(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105663171 A
(43)申请公布日 2016.06.15

(21)申请号 201610034562.7
(22)申请日 2010.01.11
(30)优先权数据
0900350.0 2009.01.09 GB
(62)分案原申请数据
201080010410.4 2010.01.11
(71)申请人 剑桥企业有限公司
地址 英国剑桥郡
申请人 莱斯法姆库博拉控股有限公司
(72)发明人 亚历山大·爱德华兹
尼加尔·斯拉特
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
A61K 35/74(2015.01)
A61K 9/20(2006.01)
A61K 47/30(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 1/04(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图6页

(54)发明名称

用于口服递送的活细胞制剂

(57)摘要

本发明涉及用于活微生物细胞的口服递送的固体制剂，其包含干燥的活细胞和少量胆汁酸结合剂，所述胆汁酸结合剂例如诸如消胆胺的阴离子交换树脂。所述制剂中胆汁酸结合剂的存在显著增加肠道中细胞的存活并促进将活细胞递送至肠。

CN 105663171 A

1.用于对个体口服给药的固体制剂,其包含干燥的活细胞和胆汁酸结合剂。

2.如权利要求1所述的固体制剂,其中所述细胞是细菌细胞。

3.如权利要求1或2所述的固体制剂,其中所述胆汁结合剂是带正电的聚合物。

4.如权利要求3所述的固体制剂,其中所述带正电的聚合物是阴离子交换树脂。

5.如权利要求4所述的固体制剂,其中所述阴离子交换树脂是消胆胺。

6.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,其中通过增加细胞中二糖的细胞内水平并在碳水化合物稳定剂的存在下干燥细胞来对所述活细胞进行干燥。

7.如权利要求6所述的固体制剂,其中所述二糖和碳水化合物稳定剂是海藻糖。

8.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,包含:

内核,所述内核包含干燥的活细菌的颗粒和干燥的胆汁结合剂的颗粒。

9.如权利要求1-7中任一项所述的固体制剂,所述固体制剂包含内核,所述内核包含干燥的活细菌,所述内核被包含胆汁结合剂的层包围。

10.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,其中所述干燥的活细胞是溶菌酶敏感性的。

11.如权利要求10所述的固体制剂,其还包含阳离子交换树脂。

12.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,其中所述干燥的活细胞包含异源核酸。

13.如权利要求12所述的固体制剂,其中所述异源核酸编码外源抗原。

14.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,其中所述干燥的活细胞和胆汁结合剂被封装在聚合物壳中。

15.如权利要求14所述的固体制剂,其中所述聚合物壳包含羟丙基甲基纤维素。

16.如前述权利要求中任一项所述的固体制剂,其被肠溶衣覆盖。

17.如权利要求16所述的固体制剂,其中所述制剂包含:

内核,所述内核包含干燥的活细菌和胆汁结合剂;以及

包围所述内核的肠溶衣。

18.如权利要求17所述的固体制剂,其中所述内核被封装在聚合物壳中,所述聚合物壳被所述肠溶衣包被。

19.制备用于口服给药的固体制剂的方法,所述方法包括:

干燥活细胞;以及

将所述干燥的活细胞与胆汁酸结合剂以及任选的药学可接受的赋形剂混合来制备固体制剂。

20.制备用于口服给药的固体制剂的方法,所述方法包括:

将活细胞与胆汁酸结合剂以及任选的药学可接受的载体和/或上文所述的其它材料混合来制备混合物;以及

干燥所述混合物来制备固体制剂。

21.干燥的活细胞和胆汁酸结合剂的组合在人体或动物体的治疗性或预防性处理中的用途。

22.如权利要求1-18中任一项所述的固体制剂在将活细胞递送至个体的肠中的用途。

23.如权利要求1-18中任一项所述的固体制剂在人体或动物体的治疗性或预防性处理中的用途。

24.干燥的活细胞和胆汁酸结合剂的组合在选自以下的治疗性或预防性处理方法中的用途:病原体感染、炎性肠病、免疫接种、免疫治疗和肠的微生物菌群的重新建群。

25.如权利要求1-18中任一项所述的固体制剂在选自以下的治疗性或预防性处理方法中的用途:病原体感染、炎性肠病、免疫接种、免疫治疗和肠的微生物菌群的重新建群。

26.选自病原体感染、炎性肠病、免疫接种、免疫治疗和肠的微生物菌群的重新建群的治疗性或预防性处理的方法,所述方法包括将干燥的活细胞和胆汁酸结合剂的组合给予有需要的个体。

27.选自病原体感染、炎性肠病、免疫接种、免疫治疗和肠的微生物菌群的重新建群的治疗性或预防性处理的方法,所述方法包括将权利要求1-18中任一项所述的固体制剂给予有需要的个体。

28.增加干燥的活细菌细胞的治疗功效的方法,所述方法包括将所述细胞与胆汁酸结合剂一起配制。

用于口服递送的活细胞制剂

[0001] 本发明涉及用于活细胞的口服递送的制剂，所述活细胞例如细菌细胞。

[0002] 目前，口服活细菌递送被用于两种主要类型的治疗应用中。首先，从肠分离物鉴定出的未修饰的肠细菌菌株在抗生素治疗后的肠的重新建群[1]、炎性肠病患者的症状缓解[2]以及生物学治疗递送的基因工程化形式(例如IL-10[3])中具有治疗应用。其次，活细菌是有前景的候选疫苗。目前，测试减毒活细菌的不同菌株在对抗诸如霍乱、肠毒性大肠杆菌和伤寒的疾病中的保护作用的很多人群临床试验正在进行中([4])。活细菌疫苗超过常规疫苗的优势在于它们是口服给药的，这避免了注射和用针。基因工程化的活细菌疫苗还可以携带来自病原体或肿瘤的异源DNA或抗原来刺激或引发对抗病原体或肿瘤细胞的免疫应答。

[0003] 由于稳定性的原因，通常对用于活递送的细菌进行干燥。用于活细菌递送的干燥制剂的备选方案是“湿”的形式，例如诸如酸乳的食品。活细菌在液体形式时具有明显的稳定性问题，即使是冷藏。已经提议了用于细菌口服递送的多种微封装系统[5]，但是都遭受细菌在贮存时降解这一相同问题，并且需要昂贵的冷藏设备来减少降解。

[0004] 制备干燥的细菌的各种技术是本领域已知的。最常见的是使用常规冷冻干燥。此外，最近还关注于使用诸如海藻糖和蔗糖的二糖，二糖能稳定生物分子并使干燥的细菌在室温下更稳定[6]、[7]。二糖稳定化的干燥的细菌可以例如常规贮存在室温下。

[0005] 目前，干燥的活细菌的口服给药是以下两种常见形式：冷冻干燥的细菌的肠胶囊和需要在碳酸氢盐缓冲液中重悬的冷冻干燥的细菌的药囊。通常，给予非常高剂量的细菌，并且需要多剂量才仅产生适当的效果。有趣的是，临床数据表明肠胶囊制剂的功效显著低于碳酸氢盐缓冲液系统[8][15]，但是对肠胶囊为何功效相对较低还知之甚少。

[0006] 对于碳酸氢盐缓冲液系统的作用机制的了解还很少。吞服的碳酸氢盐缓冲液的量不太可能吸收分泌至胃中的酸，所以似乎是以这种方式给药的细菌会遇到一定酸度。尽管存在这些可能的局限，但是在诸如霍乱[9]和肠毒性大肠杆菌[10]的疾病的疫苗菌株的现行的人群临床试验中，与碳酸氢盐缓冲液或相似酸中和缓冲液的共同给药目前是递送的标准模式。

[0007] 胃具有分泌盐酸并将内容物降至pH 1以下的能力。很少的细菌能在该pH下存活[11]，并且已证实干燥的活细菌比来自新鲜培养物的细菌更敏感[12]。“肠溶”衣可以用于避免活细菌制剂在胃酸中死亡。肠溶衣是在酸性条件下不会溶解的聚合物层，但是在胃排空后它会在肠中溶解，从而将干燥的细菌释放到小肠上段。如上文所述，已有的活细菌疫苗的肠胶囊的功效相对较低，尽管它们具有保护细菌对抗胃酸的能力[8]。

[0008] 肠含有酶和其它杀微生物成分的复杂混合物。胆汁是从胆囊分泌到十二指肠中。胆汁通常包含至少50％的胆汁酸，胆汁酸作为清洁剂来溶解和消化脂肪食物成分。胆汁酸在杀细菌方面也很强。诸如沙门氏菌(Salmonella spp.)的通常存在于肠内部位的细菌菌株对于诸如胆汁盐的清洁剂具有演变的抗性机制，这允许它们在肠中存活和生长。

[0009] 细菌在干燥或冷冻后通常丧失了它们对于胆汁酸的抗性。从肠溶制剂中释放入肠的干燥的细菌对于胆汁酸是敏感的，并且不能在肠环境中存活[12]。

[0010] 本发明涉及下述发现:在干燥的活细胞的制剂中掺入少量胆汁酸结合剂能显著增加细胞在肠道中的存活。因此,这些制剂可以用于将诸如细菌细胞的活细胞口服递送至肠。

[0011] 本发明的一方面提供了用于对个体口服给药的固体制剂,其包含干燥的活细胞和胆汁酸结合剂。

[0012] 胆汁结合剂允许水性液体渗入制剂,但是吸收胆汁酸并阻止它们渗入制剂。这能保护干燥的活细胞免受胆汁酸毒性的损害,直至它们被渗入的水性液体再水合并恢复其胆汁耐受性。这可以例如增加将细胞递送至肠的功效。

[0013] 干燥的活细胞可以是微生物细胞。本文所述的制剂中可以使用任何微生物细胞,并且细胞的类型取决于制剂的具体使用目的。

[0014] 在一些实施方案中,可以使用细菌细胞,例如来自肠细菌的细胞。肠细菌是本领域公知的,并且包括病原体和非致病性种类,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),所述肠杆菌科例如埃希氏菌属(Escherichia)、沙门氏菌属(Salmonella)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、肠杆菌属(Enterobacter)、沙雷氏菌属(Serratia)、变形菌(Proteus spp)以及双歧杆菌属(Bifidobacterium)、拟杆菌属(Bacteroides)、梭菌属(Clostridium)、假单胞菌属(Pseudomonas)、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、乳酸杆菌属(Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、弯曲杆菌属(Campylobacter)和链球菌(Streptococcus spp.)。

[0015] 使用本文所述的制剂将肠细菌细胞递送至肠可以用于,例如抗生素治疗后的患者的肠内菌群的恢复以及炎性肠病患者的症状缓解。

[0016] 在其它实施方案中,所述干燥的活的微生物细胞可以是真核细胞,例如酵母或真菌细胞,例如酵母(Saccharomyces spp.)、曲霉(Aspergillus spp.)或念珠菌(Candida spp.)。

[0017] 在一些实施方案中,可以使用具有特定的酶学性质或其它性质的微生物细胞。将所述细胞递送至肠可以用于,例如疾病相关化合物或毒素的分解或代谢或通过影响肠吸收来降低胆固醇水平,所述疾病相关化合物或毒素例如草酸盐,草酸盐是肾结石形成的危险因素。

[0018] 在一些实施方案中,所述微生物细胞可以表达治疗因子,例如表达重组蛋白。合适的重组多肽对于细菌细胞可以是外源的(即所述细菌细胞不会天然表达的多肽,例如人多肽),并且可以对患者具有治疗效果。合适的重组多肽包括细胞因子,包括诸如IL-10的白细胞介素;趋化因子;以及抗体、抗体片段或与免疫应答的介质结合的相关结合分子,所述介质例如细胞因子(例如中和炎性肠病中的TNF-α的细胞因子)。

[0019] 用于表达重组多肽的合适的微生物细胞包括来自乳酸细菌的细胞,,诸如乳酸乳球菌(L.lactis)(European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics(2005)60:349)的乳球菌(Lactococci);肠杆菌科和上文所述的其它肠细菌;以及其它微生物细胞,例如酵母和真菌,例如酵母或念珠菌。

[0020] 在一些实施方案中,所述干燥的活细胞可以是活细菌疫苗的细胞。活细菌疫苗通常是毒力已被减弱的细菌细胞,例如通过使一个或多个毒力基因失活。适于用作疫苗的减毒细菌细胞的很多实例是本领域已知的。

[0021] 细菌疫苗可以是细菌病原体的减毒细胞。减毒疫苗表达病原体的天然内源性抗原可以刺激或引发针对病原体的有毒力的非疫苗菌株的保护性免疫应答。合适的细菌疫苗包

括以下细胞的减毒细胞:霍乱弧菌(Vibrio cholerae);大肠杆菌(E.coli)的肠毒性菌株,例如0157:H7、0121和0104:H21;志贺氏菌(Shigella),例如痢疾志贺氏菌(S.dysenteriae)、宋内志贺氏菌(S.sonnei)、鲍氏志贺氏菌(S.boydii)和福氏志贺氏菌(S.flexneri);弯曲杆菌,例如空肠弯曲杆菌(C.jejuni);和沙门氏菌,例如肠沙门氏菌(Salmonella enterica)(特别是伤寒血清变型)。

[0022] 用于伤寒的治疗或预防性处理的活细菌疫苗是本领域公知的,并且包括伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)菌株Ty21a(Vivotif™)、Ty800、CVD908、CVD908-htr、CVD915和ZH9。

[0023] 用于霍乱的治疗或预防性处理的活细菌疫苗也是本领域公知的,并且包括JBK-70、CVD 101、CVD 102、CVD 104、CVD 105、395N1、JJM43、TCP2、CVD 103、CVD 103-RM、CVD 103-HgR(Mutachol®)、CVD110、Bahrain-3、Peru-3、Peru-5和Peru-15。

[0024] 用于志贺氏菌病和细菌性痢疾的治疗或预防性处理的活细菌疫苗也是本领域公知的,并且包括减毒志贺氏菌的减毒疫苗菌株,例如CVD1204和WRSS1。

[0025] 用于腹泻的治疗或预防性处理的活细菌疫苗也是本领域公知的,并且包括减毒肠毒性大肠杆菌细胞,例如PTL002和PTL003。

[0026] 用于李斯特菌病的治疗或预防性处理的活细菌疫苗也是本领域公知的,并且包括单核细胞增多性李斯特菌(Listeria monocytogenes)的减毒菌株,例如Lmdd。

[0027] 细菌疫苗可以包含编码外源抗原即不是由疫苗细胞天然表达的抗原(例如人或病毒抗原或来自不同细菌种类的抗原)的异源核酸。细菌疫苗可以刺激或引发针对外源抗原的保护性免疫应答,例如当抗原出现在病原体或诸如癌细胞或病毒感染的细胞的疾病细胞的表面上时。

[0028] 术语“异源”表示的核酸序列是重组序列,所述重组序列被人工使用基因工程或重组手段,即通过人为干预,引入构建体、载体或细胞。异源的核苷酸序列在自然界中不会一起出现。对于细胞是异源性的核苷酸或氨基酸序列不会天然存在于该类型、品种(variety)或种类的细胞中(即外源的或外来的)。对于细胞是异源性的核酸序列可以编码异源氨基酸序列,即对于该细胞是外源的或外来的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,异源核酸可以由微生物细胞表达来产生外源抗原。外源抗原可以由微生物细胞分泌、出现在微生物细胞的表面上或保留在微生物细胞的细胞内。

[0030] 在其它实施方案中,异源核酸可以不由微生物细胞表达。例如,异源核酸可以在递送至肠后被转移到个体的宿主细胞并在宿主细胞中表达。可以例如以DNA接种或DNA转移的方法表达异源核酸来产生外源抗原,或者可以例如以RNA干扰的方法表达异源核酸来产生有义或反义RNA分子。

[0031] 可以由异源核酸编码的合适的外源抗原包括疾病相关抗原,例如肿瘤抗原和病毒、细菌和其它病原体的抗原,例如来自于变形链球菌(Streptococcus mutans)、宋内志贺氏菌、大肠杆菌、空肠弯曲杆菌、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、霍乱弧菌、鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、HIV、流感病毒、肝炎病毒、乳头瘤病毒、镰状疟原虫(Plasmodium falciparum)、土拉热弗朗西丝菌(Francisella tularensis)和曼森血吸虫(Schistosoma mansoni)的抗原,或来自肿瘤的抗原,例如Her2/neu或前列腺特异性抗原

(PSA)。

[0032] 其它合适的外源抗原包括来自个体的分子，例如抗体个体基因型，例如用于产生抗个体基因型免疫应答。

[0033] 任选地，细菌疫苗还可以共表达重组异源免疫调节多肽，例如细胞因子，例如TNF-α、GM-CSF、IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、IFN-α、IFN-γ；趋化因子，例如CCL-25；或抑制细胞因子(例如IL-10、TGF-β)或其它免疫应答介导物或免疫细胞(例如调节性T细胞或抑制性T细胞)的抗体或抗体片段或其它结合多肽。这可以用于增强对外源抗原的免疫应答。

[0034] 用于表达外来抗源的合适的细菌疫苗包括活细菌疫苗菌株，例如减毒病原菌，例如肠沙门氏菌、霍乱弧菌、肠毒性大肠杆菌、志贺氏菌和空肠弯曲杆菌；和非病原菌细胞，包括肠细菌，例如肠细菌科；以及其它细菌，例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtlis)和乳酸细菌种类，例如，诸如乳酸乳球菌(Nature Reviews Microbiology(2008)6:349)的乳球菌。

[0035] 固体制剂中的干燥的活细胞可以是同一类型细胞(例如，同一微生物菌株的细胞)的同种群体。可选地，固体制剂中的干燥的活细胞可以是包含不同类型细胞的混合物的异种群体。例如，制剂可以包含细胞两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种或五种或更多种不同类型。不同类型的细胞可以包括微生物的不同菌株或种类的细胞和/或具有不同遗传修饰的细胞。

[0036] 可以将本文所述的制剂给予任何合适的个体。例如，个体可以是人或非人动物，例如啮齿动物(例如豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠类(例如小鼠)、犬科动物(例如狗)、猫科动物(例如猫)、马科动物(例如马)、猪类(例如猪)、灵长类、猿猴类(例如猴或猿)、猴类(例如绒猴、狒狒)、猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)、鸟类(例如鸡)或鱼类(例如鲑鱼、鳟鱼)。

[0037] 例如，包含干燥的活的沙门氏菌细胞的本文所述的制剂可以用作诸如猪和马的非人动物的兽医治疗的疫苗。

[0038] 可以鉴定或选择需要治疗的合适的个体。

[0039] 所述制剂优选包含治疗有效量或预防有效量的干燥的活细胞。

[0040] 本文所用的术语“治疗有效量量”或“预防有效量”是指分别有效产生一定希望的、与合理的收益/风险比相称的治疗或预防性效果的干燥的活细胞的量。

[0041] 本文所述的制剂可以例如包含10^3个或更多个、10^4个或更多个、10^5个或更多个、10^6个或更多个、10^7个或更多个、10^8个或更多个、10^9个或更多个、或10^{10}个或更多个干燥的活细胞。

[0042] 本文所述的制剂中的干燥的活细胞在再水合之后保留至少0.1％、至少1％、至少5％、至少10％、至少20％、至少40％或至少60％的活力。因此，制剂中的大量细胞在再水合之后能具有代谢活性和进行细胞分裂。评价细胞活力的方法是本领域公知的，并且包括，例如集落形成单位(CFU)的平板测定。

[0043] 优选地，当制剂长期贮存在室温下时(例如15℃-30℃，持续24个月或更长)，本文所述的制剂中的干燥的活细胞保留上文所述的活力。

[0044] 相对于未干燥的细胞，干燥的细胞的水分含量降低。例如，相对于干燥前的同一细胞，干燥的细胞可以含有10％或更少、5％或更少、4％或更少、3％或更少、或1％或更少残余水分。

[0045] 可以通过不会显著影响细胞活力的任何方便的方法来干燥适于本文所述用途的

细胞。多种合适的方法是本领域已知的的，包括冷冻干燥、环境温度干燥、喷雾干燥、流化床干燥、泡沫干燥、片剂成粒期间直接干燥和利用冷冻保护剂的冷冻(Potts(2004)Micro Rev 58:755-805;Crowe et al(1990)Cryobiol.27:219-231;Lievense et al(1994)Adv Biochem Eng Biotechnol.51 45-89)。任选地，可以在诸如二糖的稳定剂和/或诸如聚合物的药物赋形剂的存在下进行干燥，所述聚合物例如羟丙基甲基纤维素。

[0046] 在一些实施方案中，可以通过冷冻干燥将细胞冻干。冷冻干燥涉及通过减压升华和脱附从冷冻物质中去除水。合适的冷冻干燥技术是本领域公知的(F.Franks European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1997(45)221-229;Fundamentals of freeze-drying JD Mellor Academic Press 1978)。任选地，可以在诸如二糖的稳定剂的存在下和/或在药物赋形剂或制剂的其它组分的存在下将细胞冷冻干燥，所述二糖例如海藻糖(Israeli et al(1993)Cryobiol 30 519-523;Leslie et al(1995) Appl.Env.Microbiol.61 3592-3597)。

[0047] 在一些实施方案中，可以使细胞进行二糖稳定化的干燥。这可以包括增加细胞中诸如海藻糖的二糖的细胞内水平，并然后在碳水化合物稳定剂的存在下、例如通过蒸发并在减压和非冷冻温度下干燥细胞。合适的碳水化合物稳定剂包括二糖，例如海藻糖、麦芽糖醇、乳糖醇、palatinit、GPS(α-D-吡喃葡萄糖基-1->6-山梨糖醇)、GPM(α-D-吡喃葡萄糖基-1->6-甘露醇)、寡聚麦芽糖和氢化寡聚麦芽糖。合适的二糖稳定化的干燥方法是本领域公知的，并且描述于，例如Crowe JH et al Annu Rev Physiol 1998;60:73-103.Bullifent HL,et al.Vaccine 2000Dec 8;19(9-10):1239-45;Garcia De Castro A,et al Appl Environ Microbiol 2000Sep;66(9):4142-4;US6468782和US6610531。

[0048] 胆汁酸是类固醇酸，其是由肝脏通过胆固醇的氧化产生并作为胆汁的组分被分泌至肠中。胆汁酸包括胆酸、脱氧胆酸和鹅脱氧胆酸。

[0049] 胆汁酸结合剂或螯合剂是结合、吸收或螯合胆汁酸的化合物。合适的胆汁结合剂包括结合胆汁酸的带负电的羧酸首基的带正电的聚合物。结合胆汁酸的带正电的聚合物包括阴离子交换树脂，例如消胆胺(例如Questran™或Dowex 1X2™)、考来替兰、2-甲基咪唑、盐酸考来糖酐、盐酸考来维仑、考来替泊、DEAE-葡聚糖、胺化纤维素、DEAE-纤维素、TEAE-纤维素、Q-琼脂糖、QAE葡聚糖凝胶、四聚羟乙基纤维素乙基氧化物(quaternised hydroxyethyl cellulose ethoxylate)和胺化壳聚糖。

[0050] 合适的带正电的聚合物在本领域内已知能用作降胆固醇剂(cholesterol lowering agent)，并且描述于，例如US4557930、US3308020、US3383281、US3499960、US3780171、WO2005023305和GB929,391。

[0051] 其它合适的胆汁结合剂包括与胆汁酸的疏水性胆固醇尾结合的疏水性聚合物。合适的疏水性聚合物包括聚苯乙烯相关的聚合物。

[0052] 其它合适的试剂还可以包括天然存在的试剂，例如膳食纤维，例如角豆胶(Dongowski Food Chemistry 2007 104:p390-397)或苜蓿(Kritchevsky and Story Journal of Nutrition 1974,104(4):p458-462)、活性碳和骨炭。

[0053] 胆汁结合剂在制剂中可以是任何形状或形式，例如颗粒、粉末、珠、膜或多孔整体。

[0054] 本文所示的数据表明少量胆汁结合剂足以保护干燥的活细胞免受胆汁酸毒性的损害。本文所述的制剂中胆汁结合剂的量通常显著少于结合制剂在个体的肠中所暴露于的

所有胆汁酸所需要的量。

[0055] 固体制剂可以为单元剂量形式，并且可以包含5g或更少、2g或更少、1g或更少、或0.5g或更少的固体物质。

[0056] 本文所述的固体制剂可以包含少于95％(w/w)、少于90％(w/w)、少于80％(w/w)、少于70％(w/w)、少于60％(w/w)、少于50％(w/w)、少于40％(w/w)、少于30％(w/w)、少于20％(w/w)、少于10％(w/w)、少于1％(w/w)或少于0.1％(w/w)的所述胆汁酸结合剂。

[0057] 本文所述的固体制剂可以包含大于5％(w/w)、大于10％(w/w)、或大于20％(w/w)、大于30％(w/w)、大于40％(w/w)、大于50％(w/w)、大于60％(w/w)、大于70％(w/w)、大于80％(w/w)、大于90％(w/w)、或大于95％(w/w)的所述胆汁酸结合剂。

[0058] 制剂中细胞与胆汁酸结合剂的重量比可以为5或更少、1或更少、0.5或更少、0.1或更少、0.01或更少、0.001或更少、或0.0001或更少。

[0059] 制剂中胆汁酸结合剂与细胞的重量比可以为0.2或更多、1或更多、10或更多、100或更多、1000或更多、或10000或更多。

[0060] 在某些优选的实施方案中，干燥的活细胞、胆汁酸结合剂和制剂的其它组分可以被封装在聚合物壳中。

[0061] 聚合物壳可以用于进一步增加制剂的胆汁抗性。

[0062] 优选地，聚合物壳包含两性疏水性-亲水性聚合物，例如羟丙基甲基纤维素(HPMC)。合适的聚合物壳可商购获得。

[0063] 在某些优选的实施方案中，本文所述的固体制剂可以用肠溶衣覆盖。

[0064] ，肠溶衣是不透外层，当制剂通过胃时，其能保护干燥的活细胞免受酸损害，并然后当制剂到达肠时，允许细胞的释放。肠溶衣的使用是本领域公知的。

[0065] 肠溶衣可以是pH敏感的。例如，肠溶衣可以在胃中的酸性条件下(例如pH 1-3)是稳定的，但在肠中的较高pH下(例如高于pH 5.5)可以是不稳定的。

[0066] 用于肠溶衣的合适的聚合材料是本领域公知的，并且可以包括，例如脂肪酸、蜡，shellac™、邻苯二甲酸醋酸纤维素(CAP)、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸共聚物、醋酸琥珀酸纤维素、醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP)、醋酸偏苯三酸纤维素、羧甲基乙基纤维素和甲基异丁烯酸酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0067] 本文所述的固体制剂还可以包含一种或多种其它组分，例如用于根据特定应用修改或调整制剂的性质。

[0068] 例如，制剂还可以包含缓释剂，例如通过形成缓慢腐蚀而释放细胞的稳定凝胶层，肠溶衣溶解后，缓释试剂能控制细胞从制剂释放入肠。

[0069] 合适的缓释剂包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟乙基纤维素、其它修饰的纤维素、诸如瓜尔胶的天然胶、聚乙烯氧化物、聚乙烯醇和聚(乳酸共乙醇酸)。

[0070] 干燥的活细胞可以对胆汁酸之外的肠中的毒素是敏感的，例如溶菌酶；抗微生物肽，例如防御素；和消化酶，例如胃蛋白酶、胰蛋白酶和脂肪酶。制剂还可以包含保护细胞免受这些毒素损害的试剂。例如，制剂可以包含阳离子交换树脂来结合和保护干燥的活细胞免受诸如溶菌酶的带正电的酶的损害。

[0071] 合适的阳离子交换树脂包括离子交换树脂，例如Dowex 50wX1树脂、聚苯乙烯磺酸

钠或诸如羧甲基纤维素或海藻酸的聚合物。

[0072] 制剂还可以包含稳定剂来保持干燥的细胞的活力。合适的稳定剂的实例包括上文所述的碳水化合物。

[0073] 制剂还可以包含一种或多种药学可接受的载体、佐剂、赋形剂、粘合剂、崩解剂、疏松剂、助流剂、稀释剂、填充剂、缓冲液、稳定剂、防腐剂、润滑剂或本领域技术人员公知的其它材料，并任选地包含其它治疗剂或预防剂。在一些实施方案中，制剂还可以包含一种或多种在细菌的释放过程中将制剂保持在肠中的粘膜粘附剂。合适的粘膜粘附剂包括聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、壳聚糖、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素和其它纤维素衍生物。

[0074] 本文使用的术语“药学可接受的”是指在合理的医学判断下，适于与个体(例如人)的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症、与有合理的受益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。在与制剂的其它成分相容的方面上，每种载体、赋形剂等必须也是“可接受的”。

[0075] 合适的载体，赋形剂等可见于标准药学教材，例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy(雷明顿药物科学与实践)，第21版，Mack Publishing Company，Easton，Pa.，2005；和Handbook of Pharmaceutical Excipients(药物赋形剂手册)，第5版，2006，Pharmaceutical Press，London。

[0076] 在本文所述的制剂的制备过程中，可以在制备过程中的任何阶段将胆汁酸结合剂与活细胞组合。

[0077] 例如，可以通过以下制备制剂：干燥活细胞，并然后将干燥的活细胞与胆汁酸结合剂和任选的药学可接受的载体和/或上述其它材料混合。可选地，可以通过以下制备制剂：将活细胞与胆汁酸结合剂和任选的药学可接受的载体和/或上述其它材料混合来产生混合物，并然后将混合物干燥。

[0078] 合适的干燥方法在上文进行了比较详细的描述。

[0079] 干燥的活细胞和胆汁酸结合剂可以与其它药学可接受的载体、佐剂、赋形剂和/或上述其它材料混合；将其压缩、模印或以其它方式制成适于口服递送的制剂；和/或用肠溶衣覆盖以制备制剂。

[0080] 可以测定制剂中的细胞对暴露于胆汁的抗性。可以改变制剂中细胞和/或胆汁结合剂的量以优化细胞对胆汁的抗性。例如，如果在胆汁暴露后从制剂回收的活细胞的数量相对低于对照，则可以增加制剂中胆汁酸结合剂的量。

[0081] 适于口服给药的固体制剂可以由一个或多个分离的单元组成，例如片剂、小丸、丸剂或胶囊。在一些实施方案中，诸如丸剂或胶囊的分离的单元可以包含多个小的子单元，例如颗粒或粉末。

[0082] 口服给药的固体制剂可以方便地以单元计量形式存在，并且可以通过本领域公知的任何方法进行制备。这些方法可以包括使干燥的活细胞和胆汁酸结合剂与由一种或多种附属成分组成的载体结合的步骤。

[0083] 通常，通过将干燥的活细胞和胆汁酸结合剂的混合物与精细分开的固体载体均匀地和紧密地结合，并然后视情况将产品成形来制备制剂。

[0084] 适于口服给药(例如通过摄食)的制剂可以以分离的单元存在，例如胶囊、扁胶囊

(cachet)或片剂,每个单元含有诸如粉末或颗粒形式的预定量的干燥的活细胞和胆汁酸结合剂。

[0085] 可以通过常规手段制备片剂,例如压缩、模印、湿法制粒或干法制粒,任选地与一种或多种附属组分一起进行,例如粘合剂(例如聚乙烯吡咯酮、明胶、阿拉伯胶、山梨醇、黄蓍树胶、羟丙基甲基纤维素);填充剂或稀释剂(例如乳糖、微晶体纤维素、磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅);崩解剂(例如淀粉羟乙酸钠、交联聚乙烯吡咯酮、交联羧甲基纤维素钠);表面活性剂或分散剂或润湿剂(例如月桂硫酸钠);和防腐剂(例如对羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、山梨酸)。例如,可以通过在合适的机器中压缩诸如粉末或颗粒的自由流动形式的活性化合物来制备压缩的片剂,所述活性化合物任选地与一种或多种附属组分混合。可以通过在合适的机器中将用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物进行模印来制备模印片。可以任选地将片剂进行包衣或划痕,并且可以进行配制从而提供其中活性化合物的缓释或控释,例如使用不同比例的羟丙基甲基纤维素或其它缓释剂来提供所需的释放谱。如上文所述,可以任选地向片剂、小丸、丸剂、胶囊和其它固体制剂提供肠溶衣,从而提供在肠部分而不是胃中的释放。

[0086] 可以通过常规手段制备包含由聚合物壳封装的粉末或颗粒形式的干燥的细胞和胆汁酸结合剂的胶囊。

[0087] 可以将组分以各种不同的排列安排在本文所述的制剂中,并且组分的确切排列取决于给定应用所需的具体性质。例如,制剂可以是均质的,即干燥的活细胞和胆汁结合剂可以在制剂中均匀分布,或者制剂可以是非均质的,即干燥的活细胞和胆汁结合剂可以在制剂中非均匀分布。

[0088] 本文所述的制剂中组分的不同排列的实例如图6所示。

[0089] 在一些实施方案中,制剂可以包含内核和包围内核的包衣,所述内核包含活干燥的细菌和胆汁结合剂,所述包衣优选为肠溶衣。任选地,所述包衣可以是封装所述内核的聚合物壳。

[0090] 可选地,制剂可以包含药学可接受的赋形剂的内核,所述内核包含干燥的活细菌的颗粒和干燥的胆汁结合剂的颗粒。任选地,所述内核还可以包含缓释材料的颗粒。任选地,所述内核可以被封装在聚合物壳中。任选地,所述制剂还可以包含包围所述内核的肠溶衣。

[0091] 可选地,制剂可以包含干燥的活细菌的内核,所述内核由胆汁结合剂层包围。任选地,所述胆汁结合剂层还可以包含缓释材料。任选地,所述内核和胆汁结合剂层可以被封装在聚合物壳中。任选地,所述制剂还可以包含包围胆汁结合剂层的肠溶衣。

[0092] 本文所述的制剂在室温下是稳定的,即在室温下(例如15℃-30℃)长期贮存后细胞仍保持是活的。

[0093] 例如,上文所述制剂中胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合可用于将活细胞递送至个体的肠。

[0094] 本文所述的制剂可用于医药、治疗性或预防性用途。例如,上文所述制剂中胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合可用于人或动物体的治疗性或预防性处理。

[0095] 在处理个体的疾病状况的情况下,本文所用的术语“治疗性处理”通常涉及人或非人动物(例如在兽医学应用中)的处理和治疗,其中达到了某些所需的治疗效果,例如,抑制

疾病状况的进展，并且包括进展速度的降低、进展速度的停止、疾病状况或其一种或多种症状的改善和疾病状况的治愈。

[0096] 在处理个体的疾病状况的情况下，本文所用的术语“预防性处理”通常涉及防止或降低疾病状况或其一种或多种症状的发生或复发的风险的处理。例如，可以在下述个体(例如人或非人动物)上进行预防性处理：在处理时未患有疾病状况的个体或未表现出疾病状况的症状的个体。

[0097] 具体而言，例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合可用于个体中病原体感染的治疗性或预防性处理。处理个体中病原体感染的方法可以包括将例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0098] 病原体感染包括细菌感染，例如霍乱(霍乱弧菌)、伤寒(伤寒沙门氏菌)、痢疾(志贺氏菌)、炭疽(炭疽芽胞杆菌)、鼠疫(鼠疫耶尔森菌)、结核(结核分枝杆菌)、麻风(麻风分枝杆菌)、弯曲菌病(弯曲菌)和胃肠炎(肠毒性大肠杆菌和沙门氏菌)；病毒感染，例如流感、HIV-AIDS、天花和SARS；和寄生性感染，例如疟疾(疟原虫)、血吸虫病(血吸虫)。

[0099] 例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合也可以用于免疫接种和/或免疫治疗的方法，例如通过刺激或引发对由细胞编码并优选表达的疾病相关抗原的免疫应答。通过免疫接种或免疫治疗处理个体的方法可以包括将例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0100] 上文所述，疾病相关抗原可以由细胞(例如在减毒细菌疫苗中)天然表达，或疾病相关抗原可以是细胞中从异源核酸表达的外源抗原。

[0101] 细胞还可以包含编码免疫调节多肽的异源核酸，从而导致免疫应答增强，所述免疫调节多肽例如细胞因子，例如TNF-α、GM-CSF、IL-1、IL-6、IL-12、IFN-α或IFN-γ；趋化因子，例如CCL-25；或抑制细胞因子(例如IL-10、TGF-β)或其它免疫应答调节物或细胞(例如调节性或抑制性T细胞)的抗体或其它结合分子。

[0102] 疾病相关抗原包括上文所述的肿瘤抗原和病毒、细菌和其它病原体的抗原。例如，所述细胞可以表达来自病原体的抗原，例如变形链球菌、宋内志贺氏菌、空肠弯曲杆菌、大肠杆菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、霍乱弧菌、鼠疫耶尔森菌、炭疽芽孢杆菌、HIV、流感病毒、肝炎病毒、镰状疟原虫、土拉热弗朗西丝菌或曼森血吸虫，或者所述细胞可以表达来自肿瘤的抗原，例如Her2/neu或前列腺特异性抗原(PSA)，从而引起或引发对病原体或肿瘤的免疫应答。因此，本文所述的制剂可以用于病原体感染和癌症的治疗性和预防性处理。

[0103] 例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合也可以用于将活细胞递送至肠，例如用于恢复个体的肠中的微生物菌群。这例如在抗生素治疗之后可以是有用的。恢复肠的微生物菌群的方法可以包括例如在抗生素治疗之后将例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0104] 例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合也可以用于个体中的炎性肠病或其一种或多种症状的治疗性和预防性处理。处理炎性肠病或其一种或多种症状的方法可以包括将例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0105] 例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合也可以用于个体中肾结石形成的治疗性和预防性处理。处理肾结石形成的方法可以包括将例如上文所述制剂

中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0106] 例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合也可以用于降低个体中胆固醇水平。降低胆固醇水平的方法可以包括将例如上文所述制剂中的胆汁酸结合剂和干燥的活细胞的组合口服给予有需要的个体。

[0107] 胆汁酸结合剂和活的干燥的细胞可以用于制备在任何上述治疗性和预防性应用和处理中使用的药物。

[0108] 合适的制剂、胆汁酸结合剂和干燥的活细菌细胞在上文进行了比较详细描述。

[0109] 本文所述的方法可以用于，例如，提高包含干燥的活细胞例如细菌疫苗的治疗剂的功效。提高所述药剂的功效的方法可以包括如本文所述将所述药剂与胆汁酸结合剂一起配制。

[0110] 本文所述的方法可以用于，例如，增加个体的肠中干燥的活细胞的存活。增加肠中干燥的活细胞存活的方法可以包括如本文所述将所述细胞与胆汁酸结合剂一起配制。

[0111] 本发明的其它方面提供了本文所述的胆汁酸结合剂在本文所述的方法中的用途，所述方法例如，制备用于口服给药的包含干燥的活细胞的固体制剂的方法；增加个体的肠中干燥的活细胞存活的方法或提高包含干燥的活细胞的治疗剂功效的方法。

[0112] 根据本公开，本发明的各个其它方面和实施方案对于本领域技术人员是显而易见的。本说明书中提及的所有文献都通过引用整体并入本文。

[0113] 本文所用的“和/或”应解释为具体公开了两个特定特征或组分中的每一个，包括有另一个或没有另一个的情况。例如“A和/或B”应解释为具体公开了(i)A、(ii)B和(iii)A和B中的每一个，就如同每一个都在本文中单独列出。

[0114] 除非另外指明，上文所示的特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案，并且等同地应用于所述的所有方面和实施方案。

[0115] 现以举例的方式并结合下述附图说明本发明的某些方面和实施方案。

[0116] 图1显示再水合后胆汁耐受性的快速恢复。

[0117] 图2表明使用BAR从胆汁液去除胆汁酸防止了胆汁液对干燥的细菌的毒性。

[0118] 图3表明消胆胺防止了胆汁毒性。

[0119] 图4表明在干燥细菌之前向干燥赋形剂添加BAR在将干燥的细胞重悬于胆汁液中时提供了防毒性的显著保护作用。

[0120] 图5表明向压缩的基体片剂添加BAR提供了防1％胆汁液毒性的显著保护作用。

[0121] 图6显示了口服剂型的可能制剂的三个实例。

[0122] 图7证实了优化的制剂能够保护干燥的活细菌疫苗的细胞免受胆汁的损害。

[0123] 图8显示了使用肠溶衣胶囊和BAR消胆胺保护干燥的活沙门氏菌疫苗免受酸和胆汁的损害。

[0124] 图9显示了使用BAR消胆胺保护胶囊中的干燥的乳酸细菌免受胆汁液的损害。

[0125] 实验

[0126] 我们使用活细菌疫苗菌株SLDAPD pUC18I作为口服细菌递送的模型[13]。细菌在加入250mM NaCl的M9培养基(加有必需氨基酸和养分)中生长过夜，然后在干燥器中将10μl样品在加入40％海藻糖和1.5％PVP的磷酸缓冲盐溶液(PBS)中进行干燥，如([14])所述。使平行样品保持干燥或用200μl PBS或水再水合，并按照所示静置1、5或20分钟。然后，通过以

下测试干燥的或恢复的样品或来自富集培养液培养物的对照细胞:按照所示在酸或胆汁液或对照缓冲液中大量稀释,孵育1小时,然后进行稀释,在琼脂平板上接种并对过夜集落进行计数。根据恢复和测试期间的稀释度校正细菌计数,并表示为相对于最初10μl样品体积的cfu/ml。

[0127] 当在暴露于胆汁之前干燥的细菌在水或缓冲液中再水合,发现干燥的细菌非常快速地恢复了胆汁耐受性。当丢失了50倍活力的细菌的干燥制剂在胆汁中再水合时,在再水合5分钟之内获得了5倍的更好的存活,并在20分钟后获得了20倍的更好的存活(图1)。

[0128] 在缓冲液和水中的再水合获得了相似的结果。到再水合后1小时的时候,细菌的表现与来自液体培养物的对照细胞没有差别。

[0129] 使活细菌疫苗菌株SLDAPD pUC18I[13]和大肠杆菌菌株K12DH5a(Invitrogen)在加入250mM NaCl的M9培养基中生长过夜,然后在干燥器中将10μl样品在PBS/40%海藻糖/1.5%PVP中进行干燥,如[12]所述。将配制在PBS中的5%w/v胆汁液(Sigma,牛胆汁)与或不与10%w/v的消胆胺(Dowex 1x2,Sigma,Poole UK)在室温下混合1小时。通过离心然后过滤(0.2微米,millipore)去除消胆胺。使用酶学检测(Randox总胆汁酸检测,Randox labs,Co.Antrim)测定胆汁盐表明,消胆胺处理使胆汁盐的浓度从130mM降至0.8mM。将得到的溶液添加至干燥的细菌的平行样品并培养1小时,然后稀释、接种、对过夜集落进行计数并计算相对cfu/ml。

[0130] 发现利用BAR去除胆汁酸能有效防止胆汁液对干燥的细菌的毒性(图2)。图2还表明对细菌大肠杆菌K12的不同菌株的干燥样品的高胆汁毒性,并且表明消胆胺的预处理也能保护这些干燥的细胞。

[0131] 将10μl SLDAPD pUC18I(含有氨苄西林抗性基因)的干燥的样品在6ml测试管中进行干燥。向平行样品中干燥的细胞的顶部不添加任何物质或添加150mg消胆胺。然后,2ml配制在PBS中的2%胆汁液或对照PBS添加至消胆胺,然后在37℃下孵育1小时。孵育后,获取样品、稀释、接种并对具有或不具有氨苄西林的琼脂平板上的过夜集落进行计数并计算相对cfu/ml。在将消胆胺添加至细菌样品之前,通过用70%乙醇进行预处理并充分干燥,将消胆胺灭菌。此外,在有或没有氨苄西林的情况下都发现相同数量的集落,这表明仅存在细菌的测试菌株并且未发生污染。

[0132] 发现向干燥的细菌的顶部添加BAR然后添加胆汁液能阻断胆汁液的毒性。这表明相继去除胆汁然后向干燥的细菌给予清除胆汁酸的液体对于保护细菌是不需要的,并且表明与BAR复合的胆汁酸对干燥的细菌没有毒性(图3)。

[0133] 将10μl SLDAPD pUC18I的平行样品悬浮在对照赋形剂(配制在PBS中的40%海藻糖、1.5%PVP)或含BAR的赋形剂(配制在PBS中的40%海藻糖、1.5%PVP加5或10%消胆胺)中,并在6ml测试管中进行干燥。向平行样品添加2ml 2%或0.4%胆汁液或对照缓冲液,并将管在37℃下孵育1小时,然后进行采样、稀释和在琼脂平板上接种。发现在干燥赋形剂中加入BAR能为干燥的细菌提供防胆汁的有效保护,即使BAR的量不能结合测试溶液中存在的全部胆汁酸(图4)。

[0134] 重要的是,当BAR简单地结合和螯合胆汁酸时,不会预期到具有保护作用,在这样的条件下,发现简单干燥细菌同时将少量消胆胺添加到干燥赋形剂能提供明显的保护作用。在图4中,消胆胺的存在量远小于测试培养基中存在的胆汁酸的总量。消胆胺的能力为

每1mg结合1.2mg胆汁盐(这是通常值,精确值取决于结合的是哪种胆汁酸[14])。因此,在10μl干燥的细菌样品中存在1mg消胆胺,其能力为1.2mg胆汁酸,而在2ml 2%胆汁液中总共存在20mg胆汁酸(通常使用的牛胆汁含有以重量计超过50%的胆汁酸),大于消胆胺的能力所能结合的胆汁酸的15倍。

[0135] 将SLDAPD pUC18I细胞在标准赋形剂(配制在PBS中的40%海藻糖、1.5%PVP)中进行干燥,然后要研钵中研磨成粉。按照以下,将干燥的细菌的粉末以仔细称重的比例混合:

[0136] 对照片剂-蔗糖填充剂:9%干燥的细菌粉末/91%蔗糖粉末

[0137] 对照片剂-MCC填充剂:8%干燥的细菌粉末/92%微晶纤维素(MCC,Avicel PH101)

[0138] BAR片剂-消胆胺:8%干燥的细菌粉末/33%消胆胺/58%MCC填充剂

[0139] BAR片剂-Dowex 1X2:6%干燥的细菌粉末/63%Dowex 1X2 400目树脂/32%MCC填充剂

[0140] 然后,将70-90mg混合粉末样品在压机(来自International Crystal Laboratories的Port-A压机,由Crystan Ltd提供,使用10牛米的力矩)中的7mm模具中进行压缩,从而制备厚度为约1mm的压缩基体片剂。然后,按照以下在模拟的肠条件下测试片剂:将片剂称重并单独加入至17ml的国际药典模拟的肠液部分,所述模拟的肠液即单独的磷酸钠/磷酸钾缓冲液(pH7.0)或加入了1%牛胆汁液的磷酸钠/磷酸钾缓冲液(pH7.0),并在37℃下孵育45分钟。取样、稀释、接种过夜并将活cfu进行计数。以干燥的细菌的原始重量为准表达恢复的细菌计数,即以干燥的细菌的cfu/mg形式表达,并且每个柱代表单一片剂,误差棒代表该片剂的多个细菌计数。

[0141] 发现含有BAR加干燥的细菌的原型人用片剂在模拟的肠释放模型中能提供明显的胆汁保护作用(图5)。我们测试了含有活干燥的细菌的片剂,所述的片剂添加了或没有添加BAR消胆胺或等同的离子交换树脂Dowex1x2,所述测试是通过将片剂溶解于缓冲液和胆汁液,并进行比较。对于含有稀释于作为填充剂的蔗糖的干燥的细菌的对照片剂,将其溶解于1%胆汁液时恢复的细胞比将其溶解于单独缓冲液时恢复的细胞少1228倍,这表明明显的胆汁毒性。相似地,对于使用MCC作为填充剂制备的片剂,将其溶解于1%胆汁液时恢复的细胞比将其溶解于单独缓冲液时恢复的细胞少638倍。相比之下,对于除干燥的细菌和MCC填充剂之外还含有消胆胺或Dowex 1X2树脂的片剂,将其溶解于胆汁时的活细胞恢复仅减少2.5-3.1倍。这表明与对照片剂相比,BAR片剂的活细胞提高了208-254倍。重要的是,消胆胺片剂最多含有24mg消胆胺,24mg消胆胺的能力可以结合最多29mg胆汁酸,而17ml的1%胆汁液含有约85mg胆汁酸,因此消胆胺不是简单地螯合测试溶液中过量的全部胆汁酸。

[0142] 不希望以任何方式被理论限制,该制剂可能具有如下的作用机制:赋形剂中的消胆胺与有限量缓冲液中存在的胆汁酸结合,所述缓冲液被干燥的样品吸收,并因此干燥的细菌在“清洁”水中再水合,这允许如图1所示的快速恢复。随后,当再水合的样品崩解并分散于胆汁液中时,细菌已经恢复了显著的胆汁抗性。

[0143] 即使是对于由添加至干燥赋形剂的BAR组成的简单的实验制剂,当将该试剂重悬于2%胆汁液中时,BAR制剂(10%消胆胺)恢复的活细菌多于对照制剂50倍,这表明了显著的提高。与具有常规干燥赋形剂的常规对照制剂的活细胞恢复减少270倍相比,这表明当重悬于2%胆汁时该制剂的活细胞恢复减少5倍。相似地,对于在片剂压缩之前将BAR与干燥的细菌混合而制得的压缩基体片剂制剂,当含BAR的片剂制剂与对照制剂重悬于2%胆汁液

时，含BAR的片剂制剂恢复的活细菌多于对照制剂恢复的活细菌208-254倍，这表明了显著的提高。与常规对照片剂制剂的活细胞恢复减少1228-638倍相比，这表明含BAR的片剂制剂溶解于1％胆汁时活细胞恢复减少2.5-3.1倍。

[0144] 测试了优化制剂保护干燥的活细菌疫苗免受胆汁损害的能力。

[0145] 在这些实验中，使用了鼠疫疫苗菌株SL3261/pAHL[17]；使用无抗生素质粒保持菌株SLDAPD/pUC18I[12,16,13]获得了相似结果。使用含有对于SLDAPD/pUC18I的氨苄西林或对于SL3261/pAHL的卡那霉素的LB琼脂板计数细菌，从而确保仅计数了疫苗细菌。按[12,16]所述培养和干燥细菌，并然后将数个平行干燥制备物收集在一起并将其在研钵中研磨为均质粉末，并将粉末与干燥的MCC混合以制备制剂的自由流动粉末并填入胶囊。该粉末通常含有2-5×10^6cfu/mg，并将其在室温下保存在真空干燥器中直至测试；该制剂在2个月中表现出少于10％的活力丢失。

[0146] 将该粉末以25％与MCC填充剂加BAR混合，然后直接称重至测试管中或填入标明的壳材料的00号胶囊并称重至测试管中。每克总粉末添加20-30mg细菌，从而确保每个胶囊包含6-10mg干燥的细菌粉末。使用Cap-M-Quick(Value Healthcare Company,Sheffield UK)将混合的粉末手动填入标明的壳材料的00号胶囊；将直径6.4mm的钢球负重加至胶囊使胶囊在溶解时沉下。

[0147] 添加25ml缓冲液或1％或4％牛胆汁并在37℃下孵育50分钟，然后将管充分混合，取样、稀释、在含卡那霉素琼脂板上接种，并孵育过夜。将集落进行计数并用于确定活细胞数，结果表示为CFU/mg干燥的疫苗最初的粉末。使用鼠疫疫苗菌株SL3261/pAHL的干燥的稳定化的细胞；在使用疫苗菌株SLDAPD/pUC18I的干燥的细胞的单独实验中，观察到相似的保护作用。

[0148] 用快速释放的HPMC胶囊壳研究了不同BAR类型对胆汁保护作用的影响。快速释放的HPMC胶囊是改良的HPMC胶囊，其被设计用于提供比常规HPMC胶囊更快的释放。成像研究预测，通过简单地去除水分而产生自由流动的非聚集粉末，能显著提高400目Dowex 1x2提供的保护作用，并且事实上，当将干燥的400目Dowex 1x2以25％添加至干燥的LBV和MCC填充剂时，观察到了明显的差异，干燥的400目Dowex 1x2提供的保护作用是无胶囊粉末的92倍。相比之下，400目Dowex 1x2的湿制剂未提供明显的保护作用(图7a)。此外，消胆胺提供的保护作用强于干燥的400目Dowex 1x2，消胆胺提供的保护作用是无胶囊粉末的120倍，并且与溶解于缓冲液相比，溶解于1％胆汁时未表现出明显的细菌损失(图7a)。

[0149] 然后，我们制备并测试了胆汁浓度增加的优化制剂。该制剂包括了成像和理论研究所预测的保护性特征，即25％消胆胺、增加的剂量大小和胶囊几何性质，并且也使用常规HPMC胶囊测试该制剂。

[0150] 添加25％消胆胺BAR导致在4％胆汁条件下HPMC胶囊中活细胞的100％恢复，细胞恢复在胆汁和缓冲液之间没有差异(图7b)。此外，当快速释放的HPMC胶囊也填装了25％消胆胺和干燥的LBV时，与溶解于缓冲液相比，溶解于4％胆汁未检测到明显的细菌损失(图7b)。因此，简单地将25％消胆胺添加至干燥的LBV制剂可以提供对4％胆汁的4200倍的保护作用。猪胆汁的组成更接近于人胆汁的组成[8]，也观察到了对1％、4％和8％的猪胆汁的相似的高度保护作用，这证实了该优化制剂可以保护干燥的疫苗细菌免受过量浓度的胆汁酸的损害。

[0151] 在片剂中包含BAR提供了对胆汁液的保护作用，所述胆汁液含有的胆汁酸的量远远超过所述片剂中的BAR的最大能力[16]。相似地，在胶囊实验中，消胆胺的总量为75mg(300mg粉末的25％)，其能够结合的最大量为218-292μmole胆汁酸[4]。将该胶囊添加到含有总共2500μmole胆汁酸的25ml的4％胆汁液中，这表示胆汁酸超过BAR能力的8-11倍，这表明与片剂一样，含BAR的胶囊在干燥的细菌恢复胆汁耐受时提供了暂时的保护作用，而不是简单地螯合测试样品中的全部胆汁酸。

[0152] 测试了肠溶衣胶囊和BAR消胆胺保护干燥的活沙门氏菌疫苗免受酸和胆汁损害的能力。

[0153] 按照与上述实验相同的方式，培养和干燥SL3261/pAHL细菌。将干燥的细菌粉末与微晶纤维素和消胆胺以1:75:25(细胞:MCC:消胆胺)的比例混合。将该粉末填入00号标准HPMC胶囊，大约每个胶囊300mg，利用小球负重将胶囊在溶解测试过程中沉下。胶囊是无包衣的或每一侧在10％w/v肠溶聚合物溶液中各浸入一次，所述肠溶聚合物溶液是溶解于甲醇和二氯甲烷的3:2v/v混合物的甲基丙烯酸:丙烯酸乙酯共聚物(Kollicoat MAE 100P，BASF，Mannheim Germany)，然后将胶囊干燥过夜。

[0154] 将5个肠溶衣胶囊分别浸入37℃的20ml 0.1M HCl持续40分钟来模拟胃中的胃酸；正如预期，肠溶衣防止胶囊壳被酸溶解或渗透。然后，将这5个胶囊转移到溶解于磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中的2％牛胆汁。同时，将2个包衣的胶囊和3个无包衣的胶囊分别添加到20ml磷酸盐缓冲液(pH7.0)(缓冲液)；同时，将2个包衣的胶囊分别添加到20ml 0.1M HCl。然后，所有胶囊在37℃下孵育1小时，然后充分混合。无包衣的胶囊在1小时内完全溶解于酸中。再过1小时后(共孵育2小时)，取样、稀释、并在含卡那霉素的琼脂板上接种，然后孵育过夜。计数集落并计算活细胞恢复，将活细胞恢复表示为集落形成单位/ml；每个柱表示1个胶囊，误差棒表示1个标准差。

[0155] 发现无包衣的胶囊能将大量活细胞释放入缓冲液，但在酸中不能恢复活细胞。相比之下，对于浸酸后的肠溶包衣胶囊，在缓冲液和胆汁中恢复了相似数量的活细胞(参见图8)。这表明含有BAR消胆胺的肠溶包衣的固体制剂保护干燥的活异源抗原细菌疫苗细胞免受胃酸和随后的肠胆汁的损害。

[0156] 测试了含BAR消胆胺的胶囊保护干燥的乳酸细菌免受胆汁液损害的能力。通过发酵过程和冷冻干燥以商业方法制备了粉末形式的活乳酸细菌。生产商测试了培养物的沙门氏菌和其它病原体，并将其提供为适于人消费的食品补充剂。

[0157] 将含干酪乳酸杆菌(Lactobacillus caseii)的干燥的乳酸细菌粉末与含有或不含有50％w/wBA消胆胺的微晶纤维素(MCC)填充剂混合，然后将混合物填入具有用于沉没胶囊的1g小球负重的HPMC胶囊。胶囊含量的13-15％w/w是细菌，对应于300mg胶囊中的39-45mg，即9.8×10^{9}-11×10^{9}CFU/胶囊的范围。将个体胶囊添加到含有25ml对照磷酸盐缓冲液(pH7.0)或标明浓度的配制在磷酸盐缓冲液中的牛胆汁和猪胆汁的50ml管中，在37℃下持续1小时。取样、稀释并将部分接种于琼脂培养板上，在37℃下孵育72小时，然后计数菌落并计算集落形成单位(CFU)，从而表明相对于添加至胶囊的干燥的乳酸粉末的初重的活细胞数。每个柱代表4个分别测试的胶囊的平均值。

[0158] 当在对照缓冲液中分散时，发现含有仅与MCC填充剂混合的细胞的对照胶囊能释放预期的大量活干酪乳酸杆菌细胞；相比之下，剂量渐增的胆汁使活细胞恢复减少，4％牛

胆汁提供超过30倍的杀伤。当将将消胆胺添加到与细菌和填充剂粉末混合的胶囊中时，对于4％牛胆汁，观察到少于3倍的损失，这提供了超过10倍的针对该高剂量胆汁的保护作用。对于猪胆，汁观察到了相似的结果(图9)。这表明使用BAR消胆胺可以保护乳酸细菌的冷冻干燥的商业食品级制剂免受胆汁的损害。

[0159] 上述实验数据表明，如果对胆汁敏感的干燥的细菌在暴露于胆汁之前进行再水合，则能够快速恢复对胆汁的耐受性，并且用胆汁酸螯合剂预处理胆汁液防止对干燥的细菌的胆汁毒性。此外，在干燥的细菌的顶部添加胆汁酸螯合剂被证实能防止胆汁毒性，并且与在常规赋形剂中干燥的细菌相比，在干燥之前向赋形剂添加胆汁酸螯合剂也提供了防胆汁毒性的明显保护作用。与不含胆汁酸螯合剂的对照片剂或胶囊相比，含有胆汁酸螯合剂的基体片剂和胶囊在添加到胆汁液时也表现出增加的活细菌释放。

[0160] 在无胆汁酸的再水合之后，发现干燥的细菌能非常快速地恢复胆汁抗性。这表明，通过具有胆汁保护的再水合，可以允许干燥的细菌以口服递送形式在肠中恢复。

[0161] BAR常规用于螯合胆汁酸和阻断重吸收，但在之前还未被证实能调节肠中胆汁酸的作用。

[0162] 上述数据还表明，如果干燥的细菌和胆汁酸结合剂共同存在，则胆汁酸的毒性被阻断，即在胆汁酸结合剂的存在下，胆汁酸不能杀死干燥的细菌。这表明可以在体内保护干燥的细菌免于胆汁酸毒性的损害。

[0163] 上述数据还表明：如果在胆汁酸结合剂的存在下干燥细菌，则能提供防胆汁毒性的足够保护，即使是在测试管中胆汁酸的总量远超过干燥的细菌制剂中存在的胆汁酸结合剂的总能力的情况下。

[0164] 因此，可以将胆汁酸螯合剂掺入剂量制剂中来增加将活细菌递送至肠的效率。当由常规肠溶递送系统释放入肠时，胆汁酸螯合剂会保护干燥的细菌免受胆汁酸的损害，这给予了细菌进行再水合而不受胆汁酸毒性的时间，从而允许恢复胆汁耐受性并提高活细菌至肠的递送。例如，本文所述的制剂保护含有重组抗原(质粒中的鼠疫F1抗原)的细菌疫苗(菌株SL3261/pAHL)和乳酸细菌干酪乳酸杆菌的商业干燥制剂免受胆汁损害。此外，肠溶衣以及胆汁酸螯合剂的存在保护剂量制剂免受相继的酸和胆汁液的暴露(模拟摄入)的损害。

[0165] 参考文献

[0166] [1]Bergogne-Berezin E.Int J Antimicrob Agents 2000Dec;16(4):521-6.

[0167] [2]Bohm SK,Kruis W.Ann N Y Acad Sci 2006 Aug;1072:339-50.

[0168] [3]Huyghebaert N et al Eur J Pharm Biopharm 2005Aug;60(3):349-59.

[0169] [4]Levine MM.Vaccine 2006 May 1;24(18):3865-73.

[0170] [5]Prakash S et al Appl Biochem Biotechnol 2006 Jan;128(1):1-22.

[0171] [6]Crowe JH,et al Annu Rev Physiol 1998;60:73-103.

[0172] [7]Bullifent HL et al.Vaccine 2000 Dec 8;19(9-10):1239-45.

[0173] [8]Fraser A et al Vaccine 2007 Nov 7;25(45):7848-57.

[0174] [9]Sack DA et al Infect Immun 1997 Jun;65(6):2107-11.

[0175] [10]McKenzie R et al.Vaccine 2008 Aug 26;26(36):4731-9.

[0176] [11]Foster JW.Nat Rev Microbiol 2004 Nov;2(11):898-907.

[0177] [12]Edwards AD,Slater NK.Vaccine 2008 Aug 30.

[0178] [13]Garmory HS et al.Infect Immun 2005 Apr;73(4):2005-11.

[0179] [14]Honda Y,Nakano M.Chem Pharm Bull(Tokyo)2000Jul;48(7):978-81.

[0180] [15]Levine MM,et al Lancet 1990 Oct 13;336(8720):891-4.

[0181] [16]A.D.Edwards,N.K.Slater Vaccine 27(29)(2009)3897-3903.

[0182] [17]H.L.Bullifent et al Vaccine 19(9-10)(2000)1239-1245.

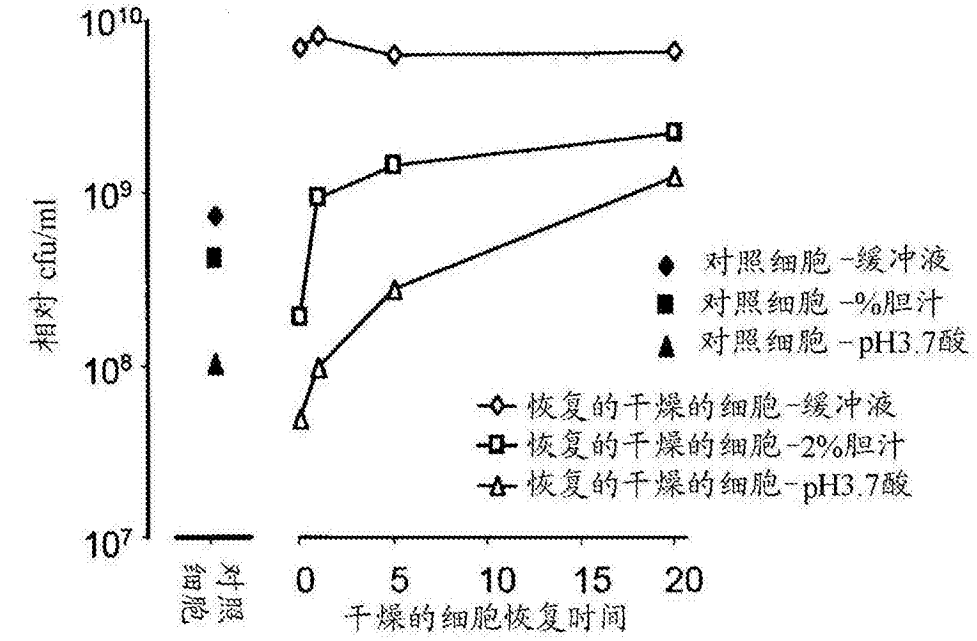

10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
相对 cfu/ml
对照细胞
0
5
10
15
20
干燥的细胞恢复时间
对照细胞-缓冲液
对照细胞-%胆汁
对照细胞-pH3.7酸
恢复的干燥的细胞-缓冲液
恢复的干燥的细胞-2%胆汁
恢复的干燥的细胞-pH3.7酸

图1

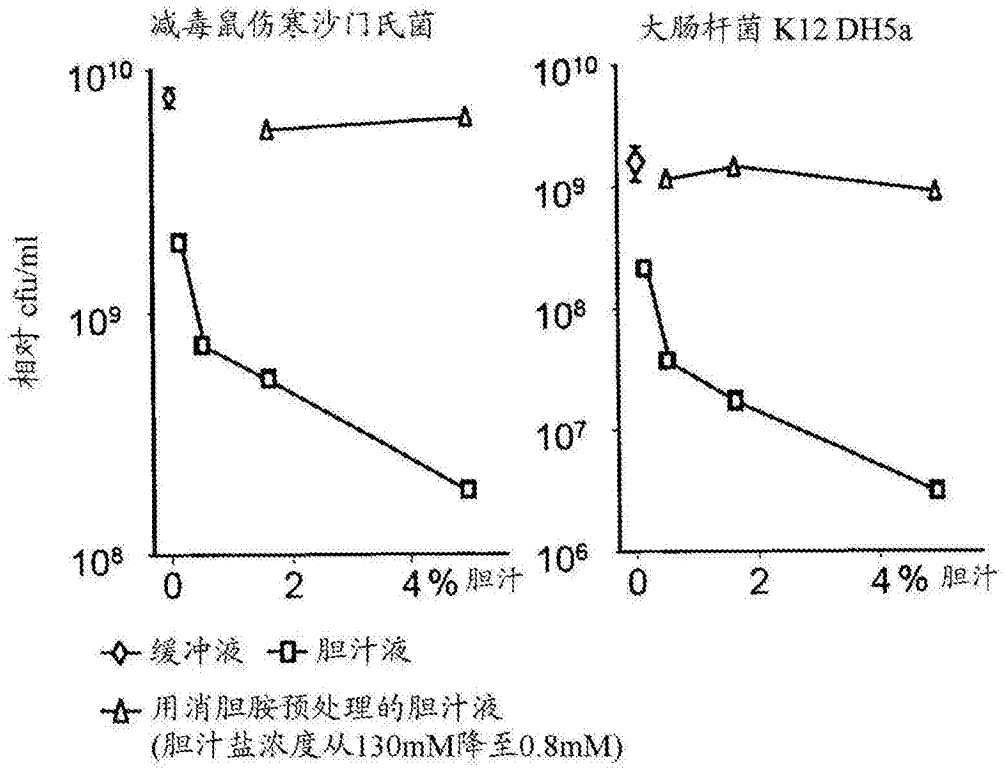

减毒鼠伤寒沙门氏菌
大肠杆菌 K12 DH5a
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
相对 cfu/ml
0
2
4%胆汁
缓冲液
胆汁液
用消胆胺预处理的胆汁液
(胆汁盐浓度从130mM降至0.8mM)

图2

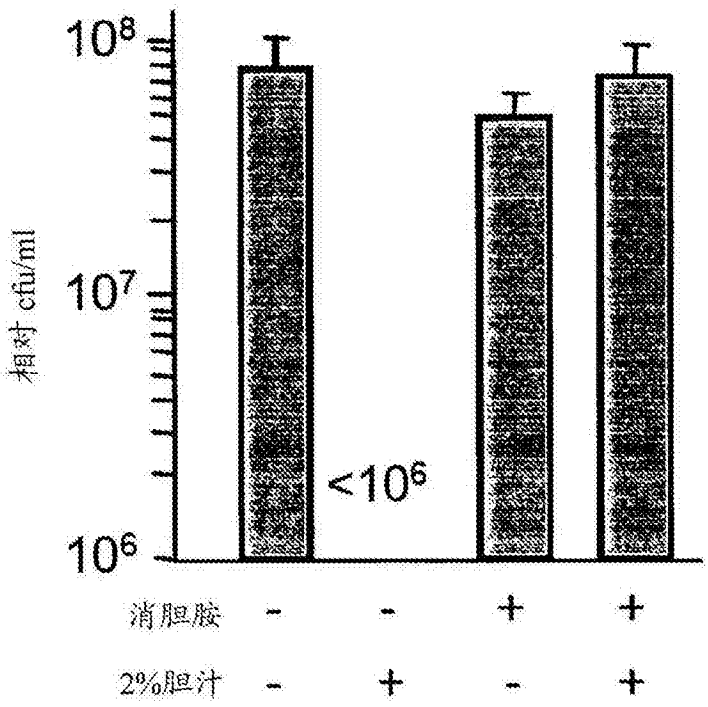

10^8
10^7
10^6
相对 cfu/ml
<10^6
消胆胺 - - + +
2%胆汁 - + - +

图3

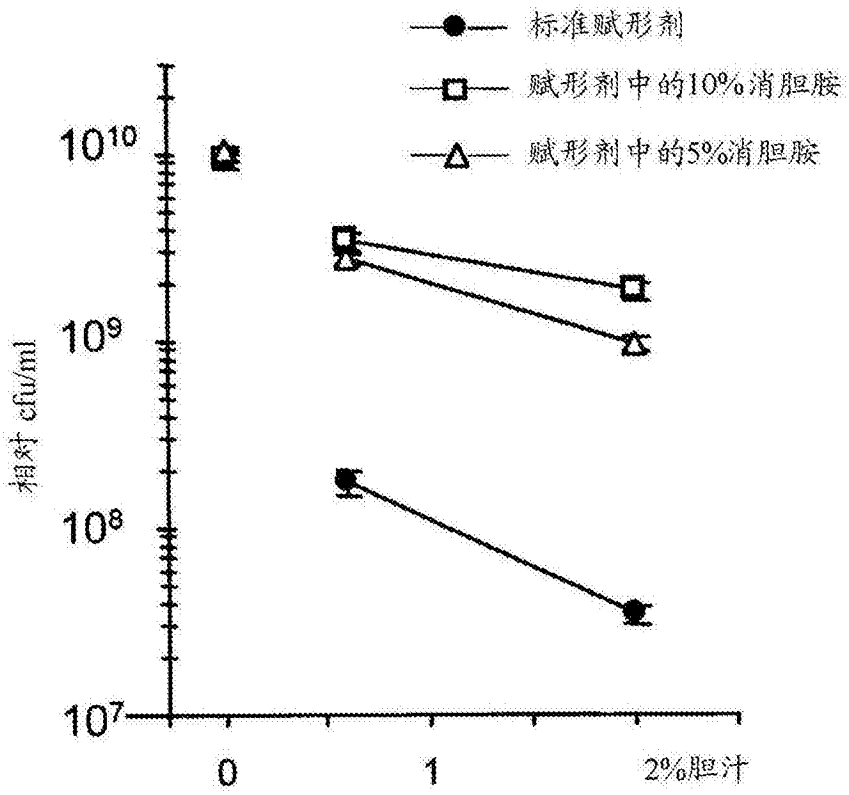

标准赋形剂
赋形剂中的10%消胆胺
赋形剂中的5%消胆胺
10^{10}
10^9
10^8
10^7
相对 cfu/ml
0
1
2%胆汁

图4

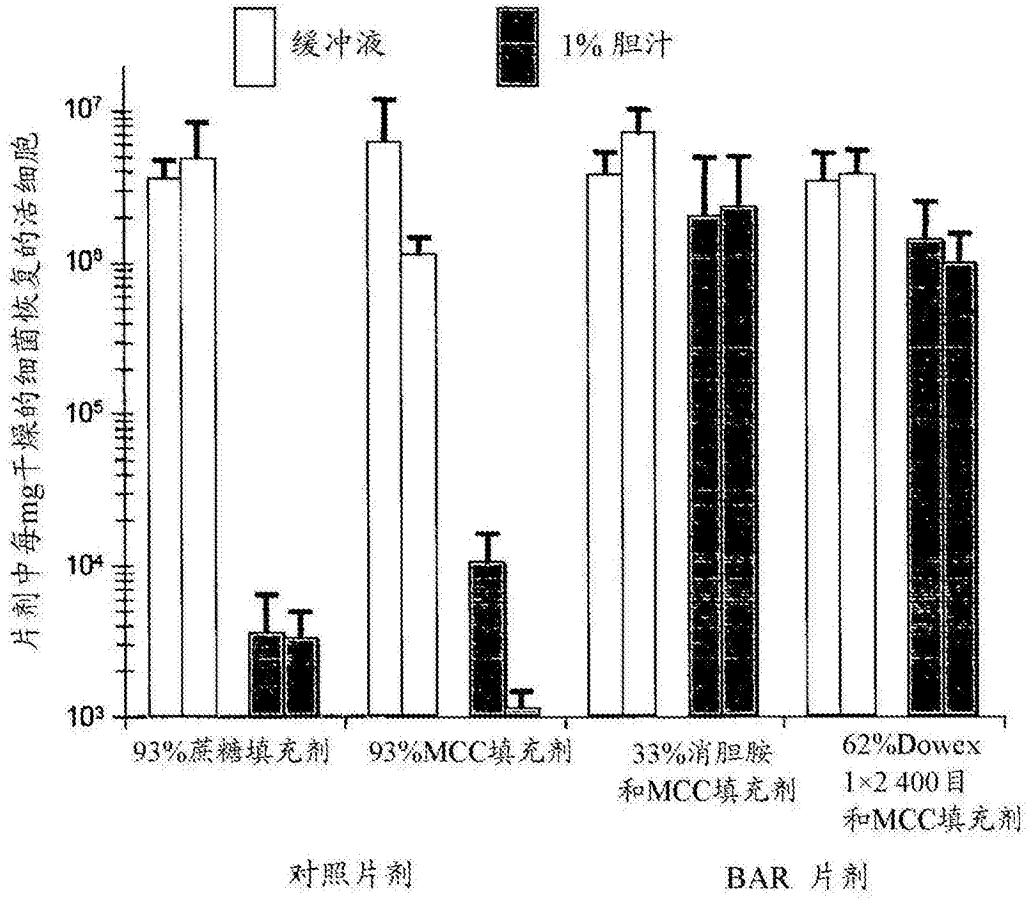

缓冲液
1% 胆汁
片剂中每mg干燥的细菌恢复的活细胞
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
93%蔗糖填充剂
93%MCC填充剂
33%消胆胺和MCC填充剂
62%Dowex 1×2 400目和MCC填充剂
对照片剂
BAR 片剂

图5

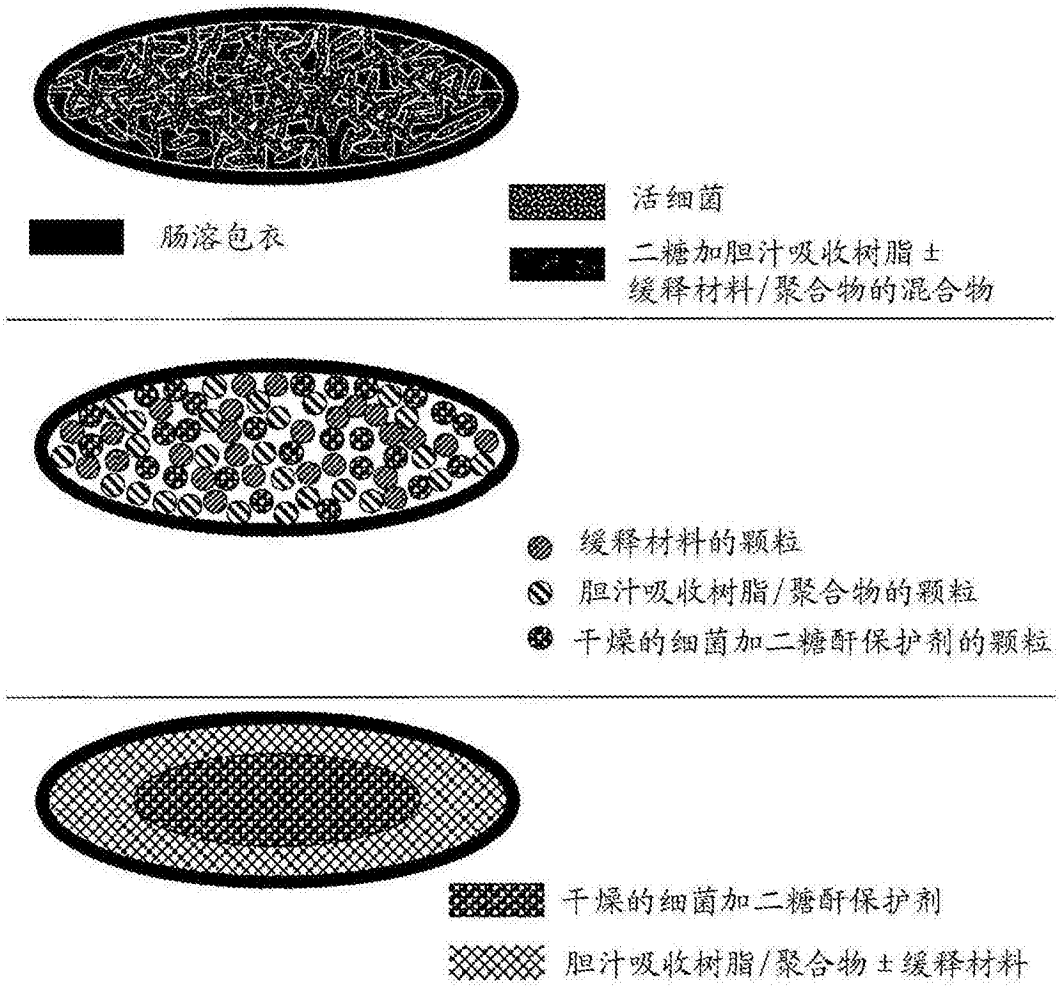

肠溶包衣
活细菌
二糖加胆汁吸收树脂±
缓释材料/聚合物的混合物
缓释材料的颗粒
胆汁吸收树脂/聚合物的颗粒
干燥的细菌加二糖酐保护剂的颗粒
干燥的细菌加二糖酐保护剂
胆汁吸收树脂/聚合物±缓释材料

图6

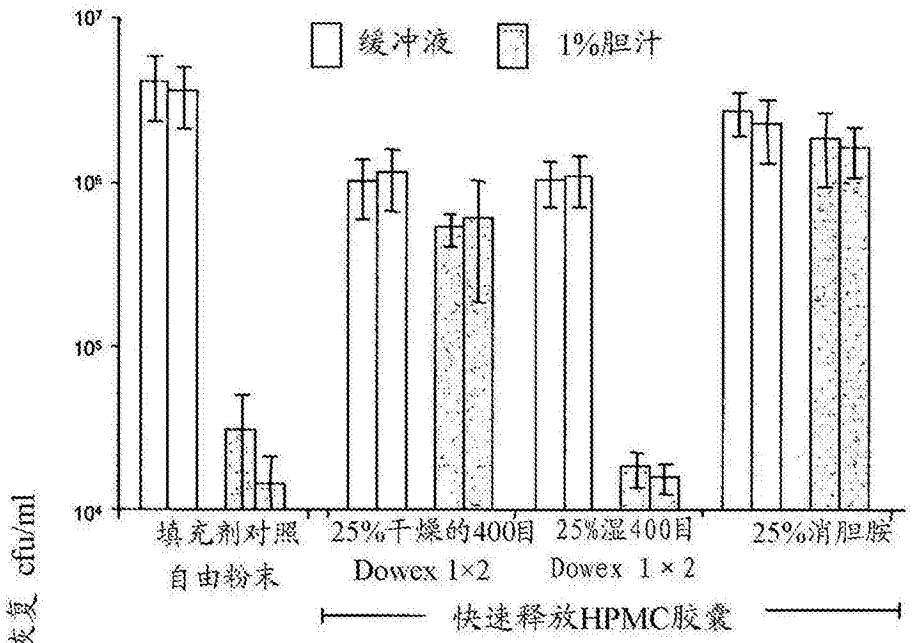

缓冲液
1%胆汁
10^7
10^6
10^5
10^4
等量活细菌枚数 cfu/ml
填充剂对照
自由粉末
25%干燥的400目
Dowex 1×2
25%湿400目
Dowex 1×2
25%消胆胺
快速释放HPMC胶囊

图 7a

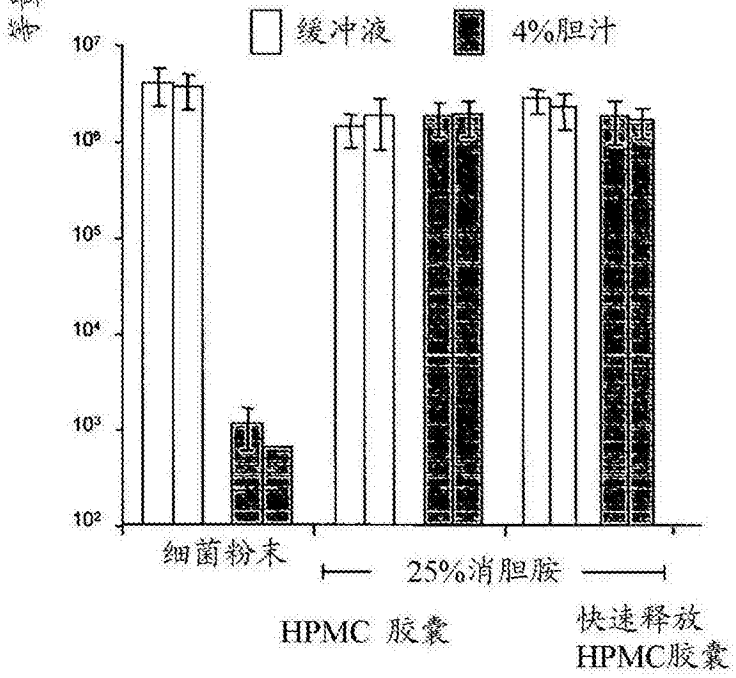

缓冲液
4%胆汁
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
细菌粉末
25%消胆胺
HPMC 胶囊
快速释放
HPMC胶囊

图 7b

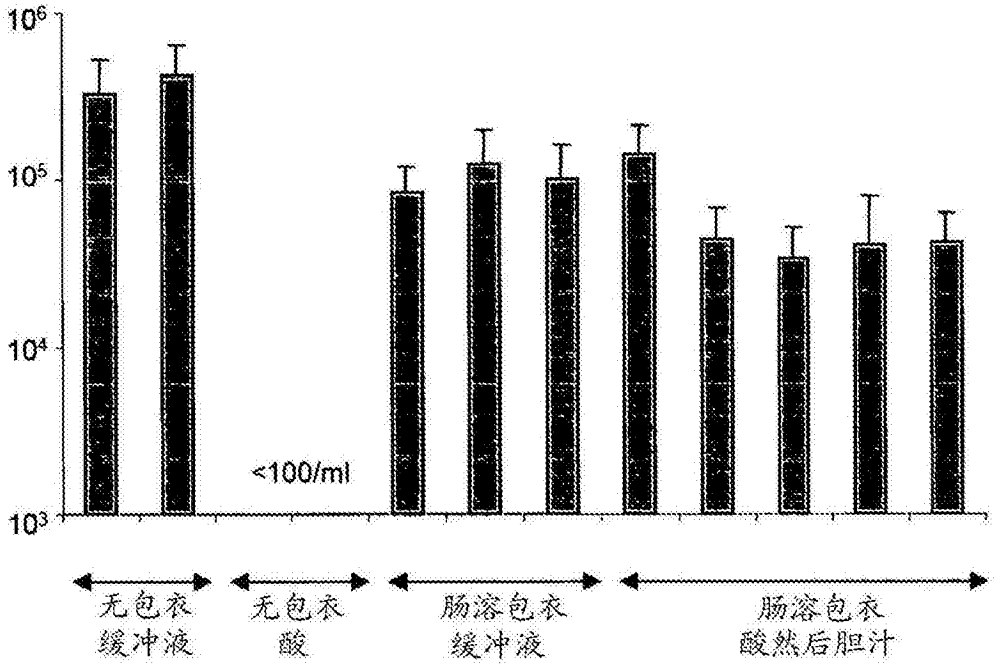

10^6
10^5
10^4
10^3
<100/ml
无包衣
缓冲液
无包衣
酸
肠溶包衣
缓冲液
肠溶包衣
酸然后胆汁

图8

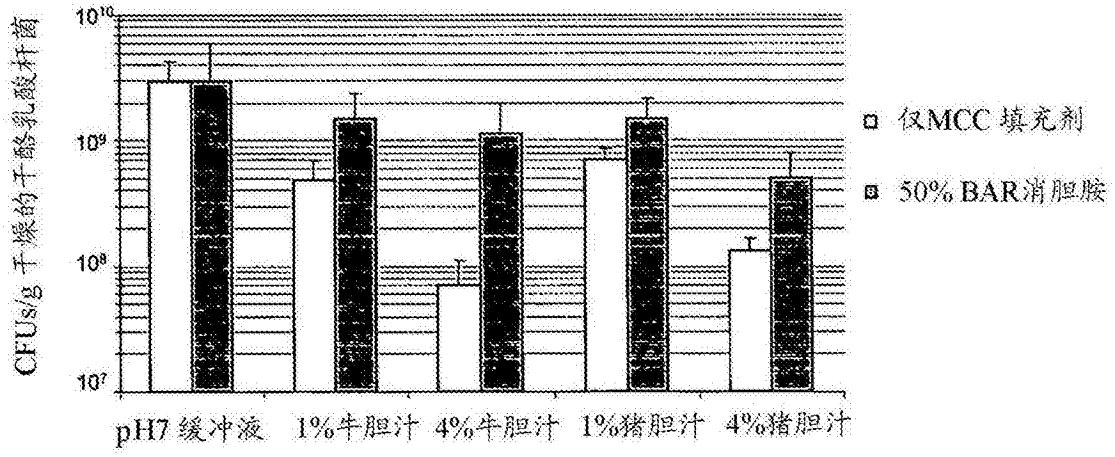

CFUs/g 干燥的干酪乳酸杆菌
10^{10}
10^9
10^8
10^7
仅MCC 填充剂
50% BAR消胆胺
pH7 缓冲液
1%牛胆汁
4%牛胆汁
1%猪胆汁
4%猪胆汁

图9