



(10) 授权公告号 CN 110869036 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 02

(21) 申请号 201880045148.3

(22) 申请日 2018.07.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110869036 A

(43) 申请公布日 2020.03.06

(30) 优先权数据
62/529,756 2017.07.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/040884 2018.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/010282 EN 2019.01.10

(73) 专利权人 奥赛尔股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 托马斯·P·帕克斯

安吉拉·马可巴尔

(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
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102414310 A, 2012.04.11
CN 104178437 A, 2014.12.03
US 2010151026 A1, 2010.06.17
W0 2017073752 A1, 2017.05.04

审查员 许小红

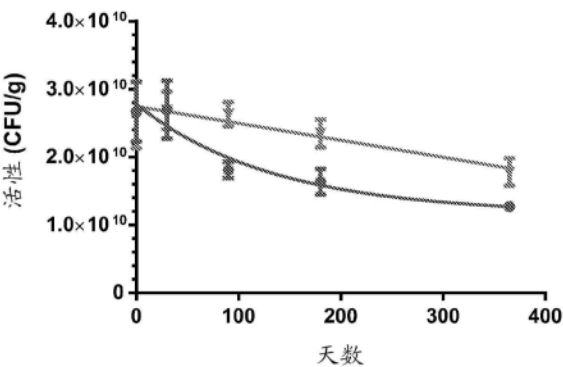
权利要求书3页 说明书20页 附图1页

(54) 发明名称

阴道乳杆菌的高效能稳定制剂

(57) 摘要

本发明提供了适于作为益生菌或活生物治疗处理施用于人的干燥保存的乳杆菌制剂,其中所述制剂是稳定的,具有高的效能,并且不含有动物来源的赋形剂。



1. 阴道乳杆菌物种的水性细菌悬液, 其不具有动物来源的赋形剂, 其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*), 以及其中所述悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生, 所述水性保存介质由以下组成:

- (i) 15% w/v 的海藻糖;
- (ii) 6% w/v 的木糖醇;
- (iii) 1% w/v 的抗坏血酸钠; 和
- (iv) 10mM 的磷酸钠。

2. 阴道乳杆菌物种的水性细菌悬液, 其不具有动物来源的赋形剂, 其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌, 以及其中所述悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生, 所述水性保存介质由以下组成:

- (i) 12-15% w/v 的海藻糖;
- (ii) 6-8% w/v 的木糖醇;
- (iii) 1% w/v 的抗坏血酸钠;
- (iv) 10mM 的磷酸钠; 和
- (v) 5% w/v 的谷氨酸钠。

3. 如权利要求1或2所述的细菌悬液, 其中所述阴道乳杆菌物种在有效培养条件下具有产生大于0.5ppm过氧化氢的能力。

4. 干燥粉末, 其是通过将权利要求1或2所述的细菌悬液冻干而产生的。

5. 如权利要求4所述的干燥粉末, 其中所述粉末具有小于0.220的水活度值。

6. 如权利要求5所述的干燥粉末, 其中所述粉末与非活性赋形剂以1:1至1:10w/w的比率组合。

7. 如权利要求6所述的干燥粉末, 其中所述非活性赋形剂是麦芽糖糊精。

8. 如权利要求6所述的干燥粉末, 其中所述粉末: 非活性赋形剂的比率为1:1至1:5w/w。

9. 如权利要求4所述的干燥粉末, 其中所述粉末被包含在设计用于阴道施用的塑料外壳内。

10. 在干燥条件下且在没有动物来源的赋形剂的情况下保存乳杆菌的方法, 所述方法包括:

(i) 获得细胞浓度为 10^8 /ml至 10^{13} /ml的阴道乳杆菌物种的水性悬液, 其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌;

(ii) 离心所述水性悬液以形成细菌细胞团块; 和

(iii) 将所述细菌细胞团块重悬于水性保存介质中以产生细菌悬液, 所述水性保存介质由以下组成:

- (a) 15% w/v 的海藻糖;
- (b) 6% w/v 的木糖醇;
- (c) 1% w/v 的抗坏血酸钠; 和
- (d) 10mM 的磷酸钠;

其中细胞团块湿重与所述水性保存介质的重量体积比为1:1g/mL至1:5g/mL。

11. 在干燥条件下且在没有动物来源的赋形剂的情况下保存乳杆菌的方法, 所述方法包括:

(i) 获得细胞浓度为 10^8 /ml至 10^{13} /ml的阴道乳杆菌物种的水性悬液,其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌;

(ii) 离心所述水性悬液以形成细菌细胞团块;和

(iii) 将所述细菌细胞团块重悬于水性保存介质中以产生细菌悬液,所述水性保存介质由以下组成:

(a) 12-15%w/v的海藻糖;

(b) 6-8%w/v的木糖醇;

(c) 1%w/v的抗坏血酸钠;

(d) 10mM的磷酸钠;和

(e) 5%w/v的谷氨酸钠;

其中细胞团块湿重与所述水性保存介质的重量体积比为1:1g/mL至1:5g/mL。

12. 如权利要求10或11所述的方法,其中所述阴道乳杆菌物种在有效培养条件下具有产生大于0.5ppm过氧化氢的能力。

13. 如权利要求10或11所述的方法,其还包括将所述细菌悬液冻干以产生干燥粉末。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述粉末具有小于0.220的水活度值。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述干燥粉末与非活性赋形剂以1:1至1:10w/w的比率组合。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述非活性赋形剂是麦芽糖糊精。

17. 如权利要求15所述的方法,其中所述粉末:非活性赋形剂的比率为1:1至1:5w/w。

18. 来源于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末在制备用于治疗女性的异常阴道微生物群的药物中的用途,其中所述女性被诊断为具有异常阴道微生物群;所述女性之前已被施用有效降低异常阴道微生物群水平的量的抗生素;以及所述悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生,所述水性保存介质由以下组成:

(a) 15%w/v的海藻糖;

(b) 6%w/v的木糖醇;

(c) 1%w/v抗坏血酸钠;和

(d) 10mM的磷酸钠;

其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌。

19. 来源于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末在制备用于治疗女性的异常阴道微生物群的药物中的用途,其中所述女性被诊断为具有异常阴道微生物群;所述女性之前已被施用有效降低异常阴道微生物群水平的量的抗生素;以及所述悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生,所述水性保存介质由以下组成:

(a) 12-15%w/v的海藻糖;

(b) 6-8%w/v的木糖醇;

(c) 1%w/v的抗坏血酸钠;

(d) 10mM的磷酸钠;和

(e) 5%w/v的谷氨酸钠;

其中所述阴道乳杆菌物种为卷曲乳杆菌。

20. 如权利要求18或19所述的用途,其中所述阴道乳杆菌物种在有效培养条件下具有产生大于0.5ppm过氧化氢的能力。

21. 如权利要求18或19所述的用途,其中所述干燥粉末具有小于0.220的水活度值。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述干燥粉末与非活性赋形剂以1:1至1:10w/w的比率组合。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述非活性赋形剂是麦芽糖糊精。

24. 如权利要求22所述的用途,其中所述粉末:非活性赋形剂的比率为1:1至1:5w/w。

25. 如权利要求18或19所述的用途,其中所述抗生素是克林霉素、甲硝唑或替硝唑。

阴道乳杆菌的高效能稳定制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年7月7日提交的美国临时专利申请第62/529,756号的优先权,其全部内容出于所有目的以其整体并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 所有人的粘膜自然地细菌微生物群定殖。最近的研究表明,在人体肠道、口腔和阴道中发现的微生物群与人体细胞和组织密切相互作用以调节天然的生物过程,例如非特异性宿主防御。参见,例如,Redondo-Lopez等人,(1990) Rev. Infect. Dis. 12:856-872; Gilbert, J.A., 等人, Nature 2016 Jul 7, 535 (7610):94-103; McDermott, A.J. 等人, Immunology 2014 May, 142 (1):24-31; Nelson, D.B. 等人, Anaerobe 2016 Dec, 42:67-73。通常,健康的阴道微生物群以乳杆菌物种为主,所述乳杆菌物种是革兰氏阳性杆菌,其在通过产生乳酸和酸化阴道或通过产生其它抗微生物产物如过氧化氢 (H_2O_2) 来抵抗感染中起重要作用。从世界范围内的健康女性的生殖道中最常分离出的乳杆菌种类包括卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus. crispatus*)、詹氏乳杆菌 (*Lactobacillus. jensenii*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacillus. gasseri*) 和惰性乳杆菌 (*Lactobacillus. iners*)。参见,例如, Antonio 等人, (1999) J. Infect. Dis. 180:1950-1956; Vasquez 等人, (2002) J. Clin. Microbiol. 40:2746-2749; Vallor, A.C. 等人, J Infect Dis. 2001 Dec 1, 184 (11):1431-6; Ravel, J. 等人, Proc Natl Acad Sci, USA. 2011 Mar 15, 108 Suppl 1:4680-7。卷曲乳杆菌、詹氏乳杆菌和加氏乳杆菌能够产生 H_2O_2 , 而惰性乳杆菌菌株通常不产生 H_2O_2 。这些物种在系统发育和功能上不同于食物和/或环境乳杆菌物种。这些兼性厌氧菌将葡萄糖代谢成乳酸,有助于维持较低的阴道 pH (4.0-4.5), 这是阴道非特异性宿主防御的主要部分。酸性 pH 对机会性共生和致病有机体的生长具有显著的拮抗作用,并且乳酸对 HIV 和 HSV-2 具有抗病毒活性。

[0005] 产生 H_2O_2 的菌株 (例如卷曲乳杆菌和詹氏乳杆菌) 比不产生 H_2O_2 的那些菌株 (惰性乳杆菌) 更具保护性。实际上,已经证明阴道粘膜上定殖有足够量的保护性乳杆菌的女性患淋病、衣原体感染、滴虫病和细菌性阴道病的频率降低了 50%。阴道中产生 H_2O_2 的乳杆菌的存在与细菌性阴道病, 症状性酵母阴道炎和性传播病原体 (包括淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhea*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 和阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)) 的频率降低有关。体外研究已经证明,产生 H_2O_2 的乳杆菌对阴道病原体 (包括人免疫缺陷病毒 (HIV)) 具有有效的杀菌和杀病毒特性。因此,可以认为与阴道粘膜相关的有益乳杆菌提供了保护性“生物膜”。参见例如 Falagas 等人, (2006) Drugs, 66:1253-1261。

[0006] 许多阴道和全身药物可以杀死阴道乳杆菌,并且占优势的阴道乳杆菌物种的消耗导致聚居了兼性和严格的厌氧菌,例如阴道加德纳菌 (*Gardnerella vaginalis*) 和阴道奇异菌 (*Atopobium vaginae*) 的更多样的异常微生物群,较高的阴道 pH 和较高水平的促炎细胞因子,这可能与临床综合征,例如细菌性阴道病 (BV) 的发展、机会性感染的建立以及在女性中获得 HIV-1 和 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 的风险增加相关。参见例如 Sha 等人, (2005) J. Infect. Dis. 191:25-32; Taha 等人 (1998) AIDS 12:1699-1706; Bolton, M. 等人, Sex Trans Dis 2008 Mar 35 (3):214-215。因此,用抗生素治疗性传播疾病可能会使女性处于反复获得

该疾病的风险增加。这些发现以及普遍认为乳杆菌通常促进阴道健康的观点,已经使临床医生想到女性应使用乳杆菌重新定殖阴道以预防或治疗泌尿生殖道感染。

[0007] 在开发非抗生素生态上合适的方法,例如乳杆菌替代疗法(LRT)以补充健康阴道微生物群和预防泌尿生殖道感染引起了人们相当大的兴趣。LRT的成功部分取决于生态上适当的乳杆菌菌株的选择、细胞保存、再水化后干乳杆菌制剂的恢复,以及阴道定殖的程度和持续时间。对阴道粘膜施用有益细菌和其它物质的各种方法是已知的。事实上,用于阴道内或口服使用的乳杆菌产品已经以保健食品商店中可获得的“嗜酸杆菌”制备剂的形式,以及杂货店中购买的嗜酸杆菌牛奶或酸奶(例如,这些产品通常宣传包含嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)菌株)的形式可获得100多年。这些产品包括含有冻干的人源嗜酸乳杆菌以及各种营养补充剂的阴道片剂、胶囊和阴道栓剂。

[0008] 由于这些产品不能使外源乳杆菌定殖阴道,因此这些产品在很大程度上是无效的。这些失败通常是由于市售产品的质量差,并且益生菌中所含的乳杆菌物种不是阴道来源的,因此不适合用于阴道。已经证明,以食品或乳杆菌补充剂销售的乳杆菌产品经常被其它潜在的病原体污染。此外,从酸奶中获得的乳杆菌不能与阴道上皮细胞结合。乳杆菌与上皮细胞的结合是建立宿主有机体定殖的必需步骤。此外,由模拟阴道流体中的低回收率反映出的低百分比的生理学活细胞显著影响实际的细菌剂量。

[0009] 因此,需要用于治疗阴道感染的产品,其可以在严格的条件下制造,并且使用具有体内杀微生物特性、对阴道上皮细胞具有粘附性和具有有效的活微生物效能的乳杆菌的适当的人类菌株。本发明解决了这些和其它需求。

[0010] 发明概述

[0011] 在一个方面,本发明提供了阴道乳杆菌物种的水性细菌悬液,其不具有动物来源的赋形剂。悬液可以由阴道乳杆菌物种的细胞团块和水性保存介质的组合产生。水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了在干燥条件下,在不存在动物来源的赋形剂的情况下保存乳杆菌物种的方法。所述方法包括获得细胞浓度为约 10^8 至约 10^{10} /ml的阴道乳杆菌物种的水性悬液,离心该溶液以形成细菌细胞团块,以及将所述细菌细胞团块重悬浮于水性保存介质中。所述水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠。所得细菌悬液的细胞团块湿重(即离心和离心上清液后的细胞团块的克数)与保存介质(ml)的重量比可以为1:1至1:5的团块(克):保存介质(ml)。

[0013] 本发明的另一方面提供了治疗女性中异常阴道微生物群的方法。所述方法包括选择诊断为具有异常阴道微生物群的女性,施用有效降低异常阴道微生物群水平的量的抗生素,然后施用于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末。水性悬液是阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合的结果,所述水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠。

[0014] 在一些实施方案中,治疗女性中的异常阴道微生物群的方法包括每日施用抗生素,持续2至7天,并且可以在停止施用抗生素前2天和施用抗生素后2天之间的任何时间开

始施用干燥粉末。在一些情况下,抗生素可以是克林霉素、甲硝唑或替硝唑。

[0015] 以下实施方案可与本发明的上述方面中的任一个组合。例如,在一些实施方案中,水性细菌悬液的阴道乳杆菌物种可以在有效培养条件下产生大于0.5ppm的过氧化氢。在其它实施方案中,阴道乳杆菌物种可以选自以下物种:卷曲乳杆菌、詹氏乳杆菌和加氏乳杆菌。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,水性保存介质可以包含5-15% (w/v) 的海藻糖、2-7% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.0% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-30mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠。

[0017] 在另一个实施方案中,可以将细菌悬液冻干以产生干燥粉末。干燥粉末可具有小于0.220的水活度值。在一些实施方案中,粉末可以与非活性赋形剂以1:1至1:10w/w的粉末:赋形剂的比率组合以调节菌落形成单位的浓度。可选地,可以将干燥的细菌粉末与赋形剂共混物组合以调节最终产物的效能。为方便起见,干燥粉末可被包含在设计用于阴道施用的塑料外壳内。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,细菌悬液的水性保存介质不包含脱脂乳。在另一个实施方案中,细菌悬液的水性保存介质不包含 α -生育酚。在本发明的一些实施方案中,细菌悬液的水性保存介质不包含脱脂乳或 α -生育酚。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠,其中所述水性保存介质不包含脱脂乳。在本发明的一些实施方案中,水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠,其中所述水性保存介质不包含 α -生育酚。在本发明的一些实施方案中,水性保存介质可以包含5-20% (w/v) 的海藻糖、2-9% (w/v) 的木糖醇、0.5-1.5% (w/v) 的抗坏血酸钠、10-50mM的磷酸钠和任选地0-5% (w/v) 的谷氨酸钠,其中所述水性保存介质不包含脱脂乳或 α -生育酚。

[0020] 在一个方面,本发明涉及组合物,其包含来源于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末,所述组合物用于治疗诊断为具有异常阴道微生物群的女性,其中所述女性先前已经用有效降低异常阴道微生物群水平的量的抗生素治疗;并且其中所述水性细菌悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生,所述水性保存介质基本上由以下组成:(a) 5-20%w/v的海藻糖;(b) 2-9%w/v的木糖醇;(c) 0.5-1.5%w/v的抗坏血酸钠;和(d) 10-50mM的磷酸钠。在一些实施方案中,水性保存介质任选地包含0-5%的谷氨酸钠。

[0021] 本发明的另一个方面涉及用于治疗诊断为具有异常阴道微生物群的女性的成套部件,所述成套部件包含:第一容器,其包含有效降低异常阴道微生物群水平的量的一种或多种抗生素;第二容器,其包含一定量的组合物,所述组合物包含来源于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末,其中所述悬液由阴道乳杆菌物种的细胞团块与水性保存介质的组合产生,所述水性保存介质基本上由以下组成:(a) 5-20%w/v的海藻糖;(b) 2-9%w/v的木糖醇;(c) 0.5-1.5%w/v的抗坏血酸钠%;和(d) 10-50mM的磷酸钠;和任选地,使用所述试剂盒治疗诊断为具有异常阴道微生物群的女性的说明书。在一些实施方案中,水性保存介质任选地包含0-5%的谷氨酸钠。

[0022] 在实施方案中,所述一种或多种抗生素用于向所述女性施用例如2至7天;并且其中所述干燥粉末用于在抗生素施用完成前两天至抗生素施用结束后两天之间的任何时间施用。

[0023] 因此,所述成套部件优选意在用于依次施用i)一种或多种抗生素,然后施用ii)组合,其包含来源于没有动物来源的赋形剂的阴道乳杆菌物种水性细菌悬液的干燥粉末,所述组合用于治疗诊断为具有异常阴道微生物群的女性。

[0024] 在实施方案中,所述阴道乳杆菌物种在有效培养条件下具有产生大于0.5ppm过氧化氢的能力,其中所述乳杆菌物种例如选自:卷曲乳杆菌、詹氏乳杆菌和加氏乳杆菌。

[0025] 应注意,在本发明的一个方面的上下文中描述的实施方案和特征也适用于本发明的其它方面。

[0026] 附图简述

[0027] 图1:在含有脱脂乳(下方的线,圆圈)或不含脱脂乳(上方的线,倒三角形)的情况下配制的LACTIN-V的稳定性。将粉末样品在25℃储存一年,并通过在MRS琼脂板上培养并计数菌落在不同时间点测定活性。

[0028] 图2:含有谷氨酸一钠或不含谷氨酸一钠的乳杆菌粉末制剂。通过测量随时间的活力来确定在37℃下不含谷氨酸一钠(圆形,三角形)或含有谷氨酸一钠(正方形,倒置三角形)的四种LACTIN-V制剂的加速稳定性。将粉末样品在37℃下储存90天,并通过在MRS琼脂板上培养并计数菌落在不同时间点测定活力。

[0029] 发明详述

[0030] I. 引言

[0031] 本发明提供了高效能稳定的干燥保存的乳杆菌制剂,其适于作为治疗施用于人,其中所述制剂具有高定殖效能并且没有动物来源的赋形剂。具体地,如本文所公开的,本发明提供了用于乳杆菌替代疗法(LRT)的方法和组合,以用保护性乳杆菌微生物群重新住入阴道粘膜,作为矫正生态失调和维持阴道健康的手段。如下面更详细描述,本发明教导了用于制备和使用瞬时缓冲的干燥乳杆菌制剂的方法,组合物和试剂。

[0032] II. 定义

[0033] 如本文所用,术语“阴道微生物群”或“阴道微生物组”可互换使用,并且是指定殖阴道的微生物,尽管“微生物群”和“微生物组”是优选的术语。术语“异常阴道微生物群”或“异常阴道微生物组”或“阴道生态失调”是指阴道粘膜缺乏保护性乳杆菌并且被大量不同的非乳杆菌定殖的病况。该病况可以是有症状的或无症状的。

[0034] 如本文所用,术语“水性保存介质”或“保存制剂”或“保存介质”可互换使用,并且是指能够将细菌细胞培养物保存和维持在代谢上非活动的状态,同时使保存过程中遇到的损伤效应最小化的组合物。通常,在添加到保存介质中、冷冻和冻干时,乳杆菌菌株从活跃生长的代谢状态转变为代谢上非活动的状态。因此,可以配制保存介质以获得最佳的细胞恢复力,从而使细胞可以在再水合时粘附到粘膜表面并恢复到完全的代谢活性。本文所用的水性保存介质是水溶液,其通常包含碳水化合物、多元醇(糖醇)、抗氧化剂、缓冲剂和任选的氨基酸。使用水性保存介质将细菌的细胞团块重悬至约 10^8 CFU/mL的浓度,其中可以干燥悬液,在2-8℃储存至少2年,并且以小于15%的CFU损失重悬。

[0035] 如本文所用,术语“动物来源的赋形剂”是指来源于动物的惰性物质,其可以包含

在这样的组合物中,所述组合物包含被认为是活性成分的物质。非限制性实例包括牛奶、酸奶、黄油、鸡脂肪、猪油、明胶和动物油脂。

[0036] 如本文所用,术语“赋形剂”和“非活性赋形剂”可互换使用,并且是指这样的惰性物质,其与药物的活性成分一起配制,将其包括在内出于长期稳定的目的,为粉末制剂提供体积(因此通常称为“填充剂(bulking agent)”、“填充剂(filler)”或“稀释剂”),或赋予最终剂型中的活性成分治疗增强,例如促进药物吸收、降低粘度或增强溶解度。赋形剂的实例包括但不限于麦芽糖糊精、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸二钙、胶体SiO₂、Pharmasperse®、甘露醇、木糖醇、海藻糖、乳糖、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、交联聚维酮、甘氨酸、硬脂酸镁、硬脂酰富马酸钠、环糊精以及它们的衍生物和混合物。

[0037] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指组合物或方法,其包括所公开的组分或步骤,以及不会实质上影响组合物或方法的基本特性和新特性的任何其它组分或步骤。基本上由所列成分组成的组合物不包含会影响那些细菌组合物的基本特性的另外的成分。例如,本发明的乳杆菌粉末制剂还可以包含药学上可接受的赋形剂,例如着色剂和/或填充剂,和抗病毒剂或抗菌剂,和/或酶,而不影响干燥乳杆菌粉末的活力特性。

[0038] 如本文所用,术语“乳杆菌”是指革兰氏阳性兼性厌氧细菌,其特征在于能够从碳水化合物源如葡萄糖产生乳酸盐(乳酸)。这些细菌可以存在于食品中或者可以是定殖阴道或胃肠粘膜的共生有机体。

[0039] 如本文所用,术语“卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)”或“卷曲乳杆菌(*L.crispatus*)”是指乳杆菌属的物种。该物种通常基于核糖体的16SrRNA基因的多核苷酸序列与其它乳杆菌区别开。“加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)”或“加氏乳杆菌(*L.gasseri*)”和“詹氏乳杆菌(*Lactobacillus jensenii*)”或“詹氏乳杆菌(*L.jensenii*)”是指其它种类的乳杆菌。卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和詹氏乳杆菌是能够产生过氧化氢的阴道物种。

[0040] 如本文所用,术语“干燥组合物”是指已除去水分的组合物。风干或干燥技术包括例如加热(例如,升华)、施加低压或真空、冻干(即,冷冻干燥)及其组合。通常将组合物干燥以易于储存和运输。

[0041] 如本文所用,术语“有效培养条件”是指乳杆菌细胞置于或暴露于其中以促进所述细胞生长的环境。因此,该术语是指可影响细胞生长的培养基、温度、大气条件、底物、搅拌条件等,允许约0.5至2.5小时的增殖时间(细胞群的倍增速率)。

[0042] 如本文所用,术语“效能”是指每个药物单位(即,药粉)递送的活微生物细胞的数目。根据本发明,活细胞能够生长和繁殖。为了使乳杆菌干燥粉末在体内有效,微生物细胞以至少约10⁸CFU/药物单位的效能定殖阴道上皮细胞和生物效应(例如,如通过没有感染状态如细菌性阴道病所证明的)是必需的。“高效能”是指每个药物单位含有至少10⁸个活微生物细胞(CFU)的阴道药物。

[0043] 如本文所用,术语“冻干”是指冷冻物质然后通过升华和/或蒸发将水的浓度降低至不支持生物或化学反应的水平过程。

[0044] 如本文所用,术语“水活度”和符号“a_w”是指并且被定义为等于平衡相对湿度(“ERH”)除以100。ERH是干燥粉末既不从环境中吸收水分也不将水分释放到环境中的平衡状态。ERH受到所有成分的组成的影响,所述成分特别是具有高水含量的那些成分,其可以

以游离水或结合水存在。游离水的量可影响干燥粉末的储存稳定性和纯度,这可导致在储存期间不期望的活性降解或污染微生物的生长。

[0045] 如本文所用,术语“湿重”是指离心和倾析上清液后细胞团块的重量(克)。通常,在细胞收获步骤之后,预先称重离心瓶,离心细胞,倾析上清液,再次对瓶进行称重。重量差是团块的湿重。

[0046] III. 组合物和方法

[0047] 获得阴道细菌

[0048] 适用于本发明的药物(即,药粉)的乳杆菌菌株可以是具有本文所述的鉴定特性的任何乳杆菌菌株。可以使用本领域已知的适当筛选技术从天然来源检测和分离乳杆菌菌株。具体地,用于本发明药物的合适的乳杆菌菌株可以通过公众可获得的资源例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)或生物防御和新兴感染研究资源库(BEI, beiresources.org)获得,或者从人的健康阴道分离。下面详细讨论适用于本发明的乳杆菌菌株的鉴定特性和筛选这些特性的方法。

[0049] 适用于本发明的乳杆菌的一个鉴定特性是该乳杆菌菌株具有至少约50%的阴道上皮细胞(VEC)内聚力值(cohesion value)百分比。“VEC内聚力值百分比”被定义为至少一个乳杆菌细胞粘附的VEC占鉴定的组的VEC总数的百分比。根据本发明,术语“内聚性”和“粘附性”可以互换使用。微生物细胞对阴道上皮细胞的粘附对于定殖和生物效应是关键的。将药粉的乳杆菌细胞成功粘附到阴道上皮细胞导致阴道上皮细胞的成功定殖。长期体内定殖是本发明的产品和方法的目标,“VEC内聚力值百分比”是显著数量的VEC是否将在体外和体内接受微生物细胞的良好预测。用于测定可接受的VEC内聚力值的方法是本领域熟知的,并且可以见于美国专利第6,468,526号和美国专利第6,093,394号。另见Kwok等人, J. Urol. 2006, 176:2050-2054。

[0050] 适用于本发明药物的乳杆菌的另一个鉴定特性是产生过氧化氢(H_2O_2)的能力。 H_2O_2 阳性表型也与持续的阴道定殖有关。参见,例如, Vallor, A.C. 等人, J Infect Dis. 2001 Dec 1; 184(11):1431-6。如上所论述的,已经显示过氧化氢是乳杆菌杀死它微生物的原因。优选地,乳杆菌在正常生长条件下可产生大于约0.5ppm的 H_2O_2 。更优选地,在有效生长条件(在本文被定义为能够促进 H_2O_2 产生的任何培养基和条件)下,乳杆菌可产生至少约10ppm的 H_2O_2 ,甚至更优选地,乳杆菌可产生至少约20ppm的 H_2O_2 。有效生长条件包括体外生长条件(例如,有效培养基和条件)和体内生长条件(例如,阴道的成功定殖)。产生过氧化氢的阴道乳杆菌包括大多数卷曲乳杆菌和詹氏乳杆菌菌株,以及大约一半的加氏乳杆菌菌株,如Antonio等人, The Journal of Infectious Diseases 1999, 180:1950-6中所述的。

[0051] 本发明的乳杆菌产生 H_2O_2 可以通过用于测量 H_2O_2 产生任何的方法进行定量。用于测量 H_2O_2 产生的方法是本领域熟知的,并且可以包括培养方法或直接检测方法。培养方法可以包括通过定量当将乳杆菌接种到四甲基联苯胺培养基(TMB)上并在厌氧条件下温育时形成的蓝色颜料的强度来测量 H_2O_2 产生。例如,在37℃下,在厌氧条件下,将乳杆菌在TMB琼脂板上温育约48小时。然后将琼脂板暴露于环境空气中。暴露于环境空气导致乳杆菌产生的 H_2O_2 与琼脂中的辣根过氧化物酶反应以氧化TMB,导致乳杆菌菌落变蓝。参见,例如, Antonio 等人, The Journal of Infectious Diseases 1999; 180:1950-6。直接检测方法可用于使用可商购获得的 H_2O_2 检测测试条(例如,可从EM Sciences或Merck获得)在0至100mg/L的检

测规模上测量H₂O₂的量。参见,例如,Strus,M.等人,The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida. Infect Dis Obstet Gynecol. 2005 Jun; 13(2):69-75。

[0052] 适用于本发明药物的乳杆菌的另一种鉴定特性是乳杆菌菌株在体内和体外随时间的遗传同一性和稳定性。根据本发明,遗传稳定性是指乳杆菌菌株的连续世代能够基本上维持母代株系的相同遗传概况。换言之,遗传稳定菌株的连续世代在一段时间内不会在其基因组DNA中获得显著的突变。重复序列聚合酶链式反应(Rep PCR)可用于确认乳杆菌菌株在体外储存或阴道上皮细胞的体内定殖后随时间的遗传同一性和稳定性。用于确认乳杆菌菌株的遗传同一性和稳定性的Rep PCR方法是本领域熟知的,并且可以见于美国专利第6,093,394号。还参见Antonio&Hillier, J. Clin. Microbiol. 2003, 41:1881-1887。

[0053] 适用于本发明药物的乳杆菌的另一种鉴定特性是产生乳酸的能力。已经显示乳酸抑制体外病原体的生长。优选地,乳杆菌在有效生长条件下产生至少约0.75mg/100mL乳酸,更优选至少约4mg/100mL乳酸,甚至更优选至少约8.8mg/100mL乳酸。

[0054] 合适的乳杆菌菌株可以具有相对大的细胞大小。如伯杰氏鉴定细菌学手册(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)中所提供的,典型的乳杆菌的宽度为0.8-1.6μm,长度为2.3-11μm。用于本发明的优选的乳杆菌菌株具有宽为约1至约2微米和长为约2至约4微米的细胞大小。不受理论的束缚,本申请的发明人认为本发明的乳杆菌菌株的细胞所表现出的大尺寸可以使其在生物竞争排除(biocompetitive exclusion)中更好地用作保护剂。生物竞争排除是指本发明的一种或多种药粉菌株能够竞争性地抑制不期望的细菌菌株的生长。这种排除归因于有益的乳杆菌细胞(例如,药粉菌株)在阴道上皮细胞上占据了可用空间,从而防止了致病的或不期望的微生物细胞的粘附。

[0055] 除了乳杆菌的已知物种和菌株之外,来自自然界的新鉴定的物种和菌株以及衍生自己知或新鉴定的菌株的突变菌株可用于本发明的药物中。具有适用于本发明药物的乳杆菌的鉴定特性的乳杆菌亲本菌株的突变体可以通过例如以下获得:使亲本菌株经受至少一轮化学和/或辐射诱变以增加诱变速率,从而增加了获得具有改善的期望特性的微生物的可能性。对本领域技术人员显而易见的是,本发明的突变微生物还包括可通过遗传工程改造微生物以例如具有增加的VEC内聚力值获得的微生物。如本文所用,“突变的微生物”是这样的突变的亲本微生物,其中这种微生物的核苷酸组成已被突变修饰,所述突变是天然存在的,是暴露于诱变剂的结果,或者是基因工程的结果。

[0056] 优选的乳杆菌物种包括卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和詹氏乳杆菌,或与任何鉴定物种的16S rRNA基因序列具有95%的序列同源性的乳杆菌物种。特别优选的乳杆菌菌株是具有卷曲乳杆菌CTV-05菌株、卷曲乳杆菌SJ-3C菌株的所有鉴定特性的菌株。卷曲乳杆菌CTV-05是优选的菌株。用于区分乳杆菌菌株的方法包括Rep-PCR(如Antonio&Hillier, J. Clin. Microbiol. 2003, 41:1881-1887中所述)、多位点序列分型(MLST)(最初被开发用于鉴定病原体的菌株(参见,例如,Maiden, M.C.等人, 1998, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95:3140-2145))和全基因组测序。

[0057] 培养阴道细菌

[0058] 可用于本发明的乳杆菌菌株可以在液体或固体培养基(例如琼脂)中生长。用于生长可用于本发明的乳杆菌菌株的细菌培养基是已知的,可商购获得的(例如来自BD Difco),并且包括例如de Man,Rogosa和Sharpe(MRS)培养基以及Rogosa培养基。乳杆菌优选厌氧或微需氧培养,培养基的温度可以是适于乳杆菌生长的任何温度。本发明的乳杆菌菌株可以在厌氧条件下培养,并且通常在约37℃下生长。可用于本发明的阴道乳杆菌菌株的有效培养条件是本领域熟知的。具体的培养条件、培养基和培养乳杆菌菌株,特别是卷曲乳杆菌和加氏乳杆菌的方法可以见于例如美国专利第8,329,447号、美国专利第6,093,394号和Davis,C.Enumeration of probiotic strains:Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria.J Microbiol Methods.2014; 103:9-17。

[0059] 以足以在合理的生长期后产生用于转移到保存介质中的合适细胞密度(或效能)的量的乳杆菌菌株的活跃生长的培养物接种培养基。本文所用的乳杆菌的合理生长期的非限制性实例是1-2.5小时的代时。使细胞生长至范围为约 10^8 CFU/mL至约 10^{10} CFU/mL的优选细胞密度。使用基于培养的方法测定细胞密度,其中将乳杆菌培养物的系列稀释液涂铺到MRS琼脂板上,并在37℃下厌氧温育48小时。对板上的菌落进行计数,并以CFU/mL或CFU/克计算样品中的CFU(菌落形成单位)的数目。下面详细描述了确定CFU的方法。

[0060] 一旦细胞生长至优选的细胞密度,可以使用任何合适的方法从培养基中去除细胞来收获细菌细胞。收获培养细胞的非限制性示例性方法包括过滤、离心和沉淀。在一些实例中,收获培养的细胞可包括中空纤维过滤和经由渗滤洗涤。收获培养的乳杆菌细胞的方法是本领域熟知的,并在实施例部分详细描述。从培养基中分离细胞和/或洗涤生物物质后,离心细胞以形成细胞团块,以准备悬浮在保存介质中。

[0061] 水性保存介质的制备

[0062] 将由上述方法形成的细菌细胞团块重悬于合适的水性保存介质中,其中细胞团块湿重(克)与保存介质(mL)的重量比可以为1:1至1:8的细胞团块(克):保存介质(mL)。在一些实施方案中,将细菌细胞团块重悬于合适的水性保存介质中,其中细胞沉淀湿重(克)与保存介质(mL)的重量比可以为1:1至1:7的细胞沉淀(克):保存介质(mL),或1:1至1:6,或1:1至1:5,或1:1至1:4,或1:1至1:3,或1:1至1:2,或1:2至1:6,或1:3至1:5的细胞沉淀(克):保存介质(mL)。在一些实施方案中,将细菌细胞团块重悬于合适的水性保存介质中,其中细胞团块湿重(克)与保存介质(mL)的重量比可以为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7或1:8的细胞团块(克):保存介质(mL)。在一些实施方案中,将细菌细胞团块重悬于合适的水性保存介质中,其中细胞团块湿重(克)与保存介质(mL)的重量比可以为1:1至1:5的细胞沉淀(克):保存介质(mL)。在一些实施方案中,将细菌细胞团块重悬于合适的水性保存介质中,其中细胞团块湿重(克)与保存介质(mL)的重量比可以为1:1至1:3的细胞沉淀(克):保存介质(mL)。

[0063] 水性保存介质包含使保存过程中遇到的损害效应最小化的成分。本发明的保存介质包括碳水化合物、多元醇、抗氧化剂、缓冲剂和任选的氨基酸。保存介质中使用的碳水化合物作为冻干保护剂发挥功能,以在冷冻干燥期间和之后在储存期间保护和稳定细胞。适用于本发明的非限制性示例性碳水化合物包括海藻糖、右旋糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖和/或任何其它二糖或多糖。在一些实施方案中,保存介质包含约0.5%至约30重量%的碳水化合

物/体积(w/v)的保存介质,或约1%至约25%,或约5%至约20%,或约10%至约15重量%的碳水化合物/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约0.5重量%的碳水化合物/体积(w/v)的保存介质,或约1%、2%、5%、7%、10%、15%、20%、25%或30重量%的碳水化合物/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约5%至约20重量%的海藻糖/体积(w/v)的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质包含约5%至约15重量%的海藻糖/体积的保存介质。

[0064] 保存介质中的多元醇(即,多元醇)是冻干保护剂,其有助于保护细胞免受冷冻干燥期间脱水的应力。适用于本发明的非限制性示例性多元醇包括木糖醇、核糖醇、甘油、半乳糖醇、肌醇、甘露糖醇、麦芽糖醇、异麦芽酮糖醇、乳糖醇、赤藓糖醇、山梨糖醇和/或阿拉伯糖醇。在一些实施方案中,保存介质包含约0.1%至约12重量%的多元醇/体积(w/v)的保存介质,或约1重量%至约10重量%,或约2重量%至约9重量%,或约3重量%至约7重量%的多元醇/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约0.1重量%的多元醇/体积(w/v)的保存介质,或约0.5重量%、1重量%、2重量%、3重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、11重量%或12重量%的多元醇/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约2%至约9重量%的木糖醇/体积的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质包含约2重量%至约7重量%的木糖醇/体积的保存介质。

[0065] 保存介质中的抗氧化剂延缓了保存和储存过程中对微生物细胞的氧化损伤。适用于本发明的非限制性示例性抗氧化剂包括抗坏血酸钠、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酯、没食子酸丙酯和维生素E(α -生育酚)。在一些实施方案中,保存介质包含约0.1重量%至约5重量%的抗氧化剂/体积(w/v)的保存介质,或约0.5重量%至约3.0重量%,或约1.0重量%至约2.0重量%的抗氧化剂/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约0.1重量%的抗氧化剂/体积(w/v)的保存介质,或约0.3重量%、0.5重量%、1.0重量%、1.5重量%、2.0重量%、2.5重量%、3.0重量%、3.5重量%、4.0重量%、4.5重量%或5.0重量%的抗氧化剂/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质包含约0.5重量%至约1.5重量%的抗坏血酸钠/体积的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质包含约0.5重量%至约1.5重量%的抗坏血酸钠/体积的保存介质。

[0066] 适用于保存介质的缓冲剂增强了细菌细胞的稳定性和恢复。适用于保存介质的缓冲剂是使用药物组合物对细菌、阴道上皮细胞或女性患者不产生任何毒性作用的生理剂。适用于本发明的非限制性示例性缓冲剂包括磷酸钠、磷酸二钠、磷酸钾、碳酸氢钠、组氨酸、精氨酸和柠檬酸钠。在一些实施方案中,缓冲剂的pKa可以为约4.3至约8.0、或约4.6至约7.7、或约5.0至约7.3、或约5.4至约7.0、或约6.0至约6.7。在一些其它实施方案中,保存介质包含pKa为至少4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0或更高的缓冲溶液。在一些实施方案中,保存介质包含pKa在生理范围内的缓冲溶液。在其它实施方案中,保存介质包含pKa为约6.7至约7.8的缓冲溶液。

[0067] 在其它实施方案中,保存介质包含约5mM至约70mM的缓冲剂、或约10mM至约65mM、或约15mM至约60mM、或约20mM至约55mM、或约25mM至约50mM、或约30mM至约45mM、或约35mM至约40mM的缓冲剂。在一些实施方案中,保存介质包含约5mM缓冲剂,或约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70mM。在一些实施方案中,保存介质包含约10mM至约50mM的磷酸钠。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质包含约10mM至约30mM磷酸钠。

[0068] 在一些实施方案中,保存介质可以任选地包含氨基酸,该氨基酸有助于提高乳杆菌细胞在升高的温度下的稳定性,而不会显著影响冻干过程中的低温保存。在一些实施方案中,任选的氨基酸可以是合适的氨基酸的盐形式。适用于本发明的非限制性示例性氨基酸和/或其盐包括谷氨酸钠、谷氨酰胺、甘氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸。在一些实施方案中,保存介质任选地包含约0%至约5重量%的氨基酸/体积(w/v)的保存介质,或约0.5%至约3.0%,或约1.0%至约2.0重量%的氨基酸/体积的保存介质。在一些实施方案中,保存介质任选地包含约0.1重量%的氨基酸/体积(w/v)的保存介质的氨基酸,或约0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%或5.0重量%的氨基酸/体积的保存介质。在一些实施方案中,任选包含在保存介质中的氨基酸是氨基酸盐谷氨酸钠,优选谷氨酸一钠。在一些实施方案中,保存介质任选地包含约0%至约5重量%的谷氨酸钠/体积的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质任选地包含约0%至约5重量%的谷氨酸一钠/体积的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质任选地包含约1%至约4重量%的谷氨酸钠/体积的保存介质。在本发明的一些其它实施方案中,保存介质任选地包含约1%至约4重量%的谷氨酸一钠/体积的保存介质。

[0069] 本发明的保存介质包含以重量/体积计为保存介质的约5%至20%的碳水化合物,以重量/体积计为保存介质的约2%至9%的多元醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.5%的抗氧化剂和10mM-50mM的缓冲剂。在其它实施方案中,适用于本发明的保存介质可以包含以重量/体积计为保存介质的约5%至15%的碳水化合物,以重量/体积计为保存介质的约2%至7%的多元醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.0%的抗氧化剂和约10mM至30mM的缓冲剂。

[0070] 在一些实施方案中,本发明的保存介质包含以重量/体积计为保存介质的约5%至20%的碳水化合物,以重量/体积计为保存介质的约2%至9%的多元醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.5%的抗氧化剂,10mM至50mM的缓冲剂,以及任选的氨基酸,以重量/体积计所述氨基酸为保存介质的约0%至5%。在其它实施方案中,适用于本发明的保存介质可以包含以重量/体积计为保存介质的约5%至15%的碳水化合物,以重量/体积计为保存介质的约2%至7%的多元醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.0%的抗氧化剂,10mM至30mM的缓冲剂,以及任选的氨基酸,以重量/体积计,所述氨基酸为保存介质的0%至5%。

[0071] 本发明特别有用的保存介质的一个实例包括海藻糖作为碳水化合物,以重量/体积计,其为保存介质的约5%至20%;木糖醇作为多元醇,以重量/体积计,其为保存介质的约2%至9%;抗坏血酸钠作为抗氧化剂,以重量/体积计,其为保存介质的约0.5%至1.5%;和磷酸钠作为缓冲剂,其为10mM至50mM。在一些实施方案中,本发明的特别有用的保存介质包括海藻糖作为碳水化合物,以重量/体积计,其为保存介质的约5%至20%;木糖醇作为多元醇,以重量/体积计,其为保存介质的约2%至9%;抗坏血酸钠作为抗氧化剂,以重量/体积计,其为保存介质的约0.5%至1.5%;磷酸钠作为缓冲剂,其为10mM至50mM和任选地,谷氨酸钠作为氨基酸,以重量/体积计,其为保存介质的约0%至5%。在其它实施方案中,适用于本发明的保存介质包含以重量/体积计为保存介质的约5%至15%的海藻糖,以重量/体积计为保存介质的约2%至7%的木糖醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.0%的抗坏血酸钠和10mM至30mM的磷酸钠。在一些其它实施方案中,适用于本发明的保存介质包

含以重量/体积计为保存介质的约5%至15%的海藻糖,以重量/体积计为保存介质的约2%至7%的木糖醇,以重量/体积计为保存介质的约0.5%至1.0%的抗坏血酸钠,10mM至30mM的磷酸钠以及任选的谷氨酸钠,以重量/体积计,其为保存介质的约0%至5%。代表性的保存介质组成(决非意在是限制性的)包括在下表1中。

[0072] 表1示例性保存介质组成和成分比率。

编号		成分(%, w/w)				
	<u>海藻糖</u>	<u>木糖醇</u>	<u>抗坏血酸钠</u>	<u>NaPO₄*</u>	<u>谷氨酸钠</u>	
[0073]	<i>i</i>	5 – 15	2 – 9	0.5 – 1.5	10 – 30	0–5
	<i>ii</i>	5、10 或 15	2	0.5	10	0–5
	<i>iii</i>	7.5	2、3 或 9	0.75	15	0–5
	<i>iv</i>	7.5	3	0.5、1.0 或 1.5	15	0–5
	<i>v</i>	7.5	3	0.75	10、12 或 15	0–5

[0074] *磷酸钠的量以mM测量

[0075] 在将上述收获的乳杆菌细胞加入到培养基中之前,可以在盐水缓冲液中洗涤细胞。在将收获的乳杆菌细胞引入到本文所述的保存介质中后,所得混合物被称为细胞保存介质浆液。在一些实施方案中,细胞保存介质浆液可具有 10^8 CFU/mL至 10^{11} CFU/mL的活性。更优选的细胞保存介质浆液可具有至少约 10^{10} CFU/mL的活性。应理解,本领域普通技术人员将理解本文公开的基本培养、收获和悬浮步骤的变化,因此,本发明并入了这种变化。

[0076] 干燥细胞保存介质浆液

[0077] 可以使用本领域已知的任何合适的干燥方法将细胞保存介质浆液干燥以产生所得的原料药粉末。通常,干燥的效果是使细菌处于休眠状态以保护细菌免受对细菌活力产生负面影响的环境因素的影响。引起休眠的标准方法是通过除去水。通常,除去足够的水,使得正常的细胞过程(例如酶活性)停止或至少大幅减少。

[0078] 可以使用本领域已知的用于干燥细菌制剂的多种方法中的任一种来干燥细胞保存介质浆液,以增加其长期储存的稳定性。在Morgan等人,(2006) J. Microbiol. Meth. 66: 183-193的综述中公开了干燥方法和保护剂。合适的干燥方法包括空气干燥、真空干燥、烘箱干燥、喷雾干燥、闪蒸干燥、流化床干燥、受控气氛干燥和冻干(即冷冻干燥)。在一些实施方案中,使用干燥剂来帮助干燥过程,和/或防止水分再吸收到干燥制剂中。在一些实施方案中,使用冻干机(即Virtis, SP Scientific)进行干燥。详细的冷冻干燥方法是本领域技术人员已知的并且公开于美国专利第6,093,394号;第8,329,447号;和第8,642,029号中。使用下述方法测试称为原料粉末的所得干燥制剂的效能。干燥原料药粉末的效能可以为 10^9 CFU/g至 10^{12} CFU/g。更优选的原料粉末可以具有至少约 10^{10} CFU/g的活性。

[0079] 测量残留水

[0080] 可以使用本领域已知的任何合适的方法测试干燥制剂中残留水的存在。在一些情况下,干燥制剂中的残留水可以通过重量分析法测量,如美国专利第8,329,447号和第8,642,029号中所述。可选地,用于测量粉末中水含量的仪器例如IR-120水分分析仪(Denver Instruments, Denver, Colo.)可以用于监测干燥过程中制剂的水分含量。还可以通过进行

众所周知的库仑滴定或体积滴定技术,例如Karl Fischer滴定来测定残留的水份。

[0081] 也可以使用水分活度仪,例如AquaLab CX-2Model系列(Decagon Instruments, Pullman, Wash.)或Rotronic Model系列(Rotronic Instrument Corp., Huntington, N.Y.)将乳杆菌粉末中的水含量测量为游离水或水活度(a_w)。水分活度仪(AquaLab CX-2, Decagon Instruments)使用冷镜露点技术来测量产品的 a_w 。当将样品置于Aqualab中时,腔室内的不锈钢镜子反复冷却和加热,同时形成露水并被驱除。仪器的风扇使传感室中的空气循环,加速平衡过程。每次在镜子上形成露水时,Aqualab测量温度并计算样品的 a_w ,保存这些值以与先前的值进行比较。当连续读取的 a_w 值相差小于0.001时,测量过程完成。

[0082] 水能级或水活度(a_w)决定了所得的干燥原料乳杆菌药物粉末的总体稳定性。本领域的普通技术人员将理解药物的水活度例如本发明的药物粉末的 a_w 的重要性。通过维持药物产品的低水活度,可以避免活性药物成分(即乳杆菌药物粉末)的降解。此外,具有低水活度的药物产品,例如本发明的乳杆菌药物粉末较不容易结晶、结团和结块,这带来药物的降解和无效。这些是时间依赖性反应,其速率受水活度的影响。关于 a_w 对产物制剂的影响的细节可见于美国药典方法<1112>未经灭菌的药物产品的微生物属性-水活度测定的应用。

[0083] 在一些实施方案中,干燥原料乳杆菌药物物质可以具有约0.001至约0.220、或约0.005至约0.200、或约0.010至约0.150、或约0.025至约0.100、或约0.050至约0.075的测量的 a_w 。在其它实施方案中,干燥原料乳杆菌药物物质可以具有约0.001、0.003、0.005、0.007、0.010、0.030、0.050、0.070、0.100、0.150、0.170、0.200、0.220的测量的 a_w 。在特定的实施方案中,干燥原料乳杆菌药物物质可以具有小于0.220的测量的 a_w 。

[0084] 测量效能

[0085] 使用本领域已知的任何合适的方法在整个制备过程中在不同时间测试本发明的乳杆菌制剂(湿的和/或干的)的效能。用于测定乳杆菌制剂的效能的这种方法包括但不限于基于培养的方法。用于测定乳杆菌的细胞密度的光散射方法被用于监测发酵过程,并且涉及测量细菌样品在600nm处的光密度。

[0086] 用于测量乳杆菌制剂效能的优选方法是涉及连续稀释的基于培养的方法。获得待测试的乳杆菌制剂样品并进行连续稀释。将小的等分试样(即,100 μ L)的连续稀释液涂铺到MRS琼脂板上。使样品在37 $^{\circ}$ C下厌氧温育48小时。在经过适当的时间后,通过将培养皿置于透射光中来照射板。使用可商购获得的细菌计数软件手动或用相机和计算机计数单独的菌落,并以CFU/ml或CFU/克计算样品中CFU的数目。涉及基于培养的方法的更多细节公开于Brugger, S.D.等人, Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. PLOS ONE 2012; 7(3): e33695中。

[0087] 纯度与特性

[0088] 除了测量效能和水活度之外,可以测试由上述干燥方法生产的原料药物粉末的纯度和特性。使用本领域熟知的方法,以及如美国药典方法<61>微生物计数试验和美国药典方法<62>针对特定微生物的试验中所述测定原料药物粉末的纯度。通过使用可商购获得的试剂盒(例如Power Soil DNA分离试剂盒, Mo Bio)分离基因组DNA,使用特异性引物通过PCR扩增16S rRNA基因,使用商业DNA测序服务(MCLAB)对基因进行测序,以及将序列与参考标准进行比较,来进行原料粉末和最终药物产品中乳杆菌物种的遗传鉴定。使用本领域熟知的方法,例如重复序列聚合酶链式反应(Rep PCR)以及如美国专利第6,093,3941号、第8,

329,447号和第8,642,029号中所述,测定原料药粉末中乳杆菌菌株的特性。

[0089] 用非活性赋形剂稀释菌粉

[0090] 为了遵守美国食品和药物管理局(FDA)商定和开发的效能和剂量指南,使用药学上可接受的赋形剂稀释原料乳杆菌药物粉末的活性。本领域已知的任何合适的非活性的药学上可接受的赋形剂(即稀释剂)可用于稀释乳杆菌药物粉末的效能。在一些实施方案中,稀释剂可以是麦芽糖糊精、预糊化淀粉、乳糖、Pharmasperse®、甘露糖醇、木糖醇、微晶纤维素、糖或它们的组合。在其它实施方案中,非活性填充剂可以与另一种稀释剂组合使用。在其它实施方案中,麦芽糖糊精或预糊化淀粉可以用于稀释原料乳杆菌药物粉末。在一些实施方案中,麦芽糖糊精用于稀释原料乳杆菌药物粉末。

[0091] 在一些实施方案中,用非活性赋形剂将原料乳杆菌药物粉末稀释3倍至10倍。在其它实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与非活性赋形剂以粉末与非活性赋形剂的比率为1:1至1:12w/w组合。在一些实施方案中,原料乳杆菌药物粉末可以与非活性赋形剂以1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11或1:12w/w的粉末与非活性赋形剂的比率组合。在具体的实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与非活性赋形剂以粉末与非活性赋形剂的比率为1:1至1:10w/w组合。在具体的实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与非活性赋形剂以粉末与非活性赋形剂的比率为1:1至1:5w/w组合。在一些实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与非活性赋形剂以粉末与非活性赋形剂的比率为1:1至1:3w/w组合。

[0092] 在具体的实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与麦芽糖糊精以1:1至1:10w/w的粉末与麦芽糖糊精的比率组合。在具体的实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与麦芽糖糊精以1:1至1:5w/w的粉末与麦芽糖糊精的比率组合。在一些实施方案中,可以将原料乳杆菌药物粉末与麦芽糖糊精以1:1至1:3w/w的粉末与麦芽糖糊精的比率组合。被称为药物产品的稀释的干燥原料乳杆菌药物粉末的效能可以为 10^8 CFU/g至 10^{11} CFU/g,或者为 10^8 CFU/g至 10^{10} CFU/g。更优选的药物产品可以具有大于 10^9 CFU/g的活性。

[0093] 药物产品可以约100mg至600mg的剂量包装。在一些实施方案中,药物产品剂量可以以约100mg或约150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg或600mg的剂量包装。在其它实施方案中,药物产品可以以约150mg至约450mg、或约150mg至约400mg、或约150mg至约350mg的剂量包装。在一些实施方案中,药物产品可以以约150mg至250mg的剂量包装。在具体的实施方案中,药物产品可以以约200mg的剂量包装。

[0094] 可以将药物产品放置在医用粉末施药器(被称为最终药物产品)中,并包装以在运输和储存过程中防止水分和氧气。该包装可以包含用于这种保护的合适的材料,例如Mylar或金属膜袋。在一些实施方案中,将最终药物产品密封到单独的包装中,例如用于单独的剂量。

[0095] 使用干燥保存的乳杆菌最终药物产品

[0096] 如本文所述,任何合适的乳杆菌物种和菌株的最终药物产品(即,干燥粉末)可以用于预防和/或治疗阴道感染(即,异常阴道微生物群)。这种阴道感染包括但不限于细菌性阴道病、酵母菌性阴道炎、淋病、衣原体、滴虫病、人免疫缺陷病毒感染、2型单纯疱疹病毒(HSV-2)、尿路感染和盆腔炎性疾病。在一些实施方案中,最终药物产品可以用于预防和/或治疗细菌性阴道病、酵母菌性阴道炎或尿路感染。在具体的实施方案中,干燥粉末可以用于

预防和/或治疗细菌性阴道病(BV)。

[0097] 可以使用本领域已知的任何合适的手段来检测和诊断异常的阴道微生物群。阴道感染可以是有症状的或无症状的。症状通常包括异常的气味和/或分泌物,以及瘙痒和/或疼痛的不适。根据阴道感染,女性可以在没有医学咨询或诊断设备或试剂盒的情况下将其检测出来。例如,用于检测酵母菌性阴道炎的一些廉价的非处方试剂盒是可获得的(例如,Vagisil™)。

[0098] 在一些情况下,执业医师将检测和诊断阴道感染。临床标准要求存在至少三种症状,包括上文提及的那些症状,阴道流体pH>4.5以及显微镜检查存在线索细胞(例如,布满粘附球杆菌的阴道上皮细胞)。例如,可以通过例如Amse1临床标准或革兰氏染色的阴道涂片(Nugent评分系统)来检测细菌性阴道病。革兰氏染色的阴道涂片用于测定乳杆菌(革兰氏阳性细菌)、革兰氏阴性和革兰氏可变杆菌和球菌(即,阴道加德纳菌、普雷沃氏菌(Prevotella)、卟啉单胞菌(Porphyromonas)和消化链球菌(peptostreptococci))以及BV特有的弯曲革兰氏阴性杆菌(即,动弯杆菌(Mobiluncus))的相对浓度。用于各种阴道感染的检测和诊断方法是本领域熟知的,并且描述于美国专利第8,329,447号中。另外参见<https://www.cdc.gov/std/tg2015/bv.htm>。

[0099] 本发明的干燥粉末可以单独施用或与用于预防和/或治疗阴道感染的任何其它疗法组合(例如,同时、之前和/或之后)施用。可以以有效降低异常阴道微生物群水平的量施用用于预防和/或治疗阴道感染的任何其它疗法的施用。用于预防和/或治疗阴道感染的其它疗法可以包括本领域中熟知的抗生素或抗病毒剂。在一些实施方案中,用于预防和/或治疗阴道感染的其它疗法可以是抗生素。用于预防和/或治疗异常阴道微生物群的合适的抗生素是本领域熟知的。这种抗生素包括但不限于克林霉素、甲硝唑和替硝唑。用于与本发明的干燥粉末结合使用的抗生素可以是用于施用的任何合适的形式。例如,抗生素可以局部递送(作为凝胶或乳膏剂),或以口服或阴道片剂、胶囊或栓剂递送。在具体的实施方案中,以局部凝胶施用抗生素。

[0100] 抗生素治疗可以每天施用1-2次。在具体的实施方案中,抗生素治疗可以每天施用1次。

[0101] 在本发明的一些实施方案中,抗生素可以施用2至7天。在其它实施方案中,抗生素可以施用2、3、4、5、6和7天。在一些其它实施方案中,抗生素可以施用2至7天、或3至6天、或4至5天、或4至7天。在具体的实施方案中,抗生素可以施用2至7天。在另一个实施方案中,抗生素可以施用7天。在另一个实施方案中,抗生素可以施用5天。

[0102] 在一些实施方案中,干燥粉末的施用是在抗生素施用方案的最后几天期间(即,在抗生素施用方案完成之前2至4天)。在其它实施方案中,在抗生素施用方案完成后施用干燥粉末。可以在抗生素施用方案完成后每天施用1次或2次干燥粉末。在一些实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后每天施用2次干燥粉末。在具体的实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后每天施用1次干燥粉末。

[0103] 在本发明的一些实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后施用1至14天的干燥粉末。在其它实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后施用1、2、3、4、5、6、7、10、12或14天的干燥粉末。在一些其它实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后施用2至12天、或3至10天、或4至7天、或5至6天的干燥粉末。在具体的实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后

施用5至7天的干燥粉末。在另一个实施方案中,可以在抗生素施用方案完成后施用5天的干燥粉末。

[0104] 在抗生素施用方案和初始干燥粉末施用方案完成后,本发明的干燥粉末可再施用一段时间。例如,在使用干燥粉末完成初始治疗(即,每天1剂持续7天)之后,可以每周施用1至5次干燥粉末。在一些实施方案中,可以在初始干燥粉末治疗方案完成后每周施用1次、2次、3次、4次或5次干燥粉末。在其它实施方案中,可以在初始干燥粉末治疗方案完成后以每周1至4次、或每周2至5次、或每周1至3次、或每周1至2次施用干燥粉末。在具体的实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后每周施用1次干燥粉末。

[0105] 在本发明的一些实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后施用1至26周的干燥粉末。在其它实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后施用1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26周干燥粉末。在一些其它实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后施用2周至26周、或3周至24周、或4周至22周、或5周至20周、或6周至18周、或7周至16周、或8周至14周、或10周至12周的干燥粉末。在具体的实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后施用5周至10周的干燥粉末。在另一个实施方案中,可以在完成初始干燥粉末治疗方案后施用10周的干燥粉末。

[0106] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指出通过引用并入本文。

[0107] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过示例和实例的方式详细描述了上述发明,但是根据本发明的教导,对于本领域的普通技术人员显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对本发明进行某些改变和修改。

[0108] IV. 实施例

[0109] 下述实施例仅通过示例方式而非通过限制性方式被提供。本领域技术人员将容易认识到可改变或修改多种非关键参数以产生基本类似的结果。

[0110] 实施例1制备乳杆菌的干燥组合物

[0111] 本实施例详细说明了制备粉末形式的乳杆菌的干燥组合物作为医疗产品一般策略,包括细菌培养、保存介质中的悬浮、干燥、稀释和包装。本文所述的用于培养和加工卷曲乳杆菌SJ-3C的程序可应用于任何适用于本发明的微生物。

[0112] 最初的卷曲乳杆菌SJ-3C (SJ-3C) 细胞可以从保藏机构美国典型培养物保藏中心(ATCC)以ATCC编号PTA-10138获得。制备这些细胞的主细胞库和工作细胞库,随后可将其用于制备干燥的乳杆菌组合物。

[0113] 首先将SJ-3C细胞涂铺到改良的de Man, Rogosa和Sharpe (MRS) 琼脂板上,并在厌氧条件下于37℃生长72小时。将来自板的细胞接种到10mL改良的MRS中,并在37℃下厌氧温育24小时。然后将该培养物转移到490mL生长培养基中,并在37℃下温育24小时,然后转移到5L Bellco生物反应器中的4.5L培养基中。将5升培养物在37℃下厌氧温育另外24小时以用作发酵罐接种物。

[0114] 在用氮气鼓泡的改良MRS培养基的存在下,在pH 6.0的发酵罐(100L发酵罐)中进行发酵。通过加入接种物开始发酵,并在细胞达到早期稳定期并停止生长时约15小时后完成发酵。此时,葡萄糖被耗尽,乳酸产生停止,培养物在600nm处的光密度(OD600)保持恒定并收获细胞。

[0115] 收获细胞,浓缩,并通过在无菌密闭中空纤维系统中使用切向流膜将缓冲液交换成磷酸盐缓冲盐水(渗滤)来洗涤。当残余乳酸盐浓度达到收获时的起始值的10%并且渗透物的pH保持恒定时,将细胞从收获系统中无菌地取出,并且通过在1500xg离心20分钟(2-8℃)来收集。

[0116] 将细胞团块重悬于保存介质溶液中,每克细胞体(cell paste)使用2.5mL保存溶液。保存介质溶液含有在10mM磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的15%海藻糖、6%木糖醇和1%抗坏血酸钠,其用于制备多批收获的SJ-3C浆液。所得的多批的保存介质细胞浆液具有 1×10^{10} CFU/mL至 5×10^{10} CFU/mL的计算活性。将浆液转移到无菌的Lyoguard™盘中并在Virtis Genesis冻干机中冻干。在冻干之前通过板计数测定细胞浆液的活力。将含有细胞饼的Lyoguard™盘置于具有干燥剂的热密封袋中,用氮气吹扫,并保持在2-8℃下直至研磨。

[0117] 通过使用锥磨机,将冻干的细胞饼与作为防结块剂的0.5%胶态二氧化硅一起碾磨来生产SJ-3C原料药物质。用氮气(N₂)吹扫原料粉末,并将其与干燥剂一起储存在2-8℃的热封袋中,直至用于制造药物产品。使用如先前描述的方法和本领域技术人员已知的那些方法测试SJ-3C原料药物质的纯度、效能(CFU)、特性和残留水分。所得批次的干燥SJ-3C原料药物质的理想活性应为 5×10^{10} CFU/g至 1.0×10^{11} CFU/g。干燥的SJ-3C原料药物质的理想水活度应<0.220。当测试纯度时,所得的SJ-3C原料药物质将含有<200CFU/g的总需氧计数,<20CFU/g的总酵母菌和霉菌,以及不存在令人反感的有机体。通过16S rRNA基因序列证实所得SJ-3C原料药物质的特性。

[0118] 用麦芽糖糊精将原料药物质稀释3至10倍,得到 2×10^9 CFU/剂至 5×10^9 CFU/剂的最终剂量。剂量为200mg。将一剂稀释的药物物质置于医用粉末施药器中并将其包装成最终的药物产品。

[0119] 实施例2含有和不含动物来源的赋形剂的保存介质的制剂研究

[0120] 下述实施例显示了对干燥粉末卷曲乳杆菌表现出良好的室温稳定性的无脱脂乳的保存介质制剂的开发和鉴定。该实施例说明当动物来源的赋形剂从保存介质中除去时,干燥的乳杆菌粉末的稳定性增加。描述使用卷曲乳杆菌CTV-05的保存介质培养物的配制和开发的下述程序可应用于适合用于本发明的任何微生物。

[0121] 为了保存制剂的开发研究,在搅拌的生物反应器BioFlo 110发酵罐和生物反应器(New Brunswick Scientific,Edison,NJ)中,使卷曲乳杆菌CTV-05在1升规模上的pH 6.0的改良MRS培养基中生长。使用分批发酵方法,并且当葡萄糖消耗和乳酸生产完成时,在早期稳定期收获细胞。发酵过程通常产生 1.0×10^9 - 1.5×10^9 CFU/mL,细胞活力>90%。通过离心回收细胞,用磷酸盐缓冲盐水洗涤,并与一种或多种保存基质混合。然后将混合物在Virtis Advantage冻干机中冷冻干燥。

[0122] 最初,在含有不同浓度的用于保存乳杆菌的赋形剂的16种保存基质中评价CTV-05的低温保存和加速稳定性,所述赋形剂包括脱脂乳、海藻糖、木糖醇、抗坏血酸、 α -生育酚和磷酸盐缓冲液(表2)。

[0123] 表2含有脱脂乳的保存基质的组成

编号	成分(%, w/w)						
	抗坏血酸钠	α -生育酚	木糖醇	脱脂乳	海藻糖	NaPO4*	
[0124]	1	0.1	0.2	2	5.0	5.0	10
	2	1.0	0.2	2	15	5.0	10
	3	0.1	1.2	2	15	15	10
	4	1.0	1.2	2	5.0	15	10
	5	0.1	0.2	6	15	15	10
	6	1.0	0.2	6	5.0	15	10
	7	0.1	1.2	6	5.0	5.0	10
	8	1.0	1.2	6	15	5.0	10
	9	0.1	0.2	2	5.0	15	20
	10	1.0	0.2	2	15	15	20
	11	0.1	1.2	2	15	5.0	20
	12	1.0	1.2	2	5.0	5.0	20
	13	0.1	0.2	6	15	5.0	20
	14	1.0	0.2	6	5.0	5.0	20
	15	0.1	1.2	6	5.0	15	20
	16	1.0	1.2	6	15	15	20

[0125] *磷酸钠的量以mM测量

[0126] 将样品置于血清小瓶中并在-40℃下冷冻5小时,然后在真空中于-40℃下进行30小时的初步干燥和在25℃下进行20小时的二次干燥。将样品包装在具有干燥剂的箔袋中并且在37℃下储存。定期取出粉末样品,通过在MRS琼脂上涂铺并且在0、10和30天进行菌落计数来测量活力(即,活性)。如表3所示,制剂#6和#16在37℃下表现出最佳的储存稳定性(初始活力的70%-75%的保留)。

[0127] 表3CTV-05在含有脱脂乳的保存基质中在37℃下的稳定性

编号	T ₀ 时的 CFU/g	T ₁₀ 时的 CFU/g	T ₃₀ 时的 CFU/g	T ₃₀ 的稳定性
				(%的 T ₀ 活性)
1	4.62x10 ¹⁰	3.17x10 ⁹	2.05x10 ⁹	4.4
2	2.34x10 ¹⁰	8.24x10 ⁹	4.20x10 ⁹	17.9
3	1.04x10 ¹⁰	1.11x10 ⁹	5.49x10 ⁸	5.3
4	1.69x10 ¹⁰	3.78x10 ⁹	2.15x10 ⁹	12.7
5	8.99x10 ⁹	6.80x10 ⁹	4.05x10 ⁹	45.1
6	1.60x10 ¹⁰	1.51x10 ¹⁰	1.13x10 ¹⁰	70.6
7	2.43x10 ¹⁰	2.43x10 ⁸	7.41x10 ⁷	0.3
8	2.10x10 ¹⁰	9.41x10 ⁹	6.27x10 ⁹	29.9
9	2.18x10 ¹⁰	2.06x10 ⁹	3.62x10 ⁸	1.7
10	1.21x10 ¹⁰	6.56x10 ⁹	3.05x10 ⁹	25.2
11	1.54x10 ¹⁰	1.82x10 ⁹	6.04x10 ⁸	3.9
12	2.07x10 ¹⁰	4.52x10 ⁹	1.86x10 ⁹	9
13	2.14x10 ¹⁰	1.14x10 ¹⁰	5.32x10 ⁹	24.9
14	3.80x10 ¹⁰	1.59x10 ¹⁰	4.68x10 ⁹	12.3
15	9.79x10 ⁹	5.65x10 ⁹	3.70x10 ⁹	37.8
16	7.34x10 ⁹	7.32x10 ⁹	5.55x10 ⁹	75.6

[0129] 使用与上述相同的16种制剂进行类似的实验,其中除去了脱脂乳组分(表4)。

[0130] 表4无脱脂乳的保存基质的组成

编号	成分(%, w/w)				
	抗坏血酸钠	α -生育酚	木糖醇	海藻糖	NaPO4 *
1	0.1	0.2	2	5.0	10
2	1.0	0.2	2	5.0	10
3	0.1	1.2	2	15	10
4	1.0	1.2	2	15	10
5	0.1	0.2	6	15	10

	6	1.0	0.2	6	15	10
	7	0.1	1.2	6	5.0	10
	8	1.0	1.2	6	5.0	10
	9	0.1	0.2	2	15	20
	10	1.0	0.2	2	15	20
[0132]	11	0.1	1.2	2	5.0	20
	12	1.0	1.2	2	5.0	20
	13	0.1	0.2	6	5.0	20
	14	1.0	0.2	6	5.0	20
	15	0.1	1.2	6	15	20
	16	1.0	1.2	6	15	20

[0133] *磷酸钠的量以mM测量

[0134] 如下表5中所示,不含脱脂乳的制剂#6和#16表现出类似的初始效能和在37℃下的最高储存稳定性(初始活力的约25%)。

[0135] 表5 CTV-05在无脱脂乳的保存基质中在37℃下的稳定性

	编号	T ₀ 时的 CFU/g	T ₁₀ 时的 CFU/g	T ₃₁ 时的 CFU/g	T ₃₁ 的稳定性 (%的 T ₀ 活性)
	1	6.70x10 ¹⁰	1.50x10 ⁹	2.03x10 ⁸	0.3
	2	8.10x10 ¹⁰	1.09x10 ¹⁰	2.90x10 ⁹	3.6
	3	3.00x10 ¹⁰	1.89x10 ⁹	8.61x10 ⁸	2.9
	4	3.77x10 ¹⁰	9.09x10 ⁹	2.80x10 ⁹	7.4
	5	3.16x10 ¹⁰	4.41x10 ⁹	7.79x10 ⁸	2.5
	6	3.07x10 ¹⁰	1.32x10 ¹⁰	7.36x10 ⁹	24
[0136]	7	7.53x10 ¹⁰	1.36x10 ⁸	7.90x10 ⁶	0.01
	8	6.45x10 ¹⁰	1.66x10 ⁹	5.47x10 ⁷	0.08
	9	2.77x10 ¹⁰	1.91x10 ⁹	2.82x10 ⁸	1.0
	10	3.00x10 ¹⁰	5.52x10 ⁹	1.68x10 ⁹	5.6
	11	4.87x10 ¹⁰	6.91x10 ⁸	1.92x10 ⁸	0.39
	12	4.80x10 ¹⁰	5.42x10 ⁹	5.19x10 ⁹	10.8
	13	6.07x10 ¹⁰	2.69x10 ⁸	4.09x10 ⁷	0.067
	14	5.69x10 ¹⁰	2.02x10 ⁹	2.30x10 ⁸	0.4
	15	2.49x10 ¹⁰	2.84x10 ⁹	6.56x10 ⁸	2.6
	16	2.60x10 ¹⁰	1.39x10 ¹⁰	6.66x10 ⁹	25.6

[0137] 虽然制剂#6和#16中的脱脂乳似乎改善了储存稳定性,但较高浓度的抗坏血酸钠和木糖醇也似乎改善了储存稳定性。然而,较高浓度的 α -生育酚似乎没有改善CTV-05的储存稳定性,并且随后的实验显示 α -生育酚(及其媒介物,吐温20)的去除导致CTV-05的稳定性改善。

[0138] 在从上表2中的制剂6的保存基质中除去 α -生育酚(和吐温20)之后,确定也可以除去脱脂乳而不会不利地影响冷冻干燥期间的低温保护或在25℃下的长期储存稳定性(图1)。因此,使用含有15%海藻糖、6%木糖醇、1%抗坏血酸钠和10mM磷酸钠(pH7.4)的保存溶液(图1,上面的线)实现低温保护和室温稳定性的最佳组合。与含有5%脱脂乳的相同制剂相比,该制剂提供了更好的稳定性(图1,下面的线)。

[0139] 实施例3谷氨酸一钠改善稳定性的用途

[0140] 按照实施例2的程序,在四种不同的保存介质中配制培养的卷曲乳杆菌CTV-05(LACTIN-V)细胞:1) 15%海藻糖、6%木糖醇、1%抗坏血酸钠和10mM磷酸钠,pH7.4(三角形);2) 与1)相同的保存介质,以及另外5%的谷氨酸一钠(倒三角形);3) 12%海藻糖、8%木糖醇、1%抗坏血酸钠和10mM磷酸钠,pH7.4(圆圈);和4) 与3)相同的保存介质,以及另外5%的谷氨酸一钠(正方形)。如图2中所示,谷氨酸一钠改善了两种粉末制剂在升高的温度(37℃)下的稳定性,同时对初始低温保存没有影响。

[0141] 实施例4干燥组合物治疗异常阴道微生物群的用途

[0142] 该实施例详述了体内研究,其显示了本发明的乳杆菌可以在体内使用,以粉末的形式递送给患者,以重新定殖患有复发性细菌性阴道病的女性的阴道。

[0143] 患有复发性细菌性阴道病(BV)的25岁女性患者患有BV感染的症状,例如异常的阴道气味和分泌物,以及瘙痒和疼痛的不适。通过Amsel临床标准(满足 ≥ 3 个标准)在女性患者中检测到BV,并通过Nugent评分系统(Nugent评分为7-10)在微生物学上确认了BV。

[0144] 患者接受用0.75%局部甲硝唑(MetroGel®)进行的初始标准化抗生素治疗,每天一次,持续5天。在甲硝唑治疗完成后,女性患者开始使用本发明的乳杆菌SJ-3C药物产品进行治疗。使用包装的医用粉末施药器对患者阴道施用200mg剂量的具有 2×10^9 CFU/剂的活性的SJ-3C药物产品。在睡眠之前,患者每天接受一个剂量的SJ-3C药物产品一次,持续连续5天,然后进行每周两次治疗,持续10周。

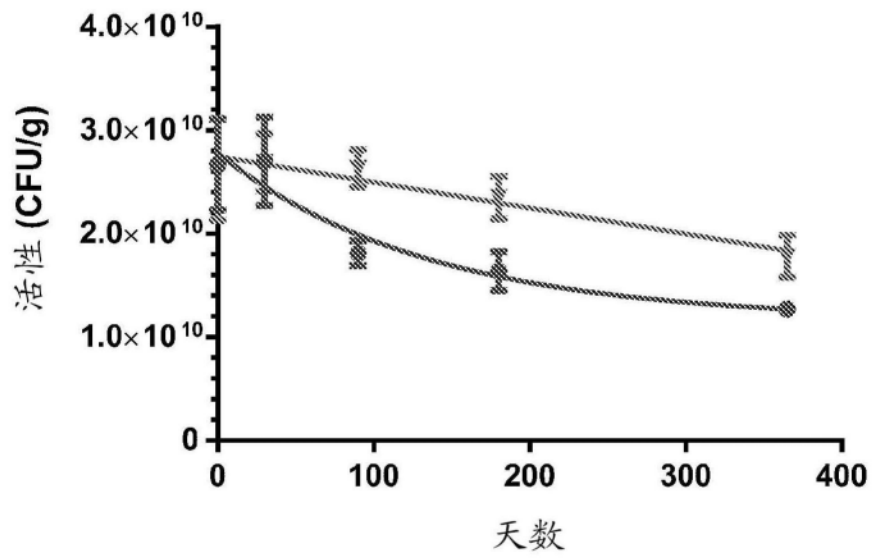


图1

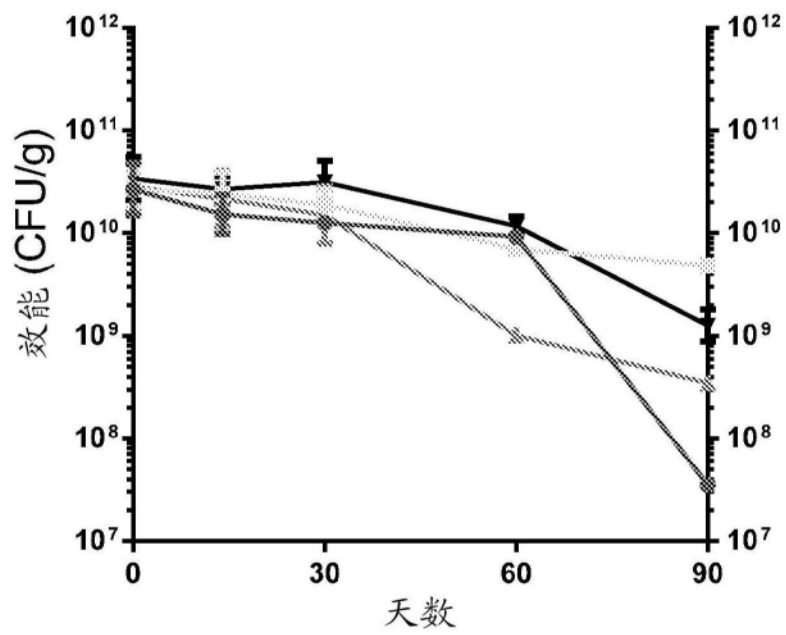


图2