



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0104344
(43) 공개일자 2025년07월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/20 (2020.01)
A01P 1/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A01N 63/20 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0196652
(22) 출원일자 2023년12월29일
심사청구일자 2023년12월29일
- (71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
로버트 제임스 미첼
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
문원식
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인리채

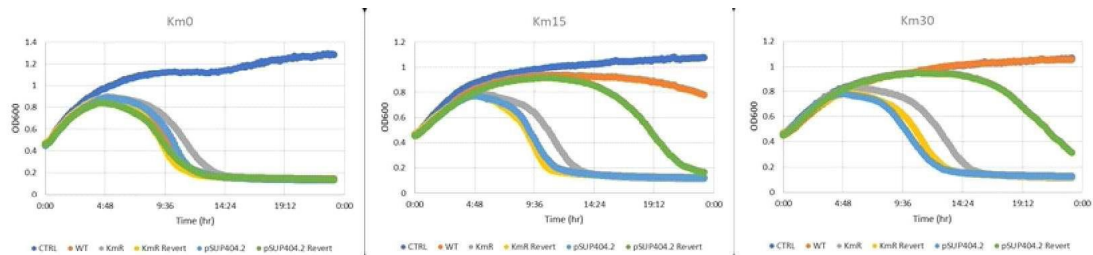
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 항생제 적응성을 갖는 신규한 델로비브리오 박테리오폭루스 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오폭루스 109J(Km240T) 균주에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오폭루스 109J(Km240T) 균주를 포함함으로써 병원균을 효과적으로 제거할 수 있으며 병원균의 gDNA와 항생제 내성 유전자를 제거하여 이들이 전파되는 것을 막을 수 있어 항생제와 함께 사용하는 경우 시너지 효과가 기대되는 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오폭루스 109J(Km240T) 균주에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)

C12R 2001/01 (2021.05)

(72) 발명자

박동현

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

최수민

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

최성열

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164857
과제번호	2020R1A2C2012158
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	포식미생물을 이용한 CRE 병원균의 제거와 항생제 내성 DNA, 단백질 분해
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354132
과제번호	2022R1I1A1A01066417
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	포식균-항생제 시너지 효과: 병원획득폐렴(HAP)에 대한 치료적 항생제 요구량 감소
및 염증 반응의 효과적 완화	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항생제는 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 균주.

청구항 3

항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 포함하는 병원균에 대한 항생제 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 포함하는 병원균에 대한 항생제 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 병원균은 아시네토박터 바우마니, 대장균 및 폐렴막대균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 병원균에 대한 항생제 조성물.

청구항 6

항생제 내성 병원균에 기탁번호 KCTC15671BP의 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 균주는 세포 또는 인간을 제외한 동물에 처리하는 것인 병원균의 사멸 방법.

청구항 9

델로비브리오 박테리오포루스를 병원균과 항생제가 처리된 제1 배지에서 배양하는 제1 단계;

상기 제1 배지의 흡광도가 0.5 미만이 되었는지를 확인하는 제2 단계; 및

상기 제2 단계의 흡광도가 0.5 미만이 되면 상기 제1 배지에서 상기 텔로비브리오 박테리오포루스를 분리하여 상기 항생제의 농도가 2배인 제2 배지에서 재배양하는 제3 단계를 포함하는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 제1 배지의 초기 흡광도는 1인, 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 흡광도는 600 nm에서 측정되는 것인, 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 병원균은 아시네토박터 바우마니, 대장균 및 폐렴막대균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 항생제는 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종래의 항생제를 이용한 항생제 내성 병원균(슈퍼박테리아)의 제거 방법은 항생제 내성 병원균의 항생제 저항성으로 인하여 제한되어 있으며, 이로 인하여 효과적으로 항생제 내성 병원균을 제거하지 못하고 있다. 또한 과도한 항생제의 사용은 항생제 내성 병원균의 출몰을 촉진할 수 있다.

[0004] 이에 따라 항생제 사용량을 줄일 수 있고, 항생제 내성 병원균의 항생제 내성 유전자를 확산시키지 않는 기술이 필요한 상황이다. 본 발명자는 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)와 이의 제조방법 및 용도를 제안한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 특허등록 제10-2613646호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 포함하는 항생제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 제조방법 및 이를 활용한 병원균의 사멸 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 항생제는 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 균주.
- [0013] 3. 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 포함하는 병원균에 대한 항생제 조성물.
- [0014] 4. 위 3에 있어서, 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 포함하는 병원균에 대한 항생제 조성물.
- [0015] 5. 위 3에 있어서, 병원균은 아시네토박터 바우마니, 대장균 및 폐렴막대균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 병원균에 대한 항생제 조성물.
- [0016] 6. 항생제 내성 병원균에 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법.
- [0017] 7. 위 6에 있어서, 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법.
- [0018] 8. 위 6에 있어서, 균주는 세포 또는 인간을 제외한 동물에 처리하는 것인 병원균의 사멸 방법.
- [0019] 9. 텔로비브리오 박테리오포루스를 병원균과 항생제가 처리된 제1 배지에서 배양하는 제1 단계; 제1 배지의 흡광도가 0.5 미만인 되었는지를 확인하는 제2 단계; 및 제2 단계의 흡광도가 0.5 미만인 되면 제1 배지에서 텔로비브리오 박테리오포루스를 분리하여 항생제의 농도가 2배인 제2 배지에서 재배양하는 제3 단계를 포함하는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.
- [0020] 10. 위 9에 있어서, 제1 배지의 초기 흡광도는 1인, 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.
- [0021] 11. 위 9에 있어서, 흡광도는 600 nm에서 측정되는 것인, 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.
- [0022] 12. 위 9에 있어서, 병원균은 아시네토박터 바우마니, 대장균 및 폐렴막대균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.
- [0023] 13. 위 9에 있어서, 항생제는 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법.

발명의 효과

- [0025] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 제공하여 병원균을 효과적으로 제거할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 항생제와 함께 사용하여 병원균을 완전히 제거할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 병원균의 gDNA와 항생제 내성 유전자를 제거하여 이들이 전파되는 것을 막을 수 있다.
- [0028] 본 발명의 방법은 항생제 적응성이 높아 항생제와 함께 사용해도 포식 제거능력이 감소하지 않는 신규한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 제조할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 항생제 내성 병원균의 제거에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 방법은 항생제 내성 병원균 제거를 위한 항생제 조성물 제조에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0031] 본 발명은 항생제 사용량을 줄여 항생제 내성 병원균 출몰을 막는데 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 텔로비브리오 박테리오포루스 109J 야생형(Wild type)을 다양한 농도의 항생제 카나마이신에 장기간 지속적으로 1회 노출시켜 항생제 적응을 유도시킨 결과이다. Y축은 OD(Optical Density, 600nm)이며, 병원균의 OD 감소는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 성장 및 증식의 지표이다.
- 도 2는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J 야생형(Wild type)을 점진적으로 항생제에 노출시켜 항생제 적응을 유도시킨 결과이다. 대장균의 OD가 0.5미만으로 낮아진 경우 텔로비브리오 박테리오포루스 109J가 성장하였음을 나타낸다. 빨간색 원은 24시간 단위로 성장한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 선별한 것이며, 선별된 샘플을 0~240 μ g/ml의 카나마이신을 포함한 대장균 희석액에 재배양하고 다음날 OD를 측정하였다, 우측 상단의 빨간색 원은 7일만에 모든 샘플이 240 μ g/ml의 카나마이신에서 적응했음을 의미한다.
- 도 3은 포식 테스트에 사용된 카나마이신의 농도(μ g/ml)별로 각 샘플을 처리한 대장균(K12 MG1655)의 OD를 측정한 결과이다. CTRL(파란색)은 대장균만 존재하는 것이고, WT(주황색)는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J 야생형이고, KmR(회색)은 카나마이신 적응 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)이고, KmR Revert(노란색)은 카나마이신 적응 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 무항생제 조건에서 14일간 배양한 것이고, pSUP404.2(하늘색)은 카나마이신 적응 플라스미드 pSUP404.2를 가지고 있는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J이며, pSUP404.2 Revert(녹색)은 카나마이신 적응 플라스미드 pSUP404.2를 가지고 있는 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 무항생제 조건에서 14일간 배양한 것이다.
- 도 4는 카나마이신에 감수성(sensitive)이 있는 병원균인 대장균(*E. coli* NCCP 16044)에 카나마이신 단독(회색) 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동 투여(빨간색)하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정한 결과이다.
- 도 5는 카나마이신에 중간 내성(intermediate) 병원균인 폐렴막대균(*K. pneumoniae* YS-CRE-16201)에 카나마이신 단독(회색) 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동 투여(빨간색)하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정한 결과이다.
- 도 6은 카나마이신 내성(resistant) 병원균인 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* NCCP 15994)에 카나마이신 단독(회색) 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동 투여(빨간색)하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정한 결과이다.
- 도 7은 카나마이신만 사용한 경우(좌) 및 카나마이신과 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 함께 사용한 각 경우에 카파페넴 내성 병원균인 대장균(*E. coli* NCCP 16044)의 DNA 양(gDNA 내 16S rDNA 또는 카바페넴계 항생제 내성 유전자 KPC-2)을 측정한 결과이다.
- 도 8은 카나마이신만 사용한 경우(좌) 및 카나마이신과 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 함께 사용한 각 경우에 카파페넴 내성 병원균인 폐렴막대균(*K. pneumoniae* YS-CRE-16201)의 DNA 양(gDNA 내 *gltA* 또는

카바페넴계 항생제 내성 유전자 KPC-2)을 측정하는 결과이다.

도 9는 카나마이신만 사용한 경우(좌) 및 카나마이신과 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 함께 사용한 각 경우에 카바페넴 내성 병원균인 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* NCCP 15994)의 DNA 양(gDNA 내 16s rDNA 또는 카바페넴계 항생제 내성 유전자 Oxa-23)을 측정하는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명은 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 제공한다.
- [0035] 항생제는 특정한 항생제로 한정되지 않는다.
- [0036] 항생제는 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0037] 본 발명은 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 포함함으로써 병원균을 효과적으로 제거할 수 있는 항생제 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주에 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 포함하는 병원균에 대한 항생제 조성물을 제공한다.
- [0039] 병원균은 특정 병원균으로 한정되지 않는다.
- [0040] 일 실시예에서, 병원균은 아시네토박터 바우마니, 대장균 및 폐렴막대균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0041] 본 발명은 항생제 내성 병원균에 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명은 항생제 내성 병원균에 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 처리한 후 카나마이신, 젠타마이신, 시프로플록사신 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 항생제를 더 처리하는 단계를 포함하는 병원균의 사멸 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명은 병원균의 gDNA와 항생제 내성 유전자를 제거하여 이들이 전파되는 것을 막을 수 있고 항생제와 함께 사용하는 경우 시너지 효과가 기대되는 항생제 적응성을 갖는 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주를 제공한다.
- [0044] 본 발명은 기탁번호 KCTC15671BP의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법은 텔로비브리오 박테리오포루스를 병원균과 항생제가 처리된 제1 배지에서 배양하는 제1 단계; 제1 배지의 흡광도가 0.5 미만이 되었는지를 확인하는 제2 단계; 및 제2 단계의 흡광도가 0.5 미만이 되면 제1 배지에서 텔로비브리오 박테리오포루스를 분리하여 항생제의 농도가 2배인 제2 배지에서 재배양하는 제3 단계를 포함한다.
- [0046] 제1 단계는 항생제 감수성인 텔로비브리오 박테리오포루스를 항생제가 처리된 배지에서 배양하는 단계이다. 배지에는 항생제와 텔로비브리오 박테리오포루스의 먹이인 병원균이 함께 포함된다.
- [0047] 항생제는 배지에 텔로비브리오 박테리오포루스가 항생제 적응성을 가질 수 있는 농도로 처리되면 죽고 특정 농도로 처리될 필요는 없다. 일 실시예에서 항생제는 1 내지 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리될 수 있다.
- [0048] 병원균은 텔로비브리오 박테리오포루스의 먹이이면 특정 종류의 병원균으로 한정되지 않는다. 병원균은 세균, 바이러스, 균류, 프리온, 기타 기생충, 조류 등을 포함한다. 일 실시예에서 병원균은 대장균이다.
- [0049] 제2 단계는 제1 단계의 배양을 통해 텔로비브리오 박테리오포루스가 생존했는지를 확인하는 단계이다. 텔로비브리오 박테리오포루스가 항생제 처리에도 불구하고 먹이인 병원균을 먹고 생존하였을 경우 병원균의 양은 줄어들고 이에 따라 제1 배지의 흡광도가 떨어진다.
- [0050] 제1 배지의 초기 흡광도는 1이고 병원균이 줄어들면 흡광도가 예컨대 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 등으로 떨어진다. 600 nm에서 흡광도를 측정할 경우 항생제(화합물)는 흡광도에 영향이 없고 텔로비브리오 박테리

보루스는 일부 영향이 있으나 본 실험에서는 무시할 수 있는 수준이고 주로 병원균의 양이 흡광도에 주요한 영향을 미친다.

[0051] 제1 배지의 흡광도가 0.5 미만이었다면 이는 초기 병원균의 50% 정도가 사멸했고, 텔로비브리오 박테리오포루스가 항생제 적응성을 얻고 개체가 증식되었음을 의미한다. 제2 단계에서 항생제 적응성을 얻은 텔로비브리오 박테리오포루스를 선별하여 제3 단계를 수행한다.

[0052] 제3 단계는 제2 단계에서 선별한 텔로비브리오 박테리오포루스를 분리하여 항생제가 제1배지의 2배의 높은 농도로 처리된 제2 배지에서 재배양하는 단계이다. 제3 단계는 항생제의 농도가 높기 때문에 제2 단계의 텔로비브리오 박테리오포루스 중에서 상대적으로 항생제 적응성이 높거나, 제2 단계의 텔로비브리오 박테리오포루스가 2배 높은 농도의 항생제에 적응하여 보다 개선된 항생제 적응성을 획득한 균주만 살아남는다.

[0053] 제3 단계 후 위 흡광도를 측정하는 단계를 수행할 수 있다. 보다 높은 농도의 항생제 처리에도 불구하고 병원균의 농도(흡광도)가 1/2 미만으로 되었는지 확인하여 항생제 적응성을 획득한 텔로비브리오 박테리오포루스를 다시 선별할 수 있다.

[0054] 일 실시예에서, 본 발명의 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 균주의 제조방법은 배지에 병원균(대장균 등)과 3.75 μ g/ml의 항생제(카나마이신)를 처리한 후 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 배양하는 단계; 배양 후 600nm에서 측정한 병원균의 Optical Density 값이 0.5 미만인 텔로비브리오 박테리오포루스 109J 배양 샘플을 선별하는 단계; 및 선별한 샘플에 항생제 농도를 2배씩 높여 처리하여 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0055] 이하 본 발명을 실시예로 보다 상세히 설명한다.

[0057] 실시예

[0058] 실시예 1 : 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 제조방법 1

[0059] 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 다양한 농도의 항생제 카나마이신(Kanamycin)에 장기간 지속적으로 1회 노출시켜 항생제 적응을 유도시켰다. 이를 위한 제조 방법은 아래와 같다. 먼저 LB agar plate에서 배양된 대장균(K12 MG1655)의 콜로니를 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양하였다. 그 후 원심분리기를 이용하여 대장균 세포만을 배양액으로부터 분리한 뒤(4,000 x g, 10분), 이를 3mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, Nutrient broth 0.8g/L를 각각 함유한 멸균된 25mM HEPES buffer로 희석하여 Optical density 값을 1.1으로 조정하였다. OD측정은 Eppendorf Biophotometer를 활용하였고, 이 때의 CFU/ml의 값은 대략 5 X 10⁸이었다. 본 희석액에 미리 배양해둔 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 0.45 μ m PES filter에 통과시킨 뒤, 해당 먹이 희석액 13.5ml에 이를 1.5ml 투여했고, 이후 카나마이신을 타겟농도(0, 30, 60, 120, 240 μ g/ml)가 되도록 투여하였다. 해당 배양액은 30 $^{\circ}$ C 진탕배양기(300rpm)에서 지속적으로 배양하였고, 24시간 간격으로 OD를 측정하였다. 그 결과로써 저농도의 카나마이신(30 μ g/ml)의 경우 3 내지 4일차에 항생제에 적응한 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)가 포화 증식하였으며 이는 실험에서 사용한 병원균인 대장균(*E. coli* K12 MG1655)의 Optical Density(600nm) 값이 감소하는 것을 통해 확인할 수 있었다. 고농도의 카나마이신(240 μ g/ml)의 경우 7일차에 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) Triplicate 샘플 중 1개가 포화 증식한 것을 확인하였다(도 1).

[0061] 실시예 2 : 텔로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T) 제조방법 2

[0062] 텔로비브리오 박테리오포루스 109J를 점진적으로 항생제에 노출시켜 항생제 적응을 유도시켰다. 이때 사용한 카나마이신의 농도는 0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240 μ g/ml이었다. 본 실시예를 위한 대장균 및 텔로비브리오 박테리오포루스 109J 제조방법은 실시예 1과 같다. 24시간 단위로 실험에서 사용한 병원균인 대장균(*E. coli* K12 MG1655)의 Optical Density(600nm) 값이 감소하는 것을 측정하였으며, OD600의 값이 0.5미만으로 떨어진 항생제 농도(텔로비브리오 박테리오포루스 109J의 성장이 50% 미만으로 저해되는 항생제 농도(IC50; 빨간원))가 있는 샘플을 선정하였다. 선정된 샘플은 신선한 병원균(매일 내용 확인)과 신선한 카나마이신(0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240 μ g/ml)이 있는 샘플에서 실시예 1의 방법으로 재배양하여 증가된 항생제 적응성을 관찰하였다. 7일 만에 텔로비브리오 박테리오포루스 109J의 Triplicate 모두가 카나마이신 240 μ g/ml 농도에 적응한 것을 확인하였다.

[0063] 이 실험 결과를 통해 보다 안정적으로 델로비브리오 박테리오포루스 109J의 항생제에 대한 높은 적응성을 부여할 수 있음을 알 수 있었다.

[0065] 실시예 3 : 카나마이신 농도에 따른 샘플 별 OD 측정 실험

[0066] 병원균인 대장균(*E. coli* K12 MG1655)에 6종류의 샘플을 처리하고 각각 다른 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 카나마이신을 처리한 뒤 포식 시간에 따른 대장균의 OD 값을 측정하였다. 이를 위한 대장균과 포식 박테리아 준비 방법은 실시예 1에서 사용된 방법을 일부 변형하여 활용하였다. 본 실험은 실험 튜브가 아닌 투명 96-well plate를 활용하여 진행하였으므로, 실험 용액 부피가 최종 $200\mu\text{l}$ 로 낮추어졌다. 또한 대장균의 OD 600nm 값 측정은 microplate reader(TECAN spark, Switzerland)를 통해 이루어졌다.

[0067] 항생제 적응성이 부여된 경우, 야생형(WT)에 비해 포식 능력이 약간 저해됨이 보이거나(도 3, 첫 번째 그래프에서 주황색과 회색 비교), 14일간 무항생제 조건에서 배양함으로써 야생형(WT)과 같은 수준의 포식 능력을 회복한 것을 확인하였다(도 3, 첫 번째 그래프에서 주황색과 노란색 비교).

[0068] 항생제 적응성을 부여한 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 경우, 14일간 무항생제 조건에서 배양한 이후에도 항생제 조건에서 포식능력을 잃어버리지 않았고 오히려 더욱 증가된 포식능력을 가지는 것을 확인하였다(도 3, 두 번째 그래프 및 세 번째 그래프에서 회색과 노란색 비교).

[0069] 그러나 플라스미드(pSUP404.2)를 통해 카나마이신 적응성을 부여한 델로비브리오 박테리오포루스 109J의 경우 14일간 무항생제 조건에서 배양하면 적응성을 일부 잃어버리게 되는 것을 확인하였다(도 3, 두 번째 그래프 및 세 번째 그래프에서 녹색과 하늘색 비교).

[0071] 실시예 4 : 카나마이신 단독 투여와 카나마이신 및 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 공동 투여의 병원균 사멸효과 비교 실험

[0072] (1) 병원균이 카나마이신에 감수성(sensitive)이 있는 대장균(*E. coli* NCCP 16044)인 경우

[0073] 카나마이신에 감수성(sensitive)이 있는 병원균인 대장균(*E. coli* NCCP 16044)에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정하였다. 이를 위한 실험 방법은 실시예 1과 같으며, 생존능은 배양액을 HEPES buffer에 연속 희석한 뒤 LB agar plate에 도말하고 24시간 뒤 콜로니 개수를 세고, 희석 배수만큼 역산하여 측정하였다.

[0074] 카나마이신을 단독으로 투여한 경우에 비해 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동 투여한 경우에서 더 적은 양의 병원균이 잔존함을 확인하였다(도 4).

[0075] (2) 병원균이 카나마이신에 중간 내성(intermediate)인 폐렴막대균(*K. pneumoniae* YS-CRE-16201)인 경우

[0076] 카나마이신에 중간 내성(intermediate) 병원균인 폐렴막대균(*K. pneumoniae* YS-CRE-16201)에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정하였다. 이를 위한 실험 방법은 실시예 1과 같으며, 생존능은 배양액을 HEPES buffer에 연속 희석한 뒤 LB agar plate에 도말하고 24시간 뒤 콜로니 개수를 세고, 희석 배수만큼 역산하여 측정하였다.

[0077] 카나마이신을 단독으로 투여한 경우에 비해 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동 투여한 경우에서 더 적은 양의 병원균이 잔존함을 확인하였다(도 5). 특히 공동 투여한 경우 카나마이신 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 시너지효과를 보여 병원균이 완전 사멸하는 것을 확인하였다.

[0078] (3) 병원균이 카나마이신 내성(resistant)인 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* NCCP 15994)인 경우

[0079] 카나마이신 내성(resistant) 병원균인 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* NCCP 15994)에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여하고 24시간 이후 잔존한 병원균의 생존능(viability)을 측정하였다. 이를 위한 실험 방법은 실시예 1과 같으며, 생존능은 배양액을 HEPES buffer에 연속 희석한 뒤 LB agar plate에 도말하고 24시간 뒤 콜로니 개수를 세고, 희석 배수만큼 역산하여 측정하였다.

- [0080] 카나마이신을 단독으로 투여한 경우에 비해 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여한 경우에서 더 적은 양의 병원균이 잔존함을 확인하였다(도 6). 특히 카나마이신이 병원균을 전혀 사멸시키지 못했음에도 불구하고 포식박테리아의 포식능력에 의해 99.9%가량의 병원균이 사멸되는 것을 확인하였다.
- [0082] **실시예 5 : 카나마이신 단독 투여와 카나마이신 및 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 공동 투여의 병원균 DNA 제거 효과 비교 실험**
- [0083] (1) 카파페넴 내성 병원균인 대장균(*E. coli* NCCP 16044)의 경우
- [0084] 대장균에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여한 뒤 대장균의 DNA 양(gDNA 내 16S rDNA 또는 카바페넴계 항생제 내성 유전자 KPC-2)을 측정하였다.
- [0085] 카나마이신 무처리 대조군(Unpredated, Kanamycin 0 μ g/ml과 비교할 때 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 투여한 경우(Predated, 우) 대장균의 gDNA 또는 항생제 내성유전자가 약 99% 가량 제거됨을 qPCR을 통해 확인하였다(도 7). 1 μ l의 박테리아 배양액을 95 $^{\circ}$ C에 10분간 전처리 후 qPCR 분석에 활용하였으며, qPCR기기는 LightCycler $^{\circledR}$ 480(Roche, Switzerland), Mastermix는 SYBR Green을 활용하였다.
- [0086] (2) 카파페넴 내성 병원균인 폐렴막대균(*K.pneumoniae* YS-CRE-16201)의 경우
- [0087] 폐렴막대균에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여한 뒤 폐렴막대균의 DNA 양(gDNA 내 *gltA* 또는 카바페넴계 항생제 내성 유전자 KPC-2)을 측정하였다.
- [0088] 카나마이신 무처리 대조군(Unpredated, Kanamycin 0 μ g/ml)과 비교할 때 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 투여한 경우(Predated, 우) 폐렴막대균의 gDNA 또는 항생제 내성유전자가 약 99%가량 제거됨을 qPCR을 통해 확인하였다(도 8). 1 μ l의 박테리아 배양액을 95 $^{\circ}$ C에 10분간 전처리 후 qPCR 분석에 활용하였으며, qPCR기기는 LightCycler $^{\circledR}$ 480(Roche, Switzerland), Mastermix는 SYBR Green을 활용하였다.
- [0089] (3) 카파페넴 내성 병원균인 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* NCCP 15994)의 경우
- [0090] 아시네토박터 바우마니에 카나마이신을 단독으로 또는 카나마이신과 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 공동으로 투여한 뒤 아시네토박터 바우마니의 DNA 양(gDNA 내 16S rDNA 또는 카바페넴계 항생제 내성 유전자 *Oxa-23*)을 측정하였다.
- [0091] 카나마이신 무처리 대조군(Unpredated, Kanamycin 0 μ g/ml)과 비교할 때 카나마이신 적응 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)를 투여한 경우(Predated, 우) 아시네토박터 바우마니의 gDNA 또는 항생제 내성유전자가 약 99%가량 제거됨을 qPCR을 통해 확인하였다(도 9). 1 μ l의 박테리아 배양액을 95 $^{\circ}$ C에 10분간 전처리 후 qPCR 분석에 활용하였으며, qPCR기기는 LightCycler $^{\circledR}$ 480(Roche, Switzerland), Mastermix는 SYBR Green을 활용하였다.
- [0093] **실시예 6 : 델로비브리오 박테리오포루스 109J 야생형과 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)의 항생제에 대한 적응성 비교 실험**
- [0094] 델로비브리오 박테리오포루스 109J 야생형과 델로비브리오 박테리오포루스 109J(Km240T)에 각기 다른 항생제를 처리하여 적응성을 비교하였다. 이를 위한 실험 준비는 실시예 3의 방법과 같다. 결과는 하기 표 1과 같다.

[0095] [표 1]

항생제	델로비브리오 박테리오포루스109J 야생형 ($\mu\text{g/ml}$)	델로비브리오 박테리오포루스109J (Km240T) ($\mu\text{g/ml}$)
카나마이신	4	240 이상 (60배 이상)
젠타마이신	0.63	2.5 (4배)
시프로플록사신	0.5	1 (2배)

[0096]

수탁번호

[0098]

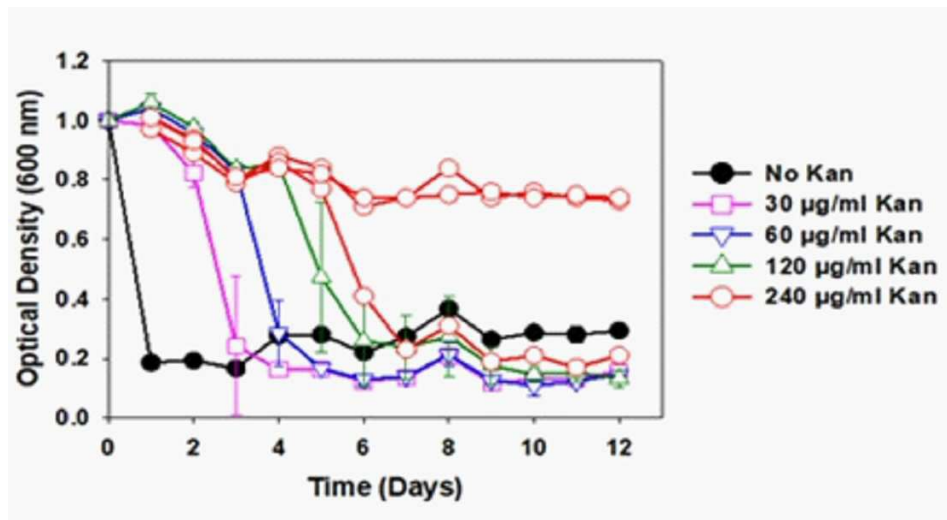
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15671BP

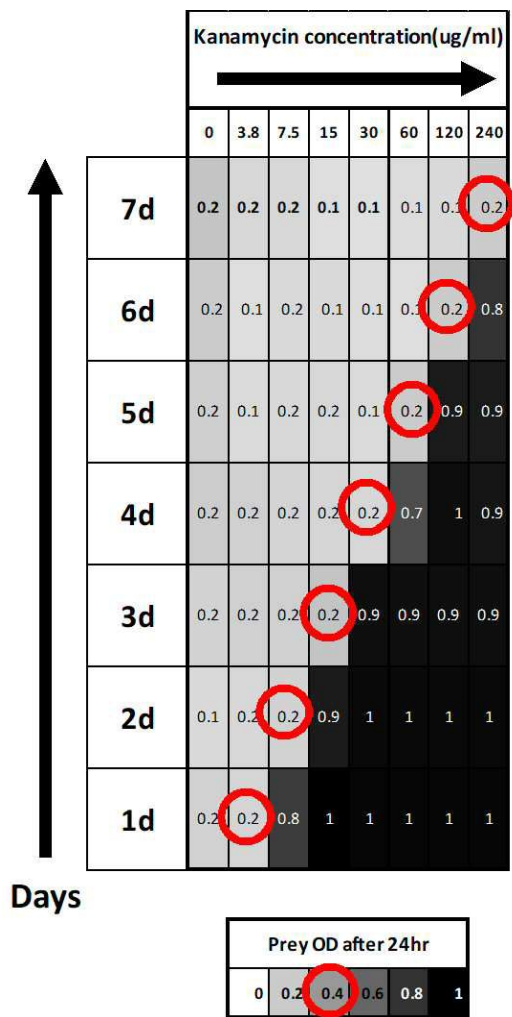
수탁일자 : 20231025

도면

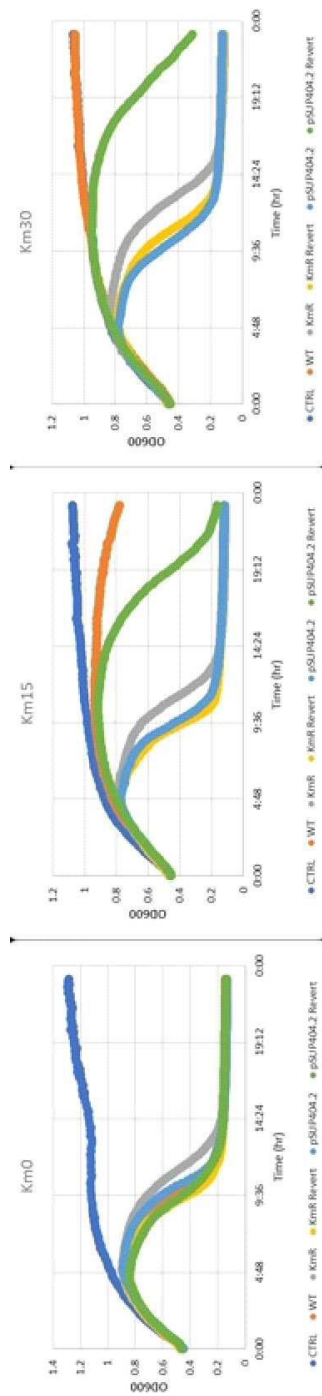
도면1



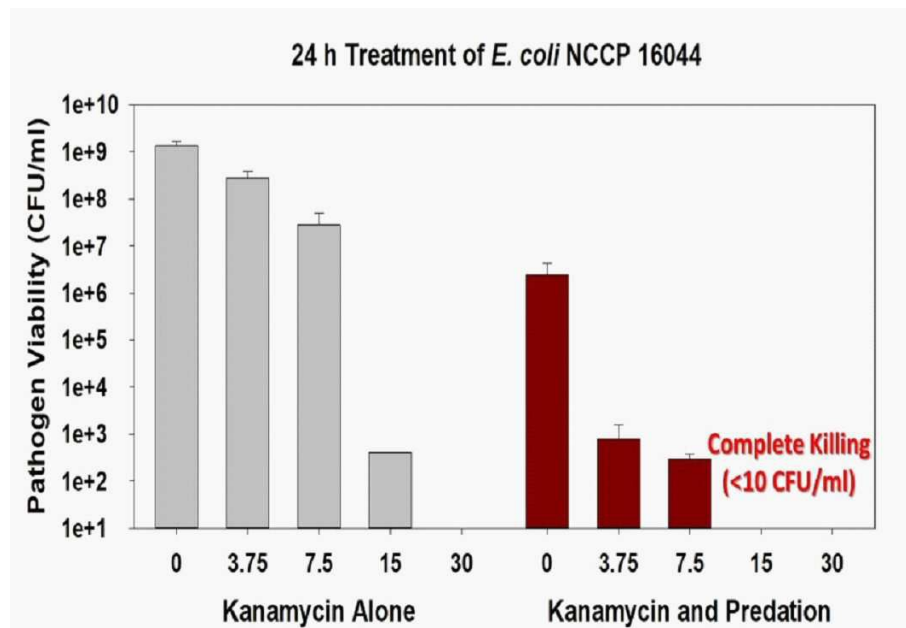
도면2



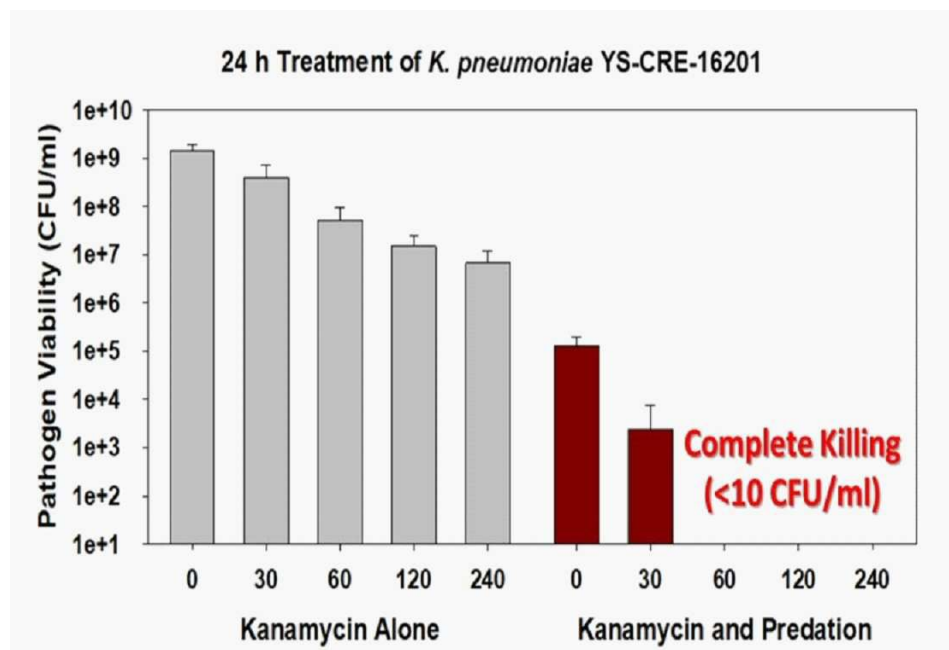
도면3



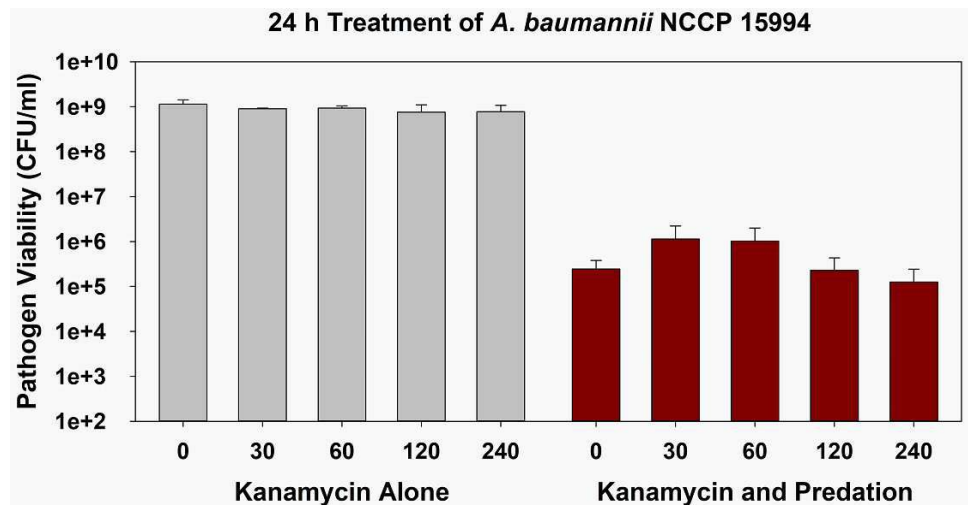
도면4



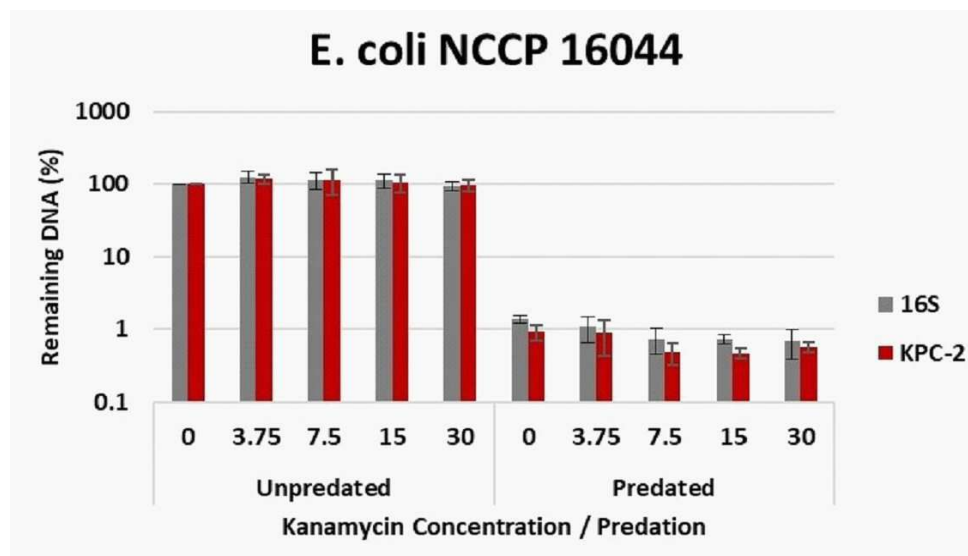
도면5



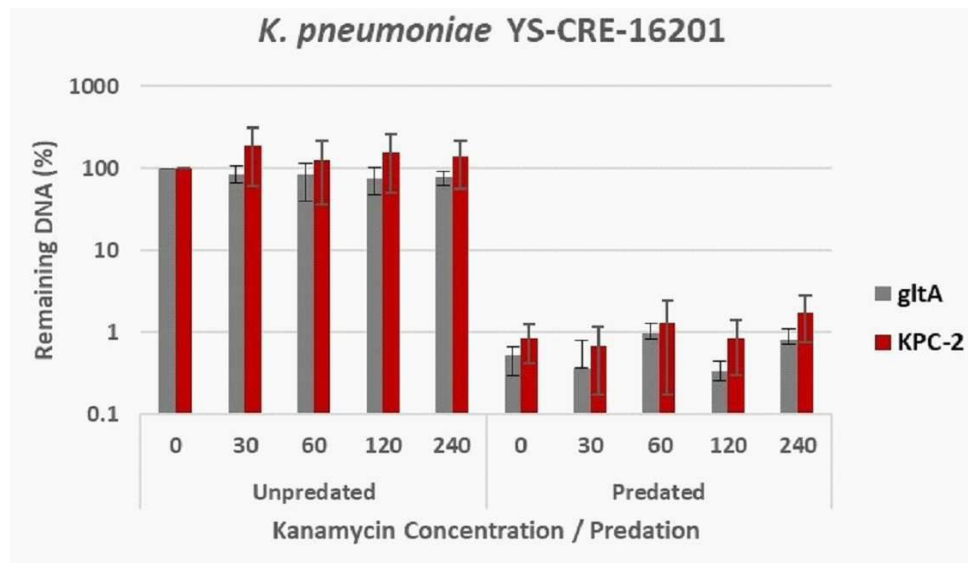
도면6



도면7



도면8



도면9

