



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106459876 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580024464.9

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2015.03.27

代理人 张文辉

(30)优先权数据

61/971,913 2014.03.28 US

(51)Int.Cl.

G12N 1/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.10

G12N 1/20(2006.01)

G12N 1/26(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/023026 2015.03.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/148943 EN 2015.10.01

(71)申请人 促接合因子股份有限公司

地址 美国威斯康辛州

(72)发明人 S.R.瓦特 C.W.多尔西

J.A.史密斯

权利要求书8页 说明书21页 附图5页

(54)发明名称

治疗性细菌的小菌落变异株的制备

(57)摘要

本发明涉及大肠杆菌、优选大肠杆菌83972或大肠杆菌HU2117或其修饰形式或变异形式的小菌落变异株(SCV)的分化、分离、增殖和贮藏方法,及使用制备的SCV细菌在受治受试者中和/或在经处理的医疗设备上建立益生菌生物膜的方法。

1. 一种培养益生菌的方法,其包括:
 - a) 分离大肠杆菌小菌落变异株 (SCV) 细菌;
 - b) 用所述SCV细菌接种液体生长培养基,其中所述液体生长培养基补充有基本培养基,其包含:
 - i) 缓冲溶液;
 - ii) 糖或糖醇;和
 - iii) 半胱氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸和赖氨酸,其中所述液体生长培养基不包含添加的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、酵母提取物或复合蛋白的酶消化物;
 - c) 在其中所述SCV细菌菌株生长的条件下孵育所述液体生长培养基以产生SCV细菌细胞的液体培养物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述糖或糖醇包括甘油。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述糖或糖醇由作为所述液体生长培养基中唯一添加的碳源的甘油组成。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述大肠杆菌SCV细菌选自大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117或其变异株或衍生物。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述SCV细菌细胞的液体培养物中包含少于50%,优选少于40%,优选少于30%,优选少于20%,优选少于10%,优选少于5%,优选少于1%,更优选少于0.1%的相应大菌落变异株 (LCV) 细菌细胞。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述SCV细菌细胞的液体培养物不含相应的LCV细菌细胞。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离包括从尿中分离SCV细菌。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离包括使SCV细菌在尿中生长,其中所述尿包含天然尿和合成尿中的一种或多种。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离包括使所述SCV细菌在固体培养基上生长。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述固体培养基为麦康基氏琼脂。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缓冲溶液为3-(N-吗啉代) 丙磺酸 (MOPS) 缓冲溶液。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述MOPS缓冲液为MOPS/三(羟甲基) 甲基甘氨酸。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体生长培养基还包含一种或多种选自天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的氨基酸。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体生长培养基包含硫酸亚铁、氯化铵、硫酸钾、氯化钙、氯化镁和氯化钠中的一种或多种。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体生长培养基还包含钼酸铵、硼酸、氯化钴、硫酸铜、氯化锰和硫酸锌中的一种或多种。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体生长培养基基本上由以下物质组成:

MOPS	40 mM
(3-(N-吗啉代)-丙磺酸)	
三(羟甲基)甲基甘氨酸	4 mM
硫酸铁	10 μ M
氯化铵	9.5 mM
硫酸钾	276 μ M
一水氯化钙	0.5 μ M
氯化镁	525 μ M
氯化钠	50 mM
钼酸铵	2.92×10^{-9} M
硼酸	4×10^{-7} M
氯化钴	3.02×10^{-8} M
硫酸铜	9.62×10^{-9} M
氯化锰	8.08×10^{-8} M
硫酸锌	9.74×10^{-9} M
磷酸氢二钾	1.32 mM
丙氨酸	0.798 mM
精氨酸 HCl	5.2 mM
天冬酰胺	0.4 mM
天冬氨酸, 钾盐	0.4 mM
半胱氨酸盐酸盐一水合物	0.1 mM
谷氨酸, 钾盐	0.7 mM
谷氨酰胺	0.6 mM
甘氨酸	0.8 mM
组氨酸盐酸盐一水合物	0.2 mM
异亮氨酸	0.4 mM
亮氨酸	0.8 mM
赖氨酸二盐酸盐	0.4 mM
甲硫氨酸	0.2 mM
苯丙氨酸	0.4 mM
脯氨酸	0.4 mM
丝氨酸	10.0 mM
苏氨酸	0.4 mM
色氨酸	0.1 mM
酪氨酸	0.2 mM
缬氨酸	0.6 mM
盐酸硫胺素	0.01 mM
泛酸钙	0.01 mM

p对氨基苯甲酸	0.01 mM
p对羟基苯甲酸	0.01 mM
2,3-二羟基苯甲酸	0.01 mM
甘油	0.4 % (w/v)
水	

17. 一种制备包含益生SCV细菌细胞的医用润滑凝胶的方法,其包括:

a) 在水流体中提供包含以下物质的混合物:

i) 益生SCV细菌细胞的液体培养物;

ii) 药学上可接受的胶凝剂;和

iii) 药学上可接受的第一保护剂;

并且

b) 冷冻所述混合物以产生冷冻制剂。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中在真空下干燥所述冷冻制剂以产生干燥制剂。

19. 根据权利要求17或权利要求18所述的方法,其中所述益生SCV细菌细胞的液体培养物是根据权利要求1-16中任一项产生的大肠杆菌SCV细菌细胞的液体培养物。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述胶凝剂选自由以下组成的组:羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、卡波姆、藻酸盐、明胶和泊洛沙姆。

21. 根据权利要求17所述的方法,其中所述混合物还包含药学上可接受的第二保护剂,其中所述第二保护剂与所述第一保护剂不同,并且所述第一和所述第二保护剂选自由以下组成的组:非脂乳固体、海藻糖、甘油、甜菜碱、蔗糖、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20去污剂、Tween 80去污剂和氨基酸盐酸盐。

22. 一种包含益生SCV细菌细胞的冷冻组合物,其根据权利要求17所述的方法产生。

23. 一种用于制备包含益生SCV细菌细胞的医用润滑凝胶的冷冻干燥组合物,所述组合物通过根据权利要求18所述的方法产生。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其根据根据权利要求19所述的方法产生。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述大肠杆菌SCV细菌细胞选自大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117或其变异株或衍生物。

26. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其中在所述SCV细菌细胞制剂中包含少于50%,优选少于40%,优选少于30%,优选少于20%,优选少于10%,优选少于5%,优选少于1%,更优选少于0.1%的相应LCV细菌细胞。

27. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其中所述SCV细菌细胞制剂不含相应LCV细菌细胞。

28. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其中所述胶凝剂选自由以下组成的组:羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、卡波姆、藻酸盐、明胶和泊洛沙姆。

29. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其中所述第一保护剂选自由以下组

成的组：非脂乳固体、蔗糖、海藻糖、甘油、甜菜碱、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20去污剂、Tween 80去污剂和氨基酸盐酸盐。

30. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物，其还包含药学上可接受的第二保护剂，其中所述第二保护剂与所述第一保护剂不同，并且选自由以下组成的组：非脂乳固体、海藻糖、甘油、甜菜碱、蔗糖、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20去污剂、Tween 80去污剂和氨基酸盐酸盐。

31. 一种在医疗设备上形成生物膜的方法，其包括：

a) 提供包含SCV细菌细胞、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻干燥制剂；

b) 将所述冷冻干燥制剂暴露于水流体以形成包含有效量的所述SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶；

c) 使所述医疗设备与所述润滑凝胶接触以产生经处理的设备；并且

d) 将所述经处理的设备暴露于其中在所述经处理的设备上形成SCV细菌细胞的生物膜的条件。

32. 一种在医疗设备上形成生物膜的方法，其包括：

a) 提供包含SCV细菌细胞制剂、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻制剂；

b) 使所述冷冻制剂解冻以形成包含有效量的所述SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶；

c) 使所述医疗设备与所述润滑凝胶接触以产生经处理的设备；并且

d) 将所述经处理的设备暴露于其中在所述经处理的设备上形成SCV细菌细胞的生物膜的条件。

33. 根据权利要求31或权利要求32所述的方法，其中所述医疗设备为导尿管。

34. 根据权利要求33所述的方法，其中所述经处理的设备的所述暴露包括使受试者与所述经处理的设备接触。

35. 一种向受试者施用SCV细菌细胞的方法，其包括：

a) 提供包含SCV细菌细胞制剂、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻干燥制剂；

b) 将所述冷冻干燥制剂暴露于水流体以形成包含有效量的所述SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶；

c) 使所述受试者与所述润滑凝胶接触。

36. 一种向受试者施用SCV细菌细胞的方法，其包括：

a) 提供包含SCV细菌细胞制剂、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻制剂；

b) 使所述冷冻制剂解冻以形成包含有效量的所述SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶和；

c) 使所述受试者与所述润滑凝胶接触。

37. 根据权利要求35或权利要求36所述的方法，其中使所述受试者与所述凝胶接触包

括使医疗设备与所述润滑凝胶接触以产生经处理的设备,并且使所述受试者与所述经处理的设备接触。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述医疗设备为导尿管。

39. 根据权利要求35或权利要求36所述的方法,其中所述SCV细菌细胞为大肠杆菌HU2117或大肠杆菌83972。

40. 一种试剂盒,其包括根据权利要求22-30中任一项所述的组合物。

41. 根据权利要求40所述的试剂盒,其还包括无菌水流体的容器。

42. 根据权利要求41所述的试剂盒,其中所述无菌水流体为水。

43. 根据权利要求40所述的试剂盒,其还包括医疗设备。

44. 根据权利要求42所述的试剂盒,其中所述医疗设备包括导尿管。

45. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述大肠杆菌SCV细菌选自大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117,或其变异株或衍生物。

46. 根据权利要求1-3和45中任一项所述的方法,其中在所述SCV细菌细胞的液体培养物中包含少于50%,优选少于40%,优选少于30%,优选少于20%,优选少于10%,优选少于5%,优选少于1%,更优选少于0.1%的相应LCV细菌细胞。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述SCV细菌细胞的液体培养物不含相应LCV细菌细胞。

48. 根据权利要求1-3和45-47中任一项所述的方法,其中所述分离包括从尿中分离SCV细菌。

49. 根据权利要求1-3和45-48中任一项所述的方法,其中所述分离包括使SCV细菌在尿中生长,其中所述尿包含天然尿和合成尿中的一种或多种。

50. 根据权利要求1-3和45-49中任一项所述的方法,其中所述分离包括使所述SCV细菌在固体培养基上生长。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述固体培养基为麦康基氏琼脂。

52. 根据权利要求1-3和45-51中任一项所述的方法,其中所述缓冲溶液为3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲溶液。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述MOPS缓冲液为MOPS/三(羟甲基)甲基甘氨酸。

54. 根据权利要求1-3和45-53中任一项所述的方法,其中所述液体生长培养基还包含一种或多种选自天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的氨基酸。

55. 根据权利要求1-3和45-54中任一项所述的方法,其中所述液体生长培养基包含硫酸亚铁、氯化铵、硫酸钾、氯化钙、氯化镁和氯化钠中的一种或多种。

56. 根据权利要求1-3和45-55中任一项所述的方法,其中所述液体生长培养基还包含钼酸铵、硼酸、氯化钴、硫酸铜、氯化锰和硫酸锌中的一种或多种。

57. 根据权利要求1-3和45-56中任一项所述的方法,其中所述液体生长培养基基本上由以下物质组成:

MOPS	40 mM
(3-(N-吗啉代)-丙磺酸)	
三(羟甲基)甲基甘氨酸	4 mM
硫酸铁	10 μ M
氯化铵	9.5 mM

硫酸钾	276 μ M
一水氯化钙	0.5 μ M
氯化镁	525 μ M
氯化钠	50 mM
钼酸铵	2.92×10^{-9} M
硼酸	4×10^{-7} M
氯化钴	3.02×10^{-8} M
硫酸铜	9.62×10^{-9} M
氯化锰	8.08×10^{-8} M
硫酸锌	9.74×10^{-9} M
磷酸氢二钾	1.32 mM
丙氨酸	0.798 mM
精氨酸 HCl	5.2 mM
天冬酰胺	0.4 mM
天冬氨酸, 钾盐	0.4 mM
半胱氨酸盐酸盐一水合物	0.1 mM
谷氨酸, 钾盐	0.7 mM
谷氨酰胺	0.6 mM
甘氨酸	0.8 mM
组氨酸盐酸盐一水合物	0.2 mM
异亮氨酸	0.4 mM
亮氨酸	0.8 mM
赖氨酸二盐酸盐	0.4 mM
甲硫氨酸	0.2 mM
苯丙氨酸	0.4 mM
脯氨酸	0.4 mM
丝氨酸	10.0 mM
苏氨酸	0.4 mM
色氨酸	0.1 mM
酪氨酸	0.2 mM
缬氨酸	0.6 mM
盐酸硫胺素	0.01 mM
泛酸钙	0.01 mM
p对氨基苯甲酸	0.01 mM
p对羟基苯甲酸	0.01 mM
2,3-二羟基苯甲酸	0.01 mM
甘油	0.4 % (w/v)
水	

58. 一种制备包含益生SCV细菌细胞的医用润滑凝胶的方法,其包括:

a) 在水流体中提供包含以下物质的混合物:

- i) 根据权利要求1-3和45-57中任一项产生的大肠杆菌SCV细菌细胞的液体培养物;
 - ii) 药学上可接受的胶凝剂;和
 - iii) 药学上可接受的第一保护剂;
- 并且
- b) 冷冻所述混合物以产生冷冻制剂。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中在真空下干燥所述冷冻制剂以产生干燥制剂。

60. 根据权利要求58或权利要求59所述的方法,其中所述胶凝剂选自由以下组成的组:羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、卡波姆、藻酸盐、明胶和泊洛沙姆。

61. 根据权利要求58-60中任一项所述的方法,其中所述混合物还包含药学上可接受的第二保护剂,其中所述第二保护剂与所述第一保护剂不同,并且所述第一和所述第二保护剂选自由以下组成的组:非脂乳固体、海藻糖、甘油、甜菜碱、蔗糖、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20去污剂、Tween 80去污剂和氨基酸盐酸盐。

62. 一种包含益生SCV细菌细胞的冷冻组合物,其根据根据权利要求58和60-61中任一项所述的方法产生。

63. 一种用于制备包含益生SCV细菌细胞的医用润滑凝胶的冷冻干燥组合物,所述组合物通过根据权利要求59-61中任一项所述的方法产生。

64. 一种试剂盒,其包括根据权利要求62和/或权利要求63所述的组合物。

65. 根据权利要求64所述的试剂盒,其还包括无菌水流体、优选无菌水的容器。

66. 根据权利要求64-65中任一项所述的试剂盒,其还包括医疗设备。

67. 根据权利要求66所述的试剂盒,其中所述医疗设备包括导尿管。

治疗性细菌的小菌落变异株的制备

[0001] 本申请要求保护2014年3月28日提交的美国临时申请案序列No. 61/971,913的优先权,其通过引用并入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及制备和使用益生生物体,例如非病原性大肠杆菌(*E. coli*)菌株的小菌落变异株的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 菌尿(Bacteriuria)和脓尿(pyuria)在具有留置导尿管的患者中都存在。抗微生物疗法可暂时消灭细菌,但菌尿迅速复发,并且感染细菌逐渐变得对抗生素有抗性。在插入导管的患者中无症状尿路感染(UTI)的抗微生物(例如,抗生素和/或抗菌剂)治疗尚未被证实有益,因为经治疗和未治疗的插入导管的患者在治疗结束之后几周具有相似的发病率,并且出现UTI症状发作的可能性相等(Nicolle, L.E., *Drugs Aging* 22(8):627-39 (2005)。此外,已经将无症状导管相关UTI(CAUTI)的抗微生物治疗与抗药性生物体的出现联系起来,当出现症状性感染时使管理复杂化。

[0005] 研究已表明,用某些非病原性大肠杆菌菌株预定植膀胱是一种安全且有效的预防或降低各种尿路病原体定植导尿管的体内发生率的途径。

发明概要

[0006] 本发明涉及非病原性大肠杆菌的特定变异形式的制备和增殖。在一些实施方案中,选择小菌落变异株用于治疗性制剂,例如用于含有益生微生物的润滑凝胶的冷冻干燥制剂中。本发明涉及大肠杆菌,优选大肠杆菌83972或大肠杆菌HU2117或其修饰或变异形式的小菌落变异株(SCV)的分化、分离、增殖和储存方法,及使用制备的细菌在受治受试者中建立生物膜的方法。

[0007] 在一些实施方案中,所述技术提供了优选在液体培养物中培养益生菌SCV的方法。在一些实施方案中,所述方法包括分离大肠杆菌小菌落变异株(SCV)细菌,为液体生长培养基接种SCV细菌,其中所述液体生长培养基是补充基本培养基,其包含碳源如糖或糖醇,并且还包含氨基酸半胱氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸和赖氨酸。优选地,所述液体生长培养基不包含添加的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、酵母提取物或复合蛋白的酶消化物。在一些实施方案中,所述液体生长培养基包含缓冲溶液,如3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲溶液。在某些优选实施方案中,MOPS溶液包含MOPS/三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)。

[0008] 培养SCV细菌的方法还包括在其中所述SCV细菌菌株生长的条件下孵育接种的液体生长培养基以产生保持SCV形式,最低限度恢复为正常或“大菌落变异株”(LCV)形式的细菌细胞的液体培养物。在一些实施方案中,SCV细菌细胞的液体培养物包含少于50%,优选少于40%,优选少于30%,优选少于20%,优选少于10%,优选少于5%,优选少于1%,更优选少于0.1%的相应正常或LCV形式的细菌。在一些优选实施方案中,SCV细菌细胞的液体培养物不含或基本上不含相应LCV细菌细胞。

[0009] 在一些实施方案中,碳源包含甘油,并且在某些优选实施方案中,碳源基本上由甘油组成,因为甘油是液体生长培养基中唯一添加的碳源。

[0010] 在一些实施方案中,分离SCV形式的大肠杆菌包括从尿中分离SCV细菌。在一些实施方案中,尿是生物的,即是由人类或动物产生的尿,而在一些实施方案中,尿是合成或人工尿。在一些实施方案中,在尿中培养SCV细菌。在尿中培养SCV细菌可发生在体内(活体内,例如在个体的尿道中),或其可以发生在体外(活体外,例如在实验室的容器中)。

[0011] 在一些实施方案中,分离SCV细菌包括使SCV细菌在固体培养基上,例如在含琼脂的培养基如麦康基氏琼脂(MacConkey's agar)或LB琼脂上生长。

[0012] 在一些实施方案中,液体生长培养基,例如以上所讨论的补充基本培养基,还包含一种或多种选自天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的氨基酸。液体培养基还可含一种或多种盐。在一些实施方案中,液体生长培养基包含硫酸亚铁、氯化铵、硫酸钾、氯化钙、氯化镁和氯化钠中的一种或多种,并且在一些实施方案中,液体生长培养基还包含钼酸铵、硼酸、氯化钴、硫酸铜、氯化锰和硫酸锌中的一种或多种。

[0013] 在某些实施方案中,液体生长培养基是基本上由以下物质组成的确定成分培养基:

	MOPS	40 mM
	3-(N-吗啉代)-丙磺酸	
	三(羟甲基)甲基甘氨酸	4 mM
	硫酸铁	10 μ M
	氯化铵	9.5 mM
	硫酸钾	276 μ M
	一水氯化钙	0.5 μ M
[0014]	氯化镁	525 μ M
	氯化钠	50 mM
	钼酸铵	2.92×10^{-9} M
	硼酸	4×10^{-7} M
	氯化钴	3.02×10^{-8} M
	硫酸铜	9.62×10^{-9} M
	氯化锰	8.08×10^{-8} M
	硫酸锌	9.74×10^{-9} M

	磷酸氢二钾	1.32 mM
	丙氨酸	0.798 mM
	精氨酸 HCl	5.2 mM
	天冬酰胺	0.4 mM
	天冬氨酸, 钾盐	0.4 mM
	半胱氨酸盐酸盐一水合物	0.1 mM
	谷氨酸, 钾盐	0.7 mM
	谷氨酰胺	0.6 mM
	甘氨酸	0.8 mM
	组氨酸盐酸盐一水合物	0.2 mM
	异亮氨酸	0.4 mM
	亮氨酸	0.8 mM
	赖氨酸二盐酸盐	0.4 mM
[0015]	甲硫氨酸	0.2 mM
	苯丙氨酸	0.4 mM
	脯氨酸	0.4 mM
	丝氨酸	10.0 mM
	苏氨酸	0.4 mM
	色氨酸	0.1 mM
	酪氨酸	0.2 mM
	缬氨酸	0.6 mM
	盐酸硫胺素	0.01 mM
	泛酸钙	0.01 mM
	p对氨基苯甲酸	0.01 mM
	p对羟基苯甲酸	0.01 mM
	2,3-二羟基苯甲酸	0.01 mM
	甘油	0.4 % (w/v)
	水	

[0016] 在一些实施方案中,所述技术在例如用于在使用之前润滑医疗设备的医用润滑凝胶中提供了活的益生SCV大肠杆菌。在优选实施方案中,益生凝胶组合物的使用诱导例如在经处理的医疗设备的表面和/或在暴露于经处理装置的组织表面,例如在患者的尿道中形成所述大肠杆菌的生物膜。

[0017] 在一些实施方案中,提供含有SCV大肠杆菌的润滑凝胶包括以下步骤:a)在水流体中提供包含以下物质的混合物:i)如上所述的益生SCV细菌细胞的液体培养物,ii)药学上可接受的胶凝剂,和iii)药学上可接受的第一保护剂;并且b)冷冻所述混合物以产生与润滑凝胶混合的细菌的冷冻制剂。在一些实施方案中,然后在真空下干燥所述冷冻制剂以产生例如用于稳定储存的冷冻干燥制剂。

[0018] 可以如例如在美国专利申请第12/671,370号中所述制备益生大肠杆菌和润滑凝

胶的冷冻干燥制剂,所述专利申请通过引用整体并入本文。在制剂解冻(若冷冻)或用液体复水(若冷冻干燥)时,选择胶凝剂以在使用期间提供合适的润滑功能。在一些实施方案中,胶凝剂包含羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、卡波姆(carbomer)、藻酸盐、明胶和泊洛沙姆(poloxamer)中的一种或多种。在某些优选实施方案中,胶凝剂包含或由羟乙基纤维素组成。

[0019] 在一些实施方案中,含SCV细菌的水流体混合物还包含药学上可接受的第二保护剂,第二保护剂与第一保护剂不同。在某些实施方案中,第一和第二保护剂包含非脂乳固体、海藻糖、甘油、甜菜碱、蔗糖、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20(Tween 20)去污剂、Tween 80(Tween 80)去污剂和/或氨基酸盐酸盐中的一种或多种。

[0020] 在一些实施方案中,所述技术提供了根据上述方法产生的包含益生大肠杆菌SCV细菌细胞的冷冻或冷冻干燥组合物。在一些实施方案中,SCV细菌细胞制剂包含少于50%,优选少于40%,优选少于30%,优选少于20%,优选少于10%,优选少于5%,优选少于1%,更优选少于0.1%的相应正常或LCV形式的细菌。在某些优选实施方案中,SCV细菌细胞制剂不含或基本上不含相应LCV细菌细胞。

[0021] 在一些实施方案中,所述技术提供了通过用SCV大肠杆菌细菌细胞的制剂处理医疗设备在所述设备上形成生物膜的方法。在某些实施方案中,所述技术包括a)提供包含SCV细菌细胞、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻干燥制剂;b)将冷冻干燥制剂暴露于水流体以形成包含有效量的SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶;c)使医疗设备与润滑凝胶接触以产生经处理的设备;并且d)将经处理的设备暴露于其中在经处理的设备上和/或在暴露于经处理的设备的组织上形成细菌细胞的生物膜的条件。

[0022] 在一些实施方案中,在医疗设备上形成生物膜的方法包括a)提供包含SCV细菌细胞制剂(例如,如上所述)、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的冷冻制剂;b)使冷冻制剂解冻以形成包含有效量的SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶;c)使医疗设备与润滑凝胶接触以产生经处理的设备;并且d)将经处理的设备暴露于其中在经处理的设备上和/或在暴露于经处理的设备的组织上形成SCV细菌细胞的生物膜的条件。

[0023] 在某些实施方案中,医疗设备为导尿管。在某些实施方案中,将经处理的设备暴露与生物膜形成条件包括使受试者,例如患者与经处理的设备接触。

[0024] 在另外的实施方案中,所述技术提供了向受试者施用SCV细菌细胞的方法,其包括a)提供包含SCV细菌细胞制剂、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的混合物的冷冻干燥制剂;b)将冷冻干燥制剂暴露于水流体以形成包含有效量的SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶;c)使受试者与润滑凝胶接触。在其它实施方案中,所述技术提供了向受试者施用SCV细菌细胞的方法,其包括a)提供包含SCV细菌细胞制剂、药学上可接受的胶凝剂和药学上可接受的保护剂的混合物的冷冻制剂;b)使冷冻制剂解冻以形成包含有效量的SCV细菌细胞的医学上可接受的润滑凝胶;并且c)使受试者与润滑凝胶接触。

[0025] 在某些实施方案中,使受试者与凝胶接触包括使医疗设备与润滑凝胶接触以产生经处理的设备,并且使受试者与经处理的设备接触。在某些优选实施方案中,医疗设备为导尿管。

[0026] 所述技术还提供了供方便使用上述组合物和方法的试剂盒。例如,在某些实施方案中

案中,所述技术作为试剂盒提供,所述试剂盒包括,例如i)如上所述,包含SCV大肠杆菌细菌细胞的冷冻干燥或冷冻组合物混合物。在所述组合物呈冷冻干燥形式提供的某些实施方案中,试剂盒还可包括无菌水流体例如水的容器,用于使冷冻干燥混合物重新悬浮以产生含有有效量的SCV细菌的润滑凝胶。在一些实施方案中,试剂盒还包括医疗设备,例如导管如导尿管。

附图说明

[0027] 图1A-1C示出了麦康基氏琼脂(A)、LB琼脂(B)或改良MOPS基本琼脂(C)上大肠杆菌HU2117的大小菌落变异株的菌落形态。在每张板的左侧划线接种大菌落变异株,而在右侧划线接种小菌落变异株。

[0028] 图2示出了用SCV型大肠杆菌HU2117的两种不同甘油冷冻剂原液划线接种的麦康基氏琼脂板。左侧板显示HU2117原液A;右侧板显示HU2117原液B。

[0029] 图3示出了用SCV型大肠杆菌HU2117的两种不同甘油冷冻剂原液划线接种的LB琼脂板。左侧板显示HU2117原液A;右侧板显示HU2117原液B。

[0030] 图4示出了用LCV型大肠杆菌83972的两种不同甘油冷冻剂原液划线接种的麦康基氏琼脂板。左侧板显示83972原液A;右侧板显示83972原液B。

[0031] 图5示出了用LCV型大肠杆菌83972的两种不同甘油冷冻剂原液划线接种的LB琼脂板。左侧板显示83972原液A;右侧板显示83972原液B。

[0032] 图6示出了用SCV和LCV形式的大肠杆菌83972的甘油冷冻剂原液划线接种的麦康基氏琼脂板。左侧板显示SCV型CON42-5;右侧板显示LCV型CON19-4A。

[0033] 图7示出了用SCV和LCV形式的大肠杆菌83972的甘油冷冻剂原液划线接种的LB琼脂板。左侧板显示SCV型CON42-5;右侧板显示LCV型CON19-4A。

[0034] 图8A和8B示出了用如本文所述制备的SCV形式的大肠杆菌83972和HU2117的甘油原液划线接种的麦康基氏和LB琼脂板。8A和8B的左侧板显示83972而右侧板显示HU2117。

[0035] 定义

[0036] 为利于本发明的理解,下面定义了许多术语和短语:

[0037] 小菌落变异株(SCV)是指大肠杆菌的变异株,其特征在于,在固体培养基上生长时,形成比相应亲本菌株的正常菌落尺寸小得多的菌落。例如,大肠杆菌的SCV通常在隔夜孵育之后在其生长的琼脂上形成尺寸微小的菌落,而LCV与其它菌落很好地分开时,形成正常尺寸,例如直径1mm或更大的菌落。参见,例如图1,其比较了在麦康基氏琼脂、Luria-Bertani(LB)琼脂和改良MOPS基本琼脂上的大肠杆菌HU2117的LCV和SCV。大肠杆菌菌株的SCV菌落通常占相同生物体的正常或大菌落变异株直径的十分之一或更少。虽然通常在液体培养基中培育期间不形成菌落,但是如果在固体培养基上划线接种液体培养物并且孵育以形成菌落时,所得菌落主要或完全呈SCV形式时,则将微生物的形式视为“SCV”。

[0038] 如本文中所用的大菌落变异株是指具有正常尺寸,在同样生长时通常比相同生物体的SCV直径大至少10倍的变异株。

[0039] 如本文中所用,术语“受试者”是指有待通过本发明的方法或组合物治疗的个体(例如,人、动物或其它生物体)。受试者包括但不限于哺乳动物(例如,鼠、猿、马、牛、猪、犬、猫等),并且最优选地包括人。在本发明的上下文中,术语“受试者”通常是指因为特征在于

存在病原菌的情况,或预期可能暴露于病原菌,将接受或已经接受治疗(例如,施用益生菌和任选地一种或多种其它药剂)的个体。

[0040] 术语“诊断”如本文中所用,是指通过体征和症状(例如,对常规疗法的抗性)或遗传分析、病理分析、组织学分析等识别疾病(例如,因病原菌的存在而引起)。

[0041] 如本文中所用,术语“体外”是指人工环境并且是指在人工环境中发生的过程或反应。体外环境包括但不限于试管和细胞培养。术语“体内”是指自然环境(例如,动物或细胞)并且是指在自然环境中发生的过程或反应。

[0042] 如本文中所用,术语“毒力”是指微生物体的致病性程度,例如,通过产生的疾病的严重程度或其侵入受试者组织的能力指示。通常在实验上通过半数致死剂量(LD₅₀)或半数感染剂量(ID₅₀)来测量。该术语也可用于指任何感染剂产生病理效应的能力。

[0043] 如本文中所用,术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的组合物(例如,益生菌)的量。有效量可以分一次或多次施用、应用或剂量施用并且并非旨在限于特定配制或施用途径。相对容易地测定益生微生物或其它治疗性组合物的有效量在技术人员能力范围之内。

[0044] 如本文中所用,术语“施用”是指给予生理系统(例如,受试者或体内、体外或活体外细胞、组织和器官)药物、前药或其它药剂或治疗性治疗(例如,本发明的组合物)的动作。向人体施用的示范性途径可以通过尿道、眼部(眼用)、口腔(口服)、皮肤(经皮)、鼻(经鼻)、肺部(吸入)、口腔粘膜(经颊)、耳朵,通过注射(例如,静脉、皮下、瘤内、腹腔内等等)。

[0045] 如本文中所用,术语“处理表面”是指将例如导管的表面暴露于本发明的一种或多种组合物的动作。处理表面的方法包括但不限于喷雾、雾化、浸没和涂布。

[0046] 如本文中所用,术语“共同施用”是指向受试者施用至少两种药剂(例如,两种单独的供体细菌,各自包含不同质粒)或疗法。在一些实施方案中,两种或更多种药剂或疗法的共同施用是同时的。在其它实施方案中,第一药剂/疗法在第二药剂/疗法之前施用。本领域的技术人员理解,所用各种药剂或疗法的配制和/或施用途径可以不同。用于共同施用的适当剂量可由本领域的技术人员容易地测定。在一些实施方案中,当药剂或疗法共同施用,各药剂或疗法以低于适合其单独施用的剂量施用。因此,在药剂或疗法的共同施用降低了潜在有害的(例如,毒性)药剂的必需剂量的实施方案中,尤其期望共同施用。

[0047] 如本文中所用,术语“毒性”是指在施用毒物之前,与相同细胞或组织相比,对受试者、细胞(包括例如根据本文的方法制备的细菌细胞)或组织的任何不利或有害影响。

[0048] 如本文中所用,术语“药物组合物”是指活性剂(例如,益生菌)与惰性或活性载体的组合,其使得组合物特别适合体外、体内或活体外诊断或治疗使用。

[0049] 术语“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”,如本文中所用,是指向受试者施用,基本上不产生不良反应,例如毒性、变态或免疫反应的组合物。

[0050] 如本文中所用,术语“局部”是指向皮肤表面及粘膜细胞和组装(例如,上皮、肺泡、颊、舌、咀嚼或鼻粘膜,及内衬于中空器官或体腔的其它组织和细胞)涂敷本发明的组合物。

[0051] 如本文中所用,术语“药学上可接受的载体”是指任何标准药物载体,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如,油/水或水/油乳液)和各种类型的润湿剂,任何所有溶剂、分散介质、包衣、硫酸月桂酯钠、等渗和吸收延迟剂、崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羧基乙酸淀粉钠)等。所述组合物还可包括稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例

(参见例如, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. Co., Easton, Pa. (1975), 其通过引用并入本文)。而且, 在某些实施方案中, 可配制本发明的组合物供园艺和农业使用。此类配制物包括浸渍剂、喷雾剂、拌种剂、树干注射剂、喷雾剂和雾化剂。

[0052] 如本文中所用, 术语“药学上可接受的盐”是指在目标受试者(例如, 哺乳动物受试者和/或体内或活体外细胞、组织或器官)中生理上耐受的本发明化合物的任何盐(例如, 通过与酸或碱反应获得)。本发明化合物的“盐”可源自无机或有机酸和碱。酸的实例包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、对甲苯磺酸、酒石酸、醋酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、磺酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。其它酸, 如草酸, 虽然本身不是药学上可接受的, 但也可用于制备用作在获得本发明的化合物及其药学上可接受的酸加成盐中的中间产物的盐。

[0053] 碱的实例包括但不限于碱金属(例如, 钠)氢氧化物、碱土金属(例如, 镁)氢氧化物、氨和式 NW_4^+ 的化合物, 其中W为 C_{1-4} 烷基, 等等。

[0054] 盐的实例包括但不限于: 醋酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐(flucloheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐等。盐的其它实例包括与合适的阳离子, 如 Na^+ 、 NH_4^+ 和 NW_4^+ (其中W是 C_{1-4} 烷基基团)等化合的本发明化合物的阴离子。供治疗使用时, 期望本发明化合物的盐为药学上可接受的。然而, 非药学上可接受的酸和碱的盐也可利用, 例如用于制备或纯化成药学上可接受的化合物。

[0055] 供治疗使用时, 期望本发明化合物的盐为药学上可接受的。然而, 非药学上可接受的酸和碱的盐也可利用, 例如用于制备或纯化成药学上可接受的化合物。

[0056] 如本文中所用, 术语“医疗设备”包括例如在医学治疗过程中(例如, 对于疾病或损伤而言), 在受试者或患者的身体上、身体中或穿过身体使用的任何材料或设备。医疗设备包括但不限于诸如医学植入物、伤口护理设备、药物递送设备及体腔和个人保护设备等物品。医学植入物包括但不限于导尿管、血管内导管、透析分流管、伤口引流管、皮肤缝合线、血管移植物、可植入网、眼内装置、心脏瓣膜等。伤口护理设备包括但不限于一般伤口敷料、生物移植材料、带闭合物和敷料及手术用切口消毒盖布。药物递送设备包括但不限于针、药物递送皮肤贴片、药物递送粘膜贴片和医用海绵。体腔和个人保护设备包括但不限于止血垫、海绵、手术和检查手套及牙刷。避孕装置包括但不限于宫内节育器(IUD)、隔膜和避孕套。

[0057] 如本文中所用, 术语“治疗剂”是指降低接触病原微生物体的受试者中的传染性、发病率或死亡率发生, 或预防接触病原微生物体的宿主中的传染性、发病率或死亡率发生的组合物。如本文中所用, 治疗剂涵盖例如在病原体不存在时, 考虑到可能未来会暴露于病原体而预防性使用的药剂。此类药剂可另外包含药学上可接受的化合物(例如, 佐剂、赋形剂、稳定剂、稀释剂等)。在一些实施方案中, 本发明的治疗剂呈局部用组合物、可注射组合

物、可摄取组合物等形式施用。当途径为局部时，所述形式可为，例如溶液、霜剂、软膏剂、油膏剂或喷雾剂。

[0058] 如本文中所示，术语“病原体”是指在宿主中引起疾病状态（例如，感染、癌症等）的生物剂。“病原体”包括但不限于病毒、细菌、古细菌、真菌、原生动物、支原体、朊病毒和寄生生物。

[0059] 如本文中所示，术语“益生菌”和“益生微生物”可互换用于指按足够量施用以赋予宿主健康益处的活微生物体。参见例如，Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice, G.Reid等人, Clinical Microbiology Reviews, 2003年10月, 第658-672页, 其通过引用并入本文。益生菌不限于通过任何特定途径施用的微生物体。向人体施用的示例性途径可以通过眼部（眼用）、口腔（口服）、皮肤（经皮）、鼻（经鼻）、肺部（吸入）、口腔粘膜（经颊）、阴道、直肠、尿道、耳朵，通过注射（例如，静脉、皮下、瘤内、腹腔内等）等。如本文中所示，术语“益生菌”包括但不限于自然存在的生物体及其衍生物，例如大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117。益生生物体也可（例如）通过选择性培养或重组工程修饰为具有改变的性质。例如，构造为含有改变受体细胞（例如，以杀伤或降低病原体受体细胞的病原性）的结合转移质粒的益生微生物也可与本发明一起使用。参见例如，美国申请案序列号11/137,950和11/137,948, 其各自通过引用整体并入本文。

[0060] 如本文中所示，术语“微生物”是指微生物体并且旨在涵盖单独生物体或包含任意数量的生物体的制剂两种。

[0061] 术语“细菌”是指所有原核生物体，包括原核生物界中所有门的那些原核生物体。预期该术语涵盖被视为细菌的所有微生物体，包括支原体（Mycoplasma）、衣原体（Chlamydia）、放线菌（Actinomyces）、链霉菌（Streptomyces）和立克次体（Rickettsia）。所有形式的细菌都包括在这个定义中，包括球菌（cocci）、杆菌（bacilli）、螺旋菌（spirochete）、原生质球状体（spheroplast）、原生质体（protoplast）等。在该术语中还包括革兰氏阴性（Gram-negative）或革兰氏阳性（Gram-positive）的原核生物体。“革兰氏阴性”和“革兰氏阳性”是指经革兰氏染色过程的染色模式，这是本领域中公知的。（参见例如，Finegold和Martin, Diagnostic Microbiology, 第6版, CV Mosby St.Louis, 第13-15页（1982））。“革兰氏阳性细菌”是保留用于革兰氏染色的主要染料，使染色细胞在显微镜下通常呈现深蓝色至紫色的细菌。“革兰氏阴性细菌”不保留用于革兰氏染色的主要染料，但是被复染剂染色。因此，革兰氏阴性细菌通常呈现红色。

[0062] 如本文中所示，术语“微生物体”是指任何物种或类型的微生物体，包括但不限于细菌、古细菌、真菌、原生动物、支原体和寄生生物体。本发明考虑到，其中涵盖的许多微生物体对于受试者也将是致病性的。

[0063] 如本文中所示，术语“真菌”关于真核生物体如霉菌和酵母，包括双态性真菌使用。

[0064] 术语“非病原菌”包括所有已知和未知的非病原菌（革兰氏阳性或革兰氏阴性）及已经突变或转化为非病原菌的任何病原菌。此外，技术人员公认，一些细菌可对特定物种是致病性的而对其它物种是非致病性的；因此，这些细菌可以在其为非病原性或突变使其为非病原性的物种中使用。

[0065] 如本文中所示，术语“非人类动物”是指所有非人类动物，包括但不限于脊椎动物如啮齿动物、非人灵长类、绵羊、牛、反刍动物、兔类、猪、山羊、马、犬、猫、鸟类等。

[0066] 如本文中所示,术语“细胞培养物”是指细胞的任何体外培养物,包括例如原核细胞和真核细胞。在该术语中包括连续细胞系(例如,具有永生表现型)、原代细胞培养物、转化细胞系、有限细胞系(例如,非转化细胞)、固体或液体培养基内部或表面的细菌培养物及体外保持的任何其它细胞群。

[0067] 如本文中所示,术语“液体培养物”是指已经在液体培养基,例如LB肉汤、MOPS基本培养基中生长,使得所得液体含有生物体例如细菌的分布的生物体制剂。

[0068] “液体培养基”可具有适于为生物体提供营养以便生长的任何液体组成。可添加固化剂,例如琼脂,以产生“固体培养基”,例如培养板或斜面,也称为琼脂板和琼脂斜面。

[0069] 如本文中所示,术语“接种”作为动词是指将生物体引入到无该生物体的环境中的动作,例如使用大肠杆菌样品或菌落为无菌培养基接种以便培育大肠杆菌菌株。

[0070] 如本文中所示,术语“孵育”是指将物品或样品(例如,接种的培养物、化学或酶促反应混合物)保持在一定温度下一段时间或直至出现特定结果(例如,生物体生长或反应结果)。

[0071] 如本文中所示,术语“尿”是指具有在生物尿,即人或动物产生的尿中发现的基本元素的液体制剂。尿可为天然的或合成的。例如,合成尿制剂可包含蛋白胨137酵母提取物、乳酸、柠檬酸、碳酸氢钠、尿素尿酸、肌酸酐、氯化钙、氯化钠、硫酸铁II、硫酸镁、硫酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和氯化铵的混合物,各自在水中为生理浓度。参见例如,Brooks和Keevil,Letters in Applied Microbiology 1997, (24):203-206,“A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens”,及Souhaila Bouatra等人,PLoS One, 2013年9月;第8卷/第9期/e73076,其各自通过引用整体并入本文。

[0072] 如本文中所示,术语“生物膜”是指粘附于表面的生物体,例如大肠杆菌的粘着基质。生物膜通常包含生物体流出的胞外多聚物(包含,例如多糖),是细胞嵌入其中并且使细胞相互粘附并粘附于表面的基质。支撑生物膜的表面可为非生物表面(例如,医疗设备的表面)或可为生物的(例如,受试者的组织表面)。生物膜可包含多个物种或可通过单一物种的微生物形成。

[0073] 正如所使用的那样,术语“真核生物”是指可与“原核生物”区别开的生物体。意图是该术语涵盖具有表现出真核生物的常见特征的细胞的所有生物体,所述特征例如存在周围是核膜的真核,染色体位于其中,存在膜结合细胞器及真核生物体中通常所观察到的其它特征。因此,该术语包括但不限于诸如真菌、原生动物和动物(例如,人)等生物体。

[0074] 如本文中所示,术语“试剂盒”是指用于递送材料的任何递送系统。在反应材料如益生微生物的情况下,此类递送系统包括但不限于允许储存、运输或递送适当试剂(例如,适当容器中的细胞、缓冲液、培养基、选择试剂等)和/或设备(例如,导管、注射器、反应管或板、培养管或板)和/或支撑材料(例如,培养基、使用所述材料进行的书面说明书等)从一个位置到另一位置的系统。例如,试剂盒包括一个或多个含有相关反应试剂和/或支撑材料的外壳(例如,盒子、袋子)。如本文中所示,术语“片段化试剂盒”是指包含两个或更多个独立容器的递送系统,每个容器含有总试剂盒组分的子部分。可将容器一起或单独递送给预定接收者。例如,第一容器可含有供特定用途的微生物与胶凝剂的干燥组合物,而第二容器含有用于溶解或重新悬浮干燥组合物的无菌流体如水或缓冲液。术语“片段化试剂盒”旨在涵盖含有受联邦食品、药物和化妆品法案(Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)第520(e)

章监管的分析物特定试剂(ASR)的试剂盒,但不限于此。事实上,在术语“片段化试剂盒”中包括包含两个或更多个独立容器的任何递送系统,每个容器含有总试剂盒组分的子部分。相反,“组合试剂盒”是指在单个容器中(例如,在封装每种所需组分的单个盒子中)含有供特定用途所需的反应材料的所有组分的递送系统。术语“试剂盒”包括片段化和组合试剂盒两者。

[0075] 关于通过组合物冻干产生的干饼,在文献中使用术语“精致”来描述无裂纹、无皱缩、边缘光滑且稠度松软的‘完美’冻干产物。

[0076] 如本文中所示,术语“一”和“一种(个)”意指至少一个,并且可以指一个以上。

[0077] 术语“细菌干扰”如本文中所示是指细菌和其它微生物之间为自身建立并且控制其环境的拮抗相互作用。细菌干扰通过几种机制起作用,例如生成拮抗性物质,细菌微环境的变化,竞争附着位点,及减少需要的营养物质。

[0078] 术语“包衣”如本文中所示是指覆盖(例如)医疗设备或其一部分的一层材料。包衣可施加于表面或浸入植入物的材料中。

[0079] 如本文中所示,术语“抗微生物剂”是指除益生菌以外,降低、防止或抑制细菌和/或真菌生物体生长的组合物。抗微生物剂的实例包括例如抗生素和杀菌剂。

[0080] 术语“杀菌剂”如本文中所示被定义为抑制微生物作用的抗微生物物质,包括但不限于 α -萜品醇、甲基异噻唑啉酮、氯化十六烷基吡啶、氯二甲苯酚、六氯酚、洗必泰(chlorhexidine)和其它阳离子双胍、亚甲基氯、碘和碘伏(iodophore)、三氯生(triclosan)、牛磺酰胺(taurinamide)、呋喃妥英(nitrofurantoin)、乌洛托品(methenamine)、醛、azylic acid、银、苜基过氧化物、醇及羧酸和盐。本领域的技术人员将认识到这些杀菌剂可以呈两种或更多种的组合使用以获得协同效应。杀菌剂组合的一些实例包括洗必泰、洗必泰和氯二甲苯酚、洗必泰和甲基异噻唑啉酮、洗必泰和 α -萜品醇、甲基异噻唑啉酮和 α -萜品醇;百里酚(thymol)和氯二甲苯酚;洗必泰和氯化十六烷基吡啶;或洗必泰、甲基异噻唑啉酮和百里酚的混合物。这些组合提供了广泛的针对各种生物体的活性。

[0081] 如本文中所示,术语“干燥”在提及益生菌组合物使用时是指去除溶剂组分达到不再支持化学反应的水平。该术语也在提及已经干燥的组合物(例如,干燥制剂或干燥组合物)时使用。本领域的技术人员将意识到组合物可经“干燥”,而在冻干之后仍然具有残留溶剂或水分含量,或在干燥过程结束之后,干燥的组合物可以例如从大气中吸湿性地吸收水分。术语“干燥”涵盖由于吸湿性吸收引起水分含量增加的组合物。

[0082] 如本文中所示,术语“保护剂”是指在活性剂暴露于某种条件(例如,干燥、冷冻)时保护活性剂(例如,酶、益生微生物)的活性或完整性的组合物或化合物。在一些实施方案中,保护剂在冷冻过程中保护活生物体(例如,益生微生物)(即,其为“防冻剂”)。保护剂的实例包括但不限于非脂乳固体、海藻糖、甘油、甜菜碱、蔗糖、葡萄糖、乳糖、葡聚糖、聚乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯丙烯、谷氨酸钾、谷氨酸一钠、Tween 20去污剂、Tween 80去污剂和氨基酸盐酸盐。

[0083] 如本文中所示,术语“胶凝剂”是指溶解、悬浮或分散在流体(例如,水流体如水或缓冲溶液)中时,形成明胶半固体(例如,润滑凝胶)的组合物。胶凝剂的实例包括但不限于羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、卡波姆、藻酸盐、明胶和泊洛沙姆。

[0084] 如本文中所示,术语“赋形剂”是指添加到活性成分的制剂中的非活性成分(即,无药理学活性的)。本文描述的胶凝剂和保护剂通常称为“赋形剂”。

[0085] 如本文中所示,术语“基本上由……组成”在提及组合物使用时意指该组合物由所叙述的组分组成,并且该组合物不包括会实质性改变所叙述的组合物特征的其它组分(例如,不含其它活性成分)。例如,不改变组合物特征的微量杂质或最低量的一种或多种附加组分将属于所叙述的组合物范围内。类似地,在提及方法或一系列步骤使用时,该术语是指限于所叙述的步骤的步骤集合的方法,仅施用不会实质性改变步骤特征或所叙述的方法的结果的最低偏差。

具体实施方式

[0086] 本发明涉及用于用非病原性生物体,例如细菌处理表面的方法和材料。在特定实施方案中,所述方法和材料用于在受试者,例如受试者尿道的表面上,和/或在医疗设备例如导尿管的表面上建立细菌培养物。在特定实施方案中,培养物包含生物膜。本发明的实施方案涉及用于在受试者的尿道中建立培养物和/或生物膜的小菌落变异株(SCV)形式的细菌,例如大肠杆菌的治疗性制剂。

[0087] 在本说明书中和以上通过引用并入此处的发明概要中描述了本发明的实施方案。虽然已经连同具体实施方案描述了本发明,但是应理解要求保护的本发明不应过度限于此类具体实施方案。例如,本文关于大肠杆菌83972的讨论也涵盖大肠杆菌HU2117,因为HU2117是83972经工程化为在papG基因中具有缺失的型式。已经观察到这些菌株的生长特征相同。

[0088] 小菌落变异株(SCV)是在培养基上形成的菌落明显小于亲本细菌形成的菌落的自然存在的细菌亚群。例如大肠杆菌的SCV可为相同固体培养基上生长的相同菌株的正常或“大菌落变异株”(LCV)形式的直径的约十分之一。参见例如,Proctor等人,Nature Rev.Micro.,4:295-305(2006)。技术开发期间,已经观察到大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117的SCV形式例如在导管表面和/或在受治受试者的尿道中建立治疗性生物膜特别有用。

[0089] 来自于具有无症状尿路感染的受试者的非病原性大肠杆菌83972和/或大肠杆菌HU2117的分离物显示出这些菌株的小菌落和大菌落形式的混合物。如以下更加详细地讨论,小菌落和大菌落变异株可以通过查看琼脂板上的菌落形态容易地区别,麦康基氏琼脂尤其显露尺寸差异。

[0090] 本技术开发期间,确定用于细菌肉汤培养的标准富培养基(例如,Luria Bertani(LB)或补充了完全氨基酸来源,例如酵母提取物、胰酪、蛋白胨等的其它培养基)促进在大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117中SCV形式恢复为LCV形式。

[0091] 另外,这些大肠杆菌的SCV形式对于许多氨基酸而言为营养缺陷型,而相同菌株的LCV形式不是。因此,SCV菌株需要补充培养基才能生长并且可以使用基本培养基以对其生长进行选择。例如,大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117的SCV对氨基酸半胱氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸和赖氨酸有绝对需求,对天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和色氨酸有更少的基本需求。相反,LCV形式不是营养缺陷型并且可易于在补充了碳源(例如,0.2%的葡萄糖或甘油)的MOPS基本培养基中生长。因此,可见找出减少SCV出现的生长条件相对简单,而难

以找到选择供SCV形式生长而抑制LCV形式的生长条件。这使得难以产生其中细胞群主要呈SCV形式的液体培养物,更难以产生基本上完全为SCV型细菌的液体培养物。

[0092] 本发明涉及开发大肠杆菌菌株,特别是非病原性菌株大肠杆菌83972、大肠杆菌HU2117及其或源于其的变异株的SCV的分离、生长和储存方法。

[0093] 本发明涉及用于产生主要为SCV,优选完全为SCV的培养物,使得液体培养物中的任何LCV型大肠杆菌在数量上减少或不存在的的方法和组合物。因此,本发明的一个方面是生长条件的鉴定,该生长条件鉴定并保持大肠杆菌菌株,例如大肠杆菌83972和大肠杆菌HU2117的SCV形式,其用于生产例如用于涂布导管的益生菌制剂。在优选实施方案中,细菌在液体培养物中生长,无需使用抗微生物组分,例如铜(Hirsch, J Bacteriol. 81:448-58 (1961); 2-甲基-1,4-萘醌(参见例如, Colwell, J Bacteriol. 52 (4):417-22 (1946))。

[0094] 本发明的一个方面是选择供治疗使用,例如产生生物膜的SCV形式的大肠杆菌。已经确定在本文描述的技术的组合物和方法中使用SCV形式的益生大肠杆菌在受治受试者的尿道中和/或在导尿管的表面上产生益生菌株的生物膜有效。因此该技术提供了大肠杆菌,优选大肠杆菌83972或大肠杆菌HU2117或其修饰或变异形式的小菌落变异株(SCV)的分化、分离、增殖和储存方法,及使用制备的细菌在受治受试者中建立生物膜的方法。

[0095] 该技术还提供了用于向受试者或患者递送有效量的益生SCV大肠杆菌的方法和组合物。虽然本发明不限于任何特定配制物或施用模式,但是在一些优选实施方案中,益生微生物按约 10^7 至 10^9 /ml润滑凝胶的浓度存在于制备的润滑凝胶混合物中。

[0096] 大肠杆菌菌株83972和HU2117的生长特征

[0097] 在技术开发和本文讨论的大肠杆菌菌株(大肠杆菌菌株83972和HU2117)培育期间,对这些菌株的小菌落和大菌落变异株生长特征的观察表明以下:

[0098] 1. 在麦康基氏琼脂上划线接种包含该菌株的SCV和LCV形式的混合培养物清楚且明显地显示出两种菌落形态,使得可以选出新SCV菌落用于其它步骤。形态上的差异,虽然在LB琼脂上显而易见,但是在这种培养基上不太清楚。

[0099] 2. 在富培养基(例如, LB或胰酪大豆)中长期培养大肠杆菌HU2117引起培养物从小菌落形态改变为大菌落形态。虽然小菌落变异群可以在试验的几种培养条件下产生具有大菌落表现型的细胞,但是难以改变特定LCV分离物的表现型以产生SCV微生物群。

[0100] 3. SCV分离物在麦康基氏琼脂上的传代随时间推移保持小菌落表现型。

[0101] 4. 小菌落变异株在MOPS基本培养基上或在MOPS基本肉汤中不生长。

[0102] 5. 用SCV接种物接种的MOPS基本培养基会在几天之后变得混浊,主要是因为具有LCV形态的细胞生长,表明由于细胞从小菌落形态转化为大菌落形态,和/或SCV接种物中一小群LCV存活和复制而发生浊度显现。这表明仅使用基本培养基培养这些菌株将利于培育LCV形式的大肠杆菌HU2117和83972。

[0103] 6. 技术开发期间,确定使用甘油作为碳源(例如,代替葡萄糖)降低了恢复为LCV形式的速率,并且从而有助于在液体培养期间保持SCV形态。

[0104] 实验

[0105] 提供以下实施例是为了证明和进一步说明本发明的某些优选实施方案和方面而不得解释为对其范围的限制。

[0106] 在下面的实验公开内容中,以下缩写适用: °C . (摄氏度); cm (厘米); g (克); l或L

(升);ml或mL(毫升); μ l或 μ L(微升); μ g(微克); μ m(微米); μ M(微克分子); μ mol(微摩尔);mg(毫克);mm(毫米);mM(毫克分子);mmol(毫摩尔);M(克分子);mol(摩尔);ng(毫微克);nm(纳米);nmol(毫微摩尔);N(正常);pmol(皮摩尔);bp(碱基对);cfu(菌落形成单位)。

[0107] 实施例1

[0108] 限定用于培养大肠杆菌83972和HU2117的小菌落变异株形式的条件

[0109] 大肠杆菌83972和HU2117的初步表征从尝试限定培养这些大肠杆菌菌株的优良合成分生长培养基开始。菌株HU2117是papG基因具有工程化缺失的83972工程化变异株。

[0110] 尝试几种不同的培养基(琼脂板和肉汤两种)以找到可用于生产且也可帮助区别小菌落和大菌落变异株的可接受的培养基。从Teknova(Hollister,CA)购得两种可商购获得的培养基,富EZ确定成分培养基和MOPS基本培养基。两种不同的碳源,葡萄糖和甘油,与这两种不同的培养基组合使用。还在不同琼脂,包括麦康基氏(MacConkey's)、TSA琼脂和LB琼脂上划线和培养菌株。培养基和琼脂配制如下所示:

[0111] MOPS确定成分培养基(例如,富EZ确定成分培养基)

[0112]

组分#	描述	量
1	10X MOPS混合物	100mL
2	0.132M K_2HP04	10mL
3	10X ACGU	100mL
4	5X补充物EZ	200mL
	无菌 H_2O^*	580mL
	20%葡萄糖或甘油	10mL
	总计	1000mL

[0113] MOPS基本培养基

组分#	描述	量
1	10X MOPS 混合物 (参见下文)	100 mL
2	0.132M K_2HP04	10 mL
	无菌 H_2O^*	880 mL
	20%葡萄糖或甘油	10 mL
	总计	1000 mL

[0115] MOPS培养基组分

[0116]

#1 MOPS 改良富缓冲液	10X 浓度	1X 浓度
MOPS(MW209.3)	400mM	40mM
三(羟甲基)甲基甘氨酸(MW179.2)	40mM	4.0mM
硫酸铁原液	0.1mM	0.01mM
氯化铵	95mM	9.5mM
硫酸钾	2.76mM	0.276mM

#4 5X 补充物	5X 浓度	1X 浓度
L-丙氨酸	4.0mM	0.8mM
L-精氨酸	26mM	5.2mM
L-天冬酰胺	2.0mM	0.4mM
L-天冬氨酸, 钾盐	2.0mM	0.4mM
L-谷氨酸, 钾盐	3.3mM	0.66mM
L-谷氨酰胺	3.0mM	0.6mM
L-甘氨酸	4.0mM	0.8mM

氯化钙	0.005mM	0.0005mM
氯化镁	5.25mM	0.525mM
氯化钠	500mM	50mM
钼酸铵	3×10^{-8} M	3×10^{-9} M
硼酸	4×10^{-6} M	4×10^{-7} M
氯化钴	3×10^{-7} M	3×10^{-8} M
硫酸铜	10^{-7} M	10^{-8} M
氯化锰	8×10^{-7} M	8×10^{-8} M
硫酸锌	10^{-7} M	10^{-8} M

[0117]

#2 磷酸氢二钾 溶液	100X 浓 度	1X 浓度
磷酸氢二钾	132mM	1.32mM

#3 ACGU 溶液	10X 浓度	1X 浓度
氢氧化钾	15mM	1.5mM
腺嘌呤	2.0mM	0.2mM
胞嘧啶	2.0mM	0.2mM
尿嘧啶	2.0mM	0.2mM
鸟嘌呤	2.0mM	0.2mM

L-组氨酸 HCl H2O	1.0mM	0.2mM
L-异亮氨酸	2.0mM	0.4mM
L-脯氨酸	2.0mM	0.4mM
L-丝氨酸	50mM	10mM
L-苏氨酸	2.0mM	0.4mM
L-色氨酸	0.5mM	0.1mM
L-缬氨酸	3.0mM	0.6mM
L-亮氨酸	4.0mM	0.8mM
L-赖氨酸	2.0mM	0.4mM
L-甲硫氨酸	1.0mM	0.2mM
L-苯丙氨酸	2.0mM	0.4mM
L-半胱氨酸 HCl	0.5mM	0.1mM
L-酪氨酸	1.0mM	0.2mM
硫胺素	0.05mM	0.01mM
泛酸钙	0.05mM	0.01mM
对氨基苯甲 酸	0.05mM	0.01mM
对羟基苯甲 酸	0.05mM	0.01mM
二羟基苯甲 酸	0.05mM	0.01mM
20%葡萄糖 溶液	10X 浓 度	1X 浓度
葡萄糖	20%	2.00%
20%甘油溶 液	10X 浓 度	1X 浓度
甘油	20%	2.00%

[0118] (参见例如, Teknova; F. C. Neidhardt, P. L. Bloch 和 D. F. Smith. 1974. Culture medium for enterobacteria. J Bacteriol 119 (3): 736-747)

[0119] 麦康基氏琼脂:

[0120] 蛋白胨 (Difco) 或 Gelysate (BBL) 17.0g

[0121] 胨蛋白胨 (Difco) 或多聚蛋白胨 (BBL) 3.0g

[0122] 乳糖 10.0g

[0123] NaCl 5.0g

- [0124] 结晶紫 1.0mg
- [0125] 中性红 30.0mg
- [0126] 胆汁盐 1.5g
- [0127] 琼脂 13.5g
- [0128] 蒸馏水 添加至达到1升
- [0129] pH调节至7.1+/-0.2
- [0130] 胰胨大豆琼脂
- [0131] 酪蛋白蛋白胨(胰腺) 15.0g
- [0132] 大豆蛋白胨(木瓜蛋白酶) 5.0g
- [0133] 氯化钠 5.0g
- [0134] 琼脂 15.0g
- [0135] 添加蒸馏水至达到1升
- [0136] pH调节至7.3+/-0.2
- [0137] Luria-Bertani肉汤和琼脂:
- [0138] 胰胨 10g
- [0139] 酵母提取物 5g
- [0140] NaCl 10g
- [0141] 琼脂 15.0g
- [0142] 添加蒸馏水至达到1升
- [0143] 上面两种形式的培养基均省略了琼脂组分。全部例如通过在15psi、121-124°C下高压灭菌约15分钟来灭菌。
- [0144] i. 三种琼脂上大肠杆菌HU2117的小菌落和大菌落变异株的比较
- [0145] 在开发所述技术的过程期间,观察到这些大肠杆菌菌株的SCV形式在如上所述配制的改良MOPS基本肉汤或琼脂上不会生长。图1中示出了麦康基氏琼脂、LB琼脂和改良MOPS基本琼脂上的大菌落和小菌落变异株的外观。每张板的左侧划线接种LCV形式,而每张板的右侧划线接种SCV形式。所有板孵育相同时间段。虽然在LB板上可以观察到菌落尺寸差异(图1B),但是划线在外观上足够相似,以致可以忽视SCV形式。相反,在麦康基氏琼脂板上(图1A),SCV菌落已经长到LCV菌落尺寸的一小部分。MOPs基本培养基板清楚地显示SCV形式不在这种培养基上生长。
- [0146] ii. 富培养基中小菌落向大菌落转化的速率
- [0147] 使用仅有SCV的菌株的甘油原液,可能计算在不同类型的液体培养基中小菌落向大菌落转化的速率。
- [0148] 富EZ确定成分的甘油培养基
- [0149] 使用SCV原液接种富EZ确定成分的甘油培养基肉汤(上述)。孵育后,培养物的等分试样经稀释并且接种到LB琼脂上(以显示所有菌落)和MOPS基本葡萄糖琼脂板上(SCV在上面不生长),使得可以测定培养物中每种形态类型的相对量。仅两种菌落在MOPS基本葡萄糖板上生长,显示肉汤培养物(和原液)几乎完全由SCV分离物组成。
- [0150] 计算将会在这种培养物中的大菌落的总数(考虑到稀释)和该培养物中的大肠杆菌HU2117的总数,确定甘油基培养基中每种细菌的转化速率为 1.4×10^{-9} 。

[0151] 富EZ确定成分的葡萄糖培养基

[0152] 使用相似原液接种富EZ确定成分的葡萄糖培养基。孵育后,培养物的等分试样经稀释并且接种到LB琼脂和MOPS基本葡萄糖琼脂板上,使得可以测定液体培养物中每种形态类型的相对量。33个菌落在MOPS基本葡萄糖板上生长,显示在葡萄糖基培养基中每种细菌转化速率为 3.04×10^{-8} 。

[0153] 这些数据显示,使用甘油作为液体培养物中的唯一碳源产生更慢的转化速率,并且对于保持SCV形态而言甘油比葡萄糖优选。

[0154] 在一个具体实施方案中,用于制备SCV形式的大肠杆菌,例如菌株83972和HU2117的液体培养基具有以下配方(接种前):

[0155]

MOPS	40 mM
3-(N-吗啉代)-丙磺酸	
三(羟甲基)甲基甘氨酸	4 mM
硫酸铁	10 μ M
氯化铵	9.5 mM
硫酸钾	276 μ M
一水氯化钙	0.5 μ M
氯化镁	525 μ M
氯化钠	50 mM
钼酸铵	2.92×10^{-9} M
硼酸	4×10^{-7} M
氯化钴	3.02×10^{-8} M
硫酸铜	9.62×10^{-9} M
氯化锰	8.08×10^{-8} M

[0156]

硫酸锌	9.74x10 ⁻⁹ M
磷酸氢二钾	1.32 mM
丙氨酸	0.798 mM
精氨酸 HCl	5.2 mM
天冬酰胺	0.4 mM
天冬氨酸, 钾盐	0.4 mM
半胱氨酸盐酸盐一水合物	0.1 mM
谷氨酸, 钾盐	0.7 mM
谷氨酰胺	0.6 mM
甘氨酸	0.8 mM
组氨酸盐酸盐一水合物	0.2 mM
异亮氨酸	0.4 mM
亮氨酸	0.8 mM
赖氨酸二盐酸盐	0.4 mM
甲硫氨酸	0.2 mM
苯丙氨酸	0.4 mM
脯氨酸	0.4 mM
丝氨酸	10.0 mM
苏氨酸	0.4 mM
色氨酸	0.1 mM
酪氨酸	0.2 mM
缬氨酸	0.6 mM
盐酸硫胺素	0.01 mM
泛酸钙	0.01 mM
p对氨基苯甲酸	0.01 mM
p对羟基苯甲酸	0.01 mM
2,3-二羟基苯甲酸	0.01 mM
甘油	0.4 % (w/v)
水	

[0157] 表1

[0158] iii. 储存的SCV分离物保持SCV构象

[0159] 使用SCV形式的大肠杆菌HU2117的两种不同甘油原液(原液A和B, 参见图2和3)和LCV形式的大肠杆菌83972的两种不同原液(原液A和B, 参见图4和5)划线接种LB琼脂和麦康基氏琼脂板。

[0160] 在37℃下孵育24小时后,在划线接种的所有板上观察到生长良好。图2和图3显示用大肠杆菌HU2117划线接种的所得麦康基氏琼脂板和LB琼脂板。麦康基氏琼脂板(图2)和LB板(图3)上的所有菌落显示小菌落形态。

[0161] 用大肠杆菌83972的原液划线接种的板几乎一致显示LCV衍生物。大肠杆菌83972的原液A和B两种在将这些划线接种到麦康基氏琼脂(图4)或LB琼脂(图5)上时看上去相同。值得注意的是将这些板保持在37℃的时间量与图2和3中所示的HU2117划线平板相同,这证明菌落尺寸上的差异不是孵育时间不同的结果。

[0162] 为制备例如在-80℃下储存的SCV细胞,例如大肠杆菌HU2117SCV细胞的另外原液,将大约50个菌落接种到1升烧瓶中,烧瓶含有125mL上表1中描述的改良富EZ确定成分的培养基。将细胞生长16小时,并且通过离心收获烧瓶中的所有培养物。使团块重新悬浮在约11mL的改良富EZ确定成分的培养基中。使细胞重新悬浮时,添加11mL的2X冷冻培养基(含50%甘油的相同改良富EZ确定成分的培养基)并将细胞置于冰上。细胞悬液在冰上冷却60分钟,之后等分至小瓶中,例如按1.0mL/小瓶的体积(3.6×10^9 cfu/mL)。将细胞等分至小瓶中后,将其冷冻并且储存在-80℃下。优选地,将小瓶从-80℃储存移出并且一次性使用。

[0163] iv. 大肠杆菌83972的小菌落和大菌落变异株的比较

[0164] 用SCV形式的大肠杆菌83972(“CON42-5”)和LCV形式的大肠杆菌83972(“CON19-4A”)的每一种划线接种一张麦康基氏琼脂板和一张LB琼脂板。将板在37℃下孵育24小时并且于图6和7中示出。

[0165] 图6所示的麦康基氏琼脂板上的菌落尺寸变异株易于相互区别。用CON42-5划线接种的板(左侧)显示小菌落形态,极微小的菌落,并且用LCV-型CON19-4A分离物划线接种的板(右侧)清楚地显示大菌落形态。在用相同甘油冷冻剂原液划线接种的LB琼脂板上观察到相同的菌落形态(图7)。

[0166] v. 确认小菌落和大菌落变异株为相同菌株

[0167] 表征以上讨论的具有不同生长需求的SCV和LCV形式的大肠杆菌HU2117以检验其在遗传上相同。为分离大菌落变异株,将大肠杆菌HU2117直接划线接种到仅支持大菌落变异株生长的改良MOPS基本培养基和支持大菌落和小菌落变异株两者生长的麦康基氏琼脂上。在37℃下生长40小时后,在MOPS基本琼脂板上获得几个大菌落。将大菌落和小菌落变异株两者划线接种到麦康基氏琼脂上,然后再次划线接种到麦康基氏琼脂和Luria-Bertani(LB)琼脂上,并且在37℃下孵育18小时。图1中示出代表性比较,其显示了麦康基氏琼脂和LB琼脂两者上的大菌落和小菌落变异株。对两种菌落变异株的分析显示两种变异株的血清型为O6:H1,其与菌株HU2117和野生型菌株83972两者相同。

[0168] vi. 菌株身份的确认

[0169] 通过PCR扩增进进一步确认身份。83972和HU2117两者具有1.6kb隐性质粒,该隐性质粒是这些菌株独有的,它的存在将这些菌株与其它大肠杆菌菌株区别开。另外,HU2117的papG基因具有易于将HU2117与其亲本菌株83972及具有pap操纵子的其它大肠杆菌菌株区别开的工程化803bp缺失。使用对隐性质粒和papG缺失有特异性的引物对的PCR确认SCV和LCV分离物两者均为大肠杆菌HU2117。

[0170] 通过举例的方式,表2描述了一组可用于检验HU2117菌株的身份的试验:

试验目标	方法	说明(结果)
<i>papG</i> -基因型	PCR 和测序	PCR 扩增菌株特异性 1584bp 片段 缺失的 <i>papG</i> 的侧翼区与大肠杆菌 83972 相比不应显示出任何意外改变
物种的遗传学检验	16S rRNA 序列的系统进化分析	与大肠杆菌在系统进化上最近
[0171] 物种的生物化学检验	β -葡萄糖醛酸酶活性	Chromocult TBX 琼脂培养基(EMD Biosciences)上的蓝色菌落
质粒 ID	PCR	扩增对质粒有特异性的三个片段
RFLP	PFGE	对大肠杆菌 HU2117 有特异性的 RFLP 的独特模式, 可与其它大肠杆菌菌株区别
抗生素易感性	在抗生素存在下的生长	对试验的所有抗生素易感

[0172] 表2

[0173] 实施例2

[0174] 含SCV型大肠杆菌HU2117的冷冻干燥润滑凝胶的制备

[0175] 该实施例提供了生产含有效量的SCV形式的大肠杆菌HU2117的冷冻干燥润滑凝胶的示例性方法。例如在2009年2月12日公布的美国专利公布2009/0041727中描述了另外的冷冻干燥制剂及其制备和使用方法, 所述专利公布为了所有目的整体并入本文。

[0176] 通过举例的方式而不是限制的方式, 选择起始量以便在包含胶凝剂的组合物中冷冻干燥的细胞中保持有效水平的存活力。例如, 在一些实施方案中, 活SCV细胞的优选浓度可为大约 10^8 cfu/ml。如果要使一小瓶(或其它容器)的制剂悬浮或溶解例如在10ml水中, 则小瓶内的干饼将任选地具有大约 10^9 个活细胞。

[0177] 细胞制备

[0178] 一个2升烧瓶的细胞从1ml接种到1L改良富EZ确定成分的甘油培养基中的SCV HU2117种原液开始生长, 在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下以250RPM持续振荡孵育8小时, 或达到约2-2.3的 OD_{600} 。

[0179] 通过例如在 4°C 下以6000RPM离心8分钟来收集细胞。例如用0.9%盐水洗涤团块化细胞两次并用10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 7.0)洗涤一次。

[0180] 使团块化细胞重新悬浮到2-3ml缓冲液, 例如10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 7.0)中, 最终体积为大约10ml。

[0181] 重新悬浮的细胞的浓度可使用平板计数法测定。

[0182] 冻干

[0183] 将0.5ml重新悬浮的细胞与1.5ml赋形剂例如5-10%蔗糖和无菌润滑凝胶例如10ml的2%高压灭菌羟乙基纤维素(HEC)混合。

[0184] 例如,如下所述,冻干混合物。

工序	步骤描述
装载	在5°C和一个大气压下孵育60分钟
冷冻	按5°C/min的平均控制速率使架子上升到-45°C。 将架子控制在-45°C的目标设定点285分钟。
[0185] 初步干燥/ 二次干燥	抽空腔室,控制在60mTorr的目标设定点下。 (a) 按0.2°C/min的平均控制速率使架子上升到-30°C。将架子控制在-30°C的目标设定点2850分钟。 (b) 按0.2°C/min的平均控制速率使架子上升到-22°C。将架子控制在-22°C的目标设定点1080分钟。 (c) 按0.2°C/min的平均控制速率使架子上升到-10°C。将架子控制在-10°C的目标设定点600分钟。
[0186]	(d) 将室压控制在60 mTorr的目标设定点。按0.2°C/min的平均控制速率使架子上升到25°C。将架子控制在目标设定点720分钟。

[0187] 干燥后,使干饼重新悬浮例如在约10-12ml蒸馏水中,用于试验以测定细菌存活力和/或用作润滑凝胶,例如以在插入之前涂布导管,其中以有助于在尿道中和/或在插入的导管上形成大肠杆菌HU2117的生物膜的方式润滑导管并且为要插入导管的受试者接种。

[0188] 使用上文描述的生长条件,可以将最终产物中大菌落的比例保持在极低水平(例如,1.0x10⁸cfu/ml中有1个的频率)。

[0189] 以上说明书中提到的所有出版物和专利为所有目的了通过引用并入本文。在不背离本发明的范围和精神的前提下,描述的本发明组合物和的各种修改和变型对于本领域技术人员将显而易见。虽然已经连同具体优选实施方案描述了本发明,但是应理解要求保护的本发明不应过度限于此类具体实施方案。事实上,对于相关领域的技术人员明显的,对描述的用于实施本发明的模式的各种修改旨在属于本发明的范围之内。



图 1C

图 1B

图 1A

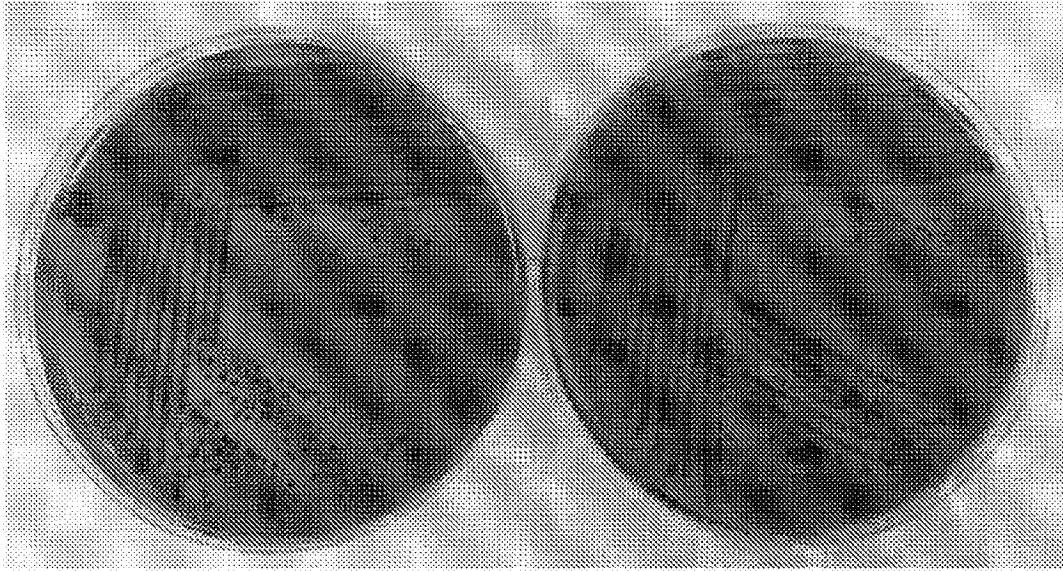


图2

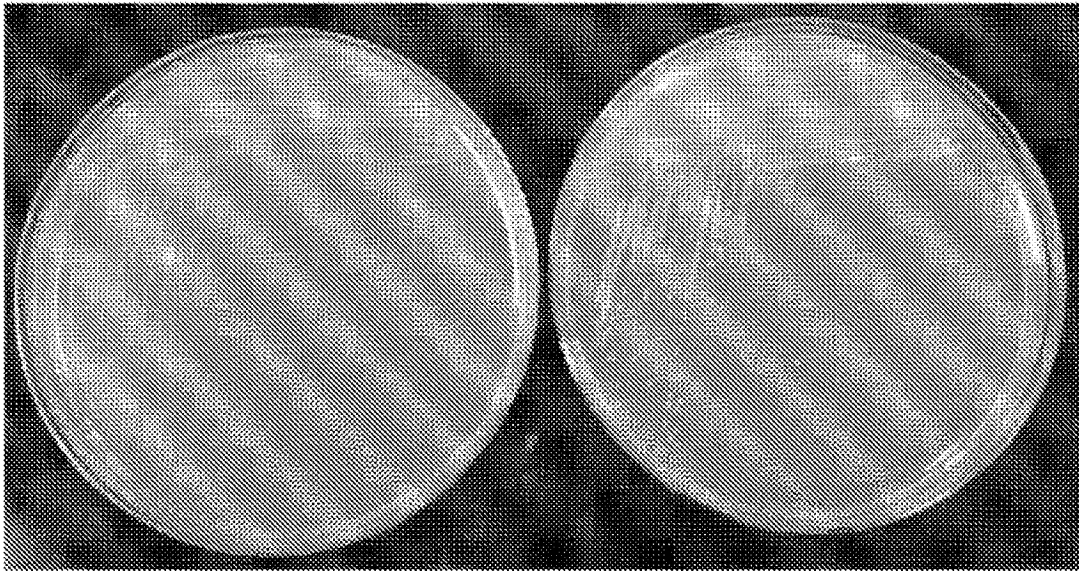


图3

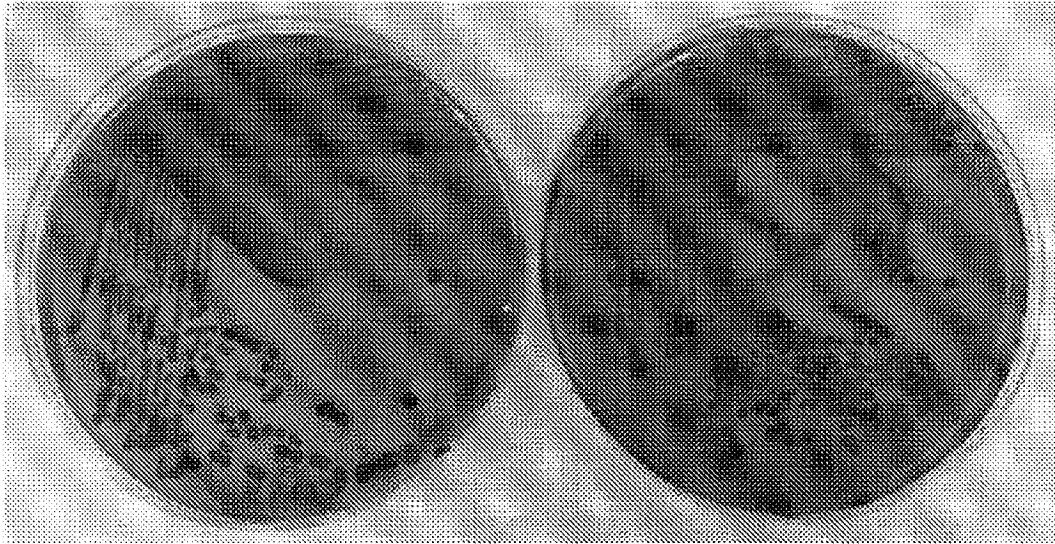


图4

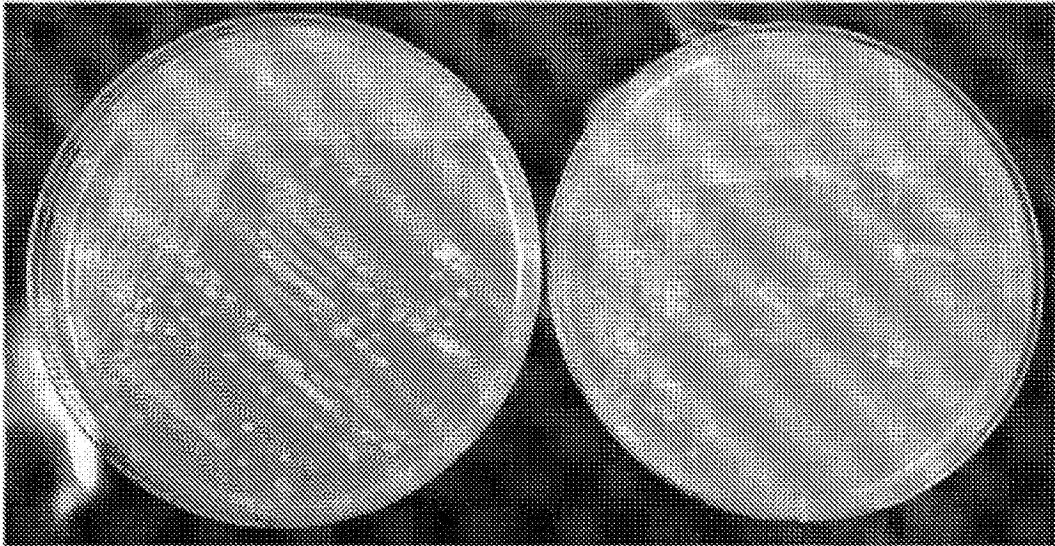


图5

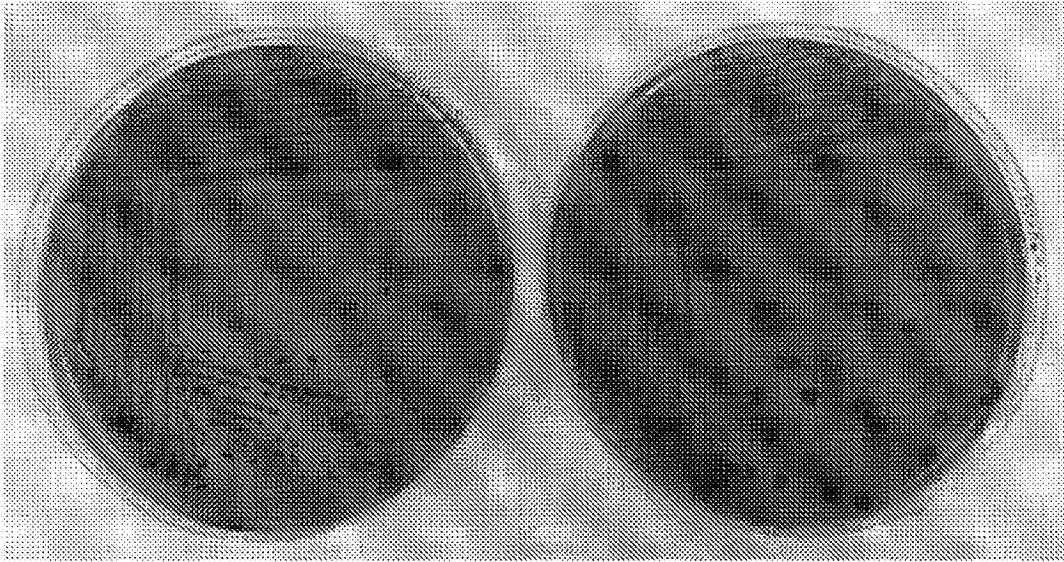


图6

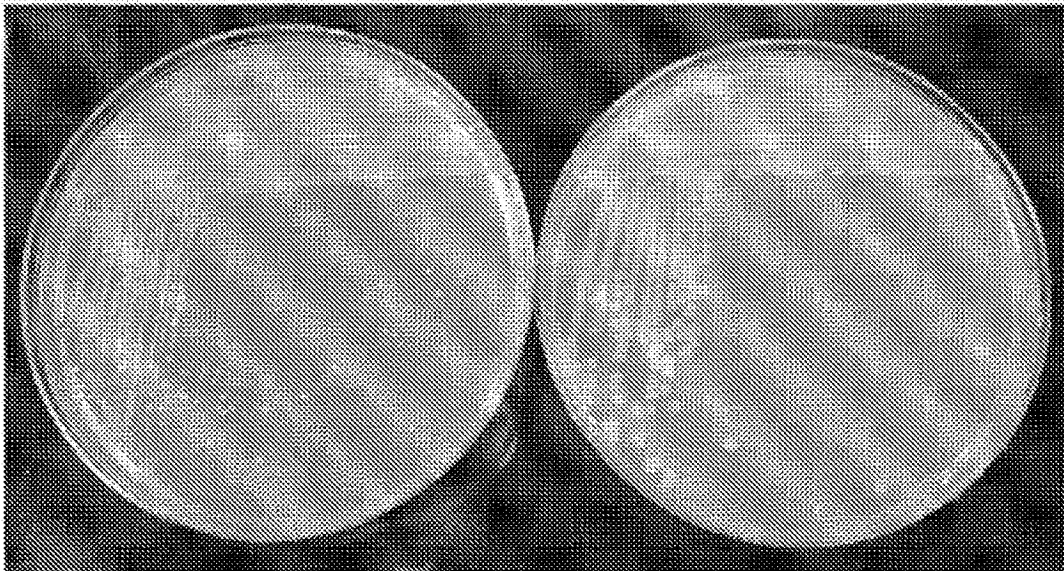


图7

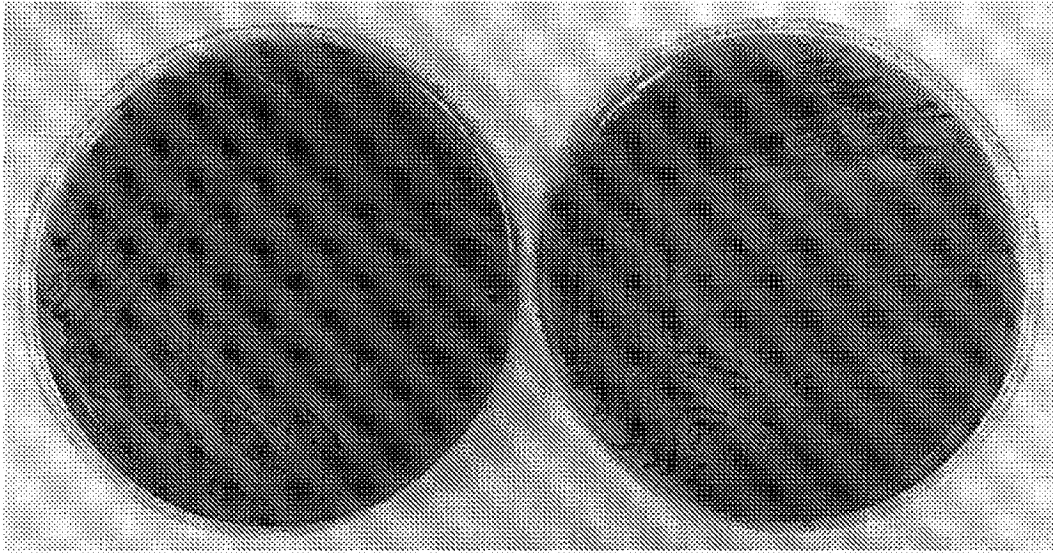


图8A

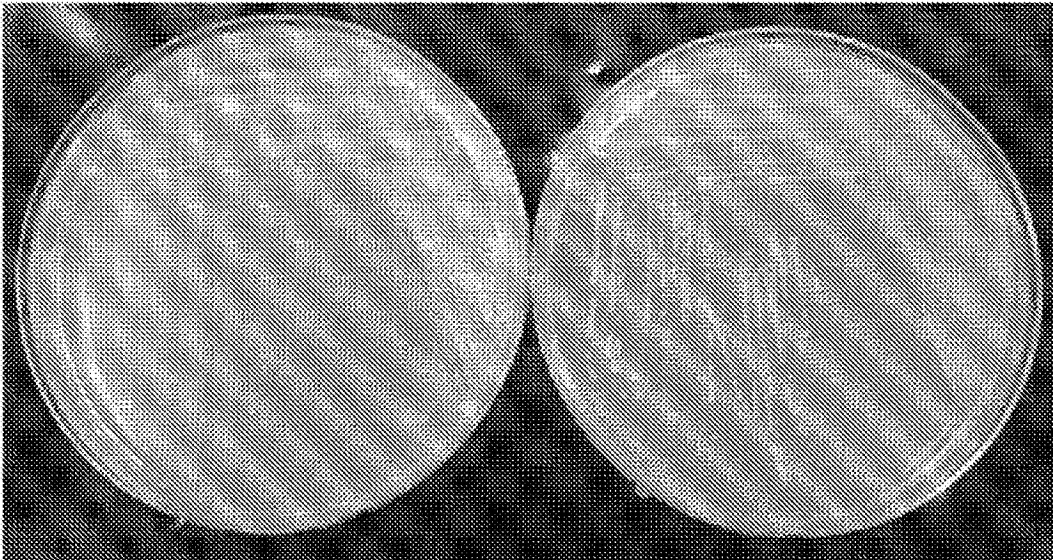


图8B