

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-533408
(P2020-533408A)

(43) 公表日 令和2年11月19日(2020.11.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 35/76 (2015.01)	A 61 K 35/76	4 B 06 3
C12Q 1/686 (2018.01)	C 12 Q 1/686	Z 4 B 06 5
A61P 31/04 (2006.01)	A 61 P 31/04	4 C 08 7
A61P 1/04 (2006.01)	A 61 P 1/04	
C12N 7/00 (2006.01)	C 12 N 7/00	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-535321 (P2020-535321)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(86) (22) 出願日	平成30年9月7日 (2018.9.7)	(71) 出願人	520080311 バイオミクス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年4月17日 (2020.4.17)	(87) 国際公開番号	B 10 MX LTD. イスラエル国 7403635 ネス ジ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2018/001128	(31) 優先権主張番号	オナ イラン ラーモン ストリート 2
(87) 国際公開番号	W02019/048930	(32) 優先日	平成31年3月14日 (2019.3.14)
(88) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(33) 優先権主張国・地域又は機関	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患を制御するためのバクテリオファージ

(57) 【要約】

本明細書に開示されるのは、バクテリオファージ組成物およびその処置的使用である。本開示はまた、クレブシエラ細菌株（例えば、炎症性腸疾患に関連し、それによって疾患を制御し得る株）を溶解し得るバクテリオファージに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1) 各々が異なる群から選択される少なくとも2つの異なる溶解性バクテリオファージを含む医薬組成物であって、

前記群は、

a) KP2W-P0101、KP2W-P0102、KP2W-P0103、KP2W-P0104、KP2W-P0105、KP2W-P0106、KP2W-P0107、KP2W-P0108、KP2W-P0109、および、a)における上記のいずれかのバクテリオファージに対してBLASTにより少なくとも83%の同一性を有し、かつKP2またはKP2突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

b) KP2M-P0201、KP2M-P0202、KP2M-P0203、KP2M-P0204、KP2M-P0205、KP2M-P0206、KP2M-P0207、KP2M-P0208、KP2M-P0209、KP2M-P0210、KP2M-P0211、KP2M-P0212、および、b)における上記のいずれかのバクテリオファージに対してBLASTにより少なくとも85%の同一性を有し、かつKP2またはKP2突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

c) KP2W-M0101、KP2W-M0102、KP2W-M0103、KP2W-M0104、KP2M-M0105、KP2M-M0106、KP2W-M0107、KP2M-M0108、KP2M-M0109、KP2M-M0110、KP2M-M0111、KP2M-M0112、および、c)における上記のいずれかのバクテリオファージに対してBLASTにより少なくとも86%の同一性を有し、かつKP2またはKP2突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

からなり、

哺乳動物の腸への送達のために処方されるか、または哺乳動物の口への送達のために処方される、組成物。

【請求項 2】

a) ~ c)から選択される少なくとも1つのバクテリオファージを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

a) KP2W-P0105およびKP2M-P0203、

b) KP2M-P0203およびKP2W-M0104、

c) KP2W-P0105およびKP2W-M0104、

d) KP2W-P0102およびKP2M-P0209、

e) KP2M-P0209およびKP2W-M0107、

f) KP2W-P0102およびKP2W-M0107、

g) KP2W-P0109およびKP2M-P0211、

h) KP2M-P0211およびKP2M-M0112、

i) KP2W-P0109およびKP2M-M0112、

j) KP2W-P0105、KP2M-P0203およびKP2W-M0104、

k) KP2W-P0102、KP2M-P0209およびKP2W-M0107、

l) KP2W-P0109、KP2M-P0211およびKP2M-M0112、

m) KP2W-P0105、KP2M-P0209およびKP2W-M0112、

n) KP2W-P0102、KP2M-P0211およびKP2W-M0104、または

o) KP2W-P0109、KP2M-P0203、およびKP2W-M0107

を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

哺乳動物の腸への送達のために製剤化される、請求項1~3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 5】

哺乳動物の口への送達のために処方される、請求項1~4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 6】

クレブシエラ・ニューモニ工株のATCC BAA-2552 (KP1)、KP3、ATCC 13882 (KP5)、A

10

20

30

40

50

TCC BAA - 1705 (KP6) 、 ATCC 700603 (KP7) 、 および ATCC 700721 (KP8) のいずれかを溶解する溶解性バクテリオファージを含まない、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

クレブシエラ・ニューモニ工株の ATCC BAA-2552 (KP1) 、 KP3 、 ATCC 23356 (KP4) 、 ATCC 13882 (KP5) 、 ATCC BAA-1705 (KP6) 、 ATCC 700603 (KP7) 、 および ATCC 700721 (KP8) のいずれかを溶解する溶解性バクテリオファージを含まない、請求項 1 、 2 、 または 4 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

各々が異なる群から選択される少なくとも 2 つの異なる溶解性バクテリオファージを含む医薬組成物であって、

前記群は、

a) KP3W - P0101 、 KP3W - P0102 、 KP3W - P0103 、 KP3W - P0104 、 KP3W - P0105 、 KP3W - P0106 、 KP3W - P0107 、 KP3W - P0108 、 KP3W - P0109 、 KP3W - P0110 、 KP3W - P0111 、 KP3W - P0112 、 KP3W - P0113 、 KP3W - P0114 、 および、 a) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 78 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

b) KP3W - P0201 、 KP3W - P0202 、 KP3W - P0203 、 および、 b) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 96 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

c) KP3W - S0101 、 KP3W - S0102 、 および、 c) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 88 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、からなり、

哺乳動物の腸への送達のために処方されるか、または哺乳動物の口への送達のために処方される、組成物。

【請求項 9】

哺乳動物の腸への送達のために製剤化される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

哺乳動物の口への送達のために処方される、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

クレブシエラ・ニューモニ工株の ATCC BAA-2552 (KP1) 、 KP2 、 ATCC 23356 (KP4) 、 ATCC 13882 (KP5) 、 ATCC BAA-1705 (KP6) 、 ATCC 700603 (KP7) 、 および ATCC 700721 (KP8) のいずれかを溶解する溶解性バクテリオファージを含まない、請求項 9 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

少なくとも 2 つの異なる溶解性バクテリオファージを含む医薬組成物であって、

a) 少なくとも 1 つの溶解性バクテリオファージは、

i) KP2W - P0101 、 KP2W - P0102 、 KP2W - P0103 、 KP2W - P0104 、 KP2W - P0105 、 KP2W - P0106 、 KP2W - P0107 、 KP2W - P0108 、 KP2W - P0109 、 および、 i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して少なくとも 83 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

ii) KP2M - P0201 、 KP2M - P0202 、 KP2M - P0203 、 KP2M - P0204 、 KP2M - P0205 、 KP2M - P0206 、 KP2M - P0207 、 KP2M - P0208 、 KP2M - P0209 、 KP2M - P0210 、 KP2M - P0211 、 KP2M - P0212 、 および、 ii) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 85 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

iii) KP2W - M0102 、 KP2W - M0103 、 KP2W - M0104 、 KP2M - M0105 、 KP2M - M0106 、 KP2W - M0107 、 KP2M - M0108 、 KP2M - M0109 、 KP2M - M0110 、 KP2M - M0111 、 KP2M - M0112 、 および、 iii) にお

10

20

30

40

50

ける上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 6 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

から選択され、並びに、

b) 少なくとも 1 つの溶解性バクテリオファージは、

i) KP3W - P0101、KP3W - P0102、KP3W - P0103、KP3W - P0104、KP3W - P0105、KP3W - P0106、KP3W - P0107、KP3W - P0108、KP3W - P0109、KP3W - P0110、KP3W - P0111、KP3W - P0112、KP3W - P0113、KP3W - P0114、および、i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 7 8 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

ii) KP3W - P0201、KP3W - P0202、KP3W - P0203、および、ii) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 9 6 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

iii) KP3W - S0101、KP3W - S0102、および、iii) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 8 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、から選択され、

哺乳動物の腸への送達のために処方されるか、または哺乳動物の口への送達のために処方される、組成物。

【請求項 1 3】

哺乳動物の腸への送達のために製剤化される、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

哺乳動物の口への送達のために処方される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

クレブシエラ・ニューモニ工株のATCC BAA-2552 (KP1)、ATCC 13882 (KP5)、ATCC BA A-1705 (KP6)、ATCC 700603 (KP7)、およびATCC 700721 (KP8) のいずれかを溶解する溶解性バクテリオファージを含まない、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

経口または直腸投与用に製剤化された、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、炎症性腸疾患の処置方法。

【請求項 1 8】

前記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記炎症性腸疾患がクローン病である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記炎症性腸疾患が、プロトンポンプ阻害剤療法に関連する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記炎症性腸疾患が原発性硬化性胆管炎に関連する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記対象が、K P 2 および K P 3 から選択される細菌に感染している、請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記対象が、K P 2 および K P 3 から選択される細菌に感染していると判定されている、請求項 1 7 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

K P 2 および / または K P 3 感染の判定が P C R によってアッセイされる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

K P 2 および K P 3 から選択される細菌に感染した対象に、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与し、それによって前記対象を処置することを含む、対象における炎症性腸疾患の処置方法。

【請求項 2 6】

前記組成物が経口または直腸投与される、請求項 1 5 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

K P 2 バクテリオファージで処置される対象を判定する方法であって、

a) 前記対象から生物学的試料を取得し、

b) 前記生物学的試料から得られたバクテリアを培養し、

c) i) KP2W-P0101、KP2W-P0102、KP2W-P0103、KP2W-P0104、KP2W-P0105、KP2W-P0106、KP2W-P0107、KP2W-P0108、KP2W-P0109、および、i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 3 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

20

i i) KP2M-P0201、KP2M-P0202、KP2M-P0203、KP2M-P0204、KP2M-P0205、KP2M-P0206、KP2M-P0207、KP2M-P0208、KP2M-P0209、KP2M-P0210、KP2M-P0211、KP2M-P0212、および、i i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 5 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

i i i) KP2W-M0102、KP2W-M0103、KP2W-M0104、KP2W-M0105、KP2W-M0106、KP2W-M0107、KP2W-M0108、KP2W-M0109、KP2W-M0110、KP2W-M0111、KP2W-M0112、および、i i i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 6 % の同一性を有し、かつ K P 2 または K P 2 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

のうち 1 つ以上から選択されるバクテリオファージを、培養された前記細菌に接種し、

30

d) 培養された前記細菌が前記バクテリオファージによって溶菌されるかどうかを判定し、培養された前記細菌のいずれかが前記バクテリオファージによって溶菌される場合、対象は K P 2 によって感染されていると判定される、方法。

【請求項 2 8】

前記 K P 2 の感染の判定が P C R によってアッセイされる、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

K P 3 バクテリオファージで処置される対象を判定する方法であって、

a) 前記対象から生物学的試料を取得し、

b) 前記生物学的試料から得られたバクテリアを培養し、

c) i) KP3W - P0101、KP3W - P0102、KP3W - P0103、KP3W - P0104、KP3W - P0105、KP3W - P0106、KP3W - P0107、KP3W - P0108、KP3W - P0109、KP3W - P0110、KP3W - P0111、KP3W - P0112、KP3W - P0113、KP3W - P0114、および、i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 7 8 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、

40

i i) KP3W - P0201、KP3W - P0202、KP3W - P0203、および、i i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 9 6 % の同一性を有し、かつ K P 3 または K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、並びに、

i i i) KP3W - S0101、KP3W - S0102、および、i i i) における上記のいずれかのバクテリオファージに対して B L A S T により少なくとも 8 8 % の同一性を有し、かつ K P 3 または

50

K P 3 突然変異体の溶菌感染が可能であるいずれかの他の溶菌性バクテリオファージ、のうち1つ以上から選択されるバクテリオファージを、培養された前記細菌に接種し、

d) 培養された前記細菌が前記バクテリオファージによって溶菌されるかどうかを判定し、培養された前記細菌のいずれかが前記バクテリオファージによって溶菌される場合、対象はK P 3 によって感染されていると判定される、方法。

【請求項30】

前記K P 3 の感染の判定がPCRによってアッセイされる、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年9月8日に出願された米国仮出願第62/555,790号の優先権を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。前記ASCIIコピーは2017年8月31日に作成され、14283_6000-00000_SL.txtと名付けられ、サイズは32,895,979バイトである。

【0003】

本開示は、バクテリオファージ組成物およびその治療的使用に関する。特定の態様では、本開示は、クレブシエラ細菌株を溶解することができる溶解性バクテリオファージに関する。特定の実施形態では、溶解性バクテリオファージは、炎症性腸疾患（IBD）（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）に関連するクレブシエラ細菌株を溶解し、それによって疾患を制御（調節）することができる。

【背景技術】

【0004】

腸内微生物叢の生体異常は、IBDの病因と関連している（Said et al.）。腸内微生物叢からの刺激の増加は、炎症を引き起こし、患者の免疫応答を変更させる可能性がある。ヒトにおいて、経口微生物叢は、700種以上の細菌種または植物型を含む（Said et al.）。摂取された経口バクテリアは、典型的には、健康な腸にコロニー形成しない（Chen et al., 2016; Bik et al., 2010; TH1 Cell Stimulatory Bacteria Colonizing in Human Oral Cavity；実施例1も参照のこと）。しかしながら、経口起点の細菌は、IBD患者の腸内微生物叢において増加し得る（Gevers et al., 2014）。経口微生物叢の生体異常は、IBDを有する患者において観察され、そして疾患の病因に寄与し得る（Said et al.）。

【0005】

クローン病（CD）および潰瘍性大腸炎（UC）などのIBDは、下痢、栄養素の吸収不良、栄養失調、貧血、および体重減少を引き起こし得る。重度の腸炎症は、腸の粘膜を越えて広がり、潰瘍形成、出血、中毒性巨大結腸、狭窄、および瘻孔を引き起こし得る。さらに、慢性炎症は結腸がんに関連する。腸外合併症には、関節炎、皮膚発疹、肝疾患、ならびに上強膜炎およびブドウ膜炎などの眼障害が含まれるが、これらに限定されない。

【発明の概要】

【0006】

Crohn's & Colitis Foundation of Americaによれば、IBDのための「単一の理想的な治療法は存在しない」。食事制限のみではIBDを改善することは示されていない。多くの患者にとって、外科的介入が必要である。現在利用可能なIBD処置（治療）を用いてさえ、多くの患者は、寛解期間の間にIBDフレアを経験する。したがって、IBDの効果的で、信頼性があり、長期間の処置および/または防止に対する、かなりの満たされていない必要性が存在する。

【0007】

本開示は、バクテリオファージ組成物およびその治療的使用を提供する。特定の実施形態において、本発明は、IBDに関連する、クレブシエラ・ニューモニウ（Klebsiella pneu

10

20

30

40

50

moniae) (例えば、本明細書中のクレブシエラ・ニューモニエ 2 H 7 菌株、「KP2」) またはクレブシエラ・エアロモビリス (Klebsiella aeromobilis) (例えば、本明細書中のクレブシエラ・エアロモビリス / エンテロバクター・エロゲネス (Enterobacter aerogenes) 11E12、「KP3」) のような、1 つ以上のクレブシエラ種、菌株、または亜菌株を溶解し得る溶解性バクテリオファージを提供する。本開示は、IBDを制御するための方法を提供する。本開示はまた、本明細書中に提供される方法で処置されるべき患者を選択するための方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図 1】図 1 A ~ 図 1 C。ヒト唾液微生物叢からのTH1細胞誘導性および炎症性クレブシエラ・ニューモニエ株の単離。(図 1 A) CD患者由来の唾液試料を接種した唾液微生物叢コロニー形成無菌 (ex - GF) マウス由来の結腸固有層 (LP) CD4⁺TCR⁺T細胞内のIFN⁺の頻度。各点は、個々のマウスを表す。(図 1 B) 8ミックス、Veillo+Fuso、Kp-2H7、または7ミックスでコロニー形成されたB6マウスの結腸LPにおけるTH1細胞の割合。(図 1 C) Kp-2H7-またはEc-2B1-単色化WTまたはII100Bマウスの近位結節のSEM画像。記号は、個々のマウスを表す。エラーバーは平均 ± SEMを示す。データは、同様の結果少なくとも2つの独立した実験を表す。* P < 0.02; ** P < 0.001。

【図 2】図 2 A ~ 図 2 C。別のTH1細胞誘導性口腔細菌種としてのエンテロバクター・エロゲネス。(図 2 A) 健康なドナーおよびUC患者由来の唾液試料を接種したex - GFマウス由来の結腸LP CD4⁺TCR⁺T細胞内のIFN⁺の頻度。各点は、個々のマウスを表す。(図 2 B) 13 - mix、Efae - 11A1、Ka - 11E12、または11 - mixでコロニー形成されたB6マウスの結腸LPにおけるTH1細胞の割合。(図 2 C) Ea-11E12単色化WTまたはII10^{-/-}マウスの近位結腸のSEM画像。

【図 3】図 3。KP2およびKP3に対して単離されたファージの宿主域(宿主範囲)分析(示されるように、他のクレブシエラ株に対する活性を含む)。活性を、2つのファージ力値 (1×10⁹PFU/mL および 1×10⁶PFU/mL) で測定した。S - 感受性、R - 耐性、NT - テストされていない、PFU - プラーク形成単位。

【図 4】図 4。非感染対照と比較した、単一ファージおよび6ファージのカクテル (Cocktail) に感染したKP2培養物におけるファージ耐性突然変異体の出現。ファージを含まないKP2成長曲線を黒い線で示し、一方、残りの線は、示されるように、単一のファージを有するKP2の成長曲線を示す。破線は、6つのファージのカクテルの存在下でのKP2増殖曲線を表す。個々のファージの存在下で作成されたKP2増殖曲線は、1 ~ 2 時間後の耐性株の再増殖または突然変異株の出現を実証する。対照的に、カクテルの存在下でのKP2の成長は、9 時間後に耐性突然変異体の出現を示し、「突然変異までの時間」パラメータの有意な改善を可能にした。KP3株に対して同様の分析を行った結果、「突然変異までの時間」が3倍になったか、研究の過程で突然変異体が出現しなくなった。

【図 5】図 5。オリジナルのKP2ファージによる感染に抵抗性の突然変異KP2菌株に対して単離されたファージの宿主域分析および相同性パーセント。(左) 耐性細菌突然変異株MKP2_2161_1 (ファージKP2W-P0104に耐性) および耐性細菌突然変異株MKP2_coc_1 (ファージKP2W-P0101、KP2W-P0102、KP2W-P0103、KP2W-P0104、KP2W-P0106、KP2W-M0104に耐性) およびKP2株で単離されたファージの宿主域分析を、4つの追加のKP突然変異株MKP2_2161_C (KP2W-P0104による感染に耐性)、MKP2_251_B、MKP2_251_C およびMKP2_251_D (KP2W-M0104による感染に耐性) で実施した。滴下アッセイにより、それぞれのファージを48ウェルプレート内のさまざまなクレブシエラ・ニューモニエ (K. pneumoniae) 株のバクテリアローンに追加した (10 μL)。プレートを好気的条件下で2 ~ 3 時間 (37℃) インキュベートした後、プランクがバクテリアローン上に見えるようになった。MKP2_2161_1、MKP2_coc_1、KP2およびそれらのそれぞれのファージのバクテリアローンを有するプレートを、陽性対照として用いた。宿主域は、2つのファージ力値; 1×10⁶PFU/mL および 1×10⁹PFU/mL でファージの各々について行った。S - テストされたファージの感染に対する耐性、R - テストされたファージの感染に対する感受性、NT - テストされていない

10

20

30

40

50

。しかしながら、KP2に感染した部分またはすべてのKP2変異株ならびに商用株KP4上で単離されたファージ。（右）ファージゲノム間の同一性（相同性）の割合は、すべての重複しないBLASTNアライメントセグメント（BLAST HSP）を組み合わせ、それらの「同一の一致数」の値を合計し、この合計をクエリシーケンスの長さで割ることによって決定される。いくつかの実施形態では、これは、非対称マトリックスをもたらす。

【図6】図6。クラスポドウイルス科の19ファージ（Pで示す）およびクラスサイフォウイルス科の2ファージ（Sで示す）を含むKP3に対して単離されたファージの同一性の割合を決定する。ファージゲノム間の同一性の割合は、すべての重複しないBLASTNアライメントセグメント（BLAST HSP）を組み合わせ、それらの「同一の一致数」の値を合計し、この合計をクエリシーケンスの長さで割ることによって決定される。いくつかの実施形態では、これは、非対称マトリックスをもたらす。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

例示的なバクテリオファージおよびバクテリアの配列を表1に開示する。KP2ゲノムは、配列決定されており、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank BDQR01000001.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BDQR01000001.1>)、GenBank GCA_002260905.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002260905.1)、BioSample: SAMD00083910 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMD00083910/>)、BioProject PRJDB5883 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB5883>)、およびAtarashi et al., *Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation*, *Science* (2017) を参照のこと。いくつかの実施形態では、ゲノム配列、例えばKP2ゲノム配列は、同じ細菌の別のゲノム配列と比較して、小さな配列決定の差異、例えば0.5%未満、1%未満、1.5%未満、2%未満、2.5%未満、または3%未満を含み得、配列決定の差異は、細菌の機能的差異、例えばバクテリオファージ感染性をもたらさないはずである。

20

【0010】

【表1-1】

表1.配列決定の簡単な説明

配列番号:	配列名
1	KP3W-P0101 バクテリオファージ配列
2	KP3W-P0102 バクテリオファージ配列
3	KP3W-P0103 バクテリオファージ配列
4	KP3W-P0104 バクテリオファージ配列
5	KP3W-P0105 バクテリオファージ配列
6	KP3W-P0106 バクテリオファージ配列
7	KP3W-P0107 バクテリオファージ配列
8	KP3W-P0108 バクテリオファージ配列
9	KP3W-P0109 バクテリオファージ配列
10	KP3W-P0110 バクテリオファージ配列
11	KP3W-P0111 バクテリオファージ配列
12	KP3W-P0112 バクテリオファージ配列
13	KP3W-P0113 バクテリオファージ配列
14	KP3W-P0114 バクテリオファージ配列
15	KP3W-P0201 バクテリオファージ配列
16	KP3W-P0202 バクテリオファージ配列
17	KP3W-P0203 バクテリオファージ配列
18	KP3W-S0101 バクテリオファージ配列
19	KP3W-S0102 バクテリオファージ配列
20	KP3W-S0102 バクテリオファージ配列
21	KP2W-P0101 バクテリオファージ配列
22	KP2W-P0102 バクテリオファージ配列
23	KP2W-P0103 バクテリオファージ配列
24	KP2W-P0104 バクテリオファージ配列
25	KP2W-P0105 バクテリオファージ配列
26	KP2W-P0106 バクテリオファージ配列
27	KP2W-P0107 バクテリオファージ配列
28	KP2W-P0108 バクテリオファージ配列
29	KP2W-P0109 バクテリオファージ配列
30	KP2W-M0102 バクテリオファージ配列
31	KP2W-M0103 バクテリオファージ配列
32	KP2W-M0104 バクテリオファージ配列
33	KP2M-M0105 バクテリオファージ配列
34	KP2W-M0106 バクテリオファージ配列
35	KP2W-M0107 バクテリオファージ配列
36	KP2M-M0108 バクテリオファージ配列
37	KP2M-M0109 バクテリオファージ配列
38	KP2M-M0110 バクテリオファージ配列
39	KP2M-M0111 バクテリオファージ配列
40	KP2M-M0112 バクテリオファージ配列
41	KP2M-P0201 バクテリオファージ配列
42	KP2W-P0202 バクテリオファージ配列
43	KP2M-P0203 バクテリオファージ配列

10

20

30

40

【表1-2】

44	KP2M-P0204 バクテリオファージ配列
45	KP2M-P0205 バクテリオファージ配列
46	KP2M-P0206 バクテリオファージ配列
47	KP2M-P0207 バクテリオファージ配列
48	KP2M-P0208 バクテリオファージ配列
49	KP2M-P0209 バクテリオファージ配列
50	KP2M-P0210 バクテリオファージ配列
51	KP2M-P0211 バクテリオファージ配列
52	KP2M-P0212 バクテリオファージ配列
53	MKP2_coc_1変異体細菌配列
54	MKP2_coc_1変異体細菌配列
55	MKP2_coc_1変異体細菌配列
56	MKP2_coc_1変異体細菌配列
57	MKP2_coc_1変異体細菌配列
58	MKP2_coc_1変異体細菌配列
59	MKP2_coc_1変異体細菌配列
60	MKP2_coc_1変異体細菌配列
61	MKP2_coc_1変異体細菌配列
62	MKP2_coc_1変異体細菌配列
63	MKP2_coc_1変異体細菌配列
64	MKP2_coc_1変異体細菌配列
65	MKP2_coc_1変異体細菌配列
66	MKP2_coc_1変異体細菌配列
67	MKP2_coc_1変異体細菌配列
68	MKP2_coc_1変異体細菌配列
69	MKP2_coc_1変異体細菌配列
70	MKP2_coc_1変異体細菌配列
71	MKP2_coc_1変異体細菌配列
72	MKP2_coc_1変異体細菌配列
73	MKP2_coc_1変異体細菌配列
74	MKP2_coc_1変異体細菌配列
75	MKP2_coc_1変異体細菌配列
76	MKP2_coc_1変異体細菌配列
77	MKP2_coc_1変異体細菌配列
78	MKP2_coc_1変異体細菌配列
79	MKP2_coc_1変異体細菌配列
80	MKP2_coc_1変異体細菌配列
81	MKP2_coc_1変異体細菌配列
82	MKP2_coc_1変異体細菌配列
83	MKP2_coc_1変異体細菌配列
84	MKP2_coc_1変異体細菌配列
85	MKP2_coc_1変異体細菌配列
86	MKP2_coc_1変異体細菌配列
87	MKP2_coc_1変異体細菌配列
88	MKP2_coc_1変異体細菌配列
89	MKP2_coc_1変異体細菌配列

10

20

30

40

【表1-3】

90	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
91	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
92	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
93	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
94	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	10
95	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
96	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
97	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
98	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
99	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
100	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
101	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
102	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
103	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
104	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
105	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
106	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
107	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	20
108	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
109	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
110	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
111	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
112	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
113	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
114	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
115	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
116	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
117	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
118	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	30
119	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
120	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
121	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
122	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
123	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
124	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
125	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
126	MKP2_coc_1 変異体細菌配列	
127	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
128	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	40
129	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
130	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
131	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
132	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
133	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
134	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	
135	MKP2_2161_1 変異体細菌配列	

【表1-4】

136	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
137	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
138	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
139	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
140	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
141	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
142	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
143	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
144	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
145	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
146	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
147	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
148	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
149	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
150	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
151	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
152	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
153	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
154	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
155	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
156	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
157	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
158	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
159	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
160	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
161	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
162	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
163	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
164	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
165	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
166	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
167	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
168	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
169	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
170	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
171	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
172	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
173	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
174	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
175	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
176	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
177	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
178	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
179	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
180	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
181	MKP2_2161_1 変異体細菌配列

10

20

30

40

【表 1 - 5】

182	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
183	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
184	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
185	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
186	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
187	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
188	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
189	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
190	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
191	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
192	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
193	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
194	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
195	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
196	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
197	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
198	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
199	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
200	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
201	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
202	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
203	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
204	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
205	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
206	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
207	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
208	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
209	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
210	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
211	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
212	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
213	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
214	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
215	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
216	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
217	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
218	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
219	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
220	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
221	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
222	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
223	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
224	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
225	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
226	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
227	MKP2_2161_1 変異体細菌配列

10

20

30

40

【表1-6】

228	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
229	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
230	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
231	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
232	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
233	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
234	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
235	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
236	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
237	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
238	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
239	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
240	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
241	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
242	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
243	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
244	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
245	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
246	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
247	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
248	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
249	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
250	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
251	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
252	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
253	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
254	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
255	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
256	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
257	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
258	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
259	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
260	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
261	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
262	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
263	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
264	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
265	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
266	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
267	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
268	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
269	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
270	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
271	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
272	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
273	MKP2_2161_1 変異体細菌配列

10

20

30

40

【表1-7】

274	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
275	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
276	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
277	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
278	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
279	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
280	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
281	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
282	MKP2_2161_1 変異体細菌配列
283	KP2 バクテリア配列
284	KP2 バクテリア配列
285	KP2 バクテリア配列
286	KP3 バクテリア配列

10

【0011】

本開示は、バクテリオファージ、その医薬組成物、IBDを制御する方法 (Jostins et al., 2012)、および本明細書に記載の方法による処置に応答する患者を選択する方法に関する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のバクテリオファージは、IBDに関連するクレブシエラ菌を溶解することができる。クレブシエラ・ニューモニエ（肺炎桿菌）は IBDと関連している。IBD患者は、対照および他の病的状態と比較して、一定の被膜型（例えば、KP2に見られるK2、K17、K26、K36、K50、およびK21）に対する全身性抗体の上昇を示す。これらの知見は、IBDにおけるクレブシエラの関与を示唆するが、クレブシエラが病因に積極的に関与しているかどうか、および種々の菌株が類似の被膜型を共有するので、菌株特異的分解能を提供しないかどうかを説明しない。実施例1は、単一の病原体株（KP2またはKP3）の腸内投与と、腸における免疫応答（固有層におけるTH1偏光）と、インビボにおける大腸炎の誘導（I110-/-マウスにおける）との間の関係を示す。

20

定義

30

【0012】

本開示がより容易に理解され得るように、特定の用語が最初に定義される。これらの定義は、開示の残りの部分に照らして、かつ当業者によって理解されるように読まれるべきである。別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。詳細な説明の全体にわたって、追加の定義を述べる。

30

【0013】

本明細書中で使用される場合、用語「処置する」および「制御する」およびそれらの同語族は、IBDまたはその少なくとも1つの識別可能な症状の改善をいう。いくつかの実施形態において、「処置する」および「制御する」およびそれらの同語族は、患者によって必ずしも識別可能ではない、少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善をいう。いくつかの実施形態において、「処置する」および「制御する」およびそれらの同語族は、物理的に（例えば、識別可能な症状の安定化）、生理学的に（例えば、物理的パラメータの安定化）、またはその両方で、IBDの進行を、未処置の対照と比較して、阻害するか、低減させるか、または遅らせるなどをいう。特定の実施形態において、「処置する」および「制御する」ならびにそれらの同語族は、未処置の対照と比較して、IBDの進行を遅らせるか、または逆転させることをいう。本明細書中で使用される場合、「予防する」およびその同語族は、未処置の対照（コントロール）と比較して、IBDまたはIBDに関連する症状を獲得する危険性を減少させるかまたは発症を遅延させることをいう。

40

【0014】

50

特定の実施形態では、本明細書に記載されるバクテリオファージは、対象におけるIBDを改善するために投与され、未処置またはコントロール対象におけるレベルと比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上改善するための状態または障害の1つまたは複数の症状または物理的パラメータをもたらす。いくつかの実施形態では、改善は、バクテリオファージの投与前後の対象における症状または物理的パラメータを比較することによって測定される。いくつかの実施形態では、測定可能な物理的パラメータは、便中のバクテリアCFUの減少である。

【0015】

測定可能な物理的なパラメータは、例えば、クローン病(Sandborn et al., 2013; Best et al., 1976; Warrel-Oxford Textbook of Medicine, 5th edition)または潰瘍性大腸炎(Tursi et al., 2010; Warrel-Oxford Textbook of Medicine, 5th edition)について、当技術分野で公知の任意の好適な臨床パラメータであってもよい。クローン病パラメータには、クローン病活性指数(CDAI)(150点のCDAIスコア)およびCDAI-100応答(ベースラインからのCDAIスコアの100点以上の低下)を用いる臨床的寛解の評価;C反応性タンパク質の血清レベル、示差血球数および血清アルブミンレベルの低下によって測定される炎症の低下;内視鏡的手順(例えば、好中球、マクロファージおよび他の免疫細胞浸潤の低下、肉芽腫のサイズおよび数、潰瘍の数およびサイズの低下、浮腫性粘膜)の間に収集された生検の顕微鏡検査によって評価される回腸末端および直腸における糞便カルプロテクチンのレベルの低下および粘膜層の外観の向上が含まれるが、これらに限定されない。また、下痢、腹痛、体重減少、発熱、嘔吐、結腸、直腸出血、貧血、腸管外症状(スルファサラジンに対する過敏性発疹、結節性紅斑、壞疽性膿皮症、口腔アフタ性潰瘍、舌の痛み、角性口内炎、上強膜炎または前部ブドウ膜炎、関節炎、急性関節症、腰痛、仙腸炎、強直性脊椎炎、肝疾患:アルカリホスファターゼまたはトランスマニナーゼのわずかな上昇、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎から、胆管の閉塞を伴う同心性の管周囲線維症の古典的な描写までにわたる慢性肝疾患、胸水を伴うまたは伴わない心膜炎、自己免疫性溶血性貧血、アミロイド、急速に進行する気管支拡張症)。

10

20

30

40

50

【0016】

潰瘍性大腸炎疾患パラメータには、潰瘍性大腸炎の疾患活動性指数(UCDAI)の改善(ベースラインからのUCDAIの50%以上の減少)、再発性UCの活動、UCDAI-2と見なされる寛解、ヘモグロビンレベル、血清アルブミンレベルの改善、C反応性タンパク質レベルの低下;好中球白血球増加症(血球数)の改善;内視鏡スコアの改善(浮腫性粘膜領域の減少、好中球、マクロファージおよび他の免疫細胞浸潤の減少、潰瘍、浮腫性粘膜の数とサイズの減少;臨床症状:直腸出血、発熱、排便回数、下痢、粘液の通過、腹痛、便秘、食欲不振、吐き気、体重減少、倦怠感、慢性鉄欠乏症の症状、亀裂などの小さな肛門周囲疾患上記の腸管外症状、さらに口腔カンジダ症、指のクラビング、の改善、が含まれるが、これらに限定されない。

【0017】

処置を必要とする人々は、既にIBDを有する人々、ならびに疾患有するリスクがある人々、または最終的に疾患有する可能性がある人々を含むことができる。処置の必要性は、例えば、IBDの開発、IBDの存在もしくは進行、またはIBDを有する対象の処置に対する受容性の可能性に関連する1つ以上の危険因子の存在によって評価される。例えば、IBDを「処置する」とは、関連する症状を低減または排除することを含むてもよく、基礎疾患病因、例えば、遺伝的不安定性遺伝子座の排除を必ずしも含むしない。

【0018】

いくつかの実施形態では、IBDを有する個体は、寛解状態および/または現在無症候性であり、本明細書中に記載されるバクテリオファージは、寛解期間中に投与されて、再燃の可能性を低減し得る。いくつかの実施形態では、IBDについて寛解中および/または現在無症候性である個体は、処置(例えば、抗生物質および/またはステロイド)を受けており、そして本明細書中に記載されるバクテリオファージは、再燃の可能性を減少させるために、このような処置とともに同時投与され得る。

【0019】

クレブシエラは、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) に属するバクテリアの属である。クレブシエラはグラム陰性、非運動性、棒状である。いくつかの実施形態では、クレブシエラの種は、ヒト疾患、例えば、クレブシエラ・ニューモニエに関連し得る。本明細書中で使用される場合、クレブシエラは、現在分類されているか、以前に分類されているか、またはクレブシエラ菌として再分類されるバクテリア（例えば、エンテロバクター・エロゲネスとしても公知である、クレブシエラ・エアロモビリスを含む (Tindall et al., 2017; Diene et al., 2013)）。いくつかの実施形態において、クレブシエラは、クレブシエラ・ニューモニエを指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラは、クレブシエラ・エアロモビリス / エンテロバクター・エロゲネス菌を指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラは、天然に存在するクレブシエラを指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラは、天然に存在する、変異体または変異体クレブシエラ（例えば、抗生物質耐性、ファージ耐性、医原性）を指す。いくつかの実施形態では、変異体または変異体クレブシエラは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、または少なくとも5種の抗生物質に対して耐性である。いくつかの実施形態では、突然変異細菌株は、バクテリオファージの存在下で生じ、前記バクテリオファージに対して耐性になることができる。

【0020】

本明細書では、細菌の「株」とは、細菌の遺伝的変異体または亜型を指す。いくつかの実施形態では、細菌の「株」は、前記細菌の純粋培養物における単一の分離からの子孫を含む。本明細書で使用する場合、細菌の「株」とは、前記細菌の1つ以上の遺伝的変異体または亜型を指すことができる。例えば、本明細書で使用する場合、クレブシエラ・ニューモニエの「株」とは、KP1(ATCC BAA-2552; クレブシエラ・バリコラ (*Klebsiella variicola*) とも呼ばれる)、KP2(本明細書に記載される、クレブシエラ・ニューモニエ株2H7)、KP4 (ATCC 23356)、KP5 (ATCC 13882)、KP6 (ATCC BAA-1705)、KP7 (ATCC 700603)、およびKP8 (ATCC 700721) を含むが、これらに限定されない、クレブシエラ・ニューモニエの1つ以上の遺伝的変異体または亜型を指すことができる。同様に、本明細書中で使用される場合、クレブシエラ・ニューモニエの「株」を溶解し得るバクテリオファージは、KP1、KP2、KP3、KP4、KP5、KP6、KP7、およびKP8を含むがこれらに限定されない、クレブシエラ・ニューモニエの1つ以上の遺伝子改変体またはサブタイプを溶解し得るバクテリオファージを指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラ・ニューモニエの「株」を溶解することができるバクテリオファージとは、クレブシエラ・ニューモニエKP1、KP2、KP4、KP5、KP6、KP7、およびKP8の1つ以上の遺伝的変異またはサブタイプを溶解することができるバクテリオファージを指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラ・ニューモニエの「株」を溶解することができるバクテリオファージとは、クレブシエラ・ニューモニエKP2、KP4、KP5、KP6、KP7、およびKP8の1つ以上の遺伝的変異体またはサブタイプを溶解することができるバクテリオファージを指す。いくつかの実施形態では、クレブシエラ・エアロモビリス / エンテロバクター・エロゲネスの「菌株」を溶解できるバクテリオファージとは、本明細書に記載される、例えば、11E12株のような、クレブシエラ・エアロモビリス / エンテロバクター・エロゲネスKP3の1つまたは複数の遺伝的変異体またはサブタイプを溶解できるバクテリオファージを指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のKP2バクテリオファージは、クレブシエラ・ニューモニエのKP2株を溶解することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のKP3バクテリオファージは、クレブシエラ・エアロモビリスのKP3株を溶解することができる。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される「変異体」細菌は、対応する野生型細菌株に対して約85%超、約90%超、約95%超、約97%超、または約99%超の同一性を含む細菌を指す。例えば、変異KP2細菌は、野生型KP2細菌に対して約85%超、約90%超、約95%超、約97%超、または約99%超の同一性を含む（表1、コンティグ）。変異KP3細菌は、野生型KP3細菌に対して約85%超、約90%超、約95%超、約97%超、または約99%超の同一性を含む（表1）。

10

20

30

40

50

【0022】

いくつかの実施形態では、「突然変異」KP2細菌は、本明細書に開示されるKP2バクテリオファージによって溶解され得る細菌である。いくつかの実施形態では、「突然変異」KP2細菌は、野生型KP2と比較して約85%未満の同一性を含むが、本明細書に開示されるKP2バクテリオファージによって溶解され得る細菌を指す。いくつかの実施形態では、「突然変異」KP3細菌は、野生型KP3と比較して約85%未満の同一性を含むが、本明細書に開示されるKP3バクテリオファージによって溶解され得る細菌を指す。

【0023】

いくつかの実施形態において、KP2細菌（例えば、KP2細菌の株）、および／または変異KP2細菌（例えば、本明細書中に記載されるような環境単離物および／または臨床単離物）は、以下のプライマー：5' AGCACTAGCGCTGTGGTAT3' および5' ACTTACTCGGGCCCTTGAT3' を使用するPCRによって同定され得るユニークなゲノム領域について陽性である。例えば、Atarashiら、2017を参照のこと。いくつかの実施形態では、変異KP2細菌、例えば、前記プライマーを使用して同定された環境および／または臨床単離株は、KP2細菌に対して約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、または約99%超の同一性（表1、コンティグ）、例えば、ANI (Average Nucleotide Identity)によって計算されるコーディング領域の同一性%を含む。例えば、Han et al., ANI tools web: a web tool for fast genome comparison in multiple bacterial strains (2016) を参照されたい。いくつかの実施形態では、前記プライマーによって同定され、KP2細菌（表1、コンティグ）と少なくとも約99%相同である突然変異KP2細菌は、本明細書では「KP2様」と呼ばれる。いくつかの実施形態において、変異体および／またはKP2様細菌は、本明細書中に開示されるKP2バクテリオファージの少なくとも1つによって溶解され得る。

10

20

30

【0024】

本明細書で使用される場合、「バクテリオファージ」および「ファージ」は、互換的に使用され、細菌に感染することができる単離されたウイルスを指す。いくつかの実施形態では、ファージは、DNAまたはRNAゲノムを含む。いくつかの実施形態では、ファージは、天然またはヒトの環境から単離されてもよい。いくつかの実施形態では、ファージは、ミオウイルス科、ポドウイルス科、およびサイフォウイルス科から選択される。本明細書で使用される場合、「KPバクテリオファージ」は、クレブシエラ・ニューモニエまたはクレブシエラ・エアロモビリス／エンテロバクター・エロゲネス細菌を溶解することができるバクテリオファージを指すことが意図される。例えば、「KP2バクテリオファージ」は、野生型および変異型KP2細菌を含むクレブシエラ・ニューモニエ菌株KP2細菌を溶解することができるバクテリオファージを指す。「KP3バクテリオファージ」は、クレブシエラ・エアロモビリス／エンテロバクター・エロゲネス菌株KP3細菌（野生型および変異型KP3細菌を含む）を溶解し得るバクテリオファージを指す。

【0025】

所与のバクテリオファージの異なる単離物は、核酸配列レベルで変化し得ることが知られている。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、類似の表現型、例えば、類似の宿主域、類似の溶解能、および／またはしきい値配列類似性（例えば、約85%超、約90%超、約95%超、約97%超、または約99%超）を示す限り、「機能的に当量」であると考えられる。

40

【0026】

本明細書中で使用される場合、「宿主域（宿主範囲）」は、特定のファージによる感染に感受性であるバクテリアをいう。ファージの宿主域は、菌株、種、属、またはバクテリアの複数の属を含み得るが、これらに限定されない。この用語は、ファージ吸着性、非生産的感染（例えば、制限的、流産性、溶原性）、および生産的感染を包含する。いくつかの実施形態において、ファージは、2つ以上の菌株を認識し得る。いくつかの実施形態において、ファージは、野生型およびファージ耐性変異株を認識し得る。

【0027】

異なるファージ単離を、当該分野で公知の方法（例えば、プラークアッセイ、液体培地

50

アッセイ、固体培地アッセイ)を使用して調製し、そして表現型決定し得る。いくつかの実施形態では、ファージを定量および単離するための固体培地アッセイは、ブレーティング効率(EOP) (Kutter, 2009) からスポット試験(Hyman & Abedon, 2010)までの範囲のブラークアッセイ(Abedon & Yin, 2009)に基づく。いくつかの実施形態において、ブラークアッセイのために使用されるプレート形式は、例えば、シャーレから48ウェルプレートに改変され得る。

【0028】

いくつかの実施形態において、二重層ブラークアッセイを用いて、バクテリオファージ単離物を表現型決定する。例えば、4mLのBHISのスターター培養物に、プレートからの5~10個のコロニーを接種することができる。この培養物を37℃で1.5~2時間インキュベートすることができる。100μLの容量のこの培養物を100μLのファージ含有試料(または培地のみの対照)と混合し、15分間インキュベートすることができる。その後、3mLのBHISトップ寒天(1mM Ca²⁺およびMg²⁺イオンを補充した予め溶融した0.4%寒天BHIS)を添加し、混合物をBHISボトム寒天プレート(1.5%寒天BHIS)上に注ぐことができる。プレートを室温でゲル化させ、次いで、ブラークが同定されるまで37℃で2~3時間インキュベートすることができる。

【0029】

いくつかの実施形態において、改変スポットドロップアッセイを用いて、バクテリオファージ単離物を表現型決定する。例えば、4mLのBHISの種培養(starter culture)に、プレートからの5~10個のコロニーを接種することができる。この培養物を37℃で1.5~2時間インキュベートすることができる。100μLの容量のこの培養物を、3mLのBHISトップ寒天(1mM Ca²⁺およびMg²⁺イオンを補充した予め溶融した0.4%寒天BHIS)と混合し得、そして100μLのこの混合物を、1ウェルあたり1mLのBHISボトム寒天を既に含むNunc 48ウェルプレートのウェルあたり分配し得る。室温で固化させた後、プレートを37℃で30分間インキュベートし得る。この段階で、ファージまたは培地のみの対照を含む試料10μLをウェルの中間に滴下し、吸収させ、次いでブラークが計数のために見えるまで2~3時間インキュベートし得る。

【0030】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージを表現型決定するために液体培地アッセイが使用される。いくつかの実施形態において、液体ベースのファージ感染アッセイは、感染の時間経過に従い、そして固相ブラークアッセイと比較して、感染の定量的なエンドポイントより多くを提供し得る。いくつかの実施形態において、ファージを液体培地中で細菌と混合し、次いで、経時的な培養物の濁度に統いて、異なる細菌株がファージとどのように相互作用するかの間のより微細な差異(例えば、細胞溶解の時間の遅延)を識別し得る。いくつかの実施形態では、液体培地アッセイは、96ウェルプレートを使用し、プレートリーダーで光学密度を読み取ることによって、ハイスループット測定を可能にする。

【0031】

例えば、細菌株は、OD₆₀₀が約1.7~2になるまで1.5~2時間増殖させることができる。次いで、この培養物を、BHIS媒体を使用して、出発光学濃度(代表的には、0.05~0.2 OD₆₀₀の間)まで希釈し得る。次いで、200μLの容量の培養物を、Nunclon平底96ウェルプレートのウェルに分注し得る。ファージを含む10μLの試料または対照としての培地10μLを各ウェルに添加することができる。ウェルは、蒸発を制限するために50μLの鉛物油で覆われてもよく、培養物を滅菌状態に保つために、薄くて滅菌された光学的に透明なポリエチル膜が添加されてもよい。光学密度測定は、15分毎に、例えば、Tecan EV075ロボットに接続されたTecan Infinite M200プレートリーダーにおいて実施され得る。測定の間、プレートは、37℃で振盪しながら、例えばEV075インキュベーター内でインキュベートされ得る。

【0032】

いくつかの実施形態において、感染性は、固体アッセイのみにおけるブラークの存在によって判定される。いくつかの実施形態において、感染性は、液体アッセイのみにおける

10

20

30

40

50

細菌培養光学密度の低下によって判定される。いくつかの実施形態において、感染性は、液体アッセイおよび固体アッセイの両方における細菌培養物の光学密度およびプラークの存在の低下によって判定される。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「溶解性」バクテリオファージは、その過程で細菌宿主に付着し、そしてその遺伝物質を細菌宿主細胞に挿入する、毒性バクテリオファージをいう。その後、ファージは通常、溶菌性（毒性）または溶原性（テンペレート）の2つのライフサイクルのうちの1つをたどる。溶菌ファージは細胞の機構を引き継いでファージ成分をつくる。次いで、それらは、細胞を破壊または溶解し、新しいファージ粒子を放出する。溶原性ファージは、それらの核酸を宿主細胞の染色体に組み込み、細胞を破壊することなく、それを単位として複製する。特定の条件下で、溶原性ファージは、溶解サイクルに従うように誘導され得る。いくつかの実施形態では、感染後、新しいバクテリオファージ粒子が放出される。いくつかの実施形態において、感染後、宿主細菌細胞は溶解され、破壊される。いくつかの実施形態では、宿主細菌細胞の90%未満が溶解および破壊される。例えば、Abedon et al., 2011; Sulakvelidze et al., 2001; Green et al., 2017を参照のこと。

10

【0034】

いくつかの実施形態では、溶解%は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載される方法によって、例えば、光学密度（OD）またはqPCRによって測定される。

20

【0035】

本明細書中で使用される場合、「%同一性」は、配列アラインメントプログラムを使用して第2の核酸またはアミノ酸配列にアラインメントされた場合の、第1の核酸またはアミノ酸配列間の核酸配列同一性またはアミノ酸配列同一性のレベルをいう。第1および第2の配列中の位置が同じ核酸またはアミノ酸によって占有される場合（例えば、第1の核酸配列および第2の核酸配列中の位置がシットシンによって占有される場合）、第1および第2の配列はその位置で相同である。

30

【0036】

一般に、2つの配列間の同一性は、比較される位置の総数にわたって2つの配列によって共有される一致または相同位置の数から計算される。いくつかの実施形態では、第1および第2の配列は、%同一性を最大にするように整列される。いくつかの実施形態では、%同一性は、2つの配列の短い方に対する%同一性を指す。いくつかの実施形態では、核酸配列の同一性%は、イントロン領域および/または遺伝子間領域を含む。同一性%の例示的なレベルには、第1の配列と第2の配列との間の80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%以上の配列同一性が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0037】

2つの配列間の同一性%を決定するために使用され得る例示的な配列アラインメントプログラムには、FASTA包装体（精密（SSSEARCH、LALIGN、GGSEARCHおよびGLSEARCHを含む）および発見的（FASTA、FASTX/Y、TFASTX/YおよびFASTS/M/F）アルゴリズム、エンボス包装体（ニードル（Needle）、ストレッチャー、水およびマッチャー）、BLASTプログラム（BLASTN、BLASTX、TBLASTX、BLASTTP、TBLASTNを含むがこれらに限定されない）、メガblastおよびBLATが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、配列アラインメントプログラムはBLASTNである。例えば、95%同一性とは、全ての非重複アラインメントセグメント(BLAST HSP)を組み合わせ、それらの同一のマッチングの数を合計し、そしてこの合計をより短い配列の長さで割ることによって、BLASTNによって決定される95%配列同一性をいう。

40

【0038】

いくつかの実施形態では、配列アラインメントプログラムは、基本的な局部アラインメントプログラム、例えば、BLASTである。いくつかの実施形態では、配列アラインメントプログラムは、ペアワイズグローバルアラインメントプログラムである。いくつかの実施

50

形態において、ペアワイズグローバルアラインメントプログラムは、タンパク質 - タンパク質アラインメントのために使用される。いくつかの実施形態では、ペアワイズグローバルアラインメントプログラムはニードルである。いくつかの実施形態では、配列アラインメントプログラムは、多重アラインメントプログラムである。いくつかの実施形態では、多重アラインメントプログラムはMAFFTである。いくつかの実施形態では、配列アラインメントプログラムは、全ゲノムアラインメントプログラムである。いくつかの実施形態において、全ゲノムアラインメントは、BLASTNを使用して行われる。いくつかの実施形態において、BLASTNは、デフォルトパラメータに対するいかなる変化もなしに利用される。

【0039】

本明細書中で使用される場合、「医薬組成物」は、生理学的に適切なキャリアおよび/または賦形剤などの他の成分を有する本発明のバクテリオファージの調製物をいう。

10

【0040】

「生理学的に受容可能なキャリア」および「薬学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中では、生物に有意な刺激を引き起こさず、そして投与されたバクテリオファージ組成物の生物学的活性および特性を阻害しないキャリアまたは希釈剤を指すために、互換的に使用される。アジュバントは、これらの語句の下に含まれる。

【0041】

用語「賦形剤」は、活性成分の投与をさらに促進するために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。例としては、重炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖およびデンプンの型、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および界面活性剤（例えば、ポリソルベート20を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0042】

用語「処置有効量」および「処置有効量」は、未処置対照と比較して、予防、症状の発症の遅れ、またはIBDの症状の改善をもたらす化合物の量を指すために使用される。処置有効量は、例えば、未処置対照と比較して、IBDの1つ以上の症状の発生の処置、予防、重症度の低減、発症の遅延、および/またはリスクの低減に十分であり得る。

【0043】

本明細書で使用される場合、「腸」とは、哺乳動物の消化管をいい、食品の移動・消化、栄養素の吸入、老廃物の排出を担う臓器、腺、管、系を指す。ヒトでは、「腸」とは、口で始まり肛門で終わる消化管、さらに食道、胃、小腸、大腸を含む。上部消化管は、食道、胃、および小腸の十二指腸を含む。下部消化管は、小腸の残り、すなわち空腸および回腸、ならびに大腸の全て、すなわち盲腸、結腸、直腸、および肛門管を含む。バクテリアは、腸全体に見出すことができる。本明細書中で使用される場合、口は、口内の組織、例えば、哺乳動物の口内の任意の軟組織、咽頭などを包含する。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、腸の異なる部分が疾患に関連し得る。CDにおいて、例えば、バクテリオファージは、小腸、結腸、回腸、回盲ジャンクション、食道、口、および/または肛門に存在するバクテリアを標的とするように処方され得る。UCにおいて、例えば、バクテリオファージは、哺乳動物の結腸、直腸、肛門、および大腸に存在するバクテリアを標的とするように処方され得る。

40

【0045】

本明細書で使用される冠詞「a」および「an」は、反対のことが明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

【0046】

語句「および/または」は、リスト内の要素間で使用される場合、（1）列挙された単一の要素のみが存在すること、または（2）リストの複数の要素が存在することのいずれかを意味することが意図される。例えば、「A、B、および/またはC」は、選択がA単独、B単独、C単独、AおよびB、AおよびC、BおよびC、またはA、BおよびCであってもよいことを示す。語句「および/または」は、リスト内の要素の「少なくとも1つ」または「1つ以上」と交換可能に使用されてもよい。

50

【 0 0 4 7 】

全ての範囲は、終点を含む。引用された全ての参考文献は、任意の目的（矛盾がある場合明細書が制御する）のために組み込まれる。単数形は複数を含む。

バクテリオファージ**【 0 0 4 8 】**

本明細書中に記載されるバクテリオファージは、IBD（例えば、潰瘍性大腸炎、クローアン病）に関連する1つ以上のクレブシエラ細菌株を溶解し得る。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、IBDに関連する1つ以上のクレブシエラ・ニューモニコ細菌株を溶解することができる。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、IBDに関連する1つ以上のクレブシエラ・エアロモビリス細菌株を溶解することができる。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、哺乳動物において1つ以上のクレブシエラ菌を溶解することによってIBDを制御することができる。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、哺乳動物の腸内で1つ以上のクレブシエラ菌を溶解することによってIBDを制御することができる。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、哺乳動物の口内で1つ以上のクレブシエラ菌を溶解することによってIBDを制御することができる。

10

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、バクテリオファージは、1つ以上のクレブシエラ菌を溶解することによって、プロトンポンプ阻害剤（PPI）治療（Juillerat et al., 2012）に関連するIBDを制御することができる。いくつかの実施形態において、バクテリオファージは、1つ以上のクレブシエラ菌を溶解することによって、原発性硬化性胆管炎に関連するIBDを制御することができる（Hirschfield et al., 2013; Palmela et al., 2017）。

20

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2W - P0101、KP2W - P0102、KP2W - P0103、KP2W - P0104、KP2W - P0105、KP2W - P0106、KP2W - P0107、KP2WP0108、およびKP2W - P0109から選択される。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定してKP2W - P0101の配列に対して少なくとも約83%、少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含むバクテリオファージからさらに選択される。この段落で同定されるバクテリオファージは、「グループ1」バクテリオファージと呼ばれ、本明細書中に記載される細菌株に感染し得る（例えば、図3および図5を参照のこと）。

30

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2M - P0201、KP2W - P0202、KP2M - P0203、KP2M - P0204、KP2M - P0205、KP2M - P0205、KP2M - P0207、KP2M - P0208、KP2M - P0209、KP2M - P0210、KP2M - P0210、KP2M - P0211、KP2M - P0212から選択される。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定してKP2M - P0201の配列に対して少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含むバクテリオファージからさらに選択される。この段落で同定されるバクテリオファージは、「グループ2」バクテリオファージと呼ばれ、本明細書中に記載される細菌株に感染し得る（例えば、図3および図5を参照のこと）。

40

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2W - M0102、KP2W - M0103、KP2W - M0104、KP2M - M0105、KP2W - M0106、KP2W - M0107、KP2M - M0108、KP2M - M0109、KP2M - M0110、KP2M - M0111、KP2M - M0112から選択される。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定してKP2W - M0102の配列に対して少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含むバクテリオファージからさらに選択される。この段落で同定されるバクテリオファージは、「グループ3」バクテリオファージと呼ばれ、本明細書中に記載される細菌株に感染し得る（例えば、図3および図5を参照のこと）。

50

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP3W - P0101、KP3W - P0102、KP3W - P0103、KP3W - P0104、KP3W - P0105、KP3W - P0106、KP3W - P0107、KP3W - P0108、KP3W - P0109、KP3W - P0110、KP3W - P0111、KP3W - P0112、KP3W - P0113、KP3W - P0114、KP3W - P0201、KP3W - P0202、およびKP3W - P0203から選択される。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定して、KP3W - P0101の配列に対して少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定して、KP3W - P0201の配列に対して少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含む。この段落で同定されたバクテリオファージは、「グループ4」バクテリオファージと呼ばれ、本明細書に記載の細菌株に感染することができる。例えば、図3および図6を参照のこと。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP3W - S0101、およびKP3W - S0102から選択される。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、BLASTNによって測定してKP3W - P0201の配列に対して少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の同一性を含むバクテリオファージからさらに選択される。この段落で同定されたバクテリオファージは、「グループ5」バクテリオファージと呼ばれ、本明細書に記載の細菌株に感染することができる。例えば、図3および図6を参照のこと。

20

【0055】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2に感染することができるが、ATCC BAA - 2552 (KP1)、KP3、ATCC 23356 (KP4)、ATCC 13882 (KP5)、ATCC BAA - 1705 (KP6)、ATCC 700603 (KP7)、またはATCC 700721 (KP8)のいずれにも感染することができない。例えば、図3および図5を参照のこと。

【0056】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP3に感染することができるが、ATCC BAA - 2552 (KP1)、KP2、ATCC 23356 (KP4)、ATCC 13882 (KP5)、ATCC BAA - 1705 (KP6)、ATCC 700603 (KP7)、またはATCC 700721 (KP8)のいずれにも感染することができない。例えば、図3および図5を参照のこと。

30

【0057】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2およびKP4に感染することができるが、ATCC BAA - 2552 (KP1)、KP3、ATCC 13882 (KP5)、ATCC BAA - 1705 (KP6)、ATCC 700603 (KP7)、またはATCC 700721 (KP8)のいずれにも感染することができない。例えば、図3および図5を参照のこと。

【0058】

いくつかの実施形態において、ファージ感染の間に、ファージに対して耐性である変異細菌株が生じる。いくつかの実施形態では、ファージが突然変異細菌を標的とすることが有益である。前記ファージを産生するために、バクテリアは、本明細書に開示される1つ以上のファージをインキュベート (incubate) されて、変異菌株を生成し得る。次いで、新しいファージを同定するために、突然変異細菌株に感染することができるファージについて、環境および臨床試料をスクリーニングすることができる。次いで、ファージの力価は、細菌細胞からの新しいファージの効率的な付着、侵入、増幅および放出を可能にするように選択される。例示的な突然変異KP2菌株が本明細書に記載されている。例えば、表1 (コンティグ) を参照されたい。いくつかの実施形態において、変異細菌株は、対象が本明細書中に開示されるファージで処置される場合、インビボで起こり得る変異を反映する。いくつかの実施形態では、変異細菌株に感染し、溶解することができるバクテリオファージを生成することができる。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージは、未修飾KP2および/またはKP3バクテリア、ならびに耐性KP2および/またはKP3変異体を処置することができる。

40

50

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2およびMKP2_2161_1、MKP2_2161_C、MKP2_251_B、MKP2_251_C、MKP2_251_D、およびMKP2_coc_1から選択される少なくとも1つの細菌、少なくとも2つの細菌、少なくとも3つの細菌、少なくとも4つの細菌、または少なくとも5つの細菌に感染することができる。例えば、図5を参照のこと。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、KP2、KP4、およびMKP2_2161_1、MKP2_2161_C、MKP2_251_B、MKP2_251_C、MKP2_251_D、およびMKP2_coc_1から選択される少なくとも1つの細菌、少なくとも2つの細菌、少なくとも3つの細菌、少なくとも4つの細菌、または少なくとも5つの細菌に感染することができる。例えば、図5を参照のこと。

10

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、MKP2_2161_1、MKP2_2161_C、MKP2_251_B、MKP2_251_C、MKP2_251_D、およびMKP2_coc_1から選択される少なくとも1つの細菌に感染することができる。例えば、図5を参照のこと。

【 0 0 6 2 】

本明細書中で使用される場合、溶解性バクテリオファージ「カクテル」は、本明細書中に記載される溶解性バクテリオファージの少なくとも2つの異なる単離物を含む組成物をいい、本明細書中で使用される場合、「a」または「one」バクテリオファージは、バクテリオファージの単離物または型をいい、そして必ずしも单一のバクテリオファージ粒子を指すことを意図されない。

20

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP2バクテリオファージを含み、野生型KP2バクテリアに感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP2バクテリオファージを含み、突然変異KP2バクテリアに感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP2バクテリオファージを含み、野生型KP2細菌および突然変異KP2細菌に感染することができる。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP3バクテリオファージを含み、野生型KP3バクテリアに感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP3バクテリオファージを含み、突然変異KP3バクテリアに感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるKP3バクテリオファージを含み、野生型KP3細菌および突然変異KP3細菌に感染することができる。

30

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも2つの異なるタイプのKP2バクテリオファージを含み、KP3バクテリオファージを含まない。いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも2つの異なるタイプのKP3バクテリオファージを含み、KP2バクテリオファージを含まない。いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも1つのタイプのKP2バクテリオファージおよび少なくとも1つのタイプのKP3バクテリオファージを含む。いくつかの実施形態では、カクテルは、ただ1つのタイプのKP2バクテリオファージおよびただ1つのタイプのKP3バクテリオファージを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも2つのファージを含むカクテルは、単一のファージと比較して宿主域を広げる。いくつかの実施形態において、少なくとも2つのファージを含むカクテルは、単一のファージと比較して、ファージ耐性細菌の出現を減少させる。

40

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも1つのKP2バクテリオファージおよび本明細書に記載の少なくとも1つのKP3バクテリオファージを含み、野生型KP2細菌および野生型KP3細菌に感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも1つのKP2バクテリオファージおよび本明細書に記載の少なくとも1つのKP3バクテリオ

50

ファージを含み、野生型KP2細菌、突然変異ファージ耐性KP2、および／または野生型KP3細菌に感染することができる。いくつかの実施形態では、カクテルは、少なくとも1つのKP2バクテリオファージおよび本明細書に記載の少なくとも1つのKP3バクテリオファージを含み、野生型KP2細菌、突然変異ファージ耐性KP2、野生型KP3細菌、および／または突然変異ファージ耐性KP3に感染することができる。

【0067】

いくつかの実施形態では、カクテルは、KP2W - P0105+KP2M - P0203 ; KP2M - P0203+KP2W - M0104 ; KP2W - P0105+KP2W - M0104 ; KP2W - P0102+KP2M - P0209 ; KP2M - P0209+KP2W - M0107 ; KP2W-P0102+KP2W-M0107 ; KP2W - P0109+KP2M - P0211 ; KP2M - P0211+KP2M - M0112 ; またはKP2W - P0109+KP2M - M0112 - M0112を含む。いくつかの実施形態では、カクテルは、KP2W - P0105、KP2W - P0102、およびKP2W - P0109から選択される少なくとも1つのバクテリオファージ；KP2M - P0203、KP2M - P0209、およびKP2M - P0211から選択される少なくとも1つのバクテリオファージ；ならびにKP2W - M0104、KP2W - M0107、およびKP2M - M0112から選択される少なくとも1つのバクテリオファージを含む。いくつかの実施形態では、カクテルは、KP2W - P0105+KP2M - P0203+KP2W - M0104 ; KP2W - P0102+KP2M - P0209+KP2W - M0107 ; KP2W - P0109+KP2M - P0211+KP2M - M0112 ; KP2W-P0105+KP2M-P0209+KP2M-M0112KP2W-P0102+KP2M-P0211+KP2W-M0104 ; またはKP2W-P0109+KP2M-P0203+KP2W-M0107を含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージまたはカクテルは、対象の微生物叢に大きな影響を及ぼさない。いくつかの実施形態では、バクテリオファージまたはカクテルは、対象の共生バクテリアに大きな影響を及ぼさない。いくつかの実施形態では、バクテリオファージまたはカクテルは、対象のプロバイオティックバクテリアに大きな影響を及ぼさない。いくつかの実施形態において、バクテリオファージまたはカクテルは、バクテリオファージの天然宿主域が、例えば、KP2またはKP3に限定されるため、微生物叢、共生細菌、またはプロバイオティック細菌に天然に影響を及ぼすことができない。

【0069】

いくつかの実施形態では、細菌に特異的なバクテリオファージは、前記細菌によって排他的に発現される特異的受容体および／または付着部位を認識することができる。いくつかの実施形態では、KP2バクテリオファージは、KP2バクテリアに「特異的」である。例えば、KP2バクテリオファージは、ラークアッセイ、ODアッセイ、ファージ吸着アッセイ、またはバクテリオファージがバクテリアに入り、増殖し、出ることを示す任意の他のアッセイにおいて、インビトロ (in vitro) またはインビボ (in vivo) アッセイにおいて、KP2バクテリアにより多くのビリオンを感染および／または生産的に生成することができる。いくつかの実施形態では、KP3バクテリオファージは、KP3バクテリアに「特異的」である。例えば、KP3バクテリオファージは、インビトロまたはインビボアッセイ、例えば、ラークアッセイ、ODアッセイ、ファージ吸着アッセイ、またはバクテリオファージがバクテリアに入り、増殖し、出ることを示す任意の他のアッセイにおいて、KP3バクテリアにおいてより多くのビリオンを感染および／または生産的に生成することができる。

バクテリア溶解

【0070】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージは、免疫および／または炎症応答を誘導する有害なクレブシエラ菌を溶解することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージは、例えば、炎症誘発活性を増強することによって、腸における免疫恒常性のバランスを破壊し、最終的に慢性腸炎症をもたらす有害なクレブシエラ菌を溶解することができる。いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるバクテリオファージは、Tヘルパー-1 (TH1) 細胞応答を誘導する有害なクレブシエラ細菌を溶解し得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージによって溶解されるクレブシエラ菌は、管腔内にある。いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるバクテリオファージによって溶解されるべきクレ

10

20

30

40

50

ブシェラ細菌は、上皮に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージによって溶解されるクレブシエラ菌は、回腸の粘膜層と粘膜下層との間、例えばクローン病 (Chiodini al., 2015) にある。

【0071】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージは、IBD、例えば潰瘍性大腸炎またはクローン病に関連する有害なKP2および/またはKP3バクテリアを溶解することができ、疾患またはその少なくとも1つの症状を改善するために投与することができる。いくつかの実施形態では、潰瘍性大腸炎と比較して、クローン病に関連するKP2バクテリアの発生率が高い。しかしながら、対象がKP2細菌の存在に関連する潰瘍性大腸炎を有する実施形態では、本明細書中に提供されるバクテリオファージは、これらの細菌を溶解し、潰瘍性大腸炎またはその少なくとも1つの症状を改善するために投与され得る。

10

【0072】

胃酸分泌を阻害する薬剤、例えば、プロトンポンプ阻害剤、および原発性硬化性胆管炎 (PSC) は、IBDの経過を変化させ得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバクテリオファージは、プロトンポンプ阻害剤療法またはPSCに関連する有害なKP2および/またはKP3バクテリアを溶解することができ、プロトンポンプ阻害剤療法またはPSCに関連するIBDの少なくとも1つの症状を改善するために投与することができる。

医薬組成物

【0073】

本明細書中に記載されるバクテリオファージを含む医薬組成物は、IBDを制御するために使用され得る。1つ以上のバクテリオファージを単独で、または予防剤、処置薬剤、および/または薬学的に許容可能な担体と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の1つのバクテリオファージを含む。代替の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の2つ以上のバクテリオファージを含む。

20

【0074】

本明細書に記載の医薬組成物は、医薬用途のための組成物への活性成分の処理を容易にする賦形剤および助剤を含む1つ以上の生理学的に許容される担体を使用して、従来の方法で製剤化することができる。医薬組成物を製剤化する方法は、当該分野で公知である（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co., Easton, PAを参照のこと）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、錠剤化、凍結乾燥、直接圧縮、従来の混合、再溶解、造粒、微粉化、乳化、カプセル化、封入、捕捉、または噴霧乾燥に供されて、タブレット、顆粒、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、マイクロ錠剤、ペレット、または紺体を形成し、これらは腸溶コーティングされていてもコーティングされていなくてもよい。適切な配合組成は、投与経路に依存する。

30

【0075】

本明細書中に記載されるバクテリオファージは、任意の適切な投薬形態（例えば、経口投与のための液体、カプセル、小袋、硬カプセル、軟カプセル、タブレット、腸溶コーティングタブレット、紺体懸濁液、顆粒、またはマトリックスの持続放出形成）において、および任意の適切な型の投与（例えば、経口、局所、注射可能、即時放出、拍動放出、遅延放出、または持続放出）のために、医薬組成物に処方され得る。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、経口洗浄、ロゼンジ、ストリップ、またはガムとして投与するために製剤化される。組成物は、毎日、毎週、または毎月1回以上投与することができる。

40

【0076】

バクテリオファージは、1つ以上の薬学的に受容可能なキャリア、増粘剤、希釈剤、バッファー、緩衝剤、界面活性剤、中性またはカチオン性脂質、脂質複合体、リポソーム、浸透促進剤、キャリア化合物、および他の薬学的に受容可能なキャリアまたは薬剤を含む薬学的組成物に処方され得る。例えば、医薬組成物は、重炭酸カルシウム、重炭酸ナトリ

50

ウム、リン酸カルシウム、種々の糖およびデンプンの型、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および界面活性剤（例えば、ポリソルベート20を含む）の付加を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、重炭酸ナトリウムの溶液、例えば、重炭酸ナトリウムの1モル溶液（例えば、胃などの酸性細胞環境を緩衝するため）中に製剤化されてもよい。バクテリオファージは、中性または塩類形態として投与および製剤化され得る。薬学的に許容される塩類には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるものなどのアニオンで形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエチルアルコール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるものなどのカチオンで形成されるものが含まれる。

10

【0077】

バクテリオファージは、経口投与され得、そしてタブレット、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー液、懸濁液などとして処方され得る。経口使用のための薬理学的組成物は、固体賦形剤を使用して作製することができ、場合により、得られた混合物を粉碎し、所望であれば、適当な補助を添加した後、顆粒の混合物を加工して、タブレットまたは糖衣錠コアを得る。好適な賦形剤には、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤；トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ポテトスター、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウムなどのセルロース組成物；および／またはポリビニルピロリドン（PVP）またはポリエチレングリコール（PEG）などの生理学的に許容されるポリマーが含まれるが、これらに限定されない。架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどのそれらの塩類物などの崩壊剤を添加することもできる。

20

【0078】

いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、哺乳動物の口への送達のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤を含み、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤は、性質と一緒に存在しない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤を含み、薬学的に許容される賦形剤は、天然に存在しない賦形剤である。

30

【0079】

いくつかの実施形態において、バクテリオファージは、哺乳動物腸への送達のために処方される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤を含み、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤は、性質と一緒に存在しない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バクテリオファージおよび薬学的に許容される賦形剤を含み、薬学的に許容される賦形剤は、天然に存在しない賦形剤である。

【0080】

タブレットまたはカプセルは、結合剤（例えば、予め糊化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ショ糖、グルコース、ソルビトール、デンプン、ガム、カオリン、およびトラガカント）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、カルシウム、アルミニウム、亜鉛、ステアリン酸、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、安息香酸ナトリウム、L-ロイシン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えば、デンプン、ポテトスター、デンブングリコール酸ナトリウム、糖類、セルロース誘導体、シリカ紛体）；または濡れ剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤を用いて、従来の平均によって調製することができる。タブレットは、当技術分野で周知の方法によってコーティングすることができる。コーティングシェルが存在してもよく、一般的なメンブレンには、これらに限定されないが、ポリラクチ

40

50

ド、ポリグリコール酸、ポリ無水物、その他の生分解性ポリマー、アルギン酸塩 - ポリリジン - アルギン酸塩 (APA) 、アルギン酸塩 - ポリメチレン - コ - グアニジン - アルギン酸塩 (A - PMCG - A) 、ヒドロキシメチルアクリレート - メチルメタクリレート (HEMA - MMA) 、多層HEMA - MMA - MAA 、ポリアクリロニトリルビニルクロリド (PAN - PVC) 、アクリロニトリル/メタリルスルホン酸ナトリウム (AN - 69) 、ポリエチレングリコール/ポリベンタメチルシクロペンタシロキサン / ポリジメチルシロキサン (PEG / PD5 / PDMS) 、ポリN, N - ジメチルアクリルアミド (PDMAAm) 、ケイ酸質カプセル、硫酸セルロース/アルギン酸ナトリウム / ポリメチレン - コ - グアニジン (CS / A / PMCG) 、酢酸フタル酸セルロース、アルギン酸カルシウム、k - カラギーナン - イナゴマメガムゲルビーズ、ジェラン - キサンタンビーズ、ポリ (ラクチド - コ - グリコリド) 、カラギーナン、澱粉ポリ無水物、デンプンポリメタクリレート、ポリアミノ酸、および腸溶性コーティングポリマー、が含まれる。

10

【0081】

いくつかの実施形態において、バクテリオファージは、腸または腸の特定の領域への放出のために腸溶性にコーティングされる。胃から結腸までの典型的なpH輪郭は、約1~4 (胃) 、5.5~6 (十二指腸) 、7.3~8.0 (回腸) 、および5.5~6.5 (結腸) である。いくつかの疾患において、pH輪郭は変更され得る。いくつかの実施形態において、コーティングは、放出部位を特定するために、特異的なpH環境において分解される。

20

【0082】

経口投与のための液剤は、使用前に水または他の好適なビヒクルで構成するために、溶液、シロップ、懸濁液、または乾燥生成物の形成をとってもよい。このような液状調製物は、懸濁剤 (例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂肪) ; 乳化剤 (例えば、レシチンまたはアカシア) ; 非水性ビヒクル (例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、または分画植物油) ; および防腐剤 (例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸塩またはソルビン酸) などの薬学的に許容される薬剤を用いて従来の方法で調製され得る。調製物はまた、緩衝液塩類、香味剤、着色剤、および甘味剤を適宜含有してもよい。経口投与のための調製物は、バクテリオファージの徐放、制御放出、または徐放のために適切に処方され得る。

30

【0083】

特定の実施形態において、バクテリオファージは、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体と共に経口投与され得る。化合物はまた、硬質または軟質シェルゼラチンカプセルに封入されてもよく、タブレットに圧縮されてもよく、または対象の食事に直接的に組み込まれてもよい。経口処置投与のために、化合物は、賦形剤と共に組み込まれ得、そして摂取可能なタブレット、頬側タブレット、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハーなどの形態で使用され得る。非経口投与以外によって化合物を投与するためには、化合物を、その不活性化を防ぐための物質で被覆するか、または化合物と一緒に投与することが必要であり得る。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、口への送達のために経口投与され、口内に存在するバクテリアを溶解することができる。いくつかの実施形態では、バクテリオファージは、腸への送達のために経口投与され、腸内に存在するバクテリアを溶解することができる。

40

【0084】

いくつかの実施形態において、組成物は、腸内投与、空腸内投与、十二指腸内投与、回腸内投与、胃分流投与、または結腸内投与のために、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、または腸溶コーティングされているかまたはコーティングされていないマイクロタブレットを介して製剤化される。医薬組成物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドのような従来の坐剤塩基類を使用して、坐剤または停滞性注腸剤のような直腸組成物に製剤化され得る。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳剤であってもよく、懸濁、安定化および / または分散剤を含有してもよい。

【0085】

いくつかの実施形態において、薬学的に受容可能な組成物は、単一の剤形である。單一

50

の剤形は、液体または固体形態であり得る。単一の剤形は、改変することなく患者に直接投与され得るか、または投与の前に希釈もしくは再構成され得る。特定の実施形態では、単一投薬形態は、複数タブレット、カプセル、丸剤などを含む経口用量を含む、例えば、単回注射、単回経口用量などの、丸薬形態で投与されてもよい。代替の実施形態では、単一の剤形は、ある期間にわたって、例えば、注入によって投与されてもよい。医薬組成物の単一剤形は、医薬組成物を、より小さなアリコート、単一用量容器、単一用量液剤形、またはタブレット、顆粒、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、マイクロ錠剤、ペレット、もしくは紺体などの単一用量固体剤形に分割することによって調製することができ、これらは腸溶コーティングされていてもコーティングされていなくてもよい。固体形態の単回用量は、患者に投与する前に、液体、典型的には滅菌水または生理食塩水を添加することによって再構成することができる。

10

【0086】

他の実施形態では、組成物は、制御放出または持続放出系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用して、制御放出または持続放出を達成することができる。別の実施形態では、ポリマー材料を使用して、本開示の治療の制御放出または持続放出を達成することができる（例えば、米国特許第5,989,463号を参照されたい）。徐放性配合組成において使用されるポリマーの例としては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(Nビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられるが、これらに限定されない。徐放性配合組成で使用される重合体は、不活性であり、浸出性不純物を含まず、貯蔵時に安定であり、滅菌され、そして生分解性であり得る。いくつかの実施形態では、制御または持続放出系は、予防または処置標的の近傍に配置することができ、したがって、全身用量のほんの一部しか必要としない。当業者に公知の任意の適切な技術が使用され得る。

20

【0087】

投薬レジメンは、治療応答を提供するように制御され得る。投与は、疾患の重症度および応答性、投与経路、処置の時間経過（数日から数ヶ月から数年）、および疾患の改善までの時間を含むいくつかの因子に依存し得る。例えば、単一のボーラスが一度に投与されてもよく、いくつかの分割された用量が所定時間にわたって投与されてもよく、用量は、治療状況によって示されるように減少または増加されてもよい。

30

【0088】

いくつかの実施形態において、成分は、別々に供給されるか、または単位投薬形態で一緒に混合されるかのいずれかである。医薬組成物は、薬剤の量を示すアンプルまたは小袋などの密閉容器に包装することができる。1つの実施形態において、1つ以上の医薬組成物は、密閉された容器内で乾燥滅菌凍結乾燥紺体または無水濃縮物として供給され、そして対象への投与のために適切な濃度に（例えば、水または生理食塩水で）再構成され得る。一実施形態では、予防剤または治療剤または医薬組成物のうちの1つ以上は、密閉された容器内で乾燥滅菌凍結乾燥紺体として供給され、投与前に再構成される。凍結保護剤、主に0~10%ショ糖（最適には0.5~1.0%）を凍結乾燥剤形に含めることができる。他の適切な凍結保護剤としては、トレハロースおよびラクトースが挙げられる。他の適切な增量剤としては、グリシンおよびアルギニンが挙げられ、これらのいずれかは、0~0.05%の濃度で含まれ得；およびポリソルベート-80（最適には、0.005~0.01%の濃度で含まれる）が挙げられる。追加の界面活性剤としては、ポリソルベート20およびBRIJ界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。医薬組成物は、注射可能な溶液として調製することができ、アジュバントとして有用な薬剤、例えば、吸収または分散を増加させるために使用されるもの、例えば、ヒアルロニダーゼをさらに含むことができる。

40

処置方法

【0089】

50

バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／またはバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を使用して哺乳動物においてIBDを処置する方法が提供される。いくつかの実施形態では、IBDの処置方法は、本明細書に記載のKP2および／またはKP3バクテリオファージを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、クローン病の処置法は、本明細書に記載のKP2および／またはKP3バクテリオファージを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、潰瘍性大腸炎の処置法は、本明細書に記載のKP2および／またはKP3バクテリオファージを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、原発性硬化性胆管炎に関連するIBDを処置する一方は、本明細書に記載のKP2および／またはKP3バクテリオファージを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、IBDは、プロトンポンプインヒビター処置と関連し得、対象は、プロトンポンプインヒビター処置の前、間、または後に、本明細書中に記載されるKP2および／またはKP3バクテリオファージを投与され得る。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、IBDを処置する方法は、クレブシエラ菌に感染していると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書に記載のバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IBDを処置する方法は、クレブシエラ・ニューモニエ菌に感染していると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書に記載のバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IBDを処置する方法は、クレブシエラ・ニューモニエKP2菌に感染していると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書に記載のバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IBDを処置する方法は、クレブシエラ・エアロモビリス菌に感染していると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書に記載のバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IBDを処置する方法は、クレブシエラ・エアロモビリスKP3菌に感染していると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書に記載のバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与することを含む。

20

【0091】

いくつかの実施形態において、バクテリオファージおよび処置方法は、予防的に使用される。例えば、この方法は、IBDに感受性であると判定された哺乳動物に、バクテリオファージ、バクテリオファージカクテル、および／または本明細書中に記載されるバクテリオファージまたはバクテリオファージカクテルを含む医薬組成物を投与する工程を包含する。

30

【0092】

いくつかの実施形態において、IBDへの感受性は、炎症や免疫調節、組織リモデリング、腫瘍形成、アポトーシス（例えば、NOD2、HLA-27、ATG16L1、インターロイキン、CCLおよびCCR遺伝子、SOD遺伝子、MMP、JAK、STAT、TIMP遺伝子、およびSuzuki et al., 2012で説明されている他の多くのもの）およびオートファジーに関連する遺伝子（Jostins et al., 2012）；他の免疫状態の存在（兄弟病）、例えば、自己免疫障害、ベーチェット病、移植片対宿主病、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、多発性筋炎、自己免疫性慢性活動性肝炎、尋常性天疱瘡、結節性多発動脈炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、ループス腎炎、血小板輸血不応性I型糖尿病、強直性脊椎炎、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、喘息、および関節リウマチ（Suzuki et al., 2012）；急性胃腸炎（Raposo et al., 2017）；微生物叢の調整を通じて免疫応答と炎症状態に影響を与えることが示されている食物成分、例えば、高炭水化物および動物性脂肪食、赤身肉と加工肉、タンパク質、アルコール飲料、硫黄、硫酸塩の加工食品の大量摂取（Ra

40

50

poso et al., 2017) ; 生活習慣（西部の衛生基準と衛生状態の改善）；薬（抗生物質およびステロイド）、特に小児期に使用された場合、微生物叢の組成に変化をもたらす (Raposo et al., 2017) ; 栄養素に依存するエピジェネティックなメカニズム、例えば、葉酸とセレン (DNAメチル化 (Raposo et al., 2017) ; 汚染物質、座りがちなライフスタイルと喫煙 (Raposo et al., 2017) ; 地理 (Hold et al., 2014) ; 家族におけるIBDの歴史 (Baumgart and Sandborn, 2012; Neurath, 2014) に関する遺伝子座や遺伝子を含む腸内の免疫機能に関連する遺伝子または遺伝子座の変異の存在によって決定される、IBDを獲得する遺伝的感受性によって測定される。

【0093】

いくつかの実施形態において、バクテリオファージは、所望の処置効果を達成するため10に2回以上投与される。たとえば、宿主バクテリアが破壊されると、そのバクテリアに感染したバクテリオファージは、その宿主が根絶されて消化管から除去される可能性があるため、増殖できなくなり、例えば、少なくとも1日2回、少なくとも毎日、少なくとも毎週、または少なくとも毎月、バクテリオファージの再投与が必要になるかもしれない。

【0094】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるファージは、抗炎症薬、食事療法、プロバイオティクスなどを含む、IBDのための1つ以上の既知の適切な薬剤と組み合わせて投与されてもよい。

ファージで処置される対象を決定する方法

【0095】

処置に応答する対象を選択する方法が、本明細書中に提供される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法による処置に応答する対象を選択する方法は、(1)生物学的試料を、例えば、対象の腸または口から得ること、(2)生物学的試料から得られた細菌を培養すること、(3)培養された細菌に本明細書に記載のバクテリオファージを接種すること、および(4)バクテリオファージによって溶解される培養された細菌の量を測定することを含む。いくつかの実施形態において、溶解は、本明細書中に記載されるように、液体培地アッセイおよび/または固体培地アッセイによって判定される。いくつかの実施形態では、腸試料から培養されたバクテリアを用いた溶解の量を、対照、例えば、別の非感染対象または感染前の同じ対象からの試料から得られた試料と比較する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるファージは、任意の溶解がインビトロおよび/またはインビボでファージによって媒介される場合、KP感染を処置するために適切である。いくつかの実施形態において、対象から培養されたバクテリアの検出可能な部分がバクテリオファージによって溶解される場合、対象はクレブシエラに感染していると判定される。いくつかの実施形態において、培養されたバクテリアの検出可能な部分がKP2バクテリオファージによって溶解される場合、対象は、クレブシエラ・ニューモニエ(KP2)に感染していると判定される(例えば、表5を参照のこと)。いくつかの実施形態において、培養された細菌の検出可能な部分がKP3バクテリオファージ、例えば、KP3W-P0101、KP3W-P0102、KP3W-P0103、KP3W-P0104、KP3W-P0105、KP3W-P0106、KP3W-P0107、KP3W-P0108、KP3W-P0109、KP3W-P0110、KP3W-P0111、KP3W-P0112、KP3W-P0113、KP3W-P0114、KP3W-P0201、KP3W-P0202、KP3W-P0203、KP3W-S0101、KP3W-S0101、またはそれらの変異体もしくは突然変異体によって溶解された場合、対象はクレブシエラ・エアロモビリス(KP3)に感染していると判断される。

【0096】

いくつかの実施形態では、生物学的試料は、経口試料または痰、生検、または糞便である。いくつかの実施形態において、バクテリオファージによって溶解される培養細菌の量を判定することは、細菌試料のKP2特異的qPCR、細菌試料のKP3特異的qPCR、および/または本明細書中に記載されるブラークアッセイまたは液相OD法を使用するファージ感受性についての直接試験を行うことを含む。いくつかの実施形態において、処置される陽性試料または対象は、ブラークアッセイにおけるブラークの存在によって判定される。いくつかの実施形態において、処理される陽性試料または対象は、液状ODアッセイにおけるOD

10

20

30

40

50

の減少によって判定される。いくつかの実施形態において、血清型に基づくスクリーニングは、KP2、KP3、および／またはそれらのそれぞれの被膜型に対する抗体の存在を判定するために、アッセイ（例えば、イムノアッセイ、ELISA）を使用して行われる。いくつかの実施形態において、ファージは、検出可能なマーカー（例えば、発光マーカー）で標識され、バクテリアの感染は、マーカーの増加を検出することによって（例えば、発光アッセイにおいて）判定される。

【0097】

参考文献

1. Abedon, S. T., & Yin, J. (2009). Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 501, 161 - 74. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_17 10
2. Altschul et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
3. Baym et al. (2015). Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes. *PLoS ONE*, 10(5), 1 - 15
4. Y. Chen et al., Dysbiosis of small intestinal microbiota in liver cirrhosis and its association with etiology. *Scientific reports* 6, 34055 (Sep 30, 2016).
5. Cole et al. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42:D633-D642
6. A. Davin-Regli, J. M. Pages, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology* 6, 392 (2015). 20
7. Diene et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol.* 2013 Feb;30(2):369-83. PubMed PMID: 23071100.
8. D. Gevers et al., The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe* 15, 382 (Mar 12, 2014).
9. J. H. Grose et al., Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology* 0, 421 (November 2014). 30
10. K. E. Holt et al., Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E3574 (Jul 07, 2015).
11. Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology* (1st ed., Vol. 70, pp. 217 - 48). Elsevier Inc. doi:10.1016/S0065-2164(10)70007-1
12. Kazutaka Katoh, Daron M. Standley; MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* 2013; 30 (4): 772-780 40
13. Kutter, E. (2009). Phage host range and efficiency of plating. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 501, 141 - 9. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_14
14. C. A. Lozupone et al., Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell host & microbe* 14, 329 (Sep 11, 2013).
15. S. Mondot et al., Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflammatory bowel diseases* 17, 185 (Jan, 2011).
16. E. G. Pamer, Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science* 352, 535 (Apr 29, 2016).
17. N. Qin et al., Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513, 59 (Sep 04, 2014). 50

18. H. S. Said et al., Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 21, 15 (Feb, 2014).
19. C. L. Sears, W. S. Garrett, Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell host & microbe* 15, 317 (Mar 12, 2014).
20. E. S. Snitkin et al., Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Science translational medicine* 4, 148ra116 (Aug 22, 2012).
21. Y. Taur, E. G. Pamer, The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Current opinion in infectious diseases* 26, 332 (Aug, 2013). 10
22. Tindall et al. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Feb;67(2):502-504. PubMed PMID: 27902205.
23. I. Vujkovic-Cvijin et al., Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Science translational medicine* 5, 193ra91 (Jul 10, 2013). 20
24. Zhou et al. 2011 PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucl. Acids Res.* 39 suppl. 2: W347-W352
25. U.S. Patent No. 9,415,079. Composition for inducing proliferation or accumulation of regulatory T cells.

【0098】

実施例

実施例1：単離されたクレブシエラ・ニューモニエ2H7（「KP2」）およびエンテロバクター・エロゲネス 11E12菌株（「KP3」）の病原性および腸炎惹起性の可能性の評価。

【0099】

クレブシエラ・ニューモニエ2H7菌株

ヒト唾液試料から候補である病原性クレブシエラ・ニューモニエ株ID 2H7（「KP2」）を単離した。ヒト唾液試料は、Said et al.に記載されている試験プロトコールを用いてRyukyu大学病院で採取した。KP2株の供給源は、クローン病患者 [IBD121、52歳日本人男性、IBDスコア1（寛解期）、「CD患者#2」]からの唾液試料であった。CD患者由来の唾液試料 [IBD029、50歳日本人男性、IBDスコア3（活動期）、CD患者#1、IBD121、52歳日本人男性、IBDスコア1（寛解期）、「CD患者#2、CD#2」]、UC (IBD096、23歳日本人女性、UC-DAIマイルド、「UC患者#1 UC#1」)、IBD118、65歳日本人男性、UC-DAI中等症「UC患者#2、UC#2」、および健康なドナー (H11、22歳日本人女性；H17、23歳日本人男性)を各群（健康、CDおよびUC）の代表として、唾液微生物叢の16S rRNAシーケンスデータの主要な座標分析に基づいて選択した。唾液試料を、40%グリセロールを含む等容量 (w/v) のPBSに懸濁し、液体窒素中で急速凍結し、使用するまで -80°C で保存した。凍結したストックを解凍し、GFマウス (1匹あたり250 μL) に経口接種した。

【0100】

クローン病患者由来の唾液試料を、最初に強制経口投与によりC57BL/6 (B6) 無菌 (GF) マウスに移植した。マウスは、Sankyo Laboratories Japanから購入し、GF条件下で維持した。各群のマウスを別々のノトバイオティックアイソレーターに3週間収容し、その時点で小腸および結腸固有層 (LP) 免疫細胞を試験した。

【0101】

LPリンパ球を単離するために、小腸および大腸を収集し、長手方向に開き、リン酸緩衝

10

20

30

40

50

生理食塩水 (pH7.4) (PBS) で洗浄して全ての管腔内容物を除去し、5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むハンクス平衡塩類液 (HBSS) 中で、37℃で20分間振盪した。鉗子を用いて上皮細胞および筋肉層を除去した後、LP層を小片に切断し、4%ウシ胎児血清、0.5mg / mLコラゲナーゼD、0.5mg / mLディスパーゼ、および40μg/mL DNase Iを含むRPMI 1640と共に振盪水浴中で、37℃で1時間インキュベートした。消化した組織を、5mM EDTAを含むHBSSで洗浄し、5mLの40% Percollに再懸濁し、15mLのFalconチューブ中の2.5mLの80% Percoll上に重ねた。パーコールグラジエント分離を、25℃で20分間、800×gで遠心分離することによって行った。リンパ球をパーコール勾配のインターフェースから回収し、氷冷PBSに懸濁し、50ng / mLのホルボールミリスチン酸酢酸 (PMA) および750ng / mLのイオノマイシンで、37℃で4時間ゴルジストップの存在下で刺激した。LIVE / DEAD固定染色キットを用いて死んだセルにラベルをつけた後、細胞を浸透させ、Fox3染色バッファセットを用いて抗CD3、CD4、TCRγ/δ、IL-17A、IFN-γ、T-Bet、RORγtで染色した。全てのデータをBD LSRFortessaまたはFACSAria IIIで収集し、Flowjoソフトウェアで分析した。CD4+T細胞を、生きているリンパ球ゲート内のCD4+TCRγ/δサブセットとして定義した。

【0102】

CD患者 #1から唾液試料を受けたマウス (GF + CD #1マウス) では、腸免疫細胞特性に有意な変化はなかった。対照的に、CD患者 #2 (GF + CD #2マウス) から唾液試料を受けた群では、腸LPにおいてインターフェロンγ(IFN-γ)+ CD4+T細胞 (TH1細胞) の顕著な蓄積があった (図1A)。GFマウスへの投与前の唾液微生物叢の群集組成およびその結果としてのコロニー形成動物 (ex-GFマウス) の糞便微生物叢を、16S rRNA遺伝子配列決定によって比較した。この目的のために、マウスからの盲腸内容物を、10mM Tris-HCl (pH 8.0) および100μg/mL RNase Aを含有する10mM EDTAを含有する10mLのTris-EDTA緩衝液に懸濁し、そしてリゾチームを15mg / mLの最終濃度まで添加した。懸濁液を穏やかに混合しながら37℃で1時間インキュベートした。精製したアクロモペプチダーゼを最終濃度2,000単位 / mLまで添加し、試料物を37℃で30分間さらにインキュベートした。次いで、ドデシル硫酸ナトリウム (最終濃度、1%) を懸濁液に添加し、十分に混合した。続いて、プロテイナーゼKを懸濁液に添加し (最終濃度、1mg / mL) 、混合物を55℃で1時間インキュベートした。高分子量DNAを、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) によって抽出し、ポリエチレンリコール8000 (PEG 8000) によって沈殿させ、70%エチルアルコールで洗浄し、TEに再懸濁し、PCRを、Ex Taqおよび(1) 454プライマーA (5' - CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (454アダプター配列) + バーコード (10塩基類) + AGRGTTTGATYMTGGCTCAG - 3' (27Fmod)) および(2) 454プライマーB (5' - CCTATCCCTGTGTGCCCTGGCAGTCTCAG (454アダプター配列) + TGCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3' (338R)) を使用して、16S rRNA遺伝子のV1-V2領域を行った。それぞれの試料 (~330bp) から生成したアンブリコンを、その後、AMPure XPを用いて精製した。Quant-iT Picogreen dsDNAアッセイキットおよびTBS-380 Mini-Fluorometerを用いてDNAを定量した。次いで、増幅したDNAを、GS Junior Titanium PCR Kit-Lib-L、GS Junior Titanium Sequencing Kit、およびGS Junior Titanium PicoTiterPlate Kitを用いて、製造者の指示に従って、454 GS Junior バイロシーケンシングの鋳型として用いた。両方のプライマー配列を有さず、25未満の平均品質を有し、おそらくキメラであった読み取りを除去することによって、品質フィルタ通過読み取りを得た。フィルタ通過した読み取りのうち、3,000の読み取りを、それぞれの試料について両方のプライマー配列を切り取った後に使用し、96%同一性のカットオフ類似性を有するOTU分析に供した。各OTUからの代表的な配列を、NCBIおよびHuman Microbiome Projectデータベース中の公的に入手可能なゲノム配列から構築されたRDPおよび参照ゲノムデータベースからのデータベースにblastした。

【0103】

両患者の唾液試料は同様の微生物群集を有したが、糞便微生物叢組成はGF + CD #2マウスとGF + CD #1マウスとの間で顕著に異なった。ex-GFマウスの糞便微生物叢で観察された細菌種の大部分は唾液微生物叢のマイナー成分であることが見出され、口腔微生物叢の小画分を構成する細菌種が腸内でコロニー形成することができ、さらに限定されたサブセ

10

20

30

40

50

ットが腸内TH1細胞の集積を誘導することができることを示唆した。

【0104】

CD #2試料中のTH1細胞誘導バクテリアを単離するために、GF + CD #2マウスからの盲腸内容物をPBSで連続希釀し、非選択寒天プレート（シェードラー、BHI、GAM、CM0151、BL、およびTS）上に播種した。嫌気性条件下（80% N₂、10% H₂、10% CO₂）で37 にて2日間または4日間培養した後、個々のコロニーを採取し、DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子フラグメントの配列決定に供した。224個のコロニーを、異なるコロニー外観を有する培養培地からGF + CD #2マウスについて採取した。培養コレクション中の個々の単離株は、それらが > 96% の同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を共有する場合、「株」に分類された。得られた菌株配列を、リボソームデータベースプロジェクト（RDP）データベースの配列および海洋試料で観察されたOTUと比較して、密接に関連する種または菌株および対応するOTUを決定した。
10

【0105】

16S rRNA遺伝子の配列決定は、これらのコロニーが、ゲメラ（*Gemella*）、ビフィドバクテリウム（*Bifidobacterium*）、連鎖状球菌（*Streptococcus*）、エシェリキア（*Escherichia*）、フソバクテリウム（*Fusobacterium*）、ベイロネラ（*Veillonella*）、アナエロコッカス（*Anaerococcus*）、およびクレブシエラを含む8つの菌株を含むことを明らかにした。8株を培養し、混合物（8 - mix）としてGFマウスに導入した。細菌混合物を調製するために、細菌株を、コンフルエントになるまでEGプロス中で個々に増殖させ、そして等容量の培地で混合した。分離株の混合物をGFマウスに経口投与した（1匹あたり150 μLの培地に約1 × 10⁸ CFUの総細菌）。細菌株の所定の混合物を与えられた全てのマウスを、単一のノトバイオティックアイソレーター中で維持した。クレブシエラ・ニューモニエを、*Luria - Bertani* (LB) プロスまたはLB寒天プレートにおいて37 で増殖させた。
20

【0106】

8 - mixを接種したマウスでは、TH1細胞の効率的な誘導が結腸LPで観察され、GF + CD #2マウスで観察されたものに匹敵する大きさであった。フソバクテリウム（Fu）およびベイロネラ（Ve）は、IBD病因に関与しているので（Gevers et al., 2014）、マウスに2つの菌株（菌株ID Fu - 21f およびVe - 2E1）をコロニー形成させた。しかしながら、予想外に、Fu 21f およびVe 2E1菌株のコロニー形成は、TH1細胞頻度のわずかな上昇のみをもたらした。一方、驚くべきことに、クレブシエラ・ニューモニエ菌株ID 2H7（「KP2」）単独での経口投与は、TH1細胞を誘導したが、残りの7菌株（7 - mix）の混合物は、そうすることができず、KP2菌株が、GF + CD #2マウスにおいて観察されるTH1細胞の集積に対する主要な寄与因子であることを示唆した。（図1B）。
30

【0107】

KP2の腸炎惹起性の可能性について検討した。KP2は、TH1細胞を誘導するにもかかわらず、B6GFマウスにおいて単色化されるか、またはAmp処理B6 SPFマウスにおいてコロニー化されるかのいずれかである、野生型（WT）宿主の腸において、いかなる炎症変化も誘導しなかった。微生物と遺伝子要因間の相互作用がIBDの病原性に大きく寄与しているため、遺伝子的に大腸炎を起こしやすいII10-/-B6個体（Jackson Laboratories）におけるKP2コロニーーションの影響を検討した。GF II10-/-マウスまたはAmp処理SPF II10-/-マウスにKP2または大腸菌株ID 2B1（Ec-2B1）を経口投与し、これもGF + CD #2マウスから分離されたが、TH1細胞を誘導する能力は弱かった。クレブシエラ・ニューモニエおよび大腸菌の両方は、IBD病因に関与しているファミリーである腸内細菌科に属する（Gevers et al., 2014）。組織学的分析は、KP2がex - GFまたはAmp処理SPF II10-/-マウスの近位結腸においてEc - 2B1よりも重篤な炎症を誘導することを示し、KP2がTH1細胞応答を誘導することによって腸病原体として作用することを示唆した。（図1C）。KP2はまた、種特異的および宿主遺伝子型特異的な様式で、さらなる炎症誘発効果を誘導し得る。
40

【0108】

エンテロバクター・エロゲネス 11E12菌株

ヒト唾液試料から候補の病原性エンテロバクター・エロゲネス ID 11E12菌株（「KP3」）

10

20

30

40

50

)を単離した。ヒト唾液試料を、Said et al.に記載されているような研究プロトコールを用いて、ライウキュウス大学病院で収集した。KP3菌株の供給源は、潰瘍性大腸炎患者の唾液であった [IBD118、65歳日本人男性、UC - DAI中等度、「UC患者2、UC # 2」]。試験唾液試料を、40%グリセロールを含む等容量 (w/v) のPBS中に懸濁し、液体窒素中で急速凍結し、使用するまで -80°で保存した。凍結したストックを解凍し、KP2について記載したようにGFマウス (1匹当たり250 μL) に経口接種した。

【0109】

活動性潰瘍性大腸炎の2人の患者 (UC患者 #1およびUC患者 #2) からの唾液試料を、GF WT B6マウスに投与し、クレブシエラ・ニューモニエKP2菌株について記載したように分析した。TH1細胞の顕著な蓄積が、UC患者 #2 (GF + UC # 2マウス) 由来の唾液試料を接種したマウスの結腸LPにおいて観察され、その量は、GF + CD # 2マウスにおいて観察された量に匹敵した。(図2A)。

10

【0110】

UC # 2試料において観察されたTH1細胞誘導の原因となる菌株を単離するために、盲腸内容物をGF + UC # 2マウスから収集し、CD # 2試料の培養について記載したようにインビトロで培養した。13株が単離され、GF + UC # 2マウスの微生物叢構成をおおよそ表した。GFマウスにおける13株 (13 - mix) の混合物の経口投与は、結腸TH1細胞誘導に関してGF + UC # 2マウスにおいて観察された表現型を複製した。13株のうち、エンテロコッカスフェシウム ID 11A1株 (Ef - 11A1) およびクレブシエラ・エアロモビリス11E12 (「KP3」) は、重大な多剤耐性病原体であることが報告されており、IBDの病因に関与している (Taur et al., 2013; Davin-Regli et al., 2015; Mondot et al., 2011; Diene et al., 2013)。GFマウスを、Ef - 11A1、KP3、または11種の他の菌株の混合物 (11 - mix) のいずれかで強制飼養した。KP3は、GF + 13 - 混合およびGF + UC # 2マウスで観察されたレベルに匹敵するレベルで、結腸においてTH1細胞の顕著な蓄積を誘導したが、Ef - 11A1または11 - mixはそうならなかった。したがって、KP3は、GF + UC # 2マウスにおける腸内微生物叢のマイナーメンバーであったが、TH1細胞の誘導と関連しているようであった。(図2B)。

20

【0111】

次に、KP2について説明したようにII10^{-/-}マウスにおいて、単離したKP3菌株の腸炎惹起性の可能性を評価した。KP3コロニー形成はII10^{-/-}マウスの炎症をもたらし、経口由来のクレブシエラ・エアロモビリス株も腸内で病原菌として作用する可能性があることを示唆した。(図2C)。

30

【0112】

実施例2：バクテリオファージのための試料供給および加工。

下水は、Sheba病院のNational Virology Centerから入手した。Poria病院の歯科クリニックから歯科下水を採取した。イチロフ病院の健康なドナーから糞便試料が提供された。

【0113】

様々な時点で様々な場所から得られた5~6試料からなる汚水のバッチを遠心分離し、上澄み液を、減圧ろ過システムを用いてろ過した (メルクミリポアガラス纖維プレフィルタ - APFD、APFB、続いてエクスプレスプラスPES 47mmディスク、フィルタ0.45 μm)。この工程の間、400mLの5~6試料を1つのプールに混合した。プールした下水試料混合物をペリコンフィルタシステムにより濃縮した (2Lから20mLへ)。濃縮下水試料を0.45 μmのフィルタで濾過し、バーコード管に通し、4°で保存する。したがって、貯蔵場所における下水ファージ単離株はそれぞれ、地理的起源の違う5~6試料のファージから構成されている。

40

【0114】

4~5名の異なるドナーの歯科用下水試料を、バッチ開始量が400mL未満であったことを除き、通常の下水と同様の方法で処理した。濃縮歯科用下水試料を0.45 μmフィルタで濾過し、バーコード管に通し、4°で保存した。

【0115】

糞便試料を以下のように個々に処理した：個々のドナーのそれぞれの糞便試料5gを秤量

50

し、SM緩衝液（50mM Tris、200mM NaCl、10mM MgSO₄、0.01%ゼラチン）と一緒にBagMixerプラスチックバッグに挿入した。糞便をBagMixer 400Pストマッカー内で2分間の2サイクルによって再懸濁した。得られた懸濁液を遠心分離し、残った上澄み液を0.45 μmのフィルタで濾過してバクテリア分画を除去し、4に保った。

【0116】

実施例3：クレブシエラ・ニューモニエ臨床株を認識するファージについての環境および臨床試料のスクリーニング。

KP2およびKP3を単離し、本明細書中に記載されるように配列決定して、参照ゲノムを產生した。その後のアラインメントは、参照ゲノムに対してbowtie2を用いてIllumina読み取りで行った。>98%の全体的なアラインメントにより、後続の菌株が純粋であることが確認された。NCBI BLAST (Altschul et al., 1997) およびRibosomal Database Project (Cole et al., 2014) の両方が、それぞれクレブシエラ・ニューモニエおよびエンテロバクター・エロゲネスの16Sに適合するアンプリコンを生じる、KP2およびKP3ゲノム上でインシリコ16S PCRを行った。KP3のエンテロバクター・エロゲネスへの帰属を、コロニー質量分析によってさらに確認した。

【0117】

10の歯科用下水試料、41の下水試料および70の糞便試料を用いて、ミニ混合または3試料混合（全部で39の混合）を組み立てた。スクリーニングは、ドロップブラークアッセイ (Bacteriophages methods and protocols MRJ Clokie AM Kropinsky)により、48ウェルプレートにおいて、KP2およびKP3バクテリアローンの両方で10 μLの各混合物を試験することにより行った。プレートを好気性条件下で2~3時間（37）インキュベートし、その後、ブラークがバクテリアローン上に見えるようになった。この手順により、表2に示すように、KP2上の1/39ウェルでブラークが検出され、KP3上の11/39ウェルでブラークが検出された。KP3上で観察されたブラークを以下のように単離した：5/11ウェルから1つのブラークをそれぞれ採取し、4/11ウェルから2つの異なるブラークをモルフォロジーにより採取し、2/11ウェルから3つの異なるブラークをモルフォロジーにより採取した。単一のブラークをKP2について単離した。ブラークをファージ緩衝液（Tris-HCl pH 7.5 50mM、NaCl 100mM、MgCl₂ * 6H₂O 5mM、MnCl₂ * 4H₂O 0.1mM、DDW中）中に（滅菌20 μLチップを使用して）採取し、全部で3ラウンド再単離した（表2を参照のこと）。

【0118】

表2. 環境試料から得たKP2およびKP3ファージ

10

20

30

【表2】

ファージ名	宿主	混合物 no.	試料番号 (それぞれの試 料は 5 の混液で ある)。
KP2W-P0106	KP2	5	1-3
KP3W-P0109	KP3	5	1-3
KP3W-P0201 KP3W-S0101	KP3	6	4- 6
KP3W-P0202 KP3W-P0103	KP3	7	7- 9
KP3W-P0112	KP3	8	10- 12
KP3W-P0105 KP3W-P0102	KP3	11	19- 21
KP3W-P0101	KP3	12	22- 24
KP3W-P0108	KP3	13	25- 27
KP3W-P0110 KP3W-P0113 KP3W-P0114	KP3	15	31- 34
KP3W-P0106 KP3W-P0203 KP3W-S0102	KP3	16	35- 37
KP3W-P0104 KP3W-P0107	KP3	17	38- 40
KP3W-P0111	KP3	18	41

10

20

30

40

【0119】

KP2を認識するファージのプールを拡大するために、環境および臨床試料を、以下のように所望のファージについて富化した：10の歯科下水試料、41の下水試料および70の糞便試料を使用して、6- 試料混合物（全部で21の混合物）を組み立てた。各混合物100 μ Lを加えた21 \times 4mLの培養管中でKP2を培養し、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートすることによって富化を行った。この期間中、KP2に感染する任意のファージは、ブラークアッセイによるより容易な検出を可能にするために増幅される。富化を介して見出されたKP2ファージは、元の試料に存在した増幅された野生型ファージ、または特異的突然変異を獲得したファージであって、指向性富化過程の間により効率的な感染を可能にするファージであってよい。

【0120】

50

インキュベーション後、チューブを遠心分離し、上澄み液を0.45 μmのシリジンジフィルタで濾過し、チューブを4℃に保った。富化された環境試料のスクリーニングは、48ウェルプレートにおいて、KP2バクテリアローン上でそれぞれ10 μLをドロッププランクアッセイにより試験することにより行った。プレートを、好気性条件下、37℃で2~3時間インキュベートし、その後、プランクがバクテリアローン上で見えるようになった。この手順により、表3に示すように、4/21富化においてプランクが検出された。3/21ウェルからそれぞれ1つのプランクを採取し、1/21ウェルから2つの異なったプランクをモルフォロジーによって採取した。プランクをファージ緩衝液中にピックアップし（滅菌20 μLチップを使用して）、合計3ラウンド再単離した。

【0121】

10

表3. 環境および臨床試料の富化により得られた追加のKP2ファージ。SWG - 下水、糞便 - 健康なIBDドナーから入手した糞便診療試料。

【表3】

20

名称	宿主	富化源
KP2W-M0104	KP2	SWG (4-6) + 糞便 (13-15)
KP2W-P0101	KP2	SWG (31-34) + 糞便 (41-44)
KP2W-P0102	KP2	SWG (35-37) + 糞便 (45-47)
KP2W-P0103	KP2	SWG (35-37) + 糞便 (45-47)
KP2W-P0104	KP2	SWG (38-40) + 糞便 (48-50)

【0122】

実施例4：ファージ増幅およびファージ力価の判定。

25ファージ（KP2上で単離された6ファージ + KP3上で単離された19ファージ）のうち、一部は液体プロスから増幅されたが、残りは二重寒天重層プランクアッセイにより軟寒天から増幅された。50 μLの単離したファージ試料をOD=1.7の対数相培養物4mL、またはOD=0.5の対数相培養物4mLに希釈し、37℃で一晩インキュベートすることにより、液プロスからの増幅を行った。チューブを遠心分離し、上澄み液を0.45 μmシリジンジフィルタで濾過し、1mMの二価イオンCa²⁺およびMg²⁺を添加した。

30

【0123】

ファージ力価は、以下のようにドロッププランクアッセイによって決定した：宿主培養物を、4mLの液状BHIS (BACTO (商標) 脳心臓注入BHI、酵母抽出物0.5%およびレザズリン) に宿主の5~10個のコロニーを接種し、ODが1.7 (1.5~2時間) になるまで37℃でインキュベートすることによって調製した。100 μLの宿主培養液を、2価イオンCa²⁺Mg²⁺を含む4mLの溶融トップ寒天 (BHISトップ寒天：BHIS培地、0.4%アガロース) に加え、ボトム寒天 (BHISボトム寒天：BHISメディア、1.6%アガロース) を下敷きにして48ウェルプレートに分注 (100 μL/ウェル) した。プレートを30分間 (37℃) インキュベートした後、ファージサンプルの段階希釈液 (10 μL) を滴下した。プレートを2~3時間インキュベートした後、プランク (10~50プランク) を計数し、ファージ力価 (プランク数 × 10 × 計数希釈の逆数 = PFU/mL) を決定した。

40

【0124】

ソフトアガーからのファージの増幅は、液状BHISから産生されたファージの力価が1×10⁹PFU/mLより低い場合に行なった。OD=1.7の宿主培養物をOD=1に希釈し、100 μLの希釈した宿主培養物のアリコートを、コンフルエントなプランクの産生をもたらすのに十分な力価で100 μLのファージに添加し、室温で15分間インキュベートした。次いで、各宿主-ファージ混合物を3mLの軟溶融寒天で希釈し、BHISボトム寒天の上に注いだ。プレートを硬化させ、次いで37℃で2~3時間、または完全に溶解するまでインキュベートした。プレ

50

ートをスプレッダーでトップ寒天から掻き取り、寒天をBHISおよび10 µLのクロロホルムを含む滅菌チューブに移した。チューブを30分間放置し、ファージを軟寒天から溶出させた。チューブを遠心分離し、上澄み液を0.45 µM注射器フィルタで濾過して、残留寒天を除去した。二価イオンCa²⁺Mg²⁺を1mMの濃度で、4℃で保存したチューブに添加した。

【0125】

実施例5：単離ファージの宿主域分析。

商用ファージ(ATCC 23356 - B1)と同様にKP2およびKP3菌株で単離したファージの宿主域分析を、ATCC由来の6つのクレブシエラ・ニューモニエ：BAA-2552 (KP1)、23356 (KP4)、13882 (KP5)、BAA-1705 (KP6)、700603 (KP7)、700721 (KP8)について行った。
各ファージを、48ウェルプレート中のクレブシエラ・ニューモニエのバクテリアローンに滴下アッセイにより添加した(10 µL)。プレートを好気性条件下で2~3時間(37℃)インキュベートした後、プラークがバクテリアローン上に見えるようになった。KP2およびKP3のバクテリアローンを有するプレート、ならびにそれらのそれぞれのファージを陽性対照とした。宿主域は、2つのファージ力価； 1×10^6 PFU / mLおよび 1×10^9 PFU / mLでファージの各々について行った。図3に見られるように、ダークグレーは感受性を示し、グレーは耐性を示すが、全てのファージはそれらの宿主に対して高い特異性を示した。この観察の例外は、 1×10^9 PFU/mLの力価で23356株に感染したファージKP2W-M0104であったが、より低い力価 1×10^6 PFU/mLの23356でKP2W-M0104のプラークは観察されなかった。従って、KP2およびKP3上に単離されたファージは、それぞれ、それらの宿主に特異的であり、これは、それらが、これらの細菌株(KP2、KP3)によって排他的に発現される特異的受容体/付着部位を認識することを意味する。さらに、市販のファージATCC 23356 B1は、KP2もKP3も認識せず、それが単離されたKP4株のみを認識し、新しく単離されたファージが新規の機能を有することを示唆した。

【0126】

実施例6：KP2、KP3、および変異体の増殖曲線。

KP2株およびKP3株の増殖曲線は、個々のファージの存在下で、または各細菌株に対して利用可能な全てのファージのカクテルの存在下で、単独で培養された株についてのプレートリーダーを使用して、600nmでのODをモニターすることによって作製した。簡単に述べると、KP2およびKP3菌株を4mLの液体BHIS中でOD₆₀₀ = 1.7まで培養した。次いで、培養物をOD₆₀₀ = 0.2に希釈し、96ウェルプレートに分注した(0.2mL / ウェル)。それぞれの細菌株を、それぞれの個々のファージ(KP2ファージ(n=6)およびKP3ファージ(n=19))を用いて二重に試験したか、または、全てのそれぞれのファージを等しい比率で、かつ、ファージを含まない対照と並んで個々のファージの総数と当量総数で含むファージカクテルの存在下で試験した。ファージ力価は、10 µL / ウェルの容量のファージまたはファージカクテルで 1×10^6 PFU / mLであった。ウェルを鉛物油(50 µL / ウェル)で満たし、インキュベーション中の試料の蒸発を避けるために、プレートを光学シールで密封した。プレートをロボットプレートリーダー(Freedom EVO 75、Tecan)に挿入し、プレートをインキュベートし(37℃)、OD = 600nmで22時間15分毎に読み取った。KP2株についての分析結果を図4に示した。ファージなしの場合のKP2成長曲線は黒線、それ以外の線は、1相の場合のKP2曲線を示している。破線は、6つのファージのカクテルの存在下でのKP2増殖曲線を表す。個々のファージの存在下で作成されたKP2増殖曲線は、1~2時間後の耐性株の再増殖または突然変異株の出現を実証する。対照的に、カクテルの存在下でのKP2の成長は、9時間後に耐性突然変異体の出現を示し、「突然変異までの時間」パラメータの有意な改善を可能にし、KP3菌株について実施した同様の分析は、3倍の「突然変異までの時間」をもたらし、または、検討の過程の間に、突然変異体の出現さえもたらさなかった。

【0127】

実施例7：さらなるファージのスクリーニングのためのKP2変異体の作製。

ファージによるバクテリアの感染の間に、ファージに対して耐性である突然変異菌株が生じる。耐性変異株を標的とするために、以下のストラテジーを用いた：まず、以下のファージKP2W - P0101、KP2W - P0102、KP2W - P0103、KP2W - P0104およびKP2W - M0104(1×10^6

10

20

30

40

50

PFU / mLのファージ力価)のカクテルとのインキュベーションの影響として生じる変異KP2株、ならびにKP2W - P0104ファージに対して生じる変異体を収集し、特徴付けた。この目的のために、KP2菌株を、37[°]で、OD_{600nm} = 1.5まで振盪しながら、4mLのBHIS中で培養した。次いで、培養物を液体BHISでOD = 0.2に希釀し、96ウェルプレートに分注した(200 μL / ウェル)。10 μLの体積のKP2W - P0104ファージを加えてMKP2_2161_1変異体を作製し、10 μLの上記のファージのカクテル(等量)を加えてMKP2_coc_1変異体を作製した。各ウェルを鉛物油(50 μL / ウェル)で覆い、試料の蒸発を避けるためにテープで密封した。吸光度(600nm)をプレートリーダーで15分毎に24時間モニターした。KP2単独、またはKP2W - P0104に感染したKP2、または6つ全てのファージに感染したKP2の増殖曲線の分析は、突然変異体候補を明らかにした。変異株を含むウェルの内容物をBHIS寒天プレート上に播種し、37[°]で一晩インキュベートした。次に、單一コロニーを単離し、液体BHIS中で増殖させた。候補は、16Sピロシーケンシングによりクレブシエラ・ニューモニエとして検証され、その後、ドロップアッセイおよび全ゲノム配列決定によりそれぞれのファージに対する耐性が確認された。MKP2_2161_1はすべてのファージ単離株に耐性であることが見出されたが、KP2W - M0104およびMKP2_coc_1は試験したすべてのファージに耐性であることが見出された。2つの突然変異体MKP2_2161_1およびMKP2_Coc_1をファージ選択に使用して、本発明者らのファージプールをさらに拡張した。

【0128】

実施例8：MKP2_2161_1 およびMKP2_coc_1 によるエンリッチメント

耐性KP2変異体、MKP2_2161_1およびMKP2_coc_1に感染することができるファージを単離するために、以下の環境および臨床試料をMKP2_2161_1およびMKP2_coc_1で富化した：19の歯科下水、58の下水および100の糞便試料を用いて、7~9の試料混合物(合計19の混合物)を組み立てた。それぞれの変異体(MKP2_2161_1およびMKP2_Coc_1)を19×4mL培養管に加えて各混合物150 μLを加えた19混合物と共に、37[°]に3時間培養して富化を行った。インキュベーション後、試験管を遠心分離し、上澄み液を0.45 μm注射器フィルタでろ過し、4[°]に保った。富化試料のスクリーニングは、48ウェルプレートにおいて、KP2、MKP2_2161_1およびMKP2_Coc_1バクテリアローン上で10 μLの各々の富化試料をドロップブラークアッセイにより試験することにより行った。プレートを37[°]、好気条件で2~3時間インキュベートし、その後、ブラークがバクテリアローン上に見えるようになった。この手順により、表4に示すように、8/19富化のブラークが得られた。MKP2_2161_1ローンで試験されたMKP2_2161_1での富化は9ファージをもたらし、MKP2_Coc_1で試験された富化は8つの異なる供給源からの17ファージをもたらした。MKP2_Coc_1での富化を、MKP2_2161_1およびMKP2_Coc_1ローンでの感染性について試験し、8つの異なる供給源から10個のブラークを得た。KP2ローンで試験されたMKP2_2161_1での富化およびKP2ローンで試験されたMKP2_Coc_1での富化は、6つの異なる供給源からの10個のブラークをもたらした(表4)。ブラークを、滅菌20 μLチップを用いてファージ緩衝液中にピックアップし、合計3ラウンド再単離した。

【0129】

表4. ファージ単離物の富化から得られたKP突然変異体に対するファージ。

MKP2_2161_1での富化 / 再単離(1ラウンドまたは2ラウンドのいずれか、または(0)なし)は、9個のファージをもたらし、MKP2_Coc_1での富化 / 再単離(1ラウンドから3ラウンドの範囲、または(0)なし)は、8個の異なる供給源からの17個のファージをもたらした。富化は、MKP2_2161_1、MKP2_Coc_1およびKP2ローンで試験した。SWG - 下水道、DSWG-歯科下水道、糞便 - 健康なドナーまたはIBDドナーから得られた糞便診療試料。

10

20

30

40

【表4】

ファージ名	ミニ ミックス no	供給源および試料 no (それぞれの試料は 5 の混液である)。	MKP2_2161_1 富化ラウンド	MKP2_Coc_1 富化ラウンド
KP2W-M0102	3	19 (DSWG)	1	2
KP2M-M0109		1-6 (SWG)		
KP2M-P0204	4	7-15 (SWG)	2	2
KP2W-M0103				
KP2M-M0105	5	16-24 (SWG)	1	2
KP2W-P0202				
KP2M-P0207	6	25-34 (SWG)	0	2
KP2M-M0110				
KP2M-P0203	7	35-42 (SWG)	1	3
KP2W-M0106				
KP2M-M0111	8	44-52 (SWG)	2	2
KP2M-P0206				
KP2W-P0109	9	53-58 (SWG)	2	3
KP2W-P0107				
KP2M-M0112	15	1-3 (糞便)	0	1
KP2W-P0105				
KP2W-P0108	15	51-56 (糞便)	0	1
KP2M-P0201				
KP2M-P0212	15	1-3 (糞便)	0	1
KP2M-P0208				
KP2M-P0209	15	51-56 (糞便)	0	1
KP2M-P0210				
KP2W-M0107	15	51-56 (糞便)	0	1
KP2M-M0108				
KP2M-P0211				

10

20

30

40

【0130】

実施例9：新たに単離されたファージの宿主域分析。

MKP2_2161_1、MKP2_Coc_1およびKP2菌株で単離したファージの宿主域分析を、4つの追加のKP変異体、MKP2_2161_C (KP2W-P0104に対して産生)、MKP2_251_B、MKP2_251_CおよびMKP2_251_D (KP2W-M0104に対して産生)ならびにKP4菌株に対して行った。ファージの各々を、48ウェルプレート中の異なるクレプシエラ・ニューモニエのバクテリアローンに滴下アッセイにより添加した (10 μ L)。プレートを好気的条件下で2~3時間 (37 $^{\circ}$ C) インキュベートした後、プラークがバクテリアローン上に見えるようになった。MKP2_2161_1、MKP2_Coc_1およびKP2のバクテリアローンを有するプレートおよびそれらのそれぞれのファージを陽性対照とした。宿主域は、2つのファージ力価 ; 1×10^6 PFU / mL および 1×10^9 PFU / mL でファージの各々について行った。表5、表6、および表7は、MKP2_2161_1およびMKP2_Coc_1上で単離されたファージがKP2に感染しなかったことを示す。しかし、KP2に感染した部分またはすべてのKP2変異株ならびに商用株KP4上で単離されたファージ。

【0131】

表5. 単離されたファージの特徴づけ

【表5】

ファージ	単離	サイズ (Kb)	GC %	ヌクレオツチドリ遺伝子	VIRFAM分析	もっとも近似
KP3W-P0101	KP3	40.2	52.74%	50	III型ボドウイルス	phiYeO3-12 / T3 / T7
KP3W-P0102	KP3	40.6	52.93%	48		
KP3W-P0103	KP3	40.7	52.93%	48		
KP3W-P0104	KP3	41.4	52.83%	49		
KP3W-P0105	KP3	40.3	52.98%	47		
KP3W-P0106	KP3	40.7	52.45%	49		
KP3W-P0107	KP3	41.3	52.32%	52		
KP3W-P0108	KP3	41	52.41%	53		
KP3W-P0109	KP3	41.1	52.35%	53		
KP3W-P0110	KP3	41.2	52.59%	52		
KP3W-P0111	KP3	40.8	52.44%	51		
KP3W-P0112	KP3	40.7	52.42%	50		
KP3W-P0113	KP3	40.7	52.46%	50		
KP3W-P0114	KP3	40.4	52.34%	47		
KP3W-P0201	KP3	40.6	51.64%	49		
KP3W-P0202	KP3	40.4	51.69%	50		
KP3W-P0203	KP3	40.6	51.58%	48		
KP3W-S0101	KP3	51.7	51.71%	81	I型サイフォウイルス	T1 / TLS / RTP
KP3W-S0102	KP3	50.4	51.31%	73		
KP2W-P0101	KP2	40.3	50.16%	51	III型ボドウイルス	phiYeO3-12 / T3 / T7
KP2W-P0102	KP2	40.4	50.16%	51		
KP2W-P0103	KP2	40.4	50.16%	51		
KP2W-P0104	KP2	38.2	50.92%	45		
KP2W-P0105	KP2	39.1	50.79%	46		
KP2W-P0106	KP2	39.4	50.73%	48		
KP2W-P0107	KP2	39	50.67%	47		
KP2W-P0108	KP2	39	50.66%	47		
KP2W-P0109	KP2	39	50.69%	47		
KP2M-P0201	KP2-Coc-M	44.2	54.28%	53		
KP2M-P0202	KP2	43.8	54.13%	56		
KP2M-P0203	KP2-Coc-M	43.8	54.15%	54		
KP2M-P0204	KP2-Coc-M	43.5	54.19%	53		
KP2M-P0205	KP2-Coc-M	43.9	54.10%	54		
KP2M-P0206	KP2-Coc-M	44.6	53.96%	56		
KP2M-P0207	KP2-Coc-M	43.2	54.21%	53		
KP2M-P0208	MKP2_2161_1	44.8	54.14%	55		
KP2M-P0209	KP2-Coc-M	44.8	54.12%	56		
KP2M-P0210	KP2-Coc-M	44.8	54.14%	57		
KP2M-P0211	KP2-Coc-M	43.6	54.16%	54		
KP2M-P0212	KP2-Coc-M	43.6	54.13%	55		
KP2W-M0102	KP2	178.1	44.89%	274	II型ミオウイルス	RB43 / T4
KP2W-M0103	KP2	179.7	44.90%	280		
KP2W-M0104	KP2	178.4	44.92%	273		
KP2M-M0105	MKP2_2161_1	178.9	44.90%	276		
KP2W-M0106	KP2	179	44.67%	273		
KP2W-M0107	KP2	178.1	44.84%	270		
KP2M-M0108	MKP2_2161_1	177.8	44.85%	267		
KP2M-M0109	MKP2_2161_1	178.6	44.76%	270		
KP2M-M0110	MKP2_2161_1	177.5	44.78%	267		
KP2M-M0111	MKP2_2161_1	178.8	44.72%	275		
KP2M-M0112	MKP2_2161_1	179.5	44.54%	267		

【0132】

表6. MKP2_2161_1、MKP2_coc_1およびKP2に対して単離されたファージの宿主域分析（他のKP2変異体およびクレブシエラ菌株KP4に対する活性を含む）。ファージ力価は 1×10^9 PFU / mLであった。R - 被験ファージの感染に対する抵抗性、S - 被験ファージの感染に対する感受性、NT - 未試験

10

20

30

40

【表6】

 1×10^9 PFU/mL での感染性

ファージ名	単離	KP2	MKP2_2161_1	MKP2_2161_C	MKP2_251_B	MKP2_251_C	MKP2_251_D	MKP2_coc_1	KP4
KP2M-M0109	MKP2_2161_1	R	S	S	R	R	R	R	NT
KP2M-M0105		S	S	S	R	R	R	R	NT
KP2M-M0110		R	S	S	R	R	R	R	NT
KP2M-M0111		S	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-M0112		S	S	S	R	R	R	R	NT
KP2M-M0108		S	S	S	R	R	R	R	NT
KP2M-P0208		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0204	MKP2_coc_1	R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0207		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0203		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0206		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0205		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0212		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0201		R	R	R	R	S	S	S	NT
KP2M-P0209		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2M-P0210		R	S	R	R	R	S	R	NT
KP2M-P0211		R	S	S	R	S	S	S	NT
KP2-M0102	KP2	S	S	S	S	S	S	S	NT
KP2-M0103		S	S	S	R	R	R	R	NT
KP2W-P0202		S	S	S	S	S	S	S	S
KP2-M0106		S	S	S	R	R	R	R	S
KP2W-P0109		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2W-P0107		S	S	S	S	S	S	S	NT
KP2W-P0108		S	R	R	S	S	S	R	R
KP2W-P0105		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2-M0107		S	S	S	R	R	R	R	NT
KP2W-P0106		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2-M0104		S	S	S	S	S	S	S	NT
KP2W-P0101		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2W-P0102		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2W-P0103		S	R	R	S	R	R	R	NT
KP2W-P0104		S	R	R	S	R	R	R	NT

【0133】

表7. MKP2_2161_1、MKP2_coc_1およびKP2に対して単離されたファージの宿主域分析（他のKP2変異体およびクレブシエラ菌株KP4に対する活性を含む）。ファージ力価は 1×10^6 PFU/mL であった。R - 被験ファージの感染に対する抵抗性、S - 被験ファージの感染に対する感受性、NT - 未試験

10

20

30

40

【表7】

		1×10^8 PFU/mL での感染性								
ファージ名	単離	KP2	MKP2_2161_1	MKP2_2161_C	MKP2_251_B	MKP2_251_C	MKP2_251_D	MKP2_coc_1	KP4	
KP2M-M0108	MKP2_2161_1	S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-M0105		S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-M0110		R	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-M0111		R	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-M0112		S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-M0108		S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-P0208		R	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2M-P0204		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0207		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0203		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0206	MKP2_coc_1	R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0205		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0212		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0201		R	R	R	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0209		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0210		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2M-P0211		R	S	S	R	S	S	S	NT	
KP2W-M0102		S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2W-M0103		S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2W-P0202		S	S	S	S	S	S	S	NT	
KP2W-M0106	KP2	S	S	S	R	R	R	R	NT	
KP2W-P0109		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0107		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0108		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0105		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-M0107		S	S	S	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0106		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-M0104		S	S	S	R	R	R	S	NT	
KP2W-P0101		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0102		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0103		S	R	R	S	R	R	R	NT	
KP2W-P0104		S	R	R	S	R	R	R	NT	

10

20

30

【0134】

実施例10：ファージDNA抽出および配列決定。

ファージDNAを、QIAGEN QIAamp DNAミニキットおよび以下のプロトコールを使用して、0.2mLのファージから少なくとも 1×10^9 PFU/mLで抽出した。抽出後、Baym et al. (2015)のプロトコールに従って Illuminaライブライマーを作製し、1つの位置あたり約250個の読み取りの平均被覆率を有する対になった末端40bp読み取りを使用して配列決定した。

【0135】

実施例11：ファージDNAアセンブリーおよび分析。

SPAdes 3.9.0を使用して読み取りをアセンブルし、PHASTを使用して注釈を付けた(Yo u Zhou et al. 2011)。ファージ構造遺伝子は、VIRFAM (Lopes A, et al. Automated Detection and Classification of head-to-tail connection proteins in bacteriophages, BMC Genomics. 2014 Nov 27; 15: 1027) を用いて分析し、3つの異なったファミリー：2型のミオウイルス科（既知のファージT4またはRB43など）、3型のポドウイルス科（既知のファージphiYe03 - 12、T3またはT7など）、および1型のサイフォウイルス科（既知のファージT1、TLSまたはRTPなど）にクラスター化した。

【0136】

表5からわかるように、KP3菌株に対して単離されたファージの大部分は、ゲノムが約40kbのポドウイルスファミリー3型に属し、ゲノムサイズが約50kbのサイフォウイルスファミリーに属するファージは2個のみである。KP2菌株に対して単離された5個を除くすべて

40

50

のファージは、ポドウイルスファミリー3型に属し、KP2突然変異体KP2-Coc-M (MKP2 - Coc_1とも呼ばれる) に対して単離されたすべてのファージおよび突然変異体KP2 MKP2 - 2161_1に対して単離された1個のファージに属する。KP2に対して単離された5個のファージと、突然変異体KP2 MKP2 - 2161_1に対して単離された1個を除くすべてのファージは、ポドウイルス科のゲノムより4倍大きいゲノム～180kbのゲノムを有するミオウイルスファミリーに属する。

【0137】

図5に見られるように、KP2を認識するポドウイルスは、83%以上と85%以上の同一性を持つ2つのクラスターにクラスター化する。KP2を認識するミオウイルスは、86%を超える相同性を持つ別のクラスターにクラスター化する。

10

【0138】

KP3に対するポドウイルスは、それぞれ>78%および>96%の同一性を有する2つの別々のブロックにクラスター化され(図6)、2つの異なるクラスターからのメンバー間の同一性のパーセントは、38%から50%をわずかに超える範囲である。サイフォウイルスは、2つの間で>88%の同一性を有する別個のクラスターを形成する。

20

【0139】

我々のファージと同じ分類群に属する、よりよく知られているファージ(例えば、T4、T7およびT1)は、通常、毒性(溶解のみ)ファージであることが知られているが、ファージ配列は、溶原性に関連する特定の遺伝子を検出するために、PHAST (Zhou et al., 2011)を使用して注釈を付けた。スクリーニングは、溶原化サイクルに関与することが知られているインテグラーゼ、リコンビナーゼまたは他の遺伝子がないことを明らかにし、このことは、ファージが溶解性のみであり、そして処置目的のためにファージに必要であることを示唆する。ファージプライマーを用いた2つの細菌株KP2およびKP3のPCR分析は、PCR産物を全く生じなかった。

【0140】

実施例12：インビボ試験。

ファージ処理の効力を評価する。インビボプラットフォームを使用して、1) 胃腸管におけるクレブシエラ・ニューモニエの毒性株のコロニー形成、および2) ファージ療法によるそれらの根絶を試験する。いくつかの実施形態では、細菌株に対するいくつかのファージを含むファージカクテルを試験する。いくつかの実施形態において、ファージカクテル中の1つ以上のファージは、細菌突然変異体および/または標的細菌突然変異体の出現を遅らせる。いくつかの実施形態では、インビボプラットフォームを使用して、例えばKP2の病原性株を用いて、胃腸管のコロニー形成を試験することができる。いくつかの実施形態において、インビボプラットフォームは、コロニー形成を誘導するために、2つの異なる抗生物質カクテルで前処理されたKP2菌株の単回および二重投与後の接種効率を比較するために使用され得る。動物に細菌培養物を接種し、表8に記載のようにファージまたはファージカクテルで処理する。細菌負荷および炎症を、表9に記載のように評価する。

30

【0141】

表8：実験手順

【表8】

マウス株：	C57BL/6、8週、雄	
条件：	KP2用 SPF	
研究グループ：	n=8 (SPF検証後に一緒に収容)、n=8 (個々の SPF ケージに収容)	
抗生物質処置：	<p>処置 1 (群 1~3)：コロニー形成の 4 日前に開始する、飲料水中のアンピシリン 200mg/L、チロシン 500mg/L およびカナマイシン 500mg/L のカクテルの連続投与。</p> <p>処置 2 (群 4~6)：アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、カナマイシンのカクテルを 1g/L で -16~ -3 日間連続投与、カナマイシンを 500mg/L で、コロニー形成 2 日前から飲料水に連続投与</p>	10
病原体：	対数期まで培養したクレブシェラ・ニューモニエ KP2 菌株	
コロニー形成プロトコール：	10 ⁸ CFU/動物、強制経口 (PBS200μL)、0 日目 (抗生物質投与 5 日目) 単回投与、0 日目と 1 日目 (抗生物質投与 5 日目と 6 日目) の反復投与	20
寿命中のフェーズ期間：	15~27 日	
屠殺スケジュール：	10 日目	
読み取り：	<p>開発全体にわたるクレブシェラコロニー形成の程度を評価するために、以下の読み取り値を使用する：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. -1、1、2、3、4、7、8、9、10 日目 (10 の腸) の IVIS システムを用いた全身および (腸) 画像 2. 増殖培地上に播種し、株特異的プライマーを用いて定量的 PCR することによる毎日の糞便試料中のクレブシェラ数の評価 3. 選択培地上での播種および 10 日目の株特異的プライマーを用いた定量的 PCR による腸内容物および粘膜中のクレブシェラ数の評価 4. 屠殺：腸組織学、腸サイトカイン mRNA、肝臓および脾臓の細菌数 	30
		40

【0142】

表9：試験設計

【表9】

群番号	群ID	前処置	チャレンジ	エンドポイント	
1 (4)	対照、 病原体なし		ビヒクル	1. 0日目(コロニー形成の3時間後)、 1、2、3、4、7、8、9、10日目の 全身イメージング。	10
2 (5)	単回投与		10^8 0日目	2. -4、-2、0、1、3、5、7、9、10 日目の一晩の糞便採取。	
3 (6)			10^8 0日目 10^8 1日目	a. LB + KAN 寒天プレート上 の糞便プレーティング b. KP2特異的プライマーを用 いた糞便試料の qPCR c. 発光評価 3. 10日目に屠殺。 a. 腸管回収 b. 腸管の IVIS c. 腸の大腸、小腸、盲腸への 分節化 d. 腸管セグメントの内容物中 の KP2 負荷の推定 i. クレブシエラ寒天プ レート上での糞便プ レーティング ii. KP2特異的プライマ ーを用いた糞便試料 の qPCR iii. 発光評価 e. BagMixer 抽出プロトコル を用いた腸管セグメントの 粘膜における KP2 負荷の推 定 i. クレブシエラ寒天プ レート上でのブレー ティング ii. KP2特異的プライマ ーを用いた糞便試料 の qPCR iii. 発光評価 f. RNAlater キットを用いて サイトカイン mRNA 数を 潜在的に評価する mRNA の抽出 g. 潜在的な組織学的検査のた めのパラフィンの包埋腸部 h. 肝臓および脾臓における細 菌負荷の評価	20
	二重投与	抗生物質處 置 1 または 2 (上記參 照)			30
					40

【0143】

実施例13. KP2様臨床株の単離。

緩衝液中に懸濁した $10 \mu\text{L}$ の糞便の体積を、4mlのペプトン水 (M028、Hylabs) 中で一晩、37°Cで培養し、その後、 $10 \mu\text{L}$ の培養物を、MacConkeyおよびChromagar配向性プレート (Hylabs) 上に画線培養した。MacConkeyプレート上で増殖し、ピンク色の粘液コロニー-モルフォロジーまたはクロマトグラフィープレート上で青色に見えるコロニーを提示する能力を有するコロニーを、UMI寒天チューブ (TT-147、Hylabs) を使用して、運動性およびインドールガスを形成する能力について試験した。非運動性および非インドール産生コ

口ニーについて、16S rRNA領域のPCRを行った。クレブシエラ・ニューモニエとしての同一性を決定するために、PCR産物を配列決定した。陽性単離株を、211bpの一意領域（fwdプライマー：5' AGCACTAGCGCTGTGGTAT3' およびrevプライマー：5' ACTTACTCGGGCCCTTGAT3'）についてPCRを用いてKP2様と同定した。例えば、Atarashi et al., 2017を参照のこと。

【0144】

KP2ファージの宿主域分析を、18のKP2様臨床株について行った。ファージのそれぞれを、BHIS寒天プレート中の異なるクレブシエラ・ニューモニエのバクテリアローンに、滴下アッセイによって以下のように添加した：4mLのBHISの開始培養物に、プレートからの5~10個のコロニーを接種した。この培養物を37℃で1.5~2時間インキュベートした。150 μLの容量のこの培養物を、4mLのBHISトップ寒天（1mM Ca²⁺およびMg²⁺イオンを補充した予め溶融した0.4%寒天BHIS）と混合し、BHISボトム寒天（1.5%アガロースを含むBHIS）を含むペトリ皿に注いだ。室温で固化させた後、プレートを37℃で30分間インキュベートした。この段階で、10⁶pfu/mlファージを含む試料から5μLを滴下し、吸収させた。プレートを好気的条件下で、37℃で一晩インキュベートした後、バクテリアローン上にプラークが見えるようになった。宿主域を、ファージの各々について、1×10⁶ PFU / mLの力価で行った（表10）。特定の臨床ラインローン上に少なくとも10個のプラークを形成することができるファージについて、細菌宿主をそのファージに感受性であると判定した。

10

【0145】

表10：KP2ファージの宿主域分析（力価1×10⁶ PFU/mL）は、19のKP2様臨床株で実施された。

20

R - 被験ファージの感染に対する抵抗性、S - 被験ファージの感染に対する感受性。

【表 10】

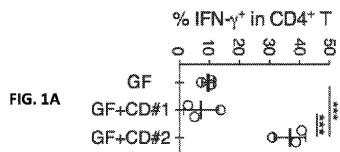
ファージ名	単離	CT-123-A	CT-131-A	CT-134-A	CT-136-A	CT-139-A	CT-141-A	CT-141-B	CT-142-A	CT-145	CT-147-A	CT-174-A	CT-130-A2	CT-130-C6	CT-132-A	CT-132-B	CT-132-C	CT-138-A	CT-128-A
		CT-123-B	CT-131-B	CT-134-B	CT-136-B	CT-139-B	CT-141-B	CT-142-B	CT-145-B	CT-147-B	CT-174-B	CT-130-A2	CT-130-C6	CT-132-A	CT-132-B	CT-132-C	CT-138-A	CT-128-B	
KP2M-M0109	MKP2-2161-1	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-M0105		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-M0110		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-M0111		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-M0112		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-M0108		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2M-P0208		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0204		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0207		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0203		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0206		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0205		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0212		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0209		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0210		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2M-P0211		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2W-M0102	KP2	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-M0103		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-M0106		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0109		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0107		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0108		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0105		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-M0107		S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0106		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-M0104		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
KP2W-P0101		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0102		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0103		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
KP2W-P0104		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

10

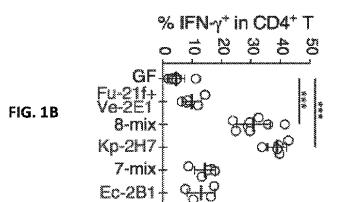
20

30

【図1A】



【図1B】



【図1C】

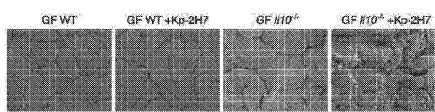
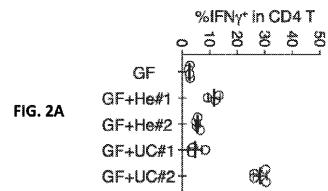
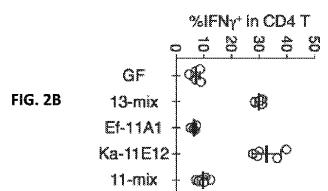


FIG. 1C

【図2A】



【図2B】



【図2C】

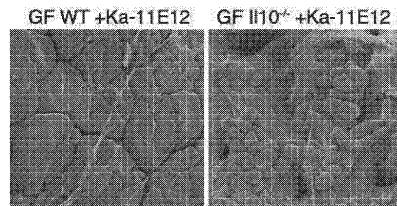
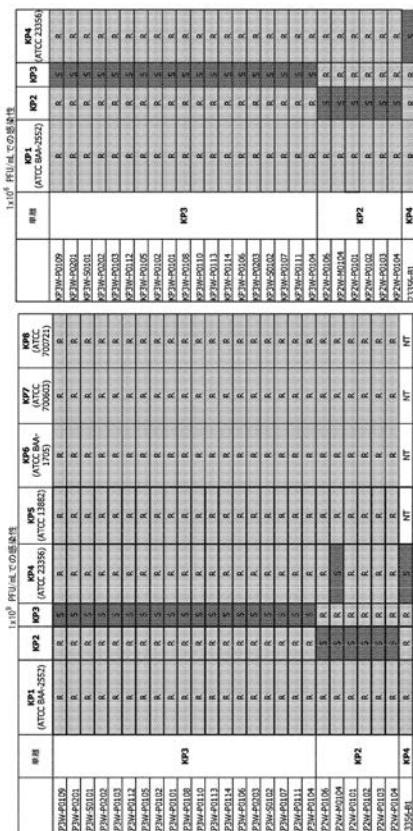
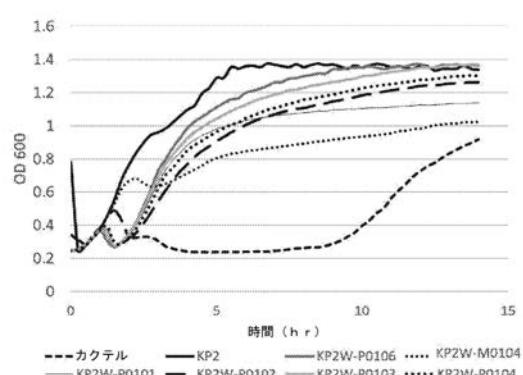


FIG. 2C

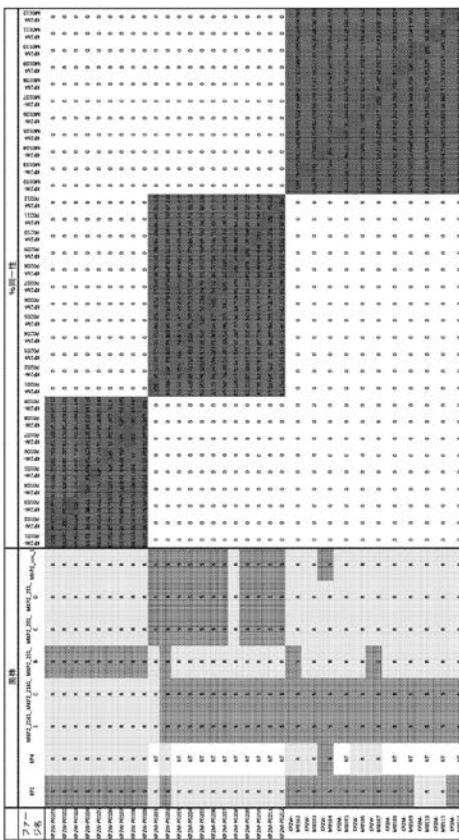
【図3】



【図4】



【 四 5 】



【 四 6 】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2018/001128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/00 A61K35/76 C12N7/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TAHA RASHID ET AL: "The Role of Klebsiella in Crohn's Disease with a Potential for the Use of Antimicrobial Measures", INTERNATIONAL JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 2013, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1-8, XP055558845, ISSN: 1687-9260, DOI: 10.1155/2013/610393 abstract section 4; page 5</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 March 2019	13/03/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2018/001128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTHIEU GALTIER ET AL: "Bacteriophages targeting adherent invasive Escherichia coli strains as a promising new treatment for Crohn's disease", JOURNAL OF CROHN'S AND COLITIS, 27 January 2017 (2017-01-27), page jjw224, XP055558846, NL ISSN: 1873-9946, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw224 abstract -----	1-30
A	US 2016/143965 A1 (DANGLAS PASCAL [CH] ET AL) 26 May 2016 (2016-05-26) abstract -----	1-30
A	Rose ET AL: "Sa1981 Pre-Operative Nutritional Status and Immunosuppression as Predictors of Post-Operative Events in Pediatric Ulcerative Colitis Patients", Gastroenterology, 1 January 2012 (2012-01-01), pages S-373, XP055558847, DOI: 10.1016/S0016-5085(12)61407-3 Retrieved from the Internet: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508512614103?via%3Dihub abstract -----	1-30
A	CHIH-HSIN HUNG ET AL: "ABSTRACT", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 55, no. 4, 18 January 2011 (2011-01-18), pages 1358-1365, XP055558848, US ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.01123-10 abstract page 1358 - page 1359 -----	1-30
A	H. S. SAID ET AL: "Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers", DNA RESEARCH., vol. 21, no. 1, 7 September 2013 (2013-09-07), pages 15-25, XP055558853, JP ISSN: 1340-2838, DOI: 10.1093/dnare/dst037 cited in the application the whole document ----- -/-	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2018/001128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	KOJI ATARASHI ET AL: "Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T H 1 cell induction and inflammation", SCIENCE, vol. 358, no. 6361, 20 October 2017 (2017-10-20), pages 359-365, XP055558856, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aan4526 cited in the application the whole document -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2018/001128

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016143965 A1	26-05-2016	AU 2014261461 A1 BR 112015027269 A2 CA 2910539 A1 CN 105407872 A EA 201591979 A1 EP 2799063 A1 EP 2991633 A1 HK 1221164 A1 JP 2016519126 A KR 20160005728 A PH 12015502500 A1 SG 112015088970 A US 2016143965 A1 WO 2014177622 A1	12-11-2015 26-09-2017 06-11-2014 16-03-2016 29-04-2016 05-11-2014 09-03-2016 26-05-2017 30-06-2016 15-01-2016 22-02-2016 27-11-2015 26-05-2016 06-11-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 12 Q 1/689 (2018.01)	C 12 Q 1/689	Z

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(71)出願人 520080366
 イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド アット ザ ウィツ
 マン インスティチュート オブ サイエンス
 Y E D A R E S E A R C H A N D D E V E L O P M E N T C O . L T D . A T T H
 E W E I Z M A N N I N S T I T U T E O F S C I E N C E
 イスラエル国 76100 レホヴォト ヘルツル ストリート 234

(74)代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74)代理人 230118913
 弁護士 杉村 光嗣
 (74)代理人 100181847
 弁理士 大島 かおり
 (72)発明者 本田 賢也
 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内
 (72)発明者 新 幸二
 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内
 (72)発明者 成島 聖子
 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内
 (72)発明者 エラン エリナブ
 イスラエル国 7680400 マズケレット バティア ハゲフェン ストリート 16
 (72)発明者 ロテム ソレック
 イスラエル国 76100 レホヴォト メオノット シャイン 12
 (72)発明者 エフラット カブラ
 イスラエル国 491606 ペタク ティクヴァ ベレル カツェネルソン ストリート 3
 (72)発明者 ハヴァ ベン ダビッド
 イスラエル国 7624811 レホヴォト パルディ イエヒエル 11/15
 (72)発明者 エヤル ウェインストック
 イスラエル国 66083 テルアビブ ウリエル アキュスタ ストリート 24
 (72)発明者 サラ ポロック
 イスラエル国 7628920 レホヴォト ゴードン ストリート 24 アパートメント ナンバー1
 (72)発明者 ユリア ムティウヒン
 イスラエル国 37105 パルデス ハツナ カルクル ハメヤスディム ストリート 12
 ピーオービー 643
 (72)発明者 ナオミ ザック
 イスラエル国 945611 エルサレム モルデカイ ナーキス ストリート 29

QX02

4B065 AA98X BA22 BA24 CA44
4C087 AA01 AA02 BC83 MA52 MA60 NA14 ZA68 ZB35