



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005101
(43) 공개일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/76 (2015.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/76 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7043358(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년03월31일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7033895
원출원일자(국제) 2017년03월31일
심사청구일자 2022년10월27일
(85) 번역문제출일자 2023년12월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/025305
(87) 국제공개번호 WO 2017/173229
국제공개일자 2017년10월05일
(30) 우선권주장
62/316,704 2016년04월01일 미국(US)

(71) 출원인
트러스티즈 오브 더프츠 칼리지
미국 02155 매사추세츠 메드포드 발루 홀
(72) 발명자
카밀리, 앤드류
미국 매사추세츠주 02067 샤론 무즈 힐 파크웨이 5
캐언스, 린
미국 매사추세츠주 02143 섬버빌 마운틴 애비뉴 22
옌, 민민
미국 매사추세츠주 02138 캠프릿지 가필드 스트리트 54에이
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

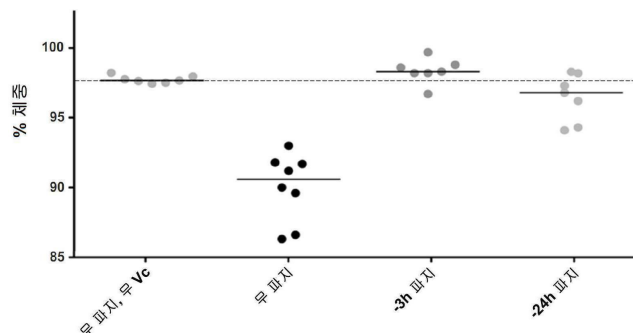
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 비브리오 종에 의한 감염을 예방하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

세균 속 비브리오의 종에 의해 야기된 질환, 예를 들어 브이. 콜레라에 의해 야기된 콜레라를 예방, 개선, 또는 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공되며, 상기 조성물은 비브리오 세포를 감염시키고 사멸시키는 용균성 박테리오파지의 2 이상의 균주를 함유한다. 박테리오파지는 무독성이고, 이는 세포내로 복제되며 세균을 용균 및 사멸시킨다. 단일 치료에서 2 이상의 균주의 사용은, 무시할 수 있을 만큼 낮은 모든 박테리오파지의 동시 내성에 대한 세균의 돌연변이의 비율의 결과로서, 파지-내성 세균의 출현을 통계적으로 사소한 정도까지 감소시킨다. 정상 인간 세균총 중은 영향을 받지 않았다. 본 방법 및 조성물의 대안적 실시양태에서, 항생제 또는 다른 치료제가 다수의 박테리오파지 균주의 콕테일과 함께 투여될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2795/00021 (2013.01)

C12N 2795/00032 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

발명의 설명에 기재된 발명.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 발명자 앤드류 카밀리, 민민 옌 및 린 케언스로 2016년 4월 1일에 출원되고, 명칭이 "*비브리오* (*Vibrio*) 종에 의한 감염을 예방하고 치료하기 위한 방법 및 조성물"인 가특허 출원 번호 제62/316,704호의 우선권을 주장하며, 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 국립보건원이 수여하는 승인 AI055058의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 배경

[0006] 콜레라는 소장 내의 *비브리오 콜레라에*(*Vibrio cholerae*)에 의한 증식 및 독소 생산에 의해 야기된 설사 질환이다. 가정 내의 콜레라의 신속한 전염은 발병 동안 새로운 감염의 주요 원인이다. 이들 이차 사례의 피크 타임은 지침 증례(최초 환자)가 나타난 후 48 시간이다. 예방적 항생제 사용은 정상 미생물총(microbiota)에 대한 파괴(disruption) 때문에 권장되지 않으며, 다른 약제는 이 질환을 치료하거나 예방하기 위해 이용이 용이하지 않다. 감염 위험은 환자를 갖지 않은 가정과 비교하여, 콜레라에 걸린 환자를 보유한 가족 구성원의 가정에서 대략 100 배 증가한다.

[0007] 식물성(용균성 또는 독성) *비브리오* 박테리오파지 중 3 개의 균주인 ICP-1, ICP-2 및 ICP-3가 단리되고, 서열결정되었다. (Seed et al., *mBio*, 2(1):1-9, 2011). 이들 파지 균주 각각은 방글라데시의 다카의 콜레라 환자의 대변 샘플로부터 자주 단리되었다. 드물게는, 이들 파지 균주 중 2 개가 단일 콜레라 환자의 대변 샘플에서 검출되었으며, 발생률이 드물기 때문에, PCR이 필요하고, 모든 3 개의 파지 균주가 동일한 샘플에서 함께 검출되지는 않았다.

[0008] 표면 층 지질다당류(lipopolysaccharide)(LPS)의 O1 항원인 ICP-1 수용체를 인코딩하는 유전자에서 *비브리오 콜레라에*의 돌연변이가 선택되고, 돌연변이체는 파지 감염에 대해 내성이다(Seed et al., *PLoS Pathog*, 8(9):1-13, 2012). 이들 돌연변이는 시험관내(*in vitro*)에서 높은 빈도로 발생한다. 동물 또는 인간에서의 감염 동안에는, 질환에 걸린 장관에서의 세균 독성에 *브이. 콜레라에*(*V. cholerae*) 지질다당류가 필요하기 때문에 상기 빈도는 감소한다.

[0009] *브이. 콜레라에*의 일부 균주는 ICP-1에 대한 내성 메커니즘을 갖는다(Seed et al., *Nature*, 494 (7438): 489-491, 2013). 그러나, ICP-1 파지 균주는 파지가 감염 사이클을 유지하게 하는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 상기 내성을 극복하도록 메커니즘을 진화시켜왔다.

[0010] ICP-2에 대한 세균 수용체는 OmpU로 지칭되는 독성에 대해 중요한 표면 단백질이다(Seed et al., *eLife*, 3:e03497, 2014). 세균 회피 돌연변이체 균주는 일부의 환자에서 발견되었으며, OmpU 단백질을 코딩하는 유전자에서의 점 돌연변이를 함유한다. 특정 환자는 OmpU 단백질을 더 이상 발현하지 않는 무독성 *브이. 콜레라에* 회피 돌연변이체를 발산하는 것으로 관찰되었으며, 이들 돌연변이체는 다른 사람에게 질환을 전염시키지 않는다.

[0011] 콜레라 및 관련 *비브리오* 세균 질환의 전염을 예방하는 비-항생제 제제가 필요하다.

발명의 내용

[0012]

요약

[0013]

본원에서 본 발명의 양태는 세균 감염 *비브리오* 종의 세포를 감염 및 용균시키는 다수의 용균성 박테리오파지 균주의 예방 혼합물을 함유하는, 대상체에서 *비브리오* 세균 감염을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물을 제공한다. 상기 조성물의 실시양태에서, 용균성 박테리오파지 균주는 *비브리오 콜레라*에 감염된 환자의 대변 샘플로부터의 단리물이다. 예를 들어, 상기 다수는 ICP-1, ICP-2, ICP-3, 또는 이의 독성 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 2 개의 박테리오파지 균주이다. 상기 조성물의 특별한 실시양태는 상기 다수가 박테리오파지 균주 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3을 포함하는 각테일이다. 추가 실시양태는 야생형 박테리오파지의 변이체 또는 돌연변이체인 적어도 하나의 균주를 포함하고, 변이체는 자연 돌연변이체, 유도된 돌연변이체, 및 유전적으로 조작된 재조합체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일반적으로, 박테리오파지의 용균성 균주의 비리온(virion)은 *비브리오* 감염 종의 세포에서 복제되고 세포를 용균시키고, 대상체에서 세균의 사멸을 야기하여, 감염을 예방하거나 감소시킨다.

[0014]

본원에 사용된 "독성" 및 "용균성"이라는 용어는 세균을 감염시키고 세균 세포의 사멸 및 용균을 야기하는 생산적 복제 사이클을 갖는 박테리오파지 균주를 지칭한다. "용원성" 또는 "약독(temperate)"이라는 용어는 세균 세포의 용원성이 세균 염색체 내에 통합된 파지 게놈을 보유한 세포의 지속된 성장을 야기할 수 있는 박테리오파지 균주를 지칭한다. 용원성 파지 균주는 성장시 절대적으로 용균성이고 본원의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 독성 유도체로 돌연변이될 수 있다.

[0015]

임의의 실시양태의 조성물은 조성물 내의 다수의 균주 중 임의의 2 개의 각각의 균주의 플라크 형성 단위(plaque forming unit)(PFU)의 양이 각각 제1 및 제2 균주의 역가의 각각 약 1:10 미만 내지 제1 및 제2 균주의 역가의 10:1 초과 범위 내인 비율로 다수의 균주를 함유한다. 조성물은 이전에 *비브리오* 감염 중에 노출되지 않았던 대상체, 예를 들어 가장 잘 알고 있는 대상체에게 투여하기에 적합하다. 대안적으로, 대상체는 *비브리오* 감염 중에 노출되며, 예를 들어 노출된 대상체는 감염을 앓고 있는 환자의 가구원이거나, 의료진이다.

[0016]

감염된 세균 중 내성 돌연변이체의 출현을 광범위하게 감소시키거나 제거하기 위해, 박테리오파지의 비리온은 세균 표면 상의 제1 수용체에 대한 제1 균주의 부착, 및 제2 수용체에 대한 제2 균주의 부착에 의해 *비브리오* 세포의 표면에 결합하고, 제1 및 제2 수용체는 분자적으로 상이하다. 이 방식에서, 대부분의 세균 유전자에 대해 약 10^{-7} 내지 약 10^{-9} 의 세균 집단에서 빈도의 순서인 내성에 대한 자연 돌연변이의 비율은 2 개 파지 균주에 대한 이중 내성 돌연변이체를 얻기 위해 제공될 필요가 있을 것이며, 이는 무시할 수 있을 만큼 낮거나 존재하지 않는 비율이다. 따라서, 본원의 조성물의 실시양태에서, 박테리오파지의 제1 균주의 비리온은 세균 세포 외막 단백질 OmpU에 결합하고, 박테리오파지의 제2 균주의 비리온은 지질다당류에 결합한다.

[0017]

본원에 제공된 조성물의 특별한 이점은 정상 마이크로바이옴 균주의 세포가 다수의 박테리오파지 균주에 대한 수용체가 결핍되고, 정상 장내 세균총(gut flora) 종의 생존력이 영향을 받지 않은 채로 유지된다는 것이다. 용균성 박테리오파지 균주의 숙주 범위는 *비브리오* 감염 종을 포함한다. 예를 들어, 감염은 콜레라이고, 용균성 박테리오파지의 균주는 *브이. 콜레라*의 세포를 감염시킨다. 일부 실시양태에서, 용균성 박테리오파지 균주의 숙주 범위는 다수의 *비브리오* 종을 감염시키는 능력을 포함한다. 이 속(genus)의 세균은 다수의 동물 종에서 질환을 일으킨다. 예를 들어, 본 조성물의 실시양태는 *비브리오 애로제네스(Vibrio aerogenes)*, *브이. 애스티버스(V. aestivus)*, *브이. 애스투아리아누스(V. aestuarianus)*, *브이. 아가리보란스(V. agarivorans)*, *브이. 알벤시스(V. albensis)*, *브이. 알파센시스(V. alfacensis)*, *브이. 알기놀리티쿠스(V. alginolyticus)*, *브이. 앙길라룸(V. anguillarum)*, *브이. 아레니니그라(V. areninigræ)*, *브이. 아르타브로룸(V. artabrorum)*, *브이. 아틀란티쿠스(V. atlanticus)*, *브이. 아티피쿠스(V. atypicus)*, *브이. 아주레우스(V. azureus)*, *브이. 브라질리엔시스(V. brasiliensis)*, *브이. 부불루스(V. bubulus)*, *브이. 칼비엔시스(V. calviensis)*, *브이. 캄프벨리(V. campbellii)*, *브이. 카세이(V. casei)*, *브이. 차가시(V. chagasii)*, *브이. 콜레라에*, *브이. 신시네티엔시스(V. cincinnatiensis)*, *브이. 코랄릴리티쿠스(V. coralliilyticus)*, *브이. 크라소스트레아에(V. crassostreae)*, *브이. 시클리트로피쿠스(V. cyclitrophicus)*, *브이. 디아볼리쿠스(V. diabolicus)*, *브이. 디아조트로피쿠스(V. diazotrophicus)*, *브이. 예주라에(V. ezurae)*, *브이. 플루비알리스(V. fluvialis)*, *브이. 포르티스(V. fortis)*, *브이. 푸르니시(V. furnissii)*, *브이. 갈리쿠스(V. gallicus)*, *브이. 가조제네스(V. gazogenes)*, *브이. 기간티스(V. gigantis)*, *브이. 할리오티콜리(V. haliotocoli)*, *브이. 하르베이(V. harveyi)*, *브이. 헤파타리우스(V. hepatarius)*, *브이. 히포캄피(V. hippocampi)*, *브이. 히스파니쿠스(V. hispanicus)*, *브이. 익티오엔*

테리(*V. ichthyenteri*), 브이. 인디쿠스(*V. indicus*), 브이. 카날로아에(*V. kanaloae*), 브이. 렌투스(*V. lentus*), 브이. 리토랄리스(*V. litoralis*), 브이. 로게이(*V. logei*), 브이. 메디테라네이(*V. mediterranei*), 브이. 메츠시니코비(*V. metschnikovii*), 브이. 미미쿠스(*V. mimicus*), 브이. 미틸리(*V. mytili*), 브이. 나트리에겐스(*V. natriegens*), 브이. 나바렌시스(*V. navarrensis*), 브이. 네오나테스(*V. neonates*), 브이. 넵투니우스(*V. neptunius*), 브이. 네레이스(*V. nereis*), 브이. 니그리폴크리투도(*V. nigripulchritudo*), 브이. 오르달리(*V. ordalii*), 브이. 오리엔탈리스(*V. orientalis*), 브이. 파시니(*V. pacinii*), 브이. 파라해몰리티쿠스(*V. parahaemolyticus*), 브이. 페크테니시다(*V. pectenica*), 브이. 페나에이시다(*V. penaeicida*), 브이. 포메로이(*V. pomeroyi*), 브이. 폰티쿠스(*V. ponticus*), 브이. 프로테올리티쿠스(*V. proteolyticus*), 브이. 로티페리아누스(*V. rotiferianus*), 브이. 루베르(*V. ruber*), 브이. 루모이엔시스(*V. rumoiensis*), 브이. 살모니시다(*V. salmonicida*), 브이. 스코프탈미(*V. scophthalmi*), 브이. 스피렌디두스(*V. splendidus*), 브이. 수페르스테스(*V. superstes*), 브이. 타페티스(*V. tapetis*), 브이. 타스마니엔시스(*V. tasmaniensis*), 브이. 투비아쉬(*V. tubiashii*), 브이. 볼니피쿠스(*V. vulnificus*), 브이. 워다니스(*V. wodanis*), 및 브이. 슈이(*V. xuii*)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나인 비브리오 종에 대한 숙주 범위를 갖는 다수의 박테리오파지 균주를 함유한다.

[0018] 다양한 실시양태에서, 본 조성물은 항생제, 항진균제, 항-원충제, 항-염증제, 항-탈수제, 및 수화제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 치료제를 추가로 포함한다. 대안적 실시양태에서, 조성물은 액체, 정제, 캡슐, 식품 첨가제, 및 동결건조물(lyophil)로부터 선택되는 그룹 중 하나로서 제형화된다. 동결건조물의 경우, 조성물은 용매화제로서 살균 완충제를 포함하도록 패키징된다.

[0019] 본원에서 본 발명의 양태는 비브리오 감염 증의 세포를 감염 및 용균시키는 다수의 용균성 박테리오파지 균주의 예방적 용량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 비브리오 종 감염을 예방하거나 개선하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 비브리오 종은 비브리오 에로제네스, 브이. 에스티버스, 브이. 에스투아리아누스, 브이. 아가리보란스, 브이. 알벤시스, 브이. 알파센시스, 브이. 알기놀리티쿠스, 브이. 양길라룸, 브이. 아레니니그래, 브이. 아르타브로룸, 브이. 아틀란티쿠스, 브이. 아티피쿠스, 브이. 아주레우스, 브이. 브라실리엔시스, 브이. 부블루스, 브이. 칼비엔시스, 브이. 캄프벨리, 브이. 카세이, 브이. 차가시, 브이. 콜레라에, 브이. 신시내티엔시스, 브이. 코랄릴리티쿠스, 브이. 크라소스트레아에, 브이. 시클리트로피쿠스, 브이. 디아볼리쿠스, 브이. 디아조트로피쿠스, 브이. 제주라에, 브이. 플루비알리스, 브이. 포르티스, 브이. 푸르니시, 브이. 갈리쿠스, 브이. 가조제네스, 브이. 기간티스, 브이. 할리오티콜리, 브이. 하르베이, 브이. 헤파타리우스, 브이. 히포캄피, 브이. 히스파니쿠스, 브이. 익티오엔테리, 브이. 인디쿠스, 브이. 카날로아에, 브이. 렌투스, 브이. 리토랄리스, 브이. 로게이, 브이. 메디테라네이, 브이. 메츠시니코비, 브이. 미미쿠스, 브이. 미틸리, 브이. 나트리에겐스, 브이. 나바렌시스, 브이. 네오나테스, 브이. 넵투니우스, 브이. 네레이스, 브이. 니그리폴크리투도, 브이. 오르달리, 브이. 오리엔탈리스, 브이. 파시니, 브이. 파라해몰리티쿠스, 브이. 페크테니시다, 브이. 페나에이시다, 브이. 포메로이, 브이. 폰티쿠스, 브이. 프로테올리티쿠스, 브이. 로티페리아누스, 브이. 루베르, 브이. 루모이엔시스, 브이. 살모니시다, 브이. 스코프탈미, 브이. 스피렌디두스, 브이. 수페르스테스, 브이. 타페티스, 브이. 타스마니엔시스, 브이. 투비아쉬, 브이. 볼니피쿠스, 브이. 워다니스, 및 브이. 슈이로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나이다.

[0020] 다양한 실시양태에서, 대상체는 인간, 가축, 동물원 동물, 예컨대 코알라, 고 가치의 포유동물, 예컨대 개 또는 말, 실험 동물, 예컨대 설치류 또는 토끼, 물고기, 및 새, 예컨대 앵무새 또는 잉꼬로부터 선택된다. 예를 들어, 대상체는 환자의 가구원 또는 가족 구성원, 및 의료진, 예컨대 의사, 간호사, 또는 잡역부로부터 선택된 인간이다. 본 방법의 실시양태에서, 투여 단계는 경구이다.

[0021] 본 방법의 실시양태는 투여 단계 후에, 위장관에서 비브리오 세포 로딩량의 감소량을 분석하는 단계를 추가로 포함하며, 투여 단계에 의해 대상체에서 비브리오 종 세포의 로딩량 감소 및 비브리오 세균에 의한 대상체의 집락화 예방이 야기된다. 분석 단계는 세균 집락을 계수하기 위해 DNA 함량에 의해 또는 선택적 고체 배지 사용에 의해 대변 샘플을 에세이하는 비-침습적 방법을 포함한다. 처리된 대상체에 존재하는 박테리오파지는 대변 샘플에서 배설된 PFU로서 분석되거나, 다른 방법에 의해 분석될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본 방법은 적어도 하나의 재수화 치료제 및 적어도 하나의 항생제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법은 투여 단계 후에, 숙주의 미생물총의 세균총 함량을 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법의 실시양태에서, 투여 단계는 비브리오 감염 증에 대한 노출 이후이고, 본 방법은 감염을 개선하는 단계를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 투여 단계는 노출 이후 및 콜레라 증상의 개시 이전이거나, 투여 단계는 노출 이전이고 본 방법은 감염을 예방하거나 개선하는 것이거나, 일부 조합이 사용된다.

- [0022] 다양한 실시양태에서, 본 방법은 투여 단계 전에, 적어도 약 10^7 , 약 10^8 , 약 10^9 , 약 10^{10} , 약 10^{11} , 약 10^{12} , 또는 적어도 약 10^{13} PFU/mL의 박테리오파지 총 역가로 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 다수의 균주 중 적어도 2 개의 PFU 내인 역가의 조성물을 제형화하는 단계는 각각 약 1:10 미만 내지 적어도 약 1:5, 적어도 약 1:1, 적어도 약 5:1, 적어도 약 10:1의 제1 균주의 역가 대 제2 균주의 역가의 비율 범위로 균주를 혼합함으로써 상기 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함한다. 파지 균주를 혼합함으로써 조성물을 형성하는 단계 전에, 본 방법은 투여 단계 전에, 각각의 용균성 박테리오파지 균주를 무독성 *비브리오* 종 숙주와 함께 배양하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 방법의 실시양태는 투여 단계 전에, 대상체에서 회피 파지 내성 돌연변이체의 선택을 제한하기 위한 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 방법은 투여 단계 전에, ICP-1, ICP-2, ICP-3, 균주 138, 균주 145, 균주 163, 및 이의 용균성 변이체로 이루어진 그룹으로부터의 적어도 2 개 균주를 선택함으로써 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 조성물은 적어도 약 10^7 , 약 10^8 , 약 10^9 , 약 10^{10} , 약 10^{11} , 약 10^{12} , 또는 적어도 약 10^{13} PFU/용량의 투여량으로 투여되며, 선택되는 양은 치료되는 대상체의 크기, 연령, 및 병의 단계에 의존한다.
- [0024] 일 실시양태에서, 본 방법은 투여 단계를 재반복하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 본 방법은 항생제를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 본 방법은 투여 단계 전에, 환경 샘플로부터 또는 *비브리오* 감염된 대상체로부터 용균성 박테리오파지 균주를 단리시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 대상체는 인간이고 샘플은 감염된 대상체의 대변 샘플이다. 일 실시양태에서, 본 방법은 투여 단계 전에, 박테리오파지 균주의 비리온 혼합물을 캡슐화함으로써 조성물을 제형화하는 단계를 포함한다.
- [0025] 본원에서 본 발명의 양태는 다수의 용균성 박테리오파지 균주를 포함하는 상당량의 파지 각테일을 함유하고, 각각의 균주가 *비브리오* 세균 종의 세포를 감염 및 용균시킬 수 있는, 인간의 치료를 위해 제형화된 조성물의 단위 용량을 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도면의 간단한 설명

도 1a는 24 시간 동안 파지의 존재 하에서 *시험관내 브이. 콜레라에* 배양액, 및 파지가 결핍된 대조군 배양액의 성장 곡선이다. mL 당 세포의 수를 가로좌표에 대한 시간의 함수로서 세로좌표(로그 스케일)에 나타낸다. 각각의 배양액에서 파지의 감염 다중도(multiplicity of infection)(MOI)는 1 파지/세포이다. 흑색 원은 파지가 없는 대조군 *브이. 콜레라에*의 성장을 나타내며, 세균은 초기 대수기에서 성장하여 4 시간 내에 정체기를 달성한다. ICP-1(삼각형), ICP-2(사각형), ICP-3(역삼각형) 또는 이들 3 개 균주의 파지 각테일 혼합물(-x-)의 존재 하에서 세포의 성장은 상당히 지연되었으며, 각테일은 파지가 없는 대조군에서의 10^8 세포/mL와 비교하여 10^3 /mL의 초기 역가까지 세포 역가를 감소시켰다. 3 개 파지 균주의 각테일의 존재 하에서 세균의 성장은 초기 12 시간 동안 적어도 세 자릿수 감소되었으며, 전체 24 시간 동안 감소된채 유지되었다.

도 1b는 도 1a에서 감염된 배양액 각각에서 mL 당 파지 역가를 24 시간 동안의 시간의 함수로서 나타낸다. 파지 역가는 24 시간 동안 지속되었으며, 최종 역가는 약 10^6 내지 약 10^8 /mL의 범위로 관찰되었다.

도 2a는 파지가 투여되지 않은 대조군의 마우스와 비교하여, 각각 하나의 표시된 파지 균주가 투여되거나 3 개 균주의 각테일이 투여된 어린 마우스의 소장내 존재하는 생존성 *브이. 콜레라에* 세균 수(CFU)의 감소를 나타내는 그래프 표시이다. 약 10^6 내지 약 10^7 PFU의 용량의 파지를 투여하였다. 3 개 균주의 각테일이 세균 역가를 다섯 자릿수를 초과하여 검출 한계(약 10 개 집락)까지 감소시켰으며, 각각의 개별 균주가 약 두 자릿수 내지 다섯 자릿수까지 세균 로딩량을 감소시켰음이 관찰되었다.

도 2b는 *브이. 콜레라에*로 감염된 도 2a의 동물의 소장에서의 파지 역가의 그래프 표시이다.

도 3a-3e는 어린 마우스 소장 모델로부터 PFU 및 CFU 에세이의 그래프 표시이며, 파지가 세균 감염 전 24 시간까지 투여되었을 때, 세균 세포 수의 *브이. 콜레라에* 부담이 감소되었음을 나타낸다. 기호 특징: ICP-1은 원으로 나타내고; ICP-2는 사각형으로 나타내며, ICP-3는 삼각형으로 나타낸다.

도 3a는 3 개 파지 균주 각각에 대하여, 세균 감염 부재시, 3 시간, 6 시간, 12 시간, 또는 24 시간 후에 유지

된 파지 역가를 나타낸다: 24 시간 동안 생존한 파지는 100에서 약 10^6 내지 약 10^7 까지의 최종 역가를 나타낸다. 원은 ICP-1이고, 사각형은 ICP-2이며, 삼각형은 ICP-3이다.

도 3b는 감염시도 용량(challenge dose)의 세균을 투여받기 전에 표시된 시간 동안 3 개 균주의 파지 카테일을 이용한 파지 예방법 후 소장 당 세균의 수를 나타낸다. 마우스를 약 2×10^5 내지 약 5×10^5 PFU의 양의 파지 카테일로 처리한 다음에, 약 5×10^5 내지 약 9×10^5 의 양의 *브이. 콜레라에* 세포를 이용한 감염을 시도하였다. 마우스를 감염된지 24 시간 후에 희생시키고, 세균 CFU를 장 균질액 중에서 측정하였다. 데이터는 파지가 투여되지 않은 대조군 대상체와 비교하여, 세균 세포 수가 여러 자릿수 감소하였으며, 예방법은 감염되기 6 시간 전에 투여되었을 때 최대를 나타내었다. 파지 예방법은 세균 감염시도 전 24 시간까지 투여되었을 때 5 일령 마우스의 소장에서 *브이. 콜레라에*의 로딩량을 감소시켰다. 파지 카테일은 감염시도 6 시간 전 또는 12 시간 전에 투여되었을 때 가장 효과적이었으며, 감염시도되기 24 시간 전에 투여된 후에도, 장 세균 로딩량은 파지가 투여되지 않은 대조군 대상체에 비해 약 100 배 낮게 감소된 것으로 관찰되었다. 점선은 검출 한계이다. 감염되기 24 시간 전에 투여된 파지를 이용한 예방법 후에도, 관찰된 세균 세포 수는 파지가 투여되지 않은 대조군 동물과 비교하여 적어도 두 자릿수 감소되었다.

도 3c는 도 3b에서의 동물 감염되기 6 시간 전, 12 시간 전 또는 24 시간 전에서의 파지 예방법 후 소장 당 파지 PFU를 나타내며, 세균 감염시도하기 24 시간 전에 파지가 투여된 동물에서 최대 파지 생산이 관찰되었다.

도 3d는 3 개 파지 균주 카테일을 이용한 예방법 및 고용량(1 내지 1.3×10^8 의 *브이. 콜레라에* 세포)을 이용한 감염시도 후의 세균의 생존 CFU를 나타낸다. 데이터는 CFU가 적어도 약 한 자릿수 내지 두 자릿수 감소되었으며, 세균 감염시도 전 6 시간에 투여된 파지를 이용한 예방법 후에 최대 효능이 관찰되었음을 나타낸다.

도 3e는 도 3d에서 나타난 장 샘플에서 PFU의 파지 역가의 지속성을 나타낸다.

도 4a-4c는 *브이. 콜레라에*에 감염되기 3 시간 전 또는 24 시간 전 시점에 파지 카테일이 투여된 어린 토끼 대상체로부터 얻어진 데이터를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 3×10^8 PFU의 ICP 파지 카테일을 투여하고 3 시간 또는 24 시간 후 희생시킨 이후의 시점에서 세균 감염이 없는 소장에서의 파지 체류를 나타낸다. PFU로서 파지의 실질적 수는 각각의 시점에서 3 시간 후 초기 투입 파지의 약 10%, 및 24 시간 후 약 1%까지 감소하여 유지된 것으로 밝혀졌다.

도 4b는 4×10^9 내지 8×10^9 PFU의 파지 카테일이 투여된 다음, 3 시간 또는 24 시간 후 5×10^8 CFU의 *브이. 콜레라에*가 감염시도된 토끼의 소장에서 관찰된 *브이. 콜레라에*의 세포 수를 나타낸다. 데이터는 감염시도 3 시간 전에 투여된 대상체에서, 2분의 1을 초과하는 대상체가 검출 한계 내의 세균 CFU를 나타내지 않았으며, 나머지 대상체가 세균 수의 두 자릿수 내지 세 자릿수 감소를 가졌음을 나타낸다. 감염시도 24 시간 전에 투여된 파지 예방법의 결과로서, 장(intestine) 당 *브이. 콜레라에* 세균의 수가 두 자릿수 내지 세 자릿수 감소되었다.

도 4c는 *브이. 콜레라에* 감염시도 후, 도 4b의 대상체에서 파지 PFU 수의 분석을 나타낸다. 데이터는 도 4b에서 나타난 세균의 감소가 세균으로 감염된 대상체에서 파지의 용균성 성장으로 인한 것인 경우 예상된 바와 같이, 대상체의 소장에서 많은 수의 파지가 존재하였음을 나타낸다. 세균 감염시도 3 시간 전 또는 24 시간 전에 예방적으로 투여되었던 대상체로부터 분리된 것에서 유사한 PFU가 관찰되었다.

도 5는 도 4a-c에 나타난 시간 경과와 중점까지 대상체의 초기 체중의 퍼센트를 나타낸다. *브이. 콜레라에*를 이용한 감염시도하기 3 시간 전 또는 24 시간 전에 파지 카테일 예방법을 투여받은 대상체는 미처치된 대조군(무 파지, 무 Vc)에서의 체중에 필적하는 체중을 유지하였으며, *브이. 콜레라에*를 이용한 감염시도 후 체중의 유지에 관하여, 감염시도 3 시간 전의 예방법이 24 시간 전에서의 투여에 비해 더욱 효과적이었다. 반면에, *브이. 콜레라에*로 감염되고 파지로 처리되지 않은 대상체는 실시예의 과정 동안 약 10-15%의 체중을 손실하였고, 이는 단시간 동안의 큰 체중 손실이다. 대조군 동물에서의 적은 체중 손실은 이들의 어미 동물로부터 어린 토끼 대상체를 분리시킨 결과로서 생긴것이다.

도 6은 성체 동물 모델에서 파지의 지속 능력을 결정하는 것을 나타낸다. 파지 카테일을 마우스에게 투여하고, 표시된 시점에서 수득된 대변 샘플을 파지 함량에 대해 에세이하였다. 파지는 투여 후 12 시간 및 36 시간, 및 60 시간까지 대상체 당 재현가능한 역가로 검출가능하였다.

도 7은 항생제(양성 대조군), 또는 파지 카테일, 또는 가열-살균된 파지 카테일(음성 대조군)을 이용하여 처리된 동물의 대변에서 0 일차(처리 직전) 및 2 일차(처리 후 대략 36 시간)에 수득된 대변 샘플로부터 추출된 게놈 DNA의 도 6으로부터의 샘플의 베타-다양성의 주요 좌표 분석이다. 게놈 DNA를 16s V4 영역 특이적 프라이머를 이용한 PCR을 위한 주형으로서 사용하였다. PCR 생성물을 정제하고, Nextera 서열결정 어댑터를 PCR에 의해 첨가하였으며, 250 bp 쌍형성 말단 Illumina MiSeq run을 사용하여 샘플을 서열결정하였다. QIIME v1.8을 사용하여 데이터를 분석하였다. 99% 유사성에 의해 조작 분류 기호(Operational taxonomic unit)(OTU)를 고르고, Greengenes 데이터베이스를 사용하여 계통발생을 할당하였다. 각각의 지점은 1 마리의 동물로부터의 장 미생물 집단을 나타낸다. 데이터는 항생제 처리 후 동물 그룹의 마이크로바이옴이 0 일차와 1 일차 사이, 및 1 일차와 2 일차 사이에 유사하지 않음을 나타낸다. 반면에, 이들 날짜 중 임의의 날짜 사이에서 파지 카테일 처리된 동물 그룹 및 가열 살균된 파지 카테일 처리된 대조군 동물 그룹에서 대상체의 마이크로바이옴에서의 비유사성은 없었다. 이들 결과는 파지 처리가 미생물총 구성에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

도 8은 항생제 샘플을 제외하고는, 도 7과 동일한 데이터의 분석을 나타낸다. 샘플 사이의 베타 다양성의 양에서의 차이는 도 7에서 보다 많이 낮으며, 임의의 그룹 사이의 비유사성의 식별가능한 패턴이 없어, 이는 파지 처리가 미생물총 구성에 영향을 미치지 않았음을 추가로 나타낸다.

도 9a 및 9b는 도 3a에서와 같은 어린 마우스 소장 모델로부터의 CFU 에세이의 그래프 표시이다.

도 9a는 각각 표시된 비율의 ICP-1:ICP-2:ICP-3을 갖는 카테일의 6×10^6 내지 4×10^7 총 PFU가 경구로 투여된 마우스, 및 파지로 처리되지 않은 대조군 그룹으로부터 얻은, 도 3a에서와 같은 CFU 데이터를 나타낸다. 24 시간 후에, 마우스에게 3×10^5 내지 5×10^5 CFU의 *브이. 콜레라에*를 경구로 감염시도하였다. 감염된지 24 시간 후에, 마우스를 희생시키고, 소장 내에 생존해 있는 *브이. 콜레라에*의 CFU의 수를 계수하였다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 수평 실선은 중간값을 나타낸다. 각각의 원은 1 마리의 동물을 나타낸다. 던스 사후 다중 비교 시험(Dunn's *post-hoc* multiple comparisons test)을 이용한 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)을 사용하여 유의미성을 계산하였다. $*P = 0.01-0.05$, $**P = 0.001-0.01$. 데이터는 1:1:1 및 1:1:10의 비율이 대상체에 대한 가장 유의미한 보호를 제공하였음을 나타낸다.

도 9b는 파지 카테일이 고용량 *브이. 콜레라에* 감염시도 12 시간 전에 투여된 도 3d에서와 같은 CFU 데이터를 나타낸다. 파지 예방법은 파지가 없는 대조군 그룹과 비교하였을 때, 소장에서 *브이. 콜레라에* 집락화를 한 자릿수 내지 두 자릿수 감소시켰으며, 이 결과는 상이한 비율의 균주로 제조된 카테일을 이용하여 처리된 그룹에서 관찰되었다. 마우스에게 표시된 카테일 비율의 6×10^5 내지 2×10^6 총 PFU를 경구로 투여하였으며, 대조군은 파지로 처리하지 않았다. 12 시간 후에, 마우스에게 2×10^8 내지 3×10^8 CFU의 *브이. 콜레라에*를 경구로 감염시도하였다. 감염시킨지 24 시간 후에, 마우스를 희생시키고, 소장 당 CFU를 계산함으로써 소장 내에 생존해 있는 *브이. 콜레라에*를 계수하였다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 수평 실선은 중간값을 나타낸다. 각각의 원은 1 마리의 동물을 나타낸다. 던스 사후 다중 비교 시험을 이용한 크루스칼-왈리스 검정을 사용하여 유의미성을 계산하였다. $*P = 0.01-0.05$, $***P = 0.0001-0.001$. 데이터는 1:1:1의 비가 대상체에 대한 가장 유의미한 보호를 제공하였음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본원에서 조성물의 실시양태는 고위험에 있는 사람에서 콜레라를 예방하기 위한 3 개의 천연 산출 독성 박테리오파지 균주의 카테일 현탁액이다. 이 조성물은 경구 섭취에 의해 투여되고, 감염시도 전 24 시간까지 10^8 PFU로 투여될 때 동물 모델에서 *브이. 콜레라에* 집락화 및 질환으로부터 보호한다. 박테리오파지 균주는 무독성 *브이. 콜레라에* 숙주 상에서 성장하고, 폴리에틸렌 글리콜 침전에 의해 거의 균질하게 정제되며, 10^9 PFU/mL의 최종 역가까지 식염수에서 재현탁된다.

예방적 항생제 사용의 개입은 정상 미생물총에 대한 파괴 때문에 비권장된다. "파지 예방법", 즉 본원에서 기재된 바와 같은 독성 *브이. 콜레라에*-특이적 박테리오파지 균주 중 2 이상의 균주의 카테일인 조성물을 경구로 투여함으로써 *비브리오*-연관 질환의 발달을 예방하기 위한 파지 카테일이 대신 사용될 수 있다. 각각 상이한 세포 수용체를 표적화하는 상이한 박테리오파지 균주의 사용 및 *브이. 콜레라에*의 독성 인자로서 이들 수용체의 중요

성은 환자 내에서 세균 회피 돌연변이체의 출현을 크게 제한한다.

[0030] 감염 동물 모델에서 콜레라를 예방하기 위해 예방적으로 사용되는 3 개의 천연 산출 박테리오파지 균주는 콜레라를 예방하기 위해 인간에서 유사하게 작용할 것으로 예상된다. 파지 예방법을 투여받을 표적 집단은 콜레라 환자의 가정내 접촉, 의료인과 같은 노출 위험이 큰 다른 이들, 및 최근 노출되었으나, 여전히 무증상인 일반 집단의 사람을 포함한다. 본원의 예는 파지 카테일을 경구로 각각의 마우스 또는 토끼에게 투여하는 단계가 *비브리오 콜레라에*의 치사량을 이용한 후속 감염시도로부터 24 시간까지(지금까지 시험된 최장 시간) 동안 이들을 보호하는 것으로 나타난다. 동물 및 인간에서 감염 부위인 소장에서 *브이. 콜레라에*의 로딩량은 크게 감소되며, 동물이 설사 또는 체중 감소의 징후를 나타내지 않는다는 점이 추가로 관찰되었다.

[0031] 본원에 제공된 조성물의 실시양태의 카테일에서 각각의 파지 균주는 독성 파지 유형의 것이며, 이는 보통 숙주 세균 세포를 용균시키고(사멸시키고) 용원화하는 약독 또는 용원성 파지 균주와 반대로, *브이. 콜레라에* 세포의 감염 및 용균 과정에 상기 균주가 지속적으로 관여한다는 것을 의미한다. 3 개의 파지 균주 각각은 다른 종의 세균이 아닌, *브이. 콜레라에*를 특이적으로 감염시키고 사멸시키며, 즉 모든 종의 *비브리오*가 시험된 것은 아니지만, 각각의 균주는 매우 좁은 1 종 숙주 범위, 또는 1 속 숙주 범위를 갖는다. 따라서, 항생제 또는 폭넓은 숙주-범위 파지와 비교하여, 본원의 파지 카테일의 이점은 대상체에서 숙주 미생물총의 정상 세균총 종의 파괴가 없어, 부작용, 예컨대 위장 통증을 적게 야기할 것이라는 점이다. 항생제와 비교하여 다른 이점은 파지 비리온이 *브이. 콜레라에*의 존재 하에서 복제되므로, 점점 중인 *브이. 콜레라에*를 유지하기 위하여 수를 신속하게 증가시킬 수 있다는 것이다. 조성물 내의 3 개 파지 균주는 일부 콜레라 환자의 분비성 설사에서 자연적으로 발견되지만, 모든 3 개 파지 균주가 자연에서 함께 나타나는 것은 전혀 관찰되지 않았으므로, 본 발명의 카테일 조성물은 신규하다.

[0032] 박테리오파지 조성물 투여에 의한 세균 집락화의 감소는 병원내(병원 취득) 균혈증의 가장 일반적인 병원체인 그람-양성 세균 종인 *스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)* 및 반코마이신-내성 *엔테로코커스(Enterococcus)*에 대해서는, 모리스 등(Morris et al.)에 의해 2011년 8월 23일 등록된 미국 특허 제8,003,323 호에 나타나 있다. 그람-양성 세균 균주는 그람-음성 세균과 실질적으로 상이하며, 예를 들어 후자는 지질다당류로 구성된 외막을 함유하기 때문이다. 이 주요한 차이는 고전적 기법을 사용하여 염색하는 능력뿐 아니라, 항생제 민감성, 인간 면역계와의 상호작용을 포함한 다양한 의학적 특성, 및 광범위한 미생물학 및 환경 특성에 대해 설명한다.

[0033] *비브리오* 속의 그람-음성 세균 병원체에 의한 인간 및 다양한 동물 종의 감염의 예방 및 치료를 위한 조성물 및 방법이 본원에서 제공된다. *비브리오* 세균 배양을 위한 성장 조건 및 파지를 이용한 감염, 및 파지의 제조 및 정제 및 적정의 상세한 방법은, 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 Seed et al., *mBio*, 2(1): 1-9 (2011)에 나타나 있다. 세균 균주 제작 방법 및 제조합 세균 균주를 조작하여 수득하는 방법은 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 Seed et al., *PLoS Pathog*, 8 (9): 1-13 (2012)에 나타나 있다. 천연 환경 샘플 및 대변 샘플로부터 파지의 단리를 위한 방법, 및 이들 균주의 특징화는 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 Seed et al., *eLife*, 3:e03497 (2014)에 나타나 있다. 항-세균제로서 파지를 사용하는 방법이 Ly-Chatain, M., *Frontiers in Micro.5*: article 51: 1-7 (2014)에 나타나 있으며, *살모넬라(Salmonella)* 감염의 치료를 위해 파지 균주 펠릭스(Felix)를 미세-캡슐화하는 방법이 Ma, Y. et al., *App. Environ. Micro.* 74 (15): 4799-4805 (2008)에 나타나 있다. *비브리오* 파지의 일반적인 형질도입 균주인 파지 균주 CP-T1의 단리 및 특징화 및 온도-민감성 플라크를 얻기 위한 돌연변이유발 방법이 Hava, D. et al., *J. Micr. Methods*, 46: 217-225 (2001)에 나타나 있다. 이들 방법은 본 발명의 청구항의 조성물에서 사용하기 위한 상기 파지 균주의 독성이 강한 플라크(virulent clear plaque)-형성 변이체의 단리를 위해 용이하게 적응가능할 것으로 예상된다. 숙주 방어 시스템에 의한 비활성화를 지연시키기 위한 박테리오파지의 변형, 예컨대 UV-돌연변이유발된 파지 람다의 마우스에서 *생체내(in vivo)* 계대 배양 또는 *에스케리키아 콜리(Escherichia coli)*에 대한 상기 파지 균주의 *OrfX* 유전자의 삽입 돌연변이유발이 1998년 6월 16일 등록된 Merril et al.에 의한 미국 특허 제5,766,892호에 의해 기재되어 있다.

[0034] 본원에 사용된 "파지"라는 단어는 세균-특이적 바이러스인 "박테리오파지"라는 용어의 단축 형태이고, 본원에 사용된 이들 단어들은 상호교환적이다. 본원에 사용된 "미음양변(rice-water stool)"이라는 어구는 콜레라 환자에 의해 발산된 분비성 설사를 의미할 것이다. *브이. 콜레라에*에 관하여 본원에 사용된 "맹장액"이라는 어구는 감염된, 증후성(칼레라 증상) 대상체 또는 환자의 맹장 내의 유체를 의미한다. 예를 들어, 어린 토끼는 동물 모델을 제공하고, 인간 미음양변과 매우 유사한 맹장액을 생산하므로, 이들 동물은 콜레라에 대한 동물 모델 시스템으로서 사용된다.

- [0035] 본원에 사용된 "ID₅₀"라는 약어는 동물의 2분의 1의 감염을 야기하는 세균의 양을 의미한다. "CFU"라는 약어는 집락-형성 단위를 의미하며, 이는 살아있는 세균 세포 수의 측정치이다. 감염된 동물의 맹장액은 약 10⁸ CFU/mL의 *브이. 콜레라에*를 함유한다. "감염 다중도"(MOI)라는 어구는 첨가된 파지의 수 대 세균의 수의 비를 의미한다. 예를 들어, 0.1의 MOI는 10 개 세균 세포 당 1 개 파지 비리온을 의미하며, 5의 MOI는 세균 세포 당 5 개 파지를 의미한다.
- [0036] 본원에 사용된 "상변이"라는 어구는 표현형에서의 변화를 야기하는 높은 빈도의 가역적 유전자 변화를 지칭하며, 본원에서는 파지에 대한 내성으로의 세균 세포에서의 돌연변이를 지칭하기 위해 일반적으로 사용된다. "기능상실 돌연변이(null mutation)"라는 어구는 돌연변이를 보유한 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 녹아웃(knock out)시키는 돌연변이를 지칭한다.
- [0037] "PFU"라는 약어는 감염성 파지 입자(비리온)의 수 또는 파지 역가의 정도인 플라크-형성 단위를 의미한다. "독성 파지"라는 어구는 용균성 방식으로 순수하게 증식하고, 투명 플라크를 생산하는 파지 유형을 지칭한다. 독성 파지 군주는 파지의 "용원성" 군주와 대조를 이루며, 이들이 DNA를 세균 세포 내로 통합시키고, 그렇게 하여 세균 세포의 일부가 된 다음에, 휴면기를 유지할 수 있으나, 일부가 용균성으로 성장하여 혼탁한 플라크를 생산하는 대안적 생활 주기를 갖는다. "용균성"이라는 용어는 박테리오파지 군주의 생활 주기의 특징에 관하여, "독성"과 동일한 의미를 가질 것이다.
- [0038] "LPS"라는 약어는 외막 지질 이중층의 표면 단일층을 형성하는 지질다당류를 의미하며, 이들 용어는 상호교환적으로 사용된다. 외막은 그람-음성 세균, 예컨대 *비브리오 콜레라에*의 최외측 표면이다. "O-항원"이라는 단어는 세균 세포의 표면으로부터 외부로 연장되는, LPS의 반복 올리고당 부분을 지칭한다. 이는 인간 면역계에 의해 보통 표적화되므로, 이의 명칭을 설명한다. O-항원은 파지 군주 전부는 아니지만 많은 군주에 대한 수용체이다. 세계에서 콜레라 사례의 대다수의 원인인 *브이. 콜레라에* 혈청군 O1에 대하여, O-항원은 테트로네이트-연결된 페로사민(tetronate-linked perosamine)의 12-18 개 반복체로 구성된다. *브이. 콜레라에* 종 내에서 약 200 개의 O-항원 유형 또는 혈청군이 특징화되었으며, 이들은 O1 내지 O200으로 지정된다.
- [0039] 병원성 *브이. 콜레라에*의 생활 주기는 Nelson, et al. *Nat Rev Microbiol.* Oct;7(10):693-702, 2009에서 검토되어 있다. 콜레라 환자 미음양변 샘플 중 약 2분의 1은 높은 역가의 독성(용균성) 파지를 함유하고 있고 (Nelson et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 19091-19096, 2007, PMID: PMC2141913), 86 년 전에 최초로 관찰이 보고되었다(d'Herelle et al. *Ind. Med. Gaz.* 62:614-616, 1927). 과학자들은 용균성 파지가 *브이. 콜레라에*의 전염 및 전파에 영향을 미칠 수 있다고 추측하였다(d'Herelle et al. *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). 그러나, 잠재적 영향에 관한 정량적 증거만이 보고되어 왔다 (d'Herelle et al. *Ind. Med. Gaz.* 62:614-616, 1927; Faruque et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 1702-1707, 2005; Faruque et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 6119-6124, 2005).
- [0040] 따라서, 본원의 예는 *브이. 콜레라에*의 전염성에 대한 2 이상의 용균성 파지 군주 각테일의 영향의 정도를 분석한다. 본원의 예는 용균성 파지가 소장에서 용량-의존 방식으로 *브이. 콜레라에*의 로딩량을 감소시킴을 보여준다(Nelson et al. *PLoS ICP-2.* 4, e1000187, 2008, PMID: PMC2563029). 본원의 예는 *브이. 콜레라에*에 대한 파지 요법의 최초의 제어된 실험실 입증을 나타낸다.
- [0041] 본원의 예에서는 방글라데시에서 얻어진 보관된 미음양변을 사용하여 수행된 후향적 연구(retrospective study)로 용균성 파지의 치료 가능성이 조사되었다. 일부 용균성 파지는 시험된 10 년 기간에 걸쳐 일시적이었으나, ICP-1로 지정된 하나의 파지는 상기 기간 동안 편재성을 유지하였던 것으로 발견되었으며(Seed et al. *mBio.* 2(1). pii: e00334-10 (2011). PMID: PMC3037004), 현재도 존재를 유지한다는 것이 발견되었다. 본원에서 ICP-1은 유행성 *브이. 콜레라에* 군주와 밀접하게 연관되도록 적응될 수 있었던 것으로 예상된다. ICP-1과 *브이. 콜레라에*의 상호작용 연구에서, *브이. 콜레라에*는 시험관내 및 습식 마이크로코즘(pond microcosm)에서 ICP-1-내성 돌연변이체의 신속한 생성을 위해 상변이를 사용한다는 것이 밝혀졌다(Seed et al. *PLoS ICP-2.* 8(9):e1002917 (2012). PMID: PMC3441752). 상변이체는 절단된 LPS O-항원을 가지며, 야생형 LPS는 ICP-1에 대한 수용체인 것으로 결정되었다. 또한, 세균의 상 변이체는 감염을 야기하는 능력이 약화되는 것으로 밝혀졌고, 이는 이러한 돌연변이체가 환자 대변 샘플에서 왜 발견되지 않았는가를 설명한다. 따라서, ICP-1은 *브이. 콜레라에*의 세포와 함께 인간에 진입할 수 있고, 파지는 계속 증식한다.

- [0042] *브이. 콜레라*의 일부 균주는 ICP-1 복제를 특이적으로 간섭하는 파지-유도성 염색체 섬-유사 요소(phage-inducible chromosomal island-like element)(PLE)인 다른 방어 메커니즘을 사용한다(Seed et al. *Nature*. 494(7438):489-91 (2013). PMID: PMC3587790). 놀랍게도, ICP-1 단리물의 2분의 1은 파괴하도록 이를 표적화함으로써 PLE를 회피하게 하는 기능적 CRISPR/Cas 시스템을 보유한다는 것이 밝혀졌다(Seed et al. *Nature*. 494(7438):489-91, 2013). 이는 그람-음성 세균에서의 PLE의 최초 보고이며, 또한 파지에 의해 코딩된 기능적 CRISPR/Cas의 최초 보고이다. ICP-1에 대해 방어하게 하는 PLE를 함유하는, 1931 년에 이라크에서 단리된 균주를 포함하여, 몇몇의 고전적 유전인자형(biotype) 균주가 발견되었다. 따라서, 세균과 파지 사이의 분자 다름이 적어도 80 년 동안 진행중이다.
- [0043] 본래 방글라데시에서 단리된 다른 용균성 파지 균주인 ICP-2는 발산 세균의 집단 구조를 극적으로 변경시키는 방식으로 방글라데시 및 아이티에서 인간 감염 동안 *브이. 콜레라*에 대한 선택적 압력을 가한다. ICP-2는 아이티 유행병으로부터 얻어진 샘플에서만 확인된 유일한 용균성 파지이다. 일부 환자는 ICP-2에 대한 수용체인 주요 외막 단백질 OmpU의 2 개의 세포외 루프 중 하나에서 단일 아미노산 변화를 보유하는 것으로서 특징화된 ICP-2 내성 돌연변이체를 발산한다. OmpU는 *브이. 콜레라*의 중요한 독성 인자인 것으로 알려져 있으며, 이의 발현은 장관의 감염 동안 높게 상향조절된다. 단일 아미노산 돌연변이체는 OmpU 발현 및 적어도 부분적인 기능을 보유하며, 이는 시험된 몇몇 돌연변이체가 독성인 채로 유지되기 때문이다. 그러나, 이들은 숙주 외부에서의 성장 동안 약간의 적합성 결여(fitness defect)를 경험한다. 이 적합성 결여는 돌연변이체 OmpU 대립유전자가 집단에서 고정되지 않은 이유를 설명할 수 있다. 흥미롭게도, 다른 환자들은 ToxR에서 기능상실 돌연변이를 갖는 상이한 유형의 ICP-2-내성 돌연변이체 세균 균주를 발산하는 것으로 관찰되었다. ToxR은 *ompU* 및 독성 유전자의 양성 전사 조절인자이다. 따라서, 이들 환자로부터 발산된 집단은 ICP-2-내성이다. 이들 세균의 세포는 외막에서 정상적인 양의 OmpU를 발현하는데 실패했다. 이들 세균은 독성 유전자 발현이 결여된다. 이들 상이한 집단은 *브이. 콜레라*에 대한 선택적 압력을 가하였을, 파지 블룸(bloom)의 인간 감염 동안의 단계에 따라 선택된 것으로 예상되었다. 예를 들어, ToxR에서의 기능상실 돌연변이는 감염 초기에 아마도 용인되지 않았을 것이지만, 세균 부담이 높고 콜레라 독소가 이미 분비성 설사를 유도하였을 감염 후기에는 중요하지 않았을 것이다.
- [0044] 특히, 세균에서의 다약제 내성이 전세계적으로 됨에 따라 항생제가 효과를 잃는 시대에서 감염성 질환을 방지하기 위해서는 다면적 접근법이 필요하다. 효과적인 예방 전략은 세균 감염으로 인한 질환을 감소시키는데 필수적일 것이다. 따라서, 본원에 제공된 조성물 및 방법의 실시양태는 *비브리오* 속 세균에 의해 야기된 질환, 특히 콜레라, 유행기생충인 *비브리오 콜레라*에 의해 야기된 극심한 탈수 질환에 대한 예방 요법으로서 박테리오파지의 특이성 및 신속한-작용 특성을 활용한다. 3 개 독성 파지의 혼합물 또는 각테일인 조성물을 사용하여, 콜레라 발병의 2 개 동물 모델을 이용한 본원의 방법은 이 접근법이 질환을 감소시키기 위해 성공적으로 사용되었음을 나타낸다. *브이. 콜레라*에 감염시도 전 24 시간까지의 파지의 경구 투여는 장관의 집락화를 감소시키고 콜레라-유사 설사를 예방하였다. 생존하고 있는 *브이. 콜레라* 집락을 파지 민감성에 대해 시험하였으며, 모든 3 개 파지에 대해 어느 것도 내성이 아니었다. 게놈 서열결정 및 변이체 분석은 파지 수용체의 생산을 위해 요구되는 유전자에서의 돌연변이에 의해 내성이 대부분 부여되었음을 나타내었다. 또한, 관찰된 내성 균주는 독성에 대해 손상될 가능성이 있다. *비브리오* 종에 의해 야기된 급성 감염, 예컨대 콜레라 및 관련 질환에 대하여, 파지 예방법은 인간 건강에 대한 세균 질환의 영향을 제한하기 위한 잠재적 전략을 제공한다.
- [0045] 콜레라는 수인성 세균 *비브리오 콜레라*에 의해 야기된 급성의 극심한 탈수성 설사 질환이다. 콜레라는 세계적으로 실질적인 건강 부담이 되고 있고 아프리카 및 아시아의 많은 지역에 고질적이다(Zuckerman et al. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 521-530, 2007). 재난에 시달리거나 전쟁으로 피해를진 국가, 예컨대 아이티(Luquero et al. *Emerging infectious diseases* 22, 410-416, 2016) 및 이라크(Bagcchi, S. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 24-25, 2016)에서의 최근 광범위한 유행병은 갑작스러운 발병에 대한 집단의 취약성을 강조한다. 현재 권고되는 예방법은 WHO-사전승인된 경구 콜레라 백신을 이용한 집단 예방접종(Qadri et al. *The New England J Med* 374, 1723-1732, 2016) 및 위생시설 및 위생 습관의 인식 증가(Taylor et al. *PLoS One* 10, e0135676, 2015)를 포함한다. 그러나, 깨끗한 물을 얻기 어렵고, 예방접종 캠페인은 효율을 위해 사전숙고 및 시간을 필요로 한다; 양쪽 방법은 발병의 사례에서 즉각적인 보호를 위해 논리적으로 실현가능하지 않다.
- [0046] 가정 전염은 공동체 내에서 *브이. 콜레라*의 신속한 확산에 대한 주요 기여인자이다. 지침 증례(index case)의 가정 접촉은 보통 최초 환자가 아프게 된 후 2 내지 3 일에 콜레라 증상을 나타낸다(Harris et al. *PLoS neglected tropical diseases* 2, e221, 2008). 따라서, 신속한 예방 치료의 사용에 의해 콜레라의 가정 확산을 막기 위한 임상적 개입에 대한 요구가 현재 충족되지 않고 있다. 항생제를 이용한 화학적 예방법은 콜레라 부담을 효과적으로 감소시킬 수 있는 반면에(Reveiz et al. *PLoS one* 6, e27060 (2011)), WHO는 약물-내성 세균의

발달 및 확산으로 인해 이의 실행을 권고하지 않는다(WHO, 2014). 또한, 항생제의 광범위한 작용은 환자를 다른 장 감염의 위험에 빠뜨릴 수 있는 장내 상재 미생물총의 장내 불균형을 야기할 것이다.

- [0047] 거의 1 세기 전의 박테리오파지의 발견 시부터 환경적 및 임상적 적용을 위한 박테리오파지(파지)의 사용에서의 관심이 나타났다(Wittebole et al. *Virulence* 5, 226-235, 2014). 항생제와 반대로, 파지 군주는 세균 표적에 특이적이며, 이들은 바이러스 복제성이기 때문에, 파지 복제가 플라크를 형성할 수 있는 살아있는 파지의 총 역가 또는 수(플라크 형성 단위, PFU)를 증가시키는 현상인 자가-투여가 가능하며, 상기 투여에 기여한다.
- [0048] 파지를 사용하여 콜레라를 예방하거나 치료하려는 이전의 감염시도는 혼합된 결과를 생산하였다. Dutta et al. *Bull. Wld Hlth Org.* 28, 357-360 (1963)은 어린 토끼 모델에서 *브이. 콜레라에* 감염시도 1 시간 전에 투여된 단일 파지 유형이 콜레라 증상의 개시를 예방하였음을 보여주었다. Jaiswal et al. *Microbes and Infection* 15, 152-156 (2013)은 성체 토끼 모델에서 *브이. 콜레라에* 감염시도 6 내지 12 시간 전에 투여된 5 개의 용균성 박테리오파지의 각테일이 설사 중증도를 약간 감소시켰으나, 세균 로딩량을 상당히 감소시키는 것은 실패하였음을 보여주었다. 성체 마우스에서의 2 차 연구는 병원성 세균을 이용한 감염시도 전에 파지가 투여되지 않았기 때문에, 예방법을 다루지 않았다(Jaiswal et al. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 422-430, 2014).
- [0049] 3 개의 단리된 *브이. 콜레라에*-특이적, 용균성(독성) 파지 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3가 방글라데시에서 콜레라 환자의 미음양변 샘플로부터 단리되었다(Seed et al. *mBio* 2, e00334-00310, 2011). ICP-1 및 ICP-2 각각에 대한 수용체는 각각 지질다당류(LPS) O1 항원(Seed et al. *PLoS Pathog* 8, e1002917, 2012) 및 주요 외막 포린 OmpU(Seed et al. *eLife* 3, e03497, 2014)로 확인되었으며, 이들은 *브이. 콜레라에*의 독성 인자로 간주된다. ICP-3에 대한 수용체는 아직 알려지지 않았지만, LPS O-항원에 대한 적어도 부분적인 역할이 예상된다. 이들 독성 파지는 인간에서의 자연적인 감염 과정 동안 *브이. 콜레라에*에 대해 상당한 살균 억제력을 부과하는 것으로 나타났다(Seed et al. *eLife* 3, e03497, 2014).
- [0050] 상이한 수용체를 표적화하는 파지의 상이한 군주를 함유하는 각테일은 생존 집단에서 다중-파지-내성 *브이. 콜레라에* 단리물의 가능성을 감소시킬 것이다. 수용체는 상이한 화학적 조성을 갖거나, 상이한 유전자에 의해 코딩되거나, 상이한 분자 경로로부터 발생하기 때문에 서로 상이하다. 따라서, 본원에서 3 개 ICP 파지 각테일은 질환 동물 모델에서 콜레라의 징후를 예방하기 위해 소장으로 수송되는 *브이. 콜레라에*를 특이적으로 표적화하는 잠재적 예방 치료법인 것으로 예상된다.
- [0051] 본원의 예는 경구로 적용된, ICP 각테일의 예방적 사용이 어린 마우스 모델에서 *브이. 콜레라에*에 의한 집락화를 예방하였음을 보여준다. ICP 각테일은 또한 *브이. 콜레라에* 감염시도 전 24 시간까지 투여되었을 때, 어린 토끼 모델에서 콜레라 증상의 개시를 예방하였다. 이 원리 증명 연구는 점막 병원체에 의해 야기된 질환을 예방하기 위한 파지 예방법의 성공적 사용을 입증한다.
- [0052] 이 작업의 일부는 제목이 "A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models"이고, 본원의 발명자인 Yen, M, Cairns, L.S. 및 A. Camilli에 의해 공동 저술된 논문인 *Nat. Commun.* 8:14187에서 2017년 2월 1일에 공개되었으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0053] 약학 조성물
- [0054] 본 발명의 일 양태에서, 용균성(식물성 또는 독성) 복제 주기를 갖는 적어도 2 개 *비브리오* 박테리오파지 군주의 다수의 비리온(플라크 형성 단위, PFU를 야기할 수 있는 바이러스)을 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 조성물은 선택적으로 약학적 허용 담체를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 캡슐화되거나 마이크로-캡슐화된다. 특정 실시양태에서, 이들 조성물은 선택적으로 1 이상의 추가 치료제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 추가 치료제 또는 치료제들은 성장 인자, 항-염증제, 혈관 수축제, 콜라게나아제 억제제, 국소 스테로이드, 기질 금속단백분해효소 억제제, 아스코르베이트, 안지오텐신 II, 안지오텐신 III, 칼레티쿨린, 테트라사이클린, 피브로넥틴, 콜라겐, 트롬보스폰딘, 형질전환 성장 인자(transforming growth factors)(TGF), 케라티노사이트 성장 인자(KGF), 피브로블라스트 성장 인자(FGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소관 유래 성장 인자(PDGF), neu 분화 인자(neu differentiation factor)(NDF), 헤파토사이트 성장 인자(HGF), 및 히알루론산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0055] 본원에 사용된 "약학적 허용 담체"라는 용어는 소망하는 특정 투여 형태에 적합한 임의의 모든 용매, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 농조화제 또는 유화제, 보존제, 고체 바인더, 윤활제 등을 포함한다. *Remington's Pharmaceutical Sciences* Ed. by Gennaro, Mack Publishing,

Easton, PA, 1995는 약학 조성물을 제형화하는데 사용되는 다양한 담체 및 이의 제조를 위한 알려진 기법을 개시하고 있다. 약학적 허용 담체로서 제공될 수 있는 물질의 일부 예는, 비제한적으로, 당류, 예컨대 락토오스, 글루코오스, 및 수크로오스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유; 글리콜; 예컨대, 프로필렌 글리콜; 에스터, 예컨대 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 무 발열원 물; 생리식염수; 링거액(Ringer's solution); 에틸 알코올, 및 포스페이트 완충액뿐 아니라, 다른 무독성 혼화성 윤활제, 예컨대 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트뿐 아니라, 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제를 포함하며, 보존제 및 항산화제가 또한 제형업자의 판단에 따라 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0056] 치료적 유효 용량

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명의 치료 방법에 따라, 가족 구성원 또는 질환 위험이 있는 다른 대상체와 접촉하고, 본원에 기재된 바와 같은 약학 조성물을 투여함으로써 병원성 *비브리오* 전염의 예방이 촉진된다. 따라서, 본 발명은 소망하는 결과를 달성하기 위해 필요한 양으로 및 소망하는 결과를 달성하기 위해 필요한 시간 동안 적어도 2 개의 식물성 *비브리오* 박테리오파지 균주를 포함하는 활성제를 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 특정 종의 *비브리오*와 연관된 세균 질환의 치료를 위한 방법을 제공한다. 이는 세균 감염의 개시를 예방하거나 감염의 추가 발달을 예방하기 위한 치료 수단으로서, 또는 세균 감염의 발달과 연관된 합병증을 최소화하기 위한 예방 수단으로서 본 발명의 제약을 투여하는 단계를 포함함이 이해될 것이다.

[0058] 본 발명의 특정 실시양태에서, 약학 조성물의 "치료적 유효량"은 세균 감염의 추가 발달을 예방하기 위해 효과적인 양이다. 본 발명의 방법에 따른 조성물은 감염 발달의 예방을 위해 효과적인 임의의 투여 양 및 임의의 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 "감염의 예방을 위해 효과적인 양"이라는 표현은 표적 *비브리오* 종의 발달을 예방하거나 지연시키고, 이전에 얻어진 감염의 퇴행 또는 개시로부터의 회복을 야기하기 위해 충분한 조성물의 양을 지칭한다. 정확한 투여량은 치료되는 환자를 고려하여 개별 의사에 의해 선택된다. 투여량 및 투여는 활성제(들)의 충분한 수준을 제공하거나 소망하는 효과를 유지하기 위해 조정될 수 있다. 고려될 수 있는 추가 인자는 질환 상태의 중증도, 예를 들어 감염의 증상; 환자의 연령, 체중 및 성별; 식습관, 투여의 시간 및 빈도; 약물 조합; 반응 민감도; 및 요법에 대한 내성/반응을 포함한다. 장기 작용 약학 조성물은 특정 조성물의 반감기 및 클리어런스 비율(clearance rate)에 따라 매일, 또는 3 내지 4 일마다, 매주 1 회, 또는 2 주마다 1 회 투여될 수 있다. 조성물의 박테리오파지 균주는 질환을 야기하는 원치않는 *비브리오* 세포 내에서 자기-복제하는 세균 바이러스이기 때문에, 성공적인 치료가 단일 용량만을 필요로 하는 것은 특정 발명의 경계 내에 있다.

[0059] 일반적으로, 약 10 g 내지 약 200g의 체중을 갖는 소형 동물 대상체를 위한 적절한 투여량은 대상체의 크기예 따라, 다수의 박테리오파지 균주의 각테일 또는 혼합 조성물의 약 10^4 내지 약 10^8 PFU 전체의 범위 내이다. 예를 들어, 다수의 박테리오파지 균주의 각테일 또는 혼합 조성물의 PFU 전체의 적합한 범위는 소형 동물, 예컨대 어린 마우스 또는 어린 토끼에 대해 약 10^4 내지 약 10^5 , 또는 약 10^5 내지 약 10^6 , 또는 약 10^6 내지 약 10^7 , 또는 약 10^7 내지 약 10^8 , 또는 약 10^8 내지 약 10^9 이다. 인간 환자 또는 대형 동물 대상체에 대해, 적합한 범위는 약 10^7 내지 약 10^{11} 이다. 예를 들어, 약 20 kg 내지 약 200 kg의 체중이 나가는 대상체를 위해 적합한 다수의 박테리오파지 균주의 각테일 또는 혼합 조성물의 PFU 전체의 용량은 환자 또는 대상체의 크기, 연령 및 건강에 따라 약 10^7 내지 약 10^8 을 함유할 수 있거나, 약 10^8 내지 약 10^9 을 함유할 수 있거나, 약 10^9 내지 약 10^{10} 을 함유할 수 있거나, 약 10^{10} 내지 약 10^{11} 을 함유할 수 있다. 매우 큰 고 가치의 농장 또는 동물원 동물, 예를 들어 종마, 경주용 말 또는 멸종위기에 놓인 흰코뿔소를 치료하는 숙달된 수의사는 200 kg 환자에 대한 투여량부터 850 kg, 1000 kg, 1600 kg 이상 체중이 나가는 동물에 대한 투여량까지 적합한 투여량 및 범위를 확대할 수 있을 것이다.

[0060] 본 발명의 활성제는 바람직하게는 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제형화된다. 본원에 사용된 "투여량 단위 형태"라는 표현은 치료되는 환자를 위해 적절한 활성제의 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 그러나, 본 발명의 조성물의 1 일 용법과 같은 총 1 이상의 빈도는 건강한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것이라는 점이 이해될 것이다. 임의의 활성제에 대해, 치료적 유효 용량은 세포 배양 에세이 또는 동물 모델, 보통 마우스, 토끼, 개, 또는 돼지에서 최초로 추산될 수 있다. 바람직한 투여 농도

범위 및 투여 경로를 달성하기 위해 동물 모델이 또한 사용된다. 이어서, 이러한 정보는 인간에서의 투여를 위해 유용한 용량 및 경로를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 치료적 유효 용량은 증상 또는 병태를 개선하는 활성제의 양을 지칭한다. 활성제의 치료 효능 및 독성은 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약학 절차, 예를 들어, ED₅₀(용량이 집단 중 50%에서 치료적으로 유효함) 및 LD₅₀(용량이 집단 중 50%에 대해 치명적임)에 의해 결정될 수 있다. 독성 대 치료 효과의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 LD₅₀/ED₅₀ 비로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 약학 조성물이 바람직하다. 세포 배양 에세이 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간 용도를 위한 투여량의 범위를 수립하는데 사용된다.

[0061] 유효 용량은 본원 및 첨부된 부록 A 및 본원에 인용되고 본원에 참고로 포함되는 참고문헌에 기재된 방법에 따라 제조된 저장 용액의 알려진 역가를 기본으로 하여, 실험실에서 *비브리오* 세포에서 측정된 바와 같은 플라크 형성 단위(PFU)로 표현된다. 저장 용액은 적어도 약, 예를 들어 10^{10} , 10^{11} , 또는 약 10^{12} PFU/mL를 함유한다. 소형 대상체, 예컨대 유아를 위해 적합한 용량은 약 10^9 또는 10^{10} PFU를 함유할 수 있고, 100 kg 대상체를 위한 용량은 더 큰 자릿수일 수 있다. *비브리오* 질환에 의해 감염된 사람에 대한 대상체의 이전 노출을 기본으로 하여, 용인성 및 요구를 결정하는 것은 주치의의 지식에 속한다.

[0062] 약학 조성물의 투여

[0063] 적절한 약학적 허용 담체를 이용하여 소망하는 투여량으로 제형화한 후에, 본 발명의 약학 조성물은 중증도 및 활성 감염을 갖는 환자, 및 치료되는 *비브리오* 균주에 대한 노출의 위치에 따라, 인간 및 다른 포유동물에 국소로(분말, 연고, 또는 점적액에 의한), 경구로, 직장으로, 비경구적으로, 낭내로(intracisternally), 질내로, 복강내로, 구강으로, 눈으로, 또는 코로 투여될 수 있다.

[0064] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는, 비제한적으로, 약학적 허용 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르(elixir)를 포함한다. 활성제(들)와 함께, 액체 투여 형태는 당업계에서 보통 사용되는 불활성 희석제, 예컨대 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아마이드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유, 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스터, 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 아췌반트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 향미제, 및 방향제를 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 약학 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제, 또는 패치를 포함한다. 활성제는 살균 조건 하에서, 약학적 허용 담체 및 요구될 수 있는 임의의 필요한 보존제 또는 완충제와 혼합된다. 예를 들어, 눈 또는 피부 감염은 수성 점적액, 미스트, 에멀전, 또는 크림으로 치료될 수 있다. 투여는 치료적일 수 있거나 예방적일 수 있다. 예방 제형은 잠재적 감염 부위, 또는 감염의 공급원, 예컨대 오염된 물, 음식, 대변 노출, 또는 자상 또는 상처에 제공되거나 적용될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림, 및 젤은 본 발명의 활성제와 함께, 부형제, 예컨대 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크, 산화아연, 또는 이의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0066] 주사가능 제제, 예를 들어 살균 주사가능 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 알려진 바에 따라 제형화될 수 있다. 살균 주사가능 제제는 또한 무독성 비경구적 허용가능 희석제 또는 용매, 예를 들어 1,3-부탄디올의 용액 내의 살균 주사가능 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 이 용될 수 있는 허용가능 비히클 및 용매 중에는 물, 링거액, U.S.P. 및 생리식염액이 있다. 또한 살균 지방유가 용매 또는 현탁 매체로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함한 임의의 완화성 지방유가 이용될 수 있다. 또한, 지방산, 예컨대 올레산이 주사가능제의 제조에 사용된다. 주사가능 제형은 예를 들어, 세균-함유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 살균수 또는 다른 살균 주사가능 매체에서 용해되거나 분산될 수 있는 살균 고체 조성물 형태의 살균제를 포함함으로써 살균될 수 있다. 활성제의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 약제의 흡수를 늦추는 것이 보통 바람직하다. 비경구적으로 투여된 활성제의 흡수 지연은 오일 비히클에 약제를 용해시키거나 현탁함으로써 달성될 수 있다. 주사가능 데포트(depot) 형태 또는 경구 투여를 위한 형태는 생분해성 중합체, 예컨대 폴리락티드-폴리글리콜리드 내에 약제의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다. 활성제 대 중합체의 비 및 사용되는 특정 중합체의 특성에 따라, 활성제 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스터) 및 폴리(안하이드라이드)를 포함한다. 데포트 주사가능 제형 및 경구 제형은 또한 신체 조직과 양립가능한 리포솜 또는

마이크로에멀전에 약제를 포획시킴으로써 제조된다.

[0067] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 알약, 분말, 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성제는 적어도 하나의 불활성, 약학적 허용 부형제 또는 담체, 예컨대 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트 및/또는 a) 필러 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 및 규산, b) 바인더, 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 알지네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로오스, 및 아카시아, c) 보습제, 예컨대 글리세롤, d) 봉해제, 예컨대 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이 트, 및 탄산나트륨, e) 용액 지연제, 예컨대 파라핀, f) 흡수 가속제, 예컨대 제4 급 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예컨대 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 클레이, 및 i) 윤활제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이의 혼합물과 혼합된다.

[0068] 락토오스 또는 유당뿐 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용한 연질 및 경질-충진된 젤라틴 캡슐의 필러로서 유사한 유형의 고체 조성물이 또한 사용될 수 있다. 정제, 드라제(dragee), 캡슐, 알약, 및 과립의 고체 투여 형태는 장용성 코팅, 서방성 코팅 및 약학 제형화 업계에 잘 알려진 다른 코팅과 같은 코팅 및 셸(shell)을 이용하여 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성제(들)는 적어도 하나의 불활성 희석제, 예컨대 수크로오스, 락토오스 또는 전분과 혼합될 수 있다. 이러한 투여 형태는 또한 정상 실시와 같이 불활성 희석제 외의 추가 물질, 예를 들어 정제 윤활제 및 다른 정제 보조제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 및 미결정 셀룰로오스를 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우에, 투여 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 이들이 선택적으로 지연된 방식으로 오직, 또는 바람직 하게는 장관의 특정 부위에서 활성제(들)를 방출하는 조성물의 것일 수 있다. 사용될 수 있는 매립(embedding) 조성물의 예는 중합 물질 및 왁스를 포함한다.

[0069] 약학 조성물의 용도

[0070] 상기 논의되고 실시예에서 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, 세균 세포 *비브리오* 내에서 감염 및 복제되는 용균 성 박테리오파지의 적어도 2 개의 상이한 균주를 함유하는 약학 조성물은 세균 감염의 발달 또는 진행을 예방하 기에 유용하다. 일반적으로, 이들 조성물은 인간에서의 감염, 예컨대 *비브리오 콜레라에*에 의해 야기된 콜레라, 또는 *비브리오*의 동일하거나 상이한 종에 의해 야기된 상응하는 질환을 갖는 동물에서의 추가 감염 및 감염의 유행성 및 만연성(pandemic) 발생을 예방하는데 임상적으로 유용할 것으로 여겨진다.

[0071] 본 발명에 의해 포함되는 진단, 예후 및 치료 방법은 인간에서의 병태를 치료하는 것에 제한되는 것은 아니라, 비제한적으로, 소, 개, 고양이, 염소, 양, 돼지, 무린, 및 말 종을 포함한 임의의 포유동물에서 유사한 병태를 치료하기 위해서도 사용될 수 있다. 소정의 동물 종에서 감염을 치료할 때, 상기 종에 대해 *비브리오* 감염성인 세포를 감염 및 사멸시키는 적합한 용균성 박테리오파지는 동물이 발견되는 환경에서 용이하게 입수가 가능하다. 따라서, 본원의 방법은 이들 병태에 또한 적용가능한 것으로 예상된다.

[0072] 실시예

[0073] 실시예 1. 성장 조건 및 균주

[0074] 본 연구에서 사용된 박테리오파지 균주 및 세균 균주를 표 1 및 2에 열거한다. *브이. 콜레라에* 균주를 100 μ g /mL 스트렙토마이신(Sm)이 보충된 루리아-베르타니(Luria-Bertani)(LB) 브로쓰(broth)에서 성장시켰다. ICP 각 테일은 *비브리오* 파지 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3을 동일한 수로 포함한다. 이들 파지를 이전에 방글라데시 콜레라 환자 미음양변 샘플로부터 단리시켰다. ICP-1은 균주 AC4741 상에서 단리시킨 한편, ICP-2 및 ICP-3는 AC53, E7946의 Sm-내성 단리물 상에서 단리시켰다. 모든 실시예는 AC53 *브이. 콜레라에* O1 E1 Tor 균주 E7946를 사용 하여 수행하였다. 균주 AC4653 및 AC2846를 플라크 에세이에서 음성 대조군으로 사용하였다. ICP-1 및 ICP-3는 균주 AC4653 상에서 플라크를 형성할 수 없으며, ICP-2는 세균 균주 AC2846 상에서 플라크를 형성할 수 없다.

표 1

표 1. 콜레라 환자 대변으로부터 ICP-1, ICP-2 및 ICP-3 의 분리, 및 파지 특징

년도	ICP-1	ICP-2	ICP-3
2001	○ + ○		
2002	○ ○ ○	○	
2003	○ ○ +		
2004	+ ○ ○	+	
2005	○ ○ +	○	
2006	○ +	+ ○	
2007	○ ○ ○	○	+ +
2008	○ ○ ○		+ ○
2009	○ ○ ○		+ ○
2010	○ ○ ○		○
특성:			
분류 과	미오비리과(Myoviridae)	포도비리과(Podoviridae)	포도비리과
게놈 크기, bp	125,956	49,675	39,162
예상 단백질	230	73	54
% 가상	88	81	52
수용체	O1-항원	OmpU	O1-항원

부호: +는 플라크-양성을 나타냄; ○는 PCR-양성을 나타냄

표 2

표 2. 세균 균주

균주	상세내용
AC53	브이. 콜레라에 O1 E1 Tor Ogawa E7946 (Sm ^R)
AC2846	E7946 ΔompU
AC4653	E7946 ΔwbeL
AC4741	브이. 콜레라에 O1 E1 Tor Ogawa (Sm ^R), PLE 음성

약어: PLE, PICI-유사 요소; Sm^R, 스트렙토마이신 저항성

실시예 2. 박테리오파지 제조

한천 플레이트 상에서의 성장 이후 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 침전에 의해 ICP 파지의 고-역가 저장물을 제조하였다. 간략하게는, 각각의 파지를 연결 아가로오스(0.3% 아가로오스가 보충된 LB 브로쓰) 오버레이(overlay)에서 적절한 브이. 콜레라에 균주와 함께 성장시켰다. 융합되면, 오버레이를 STE 완충제(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA)와 함께 밤새 4℃에서 부드럽게 흔들면서 항온처리하여 파지를 용출시켰다. STE-파지 용액을 원심분리, 살균-여과에 의해 정화하였으며, 1X PEG(4% PEG 8000, 0.5 M NaCl)와 함께 4℃에서 1-3 일 동안 항온처리하여 파지를 침전시켰다. 10,000 x g에서 15 분 동안 4℃에서의 원심분리에 의해 파지를 수집하고, 파지 펠릿을 STE 완충제에서 재현탁하였다. 파지를 이전에 기재된 바(Dutta et al. Ibid.)와 같이, 플라크 에세이에 의해 적정하였다.

실시예 3. 시험관내 파지 사멸 에세이

브이. 콜레라에의 단일 집락으로부터 기원한 밤샘 배양액을 100 μg/mL 스트렙토마이신(Sm)이 보충된 50 mL LB에서 0.05의 OD₆₀₀까지 희석하였으며, 37℃에서 통기시키면서 성장시켰다. 15 분 후에, 파지를 각각의 배양액에 첨가하였다. 도 1b에 표시된 시점에, 샘플을 수집하여, CFU/mL 및 PFU/mL 각각을 측정하였다.

실시예 4. 비브리오 콜레라에를 이용한 어린 마우스의 감염

터프츠 대학교의 실험동물의학과 및 동물실험윤리위원회 규칙에 따라 동물 실험을 수행하였다. 4- 및 5-일령 CD-1 어린 마우스(Charles River Laboratories)를 감염시켰다. 각각의 그룹의 마우스는 적어도 2 마리의 상이한 한배새끼들로부터의 동물을 포함하였다. 암컷 및 수컷 동물 양쪽을 본 연구에서 사용하였다. 동물의 성별과 각각의 실험의 결과 사이에 관찰가능한 상관관계는 없었다. 동물은 이전에 브이. 콜레라에에 노출된 적이 없으며, 따라서 이들의 마이크로바이옴에서 임의의 브이. 콜레라에-특이적 파지를 보유하지 않았을 것이므로, 마우스를

상재성(resident) *브이. 콜레라에* 파지의 존재에 대해 시험하지 않았다.

[0083] 파지-처리된 그룹에서 어린 마우스에게 경구 삽관에 의해 2.5% 중탄산나트륨에 희석된 파지를 입위관으로 (orogastrically) 투여하였다. 콜레라 처리된 그룹 내의 어린 마우스에게 2.5% 중탄산나트륨에 희석된 약 10^5 CFU("정상" 감염 용량), 또는 약 10^9 CFU("고" 감염 용량)의 *브이. 콜레라에*를 투여하였다. 세균 이전의 적어도 3 시간 전에 파지 제제를 투여하였기 때문에, 이론적으로 계산된 MOI는 파지와 세균 사이의 상호작용의 정확한 측정치가 아니었을 것이다. 대신에, 동물에 접종된 세균과 파지의 역가를 투입 물질로부터 계산하였으며, 따라서 상기 범위는 파지의 투입 수, 또는 각각의 실시예의 결말의 관찰된 결과로서 표현하였다. 예를 들어, 마우스를 감염 후 24 시간에 희생시켰으며, 소장을 해부하고, 20% 글리세롤이 보충된 LB 브로쓰에서 균질화하였으며, 세포 함량의 에세이를 위해 균질액을 계대 희석시키고, 100 $\mu\text{g/mL}$ Sm이 보충된 LB 한천 상에 도말하였으며, 소장 당 CFU를 계산하였다. 소장 균질액으로부터 파지를 추출하기 위해, 장 균질액의 분취액을 클로로포름으로 처리하고 10,000 $\times g$ 에서 5 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 수집하고 플라크 에세이를 사용하여 소장 당 PFU를 계산하였다. 파지 예방법에 생존하는 *브이. 콜레라에* 세포의 내성 프로파일을 평가하기 위해, 동물 당 최대 10 개 집락을 무작위로 고르고, 각각의 파지 균주 ICP-1, ICP-2 및 ICP-3의 평판배양효율(efficiency of plating) 역가를 각각의 집락에 대해 결정하였다.

[0084] 실시예 5. *비브리오 콜레라에*를 이용한 어린 토끼의 감염

[0085] 어린 3-일령 뉴질랜드 화이트(New Zealand White) 토끼(Charles River Laboratories)를 본 연구에서 사용하였다. 각각의 그룹의 토끼는 적어도 2 마리의 상이한 한배새끼들로부터의 동물을 포함하였으며, 암컷 및 수컷 동물 양쪽을 포함하였다. 동물의 성별과 각각의 실험의 결과 사이에 관찰가능한 상관관계는 없었다. 파지-처리된 그룹에서 어린 토끼에게 2.5% 중탄산나트륨에 희석된 파지를 입위관으로 투여하였다. *브이. 콜레라에*를 이용하여 감염하기 3 시간 전에, 어린 토끼를 복강내 주사(체중 그람 당 2 μg)에 의해 라니티딘 하이드로클로라이드로 사전-처리하여, 위 산도(Caraco Pharmaceutical Laboratories)를 감소시켰다. 어린 토끼를 2.5% 중탄산나트륨에 희석된 5×10^8 CFU *브이. 콜레라에* AC53으로 감염시켰다. 마우스 실시예에 대해, 대상체 내로 접종되는 세균 및 파지 제제의 역가는 제제의 역가 및 적절한 투여량으로부터 계산하였다. 실시예의 개시 시에, 및 감염의 과정에 걸쳐 정기적으로 동물의 체중을 측정하였다. 감염 기간 종결 시의 체중을 개시 시의 체중으로 나누어 백분율 체중을 계산하였다. 동물은 감염된지 12-20 시간 후에 희생시켰다.

[0086] 콜레라를 앓는 어린 토끼는 전형적으로 12-14 시간 이내에 이들 체중의 10-15%를 손실하고, 이 시점에 희생된다. 자신의 체중의 10% 미만을 손실한 어린 토끼를 감염된지 20 시간 후에 본 발명자들의 IACUC 프로토콜에 따라 희생시켰다. 어린 토끼는 *브이. 콜레라에* 감염 후에 행동이 도태되고, 감염 기간 동안 음식이 없기 때문에 모체와 함께 존재할 수 없으므로, 상기 시간 제한이 필요하다.

[0087] 희생 후에, 각각의 토끼의 장을 20% 글리세롤이 보충된 LB 브로쓰에서 균질화하였다. 맹장액을, 존재하는 경우, 1 mL 주사기로 수집하였다. 맹장액 및 장 균질액을 계대 희석시키고, 장 당 CFU의 계산을 위해 100 $\mu\text{g/mL}$ Sm을 함유한 LB 한천에 도말하였다. 어린 마우스의 감염에 대해 기재된 바와 같이 균질액으로부터 파지를 수집하였다. 생존 *브이. 콜레라에* 집락을 집락-정제하고 ICP 파지에 대한 내성에 대하여 평판배양효율 에세이에 의해 평가하였다.

[0088] 실시예 6. 평판배양효율 에세이

[0089] 평판배양효율(EOP) 에세이를 파지 포식에서 생존한 단리물에 대해 수행하였다. 각각의 파지를 단리물, AC53에 대해, 또한 음성 대조군으로서 파지-내성 균주에 대해 적정하였다(ICP-1 및 ICP-3에 대해 $\Delta wbeL$ AC4653, 및 ICP-2에 대해 $\Delta ompU$ AC2846). 동물 단리물에 대한 파지의 역가를 AC53에 대한 파지의 역가로 나눔으로써 EOP를 계산하였다. 검출 한계는 1×10^{-6} 이었다. 단리물은 EOP가 약 1×10^{-6} 미만인 것으로 관찰된 경우 내성으로 기재되었으며, 단리물은 EOP가 약 1×10^{-1} 을 초과하는 것으로 관찰된 경우 민감성으로 기재되었고, 단리물은 EOP가 이들 값 사이인 것으로 관찰된 경우 부분적으로 민감성인 것으로 기재되었다.

[0090] 실시예 7. 파지-내성 단리물의 서열 분석

[0091] DNeasy 혈액 & 조직 키트(Qiagen)를 사용하여 *브이. 콜레라에* 게놈 DNA를 추출하였다. Nextera XT DNA 라이브러리 제조 키트(Illumina)를 사용하여 단일-말단 150-bp 서열결정을 위한 전체-게놈 라이브러리를 제조하였다. 서열결정은 터프츠 대학교 핵심연구시설(Core Facility)에서 Illumina HiSeq 2500을 사용하여 수행하였다. CLC

Genomics Workbench 8 소프트웨어를 사용하여 게놈을 조립하고 *브이. 콜레라에* O1 N16961(Seed et al. *mBio* 2, e00334-00310, 2011) 기준 게놈에 정렬시켰다. 파지 내성을 부여할 수 있는 돌연변이를 결정하기 위해, 20%의 빈도 임계를 갖는 맵핑된 판독물에 대하여 변이체 분석을 수행하였다. 결과를 AC53 변이체(Seed et al. *PLoS Pathog* 8, e1002917, 2012)와 비교하여, 야생형 접종물에서 발견된 것들을 제거하였다. 모든 3 개 ICP 파지에 대해 민감성인 것으로 결정된 생존 단리물을 서열결정하고, 얻어진 변이체를 또한 내성 단리물 변이체 분석물로 부터 제거하였다.

[0092] 실시예 8. 3 개-파지 ICP 카테일은 시험관내 브이. 콜레라에를 사멸시킨다.

[0093] 86 년 전 콜레라 대변에서 용균성 파지의 최초 보고에서부터, 콜레라 감염 또는 콜레라 발병의 동역학에 대한 상기 파지 효과의 일화적 또는 상관적 보고만이 있어 왔다(d'Herelle et al. 1927, *Ibid.*; Faruque et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 1702-1707, 2005; Faruque et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 6119-6124, 2005). 그러나, 최근에 들어서야 *브이. 콜레라에* 감염에 대한 용균성 파지의 효과를 시험하는 제어된 실험, 및 파지 균주의 분자 분석 결과의 보고가 나타났다(Zahid et al. *Infect Immun* 76: 5266-5273, 2008; Nelson et al. *PLoS ICP-2*. 4, e1000187, 2008. PMID: PMC2563029; Seed et al. *mBio*. 2(1). pii: e00334-10, 2011. PMID: PMC3037004; Seed et al. *Nature*. 494(7438):489-91, 2013. PMID: PMC3587790). 이들 연구 중 어느 것도 감염 전에 대상체에게 파지를 투여하는 것으로부터 야기된 예방법을 입증하지 않았다.

[0094] 본원에서는 미음양변으로부터 천연 용균성 파지/*브이. 콜레라에* 쌍 세트를 얻기 위해 다양한 에세이를 사용한다. 일반적으로, 용균성 파지는 미음양변으로부터 단리되었으며, 소장의 *브이. 콜레라에* 감염을 간접하는 것으로 밝혀진다. 세균의 감염시도와 함께 공동-투여된 ICP-1 파지는 어린 마우스의 소장에서 *브이. 콜레라에*의 로딩량을 용량-의존 방식으로 감소시켰다(Nelson et al. *PLoS ICP-2*. 4, e1000187, 2008. PMID: PMC2563029). 그러나, 이 억제 효과가 유행성 *브이. 콜레라에* 균주와 연관된 다른 용균성 파지의 특징인지는 알려지지 않았으며, 예방법은 입증되지 않았다. 또한, 일부 용균성 파지는 *브이. 콜레라에*가 감염을 수립하도록 장 감염 동안 과잉 포식을 삼가하고, 콜레라를 야기하도록 충분히 높은 밀도로 복제되며, 파지의 지속된 증식, 및 파지 및 숙주 세균 세포 양쪽을 환경으로 되돌아가는 전파를 허용하도록 진화하여 왔을 수 있다.

[0095] 최초 시험관내 사멸 시간-경과 분석은 브이. 콜레라에를 사멸시키는 데 3 개-파지 ICP 카테일이 각각의 개별 파지에 비해 더욱 효과적임을 나타내었다(도 1a). 숙주 균주, 감염성 병원성 *브이. 콜레라에* E7946(AC53)의 배양액을 다음 배양 조건에서 성장시켰다: 파지의 부재(대조군); 또는 각각의 용균성 박테리오파지 균주 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3의 별도 존재 하에서, 또는 ICP 카테일의 존재 하에서, 각각의 파지 및 세균 혼합물에 대해 1 개의 감염 다중도(MOI)로. 세균(도 1a) 및 파지(도 1b) 역가를 8 시간 동안 매 시간마다, 및 12 및 24 시간에 계수하였다.

[0096] 데이터는 세균 집단이 파지 감염의 모든 조건에서 초기에 감소하였으며, ICP-1 또는 ICP-3의 존재 하에서 각각 4 내지 6 시간 내에 성장한 배양액의 경우 성장이 재개되었음을 나타낸다(도 1a). ICP-2의 존재 하에서 항온처리된 세포는 성장을 더욱 느리게 재개하였으며, 24 시간 내에 대조군과 동일한 밀도에 도달하였다.

[0097] 반면에, ICP 카테일과 함께 성장한 세포는 실험의 종료까지 무 파지 대조군과 동일한 밀도에 도달하지 않았다. 파지 역가는 실시예의 과정에 걸쳐 모든 조건에 대해 하락하였고 안정적으로 유지되었다(도 1b). 출발 세균 접종물이 높았고(5×10^7 CFU), 액체 배양의 시간 경과 동안 양성적으로 선택된 파지-내성 돌연변이체를 함유할 수 있었음을 고려하였을 때, *브이. 콜레라에*는 시간에 걸쳐 파지 포식을 회피할 수 있었다.

[0098] 실시예 9. 어린 마우스 소장의 브이. 콜레라에 집락화는 ICP 파지 카테일에 의해 감소하였다.

[0099] 파지 균주 및 이의 숙주 세균에 대한 유전형 및 표현형 가변성이 높기 때문에, 미음양변으로부터 단리된 천연 산출 용균성 파지/*브이. 콜레라에* 카테일에 대한 분석을 제한하는 전략을 본원에서 사용하였다. 방글라데시에서 상이한 환자로부터 이전에 단리된 3 개의 상기 쌍에 대해 감염의 과정에 걸쳐 개체군 동태(Population dynamics)를 결정한다(Nelson et al. *PLoS ICP-2*. 4, e1000187, 2008. PMID: PMC2563029; Seed et al. *mBio*. 2(1). pii: e00334-10, 2011. PMID: PMC3037004). 파지 존재에 대해 내성인 미음양변에서의 *브이. 콜레라에*의 백분율을 결정하였다. 이 분석은 용균성 파지 및 *브이. 콜레라에*를 함유한 미음양변의 보관된 샘플을 사용한다. 본원에 사용된 3 개 파지, ICP-1, ICP-2 및 ICP-3을 서열결정 및 숙주 범위의 결정에 의해 이전에 분석하였다(Seed et al. *mBio*. 2(1). pii: e00334-10, 2011. PMID: PMC3037004).

[0100] 본원에서 ICP 카테일은 *브이. 콜레라에*를 사멸시키는 데 각각의 파지 균주 단독에 비해 시험관내에서 더욱 효과적인 것으로 관찰되었다. 이것이 생체내에서 사실일 수 있을지 시험하기 위해, *브이. 콜레라에* 집락화의 어린

마우스 모델에서 예방 실험을 수행하였다. ICP 카테일을 그것이 어린 마우스 소장의 *브이. 콜레라에* 감염을 예방하는데 효과적일 것인지 여부를 결정하기 위해 시험하였다. 마우스를 5 개 그룹으로 나누고 무 파지(대조군), 또는 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3의 각각의 개별 파지 균주, 또는 본원에서 ICP 카테일(또는 파지 카테일 또는 박테리오파지 카테일)로 지칭되는 모든 3 개 파지 균주의 혼합물을 투여하였다.

- [0101] 5×10^5 집락-형성 단위(CFU)의 *브이. 콜레라에*를 이용하여 감염하기 3 시간 전에 약 1×10^6 내지 1×10^7 PFU의 용량의 파지 제조물을 입위관 접종에 의해 마우스에게 투여하였다. 24 시간 후에, 마우스를 희생시키고 소장 내의 *브이. 콜레라에* 및 파지를 계수하였다.
- [0102] 소장 내의 생존 *브이. 콜레라에* 세포의 수는 미-처치된 무 파지 대조군과 비교하여, 파지가 투여된 모든 조건에서 적어도 두 자릿수 감소된 것으로 관찰되었다. 투여된 개별 단일 균주 중에서, ICP-3는 CFU의 수에서 큰 감소에 의해 판단된 바와 같이 세균 세포를 감소시키거나 제거하기 위해 가장 성공적인 단일 파지로서 관찰되었다(세 자릿수 내지 여섯 자릿수 감소)(n.s). 도 2a를 참고한다.
- [0103] ICP 카테일은 5 마리 마우스 중 4 마리의 장 균질액에서 *브이. 콜레라에*가 검출가능하지 않은 개별 균주 중 임의의 것에 비해 더욱 효과적인 것으로 관찰되었다($P < 0.01$). 이들 데이터는 각각의 파지 균주와 개별적으로 비교하여, 3 개 균주의 ICP 카테일이 *브이. 콜레라에* 집락화를 예방하는데 우수하였음을 나타낸다. PFU로서의 파지 수는 기간 종료시 소장 내에 여전히 존재하였으며(도 2b), 이는 이들 파지가 장관에서 생존하고 지속되어, 세균 병원성 세포에 대한 보호를 지속적으로 부여할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0104] 박테리오파지 카테일이 개별적으로 투여된 각각의 균주에 비해 더욱 일반적인 예방적 수단인지 여부를 결정하기 위해, ICP 카테일을 *브이. 콜레라에* 감염되기 전 24 시간까지 투여되었을 때의 효과에 대해 시험하였다. 파지가 숙주 세균의 부재 하에서 장기간 동안 소장에서 생존하는지를 결정하기 위해, 마우스에게 파지(3×10^7 내지 3×10^8 PFU)를 경구 위관영양법에 의해 투여하고, 3, 6, 12, 또는 24 시간 후에 희생시켰다. 장 균질액으로부터의 파지 역가를 플라크 에세이를 사용하여 결정하였다(도 3a). 3 시간 후에, ICP-1 및 ICP-3에 대한 파지 역가는 안정적으로 유지된 반면에, ICP-2 역가는 대략 10 배 하락한 것으로 관찰되었다. 모든 3 개 파지 균주에 대해, 역가는 6 내지 12 시간 후에 10 배 내지 100 배만 하락하였다. 24 시간 후에, ICP-1 및 ICP-2는 소장 당 대략 10^5 PFU로 여전히 유지되었으며, ICP-3의 역가는 소장 당 10^2 내지 10^4 PFU로 감소하였다. 이들 데이터는 상당한 수의 ICP 파지가 숙주 세균의 세포, 병원성 *브이. 콜레라에*의 부재 하에서 적어도 24 시간 동안 장관에서 생존할 수 있었음을 추가로 나타낸다.
- [0105] *브이. 콜레라에*에 대해 노출되기 수시간 전에 투여되는 경우 파지 보호 정도를 시험하기 위해, 어린 마우스에게 5×10^5 내지 9×10^5 CFU *브이. 콜레라에*를 이용한 감염시도하기 6, 12 또는 24 시간 전에 ICP 카테일을 접종하였다. 음성 대조군 내의 동물은 파지로 처치하지 않았다. 도 4b의 데이터는 6 시간 예방법이 가장 성공적이었으며; 생존 *브이. 콜레라에* 세포의 수는 무 파지 대조군과 비교하여, 적어도 세 자릿수 감소하였으며, 파지를 투여받은 7 마리 마우스 중 4 마리에서 검출가능한 *브이. 콜레라에*가 관찰되지 않았음을 나타낸다($P < 0.0001$). *브이. 콜레라에* 세포의 수는 12 시간 그룹에 대해 상당히 낮아지고($P < 0.001$), 이들 동물 중 4 마리는 실험 종료시 검출가능한 *브이. 콜레라에*를 갖지 않는 것으로 관찰되었다. *브이. 콜레라에* 세포의 수는 또한 24 시간 그룹에서 두 자릿수 감소하였다. 또한, 용균성 파지 PFU는 감염된지 24 시간 후에 검출가능하였다(도 3c).
- [0106] 마우스가 병원성 세균의 높은 감염시도로 처치되는 경우 ICP 카테일이 집락화를 제한하는지를 결정하기 위해, 어린 마우스에게 1×10^8 CFU의 *브이. 콜레라에*를 도 3b 및 3c에서 보다 대략 200 배 큰 용량으로 접종하였다. 도 3d의 데이터는 ICP 카테일이 감염시도하기 6, 12, 또는 24 시간 전에 파지가 투여된 마우스에서 적어도 두 자릿수만큼 소장의 *브이. 콜레라에* 집락화를 상당히 감소시키는데 효과적이었음을 나타낸다. 파지 PFU는 감염된지 24 시간 후에 모든 3 개 파지-처치된 그룹에서 유사한 수준으로 검출되었다(도 3e). 일례히, 이들 데이터는 소장의 *브이. 콜레라에* 집락화를 예방하기 위한 파지 예방 접근법의 잠재적 용도를 나타낸다.
- [0107] *브이. 콜레라에* 세균을 ICP 카테일이 투여된 몇몇 마우스의 장 균질액으로부터 단리하였다(도 2 및 3). 장관 내의 감염의 복잡성으로 인해, 이들 세균이 겨우 생존하고 있을 가능성이 있으며, 이는 이들이 ICP 파지와 맞닥뜨리지 않았기 때문이다. 대안적으로, 이들 세포는 이들이 파지 포식을 회피하게 하는 유전자 돌연변이를 함유할 수 있다.
- [0108] 실시예 10. ICP 카테일은 *브이. 콜레라에* 감염의 어린 토끼 모델에서 보호를 제공한다.

- [0109] 추가 포유동물 모델 시스템에서 콜레라를 예방하는 ICP 각테일의 능력을 평가하기 위해, 어린 토끼를 이용한 동물 모델을 사용하였다. 어린 마우스와 반대로, *브이. 콜레라에*에 의해 감염된 어린 토끼는 콜레라와 연관된 다량의 분비성 설사를 일으켰다(Abel et al. *Current protocols in microbiology* 38, 6A 6 1-15, 2015). 파지가 *브이. 콜레라에*의 부재 하에서 토끼 장관에서 유지될 수 있었는지를 확인하기 위해, 동물에게 ICP 각테일 단독 (3×10^8 PFU)을 투여하였다. 3 또는 24 시간 후에, 동물을 희생시키고, 파지 역가를 장 균질액으로부터 결정하였다.
- [0110] 24 시간 후에, 10^6 파지가 각각의 장으로부터 회수되었음이 관찰되었다(도 4a). ICP 각테일이 *브이. 콜레라에*에 의한 감염을 차단할 수 있는지를 결정하기 위해, 파지(4×10^9 내지 8×10^9 PFU)를 2 개 그룹의 어린 토끼에게 5×10^8 CFU *브이. 콜레라에*를 이용한 감염시도하기 3 또는 24 시간 전에 입위관으로 투여하였다. 대조군에는 파지를 투여하지 않았다. 콜레라 징후, 구체적으로 체중 감소(도 5) 및 미음양변(본원에서 콜레라-유사 설사로도 지칭됨)의 존재에 대해 동물을 모니터링하였다. 무-파지 대조군은 이전에 공개된 관찰(Abel et al. *Current protocols in microbiology* 38, 6A 6 1-15, 2015)과 유사하게, 감염된지 12 내지 14 시간 후에 콜레라-유사 증상을 갖는 것으로 관찰되었으며, 이 시점에서 희생시켰다. 각각의 감염된 토끼의 맹장은 팽창되고, 대략 0.5 내지 1 mL의 누적된 유체를 함유하는 것으로 관찰되었으며, 이는 *브이. 콜레라에* 감염의 추가 징후이다. 상기 그룹으로부터의 각각의 동물의 장의 맹장액 및 이들 균질액(도 3b)으로부터 대략 10^9 - 10^{10} CFU의 세균이 계수되었다.
- [0111] *브이. 콜레라에*는 감염되기 3 시간 전에 ICP 각테일이 투여된 7 마리 토끼 중 4 마리의 조직에서 검출되지 않았으며(도 4b), 이는 상기 처치에 의해 이들 동물에서 감염이 제거되었음을 나타낸다. 10^6 내지 10^8 CFU의 *브이. 콜레라에*를 이 그룹의 나머지 3 마리 토끼로부터의 장 균질액으로부터 얻었으며, 이는 미-처리된 그룹과 비교하여 10 내지 100,000 배 감소를 갖는 것으로 계산되었다(도 4b, $P < 0.001$). 대략 10^5 내지 10^9 CFU의 *브이. 콜레라에*를 감염되기 24 시간 전에 파지가 투여된 동물의 각각의 장으로부터 계수하였으며(도 4b), 이는 파지가 투여되지 않은 대조군 동물과 비교하여 세균 로딩량에서 10 내지 100,000 배 감소를 나타낸다($P < 0.05$).
- [0112] 실시예 11. 3 개 파지 균주에 대해 내성인 *비브리올* 돌연변이체는 처리된 어린 마우스에서 발생하지 않았다.
- [0113] 생존 세포의 파지 내성 표현형 프로파일을 결정하기 위해, 도 3b 및 3c의 실시예로부터 얻어진 *브이. 콜레라에* 집락을 집락 정제를 위해 무작위로 선택하였다. 세균 배양액을 단리된 집락으로부터 얻었으며, 평판배양효율(EOP) 에세이에서 사용하여 내성 표현형에 관하여 단리물을 특징지었다. 결과를 표 3에 나타내었으며, 또한 Yen et al., *Ibid.*, 2017, Supplementary File 1, Table S1 및 Supplementary File 2, Table S3의 상세내용을 참고하며, 이에 대한 데이터는 본원에 참고로 포함된다.
- [0114] 파지 예방법에서 생존한 *브이. 콜레라에*가 ICP 파지에 대해 민감성 또는 내성인지 여부를 결정하기 위해, 마우스 및 토끼 장 균질액 각각으로부터의 *브이. 콜레라에* 단리물을 집락 정제를 위해 무작위로 선택하고, 평판배양효율(EOP) 에세이에 의해 단리물의 파지 내성 표현형을 측정하였으며(Yen et al., *Ibid.*), 민감성은 0.1을 초과하는 부모 야생형 *브이. 콜레라에*에 대해 정규화된 효율로서 정의되고; 부분 민감성은 0.1 내지 10^{-5} 으로 정의되며; 내성은 10^{-6} 미만의 EOP이다.
- [0115] 이들 데이터는 감염시도되기 6 또는 12 시간 전에 ICP 각테일을 투여받은 마우스로부터의 집락 단리물 100%가 모든 3 개 ICP 파지에 대해 민감성인 것으로 결론내린다. 감염시도되기 24 시간 전에 ICP 각테일을 투여받은 마우스로부터의 대부분의 단리물은 또한 모든 3 개 ICP 파지에 대해 민감성인 것으로 관찰되었다; 그러나, 적은 수는 상이한 ICP 내성 표현형을 나타내었다. 어느 것도 모든 3 개 파지 균주에 대해 내성인 것으로 관찰되지 않았다.
- [0116] 가장 중요하게는, 모든 3 개 ICP 파지에 대해 내성으로 특징지어질 수 있는 어린 마우스 장으로부터의 상당한 수의 단리물을 발견하지 못했다는 사실은 각테일 혼합물이 지속적인 감염 예방을 위해 적합한 치료제라는 것을 나타낸다.

표 3

표 3. 어린 마우스에서 파지 예방법으로부터 생성된 브이. 콜레라에 단리물의 파지 내성

내성 클래스	예방법의 길이		
	6 h (n=30)	12 h (n=50)	24 h (n=99)
모든 ICP에 대해 S	30 (100%)	50 (100%)	75 (81%)
ICP-1 단독에 대해 R	-	-	-
ICP-2 단독에 대해 R	-	-	14 (14%)
ICP-3 단독에 대해 R	-	-	2 (2%)
ICP-2 단독에 대해 PS	-	-	4 (4%)
ICP-1 (PS) 및 ICP-3 (PS)	-	-	1 (1%)
ICP-1 (PS) 및 ICP-3 (R)	-	-	3 (3%)
ICP-1 (R) 및 ICP-3 (PS)	-	-	-
모든 ICP에 대해 R	-	-	-

표 3은 처치와 병원성 세균을 이용한 감염시도 사이의 시간의 함수로서 도 3에 나타난 파지 카테일 처리된 어린 마우스의 장 균질액으로부터 얻어진 단리물로부터의 결과를 나타낸다. 병원체 감염시도하기 6 시간 전에 처리된 마우스의 장 균질액으로부터, 30 개의 세균 단리물을 시험하였으며, 이들 중 100%가 모든 3 개 ICP 균주에 대해 민감성이었다. 유사하게는, 감염시도하기 12 시간 전에 처리된 마우스로부터, 시험된 50 개 단리물이 전체적으로 모든 3 개 ICP 균주에 대해 민감성이었다. 감염시도하기 24 시간 전에 처리된 마우스로부터, 99 개의 단리물을 시험하였으며, 이들 중 75 개(81%)가 모든 3 개 ICP 균주에 대해 민감성이었다. 4 개 단리물만이 3개 ICP 균주 중 2 개에 대해 민감성이었으며; 하나의 단리물은 ICP-1 및 ICP-3에 대해 부분적으로 민감성인 표현형을 가졌고; 3 개의 단리물은 ICP-1에 대해 부분적 민감성 및 ICP-3에 대해 내성을 나타내었다. 가장 중요하게는, 어떠한 단리물도 모든 3 개 파지에 대해 내성인 것으로 관찰되지 않았다.

실시예 12. ICP 파지 균주에 대한 세균 내성의 유전적 기초

내성에 대한 유전적 기초를 결정하기 위해, 도 4b 및 4c로부터의 동물의 샘플로부터 얻어진 24 개 단리물을 전체-게놈 서열결정 후 변이체 분석(Heidelberg et al. *Nature* 406, 477-484, 2000; Lazinski et al. *BioTechniques* 54, 25-34, 2013)에 의해 분석하였다. O-항원 합성 유전자의 폴리-A 계에서 밀람-가닥 오대합(slipped-strand mispairing)이 비정상적 O-항원을 야기하고 ICP-1 내성을 부여할 수 있음이 이전에 나타났다(Seed et al. *PLoS Pathog* 8, e1002917, 2012).

ICP-1- 및 ICP-3-내성 단리물에서의 돌연변이가 개방형 해독틀 VC0240(*gmhD*)과 VC0264(*rjg*) 사이의 브이. 콜레라에의 염색체 1에 위치한 O-항원 합성 유전자에서 발견되었다(Chatterjee et al. *Biochimica et biophysica acta* 1690, 93-109, 2004)(Supplementary File 3, Table S4). LPS 돌연변이는 이들 단리물에서 내성의 일반적인 원인이었다; 그러나, 이러한 돌연변이를 보유한 균주가 이전에 무독성인 것으로 밝혀졌기 때문에(Kamp et al. *PLoS Pathog* 9, e1003800, 2013; Pritchard et al. *PLoS genetics* 10, e1004782, 2014; Fu et al. *Cell host & microbe* 14, 652-663, 2013), 상기 사항은 주요 관심사가 아니다. 예를 들어, *ompU* 및 *toxR*에서의 돌연변이는 ICP-2 내성을 부여한다(Seed et al. *eLife* 3, e03497, 2014). 본원의 데이터는 ICP-2-내성 단리물에서의 돌연변이가 개방형 해독틀 VC0633(*ompU*) 또는 VC0984(*toxR*)에서 발견되었음을 나타낸다(Supplementary File 3, Table S4).

내성에 대한 유전적 기초를 결정하기 위해, 전체-게놈 서열결정 및 변이체 분석을 이들의 상이한 내성 표현형을 기본으로 하여 선택된, 36 개 단리물에 대해 수행하였다(Yen et al., *Ibid.*). ICP-1- 및 ICP-3-내성 단리물에서 발견된 돌연변이를 갖는 균주의 단리물을 이용해 얻어진 결과는 도 3의 마우스 실시예로부터 관찰된 결과와 유사하였다. 이들 균주 중 33 개의 경우, 돌연변이가 O-항원 합성과 관련된 유전자에서 관찰되었다. 3 개 균주의 경우, 알려진 파지-내성 전략과 관련된 어떠한 돌연변이도 검출되지 않았다. 2 개 동물 모델에서의 이들 데이터로부터 파지 내성의 주요 원인이 파지 수용체의 생산을 위해 필요한 유전자의 돌연변이인 것으로 결론내려졌다.

실시예 13. 처리된 어린 토끼에서의 무 콜레라 증상

가장 중요하게는, 파지 카테일을 이용한 어린 토끼의 처치의 결과로서 본원의 실시예에서 관찰된 세균 로딩량에

서의 감소와 함께, *브이. 콜레라에* 감염시도한지 20 시간까지 파지-투여된 그룹 중 어떤 토끼에 대해서 미음양변 또는 상당한 체중 감소의 어떠한 증거도 관찰되지 않았다(도 5). 반면에, 파지가 부재한 *브이. 콜레라에*로 감염된 대조군 토끼는 24 시간 내에 약 10%의 체중이 손실되었다.

[0125] 마우스와 반대로, *브이. 콜레라에*로 감염된 토끼는 확장된 맹장과 함께 분비성 설사를 포함하여, 인간에서 관찰된 상기 질환의 많은 위 증상을 나타낼 수 있다. 따라서, 파지 각테일을 이용한 처치 및 병원성 세균을 이용한 감염시도의 상이한 그룹에서의 대상체를 질환의 징후에 대해 추가로 관찰하였으며, 맹장액을 수집하고 부피를 측정하였다.

[0126] 이들 동물의 해부 시에, *브이. 콜레라에* 감염되기 24 시간 전에 파지를 투여받은 10 개 그룹 중 하나의 대상체(동물 번호 16, 표 4 참고)에서만 0.1 mL의 맹장액이 존재하는 것으로 관찰되었다. 동일한 각테일로 3 시간 동안 처치된 다른 동물의 맹장 중 어느 것도 유체 누적을 나타내지 않았다. 반면에, 파지 각테일로 처치되지 않았으나 세균 병원체로 감염시도된, 감염시도된 동물 모두는 맹장액을 생산하였다.

표 4

표 4. 어린 토끼에서 파지 예방법으로부터 수집된 맹장액의 세균 수

무 파지		맹장액 세균 수 (CFU/mL)			
		3 시간		24 시간	
동물 1	6.2×10^8	동물 9	없음	동물 16	5.2×10^5
동물 2	3.9×10^8	동물 10	없음	동물 17	없음
동물 3	8.8×10^8	동물 11	없음	동물 18	없음
동물 4	7.8×10^8	동물 12	없음	동물 19	없음
동물 5	1.0×10^8	동물 13	없음	동물 20	없음
동물 6	1.1×10^8	동물 14	없음	동물 21	없음
동물 7	8.2×10^8	동물 15	없음	동물 22	없음
동물 8	9.2×10^8			동물 23	없음
				동물 24	없음
				동물 25	없음

[0127]

[0128] 맹장액을 표 4에 나타난 바와 같이 세균의 존재에 대해 분석하였다. 파지 각테일을 투여받지 않은 동물로부터의 유체 샘플 모두는 약 10^8 - 10^9 CFU의 높은 세균 수를 나타내었다. 파지 각테일-처리된 대상체는 콜레라의 증상을 생산하지 않았으며, 각테일을 투여받지 않은 대조군 동물은 질환의 징후 및 맹장에서 세균 존재를 나타내었음이 결론내려졌다.

[0129] 파지-처리된 동물의 각각의 장 균질액으로부터 대략 약 10^4 - 10^6 내지 약 10^8 - 10^9 PFU를 수집하였으며(도 3c), 이는 파지가 처치 및 감염의 과정에 걸쳐 장에서 지속되었음을 나타내었다. 이들 관찰은 ICP 각테일이 실시예의 기간에 걸쳐 콜레라의 징후로부터 보호하였음을 나타낸다.

[0130] 실시예 14, 3 개 파지 균주에 대해 내성인 돌연변이체는 토끼에서 발생하지 않았다.

[0131] 집락 단리물을 토끼 장 균질액으로부터 얻었으며, 병원성 세균을 이용하여 감염시도하기 3 시간 전 또는 24 시간 전에 처리된 그룹으로부터 내성 돌연변이의 존재에 대해 분석하였다. 사용된 정량적 기준은 마우스 모델 시스템에 대한 것과 동일하였다.

[0132] 얻어진 결과는 마우스 모델에서 얻어진 것과 유사하였다. 어떠한 단리물도 모든 3 개 파지 균주에게 내성을 부여하는 돌연변이를 달성한 것으로 관찰되지 않았다. 3 시간 처리된 동물로부터 얻어진 20 개 단리물 중에서, 20%가 모든 3 개 파지 균주에 대한 민감성을 보유하는 것으로 관찰되었으며; 하나는 ICP-1 단독에 대해 내성을 갖고; 어느 것도 ICP-2 단독 또는 ICP-3 단독에 대해 내성을 갖지 않았다. 적은 수의 단리물이 파지의 쌍에 대해 부분적으로 민감성이었다. 표 5를 참고한다.

표 5

표 5. 어린 토끼에서 파지 예방법으로부터 생성된 브이. 콜레라에 단리물의 파지 내성

내성 클래스	예방법의 길이	
	3 h (n=20)	24 h (n=76)
모든 IP에 대해 S	4 (20%)	30 (39%)
ICP-1 단독에 대해 R	1 (5%)	2 (3%)
ICP-2 단독에 대해 R	-	-
ICP-3 단독에 대해 R	-	-
ICP-1 (PS) 및 ICP-3 (PS)	2 (10%)	2 (3%)
ICP-1 (PS) 및 ICP-3 (R)	2 (10%)	-
ICP-1 (R) 및 ICP-3 (PS)	3 (15%)	8 (11%)
ICP-1 (R) 및 ICP-3 (R)	7 (35%)	30 (39%)
모든 ICP에 대해 R	-	-

[0133]

[0134]

집합적으로 이들 데이터는 파지 카테일이 2 개의 상이한 포유동물 시스템에서 생체내에서 브이. 콜레라에 세포를 사멸시키고, 장의 브이. 콜레라에 집락화를 감소시키거나 예방하는데 둘 다 효율적이라는 것을 나타낸다. 3 개의 상이한 파지 균주의 파지 카테일은 또한 콜레라 감염의 어린 토끼 모델에서 콜레라-유사 설사의 개시로부터 보호를 제공한다. 또한, ICP 파지 균주 중 하나 또는 둘에 대해 내성인 동물에 의해 발산된 단리물은 01-형원 돌연변이체의 기재(Seed et al. *PLoS Pathog* 8, e1002917, 2012)와 같이, 무독성 돌연변이를 갖는 것으로 관찰되었다.

[0135]

이들 데이터는 브이. 콜레라에-특이적 파지 카테일의 예방적 투여가 2 개의 동물에서의 집락화 및 토끼 동물 모델에서의 콜레라-유사 설사 둘 다를 감소시킴으로써, 콜레라에 대해 보호적임을 나타낸다. ICP 카테일은 시험관 내에서 브이. 콜레라에를 성공적으로 사멸시켰고, 어린 마우스의 집락화를 예방하였으며, 어린 토끼에서 콜레라-유사 설사의 개시를 불가능하게 하였다. 브이. 콜레라에는 일부 파지-처리된 동물의 장 균질액으로부터 단리될 수 있었던 한편, 생존 집단은 지속적으로 자릿수만큼 적었다. ICP 파지에 대해 내성을 부여하는 것으로 확인된 많은 돌연변이가 브이. 콜레라에에 대한 독성의 손실을 야기할 가능성이 있음을 주목하는 것이 중요하다. 결정적으로, 본원의 실시예의 시간 경과와 종료시, 세균 집단은 3 개의 ICP 파지 중 적어도 하나에 대해 민감성으로 유지되었다. 브이. 콜레라에 세포를 사멸시키는데 ICP 카테일의 효과는 적어도 부분적으로 브이. 콜레라에 감염 시 장 내에 있는 파지의 농도의 함수였다.

[0136]

실시예 15. 파지 카테일은 장 미생물총의 구성을 파괴하지 않는다.

[0137]

정상 인간 미생물총은 브이. 콜레라에의 세포를 포함하지 않는다. 파지 수용체는 세균의 숙주 특정 속 또는 종의 표면 상 구조와의 상호작용에 매우 특이적일 가능성이 있다. 따라서, 대상체의 전체 마이크로바이옴을 없앨 수 있는 항생제 치료제와 반대로, 3 개의 특정 박테리오파지 균주의 혼합물 또는 카테일인 치료제가 정상 인간 (또는 마우스 또는 토끼) 마이크로바이옴의 일부를 구성하는 관련없는 세균 속 또는 종에 대해 영향을 갖지 않을 것이라는 점이 본 발명의 이점이다.

[0138]

성체 동물 모델에서 장 미생물총에 대한 ICP 파지 균주의 특이성을 시험하기 위해, 마우스에게 파지 카테일, 또는 항생제 또는 가열-살균된 파지 카테일을 투여하였다. 투여하기 수 일 전 동안 대변 샘플을 수집하였다. 도 6 은 파지가 적어도 60 시간 동안 성체 장에서 지속되었음을 나타낸다.

[0139]

대상체의 파지 카테일 처리가 마이크로바이옴 조성물 상에 임의의 효과를 가질지 여부를 결정하기 위해 추가 분석을 착수하였다. 계놈 DNA를 동결 저장된 대변 샘플로부터 추출하고 16S V4 영역 특이적 프라이머를 이용한 PCR을 위한 주형으로서 사용하였다. PCR 생성물을 정제하고, PCR에 의해 Nextera 서열결정 어댑터를 첨가하였다. 250 bp 쌍형성 말단 Illumina MiSeq run을 사용하여 샘플을 분석하고, QIIME v1.8을 사용하여 데이터를 분석하였다. 99% 유사성에 의해 조작 분류 기호를 고르고, Greengenes 데이터베이스를 사용하여 계통발생을 할당하였다.

[0140]

주요 성분 분석을 사용하여 샘플의 베타-다양성을 도 7에 나타내었다. 이 분석은 집단 사이의 유사성 스코어로서 작용하는, 샘플의 쌍 사이의 계통발생 거리를 계산한다. 도 7의 데이터는 파지 카테일 처리된 대상체와 대조군(가열-살균된 파지 카테일을 투여받음)의 마이크로바이옴 집단이 매우 유사함을 나타낸다. 양성 대조군 동물: 항생제 처리된 동물로부터 얻어진 2 개 그룹의 샘플에 대해 비유사성을 관찰하였다(동물이 항생제로 2 일 동안

처치된 좌측 측에 인접한 6 개 점; 및 동물이 항생제로 1 일 동안 처치된 하부 측에 인접한 5 개 점의 그룹).

- [0141] 이들 데이터는 파지의 가열 살균(대조군)과 관계 없이 파지 각테일로 1 또는 2 일 동안 처치된 대상체에서의 장 미생물총이 조성에서 유사하여, 어떠한 미생물총의 파괴도 파지 각테일 투여의 결과가 아님을 나타낸다. 항생제 처치된 샘플 데이터를 제거하는 것을 포함한 데이터의 다른 분석에서(도 8), 상기 분석은 상이한 대변 샘플 세균 집단으로부터의 마이크로바이옴의 관련성의 정도가 0 일 동안 처치되거나, 1 일 동안 처치되거나, 2 일 동안 처치된 동물로부터의 대변에서와 유사하였으며, 3 개 파지 균주의 생존 또는 가열 살균된 파지 각테일의 존재가 관련성의 정도에 영향을 갖지 않았음을 나타낸다. 도 8은 항생제-처리된 동물로부터의 샘플을 생략하여 플롯팅된 이들 데이터 지점을 나타낸다. 샘플의 집단화가 없으며, 최대 확산은 가로 좌표 상에 있고, 이는 도 7 상에서의 46%와 비교하여 10%이다. 본원의 데이터가 배치되고 가열 살균된 파지에 대한 대조군과 비교하여 생존 파지 처치 동안 집단화에서 차이가 없음을 나타내기 때문에, 이들 데이터는 파지 처치가 마이크로바이옴에 영향을 미치지 않으며 각테일이 *브이. 콜레라에* 세균 세포에 대해 특이적인 숙주임을 입증한다.
- [0142] 이들 데이터는 각테일 내에 존재하고 대상체의 예방법을 위해 사용된 파지 균주가 병원성 *비브리오* 세균 세포의 감염 및 사멸에 대해 특이적이라는 점을 나타내며, 이는 이들 균주가 정상 장 미생물 집단의 세균 특징의 *비-비브리오* 종의 집단 분포를 감염시키거나 변경시키지 않았기 때문이다.
- [0143] 실시예 16. 파지 각테일은 광범위한 성분 비의 균주에 효과적이다.
- [0144] 가장 효과적인 각테일의 제조에 사용된 ICP-1, ICP-2 및 ICP-3의 각각의 파지 균주의 비리온의 수의 비는 최적 상대량을 결정하기 위해 달라졌다. ICP-1:ICP-2:ICP-3에 대한 3 개 ICP 균주 각각으로부터의 투입 파지의 수의 1:1:1의 비를 사용하여, 시험하고 상기 데이터와 비교한 3 개 파지 균주의 추가 비는 1:1:10; 1:10:1; 10:1:1; 및 1:5:10이었다. 이들 실시예는 숙주 세균 병원체 상의 파지 수용체에서의 변이, 및 파지 균주 흡착의 상대 동역학, 방출 시간 및 방출량과 세균 사멸의 정도 및 최대 파지 지속에 영향을 줄 수 있는 경우에, 상기 비의 잠재적 최적화를 시험한다. 이 실시예에서, 3 개 파지 균주 중 임의의 2 개에 대한 MOI의 범위는 비의 두 자릿수 차이의 범위(10:1과 비교하여 1:10)에 걸쳐 다양하였다.
- [0145] 상기 도 3b 및 3d의 어린 마우스 모델을 사용한, 2 개의 상이한 감염시도량의 *브이. 콜레라에*에 대한 도 9a 및 9b의 데이터는 모든 비가 예방법에서 효과적이었으며, 모두 1:1:1의 비를 이용하여 본원에서 얻어진 것과 유사하게 장관에서의 병원성 세균의 수에서의 감소 결과를 제공하였음을 나타내었다. 따라서, 파지로 처치되지 않은 대조군 대상체와 비교하여, 파지 각테일은 세균 로딩량을 일부 대상체에서 검출의 한계 내로, 및 다른 대상체에서 약 두 자릿수로 완전히 감소시켰다. 이들 데이터는 본원의 파지 균주가 세균에 대한 친화도의 동역학, 방출량(burst size), 방출 시간, 및 파지 생활 주기의 다른 특성에서 유사함을 나타낸다.
- [0146] 또한, 본원의 실시예에서의 짧은 예방법 시간에 동물 모델 시스템을 이용하여 세균 로딩량의 완전한 감소가 관찰되었기 때문에, 인간 사용을 위한 임상 시험에 진입하기 전에 각각의 용량을 위한 타이밍의 최적화가 분석된다. 고질적인 콜레라 환경에서 살아가는 개체는 *브이. 콜레라에*에 반복적으로 노출될 수 있기 때문에, 다중 용량이 처방되어 각각의 개체에서의 감염을 개체, 및 집단에서 완전히 근절되는 지점까지 조절한다.
- [0147] 현재의 파지 요법 연구는 진행중인 감염을 치료하는 것에 초점을 맞추고 있다. 본원의 결과는 감염을 예방하는 데 있어서 파지 요법의 가능성을 나타낸다. 본원에 제시된 데이터는 콜레라를 예방할 가능성이 병원성 세균과의 상호작용을 위한 적어도 2 개의 상이한 유형의 파지 수용체를 갖는 다수의 파지 균주를 갖는 본원에 나타난 바와 같은 파지 각테일을 사용하는 조성물 및 방법을 이용한, 추가 조사를 타당하게 한다는 것을 나타낸다. 신속히 작용하는 파지 예방 접근법은 위험에 있는 개체, 예컨대 콜레라 증상을 나타내는 개체의 가정 접촉에 유용하다. 가정 내에서의 확산을 제한함으로써, 질환의 전체 부담이 감소된다. 점막 병원체에 대한 예방 치료로서 파지의 적용은 인간 건강에 대한 세균 감염의 영향을 제한하기 위한 신속하고 특이적인 수단을 대표한다.
- [0148] 실시예 17. 파지에 대한 청수 반응에서 *브이. 콜레라에* 생물막의 분석
- [0149] 이전에 다중 횡수의 집락 정제에 의해 얻었으며, 플라크 에세이 및 게놈 서열결정에 의해 파지가 결핍되어 있음이 확인된 3 개의 *브이. 콜레라에* 대변 단리물 각각을 키틴 조각을 함유한 연못수에서의 생물막과 같이 성장시킨다. 이 과정은 생물막 내에서 세균을 이들의 천연 초감염성 상태로 제조한다. 얻어진 생물막을 기재된 바(Tamayo et al. *Infect Immun.* 78(8):3560-9 (2010). PMID: PMC2916270)와 같이 초음파 파괴에 의해 단일 세포 현탁액으로 변화시킨다.
- [0150] 용균성 파지를 0.01, 0.1 및 1의 낮은 감염 다중도(MOI)로 첨가한다. 각각의 혼합물을 본원에 기재된 바(Nelson et al. *PLoS ICP-2.* 4, e1000187 (2008). PMID: PMC2563029)와 같이 경구 위관영양법에 의해 9 마리 어린 마

우스 그룹에 접종한다. 이들 MOI는 이들이 미음양변에서 발견되는 전형적인 범위를 포괄한다는 점에서 생리학적이다(Nelson et al. *PLoS ICP-2*. 4, e1000187 (2008); Seed et al. *mBio*. 2(1). pii: e00334-10 (2011). PMID: PMC3037004). 또한, 이들 MOI 각각은 미감염된 *브이. 콜레라에* 세포 중 일부가 소장에 진입하고 집락화를 수립하게 한다. 파지가 없는 대조군 접종을 각각의 군주에 대해 수행한다. 8, 16 및 24 시간에, 그룹 당 3 마리 마우스를 안락사시키고, 소장 내의 파지 및 *브이. 콜레라에*의 역가를 결정한다. 전형적으로, 파지의 부재 하에서, 10^5 CFU의 *브이. 콜레라에*의 접종물은 24 시간까지 10^7 CFU를 초과하여 증가한다. 매우 독성인 파지는 그 자체의 역가를 세균에서의 용균성 성장 횟수를 통해 극적으로 증가시키고, *브이. 콜레라에*의 역가가 급격하게 하락하도록 야기한다. 반면에, 덜 독성인 파지는 *브이. 콜레라에*의 로딩량에 영향을 거의 갖지 않거나 전혀 갖지 않는다. 시험된 용균성 파지 대부분 또는 전부는 *브이. 콜레라에* 감염에 간섭한다는 것이 밝혀졌다. 감염의 과정 동안 존재하는 파지의 수를 모니터링함으로써, 효과가 포식 및 파지 복제를 통하는지, 또는 동물의 *브이. 콜레라에* 감염의 결과를 어떻게든 변경하는 단일 횟수 파지 감염으로 인한 것인지 여부를 결정한다.

[0151] 용균성 파지가 *브이. 콜레라에* 감염을 강하게 간섭하는 경우, 파지 내성에 대한 선택적 압력이 있는 것으로 예상된다. *브이. 콜레라에* 집단은 LPS O1-항원 생산의 상변이 손실을 통해 *시험관내*에서 신속하게 ICP-1에 대해 내성으로 된다(Seed et al. *PLoS ICP-2*. 8(9):e1002917 (2012). PMID: PMC3441752). 그러나, 이들 파지 변이체는 집락화의 어린 마우스 모델에서 무독성인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이들 파지 변이체는 몇몇의 미음양변으로부터의 수백 개의 집락을 스크리닝한 후에 검출되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 이러한 돌연변이체는 낮은 빈도로 존재할 가능성이 있다. ICP-2는 수용체로서 O1-항원을 사용하지 않기 때문에, 파지 내성이 장 감염 동안 신속하게 발생할 수 있음이 타당하고, 이는 파지/*브이. 콜레라에* 집단 동역학에 주요 영향을 가질 수 있다. 보관된 파지-양성 미음양변 샘플은 파지-내성 단리물에 대한 깊이있는 스크리닝을 수행하기 위해 유리하게 사용된다.

[0152] 약 4 명의 환자로부터의 샘플을 *브이. 콜레라에*에 대해 선택된 배지를 함유하는 대형 페트리 플레이트 상에 도말한다. 각각의 샘플로부터의 7,680 개 집락을 골라 웰 당 60 μ L LB 브로쓰를 갖는 20 개의 384-웰 플레이트 내로 위치시키도록 로봇을 프로그래밍한다. 각각의 웰은 약 10^5 CFU *브이. 콜레라에*를 제공받는다. 제1 칼럼을 제외한 웰 내의 배지는 약 10^3 플라크-형성 단위(PFU)의 파지를 함유하고, 이는 0.01의 출발 MOI를 제공한다. 웰의 제1 칼럼은 세포 성장에 대한 양성 대조군으로서 파지가 없는 대조군을 함유한다. 384-웰 플레이트를 플레이트 판독기에서 8 시간 동안 24°C에서 간헐적으로 흔들면서 항온처리하고, OD₆₀₀ 측정은 0.5 시간마다 이루어진다.

[0153] 파지 내성을 에세이하기 위해, OD₆₀₀를 종료-시점 판독 대신에, 시간의 함수로서 모니터링하여, 파지-내성 돌연변이체의 가능한 상이한 클래스에 대한 정보를 얻는다. 상기 데이터로부터, 파지-내성 단리물의 백분율을 각각의 대변 샘플에서 계산한다. 파지-내성 단리물을 각각의 대변 샘플에 대하여 삼중 집락-정제에 의해 얻고, 상기 와 같이 파지 내성에 대해 재시험한다.

[0154] 파지 내성의 메커니즘(들)을 게놈 서열결정 및 돌연변이 분석을 통해 결정한다. 상기로부터 확인된 파지-내성 단리물의 게놈(최대 72 개 군주)을 서열결정하고, 각각 동일한 대변 샘플로부터 단리된 파지-민감성 게놈과 비교하여, 파지 내성을 담당하는 돌연변이를 확인한다. 돌연변이를 새로운 세포 백그라운드로 이동시키고 파지 내성을 시험함으로써, 후보 파지-내성 돌연변이를 확인한다. 이 전략은 파지 수용체 및 파지 내성의 신규한 메커니즘을 발견하기 위해 사용된다(Seed et al. *mBio*. 2(1). pii: e00334-10, 2011. PMID: PMC3037004; Seed et al. *Nature*. 494(7438):489-91, 2013. PMID: PMC3587790; Seed et al. *PLoS ICP-2*. 8(9):e1002917, 2012. PMID: PMC3441752).

[0155] 상기 실시예는 장 감염 동안 용균성 파지 및 *브이. 콜레라에*의 집단 동역학뿐 아니라, 파지-내성의 메커니즘에 대한 정량적 정보를 제공한다. 상기 결과는 발병 동안 특정 파지 군주와 *브이. 콜레라에*의 연관성의 빈도, 및 개별 감염의 결과에 대한 용균성 파지의 효과의 이해에 영향을 준다. 또한, 결과는 콜레라 환자를 치료하기 위한 파지 요법을 개발하기 위해 제공될 수 있다.

[0156] 전파 동안 파지 군주 및 *브이. 콜레라에* 군주의 임상적으로 얻어진 쌍의 집단 동역학을 결정한다. *브이. 콜레라에*의 전파에 대한 콜레라 대변에서의 용균성 파지의 영향은 대체로 알려져 있지 않다. 생산적 파지 감염은 대사적으로 활성인 숙주를 필요로 하기 때문에, 본원에서는 영양분이 부족한 물에서의 전파에 대해 파지가 최소한의 영향을 갖지만, *브이. 콜레라에*의 성장을 지지하기 위해 키틴이 존재할 때 주요 영향을 갖는 것으로 예상된다. 키틴은 천연 청수 환경에서 주요 탄소 공급원이다. 본 섹션에서는, 어린 토끼 숙주를 사용하고 맹장으로부터 고

전파성 브이. 콜레라에 및 파지를 수집하여, 상기 가설을 시험하기 위해, 상기 3 개의 용균성 파지/브이. 콜레라에 쌍을 사용한다.

[0157] 용균성 파지를 상기와 같은 생물막-성장 브이. 콜레라에와 혼합한 다음에, 3 마리 어린 토끼의 그룹에 입위관으로 접종한다. 파지 없이 접종된 대조군이 각각의 군주에 포함된다. 유증상일 때, 각각의 동물을 안락사시키고, 맹장액을 수집한다. 미가공된 샘플(잔해 또는 응집물의 제거 없음)을 나누고 다음 에세이에서 사용한다. 일부를 와동시켜(vortex), 응집물을 분산시키고, 샘플에서의 파지 PFU 및 브이. 콜레라에 세포의 수를 결정하기 위해 사용한다. 다른 일부를 개방형 비커에서 키틴 조각 첨가가 있거나 없이 연못수에서 희석하여, 전파 적합성 에세이를 수행한다. 또 다른 일부를 사용하여, 하기 기재된 바와 같은 전염에 대한 용균성 파지의 효과를 결정한다.

[0158] 전파 에세이를 위해, 파지 및 브이. 콜레라에를 각각의 비커에서의 항온처리한지 8, 16, 24, 48 및 96 시간 후에 역가를 에세이한다. 브이. 콜레라에의 감소율(또는 성장률)을 파지가 결핍된 대조군의 것과 비교한다. 이들 실시예의 결과는 영양분-부족 및 영양분-충분(키틴) 환경 둘 다에서의 전파 동안 브이. 콜레라에의 적합성에 대해 용균성 파지가 갖는 영향을 밝혀낸다. 파지가 키틴-함유 환경에서 발산된 세균에 대한 감염 및 증식을 지속하는 경우, 브이. 콜레라에의 생활 주기가 설명된다. 이러한 데이터는 용균성 파지를 사용하여 환경적 저장소의 세균 함량을 조절하는 개념을 지지한다. 반면에, 전파의 스트레스를 고려하면, 파지는 영양분-부족 또는 키틴-함유 환경으로 인해 환경에서 증식될 수 없을 수 있다. 이 시나리오에서, 파지는 여전히 브이. 콜레라에와 연관될 수 있으며, 이 방식으로, 브이. 콜레라에가 새로운 숙주로 전염될 때까지 존재 및 비활성화를 유지할 수 있다.

[0159] 용균성 파지의 존재 하에서 전파된 브이. 콜레라에의 전염성을 결정한다. 콜레라의 확산을 이해하기 위한 중요성에도 불구하고, 연못수 중간물을 통한 콜레라의 대변-경구 전염에 대한 용균성 파지의 영향은 전혀 조사되지 않아왔다. 활발히 복제되든지, 아니든지, 브이. 콜레라에와 연관된 파지는 오염된 물로부터의 질환의 전염을 감소시키는 것으로 예상된다.

[0160] 상기 맹장액 브이. 콜레라에 및 관련 용균성 파지의 전파 배양액을 사용하여, 어린 마우스에 대한 전염 및 그 후의 변형을 측정한다. 경쟁 실험을 수행하는 대신에, 브이. 콜레라에의 ID₅₀을 결정한다. 본원에서 경쟁 실험은 불가능하며, 이는 용균성 파지가 경쟁성 LacZ⁻ 브이. 콜레라에 균주를 공격하여, 경쟁 지수(competitive index)(CI) 값이 매우 가변적일 것이기 때문이다.

[0161] ID₅₀을 결정하기 위해, 상기 실시예로부터의 24 시간 시점에서의 전파 배양액의 일부를 연속으로 연못수에 희석시켜, 파지 및 세균의 농도 범위를 달성한다. 3 개의 어린 마우스의 그룹에 10¹, 10², 10³ 및 10⁴ CFU의 브이. 콜레라에 각각을 함유하는 것으로 추정되는 희석액을 입위관으로 접종한다. 24 시간 후에, 어린 마우스를 안락사시키고, 소장 내의 브이. 콜레라에의 로딩량을 결정한다. ID₅₀을 도표로 결정한다. 이 실시예는 연못수 내의 용균성 파지가 브이. 콜레라에의 감염성을 감소시킨다는 것, 즉 실질적으로 높은 ID₅₀을 야기한다는 것을 결정한다. 이들 실시예의 결과는 청수의 오염된 물체로부터의 브이. 콜레라에의 전염에 대한 용균성 파지의 효과를 이해하기 위한 귀중한 정보를 제공한다.

[0162] 콜레라의 신속한 전염에 대한 용균성 파지의 영향을 결정한다. 상기 실시예는 오염된 연못수로부터의 전염에 대한 용균성 파지의 효과를 시험한다. 그러나, 동일하게 중요하지만 답이 나오지 않은 질문은 용균성 파지가 미음양변에서 발산된 초감염성 브이. 콜레라에의 신속한 전염에 영향을 주는지 여부이다. 용균성 파지는 초감염성 대변 브이. 콜레라에의 전염을 크게 감소시키는 것으로 예상된다.

[0163] 상기 기재된 어린 토끼 맹장액에서 어린 마우스까지의 초감염성 전염의 모델을 사용하여, 3 개의 파지/브이. 콜레라에 쌍에 대한 전염을 측정한다. 어린 마우스에서의 ID₅₀을 각각 새로 얻은 맹장액 샘플에 대해 측정한다. 이 에세이를 사용하여, 초감염성 브이. 콜레라에의 ID₅₀은 10² CFU인 것으로 밝혀졌으며, 이는 시험관내 성장한(비-초가변성) 세균에 대해서보다 10 배 낮다(Butler et al. *Mol Microbiol* 60 (2), 417-26, 2006. PMID: PMC2754204; Nelson et al. *PLoS ICP*-2. 4, e1000187, 2008. PMID: PMC2563029). 따라서, 파지-함유 샘플에 대한 ID₅₀을 파지가 결핍된 샘플의 것과 비교한다. 이 실시예는 맹장액 내의 용균성 파지가 정상적으로 초감염성인 브이. 콜레라에의 감염성을 크게 감소시키는지 여부에 의존한다. 이들 실시예의 결과는 예를 들어, 유행병 동안 가정 내에 발생하는 대변에서 발산된 브이. 콜레라에의 신속한 전염에 대한 용균성 파지의 효과를 이해하기 위한 귀중한 정보를 제공한다(Harris et al. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2,e221, 2008; Weil et al. *Clin*

Infect Dis. 15;49(10):1473-9, 2009).

- [0164] 본 발명은 이제 완전히 기재되어 실행 가능하며, 예시적일 뿐이고 추가적 제한으로 이해되지 않는 추가의 실시양태에 이어 특허청구범위가 기재된다. 모든 인용된 참고문헌의 내용은 그 전체가 본원에 포함된다.
- [0165] 본 발명은 다음과 같은 실시양태로 나타내어진다.
- [0166] [실시양태 청구항 1]
- [0167] 세균 감염 *비브리오(Vibrio)* 종의 세포를 감염 및 용균시키는 다수의 독성 용균성 박테리오파지 균주의 예방 혼합물을 포함하는, 대상체에서 *비브리오* 세균 감염을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물.
- [0168] [실시양태 청구항 2]
- [0169] 제1항에 있어서,
- [0170] 용균성 박테리오파지 균주가 *비브리오 콜레라에(Vibrio cholerae)*로 감염된 환자의 대변 샘플로부터의 단리물인 조성물.
- [0171] [실시양태 청구항 3]
- [0172] 제1항에 있어서,
- [0173] 상기 다수가 ICP-1, ICP-2, ICP-3, 또는 이의 독성 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 2 종의 박테리오파지 균주인 조성물.
- [0174] [실시양태 청구항 4]
- [0175] 제3항에 있어서,
- [0176] 상기 다수가 박테리오파지 균주 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3을 포함하는 조성물.
- [0177] [실시양태 청구항 5]
- [0178] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0179] 균주 중 적어도 하나가 야생형 박테리오파지의 변이체 또는 돌연변이체이고, 변이체가 자연 돌연변이체, 유도된 돌연변이체, 및 유전적으로 조작된 재조합체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 조성물.
- [0180] [실시양태 청구항 6]
- [0181] 제1항에 있어서,
- [0182] 박테리오파지의 용균성 균주의 비리온(virion)이 *비브리오* 감염 종의 세포에서 복제되고 세포를 용균시키는 조성물.
- [0183] [실시양태 청구항 7]
- [0184] 제6항에 있어서,
- [0185] 조성물 내의 다수의 균주 중 임의의 2 종의 각각의 균주의 플라크 형성 단위(plaque forming unit)(PFU)의 양이 각각 제1 및 제2 균주의 역가의 각각 약 1:10 미만 내지 제1 및 제2 균주의 역가의 10:1 초과 범위 내인 비율을 포함하는 조성물.
- [0186] [실시양태 청구항 8]
- [0187] 제1항에 있어서,
- [0188] 대상체가 이전에 *비브리오* 감염 종에 노출되지 않았던 조성물.
- [0189] [실시양태 청구항 9]
- [0190] 제1항에 있어서,
- [0191] 대상체가 *비브리오* 감염 종에 노출되며, 예를 들어 노출된 대상체가 감염을 앓고 있는 환자의 가구원이거나, 노출된 대상체가 의료진인 조성물.

- [0192] [실시양태 청구항 10]
- [0193] 제7항에 있어서,
- [0194] 박테리오파지의 비리온이 제1 균주에 대한 제1 수용체, 제2 균주에 대한 제2 수용체에 부착하는 것에 의해 *비브리오* 세포의 표면에 결합하고, 제1 및 제2 수용체가 분자적으로 상이한 조성물.
- [0195] [실시양태 청구항 11]
- [0196] 제10항에 있어서,
- [0197] 박테리오파지의 제1 균주의 비리온이 세균 세포 외막 단백질에 결합하고, 박테리오파지의 제2 균주의 비리온이 지질다당류에 결합하는 조성물.
- [0198] [실시양태 청구항 12]
- [0199] 제10항에 있어서,
- [0200] 정상 마이크로바이옴 세포는 다수의 박테리오파지 균주에 대한 수용체가 결핍된 조성물.
- [0201] [실시양태 청구항 13]
- [0202] 제1항에 있어서,
- [0203] 용균성 박테리오파지의 균주의 숙주 범위가 *비브리오* 감염 종을 포함하는 조성물.
- [0204] [실시양태 청구항 14]
- [0205] 제13항에 있어서,
- [0206] 감염이 콜레라이고, 용균성 박테리오파지의 균주가 *브이. 콜레라에(V. cholerae)*의 세포를 감염시키는 조성물.
- [0207] [실시양태 청구항 15]
- [0208] 제13항에 있어서,
- [0209] 용균성 박테리오파지의 균주의 숙주 범위가 다수의 *비브리오* 종을 감염시키는 조성물.
- [0210] [실시양태 청구항 16]
- [0211] 제15항에 있어서,
- [0212] *비브리오* 종이 *비브리오 애로제네스(Vibrio aerogenes)*, *브이. 애스티버스(V. aestivus)*, *브이. 에스투아리아누스(V. aestuarianus)*, *브이. 아가리보란스(V. agarivorans)*, *브이. 알벤시스(V. albensis)*, *브이. 알파센시스(V. alfacensis)*, *브이. 알기놀리티쿠스(V. alginolyticus)*, *브이. 앙길라룸(V. anguillarum)*, *브이. 아레니니그래(V. areninigræ)*, *브이. 아르타브로룸(V. artabrorum)*, *브이. 아틀란티쿠스(V. atlanticus)*, *브이. 아티피쿠스(V. atypicus)*, *브이. 아주레우스(V. azureus)*, *브이. 브라질리엔시스(V. brasiliensis)*, *브이. 부불루스(V. bubulus)*, *브이. 칼비엔시스(V. calviensis)*, *브이. 캄프벨리(V. campbellii)*, *브이. 카세이(V. casei)*, *브이. 차가시(V. chagasii)*, *브이. 콜레라에*, *브이. 신시내티엔시스(V. cincinnatiensis)*, *브이. 코랄릴리티쿠스(V. coralliilyticus)*, *브이. 크라소스트레아에(V. crassostreae)*, *브이. 시클리트로피쿠스(V. cyclitrophicus)*, *브이. 디아볼리쿠스(V. diabolicus)*, *브이. 디아조트로피쿠스(V. diazotrophicus)*, *브이. 에주라에(V. ezuræ)*, *브이. 플루비알리스(V. fluvialis)*, *브이. 포르티스(V. fortis)*, *브이. 푸르니시(V. furnissii)*, *브이. 갈리쿠스(V. gallicus)*, *브이. 가조제네스(V. gazogenes)*, *브이. 기간티스(V. gigantis)*, *브이. 할리오티콜리(V. halioticoli)*, *브이. 하르베이(V. harveyi)*, *브이. 헤파타리우스(V. hepatarius)*, *브이. 히포캄피(V. hippocampi)*, *브이. 히스파니쿠스(V. hispanicus)*, *브이. 익티오엔테리(V. ichthyenterii)*, *브이. 인디쿠스(V. indicus)*, *브이. 카날로아에(V. kanaloæ)*, *브이. 렌투스(V. lentus)*, *브이. 리토랄리스(V. litoralis)*, *브이. 로게이(V. logei)*, *브이. 메디테라네이(V. mediterranei)*, *브이. 메츠시니코비(V. metschnikovii)*, *브이. 미미쿠스(V. mimicus)*, *브이. 미틸리(V. mytili)*, *브이. 나트리에겐스(V. natriegens)*, *브이. 나바렌시스(V. navarrensis)*, *브이. 네오나테스(V. neonates)*, *브이. 넵투니우스(V. neptunius)*, *브이. 네레이스(V. nereis)*, *브이. 니그리폴크리투도(V. nigripulchritudo)*, *브이. 오르달리(V. ordalii)*, *브이. 오리엔탈리스(V. orientalis)*, *브이. 파시니(V. pacinii)*, *브이. 파라해몰리티쿠스(V. parahaemolyticus)*, *브이. 페크테니시다(V. pectenecida)*, *브이. 페나에이시다(V. penaeicida)*, *브이. 포메로이(V. pomeroyi)*, *브이. 폰*

티쿠스(*V. ponticus*), 브이. 프로테올리티쿠스(*V. proteolyticus*), 브이. 로티페리아누스(*V. rotiferianus*), 브이. 루베르(*V. ruber*), 브이. 루모이엔시스(*V. rumoiensis*), 브이. 살모니시다(*V. salmonicida*), 브이. 스코프탈미(*V. scophthalmi*), 브이. 스피렌디두스(*V. splendidus*), 브이. 수페르스테스(*V. superstes*), 브이. 타페티스(*V. tapetis*), 브이. 타스마니엔시스(*V. tasmaniensis*), 브이. 투비아쉬(*V. tubiashii*), 브이. 불니피쿠스(*V. vulnificus*), 브이. 워다니스(*V. wodanis*), 및 브이. 슈이(*V. xuii*)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나인 조성물.

[0213] [실시양태 청구항 17]

[0214] 제1항에 있어서,

[0215] 항생제, 항진균제, 항-원충제, 항-염증제, 항-탈수제, 및 수화제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

[0216] [실시양태 청구항 18]

[0217] 제1항에 있어서,

[0218] 액체, 정제, 캡슐, 식품 첨가제, 및 동결건조물(lyophil)로부터 선택되는 그룹 중 하나로서 제형화되는 조성물.

[0219] [실시양태 청구항 19]

[0220] 비브리오 감염 중의 세포를 감염 및 용균시키는 다수의 용균성 박테리오파지 균주의 예방적 용량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 비브리오 중 감염을 예방하거나 개선하는 방법.

[0221] [실시양태 청구항 20]

[0222] 제19항에 있어서,

[0223] 비브리오 종이 비브리오 애로제네스, 브이. 애스티버스, 브이. 애스투아리아누스, 브이. 아가리보란스, 브이. 알벤시스, 브이. 알파센시스, 브이. 알기놀리티쿠스, 브이. 앙길라룸, 브이. 아레니니그래, 브이. 아르타브로룸, 브이. 아틀란티쿠스, 브이. 아티피쿠스, 브이. 아주레우스, 브이. 브라실리엔시스, 브이. 부블루스, 브이. 칼비엔시스, 브이. 캄프벨리, 브이. 카세이, 브이. 차가시, 브이. 콜레라에, 브이. 신시내티엔시스, 브이. 코랄릴리티쿠스, 브이. 크라소스트레아에, 브이. 시클리트로피쿠스, 브이. 디아볼리쿠스, 브이. 디아조트로피쿠스, 브이. 예주라에, 브이. 플루비알리스, 브이. 포르티스, 브이. 푸르니시, 브이. 갈리쿠스, 브이. 가조제네스, 브이. 기간티스, 브이. 할리오티폴리, 브이. 하르베이, 브이. 헤파타리우스, 브이. 히포캅피, 브이. 히스파니쿠스, 브이. 익티오엔테리, 브이. 인디쿠스, 브이. 카날로아에, 브이. 렌투스, 브이. 리토랄리스, 브이. 로게이, 브이. 메디테라네이, 브이. 메츠시니코비, 브이. 미미쿠스, 브이. 미틸리, 브이. 나트리에겐스, 브이. 나바렌시스, 브이. 네오나테스, 브이. 넵투니우스, 브이. 네레이스, 브이. 니그리폴크리투도, 브이. 오르달리, 브이. 오리엔탈리스, 브이. 파시니, 브이. 파라해몰리티쿠스, 브이. 페크테니시다, 브이. 페나에이시다, 브이. 포메로이, 브이. 폰티쿠스, 브이. 프로테올리티쿠스, 브이. 로티페리아누스, 브이. 루베르, 브이. 루모이엔시스, 브이. 살모니시다, 브이. 스코프탈미, 브이. 스피렌디두스, 브이. 수페르스테스, 브이. 타페티스, 브이. 타스마니엔시스, 브이. 투비아쉬, 브이. 불니피쿠스, 브이. 워다니스, 및 브이. 슈이로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

[0224] [실시양태 청구항 21]

[0225] 제19항에 있어서,

[0226] 대상체가 인간, 가축, 동물원 동물, 예컨대 코알라, 고 가치의 포유동물, 예컨대 개 또는 말, 실험 동물, 예컨대 설치류 또는 토끼, 물고기, 및 새, 예컨대 앵무새 또는 잉꼬로부터 선택되는 방법.

[0227] [실시양태 청구항 22]

[0228] 제21항에 있어서,

[0229] 대상체가 환자의 가구원 또는 가족 구성원, 및 의료진, 예컨대 의사, 간호사, 또는 잠역부로부터 선택된 인간인 방법.

[0230] [실시양태 청구항 23]

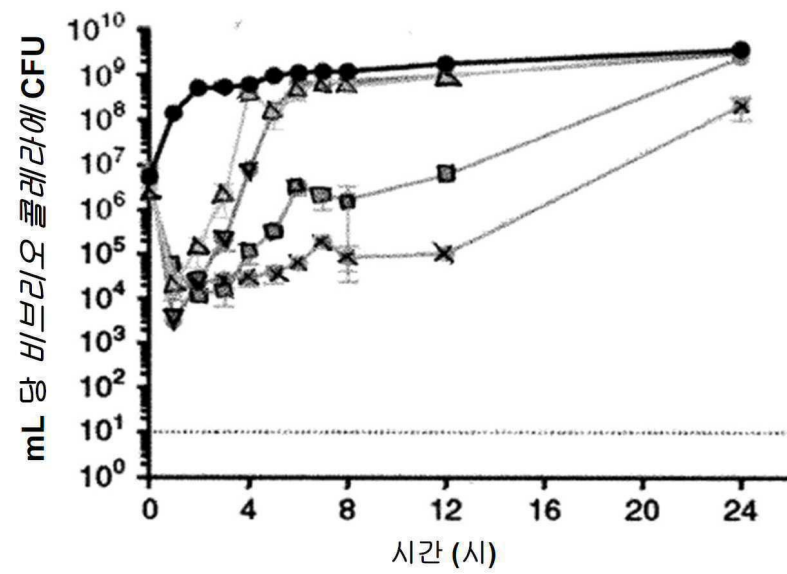
[0231] 제19항에 있어서,

- [0232] 투여 단계가 경구인 방법.
- [0233] [실시양태 청구항 24]
- [0234] 제19항에 있어서,
- [0235] 적어도 하나의 재수화 치료제 및 적어도 하나의 항생제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0236] [실시양태 청구항 25]
- [0237] 제19항에 있어서,
- [0238] 투여 단계가 *비브리오* 감염 중에 대한 노출 이후이고, 방법이 감염을 개선하는 단계를 포함하는 방법.
- [0239] [실시양태 청구항 26]
- [0240] 제25항에 있어서,
- [0241] 투여 단계가 노출 이후 및 콜레라 증상의 개시 이전인 방법.
- [0242] [실시양태 청구항 27]
- [0243] 제19항에 있어서,
- [0244] 투여 단계가 노출 이전이고, 방법이 감염을 예방하거나 개선하는 것인 방법.
- [0245] [실시양태 청구항 28]
- [0246] 제19항에 있어서,
- [0247] 투여 단계 전에, 적어도 약 10^7 , 약 10^8 , 약 10^9 , 약 10^{10} , 약 10^{11} , 약 10^{12} , 또는 약 10^{13} PFU/mL의 박테리오파지 총 역가로 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0248] [실시양태 청구항 29]
- [0249] 제28항에 있어서,
- [0250] 다수의 균주 중 적어도 2 종의 PFU 내인 역가의 조성물을 제형화하는 단계가 각각 약 1:10 미만 내지 적어도 약 1:5, 적어도 약 1:1, 적어도 약 5:1, 적어도 약 10:1의 제1 균주의 역가 대 제2 균주의 역가 비 범위로 균주를 혼합하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0251] [실시양태 청구항 30]
- [0252] 제19항에 있어서,
- [0253] 투여 단계 전에, 각각의 용균성 박테리오파지 균주를 무독성 *비브리오* 종 숙주와 함께 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0254] [실시양태 청구항 31]
- [0255] 제19항에 있어서,
- [0256] 투여 단계 전에, 대상체에서 회피 파지 내성 돌연변이체의 선택을 제한하기 위한 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0257] [실시양태 청구항 32]
- [0258] 제19항에 있어서,
- [0259] 투여 단계 전에, ICP-1, ICP-2, ICP-3, 균주 138, 균주 145, 균주 163, 및 이의 용균성 변이체로 이루어진 그룹으로부터의 적어도 2 종의 균주를 선택함으로써 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0260] [실시양태 청구항 33]
- [0261] 제19항에 있어서,
- [0262] 조성물이 적어도 약 10^9 , 약 10^{10} , 약 10^{11} , 약 10^{12} , 또는 약 10^{13} PFU/용량의 용량으로 투여되는 방법.

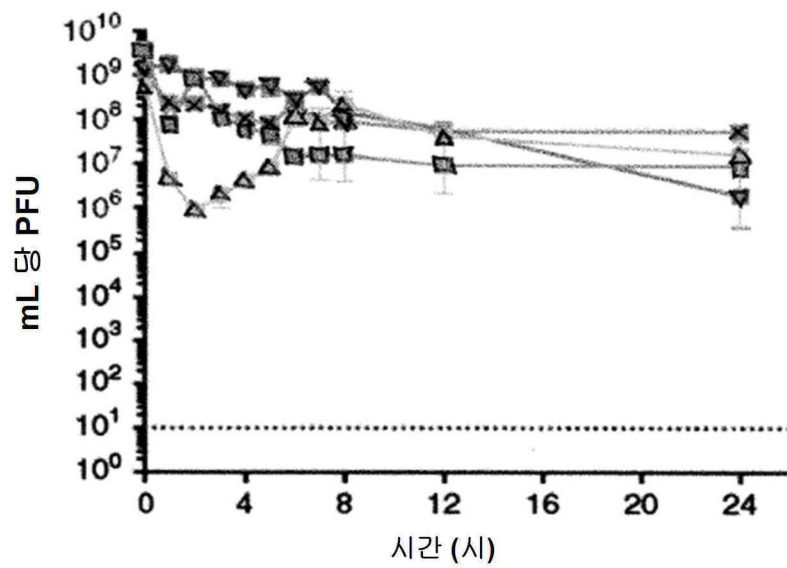
- [0263] [실시양태 청구항 34]
- [0264] 제19항에 있어서,
- [0265] 투여 단계를 재반복하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0266] [실시양태 청구항 35]
- [0267] 제19항에 있어서,
- [0268] 항생제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0269] [실시양태 청구항 36]
- [0270] 제19항에 있어서,
- [0271] 투여 단계 전에, 환경 샘플로부터 또는 *비브리오* 감염된 대상체로부터 용균성 박테리오파지 균주를 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0272] [실시양태 청구항 37]
- [0273] 제39항에 있어서,
- [0274] 대상체가 인간이고, 샘플이 감염된 대상체의 대변 샘플인 방법.
- [0275] [실시양태 청구항 38]
- [0276] 제19항에 있어서,
- [0277] 투여 단계 전에, 박테리오파지 균주의 비리온 혼합물을 캡슐화함으로써 조성물을 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0278] [실시양태 청구항 39]
- [0279] *비브리오* 종의 세균 감염에 대해 특이적인 다수의 용균성 박테리오파지 균주를 갖는 조성물을 포함하는 키트.
- [0280] [실시양태 청구항 40]
- [0281] 제38항에 있어서,
- [0282] 조성물이 단위 용량으로 존재하는 키트.
- [0283] [실시양태 청구항 41]
- [0284] 제39항에 있어서,
- [0285] 조성물이 그룹 ICP-1, ICP-2, 및 ICP-3으로부터 선택되는 박테리오파지 균주 중 적어도 하나를 포함하는 키트.

도면

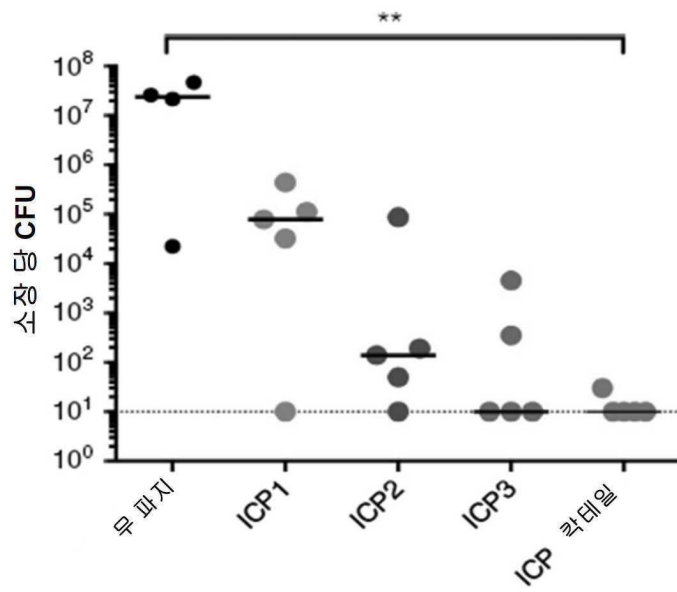
도면1a



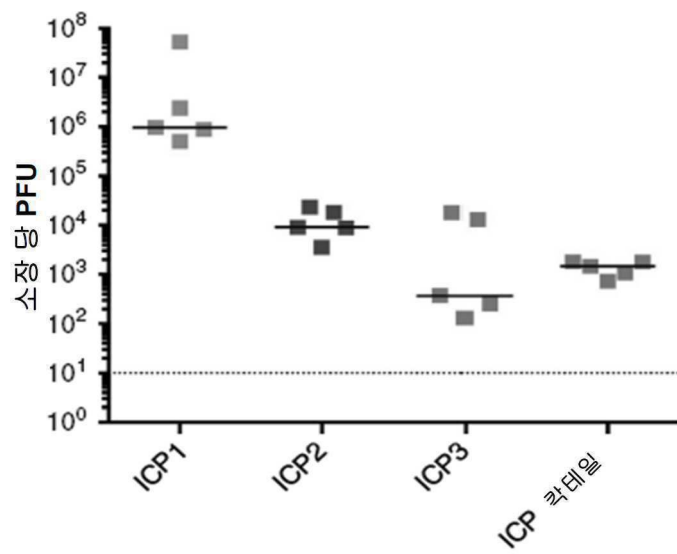
도면1b



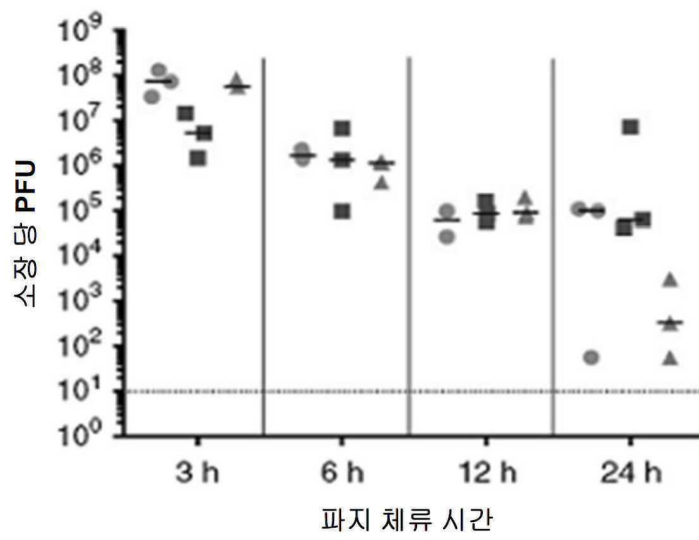
도면2a



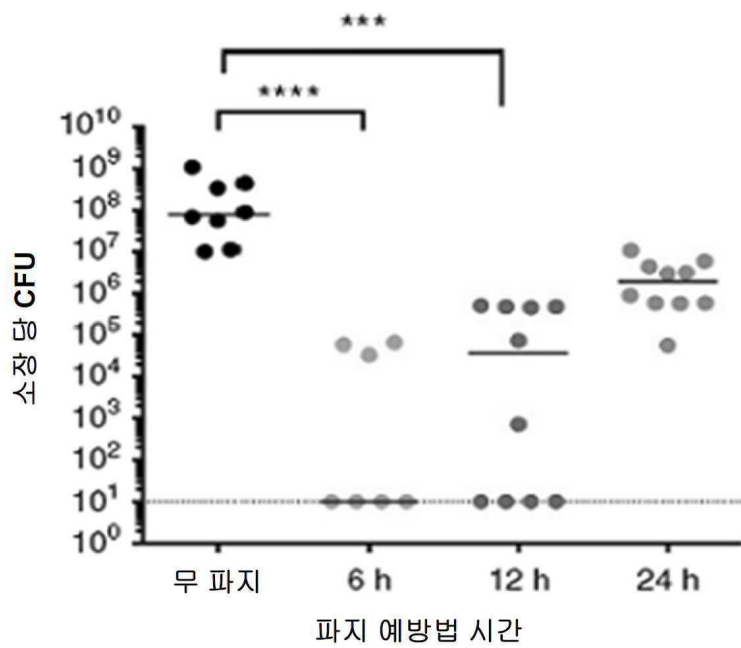
도면2b



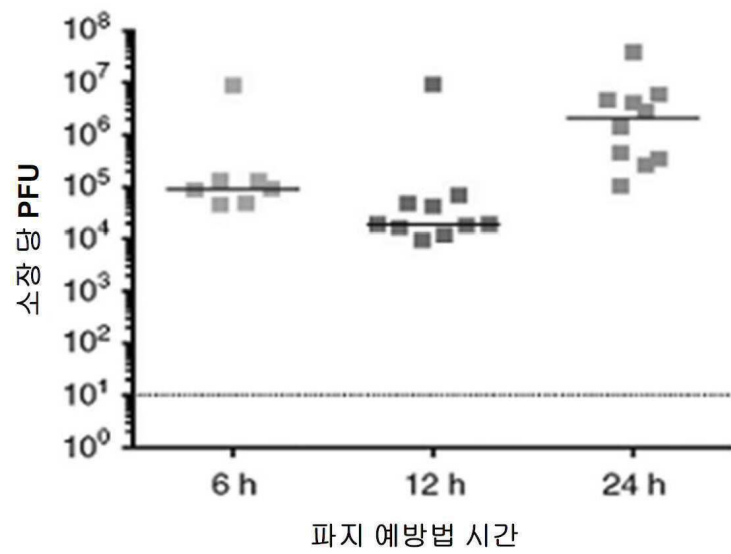
도면3a



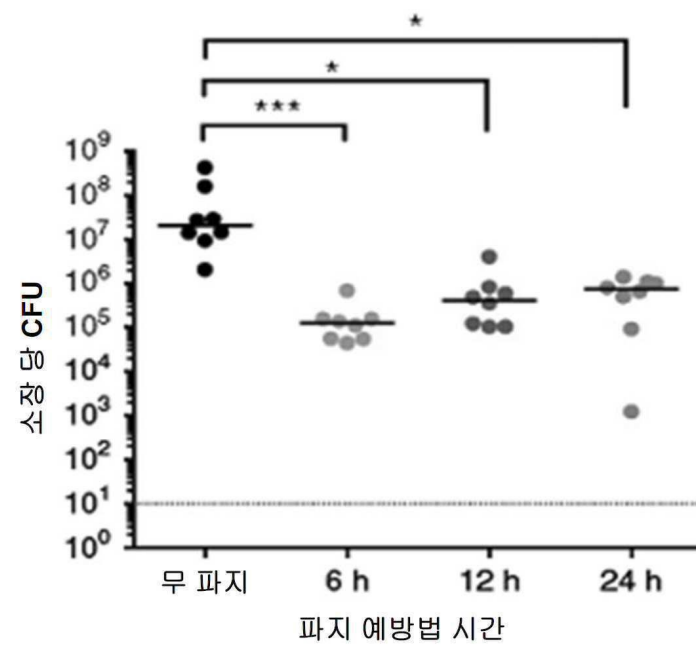
도면3b



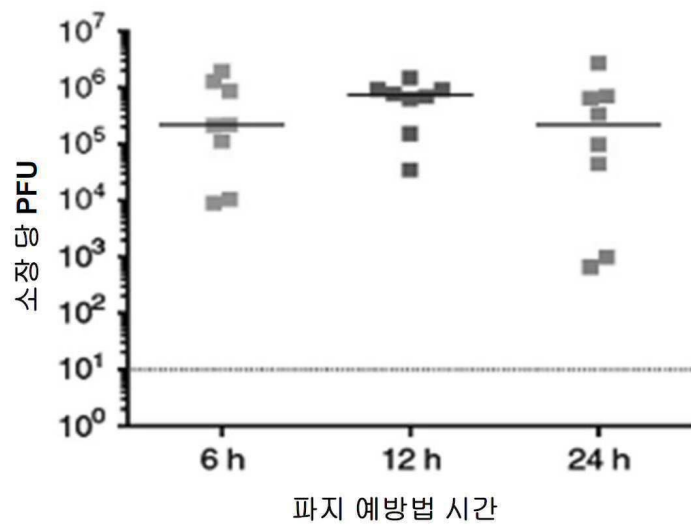
도면3c



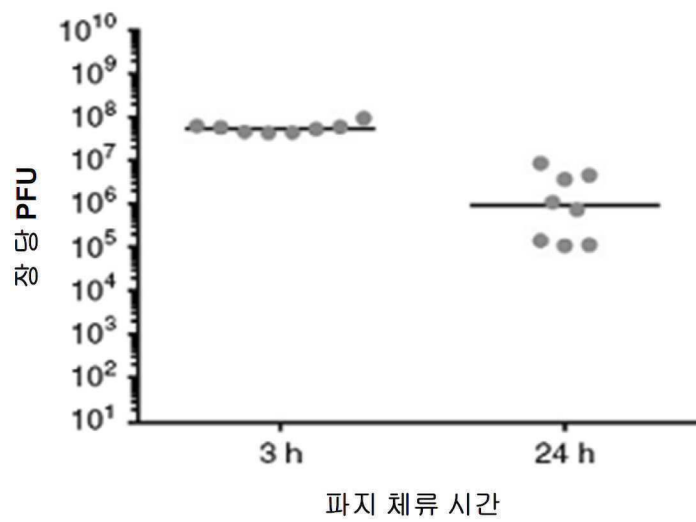
도면3d



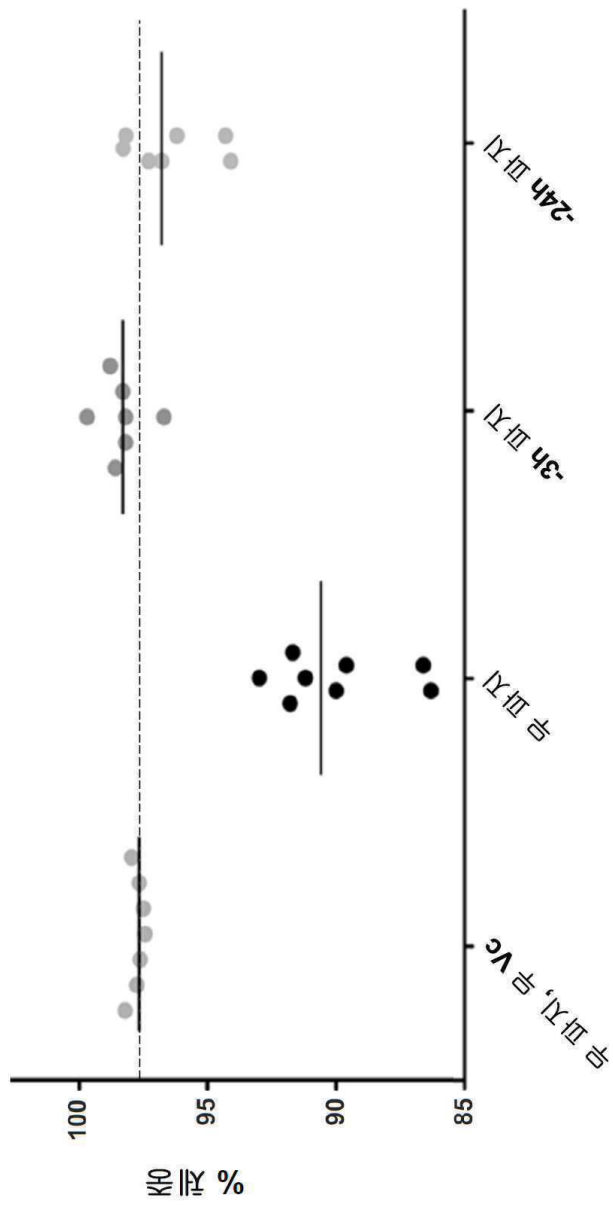
도면3e



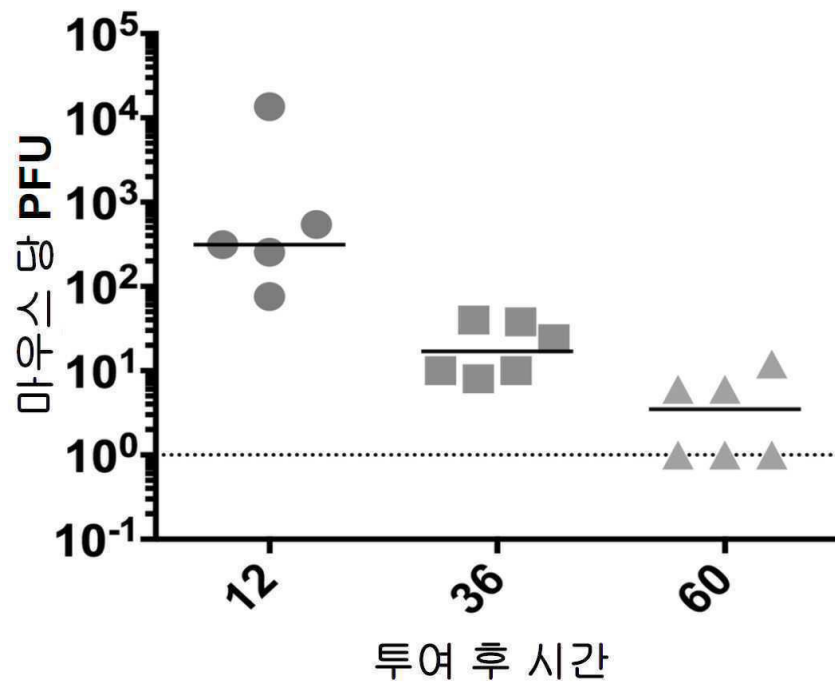
도면4a



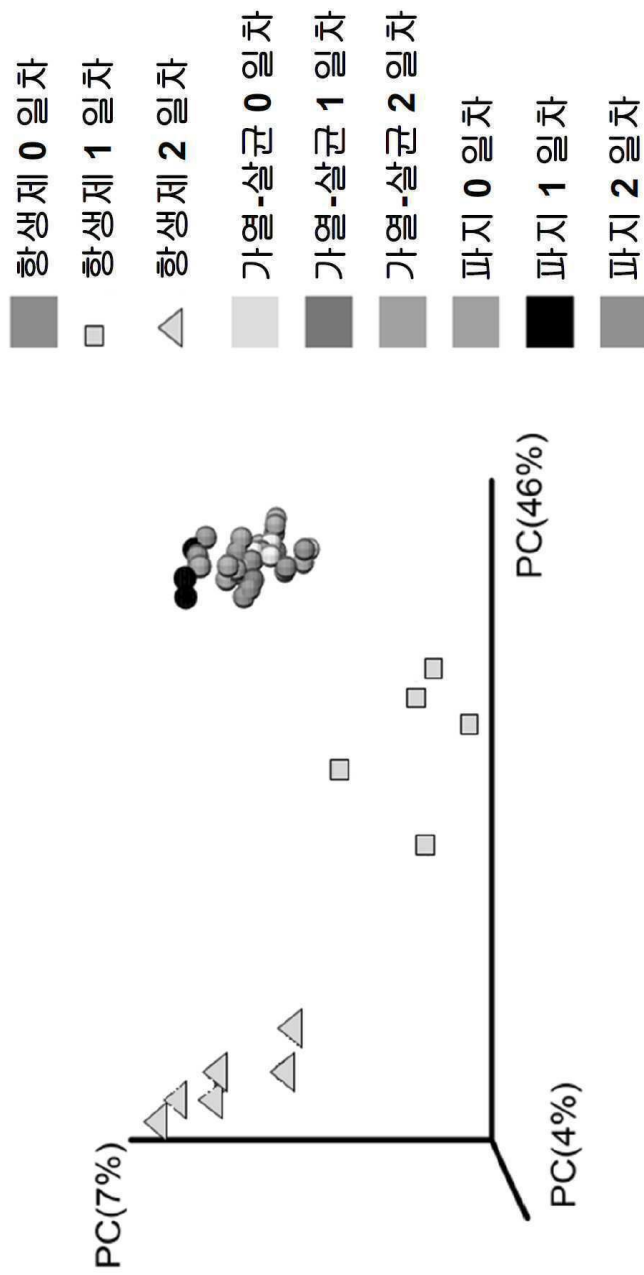
도면5



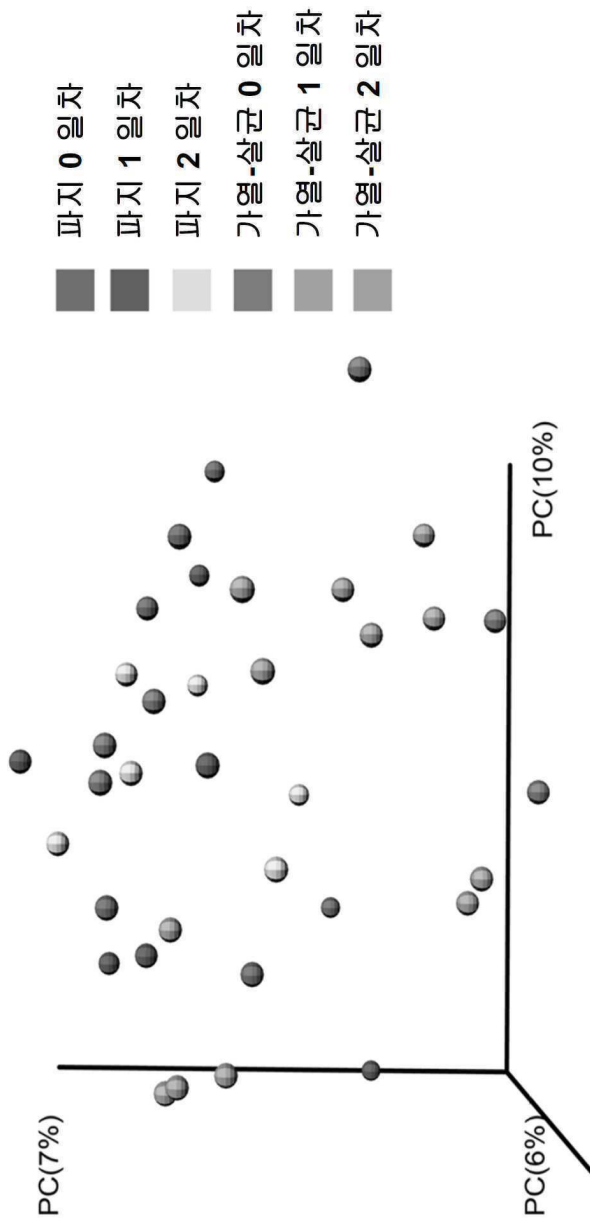
도면6



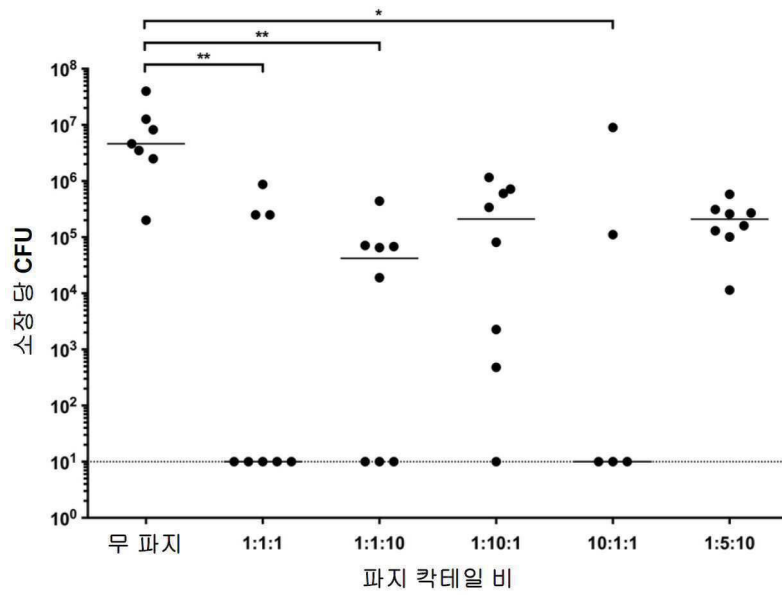
도면7



도면8



도면9a



도면9b

