



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116600829 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 15

(21) 申请号 202180059094.8

(22) 申请日 2021.05.21

(30) 优先权数据

63/028,961 2020.05.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/033606 2021.05.21

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/237061 EN 2021.11.25

(71) 申请人 波士顿大学董事会

地址 美国马萨诸塞州

申请人 贝丝以色列女执事医疗中心

(72) 发明人 马克·W·格里斯塔夫

威廉·布莱辛 阿曼达·威廉姆森

杰克·基尔希 凯瑟琳·库克

阿拉·纳扎里安

爱德华·K·罗德里格斯

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

专利代理师 董世豪 张淑珍

(51) Int. Cl.

A61K 47/34 (2017.01)

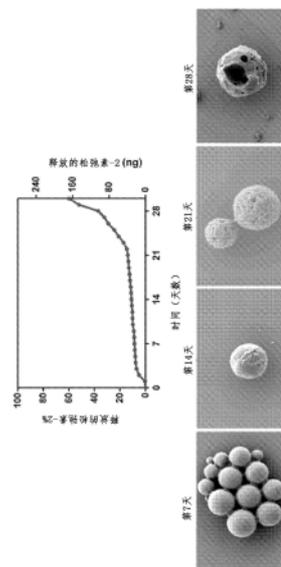
权利要求书3页 说明书58页 附图13页

(54) 发明名称

治疗纤维化疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供用于治疗疾病和紊乱的组合物和方法。在一些实施方式中,所述组合物和方法涉及给予包含抗纤维化剂的微粒或其组合物。



1. 一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,(i)所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ ;(ii)所述抗纤维化剂是松弛素,并且以总质量的0.01%-10%的量存在;(iii)所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿;或(iv)所述微粒进一步包含乙烯基聚合物。

2. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是受体RXFP1的激动剂。

3. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是人松弛素-2或类似物或变体。

4. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是聚丙交酯-共-乙交酯或聚己内酯。

5. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是聚己内酯。

6. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯被酯官能团、烷基酯官能团或羧酸官能团封端。

7. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含乙烯基聚合物,所述乙烯基聚合物是聚(乙烯醇)或聚(吡咯烷酮)。

8. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为10,000-200,000道尔顿的乙烯基聚合物。

9. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述微粒的直径为1-75 $\mu\text{m}$ 、或1-50 $\mu\text{m}$ 、或5-50 $\mu\text{m}$ 、或25-50 $\mu\text{m}$ 、或30-50 $\mu\text{m}$ 、或40-50 $\mu\text{m}$ 。

10. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为15:85至25:75的聚丙交酯-共-乙交酯。

11. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量的0.01%-0.1%的量的乙烯基聚合物。

12. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂占总制剂质量的0.005%-5%。

13. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素。

14. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在赋形剂溶液中的微粒。

15. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在氯化钠液体溶液或羧甲基纤维素钠溶液中的微粒。

16. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂包含处于冻干粉末形式的微粒。

17. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂。

18. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂,并且其中,所述抗纤维化剂在长的时间段内释放。

19. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂,其中,所述抗纤维化剂在如下的长的时间段内释放:至少1天;或至少2天;或至少3天;或至少4天;或至少5天;或至少6天;或至少1周;或至少2周;或至少3周;或至少4周;或至少5周或至少6周;或至少8周;或至少9周;至少10周;或至少12周;或至少15周;或在1-5天之间;或在2-5天之间;或在1-2天之间;或在2-3天之间;或在3-4天之间;或在4-5天之间;或在3-10天之间;或在1-15周之间;或在2-10周之间;或在4-8周之间;或在8-15周之间;或约1天;或约2天;或约3天;或约4天;或约5天;或约6天;或约1周;或约2周;或约3周;或约4周;或约5周;或约6周;或约7周;或约8周;或约9周;或约10周以上。

20. 根据权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂被配制用于作为气雾剂通过吸入给予、

通过关节内注射给予或通过肌内注射给予。

21. 根据权利要求1所述的制剂,其中,将所述制剂给予至受试者,使得所述抗纤维化剂以在1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间的剂量被给予至所述受试者。

22. 一种治疗纤维化疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予权利要求1所述的制剂。

23. 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断为患有选自表1或表2所列的疾病的组中的一种或多种疾病的受试者,并向所述受试者给予权利要求1所述的制剂。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述疾病选自于由以所组成的组:杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、中风、创伤性脑损伤、周围神经损伤、脊髓性肌萎缩症(I型、II型、III型或IV型)、脑瘫、先天性多发性关节挛缩症、肱桡关节纤维化、肱尺关节纤维化、孟肱关节纤维化、胫股关节纤维化、髌臼股关节纤维化、距小腿关节纤维化、颞下颌关节纤维化、掌指关节纤维化、跖趾关节纤维化、关节周围肌肉组织纤维化、橘皮组织和间质性肺病。

25. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述给予经由如下进行:作为气雾剂吸入、关节内注射、肌内注射、皮内注射、皮下注射、囊内注射、囊周注射、肌腱内注射、韧带内注射、韧带周围注射、腱内注射、腱周注射、骨髓内注射和骨髓周围注射。

26. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述疾病是杜氏肌营养不良症并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是杜氏肌营养不良症并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是贝克肌营养不良症并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是贝克肌营养不良症并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是脊髓性肌萎缩症并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是脊髓性肌萎缩症并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是先天性多发性关节炎并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是先天性多发性关节炎并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是脑瘫并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是脑瘫并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是中风并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是中风并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是创伤性脑损伤并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是创伤性脑损伤并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是周围神经损伤并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是周围神经损伤并且经由关节内注射进行所述给予。

27. 根据权利要求22所述的方法,其中,微粒的大小在1 $\mu\text{m}$ -10 $\mu\text{m}$ 之间并且作为气雾剂经由吸入进行所述给予;所述微粒的大小在20 $\mu\text{m}$ -100 $\mu\text{m}$ 之间并且经由肌内注射进行所述给予;所述微粒的大小在5 $\mu\text{m}$ -50 $\mu\text{m}$ 之间并且经由关节内注射进行所述给予。

28. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述疾病是间质性肺病,所述微粒的直径为1-10 $\mu\text{m}$ ,并且作为气雾剂经由吸入进行所述给予;所述疾病是杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾病是脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且经由肌内注射进行所述给予;所述疾

病是脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且经由肌肉注射进行所述给予;所述疾病是关节纤维化,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予;所述疾病是关节纤维化,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且经由关节内注射进行所述给予。

29. 根据权利要求22所述的方法,其中,将所述制剂给予至所述受试者,使得所述抗纤维化剂以在1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间的剂量被给予至所述受试者。

## 治疗纤维化疾病的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求根据35 U.S.C. §119(e)的2020年5月22日提交的美国临时申请号63/028,961的权益,通过引用的方式将其内容整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本文描述的技术涉及治疗纤维化疾病的方法和组合物。

### 背景技术

[0004] 关节僵硬是重大的公共卫生问题,现有的治疗选项提供了多变而有限的效果。关节僵硬可以影响机体中的任何关节,如肩关节、肘关节、腕关节、指关节、髋关节、膝关节、踝关节、趾关节、脊柱和下颌。肩关节常受关节僵硬的影响,其也称为肩挛缩,并且也被称为“冻结肩”。

[0005] 肩挛缩被认为是自限性疾病,但恢复是漫长而艰难的,相当多的患者从未重获完全的ROM。保守治疗(即物理治疗)的已报道的效果差异很大而且高度依赖于它们如何被测量(Neviaser A.S.和Neviaser R.J.,*J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2011, 19(9):536-42)。主观的结果测量往往比客观的结果测量的结果更有利。在一项研究中,用最低限度治疗处理的90%的患者被报告对他们的肩部功能表示满意(Griggs S.M.等,*J. Bone Joint Surg. Am.*, 2000, 82-A(10):1398-407)。然而,利用客观结果的另一研究则报告50%的患者中存在残留疼痛,并且60%的患者中存在运动障碍(Shaffer B.等,*J. Bone Joint Surg. Am.* 1992; 74(5):738-46)。轻度至中度症状可在肩挛缩的症状发作4.4年后持续。对于那些经历严重疾病的患者,这种功能损伤干扰日常活动和工作相关责任(Hand C.等,*Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 2008, 17(2):231-6)。当患者对保守处理无反应时,可采用其他治疗选项。麻醉状态下以手法治疗的形式进行的手术干预可以恢复运动并减少疼痛,但它与骨折、肌腱断裂和神经损伤等并发症有关(Castellarin G.等,*Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2004, 85(8):1236-40; Hsu S.Y.和Chan K.M.,*International Orthopaedics*, 1991, 15(2):79-83; Parker R.D.等,*Orthopaedics*, 1989, 12(7):989-90)。据报道,手法治疗或囊松解并不能提供可靠和一致的治疗效果(Shaffer B.等,*J. Bone Joint Surg. Am.* 1992, 74(5):738-46; Ryans I.等,*Rheumatology* 2005, 44(4):529-35)。因此,关节僵硬需要更有效且一致的疗法。

[0006] 另见PCT申请号US2017/055799、PCT申请号US14/380163、以及2019年8月26日的William Blessing的论文答辩;其内容以引用的方式以其整体并入本文。

### 发明内容

[0007] 本文描述的一个方面提供了一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,(i)所述微粒的直径为1-100 $\mu$ m;(ii)所述抗纤维化剂为松弛素,并且以总质量的0.01%-33%的量存在;(iii)所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿;

或(iv)所述微粒进一步包括乙烯基聚合物。

[0008] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述抗纤维化剂为受体RXFP1的激动剂。

[0009] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述抗纤维化剂包括人松弛素2或类似物或变体。

[0010] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯为聚丙交酯-共-乙交酯。

[0011] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯为聚己内酯。

[0012] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述脂肪族聚酯由如下封端:酯官能团、烷基酯官能团、胺官能团、异氰酸酯官能团、异硫氰酸酯官能团、苯甲酰氟官能团、马来酰亚胺官能团、碘乙酰胺官能团、2-硫吡啶官能团、3-芳基丙炔腈官能团、重氮盐、醛、酮、叠氮化物、炔、环辛炔、膦或羧酸官能团。

[0013] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包括乙烯基聚合物,所述乙烯基聚合物为聚乙烯醇或聚吡咯烷酮。

[0014] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包括分子量为10,000-200,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0015] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述微粒的直径为1-75 $\mu\text{m}$ 、或1-50 $\mu\text{m}$ 、或5-50 $\mu\text{m}$ 、或25-50 $\mu\text{m}$ 、或30-50 $\mu\text{m}$ 、或40-50 $\mu\text{m}$ 。

[0016] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为15:85-25:75的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0017] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂以总质量的0.01%-1.0%的量包含乙烯基聚合物。

[0018] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.005%-5%。

[0019] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述抗纤维化剂是松弛素。

[0020] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包括悬浮在液体溶液中的微粒。

[0021] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包括悬浮在氯化钠液体溶液或羧甲基纤维素钠溶液中的微粒。

[0022] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是缓释制剂。

[0023] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是缓释制剂,并且其中抗纤维化剂在长的时间段内被释放。

[0024] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是缓释制剂,其中抗纤维化剂在至少1天的时间段内被释放。

[0025] 在本文任何方面的一个实施方式中,将该制剂配制成为用于作为气溶胶通过吸入给予、通过关节内注射给予或通过肌肉注射给予。

[0026] 在本文任何方面的一个实施方式中,向受试者给予该制剂,从而使得以1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间的剂量向受试者给予所述抗纤维化剂。

[0027] 在本文任何方面的一些实施方式中,将本文提供的制剂悬浮在液体溶液中。在一些实施方式中,将微粒制剂悬浮在液体溶液中,其中微粒为总溶液的约0.0001%-0.001%、或为总溶液的约0.001%-0.01%、或为总溶液的约0.01%-0.05%、或为总溶液的约0.05%-0.1%、或为总溶液的约0.1%-1%、或为总溶液的约1%-10%、或为总溶液的约

10%-20%、或为总溶液的约20%-30%、或为总溶液的约30%-50%、或为总溶液的约50%-75%、或为总溶液的约75%-90%。在一些实施方式中,上述百分比按重量计,在其他实施方式中,上述百分比按体积计。

[0028] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂包括具有脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,其中,微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0029] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂包括具有脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,其中,抗纤维化剂为松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0030] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂包括具有脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0031] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂包括具有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒。

[0032] 在本文任何方面的一个实施方式中,该制剂包括具有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒,其中,微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0033] 一种治疗纤维化疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予本发明描述的任何制剂。

[0034] 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断为患有选自表1或表2所列的疾病的组中的一种或多种疾病的受试者,并向受试者给予本文所述的任何制剂。

[0035] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述疾病选自于由如下所组成的组:杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症(I型、II型、III型或IV型)、脑瘫、中风、创伤性脑损伤、周围神经损伤、先天性多发性关节挛缩症、肱桡关节纤维化、肱尺关节纤维化、孟肱关节纤维化、胫股关节纤维化、髋臼股(acetabulofemoral)关节纤维化、距小腿关节纤维化、颞下颌关节纤维化、掌指关节纤维化、跖趾关节纤维化、关节周围肌肉组织纤维化、橘皮组织(cellulite)和间质性肺病。

[0036] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述给药通过如下进行:作为气雾剂吸入、关节内注射、关节周围注射、肌内注射、肌肉周围注射、皮内注射、皮下注射、囊内注射、囊周注射、韧带内注射、韧带周围注射、腱内(intratendinous)注射、腱周注射、肌腱内(intramusculotendinous)注射、肌腱周围注射、骨髓内注射、骨髓周围注射。

[0037] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述疾病为杜氏肌营养不良症并且通过肌内注射方式进行所述给予;所述疾病为杜氏肌营养不良症并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为贝克肌营养不良症并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为贝克肌营养不良症并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为先天性多发性关节挛缩症并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为先天性多发性关节挛缩症并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为脑瘫并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为脑瘫并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为中风并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为中风并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为创伤性脑损伤并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为创伤性脑损伤并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为周围神经损伤并且通过肌内注射进行所述给予;所述疾病为周围神经损伤并且通过关节内注射进行所述给予。

[0038] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述微粒的大小在1-10 $\mu\text{m}$ 之间并且作为气雾剂通过吸入进行所述给予;所述微粒的大小在20-100 $\mu\text{m}$ 之间并且通过肌肉注射进行所述给予;所述微粒的大小在5-50 $\mu\text{m}$ 之间并且通过关节内注射进行所述给予。

[0039] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述疾病为间质性肺病,所述微粒的直径为1-10 $\mu\text{m}$ ,并且作为气雾剂通过吸入进行所述给予;所述疾病为杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过肌肉注射进行所述给予;所述疾病为杜氏肌营养不良症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过肌肉注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过肌肉注射进行所述给予;所述疾病为脊髓性肌萎缩症,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过肌肉注射进行所述给予;所述疾病为关节纤维化,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为关节纤维化,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为联合性脑瘫(joint Cerebral Palsy),所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射方式进行所述给予;所述疾病为联合性脑瘫,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为关节中风,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为关节中风,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为创伤性脑损伤,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为创伤性脑损伤,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为周围神经损伤,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予;所述疾病为周围神经损伤,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ ,并且通过关节内注射进行所述给予。

[0040] 在本文任何方面的一个实施方式中,向受试者给予该制剂,从而使得以1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间的剂量向受试者给予抗纤维化剂。

[0041] 定义

[0042] 为方便起见,提供了本发明、实施例和所附的权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或上下文暗示,下列术语和短语包括以下所提供的含义。这些定义被提供以帮助描述特定的实施方式,并且不限于所要求保护的技术,因为该技术的范围仅限于权利要求。除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与该技术所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。如果在本领域的术语使用与本文中提供的其定义之间存在明显的差异,应以该申请文件中提供的定义为准。

[0043] 如本文所使用的“有效量”旨在包括当通过储库(depot)向具有僵硬的关节的受试者给予时,足以影响僵硬的关节的治疗(例如,通过减少、改善或维持僵硬的关节或者僵硬的关节的一个或多个症状)的药剂(例如松弛素或其类似物、片段或变体)的量。“有效量”可根据药剂的顺序、如何给予药剂、关节僵硬的严重程度和病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先期(preceding)治疗或联合治疗的类型(如果有的话)以及待治疗的受试者的其他个体特征而变化。

[0044] 如本文所使用的术语“有效量”还旨在包括如下的药剂(例如松弛素或其类似物、片段或其变体)的量,当以储库向受试者给予时,该量足以预防或改善僵硬的关节或其一个或多个症状;所述受试者具有僵硬的关节,并且当前经历或展示出、或者尚未经历或展示出僵硬的关节的症状(如运动疼痛或受关节僵硬影响的关节活动或活动范围受限),和/或所述受试者处于发展出僵硬的关节的风险。改善僵硬的关节包括减缓关节僵硬的进程或降低后期发展出的关节僵硬的严重程度。

[0045] 如本文所使用的“受试者”是动物,如哺乳动物,包括灵长类动物(如人)、非人灵长类动物(如猴和黑猩猩)、非灵长类动物(如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马和鲸鱼)、或鸟类(如鸭或鹅)。在实施方式中,受试者是人,例如被评估为僵硬的关节的人、处于发展出僵硬的关节的风险的人、具有僵硬的关节的人或因僵硬的关节而接受治疗的人。

[0046] 如本文所使用的术语“治疗”或“改善”是指治疗性处理,其中目的是逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止病症(如与纤维化有关的病症,如纤维化疾病和紊乱)的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或减轻纤维化疾病和紊乱的至少一种不良反应或症状(如炎症、关节僵硬、关节挛缩、并非由肌肉挛缩引起的关节挛缩、与肌肉挛缩相关的关节挛缩、疼痛、活动能力丧失、呼吸困难、肌肉僵硬、肌肉功能障碍、皮肤凹陷、瘢痕疙瘩、烧伤相关瘢痕)。如果一个或多个症状或临床标志物减轻,则治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病进展减缓或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括与不存在治疗所预期的相比,症状恶化或进展的停止或至少减缓。无论可检测到或不可检测到,有益或期望的临床结果包括但不限于:一个或多个症状的缓解,疾病程度的消弱,疾病的稳定状态(即,不再恶化),疾病进展延缓或减缓,疾病状态的改善或缓和,缓解(部分或全部),死亡率降低。术语疾病的“治疗”还包括提供疾病的症状或副作用的缓减(包括姑息疗法)。

[0047] 在提及僵硬的关节而使用时,如本文所使用的“预防”是指受试者(如人类受试者)将发展出与此类僵硬的关节相关的症状的可能性降低,或与僵硬的关节相关的症状的频率或持续时间减少。例如,当具有僵硬关节的一种或多种风险因素的受试者没有发展出关节硬化、或发展出相对于具有相同风险因素而未接受本文所述的治疗的人群而言具有较低严重程度的僵硬的关节,发展出僵硬的关节的可能性降低。将如下视为有效的预防:没有发展出僵硬的关节,或与僵硬的关节相关的症状的发展减少(如减少至少约10%),或展示出迟发的症状(如迟发数天、数周、数月或数年)。

[0048] 如本文所使用的术语“给予”是指将本文公开的治疗剂(如本文描述的包含抗纤维化剂的微胶囊)或组合物通过将药剂至少部分递送至受试者的方法或途径置于受试者中。组合物(如本文公开的包含药剂的药物组合物)可以通过在受试者中产生有效治疗的任何合适的途径给予。

[0049] 如本文所使用的“受试者”意味着人或动物。动物通常是脊椎动物,如灵长类动物、啮齿动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括例如黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴(如恒河猴)。啮齿动物包括例如小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括例如牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物(如家猫)、犬科动物(如狗、狐狸、狼)、鸟类(如鸡、鹌鹑、鸵鸟)和鱼类(如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼)。在一些实施方式中,受试者是哺乳动物,如灵长类动物(如人)。术语“个体”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0050] 优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可被有利地用作代表疾病(例如与纤维化相关的疾病或紊乱)的动物模型的受试者。受试者可以是雄性或雌性。

[0051] 受试者可以是如下的受试者,其先前被诊断患有或被鉴定为患有或具有需要治疗的疾病或紊乱(如与纤维化相关的疾病或紊乱)或与此类疾病或紊乱相关的一种或多种并发症、以及任选地已经历过该疾病或紊乱或与该疾病或紊乱相关的一种或多种并发症的治疗。或者,受试者也可以是先前未被诊断为患有此类疾病或紊乱(如与纤维化相关的疾病或紊乱)或相关并发症的受试者。例如,受试者可以是表现出该疾病或紊乱的一种或多种风险因素或与该疾病或紊乱相关的一种或多种并发症的受试者,或者是未表现出风险因素的受试者。

[0052] 术语“微粒”包括但不限于微球、微颗粒、微海绵或在特定尺寸内具有能够包封药剂(如松弛素)的内部基质的任何非球形颗粒。

[0053] 术语“微粒”是指直径优选小于500 $\mu\text{m}$ 、并且更优选在1 $\mu\text{m}$ 和50 $\mu\text{m}$ 之间的颗粒。微粒也可包括纳米颗粒。纳米颗粒是指直径优选小于1 $\mu\text{m}$ 且大于10nm的颗粒。

[0054] 如本文所使用的“药剂”是指例如如下的分子、蛋白质、肽、抗体或核酸:抑制多肽或多核苷酸的表达;或与刺激结合、部分或完全阻断刺激;减少、防止、延迟激活;使多肽或多核苷酸失活,使多肽或多核苷酸脱敏,或下调多肽或多核苷酸的活性。如下的药剂减少多肽或多核苷酸的活性、防止多肽或多核苷酸的活性、延迟激活多肽或多核苷酸的活性、使多肽或多核苷酸失活、使多肽或多核苷酸脱敏、或下调多肽或多核苷酸的活性:抑制 SerpinB1,如抑制表达(如多肽的翻译、翻译后的加工、稳定性、降解、或者核或细胞质定位,或者多核苷酸的转录,转录后加工、稳定性或降解);或与刺激结合,部分或完全阻断刺激、DNA结合、转录因子活性或酶活性。药剂可以直接或间接起作用。

[0055] 如本文所使用的“药剂”意味着任何化合物或物质,例如但不限于小分子、核酸、多肽、肽、药物、离子等。“药剂”可以是任何化学品、实体或部分,包括但不限于合成的和天然产生的蛋白实体和非蛋白实体。在一些实施方式中,药剂是核酸、核酸类似物、蛋白质、抗体、肽、适体、核酸的寡聚物、氨基酸的寡聚物或碳水化合物的寡聚物,包括但不限于蛋白质、寡核苷酸、核酶、DNAzymes、糖蛋白、siRNAs、脂蛋白、适体以及其修饰物和组合物等。在某些实施方式中,药剂是具有化学部分的小分。例如,化学部分包括未取代或取代的烷基、芳香族或杂环基部分(包括大环内酯、莱普霉素(leptomycins)和相关的天然产物或其类似物等)。化合物可以已知具有期望的活性和/或性质,或者可以选自各种化合物库。

[0056] 药剂可以是来自一个或多个化学类别的分子,例如有机分子,其可包括有机金属分子、无机分子、遗传序列等。药剂也可以是来自一个或多个蛋白质的融合蛋白、嵌合蛋白(如结构域转换或者相关或不同分子的功能显著区域的同源重组)、合成蛋白或其他蛋白质变体(包括取代、缺失、插入和其他变体)。

[0057] 本文描述的方法和组合物包括抗纤维化剂,如松弛素或其功能变体等。如本文所使用的“松弛素2”是指编码肽激素的松弛素亚家族和胰岛素超家族的成员的基因。松弛素2的序列(也被称为H2、RLXH2、H2-RLX、bA12D24.1.1和bA12D24.1.2)对于许多物种都是已知的,如人松弛素2(NCBI Gene ID:6019)多肽(如NCBI Ref Seq NP\_001316120.1)和mRNA(如NCBI Ref Seq NM\_001329191.2)。松弛素2可以指人松弛素2,包括天然产生的变体、分子及

其等位基因。松弛素2是指例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马、猪等哺乳动物的松弛素2。

[0058] 术语“减少”、“降低”或“抑制”在本文中都用于意味着统计学显著量的减少。在一些实施方式中，“减少”、“降低”或“抑制”通常意味着相比于合适的对照(如不存在给定的治疗)减少至少10%，并且可包括例如减少至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多。如本文所使用的“减少”或“抑制”并不涵盖与参照水平相比的完全抑制或减少。“完全抑制”是与合适的对照相比的100%抑制。

[0059] 术语“增加”、“增强”或“激活”在本文中都用于意味着可再现的统计学显著量的增加。在一些实施方式中，术语“增加”、“增强”或“激活”可意味着与参照水平相比至少10%的增加，例如与参照水平相比至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或高达并包括100%或10%-100%之间的任何增加，或者与合适的对照相比至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加、20倍的增加、30倍的增加、40倍的增加、50倍的增加、6倍的增加、75倍的增加、100倍的增加等、或在2倍和10倍之间或更多的任意增加。在标志物的情况下，“增加”是指此类水平的可再现的统计学显著的增加。

[0060] 如本文所使用的“参照水平”是指正常的、在其他方面不受影响的细胞群或组织(如从健康受试者中获得的生物样本，或在先前的时间点从受试者中获得的生物样本，如在被诊断患有纤维化疾病或紊乱之前从患者中获得的生物样本，或未与本文公开的药剂接触的生物样本)。

[0061] 如本文所使用的“合适的对照”是指未经处理的、在其他方面完全相同的细胞或群体(如与非对照细胞相比，未给予本文所述药剂的患者、或仅给予本文所述药剂的子集的患者)。

[0062] 术语“统计学显著的”或“显著的”是指统计显著性，并且通常意味着两个标准偏差(2SD)或更大的差异。

[0063] 如本文所使用的术语“包含”被用于提及对组合物或方法而言必要的方法或组合物及其各自的组分，然而对于包括未指明的元素(无论必要与否)而言是开放的。

[0064] 如本文所使用的术语“基本上由...组成”是指给定的实施方式所需的那些要素。该术语允许存在不会实质性地影响本发明的实施方式的基本和新颖或功能特征的额外的要素。

[0065] 如本文所使用的术语“脂肪族聚酯”是指以下但不限于：聚(丙交酯)、聚(乙交酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚( $\gamma$ -戊内酯)、聚乙二醇(PEG)、藻酸酯、琼脂糖、聚(羟基戊酸酯)、聚(羟基丁酸酯)、聚(3-羟基丁酸酯-共-4-羟基丁酸酯)、聚(羟基己酸酯)、聚(丁二酸丁二醇酯)、聚(链烷酸亚烷酯)、聚(丁二酸丙二酯)、聚(丁二酸乙二酯)、聚( $\epsilon$ -己内酯)、聚(乙二醇二甲基丙烯酸酯)、明胶、胶原蛋白、琼脂糖、果胶、聚(赖氨酸)、bola型两亲分子、糖基-核苷和氟碳链。

[0066] 如本文所使用的术语“乙烯基聚合物”是指以下分子，包括但不限于：聚乙烯醇、聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚苯乙烯磺酸盐、聚氯乙烯、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、聚氧化乙烯、聚氟乙烯、聚硝酸乙烯酯、聚乙烯甲苯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯聚吡咯烷酮、

复合多元醇(pluronic polyol)、polyoxamer、多糖醛酸、聚酸酐、聚NIPAM、聚丙烯酸酯、聚(丙烯酰胺)、聚(甜菜碱)、吐温(20、40、60、80)、癸基葡萄糖苷甘油单硬脂酸酯、甘油单月桂酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、山梨醇酐单硬脂酸酯、曲拉通x-100、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和pluronic F-127。在一些实施方式中,所列分子可用于其乳化和稳定性能。

### 附图说明

[0067] 图1显示制备的微粒具有批间一致性且多分散性低。(上图)包封松弛素-2的PLGA微粒显示出球形形态。(下图)如通过动态光散射分析所释出的,它们被合成具有低的多分散性和 $7.6\mu\text{m}$ 的流体动力学半径。

[0068] 图2示出了松弛素-2在包封和在生理温度下的释放期间保持其折叠和稳定性。(左图)圆二色光谱表明松弛素-2不受双乳化过程的影响,并且能够在PLGA微粒合成期间保持其二级 $\alpha$ 螺旋结构。(右图)松弛素-2在 $37^\circ\text{C}$ 下稳定长达2个月,而无 $\alpha$ 螺旋结构的任何损失。1-4h光谱全部重叠。

[0069] 图3示出了PLGA微粒内的包封使得松弛素-2能够持续释放。(上图)在30天的过程中,荷载有松弛素-2的PLGA微粒释放初始松弛素-2的60%。释放在前三周缓慢,并且三周后迅速增加。(下图)微粒随时间降解。两周后开始,由于在聚合物表面上发生水解作用,粒子的光滑表面消失。4周后,粒子变得多孔,这引起松弛素-2释放速率的增加。比例尺= $2\mu\text{m}$ 。

[0070] 图4示出了松弛素-2在体外释放长达四周,并能够降低胶原蛋白表达。(上图)在四周的过程中,在滑膜细胞中,与未处理的对照相比,如I型胶原蛋白的表达的显著下调所示出的,松弛素-2以有效剂量释放。(下图)密度测定术显示出,I型胶原蛋白在处理减少至约50%。

[0071] 图5示出了荷载有松弛素-2的大的微粒在体外不被鼠巨噬细胞内吞。(左图)孵育24小时后,平均直径为 $4.5\mu\text{m}$ 的荧光标记的对照PLGA微粒(红色)被RAW 264.7鼠巨噬细胞内吞。(右图)荧光标记的荷载有松弛素-2的微粒被排除在RAW 264.7巨噬细胞之外,并且不会在内部发出荧光。上图的图像以10倍的放大倍数拍摄,并且下图的图像以20倍的放大倍率拍摄。

[0072] 图6示出了具有低分子量和各种物理性质的区域的超分子凝胶成分的结构。bola双脲分子1和葡糖基核苷氟化两亲物两者都具有疏水性区域(红色)、芳香性区域(蓝色)和亲水性区域(黑色)。这些区域分别有利于疏水键合、 $\pi$ - $\pi$ 堆积和氢键键合的组合。

[0073] 图7示出了松弛素-2可以被成功地荷载到两亲性水凝胶中而不损害其结构。如圆二色谱所示,松弛素-2在 $95^\circ\text{C}$ 下容许孵育至少一小时,示出了其 $\alpha$ 螺旋构象未受干扰(左图)。荷载有松弛素-2的两亲物将与并入其内的松弛素-2一起胶凝化(右图)。

[0074] 图8示出了bola双脲1的流变特性。(左图)如通过其储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )所示出的,凝胶1在1wt%、2wt%和5wt%的密度下均表现为频率高达 $100\text{rad/s}$ 的固体样材料。在所有凝胶中, $G' > G''$ ,其中, $G'/G''$ 保持大致恒定,并且与wt%无关。 $G'$ 和 $G''$ 的绝对值与凝胶密度成对数比例。(右图)线性粘弹性区域由范围为从0.01%至100%应变的应变扫描确定。5%凝胶显示出最小的LVER,其中,在2.2%的应变下 $G'' > G'$ 。2%凝胶和1%凝胶分别在5.8%和6.4%应变下从LVER转变(垂直的,虚线)。

[0075] 图9示出了糖基核苷氟化两亲物2的流变学性质。(左图)如通过其储能模量( $G'$ )和

损耗模量( $G''$ )所示出的,凝胶2在1wt%、1.5wt%和5wt%的密度下均表现为频率高达100rad/s的固体样材料。 $G'$ 和 $G''$ 的绝对值与凝胶密度成对数比例。(右图)线性粘弹性区域由范围为从0.01%至100%应变的应变扫描确定。5%凝胶显示出最小的LVER,其中,在9%的应变下 $G'' > G'$ 。2%凝胶和1%凝胶分别在20%和30%应变下从LVER转变(垂直的,虚线)

[0076] 图10示出了松弛素-2在8天内以不同的动力学从两种两亲凝胶制剂中释放。由两亲物1制成的凝胶(绿色)以明显慢于由两亲物2制成的凝胶(蓝色)释放的方式释放松弛素-2的速度。在此时间段内,几乎所有的松弛素-2都从由化合物2制成的凝胶中释放,而由1制成的凝胶释放慢约5倍。对于由1制成的凝胶,观察到释放速率和wt%成比例,而在由2制成的凝胶中不存在这种比例。

[0077] 图11示出了松弛素-2疗法将内部ROM改善回基线水平,但在7周内不会影响外部ROM。(左图)拆线后的内部ROM在健康的非手术组中显示出恒定(蓝色)。所有手术组在ROM方面显示出降低的术后基线,然而,mIA和RMP组在第2周时显示出回至健康基线的显著增加。直至第7周,赋形剂对照显示出比起治疗更少的ROM明显低于治疗组。(中图)手术组的外部ROM显著较少,并且在本研究过程中不会改善回健康基线。(右图)与赋形剂对照相比,总的ROM显示出治疗组略有改善,但在研究过程中未达到基线ROM。

[0078] 图12示出了在赋形剂对照中观察到关节纤维化的组织学特征,但在治疗组和健康组中没有。(左图)肱骨头和盂肱关节的H&E染色显示出赋形剂对照中的关节囊(箭头)附近成纤维细胞的沉积增加。在健康对照中,这种沉积显著较少。在肱骨顶部周围还存在成纤维细胞浸润(箭头),其在健康对照组和治疗组中不存在。(中图)番红-0染色显示出,所有组之间的糖胺聚糖的构造基本不变。(右图)肩关节的天狼星红染色显示出成纤维细胞的显著的定向沉积,表明纤维化。除赋形剂对照外,纤维囊和关节囊之间存在轮廓(箭头)。

[0079] 图13示出了松弛素-2的持续释放改善了总ROM。赋形剂组( $n=9$ )和载药储库组( $n=7$ )的挛缩诱导是一致的(时间=0)。在稍后的时间点,内部(中图)和总的(右图)运动范围两者显示出恢复,表明松弛素释放到关节间隙的作用。

## 具体实施方式

[0080] 肩挛缩影响约2%的美国人口、或约600万个体。虽然女性比男性更容易受到影响,但遗传或种族偏好尚未知晓(Robinson C.M.等,J.Bone Joint Surg.Br.2012,94(1):1-9;Ewald A.,Am.Fam.Physician 2011,83(4):417-22)。肩挛缩的恢复是艰巨而持久的,许多患者从未恢复完全的关节功能。该病症影响生活质量和生产能力。其主要特征是由于盂肱关节囊的进行性纤维化而导致的主动和被动盂肱运动的疼痛的、逐渐的丧失。挛缩的囊引起疼痛,特别是当它突然被拉伸时,并对运动产生机械约束。原发性(特发性)肩挛缩的病程始于疼痛和僵硬的缓慢发作(超过2至9个月),这逐渐限制了盂肱关节的被动和主动的活动范围(ROM)两者(Sharma S.,Annals of the Royal College of Surgeons of England 201193(5):343-4;discussion 5-6)。疼痛可能在夜间加剧,使患者无法以患侧入睡。随后,疼痛通常在4至12个月的时间段内减轻,但僵硬严重限制了ROM,特别是在外旋转平面。在2到4年的时间段内,在ROM方面存在缓慢的改善。继发性肩挛缩具有类似的表现和进展,但其是由已知的内在或外在原因引起的(Sheridan M.A.和Hannafin J.A.,Orthop.Clin.North Am.2006,37(4):531-9)。创伤或手术后的继发性肩挛缩具有100%发生率,在这些事件后达

到不同程度,并且需要长期的物理治疗,但原始运动并不总能恢复。

[0081] 肩挛缩病理学是增厚的盂肱关节囊,伴有堵塞腋囊的粘连。纤维化囊粘附至自身和肱骨的解剖颈,关节内体积减小,并且关节中的滑液显著减少(Hand G.C.等, *J. Bone Joint Surg. Br.* 2007, 89(7):928-32)。囊的活检显示出慢性炎症浸润、滑膜衬里缺失和滑膜下纤维化(Ozaki J.等, *J. Bone Joint Surg. Am.* 1989, 71(10):1511-5; Wiley A.M., *Arthroscopy* 1991, 7(2):138-43; Rodeo S.A.等, *J. Orthop. Res.* 1997, 15(3):427-36)。患者活检样本证实存在T细胞、B细胞、滑膜细胞、成纤维细胞和转化肌成纤维细胞,伴随I型和III型胶原蛋白(Rodeo S.A.等, *J. Orthop. Res.* 1997, 15(3):427-36; Bunker T.D.等, *J. Bone Joint Surg. Br.* 2000, 82(5):768-73)。基因和蛋白质表达测定已发现与纤维化、炎症和软骨形成相关的产物(Hagiwara Y.等, *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20(3):241-9),包括增加的COL1A1和COL1A3、白细胞介素-6、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP),以及基质金属蛋白酶(MMP)活性降低。这些数据表明,炎症变化引发成纤维细胞和免疫细胞的募集,加速纤维化过程和胶原蛋白的不适当沉积。或者,可先发生纤维化改变,然后发生炎症。在这种情况下,纤维化可能由潜在的疾病过程引起,其中控制胶原蛋白重塑的细胞信号传导通路可能是有缺陷的(Bunker T.D.等, *J. Bone Joint Surg. Br.* 2000, 82(5):768-73)。例如,使用马马司他(合成的TIMP)治疗的患者发展出肩挛缩,而当马马司他停药时,疾病消退(Hutchinson J.W.等, *J. Bone Joint Surg. Br.* 1998, 80(5):907-8)。

[0082] 肩挛缩被认为是自限性疾病,但恢复过程持久而艰难,大量患者从未恢复完全的ROM。保守治疗(即物理治疗)的报告结果差异很大,并且高度依赖于它们如何被测量(Neviaser A.S.和Neviaser R.J., *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2011, 19(9):536-42)。主观的结果测量往往比客观的结果测量的结果更有利。在一项研究中,用最低限度治疗处理的90%的患者被报告对他们的肩部功能表示满意(Griggs S.M.等, *J. Bone Joint Surg. Am.* 2000, 82-A(10):1398-407)。然而,利用客观结果的另一研究则报告50%的患者中存在残留疼痛,并且60%的患者中存在运动障碍(Shaffer B.等, *J. Bone Joint Surg. Am.* 1992; 74(5):738-46)。轻度至中度症状可在肩挛缩的症状发作4.4年后持续。对于那些经历严重疾病的患者,这种功能损伤干扰日常活动和工作相关责任(Hand C.等, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 2008, 17(2):231-6)。当患者对保守处理无反应时,可采用其他治疗选项。麻醉状态下以手法治疗的形式进行的手术干预可以恢复运动并减少疼痛,但它与骨折、肌腱断裂和神经损伤等并发症有关(Castellarin G.等, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2004, 85(8):1236-40; Hsu S.Y.和Chan K.M., *International Orthopaedics*, 1991, 15(2):79-83; Parker R.D.等, *Orthopedics*, 1989, 12(7):989-90)。据报道,手法治疗或囊松解并不能提供可靠和一致的治疗效果(Shaffer B.等, *J. Bone Joint Surg. Am.* 1992, 74(5):738-46; Ryans I.等, *Rheumatology* 2005, 44(4):529-35)。因此,关节僵硬需要更有效且一致的疗法。

[0083] 本文描述的方面提供了用于递送抗纤维化剂的微粒。例如,包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒。在某些实施方式中,所述微粒进一步包含乙烯基聚合物。

[0084] 本发明的另一方面提供了一种组合物或制剂,其包含本文所述的任何微粒、由本文所述的任何微粒组成、或基本上由本文所述的任何微粒组成。

[0085] 本发明的其他方面提供了一种对患有与纤维化相关的疾病或紊乱的受试者进行治疗的方法,所述方法包括向有需要的所述受试者给予本文描述的任何微粒、本文描述的任何组合物或本文描述的任何制剂。

[0086] 抗纤维化剂

[0087] 本文描述的是包含抗纤维化剂的微粒。

[0088] 在一个实施方式中,所述抗纤维化剂是受体RXFP1的激动剂。在一个实施方式中,所述抗纤维化剂是人松弛素-2或类似物或变体。

[0089] 如本文所使用的术语“松弛素”是指属于松弛素家族的多肽(例如松弛素-2)、松弛素类似物(例如与松弛素受体结合的多肽),或前述任一种的片段(例如生物活性片段)或变体,和/或作为与松弛素受体蛋白家族(RXFP1、RXFP2、RXFP3、RXFP4)结合的药剂的激动剂的任何药剂。

[0090] 松弛素是约6-kDa的蛋白质,属于胰岛素超家族(Sherwood O.D., *Endocr.Rev.* 2004, 25(2):205-34)。与胰岛素一样,松弛素从前体形式加工成成熟激素,包含通过两个链间二硫键桥以及A链内的一个链内二硫键连接的A肽链和B肽链(Chan L.J.等, *Protein Pept.Lett.* 2011, 18(3):220-9)。通过增加MMP的表达和减少TIMP的表达,松弛素易于减少胶原分泌并增加胶原降解(Samuel C.S.等, *Cell Mol.Life Sci.* 2007, 64(12):1539-57)。这种激素参与生殖,在其中它抑制子宫收缩并诱导宫颈的生长和软化以帮助胎儿分娩(Parry L.J.等, *Adv.Exp.Med.Biol.* 2007, 612:34-48)。最近,高度纯化的重组形式的H2松弛素、或人松弛素-2已经在许多体外和体内系统中进行了测试,以评估其修饰结缔组织的能力及其潜在的抗纤维化特性。一些研究报告称,松弛素-2在多个水平上起作用,以抑制与纤维化相关的纤维生成和胶原蛋白过度表达,并能够预防和治疗肺、肾、心脏和肝纤维化(Bennett R.G., *Transl.Res.* 2009, 154(1):1-6)。人成纤维细胞的松弛素治疗导致I型和III型胶原蛋白和纤连蛋白水平的降低(Unemori E.N.等, *The Journal of Clinical Investigation* 1996, 98(12):2739-45)。在体内,松弛素-2减少了博来霉素诱导的肺中的胶原蛋白积聚,并改善了纤维化的总量(Unemori E.N.等, *The Journal of Clinical Investigation* 1996, 98(12):2739-45)。在经培养的肾成纤维细胞、上皮细胞和系膜细胞中,松弛素-2降低了TGF- $\beta$ 诱导的纤连蛋白水平并增加纤连蛋白降解(McDonald G.A.等, *American Journal of Physiology Renal Physiology* 2003, 285(1):F59-67)。松弛素-2已被示出具有快速的药代动力学特征。先前的临床试验研究了利用通过微型泵皮下给予或静脉内给予进行的松弛素-2的持续输注,松弛素-2作为硬皮病、急性心力衰竭和宫颈成熟引产的治疗方法。松弛素-2的功效需要激活跨膜松弛素受体以进行下游信号传导。先前的临床试验利用连续输注来尝试克服药代动力学限制。局部持续释放松弛素-2实现了持续的受体激活,而无需持续给予。

[0091] 除非另有规定,否则本文中使用的术语“松弛素”包括松弛素或其类似物、片段(例如,生物活性片段)或变体。术语“松弛素或其类似物、片段或变体”包括属于胰岛素超家族的松弛素样肽家族的任何成员。松弛素样肽家族包括松弛素样(RLN)肽,例如松弛素-1(RLN1)、松弛素-2(RLN2)和松弛素-3(RLN3);以及胰岛素样(INSL)肽,如INSL3、INSL4、INSL5和INSL6。人RLN1的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:4-7;人RLN2的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:1-3;人RLN3的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:8-10;人

INSL3的代表性序列在本文中列为SEQ ID NO:11;人INSL4的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:12-13;人INSL5的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:14-15;人INSL6的代表性序列在本文中列为SEQ ID NO:16。在一些实施方式中,术语“松弛素或其类似物、片段或变体”可以包括与SEQ ID NOS:1-16中的任何一个具有至少70%(例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或至少99%)序列同一性的任何多肽,以及包含SEQ ID NOS:1-16中的任何一个的任何多肽序列。在本发明的一个实施方式中,松弛素包括RLN1、RLN2或RLN3。在一个实施方式中,松弛素是松弛素-1。在另一个实施方式中,松弛素是松弛素-3。在优选的实施方式中,松弛素是松弛素-2。在本发明另一个实施方式中,松弛素包括INSL3、INSL4、INSL5或INSL6。在一个实施方式中,松弛素是INSL3。在一个实施方式中,松弛素是INSL4。在一个实施方式中,松弛素是INSL5。在一个实施方式中,松弛素是INSL6。

[0092] 在一些实施方式中,松弛素是例如在细菌、哺乳动物或酵母宿主细胞中重组产生的。在其他方面,松弛素已被完全或部分化学合成。

[0093] 在一些实施方式中,术语松弛素包括能够与松弛素家族蛋白受体(RXFP1、RXFP2、RXFP3、RXFP4)相互作用,影响受体的形式、功能或活性的任何天然、合成或半合成的组分。这些化合物包括但不限于天然的松弛素-2、松弛素-2变体、多肽、DNA或RNA多核苷酸、小分子、以及与松弛素-2蛋白缀合或相关的任何的前文列出的化合物。

[0094] 术语“松弛素或其类似物、片段或变体”也可包括松弛素样肽家族的任何成员,包括松弛素样(RLN)肽,例如松弛素-1(RLN1)、松弛素-2(RLN2)和松弛素-3(RLN3),以及胰岛素样(INSL)肽,如INSL3、INSL4、INSL5和INSL6。人RLN1的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:4-7;人RLN2的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:1-3;人RLN3的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:8-10;人INSL3的代表性序列在本文中列为SEQ ID NO:11;人INSL4的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:12-13;人INSL5的代表性序列在本文中列为SEQ ID NOS:14-15;并且人INSL6的代表性序列在本文中列为SEQ ID NO:16。在一些实施方式中,术语“松弛素或其类似物、片段或变体”还可以包括与SEQ ID NOS:1-16中的任何一个具有至少70%(例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%)序列同一性的任何多肽,以及包含SEQ ID NOS:1-16中的任何一个的任何多肽序列。在制剂的一个实施方式中,松弛素包括RLN1、RLN2或RLN3。在一个实施方式中,松弛素是松弛素-2。在另一个实施方式中,松弛素包括INSL3、INSL4、INSL5或INSL6。

[0095] 在一些实施方式中,术语“松弛素或其类似物、片段或变体”也可包括松弛素样肽家族的任何突变体成员。这样的突变体可以是例如包含一个或多个突变的RLN1、RLN2、RLN3、INSL3、INSL4、INSL5或INSL6,所述突变例如RLN1、RLN2、RLN3、INSL3、INSL4、INSL5和INSL6的已知序列中的一个或多个氨基酸(天然或非天然的)的替换、添加或缺失。例如,松弛素样肽家族的突变体成员可以包括RLN1、RLN2、RLN3、INSL3、INSL4、INSL5或INSL6的任何天然出现或人工产生的变体。

[0096] 如本文所使用的术语“松弛素片段”或“松弛素的片段”包括松弛素的片段,即松弛素样肽家族的任何成员的部分序列,其通过与松弛素家族受体的相互作用保持治疗僵硬的关节的能力。实例包括欧洲专利局申请No.EP1641824B1(Relaxin superfamily peptide analogues)中描述的那些序列,将其全部内容通过引用并入本文。

[0097] 术语“松弛素类似物”或“松弛素的类似物”包括具有松弛素的生物活性(即与松弛素家族受体相互作用的能力)的任何非松弛素多肽序列。在一个实施方式中,这种多肽序列可包含催乳素或其类似物、片段或变体。在另一个实施方式中,这样的序列可以包括在ACS Appl.Mater.Interfaces 2019,11,49,45511-45519中描述的称为B7-33的松弛素的截短的B链类似物。

[0098] 在一些实施方式中,术语药剂或“松弛素类似物”还包括松弛素受体激动剂,例如可以结合并激活松弛素受体(例如RXFP1、RXFP2、RXFP3和RXFP4中的一种或多种)的任何药剂,例如小分子、多肽、多核苷酸或多糖。例如,松弛素受体激动剂可以是包含松弛素的受体结合位点的多肽。松弛素受体激动剂也可以是包含能够结合并激活松弛素受体(例如RXFP1、RXFP2、RXFP3和RXFP4)的任何其他序列的多肽。其他实例包括在如下中描述的那些激动剂,将其全部内容通过引用并入本文:美国专利申请No.US20130237481A1 (Modified relaxin polypeptides and their uses)、美国专利申请No.US20180222960A1 (Modified relaxin polypeptides comprising a pharmacokinetic enhancer and uses thereof)、美国专利申请No.US8445635B2 (Modified H2 relaxin for tumor suppression)、欧洲专利局申请No.EP3067365A1 (Human relaxin analogue, pharmaceutical composition of same, and pharmaceutical application of same) 和美国专利申请No.US20180222960A1 (Modified relaxin polypeptides comprising a pharmacokinetic enhancer and uses thereof)。

[0099] 术语“松弛素或其类似物、片段或变体”包括任何重组产生的松弛素,例如诺华开发的Serelaxin(RLX030)。例如,在美国专利号5,464,756中描述了生产重组松弛素(例如松弛素-2)的方法,将其全部内容通过引用并入本文。重组产生的松弛素或其类似物、片段或变体可包含松弛素序列(例如RLN1、RLN2、RLN3、INSL3、INSL4、INSL5或INSL6)和组氨酸(His)标签,以帮助在重组产生后对松弛素进行纯化。

[0100] 松弛素或其类似物、片段或变体还可包含一种或多种化学修饰,例如共价连接到松弛素或类似物、其片段或变体的化学基团。此类化学基团可包括例如碳水化合物或其他聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、例如多肽、例如一种或多种脂质(Design and Synthesis of Potent, Long-Acting Lipidated Relaxin-2 Analogs, Bioconjugate Chem. 2019, 30, 1, 83-89)。其他实例包括在美国专利申请No.US2018/0326079 (NOVEL FATTY ACIDS AND THEIR USE IN CONJUGATION TO BIOMOLECULES)、US9931372B2 (SYNTHETIC APELIN FATTY ACID CONJUGATES WITH IMPROVED HALF-LIFE)中描述的片段或变体,将其全部内容通过引用并入本文。

[0101] 在一些实施方式中,松弛素或其类似物、片段或变体与ML290或其类似物、片段或变体共同给予,以延长或增强RXLP1激活的效果(Kocan, M.等Sci.Rep., 2017)。

[0102] 在一些实施方式中,术语松弛素包括与免疫球蛋白或免疫球蛋白的片段(例如抗体或抗体片段,例如在WO 2017/100540中描述的免疫球蛋白融合蛋白)连接(例如共价连接)的松弛素。在另一些实施方式中,术语松弛素不包括与免疫球蛋白或免疫球蛋白的片段连接(例如共价连接)的松弛素。

[0103] 微粒及其组合物和制剂

[0104] 本文描述的方面涉及包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒。示例性脂肪族聚酯包

括聚丙交酯=共-乙交酯或聚己内酯。

[0105] 在一个实施方式中,微粒进一步包含乙烯基聚合物。示例性的乙烯基聚合物包括聚乙烯醇或聚吡咯烷酮。

[0106] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0107] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0108] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的微粒,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0109] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒。

[0110] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0111] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0112] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的微粒,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0113] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0114] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0115] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0116] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述微粒的直径为1-50 $\mu\text{m}$ 。

[0117] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0118] 本文的另一方面是包含脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂的PLGA微粒,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0119] 在一个实施方式中,当制剂的特征(如抗纤维化剂、松弛素、乙烯基聚合物、脂肪族聚酯等)处于以质量百分比、重量百分比、总质量百分比等表示的指定的量时,除非另有指示,该百分比基于未悬浮在溶液中的微粒。在要求保护的制剂包含悬浮在溶液中的微粒的这种情况下,质量百分比仍然是指微粒中的质量百分比,而非包含微粒和悬浮溶液的总溶液。

[0120] 药物组合物

[0121] 本文的各个方面涉及包含本文所述的任何微粒的组合物。在各种实施方式中,所述组合物是药物组合物。

[0122] 如本文所使用的术语“药物组合物”可包括当与活性成分(例如,抗纤维化剂,如松弛素)组合时,允许该成分保持生物活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料或物质。实例包括但不限于任何标准的药物载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、乳剂(例如油/水乳剂)和各种类型的润湿剂。本文中使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范

围内,适用于与人和动物的组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的收益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0123] 如本文中使用的短语“药学上可接受的载体”意味着药学上可接受的材料、组合物或赋形剂,例如液体或固体填料、稀释剂、辅料、溶剂或封装材料,其参与将受试药剂从一个器官或机体的一部分运送或运输至另一个器官和机体的另一部分。术语“药学上可接受的载体”排除了组织培养基。在与制剂的其他成分相容的意义上,每个载体都必须是“可接受的”,例如,载体不会降低药剂对治疗的影响。换句话说,载体是药学上惰性的。术语“生理学上可耐受的载体”和“生物相容性递送赋形剂”可互换使用。药物载体的非限制性实例包括基于粒子或聚合物的赋形剂,例如纳米粒子、微粒、聚合物微球或聚合物药物缀合物。

[0124] 在一些实施方式中,药物组合物是液体剂型或固体剂型。用于口服给予的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。此外,液体剂型可包含本领域中常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨醇的脂肪酸酯及他们的混合物。除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包含佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0125] 在一些实施方式中,通过使用稀释剂溶液将所提供的本文公开的制剂的冻干物或冻干粉末复原或重悬,在床旁或床旁附近制备液体剂型。

[0126] 用于口服给予的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉末剂和颗粒剂。在这种固体剂型中,本文所述的药剂与至少一种惰性的、药学上可接受的辅料或载体混合,所述辅料或载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或a) 填料或增量剂(例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、b) 粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐/酯、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、c) 湿润剂(如甘油)、d) 崩解剂(如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、e) 溶液缓凝剂(如石蜡)、f) 吸收促进剂(如季铵化合物)、g) 润湿剂(如十六醇和单硬脂酸甘油酯)、h) 吸收剂(如高岭土和膨润土)以及i) 润滑剂(如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及他们的混合物)。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。

[0127] 类似类型的固体组合物也可以用作使用乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等辅料的软和硬的填充的明胶胶囊中的填料。片剂、糖衣丸剂、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和壳(如肠溶包衣和药物制剂领域中众所周知的其他包衣)制备。它们可以任选地含有乳浊剂,并且也可以具有如下的组成,即它们仅在肠道的特定部分中或优选地在肠道的特定部分中,任选地以迟释的方式释放活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。类似类型的固体组合物也可以用作使用诸如乳糖以及高分子量聚乙二醇等辅料的软和硬的填充的明胶胶囊中的填料。

[0128] 在一些实施方式中,固体剂型是冻干粉末。

[0129] 在某些剂型中,冻干粉末固体剂型旨在用稀释剂重悬或复原。

[0130] 所述药剂也可以处于具有上述一种或多种辅料的微囊封形式。片剂、糖衣丸剂、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和壳制备,如肠溶包衣、控制释放包衣和药物制剂领域中众所周知的其他包衣。在这种固体剂型中,药剂可以与至少一种惰性稀释剂(如蔗

糖、乳糖和淀粉)混合。如在常规实践中,这种剂型还可以包括除惰性稀释剂之外的额外的物质,例如压片润滑剂和其他压片助剂,如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。它们可以任选地包含乳浊剂,并且也可以具有如下的组成,即它们仅在肠道的特定部分中或优选地在肠道的特定部分中,任选地以迟释的方式释放活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0131] 药物组合物包括适用于口服给予的制剂,可作为离散单元提供,如片剂、胶囊、扁囊剂、糖浆、酏剂、预制食品、微乳剂、溶液、悬浮液、锭剂或凝胶包衣安瓿,各自含有预定量的活性化合物;作为粉末或颗粒剂提供;作为处于水性或非水性液体中的溶液或悬浮液提供;或作为水包油或油包水乳液提供。

[0132] 因此,适用于直肠给予的制剂包括凝胶、乳膏、洗剂、水性或油性悬浮液、可分散粉末或颗粒剂、乳剂、可溶性固体材料、冲洗液等。所述制剂优选作为单位剂量栓剂提供,所述栓剂包含处于形成栓剂基质的一种或多种固体载体(例如可可脂)中的活性成分。此类制剂的合适载体包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇及他们的组合。或者,具有本发明的快速再定殖展开剂的结肠洗液可被配制用于结肠或直肠给予。

[0133] 本发明提供了用于向有需要的受试者递送多肽治疗剂的持续释放制剂。本发明的持续释放制剂由水凝胶、微粒或药剂的一些基质包封组成。该药剂的一个实例是松弛素。所述持续释放包括由储库支撑材料包封或通过接头化学结合到储库支撑材料的药剂(例如松弛素)。接头可以包含聚合物、不可裂解接头或者通过化学或酶手段可裂解的接头。在将药剂与材料混合后,可以在原位形成储库。储库可以在松弛素与材料混合之前形成。

[0134] 包含药剂(例如松弛素)的持续释放制剂可以处于包含一种或多种聚合物的水凝胶或微粒的形式。可用于持续释的松弛素制剂中的聚合物可包括但不限于聚乙二醇(PEG)、藻酸盐/酯、琼脂糖、聚(乙二醇二甲基丙烯酸酯)、聚乳酸、聚乙醇酸、聚丙交酯-共-乙交酯、明胶、胶原蛋白、琼脂糖、果胶、聚(赖氨酸)、聚羟基丁酸酯、聚 $\epsilon$ -己内酯、聚磷嗪、聚乙烯醇、聚(环氧烷烃)、聚(氧化乙烯)、聚(烯丙胺)、聚(丙烯酸酯)、聚(4-氨基甲基苯乙烯)、复合多元醇、polyoxamer、聚(糖醛酸)、聚(酸酐)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、bola型两亲分子、糖基-核苷和氟碳链。

[0135] 在本文所述的任何方面的一些实施方式中,通过控制释放或延迟释放手段向受试者给予药剂。理想地,在医疗中使用最佳设计的控制释放制剂的特征在于使用最少的药物在最短的时间内治愈或控制病情。控制释放制剂的优点包括:1)延长的药物的活性;2)减少的剂量频率;3)提高的患者依从性;4)使用更少的总的药物;5)减少局部或全身副作用;6)药物蓄积最小化;7)降低血液水平波动;8)改善治疗功效;9)减弱增效作用或丧失药物活性;以及10)提高疾病或病症的控制速度(Kim,Cherng-ju,Controlled Release Dosage Form Design,2(Technomic Publishing,Lancaster,Pa.:2000))。控制释放制剂可用于控制式(I)化合物的作用开始、作用持续时间、治疗窗口内的血浆水平和峰值血液水平。特别是,可以使用控制释放或延长释放剂型或制剂,以确保实现药剂的最大有效性,同时使潜在的不良反应和安全性问题最小化,所述不良反应和安全性问题可由于药物剂量不足(即低于最低治疗水平)以及超过药物的毒性水平而发生。

[0136] 多种已知的控制释放或延长释放剂型、制剂和装置可适用于本文所述的任何药剂。实例包括但不限于美国专利号:3,845,770;3,916,899;3,536,809;3,598,123;4,008,

719;5674,533;5,059,595;5,591,767;5,120,548;5,073,543;5,639,476;5,354,556;5,733,566以及6,365,185中描述的那些;通过引用将其各自以其整体并入本文。这些剂型可使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统(例如**OROS®**(Alza Corporation,Mountain View,Calif.USA))、多层包衣、微粒、脂质体或微球或他们的组合以提供不同比例的期望的释放曲线,用于提供一种或多种活性成分的缓慢释放或控制释放。此外,离子交换材料可用于制备所公开的化合物的固定的、吸附的盐形式,并因此影响药物的控制递送。具体的阴离子交换剂的实例包括但不限于**DUOLITE®A568**和**DUOLITE®AP143**(Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA)。

[0137] 在一些实施方式中,在荷载松弛素之前或之后,可以通过包括但不限于凝胶渗透色谱法、高效液相色谱法、超高效液相色谱仪、MALDI-TOF质谱法、粘度测定法以及光散射(例如多角度、低角度激光)等的技术对任何上述聚合物进行表征(例如尺寸、分子量、电荷、二级结构和纯度)。

[0138] 在一些实施方式中,松弛素的释放速率可以通过包括但不限于高效液相色谱法、超高效液相色谱法、快速蛋白质液相色谱法、酶联免疫吸附测定和配体结合测定等的技术来表征。在一些实施方式中,作为松弛素在制剂也存在于其中的任何生物相关液体溶液或悬浮液或介质(例如盐水、哺乳动物细胞培养基、合成滑液、滑液、血清、合成血清、血浆、合成血浆和去离子水)中的浓度,对松弛素的释放速率进行测量。在具体实施方式中,制剂和生物相关液体溶液或悬浮液保持在特定温度。在具体实施方式中,制剂和生物相关液体溶液或悬浮液以设定或变化的运动速率搅拌或混合。在具体实施方式中,使用直接酶联免疫吸附测定来测量释放到生物相关液体溶液或悬浮液中的松弛素的浓度。在具体实施方式中,使用间接酶联免疫吸附测定来测量释放到生物相关液体溶液或悬浮液中的松弛素的浓度。在优选实施方式中,使用来自Bio-technique公司的人松弛素-2Quantikine ELISA试剂盒来测量释放到生物相关液体溶液或悬浮液中的松弛素的浓度。

[0139] 在一些实施方式中,松弛素微粒的尺寸和形态(例如直径、球形度和孔隙率)可通过以下技术表征,所述技术包括但不限于动态光散射、库仑计数器、显微镜、筛分析、动态图像分析、静态图像分析和激光衍射。

[0140] 在一些实施方式中,松弛素微粒中的松弛素的总荷载含量(例如松弛素的重量/体积百分比、松弛素的重量/重量百分比)可通过以下技术表征,包括但不限于质量平衡、高效液相色谱法、超高效液相色谱法、快速蛋白质液相色谱法、酶联免疫吸附测定和配体结合测定。在一些实施方式中,可以将制剂纯化和溶解以评估松弛素的总荷载含量。

[0141] 在一些实施方式中,作为总的制剂可溶解于其中的任何液体溶液、悬浮液或介质(例如盐水、哺乳动物细胞培养基、合成滑液、滑液、血清、合成血清、血浆、合成血浆、二氯甲烷、乙腈、乙酸乙酯和去离子水)中的松弛素的浓度,对松弛素微粒中的松弛素的总荷载含量(即质量)进行测量。在具体的实施方式中,使用直接酶联免疫吸附测定来测量制剂溶解后松弛素在液体溶液、悬浮液或介质中的浓度。在具体的实施方式中,使用间接酶联免疫吸附测定来测量制剂溶解后松弛素在液体溶液、悬浮液或介质中的浓度。在具体的实施方式中,使用夹心酶联免疫吸附测定来测量制剂溶解后松弛素在液体溶液、悬浮液或介质中的浓度。在优选的实施方式中,使用来自Bio-technique公司的人松弛素-2Quantikine ELISA试

剂盒来测量制剂溶解后松弛素在液体溶液、悬浮液或介质中的浓度。

[0142] 在某些实施方式中,持续释放制剂包含PEG,例如直链PEG或支链PEG。在某些实施方式中,PEG的分子量大于0.2kDa、大于0.5kDa、大于1kDa、大于5kDa、大于10kDa或大于20kDa。

[0143] 在一些实施方式中,水凝胶由PEG基交联剂和内硫酯组成,内硫酯将与树枝状分子(dendrons)反应以制备水凝胶。这些水凝胶可以以不同的重量百分比制备以调节机械性能。在具体的实施方式中,内硫酯允许通过使用半胱氨酸甲酯溶液的受控溶解。在具体的实施方式中,凝胶材料性质包括但不限于释放曲线、杨氏模量、剪切模量、疏水性和弹性,其可以通过硫酯部分的改性来改变,以调节水凝胶的材料性质。

[0144] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯是聚丙交酯-共-乙交酯。

[0145] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯是聚己内酯。

[0146] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿;10,000-150,000道尔顿;或25,000-125,000道尔顿;或40,00-100,000道尔顿;10,000-30,000道尔顿;30,000-50,000道尔顿;50,000-70,000道尔顿;70,000至90,000道尔顿;90,000至120,000道尔顿;或120,000-150,000道尔顿。

[0147] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯由酯官能团封端。

[0148] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯由烷基酯官能团封端。

[0149] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯由羧酸官能团封端。

[0150] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯由胺官能团、异氰酸酯官能团、异硫氰酸酯官能团、苯甲酰氟官能团、马来酰亚胺官能团、碘乙酰胺官能团、2-硫代吡啶官能团、3-芳基丙腈(3-arylpropionitrile)官能团、重氮盐、醛、酮、叠氮化物、炔烃、环辛烯或膦封端。在本文任何方面的一个实施方式中,这些官能团使得PLGA和生物分子之间能够生物结合。

[0151] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含乙烯基聚合物,即聚(乙烯醇)。

[0152] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含乙烯基聚合物,即聚(吡咯烷酮)。

[0153] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含分子量为10,000-200,000道尔顿、10,000-150,000道尔顿、或25,000-125,000道尔顿、或40,00-100,000道尔顿、10,000-30,000道尔顿、30,000-50,000道尔顿、50,000-70,000道尔顿、70,000至90,000道尔顿、90,000至120,000道尔顿、或120,000-150,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0154] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0155] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述微粒的直径为1-75 $\mu\text{m}$ ;或1-50 $\mu\text{m}$ ;或5-50 $\mu\text{m}$ ;或25-50 $\mu\text{m}$ ;或30-50 $\mu\text{m}$ ;或40-50 $\mu\text{m}$ ;或5-10 $\mu\text{m}$ ;5-8 $\mu\text{m}$ ;8-12 $\mu\text{m}$ ;12-18 $\mu\text{m}$ ;18-25 $\mu\text{m}$ ;25-35 $\mu\text{m}$ ;35-45 $\mu\text{m}$ ;45-50 $\mu\text{m}$ ;1 $\mu\text{m}$ ;2 $\mu\text{m}$ ;3 $\mu\text{m}$ ;4 $\mu\text{m}$ ;5 $\mu\text{m}$ ;6 $\mu\text{m}$ ;7 $\mu\text{m}$ ;8 $\mu\text{m}$ ;9 $\mu\text{m}$ ;10 $\mu\text{m}$ ;15 $\mu\text{m}$ ;20 $\mu\text{m}$ ;25 $\mu\text{m}$ ;30 $\mu\text{m}$ ;35 $\mu\text{m}$ ;40 $\mu\text{m}$ ;45 $\mu\text{m}$ ;50 $\mu\text{m}$ ;75 $\mu\text{m}$ ;100 $\mu\text{m}$ ;150 $\mu\text{m}$ ;或200 $\mu\text{m}$ 。

[0156] 在本文任何方面的一个实施方式中,脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为15:85-25:75的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为25:75-35:65的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为35:65-45:55的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为45:55-55:45的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为55:45-65:35的

聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为65:35-75:25的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为75:25-85:15的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为约50:50的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为约45:55的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为约55:45的聚丙交酯-共-乙交酯;丙交酯:乙交酯的摩尔比为约40:60的聚丙交酯-共-乙交酯;或丙交酯:乙交酯的摩尔比为约60:40的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0157] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含乙烯基聚合物,所述乙烯基聚合物占总质量的约0.01%-0.1%;总质量的0.1%-0.3%;总质量的0.2%-0.9%;总质量的0.3%-0.7%;总质量的0.4%-0.6%;总质量的0.3%-0.6%;总质量的0.6%-1.0%;总质量的1.0%-5.0%;总质量的5.0%-10.0%;总质量的10.0%-30.0%;总质量的0.1%;总质量的0.2%;总质量的0.3%;总质量的0.4%;总质量的0.5%;总质量的0.6%;总质量的0.7%;总质量的0.8%;总质量的0.9%;总质量的10%;总质量的15%;总质量的20%;总质量的25%;总质量的30%;或总质量的33%。

[0158] 在本文任何方面的一个实施方式中,抗纤维化剂占总制剂质量的0.005%-5%。在本文任何方面的一个实施方式中,抗纤维化剂占总制剂质量的0.01%-10%、0.01%-33%或0.1%-5%;或总制剂质量的0.2%-4%;或总制剂质量的0.3%-3%;或总制剂质量的0.5%-2%;或总制剂质量的0.5%-1.5%;或总制剂质量的0.5%-3%;或总制剂质量的1%-2%;或总制剂质量的1%-5%;或总制剂质量的3%-7%;或总制剂质量的5%-10%。

[0159] 在本文任何方面的一个实施方式中,抗纤维化剂占总制剂质量的约0.005%-0.01%;总制剂质量的0.01%-0.05%;总制剂质量的0.05%-0.1%;总制剂质量的0.1%-0.5%;总制剂质量的0.5%-1.0%;总制剂质量的1.0%-2.5%;总制剂质量的2.5%-5.0%;总制剂质量的0.25%;总制剂质量的0.5%;总制剂质量的0.75%;总制剂质量的1%;总制剂质量的1.25%;总制剂质量的1.5%;总制剂质量的1.75%;总制剂质量的2%;总制剂质量的2.5%;总制剂质量的3%;或总制剂质量的5%。

[0160] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约50:50丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0161] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约50:50丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.0wt%的PVA。

[0162] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约60:40丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0163] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含PLGA摩尔比为40:60丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0164] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含悬浮在液体溶液中的微粒。

[0165] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含悬浮在氯化钠液体溶液中的微粒。

[0166] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含悬浮在氯化钠液体溶液中的微粒;氯化钠为液体溶液的0.5w/w%-1.5w/w%、或在0.75w/w%-1.25w/w%之间、或约0.5w/w%、或约0.6w/w%、或约0.7w/w%、或约0.8w/w%、或约0.9w/w%、或约1.0w/w%、或约1.1w/w%、或约1.2w/w%、或约1.3w/w%、或约1.4w/w%、或约1.5w/w%。

[0167] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含悬浮在羧甲基纤维素钠溶液中的微粒。

[0168] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂包含悬浮在羧甲基纤维素钠溶液中的微粒;羧甲基纤维素钠溶液为液体溶液的0.1w/w%-1.0w/w%、或在0.25w/w%-0.75w/w%之间、或约0.1w/w%、或约0.2w/w%、或约0.3w/w%、或约0.4w/w%、或约0.5w/w%、或约0.6w/w%、或约0.7w/w%、或约0.8w/w%、或约0.9w/w%、或约1.0w/w%。

[0169] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是持续释放制剂。

[0170] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是持续释放制剂,抗纤维化剂在长的时间段内释放。

[0171] 为了使松弛素具有持续的临床抗纤维化作用,生理学上期望松弛素的瞬时浓度在持续时间内高于最小有效浓度。据报道,单次大剂量的松弛素在动物中不起效。据报道,持续剂量的松弛素在动物中是有效的。

[0172] 松弛素的恒定的持续剂量可以通过以线性释放速率(即,无推注效应或突释效应)从微粒释放松弛素来实现。

[0173] 在本文任何方面的一个实施方式中,所述制剂是持续释放制剂,所述抗纤维化剂在如下的长的时间段内释放:至少1天;或至少2天;或至少3天;或至少4天;或至少5天;或至少6天;或至少1周;或至少2周;或至少3周;或至少4周;或至少5周;或至少6周;或至少8周;或至少9周;至少10周;或至少12周;或至少15周;或在1-5天之间;或在2-5天之间;或在1-2天之间;或在2-3天之间;或在3-4天之间;或在4-5天之间;或在3-10天之间;或在1-15周之间;或在2-10周之间;或在4-8周之间;或在8-15周之间;或约1天;或约2天;或约3天;或约4天;或约5天;或约6天;或约1周;或约2周;或约3周;或约4周;或约5周;或约6周;或约7周;或约8周;或约9周;或约10周以上。

[0174] 与纤维化相关的疾病或紊乱的治疗

[0175] 在一些实施方式中,向受试者给予本文所述的制剂。在一些实施方式中,将本文所述的制剂用于治疗受试者机体上的部位或器官、受试者中的疾病或适应症和/或使用表1和/或表2中所述的给予途径。

[0176] 表1

	给予途径和目标	位点(非关节)	肺、肾、肝、心脏、皮肤、眼睛;腱、骨腱连接、腱-骨界面、肌腱端(entheses)或肌-腱插入处,提及遍及机体的大量的腱
		位点(关节)	下巴、脊柱、肩膀、肘、手腕、手、手指、臀部、膝盖、脚踝、脚、脚趾、或任何其他滑膜关节或非滑膜关节
[0177]		给予途径	关节注射(JI): 关节内、关节周、囊内、囊周 非关节致密结缔组织注射(NJDCTI): 韧带内、韧带周围、腱内、腱周、骨腱内或骨腱周围;肌腱内、肌腱周围、肌肉周围; 其他非骨科: 静脉内、肌内、皮下、皮内、鼻内、口服、经皮(离子电渗入/电泳)、粘膜、凝胶、乳膏、软膏、洗剂、滴剂、栓剂、气雾剂、液体、粉末、肺吸入、眼用。
	适应症	何时给予治疗	对于具有僵硬的关节或处于僵硬的关节的风险中的患者(治疗或预防),在医疗程序期间或紧邻其后

[0178] 表2

	纤维化的一般原因	特发性、损伤（创伤、医疗程序如手术）、因任何原因无法移动、炎症或疾病/医疗状况
[0179]	疾病/病症：关节（经由关节注射给予）	粘连性囊炎（损伤、特发性、术后、植入后）
	疾病/病症：肺（经由吸入给予）	特发性肺纤维化、囊性纤维化、高血压
	疾病/病症：肝	乙型或丙型肝炎、长期酗酒、非酒精性脂肪性肝炎、非
		酒精脂肪性肝病、胆汁淤积症、自身免疫性肝炎肝硬化
	疾病/病症：肾	慢性肾病、终末期肾病、肾间质纤维化
	疾病/病症：心脏	心力衰竭、心肌梗死、主动脉瓣狭窄、肥厚型心肌病
	疾病/病症：肠	克罗恩病、炎症性肠病、肠病
	疾病/病症：皮肤（经由皮内注射或透皮给予）	硬皮病、瘢痕疙瘩、增生性疤痕、橘皮组织
[0180]	疾病/病症：泌尿生殖的/妇科的	佩罗尼氏病、子宫肌瘤、尿道狭窄
	疾病/病症：眼部	先天性眼外肌纤维化、视网膜下纤维化、视网膜前纤维化、角膜纤维化
	疾病/病症：结缔组织、筋膜	Dupuytren 病、乳房包膜挛缩、足底纤维瘤病
	疾病/病症：神经肌肉（经由关节或关节周围注射给予）	杜氏、贝克、先天性和其他肌营养不良症，SMA，腓骨肌萎缩症，关节挛缩症，ALS，畸形足，小儿麻痹症后，CP

[0181] 在一些实施方式中，提供了一种方法，其中，所述方法涉及鉴别被诊断患有选自于由表1或表2中所列疾病的组中的一种或多种疾病的受试者，并向所述受试者给予本发明的制剂。在一些实施方式中，提供了一种方法，其中，所述方法涉及鉴别被诊断患有选自于由以下组成的疾病的组中的一种或多种疾病的受试者：杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症I型、脊髓性肌萎缩症II型、脊髓性肌萎缩症III型、脊髓性肌萎缩症IV型、脑瘫、中风、创伤性脑损伤、周围神经损伤、先天性多发性关节挛缩症、肱桡关节纤维化、肱尺关节纤维化、孟肱关节纤维化、胫股关节纤维化、髌白股关节纤维化、距小腿关节纤维化、颞下颌关节纤维化、掌指关节纤维化、跖趾关节纤维化、关节周围肌肉组织纤维化和橘皮组织，并向所述患者给予本发明的组合物或制剂。

#### [0182] 僵硬的关节

[0183] 本文公开的各种组合物和方法可用于治疗关节僵硬的各个方面、前兆和相关病症。关节僵硬是重大的公共卫生问题，现有的治疗选项提供了多变而有限的效果。关节僵硬可以影响机体中的任何关节，如肩关节、肘关节、腕关节、指关节、髌关节、膝关节、踝关节、趾关节、脊柱和下颌。肩关节常受关节僵硬的影响，其也称为肩挛缩，并且也被称为“冻结肩”。

[0184] 肩挛缩影响约2%的美国人口、或约600万个体。虽然女性比男性更容易受到影响，但遗传或种族偏好尚未知晓 (Robinson C.M.等, J.Bone Joint Surg.Br.2012,94(1):1-9; Ewald A., Am.Fam.Physician 2011,83(4):417-22)。肩挛缩的恢复是艰巨而持久的，许多患者从未恢复完全的关节功能。该病症影响生活质量和生产能力。其主要特征是由于孟肱

关节囊的进行性纤维化而导致的主动和被动盂肱运动的疼痛的、逐渐的丧失。挛缩的囊引起疼痛,特别是当它突然被拉伸时,并对运动产生机械约束。原发性(特发性)肩挛缩的病程始于疼痛和僵硬的缓慢发作(超过2至9个月),这逐渐限制了盂肱关节的被动和主动的活动范围(ROM)两者(Sharma S.,Annals of the Royal College of Surgeons of England 2011;93(5):343-4;discussion 5-6)。疼痛可能在夜间加剧,使患者无法以患侧入睡。随后,疼痛通常在4至12个月的时间段内减轻,但僵硬严重限制了ROM,特别是在外旋转平面。在2到4年的时间段内,在ROM方面存在缓慢的改善。继发性肩挛缩具有类似的表现和进展,但其是由已知的内在或外在原因引起的(Sheridan M.A.和Hannafin J.A.,Orthop.Clin.North Am.2006,37(4):531-9)。创伤或手术后的继发性肩挛缩具有100%发生率,在这些事件后达到不同程度,并且需要长期的物理治疗,但原始运动并不总能恢复。

[0185] 肩挛缩病理学是增厚的盂肱关节囊,伴有堵塞腋襞的粘连。纤维化囊粘附至自身和肱骨的解剖颈,关节内体积减小,并且关节中的滑液显著减少(Hand G.C.等,J.Bone Joint Surg.Br.2007,89(7):928-32)。囊的活检显示出慢性炎症浸润、滑膜衬里缺失和滑膜下纤维化(Ozaki J.等,J.Bone Joint Surg.Am.1989,71(10):1511-5;Wiley A.M.,Arthroscopy 1991,7(2):138-43;Rodeo S.A.等,J.Orthop.Res.1997,15(3):427-36)。患者活检样本证实存在T细胞、B细胞、滑膜细胞、成纤维细胞和转化肌成纤维细胞,伴随I型和III型胶原蛋白(Rodeo S.A.等,J.Orthop.Res.1997,15(3):427-36;Bunker T.D.等,J.Bone Joint Surg.Br.2000,82(5):768-73)。基因和蛋白质表达测定已发现与纤维化、炎症和软骨形成相关的产物(Hagiwara Y.等,Osteoarthritis Cartilage 2012,20(3):241-9),包括增加的COL1A1和COL1A3、白细胞介素-6、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和基质金属蛋白酶抑制剂(TIM P),以及基质金属蛋白酶(MMP)活性降低。这些数据表明,炎症变化引发成纤维细胞和免疫细胞的募集,加速纤维化过程和胶原蛋白的不适当沉积。或者,可先发生纤维化改变,然后发生炎症。在这种情况下,纤维化可能由潜在的疾病过程引起,其中控制胶原蛋白重塑的细胞信号传导通路可能是有缺陷的(Bunker T.D.等,J.Bone Joint Surg.Br.2000,82(5):768-73)。例如,使用马马司他(合成的TIM P)治疗的患者发展出肩挛缩,而当马马司他停药时,疾病消退(Hutchinson J.W.等,J.Bone Joint Surg.Br.1998,80(5):907-8)。

[0186] 肩挛缩被认为是自限性疾病,但恢复过程持久而艰难,大量患者从未恢复完全的ROM。保守治疗(即物理治疗)的报告结果差异很大,并且高度依赖于它们如何被测量(Neviaser A.S.和Neviaser R.J.,J.Am.Acad.Orthop.Surg.2011,19(9):536-42)。主观的结果测量往往比客观的结果测量的结果更有利。在一项研究中,用最低限度治疗处理的90%的患者被报告对他们的肩部功能表示满意(Griggs S.M.等,J.Bone Joint Surg.Am.2000,82-A(10):1398-407)。然而,利用客观结果的另一研究则报告50%的患者中存在残留疼痛,并且60%的患者中存在运动障碍(Shaffer B.等,J.Bone Joint Surg.Am.1992;74(5):738-46)。轻度至中度症状可在肩挛缩的症状发作4.4年后持续。对于那些经历严重疾病的患者,这种功能损伤干扰日常活动和工作相关责任(Hand C.等,Journal of Shoulder and Elbow Surgery 2008,17(2):231-6)。当患者对保守处理无反应时,可采用其他治疗选项。麻醉状态下以手法治疗的形式进行的手术干预可以恢复运动并减少疼痛,但它与骨折、肌腱断裂和神经损伤等并发症有关(Castellarin G.等,

Archives of Physical Medicine and Rehabilitation 2004,85(8):1236-40;Hsu S.Y. 和Chan K.M.,International Orthopaedics,1991,15(2):79-83;Parker R.D.等, Orthopedics,1989,12(7):989-90)。据报道,手法治疗或囊松解并不能提供可靠和一致的治疗效果(Shaffer B.等,J.Bone Joint Surg.Am.1992,74(5):738-46;Ryans I.等,Rheumatology 2005,44(4):529-35)。因此,关节僵硬需要更有效且一致的疗法。

[0187] 给予前将生物活性剂封装在生物相容和可生物降解的聚合物基质中延长了患者中的有效治疗水平。水凝胶和微粒是可植入的结构。由于设计是生物相容的、由无毒成分制成、不具有免疫原性或不引起刺激并且不会在结构或机械上阻碍靶组织,因此它们对于治疗剂递送而言是期望的。显著地,它们可以向感兴趣的区域进行局部给予。广泛用于小分子药物、DNA和蛋白质的微胶囊化和延长释放的一种材料是聚(乳酸-共-羟基乙酸)(PLGA)。PLGA是生物相容的,并通过向聚合物基质外的扩散和经由聚合物基质的分解两者来释放其荷载物。这种分解通过PLGA在机体水环境的催化下水解成乳酸和乙醇酸而发生,乳酸和乙醇酸是细胞代谢的副产物。美国食品和药物管理局认为其对于向人给予而言是安全的(Han,F.C.等,Front.Pharmacol.2016,7(185))。通过调整乳酸与乙醇酸的比例和乳化方案,可以优化PLGA微粒以用于持续的药物释放。然而,据报道,它引起了异物反应。

[0188] 在丙交酯乙交酯共聚物微粒内封装生物活性剂的技术是已知的。生产技术通常包括使用两种溶剂相、稳定剂和溶解或溶剂化到其中一种相中的生物活性剂,或使用水/油/水(w/o/w)或水/油(w/o)乳液。在第一种提到的生产技术中,生物活性剂和稳定剂这两个相是乳化剂,然后除去其中一个相,留下带有稳定的荷载的药剂的微粒。在w/o/w制造技术中,初始水相含有或不含有生物活性化合物,其在含有溶解的聚合基质的有机相中乳化,然后在第二水相中乳化。有机相的去除留下含有或不含有生物活性化合物的微粒。也就是说,所用的具体方法和PLGA组合物高度依赖于包封剂,并不存在用于所有包封剂的通用方法/组合物。

[0189] 特别用于再生医学和组织维持领域中作为药物输送系统的另一种有前景的材料是水凝胶。这些水凝胶是能够封装生物活性剂的聚合网络。水凝胶具有相关的生物特性,如生物相容性、剪切变薄特性、生物降解性,并且不会影响荷载的生物活性剂的稳定性或活性。

[0190] 一种这样的水凝胶制剂涉及低分子量凝胶剂(LMWG)的网络,其用作生物医学应用的可注射支架。由于它们的超分子结构源于小分子的自组装,因此它们具有可调的物理化学和生物性质。具体而言,具有由通过脲或酰胺官能团连接到脂质部分的N-胸腺嘧啶糖基化的头部基团组成的bola型两亲分子的LMWG,已表明其快速凝胶化,体内稳定性高,且不会激活巨噬细胞(图1)(Ramen,F.A.等,Biomaterials.2017,145:72-80)。另一种LMWG制剂利用糖基核苷和氟碳链的组合作为两亲物,其自组装成高度组织的结构,从而提高水凝胶制剂的稳定性(图1)(Godeau,G.,等,Tetrahedron Letters 2010,51:1012-1015)。它们展示了许多有利的性质,包括生物相容性、对结构和纯度的控制、允许蛋白质掺入的便利处理程序、机械稳定性,并且对细胞无毒(Godeau,G.,等,Tetrahedron Letters 2010,51:1012-1015;Ramen,F.A.等,Biomaterials.2017,145:72-80)。

[0191] 水凝胶的另一种制剂是使用基于PEG的水凝胶。在该制剂中,基于PEG的水凝胶将包含聚合的PEG基质,其中生物活性剂连接或封装至基质。在聚合过程中,通过将生物剂定

位到水凝胶中进行包封。药剂的释放将通过水凝胶扩散到组织中而发生。在药剂和水凝胶之间的化学键的情况下,它将是可裂解或不可裂解的连接。如果是可裂解的,则该连接键将依赖于基于酶或非酶的机制。

[0192] 主要关节的刚性挛缩或纤维化(关节纤维化)是许多神经运动退行性紊乱的严重限制性共病和后遗症。它呈现为关节内纤维化胶原组织的积聚,并表现为关节活动范围(ROM)的疼痛和长限制,导致行动不便并需要家庭护理援助或住院治疗。

[0193] 僵硬的关节可能在患有进行性神经运动紊乱的患者的肩、肘、膝盖、臀部、腕和踝中最受限制。可通过本文提供的制剂和方法治疗并导致关节纤维化且具有不同的病因的退化性紊乱包括但不限于:杜氏(DMD)和贝克(BMD)肌营养不良症、先天性肌营养不良症(CMD)、脊髓性肌萎缩症(SMA)、腓骨肌萎缩症(CMT)、关节挛缩症、Emery Dreifus肌营养不良症(EMD)、缓慢进行性肌营养不良家族(肢带型(LGMD))、面肩肱型(FSH)、先天性强直性(CMMD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、特发性先天性畸形足、小儿麻痹症后综合征、各种形式的脑瘫(1,2)、(CP)、中风、创伤性脑损伤和周围神经损伤。对于营养不良症,这些症状的发病率约为1-10/100,000人,并且对于脑瘫而言为2-3/1000新生儿(2)。处理这些疾病的国家成本负担是巨大的,仅处理其中三种疾病的全人口国家成本估计分别为10.23亿美元(ALS)、7.87亿美元(DMD)和4.48亿美元(CMMD)(3)。CDC估计,2000年出生的脑瘫患者群体的总的护理成本将超过115亿(4)。这些费用代表着医疗和非医疗成本,并且主要用于肌肉骨骼护理。

[0194] 患有神经运动退行性病症或神经运动创伤(如中风、创伤性脑损伤和周围神经损伤)的患者的关节纤维化导致的关节活动性不足引起进一步的肌肉张力丧失、肌肉纤维化和瘢痕形成、骨质疏松、脊柱侧弯和下肢马蹄足姿势等继发性畸形,以及皮肤完整性的丧失。最终,关节纤维化导致无法行走并限制日常生活活动。在患者可能不再活动的疾病阶段,关节挛缩进一步加重了护理、休息姿势、坐姿和卫生负担(1)。

[0195] 目前,延长物理治疗、强力被动拉伸、石膏矫形(serial casting)和夹具支撑是仅有的可用的非手术治疗方式,无论是否补充肉毒杆菌毒素以减少肌肉相关挛缩(1)。用于改善纤维化关节活动性的外科手术干预包括麻醉状态下的手法治疗、腱和肌肉松解、关节囊松解或相关关节的切除手术(5)。当纤维化关节的强力松动向相邻的骨质疏松骨引入比其所能承受的更大的应力时,麻醉状态下的关节的手法治疗可能导致关节周围骨折和骨干骨折。考虑到在手法治疗或手术松解过程中施用麻痹性麻醉药来对抗肌肉阻力所需的插管和通气,许多患者也是不佳的候选人。在长时间的挛缩后,急性手术关节松解和手法治疗也可能导致严重的神经和血管拉伸损伤,具有不一致的结果和可变的复发率。

[0196] 通过替代性的旨在解决关节挛缩非手术治疗方法将极大地提高患者的整体健康和生活质量。在一些实施方式中,本发明提供了一种方案,并且是一种与物理疗法结合使用的基于非手术室的关节内注射疗法,以在二到八周的时间内松解经挛缩的关节。

[0197] 在各个方面和实施方式中,本文提供的组合物和方法对广泛范围的受试者具有价值。患有神经运动退行性疾病的患者是高度管理的人群,需要终生的密集且昂贵的医疗和非医疗支持。目前的护理标准是保守治疗或手术干预。相比之下,在一些实施方式中,本文提供的组合物和方法可以通过手术室内注射提供治疗益处,消除手术,并为无法移动的患者提供移动性,改善他们的整体健康和生活质量,并降低支持性护理的强度。护理人员、医生和专家将能够在对这一处于风险的患者群体不进行手术的情况下恢复关节运动。患者将

受益于改善的运动,并需要较少的物理治疗来保持关节活动。随着他们的病情的进展,患者将在更长的时间段内保持独立的移动和进行日常生活活动的的能力。他们将享受全面改善的肌肉骨骼健康和心理社会效益。对于支付者来说,由于每位患者的手术成本降低,加之患者能够留在家中更长时间的可能性更高,且不需要为行动不便或无法在家中执行适当护理和卫生的后遗症提供机构护理,因此管理这些病症的整体健康护理成本将降低。

[0198] 本发明提供了治疗或预防有需要的受试者中的僵硬的关节的方法。所述方法包括向受试者给予有效量的松弛素家族受体的药剂或配体、松弛素-2变体、与靶向药剂化学偶联的松弛素-2,包括单域骆驼抗体片段、肽序列、多核苷酸或小分子,从而对受试者中的僵硬的关节或周围组织区域进行治疗。

[0199] 目前治疗僵硬的关节的方法包括物理治疗或外科手术程序,如手法治疗和松解,其不能提供可靠或一致的结果(Diercks R.L.等,J.Shoulder Elbow Surg.2004,13(5):499-502)。物理治疗涉及物理治疗师的长时间的手法治疗,而外科手术程序涉及外科医生的侵入性手术松解,然后再进行长时间治疗。另一种目前的方法--Ponseti方法涉及拉伸后的石膏再矫形,有时伴随有挛缩的腱的手术松解。

[0200] 在一些实施方式中,与许多当前可用的方法相比,本发明的方法是有利的,因为它们可以用于可靠和有效地对僵硬的关节或组织区域进行治疗,同时还可以使用微创手术,例如关节内注射,这可以在门诊或手术室进行。因此,本发明的一些方法构成了可能由纤维化引起的僵硬的关节(例如肩关节)的处理的范式转变。本发明的一些方法涉及微创手术,例如,关节内或关节周围注射松弛素-2,例如封装在持续释放制剂中的松弛素-2。可根据需要重复关节内注射,直到僵硬的关节得到成功治疗,例如,直到关节中的运动恢复并且运动过程中的疼痛消除。当使用本发明的一些方法时,与使用当前可用的方法相比,可以显著更快和更有效地完成僵硬的关节的成功治疗。

[0201] 僵硬的关节(如肩关节)的病理学包括增厚的盂肱关节囊,伴有堵塞腋窝的粘连。纤维化囊粘附至自身和肱骨的解剖颈,关节内体积减少,并且关节中的滑液显著减少。囊的活检显示慢性炎症浸润,伴随着存在成纤维细胞和转化肌成纤维细胞,以及I型和III型胶原蛋白。基因和蛋白质表达测定已发现与纤维化、炎症和软骨形成相关的成分,包括增加的COL1A1和COL1A3、白细胞介素-6(IL-6)、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和TMP,以及降低的MMP活性。这一证据表明,炎症变化引发成纤维细胞和免疫细胞的募集,加速纤维化过程和过量的胶原蛋白的不适当沉积。或者,也可能先发生纤维化,然后发生炎症;纤维化继发于控制胶原蛋白重塑的缺陷的细胞信号通路。

[0202] 不希望受到特定理论的约束,据认为,当松弛素等药剂通过水凝胶或粒子、关节内注射、持续释放制剂等方式递送至关节或关节附近时,其促进胶原蛋白降解,从而改变滑膜中的细胞外基质(ECM)的稳态。该给予产生降低的关节僵硬以及增加的关节运动范围。

[0203] 在一个实施方式中,本发明的抗纤维化剂作为单一疗法给予。在一个实施方式中,本发明的抗纤维化剂与至少一种额外的治疗一起给予。示例性的额外治疗包括但不限于额外的抗纤维化治疗剂或物理治疗。

[0204] 在一些实施方式中,松弛素或其类似物、片段或变体与其他天然抗纤维化药剂(如IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、sr11 B、M3、MMP1、MMP8)共同给予。此外,使用靶向松弛素受体以外的受体的其他抗纤维化药剂:TGF- $\beta$ 抑制剂(Esbriet,吡非尼酮)、酪氨酸激酶抑制剂(Ofev,尼达尼

布)、PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体)激动剂(Ianifibranor,IVA337)、IL-1抑制剂(Arcalyst,rionacept)、IL-6抑制剂(Actmera,tocilizumab)、B细胞抑制剂(利妥昔单抗)、T细胞抑制剂(Orencia,阿巴西普)、溶血磷脂酸抑制剂(SAR100842,赛诺菲)、卤夫酮、d-青霉胺、秋水仙碱、环孢霉素、TGF- $\beta$ 阻断剂、p38 MAPK阻断剂。

[0205] 治疗僵硬的关节的方法

[0206] 本发明的一些方面提供了治疗或预防僵硬的关节的方法。如本文所使用的,术语“治疗(treating、treat、treatment)”是指有益的或期望的结果,包括但不限于缓解或改善与僵硬的关节相关的一种或多种症状(例如,关节运动疼痛、关节运动丧失或关节运动范围损失);减少由僵硬的关节引起的运动限制;关节僵硬的稳定(即,不恶化);改善或减轻由僵硬的关节引起的运动限制(例如关节运动疼痛、关节运动丧失或关节运动范围损失),无论是可检测的还是不可检测的。

[0207] 在一些实施方式中,本发明的方法使得对僵硬的关节进行治疗,从而减少关节运动时的疼痛,例如,减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更多,并且优选降至未受僵硬的关节影响的个体的正常范围内接受的水平。

[0208] 在一些实施方式中,本发明的方法引起受关节僵硬影响的关节的运动或运动范围的恢复。例如,根据本发明的方法对僵硬的关节的治疗可使得受关节僵硬影响的关节的运动或运动范围恢复到在未受僵硬的关节影响的个体的正常范围内接受的水平至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%。

[0209] 在一些实施方式中,通过本发明的方法提供的对受试者中的僵硬的关节进行的预防或治疗被完成而不会发生严重的不良事件,不会对受试者中的产生胶原的结构或组织造成显著损害,例如关节的产生胶原的结构和组织,如关节的关节软骨。例如,本发明的方法提供了不破坏关节构造的僵硬的关节的预防和治疗。对机体中的产生胶原的结构(例如关节的产生胶原的结构)的损害可以通过本领域已知的方法来评估,例如通过测量滑液中的各种标记物的水平,例如软骨寡聚基质蛋白(COMP)、聚集蛋白聚糖、胶原蛋白II、蛋白聚糖、MMP和炎性介质以及细胞因子。MRI等成像技术也可用于关节和软骨构造的可视化。

[0210] 在一些实施方式中,当关节内给予荷载有药剂(例如松弛素)的储库时,通过本发明的方法预防或治疗僵硬的关节被完成而不会发生与松弛素的全身给予相关的严重不良事件。在一项使用松弛素治疗系统性硬化症的III期临床试验中,接受24周松弛素的皮下输注的一些患者的肌酸清除率和肾脏不良事件下降;然而,肾脏生理学异常与系统性硬化症相关,并且当与松弛素治疗相结合时,可能使受影响的患者容易发生此类肾事件(Khanna, D.,等,Arthritis and Rheumatism 2009,60(4):1102-1111)。当通过本发明的方法在关节内给予松弛素时,在用于预防或治疗僵硬的关节的给予期间和之后,将对血清肌酸水平、尿液中的蛋白质水平、血细胞计数、血液中的血红蛋白浓度以及收缩压和舒张压进行监测,用于指示肾危象和高血压。

[0211] 本文提供的一个方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有选自表1或表2所

列的疾病的组中的一种或多种疾病的受试者,并向所述受试者给予前述实施方式的任一者的制剂。

[0212] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0213] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0214] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症 I 型的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0215] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症 II 型的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0216] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症 III 型的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0217] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症 IV 型的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0218] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脑瘫的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0219] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0220] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有肱桡关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0221] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有肱尺关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0222] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有孟肱关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0223] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有胫股关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0224] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有髌臼股关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0225] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有距小腿关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0226] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有颞下颌关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0227] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有掌指关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0228] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有跖趾关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0229] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有关节周围肌肉组织纤维化的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0230] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有橘皮组织的受试者,并

向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0231] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括鉴别患有间质性肺病的受试者,并向所述患者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0232] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0233] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0234] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0235] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过皮内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0236] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过皮下注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0237] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过囊内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0238] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过囊周注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0239] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过韧带内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0240] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过韧带周围注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0241] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过腱内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0242] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过腱周注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0243] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌腱内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0244] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌腱周围注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0245] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过骨髓内注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0246] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过骨髓周围注射向任何前述受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0247] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0248] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

[0249] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。

- [0250] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0251] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0252] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0253] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0254] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0255] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有脑瘫的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0256] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有中风的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0257] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有中风的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0258] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有创伤性脑损伤的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0259] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有创伤性脑损伤的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0260] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有周围神经损伤的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0261] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有周围神经损伤的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0262] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有脑瘫的受试者给予前述实施方式的任一者的组合物或制剂。
- [0263] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入而给予大小在 $1\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ 之间的前述实施方式中的任一者。
- [0264] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射给予大小在 $20\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$ 之间的前述实施方式中的任一者。
- [0265] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射给予大小在 $5\mu\text{m}$ - $50\mu\text{m}$ 之间的前述实施方式中的任一者。
- [0266] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述实施方式中的任一者。
- [0267] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述实施方式中的任一者。
- [0268] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为 $1-10\mu\text{m}$ 。
- [0269] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有杜

氏肌营养不良症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。

[0270] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。

[0271] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予任何前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。

[0272] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。

[0273] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。

[0274] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。

[0275] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。

[0276] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。

[0277] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有有关节纤维化的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。

[0278] 本文提供的另一方面是一种方法,所述方法包括通过关节内注射向被诊断患有有关节纤维化的受试者给予前述实施方式中的任一者,其中,微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。

[0279] 本文提供的另一方面是任何前述实施方式的方法或制剂,其中,所述制剂通过作为气雾剂吸入而被递送。

[0280] 本文提供的另一方面是任何前述实施方式的方法或制剂,其中,所述制剂通过关节内注射而被递送。

[0281] 本文提供的另一方面是任何前述实施方式的方法或制剂,其中,所述制剂通过肌肉注射而被递送。

[0282] 在任何前述实施方式的方法或制剂的一个实施方式中,其中,向受试者给予制剂,从而使得以如下的剂量向受试者给予抗纤维化剂(例如,松弛素):在1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在100-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在200-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在500-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或25-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或30-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或40-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或在1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在4-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或约2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

[0283] 给予

[0284] 在一些实施方式中,本发明的方法包括使用储库向受试者给予药剂,例如松弛素或其类似物、片段或变体。术语“给予(administer、administering、administration)”包括向受试者全身或受试者体内或其上的特定区域递送药剂的任何方法。例如,松弛素或载药储库可以静脉内、肌肉内、皮下、皮内、鼻内、口服、经皮、粘膜、关节内、关节周围、囊内、囊周、

腱内、腱周、韧带内、韧带周围、通过肺吸入或通过眼部特定给予途径给予。载药储库的给予可以由多人协同执行,并且可以包括例如开具经由储库待向受试者给予的松弛素或其类似物、片段或变体的处方,和/或提供说明书以直接或通过另一种方式(通过经由储库的自身递送,例如通过口服递送、皮下递送、通过中心线的静脉内递送等;或由训练有素的专业人员递送(例如关节内递送、静脉内递送、肌内递送、瘤内递送等)来服用松弛素或其类似物、片段或变体。

[0285] 在优选的实施方式中,局部给予药剂(例如松弛素或其类似物、片段或变体),例如,使用储库直接给予至受试者的关节或者给予入受试者的关节中。通过关节内注射或通过局部应用至关节或关节周围的组织中来局部给予载有药剂(例如松弛素)的储库是有利的,因为它允许向受试者递送较小剂量的药剂,并避免与全身递送相关的副作用,如背痛和关节疼痛。

[0286] 例如,在先前的松弛素治疗心力衰竭的临床研究中,松弛素以30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 全身给药2天(静脉内输注),并且未达到试验的主要有效性终点。在另一项先前的松弛素治疗硬皮病的临床研究中,松弛素以25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 全身给药24周(皮下递送),并且未达到试验的主要有效性终点。相比之下,本公开的制剂可以以约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的有效剂量局部(与全身性相反)递送松弛素约4周或约6周,并且可以证明临床有效性。

[0287] 在一个实施方式中,通过关节内注射向受试者给予药剂,例如,载有松弛素的储库。在一个实施方式中,通过关节内、关节周围、囊内、囊周、韧带内、韧带周围、腱内、腱周、骨腱内或骨腱周围注射(统称为“关节注射”)或其组合,向受试者给予药剂,例如载有松弛素的储库。在一个实施方式中,通过单次关节注射向受试者给予药剂,例如,载有松弛素的储库。在一个实施方式中,通过多次关节注射向受试者给予药剂,例如,载有松弛素的储库。可以以定期间隔的时间间隔(例如,每天、每2天、每3天、每4天、每5天、每6天、每7天、每8天、每9天、每10天、每11天、每12天、每13天或每14天)向受试者给予给予药剂(例如,载有松弛素的储库)的多次关节注射。由药剂(例如,载有松弛素的储库)的多次关节注射组成的治疗过程可以重复。

[0288] 在一个实施方式中,将药剂给予至腱、骨腱连接处、腱-骨界面、肌腱端或肌腱插入处或它们附近。这些组织可选自以下的腱组织,其中:

[0289] ■ 肩

[0290] ■ 小圆肌腱(肩袖),冈下肌腱,冈上肌腱,肩胛下肌腱

[0291] ■ 肘/前臂

[0292] ■ 三角肌腱,二头肌腱,三头肌腱,肱桡肌腱,桡侧伸腕短肌腱,桡侧伸腕长肌腱,旋后肌腱

[0293] ■ 腕

[0294] ■ 桡侧腕屈肌腱,尺侧腕屈肌腱,桡侧腕伸肌腱,桡侧腕短伸肌腱

[0295] ■ 臀部/腹股沟

[0296] ■ 髂腰肌腱,闭孔内肌腱,长收肌、短收肌和大收肌腱,臀大肌和臀中肌腱,髂胫束

[0297] ■ 膝

[0298] ■ 四头肌腱,髌骨肌腱,腓绳肌腱,缝匠肌肌腱

[0299] ■ 踝

[0300] ■腓肠肌腱,跟腱比目鱼肌腱,胫前肌腱,腓骨长肌腱

[0301] ■手(手指)

[0302] ■指长屈肌腱、骨间肌腱、指深屈肌腱、指小展肌腱

[0303] ■手(拇指)

[0304] ■拇对掌肌腱、拇屈肌腱、拇伸肌和拇外展肌腱

[0305] ■脚(脚趾)

[0306] ■拇长屈肌腱,趾短屈肌腱,蚓状肌腱,拇展肌腱,趾长屈肌腱,小趾展肌腱,足底筋膜炎

[0307] ■背

[0308] ■多裂肌腱,腰方肌腱,背最长肌腱,髂肋肌腱,脊柱胸肌腱,腰大肌腱

[0309] 可以通过使用带有适合于关节注射的针的注射器来完成药剂(例如,载有松弛素的储库)的关节注射。适用于关节注射的针可选自于由30G针、29G针、28G针、27G针、26sG针、26G针、25.5G针、25sG针、25G针、24.5G针、24G针、23.5G针、23sG针、23G针、22.5G针、22sG针、22G针、21.5G针、21G针、20.5G针、20G针、19.5G针、19G针、18.5G针和18G针所组成的组。在具体的实施方式中,通过21G针给予药剂,例如载有松弛素的储库。

[0310] 在另一个优选的实施方式中,可以局部(例如经皮)向受试者给予药剂,例如载有松弛素的储库。例如,可将药剂(例如载有松弛素的储库)作为局部施用的凝胶、乳膏、软膏、洗剂、滴剂、栓剂、气雾剂、液体或粉末剂组合物给予至关节(例如手指关节)。

[0311] 在一些实施方式中,在医疗程序(例如手术)期间,可向受试者给予药剂(例如载有松弛素的储库),以治疗或预防僵硬的关节。由于手术可能导致僵硬的关节,因此在手术期间给予松弛素可以预防在受试者中形成僵硬的关节。在一个实施方式中,可以通过插管或切口给予药剂,例如,载有松弛素的储库。

[0312] 在另一个实施方式中,可以在门诊关节镜检查、荧光镜检查或超声引导程序期间给予药剂,例如载有松弛素的储库。

[0313] 在优选的实施方式中,以持续释放制剂的形式向受试者局部给予药剂,例如载有松弛素的储库。作为持续释放制剂给予松弛素是有利的,因为它避免了重复注射,并且可以以一致和可靠的方式在期望的时间段内递送治疗剂量的松弛素。在Vaishya等,Expert.Opin.Drug Deliv.2015,12(3):415-40中描述了可用于递送多肽的示例性持续释放制剂,将其全部内容通过引用并入本文。

[0314] 本发明的某些实施方式提供了通过局部关节内递送松弛素-2(例如在持续释放制剂中)而在神经运动退行性疾病中发展的继发性关节纤维化的解决方案。在一些实施方式中,松弛素-2可通过抑制TGF- $\beta$ 1信号传导(经由NO-sGC-cGMP途径),减少体内神经运动退行性关节纤维化大动物模型中的纤维化,从而降低关节僵硬并增加运动范围。

[0315] 在一些实施方式中,制剂以冻干粉末提供,用于在护理点或护理点附近用稀释剂重悬或复原。

[0316] 临床上,治疗医师可在患有进行性神经运动退行性病症的患者的受累的挛缩关节和关节周围组织中注射本文公开的制剂,如松弛素-2微粒制剂。这些注射将在手术室设施中使用解剖标志或在超声引导下进行。注射后可后随着标准进程的物理治疗。对于更困难的关节注射(即髌、脊柱),也可以由矫形外科医生或介入放射科医生进行荧光镜检查引导的

注射。在一些实施方式中,优点可能是:消除了高风险的手术;降低终身健康护理费用;通过标准的手术室注射技术在滑膜关节间隙局部注射松弛素-2;由于局部而非全身性输送,使剂量最小化;由于局部递送,减少了脱靶副作用并提高了安全性。

[0317] 除了关节周围的组织外,该制剂还可以通过不同的给予途径治疗表达松弛素受体的额外的靶器官中的纤维化。

[0318] 对于如间质性肺病、特发性肺纤维化、囊性纤维化、高血压等肺纤维化,该制剂可作为持续释放制剂通过肺部吸入或鼻内给予,并可提供单次注射或给药或一系列注射或给药。

[0319] 对于如乙型或丙型肝炎、长期酗酒、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精脂肪性肝病、胆汁淤积症、自身免疫性肝炎肝硬化等肝纤维化;如慢性肾病、终末期肾病、肾间质纤维化等肾纤维化,以及心力衰竭、心肌梗死、主动脉瓣狭窄、肥厚型心肌病等心脏疾病;该制剂可以作为持续释放制剂经静脉内、肌内或静脉内(例如通过导管)给予,并且可以提供单次注射或给药或一系列注射或给药。

[0320] 对于克罗恩病、炎症性肠病、肠病和其他的肠纤维化等肠疾病,该制剂可作为持续释放制剂经鼻内、口服、粘膜给予,并可提供单次注射或给药或一系列注射或给药。

[0321] 对于硬皮病、瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、橘皮组织等皮肤病症,该制剂可作为持续释放制剂经肌内、皮下、皮内或经皮给予,并可提供单次注射或给药或一系列注射或给药。

[0322] 对于如佩罗尼氏病和子宫肌瘤等泌尿生殖和妇科病症,该制剂可作为持续释放制剂经皮或经粘膜给予,并可提供单次注射或给药或一系列注射或给药。

[0323] 对于先天性眼外肌纤维化、视网膜下纤维化、视网膜前纤维化、角膜纤维化等眼部疾病,该制剂可通过局部眼部给予(即结膜下、视网膜下、玻璃体内、眼球后、前房内)而局部给予,或作为持续释放制剂全身给予(即口服、静脉内、鼻内),并且可以提供单次注射或给药或一系列注射或给药。适合治疗的其他疾病和病症包括Dupuytren氏病(收缩并限制手指的活动范围的手掌中的胶原索(collagen cord)的形成)、佩罗尼氏病(过量的非弹性胶原导致阴茎弯曲;扭曲勃起)、犬和人脂肪瘤包覆的良性脂肪瘤沉积物、子宫肌瘤(良性肿瘤,伴有严重的共病)、足底纤维瘤病(足部深层结缔组织增厚引起的疼痛和失能)、包膜挛缩、乳房(可使乳房变形并引起疼痛的术后并发症)、增生性疤痕和瘢痕疙瘩(损伤部位皮肤上形成的疤痕)、德尔肯氏病(肥胖和过度敏感疼痛的脂肪组织)、膝关节纤维化(植入后形成的粘连,可能影响运动范围)、尿道狭窄(影响尿流的尿道狭窄)。

[0324] 本文所述的微粒和药剂可被给予至患有或被诊断患有与纤维化相关的疾病或病症的受试者。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向受试者给予有效量的微粒或药剂,以减轻疾病或病症的至少一种症状。如本文所使用的“减轻与纤维化相关的疾病或病症的至少一种症状”是改善与纤维化疾病或紊乱相关的任何病症或症状。与等同的未治疗的对照相比,如通过任何标准技术所测量的,这种减少为至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%以上。用于向受试者给予本文所述药剂的各种手段是本领域技术人员已知的。在任何方面的一个实施方式中,药剂被全身或局部给予(例如,给予至大脑或其他受影响器官,例如,结肠)。

[0325] 在任何方面的一个实施方式中,该药剂静脉内给予。在任何方面的一个实施方式中,连续地、间隔地或零星地给予药剂。药剂的给予途径将针对所递送的药剂类型(例如,抗

体、小分子、RNAi) 进行优化,并可由熟练的医师确定。

[0326] 如本文中使用的术语“有效量”是指缓解疾病或紊乱的至少一种或多种症状所需的本文中所述的微粒或抗纤维化剂的量,所述微粒或抗纤维化剂可被给予至患有或被诊断患有与纤维化相关的疾病或紊乱的受试者。因此,术语“治疗有效量”是指当向典型的受试者给予时,足以提供特定的抗疾病或紊乱效果的药剂的量。在各种情况下,本文中所使用的有效量还包括足以延缓疾病或紊乱的症状发展、改变疾病或紊乱的症状进程(即,炎症、关节僵硬、疼痛、行动不便、呼吸困难)、或逆转疾病或紊乱的症状(例如炎症、关节僵硬、疼痛、活动不便、呼吸困难)的微粒或药剂的量。因此,通常不可能指定准确的“有效量”。然而,对于任何给定的情况,本领域普通技术人员可以仅使用常规实验来确定适当的“有效量”。

[0327] 在任何方面的一个实施方式中,该药剂被连续给予(例如,在一段时间内以恒定水平)。可通过例如表皮贴剂、连续释放制剂或可穿戴式(on-body)注射器实现药剂的连续给予。

[0328] 可通过标准药理学程序以细胞培养物或实验动物对有效量、毒性和治疗效果进行评价。剂量可根据所使用的剂型和所利用的给予途径而变化。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且可被表示为LD50/ED50之比。优选表现出大的治疗指数的组合物和方法。治疗有效剂量最初可通过细胞培养测定来估计。此外,可以在动物模型中制订剂量,以达到包括在细胞培养中或在适当的动物模型中确定的IC50(即,达到症状的半最大抑制的药剂浓度)的循环血浆浓度范围。例如,可以通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。任何特定剂量的影响都可以通过合适的生物测定来监测,例如测量神经功能或血液工作等。剂量可由医生确定,并根据需要进行调整,以适应观察到的治疗效果。

[0329] 剂量

[0330] 本文所使用的术语“单位剂型”是指适合一次给予的剂量。举例来说,单位剂型可以是设置在递送装置(例如注射器或静脉滴注袋)中的治疗剂的量。在任何方面的一个实施方式中,单位剂型以单次给予进行给予。在另一个实施方式中,可以同时给予多于一个的单位剂型。

[0331] 本文所述药剂的剂量可由医生确定,并根据需要进行调整,以适应观察到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常对受试者进行监测,以确定治疗何时提供治疗益处,并确定是否给予进一步的细胞、停止治疗、恢复治疗或对治疗方案进行其他改变。剂量不应太大,以致引起不良副作用,如细胞因子释放综合征。通常,剂量会随患者的年龄、病情和性别而变化,并可由本领域技术人员确定。在任何并发症的情况中,也可由个体医生调整剂量。

[0332] 可通过细胞培养测定初步估算有效剂量。可以在动物中制订剂量。通常,给予组合物以使得本文中的本发明的化合物以如下的剂量使用或给予:1 $\mu$ g/kg至1000mg/kg;1 $\mu$ g/kg至500mg/kg;1 $\mu$ g/kg至150mg/kg;1 $\mu$ g/kg至100mg/kg;1 $\mu$ g/kg至50mg/kg;1 $\mu$ g/kg至20mg/kg;1 $\mu$ g/kg至10mg/kg;1 $\mu$ g/kg至1mg/kg;100 $\mu$ g/kg至100mg/kg;100 $\mu$ g/kg至50mg/kg;100 $\mu$ g/kg至20mg/kg;100 $\mu$ g/kg至10mg/kg;100 $\mu$ g/kg至1mg/kg;1mg/kg至100mg/kg;1mg/kg至50mg/kg;1mg/kg至20mg/kg;1mg/kg至10mg/kg;10mg/kg至100mg/kg;10mg/kg至50mg/kg;或10mg/kg至20mg/kg。将理解的是,本文给出的范围包括所有中间范围,例如,1mg/kg至10mg/kg的范围包括1mg/kg至2mg/kg、1mg/kg至3mg/kg、1mg/kg至4mg/kg、1mg/kg至5mg/kg、1mg/kg至

6mg/kg、1mg/kg至7mg/kg、1mg/kg至8mg/kg、1mg/kg至9mg/kg、2mg/kg至10mg/kg、3mg/kg至10mg/kg、4mg/kg至10mg/kg、5mg/kg至10mg/kg、6mg/kg至10mg/kg、7mg/kg至10mg/kg、8mg/kg至10mg/kg、9mg/kg至10mg/kg等。进一步考虑的是约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.3mg/kg至约5mg/kg、或0.5mg/kg至约3mg/kg的剂量(作为推注或连续输注)。将进一步理解的是,上述范围的中间范围也在本发明的范围内,例如,在1mg/kg至10mg/kg范围内,如使用或剂量范围为2mg/kg至8mg/kg、3mg/kg至7mg/kg、4mg/kg至6mg/kg等。

#### [0333] 组合疗法

[0334] 在任何方面的一个实施方式中,将本文所述的微粒或药剂用作单一疗法。在任何方面的另一个实施方式中,本文所述的微粒或药剂可与其他已知药剂和疗法(即,协同疗法)组合使用以用于疾病、病症或紊乱,例如与纤维化相关的疾病、病症或紊乱。如本文所使用的“组合”给予意味着在受试者罹患所述紊乱的进程中,向受试者提供两种(或更多种)不同的治疗,例如,在受试者已被诊断患有紊乱(纤维化疾病或紊乱)之后并且在所述紊乱已被治愈或消除或因其他原因已停止治疗之前,递送两种以上的治疗。在一些实施方式中,当第二种的递送开始时,一种治疗的递送仍然发生,从而使得在给予方面存在重叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行的递送”。在其他实施方式中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一情况的一些实施方式中,由于组合给予,治疗更有效。例如,第二种治疗更有效,例如,与不存在第一种治疗的情况下给予第二种治疗的情况相比,使用更少的第二种治疗观察到等同的效果,或者第二种治疗使症状减轻更大的程度,或者用第一种治疗观察到类似情况。在一些实施方式中,递送使得与紊乱相关的症状或其他参数的减少大于在不存在另一种治疗的情况下递送一种治疗时所观察到的。两种治疗的效果可以是部分叠加的、完全叠加的或大于叠加的。递送可以使得当递送第二种时,递送的第一种治疗的效果仍然是可检测的。本文所述的药剂和至少一种额外的治疗可以同时、以相同或以分开的组合物或顺序给予。对于顺序给予,可以首先给予本文所述的药剂,然后给予额外的药剂,或者可以颠倒给予顺序。所述药剂和/或其他治疗剂、程序或方式可在紊乱活跃期间、或在缓解期或不太活跃的疾病期间给予。本公开的微粒或药剂可以在另一种治疗之前、与治疗同时、治疗后或在紊乱的缓解期间给予。

[0335] 当组合给予时,药剂和额外的药剂(例如,第二或第三药剂)或所有药剂给予的量或剂量可高于、低于或等于单独使用的每种药剂的量或剂量(例如,作为单一疗法)。在某些实施方式中,药剂、额外的药剂(例如,第二或第三药剂)或所有药剂的给予量或剂量比单独使用的每种药剂的量或剂量低(例如,至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。在其他实施方式中,产生期望效果(例如,治疗纤维化疾病或紊乱)的药剂、额外的药剂(例如,第二药剂或第三药剂)或所有药剂的量或剂量低于实现相同治疗效果所需要的单独的每种药剂的量和剂量(例如,低至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0336] 在一些实施方式中,协同治疗是药物,如阿司匹林、对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药、类固醇、神经阻断剂和本领域常见的镇痛药。

[0337] 在一些实施方式中,协同治疗是用于肌营养不良症的药物,包括但不限于 deflazacourt、eteplirsen、casimersen、golodirsen、阿塔鲁伦(ataluren)、givinostat、viltolarsen、pamrevlumab、SRP-9001、SRP-5051、DS-5141B、SCAAV9.U.7.ACCA、PF-06939926、SGT-001或AT702。

[0338] 在一些实施方式中,该协同治疗是治疗脊髓性肌萎缩症的药物,包括但不限于 Spinraza、Zolgensma、Evrysdi、SRK-015、CK-2127107、LMI070、AVXS-101、BIIB110或 p38aMAPK抑制剂。

[0339] 在一些实施方式中,协同治疗是用于脑瘫、中风、创伤性脑损伤或周围神经损伤的药物,包括但不限于抗胆碱药,如甲磺酸苯扎托品、卡比多巴-左旋多巴(Sinemet)、甘罗溴铵(Robinul)、盐酸丙环啉(开马君)和盐酸苯海索;抗惊厥药,如加巴喷丁(Neurontin)、拉莫三嗪(利必通)、奥卡西平(Trileptal)、托吡酯(妥泰)和唑尼沙胺(Zonegran);或镇痉剂,即肌肉松弛剂,如巴氯芬、肉毒杆菌毒素、安定(Valium(R))、丹曲洛林、环苯扎林(Cyclobenzadrine)、丹曲林钠(Dantrolene)或替扎尼定。

[0340] 在一些实施方式中,协同治疗是物理治疗。

[0341] 在一些实施方式中,协同治疗是外科手术干预,包括但不限于外科手术松解、囊松解或外科手术修复。

[0342] 在一些实施方式中,协同治疗是基于能量的技术,包括但不限于射频能量应用,例如射频消融;热能应用或移除,例如冷冻消融;声能应用,例如基于超声的治疗技术;电能应用,如经皮电神经刺激(TEN),或其他电磁能量应用或移除方法,例如光照射。

[0343] 在一些实施方式中,协同治疗是外骨骼,被设计用于帮助患有行走或其他基于运动的功能障碍的患者进行行走或其他运动。

[0344] 胃肠外剂型

[0345] 本文所述药剂的胃肠外剂型可通过多种途径向受试者给予,包括但不限于皮下、静脉内(包括推注)、肌内和动脉内。由于胃肠外剂型的给予通常绕过患者对污染物的天然防御,因此胃肠外剂型优选是无菌的或能够在向患者给予之前进行灭菌。胃肠外剂型的实例包括但不限于准备好用于注射的溶液、准备好用于溶解或悬浮在药学上可接受的注射用赋形剂中的干产品、准备好用于注射的悬浮液、控制释放胃肠外剂型和乳剂。

[0346] 如本文中使用的短语“胃肠外给予”和“胃肠外给予的”意味着通常通过注射进行的肠和局部给予以外的给予模式,并且包括但不限于静脉内、肌内、肌肉周围、动脉内、鞘内、心室内、囊内、囊周、眶内、心内、皮内、皮周、腹腔内、经气管、皮下、角质层下、关节内、关节周、囊下、蛛网膜下腔、椎管内、脑脊髓内和胸骨内注射、输注和其他注射或输注技术,但不限于此。不受限制地,口服给予可以处于溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂、口服灌洗剂、粉末剂等形式。本领域技术人员熟知可用于提供本发明的胃肠外剂型的合适的赋形剂溶液。如本文所使用的短语“赋形剂溶液”包括但不限于:无菌水;注射用水USP;盐水溶液;羧甲基纤维素钠;葡萄糖溶液;水性赋形剂,例如但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液以及乳酸盐林格氏注射液;水混溶性赋形剂,例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及非水性赋形剂,例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0347] 功效

[0348] 本文所述药剂的例如用于治疗与纤维化相关的疾病或紊乱的功效可由技术人员确定。然而,如果纤维化疾病的一个或多个体征或症状以有益的方式改变,其他临床上接受的症状得到改善、或甚至得到缓解,或者在根据本文所述的方法进行治疗后例如诱导至少10%的期望的应答,则治疗被认为是本文所使用的术语“有效的治疗”。例如,可以通过测量

标记物、指示物、症状和/或根据本文所述的方法治疗的病症的发生率或任何其他适当的可测量参数,对功效进行评估。功效也可以通过如由住院评估的个体不再恶化或对医疗干预的需要来测量(即疾病或紊乱的进展,如通过疾病或紊乱的症状所测量)。测量这些指示物的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文进行描述。

[0349] 可在本文所述病症的动物模型中对功效进行评价,例如,纤维化疾病或紊乱的小鼠模型或适当动物模型(视情况而定)。当使用实验动物模型时,当观察到标志物的统计学显著变化时,治疗的功效得以证明。

[0350] 在一些实施方式中,治疗功效包括给予后使异物反应或免疫反应最小化。例如给予赋形剂对照制剂(例如不含治疗剂的PLGA微粒)可引发巨噬细胞和免疫激活以及炎症,而本公开所述制剂的给予可在整个治疗和给予后的评估期间的任何时间点消除较低的免疫应答或完全消除所引发的免疫应答。

[0351] 在一些实施方式中,与给予含有类固醇作为治疗剂的PLGA微粒引起的异物反应相比,给予本公开所述制剂引起的异物反应可以被减少或消除。

[0352] 本文说明性描述的发明可以在不存在本文中未具体公开的任何一个或多个要素、一种或多种限制的情况下实施。已经使用的术语和表述被用作描述的术语,而非限制性的术语,并且在使用这些术语和表述时,无意排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物,但是应当认识到,在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应当理解,虽然本发明已经通过优选实施方式和可选特征被具体公开,但本文公开的构思的修改和变化可被本领域技术人员利用,并且这种修改和变化被认为落在由所附实施方式和本发明其他地方限定的本发明的范围内。

[0353] 本文中提及或引用的文章、专利和专利申请以及所有其他文件和电子可用信息的内容通过引用以其整体并入本文,达到与各个出版物明确和单独被表示通过引用并入的程度相同的程度。申请人保留将来自任何此类文章、专利、专利申请或其他文件的任何和所有材料和信息物理地并入本申请中的权利。

[0354] 如本文中使用的术语“约”意味着定量术语加或减10%。例如,“约3%”涵盖2.7%-3.3%,且“约10%”涵盖9%-11%。此外,当“约”在本文中与定量术语结合使用时,应理解的是,除了值加或减10%之外,定量术语的确切值也被设想和描述,例如,术语“约3%”明确设想、描述并包括准确的3%。

[0355] 本文中说明性描述的发明可在不存在本文中未具体公开的任何一个或多个要素、一种或多种限制的情况下适当地被实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩展而不受限制地解读。此外,本文中使用的术语和表述被用作描述的术语,而非限制,并且在使用这些术语和表述时无意排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物,但是应当认识到,在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应当理解,虽然本发明已经通过优选实施方式和可选特征被具体公开,但本文具象化的发明的修改和变化可被本领域技术人员利用,并且这种修改和变化被认为落在在本文考虑之列的发明的各个方面和实施方式的范围内。

[0356] 本文对一个和多个发明的某些方面和实施方式进行了广泛和概括的描述。落入上位发明内的各较窄的种类和亚群分组也形成在本文考虑之列的发明的一些方面和实施方式的的部分。这包括带有从该属中移除任何主题的但书或否定限制的发明的上位描述,无论

在本文中是否具体列举了所删去的材料。

[0357] 此外,当本发明的特征或方面以马库什组的形式描述时,本领域技术人员将认识到,在本文考虑之列的发明的某些方面和实施方式也因此以马库什组的成员的亚组或任何单个成员的形式描述。

[0358] 虽然本文已经示出和描述了本发明的优选实施方式,但对于本领域技术人员来说显而易见的是,这些实施方式仅作为示例提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员将进行多种变化、改变和替换。应当理解,在实施发明时可以采用本文所述的发明的实施方式的各种替代方案。意在以如下实施方式对本发明的范围进行限定,并由此涵盖这些实施方式及其等同物的范围内的方法和结构。

[0359] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与这些发明所属领域的普通技术人员通常理解相同含义。尽管可以在发明的实践或测试中使用与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是将理解的是,修改和变化被包含在本发明的精神和范围内。目前对优选的方法和材料进行描述。

[0360] 本申请文件中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,达到与各个出版物、专利或专利申请被明确和单独地指示通过引用并入的程度相同的程度。如果发生冲突,将以申请文件(包括定义)为准。

[0361] 本文所述技术的一些实施方式可根据以下编号段落中的任一段进行定义:

[0362] 1.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0363] 2.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0364] 3.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0365] 4.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂。

[0366] 5.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂,其中,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0367] 6.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0368] 7.一种包含微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0369] 8.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0370] 9.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.01%-33%的量存在。

[0371] 10.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯和抗纤维化剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0372] 11.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂,其中,所述微粒的直径为1-50 $\mu\text{m}$ 。

[0373] 12.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维

化剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素并且以总质量的0.1%-10%的量存在。

[0374] 13.一种包含PLGA微粒的制剂,所述微粒含有脂肪族聚酯、乙烯基聚合物和抗纤维化剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0375] 14.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是受体RXFP1的激动剂。

[0376] 15.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是人松弛素-2或类似物或变体。

[0377] 16.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是聚丙交酯-共-乙交酯。

[0378] 17.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是聚己内酯。

[0379] 18.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-200,000道尔顿。

[0380] 19.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-150,000道尔顿;或25,000-125,000道尔顿;或40,00-100,000道尔顿。

[0381] 20.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为10,000-30,000道尔顿。

[0382] 21.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为30,000-50,000道尔顿。

[0383] 22.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为50,000-70,000道尔顿。

[0384] 23.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为70,000-9,000道尔顿。

[0385] 24.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为90,000至120,000道尔顿。

[0386] 25.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯的分子量为120,000-150,000道尔顿。

[0387] 26.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯由酯官能团封端。

[0388] 27.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯由烷基酯官能团封端。

[0389] 28.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯由羧酸官能团封端。

[0390] 29.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含乙烯基聚合物,所述乙烯基聚合物为聚(乙烯醇)。

[0391] 30.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含乙烯基聚合物,所述乙烯基聚合物为聚(吡咯烷酮)。

[0392] 31.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为10,000-200,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0393] 32.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为10,000-150,000道尔顿、或25,000-125,000道尔顿、或40,00-100,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0394] 33.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为30,000-50,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0395] 34.前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为50,000-70,000

道尔顿的乙烯基聚合物。

[0396] 35. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为70,000-90,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0397] 36. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含分子量为90,000至120,000道尔顿的乙烯基聚合物。

[0398] 37. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0399] 38. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为1-75 $\mu\text{m}$ 、或1-50 $\mu\text{m}$ 、或5-50 $\mu\text{m}$ 、或25-50 $\mu\text{m}$ 、或30-50 $\mu\text{m}$ 、或40-50 $\mu\text{m}$ 。

[0400] 39. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为5-10 $\mu\text{m}$ 。

[0401] 40. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为5-8 $\mu\text{m}$ 。

[0402] 41. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为8-12 $\mu\text{m}$ 。

[0403] 42. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为12-18 $\mu\text{m}$ 。

[0404] 43. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为18-25 $\mu\text{m}$ 。

[0405] 44. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为25-35 $\mu\text{m}$ 。

[0406] 45. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为35-45 $\mu\text{m}$ 。

[0407] 46. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为45-50 $\mu\text{m}$ 。

[0408] 47. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约1 $\mu\text{m}$ 。

[0409] 48. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约2 $\mu\text{m}$ 。

[0410] 49. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约3 $\mu\text{m}$ 。

[0411] 50. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约4 $\mu\text{m}$ 。

[0412] 51. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约5 $\mu\text{m}$ 。

[0413] 52. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约6 $\mu\text{m}$ 。

[0414] 53. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约7 $\mu\text{m}$ 。

[0415] 54. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约8 $\mu\text{m}$ 。

[0416] 55. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约9 $\mu\text{m}$ 。

[0417] 56. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约10 $\mu\text{m}$ 。

[0418] 57. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约15 $\mu\text{m}$ 。

[0419] 58. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约20 $\mu\text{m}$ 。

[0420] 59. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约25 $\mu\text{m}$ 。

[0421] 60. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约30 $\mu\text{m}$ 。

[0422] 61. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约35 $\mu\text{m}$ 。

[0423] 62. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约40 $\mu\text{m}$ 。

[0424] 63. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约45 $\mu\text{m}$ 。

[0425] 64. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约50 $\mu\text{m}$ 。

[0426] 65. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约75 $\mu\text{m}$ 。

[0427] 66. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约100 $\mu\text{m}$ 。

[0428] 67. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约150 $\mu\text{m}$ 。

[0429] 68. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述微粒的直径为约200 $\mu\text{m}$ 。

[0430] 69. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩

尔比为15:85-25:75的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0431] 70. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为25:75-35:65的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0432] 71. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为35:65-45:55的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0433] 72. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为45:55-55:45的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0434] 73. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为55:45-65:35的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0435] 74. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为65:35-75:25的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0436] 75. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为75:25-85:15的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0437] 76. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为约50:50的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0438] 77. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为约45:55的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0439] 78. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为约55:45的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0440] 79. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为约40:60的聚丙交酯-共-乙交酯。

[0441] 80. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述脂肪族聚酯是丙交酯:乙交酯的摩尔比为约60:40的聚丙交酯-共-乙交酯。前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.01%-0.1%的乙烯基聚合物。

[0442] 81. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.1%-0.3%的乙烯基聚合物。

[0443] 82. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.2%-0.9%的乙烯基聚合物。

[0444] 83. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.3%-0.7%的乙烯基聚合物。

[0445] 84. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.4%-0.6%的乙烯基聚合物。

[0446] 85. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.3%-0.6%的乙烯基聚合物。

[0447] 86. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量0.6%-1.0%的乙烯基聚合物。

[0448] 87. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量1.0%-5.0%的乙烯基聚合物。

[0449] 88. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含占总质量5.0%-10.0%的

乙烯基聚合物。

[0450] 89. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量10.0%-30.0%的乙烯基聚合物。

[0451] 90. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.1%的乙烯基聚合物。

[0452] 91. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.2%的乙烯基聚合物。

[0453] 92. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.3%的乙烯基聚合物。

[0454] 93. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.4%的乙烯基聚合物。

[0455] 94. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.5%的乙烯基聚合物。

[0456] 95. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.6%的乙烯基聚合物。

[0457] 96. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.7%的乙烯基聚合物。

[0458] 97. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.8%的乙烯基聚合物。

[0459] 98. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约0.9%的乙烯基聚合物。

[0460] 99. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约10%的乙烯基聚合物。

[0461] 100. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约15%的乙烯基聚合物。

[0462] 101. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约20%的乙烯基聚合物。

[0463] 102. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约25%的乙烯基聚合物。

[0464] 103. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述制剂包含占总质量约30%的乙烯基聚合物。

[0465] 104. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.005%-5%。

[0466] 105. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.01%-10%、0.01%-33%、或0.1%-5%; 或总制剂质量的0.2%-4%; 或总制剂质量的0.3%-3%; 或总制剂质量的0.5%-2%; 或总制剂质量的0.5%-1.5%; 或总制剂质量的0.5%-3%; 或总制剂质量的1%-2%; 或总制剂质量的1%-5%; 或总制剂质量的3%-7%; 或总制剂质量的5%-10%。

[0467] 106. 前述段落中任一段所述的制剂, 其中, 所述抗纤维化剂为总制剂质量的

0.005%-0.01%。

[0468] 107. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.01%-0.05%。

[0469] 108. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.05%-0.1%。

[0470] 109. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.1%-0.5%。

[0471] 110. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的0.5%-1.0%。

[0472] 111. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的1.0%-2.5%。

[0473] 112. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的2.5%-5.0%。

[0474] 113. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约0.25%。

[0475] 114. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约0.5%。

[0476] 115. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约0.75%。

[0477] 116. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约1%。

[0478] 117. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约1.25%。

[0479] 118. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约1.5%。

[0480] 119. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约1.75%。

[0481] 120. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约2%。

[0482] 121. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约2.5%。

[0483] 122. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约3%。

[0484] 123. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂为总制剂质量的约5%。

[0485] 124. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述抗纤维化剂是松弛素。

[0486] 125. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约50:50丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以所述微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0487] 126. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约50:50丙

交酯:乙交酯的PLGA微粒、以所述微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.0wt%的PVA。

[0488] 127. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含PLGA摩尔比为约60:40丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以所述微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0489] 128. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含PLGA摩尔比为40:60丙交酯:乙交酯的PLGA微粒、以所述微粒的约1wt%荷载的松弛素和浓度为约0.5wt%的PVA。

[0490] 129. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在赋形剂溶液中的微粒。

[0491] 130. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在氯化钠液体溶液中的微粒。

[0492] 131. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在氯化钠液体溶液中的微粒,其中,所述氯化钠为所述液体溶液的0.5w/w% - 1.5w/w%、或在0.75w/w% - 1.25w/w%之间、或约0.5w/w%、或约0.6w/w%、或约0.7w/w%、或约0.8w/w%、或约0.9w/w%、或约1.0w/w%、或约1.1w/w%、或约1.2w/w%、或约1.3w/w%、或约1.4w/w%、或约1.5w/w%。

[0493] 132. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在羧甲基纤维素钠溶液中的微粒。

[0494] 133. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂包含悬浮在羧甲基纤维素钠溶液中的微粒,其中,所述羧甲基纤维素钠溶液为所述液体溶液的0.1w/w% - 1.0w/w%、或在0.25w/w% - 0.75w/w%之间、或约0.1w/w%、或约0.2w/w%、或约0.3w/w%、或约0.4w/w%、或约0.5w/w%、或约0.6w/w%、或约0.7w/w%、或约0.8w/w%、或约0.9w/w%、或约1.0w/w%。

[0495] 134. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂。

[0496] 135. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂,其中,所述抗纤维化剂在长的时间段内释放。

[0497] 136. 前述段落中任一段所述的制剂,其中,所述制剂是持续释放制剂,其中,所述抗纤维化剂在如下的长的时间段内释放:至少1天;或至少2天;或至少3天;或至少4天;或至少5天;或至少6天;或至少1周;或至少2周;或至少3周;或至少4周;或至少5周或至少6周;或至少8周;或至少9周;至少10周;或至少12周;或至少15周;或在1-5天之间;或在2-5天之间;或在1-2天之间;或在2-3天之间;或在3-4天之间;或在4-5天之间;或在3-10天之间;或在1-15周之间;或在2-10周之间;或在4-8周之间;或在8-15周之间;或约1天;或约2天;或约3天;或约4天;或约5天;或约6天;或约1周;或约2周;或约3周;或约4周;或约5周;或约6周;或约7周;或约8周;或约9周;或约10周以上。

[0498] 137. 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有选自表1或表2所列疾病的组中的一种或多种疾病的受试者,并向所述受试者给予前述段落中任一段所述的制剂。

[0499] 138. 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0500] 139. 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0501] 140. 一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症I型的受试者,并向

所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0502] 141.一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症II型的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0503] 142.一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症III型的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0504] 143.一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脊髓性肌萎缩症IV型的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0505] 144.一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有脑瘫、中风、创伤性脑损伤和/或周围神经损伤的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0506] 145.一种方法,所述方法包括鉴别被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0507] 146.一种方法,所述方法包括鉴别患有肱桡关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0508] 147.一种方法,所述方法包括鉴别患有肱尺关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0509] 148.一种方法,所述方法包括鉴别患有孟肱关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0510] 149.一种方法,所述方法包括鉴别患有胫股关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0511] 150.一种方法,所述方法包括鉴别患有髌臼股关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0512] 151.一种方法,所述方法包括鉴别患有距小腿关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0513] 152.一种方法,所述方法包括鉴别患有颞下颌关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0514] 153.一种方法,所述方法包括鉴别患有掌指关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0515] 154.一种方法,所述方法包括鉴别患有跖趾关节纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0516] 155.一种方法,所述方法包括鉴别患有关节周围肌肉组织纤维化的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0517] 156.一种方法,所述方法包括鉴别患有橘皮组织的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0518] 157.一种方法,所述方法包括鉴别患有间质性肺病的受试者,并向所述患者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0519] 158.一种方法,所述方法包括通过作为气雾剂吸入而向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0520] 159.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

- [0521] 160.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0522] 161.一种方法,所述方法包括经由皮内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0523] 162.一种方法,所述方法包括经由皮下注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0524] 163.一种方法,所述方法包括经由囊内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0525] 164.一种方法,所述方法包括经由囊周注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0526] 165.一种方法,所述方法包括经由韧带内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0527] 166.一种方法,所述方法包括经由韧带周围注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0528] 167.一种方法,所述方法包括经由腱内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0529] 168.一种方法,所述方法包括经由腱周注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0530] 169.一种方法,所述方法包括经由骨髓内注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0531] 170.一种方法,所述方法包括经由骨髓周围注射向任何前述受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0532] 171.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0533] 172.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0534] 173.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0535] 174.一种方法,所述方法包括经由关节内注射,向被诊断患有贝克肌营养不良症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0536] 175.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0537] 176.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0538] 177.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0539] 178.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有先天性多发性关节挛缩症的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。
- [0540] 179.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有脑瘫的受试者给予前述

段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0541] 180.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有脑瘫的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0542] 181.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有中风的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0543] 182.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有中风的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0544] 183.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有创伤性脑损伤的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0545] 184.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有创伤性脑损伤的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0546] 185.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有周围神经损伤的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0547] 186.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有周围神经损伤的受试者给予前述段落中任一段所述的组合物或制剂。

[0548] 187.一种方法,所述方法包括作为气雾剂经由吸入给予大小在 $1\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ 之间的前述段落中的任一者。

[0549] 188.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射给予大小在 $20\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$ 之间的前述段落中的任一者。

[0550] 189.一种方法,所述方法包括经由关节内注射给予大小在 $5\mu\text{m}$ - $50\mu\text{m}$ 之间的前述段落中的任一者。

[0551] 190.一种方法,所述方法包括作为气雾剂经由吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述段落中的任一者。

[0552] 191.一种方法,所述方法包括作为气雾剂经由吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述段落中的任一者。

[0553] 192.一种方法,所述方法包括作为气雾剂经由吸入向被诊断患有间质性肺病的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $1-10\mu\text{m}$ 。

[0554] 193.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $10-30\mu\text{m}$ 。

[0555] 194.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $25-50\mu\text{m}$ 。

[0556] 195.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $10-30\mu\text{m}$ 。

[0557] 196.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有杜氏肌营养不良症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $25-50\mu\text{m}$ 。

[0558] 197.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $10-30\mu\text{m}$ 。

[0559] 198.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为 $25-50\mu\text{m}$ 。

- [0560] 199.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。
- [0561] 200.一种方法,所述方法包括经由肌肉注射向被诊断患有脊髓性肌萎缩症的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。
- [0562] 201.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有关节纤维化的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为10-30 $\mu\text{m}$ 。
- [0563] 202.一种方法,所述方法包括经由关节内注射向被诊断患有关节纤维化的受试者给予前述段落中的任一者,其中,所述微粒的直径为25-50 $\mu\text{m}$ 。
- [0564] 203.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,所述制剂作为气雾剂经由吸入递送。
- [0565] 204.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,所述制剂经由关节内注射递送。
- [0566] 205.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,所述制剂经由肌肉注射递送。
- [0567] 206.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂给予至受试者,使得抗纤维化剂(例如,松弛素)以如下剂量被给予至受试者:在1-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在100-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在200-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在500-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或25-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或30-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或40-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或在1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或在4-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重之间;或约2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重;或约500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。
- [0568] 207.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂给予一次。
- [0569] 208.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂给予多于一次。
- [0570] 209.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每周给予一次。
- [0571] 210.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每2周给予一次。
- [0572] 211.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每3周给予一次。
- [0573] 212.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每4周给予一次。
- [0574] 213.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每6周给予一次。
- [0575] 214.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每8周给予一次。
- [0576] 215.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每10周给予一次。
- [0577] 216.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每12周给予一次。
- [0578] 217.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每16周给予一次。
- [0579] 218.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每20周给予一次。
- [0580] 219.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每24-26周给予一次。
- [0581] 220.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每8个月给予一次。
- [0582] 221.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每9个月给予一次。
- [0583] 222.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述制剂每12个月给予一次。
- [0584] 223.前述段落中任一段所述的方法或制剂,其中,将所述抗纤维化剂以线性释放

曲线从所述微粒释放。

[0585] 224. 前述段落中任一段所述的方法或制剂, 其中, 将所述抗纤维化剂以非线性释放曲线从所述微粒释放。

[0586] 225. 前述段落中任一段所述的方法或制剂, 其中, 将所述抗纤维化剂以其释放曲线中的起始单次大剂量(initial bolus)从所述微粒释放。

[0587] 226. 前述段落中任一段所述的方法或制剂, 其中, 将所述抗纤维化剂不用以其释放曲线中的起始单次大剂量从所述微粒释放。

[0588] 227. 前述段落中任一段所述的方法或制剂, 其中, 将所述抗纤维化剂在最初数天后以其释放曲线中的突释从所述微粒释放。

[0589] 228. 前述段落中任一段所述的方法或制剂, 其中, 将所述抗纤维化剂从所述微粒释放, 其释放曲线中无突释。

[0590] 本文所述技术的一些实施方式可根据以下额外的编号段落中的任何一段进行定义:

[0591] 1. 一种治疗纤维化疾病的方法, 所述方法包括向有需要的受试者给予与松弛素家族肽受体结合的药剂。

[0592] 2. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述松弛素家族肽受体是RXFP1、RXFP2、RXFP3或RXFP4。

[0593] 3. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述药剂是所述受体的天然配体。

[0594] 4. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述天然配体是松弛素-2或松弛素-2变体。

[0595] 5. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述松弛素-2变体与天然松弛素-2至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相似。

[0596] 6. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述药剂在细菌、哺乳动物或酵母宿主细胞中重组产生。

[0597] 7. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述药剂是完全或部分化学合成的。

[0598] 8. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 将所述药剂缀合至靶向部分。

[0599] 9. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述靶向部分选自于由单域骆驼抗体片段、肽序列、多核苷酸或小分子或小分子变构调节剂所组成的组。

[0600] 10. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述药剂被包含在储库中。

[0601] 11. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述储库具有以下中的至少一者:

[0602] a. 体积为 $0.1\mu\text{m}^3$ ;

[0603] b. 由一种或多种聚合物组成; 或

[0604] c. 由一种或多种自组装小分子组成。

[0605] 12. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述储库的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。

[0606] 13. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述储库由水凝胶组成, 所述水凝胶由低分子量凝胶剂组成。

[0607] 14. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述储库由聚(丙交酯-共-乙交酯)组成。

[0608] 15. 前述段落中任一段所述的方法, 其中, 所述储库由交联的水凝胶组成, 所述交

联的水凝胶由聚乙二醇组成。

[0609] 16. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述储库由自组装两亲性水凝胶组成,所述自组装两亲性水凝胶由两亲性小分子组成。

[0610] 17. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述纤维化疾病选自于由以下组成的组:僵硬的纤维化关节囊、肺纤维化(即特发性肺纤维化、囊性纤维化、高血压)、肝纤维化(即乙型或丙型肝炎、长期酗酒、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、胆汁淤积症、自身免疫性肝炎肝硬化)、肾纤维化(即慢性肾病、终末期肾病、肾间质纤维化)、心脏病(即心力衰竭、心肌梗死、主动脉瓣狭窄、肥厚型心肌病)、肠道疾病(即克罗恩病、炎症性肠病、肠病和其他的肠纤维化)、皮肤病症(即硬皮病、瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、橘皮组织)、泌尿生殖和妇科病症(佩罗尼氏病、子宫肌瘤)和眼部疾病(即先天性眼外肌纤维化、视网膜下纤维化、视网膜前纤维化、角膜纤维化)。

[0611] 18. 前述段落中任一段所述的方法,其中,将所述药剂局部给予至靶器官。

[0612] 19. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述药剂全身性地给予。

[0613] 20. 前述段落中任一段所述的方法,其中,将所述药剂经由如下给予:关节内、关节周围、囊内、囊周、韧带内、韧带周围、腱内、腱周、骨髓内或骨髓周围注射、肌内、皮下、皮内、鼻内、口服、经皮、粘膜、经皮、或经由肺部吸入。

[0614] 21. 前述段落中任一段所述的方法,其中,在荧光镜检查或超声引导下进行给予。

[0615] 22. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述靶器官是肺、肾、肝、心脏、皮肤或眼睛。

[0616] 23. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述受试者被进一步给予至少第二治疗。

[0617] 24. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述至少第二治疗是物理治疗。

[0618] 25. 前述段落中任一段所述的方法,其中,所述至少第二治疗是手术。

[0619] 26. 前述段落中任一段所述的方法,包括:在给予之前,将受试者诊断为患有纤维化疾病的步骤。

[0620] 27. 前述段落中任一段所述的方法,包括:在给予之前,接收将受试者诊断为患有纤维化疾病的测定结果的步骤。

[0621] 28. 一种治疗纤维化疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予与松弛素家族肽受体结合的药剂,其中,所述药剂被包含在用于持续释放的储库中。

[0622] 29. 一种组合物,其包含与松弛素家族肽受体结合的药剂。

[0623] 30. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述松弛素家族肽受体是RXFP1、RXFP2、RXFP3或RXFP4。

[0624] 31. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述药剂是所述受体的天然配体。

[0625] 32. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述天然配体是松弛素-2或松弛素-2变体。

[0626] 33. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述松弛素-2变体与天然松弛素-2至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相似。

[0627] 34. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述药剂在细菌、哺乳动物或酵母宿主细胞中重组产生。

- [0628] 35. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述药剂是完全或部分化学合成的。
- [0629] 36. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,将所述药剂缀合至靶向部分。
- [0630] 37. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述靶向部分选自自由单域骆驼抗体片段、肽序列、多核苷酸或小分子或小分子变构调节剂所组成的组。
- [0631] 38. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述药剂被包含在储库中。
- [0632] 39. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述储库具有以下中的至少一者:
- [0633] a. 体积为 $0.1\mu\text{m}^3$ ;
- [0634] b. 由一种或多种聚合物组成;或
- [0635] c. 由一种或多种自组装小分子组成。
- [0636] 40. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述储库的直径为1-100 $\mu\text{m}$ 。
- [0637] 41. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述储库由水凝胶组成,所述水凝胶由低分子量凝胶剂组成。
- [0638] 42. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,储库由聚(丙交酯-共-乙交酯)组成。
- [0639] 43. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述储库由交联的水凝胶组成,所述交联的水凝胶由聚乙二醇组成。
- [0640] 44. 前述段落中任一段所述的组合物,其中,所述储库由自组装的两亲性水凝胶组成,所述自组装的两亲性水凝胶由两亲性小分子组成。
- [0641] 45. 前述段落中任一段所述的组合物用于治疗纤维化疾病的用途。
- [0642] 实施例
- [0643] 将在以下实施例中对本发明进行进一步描述,这些实施例并不限制本发明的范围。
- [0644] 实施例1. 荷载松弛素-2的微粒的合成、表征和评价
- [0645] 基于Igartua, M.等, International Journal of Pharmaceutics, 1998, 169(1): 45-54中描述的水/油/水(w/o/w)方法制备具有如通过ELISA分析确定的 $1.27 \times 10^{-3}\text{wt}\%$ 的荷载的松弛素的荷载有松弛素-2的PLGA微粒(RMP)。为了获得粒子,需要对该方法进行显著优化和调整。将量、时间、温度、混合速度、聚合物LA:GA含量等都进行变化,以鉴别制备聚合物的一组独特的不明显的条件。ELISA分析还显示出包封效率为90%-95%。动态光散射(DLS)显示粒子直径为 $7.65\mu\text{m}$ ,通过SEM具有小的多分散性和球形。松弛素-2微粒中的松弛素-2通过w/o/w双乳液工艺保持其天然的二级和三级结构。圆形二向色光谱显示出新鲜制备的松弛素-2和乳化的松弛素-2之间无变化(图2,左图)。此外,松弛素-2在2个月内在 $37^\circ\text{C}$ 下稳定(图2,右图)。松弛素-2PLGA微粒以批间一致性制备,并重悬在PEG-600中以减少聚集和絮凝,以及便于通过23G针给予。
- [0646] 通过喷雾干燥制备松弛素-2微粒。旋转轮雾化器以15,000RPM旋转,外围出口速度为250m/sec,且空气流速为40m/sec,产生 $35\mu\text{m}$ 松弛素-2微粒。进料溶液包含松弛素-2(在 $\text{H}_2\text{O}$ 中为1mg/ml)和PL:GA(摩尔比45:65的丙交酯:乙交酯, M.W. 50,000-75,000道尔顿,羧酸封端,在二氯甲烷中50mg/ml)的乳液。
- [0647] 通过溶剂萃取制备松弛素-2微粒。在乙酸乙酯中形成松弛素-2(0.5mg/ml)和PL:GA(摩尔比50:50的丙交酯:乙交酯, M.W. 70,000-90,000道尔顿,酯封端,50mg/ml)的乳液。将1体积%的聚乙烯醇(M.W. 30,000道尔顿)加入到快速混合的乳液中,然后通过蒸发除去

剩余的溶剂。冻干前,松弛素-2微粒的直径为48 $\mu\text{m}$ 。

[0648] 通过松弛素-2ELISA来定量松弛素-2从微粒的释放。在60天的进程中,每三天确定意在模拟滑液的生物相关缓冲液(Dublecco改良的Eagle培养基+20%热灭活的胎牛血清+25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 猪酯酶+1%青霉素-链霉素)的贮液器中的松弛素-2的浓度。28天后,85%的初始包封的松弛素-2从粒子中释放(图3,上图)。对于前四周,以半线性速率进行释放(图3,上图)。松弛素-2微粒在不同时间点的SEM图像分析显示出,进入第3周,松弛素微粒通过本体侵蚀而降解。在第5周和第6周,松弛素-2微粒显示出接近完全的降解,具有高孔隙率,并且随着光滑表面丧失并变得褶皱而降解。到第四周,RMP显著降解,如通过与初始制备时相比的其孔隙度的实质增加所示出的(图3,下图)。

[0649] 在transwell中用松弛素-2微粒处理的人成纤维细胞样滑膜细胞(HFLS)使得能够评估不同时间点的松弛素-2的释放和功效。如通过在5ng/mL TGF $\beta$ -1存在下的I型胶原蛋白表达的下调所示的,从松弛素-2微粒释放的松弛素-2显示出长达四周的抗纤维化功效(图4,上图)。在松弛素-2存在的情况下,在第1、3和4周,I型胶原蛋白以基础水平的20%至30%表达。2周时间点显示出胶原蛋白表达下调50%(图4,下图)。

[0650] 滑膜关节间隙由两种主要细胞类型组成:滑膜成纤维细胞和巨噬细胞。评估RAW 267.4鼠巨噬细胞对松弛素-2微粒的体外耐受性。处理24小时后,平均直径为4.5 $\mu\text{m}$ 的荧光标记的对照微粒被巨噬细胞内化(图5,左图)。处理24小时后,平均直径为7.6 $\mu\text{m}$ 的荧光标记的对照微粒未被巨噬细胞内化(图5,右图)。

[0651] 实施例2.用于持续释放松弛素-2的两亲性水凝胶储库的形成和表征

[0652] 合成了两种两亲性水凝胶用于松弛素-2的物理包埋,以控制其持续释放(图6)。这些两亲性分子在95 $^{\circ}\text{C}$ 下熔融,并在严格非共价相互作用下缓慢冷却回室温时凝结。1的烷基链和2的烷基氟链允许各分子之间的疏水相互作用,而三唑和胸苷部分允许 $\pi$ - $\pi$ 堆叠。最后,脱氧核糖和葡萄糖基团有利于氢键合(Godeau,G.,等,Tetrahedron Letters 2010,51:1012-1015;Ramen,F.A.等,Biomaterials.2017,145:72-80)。这些两亲分子一起形成了独特且稳定的超分子组装体,该组装体在37 $^{\circ}\text{C}$ 下稳定至少两周。这种稳定性特征是另一个新发现,并且有益于水凝胶的使用。通过将各分子溶解于具有蛋白的磷酸盐缓冲盐水溶液中,并加热至95 $^{\circ}\text{C}$ 30分钟,用不同密度的牛血清白蛋白和松弛素-2分别制成1和2各自的三种凝胶。在该温度下处理至少一小时后,通过圆二色光谱法,松弛素-2维持其折叠的3D结构(图7,左图)。冷却至室温后,荷载松弛素-2的凝胶完全凝结(图7,右图)。

[0653] 对这些荷载有松弛素-2的超分子水凝胶的流变性质进行评估。储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )由从1rad/s至100rad/s的频率扫描确定。在这个范围内,所有凝胶都维持了大于损耗模量的储能模量( $G' > G''$ ),表明在这一频率状态中,与粘性液体相比,所有凝胶更多地表现为弹性固体(图8,左图;图9,左图)。不同wt%的凝胶1的应变扫描显示,从高到低wt%凝胶,线性粘弹性区域(LVER)分别在2.2%应变至6.4%应变之间(图8,右图)。LVER与凝胶wt%成反比。或者,在不同wt%的凝胶2中,这种关系丧失(图9,右图)。5wt%的凝胶显示出最窄的LVER,在9%应变下结束。1.5wt%的凝胶显示最大的LVER,在30%时结束,而1wt%凝胶介于两者之间,LVER在20%应变时结束(图9,右图)。

[0654] 在磷酸盐缓冲盐水贮液器中于37 $^{\circ}\text{C}$ 下在8天的进程中对1(1wt%和2wt%)和2(1wt%和1.5wt%)的释放曲线进行评估。在此时间框内,由分子2产生的两种凝胶释放了总

的荷载的松弛素-2的90%和84% (图10)。由化合物1制备的凝胶显示出显著慢于化合物2的释放模式。这些凝胶仅释放了总的荷载的松弛素-2的15%和27% (图10)。由化合物1制成的凝胶显示出释放时间和wt%之间成比例,而由化合物2制成的凝胶中不存在这种趋势。在8周的进程中,所有凝胶保持完整,观察到一些溶胀。不存在明显的材料降解迹象。目前还不清楚为何这两种凝胶会以不同的速率释放松弛素,而其本身指向了这一惊人发现。

[0655] 实施例3:大鼠的肩挛缩模型的开发

[0656] 该实验的目的在Villa-Camacho等, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 2015, 24 (11) :1809-16的出版物中进行描述,目的是在肩挛缩的体内动物模型中研究盂肱关节的关节外的、内部固定对肩部动力学和运动学的影响。预计大鼠肩部的关节外的、内部固定会引起随后的旋转ROM的减少,以及关节僵硬的增加,这将持续至少8周。

[0657] 该研究由机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准,并在研究中使用了10只Sprague-Dawley大鼠 (250-300g, Charles River 实验室, Wilmington, MA, USA)。对于每只动物,在任何手术干预 (基线) 之前,在完整的左肩上测量每度的扭矩,作为内旋转80° (按惯例为负值) 和外旋转60° (按惯例为正值) 之间的旋转角度的函数。如通过荧光镜检查所证实的,旋转被限制在观察到的引发最小肩胛骨募集的边界内。因此,记录了每只动物的外旋转60° ( $\tau_{OUT}$ ) 和内旋转80° ( $\tau_{INT}$ ) 时的扭矩值。

[0658] 每只动物的左前肢均采用关节外的内部固定进行固定。在异氟烷麻醉下,制造垂直于肩胛冈的纵向皮肤切口。将两根No. 2-0经编织的聚酯缝合线 (Ethibond Excel, Ethicon-San Lorenzo, PR, USA) 在肩胛骨内侧缘和肱骨干之间穿过,并收紧以固定肩关节 (图1, 子图A)。手术过程中,肌肉结构未被操纵,并且手术后动物被允许立即在其笼子里正常活动。

[0659] 固定8周后,移除束缚缝合线,并将10只动物分入两组,以评估ROM (ROM组,  $n=5$ ) 和关节僵硬 (僵硬组,  $n=5$ ) 方面的变化。在ROM组中,通过对基线时测量的 $\tau_{OUT}$ 和 $\tau_{INT}$ 所达到的ROM进行测定,在随访期间纵向量化运动学的变化。进行这是为了评估固定是否介导ROM的显著降低。在僵硬组中,通过测量分别达到初始的80°内旋转和60°外旋转所需的 $\tau_{OUT}$ 和 $\tau_{INT}$ 的差来检查关节动力学。两组均在缝合线拆除后 (随访第0天) 立即进行测量,其后定期进行测量 (每周两次,直到三个连续时间点处观察到的变化小于10%,此时测量频率降至每周一次)。每组的基线测量值用作内部对照,以减少研究所需的动物总数。内部对照的使用也增加了内部有效性和统计能力,因为甚至使用同一动物的对侧肩部时,无论是ROM还是测量的扭矩,存在高的试样间差异。最后,一项初步研究表明,试样内的测量值是高度可重复的,并在8周时间段内保持稳定。

[0660] 在全身麻醉下,使用由传感器组件、旋转轴和臂夹组成的装置进行ROM和扭矩测量。传感器组件包含方位传感器 (3DM-GX3-15, MicroStrain-Williston, VT)、以及固定至所述轴以使传感轴与旋转中心共线的反作用扭矩传感器 (TFF400, Futek-Irvine, CA)。将前肢在3个点 (手腕、肘部和手臂) 处固定,确保感知轴与肱骨的长轴对齐。传感器组件的旋转引起盂肱关节内的直接的肱骨内旋转和肱骨外旋转。

[0661] 为了重复获取ROM和扭矩,被动肢体旋转由微控制器控制的步进电机执行 (UNO R3, Arduino-Torino, 意大利)。该系统利用来自反作用扭矩传感器或方位传感器的输入来开始和结束ROM和扭矩的动态测量。在ROM组中,将预先设定的可编程扭矩值 (对各动物而言

是特异的,并在基线时测量) ( $\tau_{OUT}$ 和 $\tau_{INT}$ ) 用作输入变量,以检测旋转ROM的变化,分辨率为 $0.2^\circ$ 。在僵硬组中,将预先设定的可编程旋转角度( $60^\circ$ 外旋转, $80^\circ$ 内旋转)用作输入,从而以 $0.01\text{N/mm}$ 的分辨率测量扭矩变化。微控制器由使用MATLAB 7.13.0.564(MathWorks Inc-Natick,MA,USA)的计算机引导。

[0662] 在ROM组中,通过重复测量方差分析,比较三个不同时间点(基线、拆线后即刻和随访8周)的平均ROM值。在僵硬组中,使用了两个不同的指标进行比较:1)实现完全ROM所需的扭矩差异,以及2)僵硬度,根据旋转角扭矩曲线下的面积进行估算。对于两组而言,将P值 $< 0.05$ 均视为具有统计学意义。确定随访期内的ROM时间行为。紧接在拆线后,与基线相比,总的ROM下降了63% ( $51^\circ \pm 10^\circ$  vs.  $136^\circ \pm 0^\circ$ ;  $P < 0.001$ )。类似地,与基线相比,总的扭矩增加了 $13.4\text{N}\cdot\text{mm}$  ( $22.6 \pm 5.9\text{N}\cdot\text{mm}$  vs.  $9.2 \pm 2.6\text{N}\cdot\text{mm}$ ;  $P = 0.002$ )。随访8周时,残余的总ROM限制和增加的内旋转扭矩仍然明显 ( $113^\circ \pm 8^\circ$  vs.  $137^\circ \pm 0^\circ$ ,  $P < 0.001$ 和 $3.5 \pm 0.4\text{N}\cdot\text{mm}$  vs.  $2.7 \pm 0.7\text{N}\cdot\text{mm}$ ,  $P = 0.036$ )。

[0663] 动力学和运动学变化不是短暂的。在8周的随访中,ROM的减少和关节僵硬的增加都是显著的。虽然没有研究评估这种肩挛缩模型的自然进展和时间行为,但预期在进入固定后时期8周后出现的关节残余变化可能是永久性的(Trudel G.等,Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md:1985), 2014, 117 (7): 730-7)。实施例4中存在的结果表明,大鼠肩挛缩模型可用于对治疗肩挛缩的治疗干预进行评估。

[0664] Kim等随后验证了上述发现,他们独立地报告了类似的肩挛缩模型(Kim等, J.Orthop.Surg.Res.2016;11(1):160)。孟肱关节的腋窝隐窝的一系列显微图像与Kim等在6周内拍摄的图像相似。将Masson三色染色用于鉴别纤维化(红色)。在3天和6周时观察到挛缩发展的组织学证据。纤维化和炎症发生较早,并在固定期间持续,并且特别是,早在3天,炎性细胞浸润、囊肥厚和囊组织内的血管生成就明显可见。虽然急性炎症反应在第6周时减轻,但囊肥厚和纤维化结构仍然余留,密切模仿了其他研究的发现(Trudel等, J.Appl.Physiol. (1985), 2014, 117 (7): 730-7)。这种持续降低ROM和增加僵硬度的模型允许对当前和潜在的肩挛缩治疗干预进行全面评估。

[0665] 实施例4.使用松弛素-2微粒治疗鼠模型中的关节僵硬。

[0666] 这项研究对重组人松弛素-2对肩挛缩动物模型中的孟肱关节的动力学和运动学的影响进行调查,如Villa-Camacho等,Journal of Shoulder and Elbow Surgery,2015, 24(11):1809-16中所述。预期在8周的监测期内,多次关节内注射松弛素-2(mIA)的大鼠将比未经治疗的对照表现出运动范围(ROM)的更快的恢复。对于各动物,在任何手术干预之前,在整个左肩上测量每度的扭矩,作为 $100^\circ$ 内旋转和 $60^\circ$ 外旋转之间的旋转角度的函数。固定8周后,测量ROM,并在荧光镜检查的引导下(第0天)将在磷酸盐缓冲盐水(即赋形剂组)中的 $2\mu\text{g/kg}$ 的松弛素-2直接注射至大鼠的僵硬肩部的滑膜关节间隙中。大鼠接受每隔一天给予的 $2\mu\text{g/kg}$ 的松弛素-2总共5次注射,持续10天,每只大鼠总共给予 $10\mu\text{g/kg}$ (即MIA组)。在第0天向大鼠注射单剂量的PLGA微粒,其包封约 $10\mu\text{g/kg}$ 松弛素-2(即RMP组)。作为额外的对照,另一组动物无肩挛缩,并且每隔一天接受 $2\mu\text{g/kg}$ 的松弛素-2总共5次注射,持续10天,每只大鼠总共给予 $10\mu\text{g/kg}$ (即,健康+MIA组)。从第0天开始并在随访期间,通过测量以在基线时测量的 $\tau_{OUT}$ 和 $\tau_{INT}$ 达到的ROM,对运动学变化进行纵向量化。在拆线后(随访第0天)立即进行ROM测量,并在此后以规律间隔(每周两次,直到在连续三个时间点观察到小于10%

的变化,此时,测量频率降至每周一次)进行测量,持续8周随访。除了对侧未受伤肩部的相同ROM测量值外,每组的基线测量值起到内部对照的作用。接受荷载在微粒中的松弛素(RMP)或松弛素-2的mIA的大鼠在8周随访期后显示内部ROM恢复到基线测量值(图11)。使用该模型,与未治疗的对照组相比,以更大剂量单次节注射松弛素或静脉内注射松弛素-2显示出类似的受限的内部ROM。肩关节的组织学分析表明,未经治疗的大鼠的固定的肩部减少了肱骨头上的关节表面和囊之间的描绘的分离、成纤维细胞浸润和囊粘连,而接受松弛素-2的mIA(Blessing, W.A.等, Proc. Natl. Acad. Sci. 2019, 116: 12183-12192)或荷载有松弛素的微粒的大鼠的固定肩部无任何明显的粘连,并且滑膜和关节软骨表面通过适当的细胞组织保持彼此分离,并且与赋形剂微粒对照相比,显示出异物反应的减少(图12)。

[0667] 使用上述挛缩模型,第0天的动物接受赋形剂(空微粒)或荷载松弛素的微粒(即SR-RLX),并随访8周。图13显示出接受单次关节内注射或荷载有松弛素-2的微粒的大鼠的肩部运动恢复范围与接受5次关节内注射松弛素-2的大鼠相似。对照未荷载赋形剂微粒和对照盐水注射显示出相似的ROM恢复。对于总角度、内部角度和外部角度而言,该恢复低于松弛素-2治疗组的数据。在第14天和第16天的时间点,使用荷载松弛素的储库(n=7)和未荷载赋形剂对照(n=9)治疗的大鼠中的总运动范围之间存在统计学显著的差异(p<0.01)。该数据与来自图11的结果一致。

[0668] 实施例5. 使用荷载松弛素-2的微粒治疗人类受试者中的僵硬的关节。

[0669] 将由PLGA(丙交酯:乙交酯的摩尔比45:65, M.W. 50,000-75,000道尔顿,羧酸封端)组成并荷载1%w/w松弛素的直径为35 $\mu$ m的松弛素-2微粒给予至被诊断患有肩部粘连性囊炎的患者。注射前,将松弛素-2微粒重悬在无菌等渗羧甲基纤维素稀释剂中至如下总体积,所述总体积使得最终剂量为50 $\mu$ g/kg体重。使用23G针以1ml关节内注射的形式给予。注射后,对患者监测关节活动范围的变化(如内旋、外旋、旋前、旋后、屈曲、伸展、外展和内收)、患者报告的疼痛、活动度、患者报告的自主性和患者报告的生活质量。

[0670] 实施例6. 使用荷载松弛素-2的微粒来治疗继发于NMD的僵硬关节。

[0671] 将由PLGA(丙交酯:乙交酯的摩尔比50:50, M.W. 70,000-90,000道尔顿,酯封端)和PVA(M.W. 30,000道尔顿)组成并荷载有0.5%w/w松弛素的直径为35 $\mu$ m的松弛素微粒给予至被诊断患有杜氏肌营养不良症并伴有髋臼股关节挛缩的患者。注射前,将松弛素微粒重悬在基于无菌盐水缓冲液的稀释剂中至如下总体积,该总体积使最终剂量为20 $\mu$ g/kg体重。使用21G针以1ml关节内注射的形式给予。在初次注射后,每14天进行10 $\mu$ g/kg的1ml后续注射持续70天。在初次注射后、重复剂量期间和给药方案完成后,对患者监测关节活动范围的变化(例如内旋、外旋、旋前、旋后、屈曲、伸展、外展和内收)、患者报告的疼痛、活动度、患者报告的自主性和患者报告的生活质量。

[0672] 实施例7. 使用荷载松弛素-2的微粒治疗肺纤维化。

[0673] 将由PLGA组成并荷载0.5%w/w松弛素的直径为3.1 $\mu$ m的松弛素微粒给予至被诊断患有特发性肺纤维化并伴有用力肺活量降低和干咳的患者。在给予之前,轻轻搅拌松弛素微粒,以使储存期间形成的任何干粉结块解聚。使用干粉计量吸入器,患者的吸入剂量相当于25 $\mu$ g/kg。给予后,通过CT扫描对患者监测纤维化病理特征(hallmarks)的减少、以及用力肺活量的增加和呼吸窘迫症状的减少。

[0674] 实施例8. 使用松弛素-2治疗纤维化。

[0675] 本发明提供了通过给予含有松弛蛋白家族肽受体(RXFP1、RXFP2、RXFP3、RXFP4)的结合剂的储库来治疗受试者中的纤维化疾病的物质的组合物和方法,所述纤维化疾病包括硬化性纤维化关节囊、肺纤维化(即特发性肺纤维化、囊性纤维化、高血压)、肝纤维化(即乙型或丙型肝炎、长期酗酒、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、胆汁淤积、自身免疫性肝炎肝硬化)、肾纤维化(即慢性肾病、终末期肾病、肾间质纤维化)、心脏病(即心力衰竭、心肌梗死、主动脉瓣狭窄、肥厚型心肌病)、肠道疾病(即克罗恩病、炎症性肠病、肠病和其他的肠纤维化)、皮肤病症(即硬皮病、瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、橘皮组织)、泌尿生殖和妇科病症(佩罗尼氏病、子宫肌瘤)和眼部疾病(即先天性眼外肌纤维化、视网膜下纤维化、视网膜前纤维化、角膜纤维化)。该药剂是受体的天然配体、松弛素-2、松弛素-2变体、化学偶联至靶向药剂(包括单域骆驼抗体片段、肽序列、多核苷酸或小分子、或小分子变构调节剂)的松弛素-2。储库是体积至少为 $0.1\mu\text{m}^3$ 并且由一种或多种聚合物或自组装小分子组成的物体,在数周到数月内递送最低有效的临床剂量。荷载有松弛素的储库可通过静脉内、肌内、皮下、皮内、鼻内、口服、经皮、粘膜、关节内、关节周围、囊内、囊周、腱内、腱周、韧带内、韧带周围、通过肺部吸入或通过眼部特定给予途径作为持续释放制剂给予,并且可以作为单次注射或一系列注射提供。

[0676] 序列表

[0677] SEQ ID NO:1

[0678] >gi116497221HgbAA126416.1松弛素2[智人]

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTTPRVA

[0679] EIVPSFINKDTEETINMMSEFVANLPQELKLTLEMQPALPQLQQHVPVLKDSLLFEEFKKLIRNRQSEA

ADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0680] SEQ ID NO:2

[0681] >gi116496899IgbIAAI26420.1I松弛素2[智人]

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTTPRPV

[0682] AEIVPSFINKDIETINMMSEFVANLPQELKLILSEMOPALPQLQQHVPVLKDSLLFEEFKKLIRNRQS

EAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0683] SEQ ID NO:3

[0684] >gi1313884020IgbIADR83496.1I松弛素2,部分[合成构建体]

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTTPRPV

[0685] AEIVPSFINKDIETINMMSEFVANLPQELKLILSEMOPALPQLQQHVPVLKDSLLFEEFKKLIRNRQS

EAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0686] SEQ ID NO:4

[0687] >gi113543609IgbIAAH05956.1I松弛素1[智人]

MPRLFLFHLLFCLLLNQFSRAVAANKWDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTP

[0688] RPVAEIVPSFINKDIETIIMLEFIANLPPELKAALSERQPSLPQLQQYVPALKDSNLSFEEFKKLIRN

RQSEAADSNPSELKYLGLDTHSQKKRRPYVALFEKCCIGCTKRSLAKYC

[0689] SEQ ID NO:5

[0690] >gi119579171Igb1EAW58767.1I松弛素1,同种型CRA\_a[智人]

- [0691] MPRLFLFHLLLEFCLLLNQFSRAVAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTPRPV  
A EIVPSFINKDIETIIIMLEFIANLPPELKAALSERQPSLPPELQQYVPALKDSNLSFEEFKKLI RNRQ  
SEAADSNPSELKYLGLDTHSQKRRPYVALFEKCCCLIGCTKRSLAKYC
- [0692] SEQ ID NO:6
- [0693] >gi119579172gbEAW58768.1松弛素1,同种型CRA b[智人]
- [0694] MPRLFLFHLLLEFCLLLNQFSRAVAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTPRPVAGISS  
LLRRRLFEDHDGPSFLV
- [0695] SEQ ID NO:7
- [0696] >gi119579173Hg-bEAW58769.1松弛素1,同种型CRA c[智人]
- [0697] MLEFIANLPPELKAALSERQPSLPPELQQYVPALKDSNLSFEEFKKLI RNRQSEAADSNPSELKYLGLDTHSQKRR  
RPYVALFEKCCCLIGCTKRSLAKYC
- [0698] SEQ ID NO:8
- [0699] >gi119604794gbEAW84388.1松弛素3[智人]
- [0700] MARYMLLLLLLAVWVLTGELWPGAEARAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRWRRSDILAHEAMGDTFPDADA  
DEDSLAGELEAMGSSEWLALTKSPQAFYRGRPSWQGT PGVLRGSRDVLAGLSSSCCKWGCSKSEISSLC
- [0701] SEQ ID NO:9
- [0702] >gi187954661gbAAI40936.1松弛素3[智人]
- [0703] MARYMLLLLLLAVWVLTGELWPGAEARAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRWRRSDILAHEAMGDTFPDAD  
ADEDSLAGELEAMGSSEWLALTKSPQAFYRGRPSWQGT PVVLRGSRDVLAGLSSSCCKWGCSKSEISSLC
- [0704] SEQ ID NO:10
- [0705] >gi17484096HgbAAL40345.1AF447451 1松弛素3[智人]
- [0706] MARYMLLLLLLAVWVLTGELWPGAEARAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRWRRSDILAHEAMGDTFPDADADE  
SLAGELEAMGSSEWLALTKSPQAFYRGRPSWQGT PGVLRGSRDVLAGLSSSCCKWGCSKSEISSLC
- [0707] SEQ ID NO:11
- [0708] >gi317373369spJ) 51460.2INSL3人RecName:Full=胰岛素样3;
- [0709] MDPRLPAWALVLLGPALVFALGPAPTPEMREKLCGHHEVRALVRVCGGPRWSTEARRPATGGDRELLQWLERRH  
LLHGLVADSNLTLPGLQPLPQTSHHRRHRAAATNPARYCCLSGCTQQDLLTLCPY
- [0710] SEQ ID NO:12
- [0711] >gi119579176gbEAW58772.1胰岛素样4(胎盘)[智人]
- [0712] MASLFRSYLPAIWLLLSQLLRESLAAELRGCGPRFGKHLLSYCPMPEKTFTTTTPGGWLLESGRPKEMVSTSN  
KDGQALGTTSEFIPNLSPELKKPLSEGQPSLKKIILSRKKRSGRHRFDPFCCCEVICDDGTSVKLCT
- [0713] SEQ ID NO:13
- [0714] >gi20070773HgbAAH26254.1胰岛素样4(胎盘)[智人]
- [0715] MASLFRSYLPAIWLLLSQLLRESLAAELRGCGPRFGKHLLSYCPMPEKTFTTTTPGGWLLESGRPKEMVSTSN  
KDGQALGTTSEFIPNLSPELKKPLSEGQPSLKKIILSRKKRSGRHRFDPFCCCEVICDDGTSVKLCT
- [0716] SEQ ID NO:14
- [0717] >gi37183171AQ89389.1INSL5[智人]
- [0718] MKGSIFTLFLFSVLFALSEVRSKESVRLCGLEYIRTVIYICASSRWRRHLEGI PQAQQAETGNSFQLPHKREFSE  
ENPAQNLPKVDASGEDRLWGGQMPTEELWKSCKHVSMSRQDLQTLCTDGCSTDLALC
- [0719] SEQ ID NO:15

- [0720] >giH4768935gbAAD29686.1AF133816 1胰岛素样肽INSL5[智人]  
MKGSIFTLFLFSVLFALSEVRSKESVRLCGLEYIRTVIYICASSRWRRHLEGI PQAQQAETGNSFQLPHKRE
- [0721] FSEENPAQNLPKVDASGEDRLWGGQMPTEELWKS KHSVMSRQDLQTLCTDGC SMTDLSALC
- [0722] SEQ ID NO:16
- [0723] >gik5059419gbAAD39003.1AF156094 1胰岛素样蛋白6[智人]  
MPRLRLSLLWLGLLLVRF SRELS DISSARKLCGRYLVKEIEKLCGHANWSQFRFEETPF SRLIAQASEKV
- [0724] EAYSPYQFESPQTASEFARGRCTNPVSTSWEEAVNSWEMQSLPEYKDKKGYSP LGKTRFSSSHNINVYIHENAFFQKK  
RRNKIKTLSNLFWGHPQRKRRGYSEKCCLTGCTKEELS IACL PYIDFKRLKEKRSSLVTKIY

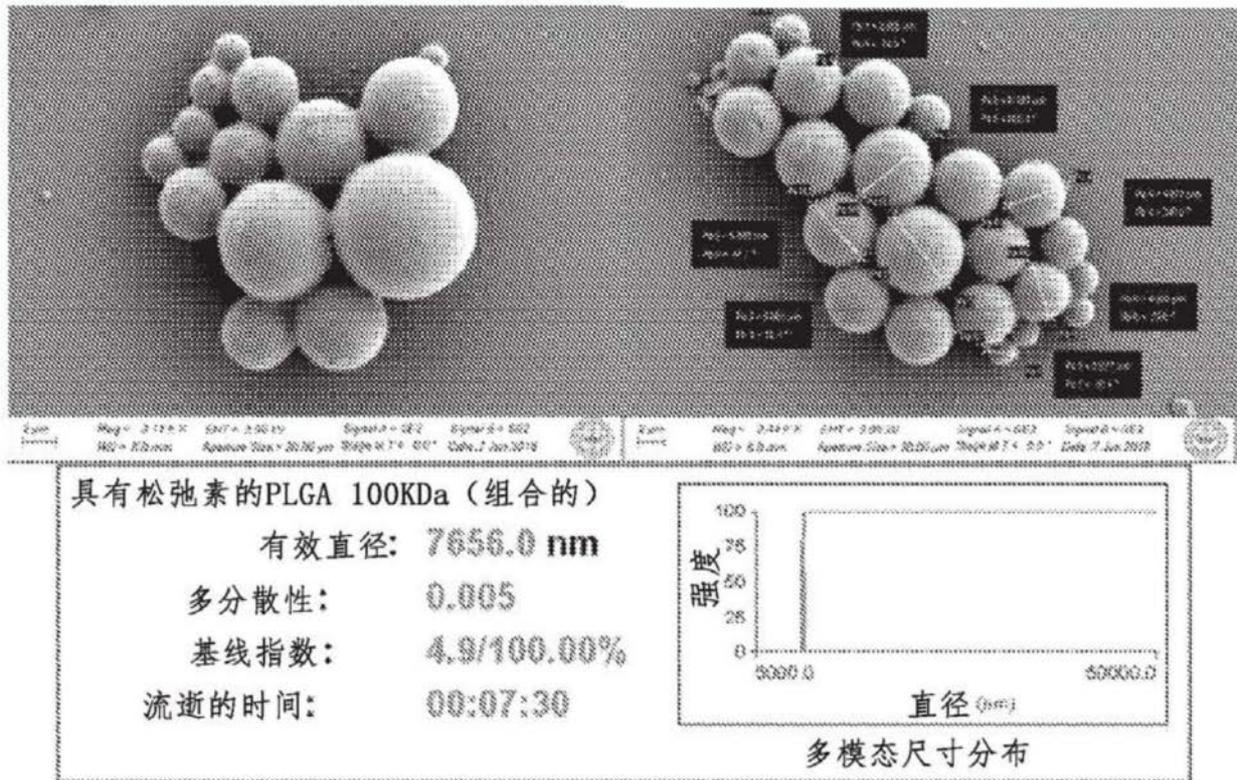


图1

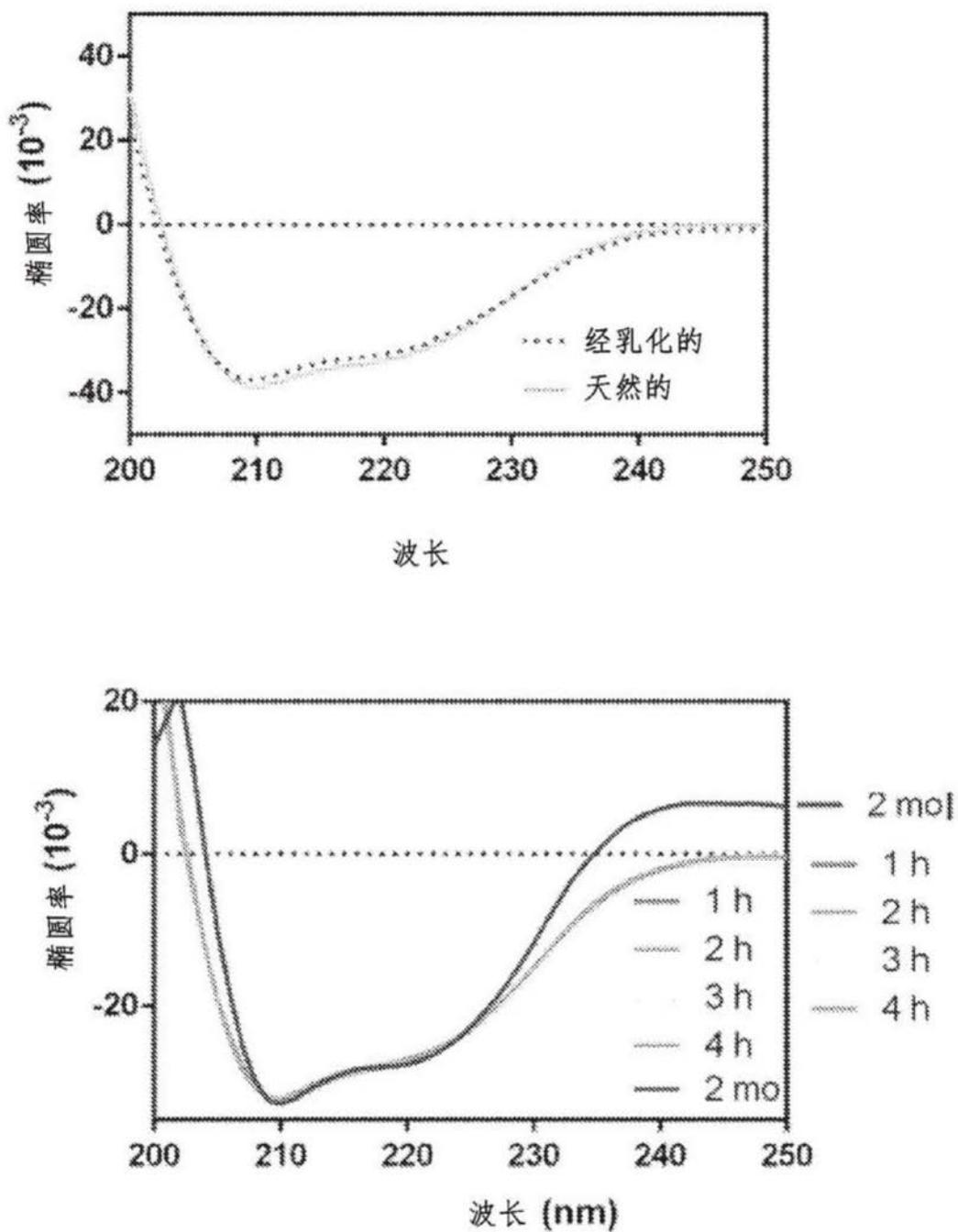


图2

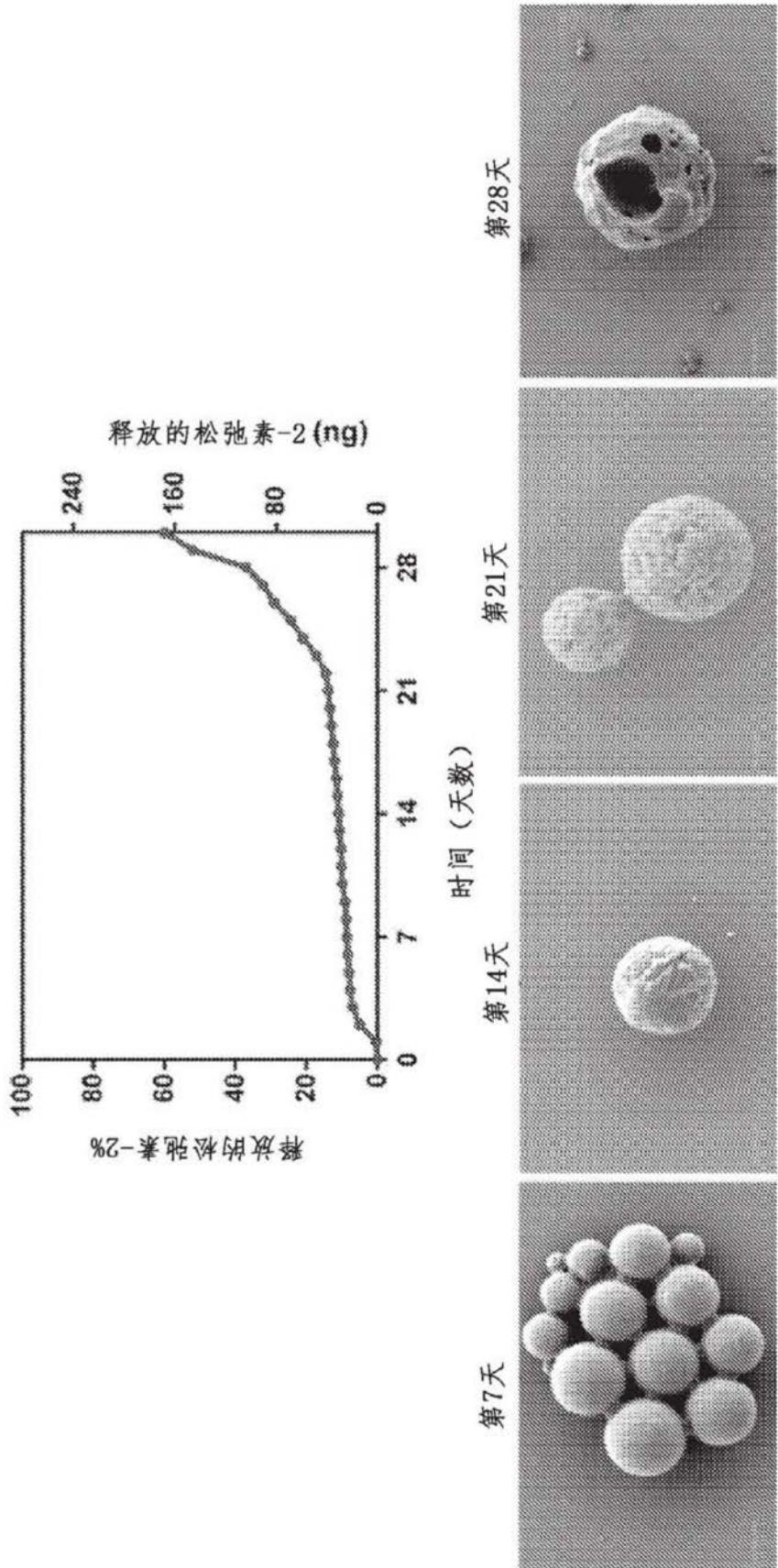


图3

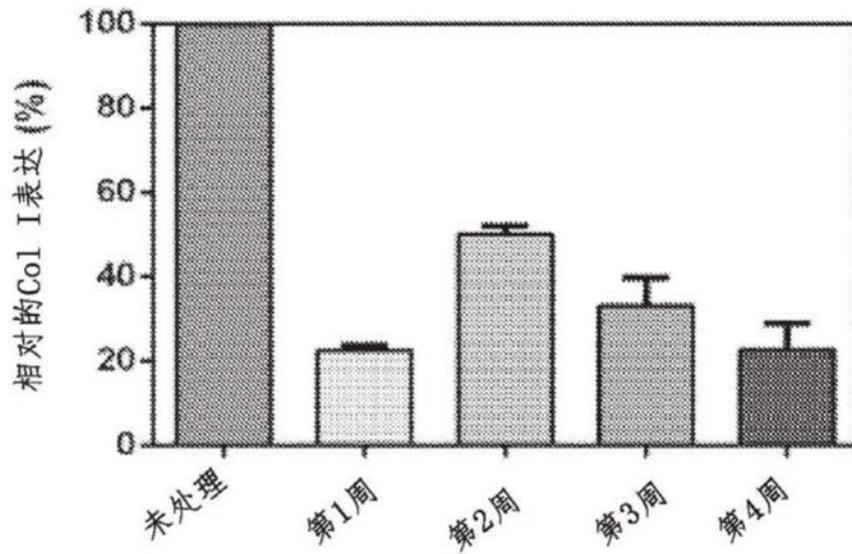
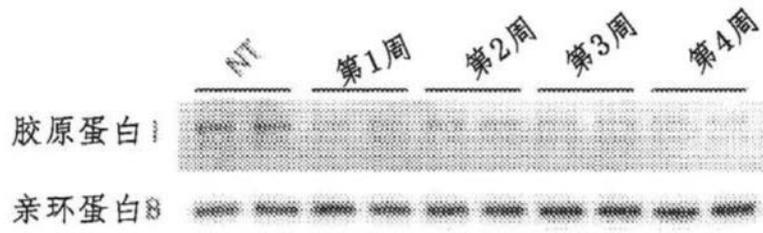


图4

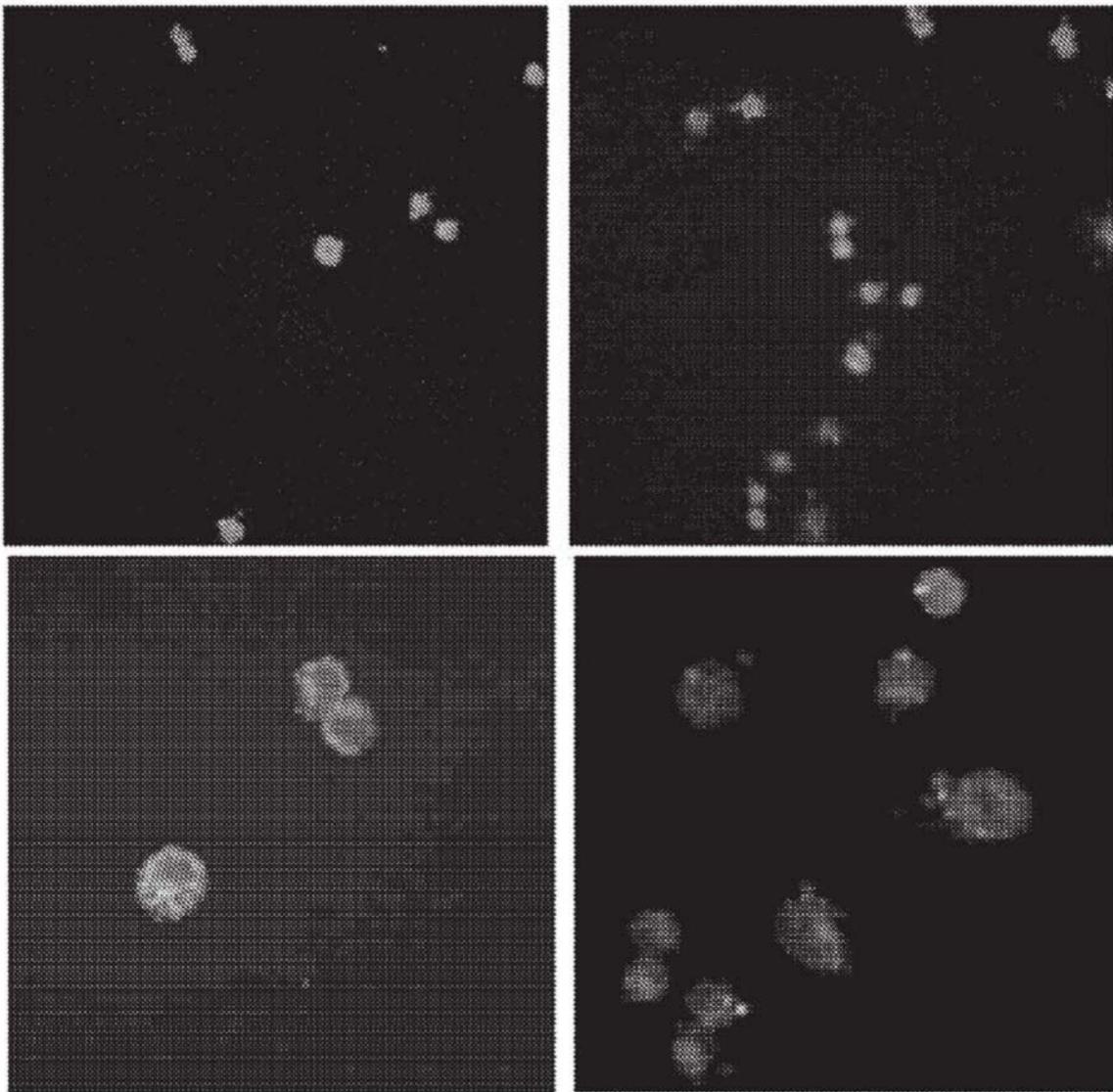


图5

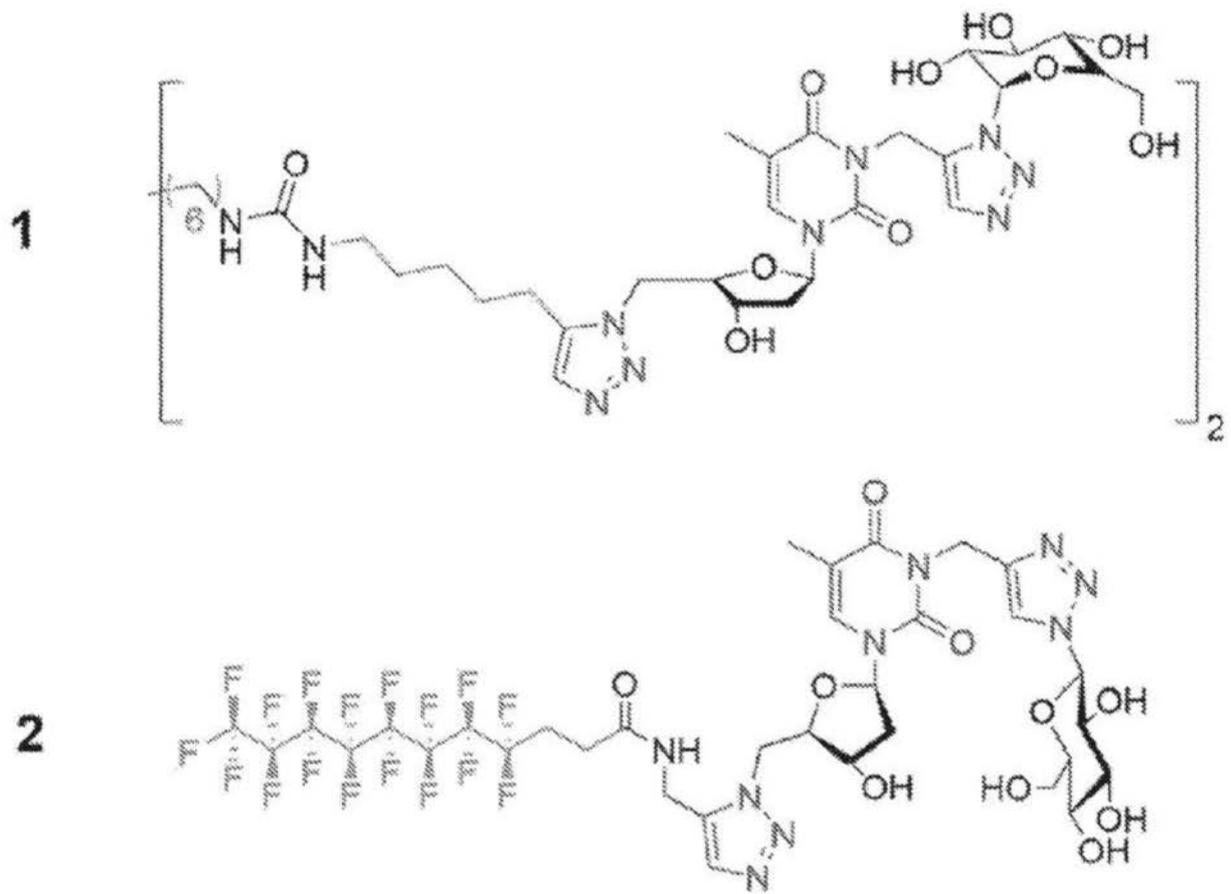


图6

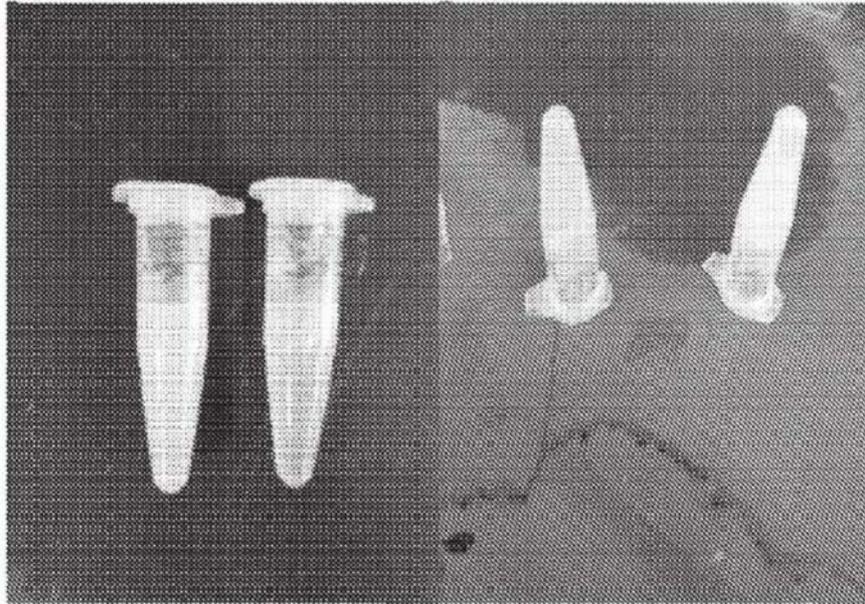
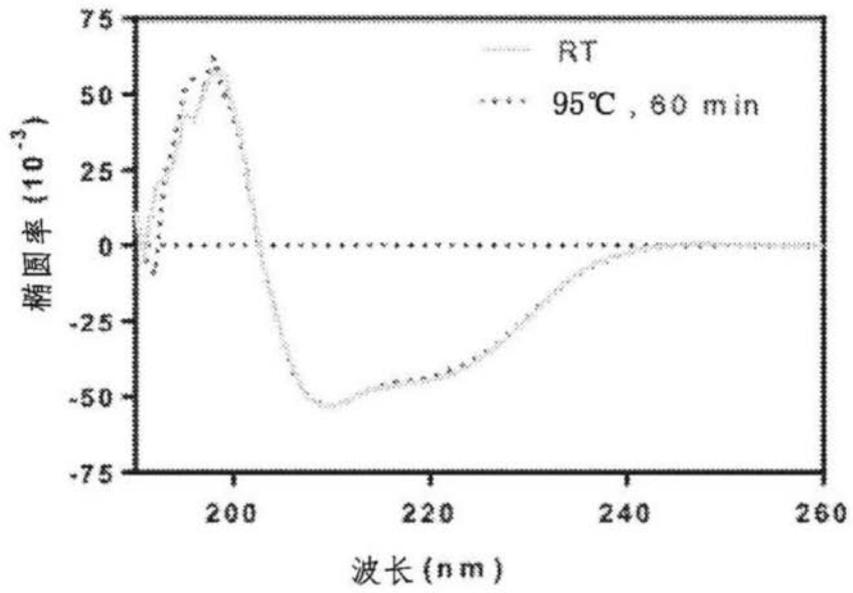


图7

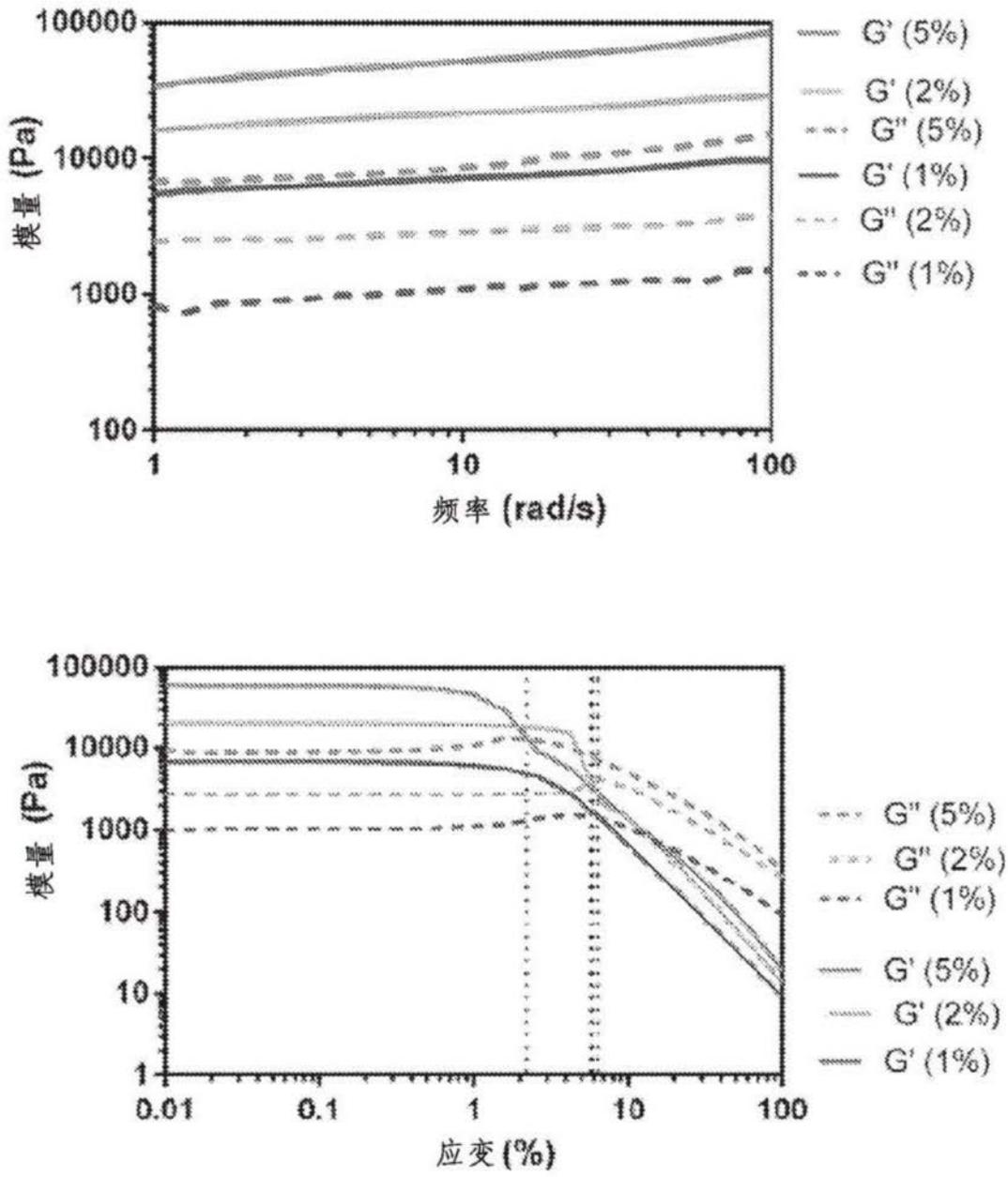


图8

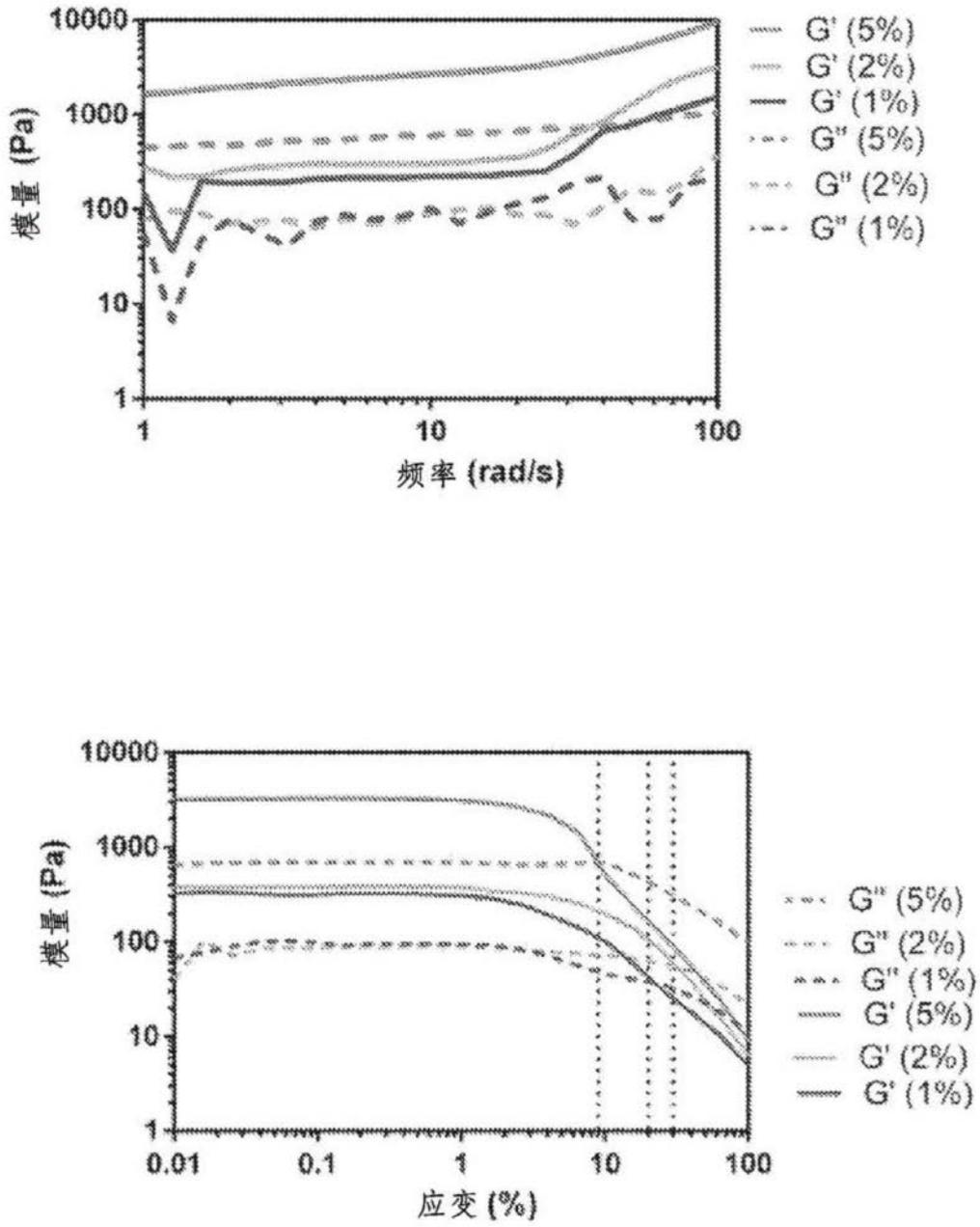


图9

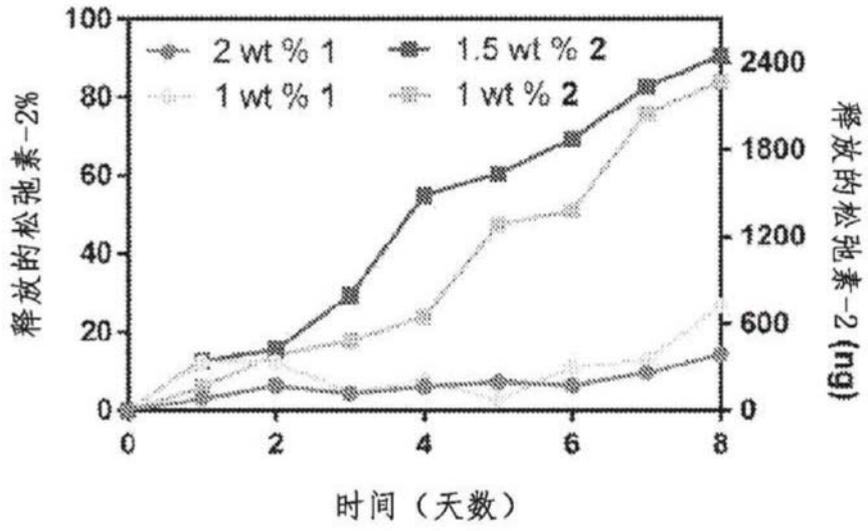


图10

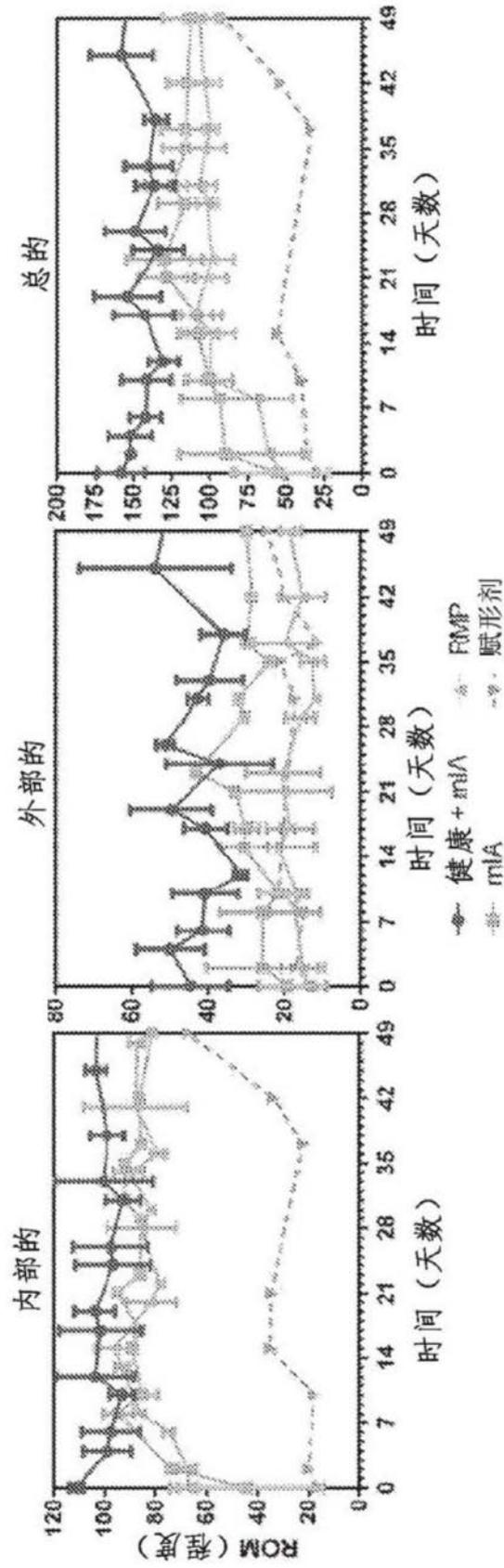


图11

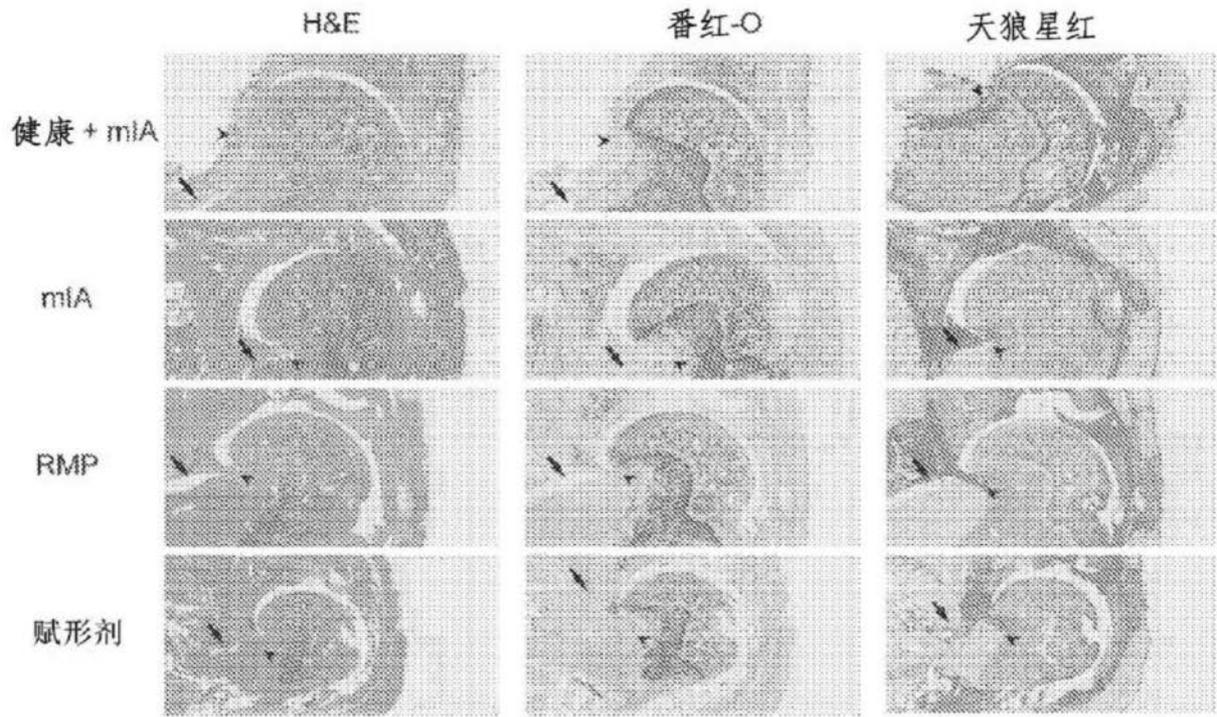


图12

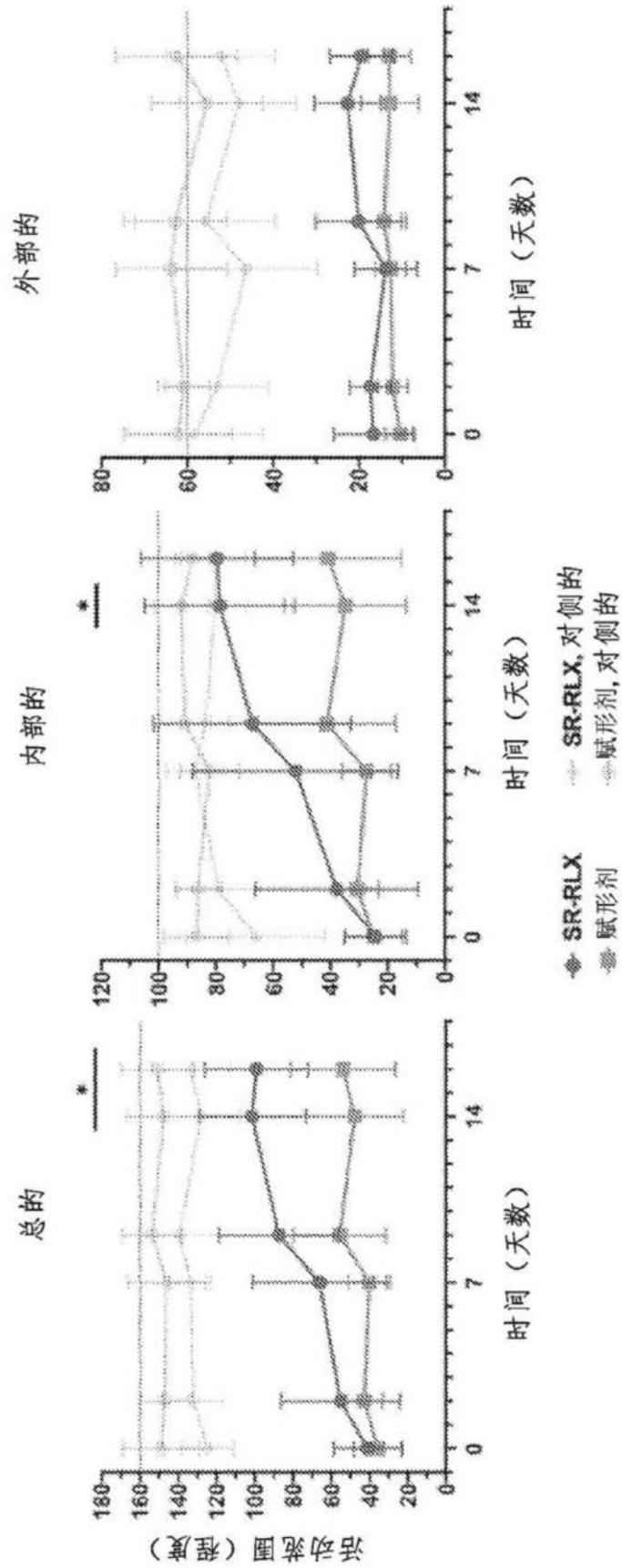


图13