

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510018924.5

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年8月27日

[11] 授权公告号 CN 100413962C

[22] 申请日 2005.6.16

[21] 申请号 200510018924.5

[73] 专利权人 华中科技大学同济医学院附属同济
医院

地址 430030 湖北省武汉市华中科技大学
同济医学院基础医学院免疫系

[72] 发明人 王晶 胡俊波 徐敏超 胡北

[56] 参考文献

CN -1541101 -A 2004.10.27

WO -0308023 -A2 2003.10.2

WO -02086153 -A1 2002.10.31

审查员 宋智刚

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限责任公
司

代理人 王和平

权利要求书1页 说明书12页 附图4页

[54] 发明名称

一种作用于产超广谱 β - 内酰胺酶大肠杆菌噬菌体

[57] 摘要

一种作用于超广谱 β - 内酰胺酶大肠杆菌噬菌体，本发明涉及一种宽宿主谱产超广谱 β - 内酰胺酶 (extended - spectrum β - lactamases, ESBLs) 大肠杆菌噬菌体。噬菌体是一类特异的细菌病毒，裂解性噬菌体能使宿主菌裂解、死亡。噬菌体具有严格宿主特异性，宿主谱特异性发生突变的宽噬菌体裂解其宿主菌和易感宿主菌，可以利用这一特性治疗超广谱 β - 内酰胺酶大肠杆菌感染，将宽噬菌体制成临床抗细菌感染的生物制剂。



- 1、一种作用于产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882
CCTCC NO: M205044。
- 2、一种含有权利要求1所述的大肠杆菌噬菌体的生物制剂。
- 3、权利要求1所述的大肠杆菌噬菌体在制备用于抗感染生物制剂中的用途。

一种作用于产超广谱 β -内酰胺酶 大肠杆菌噬菌体

【技术领域】

本发明涉及一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体，属于微生物生物工程领域。

【背景技术】

随着人类对抗菌药物广泛及不合理应用，耐药性细菌大量出现，多重耐药菌的产生及传播已成为全世界高度关注的问题。人们试图通过不断研制新抗菌药物来对付细菌日益复杂的耐药性，但一种新的抗菌药物在临床应用后，仍将面对细菌耐药性的产生。

β -内酰胺类抗生素是指分子结构中含有 β -内酰胺环的一大类抗生素，包括青霉素类、头孢菌素类及非黄型 β -内酰胺类。 β -内酰胺类抗生素通过抑制青霉素结合蛋白（Penicillin binding proteins, PBPs）发挥治疗作用，阻止细菌细胞壁粘肽（Mucopiptide）的合成，阻止粘肽链的交叉连结，使细菌无法形成细胞壁，从而导致细菌溶解并死亡。

超广谱 β -内酰胺酶（extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs）是指由细菌质粒介导的能水解氧亚氨基 β -内酰胺抗生素，能使第三代头孢菌素（如头孢他啶、头孢唑肟、头孢曲松）和单菌霉素（如氨曲南）失活的一类酶。1983年德国学者knothe首先报道ESBLs以来，许多国家都相继发现产ESBL细菌的出现，目前全世界产ESBL细菌在

临床标本中的分离率有增加的趋势。ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生，以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为代表，10%-20%的菌株产 ESBLs。ESBLs 的产生使治疗更为困难，使得抗菌药物的选择范围更窄。大大减少抗菌药物的选择余地，常导致临床治疗的失败、感染的复发，并增加死亡的危险性。

自从 1915 年英国细菌学家 Twort 和 1917 法国细菌学家 d'Herelle 观察到噬菌体以来，人们对噬菌体的研究日益深入。噬菌体是一类特异的细菌病毒，有毒性噬菌体和温和噬菌体两种类型。毒性噬菌体在宿主菌内以复制方式进行增殖，裂解宿主菌。美国、英国、法国、澳大利亚、波兰、前苏联等国有的科学家一直在研究用裂解性的噬菌体来治疗细菌感染。前苏联，噬菌体制剂被长期大量用于军队中腹泻的控制并取得显著效果。在东欧国家（如波兰）及法国，噬菌体作为一种治疗感染的手段也被长期使用并有成品制剂在市场出售。

近年来，人们已经注意到产 ESBL 细菌的检出率较高，其产生的耐药性已成为全球性的临床治疗难题，产 ESBL 细菌感染导致住院时间延长，费用增加及死亡率增高等。在这种严峻的情况下，各国也都采取合理使用抗生素、减少抗生素应用的选择性及盲目性，加强对细菌耐药率监测，定期通报细菌耐药情况等措施。但 ESBLs 由质粒介导可在菌株间转移和传播，不易控制医院交叉感染和院外细菌扩散。ESBLs 菌株不但对大部分 β -内酰胺类抗生素耐药，而且也对氨基糖苷类、氟喹诺酮类和磺胺类耐药。目前临床对于产 ESBL 细菌感染，使用 β -内酰胺酶抑制剂也可取得一定疗效，但肠科杆菌容易对 β -内

酰胺酶抑制剂产生耐药。对产 ESBL 细菌耐药性分析表明，亚胺培南抗菌作用最强，可作为临床治疗产 ESBL 细菌感染的首选药，但是一种新的抗菌药物在临床应用后，仍不可避免地面对细菌耐药性的产生。因此，积极面对产 ESBL 细菌耐药性这一世界性难题，将噬菌体应用于产 ESBL 细菌感染的治疗中，有着极为广阔前景

【发明内容】

本发明人经过广泛的研究，分离获得一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882，它能有效地在体内、体外杀灭产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882。本发明人在进一步研究中发现，该噬菌体能在体内外裂解多株临床分离产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌，具有较宽的宿主谱。

因而，本发明的一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882，它能够在体内、体外有效地杀灭临床分离的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌。

本发明的第二个目的是证实了宽噬菌体作为一种治疗性物质应用临床抗产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌感染治疗的优越性及可行性，在临床抗产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌感染治疗开发和应用中可以成为有效的生物制剂。

根据本发明，宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 在培养皿上可以形成较大的透亮空斑，并且对所收集的 30 株产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌临床分离株中的 11 株有裂解作用，裂解率为 36.67%，其所能裂解的临床分离株如下：产超广谱 β -内酰胺酶

大肠杆菌 9716、9719、9539、9853、9854、9860、9882、9730、9739、9914、1068。采用本发明的噬菌体用于小鼠菌血症的治疗，在 $MOI \geq 0.0001$ (multiple of infection, 感染复数) 时可以治愈全部小鼠。即使在延迟 3 小时治疗的情况下(此时小鼠已经出现明显的全身感染症状如无活力、卷毛、弓背、眼周脓性渗出物聚集等) 仍有 20% 的疗效。体内、体外实验均证明本发明的噬菌体为一种有效的抗感染物质，具有临床应用的潜在药学价值。

分离获得本发明的噬菌体的过程如下：取医院污水处理中心处理前污水 1L, 加 NaCl 58g, $10,000 \times g$ 离心 10min。取上清, 加 PEG-8000 至终浓度为 10% (w/v), 置 4°C 冰箱过夜后在 4°C , $10,000 \times g$ 离心 20min。用 5ml SM Buffer 重悬沉淀。等体积氯仿抽提一次。300 μl 处理后的污水与 200 μl 过夜培养的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882, 37°C 孵育 20min, 与 3ml 融化顶层琼脂在于 50°C 混匀, 铺平皿, 冷却后倒置于 37°C 过夜培养。次日在培养皿上发现数个大小不等透亮空斑。用 tip 头取下其中最大的空斑, 溶于 2ml LB 培养液中, 按 1: 100 的比例向该培养液中加入过夜培养的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882, 37°C , 250 转振摇 4.5~5 小时。12000 转离心 5 分钟, 取 80% 上清 4°C 保存。取此上清再与产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882 于固体培养基上共培养, 用 tip 挑取较大噬斑。如此反复 3 次, 即可得到大小均一的噬斑。取出噬斑, 按上述方法进行小量扩增, 得到液态的噬菌体扩增液。将过夜培养的宿主菌按 1: 100 稀释, 继续培养至早期对数生长期。加入前述浓缩噬菌体 10 μl , 继续培养

5h, 加入 1/10 体积的氯仿, 继续振摇 10 分钟后, 分别加入 DNase I 及 RNase A 至终浓度均为 1 μ g/ml, 室温放置 30 分钟, 离心除去细菌碎片。加 1/6 体积的 PEG/NaCl, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g 离心 20min。用 1ml SM Buffer 重悬沉淀。加入 1/6 体积 PEG/NaCl 再次沉淀, 冰上孵育 1h, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g 离心 20min。用 200 μ l SM Buffer 重悬沉淀, 即得到扩增的噬菌体, 经过反复扩增可以达到所需的滴度。

本发明的一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 已于 2005 年 5 月 16 日在中国典型微生物保藏中心(中国武汉市, 武汉大学, 布达佩斯条约保藏单位) 保藏, 并收到保藏登记号 CCTCC NO:M205044。

本发明一种作用于产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 CCTCC NO:M205044, 其具有相对较宽宿主谱。

本发明宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 的宿主细胞是产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882, 它含有上述大肠杆菌噬菌体的生物制剂。

本发明一种作用于产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882, 在制备用于抗感染生物制剂中的用途。

本发明所采用的培养基具有以下组成: LB 培养基: 1% tryptone、0.5% Yeast extract 和 1% NaCl。固体琼脂: 1% tryptone、0.5% Yeast extract 和 1% NaCl 及 1.5% Agar。顶层琼脂: 1% tryptone、0.5% Yeast extract 和 1% NaCl 及 0.7% Agarose。SM Buffer 由 0.1M NaCl, 0.01M MgSO₄ \cdot 7H₂O, 0.05M Tris-HCl(pH7.5)和 0.01% gelatin(明胶)配制而成。

PEG/NaCl 由 20%PEG-8000 和 2.5MNaCl 配制而成。

本发明的一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 (CCTCC NO:M205044) 具有以下微生物学特征:

1、形态学特性:

磷钨酸负染色电子显微镜观察, 电镜超微结构显示, 此噬菌体为直径 70nm 微球形颗粒, 棱角不明显, 可见 100nm 长尾轴 (如图 1)。

2、培养学特性

本发明的噬菌体株在宿主菌产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882 的固体培养基上可以形成透亮空斑, 空斑直径 2—3mm, 周围无晕环。

3、生物学特性:

本发明的噬菌体株可以快速的吸附于宿主菌产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882 上, 在 5 分钟内的吸附率达到 98% (如图 2)。该噬菌体的一步生长曲线 (如图 3), 从中可以看出该噬菌体感染宿主菌的潜伏期为 30—40 分钟, 平均裂解量为 110。潜伏期短, 裂解量大, 说明该宽噬噬菌体具有很强的裂解效应。

本发明的一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882, 能同时裂解临床分离的 11 株产超广谱 β -内酰胺酶株大肠杆菌, 其宽噬率为 36.67%, 滴度为 8.1×10^{18} pfu/ml。同时宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 不能裂解金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌, 甲型溶血性链球菌和乙型溶血性链球菌等其它菌属的菌株。

本发明人已经证实, 分离获得的宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶

大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 在动物实验(B1AB/c 小鼠, 雌性, 体重为 $20.0 \pm 0.5\text{g}$) 中可以有效地治疗产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9853 的感染。本发明的一种宽宿主谱产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌噬菌体 ϕ 9882 能治疗小鼠产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌感染, 且对易感宿主菌感染有明显的治疗效果。

本发明通过借助下列实施例将更详细说明本发明。以下实施例仅是说明性的, 应当指出, 本发明并不受这些实施例的限制。

【附图说明】

图 1: ϕ 9882 的电镜照片, 该噬菌体呈正多面体的头部结构, 直径 70nm, 有尾轴机构。尾轴长 100nm。

图 2: 噬菌体 ϕ 9882 的吸收曲线, 在 5 分钟内的吸附率达到 98% (如图 2)。

图 3: 噬菌体 ϕ 9882 的一步生长曲线, 该噬菌体感染宿主菌的潜伏期为 30—40 分钟, 平均裂解量为 110。潜伏期短, 裂解量大, 说明该噬菌体具有很强的裂解效应。

图 4: 宽噬噬菌体的筛选: 以产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9561 为宿主菌制成均匀的菌苔, 然后在培养皿的背部划分 20 个小方格, 在格内滴加噬菌体, 具有裂解性的噬菌体则可以形成透亮的空斑。

图 5 产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9853 感染小鼠最小致死量的确定, $3 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU 的菌液均可以导致全部小鼠死亡, 而 $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ CFU 的菌液不会引起全部小鼠死亡。因此, 3×10^7 CFU 为引起小鼠死亡的最小致死量。

图 6 最小致死量的精确时相性分析, MLD 的菌液经腹腔注射于 10 只小鼠, 小鼠在 8~14 小时内死亡。

图 7 不同剂量噬菌体治疗效果, 噬菌体剂量在 $MOI \geq 0.0001$ 的情况下全部小鼠均可存活并最终痊愈。

图 8 噬菌体延迟治疗效果, 在延迟 40 分钟内的情况下, 全部濒死的小鼠均可治愈。而在延迟治疗 1 小时以上时, 由于此时小鼠的状态较差, 已出现明显的感染症状如卷毛、弓背、眼周渗出物聚集等, 噬菌体的效果有所下降, 但仍具有统计学意义($P < 0.01$)。

【具体实施方式】

实施例 1:

取医院污水处理中心污水 1L, 加 NaCl 58g, $10,000 \times g$ 离心 10min。取上清, 加 PEG-8000 至终浓度为 10% (w/v), 置 4°C 冰箱过夜后在 4°C , $10,000 \times g$ 离心 20min。用 5ml SM Buffer 重悬沉淀。等体积氯仿抽提一次。300 μl 处理后的污水与 200 μl 过夜培养的宿主菌混合, 37°C 孵育 20min, 与 3ml 融化顶层琼脂在于 50°C 混匀, 铺平皿, 冷却后倒置于 37°C 过夜培养。用 tip 头取下其中最大的空斑, 溶于 2ml LB 培养液中, 按 1: 100 的比例向该培养液中加入过夜培养的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 $\phi 9882$, 37°C , 250 转振摇 4.5~5 小时。12000 转离心 5 分钟, 取 80% 上清 4°C 保存。取此上清再与产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 $\phi 9882$ 于固体培养基上共培养, 用 tip 挑取较大噬斑。如此反复 3 次, 即可得到大小均一的噬斑。取此噬斑按前述方法液体扩增, 得到浓缩噬菌体液。

实施例 2:

将过夜培养的宿主菌产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9882 按 1:100 稀释, 继续培养至早期对数生长期。加入实施例 1 中的浓缩噬菌体 10 μ l, 继续培养 5h, 加入 1/10 体积的氯仿, 继续振摇 10 分钟后, 分别加入 DNase I 及 RNase A 至终浓度均为 1 μ g/ml, 室温放置 30 分钟, 离心除去细菌碎片。加 1/6 体积的 PEG/NaCl, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g 离心 20min。用 1ml SM Buffer 重悬沉淀。加入 1/6 体积 PEG/NaCl 再次沉淀, 冰上孵育 1h, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g 离心 20min。用 200 μ l SM Buffer 重悬沉淀, 即得到扩增的噬菌体, 经过反复扩增可以达到所需的滴度。

实施例 3:

用 30 株稀释的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌在 LB 培养基上制成均匀的菌苔。在该培养基背面划分 16-20 个方格并作标记, 然后在相应的方格内滴加噬菌体 ϕ 9882 液, 待液滴干燥后倒置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 12-16h, 观察结果 (图 4)。可见 ϕ 9882 在其中的 11 个菌株上形成噬斑, 具体如下:

- 1、取 100 μ l 过夜生长的细菌培养物, 接入 10ml 培养基的三角烧瓶中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2—2.5 小时后, 经镜检计数, 细胞可达到 10 8 /ml 以上, 用培养基稀释, 配制成 5 \times 10 7 /ml。
- 2、实验前一天测定噬菌体效价, 按此稀释配制成 5 \times 10 9 PFU/ml。
- 3、将上述二者在 37 度水浴中平衡, 按 MOI=10 将 1ml 噬菌体液加入 9ml 的细菌悬液, 混合均匀, 放回水浴中保温或振荡保温。

4、按一定时间间隔（1-5min）取样，稀释 1000 倍，放在冰中，终止吸附。

5、取稀释样品 1ml，在 Ep 管中离心 3min 或 4000rpm 离心 5min，沉降细菌和吸附噬菌体的细胞。

6、经适当稀释（10-100 倍）后，按双层琼脂法测定上清液中的游离噬菌体，培养后记录。

实施例 4:

1、稀释噬菌体液至 5×10^7 PFU/ml。

2、将菌液稀释成 5×10^7 CFU/ml。

3、取 20 支 Ep 管，每管加入 900ul LB 液。

4、取 20 支 Ep 管，每管加入 200ul 菌液。

5、取 20 支试管，每管加入 3ml 熔化的顶层胶，在 50 度水浴箱中保温。

6、将上述噬菌体液，菌液置 37 度温育。

7、取 0.1ml 噬菌体液加入 0.9ml 的细菌悬液中，吸附 5 分钟。

8、取 0.1ml 混合液加至 9.9ml 冰 TSBM 液，混合均匀后各取 1ml。

9、取 0.1ml 重悬液加至 9.9ml LB 液，37⁰C 振荡培养，期间分别于第 0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 分钟取 0.1ml 共培养液与 200ul 菌液混合，5 分钟后铺平皿，分别置于 37⁰C 培养。由上述各点的噬斑数一时间作曲线（图 3），可得该噬菌体潜伏期为 30—40min，裂解量为 112。

实施例 5:

建立全身感染模型 培养过夜的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9853 按 1: 100 的比例稀释于 100ml LB 中, 继续培养至早期对数生长期 (OD_{600} 值约为 0.5), 4°C , 8000g 离心 5 分钟, 弃上清, 将沉淀以等体积灭菌生理盐水重悬, 再次离心, 沉淀溶解于 5ml 生理盐水中。用生理盐水系列稀释的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9853 菌液经腹腔 (intraperitoneal, i.p) 注射于 11 组小鼠, 导致一组 (如无特殊说明, 均为 5 只/组) 小鼠全部死亡的最小剂量为最小致死量 (minimal lethal dose, MLD)。系列稀释的菌液注射于小鼠后, $3 \times 10^7 - 1 \times 10^8 \text{CFU}$ 的菌液均可以导致全部小鼠死亡, 而 $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7 \text{CFU}$ 的菌液不会引起全部小鼠死亡 (如图 5)。因此, $3 \times 10^7 \text{CFU}$ 为引起小鼠死亡的最小致死量。MLD 的产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌 ϕ 9853 菌液经腹腔注射于 10 只小鼠, 小鼠在 6~14 小时内死亡 (如图 6)。

实施例 6:

不同噬菌体剂量对疗效的影响: 取 9 组小鼠, 用 MLD 剂量的菌液经一侧腹腔注射, 立即经另一侧腹腔注射不同剂量的噬菌体 ϕ 9882 制剂 (LB 稀释), 其中一组 i.p 注射 LB 培养液作为对照。观测小鼠的健康状态 20 天以上。如图 7, 噬菌体剂量在 $\text{MOI} \geq 0.0001$ 的情况下全部小鼠均可存活并最终痊愈。MOI=0 和 $\text{MOI} \geq 0.0001$ 情况下小鼠生存率存在显著的统计学差异 ($P < 0.01$)。

实施例 7:

延迟治疗效果监测: 取 7 组小鼠, 均用 MLD 剂量的菌液感染,

并分别于注射后第 0, 20, 40, 60, 180, 360 分钟以 500 μ l 较高滴度的噬菌体 ϕ 9882 液(MOI=200)i.p 注射, 观测 20 天以上。每组小鼠均设置相应的对照组 (即 i.p 注射等量的 LB 培养液)。如图 8, 在延迟 40 分钟内的情况下, 全部小鼠均可免于死亡。而在延迟治疗 1 小时以上时, 由于此时小鼠的状态较差, 已出现明显的感染症状如卷毛、弓背、眼周渗出物聚集等, 噬菌体的效果有所下降, 但仍具有统计学意义($P<0.01$)。

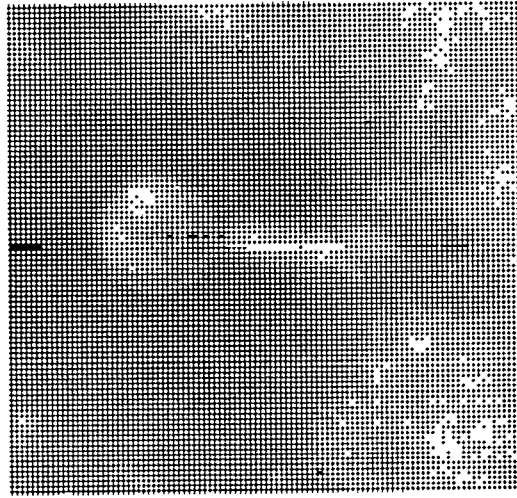


图 1

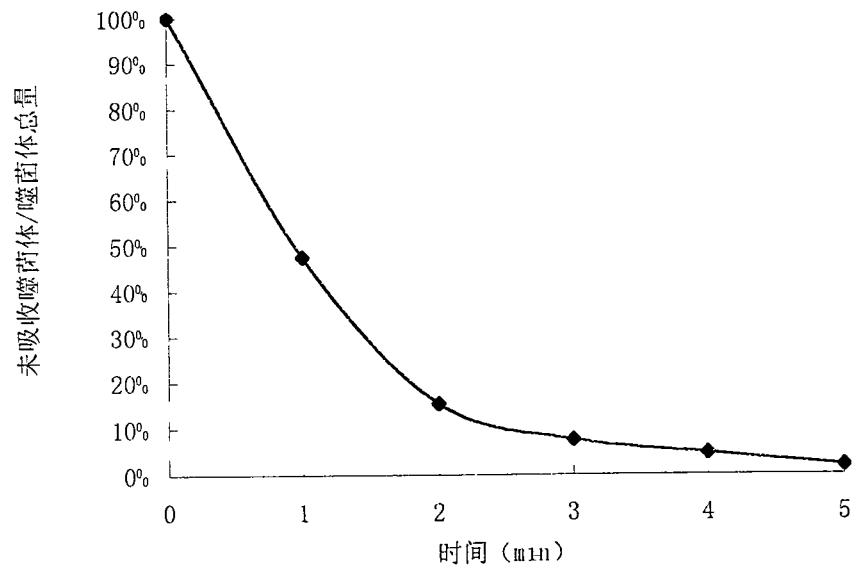


图 2

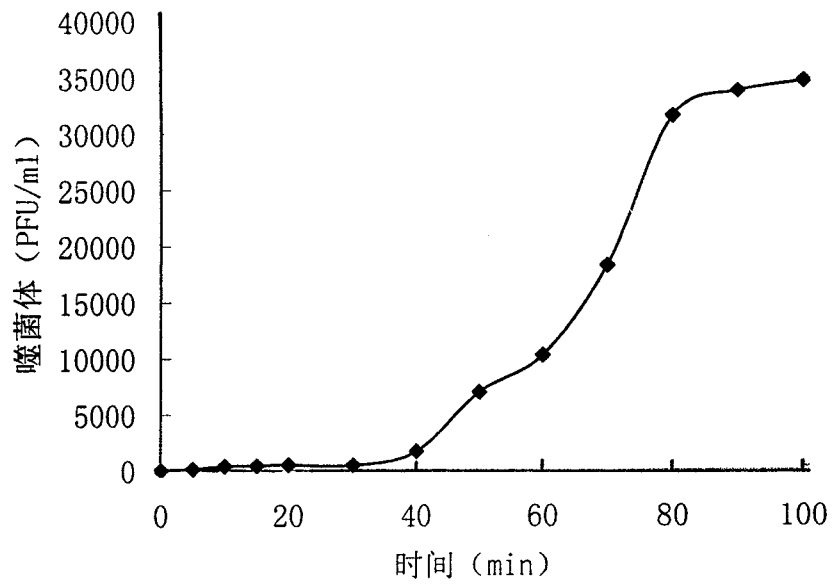


图 3

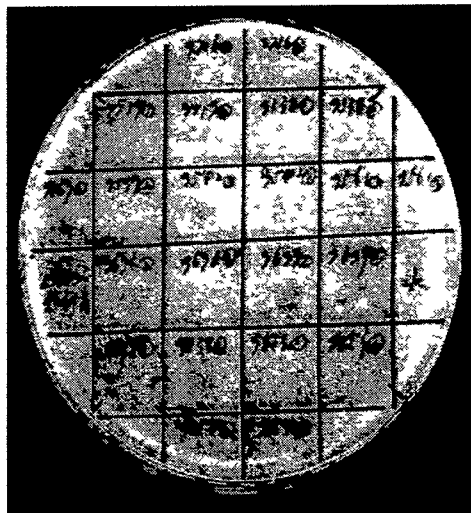


图 4

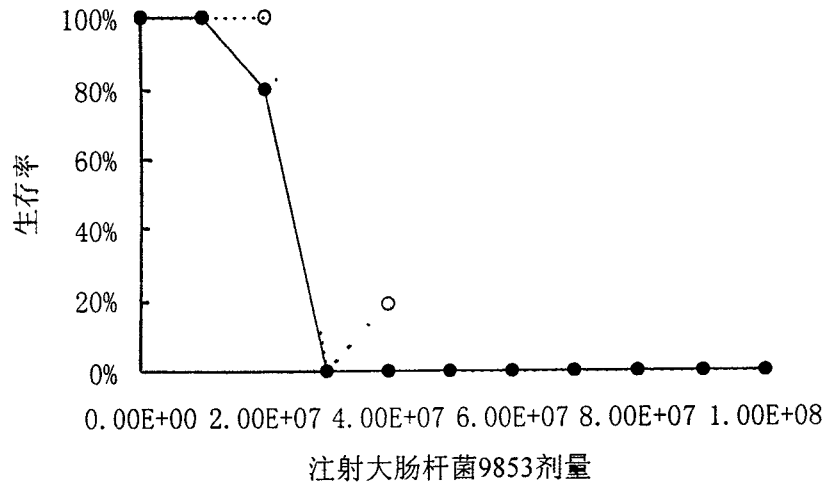


图 5

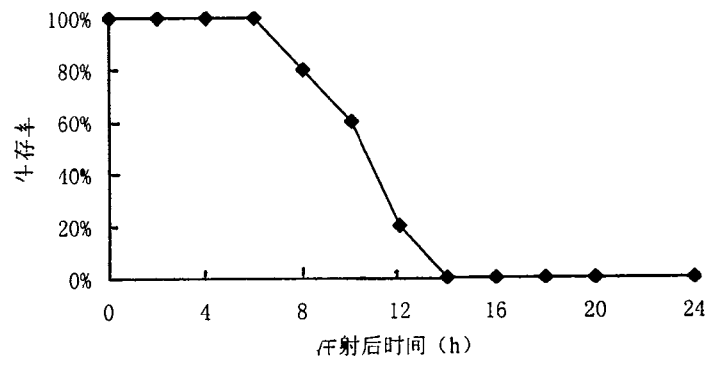


图 6

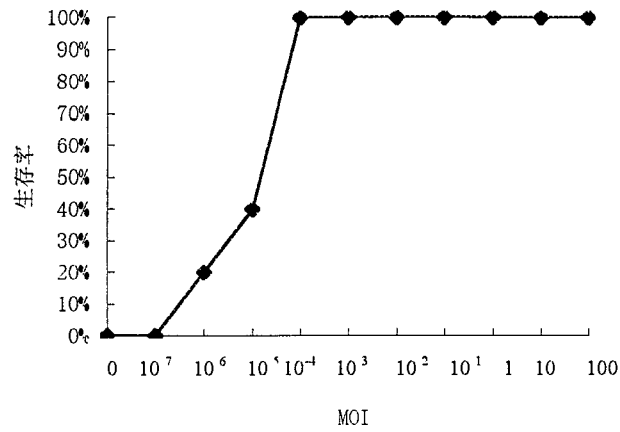


图 7

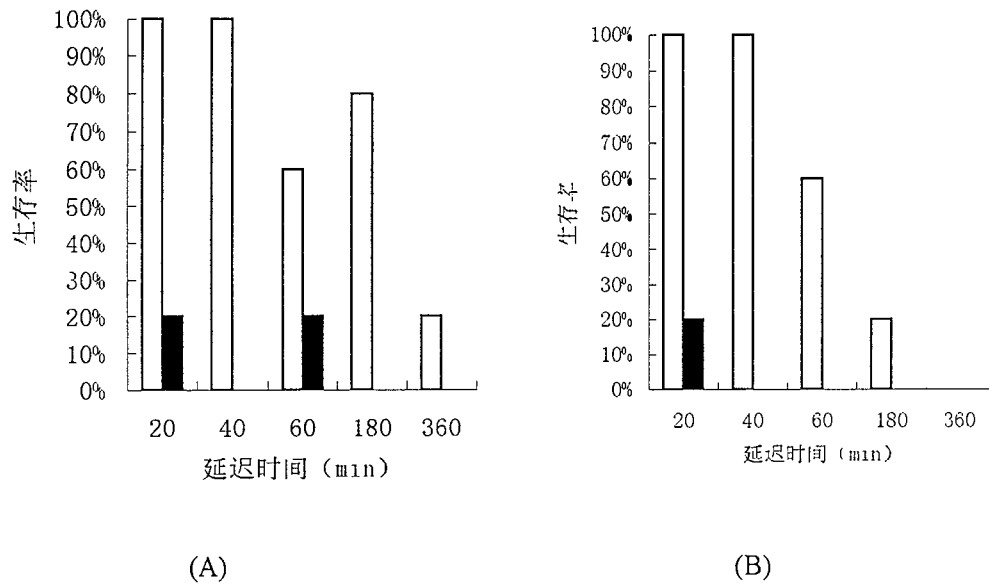


图 8