



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112424363 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 201980044965.1

(22) 申请日 2019.05.03

(30) 优先权数据

62/667,400 2018.05.04 US

62/743,740 2018.10.10 US

62/818,066 2019.03.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/030695 2019.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/213592 EN 2019.11.07

(71) 申请人 洛可斯生物科学公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 保罗·M·加罗福洛

大卫·G·奥斯特劳特

库尔特·塞利 桑迪·黄

汉纳·休伊特·图森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陆扬 韦昌金

(51) Int.Cl.

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

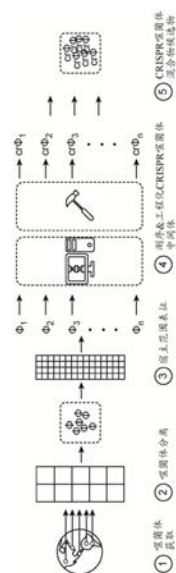
权利要求书11页 说明书82页 附图75页

(54) 发明名称

杀灭靶细菌的方法和组合物

(57) 摘要

本文公开了用于杀灭靶细菌的方法和组合物。还公开了工程化的细菌噬菌体。



1. 一种杀灭靶细菌的方法,所述方法包括:
将细菌噬菌体引入靶细菌中,所述细菌噬菌体包含:
 - (a) 编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸,其中所述间隔序列与来自所述靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补;和
 - (b) 能够诱导所述靶细菌裂解的基因,其中通过所述细菌噬菌体的裂解活性或使用所述间隔序列或所述由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一核酸序列是进一步包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述细菌噬菌体还包含编码用于所述CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述基因对于所述细菌噬菌体是内源的。
5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述基因对于所述细菌噬菌体是外源的。
6. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。
7. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。
9. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。
11. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子是代谢感知蛋白。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述CRP对环状AMP(cAMP)敏感。
14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述代谢感知蛋白是 σ 因子。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述 σ 因子是RpoN(σ^{54})。
16. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子破坏抑制元件的活性。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抑制元件包含热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抑制元件是转录抑制因子。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述转录抑制因子是全局转录抑制因子。
20. 根据权利要求3-19中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子包含Leu0或与SEQ ID NO:1具有至少75%的序列同源性的多肽。
21. 根据权利要求3-19中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子包含CD2983或与SEQ ID NO:2具有至少75%的序列同源性的多肽。
22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细

菌是内源的。

23. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是外源的。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统包括所述I型CRISPR-Cas系统。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列包含所述靶基因的全部或部分启动子序列。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列包含位于所述靶基因的转录区的编码链上的全部或部分的核苷酸序列。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列是所述靶细菌存活所需的必需基因的至少一部分。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述必需基因是Tsf、acpP、gapA、infA、secY、csrA、trmD、ftsA、fusA、glyQ、eno或nusG。

30. 根据权利要求2-29中任一项所述的方法,其中所述至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至所述间隔序列。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中仅通过所述细菌噬菌体的裂解活性杀灭所述靶细菌。

32. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中仅通过所述CRISPR-Cas系统的活性杀灭所述靶细菌。

33. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中通过所述细菌噬菌体的裂解活性和所述CRISPR-Cas系统的活性两者杀灭所述靶细菌。

34. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中通过与独立于所述细菌噬菌体的裂解活性的所述CRISPR-Cas系统的活性杀灭所述靶细菌。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统的活性补充或增强了所述细菌噬菌体的裂解活性。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述间隔序列与第二间隔序列重叠。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体的裂解活性和所述CRISPR-Cas系统的活性是协同的。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体的裂解活性、所述CRISPR-Cas系统的活性或两者均由所述细菌噬菌体的浓度调节。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体感染多种细菌菌株。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。

41. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的方法,其中除了由所述细菌噬菌体的裂解活性和/或所述CRISPR-Cas阵列的活性引起的细胞死亡之外,所述细菌噬菌体不赋予所述靶细

菌任何新的特性。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中所述靶细菌是艰难梭菌。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。

45. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中所述靶细菌是大肠杆菌。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述细菌噬菌体是T4、T7或T7m。

47. 根据权利要求1-46中任一项所述的方法,其中将编码间隔序列或crRNA的所述第一核酸插入非必需的细菌噬菌体基因中。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述非必需基因是gp49。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中所述非必需基因是gp75。

50. 根据权利要求47所述的方法,其中所述非必需基因是hoc。

51. 根据权利要求47所述的方法,其中所述非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。

52. 根据权利要求47所述的方法,其中所述非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。

53. 一种细菌噬菌体,所述细菌噬菌体包含:

(a) 编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸,其中所述间隔序列与来自靶细菌的靶基因的靶核苷酸序列互补;和

(b) 能够诱导所述靶细菌裂解的基因,

其中通过所述细菌噬菌体的裂解活性或使用所述间隔序列或由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭所述靶细菌。

54. 根据权利要求53所述的细菌噬菌体,所述细菌噬菌体还包含编码用于所述CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。

55. 根据权利要求54所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。

56. 根据权利要求54所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。

57. 根据权利要求56所述的细菌噬菌体,其中所述蛋白质是应答调控子BaeSR。

58. 根据权利要求54所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。

59. 根据权利要求58所述的细菌噬菌体,其中所述稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。

60. 根据权利要求54所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是代谢感知蛋白。

61. 根据权利要求60所述的细菌噬菌体,其中所述代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。

62. 根据权利要求61所述的细菌噬菌体,其中所述CRP对环状AMP(cAMP)敏感。

63. 根据权利要求60所述的细菌噬菌体,其中所述代谢感知蛋白是 σ 因子。

64. 根据权利要求63所述的细菌噬菌体,其中所述 σ 因子是RpoN(σ^{54})。

65. 根据权利要求54所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子破坏所述靶细菌的抑制元件的活性。

66. 根据权利要求65所述的细菌噬菌体,其中所述抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。

67. 根据权利要求65所述的细菌噬菌体,其中所述抑制元件是转录抑制因子。
68. 根据权利要求67所述的细菌噬菌体,其中所述转录抑制因子是全局转录抑制因子。
69. 根据权利要求54-68中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子包含LeuO或与SEQ ID NO:1具有至少75%序列同源性的多肽。
70. 根据权利要求54-68中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子包含CD2983或与SEQ ID NO:2具有至少75%的序列同源性的多肽。
71. 根据权利要求53-70中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是内源的。
72. 根据权利要求53-70中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是外源的。
73. 根据权利要求53-72中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。
74. 根据权利要求73所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。
75. 根据权利要求53-74中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶核苷酸序列包含所述靶基因的全部或部分启动子序列。
76. 根据权利要求53-75中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶核苷酸序列包含位于所述靶基因的转录区的编码链上的全部或部分的核苷酸序列。
77. 根据权利要求53-76中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶核苷酸序列是必需基因。
78. 根据权利要求77所述的细菌噬菌体,其中所述必需基因是Tsf、acpP、gapA、infA、secY、csrA、trmD、ftsA、fusA、glyQ、eno或nusG。
79. 根据权利要求53-76中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶核苷酸序列是非必需基因。
80. 根据权利要求53-79中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述第一核酸序列是包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。
81. 根据权利要求80所述的细菌噬菌体,其中所述至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至所述间隔序列。
82. 根据权利要求53-81中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体感染多种细菌菌株。
83. 根据权利要求53-82中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。
84. 根据权利要求53-82中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。
85. 根据权利要求84所述的细菌噬菌体,其中通过去除、替换或失活一个或多个溶原性基因使所述温和细菌噬菌体获得裂解性。
86. 根据权利要求53-85中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶细菌是艰难梭菌。
87. 根据权利要求86所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。
88. 根据权利要求53-85中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶细菌是大肠杆菌。

89. 根据权利要求88所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是T4、T7或T7m。
90. 根据权利要求53-89中任一项所述的细菌噬菌体,其中将编码间隔序列或crRNA的所述第一核酸插入非必需基因中。
91. 根据权利要求53-90中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp49。
92. 根据权利要求53-90中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp75。
93. 根据权利要求53-90中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是hoc。
94. 根据权利要求53-90中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。
95. 根据权利要求53-90中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。
96. 一种调节靶细菌中的CRISPR-Cas系统活性的方法,所述方法包括:引入包含编码用于所述靶细菌中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸的细菌噬菌体。
97. 根据权利要求96所述的方法,其中所述转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。
98. 根据权利要求96所述的方法,其中所述转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。
99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。
100. 根据权利要求96所述的方法,其中所述转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。
102. 根据权利要求96所述的方法,其中所述转录激活因子是代谢感知蛋白。
103. 根据权利要求102所述的方法,其中所述代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。
104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述CRP对环状AMP(cAMP)敏感。
105. 根据权利要求102所述的方法,其中所述代谢感知蛋白是 σ 因子。
106. 根据权利要求105所述的方法,其中所述 σ 因子是RpoN(σ^{54})。
107. 根据权利要求96-106中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子破坏抑制元件的活性。
108. 根据权利要求107所述的方法,其中所述抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。
109. 根据权利要求107-108中任一项所述的方法,其中所述抑制元件是转录抑制因子。
110. 根据权利要求109所述的方法,其中所述转录抑制因子是全局转录抑制因子。
111. 根据权利要求96-110中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子包含Leu0或与SEQ ID NO:1具有至少75%序列同源性的多肽。
112. 根据权利要求96-110中任一项所述的方法,其中所述转录激活因子包含CD2983或与SEQ ID NO:2具有至少75%序列同源性的多肽。
113. 根据权利要求96-112中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是内源的。
114. 根据权利要求96-112中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是外源的。
115. 根据权利要求96-114中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统是I型

CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

116. 根据权利要求115所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。

117. 权利要求96-116中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体感染多种细菌菌株。

118. 权利要求96-117中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。

119. 权利要求96-117中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。

120. 权利要求96-119中任一项所述的方法,其中所述靶细菌是艰难梭菌。

121. 根据权利要求120所述的方法,其中所述细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。

122. 根据权利要求96-119中任一项所述的方法,其中所述靶细菌是大肠杆菌。

123. 根据权利要求122所述的方法,其中所述细菌噬菌体是T4、T7或T7m。

124. 根据权利要求96-123中任一项所述的方法,其中编码转录激活因子的核酸插入到非必需的细菌噬菌体基因中。

125. 根据权利要求96-124中任一项所述的方法,其中所述非必需基因是gp49。

126. 根据权利要求96-124中任一项所述的方法,其中所述非必需基因是gp75。

127. 根据权利要求96-124中任一项所述的方法,其中所述非必需基因是hoc。

128. 根据权利要求96-124中任一项所述的方法,其中所述非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。

129. 根据权利要求96-124中任一项所述的方法,其中所述非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。

130. 一种细菌噬菌体,所述细菌噬菌体包含编码用于靶细菌中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸。

131. 根据权利要求130所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。

132. 根据权利要求130所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。

133. 根据权利要求132所述的细菌噬菌体,其中所述参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。

134. 权利要求130所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。

135. 根据权利要求134所述的细菌噬菌体,其中所述稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。

136. 根据权利要求130所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子是代谢感知蛋白。

137. 根据权利要求136所述的细菌噬菌体,其中所述代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。

138. 根据权利要求137所述的细菌噬菌体,其中所述CRP对环状AMP(cAMP)敏感。

139. 根据权利要求136所述的细菌噬菌体,其中所述代谢感知蛋白是 σ 因子。

140. 根据权利要求139所述的细菌噬菌体,其中所述 σ 因子是RpoN(σ^{54})。

141. 根据权利要求130-140中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子破坏抑制元件的活性。

142. 根据权利要求141所述的细菌噬菌体,其中所述抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。

143. 根据权利要求141-142中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述抑制元件是转录抑制因子。

144. 根据权利要求143所述的细菌噬菌体,其中所述转录抑制因子是全局转录抑制因子。

145. 根据权利要求130-144中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子包含Leu0或与SEQ ID NO:1具有至少75%序列同源性的多肽。

146. 根据权利要求130-144中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述转录激活因子包含CD2983或与SEQ ID NO:2具有至少75%序列同源性的多肽。

147. 根据权利要求130-146中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统对所述靶细菌是内源的。

148. 根据权利要求130-146中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统对所述靶细菌是外源的。

149. 根据权利要求130-148中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

150. 根据权利要求149所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。

151. 根据权利要求130-150中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体感染多种细菌菌株。

152. 根据权利要求130-151中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。

153. 根据权利要求130-151中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。

154. 根据权利要求130-153中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶细菌是艰难梭菌。

155. 根据权利要求154所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。

156. 根据权利要求130-153中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述靶细菌是大肠杆菌。

157. 根据权利要求156所述的细菌噬菌体,其中所述细菌噬菌体是T4、T7或T7m。

158. 根据权利要求130-157中任一项所述的细菌噬菌体,其中将编码转录激活因子的核酸插入到非必需的细菌噬菌体基因中。

159. 根据权利要求130-158中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp49。

160. 根据权利要求130-158中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp75。

161. 根据权利要求130-158中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是hoc。

162. 根据权利要求130-158中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。

163. 根据权利要求130-158中任一项所述的细菌噬菌体,其中所述非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。

164. 一种杀灭靶细菌的方法,所述方法包括将细菌噬菌体引入靶细菌,所述细菌噬菌

体包含

(a) 裂解活性, 和

(b) 编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列,

其中所述抗CRISPR多肽增强了所述细菌噬菌体的裂解活性。

165. 根据权利要求164所述的方法, 其中所述抗CRISPR多肽使CRISPR-Cas系统失活。

166. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述抗CRISPR多肽使用包括基因调控干扰的过程使所述CRISPR-Cas系统失活。

167. 根据权利要求165-166中任一项所述的方法, 其中所述抗CRISPR多肽使用包括核酸酶募集干扰的过程使所述CRISPR-Cas系统失活。

168. 根据权利要求165-167中任一项所述的方法, 其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

169. 根据权利要求168所述的方法, 其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。

170. 根据权利要求164-169中任一项所述的方法, 其中所述抗CRISPR多肽直接或间接结合至Cascade或Cascade样复合物。

171. 根据权利要求164-170中任一项所述的方法, 其中所述抗CRISPR多肽是截短蛋白、融合蛋白、二聚体蛋白或突变蛋白。

172. 根据权利要求164-171中任一项所述的方法, 其中所述细菌噬菌体还包含编码CRISPR阵列的第二核酸。

173. 根据权利要求172所述的方法, 其中所述CRISPR阵列包含至少一个重复序列和与来自所述靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补的至少一个间隔序列。

174. 一种细菌噬菌体, 所述细菌噬菌体包含:

(c) 裂解活性, 和

(d) 编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列,

其中所述抗CRISPR多肽增强了所述细菌噬菌体的裂解活性。

175. 根据权利要求174所述的细菌噬菌体, 其中所述抗CRISPR多肽使CRISPR-Cas系统失活。

176. 根据权利要求175所述的细菌噬菌体, 其中所述抗CRISPR多肽使用包括基因调控干扰的过程使所述CRISPR-Cas系统失活。

177. 根据权利要求175或176所述的细菌噬菌体, 其中所述抗CRISPR多肽使用包括核酸酶募集干扰的过程使所述CRISPR-Cas系统失活。

178. 根据权利要求175-177中任一项所述的细菌噬菌体, 其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

179. 根据权利要求178所述的细菌噬菌体, 其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。

180. 根据权利要求174-179中任一项所述的细菌噬菌体, 其中所述抗CRISPR多肽直接或间接结合至Cascade或Cascade样复合物。

181. 根据权利要求174-180中任一项所述的细菌噬菌体, 其中所述抗CRISPR多肽是截短蛋白、融合蛋白、二聚体蛋白或突变蛋白。

182. 根据权利要求174-180中任一项所述的细菌噬菌体, 其中所述细菌噬菌体还包含

编码CRISPR阵列的第二核酸。

183. 根据权利要求182所述的细菌噬菌体,其中所述CRISPR阵列包含至少一个重复序列和与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补的至少一个间隔序列。

184. 一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括对所述受试者施用权利要求53-95、130-163或174-183中任一项所述的细菌噬菌体。

185. 根据权利要求184所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

186. 根据权利要求184-185中任一项所述的方法,其中所述疾病是细菌感染。

187. 根据权利要求186所述的方法,其中引起所述细菌感染的细菌是是不动杆菌属种、放线菌属种、洋葱伯霍尔德杆菌复合体、弯曲杆菌属种、念珠菌属种、艰难梭菌、微小棒状杆菌、假白喉棒状杆菌、纹带棒状杆菌、棒状杆菌群G1、棒状杆菌群G2、肠杆菌科、肠球菌属种、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、莫拉菌属种、结核分枝杆菌复合体、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、非结核性分枝杆菌属种、紫单胞菌属种、产黑素普雷沃氏菌、假单胞菌属种、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、表皮葡萄球菌、唾液葡萄球菌、缓症链球菌、血链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、霍乱弧菌、球孢菌属种、隐球菌属种、猫螺杆菌、幽门螺杆菌、鲍氏梭菌及其任何组合。

188. 根据权利要求187所述的方法,其中所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的耐药性细菌。

189. 根据权利要求187或188所述的方法,其中所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的多重耐药性细菌。

190. 根据权利要求188或189所述的方法,其中所述抗生素包括头孢菌素、氟喹诺酮、碳青霉烯、黏菌素、氨基糖苷、万古霉素、链霉素或甲氧西林。

191. 根据权利要求184-190中任一项所述的方法,其中所述施用是动脉内、静脉内、肌内、口服、皮下、吸入或其任何组合。

192. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:

a. 权利要求53-95、130-163或174-183中任一项所述的细菌噬菌体;和

b. 药学上可接受的赋形剂。

193. 根据权利要求192所述的药物组合物,其为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂及其任何组合的形式。

194. 一种杀灭靶细菌的方法,所述方法包括:

将温和细菌噬菌体引入所述靶细菌,

其中所述温和细菌噬菌体的溶原性基因被去除、替换或失活,并使所述温和细菌噬菌体获得裂解性,从而杀灭所述靶细菌。

195. 根据权利要求194所述的方法,其中所述溶原性基因包括cI噬菌体阻遏基因。

196. 根据权利要求194或195所述的方法,其中所述细菌噬菌体感染多种细菌菌株。

197. 根据权利要求194-196中任一项所述的方法,其中所述靶细菌是艰难梭菌。

198. 根据权利要求197所述的方法,其中所述细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。

199. 根据权利要求194-198中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体还包含编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸。

200. 根据权利要求199所述的方法,其中所述间隔序列与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补。

201. 根据权利要求199或200所述的方法,其中所述第一核酸序列是进一步包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。

202. 根据权利要求201所述的方法,其中所述至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至所述间隔序列。

203. 根据权利要求199-202中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体还包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。

204. 根据权利要求203所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是内源的。

205. 根据权利要求203所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统对于所述靶细菌是外源的。

206. 根据权利要求203-205中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。

207. 根据权利要求203-205中任一项所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统包括I型CRISPR-Cas系统。

208. 根据权利要求200-207中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列包含所述靶基因的全部或部分启动子序列。

209. 根据权利要求200-207中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列包括位于所述靶基因的转录区的编码链上的全部或部分核苷酸序列。

210. 根据权利要求200-207中任一项所述的方法,其中所述靶核苷酸序列包含至少一部分所述靶细菌存活所需的必需基因。

211. 根据权利要求203-210中任一项所述的方法,其中通过所述细菌噬菌体的裂解活性和所述CRISPR-Cas系统的活性两者来杀灭所述靶细菌。

212. 根据权利要求211所述的方法,其中所述CRISPR-Cas系统的活性补充或增强了所述细菌噬菌体的裂解活性。

213. 根据权利要求203-210中任一项所述的方法,其中通过独立于所述细菌噬菌体的裂解活性的所述CRISPR-Cas系统的活性而杀灭所述靶细菌。

214. 根据权利要求203-210中任一项所述的方法,其中所述细菌噬菌体的裂解活性和所述CRISPR-Cas系统的活性是协同的。

215. 根据权利要求194-214中任一项所述的方法,其中通过所述细菌噬菌体的浓度调节所述细菌噬菌体的裂解活性、所述CRISPR-Cas系统的活性或两者。

216. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:(a)温和细菌噬菌体,其中所述温和细菌噬菌体的溶原性基因被去除、替换或失活;和(b)药学上可接受的赋形剂。

217. 根据权利要求216所述的药物组合物,其为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂或其任何组合的形式。

218. 一种调节受试者的微生物组的方法,所述方法包括:向所述受试者施用权利要求192-193或216-217中任一项所述的药物组合物。

219. 根据权利要求187-191中任一项所述的方法,其中所述细菌是假单胞菌属。

220. 根据权利要求187-191中任一项所述的方法,其中所述细菌是葡萄球菌属。

221. 根据权利要求187-191或219-220中任一项所述的方法,其中所述细菌是耐甲氧西林的。

222. 根据权利要求187-191或221中任一项所述的方法,其中所述细菌是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌。

223. 根据权利要求187-191中任一项所述的方法,其中所述细菌是多重耐药性铜绿假单胞菌。

杀灭靶细菌的方法和组合物

交叉引用

[0001] 本申请要求于2018年5月4日提交的美国临时申请号62/667,400、于2018年10月10日提交的美国临时申请号62/743,740和于2019年3月13日提交的美国临时申请号62/818,066的权益,所有申请均通过引用并入本文。

发明内容

[0002] 在某些实施方案中,本文公开了杀灭靶细菌的方法。在一些实施方案中,用于杀灭靶细菌的方法包括将细菌噬菌体引入靶细菌中,该噬菌体包含:编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸,其中间隔序列与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补;和能够诱导靶细菌裂解的基因。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性或使用间隔序列或由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌。在一些实施方案中,第一核酸序列是进一步包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。在一些实施方式中,细菌噬菌体还包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。在一些实施方案中,该基因是内源的或外源的。在一些实施方案中,转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。在一些实施方案中,转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。在一些实施方案中,参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。在一些实施方案中,转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。在一些实施方案中,稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。在一些实施方案中,转录激活因子是代谢感知蛋白。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。在一些实施方案中,CRP对环状AMP(cAMP)敏感。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是 σ 因子。在一些实施方案中, σ 因子是RpoN(σ^{54})。在一些实施方案中,转录激活因子破坏抑制元件的活性。在一些实施方案中,抑制元件包括热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。在一些实施方案中,抑制元件是转录抑制因子。在一些实施方案中,转录抑制因子是全局转录抑制因子。在一些实施方案中,转录激活因子包含LeuO或与SEQIDNO:1具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,转录激活因子包含CD2983或与SEQIDNO:2具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是内源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统包括I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含靶基因的全部或部分启动子序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包括位于靶基因的转录区的编码链上的全部或部分的核苷酸序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列是靶细菌存活所需的必需基因的至少一部分。在一些实施方案中,必需基因是Tsf、acpP、gapA、infA、secY、csrA、trmD、ftsA、fusA、glyQ、eno或nusG。在一些实施方案中,至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至至少一个间隔序列。在一些实施方案中,仅通过细菌噬菌体的裂解活性杀灭靶细菌。在一些实施方案中,仅通过CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和CRISPR-Cas系统的活性两者结合来杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过独立于细菌噬菌体的裂解活性的CRISPR-Cas系统的活性来杀

灭靶细菌。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统的活性补充或增强了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列与第二间隔序列重叠。在一些实施方案中,细菌噬菌体的裂解活性和CRISPR-Cas系统的活性是协同的。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的浓度调节细菌噬菌体的裂解活性、CRISPR-Cas系统的活性或两者。在一些实施方案中,细菌噬菌体感染多种细菌菌株。在一些实施方案中,细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。在一些实施方案中,除了由细菌噬菌体的裂解活性和/或CRISPR-Cas阵列的活性引起的细胞死亡以外,细菌噬菌体不赋予靶细菌任何新的特性。在一些实施方案中,靶细菌是艰难梭菌(*C.difficile*)。在一些实施方案中,细菌噬菌体为 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。在一些实施方案中,靶细菌是大肠杆菌(*E.coli*)。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4、T7或T7m。在一些实施方案中,将编码间隔序列或crRNA的第一核酸插入非必需的细菌噬菌体基因中。在一些实施方案中,非必需基因是gp49、gp75或hoc。在一些实施方案中、非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。在一些实施方案中、非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。

[0003] 在一些实施方案中,本文公开了用于杀灭例如在包含靶细菌和非靶细菌的细菌的混合群体中(例如,在如本文所述的治疗和/或环境处理过程中)的多种靶细菌的方法。在特定实施方案中,根据本文所述的任何方法处理靶细菌(例如,用于杀灭靶细菌),并且通过细菌噬菌体的裂解活性来杀灭靶细菌的第一群体,并通过使用间隔序列或其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌的第二群体(例如其中非靶细菌未被杀灭,例如,以比靶细菌更低的比率被杀灭,如以该比率的50%、小于该比率的25%、小于该比率的10%,或小于20%被杀灭、小于10%被杀灭、小于5%被杀灭等)。

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了用于调节靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括:在靶细菌中引入包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸细菌噬菌体。在一些实施方案中,转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。在一些实施方案中,转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。在一些实施方案中,参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。在一些实施方案中,转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。在一些实施方案中,稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。在一些实施方案中,转录激活因子是代谢感知蛋白。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。在一些实施方案中,CRP对环状AMP(cAMP)敏感。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是 σ 因子。在一些实施方案中, σ 因子是RpoN(σ^{54})。在一些实施方案中,转录激活因子破坏抑制元件的活性。在一些实施方案中,抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。在一些实施方案中,抑制元件是转录抑制因子。在一些实施方案中,转录抑制因子是全局转录抑制因子。在一些实施方案中,转录激活因子包含Leu0或与SEQIDNO:1具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,转录激活因子包含CD2983或与SEQIDNO:2具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是内源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,细菌噬菌体感染多种细菌菌株。在一些实施方案中,细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。在一些实施方案中,靶细菌是艰难梭菌。在一些实施方

案中,细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。在一些实施方案中,靶细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4、T7或T7m。在一些实施方案中,将编码转录激活因子的核酸插入非必需的细菌噬菌体基因中。在一些实施方案中,非必需基因是gp49。在一些实施方案中,非必需基因是gp75。在一些实施方案中,非必需基因是hoc。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了杀灭靶细菌的方法。该方法包括将包含裂解活性和编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列的细菌噬菌体引入靶细菌。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽cr噬菌体的裂解活性(例如,如通过杀灭靶细菌的速度所确定)。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括基因调控干扰的过程使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括核酸酶募集干扰的过程使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽直接或间接结合Cascade或Cascade样复合物。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽是截短蛋白、融合蛋白、二聚体蛋白或突变蛋白。在一些实施方案中,细菌噬菌体还包含编码CRISPR阵列的第二核酸。在一些实施方案中,CRISPR阵列包含至少一个重复序列和与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补的至少一个间隔序列。在特定的实施方案中,本文提供了杀灭靶细菌的方法(例如,在包含靶细菌和非靶细菌的细菌的混合种群中)。该方法包括将具有裂解活性并包含编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列的细菌噬菌体引入靶细菌。在特定实施方案中,抗CRISPR多肽cr噬菌体的裂解活性(例如,如通过在给定的时间内杀灭的靶细菌的数量所测定)。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包括:编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸,其中所述间隔序列与来自(例如靶标)细菌的(例如靶标)基因的(例如靶标)核苷酸序列互补;以及能够诱导(例如靶标)细菌裂解的基因。在特定的实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性或使用间隔序列或由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌。在一些实施方式中,细菌噬菌体还包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。在一些实施方案中,转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。在一些实施方案中,转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。在一些实施方案中,该蛋白质是应答调控子BaeSR。在一些实施方案中,转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。在一些实施方案中,稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。在一些实施方案中,转录激活因子是代谢感知蛋白。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。在一些实施方案中,CRP对环状AMP(cAMP)敏感。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是 σ 因子。在一些实施方案中, σ 因子是RpoN(σ^{54})。在一些实施方案中,转录激活因子破坏靶细菌的抑制元件的活性。在一些实施方案中,抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。在一些实施方案中,抑制元件是转录抑制因子。在一些实施方案中,转录抑制因子是全局转录抑制因子。在一些实施方案中,转录激活因子包含Leu0或与SEQ IDNO:1具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,转录激活因子包含CD2983或与SEQ IDNO:2具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是内源的。在一些实施

方案中,CRISPR-Cas系统是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含靶基因的全部或部分启动子序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包括位于靶基因的转录区的编码链上的全部或部分的核苷酸序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列是必需的。在一些实施方案中,必需基因是Tsf、acpP、gapA、infA、secY、csrA、trmD、ftsA、fusA、glyQ、eno或nusG。在一些实施方案中,靶核苷酸序列是非必需基因。在一些实施方案中,第一核酸序列是包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。在一些实施方案中,至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至间隔序列。在一些实施方案中,细菌噬菌体感染多种细菌菌株。在一些实施方案中,细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。在一些实施方案中,通过去除、替换或失活一个或多个溶原性基因使温和细菌噬菌体获得裂解性。在一些实施方案中,靶细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。在一些实施方案中,靶细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4、T7或T7m。在一些实施方案中,将编码间隔序列或crRNA的第一核酸插入非必需基因中。在一些实施方案中,非必需基因是gp49。在一些实施方案中,非必需基因是gp75。在一些实施方案中,非必需基因是hoc。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。在一些实施方案中,本文还公开了包含本文公开的细菌噬菌体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂或其任何组合的形式。在一些实施方案中,本文进一步公开了治疗受试者的疾病的方法,包括向受试者施用本文公开的细菌噬菌体。在一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,所述疾病是细菌感染。在一些实施方案中,引起细菌感染的细菌是不动杆菌属(*Acinetobacter*)种、放线菌属(*Actinomyces*)种、洋葱伯霍尔德杆菌(*Burkholderia cepacia*)复合体、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)种、念珠菌属(*Candida*)种、艰难梭菌、微小棒状杆菌(*Corynebacterium minutissimum*)、假白喉棒状杆菌(*Corynebacterium pseudodiphtheriae*)、纹带棒状杆菌(*Corynebacterium striatum*)、棒状杆菌群(*Corynebacterium* group) G1、棒状杆菌群G2、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、肠球菌属(*Enterococcus*)种、大肠杆菌、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、莫拉菌属(*Moraxella*)种、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)复合体、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、非结核性分枝杆菌属(non-tuberculous mycobacteria)种、紫单胞菌属(*Porphyromonas*)种、产黑素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogenica*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)种、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、唾液葡萄球菌(*Staphylococcus salivarius*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、球孢菌属(*Coccidioides*)种、隐球菌属(*Cryptococcus*)种、猫螺杆菌

(*Helicobacter felis*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、鲍氏梭菌 (*Clostridium bolteae*) 及其任何组合。在一些实施方案中,所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的多重耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是假单胞菌属。在一些实施方案中,所述细菌是葡萄球菌属 (*staphylococcus*)。在一些实施方案中,所述细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,所述细菌是艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌。在一些实施方案中,所述细菌是多重耐药性铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas Aeruginosa*)。在一些实施方案中,所述抗生素包括头孢菌素、氟喹诺酮、碳青霉烯、黏菌素、氨基糖苷、万古霉素、链霉素或甲氧西林。在一些实施方案中,所述施用是动脉内、静脉内、肌内、口服、皮下、局部、吸入、膀胱内或其任何组合。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了包含编码用于(例如靶标)细菌中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸的细菌噬菌体。在一些实施方案中,转录激活因子由群体感应(QS)信号调节。在一些实施方案中,转录激活因子是参与感测细菌膜的应激的蛋白质。在一些实施方案中,参与感测应激的蛋白质是应答调控子BaeSR。在一些实施方案中,转录激活因子是稳定Cas的蛋白质。在一些实施方案中,稳定Cas的蛋白质是热休克蛋白G(HtpG)。在一些实施方案中,转录激活因子是代谢感知蛋白。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是cAMP受体蛋白(CRP)。在一些实施方案中,CRP对环状AMP(cAMP)敏感。在一些实施方案中,代谢感知蛋白是 σ 因子。在一些实施方案中, σ 因子是RpoN(σ^{54})。在一些实施方案中,转录激活因子破坏抑制元件的活性。在一些实施方案中,抑制元件是热稳定的核样体结构蛋白(H-NS)、亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)或CodY。在一些实施方案中,抑制元件是转录抑制因子。在一些实施方案中,转录抑制因子是全局转录抑制因子。在一些实施方案中,转录激活因子包含Leu0或与SEQIDNO:1具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,转录激活因子包含CD2983或与SEQIDNO:2具有至少75%序列同源性的多肽。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是内源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,细菌噬菌体感染多种细菌菌株。在一些实施方案中,细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是获得裂解性的温和细菌噬菌体。在一些实施方案中,靶细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体为 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。在一些实施方案中,靶细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4、T7或T7m。在一些实施方案中,将编码转录激活因子的核酸插入非必需的细菌噬菌体基因中。在一些实施方案中,非必需基因是gp49。在一些实施方案中,非必需基因是gp75。在一些实施方案中,非必需基因是hoc。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.7、gp4.3、gp4.5或gp4.7。在一些实施方案中,非必需基因是gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3或gp4.5。在一些实施方案中,本文还公开了包含本文公开的细菌噬菌体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂及其任何组合的形式。本文进一步公开了治疗受试者的疾病的方法,包括向受试者施用细菌噬菌体。在一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,所述疾病是细菌

感染。在一些实施方案中,引起细菌感染的细菌是不动杆菌属种、放线菌属种、洋葱伯霍尔德杆菌复合体、弯曲杆菌属种、念珠菌属种、艰难梭菌、微小棒状杆菌、假白喉棒状杆菌、纹带棒状杆菌、棒状杆菌群G1、棒状杆菌群G2、肠杆菌科、肠球菌属种、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、莫拉菌属种、结核分枝杆菌复合体、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、非结核性分枝杆菌属种、紫单胞菌属种、产黑素普雷沃氏菌、假单胞菌属种、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、表皮葡萄球菌、唾液葡萄球菌、缓症链球菌、血链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、霍乱弧菌、球孢菌属种、隐球菌属种、猫螺杆菌、幽门螺杆菌、鲍氏梭菌及其任何组合。在一些实施方案中,所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的多重耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是假单胞菌属。在一些实施方案中,所述细菌是葡萄球菌属。在一些实施方案中,所述细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,所述细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌。在一些实施方案中,所述细菌是多重耐药性铜绿假单胞菌。在一些实施方案中,所述抗生素包括头孢菌素、氟喹诺酮、碳青霉烯、黏菌素、氨基糖苷、万古霉素、链霉素或甲氧西林。在一些实施方案中,所述施用是动脉内、静脉内、肌内、口服、皮下、局部、吸入、膀胱内或其任何组合。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了细菌噬菌体,其包含:裂解活性和编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列。在特定的实施方案中,抗CRISPR多肽 cr 噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括基因调控干扰的过程使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括核酸酶募集干扰的过程使CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽直接或间接结合Cascade或Cascade样复合物。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽是截短蛋白、融合蛋白、二聚体蛋白或突变蛋白。在一些实施方案中,细菌噬菌体还包含编码CRISPR阵列的第二核酸。在一些实施方案中,CRISPR阵列包含至少一个重复序列和与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补的至少一个间隔序列。在一些实施方案中,本文还公开了包含本文公开的细菌噬菌体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂或其任何组合的形式。在一些实施方案中,本文进一步公开了治疗受试者的疾病的方法,包括向受试者施用本文公开的细菌噬菌体。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,疾病是细菌感染。在一些实施方案中,引起细菌感染的细菌是不动杆菌属种、放线菌属种、洋葱伯霍尔德杆菌复合体、弯曲杆菌属种、念珠菌属种、艰难梭菌、微小棒状杆菌、假白喉棒状杆菌、纹带棒状杆菌、棒状杆菌群G1、棒状杆菌群G2、肠杆菌科、肠球菌属种、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、莫拉菌属种、结核分枝杆菌复合体、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、非结核性分枝杆菌属种、紫单胞菌属种、产黑素普雷沃氏菌、假单胞菌属种、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、表皮葡萄球菌、唾液葡萄球菌、缓症链球菌、血链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、霍乱弧菌、球孢菌属种、隐球菌属种、猫螺杆菌、幽门螺杆菌、鲍氏梭菌及其任何组合。在一些实施方案中,所

述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是对至少一种抗生素具有抗性的多重耐药性细菌。在一些实施方案中,所述细菌是假单胞菌属。在一些实施方案中,所述细菌是葡萄球菌属。在一些实施方案中,所述细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,所述细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的。在一些实施方案中,所述细菌是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌。在一些实施方案中,所述细菌是多重耐药性铜绿假单胞菌。在一些实施方案中,所述抗生素包括头孢菌素、氟喹诺酮、碳青霉烯、黏菌素、氨基糖苷、万古霉素、链霉素或甲氧西林。在一些实施方案中,所述施用是动脉内、静脉内、肌内、口服、皮下、局部、吸入或其任何组合。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了杀灭靶细菌的方法,其包括将包含去除、置换或失活的至少一种溶原性基因的温和细菌噬菌体引入靶细菌,其中使所述温和细菌噬菌体裂解,从而杀灭靶细菌。在一些实施方案中,溶原性基因是阻遏基因。在一些实施方案中,溶原性基因是cI噬菌体阻遏基因。在一些实施方案中,细菌噬菌体感染多种细菌菌株。在一些实施方案中,靶细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体是 ϕ CD146或 ϕ CD24-2。在一些实施方案中,细菌噬菌体还包含编码间隔序列或由其转录的crRNA的第一核酸。在一些实施方案中,间隔序列与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,第一核酸序列是进一步包含至少一个重复序列的CRISPR阵列。在一些实施方案中,至少一个重复序列在其5'端或3'端可操作地连接至间隔序列。在一些实施方案中,细菌噬菌体还包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的第二核酸。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是内源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统包括I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含靶基因的全部或部分启动子序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包括位于靶基因的转录区的编码链上的全部或部分的核苷酸序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含至少一部分靶细菌存活所需的必需基因。在一些实施方案中,细菌噬菌体的裂解活性和CRISPR-Cas系统的活性两者杀灭靶细菌。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统的活性补充或增强了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,通过独立于细菌噬菌体的裂解活性的CRISPR-Cas系统的活性而杀灭靶细菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体的裂解活性和CRISPR-Cas系统的活性是协同的。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的浓度调节细菌噬菌体的裂解活性、CRISPR-Cas系统的活性或两者。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了药物组合物,该药物组合物包含:(a)包含去除、置换或失活的至少一种溶原性基因的温和噬菌体;和(B)药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,该药物组合物为片剂、液体剂、糖浆、口服制剂、静脉内制剂、鼻内制剂、眼用制剂、耳用制剂、皮下制剂、可吸入呼吸制剂、栓剂或其任何组合的形式。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了调节受试者的微生物组的方法,该方法包括:向受试者施用本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物治疗微生物组失衡。

附图说明

[0012] 本公开内容的特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用到本发

明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将获得对本发明的特征和优点的更好的理解。在这些附图中:

[0013] 图1图示了工程化CRISPR增强的细菌噬菌体的工作流程。

[0014] 图2A示例了来自艰难梭菌的五个菌株内的CRISPR-Cas系统的线性比对的示意图,其中鉴定了各种CRISPR-Cas组成组分。

[0015] 图2B进一步示例了艰难梭菌630和R20291的CRISPR-Cas系统操纵子结构的示意图。

[0016] 图3A示例了当用天然野生型细菌噬菌体T7m或相应工程化的cr噬菌体T7m处理时,大肠杆菌菌株BW25113的细胞群体减少。天然野生型细菌噬菌体显示细菌通过裂解活性而被杀灭。相应的包含ftsA的Leu0和CRISPR阵列的crT7m显示,与野生型细菌噬菌体T7m相比,细菌杀灭活性提高了5个对数。

[0017] 图3B示例了对细菌直接施用ftsA的CRISPR阵列而不依赖噬菌体的递送时的致死率(降低7个对数)。

[0018] 图4A示例了当用天然野生型细菌噬菌体 ϕ CD146或相应的工程化的cr噬菌体(crPhage) ϕ CD146处理时,艰难梭菌菌株R20291的细胞群体减少。天然野生型细菌噬菌体显示细菌通过裂解活性而被杀灭。然而,与野生型噬菌体相比,相应的cr噬菌体 ϕ CD146在杀灭细菌活性上显示出额外提高1个对数。

[0019] 图4B示例了当直接对细菌施用而不依赖于噬菌体递送时R20291-3的CRISPR阵列的致死率(降低3.5个对数)。

[0020] 图5示例了艰难梭菌菌株069的细菌菌苔,其对野生型噬菌体 ϕ CD146的裂解不敏感。图像左侧缺少噬菌斑表明缺乏野生型噬菌体 ϕ CD146的杀伤作用。图像右侧由于cr噬菌体 ϕ CD146的存在导致的噬菌斑表明细菌死亡是由于靶向CRISPR阵列的R20291-3的活性所致。

[0021] 图6A-图6V示例了与野生型细菌噬菌体对不同艰难梭菌菌株的致死率相比,cr噬菌体 ϕ CD146的致死率提高。图6A示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株043的致死率。在用野生型或含有CRISPR-阵列的cr噬菌体 ϕ CD146处理后,通过600nm的光密度监测长达6小时的艰难梭菌的各种菌株的种群生长。图6B示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株051的致死率。图6C示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株073的致死率。图6D示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌093的致死率。图6E示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株0180的致死率。图6F示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株106的致死率。图6G示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株128的致死率。图6H示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株199的致死率。图6I示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株111的致死率。图6J示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株108的致死率。图6K示例了cr噬菌体 ϕ CD146对噬菌艰难梭菌25的致死率。图6L示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株148的致死率。图6M示例了cr噬菌体 ϕ CD146对噬菌艰难梭菌154的致死率。图6N示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌195的致死率。图6O示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株FOBT195的致死率。图6P示例了cr噬菌体 ϕ CD146对噬菌艰难梭菌038的致死率。图6Q示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株112的致死率。图6R示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌196的致死率。图6S示例了对艰难梭菌菌株105的cr噬菌体 ϕ CD146致死率。图6T示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株UK1的致死

率。图6U示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株UK6的致死率。图6V示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株BI-9的致死率。

[0022] 图7A-图7C示例了与野生型细菌噬菌体对不同艰难梭菌菌株的致死率相比,cr噬菌体 ϕ CD24-2的致死率提高。在用野生型或含有CRISPR-阵列的crr噬菌体 ϕ CD24-2处理后,通过600nm的光密度监测长达6小时的艰难梭菌各种菌株的种群生长。图7A示例了crr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株041的致死率。图7B示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株042的致死率。图7C示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株046的致死率。

[0023] 图8A-图8E示例了与野生型细菌噬菌体对不同艰难梭菌菌株的致死率相比,cr噬菌体 ϕ CD146的致死率提高。在用野生型或含有CRISPR-阵列的cr噬菌体 ϕ CD146处理后,使用CFU减少测定法监测长达6小时的艰难梭菌各个菌株的种群生长。CFU减少测定法提供了比光密度测量更高的定量灵敏度。图8A示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株043的致死率。图8B示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌051的致死率。图8C示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株073的致死率。图8D示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌菌株093的致死率。图8E示例了cr噬菌体 ϕ CD146对艰难梭菌R20291的致死率。

[0024] 图9示例了与野生型细菌噬菌体对艰难梭菌菌株F19的致死率相比,cr噬菌体 ϕ CD24-2的致死率提高。用野生型或含有CRISPR阵列的cr噬菌体 ϕ CD24-2的处理后,使用CFU减少测定法监测艰难梭菌CD19长达6小时的种群生长。CFU减少测定法的使用提供了比光密度测量更高的定量灵敏度。

[0025] 图10示例了对艰难梭菌菌株043的cr噬菌体 ϕ CD146和cr噬菌体 ϕ CD24-2的组合比较进行测定。分别针对每种cr噬菌体以及一起施用时对cr噬菌体 ϕ CD146和cr噬菌体 ϕ CD24-2的抗菌活性进行了CFU测定。与结合使用两种野生型噬菌体一起处理相比,共同施用显示出更高的杀灭功效。

[0026] 图11示例了在广泛的靶向CRISPR阵列的R20291-3的病毒滴度MOI中,cr噬菌体 ϕ CD146的杀灭活性始终胜过野生型噬菌体的致死率。

[0027] 图12A-图12B示例了计算机模拟模型,该模型预测了由于靶位点突变而导致的随时间推移出现的抗性克隆的数目与crRNA靶向的独立基因数目的关系。这些模型假设高度保守的假设,即(1)突变率与基因靶标无关,以及(2)crRNA的所有32个碱基均匹配活性。对两种类型的感染进行了建模:如图12A所示,通过每6个小时加倍增加至 10^{10} CFU的总负荷的急性感染,或者如图12B所示,通过每20分钟加倍增加至 10^{14} CFU的总负荷的剧烈感染。两种模型均显示3个独立的基因靶标足以防止长达28天的感染时间的突变逃逸。

[0028] 图13示例了靶向大肠杆菌基因组保守区的一系列单个I-E型crRNA的菌株覆盖范围。crRNA阵列靶标包括以下基因,按菌株覆盖率的从高到低的顺序排列:Tsf (100%)、acpP (99%)、gapA (99%)、infA (99%)、secY (99%)、secY' 2 (99%)、csrA (99%)、trmD (99%)、ftsA (99%)、nusG (99%)、fusA' 2 (99%)、fusA (98%)、glyQ (98%)、eno (95%)、gapA' 2 (91%)、eno' 2 (89%)和nusG' 2 (73%)。

[0029] 图14示例了一系列带有靶向大肠杆菌基因组保守区的间隔子的单个I-E型crRNA的功能致死率评估。crRNA靶标包括以下基因:acpP、csrA、eno、fusA、gapA、glyQ、infA、nusG、secY、trmD和Tsf。

[0030] 图15示出了三种针对大肠杆菌的工程化的CRISPR增强的细菌噬菌体的示意图,所

述细菌噬菌体是由三种不同的专性裂解细菌噬菌体的混合剂开发而成的,所述专性裂解细菌噬菌体包含编码转录激活因子Leu0和CRISPR-阵列的相同DNA序列。三种工程化的Leu0cr噬菌体包括crT4、crT7和crT7m。

[0031] 图16A示例了在大肠杆菌中典型的I-E型或I-F型CRISPR-Cas系统的相对流行度和分布。分析了625个可公开获得的大肠杆菌基因组,涵盖了多种菌株,包括:致肾盂肾炎大肠杆菌(UPEC)、产志贺样毒素大肠杆菌(STEC)、O157:H7血清型大肠杆菌、致泻大肠埃希氏菌(DEC)、非1570抗原型大肠杆菌和肠致病性大肠杆菌(EPEC)。

[0032] 图16B示出了在图16A中所有测试的菌株中约78%(487/625)的菌株具有完整的CRISPR-Cas3系统,不论是I-E型或I-F型。

[0033] 图17示例了使用经验证的ftsA间隔序列的Leu0增强的CRISPR阵列构建体的非裂解的M13衍生的噬菌粒递送,该ftsA间隔序列被设计用于测试对于CRISPR介导的致死率,对Leu0表达的依赖性。通过将M13细菌噬菌体转导到一系列菌株中来测试Leu0增强的噬菌粒载体的致死率,这些菌株包括含有野生型H-NS抑制的大肠杆菌I-E型CRISPR-Cas3操纵子的亲本EMG2、缺乏CRISPR-Cas3操纵子(Δ hns)中的H-NS抑制基序的BW25113-衍生物、包含过表达的CRISPR-Cas3操纵子(BW+Cas)的BW25113衍生物和缺乏Cas3基因(BW Δ Cas)的BW25H3-衍生物。

[0034] 图18A-图18C示例了三种包含转录激活因子Leu0和CRISPR阵列的Leu0增强的cr噬菌体(图18A-crT7m、图18B-crT4和图18C-crT7)与其野生型变体相比增强的致死动力学。将靶标大肠杆菌的crT7m、crT4和crT7分别在生长培养基中以指示的每种细菌噬菌体的感染复数(噬菌体与细菌的比率)孵育2小时或5小时。在所有三种cr噬菌体中观察到CFU降低的显著差异。

[0035] 图19A-图19E示例了每种cr噬菌体或cr噬菌体混合剂的Leu0增强的cr噬菌体crT4、crT7和crT7m对大肠杆菌菌株MG1655的剂量反应体外杀灭曲线,通过光密度测量群体的最终变化。大肠杆菌生长至对数中期,并用感染复数(MOI;噬菌体与细菌的比率)进行如下处理:图19A,crT7以0.0001、0.01和1.0的MOI孵育;图19B,crT7m以0.0009、0.09和9.0的MOI孵育;图19C,crT4以0.0006、0.06和6.0的MOI孵育。将每种噬菌体等量混合以生成cr噬菌体混合剂("cocktail"),并以0.0006、0.06和6.0的MOI(每种cr噬菌体)孵育(如图19D所示)。图19E是图19D的放大图。

[0036] 图20示例了在大肠杆菌MG1655中,Leu0增强的cr噬菌体的浓度与所得的裂解时间之间观察到的剂量依赖性关系。大肠杆菌生长到对数中期,并用每种cr噬菌体所示的感染复数(MOI;噬菌体与细菌的比率)进行处理。对于所有三种所测试的细菌噬菌体,MOI超过1.0会导致最快的裂解时间,大概是受每种细菌噬菌体裂解时间的限制。对于crT7m和crT7,每种噬菌体观察到的裂解时间约为15-20分钟,对于crT4大约为45-50分钟。

[0037] 图21A-图21G示出了三种Leu0增强的cr噬菌体crT4、crT7和crT7m的体内耐受性的剂量参数的示意性时间线表示。如图21B-图21G所示,在给药每种cr噬菌体制剂后,在兽医观察期间未观察到明显的毒性,并且未观察到体温或体重的可测量变化。图21B和图21E分别示出了给药后crT7的体温和体重。图21C和图21F分别示出了给药后crT7m的体温和体重。图21D和图21G分别示出了给药后crT4的体温和体重。

[0038] 图22A-图22D示出了具有Leu0增强的cr噬菌体的大肠杆菌的鼠体内腹膜炎模型的

治疗参数的示意性时间线表示和结果。给雌性CD-1小鼠腹膜内注射致死剂量的大肠杆菌($\sim 5 \times 10^7$ CFU/ATCC8739的小鼠),然后在30分钟内腹膜内注射盐水或cr噬菌体。单剂量施用的cr噬菌体(2.0×10^{11} PFU/剂量的crT7(图22B)、 3.7×10^9 PFU/剂量的crT7m(图22C)或 6.0×10^8 PFU/剂量的crT4(图22D))产生了显著的保护作用。

[0039] 图23A-图23E示出了用Leu0增强的cr噬菌体处理的大肠杆菌的鼠体内大腿感染模型的治疗参数的示意性时间线表示,以监测对细菌生物负荷减少的影响和结果。用 10^5 CFU的MG1655大肠杆菌肌肉内注射大腿而接种小鼠,30分钟后,以 4.0×10^{11} PFU/剂量的crT7、 2.0×10^{11} PFU/剂量的crT7M、 2.0×10^{10} PFU/剂量的crT4或含 1.0×10^{10} PFU/剂量的每种细菌噬菌体的相应剂量肌肉内注射指定的cr噬菌体或cr噬菌体混合剂。注射每种cr噬菌体后,在指定的时间点切除大腿整个肌肉,匀浆并立即稀释并平板接种(plated),以计数每克组织存活的细菌菌落。对于crT4(图23C),测定CFU降低约2个对数;对于crT7M(图23D),CFU降低约3个对数;对于crT7(图23B)和组合的cr噬菌体混合剂(图23E),CFU降低约>5个对数。

[0040] 图24图示了Leu0增强的细菌噬菌体的体内持久性和分布。通过将约 11.0×10^9 PFU/剂量/细菌噬菌体的crT7/crT7m混合剂直接尿道内滴注到膀胱中来处理雌性CD-1小鼠。在接种后0、0.5、1、6、12、24和72小时的时间点处死3只小鼠,并收集膀胱、肾脏、血液、肝脏和脾脏的全组织匀浆,将其稀释并进行噬菌体滴定分析以量化crT7和crT7m的总量。给药后最多72小时检测到活性cr噬菌体的存在。cr噬菌体水平随着时间的推移在膀胱中下降,经过72小时在肾脏、肝脏、血液和脾脏中均未检测到。在肾脏中观察到显著的噬菌体滴度,表明在某些情况下,尿道内施用途径会导致在下尿道和上尿道中暴露。此外,在血液、肝脏和脾脏组织中检测到噬菌体滴度,表明cr噬菌体似乎通过穿过尿道上皮而进入循环。

[0041] 图25A-图25C示例了使用定量PCR检测代替PFU测定的类似于图24所示的Leu0增强的cr噬菌体的小规模体内持久性和分布研究。通过口服管饲法各自施用单剂量总计 2.7×10^9 PFU的crT7、crT7m和crT4。处死经处理的小鼠,并提取来自整个组织匀浆的总DNA,并进行qPCR分析以量化存在的crT7(图25A)、crT4(图25B)或crT7m的量。

[0042] 图26A-图26B示例了用敲除cI的细菌噬菌体处理的溶原形成速率的降低和活CD19细胞的减少。图26A示例了与用WT CD24-2处理的CD19细胞相比,用 Δ cI CD24-2处理时活CD19细胞的减少。图26B示例了与用WT CD24-2处理的CD19细胞相比,用 Δ cI CD24-2处理的活CD19细胞中的溶原性细菌的百分比降低。

[0043] 图27A-图27B示例了通过静脉内递送(图27A)或局部递送(图27B)野生型噬菌体(wt噬菌体)、cr噬菌体和环丙沙星比较膀胱中的CFU降低。结果表明,与wt噬菌体相比,cr噬菌体改善了CFU降低。

[0044] 图28A-图28B示例了在膀胱(图28A)和肾脏(图28B)中cr噬菌体处理的剂量反应。cr噬菌体经尿道内递送。

[0045] 图29图示了示例性UTI功效研究的示意图,其中研究级材料通过静脉内(IV)、尿道内(IU)或同时IV和IU递送比较了WT与工程化的混合剂的比较。

[0046] 图30A-图30D示例了UTI功效研究,表明尿道内(IU)或静脉内(IV)施用后膀胱(图30A和图30B)和肾脏(图30C和图30D)中大肠杆菌的减少。在图30A和图30C中在感染后54小时进行测量。在图30B和图30D中在感染后102小时进行测量。结果表明,cr噬菌体混合剂在120h内的wt噬菌体混合剂的杀灭力比wt噬菌体混合剂高1.5至3.5个对数。该结果还示例

了,不管递送途径如何,在120h时cr噬菌体混合物在膀胱中的表现与环丙沙星相当。

[0047] 图31A-图31D示出了噬菌体对不同组织的途径依赖性渗透,例如在感染后78小时(图31A)在尿液中,在感染后102小时(图31B)进入肾脏,在感染后1102小时进入膀胱(图31C),并在感染后102小时进入脾脏(图31D)。

[0048] 图32示出了示例性UTI功效研究的示意图,其中研究级材料通过静脉内(IV)、尿道内(IU)或同时IV和IU递送将WT与工程混合剂进行了比较。

[0049] 图33A-图33D图示了静脉内给药cr噬菌体混合剂需要高剂量才能发挥功效,而IU递送即使在低剂量时也有效,而高剂量cr噬菌体优于环丙沙星。感染后54小时分析了图33A(膀胱)和图33C(肾脏)中的CFU。感染后102小时分析了图33B(膀胱)和图33D(肾脏)中的CFU。

[0050] 图34A是在复发和无症状的大肠杆菌定植尿道的成年人中进行的示例性人体研究的示意图。

[0051] 图34B是UTI 1b期研究的示例性研究参与者纳入和排除标准。

[0052] 图35A-图35F图示了工程化的噬菌体(p33s和p33s-6)显示出增加的对IE型和IF型大肠杆菌菌株的杀灭作用。

[0053] 图36A-图36F图示了工程化的噬菌体(CRISPR噬菌体crp0046),显示出增加的对IE型和IF型大肠杆菌菌株的杀灭作用。

[0054] 图37A-图37C图示了切换噬菌体混合剂克服了大肠杆菌中的靶细菌抗性。

[0055] 图38A-图38B图示了野生型噬菌体PB1和CRISPR增强的PB1(cr-PB1)针对铜绿假单胞菌菌株的比较。

[0056] 图39A-图39B图示了通过I型CRISPR-Cas系统在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中基于质粒的杀灭。

具体实施方式

定义

[0057] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。在本文的公开内容的描述中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本公开内容。

[0058] 除非上下文另有说明,否则特别地本文描述的本公开内容的各种特征旨在能够以任何组合使用。此外,本公开内容还考虑在一些实施方案中,排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。举例说明,如果说明书指出组合物包含组分A、B和C,则明确表示单独地或以任何组合省略或放弃A、B或C或其组合中的任何一项

[0059] 本领域技术人员将理解,由于文献中缺乏一致性以及本领域中为统一这种术语所做出的不断努力,指定各种CRISPR-Cas系统及其组分的术语具有互换性。同样地,本领域技术人员还将理解,由于文献中缺乏一致性以及本领域中为统一这种术语所做出的的不断努力,指定各种抗CRISPR蛋白的术语具有互换性。

[0060] 如说明书和所附权利要求书中所使用的,除非上下文另有明确说明,单数形式“一”、“一个(种)”和“该(所述)”也旨在包括复数形式。同样如本文中所使用的,“和/或”是指并且涵盖一个或多个相关联的所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替代方式

(“或”)解释时所缺乏的组合。

[0061] 当涉及可测量值如剂量或时间段时,本文所使用的术语“约”是指指定量的±20%、±10%、±5%、±1%、+0.5%,甚至是±0.1%的变化。如本文所用,短语如“在X与Y之间”和“在约X与Y之间”应解释为包括X和Y。如本文所使用,短语如“在约X与Y之间”意指“在约X与约Y之间”,短语如“从约X至Y”意指“从约X至约Y”。

[0062] 本文所用的术语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包含(includes)”、“包含(including)”和“具有(have)”指定存在所述特征、步骤、操作、元件和/或组分、但不排除一个或多个其他特征、步骤、操作、元件、组分和/或其组合的存在或加入。

[0063] 如本文所用,过渡性短语“基本上由……组成”是指权利要求的范围应解释为涵盖权利要求中所述的指定材料或步骤以及不实质性地影响权利要求的基本特征和新颖特征的材料或步骤要求保护的公开内容。因此,当在本公开内容的权利要求书中使用时,术语“基本上由……组成”不旨在解释为等同于“包括(comprising)”。

[0064] 如本文中所使用的,术语“由……组成(consists of)”和“由……组成(consisting of)”排除了没有以其他方式直接陈述的任何特征、步骤、操作、元件和/或组分。“由……组成”的使用仅限制该条款中阐述的特征、步骤、操作、元件和/或组件,并且的确从权利要求整体上排除了其他特征、步骤、操作、元件和/或组分。

[0065] 如本文所用,“嵌合体”是指其中至少两种组分衍生自不同来源(例如,不同生物、不同编码区)的核酸分子或多肽。

[0066] 如本文所用,“补体”是指与比较物核苷酸序列具有100%互补性或同一性,或者是指小于100%的互补性(例如约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%等的互补性)。补体或可互补还可以用于突变的“补体”或与突变“互补”。

[0067] 如本文所用,术语“互补的”或“互补性”是指多核苷酸在允许的盐和温度条件下通过碱基配对的天然结合。例如,序列“A-G-T”与互补序列“T-C-A”结合。两个单链分子之间的互补性是“部分的”,其中仅某些核苷酸结合,或者当单链分子之间存在完全互补性时是完全的。核酸链之间的互补程度对核酸链之间杂交的效率和强度具有重要影响。

[0068] 如本文所用,术语“基因”是指能够用于产生mRNA、tRNA、rRNA、miRNA、抗微小RNA、调控RNA等的核酸分子。基因可能或可能不能用于产生功能性蛋白质或基因产物。基因包括编码区和非编码区(例如,内含子、调节元件、启动子、增强子、终止序列和/或5'和3'非翻译区)。“分离”的基因是指基本上或主要不含通常与天然状态的核酸结合的组分的核酸。此类成分包括其他细胞材料、重组生产的培养基和/或用于化学合成核酸的各种化学物质。

[0069] 如本文所用,“靶核苷酸序列”是指与重组CRISPR阵列的间隔序列互补的部分靶基因。

[0070] 如本文所用,“靶DNA”、“靶核苷酸序列”、“靶区域”或“基因组中的靶区域”是指与CRISPR序列中的间隔序列完全互补或基本上互补(例如,至少70%互补(例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多))的生物体基因组的区域。在一些实施方案中,靶区域的长度为约10至约40个连续核苷酸的位置

紧邻该生物体的基因组中的PAM序列(紧邻靶区域的3'的PAM序列)。在一些实施方案中,靶核苷酸序列位于PAM(原间隔物相邻基序)附近或侧翼。虽然PAM通常特异于特定CRISPR-Cas系统,但通过合适的方法确定PAM序列。因此,例如实验方法包括靶向侧翼于所有可能的核苷酸序列的序列,并鉴定未经历靶向的序列成员,例如通过体外切割靶DNA或靶质粒DNA的转化。在一些实施方案中,计算方法包括对天然间隔子进行BLAST搜索,以鉴定细菌噬菌体或质粒中的原始靶DNA序列,并比对这些序列以确定与靶序列相邻的保守序列。

[0071] 如本文所用,术语“前间隔序列邻近基序”或“PAM”是指存在于靶DNA分子上与匹配引导RNA间隔子的序列相邻的DNA序列。由于与该区域互补,因此,在靶基因中邻近结合间隔序列的区域发现该基序,并识别与间隔核苷酸序列碱基配对开始的点。对于I型系统,PAM位于与间隔子匹配的序列的5'端,因此为与间隔核苷酸序列碱基配对的序列的3'端。PAM的非限制性实例包括CCA、CCT、CCG、CCT、CCA、TTC、AAG、AGG、ATG、GAG和/或CC。对于I型系统,Cascade直接识别PAM。所需的确切的PAM序列在每个不同的CRISPR-Cas系统之间有所不同,并通过已建立的生物信息学和实验程序进行鉴定。一旦识别出前间隔序列,Cascade通常会募集内切核酸酶Cas3,该酶裂解并降解靶DNA。

[0072] 对于II型系统,Cas9/sgRNA需要PAM形成R环以通过其指导RNA与基因组的Watson-Crick配对来询问特定的DNA序列。PAM特异性是Cas9蛋白的DNA结合特异性的函数(例如在Cas9的C末端的前间隔序列相邻基序识别结构域)。

[0073] 如本文所用,I型成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)相关的抗病毒防御复合物(Cascade)是指参与前crRNA的加工以及随后与I型CRISPR-Cas系统中的靶DNA的结合的多肽的复合物。这些多肽包括但不限于I型亚型I-A、I-B、I-C、I-D、I-E和I-F的Cascade多肽。I-A型多肽的非限制性实例包括Cas7(Csa2)、Cas8a1(Csx13)、Cas8a2(Csx9)、Cas5、Csa5、Cas6a、Cas3'和/或Cas3'。I-B型多肽的非限制性实例包括Cas6b、Cas8b(Csh1)、Cas7(Csh2)和/或Cas5。IC型多肽的非限制性实例包括Cas5d、Cas8c(Csd1)和/或Cas7(Csd2)。ID型多肽的非限制性实例包括Cas10d(Csc3)、Csc2、Csc1和/或Cas6d。I-E型多肽的非限制性实例包括Cse1(CasA)、Cse2(CasB)、Cas7(CasC)、Cas5(CasD)和/或Cas6e(CasE)。I-F型多肽的非限制性实例包括Cys1、Cys2、Cas7(Cys3)和/或Cas6f(Csy4)。在一些实施方案中,本文所述的重组核酸包括、基本上由以下组成或由以下组成:编码I型Cascade多肽的子集的核苷酸序列,所述I型Cascade多肽的功能是加工CRISPR阵列,并随后使用作为指导的加工后的CRISPR RNA的间隔子与靶DNA结合。

[0074] 如本文所用,“CRISPR阵列”是指包含至少两个重复序列或每个所述重复序列的一部分以及至少一个间隔序列的核酸分子。两个重复序列之一或其一部分连接至间隔序列的5'端,两个重复序列中的另一个或其一部分连接至间隔序列的3'端。在重组CRISPR阵列中,重复序列和间隔序列的组合是人工合成的,由人工制得,在自然界中找不到。在一些实施方案中,“CRISPR阵列”是指包含5'至3'的至少一个重复间隔序列(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多重复间隔序列及其中的任何范围或数值)的核酸构建体,其中阵列的3'最重复间隔序列的3'端与重复序列连接,因此所述阵列中的所有间隔子在5'端和3'端均侧接重复序列。

[0075] 如本文所用,“间隔序列”或“间隔子”是指与靶DNA互补的核苷酸序列(即,基因组中的靶区域或“前间隔序列”,其与前间隔序列邻近基序(PAM)序列相邻)。间隔序列与靶DNA

完全互补或基本上互补(例如,至少约70%的互补(例如约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高))。

[0076] 如本文所用,“重复序列”是指例如由“间隔序列”分隔的野生型CRISPR基因座的任何重复序列或合成CRISPR阵列的重复序列(例如,重复间隔子-重复序列)。可用于本公开内容的重复序列是任何已知的或以后鉴定的CRISPR基因座重复序列,或者它是设计用于在CRISPR系统例如CRISPR I型系统中起作用的合成重复序列。

[0077] 如本文所用,术语“CRISPR细菌噬菌体”、“CRISPR增强的细菌噬菌体”和“cr噬菌体”是指包含含有至少一个异源多核苷酸的细菌噬菌体DNA的细菌噬菌体颗粒。在一些实施方案中,多核苷酸编码CRISPR-Cas系统的至少一种组分(例如,CRISPR阵列,crRNA;例如,包含靶向crRNA的插入的PI细菌噬菌体)。在一些实施方案中,多核苷酸编码CRISPR-Cas系统的至少一种转录激活因子。在一些实施方案中,多核苷酸编码CRISPR-Cas系统的抗CRISPR多肽的至少一种组分。

[0078] 如本文所用,在两个核酸分子、核苷酸序列或蛋白质序列的上下文中,短语“基本上相同”或“实质同一性”是指当使用以下序列比较算法之一或通过视觉检查进行测定比较和比对最大匹配(correspondence)时具有至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%核苷酸或氨基酸的两个或更多个序列或子序列。在一些实施方案中,实质同一性是指具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性的两个或更多个序列或子序列。为了进行序列比较,通常将一个序列用作与测试序列进行比较的参考序列。使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,根据指定的程序参数,序列比较算法计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0079] 通过诸如Smith和Waterman的局部同源性算法、Needleman和Wunsch的同源性比对算法、Pearson和Lipman的相似性搜索方法以及任选地通过计算机化的这些算法的实现如获自 **GCG® Wisconsin Package®** (Accelrys Inc., San Diego, CA) 的一部分的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,可以对用于比较窗口的序列进行最佳比对。测试序列和参考序列的比对区段的“同一性分数”是两个比对序列所共有的相同组分的数量除以参考序列区段中的组分总数,即整个参考序列或参考序列的较小确定部分。序列同一性百分比表示为同一性分数乘以100。一个或多个多核苷酸序列与全长多核苷酸序列或其一部分或与更长的多核苷酸序列进行比较。在某些情况下,对于翻译的核苷酸序列使用BLASTX 2.0版、对于多核苷酸序列使用BLASTN 2.0版来确定“同一性百分比”。

[0080] 在一些实施方案中,本文公开的重组核酸分子、核苷酸序列和多肽是“分离的”。“分离的”核酸分子、“分离的”核苷酸序列或“分离的”多肽是除其天然环境之外存在的核酸分子、核苷酸序列或多肽。在一些情况下,分离的核酸分子、核苷酸序列或多肽以纯的形式存在,该纯化形式与天然存在的生物或病毒的至少一些其他组分(例如细胞或病毒结构组分或通常发现与多核苷酸相关的其他多肽或核酸)至少部分分离。在代表性的实施方案中,

分离的核酸分子、分离的核苷酸序列和/或分离的多肽的纯度为至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高。

[0081] 如本文所用,术语“抗CRISPR”或“Acr”是指具有功能性抗CRISPR活性的任何蛋白质或基因产物。由于文献中缺乏一致性,因此本领域技术人员将理解,指定各种抗CRISPR蛋白的术语具有互换性。例如,如本文所用,Acr1-Bo的名称可与AcrIIC1Boe互换,Acr2-Nm的名称可以与AcrIIC2Nme互换。另外,如本文所用,Acr88a-32的名称可与AcrE2互换。抗CRISPR蛋白是具有阻止细菌CRISPR-Cas系统发挥作用的活性的任何细菌噬菌体蛋白。抗CRISPR蛋白的活性可防止宿主细菌基于CRISPR-Cas系统防御入侵的细菌噬菌体。

[0082] 通过术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”旨在减轻或至少部分改善或改变受试者的病况的严重性,并且实现至少一种临床症状的一些缓解、缓和或减轻,和/或疾病或病况的进展延迟,和/或疾病的发作延迟。关于感染、疾病或病况,该术语是指感染、疾病或病况的症状或其他表现的减轻。在一些实施方案中,治疗使感染、疾病或病况的症状或其他表现减少至少约5%,例如约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更高。

[0083] 本文所用的关于“感染”、“疾病”或“病况”的术语是指受试者的任何不利、负面或有害的生理病况。在一些实施方案中,“感染”、“疾病”或“病况”的来源是在受试者和/或受试者中靶细菌种群的存在。在一些实施方案中,细菌群体包含一种或多种靶细菌种类。在一些实施方案中,细菌群体中的一种或多种细菌包括一种或多种细菌的一种或多种菌株。在一些实施方案中,引起“感染”、“疾病”或“病况”的靶细菌群体是急性或慢性的。在一些实施方案中,引起“感染”、“疾病”或“病况”的靶细菌群体是局部的或全身的。在一些实施方案中,引起“感染”、“疾病”或“病况”的靶细菌群体是特发性的。在一些实施方案中,通过“手段”获得引起“感染”、“疾病”或“病况”的靶细菌群体,所述手段包括但不限于呼吸吸入、食入、皮肤和伤口感染、血流感染、中耳感染、胃肠道感染、腹膜感染、泌尿道感染、泌尿生殖道感染、口腔软组织感染、腹腔内感染、表皮或粘膜吸收、眼部感染(包括隐形眼镜污染)、心内膜炎、囊性纤维化感染、留置医疗设备的感染(如关节假体、牙科植入物、导管和心脏植入物)、性接触和/或医院获得的呼吸机相关细菌性肺炎。

[0084] 如本文所用,术语“生物膜”是指嵌入多糖基质中的微生物的堆积物。生物膜形成在固体生物或非生物表面上,具有重要的医学意义,占人体微生物感染的80%以上。

[0085] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”(及其语法变体)是指预防和/或延迟受试者感染、疾病、病况和/或临床症状的发作和/或相对于在疾病、病况和疾病发作之前不进行本文公开的方法而将发生的情况而言,感染、疾病、病况和/或临床症状发作的严重程度的降低。因此,在一些实施方案中,为了防止感染,用本文公开的组合物和方法处理食物、表面、医疗工具和装置。

[0086] 本文公开的“受试者”包括患有或易受所涉及细菌的感染、疾病或病况的任何动物。因此,在一些实施方案中,受试者是哺乳动物、禽类、爬行动物、两栖动物或鱼类。哺乳动物受试者包括但不限于人类、非人类灵长类动物(例如大猩猩、猴子、狒狒和黑猩猩等)、犬、猫、山羊、马、猪、牛、绵羊等,以及实验室动物(例如大鼠、豚鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠等)。禽类受试者包括但不限于鸡、鸭、火鸡、鹅、鹌鹑、野鸡和作为宠物饲养的禽类(例如长尾小鹦鹉、鸚鵡、鸚鵡、金刚鸚鵡、美冠鸚鵡、金丝雀等)。在一些实施方案中,合适的受试者包括男性和女

性以及任何年龄的受试者,包括胚胎(例如,子宫内或卵内)、婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。在一些实施方案中,受试者是人类。

[0087] “药学上可接受的”是指非生物学上或其他方面并非不期望的材料,即将该材料施用于受试者而不会引起任何不期望的生物学效应,例如毒性。

[0088] 在各种实施方案中提供了细菌噬菌体,其特征在于和/或包含本文所述的任何核酸。在一些实施方案中,本文提供了温和细菌噬菌体(例如,具有裂解活性的细菌噬菌体,如本文所述)。在特定的实施方案中,温和细菌噬菌体包括去除、置换或失活的至少一种溶原性基因。在某些实施方案中,本文提供具有裂解活性并包含(a)编码间隔序列和/或(b)由其转录的crRNA的核酸的细菌噬菌体。在某些具体实施方案中,本文某些实施方案提供细菌噬菌体,其包含(i)编码间隔序列和/或由其转录的crRNA的第一核酸,和(ii)能够诱导细菌(例如靶细菌)裂解的基因。在更具体的实施方案中,间隔序列与细菌(例如靶细菌)中或细菌的靶基因的核酸序列互补。本文的一些实施方案提供了细菌噬菌体,其包含编码用于细菌(例如靶细菌)中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸。在某些实施方案中,本文提供了具有裂解活性和编码抗CRISPR多肽(和/或包含抗CRISPR多肽)的第一核酸序列的细菌噬菌体。在各种实施方案中,本文提供的细菌噬菌体具有上述参考特征和/或活性中的任何一个或多个。此外,在本文的各种实施方案中,此类细菌噬菌体包含本文概述或详细描述中所述的任何一个或多个特征或活性。

[0089] 在一些实施方案中,利用了如本文所述的这种细菌噬菌体以及各种组合物(例如,药物组合物)和方法。在某些实施方案中,此类细菌噬菌体可用于多种应用和方法(例如,调节个体或受试者的微生物组,例如需要其的微生物组),例如本文所述的那些。在一些实施方案中,此类细菌噬菌体用于杀灭细菌(例如靶细菌)的方法或涉及杀灭细菌(例如靶细菌)的方法。在特定的实施方案中,靶细菌在例如如本文所述的个体、环境或其他合适的位置中的细菌的混合群体中。

[0090] 在某些实施方案中,本文提供的细菌噬菌体选择性地杀灭一种或多种靶细菌,例如使得一种或多种非靶细菌的细菌以比靶细菌更低的速率被杀灭,例如相对于一种或多种靶细菌以小于50%的速率、小于25%的速率,小于10%的速率,或约0%的速率(即完全不)杀灭。在一些情况下,例如在本文提供的某些方法中,小于50%、小于25%、少于20%、小于10%、小于5%等的非靶细菌被杀灭。

CRISPR阵列

[0091] 本文公开了CRISPR阵列。在一些实施方案中,编码CRISPR阵列的核酸包含至少一个重复序列和至少一个间隔序列,所述间隔序列与来自靶细菌的靶基因的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,CRISPR阵列具有任何长度,并且包含任何数量的间隔核苷酸序列,所述间隔核苷酸序列与通过使用一个或多个靶基因来实现期望水平的杀灭靶细菌所需的重复核苷酸序列交替。在一些实施方案中,CRISPR阵列包含、基本上由或由1至约100个间隔核苷酸序列组成,每个间隔核苷酸序列在其5'端和其3'端连接至重复核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的重组CRISPR阵列基本上由以下组成或由以下组成:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、

83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个间隔核苷酸序列。

间隔子

[0092] 在一些实施方案中,与靶DNA相比,本文所述的间隔序列包含1、2、3、4或5个错配序列。在一些实施方案中,错配序列是连续的。在一些实施方案中,错配序列是不连续的。在一些实施方案中,间隔序列与靶DNA具有70%的互补性。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列与靶DNA具有80%的互补性。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列与靶基因的靶核苷酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的互补性。在一些实施方案中,间隔序列与靶DNA具有100%的互补性。在一些实施方案中,间隔序列在长度为至少约8个核苷酸至约150个核苷酸的靶核苷酸序列的区域上具有完全互补性或基本互补性。在一些实施方案中,间隔序列在长度为至少约20个核苷酸至约100个核苷酸的靶核苷酸序列的区域上具有完全互补性或基本互补性。在一些实施方案中,间隔序列的5'区与靶DNA 100%互补,而间隔子的3'区与靶DNA基本互补,因此间隔序列与靶DNA的总体互补性小于100%。例如,在一些实施方案中,在20个核苷酸间隔序列(种子区域)的3'区中的前7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个核苷酸与靶DNA 100%互补,而间隔序列的5'区中的其余核苷酸与靶DNA基本互补(例如,至少约70%互补)。在一些实施方案中,间隔序列的3'端的前7至12个核苷酸与靶DNA 100%互补,而间隔序列的5'区中的其余核苷酸与靶DNA基本互补(例如,至少约50%互补(例如50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高))。在一些实施方案中,间隔序列的3'端的前7至10个核苷酸与靶DNA 75%-99%互补,而间隔序列的5'端的其余核苷酸与靶DNA至少约50%至约99%互补。在一些实施方案中,间隔序列的3'端的前7至10个核苷酸与靶DNA 100%互补,而间隔序列的5'区中的其余核苷酸与靶DNA基本上互补(例如,至少约70%互补)。在一些实施方案中,间隔序列的前10个核苷酸(在种子区域内)与靶DNA 100%互补,而间隔序列的5'区中的其余核苷酸与靶DNA基本上互补(例如,至少约70%互补)。在一些实施方案中,间隔序列的5'区(例如,在5'端的前8个核苷酸、在5'端的前10个核苷酸、在5'端的前15个核苷酸、在2'末端的前20个核苷酸)与靶DNA具有约75%或更多的互补性(75%至约100%的互补性),而间隔序列的其余部分与靶DNA具有约50%或更多的互补性。在一些实施方案中,间隔序列的5'端的前8个核苷酸与靶核苷酸序列具有100%互补性或具有一个或两个突变,因此分别与靶DNA约88%或约75%互补,而间隔核苷酸序列的其余部分与靶DNA至少约50%或更多互补。

[0093] 在一些实施方案中,本文所述的间隔序列的长度为约15个核苷酸至约150个核苷酸。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列的长度为约15个核苷酸至约100个核苷酸(例如约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100个核苷酸或更多)。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列的长度为约8至约150个核苷酸、约8至约100个核苷酸、约8至约50个核苷酸、约8至约40个核苷酸、约8至约30个核苷酸、约8至约25个核苷酸、约8至约20个核苷酸、约10至约150个核苷酸、约10至约100个核苷酸、约10至约80个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约10至约40

个、约10至约30个、约10至约25、约10至约20、约15至约150、约15至约100、约15至约50、约15至约40、约15至约30、约20至约150个核苷酸、约20至约100个核苷酸、约20至约80个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约20至约40个、约20至约30个、约20至约25个、至少约8个、至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个、至少约30个、至少约32个、至少约35个、至少约40个、至少约44个、至少约50个、至少约60个、至少约70个、至少约80个、至少约90个、至少约100个、至少约110个、至少约120个、至少约130个、至少约140个、至少约150个核苷酸或更多,以及其中的任何数值或范围。

[0094] 在一些实施方案中,本文公开的CRISPR阵列的两个或更多个间隔核苷酸序列的同一性是相同的。在一些实施方案中,本文公开的CRISPR阵列的两个或更多个间隔核苷酸序列的同一性是不同的。在一些实施方案中,CRISPR阵列的两个或多个间隔核苷酸序列的同一性不同,但是与一个或多个靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,CRISPR阵列的两个或多个间隔核苷酸序列的同一性不同,并且与作为重叠序列的一种或多种靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,CRISPR阵列的两个或更多个间隔核苷酸序列的同一性是不同的,并且与不是重叠序列的一个或更多个靶核苷酸序列互补。

密码子优化

[0095] 在一些实施方案中,本文描述的多核苷酸、核苷酸序列和/或重组核酸分子(例如包含CRISPR阵列的多核苷酸、Cascade多肽、Cas9多肽、Cas3多肽、Cas3'多肽、Cas3"多肽、本公开内容的重组I型或II型、III型、IV型、V型、VI型CRISPR-Cas系统、编码多核苷酸的转录激活因子等)被密码子优化以在任何感兴趣的物种中表达。密码子优化涉及使用物种特有的密码子使用表修改核苷酸序列以用于密码子使用偏向。基于对感兴趣物种的最高表达基因的序列分析而生成密码子使用表。当核苷酸序列要在细胞核中表达时,基于对感兴趣的物种的高度表达的核基因进行序列分析而生成密码子使用表。通过将物种特异性密码子使用表与天然多核苷酸序列中存在的密码子进行比较来确定核苷酸序列的修饰。核苷酸序列的密码子优化导致核苷酸序列与天然核苷酸序列具有小于100%的同一性(例如50%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%等),但其仍编码功能与原始核苷酸序列编码的功能相同的多肽。在一些实施方案中,密码子优化本公开内容的核苷酸序列和/或重组核酸分子以在感兴趣的生物/物种中进行表达。

重复核苷酸序列

[0096] 在一些实施方案中,CRISPR阵列的重复核苷酸序列包含CRISPR-Cas系统的任何已知的重复核苷酸序列的核苷酸序列。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是I型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,重复核苷酸序列是合成序列,其包含来自I型CRISPR-Cas系统(例如,内部发夹)的天然重复序列的二级结构。

[0097] 在一些实施方案中,本文所述的CRISPR阵列的间隔核苷酸序列在其5'端连接至重复序列的3'端。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列在其5'端连接至重复核苷酸序列的3'端的约1至约8个、约1至约10个或约1至约15个核苷酸。在一些实施方案中,重复核苷酸序列的约1至约8个、约1至约10个、约1至约15个核苷酸是重复核苷酸序列的3'端的一部分。在一些实施方案中,间隔核苷酸序列在其3'端连接至重复核苷酸序列的5'端。在一些实施方案

中,间隔子在其3'端连接至重复核苷酸序列的5'端的约1至约8个、约1至约10个或约1至约15个核苷酸。在一些实施方案中,重复核苷酸序列的约1至约8个、约1至约10个、约1至约15个核苷酸是重复核苷酸序列的5'端的一部分。

[0098] 在一些实施方案中,本文所述的间隔核苷酸序列在其5'端连接至第一重复核苷酸序列,并在其3'端连接至第二重复核苷酸序列,以形成重复-间隔子-重复序列。在一些实施方案中,本文所述的间隔子在其5'端连接至第一重复序列的3'端的约1至约8个、约1至约10个或约1至约15个核苷酸,并在其3'端连接至第二重复序列的5'端的约1至约8个、约1至约10个或约1至约15个核苷酸。在一些实施方案中,第一重复序列的约1至约8个、约1至约10个、约1至约15个核苷酸是第一重复核苷酸序列的3'端的一部分。在一些实施方案中,第一第二序列的约1至约8个、约1至约10个、约1至约15个核苷酸是第二重复核苷酸序列的3'端的一部分。在一些实施方案中,本文公开的间隔核苷酸序列在其5'端连接至第一重复核苷酸序列的3'端,并且在其3'端连接至第二重复核苷酸序列的5',其中在该处重复间隔核苷酸序列和第二重复核苷酸序列以形成重复-(间隔子-重复) n 序列,使得 n 为1至100的任何整数。因此,在一些实施方案中,本文公开的重复-(间隔子-重复) n 序列包含、基本上由或由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个间隔核苷酸序列组成。

[0099] 因此,在一些实施方案中,重复序列与来自野生型CRISPR I型、II型或III型基因座的重复序列相同或基本相同。在一些实施方案中,重复序列包含野生型重复序列的一部分(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个野生型重复序列的连续核苷酸)。在一些实施方案中,重复序列包含、基本上由或由至少一个核苷酸组成(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个核苷酸,或其中的任何范围)。

调节元件

[0100] 在一些实施方案中,本文公开的重组CRISPR阵列、核苷酸序列和/或核酸分子与用于在各种生物或细胞中表达的多种启动子、终止子和其他调节元件可操作地关联。在一些实施方案中,至少一个启动子和/或终止子与本文公开的重组核酸分子和/或重组CRISPR阵列可操作地连接。使用可用于本公开内容的任何启动子,其包括例如与感兴趣的生物一起起作用的启动子,以及如本文所述的组成型、诱导型、发育调控的、组织特异性的/优选的启动子等。本文所用的调节元件是内源的或异源的。在一些实施方案中,将源自受试者生物的内源调节元件插入天然不存在其的遗传环境中(例如,基因组中不同于自然界中发现的位置),从而产生重组或非天然核酸。

[0101] 在一些实施方案中,本文公开的构建体的表达是组成型的、诱导型的、时间调控的、发育调控的或化学调控的。在一些实施方案中,通过将构建体可操作地连接至感兴趣的生物中起作用的启动子,使构建体成为组成型的、诱导型的、时间调控的、发育调控的或化学调控的。在一些实施方案中,通过将本文公开的重组核酸构建体可操作地连接至感兴趣

的生物中起作用的诱导型启动子,使得抑制可逆。本文描述的启动子的选择将取决于表达的定量、时间和空间要求,并且还取决于待转化的宿主细胞。

[0102] 用于本文公开的方法、细菌噬菌体和组合物的示例性启动子包括在细菌中起作用的启动子。例如,L-阿拉伯糖诱导型(araBAD、R_{BAD})启动子、任何lac启动子、L-鼠李糖诱导型(rhaPBAD)启动子、T7 RNA聚合酶启动子、trc启动子、tac启动子、 λ 噬菌体启动子(p_{LP_L}-9G-50)、脱水四环素-诱导型(tetA)启动子、trp、Ipp、phoA、recA、proU、cst-1、cadA、nar、Ipp-lac、cspA、11-lac操纵子、T3-lac操纵子、T4基因32、T5-lac操纵子、nprM-lac操纵子、Vhb、蛋白A、棒状杆菌-大肠杆菌样启动子、thr、horn、白喉毒素启动子、sigA、sigB、nusG、SoxS、katb、 α -淀粉酶(Pamy)、Ptms、P43(由两个重叠的RNA聚合酶 σ 因子识别位点 σ A、 σ B组成)、Ptms、P43、rplK-rplA、铁氧还蛋白启动子和/或木糖启动子。

[0103] 在一些实施方案中,使用诱导型启动子。在一些实施方案中,化学调控的启动子通过施加外源化学调控子用来调节生物体中基因的表达。化学调控的启动子的使用使得仅当例如用诱导化学试剂处理生物时才能合成本文公开的RNA和/或多肽。在使用化学诱导型启动子的一些实施方案中,化学物质的施用诱导基因表达。在其中使用化学可抑制启动子的一些实施方案中,化学物质的施用抑制基因表达。在一些实施方案中,启动子是光诱导型启动子,其中特定波长的光的施加诱导基因表达。在一些实施方案中,启动子是光可抑制的启动子,其中特定波长的光的施加抑制基因表达。

转化

[0104] 在一些实施方案中,本文公开的核苷酸序列、构建体和表达盒被瞬时表达和/或稳定地结合到宿主生物的基因组中。在一些实施方案中,通过本领域技术人员已知的任何方法将本文公开的多核苷酸引入细胞。示例性的转化方法包括通过感受态细胞的电穿孔进行的转化、通过感受态细胞的被动摄取、感受态细胞的化学转化以及导致核酸引入细胞的任何其他电学、化学、物理(机械)和/或生物学机制,包括它们的任何组合。在一些实施方案中,细胞的转化包括核转化。在一些实施方案中,细胞的转化包括质粒转化和缀合。

[0105] 在一些实施方案中,当引入一个以上的核苷酸序列时,该核苷酸序列被组装为单个核酸构建体的一部分,或被组装为单独的核酸构建体,并且位于相同或不同的核酸构建体上。在一些实施方案中,将核苷酸序列以单个转化事件或以单独的转化事件引入到感兴趣的细胞中。

表达盒

[0106] 在一些实施方案中,核酸构建体是“表达盒”或在表达盒中。如本文所用,“表达盒”是指包含感兴趣的核苷酸序列的重组核酸分子(例如,本文公开的重组核酸分子和CRISPR阵列),其中该核苷酸序列与至少一个控制序列(例如启动子)可操作地相关联。在一些实施方案中,表达盒被设计成表达本文公开的重组核酸分子和/或重组CRISPR阵列。

[0107] 在一些实施方案中,包含感兴趣的核苷酸序列的表达盒是嵌合的,意味着其至少一种组分相对于其至少一种其他组分是异源的。在一些实施方案中,表达盒是天然存在的,但是已经以可用于异源表达的重组形式获得。

[0108] 在一些实施方案中,表达盒包括在所选宿主细胞中起作用的转录和/或翻译终止区(即终止区)。在一些实施方案中,终止区负责终止感兴趣的异源核苷酸序列以外的转录,并负责正确的mRNA多聚腺苷酸化。在一些实施方案中,终止区对于转录起始区是天然的,对

于感兴趣的可操作连接的核苷酸序列是天然的,对于宿主细胞是天然的,或者衍生自另一种来源(即对启动子、感兴趣的核苷酸序列、宿主或其任何组合是外来的或异源的)。在一些实施方案中,终止子可操作地连接至本文公开的重组核酸分子和CRISPR阵列。

[0109] 在一些实施方案中,表达盒包括用于可选择的标记物的核苷酸序列。如本文所用,“可选择的标记物”是指这样的核苷酸序列,其在表达时赋予表达该标记物的宿主细胞不同的表型,从而使这种转化的细胞与不具有该标记物的细胞区分开。在一些实施方案中,核苷酸序列编码可选择标记物或可筛选标记物,这取决于标记物是否赋予通过化学手段(例如通过使用选择剂(例如抗生素))选择的性状,或者取决于标记物是否仅是通过观察或测试(例如通过筛选(例如荧光))识别的性状。

载体

[0110] 除表达盒外,本文所述的核酸分子和核苷酸序列(例如包含CRISPR阵列的多核苷酸、编码转录激活因子的多核苷酸或抗CRISPR多肽)与载体结合使用。术语“载体”是指用于将核酸转移、递送或引入细胞中的组合物。载体包含核酸分子,该核酸分子包含待转移、递送或引入的核苷酸序列。一般类别的载体的非限制性实例包括但不限于病毒载体、质粒载体、噬菌体载体、噬菌粒载体、粘粒载体、fosmid载体,细菌噬菌体、人工染色体或农杆菌二元双链或单链线性或圆形形式的载体,所述载体可以或不可以自我传递或移动。本文定义的载体通过整合入细胞基因组或在染色体外存在(例如具有复制起点的自主复制质粒)来转化原核或真核宿主。还包括穿梭载体,其是指能够自然或通过设计在两种不同宿主生物中复制的DNA载体。在一些实施方案中,穿梭载体在放线菌和细菌和/或真核生物中复制。在一些实施方案中,载体中的核酸受适当的启动子或其他调节元件的控制并与其可操作地连接,以在宿主细胞中转录。在一些实施方案中,载体是在多个宿主中起作用的双功能表达载体。

CRISPR/CAS系统

[0111] CRISPR-Cas系统是在细菌和古菌中发现的天然适应性免疫系统。CRISPR系统是一种参与防御入侵的噬菌体和质粒,从而提供某种形式的获得性免疫的核酸酶系统。基于cas基因集及其系统发生关系的CRISPR-Cas系统存在多样性。至少有六种不同的类型(I到VI),其中I型代表50%以上的细菌和古菌中的所有已识别系统。在一些实施方案中,本文使用I型、II型、III型、IV型、V型或VI型CRISPR-Cas系统。

[0112] 在一些实施方案中,本文公开的CRISPR-阵列的加工包括但不限于以下方法:1)将编码CRISPR阵列的核酸转录成pre-crRNA和任选的tracrRNA;2)通过Cas6或Cas9/Rnase III将前crRNA加工为成熟crRNA;3)使crRNA成熟复合体生成Cas9或Cascade;4)通过复杂的成熟靶标识别crRNA/Cas9或crRNA/Cascade复合物;5)在靶标上的核酸酶活性导致双链或单链DNA断裂。

[0113] 关于I型系统,I型系统分为七个子类型,包括:I-A型、I-B型、I-C型、I-D型、I-E型、I-F型和I-U型。I型CRISPR-Cas系统包括称为Cascade的多亚基复合物(用于与抗病毒防御相关的复合物)、Cas3(一种具有核酸酶、解旋酶和核酸外切酶活性的蛋白质,负责靶DNA的降解)和crRNA(稳定Cascade复合体并将Cascade和Cas3导向DNA靶标)。Cascade与crRNA形成复合物,而蛋白质-RNA对通过crRNA序列5'端与预定义的前间隔序列之间的互补碱基配对识别其基因组靶标。该复合物通过crRNA内编码的区域和病原体基因组内与前间隔序列

邻近基序 (PAM) 导向病原体DNA的同源基因座。碱基配对发生在crRNA和靶DNA序列之间,导致构象改变。在I-E型系统中,PAM被Cascade中的CasA蛋白识别,然后展开侧翼DNA以评估靶标与crRNA间隔子之间的碱基配对程度。足够的识别导致Cascade募集并激活Cas3。然后,Cas3切开非靶标链,并开始沿3'至5'的方向降解该链。

[0114] 在一些实施方案中,本文公开的CRISPR阵列包含编码加工的成熟crRNA的核酸。在一些实施方案中,将成熟的crRNA引入本文所述的噬菌体或靶细菌中。在一些实施方案中,噬菌体包含编码加工的成熟crRNA的核酸。在一些实施方案中,内源或外源Cas6将CRISPR阵列加工成成熟crRNA。在一些实施方案中,将外源Cas6引入噬菌体。在一些实施方案中,噬菌体包含外源Cas6。在一些实施方案中,将外源Cas6引入靶细菌中。

[0115] 在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是内源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统对于靶细菌是外源的。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是II型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统是III型CRISPR-Cas系统。

[0116] 在一些实施方案中,本文使用I型CRISPR-Cas系统。如上所述,I型Cascade多肽加工CRISPR阵列以产生加工的RNA,然后将其用于将复合物结合至DNA,该DNA与加工的RNA中的间隔子互补。在一些实施方案中,被引入细菌噬菌体的第一核酸编码参与本文公开的第一核酸的加工的Cascade多肽。

[0117] 在一些实施方案中,本文公开的I型Cascade多肽具有与野生型I型Cascade多肽具有实质同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的Cascade多肽是任何全长的II型Cascade多肽的功能片段。在一些实施方案中,I型Cascade复合物是I-A型Cascade多肽、I-B型Cascade多肽、I-C型Cascade多肽、I-D型Cascade多肽、I-E型Cascade多肽、I-F型Cascade多肽或I-U型Cascade多肽。

[0118] 在一些实施方案中,I型Cascade复合物包含:(a) 编码Cas6b多肽的核苷酸序列、编码Cas8b (Csh1) 多肽的核苷酸序列、编码Cas7 (Csh2) 多肽的核苷酸序列和编码Cas5多肽的核苷酸序列 (I-B型); (b) 编码Cas5d多肽的核苷酸序列、编码Cas8c (Csd1) 多肽的核苷酸序列和编码Cas7 (Csd2) 多肽的核苷酸序列 (I-C型); (c) 编码Cse1 (CasA) 多肽的核苷酸序列、编码Cse2 (CasB) 多肽的核苷酸序列、编码Cas7 (CasC) 多肽的核苷酸序列、编码Cas5 (CasD) 多肽的核苷酸序列和编码Cas6e (CasE) 多肽的核苷酸序列 (I-E型); (d) 编码Cys1多肽的核苷酸序列、编码Cys2多肽的核苷酸序列、编码Cas7 (Cys3) 多肽的核苷酸序列和编码Cas6f多肽的核苷酸序列 (I-F型); (e) 编码Cas7 (Csa2) 多肽的核苷酸序列、编码Cas8a1 (Csx13) 多肽或Cas8a2 (Csx9) 多肽的核苷酸序列、编码Cas5多肽的核苷酸序列、编码Csa5多肽的核苷酸序列、编码Cas6a多肽的核苷酸序列、编码Cas3' 多肽的核苷酸序列和编码不具有核酸酶活性的Cas3" 多肽的核苷酸序列 (I-A型); 和/或 (f) 编码Cas1 0d (Csc3) 多肽的核苷酸序列、编码Csc2多肽的核苷酸序列、编码Csc1多肽的核苷酸序列和编码Cas6d多肽的核苷酸序列 (I-D型)。

细菌噬菌体

[0119] 细菌噬菌体 (bacteriophages) 或“噬菌体 (phages)”代表一组细菌病毒,是被工程化的或来自环境来源。单个噬菌体宿主的范围通常较窄,这意味着噬菌体对细菌菌种的一种或几种菌株具有高度特异性,并且这种特异性使其具有独特的抗菌作用。细菌噬菌体是依靠宿主细胞机制复制的细菌病毒。通常,噬菌体通常分为三类:裂解的、溶原的和温和的。

裂解细菌噬菌体感染宿主细胞,经历多次复制,并触发细胞裂解以释放新产生的细菌噬菌体颗粒。在一些实施方案中,本文公开的裂解细菌噬菌体保留其复制能力。在一些实施方案中,本文公开的裂解细菌噬菌体保持其触发细胞裂解的能力。在一些实施方案中,本文公开的裂解细菌噬菌体保留它们的复制能力和触发细胞裂解的能力。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含CRISPR阵列。在一些实施方案中,CRISPR阵列不影响细菌噬菌体复制和/或触发细胞裂解的能力。溶原性细菌噬菌体永久存在于宿主细胞内,无论是在细菌基因组内还是作为染色体外质粒。温和细菌噬菌体具有溶解性或溶原性,可以根据生长条件和细胞的生理状态选择一种。每当溶原性细菌暴露于不利条件时,溶原性状态就会终止。该过程称为诱导。有利于终止溶原性状态的不利条件包括干燥、暴露于紫外线或电离辐射以及暴露于突变化学物质。这导致噬菌体基因的表达、整合过程的逆转和裂解性繁殖。

[0120] 细菌噬菌体使用三种通用方法包装和递送合成的DNA。在第一种方法下,将合成的DNA随机重组到细菌噬菌体基因组中,该基因组通常涉及可选择的标记物。在第二种方法下,噬菌体内的限制性酶切位点被用于体外引入合成的DNA。在第三种方法下,将通常编码质粒的噬菌体包装位点和裂解复制起点的包装为细菌噬菌体颗粒装配的一部分。所得质粒被称为“噬菌粒”。

[0121] 由于进化的原因,噬菌体仅限于给定的细菌菌株。在一些情况下,将其遗传物质注入不相容的菌株中会适得其反。因此,噬菌体已经进化为有限横截面的特异性感染菌株。然而,已经发现一些将其遗传物质注入各种细菌中的噬菌体。经典的实例是PI噬菌体,它已经显示出将DNA注入一系列革兰氏阴性细菌中。

[0122] 在一些实施方案中,细菌噬菌体或噬菌粒DNA来自溶原性或温带性细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体或噬菌粒DNA来自专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体或噬菌粒包括但不限于PI噬菌体、M13噬菌体、λ噬菌体、T4噬菌体、φC2噬菌体、φCD27噬菌体、φNM1噬菌体、Bc431 v3噬菌体、φ10噬菌体、φ25噬菌体、φ151噬菌体、A511样噬菌体、B054、0176样噬菌体或弯曲杆菌噬菌体(例如NCTC 12676和NCTC 12677)。在一些实施方案中,细菌噬菌体是φCD146艰难梭菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是φCD24-2艰难梭菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4大肠杆菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T7大肠杆菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T7m大肠杆菌细菌噬菌体。

[0123] 在一些实施方案中,多种细菌噬菌体一起使用。在一些实施方案中,一起使用的多个细菌噬菌体靶向样品或受试者内的相同或不同细菌。在一些实施方案中,一起使用的细菌噬菌体包括T4噬菌体、T7噬菌体、T7m噬菌体或本文描述的细菌噬菌体的任何组合。

[0124] 在一些实施方案中,感兴趣的细菌噬菌体获自环境来源或商业研究供应商。在一些实施方案中,针对细菌及其相关菌株文库的裂解活性筛选获得的细菌噬菌体。在一些实施方案中,针对细菌及其相关菌株文库在筛选的细菌中产生初级抗性的能力筛选细菌噬菌体。

[0125] 在一些实施方案中,本文公开了用于杀灭靶细菌的方法,其包括将细菌噬菌体引入靶细菌中,所述细菌噬菌体包含:编码间隔序列或由其转录的crRNA的核酸,其中所述间隔序列与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补;以及能够诱导靶细菌裂解的基因,其中通过细菌噬菌体的裂解活性或使用间隔序列或由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的

活性杀灭靶细菌。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含:编码间隔序列或由其转录的crRNA的核酸,其中所述间隔序列与来自靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补;以及能够诱导靶细菌裂解的基因,其中通过细菌噬菌体的裂解活性或使用间隔序列或由其转录的crRNA的CRISPR-Cas系统的活性杀灭靶细菌。

插入位点

[0126] 在一些实施方案中,将编码CRISPR阵列的核酸引入细菌噬菌体而不破坏细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,将编码CRISPR阵列的核酸引入细菌噬菌体中保留了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,将核酸插入到细菌噬菌体基因组。在一些实施方案中,将核酸在感兴趣的操纵子末端的转录终止位点处插入细菌噬菌体基因组。在一些实施方案中,将核酸插入细菌噬菌体基因组以替代一种或多种去除的非必需基因。在一些实施方案中,将核酸插入到细菌噬菌体基因组以代替一种或多种去除的溶原性基因。在一些实施方案中,用核酸替代非必需基因和/或溶原性基因不影响细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,用核酸替代非必需基因和/或溶原性基因保留了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,用核酸替代非必需基因和/或溶原性基因增强了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,用核酸替代非必需基因和/或溶原性基因使得溶原性细菌噬菌体裂解。

[0127] 在一些实施方案中,在第一位置将核酸引入细菌噬菌体基因组,同时在单独的位置从细菌噬菌体基因组分别去除一种或多种非必需基因和/或溶原性基因和/或使其失活。在一些实施方案中,一种或多种非必需基因和/或溶原性基因的去和/或失活不影响细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,一种或多种非必需基因和/或溶原性基因的去和/或失活保留了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,一种或多种非必需基因和/或溶原性基因的去使溶原性细菌噬菌体变成裂解性细菌噬菌体。类似地,在一些实施方案中,将一种或多种裂解基因引入细菌噬菌体中以使得非裂解的溶原性细菌噬菌体变成裂解性细菌噬菌体。

[0128] 在一些实施方案中,细菌噬菌体是已通过任何前述方式裂解的温和细菌噬菌体。在一些实施方案中,噬菌体通过去除、替换或失活一种或多种溶原性基因获得裂解性。在一些实施方案中,细菌噬菌体的裂解活性是由于至少一种溶原性基因的去、置换或失活所致。在一些实施方案中,通过去除、替换或失活一种或多种溶原性基因使温和细菌噬菌体获得裂解性,并且温和细菌噬菌体包括含有至少一个间隔子的CRISPR阵列,所述间隔子与靶细菌的靶基因中的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,通过CRISPR阵列去除、替换或失活一种或多种溶原性基因使温和细菌噬菌体获得裂解性,该CRISPR阵列包括针对一种或多种溶原性基因的间隔子,并且温和细菌噬菌体包括含有至少一个间隔子的CRISPR阵列,所述间隔子与靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是维持细菌噬菌体中的溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是在细菌噬菌体中建立溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是在细菌噬菌体中建立溶原性周期和维持溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因是阻遏基因。在一些实施方案中,溶原性基因是c1阻遏基因。在一些实施方案中,溶原性基因是激活基因。在一些实施方案中,溶原性基因是cII基因。在一些实施方案中,溶原性基因是lexA基因。在一些实施方案中,溶原性基因是int(整合酶)基因。在一些实施方案中,两个或更多个溶原性基因被去除、替换或失活以引起细菌噬菌体溶原性周期的停滞和/或溶原性周期的诱导。在一些实施方

案中,通过插入一种或多种裂解基因使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,通过插入一种或多种有助于诱导裂解周期的基因,使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,通过改变一种或多种有助于诱导裂解周期的基因的表达来使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,温和细菌噬菌体在表型上从溶原性细菌噬菌体改变为裂解性细菌噬菌体。在一些实施方案中,通过环境改变使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,环境改变包括但不限于温度、pH或营养物改变、暴露于抗生素、过氧化氢、外来DNA或DNA破坏剂、有机碳的存在以及重金属(例如,以铬(VI)的形式)的存在。在一些实施方案中,获得裂解性的温和细菌噬菌体被阻止恢复为溶原状态。在一些实施方案中,通过引入添加的CRISPR阵列,防止了获得裂解性的温和细菌噬菌体恢复为溶原状态。在一些实施方案中,除了由于细菌噬菌体的裂解活性和/或CRISPR阵列的活性引起的细胞死亡以外,细菌噬菌体不赋予靶细菌任何新的特性。

[0129] 在一些实施方案中,通过化学、生化和/或任何合适的方法实现一种或多种非必需基因和/或溶原性基因的替换、去除、失活或其任何组合。在一些实施方案中,通过同源重组的任何合适的化学、生化和/或物理方法实现一种或多种裂解基因的插入。

[0130] 在一些实施方案中,细菌噬菌体是专性裂解细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是 ϕ CD146艰难梭菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是 ϕ CD24-2艰难梭菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T4大肠杆菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T7大肠杆菌细菌噬菌体。在一些实施方案中,细菌噬菌体是T7m大肠杆菌细菌噬菌体。

非必需基因

[0131] 在一些实施方案中,要从细菌噬菌体中去除和/或替换的非必需基因是对细菌噬菌体的存活非必需的基因。在一些实施方案中,要从细菌噬菌体中去除和/或替换的非必需基因是对于诱导和/或维持裂解周期非必需的基因。在一些实施方案中,要从细菌噬菌体中去除和/或替换的非必需基因是来自 ϕ CD146艰难梭菌的gp49。在一些实施方案中,要从细菌噬菌体中去除和/或替换的非必需基因是来自 ϕ CD24-2艰难梭菌的gp75。在一些实施方案中,要从细菌噬菌体中去除和/或替换的非必需基因是来自T4大肠杆菌细菌噬菌体的hoc基因。在一些实施方案中,要去除和/或替换的非必需基因包括来自T7大肠杆菌细菌噬菌体的gp0.7、gp4.3、gp4.5、gp4.7或其任何组合。在一些实施方案中,要去除和/或替换的非必需基因是来自T7m大肠杆菌细菌噬菌体的gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3、gp4.5或其任何组合。

转录激活因子

[0132] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体还包含转录激活因子。在一些实施方案中,编码的转录激活因子调节靶细菌内感兴趣的基因的表达。在一些实施方案中,转录激活因子激活靶细菌内感兴趣的基因的表达,无论是外源的还是内源的。在一些实施方案中,转录激活因子通过破坏靶细菌内的一种或多种抑制元件的活性来激活靶细菌内的感兴趣的表达基因。在一些实施方案中,抑制元件包括转录抑制因子。在一些实施方案中,抑制元件包含全局转录抑制因子。在一些实施方案中,抑制元件是组蛋白样核样体结构(H-NS)蛋白或其同源物或功能片段。在一些实施方案中,抑制元件是亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)。在一些实施方案中,抑制元件是CodY蛋白。

[0133] 在某些细菌中,CRISPR-Cas系统表达差并在大多数环境条件下被认为是沉默的。在这些细菌中,CRISPR-Cas系统的调节是转录调节因子(例如,广泛参与宿主基因组转录调节的组蛋白样核样体结构(H-NS)蛋白)活性的结果。H-NS通过沿富含AT的位点进行多聚导致DNA弯曲,从而控制宿主的转录调控。在一些细菌例如大肠杆菌中,I型CRISPR-Cas3操纵子的调控由H-NS调控。

[0134] 同样,在一些细菌中,CRISPR-Cas系统的阻遏作用是由抑制元件控制的,例如亮氨酸反应性调节蛋白(LRP)。LRP已牵涉结合至转录起始位点的上游和下游区域。值得注意的是,LRP在调节CRISPR-Cas系统的表达中的活性因细菌而异。与具有广泛的种间抑制活性的H-NS不同,LRP已显示出差异调节宿主CRISPR-Cas系统的表达。因此,在一些情况下,LRP反映了不同细菌中调节CRISPR-Cas系统表达的宿主特异性的手段。

[0135] 在一些情况下,CRISPR-Cas系统的抑制也受抑制元件CodY的控制。CodY是一种通过DNA结合起作用的GTP感应转录抑制因子。细胞内GTP浓度可作为环境营养状况的指标。在正常培养条件下,GTP丰富并且与CodY结合以抑制转录活性。但是,随着GTP浓度的降低,CodY与DNA结合的活性降低,从而使以前被抑制的基因发生转录。因此,CodY充当严格的全局转录抑制因子。

[0136] 在一些实施方案中,转录激活因子是Leu0多肽、其任何同源物或功能片段、编码该Leu0多肽的核酸序列或上调Leu0的试剂。在一些实施方案中,转录激活因子包含Leu0的任何直系同源物或功能等同物。在一些细菌中,Leu0通过充当对细菌的环境营养状况做出反应的全局转录调节因子来对抗H-NS。在正常情况下,Leu0的表达较差。然而,在细菌生命周期中氨基酸饥饿和/或达到固定相的情况下,Leu0被上调。Leu0表达的增加导致它拮抗重叠启动子区域的H-NS,从而影响基因表达。Leu0的过表达上调了CRISPR-Cas系统的表达。在大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中,Leu0驱动casABCDE操纵子的表达增加,而casABCDE操纵子已经预测了CasA上游的Leu0和H-NS结合序列。

[0137] 在一些实施方案中,Leu0的表达导致抑制元件的破坏。在一些实施方案中,由于Leu0的表达引起的抑制元件的破坏消除了CRISPR-Cas系统的转录抑制。在一些实施方案中,由于H-NS的活性,Leu0的表达消除了CRISPR-Cas系统的转录抑制。在一些实施方案中,由于LRP的活性,Leu0的表达消除了CRISPR-Cas系统的转录抑制。在一些实施方案中,由于Leu0的表达引起的抑制元件的破坏导致CRISPR-Cas系统的表达增加。在一些实施方案中,由于由Leu0的表达引起的抑制元件的破坏导致编码CRISPR阵列的核酸的CRISPR-Cas系统的加工增加。在一些实施方案中,由于通过Leu0的表达使得抑制元件受到破坏从而使得CRISPR-Cas系统的表达增加,导致编码CRISPR阵列的核酸的CRISPR-Cas加工增加,从而增加了CRISPR阵列对细菌的致死率水平。在一些实施方案中,本文所述的转录激活因子引起本文所述的细菌噬菌体和/或CRISPR-Cas系统的活性增加。

[0138] 在一些实施方案中,来自大肠杆菌菌株K12的Leu0或其任何同源物或功能片段的序列包括但不限于GenBank登录号:AP0090408.1。Leu0的蛋白质序列在下文以FASTA格式列出为SEQ ID NO.1:

```

MPEVQTDHPETAELSKPQLRMVDLNLTVFDVAVMQEQNITRAAHVLGMSQPAVSNVAVR
LKVMFNDELFRVRYGRGIQPTARAFQLFGSVRQALQLVQNELPGSGFEPASSERVFHLCVCS
PLDSILTSQIYNHIEQIAPNIHVMFKSSLNQNTHEQLRYQETEFVISYEDFHRPEFTSVPLFKD
EMVLVASKNHPTIKGPLLKHDVYNEQHAAVSLDRFASFSQPWYDVTVDKQASIAYQGMAM
MSVLSVVSQTHLVAIAPRWLAEEFAESLELQVLPPLKQNSRTCYSWHEAAGRDKGHQ
WMEEQLVSICKR

```

[0139] 在一些实施方案中,转录激活因子是CD2983多肽或其任何同源物或功能片段,或编码其的核酸。在一些实施方案中,转录激活因子是CD2983的任何直系同源物或功能等同物。在一些细菌中,CD2983充当可对细菌的环境营养状况做出反应的一种特定的转录调节因子。在一些细菌中,CRISPR-Cas系统由葡萄糖的环境营养状态以ccpA依赖性方式调节。但是,在正常情况下,CD2983被CodY抑制。在营养压力下,CodY的活性降低,无法表达CD2983。CD2983的上调与CRISPR-Cas系统的上调有关。

[0140] 在一些实施方案中,CD2983的表达导致抑制元件的破坏。在一些实施方案中,由于CD2983的表达引起的抑制元件的破坏消除了CRISPR-Cas系统的转录抑制。在一些实施方案中,由于CodY的活性,CD2983的表达消除了CRISPR-Cas系统的转录抑制。在一些实施方案中,由于CD2983的表达引起的抑制元件的破坏导致CRISPR-Cas系统的表达增加。在一些实施方案中,由于由CD2983的表达引起的抑制元件的破坏从而使得CRISPR-Cas系统的表达增加导致编码CRISPR阵列的第一核酸的CRISPR-Cas加工增加。在一些实施方案中,由于通过CD2983的表达使得抑制因子受到破坏,从而导致CRISPR-Cas系统的表达增加,导致编码CRISPR阵列的第一核酸的CRISPR-Cas加工增加,从而增加CRISPR阵列对细菌的致死率水平。

[0141] 在一些实施方案中,来自艰难梭菌菌株630的CD2983或其任何同源物或功能片段的序列包括但不限于GenBank登录号:CAJ69877.1。CD2983的蛋白质序列在下文以FASTA格式列出为SEQ ID NO.2:

```

MMILIQSRGKMKCKELSEELEVSRQIKSYKMYLEQAGIFINSTPGIYGGYEIDKCNSISLIK
LLDSEVSILDMINSQLEYNNDIYKNEFNIVEKIKAVLNTGEKSDTYMDYFTVQAQRNCDY
ESEKNKCNEIIRAYTTKHKFWIEYYSLNSGNSERIVHPYGLFNYKSDTYMVAFCEKRFKFD
FKLCRIKDYKVLEEKYNVDKSFWSDEYSKNSIGIYKGEEINVVIKISHPFSTIIKEKVWVNN
QQIIEYDDKSIMFKAKMRGYEEIKSWILSMGAYVEVVEPDRLRNDILSEIEKMKKIY

```

[0142] 在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性来实现杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过编码包含至少一个间隔子的CRISPR阵列的第一核酸的活性来实现杀灭靶细菌,所述间隔子与靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,通过I型、II型或III型CRISPR-Cas系统对CRISPR阵列的加工以产生能够指导基于CRISPR-Cas的核酸内切酶活性和/或在细菌的靶基因中的靶核苷酸序列处的裂解而产生加工的crRNA来实现杀灭细菌。在一些实施方案中,通过由于编码CRISPR-Cas系统转录激活因子的第二种核酸的表达增强CRISPR阵列的加工来实现杀灭细菌。

[0143] 在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和通过编码包含至少一个间隔子

的CRISPR阵列的核酸的活性结合来实现杀灭细菌,所述间隔子与靶细菌中的靶基因的靶核苷酸序列互补。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和通过由于表达的转录激活因子的活性而导致的编码CRISPR阵列的核酸的增强的活性来实现杀灭细菌。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和通过编码CRISPR阵列的核酸的活性结合来杀灭细菌是协同的。在一些实施方案中,由于第二核酸编码的CRISPR-Cas转录激活因子的表达,使得通过细菌噬菌体的裂解活性和通过编码CRISPR阵列的核酸的活性结合来杀灭细菌是协同的。

增强的裂解细菌噬菌体

[0144] 本文公开了产生细菌噬菌体的方法,所述细菌噬菌体包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸。另外,本文公开了包含编码用于CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸的细菌噬菌体。

[0145] 在一些实施方案中,将编码用于CRISPR-Cas的转录激活因子的核酸引入细菌噬菌体用于调节靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性。在一些实施方案中,由细菌噬菌体引入的转录激活因子增加了靶细菌中CRISPR-Cas系统的表达。在一些实施方案中,由于通过第一细菌噬菌体引入转录激活因子使得靶细菌中的CRISPR-Cas系统表达增加,提高了包含CRISPR阵列的第二种不同细菌噬菌体的致死率,如先前的实施方案所述。在一些实施方案中,由于通过第一细菌噬菌体引入转录激活因子使得靶细菌中的CRISPR-Cas系统表达增加,提高了第二种不同细菌噬菌体的致死率,所述第二种不同细菌噬菌体包括经预处理的未成熟或经处理的成熟crRNA,如由先前的实施方案所述。

[0146] 除转录激活因子的调控外,CRISPR-Cas系统还受其他调控装置和机制的严格控制。群体感应(QS)是细菌种群中细菌之间的化学交流,它允许基因表达关于种群密度进行协调。QS依赖于细菌生长过程中产生并积累的化学信号。达到阈值水平后, QS信号与转录调节因子结合,从而影响细菌基因的表达。在一些细菌中, QS信号传导通过抑制其表达来增强CRISPR-Cas系统的细菌防御能力。除了QS信号传导外,还认为CRISPR-Cas系统表达的调节对宿主细菌膜完整性的扰动敏感。BaeSR是一个两组分反应调节系统,将宿主膜的包膜应力与Cas基因的激活联系起来。同样,热休克蛋白G(HtpG)已被证明可在噬菌体感染诱导下稳定Cas。此外,代谢感知蛋白例如cAMP代谢敏感cAMP受体蛋白(CRP)能够激活CRISPR-Cas表达。调节Cas表达的其他代谢感知蛋白包括可响应氮饥饿的 σ 因子RpoN(σ^{54})。

[0147] 在一些实施方案中,转录激活因子包括QS信号。在一些实施方案中,转录激活因子包含参与感测宿主细菌膜的应激的蛋白质。在一些实施方案中,该蛋白质包含BaeSR。在一些实施方案中,转录激活因子包含稳定Cas的蛋白质。在一些实施方案中,该蛋白质包含HtpG。在一些实施方案中,转录激活因子是代谢感知蛋白。在一些实施方案中,代谢感知蛋白包含CRP或RpoN(σ^{54})。在一些实施方案中,将编码转录激活因子或其功能片段的核酸引入靶细菌。在一些实施方案中,将编码转录激活因子或其功能片段的核酸通过本文所述的CRISPR阵列引入靶细菌。在一些实施方案中,本文公开的方法包括:引入包含编码用于靶细菌中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸的细菌噬菌体。在一些实施方案中,本文公开了细菌噬菌体,其包含编码靶细菌中的CRISPR-Cas系统的转录激活因子的核酸。

抗CRISPR阵列

[0148] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体还包含抗CRISPR。

[0149] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括将细菌噬菌体引入靶细菌,所述细菌噬菌体包括:裂解活性和编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列,其中所述抗CRISPR多肽增强所述细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,本文公开了细菌噬菌体,其包括:裂解活性和编码抗CRISPR多肽的第一核酸序列,其中所述抗CRISPR多肽增强了细菌噬菌体的裂解活性。

[0150] 在一些实施方案中,编码抗CRISPR多肽的核酸直接cr噬菌体或另一种细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,细菌噬菌体裂解活性的增强归因于抗CRISPR多肽限制、失活和/或抑制宿主靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性。抗CRISPR多肽是具有阻止细菌CRISPR-Cas系统功能的活性的任何细菌噬菌体蛋白。抗CRISPR蛋白的活性可防止宿主细菌基于CRISPR-Cas系统防御入侵的细菌噬菌体。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括基因调控干扰的过程使宿主细菌的CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽使用包括核酸酶募集干扰的过程使宿主细菌的CRISPR-Cas系统失活。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽限制、失活和/或抑制I型CRISPR-Cas系统、II型CRISPR-Cas系统或III型CRISPR-Cas系统、IV型CRISPR-Cas系统、V型CRISPR-Cas系统或VI型CRISPR-Cas系统的活性。在一些实施方案中,编码抗CRISPR多肽或引入的抗CRISPR多肽的核酸的蛋白质产物直接或间接结合Cascade或Cascade样复合物。

[0151] 在一些实施方案中,抗CRISPR多肽被截短、突变或融合至另一种感兴趣的蛋白。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽是二聚体蛋白。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽是同二聚体蛋白或异二聚体蛋白。在一个实施方案中,抗CRISPR多肽包括AcrIIC1Boe、AcrIIC1Nme、AcrIIC2Nme、AcrIIC3Nme、AcrIIC4Hpa、AcrIIC5Smu或其任何功能片段。在一个实施方案中,抗CRISPR多肽以特定亲和力结合至CRISPR-Cas系统上的特异性结合位点。

[0152] 在一些实施方案中,抗CRISPR多肽限制、失活或抑制靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性,其中所述CRISPR-Cas系统靶向包含编码抗CRISPR多肽的核酸的细菌噬菌体。在一些实施方案中,抗CRISPR多肽限制、失活或抑制靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性,其中所述CRISPR-Cas系统靶向不同于第一细菌噬菌体的第二正交细菌噬菌体。在一些实施方案中,第二正交细菌噬菌体不同于第一细菌噬菌体。在一些实施方案中,通过来自第一细菌噬菌体的抗CRISPR多肽对靶细菌中的CRISPR-Cas系统活性的限制、失活或抑制增强了第一细菌噬菌体或第二正交细菌噬菌体的活性。在一些实施方案中,第二正交细菌噬菌体具有裂解活性。在一些实施方案中,第二正交细菌噬菌体包括本文公开的任何实施方案的细菌噬菌体。

杀灭靶细菌的方法

[0153] 在某些实施方案中,本文公开了杀灭细菌的方法。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性来实现杀灭靶细菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体的裂解活性是由于至少一种溶原性基因的去除、置换或失活所致。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是维持细菌噬菌体中的溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是在细菌噬菌体中建立溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因的作用是在细菌噬菌体中建立溶原性周期和维持溶原性周期。在一些实施方案中,溶原性基因是阻遏基因。在一些实施方案中,溶原性基因是cI阻遏基因。在一些实施方案中,溶原性基因是激活基因。在一些实施方案中,溶原性基因是cII基因。在一些实施方案中,溶原性基因是lexA基因。在一些实施方案中,溶原

性基因是int(整合酶)基因。在一些实施方案中,通过插入一种或多种有助于诱导裂解周期的基因,使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,通过改变一种或多种有助于诱导裂解周期的基因的表达来使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,温和细菌噬菌体在表型上从溶原性细菌噬菌体改变为裂解性细菌噬菌体。在一些实施方案中,通过环境改变使温和细菌噬菌体裂解。在一些实施方案中,环境改变包括但不限于温度、pH或营养物改变、暴露于抗生素、过氧化氢、外来DNA或DNA破坏剂、有机碳的存在以及重金属(例如以铬(VI)的形式)的存在。在一些实施方案中,获得裂解性的温和细菌噬菌体被阻止恢复为溶原状态。在一些实施方案中,通过引入添加的CRISPR阵列,防止了获得裂解性的温和细菌噬菌体恢复为溶原状态。在一些实施方案中,通过包含至少一个与靶细菌的靶基因中的靶核苷酸序列互补的间隔子的CRISPR阵列的活性来实现杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过成熟crRNA的活性来实现杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过I型、II型、III型、IV型、V型或VI型CRISPR-Cas系统对CRISPR阵列的加工来实现产生经加工的crRNA,所述经加工的crRNA能够指导基于CRISPR-Cas的核酸内切酶活性和/或在细菌靶基因中的靶核苷酸序列处的裂解。在一些实施方案中,通过CRISPR阵列的活性而不是细菌噬菌体的裂解和/或非裂解活性来实现杀灭靶细菌。在一些实施方案中,通过本文公开的任何方法或方法的组合来杀灭靶细菌。

[0154] 在一些实施方案中,仅通过细菌噬菌体的裂解活性来杀灭细菌。在一些实施方案中,仅通过编码包含至少一个间隔子的CRISPR阵列的核酸的活性来实现杀灭细菌。在一些实施方案中,仅通过编码成熟crRNA的核酸的活性来实现杀灭细菌。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和CRISPR阵列或成熟crRNA的活性的组合来实现杀灭细菌。在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的裂解活性和通过编码CRISPR阵列的第一核酸的活性的结合来杀灭细菌是协同的。在一些实施方案中,CRISPR阵列或成熟crRNA的杀灭活性补充或增强了细菌噬菌体的裂解活性。在一些实施方案中,杀灭靶细菌是两个或更多个系统的协同作用。

[0155] 在一些实施方案中,通过细菌噬菌体的浓度和/或CRISPR阵列的设计来调节细菌的协同杀灭。在一些实施方案中,通过增加施用至细菌的细菌噬菌体的浓度,将细菌的协同杀灭调节为有利于通过细菌噬菌体的裂解活性超过CRISPR阵列的活性而进行杀灭。在一些实施方案中,通过降低施用至细菌的细菌噬菌体的浓度,将细菌的协同杀灭调节为不利于通过细菌噬菌体的裂解活性超过CRISPR阵列的活性而进行杀灭。在一些实施方案中,在低浓度下,裂解复制允许扩增和杀灭靶细菌。在一些实施方案中,在高浓度下,不需要噬菌体的扩增。

[0156] 在一些实施方案中,通过改变间隔子的数量、长度、组成、同一性或其任何组合以增加CRISPR阵列的致死率而将细菌的协同杀灭调节成有利于通过CRISPR阵列的活性超过细菌噬菌体的裂解活性而进行杀灭。在一些实施方案中,通过改变间隔子的数目、长度、组成、同一性或其任何组合以减少CRISPR阵列的致死率而将细菌的协同杀灭调节成不利于通过CRISPR阵列的活性超过细菌噬菌体的裂解活性来进行杀灭。

[0157] 在一些实施方案中,要杀灭的细菌中的靶核苷酸序列是任何必需的感兴趣的靶核苷酸序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列是非必需序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含、基本上由以下组成或由以下组成:全部或部分的编码靶基因的启动子或其互补

序列的核苷酸序列。在一些实施方案中,间隔子核苷酸序列与靶基因的启动子或其部分互补。

[0158] 在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含位于DNA的编码或非编码链上的全部或部分的核苷酸序列。在一些实施方案中,靶核苷酸序列包含位于靶基因的转录区的编码物上的全部或部分核苷酸序列。

[0159] 必需基因是生物体对其存活至关重要的任何基因。但是,必需是高度依赖于生物体的生存环境的。例如,仅当淀粉是唯一的能量来源时,才需要消化淀粉的基因。在一些实施方案中,必需基因包括但不限于:acpP、csrA、eno、fusA、gapA、glyQ、infA、nusG、secY、trmD、Tsf和ftsA。在一些实施方案中,非必需基因是对生物体的存活并非关键的任何基因。但是,非必需是高度依赖于生物体的生存环境的。

[0160] 在一些实施方案中,感兴趣的靶基因的非限制性实例包括编码转录调节子、翻译调节子、聚合酶基因、代谢酶、转运蛋白、RNA酶、蛋白酶、DNA复制酶、DNA修饰或降解酶、调节性RNA、转移RNA或核糖体RNA的基因。在一些实施方案中,靶基因是涉及细胞分裂、细胞结构、代谢、运动性、致病性或毒力的基因。在一些实施方案中,靶基因包括其功能尚未被表征的假设基因。因此,例如靶基因是来自任何细菌的任何基因。

抗微生物剂和肽

[0161] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体被进一步遗传修饰以表达抗菌肽、抗菌肽的功能片段或裂解基因。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体表达至少一种本文公开的抗微生物剂或肽。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含编码酶生物的核酸序列,其中核酸序列的蛋白质产物靶向噬菌体抗性细菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体包含核酸,其编码有助于分解或降解生物膜基质的酶。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含编码分散素D氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精葡萄糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶或裂解酶。在一些实施方案中,该酶选自纤维素酶,例如纤维素酶的糖基羟化酶家族,例如也称为纤维素酶A的酶的糖基羟化酶5家族;聚葡萄糖胺(PGA)解聚酶;和结肠酸解聚酶,例如1,4-L-岩藻糖苷水解酶(表征1,4- β -岩藻糖苷水解酶降解可拉酸)、解聚藻酸酶、DNase I或其组合。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体分泌本文公开的酶。

[0162] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体表达和/或分泌抗微生物剂或肽。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体分泌并表达抗生素例如氨苄西林、青霉素、青霉素衍生物、头孢菌素类、单菌胺类、碳青霉烯类、氧氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星、诺氟沙星、洛美沙星、曲伐沙星、莫西沙星、司帕沙星、吉米沙星、帕珠沙星或本文公开的任何抗生素。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含编码抗菌肽、表达抗菌肽或分泌有助于或增强靶细菌杀灭的肽的核酸序列。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体包含编码肽的核酸序列、编码抗菌肽的核酸序列、表达抗菌肽或分泌有助于或增强CRISPR-Cas系统活性的肽。

用途

细菌感染

[0163] 本文公开了治疗细菌感染的方法。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体在人或动物受试者中治疗或预防由本文公开的细菌介导或引起的疾病或病况。这些细菌通常与受试者的组织接触,所述组织包括:肠、口腔、肺、腋窝、眼、阴道、肛门、耳、鼻或喉组织。在一些实施方案中,通过调节细菌的活性和/或通过直接杀灭细菌来治疗细菌感染。

[0164] 在一些实施方案中,存在于细菌群体中的一种或多种靶细菌是致病的。在一些实施方案中,致病细菌是尿道致病性的。在一些实施方案中,致病细菌是尿道致病性大肠杆菌(UPEC)。在一些实施方案中,致病细菌是致泻性的。在一些实施方案中,致病细菌是致泻大肠埃希氏菌(DEC)。在一些实施方案中,致病细菌是产生志贺毒素的。在一些实施方案中,致病细菌是产志贺毒素大肠杆菌(STEC)。在一些实施方案中,致病细菌是产生志贺毒素的。在一些实施方案中,致病细菌是产志贺毒素大肠杆菌(STEC)。在一些实施方案中,致病细菌是产志贺毒素大肠杆菌(STEC)。在一些实施方案中,致病细菌是各种O-抗原:H抗原血清型大肠杆菌。在一些实施方案中,致病细菌是肠致病性的。在一些实施方案中,致病细菌是肠致病性大肠杆菌(EPEC)。

[0165] 在一些实施方案中,致病细菌是艰难梭菌的各种菌株,包括:CD043、CD05、CD073、CD093、CD180、CD106、CD128、CD199、CD111、CD108、CD25、CD148、CD154、FOBT195、CD03、CD038、CD112CD196、CD105、UK1、UK6、BI-9、CD041、CD042、CD046、CD19或R20291。

[0166] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于治疗受试者胃肠道中的感染、疾病或病况。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于调节和/或杀灭受试者的微生物组或肠道菌群内的靶细菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于从受试者的微生物组或肠道菌群内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶细菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于从受试者的微生物组或肠道菌群内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶肠致病性细菌。在一些实施方案中,靶肠致病性细菌是肠致病性大肠杆菌(EPEC)。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于从受试者的微生物组或肠道菌群内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶致泄性细菌。在一些实施方案中,靶双歧杆菌细菌是致泻大肠埃希氏菌(DEC)。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于从受试者的微生物组或肠道菌群内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种产生志贺毒素的靶细菌。在一些实施方案中,靶志贺毒素产生细菌是产志贺毒素大肠杆菌(STEC)。

[0167] 在一些实施方案中,细菌噬菌体用于选择性地调节和/或杀灭受试者的微生物组或肠道菌群内的一种或多种靶肠致病性艰难梭菌细菌菌株,包括:CD043、CD05、CD073、CD093、CD180、CD106、CD128、CD199、CD111、CD108、CD25、CD148、CD154、FOBT195、CD03、CD038、CD112、CD196、CD105、UK1、UK6、BI-9、CD041、CD042、CD046、CD19或R20291。

[0168] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于治疗受试者的尿路中的感染、疾病或病况。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于调节和/或杀灭受试者的尿道菌群内的靶细菌。尿道菌群包括但不限于表皮葡萄球菌、粪肠球菌和一些 α -溶血性链球菌。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于从受试者的尿道菌群内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶尿道致病性细菌。在一些实施方案中,靶细菌是尿道致病性大肠杆菌(UPEC)。

[0169] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于治疗受试者皮肤上的感染、疾病或病况。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于调节和/或杀灭受试者皮肤上的靶细菌。

[0170] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于治疗受试者的粘膜上的感染、疾病或病况。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于调节和/或杀灭受试者粘膜上的靶细菌。

[0171] 在一些实施方案中,致病细菌是抗生素抗性的。在一实施方案中,致病细菌是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)。

[0172] 在一些实施方案中,存在于细菌群体中的一种或多种靶细菌形成生物膜。在一些实施方案中,生物膜包含病原菌。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于治疗生物膜。

[0173] 在一些实施方案中,靶细菌的非限制性实例包括大肠埃希氏菌属种(*Escherichia* spp.)、沙门氏菌属种(*Salmonella* spp.)、芽孢杆菌属种(*Bacillus* spp.)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)梭菌属种(*Clostridium* spp.)、假单胞菌属种(*Pseudomonas* spp.)、梭菌属种(*Clostridium* spp.)、乳球菌属种(*Lactococcus* spp.)、不动杆菌属种、分枝杆菌属种(*Mycobacterium* spp.)、粘球菌属种(*Myxococcus* spp.)、葡萄球菌属种(*Staphylococcus* spp.)、链球菌属种(*Streptococcus* spp.)、蓝藻菌(cyanobacteria)等。在一些实施方案中,细菌的非限制性实例包括大肠杆菌、肠炎沙门菌亚属(*Salmonella enterica*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、将达梭状杆菌(*Clostridium ljungdahlii*)、艰难梭菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌或蓝藻菌。在一些实施方案中,细菌的非限制性实例包括金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌、耐碳青霉烯的肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*)、表皮葡萄球菌、唾液葡萄球菌、微小棒状杆菌、假白喉棒状杆菌、纹带棒状杆菌、棒状杆菌群G1、棒状杆菌群G2、肺炎链球菌、缓症链球菌、血链球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、洋葱伯霍尔德杆菌、粘质沙雷氏菌、流感嗜血杆菌、莫拉菌属种、脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、鼠伤寒沙门氏菌、放线菌属种、紫单胞菌属种、产黑素普雷沃氏菌、幽门螺杆菌、猫螺杆菌或空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)。细菌的其他非限制性实例包括乳酸菌,包括但不限于乳杆菌属种(*Lactobacillus* spp.)和双歧杆菌属种(*Bifidobacterium* spp.);电燃料细菌菌株,包括但不限于地杆菌属种(*Geobacter* spp.)、梭菌属种或富养产碱菌(*Ralstonia eutropha*);或对例如植物和哺乳动物有致病性的细菌。在一些实施方案中,细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中,细菌是艰难梭菌。

[0174] 在一些实施方案中,细菌噬菌体治疗痤疮和其他相关的皮肤感染。

[0175] 在一些实施方案中,靶细菌是多重耐药性(MDR)细菌菌株。MDR菌株是对至少一种抗生素具有抗性的细菌菌株。在一些实施方案中,细菌菌株对抗生素类例如头孢菌素、氟喹诺酮、碳青霉烯、粘菌素、氨基糖苷、万古霉素、链霉素和甲氧西林具有抗性。在一些实施方案中,细菌菌株对抗生素例如头孢比罗、头孢洛林、克林霉素、达巴凡星、达托霉素、利奈唑胺、莫匹罗星、奥利万星、特地唑胺、替拉凡星、替吉环素、万古霉素、氨基糖苷、碳青霉烯、头孢他啶、头孢吡肟、头孢吡普、氟喹诺酮、哌拉西林、替卡西林、利奈唑胺、链霉菌素、替加环素、达托霉素或其任意组合具有抗性。MDR菌株的实例包括:耐万古霉素的肠球菌(VRE)、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)、产生革兰氏阴性菌的超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)、产生

革兰氏阴性菌的肺炎克雷伯碳青霉烯酶以及多重耐药革兰氏阴性杆菌 (MDR GNR) MDRGN 细菌, 例如肠杆菌属大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌。

[0176] 在一些实施方案中, 靶细菌是肺炎克雷伯菌。在一些实施方案中, 靶细菌是金黄色葡萄球菌。在一些实施方案中, 靶细菌是肠球菌属。在一些实施方案中, 靶细菌是不动杆菌属。在一些实施方案中, 靶细菌是假单胞菌属。在一些实施方案中, 靶细菌是肠杆菌属。在一些实施方案中, 靶细菌是艰难梭菌。在一些实施方案中, 靶细菌是大肠杆菌。在一些实施方案中, 靶细菌是鲍氏梭菌 (*Clostridium bolteae*)。在一些实施方案中, 本文公开的方法和组合物用于兽医和医学应用以及研究应用中。

微生物组

[0177] “微生物组”、“微生物群”和“微生物生境”在下文可互换使用, 是指生活在对象的身体表面、空腔和体液之上或之中的微生物的生态群落。微生物组生境的非限制性实例包括: 肠、结肠、皮肤、皮肤表面、皮肤毛孔、阴道腔、脐区、结膜区、肠区、胃、鼻腔和通道、胃肠道、泌尿生殖道、唾液、粘液和粪便。在一些实施方案中, 微生物组包含微生物材料, 所述微生物材料包括但不限于细菌、古菌、原生生物、真菌和病毒。在一些实施方案中, 微生物材料包含革兰氏阴性细菌。在一些实施方案中, 微生物材料包含革兰氏阳性细菌。在一些实施方案中, 微生物材料包括变形菌 (*Proteobacteria*)、放线菌 (*Actinobacteria*)、拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 或硬壁菌门 (*Firmicutes*)。

[0178] 在一些实施方案中, 本文公开的细菌噬菌体用于调节或杀灭受试者的微生物组内的靶细菌。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于通过CRISPR-Cas系统、裂解活性或其组合来调节和/或杀灭微生物组内的靶细菌。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于调节和/或杀灭受试者的微生物组内的靶细菌。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于从受试者的微生物组内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶细菌。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于从受试者的微生物组内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶肠致病性细菌。在一些实施方案中, 靶肠致病性细菌是肠致病性大肠杆菌 (EPEC)。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于从受试者的微生物组内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种靶致泄性细菌。在一些实施方案中, 靶双歧杆菌细菌是致泻大肠埃希氏菌 (DEC)。在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于从受试者的微生物组内的多种细菌中选择性地调节和/或杀灭一种或多种产生志贺毒素的靶细菌。在一些实施方案中, 靶志贺毒素产生细菌是产志贺毒素大肠杆菌 (STEC)。

[0179] 在一些实施方案中, 所述细菌噬菌体用于选择性地调节和/或杀灭受试者的微生物组内的一种或多种靶肠致病性艰难梭菌菌株, 所述菌株包括: CD043、CD05、CD05、CD073、CD093、CD180、CD106、CD128、CD199、CD111、CD108、CD25、CD148、CD154、FOBT195、CD03、CD038、CD112、CD196、CD105、UK1、UK6、BI-9、CD041、CD042、CD046、CD19或R20291。

[0180] 在一些实施方案中, 细菌噬菌体用于调节或杀灭受试者胃肠道的微生物组或肠道菌群内的单个或多个靶细菌。微生物组或肠道菌群的改变 (例如, 营养不良) 会增加健康状况的风险, 例如糖尿病、精神疾病、溃疡性结肠炎、结肠直肠癌、自身免疫性疾病、肥胖症、糖尿病、中枢神经系统疾病和炎症性肠病。与胃肠道疾病和病况有关并被细菌噬菌体调节或杀灭的示例性细菌列表包括以下菌株、亚株和肠型: 肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*)、巴氏杆菌科 (*pasteurellaceae*)、梭形菌科 (*fusobacteriaceae*) 奈瑟球菌科 (*neisseriaceae*)、

韦荣球菌科(veillonellaceae)、孪生菌科(gemellaceae)、拟杆菌门(bacteriodales)、梭菌目(clostridiales)、丹毒丝菌科(erysipelotrichaceae)、双歧杆菌科(bifidobacteriaceae)拟杆菌属(bacteroides)、粪杆菌属(faecalibacterium)、罗氏菌属(roseburia)、blautia、瘤胃球菌属(ruminococcus)、粪球菌属(coprococcus)、链球菌属(streptococcus)、多尔氏菌属(dorea)、blautia、瘤胃球菌属、肠杆菌属、大肠杆菌、具核梭杆菌(fusobacterium nucleatum)、副流感嗜血杆菌(haemophilus parainfluenzae)(巴斯德菌科(pasteurellaceae))、小韦荣球菌(veillonella parvula)、嗜蚀艾肯菌(eikenella corrodens)(奈瑟球菌科)、兼性双球菌(属)(gemella moribillum)、普通拟杆菌(bacteroides vulgatus)、粪拟杆菌(bacteroides caccae)、两歧双歧杆菌(bifidobacterium bifidum)、长双歧杆菌(bifidobacterium longum)、青春双歧杆菌(bifidobacterium adolescentis)、齿双歧杆菌(bifidobacterium dentum)、汉森氏布氏菌(blautia hansenii)、活泼瘤胃球菌(ruminococcus gnavus)、系结梭菌(clostridium nexile)、普氏栖粪杆菌(faecalibacterium prausnitzii)、扭链瘤胃球菌(ruminococcus torques)、鲍氏梭菌、直肠真杆菌(eubacterium rectale)、罗氏弧菌(roseburia intestinalis)、陪伴粪球菌(coprococcus comes)、放线菌属(actinomyces)、乳球菌属(lactococcus)、罗氏菌属、链球菌属、blautia、小杆菌属(dialister)、脱硫弧菌属(desulfovibrio)、埃希氏菌属(escherichia)、乳杆菌属、粪球菌属、梭菌属、双歧杆菌属、克雷伯菌属(klebsiella)、颗粒链菌属(granulicatella)、真细菌属(eubacterium)、厌氧棒状菌属(anaerostipes)、副拟杆菌属(parabacteroides)、粪芽孢菌属(coprobacillus)、线虫杆菌属(gordonibacter)、柯林斯菌属(collinsella)、拟杆菌属(bacteroides)、粪杆菌属、厌氧杆菌属、阿利培斯、嗜血杆菌、厌氧球菌、维永氏菌、厌氧杆菌属(anaerotruncus)、另枝菌属(alistipes)、嗜血菌属(haemophilus)、厌氧球菌属(anaerococcus)、韦荣球菌属(veillonella)、阿雷韦氏菌(arevotella)、akkermansia、嗜胆菌属(bilophila)、萨特氏菌属(sutterella)、伊格尔兹氏菌(eggerthella)、霍尔德曼氏菌(holdemania)、兼性双球菌(属)(gemella)、peptoniphilus、罗氏菌属(rothia)、肠球菌属(enterococcus)、小球菌属(pediococcus)、柠檬酸杆菌属(citrobacter)、odoribacter、肠杆菌(enterobacteria)、梭杆菌属(fusobacterium)和变形杆菌属(proteus)。

[0181] 在一些实施方案中,将本文公开的细菌噬菌体施用于受试者以促进健康的微生物组。在一些实施方案中,将本文公开的细菌噬菌体施用于受试者,以将受试者的微生物组恢复为促进健康的微生物组组合物。在一些实施方案中,包含本文公开的细菌噬菌体的组合物包含益生元或第三试剂。在一些实施方案中,通过本文公开的细菌噬菌体治疗与微生物组有关的疾病或病况。

环境疗法

[0182] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体还用于食品和农业卫生(包括肉类、水果和蔬菜卫生)、医院卫生、家庭卫生、车辆和设备卫生、工业卫生等。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于从医学、兽医、畜牧业或细菌传递给人或动物的任何其他环境中去除耐药性或其他不良病原体。

[0183] 噬菌体在卫生保健机构中的环境应用是用于设备(例如内窥镜)和环境(例如ICU),这些设备和环境由于难以或不可能消毒的病原体而成为医院内感染的潜在来源。在

一些实施方案中,本文公开的噬菌体用于治疗被对常用消毒剂具有抗性的细菌属(例如假单胞菌属)占据的设备或环境。在一些实施方案中,本文公开的噬菌体组合物用于消毒无生命的物体。在一些实施方案中,本文公开的环境用具有噬菌体滴度的水溶液喷雾、涂覆或倾倒在上述上。在一些实施方案中,本文所述的溶液包含 10^1 - 10^{20} 个噬斑形成单位(PFU)/ml。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体通过包括干分散剂的雾化剂施加,以促进细菌噬菌体向环境中分布。在一些实施方案中,将物体浸入含有本文公开的细菌噬菌体的溶液中。

卫生

[0184] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体在多种领域中用作卫生剂。尽管可以使用术语“噬菌体”或“细菌噬菌体”,但应注意,在适当的情况下,该术语应广义地解释为包括单个细菌噬菌体、多个细菌噬菌体,例如细菌噬菌体混合物和细菌噬菌体与试剂如消毒剂、洗涤剂、表面活性剂、水等的混合物。

[0185] 在一些实施方案中,细菌噬菌体用于消毒医院设施,包括手术室、患者室、候诊室、实验室或其他各种医院设备。在一些实施方案中,该设备包括心电图仪、呼吸器、心血管辅助设备、主动脉内球囊泵、输液设备、其他患者护理设备、电视、监视器、遥控器、电话、床等。在一些情况下,细菌噬菌体通过气溶胶罐施加。在一些实施方案中,细菌噬菌体通过用转移媒介擦拭物体上的噬菌体来施加。

[0186] 在一些实施方案中,本文所述的细菌噬菌体与患者护理装置结合使用。在一些实施方案中,细菌噬菌体与常规的呼吸机或呼吸治疗装置结合使用以清洁患者之间的内表面和外表面。呼吸机的实例包括在手术期间支持通气的设备、支持无行为能力的患者的通气的设备以及类似设备。在一些实施方案中,传统疗法包括自动或电动设备,或手动袋式设备,例如急诊室和救护车中常见的设备。在一些实施方案中,呼吸疗法包括吸入器以引入药物(例如通常与慢性阻塞性肺疾病或哮喘一起使用的支气管扩张药),或维持气道通畅的装置,例如连续的气道正压装置。

[0187] 在一些实施方案中,本文所述的细菌噬菌体用于清洁表面并治疗存在高传染性细菌性疾病如脑膜炎或肠感染的区域中的定殖的人。

[0188] 在一些实施方案中,用本文公开的组合物处理供水。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于处理污水、在水箱、井、储水池、储水箱、渡槽、导管和类似的水分配装置中发现的水。在一些实施方案中,细菌噬菌体被应用于工业储罐,在该工业储罐中水、油、冷却流体和其他液体积聚在收集池中。在一些实施方案中,将本文公开的细菌噬菌体周期性地引入工业储罐以减少细菌生长。

[0189] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于清洁生活区,例如房屋、公寓、公寓大厦、宿舍或任何生活区域。在一些实施方案中,细菌噬菌体用于对公共区域进行消毒,所述公共区域例如剧院、音乐厅、博物馆、火车站、机场、宠物区域例如宠物床或垃圾箱。以这种能力,将细菌噬菌体由常规设备分配(包括泵喷雾器、气雾剂容器、注射瓶、预湿的药巾等)直接应用于(例如喷洒到)要消毒的区域,或通过转移媒介(例如毛巾、海绵等)转移到该区域。在一些实施方案中,本文公开的噬菌体被应用于房屋的各种房间,包括厨房、卧室、浴室、车库、地下室等。在一些实施方案中,本文公开的噬菌体的方式与常规清洁剂相同。在一些实施方案中,噬菌体与常规清洁剂结合(之前、之后或同时)施用,条件是配制常规清洁剂以保持足够的细菌噬菌体生物学活性。

[0190] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体在纸产品的加工期间或完成加工之后被添加到纸产品的组分中。添加了本文公开的细菌噬菌体的纸产品包括但不限于纸巾、卫生纸、湿纸巾。

食品安全

[0191] 在一些实施方案中,本文所述的细菌噬菌体用于任何食品或营养补品中,以防止污染。食品或药品的实例是牛奶、酸奶、凝乳、奶酪、发酵乳、乳基发酵产品、冰淇淋、谷类发酵食品、乳粉、婴儿配方食品或片剂、液体混悬剂、干燥口服补充剂、湿口服补充剂或干管饲喂。

[0192] 细菌噬菌体卫生的广泛概念适用于其他农业应用和生物。农产品包括水果和蔬菜、乳制品和其他农产品。例如,鲜切农产品通常到达被病原菌污染的加工厂。这导致了可追溯到农产品的食源性疾病暴发。在一些实施方案中,通过施加对与食源性疾病有关的细菌物种具有特异性的单一噬菌体或噬菌体混合物,将细菌噬菌体制剂施加至农产品可以显著减少或消除食源性疾病的可能性。在一些实施方案中,在生产和加工的各个阶段施用细菌噬菌体以减少该阶段点的细菌污染或在随后的阶段点防止细菌污染。

[0193] 在一些实施方案中,将特定的细菌噬菌体应用于餐厅、杂货店、产品分配中心中的农产品。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体被定期或连续地施加到色拉条的水果和蔬菜内容物中。在一些实施方案中,将细菌噬菌体施加到色拉条上或对食品的外部进行消毒是喷雾或喷洒过程或洗涤过程。

[0194] 在一些实施方案中,本文所述的细菌噬菌体用于基质或支持介质中,所述基质或支持介质包含有包含肉类、农产品、水果和蔬菜以及其他食品的包装。在一些实施方案中,将适合包装的聚合物用细菌噬菌体制剂浸渍。

[0195] 在一些实施方案中,本文所述的细菌噬菌体用于农舍和家畜饲料中。在一些实施方案中,在饲养家畜的农场中,向家畜的饮用水、食物或两者中都提供细菌噬菌体。在一些实施方案中,将本文所述的细菌噬菌体喷雾到屠宰后兽体上并用于消毒屠宰区域。

[0196] 将特定的细菌噬菌体用作农产品上的生物防治剂具有许多优点。例如,细菌噬菌体是天然的无毒产品,不会像普通化学消毒剂那样干扰天然微生物区系的生态平衡,但是会特异性地裂解靶标食源性病原体。由于细菌噬菌体与化学消毒剂不同,细菌噬菌体是与宿主细菌一同进化的天然产物,对新近出现的新噬菌体具有活性,可在需要时迅速鉴定出耐药性细菌,而鉴定新型有效消毒剂则需要更长的过程、需要花费数年的时间。

药物组合物

[0197] 在一些实施方案中,本公开内容提供了药物组合物以及施用其以治疗细菌、古菌感染或对区域进行消毒的方法。在一些实施方案中,所述药物组合物包含上文讨论的任何在药学上可接受的载体中的试剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物或方法治疗肺部感染(CFP、NCFB、HAP/VAP)全身性感染(菌血症、SSSI)、GI微生物组生态失调(CDI)和/或尿路感染(cUTI)。

[0198] 在一些实施方案中,本文公开的组合物包含药用试剂、制药试剂、载体、佐剂、分散剂、稀释剂等。

[0199] 在一些实施方案中,根据合适的方法,本文公开的细菌噬菌体被配制用于在药物载体中施用。在一些实施方案中,在制造本发明的药物组合物中,所述细菌噬菌体尤其与可

接受的载体混合。在一些实施方案中,所述载体是固体(包括粉末)或液体或两者,并且优选配制成单位剂量组合物。在一些实施方案中,将一种或多种细菌噬菌体掺入本文公开的组合物中,所述组合物通过任何合适的药学方法制备。

[0200] 在一些实施方案中,一种体内治疗受试者的方法,其包括向受试者施用包含在药学上可接受的载体中的本文公开的细菌噬菌体的药物组合物,其中所述药物组合物以治疗有效量施用。在一些实施方案中,通过本领域已知的任何方式将细菌噬菌体给予需要其的人受试者或动物。

[0201] 在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体用于口服施用。在一些实施方案中,细菌噬菌体以固体剂型例如胶囊、片剂和粉末剂施用,或以液体剂型例如酞剂、糖浆和悬浮剂施用。在一些实施方案中,适合于颊(舌下)施用的组合物和方法包括在风味基质中包含细菌噬菌体的锭剂,所述风味基质通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶;以及在惰性基质中包含细菌噬菌体的锭剂,所述惰性基质例如为明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶。

[0202] 在一些实施方案中,本公开内容的方法和组合物适合于肠胃外施用,其包含细菌噬菌体的无菌水性溶液和非水性注射溶液。在一些实施方案中,这些制剂与预期受体的血液等渗。在一些实施方案中,这些制剂包含抗氧化剂、缓冲剂、硫双二氯酚和溶质,其使组合物与预期受体的血液等渗。在一些实施方案中,水性和非水性无菌悬浮液包括悬浮剂和增稠剂。在一些实施方案中,本文公开的组合物存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿瓶和小瓶中,并且存储在立即使用前仅需要添加无菌液体载体(例如,盐水或注射用水)的冻干条件下。

[0203] 在一些实施方案中,适于直肠施用的方法和组合物作为单位剂量栓剂存在。在一些实施方案中,通过将细菌噬菌体与一种或多种常规固体载体(例如可可脂)混合,然后使所得混合物成形来制备这些组合物。在一些实施方案中,适合于局部施用于皮肤的方法和组合物为软膏、乳剂、洗剂、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂或油的形式。在一些实施方案中,所使用的载体包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇、透皮增强剂及其两种或更多种的组合。

[0204] 在一些实施方案中,适于经皮施用的方法和组合物以适于与受体的表皮保持长时间的紧密接触的离散贴剂的形式存在。

[0205] 在一些实施方案中,适用于经鼻施用或以其他方式施用给受试者的肺的方法和组合物包括任何合适的方式,例如,通过由受试者吸入的包含细菌噬菌体组合物的可吸入颗粒的气雾悬浮液来施用。在一些实施方案中,可吸入颗粒是液体或固体。如本文所用,“气雾剂”包括任何气体悬浮相,其能够被吸入细支气管或鼻道中。在一些实施方案中,液体颗粒的气雾剂通过任何合适的装置产生,例如用压力驱动的气雾剂雾化器或超声雾化器。在一些实施方案中,通过药物领域中已知的技术,用任何固体颗粒药物气雾剂产生器产生包含所述组合物的固体颗粒的气雾剂。

[0206] 在一些实施方案中,适于将本文公开的细菌噬菌体施用至物体表面或受试者的方法和组合物包括水溶液。在一些实施方案中,将这样的水溶液喷雾到物体的表面或受试者上。在一些实施方案中,水溶液用于冲洗和清洁受试者的包含细菌的外来异物形式的物理伤口。

[0207] 在一些实施方案中,以治疗有效量向受试者施用本文公开的细菌噬菌体。在一些实施方案中,将本文公开的至少一种细菌噬菌体组合物配制为药物制剂。在一些实施方案

中,所述药物制剂包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种本文公开的细菌噬菌体。在一些情况下,药物制剂包含本文所述的细菌噬菌体和以下中的至少一种:赋形剂、稀释剂或载体。

[0208] 在一些实施方案中,药物制剂包含赋形剂。赋形剂在美国药学会的《药用赋形剂手册》(1986)中进行了描述,包括但不限于溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂和润滑剂。

[0209] 合适的赋形剂的非限制性实例包括但不限于缓冲剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂、压实剂、润滑剂、螯合剂、分散增强剂、崩解剂、调味剂、甜味剂、着色剂。

[0210] 在一些实施方案中,赋形剂是缓冲剂。合适的缓冲剂的非限制性实例包括但不限于柠檬酸钠、碳酸镁、碳酸氢镁、碳酸钙和碳酸氢钙。在一些实施方案中,药物制剂包含列出的任何一种或多种缓冲剂:碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化镁、乳酸镁、葡萄糖酸镁、氢氧化铝、柠檬酸钠、酒石酸钠、乙酸钠、碳酸钠、多磷酸钠、多磷酸钾、焦磷酸钠、焦磷酸钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸三钠、磷酸三钾、偏磷酸钾、氧化镁、氢氧化镁、碳酸镁、硅酸镁、乙酸钙、甘油磷酸钙、氯化钙、氢氧化钙和其他钙盐。

[0211] 在一些实施方案中,赋形剂是防腐剂。合适的防腐剂的非限制性实例包括但不限于抗氧化剂,例如 α -生育酚和抗坏血酸盐,以及抗微生物剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇和苯酚。在一些实施方案中,抗氧化剂包括但不限于EDTA、柠檬酸、抗坏血酸、丁基羟基甲苯(BHT)、丁基化羟基茴香醚(BHA)、亚硫酸钠、对氨基苯甲酸、谷胱甘肽、没食子酸丙酯、半胱氨酸、蛋氨酸、乙醇和N-乙酰半胱氨酸。在一些实施方案中,防腐剂包括有效霉素A、TL-3、原钒酸钠、氟化钠、N- α -甲苯磺酰基-苯丙氨酸-氯甲基酮、N- α -甲苯磺酰基-赖氨酸-氯甲基酮、抑肽酶、苯甲基磺酰氟化物、氟磷酸二异丙酯、蛋白酶抑制剂、还原剂、烷化剂、抗微生物剂、氧化酶抑制剂或其他抑制剂。

[0212] 在一些实施方案中,药物制剂包含粘合剂作为赋形剂。合适的粘合剂的非限制性实例包括淀粉、预胶凝淀粉、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯基氧杂唑、聚乙烯醇、C₁₂-C₁₈脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、糖、寡糖及其组合。

[0213] 在一些实施方案中,在药物制剂中使用的粘合剂选自淀粉,例如马铃薯淀粉、玉米淀粉、小麦淀粉;糖,例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖、麦芽糊精;天然和合成树脂;明胶;纤维素衍生物,例如微晶纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素;聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮);聚乙二醇(PEG);蜡;碳酸钙;磷酸钙;醇,例如山梨糖醇、木糖醇、甘露糖醇和水或它们的组合。

[0214] 在一些实施方案中,药物制剂包含润滑剂作为赋形剂。合适的润滑剂的非限制性实例包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、氢化植物油、氢化植物油(sterotex)、聚氧乙烯单硬脂酸酯、滑石粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸镁和轻质矿物油。在一些实施方案中,药物制剂中的润滑剂选自金属硬脂酸盐(例如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸铝)、脂肪酸酯(例如硬脂富马酸钠)、脂肪酸(例如硬脂酸)、脂肪醇、山嵛酸甘油酯、矿物油、石蜡、氢化植物油、亮氨酸、聚乙二醇(PEG)、十二烷基金属硫酸盐(例如十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸镁)、氯化钠、苯甲酸钠、乙酸钠和滑石粉或它们的混合物。

[0215] 在一些实施方案中,赋形剂包含调味剂。在一些实施方案中,调味剂包括天然油;

植物、树叶、花和水果的提取物；及其组合。

[0216] 在一些实施方案中，赋形剂包含甜味剂。合适的甜味剂的非限制性实例包括葡萄糖（玉米糖浆）、右旋糖、转化糖、果糖及其混合物（当不用作载体时）；糖精及其各种盐，例如钠盐；二肽甜味剂，例如阿斯巴甜；二氢查尔酮化合物、甘草甜素；甜叶菊（甜菊糖）；蔗糖的氯代衍生物，例如三氯蔗糖；和糖醇，例如山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇等。

[0217] 在一些情况下，药物制剂包含着色剂。合适的着色剂的非限制性实例包括食品、药物和化妆品颜色（FD&C）、药物和化妆品颜色（D&C）以及外部药物和化妆品颜色（Ext. D&C）。

[0218] 在一些实施方案中，本文公开的药物制剂包含螯合剂。在一些实施方案中，螯合剂包括乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸（EDTA）；EDTA的二钠、三钠、四钠、二钾、三钾、二锂和二铵盐；EDTA的钡、钙、钴、铜、镉、钨、铁、钆、镧、镁、锰、镍、钇、锶或锌螯合物。

[0219] 在一些情况下，药物制剂包含稀释剂。稀释剂的非限制性实例包括水、甘油、甲醇、乙醇和其他类似的生物相容性稀释剂。在一些实施方案中，稀释剂是含水酸，例如乙酸、柠檬酸、马来酸、盐酸、磷酸、硝酸、硫酸或类似酸。

[0220] 在一些实施方案中，药物制剂包含表面活性剂。在一些实施方案中，表面活性剂选自但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯（聚山梨酸酯）、月桂基硫酸钠、硬脂富马酸钠、聚氧乙烯烷基醚、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚乙二醇（PEG）、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、多库酯钠、季铵化合物、氨基酸（例如L-亮氨酸）、脂肪酸的糖酯、脂肪酸的甘油酯或其组合。

[0221] 在一些情况下，药物制剂包含另外的药剂。在一些实施方案中，另外的药剂是抗生素剂。在一些实施方案中，抗生素剂是由氨基糖苷类、安沙霉素类、碳头孢烯类、碳青霉烯类、头孢菌素类（包括第一、第二、第三、第四和第五代头孢菌素）、林可酰胺类、大环内酯类、单菌胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、青霉素、磺胺类、多肽或四环素组成的集合。

[0222] 在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是氨基糖苷，例如阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、妥布霉素或巴龙霉素。在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是安沙霉素，例如格尔德霉素或除莠霉素。

[0223] 在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是碳头孢烯，例如氯碳头孢。在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是碳青霉烯，例如厄他培南、多立培南、亚胺培南/西司他丁或美罗培南。

[0224] 在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是头孢菌素类（第一代），例如头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢氨苄、头孢噻吩或头孢金素、或头孢菌素类（第二代）例如头孢克洛、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯或头孢呋辛。在一些实施方案中，抗生素剂是头孢菌素类（第三代），例如头孢克肟、头孢地尼、头孢托伦、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢布烯、头孢唑肟和头孢曲松或头孢菌素（第四代），例如头孢吡肟或头孢比普。

[0225] 在一些实施方案中，本文描述的抗生素剂是林可酰胺类，例如克林霉素和阿奇霉素，或大环内酯类例如阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、红霉素、罗红霉素、醋竹桃霉素、替利霉素和大观霉素。

[0226] 在一些实施方案中，本文描述的抗生素是单菌胺类，例如氨曲南、或硝基咪唑、例如咪唑啉酮或咪唑妥因。

[0227] 在一些实施方案中，本文所述的抗生素剂是青霉素，例如阿莫西林、氨苄青霉素、阿洛西林、羧苄西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、美洛西林、萘夫西林、苯唑西林、青霉

素G或V、哌拉西林、替莫西林和替卡西林。

[0228] 在一些实施方案中,本文所述的抗生素剂是磺酰胺,例如磺胺米隆、2,4-二氨基偶氮苯-4-磺酰胺、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺嘧啶银、磺胺甲二唑、磺胺甲恶唑、磺胺二甲异恶唑、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、三甲氧苄氨嘧啶或三甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异唑(复方增效磺胺(Co-trimoxazole))(TMP-SMX)。

[0229] 在一些实施方案中,本文所述的抗生素剂是喹诺酮,例如环丙沙星、依诺沙星、加替沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、莫西沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、曲伐沙星、格帕沙星、司帕沙星和替马沙星。

[0230] 在一些实施方案中,本文所述的抗生素剂是多肽,例如杆菌肽,黏菌素或多粘菌素B。

[0231] 在一些实施方案中,本文所述的抗生素剂是四环素,例如地美环素、多西环素、米诺环素或土霉素。

剂量

[0232] 本文公开的组合物的施用剂量和持续时间将取决于多种因素,包括受试者的年龄、受试者的体重和噬菌体的耐受性。在一些实施方案中,本文公开的细菌噬菌体通过口服施用来施用给患者。在一些实施方案中,给出了 10^3 至 10^{20} PFU的噬菌体剂量。例如,在一些实施方案中,细菌噬菌体以 10^3 至 10^{11} PFU的量存在于组合物中。在一些实施方案中,细菌噬菌体以约 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、 10^{17} 、 10^{18} 、 10^{19} 、 10^{20} 、 10^{21} 、 10^{22} 、 10^{23} 、 10^{24} PFU或更高的量存在于组合物中。在一些实施方案中,细菌噬菌体以小于10PFU的量存在于组合物中。在一些实施方案中,细菌噬菌体以 10^1 至 10^8 、 10^4 至 10^9 、 10^5 至 10^{10} 或 10^7 至 10^{11} PFU的量存在于组合物中。在一些实施方案中,将细菌噬菌体或混合物每天1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24次施用给有需要的受试者。在一些实施方案中,将细菌噬菌体或混合物每周至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21次施用给有需要的受试者。在一些实施方案中,将细菌噬菌体或混合物每月至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90次施用给有需要的受试者。

[0233] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(细菌噬菌体)在疾病或病况发生之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,施用包含细菌噬菌体的组合物的时间是变化的。在一些实施方案中,药物组合物用作预防剂,并连续地向易患病况或疾病的受试者施用,以防止疾病或病况的发生。在一些实施方案中,在症状发作期间或之后尽快将药物组合物施用于受试者。在一些实施方案中,在症状发作的前48小时内、症状发作的前24小时内、症状发作的前6小时内或症状发作的前3小时内开始施用组合物。在一些实施方案中,通过任何可行的途径(例如通过本文所述的任何途径)、使用本文所述的任何制剂开始施用组合物。在一些实施方案中,在检测到或怀疑疾病或病况发作后,在可行的范围内尽快施用该组合物,并持续必要的一段时间以治疗该疾病,例如从约1个月至大约3个月。在一些实施方案中,治疗的长度将针对每个受试者而变化。

试剂盒

[0234] 本文公开了使用的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含用于CRISPR阵列,转录激活因子和/或抗CRISPR多肽的核酸构建体,以及本文公开的细菌噬菌体和/或任何其他载体/表达盒,其形式适于引入细胞和/或施用于受试者。在一些实施方案中,试剂盒包含其他治疗剂、载体、缓冲液、容器、用于施用的装置等。在一些实施方案中,试剂盒包含用于抑制靶基因表达和/或调节靶基因表达抑制的标记和/或说明书。在一些实施方案中,标记和/或说明书包括例如关于用于CRISPR阵列、转录激活因子和抗CRISPR多肽的核酸构建体以及细菌噬菌体和/或任何其他载体/表达盒的引入和/或施用的量、频率和方法的信息。

[0235] 在一些实施方案中,提供了一种用于杀灭一种靶细菌的试剂盒,所述试剂盒包括、基本上由以下组成、由以下组成:用于CRISPR阵列、转录激活因子和/或抗CRISPR多肽的核酸构建体以及细菌噬菌体和/或通过本文公开的任何实施方案实现杀灭靶细菌所必需的任何其他载体/表达盒。

[0236] 在一些实施方案中,提供了用于调节靶细菌中的CRISPR-Cas系统的活性的试剂盒,该试剂盒包括、基本上由以下组成、由以下组成:用于CRISPR阵列、转录激活因子和抗CRISPR多肽的核酸构建体,以及细菌噬菌体和/或通过本文公开的任何实施方案实现靶细菌中的CRISPR-Cas系统的调节所必需的任何其他载体/表达盒。

[0237] 在一些实施方案中,用于所述试剂盒的CRISPR阵列、转录激活因子和/或抗CRISPR多肽的核酸构建体包含在单个载体或表达盒中或在分开的载体或表达盒中或在单个细菌噬菌体或多个细菌噬菌体中。在一些实施方案中,试剂盒包含本文公开的一种或多种细菌噬菌体。在一些实施方案中,试剂盒包含使用说明书。在一些实施方案中,用于实施该方法的说明书被记录在合适的记录介质上。在一些实施方案中,说明书被印刷在诸如纸或塑料等的基质上。在一些实施方案中,说明书在试剂盒中作为包装插页、在试剂盒的容器或其组件的标签中(即,与包装或分装相关联)等存在。在一些实施方案中,说明书作为电子存储数据文件存在,该电子存储数据文件存在于合适的计算机可读存储介质上,例如CD-ROM、软盘、闪存驱动器等。在一些实施方案中,试剂盒中不存在实际的说明书,但是提供了用于从远程源(例如,经由互联网)获得说明书的装置。在一些实施方案中,该试剂盒包括网址,在该网址上可以查看和/或从中下载说明书。

[0238] 现在将参考以下实施例描述本文公开的某些实施方案,无论是其方法还是其组合物。应当理解,这些实施例并非旨在将权利要求的范围限制于本公开内容,而是旨在作为某些实施方案的示例。本领域技术人员想到的示例性方法的任何变化都将落入本公开内容的范围内。

实施例

实施例1:产生CRISPR增强的噬菌体的概述

[0239] CRISPR增强的噬菌体是被工程化以从维持必需基因裂解生活方式的细菌噬菌体基因组表达CRISPR RNA构建体的噬菌体。涉及的步骤是获得、分离和鉴定针对细菌具有广泛宿主范围的细菌噬菌体和细菌噬菌体混合剂,然后工程化每种噬菌体以携带靶向细菌基因组的表达构建体(例如crRNA),并验证待用作临床主要候选物的cr噬菌体的优化组合。在一些实施方案中,一般过程如图1的步骤1-5示意性所示。步骤1-5旨在识别合适数量的野生型细菌噬菌体,从而使它们:

[0240] 1.符合下表1中提出的最低质量标准(缺乏溶原性、毒力基因或抗生素抗性基因):

表1:细菌噬菌体特征总结

测试/表征	方法
基因组大小(kb)	基因组测序
有尾噬菌体科	透射电子显微镜检查
宿主范围活性	针对尿道致病性大肠杆菌临床分离株和代表性大肠杆菌菌株的宿主范围分析
基因组序列	基因组测序
DNA 限制图谱	限制酶消化/电泳
分型	特异于工程化插入的 PCR
生活方式(裂解、温和)	DNA 分析
广义转导的缺失	微生物转导测定
毒力基因的缺失	基因组序列分析
抗生素抗性的缺失	基因组序列分析

[0241] 2.对大约90%或更多的临床隔离组具有总体活性。

[0242] 3.导致每种菌株被混合剂(两种或多种噬菌体的混合物)中的至少2种细菌噬菌体感染,旨在确保在对任何单个细菌噬菌体有抗性的事件下,菌株对混合剂的敏感性。在一些实施例中,本文所述的混合剂包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100或更多种细菌噬菌体。

[0243] 4.包括每种候选细菌噬菌体的基因工程,以表达来自野生型基因组的crRNA构建体。每种工程化的细菌噬菌体均旨在保留裂解活性。然后将cr噬菌体进行体外分析以评估宿主范围和体外功效。这些研究旨在证实,如果通过缺少生产性裂解感染转导致死的crRNA构建体的能力不扩大宿主范围,则cr噬菌体可以保留较宽的宿主范围,也可以提高每种cr噬菌体对同源野生型细菌噬菌体的致死率。

[0244] 5.确定用于混合剂的cr噬菌体,这些混合剂经过优化可改善宿主范围、制造限制或非临床功效。

实施例2:噬菌体分离

[0245] 细菌噬菌体载体从北卡罗莱纳州的环境来源获得。通过与尿道致病性大肠杆菌 ECOR 14、62、64和71共孵育,直接从这些样品中分离出噬菌体。然后在扩增、过滤和在4摄氏度下长期储存之前,通过在整个三轮双层琼脂覆盖物中通过单噬斑分离对每种细菌噬菌体进行克隆纯化。将每种噬菌体扩增、过滤、进行氯化铯梯度纯化并渗入1×tris缓冲盐水中。使用基于柱的噬菌体DNA制备试剂盒(Norgen)从纯化的噬菌体原液中提取噬菌体基因组DNA,并根据需要通过MiSeq或PacBio测序提交基因组测序,并在第三方供应商(Genewiz)进行组装。获得了先前分离的噬菌体K1F,该噬菌体先前已证明可感染尿道致病性大肠杆菌分离株并具有已知的基因组(K1F:NC_007456)。

实施例3:噬菌体宿主范围分析

[0246] 该野生型细菌噬菌体文库针对大肠杆菌群的复制和裂解每个靶标的的能力进行了个性化表征。预计该过程将导致野生型细菌噬菌体群裂解大约90%的尿道致病性大肠杆菌组,并在24小时攻击研究中显示出最小的抗性。从该主文库中,产生了一个简化的野生型细菌噬菌体文库,该文库具有针对约90%的尿道致病性大肠杆菌组的预测活性。

[0247] 测试每种噬菌体对进化上广泛的大肠杆菌的裂解活性。简而言之,将噬菌体生产至高滴度(10⁹-10¹¹PFU/mL)、过滤并使其悬浮在生长培养基中。每个靶标宿主都生长到对数中期,并掺入软琼脂覆盖物中以形成细菌菌苔。将噬菌体系列稀释至约10³-10⁵PFU/mL,并将每种稀释液的5微升点种在每个细菌菌苔上。宿主对每种噬菌体的敏感性定义为每个斑点内任何可观察到的清除区。在一些情况下,这种分析包括一些细菌噬菌体,这些细菌噬菌体吸附到靶标宿主上,并引起由生产性裂解感染引起的称为外溶菌作用而不是内溶菌作用的现象。但是,我们有意选择不排除这些数据点的假设是,即使在没有生产性裂解感染的情况下,吸附引起的外溶菌作用仍允许DNA转导。

[0248] 从该初步分析中,选择了共同感染了在组中检测的18个分离株中的17个(94%)分离株的10个噬菌体,包括从人类患者中分离出的4个尿致病菌,如下表2所示。如突出显示的那样,对噬菌体进行分离或针对ECOR 14、62、64或71对其进行测试,然后针对所示的较宽组进行测试。重要的是,细菌噬菌体宿主范围被认为是所有生产性裂解事件,包括由外溶菌作用引起的事件。

表2:分离的噬菌体针对多种大肠杆菌组的宿主范围分析。

	噬菌体										每种菌株分离的噬菌体的数目
	φECOR71-2	φECOR71-3	φECOR71-4	φECOR71-5	φECOR71-6	φECOR71-7	φECOR71-8	φECOR71-10	φECOR14-1	φK1F	
ECOR2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3/10
ECOR5	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	4/10
ECOR14(UTI分离株)	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3/10
ECOR21	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3/10
ECOR27	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3/10
ECOR29	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3/10
ECOR35	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3/10
ECOR36	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3/10
ECOR41	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4/10
ECOR47	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	8/10
ECOR51	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3/10
ECOR56	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	6/10
ECOR58	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3/10
ECOR62(UTI分离株)	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	6/10
ECOR64(UTI分离株)	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6/10
ECOR71(UTI分离株)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	9/10
EV36	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	7/10
CFT073(UPPEC菌株)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
对噬菌体敏感的菌株的数目	9/18	12/18	3/18	3/18	4/18	13/18	12/18	8/18	8/18	5/18	
对噬菌体敏感的菌株的百分比	50%	67%	17%	17%	22%	72%	67%	44%	44%	28%	

灰色阴影行显示了针对尿道致病性大肠杆菌分离株的初步宿主范围覆盖。

实施例4:分离噬菌体的初级耐药性

[0249] 使用该简化文库中对多种野生型细菌噬菌体敏感的选定大肠杆菌,然后在与攻击性噬菌体孵育过夜后,评估单个细菌噬菌体在未处理宿主中产生抗性克隆的能力。将每个野生型细菌噬菌体的明显抗性菌落克隆分离,并用原始细菌噬菌体和文库中的其他细菌噬菌体再次攻击。这些数据被用来告知哪些细菌噬菌体可能产生快速的初级耐药性,定义为用相同的细菌噬菌体再次攻击后的稳定耐药性表型。通过检查在包含攻击的细菌噬菌体的培养基在24小时培养期间的生长曲线,稳定的耐药性表型没有表现出明显的裂解。在50%以上的克隆中产生初级耐药性的细菌噬菌体被排除在进一步研究之外。然后,进一步的表征步骤测量每个克隆对简化文库中其他野生型细菌噬菌体的敏感性。

[0250] 通过发酵、过滤和≥10¹⁰PFU/mL滴度的验证,所有噬菌体原液均在生长培养基中以野生型、野生型细菌噬菌体的粗裂解物的形式产生。为确定拟议的10种噬菌体混合剂中每种野生型细菌噬菌体的经验耐药性谱,通过将~108个大肠杆菌宿主菌落形成单位与高滴度裂解物(>10⁸PFU,MOI>1.0)在双层琼脂覆盖物中一起孵育,生成了特定宿主的推定抗性克隆:噬菌体配对。培养过夜后,通过三菌落纯化分离推定抗性克隆。长大后,将每个克隆来自简化的10个噬菌体混合剂的每个原始噬菌体进行攻击。值得注意的是,许多具有明显

耐药性表型(被定义为初始攻击后的存活)的克隆,在缺乏噬菌体攻击的情况下在生长后明显恢复了敏感性,如下表3所示:

表3:所选cr噬菌体对大肠杆菌ECOR71的耐药性谱数据。

噬菌体:宿主克隆	复制	平板 ID	71-2	71-3	71-4	71-5	71-6	71-7	71-8	71-10	14-1	KIF
71-2	1	ECOR71:φECOR71-2-R1	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	R	S
71-2	2	ECOR71:φECOR71-2-R2	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	S	S
71-2	3	ECOR71:φECOR71-2-R3	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	S	T
71-2	4	ECOR71:φECOR71-2-R4	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	S	S
71-2	5	ECOR71:φECOR71-2-R5	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	S	S
71-2	6	ECOR71:φECOR71-2-R6	<u>R</u>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
71-2	7	ECOR71:φECOR71-2-R7	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	S	S	S
71-2	8	ECOR71:φECOR71-2-R8	<u>R</u>	S	R	R	R	S	S	R	R	T
71-3	1	ECOR71:φECOR71-3-R1	R	<u>S</u>	S	R	R	S	S	S	S	T
71-3	2	ECOR71:φECOR71-3-R2	R	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S	S
71-3	3	ECOR71:φECOR71-3-R3	R	<u>S</u>	S	R	R	S	S	S	S	S
71-3	4	ECOR71:φECOR71-3-R4	R	<u>S</u>	S	R	S	S	R	R	R	R
71-3	5	ECOR71:φECOR71-3-R5	R	<u>S</u>	S	R	R	S	R	S	S	S
71-3	6	ECOR71:φECOR71-3-R6	R	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S	S
71-3	7	ECOR71:φECOR71-3-R7	R	<u>S</u>	S	R	R	S	S	R	S	S
71-3	8	ECOR71:φECOR71-3-R8	R	<u>S</u>	S	R	R	S	S	S	S	S
71-4	1	ECOR71:φECOR71-4-R1	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-4	2	ECOR71:φECOR71-4-R2	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-4	3	ECOR71:φECOR71-4-R3	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S

71-4	4	ECOR71:φECOR71-4-R4	S	S	<u>S</u>	S	S	S	R	S	S	S
71-4	5	ECOR71:φECOR71-4-R5	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-4	6	ECOR71:φECOR71-4-R6	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-4	7	ECOR71:φECOR71-4-R7	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-4	8	ECOR71:φECOR71-4-R8	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S	S
71-5	1	ECOR71:φECOR71-5-R1	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S
71-5	2	ECOR71:φECOR71-5-R2	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S
71-5	3	ECOR71:φECOR71-5-R3	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S
71-5	4	ECOR71:φECOR71-5-R4	S	S	S	<u>S</u>	S	S	T	S	S	S
71-5	5	ECOR71:φECOR71-5-R5	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S
71-5	6	ECOR71:φECOR71-5-R6	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S	S
71-5	7	ECOR71:φECOR71-5-R7	S	S	S	<u>S</u>	S	S	R	S	S	S
71-5	8	ECOR71:φECOR71-5-R8	S	S	S	<u>S</u>	S	S	R	S	S	S
71-6	1	ECOR71:φECOR71-6-R1	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S
71-6	2	ECOR71:φECOR71-6-R2	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S
71-6	3	ECOR71:φECOR71-6-R3	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
71-6	4	ECOR71:φECOR71-6-R4	S	S	S	S	<u>S</u>	S	R	S	S	S
71-6	5	ECOR71:φECOR71-6-R5	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	R	S
71-6	6	ECOR71:φECOR71-6-R6	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S
71-6	7	ECOR71:φECOR71-6-R7	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S
71-6	8	ECOR71:φECOR71-6-R8	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	S	S
71-7	1	ECOR71:φECOR71-7-R1	R	X	X	X	X	<u>X</u>	X	S	X	X
71-7	2	ECOR71:φECOR71-7-R2	R	S	S	R	R	<u>S</u>	S	S	S	S
71-7	3	ECOR71:φECOR71-7-R3	R	S	S	R	R	<u>S</u>	S	S	S	S
71-7	4	ECOR71:φECOR71-7-R4	R	S	R	R	R	<u>S</u>	S	S	S	S
71-7	5	ECOR71:φECOR71-7-R5	R	S	S	R	R	<u>S</u>	R	R	S	S
71-7	6	ECOR71:φECOR71-7-R6	R	S	R	R	R	<u>S</u>	S	S	S	S
71-7	7	ECOR71:φECOR71-7-R7	R	S	R	R	R	<u>S</u>	S	S	S	S
71-7	8	ECOR71:φECOR71-7-R8	R	R	S	R	R	<u>S</u>	R	R	R	S
71-8	1	ECOR71:φECOR71-8-R1	R	S	R	X	R	X	<u>X</u>	X	X	X
71-8	2	ECOR71:φECOR71-8-R2	R	S	R	R	R	S	<u>T</u>	S	S	S
71-8	3	ECOR71:φECOR71-8-R3	R	S	X	R	X	R	<u>X</u>	X	X	X
71-8	4	ECOR71:φECOR71-8-R4	R	S	R	R	R	S	<u>S</u>	S	T	S
71-8	5	ECOR71:φECOR71-8-R5	R	R	S	R	R	S	<u>R</u>	R	S	S
71-8	6	ECOR71:φECOR71-8-R6	R	S	R	R	R	S	<u>S</u>	S	S	S
71-8	7	ECOR71:φECOR71-8-R7	R	S	S	R	R	S	<u>S</u>	S	S	S
71-8	8	ECOR71:φECOR71-8-R8	R	S	S	R	R	S	<u>R</u>	R	R	S
71-10	1	ECOR71:φECOR71-10-R1	R	S	S	S	S	S	S	<u>S</u>	X	S
71-10	2	ECOR71:φECOR71-10-R2	R	X	X	R	X	S	X	<u>S</u>	X	R
71-10	3	ECOR71:φECOR71-10-R3	R	S	S	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S
71-10	4	ECOR71:φECOR71-10-R4	R	S	S	R	S	S	S	<u>S</u>	S	S
71-10	5	ECOR71:φECOR71-10-R5	R	S	R	R	R	S	S	<u>R</u>	S	S
71-10	6	ECOR71:φECOR71-10-R6	R	S	R	R	R	S	S	<u>S</u>	S	S
71-10	7	ECOR71:φECOR71-10-R7	R	S	S	S	S	S	S	<u>X</u>	S	S
71-10	8	ECOR71:φECOR71-10-R8	R	S	S	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S

14-1	1	ECOR71:φECOR14-1-R1	R	S	S	R	R	R	S	S	R	X
14-1	2	ECOR71:φECOR14-1-R2	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
14-1	3	ECOR71:φECOR14-1-R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14-1	4	ECOR71:φECOR14-1-R4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14-1	5	ECOR71:φECOR14-1-R5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14-1	6	ECOR71:φECOR14-1-R6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14-1	7	ECOR71:φECOR14-1-R7	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
14-1	8	ECOR71:φECOR14-1-R8	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KIF	1	EV36:φK1F-R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KIF	2	EV36:φK1F-R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KIF	3	EV36:φK1F-R3	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
KIF	4	EV36:φK1F-R4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KIF	5	EV36:φK1F-R5	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
KIF	6	EV36:φK1F-R6	S	T	R	R	R	R	S	S	S	S
KIF	7	EV36:φK1F-R7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KIF	8	EV36:φK1F-R8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X

R:耐药性;S:敏感;T:暂时的(最初定义为敏感,随后出现耐药性表型);X:未确定;灰色阴影框表示来自克隆的结果,这些克隆使用用于分离原始推定抗性克隆的所示细菌噬菌体再次攻击。

[0251] 在其他情况下,容易鉴定出对原始攻击噬菌体具有稳定表型耐药性的单个克隆。然而,这些克隆中的每一个虽然对原始的野生型噬菌体均具有耐药性,但仍保留了对组中至少一种细菌噬菌体的敏感性。每次初始噬菌体攻击仅测试一个。在一些情况下,噬菌体和单个噬菌体的耐药性谱图会根据测试而发生变化。

实施例5:鉴定混合剂的主要细菌噬菌体

[0252] 使用来自各个野生型噬菌体宿主范围的数据和表2和表3中的耐药性结果针对以下参数分别评估潜在的野生型细菌噬菌体及其组合:1)噬菌体对大约90%或更高的临床分离株组具有总体活性;2)噬菌体导致每种被混合剂内至少2种噬菌体感染,以确保在对任何单一细菌噬菌体有耐药性的事件下对混合剂的敏感性;3)噬菌体在超过50%的经分离的克隆中不产生初级耐药性,初级耐药性定义为在单个噬菌体攻击后逃逸克隆的出现,这些克隆在克隆生长和再攻击后仍保留对特定噬菌体的耐药性,最后是4)噬菌体不会与混合剂中的所有其他噬菌体产生交叉耐药性,定义为初始攻击和克隆生长后逃逸克隆的出现,这些克隆表现出对初始攻击噬菌体的持续耐药性和对拟议混合剂中克隆以前未经处理的其他细菌噬菌体的新耐药性。

[0253] 将表2中所示的野生型细菌噬菌体组合(累计宿主范围约为94%)与表3中所示的耐药性进行了比较。从这些数据中,并根据上述优化参数,当针对一组18种(每一种对5个噬菌体中的至少2种具有敏感性)遗传多样的大肠杆菌分离株进行测试时,已鉴定出五种候选细菌噬菌体,其宿主范围覆盖率约为94%。预计每种野生型噬菌体会产生小于50%的显示出初级耐药性的克隆,而没有克隆对拟议混合剂中的所有噬菌体均显示出耐药性。这些数据总结在表4、表5和表6中,构成了cr噬菌体混合剂初步开发的基础。设计单个crRNA表达构建体,使得其指导大约78%的经评估的大肠杆菌基因组(n=625)中存在的I-E型和I-F型CRISPR-Cas3系统的活性,以靶向宿主大肠杆菌染色体的多个高度保守的基因座,所述基因座共同存在于>99%的评估基因组中。通过转化到大肠杆菌分离株中以体外验证每个个体

的crRNA,以证明每个个体crRNA对靶向大肠杆菌序列的活性。然后将这些crRNA组装成从细菌噬菌体基因组表达的阵列,并通过内源CRISPR-Cas系统加工以靶向宿主染色体。

[0254] 如表1所示,目前正在评估拟议的野生型细菌噬菌体是否缺乏溶原性、毒力基因或抗生素抗性基因。

表4:建议的cr噬菌体混合剂的5种单独细菌噬菌体的宿主范围。

	φECOR71-3	φECOR71-7	φECOR71-10	φECOR14-1	φK1F***	混合剂中敏感噬菌体的数目
大肠杆菌菌株	ECOR2	1	1	0	0	2/5
	ECOR5	1	1	0	0	2/5
	ECOR14 (UTI分离株)	0	0	1	1	2/5
	ECOR21	1	1	0	0	2/5
	ECOR27	1	1	0	0	2/5
	ECOR29	1	1	0	0	2/5
	ECOR35	0	0	0	1	2/5
	ECOR36	0	0	0	1	2/5
	ECOR41	0	0	1	1	3/5
	ECOR47	1	1	1	1	4/5
	ECOR51	0	1	1	0	2/5
	ECOR56	1	1	1	1	4/5
	ECOR58	1	1	0	0	2/5
	ECOR62 (UTI分离株)	1	1	1	0	4/5
	ECOR64 (UTI分离株)	1	1	0	0	2/5
	ECOR71 (UTI分离株)	1	1	1	1	5/5
	EV36	1	1	1	1	5/5
	CFT073 (UPEC菌株)	0	0	0	0	0/5
对噬菌体敏感的菌株的数目	12/18	13/18	8/18	8/18	6/18	17/18
对噬菌体敏感的菌株的百分比	67%	72%	44%	44%	33%	94.4%

灰色阴影行显示了针对尿道致病性大肠杆菌分离株的初步宿主范围覆盖。

表5:建议的cr噬菌体混合剂的5种单独细菌噬菌体的耐药性图谱。

(根据表3中观察到的ECOR71对φK1F的敏感性对表2进行了修订)

初始攻击噬菌体/明显耐药性的克隆			用所示噬菌体再次攻击后的敏感性				
噬菌体		耐 药 性 的 克 隆	φECOR71-3	φECOR71-7	φECOR71-10	φECOR14-1	φK1F
φECOR71-3	ECOR71	1	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	2	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	3	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	4	Y	Y	N	N	N
φECOR71-3	ECOR71	5	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	6	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	7	Y	Y	N	Y	Y
φECOR71-3	ECOR71	8	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	1	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	2	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	3	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	4	Y	Y	N	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	5	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	6	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-7	ECOR71	7	N	Y	N	N	Y
φECOR71-10	ECOR71	1	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-10	ECOR71	2	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-10	ECOR71	3	Y	Y	N	Y	Y
φECOR71-10	ECOR71	4	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR71-10	ECOR71	5	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	1	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	2	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	3	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	4	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	5	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	6	Y	Y	Y	Y	Y
φECOR14-1	ECOR71	7	Y	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	1	Y	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	2	Y	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	3	Y	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	4	Y	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	5	N	Y	Y	Y	Y
φK1F	EV36	6	Y	N	Y	Y	Y
φK1F	EV36	7	Y	Y	Y	Y	Y

灰色阴影框表示用表示的细菌噬菌体再次攻击的克隆的结果,该细菌噬菌体用于分离最初的推定抗性克隆。

表6: 建议的cr噬菌体混合剂的5种单独细菌噬菌体的汇总数据。

组分名称	噬菌体	宿主范围		耐药性数据			
		# s	% s	# 初始抗性克隆*	# 总克隆*	% 初始耐药性*	每**的最小噬菌体#
LBx-UT01-ECΦ1	φECOR71-3	12/18	66.7%	0	8	0.0%	2
LBx-UT01-ECΦ2	φECOR71-7	13/18	72.2%	0	7	0.0%	2
LBx-UT01-ECΦ3	φECOR71-10	8/18	44.4%	1	7	14.3%	4
LBx-UT01-ECΦ4	φECOR14-1	8/18	44.4%	1	8	12.5%	5
LBx-UT01-ECΦ5	φK1F	6/18	33.3%	0	7	0.0%	4
LBx-UT01	混合剂	17/18	94.4%				

*对于初始攻击噬菌体的耐药性,排除了无法确定噬菌体敏感性数据的单个数据点(N=3)。

**对于混合剂敏感性,由于无法确定某些单个噬菌体文库数据点,因此排除6个耐药性分离株的数据(N=6)。

[0255] 下表7进一步总结了拟议的cr噬菌体混合剂:

表7:建议的初步cr噬菌体混合剂汇总。

cr 噬菌体名称	噬菌体类型	复制宿主	分离来源	建议的浓度
LBx-UT01-ECΦ1	专性裂解	大肠杆菌菌株 ECOR71	Durham, NC 废水处理厂	10 ⁹ - 10 ¹¹ PFU/mL
LBx-UT01-ECΦ2	专性裂解	大肠杆菌菌株 ECOR71	Durham 废水处理厂	10 ⁹ - 10 ¹¹ PFU/mL
LBx-UT01-ECΦ3	专性裂解	大肠杆菌菌株 ECOR71	Durham 废水处理厂	10 ⁹ - 10 ¹¹ PFU/mL
LBx-UT01-ECΦ4	专性裂解	大肠杆菌菌株 ECOR71	Durham 废水处理厂	10 ⁹ - 10 ¹¹ PFU/mL
LBx-UT01-ECΦ5	专性裂解	大肠杆菌菌株 EV36	外部来源 (K1F 噬菌体)	10 ⁹ - 10 ¹¹ PFU/mL

[0256] 拟议的cr噬菌体混合剂的crRNA阵列组成如下表8所示:

表8:单个crRNA信息汇总。

阵列	crRNA 名称	兼容的 Cas 系统	靶基因名称	靶基因功能	靶序列	PAM
LBx-UT01-EC-IEa	LBx-UT01-E C-IE_间隔子 1	Type I-E	<i>acpP</i>	脂质生物合成	SEQ ID NO. 3 ATCCGGACGAAGAAGCTGAGAA AATCACCAC	GAG
LBx-UT01-EC-IEa	LBx-UT01-E C-IE_间隔子 2	Type I-E	<i>gapA1</i>	糖酵解	SEQ ID NO. 4 TATCAACGGTTTGGCCGTATCGG TCGCATTG	AGG
LBx-UT01-EC-IEa	LBx-UT01-E C-IE_间隔子 3	Type I-E	<i>secY1</i>	分泌	SEQ ID NO. 5 TGCAAACCTCTGATGATGTCCAGTC AGTATGAG	AAG
LBx-UT01-	LBx-UT01-E	Type I-E	<i>tsf</i>	翻译	SEQ ID NO. 6	GAG
EC-IEa	C-IE_间隔子 4				AAAATGGTTGAAGGCCGCATGAA GAAATTCAC	
LBx-UT01-EC-IFa	LBx-UT01-E C-IF_间隔子 1	Type I-F	<i>csrA</i>	糖酵解	SEQ ID NO. 7 AGGCTGAAAAATCCCAGCAGTCC AGTTACTA	CC
LBx-UT01-EC-IFa	LBx-UT01-E C-IF_间隔子 2	Type I-F	<i>ftsA</i>	细胞分裂	SEQ ID NO. 8 GTATTATTCGACGGCGGTGGGATT GCTTCAC	CC
LBx-UT01-EC-IFa	LBx-UT01-E C-IF_间隔子 3	Type I-F	<i>ftsA</i>	翻译	SEQ ID NO. 9 AAAGCTGACCAGGAAAAAATGGG TCTGGCTC	CC
LBx-UT01-EC-IFa	LBx-UT01-E C-IF_间隔子 4	Type I-F	<i>secY</i>	分泌	SEQ ID NO. 10 GCTTTATGTGTTACTCTATGCGTCT GCAATC	CC

实施例6:优化CRISPR阵列的致死率

[0257] 为了开发有效的CRISPR增强的艰难梭菌细菌噬菌体,对CRISPR阵列进行了各种修饰。

[0258] 图2A显示了来自五个艰难梭菌菌株中的经鉴定的CRISPR-Cas系统的线性比对的示意图,并鉴定了各种CRISPR-Cas的组成组分。图2B中进一步图示了菌株630和R20291的CRISPR-Cas系统操纵子结构。

[0259] 靶向cr噬菌体的艰难梭菌中的初始crRNA阵列包含来自艰难梭菌630或R20291的CRISPR阵列的天然前导序列,其与来自发现于艰难梭菌中的天然CRISPR阵列的共有重复序列组合。间隔序列由艰难梭菌中的内源I-B型系统的共有PAM序列定义,并与三种选定的艰

难梭菌靶标宿主基因互补,所述宿主基因包括:dmsB、phif和phi2。测试了两个另外的构型,包括:使用内源性烯醇酶启动子代替天然前导序列和crRNA阵列,其中改变了第二重复序列以促进IDT合成(R2 A>G)。因此,用于工程化细菌噬菌体的CRISPR-RNA的构型是前导序列-重复序列-间隔序列-重复序列。工程化的细菌噬菌体是通过使用天然化的质粒进行梭菌的遗传操作,在天然细菌宿主中作为溶原性细菌,通过同源重组产生的。

[0260] 艰难梭菌菌株630和R20291在无氧环境中于37°C的脑心浸液(BHI)培养基中过夜生长,然后继代培养到5mL浓度为1% (体积/体积) 接种物的新鲜BHI中。然后在开始CFU减少测定法之前,将艰难梭菌菌株孵育至OD为0.2。如前所述进行细菌噬菌体的所有制备和处理。向每种培养物中添加最终浓度为10mM MgCl₂和1mM CaCl₂的总MOI为10的野生型或CRISPR噬菌体裂解物。然后在6小时的过程中监测OD和CFU。

[0261] 同样,CRISPR阵列中重复序列核苷酸组成的改变对crRNA的整体致死率具有边际影响。艰难梭菌菌株630的SEQ ID NO: 11-5' -GTTTTATATTATACTATATGGAATGTAAAT-3' 因含有CRISPR天然前导序列的crRNA的单点核苷酸突变而变化艰难梭菌630或R20291的阵列或内源性烯醇酶基因启动子以及与dmsB或难辨梭状芽胞杆菌宿主基因互补的间隔子。预期重复序列的变化会改变发夹二级结构,从而影响总体crRNA活性。下表9总结了各种构建体的crRNA致死率的变化。

表9: crRNA阵列重复序列的改变影响crRNA的致死率。

间隔子	启动子	长度	重复两次 (改动加了下划线)	Δlog
<i>dmsB</i>	前导序列	36	SEQ ID NO. 12 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAAT	0.15
<i>dmsB</i>	烯醇酶	36	SEQ ID NO. 12 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAAT	0.01
<i>dmsB</i>	前导序列	36	SEQ ID NO. 13 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	0.00
<i>int</i>	前导序列	36	SEQ ID NO. 14 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	0.44
<i>int</i>	前导序列	36	SEQ ID NO. 15 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TAT <u>G</u> TGGAATGTAAAT	
<i>int</i>	前导序列	34	SEQ ID NO. 16 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	
<i>int</i>	前导序列	35	SEQ ID NO. 17 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	
<i>int</i>	前导序列	37	SEQ ID NO. 18 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	
<i>int</i>	前导序列	38	SEQ ID NO. 19 GTTTTAGATTA <u>ACT</u> TATATGGAATGTAAGT	

实施例7: cr噬菌体具有增强的杀灭活性

[0262] 针对大肠杆菌和艰难梭菌的CRISPR增强的细菌噬菌体是由不同的专性裂解细菌噬菌体开发而成,所述专性裂解细菌噬菌体含有相同的DNA序列,该序列编码嵌入野生型噬菌体基因组的功能性自靶向CRISPR RNA。如图3A所示,用天然的未修饰的噬菌体处理含有10¹⁰个细菌细胞的大肠杆菌培养物,通过噬菌体的裂解活性导致细菌细胞减少5个对数。用修饰的cr噬菌体处理可进一步将大肠杆菌的杀灭活性提高约5个对数。在一些情况下,抗微生物活性的提高独立于噬菌体的固有裂解活性,而是CRISPR阵列本身的抗微生物活性的结

果。如图3B所示,用CRISPR阵列处理显示细菌细胞群减少了约7个对数。

[0263] 类似地,用天然的未修饰的噬菌体处理含有约 10^8 个细菌细胞的艰难梭菌培养物,由于噬菌体的裂解活性,导致细菌细胞减少了几乎约1.5个对数。如图4A所示,当用修饰的cr噬菌体处理时,细菌细胞的杀灭活性进一步降低了1个对数。在一些情况下,抗微生物活性的提高独立于噬菌体固有的裂解活性,而是CRISPR阵列本身的抗微生物活性的结果。如图4B所示,用CRISPR阵列处理仅显示艰难梭菌细胞群减少了约3.5个对数。

实施例8:cr噬菌体扩大了宿主范围并具有相关的杀灭活性

[0264] 将相同浓度的野生型或cr噬菌体点种到接种有艰难梭菌菌株069的琼脂平板上,以鉴定cr噬菌体敏感性。如图5所示,艰难梭菌细菌菌苔平板上噬菌斑的存在用于鉴定对cr噬菌体 ϕ CD146杀灭敏感但对野生型噬菌体 ϕ CD146不敏感的艰难梭菌菌株。通过cr噬菌体 ϕ CD146而不是野生型噬菌体 ϕ CD146引起的细胞死亡表明细菌细胞死亡独立于基于噬菌体的裂解活性。反而,通过CRISPR阵列代表艰难梭菌菌株的细菌细胞死亡,所述艰难梭菌菌株对裂解噬菌体 ϕ CD146感染天然不敏感。crRNA阵列使用靶向R20291-3。

实施例9:cr噬菌体在广泛的艰难梭菌菌株中具有增强的杀灭活性

[0265] 确定了cr噬菌体在一组艰难梭菌菌株上有效的能力。通过整合艰难梭菌R20291的CRISPR阵列的天然前导序列,然后与艰难梭菌中发现的天然CRISPR阵列的共有重复序列结合起来设计CRISPR-RNA。由艰难梭菌中的内源性I-B型系统的共有PAM序列来定义间隔序列,长度由艰难梭菌中的内源性CRISPR阵列中发现的最具代表性的间隔子长度决定。因此,用于工程化细菌噬菌体的CRISPR-RNA的构型是前导序列-重复序列-间隔序列-重复序列。工程化的细菌噬菌体是通过使用天然化的质粒进行梭菌的遗传操作,在天然细菌宿主中作为溶原性细菌,通过同源重组产生的。

[0266] 艰难梭菌菌株在无氧环境中于37℃的脑心浸液(BHI)培养基中过夜生长,然后继代培养到5mL浓度为1% (体积/体积) 接种物的新鲜BHI中。然后孵育艰难梭菌菌株,直到OD降低试验的OD为0.1和CFU降低试验的OD为0.2。如前所述进行细菌噬菌体的所有制备和处理。向每种培养物中加入最终浓度为10mM $MgCl_2$ 和1mM $CaCl_2$ 的总MOI为10的野生型或CRISPR噬菌体裂解物。然后在6小时的过程中监测OD和CFU。

[0267] 如图6A-图6V所示,通过针对cr噬菌体 ϕ CD146的艰难梭菌菌株1-22的光密度(OD600nm)来测量针对两种cr噬菌体变体的野生型噬菌体的比较。如图7A-图7C所示,同样针对艰难梭菌菌株23-25测试了另外的变体cr噬菌体 ϕ CD24-2。

[0268] 使用菌落形成单位(CFU)计数进一步检查了所选菌株的子集,以比较cr噬菌体 ϕ CD146和2的细菌杀灭活性。图8A-图8D示出了艰难梭菌菌株1-4针对野生型和cr噬菌体 ϕ CD146的CFU测定。图9示出了菌株CD19针对野生型和cr噬菌体 ϕ CD24-2的CFU测定。图10中测试了cr噬菌体 ϕ CD146和cr噬菌体 ϕ CD24-2的组合比较。对cr噬菌体 ϕ CD146和cr噬菌体 ϕ CD24-2针对每种cr噬菌体以及当一起施用时的抗菌活性进行了CFU测定。与同时使用两种野生型噬菌体一起治疗相比,共同施用显示出更高的杀灭功效。尽管与野生型噬菌体 ϕ CD146相比,野生型噬菌体 ϕ CD24-2表现出更强的抗菌杀灭活性,但将其联合使用时,其杀灭组合功效显著降低。这表明野生型 ϕ CD146细菌噬菌体可能干扰野生型噬菌体 ϕ CD24-2的活性。然而,与野生型噬菌体 ϕ CD24-2本身的细菌杀灭能力相比,cr噬菌体 ϕ CD146和cr噬菌体 ϕ CD24-2的组合显示出略微提高的细菌杀灭能力。

[0269] 为了评价MOI对细菌生长的影响,艰难梭菌R20291的培养物在0至16的各种MOI下生长并接种了野生型 ϕ CD146或cr噬菌体 ϕ CD146。评估了针对R20291-3的裂解活性和CRISPR阵列活性对靶标宿主细菌的综合影响。对于野生型和cr噬菌体,较高的MOI导致艰难梭菌的对数减少更大。但是,在所有测试的MOI上,与野生型噬菌体 ϕ CD146相比,cr噬菌体 ϕ CD146在减少细菌种群方面显示出持续改善,如图11所示。实施例10:CRISPR增强的cr噬菌体在CRISPR阵列的计算机设计中用于克服耐药率

[0270] 为了确定对基于CRISPR的靶向的潜在耐药率,开发了一个数学模型来确定在靶基因组中约32个碱基对的任何给定潜在靶位点的突变频率:

[0271] 存活的具有突变的细胞数目 =

$$\left(1 - \left(1 - \left(\frac{\text{突变率}}{\text{基因组}} * \frac{\text{基因组}}{\text{\#碱基对}} * \text{\#总世代} \right) \right)^{32} \right)^n * (\text{CFU 负荷})$$

[0272] 估计种群中逃逸突变体的计算推定任何给定基因的一般突变率是每代每个基因组1000个突变中的1个,典型细菌基因组的长度约为 5×10^6 个碱基对,并且总的代数估计为总感染长度除以生物体的倍增时间。因此,假设给定基因组的独立突变率乘以种群中基因组(例如细胞)总数,该方程式估计的存活细胞总数为在所有潜在间隔靶中在感染过程中获得突变的那些细胞。

[0273] 在计算机上预测由于靶位点突变而导致的随时间推移而出现的抗性克隆数量与crRNA靶向的独立基因数量的关系。这些模型假设高度保守的假设,即(1)突变率与基因靶标无关,以及(2)crRNA的所有32个碱基均与活性匹配。测试了两组假设,以了解独立靶向基因的数量对CRISPR潜在耐药性的影响。对两种类型的感染进行了建模:如图12A所示,通过每6个小时加倍增加到 10^{10} CFU的总负荷的急性感染,或者如图12B所示,通过每20分钟加倍增加到 10^{14} CFU的总负荷的侵袭性感染。在这些假设下,两个模型均显示3个独立的基因靶标足以防止长达28天的感染时间的突变逃逸。

[0274] 这些估计值被认为是保守的,因为:(1) crRNA靶标位于必需基因的高度保守区内,因此突变的可能性低于此处计算的值;(2) 此模型假设32个碱基对的crRNA靶标中的任何单个突变消除了活性,这与证明crRNA在其靶标位点可耐受1个或更多个错配序列的数据相反。CRISPR阵列旨在针对4个独立靶标表达4个独立的crRNA,以确保因CRISPR靶标丢失而产生的耐药性仍然不太可能。为了鉴定各种大肠杆菌菌株中患病率最高的靶标,分析了每个间隔靶标的菌株覆盖率,如图13所示。crRNA阵列靶标包含以下基因,按菌株覆盖率的最高至最低顺序排列:Tsf (100%)、cpP (99%)、gapA (99%)、infA (99%)、secY (99%)、secY' 2 (99%)、csrA (99%)、trmD (99%)、ftsA (99%)、nusG (99%)、fusA' 2 (99%)、fusA (98%)、glyQ (98%)、eno (95%)、gapA' 2 (91%)、eno' 2 (89%)和nusG' 2 (73%)。

[0275] 如图14所示,构建了靶向大肠杆菌基因组保守区的一系列单个I-E型crRNA。crRNA靶标包括以下基因:acpP、csra、eno、fusA、gapA、glyQ、infA、nusG、secY、trmD和Tsf。通过将crRNA表达构建体转化到组成性表达I-E型CRISPR-Cas3系统的大肠杆菌细胞中来测试这些单个I-E型crRNA构建体,转化效率计算为每微克输入DNA转化体,每个数据点是一个来自三

个独立实验的单次复制。当转化到受体大肠杆菌中时,每个测试的crRNA导致相似的观察到的致死率水平。从这些间隔子中,从每个子集中选择4种I-E型crRNA,组装成最终的阵列。

实施例11:用Leu0转录激活因子增强的cr噬菌体

[0276] 对大肠杆菌CRISPR增强的细菌噬菌体被开发为多达三种不同的专性裂解细菌噬菌体的混合剂,所述专性裂解细菌噬菌体含有编码嵌入野生型噬菌体基因组中的功能性自靶向CRISPR RNA (crRNA盒)的相同DNA序列。通过两种方法之一对细菌噬菌体进行了工程改造:(1)在大肠杆菌细胞中用活性细菌噬菌体感染的同源重组,或者(2)通过在细胞外部组装的工程细菌噬菌体DNA的转化,以重组具有工程化基因组的活性噬菌体。每种细菌噬菌体均经过相似的crRNA盒工程化,所述crRNA盒包含两个元件:(1)在合成启动子之前衍生自大肠杆菌的Leu0转录因子基因,以及(2)在合成启动子之前编码靶向ftsA基因的crRNA的重复序列-间隔序列-重复序列。改造了三种细菌噬菌体构建体:crT4、crT7和crT7m。图15示意性地图示了所有三种细菌噬菌体构建体。工程化的各种cr噬菌体中使用的crRNA表达盒包含单个crRNA,如下表10所示:

表10. crRNA表达盒。

阵列	crRNA 名称	兼容的 Cas 系统	靶基因 名称	靶基因功能	靶序列	PAM
ftsA	ftsA	I-E 型	<i>ftsA</i>	细胞分裂	SEQ ID NO. 20 AGGGTCTCACCAACTCGACGAGTCAGAATCAG	AAG

[0277] 通过删除hoc基因并替换为crRNA盒来改造细菌噬菌体crT4。通过删除gp0.7、gp4.3、gp4.5和gp4.7并替换为crRNA盒来改造细菌噬菌体crT7。通过删除gp0.6、gp0.65、gp0.7、gp4.3和gp4.5并替换为crRNA盒来改造细菌噬菌体crT7m。基于这些缺失后所有噬菌体均被成功改造的观察结果,得出结论:这些早期噬菌体基因对于噬菌体存活不是必需的。这些工程化细菌噬菌体的详细信息汇总在下表11中:

表11. 工程化的cr噬菌体的汇总。

cr噬菌体名称	噬菌体类型	重复宿主	分离来源
crT7m	专性裂解	大肠杆菌B-菌株	市售(ATCC T7m)
crT4	专性裂解	大肠杆菌B-菌株	市售(ATCC T4)
crT7	专性裂解	大肠杆菌B-菌株	市售(ATCC T7)

[0278] 在感染过程中进行DNA转导后,Leu0从噬菌体基因组表达,并随后在大肠杆菌中上调表达内源性I-E型CRISPR-Cas3操纵子。同时,合成的靶向ftsA的crRNA从噬菌体基因组表达,该噬菌体基因组被内源I-E型CRISPR-Cas3蛋白复合物识别并加工。然后将此crRNA加载到CRISPR-Cas3复合物中,从而指导靶细菌DNA的靶向和降解。

实施例12:CRISPR-Cas系统在大肠杆菌中的流行和分布

[0279] CRISPR-Cas系统类型和亚型种类繁多,发现的系统中的大多数(>60%)属于I型组,它们共享具有Cas3签名核酸酶的独特功能。CRISPR-Cas3系统的独特之处在于它们会产生单链缺口,然后对靶DNA进行核酸外切降解。大肠杆菌CRISPR-Cas系统属于两种不同的亚型,即I-E型和I-F型,它们使用这种签名的Cas3核酸酶进行降解。

[0280] 为了确定CRISPR-Cas系统在大肠杆菌中的大致分布,分析了625种可公开获得的大肠杆菌基因组,涵盖了多种菌株,包括:尿道致病性大肠杆菌(UPEC)、产生志贺毒素的大肠杆菌(STEC)、O157:H7血清型大肠杆菌、致泄性大肠杆菌(DEC)、非-1570抗原型大肠杆菌

和肠致病性大肠杆菌 (EPEC)。扫描每个基因组的操纵子,与经典的I-E型或I-F型大肠杆菌CRISPR-Cas系统相似。图16A显示了每个这些大肠杆菌基因组的相对量。图16B显示,所有菌株中约78% (487/625) 已经具有完整的CRISPR-Cas3系统,即I-E型或I-F型。拟议的产品通过仅提供激活内源性CRISPR-Cas3系统靶向基因组所需的指导和附件,来利用大多数大肠杆菌中存在的CRISPR-Cas3蛋白。

实施例13:在大肠杆菌中Cas操纵子附近的Leu0结合位点的存在

[0281] 为了确定大肠杆菌基因组中Cas操纵子附近Leu0结合位点的患病率,直接从NCBI下载了628个具有登录号的大肠杆菌基因组,多样性为s,包括尿道致病性大肠杆菌 (UPEC)、产生志贺毒素的大肠杆菌 (STEC)、各种O抗原:H抗原血清型大肠杆菌、致泄性大肠杆菌 (DEC) 和肠致病性大肠杆菌 (EPEC)。然后查询基因组,寻找被标记为“CasB”的基因。提取CasB编码序列和两侧的5kb侧翼以作进一步注释。通过视觉检查CasABCDE或Cas3基因中的截短基因来确定完整的Cascade操纵子。检测到401个完整的Cascade-Cas3操纵子(查询的所有基因组的64%)。接下来,分别提取Cas3上游和Cas3下游200-400个核苷酸用于分析。检索候选Leu0结合序列并进行比对以产生共有序列。接下来,针对阈值核苷酸同一性为60%的Cas3上游和下游序列查询单个和共有序列。共同地,在88.5%的含有完整Cascade-Cas3操纵子的菌株中观察到候选的Leu0结合位点。表12总结了以下大肠杆菌基因组的搜索分析:

表12. 大肠杆菌基因组中Leu0患病率的汇总。

大肠杆菌菌株名称	登记号.	CRISPR	Cascade	Cas3-Cascade	LeuO 位点
DEC1A	NZ_AIEV00000000				

DEC1B	NZ_AIEW00000000				
DEC1C	NZ_AIEX00000000				
DEC1D	NZ_AIEY00000000				
DEC1E	NZ_AIEZ00000000				
DEC2B	NZ_AFJB00000000				
DEC2C	NZ_AIFB00000000				
DEC2D	NZ_AIFC00000000				
DEC2E	NZ_AIFD00000000				
DEC3A	NZ_AIFE00000000	是		是	是
DEC3B	NZ_AIFF00000000	是		是	是
DEC3C	NZ_AIFG00000000	是		是	是
DEC3D	NZ_AIFH00000000	是		是	是
DEC3E	NZ_AIFI00000000	是		是	是
DEC3F	NZ_AIFJ00000000	是		是	是
DEC4A	NZ_AIFK00000000	是		是	是
DEC4B	NZ_AIFL00000000	是		是	是
DEC4C	NZ_AIFM00000000	是		是	是
DEC4D	NZ_AIFN00000000	是		是	是
DEC4E	NZ_AIFO00000000	是		是	是
DEC4F	NZ_AIFP00000000	是		是	是
DEC5A	NZ_AIFQ00000000	是		是	是
DEC5B	NZ_AIFR00000000	是		是	是
DEC5C	NZ_AIFS00000000	是		是	是
DEC5D	NZ_AIFT00000000	是		是	是
DEC5E	NZ_AIFU00000000	是		是	是
DEC6A	NZ_AIFV00000000				
DEC6B	NZ_AIFW00000000				
DEC6E	NZ_AIFZ00000000	是		是	
DEC7A	NZ_AIGA00000000	是		是	是
DEC7B	NZ_AIGB00000000				
DEC7C	NZ_AIGC00000000	是		是	是
DEC7D	NZ_AIGD00000000	是		是	是
DEC7E	NZ_AIGE00000000	是		是	是
DEC8A	NZ_AIGF00000000	是		是	是
DEC8B	NZ_AIGG00000000	是		是	是
DEC8C	NZ_AIGH00000000	是		是	是
DEC8D	NZ_AIGI00000000	是		是	是
DEC8E	NZ_AIGJ00000000	是		是	是
DEC9A	NZ_AIGK00000000	是		是	是
DEC9B	NZ_AIGL00000000	是		是	是
DEC9C	NZ_AIGM00000000	是		是	是
DEC9D	NZ_AIGN00000000	是		是	是
DEC9E	NZ_AIGO00000000	是		是	是
DEC10E	NZ_AIGT00000000	是		是	是
DEC10F	NZ_AIGU00000000	是		是	是

DEC11A	NZ_AIGV00000000	是		是	是
DEC11B	NZ_AIGW00000000	是		是	是
DEC11C	NZ_AIGX00000000	T			
DEC11D	NZ_AIGY00000000	是		是	是
DEC11E	NZ_AIGZ00000000	是		是	是
DEC12A	NZ_AIHA00000000	是		是	是
DEC12B	NZ_AIHB00000000	是		是	是
DEC12C	NZ_AIHC00000000	是		是	是
DEC12D	NZ_AIHD00000000	是		是	是
DEC12E	NZ_AIHE00000000	是		是	是
DEC13A	NZ_AIHF00000000	是		是	是
DEC13B	NZ_AIHG00000000	是		是	是
DEC13C	NZ_AIHH00000000	是		是	是
DEC13D	NZ_AIHI00000000	是		是	是
DEC13E	NZ_AIHJ00000000	是		是	是
DEC14A	NZ_AIHK00000000	是		是	是
DEC14B	NZ_AIHL00000000	是		是	
DEC14C	NZ_AIHM00000000	是		是	是
DEC14D	NZ_AIHN00000000	是		是	是
DEC15A	NZ_AIHO00000000	是		是	是
DEC15B	NZ_AIHP00000000	是		是	是
DEC15C	NZ_AIHQ00000000	是		是	是
DEC15D	NZ_AIHR00000000	是		是	是
DEC15E	NZ_AIHS00000000	是		是	是
EPECa12	NZ_AKNH00000000	是		是	是
EPECa14	NZ_ADUN00000000	是		是	是
EPEC C342-62	NZ_AKNI00000000	是		是	是
O5:K4(L):H4 str. ATCC 23502	NZ_CAPL00000000				
O6:H16:CFA/II str. B2C	NZ_AUZS00000000	是	是		是
O6:H16 str. 99-3165	NZ_JHJW00000000	是	是		是
O6:H16 str. F5656C1	NZ_JHJU00000000	是	是		是
O08	NZ_AOGM00000000	是		是	是
O10:K5(L):H4 str. ATCC 23506	NZ_CAPK00000000				
O15:H18 str. K1516	NZ_JHJE00000000	是		是	是
O25:NM str. E2539C1	NZ_JHJV00000000	是		是	
O26:H1 str. 2009C-4747	NZ_JHGM00000000	是		是	是
O26:H11 str. 2009C-3612	NZ_JHGZ00000000	是		是	是
O26:H11 str. 2011C-3655	NZ_JHLN00000000	是		是	是
O28ac:NM str. 02-3404	NZ_JHNY00000000				
O32:H37 str. P4	NZ_AJQW00000000	是		是	
O39:NM str. F8704-2	NZ_JHHJ00000000	是		是	是
O45:H2 str. 01-3147	NZ_JHOA00000000				
O45:H2 str. 03-EN-705	NZ_AGTK00000000				
O45:H2 str. 2009C-3686	NZ_JHGY00000000				
O45:H2 str. 2009C-4780	NZ_JHGJ00000000				

O45:H2 str. 2010C-3876	NZ_JHFI00000000			
O45:H2 str. 2010C-4211	NZ_JASS00000000			
O55:H7 str. 06-3555	NZ_JHNL00000000	是	是	是
O55:H7 str. 3256-97	NZ_AEUA00000000	是	是	是
O55:H7 str. USDA 5905	NZ_AEUB00000000	是	是	是
O69:H11 str. 06-3325	NZ_JHNP00000000	是	是	是
O69:H11 str. 07-3763	NZ_JASN00000000	是	是	是
O69:H11 str. 07-4281	NZ_JHLA00000000	是	是	是
O69:H11 str. 08-4661	NZ_JHHG00000000	是	是	是
O69:H11 str. 2009C-3601	NZ_JHHA00000000	是	是	是
O78:H12 str. 00-3279	NZ_JFBE00000000			
O79:H7 str. 06-3501	NZ_JHNM00000000	是	是	是
O81:NM str. 02-3012	NZ_JHNZ00000000			
O91:H21 str. B2F1	NZ_AGTI00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02030	NZ_AMVR00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02033-1	NZ_AMVS00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02092	NZ_AMVT00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02093	NZ_AMVU00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02281	NZ_AMVV00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-02913	NZ_AMVX00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-03439	NZ_AMVY00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-03943	NZ_AMWA00000000	是	是	是
O104:H4 str. 11-04080	NZ_AMVZ00000000	是	是	是
O104:H4 str. E112/10	NZ_AHAV00000000	是	是	是
O104:H4 str. GOS1	NZ_AFWO00000000	是	是	是
O104:H4 str. GOS2	NZ_AFWP00000000	是	是	是
O104:H4 str. H112180280	NZ_AFPN00000000	是	是	是
O104:H4 str. H112180282	NZ_AFSS00000000			
O104:H4 str. ON2010	NZ_AHZE00000000			
O104:H4 str. ON2011	NZ_AHZF00000000			
O104:H4 str. TY-2482	NZ_AFVR00000000	是	是	是
O104:H4 str. TY-2482	NZ_AFOG00000000			
O104:H21 str. 94-3025	NZ_JHJZ00000000			
O111:H11 str. CVM9455	NZ_AKAX00000000	是	是	是
O111:H11 str. CVM9534	NZ_AJVS00000000	是	是	是
O111:H11 str. CVM9545	NZ_AJVT00000000	是	是	是
O111:H11 str. CVM9553	NZ_AKAY00000000	是	是	是
O111:H8 str. CVM9570	NZ_AJVV00000000	是	是	是
O111:H8 str. CVM9574	NZ_AJVV00000000	是	是	是
O111:H8 str. CVM9602	NZ_AKAV00000000	是	是	是
O111:H8 str. CVM9634	NZ_AKAW00000000	是	是	是
O111:H11 str. CFSAN001630	NZ_AMXP00000000	是	是	是
O111:NM str. 01-3076	NZ_JFGU00000000	是	是	是
O111:NM str. 03-3484	NZ_JHNU00000000	是	是	是
O111:NM str. 04-3211	NZ_JHNS00000000	是	是	是

O111:NM str. 08-4487	NZ_JHKU00000000	是		是	是
O111:NM str. 2009C-4006	NZ_JHGU00000000	是		是	是
O111:NM str. 2009C-4052	NZ_JHGS00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-3053	NZ_JHFZ00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-3977	NZ_JHFG00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4086	NZ_JHFF00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4221	NZ_JHFE00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4592	NZ_JHMY00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4622	NZ_JHMX00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4715	NZ_JHMW00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4735	NZ_JHMU00000000	是		是	是
O111:NM str. 2010C-4746	NZ_JHMT00000000	是		是	是
O111:NM str. 2011C-3170	NZ_JHMA00000000	是		是	是
O111:NM str. 2011C-3362	NZ_JHLW00000000	是		是	是
O111:NM str. 2011C-3573	NZ_JHLQ00000000	是		是	是
O111:NM str. 2011C-3632	NZ_JHLO00000000	是		是	是
O111:NM str. 2011C-3679	NZ_JHLM00000000	是		是	是
O111:NM str. K6904	NZ_JHHN00000000	是		是	是
O111:NM str. K6908	NZ_JHHM00000000	是		是	是
O111:NM str. K6915	NZ_JHHL00000000	是		是	是
O113:H21 str. CL-3	NZ_AGTH00000000	是		是	是
O118:H16 str. 07-4255	NZ_JASP00000000	是		是	是
O119:H6	NZ_BBUR00000000				
O119:H6	NZ_BBUT00000000				
O119:H6	NZ_BBUU00000000				
O119:H6	NZ_BBUS00000000				
O121:H7 str. 2009C-3299	NZ_JHHC00000000	是		是	是
O121:H19 str. 03-3227	NZ_JHNX00000000				
O121:H19 str. 06-3003	NZ_JHNR00000000				
O121:H19 str. 06-3822	NZ_JHNH00000000				
O121:H19 str. 2009C-4050	NZ_JHGT00000000				
O121:H19 str. 2009C-4659	NZ_JHGN00000000				
O121:H19 str. 2009C-4750	NZ_JHGL00000000				
O121:H19 str. 2009EL1302	NZ_JHGH00000000				
O121:H19 str. 2009EL1412	NZ_JHGG00000000				
O121:H19 str. 2010C-3609	NZ_JHFM00000000				
O121:H19 str. 2010C-3794	NZ_JHFL00000000				
O121:H19 str. 2010C-3840	NZ_JHFK00000000				
O121:H19 str. 2010C-4254	NZ_JHFC00000000				
O121:H19 str. 2010C-4824	NZ_JHMO00000000				
O121:H19 str. 2010C-4966	NZ_JHML00000000				

O121:H19 str. 2010C-4989	NZ_JHMJ00000000				
O121:H19 str. 2010EL1058	NZ_JHMG00000000				
O121:H19 str. 2011C-3537	NZ_JHLR00000000				
O121:H19 str. 2011C-3609	NZ_JASV00000000				
O121:H19 str. F6714	NZ_JHJR00000000				
O121:H19 str. K5198	NZ_JHIK00000000				
O121:H19 str. K5269	NZ_JHIJ00000000				
O121:H19 str. MT#2	NZ_AGTJ00000000				
O123:H11 str. 2009C-3307	NZ_JHHB00000000	是		是	是
O127:H6 str. E2348/69 substr. CVDNalr	NZ_ASZR00000000				
O127:H6 str. E2348/69 substr. UMD753	NZ_ASZS00000000				
O127:H27 str. C43/90	NZ_AHAW00000000				
O128:H2 str. 2011C-3317	NZ_JASU00000000	是		是	是
O145:H25 str. 07-3858	NZ_JASO00000000	是		是	是
O145:H28 str. 2009C-3292	NZ_JHHD00000000	是		是	是
O145:H28 str. 4865/96	NZ_JHEY00000000	是	是		是
O145:H28 str. 4865/96	NZ_AGTL00000000	是	是		是
O145:NM str. 06-3484	NZ_JHNN00000000				
O145:NM str. 08-4270	NZ_JHKV00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3507	NZ_JHFW00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3508	NZ_JHFV00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3509	NZ_JHFU00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3510	NZ_JHFT00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3511	NZ_JHFS00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3516	NZ_JHFR00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3517	NZ_JHFQ00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3518	NZ_JHFP00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3521	NZ_JHFO00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-3526	NZ_JHFN00000000	是	是		是
O145:NM str. 2010C-4557C2	NZ_JHNA00000000	是	是		是
O146:H21 str. 2010C-3325	NZ_JASR00000000	是		是	是
O153:H2 str. 2010C-5034	NZ_JMH00000000	是		是	是
O156:H25 str. 2011C-3602	NZ_JHLP00000000	是		是	是
O157:H7	NZ_LAYW00000000	是		是	是
O157:H7	NZ_LMXL00000000	是		是	是
O157:H7	NZ_LCWU00000000	是		是	是
O157:H7	NZ_LKAL00000000	是		是	是
O157:H7	NZ_LKAK00000000	是		是	是
O157:H7 str. 06-3745	NZ_JHNI00000000	是		是	是
O157:H7 str. 06-4039	NZ_JHNG00000000	是		是	是
O157:H7 str. 07-3091	NZ_JHNF00000000	是		是	是

O157:H7 str. 07-3391	NZ_JHNE00000000	是		是	是
O157:H7 str. 08-3037	NZ_JHKZ00000000	是		是	是
O157:H7 str. 08-3527	NZ_JHKY00000000	是		是	是
O157:H7 str. 08-4169	NZ_JHKW00000000	是		是	是
O157:H7 str. 08-4529	NZ_JHHI00000000	是		是	是
O157:H7 str. 08BKT061141	NZ_JJOL00000000				
O157:H7 str. 09BKT048303	NZ_JJOM00000000				
O157:H7 str. 1044	NZ_AERP00000000	是		是	是
O157:H7 str. 1125	NZ_AERR00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2009C-4258	NZ_JHGQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2009EL1449	NZ_JHGF00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2009EL1705	NZ_JHGE00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2009EL1913	NZ_JHGD00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2009EL2109	NZ_JHGC00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2010C-4979C1	NZ_JHMK00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-1107	NZ_JHLK00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2090	NZ_JHLI00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2091	NZ_JHLH00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2092	NZ_JHLG00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2093	NZ_JHLF00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2094	NZ_JHLE00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2096	NZ_JHLD00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2097	NZ_JHLC00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2098	NZ_JHLB00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2099	NZ_JHKT00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2099	NZ_JHKT00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2101	NZ_JHKS00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2101	NZ_JHKS00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2103	NZ_JHKR00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2104	NZ_JHKQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2105	NZ_JHKP00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2106	NZ_JHKO00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2107	NZ_JHKN00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2108	NZ_JHKM00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2109	NZ_JHKL00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2111	NZ_JHKK00000000	是		是	是
O157:H7 str.	NZ_JHKJ00000000	是		是	是

2011EL-2112					
O157:H7 str. 2011EL-2113	NZ_JHKI00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2114	NZ_JHKH00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2286	NZ_JHKG00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2287	NZ_JHKF00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2288	NZ_JHKE00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2289	NZ_JHKD00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2290	NZ_JHKC00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2312	NZ_JHKB00000000	是		是	是
O157:H7 str. 2011EL-2313	NZ_JHKA00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC508	NZ_ABHW00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC536	NZ_ADVC00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC869	NZ_ABHU00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC1212	NZ_AERQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4009	NZ_ADMX00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4042	NZ_ABHM00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4045	NZ_ABHL00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4076	NZ_ABHQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4113	NZ_ABHP00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4127	NZ_ADUZ00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4191	NZ_ADVA00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4192	NZ_ADUX00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4196	NZ_ABHO00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4206	NZ_ABHK00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4401	NZ_ABHR00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4486	NZ_ABHS00000000	是		是	是
O157:H7 str. EC4501	NZ_ABHT00000000	是		是	是
O157:H7 str. F6142	NZ_JHJT00000000	是		是	是
O157:H7 str. F6749	NZ_JHJQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. F6750	NZ_JHJP00000000	是		是	是
O157:H7 str. F6751	NZ_JHJO00000000	是		是	是
O157:H7 str. F7350	NZ_JHJN00000000	是		是	是
O157:H7 str. F7377	NZ_JHJM00000000	是		是	是
O157:H7 str. F7384	NZ_JHJL00000000	是		是	是
O157:H7 str. F7410	NZ_JHJK00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1420	NZ_JHJF00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1792	NZ_JHJD00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1793	NZ_JHJC00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1795	NZ_JHJB00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1796	NZ_JHJA00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1845	NZ_JHIZ00000000	是		是	是
O157:H7 str. K1921	NZ_JHIY00000000	是		是	是

O157:H7 str. K1927	NZ_JHIX00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2188	NZ_JHIW00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2191	NZ_JHIV00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2192	NZ_JHIU00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2324	NZ_JHIT00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2581	NZ_JHIS00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2622	NZ_JHIR00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2845	NZ_JHIQ00000000	是		是	是
O157:H7 str. K2854	NZ_JHIP00000000	是		是	是
O157:H7 str. K4396	NZ_JHIO00000000	是		是	是
O157:H7 str. LSU-61	NZ_AEUC00000000	是		是	是
O157:H7 str. TW14313	NZ_AKMD00000000				
O157:H43 str. T22	NZ_AHZD00000000	是		是	是
O157:H- str. 493-89	NZ_AETY00000000	是		是	是
O157:H- str. 493-89	NZ_AGTG00000000	是		是	是
O157:H- str. H 2687	NZ_AETZ00000000	是		是	是
O157:NM str. 08-4540	NZ_JHHH00000000	是		是	是
O157: str. 2010EL-2044	NZ_JHME00000000	是		是	是
O157: str. 2010EL-2045	NZ_JHMD00000000	是		是	是
O157 str. NCCP15738	NZ_ASHB00000000				
O157 str. NCCP15739	NZ_ASHA00000000	是		是	是
STEC 7v	NZ_AEXD00000000				
STEC B2F1	NZ_AFDQ00000000	是		是	是
STEC C165-02	NZ_AFDR00000000	是		是	
STEC EH250	NZ_AFDW00000000	是		是	
STEC_MHI813	NZ_AFDZ00000000	是		是	是
STEC O31	NZ_AFEX00000000	是		是	是
STEC S1191	NZ_AFEA00000000	是		是	
STEC O174:H8 str. 02-07607	NZ_AQGN00000000	是		是	
STEC 29	NZ_LNFU00000000	是		是	
STEC 66	NZ_LNFT00000000	是		是	
STEC 168	NZ_LNFV00000000	是		是	
STEC 169	NZ_LNZJ00000000				
STEC 196	NZ_LNZK00000000	是		是	
STEC 200	NZ_LNZL00000000	是		是	是
STEC 299	NZ_LOCR00000000	是		是	是
STEC 309	NZ_LOCS00000000	是		是	是
STEC 329	NZ_LOCT00000000	是		是	
STEC 343	NZ_LDOZ00000000	是		是	是
STEC 370	NZ_LOCU00000000	是		是	是
STEC 380	NZ_LOCV00000000	是		是	是
STEC 384	NZ_LOCW00000000	是		是	是
STEC 464	NZ_LOCX00000000	是		是	是
STEC 477	NZ_LOCY00000000	是		是	是
STEC 479	NZ_LOCZ00000000	是		是	是

STEC 487	NZ LODA00000000	是		是	是
STEC 545	NZ LODB00000000	是	是		是
STEC 559	NZ LODC00000000	是		是	是
STEC 563	NZ LODD00000000	是		是	是
STEC 565	NZ LODE00000000				
STEC 605	NZ LFUA00000000	是		是	是
STEC 623	NZ LFUB00000000	是		是	是
STEC 627	NZ LODF00000000	是		是	是
STEC 645	NZ LODG00000000	是		是	
STEC 690	NZ LOFJ00000000				
STEC 691	NZ LOFK00000000	是		是	是
STEC 707	NZ LOFL00000000	是		是	是
STEC 709	NZ LOFM00000000	是		是	是
STEC 731	NZ LOFN00000000	是	是		是
STEC 757	NZ LOFO00000000	是		是	是
STEC 764	NZ LOFP00000000	是		是	是
STEC 793	NZ LOFQ00000000				
STEC 886	NZ LOFR00000000	是		是	是
STEC 931	NZ LOFS00000000	是		是	是
STEC 940	NZ LOFT00000000				
STEC 1117	NZ LOFU00000000	是		是	是
STEC 1161	NZ LOFV00000000	是		是	是
STEC 1178	NZ LOFW00000000				
STEC 1188	NZ LOFX00000000	是		是	是
STEC 1198	NZ LOFY00000000				
STEC 1201	NZ LOFZ00000000	是		是	是
STEC 1225	NZ LOGA00000000	是		是	是
STEC 1236	NZ LOGB00000000	是		是	是
STEC 1255	NZ LOGC00000000	是		是	是
STEC 1270	NZ LOGD00000000				
STEC 1284	NZ LOGE00000000	是		是	是
STEC 1293	NZ LOGF00000000	是		是	是
STEC 1299	NZ LOGG00000000	是		是	是
STEC 1303	NZ LOGH00000000				
STEC 1363	NZ LOGI00000000	是		是	是
STEC 1375	NZ LOGJ00000000	是		是	是
STEC 1442	NZ LOGK00000000	是	是		是
STEC 1465	NZ LOGL00000000	是		是	是
STEC 1473	NZ LOGM00000000				
STEC 1500	NZ LOGN00000000	是		是	
STEC 1513	NZ LOGO00000000	是		是	是
STEC 1528	NZ LOGP00000000				
STEC 1532	NZ LOGQ00000000	是		是	是
STEC 1585	NZ LOGR00000000	是		是	
STEC 1634	NZ LOGS00000000	是		是	是

STEC 1686	NZ_LOGT00000000	是		是	是
STEC 2064	NZ_LOJC00000000	是		是	
STEC 2074	NZ_LOJD00000000	是		是	是
STEC 2075	NZ_LGBD00000000	是		是	是
STEC 2110.1	NZ_LPWW00000000	是		是	
STEC 2110.3	NZ_LOJE00000000	是		是	是
STEC 2112	NZ_LGBE00000000	是		是	是
STEC 2144	NZ_LOGU00000000	是		是	是
STEC 2174	NZ_LOGV00000000	是		是	
STEC 2193	NZ_LOGW00000000	是		是	是
STEC 2211	NZ_LOGX00000000	是		是	是
STEC 2236	NZ_LOGY00000000				
STEC 2257	NZ_LGBF00000000	是		是	是
STEC 2270	NZ_LPWX00000000	是		是	是
STEC 2334	NZ_LOGZ00000000				
STEC 2346	NZ_LOHA00000000				
STEC 2359	NZ_LOHB00000000	是		是	是
STEC 2363	NZ_LPWY00000000	是		是	
STEC 2410	NZ_LGBG00000000	是		是	是
STEC 2419	NZ_LPWZ00000000				
STEC 2441	NZ_LOHC00000000	是		是	是
STEC 2450	NZ_LPXA00000000	是		是	是
STEC 2499	NZ_LOIE00000000	是		是	是
STEC 2505	NZ_LPXB00000000	是		是	是
STEC 2539	NZ_LOIF00000000				
STEC 2564	NZ_LOIG00000000				
STEC 2573	NZ_LOIH00000000	是		是	是
STEC 2591	NZ_LOII00000000	是		是	是
STEC 2595	NZ_LOIJ00000000	是		是	
STEC 2620	NZ_LPXC00000000	是		是	
STEC 2633	NZ_LOIK00000000				
STEC 2667	NZ_LGBH00000000	是		是	是
STEC 2708	NZ_LOIL00000000				
STEC 2743	NZ_LOIM00000000	是		是	是
STEC 2746	NZ_LPXD00000000	是		是	是
STEC 2764	NZ_LOIN00000000	是		是	
STEC 2770	NZ_LPXF00000000	是		是	是
STEC 2788	NZ_LOIO00000000	是		是	
STEC 2797	NZ_LOIP00000000	是		是	
STEC 2820	NZ_LGBQ00000000	是		是	是
STEC 2821	NZ_LGBI00000000	是		是	是
STEC 2826	NZ_LOJA00000000	是		是	是
STEC 2839	NZ_LOJB00000000	是		是	
STEC 2841	NZ_LOIQ00000000	是		是	是
STEC 2861	NZ_LOIR00000000	是		是	

STEC 2868	NZ_LGBJ00000000	是		是	是
STEC 2894.1	NZ_LOIS00000000	是		是	
STEC 2894.2	NZ_LOIT00000000				
STEC 2920	NZ_LOIU00000000	是		是	是
STEC 2938	NZ_LOIV00000000	是		是	是
STEC 2953	NZ_LOIW00000000				
STEC 2954	NZ_LPXE00000000	是		是	
STEC 2962	NZ_LOIX00000000	是		是	
STEC 2980	NZ_LOIY00000000	是		是	是
STEC 3031	NZ_LOIZ00000000				
STEC 3039	NZ_LPUH00000000	是		是	是
STEC 3055	NZ_LPUI00000000	是		是	
STEC 3084	NZ_LPUJ00000000	是		是	
STEC 3087	NZ_LPUK00000000	是		是	
STEC 3094	NZ_LPUL00000000	是		是	是
STEC 3098	NZ_LPUM00000000	是		是	是
STEC 3106	NZ_LPUN00000000	是		是	
upec-2	NZ_JSLN00000000	是	是		是
upec-3	NZ_JSIF00000000	是		是	是
upec-4	NZ_JSHU00000000				
upec-7	NZ_JSGV00000000				
upec-8	NZ_JSGK00000000				
upec-9	NZ_JSFZ00000000				
upec-10	NZ_JSPB00000000				
upec-15	NZ_JSNA00000000				
upec-22	NZ_JSKT00000000				
upec-23	NZ_JSKJ00000000				
upec-24	NZ_JSJZ00000000				
upec-28	NZ_JSIQ00000000				
upec-29	NZ_JSIG00000000				
upec-30	NZ_JSIE00000000	是		是	是
upec-31	NZ_JSID00000000	是		是	是
upec-33	NZ_JSIB00000000	是		是	
upec-34	NZ_JSIA00000000				
upec-36	NZ_JSHY00000000				
upec-37	NZ_JSHX00000000				
upec-38	NZ_JSHW00000000				
upec-39	NZ_JSHV00000000				
upec-50	NZ_JSHM00000000				
upec-51	NZ_JSHL00000000				
upec-53	NZ_JSHK00000000				
upec-54	NZ_JSHJ00000000				
upec-55	NZ_JSHI00000000				
upec-56	NZ_JSHH00000000	是		是	
upec-57	NZ_JSHG00000000				

upec-58	NZ_JSHF00000000				
upec-59	NZ_JSHE00000000				
upec-60	NZ_JSHD00000000				
upec-61	NZ_JSHC00000000				
upec-62	NZ_JSHB00000000				
upec-64	NZ_JSHA00000000				
upec-65	NZ_JSGZ00000000				
upec-66	NZ_JSGY00000000	是		是	是
upec-69	NZ_JSGW00000000	是		是	
upec-70	NZ_JSGU00000000				
upec-72	NZ_JSGS00000000				
upec-73	NZ_JSGR00000000				
upec-74	NZ_JSGQ00000000				
upec-75	NZ_JSGP00000000				
upec-76	NZ_JSGO00000000				
upec-77	NZ_JSGN00000000				
upec-78	NZ_JSGM00000000				
upec-79	NZ_JJGL00000000				
upec-80	NZ_JJGJ00000000				
upec-81	NZ_JJGI00000000	是		是	是
upec-82	NZ_JJGH00000000	是		是	
upec-83	NZ_JJGG00000000				
upec-84	NZ_JJGF00000000				
upec-85	NZ_JJGE00000000				
upec-87	NZ_JJGC00000000				
upec-88	NZ_JJGB00000000				
upec-89	NZ_JJGA00000000				
upec-90	NZ_JJFY00000000				
upec-91	NZ_JJFX00000000				
upec-93	NZ_JJFV00000000				
upec-94	NZ_JJFU00000000				
upec-95	NZ_JJFT00000000	是		是	是
upec-97	NZ_JJFS00000000				
upec-98	NZ_JJFR00000000				
upec-99	NZ_JJFQ00000000	是		是	
upec-100	NZ_JJSPA00000000				
upec-101	NZ_JJSOZ00000000				
upec-103	NZ_JJSOX00000000				
upec-104	NZ_JJOW00000000	是		是	是
upec-105	NZ_JJSOV00000000				
upec-106	NZ_JJSOU00000000				
upec-107	NZ_JJSOT00000000				
upec-108	NZ_JJSOS00000000				
upec-109	NZ_JJSOR00000000				
upec-110	NZ_JJSOQ00000000				

upec-114	NZ JSOM00000000	是		是	是
upec-115	NZ JSOL00000000				
upec-116	NZ JSOK00000000				
upec-117	NZ JSOJ00000000				
upec-118	NZ JSOI00000000	是		是	是
upec-119	NZ JSOH00000000	是		是	是
upec-120	NZ JSOF00000000				
upec-121	NZ JSOE00000000	是		是	是
upec-123	NZ JSOC00000000				
upec-124	NZ JSOB00000000				
upec-125	NZ JSOA00000000				
upec-126	NZ JSNZ00000000				
upec-127	NZ JSNY00000000				
upec-128	NZ JSNX00000000				
upec-129	NZ JSNW00000000				
upec-130	NZ JSNV00000000	是		是	是
upec-131	NZ JSNU00000000				
upec-132	NZ JSNT00000000	是		是	是
upec-133	NZ JSNS00000000	是		是	
upec-134	NZ JSNR00000000				
upec-135	NZ JSNQ00000000				
upec-136	NZ JSNP00000000				
upec-137	NZ JSO0000000	是		是	是
upec-138	NZ JSNN00000000				
upec-139	NZ JSNM00000000				
upec-140	NZ JSNK00000000				
upec-141	NZ JSNJ00000000				
upec-142	NZ JSNI00000000				
upec-143	NZ JSNH00000000				
upec-144	NZ JSNG00000000				
upec-145	NZ JSNF00000000	是		是	
upec-146	NZ JSNE00000000	是		是	是
upec-147	NZ JSND00000000	是		是	是
upec-148	NZ JSNC00000000				
upec-149	NZ JSNB00000000				
upec-150	NZ JSMZ00000000	是		是	是
upec-151	NZ JSMY00000000	是		是	是
upec-153	NZ JSMX00000000				
upec-154	NZ JSMW00000000				
upec-155	NZ JSMV00000000	是		是	
upec-156	NZ JSMU00000000				
upec-157	NZ JSMT00000000				
upec-158	NZ JSMS00000000				
upec-159	NZ JSMR00000000				
upec-161	NZ JSMQ00000000				

upec-162	NZ JSMP00000000				
upec-166	NZ JSMO00000000				
upec-169	NZ JSMN00000000				
upec-170	NZ JSML00000000	是	是		是
upec-171	NZ JSMK00000000				
upec-172	NZ JSMJ00000000				
upec-173	NZ JSMI00000000	是	是		是
upec-175	NZ JSMH00000000	是		是	是
upec-176	NZ JSMG00000000				
upec-207	NZ JSLE00000000				
upec-208	NZ JSLD00000000				
upec-209	NZ JSJC00000000				
upec-211	NZ JSJB00000000	是		是	是
upec-212	NZ JSJA00000000				
upec-213	NZ JSKZ00000000	是		是	是
upec-219	NZ JSKU00000000				
upec-220	NZ JSKS00000000				
upec-221	NZ JSKR00000000	是		是	
upec-225	NZ JSKO00000000				
upec-226	NZ JSKN00000000				
upec-227	NZ JSKM00000000				
upec-228	NZ JSKL00000000				
upec-229	NZ JSKK00000000				
upec-230	NZ JSKI00000000				
upec-232	NZ JSKG00000000				
upec-233	NZ JSKF00000000				
upec-235	NZ JSKE00000000				
upec-236	NZ JSKD00000000				
upec-237	NZ JSKC00000000				
upec-238	NZ JSKB00000000	是		是	是
upec-239	NZ JSKA00000000				
upec-243	NZ JSJX00000000				
upec-244	NZ JSJW00000000				
upec-248	NZ JSJT00000000				
upec-249	NZ JSJS00000000				
upec-250	NZ JSJQ00000000				
upec-251	NZ JSJP00000000				
upec-253	NZ JSJO00000000				
upec-254	NZ JSJN00000000	是		是	
upec-255	NZ JSJM00000000				
upec-256	NZ JSJL00000000	是		是	
upec-257	NZ JSJK00000000				
upec-258	NZ JSJJ00000000				
upec-259	NZ JSJI00000000				
upec-260	NZ JSJG00000000				

upec-261	NZ JSJF00000000				
upec-265	NZ JSJB00000000				
upec-266	NZ JSJA00000000				
upec-269	NZ JSIY00000000	是	是		是
upec-271	NZ JSIV00000000				
upec-273	NZ JSIU00000000	是	是		是
upec-274	NZ JSIT00000000	是		是	
upec-276	NZ JSIS00000000				
upec-277	NZ JSIR00000000				
upec-281	NZ JSIO00000000				
upec-282	NZ JSIN00000000				
upec-284	NZ JSIM00000000				
upec-285	NZ JSIL00000000				
upec-286	NZ JSIK00000000				
upec-287	NZ JSIJ00000000				
upec-288	NZ JSIH00000000				
upec-289	NZ JSIH00000000				
总计	628	401	25	376	355
百分比		63.85	6.23	93.77	88.53

实施例14:Leu0的表达对于引起CRISPR-Cas致死率是必要的

[0282] 大多数大肠杆菌在其基因组中编码I型CRISPR-Cas3活性的必要成分。但是,大肠杆菌I-E型CRISPR-Cas3操纵子受组蛋白样核苷酸结构(H-NS)阻遏作用调节,在正常培养条件下不表达。Leu0在重叠的启动子区域与H-NS的作用相对,并激活基因表达。通过检查与Leu0过表达或敲除有关的全局转录变化,H-NS和Leu0活性之间的相互作用已在鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌中进行了研究。在常规培养条件下,Leu0本身不表达,但在饥饿和静止期会被上调。但是,大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中的casABCDE操纵子被Leu0过表达显著上调,并预测了CasA上游的H-NS和Leu0结合序列。但是,在没有Leu0表达盒的情况下,casABCDE表达不足以借助自靶向的crRNA支持致死率。

[0283] 向病原体递送Leu0表达盒的主要风险包括其对其调控子内非靶(非Cas)基因的影响。在鼠伤寒沙门氏菌中,Leu0上调了一些与致病性有关的基因,但尚不清楚表达是否有有意义的增加,以及这种观察如何应用于除鼠伤寒沙门氏菌以外的细菌。在大肠杆菌中,Leu0会增加或降低对某些种类的抗生素的耐药性。

[0284] 为了验证Leu0在大肠杆菌中CRISPR介导的致死率的功能,设计了一种编码Leu0表达盒的噬菌粒来克服内源性的CRISPR-Cas3操纵子的野生型抑制。设计的噬菌粒衍生自M13细菌噬菌体,已被证明是非裂解的,以免混淆基于CRISPR-Cas3的致死率。噬菌粒还编码靶向保守的大肠杆菌ftsA基因的CRISPR阵列,从而该阵列的表达激活并直接自靶向I-E型大肠杆菌CRISPR-Cas3系统以引发细胞死亡。

[0285] 图17显示了使用经验证的ftsA间隔序列的CRISPR构造体的非裂解的M13衍生的噬菌粒递送,该ftsA间隔序列设计用于测试CRISPR介导的致死率对Leu0表达的依赖性。产生的细菌噬菌体滴度为每毫升 10^9 个转导单位,并保持在生长培养基中以进行体外研究。噬菌粒载体编码ftsA重复间隔子阵列,Leu0表达盒和与M13相容的复制起点。通过将M13细菌噬菌体转导到一定范围内来测试噬菌粒载体的致死率,包括含有抑制大肠杆菌I-E型CRISPR-Cas3操纵子的野生型H-NS的亲本EMG2、在CRISPR-Cas3操纵子(Δ hns)中缺乏H-NS抑制基序

的BW25113衍生物、包含过表达的CRISPR-Cas3操纵子(BW+Cas)的BW25113衍生物和缺乏Cas3基因(BW Δ Cas)的BW25113衍生物。

[0286] 将指示的大肠杆菌用每种M13噬菌粒的每毫升 10^9 个转导单位感染,并平板接种在选择性培养基上,以回收转导的细胞并计数存活的菌落形成单位(转导子)。每个都用以下图例中所示的噬菌粒进行转导:对照,通用的M13转导对照;pCRISPR,可组成型表达非靶向性crRNA的噬菌粒;Leu0,组成型表达大肠杆菌Leu0基因的噬菌粒;ftsA,组成型表达大肠杆菌中存在的保守ftsA基因的噬菌粒;ftsA::Leu0,组成型表达Leu0基因和靶向ftsA的crRNA的噬菌粒。

[0287] 与除缺乏Cas3活性的BW Δ Cas外的每个对照相比,Leu0和靶向ftsA的间隔子的共同递送导致降低3.4个对数(± 0.04)至4.3个对数(± 0.06)的范围,证实致死率取决于噬菌粒基因组表达的构建体。值得注意的是,仅在BW+Cas细胞系中观察到仅通过靶向ftsA的间隔子表达引起的CRISPR-Cas3致死率,表明仅去除H-NS抑制作用不足以挽救显著水平的内源性CRISPR-Cas3靶向。基于这些数据,ftsA间隔子和Leu0都是非工程化的野生型大肠杆菌中细胞死亡所必需的。

实施例15:Leu0增强的细菌噬菌体具有增强的致死动力学

[0288] 将每个cr噬菌体与野生型噬菌体进行系统比较,以确定与它们各自的野生型噬菌体相比,CRISPR增强的噬菌体的效力变化。在生长培养基中产生cr噬菌体和相应的野生型噬菌体,将其过滤并调节至相同的滴度。根据现有的公开可用测序数据,这三种野生型噬菌体具有明显不同的基因组架构,但均为专性裂解细菌噬菌体(数据未显示)。将靶大肠杆菌的crT7m、crT7和crT4分别在生长培养基中以每种噬菌体指示的感染复数(噬菌体与细菌的比率)孵育2或5小时。孵育后,立即收集培养物,连续稀释并平板接种以计数存活的菌落。如图18A-图18C所示,在所有三种cr噬菌体:野生型噬菌体比较中观察到了CFU降低的显著差异,包括crT7m提高约4个对数(图18A)、crT4提高约4.5个对数(图18B)和crT7活性(图18C)提高约1个对数。这些数据表明,与野生型噬菌体相比,在所选时间点,CRISPR增强的噬菌体消除靶大肠杆菌种群。

实施例16:Leu0增强的cr噬菌体体外杀灭曲线

[0289] 图19A-图19E显示了每种cr噬菌体的剂量-反应体外杀灭曲线。每种cr噬菌体通过标准的裂解扩增产生;过滤并悬浮在原始生长培养基(LB肉汤)中。所有实验均在LB肉汤中进行。将大肠杆菌MG1655生长至对数中期,然后与所示感染复数(MOI)的每种cr噬菌体、cr噬菌体混合剂或仅阴性对照的LB混合。使经处理的种群在有氧、摇动条件下于37°C下在酶标仪(plate reader)中生长24小时,以通过光密度(OD 630nm)监测经处理的种群的生长。

[0290] 将大肠杆菌MG1655生长至对数中期,并用感染复数(MOI;噬菌体与细菌的比率)进行如下处理:图19A,将crT7以0.0001、0.01和1.0的MOI孵育;图19B,crT7m以0.0009、0.09和9.0的MOI孵育;图19C,crT4以0.0006、0.06和6.0的MOI孵育。将每种噬菌体等量混合以制成cr噬菌体混合剂(“混合剂”),并以0.0006、0.06和6.0的MOI(每种cr噬菌体)孵育(如图19D所示)。图19E是图19D的放大图。

[0291] 正如预期的那样,所有cr噬菌体均裂解靶标而与MOI无关。值得注意的是,在存在初始噬菌体剂量的情况下,经过24小时连续培养,在crT7m高剂量种群(图19B)和crT4低剂量种群(MOI=0.0006,图19C)中出现了耐药性种群。但是,当用crT7、crT7m和crT4的混合剂

攻击时,未观察到耐药菌群(图19D和图19E)。

[0292] 如图20所示,在cr噬菌体浓度和可观察到的裂解时间之间观察到剂量依赖性关系,与MOI相比,可量化裂解时间。裂解时间定义为在细菌种群由于推测的裂解性噬菌体扩增而崩溃后,生长曲线的一阶导数达到零的时间。宿主基因组的核酸内切酶降解被认为是杀灭细菌的非裂解机制,因此生长曲线分析预计不会观察到CRISPR介导的致死率。

[0293] 将大肠杆菌MG1655生长至对数中期,并用每种cr噬菌体指示的感染复数(MOI;噬菌体与细菌的比率)进行处理。使用PRISM软件套包对生长曲线进行平滑处理,并确定平滑线的一阶导数。裂解时间计算为一阶导数在初始观察到的种群下降之后立即达到零的时间。

[0294] 对于所有3个测试的cr噬菌体,MOI超过1.0会导致最快的裂解时间,推测受每种噬菌体裂解时间的限制。观察到的crT7m和crT7的裂解时间为大约15-20分钟和crT4的裂解时间为大约45-50分钟,分别与野生型裂解噬菌体T7(~17分钟)、T7m(~15-20分钟)和T4(35分钟)一致。

实施例17:Leu0增强的cr噬菌体体内耐受性

[0295] 在腹膜炎模型中进行生存研究之前,应在体内确定每种cr噬菌体的耐受性。制备cr噬菌体,耐受性如下表13所述。

表13:体内耐受性研究的cr噬菌体。

研究信息		批次信息				给药信息			
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标注	PFU/mL	EU/mL	给药(mL)	# 给药	RoA
035467	耐受性	crT7	0.9% 盐水	CF;TP	2.0E+12	3	0.1	5	i.p.
035467	耐受性	对照	0.9% 盐水		N/A	<1	0.1	5	i.p.
035551	耐受性	crT7m	0.9% 盐水	CF;TP	3.7E+10	10	0.1	5	i.p.
035551	耐受性	对照	0.9% 盐水		N/A	<1	0.1	5	i.p.
035730	耐受性	crT4	1X TBS, pH 7.4 + C/M	CF;TP	6.0E+09	9.6	0.1	1	i.p.
035730	耐受性	对照	1X TBS, pH 7.4 + C/M		N/A	<1	0.1	1	i.p.

[0296] 在图21A中示意性地示出了耐受性的治疗概述。在耐受性研究中,雌性CD-1小鼠每天每只通过腹膜内注射接受100微升剂量的以下物质:5天的crT7, 2.0×10^{11} PFU/天/小鼠;5天的crT7M, 3.7×10^9 PFU/天/小鼠;1天的crT4, 6.0×10^8 PFU/天/小鼠。将crT7和crT7m悬浮在无菌、无内毒素的0.9%盐水中,同时将crT4悬浮在无菌、无内毒素的1X tris缓冲盐水(pH7.4)中,并分别补充10mM的CaCl₂和MgCl₂。如图21B至图21G所示,在给药每种cr噬菌体制剂后,在兽医观察期间未观察到明显的毒性,并且未观察到体温或体重的可测量变化。

实施例18:Leu0增强的cr噬菌体体内腹膜炎模型研究

[0297] 如下表14所示,为腹膜炎模型准备了cr噬菌体:

表14:体内腹膜炎模型研究的cr噬菌体。

研究信息		批次信息				给药信息			
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标注	PFU/mL	EU/mL	给药(mL)	# 给药	RoA
035552	腹膜炎	crT7m	0.9% 盐水	CF;TP	3.7E+10	10	0.1	5	i.p.
035552	腹膜炎	对照	0.9% 盐水		N/A	<1	0.1	5	i.p.
035468	腹膜炎	crT7	0.9% 盐水	CF;TP	2.0E+12	3	0.1	5	i.p.
035468	腹膜炎	对照	0.9% 盐水		N/A	<1	0.1	5	i.p.
035730	腹膜炎	crT4	1X TBS, pH 7.4 + C/M	CF;TP	6.0E+09	9.6	0.1	1	i.p.
035730	腹膜炎	对照	1X TBS, pH 7.4 + C/M		N/A	<1	0.1	1	i.p.

[0298] 基于三种cr噬菌体对粪便大肠杆菌分离株(ATCC8739、crT7M和crT7)或实验室

(MG1655、crT4)的活性,在带有大肠杆菌的鼠腹膜炎模型中评估了这三种cr噬菌体。图22A中示意性地示出了腹膜炎模型的治疗概述。给雌性CD-1小鼠腹膜内注射致死剂量的大肠杆菌($\sim 5 \times 10^7$ CFU/ATCC8739的小鼠),然后在30分钟内腹膜内注射盐水或cr噬菌体。如前所述,将crT7和crT7m悬浮在无菌、无内毒素的0.9%盐水中,而将crT4悬浮在无菌、无内毒素的1X tris缓冲盐水(pH7.4)中,该盐水分别补充有10mM的CaCl₂和MgCl₂。单剂量施用cr噬菌体(2.0×10^{11} PFU/剂量的crT7、 3.7×10^9 PFU/剂量的crT7M或 6.0×10^8 PFU/剂量的crT4),在这种急性、高致死率细菌攻击中产生了显著的保护作用,如图22B-图22D所示。对照动物仅用盐水注射治疗。这些数据表明,细菌噬菌体能够感染并杀灭足够数量的靶细菌,以挽救相关感染动物模型中的致死率疾病攻击。

实施例19:大腿模型中Leu0增强的cr噬菌体体内生物负荷减少

[0299] 为减少大腿模型的体内生物负荷,准备了细菌噬菌体,如下表15所示:

表15:大腿模型研究中用于体内生物负荷减少的cr噬菌体。

研究信息		批次信息				给药信息			
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标识	PFU/mL	EU/mL	给药(mL)	# 给药	RoA
035790	大腿感染	crT7m	1X TBS, pH 7.4	PE;CC	$2.0E+12$	<100	0.1	1	i.m.
035790	大腿感染	crT4	1X TBS, pH 7.4	CF;CC	$2.0E+11$	<1000	0.1	1	i.m.
035790	大腿感染	crT7	1X TBS, pH 7.4	PE;CC	$4.0E+12$	<100	0.1	1	i.m.
035790	大腿感染	混合剂 (crT7m/T7/T4)	1X TBS, pH 7.4		各自 $1.0E+11$	<1000	0.1	1	i.m.
035790	大腿感染	对照	1X TBS, pH 7.4		N/A	<1	0.1	1	i.m.

[0300] 作为体内功效的第二个证明,进行了小鼠大腿感染模型以测量cr噬菌体治疗后生物负荷的减少。在图23A中示意性地示出了该大腿模型的治疗概述。本研究使用的原始cr噬菌体原液的效力为 4.0×10^{12} PFU/mL的crT7、 2.0×10^{12} PFU/mL的crT7M和 2.0×10^{11} PFU/mL的crT4,每种噬菌体均悬浮在无菌、无内毒素的1X tris缓冲盐水(pH7.4)中。将3种cr噬菌体合并到混合剂中,每种噬菌体的最终浓度为 1×10^{11} PFU/mL,每种噬菌体含有的内毒素含量估计为 $<10^3$ EU/mL。

[0301] 在细菌接种前一天和四天,通过腹膜内向左腹部注射150mg/kg的环磷酰胺使雌性CD-1小鼠中性粒细胞减少。在肌肉内注射指示的cr噬菌体或1X tris缓冲盐水(噬菌体溶媒)之前30分钟,通过肌肉注射大腿向小鼠接种 10^5 CFU的大肠杆菌MG1655。通过将100微升cr噬菌体溶液肌肉注射到同一大腿中来施用每种cr噬菌体或3种cr噬菌体的混合剂,分别对应于 4.0×10^{11} PFU/剂量的crT7、 2.0×10^{11} PFU/剂量的crT7M、 2.0×10^{10} PFU/剂量的crT4或含 1.0×10^{10} PFU/剂量的每种细菌噬菌体的混合剂。注射每种cr噬菌体后,在指定的时间点切除整个大腿肌肉、匀浆并立即稀释并平板接种,以计数每克组织存活的细菌菌落。如图23B-图23E所示,对于crT4,测定CFU降低约2个对数,对于crT7M为3个对数,对于crT7和组合的cr噬菌体混合剂,其CFU降低约>5个对数。结合图22B-图22D所示的腹膜炎结果,这些数据表明cr噬菌体具有成为体内高效抗菌剂的潜力。

实施例20:通过噬菌体滴定测量的Leu0增强的cr噬菌体体内持久性和分布研究

[0302] 鉴于活性噬菌体产品的独特PK/PD/ADME考虑因素,评估了每种cr噬菌体在靶组织和远端器官中的持久性和分布,以了解健康动物中暴露的动力学。如下表16所示,通过尿道内施用制备了用于体内持久性和分布研究的细菌噬菌体:

表16:用于体内持久性和分布研究的cr噬菌体。

研究信息		批次信息					给药信息		
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标识	PFU/mL	EU/mL	给药 (mL)	# 给药	RoA
036239	持久性 & 分布	混合剂 (crT7m/T7)	1X TBS, pH 7.4	CF	各自 2.0E+10	未测定	0.05	1	i.u.
036239	持久性 & 分布	对照	1X TBS, pH 7.4		N/A	<1	0.05	1	i.u.

[0303] 通过尿道内滴注到N=3只小鼠/条件/时间点,将悬浮在1X tris缓冲盐水(pH 7.4)中的crT7/crT7m混合剂的约 1.0×10^9 PFU/剂量/噬菌体处理雌性CD-1小鼠。尿道内滴注是通过将硅胶头注射器插入雌性小鼠的尿道中并将溶液直接注入膀胱中完成的。在异氟烷麻醉下,每只小鼠通过尿道内滴注给药约50 μ L的赋形剂或噬菌体混合剂。在接种后0(在尿道内施用之后立即)、0.5、1、6、12、24和72小时的时间点,在每个时间点处死3只小鼠,并收集膀胱、肾脏、血液、肝脏和脾脏的全组织匀浆,将其稀释并进行噬菌体滴定分析以定量crT7和crT7m的总量。显示的平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM)是来自3只动物的3次技术重复试验的结果,并量化每克(膀胱、肾脏、肝脏、脾脏)或每毫升(血液)crT7或crT7m(测定并不特定于任一cr噬菌体)的噬斑形成单位。对已知易受crT7和crT7m感染的宿主进行常规细菌噬菌体滴定,将cr噬菌体量化为合并测量。

[0304] 如图24所示,在给药后72小时内检测到活性cr噬菌体的存在。由于正常组织中缺乏靶大肠杆菌复制宿主,并且无法在哺乳动物细胞中复制,因此未观察到此时间段的表现扩增。重要的是,cr噬菌体水平随着时间的推移在膀胱中下降,并且到72小时仍未在肾脏、肝脏、血液和脾脏中检测到,这表明在治疗的动物中缺乏合适的大肠杆菌复制宿主会导致cr噬菌体随时间流逝。值得注意的是,在肾脏中观察到显著的噬菌体滴度,表明在某些情况下,尿道内施用途径会导致下尿道和上尿道暴露。另外,在血液、肝脏和脾脏组织中检测到显著的噬菌体滴度,表明cr噬菌体似乎通过穿过尿道上皮进入循环。

实施例21:通过定量PCR测量的Leu0增强的cr噬菌体体内持久性和分布研究

[0305] 开发了一种基于PCR的定量方法,并验证了该方法可检测给定混合剂(数据未显示)中的每种cr噬菌体,从而使检测水平低至复杂样品(例如混合的小鼠血液和整个DNA)中每ng的总DNA为50拷贝。定量PCR是检测和定量DNA的高度特异性方法,理论上能够测量样品中每个工程化的cr噬菌体的总量,因为引物设计用于识别包含相同crRNA盒插入物的特定噬菌体基因组。如下表17所述,通过口服施用制备了用于体内持久性和分布研究的cr噬菌体:

表17:用于体内持久性和分布研究的cr噬菌体。

研究信息		批次信息					给药信息		
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标识	PFU/mL	EU/mL	给药 (mL)	# 给药	RoA
035789	持久性&分布	混合剂 (crT7m/T7/T4)	1X TBS, pH 7.4	CF	各自 1.35E+10	未测定	0.2	1	oral
035789	持久性&分布	对照	1X TBS, pH 7.4		N/A	<1	0.2	1	oral

[0306] 在小鼠中进行了一项小型研究,以确定在单次口服cr噬菌体溶液后一段时间内是

否存在多个cr噬菌体。为了减轻潜在的噬菌体降解,在cr噬菌体给药前约30分钟,给小鼠管饲0.2mL的6%碳酸氢钠以降低胃酸水平。在每个条件/时间点通过口服管饲法分别向N=3小鼠单剂量施用200 μ L的1X tris缓冲盐水(pH 7.4)中的单次剂量的总计 2.7×10^{10} PFU的crT7、crT7m和crT4。在各个时间点处死动物,并从整个组织匀浆提取总DNA,进行qPCR分析以量化存在的crT7(图25A)、crT4(图25B)或crT7m的量。显示的平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM)是来自3只动物的3次技术重复的结果。

[0307] 如图25A至图25C所示,有可能成功地在穿过胃肠道以及在粪便中通过胃肠道的过程中成功地检测每种cr噬菌体。到72小时,在任何组织中均未检测到大量的cr噬菌体混合剂,表明cr噬菌体已成功清除。这些数据证实了单次尿道内施用后cr噬菌体随时间的流失,如图24中的噬菌体滴定所定量。值得注意的是,这些数据表明口服cr噬菌体会导致全身暴露,特别是在血液和肝脏组织中,如图24尿道内施用后观察到的。

实施例22:Leu0增强的cr噬菌体非GLP毒理学研究

[0308] 每天一次连续7天向雌性Cr1:CD-1小鼠静脉内施用(1.0×10^{11} PFU/剂量/噬菌体)含crT7和crT7m的cr噬菌体混合剂测试品或通过导管内滴注到膀胱中(0.5×10^{11} PFU/剂量/噬菌体)。如下表18所述,制备用于7天毒理学研究的cr噬菌体:

表18:用于7天的毒理学研究的cr噬菌体。

研究信息		批次信息					给药信息		
研究	研究类型	噬菌体	稀释剂	产品标识	PFU/mL	EU/mL	给药(mL)	# 给药	RoA
035938	7天的毒理学	混合剂(crT7m/T7)	1X TBS, pH 7.4	PE;CC	各自 1.0E+12	未测定	0.1	7	i.v.
035938	7天的毒理学	对照	1X TBS, pH 7.4		N/A	<1	0.1	7	i.v.
035938	7天的毒理学	混合剂(crT7m/T7)	1X TBS, pH 7.4	PE;CC	各自 1.0E+12	未测定	0.05	7	i.u.
035938	7天的毒理学	对照	1X TBS, pH 7.4		N/A	<1	0.05	7	i.u.

[0309] 使用无菌的无内毒素的1X tris缓冲盐水(pH 7.4)制备cr噬菌体制剂。第1组和第2组(每组9只雌性小鼠)在尾静脉中给药0.1mL的赋形剂(1X tris缓冲盐水,pH 7.4)或测试制品。使用导管注射器将第3组和第4组(每组9只雌性小鼠)给药0.05mL的赋形剂或测试制品注入膀胱。组分配和剂量水平在下表19中描述:

表19:非GLP毒理学研究的组分配和剂量水平。

给药组	动物#	测试制品	给药途径	给药体积(mL/动物)	第8天尸检动物#
1	9	赋形剂	静脉内	0.1	6
2	9	cr噬菌体	静脉内	0.1	6
3	9	赋形剂	尿道内	0.05	6
4	9	cr噬菌体	尿道内	0.05	6

[0310] 在研究期间,每天两次对动物进行临床体征监测。在给药前和第8天尸检之前,进行一次详细的临床观察。在给药前和第1、3和7天测量一次体重。在7天的给药期间测量食物消耗。在第8天,每组随机选择6只动物进行尸检,其余3只动物不进行尸检。尸检时,采集禁食至少4小时的动物的体重,并将其用于计算相对于体重的器官重量。在预定的尸检当天进行临床病理学评估、血液学(3只小鼠/组)和血清化学参数(3只小鼠/组)。死后评估包括尸

检和选定器官重量的测量。尸检时收集完整的组织清单。将收集的组织切成切片,其中一部分冷冻在液氮中(冷冻保存在 -70°C 下),另一部分冷冻保存在10%中性缓冲福尔马林中。

[0311] 没有cr噬菌体相关的死亡率或发病率,对体重没有影响,并且任一施用途径都没有异常的临床观察结果。噬菌体对血液学的相关影响仅限于较低的血红蛋白水平,而在cr噬菌体静脉内治疗组中,降低其他RBC质量相关参数、增加网织红细胞计数和降低嗜酸性粒细胞计数。cr噬菌体尿道内治疗组中,cr噬菌体对血清化学的相关影响仅限于较高的胆固醇和甘油三酸酯水平。在cr噬菌体静脉内治疗组中,cr噬菌体对器官重量(绝对重量以及相对于身体和大脑的重量)的影响包括脾脏和肾脏重量增加和肺部重量减少。

[0312] 总而言之,每天一次静脉内或尿道内施用cr噬菌体的耐受性良好。在噬菌体静脉内治疗组中,与测试制品相关的可能影响仅限于与红细胞质量相关的参数降低、网织红细胞计数增加、嗜酸性粒细胞减少以及脾脏、肾脏增加和肺部重量减少。在细菌噬菌体尿道内治疗组中,可能与测试制品相关的作用仅限于较高的胆固醇和甘油三酸酯水平。该研究的临床化学和器官重量结果应在使用的样本量较小的情况下进行观察(对于临床化学来说为3,对于器官重量为6),并且由于样本量较小,这些变化可能是假象。

实施例23:鉴定艰难梭菌中的Leu0当量

[0313] 如在大肠杆菌中所见,艰难梭菌中的CRISPR-Cas操纵子不受Leu0和H-NS的调节。相反,在不存在ccpA结合位点的情况下,调节由葡萄糖以ccpA依赖性方式调节。值得注意的是,CD2983的上调与营养转移期间Cas操纵子的上调相关。此外,CD2983的调节似乎受CodY(全球严格的应答调控子)控制。I-D型系统中序列相似($>40\%$ 相似)的蛋白质的丢失已显示导致Cas操纵子的表达增加。

[0314] 因此,CodY和CD2983可能与艰难梭菌中的HNS和Leu0类似。

下表20总结了这两个系统之间的相似性:

表20:大肠杆菌和艰难梭菌中Cas操纵子调控的特征汇总。

革兰氏阴性(例如大肠杆菌)	革兰氏阴性(例如艰难梭菌)
Cas受营养条件调控	Cas受营养条件限制
HNS全局抑制因子	CodY全局抑制因子
Leu0受ppGpp调控	CodY受GTP、BCAA调控
Leu0影响BCAA生物合成	CodY影响BCAA生物合成
Leu0含有N-term HTH	CD2983含有N-term HTH
Leu0全局激活因子	CD2983特异性调控因子?

实施例24:溶原模块敲除细菌噬菌体的工程设计和验证

[0315] 工程化——在计算机上设计了一个质粒并由BioBasic合成,该质粒包含cpCD24-2中溶原性区域两侧的同源臂和靶向溶原性区域的反选择性crRNA。将质粒转化到大肠杆菌中,并缀合到艰难梭菌菌株CD19中。在携带工程质粒的CD19上扩增cpCD24-2。通过PCR筛选所得噬菌体群体中工程化噬菌体的存在。如果批量PCR筛选呈阳性,则将裂解物噬斑,并筛选单个噬斑的cI阻遏基因敲除。将纯工程改造的噬菌体扩增至高滴度,以供验证研究。

[0316] 验证——将对数中期的CD19培养物用BHI(生长培养基,无治疗对照)、WTCD24-2或 Δ cI CD24-2(即溶原模块敲除)处理。图26A示例了在治疗后的各个时间点计数的存活细胞数(CFU/mL)。进一步筛选存活细胞中是否存在溶原性的CD24-2。图26B示例了在治疗后的各

个时间点存在的溶原性细菌%。

实施例25:微生物组相关疾病的治疗

[0317] 为了调整受试者的微生物组,可以将包含本文所述的工程化细菌噬菌体的药物组合物施用于受试者。药物组合物可以通过CRISPR-Cas活性、裂解活性或其组合来调节或杀灭微生物组内的单个或多个细菌种群。

实施例26:阐述尿道内 (IU) 或静脉内 (IV) 施用后膀胱和肾脏中大肠杆菌的减少的UTI功效研究

[0318] 将用NC101定植的小鼠用盐水、噬菌体混合剂 (2.4×10^{10} PFU/mL);或环丙沙星处理。环丙沙星(1-环丙基-6-氟-1,4二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸盐)是一种抗生素,尽管有效,但使用时会产生大量副作用和细菌耐药性。

[0319] 在该实施例中,在单次剂量或5次剂量后收集组织,并分析CFU。噬菌体治疗降低膀胱(图30A-图30B)和肾脏(图30C-图30D)中的CFU。该结果示例了噬菌体的尿道内和静脉内递送降低了膀胱中的CFU。进一步地,该结果示例了cr噬菌体混合剂在膀胱中在120小时时的杀灭作用比wt噬菌体混合剂高1.5-3.5个对数(图30B)。该结果还示例了,不管递送途径如何,在120h时cr噬菌体混合剂在膀胱中的表现与环丙沙星相当。

[0320] 该研究进一步说明了噬菌体对不同组织和体液例如尿液(图31A)、肾脏(图31B)、膀胱(图31C)和脾脏(图31D)的途径依赖性渗透。结果表明,不管治疗途径如何,尿液中都有可测量的噬菌体。

实施例27:通过不同的施用途径比较WT和工程化的混合剂的研究级材料的UTI功效研究比较

[0321] 用NC101定植的小鼠用盐水;细菌噬菌体混合剂 (2.4×10^{10} PFU/mL);或环丙沙星处理。单次剂量或5次剂量后收集组织并分析CFU。噬菌体治疗可降低膀胱(图33A-图33B)和肾脏(图33C-图33D)中的CFU。该结果示例了细菌噬菌体的尿道内和静脉内递送降低了膀胱中的CFU。此外,该结果示例了高滴度的cr噬菌体混合剂在膀胱中在120小时时比赋形剂的杀灭作用高5.1个对数(图33B),并且无论递送途径如何,高剂量的cr噬菌体混合剂在120小时时在膀胱中的表现都优于环丙沙星(图33B)。

实施例28:评估cr噬菌体在大肠杆菌定植的成年人中的安全性、药代动力学和潜在功效的临床试验

[0322] 1b期——通过导管滴注最大可行剂量BID对尿路定植的患者进行安全性、耐受性和PK研究。与噬菌体持续时间、分布和消除有关的药代动力学在膀胱中得到证实。无毒且不能感染人细胞的细菌噬菌体具有很高的治疗指数。

[0323] 2期——非劣势,2:1随机护理对标准护理,在患有复发性尿路感染(UTI)的成年患者(包括MDR和CR菌株)和肾盂肾炎患者中进行双盲临床试验。评估静脉内施用和施用方案。

[0324] 主要终点:治疗结束时UTI症状的缓解和治愈测试(TOC-治疗结束后7天),证明在尿液培养物上细菌病原体减少量 $\leq 10^3$ CFU/mL (TOC测量)(微生物学成功)。

[0325] 次要终点:免疫原性(存在抗噬菌体抗体)、QoL量度(疼痛/不适等)、反应的持久性。

[0326] 图34A是在尿道复发和无症状的大肠杆菌定植的成年人中实施的示例性人体研究的示意图。图34B是UTI 1b期研究的示例性研究参与者纳入和排除标准。

实施例29:CDAD患者的1b期设计

[0327] 1期:在健康志愿者中(自然发生艰难梭菌定植)进行安全性、耐受性和PK研究。评价10-14天的口服给药方案和28天的随访。评估安全性和耐受性。随时间评估粪便中噬菌体和艰难梭菌的PK分析。

[0328] 2期:非劣势研究;2:1随机化、主动护理对标准护理(即万古霉素),二线和三线CDI患者的双盲研究

- 探索性剂量查找
- 口服活性cr噬菌体混合剂与万古霉素10-14天(或者,如果尚未缓解,直至症状缓解)
- 主要终点:治疗期结束后最多8周评估腹泻的缓解时间(TTrod)、CDAD复发(腹泻的时间)和腹泻等级、安全性和耐受性评估、PK分析

- 次要终点:免疫原性(存在抗噬菌体抗体)、其他QoL措施、反应的持久性

[0329] 3期:与口服SOC(万古霉素)相比,对于一线和复发性CDI较大的患者群体进行10-14天给药方案的功效研究(40天研究),前线与复发患者治疗的亚分析

- 针对初始FDA相互作用的安慰剂对照双盲研究将确定哪些扩展数据集是必需的 • 如果2期数据提供了足够的有效性和安全性证据,则较小的数据集可能就足够了

实施例30:工程化的噬菌体显示出对IE型和IF型大肠杆菌菌株的杀灭作用增加

[0330] 对于所有宿主范围和CFU降低实验,菌株和噬菌体的制备如下。所有实验均在96孔平底透明板在含盐的LB中(10mM MgCl₂和CaCl₂)中进行,最终总体积为200uL。选择三种菌株比较WT和CRISPR噬菌体。将每种大肠杆菌菌株与Wt噬菌体(p33s;p46)或cr噬菌体(p33s-6;p46cr)以MOI为0.1分别置于微量滴定板中。对于宿主范围实验,将培养物在酶标仪中于37℃孵育20小时,以通过光密度(OD₆₀₀)监测种群的生长。对于CFU降低实验,将培养物在摇动培养箱中在37℃下培养24小时,并在0、3、6和24小时取等分试样。结果示例在图35A-图35F和图36A-图36F中。

实施例31:切换噬菌体混合剂克服了大肠杆菌中的靶细菌耐药性

[0331] 如上文所述针对菌株508和527的cr混合剂(cr33s、cr46、cr4k)建立宿主范围实验。24小时后,仅菌株508产生活菌落。将菌落再划线3x以除去任何噬菌体。使用相同的宿主范围方案,使用crCocktail和WT混合剂2(pF0、pJ0、pJc、pE8、pE4和pJ4)重新评估508个耐药菌株。结果示例在图37A-图37C中。

实施例32:针对铜绿假单胞菌菌株的野生型噬菌体PB1和CRISPR增强的PB1的比较

[0332] 将一组44个铜绿假单胞菌菌株与LB、PB1或cr-PB1在MOI为0.01($\sim 5 \times 10^5$ 细菌和 5×10^3 噬菌体或LB)下混合。菌株+噬菌体或LB在37℃下生长20小时,每小时测量600nm的光密度(OD₆₀₀),以生成生长曲线。对于未感染、PB1感染和cr-PB1感染的培养物,计算了t=4小时至t=12小时的值的黎曼和。结果示例于表21。表中的值表示与未感染的对照相比,PB1或cr-PB1(PB.工程化的)的曲线下面积(AUC)的比率。较小的数字表示光密度的较大降低。灰色框表示AUC比率<0.7。命中百分比是AUC比率<0.7的菌株的百分比。

表21

	PB1	cr-PB1
b1031	0.963297	0.870552
b1045	1.717988	1.011726
b1066	0.96017	0.98204
b1046	0.971213	0.969247
b1073	1.024263	1.017944
b1048	0.976147	0.998046
b1074	0.83458	1.072608
b1050	0.999267	1.001961
b1075	0.998144	1.021623
b1051	0.954393	0.890835
b1055	0.860689	1.192755
b1076	0.966672	0.99161
b1052	0.982928	0.947011
b1079	0.350342	0.440958
b1054	0.879394	0.987756
b1084	1.025938	0.987852

b1034	1.007372	1.028967
b1058	0.953205	1.006118
b1059	0.925737	0.983083
b1035	0.229912	0.20969
b1061	0.931473	0.993693
b1041	0.970653	0.970961
b1085	1.023776	1.001058
b1126	0.99979	0.969054
b1102	1.013489	0.998923
b1127	0.136604	0.13795
b1128	0.183435	0.164191
b1109	0.948729	0.742165
b1138	0.982688	0.967086
b1110	0.261029	0.258299
b1111	1.035309	0.969425
b1118	1.084256	1.036543
b1233	0.423587	0.253027
b1112	1.05943	1.041742
b1033	0.989803	1.002004
b1117	1.023928	1.026984
b1099	1.006169	1.150375
b1086	1.019048	1.014256
b1121	0.129781	0.126992
b1090	1.068717	1.064457
b1122	0.180161	0.181129
b1092	0.54725	0.532722
b1125	1.05666	0.986049
b1100	0.763823	0.768105
命中百分比	18.75	18.75

[0333] 生长曲线:在补充的LB (LB+10mM MgCl₂和10mM CaCl₂) 中,将LFP805固定相培养物稀释至~10⁷CFU/ml的浓度。将野生型PB1和cr-PB1噬菌体的原液在补充的LB中稀释至10⁵PFU/ml的浓度。将细菌和噬菌体原液以1:1比例混合 (MOI为0.01),并在37℃下在酶标仪中通气生长20小时。每10分钟测量一次OD₆₀₀。图38A中示例了PB1和cr-PB1的生长曲线。

[0334] CFU降低:将LFP805的固定相培养物稀释至光密度为1.0,然后将10 μ L的稀释培养物添加到180 μ L的LB($\sim 10^5$ 个细菌)中。将PB1和cr-PB1稀释至 10^8 PFU/ml,并添加10 μ L的噬菌体(10^6 PFU)或10 μ L的LB。培养物在37 $^{\circ}$ C下通气生长,并且在接种后4小时和8小时将10倍稀释液平板接种在LB琼脂上以测定每种培养物中的CFU/ml。图38B示例了未感染的(黑色条)、野生型PB1感染的(浅灰色条)或cr-PB1噬菌体感染的培养物(中灰色的条)在4小时和8小时计算的CFU/ml。使用带有Holm-Sidak比较的t检验比较PB1和cr-PB1之间的CFU。 $*=p<0.05$, $***=p<0.001$

实施例33:通过I型CRISPR-Cas系统在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中基于质粒的杀灭

[0335] 大肠杆菌I型测试:从细菌gDNA克隆了五个I型Cas系统进入pUCP19。将相应的大肠杆菌(BL21)靶向间隔子克隆到第二个相容质粒(pRSF1b)中。用每个Cas系统质粒和靶向间隔子或pRSF1b对照转化B121电感受态细胞。将转化物稀释并点种在Kan/Carb LB平板上。在37 $^{\circ}$ C下过夜孵育后计算CFU。结果示例在图39A中。

[0336] 铜绿假单胞菌的I型测试:从细菌gDNA中将四种I型Cas系统与假单胞菌属靶向间隔子一起克隆到pUCP19中。使用Locus实验室方案使电感受态PA01细胞感受态。用Cas+间隔质粒或Cas质粒转化细胞。将转化物稀释并点种在Carb300 LB板上。在37 $^{\circ}$ C下过夜孵育后计算CFU。结果示例在图39B中。结果示例了4个系统中的3个能够以最少3个对数的减少成功地靶向PA01。1个系统均未显示任一质粒的CFU。

[0337] 尽管已经在本文中示出和描述了本公开内容的优选实施方案,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,仅通过示例的方式提供了这样的实施方案。在不脱离本公开内容的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替代。应当理解,在实践本发明时采用了本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。旨在以下权利要求限定本公开内容的范围,并且由此涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

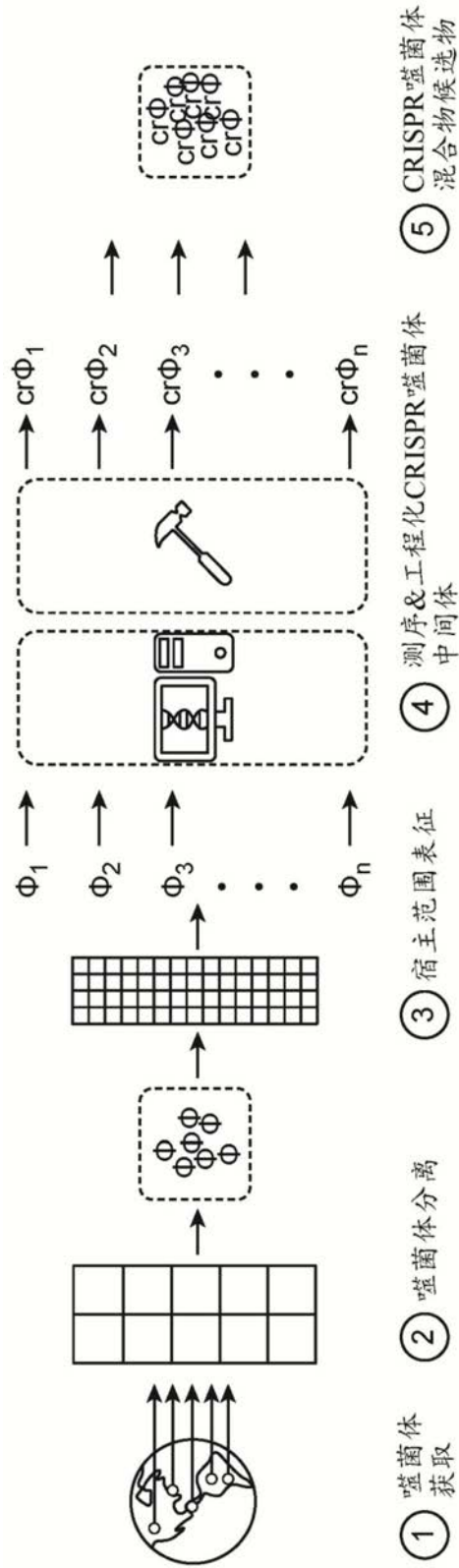


图1

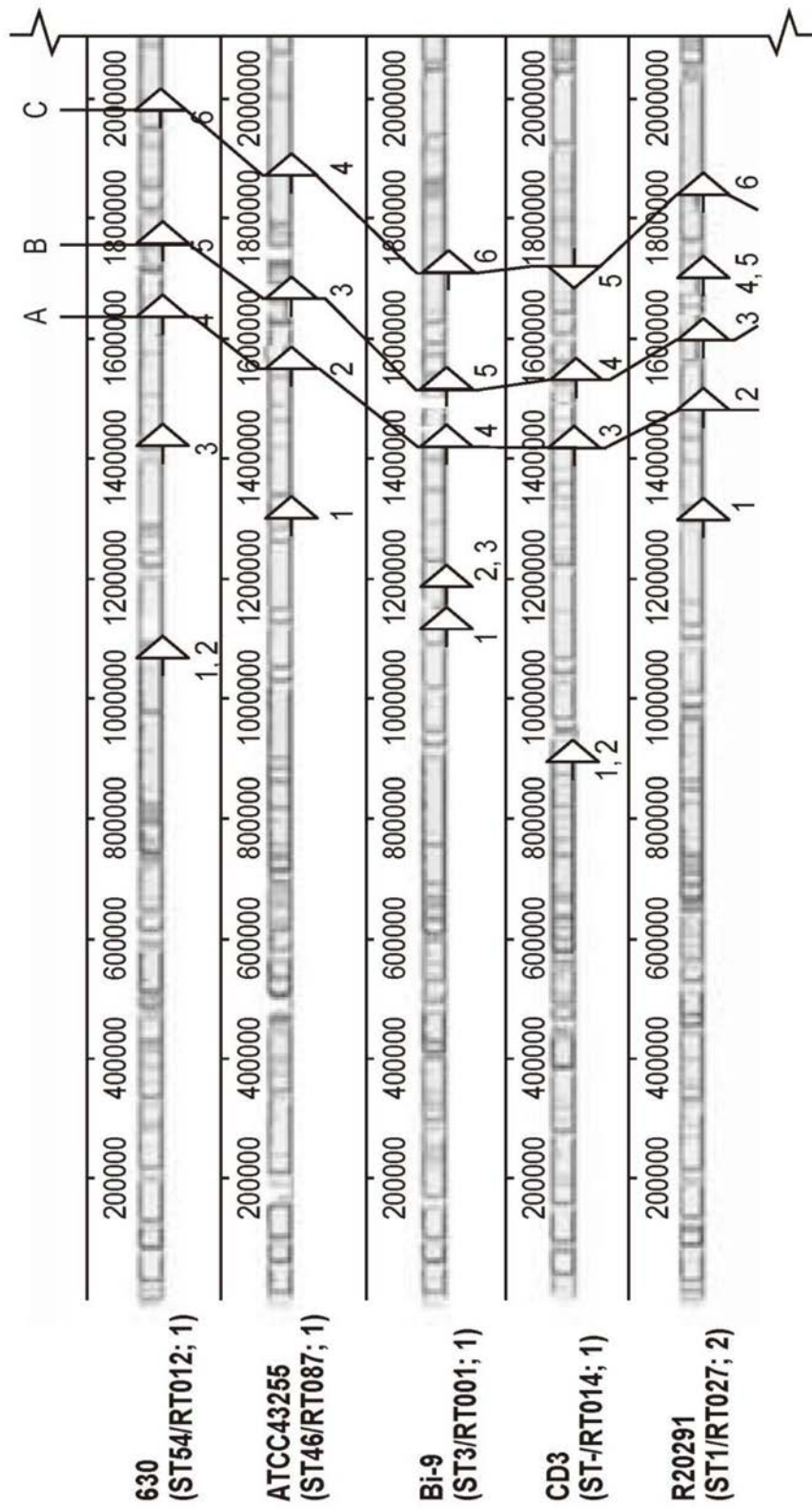


图2A

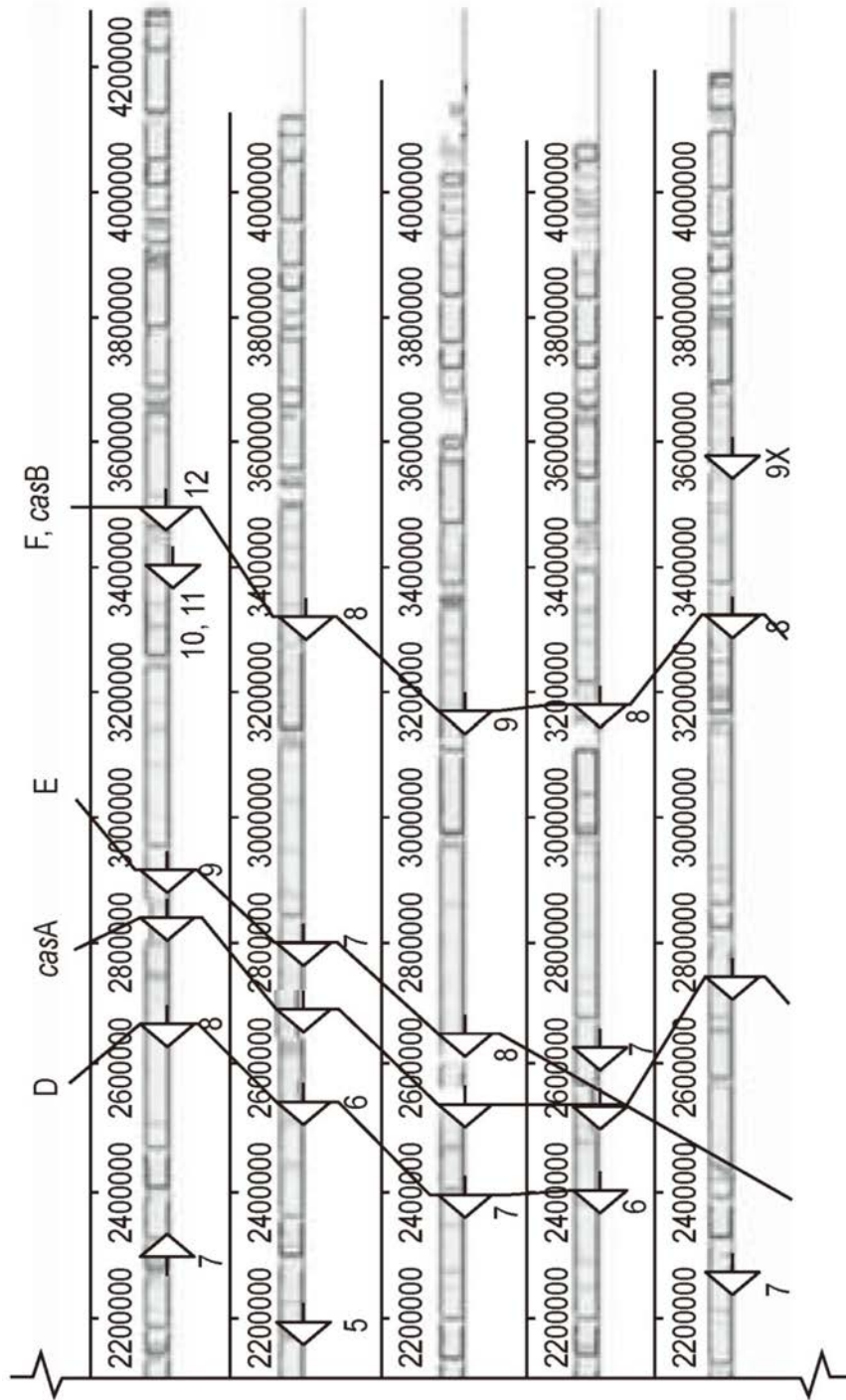


图2A(续)

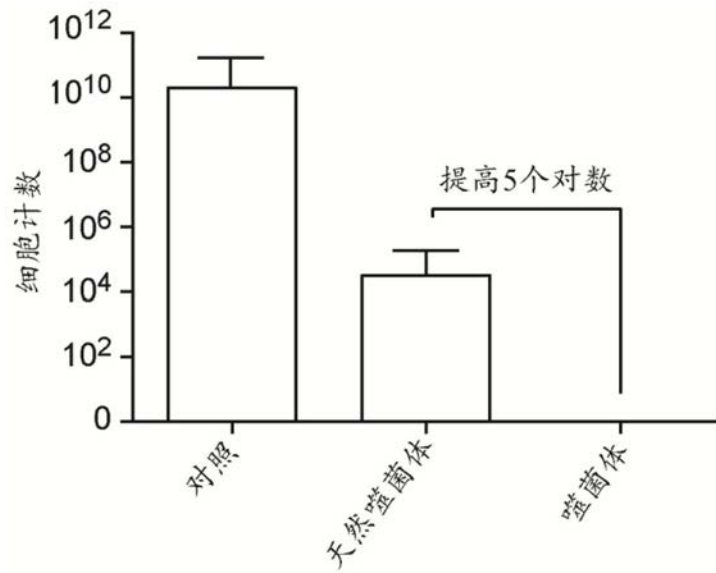


图3A

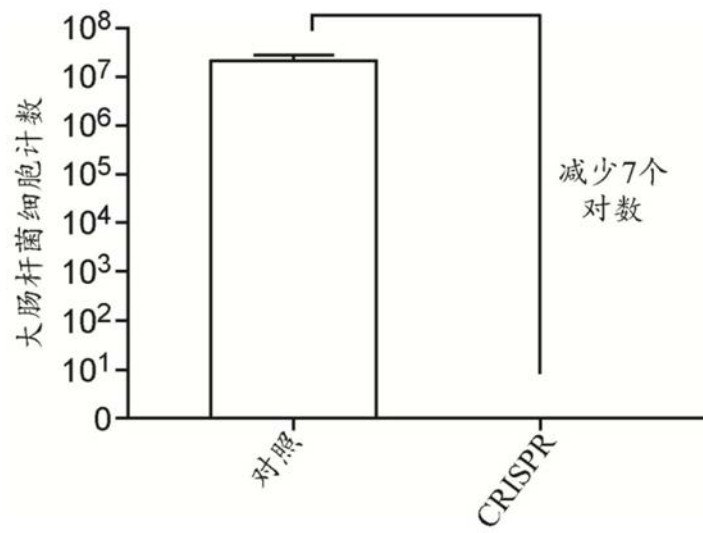


图3B

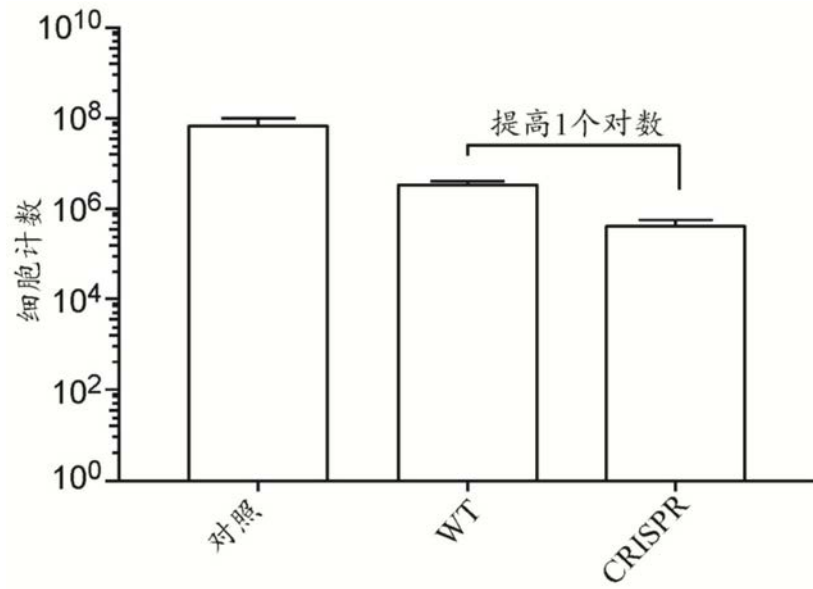


图4A

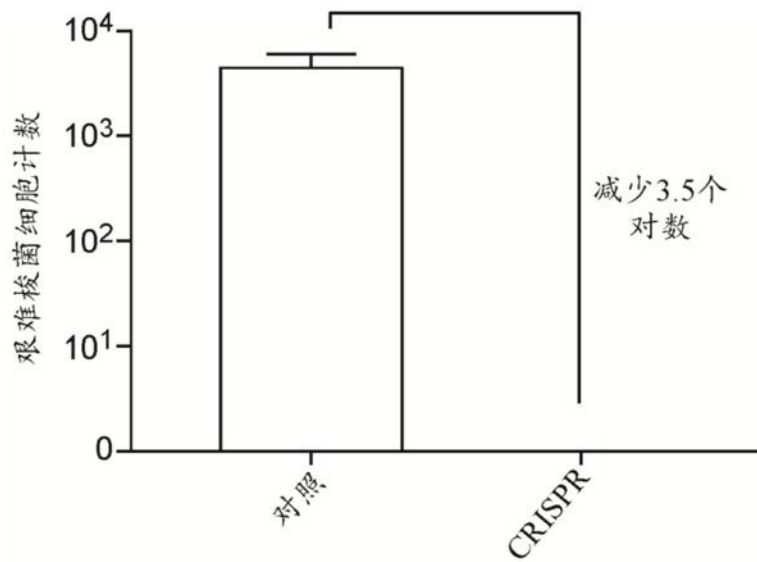


图4B



图5

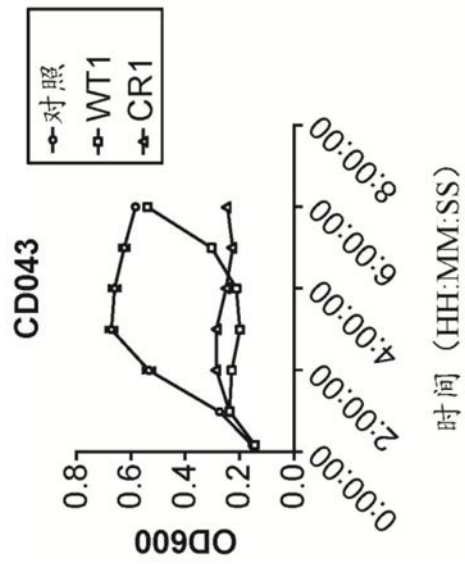


图6A

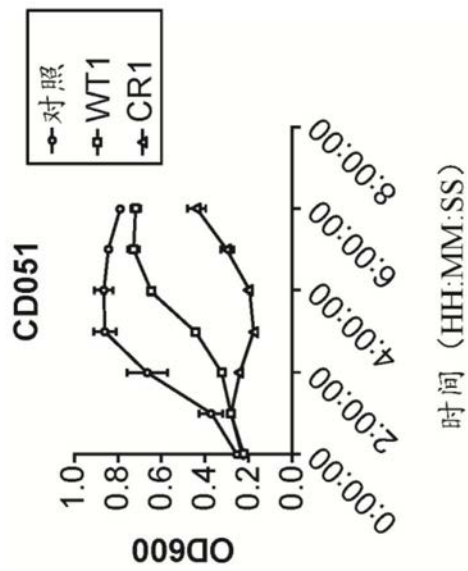


图6B

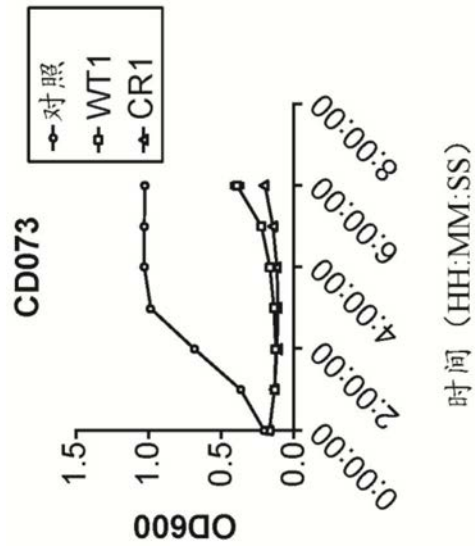


图6C

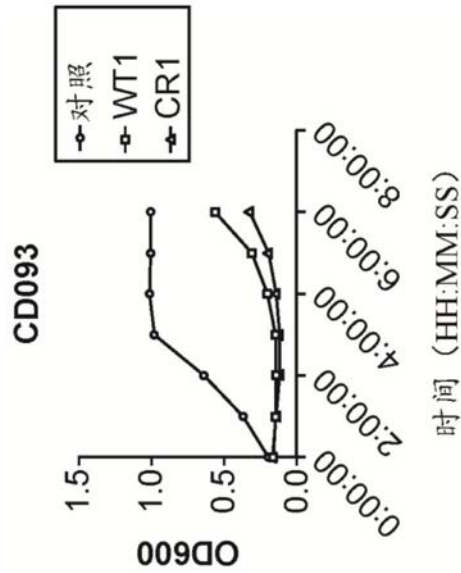


图6D

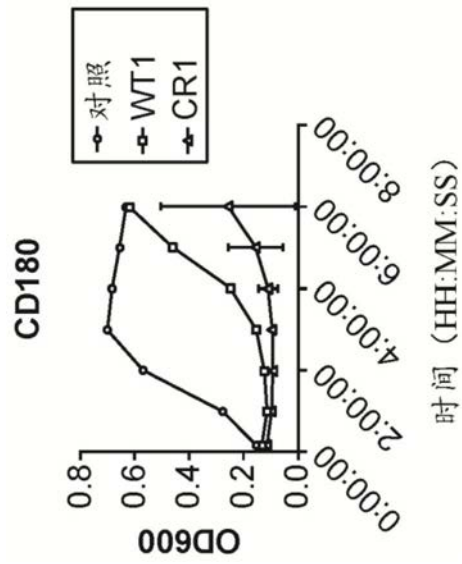


图6E

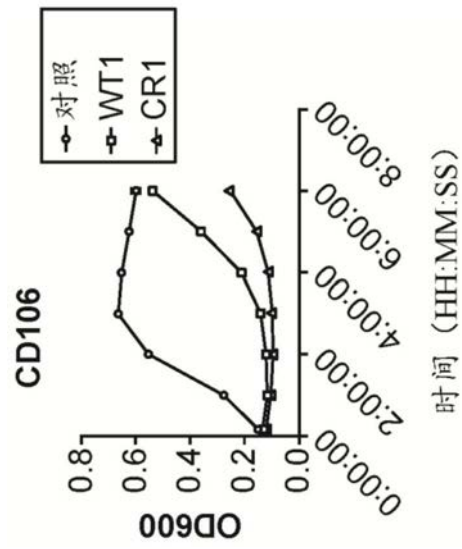


图6F

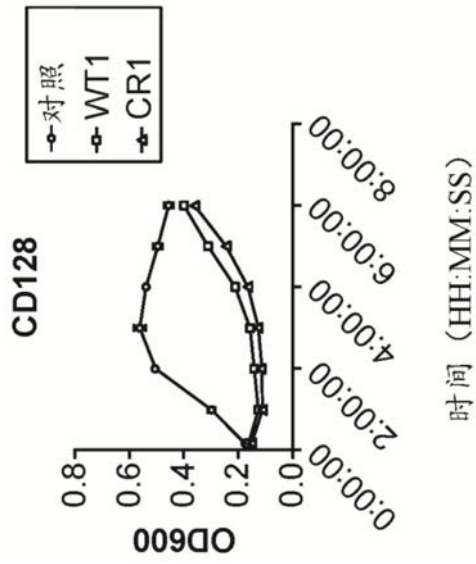


图6G

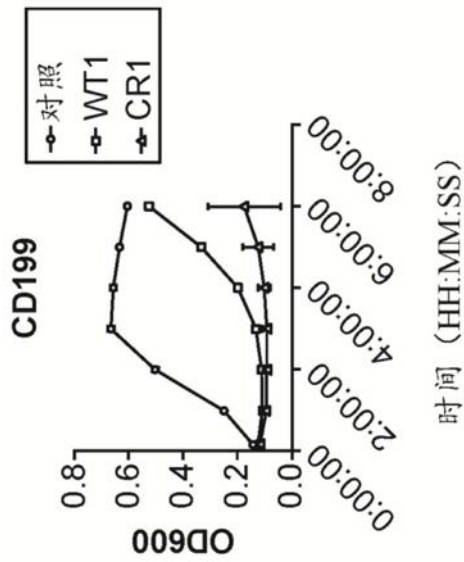


图6H

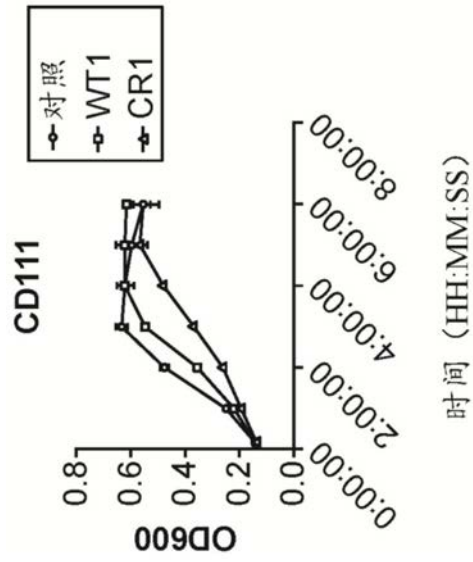


图6I

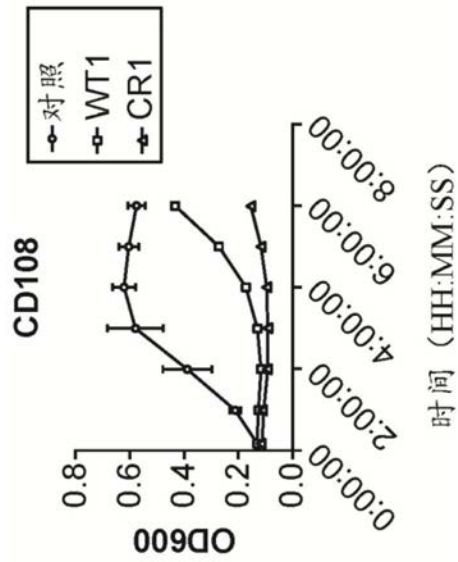


图6J

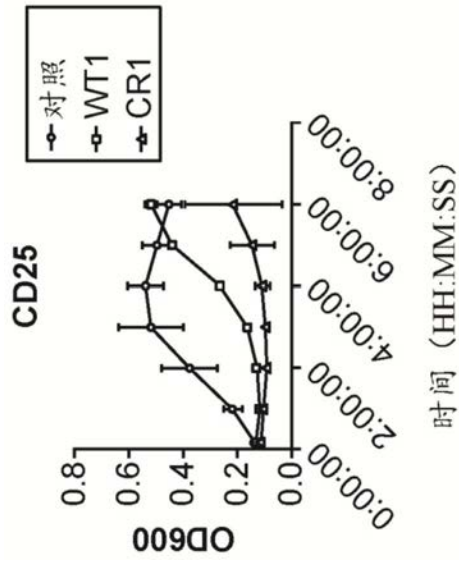


图6K

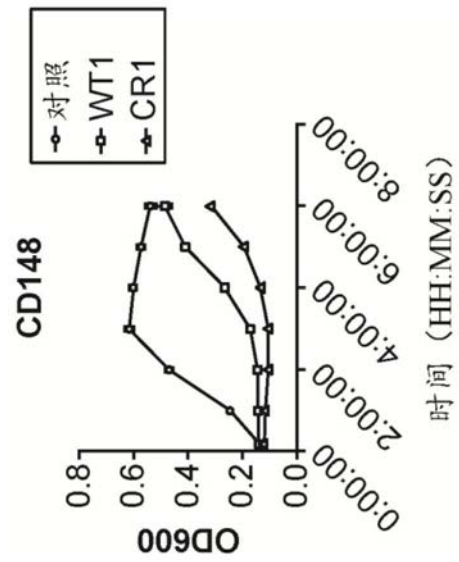


图6L

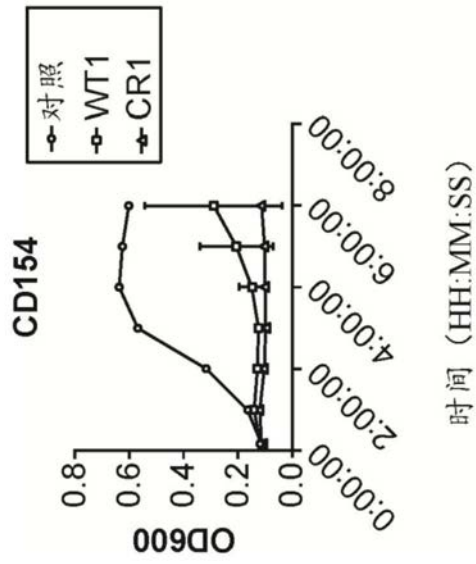


图6M

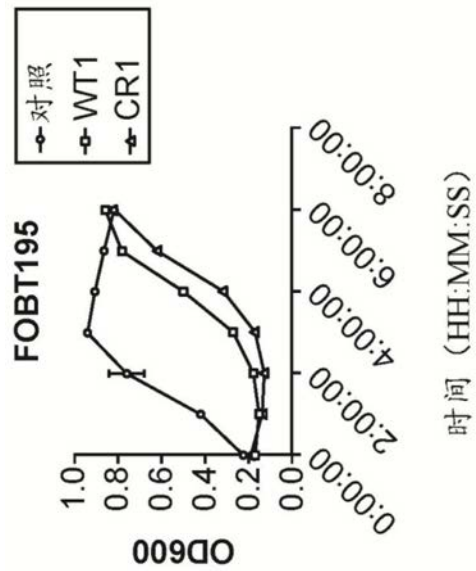


图6N

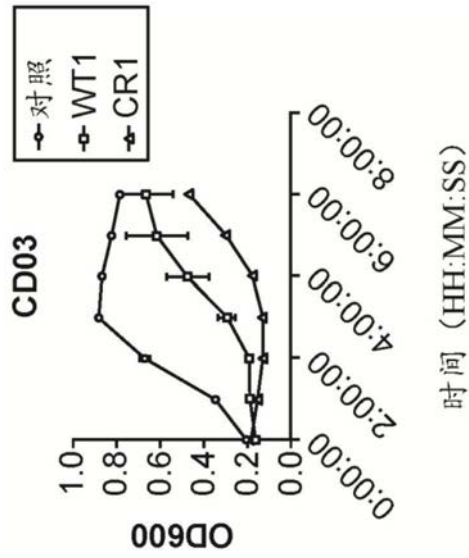


图60

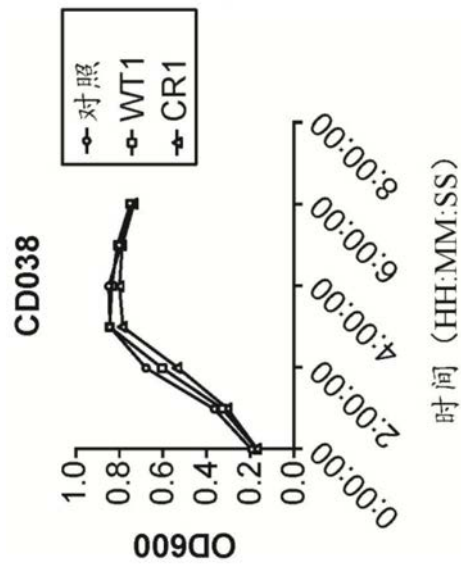


图6P

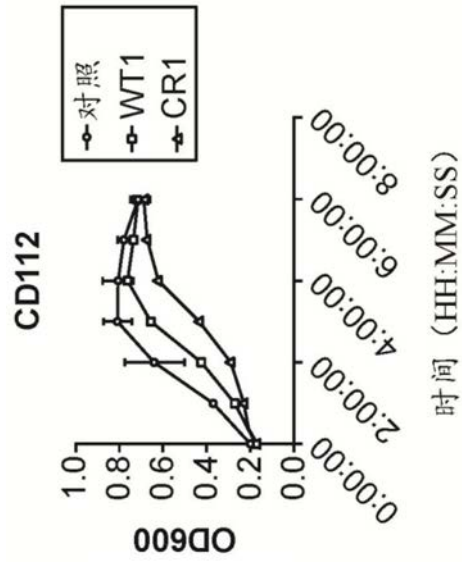


图6Q

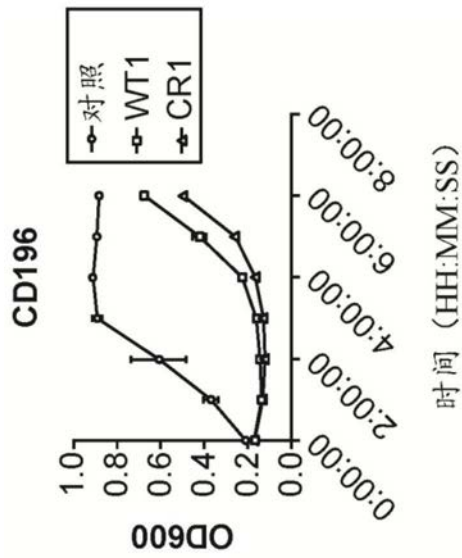


图6R

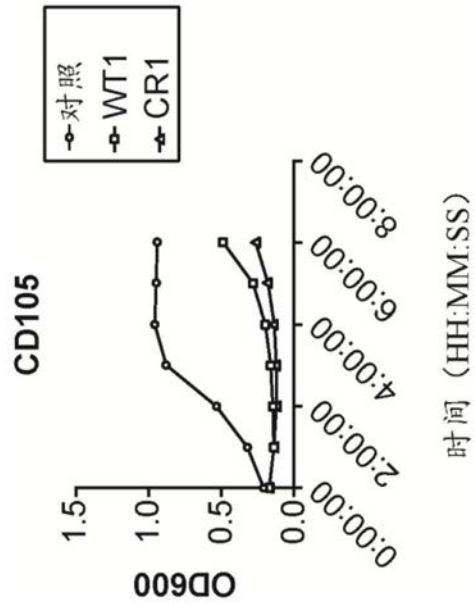


图6S

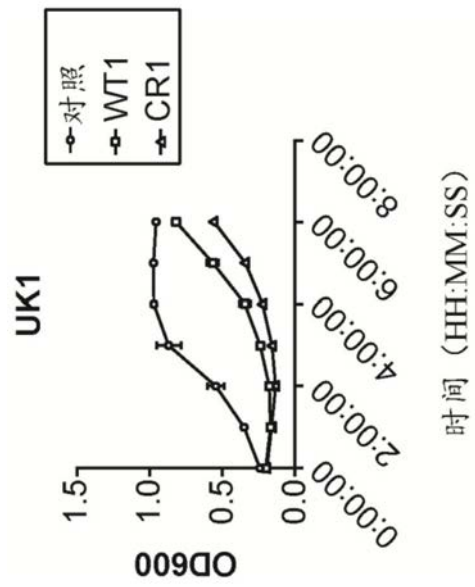


图6T

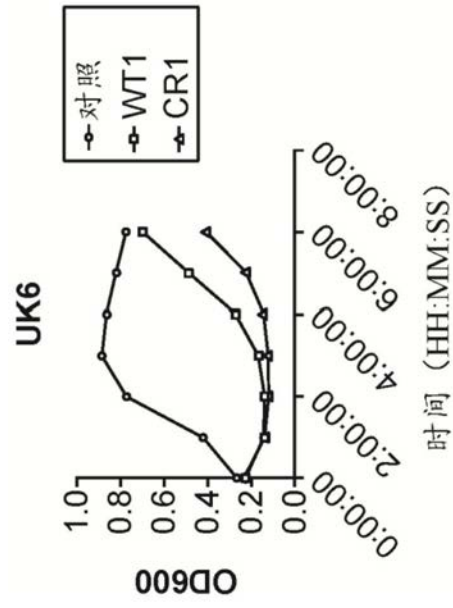


图6U

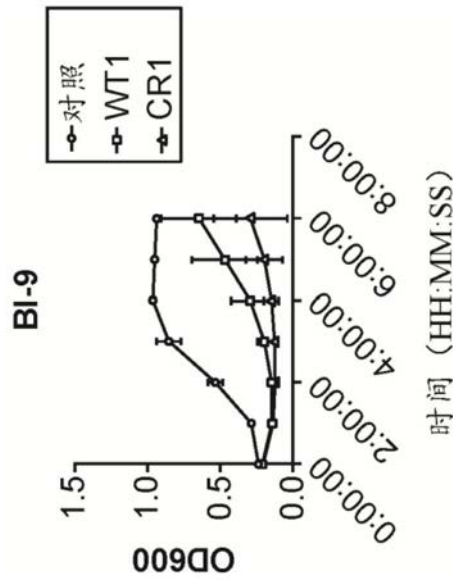


图6V

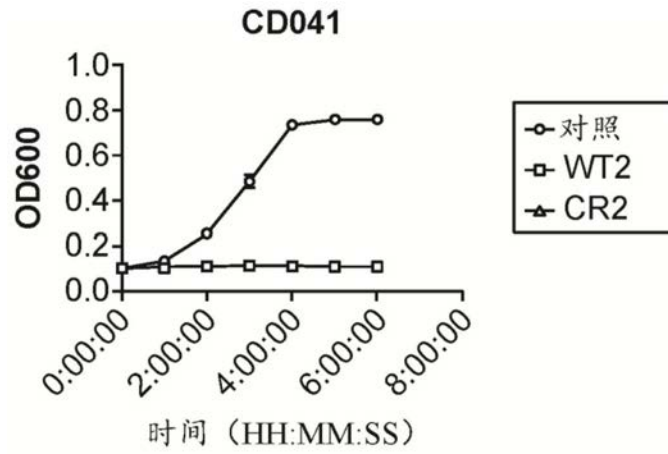


图7A

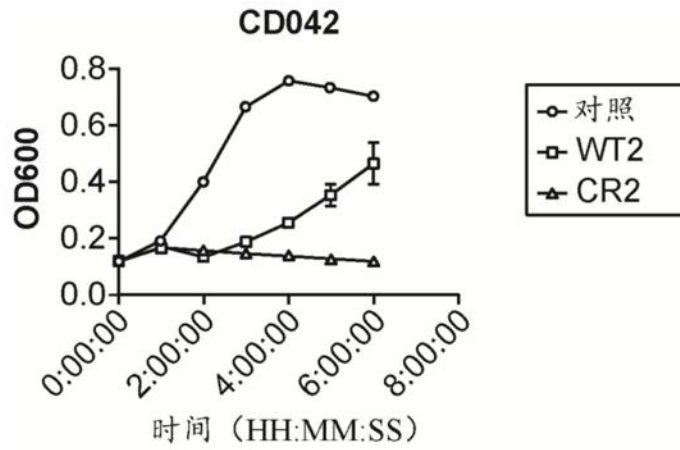


图7B

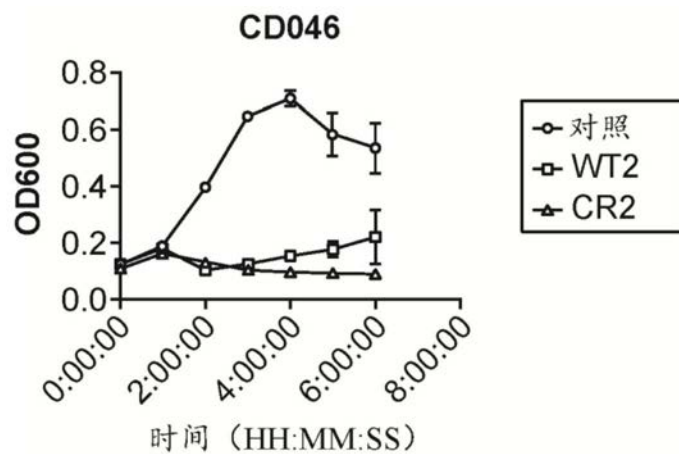


图7C

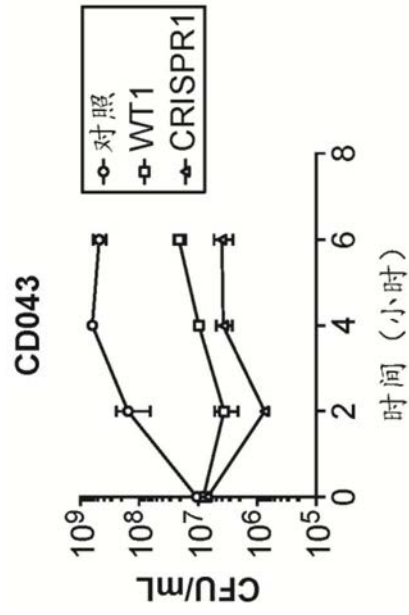


图8A

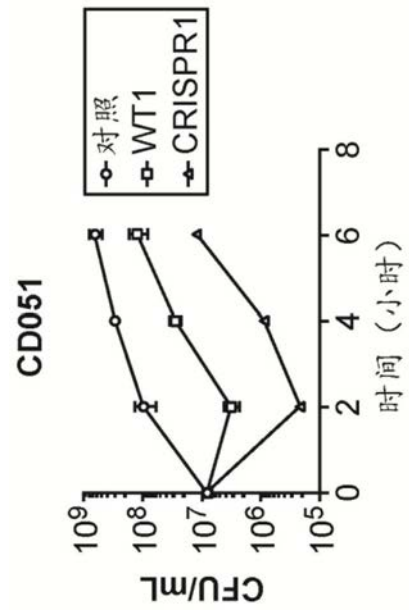


图8B

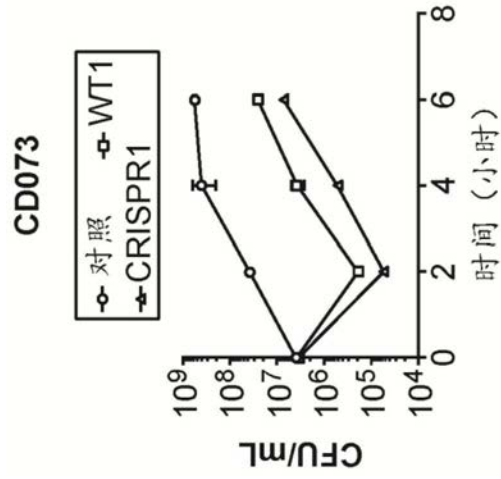


图8C

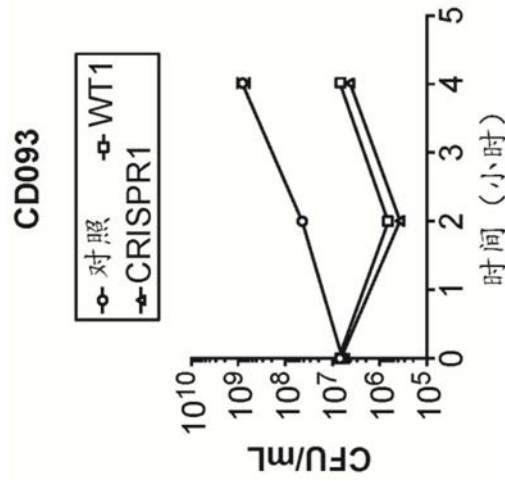


图8D

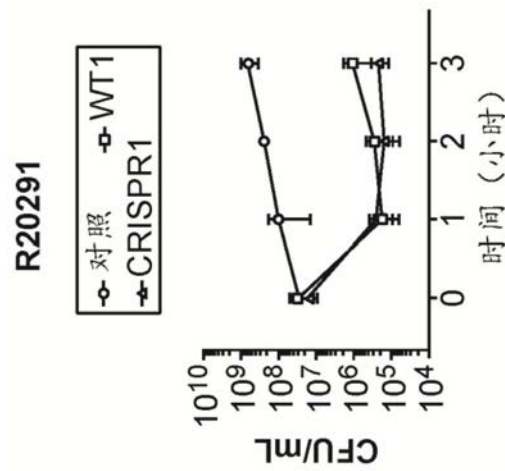


图8E

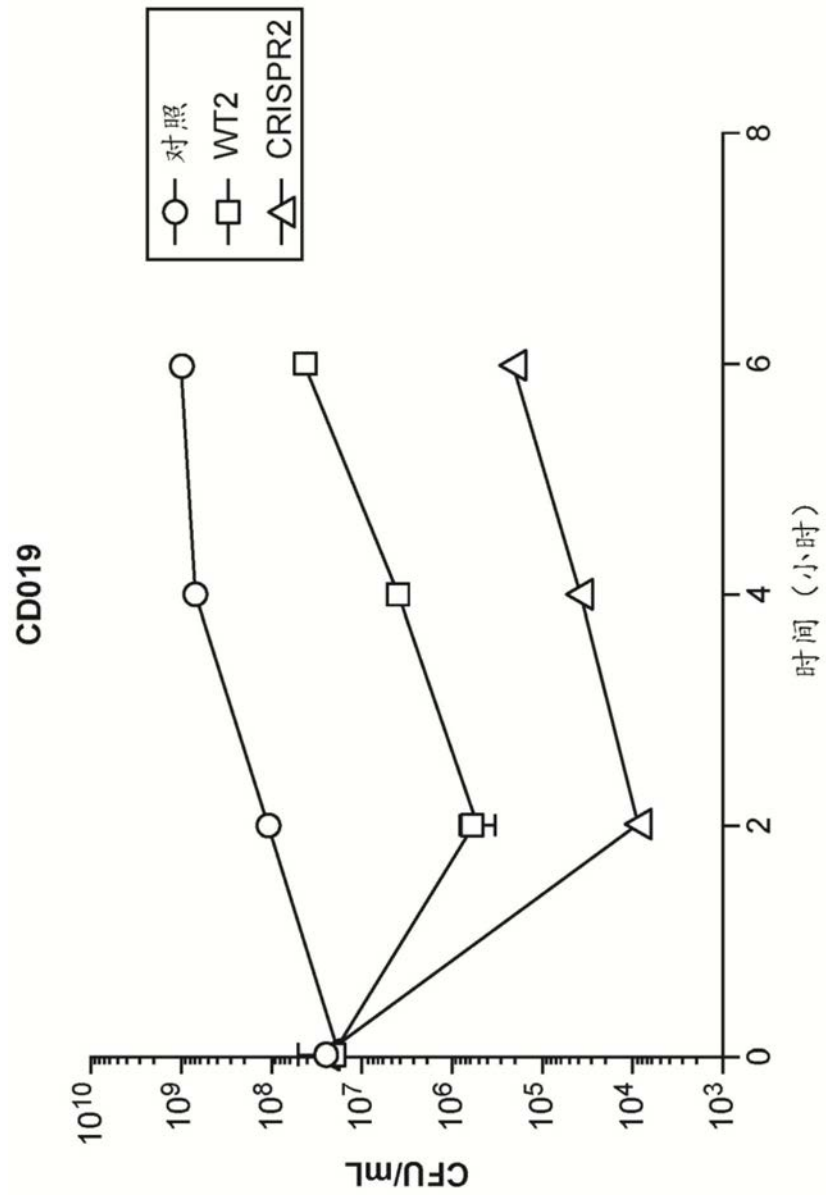


图9

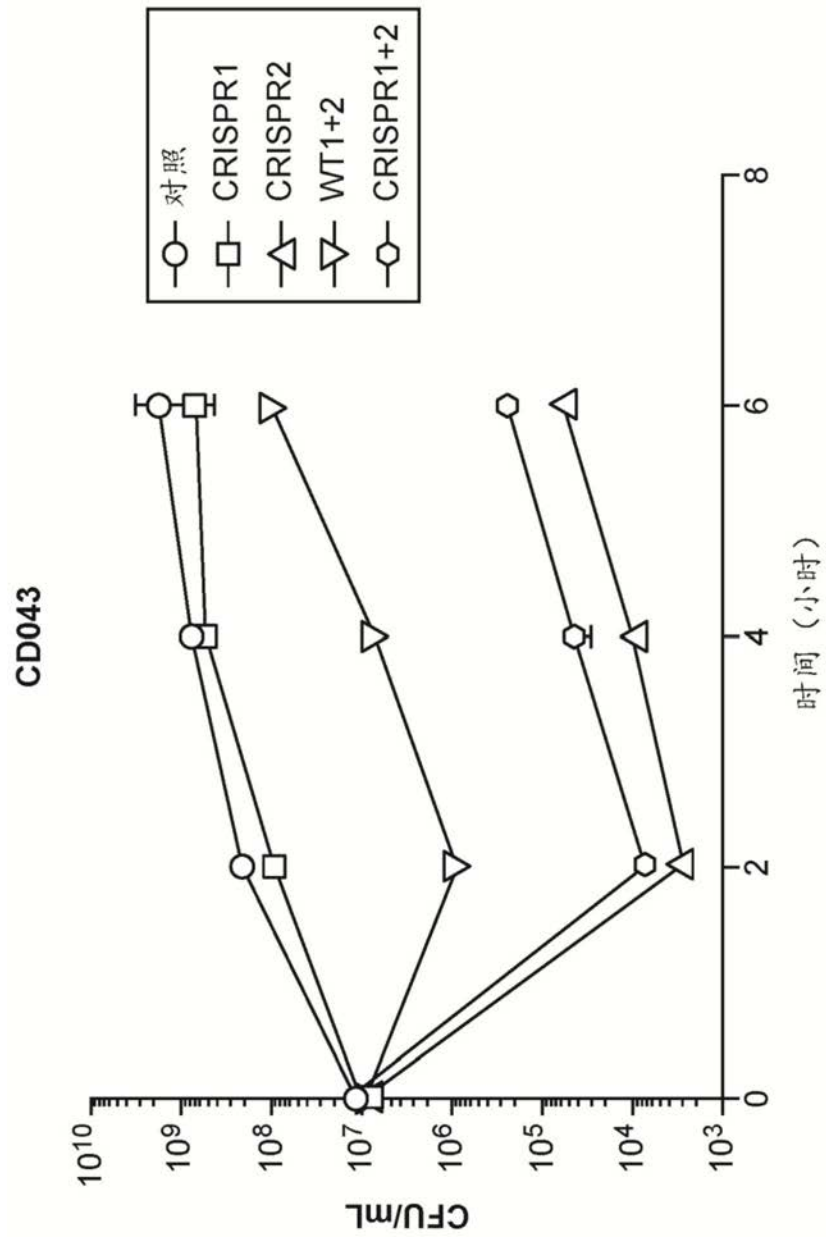


图10

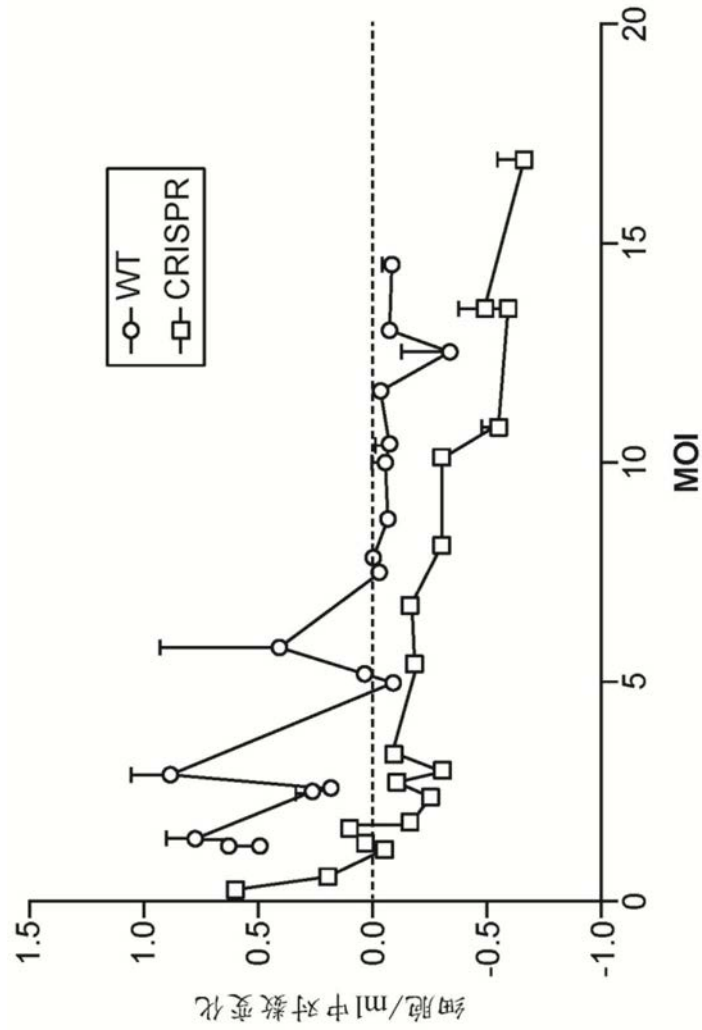


图11

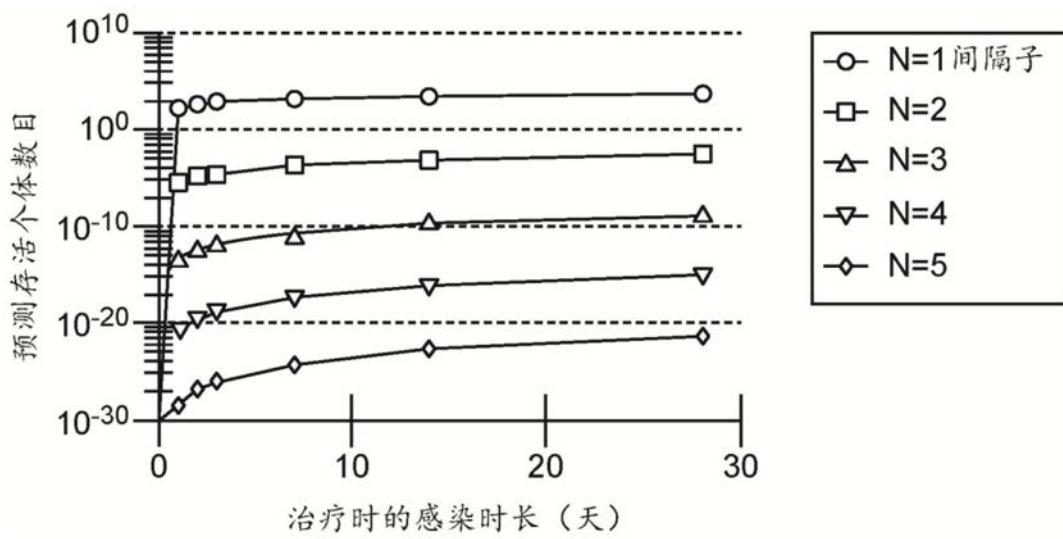


图12A

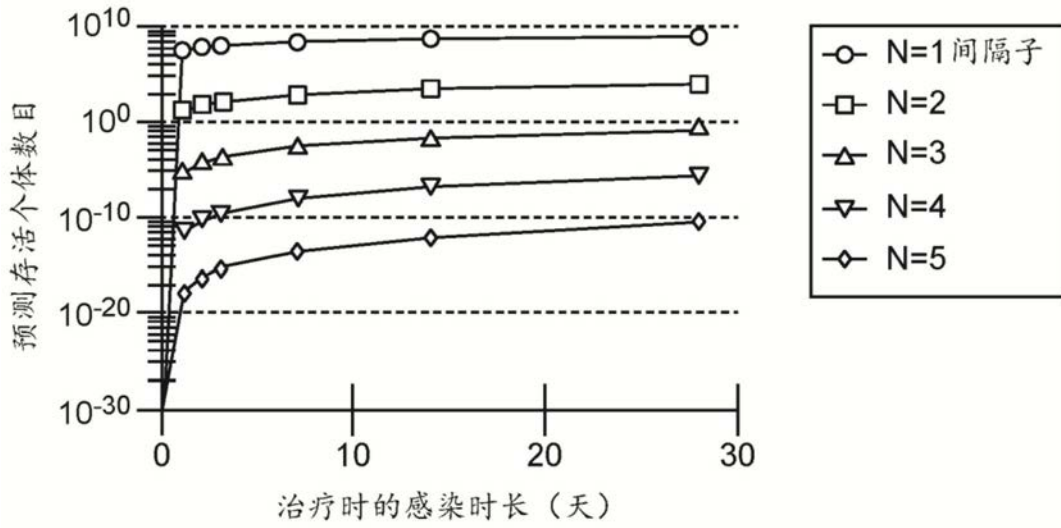


图12B

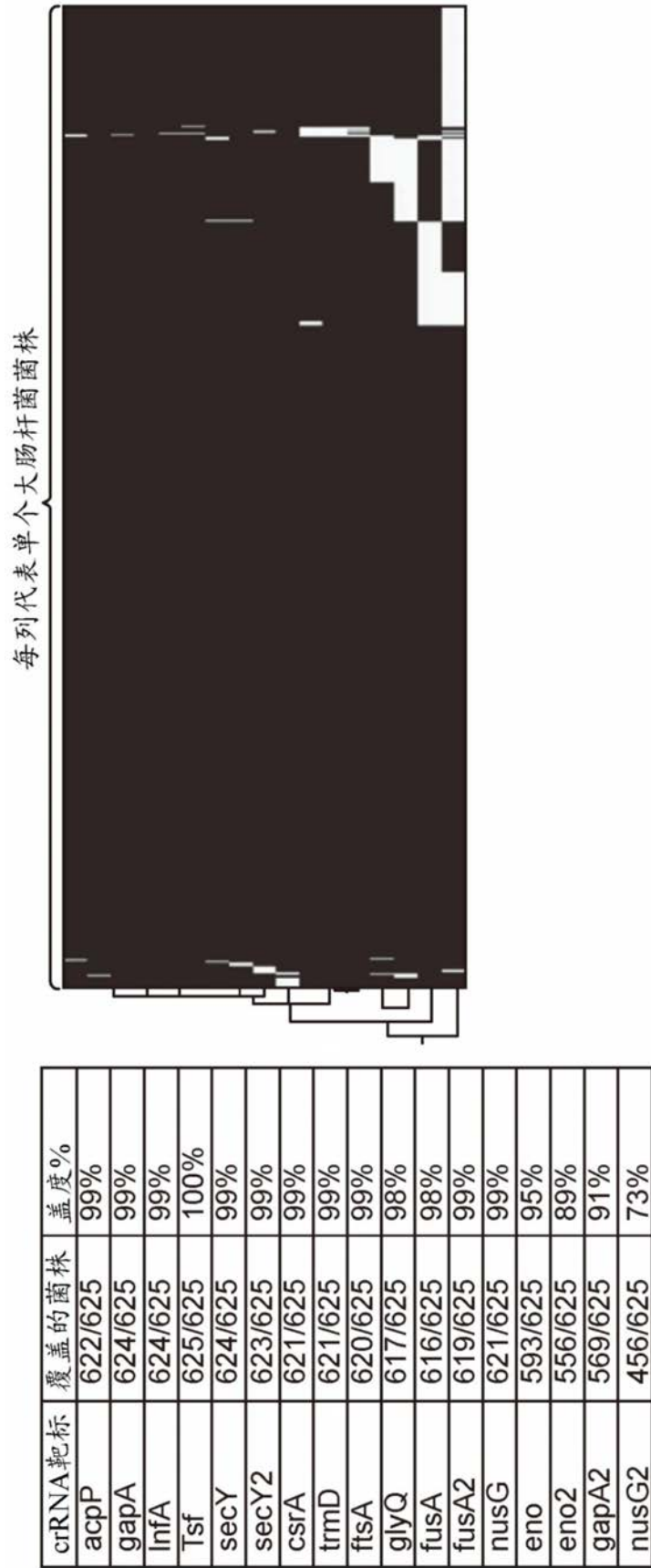


图13

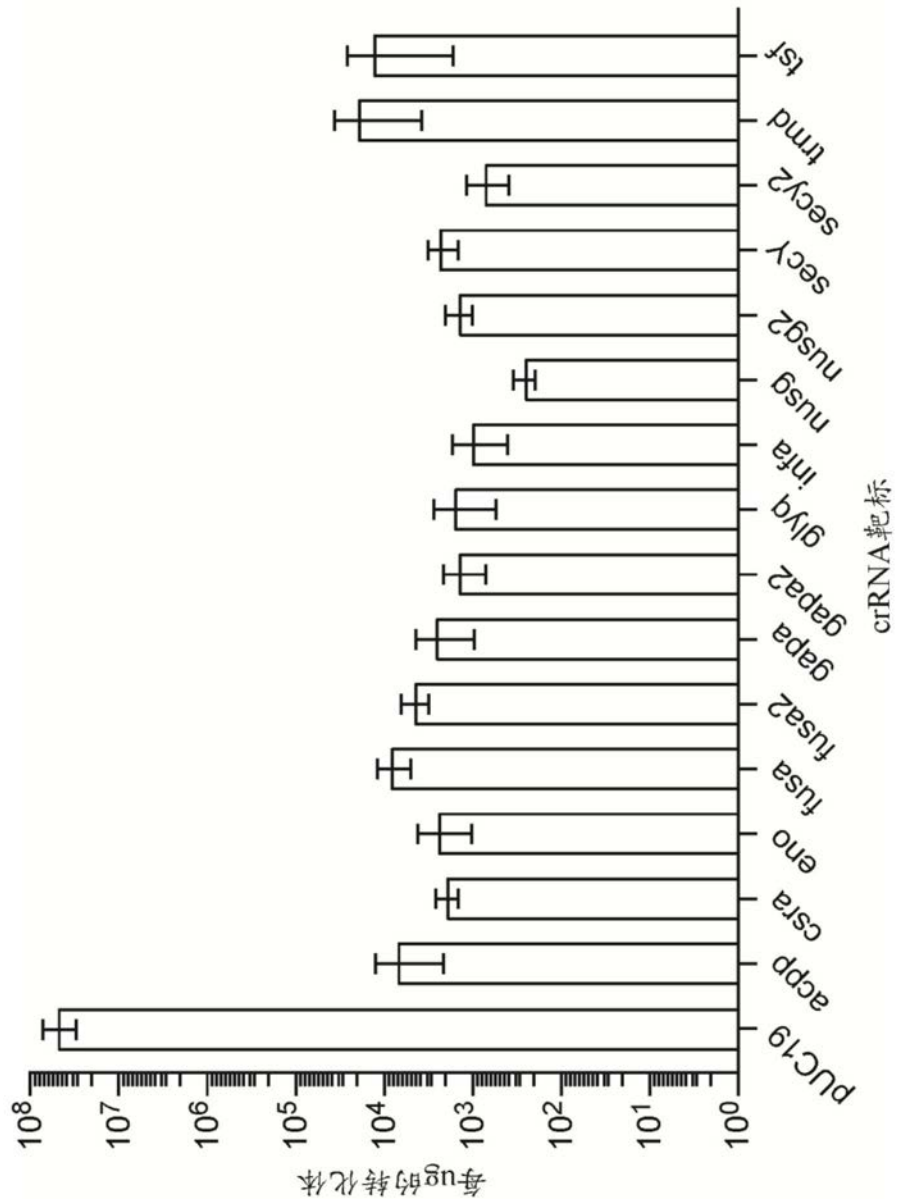


图14

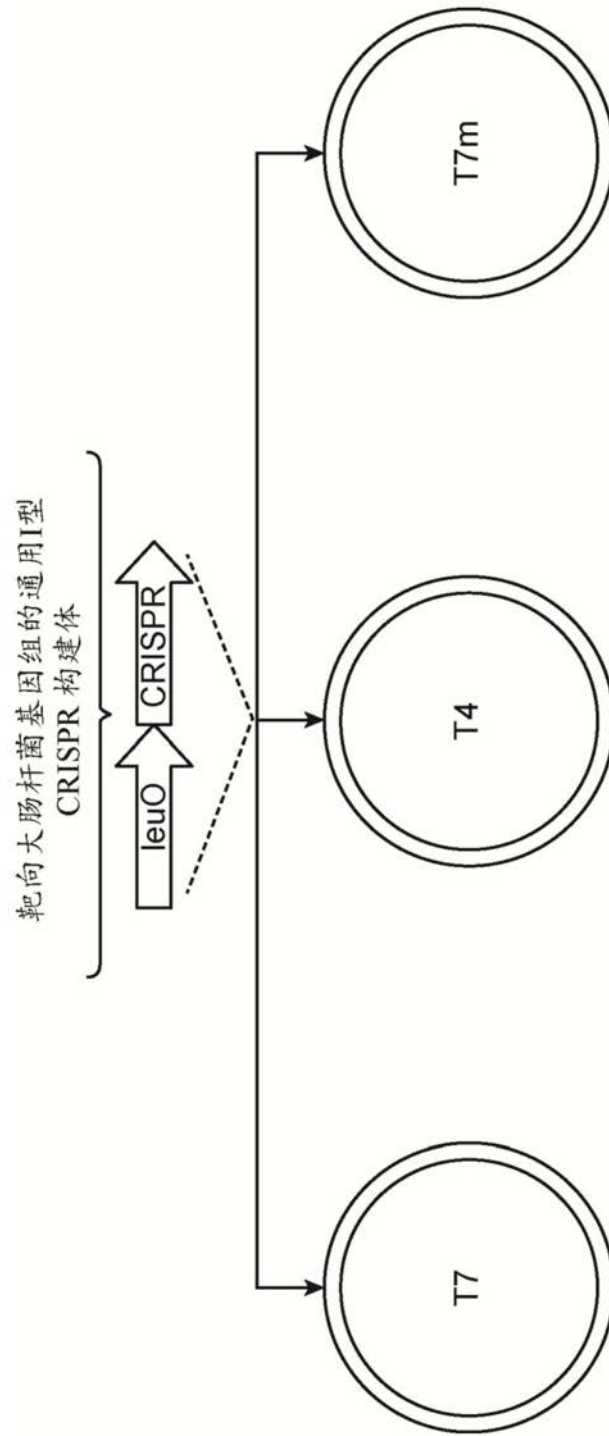


图15

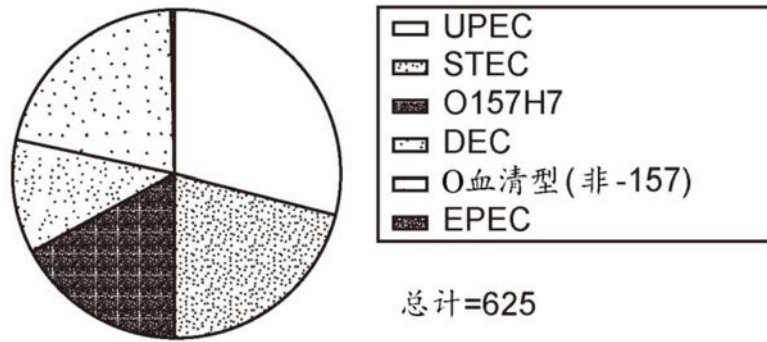


图16A

系统类型	菌株	盖度%
I-E	442/625	70.7%
I-F	45/625	7.2%
总计	487/625	77.9%

图16B

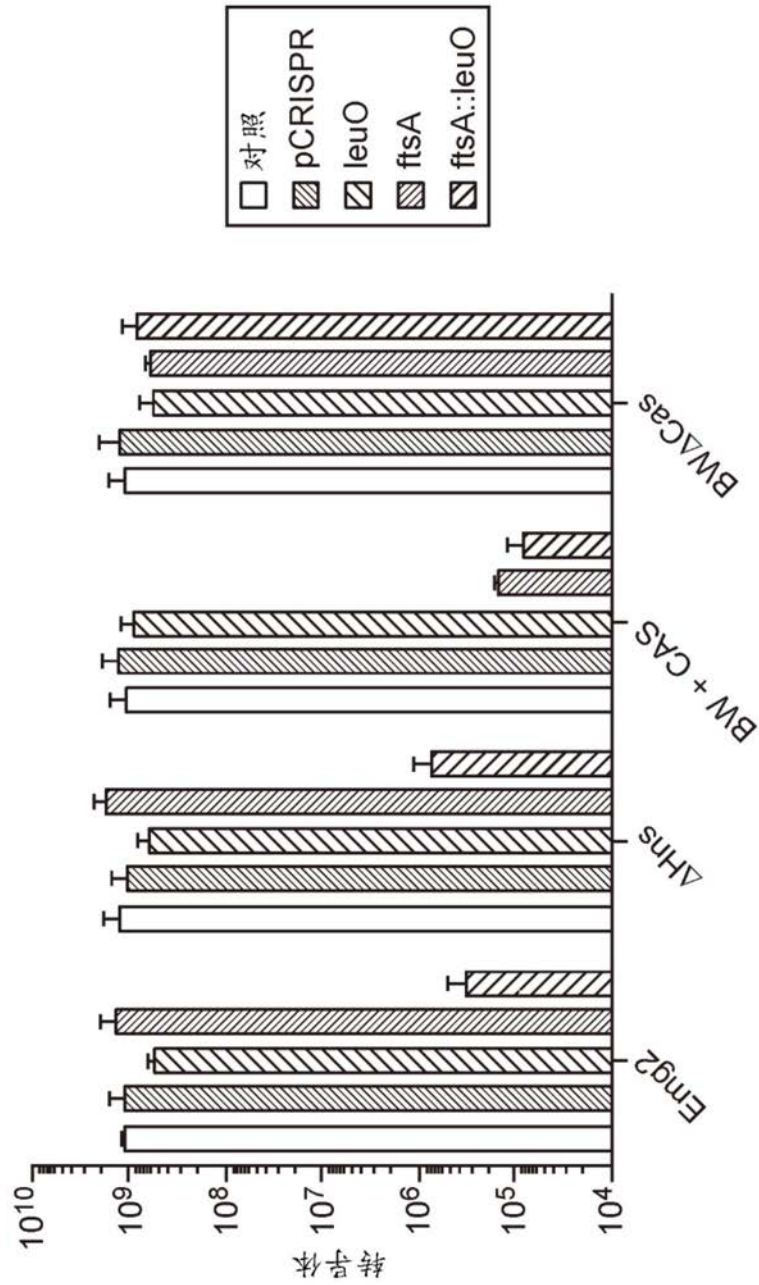


图17

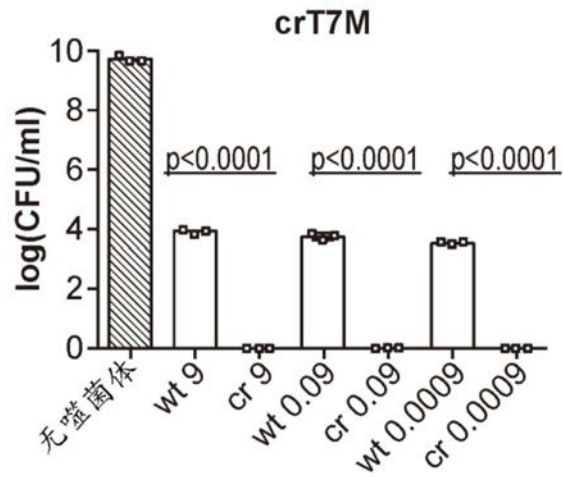


图18A

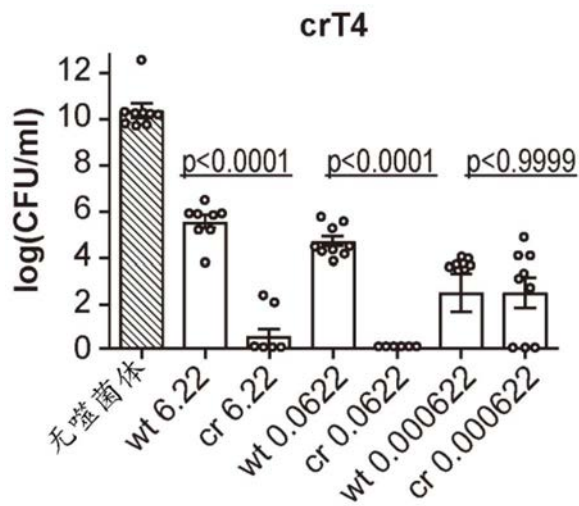


图18B

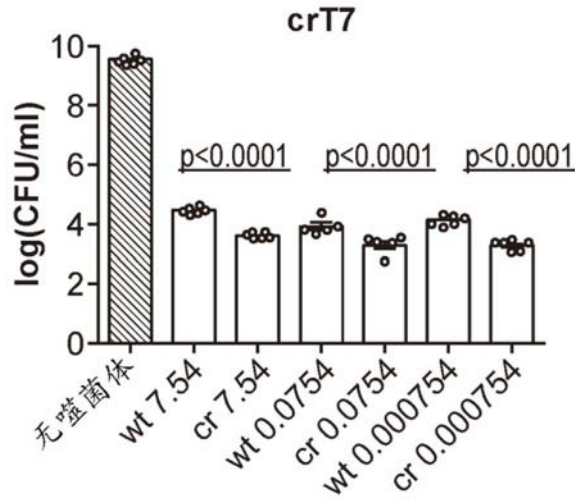


图18C

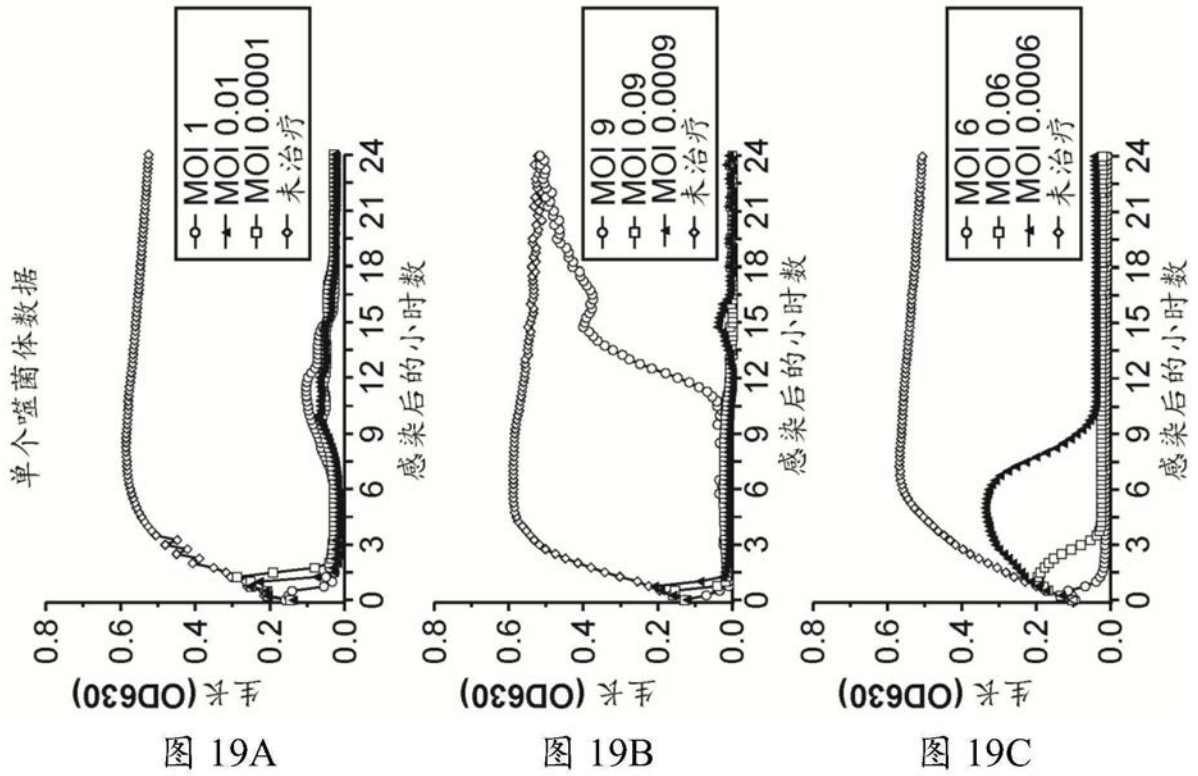


图 19A

图 19B

图 19C

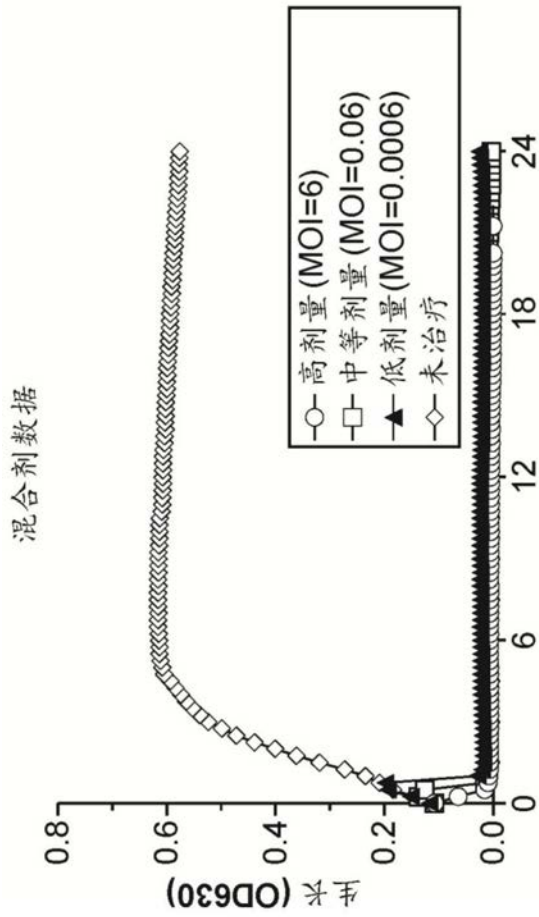


图 19D

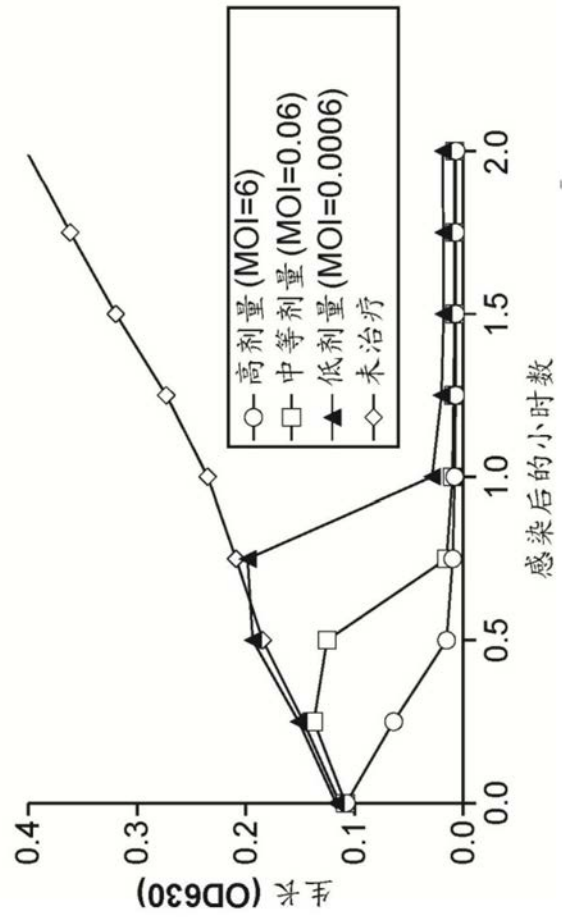


图 19E

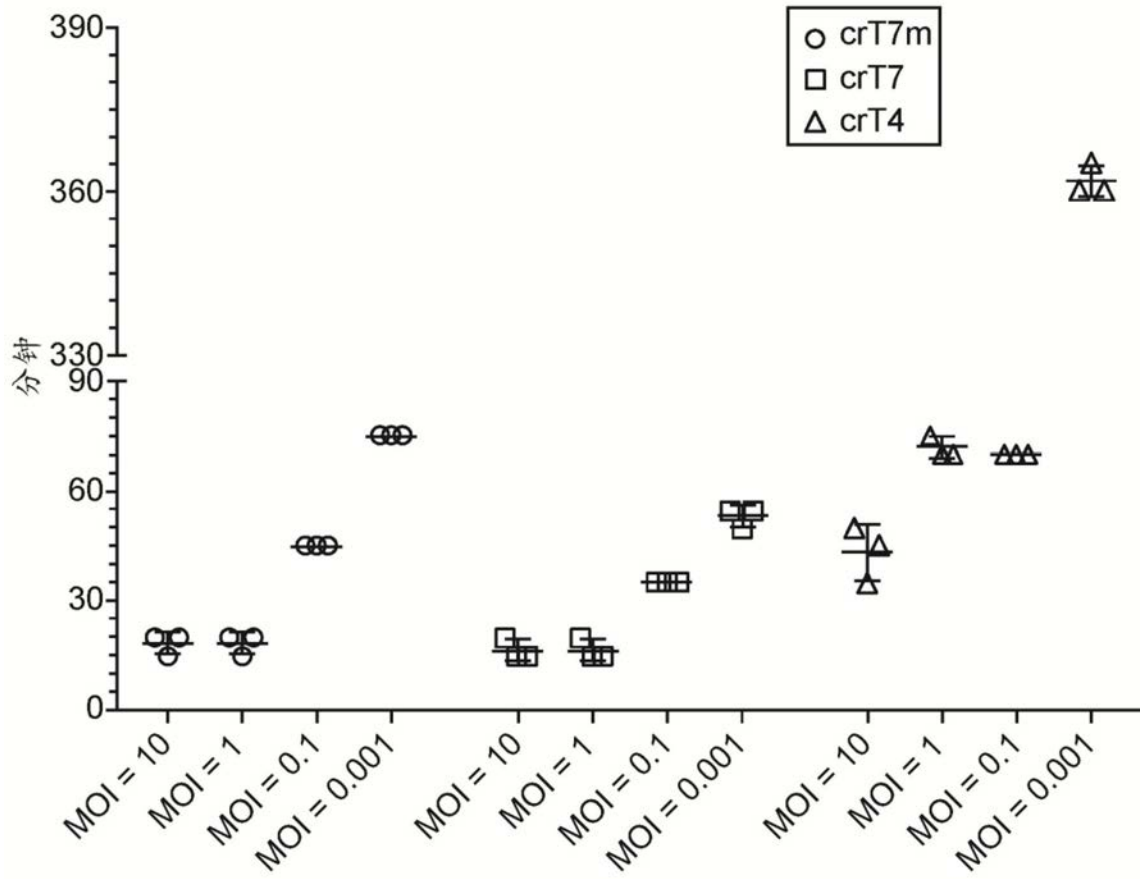


图20

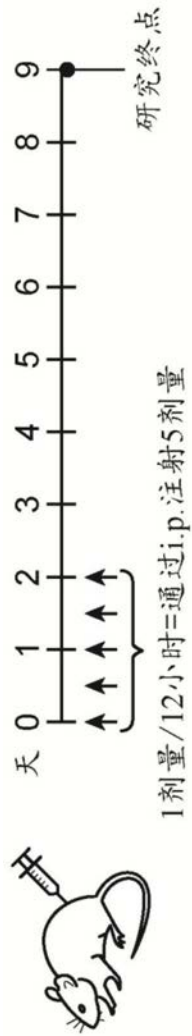


图21A

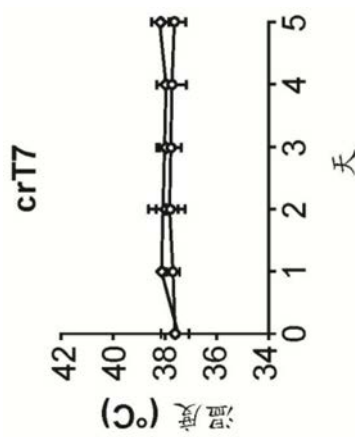


图21B

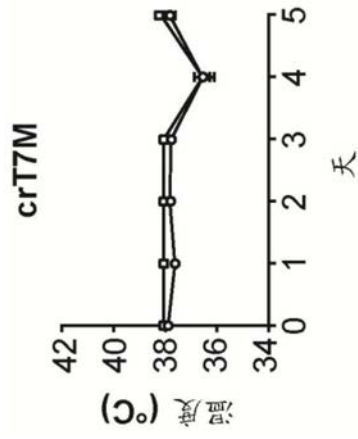


图21C

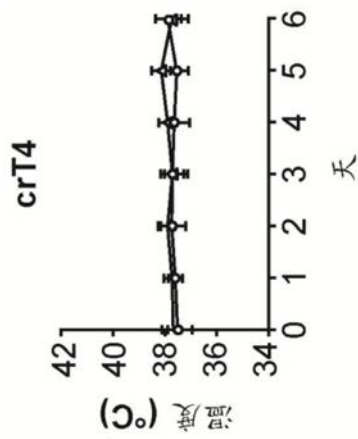


图21D

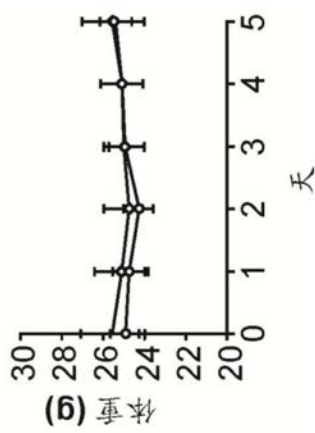


图21E

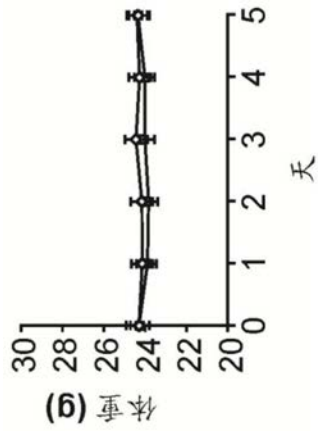


图21F

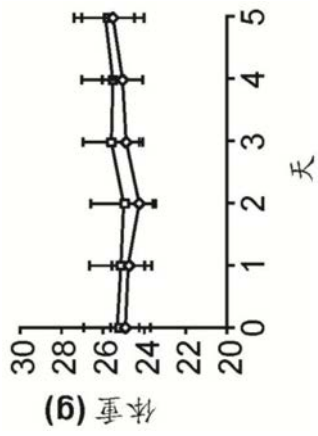


图21G

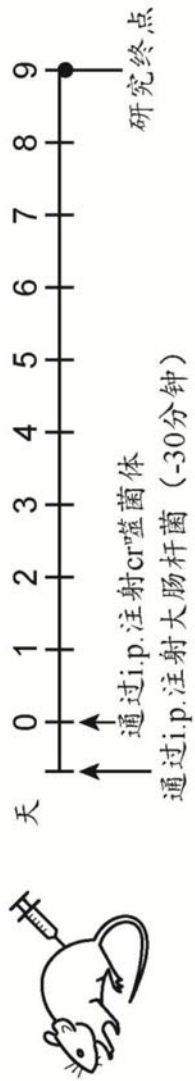


图22A

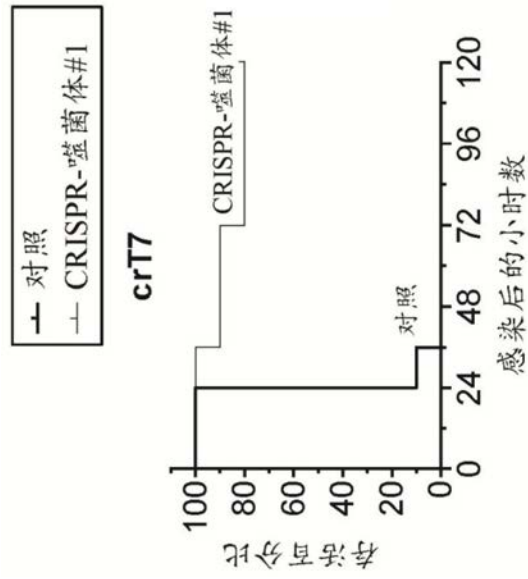


图22B

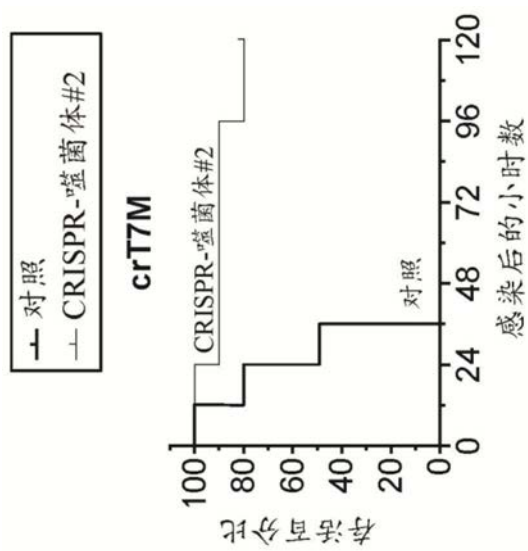


图22C

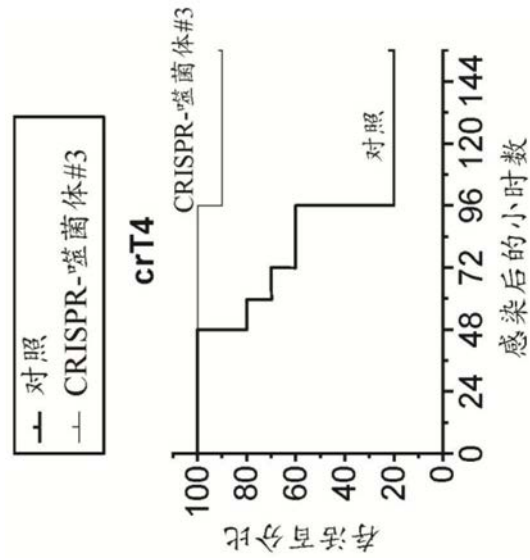


图22D

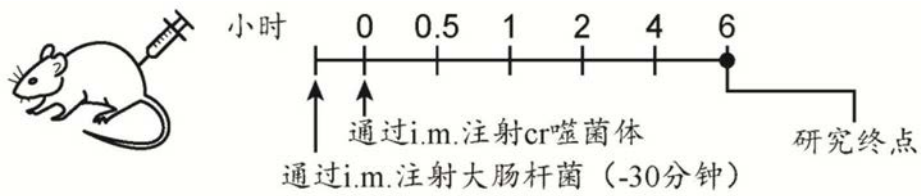


图23A

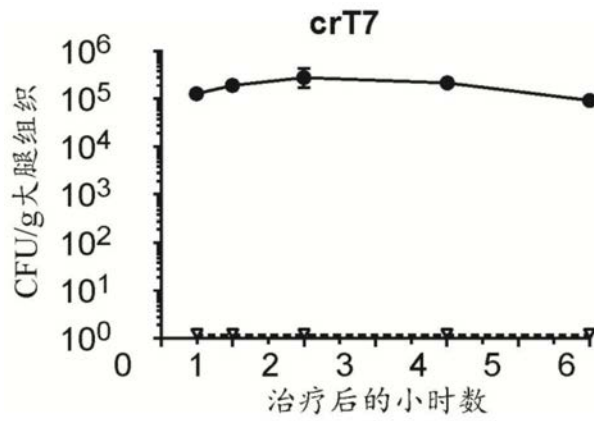


图23B

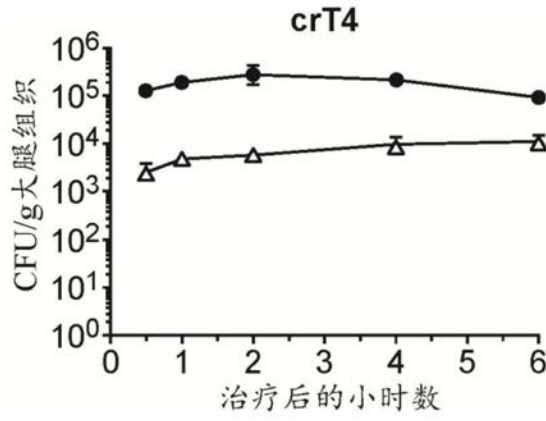


图23C

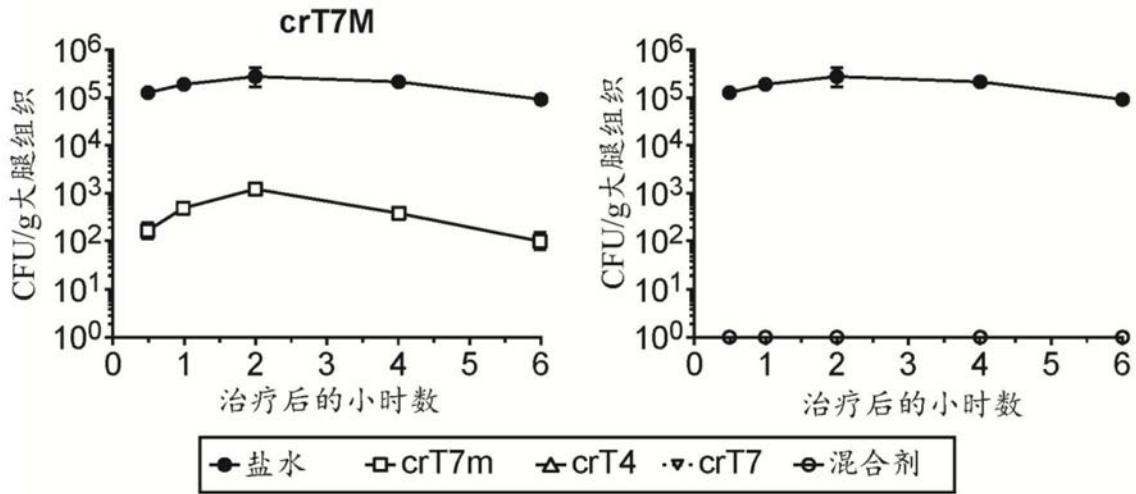


图 23D

图 23E

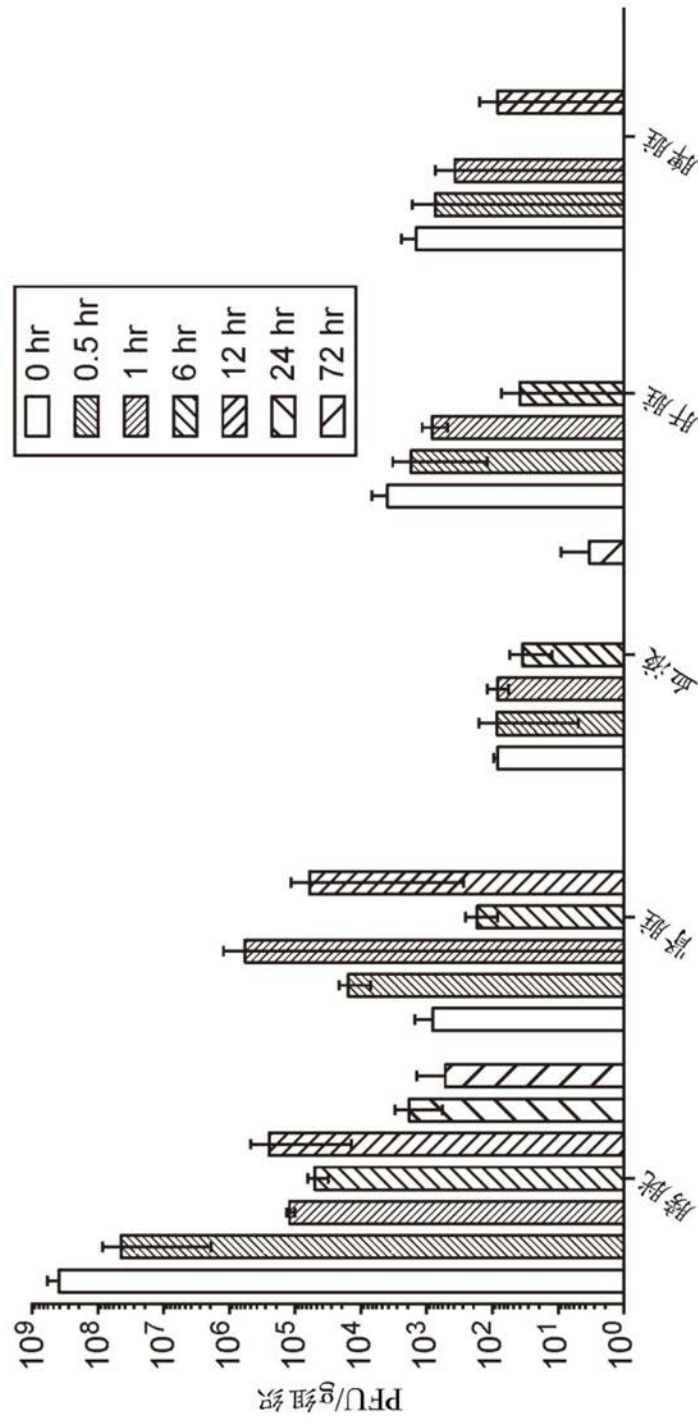
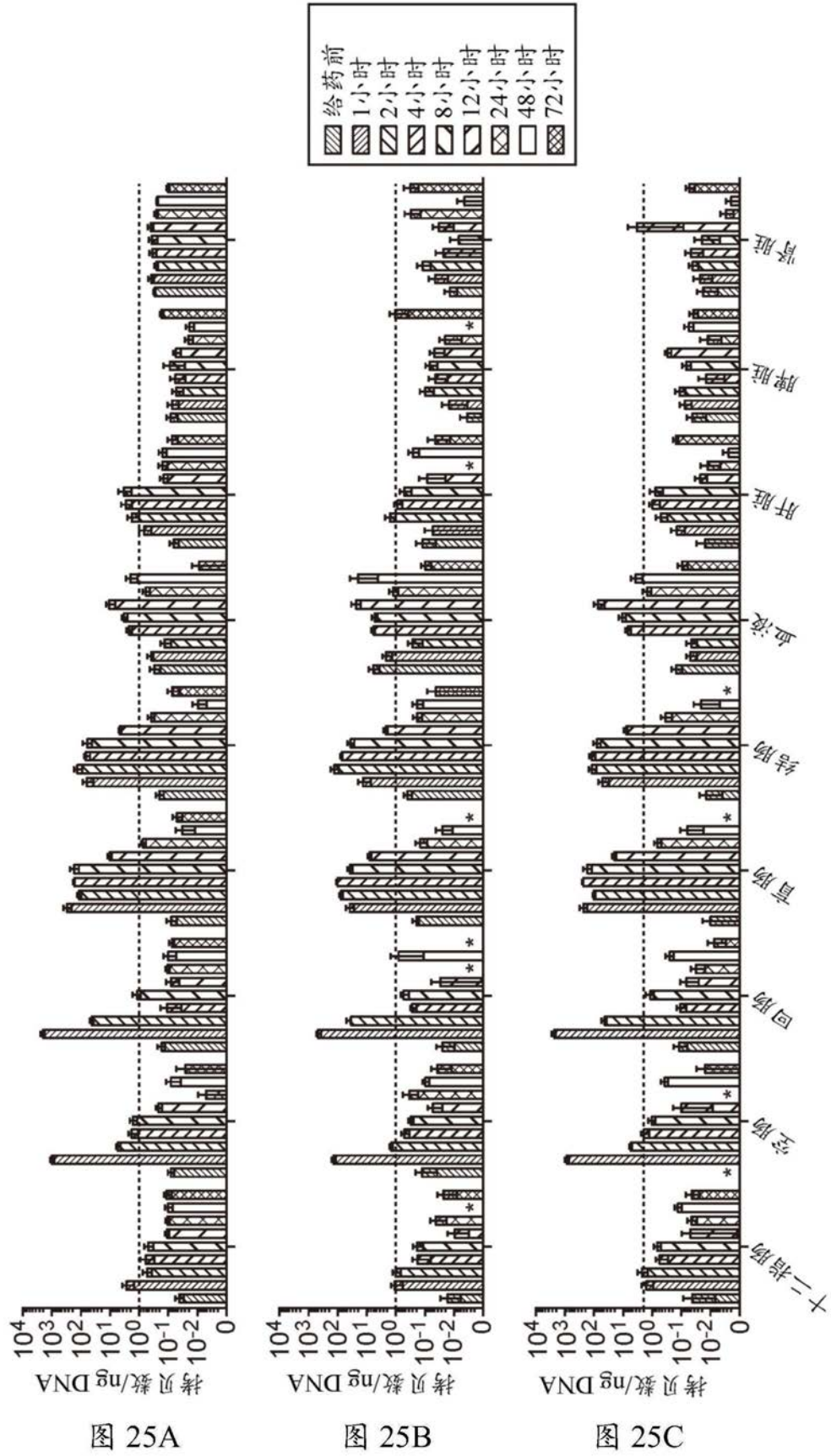


图24



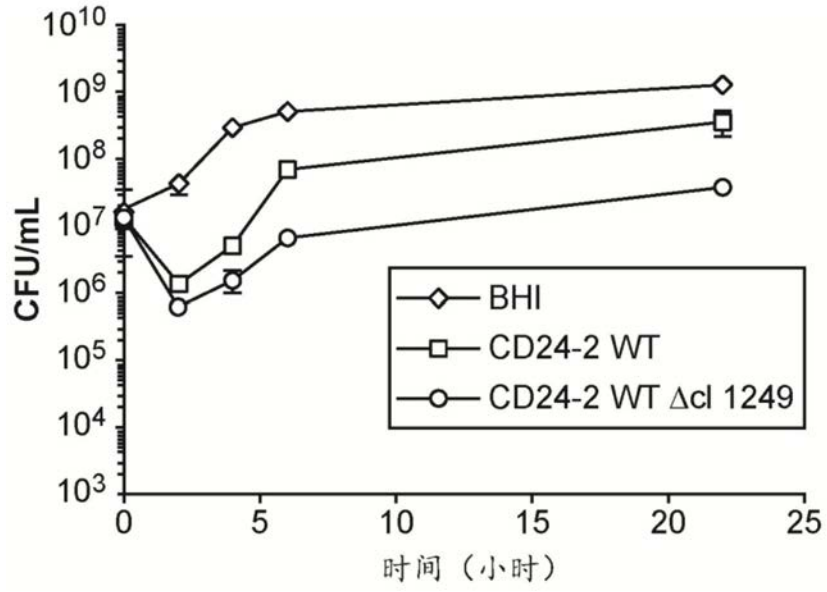


图26A

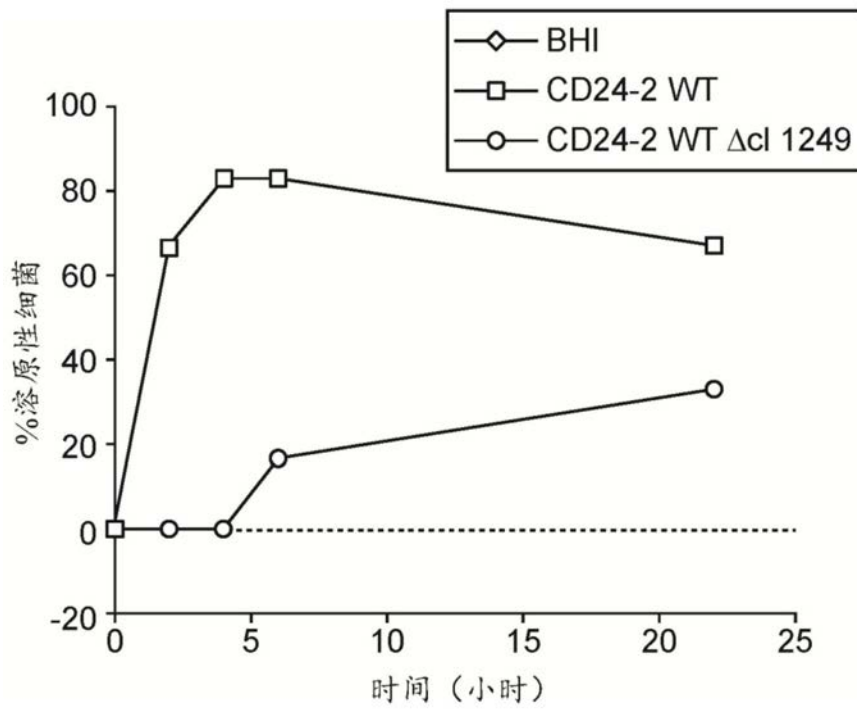


图26B

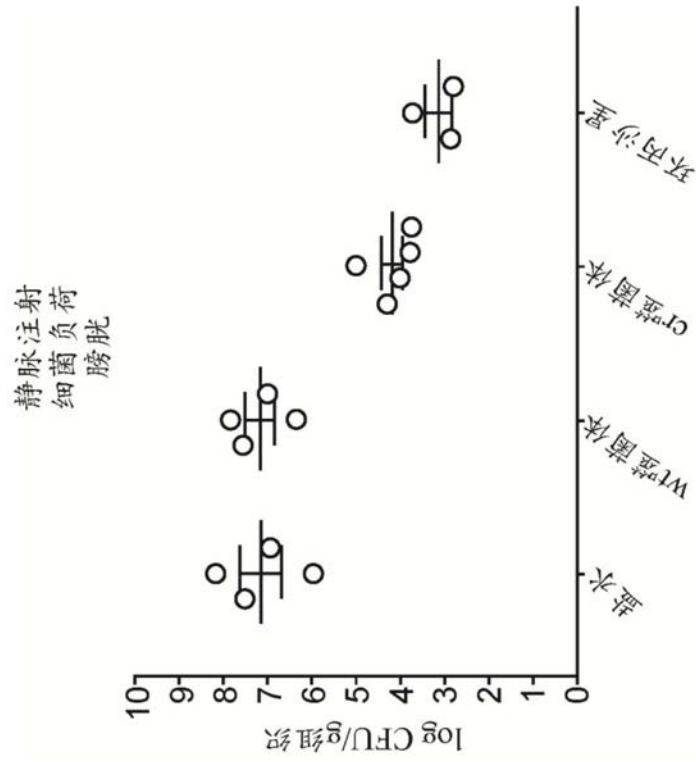


图27A

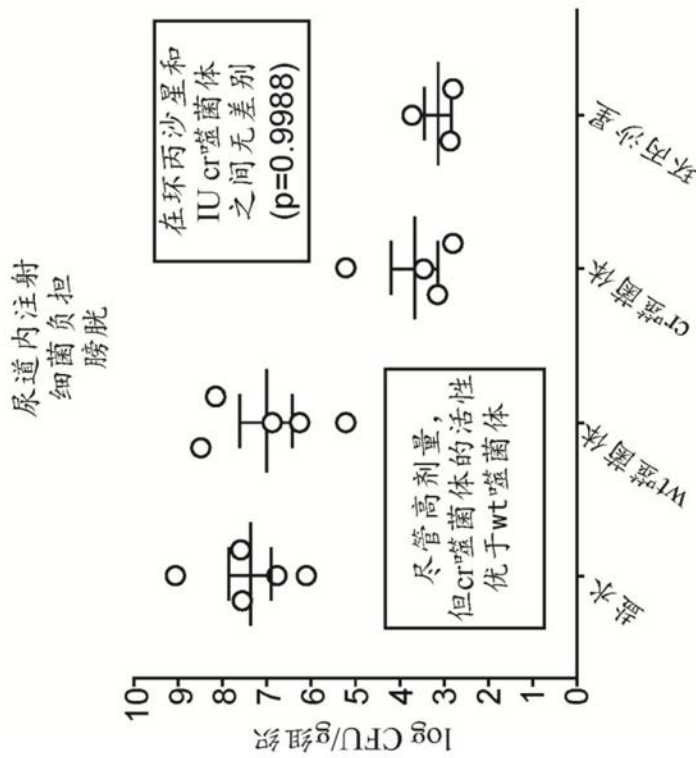


图27B

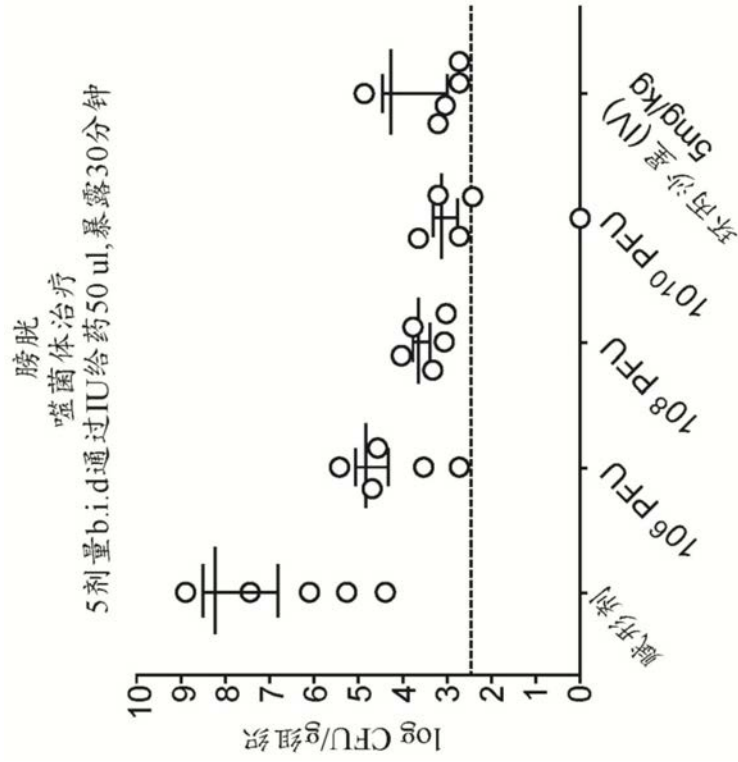


图28A

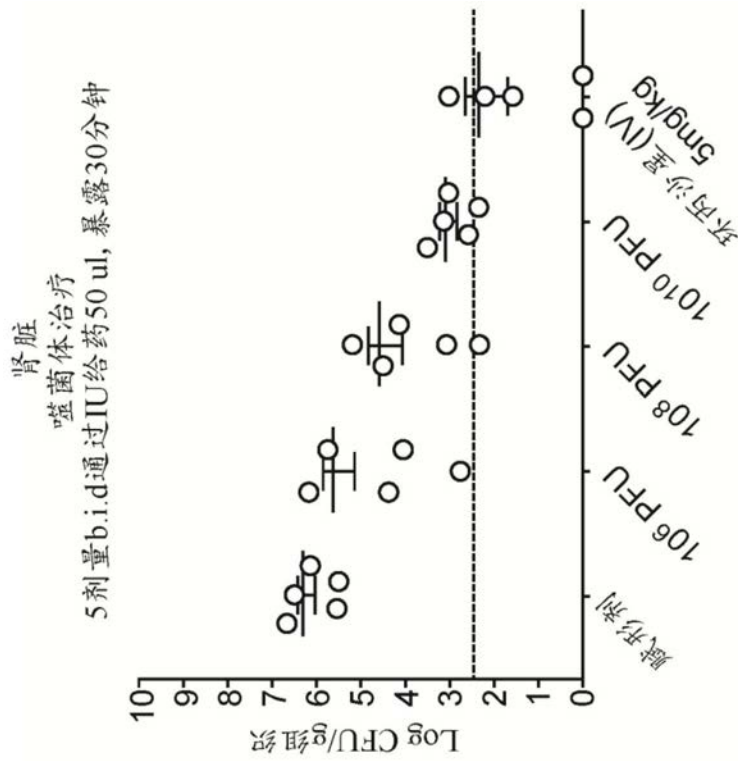


图28B

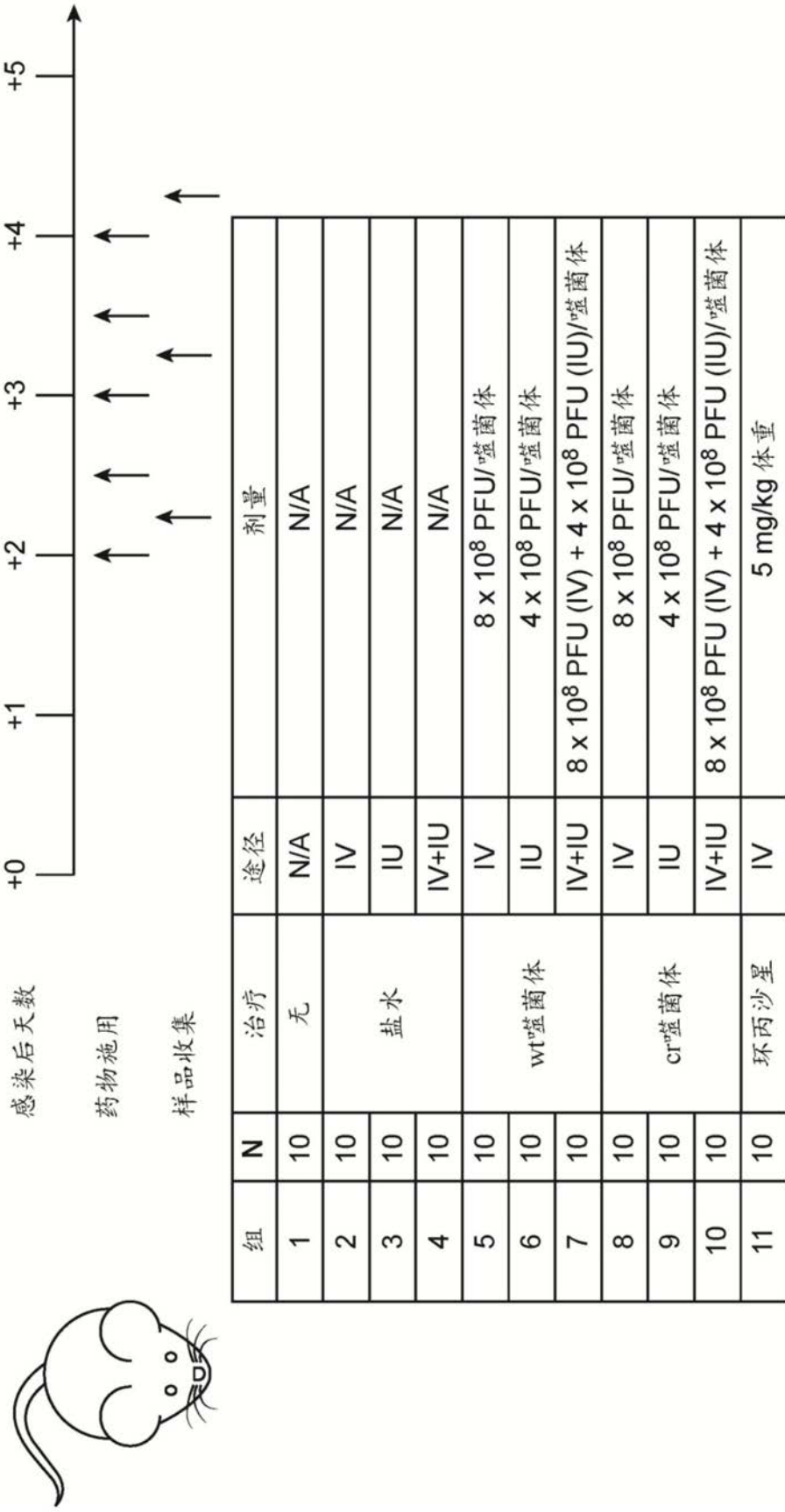


图29

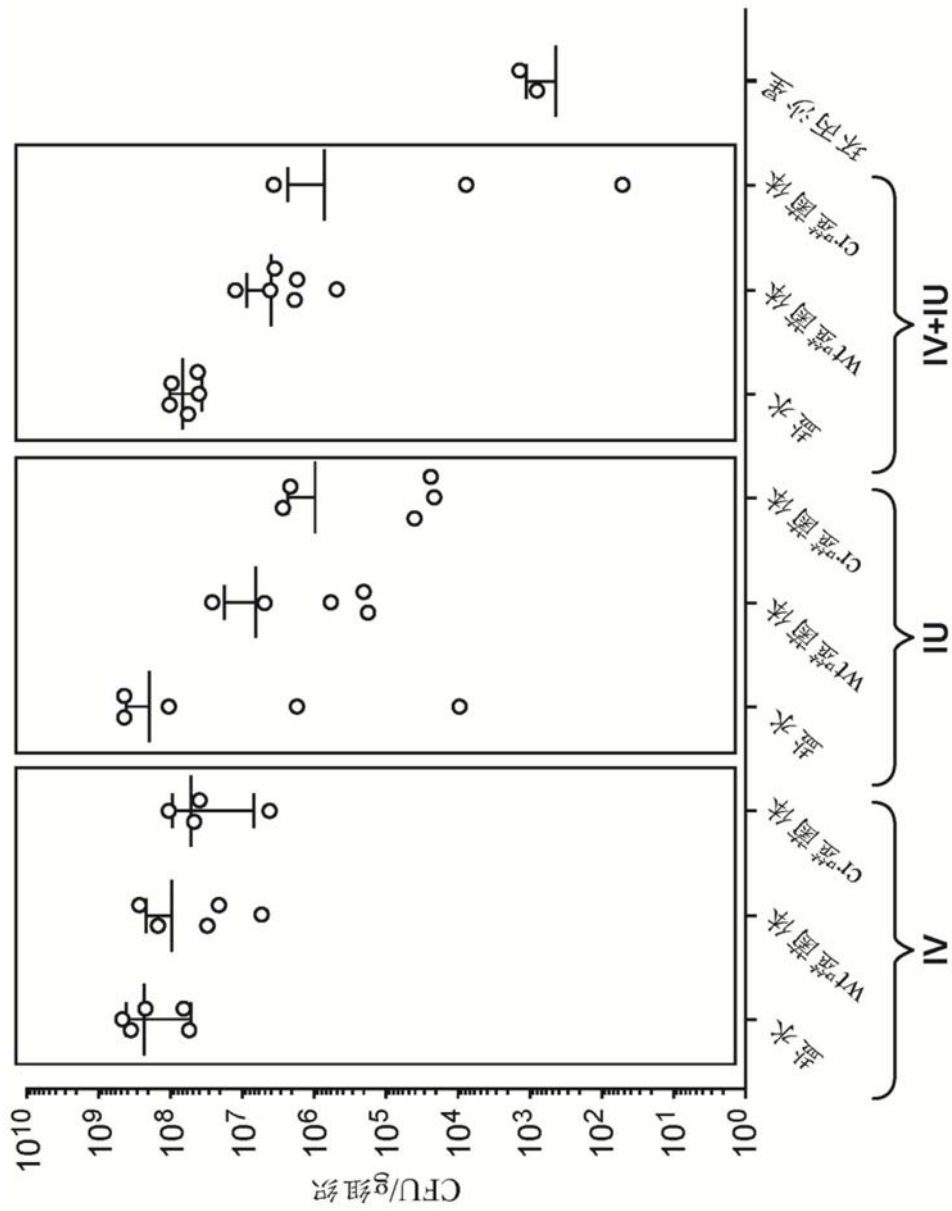


图30A

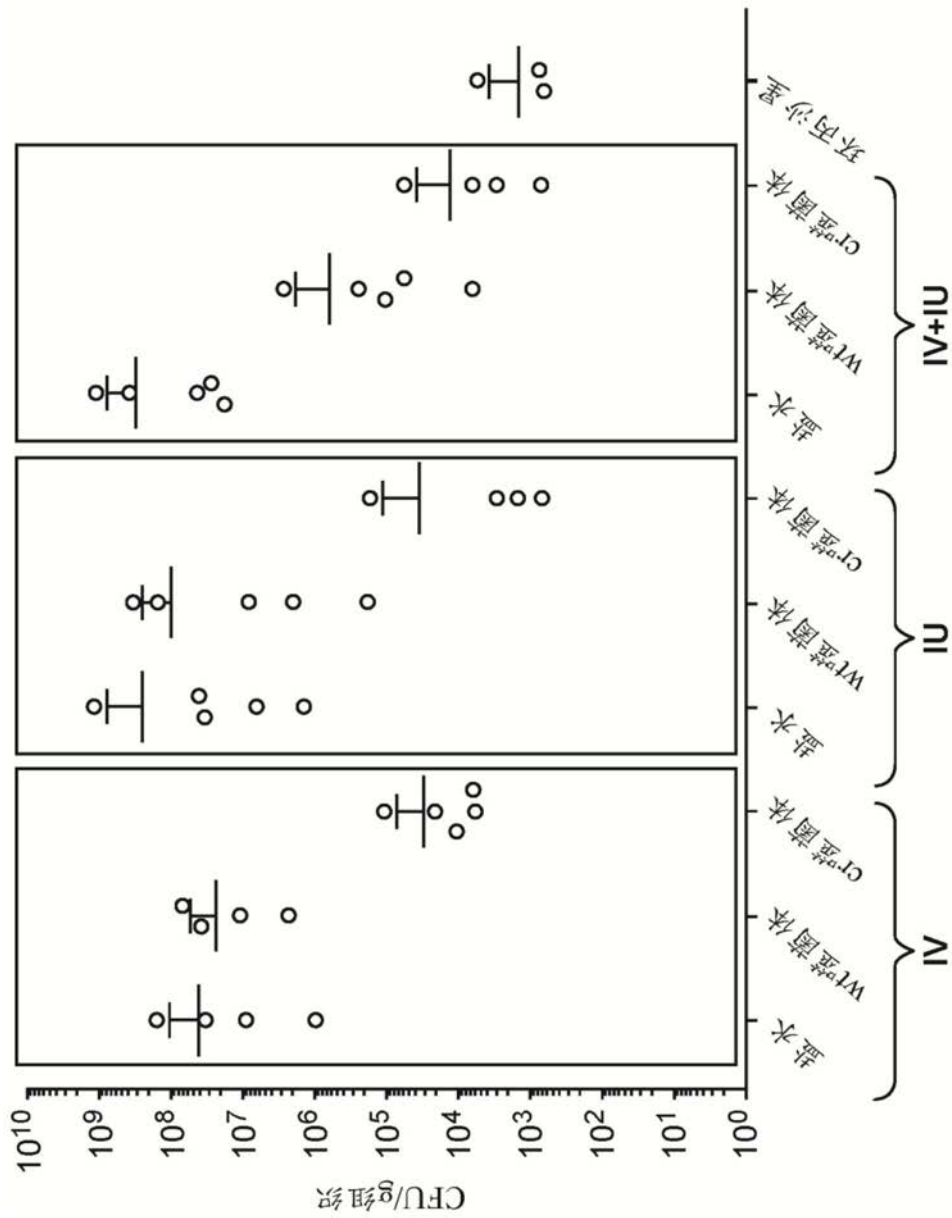


图30B

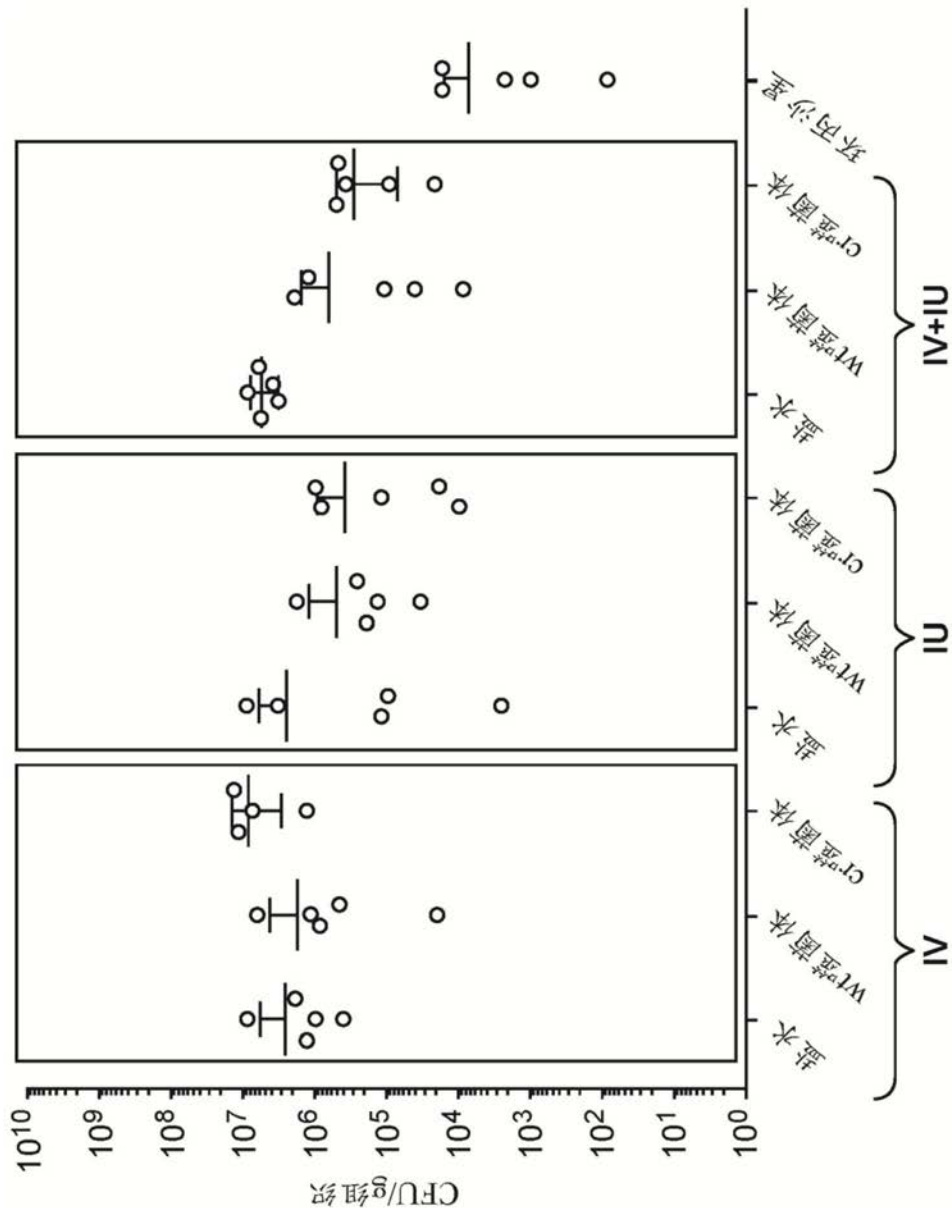


图30C

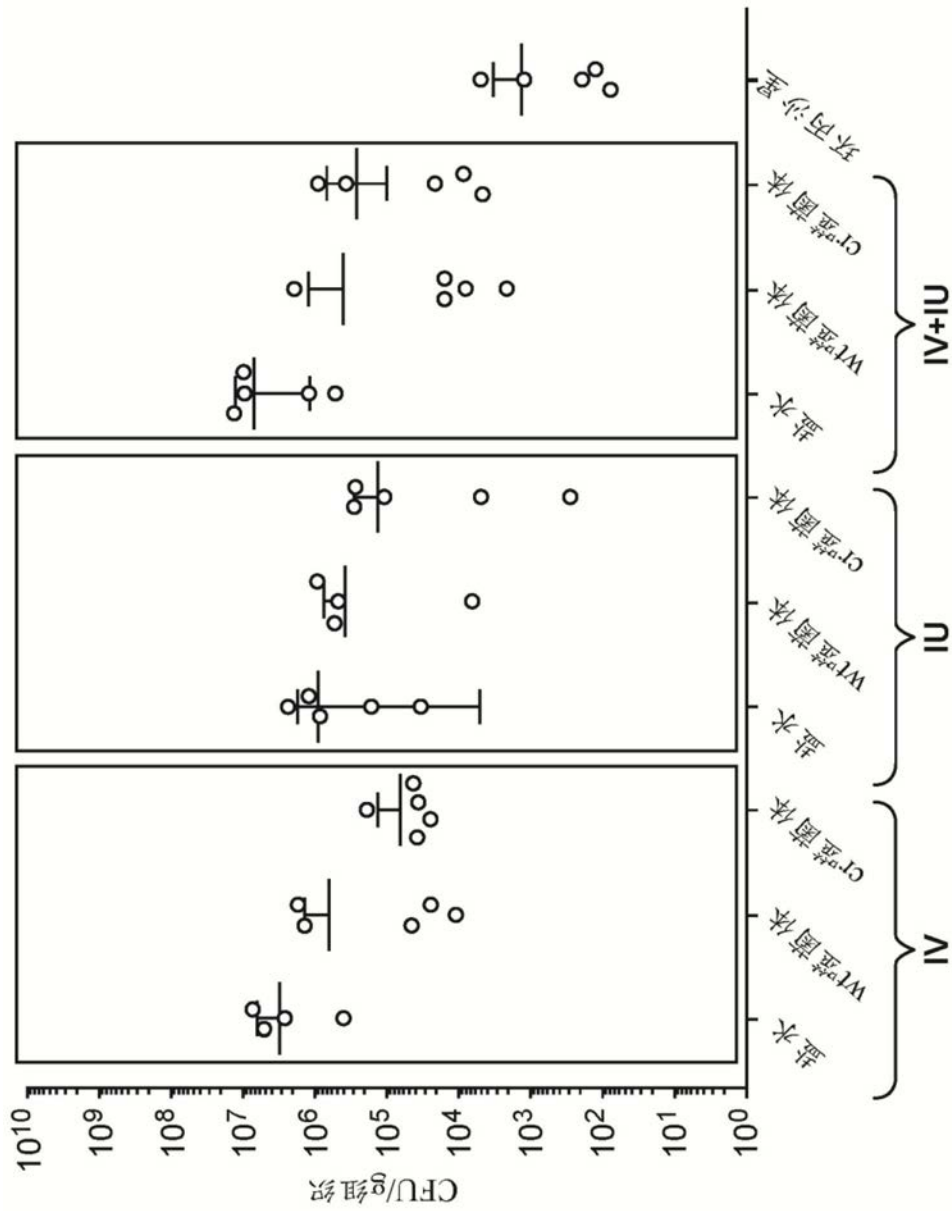


图30D

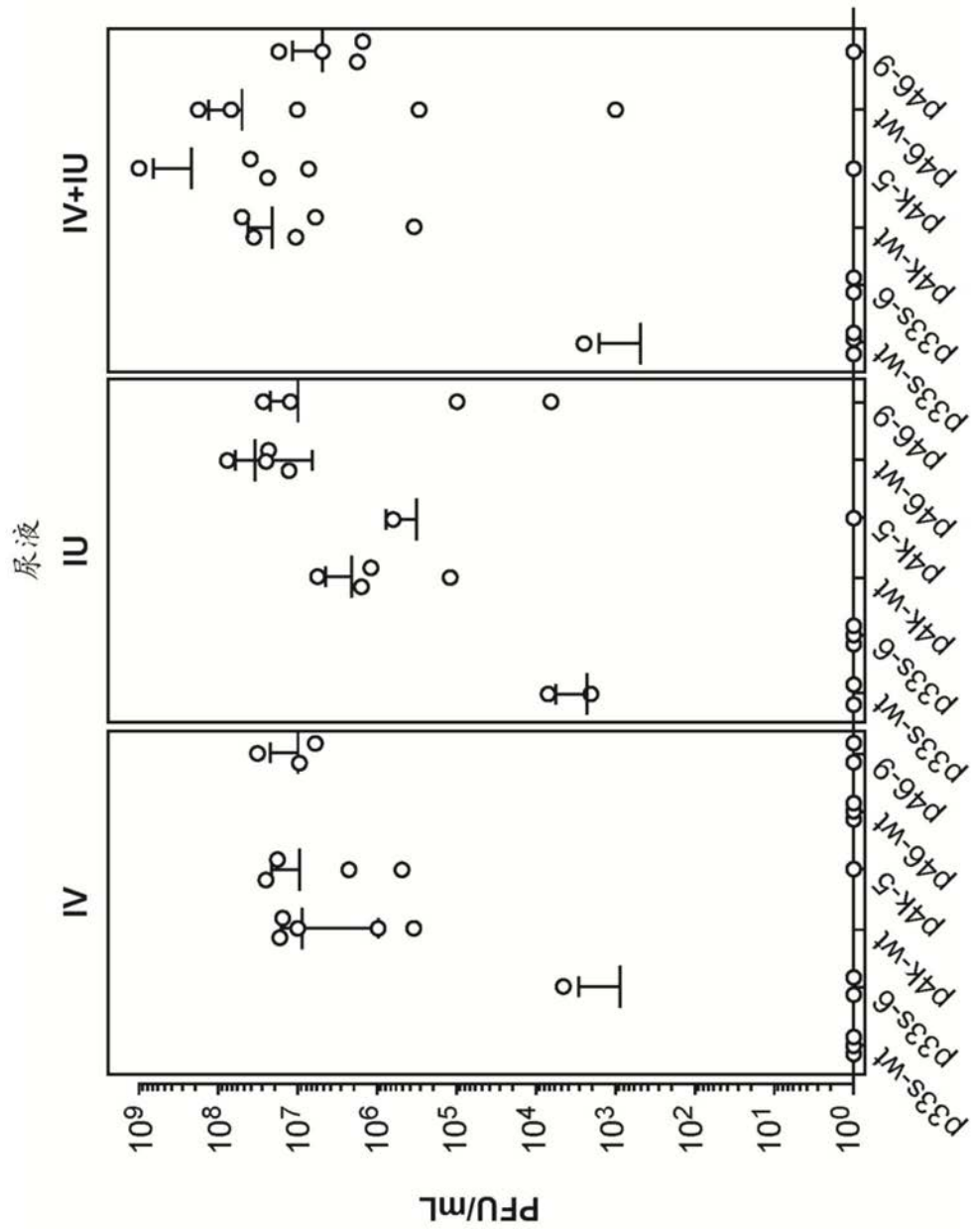


图31A

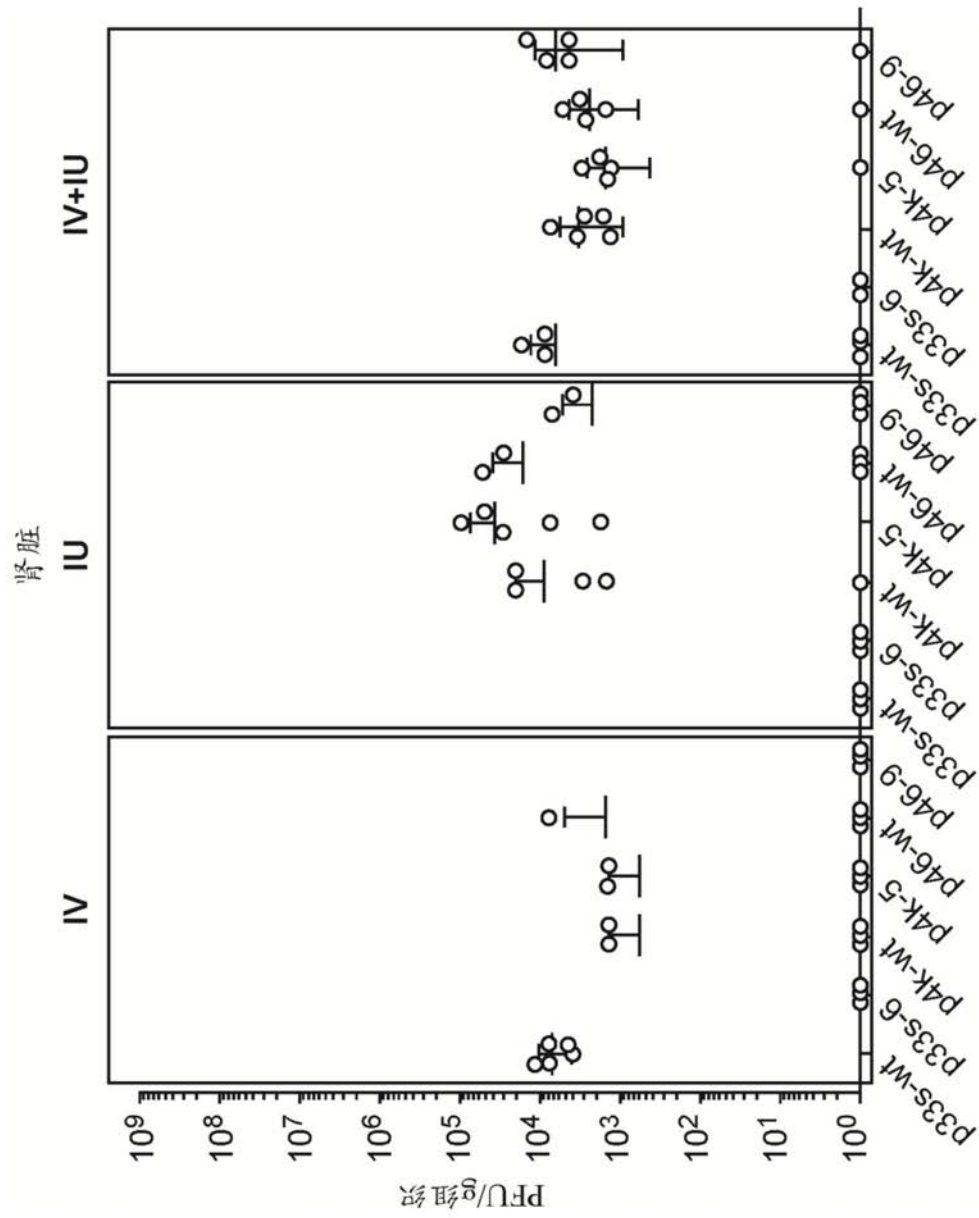


图31B

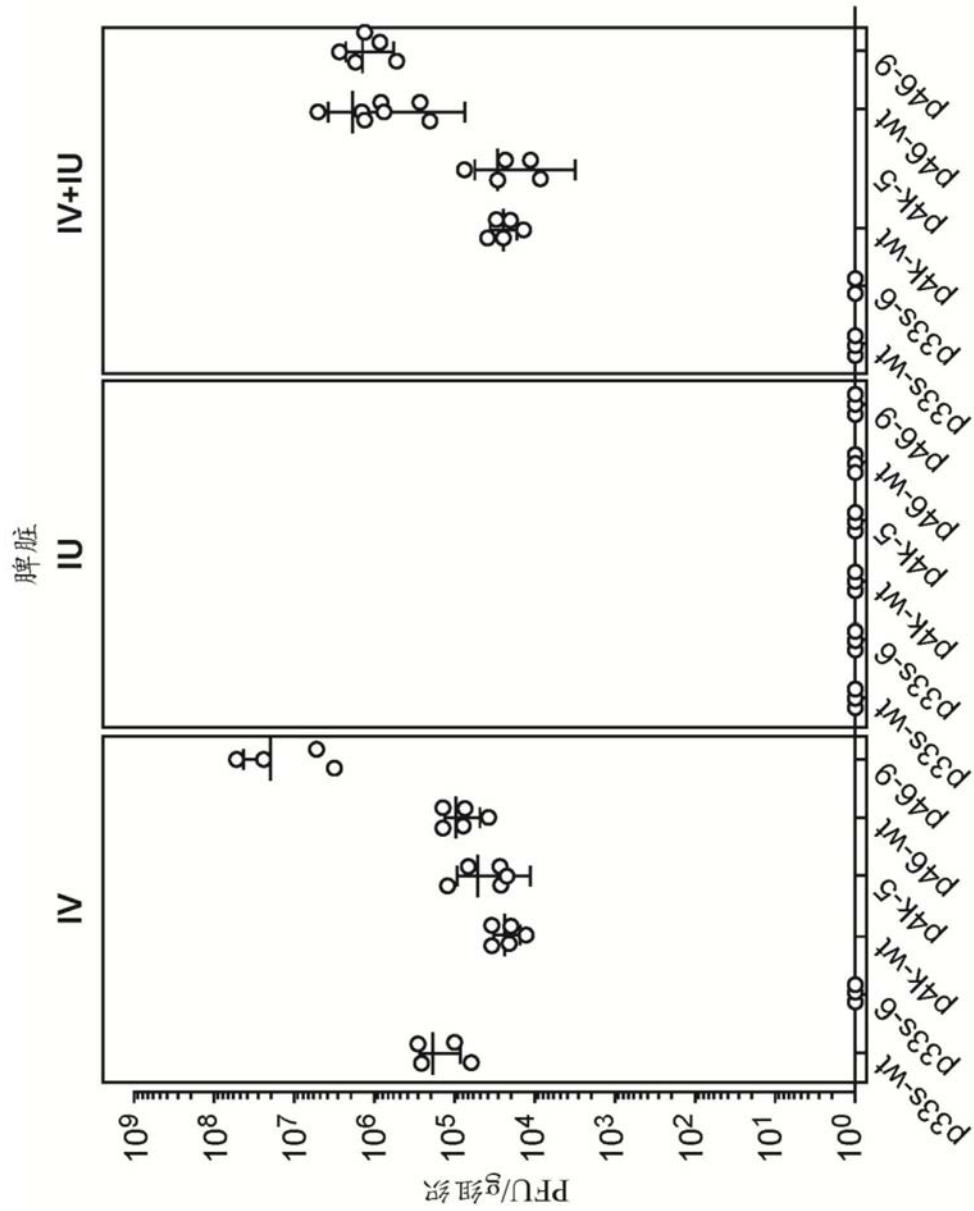


图31D

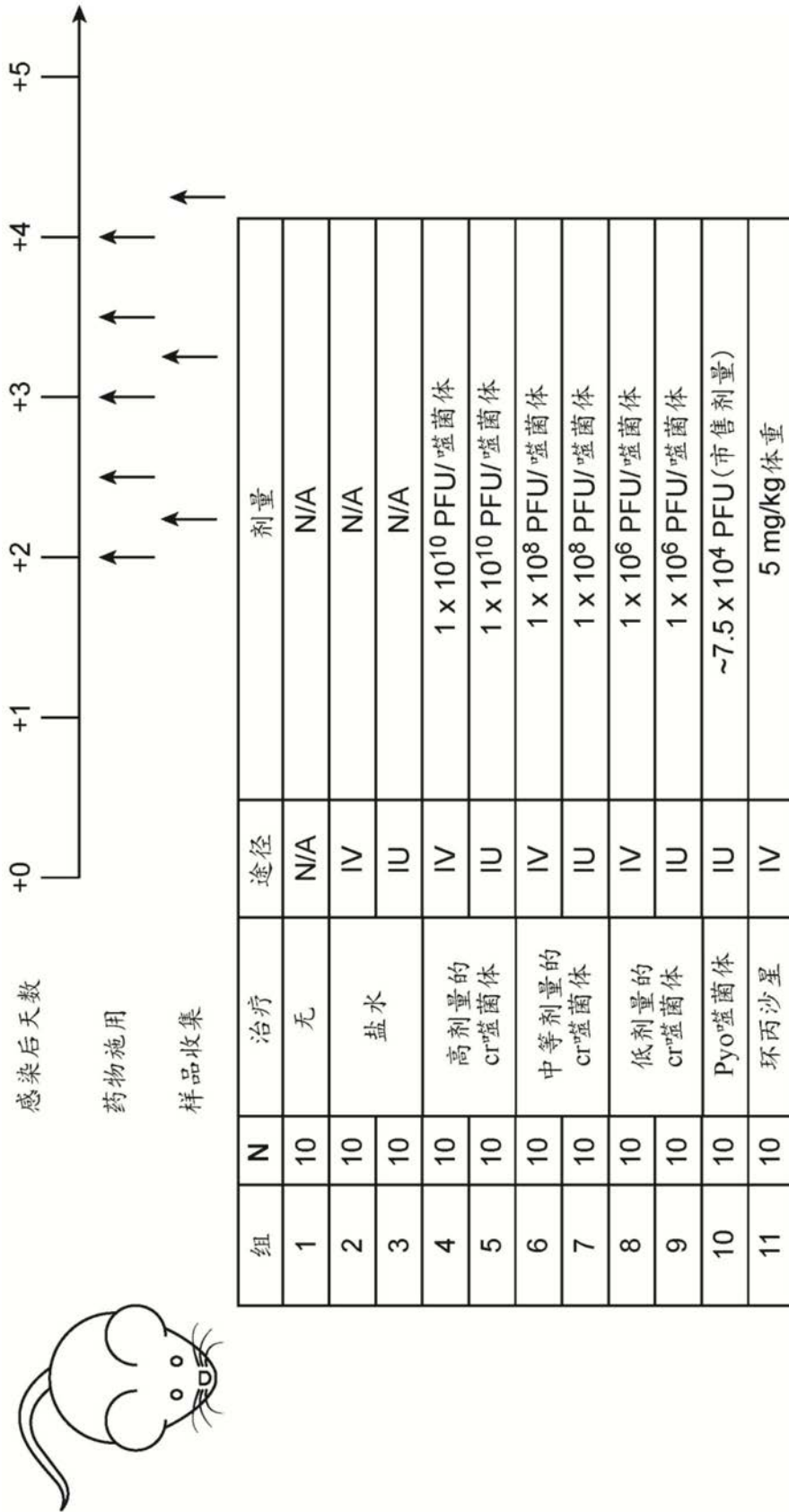


图32

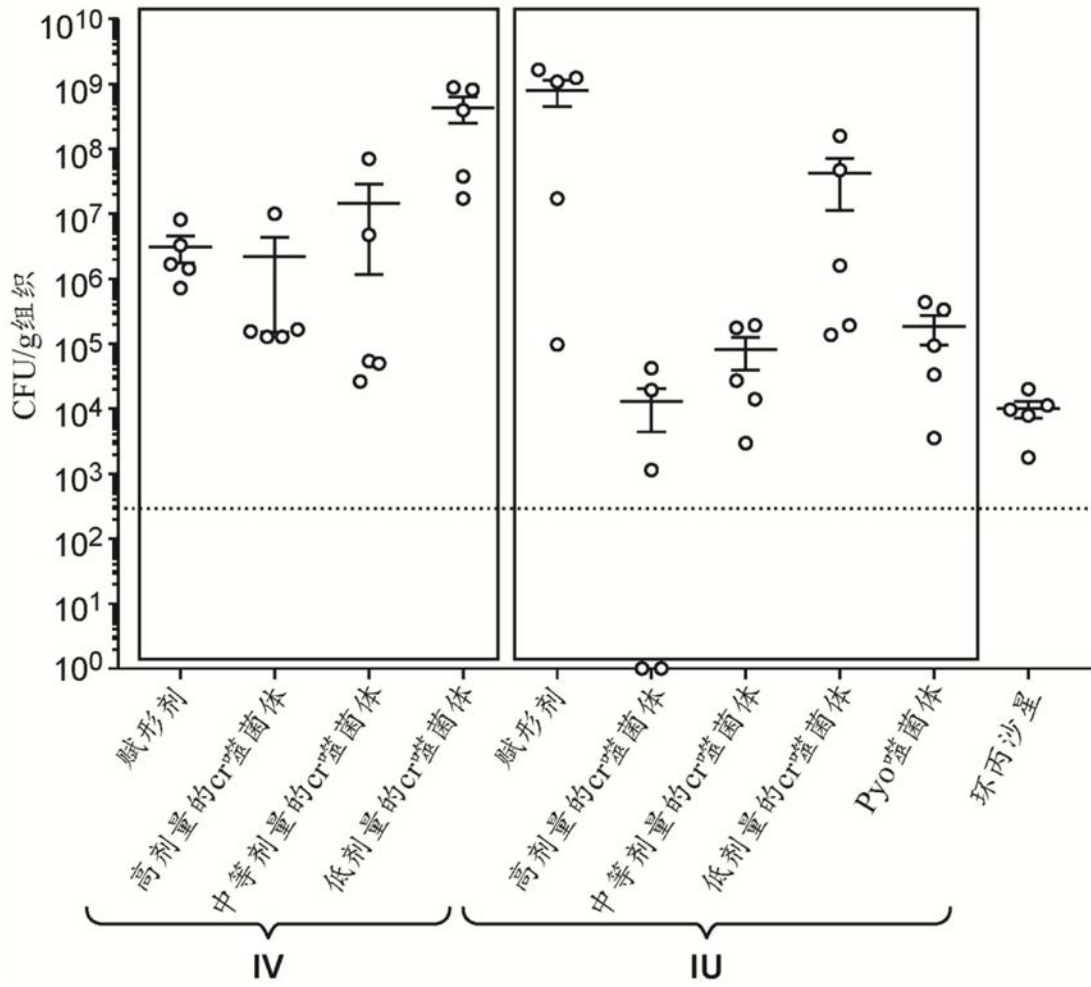


图33A

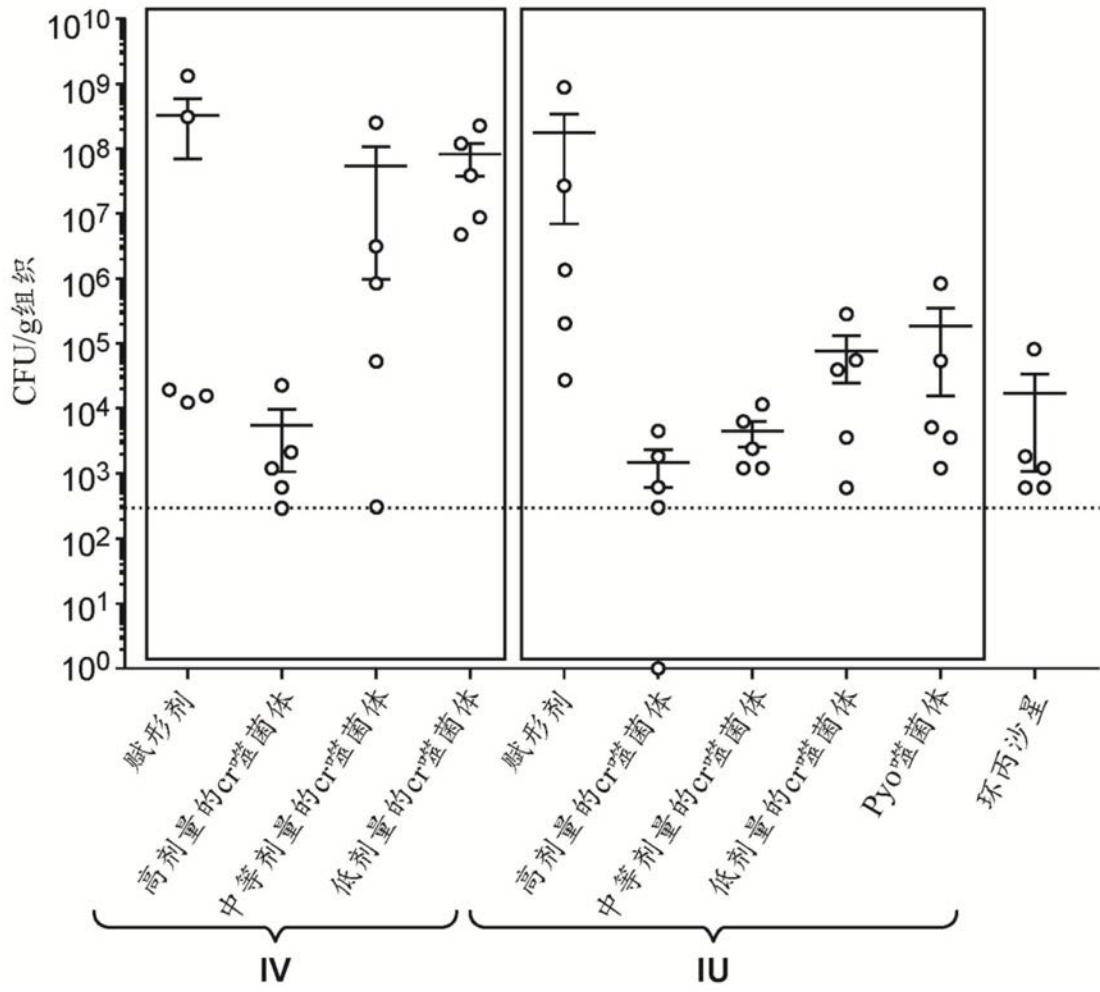


图33B

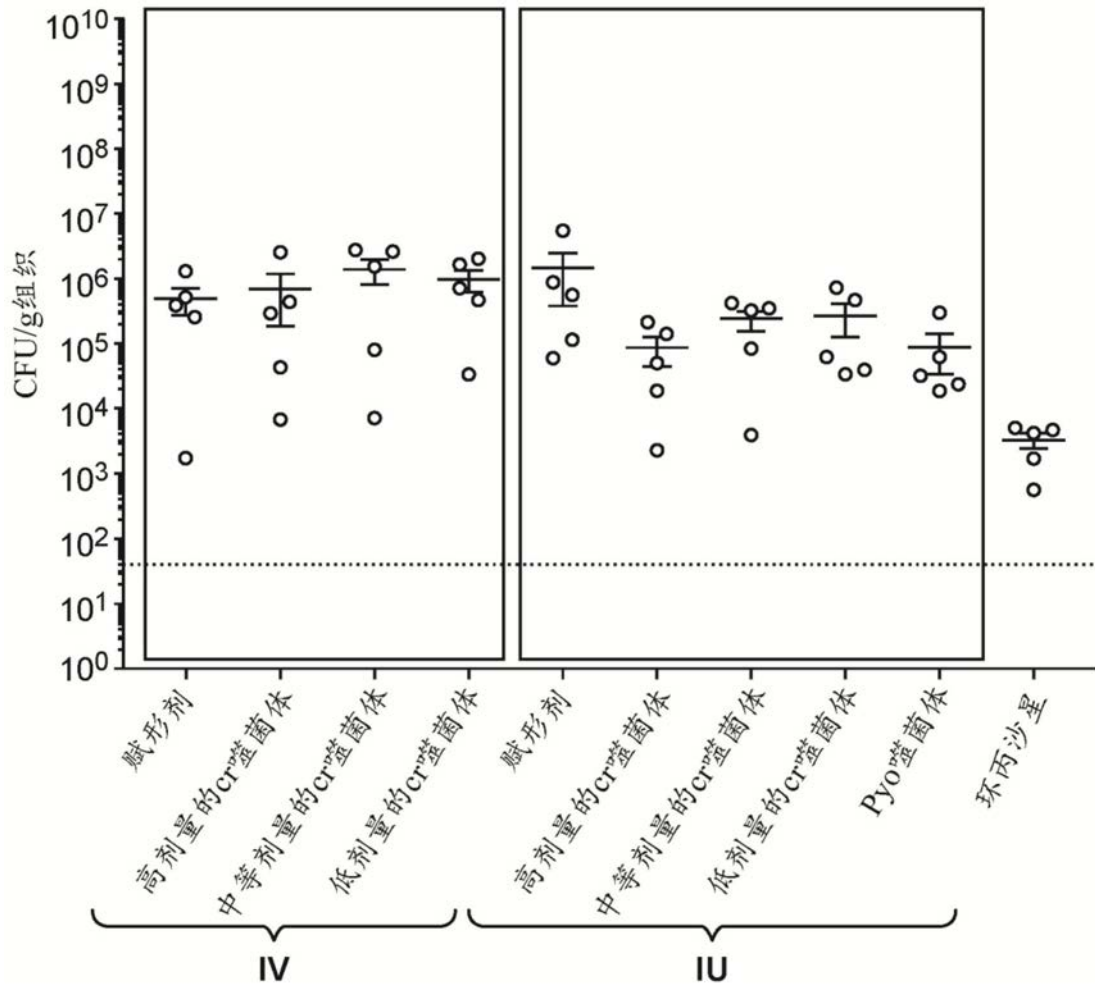


图33C

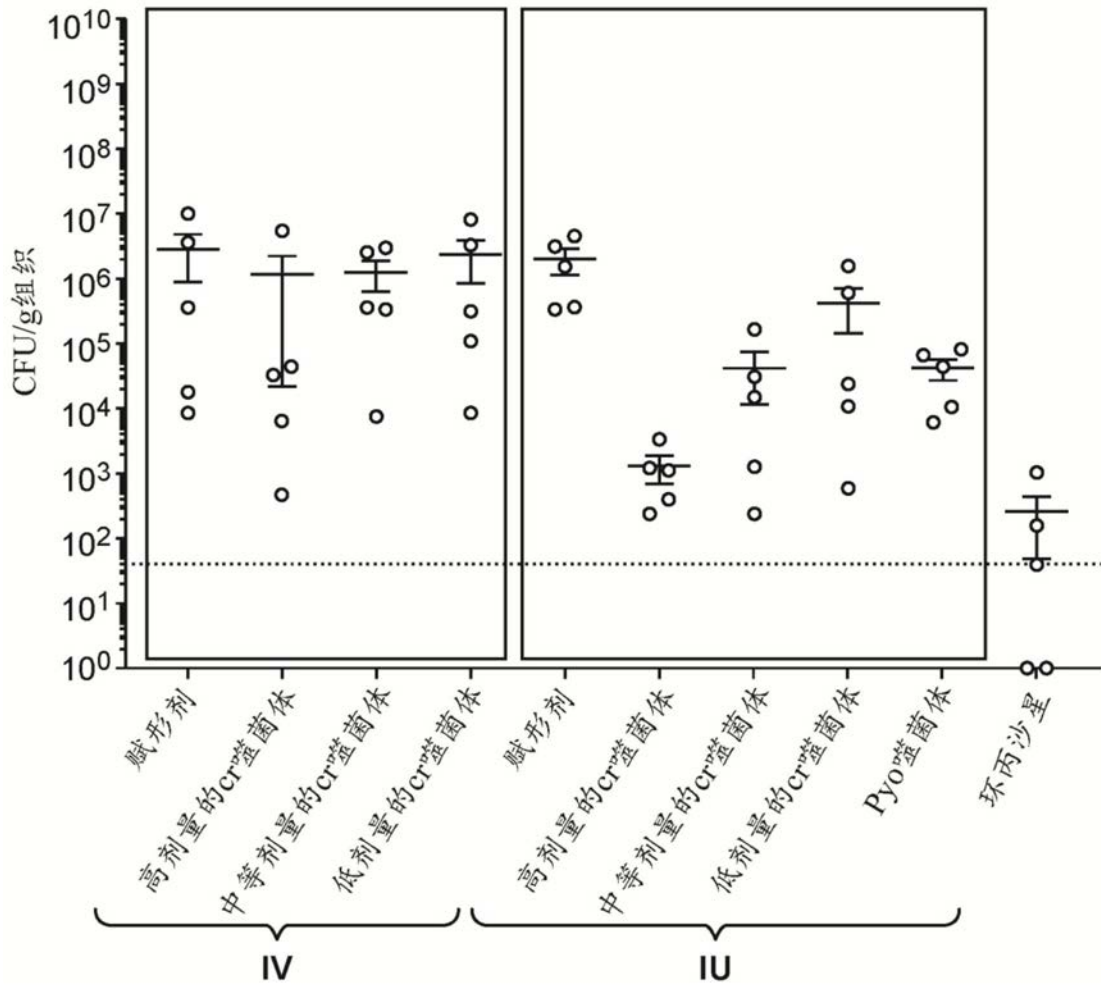


图33D

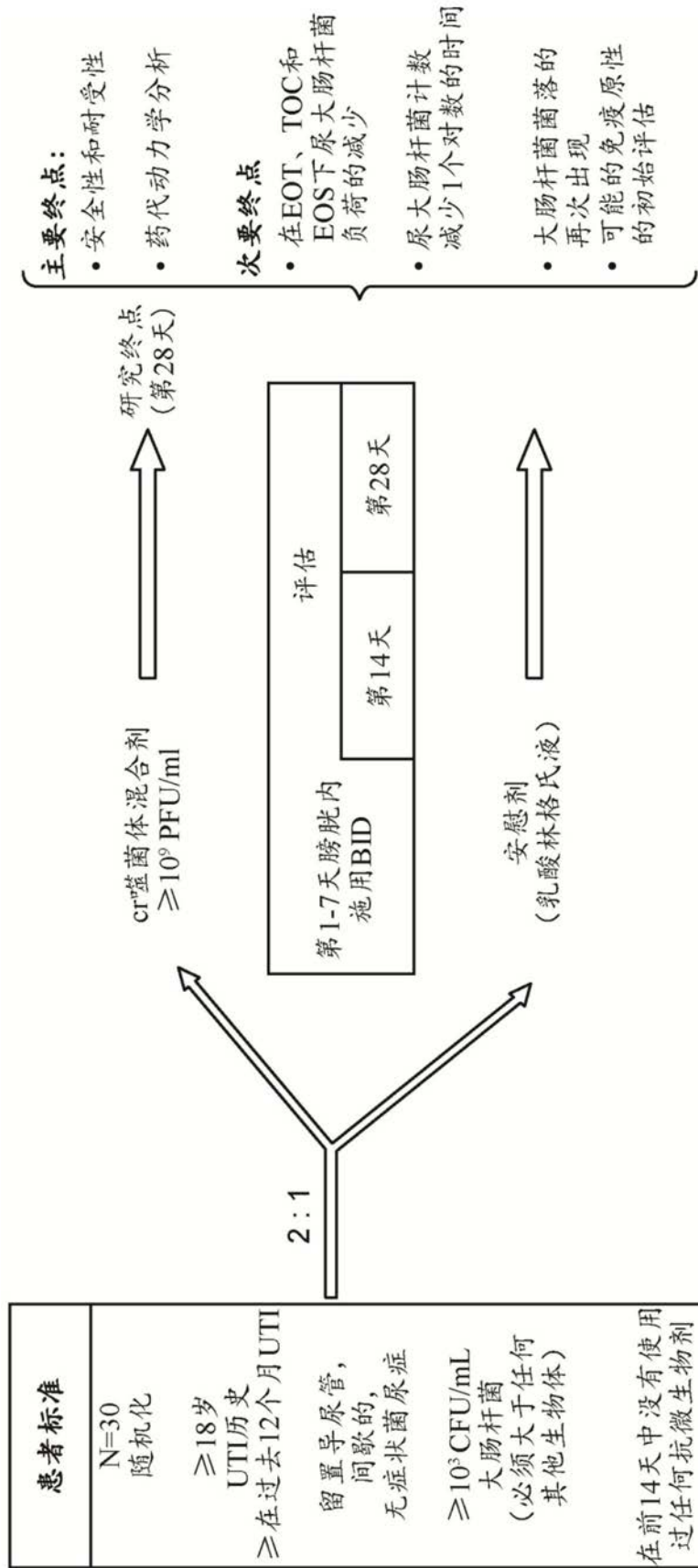


图34A

包括	排除
<ul style="list-style-type: none"> • 18岁或以上的男性或女性 • 留置的导尿管或耻骨上导尿管，需要间歇性导尿管或具有无症状菌尿症和由大肠杆菌引起的下尿路定植 ($\geq 10^3$ CFU/ml) • 如果其他细菌的相对CFU/ml水平低于大肠杆菌，则其他分离的革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌混合定植的患者将具有资格 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要抗微生物治疗的活性UTI或其他感染的临床体征允许使用止痛药 • 在过去的14天内接受过革兰氏阴性菌抗微生物剂 不排除正在接受革兰氏阳性抗生素治疗的非尿路感染患者 • 存在经外科手术治疗的膀胱，但经修复的破裂膀胱除外

图34B

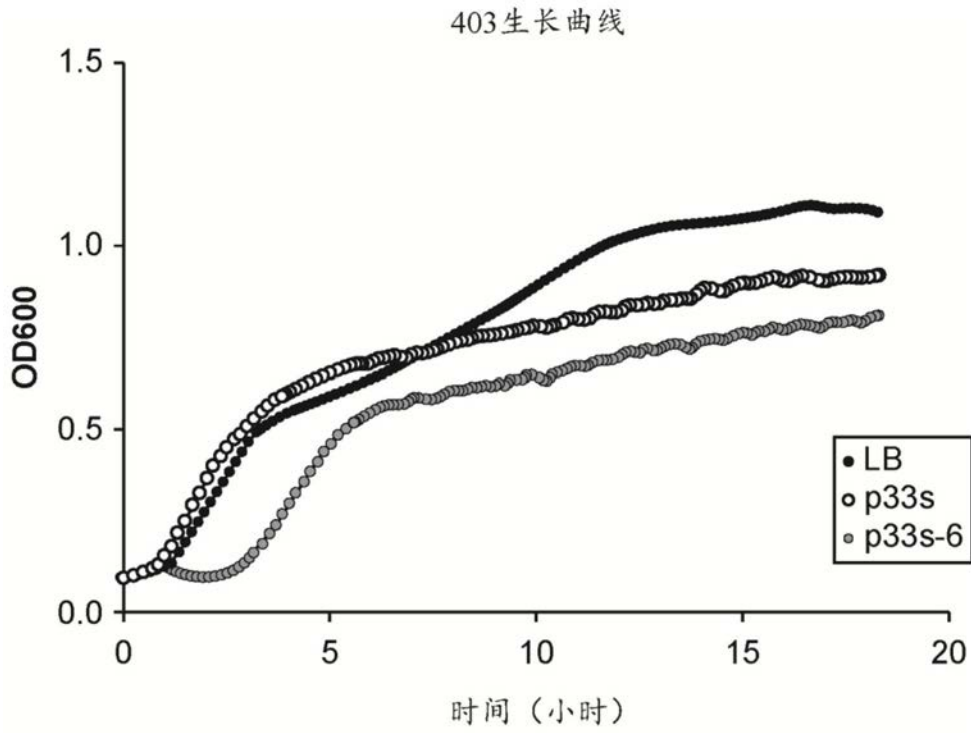


图35A

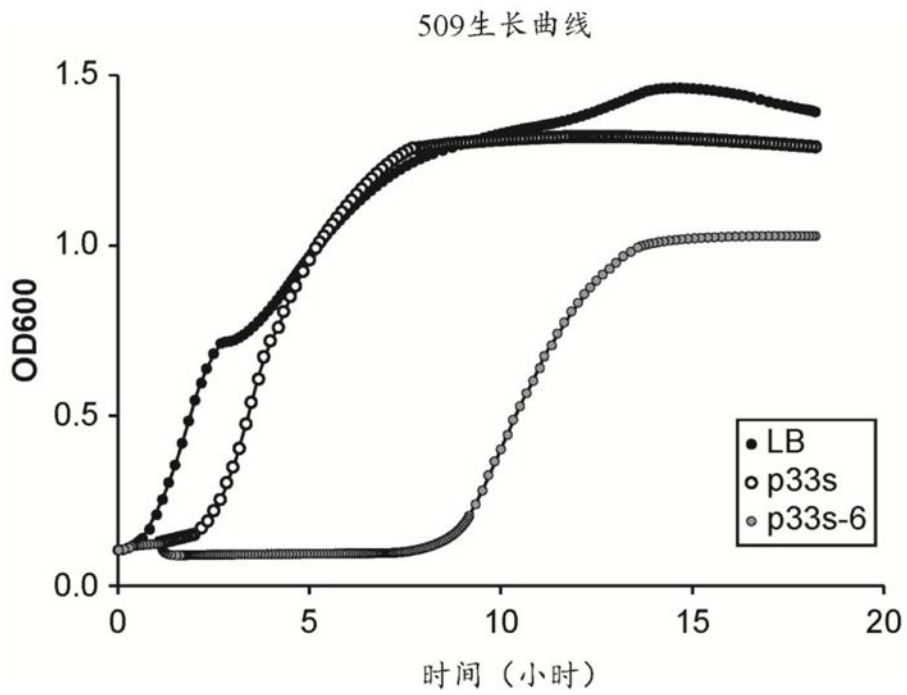


图35B

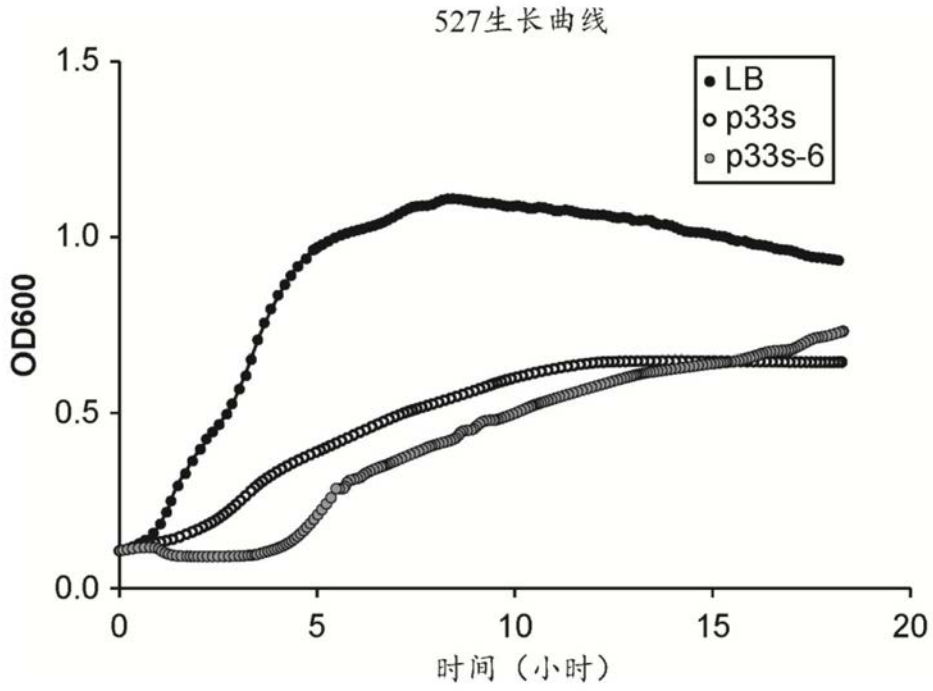


图35C

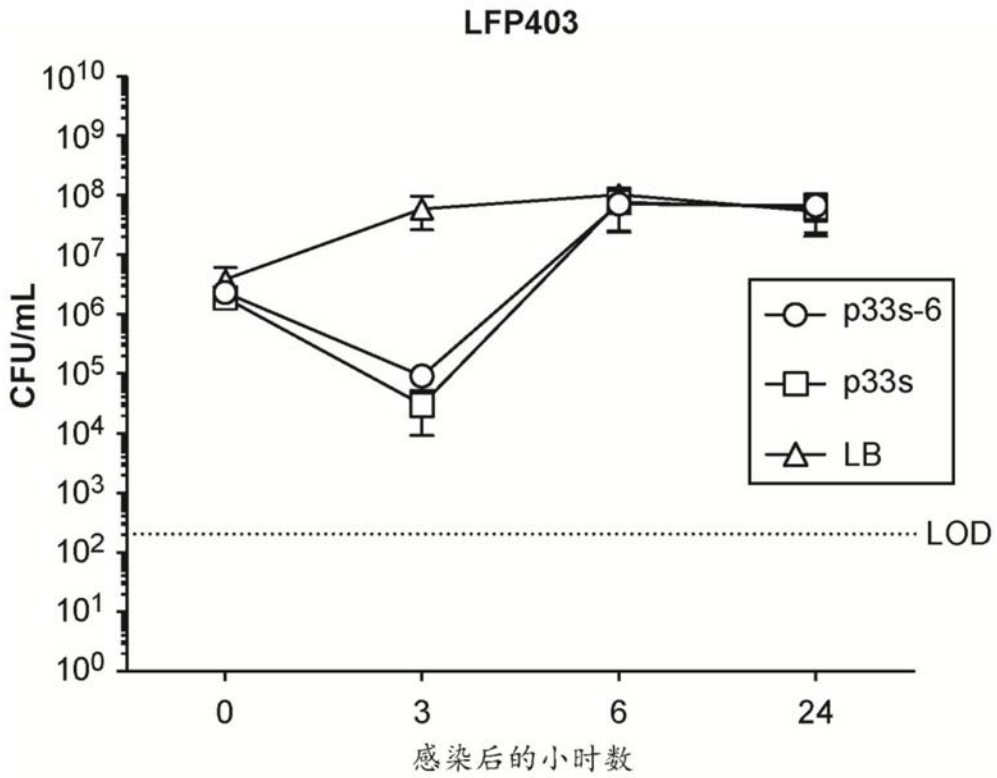


图35D

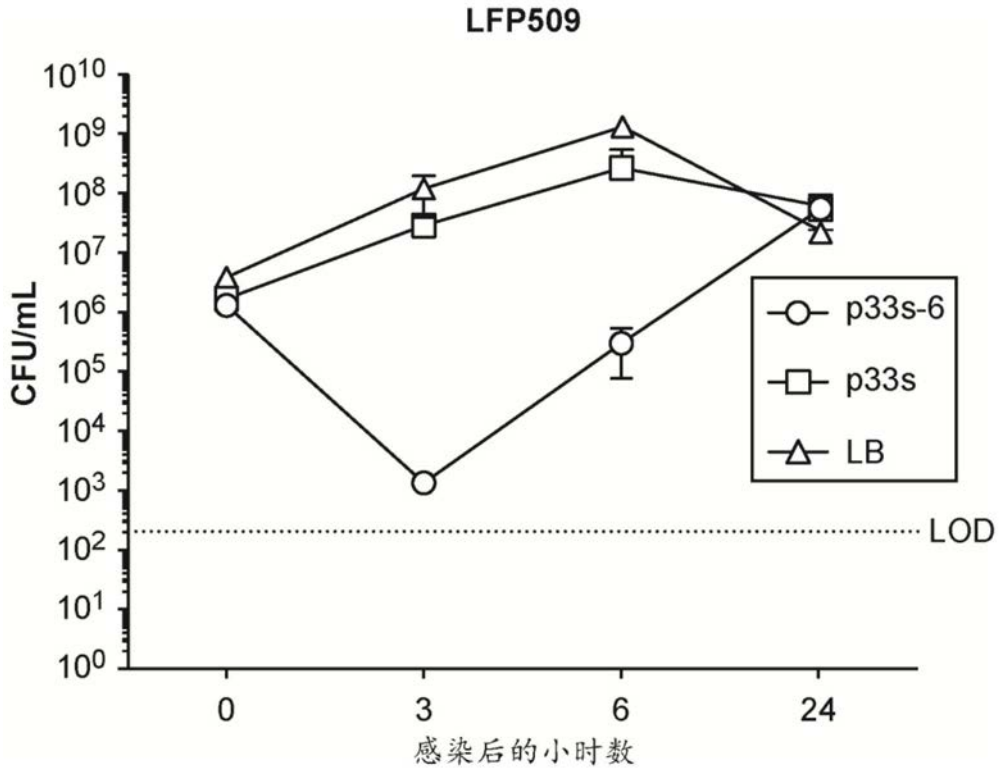


图35E

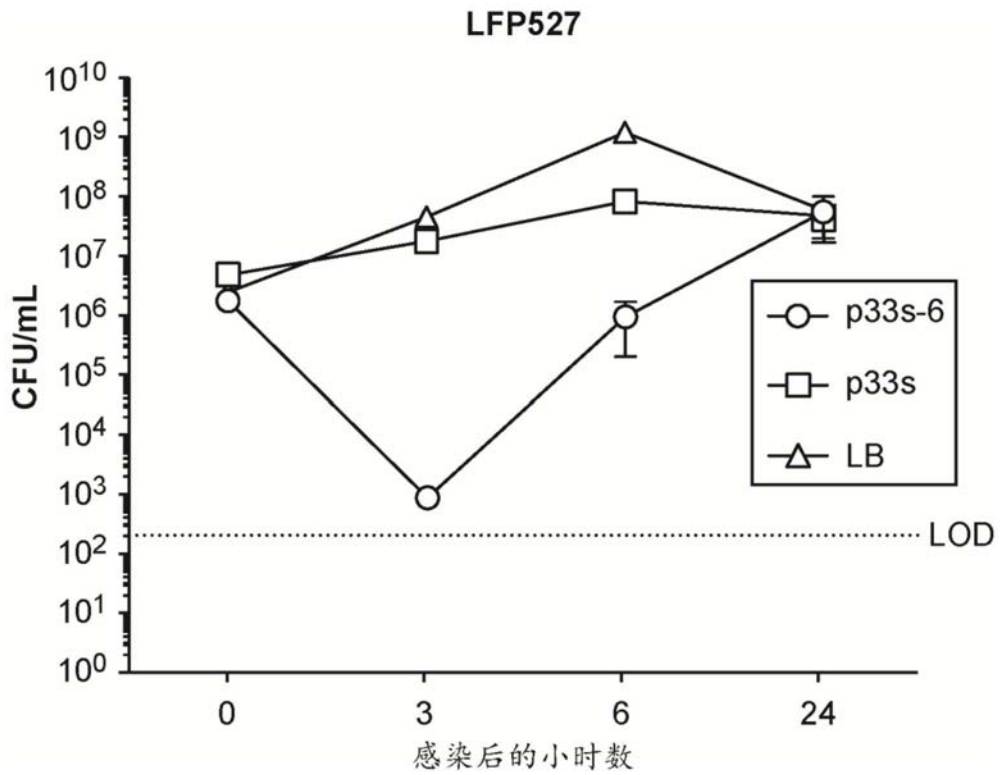


图35F

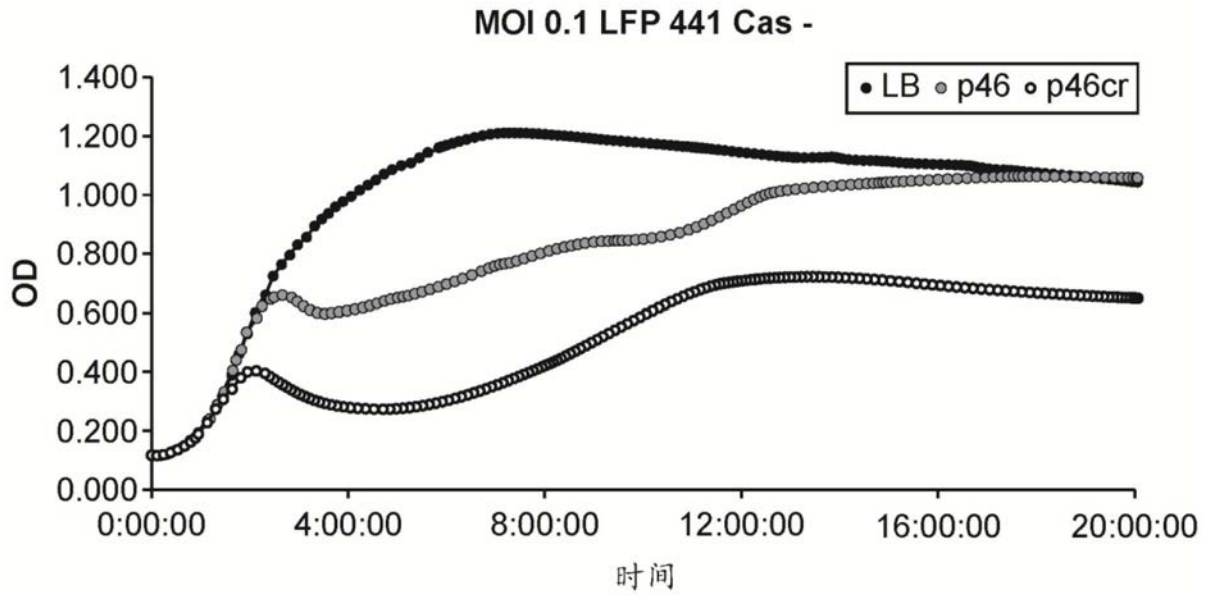


图36A

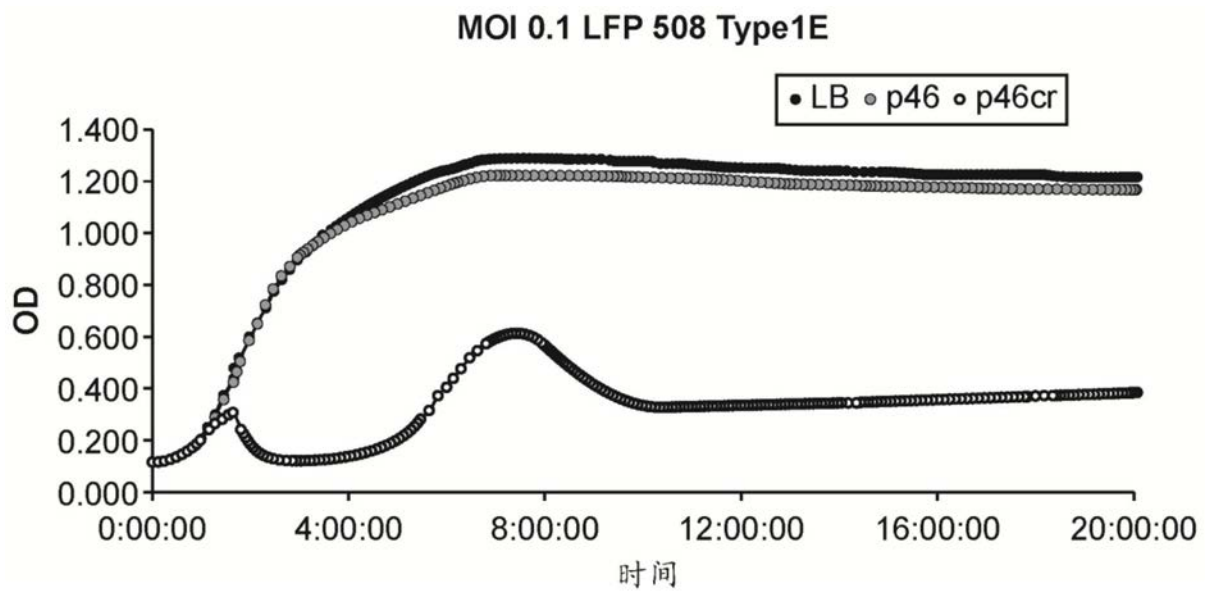


图36B

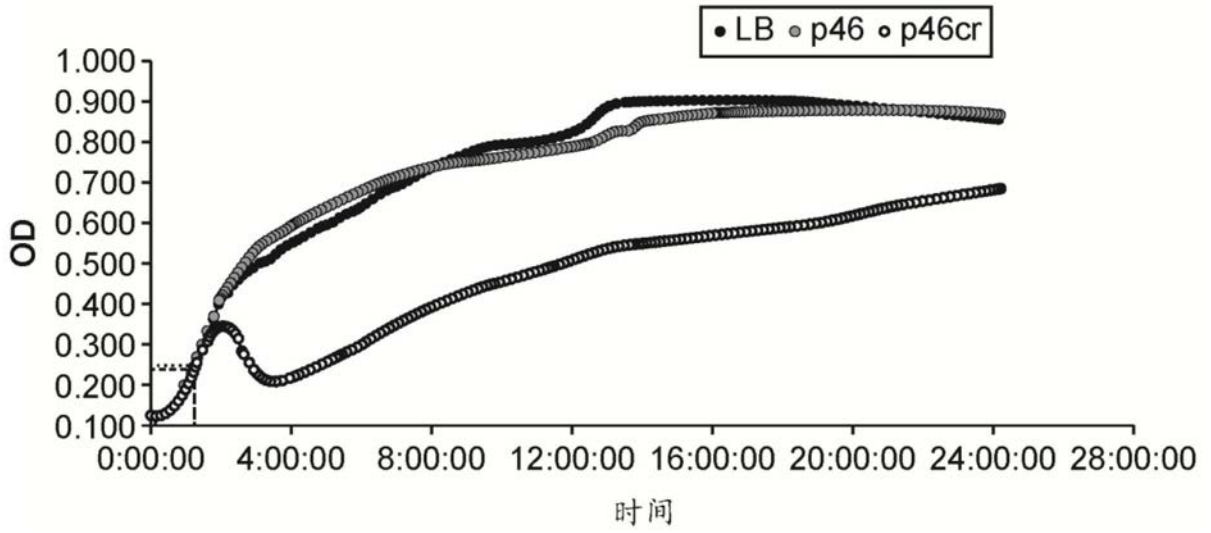


图36C

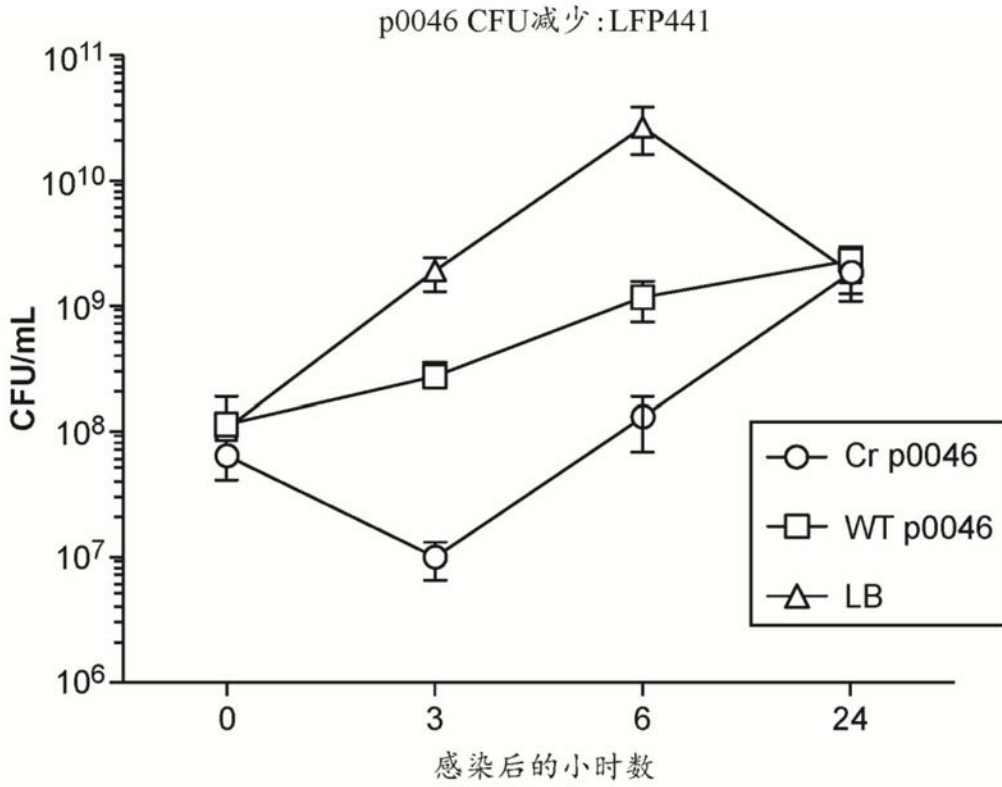


图36D

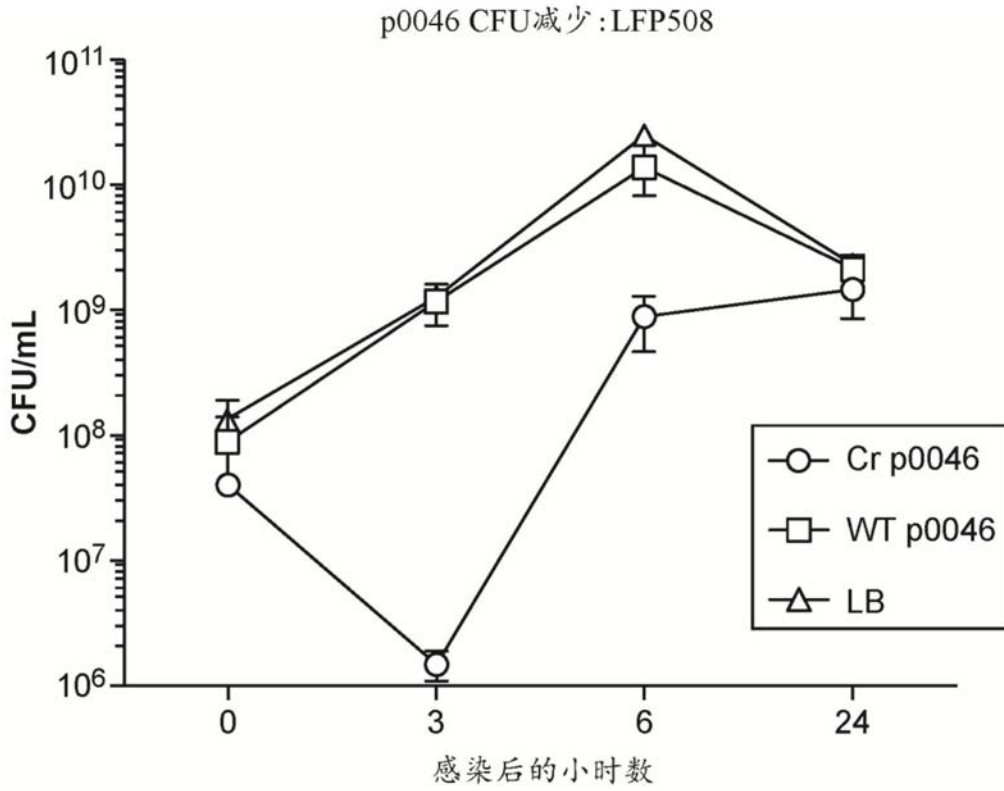


图36E

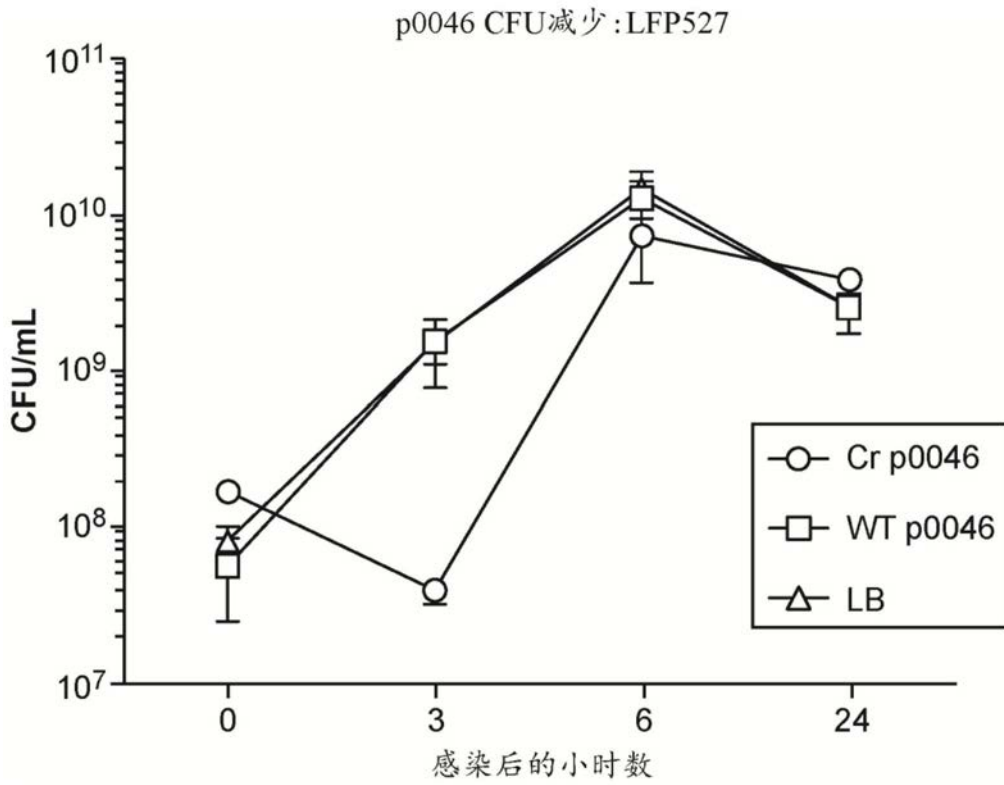


图36F

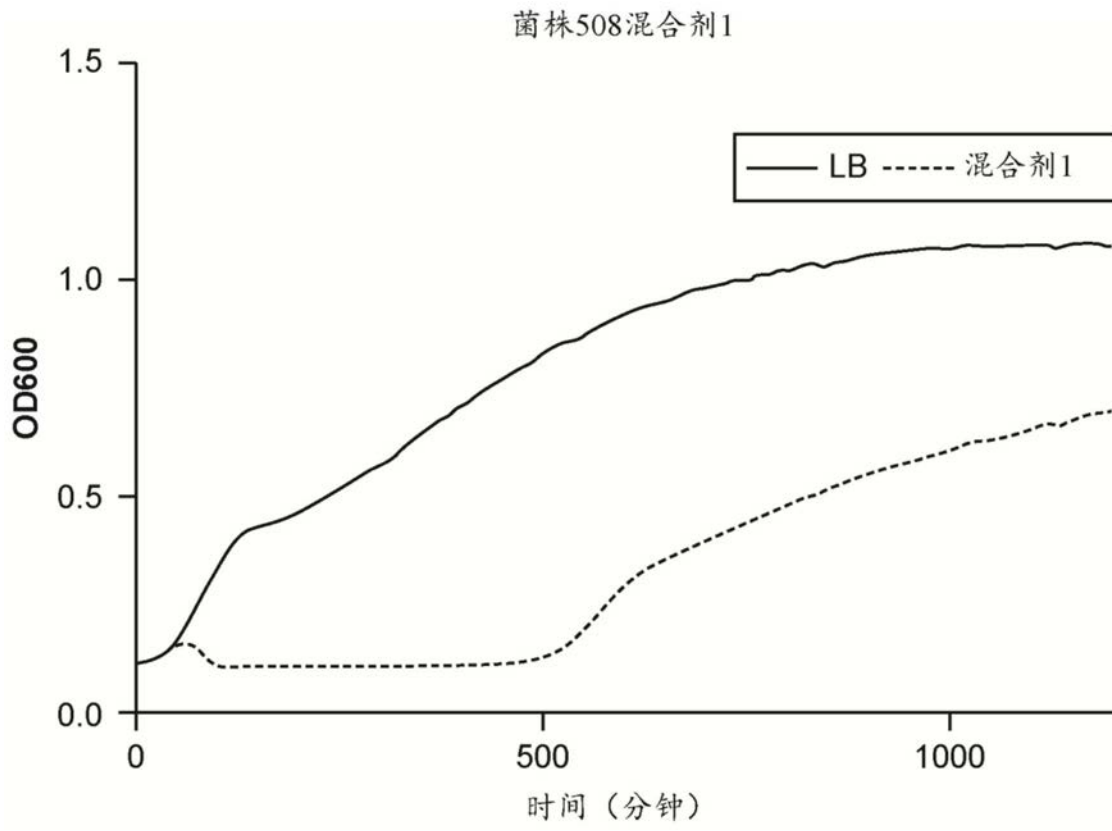


图37A

耐药性菌株508混合剂1

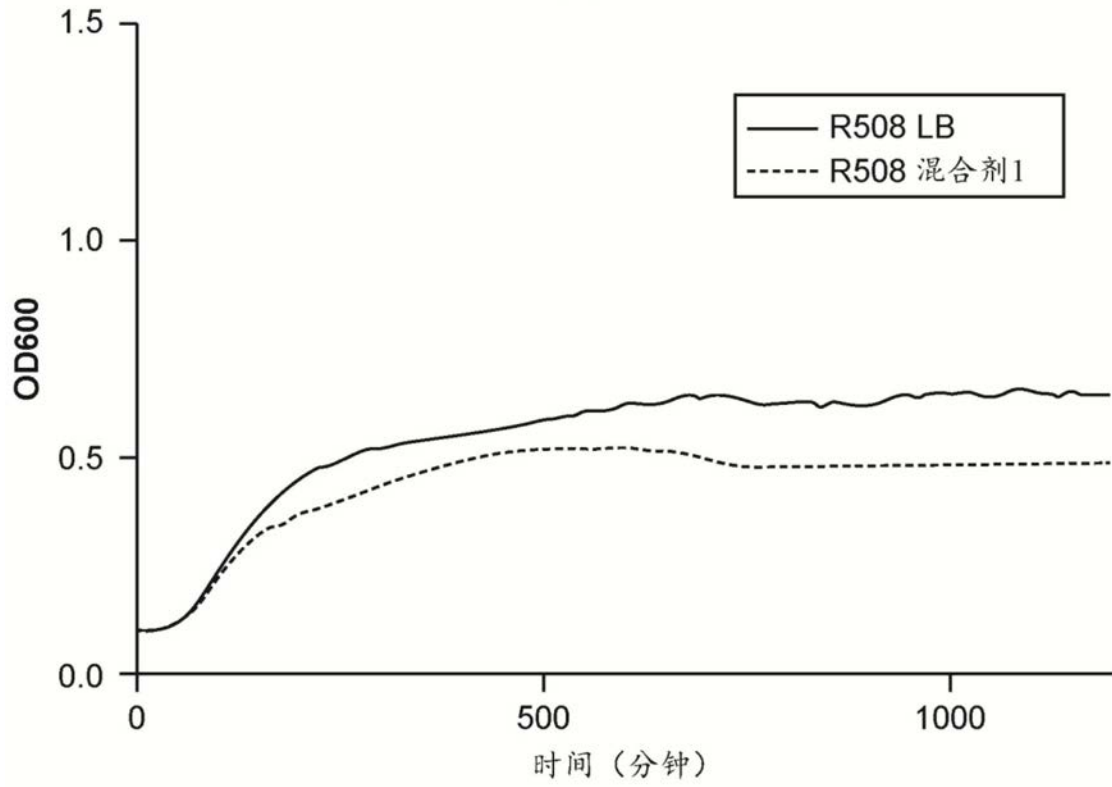


图37B

耐药性菌株508混合剂2

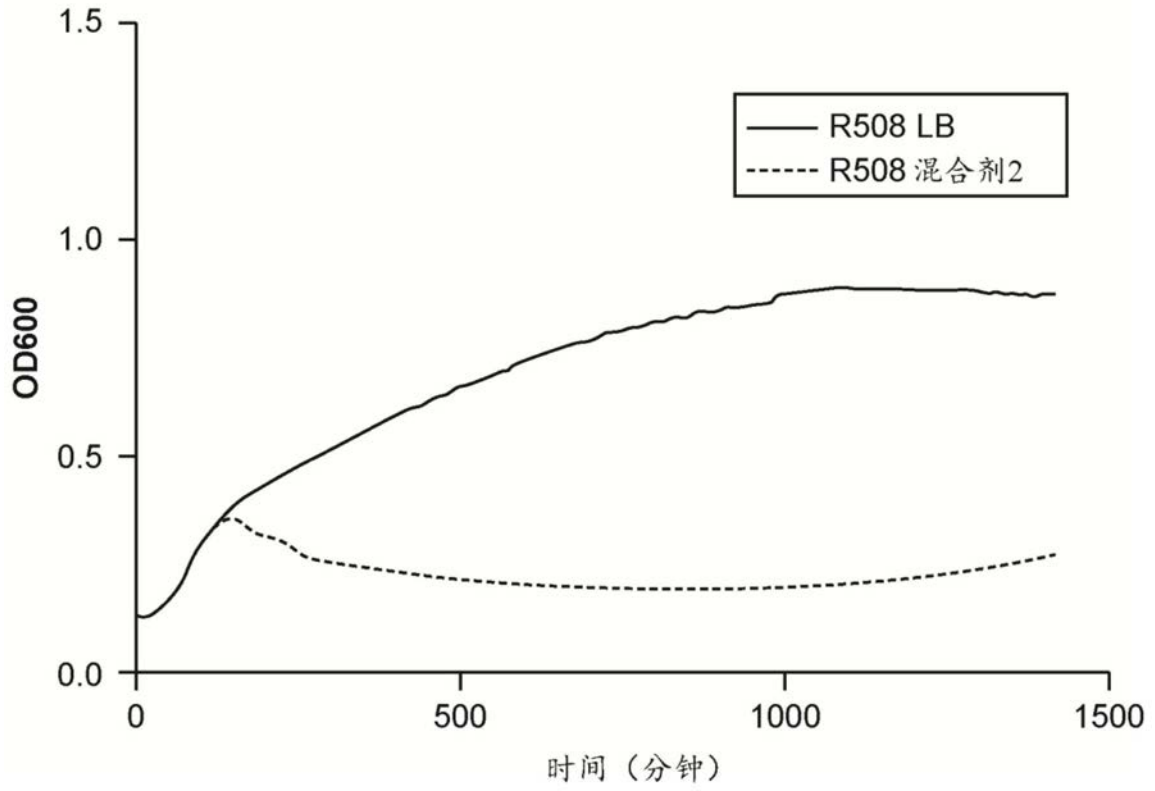


图37C

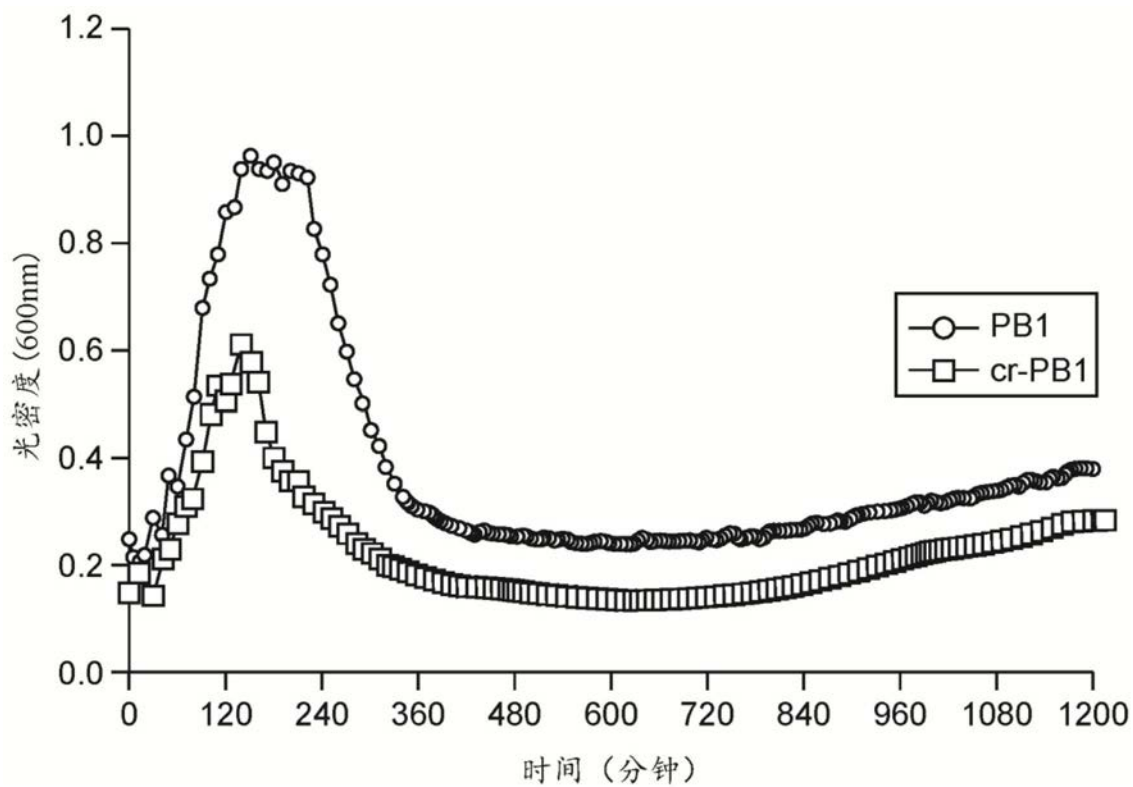


图38A

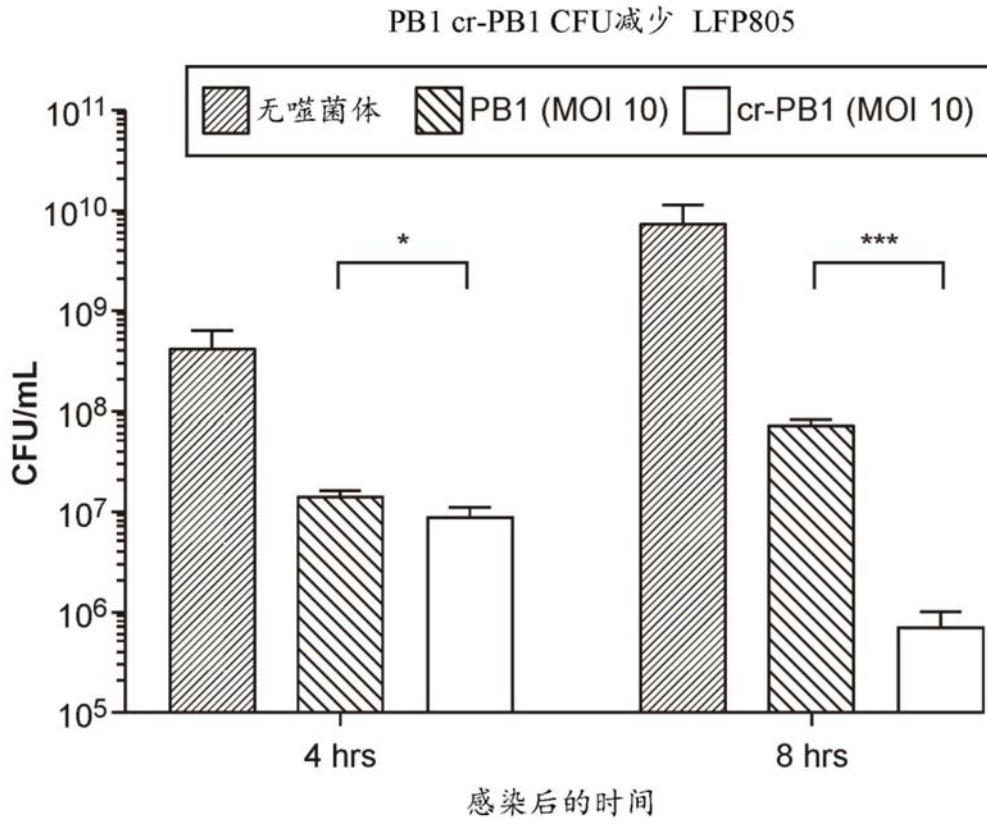


图38B

大肠杆菌中的I型Cas系统杀灭

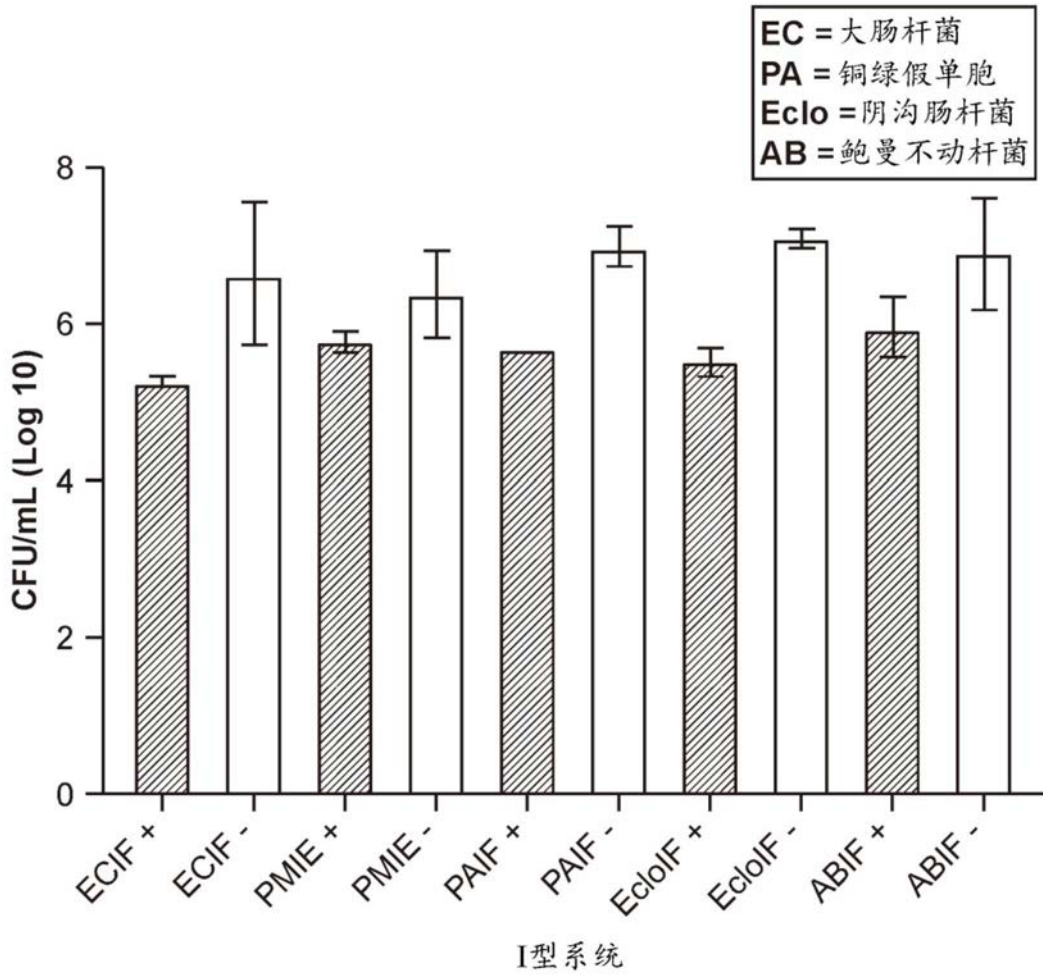


图39A

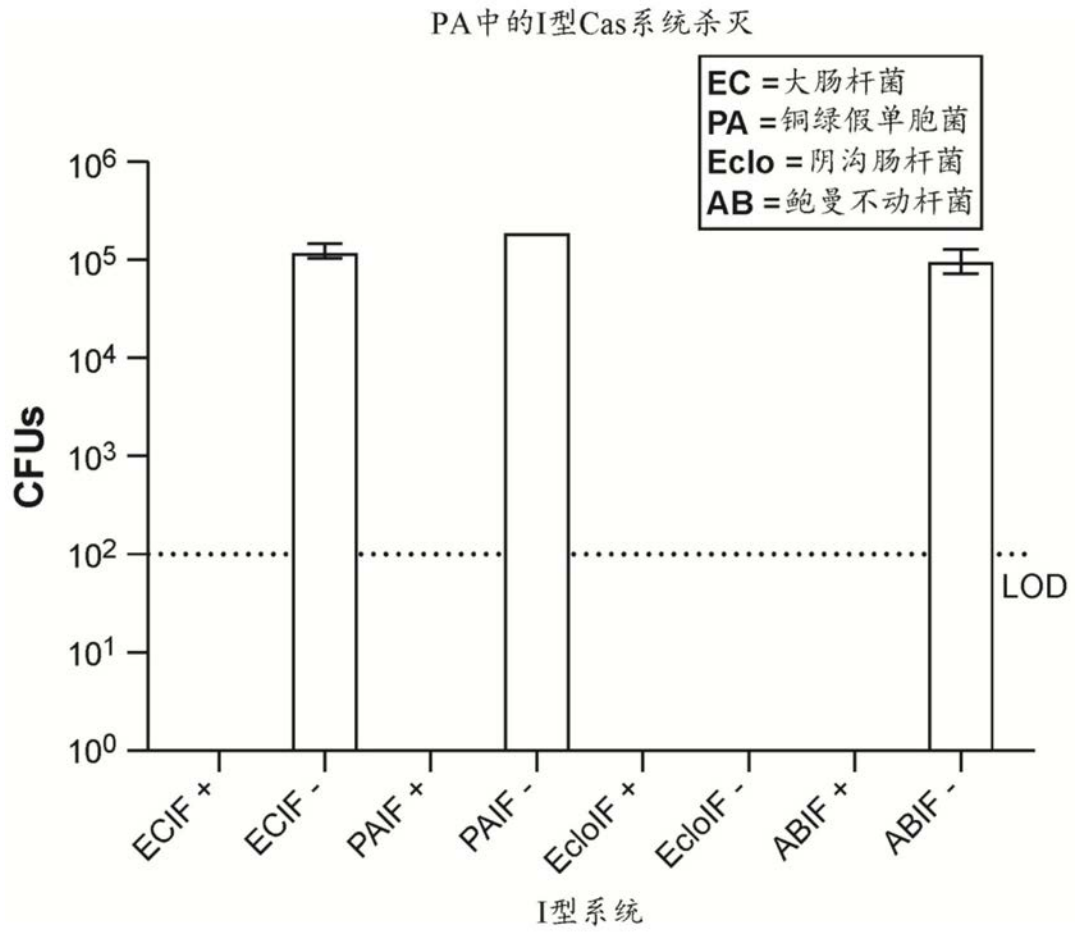


图39B