(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104411326 B
(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201280071390.0

(22)申请日 2012.01.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104411326 A

(43)申请公布日 2015.03.11

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2012/000353 2012.01.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/104943 EN 2013.07.18

(83)生物保藏信息
NCTC 13536 2010.12.03

(73)专利权人 阿尔西维尔法尔玛公司
地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 佩·雷琼·卡尔多纳·伊格莱西亚斯
伊莎贝尔·艾玛特·里拉
布兰卡·雷耶斯·莫雷诺
玛利亚·梅尔斯·艾玛特·法布瑞喀特

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
代理人 肖善强

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/04(2006.01)
A61K 39/35(2006.01)

(56)对比文件
CN 102264389 A,2011.11.30,
Riffo-vasquez Y et al..Effect of mycobacterium tuberculosis chaperonins on bronchial eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic inflammation.《Clin exp allergy》.2004,第34卷(第5期),712-719.
Zhang GS et al..New insights into the effects of mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin on asthma.《Chin med j》.2009,第122卷(第5期),577-583.
Deng Y et al..The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th17/IFN-I balance in a BALB/c mouse asthma model.《J clin immunol》.2011,第31卷(第3期),419-429.

审查员 王胜佳

权利要求书2页 说明书36页 附图15页

(54)发明名称

抗哮喘的MTB-C疫苗

(57)摘要

本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物的变应性病症例如哮喘的药剂。所述药剂包含结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis-complex,MTB-C)菌株的片断。这些具体的片断可来源于有毒力的MTB-C菌株和/或以脂质体组合物的形式存在。所述药剂可包含其他组分,例如脂质体形成剂和/或来源于MTB-C菌株的具体蛋白。可利用本发明所述的药剂治疗的具体变态反应是变应性哮喘。本发明还提供了包含所述药剂的药物组合物。施用本文中所述的药剂显著减弱了敏化动物气道中的气道过度反应性、嗜曙红细胞增多和淋巴细胞增多。所述药剂在所有的经评估参数方面的有效性都超过了商业化的疫苗BCG丹麦1331菌株。

CN 104411326 B

1.用于预防或治疗人或动物的变态反应的药剂,其为脂质体制剂,其包含:

(a)来源于结核分枝杆菌菌株的片断,其包含下述物质:

(i)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量为70kDa的第一多肽,

(ii)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量为38kDa的第二多肽,

(iii)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量为30kDa的第三多肽,

(iv)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量为10kDa的第四多肽,和

(v)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量为6kDa的第五多肽,

(b)脂质体形成剂,

(c)1-20%的蔗糖,

其中脂质体微粒的z-平均粒径为135nm或更小。

2.根据权利要求1所述的药剂,其中所述微粒是单分散的。

3.根据权利要求1所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。

4.根据权利要求2所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。

5.根据权利要求1所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是于2010年保藏在伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

6.根据权利要求2所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是于2010年保藏在伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

7.根据权利要求3所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是于2010年保藏在伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

8.根据权利要求4所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌菌株是于2010年保藏在伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂,其额外地包含

(d)表面张力活性剂。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂,其额外地包含

(d)一种或更多种非离子型表面活性剂。

11.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂,其中所述结核分枝杆菌的细胞的片断是或包含细胞壁片断。

12.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂,其中所述脂质体形成剂是氢化的、部分氢化的或未氢化的磷脂。

13.根据权利要求9所述的药剂,其中所述表面张力活性剂选自胆酸盐/酯、脱氧胆酸盐/酯、胆固醇和胆固醇半琥珀酸酯。

14.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂,其中存在下列结核分枝杆菌抗原或其片段中的至少一种:HSP70、38kDa蛋白和Ag85B。

15.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂，其包含一种或更多种霉菌酸和/或缀合糖的霉菌酸酯。

16.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂，其额外地包含一种或更多种盐或其溶液。

17.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂，其中所述脂质体制剂是冻干的。

18.用于预防或治疗人或动物的变态反应的药物组合物，其包含前述权利要求中任一项所述的药剂和药物学上可接受的载体。

19.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其中所述变态反应是由IgE介导的。

20.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其中所述反应是特应性。

21.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其中所述变态反应是呼吸功能障碍和/或支气管炎症。

22.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其中所述反应选自哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹。

23.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其中所述反应是哮喘。

24.根据权利要求22所述的药剂或药物组合物，其中所述哮喘是支气管哮喘。

25.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其用于注射，或者用于舌下施用，或者用于通过吸入施用。

26.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其每剂量施用200μg或更少。

27.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其用于预防权利要求1-8或18中任一项所述的反应。

28.根据权利要求26所述的药剂，其中施用所述药剂至少2次。

29.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其用于治疗权利要求1-8或18中任一项所述的反应。

30.根据权利要求1-8中任一项所述的药剂或权利要求18所述的药物组合物，其用于重复施用。

抗哮喘的MTB-C疫苗

[0001] 引言

[0002] 本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物(例如人)的变应性病症(例如哮喘)的药剂。所述药剂包含结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis-complex,MTB-C)菌株的片断(fragment)。

[0003] 一般而言,许多物质可引发变态反应,这些物质包括但不局限于环境因素例如花粉、灰尘、霉菌,植物(像草或树),动物皮屑,食物,药物或化学品。变态反应的症状包括但不局限于发痒、肿胀、流鼻涕、流眼泪、咳嗽、气喘、呼吸困难、荨麻疹、疹子、产生黏液或者甚至是作为更严重反应的过敏反应。变态反应及其严重程度在任何给定物种的个体之间都存在巨大差异。

[0004] 人们普遍认为:变态反应的分子基础存在于旨在保护机体免受潜在危害的哺乳动物免疫系统中。在显示变态反应的个体中,免疫系统对变应原(即引发免疫反应的物质)做出反应。典型的变应原包括例如花粉、螨虫(mites)或霉菌,并且这些变应原通常是可吸入的,这使它们成为呼吸道变态反应的重要触发物。因此,变态反应是对这样的物质过度敏感的免疫反应,该物质在健康的(不受影响的)个体中是无害的,但可在被影响的个体中引起有害的症状。

[0005] 对变应原的固定的过度敏感性也被称为特应性。尽管在过度敏感性反应可发生之前必须发生与变应原的接触,但特应性可以具有遗传成分。最常见的一种呼吸道变应性疾病是变应性哮喘,它是最常见的变态反应之一。由此,可以理解变应性哮喘是最常见的哮喘类型。约90%患有儿童期哮喘的儿童患有(其它)变态反应,而在成年人中这个比例约为50%。吸入特定的变应原可引起与变应性哮喘有关的哮喘症状的发生。当在冷空气中锻炼或者吸入任何类型的烟雾、灰尘、烟气和有时的强烈气味之后,几乎每个患有哮喘(变应性的或非变应性的)的个体都会情况变差。

[0006] 哮喘是阻塞性肺病,并且是临床医学上遇到的最常见的疾病之一。哮喘的典型特征在于多种程度的气流阻塞、气道炎症反应和支气管过度反应性。一些哮喘患者还表现出对常见吸入物(例如花粉)的过度敏感性。哮喘是慢性的呼吸系统炎症性疾病,它导致气道上皮的破坏、炎性细胞的浸润以及平滑肌的紧张。哮喘是慢性的呼吸系统炎症性疾病,其特征在于可逆性气道阻塞以及气管和支气管的过度反应性,导致气道变窄。哮喘的临床特征为气喘、呼吸困难和咳嗽。虽然哮喘的最常见形式是变应性哮喘,但其它引起哮喘的因素包括感染、锻炼、空气污染和可能的情绪因素。在患有哮喘的对象中,从肺到鼻子和嘴的气道变窄,从而导致呼吸困难。这些症状长期存在或急性发作,或者是慢性疾病的急性发作症状;它们通常响应环境变化例如天气变化、变应原的存在和/或呼吸道感染而多次出现。哮喘还被定义为由肺病引起的突发性或慢性呼吸困难。

[0007] 不希望受任何特定理论的束缚,哮喘和其它变态反应经常牵涉遗传易感性。虽然一些患者的确显示出哮喘或其它变态反应的家族史,但大量患者没有个人史或家族史。

[0008] 支气管哮喘的特征在于复现性平滑肌收缩,并且作为慢性或阵发性病症或者慢性疾病的阵发性症状发生。支气管哮喘的临床特征为:阵发性或慢性气喘、咳嗽和胸闷感;肺

功能检测中气流受限;支气管扩张治疗后阻塞性功能紊乱的完全或部分可逆性。

[0009] 哮喘的基本症状是慢性炎症,患者的肺通常显示过度炎症。哮喘的标志是支气管过度反应性(支气管过度响应性)。支气管过度响应性(或与气道的其它结合或过度反应性)是特征为易于引发支气管痉挛(细支气管或小气道的收缩)的状态。哮喘患者显示出的主要症状是气道过度响应性(airway hyperresponsiveness,AHR),即对非特异性支气管收缩剂如乙酰甲胆碱起反应的支气管肌肉的过度收缩反应。乙酰甲胆碱(氯乙酰甲胆碱)是一种合成的胆碱酯,它在副交感神经系统中起非选择性毒蕈碱受体激动剂的作用。可使用乙酰甲胆碱通过支气管激发试验诊断支气管过度反应性/过度敏感性/过度响应性(这三个术语可交换使用)。对此,化学物质(像乙酰甲胆碱或组胺)在正常个体中也引发支气管痉挛,但支气管过度响应性的个体的阈值更低。

[0010] 20世纪中期以来,哮喘和其它特应性/变应性反应的普遍性和严重性显著增加。一些研究已经指出:特应性疾病(包括哮喘)的普遍性与早年抗原暴露相关。在农场长大的儿童、有更多哥哥姐姐的儿童以及早年参加幼教中心的儿童似乎在很大程度上避免了哮喘和其它特应性病症。这导致了“卫生假说”的形成,根据该假说,特应性疾病的风险与儿童期较少的微生物暴露相关(Strachan,BMJ.,1989,299:1259-1260;和Rook等人,Springer Semin.Immunopathol.,2004.25:237-255)。目前人们认为在被暴露的个体(儿童)中固有免疫系统被抗原激活可能是这种现象的分子原因。固有免疫系统基于识别“外来”模式(与病原体/微生物相关的模式(PAMP/MAMP)),并且对潜在病原体提供快速但非特异地应答(需要之前没有暴露至特定的病原体)。

[0011] 已知T-辅助2(Th2)细胞因子在变应性哮喘和其它变应性/特应性反应中起重要作用。这些Th2细胞因子包括IL-4、IL-5和IL-13等,它们诱导许多特应性反应和炎症的临床表现,例如B细胞同种型转变成IgE产生、嗜曙红细胞趋化和激活以及气道的特异性反应例如支气管的过度反应性(Kline,Proc.Am.Thor.Soc.,4(3):283-8,2007)。嗜曙红粒细胞(eosinophil granulocyte)(通常被称为嗜曙红细胞(eosinophil)或嗜酸细胞(acidophils))是免疫系统组分中的一种白血细胞,它负责与多细胞寄生生物和脊椎动物中的某些感染斗争。嗜曙红粒细胞还同肥大细胞一起控制与变应反应和哮喘相关的机制。嗜曙红粒细胞是在造血过程中形成于骨髓的粒细胞,然后其迁移至血液。在变应性哮喘中,嗜曙红细胞通常发现于支气管周围区域,因此它们被称为支气管周嗜曙红细胞。

[0012] 由于Th1反应和Th2反应是相反调控的,因此人们提出诱导Th1反应可避免不想要的Th2反应(例如特应性病症,像变应性哮喘)并且对Th1反应的这种诱导可提供对特应性哮喘的易感性增加。然而,肠虫侵袭的儿童(具有强烈的Th2炎症)中变应性疾病降低以及伴随哮喘流行的Th1依赖性疾病(例如1型糖尿病、炎症性肠病和多发性硬化病)的普遍性增加暗示,诱导Th1驱动的免疫并不能充分解释卫生假说所述的保护。最近的工作集中于通过与病原体相关的分子模式来促进已知抑制Th1类型和Th2类型两种炎症的调控类型的响应(Treg细胞)(Kline等人,J allergy Clin Immunol 2005;116:1202-5)。

[0013] 变应性哮喘是目前日益流行的气道疾病,对其治疗集中于控制症状,但并不总是成功的。

[0014] 这种治疗可涉及吸入皮质类固醇或者施用β激动剂、甲基黄嘌呤、胆碱能药或白三烯激动剂。然而这些药剂通常不仅针对哮喘,而是伴随大量的副作用。因此期望使用根据病

症定制的药剂;从这种意义上来说,研究用于调节哮喘和特应性疾病中的炎症的微生物产品的应用是目前研究中有成果的领域。为此,现有技术中使用在临床试验中已被检测过的下述药剂:(1)具有CpG基序的核酸;(2)BCG(卡介苗(Bacille-Calmette Guerin),牛分枝杆菌(M.bovis)),其是活的预防性结核病疫苗,来源于牛分枝杆菌的减毒菌株;(3)目前正处于临床开发的包括加热灭活的母牛分枝杆菌(M.vaccae)的药剂。

[0015] 1.CpG二核苷酸:细菌DNA区别于哺乳动物DNA之处在于其中存在胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸未被甲基化的序列模式,细菌DNA的许多效应都可以被在特定的碱基序列基序(CpGoDNS)中含这些CpGs的寡脱氧核苷酸(ODNs)再现。有假说认为CpG ODNS通过引起Th1/Th2平衡的调控防止特应性哮喘。例如,Kline等人,J allergy Clin Immunol 2005;116:1202-5中综述了CpGDNA作为可能的免疫调节剂在哮喘患者中的作用。

[0016] 2.BCG肺结核疫苗:正如一些研究所提出的,发达国家中细菌感染(例如肺结核)的下降是造成特应性疾病的普遍性和严重性上升的因素,在哮喘的预防性疗法中,已检验了基于减毒的牛分枝杆菌活菌株的抗结核分枝杆菌(M.tuberculosis)的BCG(Bacille-Calmette Guerin)预防性疫苗。然而,由于不同的流行病学研究显示出相反的结果,所以关于BCG接种和哮喘之间的逆相关仍然存在相冲突的观点。BCG作为抑制变态反应的药剂的生物学解释一般地基于其刺激Th1细胞因子产生的能力。Zhang等人,Chin.Med.J.,2009,122(5):577-583综述了BCG在哮喘中的作用。

[0017] 3.母牛分枝杆菌:第三种途径基于下述假说:最初研发以治疗肺结核的母牛分枝杆菌(M.vaccae)疫苗能够减弱变应原激发后发生的哮喘反应。母牛分枝杆菌疫苗基于加热灭活的母牛分枝杆菌菌株。有人提出加热灭活的母牛分枝杆菌可调节Th1/Th2的平衡。在一些临床试验中已检测到母牛分枝杆菌的作用的阳性结果(Camporota等人,Eur.Respir.J.,2003,21:287-293)。

[0018] 鉴于上述途径(1)至(3)中每个的缺点,有必要研发可改善普遍情况且能够被用作预防性和/或治疗性药剂的新型化合物和组合物。

[0019] 待解决的问题

[0020] 本发明的目标是提供用于治疗和预防人类和其它哺乳动物的变应性病症(包括哮喘和鼻炎)的改进的药剂。

[0021] 发明简述

[0022] 本发明涉及用于预防或治疗人类或动物的变应性反应的药剂,其包含结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断。在一些具体的实施方式中,所述药剂进一步具有至少一种下述特征:

[0023] 1.所述片断来源于有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C);

[0024] 2.所述药剂可通过如下获得:培养MTB-C菌株,然后在优选的非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物;

[0025] 3.所述药剂是包含脂质体形成剂和蔗糖的脂质体制剂;

[0026] 4.所述药剂是包含脂质体形成剂且微粒的z-平均粒径(z-average size)为150nm或更小的脂质体制剂。

[0027] 虽然可以单独满足以上特征1-4中的一个,但也可以联合满足它们的任意一个或更多个。因此,例如,在特征1和特征2的情况下,所述药剂还可以是脂质体制剂的形式;在特

征1-3的情况下，脂质体微粒的z-平均粒径还可以是150nm或更小。在一个具体的实施方式中，脂质体微粒的z-平均粒径可以是40-135nm，更优选的是55-125nm；或者，本发明的脂质体制剂可以是乳剂，从而微粒的z-平均粒径可以小于40nm。优选地，粒径均匀分布以使微粒的多分散指数为0.4或更小，优选0.3或更小。

[0028] 而且，根据任何上述特征2-4的微粒还可以具有以下特征：所述结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。在本发明的一个具体实施方案中，结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是于2010年12月3日保藏于伦敦NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

[0029] 本发明的药剂可以是脂质体制剂，其可以额外地包含表面张力活性剂(d)。本发明的药剂还可以额外地包含一种或更多种非离子型表面活性剂(e)。优选地，所述非离子型表面活性剂选自烷基酚乙氧基化物(alkylphenol ethoxylates)和山梨醇酐酯乙氧基化物(sorbitan ester ethoxylates)以及更优选的辛基酚乙氧基化物(octylphenol ethoxylate)。

[0030] 本发明药剂的MTB-C片断还可以是或者包含细胞壁片断。

[0031] 本发明的药剂可进一步具有一种或更多种下述特征：(i)所述脂质体形成剂可以是氢化的、部分氢化的或者未氢化的磷脂，优选的是卵磷脂，最优选的是大豆卵磷脂。(ii)所述表面张力活性剂选自胆酸盐/酯、脱氧胆酸盐/酯、胆固醇和胆固醇半琥珀酸酯。(iii)所述片断是或者包含MTB-C的蛋白片断。在一个其具体实施方式中，所述药剂可包含至少两种，优选三种，更优选四种，最优选所有的下述物质：

[0032] (i)分子量约为70kDa的第一个多肽，其质量指纹图谱(mass fingerprint)与结核分枝杆菌(M.tuberculosis)HSP70蛋白(Rv0350)的质量指纹图谱相似，

[0033] (ii)分子量约为38kDa的第二个多肽，其质量指纹图谱与结核分枝杆菌38kDa蛋白(Rv 0934)的质量指纹图谱相似，

[0034] (iii)分子量约为30kDa的第三个多肽，其质量指纹图谱与结核分枝杆菌Ag85B蛋白(Rv 1866c)的质量指纹图谱相似，和

[0035] (iv)分子量约为10kDa的第四个多肽，其质量指纹图谱与结核分枝杆菌CFP10蛋白(Rv 3874)的质量指纹图谱相似，和

[0036] (v)分子量约为6kDa的第五个多肽，其质量指纹图谱与结核分枝杆菌ESAT-6蛋白(Rv 3875)的质量指纹图谱相似。

[0037] 更进一步，本发明的药剂中可以存在下列结核分枝杆菌抗原或其片断中的至少一种：HSP70、38kDa蛋白和Ag85B。所述药剂中还可以包含一种或更多种霉菌酸和/或糖缀合霉菌酸酯，优选海藻糖二霉菌酸酯和/或糖脂，优选脂阿拉伯甘露聚糖。本发明所述的药剂可额外包含一种或更多种盐或者其溶液，其中所述盐优选地是氯化钠。

[0038] 特别在所述药剂满足上述特征2的情况下(即，所述药剂可通过如下获得：培养MTB-C菌株，然后在优选的非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物)，可获得所述药剂的方式可进一步具有如下特征：(a)培养MTB-C菌株等于或大于3周的时间，然后(b)在非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物。在一个优选的实施方式中，可获得所述药剂的方法进一步包括以下步骤：

[0039] a.通过离心的方式分离未片断化的细胞和溶解的组分，

[0040] b.使细胞壁片断的级分经受化学处理或物理处理以使其最终所含的最终有毒力菌株细胞失活，和

[0041] c.通过冷冻干燥法干燥所述药剂。

[0042] 可以根据本领域已知的任何方法保藏根据本发明所述的药剂；然而，对于根据本发明所述的脂质体制剂的情况，优选地通过冻干保藏。

[0043] 本发明还涉及用于预防或治疗人或动物的变态反应的药物组合物，其包含本发明所述药剂(脂质体制剂)和药学上可接受的载体。

[0044] 在一个具体实施方式中，可利用本发明所述的药剂(例如脂质体制剂)治疗的变态反应是由IgE介导的。所述反应可以是特应性。所述变态反应可以是呼吸功能障碍和/或支气管炎症。优选地，所述反应选自哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹。不希望受任何特定理论的束缚，目前认为哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹可涉及变应产生性(allergenic)反应。然而，本发明涉及本文中所述的药剂和药物组合物用于预防或治疗哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹中的任意一种或更多种的所有用途，而不考虑在特定个体中哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹是否涉及变态反应。然而，优选地，在一个实施方式中，哮喘是变应性哮喘，鼻炎是变应性鼻炎。在一个具体实施方式中，哮喘是支气管哮喘。

[0045] 施用途径本身没有特别的限制，除非药剂或组合物的特征需要有限制。然而，优选地提供用于注射(优选的是皮下注射或肌内注射)或者用于舌下施用、吸入施用、经皮(percutaneous)施用或皮内(intradermal)施用的本发明所述的药剂或组合物。在一个具体实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物施用每剂量200μg或更低，优选地每剂量多至50μg，例如最优选每剂量25μg。

[0046] 在一个具体实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物被用于预防变态反应。在一个替代性的具体实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物被用于治疗变态反应。

[0047] 可以施用根据本发明所述的药剂一次或几次，在预防的情况下，优选施用至少两次，优选地施用多于两次。本发明所述的药剂或药物组合物可被提供用于重复施用，优选地以一周或者更久为间隔，更优选地以两周或者四周为间隔。

[0048] 附图简述

[0049] 图1：流程图，其显示了药物FCMtb的上游工序，包括工序中涉及的材料和试剂以及适合的工序中控制。

[0050] 图2：流程图，其显示了药物FCMtb的下游工序，包括工序中涉及的材料和试剂以及适合的工序中控制。

[0051] 图3：蛋白表征的流程图。

[0052] 图4：通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色方法鉴定抗原。显示了参考抗原ESAT6(6kDa)(7)、CFP10(10kDa)(6)、Ag85B(30kDa)(1)、38kDa(2)、HSP70(70kDa)(4)以及分子量标记MW(5)。

[0053] 图5：蛋白表征。图5a：蛋白图谱：SDS page之后进行考马斯亮蓝染色，参考标准品FCMtb-52.1(1-6)在终浓度为15.6μg FCMtb/mL(1、2)、6.25μg FCMtb/mL(3、4)和1.56μg FCMtb/mL(5、6)时的蛋白图谱。分子量的单位为kDa。图5b：SDS page之后进行银染鉴定19kDa的条带。图5c：蛋白图谱：通过SDS-PAGE和银染方法鉴定指定FCMtb批次中的条带(10kDa和6kDa)以及平行进行的来自Lionex的ESAT-6标准品。不同的FCMtb批次(1、2、3、9、

10、11、(FCMtb-52.1批次在泳道9))，不同浓度的来自Lionex的ESAT-6标准品(4-8)；5d：通过Western印迹使用特定抗体与结核分枝杆菌HSP70标准品平行地Western印迹鉴定FCMtb批次中的抗原结核分枝杆菌HSP70(Rv 0350)。不同的FCMtb批次(1、2、3、4、7、8、9)，HSP70标准品(5、6)；5e：通过Western印迹法使用特异性抗体鉴定FCMtb批次中的抗原结核分枝杆菌38kDa(Rv 0934)和平行进行的来自Lionex的结核分枝杆菌38kDa标准品。使用Odyssey系统进行荧光检测。不同的FCMtb批次(1、2、3、6、7)，38kDa标准品(4、5)。5f：通过Western印迹法使用特异性抗体鉴定FCMtb批次中的抗原Ag85B(Rv 1886c)和平行进行的来自Lionex的结核分枝杆菌Ag85B标准品。使用Odyssey系统进行荧光检测。FCMtb批次(1、2、3、5、6、7)，Ag85B标准品(4)。

[0054] 图6：用基于本发明所述的药物疫苗组合物的脂质体制剂接种小鼠2次后，利用Western印迹法分析不同FCMtb批次(50μg/泳道)的指定蛋白条带与从被感染的小鼠中得到的经1/8000稀释的血清的相互作用。

[0055] 图7：脂质分析。7a：利用TLC方法鉴定参考菌株(H37Rv(2)和NCTC13536(1)和不同FCMtb批次(3-9)以及TDM标准品(10)中的聚酰基海藻糖(polyacyltrehalose，PT)、海藻糖6，6'-二霉菌酸酯(TDM)和二酰基海藻糖(DAT)。7b：利用TLC法鉴定FCMtb批次中的海藻糖6，6'-二霉菌酸酯(TDM)。图(A)和(B)代表两个独立的试验。(A)TDM标准品为(11)和(12)，其它泳道是不同的FCMtb批次。B：(1)TDM标准品为(1)，其它通道是不同的FCMtb批次。7c：利用TLC法分析FCMtb批次中霉菌酸I、III和IV的模式。图(A)、(B)和(C)代表三个独立的试验。(A)FCMtb批次(1-6(FCMtb-51.2标准品6))。(B)用于说明/参考，(C)批次FCMtb-47b(1)，与霉菌酸标准品(2)比较。7d：LAM的鉴定(左边的泳道是参照物，其余的通道中是来源于本发明所述的脂质体的样品)。

[0056] 图8：冷冻断裂制备的脂质体浓缩液(LCS)本体(bulk)(电子显微镜)。

[0057] 图9：根据本发明的优选实施方式的方法的流程图。

[0058] 图10显示了方案的示意性概要：诱导哮喘、用制剂A处理(参见实施例11)、测量被处理的动物和对照中的那些变量。

[0059] 图11：显示所有个体值的平均值的条线图中的结果显示图。

[0060] 图12通过比较敏化动物相对于未敏化动物的肺功能和嗜曙红细胞募集，显示暴露于OVA对未被处理的动物的影响。如数据所示，与未敏化动物相比，暴露于OVA的那些动物对乙酰甲胆碱显示气道反应明显和显著($p<0.001$，二因素ANOVA)增强(图12a)，因此敏化过程是有效的。此外，未敏化动物的气道中含有极其少量的嗜曙红细胞，但发明人在那些对OVA敏化的动物的气道中发现肺部嗜曙红细胞增多显著增加($p<0.001$，t检验)(图12b)。因此，本模型有利于评估试验处理引起的潜在效果。

[0061] 图13显示了7组小鼠响应于剂量增加的乙酰甲胆碱的支气管反应性，而图14显示了4个不同的处理组(a、b、c和d)。为了简化整体的数据表示，仅在图14中指出了统计显著性。

[0062] 图14显示了每个动物相对于其自身在基线时的响应的归一化的剂量-响应曲线。用BCG或制剂A处理(P)的未敏化动物显示出比未被处理的对照组中的未敏化动物更高的反应性(14a)。将比较用BCG疫苗处理的动物时，没有观察到敏化和未敏化动物之间支气管反应性的差异(14b)。就用制剂A疫苗处理而言，在敏化动物中预防性施用(P)导致的反应性比

用同样的疫苗处理未敏化动物所展示的反应性低(14c)。并且,其还低于在敏化动物和用BCG处理的那些这二者中观察到的反应性(14d)。与未被处理的敏化小鼠的曲线相比,虽然没有达到在未敏化小鼠中观察到的基线反应值,但反应性的抑制变得非常明显($p<0.001$,二因素ANOVA)。治疗性处理方案略微减弱了对乙酰甲胆碱的响应(剂量从2.50mg/ml开始),但从未达到统计显著性(14d)。

[0063] 图15用图表表示出不同组中嗜曙红细胞增多的统计显著性。更多细节请参见正文。

[0064] 定义

[0065] 如果没有另行指明,“粒径”指的是微粒的直径。当无法精确测量粒径时,指的是近似粒径。

[0066] “z-平均值”是平均粒径,可根据材料和方法部分所述进行测定。

[0067] 缩写

[0068]	BAL	支气管肺泡灌洗
[0069]	BCG	卡介苗
[0070]	CFU	集落形成单位
[0071]	CpG	胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸
[0072]	DP	药品
[0073]	DS	药物
[0074]	ELISA	酶联免疫吸附试验
[0075]	ELISPOT	酶联免疫印迹试验
[0076]	EMDA	欧洲药品管理局
[0077]	FCMtb	结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断
[0078]	IFN-γ	干扰素γ
[0079]	IgE	免疫球蛋白E
[0080]	IGTIP	德国Trias i PujolCiènces研究所(Institut per a la Recerca en Ciènces de la Salut Germans Trias i Pujol)
[0081]	IL	白介素
[0082]	IMP	研究药品
[0083]	i.p.	腹腔内
[0084]	IPC	工艺中控制
[0085]	LCS	脂质体浓缩悬液
[0086]	LPS	脂多糖
[0087]	Mtb	结核分枝杆菌
[0088]	Mtb-C	结核分枝杆菌复合群
[0089]	NCTC	国家典型菌种保藏中心(伦敦)
[0090]	OVA	卵清蛋白
[0091]	PPD	蛋白纯化衍生物
[0092]	q.s.	足量
[0093]	s.c.	皮下

[0094] TB 肺结核

[0095] Th1 T辅助细胞1

[0096] Th2 T辅助细胞2

[0097] w/v 重量/体积

[0098] w/w 重量/重量

[0099] Form.A 制剂A

[0100] 发明详述

[0101] 本发明涉及用于预防或治疗人类或动物的变应性反应的药剂，其包含结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断。

[0102] 除非另有明确说明，本申请的上下文中使用的术语“包含”表示除通过“包含”引入的列表中的成员外还可任选地存在其他成员。然而涉及本发明所述的一个具体实施方式时，术语“包含”涵盖不存在其他成员的可能性，即为了该实施方式的目的，“包含”应被理解为具有“由……组成”的含义。

[0103] 详细的描述公开了本发明单个特征的特定和/或优选的变化形式。本发明还考虑了作为特别优选的实施方式的通过将对本发明两个或更多个特征描述的两个或更多个特定和/或优选的变化形式组合而产生的那些实施方式。

[0104] 所述药剂可进一步具有至少一种下述特征：

[0105] 1.所述片断来源于有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)；

[0106] 2.所述药剂可通过以下获得：培养MTB-C菌株，然后在优选的非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物。

[0107] 3.所述药剂是脂质体制剂，其包含来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)的片断，脂质体形成剂和蔗糖，

[0108] 4.所述药剂是脂质体制剂，其包含来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)的片断，脂质体形成剂并且微粒的z-平均粒径为150nm或更低。

[0109] 贯穿本说明书，“有毒力(virulent)的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)”表示对(至少)人类有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。已知BCG(牛分枝杆菌)和加热灭活的药剂(例如加热灭活的不属于MTB-C的母牛分枝杆菌)对具有免疫力的人是无毒力的。在具有上述特征1的实施方式中，所述片断不来源于牛分枝杆菌或者(加热失活的)母牛分枝杆菌。在一个具体的实施方式中，所述片断不来源于BCG，尤其不来源于BCG丹麦1331菌株。为避免生疑，肺结核并非变态反应。优选地，在本发明的限定中，不施用所提供的药剂用于预防或治疗肺结核。

[0110] 特别地，可通过包括下述步骤的方法得到根据上述特征2所述的药剂：(a)培养MTB-C菌株等于或多于3周的时间，然后(b)在非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物。

[0111] 可以看出上述特征3和特征4的共同之处在于：所述药剂是包含来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)的片断和脂质体形成剂的脂质体制剂。

[0112] 虽然可以单独满足上述特征1-4中的一个，但也可以联合满足它们之中的任意一个或更多个。因此，例如，在特征1和特征2的情况下，所述药剂还可以是脂质体制剂的形式；在特征1-3的情况下，脂质体微粒的z-平均粒径还可以是150nm或更小等。2、3或者所有特征

1-4的任意组合都是可行的。人们通常认为脂质体化(liposomation)过程产生脂质环境,从而促进溶解并产生物质(例如FCMtb)的悬液。本发明意义上的脂质体可以是单层的、多层的或其组合。

[0113] 来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)的片断也被称为FCMtb。FCMtb可以是来源于MTB-C菌株或者MTB-C菌株的任意混合物的任何类型的物质,优选地,所述片断是或者来源于蛋白质和/或脂质。本申请意义上的FCMtb通常是可来源于MTB-C细胞的不同的蛋白抗原和脂质的混合物。可利用本领域技术人员已知的任何适于片断化微生物或细菌细胞(特别地,例如MTB-C细胞)的方法(例如均化)得到细胞片断。在一个具体的实施方式中,可以按照WO2008053055和EP2090318A1中所述得到细胞片断,尽管并不一定限于有毒力菌株(如上所述)。

[0114] 可通过超声处理的方法或者通过联合使用直径约为0.1mm的小珠(例如二氧化硅或者氧化锆/二氧化硅珠)和机械匀浆器的方法进行均化。可用的机械匀浆器例如是BioSpec BeadBeater®型。通过这种均化方法破碎MTB-C细胞以得到通常包含小的细胞壁片断的小的细胞片断。在一个具体的实施方式中,可以按照WO2008053055和EP2090318 A1中所述得到细胞片断,尽管并不一定限于有毒力菌株(如上所述)。

[0115] 如本领域技术人员所公知,制造细胞片断的典型相关特征是通过部分去脂对细胞壁片断"脱毒(detoxification)",该过程允许除去类内毒素分子,像脂阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomanann)。因此,优选地对FCMtb进行脱毒和巴氏消毒,因而所获得的脂质体制剂是无菌且不含内毒素的。任选地,可冷冻干燥缓冲液中的细胞片断分散体以利于其存储。为此,可将分散体分装至小瓶并且在-15℃至-120℃的温度,例如,-45℃并且真空,例如在0.1-0.5mbar。

[0116] 当药剂是脂质体制剂时,脂质体通常的粒径分布为:其中至少99.9%(根据数量)小于1μm。在一个具体的实施方式中,微粒的z-平均粒径(可通过动态光散射测定)为150或更小,优选地135nm或更小,更优选地125nm或更小。(也可以是145nm或更小、140nm或更小、130nm或更小、120nm或更小、110nm或更小、100nm或更小、95nm或更小、90nm或更小、85nm或更小、80nm或更小)。在动态光散射中,z-平均参数被认为是可通过技术得到的稳定且重要的数值,尺寸数值被优选地用于控制质量目的。优选地,根据本发明所述的制剂中的脂质体是单型(monomodal)的,即在动态光散射测定中它们仅显示一个峰。更优选地,如利用电子显微镜对用冷冻断裂制备的脂质体制剂可检测的,根据本发明所述的制剂的脂质体是球形的(如图8所示)。球形意味着对于至少90%的脂质体微粒(根据数目)而言,单个微粒的所有表面点到脂质体中心的距离相似或相同,即这种微粒的最小半径相对同一微粒的最大半径的比率为0.6或更大、0.7或更大、0.8或更大或者0.9或更大。根据本发明所述的脂质体制剂可包括多层或单层脂质体或其混合物。与本领域技术人员的标准知识相符,应该在合适的缓冲液(即其本身不会破坏、分解或融合脂质体或者以任意其它方式使脂质体显著地物理不稳定的缓冲液)中进行动态光散射测定。根据经验,只要离子强度和pH值都能够比得上其中已形成脂质体的缓冲液,则任何这样的缓冲液都可以是合适的。优选地,使用与其中已形成脂质体的缓冲液具有相似或相同构成的缓冲液。

[0117] 在上述实施方式3的情况下,脂质体制剂优选地包含1-20%(重量/体积)的蔗糖,优选地是1-12%(重量/体积)的蔗糖,更优选地是3-8%(重量/体积)的蔗糖,最优选地是4-

6%(重量/体积)的蔗糖。特别优选的是约5%的蔗糖。

[0118] 在一个具体的实施方式中,上述脂质体制剂的z-平均粒径为40-150nm,优选地为50-135nm,更优选地为55-125nm。(也可以是与之前句子中的任意较低值组合的145nm或更小、140nm或更小、130nm或更小、120nm或更小、110nm或更小、100nm或更小、95nm或更小、90nm或更小、85nm或更小、80nm或更小)。因此,如上文所大体描述以及"材料和方法"部分所详细描述的,优选地通过动态光散射测定z-平均粒径(和在本说明书的全文中一般所述的尺寸值)。

[0119] 在一个替代性的具体实施方式中,上述脂质体制剂的z-平均粒径可以更小,以使得所述脂质体制剂为乳剂,即在该具体的实施方式中,微粒的z-平均粒径优选地低于40nm。

[0120] 优选地,粒径均匀分布以使微粒的多分散指数为0.4或更低,优选地0.3或更低。

[0121] 此外,根据任意上述特征2-4所述的微粒可进一步具有如下特征:结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是有毒力的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。在本发明的一个具体实施方式中,用于根据本发明所述的制剂的结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是于2010年保藏在伦敦的NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。

[0122] 在任意一个或更多个上述实施方式的一个优选实施方式中,根据本发明所述的制剂的脂质体还是单分散(monodisperse)的,这表示没有观察到显著的尺寸分布的宽度。在技术上,这是通过低的多分散指数(PDI)(如利用动态光散射所测定的)例如0.4或更低、优选地0.3或更低而被检测的。因此,脂质体制剂是这样的脂质体制剂,其中微粒的多分散指数(如可通过动态光散射测定的)为0.4或更低,优选0.3或更低,最优选0.25或更低。

[0123] 利用包括上游工序和下游工序的方法可获得来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断。在一个具体的实施方式中,可以按照WO2008053055和EP2090318A1中所述得到细胞片断,尽管并不一定限于有毒力菌株(如上所述)。为了说明目的,此处简要描述了5个主要的步骤,下述的实施例2和3给出了实施所述方法的具体模式。

[0124] 上游工序(实施例2):

[0125] 步骤1:培养结核分枝杆菌

[0126] 步骤2:收集结核分枝杆菌并冷冻粗提取物

[0127] 下游工序(实施例3):

[0128] 步骤3:使细胞片断化(fragmentation)并去脂(delipidation)

[0129] 步骤4:巴氏灭菌

[0130] 步骤5:冻干(任选的)

[0131] 在任意上述实施方式的一个更优选的实施方式中,结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株是有毒力的分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株。有毒力(virulent)指的是依情况的致病性和/或杆菌入侵(人)宿主组织并引起活性疾病的能力。有毒力菌株可以是属于MTB-C的任何物种的任何有毒力菌株,但优选的是属于结核分枝杆菌的菌株。根据本发明所述的MTB-C菌株可被接种至本领域技术人员公知的培养基例如Middlebrook 7H10或7H11琼脂、Sauton's培养基或者Proskauer-Beck培养基而进行培养。优选地,经延长的时间(例如等于或多于3周,优选地为3-4周)进行有毒力菌株的培养。优选地,培养温度维持在34℃-38℃。培养结束后,收集细胞并利用本领域公知的技术(例如在专利申请ES2231037-A1中所述的那些技术)分离细胞。

[0132] 优选地，脂质体制剂的脂质体形成剂是氢化的、部分氢化的或者未被氢化的磷脂。所用的磷脂可以是或者包括例如：磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇。最典型的是可合成或者从多种天然来源分离的磷脂酰胆碱。优选地，脂质体形成剂是或者包括选自蛋卵磷脂和大豆卵磷脂的卵磷脂。大豆卵磷脂是包括磷脂酰胆碱等的磷脂的复杂混合物并且是特别优选的。制剂中还可以包括作为脂质体形成剂本身或者额外组分的下述典型脂质：磷酸二鲸蜡脂(dicetyl phosphate，DCP)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPc)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、磷脂酰胆碱(PC)和/或磷脂酰丝氨酸(PS)，其中各脂质可以是氢化的、部分氢化的或者未被氢化的。可以使用常规的辅助脂质和本领域技术人员公知的技术(例如那些在专利申请ES2231037-A1中所述的技术)形成脂质体。

[0133] 进一步优选地，在任意上述实施方式中，(a)来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断与(b)脂质体形成剂的比例在0.01:1至1:1之间，优选地在0.06:1至0.1:1之间。

[0134] 在任意上述实施方式的一个更优选的实施方式中，脂质体制剂额外包含：(d)表面张力活性剂(tensioactive agent)。通常，可以使用能够改变表面张力值的所有类型的试剂作为本发明意义上的表面张力活性剂，但属于上述脂质体形成剂的定义下的化合物被排除在外。多种类型的表面张力活性剂是本领域的技术人员已知的，它们可被用于根据本发明所述的脂质体制剂中。如技术人员所知，表面张力活性剂通常是具有极性-非极性结构的化学品。不希望受任何特定理论的束缚，表面张力活性剂通常倾向于定位在微粒的表面，从而在界面上产生单分子层以降低表面张力值。表面张力活性剂也被称为表面活性剂或活性表面剂。在含有表面活性剂的脂质体制剂的一个优选实施方式中，表面张力活性剂选自固醇和其衍生物例如胆固醇和/或胆汁盐或其衍生物(例如胆酸盐/酯)。一些特别优选的实施方式中，表面张力活性剂选自胆酸盐/酯、脱氧胆酸盐/酯、胆固醇和胆固醇半琥珀酸酯。实施本发明的一个优良但非限制性的模式中，制剂的脂质体包含来源于大豆的卵磷脂和胆酸钠二者。

[0135] 在一个甚至更优选的实施方式中，包含(d)表面张力活性剂的脂质体制剂是这样的脂质体制剂，其中(a)与(d)的比率在0.05:1至3:5之间(重量/重量)。可以使用本领域技术人员公知的多种类型的脂质体形成剂。

[0136] 所述药剂可任选地含有改善稳定性的添加剂，例如：维生素E，其被认为起着脂质抗氧化剂的作用，因此在脂质体的情况下特别有用。

[0137] 在一个更优选的实施方式中，上述脂质体制剂是这样的脂质体制剂，其中MTB-C细胞的片断是或者包含细胞壁片断。可以使用属于MTB-C的任何菌株，优选地使用属于结核分枝杆菌的任何菌株。在另一个更优选的实施方式中，上述脂质体制剂包含MTB-C菌株NCTC 13536的片断，该菌株于2010年12月3日保藏在位于伦敦的NCTC(实施例1)。可以使用的另一个菌株(因此脂质体制剂中可以包含其片断)被称为H37Rv，该菌株可从例如位于英国伦敦的国家典型菌种保藏中心(NCTC)获得(保藏编号：NC007416)，其经常被本领域的研究人员使用。还可以使用多于一种的菌株，即脂质体制剂包含多种(例如2种、3种或多于3种)菌株的片断。

[0138] 本发明的药剂还可以另外地包含一种或更多种非离子型表面活性剂(e)。所述非

离子型表面活性剂可以优选地选自烷基酚乙氧基化物、山梨醇酐酯乙氧基化物和更优选的辛基酚乙氧基化物。该表面活性剂还可以在上述特征2的情况下使用。

[0139] 本发明所述药剂的MTB-C的片断还可以是或者包含细胞壁片断。

[0140] 优选地，脂质体制剂的脂质体形成剂是氢化的、部分氢化的或者未被氢化的磷脂。所用的磷脂可以是或者包括例如：磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇。最典型的是可合成或者从多种天然来源分离的磷脂酰胆碱。优选地，脂质体形成剂是或者包括选自蛋卵磷脂和大豆卵磷脂的卵磷脂。大豆卵磷脂是包含磷脂酰胆碱等的磷脂的复杂混合物并且是特别优选的。制剂中还可以包含作为脂质体形成剂本身或者额外组分的下述典型脂质：磷酸二鲸蜡脂(dicetyl phosphate，DCP)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPc)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、磷脂酰胆碱(PC)和/或磷脂酰丝氨酸(PS)，其中各脂质可以是氢化的、部分氢化的或者未被氢化的。可以使用常规的辅助脂质和本领域技术人员公知的技术(例如那些在专利申请ES2231037-A1中所述的技术)形成脂质体。

[0141] 进一步优选地，在任意上述实施方式中，(a)来源于结核分枝杆菌复合群(MTB-C)菌株的片断与(b)脂质体形成剂的比例在0.01:1至1:1之间，优选地在0.06:1至0.1:1之间。

[0142] 在任意上述实施方式的一个更优选的实施方式中，脂质体制剂额外包含：(d)表面张力活性剂(tensioactive agent)。通常，可以使用能够改变表面张力值的所有类型的试剂作为本发明意义上的表面张力活性剂，但属于上述脂质体形成剂的定义下的化合物被排除在外。多种类型的表面张力活性剂是本领域的技术人员已知的，它们可被用于根据本发明所述的脂质体制剂中。如技术人员所知，表面张力活性剂通常是具有极性-非极性结构的化学品。不希望受任何特定理论的束缚，表面张力活性剂通常倾向于定位在微粒的表面，从而在界面上产生单分子层以降低表面张力值。表面张力活性剂也被称为表面活性剂或活性表面剂。在含有表面活性剂的脂质体制剂的一个优选实施方式中，表面张力活性剂选自固醇和其衍生物例如胆固醇和/或胆汁盐或其衍生物(例如胆酸盐/酯)。一些特别优选的实施方式中，表面张力活性剂选自胆酸盐/酯、脱氧胆酸盐/酯、胆固醇和胆固醇半琥珀酸酯。实施本发明的一个优良但非限制性的模式中，制剂的脂质体包含来源于大豆的卵磷脂和胆酸钠二者。

[0143] 在一个甚至更优选的实施方式中，包含(d)表面张力活性剂的脂质体制剂是这样的脂质体制剂，其中(a)与(d)的比率在0.05:1至3:5之间(重量/重量)。可以使用本领域技术人员公知的多种类型的脂质体形成剂。

[0144] 脂质体可任选地含有改善其稳定性的添加剂，例如：维生素E，其被认为起着脂质抗氧化剂的作用。

[0145] 在一个更优选的实施方式中，上述脂质体制剂是这样的脂质体制剂，其中MTB-C细胞的片断是或者包含细胞壁片断。

[0146] 可以使用属于MTB-C的任何菌株，优选地使用属于结核分枝杆菌的任何菌株。在另一个更优选的实施方式中，上述脂质体制剂包含MTB-C菌株NCTC 13536的片断，该菌株于2010年12月3日保藏在位于伦敦的NCTC(实施例1)。可以使用的另一个菌株(因此脂质体制剂中可以包含其片断)被称为H37Rv，该菌株可从例如位于英国伦敦的国家典型菌种保藏中

心(NCTC)获得(保藏编号:NC007416),其经常被本领域的研究人员使用。还可以使用多于一种的菌株,即脂质体制剂包含多种(例如2种、3种或多于3种)菌株的片断。

[0147] 考虑到约有4000种推定的结核分枝杆菌抗原,因此不可能分析所有这些蛋白的药物。不过,某些MTB-C蛋白已显示出与期望的免疫反应相关。它们是大小约为6kDa、10kDa、30kDa、38kDa和70kDa的5个蛋白条带(Renshaw,等人,2005,EMBO Journal 24(14):2491-2498;Singh,等人,2005,Clin.Diagn.Lab.Immunol.12(2),354-358)。因此,在一个甚至更优选的实施方式中,上述脂质体制剂包含至少两种,优选三种,更优选四种,最优选所有下述物质:

[0148] (i)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为70kDa的第一多肽,其中该第一多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌HSP70蛋白(Rv0350)的质量指纹图谱相似,

[0149] (ii)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为38kDa的第二多肽,其中该第二多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌38kDa蛋白(Rv 0934)的质量指纹图谱相似,

[0150] (iii)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为30kDa的第三多肽,其中该第三多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌Ag85B蛋白(Rv 1866c)的质量指纹图谱相似,和

[0151] (iv)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为10kDa的第四多肽,其中该第四多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌CFP10蛋白(Rv 3874)的质量指纹图谱相似,和

[0152] (v)通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为6kDa的第五多肽,其中该第五多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌ESAT-6蛋白(Rv3875)的质量指纹图谱相似。

[0153] 在其又一更优选的实施方式中,脂质体制剂进一步包含通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳测量的分子量约为19kDa的脂多肽,其中该脂多肽的质量指纹图谱与结核分枝杆菌19kDa的脂蛋白抗原前体LpqH(Rv 3763)的质量指纹图谱相似。利用本领域已知的方法例如银染可以使各条带可视化。本发明的研究人员发出乎意料地现:在接种MTB-C菌株的核分枝杆菌感染的临床前动物模型中,针对这种多肽的总IgG体液应答在所述制剂的所有抗原中可以是最高的。

[0154] 实施例4中给出了可如何鉴定多肽或脂多肽的非限制性实例。

[0155] 甚至更优选地,上述脂质体制剂进一步具有以下特点:存在下述结核分枝杆菌抗原或其片断中的至少一种:HSP70、38kDa蛋白和Ag85B;最优选地,存在HSP70、38kDa蛋白和Ag85B中的至少一种。这种意义上的片断可以是任何这些多肽的任何部分(例如降解产物)。可以采用获得这种片断的多种方法,例如化学水解或酶促水解,其中片断化是否为特意产生的、在脂质体形成之前或之后进行并不重要。优选地,各片断可被归属于其各自的来源,例如通过氨基酸序列(例如至少5个,至少10个,至少20个连续的氨基酸)的基本重叠。

[0156] 优选地,从在饥饿、低氧和低pH的应激条件下生长的杆菌中获得根据本发明所述的片断。低氧是由于细菌在生长期(例如21天)在用密封袋密封的平板上汇合生长,从而导致微需氧的(microaerobiotic)环境。低pH被解释如下:培养开始时的pH值为7.0-6.8,培养

结束(通常是培养21天后)时的pH值为6.4-6.5。在这些条件下,细菌的代谢较慢,从而平稳生长(stationary growth)。可以理解为这使得杆菌更能抵抗应激。推测在这种条件下培养的杆菌具有与在LTBI(潜伏结核感染)中体内潜伏的杆菌相似的特征。因此,预计存在于FCMtb中的抗原将引发针对潜伏杆菌抗原(即所谓的"结构"抗原)的新的免疫学反应和与应激反应相关的那些。

[0157] 分支杆菌糖脂长期以来就被认为具有免疫调节活性,尤其是诱导肉芽肿反应和发挥强类佐剂作用。因此,在一个更优选的实施方式中,上述脂质体制剂含有通常发现于结核分枝杆菌的脂质或其衍生物,例如缀合产物(像缀合糖的脂质)。在结核分枝杆菌样品中已鉴定出了一些具有免疫原性的脂质组分(Brennan,Tuberculosis(Edinburgh),2003,83(1-3),91-97),而且已研发出了测定它们的分析方法(电泳、SDS-PAGE和薄层色谱法)。分离每种脂质组分需要强力的处理从而很难获得MTB-C提取物或脂质体制剂中可检测到的每种组分的定量数据或百分比,尽管如此,定性特征将有助于表征本发明的一个进一步优选的实施方式。根据这个进一步优选的实施方式,一种或更多种霉菌酸,优选地是属于类型I、III或IV的任何一种或更多种的霉菌酸被包括在内。可选择地或者此外,制剂中可包含缀合糖的霉菌酯,优选的是海藻糖二霉菌酸酯。可选择地或者此外,制剂中可包含糖脂:脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)。此外,片断的多抗原属性(多抗原的蛋白混合物加上脂质,而非单独的纯化的抗原)被认为是一种优势,因此技术人员可调整细胞的片断化方法以得到最佳的细胞抗原混合物。

[0158] 在一种或更多种表面活性剂(优选的是非离子型表面活性剂)存在时均化MTB-C细胞。因此,上述脂质体制剂可额外包含一种或更多种这种表面活性剂。本领域技术人员的标准知识中包括大量这种表面活性剂。优选地,所用的非离子型表面活性剂选自烷基酚乙氧基化物和山梨醇酐酯乙氧基化物。更优选地,非离子型表面活性剂选自辛基酚乙氧基化物。甚至更优选地,使用具有7-8摩尔环氧乙烷含量的辛基酚乙氧基化物,在市场上能够找到名称为Triton X-114®的这种表面活性剂。使含有细胞壁片断的均化物经受常规处理以分离和丢弃未片断化的细胞及溶解的组分。以不同的速度离心,然后例如可使用专利申请ES2231037-A1中所述的缓冲液洗涤。进行所述纯化过程后得到含有细胞壁片断的沉降物。将所述沉降物分散在磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液中,然后进行常规处理以确保片断化和纯化后可能仍然有活性的MTB-C细胞完全失活。上述处理可以是化学方法(例如通过用甲醛处理的方法)或物理方法(例如通过高压灭菌法或巴氏灭菌法处理的方法)。下述实施例5中给出了脂质表征的实例。本发明所述的药剂可额外含有一种或更多种盐或者其溶液,优选地,所述盐是氯化钠。

[0159] 特别的,在药剂满足上述特征2(即可通过培养MTB-C菌株以及在优选的非离子型表面活性剂的存在下均化细胞培养物得到)的情况下,可得到其的方法可进一步具有如下特征:(a)培养MTB-C菌株等于或多于3周的时间,然后(b)在非离子型表面活性剂存在下均化细胞培养物。在一个优选的实施方式中,可得到其的方法进一步包括下述步骤:

[0160] d.通过离心的方式分离未片断化的细胞和溶解的组分,

[0161] e.使细胞壁片断的级分经受化学处理或物理处理以使其最终所含的最终有毒力菌株失活,和

[0162] f.通过冷冻干燥干燥所述药剂。

[0163] 可按照EP2090318 A1中所述实施该方法。

[0164] 可按照本领域已知的任何方法保藏根据本发明所述的药剂;然而,对于根据本发明所述的脂质体制剂的情况,优选地通过冻干保藏。

[0165] 在任意上述实施方式的一个甚至更优选的实施方式中,脂质体制剂是冻干的。可使脂质体经受冷冻干燥以获得冷冻干燥的脂质体形式的免疫治疗剂。为此,可将分散物分装至小瓶,然后在低温(例如在-15℃至-120℃之间,例如-45℃和真空例如0.1-0.5mbar下冷冻干燥。冷冻干燥后得到的小瓶中含有适合作为免疫治疗剂的脂质体制剂,优选地在极低的温度(例如-70℃)下存储它们。

[0166] 本发明还提供悬液,其中任意在前权利要求中的脂质体制剂在溶剂中重构。在一个优选的实施方式中,这种悬液的溶剂是水溶液,更优选地和最优选地,其是或者包含生理血清。使脂质体制剂悬浮在溶剂中的方法是本领域技术人员公知的。根据本发明的制剂的特别有利的性能在于:相较于包含MTB-C片断的常规脂质体制剂,该制剂可以被更快地悬浮(参加实施例9)。

[0167] 本发明进一步的目的是提供用于预防或治疗人或动物的变态反应的包含本发明药剂的药物组合物,其中所述药剂是或者包含在以上任意所述实施方式或其组合中所述的药剂。药物的药物制剂/盖仑制剂(galenic formulation)的主要范围是为了获得这样的悬液,其足够有效和稳定以被细胞充分识别并且具有在人或动物体内引发相关的细胞免疫反应的能力。为此,本发明还提供包含脂质体制剂或在任意一个或更多个上述实施方式中所述的悬液以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。多种这些载体、赋形剂和稀释剂是本领域的技术人员已知的且不以任何方式局限于本公开。而是可以使用适合作为载体、赋形剂或稀释剂的任何物质。在一个优选的实施方式中,这种药物组合物额外包含药学上可接受的佐剂。因此,佐剂可被理解为本发明的这个实施方式中包含的一种物质,其中佐剂是这样的物质,当其被应用于人体或动物体时,能够响应靶抗原刺激免疫系统,而佐剂自身不赋予免疫性。不希望受任何特定的佐剂物质的束缚,优选的实施方式中的佐剂是铝盐(例如氯化铝)或矿物油或包含矿物油的组合物(例如不完全弗氏佐剂(IFA)或完全弗氏佐剂(CFA))或者卤化铵(例如烷基化的溴化铵(例如二甲基双十八烷基-溴化铵))。

[0168] 用于本发明治疗的一种具体的本发明药剂由ARCHIVEL FARMA(西班牙)开发,其被称为制剂A(Formulation A)。在“实施发明的优选方式”部分描述了其制备。

[0169] 如在以下实施例中所详述,发明人在具有变态反应诱导的哮喘的小鼠模型中获得的结果支持这些申请。简而言之,通过腹腔内注射卵清蛋白(OVA)使小鼠对OVA敏化,然后将小鼠局部暴露于雾化的抗原(i.n.)。将敏化的小鼠分成两组:未被处理的组以及用检测疫苗BCG(正对照)或载剂处理的组,所有均为皮下施用(s.c.)。发明人还在未敏化的小鼠中建立了上述处理的对照组。在暴露于OVA的动物(但未被处理)中,响应乙酰甲胆碱的支气管反应性增加且出现支气管周嗜曙红细胞,这表明高效诱导了变应性过程。接种BCG使炎症的水平(不显著)和支气管的过度反应性(没有回复到基线水平)降低了几乎一半。作为预防措施施用制剂A疫苗极大地降低了肺部嗜曙红细胞增多,并且使支气管的过度反应性水平几乎回复到基线。使用制剂A疫苗作为治疗剂显著减少了支气管炎症,同时观察到响应OVA抗原的支气管过度响应性有降低的趋势。基于这些结果,发明人得出如下结论:当在激发阶段前施用3次制剂A疫苗时,其对被OVA激发的小鼠的气道产生明显有益的效果;然而,治疗性施

用明显降低了炎症且对支气管的过度响应性有缓和(mild)影响。

[0170] 在一个具体的实施方式中，可以用本发明所述的药剂(脂质体制剂)治疗的变态反应为由IgE介导的。IgE是由B细胞分泌的与变态反应有关的免疫球蛋白，通常由Th2细胞因子诱导B细胞转变成IgE产生的。因此，在本发明的一方面，期望不增加朝向IgE的同种型转换和/或不触发Th2反应。

[0171] 所述反应可以是特应性。变态反应可以是呼吸功能障碍和/或支气管炎症。优选地，所述反应选自哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹。不希望受任何特定理论的束缚，目前认为哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹可涉及引起变应性反应。然而，本发明涉及本文中所述的药剂和药物组合物用于预防或治疗哮喘、花粉热和湿疹中的任意一种或更多种的所有用途，而不考虑在具体个体中变态反应是否为哮喘、花粉热、鼻炎和湿疹的基础的问题。但在一个实施方式中，优选地，哮喘是变应性哮喘。在一个具体的实施方式中，哮喘是支气管哮喘。本发明的药剂还被用于治疗或预防多重变态反应(multiple allergies)。多重变态反应是这样的病症，其中多种变态反应(例如哮喘、湿疹和变应性鼻炎中的两种或更多种)同时发生。鼻炎是鼻内部黏膜的刺激/炎症。鼻炎的症状是鼻塞、流鼻涕和后鼻滴(post-nasal drip)。最常见的鼻炎类型是变应性鼻炎，它可引起额外的症状，例如打喷嚏、鼻痒、咳嗽和疲劳。

[0172] 施用途径本身没有特别的限制，除非药剂或组合物的特征要求如此。可以在黏膜(例如眼睛黏膜、鼻内黏膜、口腔黏膜、胃黏膜、肠黏膜、阴道黏膜或泌尿道黏膜)或者肠胃外(例如皮下地、皮内地、经皮地、肌内地、静脉内地或腹腔内地)或者通过吸入施用所述药物。在一些实施方式中，肠胃外施用可以是优选的。在一个具体的实施方式中，本发明提供用于注射的这种脂质体制剂、悬液或药物组合物。优选地，提供用于注射(优选的是皮下注射或肌内注射)、舌下施用或吸入施用的药剂或组合物。

[0173] 在涉及通过疗法治疗人体的方法中使用根据上文所述的脂质体制剂、悬液或药物组合物时，其合适剂量取决几个参数，包括施用方法和待治疗的对象。在一个优选的实施方式中，其用于对人体施用。在一个其优选的实施方式中，以包括1-1000，优选3-250的剂量进行施用。在一个具体的实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物的每剂量施用200μg或更少，优选每剂量约5-50μg FCMtb，例如最优选每剂量25μg FCMtb。

[0174] 在一个具体的实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物被用于预防变态反应。预防医学或预防护理指的是所采取的用于预防疾病，而非治愈疾病或治疗疾病的症状的措施。预防护理可包括根据个体的年龄、健康状况和家族史定制的检查和筛选试验。可施用预防性治疗。预防是目的为预防疾病，而非治疗或治愈疾病的任何过程。预防措施可被细分为初级预防(以避免疾病发生)和次级预防(其中疾病已经发生，使患者免受该过程的恶化)。有时，预防被细分为普遍性预防、选择性预防和指向性预防。普遍性预防涉及整个群体(国家、本地社区、学校、地区)，其目的是预防病症。普遍性预防的目的是使所有的个体都接受治疗。选择性预防涉及出现变态反应(像变应性哮喘)的风险高于平均水平的群组。可以通过性状例如年龄(例如儿童)或家族史辨别所述群组。指向性预防涉及筛选过程，其目的是鉴定显示变态反应的早期征兆的个体。本发明包括所有类型的预防/治疗，尽管其中的一些实施方式中可以选择子集。

[0175] 在一个具体的替代性实施方式中，本发明所述的药剂或药物组合物被用于治疗变态反应。治疗或治愈性护理通常指对显示出变态反应症状的个体的治疗。因此，治愈性护理

不同于旨在预防病症出现的预防性护理和重点在于降低疾病症状(例如疼痛)的严重程度的姑息护理。

[0176] 发明人已提供了预防药剂对治疗目的和预防目的都具有高效力的证据(参加实施例)。

[0177] 可以施用一次或几次根据本发明所述的药剂,在预防的情况下,优选施用至少两次,优选地多于两次。可提供本发明药剂或药物组合物用于重复施用,优选地以一周或者更久为间隔,更优选地以两周或者四周为间隔。

[0178] 在一个具体的实施方式中,本发明所述的药剂或药物组合物是用于施用给患有或倾向于发生各变态反应(包括哮喘)的个体和/或用于具有各倾向性(predisposition)或被怀疑具有各倾向性的个体。被怀疑具有各倾向性的个体可以是例如来自已知患变态反应的家族(例如来自父母之一或父母双方,或者来自(年长的)兄弟姐妹)的家庭成员,尤其是儿童。倾向于患变态反应的任何家庭的目标都是预防他们的孩子出现变态反应。为此,可以施用本发明的药剂作为预防性措施。

[0179] 本公开进一步提供于2010年12月3日保藏在伦敦的NCTC的MTB-C菌株NCTC 13536。该菌株具有低遗传多态性。因为遗传多态性低,所以包含NCTC 13536片断的药剂具有重复性极高的优势。

[0180] 实施发明的优选模型

[0181] 在一个具体的实施方式中,优选地,本文所述的制剂A是根据本发明施用的具体药剂。制剂A被表征如下。当剂量为50μg FCMtb时,表1中给出了存在于一小瓶(vial)制剂中的量/物质:

[0182]

组分	**单位/小瓶**	**功能**
药物		
FCMtb	66.7 mg	免疫原
其它组分		
蔗糖	20000.0 mg	填充物(charge substance)(冻干)和冷冻保护剂
大豆卵磷脂[1]	845.8 mg	脂质体形成剂
胆酸钠	92.0 mg	表面张力活性剂
氯化钠[2]	20.8 mg	溶剂
微粒表征		
z-平均粒径	75 +/- 20 nm	
多分散指数	≤ 0.350	

[0183] [1]含有磷脂酰胆碱(94.0%(重量/重量))

[0184] [2]以0.9%NaCl溶液的形式加入。

[0185] 表1.

[0186] 已表明由高度富含磷脂酰胆碱(94.0%(重量/重量))的大豆卵磷脂(脂质体形成剂)和胆酸钠(表面张力活性剂)制成的脂质体制剂足以在制造和重构悬液的过程中保证更好的药物溶解性。脂质体制剂中FCMtb的稳定性的一个重要参数是组成脂质体的组分的比例。检测不同的FCMtb/脂质组分比率之后,建立的非常好的比例约为0.03:0.2:0.7(FCMtb:胆酸钠:大豆卵磷脂,重量/重量/重量)。进一步观察得到:当水相中存在盐时,脂质体的形成增强。因此,这种具体的制剂中包含氯化钠。

[0187]

参数		接受标准	检验方法
外观		白色至灰白色的粉末	视检
块状物形态(Cake morphology)		平坦至接近平坦以及均质的	视检
剂量统一性	质量统一性(mg/小瓶)	21.02 ± 15%	称量,内部方法(in house method)
	质量平均值(mg/小瓶)	质量 ± 5%	称量,内部方法

[0188]

含水量(%)			≤ 3 %	卡尔费休库伦试验(Karl Fischer coulometric assay),Ph.Eur.2.5.12(USP<921>)
FCMtb 的蛋白总量			90-140 μg /mg FCMtb	BCA 试验,Ph. Eur. 2.5.33(USP <1057>)
重构时间(秒)			良好重构≤10 秒	视检
pH			7-8	电位测定法,Ph.Eur 2.2.3(USP<791>)
粒径	z-平均(nm)(多分散指数)		75 ± 20(≤ 0.310)	动态光散射 Ph.Eur. 2.9.31
被结核分枝杆菌感染的鼠模型产生免疫性的效力	抗原特异性 IFN-γ 印迹形成单位	PPD	相对于基线值(基线值以 SFU/10^6 个细胞)3-12 的比率 SFU/10^6 细胞	ELISpot
蛋白质图谱	SDS-PAGE		阳性条带:70 kDa、38 kDa、30 kDa、10 kDa、6 kDa	通过 SDS-PAGE 电泳
	Western 印迹		HSP70(Rv0350)、38 kDa(Rv0934)、Ag85B(Rv1886c)为阳性	Western 印迹
无菌性			无菌	Ph. Eur. 2.6.1(USP<71>)
细菌内毒素(IU/剂量)			≤ 10 IU/ 小瓶	Ph. Eur. 2.6.14 方法 D(USP<85>)

[0189] 表2:50μg/剂量的药品(FCMtb)(在重构冻干的脂质体组合物后进行检测)。

[0190] 在一个优选的模式中，以使根据本发明所述的脂质体制剂具有如表2所述的性质的方式实施本发明。

[0191] 为了向对象施用，可用0.4ml注射用水在小瓶中重构以产生含有166.7μg/ml FCMtb的悬液。

[0192] 表3显示了以50μg/剂量重构后，每个小瓶中各组分的浓度。

[0193]

组分	浓度/mL
药物	
FCMtb	166.7 mg/mL
赋形剂	
蔗糖	50000.0 μg/mL

[0194]

大豆卵磷脂	2114.4 mg /mL
胆酸钠	230.0 mg /mL
氯化钠	52.1 mg /mL

[0195] 表3：在0.4mL注射用水中重构后组分的浓度。

[0196] 优选地，施用这种制剂用于预防或者治疗包括哮喘和鼻炎的变态反应。

[0197] 材料和方法

[0198] 为了评估根据本发明所述的药剂在体内可具有的治疗益处，按照两套不同的试验流程施用由ARCHIVEL FARMA生产的药剂制剂A以处理小鼠的变态反应介导的呼吸系统问题。

[0199] 参考材料

[0200] a)单克隆抗体：使用特异性单克隆抗体(抗-HSP70、抗-38kDa、抗-Ag85B(来自Lionex Diagnostic GmbH，布伦瑞克，德国))以鉴定FCMtb批次的蛋白图谱。

[0201] b)白蛋白标准品：用于测定蛋白含量的这种标准品由0.9％盐溶液中的牛白蛋白(2mg/ml)构成，保存在叠氮化钠中(制造商：Pierce)。

[0202] c)来源于结核分枝杆菌的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)标准品：使用市售的TDM(Sigma)鉴定FCMtb批次中的TDM。

[0203] d)来源于结核分枝杆菌的霉菌酸标准品：使用市售的霉菌酸(Sigma)鉴定FCMtb批次中的霉菌酸。

[0204] e)分子量标记：使用市售的名称为SeeBlue®Plus pre-stained Standard”(Invitrogen)的分子量标记。

[0205] 参数的测定

[0206] a)pH

[0207] 根据Ph.Eur.2.2.3和USP<791>，通过电位测定法测定FCMtb的重构悬

[0208] 液(20mg/ml)的pH。

[0209] b)含水量

[0210] 根据Ph.Eur.，方法2.5.12中的一般指示和USP<921>水测定，利用Coulometric Karl Fisher设备进行测定冷冻干燥的FCMtb中的残留水的测试。

[0211] c)总蛋白含量的测定

[0212] 根据Ph.Eur.,方法2.5.33,方法4(二喹啉甲酸或BCA试验)和USP<1057>,使用商品化试剂盒(BCA试剂盒,Pierce)进行测定FCMtb中的总蛋白含量的测试。

[0213] d)通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定蛋白图谱

[0214] 根据Ph.Eur.,方法2.2.31和USP<726>进行试验;通过改进的考马斯亮蓝染色或银染色检测凝胶上的蛋白。试验样品:在纯水中以浓度40mg/ml或20mg/ml重构FCMtb。参考溶液:分子量标记、纯化的抗原、FCMtb参考标准品

[0215]

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

[0216] 表4:参考抗原

[0217] 对于考马斯亮蓝染色,按照制造商的说明使用Gel-Code Blue Stain试剂溶液(Pierce)。对于银染色,按照制造商的说明使用PROTSIL1试剂盒(Invitrogen)。对于Western印迹分析,根据本领域已知的标准方法通过SDS PAGE分离蛋白,然后电转至PVDF膜上以利用特异性单克隆抗体进行免疫检测。通过与引发化学发光反应的抗-抗体一起孵育使抗原和抗体的相互作用可视化。使用来源于Lionex(布伦瑞克,德国)的抗原(结核分枝杆菌HSP70蛋白(70kDa)、结核分枝杆菌38kDa蛋白、结核分枝杆菌Ag85B蛋白(30kDa))和来源于Lionex的特异性单克隆抗体(抗-HSP70、抗-38kDa、抗-Ag85B)。

[0218] e)霉菌酸的鉴定

[0219] 根据Ph.Eur.,方法2.2.27,通过一维TLC检测FCMtb中的霉菌酸。检测样品:冻干的FCMtb,40mg。参考溶液:霉菌酸标准品(Sigma)。程序:

[0220] a)提取方法:用氯仿:甲醇(1:1)提取样品,然后孵化过夜。

[0221] 除去上清液部分。

[0222] b)霉菌酸的酯化:向每个管中加入2mL甲醇:甲苯:硫酸(30:15:1;体积/体积),过夜后即完成酯化。然后加入4mL正己烷。

[0223] 在氮气流中干燥后用500μl已烷重悬。

[0224] c)TLC:在平行于板(二氧化硅凝胶60(20×20cm)(Merck))边缘的线上施加10μl每种样品。在含有流动相(二乙醚:正己烷(15:85,体积/体积))的饱和罐中进行色谱分离3次。然后在空气中干燥板。

[0225] d)用96°乙醇中的磷钼酸溶液喷涂板并在120℃下加热10分钟以显示霉菌酸。

[0226] 通过与霉菌酸商业化标准品的印迹进行比较,检测FCMtb样品中的霉菌酸。结果被表示为定性数据(存在所评估的霉菌酸(阳性)/不存在所评估的霉菌酸(阴性))。

[0227] f)海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的鉴定:检测样品:冻干的FCMtb,40mg。参考溶液:TDM标准品(Sigma)。程序:

[0228] (i)提取方法:用氯仿:甲醇(1:1;体积/体积)提取样品,然后孵育过夜。在氮气流中干燥上清液部分,然后称重。最后,在氯仿中重悬干燥的样品至终浓度为40mg/ml。

[0229] (ii)TLC:在平行于板(二氧化硅凝胶60(20×20cm)(Merck))边缘的线上施加10μl每种样品。在含有流动相(氯仿:甲醇:水(60:12:1;体积/体积))的饱和罐中进行色谱分离。然后在空气中干燥板。

[0230] (iii)检测:用硫酸中的1%的蒽酮溶液喷涂板并在120℃下加热5分钟以显示TDM。

[0231] (iv)鉴定:通过和被用于产生标准印迹的商业TDM比较,从而测定FCMtb样品中的TDM。结果被表示为定性数据,即存在所评估的TDM(阳性)/不存在所评估的TDM(阴性)。

[0232] g)脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的鉴定:为了对LAM进行Western印迹分析,根据标准方法通过SDS PAGE分离化合物,然后将其电转至硝酸纤维素膜上以使用特异性抗体CS35进行免疫检测。通过与引发荧光反应的抗-抗体(IgG山羊抗-小鼠IR Dye 800CW)一起孵育使抗原和抗体的相互作用可视化。

[0233] h)无菌性

[0234] 根据本领域技术人员的知识,所有需要无菌的方法都在无菌条件下进行;这也适用于那些没有明确描述无菌但需要无菌条件的任意所给步骤。根据Ph.Eur.2.6.1(USP<71>)中的规定,对无菌性试验进行评估。

[0235] i)分支杆菌失活

[0236] 依照Ph.Eur.2.6.2,评估分支杆菌的失活。

[0237] j)细菌内毒素

[0238] 根据Ph.Eur.,方法2.6.14的一般指示,依照方法D(动态显色法)和USP<85>进行关于细菌内毒素的试验(LAL试验,鲎变形细胞溶解物)。

[0239] 杆菌的片断化

[0240] 选择被认为能够最佳呈现细胞抗原(尤其是细胞壁抗原)的杆菌片断。通过动态光散射(如下所述)和激光衍射方法测定FCMtb的片断。

[0241] 激光衍射能够测量0.04μm-2000μm的片断。在Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona(西班牙)中进行该试验。仪器:配备有通用液体模块(ULM)的Coulter LS13320。溶剂:纯化的水/矿物油。结果:被绘制成柱形图,其展示了微粒数目相对于微粒直径(0.04μm-2000μm)的相对频率(%)。

[0242] z-平均粒径和多分散指数的测定

[0243] 通过动态光散射(DLS)(基于微粒的布朗运动这个物理概念)测定本文件中所述的平均粒径,其被限定于Stokes-Einstein方程:

[0244] $$d(H)=\frac{kT}{3\pi\eta D}$$

[0245] 其中:

[0246] d(H)=流体力学直径

[0247] D=平动扩散系数

[0248] k=玻尔兹曼常数

[0249] T=绝对温度

[0250] η＝粘度

[0251] 不希望受任何特定理论的束缚，Stokes-Einstein方程规定：悬浮在液体介质中的微粒恒定且随机运动，其速度取决于它们的大小：微粒越大，布朗运动越慢。

[0252] 在动态光散射测量中，用单色光源(优选的是激光)照射待测量的含有微粒的样品，然后在相关函数中分析散射光的强度如何随时间波动。例如，如果测量的是大的微粒，由于它们移动缓慢，因此散射光的强度缓慢波动，所以关联性的衰减时间长；另一方面，如果测量的是小的微粒，由于它们移动迅速，因此散射光的强度快速波动，所以信号衰减的关联性更迅速。

[0253] 根据本发明，优选地使用下述仪器测量微粒：Zetasizer nano zs(Malvern Instruments)，并使用纯化的水/矿物油作为溶剂。

[0254] 如果没有相反的指示，则按照制造商的说明书使用仪器；如果适用，也按照制造商的说明书进行调节和校准。

[0255] 根据相关函数使用多种算法计算大小。在本申请中，使用在ISO13321的第8部分所定义的“累积量分析”。相关函数拟合产生单一指数曲线，因此能够计算出下列参数：

[0256] -微粒分布的平均大小或z-平均直径。该平均大小是强度平均值。

[0257] -多分散指数(pdi)，即对应于粒径分布的宽度。

[0258] 结果通常被绘制成柱形图，其展示了微粒数目相对于微粒直径(可以是包含在1nm-3μm的范围内的任意直径)的相对频率(%)。

[0259] 在小鼠中诱导哮喘并施用化合物

[0260] 为了使小鼠敏化，在研究的第0天和第14天向雌性的BALB/c小鼠(实验开始时8周大)腹腔内注射20μg OVA(等级V)和2mg明矾。在激发阶段，通过雾化使所有的动物(包括非敏化的动物)暴露在1％的OVA溶液中(第28-30天)。对一组对OVA敏化的小鼠施用制剂A作为预防性措施/制剂A P(P代表预防性)，对另一组进行施用作为治疗性药剂(制剂A T(T代表治疗性)，这两个组都接受200μg/剂量。发明人利用用BCG丹麦菌株1331(Pfizer)处理的敏化小鼠作为阳性对照，其在第31天皮下施用150μg/剂量。向敏化的小鼠施用安慰剂(制剂A疫苗的载剂)作为阴性对照。另外还包括两个非敏化的组，用对照疫苗(BCG)或者试验疫苗(制剂A)处理每个组，这样就建立了下列7种条件/实验组：

[0261] 组1(对照)：用载剂处理非敏化的小鼠(n＝8)

[0262] 组2(阴性对照)：用载剂处理敏化的小鼠(n＝8)

[0263] 组3(BCG对照)：在第31天，用BCG疫苗处理非敏化的小鼠(n＝8)

[0264] 组4(阳性对照)：在第31天，用BCG疫苗处理敏化的小鼠(n＝8)

[0265] 组5(制剂A®对照)：用制剂A处理非敏化的小鼠(预防性)(n＝8)

[0266] 组6(试验)：用制剂A处理敏化的小鼠(预防性)(n＝8)

[0267] 组7(试验)：用制剂A处理敏化的小鼠(治疗性)(n＝8)

[0268] 发明人提供装在单独的小瓶中的疫苗和安慰剂。在每日临施用之前，于层流净化罩中在这些小瓶中重构。在图10展示的时间点背部皮下施用所有疫苗剂量和安慰剂。

[0269] 取样和评估气道参数

[0270] 由于涉及大量动物，因此本实验进行4轮，其中每一轮都与之前的一轮短暂重叠，而且每一轮都同样依照诱导和处理哮喘的流程进行。在全部实验中，监控动物并进行取样

用于后续分析。

[0271] 监控小鼠

[0272] 发明人从施用的第一天(-31)开始记录所有小鼠的重量,然后每周记录一次一直到处死。使用标准流程(包括行为监控以及观察毛发和黏膜)仔细评估每种处理方案下的小鼠。

[0273] 测定肺功能性

[0274] 测定来自于每个组的8只小鼠的反应性程度。在最后用OVA激发(第31天)后24小时,发明人通过利用侵入性体积描述法(Fine Pointe,Buxco Europe Ltd,UK)评估对乙酰甲胆碱的支气管反应性程度以检测所有小鼠的气道反应性。测定气管切开的动物的肺抗性(镇静和麻醉后)作为气道响应支气管收缩药刺激的测量值。

[0275] 炎症的评估-支气管肺泡灌洗(BAL)

[0276] 评估肺功能之后,通过放血使所有仍被麻醉的动物死亡。然后通过支气管肺泡灌洗(BAL)收集气管支气管树中的细胞和分子。向气管内反复注射0.3ml PBS+2%FCS以进行BAL。从抽出液中取出一份,然后进行总细胞计数以评估炎症的程度。离心剩余的BAL液,将细胞放在细胞离心涂片器中并使用Diff-Quick染色进行分类计数,然后存储上清以供后续分析。

[0277] 取样

[0278] 此外,收集肺样品和血清样品并存储在-80℃以供之后利用ELISA鉴定感兴趣的蛋白。同时,冷冻血液样品过夜,对血清等分并存储在-20℃。

实施例

[0279] 在下文中,通过实施例阐述本发明。这些实施例是出于解释的目的,而不能以任何方式被理解为限制本发明的范围。

[0280] 实施例1:分离菌株结核分枝杆菌NCTC 13536

[0281] 用于生产FCMtb的起始材料是菌株NCTC 13536(同义地被称为511或结核分枝杆菌NCTC 13536)的接种物,该菌株是从在西班牙巴塞罗那的被诊断为肺结核的具有免疫能力的患者中分离的结核分枝杆菌的菌株。该菌株在2010年12月3日被保藏在位于伦敦的NCTC,NCTC是根据布达佩斯条约所述的官方保藏机构。此外,西班牙巴塞罗的de Sant Pau医院微生物菌株收集服务已保藏了该菌株。

[0282] 原始菌株的两次传代分别完成于1995年和1996年。MSL PB#1对应于结核分枝杆菌NCTC 13536原始菌株的第二次传代,其于1996年10月完成从而产生了100小瓶(3ml无菌玻璃小瓶)(存储在-70±5℃)。如利用本领域的标准方法所鉴定的,所述菌株具有低遗传多态性。

[0283] 实施例2:生产MTB-C细胞的上游工序

[0284] 图1中给出了该工序的流程图。用于生产FCMtb的原始材料是结核分枝杆菌NCTC 13536菌株(实施例1)的接种物。为确保能够持续供应这种原始材料,优选地使用种源批次系统(seed lot system)。因此,使用来源于主种子批(MSL)的工作种子批(WSL)生产FCMtb。在Löwenstein-Jensen培养基中培养结核分枝杆菌NCTC 13536(实施例1)3-5周。然后在温度为37±2℃且搅拌速度为100±5rpm下,在Proskauer Beck培养基中对细菌生长进行亚培

养。达到最大细菌浓度(通过视检)后,开始在Proskauer Beck培养基中进行亚培养并孵育。当达到相似的细菌浓度时,取出小部分。在37±2℃下培养3-4周后,通过在Middlebrook琼脂培养基中得到的菌落形成单位(CFUs)的数量判断活菌数。细菌数必须是2-5x 10^7CFU/ml。

[0285] (1)培养结核分枝杆菌

[0286] FCMtb的生产始于将0.2mlWSL批接种至7H11琼脂板上并在37±1℃下孵育15±2天。然后,将菌落转移至含有一些玻璃珠的管中,混合后加入约5ml注射用水(WFI)以得到细菌悬液。此时进行平板活力计数和无菌性试验。使用经细菌悬液浸泡的拭子向约100个Middlebrook 7H1琼脂板上接种结核分枝杆菌以得到汇合培养物。在37±1℃下孵育平板21±2天。

[0287] 按照如下所述实施作为过程中控制的无菌性试验:

[0288] 无菌性试验旨在确保不存在除分枝杆菌之外的真菌和细菌。依照Ph.Eur 2.6.1中所述的无菌性试验的条件,通过直接接种进行试验。被检测的样品必须是无菌的。使用培养基7H11代替7H10(如Ph.Eur 2.6.2中所述)。7H11是在培养基7H10的基础上加入1克胰酶消化的酪蛋白,以增强结核分枝杆菌菌株的生长。

[0289] (2)获取结核分枝杆菌并冷冻粗提取物

[0290] 孵育期之后,通过视检琼脂平板和进行无菌性试验控制细菌培养物的纯度。然后,从琼脂平板收集细菌生长物并转移至无菌管中。称量得到的粗提取物(20-22g)。在-80℃±5℃下保存混合物。

[0291] 实施例3:生产从粗提取物中得到的脂质体的下游工序

[0292] 图2中给出了该工序的流程图。

[0293] (3)细胞片断化和去脂

[0294] 在37±1℃下解冻冷冻的粗提取物(实施例2),然后在4℃下加入含有4%(重量/重量)Triton-X114(pH 7.0-7.5)的无菌PBS缓冲液。混合后,将其转移至含有无菌的二氧化硅/氧化锆珠的无菌聚碳酸酯容器中。然后,在研磨珠均质器中通过实施下述片断化方法进行细胞片断化:3个循环,每个循环由5个开/关(ON/OFF)周期和10分钟的间歇组成。上述过程结束后,用含有4%Triton-X114(pH 7.0-7.5)的无菌PBS缓冲液进行后续洗涤(重复地震荡和沉降)以使细胞片断化级分与珠分离。然后收集细胞片断化级分的洗涤悬液的一部分用于pH控制,最后在4℃下以845g离心30分钟。

[0295] 为了除去胞质级分并得到富含细胞片断的悬液,在4℃下以约20000g高速离心2次60分钟。第一次离心之后,弃去浅黄色的上清液(富含可溶性蛋白和脂质),然后在PBS中重悬沉淀,之后在与上述条件相同的条件下进一步离心。之后丢弃的上清液的外观必须是清澈无色的。最后,在终体积为50-60ml的PBS中重悬得到的沉淀(FCMtb悬液)。

[0296] (4)巴氏灭菌

[0297] 然后在65±2℃下对FCMtb悬液进行巴氏灭菌60分钟。巴氏灭菌结束后,利用石蕊试纸测定经巴氏灭菌的FCMtb的pH。pH 6.5-7.5被认为是可接受的范围。向无菌和脱去热源的小瓶内填充0.5ml悬液产物,然后执行无菌性IPC和分支杆菌的失活。最后,将填充后的小瓶冷冻在-80±5℃。对材料进行巴氏灭菌后,其将与未被处理的材料物理隔离,即明确分开在巴氏灭菌前所用的空间和那些在随后的填充过程中所用的空间。

[0298] (5)冻干

[0299] 然后在约-45℃至30℃的温度和0.310mbar的压力下冷冻干燥所有含有冷冻产物的小瓶约18小时(每瓶小时0.5ml体积)。在氮气氛下,使用无菌技术盖紧小瓶并贴上标签。然后在-20±5℃下存储包装过的药物长达12个月。

[0300] 实施例4:蛋白表征

[0301] 图3给出了蛋白图谱的表征策略的综述。

[0302] 基于文献(Andersen P.,1997,Scand J.Immunol.;45(2):115-31;Geisel等人,2005,J.Immunol.;174(8):5007-15;Stewart等人,2005,Infect.Immun.,73(10):6831-7.,Wang等人,2007,J.Mol.Biol.,366(2):375-81),选择在蛋白图谱评估中有代表性的6条蛋白带:HSP70蛋白(Rv0350)、38kDa蛋白(Rv 0934)、(Rv 1866c)、19kDa蛋白(Rv 3763)、CFP10蛋白(Rv3874)和ESAT-6蛋白(Rv3875)。

[0303] A.测定总蛋白含量:通过二喹啉甲酸(BCA)方法对FCMtb中的总蛋白水平进行定量。总蛋白代表约10%(w/w)的FCMtb含量。参考标准物FCMtb-0429-16和FCMtb-52.1分别含有167μg蛋白/mg FCMtb and 115μg蛋白/mg FCMtb。

[0304] B.通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定蛋白图谱:通过与来源于结核分枝杆菌的参考抗原(和ESAT6(6kDa)(7)、CFP10(10kDa)(6)、Ag85B(30kDa)(1)、38kDa(2)和HSP70(70kDa)对应)和分子量标记MW(5)进行比较,确定药物FCMtb的蛋白图谱,请参见图4所示。药物FCMtb的蛋白图谱的确定和蛋白带(约70kDa、38kDa、30kDa、10kDa和6kDa)的鉴定是通过考马斯亮蓝染色实现的。19kDa蛋白带(脂多肽)的鉴定是通过银染色实现的。

[0305] C.利用特异性单克隆抗体通过Western印迹鉴定蛋白图谱:药物FCMtb的蛋白图谱是通过利用使用单克隆抗体(mAb)的Western印迹分析获得的模式确定的,其中所述单克隆抗体(mAb)是抗-HSP70(70kDa,图5c)、抗-38kDa(图5d)和抗-Ag85B(30kDa,图5e)。

[0306] 根据实施本发明的优选方式,FCMtb-52.1是FCMtb的参考批次。

[0307] 实施例6:脂质表征

[0308] FCMtb的脂质图谱的表征由基于氯仿:甲醇(1:1)提取的分馏工艺组成。在这些研究中实施的分馏工艺基于由Delmas等人,1997,Glycobiology 7(6),811-7所述的程序。薄层色谱法(TLC)是用于分析FCMtb中存在的脂质和糖脂含量的方法。特别地,利用薄层色谱法(TLC)鉴定参考菌株(H37rv和NCTC 13536)和不同FCMtb批次中的聚酰基海藻糖(polyaciltrehalose,PT)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、二酰基海藻糖(DAT)、磷酸肌醇甘露糖(phosphatidilinositolmannosid,PIM)及其它磷脂、结核菌醇二霉菌蔗蜡酸酯(phthiocerol dimycocerosates,PDIM)和霉菌酸。参见图7a。利用TLC分析上清液中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的含量。按照TLC方法,测定沉降中霉菌酸。虽然MTB-C的脂质图谱的定量数据是未知的,但在研究中建立的定性脂质图谱与目前的科学知识相符并且允许目前已知的具有免疫原性的脂质的标准表征。将FCMtb与结核分枝杆菌菌株NCTC 13536和H37Rv的总细胞脂质级分以及TDM商业标准品进行比较(参加图7a和7b)。总而言之,不同批次的根据本发明所述的包含FCMtb的脂质体显示出一致的脂质含量。图7d展示了LAM的鉴定。

[0309] 实施例7:片断化细胞材料的表征

[0310] 通过两种方法得到的初步结果都显示FCMtb的片断大小大部分小于1μm(99%＜1μm),这被FCMtb的电子显微镜检查所证实:片断大小大部分为100-300nm。

[0311] 通过在260nm处的吸光度来研究用苯酚/氯仿混合物提取后残留的DNA的水平(检测限:0.2μg DNA/mg FCMtb)。目前得到的典型结果是低于15μg DNA/mg FCMtb。

[0312] 在不同的FCMtb批次中可重复的脂质图谱和蛋白图谱显示出药物生产过程的一致性。

[0313] 实施例8:蔗糖的效果

[0314] 在初期试验中,任选地将下述赋形剂:(a)1.5%甘氨酸和(b)5%蔗糖分别并入包含MTB-C菌株NCTC 13536片断的脂质体制剂中。随后,对与这两种制剂相关的物化性能和生物活性进行对比评估。

[0315] 表5展示了重构冻干的脂质体组合物之后,根据目前的批次放行规格参数进行试验后而得到的测量结果。

[0316]

参数	接受标准	脂质体悬液中配置的 FCMtb		
		无赋形剂	5%蔗糖	1.5%甘氨酸
		脂质体悬液中配置的 FCMtb		
外观	白色至灰白色粉末	ND	符合	符合
块状物形态(Cake	平坦至接近平坦且	ND	符合	符合

[0317]

morphology）		均质				
水含量（%）		≤3%		ND	1.4	3.0
重构时间（秒）		良好重构≤10秒		ND	5	12
pH		7-8		8.1	7.4	7.0
粒径	z-平均（nm） Pdi [a]	75±20 （≤0.250）		370 [1] （0.492）	66 （0.215）	504 [1] （0.569）
被结核分枝杆菌感染的鼠模型产生免疫性的效力	抗原特异性 IFN-γ 印迹形成单位	PPD	相对于基线值（基线值以 $SFU/10^6$ 细胞）3-12 比率 $SFU/10^6$ 细胞	3.6 （183）	5.1 （183）	2.8 （183）
		Ag85B（30 kDa）	相对于基线值（基线值以 $SFU/10^6$ 细胞）5-20 比率 $SFU/10^6$ 细胞	5.5 （73）	9.6 （73）	5.4 （73）

[0318] [a] 多分散指数 [1] 存在脂质体聚集体

[0319] ND＝未检测

[0320] 表5:测量重构冻干的脂质体组合物后得到的3种不同制剂的规格。

[0321] 本研究的研究人员出乎意料地发现5%蔗糖制剂提供了良好的物化结果(例如水含量或重构时间,分别地)的优势。但最关键的事实在于:与另外两种制剂相比,包含蔗糖的制剂显示出脂质体聚集体的重要减少(粒径、z-平均值)。动态光散射分析显示:含有蔗糖的脂质体的z-平均值为75±20nm(多分散指数≤0.350)。用电子显微镜对用冷冻断裂法制备的的含蔗糖的脂质体剂型进行观察,显示出大小在40-100nm之间的多层和单层脂质体的混合物(图8)。

[0322] 由于5%的蔗糖制剂具有这种改良的参数以及观察到较低的含水量水平(≤2%),因此预计这种制剂具有改善的稳定性结果。事实确实如此。

[0323] 实施例9:冻干的脂质体制剂(制剂A)的制造方法

[0324] 图9中展示了制造包含根据本发明的脂质体制剂的药物组合物的一个实施方式。简而言之,其包括下述步骤1-5。

[0325] (1)LCS本体(bulk)组分的制备

[0326] 将LCS本体大豆卵磷脂和胆酸钠分别溶解在乙醇(1:1;重量/重量)和水(1:5;重量/重量)中。通过过滤使溶液无菌。混合大豆卵磷脂溶液和胆酸钠溶液之后,加入冻干的

FCMtb(实施例1)同时搅拌。组分的比例为0.03:0.2:0.7(FCMtb:胆酸钠:大豆卵磷脂;重量/重量/重量)。

[0327] (2)LCS本体的制备

[0328] 将水相转移至无菌的不锈钢混合器中。以0.7:0.3(水相:脂质相,重量/重量)的比率加入含有大豆卵磷脂、胆酸钠和FCMtb的脂质相(1)。在2200rads/s下混合相3分钟以均化并形成脂质体。均化之后,将本体LCS转移至另一个容器并放置至少5分钟。对LCS本体的粒径进行IPC。

[0329] (3)稀释LCS本体,脂质体悬液的最终制剂

[0330] 配制10%(重量/重量)的蔗糖溶液并灭菌。以合适的比例将蔗糖溶液与水和LCS本体混合从而得到最终的脂质体悬液(LS)本体,其由5%蔗糖溶液中的21mg/ml的LCS构成。根据过程中控制检测pH、无菌性和粒径。

[0331] (4)填充

[0332] 用0.4ml LS(处于连续搅动条件下)填充小瓶并部分地封闭以便冷冻和冷冻干燥。

[0333] (5)冷冻干燥、包装和标记

[0334] 将小瓶冷冻在-80±5℃直至进行冷冻干燥。冷冻干燥是在-45℃至25℃的温度范围和0.150mbar下进行的。该过程持续24小时。冷冻干燥结束时,在氮气氛中将冷冻干燥的小瓶完全塞住,密封、标记并存储在5℃±3℃。

[0335] 实施例10:小鼠模型

[0336] 发明人使用具有变态反应诱导的哮喘的小鼠模型。小鼠模型的个体的详细结果参见附录中的表格。

[0337] 通过腹腔内注射卵清蛋白(OVA)使小鼠对OVA敏化,然后将其局部暴露于雾化的抗原(i.n.)中。敏化的小鼠被分成下述组:未被处理的组和用试验疫苗或BCG(阳性对照)处理的组,所有的组都通过皮下(s.c.)施用。发明人还在不敏化的小鼠中建立了上述处理的对照组。在那些暴露于OVA的动物(但未被处理)中,响应乙酰甲胆碱的支气管反应性增加且出现支气管周嗜曙红细胞,这表明高效诱导了变应性过程。接种BCG使炎症的水平降低了几乎一半(不显著),同时支气管的过度响应性也降低了几乎一半(没有回复到基线水平)。作为预防性措施施用制剂A疫苗(根据本发明所述的药剂)极大降低了肺部的嗜曙红细胞增多,并且支气管过度反应性几乎回复至基线水平。使用制剂A疫苗作为治疗性药剂显著降低了支气管炎症,同时观察到响应OVA抗原的支气管过度响应性有降低的趋势。基于这些结果,发明人得出如下结论:当在激发阶段之前施用制剂A疫苗(例如在激发阶段之前施用3次),将对被OVA激发的小鼠的气道产生明显有益的效果;而治疗性的施用明显降低了炎症且对支气管的过度响应性有温和(mild)作用。

[0338] 对各个小鼠的监控(黏膜、毛发和行为)并没有显示出任何可归因于制剂A疫苗的副作用,除了接种后的几天内在注射位置出现的肉芽肿。小鼠的大体情况正常且所有组(被处理和未被处理,对OVA敏化或不敏化)之间的情况相同。图11显示:在整个实验阶段,来自于7个组的小鼠的平均体重始终且接近统一地增长。(参见附录部分中的个体数据和相关体重的平均值±SEM)。

[0339] 出乎意料地,处于安慰剂方案下的非敏化对照组(组1)中的一只小鼠在-21天被发现死于笼子中。在病理科进行的尸体解剖显示了中度至重度的自溶(取决于区域)、稠密且

化脓的皮下腹侧/腹股沟渗出物和脾肿大，这暗示死亡是由于腹侧/腹股沟区域的咬伤或创伤感染。发明人用年长一周的来自于相同品种和来源且未被给过任何药物或者未接受过任何之前操作的另一只小鼠代替上述小鼠。

[0340] 实施例11：处理对气道的影响

[0341] 对进行总炎性细胞和分类细胞计数以测定募集至气管支气管树的炎性细胞。小鼠模型中个体的详细结果请参见附录中的表格。

[0342] BAL细胞的分类计数

[0343] 为了测量整体的炎症，测定在BAL中累积的细胞的总数，之后对炎性细胞进行分别计数(在细胞离心涂片器中使用Diff-Quick对300个细胞进行染色)。展示于图15的组合数据显示了每毫升BAL中存在的嗜曙红细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的数目(细胞/ml)。如图15所示，在那些暴露于OVA的动物中观察到了剧烈的嗜曙红细胞增多，这是源于变态反应的炎性过程的标志。在接受BCG疫苗的动物组中，嗜曙红细胞增多低了43.58％，尽管这并未达到统计学显著性(p＝0.08)。制剂A疫苗不仅影响支气管反应性，同时还明显有助于控制嗜曙红细胞增多的程度：在治疗性方案(T)中减少了61.19％在预防性方案(P)中减少了75.81％(p<0.0005，学生t检验)。除了明显减少嗜曙红细胞增多之外，制剂A疫苗还有助于缓和淋巴细胞的增加，但只有在T的情况下达到统计学显著性(p<0.05，学生t检验)，在P的情况下保持不变(p＝0.09，学生t检验)。

[0344] 结论

[0345] 基于这个项目的结果(参见实施例)，可得出如下结论：施用本文中所述的药剂(例如制剂A)显著减弱了暴露于OVA的小鼠的气道中的气道过度响应性、嗜曙红细胞增多和淋巴细胞增多。在所用的实验条件下，所述药剂在所有的评估参数方面的有效性都超过了Pfizer的商业化疫苗BCG丹麦1331菌株。治疗性方案减少了肺部嗜曙红细胞增多且显示出过度反应性降低(虽然不显著)。与Pfizer的商业化疫苗BCG丹麦1331菌株相比，制剂A疫苗在减弱肺部嗜曙红细胞增多方面更优。

[0346] 附录：

[0347] 所有被测变量的数据

[0348] 表6.每只小鼠的分别重量(g)

[0349]

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
平均值	**18,97**	**18,94**	**19,71**	**20,39**	**20,92**	**21,19**	**21,43**	**22,09**	**21,88**	**22,57**

[0350]

SEM	0,169	0,343	0,475	0,419	0,443	0,379	0,598	0,463	0,491	0,442
ID	-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
平均值	18,68	18,83	19,2	19,71	20,48	20,75	21,11	21,22	21,18	22,3
SEM	0,325	0,191	0,231	0,278	0,24	0,239	0,351	0,255	0,282	0,3
ID	-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
平均值	18,89	18,77	19,18	19,96	20,63	20,81	21,18	21,02	21,31	22,23
SEM	0,272	0,409	0,359	0,459	0,346	0,372	0,392	0,344	0,337	0,469
ID	-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
平均值	19,08	19,15	19,32	20	20,62	20,96	21,28	21,28	21,59	22,51
SEM	0,472	0,381	0,3	0,248	0,328	0,302	0,317	0,278	0,295	0,397
ID	-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
平均值	19,19	19,56	19,9	20,46	21,18	21,38	21,38	21,85	21,9	23,03
SEM	0,311	0,27	0,272	0,347	0,25	0,283	0,323	0,354	0,306	0,285
ID	-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

[0351]

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
平均值	**18,7**	**18,94**	**19,36**	**20,11**	**20,53**	**20,94**	**21,27**	**21,44**	**21,78**	**22,81**
SEM	**0,172**	**0,229**	**0,207**	**0,38**	**0,302**	**0,233**	**0,235**	**0,244**	**0,237**	**0,337**
ID	**-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
平均值	**19,1**	**19,06**	**19,27**	**19,65**	**20,48**	**20,87**	**21,04**	**21,18**	**21,29**	**22,25**
SEM	**0,119**	**0,211**	**0,24**	**0,266**	**0,335**	**0,324**	**0,305**	**0,309**	**0,267**	**0,298**

[0352] 表7.施用乙酰甲胆碱后,RL响应曲线测量值(%)(100%表示每个动物的基线响应水平)

[0353] R1(%)

[0354]

NS载剂	PBS	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
平均值	123,79	141,71	155,67	156,78	160,02	159,53	163,38
SEM	4,21	6,56	10,50	10,63	13,08	12,49	13,35

OVA载剂	PBS	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
平均值	**124,52**	**179,34**	**212,84**	**244,97**	**284,70**	**296,60**	**332,75**
SEM	**3,08**	**22,45**	**22,20**	**29,59**	**37,47**	**39,94**	**43,88**

[0355]

NS BCG	PBS	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
平均值	**135,30**	**152,78**	**167,93**	**193,30**	**199,15**	**202,08**	**215,82**
SEM	**3,95**	**6,01**	**7,67**	**17,17**	**17,40**	**17,06**	**20,88**

OVA BCG	PBS	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
平均值	**119,55**	**156,60**	**179,72**	**195,40**	**220,42**	**245,82**	**249,82**
SEM	**3,36**	**18,68**	**18,88**	**19,79**	**24,62**	**38,82**	**28,08**

NS 制剂A P	PBS	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
NS 制剂A P	PBS	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

OVA	PBS	0.625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00

[0356]

制剂AP							
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
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
平均值	**120,49**	**147,12**	**166,18**	**175,67**	**182,55**	**195,53**	**207,67**
SEM	**5,35**	**6,01**	**8,05**	**9,19**	**10,02**	**14,91**	**17,65**

OVA 制剂AT	PBS	0.625	1.25	2.5	5,00	10,00	20,00
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
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
平均值	**134,97**	**191,01**	**222,26**	**235,82**	**241,30**	**268,13**	**256,34**
SEM	**8,45**	**22,29**	**29,61**	**30,09**	**31,97**	**41,41**	**33,18**

[0357] 表8.各炎性细胞计数

[0358]

	NS	OVA	NS BCG	OVA BCG	NS 制剂AP	OVA 制剂AP	OVA 制剂AT
	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
	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
平均值	**255000**	**445625**	**305625**	**311875**	**268750**	**329375**	**324375**
SEM	**31282,13**	**41623,71**	**54210,55**	**48494,64**	**13354,71**	**26295,67**	**32820,36**

[0359] 表9.各分类细胞计数(%,BAL)

[0360]

	NS				OVA			
	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
	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
	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
平均值	**1,49**	**84,86**	**7,35**	**6,30**	**38,97**	**37,73**	**7,98**	**15,33**
SEM	**0,64**	**2,99**	**1,74**	**0,94**	**6,48**	**6,42**	**1,22**	**2,03**

[0361]

	NS BCG				OVA BCG			
	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
	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
	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
平均值	**1,97**	**81,35**	**6,88**	**9,80**	**28,83**	**50,80**	**6,73**	**13,63**
SEM	**0,60**	**4,59**	**1,45**	**3,20**	**4,42**	**6,27**	**1,42**	**2,50**

[0362]

	NS RUTI P				OVA 制剂A P			OVA 制剂A T			
嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
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
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
0,49	**77,93**	**10,35**	**11,23**	**13,20**	**64,91**	**7,50**	**14,39**	**23,10**	**54,13**	**10,06**	**12,71**
0,20	**3,37**	**3,07**	**1,84**	**5,39**	**8,02**	**1,56**	**2,15**	**5,11**	**7,23**	**2,20**	**1,30**

[0363] 表10.BAL分类细胞计数的各结果(细胞/ml)

[0364]

	NS				OVA			
	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
	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	39090.27	106956.52
	5761.17	190938.97	27605.63	20704.23	228750.00	121250.00	42500.00	47500.00
	1928.10	259330.07	10604.56	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	198675.00	4031.25	11421.88	188100.00	64900.00	8800.00	66200.00
	12080.81	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
平均值	**3121.76**	**219309.12**	**17633.11**	**14936.01**	**169001.82**	**173088.15**	**34708.27**	**68826.76**
SEM	**1459.25**	**32091.46**	**4314.20**	**2701.14**	**29106.93**	**39999.89**	**4689.31**	**11820.78**

[0365]

	NS BCG				OVA BCG			
	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
	1714.29	495428.57	13714.29	29142.86	67833.33	241733.33	11100.00	49333.33
	0.00	338637.93	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
	1065.53	1466546.05	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
平均值	**5013.19**	**259047.39**	**17158.32**	**24406.11**	**95359.93**	**150407.76**	**22286.03**	**43821.28**
SEM	**1601.77**	**54626.61**	**2785.39**	**8419.42**	**26243.44**	**21213.97**	**5871.74**	**9603.35**

[0366]

NS 制剂A P			OVA 制剂A P				OVA 制剂A T			
巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	嗜曙红细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
39090,91	25408,09	41363,64	7857,14	236714,29	9603,17	21825,40	66822,74	223979,93	28461,54	50795,79
35000,00	27352,94	16764,71	2153,11	976794,26	36602,87	34449,76	27677,97	263542,37	36101,69	27677,97
31535,84	93157,00	46877,13	94456,52	196273,29	45398,20	58661,99	30000,00	398571,43	17142,86	34285,71
30841,75	15875,42	8282,83	109055,37	136319,22	20195,44	44429,97	61357,62	66754,97	36854,30	25033,11
35661,22	85119,05	29384,35	19556,82	255294,12	7205,88	32941,18	98250,00	82500,00	11250,00	33000,00
14933,33	10400,00	32933,33	7277,23	171014,85	24257,43	42453,50	61528,66	231847,13	35666,79	50955,41
17213,11	8196,72	24590,16	0,00	314126,69	13310,58	62669,73	38028,78	171070,23	17474,82	47626,09
92566,67	21200,00	51233,33	66752,58	63092,76	37680,41	67474,23	100465,12	74418,60	59534,88	45581,40
68342,85	**28338,78**	**30678,69**	**40888,85**	**218579,06**	**24290,50**	**45625,59**	**65591,36**	**169085,58**	**30311,12**	**39386,83**
11472,59	8550,53	5327,80	16619,58	35230,40	5037,23	5675,15	10537,35	40892,19	5461,07	3737,27

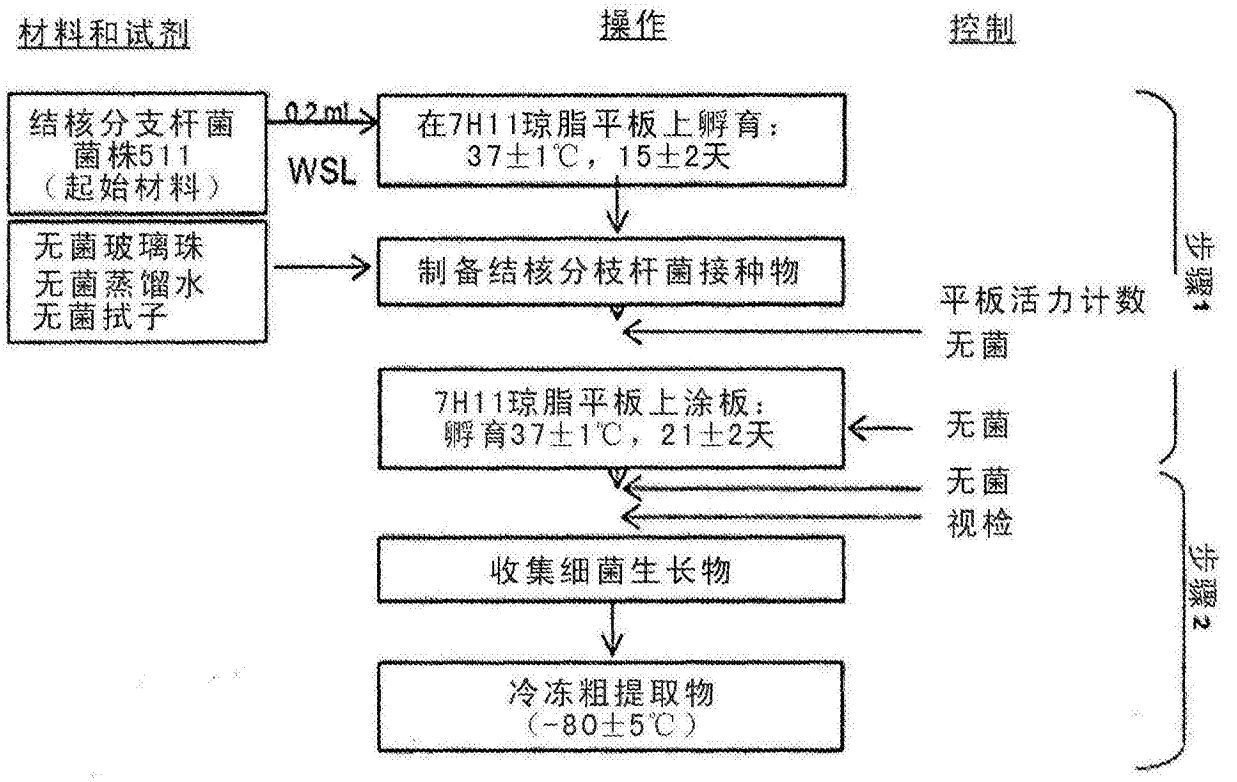
材料和试剂
操作
控制
结核分支杆菌
菌株511
（起始材料）
0.2ml
WSL
在7H11琼脂平板上孵育：
37±1℃，15±2天
无菌玻璃珠
无菌蒸馏水
无菌拭子
制备结核分枝杆菌接种物
平板活力计数
无菌
7H11琼脂平板上涂板：
孵育37±1℃，21±2天
无菌
无菌
视检
收集细菌生长物
冷冻粗提取物
（-80±5℃）
步骤1
步骤2

图1

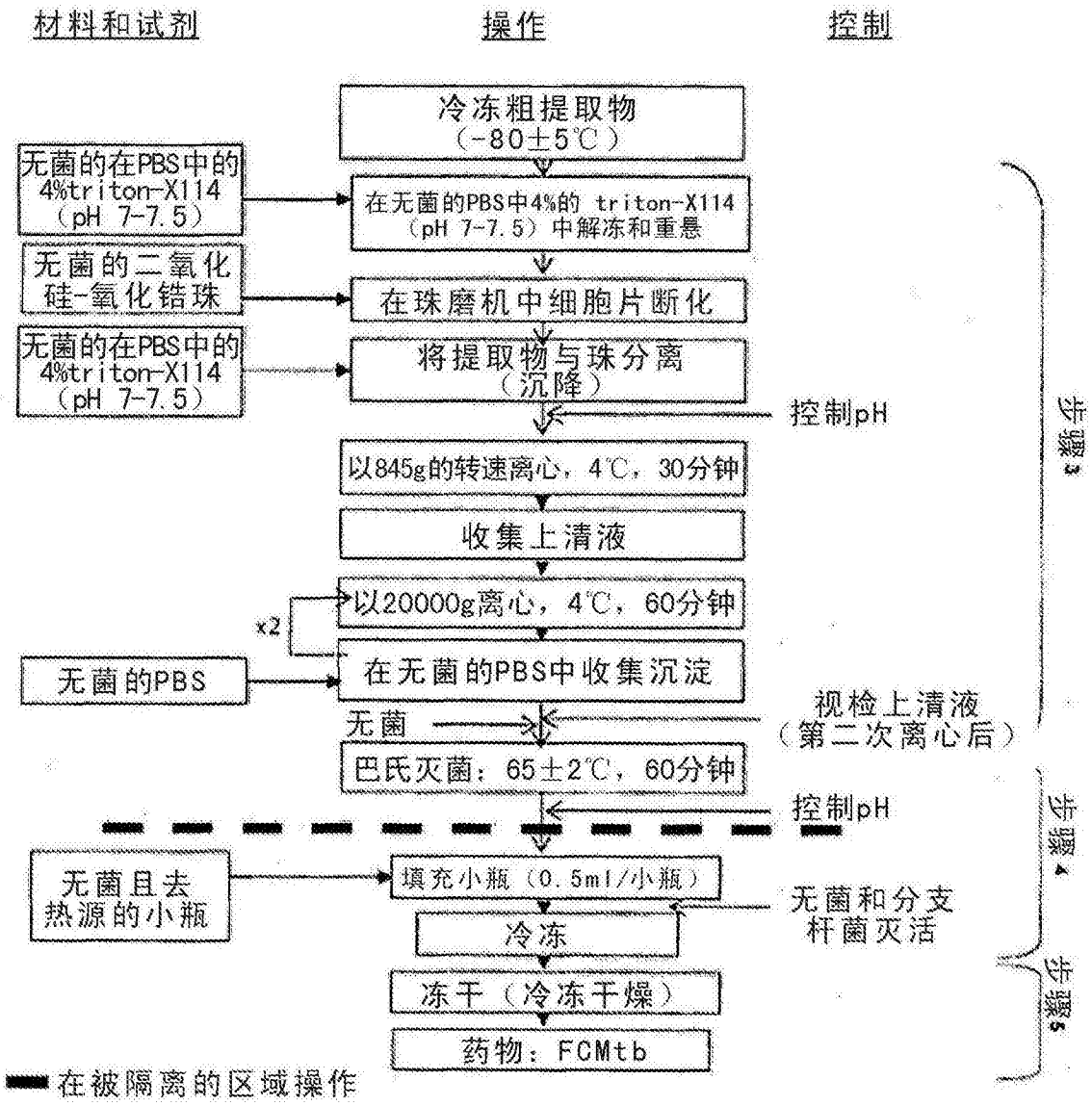
材料和试剂
操作
控制
冷冻粗提取物
（-80±5℃）
无菌的在PBS中的
4%triton-X114
（pH 7-7.5）
在无菌的PBS中4%的 triton-X114
（pH 7-7.5）中解冻和重悬
无菌的二氧化
硅-氧化锆珠
在珠磨机中细胞片断化
无菌的在PBS中的
4%triton-X114
（pH 7-7.5）
将提取物与珠分离
（沉降）
控制pH
以845g的转速离心，4℃，30分钟
收集上清液
以20000g离心，4℃，60分钟
x2
无菌的PBS
在无菌的PBS中收集沉淀
视检上清液
（第二次离心后）
无菌
巴氏灭菌：65±2℃，60分钟
控制pH
无菌且去
热源的小瓶
填充小瓶（0.5ml/小瓶）
无菌和分支
杆菌灭活
冷冻
冻干（冷冻干燥）
药物：FCMtb
步骤3
步骤4
步骤5
在被隔离的区域操作

图2

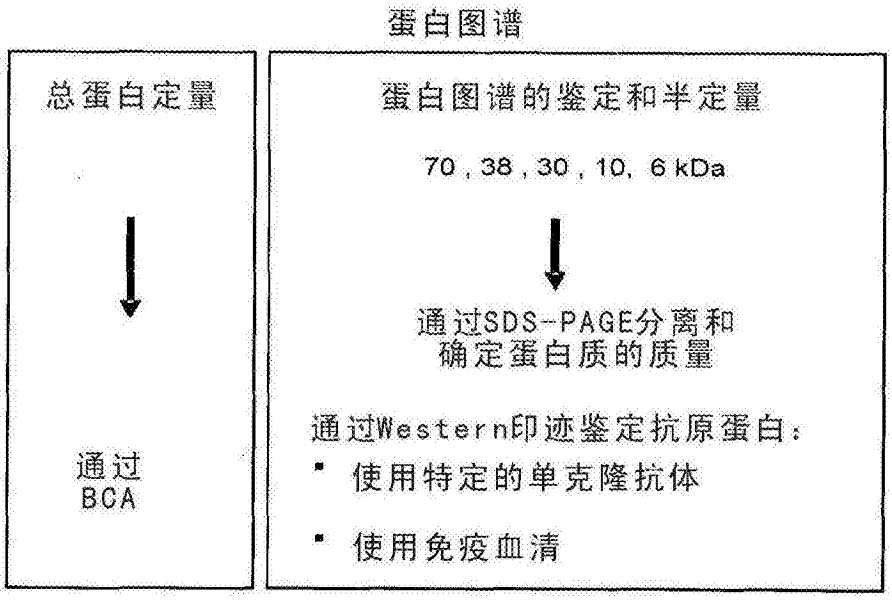
蛋白图谱
总蛋白定量
通过
BCA
蛋白图谱的鉴定和半定量
70，38，30，10，6 kDa
通过SDS-PAGE分离和
确定蛋白质的质量
通过Western印迹鉴定抗原蛋白：
使用特定的单克隆抗体
使用免疫血清

图3

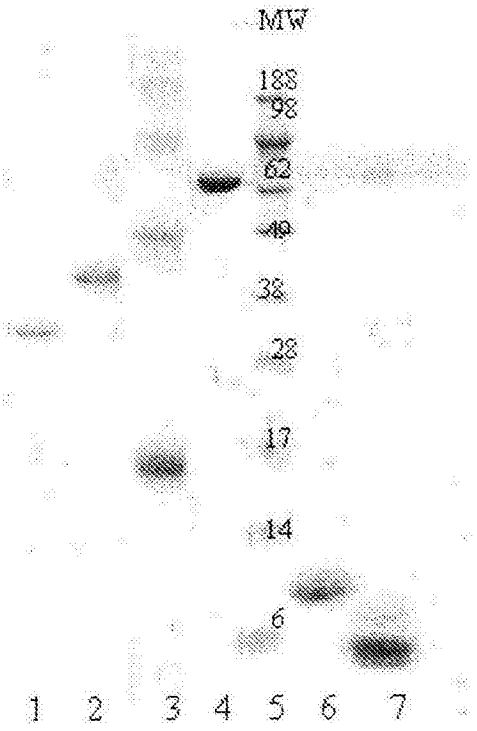
MW
188
98
62
49
38
28
17
14
6
1 2 3 4 5 6 7

图4

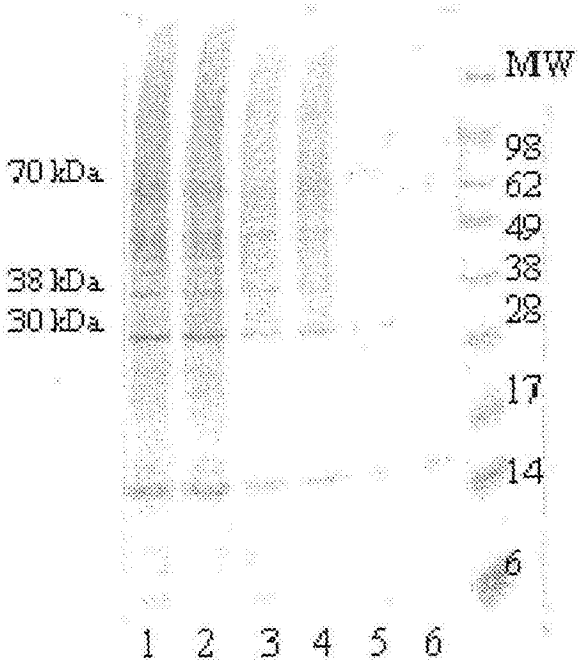
MW
98
62
49
38
28
17
14
6
70 kDa
38 kDa
30 kDa
1 2 3 4 5 6

图5a

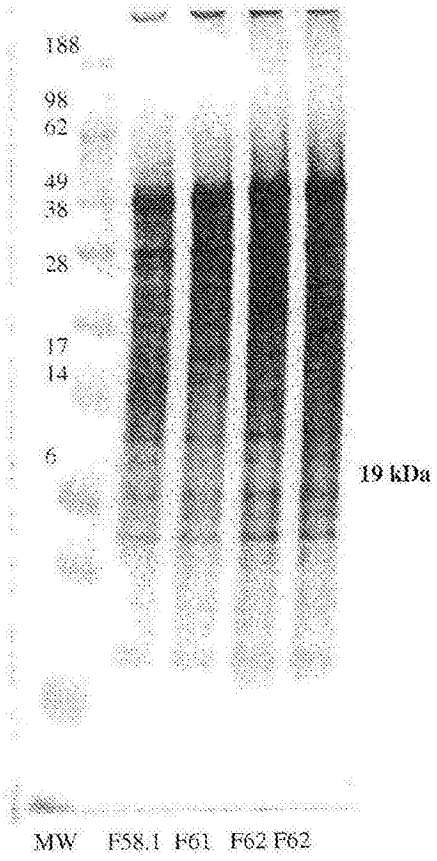
188
98
62
49
38
28
17
14
6
19 kDa
MW F58.1 F61 F62 F62

图5b

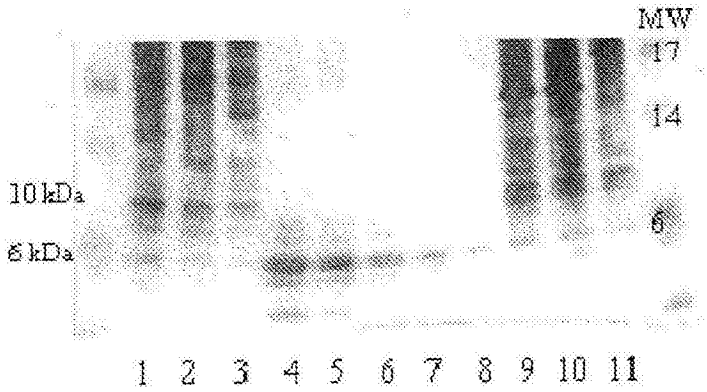

图5c

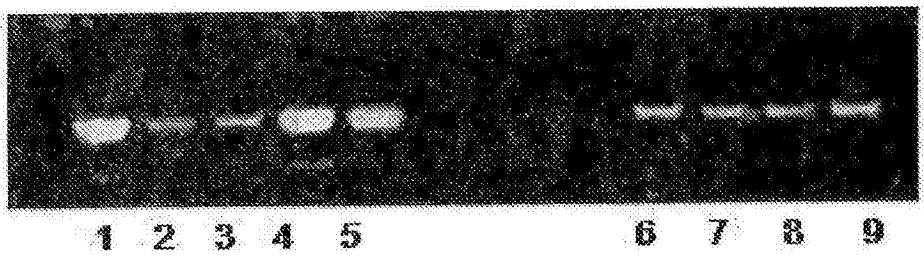

图5d

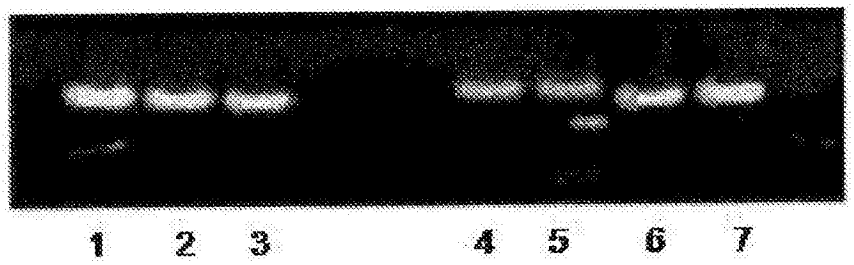

图5e

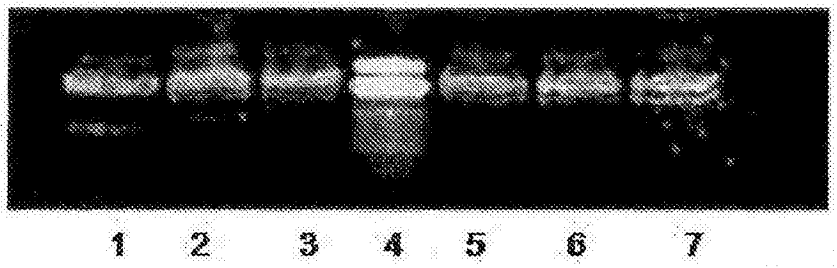

图5f

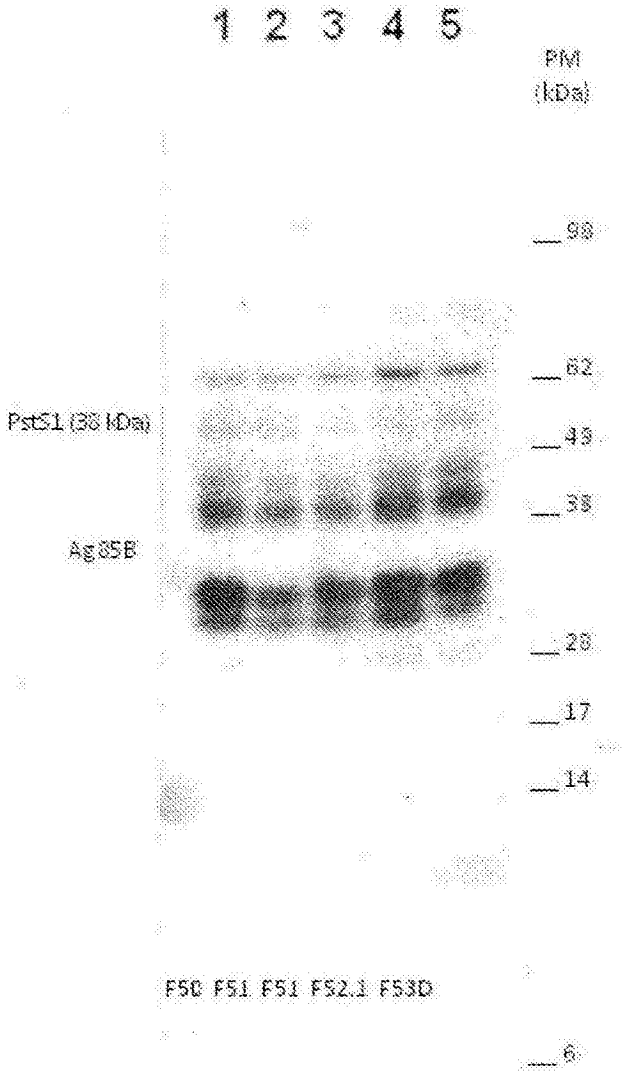
1 2 3 4 5
PM
(kDa)
98
62
49
38
28
17
14
6
PstS1 (38 kDa)
Ag85B
F5D F5I F5J F5J.1 F53D

图6

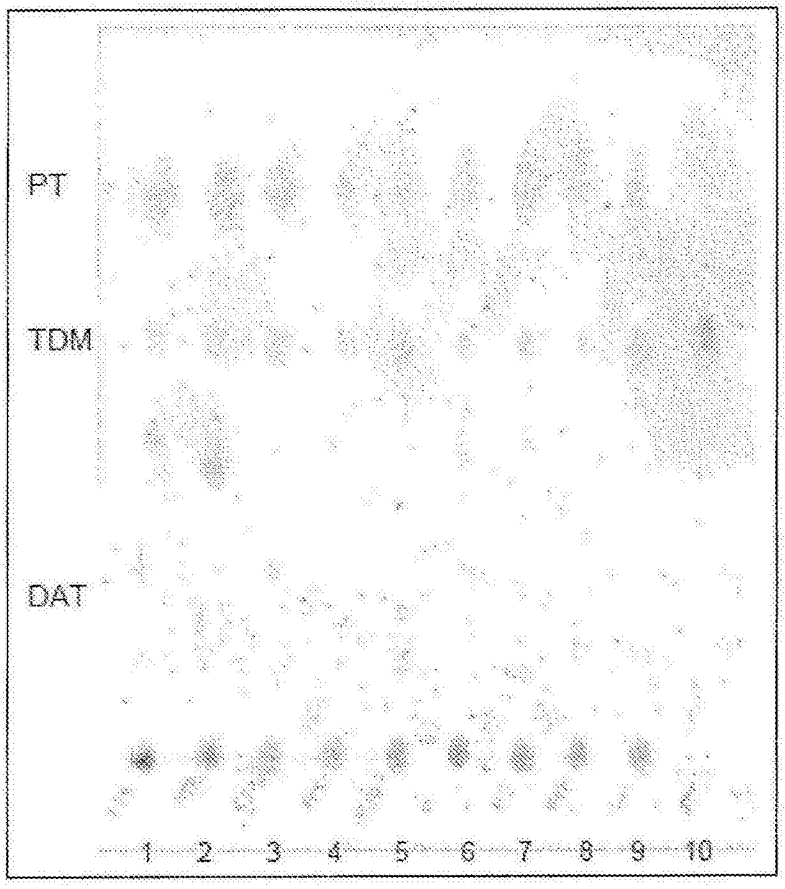

图7a

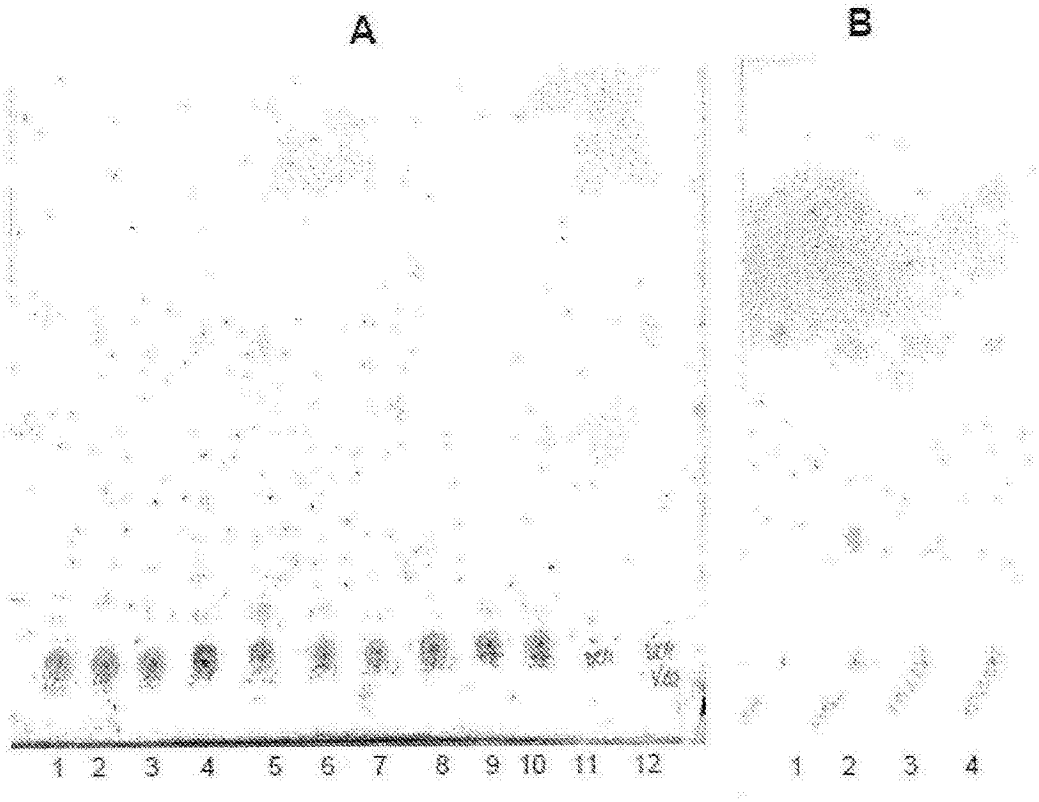

图7b

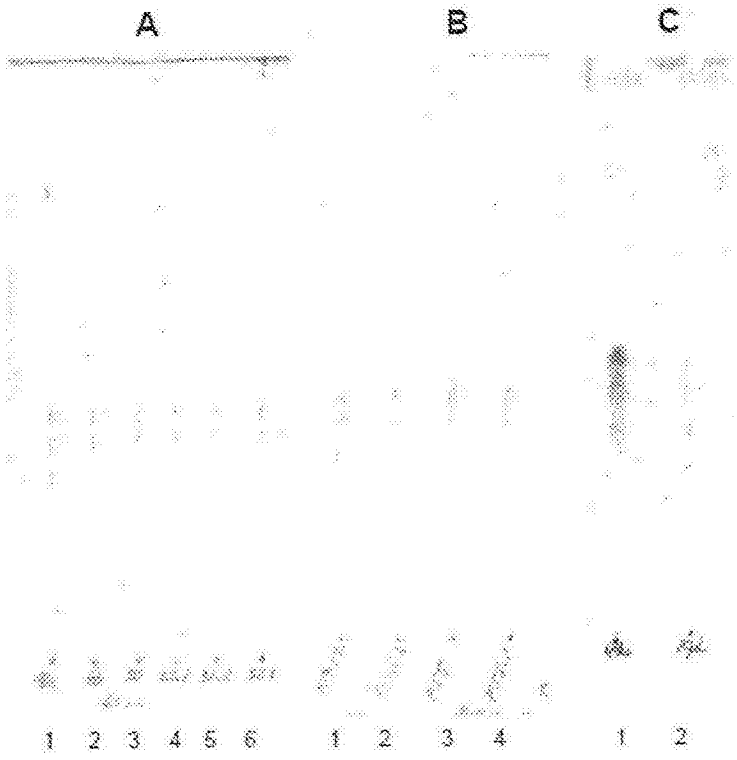

图7c

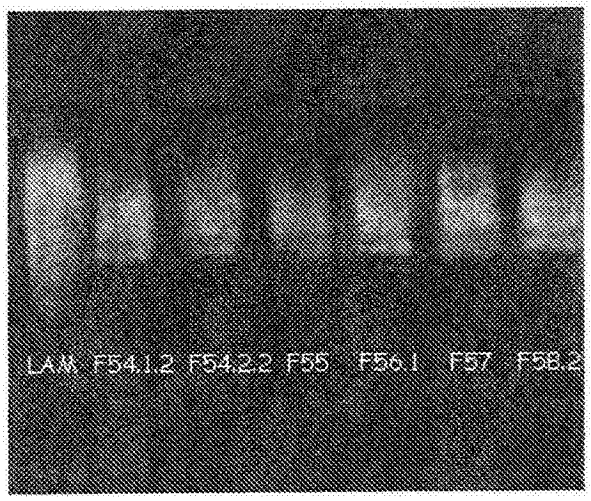

图7d

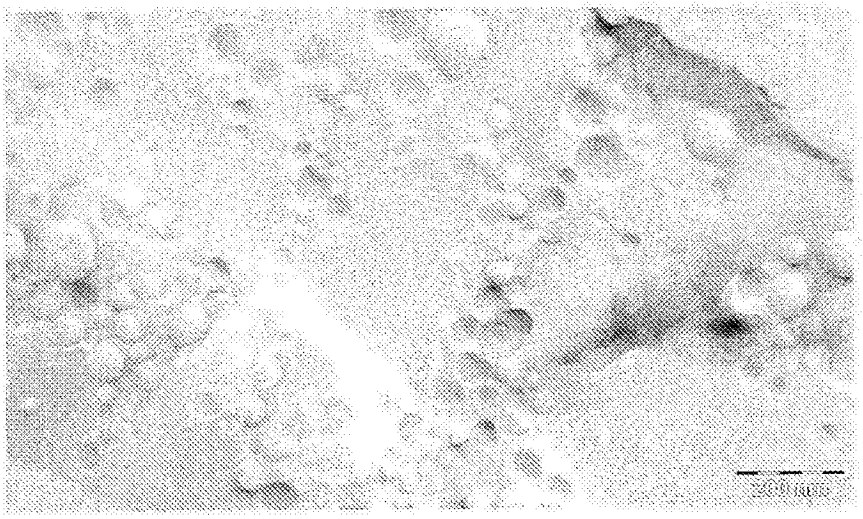

图8

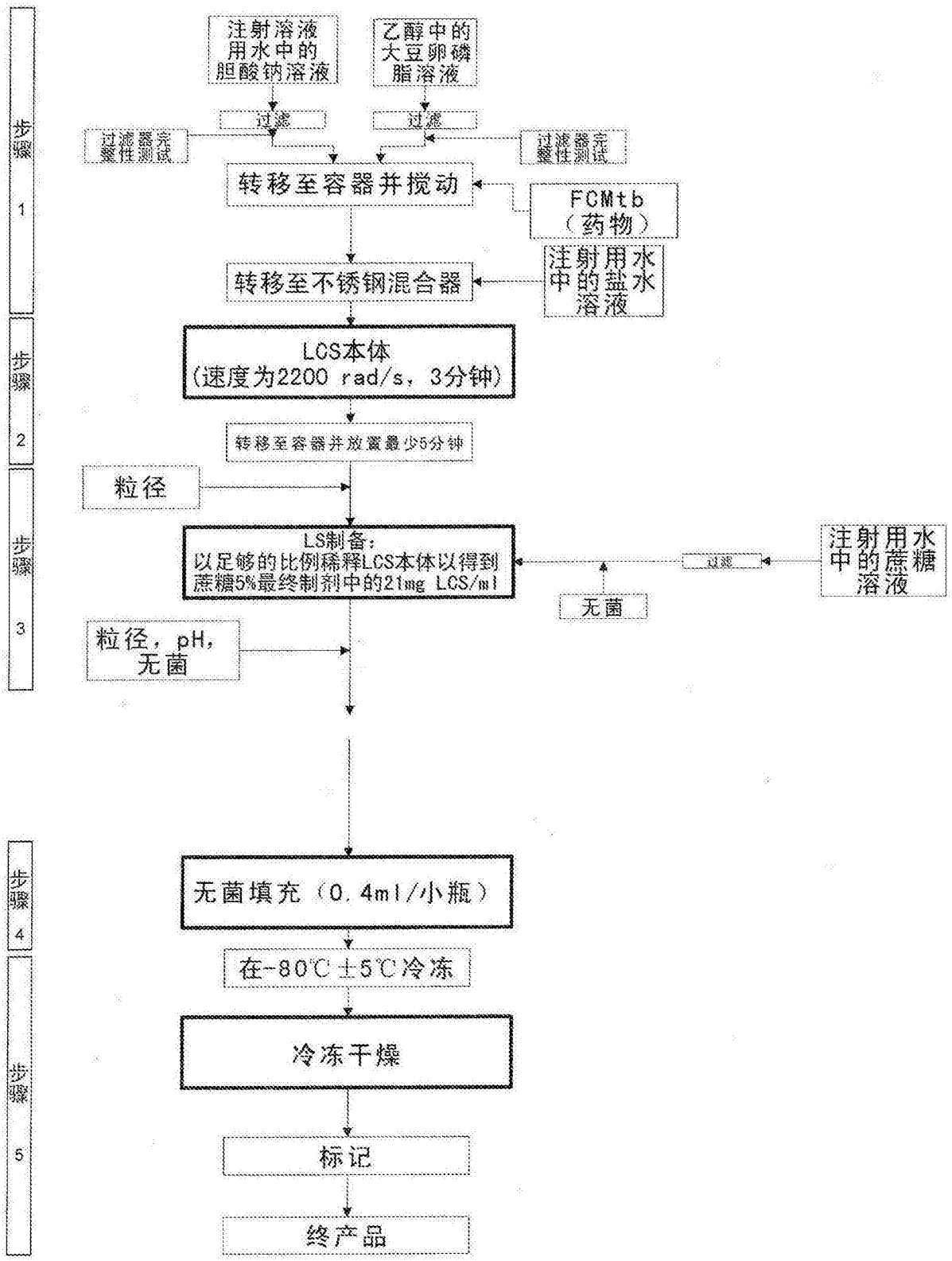
步骤1
步骤2
步骤3
步骤4
步骤5
注射溶液用水中的胆酸钠溶液
乙醇中的大豆卵磷脂溶液
过滤
过滤
过滤器完整性测试
过滤器完整性测试
转移至容器并搅动
FCMtb（药物）
转移至不锈钢混合器
注射用水中的盐水溶液
LCS本体（速度为2200 rad/s，3分钟）
转移至容器并放置最少5分钟
粒径
LS制备：以足够的比例稀释LCS本体以得到蔗糖5%最终制剂中的21mg LCS/ml
过滤
注射用水中的蔗糖溶液
无菌
粒径，pH，无菌
无菌填充（0.4ml/小瓶）
在-80℃±5℃冷冻
冷冻干燥
标记
终产品

图9

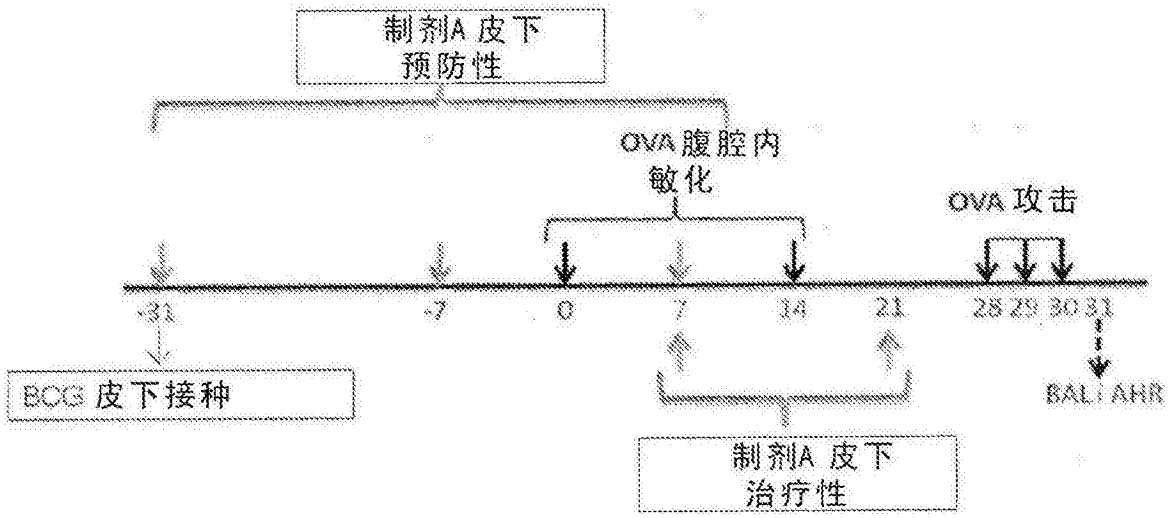
制剂A 皮下
预防性
OVA 腹腔内
敏化
OVA 攻击
-31
-7
0
7
14
21
28 29 30 31
BCG 皮下接种
BAL AHR
制剂A 皮下
治疗性

图10

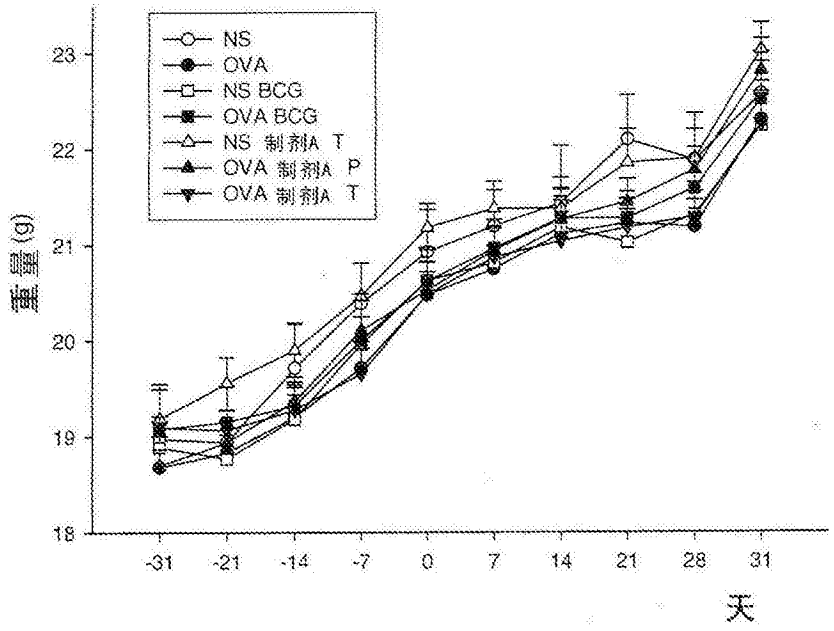
NS
OVA
NS BCG
OVA BCG
NS 制剂A T
OVA 制剂A P
OVA 制剂A T
重量 (g)
23
22
21
20
19
18
-31
-21
-14
-7
0
7
14
21
28
31
天

图11

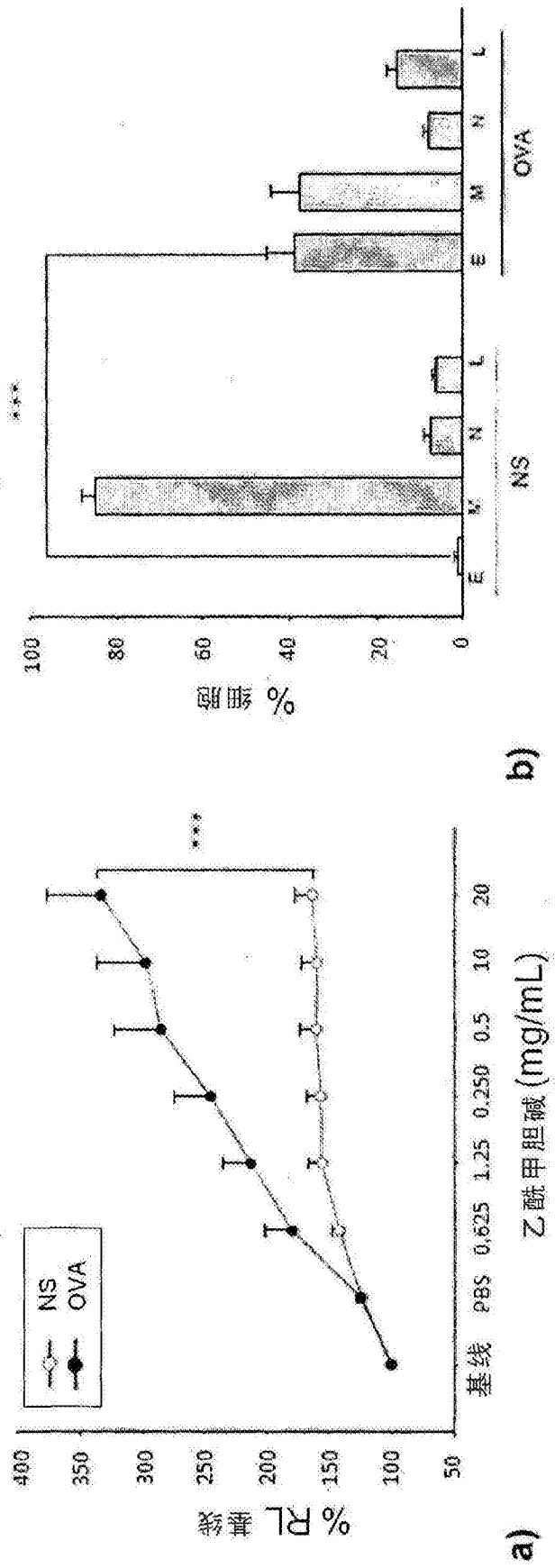
a)
% RL 基线
400
350
300
250
200
150
100
50
NS
OVA
***
基线 PBS 0,625 1,25 0,250 0,5 10 20
乙酰甲胆碱(mg/mL)
b)
% 细胞
100
80
60
40
20
0
***
E
M
N
L
NS
E
M
N
L
OVA

图12

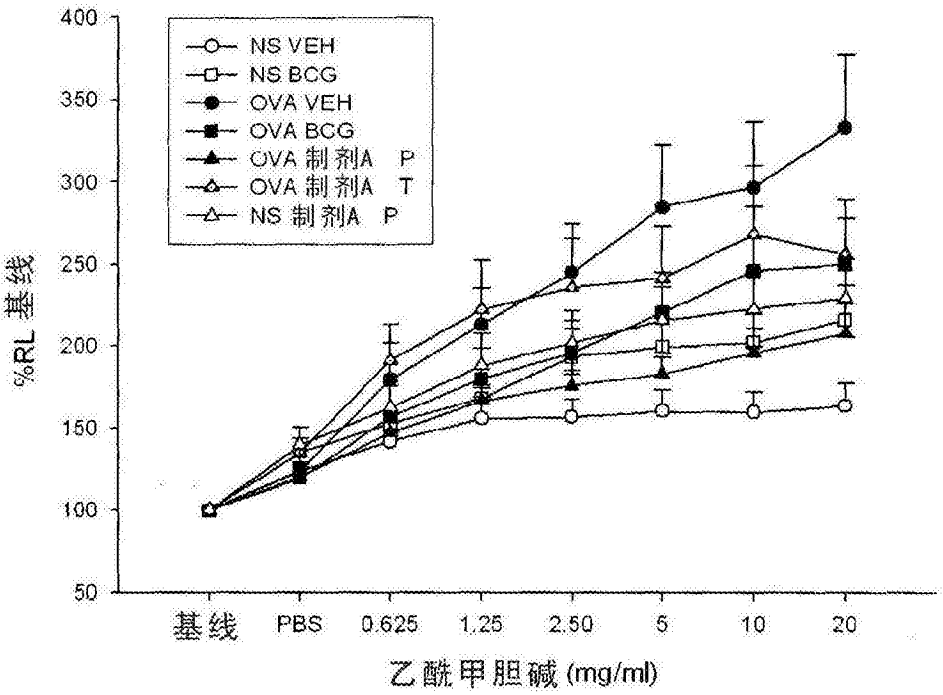
400
350
300
250
200
150
100
50
%RL 基线
NS VEH
NS BCG
OVA VEH
OVA BCG
OVA 制剂A P
OVA 制剂A T
NS 制剂A P
基线
PBS
0.625
1.25
2.50
5
10
20
乙酰甲胆碱 (mg/ml)

图13

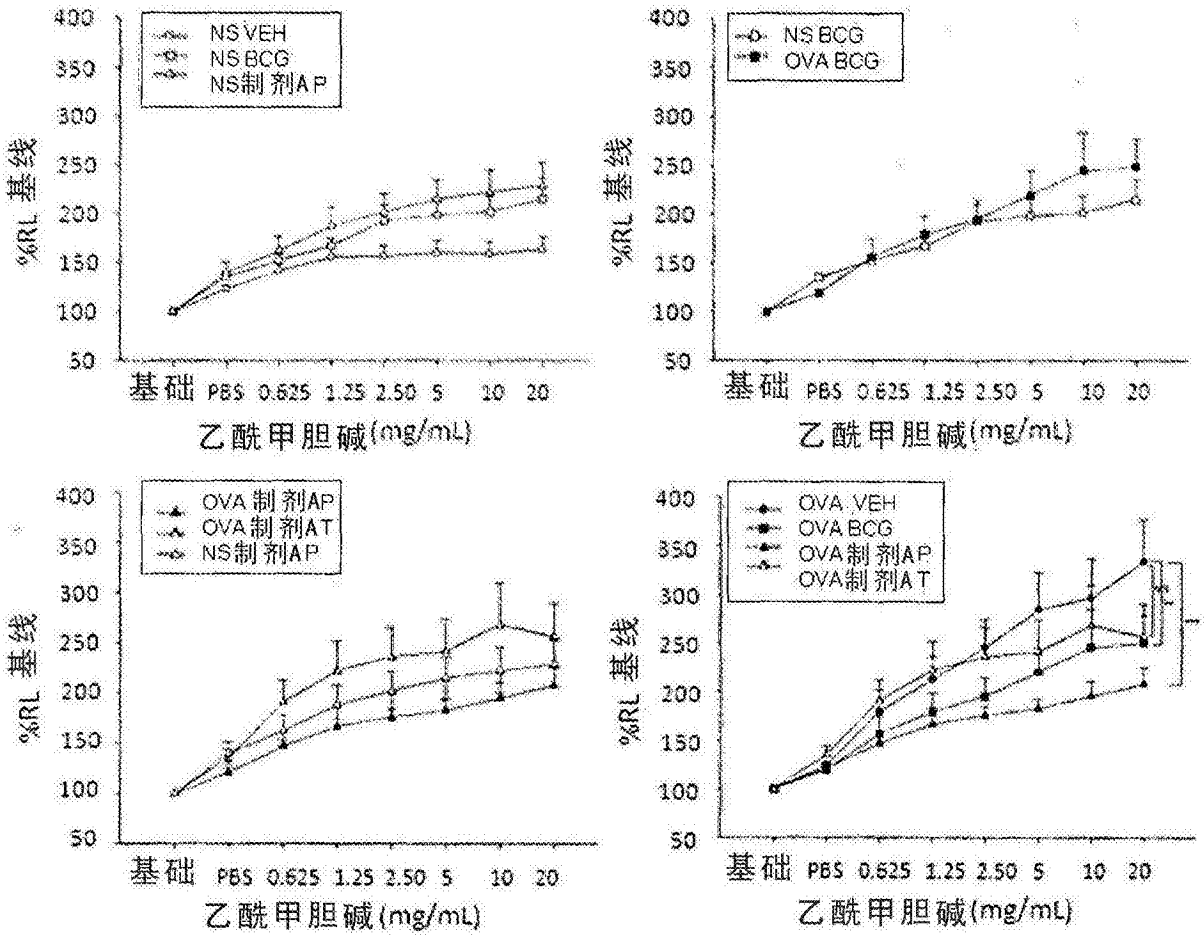
NS VEH
NS BCG
NS制剂AP
NS BCG
OVA BCG
OVA 制剂AP
OVA 制剂AT
NS制剂AP
OVA VEH
OVA BCG
OVA制剂AP
OVA制剂AT
%RL 基线
400
350
300
250
200
150
100
50
基础 PBS 0.625 1.25 2.50 5 10 20
乙酰甲胆碱(mg/mL)

图14

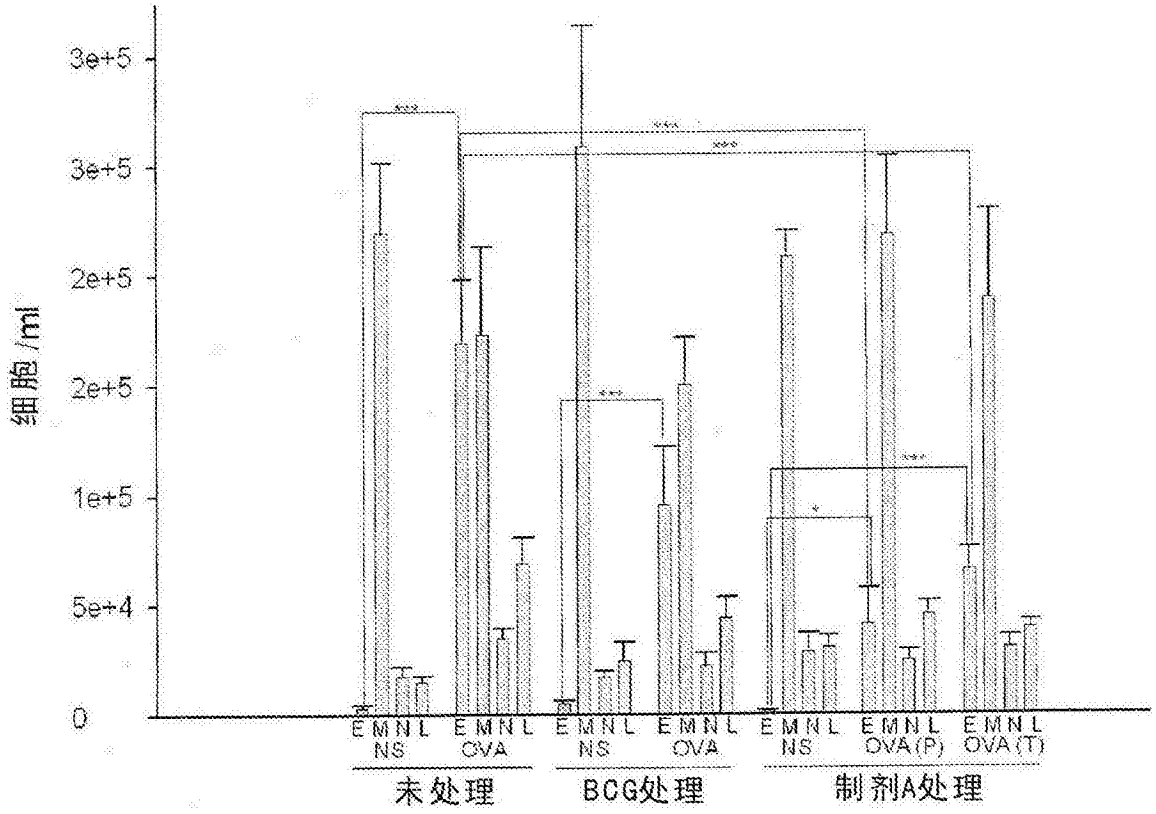
3e+5
3e+5
2e+5
2e+5
1e+5
5e+4
0
细胞/ml
E M N L
NS
OVA
OVA(P)
OVA(T)
未处理
BCG处理
制剂A处理

图15