

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7170031号

(P7170031)

(45)発行日 令和4年11月11日(2022.11.11)

(24)登録日 令和4年11月2日(2022.11.2)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	9/50 (2006.01)	A 6 1 K	9/50
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04

請求項の数 13 (全40頁)

(21)出願番号	特願2020-502549(P2020-502549)	(73)特許権者	594106405
(86)(22)出願日	平成30年4月3日(2018.4.3)		ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション
(65)公表番号	特表2020-513033(P2020-513033 A)		WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(43)公表日	令和2年4月30日(2020.4.30)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 2 6 , マディソン , ウォルナット ストリート 6 1 4
(86)国際出願番号	PCT/US2018/025913	(74)代理人	100101454
(87)国際公開番号	WO2018/187344		弁理士 山田 卓二
(87)国際公開日	平成30年10月11日(2018.10.11)	(74)代理人	100156144
審査請求日	令和3年3月31日(2021.3.31)		弁理士 落合 康
(31)優先権主張番号	62/480,710	(72)発明者	ウィリアム・マーフィー
(32)優先日	平成29年4月3日(2017.4.3)		アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的に活性な分子を持続送達するためのミネラルコーティングされたマイクロ粒子

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

担体溶液を含む、活性剤を提供するための製剤であって、  
担体溶液が、

少なくとも第1未結合活性剤、

コアとミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および  
該ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に結合した、少なくとも第2活性剤  
を含み、

第1の未結合の活性剤と該ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に結合した第2活性剤が共に製剤化されている、製剤。

## 【請求項 2】

第2結合活性剤が、第1未結合活性剤と同一であるかまたは異なる、請求項1に記載の製剤。

## 【請求項 3】

担体溶液に含まれる第1未結合活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている第2結合活性剤が、第1未結合活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている第2結合活性剤が別々の製剤で投与された場合の作用プロファイルと同一または実質的に同一な作用プロファイルを有する、請求項1または2に記載の製剤。

## 【請求項 4】

第2結合活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されているか、ミネラルコーティング内に組み込まれているか、またはその組合せである、請求項1～3のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項5】

第1未結合活性剤および第2結合活性剤が、IL-1アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11アンタゴニスト；IL-1Rアンタゴニスト；アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せより選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項6】

IL-1アンタゴニストが、組み換えIL-1アンタゴニストである、請求項5に記載の製剤。

【請求項7】

ミネラルコーティングが、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、アスタチンおよびそれらの組合せより選択されるハロゲンを含み、請求項1～6のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項8】

コアが、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項9】

少なくとも1つの活性剤を持続送達するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項10】

全身投与または局所投与により投与される、請求項9に記載の製剤。

【請求項11】

治療的、予防的および/または診断的処置として与えられる、請求項9または10に記載の製剤。

【請求項12】

炎症性疾患を処置するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項13】

活性剤の生物学的活性を増加させるための、請求項1～8のいずれか一項に記載の製剤。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2017年4月3日出願の米国仮出願第62/480,710号に基づく優先権を主張し、該出願は、出典明示によりその全体として本明細書の一部とする。

【0002】

(連邦政府資金による研究開発の記載)

本発明は、米国国立衛生研究所の助成HL093282の支援で行われた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。

40

【背景技術】

【0003】

本開示は、活性剤を提供するための製剤に関する。製剤は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む担体を含み、ここで、活性剤は、ミネラルコーティングに吸着されている。活性剤を提供するための製剤を用いた、活性剤の持続送達方法および炎症性疾患の処置方法もまた開示する。

【0004】

活性剤の送達戦略には、局所送達戦略および持続送達戦略が含まれる。局所送達において、活性剤は、対象とする部位でのみ活性であり、対象とする部位以外の領域に対する影

50

響を制限する。例えば、担体システム（ゲル、スcaffolds、マイクロ粒子）への封入は、薬剤が局所的に作用するが、循環に入る薬剤の量を制限する局所送達のために利用される。持続送達システムの送達は、様々なプラットフォームを利用して、長時間かけて薬剤を制御放出することにより、全身的または局所的に治療濃度範囲を維持する。以前に探索された持続送達の戦略によって、活性剤がより低活性となり得て、これは、治療効果を提供するためにより高用量を必要とする。

#### 【0005】

骨関節症（OA）およびリウマチ性関節炎（RA）は、重大な臨床的課題である。関節炎は、米国における身体障害の主要原因であり、5000万人以上が罹患する。OAの費用は相当であるが、患者のクオリティ・オブ・ライフは、低いままである。米国において、RAの罹患率は、1～2%であり、年間医療費は、米国の患者1人当たり60,000～120,000ドルである。両方とも慢性的で進行性であり、両方とも炎症過程を伴うが、2つの病態間の1つの相違は、OAは局所的と考えられているが、RAは全身疾患とみなされていることである。OAは、しばしば関節置換に至るが、RA患者の3分の1は、重度の身体障害となる。関節炎は、集中した荷重支持力および運動誘発摩擦から可動関節の骨を保護する組織である、関節軟骨を破壊する。関節軟骨は、制限された再生能力を有する。いったん損傷を受けると、正のフィードバックループは、分子産物が生産するマトリックスプロテアーゼを放出し、慢性病因を引き起こす。内因性シグナル伝達は、腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）およびインターフェロン- $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）を含む関節滑膜における炎症シグナルの上方制御により増強される。

#### 【0006】

現在、非ステロイド系抗炎症剤以外のOAを処置するのに利用可能な治療薬はほとんどない。関節置換の前に、様々な外科手術手順が、軟骨修復を促進するために用いられ得る。これらは、一時的な軽減を提供するが、不十分に組織化され、機能的に劣り、時間とともに壊れる修復組織をもたらす。RAについて、メトトレキサートが一般的に用いられるが、患者の50%がこの処置に失敗する。その後、TNF阻害剤が処方される。それらは、高価であり、なお多くの患者で失敗する。OAおよびRA患者の両方について、IL-1阻害剤には、大きな有望性があり、重要な処置ギャップを埋め得る。しかしながら、持続送達によりインビボで治療濃度を維持することは、その臨床的使用を制限し得る手ごわい課題である。遺伝子送達は、IL-1阻害剤レベルを保持する新たな戦略である。このコンセプトは、科学的に魅力的だが、自己滑膜細胞を採取し、ウイルスでトランスフェクトして、IL-1Raを過剰発現させ、患者の滑膜関節へ再移植することを必要とするが、これは、臨床的実現可能性および安全性に関する懸念を生じる。

#### 【0007】

インターロイキン-1（IL-1）は、慢性炎症状態（例えばリウマチ性関節炎、骨関節症、および2型糖尿病）、神経病理学的疾患（例えば卒中、アルツハイマー病、パーキンソン病、および癲癇）、およびより局所的な炎症状態（例えば皮膚および靭帯の創傷治癒）を含む、多くの炎症状態において炎症の主要なメディエーターである。インターロイキン-1がその受容体と相互作用するとき、炎症誘発性シグナル伝達カスケードは、リンパ球、内皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞および軟骨細胞を含む、様々な細胞タイプにおいて開始される。インターロイキン-1受容体アンタゴニスト（IL-1Ra）は、IL-1受容体に結合するが、炎症カスケードを開始しない、炎症誘発性インターロイキン-1（IL-1）誘発炎症の天然に存在するアンタゴニストである。IL-1Raの組み換え型は、リウマチ性関節炎を処置するために臨床的に承認されている。他の臨床適用のために適用外でも使用されている。IL-1Raは、他の可能性のある治療的タンパク質と比較したとき、IL-1受容体との高い結合親和性および標的特異性、低毒性ならびに低分子量（17kD）を含む、炎症を制御するのに理想的な候補となる独特で望ましい特性を有する。IL-1発現に関連する炎症状態の多くのための可能な処置戦略として研究されている。

#### 【0008】

IL-1活性を阻害するのに必要とされるIL-1Raの短いインビボ半減期（4～6時間）および

10

20

30

40

50

高い用量（1 mg/kg）は、多くの病態に対してIL-Ra処置の有効性を制限し、高用量（100 mg）の毎日の皮下注射などの面倒な処置レジメンを作り出している課題である。異なるタンパク質およびペプチドパートナーとのIL-Raの融合を含む、IL-Raの半減期を延長させる送達戦略が以前に開発された。タンパク質およびペプチドパートナーとのIL-Raの融合は、酵素分解および腎ろ過を防止することにより、インビボ半減期を延ばす。他のペプチドパートナーとの融合は、IL-Raの半減期を最大20倍長くしたが、一部の融合の活性は、IL-Raより100～500倍低くなる。研究者らはまた、IL-Raをポリエチレングリコール（PEG）と融合させて、IL-RaをPEG化し、その半減期を延長させた。PEG化の後、IL-Ra-PEGは、IL-1受容体との結合活性の著しい低下を示した。IL-Ra構造の変化は、IL-Raの半減期の向上に成功したが、IL-Ra構造の変化およびIL-1受容体結合への干渉は、臨床における使用を制限し得る。他の分子とのIL-Raの融合に加えて、研究者らはまた、乳酸-グリコール酸共重合体マイクロスクフエアにIL-Raを封入することにより、持続的で局所的な方法でIL-Raを送達することを試みた。BALB/cマウスにおいてPLGAマイクロスクフエアを皮下注射により投与したとき、IL-Raの血清レベルは、8日間上昇したままであり、24時間後にIL-Raが検出不能であるIL-Raのボーラス皮下注射と比較したとき、著しい増加であった。しかしながら、同じ研究において、IL-Raの生物学的活性が、封入過程で中到大に損なわれたこともまた示され、封入されたIL-Raの6%のみが生物学的に活性なままであると推定された。ポリマーマイクロスクフエアにおける封入は、過酷な処理環境、封入のために必要とされる溶媒の使用、および密なタンパク質の充填により引き起こされるタンパク質の凝集のため、タンパク質の生物学的活性にしばしば有害である。

#### 【0009】

半減期が短い活性剤の利点を延長させる戦略は、活性を低下させる、および／またはより高い用量を必要とした。したがって、生物学的に活性な分子の持続送達および／または局所送達を提供し得る代替送達システムが必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

一態様において、本開示は、活性剤を提供するための製剤に関する。製剤は、担体を含み、ここで、担体は、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラル内に組み込まれている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されており、そしてミネラル内に組み込まれている。

#### 【0011】

一態様において、本開示は、活性剤を提供するための製剤に関する。製剤は、担体を含み、ここで、担体は、ミネラルに吸着されている活性剤を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。

#### 【0012】

一態様において、本開示は、活性剤を持続送達するための製剤に関する。製剤は、第1活性剤を有する溶液；および第1活性剤を有する溶液に加えられたミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。一実施態様において、活性剤は、第1活性剤を含有する溶液に加えることにより、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着する。別の一実施態様において、第2活性剤は、第1活性剤の溶液に加えられる前に、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子内に組み込まれている。

#### 【0013】

一態様において、本開示は、活性剤を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関する。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラル内に組み込まれている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されており、そしてミネラル内に組み込まれている。

#### 【0014】

一態様において、本開示は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関するもので

あり、ここで、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、層状ミネラルコーティングおよび少なくとも1つのミネラルコーティング層上に吸着されている少なくとも1つの活性剤を含む。

【0015】

一態様において、本開示は、活性剤を即時および持続送達するための方法に関する。当該方法は、それを必要とする個体に製剤を提供することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラル内に組み込まれている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されており、そしてミネラル内に組み込まれている。

10

【0016】

一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体において炎症性疾患を処置するための方法に関する。当該方法は、対象体に製剤を投与することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラル内に組み込まれている。一実施態様において、第2活性剤は、ミネラルに吸着されており、そしてミネラル内に組み込まれている。

【0017】

別の一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体において手術後炎症を処置するための方法に関する。当該方法は、対象体に製剤を投与することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、活性剤を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1Aは、4.2 mM（低）炭酸の改変模擬体液（mSBF）で形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の板状形態を示す低倍率SEMである。図1Bは、4.2 mM（低）炭酸のmSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の板状形態を示す高倍率SEMである。図1Cは、25 mM（中）炭酸のmSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の球晶様形態を示す低倍率SEMである。図1Dは、25 mM（中）炭酸のmSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の球晶様形態を示す高倍率SEMである。図1Eは、100 mM（高）炭酸のmSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の球晶様形態を示す低倍率SEMである。図1Fは、100 mM（高）炭酸のmSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子の球晶様形態を示す高倍率SEMである。図1Gは、低 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）、中 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）、および高 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）で形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子によるカルシウム放出を示すグラフである。図1Hは、低 $\text{HCO}_3^-$  mSBF、中 $\text{HCO}_3^-$  mSBF、および高 $\text{HCO}_3^-$  mSBFで形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子と結合するBMP-2を示すグラフである。図1Iは、低 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）、中 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）、および高 $\text{HCO}_3^-$  mSBF（ ）で形成したミネラルコーティングされたマイクロ粒子からのBMP-2の放出を示すグラフである。

30

40

【0019】

【図2A】図2Aは、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子（例えば、高炭酸および低炭酸のマイクロ粒子）の種々の製剤へのIL-Raの結合とインキュベーション溶液中における活性剤の種々の濃度を示すグラフである。

【0020】

【図2B】図2Bは、高炭酸および低炭酸のマイクロ粒子によるIL-Raの結合効率とインキュベーション溶液中における活性剤の種々の濃度を示すグラフである。

【0021】

50

【図3】図3は、7日間にわたるミネラルコーティングされたマイクロ粒子によるIL-Raの持続放出を示すグラフである。

【0022】

【図4A】図4Aは、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子から放出されたIL-Raが活性であり、IL-1で刺激されたマクロファージにおけるIL-6産生を阻害したことを示すグラフである。IL-1での刺激12時間後に、IL-Raを含有する4.2 mMミネラルコーティングされたマイクロ粒子、IL-Raを含有する100 mMミネラルコーティングされたマイクロ粒子、可溶性IL-Ra、無負荷マイクロ粒子、およびIL-Ra無しでインキュベートしたマクロファージにより産生したIL-6の培地濃度を表す。

【0023】

【図4B】図4Bは、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子から放出されたIL-Raが活性であり、IL-1で刺激されたマクロファージにおけるIL-6産生を阻害したことを示すグラフである。IL-1での刺激24時間後に、IL-Raを含有する4.2 mMミネラルコーティングされたマイクロ粒子、IL-Raを含有する100 mMミネラルコーティングされたマイクロ粒子、可溶性IL-Ra、無負荷マイクロ粒子、およびIL-Ra無しでインキュベートしたマクロファージにより産生したIL-6の培地濃度を表す。

【0024】

【図5】図5は、マウスがPBS、無負荷マイクロ粒子、可溶性IL-Ra、またはIL-Raマイクロ粒子（可溶性IL-Ra中でインキュベートしたMP）の単回皮下注射を受けたときのインビボでIL-6のIL-1誘発産生の阻害を示すグラフである。

【0025】

【図6】図6は、マウスT-リンパ球のIL-1誘発増殖を減少させるマイクロ粒子から放出されたIL-Raの生物学的活性を示すグラフである。

【0026】

【図7】図7は、炎症フェーズ、増殖フェーズおよび再形成フェーズの3つのオーバーラップするフェーズからなるラットMCL治癒を示す時間図である。炎症細胞が靱帯を浸潤し、IL-1レベルが増加する間の炎症フェーズは、損傷日から損傷後5日目まで及ぶ。

【0027】

【図8A】図8Aは、マイクロ粒子濃度が減少している低信号域の減少を示すT2強調MRIを用いた、筋肉内注射したSPIO標識ミネラルコーティングされたマイクロ粒子の種々の濃度を示す磁気共鳴画像（MRI）である。

【0028】

【図8B】図8Bは、損傷後に注射したときのラットMCLの治癒におけるSPIO標識MCMを示す磁気共鳴画像（MRI）である。

【0029】

【図8C】図8Cは、MCMが、注射後少なくとも15日間MCL内に局在したままであることを示す磁気共鳴画像（MRI）である。

【0030】

【図9A】図9Aは、損傷14日後に慢性炎症を引き起こすことなく、損傷7日後に肉芽組織においてMCMによりM1マクロファージが上方制御されることを示すグラフである。

【0031】

【図9B】図9Bは、MCMが、カルシウムのアリザリンレッド染色により示されるように損傷後7日間MCL内に局在したままであるが、靱帯構造に影響を及ぼさず、または更なる浮腫を引き起こさないことを示す光学顕微鏡写真である。

【0032】

【図9C】図9Cは、MCMが、損傷21日後にはMCLにもはや存在せず、靱帯形態に影響を及ぼさず、または組織を石灰化しないことを示す光学顕微鏡写真である。

【0033】

【図10】図10A～10Dは、MPに結合するIL-Raの量を調整し得て、MPが持続的にIL-Raを放出することを示す。図10Aは、IL-Raの作製の概略図であり、これは、IL-Ra含有溶

10

20

30

40

50

液にマイクロ粒子を添加し、その後1時間インキュベートすることを含む。図10Bは、負荷中にIL-Ra濃度を減少させてインキュベートしたときに、MP 1 mg当たりのIL-Ra結合の量が減少したことを示す。図10Cは、MPに対するIL-Raの結合効率が、負荷中にIL-Raの濃度の減少とともに増加したことを示す。図10Dは、14日間にわたる模擬体液におけるMPからのIL-Raの累積放出が、少なくとも14日間持続放出を示したことを示す。データは、平均±標準誤差を表す。

#### 【0034】

【図11】図11A～11Eは、MPから放出されたIL-Raが、インビトロにおいて生物学的に活性であることを示す。図11Aは、D10.G4.1マウスT-リンパ球をIL-1で処理した後、細胞濃度が増加し、無負荷MPは、細胞濃度のIL-6誘発増加に影響を及ぼさなかったことを示す。図11Bは、可溶性IL-RaまたはPBSで処理した細胞と比較して、D10.G4.1マウスT-リンパ球をIL-1で刺激した後に、IL-Ra MPが細胞濃度を著しく減少させたことを示す。図11Cは、D10.G4.1マウスT-リンパ球培養培地におけるIL-Raの濃度が、IL-Ra MPと比較して、可溶性IL-Raで処理した培地において著しく高く、PBSで処理した培地において検出不能であったことを示す。図11Dは、トランスウェル細胞培養系における無負荷MPまたはIL-Ra MPとのTHP-1の培養の概略図である。処理6時間後にIL-1を培養培地に加えた。図11Eは、IL-Ra MPでの処理が、無負荷MPと比較して、IL-1刺激THP-1細胞培養において処理後18および30時間にてIL-6の培地濃度を著しく減少させたことを示す。データは、平均±標準偏差を表す。異なる文字は、群間の有意差(ANOVA、 $p < 0.05$ )を表し、\*は、比較処置間の有意差(スチューデントt検定、 $p < 0.05$ )を表す。

#### 【0035】

【図12】図12A～12Cは、IL-Ra MPが、IL-Raの血清濃度を14日間増加させ、インビボでIL-1活性を阻害したことを示す。図12Aは、マイクロ粒子をIL-Raの溶液へ加え、その後注射することを含む、IL-Ra MPのインビボ処置の概略図である。図12Bは、処置1、3、5、7および14日後に採取した血清におけるIL-Raの濃度が、14日間増加したままであることを示す。図12Cは、IL-1刺激の2時間後に採取したPBS処置動物におけるIL-6の血清濃度に対して正規化した血清IL-6を示す。1より低い値は、IL-誘発血清IL-6の減少を表す。異なる文字は、群間の有意差( $p < 0.05$ )を表し；\*は、処置およびPBS対照間の有意差( $p < 0.05$ )を表す。N.D.は、検出不能を表す。

#### 【0036】

【図13】図13A～13Eは、層状IL-Ra MPが、より多くのIL-Raと結合し、より低いバースト放出でより遅い速度にてIL-Raを放出し、長時間にわたってインビボでIL-1活性を阻害したことを示す。図13Aは、層状IL-Ra MP作製の概略図である。図13Bは、層状IL-Ra MPが、IL-Ra MPよりMP 1 mg当たり多くのIL-Raと結合したことを示す。図13Cは、層状IL-Ra MPが、IL-Ra MPと比較して、1日後に負荷IL-Raのより低い割合を放出し、少なくとも14日間持続的にIL-Raを放出したことを示す。図13Dは、層状IL-Ra MPが、血清IL-Raを検出可能なレベルを超えて10日間上昇させたことを示す。図13Eは、層状IL-Ra MPが、少なくとも14日間IL-1刺激後にPBS対照と比較して血清IL-6濃度を減少させたことを示す。

#### 【0037】

【図14】図14A～14Cは、マイクロ粒子のコーティング形成およびIL-Ra負荷を示す。図14Aは、低倍率(上)および高倍率(下)での未コーティングのB-TCPコア材料のSEMを示す。図14Bは、低倍率(上)および高倍率(下)でのmSBFにおけるコーティングの7日後のマイクロ粒子のSEMを示す。図14Cは、マイクロ粒子のコーティング形成およびIL-Ra負荷の概略図である。

#### 【0038】

【図15】図15A～15Cは、マイクロ粒子によるIL-Raの局所送達を示す。図15Aは、均質化MCLにおけるIL-Raの組織濃度を示す。図15Bは、IL-Raの血清濃度を示す。図15Cは、処置7および14日後のMCL内におけるMPのアリザリンレッド染色を示す。グラフは、平均±標準誤差を表し、\*は、可溶性IL-RaおよびIL-Ra MP間の $p < 0.05$ を表し、\*\*は

、7日目のIL-Ra MPおよび14日目のIL-Ra MP間での $p < 0.05$ を表し、N.D.は、「検出不能」を表す。

【0039】

【図16】図16A～16Cは、IL-Ra MPの抗炎症活性を示す。図16Aは、損傷7日後（暗いパー）および損傷14日後（明るいパー）のMCLの肉芽組織内のM1マクロファージ濃度を示す。グラフは、平均±標準誤差を表し、\*は、PBS処置対照と比較した $p < 0.05$ を表す。図16Bは、損傷7日および14日後のMCL肉芽組織内におけるED1染色したM1マクロファージ（褐色）を示す。スケールバーは、 $100 \mu\text{m}$ を表す。図16Cは、損傷7日および14日後の無負荷およびIL-Ra MP周辺のED1染色したM1マクロファージを示す。スケールバーは、 $20 \mu\text{m}$ を表す。

10

【0040】

【図17】図17Aおよび17Bは、MCL内における局所炎症性タンパク質濃度を示す。図17Aは、IL-1 の濃度を示し、図17Bは、総タンパク質濃度に対して正規化した処置7および14日後のIL-1 の濃度を示す。グラフは、平均±標準誤差を表し、\*は、示される群間での $p < 0.05$ を表し、#は、示される群間での $p < 0.15$ を表す。

【0041】

【図18】図18A～18Cは、マイクロ粒子に対するインピボでの反応を示す。図18Aは、損傷7日および14日後のMCL切片のH&E染色を示す。スケールバーは、 $500 \mu\text{m}$ を表す。図18Bは、損傷7日および14日後の肉芽組織内におけるT-リンパ球濃度を示す。グラフは、平均±標準誤差を表し、\*は、示される群間での $p < 0.05$ を表す。図18Cは、マイクロ粒子を取り囲む組織のH&E染色を示す。スケールバーは、 $100 \mu\text{m}$ を表す。

20

【発明を実施するための形態】

【0042】

本開示は、活性剤を提供するための製剤に関する。いくつかの実施態様において、製剤は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む担体を含み、ここで活性剤は、ミネラルコーティングに吸着されている。いくつかの実施態様において、製剤は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む担体を含み、ここで活性剤は、ミネラルコーティング内に組み込まれている。いくつかの実施態様において、製剤は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む担体を含み、ここで活性剤は、ミネラルコーティング内に組み込まれており、活性剤は、ミネラルコーティングに吸着されている。担体に含まれる活性剤は、投与後急速な効果を提供するが、ミネラルコーティングに吸着されているおよび/またはミネラルコーティング内に組み込まれている活性剤は、ミネラルコーティングが分解するにつれて持続送達を提供する。また、活性剤の持続放出を提供するための製剤を用いた、活性剤の持続放出方法および炎症性疾患の処置方法を開示する。

30

【0043】

一態様において、本開示は、活性剤を提供するための製剤に関する。

【0044】

一実施態様において、製剤は、担体を含み、ここで、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コア；コア上のミネラルコーティング；およびミネラルコーティングに吸着されている活性剤を含む。

40

【0045】

一実施態様において、製剤は、担体を含み、ここで、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コア；コア上のミネラルコーティング；およびミネラルコーティング内の活性剤を含む。

【0046】

一実施態様において、製剤は、担体を含み、ここで、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コア；コア上のミネラルコーティング；およびミネラルコーティング内の少なくとも1つの

50



活性剤およびミネラルコーティングに吸着されている少なくとも1つの活性剤を含む。

【0047】

一実施態様において、製剤は、担体を含み、ここで、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コア、コア上の第1ミネラルコーティング層、第1ミネラルコーティング層上に吸着されている活性剤、第2ミネラルコーティング層および第2ミネラルコーティング層に吸着されている第2活性剤を含む。

【0048】

一実施態様において、製剤は、担体を含み、ここで、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コア、複数のミネラルコーティング層、および活性剤を含む。複数のミネラルコーティング層は、本明細書に記載されるように同一コーティング組成であり得る。複数のミネラルコーティング層はまた、本明細書に記載されるように異なるコーティング組成であり得る。本明細書に記載されるように各ミネラルコーティング層が調製された後に、活性剤は、ミネラルコーティング層上に吸着され得る。本明細書に記載されるようにミネラル形成中に、活性剤は、ミネラルコーティング層内に組み込まれ得る。活性剤は、本明細書に記載されるように同一活性剤であり得る。活性剤は、本明細書に記載されるように異なる活性剤であり得る。

10

【0049】

本明細書で用いられる用語「製剤」は、有益な剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、非経腸投与に許容される物理化学的形態の液体中でまたはそれにより製剤化、混合、添加、溶解、分散、可溶化、溶液への製剤化、運搬などされることを総称的に示す。

20

【0050】

一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と同一である。別の一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と異なる。別の一態様において、少なくとも2つの異なる活性剤が、ミネラルコーティングに吸着される。企図される実施態様は、ミネラルコーティングに吸着されている3、4、5またはそれ以上の異なる活性剤をさらに含む。一実施態様において、ミネラルコーティング内に組み込まれている活性剤は、担体中の活性剤と同一である。別の一実施態様において、ミネラルコーティング内に組み込まれている活性剤は、担体中の活性剤と異なる。別の一態様において、少なくとも2つの異なる活性剤が、ミネラルコーティング内に組み込まれる。企図される実施態様は、ミネラルコーティング内に組み込まれている3、4、5またはそれ以上の異なる活性剤をさらに含む。別の一態様において、活性剤は、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤と組み合わせてミネラルコーティング内に組み込まれ得る。製剤は、担体溶液中に3、4、5またはそれ以上の異なる活性剤を含む。

30

【0051】

特に適切な活性剤は、IL-1アンタゴニスト；IL-1受容体アンタゴニスト；アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せであり得る。特に適切なIL-1アンタゴニストは、組み換えIL-1アンタゴニストである。アバタセプトは、CTLA-4の細胞外ドメインとIgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメインから構成される融合タンパク質であり、リウマチ性関節炎患者における使用が現在承認されている。リツキシマブは、タンパク質CD20に対するモノクローナル抗体であり、主に免疫系B細胞の表面で見られ、自己免疫性疾患および種々の癌を処置するために用いられる。リツキシマブはまた、中等度から重度の活動性リウマチ性関節炎（RA）の成人患者において兆候および症状を軽減するために、メトトレキサート（MTX）と組み合わせた使用が承認されている。トシリズマブは、主にリウマチ性関節炎（RA）および小児における関節炎の重症型である全身性若年性特発性関節炎の処置のための免疫抑制薬である。それは、インターロイキン-6受容体（I

40

50

L-6R) に対するヒト化モノクローナル抗体である。アナキンラは、リウマチ性関節炎を処置するために用いられるインターロイキン1 (IL1) 受容体アンタゴニストである。アダリムマブは、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎および若年性特発性関節炎を処置するために用いられるTNF阻害抗炎症性モノクローナル抗体である。エタネルセプトは、TNF受容体とTNFを阻害するIgG1抗体の定常末端の融合タンパク質であり、リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎および乾癬性関節炎、局面型乾癬および強直性脊椎炎を処置するために用いられる。インフリキシマブは、TNF- と結合するキメラモノクローナル抗体であり、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎およびリウマチ性関節炎を処置するために用いられる。セルトリズマブ (およびヒト化TNF阻害モノクローナル抗体のPEG化Fab'フラグメントであるセルトリズマブペゴル) は、腫瘍壊死因子 (TNF-) に特異的なモノクローナル抗体のフラグメントであり、クローン病、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎および強直性脊椎炎を処置するために用いられる。ゴリムマブは、腫瘍壊死因子 (TNF-) を標的とするヒトモノクローナル抗体であり、それ故にTNF阻害剤であり、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎および潰瘍性大腸炎のための処置として用いられる。

10

#### 【0052】

他の適切な活性剤は、サイトカインのIL-1ファミリーのアンタゴニストであり得る。IL-1ファミリーは、炎症誘発性サイトカインの複雑なネットワークを誘発し、炎症反応を制御および開始する11個のサイトカインのグループである。11個のサイトカインとしては、IL-1a (IL-1F1)、IL1b (IL-1F2)、IL-Ra (IL-1F3)、IL-18 (IL-1F4)、IL-36Ra (IL-1F5)、IL-36 (IL-1F6)、IL-37 (IL-1F7)、IL-36 (IL-1F8)、IL36 (IL-1F9)、IL-38 (IL-1F10) およびIL-33 (IL-1F11) が挙げられる。

20

#### 【0053】

他の適切な活性剤は、インターロイキン-1受容体 (IL-1R) ファミリーのアンタゴニストであり得る。IL-1R受容体ファミリーは、細胞外免疫グロブリン様ドメインおよび細胞内Toll/インターロイキン-1R (TIR) ドメインにより特徴付けられる。それは、植物から哺乳類まで同定されるため、種にわたって保存された構造的に相同なタンパク質のグループである。IL-1Rは、免疫宿主防御および造血に関与する。I型IL-1R (IL-1RI) (CD121aとしても知られる) は、IL-1、IL-1 およびIL-RAの受容体である。IL-1Rファミリーのメンバーとしては、IL-1R1、IL-18R、IL-Rrp2およびST2が挙げられる。IL-1RIIは、主にリンパ系および骨髄系細胞に発現する。IL-1RIIは、IL-1、IL-1 およびIL-1RIに結合できる表面受容体であり、可溶性sIL-1RIIを形成する。

30

#### 【0054】

1つの製剤に製剤化される場合、担体に含まれている未結合の活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている活性剤は、未結合の活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている活性剤が別々の製剤で投与された場合の作用プロファイルと同一または実質的に同一な作用プロファイルを有する。したがって、未結合の活性剤は、急速な (rapid) または即時の (immediate) 作用プロファイルを有するボラス投与として機能するが、結合活性剤 (ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている) は、持続放出の作用プロファイルとして機能する。

40

#### 【0055】

本明細書で用いられる、有効量、治療的有效量、予防的有效量および診断的有效量は、投与後の所望の生物学的反応を誘発するのに必要とされる未結合活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている活性剤の量である。

#### 【0056】

適切な担体としては、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液などが挙げられる。

#### 【0057】

製剤はまた、界面活性剤、防腐剤および添加剤などの他の成分を含み得る。界面活性剤

50

は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子の表面誘発凝集を減少または防止し得る。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、およびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどの様々な従来の界面活性剤が用いられ得る。量は、一般的に、製剤の約0.001～4重量%の範囲である。医薬的に許容される防腐剤としては、例えばフェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、2-フェノキシエタノール、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびチメロサル、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロロヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン（3p-クロルフェノキシプロパン-1,2-ジオール）およびそれらの混合物が挙げられる。防腐剤は、約0.1 mg/ml～約20 mg/ml、例えば約0.1 mg/ml～約10 mg/mlの範囲の濃度で存在し得る。医薬組成物における防腐剤の使用は、当業者に周知である。便宜のため、The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995を参照されたい。製剤は、酢酸ナトリウム、グリシルグリシン、HEPES（4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸）およびリン酸ナトリウムなどの適切な緩衝剤を含み得る。添加剤は、医薬製剤の製造で一般的に用いられる等張化剤、抗酸化剤および安定化剤のための成分を含む。他の不活性成分としては、例えばL-ヒスチジン、L-ヒスチジン塩化塩一水和物、ソルビトール、ポリソルベート80、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、およびEDTA二ナトリウムが挙げられる。

10

**【0058】**

20

任意の適切な材料を、ミネラルコーティングが形成されるコアとして用い得る。特に適切なコア材料は、ヒトおよび動物に無毒性であることが知られている材料である。特に適切なコア材料としてはまた、ヒトおよび動物で分解および/または溶解することが知られている材料が挙げられる。適切なコア材料としては、Ⅰ型リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、PLGA、およびそれらの組合せが挙げられる。Ⅰ型リン酸三カルシウムは分解するため、Ⅰ型リン酸三カルシウムコアは特に適切である。他の実施態様において、コア材料は、ミネラルコーティング形成後に溶解し得る。他の実施態様において、コア材料は、非分解性である。

**【0059】**

ミネラルコーティングは、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む。ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を製造するために、コア材料は、改変模擬体液中でインキュベートされる。改変模擬体液は、カルシウムおよびリン酸を含み、コア表面にミネラルコーティングを形成し、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を生じる。異なるミネラルコーティング形態は、カルシウム、リン酸および炭酸の量および比率を変更することにより達成され得る。異なるミネラルコーティング形態は、例えば板状構造、球晶様構造を含む。高炭酸濃度は、板状構造を有するミネラルコーティングを生じる。低炭酸濃度は、球晶様構造を有するミネラルコーティングを生じる。ミネラルコーティング形態はまた、活性剤の吸着に影響を及ぼす。

30

**【0060】**

ミネラルコーティングが形成される適切なコア材料としては、粒子形態のポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せが挙げられる。適切な粒子は、例えばアガロースビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、ポリマービーズ、セラミックビーズ、金属ビーズ（磁性金属ビーズを含む）、ガラスビーズおよびそれらの組合せであり得る。マイクロ粒子は、セラミック（例えば、ヒドロキシアパタイト、ベータ-リン酸三カルシウム（ベータ-TCP、 $\beta$ -TCP）、磁鉄鉱、ネオジム）、プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリカプロラクトン）、ヒドロゲル（例えば、ポリエチレングリコール；乳酸-グリコール酸共重合体など、およびそれらの組合せを含む。特に適切なコア材料は、ベータ-リン酸三カルシウム（ベータ-TCP、 $\beta$ -TCP）などのインピボで溶解するものである。

40

**【0061】**

適切なマイクロ粒子サイズは、直径約1  $\mu$ m～約100  $\mu$ mの範囲であり得る。マイクロ粒

50

子の直径は、顕微鏡画像から得られる測定（光学および電子顕微鏡画像を含む）、サイズ選択基材による過などの当業者に公知な方法により測定され得る。

【0062】

コア基材は、最初に例えばポリ(ε-ヒドロキシエステル)フィルムでコーティングされ得る。特に適切なポリ(ε-ヒドロキシエステル)は、例えばポリ(L-ラクチド)、ポリ(ラクチド-ε-グリコリド)、ポリ(ε-カプロラクトン)、およびそれらの組合せであり得る。上記フィルムの任意の組合せを作るときに、フィルムは、典型的には、当該技術分野で知られる適切な有機溶媒中で混合されることを理解されたい。また、当分野で理解されたとおり、分子量、結晶化速度、ガラス転移温度、粘度などの違いが、最終基材での相分離および均質性欠如を防止するために、同様に考慮されるべきである。相分離および均質性欠如はまた、

10

【0063】

基材においてポリ(ε-ヒドロキシエステル)フィルムを製造した後、フィルムコーティングの表面を、アルカリ性条件下で加水分解して、COOHおよびOH基を有する表面を作製する。表面の加水分解後、基材を、適切なミネラル形成材料を含有する模擬体液中でインキュベートして、ミネラルコーティングを形成する。適切なミネラル形成材料は、例えばカルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せであり得る。

【0064】

本開示の方法における使用のための模擬体液（SBF）は、典型的には、約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン、例えば約7 mM～約10 mMのカルシウムイオン、例えば約8.75 mMのカルシウムイオン；約2 mM～約12.5 mMのリン酸イオン、例えば約2.5 mM～約7 mMのリン酸イオン、例えば約3.5 mM～約5 mMのリン酸イオン；および約4 mM～約100 mMの炭酸イオンを含む。

20

【0065】

いくつかの実施態様において、SBFは、約141 mMの塩化ナトリウム、約4 mMの塩化カリウム、約0.5 mMの硫酸マグネシウム、約1 mMの塩化マグネシウム、約5 mMの塩化カルシウム、約2 mMのリン酸カリウム、および約4 mMの重炭酸ナトリウムを含み得て、pH約6.8に緩衝化され得る。

【0066】

いくつかの実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン、約6 mM～約9 mMのカリウムイオン、約1.5 mMのマグネシウムイオン、約150 mM～約175 mMの塩化物イオン、約4 mMのHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、および約0.5 mMのSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンをさらに含み得る。

30

【0067】

SBFのpHは、典型的には、約4～約7.5、例えば約5.3～約6.8、例えば約5.7～約6.2、例えば約5.8～約6.1の範囲であり得る。

【0068】

適切なSBFは、例えば約145 mMのナトリウムイオン、約6 mM～約9 mMのカリウムイオン、約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン、約1.5 mMのマグネシウムイオン、約150 mM～約175 mMの塩化物イオン、約4.2 mMのHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、約2 mM～約5 mMのHPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオン、および約0.5 mMのSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンを含み得る。模擬体液のpHは、約5.3～約7.5、例えば約6～約6.8であり得る。

40

【0069】

一実施態様において、SBFは、例えば約145 mMのナトリウムイオン、約6 mM～約17 mMのカリウムイオン、約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン、約1.5 mMのマグネシウムイオン、約150 mM～約175 mMの塩化物イオン、約4.2 mM～約100 mMのHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、約2 mM～約12.5 mMのリン酸イオン、および約0.5 mMのSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンを含み得る。模擬体液のpHは、約5.3～約7.5、例えば約5.3～約6.8であり得る。

【0070】

別の一実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン、約6 mM～約9 mMのカリウムイオン、約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン、約1.5 mMのマグネシ

50

ウムイオン、約60 mM～約175 mMの塩化物イオン、約4.2 mM～約100 mMの $\text{HCO}_3^-$ 、約2 mM～約5 mMリン酸イオン、約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオンを含み、pHは約5.8～約6.8、例えば約6.2～約6.8である。

【0071】

さらに別の実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン、約9 mMのカリウムイオン、約12.5 mMのカルシウムイオン、約1.5 mMのマグネシウムイオン、約172 mMの塩化物イオン、約4.2 mMの $\text{HCO}_3^-$ 、約5 mM～約12.5 mMのリン酸イオン、約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオン、約4 mM～約100 mMの $\text{CO}_3^{2-}$ を含み、pHは約5.3～約6.0である。

【0072】

層状ミネラルコーティングを含む実施態様において、コアを改変模擬体液の製剤中でインキュベートする。ミネラルコーティング層は、数分から数日のインキュベート中にコア上に形成される。最初ミネラルコーティング層がコア上に形成された後、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、改変模擬体液から除去し、洗浄し得る。複数のミネラルコーティング層を形成するために、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、所望の数のミネラルコーティング層が達成されるまで、第2、第3、第4などの改変模擬体液中でインキュベートされる。各インキュベート期間中に、新しいミネラルコーティング層が、前の層上に形成される。これらの工程は、所望の数のミネラルコーティング層が達成されるまで、繰り返される。

【0073】

ミネラル形成中に、活性剤を改変模擬体液中に含ませて、ミネラル形成中にミネラルコーティング層内に活性剤を組み込ませ得る。ミネラルの各層の形成後、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、少なくとも1つの活性剤を含む担体中でインキュベートして、ミネラルコーティング層に活性剤を吸着させる。ミネラルコーティング層内に活性剤を組み込むおよび/またはミネラルコーティング層に活性剤を吸着させた後、別のミネラルコーティング層が、改変模擬体液の別の製剤中でマイクロ粒子をインキュベートすることにより形成し得る。必要に応じて、ミネラルコーティング層はミネラルに活性剤を組み込み得て（層は、ミネラル層に吸着されている活性剤を有し得る）、ミネラルコーティング層は、活性剤を組み込むことなく、または活性剤を吸着することなく形成でき、かつそれらの組合せである。異なるミネラルコーティング層を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、改変模擬体液の1つの製剤を用いてミネラル層を形成し、その後改変模擬体液の異なる製剤中でミネラルコーティングされたマイクロ粒子をインキュベートすることにより調製され得る。したがって、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、各層が異なる複数のミネラルコーティング層を有するように調製され得る。異なる1つ以上のミネラルコーティング層と組み合わせた、同一の2つ以上のミネラルコーティング層を含む実施態様もまた企図される。

【0074】

異なる層におけるミネラルコーティングの組成を調整することにより、有利には、各ミネラルコーティング層からの活性剤の放出動態を調整できる。

【0075】

ミネラルコーティング内に1つ以上の活性剤を組み込むことが所望される実施態様において、活性剤は、SBF中に含まれる。ミネラル形成が生じると、活性剤は、ミネラルコーティングに組み込まれるようになる。

【0076】

他の実施態様において、磁性物質は、ミネラルコーティングに組み込まれ得る。例えば、ウシ血清アルブミンに結合した超磁性酸化鉄は、ミネラルコーティングに組み込まれ得る。結合タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）は、ミネラルコーティング上に吸着して、ミネラルコーティングに磁性物質を組み込み得る。

【0077】

いくつかの実施態様において、ミネラルコーティングは、ドーパントをさらに含む。適

10

20

30

40

50

切なドーパントとしては、ハロゲン化物イオン、例えばフッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオンおよびヨウ化物イオンが挙げられる。SBF中で基材をインキュベートして、ミネラルコーティングを形成する前に、ドーパントは、SBFの他の成分と共に加えられ得る。

#### 【0078】

一実施態様において、ハロゲン化物イオンは、フッ化物イオンを含む。適切なフッ化物イオンは、フッ化物イオン含有物、例えば水溶性フッ化物塩、例えばフッ化アルカリ塩およびフッ化アンモニウム塩により提供され得る。

#### 【0079】

フッ化物イオン含有物は、一般的に、100 mMまでのフッ化物イオン、例えば約0.001 mM ~ 約100 mM、例えば約0.01 mM ~ 約50 mM、例えば約0.1 mM ~ 約15 mM、例えば約1 mMのフッ化物イオンの量を提供するようにSBF中に含まれる。

#### 【0080】

SBF中に1つ以上のドーパントを含むことは、細胞への生体分子送達の効率を著しく向上させるハロゲンドーパミネラルコーティングの形成をもたらすことが分かった。

#### 【0081】

さらに別の実施態様において、磁鉄鉱、磁鉄鉱ドーパプラスチックおよびネオジムを含む磁性物質は、マイクロ粒子コア材料に用いられる。磁性物質を含むことで、磁力の適用によるMCMの位置および/または移動/位置決めを可能にするMCMが形成される。磁性マイクロ粒子コア材料を別に使用することで、例えば細胞に対する生体分子の影響を分析しながら、どこに生体分子送達が生じるかを空間的に制御できる。

#### 【0082】

ミネラルコーティングは、約3日 ~ 約10日の期間約37 °の温度にてSBFと基材をインキュベートすることにより形成され得る。

#### 【0083】

ミネラルコーティング製造が完了した後、ミネラルコーティングを分析して、ミネラルコーティングの形態および組成を決定し得る。ミネラルコーティングの組成は、エネルギー分散型X線分光法、フーリエ変換赤外分光法、X線回折法、およびそれらの組合せにより分析され得る。適切なX線回折ピークは、例えば26 °および31 °におけるものであり得て、これは、ヒドロキシアパタイト鉱物相についての(002)面、(211)面、(112)面および(202)面に対応する。特に適切なX線回折ピークは、例えば26 °および31 °におけるものであり得て、これは、炭酸置換ヒドロキシアパタイトについての(002)面、(112)面および(300)面に対応する。他の適切なX線回折ピークは、例えば16 °、24 °および33 °におけるものであり得て、これは、リン酸八カルシウム鉱物相に対応する。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる適切なスペクトルは、例えば、O-P-O結合に対応する450 ~ 600  $\text{cm}^{-1}$ におけるピーク、およびヒドロキシアパタイトの $\text{PO}_4^{3-}$ 基の非対称P-O伸縮に対応する900 ~ 1200  $\text{cm}^{-1}$ におけるピークであり得る。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる特に適切なスペクトルピークは、例えば炭酸( $\text{CO}_3^{2-}$ )基に対応する876  $\text{cm}^{-1}$ 、1427  $\text{cm}^{-1}$ および1483  $\text{cm}^{-1}$ におけるピークであり得る。 $\text{HPO}_4^{2-}$ のピークは、ミネラルコーティングを調製するのに用いられるSBFのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を調節することにより影響を受け得る。例えば、 $\text{HPO}_4^{2-}$ ピークは、SBFのカルシウムおよびリン酸濃度の増加により増加し得る。あるいは、 $\text{HPO}_4^{2-}$ ピークは、SBFのカルシウムおよびリン酸濃度の減少により減少し得る。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる別の適切なピークは、例えば1075  $\text{cm}^{-1}$ におけるリン酸八カルシウム鉱物相についてのピークであり得て、これは、ミネラルコーティングを調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を調節することにより影響を受け得る。例えば、1075  $\text{cm}^{-1}$ ピークは、ミネラルコーティングを調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を増加させることにより明瞭にさせ得る。あるいは、1075  $\text{cm}^{-1}$ ピークは、ミネラルコーティングを調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を減少させることにより明瞭でなくさ

10

20

30

40

50

せ得る。

【0084】

エネルギー分散型X線分光法分析はまた、ミネラルコーティングのカルシウム/リン酸比を決定するために用いられ得る。例えば、カルシウム/リン酸比は、SBF中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を減少させることにより増加し得る。あるいは、カルシウム/リン酸比は、SBF中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を増加させることにより減少し得る。エネルギー分散型X線分光法によるミネラルコーティングの分析により、 $\text{PO}_4^{3-}$ の炭酸( $\text{CO}_3^{2-}$ )置換レベルおよびミネラルコーティングへの $\text{HPO}_4^{2-}$ の組込みを決定できる。典型的には、SBFは、約10:1~約0.2:1、例えば約2.5:1~約1:1の範囲の比でカルシウムおよびリン酸イオンを含む。

10

【0085】

また、ミネラルコーティングの形態は、例えば走査型電子顕微鏡法により分析され得る。走査型電子顕微鏡法は、得られたミネラルコーティングの形態を視覚化するために用いられ得る。得られたミネラルコーティングの形態は、例えば球晶微細構造、板状微細構造、および/または網状微細構造であり得る。球晶微細構造の球晶の適切な平均直径は、例えば約2 $\mu\text{m}$ ~約42 $\mu\text{m}$ の範囲であり得る。球晶微細構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約2 $\mu\text{m}$ ~約4 $\mu\text{m}$ の範囲であり得る。別の一実施態様において、球晶微細構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約2.5 $\mu\text{m}$ ~約4.5 $\mu\text{m}$ の範囲であり得る。別の一実施態様において、球晶微細構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約16 $\mu\text{m}$ ~約42 $\mu\text{m}$ の範囲であり得る。

20

【0086】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、後で使用するために保存されてもよく、後で使用するために洗浄および保存されてもよく、吸着工程のために洗浄されすぐに使用されてもよく、または洗浄することなく吸着工程のためにすぐに使用されてもよい。

【0087】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に活性剤を吸着させるために、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を活性剤含有溶液に接触させる。本明細書で用いられる「活性剤」は、生物学的に活性な物質を指す。活性剤を、当該技術分野で公知の任意の方法を用いてミネラルコーティングされたマイクロ粒子と接触させ得る。例えば、活性剤の溶液を、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子上にピペットで移すしてもよく、注いでもよく、またはスプレーしてもよい。あるいは、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、活性剤含有溶液中に浸してもよい。活性剤は、活性剤とミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラルコーティング間の静電相互作用によりミネラルコーティングに吸着する。適切な活性剤としては、生体分子が挙げられる。特に適切な活性剤としては、インターロイキン-1(IL-1; IL1F1)アンタゴニスト; IL-1F2アンタゴニスト; IL-1F3アンタゴニスト; IL-1F4アンタゴニスト; IL-1F5アンタゴニスト; IL-1F6アンタゴニスト; IL-1F7アンタゴニスト; IL-1F8アンタゴニスト; IL-1F9アンタゴニスト; IL-1F10アンタゴニスト; IL-1F11アンタゴニスト; アバタセプト; リツキシマブ; トシリズマブ; アナキンラ; アダリムマブ; エタネルセプト; インフリキシマブ; セルトリズマブ; ゴリムマブ; およびそれらの組合せが挙げられる。特に適切なIL-1アンタゴニストは、炎症誘発性IL-1の天然に存在するアンタゴニストであるIL-1受容体アンタゴニスト(IL-Ra)である。特に適切なIL-Raとしては、アナキンラ(例えば、KINERET(登録商標))が挙げられ、これは、全身性慢性炎症の処置について米国食品医薬品局(FDA)により承認を受けたIL-Raの組換え型である。

30

40

【0088】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子への活性剤の吸着は、ミネラル成分(例えば、高炭酸および低炭酸マイクロスクフエア)を変えること、活性剤とインキュベートするミネラルコーティングされたマイクロ粒子の量を変えること、インキュベート溶液中の活性剤の濃度を変えること、およびそれらの組合せにより調整し得る。

【0089】

50

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、ミネラルコーティングが分解するにつれて放出される。ミネラル分解は、ミネラルコーティングが急速にまたはゆっくりと分解できるように制御され得る。ミネラルコーティング溶解速度は、ミネラルコーティング組成を変えることにより制御され得る。例えば、炭酸置換がより多いミネラルコーティングほど、より急速に分解する。炭酸置換がより少ないミネラルコーティングほど、よりゆっくりと分解する。ドーパント、例えばフッ化物イオンの組込みはまた、溶解動態を変え得る。ミネラルコーティング組成の変更は、コーティング形成中に改変模擬体液におけるイオン濃度を変えることにより達成し得る。より高濃度の炭酸、例えば100 mMの炭酸を有する改変模擬体液は、生理学的炭酸濃度（4.2 mMの炭酸）を有する改変模擬体液において形成されたコーティングより急速に分解するコーティングをもたらす。

10

#### 【0090】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子内に活性剤を組み込むために、活性剤は、ミネラルコーティング工程中模擬体液に含まれる。特に適切な活性剤としては、インターロイキン-1（IL-1；IL1F1）アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11 アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せが挙げられる。特に適切なIL-1アンタゴニストは、炎症誘発性IL-1の天然に存在するアンタゴニストであるIL-1受容体アンタゴニスト（IL-Ra）である。特に適切なIL-Raとしては、アナキンラ（例えば、KINERET（登録商標））が挙げられ、これは、全身性慢性炎症の処置について米国食品医薬品局（FDA）により承認を受けたIL-Raの組換え型である。

20

#### 【0091】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子の異なる層に活性剤を吸着させるために、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、各層の形成後、活性剤含有溶液中でインキュベートされる。一部の層は、表面上に吸着される活性剤を有しなくてもよい。特に適切な活性剤としては、インターロイキン-1（IL-1；IL1F1）アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11 アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せが挙げられる。特に適切なIL-1アンタゴニストは、炎症誘発性IL-1の天然に存在するアンタゴニストであるIL-1受容体アンタゴニスト（IL-Ra）である。特に適切なIL-Raとしては、アナキンラ（例えば、KINERET（登録商標））が挙げられ、これは、全身性慢性炎症の処置について米国食品医薬品局（FDA）により承認を受けたIL-Raの組換え型である。

30

#### 【0092】

本開示の製剤は、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に、担体を加えることにより製造され得る。一実施態様において、活性剤を含む担体を、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に加えて、結合活性剤（ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている活性剤）および未結合活性剤を含む製剤を製造し得る。別の一実施態様において、活性剤を含まない担体を、ミネラルに吸着されている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に加えて、結合活性剤を含む製剤を製造し得る。

40

#### 【0093】

特に適切な製剤の実施態様において、製剤は、結合および未結合活性剤の両方を含む。理論に拘束されるものではないが、結合活性剤および未結合活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む製剤を注射することで、未結合活性剤が即時効果を提

50



供でき、一方、結合活性剤が、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子への吸着により隔離され、ミネラルコーティングが分解し、活性剤を放出するにつれて、持続効果を提供すると考えられる。

【 0 0 9 4 】

一実施態様において、担体は、医薬的に許容される担体である。当業者に理解されているとおり、医薬的に許容される担体、場合により他の治療的および/または予防的成分は、製剤の他の成分と適合し、その受給者に有害でないという意味で「許容され」なければならない。適切な医薬的に許容される担体溶液としては、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液などが挙げられる。本開示の組成物は、動物に、好ましくは哺乳類に、特にヒトに、治療薬自体として、互いの混合物として、または通常

10

【 0 0 9 5 】

非経腸投与（例えば注射、例えばボラス注射または持続点滴による）のための製剤は、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量点滴の単位投与形態で、または防腐剤が添加された、および添加されていない多回投与容器で提供され得る。製剤は、懸濁剤、液剤、または油性もしくは水性ビヒクル中のエマルジョンなどの形態であり得て、製剤化物質、例えば懸濁化、安定化および/または分散化物質を含有し得る。あるいは、活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌済みの発熱物質を含まない水で構成するための、例えば溶液からの凍結乾燥により得られる粉末形態であり得る。

20

【 0 0 9 6 】

一態様において、本開示は、ミネラルコーティング内に組み込まれている少なくとも1つの活性剤およびミネラルコーティングに吸着されている少なくとも1つの活性剤を含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関する。

【 0 0 9 7 】

本明細書に開示されるように、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子内に活性剤を組み込むために、活性剤は、ミネラルコーティング工程中に模擬体液に含まれる。特に適切な活性剤としては、本明細書に記載のものが挙げられる。

【 0 0 9 8 】

本明細書に記載されるように、活性剤は、ミネラルコーティングに吸着され得る。本明細書に記載されるように、活性剤はまた、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル内に組み込まれ得る。本明細書に記載されるように、活性剤はさらに、ミネラルコーティングに吸着され、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル内に組み込まれ得る。本明細書に記載されるように、異なる活性剤は、ミネラルに吸着されてもよく、またはその内部に組み込まれてもよい。

30

【 0 0 9 9 】

別の一態様において、本開示は、活性剤の即時および持続送達方法に関する。方法は、それを必要とする個体に製剤を提供することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、少なくとも第1活性剤；およびミネラルコーティングに吸着されている少なくとも第2活性剤を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。

40

【 0 1 0 0 】

一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と同一である。別の一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と異なる。別の一態様において、少なくとも2つの異なる活性剤が、ミネラルコーティングに吸着される。

【 0 1 0 1 】

本開示の製剤の投与に適する方法は、非経腸（例えば、IV、IM、SCまたはIP）経路によるものであり、通常投与される製剤は、許容される希釈剤、担体および/またはアジュバントと組み合わせて有効量の生成物を含む。ヒト血清アルブミンなどの標準的な希釈剤

50

は、生理食塩水などの標準的な担体と同様に、本発明の医薬組成物に企図される。

【0102】

活性剤の持続送達は、確立された治療レベルの活性剤を模倣する活性剤放出値を得るために決定され得る。一定期間にわたって所望の濃度の活性剤を送達するのに必要とされるミネラルコーティングされたマイクロ粒子（活性剤が吸着している）の量は、予め計算され得る。例えば、所望の治療効果を提供する活性剤の単回ボーラス注射は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子からの活性剤放出値を得ることにより所望の期間にわたって持続的に送達され得る。その後、所望の期間治療効果を提供するために活性剤を送達するのに必要とされるミネラルコーティングされたマイクロ粒子の量は、計算され得る。局所的かつ持続的送達プラットフォームは、多回注射を必要とせずに、損傷部位における連続

10

【0103】

有効用量は、用いられる活性剤および処置される具体的な疾患、障害または状態に応じて実質的に変化すると予想される。本開示の製剤に含まれる活性剤の急速および持続送達のため、適切な用量は、ボーラス注射により送達される活性剤の有効用量より低いと予想される。本明細書に記載されるように、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、数日間にわたって有効量の活性剤を送達するために製造され得る。したがって、本願の製剤の投与は、活性剤の急速な効果を有する未結合活性剤のボーラス投与および望みどおり数時間から数日間にわたって効果を維持するために活性剤の持続放出を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラルコーティングの分解中の活性剤の持続放出を提供

20

【0104】

本開示の製剤は、それを必要とする対象体に投与され得る。本明細書で用いられる「対象体」（「個体」および「患者」とも相互交換可能に称される）は、ヒトおよび非ヒト動物を含む動物を指す。したがって、本明細書に記載の組成物、デバイスおよび方法は、ヒトおよび獣医用途、特にヒトおよび獣医医療用途に用いられ得る。適切な対象体としては、温血哺乳類宿主、例えばヒト、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコ）、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、霊長類およびブタ、好ましくはヒト患者が挙げられる。

【0105】

本明細書で用いられる「それを必要とする対象体」（「それを必要とする患者」とも相互交換可能に称される）は、特定の疾患、障害または状態に感受性であるか、またはリスクがある対象体を指す。本明細書に記載の方法は、炎症性疾患および障害に感受性であるか、またはリスクが高い対象体のサブセットで用いられ得る。本開示の方法の実施態様のいくつかは、特定の対象体の特定のサブセットまたはサブクラス（すなわち、本明細書で言及される1つ以上の特定の状態に対処する際に助けを「必要とする」対象体のサブセットまたはサブクラス）に関するため、すべてではない対象体が、本明細書に記載される特定の疾患、障害または状態についてのサブセットまたはサブクラスに含まれる。

30

【0106】

別の一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体において炎症性疾患を処置するための方法に関する。当該方法は、対象体に製剤を投与することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、活性剤を含む。

40

【0107】

いくつかの実施態様において、方法は、リウマチ性関節炎の全身処置に関する。いくつかの実施態様において、方法は、骨関節症の局所処置に関する。

【0108】

炎症性疾患としては、関節炎、特に、リウマチ性関節炎および骨関節症が挙げられる。他の適切な炎症性疾患としては、インターロイキン-1関連疾患、例えば2型糖尿病、自己免疫疾患、新生児期発症多臓器系炎症性疾患、および神経障害性疾患（例えばアルツハイマー病）ならびに局所および急性炎症状態（例えば皮膚および靱帯創傷治癒）が挙げられ

50

る。

【0109】

製剤は、注射により投与され得る。骨関節症については、製剤は、滑膜注射であり得る。

【0110】

一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と同一である。別の一実施態様において、ミネラルコーティングに吸着されている活性剤は、担体中の活性剤と異なる。別の一態様において、少なくとも2つの異なる活性剤が、ミネラルコーティングに吸着される。

【0111】

適切な活性剤は、本明細書に記載されている。特に適切な活性剤としては、インターロイキン-1 (IL-1; IL1F1) アンタゴニスト; IL-1F2アンタゴニスト; IL-1F3アンタゴニスト; IL-1F4アンタゴニスト; IL-1F5アンタゴニスト; IL-1F6アンタゴニスト; IL-1F7アンタゴニスト; IL-1F8アンタゴニスト; IL-1F9アンタゴニスト; IL-1F10アンタゴニスト; IL-1F11 アバタセプト; リツキシマブ; トシリズマブ; アナキンラ; アダリムマブ; エタネルセプト; インフリキシマブ; セルトリズマブ; ゴリムマブ; およびそれらの組合せが挙げられる。特に適切なIL-1アンタゴニストは、炎症誘発性IL-1の天然に存在するアンタゴニストであるIL-1受容体アンタゴニスト (IL-Ra) である。特に適切なIL-Raとしては、アナキンラ (例えば、KINERET (登録商標)) が挙げられ、これは、全身性慢性炎症の処置について米国食品医薬品局 (FDA) により承認を受けたIL-Raの組換え型である。

10

【0112】

本開示の製剤の投与に適する方法は、本明細書に記載されるように非経腸 (例えば、IV、IM、SCまたはIP) 経路によるものである。

20

【0113】

別の一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体において手術後炎症を処置するための方法に関する。当該方法は、対象体に製剤を投与することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、活性剤を含む。

【0114】

適切な活性剤は、本明細書に記載されている。特に適切な活性剤としては、インターロイキン-1 (IL-1; IL1F1) アンタゴニスト; IL-1F2アンタゴニスト; IL-1F3アンタゴニスト; IL-1F4アンタゴニスト; IL-1F5アンタゴニスト; IL-1F6アンタゴニスト; IL-1F7アンタゴニスト; IL-1F8アンタゴニスト; IL-1F9アンタゴニスト; IL-1F10アンタゴニスト; IL-1F11 アバタセプト; リツキシマブ; トシリズマブ; アナキンラ; アダリムマブ; エタネルセプト; インフリキシマブ; セルトリズマブ; ゴリムマブ; およびそれらの組合せが挙げられる。特に適切なIL-1アンタゴニストは、炎症誘発性IL-1の天然に存在するアンタゴニストであるIL-1受容体アンタゴニスト (IL-Ra) である。特に適切なIL-Raとしては、アナキンラ (例えば、KINERET (登録商標)) が挙げられ、これは、全身性慢性炎症の処置について米国食品医薬品局 (FDA) により承認を受けたIL-Raの組換え型である。

30

【0115】

本開示の製剤の投与に適する方法は、本明細書に記載されるように非経腸 (例えば、IV、IM、SCまたはIP) 経路によるものである。

40

【実施例】

【0116】

実施例1

この実施例において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子へのIL-Ra結合を決定した。

【0117】

Suarez-Gonzalezら (Acta Biomater. 8 (2012)) に記載のように、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子 (本明細書で「MCM」および「MP」とも相互交換可能に称される) を、-TCPマイクロ粒子をmSBF (ヒト血清の2倍カルシウムおよびリン酸濃度)

50

中で毎日新しくしながら7日間インキュベートすることにより作製した。mSBF中の炭酸濃度を変化させて(4.2 mMまたは100 mM)、異なるコーティング組成を有するMCMを形成させた。IL-Ra結合効率を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中のIL-Raの濃度を変化させながらMCMをインキュベートすることにより決定した。BCAを用いて、MCMインキュベート前後の結合溶液中のIL-Raタンパク質濃度を測定した。MCMインキュベート前後のタンパク質濃度の差異を用いて、マイクロ粒子に結合したタンパク質の量を決定した。MCM無しの対照を用いて、結合中にチューブ壁上へのタンパク質吸着で損失したIL-Raの量を決定した。その後、IL-Ra負荷MCMを、模擬体液(SBF)中37℃にて連続回転下インキュベートして、タンパク質放出動態を決定した。SBFを交換し、14日間毎日採取し、micro BCAを用いて、タンパク質放出を決定した。初期の結合および放出試験を複数のコーティング剤(種々の炭酸濃度)について実施して、バースト放出を低下させ、治療範囲で持続送達を提供するために、最高結合効率を有するIL-Ra結合および放出を提供するミネラルコーティングを決定した。結果を図2および3に示す。

【0118】

#### 実施例2

この実施例において、MCMから放出されたIL-Raの生物学的活性を決定した。

【0119】

IL-1に曝露したマウスT D10.G4胸腺細胞は増殖するものであり、IL-Ra生物活性試験のために用いた。胸腺細胞を、IL-Ra負荷MCM、無負荷MCMまたはボラスIL-Ra単独を含有するIL-1培地中で培養した(図6)。胸腺細胞増殖を細胞数およびcell titer blue細胞生存率アッセイにより決定した。IL-Ra負荷MCMは、IL-1誘発胸腺細胞増殖を阻害し、これは、IL-Raが生物学的に活性なままのMCMにより送達されたことを示している。MCMから放出されるIL-Raの生物学的活性をさらに調べるために、IL-1刺激、ホルボール12-ミリスレート13-アセテート(PMA)活性化THP-1マクロファージをIL-Ra負荷MCMまたは無負荷MCMと共に培養した。IL-1は、IL-6を含む多くの炎症性サイトカインの産生をTHP-1マクロファージにより誘発する(図4)。これらのサイトカインの分泌を、細胞培養上清においてIL-6 ELISAを用いて測定した。IL-Ra負荷MCMは、IL-1刺激の12および24時間後に無負荷MCMと比較して、IL-1刺激THP-1マクロファージによるIL-6の産生を阻害し(図4Aおよび4B)、これはまた、MCMから放出されるIL-Raが生物学的に活性なままであることを示す。

【0120】

#### 実施例3

この実施例において、IL-1誘発炎症におけるIL-Ra溶液中のIL-Ra負荷MCMの皮下注射によるIL-Raの全身送達の効果を決定した。

【0121】

IL-Raは、溶液中のIL-Ra負荷MCMまたはIL-Raのいずれかの皮下注射により送達されて、IL-1誘発炎症をマウスモデルにおいて阻害した。無負荷マイクロ粒子注射およびPBS注射対照を試験した。マウス(n=5/処置)に、0.1 mlのPBS(PBS)、0.1 mlのPBS中1 mgの4.2 mM炭酸MCM(MCM)、0.1 mlの10 mg/ml可溶性IL-Ra(IL-Ra)、または0.1 mg/ml IL-Ra + 1 mgの4.2 mM炭酸MCM(IL-Ra + MCM)のいずれかを皮下注射した。IL-Ra + MCM群について、MCMを、注射前の約1時間IL-Ra溶液中でインキュベートした。処置1日または3日後、マウスに10 ngのrhIL-1BをI.P.注射して、IL-6のIL-1産生を誘発させた。IL-1処置後2時間にて血液を採取して、ELISAにより血漿中IL-6レベルを試験した。効果的なIL-Ra処置は、IL-1投与2時間後にIL-6の血清レベルを減少させる。IL-Ra + MCMのみが、PBS対照と比較して、処置後1日および3日にて血清IL-6を著しく減少させた(図5)。

【0122】

#### 実施例4

この実施例において、靱帯治癒中の炎症に対するMCMの靱帯内注射の効果を決定した。

【0123】

10

20

30

40

50

ラットMCLの治癒段階をマッピングし、炎症フェーズが損傷後0～5日目の間で生じることとを決定した（図7）。したがって、IL-Raなどの抗炎症因子での処置は、炎症細胞集団および炎症誘発性サイトカインが最高レベルである損傷後最初の5日間で重要である。損傷したMCL内におけるMCMの局在化を決定するために、MCMを超磁性酸化鉄（SPIO）で標識し、T2強調MRIを用いて可視化した（図8A～8B）。MCL内のMCM局在により、少なくとも15日間損傷部位にとどまっていることが決定された（図8C）。MCM送達システムからの潜在的な有害作用を決定するために、組織学を用いて、MCMが長期の炎症反応または靱帯石灰化を引き起こすかを決定した。炎症誘発性（M1）マクロファージが、靱帯治癒中の早い時点でMCMの周囲に局在化するが（図8A）、長期のM1応答は無かった。アリザリンレッドでの染色は、MCM溶解後、靱帯組織が石灰化しないことを示し、MCMは、靱帯構造に影響を及ぼさないと考えられた（図9Bおよび9C）。

10

#### 【0124】

##### 実施例5

この実施例において、マイクロ粒子からのIL-Raの持続送達およびインビトロおよびインビボでのIL-1活性を阻害する能力を決定した。

#### 【0125】

マイクロ粒子を、（-TCP）コア（Plasma Biotol Limited、Derbyshire、UK）を改変模擬体液（mSBF）中でインキュベートすることにより作製して、リン酸カルシウム（CaP）ミネラルコーティングされたマイクロ粒子（MP）を形成させた。mSBFを、NaCl（141 mM）、KCl（4.0 mM）、MgSO<sub>4</sub>（0.5 mM）、MgCl<sub>2</sub>（1.0 mM）、CaCl<sub>2</sub>（5.0 mM）、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（2.0 mM）およびNaHCO<sub>3</sub>（4.2 mM）を溶解させ、pH 6.8に緩衝化させることにより調製した。-TCP（100 mg）を37℃にて連続回転下7日間50 mlのmSBF中でインキュベートして、MPを形成させた。mSBF溶液を毎日交換し、連続してコーティングを成長させるため適切なカルシウムおよびリン酸イオン濃度を維持した。

20

#### 【0126】

1 mgのMPを、図10Aに示すように、1条件当たりn=3の試料で1.5 ml Protein LoBind Eppendorfチューブ（Eppendorf、Hamburg、Germany）において37℃にて連続回転下1時間リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の1 mlの様々なIL-Ra（Swedish Orphan Biovitrum、Stockholm、Sweden）濃度（10、5、2、1、0.5および0.1 mg/ml）中でインキュベートした。その後、MPを、200 rcfにて5分間遠心分離し、上清を除去した。MPに結合しているタンパク質を試験するために、1 mgのIL-Ra MPを50 μlの2N HCl中に溶解させた。20 μlの溶解させたIL-Ra MP試料またはIL-Ra標準を、黒色96ウェルプレート中で200 μlのフルオロアルデヒド o-フタルアルデヒドと混合した。試料を360 nmにて励起し、蛍光を460 nmにて読み取り、溶液中のタンパク質濃度を定量した（1条件当たりn=3）。

30

#### 【0127】

すべてのインビトロおよびインビボでのアッセイに用いるIL-Ra MPを、MPを10 mg/mlのIL-Ra中で1時間インキュベートすることにより作製した。MPから放出されるIL-RaをSBF<sup>35</sup>中において試験した。1 mg/mlのIL-Ra MPを、1.5 ml Protein LoBind Eppendorfチューブにおいて37℃にて連続回転下SBF中でインキュベートした。SBFを毎日交換し、採取し、IL-Ra標準をSBF中で作製した（1条件当たりn=3）。フルオロアルデヒド o-フタルアルデヒドアッセイを用いて、上記のように溶液中のタンパク質濃度を測定した。

40

#### 【0128】

インビトロでのIL-Ra活性アッセイのために、THP-1ヒト単球（ATCC、Manassas、Virginia）を増殖させた。2x10<sup>5</sup>細胞を、12ウェルトランスウェルプレート（Costar、Kennebunk、ME）において10% FBS（Gibco from Thermo Fisher Scientific）を含むglutagro（Thermo Fisher Scientific、Hampton、NJ）を含む1mlのRPMI 1640中で培養した。100 nMホルボール12-ミリスレート13-アセテート（PMA）（Sigma-Aldrich、St Louis、MO）を培地に加えて、細胞をマクロファージに分化させた。PMA活性化

50

の3日後に、1 mgのIL-Ra MPまたは1 mgの無負荷MPをトランスウェルインサートの培地に加えた（1処理条件当たりn=6ウェル）。処理の6時間後に、2  $\mu$ lの5  $\mu$ g/mlヒトIL-1（R&D systems、Minneapolis、MN）を、図11Dに示すように、培養培地に加えた。200  $\mu$ lの培地をIL-1添加の12および24時間後各ウェルから除去した。ヒトIL-6 ELISA（R&D Systems、Minneapolis、MN）をキットの説明書に従って実施し、培地試料中のIL-6レベルを試験した。

#### 【0129】

D10.G4.1マウスT-リンパ球（ATCC）をATCCにより提供される手順に従って増殖させた。1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞を、24ウェル組織培養プレートにおいて10%FBSおよび10%T-細胞培養サプリメントを含む0.45 mlのRPMI（Corning、Corning、NY）中で培養した。細胞をIL-Ra MP（0.5 mg）、無負荷MP（0.5 mg）、可溶性IL-Ra（50  $\mu$ g）で処理するか、または各ウェルに処理を加えなかった（n=6ウェル/処理）。処理の6時間後に、組み換えIL-1（10 pg/ml）を適切なウェルに加えた（n=3ウェル/処置群）。IL-1添加の48時間後に、細胞数を、トリパンブルー色素排除を用いて計数した。培地を採取し、ヒトIL-Ra ELISA（Life Technologies、Carlsbad、CA）をキットの説明書に従って実施した。

#### 【0130】

IL-Raのインビボ送達について、University of Wisconsin-Madison Institutional Animal Care and Committeeの承認後、12～13週齢の雄性C57Bl6マウス（Envigo、Huntingdon、United Kingdom）に、4つの処置（負荷溶液中1 mgのIL-Ra MP（10 mg/ml IL-Ra）、10 mg/ml IL-Ra、PBS中1 mgの無負荷MP、またはPBS（n=10動物/処置））の100  $\mu$ l皮下（s.c.）注射を投与した。IL-Ra MPを、注射前に1時間10 mg/ml IL-Ra負荷溶液中でインキュベートした。マウスを5匹の動物/処置の2群（群AおよびB）に分けて、種々の時間でIL-Ra血清濃度および活性を試験した。群Aの動物は、処置1、5および14日後に組み換えIL-1の100  $\mu$ lの腹腔内（i.p.）注射（100 ng/ml；R&D systems、Minneapolis、MN）を受け、一方、群Bの動物は、処置3および7日後にIL-1注射を受けた。各IL-1注射の2時間後に、上顎出血を実施して、血清を分離するゲルを有するチェリーレッド採血管（Terumo、Elkton、MD）に採血した。出血部位に感染の兆候があるか、またはIL-1に反応しない動物は、試験から除外した。血液試料を遠心分離し、血清をマウスIL-6 Quantikine（R&D Systems、Minneapolis、MN）およびヒトIL-Ra ELISA（Life Technologies、Carlsbad、CA）のためにキットの説明書に従って得た。IL-6レベルを、同日に採取したPBS対照群に対して正規化した。

#### 【0131】

図13Aに示すように、層状IL-Ra MPを、コーティング工程中に各日1時間1 mg/ml IL-Ra含有溶液中でMPをインキュベートすることにより作製した。コーティングの7日後、層状MPを10 mg/ml IL-Ra中で1時間インキュベートし、層状IL-Ra MPを形成させた。タンパク質の負荷および放出をIL-Ra MPについて記載のように実施した。層状IL-Ra MPのインビボ送達もまた、負荷溶液中の層状IL-Ra MP（10 mg/ml）（n=10）またはPBS（n=10）の100  $\mu$ l s.c.注射をマウスに投与したことを除いて、上記のように実施した。その後、動物は、処置後1、3および7日目（n=5/処置）または5、10および14日目（n=5/処置）のいずれかにIL-1の100  $\mu$ l i.p.注射（100 ng/ml）を受け、IL-Ra MPについて記載のようにIL-1投与2時間後に採血した。

#### 【0132】

MPは、濃度依存的にIL-Raに効率的に結合した。図10Aに示すように、IL-Ra MPを、7日間mSBF中で-TCPコアをインキュベートし、続いて、PBS中のIL-Raの負荷溶液中で1時間インキュベートすることにより作製した。IL-RaとインキュベートしたMPは、IL-Ra結合量の濃度依存的な増加を示した（図10AB）。具体的には、最高濃度のIL-Ra（10 mg/ml IL-Ra）を含有する負荷溶液においてインキュベートしたMPは、MP 1 mg当たりIL-Ra 217.5  $\mu$ gと結合し、一方、最低濃度のIL-Ra（0.1 mg/ml IL-Ra）を含有する負荷溶液においてインキュベートしたMPは、MP 1 mg当たりIL-Ra 11.2  $\mu$ gと結合した。ま

た、MPに対するIL-Raの結合効率は、結合溶液中におけるIL-Raの濃度に反比例した(図10C)。結合効率は、MPが最高IL-Ra濃度において負荷されたときの17.4%から、MPが最低IL-Ra濃度において負荷されたときの90.0%までの範囲であった。

#### 【0133】

MPは、インビトロで長時間にわたりIL-Raを放出した(図10D)。負荷IL-Raの26.2%の初期バースト放出(50.3 µg IL-Ra/mg MP)に続いて、7日間約5.6 µg IL-Ra/mg MP/日の直線的放出率であり、その後、放出率は、約1.43 µg IL-Ra/mg MP/日に低下した。14日目までに、MPは、最初に負荷したIL-Raの70.3%を放出した(70.25 µg IL-Ra/mg MP)。

#### 【0134】

MPにより送達されたIL-Raは、インビトロでIL-1誘発活性を阻害する能力により測定されるとおり、生物学的に活性であった。IL-1活性の阻害を2つの細胞アッセイにおいて評価した；1)D10.G4.1マウスT-リンパ球のIL-1誘発増殖の阻害、および2)THP-1ヒトマクロファージによるIL-6のIL-1誘発産生の阻害。T-リンパ球実験は、MPの存在にかかわらず、IL-1は、IL-1無しで培養された細胞(PBS:  $2.46 \times 10^5 \pm 0.25 \times 10^5$  細胞/mlおよび無負荷MP:  $2.63 \times 10^5 \pm 0.38 \times 10^5$  細胞/ml)と比較して、D10.G4.1マウスT-リンパ球細胞濃度(PBS:  $3.51 \times 10^5 \pm 0.63 \times 10^5$  細胞/mlおよび無負荷MP:  $3.56 \times 10^5 \pm 0.28 \times 10^5$  細胞/ml)を増加させたことを示した(図11A)。T-リンパ球濃度のIL-1刺激増加は、可溶性IL-Ra ( $3.4 \times 10^5 \pm 0.18 \times 10^5$  細胞/ml)またはPBS ( $3.51 \times 10^5 \pm 0.63 \times 10^5$  細胞/ml)のボラス送達と比較して、IL-Ra MP ( $2.15 \times 10^5 \pm 0.35 \times 10^5$  細胞/ml)により阻害された(図11B)。

上清内のIL-Raは、IL-Ra MPと比較して、可溶性IL-Raで処理した試料において著しく高く(図11C)、処理2日後のPBS処理対照(示さず)において検出不能であり、これは、IL-Ra活性が、濃度単独でなく、可溶性IL-Raと比較してMPで送達されたときT-リンパ球濃度の減少の原因となることを示す。別の一連の実験では、細胞とMP間で直接接触できないトランスウェル培養系におけるTHP-1細胞の培養(図11Dに示す)は、MPから放出されたIL-Raが生物学的に活性であることを示す。特に、IL-Ra MPは、無負荷MPと比較して、処置後18および30時間にてTHP-1ヒトマクロファージによるIL-1刺激IL-6産生をそれぞれ2.8および3.0倍著しく減少させた(図11E)。IL-6は、IL-1で刺激されなかったマクロファージにおいて検出不能であった。

#### 【0135】

IL-Ra MPの皮下注射は、IL-Raの血清濃度を14日間増加させた。マウスは、IL-Ra負荷溶液に懸濁させたIL-Ra MP(図12Aに示す)、可溶性IL-Ra、PBS中の無負荷MPまたはPBSいずれかの皮下注射を受け、各処置についてのIL-Raの血清濃度を、14日間にわたり試験した(図12B)。血清IL-Raは、試験中任意の時点でPBSのみで処置した動物では検出されなかったが、IL-Ra MPまたは可溶性IL-Raで処置した動物はそれぞれ、処置の1日後にIL-Raの血清レベルの増加を示した(それぞれ $750.4 \pm 10.8$  pg/mlおよび $853.3 \pm 40.37$  pg/ml)。可溶性IL-Ra処置は、最初は血清IL-Ra濃度を増加させたが、IL-Raレベルは、5日間で急速に減少した後、7日目までに検出不能レベルに達した。対照的に、IL-Raの血清濃度は、処置5日後に可溶性IL-Raで処置した動物と比較して、IL-Ra MPで処置した動物において著しく高かった(それぞれ $102.9 \pm 5.3$  pg/mlおよび $52.1 \pm 1.1$  pg/ml)。さらに、IL-Raは、処置後14日間のモニタリングを通じてIL-Ra MPで処置した動物の血清において検出不能であった。興味深いことに、処置後1日および5日において、無負荷MP単独で処置した動物は、可溶性IL-RaまたはIL-Ra MP条件より著しく低いレベルであるが、血清IL-Raを増加させた。

#### 【0136】

IL-Ra MPは、インビボでIL-1活性を7日間阻害した。インビボでIL-1を阻害するIL-Ra処置の能力を試験するために、動物は、処置後1、3、5、7および14日にてIL-1の全身投与を受けた。IL-1活性に反応して増加するIL-6の血清濃度を、IL-1投与2時間後に試験し、IL-1活性の阻害を試験するためにPBS処置動物に対して正規化した(図12C)。1より

10

20

30

40

50

低い値は、IL-1誘発IL-6産生の阻害を示す。IL-6の血清濃度は、PBS処置動物と比較して、IL-Ra MPでの処置後1、3および5日にてそれぞれ $61.8 \pm 11\%$ 、 $66.7 \pm 13\%$ 、および $81.5 \pm 3\%$ 減少した。可溶性IL-Raまたは無負荷MPでの処置は、同じ時点におけるIL-6の血清濃度に影響を及ぼさなかった。MPまたはIL-Ra MPでの処置は、PBS対照と比較して、7日目のIL-6レベルを減少させた。しかしながら、いずれの処置群（可溶性IL-Ra、無負荷MPまたはIL-Ra MP）の比較間でも統計学的差異は無かった。14日目までに、血清IL-6における有意差は、いずれの処置群間においても認められなかった（データは示していない）。

#### 【0137】

コーティングの全体にわたりIL-Raを層状化することで、MPに組み込まれるIL-Raの量が増加し、インビボでより長い時間枠でIL-1阻害が延長された。MPを、コーティング工程中各日1時間1 mg/ml IL-Ra溶液中でインキュベートし（図13A）、続いて、10 mg/ml IL-Ra溶液中で最後の1時間インキュベートして、層状IL-Ra MPを形成させた。層状IL-Ra MPは、従来的に作製したIL-Ra MP（ $217.0 \pm 12.0 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ ；図13B）より約3倍多いIL-Ra（ $668.5 \pm 30.2 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ ）を組み込んだ。さらに、SBF中での層状IL-Ra MPのインキュベートは、1日後にIL-Raの低いバースト放出を生じた（組み込まれたIL-Raの6.6%）。その後、IL-Raは、インビトロで少なくとも14日間持続的に放出された（図13C）。層状IL-Ra MPの皮下投与は、IL-Raの血清濃度を10日間増加させ、IL-Raは、処置14日後に血清中で検出不能であった（図13D）。重要なことに、層状IL-Ra MPで処置し、その後IL-1で刺激した動物は、処置5、7、10および14日後にPBS処置対照より著しく低いIL-6の血清濃度を示した。

#### 【0138】

本明細書で提供される結果は、マイクロ粒子（MP）が、生物学的に活性なIL-Raを送達し、インビトロおよびインビボでIL-1活性を可溶性IL-Ra単独より長時間首尾よく阻害することを示した。IL-1が強力な炎症性分子であるため、可溶性IL-Raは、4～6時間のみの短いインビボ半減期を有し、IL-Ra濃度は、IL-1活性を阻害するためにIL-1濃度の100～1000倍高くなければならない。これらの特性のため、IL-Raは、約1 mgのIL-Ra/kgの毎日の自己投与皮下注射としての投与が現在承認されている。IL-1の阻害は、ケーススタディーおよび動物モデルにおいて多くの疾患を改善することが示されているが、臨床におけるIL-Raの使用は、いくつかのクリニカルシナリオを除くすべてに制限されている。生物学的に活性なIL-Raの持続送達は、治療濃度を長時間維持することによりその臨床使用を拡大し得て、これは、多くの疾患についてのIL-Raの処置レジメンおよび有効性の両方を改善し得る。

#### 【0139】

ポリマー封入と異なり、IL-Ra MP作製は、タンパク質負荷のために苛酷な環境または複雑な製造方法を必要としない。また、マイクロ粒子上に負荷されるIL-Raの量は、負荷溶液中のタンパク質濃度を変化させることにより調整できる。MPは、PLGAマイクロスクフエアに対して2.5～7.5 w/w% IL-Raを封入するPLGAマイクロスクフエアの以前の研究より実質的に高い負荷能力（MPに対して $21.7 \pm 1.2 \text{ w/w\% IL-Ra}$ ）を有する。

#### 【0140】

等量の可溶性IL-Raが効果を有しないシナリオにおいて、IL-Ra MPは、IL-1活性を著しく阻害した。上清内のIL-Ra（ELISAにより検出される）が可溶性IL-Ra上清より約3倍低いにもかかわらず、IL-Ra MPは、マウスT-リンパ球のIL-1誘発増殖を阻害し、驚くべきことにIL-1誘発増殖に対して観測可能な影響を及ぼさなかった。

#### 【0141】

IL-Ra MPは、インビボで活性なIL-Raを送達し得る。IL-Ra MPをIL-Ra結合溶液と共に皮下注射し、一方、可溶性IL-Ra処置動物は、等量のIL-Raの皮下IL-Ra注射を受け、動物が同じ累積用量のIL-Raを受けることを確実にした。また、結合溶液からの大ポーラス用量のIL-Raは、最初にIL-1受容体により除去されるべき高用量のIL-Raを提供し、続いてIL-Ra MPからIL-Raを持続放出して受容体占有およびIL-1阻害を維持することにより、処



置レジメンに有益であり得る。動物は処置1日後に同一総量のIL-Raを投与されるが、可溶性IL-Ra処置動物は、IL-Ra処置動物より著しく高いIL-Raの血清濃度を有し、これは、MPから放出されていないIL-Raに起因し得る。IL-Ra MPは、可溶性IL-Raと比較して、後の時点（5、7および14日目）におけるIL-Raの血清濃度を著しく増加させ、これは、MPがインピボでIL-Raを持続的に送達できることを示している。予想外にも、IL-Raは、処置の1および5日後に無負荷MPで処置した動物においても検出可能であった。血清濃度を検出に用いたIL-Ra ELISAがヒトIL-Raに対するものであったが、ヒトIL-Raと80%相同性を有する内因性マウスIL-Raとの交差反応性が、この結果の原因となり得る。それにもかかわらず、血清IL-Raは、各時点で無負荷MPよりIL-Ra MPにおいて著しく高かった。

#### 【0142】

コーティングの全体にわたりIL-Raを層状化することで、従来的に負荷したIL-Ra MPと比較して、負荷能力およびIL-Ra活性の持続時間が向上し、インピボで最大2時間IL-1活性の阻害が延長された。コーティングの全体にわたりIL-Raを層状化することで、MPの不可能能力が3倍になり、1日目に放出されるIL-Ra（パースト放出）の割合が低下し、14日間にわたって放出されるIL-Raの割合が低下し、これは、層状IL-Ra MPがIL-Ra MPと比較してIL-Ra放出を延長することを示唆している。層状IL-Ra MPはまた、初期の時点（1日目および3日目）にてIL-Ra MPより高いIL-Raの血清濃度を生じるが、14日目では検出不能であり、これは、層状化することでインピボでのIL-Ra放出時間が延長されないことを示している。しかしながら興味深いことに、層状IL-Ra MPは、IL-Raの活性を延長し、これは、初期の時点におけるより高い濃度はIL-1阻害の延長に寄与することを示す可能性がある。

#### 【0143】

IL-Ra MPは、従来のポリマー封入送達プラットフォームを超える特性を有するIL-Raの持続送達プラットフォームを提供する。IL-Raは、効率的に負荷され、持続放出され、皮下注射により全身送達され得る。また、IL-Ra MPから放出されるIL-Raは、活性であり、IL-1活性を阻害し得る。IL-Ra MPは、皮下注射され得る送達プラットフォームを提供し、これは処置間の時間を延長し、IL-1媒介疾患の処置における有効性を改善する。

#### 【0144】

##### 実施例6

この実施例において、ラット内側側副靭帯（MCL）の損傷モデルにおけるインターロイキン-1受容体アンタゴニスト（IL-Ra）の局所送達を決定した。

#### 【0145】

マイクロ粒子調製およびIL-Ra結合を上記のように実施した。IL-Ra MPを、1.5 ml Protein LoBind Eppendorfチューブにおいて37℃にて連続回転下1時間凍結乾燥MPをPBS中の25 mg/mlのIL-Ra中でインキュベートすることにより作製した。MPに結合したIL-Raの量を決定するために、1 mgのIL-Ra MPを50  $\mu$ lの2N HCl中に溶解させた。20  $\mu$ lの溶解させたIL-Ra MP試料またはIL-Ra標準を、黒色96ウェルプレート中で200  $\mu$ lのフルオロアルデヒド $\alpha$ -フタルアルデヒドと混合した。試料を360 nmにて励起し、蛍光を460 nmにて読み取り、溶液中のタンパク質濃度を定量した（n=3）。

#### 【0146】

動物手術は、University of Wisconsin Institutional Animal Care and Use Committeeにより承認された。36匹の骨格的に成熟した雄性Wistarラット（320~340 g）を関節外内側側副靭帯（MCL）損傷モデルとして用いた。動物をIL-Ra MP、可溶性IL-Ra、無負荷MPまたはPBSの4つの処置群に無作為に分けた。イソフルランで麻酔をかけながら、すべてのラットを両側MCL断裂させた（0日目）。左右両膝の内側面に1 cmの皮膚切開を行った。皮下組織を切開して、縫工筋およびその下のMCLを露出させた。MCLの軸方向の中点を完全に切断した。10  $\mu$ lの25 mg/ml IL-Raに懸濁させた0.25 mgのIL-Ra MP、10  $\mu$ lの25 mg/ml IL-Ra、10  $\mu$ lのPBS中の0.25 mgの無負荷MP、または10  $\mu$ lのPBSのいずれかを切断されたMCLの各々にピペットで移した（処置当たりn=9の動物）。動物は、同じ処置を両側に受けた。断裂および処置の後、筋肉、皮下および真皮下の組織層

10

20

30

40

50

を各々4-0 Dexon縫合糸で閉じた。すべての動物は、手術直後に無制限のケージ移動 (cage movement) を許可された。各処置条件から3匹の動物を手術7日後に 殺した。処置群当たり残りの6匹の動物を手術14日後に 殺した。

【 0 1 4 7 】

手術後7日目および14日目に 殺するとすぐに、右MCLをすぐに切開し、Eppendorfチューブにおいて液体窒素中で凍結させ、分析まで-80 °Cにて保存した。個々のMCL (n=3/条件/時点) を、0.9~2.0 mmのステンレススチールビーズブレンダーおよび3.2 mmのステンレススチールボールを含むNavy Bead Lysis Kitチューブに入れた。200 µlのBio-Rad Lysing溶液を加え、各チューブをスピード10にて5分間混合した。上清を採取し、新しいEppendorfチューブに移し、凍結融解サイクルにかけ、氷上で超音波処理し、4,500 gにて4分間遠心分離し、上清を再度採取した。BCAを組織ホモジネートに行い、タンパク質濃度をキットの説明書に従って決定した。luminexラット10-プレックスマルチプレックスアレイを用いて、MCL組織ホモジネート (n=3/条件/時点) 中の10個のラットサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、INF- $\gamma$ 、GM-CSF、およびTNF- $\alpha$ ) の濃度をキットの説明書に従って試験した。IL-Ra ELISA (Life Technologies) をMCLホモジネート (n=3/条件/時点) にキットの説明書に従って行った。すべてのタンパク質濃度を、BCAにより測定したタンパク質濃度に対して正規化した。フィッシャーのLSD事後分析によるone way ANOVAを、カレイダグラフを用いて実施し、処置群間の統計学的差異を評価した。p値 < 0.05を有意とみなした。p値 < 0.15を有意な傾向とみなした。

【 0 1 4 8 】

手術後7日目および14日目に 殺するとすぐに、各動物の左MCLを切開し、測定し、Optimal Cutting Temperature (OCT) コンパウンド中で瞬間凍結し、薄さ5 µmの凍結切片に切断し、Superfrost Plus顕微鏡スライドにのせ、今後の免疫組織化学 (IHC) および組織学のために-70 °Cにて保存した。ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を組織凍結切片に実施して、回復中の靱帯の一般的形態および肉芽組織サイズを観察した。カメラ支援顕微鏡 (DP79 Olympusカメラを備えたE6000 Nikon Eclipse顕微鏡) を用いて、各組織切片の顕微鏡画像を撮影し、Image Jを用いて、肉芽組織寸法を1匹の動物当たり3つの組織切片に対して測定した。長さの測定は、靱帯の縦中点で行った。肉芽組織の横断面積の測定に、靱帯被覆層 (epiligament) 組織は含まなかった。マイクロ粒子は、カルシウム検出のためのアリザリンレッド染色によって組織切片において確認された。要すれば、切片を冷アセトン中で固定し、pH 4.1の40 mMアリザリンレッド溶液で5分間染色し、脱イオン水ですすぎ、脱水し、カバーガラスをし、上記のように光学顕微鏡を用いて観察した。

【 0 1 4 9 】

免疫組織化学 (IHC) をMCL標本の凍結切片に実施して、特定の細胞タイプを識別した。細胞タイプを、CD68 (M1マクロファージ) およびCD3 (T-リンパ球) に対するマウスノクローナル抗体を用いて特徴付けた。これらの抗体は、Abcam-Serotec (Raleigh, NC) から得られ、1:100の希釈で用いた。IHCのために、凍結切片を解凍し、アセトン中で固定し、3%過酸化水素中でインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し、バックグラウンドバスター (Innovex Biosciences, Richmond, CA) で30分間ブロックし、その後、対象とする抗体と2時間インキュベートした。一次抗体のインキュベートおよび未結合抗体の洗浄後、切片をビオチンとインキュベートし、続いてストレプトアビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Stat Q染色キット、Innovex Biosciences, Richmond, CA) 中でインキュベートした。結合抗体をジアミノベンジジン (DAB) で可視化し、脱水し、きれいにし、光学顕微鏡のためにカバーガラスをした。肉芽組織の顕微鏡画像を400倍にて各動物3つの切片に対して撮影した。陽性染色された細胞をM1マクロファージおよびT-リンパ球についての各顕微鏡画像において計数した。同一動物の3つの切片についての細胞数を一緒に平均し、靱帯面積当たりの細胞として表した。フィッシャーのLSD事後分析によるone way ANOVAを、カレイダグラフを用いて実施

し、処置群間の統計学的差異を評価した。p値 0.05を有意とみなした。p値 0.15を有意な傾向とみなした。

#### 【0150】

均一なナノ多孔性コーティングが、マイクロ粒子の表面に形成され、コーティングされたマイクロ粒子は、溶液中での結合によりIL-Raを組み込むことができた。コーティング前の-TCPマイクロ粒子の走査型電子顕微鏡画像は、滑らかな粒子表面および焼結外観を示す(図14A)。mSBF中での7日間のインキュベート後、マイクロ粒子(MP)は、板状のナノ多孔性構造を有する(図14B)。25 mg/ml IL-Ra溶液中でインキュベートしたとき、図14Cに示すように、マイクロ粒子は、 $104.4 \pm 9.8 \mu\text{g IL-Ra/mg MP}$ に結合した。

#### 【0151】

マイクロ粒子は、回復中のラットMCLにおいて少なくとも14日間局所IL-Ra濃度を首尾よく増加させた(図15)。IL-Raの組織濃度は、処置7日後に、可溶性IL-Ra( $0.12 \pm 0.07 \text{ pg IL-Ra}/\mu\text{g}$ 総タンパク質)、無負荷MP(検出不能)またはPBS処置対照(検出不能)での処置と比較して、IL-Ra MP( $0.71 \pm 0.07 \text{ pg IL-Ra}/\mu\text{g}$ 総タンパク質)で処置したMCLにおいて著しく高かった(図15A)。また、処置14日後のIL-Raの組織濃度は、処置7日後と比較して、IL-Ra MP処置MCL( $2.28 \pm 0.06 \text{ pg IL-Ra}/\mu\text{g}$ 総タンパク質)において著しく高く、これは、少なくとも1週間のマイクロ粒子からの持続放出を示している。14日目までに、IL-Raは、いずれの動物のMCLにおいても検出されなかった。MPについての陽性アリザリンレッド染色は、処置7および14日後に、無負荷MPまたはIL-Ra MPのいずれかで処置したすべての動物において見られ、これは、MPが、投与14日後に注射部位に残っていることを示している(図15C)。IL-Ra MPで送達されたときIL-Raが組織内に局在したままであるかをさらに試験するために、IL-Raの血清濃度を測定した。血清IL-Raは、無負荷MP(検出不能; 図15B)と比較して、IL-Ra MP( $283.33 \pm 174.62 \text{ pg/ml}$ )での処置1日後に著しく増加した。しかしながら、IL-Ra MPでの処置後7および14日にていずれの動物の血清においても検出可能なIL-Raはなかった。

#### 【0152】

MPで送達されたIL-Raは、生物学的に活性であり、無負荷MPと比較して炎症細胞浸潤を阻害した(図16A~16C)。炎症誘発性M1マクロファージは、外来物質の注射後に予想されるように、PBS処置した対照と比較して無負荷MPで処置した動物において損傷7日後に増加した。対照的に、IL-Ra負荷MPで処置したMCLにおけるM1マクロファージ濃度は、PBS処置動物と有意な差はなく、これは、MPからのIL-Ra放出がM1マクロファージのMP誘発浸潤を阻害できることを示している。可溶性IL-Ra単独の局所投与もまた、PBS処置動物と比較して、M1マクロファージ濃度を減少させた。処置後14日目までに、いずれの処置群間においてもM1マクロファージ濃度に差は認められなかった。

#### 【0153】

炎症誘発性サイトカインIL-1 およびIL-1 の両方の組織濃度は、損傷7日後に、他のすべての処置群と比較して無負荷MPで処置した動物において高かった(すべての比較でIL-1 についてp 0.05およびIL-1 についてp 0.15)(図17Aおよび17B)。対照的に、IL-Ra MP処置MCLにおける局所IL-1 および 濃度は、処置後7日にて、PBSまたは可溶性IL-Raで処置したものと有意な差はなかった。14日目までに、いずれの処置群間においてもIL-1 濃度に有意差は認められなかった。IL-1 は、処置14日後に、無負荷MP(p=0.03)、可溶性IL-Ra(p=0.04)およびPBS(p=0.06)で処置した動物と比較して、IL-Ra MPで処置した動物において増加した。

#### 【0154】

マイクロ粒子は、肉芽組織の形成に影響を及ぼさず、可溶性IL-Raと比較して適応免疫反応を誘発せず、2週間の試験期間内に持続的異物反応を誘発しなかった。組織切片のH&E染色(図18A)は、無負荷MP、可溶性IL-RaおよびIL-Ra MPが肉芽組織の形態または密度に影響を及ぼさず、肉芽組織のサイズに影響を及ぼさないことを示す。肉芽組織およびMCL全体の面積は、全処置群について損傷7日後と比較して損傷14日後でより小さかった。

10

20

30

40

50

## 【0155】

CD+T-リンパ球の密度（図18B）は、ヒトIL-RaがラットMCL治療中に適応免疫反応を引き起こし得ることを示唆する。ラットMCLにおける可溶性ポーラスヒトIL-Raでの処置は、処置7日後に、他のすべての処置群と比較してMCL肉芽組織内のT-リンパ球密度を著しく増加させた（図18B）。興味深いことに、無負荷MPおよびIL-Ra MPは、処置7日後のT-リンパ球密度に対して著しい影響を及ぼさなかった。14日目までに、可溶性IL-Ra処置は、T-リンパ球に対して影響を及ぼさなかったが、IL-Ra MP処置は、処置14日後に、PBS処置した対照と比較して著しくT-リンパ球を増加させた。

## 【0156】

マイクロ粒子は、回復中のラットMCLにおいて検出可能な持続的異物反応を誘発しなかった。H&E染色を用いて、各処置について肉芽組織内における異物巨細胞および多核細胞（PNC）を試験した（図18C）。マイクロ粒子は、H&E染色切片で明らかであるが（濃いピンク色の粒子）、異物巨細胞およびPNCの局在は認められなかった。また、マイクロ粒子の線維性封入が観察された。

10

## 【0157】

本明細書で示された結果は、マイクロ粒子が、IL-Raの全身での増加を制限し、IL-Raの抗炎症活性を維持しながら、高用量（104.98  $\mu$ g IL-Ra/mg MP）の送達能力を含むIL-Ra送達に関連する課題を克服し、少なくとも2週間IL-Raの局所濃度を増加させることができることを示している。回復中の靱帯内でのIL-Ra送達の結果は、多数の局所炎症性損傷および疾患の処置に有用であることを示している。

20

## 【0158】

IL-Ra MPは、IL-1受容体により除去されるべき高い初期用量のIL-Raを提供し、続いてIL-Ra MPからIL-Raを持続放出して受容体占有を維持するために、結合溶液からポーラスで可溶性用量のIL-Raで送達される。投与されるIL-Raの総量は、ポーラスおよび持続放出処置群と同じであるため、IL-Ra MPで処置されたMCLにおけるより高いIL-Ra濃度は、MPからのIL-Raの持続送達を示す。また、処置7日後と比較して処置14日後のMCLにおけるより高い濃度は、マイクロ粒子が、インビボで7日後もIL-Raを局所送達し続けることを示す。

## 【0159】

局所濃度とは対照的に、血清中のIL-Raは、IL-Ra MPでの処置1日後にのみ検出可能であった。マイクロ粒子は、全身濃度を増加させることなく組織内でIL-Raを局所的に増加させ、これは、局所症状を処置する治療的タンパク質送達にしばしば伴う標的外の副作用を排除し得る。また、マイクロ粒子は、試験期間中MCL内に局在したままであった。

30

## 【0160】

無負荷マイクロ粒子の投与は、7日で炎症誘発性M1マクロファージの濃度を著しく増加させ、マイクロ粒子へのマクロファージの共局在は明らかであった（図16C）。マイクロ粒子にIL-Raを負荷すると、マイクロ粒子自体により引き起こされるマクロファージにおける増加が改善され、共局在は認められず、これは、マイクロ粒子から送達されるIL-Raが活性であり、炎症を局所的に阻害し得ることを示している。同時に、処置7日後の無負荷マイクロ粒子での処置によるIL-1 およびIL-1 の増加は、マイクロ粒子がIL-Raを局所送達する場合、排除された。

40

## 【0161】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、同量の可溶性タンパク質単独の適用と比較して、局所タンパク質濃度を長時間増加させることに成功した。また、送達されたタンパク質は、生物学的に活性であった。これらの結果は、全身曝露を制限しながらMPが動的組織において活性タンパク質を局所送達するのに有用であることを示している。

## 【0162】

本明細書に記載のナノ構造のリン酸カルシウムミネラルコーティングは、生物学的に活性な薬剤の持続送達のためのプラットフォームを提供する。ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、活性剤（特に短い半減期を有する、例えば封入により修飾したとき活性

50

が低下する、および／または融合タンパク質にする活性剤)のボーラス注射と比較して、用量および標的外の副作用を減少させ得る注射可能で局所的な送達システムを提供する。本明細書に記載の製剤および方法は、有利には、未結合形態で送達される活性剤の即時効果、ならびにミネラルコーティングが分解し、活性剤を放出するにつれて活性剤の持続送達を提供するミネラルコーティングされたマイクロ粒子へ活性剤を吸着させることによる活性剤の持続効果の両方を可能にする。

#### 【0163】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、生物学的活性を維持しながら、治療的タンパク質を持続送達できる送達システムを提供する。また、これらのマイクロ粒子は、インビボ注射したとき局在したままであり、全身的な皮下または静脈内送達と比較してより低い治療用量を可能にする局在化タンパク質送達システムを提供する。治療的タンパク質の局所送達はまた、標的外の作用を制限できる。我々は、RAを処置するのに臨床ですでに用いられているが、RAおよび有利であり得る他の臨床適用、例えば局所炎症の第1選択治療薬としての使用を制限する面倒な処置レジメンを必要とする、治療的タンパク質であるIL-Raの送達を研究することを提案する。我々は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を用いたIL-Raの送達が、全身のおよび局所的状況の両方において、IL-Raのボーラス皮下注射よりIL-1誘発炎症の阻害に効果的であると予測する。IL-Raの持続的または局所的送達は、多くの臨床適用においてこの有望な抗炎症薬のより広範な用途を提供する。

#### 【0164】

上記を考慮して、本開示のいくつかの利点が達成され、他の有利な結果が得られることが分かるだろう。本開示の範囲から逸脱することなく上記方法において様々な変更がなされ得るため、上記説明に含まれ、添付の図面に示されるすべての事項は、限定的な意味ではなく、例示として解釈されるべきであることを意図する。

#### 【0165】

本開示の要素またはその様々な変形物、実施態様または態様を導入するとき、冠詞「a」、「an」、「the」および「said」は、1つ以上の要素があることを意味することが意図される。用語「含む(comprising)」、「含む(including)」および「有する(having)」は、包括的であり、リストされる要素以外の更なる要素があり得ることを意味することが意図される。

本発明は、以下の態様および実施態様を含む。

[1] 担体を含む、活性剤を提供するための製剤であって、担体が、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む、製剤。

[2] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されている、[1]に記載の製剤。

[3] 第2活性剤が、担体中の第1活性剤と同一である、[1]に記載の製剤。

[4] ミネラルコーティングに吸着されている第2活性剤が、担体中の活性剤と異なる、[1]に記載の製剤。

[5] 第1および第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されている、[1]に記載の製剤。

[6] 第1活性剤および第2活性剤が、IL-1アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11アンタゴニスト；IL-1Rアンタゴニスト；アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せである、[1]に記載の製剤。

[7] IL-1アンタゴニストが、組み換えIL-1アンタゴニストである、[6]に記載の製剤。

[8] ミネラルコーティングが、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、[1]に記載の製剤。

[9] ミネラルコーティングが、ハロゲンを含み、[1]に記載の製剤。

[10] ハロゲンが、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、アスタチンおよびそれらの組合せより選択される、[9]に記載の製剤。

10

20

30

40

50

[11] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含む、[1]に記載の製剤。

[12] 第2活性剤が、ミネラルコーティング内に組み込まれている、[1]に記載の製剤。

[13] 担体が、第1または第2活性剤の少なくとも1つを含む、[1]に記載の製剤。

[14] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着され、ミネラルコーティング内に組み込まれ、およびその組合せである、[1]に記載の製剤。

[15] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、複数のミネラルコーティング層を含む、[1]に記載の製剤。

[16] 複数のミネラルコーティング層が、同一ミネラル組成である、[15]に記載の製剤。

[17] 複数のミネラルコーティング層が、異なるミネラル組成である、[15]に記載の製剤。

[18] 第2活性剤が、ミネラルコーティング層に吸着され、ミネラルコーティング層内に組み込まれ、およびその組合せである、[15]に記載の製剤。

[19] 少なくとも1つの活性剤を持続送達するための方法であって、該方法が、担体を含む製剤を投与することを含み、担体が、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む、方法。

[20] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されている、[19]に記載の方法。

[21] ミネラルコーティングに吸着されている第2活性剤が、担体中の活性剤と同一である、[19]に記載の方法。

[22] ミネラルコーティングに吸着されている第2活性剤が、担体中の第1活性剤と異なる、[19]に記載の方法。

[23] 第1および第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されている、[19]に記載の方法。

[24] 第1活性剤および第2活性剤が、IL-1アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11アンタゴニスト；IL-1Rアンタゴニスト；アバタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せである、[19]に記載の方法。

[25] IL-1アンタゴニストが、組み換えIL-1アンタゴニストである、[24]に記載の方法。

[26] ミネラルコーティングが、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、[19]に記載の方法。

[27] ミネラルコーティングが、ハロゲンさらに含む、[19]に記載の方法。

[28] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含む、[19]に記載の方法。

[29] 第2活性剤が、ミネラルコーティング内に組み込まれている、[19]に記載の方法。

[30] 担体が、第1および第2活性剤の少なくとも1つを含む、[19]に記載の方法。

[31] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着され、ミネラルコーティング内に組み込まれ、およびその組合せである、[19]に記載の方法。

[32] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、複数のミネラルコーティング層を含む、[19]に記載の方法。

[33] 複数のミネラルコーティング層が、同一ミネラル組成である、[32]に記載の方法。

[34] 複数のミネラルコーティング層が、異なるミネラル組成である、[32]に記載の方法。

[35] 第2活性剤が、ミネラルコーティング層に吸着され、ミネラルコーティング層内に組み込まれ、およびその組合せである、[32]に記載の方法。

[36] 処置を必要とする対象体において炎症性疾患を処置するための方法であって、該方法が、対象体に製剤を投与することを含み、製剤が、担体を含み、担体が、少なくとも第1活性剤、およびミネラルコーティングを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子、および少なくとも第2活性剤を含む、方法。

10

20

30

40

50

[37] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着されている、[36]に記載の方法。

[38] 第2活性剤および第1活性剤が、同一活性剤である、[36]に記載の方法。

[39] 第2活性剤および第1活性剤が、異なる、[36]に記載の方法。

[40] 第1活性剤および第2活性剤が、IL-1アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11アンタゴニスト；IL-1Rアンタゴニスト；アパタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せより選択される、[36]に記載の方法。

10

[41] IL-1アンタゴニストが、組み換えIL-1アンタゴニストである、[40]に記載の方法。

[42] ミネラルコーティングが、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、[36]に記載の方法。

[43] ミネラルコーティングが、ハロゲンをさらに含む、[36]に記載の方法。

[44] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含む、[36]に記載の方法。

[45] 第2活性剤が、ミネラルコーティング内に組み込まれている、[36]に記載の製剤。

[46] 担体が、1つ以上の活性剤を含む、[36]に記載の製剤。

[47] 第2活性剤が、ミネラルコーティングに吸着され、ミネラルコーティング内に組み込まれ、およびその組合せである、[36]に記載の方法。

20

[48] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、複数のミネラルコーティング層を含む、[36]に記載の方法。

[49] 複数のミネラルコーティング層が、同一ミネラル組成である、[48]に記載の方法。

[50] 複数のミネラルコーティング層が、異なるミネラル組成である、[48]に記載の方法。

[51] 第2活性剤が、ミネラルコーティング層に吸着され、ミネラルコーティング層内に組み込まれ、およびその組合せである、[48]に記載の方法。

[52] 活性剤を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子であって、活性剤が、ミネラルに吸着され、ミネラル内に組み込まれ、およびその組合せである、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[53] コアをさらに含む、[52]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

30

[54] コアが、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択される、[52]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[55] ミネラルコーティングが、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、[52]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[56] ミネラルコーティングが、ハロゲンをさらに含む、[52]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[57] ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、複数のミネラルコーティング層を含む、[52]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[58] ミネラルコーティング層が、同一ミネラル組成である、[57]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

40

[59] ミネラルコーティング層が、異なるミネラル組成である、[57]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[60] 第2活性剤が、ミネラルコーティング層に吸着され、ミネラルコーティング層内に組み込まれ、およびその組合せである、[57]に記載のミネラルコーティングされたマイクロ粒子。

[61] 処置を必要とする対象体において手術後炎症を処置するための方法であって、該方法が、対象体に製剤を投与することを含み、製剤が、担体を含み、担体が、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含み、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、活性剤を含む、方法。

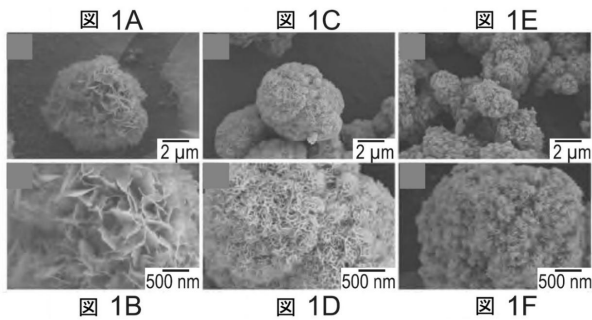
[62] 活性剤が、IL-1アンタゴニスト；IL-1F2アンタゴニスト；IL-1F3アンタゴニスト

50

；IL-1F4アンタゴニスト；IL-1F5アンタゴニスト；IL-1F6アンタゴニスト；IL-1F7アンタゴニスト；IL-1F8アンタゴニスト；IL-1F9アンタゴニスト；IL-1F10アンタゴニスト；IL-1F11アンタゴニスト；IL-1Rアンタゴニスト；アパタセプト；リツキシマブ；トシリズマブ；アナキンラ；アダリムマブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；セルトリズマブ；ゴリムマブ；およびそれらの組合せより選択される、[61]に記載の方法。

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

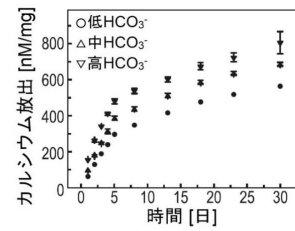


図 1G

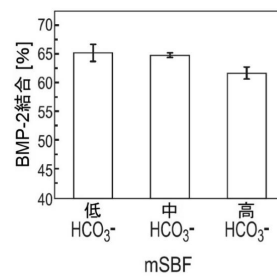


図 1H

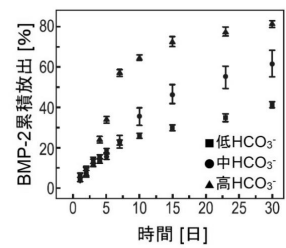


図 1I

10

20

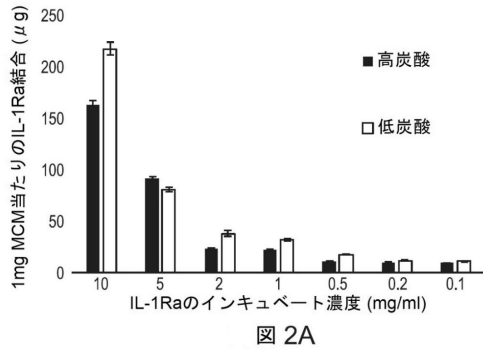
30

40

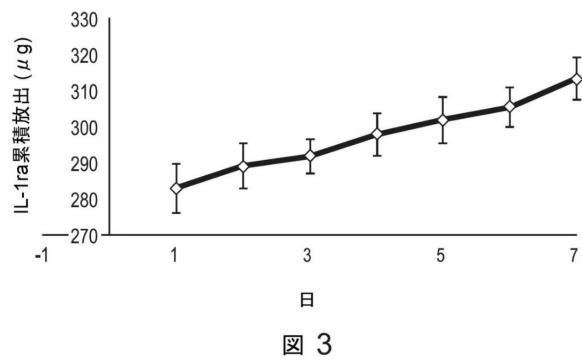
50



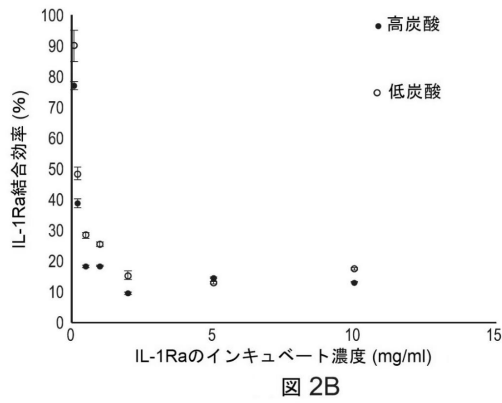
【図 2】



【図 3】

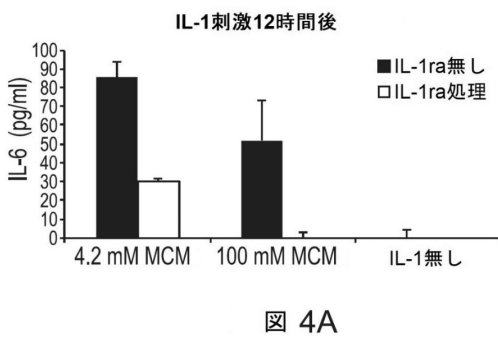


10

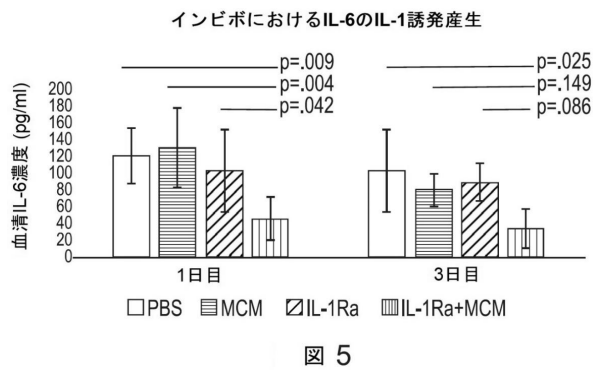


20

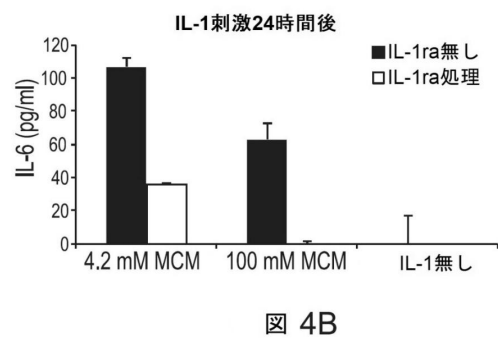
【図 4】



【図 5】



30



40

50



【図 9 - 1】

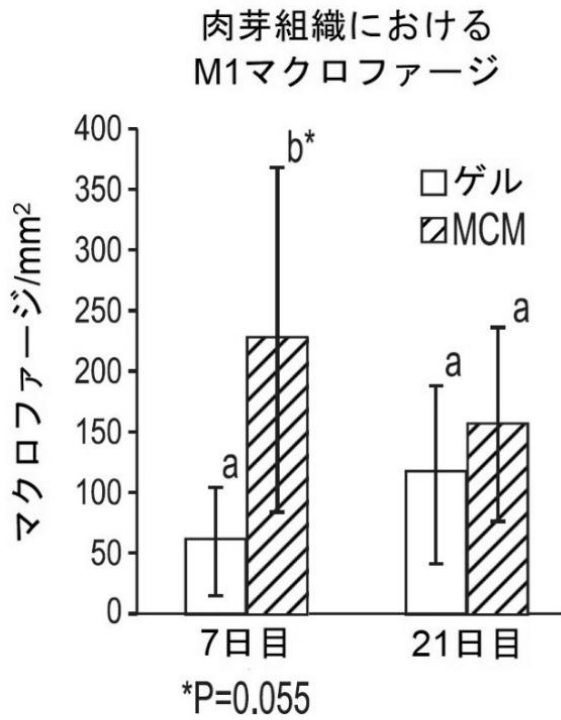
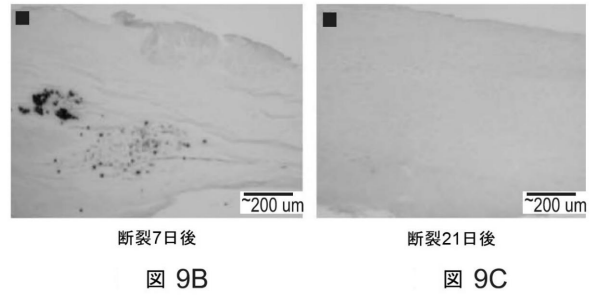


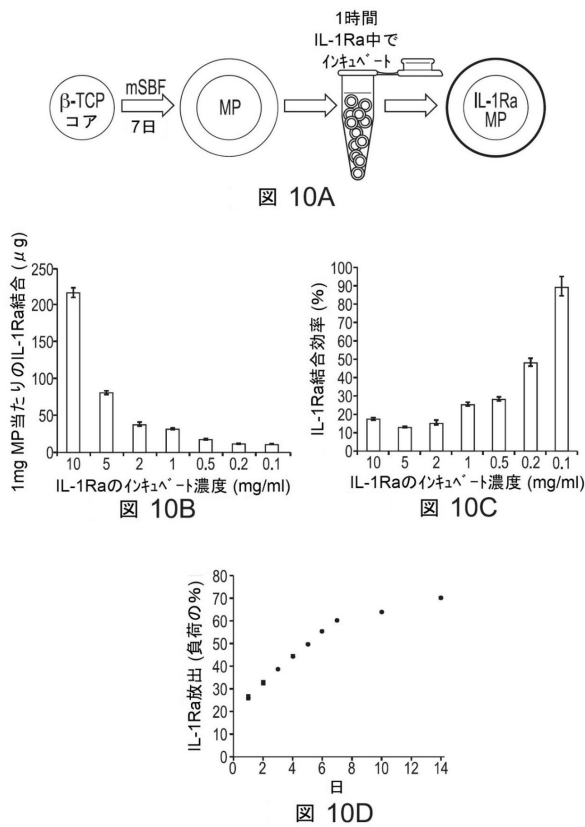
図 9A

【図 9 - 2】

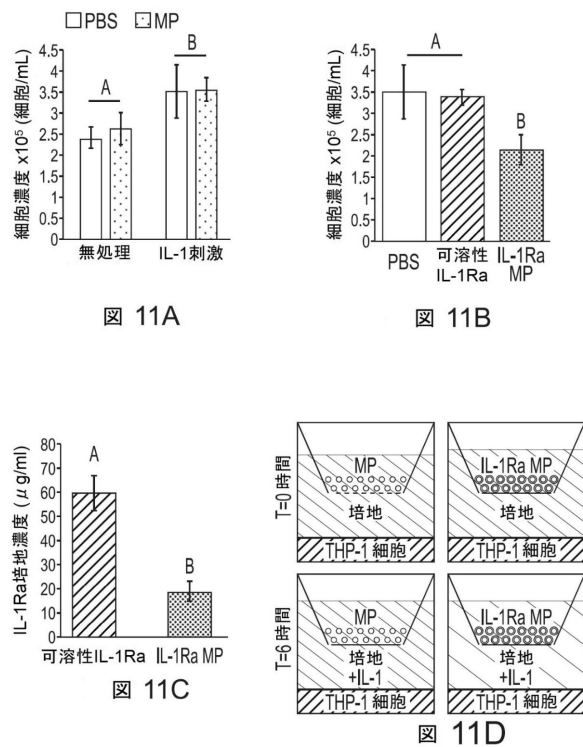


10

【図 10】



【図 11 - 1】



30

40

50

【図 1 1 - 2】

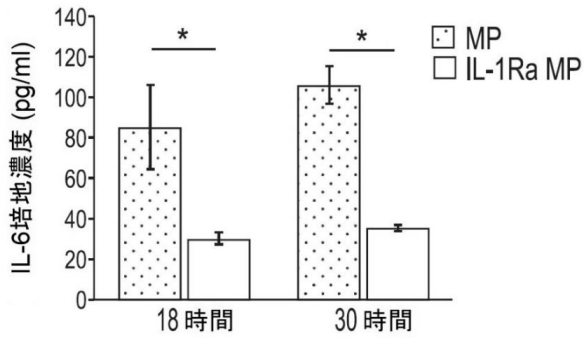


図 11E

【図 1 2 - 1】

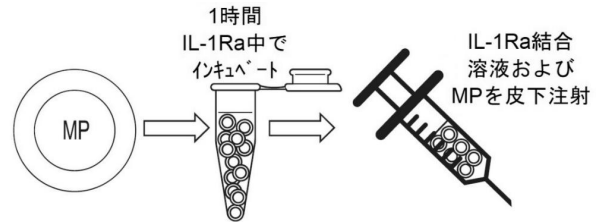


図 12A

【図 1 2 - 2】

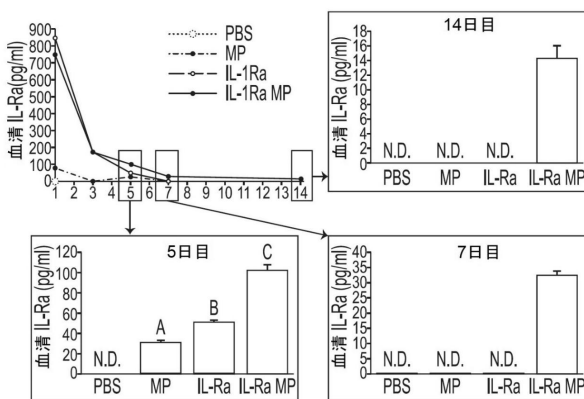


図 12B

【図 1 3】



図 13A

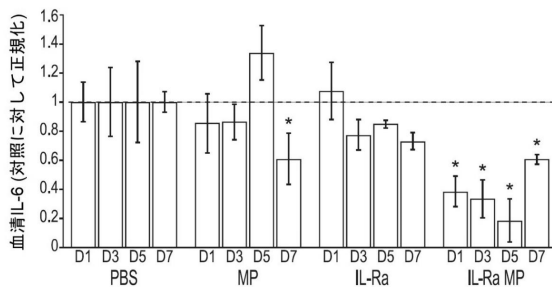


図 12C

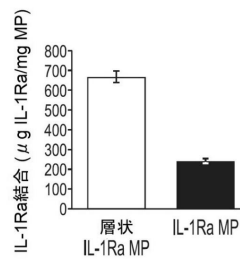


図 13B

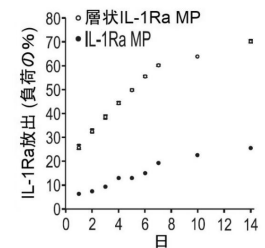


図 13C

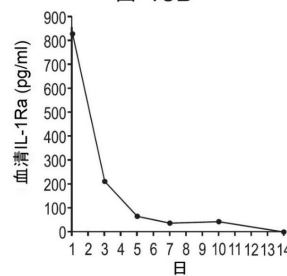


図 13D

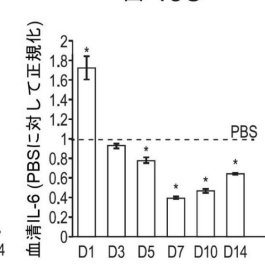


図 13E

10

20

30

40

50

【図 14 - 1】

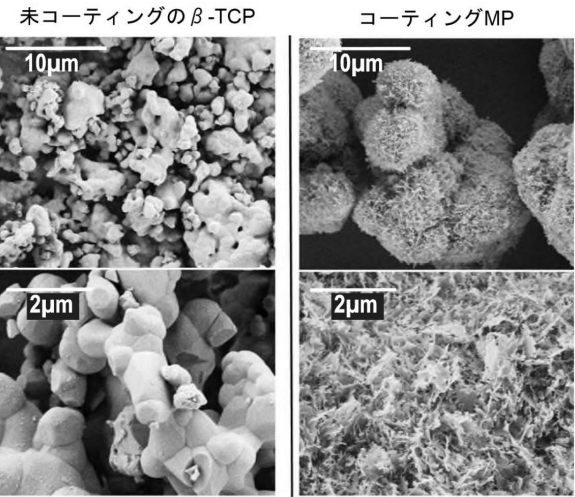


図 14A

図 14B

【図 14 - 2】

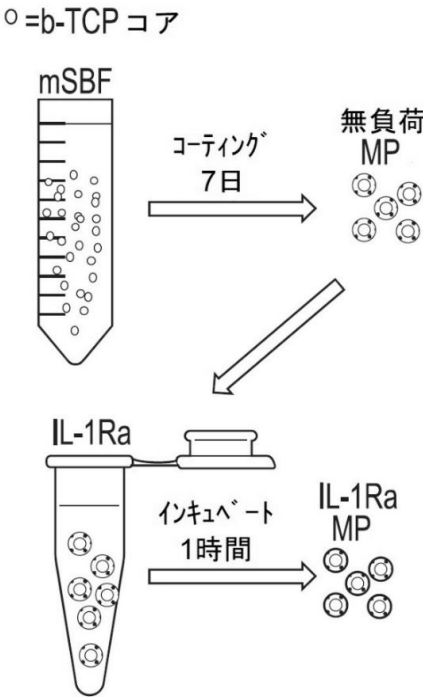


図 14C

【図 15 - 1】

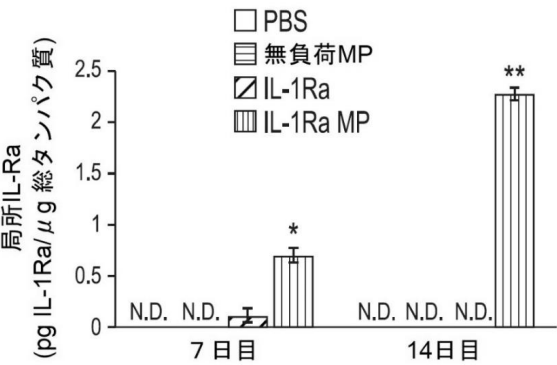


図 15A

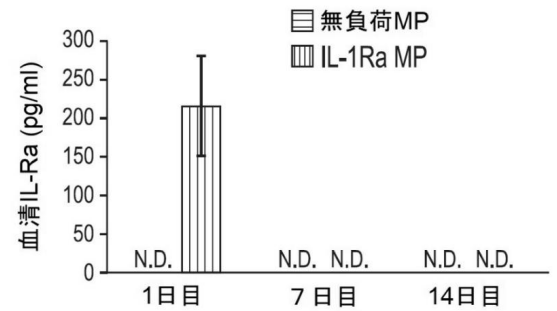


図 15B

【図 15 - 2】

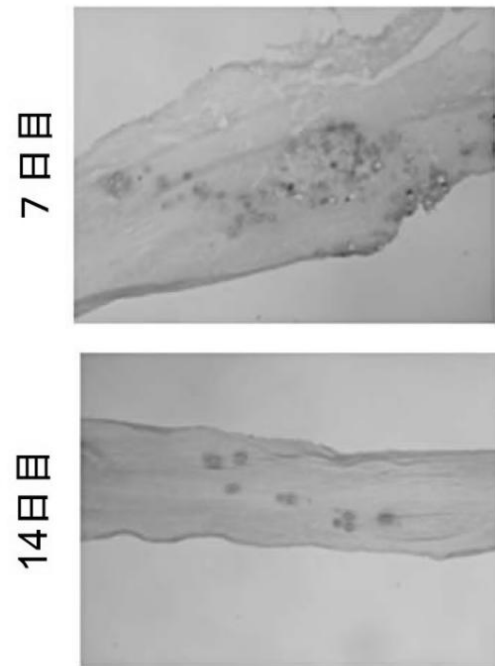


図 15C

10

20

30

40

50

【図 16 - 1】

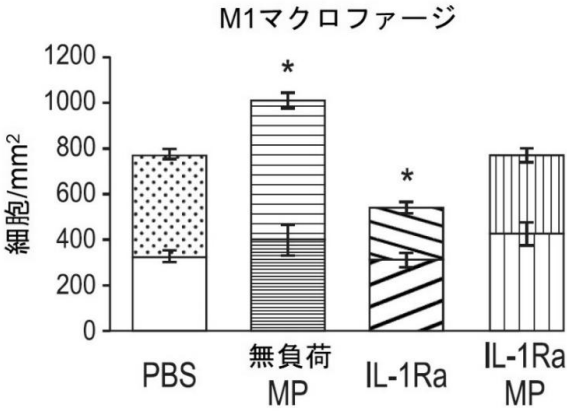
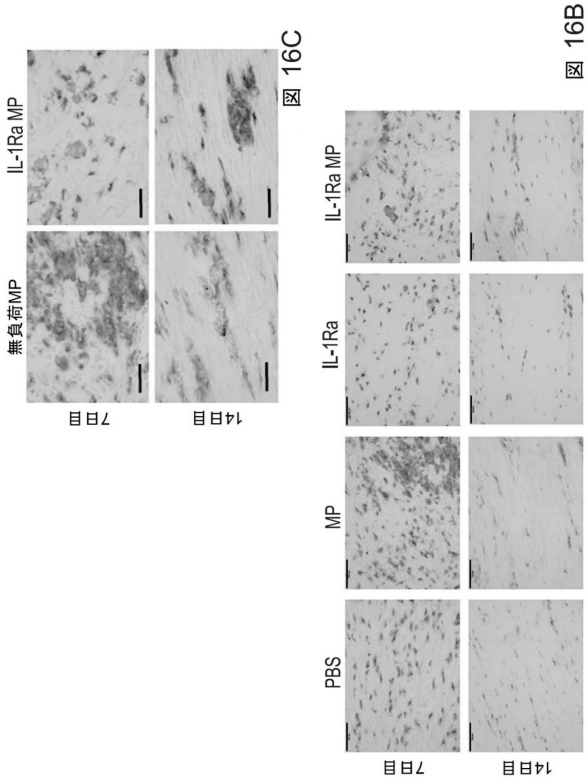


図 16A

【図 16 - 2】



【図 17】

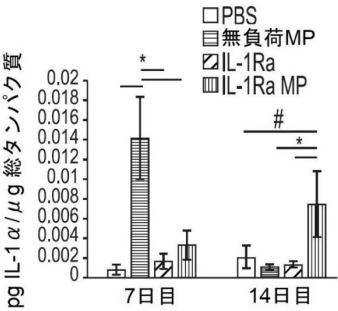


図 17A

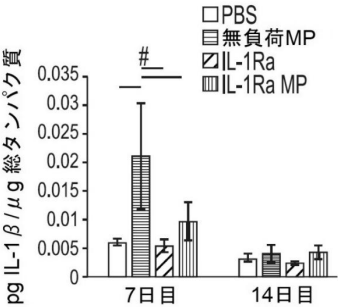
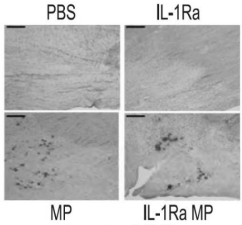
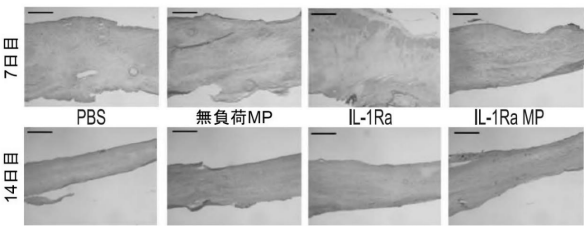


図 17B

【図 18 - 1】



10

20

30

40

50

【図 18 - 2】

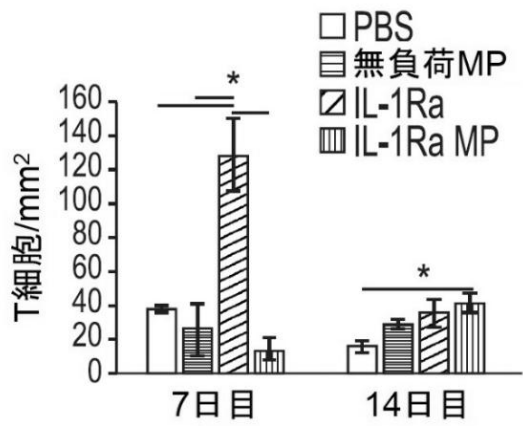


図 18B

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

ート614番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

(72)発明者 アナ・クレメンツ

アメリカ合衆国53726ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート614番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

(72)発明者 コニー・チェンバレン

アメリカ合衆国53726ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート614番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

(72)発明者 レイ・バンダービー

アメリカ合衆国53726ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート614番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2011-508788(JP,A)

YU, X. et al., Adv Funct Mater, 2014年, Vol. 24, No. 2, pp. 3082-3093

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 9/00

A61K 47/00