

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11) 2 602 771 (13) C2

(51) МПК
A61K 39/04 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014133042/15, 12.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.01.2012

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2016 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 20.11.2016 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20090081284 A1, 26.03.2009. EP 2332571 A1, 15.06.2011. WO 2010031883 A1, 25.03.2010. WO 2008053055 A1, 08.05.2008. Y.RIFFO-VASQUEZ et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis chaperonins on bronchial eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic inflammation* // Clin Exp Allergy 2004; 34:712-719;. Yu DENG et al. The (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 12.08.2014

(86) Заявка РСТ:
IB 2012/000353 (12.01.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/104943 (18.07.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КАРДОНА ИГЛЕСИАС Пере Хоан (ES),
АМАТ РИЕРА Иса贝尔 (ES),
РЕЕС МОРЕНО Бланка (ES),
АМАТ ФАБРЕГАТ Мария Мерсе (ES)

(73) Патентообладатель(и):

АРЧИВЕЛЬ ФАРМА, С.Л. (ES)

R U
2 6 0 2 7 7 1 C 2

(54) ВАКЦИНА МБТК ПРОТИВ АСТМЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и раскрывает средство для лечения или профилактики аллергического состояния. При этом средство представляет собой липосомную форму, включающую: (а) фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), (б) образующее липосомы средство, (в) от 1 до 20% сахарозы. Также предложено липосомальное средство, где средний z-размер частиц составляет

150 нм или менее, и фармацевтическая композиция, включающая указанное средство. Группа изобретения обеспечивает профилактику и лечение астмы у мlekopitaющего, снижает гиперреактивность дыхательных путей, уровень эозинофилов и лимфоцитоз в дыхательных путях сенсибилизованных животных, за счет содержания 1-20% вес/объем сахарозы и специфического размера частиц (менее 150 нм) в

R U
2 6 0 2 7 7 1 C 2

R U 2 6 0 2 7 7 1 C 2

липосомальном средстве. 3 н. и 29 з.п. ф-лы, 15 ил., 10 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

Antiasthma Effect of Neonatal BCG Vaccination Does Not Depend on the Th17/Th1 but IL-17/IFN- γ Balance in a BALB/c Mouse Asthma Model.//Journal of Clinical Immunology, June 2011, Volume 31, Issue 3, pp 419-429, First online: 22 February 2011.

R U 2 6 0 2 7 7 1 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 602 771⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 39/04 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014133042/15, 12.01.2012

(24) Effective date for property rights:
12.01.2012

Priority:

(22) Date of filing: 12.01.2012

(43) Application published: 27.02.2016 Bull. № 6

(45) Date of publication: 20.11.2016 Bull. № 32

(85) Commencement of national phase: 12.08.2014

(86) PCT application:
IB 2012/000353 (12.01.2012)

(87) PCT publication:
WO 2013/104943 (18.07.2013)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
KARDONA IGLESIAS Pere Khoan (ES),
AMAT RIERA Isabel (ES),
REES MORENO Blanka (ES),
AMAT FABREGAT Marija Merse (ES)

(73) Proprietor(s):
ARCHIVEL FARMA, S.L. (ES)

R U
2 6 0 2 7 7 1
C 2

(54) MTB-C VACCINE AGAINST ASTHMA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and describes the agent for the treatment or prevention of an allergic condition. Agent, which is a liposome formulation comprising: (a) fragments of a Mycobacterium tuberculosis-complex (MTB-C) strain, (b) a liposome-forming agent, (b) 1 to 20 % sucrose. Also a liposomal agent is offered, where z-average particle size is equal to 150 nm or less, and a pharmaceutical composition comprising the specified

agent.

EFFECT: group of inventions provides the prevention and treatment of asthma in a mammal, attenuates airway hyperresponsiveness, eosinophilia level and lymphocytosis in the airways of sensitized animals, due to content of 1-20 % weight/volume of sucrose and specific particle size (less than 150 nm) in liposomal agent.

32 cl, 15 dwg, 10 tbl, 10 ex

R U
2 6 0 2 7 7 1
C 2

Настоящее изобретение относится к средству для лечения или профилактики аллергического состояния, такого как астма, у млекопитающих, таких как человек. Средство включает фрагменты штамма микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК).

- 5 Многие вещества могут вызывать развитие аллергической реакции, включая, но не ограничиваясь факторами окружающей среды, такими как пыльца, пыль, плесень, растения, такие как трава или деревья, животные, продукты питания, лекарственные средства или химические вещества. Симптомы аллергических ответов включают следующие, но не ограничиваются ими: зуд, отек, насморк, слезотечение, кашель,
- 10 бронхиальную обструкцию, затрудненное дыхание, крапивницу, сыпь, образование слизи или анафилактическую реакцию, как более тяжелое проявление. Аллергические ответы и тяжесть их проявления сильно варьируют у представителей любых конкретных видов.

Широко известно, что молекулярной основой аллергических реакций является

- 15 иммунная система млекопитающих, которая предназначена для защиты организма от потенциальной опасности. У индивидуумов, которые проявляют аллергические реакции, иммунная система реагирует на аллергены, т.е. на вещества, запускающие иммунный ответ. Типичные аллергены включают пыльцу, клещей или пыль; и обычно эти аллергены попадают через дыхательные пути, что делает их важными средствами,
- 20 запускающими аллергические ответы в дыхательных путях. Аллергические ответы, таким образом, являются реакциями иммунной гиперчувствительности к веществам, безвредным для здоровых (не страдающих аллергией) индивидуумов, но способным вызвать развитие опасных симптомов у больных индивидуумов.

Местная гиперчувствительность к аллергену также называется атопией. Атопия

- 25 может иметь наследственный компонент, хотя контакт с антигеном обязательно предшествует развитию реакции гиперчувствительности. Одним из самых распространенных аллергических заболеваний дыхательных путей является аллергическая астма, которая относится к числу наиболее частых аллергических ответов. В свою очередь считается, что аллергическая астма представляет собой наиболее
- 30 распространенный тип астмы. Почти у 90% детей с аллергической астмой встречаются другие виды аллергии, у взрослых такая ситуация наблюдается в 50% случаев. Вдыхание специфичных аллергенов может запускать развитие симптомов астмы, связанных с аллергической астмой. Почти всем больным астмой (аллергической или неаллергической) становится хуже после физических упражнений на холодном воздухе
- 35 или после вдыхания любого вида дыма, пыли, паров и иногда сильных запахов.

- Астма представляет собой обструктивное заболевание легких и одно из самых частых заболеваний, встречающихся в лечебной практике. Астма обычно характеризуется дыхательной обструкцией разной степени, воспалением дыхательных путей и бронхиальной гиперчувствительностью. Некоторые пациенты с астмой проявляют
- 40 гиперчувствительность к обычным средствам, попадающим через дыхательные пути, к таким как пыльца. Астма представляет собой хроническое воспалительное заболевание дыхательной системы, которое приводит к повреждению эпителия дыхательных путей, инфильтрации иммунных клеток, а также к напряжению гладкой мускулатуры. Астма является хроническим воспалительным заболеванием дыхательной системы, которое
 - 45 характеризуется обратимой обструкцией дыхательных путей и гиперреактивностью трахеи и бронхов, приводящей к сужению дыхательных путей. Ее клинические характеристики включают бронхиальную обструкцию, одышку и кашель. Хотя наиболее распространенной формой астмы является аллергическая астма, другие факторы,

способствующие развитию астмы, включают инфекцию, физические упражнения, загрязнение воздуха и, возможно, эмоциональные факторы. У пациентов, страдающих астмой, воздух проходит из легких в нос и в ротовую щель, приводя к затруднению дыхания. Данные симптомы могут быть хроническими или острыми, или острым

5 проявлением хронического заболевания; часто они развиваются в ответ на изменения окружающей среды, такое как изменение погоды, наличие аллергенов и/или инфекции дыхательных путей. Астма также определяется как пароксизмальная или хроническая одышка вследствие нарушения работы легких.

Без предпочтения какой-либо теории считается, что генетическая

10 предрасположенность часто играет роль в развитии астмы и других аллергических ответов. В то время как у некоторых пациентов прослеживается семейная история астмы или других аллергических реакций, у многих пациентов отсутствует личный или семейный анамнез.

Бронхиальная астма характеризуется повторяющимся сокращением гладкой

15 мускулатуры и проявляется в виде хронического или эпизодического состояния или в виде эпизодически проявляющихся симптомов хронического заболевания. Клинические характеристики включают эпизодическую или хроническую бронхиальную обструкцию, кашель и чувство сдавленности в груди, ограничение потока воздуха при исследовании функционирования легких и полную или частично обратимую обструктивную

20 дисфункцию после проведения бронходилататорной терапии.

Синдром, лежащий в основе астмы, представляет собой хроническое воспаление, и в легких пациентов часто наблюдается гипервоспаление. Отличительным признаком астмы является бронхиальная гиперреактивность (бронхиальная

25 гиперчувствительность). Бронхиальная гиперчувствительность (или другие сочетания с верхними дыхательными путями или гиперреактивность) представляет собой состояние, характеризующееся легко начинающимся бронхоспазмом (сокращением бронхиол или малых дыхательных путей). Основным симптомом, проявляющимся у пациентов с астмой, является гиперчувствительность дыхательных путей (гиперреактивность дыхательных путей), т.е. избыточное сокращение бронхиальных мышц в ответ на

30 неспецифический бронхоконстриктор, такой как метахолин. Метахолин (Провохолин) представляет собой синтетический холиновый эфир, действующий как неселективный агонист мускаринового рецептора в парасимпатической нервной системе. Его можно использовать для диагностики бронхиальной гиперреактивности/гиперчувствительности (эти термины используются как взаимозаменяемые) при проведении

35 бронхопровокационной пробы. Использованные с этой целью химические соединения, подобные метахолину или гистамину, вызывают бронхоспазм также у нормальных индивидуумов, но для людей с бронхиальной гиперчувствительностью пороговое значение ниже.

Распространение и тяжесть астмы и других атопических/аллергических реакций

40 значительно возросла с середины двадцатого века. Несколько исследований указывают на существование корреляции между распространением атопических нарушений, включающих астму, и встречей с антигенами в раннем возрасте. Дети, растущие на фермах, имеющие большое число старших братьев и сестер и посещающие детские дошкольные учреждения в раннем возрасте, видимо, в основном защищены от астмы

45 и других атопических состояний. Эти наблюдения способствовали выдвижению «гиgienической гипотезы», согласно которой риск развития атопического заболевания связан с пониженным числом контактов с микробами в детстве (Strachan, BMJ., 1989, 299:1259-1260; и Rook et al., Springer Semin. Immunopathol., 2004. 25: 237-255). В настоящее

время считается, что активация врожденной системы иммунитета антигенами у подверженных воздействию антигенов людей (детей) может быть молекулярным механизмом, лежащим в основе данного феномена. Система врожденного иммунитета основана на узнавании «чужеродного» профиля (патоген/микроб-ассоциированного молекулярного паттерна (ПАМП/МАМП)) и развитии быстрого, но неспецифичного ответа на потенциальные патогены (предварительная встреча с определенным патогеном не требуется).

Известно, что цитокины Т-хелперов 2 (Tx2) играют важную роль в аллергической астме и других аллергических/атопических состояниях. Эти цитокины Tx2, включающие в числе прочих интерлейкин-4 (ИЛ-4), ИЛ-5 и ИЛ-13, вызывают многие проявления атопии и воспаления, такие как переключение В-клеточного изотипа на продукцию иммуноглобулинов Е, хемотаксис и активацию эозинофилов, а также специфичные для дыхательных путей ответы, такие как бронхиальная гиперреактивность (Kline, Proc. Am. Thor. Soc., 4 (3):283-8, 2007). Эозинофильные гранулоциты, обычно называемые эозинофилами (или ацидофилами), представляют собой лейкоциты, являющиеся одним из компонентов иммунной системы, отвечающим за борьбу с многоклеточными паразитами и определенными инфекциями позвоночных. Вместе с тучными клетками они также контролируют механизмы, связанные с аллергией и астмой. Это гранулоциты, развивающиеся в процессе кроветворения в костном мозге перед миграцией в кровяное русло. При аллергической астме эозинофилы обнаруживаются в областях, окружающих бронхи; такие клетки называются перибронхиальными эозинофилами.

Поскольку Tx1- и Tx2-ответы являются антагонистическими, было сделано предположение о том, что индукция Tx1-ответа может защитить от нежелательных Tx2-ответов (от атопических состояний, таких как аллергическая астма), и что такая индукция Tx1-ответа может способствовать повышению предрасположенности к атопической астме. Однако пониженное число аллергических заболеваний у детей с глистной инвазией (с интенсивным Tx2-воспалением), а также увеличивающееся распространение Tx1-опосредованных нарушений (таких как диабет 1 типа, воспаление кишечника и множественный склероз), идущее параллельно с эпидемией астмы, позволяют предположить, что индукция ТХ1-опосредованного иммунитета не может корректно объяснить защитное действие, описанное гигиенической гипотезой. Недавно сделанная работа была посвящена индукции ответа Т-регуляторных клеток, которые известны своей способностью подавлять Tx1- и Tx2-опосредованное воспаление, патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (Kline et al., J Allergy Clin Immunol 2005; 116:1202-05).

Аллергическая астма представляет собой заболевание дыхательных путей, которое становится все более распространенным сегодня и лечение которого, не всегда успешное, сосредоточено на лечении симптомов.

Такое лечение может включать ингаляцию кортикоステроидами или введение бета-агониста, метилксантина, холинэргических средств или лейкотриеновых агонистов. Однако эти средства не всегда действуют только на астму, но обладают существенными побочными эффектами. Таким образом, желательно использовать средства, действующие на определенные состояния, и в свете этого перспективным направлением настоящего исследования является изучение использования микробных продуктов для регуляции воспаления при астме и атопических нарушениях. В этом смысле следующие вещества, которые были протестиированы в рамках клинических исследований, используются на современном уровне техники: (1) нуклеиновые кислоты с CpG мотивами; (2) БЦЖ (бацилла Кальмета-Герена, *M. bovis*), представляющая собой живую

профилактическую противотуберкулезную вакцину, получаемую из ослабленного штамма *M. bovis*; (3) средство, включающее убитую нагреванием *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*), находится в настоящее время на стадии клинической разработки.

1. CpG динуклеотиды: бактериальная ДНК отличается от ДНК млекопитающих

5 наличием неметилированных последовательностей из цитозин-гуаниновых (CpG) динуклеотидов, и многие эффекты бактериальной ДНК могут быть воспроизведены с помощью олигодезоксинуклеотидов (ОДН), содержащих такие CpG в специфических мотивах (CpG ОДН). Существует гипотеза, предполагающая, что CpG ОДН предотвращают атопическую астму, регулируя баланс Tx1/Tx2. Обзор роли CpG ДНК 10 как возможного иммуномодулятора у пациентов с астмой представлен, например, в Kline et al., J allergy Clin Immunol 2005; 116:1202-5.

2. Противотуберкулезная вакцина БЦЖ: поскольку в некоторых исследованиях было сделано предположение о том, что снижение уровня бактериальных инфекций, таких как туберкулез, является фактором, лежащим в основе растущего распространения 15 и тяжести атопических расстройств в развитых странах, профилактическая вакцина БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена) против *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), состоящая из живых ослабленных штаммов *Mycobacterium bovis*, проходила исследования в качестве средства профилактической терапии астмы. Однако в настоящее время существуют противоречия друг другу идеи об обратной связи между вакцинацией 20 БЦЖ и астмой, поскольку в разных эпидемиологических исследованиях были получены противоположные результаты. Биологическое объяснение действия БЦЖ как средства, ингибирующего аллергический ответ, обычно основывается на его способности стимулировать выработку Tx1 цитокинов. Обзор роли БЦЖ в астме представлен в Zhang et al., Chin. Med. J., 2009, 122(5):577-583.

25 3. *Mycobacterium vaccae*: третий подход основан на гипотезе о том, что вакцина *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*), изначально разработанная для лечения туберкулеза, может ослаблять астматические реакции, которые развиваются послеprovokации аллергенами. Вакцина *Mycobacterium vaccae* состоит из убитого нагреванием штамма *M. vaccae*. Было высказано предположение о том, что убитые нагреванием *Mycobacterium 30 vaccae* могут модулировать баланс Tx1/Tx1. Роль *Mycobacterium vaccae* изучали в рамках некоторых клинических исследований с положительными результатами (Camporota et al., Eur. Respir. J., 2003, 21: 287-293).

Ввиду недостатков каждого из описанных выше подходов от (1) до (3), существует необходимость в разработке новых соединений и композиций, которые смогут улучшить общее состояние и которые можно будет использовать в качестве профилактических и/или терапевтических средств.

Поставленная задача

Целью настоящего изобретения является получение улучшенного средства для терапии и профилактики аллергических состояний, включающих астму и ринит, у людей 40 и других млекопитающих.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к средству, включающему фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), применяющегося для профилактики и терапии аллергического ответа у человека или животных. В частном случае применения 45 изобретения средство обладает также по меньшей мере одной из перечисленных ниже характеристик:

1. фрагмент происходит из вирулентного *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК);

2. средство можно получить при культивировании штамма МБТК и последующей гомогенизации культуры клеток в присутствии предпочтительно неионного сурфактанта;
3. средство представлено в форме липосом, включающей образующее липосомы средство и сахарозу;
- 5 4. средство представлено в форме липосом, включающей образующее липосомы средство, с z-размером частиц 150 нм или менее.

В то время как описанные выше свойства 1-4 могут встречаться по отдельности, любое из свойств или несколько свойств могут встречаться в сочетании друг с другом. Таким образом, например, в случае характеристик 1 и 2 средство может быть в форме 10 липосом, и в случае характеристик 1 и 3 z-размер липосомных частиц может быть 150 нм или менее. В частном случае применения изобретения z-размер липосомных частиц может варьировать от 40 до 135 нм, предпочтительно от 55 до 125 нм, в то время как в альтернативном варианте липосомная форма выпуска изобретения может быть представлена эмульсией, с z-размером частиц менее 40 нм. Предпочтительно, чтобы 15 размер частиц был равномерно распределенным, так что индекс полидисперсности составлял 0,4 или менее, предпочтительно 0,3 или менее.

Также частицы, соответствующие описанным выше характеристикам от 2 до 4, могут дополнительно характеризоваться наличием в качестве штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* 20 комплекса (МБТК). В частном случае применения изобретения штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса представляет собой штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса, размещенный в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне.

Средство согласно изобретению, которое может быть в форме липосом, может дополнительно включать поверхностно-активное средство (г). Средство по изобретению 25 может дополнительно включать один или более неионных сурфактантов (д). Неионный сурфактант предпочтительно выбирают из группы, состоящей из алкилфенольных этоксилатов, этоксилатов эфира сорбита и, более предпочтительно - этоксилата октилфенола.

Фрагменты МБТК средства по изобретению могут быть представлены или могут 30 содержать фрагменты клеточной стенки.

Средство по изобретению может дополнительно характеризоваться одной или несколькими следующими чертами: (i) Средство, образующее липосомы, может быть гидрогенизованным, частично гидрогенизованным или негидрогенизованным фосфолипидом, предпочтительно лецитином, и наиболее предпочтительно соевым 35 лецитином. (ii) Поверхностно-активное средство выбирают из холата, дезоксихолата, холестерина и гемисукцината холестерина. (iii) Фрагменты представляют собой или содержат белковые фрагменты МБТК. В частном случае применения изобретения средство может содержать не менее двух, предпочтительно трех, более предпочтительно четырех, и наиболее предпочтительно все перечисленные ниже:

- 40 (i) первый полипептид, имеющий молекулярный вес около 70 кДа, пептидное картирование которого схоже с пептидным картированием белка HSP70 *M. tuberculosis* (Rv0350),
- (ii) второй полипептид, имеющий молекулярный вес около 38 кДа, пептидное картирование которого схоже с пептидным картированием 38 кДа белка *M. tuberculosis* 45 (Rv0934),
- (iii) третий полипептид, имеющий молекулярный вес около 30 кДа, пептидное картирование которого схоже с пептидным картированием белка Ag85B *M. tuberculosis* (Rv1866c), и

(iv) четвертый полипептид, имеющий молекулярный вес около 10 кДа, пептидное картирование которого схоже с пептидным картированием белка CFP10 M. tuberculosis (Rv3874), и

(v) пятый полипептид, имеющий молекулярный вес около 6 кДа, пептидное

⁵ картирование которого схоже с пептидным картированием белка ESAT-6 M. tuberculosis (Rv3875).

Кроме того, по меньшей мере один из следующих антигенов *Mycobacterium tuberculosis* или его фрагмент может присутствовать в средстве по изобретению: HSP70, 38 кДа белок и Ag85B. Также одна или несколько миклевых кислот и/или конъюгированных ¹⁰ с сахаром миколатов могут входить в состав средства, предпочтительно димиколат трегалозы и/или гликолипид, предпочтительно липоарabinоманнан. Средство по изобретению может дополнительно содержать одну или несколько солей или их растворов, а предпочтительной солью является хлорид натрия.

Особенно в том случае, когда средство обладает описанной выше характеристикой

¹⁵ 2, т.е. может быть получено при культивировании штамма МБТК и гомогенизации культуры клеток в присутствии предпочтительно неионного сурфактанта, способ получения может дополнительно характеризоваться следующим: (а) культивирование штамма МБТК в течение периода, равного или превышающего три недели, и затем (б) гомогенизация культуры клеток в присутствии неионного сурфактанта. В ²⁰ предпочтительном варианте применения настоящего изобретения способ получения дополнительно включает следующие стадии:

а. разделение нефрагментированных клеток и растворимых компонентов посредством центрифугирования,

б. проведение химической или физической обработки фракции клеточных стенок для

²⁵ инактивации возможно вирулентных клеток штамма, которые он может содержать, и в. высушивание средства с помощью лиофилизации.

Хранение средства, в соответствии с настоящим изобретением, можно осуществлять с помощью любого способа, известного в данной области техники, однако в случае выпуска в форме липосом, в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно ³⁰ хранить с помощью лиофилизации.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей средство (в форме липосом) по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в профилактике или терапии любого аллергического ответа у человека или животных.

³⁵ В частном случае применения изобретения аллергический ответ, который можно лечить средством (например, в форме липосом) по изобретению, может быть опосредован иммуноглобулинами Е. Ответ может быть атопическим. Аллергический ответ может быть нарушением дыхания и/или бронховаскулярным воспалением.

Предпочтительно, чтобы ответ выбирали из астмы, поллиноза, ринита и экземы. Без ⁴⁰ предпочтения какой-либо теории в настоящее время считается, что астма, поллиноз, ринит и экзema могут включать аллергический ответ. Однако изобретение относится ко всем способам применения средства и фармацевтической композиции, описанной здесь, в профилактике или терапии любого состояния из группы, включающей астму, поллиноз, ринит и экзему, а также других состояний, независимо от вопроса о том, ⁴⁵ лежит ли аллергический ответ в основе астмы, поллиноза, ринита и экземы у конкретного индивидуума. Однако в частном случае применения изобретения предпочтительно, чтобы астма была аллергической астмой, а ринит был аллергическим ринитом. В частном случае применения изобретения астма представлена бронхиальной астмой.

Способ введения не ограничен ничем особым, кроме требований характеристик средства или композиции. Однако предпочтительно, чтобы средство или композиция по изобретению были в форме для инъекций, предпочтительно подкожных или внутримышечных, или для сублингвального, ингаляционного, чрескожного или

5 внутрикожного введения. В частном случае применения изобретения средство или фармацевтическая композиция по изобретению предназначены для введения дозы 200 мкг или менее, предпочтительно дозы 50 мкг и менее, а наиболее предпочтительно дозы 25 мкг.

В частном случае применения изобретения средство или фармацевтическая

10 композиция по изобретению предназначены для применения для профилактики аллергической реакции. В альтернативном случае применения изобретения средство или фармацевтическая композиция по изобретению предназначены для применения для терапии аллергической реакции.

Средство по изобретению можно вводить один или несколько раз, а в

15 профилактических целях предпочтительно вводить по меньшей мере два раза, более предпочтительно более двух раз. Средство или фармацевтическая композиция по изобретению могут быть предназначены для повторного введения, предпочтительно с интервалом в одну неделю или более, а более предпочтительно в две недели или четыре недели.

20 Краткое описание чертежей

Фигура 1: Блок-схема, показывающая процесс, расположенный выше действующего вещества ФМБТК, включающий материалы и реагенты, участвующие в процессе, и соответствующие производственные контроли.

25 Фигура 2: Блок-схема, показывающая процесс, расположенный ниже действующего вещества ФМБТК, включающий материалы и реагенты, участвующие в процессе, и соответствующие производственные контроли.

Фигура 3: Блок-схема характеристик белка.

30 Фигура 4: Идентификация антигенов с помощью электрофореза в поликариламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия и окрашивания Кумасси синим. Показаны стандартные антигены ESAT6 (6 кДа) (7); CFP10 (10 кДа) (6); Ag85B (30 кДа)(1); 38 кДа (2); HSP70 (70 кДа) (4), а также маркеры молекулярного веса (5).

35 Фигура 5: Характеристика белков. Фигура 5а: Белковый профиль: белковый профиль стандартов сравнения ФМБТК-52.1 (с 1 по 6) в конечной концентрации 15,6 мкг ФМБТК/мл (1, 2), 6,25 мкг ФМБТК/мл (3, 4) и 1,56 мкг ФМБТК/мл (5, 6); электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия с последующим окрашиванием Кумасси.

Молекулярный вес указан в кДа. 5б: Идентификация полосы 19 кДа; электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия с последующим окрашиванием серебром. 5с: Белковый профиль: идентификация полос (10 кДа и 6 кДа) в указанных партиях ФМБТК с помощью электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия и окрашивания

40 серебром, проведенного параллельно со стандартом ESAT-6 от Lionex. Разные партии ФМБТК (1, 2, 3, 9, 10, 11, (партия ФМБТК-52.1 на дорожке 9)), стандарт ESAT-6 от Lionex в разных концентрациях (от 4 до 8); 5д: Идентификация антигена M. tuberculosis HSP70 (Rv0350) в партиях ФМБТК с помощью Вестерн-блота со специфичными антителами, проведенная параллельно со стандартом M. tuberculosis HSP70. Разные

45 партии ФМБТК (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9), стандарт HSP70 (5, 6); 5е: Идентификация антигена M. tuberculosis 38 кДа (Rv 0934) в партиях ФМБТК с помощью Вестерн-блота со специфичными антителами, проведенная параллельно со стандартом M. tuberculosis 38 кДа от Lionex. Детектирование флуоресценции с помощью системы Odyssey. Разные

партии ФМБТК (1, 2, 3, 6, 7), стандарт 38 кДа (4, 5). 5f: Идентификация антигена M. tuberculosis Ag85B (Rv 1886c) в партиях ФМБТК с помощью Вестерн-блота со специфичными антителами, проведенная параллельно со стандартом M. tuberculosis Ag85B от Lionex. Детектирование флуоресценции с помощью системы Odyssey. Партии

5 ФМБТК (1, 2, 3, 5, 6, 7), стандарт Ag85B (4).

Фигура 6: Взаимодействие указанных белковых полос из разных партий ФМБТК (50 мкг/дорожка) с разведенной 1/8000 сывороткой, полученной из зараженных мышей после двукратной инокуляции липосомной формой на основе фармацевтической

10 композиции вакцины в соответствии с настоящим изобретением с помощью методики Вестерн-блота.

Фигура 7: Анализ липидов. 7a: Идентификация полиацилтрегалозы (ПТ), 6,6'-димиколата трегалозы (ДМТ) и диацилтрегалозы (ДАТ) в стандартах сравнения (H73Rv (2) и NCTC 13536 (1) и в разных партиях ФМБТК (3-9), и в стандарте ДМТ (10) с помощью тонкослойной хроматографии. 7b: Идентификация 6,6'-димиколата трегалозы

15 (ДМТ) в партиях ФМБТК с помощью тонкослойной хроматографии. Панели (A) и (B) представляют результаты двух независимых исследований. (A) Стандарт ДМТ (11) и (12), остальные дорожки - разные партии ФМБТК. В: (1) ДМТ (1) и (12), остальные дорожки - разные партии ФМБТК. 7c: Паттерн миколевых кислот I, III и IV в разных

20 партиях ФМБТК, определенный с помощью тонкослойной хроматографии. Панели (A), (B) и (C) представляют результаты трех независимых исследований. (A) Партии ФМБТК (1-6 (ФМБТК-51.2 стандарт 6)). (B) для иллюстрации/сравнения, (C) партия ФМБТК-47b (1) по сравнению со стандартом миколевой кислоты (2). 7d: Идентификация липоарбиноманнана (ЛАМ) (стандарт на левой дорожке, на остальных дорожках - образцы, полученные из липосом, в соответствии с настоящим изобретением).

25 Фигура 8: Препарат массы суспензии концентрата липосом, полученный замораживанием-разламыванием (электронная микроскопия).

Фигура 9: Блок-схема процесса в соответствии с предпочтительным способом реализации настоящего изобретения.

Фигура 10 показывает схему протокола: индукция астмы, лечение с помощью

30 ФОРМУЛЫ А (см. пример 11), вариабельные величины, измеренные у прошедших лечение и контрольных животных.

Фигура 11: представление результатов в виде столбчатой диаграммы, показывающей среднее всех индивидуальных значений.

Фигура 12 показывает эффекты действия овальбумина на нелеченых животных при

35 сравнении функционирования легких и привлечения эозинофилов в сенсибилизованных и несенсибилизованных животных. Как показывают данные, процесс сенсибилизации был эффективным, поскольку у данных животных, получивших овальбумин, развивался четкий и значительный ($p<0,001$, 2-факторный дисперсионный анализ) повышенный ответ дыхательных путей на метахолин при сравнении с несенсибилизованными

40 животными (Фигура 12a). Кроме того, дыхательные пути несенсибилизованных животных содержали очень мало эозинофилов, в то время как в дыхательных путях сенсибилизованных овальбумином животных изобретатели обнаружили значительное повышение ($p<0,001$, критерий Стьюдента) легочных эозинофилов (Фигура 12b). Таким образом, настоящая модель обеспечивает оценку потенциальных эффектов, обусловленных исследуемыми способами лечения.

Фигура 13 показывает бронхиальную реактивность в ответ на повышающиеся дозы метахолина в 7 группах мышей, в то время как Фигура 14 показывает четыре группы терапии (a, b, c и d). Для упрощения представления всех данных достоверность

статистических отличий указана только на Фигуре 14.

На Фигуре 14 показаны нормализованные кривые дозозависимости, полученные для каждого животного по сравнению с ответом на исходном уровне.

Несенсибилизованные животные, обработанные БЦЖ или ФОРМУЛОЙ А (П),

- 5 демонстрировали более высокую реактивность по сравнению с несенсибилизованными животными в группе нелеченого контроля (14a). При сравнении животных, получивших вакцину БЦЖ, не было замечено отличий в бронхиальной реактивности между сенсибилизованными и несенсибилизованными животными (14b). В условиях обработки вакциной ФОРМУЛЫ А профилактическое введение (П)
- 10 сенсибилизованным животным приводило к развитию пониженной реактивности по сравнению с несенсибилизованными животными, получившими такую же вакцину (14c). Более того, уровень был ниже реактивности, наблюдаемой у сенсибилизованных животных и животных, обработанных БЦЖ (14d). При сравнении с кривой, полученной для нелеченых сенсибилизованных мышей, ингибирование реактивности становится очевидным ($p<0,001$, 2-факторный дисперсионный анализ), даже если уровень значений исходной реактивности, наблюдаемой у несенсибилизованных животных, не достигается. Режим терапевтической обработки несколько снижает ответ на метахолин, начиная с дозы 2,50 мг/мл, хотя отличие никогда не становится статистически достоверным (14d).

- 20 Фигура 15: графики статистической достоверности уровня эозинофилов в разных группах. Подробное описание см. в основном тексте.

Определения

- «Размер частиц» соответствует, если иное не определено, диаметру частиц. Там, где размер частиц не может быть определен точно, имеется в виду приблизительный размер частиц.

«z-размер» представляет собой средний размер частиц, определенный, как описано в разделе материалов и методов.

Сокращения

30	БАЛ	Бронхоальвеолярный лаваж
	БЦЖ	Бацилла Кальмета-Герена
	КОЕ	Колониеобразующая единица
	CpG	Цитозин-гуаниновый динуклеотид (cytosine-guanine dinucleotide)
	ЛП	Лекарственный препарат
	ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
35	ELISPOT	Метод иммуноферментных пятен (Enzyme-linked immunospot assay)
	ЕМЕА	Европейское медицинское агентство (European Medicines Agency)
	ФМБТК	Фрагменты штамма микобактерий туберкулезного комплекса
	ИФН- γ	Интерферон гамма
	IgE	Иммуноглобулин E (Immunoglobulin E)
40	IGTIP	Научный институт здравоохранения Germans Trias i Pujol (Institut per a la Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol)
	ИЛ	Интерлейкин
	ИЛП	Исследуемый лекарственный препарат
	в.б.	внутрибрюшинно
	ПК	Производственные контроли
	СКЛ	Суспензия концентрата липосом
45	ЛПС	Липополисахарид
	МБТ	Mycobacterium tuberculosis
	МБТК	Микобактерии туберкулезного комплекса
	NCTC	Национальная коллекция типовых культур (National Culture Type Collection)
	ОВА	овальбумин

ОБП	Очищенный белковый продукт
q.s.	Сколько нужно (Quantum sufficit)
п.к.	подкожно
Tб	туберкулез
Tx1	Т-хелперные клетки 1
5 Tx2	Т-хелперные клетки 2
в/о	Вес/объем
о/о	Объем/объем
Форм. А	Формула А

Подробное описание изобретения

10 Настоящее изобретение относится к средству, содержащему фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) для применения в профилактике или терапии аллергического ответа у человека или животных.

Если иное не указано, термин «включающий» применяется в контексте настоящего применения для указания того, что другие наименования могут быть представлены 15 наряду с наименованиями, указанными в списке под словом «включающий». Однако в специальном случае применения настоящего изобретения термин «включающий» подразумевает возможность отсутствия других наименований, кроме представленных, т.е. в целях данного случая применения изобретения слово «включающий» понимается как «состоящий из».

20 Подробное описание раскрывает специфичные и/или предпочтительные варианты индивидуальных свойств изобретения. Настоящее изобретение также предполагает в качестве особенно предпочтительных случаев применения изобретения такие случаи применения изобретения, которые получаются при сочетании двух или более специфических и/или предпочтительных вариантов, описанных для двух или более 25 свойств настоящего изобретения.

Средство может дополнительно обладать по меньшей мере одной из следующих характеристик:

1. Фрагменты происходят из вирулентного *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК);
- 30 2. средство можно получить при культивировании штамма МБТК и последующей гомогенизации культуры клеток в присутствии предпочтительно неионного сурфактанта;
3. средство представлено в форме липосом, включающей фрагменты *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), образующее липосомы средство и сахарозу;
- 35 4. средство представлено в форме липосом, включающей фрагменты *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), образующее липосомы средство, с z-размером частиц 150 нм или менее.

На всем протяжении описания настоящего изобретения «вирулентный *Mycobacterium tuberculosis* комплекс (МБТК)» означает штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), который является вирулентным для (по меньшей мере) для людей. Известно, 40 что БЦЖ (*M. bovis*), а также убитые нагреванием средства (такие как убитые нагреванием *M. vaccae*, которые не относятся к МБТК) не являются вирулентными для иммунокомпетентных людей. В случае применения описанной выше характеристики 1 фрагменты не происходят из *M. bovis* или (убитых нагреванием) *M. vaccae*. В частном случае применения настоящего изобретения фрагменты не происходят из БЦЖ, в 45 частности, не происходят из датского штамма БЦЖ 1331. Во избежание сомнений, туберкулез не является аллергической реакцией. Предпочтительно, чтобы в рамках настоящего изобретения представленное средство не вводили для профилактики или лечения туберкулеза.

Средство, в соответствии с описанной выше характеристикой 2, можно, в частности, получить способом, включающим следующие стадии: (а) культивирование штамма МБТК в течение периода, равного или превышающего три недели, и затем (б) гомогенизацию культуры клеток в присутствии неионного сурфактанта.

⁵ Видно, что описанные выше характеристики 3 и 4 схожи в том, что средство представлено в форме липосом, включающей фрагменты *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) и образующее липосомы средство.

В то время как описанные выше свойства с 1 по 4 могут встречаться по отдельности, любое из свойств или несколько свойств могут встречаться в сочетании друг с другом.

¹⁰ Таким образом, например, в случае характеристик 1 и 2 средство может быть в форме липосом, и в случае характеристик с 1 по 3 z-размер липосомных частиц может быть 150 нм или менее, и т.п. Возможна любая комбинация 2, 3 или всех характеристик с 1 по 4. Считается, что в процессе образования липосом формируется липидное окружение, улучшающее растворимость и приводящее к образованию суспензии веществ, таких ¹⁵ как ФМБТК. Липосомы в рамках данного изобретения могут быть однослойными, многослойными или их комбинацией.

Фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) также называются ФМБТК. ФМБТК может быть любое вещество, полученное из штамма МБТК или из смеси штаммов МБТК, в котором фрагменты предпочтительно представляют собой ²⁰ белки и/или липиды или их производные. ФМБТК в рамках данного изобретения обычно представляет собой смесь разных белковых антигенов и липидов, полученных из клеток МБТК. Фрагменты клеток могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, который подходит для фрагментирования микробных или бактериальных клеток, таких как клетки МБТК, в частности, например, ²⁵ гомогенизацией. В частном случае применения настоящего изобретения они могут быть получены, как описано в WO2008053055 и EP2090318 A1, хотя не обязательно, что они ограничиваются вирулентными штаммами, как описано выше.

Гомогенизацию можно провести посредством обработки ультразвуком или с помощью маленьких шариков диаметром 0,1 мм, например, силиконовых или цирконий/³⁰ силиконовых шариков в сочетании с механическим гомогенизатором. Механический гомогенизатор, который можно использовать, представлен, например, моделью BioSpec BeadBeater®. Клетки МБТК разрушают посредством гомогенизации так, что в результате получаются маленькие фрагменты клеток, обычно включающие маленькие фрагменты клеточной стенки. В частном случае применения настоящего изобретения они могут ³⁵ быть получены, как описано в WO2008053055 и EP2090318 A1, хотя не обязательно, что они ограничиваются вирулентными штаммами, как описано выше.

Обычной особенностью процесса получения клеточных фрагментов является «детоксикация» фрагментов клеточной стенки посредством частичного обезжиривания, широко известного специалистам в данной области техники процесса, который позволяет ⁴⁰ удалить молекулы, похожие на эндотоксин, такие как липоарбиноманнан. Таким образом, предпочтительно провести детоксикацию и пастеризацию ФМБТК, и получить затем стерильную и свободную от эндотоксинов липосомную форму. Дисперсию фрагментов клеточной стенки в буфере можно лиофилизировать для улучшения хранения таким образом. Для этого дисперсию можно распределить по пробиркам и ⁴⁵ лиофилизировать при температуре от -15°C до -120°C, например, при -45°C с применением вакуума, например от 0,1 до 0,5 мбар.

При выпуске средства в форме липосом размер липосом обычно распределен таким образом, что 99,9% (по количеству) частиц меньше 1 мкм. В частном случае применения

настоящего изобретения, средний z-размер частиц, определенный методом динамического рассеяния света, составляет 150 нм или менее, предпочтительно 135 нм или менее, более предпочтительно 125 нм или менее. (Также возможно 145 нм или менее, 140 нм или менее, 130 нм или менее, 120 нм или менее, 110 нм или менее, 100 нм или менее, 95 нм или менее, 90 нм или менее, 85 нм или менее, 80 нм или менее). В методе динамического рассеяния света средний z-параметр считается стабильным и важным числом, получаемым с помощью данной техники, и размером частиц, который предпочтительно применяют в целях контроля качества. Предпочтительно, чтобы липосомы в форме, соответствующей настоящему изобретению, были мономодальными, т.е. имели единственный пик при измерении динамического рассеяния света. Более предпочтительно, чтобы липосомы в форме, соответствующей настоящему изобретению, были сферическими, что можно проверить с помощью электронной микроскопии препаратов липосом, приготовленных с помощью замораживания-раскалывания, как показано на Фигуре 8. Сферический, таким образом, означает, что не менее чем для 90% липосомных частиц (по количеству) все точки поверхности индивидуальных частиц имеют схожую или одинаковую удаленность от центра липосомы, т.е. отношение минимального радиуса такой частицы к максимальному радиусу этой же частицы составляет 0,6 или более, 0,7 или более, 0,8 или более, 0,9 или более. Липосомная форма, в соответствии с настоящим изобретением, может включать многослойные или однослойные липосомы или их смесь. В соответствии со стандартной информацией, известной специалистам в данной области техники, измерения динамического рассеяния света следует проводить в подходящем буфере, т.е. в буфере, который сам по себе не вызывает разрушения, распада или слияния липосом или не дестабилизирует их физически другим способом. Как показывает опыт, любой буфер является подходящим, если его ионная сила и значение pH сравнимы с таковыми у буфера, в котором формировались липосомы. Предпочтительно применять буфер, схожий или идентичный по составу буферу, в котором формировались липосомы.

В случае варианта 3 применения настоящего изобретения, липосомная форма предпочтительно включает от 1 до 20% (вес/объем) сахарозы, предпочтительно от 2 до 12% (вес/объем) сахарозы, более предпочтительно от 3 до 8% (вес/объем) сахарозы и наиболее предпочтительно от 4 до 6% (вес/объем) сахарозы. Около 5% сахарозы особенно предпочтительно.

В одном частном случае применения настоящего изобретения описанная выше липосомная форма должна иметь средний z-размер частиц в пределах от 40 до 150 нм, предпочтительно от 50 до 135 нм, более предпочтительно от 55 до 125 нм. (Также возможно 145 нм или менее, 140 нм или менее, 130 нм или менее, 120 нм или менее, 110 нм или менее, 100 нм или менее, 95 нм или менее, 90 нм или менее, 85 нм или менее, 80 нм или менее в сочетании с любым более низким значением из предыдущего предложения). Таким образом, средний z-размер частиц (и в общем случае значения размера во всем данном описании изобретения) предпочтительно измерять при помощи динамического рассеяния света, как описано в общих чертах выше и в подробностях в разделе «Материалы и методы».

В альтернативном варианте применения настоящего изобретения средний z-размер частиц описанной выше липосомной формы может быть меньше, и тогда липосомная форма представляет собой эмульсию, т.е. в данном частном случае применения настоящего изобретения средний z-размер частиц предпочтительно меньше 40 нм.

Предпочтительно, чтобы размер частиц был равномерно распределенным, так что индекс полидисперсности составлял 0,4 или меньше, а предпочтительно 0,3 или меньше.

Также частицы, соответствующие описанным выше характеристикам от 2 до 4 могут дополнительно характеризоваться наличием в качестве штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК). В частном случае применения изобретения штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК), применяемый для формулы, в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой штамм МБТК NCTC 13536, размещенный в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне.

В предпочтительном варианте любого или нескольких из описанных выше случаев применения настоящего изобретения липосомы формы, соответствующей настоящему изобретению, могут быть также монодисперсными, что означает отсутствие значительного распределения ширины частиц. Технически это анализируют при помощи индекса полидисперсности, определяемого по динамическому рассеянию света, который должен составлять 0,4 или менее, предпочтительно 0,3 или менее и наиболее предпочтительно 0,25 или менее.

Фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) получают при помощи процесса, включающего вышерасположенный и нижерасположенный процессы. В частном случае применения настоящего изобретения они могут быть получены, как описано в WO2008053055 и EP2090318 A1, хотя не обязательно, что они ограничиваются вирулентными штаммами, как описано выше. Для иллюстрации пять основных стадий кратко описаны здесь, и частные случаи процессов приведены в Примерах 2 и 3 ниже.

Вышерасположенный процесс (Пример 2):

Стадия 1: культура *Mycobacterium tuberculosis*

Стадия 2: сбор *Mycobacterium tuberculosis* и замораживание грубого экстракта

Нижерасположенный процесс:

Стадия 3: фрагментация клеток и обезжикивание

Стадия 4: пастеризация

Стадия 5: лиофилизация (при необходимости)

В более предпочтительном варианте любого из описанных выше случаев применения настоящего изобретения штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК)

представляет собой вирулентный штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК). Вирулентный относится к патогенности и/или к способности бацилл проникать в ткани хозяина (человека) и вызывать активное развитие заболевания. Вирулентный штамм может быть любым вирулентным штаммом любого вида, относящегося к МБТК, но предпочтительно, чтобы это был штамм *M. tuberculosis*. Штамм МБТК в соответствии

с настоящим изобретением можно культивировать посредством инокуляции в среде для культивирования, хорошо известной специалистам в данной области техники, например, в агаре Миддлброка 7H10 или 7H11, в среде Сатона или в среде Проскауэра-Бека. Культивирование вирулентного штамма предпочтительно проводить в течение продолжительного периода времени, например, периода, равного или превышающего

три недели, предпочтительно от 3 до 4 недель. Температуру культуры предпочтительно поддерживать в интервале от 34°C до 38°C. После окончания культивирования клетки собирают и выделяют способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, такими как описанные в патентной заявке ES2231037-A1.

Предпочтительно, чтобы образующее липосомы средство для производства

липосомной формы было гидрогенизованным, частично гидрогенизованным или негидрогенизованным фосфолипидом. Применяемый фосфолипид может включать, например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол. Наиболее распространенным является фосфатидилхолин, который можно синтезировать или

выделить из разнообразных естественных источников. Предпочтительно, чтобы образующее липосомы средство представляло собой или включало лецитин, выбранный из группы, включающей яичный лецитин и соевый лецитин. Соевый лецитин представляет собой сложную смесь фосфолипидов, включающую среди прочего фосфатидилхолин, и является особенно предпочтительным. Типичными липидами, которые можно включить в формулу в качестве самого образующего липосомы средства или в качестве дополнительного компонента, являются: дицетилфосфат (ДЦФ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), димиристоилфосфатидилглицерин (ДМФГ), диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ), диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ), диолеилфосфатидилсерин (ДОФС), дипальметоилфосфатидилхолин (ДПФХ), дипальметоилфосфатидилглицерин (ДПФГ), фосфатидилхолин (ФХ) и/или фосфатидилсерин (ФС), при этом соответствующий липид может быть гидрогенизирован, частично гидрогенизирован или негидрогенизирован. Липосомы могут быть образованы с помощью традиционных вспомогательных липидов и способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как описанные в патентной заявке ES2231037-A1.

Еще более предпочтительно, чтобы в любом из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения соотношение (а): фрагментов штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) и (б) образующего липосомы средства было в интервале от 0,01:1 до 1:1, предпочтительно в интервале от 0,06:1 до 0,1:1.

В более предпочтительном варианте любого из описанных выше случаев применения настоящего изобретения липосомная форма может дополнительно включать: (г) поверхностно-активное средство. В общих чертах, все типы средств, способных менять значение поверхностного натяжения, можно использовать в качестве поверхностно-активного средства в рамках настоящего изобретения, за исключением соединений, попадающих под приведенное выше определение средств, образующих липосомы. Разные типы поверхностно-активных веществ известны специалистам в данной области техники и могут использоваться в липосомной форме в соответствии с настоящим изобретением. Насколько известно специалистам, поверхностно-активные средства обычно представляют собой химические соединения с неполярной структурой. Без предпочтения какой-либо теории считается, что поверхностно-активные средства предпочитают располагаться на поверхности частиц, создавая таким образом, мономолекулярный слой на границе раздела, который снижает значение поверхностного натяжения. Поверхностно-активные средства также относятся к сурфактантам или активным поверхностным веществам. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в виде липосомной формы, содержащей сурфактанты, поверхностно-активное средство выбирают из стеринов и их производных, таких как холестерин, и/или солей желчных кислот или их производных, таких как холат. Особенно предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения являются такие варианты, в которых поверхностно-активное средство выбирают из холата, дезоксихолата, холестерина и гемисукцината холестерина. Хорошим, но не единственным возможным способом осуществления настоящего изобретения является такой способ, при котором липосомы включают и соевый лецитин, и холат натрия.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения липосомная форма, включающая (г) поверхностно-активное средство, представляет собой липосомную форму, в которой соотношение между (а) и (г) находится в интервале от 0,05:1 до 3:5 (объем/объем). Можно использовать различные типы образующих липосомы средств, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

При необходимости средство может дополнительно содержать добавки, улучшающие стабильность, например, витамин Е, который, как считается, действует в качестве липидного антиоксиданта и поэтому является особенно полезным в случае липосом.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

- 5 описанная выше липосомная форма представляет собой липосомную форму, в которой фрагменты клеток МБТК представляют собой или включают фрагменты клеточной стенки. Можно применять любой штамм, относящийся к МБТК, предпочтительно применять штамм, относящийся к *Mycobacterium tuberculosis*. В другом более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше
- 10 липосомная форма включает фрагменты штамма МБТК NCTC 13536, который был размещен в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне (Пример 1). Другой штамм, который можно применять, и фрагменты которого могут быть включены в липосомную форму, называется H37Rv, который можно получить, например, из Национальной коллекции типовых культур в Лондоне в Великобритании (каталожный
- 15 номер NC007416) и который часто используют исследователи в данной области техники. Также допускается применение более одного штамма, т.е. липосомная форма включает фрагменты различных, например, двух, трех или более штаммов.

Средство, представленное в настоящем изобретении, может дополнительно включать один или несколько неионных сурфактантов (e). Неионный сурфактант предпочтительно

- 20 выбирают из группы, состоящей из алкилфенольных этоксилатов, этоксилатов эфира сорбита и, более предпочтительно, этоксилата октилфенола. Данный сурфактант может быть использован в случае описанной выше характеристики 2.

Фрагменты МБТК средства, представленного в настоящем изобретении, могут включать фрагменты клеточной стенки.

25 Предпочтительно, чтобы образующее липосомы средство для производства липосомной формы было гидрогенизованным, частично гидрогенизованным или негидрогенизованным фосфолипидом. Применяемый фосфолипид может включать, например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол. Наиболее распространенным является фосфатидилхолин, который можно синтезировать или

30 выделить из разнообразных естественных источников. Предпочтительно, чтобы образующее липосомы средство представляло собой или включало лецитин, выбранный из группы, включающей яичный лецитин и соевый лецитин. Соевый лецитин представляет собой сложную смесь фосфолипидов, включающую среди прочего фосфатидилхолин, и является особенно предпочтительным. Типичными липидами, которые можно

35 включить в формулу в качестве самого образующего липосомы средства или в качестве дополнительного компонента, являются: дицитилфосфат (ДЦФ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), димиристоилфосфатидилглицерин (ДМФГ), диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ), диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ), диолеилфосфатидилсерин (ДОФС), дипальметоилфосфатидилхолин (ДПФХ),

40 дипальметоилфосфатидилглицерин (ДПФГ), фосфатидилхолин (ФХ) и/или фосфатидилсерин (ФС), при этом соответствующий липид может быть гидрогенизирован, частично гидрогенизирован или негидрогенизирован. Липосомы могут быть образованы с помощью традиционных вспомогательных липидов и способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как описанные в патентной заявке

45 ES2231037-A1.

Еще более предпочтительно, чтобы в любом из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения соотношение (а): фрагментов штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) и (б) образующего липосомы средства

было в интервале от 0,01:1 до 1:1, предпочтительно в интервале от 0,06:1 до 0,1:1.

В более предпочтительном варианте любого из описанных выше случаев применения настоящего изобретения липосомная форма может дополнительно включать: (г) поверхностно-активное средство. В общих чертах, все типы средств, способных менять

5 значение поверхностного натяжения, можно использовать в качестве поверхностно-активного средства в рамках настоящего изобретения, за исключением соединений, попадающих под приведенное выше определение средств, образующих липосомы.

Разные типы поверхностно-активных веществ известны специалистам в данной области техники и могут использоваться в липосомной форме в соответствии с настоящим

10 изобретением. Несколько известно специалистам, поверхностно-активные средства обычно представляют собой химические соединения с неполярной структурой. Без предпочтения какой-либо теории считается, что поверхностно-активные средства предпочитают располагаться на поверхности частиц, создавая таким образом, мономолекулярный слой на границе раздела, который снижает значение поверхностного

15 натяжения. Поверхностно-активные средства также относятся к сурфактантам или активным поверхностным веществам. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в виде липосомной формы, содержащей сурфактанты, поверхностно-активное средство выбирают из стеринов и их производных, таких как холестерин, и/или солей желчных кислот или их производных, таких как холат. Особенно

20 предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения являются такие варианты, в которых поверхностно-активное средство выбирают из холата, дезоксихолата, холестерина и гемисукцината холестерина. Хорошим, но не единственным возможным способом осуществления настоящего изобретения является такой способ, при котором липосомы включают и соевый лецитин, и холат натрия.

25 В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения липосомная форма, включающая (г) поверхностно-активное средство, представляет собой липосомную форму, в которой соотношение между (а) и (г) находится в интервале от 0,05:1 до 3:5 (объем/объем). Можно использовать различные типы образующих липосомы средств, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

30 При необходимости средство может дополнительно содержать добавки, улучшающие стабильность, например, витамин Е, который, как считается, действует в качестве липидного антиоксиданта.

35 В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше липосомная форма представляет собой липосомную форму, в которой фрагменты клеток МБТК представляют собой или включают фрагменты клеточной стенки.

Можно применять любой штамм, относящийся к МБТК, предпочтительно применять штамм, относящийся к *Mycobacterium tuberculosis*. В другом более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше липосомная форма 40 включает фрагменты штамма МБТК NCTC 13536, который был размещен в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне (Пример 1). Другой штамм, который можно применять, и фрагменты которого могут быть включены в липосомную форму, называется H37Rv, который можно получить, например, из Национальной коллекции типовых культур в Лондоне в Великобритании (каталожный номер NC007416) 45 и который часто используют исследователи в данной области техники. Также допускается применение более одного штамма, т.е. липосомная форма включает фрагменты различных, например, двух, трех или более штаммов.

Принимая во внимание то, что у *M. tuberculosis* существует около 4000 возможных

антигенов, невозможно проанализировать действующее вещество на предмет наличия всех этих белков. Тем не менее, было показано, что отдельные белки МБТК важны для желаемого иммунного ответа. Это пять полос белков в размером около 6, 10, 30, 38 и 70 кДа (Renshaw, et al., 2005, EMBO Journal 24(14):2491-2498; Singh, et al., 2005, Clin. Diagn.

5 Lab. Immunol. 12(2), 354-358). Таким образом, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше липосомная форма включает по меньшей мере два, предпочтительно три, более предпочтительно четыре и наиболее предпочтительно все перечисленные ниже полипептиды:

(i) первый полипептид, имеющий молекулярный вес около 70 кДа, как измерено

10 после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где первый полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием белка HSP70 M. tuberculosis (Rv0350),

(ii) второй полипептид, имеющий молекулярный вес около 38 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где второй

15 полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием 38 кДа белка M. tuberculosis (Rv0934),

(iii) третий полипептид, имеющий молекулярный вес около 30 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где третий полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием белка

20 Ag85B M. tuberculosis (Rv1866c), и

(iv) четвертый полипептид, имеющий молекулярный вес около 10 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где четвертый полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием белка CFP10 M. tuberculosis (Rv3874), и

25 (v) пятый полипептид, имеющий молекулярный вес около 6 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где пятый полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием белка ESAT-6 M. tuberculosis (Rv3875).

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

30 липосомная форма дополнительно включает липополипептид с молекулярным весом около 19 кДа, измеренным по результатам электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, пептидное картирование которого схоже с пептидным картированием 19 кДа предшественника липопротеинового антигена LpqH M. tuberculosis (Rv 3763). Соответствующую полосу можно визуализировать с помощью способов,

35 известных в данной области техники, таких как окрашивание серебром. Исследователи настоящего изобретения с удивлением обнаружили на доклинических животных моделях инфекции M. tuberculosis, вакцинированных штаммом МБТК, что общий гуморальный ответ иммуноглобулинов G против данного полипептида может быть максимальным среди всех антигенов формулы.

40 Не единственно возможные примеры возможных способов идентификации полипептидов или липополипептидов приведены в Примере 4.

Еще более предпочтительно, чтобы описанная выше липосомная форма дополнительно характеризовалась наличием по меньшей мере одного из следующих антигенов Mycobacterium tuberculosis или их фрагментов: HSP70, белка 38 кДа, Ag85B

45 и, наиболее предпочтительно, наличием по меньшей мере одного из HSP70, белка 38 кДа и Ag85B. Фрагмент в данном случае представляет собой любую часть, такую как, например, продукт деградации, любого из данных полипептидов. Возможны разные способы получения таких фрагментов, например, химический или ферментативный

гидролиз, при этом неважно, происходит ли фрагментация целенаправленно или нет, перед образованием липосом или после. Предпочтительно, чтобы соответствующий фрагмент мог быть соотнесен с его источником, например, при значительном перекрывании аминокислотной последовательности, например, на не менее чем 5, не

5 менее чем 10, не менее чем 20 последовательно расположенных аминокислот.

Фрагменты, в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно получать из бацилл, выращенных в стрессовых условиях голодаания, низкого содержания кислорода и низкого pH. Низкое содержание кислорода достигается при конфлюентном росте бактерий на чашках, запечатанных в герметичные пакеты во время роста,

10 например, в течение 21 дня, что приводит к формированию микроаэробиотического окружения. Низкий pH обусловлен следующим: в начале культивирования значение pH составляет 7,0-6,8, а в конце, через 21 день культивирования, значение pH составляет 6,4-6,5. В этих условиях метаболизм бактерий идет медленнее, и рост становится

15 стационарным. Считается, что это делает бациллы более устойчивыми к стрессу. В

15 данных условиях, вероятно, культивируемые бациллы приобретают такие же характеристики, как у латентных бацилл *in vivo* при латентной туберкулезной инфекции. Таким образом, ожидается, что антигены, присутствующие в МБТК, будут запускать новый иммунологический ответ в отношении антигенов латентных бацилл, т.е. так называемых «структурных» антигенов, а также антигенов, ассоциированных с ответом

20 на стресс.

Долгое время считалось, что гликолипиды микобактерий обладают иммуномодулирующей активностью, а именно индуцируют грануломатозный ответ и вызывают мощные адьювантоподобные эффекты. Таким образом, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше

25 липосомная форма содержит липиды, которые обычно обнаруживаются в *Mycobacterium tuberculosis*, или их производные, такие как продукты конъюгации, подобные липидам, конъюгированным с сахарами. Некоторые иммуногенные липидные компоненты были идентифицированы в образцах *M. tuberculosis* (Brennan, Tuberculosis (Edinburgh), 2003, 83 (1-3), 91-97), и были разработаны аналитические способы их определения (электрофорез,

30 электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия, тонкослойная хроматография).

Хотя выделение каждого липидного компонента потребует проведения такой агрессивной обработки, что трудно будет получить количественные данные или определить процентное содержание каждого компонента, детектируемого в экстракте МБТК или в липосомной форме, качественные характеристики будут применяться для

35 характеристики еще более предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения. В соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, в состав включена одна или несколько миколовых кислот, предпочтительно относящихся к любому или к нескольким типам I, III или IV. В качестве альтернативы или в дополнение конъюгированный с сахаром миколат, предпочтительно

40 димиколат трегалозы, может быть включен в формулу. В качестве альтернативы или в дополнение гликолипид липоарabinоманнан (ЛАМ) может быть включен в формулу. Более того, мультиантigenная природа фрагментов (мультиантigenная смесь белков плюс липидов, вместо только очищенных антигенов) считается преимуществом и, следовательно, процесс фрагментации клеток может быть адаптирован специалистом

45 для получения оптимальной смеси клеточных антигенов.

Гомогенизацию клеток МБТК проводят в присутствии одного или нескольких сурфактантов, предпочтительно неионных сурфактантов. Следовательно, описанная выше липосомная форма может дополнительно включать один или несколько

сурфактантов. Большое число таких сурфактантов хорошо известно специалистам в данной области техники. Предпочтительно, чтобы применяемый неионный сурфактант выбирали из группы, состоящей их алкилфенольных этоксилатов и этоксилатов сорбитанового эфира. Более предпочтительно, чтобы неионный сурфактант выбирали из группы этоксилатов октилфенола. Еще более предпочтительно применять этоксилаты октилфенола с содержанием оксида этилена между 7 и 8 моль; такие сурфактанты есть в продаже под названием Тритон X-114®. Гомогенизированную массу, содержащую фрагменты клеточной стенки, подвергают стандартной обработке для отделения и удаления нефрагментированных клеток и растворимых компонентов. Например, можно применять центрифугирование при разных скоростях и промывание буферным раствором, как описано в патентной заявке ES2231037-A1. Осадок, содержащий фрагменты клеточной стенки, получают после проведения указанных процессов очистки. Указанный осадок диспергируют в фосфатно-солевом буфере и подвергают стандартной обработке для обеспечения полной инактивации клеток МБТК, которые могут остаться в интактном виде после фрагментации и процесса очистки. Указанная обработка может быть химическим процессом, например, осуществляется посредством обработки формальдегидом, или физическим процессом, например, осуществляется посредством автоклавирования или пастеризации. Примеры характеристики липидов приведены ниже в Примере 5. Средство, являющееся предметом настоящего изобретения, может дополнительно содержать одну или несколько солей или их растворов, и предпочтительно, чтобы указанная соль была хлоридом натрия.

Особенно в том случае, если средство удовлетворяет описанной выше характеристике 2, т.е. может быть получено при культивировании штамма МБТК и гомогенизации культуры клеток в присутствии предпочтительно неионного сурфактанта, способ его получения может дополнительно характеризоваться следующим: (а) культивированием штамма МБТК в течение периода, равного или превышающего три недели, и затем (б) гомогенизацией культуры клеток в присутствии неионного сурфактанта. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения способ получения дополнительно включает следующие стадии:

г. разделение нефрагментированных клеток и растворимых компонентов посредством центрифугирования,
д. проведение химической или физической обработки фракции клеточных стенок для инактивации возможно вирулентных клеток штамма, которые он может содержать, и
е. Высушивание средства с помощью лиофилизации.

Процесс можно проводить, как описано в EP2090318 A1.

Средство, являющееся предметом настоящего изобретения, можно хранить с помощью любого метода, известного в данной области техники; однако в случае выпуска в форме липосом, в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно хранить с помощью лиофилизации.

В еще более предпочтительном варианте осуществления любого из вышеперечисленного липосомную форму лиофилизируют. Липосомы можно подвергнуть лиофилизации и таким образом получить иммунотерапевтическое средство в форме лиофилизованных липосом. В этом смысле дисперсию можно распределить по пробиркам и лиофилизировать при низкой температуре, такой как от -15°C до -120°C, например, при -45°C с применением вакуума, например, от 0,1 до 0,5 мбар. Пробирки, получаемые после лиофилизации, содержат липосомную форму, подходящую для применения в качестве иммунотерапевтического средства, и их предпочтительно хранить при очень низкой температуре, например, при -70°C.

Изобретение также относится к супензии, в которой липосомная форма любой из ранее описанных формул изобретения разведена в растворителе. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения растворитель данной супензии водный, более предпочтительно и наиболее предпочтительно, чтобы он представлял собой или включал физиологическую сыворотку. Способы ресуспенсирования липосомной формы в растворителе хорошо известны специалистам в данной области техники. Особенным преимуществом формулы по изобретению является то, что ее можно ресуспендировать быстрее, чем обычные липосомные формы, включающие фрагменты МБТК (см. Пример 9).

Следующим предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая средство, являющееся предметом настоящего изобретения, для применения в профилактике или терапии аллергического ответа у человека или животных, в которой средство представляет собой или включает средство, описанное выше в любом или в нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения или в их комбинации. Основной целью фармацевтической формулы/галеновой формулы действующего вещества является получение супензии, достаточно эффективной и стабильной, чтобы хорошо узнаваться клетками, и обладающей способностью запускать соответствующий иммунный ответ в организме человека или животных. В этом смысле настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей липосомную форму или супензию, описанную в любом или в нескольких описанных выше вариантах осуществления настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или растворитель. Разные такие носители, вспомогательные вещества и растворители известны специалистам в данной области техники, и они никак не ограничены данным раскрытием сущности изобретения.

Скорее можно применять любое вещество, приемлемое в качестве носителя, вспомогательного вещества или растворителя. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый адьювант. Под адьювантом в этом случае следует понимать вещество, включенное в данный вариант осуществления настоящего изобретения, в котором адьювант представляет собой вещество, способное при применении в организме человека или животных стимулировать иммунную систему в ответ на целевой антиген, при этом сам адьювант не создает иммунитет. Не ограничиваясь каким-то определенным адьювантным веществом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения адьювант представляет собой соль аллюминия, такую как хлорид аллюминия, или минеральное масло или композицию, включающую минеральное масло, такую как неполный адьювант Фрейнда (НАФ) или полный адьювант Фрейнда (ПАФ), или галогенид аммония, такой как алкилированный бромид аммония, такой как бромид диметилдиоктадециламмония.

Конкретное средство, являющееся предметом настоящего изобретения, для лечения по изобретению разработано ARCHIVEL FARMA (Испания) и называется Формулой А. Его приготовление описано в разделе «Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения».

Данные варианты применения поддержаны результатами, которые изобретатели получили на мышиной модели аллергической астмы, что подробно описано ниже.

Кратко, мышей сенсибилизовали овалбумином, делая внутрибрюшинную инъекцию овалбумина, а затем подвергали местному воздействию распыленных небулайзером антигенов. Сенсибилизованных мышей разделяли на группы - нелеченых и обработанных вакциной, БЦЖ (положительный контроль) или инертным веществом

- все препараты вводили подкожно. Изобретатели формировали контрольные группы для указанных способов лечения из несенсибилизованных мышей. Повышенная бронхиальная реактивность в ответ на метахолин, а также наличие перибронхиальных эозинофилов у животных, обработанных овальбумином (но не леченых), указывали на эффективный запуск аллергического процесса. Вакцинация БЦЖ снижала почти в два раза уровень воспаления (недостоверно) и бронхиальную гиперреактивность (без возврата к исходным уровням). Введение вакцины ФОРМУЛЫ А в профилактических целях значительно снижало уровень легочных эозинофилов и возвращало почти к исходным уровням значения бронхиальной гиперреактивности. Применение вакцины ФОРМУЛЫ А в качестве терапевтического средства значительно снижало бронховаскулярное воспаление, при этом наблюдалась тенденция к снижению бронхиальной гиперреактивности в ответ на антиген овальбумина. На основании этих результатов изобретатели делают вывод о том, что при 3-разовом введении перед стимуляцией вакцина ФОРМУЛЫ А обладает явным положительным действием на дыхательные пути обработанных овальбумином мышей, в то время как терапевтическое введение определенно снижает воспаление и оказывает умеренное действие на бронхиальную гиперреактивность.

В частном случае осуществления настоящего изобретения аллергический ответ, который можно лечить средством (липосомной формой), являющимся предметом настоящего изобретения, опосредован иммуноглобулинами Е. Иммуноглобулины Е представляют собой ассоциированные с аллергией иммуноглобулины, секретируемые В-клетками, и переключение В-клеток на выработку иммуноглобулинов Е обычно индуцируется Tx2 цитокинами. Поэтому желательно в одном из аспектов настоящего изобретения, чтобы переключение изотипа на иммуноглобулины Е не усиливалось и/или не запускался ответ Tx2.

Ответ может быть атопическим. Аллергический ответ может быть нарушением дыхания и/или бронховаскулярным воспалением. Предпочтительно, чтобы ответ выбирался из астмы, поллиноза, ринита и экземы. Без предпочтения какой-либо теории, в настоящее время считается, что астма, поллиноз, ринит и экзema могут включать аллергический ответ. Однако изобретение относится ко всем способам применения средства и фармацевтической композиции, описанной здесь, в профилактике или терапии любого состояния из группы, включающей астму, поллиноз, ринит и экзему, а также других состояний, независимо от вопроса о том, лежит ли аллергический ответ в основе астмы, поллиноза, ринита и экземы у конкретного индивидуума. Однако в частном случае применения изобретения предпочтительно, чтобы астма была аллергической астмой, а ринит был аллергическим ринитом. В частном случае применения изобретения астма представлена бронхиальной астмой. Средство, являющееся предметом настоящего изобретения, также предназначено для лечения или профилактики множественной аллергии. Множественная аллергия представляет собой состояние со многими аллергическими реакциями, например, с двумя или более из следующих: астма, экзема и аллергический ринит, которые развиваются одновременно. Ринит представляет собой раздражение/воспаление слизистой поверхности носа. Симптомами ринита являются заложенность носа, насморк, постназальный синдром. Наиболее частый тип ринита, аллергический ринит, может вызывать развитие дополнительных симптомов, таких как чихание и зуд в носу, кашель, слабость.

Способ введения не ограничен ничем особым, кроме требований характеристик средства или композиции. Препарат можно вводить в слизистую, например, в слизистую глаза, носовой полости, рта, желудка, кишечника, влагалища или мочевыделительной

системы, или парентерально, например, подкожно, внутрикожно, чрескожно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно, или с помощью ингаляции. Парентеральное введение может быть предпочтительным в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. В частном случае осуществления настоящего изобретения изобретение распространяется на липосомную форму, суспензию или фармацевтическую композицию для инъекции. Предпочтительно, чтобы средство или композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения, были в форме инъекций, предпочтительно подкожных или внутримышечных, или для сублингвального введения, или для введения с помощью ингаляции.

Подходящая доза липосомной формы, суспензии или фармацевтической композиции в соответствии с описанным выше в отношении их применения для обработки человеческого организма в рамках терапии зависит от нескольких параметров, включающих способ введения и пациента, которому предстоит пройти лечение. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения доза предназначена для введения в организм человека. В этом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вводят дозу, содержащую от 1 до 1000, предпочтительно от 3 до 250. В частном случае осуществления настоящего изобретения средство или фармацевтическая композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения, предназначены для введения в количестве 200 мкг или менее на дозу, и предпочтительно от 5 до 50 мкг ФМБТК на дозу, например, наиболее предпочтительно 25 мкг ФМБТК на дозу.

В частном случае осуществления настоящего изобретения средство или фармацевтическая композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения, предназначены для применения в профилактике аллергического ответа.

Профилактическая медицина или профилактика относится к мерам, принимаемым скорее для предотвращения заболеваний, чем для лечения их или их симптомов. Профилактика может включать осмотры и скрининговые исследования, проводимые в зависимости от возраста, состояния здоровья и семейной истории пациента. Может быть назначено профилактическое лечение. Профилактика представляет собой любую процедуру, целью которой является скорее предотвращение, чем лечение или вылечивание заболевания. Профилактические меры можно подразделить на первичную профилактику (для предотвращения развития заболевания) и вторичную профилактику (когда заболевание уже развилось и пациента защищают от ухудшения состояния). Иногда профилактику подразделяют на универсальную профилактику, селективную профилактику и профилактику по назначению. Универсальная профилактика охватывает всю популяцию (нацию, местное сообщество, школу, район) и нацелена на предотвращение состояния. Желательно, чтобы все люди прошли лечение. Селективная профилактика охватывает группы, у которых риск развития аллергической реакции, такой как аллергическая астма, выше среднего. Группы могут быть выделены в соответствии с возрастом (например, дети) или семейной историей. Профилактика по назначению включает процесс скрининга, направленный на выявление индивидуумов, которые проявляют ранние признаки аллергических реакций. Все виды профилактики/терапии охватываются настоящим изобретением, хотя определенная подгруппа может быть выбрана в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения.

В альтернативном частном случае осуществления настоящего изобретения средство или фармацевтическая композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения, предназначены для применения в терапии аллергических реакций. Терапия или медицинская помощь обычно представляет собой лечение индивидуума, проявляющего

симптомы аллергической реакции. Таким образом, терапия отличается от профилактики, направленной на предотвращение появления состояния, и от паллиативной помощи, сосредоточенной на уменьшении тяжести симптомов заболевания, таких как боль.

Изобретатели предоставляют доказательства (см. примеры), что средство, являющееся

5 предметом настоящего изобретения, является высокоэффективным как для терапевтических, так и для профилактических целей.

Средство, являющееся предметом настоящего изобретения, можно вводить один или несколько раз, и в случае профилактики предпочтительно вводить по меньшей мере два раза, предпочтительно более двух раз. Средство или фармацевтическая

10 композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения, могут поставляться для повторного введения, предпочтительно с интервалом в одну неделю или более, и более предпочтительно в две или в четыре недели.

В частном случае осуществления настоящего изобретения средство или фармацевтическая композиция, являющиеся предметом настоящего изобретения,

15 предназначены для введения людям, страдающим от или подверженных развитию соответствующей аллергической реакции, включая астму, и/или для людей с соответствующей предрасположенностью или тех, у кого подозревается такая предрасположенность. Людьми, у которых подозревают соответствующую предрасположенность, могут быть члены семьи, особенно дети, из семей с известными 20 аллергическими реакциями, например, у одного или у обоих родителей или у старших братьев и сестер. Целью каждой семьи, предрасположенной к аллергии, является предотвращение развития аллергии у ребенка. В этом смысле средство, являющееся предметом настоящего изобретения, можно вводить в качестве профилактической меры.

25 Настоящее раскрытие сущности изобретения распространяется на штамм МБТК NCTC 13536, размещенный в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне. Штамм характеризуется низким уровнем генетического полиморфизма. Таким образом, средство, включающее фрагменты NCTC 13536, имеет преимущества в виде очень высокой воспроизводимости из-за низкого уровня генетического полиморфизма.

30 Предпочтительный режим осуществления настоящего изобретения

В одном частном случае осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы описанная здесь формула А являлась частным случаем средства, применяемого в соответствии с настоящим изобретением. Формула А характеризуется следующим.

35 В дозе, содержащей 50 мкг ФМБТК, количество/вещества, приведенные в Таблице 1, присутствуют в одной пробирке формулы:

Таблица 1		
КОМПО-НЕНТЫ	ЕДИНИ-ЦЫ ПРОБИР-КЕ	ФУНК-ЦИЯ
ДЕЙСТВУЮЩЕЕ ВЕЩЕСТВО		
ФМБТК	66,7 мг	Иммуно-ген

Другие компоненты		
Сахароза	20000,0 мг	Вещество, обеспечивающее заряд (лиофилизация) и криопротектор
Соевый лецитин ¹	845,8 мг	Образующее липосомы средство
Холат натрия	92,0 мг	Поверхностно-активное вещество

Хлорид натрия ²	20,8 мг	Растворитель
Характеристика частиц		
Средний z-размер частиц	75+/-20 нм	
Индекс полидисперсности	≤0,350	
¹ содержащий фосфатидилхолин (94,0% (вес/вес))		
² Добавляют в виде 0,9% раствора		

5

Было показано, что липосомная форма, сделанная из соевого лецитина (образующего липосомы средства), сильно обогащенная фосфатидилхолином (94,0% (вес/вес)) и холатом натрия (поверхностно-активным веществом), является подходящей для обеспечения повышенной растворимости действующего вещества в процессе производства, а также в разведенной суспензии. Одним из важных параметров стабильности ФМБТК в форме липосом является пропорция компонентов, которые входят в состав липосом. После исследования нескольких соотношений ФМБТК/липидного компонента было установлено, что очень хорошим соотношением является приблизительно такое: 0,03:0,2:0,7 (ФМБТК:холат натрия:соевый лецитин, вес/вес/вес). Далее наблюдали, что образованию липосом способствовало присутствие солей в водной фазе. Таким образом, хлорид натрия включен в данную формулу.

20

Таблица 2
Лекарственный препарат (ФМБТК) в дозе 50 мкг/доза, измеренный после разведения лиофилизированной липосомной композиции

25

Параметр	Критерии приемлемости	Способы исследования	
Внешний вид	От белого до белого с металлическим оттенком	Визуальная оценка	
Морфология таблеток	От плоских до почти плоских и гомогенных	Визуальная оценка	
Однородность доз	Однородность массы (мг/пробирка) Среднее массы (мг/пробирка)	21,02±15% Масса±5%	Взвешивание, штатный способ
Содержание воды (%)		≤3%	Кулонометрический анализ Карла-Фишера, Европейская Фармакопея 2.5.12 (Фармакопея США <921>)

30

35

40

45

Общее содержание белка в ФМБТК	90-140 мкг/мг ФМБТК	Определение содержания белков с помощью бицинхониновой кислоты, Европейская Фармакопея 2.5.33 (Фармакопея США <1057>)
Время до разведения	Хорошее разведение ≤10 сек	Визуальная оценка
pH	7-8	Потенциометрия, Европейская Фармакопея 2.2.3 (Фармакопея США <791>)

	Размер ча- стич	z-размер (нм) (индекс полидисперсности ¹⁾)	7 5 ± 2 0 (≤0,310)	Динамиче- ское рассея- ние света. Европей- скаяФарма- копея 2.9.31
5			3-12 Соотноше- ние пятно- образую- щих еди- ниц/10 ⁶ кле- ток по от- ношению к исходному значению (исходное значение в пятнообра- зующих единицах/ 10 ⁶ клеток)	
10	Иммуноген- ный потен- циал в мы- шевой мо- дели зараже- ния M. tuberculosis	Антиген- специфич- ный интер- ферон-γ Пятнообра- зующих единицы	Очищен- ный белко- вый про- дукт	Метод им- мунофер- ментных пятен
15		Электрофорез а ПААГ с додецилсульфатом натрия	Положи- тельный в форез а ПААГ с до- полос: 70, 38, 30, 10, 6 фатом на- трия	Электро- форез а ПААГ с до- декилсуль- фатом на- трия
20	Белковый профиль	Вестерн-блот	Положи- тельный на H S P 7 0 (Rv0350), 38 кДа (Rv0934), A g 8 5 B (Rv1886c)	Вестерн- блот
25	Стерильность		Стерильно	Европей- скаяФарма- копея 2.6.1 (Фармако- пия США <71>)
30	Бактериальные эндотоксины (МЕ/ доза)		≤10 МЕ/ пробирка	Европей- скаяФарма- копея 2.6.14 спо- соб D(Фар- макопея С Ш А <85>)

В предпочтительном варианте настоящее изобретение осуществляется таким образом, что липосомная форма, в соответствии с настоящим изобретением, обладает свойствами в соответствии с Таблицей 2.

Для введения пациентам содержимое пробирки можно развести 0,4 мл воды для инъекций для получения суспензии, содержащей 166,7 мкг/мл ФМБТК.

Таблица 3 показывает концентрацию каждого компонента в пробирке после разведения дозы 50 мкг/доза

Таблица 3	
Концентрация компонентов после разведения в 0,4 мл воды для инъекций	
Компоненты	Концентрация в мл
ДЕЙСТВУЮЩЕЕ ВЕЩЕСТВО	
ФМБТК	166,7 мг/мл
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА	
Сахароза	50000,0 мкг/мл
Соевый лецитин	2114,4 мг/мл
Холат натрия	230,0 мг/мл
Хлорид натрия	52,1 мг/мл

Предпочтительно, чтобы данную формулу вводили для профилактики или терапии аллергической реакции, включающей астму и ринит.

Материалы и методы

Для *in vivo* оценки возможного терапевтического эффекта средства, являющегося

- 5 предметом настоящего изобретения, средство ФОРМУЛЫ А, произведенной ARCHIVEL FARMA, вводили в соответствии с двумя разными протоколами лечения опосредованных аллергией респираторных нарушений у мышей.

Сылочный материал

а) моноклональные антитела: специфичные моноклональные антитела (против

- 10 HSP70, 38 кДа, Ag85B (от Lionex Diagnostic GmbH, Брауншвейг, Германия)) применяют для идентификации белкового профиля в партиях ФМБТК.

б) Стандарт альбумина: данный стандарт, применяемый для определения содержания белка, состоит из бычьего альбумина в 0,9% физиологическом растворе (2 мг/мл) с добавлением в качестве консерванта азода натрия (производитель: Pierce).

- 15 в) Стандарт 6,6'-димиколата трегалозы (ДМТ) из Mycobacterium tuberculosis: коммерчески доступный ДМТ (Sigma) применяют для идентификации ДМТ в партиях ФМБТК.

г) Стандарт миклевой кислоты из Mycobacterium tuberculosis.

- Коммерчески доступную миклевую кислоту (Sigma) применяют для идентификации 20 миклевой кислоты в партиях ФМБТК.

д) Маркер молекулярного веса: применяют коммерчески доступный предварительно окрашенный маркер молекулярного веса SeeBlue® Plus pre-stained Standard (Invitrogen).

Определение параметров

а) pH

- 25 pH разведенной суспензии ФМБТК (20 мг/мл) определяют потенциометрически в соответствии с Европейской Фармакопеей 2.2.3 и Фармакопеей США <791>.

б) Содержание воды

Тест на определение остаточной воды в лиофилизированном ФМБТК проводят на приборе для кулонометрии Карла-Фишера в соответствии с общими требованиями

- 30 Европейской Фармакопеи 2.5.12 и Фармакопеи США <921> Определение воды.

в) Определение общего содержания белка

Тест на определение общего содержания белка в ФМБТК проводят при помощи коммерческого набора реагентов (BCA kit, Pierce) в соответствии с Европейской Фармакопеей, методом 2.5.33, и методом 4 (Бицинхониновая кислота или тест BCA) и

- 35 Фармакопеей США <1057>.

г) Идентификация белкового профиля с помощью электрофореза в поликариламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия

Тест проводят в соответствии с Европейской Фармакопеей, методом 2.2.31 и Фармакопеей США <726>; детектирование белков в геле проводят с помощью

- 40 адаптированного окрашивания Кумасси или окрашивания серебром. Опытные образцы: ФМБТК разводят в чистой воде до концентрации 40 или 20 мг/мл. Растворы сравнения: маркеры молекулярного веса, очищенные антигены, стандарт сравнения ФМБТК

Таблица 4

45

Антигены сравнения	
	Очищенные антигены
	Белок HSP70 M. tuberculosis (Rv 0350)
	Белок 38 кДа M. tuberculosis (Rv0934)
	Белок Ag85B M. tuberculosis (Rv1886c)
	Белок 19 кДа M. tuberculosis (Rv 3763)

Белок CFP10 M. tuberculosis (Rv3874)

Белок ESAT6 M. tuberculosis (Rv3875)

Для окрашивания Кумасси применяют раствор реагента Gel-Code Blue Stain (Pierce) в соответствии с рекомендациями производителя. Для окрашивания серебром применяют

5 набор реактивов PROTSIL1 от Invitrogen в соответствии с рекомендациями производителя. Для Вестерн-блота белки разделяют с помощью электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия в соответствии со стандартными способами, известными в данной области техники, а затем электрофоретически переносят на ПВДФ мембрану для иммунодетекции с применением специфичных моноклональных антител.

10 Взаимодействие антиген-антитело визуализируют с помощью инкубации с анти-антителом, которое запускает реакцию хемилюминесценции. Применяют антигены от Lionex (Брауншвейг, Германия) (белок HSP70 M. tuberculosis (70 кДа), белок 38 кДа M. tuberculosis, белок Ag85B M. tuberculosis (30 кДа) и специфичные моноклональные антитела к HSP70, 38 кДа и Ag85B от Lionex.

15 д) Идентификация миколевых кислот

Миколевые кислоты в ФМБТК исследуют с помощью одномерной тонкослойной хроматографии в соответствии с методом 2.2.27 Европейской Фармакопеи. Опытные образцы: лиофилизированный ФМБТК, 40 мг. Растворы сравнения: стандарт миколевой кислоты (Sigma). Процедура:

20 а) Процесс экстракции: образец экстрагируют хлороформом:метанолом (1:1) и затем инкубируют в течение ночи. Фракцию супернатанта удаляют.

б) Этерификация миколевой кислоты: 2 мл метанола: толуола: серной кислоты (30: 15:1; объем/объем) добавляют в каждую пробирку и проводят этерификацию в течение ночи. Затем добавляют 4 мл н-гексана. Высушивают в жидким азоте и ресуспенсируют

25 в 500 мкл гексана.

в) Тонкослойная хроматография: 10 мкл каждого образца наносят на линию, параллельную краю пластины (силикагель 60° (20×20 см) (Merck). Хроматографическое разделение проводят в атмосфере насыщенных паров с подвижной фазой (этиловый эфир: н-гексан (15:85, объем/объем)) три раза. Затем пластину оставляют высыхать на

30 воздухе.

г) Миколевые кислоты проявляют, распыляя на пластины раствор фосфомолибденовой кислоты в 96° этаноле и нагревая при 120°C в течение 10 мин.

Миколевые кислоты в образцах ФМБТК определяют путем сравнения с пятном коммерческого стандарта миколевой кислоты. Результаты выражают в виде

35 качественных данных (наличие (положительный)/отсутствие (отрицательный)) проанализированной миколевой кислоты.

е) Идентификация 6,6'-димиколата трегалозы (ДМТ): опытные образцы: лиофилизированный ФМБТК, 40 мг. Растворы сравнения: стандарт ДМТ (Sigma). Процедуры:

40 (i) Процесс экстракции: образец экстрагируют хлороформом:метанолом (1:1; объем/объем) и затем инкубируют в течение ночи. Фракцию супернатанта высушивают в жидким азоте и взвешивают. В конце высущенные образцы ресуспенсируют в хлороформе до конечной концентрации 40 мг/мл.

(ii) Тонкослойная хроматография: 10 мкл каждого образца наносят на линию,

45 параллельную краю пластины (силикагель 60° (20×20 см) (Merck). Хроматографическое разделение проводят в атмосфере насыщенных паров с подвижной фазой (хлороформ: метанол:вода (60:12:1, объем/объем)). Затем пластину оставляют высыхать на воздухе.

(iii) Детектирование: ДМТ проявляют, распыляя на пластины 1% раствор антранона

в серной кислоте и нагревая при 120°C в течение 5 мин.

(iv) Идентификация: ДМТ в образцах ФМБТК определяют путем сравнения с пятном коммерческого ДМТ, который применяют для получения стандартного пятна.

Результаты выражают в виде качественных данных, т.е наличия (положительный)/
5 отсутствия (отрицательный) проанализированного ДМТ.

ж) Идентификация липоарabinоманнана (ЛАМ): для Вестерн-блот анализа ЛАМ соединения разделяют с помощью электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия в соответствии со стандартными способами, а затем электрофоретически переносят на нитроцеллюлозную мембрану для иммунодетекции с помощью специфичных антител

10 CS35. Взаимодействие антиген-антитело визуализируют с помощью инкубации с анти-антителом (с козьими иммуноглобулинами G против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с ИК красителем 800 CW), которое запускает флуоресцентную реакцию.

3) Стерильность

15 Все процессы, которые требуют стерильности по мнению специалистов в данной области техники, проводят в стерильных условиях; это также распространяется на те случаи, когда стерильность не упоминается в явном виде на каждой конкретной стадии, которая требует соблюдения тех же условий. Тест на стерильность проводят, как рекомендовано Европейской Фармакопеей 2.6.1 (Фармакопеей США <71>).

20 и) Инактивация микобактерий

Инактивацию микобактерий проводят, как рекомендовано Европейской Фармакопеей 2.6.2.

к) Бактериальные эндотоксины

Анализ бактериальных эндотоксинов (тест с лизатом амебоцитов мечехвоста)

25 проводят в соответствии с общими указаниями Европейской Фармакопеи, метода 2.6.14, по методу D (хромогенный кинетический метод), а также Фармакопеей США <85>.

Фрагментация бацилл

Считается, что выбор фрагментации бацилл должен обеспечивать презентацию клеточных антигенов, особенно антигенов клеточной стенки. Фрагментация ФМБТК 30 определяют методами динамического рассеяния света (как описано ниже) и лазерной дифракции.

Лазерная дифракция позволяет измерить фрагментацию в диапазоне от 0,04 мкм до 200 мкм. Исследование проводят в Сервисном центре Научно-технического университета Барселоны, Испания. Прибор: счетчик Культера LS 13320, снабженный универсальным 35 модулем для жидкостей. Растворитель: очищенная вода/минеральное масло. Результаты: построены в виде гистограмм, отражающих относительную частоту количества частиц (%) к диаметру частиц (0,04 мкм - 200 мкм).

Определение среднего z-размера частиц и индекса полидисперсности

Средний размер частиц, как описано в настоящем документе, определяют с помощью 40 динамического рассеяния света, основанного на физическом понятии броуновского движения частиц, описываемого уравнением Стокса-Энштейна:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D},$$

45 где

d(H) - гидродинамический диаметр;

D - коэффициент трансляционной диффузии;

k - постоянная Больцмана;

T - абсолютная температура;

η- вязкость.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, уравнение Стокса-Энштейна показывает, что частицы, растворенные в жидкой среде, находятся в постоянном и случайному движении со скоростью, которая зависит от их размера: чем больше частица, тем медленнее ее броуновское движение.

При измерении динамического рассеяния света образец, содержащий частицы, которые предстоит измерить, облучают монохромным источником света, предпочтительно лазером, и анализируют с помощью корреляционной функции, как интенсивность рассеяния света колеблется с течением времени. Если, например, измеряют большие частицы во время их медленного движения, интенсивность рассеяния света колеблется медленно, и корреляция распадается долго; вместе с тем, при измерении маленьких частиц во время их быстрого движения интенсивность рассеяния света колеблется быстро, и корреляция сигнала распадается быстрее.

В соответствии с настоящим изобретением частицы предпочтительно измеряют на следующем инструменте: Zetasizer nano zs (Malvern Instruments), применяя очищенную воду/минеральное масло в качестве растворителей.

Размер рассчитывают по корреляционной функции, применяя разные алгоритмы. В настоящем случае применяют «анализ кумулянтов», как определено в ISO13321 части 8. Корреляционная функция соответствует результатам в одной экспоненциальной кривой, которая позволяет рассчитать следующие параметры:

- Средний размер или средний z-диаметр распределения частиц. Этот средний размер является средней интенсивностью.
- Индекс полидисперсности, т.е. соответствующий ширине распределения размеров частиц.

Результаты обычно представляют в виде гистограмм, отражающих относительную частоту количества частиц (%) к диаметру частиц, которые могут быть любого диаметра в интервале от 1 нм до 3 мкм.

Индукция астмы в мышах и введение соединений

Для сенсибилизации мышей самок BALB/c мышей (в возрасте 8 недель в начале

эксперимента) инъектировали внутрибрюшинно 20 мкг овальбумина (класса V) + 2 мг алюма в дни исследования 0 и 14. Во время фазы стимуляции всех животных (в том числе несенсибилизованных) подвергали (в дни 28-30) действию распыленного небулайзером 1% раствора овальбумина. Одной группе овальбумин-сенсибилизованных мышей вводили ФОРМУЛУ А в качестве профилактической меры/ФОРМУЛУ А П (П означает профилактический), а другой - в качестве терапевтической меры (ФОРМЛУ А Т (Т означает терапевтический)), обе группы получали 200 мкг/доза. В качестве положительного контроля изобретатели применяли сенсибилизованных мышей, обработанных датским штаммом БЦЖ 1331 Pfizer подкожно в количестве 150 мкг/доза в день -31. В качестве отрицательного контроля изобретатели вводили плацебо (инертное вещество вакцины ФОРМУЛЫ А). Также были включены две несенсибилизованные группы, каждую из которых обрабатывали либо контрольной вакциной (БЦЖ), либо экспериментальной вакциной (ФОРМУЛОЙ А), таким образом, выделяли следующие 7 условий/экспериментальных групп:

Группа 1 (контроль): несенсибилизованные мыши, обработанные инертным

носителем (n=8);

Группа 2 (контроль-): сенсибилизованные мыши, обработанные инертным носителем (n=8);

Группа 3 (контроль БЦЖ): несенсибилизованные мыши, обработанные вакциной

БЦЖ в день -31 (n=8);

Группа 4 (контроль+): несенсибилизированные мыши, обработанные вакциной БЦЖ в день -31 (n=8);

Группа 5 (контроль ФОРМУЛА А®): несенсибилизированные мыши, обработанные 5 ФОРМУЛОЙ А (Профилактической) (n=8);

Группа 6 (опыт): сенсибилизированные мыши, обработанные ФОРМУЛОЙ А (Профилактической) (n=8);

Группа 7 (опыт): сенсибилизированные мыши, обработанные ФОРМУЛОЙ А (Терапевтической) (n=8).

10 Вакцины и плацебо изобретатели поставляли в индивидуальных пробирках.

Содержимое пробирок разводили непосредственно перед ежедневным введением в ламинарном боксе. Все дозы вакцины и плацебо вводили подкожно в спину во временные точки, указанные на фигуре 10.

Сбор образцов и оценка параметров дыхательных путей

15 Из-за большого числа включенных животных эксперимент проводили в 4 раунда, каждый из которых по времени перекрывался с предыдущим и каждый из которых был проведен в точности также, в соответствии с протоколами по индукции и лечению астмы. За животными наблюдали на протяжении всего эксперимента и отбирали образцы для последующего анализа.

20 Наблюдение за мышами

Изобретатели регистрировали вес всех мышей с первого дня введения (-31) препараторов и далее еженедельно до дня умерщвления животных. Мышей из каждой группы тщательно оценивали, применяя стандартный протокол, включающий наблюдение за поведением и наблюдение за шерстью и слизистыми оболочками.

25 Определение функционирования легких

Уровень реактивности измеряли у 8 мышей из каждой группы. Изобретатели исследовали реактивность дыхательных путей у всех мышей через 24 часа после последней обработки овалбумином (день 31), оценивая уровень бронхиальной реактивности в ответ на метахолин с помощью инвазивной плетизмографии (Fine Pointe,

30 Vixco Europe Ltd, Великобритания). Сопротивление легких определяли у животных с трахеотомией (после седатирования и анестезии) как меры оценки ответа дыхательных путей на бронхоконстрикторный стимул.

Оценка воспаления - бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)

После оценки функционирования легких всех обездвиженных животных под 35 анестезией умерщвляли путем обескровливания. Затем проводили бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) для сбора клеток и молекул из трахеобронхеального древа. БАЛ проводили посредством повторяющихся эндотрахеальных инъекций 0,3 мл фосфатно-солевого буфера + 2% фетальной сыворотки телят. Брали аликвоту из отобранный жидкости и считали общее количество клеток для оценки уровня воспаления. Оставшуюся БАЛ 40 жидкость центрифугировали, клетки помещали в клеточную центрифугу для определения лейкоцитарной формулы с помощью окрашивания Diff-Quick и хранили супернатанты для последующего анализа.

Сбор образцов

Дополнительно собирали образцы легких и сыворотки и хранили их при -80°C для 45 последующей идентификации целевых белков с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. В то же время, образцы крови помещали в холодильник на ночь, отбирали аликвоты сыворотки и хранили их при -20°C.

Примеры

Настоящее изобретение ниже проиллюстрировано примерами. Примеры приведены в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1: Выделение штамма Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536

Исходным материалом для получения ФМБТК является инокулят штамма NCTC 13536, также называемого 511 или Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536, штамма Mycobacterium tuberculosis, выделенного из иммунокомпетентного пациента с диагнозом легочного туберкулеза в Барселоне, Испания. Он был размещен в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне, которая является официальным хранилищем в соответствии с Будапештским договором. Штамм дополнительном был размещен в коллекции штаммов Микробиологической службы госпиталя Сан Пау, Барселона, Испания.

Два пассажа исходного штамма делали в 1995 и 1996 гг., соответственно. MSL PB#1 соответствует второму пассажу исходного штамма M. tuberculosis NCTC 13536, 15 проведенного в октябре 1996 г., в результате чего были получены 100 пробирок (3 мл стерильных стеклянных пробирок), хранящихся при $-70\pm5^{\circ}\text{C}$. Штамм обладает низким генетическим полиморфизмом, что было определено стандартными способами в данной области техники.

Пример 2: Вышерасположенный процесс для получения клеток МБТК

Блок-схема данного процесса приведена на Фигуре 1. Исходным материалом для получения ФМБТК является инокулят штамма Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536 (Пример 1). Для обеспечения постоянной поставки данного исходного материала предпочтительно использовать систему посевных материалов. Для этого рабочий посевной материал (РПМ), полученный из главного посевного материала (ГПМ), применяют для получения ФМБТК. Mycobacterium tuberculosis NCTC 13536 (Пример 1) культивируют в течение 3-5 недель в среде Левенштайна-Йенсена. Бактерии затем субкультивируют в среде Проскауэра-Бека при $37\pm2^{\circ}\text{C}$ при помешивании со скоростью 100 ± 5 об/мин. Как только достигается максимальная концентрация бактерий (по визуальной оценке), субкультуру пересевают в среду Проскауэра-Бека и инкубируют. При достижении такой же концентрации отбирают небольшие аликвоты. Численность живых бактерий определяют по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ), полученных на агаризованной среде Миддлброка после инкубации при $37\pm2^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 недель. Численность бактерий должна составлять $2-5\times10^7$ КОЕ/мл.

(1) Культура Mycobacterium tuberculosis

Процессия ФМБТК начинается с посева 0,2 мл РПМ на чашку с агаром 7H11 и инкубации при $37\pm1^{\circ}\text{C}$ в течение 15 ± 2 дней. Затем колонии переносят в пробирку, содержащую несколько стеклянных шариков. После перемешивания добавляют около 5 мл воды для инъекций для получения бактериальной суспензии. В это время проводят определение численности живых бактерий и тест на стерильность. Около 100 чашек с агаром на среде Миддлброка 7H11 засевают M. tuberculosis при помощи ватных палочек, смоченных бактериальной суспензией для получения конфлюентных культур. Чашки инкубируют при $37\pm1^{\circ}\text{C}$ в течение 21 ± 2 дней.

Тест на стерильность в качестве производственного контроля проводят следующим образом:

Тест на стерильность направлен на обеспечение отсутствия грибков и бактерий, кроме микобактерий. Тесты проводят посредством прямой инокуляции, следя условиям, описанным в Европейской Фармакопее 2.6.1 для тестов на стерильность. Тестируемые образцы должны быть стерильными. Среду 7H11 применяют вместо 7H10 (как указано

в Европейской Фармакопее 2.6.2). 7Н11 основана на 7Н10 с добавлением одного грамма панкреатического гидролизата казеина для усиления роста штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

(2) Сбор *Mycobacterium tuberculosis* и замораживание грубого экстракта

После периода инкубации чистоту бактериальной культуры контролируют посредством визуальной оценки чашек с агаром и с помощью теста на стерильность. Затем бактериальную массу собирают с чашек с агаром и переносят в стерильную пробирку. Полученный грубый экстракт взвешивают (20-22 г). Смесь хранят при $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

10 Пример 3: нижерасположенный процесс продукции липосом, полученных из грубого экстракта

Блок-схема данного процесса приведена на Фигуре 2.

(3) Фрагментация клеток и обезжикивание

Замороженный грубый экстракт (Пример 2) размораживают при $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, затем добавляют стерильный фосфатно-солевой буфер с 4% (вес/вес) Тритоном-X114 (рН 7,0-7,5) при 4°C . После перемешивания его последовательно переносят в стерильный поликарбонатный контейнер, содержащий стерильные силиконовые/циркониевые шарики. Затем проводят фрагментацию клеток на приборе Beadbeater, применяя следующий способ фрагментации: 3 цикла, каждый из которых состоит из 5 периодов включения/выключения плюс 10 минут паузы. После окончания процесса фракцию фрагментированных клеток отделяют от шариков последовательной отмыvkой (повторяющимся взбалтыванием и осаждением) в стерильном фосфатно-солевом буфере с 4% Тритоном-X114 (рН 7,0-7,5). Аликвоту промытой суспензии клеточных фрагментов собирают для контроля pH и проводят финальное центрифугирование при 845 g при 4°C в течение 30 минут.

Для удаления цитозольной фракции и для получения суспензии, обогащенной клеточными фрагментами, дважды проводят высокоскоростное центрифугирование при 20000 g в течение приблизительно 60 минут при 4°C . После первого центрифугирования желтоватый супернатант (обогащенный растворимыми белками и липидами) удаляют, ресуспенсируют осадок в фосфатно-солевом буфере и далее центрифугируют в тех же условиях, как описанные выше. После этого внешний вид удаляемого супернатанта должен быть прозрачным и бесцветным. В конце полученный осадок ресуспенсируют в конечном объеме 50-60 мл фосфатно-солевого буфера (суспензия ФМБТК).

35 (4) Пастеризация

Суспензию ФМБТК затем пастеризуют при $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин. После окончания пастеризации определяют pH пастеризованных ФМБТК с помощью лакмусовой бумажки. Приемлемым считается диапазон pH 6,5-7,5. Стерильные и апирогенные пробирки наполняют 0,5 мл суспензии продукта и проводят производственный контроль 40 стерильности и инактивации микобактерий. В конце заполненные пробирки замораживают при $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Прошедший пастеризацию материал физически отделяют от необработанного материала, т.е. оставляют незаполненные места между образцами, не прошедшими пастеризацию, и образцами, находящимися в процессе последующего заполнения.

45 (5) Лифилизация

Все пробирки, содержащие продукт, замораживают и лифилизируют при температуре от -45°C до -30°C и давлении 0,310 мбар в течение приблизительно 18 часов (объем в пробирке 0,5 мл). Применяя асептические методики в атмосфере N_2 , пробирки закрывают

и снабжают этикетками. Упакованный лекарственный препарат затем хранят при $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ до 12 месяцев.

Пример 4: Характеристика белков

Фигура 3 представляет обзор стратегий характеристики с точки зрения белкового профиля.

На основании данных литературы (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) 6 белковых полос выбрали в качестве репрезентативных для оценки белкового профиля: белок HSP70 (Rv0350), белок 38 кДа (Rv0934), (Rv 1866c), белок 19 кДа (Rv 3763), белок CFP10 (Rv3874) и белок ESTA-6 (Rv3875).

А. Определение общего содержания белка: общие уровни белка в ФМБТК количественно оценивают при помощи бицинхонинового способа. Общий белок представляет около 10% (вес/вес) содержимого ФМБТК. Стандарты сравнения ФМБТК-0429-16 и ФМБТК-52.1 содержат 167 мкг белка/мг ФМБТК и 115 мкг белка/мг ФМБТК, соответственно.

Б. Идентификация белкового профиля с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия: белковый профиль действующего вещества ФМБТК определяли посредством сравнения с референсными антигенами из *Mycobacterium tuberculosis*, соответствующими ESAT6 (6 кДа) (7); CFP10 (10 кДа) (6); Ag85B (30 кДа) (1); 38 кДа (2); HSP70 (70 кДа) (4), а также с маркером молекулярного веса (5), показанными на Фигуре 4. Определение белкового профиля действующего вещества ФМБТК и идентификацию полос (около 70 кДа, 38 кДа, 30 кДа, 10 кДа и 6 кДа) проводят посредством окрашивания Кумасси. Идентификацию полосы 19 кДа (липополипептида) проводят посредством окрашивания серебром.

В. Определение белкового профиля с помощью Вестерн-блота со специфичными моноклональными антителами: белковый профиль действующего вещества ФМБТК определяют по распределению полос, применяя Вестерн-блот анализ с моноклональными антителами: анти-HSP70 (70 кДа, Фиг. 5c), анти-38 кДа (Фиг. 5d), анти-Ag85B (30 кДа, Фиг. 5e).

ФМБТК-52.1 является референсной партией для ФМБТК в соответствии с предпочтительным способом осуществления настоящего изобретения.

Пример 5: Характеристика липидов

Характеристика липидного профиля ФМБТК состоит из процесса фракционирования,

основанного на экстракции хлороформом:метанолом (1:1). Процесс фракционирования, проводимый в данных исследованиях, основан на процедуре, описанной Delmas et al., 1997, Glycobiology 7(6), 811-7. Тонкослойная хроматография представляет собой способ, применяемый для анализа содержания липидов и гликолипидов, присутствующих в ФМБТК. В частности, полиацилтрегалоза (ПТ), димиколат трегалозы (ДМТ), диацилтрегалоза (ДАТ), фосфатидилинозитолманнозиды (ФИМ) и другие фосфолипиды, а также димикоцерозаты фтиоцерола (ДИМФ) и миклевые кислоты были идентифицированы посредством тонкослойной хроматографии как в референсных штаммах H37rv и NCTC 13536, так и в разных партиях ФМБТК. См. Фигуру 7а.

Содержание 6,6'-димиколата трегалозы (ДМТ) анализируют с помощью тонкослойной хроматографии супернатанта. Определение миклевых кислот проводят в осадке по методу тонкослойной хроматографии. Хотя количественные данные липидного профиля МБТК неизвестны, качественный липидный профиль, установленный в рамках исследований, соответствует современным научным представлениям и позволяет

составлять стандартную характеристику иммуногенных липидов, насколько это известно. ФМБТК сравнивали с липидной фракцией целых клеток штаммов NCTC 13536 и H37Rv M. tuberculosis и коммерческим стандартом ДМТ (см. Фигуры 7а и 7б). В целом, было показано, что липидный состав является единым в разных партиях 5 ФМБТК-содержащих липосом, соответствующих настоящему изобретению. Фигура 7д показывает идентификацию ЛАМ.

Пример 6: Характеристика материала фрагментированных клеток

Предварительные результаты, полученные с помощью обоих способов, показывают, что размер фрагментов ФМБТК в большинстве случаев составляет менее 1 мкм (99% <1 10 мкм), что соответствует данным электронной микроскопии ФМБТК: размер фрагментов варьирует в основном между 100 и 300 нм.

Уровни остаточной ДНК после экстракции смесью фенола/хлороформа необходимо исследовать, измеряя поглощение при 260 нм (предел детектирования: 0,2 мкг ДНК/мг ФМБТК). Обычно результаты, полученные таким способом, ниже 15 мкг ДНК/мг 15 ФМБТК.

Постоянство процесса производства действующего вещества иллюстрируют липидный и белковый профили, которые воспроизводятся в разных партиях ФМБТК.

Пример 7: Эффект сахарозы

В исходном исследовании одно из следующих вспомогательных веществ: (а) 1,5%

20 глицин и (б) 5% сахарозу, соответственно, дополнительно включали в липосомную форму, включающую фрагменты штамма МБТК NCTC 13536. Затем проводили сравнительную оценку физико-химических свойств и биологической активности, 25 характерной для обеих формул.

Результаты, полученные при измерении после разведения лиофилизированной 25 липосомной композиции и после тестирования в соответствии с техническими параметрами текущей партии, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Результаты описания 3 разных формул изобретения, полученные после разведения лиофилизированной липосомной композиции

Параметр	Критерий приемлемости	ФМБТК в форме суспензии липосом		
		Без вспомогательного вещества	5% сахароза	1,5% глицин
ФМБТК в форме суспензии липосом				
Внешний вид	От белого до белого с металлическим оттенком	Не определяли	Соответствует	Соответствует
Морфология таблеток	От плоских до почти плоских и гомогенных	Не определяли	Соответствует	Соответствует
Содержание воды (%)	≤3%	Не определяли	1,4	3,0
Время до разведения	Хорошее разведение ≤10 сек	Не определяли	5	12
pH	7-8	8,1	7,4	7,0
Размер частиц	средний z-размер (нм) индекс полидисперсности ^(а)	75±20 (≤0,250)	370 ⁽¹⁾ (0,492) 66 (0,215)	504 ⁽¹⁾ (0,569)
Иммуногенный потенциал на мышной модели заражения M. tuberculosis	Антиген-специфичный интерферон-γ Пятнообразующие единицы	Очищенный белковый продукт	3-12 Соотношение пятнообразующих единиц/ 10^6 клеток по отношению к исходному значению (исходное значение в пятнообразующих единицах/ 10^6 клеток)	3,6 (183) 5,1 (183) 2,8 (183)
	Ag85B (30 кДа)	5-20 Соотношение пятнообразую-	5,5 (73) 9,6 (73) 5,4 (73)	

			щих единиц/ 10^6 клеток по отно- шению к исходному значению (исходное значение в пятнооб- разующих единицах/ 10^6 кле- ток)			
5	(a) Индекс полидисперсности					
	(1) Наличие агрегатов липосом					

Исследователи данного исследования неожиданно обнаружили, что формула с 5% сахарозой имеет преимущества в виде лучших физико-химических результатов, таких как содержание воды или время до разведения, соответственно. Но наиболее важным 10 фактом является значительное снижение агрегации липосом (размера частиц, среднего z-размера) в содержащей сахарозу формуле по сравнению с другими формулами. Анализ с помощью динамического рассеяния света показал, что средний z-размер содержащих сахарозу липосом составляет 75 ± 20 нм (индекс полидисперсности $\leq 0,350$). Электронная микроскопия препаратов содержащих сахарозу липосом, полученных замораживанием- 15 разламыванием, показывает смесь многослойных и однослойных липосом размером от 40 до 100 нм (Фигура 8).

Благодаря этому улучшенному параметру вместе с наблюдаемым уменьшенным содержанием воды ($\leq 2\%$) в формуле с 5% сахарозой, ожидается, что данная формула будет демонстрировать улучшенные результаты исследования стабильности. Именно 20 так и обстоит дело.

Пример 8: Процесс производства лиофилизированной липосомной формы (ФОРМУЛЫ А)

Один из вариантов процесса производства фармацевтической композиции, включающей липосомную форму, в соответствии с настоящим изобретением показан 25 на Фигурах 9а и 11б. Кратко, он включает следующие стадии от 1 до 5.

(1) Приготовление составляющих массы суспензии концентрата липосом

Соевый лецитин для массы суспензии концентрата липосом растворяют в этаноле (1:1; вес/вес), а холат натрия растворяют в воде (1:5; вес/вес). Растворы стерилизуют 30 фильтрованием. После смешивания раствора соевого лецитина и раствора холата натрия добавляют лиофилизированный ФМБТК (Пример 1) при перемешивании. Соотношение компонентов составляет 0,03:0,2:0,7 (ФМБТК:холат натрия:соевый лецитин; вес/вес/вес).

(2) Приготовление массы суспензии концентрата липосом

Водную фазу переносят в стерилизованный стальной миксер. Липидную фазу (1), 35 содержащую соевый лецитин, холат натрия, ФМБТК, добавляют в соотношении 0,7: 0,3 (водная фаза:липидная фаза, объем/объем). Фазы перемешивают при 2200 рад/сек в течение 3 мин для гомогенизации и формирования липосом. После гомогенизации массу суспензии концентрата липосом переносят в другую емкость и дают отстояться 40 в течение по меньшей мере 5 минут. Производственный контроль размера частиц проводят в массе суспензии концентрата липосом.

(3) Растворение массы суспензии концентрата липосом, конечная формула суспензии липосом

Готовят и стерилизуют 10% раствор (вес/вес) сахарозы. Раствор сахарозы смешивают с водой и массой суспензии концентрата липосом в подходящей пропорции для 45 получения массы суспензии липосом, разводя 21 мг суспензии концентрата липосом/мл в 5% растворе сахарозы. pH, стерильность и размер частиц анализируют в рамках производственного контроля.

(4) Наполнение

Пробирки наполняют 0,4 мл суспензии липосом (при постоянном перемешивании) и частично закрывают для замораживания и лиофилизации.

(5) Лиофилизация, упаковка и маркирование

Пробирки замораживают при $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ до начала процесса лиофилизации. Процесс лиофилизации проводят в диапазоне температур от -45°C до 25°C и при давлении 0,150 мбар. Процесс продолжается 24 часа. В конце лиофилизации пробирки полностью закрывают в атмосфере N₂, инкапсулируют, снабжают этикетками и хранят при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Пример 9: Мышиная модель

Изобретатели применяли мышнюю модель индуцированной аллергией астмы.

- 10 Индивидуальные подробные результаты, полученные на мышиных моделях, см. также в Таблицах в Приложении.

Мышей сенсибилизовали овальбумином с помощью внутрибрюшинной инъекции овальбумина, а затем обрабатывали распыленным небулайзером антигеном.

- 15 Сенсибилизованных мышей делили на две группы - нелеченых и обработанных исследуемой вакциной или БЦЖ (положительный контроль) - всем вводили препараты подкожно. Изобретатели также сформировали контрольные группы к указанным терапиям из несенсибилизованных мышей. Повышенная бронхиальная реактивность в ответ на метахолин, а также наличие перибронхиальных эозинофилов у животных, обработанных овальбумином (но не леченых), указывали на эффективный запуск 20 аллергического процесса. Вакцинация БЦЖ снижала почти в два раза уровень воспаления (недостоверно) и бронхиальную гиперреактивность (без возврата к исходным уровням). Введение вакцины ФОРМУЛЫ А, средства, соответствующего настоящему изобретению, в профилактических целях значительно снижало уровень легочных эозинофилов и возвращало почти к исходным уровням значения бронхиальной 25 гиперреактивности. Применение вакцины ФОРМУЛЫ А в качестве терапевтического средства значительно снижало бронховаскулярное воспаление, при этом наблюдалась тенденция к снижению бронхиальной гиперреактивности в ответ на антиген овальбумина. На основании этих результатов изобретатели делают вывод о том, что при 3-разовом введении перед стимуляцией вакцина ФОРМУЛЫ А обладает явным 30 положительным действием на дыхательные пути обработанных овальбумином мышей, в то время как терапевтическое введение определенно снижает воспаление и оказывает умеренное действие на бронхиальную гиперреактивность.

- Наблюдение за индивидуальными мышами (за слизистыми оболочками, шерстью и поведением) не выявило никаких нежелательных эффектов, имеющих отношение к 35 вакцине ФОРМУЛЫ А, за исключением гранулемы, которая появилась в месте инъекции в течение нескольких дней после вакцинации. Общее состояние мышей было нормальным и одинаковым во всех группах, леченых или нелеченых, сенсибилизованных овальбумином или нет. Фигура 11 показывает сопоставимый и почти универсальный рост среднего веса мышей из 7 групп в течение всего времени эксперимента. (См. 40 индивидуальные данные и средние значения \pm стандартную ошибку среднего соответствующих весов в разделе Приложения).

- Неожиданно одна мышь из контрольной группы несенсибилизованных мышей, получавших плацебо (группы 1), была обнаружена мертвой в клетке в день -21. Вскрытие, проведенное в отделе патологии, выявило автолиз от умеренной до тяжелой степени 45 тяжести в зависимости от области, плотный и гнойный подкожного вентрально-паховый экссудат и спленомегалию, которые указывали на то, что смерть могла наступить от укуса или раневой инфекции вентрально-паховой зоны. Изобретатели заменили мышь другой мышью той же линии и происхождения, которая была на неделю старше и

которой не давили никаких препаратов и не подвергали ранее никаким манипуляциям.

Пример 10: Эффекты лечения на дыхательные пути

Привлечение воспалительных клеток к трахеобронхиальному древу измеряли, определяя общее количество воспалительных клеток и лейкоцитарную формулу.

- 5 Индивидуальные подробные результаты, полученные на мышиных моделях, см. также в Таблицах в Приложении.

Лейкоцитарная формула клеток бронхоальвеолярного лаважа

Для измерения общего уровня воспаления определяли общее число клеток, которые собирали в БАЛ, и позже проводили подсчет клеток воспаления (300 клеток окрашивали

- 10 Diff-Quick в клеточной центрифуге). Комбинированные данные представлены на Фигуре 15, которая показывает в клетках/мл количество эозинофилов, макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов, присутствующих в мл БАЛ. Как показано на Фигуре 15, много эозинофилов наблюдалось в животных, обработанных овальбумином, что является признаком воспалительного процесса аллергического происхождения. Уровень

- 15 эозинофилов был на 43,55% ниже в группе животных, получивших вакцину БЦЖ, хотя он не достигал уровня статистической достоверности ($p=0,08$). Параллельно с влиянием на бронхиальную реактивность вакцина ФОРМУЛЫ А явно способствовала ограничению уровня эозинофилов, вызывая 61,19% снижение в режиме терапии (T) и 75,81% в режиме профилактики (P) (в обоих случаях $p<0,005$, критерий Стьюдента).

- 20 В дополнение к яльному снижению эозинофилов вакцина ФОРМУЛЫ А также способствовала подавлению роста лимфоцитов, хотя оно становилось статистически достоверным только в режиме T ($p<0,05$, критерий Стьюдента), оставаясь постоянным в случае P ($p=0,09$, критерий Стьюдента).

Выводы

- 25 На основании результатов настоящего проекта (см. примеры) можно заключить, что введение средства, описанного здесь, такого как ФОРМУЛА А, значительно снижает гиперреактивность дыхательных путей, количество эозинофилов и лимфоцитоз дыхательных путей мышей, обработанных овальбумином. В применяемых экспериментальных условиях его эффективность превосходит по всем оцененным

- 30 параметрам коммерческую вакцину БЦЖ датского штамма 1331 от Pfizer. Терапевтический режим снижает уровень легочных эозинофилов и снижает гиперреактивность (хотя не достоверно). По снижению уровня легочных эозинофилов вакцина Формулы А превосходила при сравнении коммерческую вакцину БЦЖ датского штамма 1331 от Pfizer.

- 35 **Приложение:**

Данные для всех измеренных переменных

Таблица 6

Соответствующий вес (г) каждой мыши

ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
1	18,72	18,88	19,12	19,06	20,17	19,96	20,62	21,42	21,42	21,79
2	19,44	18,57	19,5	20,7	21,27	21,9	21,25	22,83	22,07	23,02
3	18,41	17,19	17,98	18,57	18,99	20,16	19,6	20,06	19,81	20,85
4	18,45	19,24	19,39	20,36	21,36	21,28	21,54	22,69	21,77	23,19
5	19,47	19,04	20,3	20,74	20,4	20,61	21,1	21,96	22,25	22,43
6	19,24	19,65	19,2	20,8	20,82	21,12	20,73	21,18	20,8	21,61
7	19,09	20	19,57	20,38	20,99	21,17	21,28	22,14	22,3	22,66
8			22,63	22,48	23,39	23,34	25,35	24,47	24,61	24,99
Среднее	18,97	18,94	19,71	20,39	20,92	21,19	21,43	22,09	21,88	22,57
Стандартная ошибка среднего	0,169	0,343	0,475	0,419	0,443	0,379	0,598	0,463	0,491	0,442
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
9	18,93	18,77	18,74	19,04	20,67	20,71	20,42	21,68	21,58	22,15
10	19,6	18,88	19,1	19,73	20,99	21,42	21,77	21,18	21,18	22,69
11	20,02	19,73	20,04	20,9	21,02	21,12	21,41	22	22,31	23,36
12	18,96	18,87	20,02	20,46	21,39	21,56	22,11	21	21,25	22,15
13	17,77	18,06	18,77	19,6	20,02	20,49	20,83	20,96	20,52	20,99
14	17,72	19,17	18,96	19,66	19,63	19,95	20,11	20,37	20,19	22,47
15	17,53	18,13	18,27	18,36	19,54	19,68	19,74	20,31	20,33	21,29
16	18,92	19,01	19,72	19,96	20,54	21,05	22,5	22,29	22,11	23,27
Среднее	18,68	18,83	19,2	19,71	20,48	20,75	21,11	21,22	21,18	22,3
Стандартная ошибка среднего	0,325	0,191	0,231	0,278	0,24	0,239	0,351	0,255	0,282	0,3
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
17	18,33	18,73	18,56	18,99	19,61	19,9	20,75	21,14	21,22	21,6
18	19,61	19,47	19,85	20,49	21,13	21,62	22,02	21,72	21,52	22,54
19	19,16	19,34	19,71	20,8	21,8	22,08	22,48	22,11	22,28	23,8
20	18,95	19,53	19,97	21,1	21,68	22,28	22,44	21,69	22,17	23,62
21	18,31	17,13	18,9	20,4	20,3	20,42	20,68	20,66	20,89	21,78
22	19,37	19,83	19,95	21,2	21,27	20,71	21,4	21,56	21,83	23,26
23	19,83	19,3	19,5	19,24	20,01	19,89	20,39	20,01	21,3	21,36
24	17,55	16,8	17,01	17,45	19,2	19,59	19,3	19,28	19,27	19,9
Среднее	18,89	18,77	19,18	19,96	20,63	20,81	21,18	21,02	21,31	22,23
Стандартная ошибка среднего	0,272	0,409	0,359	0,459	0,346	0,372	0,392	0,344	0,337	0,469
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
25	18,71	18,88	19,4	19,57	20,69	20,22	21,16	21,09	21,66	22,38
26	18,3	18,9	19,28	19,71	20,34	20,86	21,7	21,75	21,17	23,35
27	21,27	20,79	20,34	20,62	21,6	22,12	22,22	22,68	22,6	23,86
28	20,91	20,38	20,43	21,3	21,71	22,25	22,74	21,58	22,6	23,83
29	18,02	17,68	18,1	19,2	19,34	20	20,13	20,35	20,18	20,79
30	17,85	18,25	18,5	19,9	19,81	20,36	20,95	20,65	20,87	21,37
31	19,42	19,8	19,81	20,3	21,58	21,29	20,95	21,62	21,64	22,53
32	18,16	18,53	18,72	19,39	19,87	20,59	20,35	20,48	21,96	21,98
Среднее	19,08	19,15	19,32	20	20,62	20,96	21,28	21,28	21,59	22,51
Стандартная ошибка среднего	0,472	0,381	0,3	0,248	0,328	0,302	0,317	0,278	0,295	0,397
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
33	18,42	18,64	19,34	19,63	20,68	20,68	20,22	20,16	20,63	21,7
34	20,14	20,35	20,68	21,51	22,17	22,11	22,06	23,1	22,34	23,65
35	20,65	20,76	21,04	21,9	22,2	22,9	22,4	22,5	23,03	23,99

36	19,37	19,73	20,03	20,03	21,38	21,42	22,14	22,43	22,44	23,38
37	19,04	18,91	19,28	20,6	20,54	21,02	20,8	21,67	21,72	22,76
38	19,23	19,99	20,43	21,17	20,71	21,48	21,16	21,6	21,43	23,81
39	18	19	19,55	19,59	20,45	20,5	20,15	20,76	20,9	22,35
40	18,64	19,08	18,85	19,27	21,3	20,9	22,1	22,6	22,68	22,58
Среднее	19,19	19,56	19,9	20,46	21,18	21,38	21,38	21,85	21,9	23,03
Стандартная ошибка среднего	0,311	0,27	0,272	0,347	0,25	0,283	0,323	0,354	0,306	0,285
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
41	18,71	18,54	18,75	18,88	19,38	19,51	20,01	20,56	21,19	22,03
42	18,8	19,47	19,85	20,49	21,03	21,45	21,25	21,94	21,65	22,94
43	18,88	18,79	19,58	20,5	21,24	21,25	21,84	21,81	22,84	23,93
44	17,8	17,88	18,95	18,99	19,73	21,4	21,39	20,79	21,3	21,11
45	19,18	19,98	20,16	20,18	20,31	20,95	21,12	21,31	22,05	22,48
46	18,12	18,71	18,53	19,46	19,85	20,46	20,72	20,96	20,8	23
47	19,06	18,76	19,84	22,25	21,87	21,28	21,71	22,66	22,36	22,99
48	19,03	19,38	19,25	20,1	20,79	21,21	22,08	21,52	22,02	24
Среднее	18,7	18,94	19,36	20,11	20,53	20,94	21,27	21,44	21,78	22,81
Стандартная ошибка среднего	0,172	0,229	0,207	0,38	0,302	0,233	0,235	0,244	0,237	0,337
Идентификационный номер	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
49	19,26	18,78	19,55	19,59	20,1	21	20,8	21,02	21,04	21,73
50	18,61	18,95	18,8	19,41	20,4	20,3	20,58	21,62	21,73	22,69
51	19,53	18,75	19,05	19,38	19,65	21,39	20,66	21,08	20,91	22,48
52	19,28	19,66	19,82	19,45	20,09	19,83	19,8	22,09	20,38	20,85
53	19,14	19,15	19,33	20,16	21,02	20,9	21,95	20,09	21,95	22,03
54	18,72	19,36	19,55	20,17	21,86	22,39	22,4	22,22	22,12	23,16
55	19,4	19,88	20,14	20,8	21,6	21,48	21,58	21,5	21,97	23,39
56	18,82	17,98	17,95	18,26	19,13	19,65	20,51	19,8	20,2	21,7
Среднее	19,1	19,06	19,27	19,65	20,48	20,87	21,04	21,18	21,29	22,25
Стандартная ошибка среднего	0,119	0,211	0,24	0,266	0,335	0,324	0,305	0,309	0,267	0,298

25

Таблица 7

Измерения кривой относительного ответа (%) после введения метахолина, где
100% указывает на исходный уровень ответа у каждого животного

Относительная интенсивность (%)

Несенсибилизованные инертные носитель	Фосфатно-солевой буфер	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
1	118,43	131,34	132,35	130,24	131,20	128,26	135,64
2	131,56	143,87	164,19	159,04	163,17	163,12	171,09
3	115,04	124,55	140,42	149,96	150,90	154,81	157,01
4	126,74	158,81	205,26	202,11	236,54	230,00	240,59
5	141,56	166,45	176,68	189,07	177,78	180,28	186,48
6	110,66	145,91	171,89	167,32	158,36	160,71	159,57
7	110,37	110,55	110,73	109,07	111,01	113,30	119,83
8	135,97	152,16	143,86	147,44	151,21	145,80	136,84
Среднее	123,79	141,71	155,67	156,78	160,02	159,53	163,38
Стандартная ошибка среднего	4,21	6,56	10,50	10,63	13,08	12,49	13,35

45

Овальбумин инертный носитель	Фосфатно-солевой буфер	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
9	106,86	146,71	171,29	162,44	181,44	194,87	254,44
10	119,43	125,96	193,79	197,44	199,27	224,99	233,58
11	122,53	241,41	252,50	314,73	353,16	328,97	347,92
12	129,22	304,31	340,14	289,46	345,92	445,23	597,87
13	130,91	193,30	223,68	254,45	258,39	272,47	275,50
14	135,49	151,47	166,99	392,55	478,27	480,22	409,83

15	124,92	142,11	215,72	199,42	294,69	248,12	319,51
16	126,79	129,46	138,57	149,23	166,47	177,93	223,34
Среднее	124,52	179,34	212,84	244,97	284,70	296,60	332,75
Стандартная ошибка среднего	3,08	22,45	22,20	29,59	37,47	39,94	43,88

5

Несенсилизированные БЦЖ	Фосфатно-солевой буфер	0,625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00
17	146,66	162,48	154,77	160,04	161,29	161,04	147,63
18	136,70	165,00	160,13	145,98	152,23	164,46	161,56
19	130,02	155,93	167,91	191,58	203,82	186,27	246,22
20	153,91	182,18	203,31	240,48	238,37	234,70	224,65
21	133,25	137,28	162,11	178,48	191,91	199,33	205,70
22	136,78	149,59	195,96	282,79	292,65	292,72	301,94
23	118,33	131,98	137,02	142,47	145,38	148,28	155,10
24	126,74	137,82	162,24	204,57	207,56	229,82	283,77
Среднее	135,30	152,78	167,93	193,30	199,15	202,08	215,82
Стандартная ошибка среднего	3,95	6,01	7,67	17,17	17,40	17,06	20,88

10
15

Овальбумин БЦЖ	Фосфатно-солевой буфер	0,625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00
25	108,03	138,21	183,32	202,26	202,73	182,79	185,49
26	118,25	257,81	206,97	216,36	212,99	204,10	206,23
27	134,80	222,02	236,12	280,32	280,29	283,06	282,43
28	115,15	114,03	118,00	120,39	121,71	142,98	186,51
29	115,43	129,98	150,67	180,26	171,38	174,01	185,08
30	126,05	125,12	129,19	151,90	275,44	344,08	364,32
31	129,02	136,77	267,38	261,84	330,42	461,90	371,06
32	109,68	128,89	146,11	149,87	168,38	173,64	217,46
Среднее	119,55	156,60	179,72	195,40	220,42	245,82	249,82
Стандартная ошибка среднего	3,36	18,68	18,88	19,79	24,62	38,82	28,08

20
25

Несенсилизированные ФОРМУЛА А П	Фосфатно-солевой буфер	0,625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00
33	125 ,58	144,20	168,15	186,86	175,24	176,33	177,47
34	146 ,51	169,00	260,52	250,91	252,07	246,81	249,22
35	140 ,23	142,84	148,36	161,59	199,77	204,06	212,82
36	126 ,99	155,93	160,95	177,39	186,67	176,74	196,50
Несенсилизированные ФОРМУЛА А П	PB S	0,625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00
33	125 ,58	144,20	168,15	186,86	175,24	176,33	177,47
34	146 ,51	169,00	260,52	250,91	252,07	246,81	249,22
35	140 ,23	142,84	148,36	161,59	199,77	204,06	212,82
36	126 ,99	155,93	160,95	177,39	186,67	176,74	196,50

30
35
40

Овальбумин ФОРМУЛА А П		Фосфатно- солевой буфер	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
5	41	105,56	127,62	153,09	152,64	155,79	155,05	141,78
	42	127,83	146,48	149,40	150,02	157,59	158,28	167,28
	43	132,88	171,37	178,22	185,08	192,45	276,23	295,46
	44	106,69	156,07	185,86	200,16	190,12	206,75	217,86
	45	112,65	146,94	195,29	209,32	233,57	222,81	239,62
	46	131,19	157,88	183,77	191,72	195,83	204,58	218,59
10	47	103,71	118,27	129,55	137,52	146,41	151,73	159,29
	48	143,41	152,30	154,25	178,90	188,66	188,85	221,45
	Среднее	120,49	147,12	166,18	175,67	182,55	195,53	207,67
	Стандартная ошибка среднего	5,35	6,01	8,05	9,19	10,02	14,91	17,65

Овальбумин ФОРМУЛА А Т		Фосфатно- солевой буфер	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
15	49	132,93	162,46	160,75	163,44	159,13	160,92	156,80
	50	186,62	219,08	214,06	233,51	222,61	221,68	212,96
	51	138,92	205,77	243,49	261,02	266,60	276,19	280,05
	52	125,73	155,11	170,70	189,33	211,72	321,32	271,59
20	53	111,64	147,12	208,05	235,99	249,64	280,12	274,40
	54	131,74	213,92	241,73	236,14	240,46	214,20	216,79
	55	110,04	108,98	133,52	145,54	142,20	151,71	178,89
	56	142,13	315,65	405,81	421,56	438,06	518,91	459,26
	Среднее	134,97	191,01	222,26	235,82	241,30	268,13	256,34
	Стандартная ошибка среднего	8,45	22,29	29,61	30,09	31,97	41,41	33,18

25

Таблица 8**Индивидуальное количество клеток воспаления**

Несенсибили- зированные		Овальбумин	Несенсибили- зированные БЦЖ	Овальбумин БЦЖ	Несенсибилизи- рованные Формула А П	Овальбумин Формула А П	Овальбумин Формула А Т	
30	425000	520000	540000	370000	260000	275000	370000	
	245000	615000	355000	605000	300000	450000	355000	
	245000	440000	495000	345000	335000	395000	480000	
	295000	375000	260000	240000	205000	310000	210000	
35	255000	280000	165000	295000	275000	315000	225000	
	215000	330000	105000	275000	260000	245000	400000	
	255000	430000	210000	205000	250000	390000	275000	
	105000	575000	315000	160000	265000	255000	280000	
	255000	445625	305625	311875	268750	329375	324375	
	Стандартная ошибка среднего	31282,13	41623,71	54210,55	48494,64	13354,71	26295,67	32820,36

40

45

Таблица 9

Индивидуальная лейкоцитарная формула (%), БАЛ)

Несенсибилизированные Овальбумин

	Несенсибилизированные				Овальбумин			
	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
5	0,00	95,65	3,62	0,72	20,67	61,00	10,00	8,33
	0,00	92,31	2,68	5,02	14,05	62,21	6,35	17,39
	2,35	77,93	11,27	8,45	51,99	27,56	9,66	10,80
	0,65	87,91	3,59	7,84	54,88	30,64	6,06	8,42
	0,33	80,67	11,67	7,33	17,63	54,17	14,10	14,10
10	0,31	92,50	1,88	5,31	57,00	19,67	2,67	20,67
	4,73	71,62	14,53	9,12	43,52	24,58	8,97	22,92
	3,54	80,30	9,60	6,57	52,00	22,00	6,00	20,00
	Среднее	1,49	84,86	7,35	6,30	38,97	37,73	7,98
	Стандартная ошибка среднего	0,64	2,99	1,74	0,94	6,48	6,42	1,22
15								2,03

Несенсибилизированные БЦЖ

Овальбумин БЦЖ

	Несенсибилизированные БЦЖ				Овальбумин БЦЖ			
	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
20	0,32	91,75	2,54	5,40	18,33	65,33	3,00	13,33
	0,00	94,83	1,72	3,45	40,86	33,89	8,97	16,28
	0,99	92,11	5,26	1,64	48,85	30,82	8,52	11,80
	3,40	84,35	8,84	3,40	18,24	53,82	13,24	14,71
	0,66	88,82	5,26	5,26	25,81	55,81	8,39	10,00
25	2,33	63,67	12,33	21,67	14,20	67,19	4,42	14,20
	4,00	71,00	12,67	12,33	38,55	27,41	6,93	27,11
	4,04	64,31	6,40	25,25	25,82	72,13	0,41	1,64
	Среднее	1,97	81,35	6,88	9,80	28,83	50,80	6,73
	Стандартная ошибка среднего	0,60	4,59	1,45	3,20	4,42	6,27	1,42
30								2,50

Несенсибилизированные

вакцина RUTI П

Овальбумин Формула А П

Овальбумин Формула А Т

	Несенсибилизированные вакцина RUTI П				Овальбумин Формула А П				Овальбумин Формула А Т			
	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- фильты	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
35	1,59	72,73	9,77	15,91	2,86	85,71	3,49	7,94	18,06	60,54	7,69	13,71
	0,29	85,00	9,12	5,59	0,48	83,73	8,13	7,66	7,80	74,24	10,17	7,80
	1,02	75,09	9,90	13,99	23,91	49,69	11,49	14,91	6,25	83,04	3,57	7,14
	0,00	88,22	7,74	4,04	35,18	43,97	6,51	14,33	38,74	31,79	17,55	11,92
	0,34	60,20	30,95	8,50	6,21	81,05	2,29	10,46	43,67	36,67	5,00	14,67
40	0,67	82,67	4,00	12,67	2,97	69,80	9,90	17,33	20,38	57,96	8,92	12,74
	0,00	86,89	3,28	9,84	0,00	80,55	3,41	16,04	14,05	62,21	6,35	17,39
	0,00	72,67	8,00	19,33	34,02	24,74	14,78	26,46	35,88	26,58	21,26	16,28
	Среднее	0,49	77,93	10,35	11,23	13,20	64,91	7,50	14,39	23,10	54,13	10,06
	Стандартная ошибка среднего	0,20	3,37	3,07	1,84	5,39	8,02	1,56	2,15	5,11	7,23	2,20
45												1,30

Таблица 10

Индивидуальные результаты определения лейкоцитарной формулы в
БАЛ (клетки/мл)

		Несенсибилизированные				Овальбумин			
5		Эозино- филы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- филы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
		0,00	406521,74	15398,55	3079,71	107466,67	317200,00	52000,00	43333,33
		0,00	226153,85	6555,18	12290,97	86387,96	382575,25	39080,27	106956,52
		5751,17	190938,97	27605,63	20704,23	228750,00	121250,00	42500,00	47500,00
		1928,10	259330,07	10604,58	23137,25	205808,08	114898,99	22727,27	31565,66
		850,00	205700,00	29750,00	18700,00	49358,97	151666,67	39487,18	39487,18
		671,88	198875,00	4031,25	11421,88	188100,00	64900,00	8800,00	68200,00
10		12060,81	182635,14	37043,92	23260,14	187142,86	105714,29	38571,43	98571,43
		3712,12	84318,18	10075,76	6893,94	299000,00	126500,00	34500,00	115000,00
		Среднее	3121,76	219309,12	17633,11	14936,01	169001,82	173088,15	34708,27
		Стандартная ошибка среднего	1459,25	32091,46	4314,20	2701,14	29106,93	39999,89	4689,31
									11820,78

		Несенсибилизированные БЦЖ				Овальбумин БЦЖ			
15		Эозино- филы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- филы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
		1714,29	495428,57	13714,29	29142,86	67833,33	241733,33	11100,00	49333,33
		0,00	336637,93	6120,69	12241,38	247225,91	205016,61	54269,10	98488,37
		4884,87	455921,05	26052,63	8141,45	168540,98	106327,87	29409,84	40721,31
		8843,54	219319,73	22993,20	8843,54	43764,71	129176,47	31764,71	35294,12
20		1085,53	146546,05	8684,21	8684,21	76129,03	164629,03	24741,94	29500,00
		2450,00	66850,00	12950,00	22750,00	39037,85	184779,18	12145,11	39037,85
		8400,00	149100,00	26600,00	25900,00	79036,14	56189,76	14201,81	55572,29
		12727,27	202575,76	20151,52	79545,45	41311,48	115409,84	655,74	2622,95
		Среднее	5013,19	259047,39	17158,32	24406,11	95359,93	150407,76	22286,03
		Стандартная ошибка среднего	1601,77	54626,61	2785,39	8419,42	26243,44	21213,97	5871,74
									9603,35

		Несенсибилизированные			Овальбумин Формула А П			Овальбумин Формула А Т	
		Формула А П	Овальбумин	Формула А П	Овальбумин	Формула А П	Овальбумин	Формула А Т	Овальбумин
30		Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- филы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты	Эозино- филы
		39090,91	25409,09	41363,64	7857,14	235714,29	9603,17	21825,40	66822,74
		55000,00	27352,94	16764,71	2153,11	376794,26	36602,87	34449,76	27677,97
		51535,84	33157,00	46877,13	94456,52	196273,29	45388,20	58881,99	30000,00
		30841,75	15875,42	8282,83	109055,37	136319,22	20195,44	44429,97	81357,62
		35561,22	85119,05	23384,35	19558,82	255294,12	7205,88	32941,18	98250,00
		14933,33	10400,00	32933,33	7277,23	171014,85	42457,43	42450,50	81528,66
		17213,11	8196,72	24590,16	0,00	314129,69	13310,58	62559,73	231847,13
		32566,67	21200,00	51233,33	86752,58	63092,78	37680,41	67474,23	38628,76
		08342,85	28338,78	30678,69	40888,85	218579,06	24280,50	45626,59	100465,12
		11472,59	8650,53	5327,80	16619,59	35230,40	5037,23	5675,15	74418,60
									59534,88
									45581,40
									30311,12
									39386,93

35

Формула изобретения

- Средство, представляющее собой липосомную форму, включающую:
 - фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК),
 - образующее липосомы средство,
 - от 1 до 20% сахарозы, для применения в профилактике или терапии аллергического ответа у человека и животных.
- Средство, представляющее собой липосомную форму, включающую:
 - фрагменты штамма *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) (ФМБТК),
 - образующее липосомы средство,
- где средний z-размер частиц составляет 150 нм или менее, для применения в профилактике или терапии аллергического ответа у человека и животных.
- Средство по п. 1, содержащее от 2 до 12% сахарозы (вес/объем), предпочтительно от 3 до 8% сахарозы (вес/объем), и наиболее предпочтительно от 4 до 6% сахарозы (вес/объем)

объем).

4. Средство по п. 1, где средний z-размер липосомных частиц составляет 150 нм или менее.

5. Средство по п. 4, где средний z-размер частиц находится в пределах от 40 до 135 нм, более предпочтительно от 55 до 125 нм.

6. Средство по п. 4, где липосомная форма представляет собой эмульсию и где средний z-размер частиц предпочтительно меньше 40 нм.

7. Средство по п. 1 или 2, где индекс полидисперсности частиц составляет 0,4 или менее, предпочтительно 0,3 или менее.

10 8. Средство по п. 1 или 2, где штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) является вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК).

9. Средство по п. 1 или 2, где штамм *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (МБТК) является штаммом МБТК NCTC 13536, размещенным в 2010 г. в Национальной коллекции типовых культур в Лондоне.

15 10. Средство по п. 1 или 2, дополнительно включающее
(г) поверхностно-активное средство.

11. Средство по п. 1 или 2, дополнительно включающее
(г) один или более неионный сурфактант,

и где неионный сурфактант предпочтительно выбирают из группы, состоящей из
20 алкилфенольных этоксилатов, этоксилатов сорбитанового эфира и более предпочтительно этоксилата октилфенола.

12. Средство по п. 1 или 2, где фрагменты клеток МБТК представляют собой или включают фрагменты клеточной стенки.

13. Средство по п. 1 или 2, где образующее липосомы средство представляет собой
25 гидрогенизованный, частично гидрогенизованный или негидрогенизованный фосфолипид, предпочтительно лецитин и наиболее предпочтительно соевый лецитин.

14. Средство по п. 10, где поверхностно-активное средство выбирают из холата, дезоксихолата, холестерина и гемисукцината холестерина.

15. Средство по п. 1 или 2, включающее по меньшей мере два, предпочтительно три,
30 более предпочтительно четыре и наиболее предпочтительно все из следующих:

(i) первый полипептид, имеющий молекулярный вес около 70 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где первый полипептид имеет пептидное картирование, схожее с пептидным картированием белка HSP70 *M. tuberculosis* (Rv0350),

35 (ii) второй полипептид, имеющий молекулярный вес около 38 кДа, как измерено после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где второй полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием 38 кДа белка *M. tuberculosis* (Rv0934),

(iii) третий полипептид, имеющий молекулярный вес около 30 кДа, как измерено
40 после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где третий полипептид имеет пептидное картирование схожее с пептидным картированием белка Ag85B *M. tuberculosis* (Rv1866c), и

(iv) четвертый полипептид, имеющий молекулярный вес около 10 кДа, как измерено
после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где
45 четвертый полипептид имеет пептидное картирование, схожее с пептидным картированием белка CFP10 *M. tuberculosis* (Rv3874), и

(v) пятый полипептид, имеющий молекулярный вес около 6 кДа, как измерено после
электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, где пятый

полипептид имеет пептидное картирование, схожее с пептидным картированием белка ESAT-6 *M. tuberculosis* (Rv3875).

16. Средство по п. 1 или 2, где присутствует по меньшей мере один из следующих антигенов *Mycobacterium tuberculosis* или их фрагменты: HSP70, белок 38 кДа и Ад85 В.

⁵ 17. Средство по п. 1 или 2, включающее одну или более миколовых кислот и/или конъюгированный с сахаром миколат, предпочтительно димиколат трегалозы и/или гликолипид, предпочтительно липоарabinоманнан.

18. Средство по п. 1 или 2, дополнительно содержащее одну или более солей или их растворы, где предпочтительно, чтобы соль была хлоридом натрия.

¹⁰ 19. Средство по п. 1 или 2, где липосомная форма лиофилизирована.

20. Фармацевтическая композиция, включающая средство по п. 1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель для применения в профилактике или терапии аллергического ответа у человека и животных.

¹⁵ 21. Средство по п. 1 или 2, где аллергический ответ опосредован иммуноглобулинами Е.

22. Средство по п. 1 или 2, где ответом является атопия.

23. Средство по п. 1 или 2, где аллергический ответ является нарушением дыхания и/или бронховаскулярным воспалением.

²⁰ 24. Средство по пп. 1 или 2, где ответ выбирают из астмы, поллиноза, ринита и экземы.

25. Средство по п. 1 или 2, где ответом является астма, предпочтительно аллергическая астма.

26. Средство по п. 24, где астма является бронхиальной астмой.

²⁵ 27. Средство по п. 1 или 2 для инъекции, предпочтительно подкожной или внутримышечной, или для сублингвального введения, или для введения посредством ингаляции.

28. Средство по п. 1 или 2 для введения 200 мкг или менее в дозе и предпочтительно около 25 мкг в дозе.

29. Средство по п. 1 или 2 для применения в профилактике ответа по п. 1 или 2.

³⁰ 30. Средство по п. 28, где средство вводят по меньшей мере два раза, предпочтительно более двух раз.

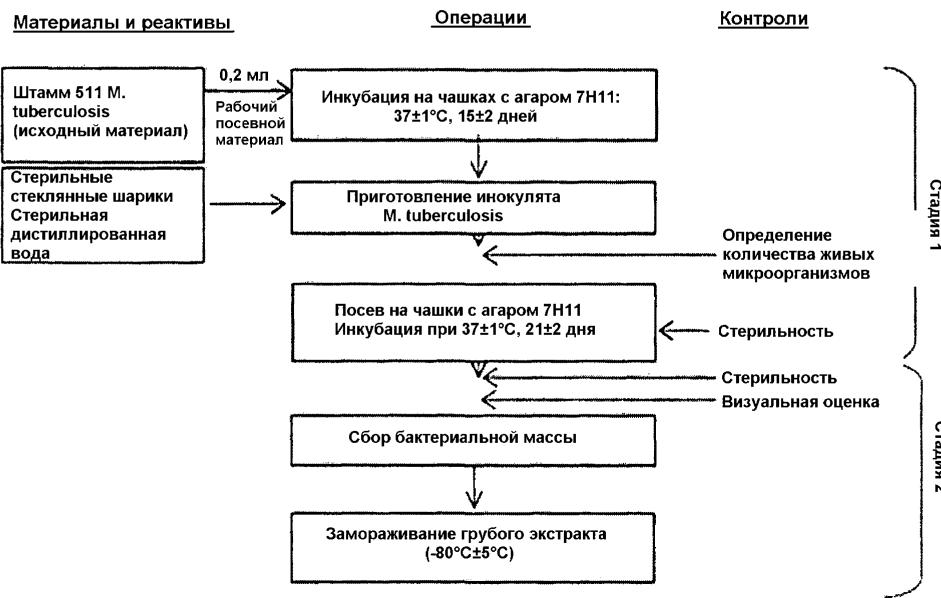
31. Средство по п. 1 или 2 для применения в терапии ответа по п. 1 или 2.

32. Средство по п. 1 или 2 для повторного введения, предпочтительно с интервалом в неделю или более и более предпочтительно в две недели или в четыре недели.

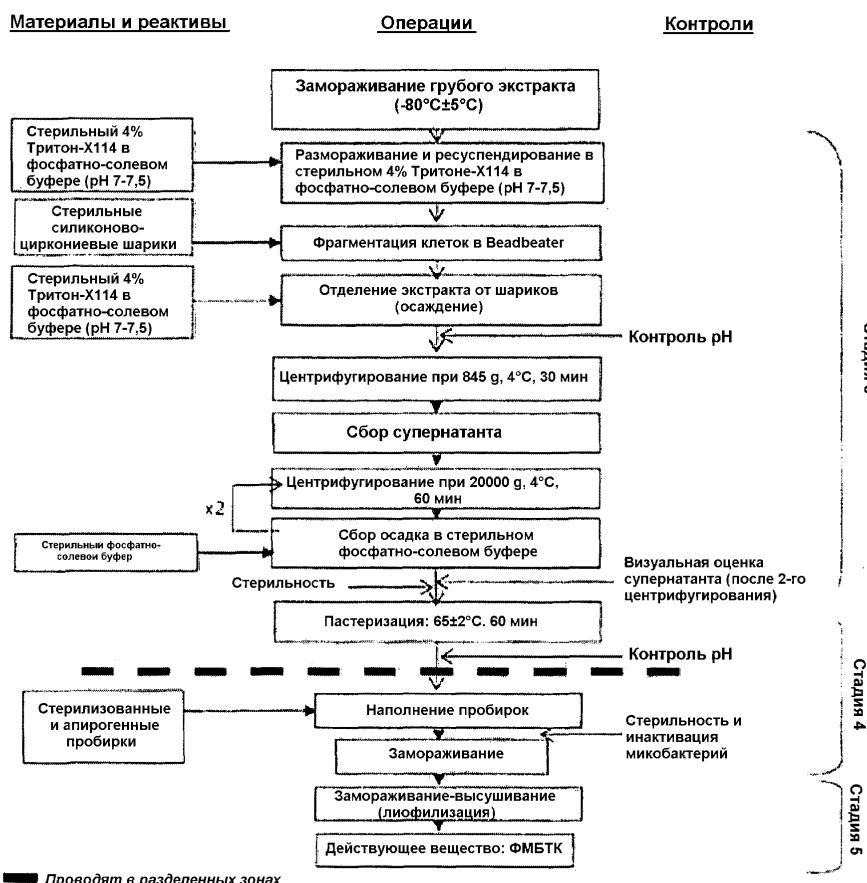
³⁵

40

45

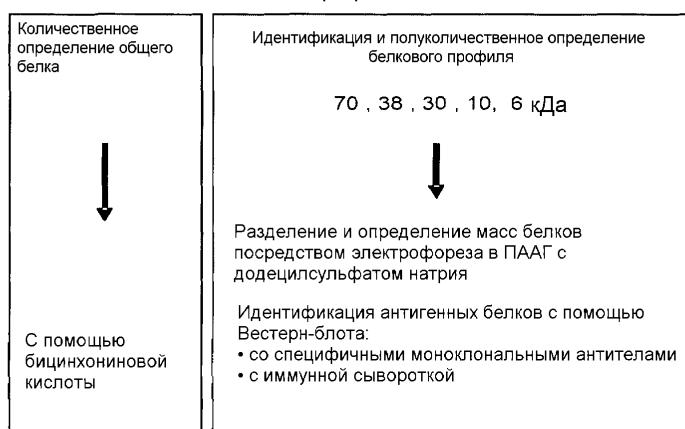


Фиг. 1



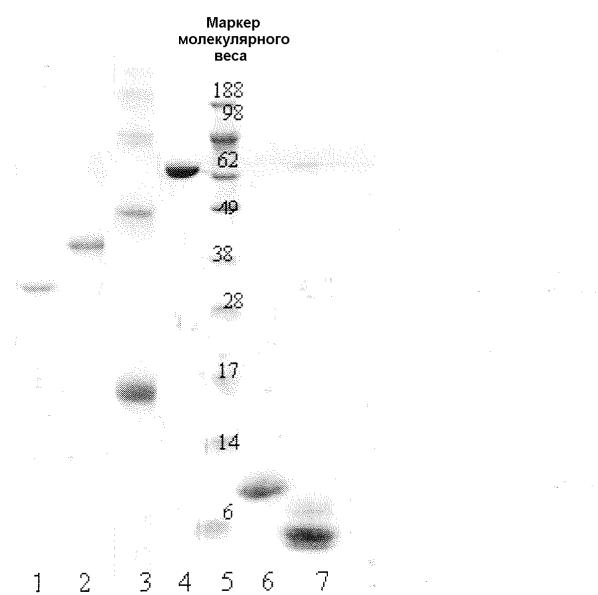
Фиг. 2

Белковый профиль

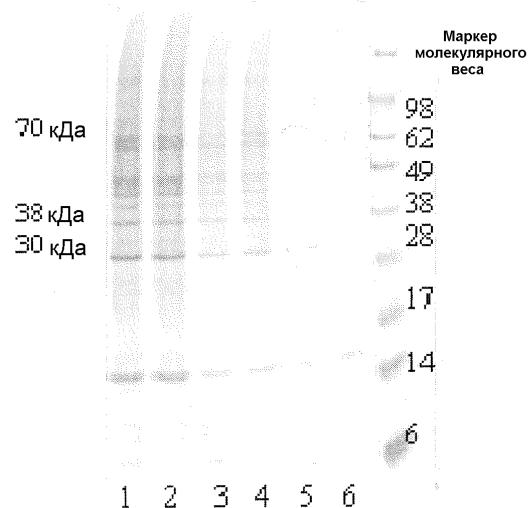


Фиг. 3

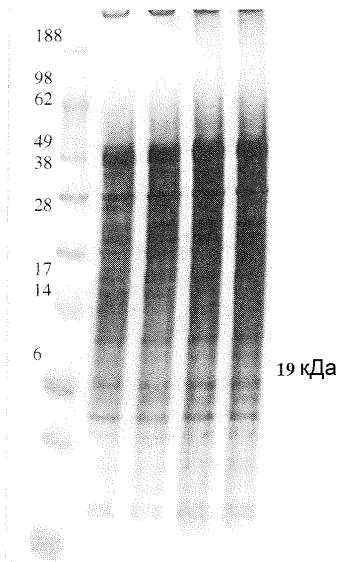
3/14



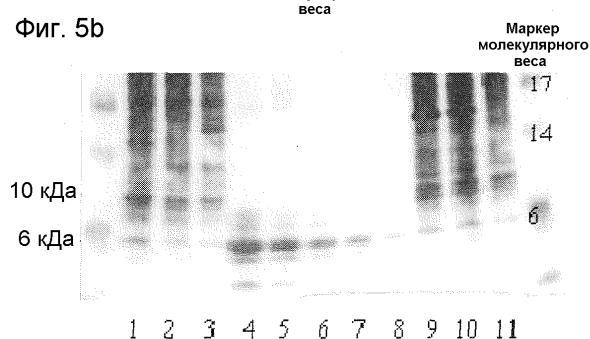
Фиг. 4



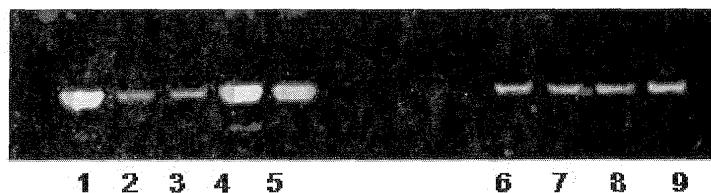
Фиг. 5а



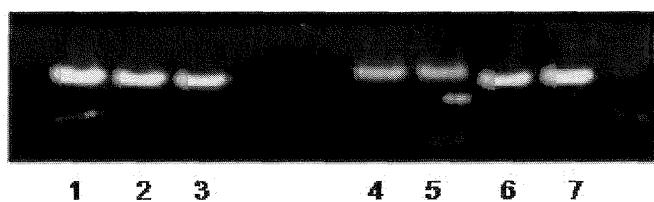
Фиг. 5б



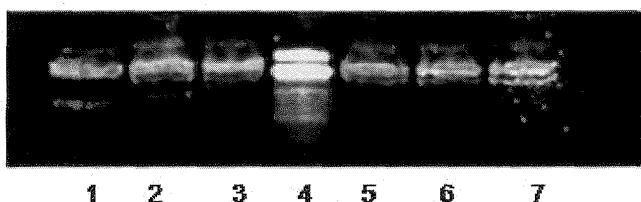
Фиг. 5с



Фиг. 5д

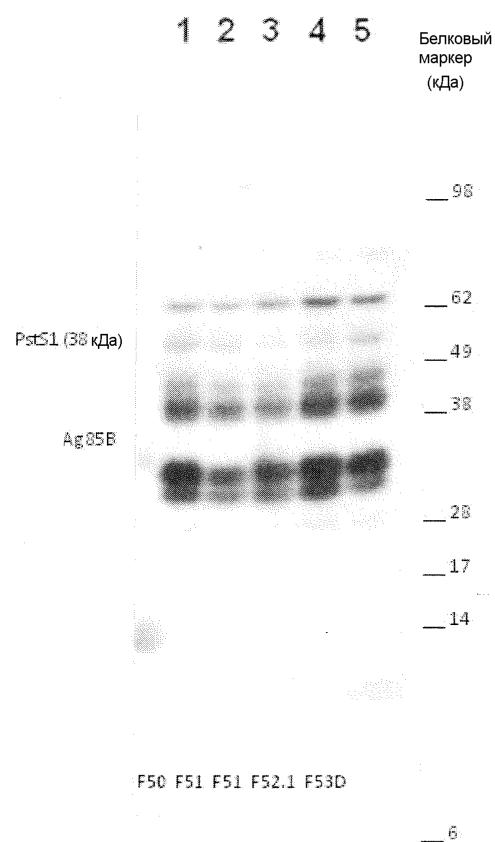


Фиг. 5е

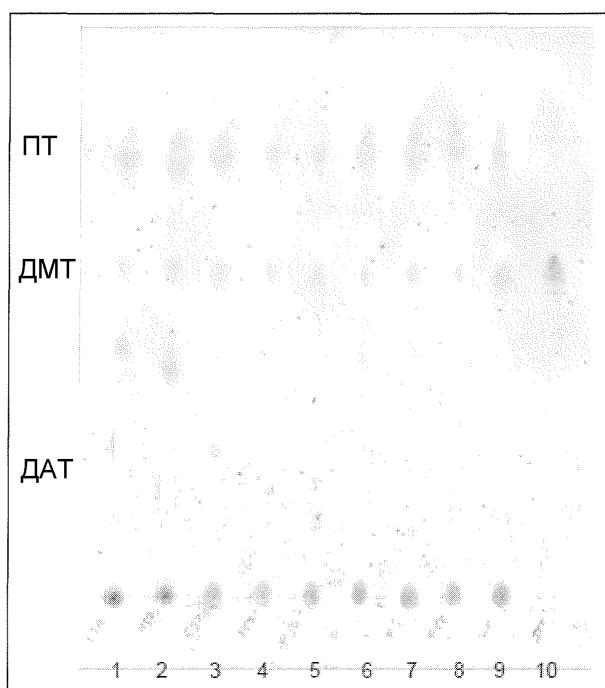


Фиг. 5f

6/14

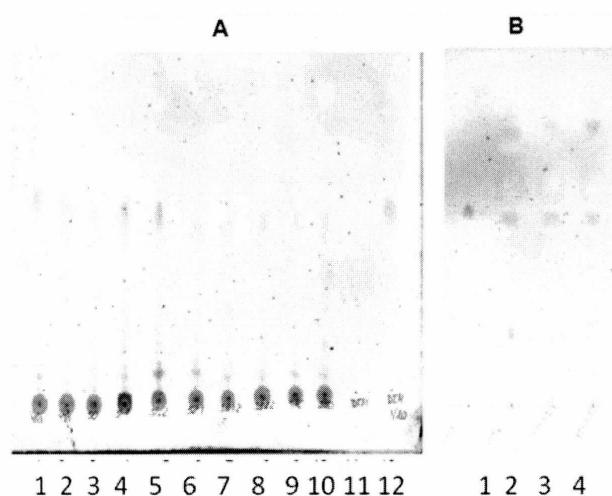


Фиг. 6

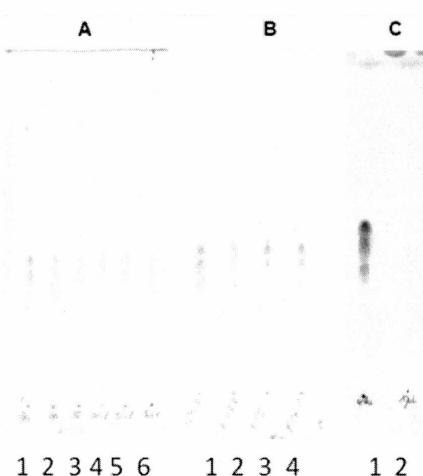


Фиг. 7а

8/14

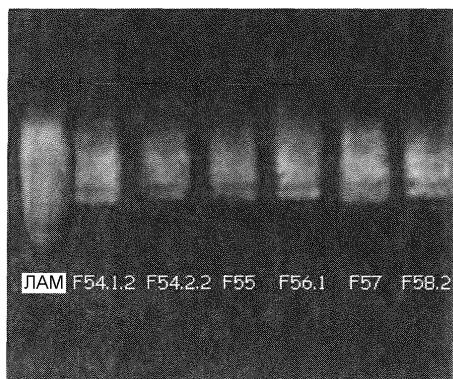


Фиг. 7б

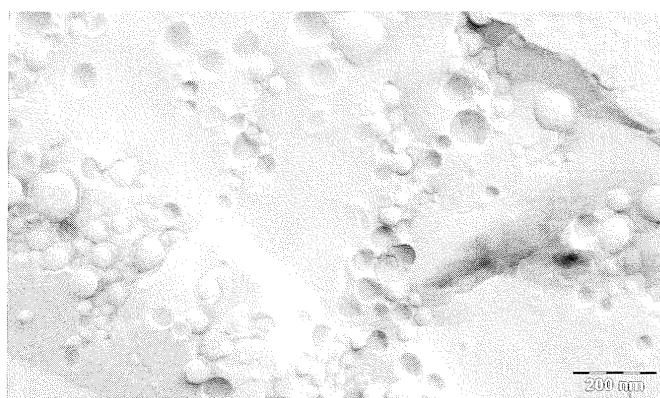


Фигю 7с

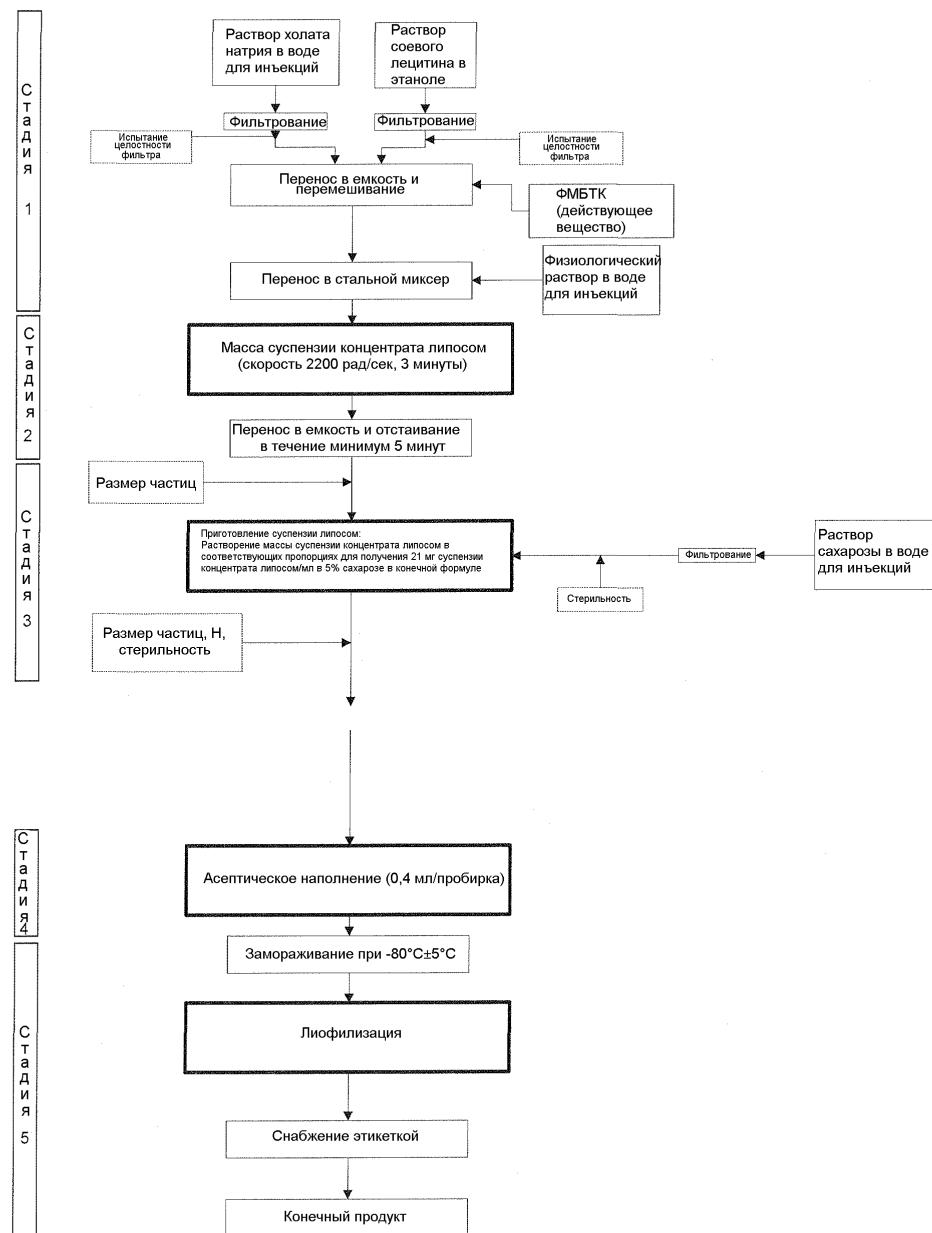
9/14



Фиг. 7д

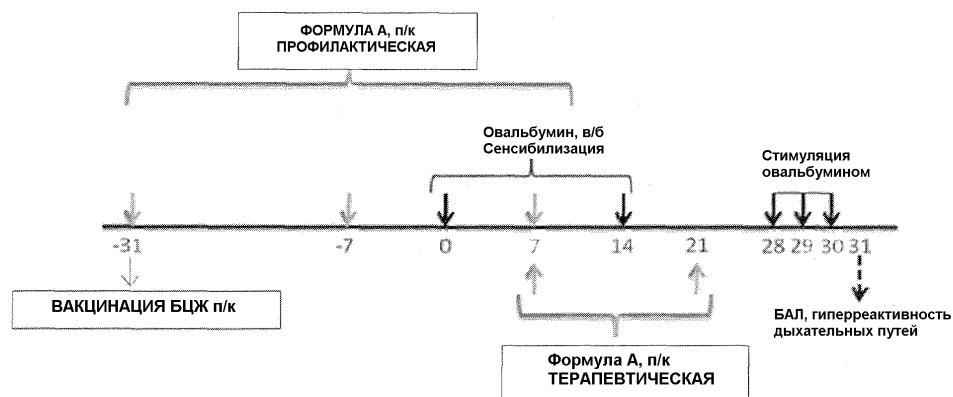


Фиг. 8

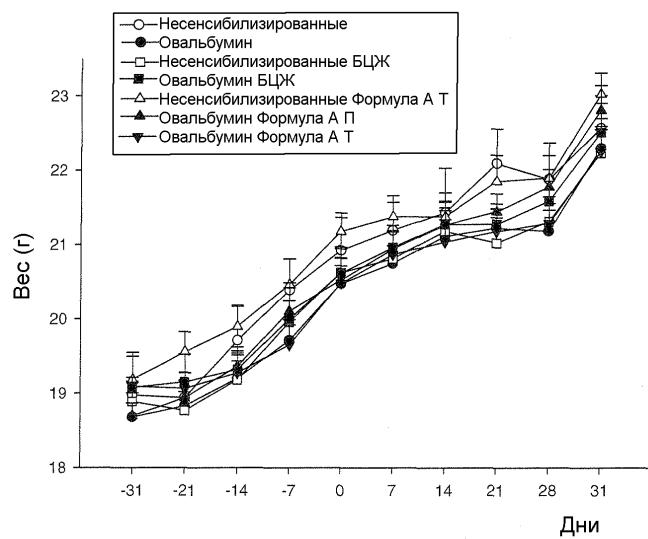


Фиг. 9

11/14

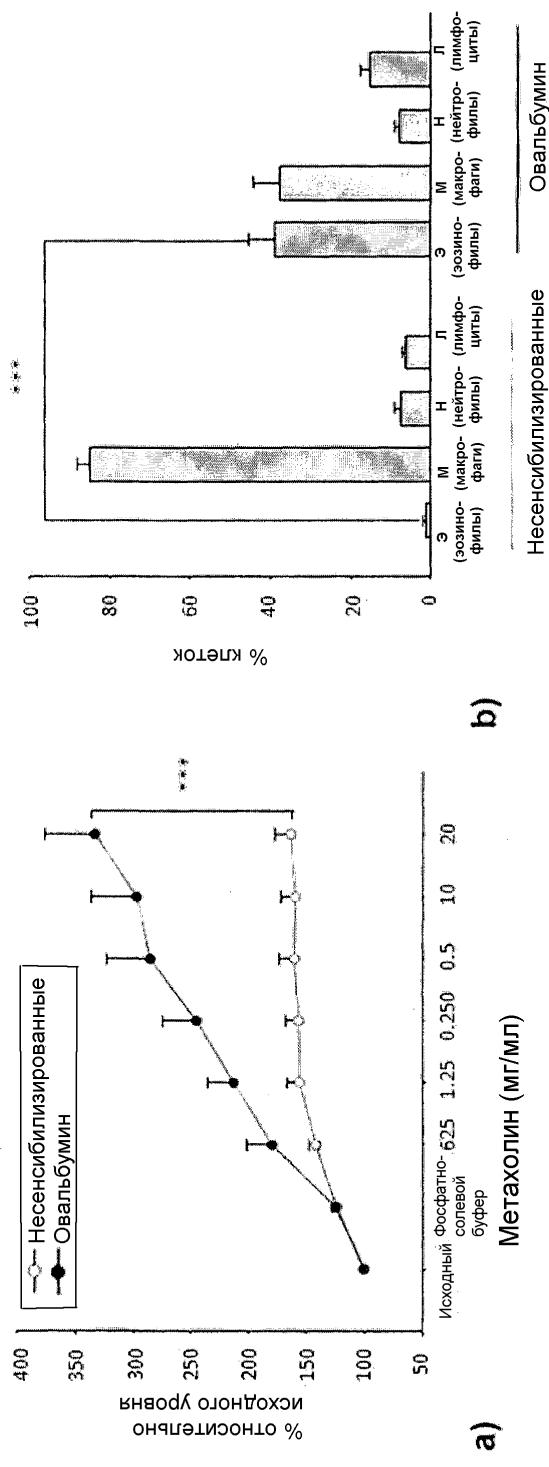


Фиг. 10

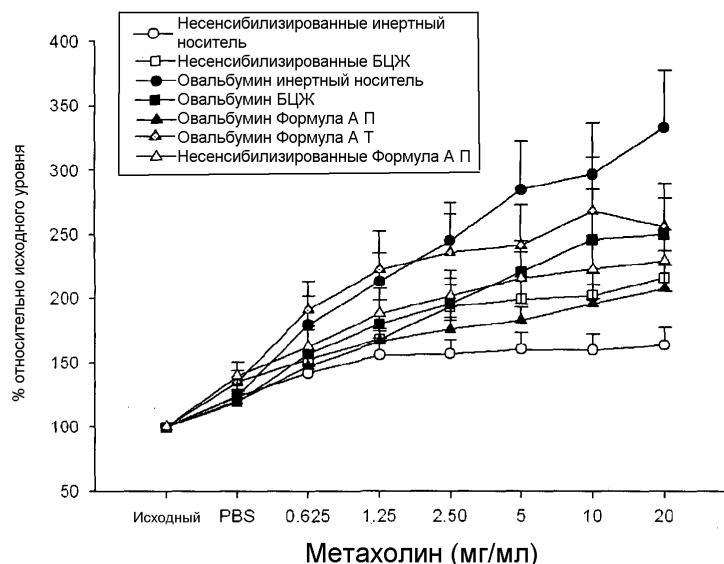


Фиг. 11

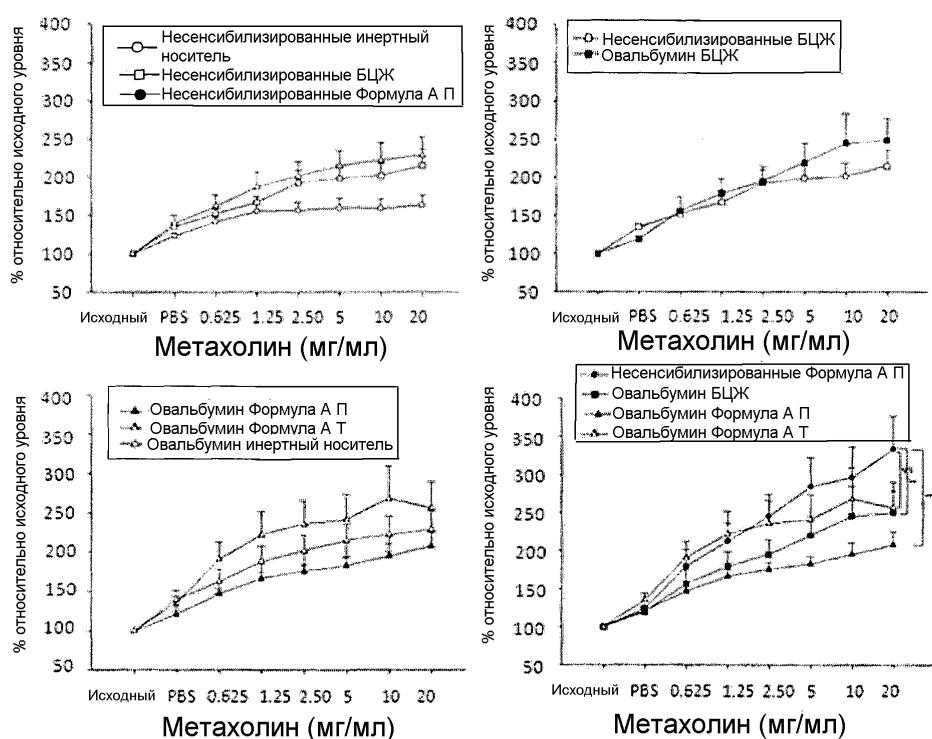
12/14



Фиг. 12

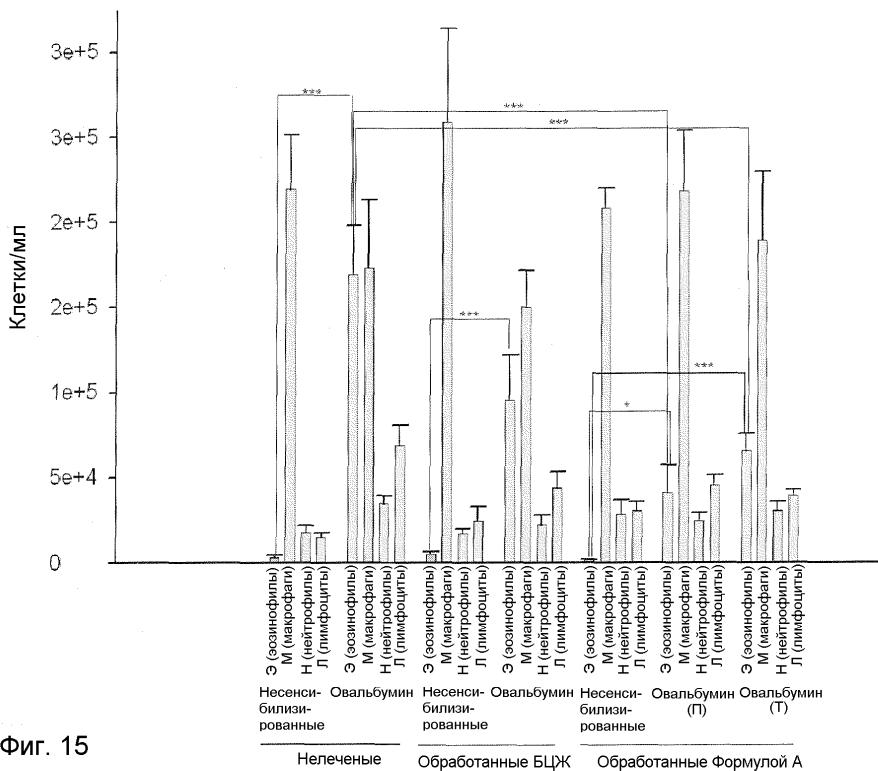


Фиг. 13



Фиг. 14

14/14



Фиг. 15