



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109310722 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780033655.0

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(22)申请日 2017.03.31

72002

(30)优先权数据

代理人 过晓东

62/316,704 2016.04.01 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 35/76(2015.01)

2018.11.30

A61P 31/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/025305 2017.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/173229 EN 2017.10.05

(71)申请人 塔夫斯大学

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·卡米利 L·凯恩斯 颜珉珉

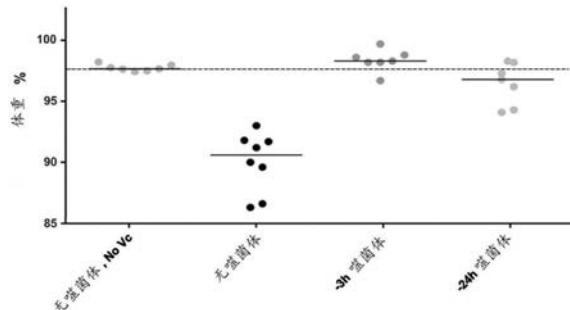
权利要求书4页 说明书28页 附图13页

(54)发明名称

用于预防弧菌感染的方法和组合物

(57)摘要

提供了用于预防、改善或处理由细菌弧菌属菌种引起的疾病的组合物和方法,例如霍乱弧菌引起的霍乱,所述组合物含有两种或两种以上的溶原性噬菌体菌株,所述溶原性噬菌体菌株可感染并杀死弧菌细胞。噬菌体具有毒性,其可在细胞内进行复制,并且裂解和杀死细菌。在一次处理中使用两种或两种以上的菌株,由于细菌突变的速率使其可针对所有噬菌体的同时,抗性能够降低到可以忽略的程度,从而使噬菌体耐药菌的出现的可能性降低至统计学上的可忽略性。正常的人类微生物菌群没有受到影响。在该方法和组合物的备选实施例中,抗生素或其他处理药物能够与多种噬菌体菌株的混合物一起施用。



1. 一种用于预防或降低受试者中的弧菌细菌感染的组合物,所述组合物包括:
一种由多种毒性溶原性噬菌体菌株形成的预防性混合物,其可感染和裂解细菌感染弧菌的细胞。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述溶原性噬菌体菌株是从感染霍乱弧菌的患者的粪便样本中分离出来的。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述多种指的是选自由ICP-1、ICP-2、ICP-3或者其毒性变体视频组成的组中至少两种噬菌体菌株。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述多数包括噬菌体菌株ICP-1、ICP-2和ICP-3。
5. 根据权利要求1至4任意一项所述的组合物,其中至少一种菌株是一种野生型噬菌体的变体或者突变体,所述变体选自由自发突变体、诱导突变体和基因工程重组突变体所组成的组中。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述噬菌体的裂解菌株的病毒体在弧菌感染物种的细胞中进行复制,并且使细胞裂解。
7. 根据权利要求6所述的组合物,包括一种在组合物中的多种菌株中的任何两种菌株的每一种菌株的噬斑形成单位(PFU)数量的比例是在第一种菌株与第二种菌株的滴度的分别小于大约1:10和第一种菌株与第二种菌株的滴度大于大约10:1的范围内。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述受试者在此前并未接触过弧菌感染物种。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述受试者被暴露于弧菌感染物种中,例如,所述受试者是受感染患者的家庭成员,或者所述受试者是医务工作者。
10. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述噬菌体的病毒体通过与第一种菌株的第一受体和第二种菌株的第二受体连接而与弧菌细胞的表面进行结合,并且所述第一受体和第二受体在分子上是不同的。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述第一株噬菌体的病毒体与细菌细胞外膜蛋白结合,并且第二株噬菌体的病毒体与脂多糖结合。
12. 根据权利要求10所述的组合物,其中通常微生物组细胞缺少针对多个噬菌体菌株的受体。
13. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述溶原性噬菌体菌株的宿主范围包括感染弧菌的宿主。
14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述感染指的是霍乱以及霍乱弧菌的溶原性噬菌体感染的细胞的菌株。
15. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述溶原性噬菌体菌株的宿主范围感染了多种弧菌种类。
16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述弧菌种类至少有一种是从下述种类中选择的:产气弧菌(*Vibrio aerogenes*)、夏天弧菌(*V.aestivus*)、河口弧菌(*V.aestuarianus*)、石琼胶弧菌(*V.agarivorans*)、易北河弧菌(*V.albensis*)、阿尔法克弧菌(*V.alfacsensis*)、溶藻弧菌(*V.alginolyticus*)、鳗弧菌(*V.anguillarum*)、*V.areninigrae*、*V.artabrorum*、大西洋弧菌(*V.atlanticus*)、非典型弧菌(*V.atypicus*)、远青弧菌(*V.azureus*)、巴西弧菌(*V.brasiliensis*)、牛弧菌(*V.bubulus*)、卡尔维湾弧菌(*V.calviensis*)、坎式弧菌(*V.campbellii*)、干酪弧菌(*V.casei*)、查氏弧菌(*V.chagasicii*)、

霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、辛辛那提弧菌 (*V. cincinnatensis*)、溶珊瑚弧菌 (*V. corallilyticus*)、大牡蛎弧菌 (*V. crassostreae*)、嗜环弧菌 (*V. cyclitrophicus*)、魔鬼弧菌 (*V. diabolicus*)、双氮养弧菌 (*V. diazotrophicus*)、吉雄氏弧菌 (*V. ezuriae*)、河流弧菌 (*V. fluvialis*)、强壮弧菌 (*V. fortis*)、弗氏弧菌 (*V. furnissii*)、高卢弧菌 (*V. gallicus*)、产气弧菌 (*V. gazogenes*)、巨大弧菌 (*V. gigantis*)、鲍鱼肠弧菌 (*V. halioticoli*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、肝弧菌 (*V. hepatarius*)、海马弧菌 (*V. hippocampi*)、西班牙弧菌 (*V. hispanicus*)、鱼肠道弧菌 (*V. ichthyoenteri*)、印度弧菌 (*V. indicus*)、卡纳罗弧菌 (*V. kanaloae*)、慢弧菌 (*V. lentus*)、岸边弧菌 (*V. litoralis*)、火神弧菌 (*V. logei*)、地中海弧菌 (*V. mediterranei*)、麦氏弧菌 (*V. metschnikovii*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*)、贻贝弧菌 (*V. mytili*)、需钠弧菌 (*V. natriegens*)、纳瓦拉弧菌 (*V. navarrensis*)、新生儿弧菌 (*V. neonates*)、海神弧菌 (*V. neptunius*)、海蛹弧菌 (*V. nereis*)、黑美人弧菌 (*V. nigripulchritudo*)、奥氏弧菌 (*V. ordalii*)、东方弧菌 (*V. orientalis*)、潘氏弧菌 (*V. pacinii*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、杀扇贝弧菌 (*V. pectenicida*)、杀对虾弧菌 (*V. penaeicida*)、伯麦罗氏弧菌 (*V. pomeroyi*)、黑海弧菌 (*V. ponticus*)、解蛋白弧菌 (*V. proteolyticus*)、轮虫弧菌 (*V. rotiferianus*)、红色弧菌 (*V. ruber*)、留萌弧菌 (*V. rumoensis*)、杀鲑弧菌 (*V. salmonicida*)、大菱鲆弧菌 (*V. scophthalmi*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、幸存弧菌 (*V. superstes*)、始仔弧菌 (*V. tapetis*)、塔斯曼尼亚弧菌 (*V. tasmaniensis*)、塔氏弧菌 (*V. tubiashii*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、沃丹弧菌 (*V. wodanis*) 和徐氏弧菌 (*V. xuii*)。

17. 根据权利要求1所述的组合物,进一步包括从由一种抗生素、一种抗真菌药、一种抗原生动物、一种抗炎药、一种抗脱水药和一种补水剂所组成组中选择的至少一种处理剂。

18. 权利要求1所述的组合物,配置成液体、偏激、胶囊、食品添加剂和冻干剂中的一种。

19. 一种预防或改善受试者中弧菌感染的方法,所述方法包括:

为受试者施用一种组合物,所述组合物包括一种预防性剂量的多种溶原性噬菌体菌株,所述溶原性噬菌体菌株能够感染和裂解弧菌感染物种细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述弧菌物种选自从下述物种构成的组中的至少一种:产气弧菌 (*Vibrio aerogenes*)、夏天弧菌 (*V. aestivus*)、河口弧菌 (*V. aestuarianus*)、石琼胶弧菌 (*V. agarivorans*)、易北河弧菌 (*V. albensis*)、阿尔法克弧菌 (*V. alfacensis*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、*V. areninigrae*、*V. artabrorum*、大西洋弧菌 (*V. atlanticus*)、非典型弧菌 (*V. atypicus*)、远青弧菌 (*V. azureus*)、巴西弧菌 (*V. brasiliensis*)、牛弧菌 (*V. bubulus*)、卡尔维湾弧菌 (*V. calviensis*)、坎式弧菌 (*V. campbellii*)、干酪弧菌 (*V. casei*)、查氏弧菌 (*V. chagasii*)、霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、辛辛那提弧菌 (*V. cincinnatensis*)、溶珊瑚弧菌 (*V. corallilyticus*)、大牡蛎弧菌 (*V. crassostreae*)、嗜环弧菌 (*V. cyclitrophicus*)、魔鬼弧菌 (*V. diabolicus*)、双氮养弧菌 (*V. diazotrophicus*)、吉雄氏弧菌 (*V. ezuriae*)、河流弧菌 (*V. fluvialis*)、强壮弧菌 (*V. fortis*)、弗氏弧菌 (*V. furnissii*)、高卢弧菌 (*V. gallicus*)、产气弧菌 (*V. gazogenes*)、巨大弧菌 (*V. gigantis*)、鲍鱼肠弧菌 (*V. halioticoli*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、肝弧菌 (*V. hepatarius*)、海马弧菌 (*V. hippocampi*)、西班牙弧菌 (*V. hispanicus*)、鱼肠道弧菌 (*V. ichthyoenteri*)、印度弧菌 (*V. indicus*)。

(*V. indicus*) 卡纳罗弧菌 (*V. kanaloae*)、慢弧菌 (*V. lentus*)、岸边弧菌 (*V. litoralis*)、火神弧菌 (*V. logei*)、地中海弧菌 (*V. mediterranei*)、麦氏弧菌 (*V. metschnikovii*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*)、贻贝弧菌 (*V. mytili*)、需钠弧菌 (*V. natriegens*)、纳瓦拉弧菌 (*V. navarrensis*)、新生儿弧菌 (*V. neonates*)、海神弧菌 (*V. neptunius*)、海蛹弧菌 (*V. nereis*)、黑美人弧菌 (*V. nigripulchritudo*)、奥氏弧菌 (*V. ordalii*)、东方弧菌 (*V. orientalis*)、潘氏弧菌 (*V. pacinii*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、杀扇贝弧菌 (*V. pectenicida*)、杀对虾弧菌 (*V. penaeicida*)、伯麦罗氏弧菌 (*V. pomeroyi*)、黑海弧菌 (*V. ponticus*)、解蛋白弧菌 (*V. proteolyticus*)、轮虫弧菌 (*V. rotiferianus*)、红色弧菌 (*V. ruber*)、留萌弧菌 (*V. rumoensis*)、杀鲑弧菌 (*V. salmonicida*)、大菱鲆弧菌 (*V. scophthalmi*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、幸存弧菌 (*V. superstes*)、始仔弧菌 (*V. tapetis*)、塔斯曼尼亚弧菌 (*V. tasmaniensis*)、塔氏弧菌 (*V. tubiashii*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、沃丹弧菌 (*V. wodanis*) 和徐氏弧菌 (*V. xuii*)。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述受试者选自人类、农场动物、动物园的动物比如考拉、高价值的哺乳动物比如狗或马、实验室动物比如老鼠或兔子、鱼以及鸟类比如鹦鹉或长尾小鹦鹉。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述受试者指的是从患者的住宿成员或者家庭成员中挑选的人,以及医务工作者例如医生、护士或护理员等。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述施用步骤是口服施用。

24. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括至少施用使用一种补液处理剂和至少一种抗生素。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中所述施用步骤是在接触弧菌感染物种之后进行,并且所该方法包括改善感染。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述施用指的是在接触后且在出现霍乱症状之前。

27. 根据权利要求19所述的方法,其中所述施用实在接触之前,并且所述方法是用于预防或者改善感染。

28. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在施用步骤之前,将组合物配制成为至少大约 10^7 、大约 10^8 、大约 10^9 、大约 10^{10} 、大约 10^{11} 、大约 10^{12} 、或者大约 10^{13} PFU/ml的噬菌体总滴度。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中在多种菌株的至少两种的PFU中的组合物的滴度的配制进一步包括将在第一种菌株的滴度与第二种菌株的滴度是在比例范围的菌株进行混合,所述第一种菌株的滴度与第二种菌株的滴度范围分别为在从至少大约1:10,到至少大约1:5,到至少大约1:1,到至少大约5:1,到至少大约10:1的范围。

30. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在所述施用步骤之前,用一种无毒的弧菌宿主培养每一种溶原性噬菌体菌株。

31. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在所述施用步骤之前,对所述组合物进行配制用于限制在受试者中逃逸噬菌体耐药突变体的选择。

32. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在所述施用步骤之前,通过选择至少两种菌株来对所述组合物进行配制,上述菌株选自由ICP-1、ICP-2、ICP-3、菌株138、菌株145、菌

株163及其裂解变体所组成的组中。

33. 根据权利要求19所述的方法,其中所述组合物是以至少大约 10^9 、大约 10^{10} 、 10^{11} 、大约 10^{12} 或者大约 10^{13} PFU/剂量的剂量施用。

34. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括重复所述施用步骤。

35. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括施用一种抗生素。

36. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在施用之前,从一种环境样品或者从弧菌感染的受试者中分离所述溶原性噬菌体菌株。

37. 根据权利要求39所述的方法,其中所述受试者为人类,并且所述样本为所述感染的受试者的粪便样本。

38. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括在施用之前,通过封装噬菌体菌株的病毒体混合物来配制所述组合物。

39. 一种试剂盒,其包括一种组合物,所述组合物具有多种对弧菌菌种细胞感染具有特异性的溶原性噬菌体菌株。

40. 根据权利要求38所述的试剂盒,其中所述组合物是以单位剂量存在。

41. 根据权利要求39所述的试剂盒,其中所述组合物至少包括从由ICP-1、ICP-2和ICP-3所组成的组中选择的一种噬菌体菌株。

用于预防弧菌感染的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本发明要求享有临时申请号为62/316,704,名称为“预防和处理弧菌感染的方法和组合物”的权益,所述临时申请是发明人Andrew Camilli、Minmin Yen和Lynne Cairns于2016年4月1日提交的申请,该申请文件的全部内容以并入本文作为参考。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的资助AI055058的政府支持下完成的。政府对这项发明有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 霍乱是由霍乱弧菌在小肠内繁殖和产生毒素引起的腹泻疾病。霍乱在爆发期新感染源主要来自于疾病在家庭内的迅速传播。这些次要病例发病的高峰时间在指数病例出现后48小时。不鼓励使用预防性抗生素,因为预防性抗生素会破坏正常的微生物群,但是其他的药物又并不能很容易的处理或者预防这种疾病。与没有霍乱患者成员的家庭相比,有霍乱患者成员的家庭的感染风险增加了大约100倍。

[0007] 已经对3株营养(裂解或毒性)弧菌噬菌体进行分离并测序,分别为ICP-1、ICP-2和ICP-3(Seed等人,mBio,2(1):1-9,2011)。每一种菌株都通常都能够从孟加拉国达卡霍乱患者的粪便样本中分离出来。罕见地,在一个霍乱患者的粪便样本中很少能够同时检测出两种噬菌体菌株,由于发病率低,因此需要PCR,与此同时,在同一个样本中没有同时检测到这三种噬菌体菌株存在。

[0008] 选择一种在编码ICP-1受体基因中的霍乱弧菌的突变体,所述受体是表面层脂多糖(LPS)的O1抗原,并且所述突变体对噬菌体感染是具有抗性(Seed等人,PLoS Pathog,8(9):1-13,2012)。这些突变在体外发生频率很高。在动物或人类感染期间,上述频率会降低,这是因为霍乱弧菌脂多糖在患病的肠道中是细菌毒性所必需的。

[0009] 一些霍乱弧菌菌株具有抗ICP-1的抗性机制(Seed等人,Nature,494(7438):489-491,2013)。但是,ICP-1噬菌体菌株已经进化出克服CRISPR/Cas系统的抗性机制来克服这种耐药性,该系统允许噬菌体维持在感染周期。

[0010] ICP-2的细菌受体是一种对毒性至关重要的表面蛋白,其被称为OmpU(Seed等个人,eLife,3:e03497,2014)。在一部分患者中观察到细菌逃逸突变株,并且在编码OmpU蛋白的基因中包含点突变。观察到某些患者产生了无毒的霍乱弧菌逃逸突变体,但是这些突变体不再表达OmpU蛋白,并且这些突变体不会将疾病传播给其他人。

[0011] 因此,有必要使用非抗生素药物来防止霍乱和相关的弧菌细菌性疾病的传播。

[0012] 附图简要说明

[0013] 附图1A是在噬菌体存在情况下24小时期间内的题为霍乱弧菌培养物的一组生长曲线,以及缺少噬菌体的对照组培养物的一组生长曲线。纵坐标标识每毫升的细胞数(对数标度),作为横坐标上显示的时间的函数。每种培养物中的噬菌体的感染复数(MOI)为1个噬菌体/细胞。黑色圆圈表明没有噬菌体的对照霍乱弧菌的生长,其在初始对数期生长的细菌在4小时内达到稳定期。在ICP-1(三角形)、ICP-2(方块)、ICP-3(倒三角形)或这三种菌株(-

x-)的噬菌体混合物存在时,细菌的生长明显减慢,混合物降低了细胞滴度至初始滴度 10^3 每毫升,而没有噬菌体的对照组为 10^8 每毫升。在最初的12小时内,有三种噬菌体菌株存在的情况下,细菌的生长至少减少了三个数量级,并且在整个24小时内都持续降低。

[0014] 附图1B显示了在附图1A中被感染的每个培养基中,每毫升噬菌体的滴度,是持续24个小时的时间的函数。噬菌体滴度在24小时内持续存在,观察到最终滴度为大约 10^6 每毫升至大约 10^8 每毫升。

[0015] 附图2A是一种显示了与未施用噬菌体的小鼠相比,分别施用每种指定的噬菌体菌株或三种菌株混合施用的小鼠小肠中所存在的存活霍乱弧菌(CFU)的数量减少的图示。噬菌体以在大约 10^6 至大约 10^7 PFU的剂量进行施用。观察到三种菌株的混合物使得细菌滴度降低至超过检测的5个数量级以上(约10个菌落),并且每个菌株将细菌载量降低至2到5个数量级之间。

[0016] 附图2B是感染霍乱弧菌的附图2A所示动物小肠中噬菌体滴度的图示。

[0017] 附图3A-3E是来自幼鼠小肠模型中的PFU和CFU的图示,其显示当在细菌感染之前直至24小时施用噬菌体时,霍乱弧菌的细菌细胞数量减少。符号图形:以圆圈形式显示的ICP-1显示为圆圈;ICP-2显示为正方形,并且ICP-3显示为三角形。

[0018] 附图3A显示了3h、6h、12h或者24h后保留的噬菌体滴度,对于三种噬菌体菌株中的每一种都没有细菌感染:噬菌体在24小时内存活,显示一种最终滴度从100至大约 10^6 和大约 10^7 之间。圆圈是ICP-1,正方形是ICP-2,三角形是ICP-3。

[0019] 附图3B显示了在接受挑战剂量的细菌之前,用三种菌株的噬菌体混合物进行噬菌体预防后,每个小肠的细菌数量。用噬菌体混合物对小鼠进行处理,其量为从大约 2×10^5 至大约 5×10^5 PFU,然后用在大约 5×10^5 至大约 9×10^5 范围内的剂量的霍乱弧菌细胞感染来进行攻击。在小鼠感染24小时后进行处死,测定肠道匀浆中细菌CFU的含量。数据显示,与未施用噬菌体的对照组相比,细菌细胞的数量减少了几个数量级,并且在感染前6h施用的预防性最大。在细菌攻击前24小时给予噬菌体预防,可减少5天大鼠小肠霍乱弧菌的载量。在接受挑战前6小时或12小时施用噬菌体混合物是最有效,并且即使是在接受挑战前24小时后施用,所述肠道细菌载量也可被观察到比未施用噬菌体的对照组降低了100倍左右。虚线是检测的极限。即使在感染前24小时时施用噬菌体进行预防后,与未施用噬菌体的对照组相比,观察到的细菌细胞数量至少减少了两个数量级。

[0020] 附图3C显示了在感染前6h、12h或者24h时进行噬菌体预防后每个小肠的噬菌体PFU,在细菌攻击前24h施用噬菌体的动物中观察到最大噬菌体产量。

[0021] 附图3D显示了用三种噬菌体混合物预防和用高剂量($1-1.3 \times 10^8$ 个霍乱弧菌细胞)攻击后存活的细菌CFU。数据显示,CFU至少降低了1到2个数量级,在细菌攻击前6小时是施用噬菌体进行预防后观察到最大疗效。

[0022] 附图3E显示了附图3D中所示的肠标本中PFU噬菌体滴度的持久性。

[0023] 附图4A-4C指的是在霍乱弧菌感染前3h或者24h的时间点给与噬菌体混合物的幼兔受试者得到的数据的图示。

[0024] 附图4A显示在以 3×10^8 PFU的ICP噬菌体混合物施用后各时间点在没有细菌感染的小肠中噬菌体的保留情况,并在3h或者24h后处死。可以发现在每个时间点都有大量的噬菌体PFU被保留,并且在3h后减少到初始输入噬菌体的10%左右,24h后减少到1%左右。

[0025] 附图4B显示了在以 4×10^9 至 8×10^9 PFU之间剂量给予噬菌体混合物的兔小肠中观察到的霍乱弧菌细胞数,然后在3h或24h后用 5×10^8 CFU霍乱弧菌进行攻击。数据显示,在攻击前3h给药的受试者中,超过一半的受试者在检测限度之内没有表现出细菌CFU,并且其余受试者的细菌数量减少了两到三个数量级。作为在攻击前24小时施用噬菌体预防的结果,每个小肠中的霍乱弧菌的数量减少了2到3个数量级。

[0026] 附图4C显示了在霍乱弧菌攻击后,附图4B的受试者中噬菌体PFU数量的分析。数据显示,如果图4B中细菌的减少是由于受细菌感染的受试者中的噬菌体的裂解生长造成的,那么受试者的小肠中存在大量噬菌体是意料之中的。观察到从细菌攻击前3h或24h进行预防性用药的受试者中可分离出类似的PFU。

[0027] 附图5显示了受试者在时间过程结束时初始体重的百分比,如附图4A-C所示。在霍乱弧菌攻击3h或24小时之前,接受噬菌体混合物预防的受试者保持了与未经处理的对照组(无噬菌体,无Vc)相当的体重,在霍乱弧菌攻击后体重的维持方面,在攻击前3h的预防措施比在24h给药更为有效。与此相反,未接受噬菌体处理的霍乱弧菌感染者在本实施例过程中损失了大约10-15%的体重,即在短时间内体重会大幅下降。在对照动物中,由于实验对象的幼兔是从水坝分离出来的因此为少量体重损失。

[0028] 附图6表示噬菌体在成年动物模型中持续存活能力的测定。将噬菌体混合物施用于小鼠体内,并在指定时间点采集粪便样本,对噬菌体含量进行检测。在给药后的12小时和36小时以及长达60个小时后,每个受试者的可重复滴度均可检测到噬菌体。

[0029] 附图7是对来自附图6所示的样本的 β -多样性的主坐标分析,从用抗生素(阳性对照)、噬菌体混合物或者用热灭活噬菌体混合物(阴性对照)处理的动物粪便的第0天(处理前)和第2天(处理后大约36小时)所采集的动物粪便样本中提取的基因组DNA。使用基因组DNA作为用16s V4区域特异性引物进行PCR的模板。对PCR产物进行纯化,通过PCR添加的Nextera测序适配器,并且使用250bp配对末端Illumina MiSeq试验对样品进行测序。使用QIIME v1.8进行数据分析。运用Greengenes数据库,通过99%的相似性和系统发育特征来选择操作分类单元(OTU)。每个点代表一个动物的肠道微生物种群。数据显示,抗生素处理后的第0天至第1天期间、第1天至第2天期间,动物群体的微生物群落结构存在差异。与之相反的,在这些天中,在噬菌体混合物处理的受试者的微生物组和接受热灭活噬菌体混合物处理的对照动物组中,研究对象的微生物群落没有差异。这些结果表明,噬菌体处理不影响微生物群的组成。

[0030] 附图8显示了与附图7相同数据分析,其中省略了抗生素样本。但在各样品之间的 β -多样性的数量差异远远低于附图7中的差异,并且在任何组之间都没有可识别的不相似模式,从而进一步说明了噬菌体处理不影响菌群组成。

[0031] 附图9A和附图9B指的是来自附图3A的幼鼠小肠模型的CFU检测的图示。

[0032] 附图9A显示了附图3A所示的CFU数据,这些数据来自于以 6×10^6 至 4×10^7 之间总PFU的指示比例为ICP-1:ICP-2:ICP-3的混合物进行口服施用的小鼠,以及未使用噬菌体处理的对照组。在24个小时后,用 3×10^5 和 5×10^5 CFU的霍乱弧菌对小鼠进行口服攻击。在感染24小时后处死小鼠,对小鼠小肠中存活的霍乱弧菌CFU数量进行计数。虚线表示检测极限,水平实心线条表示中值。每个圆圈代表一只动物。使用Kruskal-Wallis检验和Dunn's post-hoc多重比较检验来计算显著性。 $*P=0.01-0.05$, $**P=0.001-0.01$ 。数据显示,1:1:1

和1:1:10的比例能够为受试者提供最显著的保护。

[0033] 附图9B显示了附图3D所示的CFU数据,其中在使用大剂量霍乱弧菌攻击前12小时时施用噬菌体混合物。与无噬菌体对照组相比,噬菌体预防可使小肠中的霍乱弧菌定殖减少1到2个数量级,并且该结果已经在使用不同比例菌株制备的混合物组中被观察到。使用 6×10^5 至 2×10^6 总CFU之间的指定比率的混合物对小鼠进行口服施用,并且对照组不使用噬菌体进行处理。在12小时后,用 2×10^8 和 3×10^8 CFU的霍乱弧菌对小鼠进行口服攻击。在感染24小时后处死小鼠,对小鼠小肠中存活的霍乱弧菌CFU数量进行计数。虚线表示检测极限,水平实心线条表示中值。每个圆圈代表一只动物。使用Kruskal-Wallis检验和Dunn's post-hoc多重比较检验来计算显著性。 $*P=0.01-0.05$, $***P=0.0001-0.001$ 。数据显示,1:1:1的比例能够为受试者提供最显著的保护。

发明内容

[0034] 本发明的一个方面提供了一种用于预防或者减少受试者中细菌弧菌感染的组合物,所述组合物包含:多种溶原性噬菌体菌株的预防性混合物,所述溶原性噬菌体能够感染和裂解细菌感染弧菌的细胞。在所述组合物的一个实施方案中,所述溶原性噬菌体菌株是从感染霍乱弧菌的患者的粪便样本中分离出来的。例如,所述多种指的是从由ICP-1、ICP-2、ICP-3或者它们的毒性变体所组成的组中选择的至少两种噬菌体菌株。所述组合物的一个具体实施方案是一种混合物,其中所述多种包括噬菌体菌株ICP-1、ICP-2和ICP-3。其他的实施方案包括至少一个是野生型噬菌体的变体或突变体的菌株,所述变体选自由自发突变体组、诱导突变体组和转基因重组体组所组成的组中的变体。一般来说,所述噬菌体裂解菌株的病毒体是在弧菌感染菌种的细胞中进行复制并且裂解所述细胞,从而导致受试者体内细菌的死亡,并且因而预防或者减少感染。

[0035] 本发明中所使用的术语“毒性”和“裂解的”指的是噬菌体菌株,它们感染细菌并且具有一种生长复制周期,导致细菌细胞的死亡和裂解。术语“溶原性”或者“温带”指的是能够裂解细菌细胞的噬菌体菌株,导致携带整合到细菌染色体中的噬菌体基因组的细胞的持续增长。溶原性噬菌体菌株可以突变为毒性衍生物,其在生长过程中时严格裂解的并且可以应用于本发明的组合物和方法中。

[0036] 任意的实施方案中的组合物包含多种菌株,在组合物中的多个菌株的任何两个菌株的每个菌株的菌斑形成单位(PFU)的量的比例分别是在第一种菌株和与第二种菌株的滴度的从分别小于大约1:10至第一种菌株和与第二种菌株的滴度大于10:1的范围内。所述组合物适合施用于先前未暴露于弧菌感染物种的受试者,例如对施用于已知的最好的受试者。可以代替地,所述受试者暴露于弧菌感染物种中,例如,所述暴露的受试者是感染的患者的家庭成员,或者所述暴露的受试者是医务工作者。

[0037] 为了大大减少甚至消除感染细菌中抗性突变体的出现,所述噬菌体的病毒体通过将第一种菌株结合到细菌表面上的第一受体,并且将第二种菌株结合至细菌表面上的第二受体来结合弧菌细胞的表面,并且所述第一受体和第二受体在分子上是不同的。通过这种方式,自然突变对耐药性的速率是在大约 10^{-7} 至大约 10^{-9} 个细菌种群中的频率的数量级,对于大多数细菌基因来说,需要平方才能获得对两种噬菌体菌株的双重抗性突变体,这是一个低到可以忽略甚至可认为不存在的速率。因此,在本发明组合物的实施方案中,噬菌体第

一种菌株的病毒体与细菌细胞外膜蛋白OmpU结合,并且噬菌体第二中菌株的病毒体与脂多糖结合。

[0038] 本文所提供的组合物的一个特别优点是,正常微生物组菌株的细胞缺乏对多个噬菌体菌株的受体,而正常肠道菌群物种的能力不受影响。溶原性噬菌体菌株的宿主范围包括感染的弧菌种类。例如,感染是霍乱,溶原性噬菌体菌株感染霍乱弧菌的细胞。在一些实施例中,溶原性噬菌体菌株的宿主范围包括能够感染多个弧菌种类。这种细菌对许多动物的疾病负有责任。例如,该组合物的实施例中包含多个噬菌体菌株,其宿主范围至少为从以下组别中选择的一种弧菌菌株:产气弧菌(*Vibrio aerogenes*)、夏天弧菌(*V.aestivus*)、河口弧菌(*V.aestuarianus*)、石琼胶弧菌(*V.agarivorans*)、易北河弧菌(*V.albensis*)、阿尔法克弧菌(*V.alfacsensis*)、溶藻弧菌(*V.alginolyticus*)、鳗弧菌(*V.anguillarum*)、*V.areninigrae*、*V.artabrorum*、大西洋弧菌(*V.atlanticus*)、非典型弧菌(*V.atypicus*)、远青弧菌(*V.azureus*)、巴西弧菌(*V.brasiliensis*)、牛弧菌(*V.bubulus*)、卡尔维湾弧菌(*V.calviensis*)、坎式弧菌(*V.campbellii*)、干酪弧菌(*V.casei*)、查氏弧菌(*V.chagasaki*)、霍乱弧菌(*V.cholerae*)、辛辛那提弧菌(*V.cincinnatensis*)、溶珊瑚弧菌(*V.coralliiolyticus*)、大牡蛎弧菌(*V.crassostreae*)、嗜环弧菌(*V.cyclitrophicus*)、魔鬼弧菌(*V.diabolicus*)、双氮养弧菌(*V.diazotrophicus*)、吉雄氏弧菌(*V.ezurae*)、河流弧菌(*V.fluvialis*)、强壮弧菌(*V.fortis*)、弗氏弧菌(*V.furnissii*)、高卢弧菌(*V.gallicus*)、产气弧菌(*V.gazogenes*)、巨大弧菌(*V.gigantis*)、鲍鱼肠弧菌(*V.halioticoli*)、哈维氏弧菌(*V.harveyi*)、肝弧菌(*V.hepatarius*)、海马弧菌(*V.hippocampi*)、西班牙弧菌(*V.hispanicus*)、鱼肠道弧菌(*V.ichthyoenteri*)、印度弧菌(*V.indicus*)、卡纳罗弧菌(*V.kanaloae*)、慢弧菌(*V.lentus*)、岸边弧菌(*V.litoralis*)、火神弧菌(*V.logei*)、地中海弧菌(*V.mediterranei*)、麦氏弧菌(*V.metschnikovii*)、拟态弧菌(*V.mimicus*)、贻贝弧菌(*V.mytili*)、需钠弧菌(*V.natriegens*)、纳瓦拉弧菌(*V.navarrensis*)、新生儿弧菌(*V.neonates*)、海神弧菌(*V.neptunius*)、海蛹弧菌(*V.nereis*)、黑美人弧菌(*V.nigripulchritudo*)、奥氏弧菌(*V.ordalii*)、东方弧菌(*V.orientalis*)、潘氏弧菌(*V.pacini*)、副溶血弧菌(*V.parahaemolyticus*)、杀扇贝弧菌(*V.pectenicida*)、杀对虾弧菌(*V.penaeicida*)、伯麦罗氏弧菌(*V.pomeroyi*)、黑海弧菌(*V.ponticus*)、解蛋白弧菌(*V.proteolyticus*)、轮虫弧菌(*V.rotiferianus*)、红色弧菌(*V.ruber*)、留萌弧菌(*V.rumoiensis*)、杀鲑弧菌(*V.salmonicida*)、大菱鲆弧菌(*V.scophthalmi*)、灿烂弧菌(*V.splendidus*)、幸存弧菌(*V.superstes*)、始仔弧菌(*V.tapetis*)、塔斯曼尼亚弧菌(*V.tasmaniensis*)、塔氏弧菌(*V.tubiashii*)、创伤弧菌(*V.vulnificus*)、沃丹弧菌(*V.wodanis*)和徐氏弧菌(*V.xui*)。

[0039] 在各种实施方案中,组合物还包含至少一种选自下组的治疗剂:抗生素、抗真菌剂、抗原生动物、抗炎剂、抗脱水剂和水合剂。替代实施方案中的组合物配制为选自以下的组中的一种:液体、片剂、胶囊、食品添加剂和冻干蛋白。对于冻干物,将组合物包装以包含无菌缓冲液作为溶剂化剂。

[0040] 本发明的一个方面提供了预防或改善受试者中的弧菌物种感染的方法,该方法包括向受试者施用包含预防剂量的多种裂解性噬菌体菌株的组合物,所述菌株感染并裂解弧菌感染的细胞。种类。例如,弧菌物种是选自又下述物质组成的组中的至少一种:产气弧菌

(*Vibrio aerogenes*)、夏天弧菌 (*V.aestivus*)、河口弧菌 (*V.aestuarianus*)、石琼胶弧菌 (*V.agarivorans*)、易北河弧菌 (*V.albensis*)、阿尔法克弧菌 (*V.alfacsensis*)、溶藻弧菌 (*V.alginolyticus*)、鳗弧菌 (*V.anguillarum*)、*V.areninigrae*、*V.artabrorum*、大西洋弧菌 (*V.atlanticus*)、非典型弧菌 (*V.atypicus*)、远青弧菌 (*V.azureus*)、巴西弧菌 (*V.brasiliensis*)、牛弧菌 (*V.bubulus*)、卡尔维湾弧菌 (*V.calviensis*)、坎式弧菌 (*V.campbellii*)、干酪弧菌 (*V.casei*)、查氏弧菌 (*V.chagasii*)、霍乱弧菌 (*V.cholerae*)、辛辛那提弧菌 (*V.cincinnatensis*)、溶珊瑚弧菌 (*V.coralliiyticus*)、大牡蛎弧菌 (*V.crassostreae*)、嗜环弧菌 (*V.cyclitrophicus*)、魔鬼弧菌 (*V.diabolicus*)、双氮养弧菌 (*V.diazotrophicus*)、吉雄氏弧菌 (*V.ezuriae*)、河流弧菌 (*V.fluvialis*)、强壮弧菌 (*V.fortis*)、弗氏弧菌 (*V.furnissii*)、高卢弧菌 (*V.gallicus*)、产气弧菌 (*V.gazogenes*)、巨大弧菌 (*V.gigantis*)、鲍鱼肠弧菌 (*V.halioticoli*)、哈维氏弧菌 (*V.harveyi*)、肝弧菌 (*V.hepatarius*)、海马弧菌 (*V.hippocampi*)、西班牙弧菌 (*V.hispanicus*)、鱼肠道弧菌 (*V.ichthyoenteri*)、印度弧菌 (*V.indicus*)、卡纳罗弧菌 (*V.kanaloae*)、慢弧菌 (*V.lentus*)、岸边弧菌 (*V.litoralis*)、火神弧菌 (*V.logei*)、地中海弧菌 (*V.mediterranei*)、麦氏弧菌 (*V.metschnikovii*)、拟态弧菌 (*V.mimicus*)、贻贝弧菌 (*V.mytili*)、需钠弧菌 (*V.natriegens*)、纳瓦拉弧菌 (*V.navarrensis*)、新生儿弧菌 (*V.neonates*)、海神弧菌 (*V.neptunius*)、海蛹弧菌 (*V.nereis*)、黑美人弧菌 (*V.nigripulchritudo*)、奥氏弧菌 (*V.ordalii*)、东方弧菌 (*V.orientalis*)、潘氏弧菌 (*V.pacinii*)、副溶血弧菌 (*V.parahaemolyticus*)、杀扇贝弧菌 (*V.pectenicida*)、杀对虾弧菌 (*V.penaeicida*)、伯麦罗氏弧菌 (*V.pomeroyi*)、黑海弧菌 (*V.ponticus*)、解蛋白弧菌 (*V.proteolyticus*)、轮虫弧菌 (*V.rotiferianus*)、红色弧菌 (*V.ruber*)、留萌弧菌 (*V.rumoiensis*)、杀鲑弧菌 (*V.salmonicida*)、大菱鲆弧菌 (*V.scophthalmi*)、灿烂弧菌 (*V.splendidus*)、幸存弧菌 (*V.superstes*)、始仔弧菌 (*V.tapetis*)、塔斯曼尼亚弧菌 (*V.tasmaniensis*)、塔氏弧菌 (*V.tubiashii*)、创伤弧菌 (*V.vulnificus*)、沃丹弧菌 (*V.wodanis*) 和徐氏弧菌 (*V.xuii*)。

[0041] 在各种实施方案中,受试者选自人,农场动物,诸如考拉的动物园动物,诸如狗或马的高价值哺乳动物,诸如啮齿动物或兔子的实验动物,鱼,还有像鹦鹉或长尾小鹦鹉这样的鸟。例如,受试者是选自患者的家庭成员或家庭成员的人,以及诸如医生,护士或有序的医疗工作者。在该方法的一个实施方案中,给药步骤是口服。

[0042] 该方法的一个实施方案还包括,在给药步骤之后,分析胃肠道中弧菌细胞负荷的减少量,由此给药导致减少受试者体内弧菌物种细胞的负荷并防止受试者对受试者的定植。菌。分析步骤包括通过DNA含量或通过选择性固体培养基用于计数细菌菌落来测定粪便样品的非侵入性方法。存在于治疗对象中的噬菌体可以作为粪便样品中排泄的PFU或通过其他方法进行分析。各种实施方案中的方法还包括施用再水化治疗剂和至少一种抗生素中的至少一种。该方法还包括在施用步骤之后,分析宿主微生物群的细菌菌群的含量。在该方法的一个实施方案中,施用步骤是在暴露于弧菌感染物种之后,并且该方法包括改善感染。在替代实施方案中,给药是在暴露之后和霍乱症状发作之前,或者在暴露之前给药,并且该方法是预防或改善感染,或者使用某种组合。

[0043] 各种实施方案中的方法,进一步包括,在施用步骤之前,将组合物配制成为至少大约 10^7 ,大约 10^8 ,大约 10^9 ,大约 10^{10} ,大约 10^{11} ,大约 10^{12} 或至少大约 10^{13} PFU/ml的噬菌体总滴度。

在多种菌株中的至少两种的PFU中配制滴度组成还包括通过将菌株以小于大约1:10至至少大约1:5的比例混合至至少约100%来制备组合物。第一菌株的滴度与第二菌株的滴度分别为1:1至至少约5:1,至少约10:1。在通过混合噬菌体菌株配制组合物之前,该方法包括在施用步骤之前,用无毒的弧菌物种宿主培养每种裂解性噬菌体菌株。

[0044] 该方法的一个实施方案还包括,在施用步骤之前,配制用于限制受试者中逃避噬菌体抗性突变体选择的组合物。例如,该方法还包括,在给药步骤之前,通过选择以下组中的至少两种菌株来配制组合物:ICP-1, ICP-2, ICP-3, 菌株138, 菌株145, 菌株163, 及其裂解变体。例如,组合物以至少大约 10^7 , 大约 10^8 , 大约 10^9 , 大约 10^{10} , 大约 10^{11} , 大约 10^{12} 或至少大约 10^{13} PFU/剂的剂量施用,所选择的量取决于大小,年龄和待治疗对象的疾病阶段。

[0045] 在一个实施例中,该方法包括重新执行管理步骤。在一个实施方案中,该方法包括施用抗生素。在一个实施方案中,该方法包括在施用之前,从环境样品或受感染弧菌的受试者中分离裂解性噬菌体菌株。例如,受试者是人,并且样品是受感染受试者的粪便样品。在一个实施方案中,该方法包括在给药之前,通过包封噬菌体菌株的病毒粒子混合物来配制组合物。

[0046] 本发明的一个方面提供了一种试剂盒,其包含配制用于治疗人的单位剂量的组合物,其含有一定量的噬菌体混合物,其包括多种溶解性噬菌体菌株,每种菌株能够感染和裂解细胞。一种弧菌。

具体实施方案

[0047] 本文组合物的一个实施方案是三种天然存在的毒性噬菌体菌株的混合物悬浮液,用于预防高风险人群的霍乱。该组合物通过口服摄入给药,并且当在攻击前直至24小时以108PFU施用时,在动物模型中保护免于霍乱弧菌定植和疾病。噬菌体菌株在无毒的霍乱弧菌宿主上生长,通过聚乙二醇沉淀纯化至接近均一,并重悬于盐水中至终浓度为109PFU/ml。

[0048] 由于正常微生物群的破坏,不鼓励使用预防性抗生素的干预。“噬菌体预防”,即施用噬菌体混合物以防止弧菌相关疾病的发展,可以通过口服施用组合物来代替,所述组合物是两种或更多种毒力霍乱弧菌特异性噬菌体的混合物。如本文所证明的那样。使用不同的噬菌体菌株,每种菌株靶向不同的细胞受体以及这些受体作为霍乱弧菌的毒力因子的重要性,极大地限制了患者体内细菌逃逸突变体的出现。

[0049] 预期用于预防感染动物模型中的霍乱的三种天然存在的噬菌体菌株在人类中类似地起作用以预防霍乱。接受噬菌体预防的目标人群包括霍乱患者的家庭接触者,暴露风险较高的其他人,如医务人员,以及最近暴露但仍无症状的一般人群。本文的实施例显示口服噬菌体混合物给每只小鼠或兔子保护它们长达24小时(迄今为止测试的最长时间)来自随后用致死剂量的霍乱弧菌攻击。进一步观察到,小肠中霍乱弧菌的负荷,即动物和人类感染的部位,大大减少,并且动物没有表现出腹泻或体重减轻的迹象。

[0050] 本文提供的组合物的实施方案的混合物中的每种噬菌体菌株具有毒性噬菌体类型,这意味着它不断地进行感染和裂解霍乱弧菌细胞,而不是温和或溶原性噬菌体菌株,其通常都是溶解性的。(杀死)和溶原化宿主细菌细胞。三种噬菌体中的每一种都特异地感染并杀死霍乱弧菌,而不是其他种类的细菌,即每种菌株具有非常窄的一种宿主范围,或一

种宿主范围,尽管并非所有的弧菌都经过测试。因此,与抗生素或广泛的宿主范围噬菌体相比,本文的噬菌体混合物的优点是不会破坏受试者中宿主微生物群的正常菌群种类,导致较少的副作用,例如胃肠道窘迫。与抗生素相比的另一个优点是噬菌体病毒体在霍乱弧菌的存在下复制,因此可以迅速增加数量以保持霍乱弧菌的检查。尽管组合物中的三种噬菌体菌株在一些霍乱患者的分泌性腹泻中天然存在,但从未观察到所有三种噬菌体菌株在自然界中一起出现,因此我们的混合物的当前组成是新颖的。

[0051] 通过施用噬菌体组合物减少细菌定植由Morris等人,2011年8月23日授权的金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌的美国专利号8,003,323显示,革兰氏阳性菌种是最常见的致病因子。院内(医院获得性)菌血症。革兰氏阳性细菌菌株与革兰氏阴性细菌显着不同,例如,后者含有由脂多糖组成的外膜。这种主要差异不仅包括使用经典技术染色的能力,还包括各种医学特性,包括抗生素敏感性,与人体免疫系统的相互作用,以及一系列微生物和环境特性。

[0052] 本文提供了用于通过弧菌属的革兰氏阴性细菌病原体预防和治疗人和各种动物物种感染的组合物和方法。用于噬菌体细菌培养和噬菌体感染的生长条件的详细方法,以及噬菌体的制备和纯化以及滴定在Seed等人,mBio,2(1):1-9(2011)中显示,其通过引用并入本文。完整的。用于构建细菌菌株和操纵和获得重组细菌菌株的方法示于Seed等人,PLoS Pathog,8(9):1-13(2012)中,其通过引用整体并入本文。从天然环境样品和粪便样品中分离噬菌体的方法以及这些菌株的表征显示在Seed等人,eLife,3:e03497(2014)中,其通过引用整体并入本文。噬菌体作为抗菌剂的方法显示在Ly-Chatain,M.,Frontiers in Micro.5:article 51:1-7(2014)中,以及用于微囊化噬菌体菌株Felix用于治疗沙门氏菌的方法。感染显示于Ma,Y.等人,App. Environ. Micro.74(15):4799-4805(2008)。用于分离和表征噬菌体菌株CP-T1的方法,一种广义的弧菌噬菌体转导菌株和诱变以获得温度敏感的噬菌斑,见Hava,D.等人,J.Micr.Methods,46:217-225(2001)。设想这些方法易于适用于分离用于本发明权利要求的组合物的该噬菌体菌株的毒性清除噬斑形成变体。Merri1等人于1998年6月16日发布的专利号5,766,892中描述了噬菌体的修饰以延迟宿主防御系统的失活,例如在紫外诱变的噬菌体λ的小鼠体内连续培养或该噬菌体菌株的OrfX基因的插入诱变用于大肠杆菌。

[0053] 本文所用的“噬菌体”一词是术语“噬菌体”的缩写形式,它是细菌特异性病毒,这里使用的这些词是可互换的。本文所用的短语“米泔水样便”是指霍乱患者排出的分泌性腹泻。本文所用的关于霍乱弧菌的短语“盲肠液”是指感染的,有症状的(霍乱症状)受试者或患者的盲肠中的液体。例如,幼兔提供动物模型并产生盲肠液,其与人米泔水样便高度相似,因此这些动物用作霍乱的动物模型系统。

[0054] 缩写,“ID₅₀”是指导致一半动物感染的细菌量。缩写“CFU”表示菌落形成单位,其是活细菌细胞数量的量度。受感染动物的盲肠液含有约10⁸CFU/ml的霍乱弧菌。短语“感染复数”(MOI)是指添加的噬菌体数量与多个细菌的比率。例如,MOI为0.1表示每10个细菌细胞有一个噬菌体病毒粒子,MOI为5表示每个细菌细胞有5个噬菌体。

[0055] 本发明所述的短语“相位突变”是指导致表型变化的高频可逆遗传变异,通常用于指细菌细胞中对噬菌体的抗性突变。短语“无效突变”是指敲除携带突变的基因编码的蛋白质功能的突变。

[0056] 缩写“PFU”表示噬斑形成单位,其是感染性噬菌体颗粒(病毒体)或噬菌体滴度的数量的量度。短语“毒性噬菌体”是指一种纯粹以裂解方式繁殖的噬菌体,并产生清晰的噬菌斑。毒性噬菌体菌株与噬菌体的“溶原性”菌株形成对比,噬菌体具有可替代的生命周期,在这种生命周期中,它们可以将DNA整合到细菌细胞中,并且这样做成为细菌基因组的一部分,然后保持休眠,尽管一部分将通过裂解生长从而产生浑浊的斑块。就细菌噬菌体菌株的生命周期特征而言,术语“裂解”应具有与“毒性”相同的含义。

[0057] 缩写“LPS”代表脂多糖,其形成外膜脂质双层的表面单层,并且这些术语可互换使用。外膜是革兰氏阴性细菌的最外表面,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。“O-抗原”一词是指LPS的重复寡糖部分,其从细菌细胞的表面延伸出来。它通常是人体免疫系统的目标,因此解释了它的名字。O-抗原是许多但不是所有噬菌体菌株的受体。对于霍乱弧菌血清群01,它是世界上绝大多数霍乱病例的原因,O-抗原由12-18重复的tetronate连接的perosamine组成。已经在霍乱弧菌物种中表征了约200个O-抗原类型或血清群,并且这些被指定为01至0200。

[0058] Nelson等人综述了致病性霍乱弧菌的生命周期。Nat Rev Microbiol。大约一半的霍乱患者米泔水样便样品含有高滴度的毒性(裂解)噬菌体(Nelson等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA 104,19091-19096,2007,PMCID:PMC2141913),86年前首次报道的观察结果(d'Herelle等人,Ind.Med.Gaz.62:614-616,1927)。科学家推测(d'Herelle等人,Ind.Med.Gaz.62:614-616;1927;Pasricha et al.Ind.Med.Gaz.66,543-550,1931;Faruque et al.Proc.Natl Acad.Sci.USA 102,1702-1707,2005;Jensen et al.Proc.Natl Acad.Sci.USA 103,4652-4657,2006;Faruque et al.Proc.Natl Acad.Sci.USA 102,6119-6124,2005)裂解噬菌体可能影响霍乱弧菌的传播和传播。然而,仅报道了关于潜在影响的间接证据(d'Herelle et al.Ind.Med.Gaz.62:614-616,1927;Faruque等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA 102,1702-1707,2005;Faruque等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA 102,6119-6124,2005)。

[0059] 因此,本文的实施例分析了两种或更多种裂解噬菌体菌株的混合物对霍乱弧菌感染性的影响程度。本文的实施例显示裂解噬菌体以剂量依赖性方式降低小肠中霍乱弧菌的负荷(Nelson et al.PLoS ICP-2.4,e1000187,2008,PMCID:PMC2563029)。本文的实施例代表针对霍乱弧菌的噬菌体疗法的第一次受控实验室示范。

[0060] 在使用孟加拉国获得的存档的稻-水粪便进行的回顾性研究中,本文的实施例研究了裂解噬菌体的治疗潜力。据发现,虽然一些裂解噬菌体在检查的十年期间是短暂的,但在此期间发现一种称为ICP-1的噬菌体仍无处不在(Seed et al.mBio.2(1).pii:e00334-10(2011).PMCID:PMC3037004),今天仍然存在。在此设想ICP-1可能适合与流行的霍乱弧菌菌株密切相关。在研究ICP-1与霍乱弧菌的相互作用时,发现霍乱弧菌使用相变来在体外和池塘微观世界中快速产生ICP-1抗性突变体(Seed et al.PLoS ICP-2.8(9):e1002917(2012).PMCID:PMC3441752)。相变体具有截短的LPS O-抗原,野生型LPS被确定为ICP-1的受体。此外,发现细菌相变体的引起感染的能力减弱,这解释了为什么在患者粪便样品中未发现这种突变体。因此,ICP-1能够与噬菌体继续繁殖的霍乱弧菌细胞一起进入人体。

[0061] 一些霍乱弧菌菌株使用另一种防御机制,这是一种特异性干扰ICP-1复制的噬菌体诱导型染色体岛状元件(PLE)(Seed et al.Nature.494(7438):489-91(2013).PMCID:

PMC3587790)。令人惊讶的是,发现一半的ICP-1分离株具有功能性CRISPR/Cas系统,其专用于通过靶向PLE来破坏PLE(Seed et al. *Nature*. 494 (7438) : 489–91, 2013)。这是革兰氏阴性菌中PLE的首次报道,也是噬菌体编码的功能性CRISPR/Cas的第一份报告。发现了几种经典的生物型菌株,包括1931年在伊拉克分离的一种,其中含有致力于防御ICP-1的PLE。因此,细菌和噬菌体之间的分子斗争已经持续了至少80年。

[0062] 最初在孟加拉国分离的另一种裂解噬菌体菌株ICP-2在孟加拉国和海地的人类感染期间对霍乱弧菌施加选择性压力,其方式显着改变了脱落细菌的种群结构。ICP-2是迄今为止从海地流行病中获得的样品中唯一鉴定的裂解噬菌体。一些患者脱落了ICP-2抗性突变体,其特征在于在主要外膜蛋白OmpU的两个细胞外环之一中具有单个氨基酸变化,其是ICP-2的受体。已知OmpU是霍乱弧菌的关键毒力因子,并且其表达在肠道感染期间高度上调。单个氨基酸突变体保留OmpU表达和至少部分功能,因为测试的几种突变体保持毒性。然而,它们在宿主外生长期间遭受适度的健身缺陷。这种适应性缺陷可以解释为什么突变OmpU等位基因没有在人群中固定。有趣的是,观察到其他患者脱落了不同类型的ICP-2抗性突变细菌菌株,在ToxR中具有无突变。ToxR是ompU和毒力基因的阳性转录调节因子。因此,这些患者的流产人群具有ICP-2抗性。这些细菌的细胞不能在外膜中表达正常量的OmpU。这些细菌缺乏毒力基因表达。设想根据人类感染噬菌体期间的阶段选择这些不同的群体,这将对霍乱弧菌施加选择性压力。例如,ToxR中的无效突变可能在感染早期不会被耐受,但是当细菌负荷高并且霍乱毒素已经引起分泌性腹泻时,感染后期无效。

[0063] 需要多方面的办法来对抗传染病,特别是在抗生素正在丧失有效性的时代,因为细菌中的多重耐药性成为全球性的。有效的预防策略对于减少细菌感染引起的疾病负担至关重要。因此,本文提供的组合物和方法的实施方案利用噬菌体的特异性和速效特性作为由细菌属弧菌引起的疾病的预防疗法,特别是霍乱,一种由病原体霍乱弧菌引起的严重脱水疾病。使用作为三种毒力噬菌体的混合物或混合物的组合物,本文的方法与霍乱发病机理的两种动物模型表明该方法成功用于减少疾病。在霍乱弧菌攻击前24小时口服施用噬菌体减少了肠道的定植并防止了霍乱样腹泻。测试了存活的霍乱弧菌菌落的噬菌体敏感性,并且没有一个对所有三种噬菌体都有抗性。基因组测序和变异分析表明,抗性主要由噬菌体受体产生所需基因的突变所赋予。此外,观察到的抗性菌株可能因毒力而受损。对于由弧菌引起的霍乱和相关疾病等急性感染,噬菌体预防提供了一种限制细菌性疾病对人类健康影响的潜在策略。

[0064] 霍乱是由水传播的霍乱弧菌引起的急性,严重脱水的腹泻病。霍乱仍然是一个重要的全球健康负担,并且在非洲和亚洲的许多地方流行(Zuckerman et al. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 521–530, 2007)。最近在受灾或饱受战争蹂躏的国家,如海地(Luquero et al. *Emerging infectious diseases* 22, 410–416, 2016)以及伊拉克(Bagchi, S. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 24–25, 2016)中广泛流行的流行病强调人口突发爆发的脆弱性。目前推荐的预防措施包括使用世界卫生组织资格预审的口服霍乱疫苗进行大规模疫苗接种(Qadri et al. *The New England J Med* 374, 1723–1732, 2016)以及提高对卫生和卫生习惯的认识(Taylor et al. *PloS One* 10, e0135676, 2015)。然而,获得洁净水很困难,疫苗接种活动需要事先考虑和有效的时间;如果发生爆发,这两种方法在后勤方面都不具备立即保护的可行性。

[0065] 家庭传播是霍乱弧菌在社区内迅速传播的主要原因。在初始患者生病后两到三天,指数病例的家庭接触者经常出现霍乱症状(Harris et al. PLoS neglected tropical diseases 2, e221, 2008)。因此,目前对通过使用快速预防性治疗来阻止霍乱家庭传播的临床干预存在未满足的需求。虽然用抗生素进行化学预防可以有效地减少霍乱负担(Reveiz et al. PLoS one 6, e27060 (2011)),但由于耐药细菌的发展和传播,世卫组织不推荐这种做法(WHO, 2014)。抗生素的广谱作用会导致常驻肠道微生物群的生态失调,这可能使患者面临其他肠道感染的风险。

[0066] 自近一个世纪前噬菌体被发现以来,人们对环境和临床应用噬菌体(phages)的兴趣已经显现(Wittebole et al. Virulence 5, 226-235, 2014)。与抗生素不同的是,噬菌体菌株在细菌靶点上具有特异性,而且由于它们是复制病毒,因此能够自动给药。通过这种现象,噬菌体复制增加了能够形成斑块的活噬菌体的总效价或数量(斑块形成单位,PFU),并有助于增加剂量。

[0067] 以往试图使用噬菌体来预防或处理霍乱的尝试结果喜忧参半。Dutta et al. Bull. Wld Hlth Org. 28, 357-360 (1963) 表明,在霍乱弧菌挑战前一小时,在兔幼龄模型中,单一噬菌体类型可以预防霍乱症状的发生。J Jaiswal et al. Microbes and Infection 15, 152-156 (2013) 显示,在成年兔霍乱弧菌挑战前6或12小时,五种溶原性噬菌体混合后,轻微减轻了腹泻的严重程度,但没有显著降低细菌载量。另一项在成年小鼠身上进行的研究没有针对预防,因为噬菌体在与病原菌对抗之前没有进行处理(Jaiswal et al. International Journal of Medical Microbiology, 304, 422-430, 2014)。

[0068] 从孟加拉国的霍乱患者的稻-水粪便样本中分离出三种分离的霍乱弧菌特异性裂解(毒力)噬菌体ICP-1, ICP-2和ICP-3(Seed et al. mBio 2, e00334-00310, 2011)。ICP-1和ICP-2的受体分别被鉴定为脂多糖(LPS) O1抗原(Seed et al. PLoS Pathog 8, e1002917, 2012)和主要外膜孔蛋白OmpU(Seed et al. eLife 3, e03497, 2014),分别被认为是霍乱弧菌的毒力因子。ICP-3的受体目前尚不清楚,尽管LPS O-抗原至少可以看到部分作用。这些毒性噬菌体显示出在人类感染的自然过程中对霍乱弧菌施加显着的杀菌压力(Seed et al. eLife 3, e03497, 2014)。

[0069] 含有针对不同受体的不同噬菌体菌株的混合物将降低存活群体中多噬菌体抗性霍乱弧菌分离株的可能性。受体彼此不同,因为它们具有不同的化学组成,或由不同的基因编码,或由不同的分子途径产生。因此,本文可视化三种ICP噬菌体的混合物是特异性靶向霍乱弧菌的潜在预防性治疗,其过渡到小肠以预防疾病动物模型中的霍乱迹象。

[0070] 本文的实施例显示,口服施用,ICP预混合使用ICP混合物防止了霍乱弧菌在幼鼠模型中的定植。当霍乱弧菌攻击前24小时施用时,ICP混合物还防止幼兔模型中霍乱症状的发作。该原理验证研究证明了成功使用噬菌体预防来预防由粘膜病原体引起的疾病。

[0071] 这项工作的一部分已发表在题为“三种毒性噬菌体的混合物预防动物模型中的霍乱弧菌感染”的科学论文中,由本发明人Yen, M, Cairns, L.S. 和A.Camilli共同撰写的2017年2月1日的Nat. Commun. 8:14187,其全部内容通过引用并入本文。

[0072] 药物成分

[0073] 在本发明的一个方面,提供了药物组合物,其包含至少两种具有裂解(营养或毒性)复制周期的弧菌噬菌体菌株的多种病毒粒子(能够引起噬斑形成单位的病毒,PFU)。该

组合物任选还包含药学上可接受的载体。在某些实施方案中,组合物是胶囊化的或微胶囊化的。在某些实施方案中,这些组合物任选地还包含一种或多种另外的治疗剂。在某些实施方案中,另外的一种或多种治疗剂选自生长因子,抗炎剂,血管加压剂,胶原酶抑制剂,局部类固醇,基质金属蛋白酶抑制剂,抗坏血酸盐,血管紧张素II,血管紧张素III,钙网蛋白,四环素,纤连蛋白,胶原,血小板反应蛋白,转化生长因子(TGF),角质形成细胞生长因子(KGF),成纤维细胞生长因子(FGF),胰岛素样生长因子(IGF),表皮生长因子(EGF),血小板衍生生长因子(PDGF),神经分化因子(NDF),肝细胞生长因子(HGF)和透明质酸。

[0074] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂,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,润滑剂等,适合于所需的特定剂型。由Gennaro, Mack Publishing, Easton, PA, 1995公开了Remington's Pharmaceutical Sciences Ed.公开了用于配制药物组合物的各种载体和用于其制备的已知技术。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实施例包括但不限于糖,例如乳糖,葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和醋酸纤维素;粉末黄蓍草;麦芽;明胶;滑石;辅料,如可可脂和栓剂蜡;花生油,棉籽油,红花油,芝麻油,橄榄油,玉米油和豆油等油类;乙二醇;这样的丙二醇;油酸乙酯和月桂酸乙酯等酯类;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格溶液;乙醇,磷酸盐缓冲溶液,以及其他无毒相容润滑剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂,脱模剂,涂层剂,甜味剂,调味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂也可以根据配方设计师的判断,存在于组合物中。

[0075] 治疗有效剂量

[0076] 在又一个方面,根据本发明治疗的方法,预防病原性弧菌的传输是通过在对所述疾病的风险的家庭成员或其他主体接触,以及给予该药物组合物促进,如本文所述。因此,本发明提供了用弧菌包括给予治疗有效量的药物组合物包含活性剂,其包括营养弧菌噬菌体的至少两个菌株,以这样的量和针对特定物种相关的细菌性疾病的治疗方法达到预期结果所需的时间。应当理解,这包括给予本发明的药物作为预防细菌感染发作或防止感染进一步发展的治疗措施,或作为预防措施以使与细菌感染发展相关的并发症最小化。

[0077] 在本发明的某些实施方案中,药物组合物的“治疗有效量”是有效预防细菌感染进一步发展的量。根据本发明的方法,组合物可以使用有效预防感染发展的任何量和任何施用途径施用。因此,如本文使用的表述“有效量的预防感染的”,指的是组合物的足够量,以防止或延缓所述目标弧菌的发展,甚至从先前获取的感染的发病引起消退或恢复。确切的剂量由个体医生根据待治疗的患者选择。调整剂量和给药以提供足够水平的活性剂或维持所需效果。可以考虑的其他因素包括疾病状态的严重程度,例如感染症状;患者的年龄,体重和性别;饮食,时间和给药频率;药物组合;反应敏感性;和对治疗的耐受性/反应。长效药物组合物可以每天给药一次,或每3至4天,每周给药,或每两周给药一次,这取决于特定组合物的半衰期和清除率。在特定发明的范围内,成功的治疗可能仅需要单剂量,因为组合物的噬菌体菌株是在引起疾病的不需要的弧菌细胞内自我复制的细菌病毒。

[0078] 通常,对于重量为约10g至约200g的小动物受试者的合适剂量,合适的剂量为多种噬菌体菌株的混合物或混合物组合物的总量的约 10^4 至约 10^8 PFU,取决于受试者的大小。例如,对于小动物如幼鼠或幼兔,多种噬菌体菌株的混合物或混合物组合物的合适PFU总范围

为约 10^4 至约 10^5 ,或约 10^5 至约 10^6 ,或约 10^6 至约 10^7 ,或约 10^7 至约 10^8 ,或约 10^8 至约 10^9 。对于人类患者或大型动物受试者,合适的范围是大约 10^7 ,大约 10^{11} 。例如,对于体重约20kg至约200kg的受试者的合适剂量,PFU总量的混合物或多种噬菌体菌株的混合物组合物可含有约 10^7 至约 10^8 ,或可含有约 10^8 至约 10^9 ,或可含有约 10^9 至约 10^{10} ,或可能包含约 10^{10} 至约 10^{11} ,这可能取决于患者或受试者的大小、年龄和健康,从治疗非常大的高价值农场或动物园动物的熟练兽医,例如,种马赛马或濒临灭绝的白犀牛,将能够扩大适当的剂量范围,从200公斤患者的剂量到体重850kg,1000kg,1600kg或更多的动物。

[0079] 本发明的活性剂优选配制成剂量单位形式,以便于给药和剂量均匀。本文所用的表述“剂量单位形式”是指适合于待治疗患者的物理上离散的活性剂单位。然而,应当理解,在健全的医学判断范围内,主治医师将决定单次或更频繁的单次或更频繁,例如本发明组合物的每日使用。对于任何活性剂,最初可以在细胞培养测定中或在动物模型中估计治疗有效剂量,通常是小鼠,兔,狗或猪。动物模型也用于实现所需的浓度范围和给药途径。然后,这些信息可用于确定人体给药的有用剂量和途径。治疗有效剂量是指改善症状或病症的活性剂的量。活性剂的治疗功效和毒性可以通过细胞培养物或实验动物中的标准制药程序来确定,例如ED50(剂量在50%的人群中是治疗有效的)和LD50(剂量对50%的人群是致命的)。毒性与治疗效果的剂量比是治疗指数,并且可以表示为比率LD50/ED50。优选显示出大治疗指数的药物组合物。

[0080] 有效剂量表示为在实验室中在弧菌细胞中测量的噬斑形成单位(PFU),基于根据本文所述方法和附录A和本文引用的参考文献制备的已知的储备溶液滴度,并通过本文引用这里参考。储备溶液含有至少约 10^{10} 、 10^{11} 或约 10^{12} PFU/ml。适合于诸如婴儿的小受试者的剂量可能含有约 10^9 或 10^{10} PFU,并且100kg受试者的剂量可能大一个数量级。基于受试者先前暴露于受弧菌病感染的人的情况,确定耐受性和要求是在主治医师的知识范围内。

[0081] 给药药物组合物

[0082] 在以所需剂量配制合适的药学上可接受的载体后,本发明的药物组合物可局部给药(如粉末,软膏或滴剂),口服,直肠,肠胃外,脑池内,阴道内,腹膜内给予人和其他哺乳动物。根据暴露于患有活动性感染的患者的严重程度和位置,以及所治疗的弧菌的菌株,可以是,眼睛,或鼻腔。

[0083] 用于口服给药的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液,微乳液,溶液,悬浮液,糖浆和酏剂。除活性剂外,液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,如乙醇,异丙醇,碳酸乙酯,乙酯乙酸盐,苯甲醇,苯甲酸苄酯,丙二醇,1,3-丁二醇,二甲基甲酰胺,油(特别是棉籽,花生,玉米,胚芽,橄榄油,蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢糠醇,聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括佐剂,如润湿剂,乳化剂和悬浮剂,甜味剂,调味剂和芳香剂。

[0084] 用于局部或透皮施用本发明药物组合物的剂型包括软膏,糊剂,乳膏,洗剂,凝胶,粉末,溶液,喷雾剂,吸入剂或贴剂。在无菌条件下将活性剂与药学上可接受的载体和任何所需的防腐剂或缓冲剂混合。例如,可以用水滴,雾,乳液或乳膏治疗眼或皮肤感染。给药可以是治疗性的或可以是预防性的。预防性制剂可以存在或应用于潜在感染部位或感染源,例如污染水,食物,粪便暴露或切口和伤口。除了本发明的活性剂之外,软膏,糊剂,乳膏和凝胶可以含有赋形剂,例如动物和植物脂肪,油,蜡,石蜡,淀粉,黄蓍胶,纤维素衍生物,聚

乙二醇,硅氧烷,膨润土,硅酸,滑石,氧化锌或其混合物。

[0085] 可以使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂根据已知技术配制可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液,悬浮液或乳液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体和溶剂是水,林格氏溶液,U.S.P.和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的固定油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸用于制备注射剂。可注射制剂可以灭菌,例如,通过细菌截留过滤器过滤,或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,其可以在使用前溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质中。为了延长活性剂的作用,通常需要减缓皮下或肌内注射剂的吸收。胃肠外给药的活性剂的延迟吸收可以通过将药剂溶解或悬浮在油性载体中来实现。用于口服给药的可注射的储库形式或形式通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成试剂的微囊基质来制备。取决于活性剂与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制活性剂释放的速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过将药剂包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备注射和口服制剂。

[0086] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊,片剂,丸剂,粉剂和颗粒剂。在这种固体剂型中,活性剂与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或a)填充剂或增量剂如淀粉,乳糖,蔗糖,葡萄糖,甘露醇和b)粘合剂,例如羧甲基纤维素,藻酸盐,明胶,聚乙烯吡咯烷酮,蔗糖和阿拉伯胶,c)保湿剂如甘油,d)崩解剂如琼脂,碳酸钙,马铃薯或木薯淀粉,海藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠,e)溶液阻滞剂如石蜡,f)吸收促进剂如季铵化合物,g)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h)吸收剂如高岭土和膨润土,和i)润滑剂,例如滑石,硬脂酸钙,硬脂酸镁,固体聚乙二醇,十二烷基硫酸钠,以及它们的混合物。

[0087] 类似类型的固体组合物也可用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂,使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂。片剂,糖衣丸,胶囊,丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和外壳制备,例如肠溶包衣,释放控制包衣和药物配制领域熟知的其它包衣。在这种固体剂型中,活性剂可以与至少一种惰性稀释剂如蔗糖,乳糖或淀粉混合。正常情况下,这些剂型还可包含除惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊,片剂和丸剂的情况下,剂型还可包含缓冲剂。它们可以任选地含有遮光剂,并且还可以是仅在肠道的某一部分或优选地以延迟的方式在肠道的某一部分释放活性剂的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。

[0088] 药物组合物的使用

[0089] 如上所述并在实施例中更详细地描述,含有至少两种不同的裂解性噬菌体菌株的药物组合物在细菌细胞弧菌内感染和复制,可用于预防细菌感染的发展或进展。一般而言,据信这些组合物在临幊上可用于预防人类感染的进一步感染和流行和大流行的发展,例如由霍乱弧菌引起的霍乱,或在由其引起的相应疾病的动物中或通过不同种类的弧菌。

[0090] 应当理解,本发明包括的诊断,预后和治疗方法不限于治疗人类的病症,而是可以用于治疗任何哺乳动物中的类似病症,包括但不限于牛,犬,猫,山羊,绵羊,猪,小鼠和马种。当治疗给定动物物种中的感染时,在发现动物的环境中容易获得感染并杀死对该物种具有感染性的弧菌细胞的合适的裂解性噬菌体。因此,本文的方法也可以设想为适用于这

些条件。

[0091] 实施例

[0092] 实施例1生长条件和菌株

[0093] 本发明研究使用的噬菌体菌株和细菌菌株见表1和表2。霍乱弧菌菌株生长在Luria-Bertani (磅) 汤补充100μg/毫升链霉素 (Sm)。ICP混合物由等量的弧菌噬菌体ICP-1、ICP-2和ICP-3组成。这些噬菌体以前是从孟加拉国霍乱患者的米泔水样便样本中分离出来的。ICP-1在菌株AC4741上分离得到, ICP-2和ICP-3在AC53 (E7946的Sm抗性分离物) 上分离得到。所有的实施例均使用了AC53V.霍乱弧菌O1 E1 Tor菌株E7946进行。菌斑试验采用AC4653和AC2846菌株作为阴性对照。ICP-1和ICP-3不能在细菌菌株AC4653上形成斑块, ICP-2不能在细菌菌株AC2846上形成斑块。

[0094] 表1.从霍乱患者粪便中分离的ICP-1、ICP-2和ICP-3及噬菌体的特征

[0095]

年份	ICP-1	ICP-2	ICP-3
2001	○ + ○		
2002	○ ○ ○	○	
2003	○ ○ +		
2004	+ ○ ○	+	
2005	○ ○ +	○	
2006	○ +	+ ○	
2007	○ ○ ○	○	+ +
2008	○ ○ ○		+ ○
2009	○ ○ ○		+ ○
2010	○ ○ ○		○
特征:			
分类学家族	肌尾病毒科 (<i>Myoviridae</i>)	短尾病毒科 (<i>Podoviridae</i>)	短尾病毒科 (<i>Podoviridae</i>)
基因组大小, bp	125,956	49,675	39,162
预测蛋白	230	73	54
假设%	88	81	52
受体	O1-抗原	OmpU	O1-抗原

[0096] 符号:+表示菌斑阳性;○标识PCR-阳性

[0097] 表2.细菌菌株

[0098]

菌株	描述
AC53	霍乱弧菌O1 E1 Tor Ogawa E7946 (Sm ^R)
AC2846	E7946ΔompU

[0099]

AC4653	E7946ΔwbeL
AC4741	霍乱弧菌O1 E1 Tor Ogawa (Sm) ^R), PLE阴性
缩写: PLE, PICI- 样元素; Sm ^R , 链霉素抗性	

[0100] 实施例2. 噬菌体的制备

[0101] 高低度的ICP噬菌体原液是通过在琼脂平板上生长,然后用聚乙二醇(PEG)进行沉淀来制备。简单地说,在软琼脂糖(添加0.3%琼脂糖的LB肉汤)中,每个噬菌体都是用适当的霍乱弧菌菌株培养的。一旦融合,用STE缓冲液(100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA)在4℃的温度下温育过夜,同时轻轻摇晃以洗脱噬菌体。通过离心澄清STE-噬菌体溶液,无菌过滤,并与1X PEG(4%PEG 8000, 0.5M NaCl)在4℃下孵育1-3天以允许噬菌体沉淀。在4℃条件下以10,000×g离心分离15min用以收获噬菌体,并将噬菌体沉淀重新悬浮在STE缓冲液中。如前所述,通过菌斑测定对噬菌体进行滴滤(Dutta等人,同上)。

[0102] 实施例3. 体外噬菌体杀灭试验

[0103] 将来自霍乱弧菌群单菌落的过夜培养物在补充有100μg/ml的链霉素(Sm)的50mL的LB中稀释至0.05ml的OD₆₀₀,并在37℃下通气培养。15分钟后,向每种培养物中添加噬菌体。在附图1B所示的时间点上,收集样本用以分别测量CFU/mL和PFU/mL中的每一个。

[0104] 实施例4. 霍乱弧菌对幼鼠的感染

[0105] 根据塔夫茨大学实验动物医学系和机构动物护理和使用委员会的规则进行动物实验。4-5天大的CD-1幼鼠(Charles River Laboratories)被感染。每组老鼠包括至少来自两窝不同窝的动物。本研究同时使用雄性和雌性动物。动物的性别与每次实验的结果没有可观察到的相关性。由于这些小鼠在此之前从未接触过霍乱弧菌,因此它们的微生物组中不会有任何特定于霍乱弧菌的噬菌体,因此没有对小鼠进行霍乱弧菌噬菌体的检测。

[0106] 在噬菌体处理组中,通过使用2.5%的碳酸氢钠稀释的噬菌体对幼鼠进行口服施用。霍乱处理组的幼鼠接受稀释于2.5%的碳酸氢钠中的大约10⁵CFU(“正常”感染剂量)或者大约10⁹CFU(“高”感染剂量)的霍乱弧菌。由于噬菌体制剂至少是在细菌出现前3小时进行施用,因此理论上计算出的MOI并不能准确测量噬菌体和细菌之间的相互作用。相反,从输入材料计算接种到动物体内的细菌和噬菌体的滴度,因此该范围被表示为噬菌体的输入数量,或者每个实施例所得出结论时观察到的结果。例如,感染后24小时处死小鼠,解剖小肠并在补充有20%甘油的LB肉汤中匀浆,并且为了测定细胞含量,将匀浆物连续稀释并涂布在补充有100μg/ml的LB琼脂上,对每个小肠中的Sm和CFU进行计算。为了从小肠匀浆中提取噬菌体,将等分的肠匀浆用氯仿处理,并以10,000×g离心5分钟。收集上清液并用于噬斑测定以允许计算每个小肠的PFU。为了评估在噬菌体预防后存活的霍乱弧菌细胞的抗性谱,

随机挑选每只动物多达10个菌落，并确定每个菌落的每个噬菌体菌株ICP-1, ICP-2和ICP-3的平板效价。

[0107] 实施例5.幼兔霍乱弧菌感染

[0108] 在这项研究中使用了3日龄的新西兰白兔(Charles River Laboratories)。每组兔子包含至少来自两个不同窝的动物，并且包括雄性和雌性动物。动物的性别与每个实验的结果之间没有可观察到的相关性。噬菌体处理组中的幼兔口服施用通过2.5%的碳酸氢钠稀释的噬菌体。在用霍乱弧菌感染前3个小时，通过腹膜内注射(2 μ g/克体重)来用盐酸雷尼替丁预处理幼兔以降低胃酸酸度(Caraco Pharmaceutical Laboratories)。用在2.5%碳酸氢钠中稀释的 5×10^8 CFU霍乱弧菌AC53感染幼兔。对于小鼠实施例，从制剂的滴度和适当的剂量计算待接种到受试者中的细菌和噬菌体制剂的滴度。在实施例开始时将动物称重，并在整个感染过程中定期称重。通过在感染期结束时将体重除以开始时的体重来计算体重百分比。感染后12-20小时处死动物。

[0109] 患有霍乱的幼兔通常会在12-14小时内失去其体重的10-15%，并在此时被处死。根据IACUC方案，在感染后20小时处死体重损失小于20%的幼兔。这个时间的限制是必要的，因为幼兔在感染霍乱弧菌后，由于剔除行为而无法与母亲一起放回，因此在感染期间没有食物。

[0110] 解剖后，将每只兔子的肠在补充有20%甘油的LB肉汤中匀浆。如果有盲肠液体存在，用1ml注射器进行收集。将盲肠液和肠匀浆连续稀释并涂布在含有100 μ g/ml的Sm的LB琼脂上以计算CFU/肠。如对幼鼠的感染所示，从匀浆中提取噬菌体。将存活的霍乱弧菌菌落进行菌落纯化，并通过对ICP噬菌体抗性的平板测定的效率进行评估。

[0111] 实施例6.电镀测定的效率

[0112] 对噬菌体捕食后存活的分离株进行平板接种效率(EOP)测定。每个噬菌体在分离物上滴定，在AC53上以及作为阴性对照的噬菌体抗性菌株(ICP-1和ICP-3的 Δ wbeLAC4653和ICP-2的 Δ ompUAC2846)。通过将动物分离物上噬菌体的滴度除以AC53上的噬菌体滴度来计算EOP。检测限为 1×10^{-6} 。如果EOP被观察到小于 1×10^{-6} ，分离物被描述为耐药，如果观察到EOP大于 1×10^{-1} ，则认为分离物是敏感的，并且如果EOP被观察到在这些值之间，那么分离物被描述为部分敏感。

[0113] 实施例7.噬菌体抗性分离株的序列分析

[0114] 使用DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) 提取霍乱弧菌基因组DNA。使用Nextera XT DNA文库制备试剂盒(Illumina) 制备全基因组文库用于单端150-bp测序。使用Illumina HiSeq 2500在塔夫茨大学核心设施(Tufts University Core Facility) 进行测序。使用CLC Genomics Workbench 8软件组装基因组，并与霍乱弧菌01N16961 (Seed等人, mBio 2, e00334-00310, 2011) 参考基因组进行比对。为了确定可能导致噬菌体耐药的突变，对频率阈值为20%的映射读取进行了变异分析。将结果与AC53突变体(Seed等人, PLoS Pathog 8, e1002917, 2012) 进行比较，以去除在野生型接种体中发现的突变体。对确定所有三种ICP噬菌体都敏感的存活的分离物进行了测序，并从耐药分离物的变体分析中去除产生的变体。

[0115] 实施例8.三噬菌体ICP混合物在体外杀死霍乱弧菌

[0116] 自从86年前首次报道霍乱粪便中出现裂解噬菌体的首次报道以来，关于这种噬菌体对霍乱感染或霍乱爆发动力学的影响，只有零星的或相关的报道(d'Herelle等人, 1927,

Ibid; Faruque等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 1702-1707, 2005; Faruque等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 6119-6124, 2005)。然而,直到最近才有报道出现了对照实验的结果,这些实验测试了裂解噬菌体对霍乱弧菌感染的影响,以及噬菌体菌株的分子分析 (Zahid等人, Infect Immun 76:5266-5273, 2008; Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187, 2008. PMCID:PMC2563029; Seed等人, mBio. 2 (1) . pii: e00334-10, 2011. PMCID:PMC3037004; Seed等人, Nature. 494 (7438) : 489-91, 2013. PMCID:PMC3587790)。这些研究均未证实在感染前给受试者施用噬菌体可以预防感染。

[0117] 本发明在这里使用了多种测定方法来获得一组来自米泔水样便的自然的裂解噬菌体/霍乱弧菌对。一般来说,裂解噬菌体从米泔水样便中分离,并且发现其可以干扰霍乱弧菌对小肠的感染。ICP-1噬菌体与细菌联合使用,以剂量依赖性的方式降低了幼鼠小肠内霍乱弧菌的载量 (Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187, 2008. PMCID:PMC2563029)。然而,目前尚不清楚这种抑制作用是否具有与霍乱弧菌菌株相关的其他裂解噬菌体的特征,也未证实有预防作用。事实上,它可能是某些裂解性噬菌体已进化为在肠道感染期间避免过度捕食,因此可以建立感染霍乱弧菌,复制到足够高的密度以导致霍乱,并允许噬菌体继续繁殖,并用于与传播噬菌体和宿主细菌细胞的环境。

[0118] 最初的体外杀灭时程分析表明,三噬菌体ICP混合物比每个单独的噬菌体更能够有效地杀死霍乱弧菌(附图1A)。宿主菌株,感染性致病性霍乱弧菌E7946 (AC53) 的培养物在下述培养条件下进行生长:不存在噬菌体(对照);或者在每种裂解噬菌体菌株ICP-1、ICP-2和ICP-3单独存在下,或者在ICP混合物存在下,对于每种噬菌体和细菌混合物,感染复数 (MOI) 为1。每小时细菌(附图1A) 和噬菌体(附图1B) 滴度进行计数,持续8小时,并且在12小时和24小时的时候也进行计数。

[0119] 数据显示细菌群体最初在所有噬菌体感染的条件下均匀下降,并且在ICP-1或ICP-3存在下进行培养的培养物分别在4-6小时内恢复生长(附图1A)。在ICP-2存在下进行培养的细胞恢复生长更为缓慢,并在24小时内达到与对照相同的密度。

[0120] 与之相反,在实验结束时,用ICP混合物培养的细胞没有达到与无噬菌体对照相同的密度。在该实施例过程中,噬菌体滴度下降并且在整个实验过程中保持稳定(附图1B)。鉴于起始细菌接种物很高 (5×10^7 CFU) 并且可能含有在液体培养的时间过程中被正选择的噬菌体抗性突变体,因此霍乱弧菌能够随着时间的推移逃脱噬菌体的捕食。

[0121] 实施例9. 通过ICP噬菌体混合物降低幼鼠小肠的霍乱弧菌定植

[0122] 由于噬菌体菌株及其宿主细菌的基因型和表型变异程度较高,所以本发明使用的策略是将分析限制在来自米泔水样便的自然发生的裂解噬菌体/霍乱弧菌混合物。人群动态是在感染过程中确定的,在孟加拉国不同患者之前分离的三对这类对的感染过程中确定了群体动态 (Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187, 2008. PMCID:PMC2563029; Seed et al. mBio. 2 (1) . pii: e00334-10, 2011. PMCID:PMC3037004)。测定了对存在的噬菌体具有抗性的米泔水样便中的霍乱弧菌的百分比。该分析使用含有裂解噬菌体和霍乱弧菌的米泔水样便的存档样本。本发明在这里所使用的三种噬菌体ICP-1、ICP-2和ICP-3,之前通过测序和测定宿主范围 (Seed等人, mBio. 2 (1) . pii: e00334-10, 2011. PMCID:PMC3037004)。

[0123] 本文观察到ICP混合物在体外比单独的每种噬菌体菌株更有效地杀死霍乱弧菌。为了测试这在体内是否真实,在霍乱弧菌定植的幼鼠模型中进行预防性实验。测试ICP混合

物以确定它是否有效预防幼鼠小肠的霍乱弧菌感染。将小鼠分成5组,不接受噬菌体(对照),或者每个单独的ICP-1、ICP-2和ICP-3噬菌体菌株,或者所有三种噬菌体菌株的混合物,在此称为ICP混合物(或者噬菌体混合物或噬菌混合物)。

[0124] 在用 5×10^5 菌落形成单位(CFU)霍乱弧菌感染前3个小时,小鼠通过口胃施用剂量在 1×10^6 至 1×10^7 之间的PFU的噬菌体制剂。24小时后处死小鼠,计算小肠内的霍乱弧菌和噬菌体。

[0125] 与未处理的无噬菌体对照相比,在所有给予噬菌体的情况下,小肠中存活的霍乱弧菌细胞数量至少减少了两个数量级。观察到在施用噬菌体的所有条件下,小肠中存活的霍乱弧菌细胞的数量减少了至少两个数量级。在所施用的单个单一菌株中,ICP-3被观察为最成功的用于减少或消除细菌细胞的单噬菌体,如通过CFU数量的大量减少(3至6个数量级减少)(n.s)所判断的。参见附图2A。

[0126] 观察到ICP混合物比任何单个菌株更有效,在5只小鼠中的4只肠道匀浆中没有检测到霍乱弧菌($P < 0.01$)。这些数据表明,与单独的每种噬菌体菌株相比,三种菌株的ICP混合物在防止霍乱弧菌定植方面是优越的。在该时间段结束时,作为PFU的噬菌体数仍然存在于小肠中(附图2B),表明这些噬菌体可以存活并持续存在于肠道中以继续赋予针对细菌致病细胞的保护。

[0127] 为了确定噬菌体混合物是否是比单独施用的每种菌株更一般的预防措施,在霍乱弧菌感染前24小时施用ICP混合物时测试其有效性。为了确定噬菌体是否在没有宿主细菌的情况下能够在小肠中长时间存活,通过口服强饲法给小鼠施用噬菌体(3×10^7 至 3×10^8 PFU),并在3、6、12或24小时后处死。使用噬斑测定法测定来自肠匀浆的噬菌体滴度(图3A)。3小时后,观察到ICP-1和ICP-3的噬菌体滴度保持稳定,而ICP-2效价下降大约10倍。对于所有三种噬菌体菌株,滴度在6至12小时后仅下降10至100倍。24小时后,ICP-1和ICP-2仍保持在每个小肠约 10^5 PFU,并且ICP-3的滴度降至每小肠 10^2 至 10^4 PFU之间。这些数据进一步表明,在宿主细菌致病性霍乱弧菌的细胞不存在的情况下,大量的ICP噬菌体能够在肠道中存活至少24小时。

[0128] 为了测试暴露于霍乱弧菌前几小时施用的噬菌体保护程度,在攻击前6、12或24小时分别给幼鼠施用剂量在 5×10^5 或者 9×10^5 CFU霍乱弧菌的ICP混合物。阴性对照组中的动物未用噬菌体处理。图4B中的数据显示6小时预防是最成功的;与无噬菌体对照组相比,存活的霍乱弧菌细胞的数量减少至少三个数量级,在接受噬菌体的七只小鼠中的四只中没有观察到可检测到的霍乱弧菌($P < 0.0001$)。对于12小时组,观察到霍乱弧菌细胞的数量显著较低($P < 0.001$),其中4只动物在实验结束时没有可检测到的霍乱弧菌。在24小时组中,霍乱弧菌细胞的数量也减少了两个数量级。此外,裂解噬菌体PFU在感染后24小时是可检测的(附图3C)。

[0129] 为了确定如果小鼠用较高的病原菌攻击处理,ICP混合物是否会限制定植,用 1×10^8 CFU的霍乱弧菌接种幼鼠,剂量比附图1和附图2中高约200倍。附图3D中的数据显示ICP混合物有效地显著降低小肠中的霍乱弧菌定植,在小鼠中给予噬菌体至少两个数量级,在6小时,12小时或24小时之前挑战。在感染后24小时,在所有三个噬菌体处理组中以相似水平检测到噬菌体PFU(附图3E)。总而言之,这些数据表明可能使用噬菌体预防方法来预防小肠霍乱弧菌的定植。

[0130] 从给予ICP混合物的几只小鼠的肠匀浆中分离出霍乱弧菌(附图2和附图3)。由于肠内感染的复杂性,这些细菌可能仅仅因为它们没有遇到ICP噬菌体而存活。或者,这些细胞可能含有允许它们逃避噬菌体捕食的基因突变。

[0131] 实施例10. ICP混合物为霍乱弧菌感染的幼兔模型提供保护。

[0132] 为了评估ICP混合物在其他哺乳动物模型系统中预防霍乱的能力,使用了具有幼兔的动物模型。与幼鼠相反,感染霍乱弧菌的幼兔发生与霍乱相关的大量分泌性腹泻(Abel等人, *Current protocols in microbiology* 38,6A 6 1-15,2015)。为了确定在没有霍乱弧菌的情况下噬菌体是否可以保留在幼兔肠道中,对于动物单独施用ICP混合物(3×10^8 PFU)。3或24小时后,处死动物并从肠匀浆中测定噬菌体滴度。

[0133] 观察到,即使在24小时后,从每个肠中回收了 10^6 个噬菌体(附图4A)。为了确定ICP混合物是否可以阻断霍乱弧菌的感染,在用 5×10^8 CFU霍乱弧菌攻击前3或24小时,将噬菌体(4×10^9 和 8×10^9 PFU之间)口服给予两组幼兔。对照组未接受噬菌体。监测动物的霍乱迹象,特别是体重减轻(附图5)和米泔水样便(这里也称为霍乱样腹泻)的存在。观察到非噬菌体对照组在感染后12至14小时具有霍乱样症状,与先前发表的观察结果一致(Abel等人, *Current protocols in microbiology* 38,6A 6 1-15,2015),并且在这个时间点牺牲。观察到,每只感染的兔子的盲肠扩张并含有约0.5至1ml积聚的液体,这是霍乱弧菌感染的进一步标志。从盲肠液和这些来自该组的每只动物的肠的匀浆(附图3B)中计数大约 10^9 - 10^{10} CFU的细菌。

[0134] 在感染前3小时施用ICP混合物的7只兔子中的4只兔子的组织中未检测到霍乱弧菌(附图4B),表明这些动物通过治疗被清除了感染。从该组中剩余的三只兔子的肠匀浆中获得 10^6 至 10^8 CFU的霍乱弧菌,与未处理的组相比,其计算减少了10至100,000倍(附图4B, $P < 0.001$)。在感染前24小时,从施用噬菌体的动物的每个肠中计数约 10^5 至 10^9 CFU的霍乱弧菌(附图4B),与未施用噬菌体的对照动物相比,细菌负荷减少10至100,000倍($P < 0.05$)。

[0135] 实施例11. 在处理过的幼鼠中未出现抗三种噬菌体菌株的弧菌突变体

[0136] 为了确定存活细胞的噬菌体抗性表型谱,我们随机选取附图3B和附图3C中获得的霍乱菌落进行菌落纯化。从分离的菌落中获得细菌培养物,并将其用于平板接种效率(EOP)测定以表征分离株的抗性表型。结果显示在表3中,也参见Yen等人, *Ibid.*, 2017, 补充文件1, 表S1和补充文件2, 表S3中的详细描述,其数据通过引用并入本文。

[0137] 为了确定噬菌体预防中存活的霍乱弧菌是否对ICP噬菌体敏感或具有抗性,随机选择每只小鼠和兔肠匀浆中的霍乱弧菌分离株进行菌落纯化,并通过效率测定分离株的噬菌体抗性表型电镀(EOP)测定法(Yen等人, *Ibid.*),其中灵敏度定义为归一化为亲本野生型霍乱弧菌的效率,其大于0.1;部分灵敏度定义为0.1至 10^{-5} ;阻力是EOP小于 10^{-6} 。

[0138] 这些数据得出结论,在攻击前6或12小时接受ICP混合物的小鼠中100%的菌落分离物对所有三种ICP噬菌体都敏感。观察到在攻击前24小时给予ICP混合物的小鼠的大多数分离物也对所有三种ICP噬菌体敏感;然而,少数显示出不同的ICP抗性表型。没有观察到对所有三种噬菌体菌株具有抗性。

[0139] 最重要的是,没有从幼鼠肠中发现大量分离物的事实可以表征为对所有三种ICP噬菌体具有抗性,这表明混合物是用于持续预防感染的合适治疗剂。

[0140] 表3. 在幼鼠中通过预防噬菌体产生的霍乱弧菌分离株的噬菌体抗性

[0141]

抵抗等级	预防长度		
	6小时(n = 30)	12 小时 (n = 50)	24 小时 (n = 99)
S针对所有ICP	30(100%)	50(100%)	75例(81%)
R仅针对ICP-1	-	-	-
R仅针对ICP-2	-	-	14(14%)
R仅针对ICP-3	-	-	2(2%)
PS仅针对ICP-2	-	-	4(4%)
ICP-1 (PS) 和 ICP-3 (PS)	-	-	1(1%)
ICP-1 (PS)和ICP-3 (R)	-	-	3(3%)
ICP-1 (R)和ICP-3 (PS)	-	-	-
R针对所有ICP	-	-	-

[0142] 表3显示了从附图3中所见的噬菌体混合物处理的幼鼠的肠匀浆获得的分离物的结果,作为处理和用致病细菌攻击之间的时间段的函数。在病原体攻击前6小时处理的小鼠的肠匀浆中,测试了30种细菌分离物,其中100%对所有三种ICP菌株敏感。类似地,在攻击前12小时处理的小鼠中,测试的50个分离物对所有三种ICP菌株完全敏感。从攻击前24小时处理的小鼠中,测试了99个分离物,其中75个(81%)对所有三个ICP菌株敏感。只有四种分离株对三种ICP菌株中的两种具有抗性:一种分离株具有对ICP-1和ICP-3部分敏感的表型;三种分离物显示出对ICP-1的部分敏感性和对ICP-3的抗性。最重要的是,没有观察到对所有三种噬菌体都有抗性的分离株。

[0143] 实施例12. 细菌对ICP噬菌体菌株的耐药的遗传基础

[0144] 为了确定抗性的遗传基础,通过全基因组测序然后进行变异分析来分析从图4B和4C的动物样品获得的24个分离物(Heidelberg等人,Nature 406,477-484,2000;Lazinski et al.BioTechniques 54,25-34,2013)。先前已显示,O-抗原合成基因的poly-A区中的滑链错配可导致异常的O-抗原并赋予ICP-1抗性(Seed等人,PLoS Pathog 8,e1002917,2012)。

[0145] 在开放阅读框VC0240 (gmhD) 和VC0264 (rjg) 之间的霍乱弧菌1号染色体上的O-抗原合成基因中发现了ICP-1和ICP-3抗性分离株的突变(Chatterjee等人,Biochimica et biophysica acta1690,93-109,2004) (补充文件3,表S4)。LPS突变是这些分离株中常见的耐药来源;然而,这并不是主要问题,因为先前已证明携带此类突变的菌株是无毒的(Kamp等人,PLoS Pathog 9,e1003800,2013;Pritchard等人,PLoS genetics 10,e1004782,2014;Fu等人,Cell hostµbe 14,652-663,2013)。例如,ompU和toxR中的突变赋予

ICP-2抗性 (Seed等人, eLife 3, e03497, 2014)。本文的数据显示在开放阅读框VC0633 (ompU) 或VC0984 (toxR) 中发现了ICP-2抗性分离株中的突变(补充文件3, 表S4)。

[0146] 为了确定抗性的遗传基础, 对36种分离株进行全基因组测序和变体分析, 根据它们的不同抗性表型选择 (Yen等人, Ibid.)。通过分离在ICP-1-和ICP-3-抗性分离株中发现的突变的菌株获得的结果与从图3中的小鼠实施例中观察到的结果相似。对于这些菌株中的33个, 在涉及O-的基因中观察到突变。抗原合成。对于三种菌株, 未检测到与已知的噬菌体抗性策略相关的突变。从两个动物模型的这些数据得出结论, 噬菌体抗性的主要来源是产生噬菌体受体所需基因的突变。

[0147] 实施例13. 处理过的幼兔没有霍乱症状

[0148] 最重要的是, 除了用本发明实施例中观察到的用噬菌体混合物处理幼兔的细菌负荷减少外, 在任一种噬菌体中没有观察到水稻粪便或显着体重减轻的证据。在霍乱弧菌攻击后长达20小时给药组(附图5)。相反, 在没有噬菌体的情况下感染霍乱弧菌的对照兔在24小时内损失了约10%的体重。

[0149] 与小鼠不同, 感染霍乱弧菌的兔子能够产生在人类中观察到的该疾病的许多胃症状, 包括具有延长的盲肠的分泌性腹泻。因此, 进一步观察用噬菌体混合物和用致病细菌攻击的不同治疗组中的受试者的疾病迹象, 并收集盲肠液并测量体积。

[0150] 在解剖这些动物后, 发现仅在霍乱弧菌感染前24小时给予噬菌体的10只组中的一个受试者(动物编号16, 参见表4)中存在0.1ml盲肠液。用相同的混合物处理3小时的其他动物的盲肠中没有一个显示出液体积聚。相比之下, 未用噬菌体混合物处理但受细菌病原体攻击的受攻击动物均产生盲肠液。

[0151] 表4. 从幼兔的噬菌体预防中收集的盲肠液体的细菌计数

[0152]

盲肠液体的细菌计数(CFU/ml)					
没有噬菌体		3个小时		24个小时	
动物	CFU/ml	动物	CFU/ml	动物	CFU/ml
动物1	6.2×10^8	动物9	N /A	动物16	5.2×10^5
动物2	3.9×10^8	动物10	N /A	动物17	N /A
动物3	8.8×10^8	动物11	N /A	动物18	N /A
动物4	7.8×10^8	动物12	N /A	动物19	N /A
动物5	1.0×10^8	动物13	N /A	动物20	N /A
动物6	1.1×10^8	动物14	N /A	动物21	N /A
动物7	8.2×10^8	动物15	N /A	动物22	N /A
动物8	9.2×10^8			动物23	N /A
				动物24	N /A

[0153]

				动物25	N /A
--	--	--	--	------	------

[0154] 分析盲肠液中细菌的存在,如表4所示。来自未接受噬菌体混合物的动物的流体样品均具有高细菌计数,大约 10^8 – 10^9 CFU。研究人员得出的结论是,噬菌体混合物处理的受试者没有产生霍乱症状,并且未接受混合物的对照动物显示出盲肠中疾病和细菌存在的迹象。

[0155] 从噬菌体处理的动物的每个肠匀浆中收集大约 10^4 – 10^6 至约 10^8 – 10^9 PFU(附图3C),表明噬菌体在治疗和感染过程中持续存在于肠中。这些观察结果表明ICP混合物在实施例的持续时间内免受霍乱迹象的影响。

[0156] 实施例14.在家兔中未产生抗三种噬菌体菌株的突变体

[0157] 从兔肠匀浆中获得菌落分离物,并在用致病细菌攻击前3小时或24小时分析处理组的抗性突变的存在。使用的定量标准与小鼠模型系统相同。

[0158] 获得的结果与小鼠模型中获得的结果相似。没有观察到具有获得对所有三种噬菌体菌株具有抗性的突变的分离物。在从3小时处理的动物获得的20个分离物中,观察到20%保留对所有三种噬菌体菌株的敏感性;一个人只对ICP-1有抵抗力;没有人仅对ICP-2或仅对ICP-3具有抗性。少数分离株对噬菌体对部分敏感。参见表5。

[0159] 表5.在幼兔中通过噬菌体预防产生的霍乱弧菌分离株的噬菌体抗性

[0160]

抵抗等级	预防长度	
	3 h(n = 20)	24小时(n = 76)

[0161]

S针对所有IP	4(20%)	30(39%)
R仅针对ICP-1	1(5%)	2(3%)
R仅针对ICP-2	-	-
R仅针对ICP-3	-	-
ICP-1 (PS)和ICP-3 (PS)	2(10%)	2(3%)
ICP-1 (PS)和ICP-3 (R)	2(10%)	-
ICP-1 (R)和ICP-3 (PS)	3(15%)	8(11%)
ICP-1 (R)和ICP-3 (R)	7(35%)	30(39%)
R针对所有ICP	-	-

[0162] 总的来说,这些数据表明噬菌体混合物在体内有效杀死两种不同哺乳动物系统中的霍乱弧菌细胞,并减少或阻止肠道霍乱弧菌的定殖。三种不同噬菌体菌株的噬菌体混合物在霍乱感染的幼兔模型中也提供针对霍乱样腹泻发作的保护。此外,如01-抗原突变体所

述,观察到动物对一种或两种ICP噬菌体菌株具有抗性的分离株具有无毒突变(Seed等人, PLoS Pathog 8,e1002917,2012)。

[0163] 这些数据表明,通过减少两种动物模型中的定植和兔动物模型中的霍乱样腹泻,预防性施用霍乱弧菌特异性噬菌体混合物对霍乱具有保护作用。ICP混合物在体外成功杀死了霍乱弧菌,阻止了幼鼠的定植,并且排除了幼兔中霍乱样腹泻的发作。虽然可以从一些噬菌体处理的动物的肠匀浆中分离出霍乱弧菌,但存活的群体一直小于数量级。值得注意的是,许多鉴定出赋予ICP噬菌体抗性的突变可能导致霍乱弧菌的毒力丧失。至关重要的是,在本文实施例的时间过程结束时,细菌群体对三种ICP噬菌体中的至少一种保持敏感。ICP混合物杀死霍乱弧菌细胞的有效性至少部分是霍乱弧菌感染时肠道中噬菌体浓度的函数。

[0164] 实施例15. 噬菌体混合物不会破坏肠道菌群的组成

[0165] 正常的人类微生物群不包括霍乱弧菌的细胞。噬菌体受体可能对宿主特定属或细菌种类表面上的结构的相互作用具有高度特异性。因此,与能够擦除受试者的整个微生物组的抗生素治疗剂相比,本发明的一个优点是,作为三种特定噬菌体菌株的混合物或混合物的治疗剂对不相关的细菌噬菌体菌株没有影响。细菌属或构成正常人(或者小鼠或者兔)微生物组的一部分的物种。

[0166] 为了在成年动物模型中测试ICP噬菌体菌株对肠道微生物群的特异性,给小鼠施用噬菌体混合物,或用抗生素或热灭活的噬菌体混合物。在给药前收集粪便样品数天。附图6显示噬菌体在成年肠中持续至少60小时。

[0167] 进行进一步分析以确定受试者的噬菌体混合物处理是否会对微生物组组合物产生任何影响。从冷冻保存的粪便样品中提取基因组DNA,并用作16S V4区域特异性引物的PCR模板。纯化PCR产物,并通过PCR添加Nextera测序衔接子。使用250bp配对末端Illumina MiSeq运行分析样品,并使用QIIME v1.8分析数据。操作分类单位的相似性为99%,并使用Greengenes数据库分配系统发育。

[0168] 使用主成分分析,样品的β多样性如图7所示。该分析计算样品对之间的系统发育距离,作为群体之间的相似性得分。附图7中的数据显示噬菌体混合物处理的受试者和对照(接受热灭活的噬菌体混合物)的微生物组群非常相似。对于阳性对照动物观察到不同性:从抗生素处理的动物获得两组样品(靠近左轴的六个点,其中动物用抗生素处理两天;和一组五个点靠近底轴,动物具有用抗生素治疗了一天)。

[0169] 这些数据显示,用噬菌体混合物处理一天或两天的受试者的肠道微生物群,无论噬菌体的热量杀灭(对照),在组成上是相似的,因此噬菌体混合物给药不会破坏微生物群。在另一项包括去除抗生素处理样本数据的数据分析中(附图8),分析表明,来自不同粪便样本细菌群体的微生物组的相关程度与处理零天的动物的粪便相似,处理一天,或处理两天,并且存在三种噬菌体菌株的活的或热灭活的噬菌体混合物对相关程度没有影响。附图8显示了省略来自抗生素处理动物的样品的这些数据点。样品没有聚集,横坐标最大,为10%,与附图7中的46%相比。由于这里的数据散布,并且与热对照相比,活噬菌体处理的聚类没有差异。杀死噬菌体,这些数据证实噬菌体处理不影响微生物组,并且混合物是霍乱弧菌细胞的宿主特异性。

[0170] 这些数据表明,存在于混合物中并用于预防受试者的噬菌体菌株特异性感染和杀

死病原性弧菌细菌,因为这些菌株不会感染和改变非弧菌细菌的种群分布。正常肠道微生物种群的特征。

[0171] 实施例16. 噬菌体混合物在多种成分菌株的配比中是有效的

[0172] 用于制备最有效的混合物的ICP-1, ICP-2和ICP-3的每种噬菌体菌株的病毒粒子数的比例是变化的,以确定最佳相对量。测试的三种噬菌体菌株的额外比例,并与上述数据进行比较,使用ICP-1的三种ICP菌株中每一种的输入噬菌体数量比例为1:1:1:ICP-2:ICP-3人:1:1:10;1:10:1;10:1:1;和1:5:10。这些实施例测试了该比例的潜在优化,如果宿主细菌病原体上噬菌体受体的变化以及噬菌体菌株吸附,爆发时间和爆发大小的相对动力学可能影响细菌杀灭的程度和最大噬菌体持久性。在该实施例中,三种噬菌体染色中任何两种的MOI范围在比率上通过两个数量级差异(1:10与10:1比较)的范围变化。

[0173] 附图9A和9B显示了使用图1和图2的幼鼠模型的两种不同挑战量的霍乱弧菌。上面的附图3B和附图3D表明所有比例在预防中都是有效的,并且都给出了肠道中病原菌数量减少的结果,类似于本文获得的比例为1:1:1的结果。因此,与未用噬菌体处理的对照受试者相比,噬菌体混合物在一些受试者中将细菌负荷完全降低至检测限度内,并且在其他受试者中降低约两个数量级。这些数据表明,本发明的噬菌体菌株在对细菌的亲和力,爆发大小,爆发时间和噬菌体生命周期的其他特征的动力学中是相似的。

[0174] 此外,由于在本文的实施例中在较短的预防时间用动物模型系统观察到细菌负荷的完全减少,在进入人用临床试验之前分析每种剂量的时间的优化。由于生活在地方性霍乱环境中的个体可能会反复暴露于霍乱弧菌,因此需要多剂量来控制每个人的感染,直至在个体中完全根除,甚至在人群中根除。

[0175] 目前的噬菌体治疗研究主要集中在治疗持续感染。本文的结果表明噬菌体疗法在预防感染中的潜力。本文提供的数据表明,预防霍乱的前景需要进一步研究,其中使用如本文所示的噬菌体混合物的组合物和方法具有多种噬菌体菌株,其具有至少两种不同类型的噬菌体受体以与病原菌相互作用。快速作用的噬菌体预防方法对于有风险的个体是有用的,例如显示霍乱症状的个体的家庭接触。通过限制家庭内的传播,减轻了疾病的总体负担。噬菌体作为粘膜病原体的预防性治疗的应用代表了一种快速且特异的手段,通过该手段限制细菌感染对人类健康的影响。

[0176] 实施例17. 淡水中霍乱弧菌生物膜对噬菌体反应的分析

[0177] 先前通过多轮菌落纯化获得并通过噬斑测定和基因组测序证实缺乏噬菌体的三种霍乱弧菌粪便分离物中的每一种在含有几丁质片的池塘水中生长为生物膜。该过程使细菌处于生物膜内的天然高感染状态。如描述的那样 (Tamayo等人, Infect Immun. 78 (8) : 3560-9 (2010) . PMCID:PMC2916270) ,通过超声破碎将所得生物膜转变成单细胞悬浮液。

[0178] 以0.01、0.1和1的低感染复数(MOI)加入裂解噬菌体。如本发明所述,通过口服强饲法将每种混合物接种到9只幼鼠的组中 (Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187 (2008) . PMCID:PMC2563029)。这些MOI是生理学的,因为它们涵盖了水稻粪便中的典型范围 (Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187 (2008) ; Seed等人, mBio. 2 (1) . pii: e00334-10 (2011) . PMCID:PMC3037004)。此外,这些MOI中的每一个都允许一部分未感染的霍乱弧菌细胞进入小肠并建立定植。对每种菌株进行不含噬菌体的对照接种。在第8、16和24小时,每组三只小鼠被安乐死并测定小肠中噬菌体和霍乱弧菌的滴度。通常,在没有噬菌体的情况下,

10^5 CFU霍乱弧菌的接种物在24小时内增加至大于 10^7 CFU。高毒力的噬菌体通过细菌中的细胞裂解生长显着增加其自身滴度,导致霍乱弧菌的滴度急剧下降。与此相反,毒性较小的噬菌体对霍乱弧菌的负荷影响很小或没有影响。发现大多数或所有测试的裂解噬菌体都会干扰霍乱弧菌感染。通过监测感染过程中存在的噬菌体的数量,确定该效果是通过捕食和噬菌体复制,还是由于单个圆形噬菌体感染以某种方式改变动物霍乱弧菌感染的结果。

[0179] 设想,如果裂解噬菌体强烈干扰霍乱弧菌感染,那么噬菌体的耐药性就会有选择性的压力。在体外,霍乱弧菌群通过LPS O-抗原产生的相变损失迅速对ICP-1产生耐药性(Seed等人,PLoS ICP-2.8 (9) :e1002917 (2012).PMCID:PMC3441752)。然而,这些阶段变异在幼鼠定植模型中发现是无毒的。因此,这些相位变异在从几个稻水粪便中筛选出几百个菌落后没有被发现。然而,这种突变体可能以较低的频率出现。由于ICP-2不使用O1抗原作为受体,噬菌体耐药性可能在肠道感染过程中迅速出现,这可能对噬菌体/霍乱弧菌的种群动态产生重大影响。保存的噬菌体阳性稻水粪便样品有利地用于对噬菌体耐药分离物进行深筛选。

[0180] 将来自约4名患者的样品铺在含有对霍乱弧菌选择性培养基的大培养皿上。对机器人进行编程以从每个样品中挑选7,680个菌落到20个384孔板中,每孔含60 μ LB肉汤。每孔接收约105CFU的霍乱弧菌。除第一个柱外,孔中的培养基含有约103个噬斑形成单位(PFU)的噬菌体,起始MOI为0.01。第一列孔含有不含噬菌体的对照作为细胞生长的阳性对照。将384孔板在24°C下在板读数器中温育8小时,偶尔摇动,并且每0.5小时进行OD₆₀₀测量。

[0181] 为了测定噬菌体抗性,监测OD₆₀₀作为时间的函数而不是终点读数,以获得关于可能的不同种类的噬菌体抗性突变体的信息。根据数据,在每个粪便样品中计算噬菌体抗性分离物的百分比。通过三重菌落纯化获得每个粪便样品的抗噬菌体分离物,并如上所述重新测试噬菌体抗性。

[0182] 通过基因组测序和突变分析确定噬菌体抗性的机制。对来自上述(多达72个菌株)的经证实的噬菌体抗性分离株的基因组进行测序,并将每个分离物与从相同粪便样品中分离的噬菌体敏感基因组进行比较,以鉴定负责噬菌体抗性的突变。通过将突变转移到新的细胞背景中并测试噬菌体抗性来证实候选噬菌体抗性突变。该策略用于发现噬菌体受体和噬菌体抗性的新机制(Seed等人,mBio.2 (1).pii:e00334-10,2011.PMCID:PMC3037004;Seed等人,Nature.494 (7438) :489-91,2013.PMCID:PMC3587790;Seed等人,PLoS ICP-2.8 (9) :e1002917,2012.PMCID:PMC3441752)。

[0183] 上述实施例提供了关于肠道感染期间裂解噬菌体和霍乱弧菌的种群动态的定量信息,以及噬菌体抗性的机制。该结果影响了对爆发期间特定噬菌体染色与霍乱弧菌的关联频率的理解,以及裂解噬菌体对个体感染结果的影响。此外,结果可用于开发用于治疗霍乱患者的噬菌体疗法。

[0184] 确定在传播期间临床获得的噬菌体菌株和霍乱弧菌菌株的群体动态。霍乱大便中裂解性噬菌体对霍乱弧菌传播的影响在很大程度上是未知的。由于生产性噬菌体感染需要代谢活性宿主,因此在此设想噬菌体对营养不良水中的传播具有最小影响,但是当存在几丁质以支持霍乱弧菌生长时的主要影响。甲壳素是天然淡水环境中的主要碳源。在本节中,以上三个裂解噬菌体/霍乱弧菌对用于测试这个假设,使用幼兔宿主并从盲肠收集高度传播的霍乱弧菌和噬菌体。

[0185] 如上所述将裂解噬菌体与生物膜生长的霍乱弧菌混合,然后将其口服接种到三只幼兔的组中。每个菌株包括没有噬菌体接种的对照组。当有症状时,对每只动物实施安乐死并收集盲肠液。将未加工的样品(不除去碎片或聚集体)分开并用于以下测定。将一部分涡旋以分散聚集体,并用于确定样品中噬菌体PFU和霍乱弧菌细胞的数量。将另一部分在池水中稀释,在开口烧杯中加入或不加入几丁质薄片以进行传播适合性测定。另一部分用于确定裂解噬菌体对透射的影响,如下所述。

[0186] 对于传播测定,在每个烧杯中孵育8、16、24、48和96小时后测定噬菌体和霍乱弧菌的滴度。将霍乱弧菌的下降(或生长)速率与缺乏噬菌体的对照相比较。这些实施例的结果揭示了裂解噬菌体在营养贫乏和营养充足(甲壳素)环境中传播过程中对霍乱弧菌适应性的影响。如果噬菌体继续感染和繁殖含有几丁质的环境中的脱落细菌,则阐明了霍乱弧菌的生命周期。这些数据支持使用裂解噬菌体控制环境储库的细菌含量的概念。另一方面,鉴于传播的压力,由于营养不良或含有几丁质的环境,噬菌体可能无法在任一环境中繁殖。在这种情况下,噬菌体仍然可以与霍乱弧菌相关联,并且以这种方式,保持存在和无活性,直到霍乱弧菌传播给新宿主。

[0187] 确定在裂解噬菌体存在下传播的霍乱弧菌的传播性。尽管它对于了解霍乱的传播具有重要意义,但从未探索过裂解噬菌体对通过池塘水中间体的粪-口传播霍乱的影响。设想噬菌体,无论是否活跃复制,但与霍乱弧菌相关,都可减少受污染水的疾病传播。

[0188] 上述盲肠液体霍乱弧菌和相关裂解噬菌体的传播培养物用于测量对幼鼠的传播,具有以下修改。不是进行竞争实验,而是确定霍乱弧菌的ID₅₀。竞争实验在这里是不可能的,因为裂解噬菌体攻击竞争的LacZ-V霍乱菌株,因此竞争指数(CI)值将是高度可变的。

[0189] 为了确定ID₅₀,将来自上述实施例的24小时时间点的一部分传播培养物在池水中连续稀释以获得一系列浓度的噬菌体和细菌。对三只幼鼠的组进行口腔接种,其中稀释液估计含有10¹, 10², 10³和10⁴CFU的霍乱弧菌中的每一种。24小时后,对幼鼠实施安乐死,并测定小肠中霍乱弧菌的负荷。ID₅₀以图形方式确定。该实施例确定池塘水中的裂解噬菌体降低霍乱弧菌的感染性,即导致显着更高的ID₅₀。这些实施例的结果为理解裂解噬菌体对受污染的淡水体中霍乱弧菌传播的影响提供了有价值的信息。

[0190] 确定裂解噬菌体对霍乱快速传播的影响。上述实施例测试了裂解噬菌体对污染池塘水传播的影响。然而,一个同样重要但未得到解决的问题是溶解性噬菌体是否会影响米泔水样便中高传染性霍乱弧菌的快速传播。设想裂解噬菌体大大减少了过度感染的粪便霍乱弧菌的传播。

[0191] 如上所述的从幼兔盲肠液到幼鼠的超感染传播模型用于测量三种噬菌体/霍乱弧菌对的传递。测量每个新鲜获得的盲肠液样品中幼鼠的ID₅₀。使用该测定法,发现高感染性霍乱弧菌的ID₅₀为10²CFU,比体外培养的(非超感染性)细菌低10倍(Butler等人,Mol Microbiol 60 (2), 417-26, 2006. PMCID: PMC2754204; Nelson等人, PLoS ICP-2.4, e1000187, 2008. PMCID: PMC2563029)。因此将含有噬菌体的样品的ID₅₀与缺乏噬菌体的样品的ID₅₀进行比较。该实施例取决于盲肠液中的裂解噬菌体是否大大降低了通常为高感染性霍乱弧菌的感染性。这些实施例的结果为理解裂解噬菌体对粪便脱落霍乱弧菌的快速传播的影响提供了有价值的信息,例如,在流行期间在家庭中发生(Harris等人, PLoS Negl. Trop. Dis. 2, e221, 2008; Weil等人, Clin Infect Dis. 15; 49 (10): 1473-9, 2009)。

[0192] 现在已经充分描述和实现了本发明,通过以下权利要求描述了进一步的实施例,所述权利要求仅是示例性的,不应被解释为进一步的限制。所有引用的参考文献的内容在此引入作为参考。

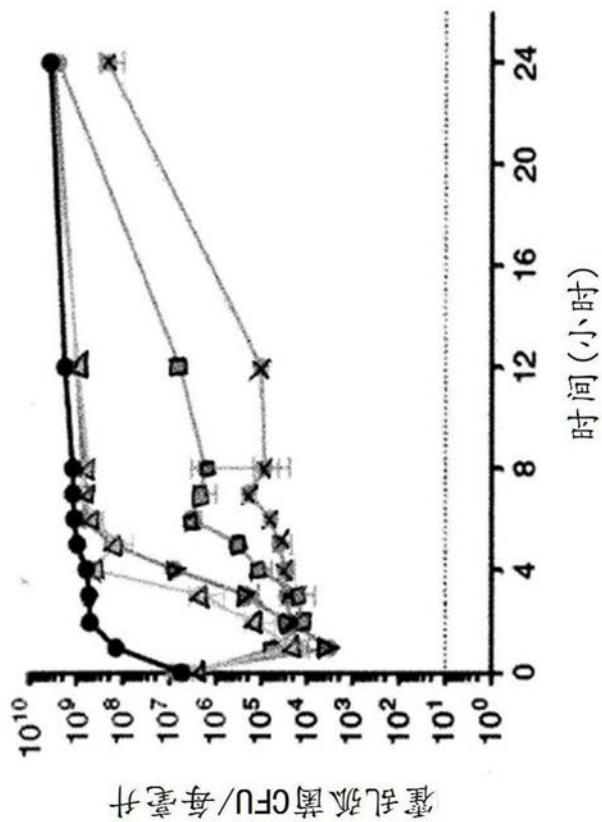


图1A

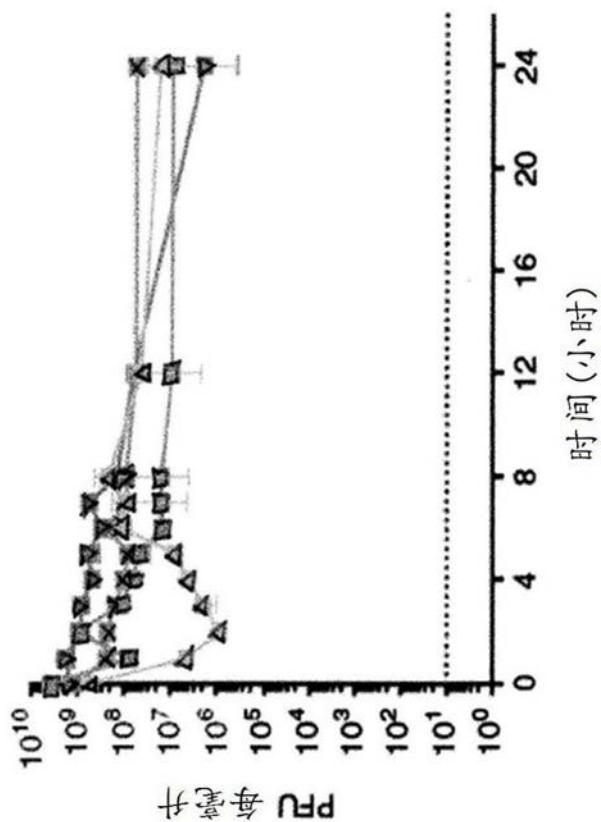


图1B

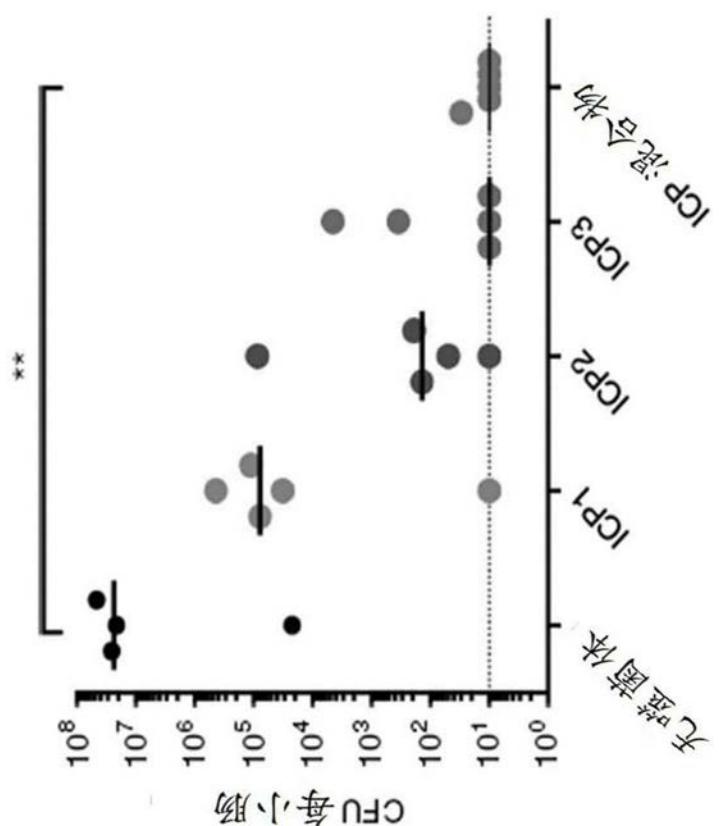


图2A

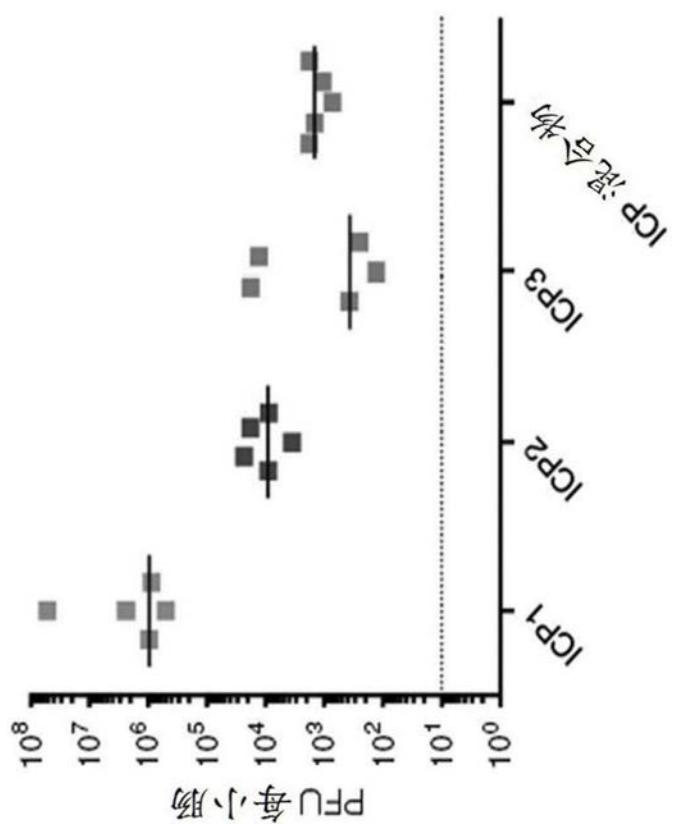


图2B

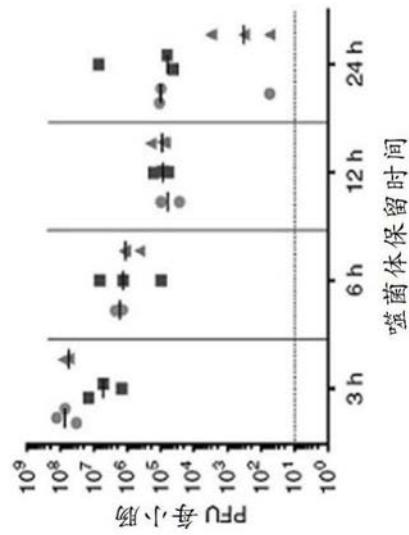


图3A

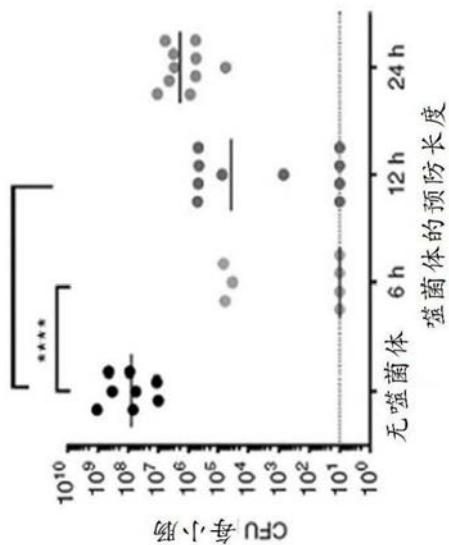


图3B

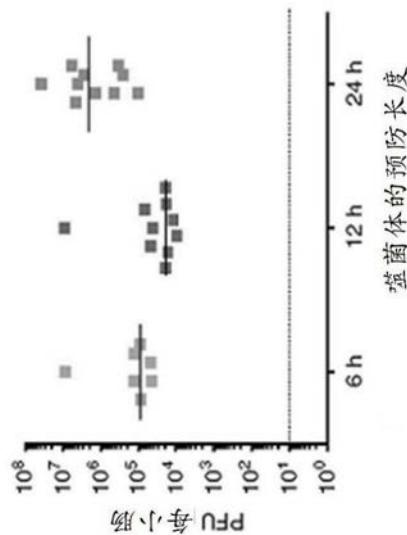


图3C

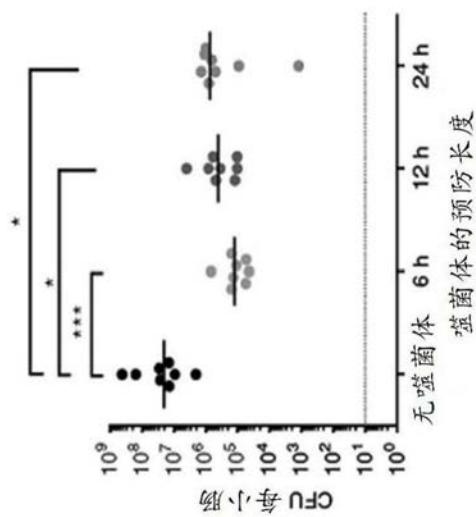


图3D

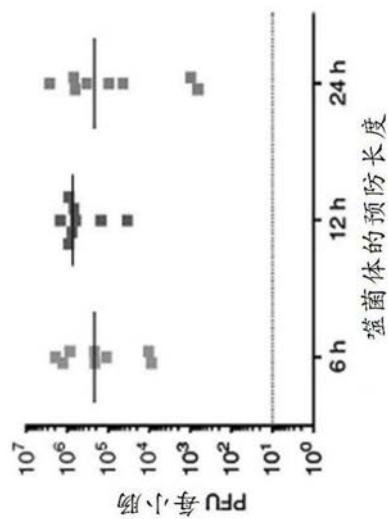


图3E

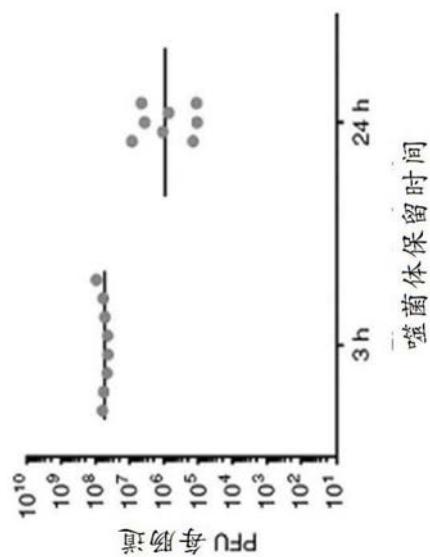


图4A

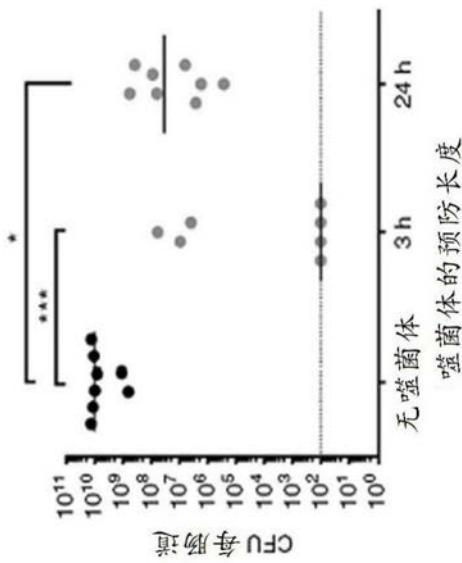


图4B

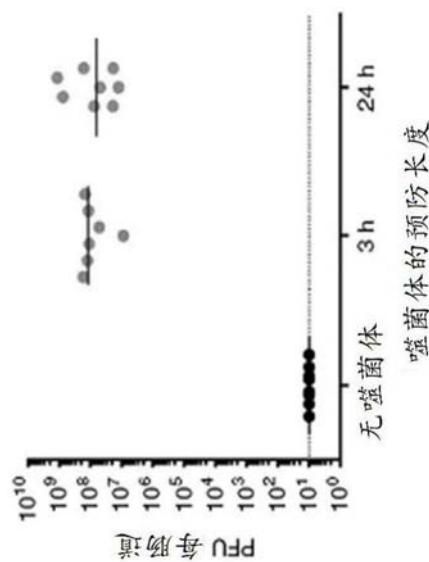


图4C

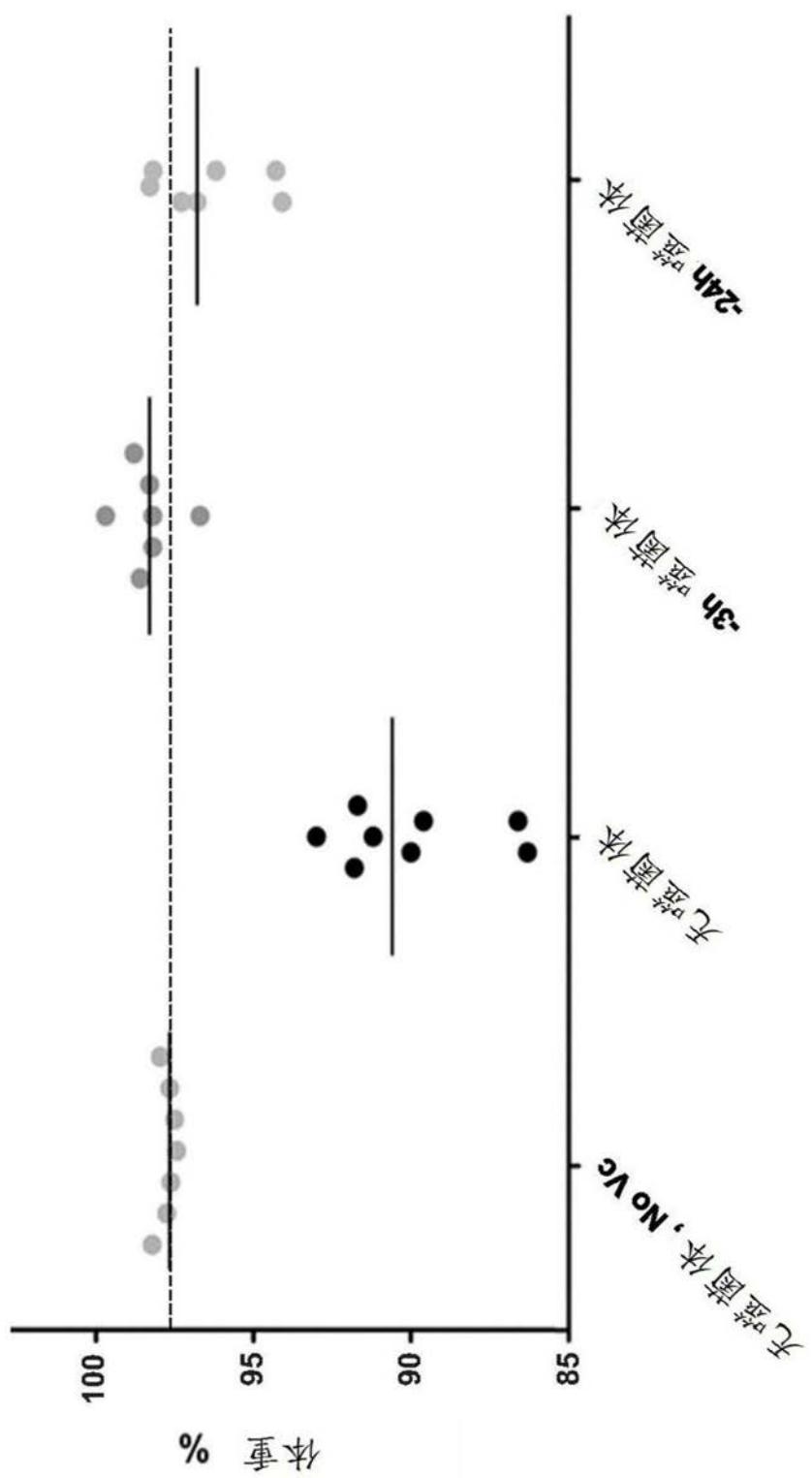


图5

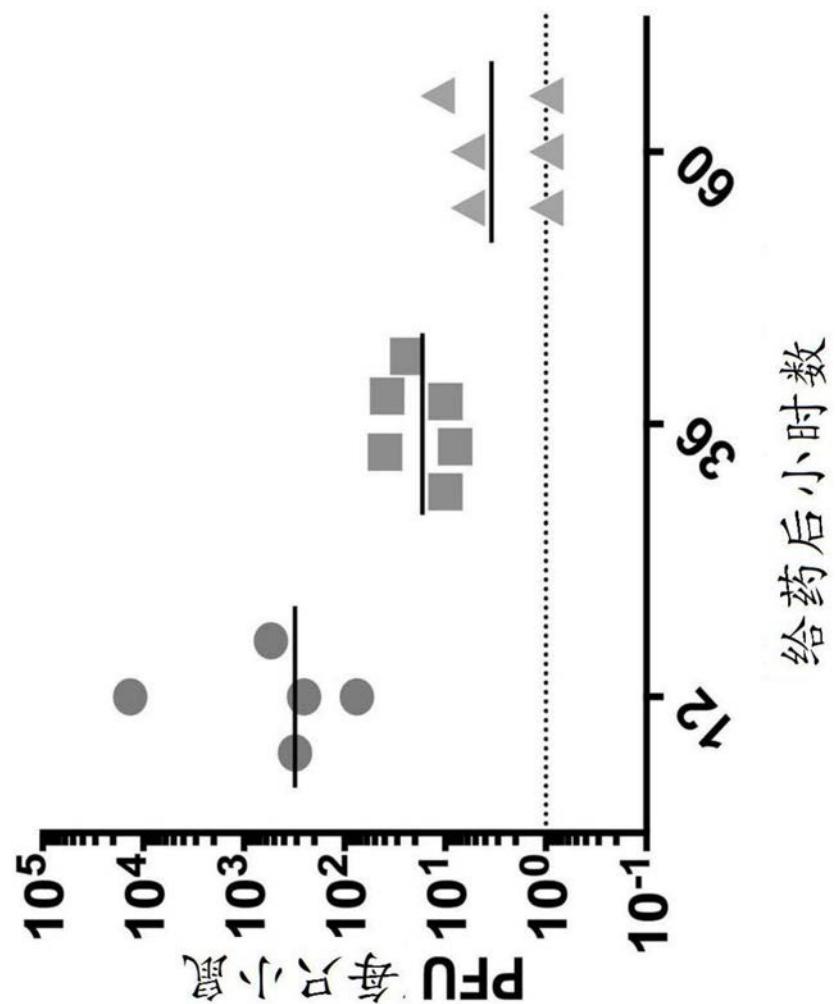


图6

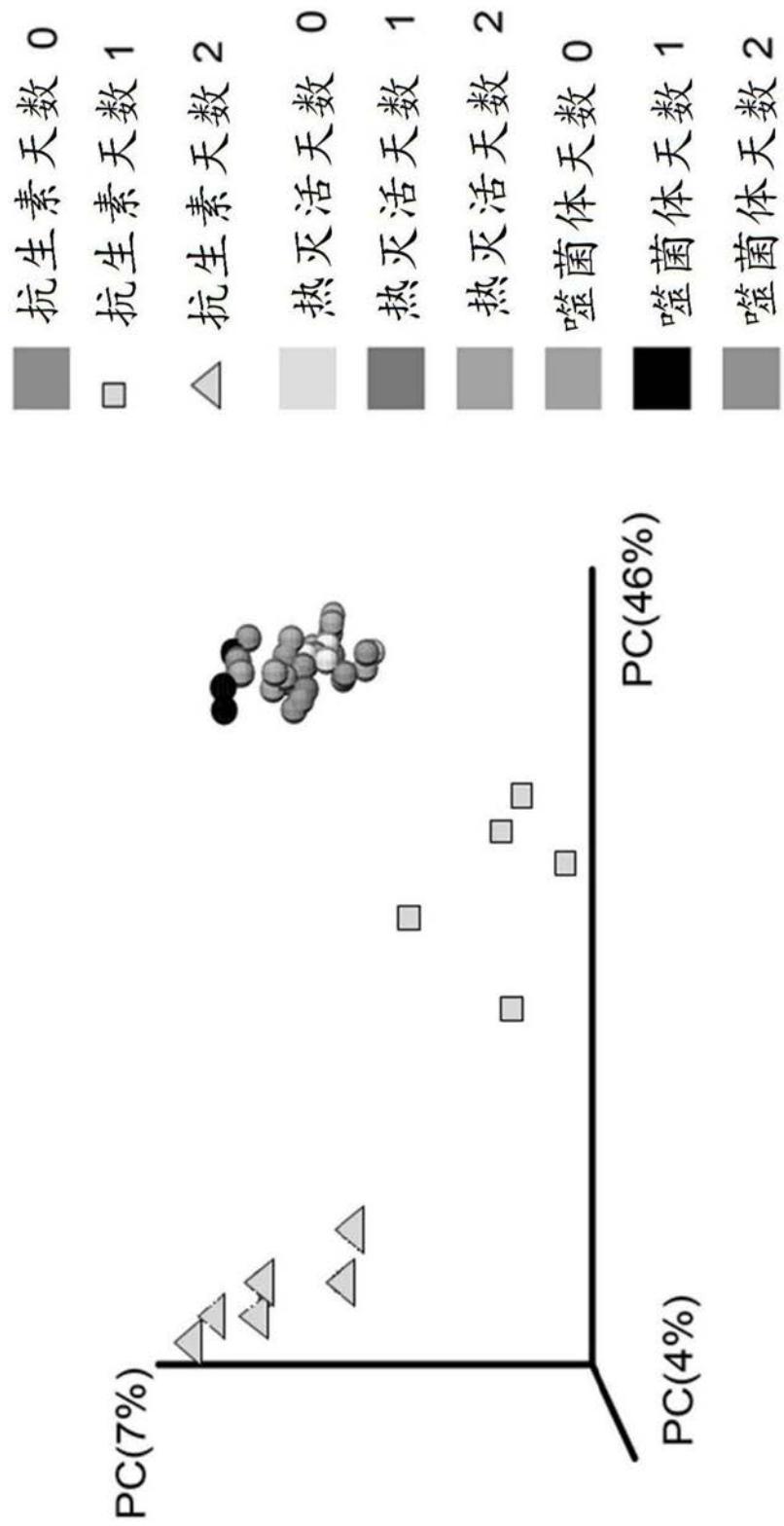
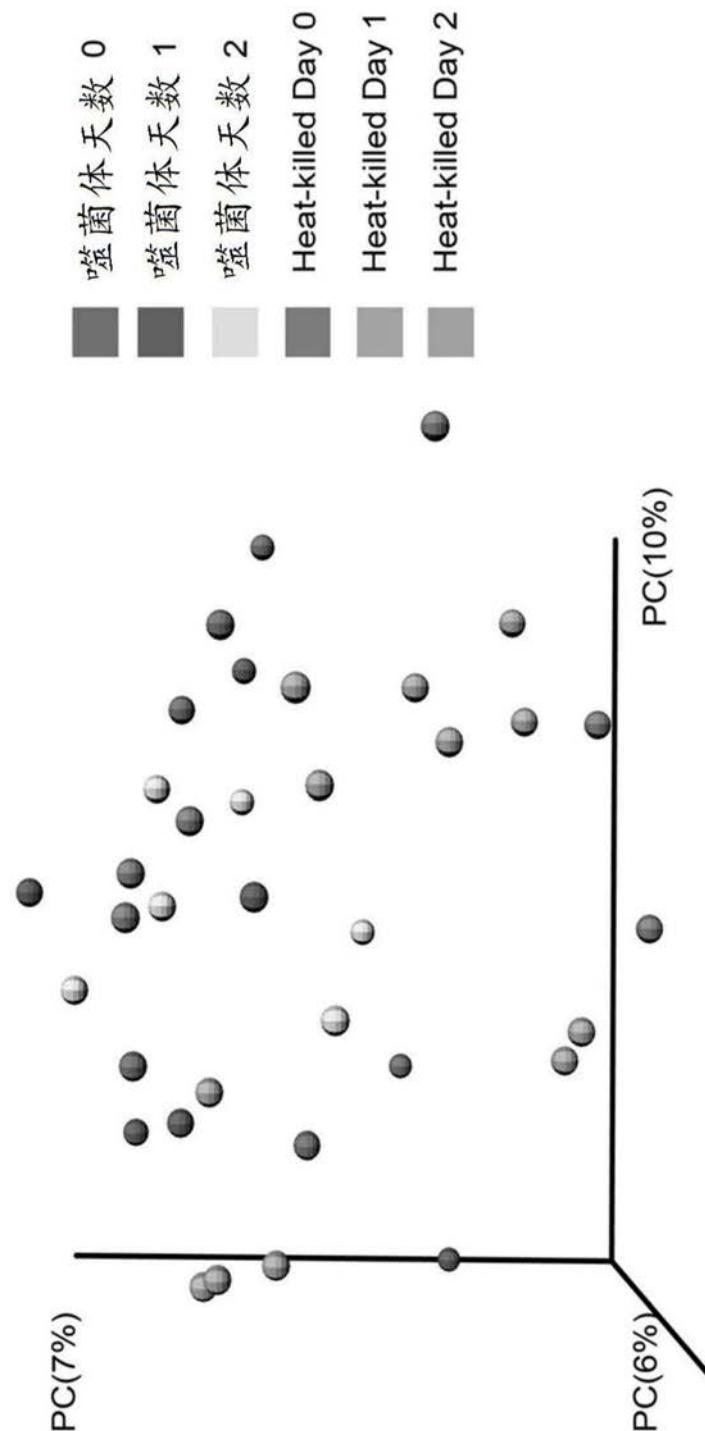


图7



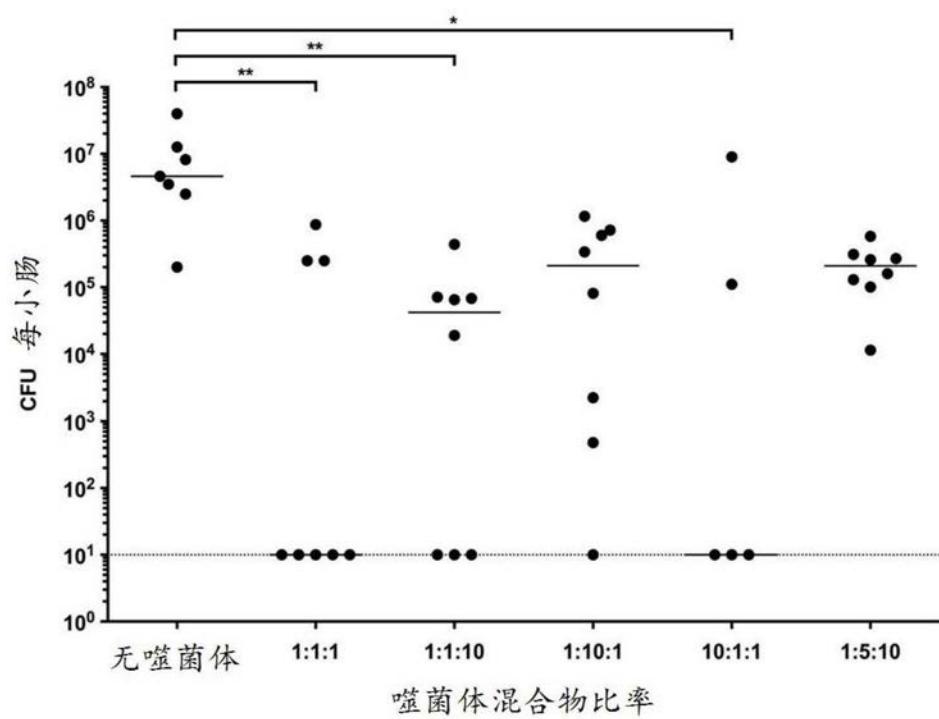


图9A

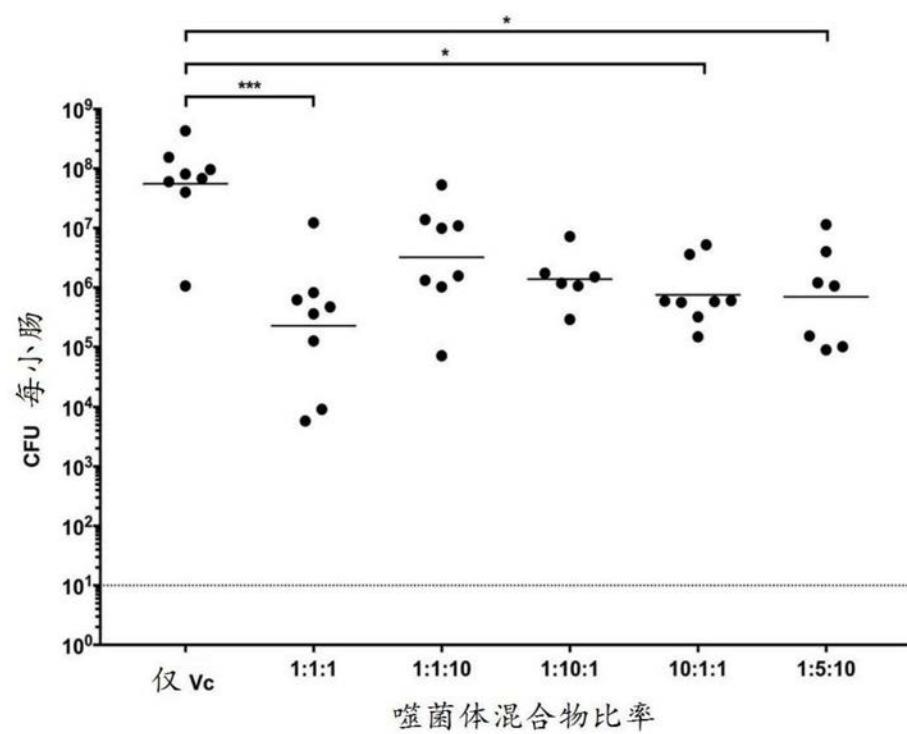


图9B