



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104780933 B

(45)授权公告日 2020.08.28

(21)申请号 201380036474.5

(22)申请日 2013.05.09

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104780933 A

(43)申请公布日 2015.07.15

(30)优先权数据

61/644799 2012.05.09 US

61/736813 2012.12.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.01.08

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/040340 2013.05.09

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/170022 EN 2013.11.14

(73)专利权人 康特拉费克特公司  
地址 美国纽约州

(72)发明人 R.舒奇 R.C.诺温斯基 M.维特金  
B.罕 J.罗托洛

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 翟建伟 彭昶

(51)Int.Cl.

A61K 39/085(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

C12N 9/52(2006.01)

(56)对比文件

W0 2010/002959 A2,2010.01.07,

W0 2010/002959 A2,2010.01.07,

SCHMITZ J.Expanding The Horizons Of  
Enzybiotic Identification.《Graduate  
School Student Theses,The Rockefeller  
University》.2011,1-375.

Meng X等.Application of A  
Bacteriophage Lysin To Disrupt Formed By  
The Animal Pathogen Streptococcus Suis.  
《Appl.Environ.Microbiol.》.2011,第77卷(第  
23期),8272-8279.

审查员 张蕾

权利要求书1页 说明书41页

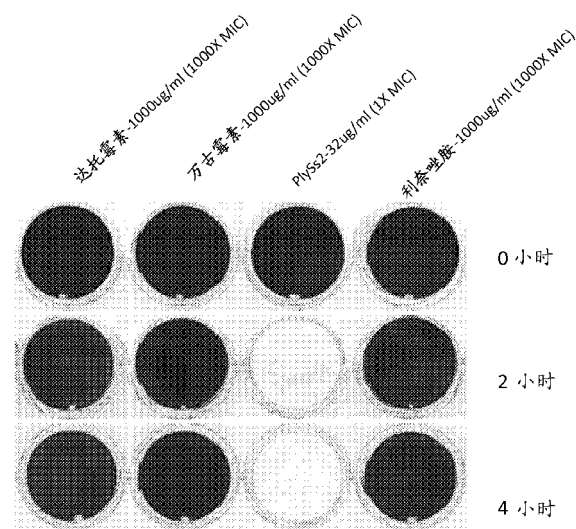
序列表4页 附图20页

### (54)发明名称

使用噬菌体溶素的生物膜预防、破坏和处理

### (57)摘要

本发明提供了用溶素,特别是具有杀死葡萄球菌属细菌(包括抗药金黄色葡萄球菌)的能力的溶素,尤其是溶素PlySs2阻止、控制、破坏和处理细菌生物膜的方法。本发明还提供了用于处理或调节细菌一种或多种生物膜和生物膜形成的组合物和方法。



1. 包含能够杀死葡萄球菌和链球菌的溶素多肽的组合物在制备用于破坏或处理包含葡萄球菌和链球菌细菌中的一种或多种的革兰氏阳性细菌生物膜的药物中的用途,其中所述生物膜与所述组合物接触并被有效地分散或处理,其中所述溶素多肽由如在图5中所示的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)组成。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述组合物进一步包含一种或多种抗生素。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗生素选自达托霉素、万古霉素和利奈唑胺。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述生物膜与一种或多种抗生素接触。

5. 包含能够杀死葡萄球菌和链球菌的溶素多肽的组合物在制备用于通过使人中的医疗装置、导管或植入物与所述组合物接触而减少在医疗装置、导管或植入物上形成的生物膜中的葡萄球菌和链球菌细菌群体的药物中的用途,其中所述溶素由如在图5中所示的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)组成。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述组合物进一步包含抗生素。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗生素选自达托霉素、万古霉素和利奈唑胺。

8. 组合物在制备用于破坏或处理链球菌或葡萄球菌细菌生物膜的药物中的用途,所述组合物包含由如图5中所示的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)组成的溶素多肽。

9. 根据权利要求8所述的用途,所述组合物进一步包含一种或多种抗生素。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述抗生素选自达托霉素、万古霉素和利奈唑胺。

11. 根据权利要求1、5或8任一项所述的用途,其中所述溶素多肽能够杀死选自葡萄球菌、链球菌、肠球菌和李斯特菌细菌的革兰氏阳性细菌。

## 使用噬菌体溶素的生物膜预防、破坏和处理

### 技术领域

[0001] 本发明一般地涉及用溶素、特别是具有杀死葡萄球菌属细菌(包括抗药金黄色葡萄球菌)的能力的溶素、尤其是溶素PlySs2阻止、控制、破坏和处理细菌生物膜。本发明也涉及用于调节细菌一种或多种生物膜和生物膜形成的组合物和方法。

### 背景技术

[0002] 随着更多的抗生素被用于多种疾病和其它病症,抗药细菌的发展成为医学领域中的一个重大问题。更多抗生素的使用和显示抗性的细菌的数目已经提示更长的治疗时间。此外,广泛的非特异性的抗生素目前正被更频繁地使用,其中一些对患者具有有害作用。一个与该增加的使用有关的问题是,许多抗生素不容易渗入粘膜衬里。

[0003] 革兰氏阳性细菌被含有多肽和多糖的细胞壁包围。革兰氏阳性细菌包括、但不限于放线菌属(*Actinomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、李斯特菌属(*Listeria*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)和梭菌属(*Clostridium*)。医学相关的物种包括酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。产芽孢的芽孢杆菌属种引起炭疽和胃肠炎。产芽孢的梭菌属种负责肉毒中毒、破伤风、气性坏疽和假膜性结肠炎。棒杆菌属种引起白喉,并且李斯特菌属种引起脑膜炎。

[0004] 新颖的抗微生物治疗方案包括基于酶的抗生素(“酶抗生素”)诸如噬菌体溶素。噬菌体使用这些溶素消化其细菌宿主的细胞壁,通过低渗裂解释放子代病毒。当将纯化的重组溶素从外部加给革兰氏阳性细菌时,产生的相似结果。溶素针对革兰氏阳性病原体的高致死活性使得其成为开发为治疗剂的有吸引力的候选物(Fischetti, V.A. (2008) *Curr Opin Microbiol* 11:393-400; Nelson, D.L. 等人(2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4107-4112)。噬菌体溶素最初提出用于根除病原性链球菌的鼻咽携带(Loeffler, J. M. 等人(2001) *Science* 294: 2170-2172; Nelson, D. 等人(2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4107-4112)。溶素是由双链DNA(dsDNA)噬菌体使用的使宿主裂解与病毒装配完成协调的裂解机制的部分(Wang, I. N. 等人(2000) *Annu Rev Microbiol* 54:799-825)。溶素是这样的肽聚糖水解酶:其破坏细菌壁中的键,快速地水解肽聚糖完整性所需的共价键,引起细菌裂解和伴随的子代噬菌体释放。

[0005] 溶素家族成员显示出其中催化结构域与特异性或结合结构域融合的模式设计(Lopez, R. 等人(1997) *Microb Drug Resist* 3:199-211)。可以从细菌基因组内的病毒原噬菌体序列克隆溶素并且将其用于治疗(Beres, S.B. 等人(2007) *PLoS ONE* 2(8):1-14)。当从外部加入时,溶素能够接近革兰氏阳性细胞壁的键(Fischetti, V.A. (2008) *Curr Opin Microbiol* 11:393-400)。噬菌体裂解酶已被确定为通过多个施用途径在对象的不同类型的感染的评价和特异性治疗中是有用的。例如,美国专利5,604,109

(Fischetti等人)涉及通过经由半纯化的C组链球菌噬菌体相关溶素酶的酶促消化,在临床样本中的A组链球菌的快速检测。该酶工作变成另外研究的基础,导致治疗疾病的方法。Fischetti和Loomis专利(美国专利5,985,271、6,017,528和6,056,955)公开了通过由C1噬菌体感染的C组链球菌细菌产生的溶素酶的用途。美国专利6,248,324 (Fischetti和Loomis)公开了通过使用在适合于局部应用于皮肤组织的载体中的裂解酶用于皮肤病学感染的组合物。美国专利6,254,866 (Fischetti和Loomis)公开了用于治疗消化道的细菌感染的方法,其包括施用对感染细菌特异性的裂解酶。用于将至少一种裂解酶递送至消化的载体选自栓剂灌肠剂、糖浆剂或具有肠溶衣的丸剂。美国专利6,264,945 (Fischetti和Loomis)公开了用于治疗细菌感染的方法和组合物,通过胃肠外引入(肌内、皮下或静脉内)至少一种裂解酶和用于将所述裂解酶递送进患者的合适载体,所述裂解酶由对该细菌特异性的噬菌体感染的细菌产生。

[0006] 噬菌体相关裂解酶已经得到鉴别且从多种噬菌体中克隆,每种被证实可有效地杀死特定细菌菌株。美国专利7,402,309、7,638,600和公开的PCT申请W02008/018854提供了可作用于治疗或减少炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)感染的抗菌剂的独特噬菌体相关裂解酶。美国专利7,569,223描述了用于肺炎链球菌的裂解酶。在美国专利7,582,291中描述了对于肠球菌属(粪肠球菌(*E. faecalis*)和屎肠球菌(*E. faecium*),包括万古霉素抗性菌株)有用的溶素。US 2008/0221035描述了非常有效地杀死B组链球菌的突变体PlyGBS溶素。在W02010/002959中详述了具有针对葡萄球菌属细菌(包括金黄色葡萄球菌)的活性且命名为ClyS的嵌合溶素。ClyS对葡萄球菌属细菌是特异性的,且对链球菌属和其它革兰氏阳性细菌是无活性的。

[0007] 基于它们的快速的、有效的且特异性的细胞壁降解性能和杀细菌性能,已经提议溶素作为抗微生物治疗剂,通过从细胞外面攻击暴露的肽聚糖细胞壁来斗争革兰氏阳性病原体(Fenton, M等人(2010) Bioengineered Bugs 1:9-16; Nelson, D等人(2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112)。已经在咽炎(Nelson, D等人(2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112)、肺炎(Witzenrath, M等人(2009) Crit Care Med 37:642-649)、中耳炎(McCullers, J.A. 等人(2007) PLOS pathogens 3:0001-0003)、脓肿(Pastagia, M等人Antimicrobial agents and chemotherapy 55:738-744)、菌血症(Loeffler, J.M. 等人(2003) Infection and Immunity 71:6199-6204)、心内膜炎(Entenza, J.M. 等人(2005) Antimicrobial agents and chemotherapy 49:4789-4792)和脑膜炎(Grandgirard, D等人(2008) J Infect Dis 197:1519-1522)的啮齿动物模型中证实了不同溶素作为单一药剂的效力。另外,溶素通常对它们的细菌宿主物种是特异性的,并且不会裂解非靶生物体,包括对胃肠体内稳态可能有益的人共生细菌(Blaser, M. (2011) Nature 476:393-394; Willing, B.P. 等人(2011) Nature reviews. Microbiology 9:233-243)。

[0008] 微生物倾向于形成附着于表面的生物膜群落,作为在不同环境中的一个重要存活策略。生物膜由微生物细胞和多种自身产生的细胞外聚合物(包括多糖、核酸和蛋白)组成(Flemming HC等人(2007) J Bacteriol 189:7945-7947)。生物膜存在于天然和工业水生环境、组织和医学材料和装置中(Costerton JW等人(1994) J Bacteriol 176:2137-2142)。尽管大多数天然生物膜由多种细菌物种形成,生物膜可以由单一细菌菌株形成(Yang L等人(2011) Int J Oral Sci 3:74-81)。由于它们的独特生理学和物理基质屏障,

抗生素的施用经常对于生物膜群体而言是无效的。

[0009] 葡萄球菌经常形成生物膜,即被包围在细胞外基质中的固着群落,其附着于生物医学植入物或受损伤的和健康的组织。与生物膜有关的感染难以治疗,并且据估测,生物膜中的固着细菌对抗生素的抗性是它们的浮游的相应物的1,000-1,500倍。生物膜的这种抗生素抗性经常导致常规抗生素疗法的失败,且需要除去被感染的装置。已经证实溶葡萄球菌酶会杀死生物膜中的金黄色葡萄球菌,并且还在体外破坏塑料和玻璃表面上的金黄色葡萄球菌生物膜的细胞外基质(Wu, JA等人(2003) *Antimicrob Agents and Chemoth* 47 (11):3407-3414)。金黄色葡萄球菌生物膜的这种破坏是对溶葡萄球菌酶敏感的金黄色葡萄球菌特异性的,且不会影响溶葡萄球菌酶抗性的金黄色葡萄球菌的生物膜。即使在24 h以后,高浓度的苯唑西林(400 $\mu$ g/ml)、万古霉素(800 $\mu$ g/ml)和克林霉素(800 $\mu$ g/ml)对建立的金黄色葡萄球菌生物膜没有影响。溶葡萄球菌酶也会破坏表皮葡萄球菌生物膜,但是,需要更高的浓度。已经报道了噬菌体溶素用于除去葡萄球菌生物膜的应用,具有混合的结果。据报道,噬菌体溶素SAL-2会除去金黄色葡萄球菌生物膜(Son JS等人(2010) *Appl Microbiol Biotechnol* 86(5):1439-1449),而在2种类似的噬菌体溶素phi11和phi12的情况下,尽管phi11水解葡萄球菌生物膜,但是phi12是无活性的(Sass P和Bierbaum G (2007) *Appl Environ Microbiol* 73(1):347-352)。针对不同系统中的细菌生物膜的除去和消毒,已经研究了所述酶的多种组合(Johansen C等人(1997) *Appl Environ Microbiol* 63:3724-3728)。但是,该方法需要最小量的2种酶或试剂,一种酶或试剂用于除去生物膜的粘附细菌,第二种酶或试剂具有杀细菌活性。

[0010] 从与目前常规抗细菌剂相关的缺陷和问题显而易见,本领域仍需要另外的特异性细菌试剂和治疗模态以及更广谱的试剂,特别是在没有获得性抗性的风险下,用于有效力和有效率地治疗、控制和预防细菌生物膜。值得注意的是,迄今为止,尚未证实如下溶素对生物膜是有效的,所述溶素对病原性的和临床上有关的革兰氏阳性细菌的多个不同物种表现出裂解活性,是可容易地制备的和稳定的,并且不具有抗性风险或具有有限的抗性风险。因此,商业上需要新抗细菌方案,特别是经由新模态起作用或提供新方式以杀死生物膜中的病原性细菌的那些。

[0011] 本文中对参考文献的引用不应解释为其是本发明的现有技术的承认。

## 发明内容

[0012] 根据本发明,提供了用于预防、破坏和处理细菌生物膜的组合物和方法。在它的最广阔方面,本发明提供了溶素在预防、破坏和处理生物膜中的用途和应用,所述溶素对多种细菌、特别是革兰氏阳性细菌、尤其包括葡萄球菌属、链球菌属、尤其是酿脓链球菌(A组链球菌)和无乳链球菌(B组链球菌)细菌菌株具有广泛杀死活性。本发明的溶素和组合物可用于和适用于杀死肠球菌属和李斯特菌属细菌菌株及其可适用的生物膜中。本发明提供了一种利用噬菌体溶素脱离、分散和除去细菌生物膜的方法,所述噬菌体溶素能够在生物膜中有效地和有效率地杀死细菌。因此,本发明预见到细菌生物膜的处理、除去和/或净化以及一种或多种生物膜分散以后的感染预防,其中在所述生物膜中怀疑存在或存在一种或多种革兰氏阳性细菌,特别是葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属和李斯特菌属细菌中的一种或多种。

[0013] 根据本发明,在本发明的方法和应用中使用从猪链球菌细菌衍生出的噬菌体溶素。在本发明中使用的溶素多肽,特别是如在本文中和在图5 (SEQ ID NO: 1)中提供的PlySs2溶素,在表现出对多种细菌(特别是革兰氏阳性细菌,包括葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属和李斯特菌属细菌菌株)的广泛杀死活性方面是独特的。在一个这样的方面,所述PlySs2溶素能够杀死生物膜中的金黄色葡萄球菌菌株和细菌,如本文中证实的。PlySs2对抗生素抗性的细菌是有效的,所述抗生素抗性的细菌包括金黄色葡萄球菌,诸如甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素抗性的金黄色葡萄球菌(VRSA)、达托霉素抗性的金黄色葡萄球菌(DRSA)和利奈唑胺抗性的金黄色葡萄球菌(LRSA)。PlySs2对具有改变的抗生素敏感性的细菌诸如万古霉素中间体敏感的金黄色葡萄球菌(VISA)是有效的。

[0014] 在本发明的一个方面,提供了一种杀死生物膜中的革兰氏阳性细菌的方法,所述方法包括下述步骤:使所述生物膜与组合物接触,所述组合物包含有效地杀死生物膜中的革兰氏阳性细菌(包括金黄色葡萄球菌)的量的分离的溶素多肽,所述分离的溶素多肽包含PlySs2溶素多肽或其有效地杀死革兰氏阳性细菌的变体。因而,提供了一种杀死生物膜中的革兰氏阳性细菌的方法,所述方法包括下述步骤:使所述生物膜与组合物接触,所述组合物包含有效地杀死生物膜中的革兰氏阳性细菌的量的分离的溶素多肽,所述分离的溶素多肽包含在图5或SEQ ID NO: 1中提供的氨基酸序列或其与图5或SEQ ID NO: 1的多肽具有至少80%同一性、85%同一性、90%同一性、95%同一性或99%同一性且有效地杀死生物膜中的革兰氏阳性细菌的变体。

[0015] 在本发明的一个方面,提供了一种分散生物膜中的革兰氏阳性细菌从而净化和释放对抗生素敏感的细菌的方法,所述方法包括下述步骤:使所述生物膜与组合物接触,所述组合物包含有效地分散生物膜中的革兰氏阳性细菌(包括金黄色葡萄球菌)的量的分离的溶素多肽,所述分离的溶素多肽包含PlySs2溶素多肽,包括如在图5或SEQ ID NO: 1中所示的多肽或其有效地杀死革兰氏阳性细菌的变体。

[0016] 在以上方法的一个方面,在体外或从体外到体内执行所述方法,从而灭菌或净化溶液、材料或装置,特别是预期由人类使用或用在人类中的那些。

[0017] 本发明提供了一种用于减少生物膜中的革兰氏阳性细菌群体的方法,所述方法包括下述步骤:使所述生物膜与组合物接触,所述组合物包含有效地杀死或释放生物膜中的至少一部分革兰氏阳性细菌的量的分离的多肽,所述分离的多肽包含图5 (SEQ ID NO: 1)的氨基酸序列或其与图5 (SEQ ID NO: 1)的多肽具有至少80%同一性且有效地杀死革兰氏阳性细菌的变体。

[0018] 本发明进一步提供了一种用于分散或治疗抗生素抗性的金黄色葡萄球菌感染的方法,所述感染涉及或包括人中的生物膜,所述方法包括下述步骤:给具有抗生素抗性的金黄色葡萄球菌生物膜感染的人施用有效量的组合物,所述组合物包含含有图5 (SEQ ID NO: 1)的氨基酸序列的分离的多肽或其与图5 (SEQ ID NO: 1)的多肽具有至少80%同一性、85%同一性、90%同一性或95%同一性且有效地分散所述生物膜并杀死其中的金黄色葡萄球菌和/或从其中释放金黄色葡萄球菌的变体,由此减少人中的金黄色葡萄球菌的数目并控制生物膜和伴随的感染。

[0019] 本发明的一种方法还包括用于阻止、分散或处理人中的革兰氏阳性细菌生物膜的方法,所述生物膜包含葡萄球菌属或链球菌属细菌中的一种或多种,所述方法包括下述步

骤:给具有或疑似具有细菌生物膜或处于细菌生物膜风险中的对象施用有效量的组合物,所述组合物包含含有图5 (SEQ ID NO: 1)的氨基酸序列的分离的多肽或其与图5 (SEQ ID NO: 1)的多肽具有至少80%同一性、85%同一性、90%同一性或95%同一性且有效地杀死革兰氏阳性细菌的变体,由此减少人中的革兰氏阳性细菌的数目并控制生物膜污染或感染。在所述方法的一个方面,有效地阻止、分散或处理生物膜,所述生物膜包含或包括肠球菌属或李斯特菌属细菌中的一种或多种。在该方法的一个特定方面,其中所述对象暴露于以下细菌或处于以下细菌的风险中:葡萄球菌属(诸如金黄色葡萄球菌)、链球菌属(特别是A组链球菌或B组链球菌,分别诸如酿脓链球菌或无乳链球菌)细菌中的一种或者一种或多种。根据本发明的方法和组合物也可能涉及和解决、阻止、分散或处理一种替代性的细菌诸如李斯特菌属(诸如产单核细胞李斯特菌)或肠球菌属(诸如粪肠球菌)细菌。所述对象可以是人。所述对象可以是成年人、儿童、婴儿或胎儿。

[0020] 在任何这样的上述一种或多种方法中,敏感的、杀死的、分散的或处理过的生物膜细菌可以选自:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、马链球菌(*Streptococcus equi*)、马链球菌兽瘟亚种(*Streptococcus equi zoo*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*,GBS)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*,GAS)、血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)、格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、G组链球菌(Group G *Streptococcus*)、E组链球菌(Group E *Streptococcus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)。

[0021] 根据本发明的任意方法,敏感细菌或生物膜细菌可以是抗生素抗性的细菌。所述细菌可以是抗生素抗性的,包括甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素抗性的金黄色葡萄球菌(VRSA)、达托霉素抗性的金黄色葡萄球菌(DRSA)或利奈唑胺抗性的金黄色葡萄球菌(LRSA)。所述细菌可以具有改变的抗生素敏感性,诸如,例如,万古霉素中间体敏感的金黄色葡萄球菌(VISA)。所述敏感细菌可以是临床上有关的或病原性的细菌,特别是对于人类而言。在所述一个或多个方法的一个方面,所述一种或多种溶素多肽有效地杀死葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属和李斯特菌属细菌菌株。

[0022] 已经证实,用抗微生物剂涂布医学植入物可以有效地阻止葡萄球菌生物膜向所述植入物的最初粘附。用溶素涂布生物医学材料也可以证实会成功地阻止细菌(包括葡萄球菌)向所述植入物的早期粘附,由此防止生物膜形成。本发明因而也提供了通过施用或涂布本发明的溶素(包括PlySs2溶素)而减少或阻止装置、植入物、分离膜(例如,渗透蒸发膜、透析膜、反渗透膜、超滤膜和微滤膜)的表面上的生物膜生长的方法。

[0023] 根据本发明的方法和组合物可以利用替代性的有活性的和合适的一种或多种溶素,包括作为使用的一种或多种溶素和/或作为一种或多种另外的有效的和有用的溶素。在本文提供的方法和用途的另一个方面或实施方案,在本文中单独地或与本文中提供和描述的PlySs2溶素联合地使用葡萄球菌特异性的溶素ClyS。

[0024] 从参考下述示例性附图进行的下述描述的综述,本领域技术人员会明白其它目的和优点。

## 附图说明

[0025] 图1描绘了以指定的量和时间用达托霉素、万古霉素、PlySs2溶素或利奈唑胺处理至多4小时的BAA-42 MRSA的生物膜。以每种抗生素的1000X MIC加入抗生素达托霉素、万古霉素和利奈唑胺。以1X MIC加入PlySs2。处理后,用结晶紫使生物膜显影。

[0026] 图2描绘了以指定的量和时间用达托霉素、万古霉素、PlySs2溶素或利奈唑胺处理至多6小时的BAA-42 MRSA的生物膜。处理后,用结晶紫使生物膜显影。

[0027] 图3描绘了以指定的量和时间用达托霉素、万古霉素、PlySs2溶素或利奈唑胺处理至多24小时的BAA-42 MRSA的生物膜。处理后,用结晶紫使生物膜显影。

[0028] 图4描绘了用指定施用量的PlySs2溶素或达托霉素处理0.5小时、1小时、4小时和24小时的24孔皿中的BAA-42 MRSA的生物膜。处理后,用结晶紫使生物膜显影。

[0029] 图5提供了溶素PlySs2的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 和编码核酸序列 (SEQ ID NO: 2)。PlySs2溶素的N末端CHAP结构域和C末端SH-3结构域带有阴影,CHAP结构域开始于LNN...且结束于...YIT (SEQ ID NO: 3),且SH-3结构域开始于RSY...且结束于...VAT (SEQ ID NO: 4)。通过与PDB 2K3A (Rossi P等人(2009) Proteins 74:515-519)的同源性鉴别出的CHAP结构域活性部位残基(Cys<sub>26</sub>, His<sub>102</sub>, Glu<sub>118</sub>,和Asn<sub>120</sub>)带有下列线。

[0030] 图6提供了通过结晶紫染色评估的PlySs2和抗生素对MRSA生物膜的活性的24小时时程分析。以每种抗生素的1000X MIC加入抗生素达托霉素(DAP)、万古霉素(VAN)和利奈唑胺(LZD)。以1X MIC加入PlySs2。

[0031] 图7描绘了作为生物膜的指示剂保留的染料的定量,所述染料在PlySs2和抗生素对MRSA生物膜的活性的24小时时程分析中被保留。以每种抗生素的1000X MIC加入抗生素达托霉素(DAP)、万古霉素(VAN)和利奈唑胺(LZD)。以1X MIC加入PlySs2溶素。

[0032] 图8显示了通过结晶紫染色评估的亚MIC浓度的PlySs2相对于单独媒介物在MRSA生物膜上的24小时时程。以0.1X MIC和0.01X MIC水平,将PlySs2加给MRSA菌株BAA-42生物膜。

[0033] 图9A和9B描绘了针对在DEPC导管上生长的MRSA的生物膜根除研究。A:将导管生物膜用单独媒介物、1X MIC达托霉素、1000X MIC达托霉素和1X MIC PlySs2处理24小时,然后冲洗,用亚甲蓝染色,并拍摄照片。B:处理24小时以后,用裂解缓冲液处理副本导管样品以除去残余生物膜,并使用用已知浓度的细菌校准的荧光素酶试剂基于相对光单位估测细菌CFU。

[0034] 图10描绘了用缓冲液或1X MIC、0.1X MIC、0.01X MIC、0.001X MIC、0.0001X MIC和0.00001X MIC PlySs2的滴定MIC的PlySs2处理4小时以后用亚甲蓝进行的DEPC导管MRSA生物膜染色的滴定分析。

[0035] 图11描绘了用缓冲液或5000X MIC、1000X MIC、100X MIC、10X MIC和1X MIC的滴定达托霉素(DAP)处理4小时以后用亚甲蓝进行的DEPC导管MRSA生物膜染色的滴定分析。

[0036] 图12A和B显示了PlySs2对DEPC导管中的MRSA生物膜的活性的时程分析。A:将导管用1X MIC PlySs2 (32 ug/ml)处理5 min、15 min、30 min、60 min、90 min、2小时、3小时、4小时和5小时,然后冲洗,用亚甲蓝染色并拍摄照片。B:每次处理后,用裂解缓冲液处理副本导管样品以除去残余生物膜,并使用用已知浓度的细菌校准的荧光素酶试剂基于相对光单位估测细菌CFU。

[0037] 图13描绘了根据图11和12所示的研究,用指定药物浓度处理导管生物膜4小时以后,DEPC导管MRSA生物膜CFU计数的滴定分析。使用用已知浓度的细菌校准的荧光素酶试剂,基于相对光单位估测药物处理以后剩余的细菌CFU。将金黄色葡萄球菌菌株ATCC BAA-42在邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)导管的管腔上形成的生物膜用指定浓度的PlySs2或达托霉素(DAP)处理4小时。包括单独的含乳酸盐的林格氏溶液作为对照。处理后,将导管排空并洗涤,并使用基于腺苷三磷酸(ATP)释放的方法(BacTiter-Glo™微生物细胞活力测定试剂盒)测量菌落形成单位(CFU)。红线指示在5000X最小抑制浓度(MIC)的DAP和在0.01X MIC的PlySs2的浓度,其导致处理的导管中的生物膜的大致等同下降。图例:\* = 低于检测阈值。

[0038] 图14描绘了溶素ClyS对金黄色葡萄球菌生物膜的活性。将BAA-42 MRSA的生物膜用指定浓度的ClyS溶素(1X MIC 32μg/ml、0.1X MIC 3.2μg/ml、0.01X MIC 0.32μg/ml和0.001X MIC 0.032μg/ml)或单独媒介物处理24小时。将每个孔洗涤并用2%结晶紫染色。

[0039] 图15提供了通过不同施用模式用PlySs2溶素处理过的皮下导管植入物在鼠体内的生物膜研究的结果。使生物膜在导管上生长,将导管植入小鼠中,并治疗小鼠。将导管取出,用亚甲蓝染色,并通过在600nm的吸光度定量染色。针对阴性对照(没有细菌)、PlySs2对照(没有细菌假处理)、经处理的媒介物、腹膜内地(IP)施用的PlySs2、静脉内地(IV)施用的PlySs2和皮下地(SC)施用的PlySs2中的每一种,绘制在600 nm/g的导管的OD图。

[0040] 图16描绘的时程研究评价了用PlySS2溶素或达托霉素处理的MRSA导管生物膜的腔含量,并评估了随PlySs2或抗生素达托霉素处理时间变化的细菌生存力和腔灭菌。

[0041] 图17描绘了使用表皮葡萄球菌(*Staphylococcal epidermidis*)菌株CFS 313 (NRS34,一种VISE菌株)细菌生物膜的导管研究的滴定分析。在用缓冲液或10X MIC、1X MIC (8μg/ml)、0.1X MIC、0.01X MIC、0.001X MIC和0.0001X MIC PlySs2的滴定MIC的PlySs2处理4小时以后,显示了亚甲蓝的生物膜染色。

[0042] 图18描绘了BAA-42 MRSA细菌的生物膜阻止测定,将所述细菌接种在24孔板中并立即与缓冲液或1X MIC (32μg/ml)的PlySs2或记录至0.0001X MIC的稀释液组合。将平板温育6小时,用PBS洗涤,用结晶紫染色以评价生物膜产生,并拍摄照片。

[0043] 图19描绘了在用缓冲液或10X MIC、1X MIC (16μg/ml)、0.1X MIC、0.01X MIC和0.001X MIC PlySs2的滴定MIC的PlySs2处理4小时以后,使用亚甲蓝的导管MRSA菌株CFS 553 (ATCC 43300)生物膜染色的滴定分析。

[0044] 图20描绘了在用缓冲液或10X MIC、1X MIC (32μg/ml)、0.1X MIC、0.01X MIC和0.001X MIC PlySs2的滴定MIC的PlySs2处理4小时以后,使用亚甲蓝的导管MRSA菌株CFS 992 (JMI 5381)生物膜染色的滴定分析。

[0045] 图21描绘了3天龄导管金黄色葡萄球菌生物膜的扫描电子显微术(SEM),所述生物膜经过PlySs2处理、洗涤、固定和扫描。显示了0分钟、30秒和15分钟的PlySs2处理。5000X放大率。

## 具体实施方式

[0046] 根据本发明,可以使用本领域技术范围内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。这样的技术在文献中进行了充分解释。参见,例如,Sambrook等人,“Molecular

Cloning: A Laboratory Manual” (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” 第 I-III 卷 [Ausubel, R. M., 编 (1994)]; “Cell Biology: A Laboratory Handbook” 第 I-III 卷 [J. E. Celis, 编 (1994)]; “Current Protocols in Immunology” 第 I-III 卷 [Coligan, J. E., 编 (1994)]; “Oligonucleotide Synthesis” (M.J. Gait 编 1984); “Nucleic Acid Hybridization” [B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编 (1985)]; “Transcription And Translation” [B.D. Hames 和 S.J. Higgins, 编 (1984)]; “Animal Cell Culture” [R.I. Freshney, 编 (1986)]; “Immobilized Cells And Enzymes” [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, “A Practical Guide To Molecular Cloning” (1984)。

[0047] 因此,如果在本文中出现,下述术语应当具有下述的定义。

[0048] 术语“一种或多种 PlySs 溶素”、“PlySs2 溶素”、“PlySs2” 和没有具体地列出的任何变体可以在本文中互换使用,并且如在本申请和权利要求书全文中使用的,表示包括一种或多种蛋白的蛋白材料,并且延伸至具有本文描述的和在图 5 和 SEQ ID NO: 1 中呈现的氨基酸序列数据和在本文和权利要求书中阐述的活性谱的那些蛋白。因此,同样预见到显示出基本上等同的或改变的活性的蛋白。这些修饰可以是故意的,例如,诸如通过定位诱变得到的修饰,或可以是意外的,诸如通过宿主(其为复合物或它的命名亚基的生产者)中的突变得到的那些。并且,术语“一种或多种 PlySs 溶素”、“PlySs2 溶素”、“PlySs2” 意图在它们的范围内包括在本文中具体地列举的蛋白以及所有基本上同源的类似物、片段或截短体、和等位基因变异。在美国专利申请 61/477,836 和 PCT 申请 PCT/US2012/34456 中描述了 PlySs2 溶素。一篇更近的论文 Gilmer 等人描述了 PlySs2 溶素 (Gilmer DB 等人 (2013) Antimicrob Agents Chemother 2013 年 4 月 9 日电子公开 [PMID 23571534])。

[0049] 术语“ClyS”、“ClyS 溶素”表示嵌合溶素 ClyS,其对葡萄球菌属细菌(包括金黄色葡萄球菌)具有活性,详述于 WO 2010/002959 中,并且也描述于 Daniel 等人 (Daniel, A 等人 (2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54 (4):1603-1612) 中。在 SEQ ID NO: 5 中提供了这样的示例性的 ClyS 氨基酸序列。

[0050] “裂解酶”包括在合适条件下和在相关时间段内杀死一种或多种细菌的任何细菌细胞壁裂解酶。裂解酶的例子包括、但不限于多种酰胺酶细胞壁裂解酶。

[0051] “噬菌体裂解酶”表示从噬菌体中提取或分离的裂解酶,或具有维持裂解酶功能性的相似蛋白结构的合成裂解酶。

[0052] 裂解酶能够特异性地切割存在于细菌细胞的肽聚糖中的键以破坏细菌细胞壁。目前还假定,细菌细胞壁肽聚糖在大多数细菌中是高度保守的,并且仅少数键的切割可以破坏细菌细胞壁。噬菌体裂解酶可以是酰胺酶,尽管其它类型的酶是可能的。切割这些键的裂解酶的例子是胞壁质酶、氨基葡萄糖苷酶、内肽酶或 N-乙酰基-胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶。Fischetti 等人 (1974) 报道称,C1 链球菌的噬菌体溶素酶是酰胺酶。Garcia 等人 (1987, 1990) 报道称,来自 Cp-1 噬菌体的肺炎链球菌的 Cpl 溶素是溶菌酶。Caldentey 和 Bamford (1992) 报道称,来自 phi 6 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 噬菌体的裂解酶是内肽酶,其分裂由 melo- diaminopemilic acid 和 D-丙氨酸形成的肽桥。大肠杆菌 T1 和 T6 噬菌体裂解酶是酰胺酶,与来自李斯特菌属噬菌体的裂解酶 (ply) (Loessner 等人, 1996) 一样。还存在本领域已知的能够切割细菌细胞壁的其他裂解酶。

[0053] “由噬菌体遗传编码的裂解酶”包括能够杀死宿主细菌的多肽,例如通过具有针对

宿主细菌的至少一些细胞壁裂解活性。所述多肽可以具有包含天然序列裂解酶的序列及其变体。所述多肽可以分离自多种来源例如细菌噬菌体(“噬菌体”),或通过重组或合成方法来制备。所述多肽可以包含在羧基端侧上的胆碱结合部分,并且可以通过在氨基端侧上能够切割细胞壁肽聚糖的酶活性(例如作用于肽聚糖中的酰胺键的酰胺酶活性)来表征。已经描述了包括多重酶活性(例如两个酶促结构域)的裂解酶,诸如PlyGBS溶素。

[0054] “天然序列噬菌体相关裂解酶”包括具有与衍生自细菌的酶相同的氨基酸序列的多肽。这样的天然序列酶可以是分离的,或可以通过重组或合成方法来制备。

[0055] 术语“天然序列酶”包括天然存在的酶形式(例如交替剪接的或改变的形式)和天然存在的酶变体。在本发明的一个实施方案中,天然序列酶是成熟或全长多肽,其通过来自对于猪链球菌特异性的噬菌体的基因遗传编码。当然,许多变体是可能和已知的,如例如在以下出版物中公认的:Lopez等人, Microbial Drug Resistance 3: 199-211 (1997); Garcia等人, Gene 86: 81-88 (1990); Garcia等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918 (1988); Garcia等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918 (1988); Garcia等人, Streptococcal Genetics (J. J. Ferretti和Curtis编, 1987); Lopez等人, FEMS Microbiol. Lett. 100: 439-448 (1992); Romero等人, J. Bacteriol. 172: 5064-5070 (1990); Ronda等人, Eur. J. Biochem. 164: 621-624 (1987)和Sanchez等人, Gene 61: 13-19 (1987)。这些参考文献各自的内容,特别是序列表和比较序列的相关文本,包括关于序列同源性的陈述,明确地通过引用整体并入。

[0056] “变体序列裂解酶”包括用多肽序列表征的裂解酶,所述多肽序列不同于裂解酶的多肽序列,但保留功能活性。在某些实施方案中,裂解酶可以由对猪链球菌特异性的噬菌体遗传编码,如在与本文的一种或多种裂解酶序列具有特定氨基酸序列同一性的PlySs2的情况下,所述裂解酶序列如在图5和SEQ ID NO: 1中所提供的。例如,在某些实施方案中,功能活性裂解酶可以通过破坏细菌的细胞壁而杀死猪链球菌细菌,和如本文提供的其它敏感细菌,包括如在表1、2和3中所示的。活性裂解酶可以与本文的一种或多种裂解酶序列具有60、65、70、75、80、85、90、95、97、98、99或99.5%氨基酸序列同一性,所述裂解酶序列如图5和SEQ ID NO: 1提供的。这样的噬菌体相关裂解酶变体包括例如这样的裂解酶多肽,其中一个或多个氨基酸残基在本文的一种或多种裂解酶序列的序列的N或C末端处添加或缺失,所述裂解酶序列如图5和SEQ ID NO: 1提供的。

[0057] 在一个特定方面,噬菌体相关裂解酶将与天然噬菌体相关裂解酶序列具有至少约80%或85%氨基酸序列同一性,特别是至少约90%(例如90%)氨基酸序列同一性。最特别地,噬菌体相关裂解酶变体将与本文的天然噬菌体相关一种或多种裂解酶序列具有至少约95%(例如95%)氨基酸序列同一性,所述裂解酶序列如图5和SEQ ID NO: 1关于PlySs2溶素提供的,或如以前关于ClyS所述的(包括在W0 2010/002959中),以及描述在Daniel等人(Daniel, A等人(2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54(4):1603-1612)中。

[0058] 就鉴别的噬菌体相关裂解酶序列而言的“氨基酸序列同一性百分比”在本文中定义为:在比对相同读码框中的序列并在需要时引入缺口以达到最大序列同一性百分比后,并且不将任何保守置换视为序列同一性的部分,在候选序列中与噬菌体相关裂解酶序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。

[0059] 就本文鉴别的噬菌体相关裂解酶序列而言的“核酸序列同一性百分比”在本文中

定义为：在比对序列和在需要时引入缺口以达到最大序列同一性百分比后，在候选序列中与噬菌体相关裂解酶序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分比。

[0060] 为了确定两个核苷酸或氨基酸序列的同一性百分比，就最佳比较目的而比对序列（例如可以在第一个核苷酸序列的序列中引入缺口）。随后比较在相应核苷酸或氨基酸位置处的核苷酸或氨基酸。当第一个序列中的位置被与第二个序列中的相应位置相同的核苷酸或氨基酸占据时，则所述分子在该位置处是相同的。在两个序列之间的同一性百分比是由所述序列共有的相同位置的数目的函数（即%同一性=（相同位置的数目/位置总数）×100）。

[0061] 两个序列之间的同一性百分比的测定可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的非限制性例子是Karlin等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993)的算法，其并入在NBLAST程序内，所述NBLAST程序可以用于鉴别与本发明的核苷酸序列具有所需同一性的序列。为了获得用于比较目的的有缺口的比对，可以如Altschul等人，Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997)中所述利用Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时，可以使用各个程序（例如NBLAST）的缺省参数。参见由国家生物技术信息中心、国立医学图书馆、国立卫生研究院提供的程序。

[0062] “多肽”包括包含以线性方式连接的多个氨基酸的聚合物分子。在某些实施方案中，多肽可以对应于由天然存在的多核苷酸序列编码的分子。多肽可以包括保守置换，其中将天然存在的氨基酸替换为具有相似性质的氨基酸，其中这样的保守置换不改变多肽的功能。

[0063] 术语“改变的裂解酶”包括改组的和/或嵌合的裂解酶。

[0064] 已经发现，对被特定噬菌体感染的细菌具有特异性的噬菌体裂解酶会有效力地且有效率地分解所讨论的细菌的细胞壁。认为裂解酶缺乏蛋白水解酶活性，并且因此当在细菌细胞壁的消化期间存在时，对哺乳动物蛋白和组织是非破坏性的。此外，因为已发现噬菌体裂解酶的作用，不同于抗生素，对一种或多种靶病原体是相当特异性的，所以正常菌群可能保持基本上完整（M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41. (1995), 通过引用并入本文）。实际上，PlySs2溶素尽管表现出特别宽的细菌物种和菌株杀死，但是对构成正常菌群的细菌（包括大肠杆菌）是相当地和特别地无活性的，如本文中所述的。

[0065] 在本发明中使用的裂解酶或多肽可以由被特定噬菌体感染后的细菌生物体产生，或可以重组地或合成地生产或制备，作为用于防止已暴露于具有感染症状的其他人的那些人生病的预防性处理，或作为用于已经由于感染而生病的那些人的治疗性处理。既然在本文中描述并参考了溶素多肽序列和编码溶素多肽的核酸，就可以优选地经由来自噬菌体基因组的关于裂解酶的分离基因来生产一种或多种裂解酶/多肽：使用本领域的标准方法，包括如本文例示的方法，将该基因置于转移载体内，并且将所述转移载体克隆进表达系统中。一种或多种裂解酶或多肽可以是截短的、嵌合的、改组的或“天然的”，并且可以是组合的。有关的美国专利号5,604,109通过引用整体并入本文中。“改变的”裂解酶可以以许多方式产生。在一个优选的实施方案中，将来自噬菌体基因组的关于改变裂解酶的基因置于转移或可移动载体（优选质粒）中，并且将所述质粒克隆进表达载体或表达系统中。用于生产本发明的溶素多肽或酶的表达载体可以适合于大肠杆菌、芽孢杆菌属或许多其它合适的细菌。载体系统还可以是无细胞表达系统。表达一个基因或一组基因的所有这些方法是本领

域已知的。也可以通过用对猪链球菌特异性的噬菌体感染猪链球菌来制备裂解酶,其中所述至少一种裂解酶专一性地裂解所述猪链球菌的细胞壁,最多对存在的其它细菌(例如天然或共生细菌菌群)具有最小作用(参见表5,该表提供了针对不同共生人肠道细菌的裂解活性研究的结果)。

[0066] “嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含与异源多肽可操作地连接的在本发明中使用的多肽的全部或(优选生物学上有活性的)部分。例如通过组合具有两个或更多个活性部位的两种或更多种蛋白而产生嵌合蛋白或肽。嵌合蛋白和肽可以独立地作用于相同或不同分子,并且因此具有同时治疗两种或更多种不同细菌感染的潜力。嵌合蛋白和肽也可以如下用于治疗细菌感染:在超过一个位置切割细胞壁,从而潜在提供来自单个溶素分子或嵌合肽的更快速或有效(或协同)杀死。

[0067] DNA构建体或肽构建体的“异源”区是在较大的DNA分子内可鉴别的DNA区段或在较大的肽分子内的肽,其在自然界中未发现与所述较大的分子结合。因此,当异源区编码哺乳动物基因时,该基因通常侧接在来源生物体的基因组中不侧接哺乳动物基因组DNA的DNA。异源编码序列的另一个例子是这样的构建体:其中编码序列自身在自然界中未发现(例如其中基因组编码序列含有内含子的cDNA,或具有不同于天然基因的密码子的合成序列)。等位基因变异或天然存在的突变事件不产生如本文定义的DNA或肽的异源区。

[0068] 术语“可操作地连接的”意指本公开内容的多肽,并且在框内融合异源多肽。异源多肽可以融合至本公开内容的多肽的N末端或C末端。通过化学合成酶促地产生或通过重组DNA技术产生嵌合蛋白。已经生产并研究了许多嵌合裂解酶。有用的融合蛋白的一个例子是GST融合蛋白,其中本公开内容的多肽融合至GST序列的C末端。这样的嵌合蛋白可以促进本公开内容的重组多肽的纯化。

[0069] 在另一个实施方案中,所述嵌合蛋白或肽含有在其N末端处的异源信号序列。例如,可以除去本公开内容的多肽的天然信号序列,并用来自另一种已知蛋白的信号序列替换。

[0070] 融合蛋白可以组合溶素多肽与具有不同能力或给所述溶素多肽提供另外能力或附加特征的蛋白或多肽。融合蛋白可以是免疫球蛋白融合蛋白,其中本公开内容的多肽的全部或部分融合至衍生自免疫球蛋白蛋白家族成员的序列。免疫球蛋白可以是抗体,例如针对敏感或靶细菌的表面蛋白或表位的抗体。免疫球蛋白融合蛋白可以改变本公开内容多肽的同源配体的生物利用度。配体/受体相互作用的抑制可以是治疗上有用的,用于治疗细菌相关的疾病和障碍,用于调节(即,促进或抑制)细胞存活。融合蛋白可以包括指导或靶向溶素,包括指导或靶向至特定组织或器官或表面的手段,诸如装置、塑料、膜。本公开内容的嵌合和融合蛋白和肽可以通过标准重组DNA技术产生。

[0071] 如本文公开的,修饰或改变形式的蛋白或肽和肽片段包括通过化学合成或通过重组DNA技术或二者制备的蛋白或肽和肽片段。这些技术包括例如嵌合和改组。如本文使用的,关于超过一种相关噬菌体蛋白或蛋白肽片段的改组蛋白或肽、基因产物或肽已经被随机切割且再装配成更有活性或特异性的蛋白。选择或筛选改组的寡核苷酸、肽或肽片段分子,以鉴别具有所需功能性质的分子。改组可以用于制备比模板蛋白更有活性(例如最高达10-100倍更多活性)的蛋白。模板蛋白选自溶素蛋白的不同变种。改组的蛋白或肽构成例如一个或多个结合结构域和一个或多个催化结构域。当通过化学合成产生蛋白或肽时,它优

选地基本上不含有化学前体或其它化学物质,即它与在蛋白合成中涉及的化学前体或其它化学物质分离。相应地,这样的蛋白制剂具有小于约30%、20%、10%、5%(按干重计)的除目的多肽以外的化学前体或化合物。

[0072] 本发明还涉及在本发明中有用的多肽的其它变体。这样的变体可以具有改变的氨基酸序列,其可以充当激动剂(模拟物)或拮抗剂。变体可以通过诱变(即不连续点突变或截短)而生成。激动剂可以保留天然存在的蛋白形式的基本上相同的生物活性或生物活性子集。通过例如竞争性地结合包括目标蛋白的细胞信号传递级联的下游或上游成员,蛋白的拮抗剂可以抑制天然存在的蛋白形式的一种或多种活性。因此,通过用具有有限功能的变体处理,可以引起特异性生物效应。相对于用天然存在的蛋白形式的治疗,用具有天然存在的蛋白形式的生物活性子集的变体治疗对象可以在对象中具有更少的副作用。通过筛选本公开内容的蛋白的突变体(诸如截短突变体)的组合文库,可以鉴别充当激动剂(模拟物)或拮抗剂的在本公开内容中使用的蛋白变体。在一个实施方案中,多样化变体文库通过在核酸水平上的组合诱变生成,并且由多样化基因文库编码。存在可以用于从简并寡核苷酸序列产生本公开内容的多肽的潜在变体文库的多种方法。本公开内容的多肽的编码序列的片段文库可以用于生成多样化多肽群体,用于变体、活性片段或截短物的筛选和后续选择。用于筛选通过点突变或截短制备的组合文库的基因产物,并且在cDNA文库中筛选具有所选性质的基因产物的几种技术是本领域已知的。用于筛选大型基因文库的顺应高通量分析的最广泛使用的技术通常包括:将基因文库克隆到可复制的表达载体内,用所得到的载体文库转化合适细胞,并且在其中所需活性的检测会促进编码被检测产物的基因的载体分离的条件下表达组合基因。在该背景下,根据实施方案的蛋白(或编码蛋白的核酸)的最小部分是可识别为对于制备溶素蛋白的噬菌体特异性的表位。因此,可以预期结合靶标或受体(例如抗体)并且对于一些实施方案而言有用的最小多肽(和编码所述多肽的相关核酸),可以具有8、9、10、11、12、13、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、85或100个氨基酸的长度。尽管短至8、9、10、11、12或15个氨基酸长度的小序列可靠地包含足够的结构以充当靶标或表位,但是5、6或7个氨基酸长度的更短序列可以在一些条件下显示出靶标或表位结构,并且在一个实施方案中具有价值。因此,本文提供的一种或多种蛋白或溶素多肽(包括如图5和SEQ ID NO:1和SEQ ID NO: 3和4的结构域序列所示)的最小部分,包括少至5、6、7、8、9、10、12、14或16个氨基酸长度的多肽。

[0073] 如本文描述的实施方案的蛋白或肽片段的生物活性部分包括这样的多肽:其包含足够等同于或衍生自本公开内容的溶素蛋白的氨基酸序列的氨基酸序列,其包括比溶素蛋白的全长蛋白更少的氨基酸,并且显示出相应全长蛋白的至少一种活性。通常,生物活性部分包含具有相应蛋白的至少一种活性的结构域或基序。本公开内容的蛋白或蛋白片段的生物活性部分可以是这样的多肽:其长度少了或多了例如10、25、50、100个氨基酸。此外,通过重组技术可以制备其它生物活性部分,其中蛋白的其它区域被缺失或添加,并且就实施方案多肽的天然形式的一种或多种功能活性进行评价。

[0074] 可以制备同源蛋白和核酸,其与这样的小蛋白和/或核酸(或较大分子的蛋白和/或核酸区域)共享功能性,如技术人员会理解的。可以特别同源的这样的小分子和较大分子的短区域预期作为实施方案。优选地,与本文提供(包括如图5和SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3和4的结构域序列中所示)的溶素多肽相比较,这样的有价值区域的同源性是至少

50%、65%、75%、80%、85%，并且优选至少90%、95%、97%、98%或至少99%。这些同源性百分比值不包括由保守氨基酸置换引起的改变。

[0075] 当至少约70%的氨基酸残基(优选至少约80%、至少约85%且优选至少约90或95%)是相同的或代表保守置换时，两个氨基酸序列是“基本上同源的”。当溶素多肽的一个或多个或几个或至多10%、或至多15%、或至多20%的氨基酸被相似或保守氨基酸置换进行置换时，可比较的溶素(诸如可比较的PlySs2溶素、或可比较的PlySs1溶素)的序列是基本上同源的，并且其中可比较的溶素具有本文公开的溶素(诸如PlySs2溶素和/或ClyS溶素)的活性谱、抗细菌效应和/或细菌特异性。

[0076] 本文描述的氨基酸残基优选呈“L”异构形式。但是，呈“D”异构形式的残基可以置换任何L-氨基酸残基，只要所需免疫球蛋白结合的功能性质被该多肽保留即可。NH<sub>2</sub>表示在多肽的氨基端处存在的游离氨基。COOH表示在多肽的羧基端处存在的游离羧基。与标准多肽命名法J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969)保持一致，氨基酸残基的缩写显示于下述对应表中：

符号		对应表
1-字母	3-字母	氨基酸
Y	Tyr	酪氨酸
G	Gly	甘氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
M	Met	甲硫氨酸
A	Ala	丙氨酸
S	Ser	丝氨酸
I	Ile	异亮氨酸
L	Leu	亮氨酸
[0077] T	Thr	苏氨酸
V	Val	缬氨酸
P	Pro	脯氨酸
K	Lys	赖氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
E	Glu	谷氨酸
W	Trp	色氨酸
R	Arg	精氨酸
D	Asp	天冬氨酸
N	Asn	天冬酰胺
C	Cys	半胱氨酸

[0078] 突变可以在氨基酸序列或编码本文的多肽和溶素的核酸序列中作出，所述序列包括在图5和SEQ ID NO: 1中或在SEQ ID NO: 3或4的结构域序列中所示的溶素序列，或其活性片段或截短物，使得特定密码子变成编码不同氨基酸的密码子，氨基酸置换另一种氨基酸，或一个或多个氨基酸被缺失。这样的突变通常通过尽可能地使得最少的氨基酸或核苷酸变化而进行制备。可以作出这类置换突变，以非保守方式(例如通过将来自属于具有特定大小或特征的氨基酸分组的氨基酸的密码子变成属于另一个分组的氨基酸)或保守方式(例如通过将来自属于具有特定大小或特征的氨基酸分组的氨基酸的密码子变成属于相同分组的氨基酸)改变所得到的蛋白中的氨基酸。这样的保守变化通常导致所得到的蛋白的结构和功能的更少变化。非保守变化更可能改变所得到的蛋白的结构、活性或功能。本发明

应视为包括含有保守变化的序列,其不显著改变所得到的蛋白的活性或结合特征。

[0079] 下述是氨基酸的不同分组的一个例子:

[0080] 具有非极性R基团的氨基酸

[0081] 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸

[0082] 具有不带电荷的极性R基团的氨基酸

[0083] 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺

[0084] 具有带电荷的极性R基团的氨基酸 (在pH6.0带负电荷)

[0085] 天冬氨酸、谷氨酸

[0086] 碱性氨基酸 (在pH6.0带正电荷)

[0087] 赖氨酸、精氨酸、组氨酸 (在pH 6.0)。

[0088] 另一个分组可以是具有苯基的那些氨基酸:

[0089] 苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸。

[0090] 另一个分组可以根据分子量 (即,R基团的大小):

[0091]	甘氨酸	75	丙氨酸	89
[0092]	丝氨酸	105	脯氨酸	115
[0093]	缬氨酸	117	苏氨酸	119
[0094]	半胱氨酸	121	亮氨酸	131
[0095]	异亮氨酸	131	天冬酰胺	132
[0096]	天冬氨酸	133	谷氨酰胺	146
[0097]	赖氨酸	146	谷氨酸	147
[0098]	甲硫氨酸	149	组氨酸 (在pH 6.0)	155
[0099]	苯丙氨酸	165	精氨酸	174
[0100]	酪氨酸	181	色氨酸	204

[0101] 特别优选的置换是:

[0102] -Lys置换Arg,反之亦然,使得正电荷可以得到维持;

[0103] -Glu置换Asp,反之亦然,使得负电荷可以得到维持;

[0104] -Ser置换Thr,使得游离-OH可以得到维持;和

[0105] -Gln置换Asn,使得游离NH<sub>2</sub>可以得到维持。

[0106] 示例性的和优选的保守氨基酸置换包括下述中的任一种:

[0107] 谷氨酰胺 (Q) 置换谷氨酸 (E), 反之亦然; 亮氨酸 (L) 置换缬氨酸 (V), 反之亦然; 丝氨酸 (S) 置换苏氨酸 (T), 反之亦然; 异亮氨酸 (I) 置换缬氨酸 (V), 反之亦然; 赖氨酸 (K) 置换谷氨酰胺 (Q), 反之亦然; 异亮氨酸 (I) 置换甲硫氨酸 (M), 反之亦然; 丝氨酸 (S) 置换天冬酰胺 (N), 反之亦然; 亮氨酸 (L) 置换甲硫氨酸 (M), 反之亦然; 赖氨酸 (L) 置换谷氨酸 (E), 反之亦然; 丙氨酸 (A) 置换丝氨酸 (S), 反之亦然; 酪氨酸 (Y) 置换苯丙氨酸 (F), 反之亦然; 谷氨酸 (E) 置换天冬氨酸 (D), 反之亦然; 亮氨酸 (L) 置换异亮氨酸 (I), 反之亦然; 赖氨酸 (K) 置换精氨酸 (R), 反之亦然。

[0108] 也可以引入氨基酸置换以置换具有特别优选的性质的氨基酸。例如, 可以将Cys引入与另一个Cys形成二硫键的潜在位点。可以引入His作为特别的“催化”位点 (即, His可以充当酸或碱, 并且是生化催化中的最常见的氨基酸)。可以由于其特定平面结构而引入Pro,

其在蛋白的结构中诱导 $\beta$ 转角。

[0109] 因此,本领域技术人员基于本文提供的PlySs2溶素多肽的序列的综述以及关于其它溶素多肽可获得的知识 and 公开信息,可以在溶素多肽序列中作出氨基酸变化或置换。可以作出氨基酸变化以替换或置换本文提供的一种或多种溶素的序列中的一个或多个、一个或几个、一个或若干、一个到五个、一个到十个、或这样的其它数目的氨基酸,以生成其突变体或变体。这样的其突变体或变体可以预测功能或试验杀死细菌(包括葡萄球菌、链球菌、李斯特菌属或肠球菌细菌)的功能或能力,和/或具有与本文所述且具体地提供的一种或多种溶素可比较的活性。因此,对溶素的序列作出变化,并且使用在本文中(包括在实施例)描述和例证的测定和方法,可以试验在序列中具有变化的突变体或变体。基于本文的一种或多种溶素的结构域结构,本领域技术人员可以预测适合于置换或替换的一个或多个、一个或若干个氨基酸,和/或不适合于置换或替换的一个或多个氨基酸,包括合理的保守或非保守置换。

[0110] 在这点上,并且示例性参考PlySs2溶素,需指出,尽管PlySs2多肽溶素代表不同类别的原噬菌体裂解酶,但是该溶素包含如图5所示的N末端CHAP结构域(半胱氨酸-组氨酸酰氨基水解酶/肽酶)(SEQ ID NO: 3)和C末端SH3-型5结构域(SEQ ID NO: 4)。所述结构域在氨基酸序列中以独特的带阴影的彩色区域描述,其中CHAP结构域对应于以LNN...开始的第一个带阴影的氨基酸序列区域,并且SH3-5型结构域对应于以RSY...开始的第二个带阴影的区域。CHAP结构域被包括在几个先前表征的链球菌和葡萄球菌噬菌体溶素中。因此,本领域技术人员可以合理地制备且试验对PlySs2的CHAP结构域和/或SH-3结构域的置换或替换。可以用CHAP和/或SH-3结构域序列中的任一个或两个或用PlySs2溶素完整氨基酸序列进行与Genbank数据库的序列比较,例如以鉴别用于置换的氨基酸。

[0111] PlySs2溶素表现出杀死革兰氏阳性细菌的众多不同菌株和物种(包括葡萄球菌、链球菌、李斯特菌或肠球菌细菌)的活性和能力。具体地且重要的是,PlySs2具有杀死葡萄球菌属菌株(包括金黄色葡萄球菌,特别是抗生素敏感菌株和不同的抗生素抗性菌株)的活性。PlySs2也具有杀死链球菌属菌株的活性,并被证实特别有效地杀死A组和B组链球菌菌株。在下面表1中描绘了PlySs2溶素对细菌的能力,其基于使用体外分离的菌株的对数杀死评估。在下面的表2和3中列出了PlySs2对不同革兰氏阳性生物和革兰氏阴性生物以及对抗生素抗性的金黄色葡萄球菌菌株的活性。指出了PlySs2对所述细菌的MIC范围,以提供相对杀死活性。

[0112] 表1

[0113] PlySs2对不同细菌生长的减少(部分列表)

[0114] 细菌	使用PlySs2的相对杀死
[0115] 金黄色葡萄球菌	+++
[0116] (VRSA、VISA、MRSA、MSSA)	
[0117] 猪链球菌	+++
[0118] 表皮葡萄球菌	++
[0119] 模仿葡萄球菌	+++
[0120] 单核细胞增生李斯特菌	++
[0121] 粪肠球菌	++

[0122]	停乳链球菌- <i>GBS</i>	++
[0123]	无乳链球菌- <i>GBS</i>	+++
[0124]	酿脓链球菌- <i>GAS</i>	+++
[0125]	马链球菌	++
[0126]	血链球菌	++
[0127]	格氏链球菌	++
[0128]	龋齿链球菌	+
[0129]	鼠链球菌	+
[0130]	口腔链球菌	+
[0131]	肺炎链球菌	+
[0132]	苏云金芽孢杆菌	-
[0133]	蜡状芽孢杆菌	-
[0134]	枯草芽孢杆菌	-
[0135]	炭疽芽孢杆菌	-
[0136]	大肠杆菌	-
[0137]	屎肠球菌	-
[0138]	铜绿假单胞菌	-
[0139]	表2	
[0140]	<u>敏感的和敏感的细菌菌株</u>	

[0141]

生物和易感性子集 (试验的数目)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	50%	90%	范围
金黄色葡萄球菌			
甲氧西林敏感的(103)	4	8	1-16
甲氧西林抗性的(120)	4	8	1-16
A组酿脓链球菌(54)	2	8	0.5-8
B组无乳链球菌(51)	8	16	1-64
其它革兰氏阳性生物			
路邓葡萄球菌(10)	8	8	8
表皮葡萄球菌(11)	128	512	4-512
肺炎链球菌(26)	16	64	1-64
变异链球菌(12)	64	256	2-256
单核细胞增生李斯特菌(12)	128	512	1-512
粪肠球菌(17)	>512	>512	32->512
屎肠球菌(5)	>512	>512	32->512
蜡状芽孢杆菌(10)	>512	>512	>512
革兰氏阴性生物			
鲍氏不动杆菌(8)	>512	>512	>512
大肠杆菌(6)	>512	>512	>512
铜绿假单胞菌(5)	>512	>512	>512

[0142] 表3

[0143] PlySs2对抗生素抗性的金黄色葡萄球菌的活性

[0144]

易感性子集(试验的数目)	MIC (mg/mL)		
	50%	90%	范围
万古霉素抗性的(14)	2	4	1-4
万古霉素中间体(31)	8	32	1-64
利奈唑胺抗性的(5)	2	2	2-4
达托霉素抗性的(8)	2	4	2-4

[0145] 呈其多种语法形式的短语“单克隆抗体”表示仅具有能够与特定抗原免疫反应的一类抗体结合位点的抗体。单克隆抗体因此通常表现出对于它与之免疫反应的任何抗原的单一结合亲和力。因此，单克隆抗体可以含有具有多个抗体结合位点的抗体分子，每个抗体结合位点对于不同抗原是免疫特异性的；例如，双特异性的(嵌合的)单克隆抗体。

[0146] 术语“特异性的”可以用于表示这样的情况：其中特异性结合对的一个成员不显示与除其特异性的一个或多个结合配偶体以外的分子的显著结合。该术语也适用于例如抗原结合结构域对于由许多抗原携带的特定表位具有特异性的情况，在所述情况下，携带抗原结合结构域的特异性结合成员将能够与携带所述表位的不同抗原结合。

[0147] 术语“包含”通常以包括的含义使用,即允许一个或多个特征或组分的存在。

[0148] 术语“基本上由……组成”表示具有限定数目的残基的产物,特别是肽序列,其不共价连接至较大产物。在本文的本发明肽的情况下,本领域技术人员会明白,但是可以预见到对肽的N或C末端的微小修饰,诸如末端的化学修饰以添加保护基等,例如C末端的酰胺化。

[0149] 术语“分离的”表示这样的状态:其中本发明的一种或多种溶素多肽或编码这样的多肽的核酸将是根据本发明。多肽和核酸将不含或基本上不含它们与之天然结合的材料,诸如它们在其天然环境中或当这样的制备是通过在体外或体内实施的重组DNA技术时在其中制备它们的环境(例如细胞培养物)中与其一起发现的其它多肽或核酸。多肽和核酸可以用稀释剂或佐剂一起配制,并且仍然为了实用目的而是分离的-例如所述多肽通常将与聚合物或粘膜粘着剂或其它载体混合,或当在诊断或疗法中使用,将与药学上可接受的载体或稀释剂混合。

[0150] 在本文中提供了能够编码在本发明中有益且适用的一种或多种猪链球菌PlySs2溶素多肽的核酸。在该背景下的代表性核酸序列是编码图5或SEQ ID NO: 1的多肽的多核苷酸序列,特别是能够编码SEQ ID NO: 1的多肽的SEQ ID NO: 2的多核苷酸序列,和在严谨条件下与SEQ ID NO: 2的DNA和/或一种或多种图5序列的互补序列杂交的序列。也预见到将这些序列和与附图中所示那些杂交的核酸序列的其它变体用于制备根据本公开内容的裂解酶,包括可以获得的天然变体。编码噬菌体相关裂解酶的多种分离的核酸序列或cDNA序列以及与这样的基因序列杂交的部分序列可用于本发明的一种或多种溶素酶或一种或多种多肽的重组生产。

[0151] “复制子”是充当体内DNA复制的自主单位的任何遗传元件(例如质粒、染色体、病毒);即能够在其自身控制下复制。

[0152] “载体”是复制子,诸如质粒、噬菌体或粘粒,另一种DNA区段可以与之连接,从而实现所连接区段的复制。

[0153] “DNA分子”表示呈其单链形式或双链螺旋的脱氧核糖核苷酸(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶)的聚合形式。该术语仅指分子的一级和二级结构,并且不将其限于任何特定三级形式。因此,该术语包括尤其在线性DNA分子(例如限制性片段)、病毒、质粒和染色体中发现的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构中,可以根据标准惯例在本文中描述序列,仅考虑沿着DNA的非转录链(即,具有与mRNA同源的序列的链)在5'至3'方向的序列。

[0154] “复制起点”表示参与DNA合成的那些DNA序列。

[0155] DNA“编码序列”是双链DNA序列,当置于合适调节序列的控制下时,其在体内转录且翻译成多肽。编码序列的边界由在5'(氨基)末端的起始密码子和在3'(羧基)末端的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括、但不限于原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列、和甚至合成的DNA序列。多腺苷酸化信号和转录终止序列通常位于编码序列的3'。

[0156] 转录和翻译控制序列是DNA调节序列,诸如启动子、增强子、多腺苷酸化信号、终止子等,其提供编码序列在宿主细胞中的表达。

[0157] “启动子序列”是能够结合细胞中的RNA聚合酶且起始下游(3'方向)编码序列的转录的DNA调节区。为了限定本发明的目的,启动子序列在其3'末端处由转录起始位点结合,

且向上游(5'方向)延伸以包括在背景以上可检测的水平起始转录所需的最小数目的碱基或元件。在启动子序列内将发现转录起始位点(方便地通过用核酸酶S1作图来限定),以及负责RNA聚合酶结合的蛋白结合结构域(共有序列)。真核启动子通常但不总是含有“TATA”框和“CAT”框。原核启动子除了含有-10和-35共有序列以外,还含有Shine-Dalgarno序列。

[0158] “表达控制序列”是控制和调节另一个DNA序列的转录和翻译的DNA序列。当RNA聚合酶将编码序列转录成mRNA、所述mRNA随后翻译成由所述编码序列编码的蛋白时,编码序列在细胞中处于转录和翻译控制序列的控制下。

[0159] 可以在编码序列之前包括“信号序列”。该序列编码在多肽的N末端的信号肽,其与宿主细胞通讯,以将多肽导向细胞表面或将多肽分泌到培养基中,并且该信号肽在蛋白离开细胞之前被宿主细胞切掉。可以发现信号序列与原核生物和真核生物的多种天然蛋白结合。

[0160] 本文中在提及本发明的探针时使用的术语“寡核苷酸”被定义为包含两个或更多个、优选超过三个核糖核苷酸的分子。它的确切大小将取决于许多因素,所述因素又取决于寡核苷酸的最终功能和用途。

[0161] 本文中使用的术语“限制性内切核酸酶”和“限制性酶”表示细菌酶,其各自在特定核苷酸序列处或附近切割双链DNA。

[0162] 当已经将外源或异源DNA引入细胞内时,细胞已经被所述外源或异源DNA“转化”。转化DNA可以整合或不整合(共价连接)到构成细胞基因组的染色体DNA内。在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,例如,转化DNA可以维持在附加型元件例如质粒上。就真核细胞而言,稳定转化的细胞是这样的细胞:其中转化DNA已经变成整合到染色体内,使得所述转化DNA通过染色体复制由子代细胞继承。该稳定性通过真核细胞建立包含含有转化DNA的子代细胞群体的细胞系或克隆的能力得到证实。“克隆”是通过有丝分裂从单个细胞或共同祖先衍生出的细胞群体。“细胞系”是能够在体外稳定生长多代的原代细胞克隆。

[0163] 当至少约75%(优选至少约80%,且最优选至少约90或95%)的核苷酸在确定长度的DNA序列上匹配时,两个DNA序列是“基本上同源的”。可以如下鉴别基本上同源的序列:使用在序列数据库中可获得的标准软件比较序列,或在DNA杂交实验中在例如如为该特定系统限定的严谨条件下。限定合适的杂交条件是在本领域的技术内。参见,例如,Maniatis等人,出处同上; DNA Cloning, 第I和II卷, 出处同上; Nucleic Acid Hybridization, 出处同上。

[0164] 本公开内容预见到这样的DNA分子和核苷酸序列:其为本文具体公开那些的衍生物,并且其通过核苷酸的缺失、添加或置换而不同于公开的那些,同时仍然编码具有一种或多种溶素多肽的功能特征的蛋白。还包括衍生自公开的DNA分子的小DNA分子。这样的小DNA分子包括适合用作杂交探针或聚合酶链式反应(PCR)引物的寡核苷酸。这样,这些小DNA分子将至少包含由猪链球菌的噬菌体遗传编码的裂解酶的区段,并且为了PCR的目的,将至少包含基因的10-15个核苷酸的序列,并且更优选15-30个核苷酸的序列。衍生自如上所述公开的DNA分子的DNA分子和核苷酸序列也可以定义为在严谨条件下与公开的DNA序列或其片段杂交的DNA序列。

[0165] 在本公开内容的优选实施方案中,严谨条件可以定义为这样的条件:在该条件下,具有超过25%序列变异(也称为“错配”)的DNA分子将不杂交。在一个更优选的实施方案中,

严谨条件是在该条件下具有超过15%错配的DNA分子将不杂交的条件,并且更加优选地,严谨条件是在该条件下具有超过10%错配的DNA序列将不杂交的条件。优选地,严谨条件是在该条件下具有超过6%错配的DNA序列将不杂交的条件。

[0166] 遗传密码的简并性进一步拓宽了实施方案的范围,因为它允许DNA分子的核苷酸序列中的重大变异,同时维持编码的蛋白的氨基酸序列。因此,基因的核苷酸序列可以在该位置处变成这三个密码子中的任何一个,而不影响所编码蛋白的氨基酸组成或蛋白的特征。特定氨基酸的核苷酸密码子中的遗传密码和变异是技术人员众所周知的。基于遗传密码的简并性,使用如上所述的标准DNA诱变技术,或通过DNA序列的合成,可以从本文公开的cDNA分子衍生出变体DNA分子。在本文中本公开内容包括这样的DNA序列:由于基于遗传密码的简并性的序列变异,所述DNA序列在严谨条件不与公开的cDNA序列杂交。

[0167] 因而,应当理解,还在本发明的范围内的是编码本发明的溶素(包括PlySs2和PlySs1)的DNA序列,所述序列编码具有与图5或SEQ ID NO: 1中提供的相同氨基酸序列的多肽,但与其简并,或与图5和SEQ ID NO: 2中提供的示例性核酸序列简并。“与……简并”意指,使用不同的三字母密码子来指定特定氨基酸。本领域众所周知可互换使用以编码每个特定氨基酸的密码子。

[0168] 本领域技术人员会认识到,这里描述的和本领域已知的DNA诱变技术可以产生多种DNA分子,其编码猪链球菌的噬菌体溶素,其仍维持本文描述和提供的裂解多肽的基本特征。还可以选择新衍生的蛋白,以便获得对一种或多种裂解多肽的特征的变异,如将在下面更充分地描述的。这样的衍生物包括在氨基酸序列中具有变异(包括微小缺失、添加和置换)的那些。

[0169] 尽管可以预定用于引入氨基酸序列变异的位点,但无需预定突变本身。氨基酸置换通常是单个残基,或可以是一个或多个、一个或几个、1、2、3、4、5、6或7个残基;插入通常将在约1-10个氨基酸残基的量级;并且缺失的范围将为约1-30个残基。缺失或插入可以呈单一形式,但优选在相邻对中作出,即2个残基的缺失或2个残基的插入。可以组合置换、缺失、插入或它们的任意组合,以得到最终构建体。置换变体是这样的变体:其中氨基酸序列中的至少一个残基已被除去,并且在其位置插入不同的残基。为了对蛋白特征不产生显著影响,或当希望细调蛋白的特征时可以做出这样的置换。在上面描述了可以置换蛋白中的原始氨基酸且被视为保守置换的氨基酸,并且本领域技术人员会认识到。

[0170] 如本领域众所周知的,可以如下表达DNA序列:在合适表达载体中将其可操作地连接至表达控制序列,并且采用该表达载体来转化合适的单细胞宿主。本发明的DNA序列与表达控制序列的这样的可操作连接当然包括,在所述DNA序列的正确读码框的上游提供起始密码子ATG,如果其尚未成为DNA序列的部分的话。多种宿主/表达载体组合可以用于表达本发明的DNA序列。有用的表达载体例如可以由染色体、非染色体和合成DNA序列的区段组成。多种表达控制序列中的任何一个(控制与之可操作地连接的DNA序列的表达的序列)可以在这些载体中用于表达本发明的DNA序列。多种单细胞宿主细胞也可用于表达本发明的DNA序列。这些宿主可以包括众所周知的真核和原核宿主,诸如以下的菌株:大肠杆菌、假单胞菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属,真菌例如酵母,和组织培养物中的动物细胞、人细胞和植物细胞。本领域技术人员无需过多实验将能够选择适当的载体、表达控制序列和宿主以完成所需表达,而不脱离本发明的范围。

[0171] 如在本文中使用的和在本领域中提及的,生物膜是具有独特体系结构的微生物聚集体。生物膜形成包括游离漂浮微生物向表面的附着。生物膜基本上是这样的集合体:其中微生物细胞(每个的长度仅为1微米或2微米)形成旋绕结构,包括可以高达数百微米的塔。在生物膜内的通道充当充满流体的导管,其根据需要循环营养物、氧、废物等,以维持有活力的生物膜群落。生物膜或微生物(细菌、真菌或藻)群落通常被微生物细胞所产生的细胞外生物聚合物包裹,并附着于液体和表面之间的界面。生物膜的包裹性质是使得其中的微生物生物体对标准抗微生物治疗剂具有高抗性的几个特征之一。例如,在生物膜中生长的细菌对抗生素具有高抗性,且在某些情况下,比在没有生物膜超结构存在下生长的相同细菌的抗性高至多1,000倍。

[0172] 标准抗生素疗法可以是无用的,其中检测到生物膜污染的植入物,并且在这样的情况下的唯一措施可以是除去污染的植入物。此外,生物膜涉入众多慢性疾病。例如,囊性纤维化患者遭受假单胞菌属感染,该感染经常产生抗生素抗性的生物膜。当游离漂浮微生物将它们自身附着于表面时,发生生物膜形成。因为生物膜会保护细菌,所以它们经常更耐受传统抗微生物治疗,从而使它们成为一个严重的健康风险,这被每年报道的超过100万例导管相关的泌尿道感染(CAUTI)证实,其中的许多可以归因于生物膜相关的细菌(Donlan, RM (2001) *Emerg Infect Dis* 7(2):277-281;Maki D和Tambyah P (2001) *Emerg Infect Dis* 7(2):342-347)。

[0173] 已经尝试了多种方案来阻止生物膜形成,包括使用化学方式和机械方式抑制蛋白吸附或生物膜粘附。化学方案包括在内在装置表面上的抗微生物涂层和聚合物改性。抗生素、杀生物剂和离子涂层是生物膜预防的化学方法的例子,并且可以干扰未成熟的生物膜的附着和繁殖。但是,这些涂层仅在短时间段(约1周)内是有效的,此后抗微生物剂的浸出会降低涂层的有效性(Dror N等人(2009) *Sensors* 9(4):2538-2554)。几个体外研究已经证实了银在预防感染中的有效性,所述银呈涂层形式和作为分散在聚合物基质中的纳米颗粒。但是,仍然担心银在体内使用过程中对人组织的潜在毒性效应,并且已经存在银涂层的有限应用。尽管这样,银涂层被用在诸如导管等装置上(Vasilev K等人(2009) *Expert Rev Med Devices* 6(5):553-567)。经由聚合物改性,使用柔性的聚合长链可以将抗微生物剂固定在装置表面上。这些链通过共价键锚定至装置表面,从而产生非浸出的接触杀死表面。一项体外研究发现,当将N-烷基吡啶鎓溴化物(一种抗微生物剂)连接至聚(4-乙烯基-N-己基吡啶)时,所述聚合物能够灭活超过99%的表皮葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌细菌(Jansen B和Kohnen W (1995) *J Ind Microbiol* 15(4):391-396)。

[0174] 阻止生物膜的机械方案包括:改变装置诸如导管的表面,包括修饰装置表面的疏水性、使用光滑表面材料改变它的物理性质、和改变表面电荷。使用几种主链化合物和抗微生物剂,包括带正电荷的聚阳离子,可以控制聚合链的疏水性和电荷。在另一个方案中,从电池供电的装置产生低能表面声波,所述装置递送扩散至表面(在该情况下为导管)的周期性矩形脉冲和波,从而产生阻止细菌附着于表面的水平波。该技术已经在白兔和豚鼠上进行了试验,并降低了生物膜生长(Hazan, Z等人(2006) *Antimicrob Agents and Chemother* 50(12):4144-152)。

[0175] 根据本发明,提供了用于预防、分散和处理细菌生物膜的方法和组合物。具体地,提供了用于预防、分散和处理包含葡萄球菌属细菌的生物膜的方法和组合物。具体地,本发

明的一个方面是用于预防、分散和处理生物膜的方法和组合物,所述生物膜包含金黄色葡萄球菌,包括或包含抗生素抗性的和/或抗生素敏感的金黄色葡萄球菌。在本发明的一个方面,本发明的方法和组合物包含溶素(特别是PlySs2溶素),所述溶素能够杀死葡萄球菌和链球菌细菌,包括抗生素抗性的细菌。

[0176] 本发明的方法和组合物(具体地包含PlySs2溶素)可以与用于预防或分散生物膜的化学方式或机械方式、组合物或方案组合或并入。因而,本文中的组合物可以与抗生素、杀生物剂和离子涂层组合或并入,以使生物膜的生长或建立最小化,特别是在内在装置或导管的内部或表面上。作为示例且不作为限制,可以施用或以其它方式提供包含PlySs2的组合物,以预灭菌内在装置或导管生物膜或使其维持不具有或具有减少的细菌粘附或降低的生物膜形成风险。因而,可以将包含PlySs2的组合物用在溶液中,以冲洗或定期清洁和维护内在装置、导管等不具有生物膜或具有减少的细菌粘附或降低的生物膜形成风险。在其中生物膜被怀疑、明显或证实的情况下,可以施用包含PlySs2的组合物或以其它方式使其与生物膜或装置、区域、位置、部位接触,从而促进、开始或导致生物膜的分散、减轻、除去、或处理。因而,例如,在其中患者具有升高的温度或与周围的装置或导管有关的不适、发红、膨胀的情况下,可以将包含PlySs2的组合物施用给患者或与装置或导管接触,以通过分散、预防或处理正在形成或已经形成的任何生物膜而减轻、消除或治疗有关的温度、不适、发红、膨胀。

[0177] 根据本发明,可以在单次或多次剂量或施用中施用包含溶素(特别是PlySs2溶素)或其活性变体的组合物或以其它方式与确定的或疑似的生物膜或具有生物膜的装置、区域、位置、部位接触。所述溶素可以与一种或多种抗生素一起、在所述抗生素之前或之后施用。所述溶素可以以初始剂量施用,例如,继之以抗生素或与抗生素一起,并且溶素的初始剂量以后可以是溶素的后续剂量。在一个这样的情形中,溶素(特别是PlySs2)的初始剂量可以用于分散生物膜,随后的溶素的后续剂量(以更低、相同或更高的量,这可以部分地取决于生物膜的初始应答和分散)可以用于进一步分散或另外杀死或除去生物膜中或来自生物膜的细菌。也可以随后或额外施用一定剂量的抗生素,以进一步用于分散或额外杀死或除去生物膜中或来自生物膜的细菌。

[0178] 本文提供了治疗组合物或药物组合物以及有关的使用方法,所述组合物包含在本发明提供的方法和应用中有一种或多种裂解酶和/或一种或多种多肽。治疗组合物或药物组合物可以包含一种或多种裂解多肽,并且任选地包括天然的、截短的、嵌合的或改组的裂解酶,其任选地与其它组分诸如载体、媒介物、多肽、多核苷酸、穿孔素蛋白、一种或多种抗生素或合适的赋形剂、载体或媒介物组合。本发明提供了本发明的溶素(包括PlySs2)的治疗组合物或药物组合物,其用于杀死、减轻、除去、预防或处理生物膜中的革兰氏阳性细菌,且具体地用于分散、预防或处理生物膜。

[0179] 在本发明的方法所用的治疗组合物中包括的一种或多种酶或一种或多种多肽可以是未改变的噬菌体相关一种或多种裂解酶、截短的裂解多肽、一种或多种变体裂解多肽、和嵌合的和/或改组的裂解酶中的一种或多种或任意组合。另外,可以使用用于治疗相同细菌的由不同噬菌体遗传编码的一种或多种不同裂解多肽。这些裂解酶也可以是“未改变的”裂解酶或多肽、一种或多种截短的裂解多肽、一种或多种变体裂解多肽、和嵌合的和改组的裂解酶的任意组合。用于革兰氏阳性细菌(包括链球菌属、葡萄球菌属、肠球菌属和李斯特

菌属)的治疗组合物或药物组合物中的一种或多种裂解酶/一种或多种多肽可以单独使用或与抗生素组合使用,或如果存在待治疗的其它侵袭性细菌生物体的话,与对待靶向的其它细菌特异性的其它噬菌体相关裂解酶组合。裂解酶、截短的酶、变体酶、嵌合酶和/或改组的裂解酶可以与穿孔素(holin)蛋白结合使用。也可以改变穿孔素蛋白的量。多种抗生素可以任选地与一种或多种酶或多肽一起包括在治疗组合物中,并且有或没有溶葡萄球菌酶的存在。在治疗组合物中可以包括超过一种裂解酶或多肽。

[0180] 本发明的方法所用的药物组合物还可以包括一种或多种改变的裂解酶,包括通过化学合成或DNA重组技术产生的其同工酶、类似物或变体。具体地,通过氨基酸置换、缺失、截短、嵌合化、改组或其组合,可以产生改变的裂解蛋白。药物组合物可以含有一种或多种天然裂解蛋白和一种或多种截短裂解蛋白、变体裂解蛋白、嵌合裂解蛋白或改组裂解蛋白的组合。药物组合物还可以含有衍生自相同或不同细菌物种的至少一种裂解蛋白的肽或肽片段,任选地添加一种或多种补充试剂,和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0181] 本发明的方法所用的药物组合物可以含有补充试剂,包括一种或多种抗微生物剂和/或一种或多种常规抗生素,具体地如本文中提供的。为了促进细菌生物膜的感染或分散的治疗,所述治疗剂可以进一步包括至少一种补充试剂,其也可以增强裂解酶的杀细菌活性。抗微生物剂主要如下起作用:通过抑制细胞壁合成、抑制细胞膜功能和/或抑制代谢功能(包括蛋白和DNA合成),干扰细菌细胞的结构或功能。抗生素可以宽泛地细分成在革兰氏阳性细菌中影响细胞壁肽聚糖生物合成的抗生素和影响DNA或蛋白合成的抗生素。细胞壁合成抑制剂(包括青霉素和与它类似的抗生素)破坏坚硬的细胞外壁,使得相对无支持的细胞膨胀并最终破裂。补充试剂可以是抗生素,诸如红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、罗红霉素、大环内酯家族的其它成员、青霉素、头孢菌素及其任意组合,其量可有效地协同增强裂解酶的治疗效果。基本上任何其它抗生素都可以与改变的和/或未改变的裂解酶一起使用。影响细胞壁肽聚糖生物合成的抗生素包括:糖肽,其通过阻止N-乙酰基胞壁酸(NAM)和N-乙酰基葡萄糖胺(NAG)肽亚基掺入肽聚糖基质内而抑制肽聚糖合成。可用的糖肽包括万古霉素和替考拉宁;青霉素,其通过抑制肽聚糖交联的形成而起作用。青霉素的官能团 $\beta$ -内酰胺部分结合且抑制DD-转肽酶,所述DD-转肽酶连接细菌中的肽聚糖分子。水解酶继续分解细胞壁,由于渗透压而引起细胞裂解或死亡。常见的青霉素包括苯唑西林、氨苄西林和氯唑西林;和多肽类,其干扰C<sub>55</sub>-异戊二烯基焦磷酸酯(在质膜外携带肽聚糖结构单元 of 的分子)的去磷酸化。影响细胞壁的多肽是杆菌肽。其它有用的和有关的抗生素包括万古霉素、利奈唑胺和达托霉素。

[0182] 类似地,在载体中可以包括其它裂解酶以治疗或分散其它细菌或细菌感染。所述药物组合物还可以含有至少一种裂解蛋白的肽或肽片段、一种穿孔素蛋白、或至少一种穿孔素和一种裂解蛋白、和合适的载体或稀释剂,任选地添加一种或多种补充试剂,所述裂解蛋白和穿孔素蛋白各自衍生自相同或不同的细菌物种。

[0183] 在所述方法中还使用含有核酸分子的组合物,所述核酸分子是单独的或与其它核酸分子组合,能够在体内表达有效量的一种或多种裂解多肽或一种或多种裂解多肽的肽片段。还提供了细胞培养物,其含有这些核酸分子、多核苷酸、和携带且在体外或体内表达这些分子的载体。

[0184] 本发明的方法可以利用这样的治疗组合物或药物组合物:其包含与多种载体组合

的一种或多种裂解多肽,以分散或除去细菌或治疗由敏感的革兰氏阳性细菌引起的疾病。所述载体适当地含有微量添加剂,诸如增强等渗性和化学稳定性的物质。这样的材料在使用的剂量和浓度对受体是无毒的,且包括:缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸和其它有机酸或它们的盐;抗氧化剂诸如抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽,例如,聚精氨酸或三肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;甘氨酸;氨基酸诸如谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸或精氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括纤维素或它的衍生物、葡萄糖、甘露糖、海藻糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖醇诸如甘露醇或山梨醇;抗衡离子诸如钠;非离子型表面活性剂诸如聚山梨酯、泊洛沙姆或聚乙二醇(PEG);和/或中性盐。用于药用的甘油或丙三醇(1,2,3-丙三醇)是商购可得的。DMSO是具有增强许多局部用药的渗透的惊人能力的非质子溶剂。特别当制备静脉内溶液时,载体媒介物还可以包括林格氏溶液、缓冲溶液和右旋糖溶液。

[0185] 可以以液体形式或以低压冻干状态将一种或多种裂解多肽加入这些物质中,此后当它遇到体液诸如唾液时,它将会溶解。一种或多种多肽/酶也可以是在胶束或脂质体中。

[0186] 改变的或未改变的本发明的裂解酶/一种或多种多肽和用在本发明中的裂解酶/一种或多种多肽的有效剂量率或量将部分地取决于治疗性地还是预防性地使用裂解酶/一种或多种多肽、接受者暴露于传染性细菌的持续时间、个体的尺寸和重量等。含有所述酶/一种或多种多肽的组合物的使用持续时间还取决于所述用途是否用于预防目的,其中所述使用可以是每小时、每天或每周,持续短时间段,或用途是否用于治疗目的,其中可能需要组合物使用的更密集方案,使得使用可以持续数小时、数天或数周,和/或以每天为基础,或在一天中的定时间隔。采用的任何剂型应当提供用于最小时间量的最小数目的单位。分类为“长”或“慢”释放载体(例如某些鼻喷雾剂或锭剂)的载体可以具有或提供更低浓度的活性(酶)单位/ml,但经过更长的时间段,而“短”或“快速”释放载体(例如漱口剂)可以具有或提供高浓度的活性(酶)单位/ml,但经过更短的时间段。每ml的活性单位的量和暴露时间的持续时间取决于感染的性质、治疗是预防性的还是治疗性的、和其它变量。存在这样的情况:其中必须具有高得多的单位/ml剂量或低得多的单位/ml剂量。

[0187] 使用的裂解酶/一种或多种多肽应当在具有允许所述裂解酶/一种或多种多肽的活性的pH的环境中。稳定缓冲液可以允许溶素酶/一种或多种多肽的最适活性。缓冲液可以含有还原剂诸如二硫苏糖醇或 $\beta$ 巯基乙醇(BME)。稳定缓冲液还可以是或包括金属螯合剂,诸如乙二胺四乙酸二钠盐,或它还可以含有磷酸盐或柠檬酸盐-磷酸缓冲液,或任何其它缓冲液。

[0188] 可以以有效增强组合物中可以使用的裂解酶/一种或多种多肽的治疗效果的量,在所述方法使用的治疗组合物或药物组合物中包括温和表面活性剂。合适的温和表面活性剂尤其包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇和脂肪酸的酯(吐温系列)、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton-X系列)、正辛基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、正辛基- $\beta$ -D-硫代吡喃葡萄糖苷、正癸基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,和生物学存在的表面活性剂,例如,脂肪酸、甘油酯、甘油单酯、脱氧胆酸盐和脱氧胆酸盐的酯。

[0189] 防腐剂也可以用在本发明中,且优选地占总组合物的约0.05重量%-0.5重量%。防腐剂的使用会确保,如果产物受微生物污染,则制剂将阻止或减少微生物生长。在本发明中的一些防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氯二甲

酚、苯甲酸钠、DMDM乙内酰脲、氨基甲酸-3-碘-2-丙基丁酯、山梨酸钾、二葡萄糖酸氯己定或它们的组合。

[0190] 在本发明的方法和应用中使用的治疗组合物还可包含其它酶,诸如用于治疗与敏感的革兰氏阳性细菌一起存在的任何金黄色葡萄球菌属细菌的溶葡萄球菌酶。溶葡萄球菌酶(模仿葡萄球菌的基因产物)通过酶促地降解细胞壁的聚甘氨酸交联而对金黄色葡萄球菌发挥抑菌和杀菌作用(Browder等人, Res. Comm., 19: 393-400 (1965))。随后已经克隆并测序溶葡萄球菌酶的基因(Recsei等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987))。治疗组合物还可以包括变溶菌素和溶菌酶。

[0191] 根据本发明的方法施用包含裂解酶/一种或多种多肽和抗生素的治疗组合物的方式包括、但不限于直接方式、间接方式、载体方式和专门方式或方式的任意组合。裂解酶/一种或多种多肽的直接施用可以通过任何合适的方法,以直接使多肽与生物膜、感染或细菌定殖的部位接触,例如施用于鼻区域(例如鼻喷雾剂)、真皮或皮肤施用(例如局部软膏剂或制剂)、栓剂、棉塞施用等。鼻施用包括例如鼻喷雾剂、滴鼻剂、鼻软膏剂、鼻洗剂、鼻注射剂、鼻填塞物、支气管喷雾剂和吸入器,或通过使用润喉片、漱口液或漱口剂间接施用,或通过使用施用于鼻孔或面部的软膏,或这些和相似施用方法的任意组合。其中可以施用裂解酶的形式包括、但不限于锭剂、糖锭、糖果、注射剂、口香糖、片剂、粉剂、喷雾剂、液体、软膏剂和气雾剂。

[0192] 裂解酶的施用模式包括许多不同类型的载体和载体组合,所述载体包括、但不限于水性液体、醇基液体、水溶性凝胶、洗剂、软膏剂、非水性液体基质、矿物油基质、矿物油和矿脂的掺和物、羊毛脂、脂质体、蛋白载体例如血清白蛋白或明胶、粉状纤维素carmel及其组合。含有治疗剂的载体的递送模式包括、但不限于涂片、喷雾剂、限时释放贴剂、吸收液体的拭子及其组合。裂解酶可以直接或在其它载体之一中施用于绷带。绷带可以是潮湿或干燥出售的,其中所述酶以冻干形式存在于绷带上。这种施用方法对于受感染皮肤的治疗是最有效的。局部组合物的载体可以包含半固体和凝胶状媒介物,其包括聚合物增稠剂、水、防腐剂、活性表面活性剂或乳化剂、抗氧化剂、防晒剂和溶剂或混合溶剂系统。可以使用的聚合物增稠剂包括本领域技术人员已知的那些,诸如在化妆品和制药工业中频繁使用的亲水胶凝剂和水醇胶凝剂。其它优选的胶凝聚合物包括羟乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、MVE/MA癸二烯交联聚合物、PVM/MA共聚物或它们的组合。

[0193] 可能有利的是,具有表现出对粘膜组织的附着的能力的材料,所述材料与一种或多种噬菌体酶和其它补充试剂一起施用一段时间。具有控释能力的材料是特别合乎需要的,并且持续释放粘膜粘着剂的使用已受到显著程度的关注。涉及为亲水材料和疏水材料的组合的粘膜粘着剂的其它方案是已知的。胶束和多层胶束也可以用于控制酶的释放。具有靶向或附着于表面的能力的材料,可以与在本发明中使用的一种或多种溶素组合、混合或融合,所述材料是诸如在临床实践中使用的塑料、膜、装置,具体地包括置于体内且易于细菌附着或生物膜发展的任意材料或组分,诸如导管、瓣膜、假体装置、药物或化合物泵、支架、矫形外科材料等。

[0194] 在所述方法中使用的治疗组合物或药物组合物还可以含有聚合粘膜粘着剂,包括用于控释生物活性剂的包含亲水主链和疏水接枝链的接枝共聚物。本申请的组合物可以任选地含有其它聚合材料,例如聚丙烯酸、聚乙烯基吡咯烷酮和羧甲基纤维素钠塑化剂以及

其它药学可接受的赋形剂,其量不会引起对组合物的粘膜粘着性的有害作用。

[0195] 通过任何药学上适用的或可接受的方式,包括局部地、口服地或胃肠外地,可以施用根据本发明使用的裂解酶/一种或多种多肽。例如,可以肌内地、鞘内地、真皮下地、皮下地或静脉内地施用裂解酶/一种或多种多肽,以治疗革兰氏阳性细菌的感染。在其中胃肠外注射是所选施用模式的情况下,优选使用等渗制剂。通常,用于等渗性的添加剂可以包括氯化钠、右旋糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。在某些情况下,等渗溶液诸如磷酸盐缓冲盐水是优选的。稳定剂包括明胶和白蛋白。可以将血管收缩剂加入制剂中。提供了根据本申请的无菌且无热原的药物制剂。

[0196] 对于任何化合物,可以最初在细胞培养测定中或在动物模型(经常为小鼠、兔、狗或猪)中评估治疗有效剂量。动物模型也用于获得合乎需要的浓度范围和施用途径。然后可以使用这样的信息来确定在人类中有用的剂量和给药途径。个别医师考虑到待治疗的患者来选择确切剂量。调整剂量和施用,以提供足够水平的活性部分或维持期望的作用。可以考虑的其它因素包括:疾病状态的严重程度,患者的年龄、重量和性别;饮食,期望的治疗持续时间,施用方法,施用时间和频率,一种或多种药物组合,反应敏感性,和对治疗的耐受/应答。可以每3-4天、每周、或每2周1次地施用长效药物组合物,取决于特定制剂的半衰期和清除率。

[0197] 要施用的裂解酶/一种或多种多肽的有效剂量率或量以及治疗的持续时间将部分地取决于感染的严重性,患者、特别是人的重量,接受者暴露于传染性细菌的持续时间,受感染的皮肤或组织或表面的平方厘米数,感染的深度,感染的严重性,和多种许多其它变量。可以在每天、每周、每月一次到数次中的任何次数施用组合物,并且可以施用短时间段(诸如数天或至多数周)或长时段(诸如几周或至多几个月)。使用可以持续数天或数周或更久。采用的任何剂型应当提供用于最小时间量的最小数目的单位。可以将认为会提供有效量或剂量的酶的酶活性单位的浓度选择为适当的。

[0198] 可以单独地或与另一种药剂(诸如一种或多种抗生素)组合地以单次剂量或多次剂量施用溶素。溶素,任选地与另一种药剂(诸如抗生素)一起,可以通过相同施用模式或通过不同施用模式来施用。所述溶素可以将一种或多种组合地或个别地施用1次、2次或多次。因而,可以在初始剂量中施用溶素,继之以随后的一个或多个剂量,具体地取决于应答和细菌杀死或除去或生物膜的分散或生物膜中的细菌的杀死,并且可以与抗生素剂量组合或交替。在本发明的一个特定方面,可以施用溶素(特别是PlySs2)或抗生素和溶素的组合较长时段,并且可以延长给药,而没有抗性的风险。

[0199] 术语“试剂”意指任何分子,包括多肽、抗体、多核苷酸、化学化合物和小分子。特别地,术语试剂包括化合物诸如试验化合物、添加的另外一种或多种化合物或溶素酶化合物。

[0200] 术语“激动剂”表示这样的配体:其在最宽的含义上刺激所述配体与之结合的受体。

[0201] 术语“测定”意指用于测量化合物的特定性质的任何方法。“筛选测定”意指这样的方法:其用于基于它们的活性而从化合物集合中表征或选择化合物。

[0202] 术语“预防”或“阻止”表示对象中获得或发展疾病或障碍的风险的减小(即,造成疾病的临床症状中的至少一种不发展),所述对象可以在疾病发作之前暴露于病因剂或易感该疾病。

[0203] 术语“预防”与术语“阻止”有关且被包括在术语“阻止”中,并且表示目的在于预防而不是治疗或治愈疾病的措施或规程。预防措施的非限制性例子可以包括:疫苗的施用;低分子量肝素对由于例如固定而处于血栓形成的风险中的住院患者的施用;和在对其疟疾是流行病或接触疟疾的风险很高的地理区域的访问之前抗疟剂诸如氯喹的施用。

[0204] “治疗有效量”意指这样的药物、化合物、抗微生物剂、抗体、多肽或药学试剂的量:其将引起医生或其它临床医师寻求的对象的生物学或医学应答。具体地,就革兰氏阳性细菌感染和革兰氏阳性细菌的生长而言,术语“有效量”意图包括有效量的化合物或试剂,其将造成革兰氏阳性细菌感染的量或程度的生物学上有意义的下降,包括具有杀细菌和/或抑制细菌效应。短语“治疗有效量”在本文中用于表示这样的量:其足以预防、且优选减少至少约30%、更优选至少50%、最优选至少90%的传染性细菌的生长或量的临床显著变化或其它病理学特征(例如高烧或白细胞计数,这可以指示它的存在和活性)。

[0205] 在一个实施方案中,术语任何疾病或感染的“治疗”表示改善疾病或感染(即阻止疾病或传染性病原体或细菌的生长,或减少其临床症状中的至少一种的表现、程度或严重性)。在另一个实施方案中,“治疗”表示改善可能未由对象辨别的至少一种身体参数。在另一个实施方案中,“治疗”表示在身体上(例如可辨别症状的稳定)、在生理学上(例如身体参数的稳定)或在两者上调节疾病或感染。在另一个实施方案中,“治疗”是指减慢疾病的进展或减少感染。

[0206] 短语“药学上可接受的”表示这样的分子实体和组合物:当施用给人类时,其是生理学上可耐受的,且通常不会产生变应性或类似的不良反应,诸如胃不适、头晕等。

[0207] 应当指出,在体内执行的治疗方法或根据本申请和权利要求的医学和临床治疗方法的背景下,术语对象、患者或个体意图表示人。

[0208] 术语“革兰氏阳性的细菌”、“革兰氏阳性细菌”、“革兰氏阳性”和未具体列出的任何变体在本文中可互换地使用,并且如贯穿本申请和权利要求使用的,表示这样的革兰氏阳性细菌:其是已知的和/或可以通过某些细胞壁和/或细胞膜特征的存在和/或通过用革兰氏染剂染色进行鉴别。革兰氏阳性细菌是已知的,并且可以容易地鉴别,且可以选自但不限于李斯特菌属、葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属、分枝杆菌属、棒杆菌属和梭菌属,并且包括其任意的和所有的识别的或未识别的物种或菌株。在本发明的一个方面,PlyS溶素敏感的革兰氏阳性细菌包括选自李斯特菌属、葡萄球菌属、链球菌属和肠球菌属中的一种或多种的细菌。

[0209] 术语“杀细菌的”表示能够杀死细菌细胞。

[0210] 术语“抑制细菌的”表示能够抑制细菌生长,包括抑制生长中的细菌细胞。

[0211] 短语“药学上可接受的”表示这样的分子实体和组合物:当施用给人类时,其是生理学上可耐受的,且通常不会产生变应性或类似的不良反应,诸如胃不适、头晕等。

[0212] 短语“治疗有效量”在本文中用于表示这样的量:其足以预防靶细胞质量的S期活性的临床上重要的变化或可能指示它的存在和活性的其它病理学特征(例如,高血压、发热或白细胞计数),且优选地使其减少至少约30%、更优选至少50%、最优选至少90%。

[0213] 本发明提供了用于预防、分散、处理和/或除去细菌生物膜以及预防生物膜分散以后的感染的方法,在所述生物膜中怀疑存在或存在一种或多种革兰氏阳性细菌,特别是葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属和李斯特菌属细菌中的一种或多种,所述方法包括施用溶素

(特别是PlySs2溶素),所述溶素具有杀死金黄色葡萄球菌属细菌(包括MRSA)的能力。本发明提供了用于减少或阻止装置、植入物、分离膜(例如,渗透蒸发膜、透析膜、反渗透膜、超滤膜和微滤膜)的表面上生物膜生长的方法,所述方法包括施用或利用溶素(特别是PlySs2溶素),所述溶素具有杀死金黄色葡萄球菌属细菌(包括MRSA)的能力。

[0214] 本发明提供了通过施用包含PlySs2溶素的组合物来治疗导管相关的泌尿道感染(CAUTI)的方法,其中所述感染归因于生物膜相关的细菌。本发明提供了用于治疗导管相关的泌尿道感染(CAUTI)的包含PlySs2溶素的组合物,其中所述感染归因于生物膜相关的细菌。所述方法或组合物包含PlySs2溶素,包括如在图5或SEQ ID NO: 1中提供的多肽或其能够杀死葡萄球菌和链球菌细菌(金黄色葡萄球菌)的变体。所述方法或组合物可以另外包含一种或多种抗生素。

[0215] 对于许多心脏患者而言,心内膜炎(包括心脏中的葡萄球菌性心内膜炎,诸如在主动脉瓣或其它瓣或植入心脏或其血管中的支架或装置中)是一个重大的临床担心、风险和现实。本发明提供了一种方法,其用于减少、预防、分散或治疗心内膜炎,包括葡萄球菌性心内膜炎,和用于预防或处理心脏瓣膜或血管支架上的一种或多种生物膜。在这些方法中,施用溶素、特别是PlySs2溶素或如本文中提供的其活性变体以预防或治疗葡萄球菌性心内膜炎或心脏瓣膜或血管支架上的一种或多种生物膜。

[0216] 通过参考下述非限制性实施例可以更好地理解本发明,提供所述实施例作为本发明的示例。为了更充分地举例说明本发明的优选实施方案,呈现下述实施例,但是,决不应解释为限制本发明的宽范围。

#### [0217] 实施例1

[0218] PlySs2溶素表现出杀死临床上重要的革兰氏阳性细菌的不同菌株的能力,所述菌株包括金黄色葡萄球菌的甲氧西林和万古霉素抗性的和敏感的菌株(MRSA、MSSA、VRSA和VISA)。PlySs2是一种具有广物种杀死活性的独特溶素,且可以杀死多个细菌物种,特别是革兰氏阳性细菌,显著不同的抗生素敏感的和抗生素抗性的葡萄球菌属,以及链球菌属,包括A组和B组链球菌。其它PlySs2敏感的细菌包括肠球菌属和李斯特菌属细菌菌株。在上面,包括在表2和3中,提供了不同细菌(包括葡萄球菌和链球菌)对PlySs2溶素的敏感性的列表。

[0219] 在下面表4中显示了其它MIC研究的列表。

#### [0220] 表4

[0221] PlySs2和抗生素对金黄色葡萄球菌菌株的活性\*

[0222]

生物体 (菌株的数目)	PlySs2		达托霉素		万古霉素		苯唑西林		利奈唑胺	
	MIC <sub>90</sub>	[uM]	MIC <sub>90</sub>	[uM]	MIC <sub>90</sub>	[uM]	MIC <sub>50/90</sub>	[uM]	MIC <sub>50/90</sub>	[uM]
MRSA (n=45)	4	0.15	1	0.6	1	0.7	<b>&gt;4*</b>	<b>&gt;10.0</b>	2	5.7
MSSA (n=28)	4	0.15	1	0.6	1	0.7	n/a	n/a	2	5.7
VISA (n=10)	32	1.2	<b>8</b>	<b>4.9</b>	<b>4</b>	<b>2.7</b>	n/a	n/a	2	5.7
VRSA (n=14)	2	0.08	1	0.6	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;10.6</b>	n/a	n/a	2	5.7
LRSA (n=5)	2	0.08	1	0.6	1	0.7	n/a	n/a	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;183</b>
DRSA (n=8)	4	0.15	<b>16</b>	<b>9.9</b>	1	0.7	n/a	n/a	2	5.7

[0223] \* 使用液体培养基微量稀释方法确定MIC,并根据CLSI方法 (M07-A9) 评价80%生长抑制。

[0224] \*Red/Bold=药物失败 (MIC值超过指定的药物在金黄色葡萄球菌上的EUCAST断点)。

[0225] 显著地且独特地,尽管对众多临床上重要的细菌(包括众多葡萄球菌属和链球菌属菌株和如在上表中指出的其它试验菌株)具有活性,但是PlySs2对其它细菌(特别是天然或共生细菌群落)至多仅表现出微小作用。下面的表5证实了PlySs2对不同共生人肠道细菌的微小裂解活性。

[0226] 表5

[0227] 肠道细菌对PlySs2的敏感性

[0228]

生物体	N (试验的数目)	CF-301 MIC (ug/ml)
肠道沙门氏菌	1	>512
铜绿假单胞菌	11	>512
大肠杆菌	10	>512
克雷伯氏菌属种	8	>512
奇异变形菌	2	>512
乳杆菌属种	6	>512
乳球菌属种	3	>512

[0229] 生物膜形成是许多细菌感染的发病机制的一个关键特征(31)。在被感染的组织(即在心内膜炎中的心脏瓣膜,或在骨髓炎中的骨)内或在植入物(即置换关节和导管)上,细菌病原体诸如金黄色葡萄球菌存在于生物膜中,从而为生长和持续提供有利环境,保护免于抗生素和免疫系统的作用(32)。本文提供的研究现在证实了与在1000X MIC浓度使用的抗生素的完全无活性相比,仅1X MIC浓度的PlySs2溶素的有效抗生物膜活性。该有效溶素抗生物膜活性提供了这样的方式和组合物:其对生物膜是有效的,且通过实现对溶素破坏的生物膜的接近而独特地补充抗生素的作用。

[0230] 考虑到PlySs2对众多临床上重要的细菌菌株和物种的快速细菌杀死和作用,使用

生物膜测定在体外试验了PlySs2溶素对金黄色葡萄球菌生物膜的效力。

[0231] PlySs2溶素对甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌MRSA菌株ATCC BAA-42的最小抑制浓度被确定为16 $\mu$ g/ml。该值是在MIC测定中有还原剂(诸如DTT或BMS)存在下确定的MIC。为了提高确定MIC值的测定之间的再现性的目的,加入还原剂。在没有加入还原剂下,进行生物膜研究。在没有还原剂存在下,BAA-42的MIC值是32 $\mu$ g/ml。平均而言,该MIC值与上面提供的表中指出的其它MRSA菌株一致(参见表2和4)。根据标准且如在临床和实验室标准学会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)文件M07-A9 (Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. 第32卷(Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute [US], 2012)中所述,使用液体培养基微量稀释方法,确定MIC。

[0232] 使用Wu等人描述的方法的变体(Wu JA等人(2003) Antimicrob Agents and Chemother 47(11):3407-3414),制备生物膜。简而言之,将 $1 \times 10^6$ 个甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株ATCC BAA-42的静止期细胞接种进2 ml补充了1%葡萄糖的胰蛋白酶-大豆液体培养基中,并在24-孔组织培养皿中在没有通气的情況下在37 $^{\circ}$ C培养18小时。通过用1X PBS洗涤,除去浮游的细胞(未粘附细菌),然后将剩余的细菌(固着细菌或生物膜细菌)用PlySs2溶素或用不同浓度的抗生素(得自Sigma-Aldrich的达托霉素、利奈唑胺或万古霉素)处理至多24小时。在不同时间点(0小时、2小时、4小时、至多24小时),将孔用1X PBS洗涤,通过在37 $^{\circ}$ C风干而固定15分钟,并用1 ml 1%结晶紫溶液(Sigma-Aldrich)染色,以使剩余的生物膜显影。还确定用结晶紫染色的生物膜的光密度以提供更定量的对比。在图7中提供了一个示例性的密度研究。

[0233] 在初步研究中,用1000X MIC浓度(1000 $\mu$ g/ml)的每种达托霉素、利奈唑胺和万古霉素和1X MIC (32 $\mu$ g/ml)的PlySs2溶素(没有添加还原剂)处理BAA-42 MRSA的生物膜。使用在临床和实验室标准学会(CLSI)文件M07-A9 (Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. 第32卷. Wayne [PA]: 临床和实验室标准学会[US], 2012)中描述的液体培养基微量稀释方法,确定所有MIC值。处理了至多4小时的MRSA生物膜显示在图1中,处理了至多6小时的MRSA生物膜显示在图2中,且处理了至多24小时的MRSA生物膜显示在图3中。在用1X MIC 32 $\mu$ g/ml的单独PlySs2溶素处理时,在2小时内清洁了生物膜(图1、2和3)。在用1000  $\mu$ g/ml (1000 X MIC)的达托霉素、万古霉素或利奈唑胺处理时,在4小时或6小时中没有明显可见的生物膜变化(图1和2)。这与以前的报道一致,所述报道已经证实生物膜对非常高剂量(10000 $\mu$ g/ml)的万古霉素的微小敏感性(Weigel LM等人(2007) Antimicrob Agents and Chemother 51(1):231-238)。

[0234] 针对MRSA菌株BAA-42的生物膜,评价了更低浓度的PlySs2溶素和达托霉素处理。用更低的亚MIC剂量的PlySs2处理生物膜0.5小时、1小时、4小时和24小时。如上所述,在24孔皿中制备BAA-42生物膜,并用PlySs2溶素或达托霉素抗生素(与适当的媒介物对照一起)处理孔。对于PlySs2,使用3.2  $\mu$ g/mL (1/10X MIC值)或0.32  $\mu$ g/mL (1/100X MIC值)的亚MIC剂量。对于达托霉素,使用1  $\mu$ g/mL (1X MIC值)或10  $\mu$ g/mL (10X MIC值)。将孔温育至多24小时,洗涤,固定,并染色。结果显示在图4中。即使在PlySs2溶素的MIC的1/100,观察到生物膜溶解。用3.2 $\mu$ g/ml (1/10X MIC)的PlySs2溶素在4小时表现出显著的溶解,且甚至用

0.32 $\mu$ g/ml (1/100X MIC) 在4小时观察到一些溶解。对于至多10X MIC的达托霉素浓度,没有观察到溶解。

[0235] 使用一种替代性的葡萄球菌溶素,特别是ClyS溶素,针对ATCC BAA-42 MRSA生物膜完成了可比较的MIC研究。ClyS溶素对于该金黄色葡萄球菌菌株的MIC为32 $\mu$ g/ml。给聚苯乙烯组织培养板接种 $5 \times 10^5$  CFU的金黄色葡萄球菌菌株ATCC BAA-42/孔(在含有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶大豆液体培养基中),并在35 $^{\circ}$ C温育24小时以允许生物膜形成。将得到的生物膜洗涤3次以除去浮游的细胞,并用32 $\mu$ g/ml、3.2 $\mu$ g/ml、0.32 $\mu$ g/ml和0.032 $\mu$ g/ml浓度的ClyS溶素(或单独媒介物)在35 $^{\circ}$ C处理24小时。将每个孔洗涤并用2%结晶紫染色。结晶紫将附着的生物膜材料染色。使用不同浓度的ClyS的结果描绘在图14中。32 $\mu$ g/ml (1X MIC) 和3.2 $\mu$ g/ml (0.1X MIC) 的ClyS有效地分散生物膜。在0.32 $\mu$ g/ml也观察到染色的生物膜的减少,并且在0.032 $\mu$ g/ml稍微观察到。葡萄球菌溶素ClyS能够分散和减少金黄色葡萄球菌生物膜。

#### [0236] 实施例2

[0237] 在生物膜上评价了亚MIC剂量的达托霉素与溶素的组合。已经发现,PlySs2溶素和达托霉素对浮游的金黄色葡萄球菌细胞发挥协同致死效应(美国临时申请系列号61/644, 944和61/737, 239)。进行了一系列实验来研究该协同效应是否也可以靶向生物膜中的细菌。将液体培养基微量稀释棋盘方法(Sopirala MM等人(2010) Antimicrob Agents and Chemother 54(11):4678-4683)施加于在96-孔微量滴定盘中培养的成熟金黄色葡萄球菌生物膜。针对MRSA菌株ATCC BAA-42的18小时生物膜,检查了溶素和达托霉素的亚MIC组合的活性,所述菌株以上述的方式进行培养,但是在0.2 ml混悬液中培养细胞。生物膜形成以后,将孔用1X PBS洗涤,并在没有通气的情況下用PlySs2和达托霉素单独地或在一系列组合中处理24小时。然后将生物膜如上洗涤、固定和染色,以评价生物膜形成。因此,通过与那些相同亚MIC浓度的任一种单独药物作用进行对比,评价了亚MIC药物组合的作用。

#### [0238] 实施例3

##### [0239] 体外混合生物膜研究

[0240] 还与达托霉素联合使用PlySs2溶素以靶向多物种生物膜。生物膜经常含有超过一个细菌物种(Yang L等人(2011) FEMS Immunol and Med 62(3):339-347)。使用PlySs2溶素和达托霉素来靶向由PlySs2和达托霉素敏感的金黄色葡萄球菌菌株ATCC BAA-42和PlySs2抗性的、达托霉素敏感的粪肠球菌菌株构成的生物膜。尽管呈浮游形式的粪肠球菌菌株对达托霉素是敏感的,但是它们作为生物膜的固着成员对达托霉素具有抗性。仅当粪肠球菌从生物膜释放时,它们才可以变成对达托霉素具有抗性。为了试验PlySs2的介导该释放(并从而使粪肠球菌对达托霉素敏化)的能力,进行了下述实验。

[0241] 使用 $1 \times 10^6$ 个葡萄球菌和 $1 \times 10^6$ 个肠球菌的初始接种物(每种单独地和在一起),如上所述在24孔皿中制备生物膜。将生物膜用PBS洗涤,并用单独和组合(使用一系列亚MIC组合)的PlySs2和达托霉素处理24小时。处理后,将生物膜孔分成2个部分,包括非粘附的(包括活细菌和死细菌)和粘附的(生物膜形式)。将非粘附部分铺板进行生存力测定,以确定葡萄球菌和肠球菌的相对CFU计数。将产生的CFU计数与用缓冲液对照处理过的那些生物膜的CFU计数进行对比。与此同时,将剩余的生物膜通过声处理进行破碎,并铺板进行生存力测定。以此方式,可以确定PlySs2是否介导粪肠球菌从生物膜的释放,其中它可以被达托霉素

杀死。

[0242] 还如下所述用溶素<sup>S</sup>抗生素<sup>S</sup>、溶素<sup>S</sup>抗生素<sup>R</sup>、溶素<sup>R</sup>抗生素<sup>S</sup>组合评价了生物膜。

[0243] I. 葡萄球菌属/肠球菌属混合生物膜-用如上所述的溶素+抗生素处理。

[0244] II. 制备和评价了金黄色葡萄球菌/表皮葡萄球菌混合生物膜或仅表皮葡萄球菌生物膜。还使用从金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌属细菌形成的生物膜,如上所述进行实验。

[0245] III. 葡萄球菌+肠球菌细菌生物膜的组合,用PlySs2和达托霉素或其它抗生素处理。

[0246] 使用从金黄色葡萄球菌和化脓链球菌(或停乳链球菌)形成的生物膜,如上所述进行实验。由于化脓链球菌(A群链球菌)和停乳链球菌(B群链球菌)都对PlySs2敏感,这些实验不使用达托霉素。相反,单独地评价PlySs2溶素,以破坏和杀死由葡萄球菌和链球菌组成的混合生物膜中的生物体。

[0247] 实施例4

[0248] 体内基于导管的生物膜模型

[0249] 由于细菌生物膜对常规抗生素的顽固性质,与内在装置有关的金黄色葡萄球菌感染可以是非常难以治疗的,并且通常需要取出被感染的装置诸如导管。可以施用抗生素的疗程,并且甚至可以似乎会消除大多数装置相关的细菌,仅仅在几天内具有感染复发。这被认为源自生物膜中的残余持续(persister)葡萄球菌过度生长、再繁殖生物膜和在装置部位或别处重新接种感染(Darouiche RO (2004) N Engl J Med 350:1422-1429)。因此,能够快速杀死生物膜中的葡萄球菌并且对浮游的细菌也有有效的治疗将具有重大益处。在先前的实施例中证实了PlySs2溶素会快速地和有效地清除体外金黄色葡萄球菌生物膜。本研究评估了PlySs2溶素根除小鼠体内的植入导管上的建立的金黄色葡萄球菌生物膜的能力。

[0250] 使用位于肋腹皮下、腹膜内或肌肉内进入大腿中的导管,评价了基于导管的模型(改自Zhu Y等人(2007) Infect Immunol 75 (9):4219-4226)。使用该基于导管的鼠模型来评估PlySs2对体内生物膜生存力的影响。在植入之前,在体外在导管管道(含有DEHP [邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯]作为塑化剂的PVC [聚氯乙烯];CareFusion SmartSite输液装置, #72023)的区段上培养生物膜。给每个2英寸导管的管腔接种200 $\mu$ l胰蛋白酶大豆液体培养基(TSB),其补充了含有 $2 \times 10^7$  CFU的金黄色葡萄球菌的0.25%葡萄糖,并将生物膜在37 $^{\circ}$ C培养72小时。可替换地,将导管切成2 mm区段,并放在1.0 ml补充了0.25%葡萄糖的接种的TSB中,并在植入之前将导管区段每天传代到新鲜培养基中持续3天。通过腹膜内注射0.15 ml 100 mg/kg氯胺酮和10 mg/kg赛拉嗪(Butler-Schein),在6-8周龄Balb/c小鼠中诱导麻醉。将导管区段皮下地植入小鼠的每个肋腹中,或可替换地植入腹膜内空间或大腿肌肉中。给5-10只小鼠的各组植入生物膜。在植入后1-24小时,用适当量的PlySs2、抗生素或媒介物、或PlySs2 + 抗生素的组合治疗小鼠。在感染后1-4天,将得自每个组的所有小鼠人道地处死。为了定量生物膜形成,在处死后立即取出受感染的导管,在无菌PBS中轻轻洗涤3次以除去非粘附细菌,并随后放在5 ml无菌PBS中。通过超声处理从导管除去粘附细菌。然后通过适当的在选择性培养基上的系列稀释和平板计数,定量回收的细菌的数目。可替换地,将洗涤过的导管通过在亚甲蓝中温育15分钟进行染色,在5 ml无菌PBS中洗涤2次,并显影。然后可以如下定量亚甲蓝染色剂:在0.2 ml 30%乙酸中在室温脱色,并在600 nm读出

吸光度。将残余生物膜质量的程度表达为在600 nm的吸光度读出除以导管区段的重量( $OD_{600}$ /克)。

[0251] 图15提供了这样的导管研究的结果,其中将具有培养了3天的金黄色葡萄球菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)生物膜的导管植入小鼠的皮下空间中,然后在植入后24小时治疗。给每只小鼠植入2个导管,并且针对下述条件中的每一种评价2只小鼠:阴性对照(没有生物膜,没有药剂),PlySs2对照(没有生物膜,用PlySs2药剂假治疗),仅媒介物,腹膜内地(IP)施用的PlySs2,静脉内地(IV)施用的PlySs2,和皮下地(SC)施用的PlySs2。施用PlySs2作为100 $\mu$ g的单次快速推注(对应于小鼠中的5mg/kg和~50 $\mu$ g/ml剂量)。在治疗后6小时取出导管,并用亚甲蓝染色。在图15中呈现了在每种条件下的染色的相对量(在600nm显影)。IP、IV和SC剂量中的每一种减少了染色,其中皮下推注导致导管中的染色消除至接近对照水平。

#### [0252] 实施例5

[0253] 在另一组实验中,用PlySs2溶素预先灌输小鼠中的植入的颈静脉导管,以评估该预处理对小鼠免于生物膜感染的保护。使用上述的颈静脉导管动物模型,在金黄色葡萄球菌攻击之前24 h,用PBS中的PlySs2溶素的灌输,预处理具有颈静脉导管的小鼠的导管。对照动物接受用单独PBS预处理的导管。在攻击当天,在攻击之前2 h,将所有导管用PBS冲洗以除去多余的未结合的溶素,然后如上所述经由尾静脉用金黄色葡萄球菌攻击小鼠。在细菌攻击以后的不同天,处死攻击的动物,回收导管和器官,并如上所述定量细菌。

#### [0254] 实施例6

[0255] 葡萄球菌性心内膜炎是一种基于生物膜的感染,其可以在大鼠的主动脉瓣中实验性地诱导(Entenza JM等人(2005) IAI 73:990-998)。简而言之,如以前所述(Entenza等人),在大鼠中制备无菌主动脉增殖体,并安装用于递送溶素的输液泵。24 h以后,通过 $10^5$ - $10^7$ 个葡萄球菌的静脉内攻击,诱导心内膜炎。在感染后24或48小时,静脉内地施用溶素和/或抗生素诸如达托霉素、万古霉素或利奈唑胺。对照大鼠接受单独的缓冲液。在感染后的不同时间点直到72小时,将动物处死,并进行定量血液和增殖体培养。将细菌密度分别表达为每mL或每克组织的 $\log_{10}$  CFU。

#### [0256] 实施例7

[0257] 为了对比PlySs2和护理标准抗生素的相对生物膜根除活性,在MRSA生物膜上进行PlySs2和抗生素活性的24小时时程分析。如下在24-孔聚苯乙烯平板中制备生物膜:将 $10^5$ 个细菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)接种进每个孔的0.5 ml含有0.2%葡萄糖胰蛋白酶-大豆液体培养基(TSB+)中,并在37 $^{\circ}$ C温育24小时。为每个要评估的处理时间点(0、0.5、1、2、4、6和24小时),制备一个平板。24小时以后,抽吸培养基,并将孔用1X PBS洗涤2次,并加入药物处理和开始处理时间。将在1 ml MHB2 (或补充至50  $\mu$ g  $CaCl_2$ /ml的MHB2)中的指定药物浓度(对达托霉素、万古霉素或利奈唑胺,为1000X MIC;对于PlySs2溶素,为1X MIC)加入每个孔中,并在抽吸之前温育指定的时间段,用1X PBS洗涤2次,并风干15分钟。将孔用1 ml的3%结晶紫溶液染色5 min,然后抽吸,用1X PBS洗涤3次,风干15分钟,并拍摄照片。一式两份地进行所有实验。结果显示在图6和7中。在图6中显示了孔的结晶紫染色,在图7中显示了保留在板孔中的染料的定量。1X MIC的PlySs2在2小时之前完全清除了生物膜,而1000X MIC浓度的达托霉素、万古霉素和利奈唑胺在24小时没有表现出生物膜清除。

[0258] 为了确定亚MIC浓度的PlySs2处理生物膜的能力,进行了24小时时程分析。如下在

24-孔聚苯乙烯平板中制备生物膜：将 $10^5$ 个细菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)接种进每个孔的0.5 ml含有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶-大豆液体培养基(TSB+)中,并在37℃温育24小时。为每个要评估的处理时间点(30 min、1小时、4小时、24小时),制备一个平板。24小时以后,抽吸培养基,并将孔用1X PBS洗涤2次,并加入PlySs2和开始处理时间。将在1 ml MHB2中的指定PlySs2浓度(0.1X MIC和0.01X MIC)或单独媒介物加入每个孔中,并在抽吸之前温育指定的时间段,用1X PBS洗涤2次,并风干15分钟。将孔用1 ml的3%结晶紫溶液染色5 min,然后抽吸,用1X PBS洗涤3次,风干15分钟,并拍摄照片。一式两份地进行所有实验。结果显示在图8中。0.1X MIC的PlySs2在4小时之前清除了生物膜。0.01X MIC的PlySs2在4小时产生了部分清除,而在24小时时间点之前观察到完全清除。

#### [0259] 实施例8

[0260] 针对在导管上生长的MRSA生物膜,评估了PlySs2和达托霉素的生物膜根除活性。如下在导管管道(含有DEHP [邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯]作为塑化剂的PVC [聚氯乙烯];(CareFusion SmartSite输液装置, #72023)的2英寸区段中制备生物膜：将 $10^5$ 个细菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)接种进每个区段的0.2 ml含有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶-大豆液体培养基(TSB+)中,并在37℃温育72小时。对于亚甲蓝染色或CFU定量,一式两份地建立所有样品。72小时以后,将培养基冲出,将区段用1 ml 1X PBS洗涤,并加入处理。将在0.2 ml含乳酸盐的林格氏溶液中的指定药物浓度(对于达托霉素,为1X MIC和1000X MIC;对于PlySs2,为1X MIC)加给每个区段,并在冲洗之前温育24小时,并用1ml 1X PBS洗涤。然后如下检查副本样品：为了评估生物膜根除,将区段用0.22 ml的0.02%亚甲蓝溶液(在水中)染色15 min。然后将区段冲洗,用dH<sub>2</sub>O洗涤3次,风干15分钟,并拍摄照片。为了定量在残余生物膜内保留的活细胞的量,将副本区段用0.22 ml裂解缓冲液(在含乳酸盐的林格氏溶液中的100 ug/ml溶葡萄球菌酶)处理8分钟。接着,取出0.1 ml样品,加入96-孔固体白色聚苯乙烯板,并与0.1 ml Promega BacTiter-Glo 荧光素/荧光素酶试剂混合,立即测量相对光单位(RLU) (如试剂盒生产商的说明书所规定的),并与以前制备的标准曲线(其将RLU值与已知细菌浓度相关联)进行对比。以此方式,确定每个生物膜中的细菌CFU的估测值。

[0261] 结果显示在图9中。在图9A中显示了相对生物膜染色。1X MIC的PlySs2从导管完全清除了生物膜,而即使1000X MIC的达托霉素也没有除去显著的生物膜。如在图9B中所见,1X MIC的PlySs2使CFU下降至100 CFU/ml,这是检测限度,而用1X MIC的达托霉素没有观察到CFU下降,并且在1000X MIC达托霉素观察到从1亿CFU/ml至100万CFU/ml的2个对数下降。

[0262] 为了确定从导管根除生物膜所需的PlySs2的最低量,进行了一个滴定实验(图10)。如下在DEHP导管管道的2 cm区段中制备生物膜：将 $10^5$ 个细菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)接种进每个区段的0.2 ml含有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶-大豆液体培养基(TSB+)中,并在37℃温育72小时。72小时以后,将培养基冲出,将区段用1 ml 1X PBS洗涤,并加入药物处理。将在0.2 ml含乳酸盐的林格氏溶液中的指定药物浓度(1X、0.1X、0.01X、0.001X、0.0001X和0.00001X MIC量的PlySs2)加给每个区段,并在冲洗之前温育24小时,并用1ml 1X PBS洗涤。将区段用0.22 ml的0.02%亚甲蓝溶液(在水中)染色15 min。然后冲洗,用dH<sub>2</sub>O洗涤3次,风干15分钟,并拍摄照片。通过染色确定的完全根除生物膜所需的PlySs2的量为0.01X MIC (0.32 ug/ml) (图10)。用达托霉素(1X、10X、100X、1000X、5000X MIC达托霉素)进行的一项类似的滴定分析表明,高达5000X MIC (5 mg/ml)的达托霉素浓度没有除去生物膜(图11)。

[0263] 为了定量溶素或抗生素处理生物膜以后剩余的CFU,将如在图10和11中评估的副本区段用0.22 ml裂解缓冲液(在含乳酸盐的林格氏溶液中的100 ug/ml溶葡萄球菌酶)处理8分钟。接着,取出0.1 ml样品,加入96-孔固体白色聚苯乙烯板,并与0.1 ml Promega BacTiter-Glo 荧光素/荧光素酶试剂混合,立即测量相对光单位(RLU) (如试剂盒生产商的说明书所规定的),并与以前制备的标准曲线(其将RLU值与已知细菌浓度相关联)进行对比。以此方式,确定每个生物膜中的细菌CFU的估测值。该滴定分析证实了亚甲蓝染色的结果,并提供在图13中。低至0.01X MIC浓度的PlySs2可有效地除去生物膜细菌,而高达5000x MIC浓度的达托霉素是完全无效的。

[0264] 然后针对MRSA导管生物膜进行了PlySs2活性的时程分析(图12)。如下在DEHP导管的2英寸区段中制备生物膜:将 $10^5$ 个细菌(MRSA菌株ATCC BAA-42)接种进每个区段的0.2 ml含有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶-大豆液体培养基(TSB+)中,并在37℃温育72小时。为每个指定的时间点(0 min、5 min、15 min、30 min、60 min、90 min、2小时、3小时、4小时、5小时)建立2个样品,以适应亚甲蓝染色和CFU定量。72小时以后,将培养基冲出,将区段用1 ml 1X PBS洗涤,并加入处理。将在0.2 ml含乳酸盐的林格氏溶液中的PlySs2 (1X MIC浓度或32 ug/mL)加给每个区段,并在冲洗之前温育指定的时间点,并用1ml 1X PBS洗涤。然后如下在每个时间点检查副本样品:将区段用0.22 ml的0.02%亚甲蓝溶液(在水中)染色15 min。然后将区段冲洗,用dH<sub>2</sub>O洗涤3次,风干15分钟,并拍摄照片。将副本区段用0.22 ml裂解缓冲液(在含乳酸盐的林格氏溶液中的100 ug/ml溶葡萄球菌酶)处理8分钟。接着,取出0.1 ml样品,加入96-孔固体白色聚苯乙烯板,并与0.1 ml Promega BacTiter-Glo 荧光素/荧光素酶试剂混合,立即测量相对光单位(RLU) (如试剂盒生产商的说明书所规定的),并与以前制备的标准曲线(其将RLU值与已知细菌浓度相关联)进行对比。以此方式,确定每个生物膜中的细菌CFU的估测值。时程分析揭示了1X MIC PlySs2随之间从导管逐渐除去可染色的生物膜,在60分钟之前完全除去(图12A)。CFU分析揭示了类似的渐进时程,CFU值在60分钟之前达到检测限度(100 CFU/ml) (图12B)。

#### [0265] 实施例9

[0266] 为了确定PlySs2在模拟导管场合中的稳定性,在含乳酸盐的林格氏溶液中在37℃温育不同浓度的PlySs2。7天以后,如下评估PlySs2的裂解活性:加入 $1 \times 10^5$ 个葡萄球菌,温育4小时,然后用蛋白水解酶K处理以除去残余的PlySs2,并进行系列稀释和铺板进行生存力测定。将每种条件的得到的CFU值除以 $1 \times 10^5$ 以确定活性损失百分比。

[0267] 在下面在表6中列出了结果。在含乳酸盐的林格氏溶液中在37℃温育7天以后,观察10X和100X MIC浓度的PlySs2的不可检测的活性损失,而对于1X MIC样品确定了58.3%损失。

[0268] 表6

[0269] 在含乳酸盐的林格氏溶液中在37℃的PlySs2稳定性

[0270]

处理	活性损失百分比(7天)
1X MIC	58.3
10X MIC	<0.002
100X MIC	<0.002

[0271] 上面指示, P1ySs2在模拟导管场合中具有活性且稳定至少多达7天, 并且可以有效地杀死葡萄球菌, 并由此阻止细菌定殖, 即使在含乳酸盐的林格氏溶液(一种示例性的标准护理IV和冲洗溶液)在温育长时间段以后。

[0272] 实施例10

[0273] 进行一项时程研究以评价导管中的腔灭菌, 从而评估在溶素处理以后从生物膜移出并悬浮于管腔的液相中的细菌的生存力。在上述的图12中, 证实了生物膜(粘附于壁)在1小时之前失去和完全分散。在本研究中, 如通过检测活细胞的CFU分析所评价的, 管腔中的细菌的灭菌(完全杀死)发生在大约6-24小时之间。使菌株ATCC BAA-42在37°C形成生物膜3天。将生物膜用1X PBS洗涤(以除去浮游的细胞), 并用含乳酸盐的林格氏溶液(缓冲液对照)或含有P1ySs2溶素(1X MIC浓度)或达托霉素(1X MIC浓度)的含乳酸盐的林格氏溶液以及用P1ySs2溶素(10X MIC浓度)处理。将生物膜处理至多24小时, 并在2分钟、15分钟、30分钟、1小时、2小时、6小时和24小时评价CFU。在每个时间点, 取出导管的管腔内容物, 并铺板进行生存力测定。图16提供了1X MIC (32µg/ml)、1X MIC达托霉素和10X MIC (320µg/ml)水平处理相对于单独缓冲液的结果。

[0274] 实施例11

[0275] 评价了溶素对表皮葡萄球菌生物膜的有效性。在聚苯乙烯24-孔微孔滴定板中制备不同表皮葡萄球菌菌株的生物膜, 并用P1ySS2溶素处理以确定P1ySs2对每种菌株的最低抑制浓度(MIC)和生物膜根除浓度(BEC)。在下面表7中列出了针对超过20种不同表皮葡萄球菌菌株的结果。使用如在上面实施例中描述和提及的液体培养基微量稀释的标准CLSI方法, 确定和计算MIC(以微克/ml为单位)。P1ySs2的生物膜根除浓度(BEC)(以微克/ml为单位)是完全地破坏指定菌株的24小时生物膜的稀释范围的最低浓度。

[0276] 为了确定BEC, 将24 h生物膜在24孔板中培养, 用PBS洗涤2次, 并用或不用在含乳酸盐的林格氏溶液中制备的P1ySs2(稀释范围)处理。将经处理的平板在37°C(环境空气)温育24小时, 用PBS洗涤, 并用结晶紫(CV)染色15分钟。接下来用每个孔中的1 mL 33%乙酸溶解CV染色剂, 并使用200 µL溶解的CV读出吸光度(OD<sub>600nm</sub>)。通过将所述孔的吸光度除以无溶素孔(生物膜对照)的吸光度, 确定生物膜百分比。将BEC确定为表现出>75%的生物膜清除的值。

[0277] 表7

[0278]

CFS	类型	命名	MIC	BEC
166	表皮葡萄球菌	环境实验室污染物; NY, NY, 16S rRNA 测序	na	5.12
224	表皮葡萄球菌	HER 1292	512	5.12
225	表皮葡萄球菌	HPH-6	128	0.512
226	表皮葡萄球菌	HPH-5	512	5.12
227	表皮葡萄球菌	HCN-4	>512	5.12
272	表皮葡萄球菌	NRS53 (VISE)	128	0.215
280	表皮葡萄球菌	NRS101 (MRSE)	128	0.512
300	表皮葡萄球菌	NRS8, (VISE)	32	0.512
313	表皮葡萄球菌	NRS34 (VISE)	8	0.512
533	表皮葡萄球菌	NRS6; (VISE); 血流 <b>USA</b>	>512	0.512
552	表皮葡萄球菌	ATCC #12228 (MSSE)	na	51.2
769	表皮葡萄球菌	NRS101	64	0.512
1152	表皮葡萄球菌	ATCC-14990	na	5.12
1154	表皮葡萄球菌	ATCC-49461	na	5.12
1161	表皮葡萄球菌	NRS850-VCU028	na	5.12
1164	表皮葡萄球菌	NRS853-VCU041	na	5.12
1165	表皮葡萄球菌	NRS854-VCU045	na	5.12
1168	表皮葡萄球菌	NRS857-VCU065	na	0.512
1174	表皮葡萄球菌	NRS864-VCU112	na	51.2
1184	表皮葡萄球菌	NRS874-VCU126	na	5.12
1185	表皮葡萄球菌	NRS875-VCU127	na	5.12
1186	表皮葡萄球菌	NRS876-VCU128	na	0.512

[0279] MIC =使用液体培养基微量稀释的标准CLSI方法计算的PlySs2的最小抑制浓度(以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计)。na指示不可得到数据

[0280] BEC = PlySs2的生物膜根除浓度(以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计)是完全地破坏指定的菌株的24小时生物膜的稀释范围的最低浓度。

[0281] 这些结果证实了PlySs2溶素对表皮葡萄球菌生物膜的有效活性;值得注意的是,所述有效活性扩展至具有高PlySs2 MIC表皮葡萄球菌生物膜的菌株;值得注意的是,所述有效活性扩展至具有高PlySs2 MIC水平的菌株。这些数据指示PlySs2对宽范围的表皮葡萄球菌生物膜是有活性的。

[0282] 将导管中的表皮葡萄球菌生物膜用PlySs2处理,并使用如上关于金黄色葡萄球菌研究类似地描述的方法进行评价。表皮葡萄球菌不会象前面描述的金黄色葡萄球菌菌株一样稳健地在导管上产生生物膜,但是,生物膜生长确实发生且可以进行评价。

[0283] 在图17中显示了在用10X MIC及以下的PlySs2处理的导管上的表皮葡萄球菌(菌株CFS 313 NRS34,其为一种万古霉素中间体敏感的表皮葡萄球菌(VISE)菌株)生物膜研究

的结果。在低至0.1X MIC的PlySs2浓度,破坏表皮葡萄球菌生物膜。这里的MIC是8 ug/ml。用金黄色葡萄球菌菌株CFS 218 (MRSA菌株ATCC BAA-42)观察到一项类似的结果和可比较的活性水平。

#### [0284] 实施例12

[0285] 在图18中呈现了生物膜阻止测定的结果。将金黄色葡萄球菌MRSA菌株BAA-42 ( $5 \times 10^5$ 细菌/ml)在2 ml TSB + 0.2%葡萄糖中接种进24孔板的一行的每个孔中。立即加入溶素PlySs2 (浓度为1X MIC (32 ug/ml)、0.1X MIC、0.01X MIC、0.001X MIC和0.0001X MIC),然后在37°C在环境空气中温育6小时。将孔用PBS洗涤,用结晶紫染色,并拍摄照片以评价在每种条件下的生物膜发展。同时也评价了缓冲液对照。在本研究中,同时加入细菌和溶素PlySs2 (不同浓度),并允许生物膜形成进行6小时。如在图18中证实的,与1X和0.1X MIC PlySs2一起预温育可以有效地和完全地阻止随后的生物膜形成。因而,PlySs2不仅可以根除成熟的生物膜,它还可以阻止生物膜从头形成。

#### [0286] 实施例13

[0287] 除了如上所述用BAA-42 MRSA制备的生物膜以外,评价了其它金黄色葡萄球菌菌株生物膜对PlySs2溶素的易感性。使用如上所述的方法,在导管研究中评价了每种MRSA菌株CFS 553 (ATCC 43300) (图19)和CFS 992 (JMI 5381)。在每种情况下,将3天龄生物膜洗涤,并用指定的PlySs2浓度处理4小时。菌株ATCC 43300的1X MIC为16 $\mu$ g/ml,且菌株JMI 5381的1X MIC为32 $\mu$ g/ml。如在图19和20中所示,这些替代性的MRSA菌株生物膜对PlySs2是敏感的,并且在10X MIC、1X MIC和0.1X MIC水平的PlySs2根除和完全分散导管生物膜。使用0.01X MIC PlySs2,显著减少了每个菌株的生物膜。

#### [0288] 实施例14

[0289] 如上在导管管道(含有DEHP作为塑化剂的PVC)上制备生物膜,并通过扫描电子显微术(SEM)评价PlySs2敏感性。将导管表面上的MRSA菌株CFS 218 (MRSA菌株ATCC BAA-42)的3天龄生物膜用在含乳酸盐的林格氏溶液中的1X MIC浓度(即32 ug/ml)的PlySs2处理30秒或15分钟,然后将处理洗掉,并将剩余的生物膜用戊二醛固定。在导管表面上固定以后,将样品进一步加工,并通过扫描电子显微术在5000倍放大率进行分析(图21)。包括使用单独缓冲液(即单独的含乳酸盐的林格氏溶液)的处理作为对照。如在图21中所示,PlySs2处理快速地减少MRSA生物膜(在30秒内),并且在15分钟之前几乎完全除去生物膜。

#### [0290] 参考文献

1. Klevens, R.M., 等人. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA* **298**, 1763-1771 (2007).
2. Brink, A.J. Does resistance in severe infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* give you the 'creeps'? *Current opinion in critical care* **18**, 451-459 (2012).
3. Ben-David, D., Novikov, I. 和 Mermel, L.A. Are there differences in hospital cost between patients with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and those with methicillin-susceptible *S. aureus* bloodstream infection? *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* **30**, 453-460 (2009).
4. Fischetti, V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current opinion in microbiology* **11**, 393-400 (2008).
5. Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony, J. 和 Coffey, A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs* **1**, 9-16 (2010).

[0291]

6. Nelson, D., Loomis, L. 和 Fischetti, V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4107-4112 (2001).
7. Witzenth, M., 等人. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Critical care medicine* **37**, 642-649 (2009).
8. McCullers, J.A., Karlstrom, A., Iverson, A.R., Loeffler, J.M. 和 Fischetti, V.A. Novel Strategy to Prevent Otitis Media Caused by Colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS pathogens* **3**, 0001-0003 (2007).
9. Pastagia, M., 等人. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 738-744 (2011).
10. Loeffler, J.M., Djurkovic, S. 和 Fischetti, V.A. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infection and Immunity* **71**, 6199-6204 (2003).
11. Entenza, J.M., Loeffler, J.M., Grandgirard, D., Fischetti, V.A. 和 Moreillon, P. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 4789-4792 (2005).
12. Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A. 和 Leib, S.L. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases* **197**, 1519-1522 (2008).
13. Blaser, M. Stop killing beneficial bacteria. *Nature* **476**, 393-394 (2011).
14. Willing, B.P., Russell, S.L. 和 Finlay, B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 233-243 (2011).
15. Gilmer, D.B., Schmitz, J.E., Euler, C. 和 Fischetti, V.A. Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* *TBD* (2012).
16. Schuch, R., Fischetti, V.A. 和 Nelson, D.C. A Genetic Screen to Identify Bacteriophage Lysins. in *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects*, 第502卷 307-319 (2009).
17. Bateman, A. 和 Rawlings, N.D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci* **28**, 234-237 (2003).
18. Whisstock, J.C. 和 Lesk, A.M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 132-133 (1999).
19. Rossi, P., 等人. Structural elucidation of the Cys-His-Glu-Asn proteolytic relay in the secreted CHAP domain enzyme from the human pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Proteins* **74**, 515-519 (2009).
20. Mueller, M., de la Pena, A. 和 Derendorf, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 369-377 (2004).
21. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 第32卷 (Wayne (PA): 临床和实验室标准学会(US), 2012).
22. Friedman, L., Alder, J.D. 和 Silverman, J.A. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 2137-2145 (2006).
23. Donlan, R.M. 和 Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193 (2002).
24. Cottarel, G. 和 Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in biotechnology* **25**, 547-555 (2007).

[0292]

25. Tallarida, R.J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **342**, 2-8 (2012).
26. LaPlante, K.L., Leonard, S.N., Andes, D.R., Craig, W.A. 和 Rybak, M.J. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 2156-2162 (2008).
27. Crandon, J.L., Kuti, J.L. 和 Nicolau, D.P. Comparative efficacies of human simulated exposures of telavancin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a range of vancomycin MICs in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 5115-5119 (2010).
28. Abad, C.L., Kumar, A. 和 Safdar, N. Antimicrobial therapy of sepsis and septic shock--when are two drugs better than one? *Critical care clinics* **27**, e1-27 (2011).
29. Fischbach, M.A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology* **14**, 519-523 (2011).
30. Loeffler, J.M., Nelson, D. 和 Fischetti, V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**, 2170-2172 (2001).
31. Costerton, J.W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **284**, 1318-1322 (1999).
32. Kiedrowski, M.R. 和 Horswill, A.R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1241**, 104-121 (2011).
33. Domenech, M., Garcia, E. 和 Moscoso, M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 4144-4148 (2011).
- [0293] 34. Meng, X., 等人. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and environmental microbiology* **77**, 8272-8279 (2011).
35. Schuch, R., Nelson, D. 和 Fischetti, V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* **418**, 884-889 (2002).
36. Fischetti, V.A., Nelson, D. 和 Schuch, R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology* **24**, 1508-1511 (2006).
37. Manoharadas, S., Witte, A. 和 Blasi, U. Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of biotechnology* **139**, 118-123 (2009).
38. Rashel, M., 等人. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *The Journal of infectious diseases* **196**, 1237-1247 (2007).
39. Daniel, A., 等人. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 1603-1612 (2010).
40. Kokai-Kun, J.F., Chanturiya, T. 和 Mond, J.J. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **60**, 1051-1059 (2007).
41. Dhand, A., 等人. Use of antistaphylococcal beta-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **53**, 158-163 (2011).
42. Matias, V.R. 和 Beveridge, T.J. Cryo-electron microscopy of cell division in *Staphylococcus aureus* reveals a mid-zone between nascent cross walls. *Molecular microbiology* **64**, 195-206 (2007).

43. Kashyap, D.R., 等人, Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nature medicine* **17**, 676-683 (2011).
44. Moise, P.A., North, D., Steenbergen, J.N. 和 Sakoulas, G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* **9**, 617-624 (2009).
45. Jobson, S., Moise, P.A. 和 Eskandarian, R. Retrospective observational study comparing vancomycin versus daptomycin as initial therapy for *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical therapeutics* **33**, 1391-1399 (2011).
46. Schweizer, M.L., 等人, Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC infectious diseases* **11**, 279 (2011).
- [0294] 47. Berti, A.D., 等人, Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 5046-5053 (2012).
48. Sopirala, M.M., 等人, Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 4678-4683 (2010).
49. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 第32卷(临床和实验室标准学会(US), Wayne (PA), 2012).
50. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 第3版 Washington DC, (ASM Press, 2010).
51. Pereira, P.M., Filipe, S.R., Tomasz, A. 和 Pinho, M.G. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 3627-3633 (2007).
52. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**, 40 (2008).
53. Pettersen, E.F., 等人, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and [0295] analysis. *Journal of computational chemistry* **25**, 1605-1612 (2004).
- [0296] 本发明可以以其它形式体现或以其它方式执行,而不背离其精神或基本特征。因此,本公开内容应当在所有方面视做举例说明且不是限制性的,本发明的范围由所附权利要求指示,并且意图在其中包含落入等同的含义和范围内的所有变化。
- [0297] 贯穿本说明书引用多篇参考文献,它们中的每一篇通过引用整体并入本文。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	Schuch, Raymond														
[0003]	<120>	使用噬菌体溶素的生物膜预防、破坏和处理														
[0004]	<130>	3136-1-008PCT														
[0005]	<140>	未指定														
[0006]	<141>	2013-05-09														
[0007]	<150>	61/644,799														
[0008]	<151>	2012-05-09														
[0009]	<150>	61/736,813														
[0010]	<151>	2012-12-13														
[0011]	<160>	5														
[0012]	<170>	PatentIn 3.5版														
[0013]	<210>	1														
[0014]	<211>	245														
[0015]	<212>	PRT														
[0016]	<213>	猪链球菌														
[0017]	<400>	1														
[0018]	Met Thr Thr Val Asn Glu Ala Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly															
[0019]	1	5	10	15												
[0020]	Ser Gly Val Ser Val Gly Asn Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp															
[0021]	20	25	30													
[0022]	Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly															
[0023]	35	40	45													
[0024]	Val Gly Trp Val Ser Gly Ala Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn															
[0025]	50	55	60													
[0026]	Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr															
[0027]	65	70	75	80												
[0028]	Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro															
[0029]	85	90	95													
[0030]	Gly Asn Pro Tyr Gly His Val Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp															
[0031]	100	105	110													
[0032]	Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln Asn Tyr Gly Gly Lys Arg Tyr Pro Val															
[0033]	115	120	125													
[0034]	Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr															
[0035]	130	135	140													
[0036]	Ile Thr Pro Pro Gly Thr Val Ala Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ala Gly															
[0037]	145	150	155	160												
[0038]	Ser Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala															

[0039]		165		170		175	
[0040]	Leu Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val						
[0041]		180		185		190	
[0042]	Tyr Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val						
[0043]		195		200		205	
[0044]	Asn Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn						
[0045]		210		215		220	
[0046]	Tyr Val Ala Thr Gly Ala Thr Lys Asp Gly Lys Arg Phe Gly Asn Ala						
[0047]	225		230		235		240
[0048]	Trp Gly Thr Phe Lys						
[0049]		245					
[0050]	<210> 2						
[0051]	<211> 738						
[0052]	<212> DNA						
[0053]	<213> 猪链球菌						
[0054]	<400> 2						
[0055]	atgacaacag taaatgaagc attaaataat gtaagagctc aggttgggtc cgggtgtgtct	60					
[0056]	gttggcaacg gcgaatgcta cgctttggct agttgggtac agcgcgatgat tagtccggat	120					
[0057]	gcaactgtcg gacttggcgc tgggtgtgggc tgggtcagcg gtgcaatcgg cgataacaatc	180					
[0058]	tctgcaaaaa acatcggtc atcatacaac tggcaagcta acggctggac agtttccaca	240					
[0059]	tctggtccat ttaaagcagg tcagattgtg acgcttgggg caacaccagg aaacccttac	300					
[0060]	ggacatgtgg taatcgtcga agcagtggac ggcgatagat tgactatttt ggagcaaaac	360					
[0061]	tacggcgga aacgttatcc cgctcgtaat tattacagcg ctgcaagcta tcgtcaacag	420					
[0062]	gtcgtgcatt acatcacacc gcctggcacg gtcgcacagt cagcacccaa ccttgcaggc	480					
[0063]	tctcgttcct atcgcgagac gggcactatg actgtcacgg tcgatgtctt caatgttcgc	540					
[0064]	aggcgccaa atacttcagg cgagattgta gcagtataca agcgtggtga atcatttgac	600					
[0065]	tatgatactg tcatcatcga tgtcaatggc tatgtctggg tgtcttacat aggcggcagc	660					
[0066]	ggcaaacgta actacgttgc gacgggcgct accaaagacg gtaagcgttt cggcaatgct	720					
[0067]	tggggtacat ttaaataa	738					
[0068]	<210> 3						
[0069]	<211> 139						
[0070]	<212> PRT						
[0071]	<213> 猪链球菌						
[0072]	<400> 3						
[0073]	Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly Ser Gly Val Ser Val Gly Asn						
[0074]	1	5		10		15	
[0075]	Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro						
[0076]		20		25		30	
[0077]	Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly Val Gly Trp Val Ser Gly Ala						

[0078]	35	40	45
[0079]	Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp		
[0080]	50	55	60
[0081]	Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly		
[0082]	65	70	75
[0083]	Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro Gly Asn Pro Tyr Gly His Val		
[0084]	85	90	95
[0085]	Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln		
[0086]	100	105	110
[0087]	Asn Tyr Gly Gly Lys Arg Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala		
[0088]	115	120	125
[0089]	Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr Ile Thr		
[0090]	130	135	
[0091]	<210> 4		
[0092]	<211> 67		
[0093]	<212> PRT		
[0094]	<213> 猪链球菌		
[0095]	<400> 4		
[0096]	Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala Leu		
[0097]	1	5	10
[0098]	Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val Tyr		
[0099]	20	25	30
[0100]	Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val Asn		
[0101]	35	40	45
[0102]	Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn Tyr		
[0103]	50	55	60
[0104]	Val Ala Thr		
[0105]	65		
[0106]	<210> 5		
[0107]	<211> 280		
[0108]	<212> PRT		
[0109]	<213> 金黄色葡萄球菌		
[0110]	<400> 5		
[0111]	Met Glu Thr Leu Lys Gln Ala Glu Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Val Asn		
[0112]	1	5	10
[0113]	Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu		
[0114]	20	25	30
[0115]	Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp		
[0116]	35	40	45

[0117]	Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr
[0118]	50 55 60
[0119]	Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val
[0120]	65 70 75 80
[0121]	Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val
[0122]	85 90 95
[0123]	Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu
[0124]	100 105 110
[0125]	Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile
[0126]	115 120 125
[0127]	Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe
[0128]	130 135 140
[0129]	Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Lys Pro Lys
[0130]	145 150 155 160
[0131]	Pro Ser Asn Arg Asp Gly Leu Asn Lys Asp Lys Ile Val Tyr Asp Arg
[0132]	165 170 175
[0133]	Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Gly Lys Ser Ala Ser Lys
[0134]	180 185 190
[0135]	Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Trp Ser Lys Gly
[0136]	195 200 205
[0137]	Ala Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr
[0138]	210 215 220
[0139]	Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala
[0140]	225 230 235 240
[0141]	Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly
[0142]	245 250 255
[0143]	Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu
[0144]	260 265 270
[0145]	Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe
[0146]	275 280

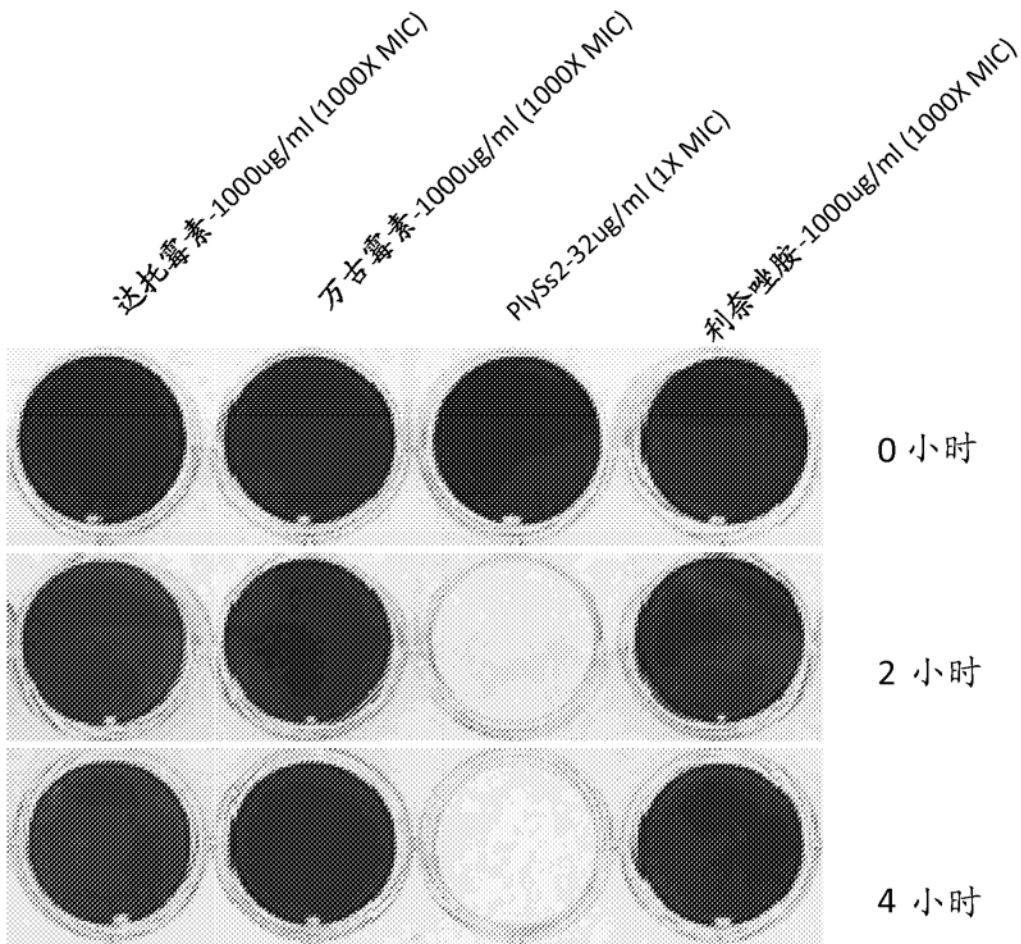


图 1

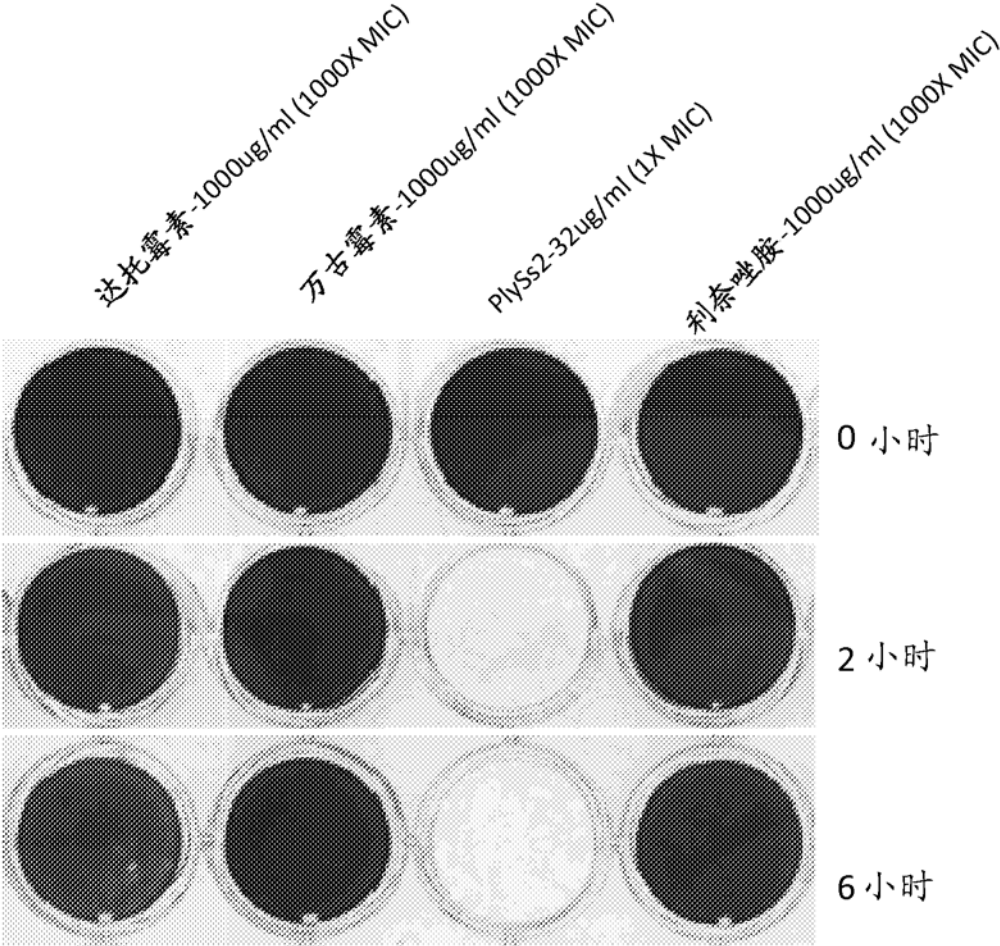


图 2

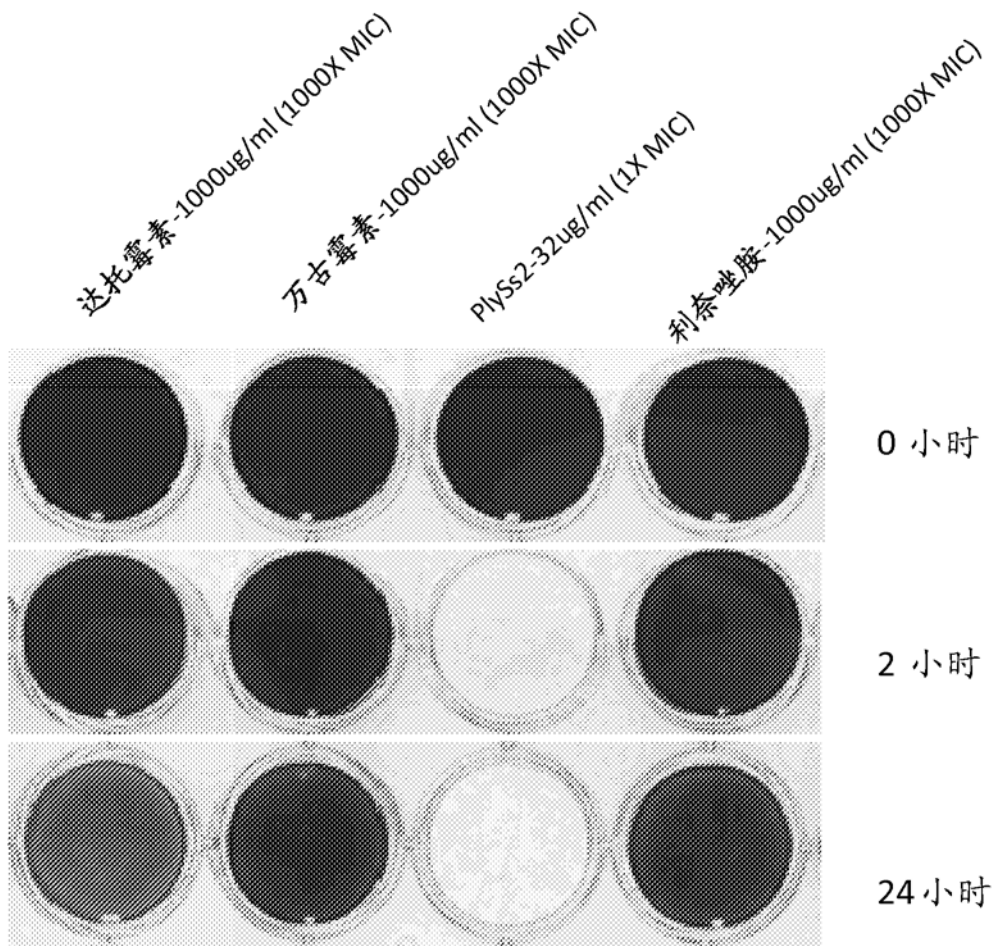


图 3

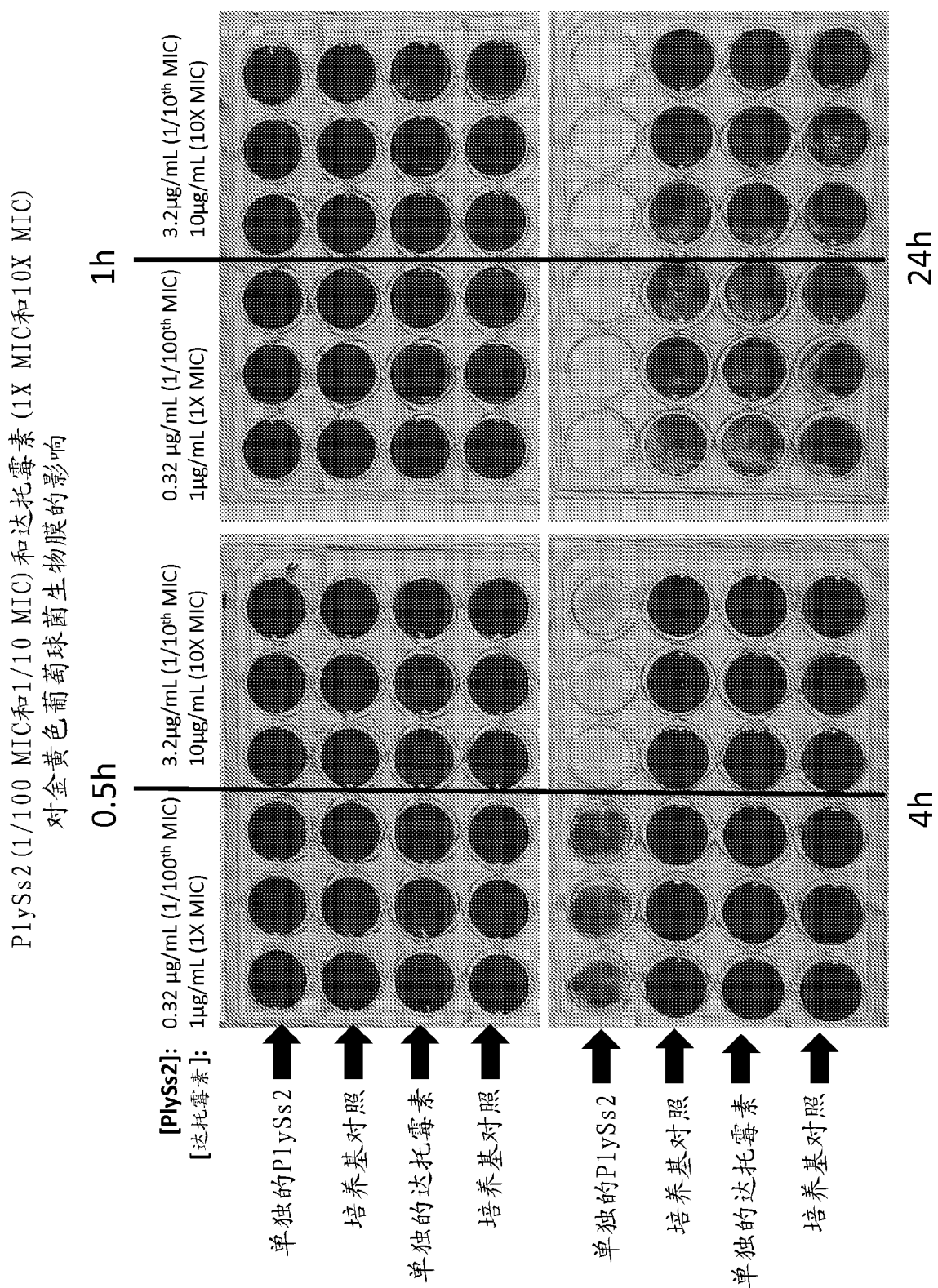
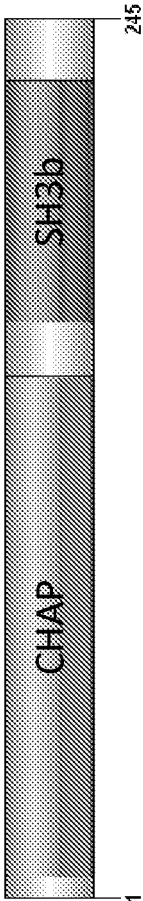


图 4

MTTVNEALNN VRAQVGSGVS VNGGEYALA SWYERMISPD ATVGLCAGVG WVSGAIGDTI SAKNIGSSYN  
WQANGWTVST SCPEKAGQIV TLGATPGNEY CHVVIVEAVD GDRLTILEQN YGCKRYEVRN YYSAAASYRQQ  
VVHYITPPGT VAQAPNLAG SRSYREITGM TWTVDALNVR RAPNTSEIV AVYKRGESEF YDTVLIIDVNG  
YVWVSYIGCS GKRNYVATGA TKDGKRFNGA WGTFFK

CHAP 结构域呈绿色 LNNVR...VVHYIT  
SH3-5 结构域呈红色 RSYRE...GKRNYVAT



ATGACAAACAG TAAATGAAGC ATTAAATAAT GTAAGAGCTC AGGTGGGTC CGGTGTGTCT GTTGGAACG  
GCGAATGCTA CGCTTTGGCT AGTTGGTACG AGCGCATGAT TAGTCCGGAT GCAACTGTCT GACTTGGCGC  
TGGTGTGGC TGGGTCAGCG GTGCAATCGG CGATACAAATC TCTGCCAAA ACATCGGCTC ATCATACAAC  
TGGCAAGCTA ACGGCTGGAC AGTTTCCACA TCTGGTCCAT TTAAGCAGG TCAGATTGTG ACGCTTGGGG  
CAACACCCAGG AAACCCTTAC GGACATGTGG TAATCGTCGA AGCAGTGGAC GCGATAGAT TGAATAATTT  
GGAGCAAAAC TACGGCGGGA AACGTTATCC CGTCCGTAAT TATTACAGCG CTGCAAGCTA TCGTCAACAG  
GTCGTGCATT ACATCACACC GCCTGGCAGG GTCGCACAGT CAGCACCCAA CCTTGCAGGC TCTCGTTCCT  
ATCGCGAGAC GGGCACTATG ACTGTACCG TCGATGCTCT CAATGTTCTG AGGCGCCAA ATACTTCAGG  
CGAGATTGTA GCAGTATACA AGCGTGGTGA ATCATTTGAC TATGATACTG TCATCATCGA TGTCAATGGC  
TATGTCTGGG TGTCTTACAT AGCGGCAGC GGCAAAACGTA ACTACGTTGC GACGGGCGCT ACCAAAGACG  
GTAAGCGTTT CGGCAATGCT TGGGGTACAT TTAAATAA

图 5

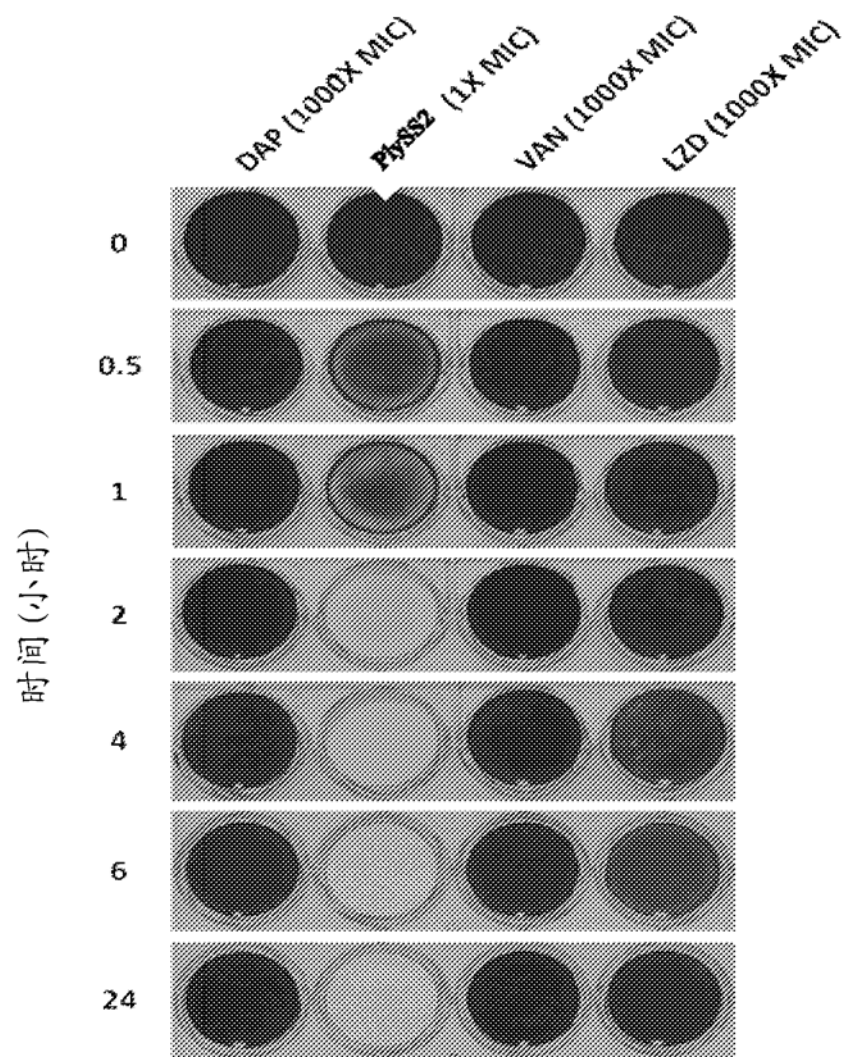


图 6

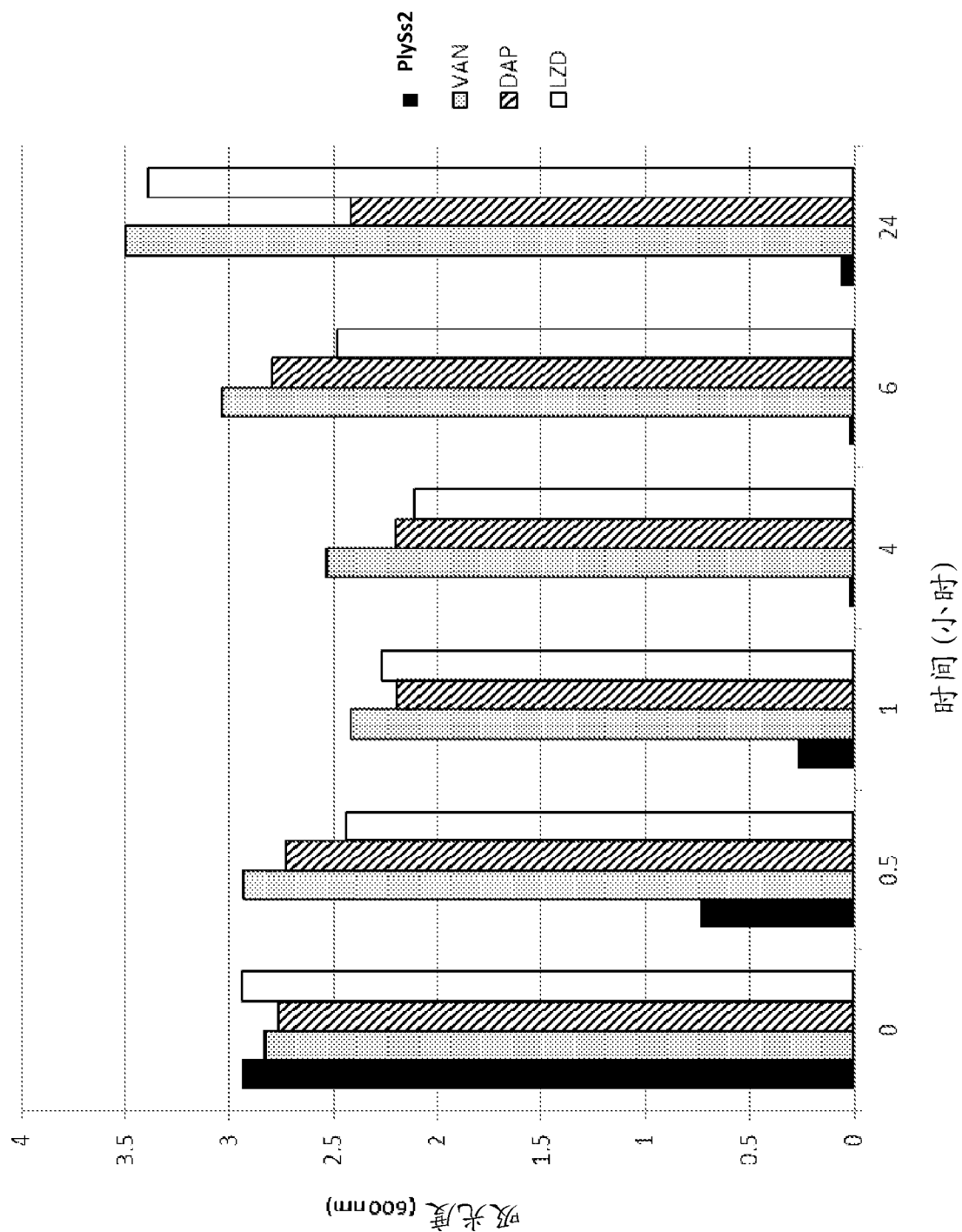


图 7

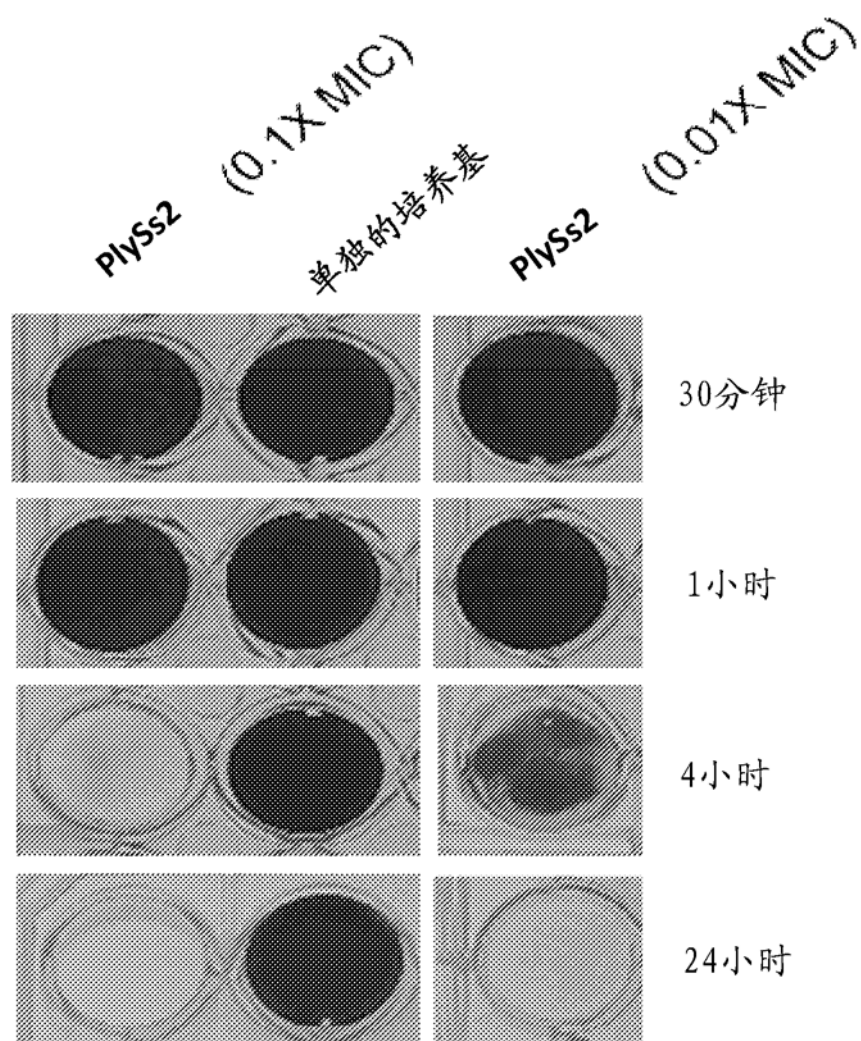


图 8

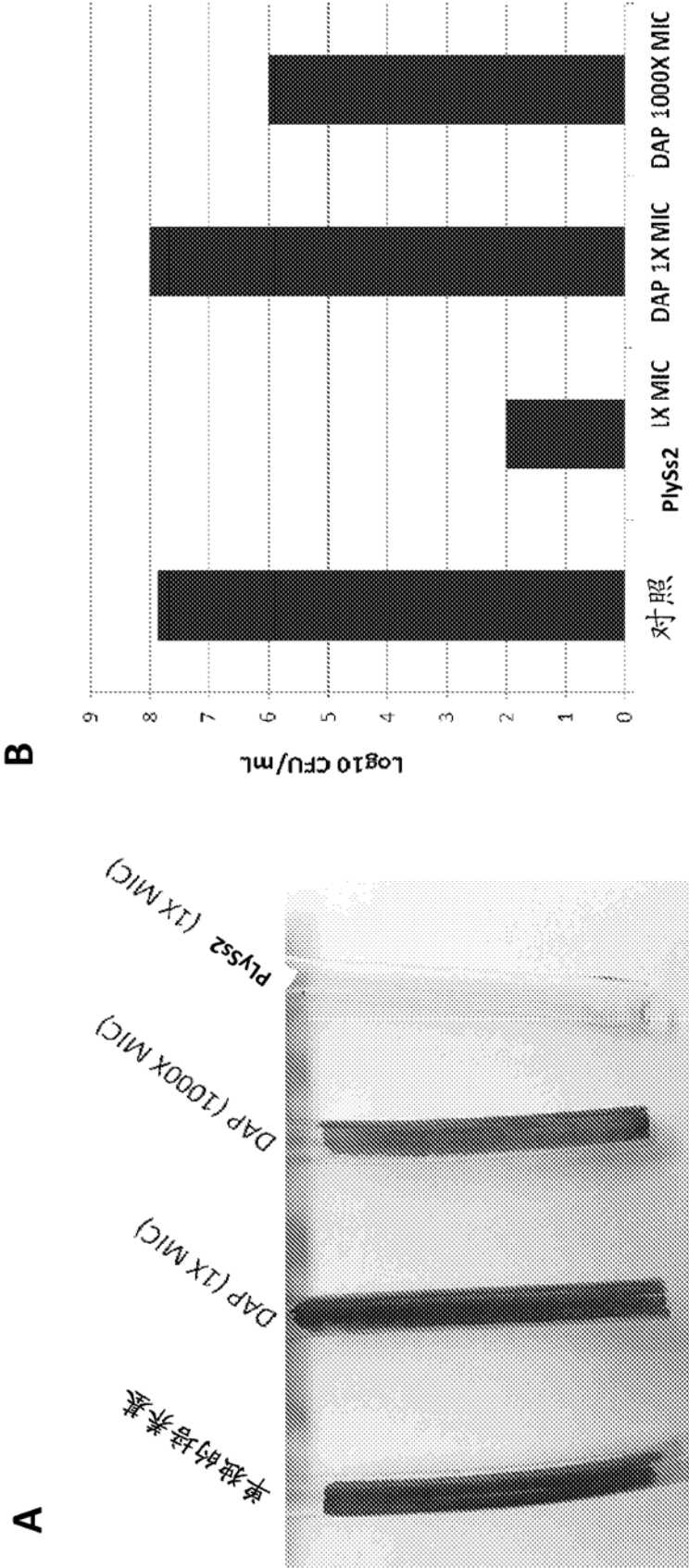


图 9

## PlySs2 MIC

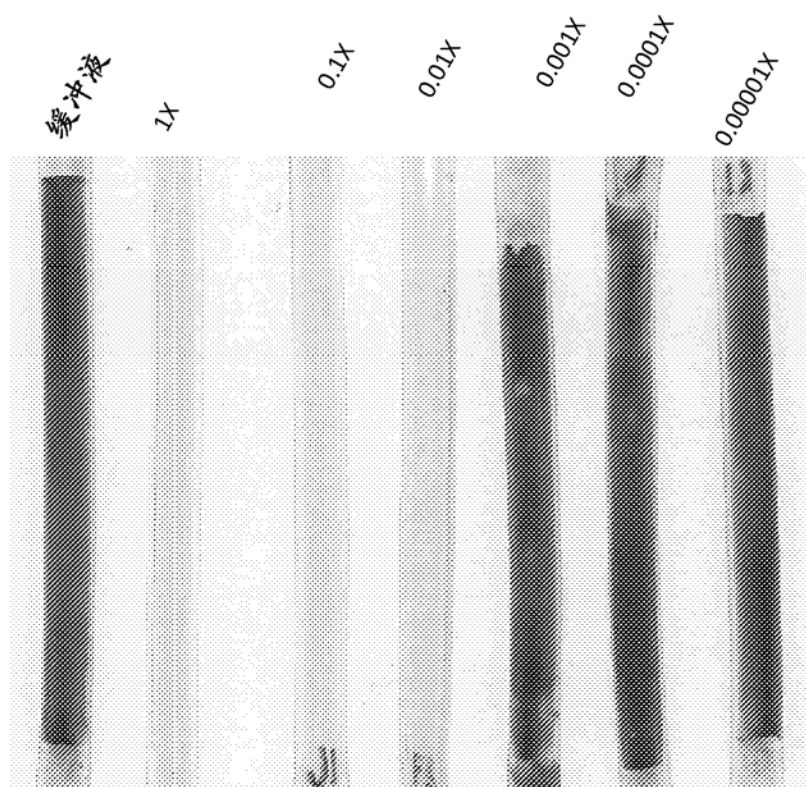


图 10

## DAP MIC

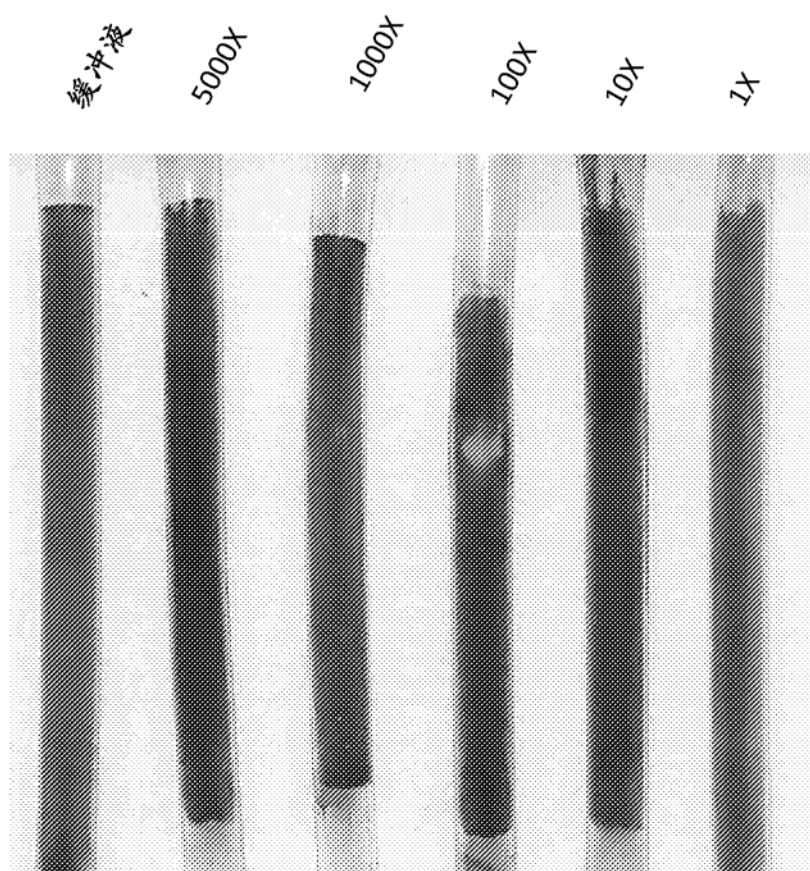


图 11

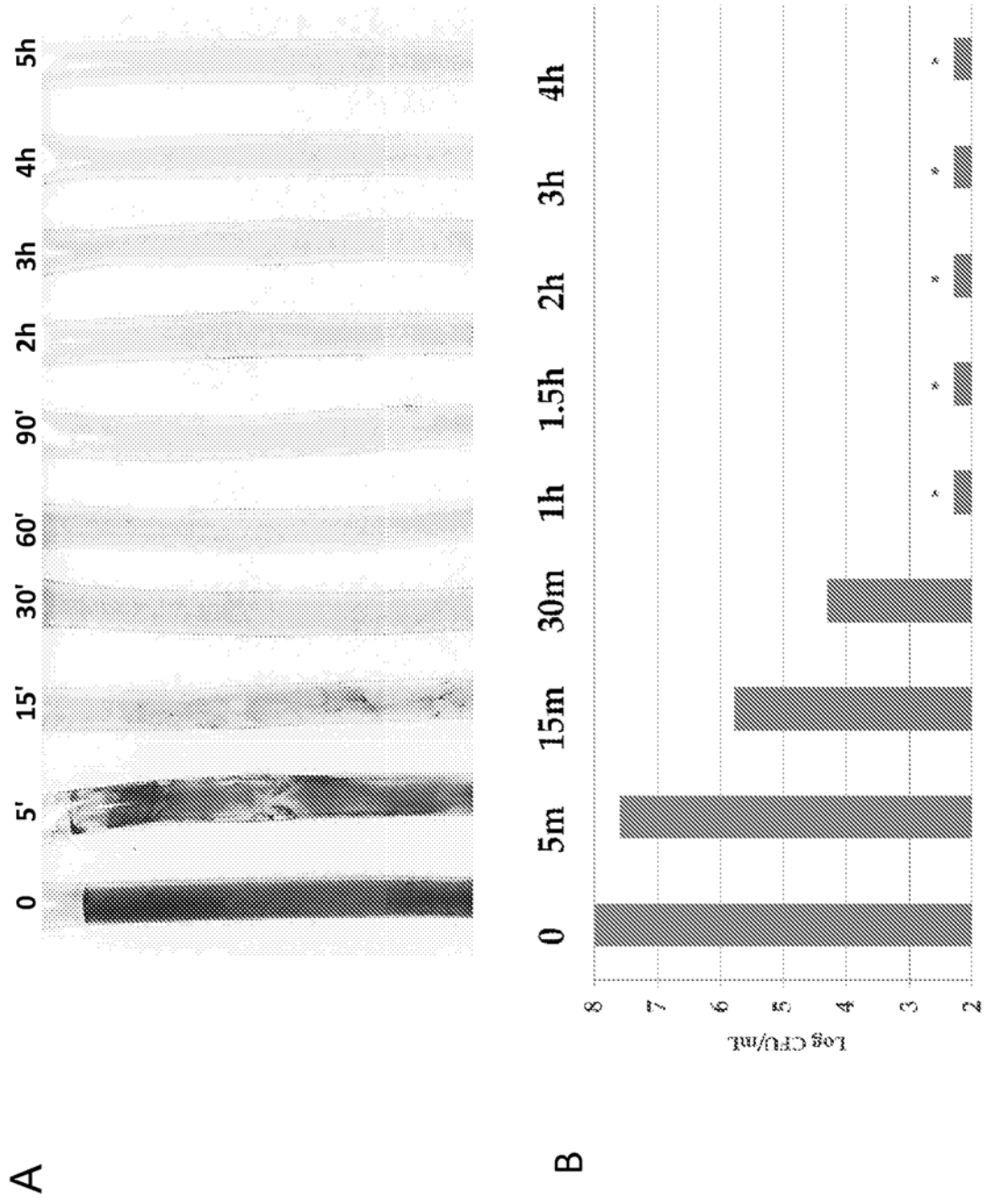


图 12

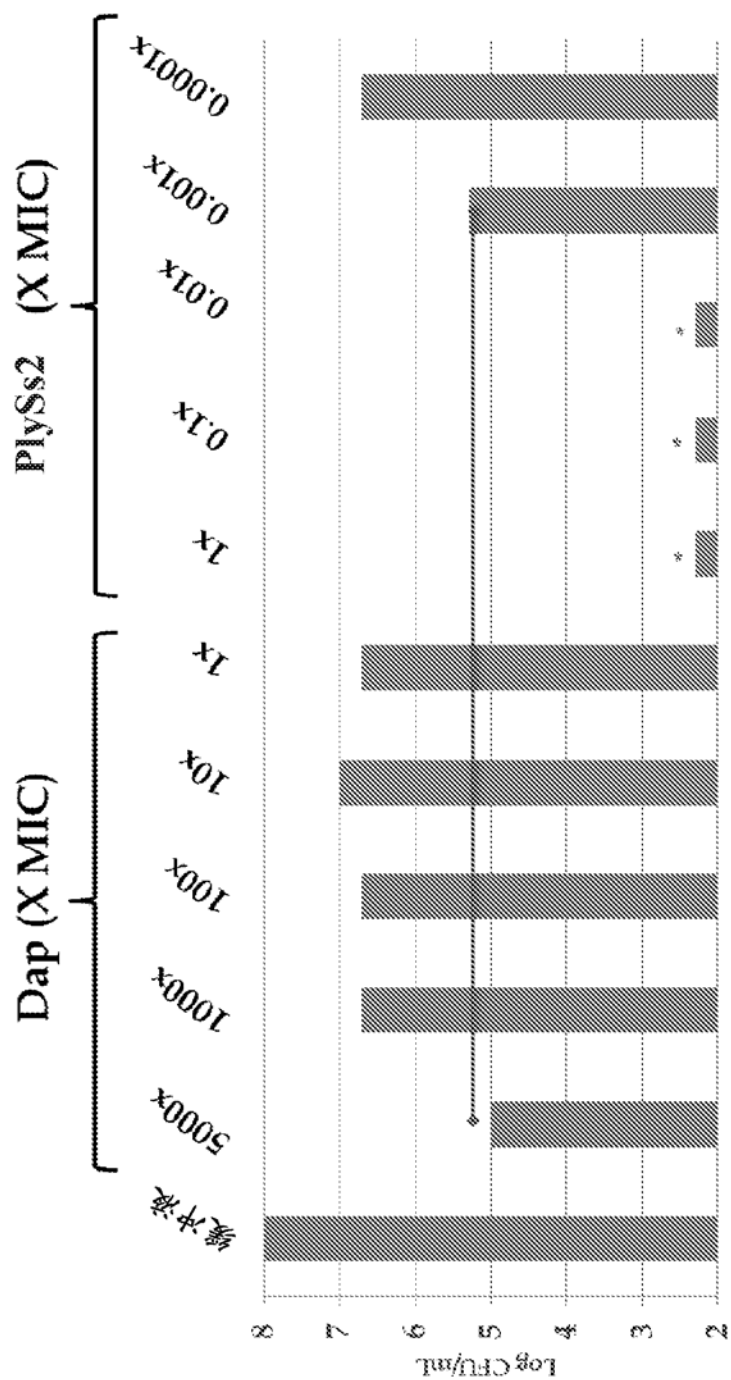


图 13

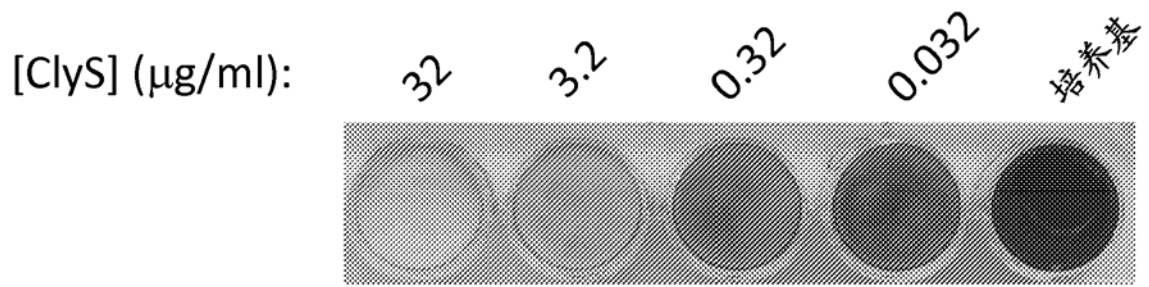


图 14

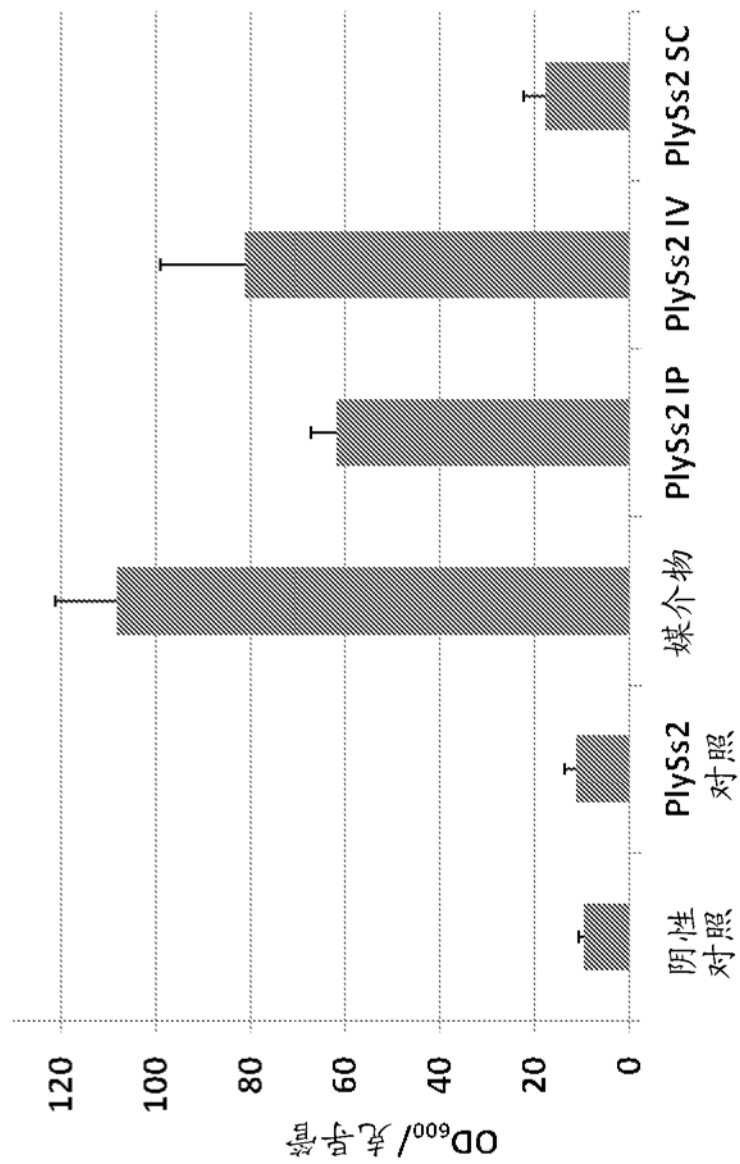


图 15

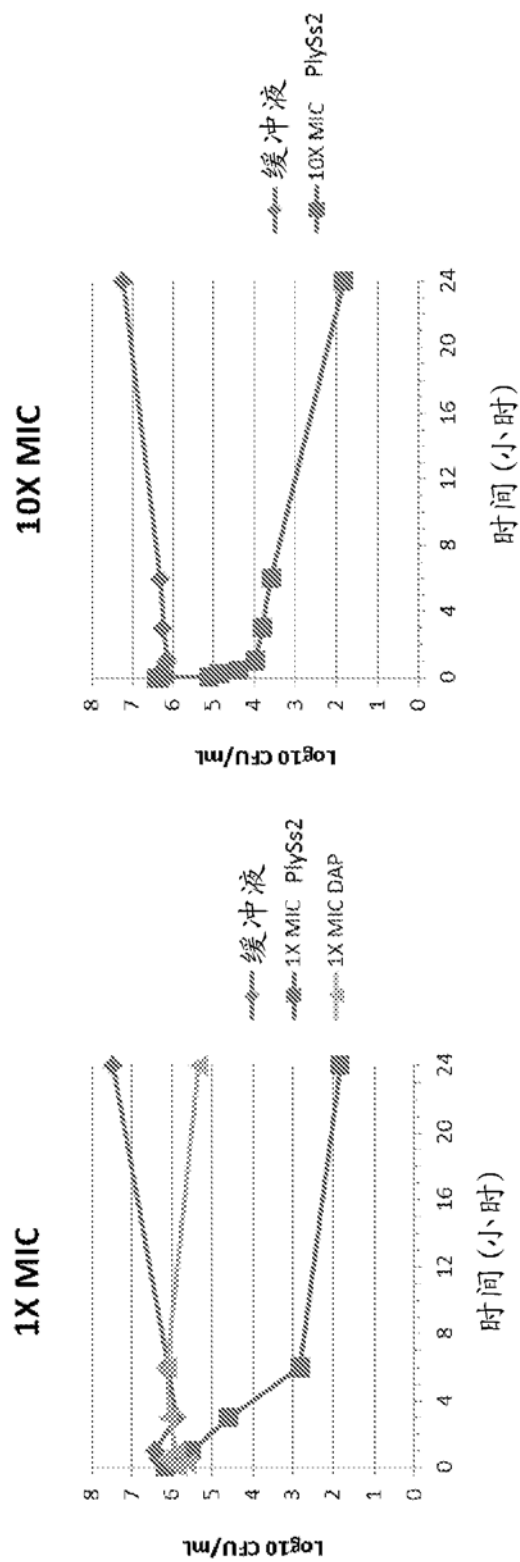


图 16

缓冲液  
缓冲液  
0.0001X MIC  
0.001X MIC  
0.01X MIC  
0.1X MIC  
1X MIC  
10X MIC

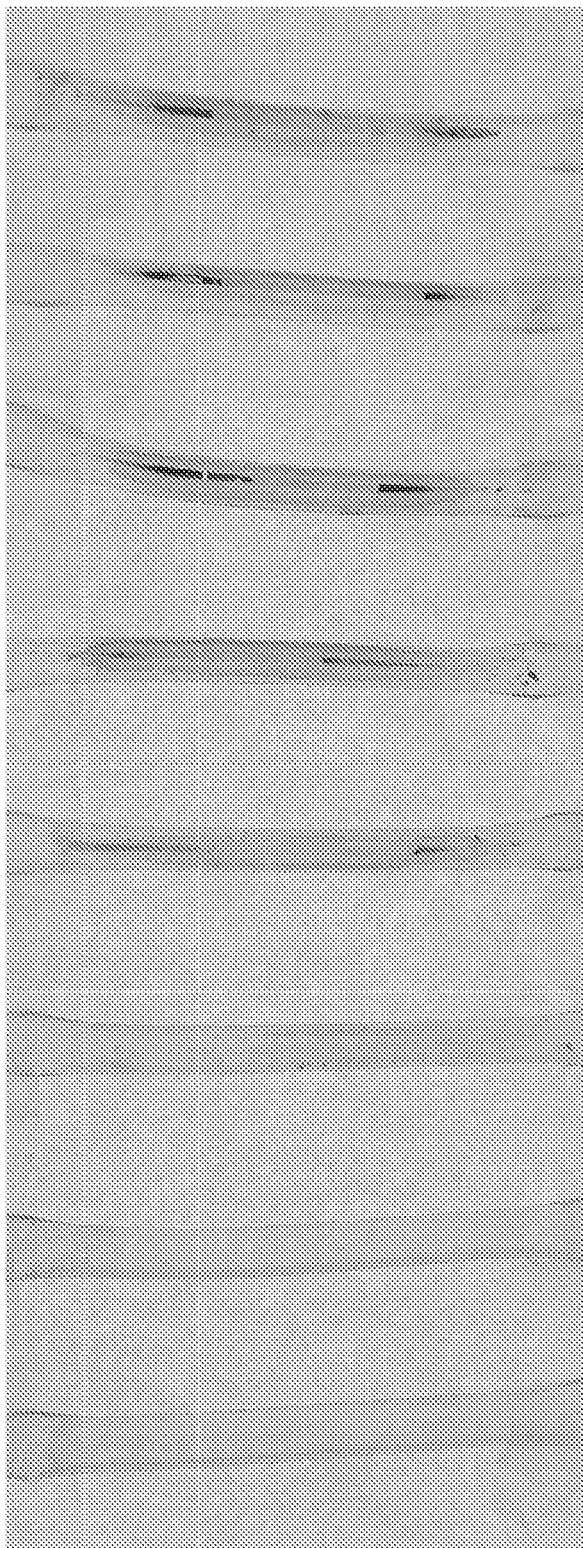


图 17

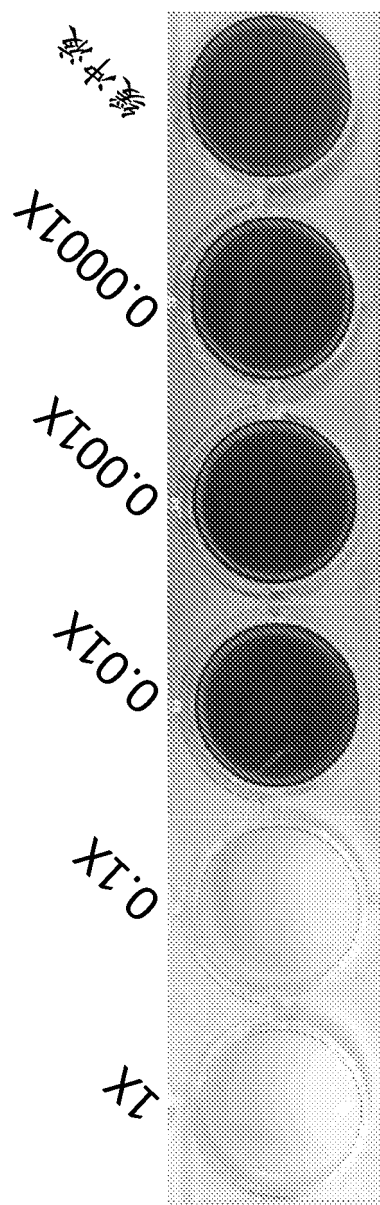


图 18

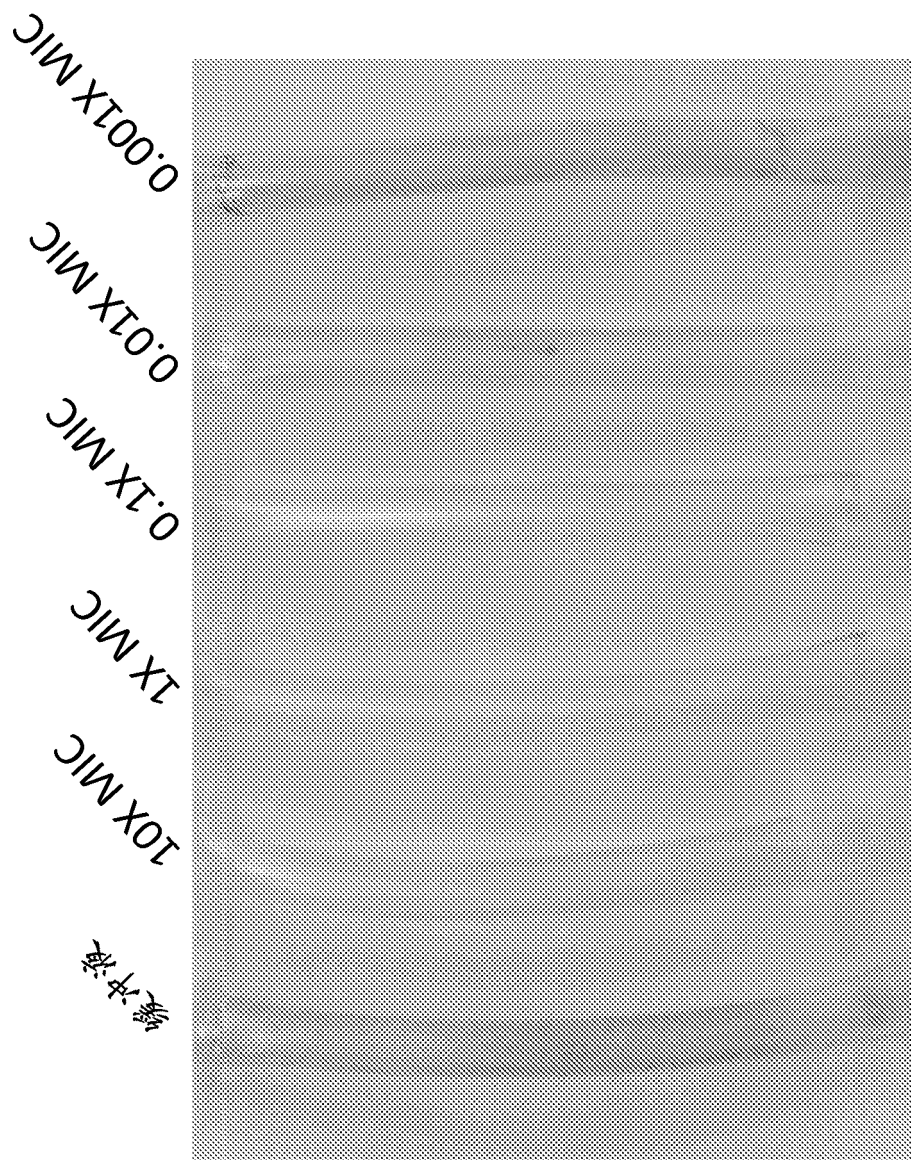


图 19

0.001X MIC  
0.01X MIC  
0.1X MIC  
1X MIC  
10X MIC  
缓冲液

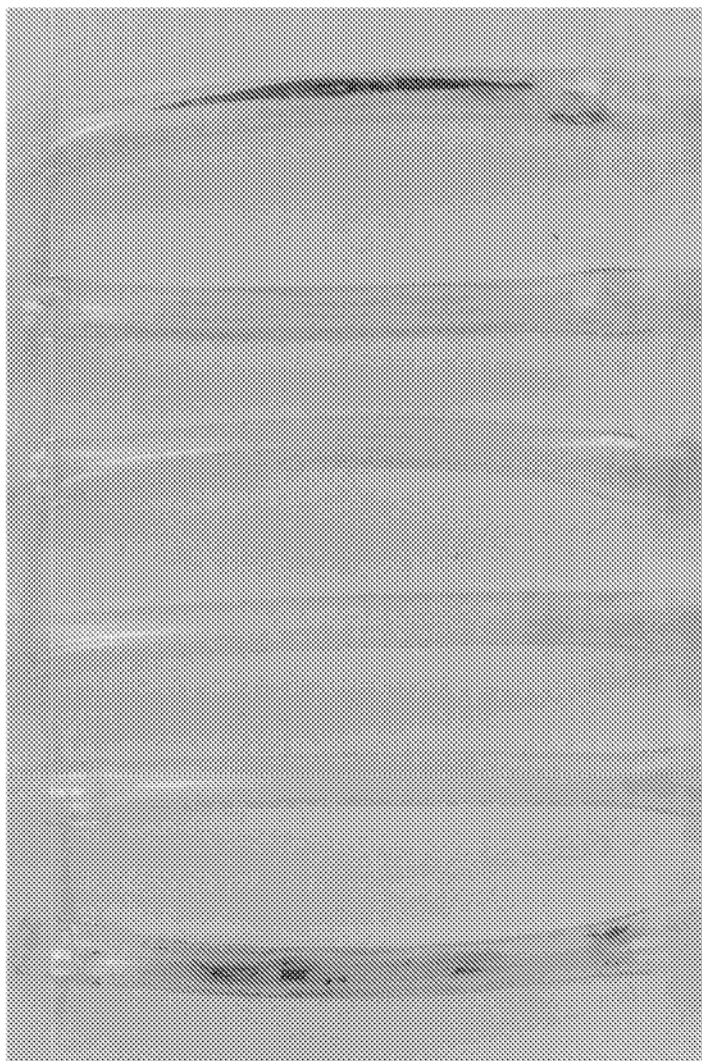


图 20

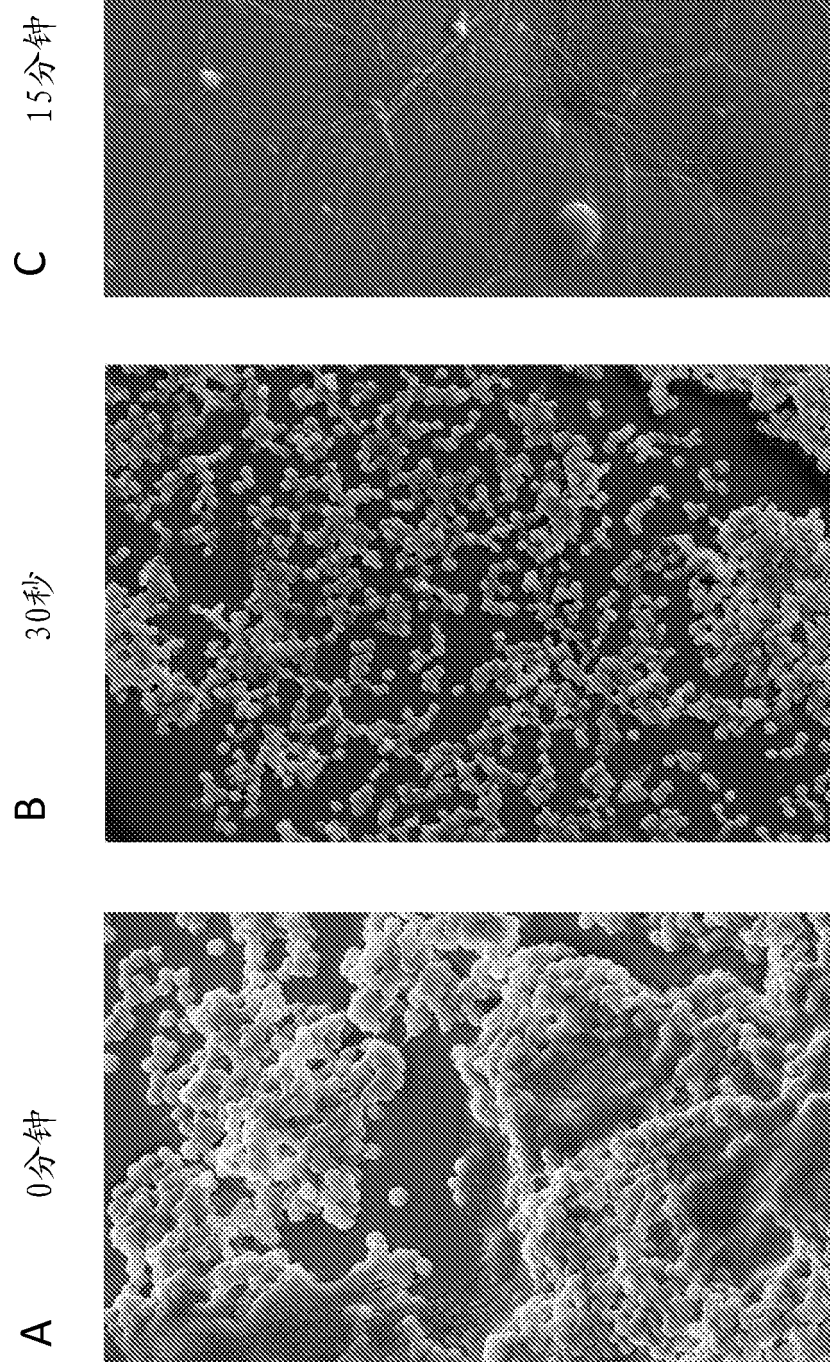


图 21