(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0098766
(43) 공개일자 2010년09월10일

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0017417
(22) 출원일자 2009년03월02일
심사청구일자 2009년03월02일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
조유희
서울특별시 마포구 창전동 서강쌍용예가 115-1002
정현희
서울특별시 송파구 문정1동 가락현대1차아파트 18-1003
허윤정
서울특별시 송파구 오금동 55-10 B-2
(74) 대리인
양부현

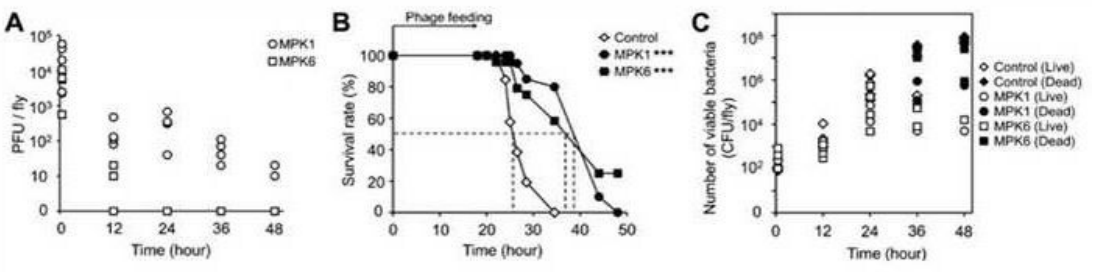
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 항-슈도모나스 애루지노사 항생제에 대한 스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법에 관한 것이다: (a) 슈도모나스 애루지노사를 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 감염시키는 단계; (b) 상기 감염된 초파리에게 스크리닝 하고자 하는 물질을 투여하는 단계; 및 (c) 상기 초파리의 사망률 또는 상기 초파리 파쇄물의 CFU(colony forming unit)를 측정하는 단계. 본 발명에 따르면, 본 발명은 항-슈도모나스 애루지노사 항생제를 스크리닝하는 방법을 제공하며 최초로 확립된 초파리 모델을 통해 항생제의 효능을 보다 적은 양으로 간편하게 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에서 확립한 초파리 모델은 박테리아의 병원성 및 숙주 면역 사이의 특이적 연락 체계를 조율하는 새로운 플랫폼을 제공한다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법:

(a) 슈도모나스 애루지노사를 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 감염시키는 단계;

(b) 상기 감염된 초파리에게 스크리닝 하고자 하는 물질을 투여하는 단계; 및

(c) 상기 초파리의 사망률 또는 상기 초파리 파쇄물의 CFU(colony forming unit)를 측정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 슈도모나스 애루지노사의 감염수는 10-1000 CFU인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 초파리의 배쪽 흉부(dorsal thorax)에 직접 슈도모나스 애루지노사를 주입하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 스크리닝 하고자 하는 물질은 단일 화합물, 혼합물 또는 파아지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 스크리닝 하고자 하는 물질은 파아지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 스크리닝 하고자 하는 물질을 초파리에 구강 투여하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 여러 생명 또는 비생명의 환경에서 편재하며, 인간의 면역체계가 약해졌을 때만 발생하는 병원균이다. 이는 낭포성섬유증, 중이염, 각막염 및 화상 상처 감염에 걸린 환자들로부터 종종 분리되며, 또한 면역이 저하된 환자들에서 패혈증의 병인이 되기도 한다. 이 박테리아는 3

세 이하의 어린이들에게 감염되어 폐의 기능에 심각한 영향을 줄 수 있다[28,33]. 게다가, *P. aeruginosa*는 맹장 파열 후 이차적으로 발생하는 패혈증, 복막염 증상의 건강한 어린이들에게서도 보통 발견된다[4]. *P. aeruginosa*에 의한 복막염은 복막 투석(continous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD)을 받고 있는 환자들에게 심각한 위협(약 10%의 치사율)이 될 수 있다[17]. 이러한 경우, 박테리아에 의한 감염은 종종 높은 사망률, CAPD의 실패 및 합병증을 유발하게 된다[16,17,19]. 복막염의 병리생리학적 복잡성을 이해하기 위해 *P. aeruginosa*에 의한 복막염에 걸린 설치류 모델이 개발되었다[38]. 병리학적 결과는 일반적으로 균혈증을 동반하며, 감염된 간에서는 감염 6시간 내에 인터류킨-6의 혈청 레벨이 증가하였고, *P. aeruginosa* 종 및 감염량에 따라 다르지만, 48시간 내에 최종적으로 사망하였다[5].

[0003] 비록, 박테리아의 감염을 조절하는데 사용되는 항생물질이 다양하게 존재하지만, 항생물질에 대한 저항성이 부득이하게 발생할 수 있기 때문에 종종 그 항생 물질은 효과적이지 못할 수 있다. 박테리아들 간의 고유한 또는 획득한 항생물질에 대한 저항성 기작의 선택 및 보급은 지금까지 밝혀진 다양한 항생 물질을 포함한 화학적 치료 방법을 방해하고, 다수의 항생 물질 저항성을 갖는 박테리아종의 발생을 증진시킨다. 이러한 이유로 최근 박테리아에 의한 감염 환자의 사망률이 증가하고 있다[26,34]. 따라서 박테리아에 의한 감염을 조절할 수 있는 새로운 치료 및 예방 전략의 개발이 강력하게 요구된다.

[0004] 항생 물질-저항성 미생물에 의해 야기되는 감염과 싸우기 위한 대체적인 및/또는 추가적인 항-감염 방법으로써, 특이적으로 숙주 박테리아의 감염을 목표로 할 수 있는 박테리오파아지가 다시 주목받고 있으며, 이를 파아지 치료 방법이라 불리운다[35]. 파아지 치료 방법은 파아지를 생체물질로서 사용하는 방법으로 최초의 항생 물질인 페니실린이 발견되기 전인 1916년 Felix d'Herelle에 의해 처음으로 소개되었다[36]. 파아지는 구소련 및 동유럽에서 박테리아 감염의 치료에 항생 물질 대신으로 사용되어왔다[30]. 최근 더 많은 박테리아들이 항생 물질의 저항에 대해 빠른 속도로 진화하고 있기 때문에 파아지 치료 방법에 많은 관심을 두고 있다. 따라서 파아지 치료 방법은 항생 물질의 가치 있는 대안이 될 수 있으며, 특정한 경우에서는 항생 물질보다 의학적으로 우월하다는 것이 증명되었다[3,22].

[0005] *P. aeruginosa*는 전통적인 항생 물질 치료 방법의 존재에도 불구하고 생태학적인 적성을 증진시키는 환경에 대한 적응력이 매우 강한 박테리아이다. 빠른 속도로 새로운 *P. aeruginosa* 종들이 발생하고, 항생 물질-저항성의 임상 분리 박테리아주들이 지속적으로 증가함에 따라 *P. aeruginosa*-매개성 감염을 치료하기 위한 파아지 치료 방법과 같은 대안이 강하게 대두되고 있다. 최근, 유전적으로 변형된 필라멘트형 파아지 Pf3R[10], 용해성 파아지 분리 집단 또는 파아지 칵테일을 이용한 파아지 치료 방법의 효능이 화상 감염[23] 및 장-유래 패혈증[37]을 포함하여 *P. aeruginosa*에 의해 감염된 다양한 실험용 마우스에 대해 연구가 진행 중에 있다. *P. aeruginosa*에 의한 병원생리학적 기작은 상당히 복잡하기 때문에 항박테리아 치료 방법의 효능 및 관련성에 대해 더 많은 감염 모델에 대한 테스트가 필요하다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명자들은 슈도모나스 애루지노사 감염증에 대한 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 새로운 스크리닝 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 최초로 초파리(*Drosophila melanogaster*) 모델을 이용하여 보다 적은 양으로 용이하게 항-슈도모나스 애루지노사 항생제를 스크리닝할 수 있는 방법을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) 슈도모나스 애루지노사를 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 감염시키는 단계; (b) 상기 감염된 초파리에게 스크리닝 하고자 하는 물질을 투여하는 단계; 및 (c) 상기 초파리의 사망률 또는 상기 초파리 파쇄물의 CFU(colony forming unit)를 측정하는 단계.

[0011] 본 발명자들은 슈도모나스 애루지노사 감염증에 대한 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 최초로 초파리 모델을 이용하여 보다 적은 양으로 용이하게 항-슈도모나스 애루지노사 항생제를 스크리닝할 수 있는 방법을 확인하였다.

[0012] 슈도모나스 애루지노사는 여러 생명 또는 비생명의 환경에서 편재하며, 인간의 면역 체계가 약해졌을 때만 발생하는 병원균으로, 식물, 벌레 및 곤충과 같은 다수의 계통 배경의 숙주들에 감염할 수 있다. 따라서 항미생물제의 항박테리아 효능을 확인하고 평가하기 위해서는 다양한 감염 모델들의 개발이 필요하다.

[0013] 본 발명에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 항-슈도모나스 애루지노사 항생제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0014] (a) 슈도모나스 애루지노사를 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 감염시키는 단계;

[0015] (b) 상기 감염된 초파리에게 스크리닝 하고자 하는 물질을 투여하는 단계; 및

[0016] (c) 상기 초파리의 사망률 또는 상기 초파리 파쇄물의 CFU(colony forming unit)를 측정하는 단계.

[0017] 초파리 전신성 감염(systemic infection)-기반 스크리닝을 통해 동정된 병원성 요인들이 마우스의 복막염에 필요하다는 사실에 기초하여[18], 본 발명자들은 파아지 치료법을 평가하기 위해 초파리 모델을 본 발명에서 최초로 확립하였으며 이러한 비-포유동물 감염 모델 및 마우스 모델을 이용하여 MPK1 및 MPK6(기탁번호: KFCC11438P)의 항박테리아 효능을 입증하였다.

[0018] 본 발명은 인간 및 동물에서 박테리아-감염증을 예방 또는 치료하기 위한 새로운 항-슈도모나스 애루지노사 항생제를 동정할 수 있는 스크리닝 방법으로서, 본 발명자들은 초파리 모델을 최초로 확립하였다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 슈도모나스 애루지노사의 감염수는 10-1000 CFU, 보다 바람직하게는 20-700 CFU, 보다 더 바람직하게는 30-400 및 가장 바람직하게는 50-200 CFU이다. 따라서 본 발명에서 이용되는 슈도모나스 애루지노사의 감염수는 매우 적은 양이며 본 발명은 이를 이용해 효과적으로 스크리닝을 수행할 수 있다는 장점을 지닌다.

[0020] 상기 단계 (a)에서 스크리닝 하고자 하는 물질의 투여는 구강 (예컨대, 섭취(feeding)를 통해 1차적으로 장내로 주입하는 방법) 또는 비구강 (예컨대, 배쪽 흉부(dorsal thorax)와 같은 신체부위에 직접 찌르거나(pricking) 또는 주입하는 방법)으로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비구강 투여이다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 초파리의 배쪽 흉부에 직접 슈도모나스 애루지노사를 주입하여 실시한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 스크리닝 하고자 하는 물질을 초파리에 구강 투여하여 실시한다.

[0023] 본 발명의 방법에 따르면, 최종적으로 초파리의 사망률 또는 상기 초파리 파쇄물의 CFU(colony forming unit)를 측정하여 슈도모나스 애루지노사 항생제를 스크리닝 한다.

[0024] 시험물질의 처리에 의해 슈도모나스 애루지노사에 감염된 초파리의 사망률이 감소하거나 초파리 파쇄물의 CFU가

감소하는 것으로 나타나면 시험물질이 슈도모나스 애루지노사를 용해하는 활성을 지닌 것으로 판정되며, 결국 시험물질은 슈도모나스 애루지노사-감염증을 치료할 수 있는 능력을 지니는 후보물질로 결정된다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 스크리닝 하고자 하는 물질은 단일 화합물, 혼합물 또는 파아지이고 보다 바람직하게는 파아지이다.

[0026] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리 또는 천연 재료로부터 얻을 수 있다. 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

[0027] 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0028] 본 발명의 방법에서 시험물질로 이용되는 박테리오파아지는 숙주세포를 용해하는 박테리아 바이러스로, 다양한 병원균에 대해 효과적으로 작용할 수 있는 넓은 스펙트럼을 가진 항생제에 비해 파아지는 안전하기는 하지만 병원균에 대해 좁은 스펙트럼을 가진다는 한계로 인해 점점 이용 빈도가 낮아지고 있다. 최근 파아지에 대한 이해가 높아짐에 따라 파아지 치료 방법 또한 새롭게 주목받고 있다. 다양한 동물에서 유발되는 질병에 대한 치료를 포함하는 실질적인 파아지의 이용에도 불구하고 임상 적용, 음식 안전-관련 이용 및 환경오염 개선 등의 여러 분야에서 새로운 파아지의 발견, 특이적인 구체적 적용을 위한 최적의 파아지 선택 및 파아지를 이용하는 방법의 개발 등이 요구되고 있다. 또한, 인간 및 동물에서 박테리아-유발 질환, 질병 또는 상태, 즉 항생제-저항성 박테리아에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위하여 새로운 파아지 및 동정 방법이 필요하다.

[0029] 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 항-슈도모나스 애루지노사 항생제는 슈도모나스 애루지노사 감염증에 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 항-슈도모나스 애루지노사 항생제는 낭포성섬유증, 중이염, 각막염, 내안구염(endophthalmitis), 균혈증, 화상 상처 감염, 폐렴, 뇌막염, 복막염 또는 패혈증을 포함하며, 보다 바람직하게는 폐렴, 뇌막염, 복막염 또는 패혈증의 치료, 가장 바람직하게는 복막염 또는 패혈증의 치료에 이용될 수 있다.

효 과

[0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0031] (a) 본 발명은 항-슈도모나스 애루지노사 항생제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0032] (b) 본 발명에 따르면, 최초로 확립된 초파리 모델을 통해 항생제의 효능을 보다 적은 양으로 간편하게 확인할 수 있다.

[0033] (c) 본 발명에서 확립한 초파리 모델은 박테리아의 병원성 및 숙주 면역 사이의 특이적 연락 체계를 조율하는 새로운 플랫폼을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0035] **실시예**

[0036] **실험 재료 및 실험 방법**

[0037] ***사용 균주 및 배양 조건***

[0038] 본 발명에서 사용한 균주는 *P. aeruginosa* 스트레인 PAO1이며[12], 리포폴리사카라이드 돌연변이체(*rmd*, *wbpM* 및 *rmlC*)는 Joe Lam 박사(University of Guelph, Canada)로부터 제공받았다[27]. 박테리아는 Luria-Bertani(LB; 1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물 및 1% NaCl) 배지에 공기 주입을 하거나, 2%의 박토-아가(Difco) 또는 세트리미드 아가(*Pseudomonas* 분리용 아가, Fluka)를 넣어 플레이트를 만들어 37℃에서 배양하였다.

[0039] ***파아지 용해물의 준비***

[0040] *P. aeruginosa* 스트레인 PAO1을 숙주로 사용하여 플레이트 용해물에 의한 파아지 MPK1 및 MPK6를 풍성하게 하는 방법은 종래의 기술에 따랐다[13]. 배양 현탁액을 4℃ 및 8,000×*g*에서 10분 동안 원심분리하여 세포 잔해를 제거하고, 파아지 파티클을 10%의 폴리에틸렌 글리콜 및 1 M의 NaCl의 존재 하에서 배양 상층액으로부터 침전시켜, 이를 파아지 버퍼[10 mM $MgSO_4$, 10 mM Tris(pH 7.6) 및 1 mM EDTA] 5 mℓ에 녹였다. 파아지 파티클은 4℃ 및 110,000×*g*에서 3시간 동안 초고속원심분리를 하여 농축하고, 이를 파아지 완충액에 재현탁하였다. 파아지 현탁액을 불연속적 농도의 CsCl(1.45, 1.50 및 1.70 g/mℓ)의 상층에 올려 놓고, 4℃ 및 87,000×*g*에서 2시간 동안 원심분리를 한 다음 파아지 밴드를 수득하여 투석 과정을 수행하였다.

[0041] ***투과 전자 현미경***

[0042] 파아지 MPK1 및 MPK6의 비리온 형태는 종래의 기술에 따라 투과 전자 현미경을 이용하여 확인하였다[13]. 간단히 설명하면, 비리온 형태로 코팅된 TEM 그리드를 친수성 처리를 10분 동안하고, 1/100 희석된 CsCl-정제 파아지 시료 20 ㎕를 표류시키고 바로 20 ㎕의 2% 우라닐 아세테이트(pH 4.0)을 사용하여 네거티브 염색을 하였다. 그리드를 30분 동안 공기 중에서 건조시키고, 투과 전자 현미경(JEM 1010 EM; JEOL Ltd)을 이용하여 120-500 K의 배율로 관찰하였다.

[0043] ***파아지 감염***

[0044] 파아지 감염은 보편적인 플라크 어세이 또는 스폿팅 어세이 방법을 사용하였다[12]. 약 10^2 플라크 형성 단위(plaque forming unit, PFU)의 파아지를 포함하는 10 ㎕의 용해물을 10^7 콜로니 형성 단위(colony forming unit, CFU)의 지수 성장 후반기까지 자란(OD_{600} = 0.7) *P. aeruginosa* 와 혼합한 다음 100 ㎕의 파아지 버퍼에 재현탁하였다. 10분 동안 배양한 후, 3 mℓ의 탑 아가를 첨가하여 혼합한 다음 혼합액을 도말하였다. 37℃에서 16-24시간 동안 배양한 후 플라크를 확인하였다.

[0045] ***마우스 실험***

[0046] 마우스 감염은 4주령의 웅성 ICE 마우스를 사용하였으며, 서강대학교의 동물 실험 윤리 위원회의 허가를 얻어 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 박테리아 세포는 정체기(OD_{600}=3.0)까지 성장시켜 하베스트하고, PBS 버퍼(2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 및 2 mM KH_2PO_4, pH 7.0)로 2회 세척한 다음 2 × 10^7 CFU/mℓ가 되도록 PBS 버퍼에 재현탁하였다. 복막염을 유도시키기 위해 100 ㎕의 박테리아 현탁액(약 2 × 10^6 CFU)을 마우스에 복강내 감염을 시켰으며, 10%의 뮤신은 사용하지 않았다. 파아지 치료 방법을 위해, 감염을 시키고 6-12시간 후에 PBS 버퍼 내에 2 × 10^6(1의 MOI) 및 2 × 10^7(10의 MOI) PFU를 포함하는 파아지 용액을 복강내 또는 근육내에 주사하였다. 마우스 조직으로부터 박테리아의 존재량을 계산하기 위해서, 감염된 마우스는 지정

된 시간(감염 후 0.5, 12, 24, 36 및 48 시간)에서 에테르를 흡입시켜 마취시켰다. 폐, 간 및 비장 시료를 무균상태에서 얻어 1 ㎖의 PBS 버퍼에 조직 호모게나이져(Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 분쇄시켰다. 혈액 및 분쇄된 조직 시료의 일부를 세트리미드 아가에 도말한 다음 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 파아지의 약물동력학을 측정하기 위해, 파아지를 감염되지 않은 마우스에 복강내 또는 근육내 주사하였고, 혈액, 폐 및 간 시료를 얻어 지정된 시간(감염 후 0.5, 12, 24, 36 및 48 시간)에서 분쇄하였다. 조직 분쇄물은 여과하였고, 여과물은 플라크 어세이를 통해 PFU 측정에 사용하였다.

[0047] ***초파리(Drosophila melanogaster) 실험***

[0048] 초파리 Oregon R은 종래 기술[20]을 약간 변형하여 25℃에서 콘 밀-덱스트로즈 배지[0.93% 아가, 6.24% 건조 효모, 4.08% 콘 밀, 8.62% 덱스트로즈, 0.1% 메틸 파라벤 및 0.45% (v/v) 프로피오닉산]를 사용하여 성장시켰다. 간단히 설명하면, 초파리의 감염은 5일령의 성체 초파리를 골라 배쪽 흉부에 10 ㎛ 바늘(Ernest F Fullam)을 사용하여 수행하였다. 정체기(OD_{600}=3.0)까지 성장시킨 배양균으로부터 10^7 CFU/㎖을 포함하는 PBS로 희석된 박테리아 현탁액을 바늘의 중간까지 도달하도록 찔러 넣었다. 상기 희석에서 동물 당 50-200의 박테리아를 도입하였다. 감염된 초파리는 5 × 10^7 PFU가 포함된 100 ㎕의 파아지 용액이 깔려있는 새로운 배지에 옮겨졌다. 초파리의 사망률은 감염 후 48시간까지 측정하였다. 상기 조건에서 15시간 내에 죽은 초파리(5% 미만)은 생존률 결정에 포함시키지 않았다. 사망률은 최소 5회 이상 반복 측정하였다. 박테리아의 존재량을 계산하기 위해서, 감염된 초파리는 지정된 시간에서 CO_2를 이용하여 마취시켜 LB에 분쇄하였다. 각각의 감염된 초파리의 분쇄물은 LB 아가에 도말하였으며, 초파리 당 CFU를 측정하기 위해 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. *D. melanogaster*에서 파아지의 약물동력학을 측정하기 위해 12시간 동안 파아지를 섭취시킨 다음 파아지가 없는 새로운 배지에 초파리를 옮겨 놓았다. 초파리를 지정된 시간(0.5, 12, 24, 36 및 48시간)에서 분쇄하였으며, 조직 분쇄물은 여과하여 플라크 어세이에 의해 PFU를 측정하는데 사용하였다.

[0049] ***통계 분석***

[0050] 사망률에 있어서 대조군 및 실험군 사이의 차이의 통계학적 유의성을 결정하는데는 캐플란-마이어 로그랭크 통계치를 사용하였다. 혈액 및 기관으로부터 회수된 생존한 박테리아의 수에 대한 통계학적 유의성은 맨-휘트니 U 테스트를 통해 확인하였다.

[0051] **실험 결과**

[0052] ***P. aeruginosa에 대한 새로운 카우도바이럴스 목에 속하는 파아지 종의 확인***

[0053] *P. aeruginosa*에 특이적인 파아지는 하수 시료로부터 처음 분리되었으며, 서울 및 서울 근교에서 여러 번 분리하였다. 파아지의 최초 분리시, 용해성 파아지의 특징인 식별할 수 있는 커다란 플라크 형성 여부에 기초하여 그들의 용해 활성을 스크리닝하였다. 본 발명자들은 MPK1 내지 MPK6로 명명한 *P. aeruginosa* 스트레인 PAO1에 대한 6종의 잠재적인 용해성 파아지를 플라크의 크기(37℃에서 18시간 동안 배양하여 지름 3 mm 이상인 것) 및 투명도에 기초하여 선별하였다(도 2). 본 발명자들은 이들 6종의 파아지를 투과 전자 현미경을 사용하여 형태를 관찰하였다. 비리온 구조에 근거하여, MPK1 내지 MPK5는 약 70 nm 지름의 이코사헤드럴(icosahedral) 헤드 및 약 110 nm 길이의 수축성 섬유질의 테일을 가진 미오비리데 패밀리(*Myoviridae* family, *Caudovirales* 목)에 속하는 것을 확인하였다(도 1A). MPK6는 MPK1과 유사한 헤드를 가지고 있으나, 10 nm 이하 길이의 짧은 테일을 가지고 있었으므로(도 1B), 이는 형태 타입 C의 포도비리데 패밀리(*Podoviridae* family, *Caudovirales* 목)의 서브디비젼 C1에 속하는 것을 확인하였다[1,2,8]. 결론적으로, 본 발명자들은 6종의 카우도바이럴스 목에 속하는 파아지를 분리하였으며, 이들은 *P. aeruginosa*에 대해 용해성이 있었다. 상기 미오비리데 파아지로부터 MPK1 및 MPK6를 선택하여 다음 실험에 사용하였다. 본 발명자들은 상기 MPK6를 *Podoviridae* MPK6로 명명하고, 기탁기관 한국미생물보존센터에 2009년 1월 21일자로 기탁하고, 기탁번호 KFCC11438P를 부여받았다.

[0054] ***파아지 MPK1 및 MPK6의 수용체***

[0055] *P. aeruginosa*의 표면 수용체의 많은 수는 박테리오파아지 수용체와 관련이 있다. 특히, 타입 IV 필라이(TFP)는 필라멘트형 파아지 Pf[6], 단일 가닥 RNA 파아지 PP7[8], 브래들리 B-타입 파아지 P04 및 MP22와 같은 잠재성 형질도입 파아지[13]를 포함한 다양한 *P. aeruginosa* 파아지의 주요 수용체로서 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

[0056] 리포폴리사카라이드(LPS)는 파아지 수용체로서 작용하는 분자로 LPS 내의 상세한 분자적 성분은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다. 다만, LPS의 핵심 부위가 파이(phi) PLS27 및 파이 CTX의 파아지 수용체로서 작용한다는 사실만이 알려져 있을 뿐이다[15,39]. LPS가 MPK1 및 MPK6의 수용체로서 작용할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 PAO1 스트레인으로부터 유래한 LPS 돌연변이체를 사용하였다: *rmd* (A-폴리사카라이드의 결핍), *wbpM* (B-폴리사카라이드의 결핍) 및 *rmlC* (핵심-폴리사카라이드의 결핍 및 A- 및 B-폴리사카라이드의 결핍). 도 2에서 보는 바와 같이, 두 파아지는 모두 야생형 및 *rmd* 박테리아에서 선명한 플라크를 형성하였으나, *rmlC* 박테리아에서는 플라크를 형성하지 못하였다. 흥미롭게도, *wbpM* 돌연변이체에서 MPK6는 플라크를 형성하지 못하였으나, MPK1은 작은 플라크를 형성하였는데, 이는 정상 수용체가 *wbpM* 돌연변이체에서 MPK1에 대해 여전히 존재하는 대체 수용체(들)로 인해 B-폴리사카라이드가 돌연변이를 일으킴으로써 영향을 받았을 것이라고 추측된다. 따라서 비록 두 파아지의 파아지-수용체 상호작용에 있어서 분자적 결정소가 다를 것으로 보임에도 불구하고, LPS의 B-폴리사카라이드는 MPK1 및 MPK6가 PAO1 박테리아 내로 들어가는데 가장 중요한 수용체일 것으로 생각된다.

[0057] ***인 비트로에서 파아지 MPK1 및 MPK6의 용해 활성***

[0058] MPK1 및 MPK6 파아지의 용해 활성은 파아지 생활 주기에서 싱글 스텝 생장곡선에 기초하여 조사하였다. 감염비(multiplicity of infection, MOI)가 1인 MPK1 또는 MPK6가 포함된 배지에서 *P. aeruginosa* PAO1(약 10^7 CFU)을 배양하였다. 생존한 박테리아의 숫자는 MPK1이 30분 동안의 배양 후 약 10^2 CFU, MPK6가 120분 동안 배양 후 약 10^3 CFU로 점차적으로 감소하였는데(도 3), 이는 두 파아지 모두 *P. aeruginosa* PAO1에 대해 잠재적인 용해 활성을 가지고 있음을 나타내며, 상기 생장 조건에서는 적어도 MPK1이 MPK6보다 빠르게 *P. aeruginosa*를 죽일 수 있다는 것을 의미한다. 이들 파아지에 의한 *인 비트로*에서 성장 저해의 능력은 *P. aeruginosa*에 의한 실험적인 감염(*인 비보*)에 대항한 항박테리아 효능을 평가할 수 있게 해주는 결과이다.

[0059] ***마우스에서 파아지 MPK1 및 MPK6의 약물동력학(pharmacokinetics)***

[0060] 치료 효능을 평가하기 이전에, 본 발명자들은 복강내 또는 근육내 경로 중에서 어떠한 경로가 마우스에서 파아지를 운반하는데 더 나은지 결정하기 위해 두 파아지의 약물동력학을 조사하였다. 5×10^7 PFU의 파아지를 감염되지 않은 마우스에 복강내 또는 근육내 경로를 통해 주입하였다. 파아지 시료를 복강내 또는 근육내에 주입받은 그룹으로부터 각각 3마리의 마우스를 감염 후 0.5, 12, 24, 36 및 48시간에서 안락사시켰다. 기관(간 및 폐) 및 혈액(밀리리터 당)으로부터 파아지의 숫자를 계산하였다(도 4). 조사한 조직에서, 다른 경로에 의해 MPK1 및 MPK6 파아지의 주사 후, 상대적인 PFU 레벨의 패턴이 일관된 것을 관찰할 수 있었는데(근육내>복강내), 이는 *P. aeruginosa*에 의한 화상 감염에 대해 10^8 PFU의 파아지 칵테일을 사용한 종래의 연구와도 일치한다[23]. 모든 조건에서, 비록 파아지 주사 직후(30분)에는 비슷한 숫자의 파아지가 운반되었음에도 불구하고, MPK1은 MPK6보다 더 나은 지속성을 보였다. 특히 MPK6가 근육내 경로에 의해 운반되었을 경우에는 혈액으로부터 거의 회수되지 않았다(도 4D). 이러한 결과들은 실시예에서 2종의 *P. aeruginosa* 파아지는 마우스에서 유사한 약물동력학을 가지고 있으나, MPK1은 동물 조직에서 MPK6보다 더 나은 지속성이 있음을 보여준다.

[0061] ***마우스 복막 감염에 대한 MPK1 및 MPK6의 치료 효능***

[0062] MPK1 및 MPK6 파아지를 *P. aeruginosa* 스트레인 PAO1의 감염 6시간 후에 복강내 또는 근육내 경로에 의해 서로 다른 양(MOI가 1 또는 10)이 되도록 주사하였다. 박테리아를 처리하지 않은 마우스와 비교할 때 감염된 마우스에서 양 파아지 모두 MOI가 10인 경우에 두드러지게 보호됨을 확인할 수 있었다(도 5A 및 도 5B). 근육내

경로를 통해 MOI가 1이 되도록 주사한 MPK6에서는 박테리아에 대해 상당히 보호가 되었음을 관찰할 수 없었다(도 5A; p=0.316). 도 4에서 볼 수 있듯이, 마우스에서는 근육내 주사의 약물동력학이 더 좋은 효과를 나타냈으나, 초파리의 경우 복강내 주사가 더 나은 효능을 보였다. 본 발명자들은 복막염 모델을 사용하였으므로, 이는 복강내 주사가 감염 부위에 직접적이고 더욱 효과적으로 파아지가 운반될 수 있음을 나타내는 것이다. 복막염은 감염된 동물의 간에서 박테리아의 침투를 수반하므로[5], 파아지의 주사가 박테리아의 증식을 저해하는지 여부를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 비장, 폐 및 간을 포함한 마우스 기관에서 박테리아의 존재량을 확인하였다. 감염 24시간 후에 살아있는 동물로부터 기관 시료들을 채취하였다. 도 5C에서 볼 수 있듯이, 두 파아지의 처리는 박테리아의 존재량을 상당히 감소시켰다; MPK1의 처리는 간, 비장 및 감염 24시간 후의 살아있는 마우스에서 채취한 간에서 약 2-3 로그 정도 박테리아의 양이 감소하였는데 반해, MPK6를 처리한 살아있는 마우스에서는 약간 감소(약 2 로그 정도)하였다. 이러한 결과는 두 파아지가 *인 비보*에서 박테리아의 증식을 저해함으로써 *P. aeruginosa*-유도성 복막염을 조절하는데 매우 효과적임을 나타낸다.

[0063] ***초파리에서 MPK1 및 MPK6 파아지의 약물동력학 및 치료 효능***

[0064] 초파리의 전신 감염 모델은 박테리아 감염성 기작을 연구하기 위한 좋은 시스템으로, 뮤린 복막염 모델(10^7 CFU)에 비해, 적은 양의 *P. aeruginosa* 박테리아(50-200 CFU)로도 감염시킬 수 있다. 본 발명자들의 최적화된 실험 조건 하에서 약 10^7 CFU까지 박테리아의 증식에 의한 전신 감염의 결과로 48시간 내에 사망을 유도한다[18,20]. *P. aeruginosa*에 대해 파아지 치료 방법을 평가하기 위한 *D. melanogaster* 모델을 설립하기 위해, 본 발명자들은 5 × 10^7 PFU를 포함한 파아지 시료들을 2.5 ml의 콘-밀 배지를 포함한 초파리 바이알에 깔아 초파리 바이알 내의 초파리 그룹(n=50)에게 파아지를 섭취시켰다.

[0065] 본 발명자들은 우선 초파리 조직에서 파아지의 지속성 및 잠재적인 독성을 측정하기 위해 초파리에게 섭취시킨 양 파아지의 약물동력학을 조사하였다. 감염되지 않은 초파리들은 각 파아지(5 × 10^7 PFU)를 섭취시키고 파아지가 없는 새로운 배지에 옮겼다. 도 6A에서 볼 수 있듯이, 파아지는 파아지를 섭취한 초파리들로부터 회수되었으며, 이는 상기 조건에서 파아지가 성공적으로 초파리에 감염되었음을 보여준다. 약 10^4 PFU의 양의 MPK1 및 MPK6 파아지가 단지 12시간의 섭취에 의해 이전되었다. 또한, 48시간에서 PFU가 약 3 로그 정도로 점차적으로 감소하였음에도 불구하고, MPK1은 새로운 배지로 옮겨진 후 48시간까지 지속되었다. 흥미롭게도, MPK6는 거의 회수되지 않았으며, 새로운 배지로 옮긴 후 박테리아의 감염이 없는 상태에서 12시간 이전에 사라졌다. 게다가, MPK1 및 MPK6 파아지는 모두 12시간 섭취에 의해서도 전혀 독성이 없었다. 72시간 이상 파아지를 섭취시켜도 죽는 초파리는 발견되지 않았다. 이러한 결과들은 초파리 감염에 대한 파아지 치료 방법에서 파아지를 섭취시키는 것이 파아지를 주입하는 대안으로 사용될 수 있음을 보여준다.

[0066] 다음으로는, 초파리 감염 모델에서 PAO1-유도 사망률 및 증식으로부터의 보호 효과에 기초하여, 양 파아지의 항박테리아 효능을 평가하였다. 50 PAO1-감염 초파리를 수용할 수 있는 초파리 바이알에 5 × 10^7 PFU의 박테리아를 투여하고 MPK1 및 MPK6 파아지를 주입하였다(즉, 한 마리의 초파리에 대해 10^6 파아지를 섭취시켰다.). 파아지를 섭취하지 않은 초파리들과 비교할 때, 감염된 초파리들은 각 파아지들에 의해 상당히 보호되었음을 확인할 수 있었다(도 6B). 초파리 조직에서 MPK1의 약물동력학이 더 나은 것으로 관찰되었음에도 불구하고, 양 파아지에서 유사한 효능을 관찰할 수 있었다(p=0.637).

[0067] 본 발명자들은 파아지를 섭취한 초파리 조직에서 박테리아의 증식에 대한 보호 효과를 조사하였다. 도 6C에서 볼 수 있듯이, MPK6 및 MPK1이 상기 감염 조건에서 박테리아의 증식을 저해하였다. 감염된 초파리가 죽는 *P. aeruginosa*의 10^7 CFU (즉, 5 로그 증가)에 도달하였기 때문에[20], PAO1-유도성 치사에 저항하기에, 초파리가 죽기 시작하는, 2 로그 이상의 저해만으로도 충분하였다. 이러한 결과들은 MPK1 및 MPK6 파아지가 *인 비보*에서 박테리아의 증식을 저해함으로써 *P. aeruginosa*에 의해 유도된 초파리의 치사를 조절하는데 매우 효과적임을 제시한다.

[0068] **논의 사항**

[0069] 파아지를 이용한 치료 방법은 80여 년 전에 처음으로 소개되었으나[14], 효과적인 파아지 치료 시스템의 개발에 있어서 파아지에 대한 박테리아의 저항 가능성이 장애가 되어 왔다[21]. 그러나 Smith 그룹은 이전 연구에서 장질환성 대장균 및 그 부모들의 파아지-저항성 돌연변이체에 의해 생성된 감염은 부모 박테리아에 대해 활동성이 있는 파아지로부터 유래한 파아지 돌연변이체를 사용하여 성공적으로 조절할 수 있다고 밝혔다[31,32]. 박테리아가 파아지 저항성을 획득한다고 하더라도, 새로운 이들 박테리아에 효과적으로 작용하는 파아지 돌연변이체는 하수 처리 식물 및 병원 오수 또는 UV 노출과 같은 실험적 조작을 통해 연구자들에게 쉽게 접근이 가능하다[22]. 파아지 처리 동안에 저항성이 발생하는 것을 막기 위한 파아지 칵테일과 같은 서로 다른 파아지 종의 혼합물은 이미 잘 알려진 방법이다. 따라서 파아지 치료 방법은 항생제 저항성의 시대에서 박테리아 감염을 조절할 수 있는 쉽고 중요한 방법이라 할 수 있다.

[0070] 마우스에서 *P. aeruginosa*에 의한 장-유래 패혈증 및 화상 감염을 포함한 실험적 감염에 대한 파아지 치료 방법의 여러 케이스가 이미 보고되어 있다[23,26]. 최근 피오신(pyocin) 치료 방법의 연구는 마우스 복막염 모델에 기초하고 있다[29]. 이러한 실험적 감염 모델은 *P. aeruginosa* 감염으로 인한 복잡한 병리생리학적 기작을 고려한다면 매우 적절한 것으로 보인다. 더욱 중요한 것은 *P. aeruginosa*가 포유동물, 곤충, 벌레 및 식물 등 계통학적으로 다양한 숙주를 감염시킬 수 있는 다숙주 병원균이라는 것이다. 따라서 항미생물제의 항박테리아 효능을 확인하고 평가하기 위해서는 다양한 감염 모델들이 개발되어야 한다.

[0071] 본 발명자들은 복강내 또는 근육내 주사된 MPK1의 항박테리아 효능을 평가하기 위해 *P. aeruginosa*의 비강 주입에 의한 마우스에서의 급성 폐 감염에 대해 시험하였다. 그러나 상기 시험에서 폐 감염-유래의 사망은 전혀 막을 수 없었으며, 이는 혈액 또는 간을 통한 주사 경로에 비해 폐로의 파아지 운반 정도가 낮았기 때문으로 생각되어진다. 따라서 *P. aeruginosa*로 인한 특별한 감염 조건은 최적의 항박테리아 효능을 보증하기 위한 치료용 파아지의 약물동력학적 정도에 근거한 특별한 주입 조건을 필요로 한다.

[0072] 본 발명의 특징 중 하나는 본 발명자들이 *인 비보*에서 항박테리아 활성을 평가하기 위한 새로운 치료용 동물 모델로 비-포유동물 모델 숙주인 초파리를 이용했다는 것이다. 본 발명자들은 현재 파아지가 주사되는 방법 및 초파리 조직 내에서 어느 부위에 특이적으로 위치하는지 이 모델을 최적화하기 위한 후속 연구를 계속 중에 있다. 최근 연구에서, 선충을 이용한 비-포유동물의 살아있는 동물 감염 모델, 즉, 엔테로코코스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*) 또는 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)에 대한 새로운 항미생물 화합물을 분리하기 위해 초고속스크린(high through-put screen)을 통한 카에노하디티스 엘레강스 (*Caenorhabditis elegans*) 감염 모델이 성공적으로 개발되었다[9,25]. 비-포유동물 모델 숙주를 이용하는 가장 큰 장점은 연구비 및 실험 스케일이 현저히 줄어든다는 것이다. 이는 비-포유동물 모델 동물의 작은 크기가 실험의 세팅에 있어서 병원균 및 항비생물의 양 및 공간을 적게 차지하고, 결과적으로 화학물 라이브러리로부터 초고속 분석을 가능하게 하기 때문이다. 또 다른 장점은 목표 미생물의 성장을 저해하지 않으나, 병원성 경로를 완화시키고 또는 숙주의 면역 반응을 증진시키는 새로운 항미생물 화합물이 분리될 수 있다는 것이다. 비록 현재의 파아지 치료 방법이 파아지의 박테리아를 용해할 수 있는 활성을 포함하고 있으나, 어떤 용원성 파아지는 가까운 장래에 병원성을 조절하는 대체 모델로서 잠재적으로 고려될 수 있다. Zegans 그룹은 용원성 형태로서 숙주 단백질과 반응하여 *P. aeruginosa*의 잠재성 파아지인 MS3가 군집 이동 및 바이오필름 형성을 포함한 집단 행동을 하도록 변형한다는 것을 보고하였다[40]. 바이오필름 형성 및 쿼럼 센싱과 같은 군집 행동은 *P. aeruginosa*의 생존 기작 및/또는 병원성에 있어서 중요하기 때문에[11], 이러한 성질을 갖는 용원성 파아지를 개발하는 파아지 치료 방법의 가능성은 살아있는-동물 감염 모델을 사용하여 시험해 볼 필요가 있다.

[0073] 항박테리아 치료 방법을 위한 잠재성 파아지를 이용하는 데 가장 큰 걸림돌은 그들이 숙주의 DNA에 상대적으로 무작위적으로 삽입된다는 것으로, 잠재적으로 박테리아의 병원성 특질에 예상치 못한 결과가 나올 수 있다는 것이다[24]. 그러나 이에 대한 직접적인 증거는 아직 밝혀진 바가 없으며, 본 발명자들은 감염된 숙주에서 잠재적 파아지 또는 용원성 파아지 및 박테리아 사이의 기능적 및 복잡한 상호작용이 각각에게 있어서 유리한지 불리한지 여부를 예상할 수 없다. 따라서 본 발명자들은 예상치 못한 돌연변이(잠재적 파아지) 및 세포용해-유래의 엔도톡신 생성(용해성 파아지)으로부터 나오는 잠재적인 부작용에 대해 염려하면서 잠재적 파아지 및 용해성 파아지 또는 양쪽의 혼합의 항박테리아 효능을 평가하기 시작하였으며, 이는 *C. elegans* 및 초파리와 같은 비-포유동물성의 살아있는 동물 감염 모델을 널리 사용함으로써 용이하게 될 수 있다. *P. aeruginosa*의 감염에 대

한 다양한 파아지들의 항박테리아 효능을 측정하기 위한 초파리 모델의 최적화는 항미생물 치료에 대해 더 넓은 시야를 갖게 해줄 것이며, 박테리아의 병원성 및 숙주 면역 사이의 특별한 연락 체계를 조율하는 플랫폼을 제공하게 될 것이다.

[0074] **참조 문헌**

[0075] 1. Ackermann, H. W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch Virol 146:843-57.

[0076] 2. Ackermann, H. W. 1998. Tailed bacteriophages: the order *caudovirales*. Adv Virus Res 51:135-201.

[0077] 3. Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport, and N. Troitsky. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. J Infect 36:5-15.

[0078] 4. Aronoff, S. C., M. M. Olson, M. W. Gauderer, M. R. Jacobs, J. L. Blumer, and R. J. Izant, Jr. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* as a primary pathogen in children with bacterial peritonitis. J Pediatr Surg 22:861-4.

[0079] 5. Barekzi, N. A., K. A. Poelstra, A. G. Felts, I. A. Rojas, J. B. Slunt, and D. W. Grainger. 1999. Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. Antimicrob Agents Chemother 43:1609-15.

[0080] 6. Bradley, D. E. 1973. The length of the filamentous *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage Pf. J Gen Virol 20:249-52.

[0081] 7. Bradley, D. E. 1973. A pilus-dependent *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage with a long noncontractile tail. Virology 51:489-92.

[0082] 8. Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. Bacteriol Rev 31:230-314.

[0083] 9. Breger, J., B. B. Fuchs, G. Aperis, T. I. Moy, F. M. Ausubel, and E. Mylonakis. 2007. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. PLoS Pathog 3:e18.

[0084] 10. Hagens, S., A. Habel, U. von Ahsen, A. von Gabain, and U. Blasi. 2004. Therapy of experimental *pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. Antimicrob Agents Chemother 48:3817-22.

[0085] 11. Hausner, M., and S. Wuertz. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. Appl Environ Microbiol 65:3710-3.

[0086] 12. Heo, Y.-J., I.-Y. Chung, K. B. Choi, and Y.-H. Cho. 2007. R-type pyocin is required for competitive growth advantage between *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Microbiol Biotechnol 17:180-5.

[0087] 13. Heo, Y.-J., I.-Y. Chung, K. B. Choi, G. W. Lau, and Y.-H. Cho. 2007. Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. Microbiology 153:2885-95.

[0088] 14. Ho, K. 2001. Bacteriophage therapy for bacterial infections. Rekindling a memory from the pre-antibiotics era. Perspect Biol Med 44:1-16.

[0089] 15. Jarrell, K. F., and A. M. Kropinski. 1981. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phi PLS27-lipopolysaccharide interactions. J Virol 40:411-20.

[0090] 16. Johnson, C. C., J. Baldessarre, and M. E. Levison. 1997. Peritonitis: update on pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Infect Dis 24:1035-45; quiz 1046-7.

[0091] 17. Juergensen, P. H., F. O. Finkelstein, R. Brennan, S. Santacroce, and M. J. Ahern. 1988. *Pseudomonas* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis: a six-year study. Am J Kidney Dis 11:413-7.

[0092] 18. Kim, S.-H., S.-Y. Park, Y.-J. Heo, and Y.-H. Cho. 2008. *Drosophila melanogaster*-based screening for multihost virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA. Infect Immun 76:4152-62.

[0093] 19. Krothapalli, R., W. B. Duffy, C. Lacke, W. Payne, H. Patel, V. Perez, and H. O. Senekjian. 1982. *Pseudomonas* peritonitis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. Arch Intern Med 142:1862-3.

[0094] 20. Lee, J.-S., Y.-J. Heo, J. K. Lee, and Y.-H. Cho. 2005. KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Infect Immun 73:4399-403.

[0095] 21. Lowbury, E. J., and A. M. Hood. 1953. The acquired resistance of *Staphylococcus aureus* to Bacteriophage. J Gen Microbiol 9:524-35.

[0096] 22. Matsuzaki, S., M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Wakiguchi, and S. Imai. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother 11:211-9.

[0097] 23. McVay, C. S., M. Velasquez, and J. A. Fralick. 2007. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. Antimicrob Agents Chemother 51:1934-8.

[0098] 24. Mizuuchi, K., and R. Craigie. 1986. Mechanism of bacteriophage mu transposition. Annu Rev Genet 20:385-429.

[0099] 25. Moy, T. I., A. R. Ball, Z. Anklesaria, G. Casadei, K. Lewis, and F. M. Ausubel. 2006. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. Proc Natl Acad Sci U S A 103:10414-9.

[0100] 26. Pruitt, B. A., Jr., A. T. McManus, S. H. Kim, and C. W. Goodwin. 1998. Burn wound infections: current status. World J Surg 22:135-45.

[0101] 27. Rocchetta H. L., Burrows L. L. and Lam J. S. 1999. Genetics of O-Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa.* Microbiol. Mol. Reviews. 62:523-553.

[0102] 28. Rosenfeld, M., B. W. Ramsey, and R. L. Gibson. 2003. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. Curr Opin Pulm Med 9:492-7.

[0103] 29. Scholl, D., and D. W. Martin, Jr. 2008. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. Antimicrob Agents Chemother 52:1647-52.

[0104] 30. Slopek, S., B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, and A. Kucharewicz- Krukowska. 1987. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 35:569-83.

[0105] 31. Smith, H. W., and M. B. Huggins. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. J Gen Microbiol 129:2659-75.

[0106] 32. Smith, H. W., M. B. Huggins, and K. M. Shaw. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J Gen Microbiol 133:1111-26.

[0107] 33. Speert, D. P., M. E. Campbell, D. A. Henry, R. Milner, F. Taha, A. Gravelle, A. G. Davidson, L. T. Wong, and E. Mahenthiralingam. 2002. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. Am J Respir Crit Care Med 166:988-93.

[0108] 34. Steinstraesser, L., Y. Oezdogan, S. C. Wang, and H. U. Steinau. 2004. Host defense peptides in burns. Burns 30:619-27.

[0109] 35. Summers, W. C. 2001. Bacteriophage therapy. Annu Rev Microbiol 55:437-51.

[0110] 36. Summers, W. C. 1999. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. Yale University Press, New Haven, Conn.

[0111] 37. Watanabe, R., T. Matsumoto, G. Sano, Y. Ishii, K. Tateda, Y. Sumiyama, J. Uchiyama, S. Sakurai, S.

Matsuzaki, S. Imai, and K. Yamaguchi. 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Antimicrob Agents Chemother 51:446-52.

[0112] 38. Weinstein, W. M., A. B. Onderdonk, J. G. Bartlett, and S. L. Gorbach. 1974. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. Infect Immun 10:1250-5.

[0113] 39. Yokota, S., T. Hayashi, and H. Matsumoto. 1994. Identification of the lipopolysaccharide core region as the receptor site for a cytotoxin-converting phage, phi CTX, of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 176:5262-9.

[0114] 40. Zegans, M. E., J. C. Wagner, K. C. Cady, D. M. Murphy, J. H. Hammond, and G. A. O'Toole. 2008. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 191:210-219.

[0115] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0116] 도 1은 우라닐아세테이트로 네거티브 염색이 된 MPK1 및 MPK6의 비리온 구조의 투과 전자 현미경 사진을 보여준다. 바는 100 nm를 나타낸다.

[0117] 도 2는 다양한 LPS 돌연변이체에서 MPK1 및 MPK6에 의한 플라크 형성을 보여준다. 약 3 × 10^2 PFU을 포함하는 MPK1 및 MPK6 파아지의 용해물을 PAO1(WT)의 박테리아 론 및 그 콘제닉(congenic) LPS 돌연변이체에 스폿팅하였다: *rmd* ($A^-B^+core^+$), *wbpM* ($A^+B^-core^+$) 및 *rmlC* ($A^-B^-core^-$).

[0118] 도 3은 *인 비트로*에서 MPK1 및 MPK6의 용해 활성을 보여준다. PAO1 배양 현탁액을 LB에서 MPK1(●) 또는 MPK6(■)의 파아지 용해물(MOI=1)과 혼합하고 배양하였다. 살아있는 박테리아의 수(CFU)는 적절히 희석하여 약 10^2 CFU 정도가 되도록 하여 측정하였다.

[0119] 도 4는 마우스에서 MPK1 및 MPK6의 약물동력학을 보여준다. MPK1 (A, B 및 C;○ 및 ●) 또는 MPK6 (D, E 및 F;□ 및 ■)의 PBS에 녹아 있는 파아지 시료(5 × 10^7 PFU)를 감염되지 않은 마우스의 복강내(i.p. 솔리드 심볼) 또는 근육내(i.m. 오픈 심볼)에 각각 주사하였다. 마우스 그룹(n=3)은 감염후 0.5, 12, 24, 36 및 48시간에 희생되었으며, 혈액(A 및 D), 간(B 및 E) 및 폐(C 및 F)를 추출하여 각각의 분쇄물을 유닛 부피(㎖)당 PFU를 측정하는데 사용하였다. PFU/㎖는 로그 스케일로 나타내었다.

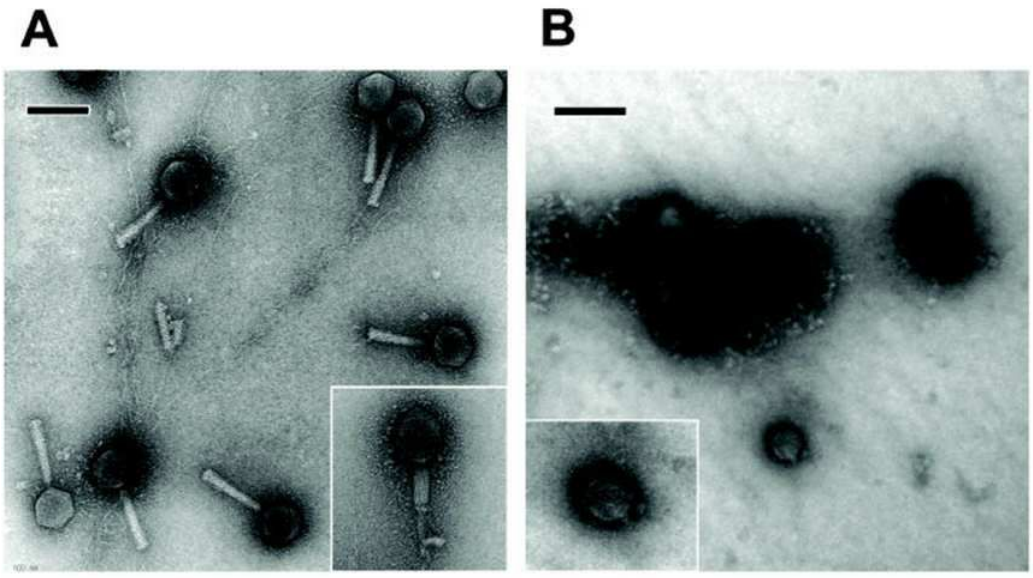
[0120] 도 5는 마우스에서 MPK1 및 MPK6의 보호 효과를 보여준다. A 및 B는 PAO1-감염 마우스에 MPK1(원; ○ 및 ●) 및 MPK6(사각형; □ 및 ■)를 각각 MOI가 1(오픈 심볼; ○ 및 □) 또는 10(솔리드 심볼; ● 및 ■)이 되도록 처리하였을 때의 사망률을 나타내며, 이는 각각 감염 6시간 후에 i.m.(A) 또는 i.p. 경로(B)를 통해 주사되었다. 파아지를 처리하지 않은 PAO1-감염 마우스(◇)는 48시간 내에 모두 사망하였다. 로그랭크 테스트에 기초한 통계학적 유의성: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. C는 MOI가 10이 되도록 복강내에 파아지를 처리하거나 처리하지 않은 마우스에서 B에서와 같이 폐, 비장 및 간의 박테리아 양을 나타낸 것이다. 살아있는 박테리아의 수(CFU)는 감염 24시간 후에 살아있는 마우스의 기관으로부터 측정하였다. 유닛 부피(㎖)당 CFU는 로그 스케일로 측정하였다. 심볼: 파아지를 처리 하지 않은 것, ◇;MPK1, ○; MPK6, □.

[0121] 도 6은 *D. melanogaster*의 전신 감염에 대한 박테리오파아지 치료법을 보여준다. A는 MPK1 및 MPK6의 약물동력학을 나타낸다. MPK1 (A;○ 및 ●) 또는 MPK6 (B;□ 및 ■)의 PBS에 녹아 있는 파아지 시료(5 × 10^7 PFU)를 초파리 배양액의 표면에 깔아 놓는다. 초파리 그룹(n=5)은 0.5, 12, 24, 36 및 48시간에서 수집하여 각각의 분쇄물을 초파리 당 PFU를 측정하기 위해 제거하였다. B는 파아지를 섭취시킨 PAO1-감염 초파리의 사망률을 나타낸다. 감염된 초파리는 아무 것도 없거나(◇) MPK1(●) 또는 MPK6(■)의 PBS에 녹아 있는 파아지 시료(5 × 10^7 PFU in PBS)가 깔린 새로운 배지로 이전하였다. 점선은 50%의 사망률에 도달하는데 필요한 시간을 의미한다. T로그랭크 테스트에 기초한 통계학적 유의성: ***, $p < 0.001$. C는 A에서와 같이 파아지를 섭취

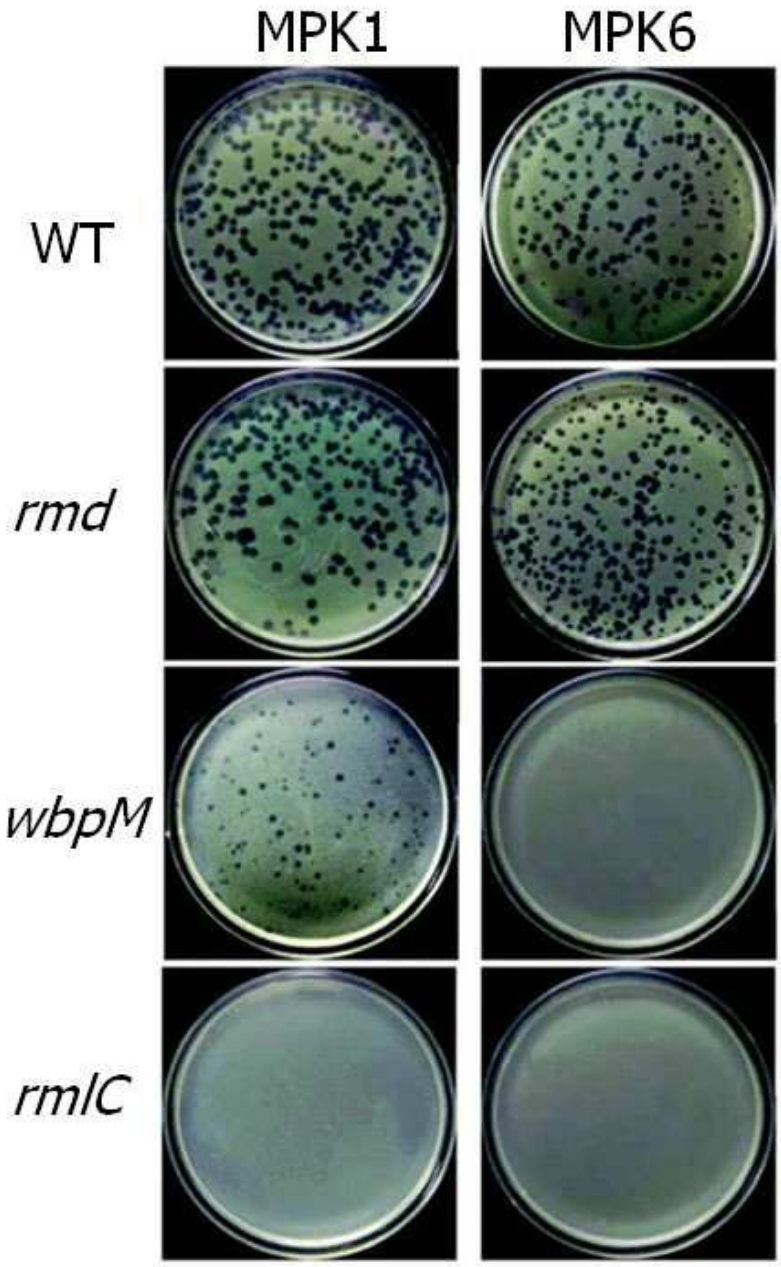
시킨 초파리의 분쇄물에서 박테리아의 양을 측정한 것이다. 살아있는 박테리아의 수(CFU)는 감염 0.5, 12, 24 또는 48시간 후에서 각각 살아있거나(오픈 심볼) 죽은(솔리드 심볼) 초파리의 분쇄물로부터 측정하였다. 초파리 당 CFU 는 로그 스케일로 나타내었다. 심볼: 파아지를 처리 하지 않은 것, ◇ 및 ◆;MPK1, ○ 및 ●; MPK6, □ 및 ■.

도면

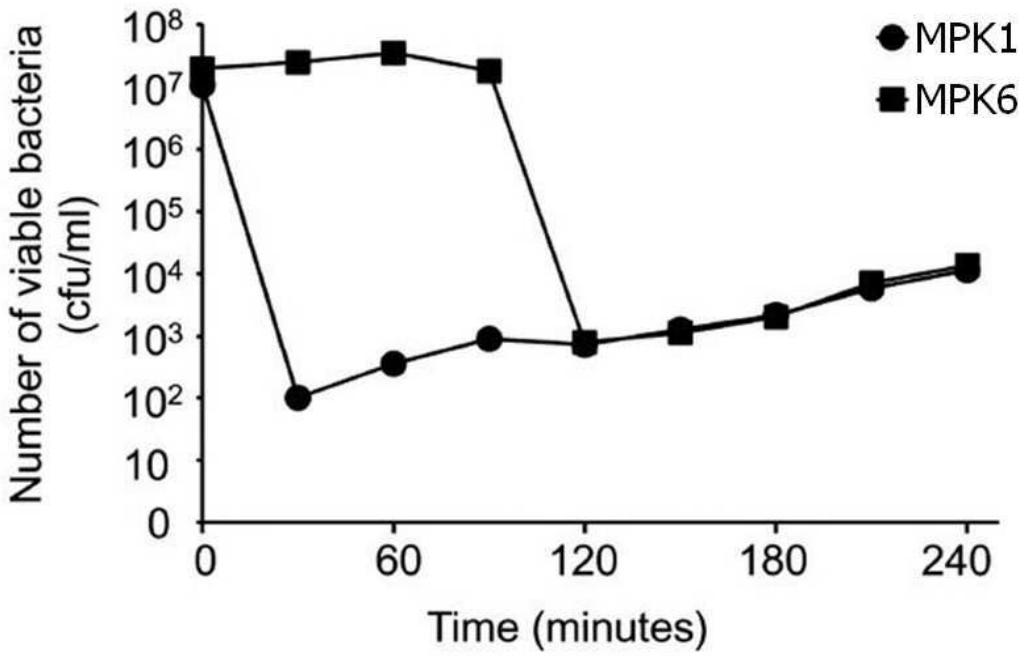
도면1



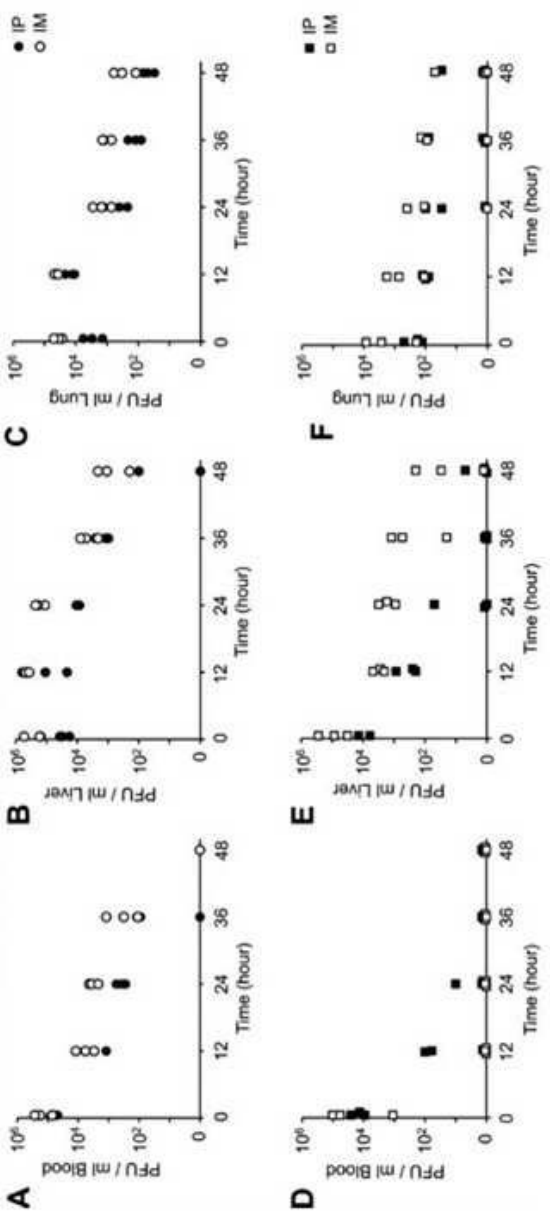
도면2



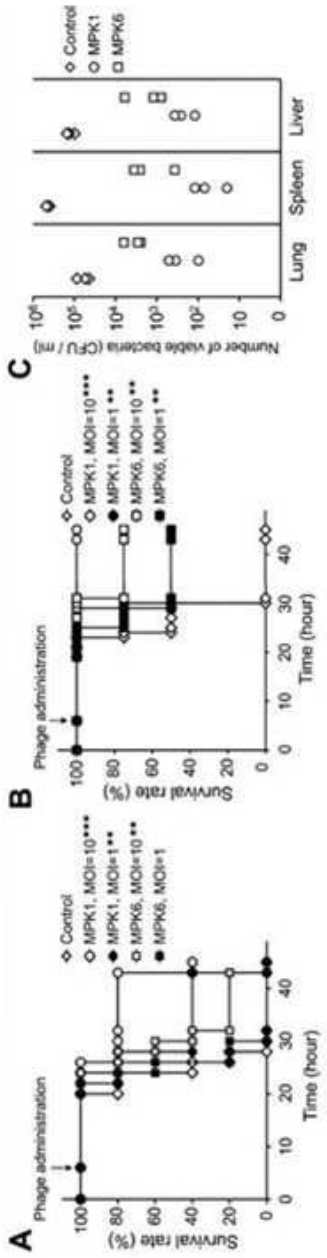
도면3


MPK1
MPK6
Number of viable bacteria (cfu/ml)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10
0
0
60
120
180
240
Time (minutes)

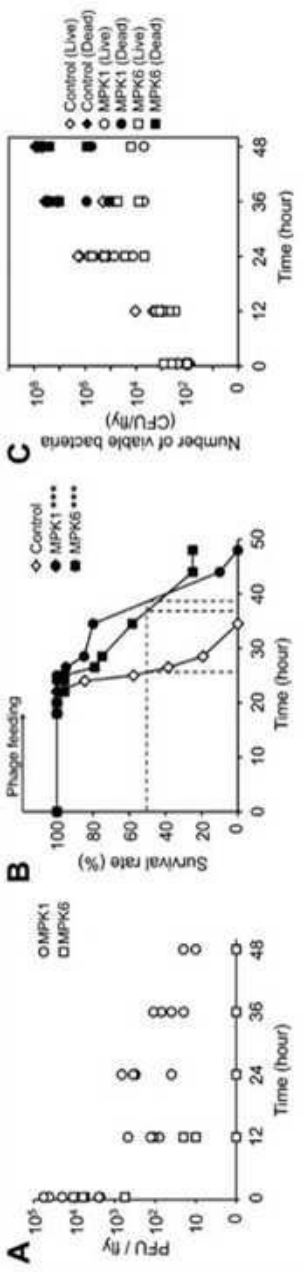
도면4


A
B
C
D
E
F
IP
IM
PFU / ml Blood
PFU / ml Liver
PFU / ml Lung
Time (hour)
0
12
24
36
48
10^6
10^4
10^2

도면5


A
Survival rate (%)
Phage administration
Time (hour)
Control
MPK1, MOI=10***
MPK1, MOI=1**
MPK6, MOI=10**
MPK6, MOI=1
B
Survival rate (%)
Phage administration
Time (hour)
Control
MPK1, MOI=10***
MPK1, MOI=1**
MPK6, MOI=10**
MPK6, MOI=1**
C
Number of viable bacteria (CFU / ml)
Lung
Spleen
Liver
Control
MPK1
MPK6

도면6


A
PFU / fly
MPK1
MPK6
Time (hour)
B
Survival rate (%)
Phage feeding
Control
MPK1***
MPK6***
Time (hour)
C
Number of viable bacteria (CFU/fly)
Control (Live)
Control (Dead)
MPK1 (Live)
MPK1 (Dead)
MPK6 (Live)
MPK6 (Dead)
Time (hour)