受试者施用制剂，其中所述制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体，其中所述矿物质涂覆微粒包含活性剂。

[0113] 在一些实施方案中，该方法涉及全身性治疗类风湿关节炎。在一些实施方案中，该方法涉及局部性治疗骨关节炎。

[0114] 炎性疾病包括关节炎，具体是类风湿性关节炎和骨关节炎。其他合适的炎性疾病包括白介素-1相关疾病，例如2型糖尿病，自身免疫性疾病，新生儿初发多系统炎性疾病和神经性疾病（例如阿尔茨海默氏病）以及局部和急性炎性情况（例如皮肤和韧带伤口愈合）。

[0115] 所述制剂可以通过注射施用。对于骨关节炎，该制剂可以经滑膜注射。

[0116] 在一个实施方案中，吸附到矿物质涂层上的活性剂与载体中的活性剂相同。在另一个实施方案中，吸附到矿物质涂层上的活性剂不同于载体中的活性剂。在另一方面，至少两种不同的活性剂被吸附到矿物质涂层。

[0117] 本文描述了合适的活性剂。具体合适的活性剂包括白介素-1(IL-1; IL1F1)拮抗剂；和IL-1F2拮抗剂；IL-1F3拮抗剂；IL-1F4拮抗剂；IL-1F5拮抗剂；IL-1F6拮抗剂；IL-1F7拮抗剂；IL-1F8拮抗剂；IL-1F9拮抗剂；IL-1F10拮抗剂；IL-1F11阿巴西普；利妥昔单抗；托珠单抗；阿那白滞素；阿达木单抗。依那西普；英夫利昔单抗；塞妥珠单抗；戈利木单抗；及其组合。特别合适的IL-1拮抗剂是IL-1受体拮抗剂(IL-Ra)，其是促炎性IL-1的天然拮抗剂。具体合适的IL-Ra包括阿那白滞素（例如KINERET®），其是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗全身性慢性炎症的IL-Ra的重组形式。

[0118] 施用本发明制剂的合适方法是通过本文所述的肠胃外（例如，IV, IM, SC或IP）途径。

[0119] 在另一方面，本发明涉及在有此需要的受试者中治疗手术后炎症的方法。该方法包括向受试者施用制剂，其中所述制剂包括包含活性剂和矿物质涂覆微粒的载体，其中所述矿物质涂覆微粒包括活性剂。

[0120] 本文描述了合适的活性剂。具体合适的活性剂包括白介素-1(IL-1; IL1F1)拮抗剂；和IL-1F2拮抗剂；IL-1F3拮抗剂；IL-1F4拮抗剂；IL-1F5拮抗剂；IL-1F6拮抗剂；IL-1F7拮抗剂；IL-1F8拮抗剂；IL-1F9拮抗剂；IL-1F10拮抗剂；IL-1F11阿巴西普；利妥昔单抗；托珠单抗；阿那白滞素；阿达木单抗。依那西普；英夫利昔单抗；塞妥珠单抗；戈利木单抗；及其组合。特别合适的IL-1拮抗剂是IL-1受体拮抗剂(IL-Ra)，其是促炎性IL-1的天然拮抗剂。具体合适的IL-Ra包括阿那白滞素（例如KINERET®），其是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗全身性慢性炎症的IL-Ra的重组形式。

[0121] 施用本发明制剂的合适方法是通过本文所述的肠胃外（例如，IV, IM, SC或IP）途径。

## 实施例

[0122] 实施例1

[0123] 在该实施例中，确定了IL-Ra与矿物质涂覆微粒的结合。

[0124] 通过将 $\beta$ -TCP微粒在mSBF（人血清中2X钙和磷酸盐浓度）中温育7天制备矿物质涂

覆微粒(在本文中可互换地称为“MCM”和“MP”),每天更换mSBF,如Suárez-González et al. (Acta Biomater. 8 (2012)) 所描述那样。改变mSBF中的碳酸盐浓度(4.2mM或100mM)以形成具有不同涂层组成的MCM。通过在磷酸盐缓冲液(PBS)中以不同浓度的IL-Ra温育MCM来确定IL-Ra结合效率。在MCM温育之前和之后,使用BCA测量结合溶液中的IL-Ra蛋白浓度。MCM温育前后蛋白质浓度的差异用于确定与微粒结合的蛋白质的量。使用无MCM对照来确定结合期间由于蛋白质吸附到管壁上而损失的IL-Ra的量。然后将负载IL-Ra的MCM在连续旋转中于37°C的模拟体液(SBF)中温育,以确定蛋白质释放动力学。更换SBF并每天收集连续14天,并使用微量BCA测定蛋白质释放。对多个涂层制剂(各种浓度的碳酸盐)进行了初始结合和释放研究,以确定提供具有最高结合效率的IL-Ra结合和释放的矿物质涂层,以降低爆发释放,并在治疗范围内提供持续递送。结果在图2和图3中提供。

[0125] 实施例2

[0126] 在该实施例中,测定了从MCM释放的IL-Ra的生物活性。

[0127] 暴露于IL-1的小鼠D10.G4胸腺细胞将增殖并用于IL-Ra生物活性研究。胸腺细胞在含有IL-Ra负载的MCM,未负载的MCM或单独的IL-Ra药团的IL-1培养基中培养(图6)。胸腺细胞增殖通过细胞计数和细胞滴度蓝活力测定法确定。负载IL-Ra的MCM抑制IL-1诱导的胸腺细胞增殖,表明通过MCM递送的IL-Ra仍然具有生物活性。为了进一步探讨从MCM释放的IL-Ra的生物学活性,将经IL-1刺激的佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)活化的THP-1巨噬细胞与负载IL-1Ra的MCM或未负载的MCM一起培养。IL-1通过THP-1巨噬细胞诱导许多炎性细胞因子的产生,包括IL-6(图4)。使用IL-6ELISA在细胞培养上清液中测定这些细胞因子的分泌。与未负载的MCM相比,在IL-1刺激后12小时和24小时负载IL-1Ra的MCM抑制IL-1刺激的THP-1巨噬细胞产生IL-6(图4A和4B),这进一步表明从MCM释放的IL-Ra仍然具有生物活性。

[0128] 实施例3

[0129] 在该实施例中,确定了通过在IL-1Ra溶液中皮下注射负载IL-1Ra的MCM来全身递送IL-1Ra对IL-1诱导的炎症的效果。

[0130] 通过在溶液中皮下注射负载有IL-Ra的MCM或IL-Ra来递送IL-Ra,以抑制小鼠模型中IL-1诱导的炎症。检查了未负载的微粒注射液和PBS注射液对照。小鼠(n=5/次)皮下注射0.1ml PBS(PBS),0.1mg PBS(MCM)中的1mg 4.2mM碳酸盐MCM,0.1ml 10mg/ml可溶性IL-Ra(IL-Ra)或0.1mg/ml IL-Ra+1mg 4.2mM碳酸盐MCM(IL-Ra+MCM)。对于IL-Ra+MCM组,在注射前将MCM在IL-Ra溶液中温育~1小时。治疗后1天或3天后,给小鼠注射10ng rhIL-1B I.P.以诱导IL-6的IL-1产生。IL-1处理后2小时收集血液,以通过ELISA检查血浆中IL-6的水平。有效的IL-Ra治疗将降低IL-1给药后2小时的血清IL-6水平。与PBS对照相比,仅IL-Ra+MCM显著降低治疗后1天和3天的血清IL-6(图5)。

[0131] 实施例4

[0132] 在该实施例中,确定了韧带愈合期间韧带内注射MCM对炎症的影响。

[0133] 绘制了大鼠MCL的愈合阶段图谱,并确定了炎症期出现在损伤后0-5天之间(图7)。因此,当炎症细胞群和促炎细胞因子处于最高水平时,在损伤后的前5天内使用抗炎因子(如IL-Ra)进行治疗很重要。为了确定MCM在受伤的MCL内的定位,用超顺磁性氧化铁(SPIO)标记MCM,使用T2加权MRI使它们可见(图8A-8B)。确定MCL内的MCM定位在损伤部位至少保留

15天(图8C)。为了确定来自MCM输送系统的潜在不良反应,使用组织学确定MCM是否引起长时间的炎症反应或韧带钙化。虽然促炎(M1)巨噬细胞在韧带愈合期间的早期定位在MCM周围(图8A),但是没有延长的M1应答。用茜素红染色表明在MCM溶解后,没有韧带组织被钙化,并且MCM似乎没有影响韧带的结构(图9B和9C)。

[0134] 实施例5

[0135] 在该实施例中,确定了从微粒持续递送IL-Ra以及在体外和体内抑制IL-1活性的能力。

[0136] 微粒的制备通过将( $\beta$ -TCP)核(Plasma Biotal Limited, Derbyshire, UK)在改良的模拟体液(mSBF)中温育以形成磷酸钙(CaP)矿物质涂覆微粒(MP)来进行。通过溶解NaCl(141mM), KCl(4.0mM), MgSO<sub>4</sub>(0.5mM), MgCl<sub>2</sub>(1.0mM), CaCl<sub>2</sub>(5.0mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(2.0mM)和NaHCO<sub>3</sub>(4.2mM)制备mSBF,并缓冲至pH为6.8。将 $\beta$ -TCP(100mg)在50ml mSBF中于37°C连续旋转温育7天,以形成MP。每天更换mSBF溶液以保持足够的钙和磷酸根离子浓度,以使涂层持续生长。

[0137] 将1mg MP在1ml磷酸盐缓冲液(PBS)(Swedish Orphan Biovitrum, Stockholm, Sweden)浓度(10, 5, 2, 1, 0.5和0.1mg/ml)中温育1小时,所述温育在1.5ml Protein LoBind Eppendorf管(Eppendorf, Hamburg, Germany)中在37°C连续旋转下进行,每种条件n=3个样品,如图10A所示。然后将MP在200rcf离心5分钟,然后除去上清液。为了检查蛋白质与MP的结合,将1mg IL-Ra MP溶解在50μl的2N HC1中。在黑色96孔板中,将20μl溶解的IL-Ra MP样品或IL-Ra标准溶液与200μl氟醛邻苯二甲醛混合。在360nm处激发样品,并在460nm处读取荧光,以量化溶液中的蛋白质浓度(每种条件n=3)。

[0138] 通过将MP在10mg/ml IL-Ra中温育1小时来生成用于所有体外和体内测定的IL-Ra MP。在SBF<sup>35</sup>中检查了从MP释放的IL-Ra。将1mg/ml的IL-Ra MP在1.5ml Protein LoBind Eppendorf管中于37°C连续旋转下于SBF中温育。每天更换并收集SBF,并在SBF中创建IL-Ra 标准品(每种条件n=3)。如上所述,利用氟醛邻苯二甲醛测定法测量溶液中蛋白质的浓度。

[0139] 对于体外IL-Ra活性测定,扩增THP-1人单核细胞(ATCC, Manassas, 弗吉尼亚州)。将 $2 \times 10^5$ 个细胞铺在12孔跨孔板(Costar, Kennebunk, ME)中的1ml RPMI 1640中,其中含有glutagro(Thermo Fisher Scientific, 汉普顿, 新泽西州)和10%FBS(Gibco from Thermo Fisher Scientific)。将100nM佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)(Sigma-Aldrich, 圣路易斯, 密苏里州)添加到培养基中,以将细胞分化为巨噬细胞。在PMA活化3天后,将1mg IL-Ra MP或1mg无负载MP添加到跨孔插入物中的培养基中(每种处理条件n=6孔)。处理后6小时,如图2所示,将2μl的5μg/ml人IL-1 $\beta$ (R&D系统, Minneapolis, MN)加入培养基中,如图11D所示。加入IL-1后12和24小时,从每个孔中取出200μl培养基。根据试剂盒说明运行人IL-6ELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN),以检查培养基样品中的IL-6水平。

[0140] D10.G4.1小鼠T淋巴细胞(ATCC)根据ATCC提供的方案扩增。将 $1.5 \times 10^5$ 个细胞接种在24孔组织培养板中的0.45ml具有10%FBS和10%T细胞培养补充剂(Corning, Corning, NY)的RPMI中。用IL-Ra MP(0.5mg)、无负载MP(0.5mg)、可溶性IL-Ra(50μg)处理细胞,或者不向每个孔中添加任何处理(n=6孔/处理)。处理后6小时,将重组IL-1 $\beta$ (10pg/ml)添加至适当的孔(n=3孔/处理组)。加入IL-1 $\beta$ 后48小时,使用台盼蓝排除法对细胞计数。收集培养基,并根据试剂盒说明书进行人IL-Ra ELISA(Life Technologies, Carlsbad, CA)。

[0141] 为了在体内递送IL-Ra,在威斯康星大学麦迪逊分校动物护理和委员会的批准下,

通过 $100\mu\text{l}$ 皮下(sc)注射给予12–13周大的雄性C57B16小鼠(Envigo, Huntingdon, 英国)4种治疗:加载溶液中的1mg IL-Ra MP(10mg/ml IL-Ra), 10mg/ml IL-Ra, 1mg PBS或PBS中的未负载MP( $n=10$ 动物/处理)。在注射前,将IL-Ra MP在10mg/ml的IL-Ra加载溶液中温育1小时。将小鼠按照5只动物/处理分成两组(A组和B组)以检查IL-Ra血清浓度和在不同时间的活性。A组动物在处理后1、5和14天分别接受 $100\mu\text{l}$ 腹膜内(ip)注射的重组IL-1 $\beta$ (100ng/ml; R&D系统, Minneapolis, MN), 而B组动物则在处理后3天和7天接受IL-1 $\beta$ 注射。每次IL-1 $\beta$ 注射后2小时,进行上颌取血在樱桃红收集管中收集血液并用凝胶分离血清(Terumo, Elkton, MD)。该研究排除了在出血部位有感染迹象或对IL-1无反应的动物。离心血样并按照试剂盒说明书获得小鼠IL-6Quantikine(R&D Systems, Minneapolis, MN)和人IL-Ra ELISA(Life Technologies, Carlsbad, CA)的血清。将IL-6水平相对于当天收集的PBS对照组标准化。

[0142] 通过在涂覆过程中每天将MP在含有1mg/ml IL-Ra的溶液中温育1小时来制造层状IL-Ra MP, 如图13A所示。涂覆7天后, 将层状MP在10mg/ml IL-Ra中温育1小时以形成层状IL-Ra MP。如关于IL-Ra MP所述进行蛋白质加载和释放。如前所述, 还进行了层状IL-Ra MP的体内递送, 不同的是给小鼠皮下注射了 $100\mu\text{l}$ 在负载溶液(10mg/ml)( $n=10$ )或PBS( $n=10$ )中的层状IL-Ra MP。然后, 在治疗后第1、3和7天( $n=5$ /次)或第5、10和14天( $n=5$ /次)给动物i.p.注射 $100\mu\text{l}$  IL-1 $\beta$ (100ng/ml), 并如针对IL-Ra MP所述在IL-1 $\beta$ 施用后放血2小时。

[0143] MP以浓度依赖性方式有效结合IL-Ra。通过将 $\beta$ -TCP核在mSBF中温育7天, 然后在PBS中的IL-Ra加载溶液中温育1小时来制备IL-Ra MP, 如图10A所示。与IL-Ra温育的MP显示出结合IL-Ra的质量的浓度依赖性增加(图10AB)。具体而言, MP在含有最高浓度IL-Ra(10mg/ml IL-Ra)的加载溶液中温育时, 每mg MP结合 $217.5\mu\text{g}$  IL-Ra, 而MP在包含最低IL-Ra浓度(0.1mg/ml IL-Ra)的加载溶液中温育时, 每mg MP结合 $11.2\mu\text{g}$  IL-Ra。另外, IL-Ra与MP的结合效率与结合溶液中IL-Ra的浓度成反比(图10C)。当MP在最高IL-Ra浓度中负载时, 结合效率的范围为17.4%, 而MP在最低IL-Ra浓度中负载时的结合效率为90.0%。

[0144] MP在延长的时间范围内在体外释放IL-Ra(图10D)。最初的突释释放(burst release)26.2%的负载IL-Ra( $50.3\mu\text{g}$  IL-Ra/mg MP), 然后线性释放速率为 $\sim 5.6\mu\text{g}$  IL-Ra/mg MP/天, 持续7天, 然后释放速率降至 $\sim 1.43\mu\text{g}$  IL-Ra/mg MP/天。到第14天, MP释放了最初负载的IL-Ra的70.3%( $70.25\mu\text{g}$  IL-Ra/mg MP)。

[0145] 通过MP递送的IL-Ra具有生物活性, 如通过在体外抑制IL-1诱导的活性的能力所测定的。在两种细胞试验中评估了对IL-1活性的抑制。1) 抑制IL-1诱导的D10.G4.1小鼠T淋巴细胞增殖, 以及2) 抑制IL-1诱导的THP-1人巨噬细胞产生IL-6。T淋巴细胞实验表明, 与没有IL-1培养的细胞相比(PBS: $2.46 \times 10^5 \pm 0.25 \times 10^5$ 细胞/ml和无负载MP: $2.63 \times 10^5 \pm 0.38 \times 10^5$ 细胞/ml), 无论MP是否存在, IL-1都会增加D10.G4.1小鼠T淋巴细胞的细胞浓度(PBS: $3.51 \times 10^5 \pm 0.63 \times 10^5$ 细胞/ml, 无负载MP: $3.56 \times 10^5 \pm 0.28 \times 10^5$ 细胞/ml)(图11A)。与以药团方式递送的可溶性IL-Ra( $3.4 \times 10^5 \pm 0.18 \times 10^5$ 细胞/ml)或者PBS( $3.51 \times 10^5 \pm 0.63 \times 10^5$ 细胞/ml)相比, IL-Ra MP( $2.15 \times 10^5 \pm 0.35 \times 10^5$ 细胞/ml)抑制了IL-1刺激的T淋巴细胞浓度的增加(图11B)。与IL-Ra MP相比(图11C), 在用可溶性IL-Ra处理的样品中上清液中的IL-Ra明显更高, 并且在处理后2天在PBS处理的对照(未显示)中无法检测到IL-Ra, 说明与可溶性IL-Ra相比, 与MP一起递送时, IL-Ra的活性而不是单独的浓度是造成T淋巴细胞浓度降低的原因。在另一组实验中, 在不允许细胞和MP之间直接接触的跨孔培养系统中培养THP-1细

胞(如图11D所示),显示从MP释放的IL-Ra具有生物活性。具体地,与未负载的MP相比,IL-Ra MP使得THP-1人巨噬细胞在处理后18和30小时的IL-1刺激下的IL-6产生分别明显降低2.8倍和3.0倍(图11E)。在未用IL-1刺激的巨噬细胞中未检测到IL-6。

[0146] 皮下注射IL-Ra MP提高IL-Ra的血清浓度达14天。小鼠接受皮下注射的以下物质:悬浮在IL-Ra加载溶液中的IL-Ra MP(图12A所示)、可溶性IL-Ra、PBS中未负载的MP、或PBS,并且检测了在14天的过程中每种治疗的IL-Ra的血清浓度(图12B)。在研究期间任何时候在仅用PBS处理的动物中均未检测到血清IL-Ra,而用IL-Ra MP或可溶性IL-Ra处理的动物均在处理后1天表现出升高的血清IL-Ra水平( $750.4 \pm 10.8 \text{ pg/ml}$ 和 $853.3 \pm 40.37 \text{ pg/ml}$ )。可溶性IL-Ra治疗最初会升高血清IL-Ra浓度,但随着时间的推移,IL-Ra水平会持续下降5天,直到第7天达到不可检测的水平。相比之下,处理后5天,与用可溶性IL-Ra处理的动物相比,接受IL-Ra MP处理的动物中IL-Ra的血清浓度明显更高(分别为 $102.9 \pm 5.3 \text{ pg/ml}$ 和 $52.1 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$ )。此外,在处理后的整个14天的监测中,在用IL-Ra MP处理的动物的血清中可检测到IL-Ra。有趣的是,在处理后第1天和第5天,仅用无负载MP处理的动物具有升高的血清IL-Ra,尽管所述的水平明显低于可溶性IL-Ra或IL-Ra MP的情形。

[0147] IL-Ra MP在抑制IL-1体内活性持续7天。为了检查IL-Ra治疗抑制IL-1体内活性的能力,动物在处理后1、3、5、7和14天接受了IL-1的全身施用。在IL-1施用后2小时检查响应IL-1活性而升高的血清IL-6浓度,并将其相对于PBS处理的动物进行标准化以检查IL-1活性的抑制(图12C)。低于1的值表示抑制了IL-1诱导的IL-6产生。与PBS处理的动物相比,在用IL-Ra MP处理后的第1、3和5天,IL-6的血清浓度分别显著降低了 $61.8 \pm 11\%$ , $66.7 \pm 13\%$ 和 $81.5 \pm 3\%$ 。在同一时间点,可溶性IL-Ra或未加载MP的处理均不会影响IL-6的血清浓度。与PBS对照相比,MP或IL-Ra MP的处理降低了第7天的IL-6水平。但是,在任何处理组(可溶性IL-Ra,无负载MP或IL-Ra MP)的比较之间均未观察到统计学差异。到第14天,任何组之间均未观察到血清IL-6的显著差异(数据未显示)。

[0148] 在整个涂层中的IL-Ra层增加了掺入MP中的IL-Ra的量,并在体内更长的时间范围内延长了对IL-1的抑制。在涂覆过程中,每天将MP在 $1 \text{ mg/ml}$  IL-Ra溶液中温育1小时(图13A),然后在 $10 \text{ mg/ml}$  IL-Ra溶液中最后温育1小时以形成层状IL-Ra MP。层状IL-Ra MP掺入的IL-Ra( $668.5 \pm 30.2 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ )比传统制造的IL-Ra MP( $217.0 \pm 12.0 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ ;图13B)高出约三倍。此外,在SBF中温育层状IL-Ra MP会导致1天后的低IL-Ra爆发释放(占结合的IL-Ra的6.6%)。此后,IL-Ra以持续的方式在体外释放至少14天(图13C)。皮下施用层状IL-Ra MP使IL-Ra的血清浓度增加了10天,并且在处理后14天在血清中未检测到IL-Ra(图13D)。重要的是,用层状IL-Ra MP处理后再用IL-1刺激的动物在治疗后5、7、10和14天的血浆IL-6浓度明显低于PBS处理的对照。

[0149] 本文提供的结果说明,与单独的可溶性IL-Ra相比,微粒(MP)递送生物学活性的IL-Ra并成功地在体外和体内抑制IL-1活性更长的时间范围。可溶性IL-Ra的体内半衰期只有4-6小时,而且由于IL-1是强效的炎症分子,因此IL-Ra的浓度必须比IL-1的浓度高100-1000倍才能抑制IL-1活性。由于这些特性,目前已批准将IL-Ra按照每日自行皮下注射大约 $1 \text{ mg IL-Ra/kg}$ 来给药。尽管在案例研究和动物模型中已显示出抑制IL-1可以改善许多疾病,但在临床中IL-Ra的使用仅限于除外少数几种临床情况的全部情形。具有生物活性的IL-Ra的持续递送可以通过在更长的时间内保持治疗浓度来扩展其临床用途,这可以改善

IL-Ra对许多疾病的治疗方案和疗效。

[0150] 与聚合物包封不同, IL-Ra MP的制造不需要苛刻的环境或复杂的蛋白质装载过程。此外,可以通过改变加载溶液中蛋白质的浓度来调节加载到微粒上的IL-Ra的量。与以前关于封装有2.5%-7.5% IL-Ra w/w的PLGA微球的PLGA微球研究相比,MP的装载量明显更高(MP的21.7%±1.2% IL-Ra w/w)。

[0151] IL-Ra MP明显抑制IL-1活性而等剂量的可溶性IL-Ra没有作用。IL-Ra MP抑制了IL-1诱导的小鼠T淋巴细胞增殖,尽管其上清液中的IL-Ra(通过ELISA检测)比可溶性IL-Ra上清液低约3倍,但令人吃惊的是可溶性IL-Ra上清液对IL-1诱导的增殖没有可观察到的影响。

[0152] IL-Ra MP可以在体内递送活性IL-Ra。将IL-Ra MP与IL-Ra结合溶液一起皮下注射,而可溶性IL-Ra处理的动物接受等质量的IL-Ra皮下IL-Ra注射,以确保动物接受相同的累积剂量的IL-Ra。此外,来自结合溶液的大剂量药团形式的IL-Ra可能有益于治疗方案,方法是先提供高剂量的IL-Ra,使其最初被IL-1受体清除,然后从IL-Ra MP持续释放IL-Ra维持受体占用和IL-1抑制。虽然给动物注射了相同质量的IL-Ra,但在治疗后1天,可溶性IL-Ra治疗的动物的IL-Ra血清浓度明显高于IL-Ra治疗的动物,这可能是由于尚未从MP释放的IL-Ra造成的。与可溶性IL-Ra相比,IL-Ra MP显著增加了IL-Ra在随后的时间点(第5、7和14天)的血清浓度,这表明MP能够在体内持续递送IL-Ra。出乎意料的是,在处理后第1天和第5天,用无负载MP处理的动物中也可检测到IL-Ra。虽然用于检测血清浓度的IL-Ra ELISA是针对人IL-Ra的,但是与人IL-Ra具有80%同源性的内源性小鼠IL-Ra的交叉反应性可能是导致这一结果的原因。然而,在每个时间点,IL-Ra MP中的血清IL-Ra显著均高于无负载MP。

[0153] 与传统的负载IL-Ra MP相比,在整个涂层中IL-Ra的分层改善了负载能力和IL-Ra活性的持续时间,并且使IL-1活性的抑制作用在体内延长达两周。整个涂层中的IL-Ra分层使MP的负载量扩大三倍,降低了第1天(爆发释放)释放的IL-Ra的百分比,并降低了14天释放的IL-Ra的百分比,这表明分层的IL-Ra MP与IL-Ra MP相比,可延长IL-Ra的释放。在较早的时间点(第1天和第3天),层状IL-Ra MP产生的IL-Ra血清浓度也高于IL-Ra MP,但在第14天未检测到,表明分层不会延长IL-Ra体内释放的持续时间。然而,有趣的是,层状IL-Ra MP延长了IL-Ra的活性,这可能表明在更早的时间点较高的浓度有助于延长IL-1的抑制作用。

[0154] IL-Ra MP为IL-Ra提供了持续的递送平台,其性质超过了传统的聚合物包封递送平台。IL-Ra可通过皮下注射有效负载,持续释放和全身释放。此外,从IL-Ra MP释放的IL-Ra具有活性并且可以抑制IL-1活性。IL-Ra MP提供了可以皮下给药的递送平台,从而延长了治疗之间的时间并提高了IL-1介导疾病的治疗效力。

#### [0155] 实施例6

[0156] 在该实施例中,确定了在受伤的大鼠内侧副韧带(MCL)模型中的白介素-1受体拮抗剂(IL-Ra)的局部递送。

[0157] 如上所述进行微粒制备和IL-Ra结合。通过将冻干的MP在PBS中的25mg/ml IL-Ra于37°C在1.5ml Protein LoBind Eppendorf管中连续旋转下温育1小时来产生IL-Ra MP。为了确定与Ms结合的IL-Ra的量,将1mg IL-Ra MP溶于50μl 2N HC1中。在黑色96孔板中,将20μl溶解的IL-Ra MP样品或IL-Ra标准品与200μl氟醛邻苯二甲醛混合。在360nm处激发样品,在460nm处读取荧光,以定量溶液中的蛋白质浓度(n=3)。

[0158] 动物手术得到了威斯康星大学动物保护与使用委员会的批准。将36具骨骼成熟的雄性Wistar大鼠(320-340g)用作额外的关节内侧副韧带(MCL)损伤模型。将动物随机分为4个治疗组,IL-Ra MP,可溶性IL-Ra,无负载MP或PBS。通过异氟烷麻醉时,对所有大鼠进行双侧MCL横切术(第0天)。在左和右膝关节的内侧切开一个1厘米的皮肤切口。分离皮下组织以暴露缝匠肌和下面的MCL。MCL的轴向中点已完全横切。将悬浮在10 $\mu$ l 25mg/ml IL-Ra中的0.25mg的IL-Ra MP,10 $\mu$ l 25mg/ml IL-Ra,10 $\mu$ l 0.25mg无负载MP或10 $\mu$ l PBS移液至每个横切的MCL(每处理n=9只动物)。动物在双侧接受相同的治疗。横切和处理后,分别用4-0Dexon缝合线闭合肌肉层,皮下层和皮下组织层。手术后立即允许所有动物在笼中自由移动。在手术后7天处死每种处理条件的三只动物。手术后14天处死每个处理组剩余的6只动物。

[0159] 在手术后第7天和第14天处死后,立即解剖右MCL并在Eppendorf管中的液氮中冷冻,并在-80°C储存直至分析。将各个MCL(n=3/条件/时间点)放入包含0.9-2.0mm不锈钢珠混合物和3.2mm不锈钢球的Navy Bead Lysis Kit管中。加入200 $\mu$ l的Bio-Rad Lysing溶液,并且将每个管以速度10混合5分钟。收集上清液并转移至新的Eppendorf管中,进行冻融循环,在冰上超声处理,以4,500g离心4分钟,并再次收集上清液。根据试剂盒说明对组织匀浆进行BCA测定蛋白浓度。根据试剂盒说明,使用luminex大鼠10重多重阵列检测10种大鼠细胞因子(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- $\gamma$ , GM-CSF和TNF- $\alpha$ )在MCL组织匀浆物中的浓度(n=3/条件/时间点)。根据试剂盒说明,对MCL匀浆(n=3/条件/时间点)运行IL-Ra ELISA(Life Technologies)。将所有蛋白质浓度标准化为通过BCA测量的蛋白质浓度。利用Kaleidograph进行单向方差分析以及Fischer's LSD事后比较分析,以评估治疗组之间的统计学差异。p值≤0.05被认为是显著的。p值≤0.15被认为具有显著的趋势。

[0160] 在手术后第7天和第14天处死后,立即分离每只动物的左MCL,进行测定,并将其快速冷冻至最佳切割温度(OCT)化合物中,切成5 $\mu$ m厚的冷冻切片,将其固定在Superfrost Plus显微镜载玻片上,并保持在-70°C以便将来进行免疫组化(IHC)和组织学检查。在组织冰冻切片上进行苏木精和曙红(H&E)染色,观察愈合韧带的一般形态和肉芽组织大小。使用照相机辅助显微镜(配备有DP790lympus照相机的E6000Nikon Eclipse显微镜)拍摄每个组织切片的显微照片,并使用Image J测量每只动物的3个组织切片的肉芽组织尺寸。在韧带的纵向中点进行长度测量。肉芽组织的横截面积测量不包括韧带周(epiligament)组织。通过茜素红染色在组织切片中鉴定出微粒用于钙检测。简而言之,将切片在冷的丙酮中固定,用40mM pH 4.1的茜素红溶液染色5分钟,用去离子水冲洗,脱水,盖玻片,并如上所述使用光学显微镜观察。

[0161] 在MCL标本的冷冻切片上进行了免疫组织化学(IHC),以鉴定具体的细胞类型。使用针对CD68(M1巨噬细胞)和CD3(T淋巴细胞)的小鼠单克隆抗体表征细胞类型。这些抗体获自Abcam-Serotec(美国北卡罗来纳州罗利),以1:100的稀释度使用。对于IHC,将冰冻切片融化,固定在丙酮中,在3%过氧化氢中温育以消除内源性过氧化物酶活性,用背景克星(Innovex Biosciences, Richmond, CA)封闭30分钟,然后与目标抗体温育2小时。在初级抗体温育并冲洗掉未结合的抗体后,将切片与生物素温育,然后在链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶中温育(Stat Q染色试剂盒,来自Innovex Biosciences, Richmond, CA)。用二氨基联苯胺(DAB)观察结合的抗体,进行脱水,清洁并加盖玻片进行光学显微镜检查。每只动物

的3个切片以400X拍摄肉芽组织的显微照片。在每张显微照片中对M1巨噬细胞和T淋巴细胞计数阳性染色的细胞。将同一动物的3个切片的细胞计数一起进行平均化，并表示为每韧带面积的细胞。利用Kaleidograph进行单向方差分析以及Fischer's LSD事后比较分析，以评估治疗组之间的统计学差异。p值≤0.05被认为是显著的。p值≤0.15被认为具有显著的趋势。

[0162] 在微粒的表面上形成均匀的纳米多孔涂层，并且经涂覆的微粒能够通过在溶液中的结合而结合IL-Ra。涂覆之前的 $\beta$ -TCP微粒的扫描电子显微照片显示出光滑的颗粒表面和烧结外观(图14A)。在mSBF中温育7天后，微粒(MP)具有板状的纳米孔结构(图14B)。当在25mg/ml的IL-Ra溶液中温育时，如图14C所示，微粒结合 $104.4 \pm 9.8 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ 。

[0163] 在愈合中的大鼠MCL中，微粒成功地提高了局部IL-Ra浓度至少14天(图15)。与可溶性IL-Ra处理( $0.12 \pm 0.07 \mu\text{g IL-Ra}/\mu\text{g 总蛋白}$ )、无负载的MP(无法检测)或PBS处理的对照(无法检测)相比，在治疗后7天用IL-Ra MP处理的MCL( $0.71 \pm 0.07 \mu\text{g IL-Ra}/\mu\text{g 总蛋白}$ )中IL-Ra的组织浓度明显更高(图15A)。此外，IL-Ra MP处理的MCL中治疗后14天的IL-Ra组织浓度( $2.28 \pm 0.06 \mu\text{g IL-Ra}/\mu\text{g 总蛋白}$ )显著高于治疗后7天的浓度，表明时从微粒中持续释放至少1周。到第14天，在任何动物的MCL中均未检测到IL-Ra。在处理后7天和14天用无负载MP或IL-Ra MP处理的所有动物中发现MP的阳性茜素红染色，表明MP在给药后14天保留在注射部位(图15C)。为了进一步检测用IL-Ra MP递送时IL-Ra是否仍保留在组织内，测定IL-Ra的血清浓度。与无负载MP相比(不可检测；图15B)，用IL-Ra MP治疗后1天血清IL-Ra明显升高( $283.33 \pm 174.62 \mu\text{g/ml}$ )。然而，在用IL-Ra MP治疗后的第7和14天，任何动物的血清中都没有检测到IL-Ra。

[0164] 与无负载的MP相比，与MP一起递送的IL-Ra具有生物学活性并且抑制了炎性细胞浸润(图16A-16C)。与注射PBS的对照组相比，在用无负载MP处理的动物中促炎性M1巨噬细胞在损伤后7天升高，这是注射异物后所预期的。相比之下，用负载IL-Ra的MP处理的MCL中M1巨噬细胞的浓度与PBS处理的动物没有显著差异，这表明从MP释放IL-Ra能够抑制MP诱导的M1巨噬细胞的浸润。与PBS处理的动物相比，单独施用可溶性IL-Ra还降低M1巨噬细胞的浓度。在治疗后第14天，在任何治疗组之间均未观察到M1巨噬细胞浓度的差异。

[0165] 受伤后7天，与所有其他治疗组相比，用无负载MP处理的动物中两种促炎细胞因子IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的组织浓度较高(对于所有比较，关于IL-1 $\alpha$ 的p<0.05，关于IL-1 $\beta$ 的p<0.15)(图17A和17B)。相反，经IL-Ra MP处理的MCL中的局部IL-1 $\alpha$ 和 $\beta$ 浓度与用PBS或可溶性IL-Ra处理的MCL在处理后7天并无显著差异。到第14天，在任何治疗组之间均未观察到IL-1 $\beta$ 浓度的显著差异。与无负载MP(p=0.03)、可溶性IL-Ra(p=0.04)和PBS(p=0.06)处理的动物相比，在用IL-Ra MP处理的动物中，处理后14天IL-1 $\alpha$ 升高。

[0166] 微粒对肉芽组织形成没有影响，与可溶性IL-Ra相比，不诱导适应性免疫应答，并且在2周的检查期内不诱导持续的异物应答。组织切片的H&E染色(图18A)表明无负载的MP、可溶性IL-Ra和IL-Ra MP对肉芽组织形态或密度没有影响，并且不影响肉芽组织尺寸。与受伤后7天的所有治疗组相比，受伤后14天肉芽组织和总体MCL面积均减小。

[0167] CD+T淋巴细胞的密度(图18B)表明人IL-Ra可在大鼠MCL愈合期间引起适应性免疫应答。与处理后7天的所有其他治疗组相比，在大鼠MCL中用可溶性大剂量人IL-Ra处理显著增加了MCL肉芽组织内的T淋巴细胞密度(图18B)。有趣的是，处理后7天，无负载MP和IL-Ra

MP对T淋巴细胞密度没有显著影响。到第14天,可溶性IL-Ra处理对T淋巴细胞无影响,但是与PBS处理的对照组相比,IL-Ra MP处理导致处理14天后的T淋巴细胞明显增多。

[0168] 微粒在愈合中的大鼠MCL中没有诱导可检测到的持续异物应答。H&E染色用于检测每种处理的肉芽组织内的异物巨细胞和多核细胞(PNC)(图18C)。尽管在H&E染色部分中有明显的微粒(深粉红色微粒),但未观察到异物巨细胞和PNC的定位。此外,未观察到微粒的纤维包封。

[0169] 本文所示的结果表明,微粒能够克服与IL-Ra递送相关的挑战,包括递送高剂量( $104.98\mu\text{g IL-Ra}/\text{mg MP}$ )的能力,提高了IL-Ra的局部浓度至少2周,同时限制IL-Ra的系统性升高,并维持IL-Ra的抗炎活性。IL-Ra在愈合韧带中递送的结果证明其可用于治疗多种局部炎症性损伤和疾病。

[0170] IL-Ra MP从结合溶液中递送可溶性药团形式的IL-Ra,以提供高初始剂量的IL-Ra从而被IL-1受体清除,然后从IL-Ra MP持续释放IL-Ra以维持受体占有率。因为药团组和持续释放处理组的总IL-Ra施用量相同,所以在用IL-Ra MP处理的MCL中较高的IL-Ra浓度表明从MP在延长的时间内递送IL-Ra。此外,与治疗后7天相比,治疗后14天MCL中较高的浓度表明微粒在7天后在体内继续局部递送IL-Ra。

[0171] 与局部浓度相反,仅在用IL-Ra MP治疗后1天可检测到血清中的IL-Ra。微粒可在组织内局部升高IL-Ra,而不会提高全身浓度,这可消除通常与治疗性蛋白质递送相关的靶标副作用,从而治疗局部病变。此外,在研究期间,微粒仍保持局部化在MCL之内。

[0172] 施用无负载的微粒在第7天显著增加促炎性M1巨噬细胞的浓度,并且巨噬细胞与微粒的共定位是明显的(图16C)。当微粒中装载有IL-Ra时,由微粒本身引起的巨噬细胞的增加得到缓解,并且未观察到共定位,这表明从微粒中递送的IL-Ra具有活性,并且可以局部抑制炎症。同时,当微粒局部递送IL-Ra时,消除了在处理后7天用未负载微粒处理的IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的增加。

[0173] 与单独施用相同量的可溶性蛋白质相比,矿物质涂覆微粒在延长的时间内成功提高了局部蛋白质浓度。此外,递送的蛋白质具有生物活性。这些结果证明了MP可用于在动态组织中局部递送活性蛋白同时限制全身性暴露。

[0174] 本文公开的纳米结构的磷酸钙矿物质涂层提供了用于持续递送生物活性剂的平台。矿物质涂覆微粒提供了一种可注射的且局部化的递送系统,与团注形式的活性剂相比,可以降低剂量和脱靶副作用,特别是对于半衰期短或经例如包封和/或制成融合蛋白的修饰后活性降低的活性剂而言。本文公开的制剂和方法有利地允许以未结合形式递送的活性剂的即时作用,以及所述活性剂的持续作用,所述活性剂的持续作用通过将活性剂吸附到提供活性剂的持续递送的矿物质涂覆微粒,其中矿物质涂层可降解并释放出所述的活性剂。

[0175] 矿物质涂覆微粒提供了可以在维持其生物活性的同时可持续释放治疗性蛋白质的递送系统。此外,这些微粒在体内注射时仍保持局部化,并提供了局部蛋白递送系统,与全身性皮下或静脉内递送相比,其可允许更低的治疗剂量。治疗性蛋白质的局部递送也可以限制其脱靶作用。我们建议研究IL-Ra(一种已经在临幊上用于治疗RA的治疗性蛋白)的递送,但需要繁重的治疗方案,这限制了它作为RA和可能需要治疗的其他其可能有益的临幊应用例如局部炎症的一线治疗剂的应用。我们预期在全身和局部情况下,使用矿物质涂

覆微粒递送IL-Ra比皮下团注IL-Ra更有效地抑制IL-1诱导的炎症。IL-Ra的持续或局部递送将在许多临床应用中广泛使用这种有希望的抗炎药。

[0176] 鉴于以上内容,将看到实现了本发明的数个优点并且获得了其他有利的结果。由于可以在不脱离本发明的范围的情况下对以上方法进行各种改变,应当理解以上描述中包含的以及附图中示出的所有内容均应被解释为说明性的,而不是限制性的。

[0177] 当介绍本发明的要素或其各种版本,实施方案或方面时,冠词“一种”,“一个”,“该”和“所述”旨在表示存在一或多种的要素。术语“包括”,“包括”和“具有”旨在是包括性的,并且意味着除列出的要素外可能还有其他要素。

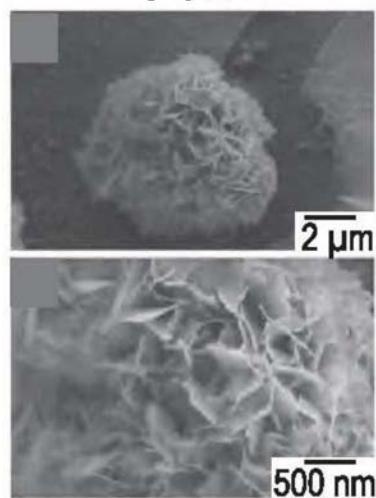
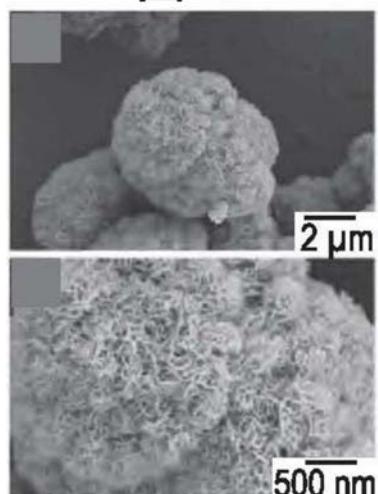
**图1A****图1B****图1C****图1D**

图1E

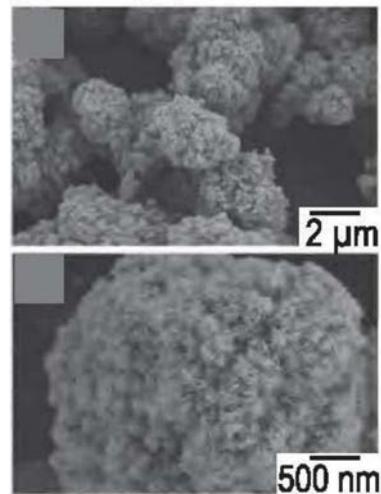


图1F

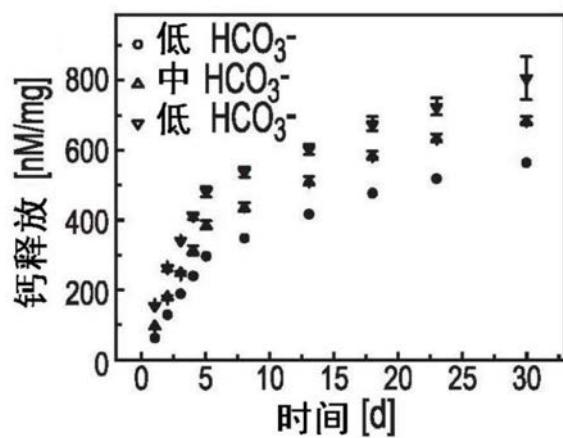


图1G

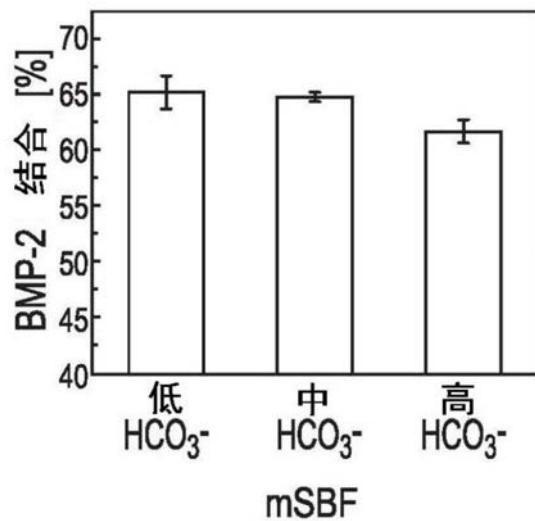


图1H

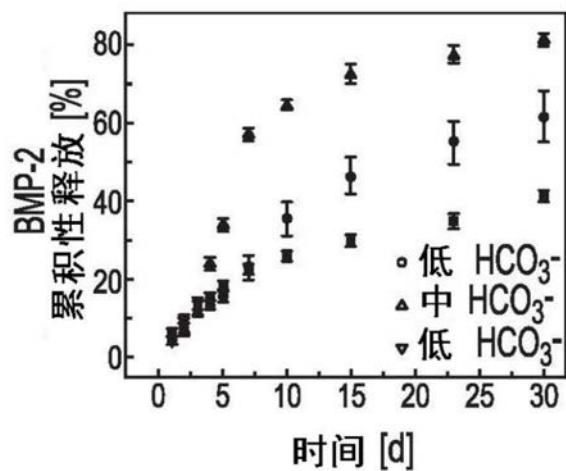


图1I

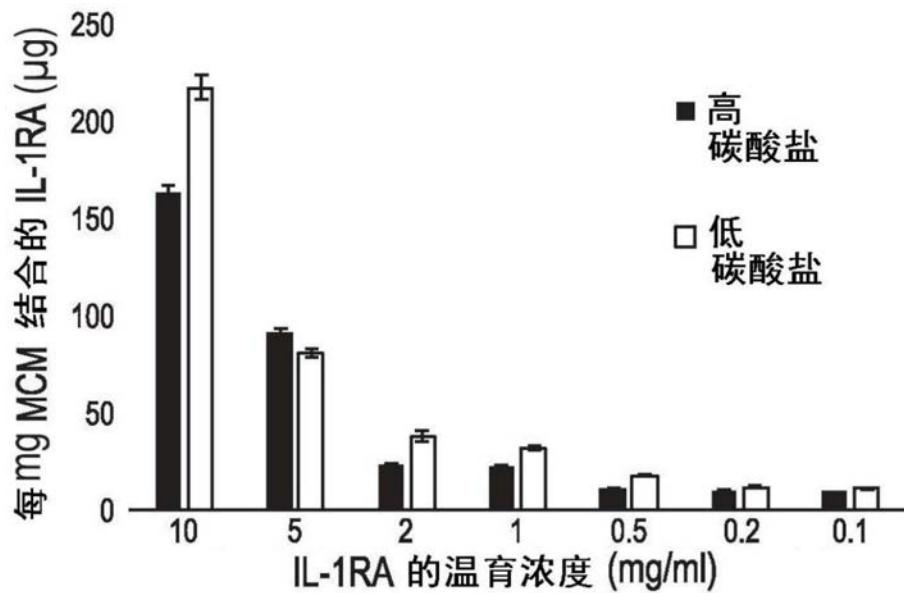


图2A

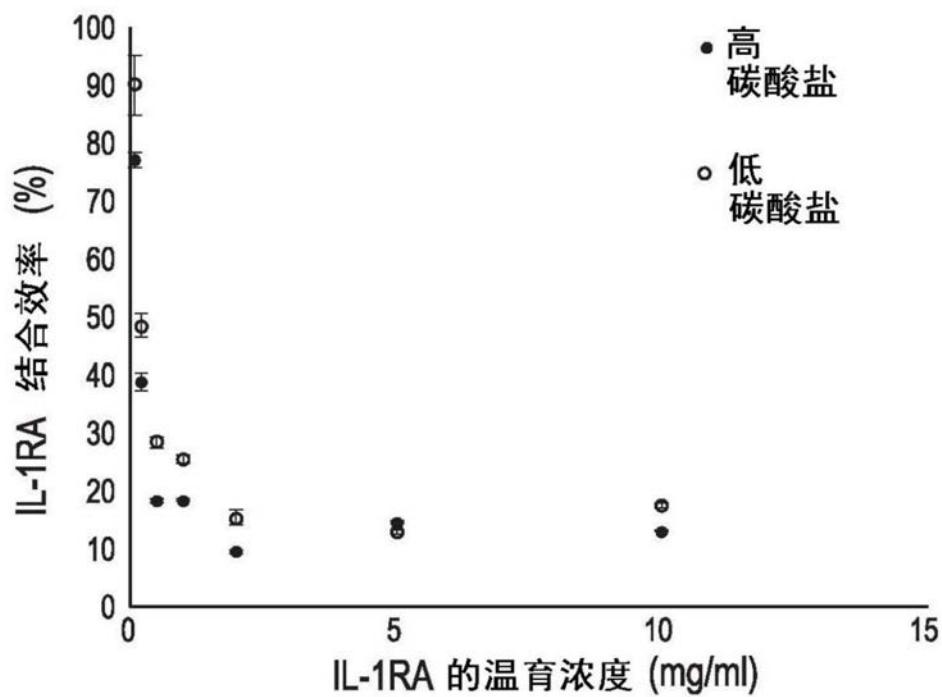


图2B

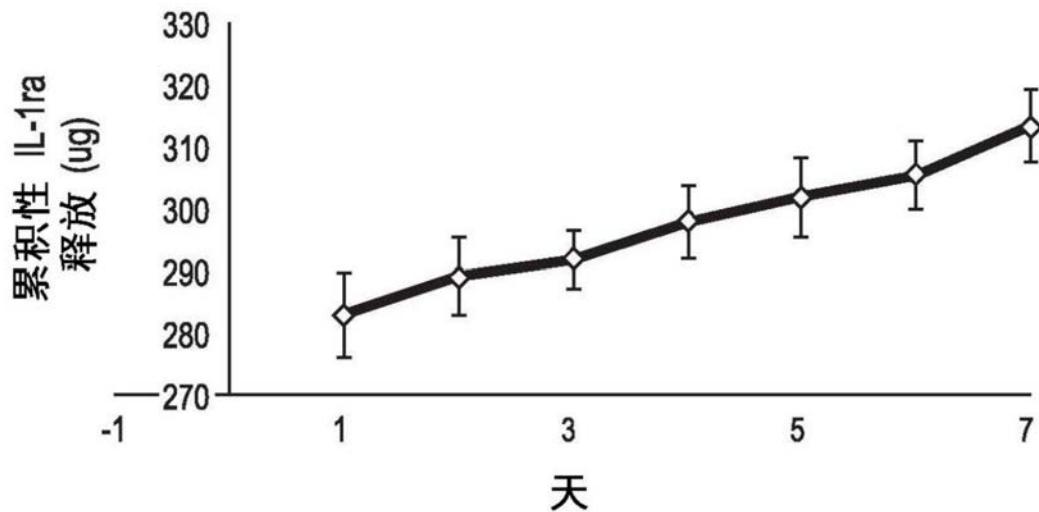


图3

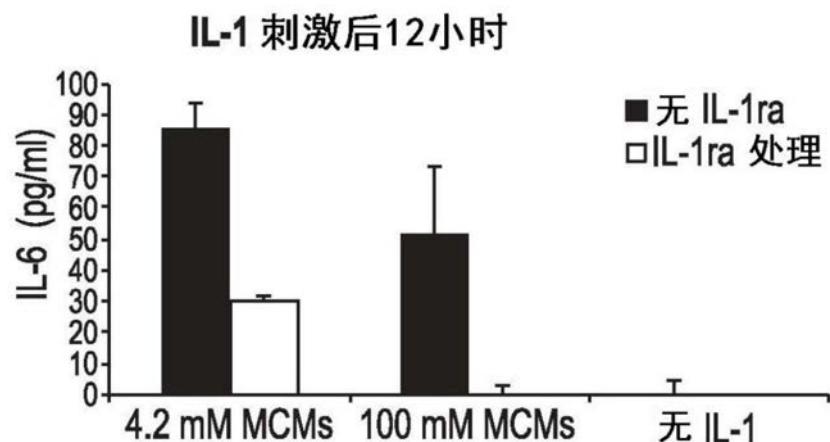


图4A

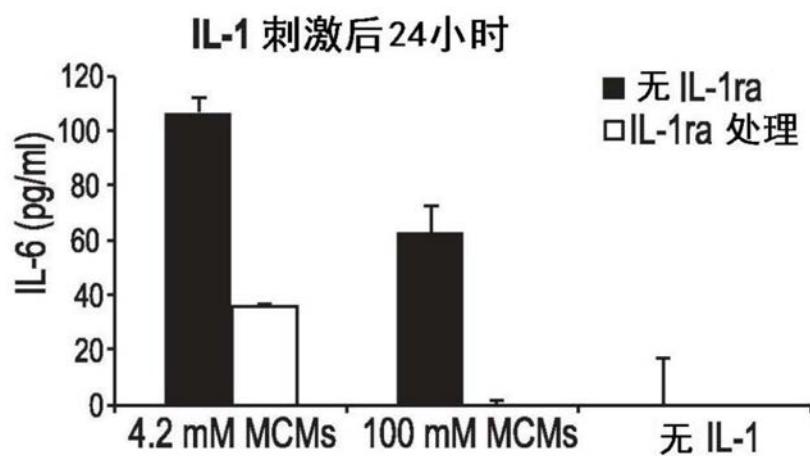


图4B

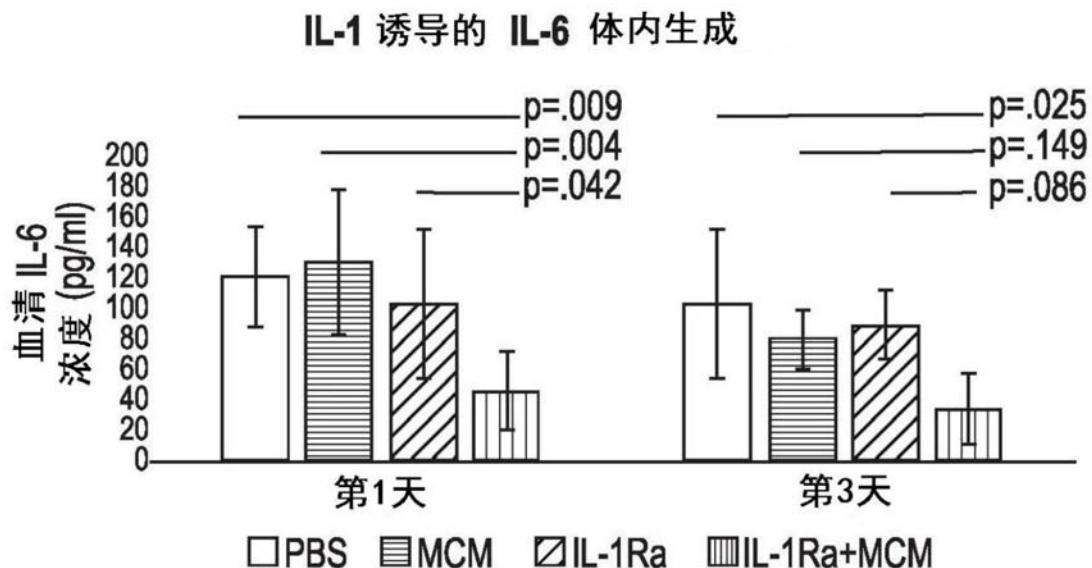


图5

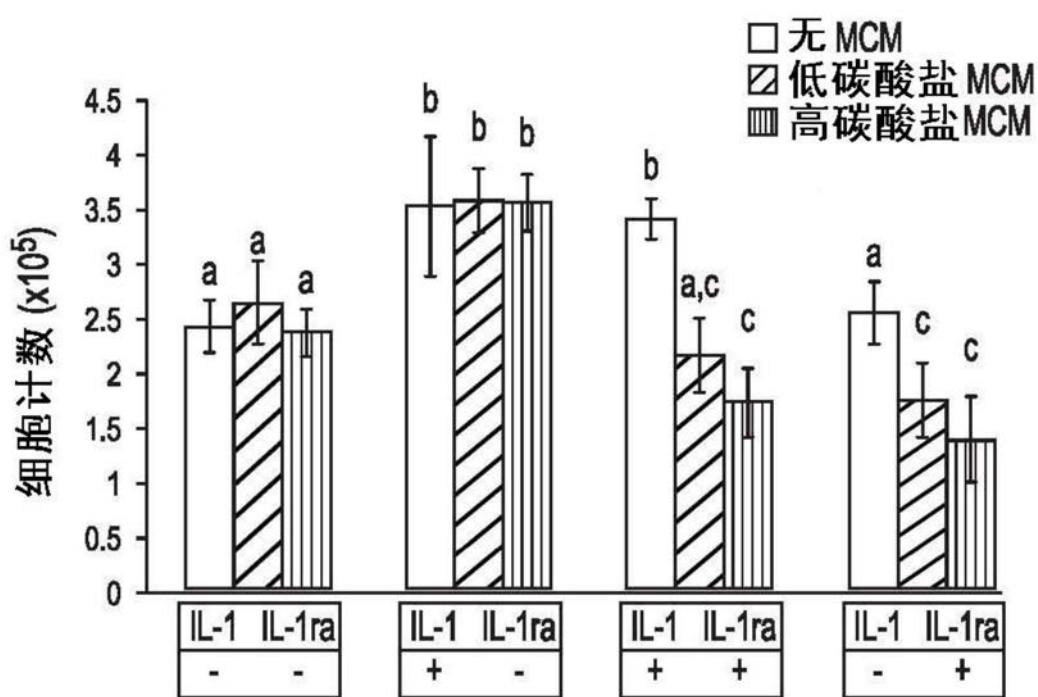


图6

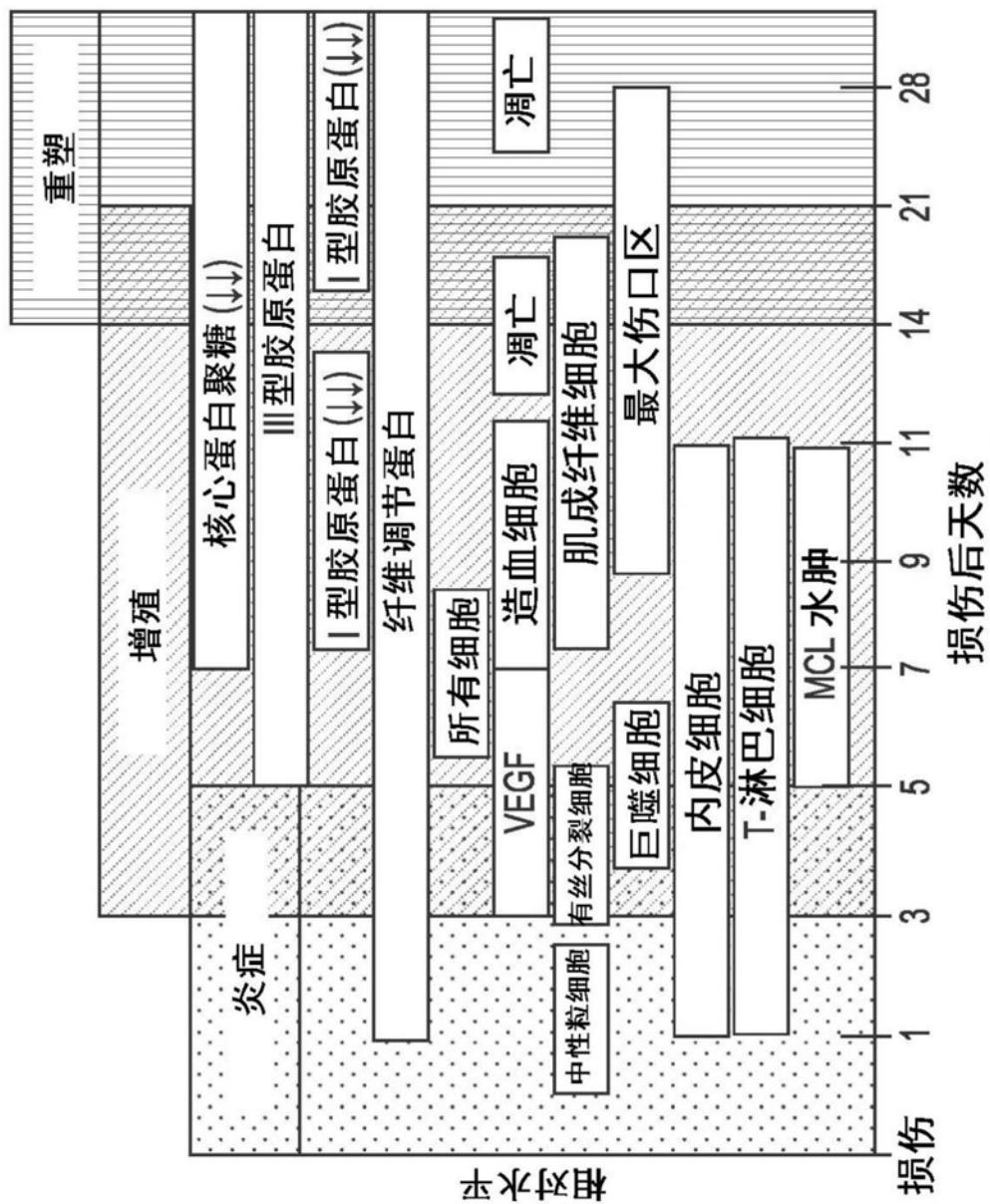


图7

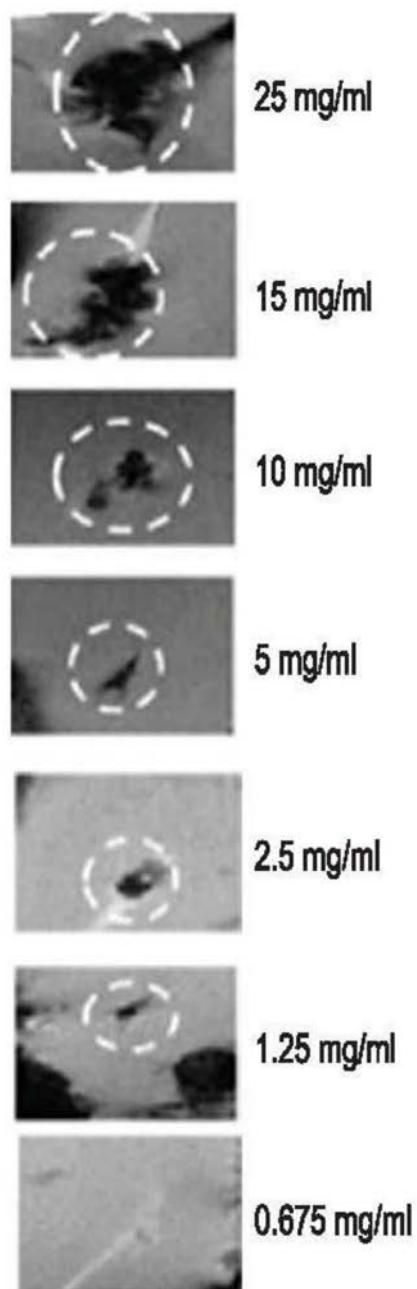


图8A

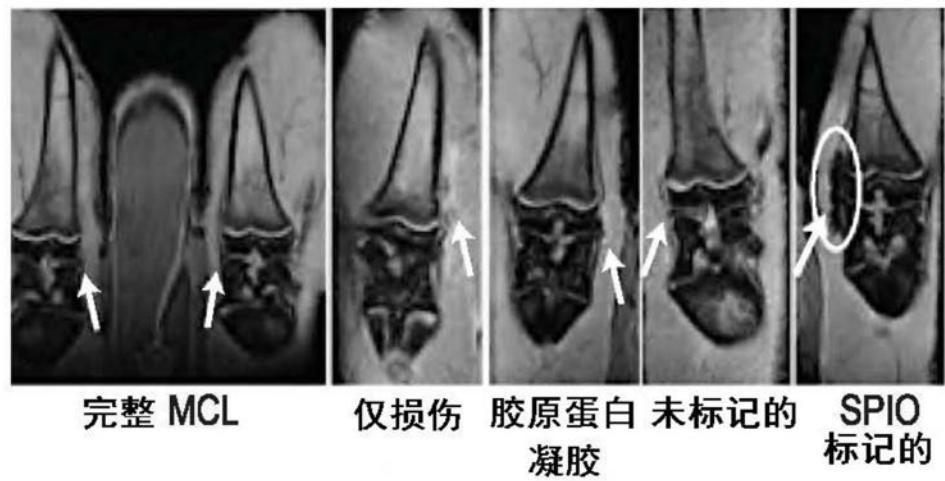


图8B

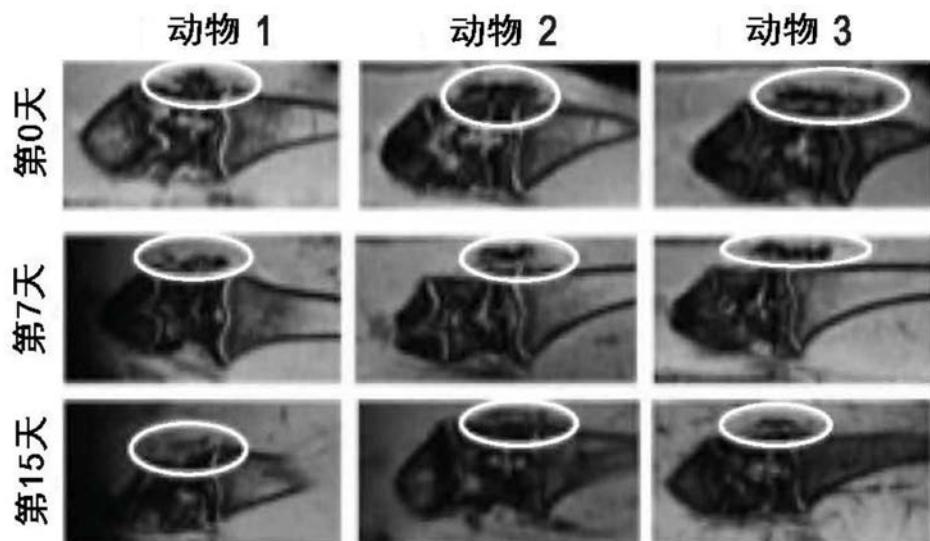


图8C

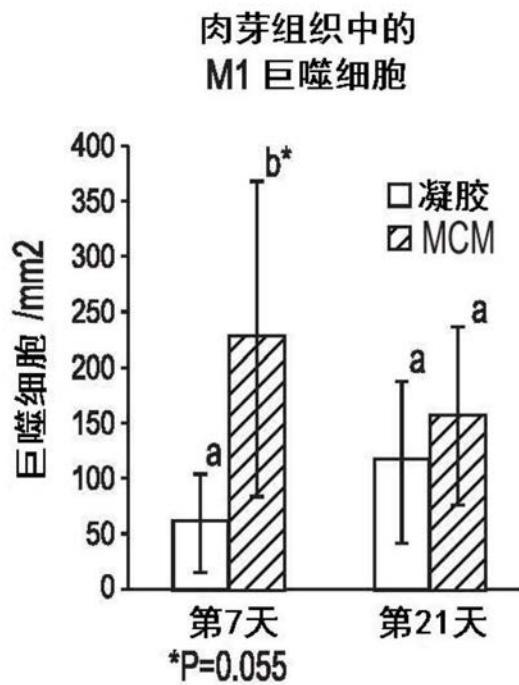
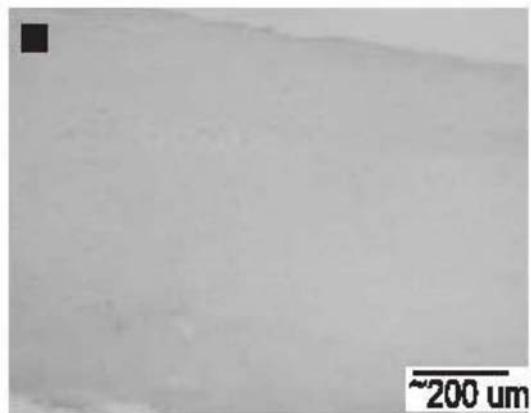


图9A



横切后7天

图9B



横切后21天

图9C

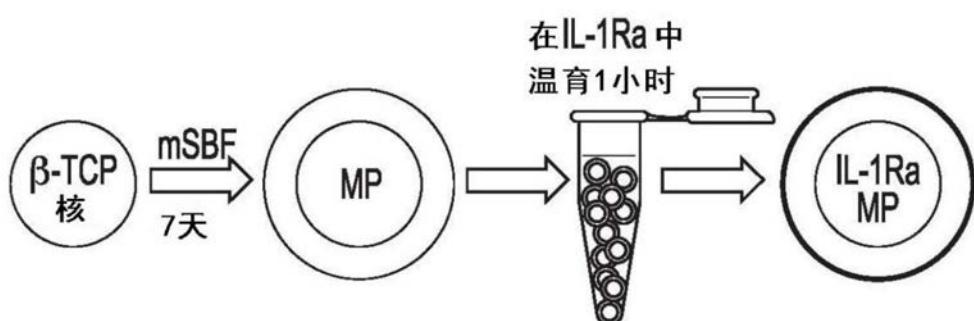


图10A

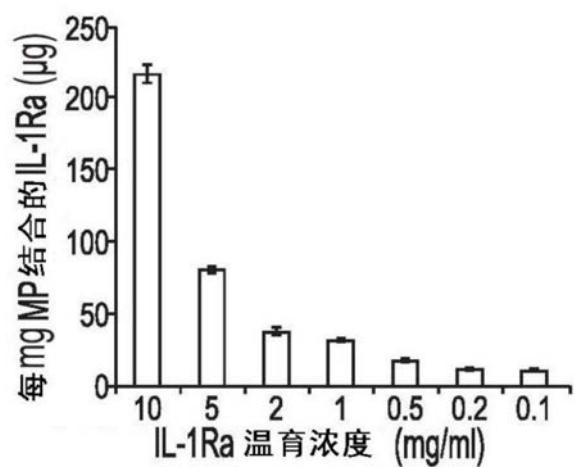


图10B

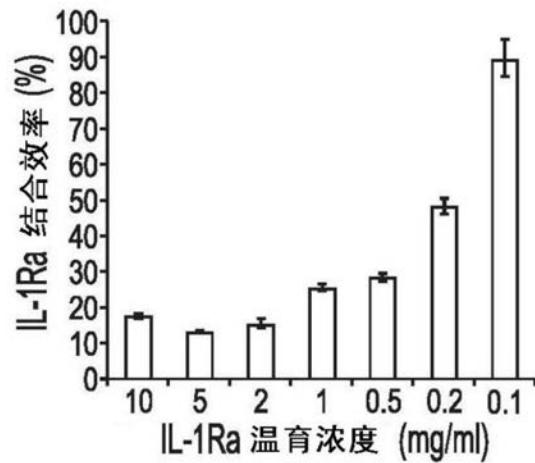


图10C

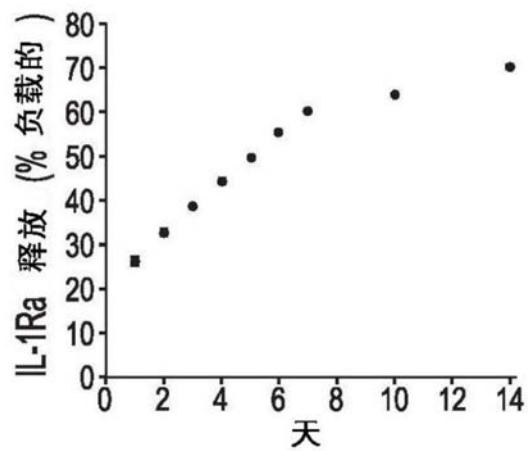


图10D

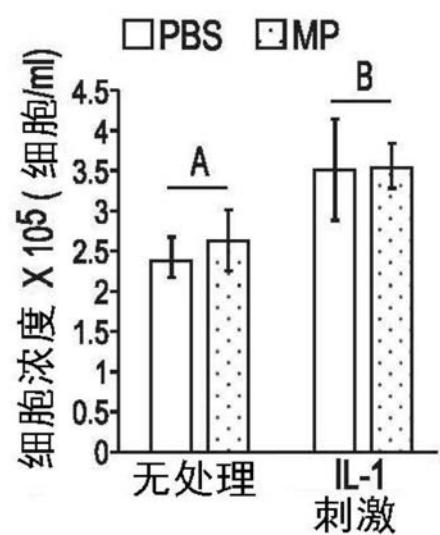


图11A

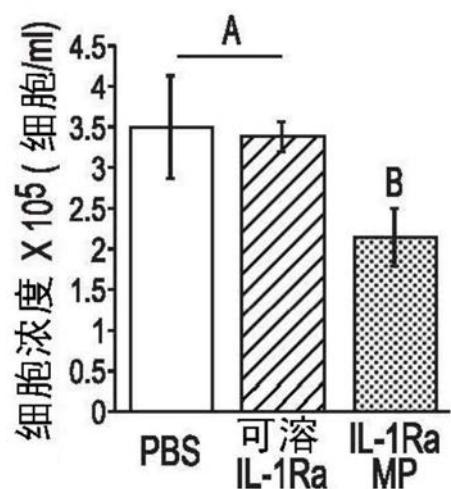


图11B

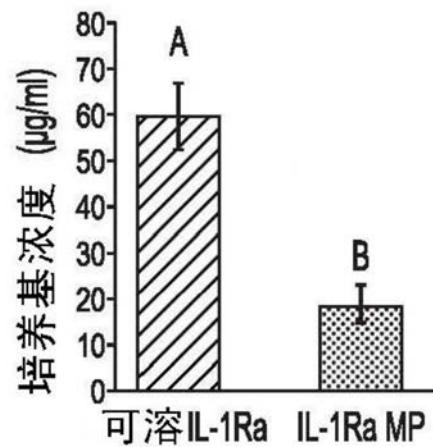


图11C

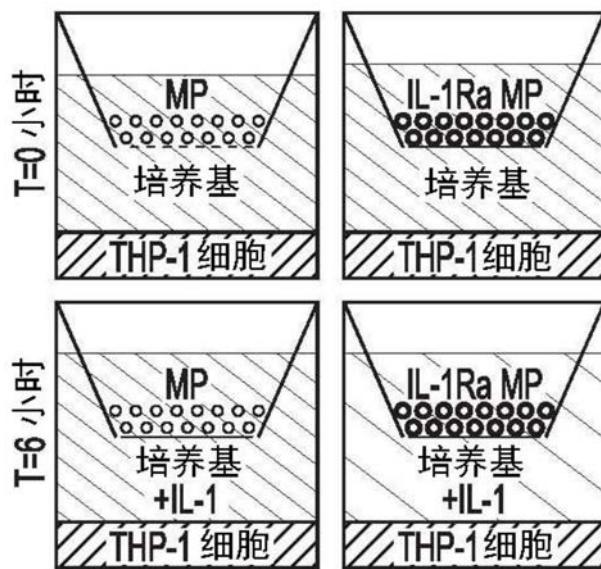


图11D

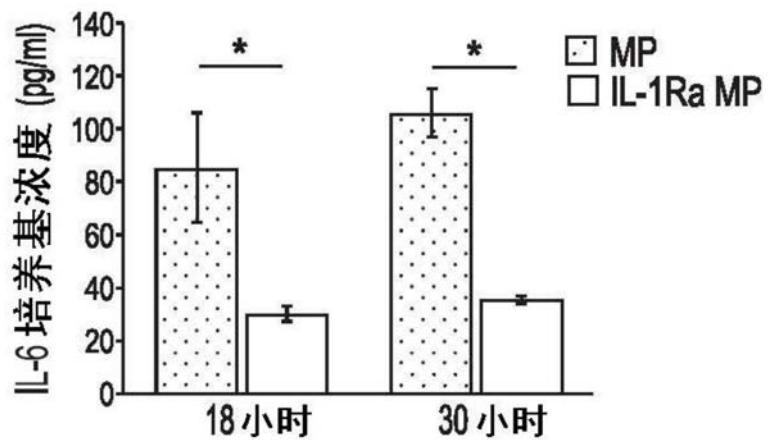


图11E



图12A

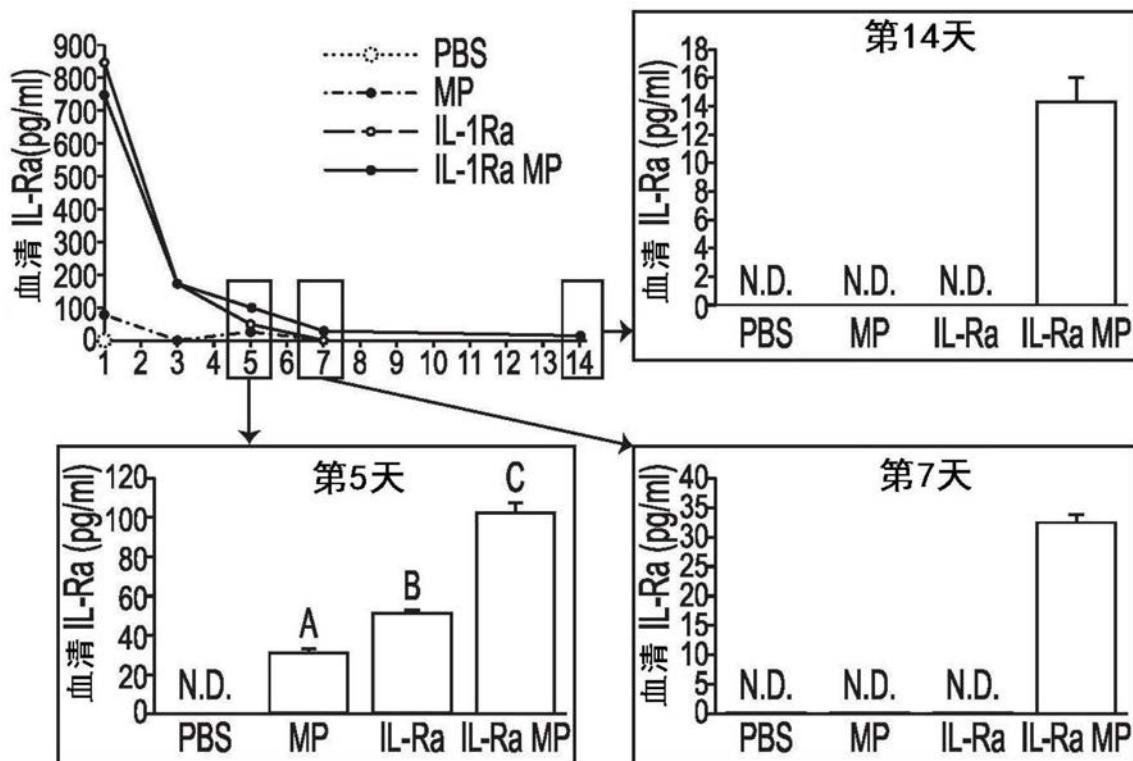


图12B

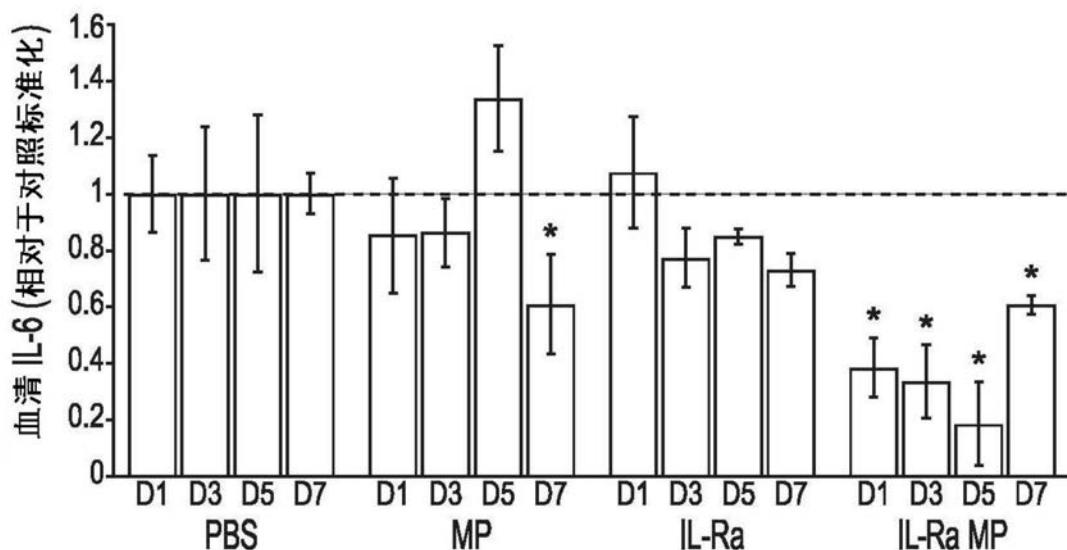


图12C



图13A

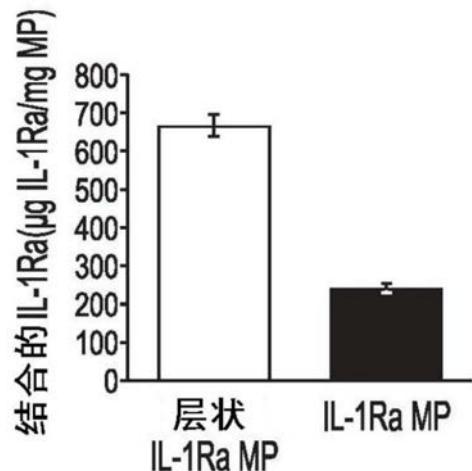


图13B

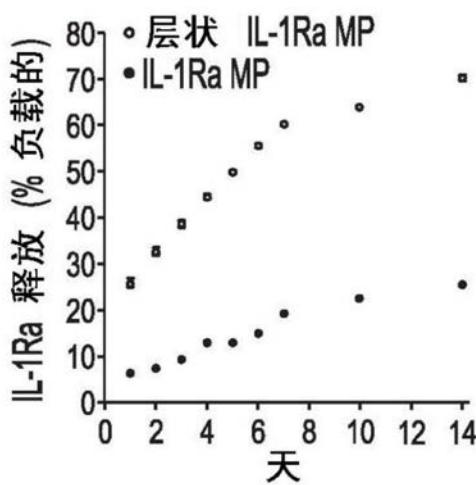


图13C

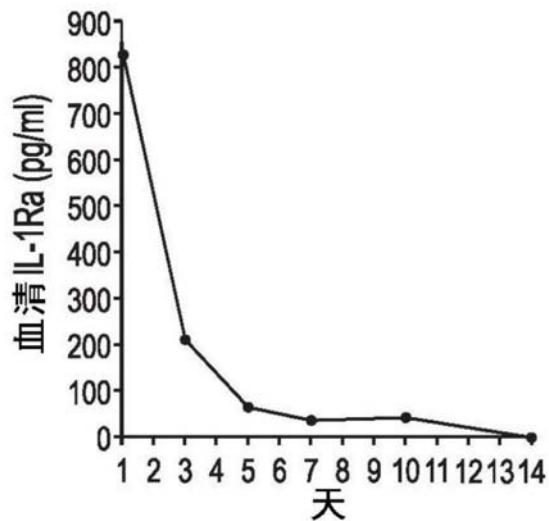


图13D

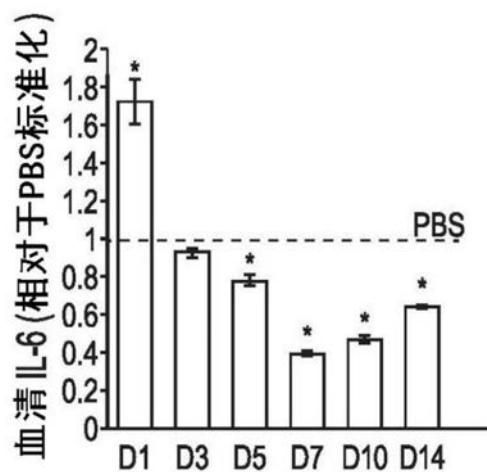


图13E

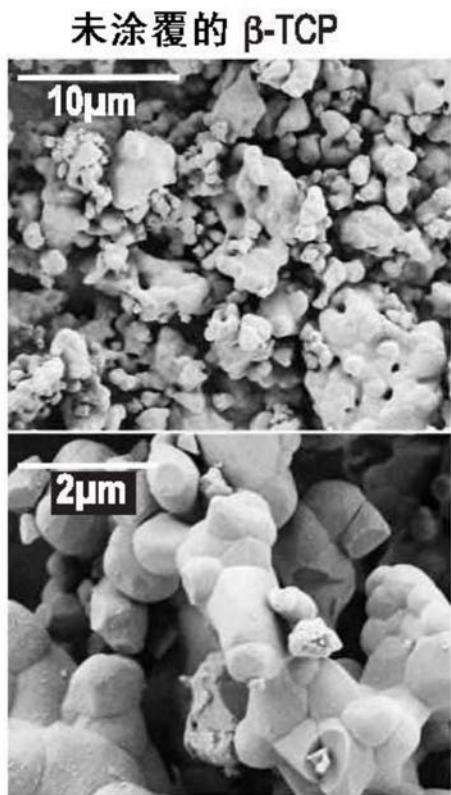


图14A

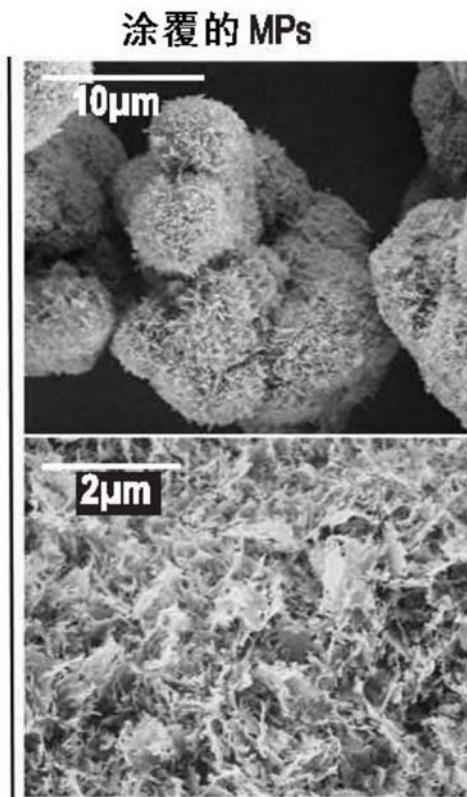


图14B

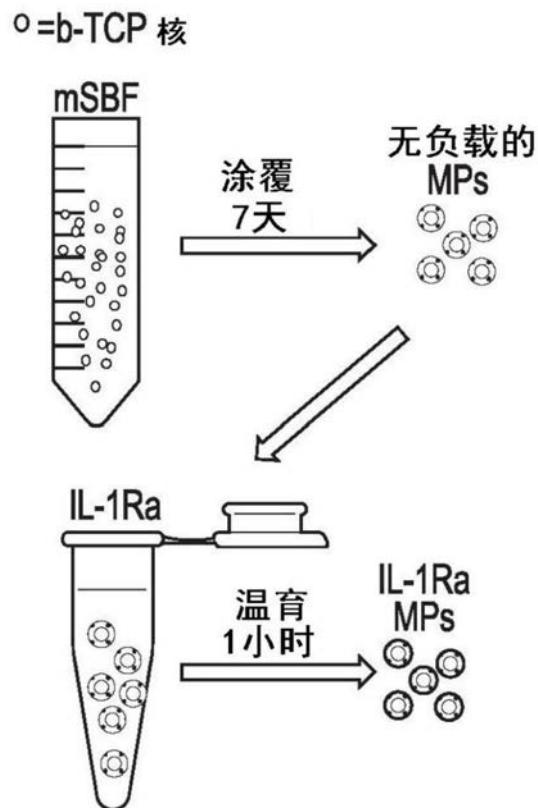


图14C

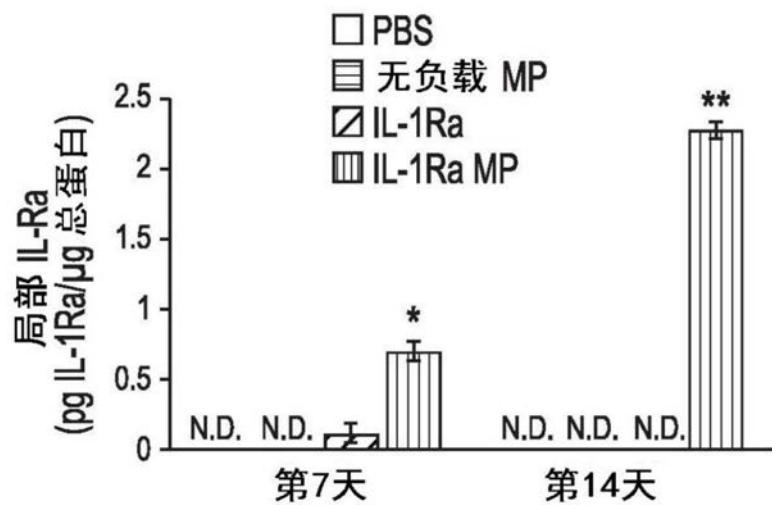


图15A

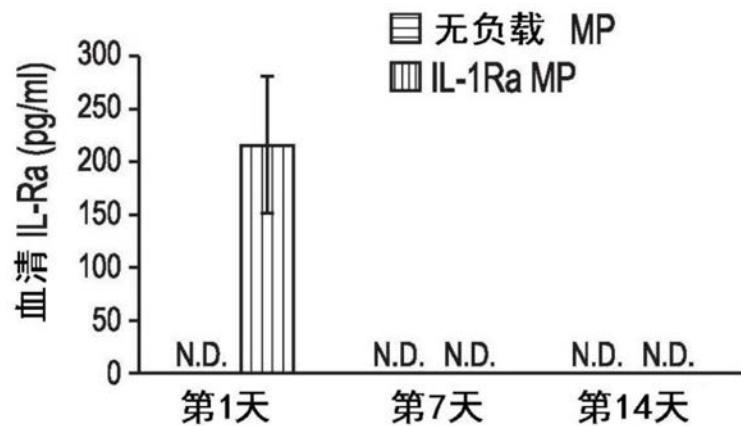


图15B

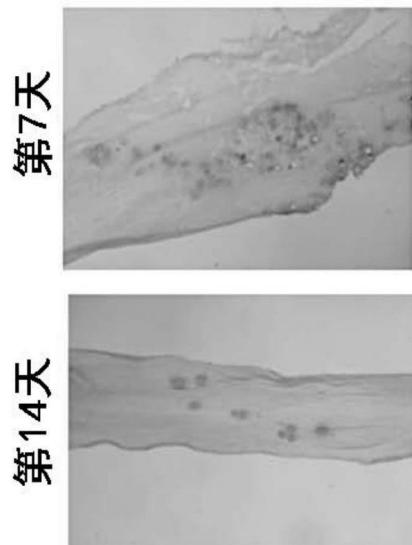


图15C

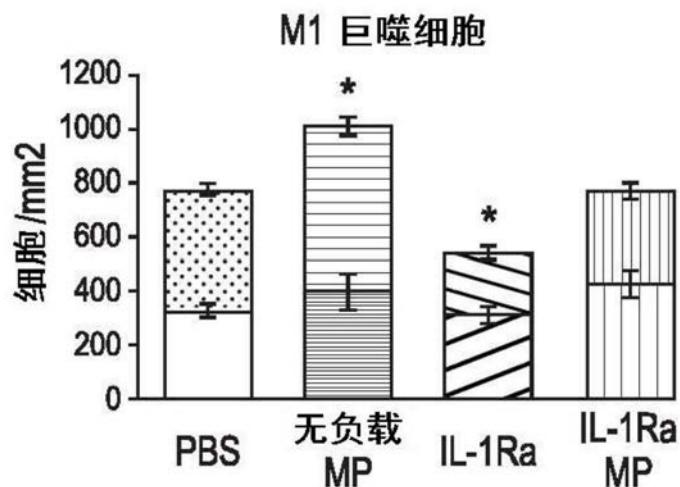


图16A

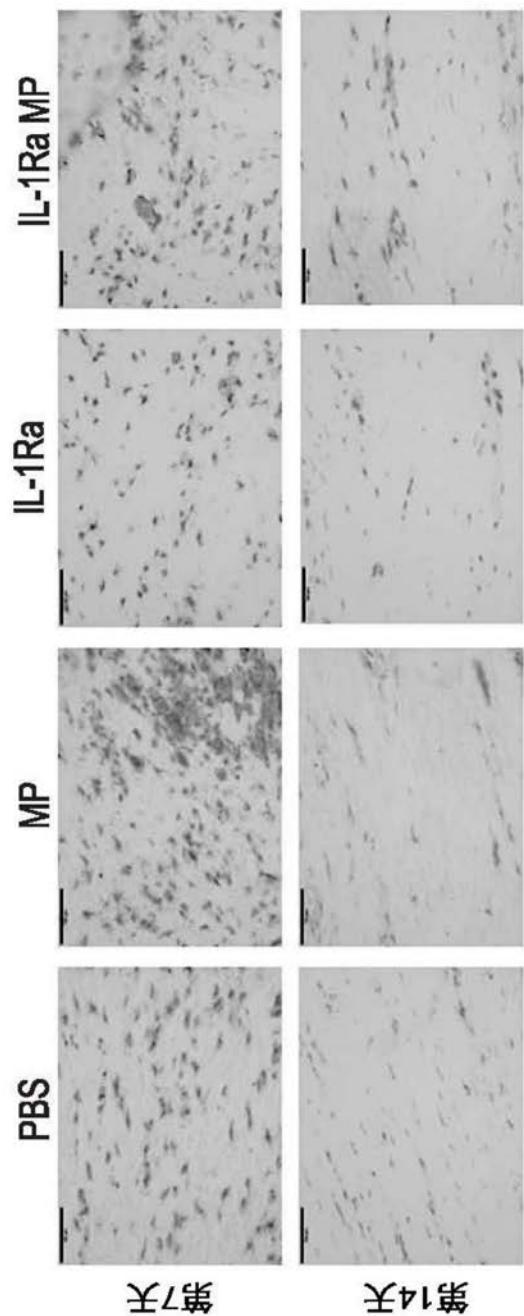


图16B

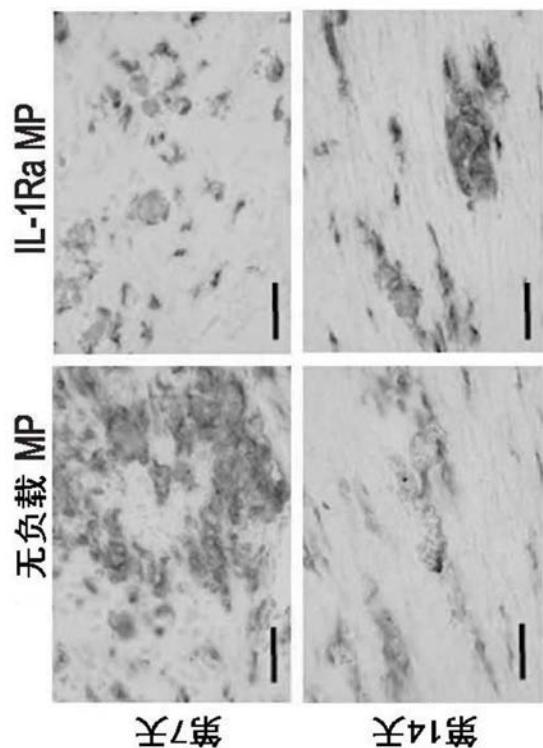


图16C

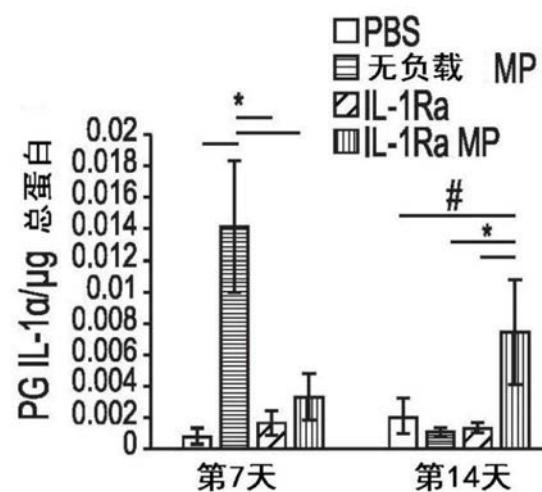


图17A

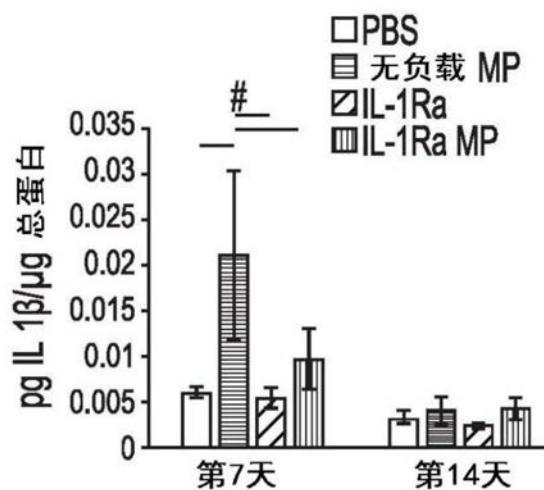


图17B

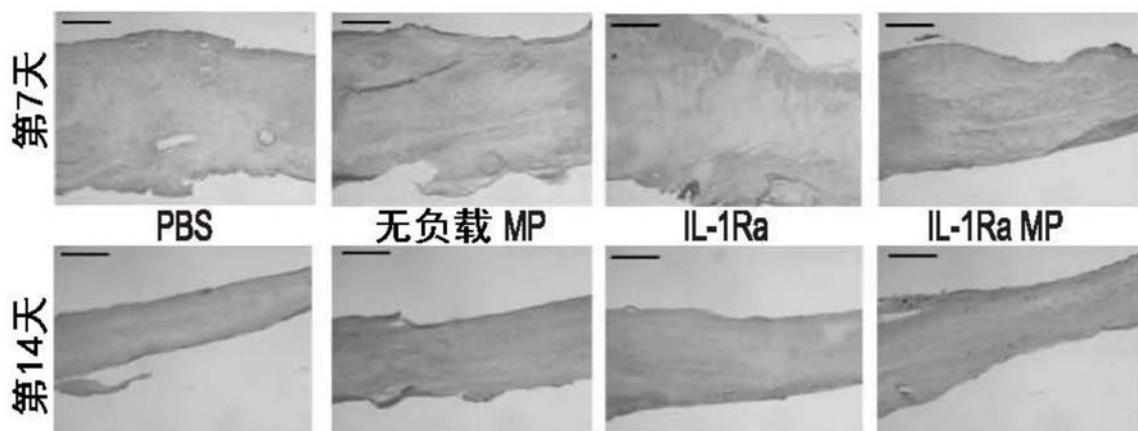


图18A

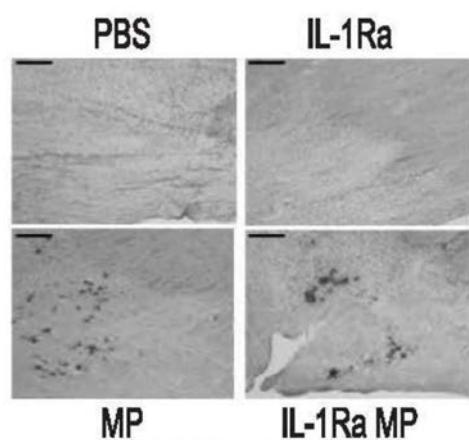


图18C

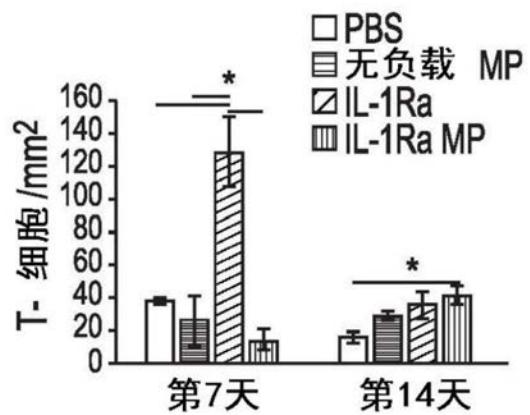


图18B