



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107296793 A

(43)申请公布日 2017. 10. 27

(21)申请号 201710129725.4

(22)申请日 2012.01.04

(30)优先权数据

11150072.4 2011.01.04 EP

11183487.5 2011.09.30 EP

(62)分案原申请数据

201280011787.0 2012.01.04

(83)生物保藏信息

NCTC 13536 2010.12.03

(71)申请人 阿尔西维尔法尔玛公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 佩尔·乔娜·卡唐娜·伊杰勒塞斯

伊莎贝尔·艾玛特·里拉

布兰卡·雷耶斯 艾瑞德纳·瑟格

梅尔斯·艾玛特

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 39/04(2006.01)

A61P 31/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书29页 附图16页

(54)发明名称

适于治疗或预防结核的脂质体制剂

(57)摘要

本发明提供了适于治疗或预防结核的脂质体制剂,包含结核分枝杆菌复合群菌株之片段的脂质体制剂,还提供了结核分枝杆菌复合群菌株,其片段可掺入选定的所述脂质体制剂的实施方案中。本发明还提供了包含所述脂质体制剂的悬液和药物组合物。此外,公开了脂质体制剂的用途,其用于治疗人或动物体的方法,特别是用于治疗或预防结核的方法,例如预防潜伏期结核或预防结核,并任选地用于联合治疗中。本发明的制剂含有蔗糖并且/或者平均粒度低于结核治疗的基于脂质体的常规药剂,导致更高的生物利用度和效力。

1. 脂质体制剂,其包含:
 - (a) 来自结核分枝杆菌菌株的片段,
 - (b) 脂质体形成剂,
 - (c) 2至12% (w/v) 的蔗糖,更优选3至8% (w/v) 的蔗糖,最优选4至6% (w/v) 的蔗糖,其中颗粒的z-平均尺寸为120nm或更小。
2. 权利要求1的脂质体制剂,其中所述颗粒的z-平均尺寸为40至110nm,更优选55至95nm。
3. 权利要求1或2中任一项的脂质体制剂,其中所述脂质体制剂为乳剂,并且其中颗粒的z-平均尺寸优选小于40nm。
4. 前述权利要求中任一项的脂质体制剂,其中颗粒的多分散性指数为0.4或更小,优选0.3。
5. 前述权利要求中任一项的脂质体制剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是2010年保藏于伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。
6. 前述权利要求中任一项的脂质体制剂,其还包含
 - (d) 表面活性物质,和/或
 - (e) 一种或更多种非离子型表面活性剂。
7. 前述权利要求中任一项的脂质体制剂,其中所述结核分枝杆菌细胞的片段是细胞壁片段或者包含细胞壁片段。
8. 权利要求6的脂质体制剂,其中(a)与(d)的比值为0.05:1至1:5 (w/w)。
9. 前述权利要求中任一项的脂质体制剂,其中所述脂质体形成剂是氢化的、部分氢化的或非氢化的磷脂,优选卵磷脂,最优选大豆卵磷脂。
10. 权利要求6至8中任一项的脂质体制剂,其中所述表面活性物质选自胆酸盐、脱氧胆酸盐、胆固醇和胆固醇琥珀酸单酯。

适于治疗或预防结核的脂质体制剂

[0001] 本申请是申请日为2012年1月4日的中国专利申请201280011787.0 (PCT/EP2012/050080)的分案申请。

[0002] 引言和背景技术

技术领域

[0003] 本发明提供了包含来自结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) 复合菌株的脂质体制剂,以及包含这些制剂的悬液和药物组合物及其在治疗方法(特别是治疗或预防结核)中的相应用途。本发明的制剂含有蔗糖 和/或平均颗粒尺寸低于结核治疗的基于脂质体的常规药剂,导致更高的生物利用度和效力。

背景技术

[0004] 结核是由结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis*-complex, MTB-C, 其包括分枝杆菌*M.tuberculosis*、*M.bovis*、*M.microti*和*M. africanum*) 杆菌导致的慢性感染性疾病。分枝杆菌细胞包膜的主要独特特征是厚且为蜡质的细胞壁。细胞壁屏障的特性还促进该生物的胞内存活, 这是通过作为宿主与MTB-C杆菌之间免疫反应的直接调节剂来实现的。包膜由两个不同部分组成:质膜,及其周围的壁。细胞壁是由共价连接的 肽聚糖结构形成的骨架,具有通过磷酸二酯键附着的支链多糖——阿拉伯 半乳聚糖。阿拉伯半乳聚糖的远端被高分子量脂肪酸(分枝菌酸,具有分枝菌的独特大小和结构)酯化。

[0005] 据世界卫生组织称,全世界每年有9,000,000例人感染该疾病的新病例记录在案,约2,000,000人死亡。全世界的感染人数被认为超过 2,700,000,000,每年又产生九百万至一千万的新感染。

[0006] 本领域中已经描述了多种基于有毒力或无毒力分枝杆菌菌株细胞壁片段的针对结核的疫苗。目前用于对结核进行预防性处理的疫苗是基于称为BCG(卡介苗,*M.bovis*的一种减毒变体)菌株的细菌。还已知,疫苗组合物中使用的佐剂能极大地影响其有效性。

[0007] 海藻糖分枝菌酸酯(特别是海藻糖二分枝菌酸酯)是结核分枝杆菌提取物中最具生物活性的脂质,其诱导影响肉芽肿形成的促炎性级联。应该指出,关于结核分枝杆菌细胞壁中这些化合物的存在量,并没有生物学数据。来自该物种的任何样品都具有高度生物复杂性。因此,为了实施定量分析,将需要激进的、复杂的并且漫长的纯化步骤,导致用于进行进一步结构分析的纯化化合物的量过低。这正是没有关于结核分枝杆菌细胞壁中每种化合物确切百分比的已公开数据的原因。一些糖脂是MTB-C细胞的典型组分,例如脂阿拉伯甘露聚糖。脂阿拉伯甘露聚糖与MTB-C毒力有关。

[0008] E.Ribi et al.,*Nature* 1963,198,1214-1215页描述了用包含无毒力卡介苗(BCG)菌株细胞壁片段和矿物油的组合物进行的免疫测定。所述片段通过在矿物油中对所述菌株的培养物进行匀浆而获得。该组合物比常规疫苗(BCG)更有效。尽管如此,同一文章中还描述了所述细胞壁片段当在水中匀浆并且不存在矿物油时不诱导免疫应答。

[0009] D.P.Pal et al.,*Indian J.Med.Res.*1977,65,340-345页描述了用有毒力的

H37Rv菌株的细胞壁片段和矿物油制备的疫苗。在这种情况下,细胞壁片段通过在水相中对死细胞进行匀浆而获得,然后向组合物中加入矿物油。还描述了,在水相中匀浆的细胞壁片段无免疫原性,必须存在矿物油才能使疫苗有效。

[0010] G.K.Khuller et al.,*Folia Microbiol.*,1992,37,407-412页描述了结核分枝杆菌的无毒力H37Ra菌株的细胞壁的不同级分的保护性效力,所述级分与弗氏不完全佐剂(也包括矿物油)配制在一起。

[0011] E.M.Agger et al.,*Scand.J.Immunol.*,2002,56,443-447页描述了包含有毒力的H37Rv菌株的细胞壁片段的疫苗,其在包含阳离子型表面活性剂二甲基双十八烷基溴化铵作为佐剂的情况下有效。还描述了,用不包含所述佐剂的匀浆结核分枝杆菌进行的测定在小鼠模型中不产生针对结核的抗性水平。

[0012] I.M.Orme *Vaccine*,2006,24,2-19页是一篇结核疫苗的综述文章,其描述了,基于常规卡介苗(BCG)的疫苗在为成年人提供针对结核的保护中基本无效。

[0013] 可能受益于涉及结核的治疗或预防的个体可分为以下亚组:

[0014] (I) 未接触该疾病的个体。预防性疫苗接种可防止这些个体发生感染。

[0015] (II) 已接触该疾病但尚未感染的个体。皮肤结核菌素测试(TST)为阴性。初级预防(primary prophylaxis)能防止这些个体发生感染。

[0016] (III) 具有潜伏期结核的未发病的个体。可通过施用化学治疗来降低疾病爆发的风险。化学治疗还提供了使这些个体基本停止作为高风险感染源的优点。

[0017] (IV) 患病个体,即患有该疾病,通常是该疾病的原发形式,但没有或基本没有传染性。化学治疗避免这些个体变成传染性。

[0018] 感染开始后,本领域描述了多种用于在感染个体(即具有潜伏期结核的个体)中防止发生活动性结核的治疗。

[0019] 例如,在专利申请EP2196473 A1中描述了,为了治疗感染个体中的结核可以在长至数月的时间中向尚未发病以及已经发病的个体施用多种药物,包括异烟肼。

[0020] 在专利申请ES 2231037 A1中描述了免疫治疗剂,其包含结核分枝杆菌复合群(MTB-C)的有毒力菌株的细胞片段,用于制备与其他药物(如异烟肼或利福霉素)联合用于治疗感染个体中的结核的药物。该专利申请还描述了用于制备包含MTB-C菌株之细胞壁片段的免疫治疗剂的方法。

[0021] 如WO 2010/031883 A1所指出,潜伏期结核感染的传播主要通过吸入被结核分枝杆菌感染的气溶胶而发生。因此,与患肺结核并因此能够散播感染气溶胶的患者直接接触的人(例如与他们住在一起或者有任何类型的充分或频繁接触的人)被认为是风险群体。

[0022] 因此,通常向I组个体(见上文)施用的感染初级预防是基于每天施用5mg/kg剂量的异烟肼(不超过300mg/天)的初级化学预防。该处理适用于与感染个体住在一起和/或任何类型密切接触的任何年龄的所有TST阴性个体。在这种情况下,化学预防需要在停止接触感染源后或感染源不具有感染性后维持三个月。然而,化学预防在一些情况下可导致继发性的不良效果,如Martínez et al.,*Arch.Bronchoneumol.*,2005,41(1),27-33所述。

[0023] 包含有毒力结核分枝杆菌复合群(MTB-C)片段的药物已经描述于例如EP1690549 B1、EP2090318 A1和PCT/ES2009/000436。EP2090318 A1和PCT/ES2009/000436描述了包含有毒力结核分枝杆菌复合群(MTB-C)片段的药物组合物,其作为适于预防性防止结核(任

选地与其他药物组合)的药物。另一方面,EP1690549 B1描述了适于治疗结核的药物组合物,其包含任选地与其他药物组合的MTB-C片段。

[0024] 专利申请EP 2090318 A1中报道,施用包含基于有毒力MTB-C菌株 细胞壁片段之药剂的药物能够诱导针对结核分枝杆菌特异性抗原的产生干扰素- γ 的Th1型应答。所述抗原包括Ag85B和Ag85A,它们是复合体 Ag85的部分,后者由一系列低分子量蛋白组成,这些蛋白在细胞壁的生物合成中发挥决定作用,并且在细菌培养处于指数生长(log)期时以可观的量产生。EP 2090318 A1还报道了,基于常规卡介苗(BCG)的疫苗不产生针对复合体Ag85的免疫保护应答。特定淋巴细胞产生的干扰素- γ 发挥关键作用:它使得感染的巨噬细胞能够终止杆菌的生长(North&Young, Ann.Rev.Immunol.,2004,22:599-623)。

[0025] 世界卫生组织认识到,与无HIV感染的人相比,患有HIV的人发生结核(TB)的风险估计要高20-37倍。“Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings”WHO Guidelines 2011,ISBN:978 92 4 150070 8)中给出了概况。然而,异烟肼预防性治疗不是会为HIV阳性个体提供持久保护的疫苗接种。相反,异烟肼必须定期施用,并且异烟肼抗性也降低了该疗法。因此,仍然需要提供用于HIV阳性人受试者的强有力的预防和治疗性处理。

[0026] 发明目的

[0027] 本发明的目的是提供改进的药剂,其在HIV阳性和HIV阴性人受试者中都适于预防或治疗结核,例如预防潜伏期结核、初级预防和/或治疗潜伏期或活动性结核。另一个目的是提供适于制备所述药剂的MTB-C菌株。制备该药剂的方法是本发明的另一个目的。

[0028] 定义

[0029] “FCMtb”代表来自结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片段。

[0030] 如果没有另外指明,则“颗粒尺寸”(亦称“粒度”)指颗粒的直径。当颗粒尺寸无法准确测定时,则指近似颗粒尺寸。

[0031] “z-平均”是如“材料和方法”章节中所述测定的平均颗粒尺寸。

[0032] 缩写

[0033] AIDS 获得性免疫缺陷综合征

[0034] BCG 卡介苗

[0035] CFU 集落形成单位

[0036] DP 药物产品

[0037] DS 药物物质

[0038] ELISA 酶联免疫吸附测定

[0039] ELISPOT 酶联免疫点测定

[0040] EMEA 欧洲药品管理局

[0041] FCMtb 结核分枝杆菌细胞的片段

[0042] FIM 首次在人中

[0043] HIV 人免疫缺陷病毒

[0044] IFN- γ 干扰素 γ

[0045] IGTIP Germans Trias i Pujol的卫生科学研究所

[0046]	IMP	研究性药物产品
[0047]	IPC	过程控制(In process controls)
[0048]	LCS	脂质体浓缩物悬液
[0049]	LTBI	潜伏期结核感染
[0050]	LPS	脂多糖
[0051]	Mtb	结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)
[0052]	Mtb	结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis- complex)
[0053]	NZB	新西兰黑
[0054]	NZW	新西兰白
[0055]	PPD	蛋白纯化衍生物
[0056]	q.s.	适量
[0057]	TB	结核
[0058]	TST	结核皮肤测试
[0059]	WHO	世界卫生组织
[0060]	w/v	重量/体积
[0061]	w/w	重量/重量

发明内容

[0062] 本发明提供了脂质体制剂,其包含来自结核分枝杆菌复合群(MTB- C)菌株的片段(FCMtb)和脂质体形成剂。

[0063] 在一个具体实施方案中,颗粒的z-平均尺寸(通过动态光散射测定)为120nm或更小,优选110nm或更小,更优选95nm或更小,最优选80 nm或更小。在一个备选实施方案中,所述脂质体制剂包含1-20% (w/v)的蔗糖,优选2-12% (w/v)的蔗糖,更优选3-8% (w/v)的蔗糖,最优选4- 6% (w/v)的蔗糖。重要的是要注意,尽管这两个实施方案的每一个都可以独立实现,但这些实施方案不视为互斥的,而是完全可以组合。

[0064] 在一个具体实施方案中,上述脂质体制剂的z-平均颗粒尺寸为40-120 nm,优选50-110nm,更优选55-95nm,最优选55-80nm。

[0065] 在另一个具体实施方案中,上述脂质体制剂的平均颗粒尺寸可以更 小,使得该脂质体制剂为乳剂,即,该具体实施方案中颗粒的z-平均尺寸 优选小于40nm。

[0066] 在上述实施方案中任何一种或更多种的优选实施方案中,所述脂质体 制剂是颗粒多分散性指数为0.4或更小(优选0.3或更小)的脂质体制 剂。

[0067] 在任何上述实施方案的一个更优选实施方案中,所述结核分枝杆菌复 合群(MTB- C)菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。

[0068] 在任何上述实施方案中,还优选(a)所述来自结核分枝杆菌复合群 (MTB-C)菌株的片段与(b)所述脂质体形成剂之间的比例为0.01:1至 1:1,优选0.06:1至0.1:1。

[0069] 在任何上述实施方案的一个更优选实施方案中,所述脂质体制剂还包 含:(d)表面活性物质(tensioactive agent)。在一个甚至更优选的实施方案 中,包含(d)表面活性物质的脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中(a)与(d) 的比值为0.1:1至10:1 (w/w),优选0.5:1至2:1 (w/w),最优选0.6:1至 0.8:1 (w/w)。

[0070] 在上述实施方案的一个具体实施方案中,所述脂质体制剂中的脂质体形成剂是磷脂,优选卵磷脂,更优选选自卵磷脂或大豆卵磷脂,最优选大豆卵磷脂,其中每一种都可以是氢化的,部分氢化的或非氢化的。

[0071] 在含有表面活性剂的脂质体制剂的一个优选实施方案中,所述表面活性物质选自胆酸盐、脱氧胆酸盐、胆固醇和胆固醇琥珀酸单酯(cholesterol hemisuccinate)。

[0072] 在一个更优选的实施方案中,上述脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中MTB-C细胞的片段是细胞壁片段或者包含细胞壁片段。

[0073] 在另一个更优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含MTB-C菌株 NCTC 13536的片段,该菌株的保藏编号为NCTC 13536,保藏单位代码为 NCTC-国家典型培养物保藏中心,保藏日期为2010年12月3日,保藏单位地址为英国伦敦科林代尔大街健康保护机构,分类命名为 *Mycobacterium tuberculosis* strain RUT1。该菌株也称为511,因此NCTC 13536和511这两种名称可互换使用。

[0074] 在一个甚至更优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含以下的至少两项,优选三项,更优选四项,最优选全部:

[0075] (i) 第一多肽,其分子量为约70kDa,与结核分枝杆菌HSP70蛋白 (Rv 0350)的质量指纹图谱相似,

[0076] (ii) 第二多肽,其分子量为约38kDa,与结核分枝杆菌38kDa蛋白 (Rv 0934)的质量指纹图谱相似,

[0077] (iii) 第三多肽,其分子量为约30kDa,与结核分枝杆菌Ag85B蛋白 (Rv 1866c)的质量指纹图谱相似,和

[0078] (iv) 第四多肽,其分子量为约10kDa,与结核分枝杆菌CFP10蛋白 (Rv3874)的质量指纹图谱相似,和

[0079] (v) 第五多肽,其分子量为约6kDa,与结核分枝杆菌ESAT-6蛋白 (Rv3875)的质量指纹图谱相似。

[0080] 在另一个更优选的实施方案中,所述脂质体制剂包含分子量约19kDa的脂多肽,其与与结核分枝杆菌19kDa脂蛋白抗原前体LpqH (Rv 3763) 的质量指纹图谱相似。

[0081] 甚至更优选地,上述脂质体的特征还在于存在以下结核分枝杆菌抗原的至少一种或其片段:HSP70、38kDa蛋白和Ag85B。这里的“片段”是指任何这些多肽的任何部分,例如降解产物。

[0082] 在一个更优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含通常可见于结核分枝杆菌中的脂质或其衍生物,例如缀合产物如糖缀合脂质。还优选的是,包含一种或更多种分枝菌酸,优选I、III或IV型中的任何一种或更多种。作为替代或补充,该制剂中可包含糖缀合的分枝菌酸酯,优选海藻糖二分枝菌酸酯。作为替代或补充,还优选的是,本发明的脂质体制剂中存在至少一种MTB-C衍生糖脂,一种优选的糖脂是脂阿拉伯甘露聚糖。

[0083] 上述脂质体制剂还可包含一种或更多种表面活性剂,其优选来自非离子型表面活性剂组。

[0084] 在另一个优选的实施方案中,前述任一权利要求的脂质体制剂还包含一种或更多种盐或其溶液,其中优选的盐是氯化钠。

[0085] 在任何上述实施方案的一个甚至更优选的实施方案中,本发明的脂质体制剂是

冻干的。

[0086] 本发明还提供悬液,其中任一前述权利要求的脂质体制剂重构于溶剂中。在一个优选的实施方案中,该悬液的溶剂是含水溶剂,优选是生理血清或者包含生理血清。

[0087] 本发明还提供药物组合物,其包含上述任何一个或更多个实施方案所述的脂质体制剂或者上述任何一个或更多个实施方案所述的悬液,以及可药用载体或稀释剂或赋形剂,其中可以施用任何适于作为载体、稀释剂或赋形剂的物质。在其一个优选实施方案中,该药物组合物还包含可药用佐剂。

[0088] 本发明还提供用于治疗人或动物体的方法中的产品。即,提供上述任何一个或更多个实施方案的脂质体制剂、上述任何一个或更多个实施方案的悬液或上述任何一个或更多个实施方案的药物组合物,其用于治疗人或动物体的方法中。在一个具体实施方案中,本发明提供用于注射的该脂质体制剂、悬液或药物组合物。在另一具体实施方案中,本发明提供用于结核治疗或预防方法中的该脂质体制剂、悬液或药物组合物。这些具体实施方案可以单独或组合实现。

[0089] 在一个更具体的实施方案中,本发明提供上文就其在人体治疗方法中的用途描述的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其特征还在于,其用于以包含1至1000、优选3至250、更优选4至80、最优选约5、约25或约50 μ g/剂FCMtb的剂量施用于人体。

[0090] 在又三个具体实施方案中(a)至(c)中,上文就其在人体治疗方法中的用途描述的脂质体制剂、悬液或药物组合物是(a)用于在具有潜伏期结核感染的个体中预防活动性结核的方法中,(b)用于结核初级预防方法中,以防止已接触疾病单尚未感染的个体发生感染,或(c)用于治疗或预防潜伏期结核的方法中。

[0091] 上述脂质体制剂、悬液或药物组合物用于人或动物体治疗方法的一个优选实施方案是其用于联合治疗或辅助治疗(adiunctive therapy)中。辅助治疗是与首要治疗(primary treatment)结合的额外治疗或第二治疗,其提高治疗疾病的有效性。联合治疗的一个具体实施方案是这样的,其中所述联合治疗包含抗生素,优选异烟肼和利福霉素中的一种或更多种,其中安沙霉素是最优选的利福霉素。在本发明的一个具体实施方案中,辅助治疗适用于HIV阳性人受试者,优选25 μ g FCMtb的单剂量。

[0092] 本发明还提供用于制备任何所述药剂(所述脂质体制剂、悬液或药物组合物)的方法。

[0093] 本发明还提供2010年保藏于伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

[0094] 发明详述

[0095] 本发明提供脂质体制剂,其包含来自结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片段(FCMtb)和脂质体形成剂。

[0096] 除非另外指明,否则本申请上下位中使用的术语“包含”均表示除了以“包含”引入的成员列表之外还可任选地包含其他成员。但是,作为本发明的一个具体实施方案,术语“包含”也包括不存在其他成员的可能性,即对于该实施方案而言,“包含”应理解成具有“由……组成”的含义。

[0097] 本发明详述公开了本发明各个特征的具体和/或优选变化方案。作为特别优选的实施方案,本发明还考虑通过将针对本发明两个或更多特征描述的两个或更多个具体和/或优选变化方案组合而产生的那些实施方案。

[0098] 公认的是,脂质体形成(liposoformation)过程产生脂质环境,提高溶解度并产生物质(如FCMtb)的悬液。本发明意义上的脂质体可以是单层的、多层的或其组合。

[0099] FCMtb可以是来自MTB-C菌株的任何类型的物质,其中来自蛋白质和/或脂质的片段是优选的。本申请意义上的FCMtb通常是来自MTB-C细胞的不同蛋白质抗原和脂质的混合物。细胞片段可通过本领域技术人员已知的任何适于破碎微生物或细菌细胞(例如特别是MTB-C细胞)的方法(如匀浆)来获得。匀浆可通过超声处理来进行,或通过直径约0.1mm的小珠(例如二氧化硅或氧化锆/二氧化硅珠)与机械匀浆机一起使用来进行。可以使用的机械匀浆机例如BioSpec **BeadBeater**®型。通过这种匀浆过程破碎MTB-C细胞,从而获得小的细胞片段,通常包括小细胞壁片段。细胞片段制造中的特别重要的特征是通过脱脂作用对细胞壁片段进行“脱毒”,脱脂作用是本领域技术人员熟知的允许除去内毒素样分子的方法。因此,优选对FCMtb进行脱毒和巴氏消毒,其后所得的脂质体制剂是无菌并无内毒素的。细胞片段在缓冲液中的分散体可以任选地冻干,以利于其保存。为此,将分散体分配到瓶中并在约-15℃至-120℃的温度(例如-45℃)下以真空(例如0.1至0.5mbar)冻干。

[0100] 本发明的脂质体的尺寸分布通常为至少99.9%(以数量计)小于1 μm。在一个具体实施方案中,颗粒的z-平均尺寸(通过动态光散射测定的)为120nm或更小,优选110nm,更优选110nm或更小,更优选95 nm或更小,最优选80nm或更小。在动态光散射中,z-平均参数被认为是可通过该技术获得的稳定且重要的数字,以及优选用于质量控制目的的尺寸数字。优选地,本发明制剂中的脂质体是单峰(monomodal)的,即,它们在动态光散射测定中仅显示一个峰。更优选地,本发明制剂中的脂质体是球状的,这可通过对该脂质体制剂的冷冻破碎制备物进行电子显微术来测试,如实施例9所示。由此,球状是指对于至少90%的脂质体颗粒(以数目计)而言,各个颗粒的所有表面点距离脂质体的中心都具有相似或相同的距离,即,这种颗粒的最小半径与同一颗粒的最大半径相比关系为0.6或更高,0.7或更高,0.8或更高或0.9或更高。本发明的脂质体制剂可包含多层或单层脂质体或其混合物。与本领域技术人员的标准知识一致,动态光散射测量应在合适的缓冲液(即本身不导致脂质体破碎、崩解或融合以任何方式使它们显著不稳定的缓冲液)中进行。根据经验,任何缓冲液都可以是合适的,只要离子强度和pH值都与形成所述脂质体的缓冲液相当。优选地,使用与形成所述脂质体的缓冲液在组成上相似或相同的缓冲液。

[0101] 在另一实施方案中,脂质体制剂还包含1-20%(w/v)的蔗糖,优选2-12%(w/v)的蔗糖,更优选3-8%(w/v)的蔗糖,最优选4-6%(w/v)的蔗糖。约5%的蔗糖是特别优选的。

[0102] 重要的是要注意,尽管这些实施方案(一个涉及具体的颗粒尺寸,另一个涉及蔗糖的存在情况)的每一个都可以独立实现,但这些实施方案不视为互斥的,而是完全可以组合。

[0103] 在一个具体实施方案中,上述脂质体制剂的z-平均颗粒尺寸为40-120 nm,优选50-110nm,更优选55-95nm,最优选55-80nm。z-平均颗粒尺寸优选通过动态光散射测定,如上文的一般描述和下文“材料和方法”章节中的详细描述。

[0104] 在另一个具体实施方案中,上述脂质体制剂的z-平均颗粒尺寸可以更小,使得该脂质体制剂为乳剂,即,该具体实施方案中颗粒的z-平均尺寸优选小于40nm。

[0105] 在上述实施方案中任何一种或更多种的优选实施方案中,本发明制剂中的脂质

体还是单分散的,这意味着观察不到显著的尺寸分布宽度。这在技术上通过以动态光散射测定的低多分散性指数(PDI)来测试,如0.4或更小,优选0.3或更小。因此,所述脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中通过动态光散射测定的颗粒多分散性指数为0.4或更小,优选0.3或更小,最优选0.25或更小。

[0106] 来自结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片段可通过包含上游方法和下游方法的方法获得。出于举例目的,本文简要描述了五个主要步骤,实施该方法的具体模式在下文实施例2和3给出。

[0107] 上游方法(实施例2):

[0108] 步骤1:培养结核分枝杆菌,

[0109] 步骤2:收获结核分枝杆菌并冷冻粗提取物。

[0110] 下游方法(实施例3):

[0111] 步骤3:细胞破碎和脱脂,

[0112] 步骤4:巴氏消毒,

[0113] 步骤5:冻干(任选的)。

[0114] 在任何上述实施方案的一个更优选实施方案中,所述结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。毒力是指致病性和/或杆菌侵入宿主组织的能力。所述有毒力菌株可以是属于MTB-C物种的任何有毒力菌株,但属于结核分枝杆菌的菌株是优选的。本发明的MTB-C菌株可通过接种在本领域技术人员熟知的培养基(如Middlebrook 7H10或7H11琼脂、Sauton's培养基或Proskauer-Beck培养基)中进行培养。所述有毒力菌株的培养优选在长时间中进行,例如等于或大于3周的时间,优选3周至4周。培养温度优选维持在34℃至38℃。培养结束后,使用本领域技术人员熟知的技术(如专利申请ES2231037-A1中描述的那些)收获和分离细胞。

[0115] 脂质体制剂中的脂质体剂优选是氢化的、部分氢化的或非氢化的磷脂。所用磷脂可以是(或包含)例如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇。最典型的是磷脂酰胆碱,它可以是合成的或分离自多种天然来源。优选地,所述脂质体形成剂是(或包含)卵磷脂(lecithin),其选自蛋卵磷脂(egg lecithin)和大豆卵磷脂(soy lecithin)。大豆卵磷脂是磷脂(尤其是包括磷脂酰胆碱)的混合物,并且是特别优选的。还可包含在所述制剂中(作为脂质体形成剂本身或者作为其他组分)的典型脂质是磷酸二鲸蜡酯(DCP)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、磷脂酰胆碱(PC)和/或磷脂酰丝氨酸(PS),其中每种脂质可以是氢化的,部分氢化的或者非氢化的。所述脂质体可使用本领域技术人员熟知的辅助脂质(auxiliary lipids)和技术(如专利申请ES2231037-A1中所述)形成。

[0116] 还优选的是,在任何上述实施方案中,(a)结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片段与(b)脂质体形成剂的比值为0.01:1至1:1,优选0.06:1至0.1:1。

[0117] 在任何上述实施方案的一个更优选实施方案中,所述脂质体制剂还包含:(d)表面活性物质。通常,所有类型的能够改变表面张力值的试剂都可用作本发明意义上的表面活性物质,但要排除的是落入上文给出的脂质体形成剂定义之中的化合物。有多种类型的表面活性物质为本领域技术人员所知,并可用于本发明的脂质体制剂中。如本领域技术人

员所知,表面活性物质通常是具有极性-非极性结构的化合物。不希望受限于任何特定理论,表面活性物质通常具有定位于颗粒表面的倾向,由此在界面上产生降低表面张力值的单分子层。在含有表面活性剂的脂质体制剂的一个优选实施方案,表面活性物质选自固醇及其衍生物,例如胆固醇,和或胆汁盐(bile salt),例如胆酸盐(cholate)。特别优选的实施方案是其中表面活性物质选自胆酸盐、脱氧胆酸盐、胆固醇和胆固醇琥珀酸单酯。实施本发明的一个优良(但非限制性)的模式是其中制剂的脂质体同时包含大豆衍生的卵磷脂和胆酸钠。

[0118] 在一个甚至更优选的实施方案中,包含(d)表面活性物质的脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中(a)与(d)之间的比值为0.05:1至3:5(w/w)。如本领域技术人员所熟知,可以使用多种类型的脂质体形成剂。

[0119] 脂质体可任选地含有提高其稳定性的添加剂,例如维生素E,其据信发挥脂质体抗氧化剂作用。

[0120] 在一个更优选的实施方案中,上述脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中MTB-C细胞的片段是(或包括)细胞壁片段。

[0121] 可以使用任何属于MTBC的菌株,优选任何属于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的菌株。在另一个更优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含2010年保藏于伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536的片段(实施例1)。另一个可以使用(因此在脂质体制剂中包含其片段)的菌株称为H37Rv,其可得自例如英国伦敦国家典型培养物中心(NCTC)(保藏号NC007416),并且经常为本领域研究者使用。还可以使用多于一种菌株,即,脂质体制剂包含多种(例如两种、三种或多于三种)菌株的片段。

[0122] 考虑到结核分枝杆菌包含约4000种推定抗原,针对全部这些蛋白来分析药物物质是不可能的。尽管如此,某些MTB-C蛋白已经显示出与期望的免疫应答相关。它们是近似大小为6、10、30、38和70kDa的五个蛋白质条带(Renshaw, et al., 2005, EMBO Journal 24, 2491-2498; Singh, et al., 2005, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(2), 354-358)。因此,在一个甚至更优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含以下的至少两项,优选三项,更优选四项,最优选全部:

[0123] (i) 第一多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约70kDa,其中所述第一多肽的质量指纹图谱(mass fingerprint)与结核分枝杆菌HSP70蛋白(Rv 0350)的质量指纹图谱相似,

[0124] (ii) 第二多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约38kDa,其中所述第二多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌38kDa蛋白(Rv 0934)的质量指纹图谱相似,

[0125] (iii) 第三多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约30kDa,其中所述第三多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌Ag85B蛋白(Rv 1866c)的质量指纹图谱相似,和

[0126] (iv) 第四多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约10kDa,其中所述第四多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌CFP10蛋白(Rv3874)的质量指纹图谱相似,和

[0127] (v) 第五多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量

为约6kDa,其中所述第五多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌ESAT-6蛋白(Rv3875)的质量指纹图谱相似。

[0128] 在另一个更优选的实施方案中,所述脂质体制剂还包含分子量(在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量)约19kDa的脂多肽,其中所述脂多肽与结核分枝杆菌19kDa脂蛋白抗原前体LpqH(Rv 3763)的质量指纹图谱相似。相应条带可通过本领域已知方法(如银染)来显现。本发明的研究者意想不到地发现,该多肽诱导高全IgG体液应答,其可以是制剂的全部抗原中最高的体液应答。

[0129] 如何鉴定多肽或脂多肽的实例在实施例4中给出。

[0130] 甚至更优选地,上述脂质体制剂的特征还在于存在以下结核分枝杆菌抗原的至少一种或其片段:HSP70、38kDa蛋白和Ag85B,最优选HSP70、38kDa和Ag85B中至少之一。这里的“片段”是指任何这些多肽的任何部分,例如降解产物。可以使用多种方法获得这些片段,例如化学或酶水解,由此,破碎是否有意发生、在脂质体形成之前或之后发生并不重要。优选的是,相应片段可以归因于其相应来源,例如由于氨基酸序列显著重叠,例如至少5、至少10、至少20个连续氨基酸。

[0131] 本发明的片段优选得自在饥饿、低氧和低pH胁迫条件下培养的杆菌。低氧是由于在培养期(例如21天)中密封在气密袋中的平板上细菌的生长,导致微氧环境。低pH的解释如下:培养开始时pH值为7.0-6.8,结束时(通常在培养21天后),pH值为6.4-6.5。在这些条件下,细菌的代谢较慢,导致稳定生长。应该理解,这使得杆菌对胁迫的抗性更高。在这些条件下,培养的杆菌产生与LTBI(潜伏期结核感染)中体内潜伏期杆菌相似的特征。因此,预计FCMt_b中存在的抗原会触发针对潜伏期杆菌之抗原(所谓的“结构”抗原)以及胁迫应答相关的抗原的新免疫应答。

[0132] 分枝杆菌糖脂长期以来就被认为具有免疫调节活性,特别是诱导肉芽肿应答和发挥强佐剂样效应。因此,在另一个优选的实施方案中,上述脂质体制剂包含通常可见于结核分枝杆菌中的脂质或其衍生物,例如缀合脂质如糖缀合脂质。已经在结核分枝杆菌样品中鉴定出一些免疫原性脂质组分(Brennan, Tuberculosis (Edinburgh), 2003, 83(1-3), 91-97),并开发了用于其测定的分析方法(电泳、SDS-PAGE、薄层层析)。尽管每种脂质组分的分离将需要如此激进的处理以致于很难获得MTB-C提取物或脂质体制剂中每种可检测组分的定量数据或百分比,但定量表征将用于表征本发明的更优选实施方案。根据这一优选实施方案,包含一种或更多种分枝菌酸,优选属于I、III或IV型中的任何一种或更多种。作为替代或补充,制剂中可包含糖缀合分枝菌酸酯,优选海藻糖二分枝菌酸酯。作为替代或补充,制剂中可包含脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)这种糖脂。此外,相信所述片段的多抗原性质(多抗原性蛋白质混合物加脂质,而不是仅有纯化的抗原)是有利的,因此本领域技术人员能够改动细胞破碎过程以允许获得最佳细胞抗原混合物。

[0133] MTB-C细胞的匀浆在一种或更多种表面活性剂(优选非离子型表面活性剂)存在下进行。因此,上述脂质体制剂还可包含一种或更多种这些表面活性剂。大量这种表面活性剂在本领域技术人员的标准知识中。优选地,所用的非离子型表面活性剂选自乙氧基化烷基酚和乙氧基化山梨糖醇酯。更优选地,所述非离子型表面活性剂选自乙氧基化辛基酚。甚至更优选地,使用具有包含7至8摩尔环氧乙烷含量的乙氧基辛基酚,该表面活性剂以Triton X-114®这一名称销售。对含有细胞壁片段的匀浆物进行常规处理以分离并移

除未破碎细胞和溶解组分。ES2231037-A1描述了例如可以使用不同速度的离心和用缓冲液进行的洗涤。进行上述纯化过程后获得含有细胞壁片段的沉淀。将所述沉淀分散在磷酸盐缓冲液(PBS)中并进行常规处理,以确保在破碎和纯化过程后可能仍保留活力的MTB-C细胞完全失活。所述处理可以是化学处理,例如用甲醛处理,或者是物理处理,例如高压灭菌或巴氏消毒处理。下文实施例5给出了脂质表征的实例。

[0134] 在另一优选实施方案中,上述脂质体制剂还包含一种或多种盐或其溶液,其中优选的盐是氯化钠。

[0135] 在任何上述实施方案的一个甚至更优选的实施方案中,所述脂质体制剂是冻干的。可以对所述脂质体进行冻干以由此获得冻干脂质体形式的免疫治疗剂。为此,可将分散体分配到瓶中并在低温(如约-15℃至-120℃的温度,例如-45℃)下以真空(例如0.1至0.5mbar)冻干。冻干后得到的瓶中含有适于作为免疫治疗剂的脂质体制剂,它们优选保存在极低的温度下,例如-70℃。

[0136] 本发明还提供悬液,其中任一前述权利要求的脂质体制剂重构在溶剂中。在一个优选的实施方案中,该悬液的溶剂是含水溶剂,更优选并且最优选是(或包含)生理血清。将脂质体制剂悬浮在溶剂中的方法为本领域技术人员所熟知。本发明制剂的一个特别有利的特性是,其能够比包含MTB-C片段的常规脂质体制剂更快地悬浮(见实施例9)。

[0137] 本发明的一个目的是提供用于制备药物组合物的包含MTB-C菌株细胞壁片段的药剂,其中所述药剂是(或包含)上文任何所述实施方案中所述的脂质体制剂或其组合。药物物质的药物制剂/盖伦制剂(galenic formulation)的主要范围是获得悬液,其有效性和稳定性足以被细胞充分识别,并具有在人或动物体中触发相关细胞免疫应答的潜力。为此,本发明还提供药物组合物,其包含上述任何一个或更多个实施方案中描述的脂质体制剂或悬液,以及可药用载体、赋形剂或稀释剂。多种这样的载体、赋形剂和稀释剂为本领域技术人员所知,它们绝不受限于本公开内容。相反,任何适于作为载体、赋形剂或稀释剂的物质均可使用。在一个优选的实施方案中,该药物组合物还包含可药用佐剂。由此,佐剂应理解为本发明该实施方案中包含的一种物质,其中所述佐剂是能够在适用于人或动物体时刺激免疫系统应答于靶抗原的物质,其中所述佐剂本身不赋予免疫力。不限于任何具体的佐剂物质,优选的实施方案是其中佐剂是铝盐例如氯化铝,或者矿物油或含有矿物油的组合物例如弗氏不完全佐剂(IFA)或弗氏完全佐剂(CFA),或者卤化铵如溴化烷基铵,例如溴化二甲基双十八烷基铵。

[0138] 本发明还提供用于人或动物体治疗方法的产品。即,提供用于人或动物体治疗方法的任何上述一个或更多个实施方案的脂质体制剂、任何所述一个或更多个实施方案的悬液或任何上述一个或更多个实施方案的药物组合物。

[0139] 所述药物可在粘膜中施用,例如眼、鼻内、口、胃、肠、阴道或尿道的粘膜,或者肠胃外施用,例如皮下、皮内、肌内、静脉内或腹膜内施用。优选肠胃外施用。在一个具体实施方案中,本发明提供用于注射的该脂质体制剂、悬液或药物组合物。

[0140] 在另一具体实施方案中,本发明提供用于结核治疗或预防方法中的该脂质体制剂、悬液或药物组合物。这些具体实施方案可以单独或组合实现。本研究的发明人发现,本发明的制剂导致提高的细胞免疫应答,还控制常见的再感染过程(否则这可在潜伏期结核感染中发生),这是通过加强针对生长中杆菌的免疫力和诱导针对非复制杆菌的免疫力来

实现的。

[0141] 上文就其在人或动物体治疗方法中的用途描述的脂质体制剂、悬液或药物组合物的合适剂量取决于若干参数,包括施用方法和受治者。在一个优选实施方案中,其用于对人体施用。在其一个优选实施方案中,这以1至1000、优选3至250、更优选4至80、最优选约5、约25或约50 μ g/剂 FCMtb的剂量实现。特别优选25 μ g的剂量。

[0142] 在又三个具体实施方案中(a)至(c)中,上文就其在人或动物体治疗方法中的用途描述的脂质体制剂、悬液或药物组合物是(a)用于在具有潜伏期结核感染的个体中预防活动性结核的方法中。在另一更优选的实施方案中,(b)用于结核初级预防方法中,以防止已接触疾病单尚未感染的个体发生感染,或(c)用于治疗或预防潜伏期结核的方法中。

[0143] 用于人或动物体治疗方法中的脂质体制剂、悬液或药物组合物可以单剂量形式施用,或者同以某时间间隔重复而以多剂量(如2、3、4、5或多于5)施用。优选地,以2至5周(优选3至4周)的间隔分开使用两剂。

[0144] 实施例8、10和12是怎样将本发明脂质体制剂施用于人或动物受试者的实例。

[0145] 上述物质的一个优选实施方案是用于联合治疗或辅助治疗的脂质体制剂、悬液或药物组合物。医学从业者经常使用辅助治疗以获得更好的治愈率或针对首要治疗更快的应答。联合治疗或辅助治疗包括使用多于一种药物来治疗人或动物体。联合治疗的第一个具体实施方案是其中所述联合治疗包含抗生素,优选异烟肼和安沙霉素,其中所述安沙霉素最优选是利福霉素。其第二个具体实施方案是其中所述联合治疗包含其他针对结核的预防性疫苗,例如S.H.E.Kaufmann, *Nature Rev. Immunol.*, 2006, 6, 699-704页中提到的那些,例如卡介苗(BCG)疫苗、亚单位疫苗或重组BCG疫苗。第一个和第二个具体实施方案可以组合。

[0146] 在联合治疗或辅助治疗中,这两种(或更多种)物质的施用可以是同时的,或者可以以在时间上分开的两次(或更多次)接种中完成。接种之间的时间甚至可以是若干年。在联合治疗的情况中,接种在时间上分开进行,首先优选施用针对结核的预防性疫苗,随后施用包含有毒力MTB-C菌株之细胞壁片段的药物,其作为先接种疫苗的再刺激剂(加强剂)。在一个实施方案中,仅对人受试者施用单剂量,该剂量优选为25 μ g FCMtb。

[0147] 或者,在辅助治疗中同时使用若干不同治疗策略或处置类型。在本发明的一个具体实施方案中,将辅助治疗施用于免疫系统受损的人受试者(例如患HIV的个体),或者任何由于其他原因而易于感染结核和/或需要这种治疗的个体。辅助治疗中也可以施用异烟肼。此外,辅助治疗可包括施用治疗受损免疫系统(例如治疗HIV感染)的任何药物或药物组合。治疗HIV感染的典型药物是抗病毒药,其非限制性综述可见于“Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents Recommendations for a public health approach:2010年版”,作者:World Health Organization, ISBN: 9789241599764。

[0148] 因此,本发明人为向HIV阳性人受试者提供有效结核保护(如疫苗接种)的需求提供了解决方案。

[0149] 可以通过允许检测待测个体体液中人免疫缺陷病毒(HIV)——导致获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病毒——存在情况的任何测试来测试个体是被认为HIV阳性与否(即HIV阴性),其中体液通常是选自血清、唾液或尿中的任何一种。这种测试可检测抗体、抗原

或RNA。合适的筛查 测试的概况在Chou et al., Ann. Intern. Med. 2005 Jul 5; 143 (1) :55-73中给出。

[0150] 本发明的发明人意想不到地发现,对HIV阳性人受试者施用的25 μ g FCMtb单剂量提供了强应答。

[0151] 25 μ g FCMtb单剂量在施用于HIV阴性人受试者时也是强有力的。本 发明人显示,这在患有潜伏期结核的受试者中特别有用(实施例12)。因此,本发明的一个优选实施方案是要向HIV阳性或HIV阴性个体施用的 25 μ g FCMtb单剂量。

[0152] 本发明还提供制造方法,其特征在于,该方法适于获得任何上述一个 或更多个实施方案的脂质体制剂以及悬液和包含它们的药物组合物。一个 非限制性实例在下文实施例11中给出。

[0153] 本发明还提供2010年保藏于伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。该菌株具有低遗传多态性。因此,包含NCTC 13536之片段的制剂 由于这种低遗传多态性而具有可重复性极高的优点。

[0154] 实施本发明的优选模式

[0155] 优选的是,使用50 μ g FCMtb/剂或25 μ g FCMtb/剂或5 μ g FCMtb/剂 的具体剂量。例如,剂量为50 μ g FCMtb时,在一瓶制剂中存在表1中给出的量/物质:

[0156]

组分	单位/瓶	功能
药物物质		
FCMtb	66.7 μ g	免疫原
其他组分		
蔗糖	20,000.0 μ g	填充物质 (Charge substance) (冻干)和低温保护剂
大豆卵磷脂 ¹	845.8 μ g	脂质体形成剂
胆酸钠	92.0 μ g	表面活性物质
氯化钠 ²	20.8 μ g	溶剂
颗粒表征		
z-平均颗粒尺寸	75 +/- 20 nm	
多分散性指数	≤ 0.350	

[0157] ¹含有磷脂酰胆碱 (94.0% (w/w))

[0158] ²作为NaCl 0.9%溶液加入。

[0159] 表1.

[0160] 对于25 μ g/剂或5 μ g/剂的施用,准备其他的瓶,其中表1中的所有数字 (除了蔗糖以外) 各自除以2或10。制剂 (50 μ g、25 μ g和5 μ g) 中的蔗糖含量总是20000 μ g单位/瓶。

[0161] 由高度富含磷脂酰胆碱(94.0% (w/w))的大豆卵磷脂(脂质体形成剂)和胆酸钠(表面活性物质)制成的脂质体制剂已经证明足以保证药物物质在制造过程中和在重构悬液中的更高溶解度。脂质体制剂中FCMtb溶解度的一个重要参数是构成脂质体的组分的比例。在测试不同的FCMtb/脂质比例之后,确认了非常好的比例是约0.03:0.2:0.7 (FCMtb:胆酸钠:大豆卵磷脂, w/w/w)。还观察到,水相中盐的存在增强了脂质体形成。因此,该具体制剂中包含氯化钠。

[0162]

参数			接受标准	测试方法
外观			白至灰白色粉末	目测
饼形态			平坦或基本平坦，均质	目测
剂量均一性	质量均一性(mg/瓶)		21.02 ± 15%	称重，自定方法
	质量平均值 (mg/瓶)		质量 ± 5%	称重，自定方法
含水量(%)			≤ 3 %	Karl Fischer 电量测定，Ph.Eur.2.5.12 (USP<921>)
FCMtb 总蛋白含量			90-140 µg /mg FCMtb	BCA 测定，Ph. Eur. 2.5.33 (USP <1057>)
重构时间(s)			在≤10s 充分重构	目测
pH			7-8	电位测定法，Ph.Eur. 2.2.3 (USP<791>)
颗粒尺寸	z- 平均 (nm) (多分散性指标)		75 ± 20 (≤ 0.310)	动态光散射 Ph.Eur. 2.9.31
在注射 结核分枝杆菌的小鼠模型中的免疫原性效力	抗原特异性 IFN-γ 点形成单位	PPD	3-12 SFU/10 ⁶ 个细胞，相对于基础值的比值 (基础值，以 SFU/10 ⁶ 个细胞计)	ELISpot
蛋白质谱	SDS-PAGE		以下条带为阳性： 70, 38, 30, 10, 6 kDa	SDS-PAGE 电泳
	Western-blot		HSP70 (Rv0350)、38 kDa (Rv0934)、Ag85B (Rv1886c)为阳性	Western-blot
无菌度			无菌	Ph. Eur. 2.6.1 (USP<71>)
细菌内毒素(IU/剂)			≤ 10 IU/ 瓶	Ph. Eur. 2.6.14 方法 D (USP<85>)

[0163] 表2:药物产品(FCMtb),在冻干脂质体组合物重构后测定

[0164] 在一个优选模式中,实施本发明以使得本发明的脂质体制剂具有表2 的特性。

[0165] 为对活受试者进行施用,用0.4ml注射用水重构该瓶,得到含有 166.7µg/ml FCMtb的悬液。

[0166] 表3显示了以50µg/剂重构后每瓶中每一组分的浓度。对于25µg/剂 或5µg/剂的应

用,使用其他的瓶,使得像对表1描述的那样,表3中的所 有数值(除了蔗糖以外)都分别除以2或10。制剂(50 μ g、25 μ g和5 μ g) 中的蔗糖含量总是50000 μ g/mL。

组分	浓度
	每 mL
药物物质	
FCMtb	166.7 μ g/mL
赋形剂	
蔗糖	50,000.0 μ g/mL
大豆卵磷脂	2,114.4 μ g /mL
胆酸钠	230.0 μ g /mL
氯化钠	52.1 μ g /mL

[0168] 表3用0.4mL注射用水重构后的组分浓度

[0169] 材料和方法

[0170] 参考材料

[0171] a) 单克隆抗体:使用特异性单克隆抗体(抗HSP70、抗38kDa、抗Ag85B,(来自Lionex Diagnostic GmbH,Braunschweig,Germany))来鉴定 FCMtb批次的蛋白质谱。

[0172] b) 白蛋白标准品:用于测定蛋白含量的该标准品由0.9%盐水溶液(2mg/ml)中的牛白蛋白构成,保存于叠氮化钠中(生产商:Pierce)。

[0173] c) 来自结核分枝杆菌的海藻糖6,6'-二分支菌酸酯(TDM)标准品:使用市售TDM(Sigma)来鉴定FCMtb批次中的TDM。

[0174] d) 来自结核分枝杆菌的分枝菌酸标准品

[0175] 使用市售分枝菌酸(Sigma)来鉴定FCMtb批次中的分枝菌酸。

[0176] e) 分子量标记:使用名为SeeBlue[®]Plus pre-stained Standard”(Invitrogen)的分子量标记。

[0177] 参数的测定

[0178] a) pH

[0179] 根据Ph.Eur.2.2.3和USP<791>,通过电位测定法测定重构FCMtb悬液(20mg/ml)的pH。

[0180] b) 含水量

[0181] 使用电量测定Karl Fisher装置进程进行测定冻干FCMtb残留水的测试,遵循Ph.Eur.,method 2.5.12和USP<921>Water determination的一般指导。

[0182] c) 测定总蛋白含量

[0183] 测定FCMtb总蛋白含量的测试使用市售试剂盒(BCA kit,Pierce)进行,遵循Ph.Eur.,method 2.5.33,method 4(Bicinchoninic acid or BCA assay)和 USP<1057>。

[0184] d) 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定蛋白质谱

[0185] 该测试根据Ph.Eur., method 2.2.31和USP<726>进行, 凝胶中蛋白质的检测通过改进的考马斯染色或银染进行。测试样品: 以40或20mg/ml浓度在纯净水中重构的FCMtb。参照溶液: 分子量标记, 纯化抗原, FCMtb参照标准品。

[0186]

纯化抗原
结核分枝杆菌HSP70蛋白 (Rv 0350)
结核分枝杆菌38KDa蛋白 (Rv0934)
结核分枝杆菌Ag85B蛋白 (Rv1886c)
结核分枝杆菌19kDa蛋白 (Rv 3763)
结核分枝杆菌CFP10蛋白 (Rv3874)
结核分枝杆菌ESAT6蛋白 (Rv3875)

[0187] 表4: 参照抗原

[0188] 为进行考马斯染色, 根据生产商的说明使用Gel-Code Blue Stain试剂溶液 (Pierce)。为进行银染, 根据生产商的说明使用来自Invitrogen的 PROTSIL1试剂盒。为进行Western Blot分析, 根据本领域已知的标准方法通过SDS PAGE分离蛋白质, 然后电泳转移到PVDF膜上, 用特异性单克隆抗体进行免疫检测。抗原-抗体相互作用通过与触发化学发光反应的抗抗体一起孵育来显现。使用来自Lionex (Braunschweig, Germany) 的抗原 (结核分枝杆菌HSP70蛋白 (70kDa)、结核分枝杆菌38kDa蛋白、结核分枝杆菌Ag85B蛋白 (30kDa)) 以及来自Lionex的特异性单克隆抗体抗HSP70、抗38kDa和抗Ag85B。

[0189] e) 分枝菌酸的鉴定

[0190] 根据Ph.Eur., method 2.2.27, 通过一维TLC检查FCMtb中的分枝菌酸: 冻干FCMtb, 40mg。参照溶液: 分枝菌酸标准品 (Sigma)。方法:

[0191] a) 提取过程: 用氯仿: 甲醇 (1:1) 提取样品, 然后孵育过夜。除去上清液级分。

[0192] b) 分枝菌酸的酯化: 向每个管中加入2mL甲醇: 甲苯: 硫酸 (30:15:1; vol/vol), 然后酯化过夜。然后加入4mL正己烷。在氮气流下干燥, 重悬于500μl己烷。

[0193] c) TLC: 在与平板 (Silica gel 60 (20x20cm) (Merck) 边缘平行的线上应用10μl每种样品。以流动相 (乙醚: 正己烷 (15:85, vol/vol)) 的饱和水箱将层析分离进行3次。然后将平板晾干。

[0194] d) 通过向平板喷雾磷钼酸在96°乙醇中的溶液并在120°C加热10分钟而使分枝菌酸显现。

[0195] 通过与分枝菌酸市售标准品点进行比较来测定FCMtb样品中的分枝菌酸。结果表达为定性数据 (评估的分枝菌酸存在 (阳性) / 不存在 (阴性))。

[0196] f) 鉴定海藻酸6,6'-二分枝菌酸酯 (TDM): 测试样品: 冻干的 FCMtb, 40mg。参照溶液: TDM标准品 (Sigma)。方法:

[0197] (i) 提取过程: 用氯仿: 甲醇 (1:1) 提取样品, 然后孵育过夜。将上清液级分在氮气流中干燥并称重。最后将干燥的样品以40mg/mL终浓度重悬于氯仿中。

[0198] (ii) TLC: 在与平板 (Silica gel 60 (20x20cm) (Merck) 边缘平行的线上应用10μl每种样品。以流动相 (氯仿: 甲醇: 水 (60:12:1, vol/vol)) 的饱和水箱进行层析分离。然后

将平板晾干。

[0199] (iii) 检测: 通过向平板喷雾硫酸中的1% 蒽酮溶液并在 120℃加热5分钟而使TDM 显现。

[0200] (iv) 鉴定: 通过与用于产生标准品点的市售TDM进行 比较来测定FCMtb样品中的TDM。结果表达为定性数据(评估 的TDM存在(阳性)/不存在(阴性))

[0201] g) 鉴定脂阿拉伯甘露聚糖(LAM): 对于LAM的Western印迹分 析, 根据标准方法通过SDS PAGE分离化合物, 然后电泳转移到硝酸纤维 素膜上, 使用特异性抗体CS35进行免疫检测。通过与触发荧光反应的抗 抗体(IgG Goat anti-mouse IR Dye 800CW)孵育而使抗原-抗体相互作用显 现。

[0202] h) 无菌度

[0203] 根据本领域技术人员知识, 所有需要无菌的过程都在无菌条件下进 行, 这也适用于没有针对需要无菌的任何给定步骤明确提到的情况。无菌 度测定如Ph.Eur.2.6.1 (USP<71>)的规定进行评估。

[0204] i) 分枝杆菌的灭活

[0205] 根据Ph.Eur.2.6.2评估分枝杆菌的灭活。

[0206] j) 细菌内毒素

[0207] 细菌内毒素的测试(LAL测试, Limulus Amoebocyte Lysate) 根据Ph. Eur., method 2.6.14的一般指导进行, 遵循Method D(生色动态法)和USP <85>。

[0208] 杆菌的破碎

[0209] 杆菌破碎的选择认为允许最优地呈递细胞抗原, 特别是细胞壁抗原。FCMtb的破碎通过动态光散射(如下文所述)和激光衍射法测定。

[0210] 激光衍射允许测定0.04μm至2000μm范围内的破碎。该测定在 Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, Spain进行。仪器: Coulter LS 13320, 装有Universal Liquide Module (ULM)。溶剂: 纯净水/矿物油。结果: 绘制成直方图, 表示颗粒直径(0.04μm-2000μm)之前 的颗粒数目相对频率(%)。

[0211] 测定z-平均颗粒尺寸和多分散性指数

[0212] 本文件描述的平均颗粒尺寸通过动态光散射(DLS)测定, 是基于颗粒布朗运动的物理概念, 以Stokes-Einstein方程定义:

$$[0213] \quad d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

[0214] 其中-

[0215] d(H) = 流体力学直径

[0216] D = 平动扩散系数

[0217] k = 玻尔兹曼常数

[0218] T = 绝对温度

[0219] η = 粘度

[0220] 不希望限于任何理论, Stokes-Einstein方程确立了, 液体介质中悬浮 动颗粒处

于恒定和随机运动中,其速度取决于其尺寸:颗粒越大,布朗运动就越慢。

[0221] 在动态光散射测定中,用单色光源(优选激光)照亮含有待测颗粒的样品,并在相关函数中分析散射光的强度如何随时间波动。例如,如果测定大颗粒,由于它们运动得慢,则散射光强度的波动也慢,其相关性需要很长时间才衰减;另一方面,如果测定小颗粒,因为它们运动得快,因此散射光强度的波动也快,信号的相关性迅速衰减。

[0222] 根据本发明,优选以下仪器测定颗粒:Zetasizer nano zs (Malvern Instruments),使用纯净水/矿物油作为溶剂。

[0223] 如果没有相反说明,则仪器根据生产商的说明使用,调节和校准(如果有的话)也根据生产商的说明进行。

[0224] 使用多种算法由相关函数计算尺寸。在本情况下使用ISO13321第8页定义的“cumulants analysis”。相关性函数在单指数曲线中的拟合结果允许计算以下参数:

[0225] -颗粒分布的平均尺寸或z-平均直径。该平均尺寸为强度平均。

[0226] -多分散性指数(pdi),即对应于颗粒尺寸分布的宽度。

[0227] 结果通常绘制成直方图,表示为颗粒数目相对频率(%)相对于颗粒直径(可以是1nm至3 μ m范围内包含的任何直径)。

[0228] 效力测试

[0229] 无特定病原体的6-7周龄雌性C57BL/6小鼠由Harlan Iberica (Spain)提供。测试样品:表3的制剂和安慰剂(无活性组分的疫苗制剂)。

[0230] a) 用单剂量对体内感染结核分枝杆菌的小鼠模型进行疫苗接种:实验设计包括:第0天:用Mtb菌株H37Rv Pasteur (4x10⁴CFUs) 在小鼠下腹部进行皮下感染。第14天:用单次口服剂量的利福喷汀(25mg/kg) 和异烟肼(10mg/kg) 对动物进行化学预防处理,从而导致1周的抗生素效应。第21天:用单剂量疫苗/安慰剂和/或水在颈部皮下进行疫苗接种。获得所有样品并对单个小鼠进行分析。每个实验包括:感染小鼠加安慰剂的基础组和感染小鼠加疫苗接种的实验组。组由6-7只动物组成,实验一式二份进行。第28天:用异氟烷麻醉小鼠。

[0231] b) 用双剂量对体内感染结核分枝杆菌的小鼠模型进行疫苗接种:实验设计包括:第0天:用Mtb菌株H37Rv Pasteur (4x10⁴ CFUs) 在小鼠下腹部进行皮下感染。第14天:用单次口服剂量的利福喷汀(25mg/kg) 和异烟肼(10mg/kg) 对动物进行化学预防处理,从而导致1周的抗生素效应。第21天:用第一剂疫苗/安慰剂和/或水在颈部皮下进行疫苗接种。第36天:用第二剂疫苗/安慰剂和/或水在颈部皮下进行疫苗接种。获得所有样品并对单个小鼠进行分析。每个实验包括:感染小鼠加安慰剂的基础组和感染小鼠加疫苗接种的实验组。组由6-7只动物组成,实验一式二份进行。第42天:用异氟烷麻醉小鼠。

[0232] 对于上文a)和b),在处死后,使用脾细胞悬液通过ELISPOT对干扰素- γ 点形成单位(SFU)参数进行离体分析,以用于细胞免疫应答。

[0233] 测定在结核分枝杆菌健康小鼠模型中的免疫原能力。无特定病原体的6-7周龄雌性C57BL/6小鼠由Harlan Iberica (Spain)提供。用双剂量对体内结核分枝杆菌健康小鼠模型进行疫苗接种。实验设计包括:第0天根据实施本发明的优选模式用第一剂疫苗或安慰剂和/或水在颈部皮下进行疫苗接种。第21天用第二剂疫苗或安慰剂和/或水在颈部皮下进行疫苗接种。获得所有样品并对单个小鼠进行分析。每个实验包括:感染小鼠加安慰

剂的 基础组和感染小鼠加疫苗接种的实验组。第28天用异氟烷麻醉小鼠。处 死后,使用小鼠血清通过ELISA对IgG抗体进行分析,以用于体液免疫应 答。

[0234] 结核的诊断

[0235] 结核的诊断方法为本领域技术人员所熟知。Quantiferon测试和TST已 知能够给出可靠的结果,并可单独或组合使用,用于将受试者就其对本发 明产品治疗的适用性进行分类。QuantiFERON也称为QFT,是针对结核感 染或潜伏期结核的市售测试,由Cellestis Limited, Chadstone, Melbourne, Victoria, Australia生产。QFT是用于结核诊断的干扰素- γ 释放测定 (IGRA)。其根据生产商的说明使用。Mantoux测试 (也称为Mantoux筛选 测试、结核菌素敏感性测试、(TST测试)、划痕测试,或用于纯化蛋白衍 生物的PPD测试) 是一种结核诊断工具。这两种测试的概况可见于 Franken et al., Clin Vaccine Immunol. 2007, April; 14 (4): 477-480。

实施例:

[0236] 给出以下实施例以为本领域技术人员提供可工作的模式以及关于本发 明一些具体实施方案的解释。这些实施例为说明性目的,而不旨在以任何 方式对本发明的范围构成限制。

[0237] 实施例1:分离Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536菌株

[0238] 用于生产FCMtb的起始材料是菌株NCTC 13536 (也称为511或 Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536,是从西班牙巴塞罗那的一名有免 疫力的肺结核患者中分离的结核分枝杆菌菌株) 的接种物。其在2010年 保藏于伦敦NCTC (符合布达佩斯条约的官方保藏组织)。该菌株还保藏 于西班牙巴塞罗那Service of Microbiology of the Hospital de Sant Pau的菌 株中心。

[0239] 在1995年和1996年分别对原始菌株进行了两次传代。MSL PB#1对 应于原始菌株结核分枝杆菌NCTC 13536的第二代,其在1996年10月进 行,获得了100管 (3ml无菌玻璃管),保存于 $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。如本领域标准 方法所测定的,该菌株具有低遗传多态性。

[0240] 实施例2:生产MTB-C细胞的上游方法

[0241] 本方法的流程图在图1中给出。用于生产FCMtb的起始材料是菌株 NCTC 13536 (实施例1) 的接种物。为确保该起始材料的持续供应,优选 使用种子批系统 (seed lot system)。因此,用来自主种子批 (MSL, master seed lot) 的工作种子批 (WSL, working seed lot) 产生FCMtb。将 Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536 (实施例1) 在 Löwenstein-Jensen 培 养基中培养3至5周。然后将细菌生长物传代到 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的 Proskauer Beck培养基中并以 $100 \pm 5\text{rpm}$ 搅拌。一旦达到最高细菌浓度 (目测) 后,在 Proskauer Beck培养基中传代培养并孵育。实现相似的细菌浓度 后,取小的等分试样。通过在 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 接种3-4周后在Middlebrook琼脂 培养基中获得的集落形成单位 (CFU) 来测定活性细菌数。细菌数必须为 $2-5 \times 10^7\text{CFUs/ml}$ 。

[0242] (1) 培养结核分枝杆菌

[0243] FCMtb的生产开始于自在7H11琼脂平板中接种0.2ml WSL并在 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 ± 2 天。然后将集落转移至含有少量玻璃珠的管中。混合后, 加入约5ml注射用水 (WFI) 以获得细菌悬液。此时,进行活性平板计数 和无菌度测试。使用浸有细菌悬液的拭子用结核分枝

杆菌接种约100 Middlebrook 7H11琼脂平板,以获得会合培养物。平板在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下孵育 21 ± 2 天。

[0244] 如下进行无菌度测试作为过程控制:

[0245] 无菌度测试的目的是确保不存在真菌和除Mycobacteria之外的细菌。测试通过根据无菌度测试的Ph.Eur. 2.6.1直接接种来进行。测试样品必须是无菌的。使用7H11培养基代替7H10 (Ph.Eur. 2.6.2中提到的)。7H11以7H10培养基为基础,加入1g酪胰蛋白酶消化物以增强结核分枝杆菌菌株的生长。

[0246] (2) 收获结核分枝杆菌并冷冻粗提物

[0247] 孵育期之后,通过对琼脂平板进行目测和进行无菌度测试来控制细菌培养物的纯度。然后,从琼脂平板上收集细菌生长物并转移至无菌管中。将获得的粗提物称重(20-22g)。将混合物保持在 $-80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0248] 实施例3:用于产生得自粗提物的脂质体的下游方法

[0249] 本方法的流程图在图2中给出。

[0250] (3) 细胞破碎和脱脂

[0251] 将粗提物(实施例2)在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 解冻,然后在 4°C 下加入含有4% (w/w) Triton-X114的无菌PBS缓冲液(pH 7.0-7.5)。混合后,随后将其转移至含有无菌二氧化硅/氧化锆珠的无菌聚碳酸酯容器中。然后,在Beadbeater中通过应用以下破碎方法来实施细胞破碎:3个循环,每个循环由5个开/关周期加10分钟休息组成。方法完成后,通过随后在含有4% Triton-X114的无菌PBS缓冲液(pH 7.0-7.5)中洗涤(反复摇动和沉淀)而将细胞破碎级分与珠子分开。然后收集经洗涤的细胞破碎级分悬液的等分试样以进行pH控制,然后在 4°C 下以845g最终离心30分钟。

[0252] 为了除去胞质级分并获得富含细胞片段的悬液,在 4°C 下以20000g进行两次约60分钟的高速离心。第一次离心后,将淡黄色的上清液(富含可溶性蛋白和脂质)弃去,将沉淀重悬于PBS中,在上述相同条件下再次离心。其后,弃去的上清液的外观必须是澄清无色的。最后,将所得沉淀重悬于50-60ml PBS的最终体积中(FCMtb悬液)。

[0253] (4) 巴氏消毒

[0254] 接着将FCMtb悬液在 $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 巴氏消毒60分钟。巴氏消毒结束后,通过石蕊滤纸测定经巴氏消毒的FCMtb的pH。pH 6.5-7.5范围内认为是可以接受的。将0.5ml产物悬液装入无菌并去热原的管中,进行针对无菌度和Mycobacteria失活的IPC。将装好的管冷冻在 $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ 。材料在进行巴氏消毒后将与未处理材料物理分离,即,巴氏消毒之前利用的空间与其后填充过程使用的空间完全分开。

[0255] (5) 冻干

[0256] 接着在约 -45°C 至 30°C 的温度和0.310mbar的压力下对所有含有冷冻产物的管冻干约18小时(每管约0.5ml体积)。使用无菌操作并在氮气氛围下将管加塞并标注。然后将包装好的药物物质在 $-20^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ 保存多至12个月。

[0257] 实施例4:蛋白表征

[0258] 图3给出了就蛋白质谱而言的表征策略的概况

[0259] 基于文献(Andersen P., 1997, Scand J. Immunol.; 45 (2): 115-31; Geisel et al., 2005, J. Immunol.; 174 (8): 5007-15; Stewart et al. 2005, Infect. Immun., 73 (10):

6831-7., Wang et al., 2007, J. Mol. Biol., 366 (2): 375-81) 选择了6个蛋白质条带作为蛋白质谱评估的代表: HSP70蛋白 (Rv0350)、38kDa蛋白 (Rv 0934)、(Rv 1866c)、19kDa蛋白 (Rv 3763)、CFP10蛋白 (Rv3874) 和 ESAT-6蛋白 (Rv3875)。

[0260] A. 测定总蛋白含量: 通过二辛可宁酸 (BCA) 法对FCMt_b的总蛋白水平进行定量。总蛋白占FCMt_b内容物的约10% (w/w)。参照标准品FCMt_b-0429-16和FCMt_b-52.1分别含有167μg蛋白/mg FCMt_b和 115μg蛋白/mg FCMt_b。

[0261] B. 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定蛋白质谱: 通过对应于以下结核分枝杆菌参照抗原进行比较来测定药物物质FCMt_b的蛋白质谱: ESAT6 (6kDa) (7); CFP10 (10kDa) (6); Ag85B (30kDa) (1); 38kDa (2); HSP70 (70kDa) (4) 以及分子量标记MW (5), 如所示 (见图4)。通过考马斯染色进行药物物质FCMt_b的蛋白质谱测定和条带 (约70kDa, 38kDa, 30kDa, 10kDa和6kDa) 鉴定。通过银染进行19kDa条带 (脂多肽) 的鉴定。

[0262] C. 用特异性单克隆抗体通过Western印迹鉴定蛋白质谱: 使用以下单克隆抗体 (mAb) 获得的图谱确定药物物质FCMt_b的蛋白质谱: 抗HSP70 (70kDa, Fig. 5c)、抗38kDa (Fig. 5d)、抗Ag85B (30kDa, Fig. 5e)。

[0263] FCMt_b-52.1是根据本发明实施的优选模式的FCMt_b的优选批次。

[0264] 实施例6: 脂质表征

[0265] FCMt_b脂质谱的表征由基于氯仿: 甲醇 (1:1) 提取的分级分离法组成。本研究中实施的分级分离方案发基于Delmas et al., 1997, Glycobiology 7 (6), 811-7描述的方法。用于分析FCMt_b中脂质和糖脂含量的方法是薄层层析 (TLC)。具体地, 通过薄层层析 (TLC) 在参照菌株H37rv和 NCTC 13536以及不同FCMt_b批次中都鉴定出了多酰基海藻糖 (polyaciltrehalose (PT))、海藻糖二分枝菌酸酯 (TDM)、二酰基海藻糖 (DAT)、磷脂酰肌醇甘露糖苷 (PIM) 和其他糖脂以及结核菌醇二分枝菌酸酯 (phthiocerol dimycocerosates (PDIM)) 和分枝菌酸。见图7a。通过TLC 分析上清液中海藻糖6,6'-二分枝菌酸酯 (TDM) 的含量。根据TLC法对沉淀中的分枝菌酸进行测定。尽管对于MTB-C脂质谱没有已知的定量数据, 但本研究中建立的定性脂质谱与目前的科学知识一致, 并允许对目前已知 的免疫原性脂质进行标准表征。将FCMt_b与结核分枝杆菌菌株NCTC 13536和H37Rv的全细胞脂质级分和TDM商品标准品进行了比较 (见图 7a和7b)。总体而言, 本发明包含FCMt_b的脂质体的不同批次中的脂质 含量是一致的。图7d显示了LAM的表征。

[0266] 实施例6: 破碎的细胞材料的表征

[0267] 使用两种方法获得的初步结果都显示, FCMt_b的片段大小主要是小于 1μm (99% < 1μm), FCMt_b电子显微术确证了这一点: 片段的尺寸主要为 100至300nm。

[0268] 通过260nm的吸光度研究了酚/氯仿混合物提取后的残余DNA水平 (检出限: 0.2μg DNA/mg FCMt_b)。目前获得的典型结果低于15μg DNA/mg FCMt_b。

[0269] 在不同FCMt_b批次之间可重复的脂质和蛋白质谱显示了该药物物质生产过程的一致性。

[0270] 实施例7: 免疫小鼠并使生物活性可见

[0271] FCMt_b蛋白质条带与小鼠免疫血清的相互作用: 利用Western印迹法, 可以使与血清中存在的IgG抗体相互作用的FCMt_b蛋白质条带可见, 所述血清得自本发明基于脂质体制剂的疫苗接种两次的感染小鼠。这被认为是生物活性的指示 (图6)。

[0272] 实施例8:包含FCMtb的脂质体制剂的体内活性

[0273] 如下在体内模型中研究该疫苗的生物活性:评估无脂质体的FCMtb (用注射用水WFI重构) 和本发明最佳实施模式的脂质体制剂 (5%蔗糖, 见上文) 中的FCMtb的免疫原能力 (图8)。这些结果显示了含有蔗糖的脂质体制剂的优势。

[0274] 脂质体的聚集或融合状态是已证明对疫苗生物活性有显著影响的参数。因此, 本发明的研究者对疫苗的生产过程中和批次释放时的颗粒尺寸 和多分散性指标进行了充分的控制。

[0275] 实施例9:蔗糖的效果

[0276] 在最初的测试中, 在包含MTB-C菌株NCTC 13536片段的脂质体制剂中任选地加入以下赋形剂之一: (a) 1.5%甘油和 (b) 5%蔗糖。随后, 对两种制剂的相关理化特性和生物活性进行比较评估。

[0277] 冻干脂质体组合物重构后和根据目前的批次释放规格参数测试后的测定结果在表5中给出。

[0278]

参数		接受标准	配制在脂质体悬液中的 FCMtb		
			无赋形剂	蔗糖 5%	甘油 1.5%
			配制在脂质体悬液中的 FCMtb		
外观		白色至灰白色粉末	ND	符合	符合
饼形态		平坦或基本平坦，均质	ND	符合	符合
含水量 (%)		≤ 3 %	ND	1.4	3.0
重构时间 (s)		在 ≤ 10s 充分重构	ND	5	12
pH		7-8	8.1	7.4	7.0
颗粒尺寸	z- 平均 (nm) Pdi ^(a)	75 ± 20 (≤ 0.250)	370 ⁽¹⁾ (0.492)	66 (0.215)	504 ⁽¹⁾ (0.569)
在结核分枝杆菌感染小鼠模型中的免疫原效力	抗 原 异 性 IFN-γ 形 单 点 成 位	PPD	3-12 SFU/10 ⁶ 个 细 胞， 相 对 于 基 础 值 的 比 值 (基 础 值， 以 SFU/10 ⁶ 个 细 胞 计) 3.6 (183)	5.1 (183)	2.8 (183)
		Ag85B (30 kDa)	5-20 SFU/10 ⁶ 个 细 胞， 相 对 于 基 础 值 的 比 值 (基 础 值， 以 SFU/10 ⁶ 个 细 胞 计) 5.5 (73)	9.6 (73)	5.4 (73)

[0279] ^(a) 多分散性指数 ⁽¹⁾ 存在脂质体聚集物

[0280] ND=未测定

[0281] 表5:冻干脂质体组合物重构后测定的三种不同制剂的规格结果

[0282] 本研究者意想不到地发现,5%蔗糖制剂提供了更好的生理化学结果(例如含水量或重构时间)。但是,最关键的事实是含蔗糖制剂与其他两种制剂相比,显示出脂质体聚集(颗粒尺寸,z平均)的重要降低。动态光散射分析显示,含蔗糖脂质体的z-平均为75±20nm(多分散性指数≤0.350)。含蔗糖制剂冻干制备物的电子显微术显示出尺寸为40至100nm的多层和单层脂质体的混合(图9)。

[0283] 鉴于5%蔗糖制剂的这种改进的参数以及观察到的更低的含水量(≤2%),预计该制剂有改进的稳定性结果。事实正是如此。本研究者关于室温保存3个月的以1.5%甘油配制的实验批次的数据显示出PPD(免疫原效力)生物活性的大幅损失。相反,在室温保存3个月对含5%蔗糖的制剂进行研究时,PPD活性基本不变。因此,蔗糖还提供了更好地保持生物活性的优点。

[0284] 实施例10:含蔗糖制剂的生物特性

[0285] 将表3的制剂用于生物学研究。可以通过ELISPOT来测量结核分枝杆菌感染小鼠模型中由接种本发明最佳实施模式的疫苗(单次接种)所触发的细胞免疫应答,结果在表6中给出。

[0286]

参数		批次 (50 µg/剂, 166.7 µg/mL)			
		a09	c09	d09	e09
抗原特异性 IFN-γ 点形成 单位 (SFU)	PPD SFU/10 ⁶ 个细胞, 相对于基础值的比 值 (基础值, 以 SFU/10 ⁶ 个细胞计)	5.1 (基础: 183 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	6.3 (基础: 98 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	7.2 (基础: 164 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	6.5 (基础: 164 SFU/10 ⁶ 个 细胞)
	Ag85B SFU/10 ⁶ 个细胞, 相对于基础值的比 值 (基础值, 以 SFU/10 ⁶ 个细胞计)	9.6 (基础: 73 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	9.9 (基础: 44 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	11.9 (基础: 90 SFU/10 ⁶ 个 细胞)	12.3 (基础: 88 SFU/10 ⁶ 个 细胞)

[0287] ND:未测定

[0288] 表6:小鼠中接种后的免疫应答

[0289] 在使用ELISPOT测定应答水平时,基于脂质体制剂的疫苗的接种导致体内细胞免疫应答与感染动物的基础值相比显著提高。相对于基础应答的比值为4-8倍(PPD)和8-14倍(Ag85B)。基于脂质体制剂的疫苗还能够诱导多抗原体液应答,这特别是在存在高感染传播的情况下有保护作用(Guirado et al.,2006,Microbes Infect.8,1252-1259)。

[0290] 特别地在无蔗糖制剂和含有蔗糖作为主要赋形剂的制剂的免疫原效力数据之间进行了比较。所得结果明确指出,在单次疫苗接种模型中,50µg FCMtb剂量的含蔗糖制剂所引发的细胞免疫应答是相同剂量无蔗糖制剂所得应答的约1.5倍。在以下两个效力测试中都获得了这种更高的细胞免疫应答水平:为批次释放规格而进行的测试(单次疫苗接种模型),以及可比性研究中包括的额外测试(两次疫苗接种的模型)。此外,在两个效力测试中,50µg FCMtb剂量含蔗糖制剂引发的细胞免疫应答都显示出与200 µg FCMtb无蔗糖制剂

相似的水平。冻干脂质体组合物重构后测量的结果在图10a和10b中给出。含蔗糖制剂显示出脂质体聚集显著降低。这被认为是免疫原效力增大的原因。用50 μ g剂量的这种新制剂获得的细胞免疫应答与200 μ g剂量无蔗糖制剂几乎相当。本领域已知,所述细胞应答被认为是有关联的应答(North RJ, Jung YJ (2004). *Annu. Rev. Immunol.* 22:599–623)。

[0291] 实施例11:冻干脂质体制剂的生产方法

[0292] 包含本发明脂质体制剂的药物组合物的生产方法的一个实施方案示于图11。简言之,其包括以下步骤1至5。

[0293] (1) LCS本体组分(bulk component)的制备

[0294] 将LCS的本体大豆卵磷脂溶于乙醇(1:1;w/w),并将胆酸钠溶于水(1:5;w/w)。通过过滤对溶液进行除菌。将卵磷脂钠溶液与胆酸钠溶液混合后,在搅拌下加入冻干的FCMtb(实施例1)。组分为0.03:0.2:0.7(FCMtb:胆酸钠:大豆卵磷脂;w/w/w)。

[0295] (2) LCS本体的制备

[0296] 将水相转移至无菌不锈钢混合器中。以0.7:0.3(水相:脂质相,w/w)的比例加入(1)的包含大豆卵磷脂、胆酸钠和FCMtb的脂质相。将各相以2200rads/s混合3分钟以进行匀浆和脂质体形成。匀浆后,将本体LCS转移至另一容器并使其静置至少5分钟。对该LCS本体的颗粒尺寸进行IPC。

[0297] (3) LCS本体的稀释,脂质体悬液的最终制备

[0298] 制备10%(w/w)蔗糖溶液并灭菌。以适当的比例将该蔗糖溶液与水和LCS本体混合,以获得5%蔗糖溶液中21mg LCS/ml重构的最终脂质体悬液(LS)本体。对pH、无菌度和颗粒尺寸进行测试,作为过程控制。

[0299] (4) 填装

[0300] 在管中装入0.4ml LS(在持续搅动下)并部分密封以进行冷冻和冻干。

[0301] (5) 冻干、包装和标记

[0302] 将管在 $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下冷冻直至冻干开始。冻干在 -45°C 至 25°C 的温度和0.150mbar下进行。该过程持续24小时。冻干结束时,在氮气氛中将管完全塞住,包裹、标记并保存在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。

[0303] 实施例12:针对LTBI的辅助治疗仅需要单次注射25 μ g oFCMtb

[0304] 设置III期双盲随机临床试验,以在具有潜伏期结核感染(LTBI)(TST+并且Quantiferon+)的96名HIV阳性(HIV+)和HIV阴性(HIV-)受试者中对3种FCMtb剂量(5、25、50 μ g各自根据本发明最佳实施方式制备)和安慰剂进行评价,所述受试者在接受1个月的异烟肼治疗后随机分入n=12的组。在刚进行异烟肼化学治疗后以及相隔4周后,用FCMtb(5、25、50 μ g各自根据本发明最佳实施方式制备)对受试者接种两次。

[0305] 免疫谱:FCMtb(5、25、50 μ g各自根据本发明最佳实施方式制备)引发了在所有剂量下激发的钟形的针对分泌抗原(ESAT-6, Ag85B)和结构抗原(16kDa, 38kDa)的多抗原应答(图12和13)。FCMtb(5、25、50 μ g各自根据本发明最佳实施方式制备)还在较高剂量下引发了与预防效果相容的长期记忆应答(WHO测试)。意想不到的是,尽管总体免疫应答在HIV-中强于HIV+,但25 μ g FCMtb(5、25、50 μ g各自根据本发明最佳实施方式制备)单次接种在两个人群中都引发最佳的免疫应答(图12和13)。

[0306] 结论:25 μ g单次疫苗接种是HIV阴性和HIV阳性受试者中针对LTBI的辅助治疗的

最佳选择。

[0307] 附图简述

[0308] 图1:流程图,其显示药物物质FCMtb的上游方法,包括该方法中涉及的材料和试剂以及合适的流程控制。

[0309] 图2:流程图,其显示药物物质FCMtb的下游方法,包括该方法中涉及的材料和试剂以及合适的流程控制。

[0310] 图3:蛋白表征的流程。

[0311] 图4:通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色法鉴定抗原。显示了参照抗原 ESAT6 (6kDa) (7);CFP10 (10kDa) (6);Ag85B (30kDa) (1);38kDa (2); HSP70 (70kDa) (4) 和分子量标记MW (5)。

[0312] 图5:蛋白表征。图5a:蛋白质谱:15.6 μ g FCMtb/mL (1,2)、6.25 μ g FCMtb/mL (3,4) 和1.56 μ g FCMtb/mL (5,6) 终浓度的参照标准品FCMtb- 52.1 (1-6) 的蛋白质谱,SDS page随后是考马斯染色。MW以kDa计。图 5b:19kDa条带的鉴定,SDS page随后是银染。图5c:蛋白质谱:与来自 Lionex的ESAT-6标准品并行地,通过SDS-PAGE和银染法鉴定所示 FCMtb批次中的条带(10kDa和6kDa)。不同的FCMtb批次 (1、2、3、9、10、11, (第9道为FCMtb-52.1批次)), 不同浓度的来自Lionex的ESAT-6 标准品 (4至8);图5d:与结核分枝杆菌HSP70并行地,使用特异性抗体 通过Western印迹在FCMtb批次中进行结核分枝杆菌HSP70 (Rv 0350) 抗原的 Western Blot鉴定。不同的FCMtb批次 (1、2、3、4、7、8、9), ESAT-6标准品 (5、6);图5e:与来自Lionex的结核分枝杆菌38kDa并行 地,使用特异性抗体通过Western印迹法在FCMtb批次中进行结核分枝杆 菌38kDa (Rv 0934) 抗原的鉴定。使用Odyssey系统进行荧光检测。不同的 FCMtb批次 (1、2、3、6、7), 38kDa标准品 (4、5)。图5f:与来自Lionex 的结核分枝杆菌 Ag85B并行地,使用特异性抗体通过Western印迹法在 FCMtb批次中进行结核分枝杆菌 Ag85B (Rv 1886c) 抗原的鉴定。使用 Odyssey系统进行荧光检测。不同的FCMtb批次 (1、2、3、5、6、7), Ag85B标准品 (4)。

[0313] 图6:使用Western印迹法测定的不同FCMtb批次 (50 μ g/条带) 的 所示蛋白条带与 1/8000稀释的血清之间的相互作用,所述血清得自用本发 明基于脂质体制剂之药物疫苗 组合物接种两次的感染小鼠。

[0314] 图7:脂质分析。图7a:通过TLC法鉴定了参照菌株 (H37Rv (2) 和 NCTC 13536 (1) 和不同FCMtb批次 (3-9) 中的多酰基海藻糖 (polyacyltrehalose (PT))、海藻糖6,6'-二分支菌 酸酯 (TDM)、二酰基海藻 糖 (DAT) 以及TDM标准品 (10)。图7b:通过TLC法鉴定FCMtb批次中 的海藻糖6,6'-二分支菌酸酯 (TDM)。图 (A) 和 (B) 代表两个独立测 定。(A) TDM标准品 (11) 和 (12),其他道为不同的FCMtb批次。B: (1) TDM标准品 (1),其他道为不同的FCMtb批次。图7c: 通过 TLC法测定的FCMtb批次中的分枝菌酸I、III和IV的图谱。图 (A)、(B) 和 (C) 代表3个独立测定。(A) FCMtb批次 (1-6 (FCMtb-51.2标 准品6))。(B) 用于说明/参考,(C) 批次FCMtb- 47b (1) 与分枝菌酸标准品 (2) 相比。图7d:LAM的鉴定 (参照在左道,其余道为产生自本发明 脂质体 的样品)。

[0315] 图8:相同剂量 (50 μ g/剂) 下,重悬于注射用水 (WFI) 的FCMtb 与用脂质体制备的 FCMtb (标记为RUTI疫苗,批次10a) 的细胞免疫效 力的比较。

[0316] 图9:脂质体浓缩物 (LCS) 本体的冷冻破碎 (电子显微术)。

[0317] 图10:a:在效力测试中用两种制剂(一次疫苗接种)测试的每批次 的细胞免疫应答。b,同a一样,但为两次疫苗接种。“制剂II”:包含 5% (w/w) 蔗糖,根据本文件的表1。“制剂I”,同制剂II一样,只是不存 在蔗糖。 μg 指 μg FCMtb/剂。85B:Ag85B。

[0318] 图11:本发明最佳实施方式的方法的流程图。

[0319] 图12:实施例12描述的1次接种RUTI 25 μg 的免疫谱。

[0320] 图13:实施例12描述的免疫原性 (HIV-和HIV+) 。

[0321] 实施方式

[0322] 具体而言,本发明涉及以下实施方式:

[0323] 实施方式1.脂质体制剂,其包含:

[0324] (a) 来自结核分枝杆菌复合群 (MTB-C) 菌株的片段,

[0325] (b) 脂质体形成剂,

[0326] (c) 1至20% (w/v) 的蔗糖,优选2至12% (w/v) 的蔗糖,更优选 3至8% (w/v) 的蔗糖,最优选4至6% (w/v) 的蔗糖,其中颗粒的z-平 均尺寸为120nm或更小。

[0327] 实施方式2.实施方式1的脂质体制剂,其中所述颗粒的z-平均尺寸 为40至110nm,更优选55至95nm。

[0328] 实施方式3.实施方式1或2中任一种的脂质体制剂,其中所述脂质 体制剂为乳剂,并且其中颗粒的z-平均尺寸优选小于40nm。

[0329] 实施方式4.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中颗粒的多分 散性指数为0.4或更小,优选0.3。

[0330] 实施方式5.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中所述结核分 枝杆菌复合群 (MTB-C) 菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群 (MTB-C) 菌株,优选为2010年保藏于伦敦 NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

[0331] 实施方式6.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其还包含

[0332] (d) 表面活性物质,

[0333] 和/或

[0334] (e) 一种或更多种非离子型表面活性剂。

[0335] 实施方式7.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中所述MTB-C 细胞的片段是细胞壁片段或者包含细胞壁片段。

[0336] 实施方式8.实施方式6的脂质体制剂,其中 (a) 与 (d) 的比值为 0.05:1至1:5 (w/w) 。

[0337] 实施方式9.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中所述脂质体 形成剂是氢化的、部分氢化的或非氢化的磷脂,优选卵磷脂,最优选大豆 卵磷脂。

[0338] 实施方式10.实施方式6至8中任一种的脂质体制剂,其中所述表面 活性物质选自胆酸盐、脱氧胆酸盐、胆固醇和胆固醇琥珀酸单酯。

[0339] 实施方式11.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中所述MTB- C细胞的片段是细胞壁片段或者包含细胞壁片段。

[0340] 实施方式12.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其包含2010年 保藏于伦敦 NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536的片段。

[0341] 实施方式13.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其包含以下的至 少两项,优

选三项,更优选四项,最优选全部:

[0342] (i) 第一多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约70kDa,其中所述第一多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌HSP70蛋白(Rv 0350)的质量指纹图谱相似,

[0343] (ii) 第二多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约38kDa,其中所述第二多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌38kDa蛋白(Rv 0934)的质量指纹图谱相似,

[0344] (iii) 第三多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约30kDa,其中所述第三多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌Ag85B蛋白(Rv 1866c)的质量指纹图谱相似,和

[0345] (iv) 第四多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约10kDa,其中所述第四多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌CFP10蛋白(Rv3874)的质量指纹图谱相似,和

[0346] (i) 第五多肽,其在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳后测量的分子量为约6kDa,其中所述第五多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌ESAT-6蛋白(Rv3875)的质量指纹图谱相似。

[0347] 实施方式14.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中存在以下结核分枝杆菌抗原的至少一种或其片段:HSP70、38kDa蛋白和Ag85B。

[0348] 实施方式15.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其包含一种或更多种分枝菌酸和/或糖缀合分枝菌酸酯优选海藻糖二分枝菌酸酯,和/或糖脂优选脂阿拉伯甘露聚糖。

[0349] 实施方式16.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其还包含一种或更多种非离子型表面活性剂。

[0350] 实施方式17.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其还包含一种或更多种盐或其溶液,其中所述盐优选为氯化钠。

[0351] 实施方式18.前述实施方式中任一种的脂质体制剂,其中所述脂质体制剂是冻干的。

[0352] 实施方式19.悬液,其中前述实施方式中任一种的脂质体制剂重构于溶剂中,其中所述溶剂优选为含水溶剂,更优选为生理血清或包含生理血清。

[0353] 实施方式20.药物组合物,其包含实施方式1至18中任一种的制剂或实施方式19的悬液,以及可药用载体或稀释剂,和/或可药用佐剂。

[0354] 实施方式21.实施方式1至18中任一种的脂质体制剂、实施方式19的悬液或实施方式20的药物组合物,其用于治疗人或动物体的方法中。

[0355] 实施方式22.实施方式21的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其用于治疗或预防结核的方法中。

[0356] 实施方式23.实施方式22的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其选自以下:

[0357] a) 用于在具有潜伏期结核感染的个体中预防活动性结核的方法中;

[0358] b) 用于结核的初级预防方法中,以防止接触过该疾病但尚未感染的个体发生感染,或

[0359] c) 用于治疗或预防潜伏期结核的方法中。

[0360] 实施方式24.实施方式21至23中任一种的脂质体制剂、悬液或药物 组合物,其用于以包含1至1000、优选3至250、更优选4至80、最优选 约5、约25或约50 μ g/剂FCMtb的剂量施用于人体。

[0361] 实施方式25.实施方式21至23中任一种的脂质体制剂、悬液或药物 组合物,其用于以25pg FCMtb的单次接种剂量施用于人体。

[0362] 实施方式26.实施方式21至25中任一种的脂质体制剂、悬液或药物 组合物,其用于联合治疗中,所述联合治疗优选包含抗生素,更优选异烟 肼和安沙霉素中的一种或更多种,其中所述安沙霉素最优选是利福霉素。

[0363] 实施方式27.实施方式125的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其用 于辅助治疗中。

[0364] 实施方式28.实施方式27的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其用 于在辅助治疗中施用于HIV阳性人受试者。

[0365] 实施方式29.实施方式25的脂质体制剂、悬液或药物组合物,其用 于施用于HIV阴性人受试者。

附图：

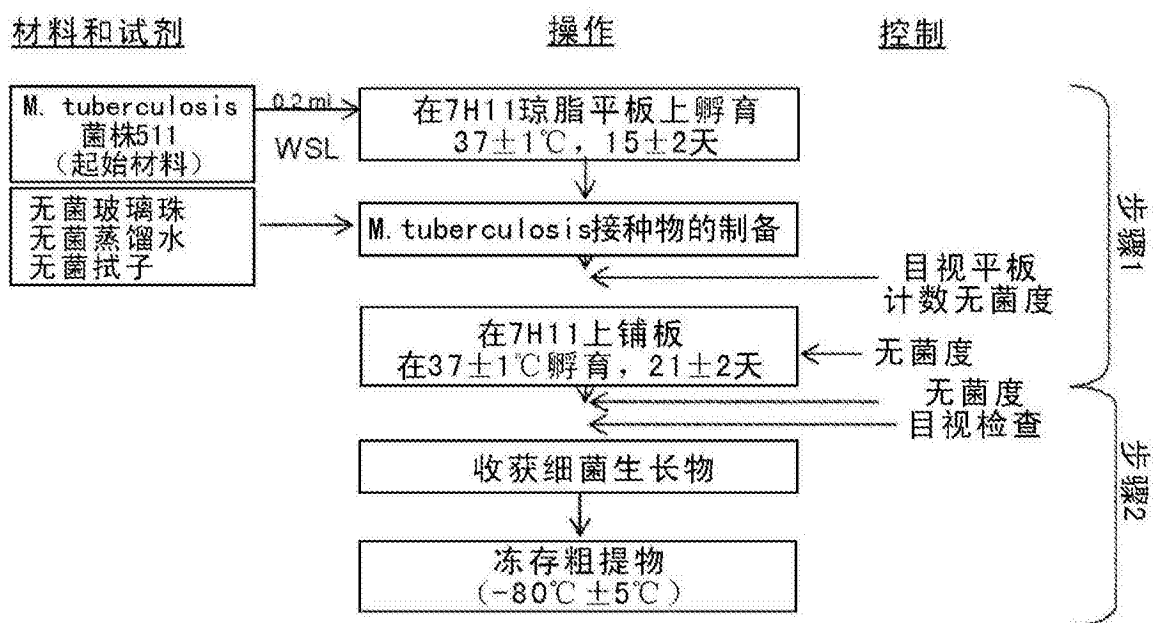


图1

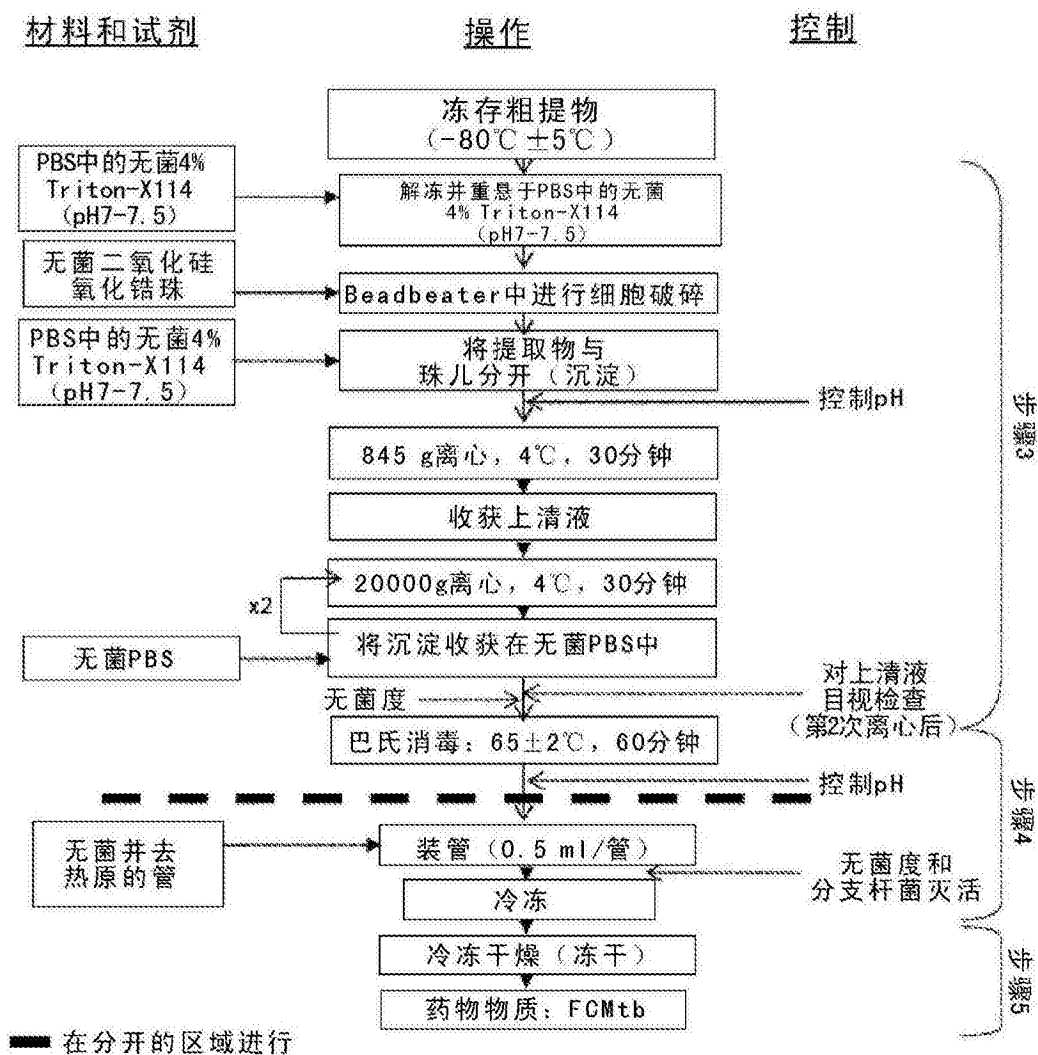


图2

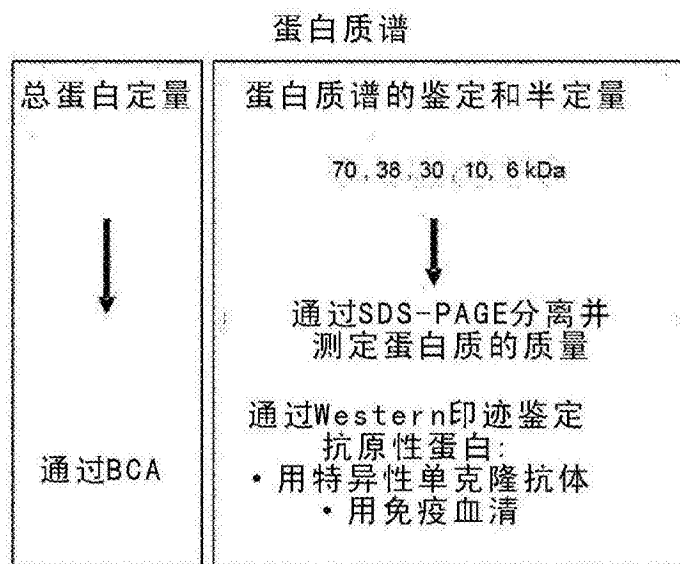


图3

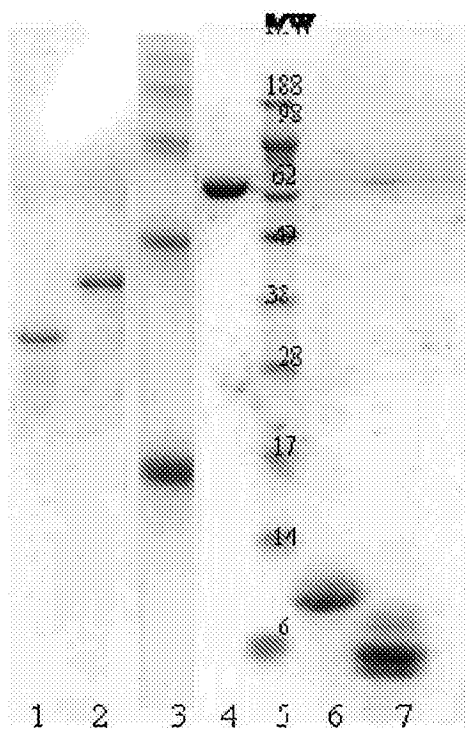


图4

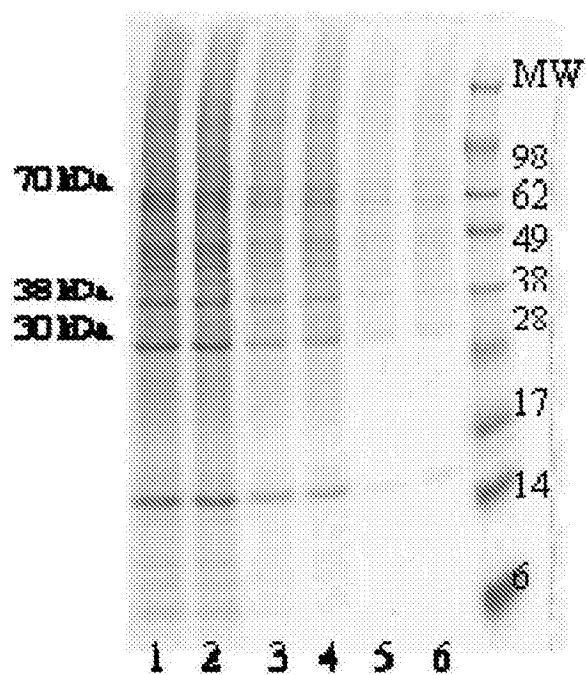


图5a

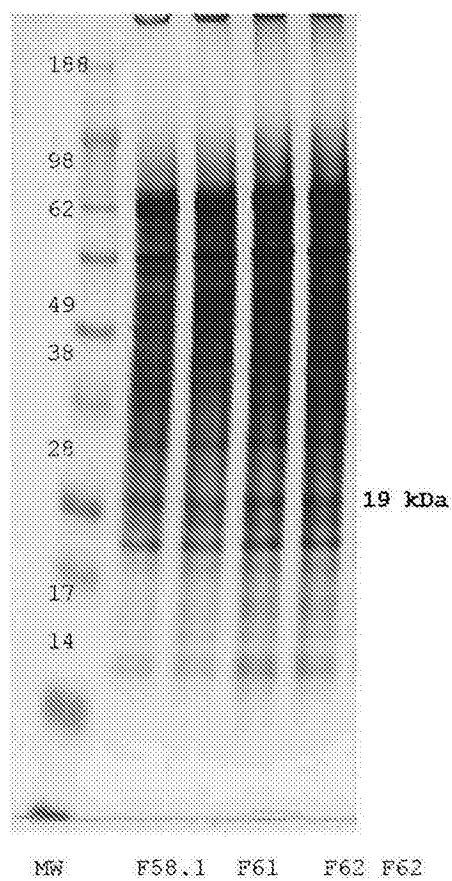


图5b

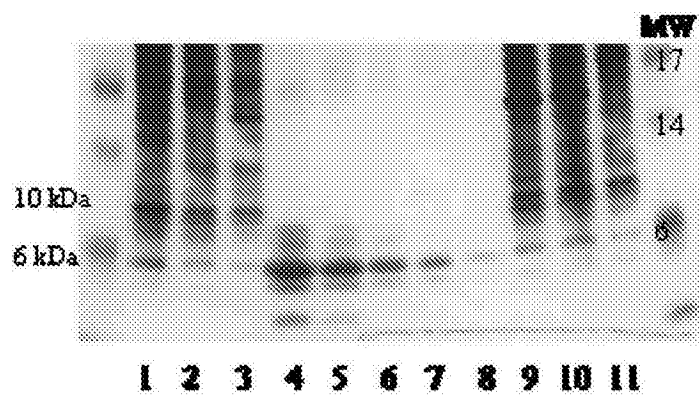


图5c

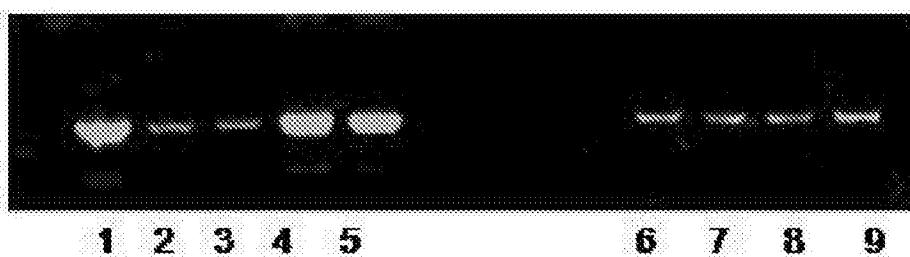


图5d

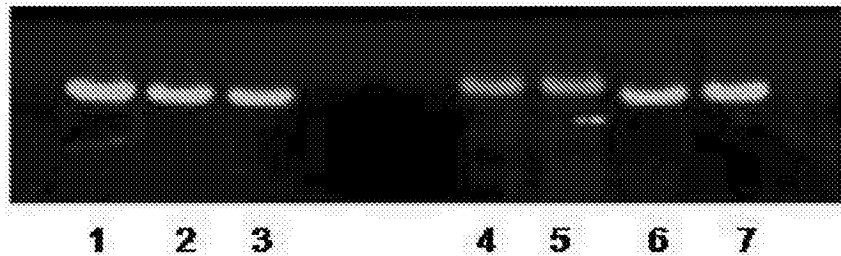


图5e

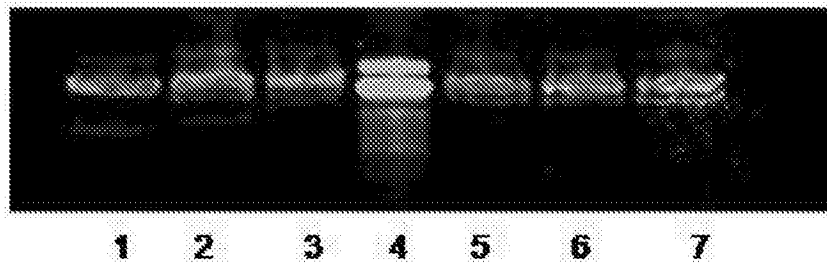


图5f

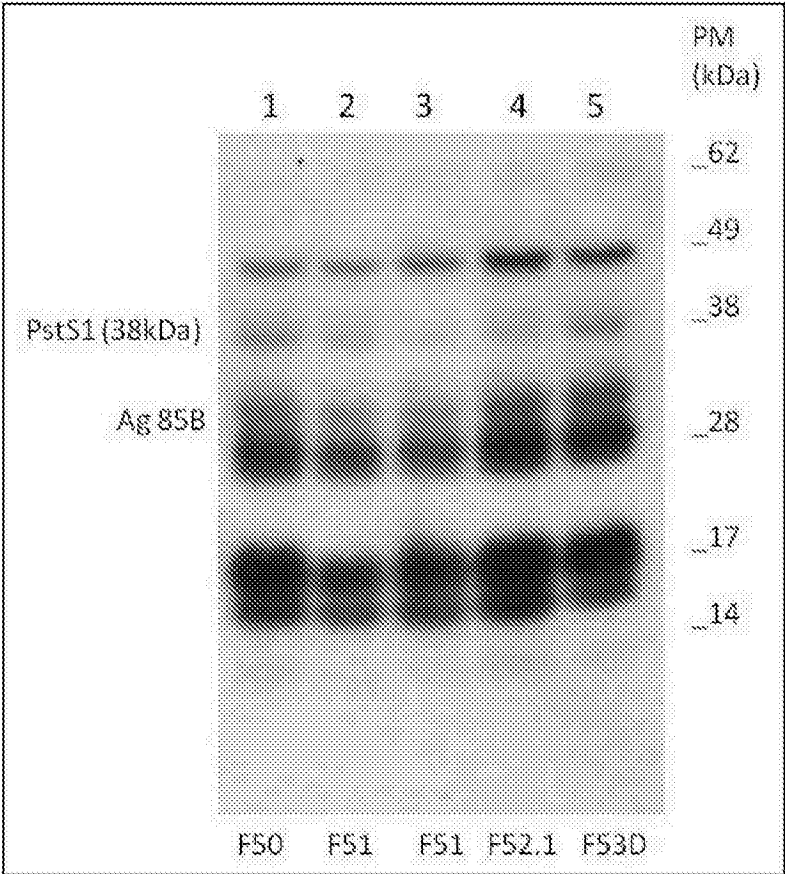


图6

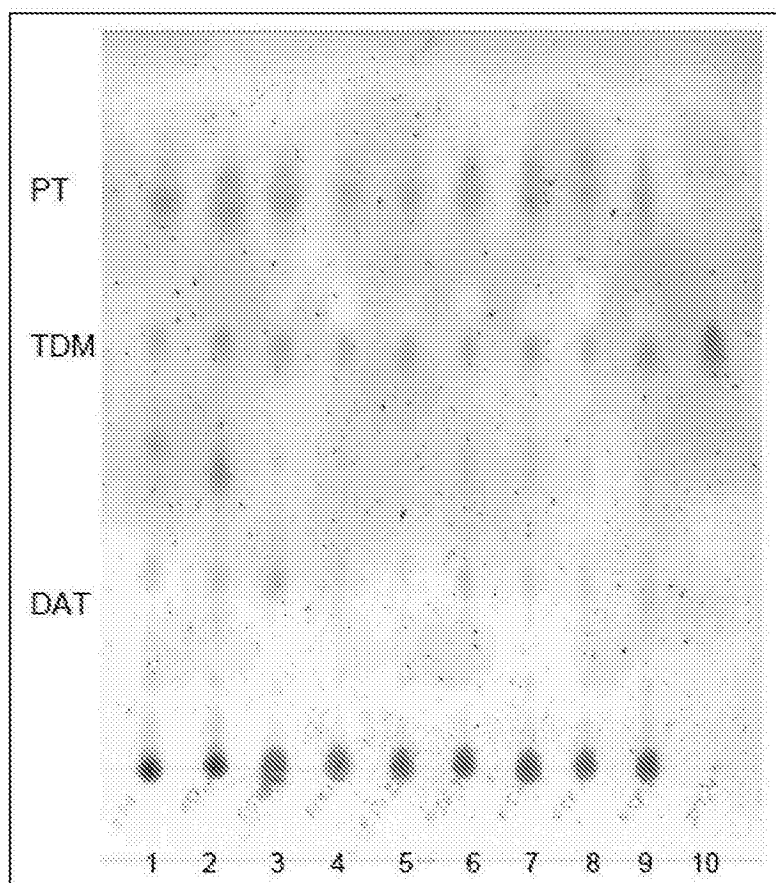


图7a

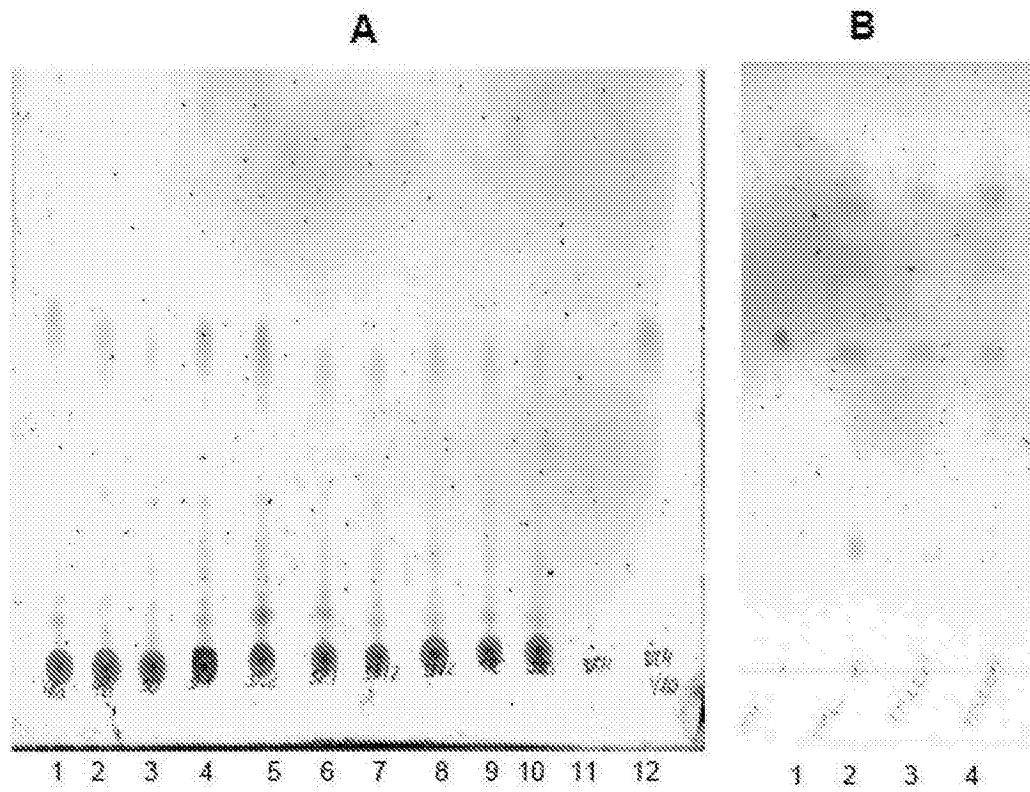


图7b

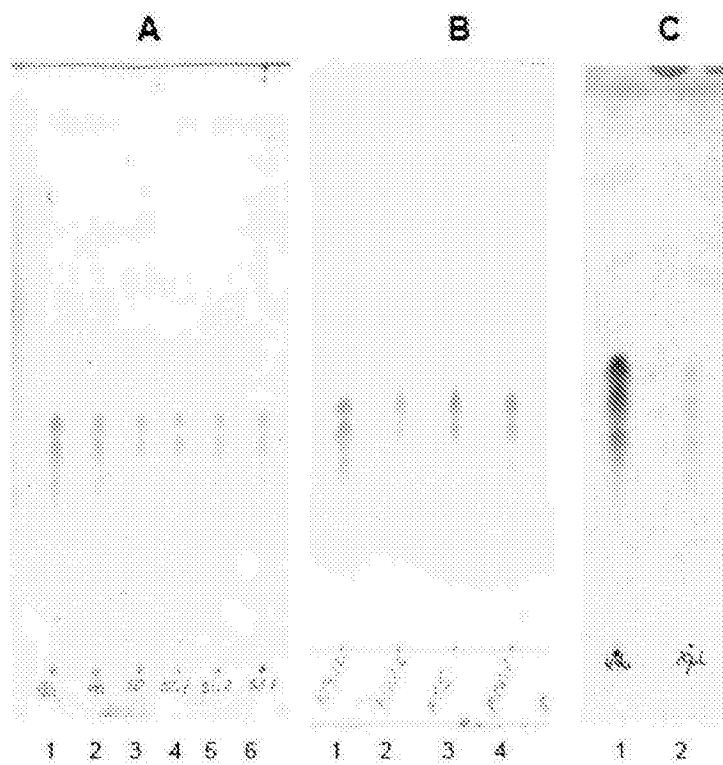


图7c

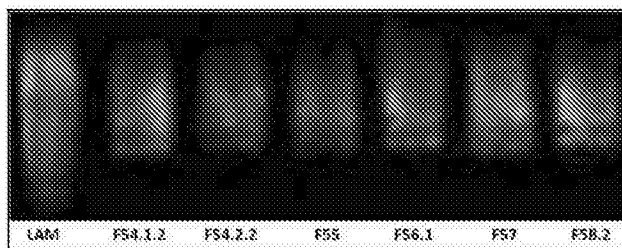


图7d

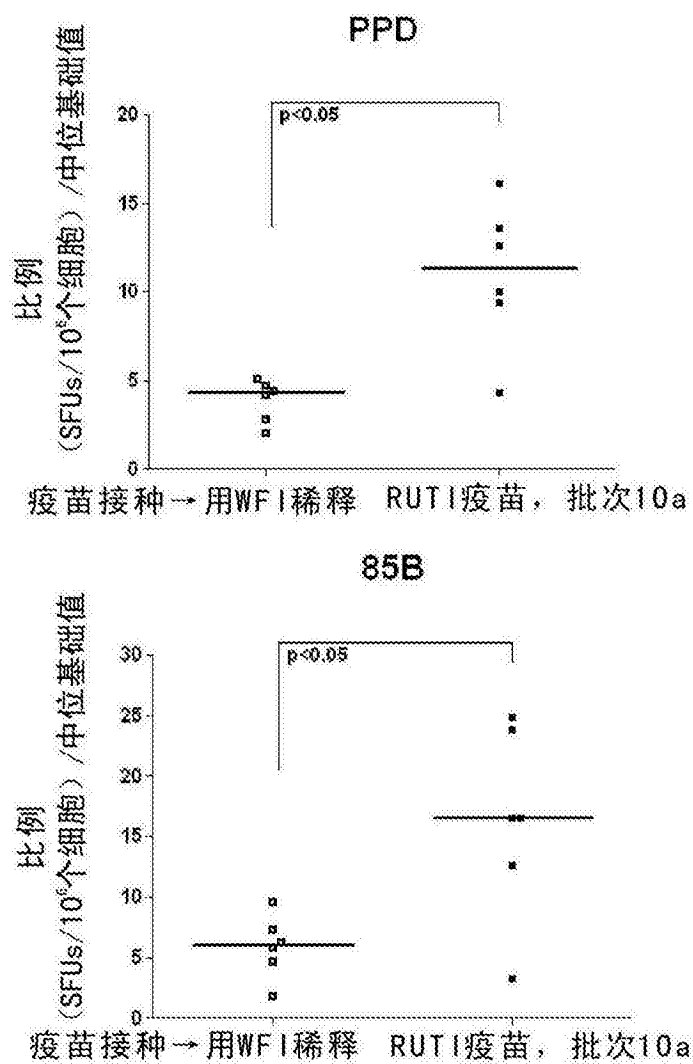


图8

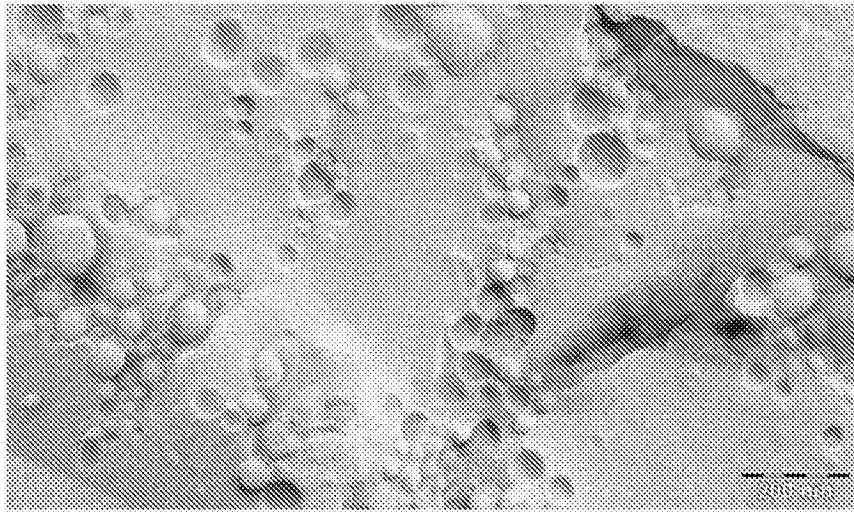


图9

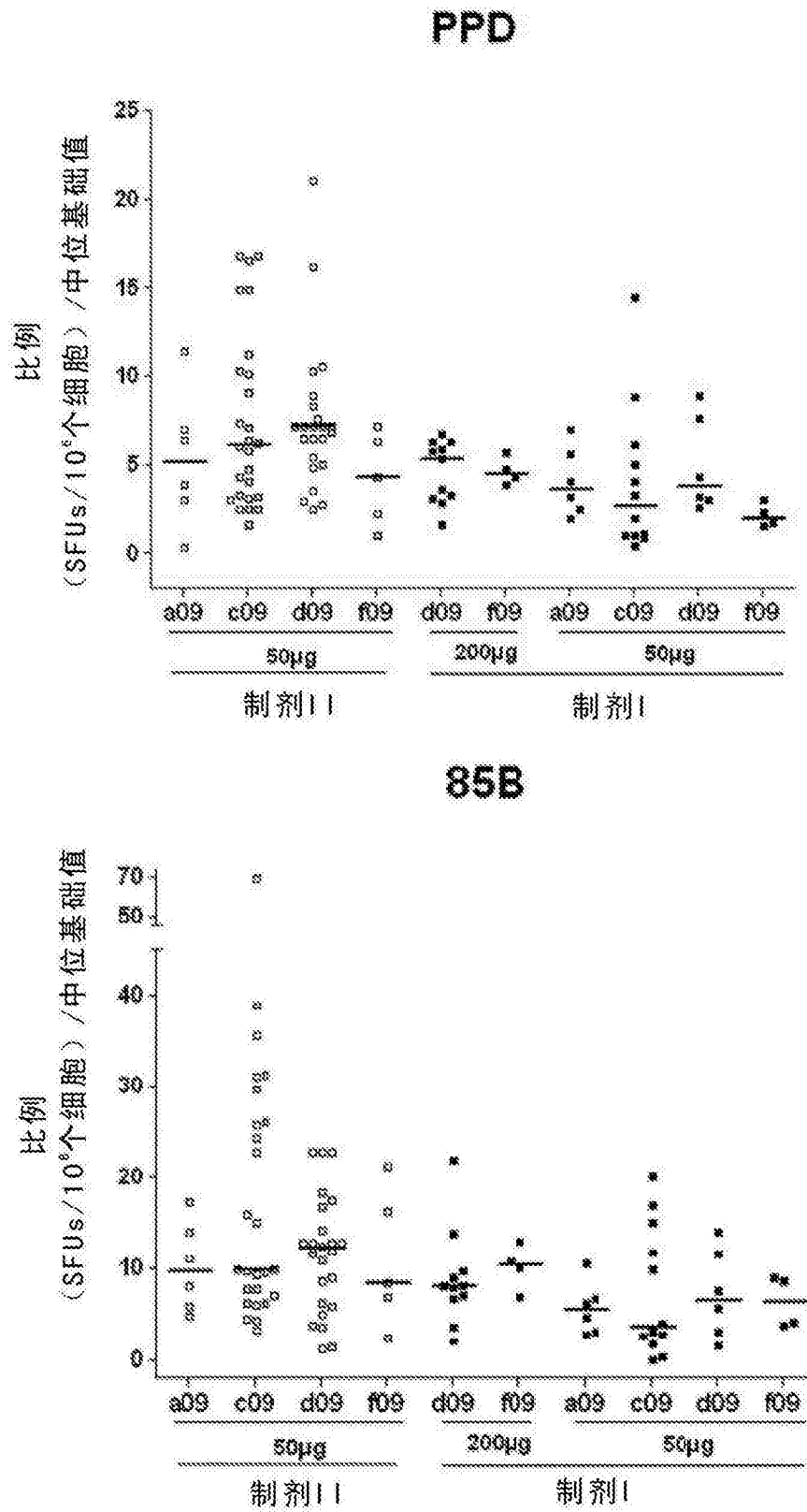


图10a

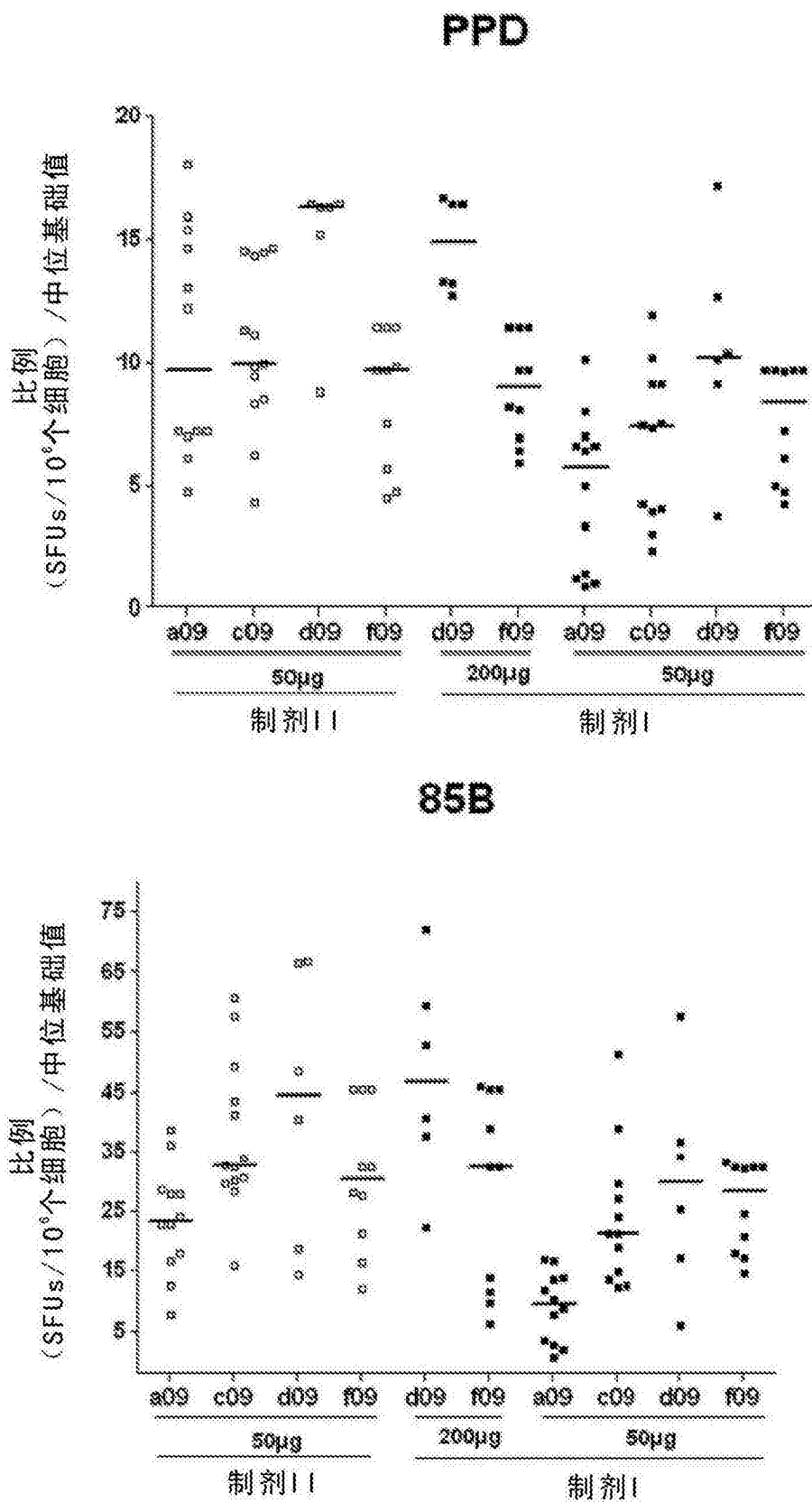


图10b

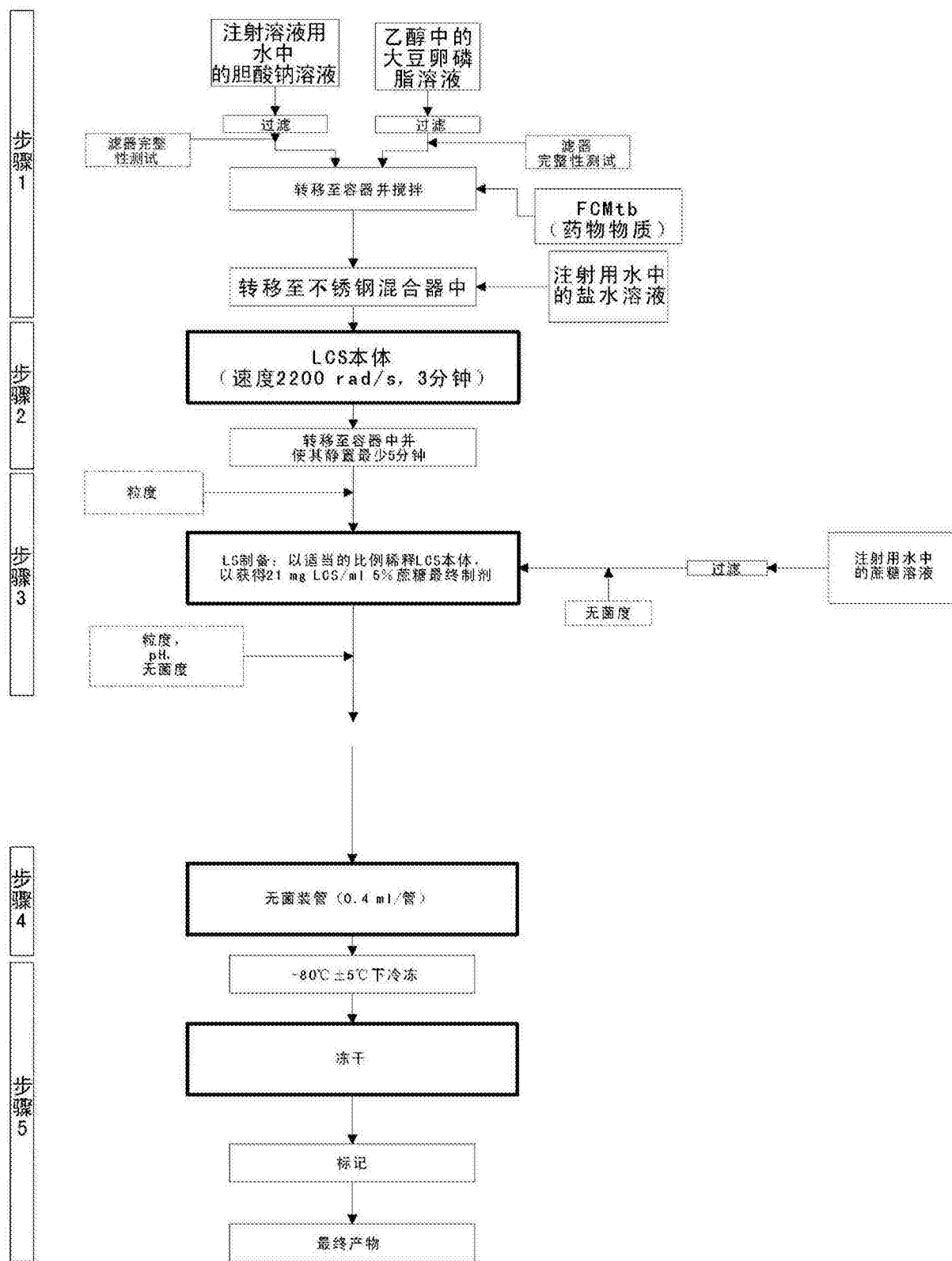


图11

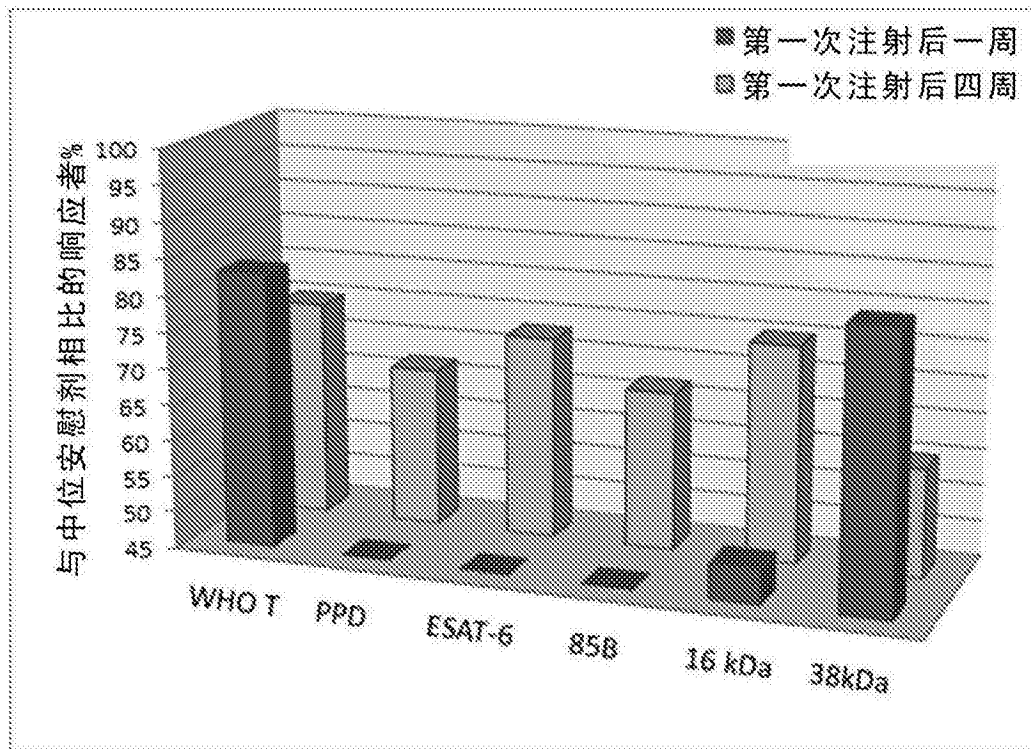
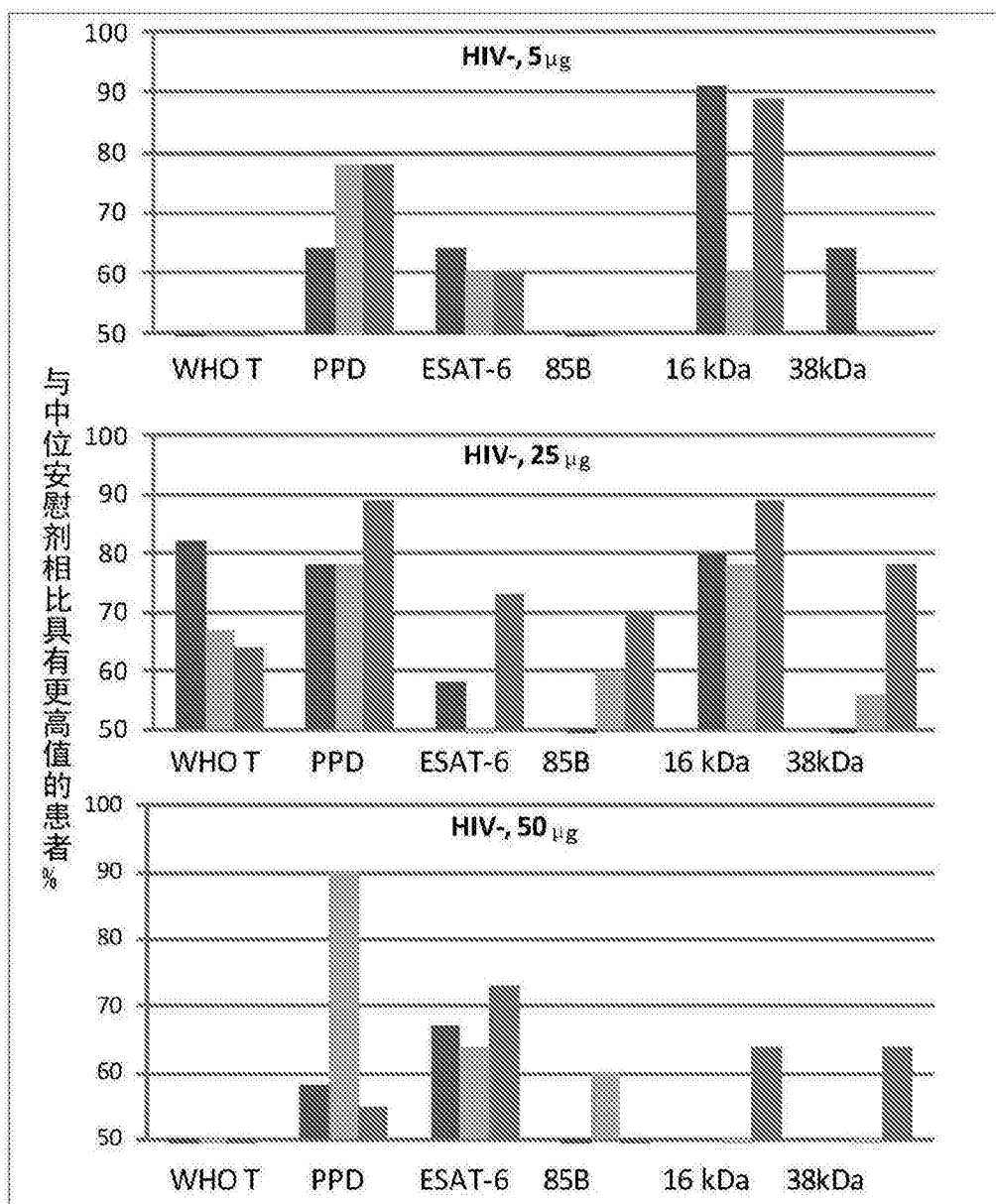
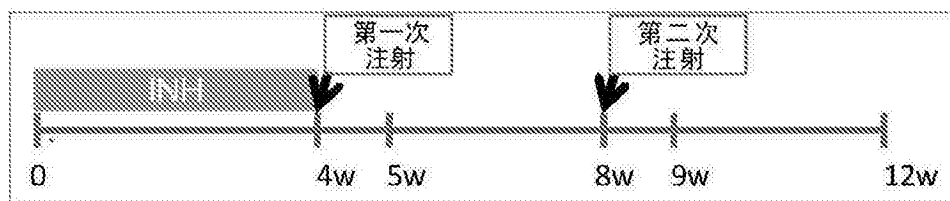


图12

总结HIV-响应者



■ 第一次注射后1周
 ■ 第一次注射后4周
 ■ 第二次注射后1周



总结HIV+响应者

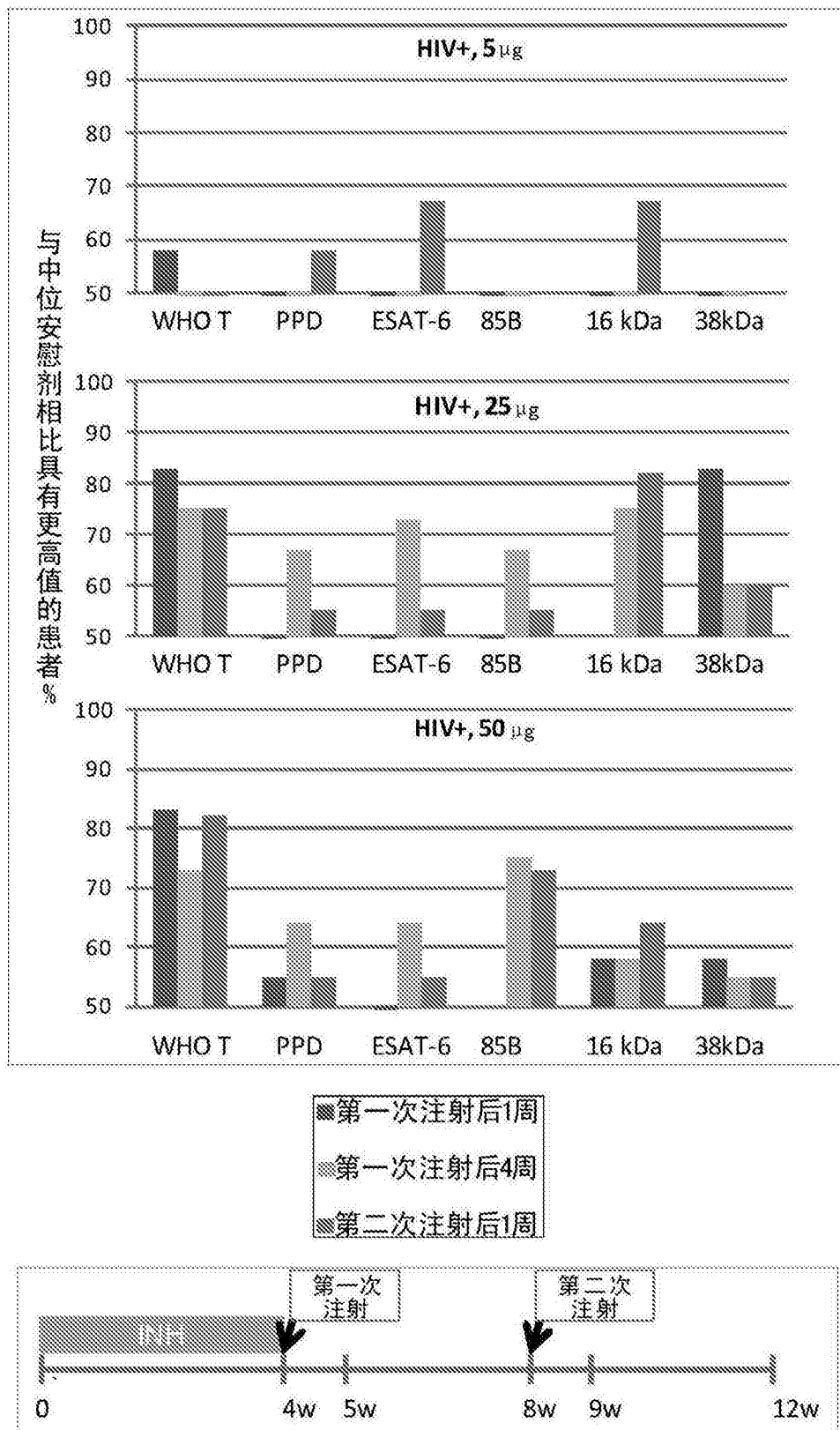


图13