(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 6 월 25 일 (25.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/130652 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 7/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/018053

(22) 국제출원일: 2019 년 12 월 18 일 (18.12.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0164181 2018 년 12 월 18 일 (18.12.2018) KR
10-2018-0164212 2018 년 12 월 18 일 (18.12.2018) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 용동은 (**YONG, Dong Eun**); 06292 서울시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705, Seoul (KR). 전종수 (**JEON, Jong Soo**); 03722 서울시 서대문구 연세로 50 연세의료원, Seoul (KR).

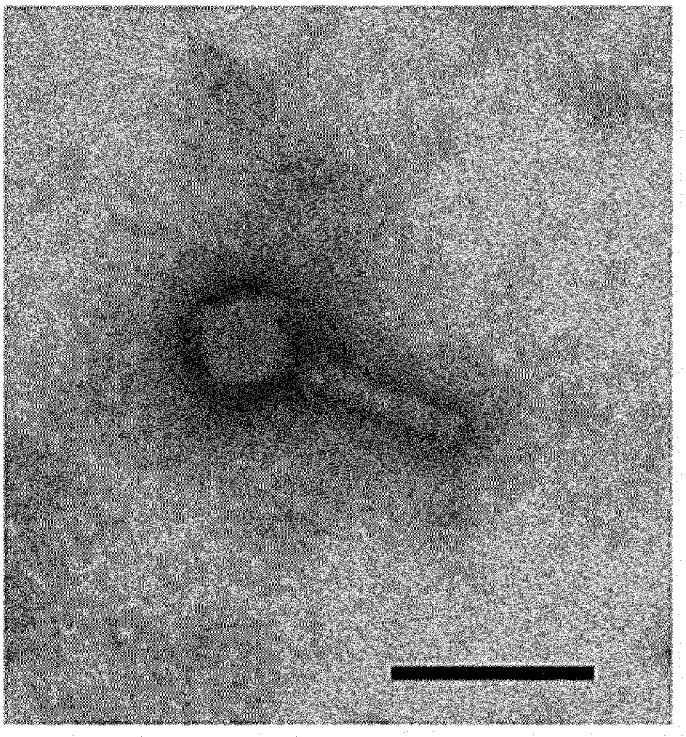
(74) 대리인: 이재영 (**LEE, Jae Young**); 06151 서울시 강남구 테헤란로43길 14 청수빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): 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, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** NOVEL BACTERIOPHAGE FOR LYSING BACTERIA

(54) **발명의 명칭:** 세균을 용균하는 신규한 박테리오파지



(57) **Abstract:** The present invention relates to a bacteriophage exhibiting bactericidal activity specifically against Acinetobacter sp. or Klebsiella sp. bacteria.

(57) **요약서:** 본 발명은 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/130652 A2

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 세균을 용균하는 신규한 박테리오파지

기술분야

[1] 본 발명은 세균, 특히는 항생제에 대한 내성을 보이는 세균을 용균시키는 신규한 박테리오파지에 관한 것이다.

배경기술

[2] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나이다. 페니실린(penicillin) 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 생체에 외부 침입의 세균 퇴치를 위하여 사용되어 왔다. 그러나 최근에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 등장하여 큰 문제로 여겨진다. 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다(Stuart B. Levy, ScientificAmerican, (1988): 46-53).

[3] 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(Pneumococcus sp.)에서 최초로 발견이 되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., Nature, 227, (1970): 138-140). 페니실린, 세팔로스포린(Cephalosporin) 등과 같은 종래의 화학 항생제는 미생물의 세포벽 또는 단백질의 합성 저해에 의하여 항생 작용을 나타낸다. 그러나, 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재 하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료 시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다. 따라서, 이들 내성 균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메커니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이며 종래의 화학 항생제와 상이한 항생 기전을 나타내는 항생 펩타이드들은 새로운 개념의 차세대 항생제로서 주목을 받고 있다(Zasloff M.Curr Opin Immunol4(1992): 3-7; Boman, H. G., Cell, 65.205 (1991); Boman, H. G. J Intern Med. 254.3 (2003): 197-215; Hancock, R. E., & Scott, M. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (2000): 8856-8861, Zasloff, M., Nature 415 (2002): 389-395).

[4] 한편, 아시네토박터 바우마니 균(*Acinetobacter baumannii*)은 그람 음성 호기성 구간균으로 많은 병원에서 병원 내 감염의 중요한 원인이 되고 있는데 특히 최근에는 아미노글리코사이드, 세파로스포린, 플루오로퀴놀론, 베타

락타마아제 억제제(beta-lactamase inhibitors), 그리고 카바페넴에 대해서 내성을 보이는 다제내성 아시네토박터 바우마니(MRAB)에 의한 감염이 증가하고 있는 실정이다.

[5] 2010년 동경대학병원에서 아시네토박터 세균의 감염으로 46명이 감염되고 이중 10명이 숨진 사건은 최근 10년 사이 전 세계적으로 급증하고 있는 항생제 내성이 강한 MRAB에 대한 경각심을 불러일으켰고 항생제 개발에 박차를 가하고 있다. 아시네토박터 세균 자체는 물이나 토양 또는 인간의 피부에도 흔하게 존재하며 건강한 사람의 경우 감염돼도 발병하지 않는다. 하지만, 면역력이 떨어진 사람이 감염될 경우 폐렴이나 패혈증으로 사망할 수 있고, 1990년대부터 미국, 유럽 등에서 늘어나기 시작했으며 2000년부터는 거의 어떤 항생제도 듣지 않는 종류까지 나타났다.

[6] 또한, 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균은 장내세균과의 한 속명으로, 그람음성간균이다. 편모는 없고, 협막을 지나다니면서 점액을 생산하는 것이 특징이다. 구연산염으로부터 탄소원을 얻고, 여러가지 탄수화물에서 황화수소를 제외한 산과 가스를 발생시킨다. 자연계에 널리 존재하며, 사람의 호흡기, 장관, 비뇨기에서 검출되며 급성 폐렴의 원인균으로 알려져 있다. 최근에는 다양한 클렙시엘라 속 세균이 진단, 검출되고 있는데, 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae), 클렙시엘라 오자에나에(Klebsiella ozaenae), 클렙시엘라 리노스클레로마티스(Klebsiella rhinoscleromatis) 등이 존재한다.

[7] 임상적 측면에서 클렙시엘라 속 세균 중 대부분을 차지하는 것으로 알려진 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae)은 그람음성(Gram negative)의 간균, 통성혐기성 또는 호기성 세균으로 사람의 장관 내, 피부, 구강, 호흡기 등에 상재하고 있으며, 폐렴의 10~20%는 이 균에 의한다고 한다. 또한 요로감염증에서 분리되는 경우도 있으며, 패혈증, 복강 내 감염 등의 주 원인균으로 보고되고 있으며, 중환자실 환자에서 발생하는 균혈증의 원인균으로 높은 감염률을 보이고 있다.

[8] 한편, 현재 미생물을 효과적으로 사멸시킬 수 있는 다양한 항균제가 사용되고 있는데, 베타락탐 계열의 항생제는 현재 사용되고 있는 항균제의 약 50% 이상을 차지하고 있다. 그러나 많은 그람음성 세균에서는 이러한 베타락탐 계열의 항생제에 대해 베타락탐분해효소를 생성함으로써 상기 항생제들에 내성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 현재 발견되는 클렙시엘라 속 세균인 폐렴간균 중에서도 항생제 내성을 나타내는 세균인 특히, K. pneumoniae 카바페네메이즈(KPC)-생산 K. pneumoniae (KPC-Kp)는 전 세계적 확산과 함께 감염환자의 사망률을 높이고 있다. 이에 국내에서도 K. pneumoniae 카바페네메이즈(KPC)-생산 K. pneumoniae (KPC-Kp)확산 및 증가 억제를 위한 새로운 전략이 필요한 실정이다.

[9] 박테리오파지(bacteriophage)는 특정 세균을 감염시켜 감염된 세균의 성장을 억제하고 저해하는 세균 특이적 바이러스를 의미한다. 박테리오파지는 박테리아에 감염(infection)한 후 박테리아 세포 내부에서 증식을 하고, 증식 후

자손 박테리오파지들이 박테리아 밖으로 나올 때 숙주인 박테리아의 세포벽을 파괴하는 방식으로 박테리아를 사멸시키는 능력을 갖고 있다. 박테리오파지의 박테리아 감염 방식은 매우 특이성이 높아서 특정 박테리아에 감염할 수 있는 박테리오파지의 종류는 일부로 한정된다. 즉, 특정 박테리오파지는 특정 범주의 박테리아에만 감염할 수 있고 이로 인하여 특정 박테리오파지는 특정 박테리아만을 사멸시키며 다른 박테리아에는 영향을 주지 않는다. 따라서 최근 세균성 질환의 대처 방안으로 박테리오파지(bacteriophage)의 활용이 크게 주목을 받고 있다. 특히 2000년 이후에 항생제 내성균의 증가로 인하여 기존 항생제의 한계성이 나타나고, 기존 항생제의 대체 물질로의 개발 가능성이 부각되면서 다시 박테리오파지가 항-박테리아제로 주목을 받고 있다.

[10] 현재까지 아시네토박터 속 및 클렙시엘라 속 세균에 의한 감염증을 예방 또는 치료하기 위한 신규한 박테리오파지에 대한 연구는 여전히 부족한 실정이다. 따라서 클렙시엘라 속 세균에 특이적인 용균 활성을 갖는 박테리오파지 및 이의 응용에 대한 기술 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명의 일 목적은 세균, 특히는 항생제에 대한 내성을 갖는 아시네토박터 속 및 클렙시엘라 속 세균에 대하여 특이적 감염 및 사멸능을 갖는 신규한 박테리오파지를 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 아시네토박터 속 세균, 특히는 항생제에 대한 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대하여 특이적 감염 및 사멸능을 갖는 신규한 박테리오파지에 의해 유발되는 감염성 질환의 예방 및 치료용 조성물과 질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 특이적인 사멸능을 갖는 박테리오파지를 제공한다.

[14] 본 발명에서, 용어 "박테리오파지(bacteriophage)"는 특정 세균에 감염하여 당해 세균의 성장을 억제하고 저해하는 세균 특이적 바이러스로, 단일 혹은 이중 사슬의 DNA 또는 RNA를 유전 물질로 포함하는 바이러스를 의미한다.

[15] 본 발명에서 상기 아시네토박터 속 세균은 아시네토박터 바우마니 (*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 헤모리티쿠스 (*Acinetobacter haemolyticus*), 아시네토박터 주니 (*Acinetobacter junii*), 아시네토박터 존스니 (*Acinetobacter johnsonii*), 아시네토박터 리워피 (*Acinetobacter lwoffii*), 아시네토박터 라디오레시스텐스 (*Acinetobacter radioresistens*), 아시네토박터 우르신지 (*Acinetobacter ursingii*), 아시네토박터 쉰들러리 (*Acinetobacter schindleri*),

아시네토박터 파르부스 (*Acinetobacter parvus*), 아시네토박터 베이리 (*Acinetobacter baylyi*), 아시네토박터 보우베티 (*Acinetobacter bouvetii*), 아시네토박터 토우너리 (*Acinetobacter towneri*), 아시네토박터 탄도이 (*Acinetobacter tandoii*), 아시네토박터 그리몬티 (*Acinetobacter grimontii*), 아시네토박터 셰른버지아 (*Acinetobacter tjernbergiae*) 및 아시네토박터 게르너리(*Acinetobacter gerneri*)군에서 선택되는 어느 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[16] 본 발명에서 상기 박테리오파지는 아시네토박터 속 세균에 특이적 사멸능을 가지지만, 상기 아시네토박터 속 세균 중에서도 항생제 내성을 가진 아시네토박터 속 세균에 대하여도 특이적 사멸능을 가진다.

[17] 본 발명에서 상기 "항생제 내성"은 특정 항생제에 내성을 보여 약효가 듣지 않는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 상기 항생제는 콜리스틴(Colistin), 에리트로마이신(Erythromycin), 엠피실린(Ampicillin), 엠피실린-설벡탐(Ampicillin-s $\mu\ell$bactam), 반코마이신(Vancomycin), 리네졸리드(Linezolid), 메티실린(Methicillin), 옥사실린(Oxacillin), 세포탁심(Cefotaxime), 리팜피신(Rifampicin), 아미카신(Amikacin), 젠타마이신(Gentamicin), 아미카신(Amikacin), 카나마이신(Kanamycin), 토브라마이신(Tobramycin), 네오마이신(Neomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴(Imipenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세프타지딤(Ceftazidime), 세페핌(Cefepime), 세프타로린(Ceftaroline), 세프토비프롤(Ceftobiprole), 아즈트레오남(Aztreonam), 피페라실린(Piperacillin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 피페라실린-타조박탐(piperacillin-tazobactam), 미노사이클린(minocycline), 티게사이클린(Tigecycline), 코트리목사(Cotrimoxa), 이의 배합체 및 이들의 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[18] 본 발명의 일 구체예에서 상기 박테리오파지는 병원 내 하수처리장으로부터 시료를 채취하여 분리한 박테리오파지로서, 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP으로 명명하고, 2018년 11월 15일에 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC11798P로 기탁된 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 육각형 머리에 긴 꼬리를 가지고 있는 미오비리대(Myoviridae) 과에 속함을 확인하였으며, 전체 염기 서열 분석 결과 44,597 bp의 크기를 갖고 전체 ORF의 수는 79개임을 확인하였다.

[20] 또한, 본 발명에서 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열을 전체 유전자의 전체 또는 일부로써 포함할 수 있다.

[21] 또한, 본 발명의 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 서열번호 1로

표시되는 염기 서열, 및 상기 염기 서열의 기능적 동등물로 이루어질 수 있다. 상기 기능적 동등물이란 염기 서열의 변형, 치환의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 염기 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 6으로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 서열을 의미한다.

[22] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 서열번호 2 내지 4 각각은 상기 박테리오파지의 ORF(Open reading frame)로, 상기 서열번호 2로 표시되는 단백질은 엔도리신(endolysin)으로 추정되는 단백질의 아미노산 서열일 수 있고, 상기 서열번호 3으로 표시되는 단백질은 리소자임 유사 도메인(lysozyme-like domain)의 아미노산 서열일 수 있으며, 상기 서열번호 4로 표시되는 단백질은 추정의 꼬리-섬유/리소좀 단백질의 아미노산 서열일 수 있다. 보다 상세하게는 상기 서열번호 2는 ORF38의 아미노산 서열이고, 서열번호 3은 ORF50의 아미노산 서열이며, 서열번호 4는 ORF51의 아미노산 서열일 수 있다.

[23] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 유전체를 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 서열번호 5는 ORF38을 코딩하는 유전체의 염기 서열이고, 서열번호 6은 ORF50을 코딩하는 유전체의 염기 서열이며, 서열번호 7은 ORF51을 코딩하는 유전체의 염기 서열일 수 있다.

[24]

[25] 본 발명의 다른 구체예에서 상기 박테리오파지는 병원 내 하수처리장으로부터 시료를 채취하여 분리한 박테리오파지로서, 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP으로 명명하고, 2018년 11월 15일에 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC11799P로 기탁된 것일 수 있다.

[26] 본 발명의 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 육각형 머리에 긴 꼬리를 가지고 있는 미오비리대 과에 속함을 확인하였으며, 전체 염기 서열 분석 결과 44,580 bp의 크기를 갖고 전체 ORF의 수는 77개임을 확인하였다.

[27] 또한, 본 발명에서 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 서열번호 8로 표시되는 염기 서열을 전체 유전자의 전체 또는 일부로써 포함할 수 있다.

[28] 또한, 본 발명의 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 서열번호 8로 표시되는 염기 서열, 및 상기 염기 서열의 기능적 동등물로 이루어질 수 있다. 상기 기능적 동등물이란 염기 서열의 변형, 치환의 결과, 상기 서열번호 8로 표시되는 염기 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 8로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 서열을 의미한다.

[29] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 서열번호 9 내지 11 중 어느 하나의 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 서열번호 9 내지 11 각각은 상기 박테리오파지의 ORF(Open reading frame)로, 상기 서열번호 9로 표시되는 단백질은 리소자임 유사 도메인(lysozyme-like domain)의 아미노산 서열일 수 있고, 상기 서열번호 10으로 표시되는 단백질은 추정의 꼬리-섬유/리소좀 단백질의 아미노산 서열일 수 있으며, 상기 서열번호 11로 표시되는 단백질은 엔도리신(endolysin) 추정 단백질의 아미노산 서열일 수 있다. 보다 상세하게는 상기 서열번호 9는 ORF7의 아미노산 서열일 수 있고, 상기 서열번호 10은 ORF8의 아미노산 서열일 수 있으며, 서열번호 11은 ORF73의 아미노산 서열일 수 있다.

[30] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 서열번호 12 내지 14 중 어느 하나로 표시되는 유전체를 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 서열번호 12는 ORF7을 코딩하는 유전체의 염기 서열이고, 상기 서열번호 13은 ORF8을 코딩하는 유전체의 염기 서열이며, 상기 서열번호 14는 ORF73을 코딩하는 유전체의 염기 서열일 수 있다.

[31] 본 발명의 또 다른 구체예에서 상기 박테리오파지는 병원 내 하수처리장으로부터 시료를 채취하여 분리한 박테리오파지로서, 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP으로 명명하고, 2018년 11월 15일에 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC11802P로 기탁된 것일 수 있다.

[32] 본 발명의 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 육각형 머리에 긴 꼬리를 가지고 있는 미오비리대 과에 속함을 확인하였으며, 전체 염기 서열 분석 결과 42,555 bp의 크기를 갖고 전체 ORF의 수는 77개임을 확인하였다.

[33] 또한, 본 발명에서 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 서열번호 15로 표시되는 염기 서열을 전체 유전자의 전체 또는 일부로써 포함할 수 있다.

[34] 또한, 본 발명의 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 서열번호 15로 표시되는 염기 서열, 및 상기 염기 서열의 기능적 동등물로 이루어질 수 있다. 상기 기능적 동등물이란 염기 서열의 변형, 치환의 결과, 상기 서열번호 15로 표시되는 염기 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 15로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 서열을 의미한다.

[35] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 서열번호 16 및 17 중 어느 하나의 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 서열번호 16 및 17 각각은 상기 박테리오파지의 ORF(Open reading frame)로, 상기 서열번호 16은 리소자임 유사 도메인(lysozyme-like domain)의 아미노산 서열일 수 있고, 서열번호 17은 리소자임 패밀리 단백질로 추정되는 단백질의 아미노산 서열일 수 있다. 보다 상세하게는 상기 서열번호 16 및 17 각각은 ORF7 및 ORF73으로 리소자임 유사 도메인의 아미노산 서열일 수 있다.

[36] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 서열번호 18 및 19 중 어느 하나로 표시되는 유전체를 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 서열번호 18은 ORF7을 코딩하는 유전체의 염기 서열이고, 서열번호 19는 ORF73을 코딩하는 유전체의 염기 서열일 수 있다.

[37] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 열 및 pH에 대한 안정성이 우수한 특성을 가지고 있다.

[38] 본 발명의 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 4 내지 60 ℃의 범위 내에서 용균 활성이 유지되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 또한, 본 발명의 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 pH 3.0 내지 pH 11.0의 범위, 바람직하게는 pH 5.0 내지 pH 10.0의 범위 내에서 용균 활성이 유지되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[40] 상기와 같은 아시네토박터 속 세균 특이적 용균 활성, 내산성 및 내염기성은, 본 발명의 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 유효 성분으로 포함하는 다양한 제품에 적용함에 있어, 다양한 pH 범위의 적용이 가능하게 한다.

[41] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 클렙시엘라 속 세균은 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae), 클렙시엘라 오자에나에(Klebsiella ozaenae), 클렙시엘라 리노스클레로마티스(Klebsiella rhinoscleromatis), 클렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca), 클렙시엘라 플란티콜라(Klebsiella planticola) 및 클렙시엘라 테리게나(Klebsiella terrigena)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 1종 이상일 수 있으며, 임상적 측면에서 폐렴간균으로 클렙시엘라 속 세균 중 대부분을 차지하는 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae)는 클렙시엘라 속 세균을 대표하는 세균으로 알려져 있다.

[42] 본 발명에서 상기 박테리오파지는 클렙시엘라 속 세균에 특이적 사멸능을 가지지만, 상기 클렙시엘라 속 세균 중에서도 항생제 내성을 가진 클렙시엘라 속 세균에 대하여도 특이적 사멸능을 가진다.

[43] 본 발명에서 상기 "항생제 내성"은 특정 항생제에 내성을 보여 약효가 듣지 않는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 상기 항생제는 카바페넴(Carbapenem)의 구조를 갖는 항생제일 수 있다. 구체적으로, 아미카신(Amicacin), 엠피실린(Ampicillin), 엠피실린/설벡탐(Ampicillin/Sulbactam), 아즈트레오남(Aztreonam), 세즈타지딤(Ceftazidime), 세파졸린(Cefazolin),

이미페넴(Imipenem), 에르타페넴(Ertapenem), 세페핌(Cefepime), 세폭시틴(Cefoxitin), 세포탁심(Cefotaxime), 젠타마이신(Gentamicine), 레보플록세신(Levoflocacin), 메로페넴(Meropenem), 피페라실린/타조박탐(Piperacillin/Tazobactam), 코트리목사(Cortrimoxa) 및 티게사이클린(Tigecyline)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적상 상기 클렙시엘라 뉴모니아는 항생제 내성을 갖는 것일 수 있고, 상기 항생제 내성은 상기 카바페넴을 분해하여 효과의 발휘를 억제하는 카바페넴아제 효소(carbapenemase)를 생산함으로써 발생될 수 있다.

[44] 본 발명에서 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 서열번호 20으로 표시되는 염기 서열을 전체 유전자의 전체 또는 일부로써 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 서열번호 20으로 표시되는 염기 서열, 및 상기 염기 서열의 기능적 동등물로 이루어질 수 있다. 상기 기능적 동등물이란 염기 서열의 변형, 치환의 결과, 상기 서열번호 20으로 표시되는 염기 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 20으로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동질의 생리 활성을 나타내는 서열을 의미한다.

[45] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지는 서열번호 21 및 22 중 어느 하나의 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 서열번호 21 및 22 각각은 상기 박테리오파지의 ORF(Open reading frame)로, 상기 클렙시엘라속 균에 흡착 및 용균의 기능을 수행하는 단백질 중에서도 특히 홀린(holin) 또는 안티-홀린(antiholin)으로 추정되는 단백질의 아미노산 서열일 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 서열번호 21 및 22는 각각 ORF57 및 ORF59의 아미노산 서열일 수 있다.

[46] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 박테리오파지는 서열번호 23 및 24 중 어느 하나로 표시되는 유전체를 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 서열번호 23은 ORF57을 코딩하는 유전체의 염기 서열이고, 서열번호 24는 ORF59를 코딩하는 유전체의 염기 서열이다.

[47] 본 발명의 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 클렙시엘라 속 세균, 특히 카바페넴계 항생제 내성 페렴간균에 대해 용균활성이 탁월하다. 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 각이 진 머리와 꼬리를 갖는 형태인 시포비리대(Siphoviridae) 과에 속함을 확인하였으며, 전체 염기 서열 분석 결과 54,880 bp의 크기를 갖고 전체 ORF의 수는 87개임을 확인하였다.

[48] 본 발명의 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 병원 내 하수처리장으로부터 시료를 채취하여 분리한 박테리오파지로서, 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP로 명명하고 2018년 11월 15일에 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC11804P로 기탁하였다.

[49] 본 발명의 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 4 ℃ 내지 60 ℃의 범위 내에서 용균 활성이 유지되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[50] 본 발명의 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 pH 3.0 내지 pH 11.0의 범위, 바람직하게는 pH 5.0 내지 pH 10.0의 범위 내에서 용균 활성이 유지되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[51] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP의 클렙시엘라 속 세균 특이적 용균 활성, 내산성 및 내염기성은, 본 발명의 박테리오파지를 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환의 예방 및 치료용 조성물이나, 상기 박테리오파지를 유효 성분으로 포함하는 다양한 제품에 적용함에 있어, 다양한 pH 범위의 적용이 가능하게 한다.

[52] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 유효 성분으로 포함하는 아시네토박터 속 세균 또는 클렙시엘라 세균에 의해 유발되는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[53] 본 발명의 조성물에서 상기 박테리오파지와 상기 아시네토박터 속 세균 또는 상기 클렙시엘라 세균에 관한 내용은 상기 박테리오파지에서 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.

[54] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 아시네토박터 속 세균, 특히 항생제 내성 아시네토박터속 세균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[55] 본 발명에서 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 C형 간염, 수족구병, 임질, 클라미디아, 연성하감, 성기단순포진, 첨규콘딜롬, 반코마이신내성황색포도알균감염증, 반코마이신내성장알균감염증, 메티실린내성황색포알균감염증, 다제내성녹농균감염증, 다제내성아시네토박터바우마니균감염증, 카바페넴내성장내속균종감염증, 장관감염증, 급성호흡기감염증 및 엔테로바이러스감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 질환이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[56] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[57] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 클렙시엘라 속 세균, 특히 카바페넴 항생제 내성을 갖는 폐렴간균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[58] 본 발명에서 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 폐렴,

요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 또는 이하선염을 포함하며, 이는 특히 폐렴간균에 의하여 발생하는 질병이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[60] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 유효성분으로 포함하는 아시네토박터 속 세균 또는 클렙시엘라 세균에 의해 유발되는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[61] 본 발명의 조성물에서 상기 박테리오파지와 상기 아시네토박터 속 세균 또는 상기 클렙시엘라 세균에 관한 내용은 상기 박테리오파지에서 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.

[62] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 아시네토박터 속 세균, 특히 항생제 내성 아시네토박터속 세균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[63] 본 발명에서 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 C형 간염, 수족구병, 임질, 클라미디아, 연성하감, 성기단순포진, 첨규콘딜롬, 반코마이신내성황색포도알균감염증, 반코마이신내성장알균감염증, 메티실린내성황색포알균감염증, 다제내성녹농균감염증, 다제내성아시네토박터바우마니균감염증, 카바페넴내성장내속균종감염증, 장관감염증, 급성호흡기감염증 및 엔테로바이러스감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 질환이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[65] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 클렙시엘라 속 세균, 특히 카바페넴 항생제 내성을 갖는 폐렴간균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[66] 본 발명에서 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 또는

이하선염을 포함하며, 이는 특히 폐렴간균에 의하여 발생하는 질병이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[68] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 유효 성분으로 포함하는 아시네토박터 속 세균 또는 클렙시엘라 세균에 의해 유발되는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[69] 본 발명의 조성물에서 상기 박테리오파지와 상기 아시네토박터 속 세균 또는 상기 클렙시엘라 세균에 관한 내용은 상기 박테리오파지에서 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.

[70] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 및 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 아시네토박터 속 세균, 특히 항생제 내성 아시네토박터속 세균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[71] 본 발명에서 상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 C형 간염, 수족구병, 임질, 클라미디아, 연성하감, 성기단순포진, 첨규콘딜롬, 반코마이신내성황색포도알균감염증, 반코마이신내성장알균감염증, 메티실린내성황색포알균감염증, 다제내성녹농균감염증, 다제내성아시네토박터바우마니균감염증, 카바페넴내성장내속균종감염증, 장관감염증, 급성호흡기감염증 및 엔테로바이러스감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 질환이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[73] 본 발명에서 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 클렙시엘라 속 세균, 특히 카바페넴 항생제 내성을 갖는 폐렴간균을 특이적으로 사멸시키므로, 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 다양한 질환의 치료에 효과를 나타낸다.

[74] 본 발명에서 상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 감염성 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 또는 이하선염을 포함하며, 이는 특히 폐렴간균에 의하여 발생하는 질병이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 본 발명의 조성물은 1 X 10^3 내지 1 X 10^{10} PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1 X 10^6 내지 1 X 10^9 PFU/mL의 박테리오파지를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 용어, PFU(plaque forming unit)는 박테리오파지가 플라크를 형성하는 것을 수치화한 단위이다.

[76] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 포함하는, 세척제를 제공한다.

[77] 본 발명의 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 속 세균에 특이적 사멸능을 가지므로, 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 세균에 노출되었거나 노출될 가능성이 있는 개체의 피부 표면 또는 신체 각 부위 등을 세척하는 용도로도 사용될 수 있다.

[78] 또한, 본 발명은 세척제 제조를 위한 용도로 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 사용하는 것일 수 있다.

[79]

[80] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP; 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP; 또는 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 유효성분으로 포함하는, 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[81] 본 발명에서 상기 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 질환은 앞서 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.

[82]

[83] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 투여하는 단계를 포함하는, 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법일 수 있다.

[84]

[85] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[86] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제,

좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[87] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[88] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[89] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[90] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[91] 본 발명에서 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용 목욕물 첨가제, 바디로션, 바디밀크, 배스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선탠크림, 스킨로션, 스킨크림,

자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제{화장용}, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 쟈스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누(비의료용), 크림비누, 페이셜 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[92] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 항생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

[93] 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.

[94] 상기 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.

[95] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

[96] 본 발명의 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 식물추출물로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[97] 본 발명의 박테리오파지가 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.

[98] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수

있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[99] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[100] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[101] 본 발명에서 제공하는 신규한 박테리오파지는 기존의 항생제 등의 화학물질에 비해 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 세균, 항생제에 대하여 내성을 갖는 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 세균에 대하여 특이적 사멸능을 가진다.

[102] 또한, 본 발명의 박테리오파지는 사람, 동물, 식물 등 세균외의 다른 숙주는 감염시키지 않으므로, 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성균의 문제점, 식품 내의 항생제의 잔류 문제, 광범위한 숙주범위의 문제점을 해결할 수 있는 장점이 있다.

[103] 따라서, 본 발명의 박테리오파지는 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 세균에 의해 유발되는 감염성 질환의 예방 또는 치료, 항생용 조성물, 사료 첨가용 조성물, 사료, 소독제, 또는 세척제 분야에서 다양하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[104] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 전자 현미경 촬영 사진을 나타낸 것이다.

[105] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 흡착능을 그래프로 나타낸 것이다.

[106] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 1단 증식 곡선을 나타낸 것이다.

[107] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 생체 외에서 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균능을 그래프로 나타낸 것이다.

[108] 도 5는 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균으로 감염시킨 꿀벌부채명나방 유충에 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 처리한 뒤 상기 유충의 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[109] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 pH 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[110] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 온도 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[111] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 전체 유전체 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

[112] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 전자 현미경 촬영 사진을 나타낸 것이다.

[113] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 흡착능을 그래프로 나타낸 것이다.

[114] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 1단 증식 곡선을 나타낸 것이다.

[115] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 생체 외에서 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균능을 그래프로 나타낸 것이다.

[116] 도 13은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균으로 감염시킨 꿀벌부채명나방 유충에 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 처리한 뒤 상기 유충의 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[117] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 pH 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[118] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 온도 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[119] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 전체 유전체 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

[120] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 전자 현미경 촬영 사진을 나타낸 것이다.

[121] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 흡착능을 그래프로 나타낸 것이다.

[122] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 1단 증식

곡선을 나타낸 것이다.

[123] 도 20은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니로 감염시킨 꿀벌부채명나방 유충에 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 처리한 뒤 상기 유충의 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[124] 도 21은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니로 감염시킨 마우스에 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 처리한 뒤 상기 마우스의 폐 내 상기 아시네토박터 바우마니의 균 수의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[125] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 pH 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[126] 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 온도 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[127] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 전체 유전체 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

[128] 도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지의 전자 현미경 촬영 사진을 나타낸 것이다.

[129] 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지의 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 흡착능을 그래프로 나타낸 것이다.

[130] 도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지의 1단 증식 곡선을 나타낸 것이다.

[131] 도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 생체 외에서 박테리오파지의 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 용균능을 그래프로 나타낸 것이다.

[132] 도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지의 pH 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[133] 도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지의 온도 안정성을 그래프로 나타낸 것이다.

[134] 도 31은 본 발명의 일 실시예에 따른 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 속 세균에 대한 용균성 박테리오파지의 전체 유전체 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[135] 본 발명은 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[136] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은

아니다.

[137]

[138] 실시예

[139]

[140] **[실시예 1] 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP**

[141] 1. 임상검체 분리 및 항생제 내성 균주 선별

[142] 하기 표 1과 같이 대학 병원의 ICU(intensive care unit) 혈액과 임상 검체 등으로부터 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 세균을 분리하여 배양하였다. 균주 동정은 키트/ ATB 32 GN 시스템 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 수행하였다. 그 뒤, 항생제 감수성 시험은 뮬러-힌튼(Mueller-Hinton) 아가를 사용하여 외기 37 ℃에서 하룻밤 동안 배양하는 CLSI 디스크 확산 시험 방법을 사용하였고, 시험 항생제는 아미카신(amicacin), 엠피실린-설벡탐(ampicillin-sulbactam), 세프타지딤(ceftazidime), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 세페핌(cefepime), 세포탁심(cefotaxime), 젠타마이신(gentamicine), 이미페넴(imipenem), 레보플록사신(levofloxacin), 메로페넴(meropenem), 미노사이클린(minocycline), 피페라실린(piperacillin), 피페라실린-타조박탐(piperacillin-tazobactam), 코트리목사(cotrimoxa) 및 티게사이클린(tigecycline)을 사용하였다. 감수성 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)를 기준으로 판독하였다. 수집된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주의 항생제 내성 프로파일은 하기 표 2 내지 4에 나타내었다. 단, 하기 표 2 내지 4에서 S, I 및 R은 항균제에 대한 감수성을 평가한 결과로, 'S'는 민감(Susceptible), 'I'는 중간(Intermediate), 'R'은 내성(Resistant)를 의미한다.

[143]

[144] [표1]

숙주 균주	시료 유래	숙주 균주	시료 유래
YMC15/01/P186	흡입 헤드(Aspirate Head)	YMC15/04/R1148	기관 튜브 팁
YMC15/01/R2319	가래 (pneumonia)	YMC15/04/R68	가래 (pneumonia)
YMC15/01/P760	스왑 또는 배액관	YMC15/04/P369	
YMC15/01/R3872	기관 흡입 (pneumonia)	YMC15/04/R663	가래 (pneumonia)
YMC15/02/R923	가래 (pneumonia)	YMC15/04/T132	
YMC15/02/R830	가래 (pneumonia)	YMC15/04/R1427	가래 (pneumonia)
YMC15/02/R1418	가래 (pneumonia)	YMC15/04/U2285	Random Urine
YMC15/02/R2403	가래 (pneumonia)	YMC15/04/R2498	가래 (pneumonia)
YMC15/02/R3331	가래 (pneumonia)	YMC15/05/R1603	가래 (pneumonia)
YMC15/02/P701	스왑 또는 배액관다리	YMC15/05/R1818	가래 (pneumonia)
YMC15/03/R2284	가래 (pneumonia)	YMC15/05/R2554	기관 흡입 (pneumonia)
YMC15/03/R2817	가래 (pneumonia)	YMC15/05/R3556	가래 (pneumonia)
YMC15/03/P828	스왑 또는 배액관골반	YMC15/06/R675	가래 (pneumonia)
YMC15/03/B10119	Blood	YMC15/08/R1402	기관 흡입 (pneumonia)
YMC15/03/R3835	가래 (pneumonia)	YMC15/08/R1398	가래 (pneumonia))
YMC15/03/R4022	가래 (pneumonia)	YMC15/08/R1719	기관 튜브 팁

[145] [표2]

【표 2】

숙주 균주	아미카신	엠피실린 - 설박탐	세프타지딤	시프로플록사신	콜리스틴	세페핌	세포탁심	젠타마이신	이미페넴	레보플록사신	메로페넴	미노시클린	피페라실린	피페라실린/타조박탐	코트리목사	티게사이클린
YMC15/01/P186	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/01/B2319	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	4 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	1 S
YMC15/01/P760	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/01/B3872	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	8 I	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/02/B923	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/02/B830	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/02/B1418	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC15/02/B2403	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC15/02/B3331	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/02/P701	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/03/B2284	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	8 I	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≤20 S	2 S
YMC15/03/B2817	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S

[146] [표3]

【표 3】

							B									
YMC15/03/P828	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	4 I	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≤20 S	1 S
YMC15/03/B10119	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	8 I	≥128 B	≥128 B	≥320 B	4 I
YMC15/03/R3835	19 S	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	2 S	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≤20 S	2 S
YMC15/03/R4022	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC15/04/R1148																
YMC15/04/R68																
YMC15/04/P369																
YMC15/04/R663	8 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≤1 S	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≤20 S	2 S
YMC15/04/T132																
YMC15/04/R1427	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	2 S
YMC15/04/U2285	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YMC15/04/R2498	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC15/05/R1603	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC15/05/R1818	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≤20 S	2 S

[147] [표4]

【표 4】

YMC15/05/B2554	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/05/B3556	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/06/B675	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/08/B1402	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC15/08/B1398	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC15/08/B1719	22 S	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	2 S	≥16 R	≥8 R	≥16 R	4 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S

[148]

[149] 상기 표 2 내지 4에서 보는 바와 같이, 수집된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 32개 균주는 다양한 항생제에 대하여 내성을 가지는 다재내성 균주임을 알 수 있었다.

[150]

[151] 2. 박테리오파지 검체 수집

[152] 2-1. 파지 은행 구축을 위한 검체 수집

[153] 세브란스 병원의 하수 처리시설에서 최초 침전지 거친 후 부유물질 및 침사물이 제거된 원수를 확보하였다. 이는 화학 처리 시설 전 단계의 하수로 제한하였다. 수집한 시료에 1 L 당 염화나트륨 58 g을 첨가한 후 10,000 g에서 10 분간 원심 분리하여 220 nm 밀리포어 필터로 여과하였다. 얻어진 여과액에 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 8000)을 10 % W/V으로 첨가하고 4 ℃에서 12 시간 동안 냉장 보관하였다. 12 시간 냉장 보관된 여과액을 12,000 g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 파지 희석 완충액 (SM 완충액)에 재부유한 뒤, 동일한 양의 클로로포름을 첨가하여 냉동 보관하였다. 이를 3 회 반복하여 300 mL의 박테리오파지 부유액을 채취하였다.

[154]

[155] 2-2. 용균성 파지 선별 및 용균역가 측정

[156] 용균성 파지의 분리 정제는 스팟 테스트(Spot Test)법 (Mazzocco A et al. In Bacteriophages, Clokie and Kropinski AM, eds. Humana Press. 2009)으로

실행하였다. 확보된 균주를 맥콘키 한천배지에서 접종 후 외기 35℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양 후, 투명한 플라크 형성을 보고 파지에 감수성인 균주를 선별하였다. 감수성인 균주를 맥콘키 한천 배지에 접종하여 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 살린 1 ml 튜브에 McFarland 0.5 탁도로 각 균주의 현탁액 제조하고 H 탑 아가 (3 ml), 감수성 박테리아 100 ㎕ 및 파지 용액 (각각 1 ㎕, 10 ㎕ 및 50 ㎕)을 섞어 LB 아가에 도포한 후, 35 ℃에서 12시간 동안 배양하였다. 플라크 관찰한 후에 파스퇴르 파이펫으로 플라크를 채취하여 SM 완충 용액에 희석하고, 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하고 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하여 보관하였다.

[157] 상기 1.에서 확인한 항생제 내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 32개 균주 각각을 맥콘키 한천배지에서 접종하여 배양한 후, 상기 과정에 의해 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 도말된 각각의 내성 균주에 5 ㎕로 접종하여 플라그 형성을 확인하고, 역가 범위를 확인하여, 용균성을 하기 표 5에 나타내었다. 단, 하기 표 5에서 + 및 -는 수집된 균주에 대한 플라크 활성을 평가한 것으로, '+'는 투명한 플라크(clear plaque)를 의미하고, '-'는 용균이 일어나지 않은 것을 의미한다.

[158]

[159] [표5]

숙주 균주	용균 여부	숙주 균주	용균 여부
YMC15/01/P186	++	YMC15/04/R1148	++
YMC15/01/R2319	++	YMC15/04/R68	++
YMC15/01/P760	++	YMC15/04/P369	++
YMC15/01/R3872	++	YMC15/04/R663	++
YMC15/02/R923	++	YMC15/04/T132	++
YMC15/02/R830	++	YMC15/04/R1427	++
YMC15/02/R1418	++	YMC15/04/U2285	++
YMC15/02/R2403	++	YMC15/04/R2498	-
YMC15/02/R3331	++	YMC15/05/R1603	++
YMC15/02/P701	++	YMC15/05/R1818	++
YMC15/03/R2284	-	YMC15/05/R2554	++
YMC15/03/R2817	++	YMC15/05/R3556	++
YMC15/03/P828	++	YMC15/06/R675	-
YMC15/03/B10119	++	YMC15/08/R1402	++
YMC15/03/R3835	++	YMC15/08/R1398	++
YMC15/03/R4022	++	YMC15/08/R1719	++

[160] 상기 표 5에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 상당 수의 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주를 용균 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[161]

[162] 3. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 용균성 박테리오파지의 전자 현미경 분석

[163] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 감수성 균주 배양 배지(20 ml LB 배지)에 접종 및 배양한 뒤 220 nm 밀리포어 필터로 여과하고, 상청액에 폴리에틸렌글리콜(MW 8,000)을 10%(w/v)의 양으로 첨가한 후 밤새 냉장 보관하였다. 이후 12,000 g의 조건으로 20 분 동안 원심 분리한 뒤, 에너지 여과 투과 전자현미경(Energy-Filtering Transmission Electron Microscope)을 이용하여 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 형태를 분석하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[164] 도 1에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 YMC14/01/P262_ABA_BP 박테리오파지를 모양으로 분류하는 기준으로 보았을 때, 육각형 머리에 긴

꼬리를 가지고 있는 미오비리대(Myoviridae) 과에 속하는 것으로 분류하였다.

[165]

[166] 4. 박페리오파지의 흡착능 및 1단 증식 곡선(One-step growth curve) 분석

[167] 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.5가 되도록 배양한 뒤, 아시네토박터 바우마니 균주에 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 MOI 0.001로 넣고 상온에서 배양한 뒤, 100 ㎕ 시료를 1, 2, 3, 4, 5분에 1 ml씩 채취하여 LB 배지에 희석한 뒤 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 흡착능을 평가하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[168] 또한, 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.3이 되도록 배양한 뒤, 4 ℃에서 5 분 동안 7,000 g로 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 0.5 ml의 LB 배지에 희석시키고, 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 MOI 0.001(titer 10^8 pfu/세포)로 넣고 37 ℃에서 5 분 동안 배양하였다. 배양된 혼합 시료를 13,000 g에서 1 분 동안 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 10 ml의 LB 배지에 희석시키고 37 ℃에서 배양하였다. 배양 도중 10 분 마다 시료를 채취하여 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 1단 증식 곡선을 평가하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[169] 도 2에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 접종 후 5분 이내에 박테리오파지의 99 % 정도가 아시네토박터 바우마니 균주에 흡착하였다(4 분: 6.9%, 10 분: 1.3%, 15 분: 0%).

[170] 또한, 도 3에서 보는 바와 같이, 1단 증식 곡선 결과 대략 79 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내었다(0 분: 8 PFU/ml, 100 분: 636 PFU/ml).

[171] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 비교적 빠른 시간 내에 흡착할 수 있고, 79 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내 항생제 내성 균주의 용균 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[172]

[173] 5. 생체 외 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증

[174] 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주 1 X 10^9 CFU/ml에 준비된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 1 X 10^8 CFU/ml(MOI: 0.1), 1 X 10^9 PFU/ml(MOI: 1), 1 X 10^{10} PFU/ml(MOI: 10)의 양으로 각각 처리하고 시간 별로 OD 값(파장 600nm)을 측정하였다. 단, 음성 대조군으로는 PBS+SM 버퍼를 처리하여, 그 값을 도 4에 나타내었다.

[175] 도 4에서 보는 바와 같이, 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 처리한 경우 OD 값이 감소하였고, MOI 값이 증가할수록 OD 값은 더욱 감소하였으며, 특히 MOI 10일 때 가장 용균능이 높았다.

[176] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는

항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 갖는 것을 알 수 있다.

[177]

[178] 6. 생체 내 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증

[179] 3 ~ 4 령된 꿀벌부채명나방 유충(Galleria mellonella larvae) 200마리를 준비한 뒤, 각 그룹당 10 마리씩 분류하였다. 각 유충에 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 최소 치사 농도(MLD)로 유충의 복각(proleg)을 통해 주입한 후, 콜리스틴과 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 MOI 10 또는 MOI 100으로 혼합 접종한 뒤 72시간까지 매 12 또는 24 시간마다 유충의 생존률을 확인하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[180] 도 5에서 보는 바와 같이, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입한 유충에 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP를 처리한 경우 유충의 생존율이 증가하였고, MOI 값이 증가할수록 유충의 생존율이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입하지 않고 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP만을 주입한 경우도 건강한 대조군과 그 생존률을 비교할 때 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[181] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 생체 내에서도 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 가지므로, 상기 아시네토박터 바우마니 균주에 의해 유발되는 감염성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 것을 알 수 있다.

[182]

[183] 7. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 박테리오파지의 안정성 평가

[184] 본 발명에 따른 박테리오파지 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP가 온도 및 알칼리에서 파괴되지 않고 안정성을 유지하는지 확인하였다.

[185] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP 1 ㎕를 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 pH로 맞춘 SM 버퍼 40 ㎕에 넣은 뒤, 37 ℃에서 1시간 동안 배양한 뒤 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균과 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[186] 또한, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP 용액을 각각 4 ℃, 37 ℃, 50 ℃, 60 ℃ 및 70 ℃에서 배양하는 1 시간 동안 10 분 단위로 각각의 샘플을 아시네토박터 바우마니 균주와 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[187] 도 6에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 산성, 중성 및 알카리성 모두에서 높은 안정성을

나타내었고, 30 일 동안 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 특히 중성(pH 7~8)에서 비교적 안정성을 나타내었다.

[188] 또한, 도 7에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 70 ℃의 고온에서 까지 매우 높은 안정성을 보였다.

[189]

[190] 8. 항생제 내성 클렙시엘라 속 균에 대한 박테리오파지의 전체 게놈 서열 분석

[191] 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 특성을 규명하기 위하여 전체 유전자 서열 분석을 Illumina sequencer(Roche)를 통하여 통상의 기술자에게 자명한 전체 게놈 서열 분석 방법을 기초로 분석하여, 그 결과를 도 8 및 표 6 내지 11에 나타내었다.

[192]

[193] [표6]

【표 6】

유전체번호	범위 (Range)		개시코돈	스트랜드 (strand)	길이 (bp)	추정 기능 (Putative function)	주석 출처 (Annotation source)	E-value	NCBI blastP identity (%)	NCBI-Bank accession number
	시작	종료								
ORF1	96	653	GTG	-	558	ParB/sulfiredoxin	Vibrio phage 1.213.O._10N.222.54.F10	4E-65	59	AUR95847.1
ORF2	686	949	ATG	-	264	hypothetical protein	Acinetobacter phage AhP2	2E-32	96	ASJ78929.1
ORF3	1054	1233	ATG	-	180	fis family transcriptional regulator	Acinetobacter phage VCHABP12	2E-06	45	ARB06798.1
ORF4	1236	1562	ATG	-	327	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	4E-74	100	AJT61457.1
ORF5	1889	2227	ATG	-	339	AB1gp40	Acinetobacter phage AB1	5E-44	96	AD014411.1
ORF6	2300	2539	ATG	-	240	AB1gp42	Acinetobacter phage AB1	2E-59	96	AD014413.1
ORF7	2680	2967	GTG	-	288	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-56	100	YP_009095433.1
ORF8	2948	3208	ATG	-	261	AB1gp43	Acinetobacter phage AB1	1E-21	42	AD014414.1
ORF9	3205	3591	ATG	-	387	gp69	Escherichia phage EB49	1E-10	56	YP_009018683.1
ORF10	3578	4159	ATG	-	582	AB1gp45	Acinetobacter phage AB1	2E-24	89	AD014416.1
ORF11	4156	4320	ATG	-	165	AB1gp46	Acinetobacter phage AB1	1E-137	98	AD014417.1
ORF12	4317	4892	ATG	-	576	AB1gp47	Acinetobacter phage AB1	2E-134	79	AD014418.1
ORF13	4889	5656	ATG	-	768	AB1gp48	Acinetobacter phage AB1	2E-16	92	AD014419.1
ORF	564	575	AT	-	114	putative bacteriophag	Acinetobacter	2E-	99	AFV51531.

[194] [표7]

【표 7】

14	4	7	G			e-associated immunity protein	phage IME-AB2	41		1
ORF 15	5754	5966	ATG	-	213	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0.32	41	YP_009055440.1
ORF 16	6038	6187	ATG	-	150	ABlgp50	Acinetobacter phage AB1	3E-58	91	AD014421.1
ORF 17	6184	6477	ATG	-	294	ABlgp51	Acinetobacter phage AB1	4E-35	63	AD014422.1
ORF 18	6474	6743	ATG	-	270	putative replicative DNA helicase	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	99	YP_009055443.1
ORF 19	6754	8097	ATG	-	1344	putative primosomal protein	Acinetobacter phage IME-AB2	0	99	AFV51535.1
ORF 20	8103	8969	ATG	-	867	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-113	100	YP_009055445.1
ORF 21	8962	9441	ATG	-	480	ABlgp54	Acinetobacter phage AB1	2E-38	87	AD014425.1
ORF 22	9454	9666	ATG	-	213	ABlgp54	Acinetobacter phage AB1	2E-38	87	AD014425.1
ORF 23	9681	10016	ATG	-	336	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	8E-76	100	YP_009055447.1
ORF 24	10200	10388	ATG	-	189	ABlgp57	Acinetobacter phage AB1	1E-21	86	AD014428.1
ORF 25	10582	11169	ATG	+	588	putative HNH homing endonuclease	Acinetobacter phage AbP2	3E-61	50	ASJ78942.1
ORF 26	11222	11416	ATG	-	195	ABlgp60	Acinetobacter phage AB1	3E-14	52	AD014431.1
ORF 27	11516	12328	ATG	+	813	putative transcriptional regulator	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055451.1
ORF	123	126	AT	+	270	ABlgp63	Acinetobacter	6E-	88	AD014434.

[195] [표8]

【표 8】

28	83	52	G				phage AB1	47		1
ORF 29	12745	13077	ATG	+	333	AB1gp64	Acinetobacter phage AB1	1E-68	94	AD014435.1
ORF 30	13077	13259	ATG	+	183	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-36	100	YP_009055454.1
ORF 31	13256	14155	ATG	+	900	recombinase	Psychrobacter phage pOW20-A	1E-70	43	YP_007673324.1
ORF 32	14152	14907	ATG	+	756	AB1gp67	Acinetobacter phage AB1	2E-169	97	AD014438.1
ORF 33	14908	15201	ATG	+	294	AB1gp68	Acinetobacter phage AB1	7E-61	96	AD014439.1
ORF 34	15198	15419	ATG	+	222	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-07	43	YP_009055458.1
ORF 35	15416	15577	ATG	+	162	AB1gp70	Acinetobacter phage AB1	3E-29	96	AD014441.1
ORF 36	15565	16137	ATG	+	573	putative nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	Acinetobacter phage IME-AB2	5E-71	64	AFV51550.1
ORF 37	16130	16360	ATG	+	231	rIIB lysis inhibitor	Caulobacter phage CcrPW	2	33	AXQ68725.1
ORF 38	16453	17061	ATG	-	609	putative endolysin	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-143	98	ARB06760.1
ORF 39	17048	17323	ATG	-	276	AB1gp74	Acinetobacter phage AB1	1E-56	95	AD014445.1
ORF 40	17396	17644	ATG	-	249	AB1gp75	Acinetobacter phage AB1	3E-30	92	AD014446.1
ORF 41	17720	19543	ATG	-	1824	putative tail fiber protein	Acinetobacter phage WCHABP1	2E-77	88	ARQ94726.1
ORF 42	19545	20390	GTG	-	846	putative tail fiber protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R2315	0	99	YP_009203603.1
ORF	203	209	AT	-	627	AB1gp78	Acinetobacter	8E-	99	AD014449.

[196] [표9]

【표 9】

43	68	94	G				phage AB1	149		1
ORF 44	20994	22178	ATG	-	1185	putative baseplate J-like protein	Acinetobacter phage IME-AB2	0	99	AFV51558.1
ORF 45	22175	22528	ATG	-	354	AB1gp60	Acinetobacter phage AB1	3E-81	99	AD014451.1
ORF 46	22674	23345	ATG	-	672	putative baseplate assembly protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-157	100	YP_009055472.1
ORF 47	23302	24192	GTG	-	891	AB1gp62	Acinetobacter phage AB1	0	94	AD014453.1
ORF 48	24301	24642	ATG	-	342	hypothetical protein	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-60	99	ARB06749.1
ORF 49	24581	25177	ATG	-	597	AB1gp63	Acinetobacter phage AB1	2E-139	98	AD014454.1
ORF 50	25185	27233	ATG	-	2049	lysozyme like domain protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055475.1
ORF 51	27236	27478	GTG	-	243	putative tail-fiber/lysozyme protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-52	99	YP_009055476.1
ORF 52	27478	27903	ATG	-	426	AB1gp01	Acinetobacter phage AB1	1E-37	46	AD014372.1
ORF 53	27949	28398	ATG	-	450	AB1gp02	Acinetobacter phage AB1	2E-59	58	AD014373.1
ORF 54	26411	29874	ATG	-	1464	AB1gp03	Acinetobacter phage AB1	0	98	AD014374.1
ORF 55	29864	30358	ATG	-	495	AB1gp04	Acinetobacter phage AB1	3E-110	93	AD014375.1
ORF 56	30355	30825	ATG	-	471	AB1gp06	Acinetobacter phage AB1	3E-108	96	AD014377.1
ORF 57	30903	31184	ATG	-	282	putative capsid protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-55	100	YP_009055482.1

[197] [표10]

【표 10】

ORF 58	31232	31417	ATG	-	186	ABlgp08	Acinetobacter phage AB1	8E-31	90	ADO14379.1
ORF 59	31414	31920	ATG	-	507	putative RNA polymerase	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-98	94	ARB06827.1
ORF 60	32427	32651	ATG	+	225	hypothetical protein	Acinetobacter phage IME-AB2	4E-47	100	AFV51493.1
ORF 61	32819	33094	ATG	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage AP22	2E-58	98	YP_006383783.1
ORF 62	33110	33559	ATG	-	450	ABlgp12	Acinetobacter phage AB1	1E-84	80	ADO14383.1
ORF 63	33559	33897	ATG	-	339	ABlgp13	Acinetobacter phage AB1	3E-21	43	ADO14384.1
ORF 64	33977	34996	ATG	-	1020	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055489.1
ORF 65	35006	35465	ATG	-	480	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-110	100	YP_009055490.1
ORF 66	35493	36827	ATG	-	1335	conserved protein of unknown function	Acinetobacter phage AP22	0	86	YP_006383778.1
ORF 67	37041	37247	ATG	-	207	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-43	100	YP_009055493.1
ORF 68	37237	37512	ATG	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	6E-61	100	YP_009055494.1
ORF 69	37611	37973	ATG	-	363	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-84	100	YP_009055495.1
ORF 70	37970	38362	ATG	-	393	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	1E-89	100	AJT61472.1
ORF 71	38355	38777	ATG	-	423					
ORF	387	391	AT	-	354	hypothetical	Acinetobacter phage YMC-13-	4E-	100	YP_009055

[198] [표11]

【표 11】

72	67	20	G			protein	01-C62	83		498.1
ORF 73	392 02	393 12	ATG	-	111	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-27	100	YP_009055499.1
ORF 74	393 49	395 13	ATG	-	165	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	7E-32	100	YP_009055500.1
ORF 75	402 03	409 73	ATG	-	771	putative head protein	Acinetobacter phage AbP2	0	99	ASJ78923.1
ORF 76	409 76	424 06	ATG	-	1431	putative portal protein	Acinetobacter phage WCHABP12	0	96	ARB06806.1
ORF 77	424 10	437 11	ATG	-	1302	putative phage terminase large subunit	Acinetobacter phage AP22	0	94	YP_006383766.1
ORF 78	436 80	440 45	ATG	-	366	DNA binding domain	uncultured Mediterranean phage uvMED	2E-12	41	BAQ88996.1
ORF 79	440 38	445 35	TTT	-	498	ParB/sulfiredoxin	Vibrio phage 1.213.O._10N.222.54.F10	6E-58	56	AUR95847.1

[199] 도 8 및 상기 표 6 내지 11에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 선형의 dsDNA(linear dsDNA)를 포함하며, 79개의 ORF로 구성되어 있었다.

[200] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP의 서열을 기존의 박테리오파지의 서열과 대조한 결과, 본 발명에 따른 박테리오파지와 유사성을 갖는 박테리오파지는 검출되지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP는 기존에 발견되지 않은 신규한 박테리오파지에 해당함을 알 수 있다.

[201]

[202] **[실시예 2] 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP**

[203] 1. 임상검체 분리 및 항생제 내성 균주 선별

[204] 하기 표 12에 나타낸 바와 같이 대학 병원의 ICU(intensive care unit) 혈액과 임상검체 등으로부터 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 세균을 분리하여 배양하였다. 균주 동정은 키트/ ATB 32 GN 시스템 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 수행하였다. 그 뒤, 항생제 감수성 시험은

뮬러-힌튼(Mueller-Hinton) 아가를 사용하여 외기 37℃에서 하룻밤 동안 배양하는 CLSI 디스크 확산 시험 방법을 사용하였고, 시험 항생제는 이미페넴(imipenem), 피페라실린-타조박탐(piperacillin-tazobactam), 엠피실린-설벡탐(ampicillin-s $\mu\ell$bactam), 아즈트레오남(aztreonam), 세프타지딤(ceftazidime), 세페핌(cefepime), 세포탁심(cefotaxime), 젠타마이신(gentamicine), 아미카신(amicacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 레보플록사신(levofloxacin), 티게실린(tigecyline) 및 콜리스틴(colistin)을 사용하였다. 감수성 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)를 기준으로 판독하였다. 수집된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주의 항생제 내성 프로파일은 하기 표 13 내지 15에 나타내었다. 단, 하기 표 13 내지 15에서 S, I 및 R은 항균제에 대한 감수성을 평가한 결과로, 'S'는 민감(Susceptible), 'I'는 중간(Intermediate), 'R'은 내성(Resistant)를 의미한다.

[205]

[206] [표12]

숙주 균주	시료 유래	숙주 균주	시료 유래
YMC15/01/P186	카테터 팁(Other Catheter Tip)	YMC15/04/R1148	가래 (pneumonia)
YMC15/01/R2319	스왑 또는 배액관발	YMC15/04/R68	가래 (pneumonia)
YMC15/01/P760	가래 (pneumonia)	YMC15/04/P369	가래 (pneumonia)
YMC15/01/R3872	둔부 욕창	YMC15/04/R663	가래 (pneumonia)
YMC15/02/R923	혈액	YMC15/04/T132	기관 튜브 팁
YMC15/02/R830	가래 (pneumonia)	YMC15/04/R1427	기관 흡입 (pneumonia)
YMC15/02/R1418	둔부 욕창	YMC15/04/U2285	기관 흡입 (pneumonia)
YMC15/02/R2403	정맥용 카테터 팁	YMC15/04/R2498	스왑 또는 배액관등
YMC15/02/R3331	가래 (pneumonia)	YMC15/05/R1603	욕창
YMC15/02/P701	정맥용 카테터 팁	YMC15/05/R1818	담즙, PTBD

[207] [표13]

【표 13】

숙주 균주	아미카신	엠피실린 - 설박탐	세프타지딤	시프로플록사신	콜리스틴	세페핌	세포탁심	젠타마이신	이미페넴	레보록사신	메로페넴	미노지클린	피페라실린	피페라실린/타조박탐	코트리목사	티게실린
YMC15/02/T28	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	32 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC14/01/P262	6 R	16 I	16 I	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	4 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≤0.5 S
YMC13/02/B669	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	1 S
YMC13/02/P180	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC13/02/B1906	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC13/02/B1380	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	4 R	32 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC13/02/P386	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 I	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC13/05/T180	20 S	≥32 R	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC13/05/B1314	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	4 R	8 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC13/05/T317	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	16 R	8 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC13/05/R2199	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC13/05/R3308	6 R	≥32	≥64 R	≥4 R	8 R	8 S	≥64	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S

[208] [표14]

【표 14】

		B					B									
YMC13/05/B3526	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	8 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC13/05/B3438	6 B	4 S	≥64 B	≥4 B	≥16 B	32 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YMC13/05/B3536		≥32 B	≥64 B	≥4 B	16 B	16 I	≥64 B	≥16 B	≥16 B	4 I	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	≤0.5 S
YMC13/06/B42	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	16 B	16 I	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	2 S
YMC13/06/B633	22 S	≥32 B	≥64 B	≥4 B	16 B	32 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	4 I
YMC13/12/P154	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	1 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	8 I	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC13/12/P180	9 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YMC13/12/P217	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	8 I	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC17/08/N34	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≥16 B	32 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YMC17/07/U6299	6 B	16 I	16 I	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	4 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≤0.5 S
YMC17/08/N153	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	1 S
YMC17/08/N243	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	4 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	2 S
YMC17/08/N456	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	4 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	2 S

[209] [표15]

【표 15】

YMC17/10/N291	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	4 R	32 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S

[210] 상기 표 13 내지 15에서 보는 바와 같이, 수집된 아시네토박터 바우마니(Acinetobacter baumannii) 20개 균주는 다양한 항생제에 대하여 내성을 가지는 다제내성 균주임을 알 수 있었다.

[211]

[212] 2. 박테리오파지 검체 수집

[213] 2-1. 파지 은행 구축을 위한 검체 수집

[214] 세브란스 병원의 하수 처리시설에서 최초 침전지 거친 후 부유물질 및 침사물이 제거된 원수를 확보하였다. 이는 화학 처리 시설 전 단계의 하수로 제한하였다. 수집한 시료에 1 L 당 염화나트륨 58 g을 첨가한 후 10,000 g에서 10 분간 원심 분리하여 220 nm 밀리포어 필터로 여과하였다. 얻어진 여과액에 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 8000)을 10% W/V으로 첨가하고 4 ℃에서 12 시간 동안 냉장 보관하였다. 12 시간 냉장 보관된 여과액을 12,000 g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 파지 희석 완충액 (SM 완충액)에 재부유한 뒤, 동일한 양의 클로로포름을 첨가하여 냉동 보관하였다. 이를 3회 반복하여 300 mL의 박테리오파지 부유액을 채취하였다.

[215]

[216] 2-2. 용균성 파지 선별 및 용균역가 측정

[217] 용균성 파지의 분리 정제는 스팟 테스트(Spot Test)법 (Mazzocco A et al. In Bacteriophages, Clokie and Kropinski AM, eds. Humana Press. 2009)으로 실행하였다. 확보된 균주를 맥콘키 한천배지에서 접종 후 외기 35 ℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양 후, 투명한 플라크 형성을 보고 파지에 감수성인 균주를 선별하였다. 감수성인 균주를 맥콘키 한천 배지에 접종하여 35 ℃에서 12시간 동안 배양하였다. 살린 1 ml 튜브에 McFarland 0.5 탁도로 각 균주의 현탁액 제조하고 H 탑 아가 (3 ml), 감수성 박테리아 100 ㎕ 및 파지 용액 (각각 1 ㎕, 10 ㎕ 및 50 ㎕)을 섞어 LB 아가에 도포한 후, 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 플라크 관찰한 후에 파스퇴르 파이펫으로 플라크를 채취하여 SM 완충 용액에 희석하고, 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3 회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하고 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하여 보관하였다.

[218] 상기 1.에서 확인한 항생제 내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주를 맥콘키 한천배지에서 접종하여 배양한 후, 상기 과정에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 도말된 각각의 내성 균주에 5 ㎕로 접종하여 플라그 형성을 확인하고, 역가 범위를 확인하여, 용균성을 하기 표 16에 나타내었다.

[219] 단, 하기 표 16에서 + 및 -는 수집된 균주에 대한 플라크 활성을 평가한 것으로, '+'는 투명한 플라크(clear plaque)를 의미하고, '-'는 용균이 일어나지 않은 것을 의미한다.

[220]

[221] [표16]

숙주 균주	용균 여부	숙주 균주	용균 여부
YMC15/02/T28	+	YMC13/05/R2199	-
YMC13/02/R669	+	YMC13/05/R3526	+
YMC13/02/R1380	+	YMC13/06/R42	-
YMC13/02/P386	+	YMC13/06/R633	+
YMC13/05/T180	+	YMC13/12/P154	+

[222] 상기 표 16에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 상당 수의 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주를 용균 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[223]

[224] 3. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 용균성 박테리오파지의 전자 현미경 분석

[225] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 감수성 균주 배양 배지(20 ml LB 배지)에 접종 및 배양한 뒤 220 nm 밀리포어 필터로 여과하고, 상청액에 폴리에틸렌글리콜(MW 8,000)을 10 %(w/v)의 양으로 첨가한 후 밤새 냉장 보관하였다. 이후 12,000 g의 조건으로 20 분 동안 원심 분리한 뒤, 에너지 여과 투과 전자현미경(Energy-Filtering Transmission Electron Microscope)을 이용하여 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 형태를 분석하여, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[226] 도 9에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 YMC15/02/T28_ABA_BP 박테리오파지를 모양으로 분류하는 기준으로 보았을 때, 육각형 머리에 긴 꼬리를 가지고 있는 미오비리대 과에 속하는 것으로 분류하였다.

[227]

[228] 4. 박페리오파지의 흡착능 및 1단 증식 곡선(One-step growth curve) 분석

[229] 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.5가 되도록 배양한 뒤, 아시네토박터 바우마니 균주에 상기 2.에서 정제된 박테리오파지

YMC15/02/T28_ABA_BP를 MOI 0.001로 넣고 상온에서 배양한 뒤, 100 ㎕ 시료를 1, 2, 3, 4, 5분에 1 ml씩 채취하여 LB 배지에 희석한 뒤 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 흡착능을 평가하여, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[230] 또한, 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.3이 되도록 배양한 뒤, 4 ℃에서 5 분 동안 7,000 g로 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 0.5 ml의 LB 배지에 희석시키고, 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 MOI 0.001(titer 10^8pfu/cells)로 넣고 37 ℃에서 5 분 동안 배양하였다. 배양된 혼합 시료를 13,000 g에서 1 분 동안 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 10 ml의 LB 배지에 희석시키고 37 ℃에서 배양하였다. 배양 도중 10 분 마다 시료를 채취하여 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 1단 증식 곡선을 평가하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[231] 도 10에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 접종 후 5 분 이내에 박테리오파지의 99 % 정도가 아시네토박터 바우마니 균주에 흡착하였다(10분: 0.24%).

[232] 또한, 도 11에서 보는 바와 같이, 1단 증식 곡선 결과 424 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내었다(10분: 0.24 PFU/ml).

[233] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 비교적 빠른 시간 내에 흡착할 수 있고, 424 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내 항생제 내성 균주의 용균 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[234]

[235] <u>5. 생체 외 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증</u>

[236] 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주 1 X 10^9 CFU/ml에 준비된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 1 X 10^8 CFU/ml(MOI: 0.1), 1 X 10^9 PFU/ml(MOI: 1), 1 X 10^{10} PFU/ml(MOI: 10)의 양으로 각각 처리하고 시간 별로 OD 값(파장 600nm)을 측정하였다. 단, 음성 대조군으로는 PBS+SM 버퍼를 처리하여, 그 값을 도 12에 나타내었다.

[237] 도 12에서 보는 바와 같이, 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 처리한 경우 OD 값이 감소하였고, MOI 값이 증가할수록 OD 값은 더욱 감소하였으며, 특히 MOI 10일 때 가장 용균능이 높았다.

[238] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 갖는 것을 알 수 있다.

[239]

[240] <u>6. 생체 내 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증</u>

[241] 3 ~ 4 령된 꿀벌부채명나방 유충(Galleria mellonella larvae) 200 마리를 준비한 뒤, 각 그룹당 10 마리씩 분류하였다. 각 유충에 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 최소 치사 농도(MLD)로 유충의 복각을 통해 주입한 후, 콜리스틴과 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 MOI 10 또는 MOI 100으로 혼합 접종한 뒤 72 시간까지 매 12 또는 24 시간마다 유충의 생존률을 확인하여 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[242] 도 13에서 보는 바와 같이, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입한 유충에 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP를 처리한 경우 유충의 생존율이 증가하였고, MOI 값이 증가할수록 유충의 생존율이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입하지 않고 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP만을 주입한 경우도 건강한 대조군과 그 생존률을 비교할 때 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[243] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 생체 내에서도 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 가지므로, 상기 아시네토박터 바우마니 균주에 의해 유발되는 감염성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 것을 알 수 있다.

[244]

[245] 7. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 박테리오파지의 안정성 평가

[246] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP가 온도 및 알칼리에서 파괴되지 않고 안정성을 유지하는지 확인하였다.

[247] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP 1 ㎕를 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 pH로 맞춘 SM 버퍼 40 ㎕에 넣은 뒤, 37 ℃에서 1시간 동안 배양한 뒤 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균과 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[248] 또한, 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP 용액을 각각 4 ℃, 37 ℃, 50℃, 60℃ 및 70℃에서 배양하는 1시간 동안 10분 단위로 각각의 샘플을 아시네토박터 바우마니 균주와 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[249] 도 14에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 pH 7.5에 해당하는 중성에서 가장 안정성을 나타내었고, 30일 동안 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 중성/알카리성에서 비교적 안정성을 나타내었다.

[250] 또한, 도 15에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 50℃의 고온에서 까지 매우 높은 안정성을 보였다.

[251]

[252] 8. 항생제 내성 클렙시엘라 속 균에 대한 박테리오파지의 전체 게놈 서열 분석

[253] 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 특성을 규명하기 위하여 전체 유전자 서열 분석을 Illumina sequencer(Roche)를 통하여 통상의 기술자에게 자명한 전체 게놈 서열 분석 방법을 기초로 분석하여, 그 결과를 도 16 및 표 17 내지 22에 나타내었다.

[254]

[255] [표17]

【표 17】

유전체 번호	범위 (Range)		개시 코돈	스트랜드 (strand)	길이 (bp)	추정 기능 (Putative function)	주석 출처 (Annotation source)	E-value	NCBI blastp identity (%)	NCBI-Bank accession number
	시작	종료								
ORF1	445	1629	ATG	-	1185	putative baseplate J-like protein	Acinetobacter phage IME-AB2	0	99	AFV51558.1
ORF2	1626	1979	ATG	-	354	AB1gp60	Acinetobacter phage AB1	3E-81	99	AD014451.1
ORF3	2125	2796	ATG	-	672	putative baseplate assembly protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-157	100	YP_009055472.1
ORF4	2753	3643	GTG	-	891	AB1gp62	Acinetobacter phage AB1	0	94	AD014453.1
ORF5	3752	4093	ATG	-	342	hypothetical protein	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-60	99	ARB06749.1
ORF6	4032	4628	ATG	-	597	AB1gp63	Acinetobacter phage AB1	2E-139	98	AD014454.1
ORF7	4636	6684	ATG	-	2049	lysozyme like domain protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055475.1
ORF8	6687	6929	GTG	-	243	putative tail-fiber/lysozyme protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-52	99	YP_009055476.1
ORF9	6929	7354	ATG	-	426	AB1gp01	Acinetobacter phage AB1	1E-37	46	AD014372.1
ORF10	7400	7849	ATG	-	450	AB1gp02	Acinetobacter phage AB1	2E-59	58	AD014373.1
ORF11	7862	9325	ATG	-	1464	AB1gp03	Acinetobacter phage AB1	0	98	AD014374.1
ORF12	9315	9809	ATG	-	495	AB1gp04	Acinetobacter phage AB1	3E-110	93	AD014375.1
ORF13	9806	10276	ATG	-	471	AB1gp06	Acinetobacter phage AB1	3E-108	96	AD014377.1

[256] [표18]

【표 18】

ORF 14	10354	10635	ATG	-	282	putative capsid protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-55	100	YP_009055482.1
ORF 15	10683	10868	ATG	-	186	AB1gp08	Acinetobacter phage AB1	8E-31	90	AD014379.1
ORF 16	10865	11371	ATG	-	507	putative RNA polymerase	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-98	94	ARB06827.1
ORF 17	11878	12102	ATG	+	225	hypothetical protein	Acinetobacter phage IME-AB2	4E-47	100	AFV51493.1
ORF 18	12270	12545	ATG	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage AP22	2E-58	98	YP_006383783.1
ORF 19	12561	13010	ATG	-	450	AB1gp12	Acinetobacter phage AB1	1E-84	80	AD014383.1
ORF 20	13010	13348	ATG	-	339	AB1gp13	Acinetobacter phage AB1	4E-20	42	AD014384.1
ORF 21	13428	14447	ATG	-	1020	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055489.1
ORF 22	14457	14936	ATG	-	480	AB1gp16	Acinetobacter phage AB1	2E-31	44	AD014387.1
ORF 23	14944	16278	ATG	-	1335	AB1gp17	Acinetobacter phage AB1	0	81	AD014388.1
ORF 24	16492	16698	ATG	-	207	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-43	100	YP_009055493.1
ORF 25	16686	16963	ATG	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	6E-61	100	YP_009055494.1
ORF 26	17062	17424	ATG	-	363	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-84	100	YP_009055495.1
ORF 27	17421	17813	ATG	-	393	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	1E-89	100	AJT61472.1
ORF 28	17806	18228	ATG	-	423					

[257] [표19]

【표 19】

ORF 29	18218	18571	ATG	-	354	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	4E-83	100	YP_009055498.1
ORF 30	18653	18763	ATG	-	111	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-27	100	YP_009055499.1
ORF 31	18800	18964	ATG	-	165	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	7E-21	100	YP_009055500.1
ORF 32	19654	20424	ATG	-	771	putative head protein	Acinetobacter phage AbP2	0	99	ASJ78923.1
ORF 33	20427	21857	ATG	-	1431	putative portal protein	Acinetobacter phage WCHABP12	0	96	ARB06806.1
ORF 34	21861	23162	ATG	-	1302	putative phage terminase large subunit	Acinetobacter phage APZ2	0	94	YP_006383766.1
ORF 35	23131	23496	ATG	-	366	DNA binding domain	uncultured Mediterranean phage uvMED	2E-12	41	BAQ88996.1
ORF 36	23489	24682	GTG	-	1194	ParB/sulfiredoxin	Vibrio phage 1.213.O._1CN.222.54.F10	4E-138	58	AUR95847.1
ORF 37	24734	24997	ATG	-	264	hypothetical protein	Acinetobacter phage AbP2	2E-32	96	ASJ78929.1
ORF 38	25102	25281	ATG	-	180	fis family transcriptional regulator	Acinetobacter phage WCHABP12	2E-06	45	ARB06798.1
ORF 39	25284	25610	ATG	-	327	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	4E-74	100	AJT61457.1
ORF 40	25937	26275	ATG	-	339	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-79	100	YP_009055430.1
ORF 41	26348	26587	ATG	-	240	AB1gp40	Acinetobacter phage AB1	5E-44	96	ADO14411.1
ORF	267	270	GT	-	288	AB1gp42	Acinetobacter	2E-	96	ADO14413.

[258] [표20]

【표 20】

42	28	15	G				phage AB1	59		1
ORF 43	26996	27256	ATG	-	261	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-55	100	YP009055433.1
ORF 44	27253	27639	ATG	-	387	AB1gp43	Acinetobacter phage AB1	1E-21	42	AD014414.1
ORF 45	27626	28207	ATG	-	582	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	5E-141	100	YP_009055435.1
ORF 46	28204	28368	ATG	-	165	AB1gp45	Acinetobacter phage AB1	2E-24	89	AD014416.1
ORF 47	28365	28940	ATG	-	576	AB1gp46	Acinetobacter phage AB1	1E-137	98	AD014417.1
ORF 48	28937	29704	ATG	-	768	AB1gp47	Acinetobacter phage AB1	2E-134	79	AD014418.1
ORF 49	29692	29805	ATG	-	114	AB1gp48	Acinetobacter phage AB1	2E-16	92	AD014419.1
ORF 50	29802	30014	ATG	-	213	putative bacteriophage-associated immunity protein	Acinetobacter phage IME-AB2	2E-41	99	AFV51531.1
ORF 51	30086	30235	ATG	-	150	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-01	41	YP_009055440.1
ORF 52	30232	30525	ATG	-	294	AB1gp50	Acinetobacter phage AB1	3E-58	91	AD014421.1
ORF 53	30522	30791	ATG	-	270	AB1gp51	Acinetobacter phage AB1	4E-35	63	AD014422.1
ORF 54	30802	32145	ATG	-	1344	putative replicative DNA helicase	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	99	YP_009055443.1
ORF 55	32151	33017	ATG	-	867	putative primosomal protein	Acinetobacter phage IME-AB2	0	99	AFV51535.1
ORF 56	33010	33489	ATG	-	480	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-	2E-113	100	YP_009055445.1

[259] [표21]

【표 21】

							01-C62			
ORF 57	33502	33714	ATG	-	213	ABlgp54	Acinetobacter phage AB1	2E-38	87	AD014425.1
ORF 58	33729	34064	ATG	-	336	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	8E-76	100	YP_009055447.1
ORF 59	34248	34436	ATG	-	189	ABlgp57	Acinetobacter phage AB1	1E-21	86	AD014428.1
ORF 60	34630	35217	ATG	+	588	putative HNH homing endonuclease	Acinetobacter phage AbP2	3E-61	50	ASJ78942.1
ORF 61	35270	35464	ATG	-	195	ABlgp60	Acinetobacter phage AB1	3E-14	52	AD014431.1
ORF 62	35564	36376	ATG	+	813	putative transcriptional regulator	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055451.1
ORF 63	36431	36700	ATG	+	270	ABlgp63	Acinetobacter phage AB1	6E-47	88	AD014434.1
ORF 64	36793	37125	ATG	+	333	ABlgp64	Acinetobacter phage AB1	1E-68	94	AD014435.1
ORF 65	37125	37307	ATG	+	183	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-36	100	YP_009055454.1
ORF 66	37304	38203	ATG	+	900	recombinase	Psychrobacter phage pOW20-A	1E-70	43	YP_007673324.1
ORF 67	38200	38955	ATG	+	756	ABlgp62	Acinetobacter phage AB1	2E-169	97	AD014438.1
ORF 68	38956	39249	ATG	+	294	ABlgp68	Acinetobacter phage AB1	7E-61	96	AD014439.1
ORF 69	39246	39467	ATG	+	222	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-07	43	YP_009055458.1
ORF 70	39464	39625	ATG	+	162	ABlgp70	Acinetobacter phage AB1	3E-29	96	AD014441.1
ORF 71	39613	40185	ATG	+	573	putative nucleoside triphosphate	Acinetobacter phage IME-AB2	5E-71	64	AFV51550.1

[260] [표22]

【표 22】

						pyrophosphohydrolase				
ORF72	40178	40408	ATG	+	231	rIIB lysis inhibitor	Caulobacter phage CcrPW	2	33	AXQ68725.1
ORF73	40501	41109	ATG	-	609	putative endolysin	Acinetobacter phage WCHABP12	5E-143	98	ARB06760.1
ORF74	41096	41371	ATG	-	276	AB1gp74	Acinetobacter phage AB1	1E-56	95	AD014445.1
ORF75	41355	41675	ATG	-	321	AB1gp75	Acinetobacter phage AB1	1E-53	95	AD014446.1
ORF76	41751	43574	ATG	-	1824	putative tail fiber protein	Acinetobacter phage WCHABP1	2E-77	88	ARQ94726.1
ORF77	43576	44421	GTG	-	846	putative tail fiber protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R2315	0	99	YP_009203603.1

[261] 도 16 및 상기 표 17 내지 22에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 선형의 dsDNA(linear dsDNA)를 포함하며, 77개의 ORF로 구성되어 있었다.

[262] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP의 서열을 기존의 박테리오파지의 서열과 대조한 결과, 본 발명에 따른 박테리오파지와 유사성을 갖는 박테리오파지는 검출되지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP는 기존에 발견되지 않은 신규한 박테리오파지에 해당함을 알 수 있다.

[263]

[264] **[실시예 3] 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP**

[265] 1. 임상 검체 분리 및 항생제 내성 균주 선별

[266] 하기 표 23에 나타낸 바와 같이 대학 병원의 ICU(intensive care unit) 혈액과 임상 검체 등으로부터 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주를 분리하여 배양하였다. 균주 동정은 키트/ ATB 32 GN 시스템 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 수행하였다. 그 뒤, 항생제 감수성 시험은 뮬러-힌튼(Mueller-Hinton) 아가를 사용하여 외기 37 ℃에서 하룻밤 동안 배양하는 CLSI 디스크 확산 시험 방법을 사용하였고, 시험 항생제는 아미카신(amicacin), 엠피실린-설벡탐(ampicillin-s $\mu\ell$bactam), 세프타지딤(ceftazidime), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 세페핌(cefepime), 세포탁심(cefotaxime), 젠타마이신(gentamicine),

이미페넴(imipenem), 레보플록사신(levofloxacin), 메로페넴(meropenem), 미노사이클린(minocycline), 피페라실린(piperacillin), 피페라실린-타조박탐(piperacillin-tazobactam), 코트리목사(cotrimoxa) 및 티게사이클린(tigecycline)을 사용하였다. 감수성 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)를 기준으로 판독하였다. 수집된 아시네토박터 속 세균의 항생제 내성 프로파일은 하기 표 24 내지 28에 나타내었다. 단, 하기 표 24 내지 28에서 S, I 및 R은 항균제에 대한 감수성을 평가한 결과로, 'S'는 민감(Susceptible), 'I'는 중간(Intermediate), 'R'은 내성(Resistant)를 의미한다.

[267]

[268] [표23]

숙주 균주	유래	숙주 균주	용균 여부
YMC16/12/R12914	가래 (pneumonia)	YMC16/01/R198	기관 흡입 (pneumonia
YMC16/12/B11422	카테터 혈액	YMC16/01/R353	가래 (pneumonia)
YMC16/12/B11449	혈액	YMC16/01/R405	가래 (pneumonia)
YMC16/12/B10832	혈액	YMC16/01/R397	가래 (pneumonia)
YMC16/12/B13325	카테터 혈액	YMC16/01/R380	가래 (pneumonia)
YMC17/01/P518	스왑 또는 배액관둔부	YMC16/12/R4637	가래 (pneumonia)
YMC17/01/B8053	카테터 혈액	YMC17/01/R2812	가래 (pneumonia)
YMC17/01/B10087	카테터 혈액	YMC17/02/R541	가래 (pneumonia)
YMC17/01/B12075	카테터 혈액	YMC17/02/R2392	가래 (pneumonia)
YMC17/02/B14	혈액	YMC17/03/R348	가래 (pneumonia)
YMC17/01/B13454	혈액	YMC17/03/R5305	
YMC17/02/B87	혈액	YMC17/03/R3095	
YMC17/02/B721	혈액	YMC17/03/R3428	
YMC17/02/B4520	카테터 혈액	YMC17/03/R4607	가래 (pneumonia)
YMC17/02/B4039	혈액	YMC17/03/P971	스왑 또는 배액관둔부
YMC17/02/B4864	혈액	YMC16/03/R4461	기관 흡입 (pneumonia
YMC17/02/P523	둔부 욕창	YMC16/05/R2210	가래 (pneumonia)
YMC17/02/B8414	복막 혈액 병	YMC16/07/R2512	기관지 세척
YMC17/03/R585	가래 (pneumonia)	YMC16/09/R2471	기관 흡입 (pneumonia
YMC17/03/B4730	카테터 혈액	YMC16/10/R2537	가래 (pneumonia)
YMC17/03/B5000	카테터 혈액	YMC16/12/P503	스왑 또는 배액관흉부
YMC17/03/R1888	가래 (pneumonia)	YMC15/02/T28	Other Catheter Tip
YMC17/03/R3279	가래 (pneumonia)	YMC15/02/R436	기관 흡입 (pneumonia

YMC17/03/R4077	기관 흡입 (pneumonia	YMC15/03/R1604	기관 흡입 (pneumonia
YMC17/04/R488	가래 (pneumonia)	YMC15/09/R1869	가래 (pneumonia)
YMC17/04/R640	가래 (pneumonia)	YMC14/06/R2359	가래 (pneumonia)
YMC/17/05/R1095	기관 흡입 (pneumonia	YMC14/08/T90	카테터 팁
YMC16/01/P11	스왑 또는 배액관복부	YMC14/08/R1169	가래 (pneumonia)
YMC16/01/R123	기관 튜브 팁		

[269] [표24]

【표 24】

숙주 균주	아미카신	엠피실린 - 설박탐	세프타지딤	시프로플록사신	콜리스틴	세페핌	세포탁심	젠타마이신	이미페넴	레보플록사신	메로페넴	미노시클린	피페라실린	피페라실린/타조박탐	코트리목사	티게실린
YMC16/12/B12914																
YMC16/12/B11422	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	1 S
YMC16/12/B11449	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC16/12/B10832																
YMC16/12/B13325	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	1 S
YMC17/01/P518	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC17/01/B8053	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC17/01/B10087	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC17/01/B12075	22 S	16 I	≥64 R	≥4 R	22 S	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≤20 S	2 S
YMC17/02/B14	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	8 I	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC17/01/B13454	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC17/02/B87	20 S	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	2 S	≥16 R	≥8 R	≥16 R	8 I	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S

[270] [표25]

【표 25】

YNC17/02/B721	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	2 S
YNC17/02/B4520	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	1 S
YNC17/02/B4039	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	80 B	≤0.5 S
YNC17/02/B4864	25 S	≤2 S	4 S	≤0.25 S	≤0.5 S	2 S	8 S	≤1 S	≤0.25 S	≤0.12 S	≤0.25 S	≤1 S	8 S	≤4 S	≤20 S	≤0.5 S
YNC17/02/P523	21 S	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	4 S	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≤20 S	1 S
YNC17/02/B8414	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YNC17/03/B585	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≥16 B	≥128 B	≥128 B	≥320 B	4 I
YNC17/03/B4730	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YNC17/03/B5000	6 B	≥32 B	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	8 I	≥128 B	≥128 B	≥320 B	1 S
YNC17/03/B1888	6 B	8 S	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YNC17/03/B3279	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≥16 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	1 S
YNC17/03/B4077	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	≤0.5 S	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	2 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B
YNC17/04/B488	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	8 B	≥64 B	≥64 B	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	160 B	2 S
YNC17/04/B	6 B	16 I	≥64 B	≥4 B	8 B	≥64 B	≥64	≥16 B	≥16 B	≥8 B	≥16 B	≤1 S	≥128 B	≥128 B	≥320 B	≥8 B

[271] [표26]

【표 26】

640							R									
YMC/17/05/B1095	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC16/01/P11	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC16/01/R123	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC16/01/R198	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC16/01/R353	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	2 S
YMC16/01/R405	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC16/01/R397	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	1 S
YMC16/01/R380		≥32 R	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	4 S	≥128 R	≥128 R	≤20 S	2 S
YMC16/12/R4637	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC17/01/R2812	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC17/02/R541	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC17/02/R2392	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC17/03/R348	6 R	16 I	32 R	≥4 R	4 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≤0.5 S

[272] [표27]

【표 27】

YMC17/03/B5305																
YMC17/03/B3095																
YMC17/03/B3428																
YMC17/03/B4607	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≤0.5 S	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC17/03/P971	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC16/03/B4461	6 R	4 S	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	32 I	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC16/05/B2210		16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC16/07/B2512	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC16/09/B2471	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	1 S
YMC16/10/B2537	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	160 R	1 S
YMC16/12/P503	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/02/T28	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	32 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC15/02/B436	6 R	≥32 R	≥64 R	≥4 R	8 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥16 R	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC15/03/B	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S

[273] [표28]

【표 28】

1604							R									
YMC15/09/B1869	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	32 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	4 I
YMC14/06/B2359	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC14/08/T90	6 R	8 S	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	2 S
YMC14/08/B1169	6 R	16 I	≥64 R	≥4 R	≥16 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≤1 S	≥128 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R

[274] 상기 표 24 내지 28에서 보는 바와 같이, 수집된 아시네토박터 바우마니(Acinetobacter baumannii) 57개 균주는 다양한 항생제에 대하여 내성을 가지는 다제내성 균주임을 알 수 있었다.

[275]

[276] 2. 박테리오파지 검체 수집

[277] 2-1. 파지 은행 구축을 위한 검체 수집

[278] 세브란스 병원의 하수 처리시설에서 최초 침전지 거친 후 부유물질 및 침사물이 제거된 원수를 확보하였다. 이는 화학 처리 시설 전 단계의 하수로 제한하였다. 수집한 시료에 1 L 당 염화나트륨 58 g을 첨가한 후 10,000 g에서 10 분간 원심 분리하여 220 nm 밀리포어 필터로 여과하였다. 얻어진 여과액에 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 8000)을 10% W/V으로 첨가하고 4 ℃에서 12 시간 동안 냉장 보관하였다. 12시간 냉장 보관된 여과액을 12,000 g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 파지 희석 완충액 (SM 완충액)에 재부유한 뒤, 동일한 양의 클로로포름을 첨가하여 냉동 보관하였다. 이를 3회 반복하여 300 mL의 박테리오파지 부유액을 채취하였다.

[279]

[280] 2-2. 용균성 파지 선별 및 용균역가 측정

[281] 용균성 파지의 분리 정제는 스팟 테스트(Spot Test)법 (Mazzocco A et al. In Bacteriophages, Clokie and Kropinski AM, eds. Humana Press. 2009)으로 실행하였다. 확보된 균주를 맥콘키 한천배지에서 접종 후 외기 35 ℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양 후, 투명한 플라크 형성을 보고 파지에 감수성인 균주를 선별하였다. 감수성인 균주를 맥콘키 한천 배지에 접종하여 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 살린 1 ml 튜브에 McFarland 0.5 탁도로 각 균주의 현탁액

제조하고 H 탑 아가 (3 ml), 감수성 박테리아 100 ㎕ 및 파지 용액 (각각 1 ㎕, 10 ㎕ 및 50 ㎕)을 섞어 LB 아가에 도포한 후, 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 플라크 관찰한 후에 파스퇴르 파이펫으로 플라크를 채취하여 SM 완충 용액에 희석하고, 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3 회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하고 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3 회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 SM 완충 용액에 희석하여 보관하였다.

[282] 상기 1.에서 확인한 항생제 내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 57개 균주 각각을 맥콘키 한천배지에서 접종하여 배양한 후, 상기 과정에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 도말된 각각의 내성 균주에 5 ㎕로 접종하여 플라그 형성을 확인하고, 역가 범위를 확인하여, 용균성을 하기 표 29에 나타내었다. 단, 하기 표 29에서 + 및 -는 수집된 균주에 대한 플라크 활성을 평가한 것으로, '+'는 투명한 플라크(clear plaque)를 의미하고, '-'는 용균이 일어나지 않은 것을 의미한다.

[283]

[284] [표29]

숙주 균주	용균 여부	숙주 균주	용균 여부
YMC17/01/B10087	+	YMC17/03/R348	+
YMC17/02/B4520	+	YMC17/03/R3095	+
YMC17/03/R585	+	YMC17/03/R3428	++
YMC17/03/R3279	+	YMC17/03/P971	+
YMC/17/05/R1095	+	YMC16/03/R4461	++
YMC16/01/P11	+	YMC16/05/R2210	++
YMC16/01/R198	+	YMC16/07/R2512	+
YMC16/01/R353	+	YMC16/09/R2471	++
YMC16/01/R405	+	YMC15/03/R1604	++
YMC16/01/R397	+	YMC15/09/R1869	+
YMC16/12/P503	+	YMC14/06/R2359	+
YMC15/02/T28	+	YMC14/08/T90	+
YMC14/08/R1169	+		

[285]

[286] 상기 표 29에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 상당 수의 항생제 내성 아시네토박터 바우마니

균주를 용균 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[287]

[288] 3. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 용균성 박테리오파지의 전자 현미경 분석

[289] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 감수성 균주 배양 배지(20 ml LB 배지)에 접종 및 배양한 뒤 220 nm 밀리포어 필터로 여과하고, 상청액에 폴리에틸렌글리콜(MW 8,000)을 10%(w/v)의 양으로 첨가한 후 밤새 냉장 보관하였다. 이후 12,000 g의 조건으로 20 분 동안 원심 분리한 뒤, 에너지 여과 투과 전자현미경(Energy-Filtering Transmission Electron Microscope)을 이용하여 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 형태를 분석하여, 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[290] 도 17에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 YMC15/09/R1869_ABA_BP 박테리오파지를 모양으로 분류하는 기준으로 보았을 때, 육각형 머리에 긴 꼬리를 가지고 있는 미오비리대 과에 속하는 것으로 분류하였다.

[291]

[292] 4. 박페리오파지의 흡착능 및 1단 증식 곡선(One-step growth curve) 분석

[293] 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.5가 되도록 배양한 뒤, 아시네토박터 바우마니 균주에 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 MOI 0.001로 넣고 상온에서 배양한 뒤, 100 ㎕ 시료를 1, 2, 3, 4, 5 분에 1 ml씩 채취하여 LB 배지에 희석한 뒤 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 흡착능을 평가하여, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[294] 또한, 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 OD 값이 0.3이 되도록 배양한 뒤, 4 ℃에서 5 분 동안 7,000 g로 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 0.5 ml의 LB 배지에 희석시키고, 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 MOI 0.001(titer 10^8 pfu/cells)로 넣고 37 ℃에서 5 분 동안 배양하였다. 배양된 혼합 시료를 13,000 g에서 1 분 동안 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 10 ml의 LB 배지에 희석시키고 37 ℃에서 배양하였다. 배양 도중 10 분 마다 시료를 채취하여 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 1단 증식 곡선을 평가하여, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[295] 도 18에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 접종 후 5 분 이내에 박테리오파지의 99 % 정도가 아시네토박터 바우마니 균주에 흡착하였다(5 분: 2.9%).

[296] 또한, 도 19에서 보는 바와 같이, 1단 증식 곡선 결과 78 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내었다(0 분: 14 PFU/ml, 50 분: 1096 PFU/ml).

[297] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 비교적 빠른 시간 내에 흡착할 수 있고, 78 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내 항생제 내성 균주의 용균 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[298]

[299] 5. 생체 내 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증

[300] 3 ~ 4 령된 꿀벌부채명나방 유충(Galleria mellonella larvae) 200마리를 준비한 뒤, 각 그룹당 10 마리씩 분류하였다. 각 유충에 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 최소 치사 농도(MLD)로 유충의 복각을 통해 주입한 후, 콜리스틴과 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 MOI 10 또는 MOI 100으로 혼합 접종한 뒤 72 시간까지 매 12 또는 24 시간마다 유충의 생존률을 확인하여 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[301] 도 20에서 보는 바와 같이, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입한 유충에 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 처리한 경우 유충의 생존율이 증가하였고, MOI 값이 증가할수록 유충의 생존율이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입하지 않고 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP만을 주입한 경우도 건강한 대조군과 그 생존률을 비교할 때 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[302] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 생체 내에서도 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 가지므로, 상기 아시네토박터 바우마니 균주에 의해 유발되는 감염성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 것을 알 수 있다.

[303]

[304] 6. 생체 내 항생제 내성 아시네토박터 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증

[305] 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주(30 ㎕)를 마우스에 2시간 동안 비강 투여한 후, 상기 2.에서 정제된 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP (30 ㎕) 또는 콜리스틴 항생제(30 ㎕)를 동일하게 비강 투여 하였다. 1일 및 5일 경과 후 각 실험군 당 4마리씩 부검하여 폐 조직을 적출하였다. 마우스 폐의 일부를 갈아 얻은 시료로 균을 배양하여 실제적인 균수의 변화를 측정해 박테리오파지 또는 항생제와의 시너지 효과를 평가하였다.

[306] 도 21에서 보는 바와 같이, 콜리스틴에 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주를 주입한 마우스에 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP를 투여한 경우 마우스의 폐 내에서 상기 아시네토박터 바우마니의 균수가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었고, MOI 값이 증가할수록 상기 아시네토박터 바우마니의 균수가 더욱 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP와 콜리스틴을 함께 투여한 경우 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP 만을 단독으로

투여한 경우에 비하여 마우스의 폐내 아시네토박터 바우마니의 균수가 더욱 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[307] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 생체 내에서도 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대하여 용균성을 가지므로, 상기 아시네토박터 바우마니 균주에 의해 유발되는 감염성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 것을 알 수 있다.

[308]

[309] 7. 항생제 내성 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 박테리오파지의 안정성 평가

[310] 본 발명에 따른 박테리오파지 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP가 온도 및 알칼리에서 파괴되지 않고 안정성을 유지하는지 확인하였다.

[311] 상기 2.의 방법에 의해 정제된 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP 1 ㎕를 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 pH로 맞춘 SM 버퍼 40 ㎕에 넣은 뒤, 37 ℃에서 1시간 동안 배양한 뒤 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균과 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 22에 나타내었다.

[312] 또한, 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP 용액을 각각 4 ℃, 37 ℃, 50 ℃, 60 ℃ 및 70 ℃에서 배양하는 1 시간 동안 10 분 단위로 각각의 샘플을 아시네토박터 바우마니 균주와 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 23에 나타내었다.

[313] 도 22에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 산성, 중성 및 알칼리성 모두에서 안정성을 나타내었으나, 30일 동안 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 중성/알카리성에서 비교적 안정성을 나타내었다.

[314] 또한, 도 23에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 70℃의 고온에서 까지 매우 높은 안정성을 보였다.

[315]

[316] 8. 항생제 내성 클렙시엘라 속 균에 대한 박테리오파지의 전체 게놈 서열 분석

[317] 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 특성을 규명하기 위하여 전체 유전자 서열 분석을 Illumina sequencer(Roche)를 통하여 통상의 기술자에게 자명한 전체 게놈 서열 분석 방법을 기초로 분석하여, 그 결과를 도 24 및 표 30 내지 35에 나타내었다.

[318]

[319] [표30]

【표 30】

유전체번호	범위 (Range)		개시코돈	스트랜드 (strand)	길이 (bp)	추정 기능 (Putative function)	주석 출처 (Annotation source)	E-value	NCBI blastP identity (%)	NCBI-Bank accession number
	시작	종료								
ORF1	445	1629	ATG	-	1185	putative baseplate J-like protein	Acinetobacter phage WCHABP1	0	99	ARQ94729.1
ORF2	1626	1979	ATG	-	354	ABlgp60	Acinetobacter phage ABl	3E-80	98	AD014451.1
ORF3	2125	2769	ATG	-	645	putative baseplate assembly protein	Acinetobacter phage WCHABP1	1E-152	97	ARQ94731.1
ORF4	2750	3640	GTG	-	891	ABlgp62	Acinetobacter phage ABl	0	94	AD014453.1
ORF5	3750	4025	ATG	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage AbP2	2E-59	100	ASJ78898.1
ORF6	4022	4639	ATG	-	618	ABlgp63	Acinetobacter phage ABl	7E-131	92	AD014454.1
ORF7	4647	6737	ATG	-	2091	lysozyme like domain	Acinetobacter phage AP22	0	74	YP_006383794.1
ORF8	6740	6952	ATG	-	213	putative tail-fiber protein	Acinetobacter phage LZ35	6E-44	99	YP_009291892.1
ORF9	6982	7407	ATG	-	426	ABlgp01	Acinetobacter phage ABl	1E-37	46	AD014372.1
ORF10	7453	7902	ATG	-	450	ABlgp02	Acinetobacter phage ABl	3E-105	97	AD014373.1
ORF11	7915	9378	ATG	-	1464	ABlgp03	Acinetobacter phage ABl	0	95	AD014374.1
ORF12	9368	9862	ATG	-	495	ABlgp04	Acinetobacter phage ABl	3E-110	93	AD014375.1
ORF13	9859	10377	ATG	-	519	ABlgp06	Acinetobacter phage ABl	3E-108	96	AD014377.1
ORF	104	106	AT	-	282	putative capsid	Acinetobacter phage YMC-13-	3E-	100	YP_009055

[320] [표31]

【표 31】

14	07	88	G			protein	01-C62	55		482.1
ORF 15	107 36	109 21	AT G	-	186	AB1gp08	Acinetobacter phage AB1	8E-31	90	AD014379.1
ORF 16	109 18	113 70	AT G	-	453	putative RNA polymerase	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	5E-104	100	YP_009055484.1
ORF 17	113 99	115 84	AT G	-	186	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-35	100	YP_009055485.1
ORF 18	116 58	118 04	AT G	-	147	lambda family tail tape measure protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-24	100	YP_009055486.1
ORF 19	118 50	122 72	AT G	-	423	AB1gp12	Acinetobacter phage AB1	1E-95	97	AD014383.1
ORF 20	122 72	126 10	AT G	-	339	AB1gp13	Acinetobacter phage AB1	3E-21	43	AD014384.1
ORF 21	126 90	137 09	AT G	-	102 0	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055489.1
ORF 22	137 19	141 98	AT G	-	480	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-109	99	YP_009055490.1
ORF 23	142 06	155 40	AT G	-	133 5	AB1gp17	Acinetobacter phage AB1	0	81	AD014388.1
ORF 24	155 40	157 04	AT G	-	165	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-30	100	YP_009055492.1
ORF 25	157 54	159 60	AT G	-	207	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	1E-43	100	YP_009055493.1
ORF 26	159 50	162 25	AT G	-	276	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	6E-61	100	YP_009055494.1
ORF 27	163 24	166 86	AT G	-	363	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-84	100	YP_009055495.1

[321] [표32]

【표 32】

ORF 28	16683	17075	ATG	-	393	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	1E-89	100	AJT61472.1
ORF 29	17068	17490	ATG	-	423					
ORF 30	17480	17833	ATG	-	354	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	4E-83	100	YP_009055498.1
ORF 31	17915	18061	ATG	-	147	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-27	100	YP_009055499.1
ORF 32	18062	18226	ATG	-	165	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	7E-32	100	YP_009055500.1
ORF 33	18916	19686	ATG	-	771	putative head protein	Acinetobacter phage AbP2	0	99	ASJ78923.1
ORF 34	19689	21119	ATG	-	1431	putative portal protein	Acinetobacter phage VCHABP12	0	96	ARB06806.1
ORF 35	21123	22400	ATG	-	1278	putative terminase large subunit	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	99	YP_009055504.1
ORF 36	22397	22996	GTG	-	600	coil containing protein	Vibrio phage 1.246.O._10N.261.54.E10	2E-32	35	AUR98010.1
ORF 37	22989	23378	ATG	-	390	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-88	100	YP_009055422.1
ORF 38	23432	23614	ATG	-	183	ABlgp34	Acinetobacter phage AB1	4	88	AD014405.1
ORF 39	23611	23784	ATG	-	174					
ORF 40	23799	24041	ATG	-	243	ABlgp35	Acinetobacter phage AB1	1E-47	93	AD014406.1
ORF 41	24038	24235	ATG	-	198	fis family transcriptional regulator	Acinetobacter phage VCHABP12	3E-33	91	ARB06798.1

[322] [표33]

【표 33】

ORF 42	24238	24564	ATG	-	327	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC11/12/R1215	4E-74	100	AJT61457.1
ORF 43	24564	24779	GTG	-	216	ABlgp39	Acinetobacter phage AB1	2E-39	87	ADO14410.1
ORF 44	24891	25238	ATG	-	348	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-78	99	YP_009055430.1
ORF 45	25302	25541	ATG	-	240	ABlgp40	Acinetobacter phage AB1	7E-45	97	ADO14411.1
ORF 46	25682	25969	GTG	-	288	ABlgp42	Acinetobacter phage AB1	2E-59	96	ADO14413.1
ORF 47	25950	26210	ATG	-	261	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-56	100	YP_009055433.1
ORF 48	26207	26467	ATG	-	261	ABlgp43	Acinetobacter phage AB1	6E-08	40	ADO14414.1
ORF 49	26464	27219	ATG	-	756	ABlgp47	Acinetobacter phage AB1	2E-134	79	ADO14418.1
ORF 50	27329	27541	ATG	-	213	putative bacteriophage-associated immunity protein	Acinetobacter phage IME-AB2	2E-41	99	AFV51531.1
ORF 51	27613	27762	ATG	-	150	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	3E-01	41	YP_009055440.1
ORF 52	27759	28052	ATG	-	294	ABlgp50	Acinetobacter phage AB1	3E-58	91	ADO14421.1
ORF 53	28049	28318	ATG	-	270	ABlgp51	Acinetobacter phage AB1	4E-35	63	ADO14422.1
ORF 54	28329	29672	ATG	-	1344	putative replicative DNA helicase	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	99	YP_009055443.1
ORF 55	29678	30544	ATG	-	867	putative primosomal protein	Acinetobacter phage IME-AB2	0	98	AFV51535.1

[323] [표34]

【표 34】

ORF 56	30537	31016	ATG	-	480	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-113	100	YP_009055445.1
ORF 57	31029	31241	ATG	-	213	ABlgp54	Acinetobacter phage AB1	2E-38	87	AD014425.1
ORF 58	31256	31591	ATG	-	336	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	8E-76	100	YP_009055447.1
ORF 59	31775	31936	ATG	-	162	ABlgp57	Acinetobacter phage AB1	1E-21	86	AD014428.1
ORF 60	32157	32744	ATG	+	588	putative HNH homing endonuclease	Acinetobacter phage AbP2	3E-61	50	ASJ78942.1
ORF 61	32797	32991	ATG	-	195	ABlgp60	Acinetobacter phage AB1	3E-14	42	AD014431.1
ORF 62	33091	33903	ATG	+	813	putative transcriptional regulator	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	0	100	YP_009055451.1
ORF 63	33970	34227	ATG	+	258	ABlgp63	Acinetobacter phage AB1	6E-47	88	AD014434.1
ORF 64	34320	34652	ATG	+	333	ABlgp64	Acinetobacter phage AB1	1E-68	94	AD014435.1
ORF 65	34652	34834	ATG	+	183	hypothetical protein	Acinetobacter phage YMC-13-01-C62	2E-36	100	YP_009055454.1
ORF 66	34831	35730	ATG	+	900	recombinase	Psychrobacter phage pOW20-A	9E-71	43	YP_007673324.1
ORF 67	35727	36482	ATG	+	756	ABlgp67	Acinetobacter phage AB1	5E-166	95	AD014438.1
ORF 68	36483	36776	ATG	+	294	ABlgp68	Acinetobacter phage AB1	2E-61	96	AD014439.1
ORF 69	36773	36955	ATG	+	183					
ORF 70	36952	37116	ATG	+	165	ABlgp70	Acinetobacter phage AB1	1E-27	92	AD014441.1
ORF	371	376	AT	+	522	putative nucleoside	Acinetobacter	1E-	64	AFV51550.

[324] [표35]

【표 35】

71	16	37	G			triphosphate pyrophosphohydrolase	phage IME-AB2	68		1
ORF72	37630	37860	ATG	+	231	AB1gp72	Acinetobacter phage AB1	3E-39	82	AD014443.1
ORF73	37959	38471	ATG	-	513	putative lysozyme family protein	Acinetobacter phage IME-AB2	3E-119	99	AFV51552.1
ORF74	38461	38733	ATG	-	273	AB1gp74	Acinetobacter phage AB1	1E-54	94	AD014445.1
ORF75	38717	39039	GTG	-	323	AB1gp75	Acinetobacter phage AB1	1E-68	95	AD014446.1
ORF76	39111	41525	ATG	-	2415	putative tail fiber	Acinetobacter phage YMC13/03/R2096	0	90	YP_009146765.1
ORF77	41527	42396	GTG	-	870	putative tail fiber protein	Acinetobacter phage AbP2	4E-155	79	ASJ78889.1

[325] 도 24 및 상기 표 30 내지 35에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 선형의 dsDNA(linear dsDNA)를 포함하며, 77개의 ORF로 구성되어 있었다.

[326] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP의 서열을 기존의 박테리오파지의 서열과 대조한 결과, 본 발명에 따른 박테리오파지와 유사성을 갖는 박테리오파지는 검출되지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP는 기존에 발견되지 않은 신규한 박테리오파지에 해당함을 알 수 있다.

[327]

[328] **[실시예 4] 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP**

[329] 1. 임상검체 분리 및 항생제 내성 균주 선별

[330] 하기 표 36과 같이 세브란스 병원 환자들 또는 그 분변 등으로부터 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 세균을 배양하여 분리하였다. 균주 동정은 키트/ATB 32 GN 시스템 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 수행하였다. 그 뒤, 항생제 감수성 시험은 뮬러-힌튼(Mueller-Hinton) 아가를 사용하여 외기 37℃에서 하룻밤 동안 배양하는 CLSI 디스크 확산 시험 방법을 사용하였다. 클렙시엘라 뉴모니아 세균에 대한 시험 항생제는 아미카신(Amicacin), 엠피실린(Ampicillin), 엠피실린/설벡탐(Ampicillin/Sulbactam),

아즈트레오남(Aztreonam), 세즈타지딤(Ceftazidime), 세파졸린(Cefazolin), 이미페넴(Imipenem), 에르타페넴(Ertapenem), 세페핌(Cefepime), 세폭시틴(Cefoxitin), 세포탁심(Cefotaxime), 젠타마이신(Gentamicine), 레보플록사신(Levofloxacin), 메로페넴(Meropenem), 피페라실린/타조박탐(Piperacillin/Tazobactam), 코트리목사(Cortrimoxa), 및 티게사이클린(Tigecyline)을 사용하였다. 감수성 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)를 기준으로 판독하였다. 수집된 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 47 개 균주의 항생제 내성 프로파일은 하기 표 37 내지 40에 나타내었다. 단, 하기 표 37 내지 40에서 S, I 및 R은 항균제에 대한 감수성을 평가한 결과로, 'S'는 민감(Susceptible), 'I'는 중간(Intermediate), 'R'은 내성(Resistant)를 의미한다.

[331]

[332] [표36]

숙주 균주	시료 유래	숙주 균주	시료 유래
YMC16/12/N708	분변	YMC17/05/N331	분변
YMC16/12/N681	분변	YMC17/05/N355	분변
YMC17/01/N115	분변	YMC17/05/R3201	가래 (pneumonia)
YMC17/01/P6	스왑 또는 배액관골반	YMC17/05/N405	분변
YMC17/01/N167	분변	YMC17/05/N500	분변
YMC17/01/N132	분변	YMC17/05/N424	분변
YMC17/01/N270	분변	YMC17/05/N421	분변
YMC17/01/N189	분변	YMC17/06/U687	임의의 소변
YMC17/02/N103	분변	YMC17/06/N182	분변
YMC17/02/N97	분변	YMC17/06/N196	분변
YMC17/02/N84	분변	YMC17/06/N263	분변
YMC17/02/N151	분변	YMC17/06/N297	분변
YMC17/02/N183	분변	YMC17/06/R4267	가래 (pneumonia)
YMC17/02/N180	분변	YMC17/06/N445	분변
YMC17/02/N189	분변	YMC17/07/N293	분변
YMC17/02/N232	분변	YMC17/07/N393	분변
YMC17/02/N227	분변	YMC17/07/R3882	가래 (pneumonia)
YMC17/02/N245	분변	YMC17/08/N34	분변
YMC17/02/N254	분변	YMC17/07/U6299	임의의 소변
YMC17/02/R2881	기관 흡입 (pneumonia)	YMC17/08/N153	분변
YMC17/02/N312	분변	YMC17/08/N243	분변
YMC17/05/N213	분변	YMC17/08/N456	분변
YMC17/05/R1069	가래 (pneumonia)	YMC17/10/N291	분변
YMC17/05/N300	분변		

[333]

[334] [표37]

【표 37】

숙주 균주	아미카신	엠피실린	엠피실린/설박탐	아즈트레오남	세즈타지딤	세파졸린	이미페넴	에르타페넴	세페핌	세폭시틴	세포탁심	젠타마이신	레보플록사신	메로페넴	피페라실린/타조박탐	코트리목사졸	티게사이클린
YMC16/12/N708								8 R									
YMC16/12/N681								12 R									
YMC17/01/N115								8 R									
YMC17/01/P6	≤2 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R	≥64 R	≥64		≥8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥8 R	≥16 R	≥128 R	≥320 R	≥8 R
YMC17/01/N167								8 R						9 R			
YMC17/01/N132								8 R						10 R			
YMC17/01/N270								12 R									
YMC17/01/N189								8 R									
YMC17/02/N103								6 R									
YMC17/02/N97								6 R									
YMC17/02/N84								6 R									
YMC17/02/N151								6 R									
YMC17/02/N								8 R									

[335] [표38]

【표 38】

183																	
YMC17/02/N180								10R									
YMC17/02/N189								6R									
YMC17/02/N232								6R									
YMC17/02/N227								6R									
YMC17/02/N245								6R									
YMC17/02/N254								8R									
YMC17/02/R2881	16S	≥32R	≥32R	≥64R	≥64R	≥64		≥8R	≥64R	≥64R	≥64R	≥16R	≥8R	≥16R	≥128R	≥320R	≥8R
YMC17/02/N312								6R									
YMC17/05/N213								6R									
YMC17/05/R1069	≤2S	≥32R	≥32R	≥64R	≥64R	≥64		≥8R	≥64R	≥64R	≥64R	≥16R	≥8R	≥16R	≥128R	≥320R	≥8R
YMC17/05/N300								8R									
YMC17/05/N331								6R									
YMC17/05/N355								8R									
YMC17/05/R3201	≤2S	≥32R	≥32R	≥64R	≥64R	≥64		≥8R	≥64R	≥64R	≥64R	≥16R	≥8R	≥16R	≥128R	≥320R	≥8R
YMC17/05/N405								6R									

[336] [표39]

【표 39】

YMCI7/05/N500								8 R									
YMCI7/05/N424								11 R						13 R			
YMCI7/05/N421								12 R									
YMCI7/06/U687	≤ 2 S	≥ 32 R	≥ 32 R	16 R	4 S	≥ 64		4 R	≤ 1 S	≤ 4 S	2 I	≤ 1 S	≤ 0.12 S	≥ 16 R	≥ 128 R	≤ 20 S	≤ 0.5 S
YMCI7/06/N182								18 R									
YMCI7/06/N196								14 R									
YMCI7/06/N263								10 R									
YMCI7/06/N297								13 R									
YMCI7/06/R4267	≤ 2 S	≥ 32 R	≥ 32 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 64		≥ 8 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 16 R	≥ 8 R	≥ 16 R	≥ 128 R	≥ 320 R	≥ 8 R
YMCI7/06/N445								18 R									
YMCI7/07/N293								10 R									
YMCI7/07/N393								6 R									
YMCI7/07/R3882	4 S	≥ 32 R		≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 64	8 R	≥ 8 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 16 R			≥ 128 R	≥ 320 R	≥ 8 R
YMCI7/08/N34								12 R									
YMCI7/07/U6299	≤ 2 S	≥ 32		≥ 64	≥ 64 R	≥ 64	≥ 16	≥ 8 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 64 R	≥ 16 R			≥ 128	≥ 320 R	≥ 8 R

[337] [표40]

【표 40】

		R		R			R								R		
YMC17/08/N153								8 R									
YMC17/08/N243								8 R									
YMC17/08/N456								18 R									
YMC17/10/N291								6 R									

[338] 상기 표 37 내지 40에서 보는 바와 같이, 수집된 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 47개 세균은 다양한 카바페넴계 항생제에 대하여 내성을 가지는 다재내성 균주임을 알 수 있었다.

[339]

[340] 2. 박테리오파지 검체 수집

[341] 2-1. 파지 은행 구축을 위한 검체 수집

[342] 세브란스 병원의 하수 처리시설에서 최초 침전지 거친 후 부유물질 및 침사물이 제거된 원수를 확보하였다. 이는 화학 처리 시설 전 단계의 하수로 제한하였다. 수집한 시료에 1 L 당 염화나트륨 58 g을 첨가한 후 10,000 g에서 10 분간 원심 분리하여 220 nm 밀리포어 필터로 여과하였다. 얻어진 여과액에 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 8000)을 10% W/V으로 첨가하고 4 ℃에서 12 시간 동안 냉장 보관하였다. 12 시간 냉장 보관된 여과액을 12,000 g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 파지 희석 완충액 (SM 완충액)에 재부유한 뒤, 동일한 양의 클로로포름을 첨가하여 냉동 보관하였다. 이를 3 회 반복하여 300 mL의 박테리오파지 부유액을 채취하였다.

[343]

[344] 2-2 용균성 파지 선별 및 용균역가 측정

[345] 용균성 파지의 분리 정제는 스팟 테스트(Spot Test)법 (Mazzocco A et al. In Bacteriophages, Clokie and Kropinski AM, eds. Humana Press. 2009)으로 실행하였다. 확보된 균주를 맥콘키 한천배지에서 접종 후 외기 35 ℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양 후, 투명한 플라크 형성을 보고 파지에 감수성인 균주를 선별하였다. 감수성인 균주를 맥콘키 한천 배지에 접종하여 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 살린 1ml 튜브에 McFarland 0.5 탁도로 각 균주의 현탁액 제조하고 H 탑 아가 (3 ml), 감수성 박테리아 100 ㎕ 및 파지 용액 (각각 1 ㎕, 10 ㎕ 및 50 ㎕)을 섞어 LB 아가에 도포한 후, 35 ℃에서 12 시간 동안 배양하였다.

플라크 관찰한 후에 파스퇴르 파이펫으로 플라크를 채취하여 SM 완충 용액에 희석하고, 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 SM 완충 용액에 희석하고 다시 감수성인 균주 현탁액을 이용하여 3회 반복 정제하였다. 이렇게 얻어진 순수한 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 SM 완충 용액에 희석하여 보관하였다.

[346] 상기 1. 에서 확인한 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 47개 균주 각각을 맥콘키 한천배지에서 접종하여 배양한 후, 상기 과정에 의해 정제된 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 도말된 각각의 내성 균주에 5 ㎕로 접종하여 플라그 형성을 확인하고, 역가 범위를 확인하여, 용균성을 하기 표 41에 나타내었다. 단, 하기 표 41에서 + 및 -는 수집된 균주에 대한 플라크 활성을 평가한 것으로, '+'는 투명한 플라크(clear plaque)를 의미하고, '-'는 용균이 일어나지 않은 것을 의미한다.

[347]

[348] [표41]

숙주 균주	용균 여부	숙주 균주	용균 여부
YMC16/12/N708	++	YMC17/05/N331	+
YMC16/12/N681	++	YMC17/05/N355	+
YMC17/01/N115	+	YMC17/05/R3201	+
YMC17/01/P6	+	YMC17/05/N405	+
YMC17/01/N167	+	YMC17/05/N500	+
YMC17/01/N132	+	YMC17/05/N424	-
YMC17/01/N270	+	YMC17/05/N421	-
YMC17/01/N189	+	YMC17/06/U687	-
YMC17/02/N103	++	YMC17/06/N182	-
YMC17/02/N97	++	YMC17/06/N196	-
YMC17/02/N84	++	YMC17/06/N263	-
YMC17/02/N151	++	YMC17/06/N297	-
YMC17/02/N183	++	YMC17/06/R4267	-
YMC17/02/N180	++	YMC17/06/N445	-
YMC17/02/N189	++	YMC17/07/N293	+
YMC17/02/N232	++	YMC17/07/N393	+
YMC17/02/N227	++	YMC17/07/R3882	+
YMC17/02/N245	++	YMC17/08/N34	-
YMC17/02/N254	++	YMC17/07/U6299	+
YMC17/02/R2881	++	YMC17/08/N153	-
YMC17/02/N312	++	YMC17/08/N243	-
YMC17/05/N213	+	YMC17/08/N456	+
YMC17/05/R1069	+	YMC17/10/N291	+
YMC17/05/N300	+		

[349] 상기 표 41에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아 47개 균주 중 35개 균주(74%)를 용균 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[350]

[351] 3. 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균에 대한 용균성 박테리오파지의 전자

현미경 분석

[352] 상기 2. 의 방법에 의해 정제된 박테리오파지를 감수성 균주 배양 배지(20 ml LB 배지)에 접종 및 배양한 뒤 220 nm 밀리포어 필터로 여과하고, 상청액에 폴리에틸렌글리콜(MW 8,000)을 10 %(w/v)의 양으로 첨가한 후 밤새 냉장 보관하였다. 이후 12,000 g의 조건으로 20 분 동안 원심 분리한 뒤, 에너지 여과 투과 전자현미경(Energy-Filtering Transmission Electron Microscope)을 이용하여 박테리오파지의 형태를 분석하여, 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[353] 도 25에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 YMC17/01/P6_KPN_BP 박테리오파지를 모양으로 분류하는 기준으로 보았을 때, 각이 진 머리와 꼬리를 갖는 시포비리대(Siphoviridae) 과에 속하는 것으로 분류하였다.

[354]

[355] 4. 박페리오파지의 흡착능 및 1단 증식 곡선(One-step growth curve) 분석

[356] 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 뉴모니아균을 OD 값이 0.5가 되도록 배양한 뒤, 클렙시엘라 뉴모니아균에 상기 2. 에서 정제된 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP를 MOI 0.001로 넣고 상온에서 배양한 뒤, 100 ㎕ 시료를 1, 2, 3, 4, 5 분에 1 ml씩 채취하여 LB 배지에 희석한 뒤 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 흡착능을 평가하여, 그 결과를 도 26에 나타내었다.

[357] 또한, 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 뉴모니아균을 OD 값이 0.3이 되도록 배양한 뒤, 4 ℃에서 5 분 동안 7,000 g로 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 0.5 ml의 LB 배지에 희석시키고, 상기 실시예 2에서 정제된 박테리오파지를 MOI 0.001(titer 10^8 pfu/cells)를 넣고 37 ℃에서 5 분 동안 배양하였다. 배양된 혼합 시료를 13,000 g에서 1 분 동안 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 10ml의 LB 배지에 희석시키고 37 ℃에서 배양하였다. 배양 도중 10 분 마다 시료를 채취하여 플라그 분석을 통해 상기 박테리오파지의 1단 증식 곡선을 평가하여, 그 결과를 도 27에 나타내었다.

[358] 도 26에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP의 접종 후 5분 이내에 박테리오파지의 99 % 정도가 클렙시엘라 뉴모니아균에 흡착하였다(10 분: 1.05 %).

[359] 또한, 도 27에서 보는 바와 같이, 1단 증식 곡선 결과 43 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내었다(0 분: 20 PFU/ml, 95 분: 872 PFU/ml).

[360] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 항생제 내성을 갖는 클렙시엘라 뉴모니아균에 비교적 빠른 시간 내에 흡착할 수 있고, 43 PFU/감염 세포의 높은 버스트 사이즈를 나타내 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균에 용균 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[361]

[362] 5. 생체 외 항생제 내성 클렙시엘라 속 세균에 대한 박테리오파지의 용균능 검증

[363] 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균 1 X 10^9 CFU/ml에 준비된 박테리오파지

YMC17/01/P6_KPN_BP를 1 X 10^8 CFU/ml(MOI: 0.1), 1 X 10^9 PFU/ml(MOI: 1), 1 X 10^{10} PFU/ml(MOI: 10)의 양으로 각각 처리하고 시간 별로 OD 값(파장 600 nm)을 측정하였다. 단, 음성 대조군으로는 PBS+SM 버퍼를 처리하여, 그 값을 도 28에 나타내었다.

[364] 도 28에서 보는 바와 같이, 음성 대조군과 비교할 때, 클렙시엘라 뉴모니아균에 대하여 박테리오파지를 처리한 경우 OD 값이 감소하였고, MOI 값이 증가할수록 OD 값은 더욱 감소하였으며, 특히 MOI 10일 때 가장 용균능이 높았다.

[365] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 박테리오파지는 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균에 대하여 용균성을 갖는 것을 알 수 있다.

[366]

[367] 6. 항생제 내성 클렙시엘라 속 균에 대한 박테리오파지의 안정성 평가

[368] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP가 온도 및 알칼리에서 파괴되지 않고 안정성을 유지하는지 확인하였다.

[369] 상기 2. 의 방법에 의해 정제된 박테리오 파지 1 ㎕를 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 pH로 맞춘 SM 버퍼 40 ㎕에 넣은 뒤, 37 ℃에서 1 시간 동안 배양한 뒤 항생제 내성 클렙시엘라 뉴모니아균과 함께 상기 4. 의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 29에 나타내었다.

[370] 또한, 상기 박테리오파지 용액을 각각 4 ℃, 37 ℃, 60 ℃ 및 70 ℃에서 배양하는 1 시간 동안 10 분 단위로 각각의 샘플을 클렙시엘라 뉴모니아균과 함께 상기 4.의 방법으로 플라크 분석을 실시하여 그 결과를 도 30에 나타내었다.

[371] 도 29에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 pH 7에 해당하는 산성, 중성 및 알카리성 모두에서 안정성을 나타내었고, 30일 동안 상기 박테리오파지는 특히 중성/알카리성에서 비교적 안정성을 나타내었다.

[372] 또한, 도 30에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 60℃의 고온에서 까지 매우 높은 안정성을 보였다.

[373]

[374] 7. 항생제 내성 클렙시엘라 속 균에 대한 박테리오파지의 전체 게놈 서열 분석

[375] 본 발명에 따른 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP의 특성을 규명하기 위하여 전체 유전자 서열 분석을 Illumina sequencer(Roche)를 통하여 통상의 기술자에게 자명한 전체 게놈 서열 분석 방법을 기초로 분석하여, 그 결과를 도 31 및 표 42 내지 46에 나타내었다.

[376]

[377] [표42]

【표 42】

유전체번호	범위 (Range)		개시코돈	스트랜드 (strand)	길이 (bp)	추정 기능 (Putative function)	주석 출처 (Annotation source)	E-value	NCBI blastp identity (%)	NCBI-Bank accession number
	시작	종료								
ORF 1	299	934	ATG	+	636	terminase small subunit	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	6E-128	84	APU92757.1
ORF 2	1202	1333	ATG	-	132					
ORF 3	1330	1608	ATG	-	279	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sergei	4E-31	67	APU92843.1
ORF 4	1605	2522	ATG	-	918	RdgC exonuclease	Salmonella phage PSL SP-062	2E-180	81	AGP89349.1
ORF 5	2525	2752	ATG	-	228					
ORF 6	2749	3021	ATG	-	273	ZPR1 zinc finger protein	Enterobacteria phage 9g	2E-15	40	YP_009032345.1
ORF 7	2975	3163	ATG	-	189					
ORF 8	3160	3321	ATG	-	162					
ORF 9	3318	3497	ATG	-	180	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sergei	6E-19	64	APU92846.1
ORF 10	3494	3766	ATG	-	273	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	4E-44	74	AGP89351.1
ORF 11	4067	4354	ATG	-	288	putative Ead/Ea22-like protein	Enterobacter phage Tyrion	1E-16	62	YP_009287781.1
ORF 12	4390	4512	ATG	-	123					
ORF 13	4529	4708	GTG	-	180					
ORF 14	4711	4893	ATG	-	183	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	2E-14	53	AGP89355.1
ORF 15	4886	5233	ATG	-	348	putative prophage protein	Escherichia coli	5E-23	63	STH76168.1
ORF 16	5415	5696	ATG	-	282	prophage CP-933R hypothetical protein (helicase)	Salmonella enterica subsp.	1E-40	74	AFH45012.1

[378] [표43]

【표 43】

ORF 17	6025	7788	ATG	+	1764	TerL	Salmonella phage PSL SP-062	0	87	AGP89358.1
ORF 18	7803	7979	ATG	+	177	hypothetical protein	Salmonella phage 9NA	3E-16	53	YP_009101187.1
ORF 19	7973	8299	ATG	-	327	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	4E-39	56	APU92769.1
ORF 20	8299	8604	ATG	-	306	hypothetical protein	Escherichia phage Greed	1E-26	46	ANY29761.1
ORF 21	8601	8912	ATG	-	312	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	2E-58	63	AGP89366.1
ORF 22	9050	10405	ATG	+	1356	putative portal protein	Salmonella phage vB_SenS_Sergei	0	86	APU92865.1
ORF 23	10504	10839	ATG	-	336	hypothetical protein	Salmonella phage 9NA	7E-28	43	YP_009101195.1
ORF 24	10902	11153	ATG	-	252	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	5E-33	71	AGP89316.1
ORF 25	11150	11527	ATG	-	378	hypothetical protein	Pseudomonas phage IME180	2E-09	36	ATG86294.1
ORF 26	11524	11853	ATG	-	330	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	7E-55	79	AGP89315.1
ORF 27	11850	12353	ATG	-	504	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	7E-79	65	APU92778.1
ORF 28	12446	13024	ATG	+	579	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-062	2E-77	60	AGP89313.1
ORF 29	13014	13205	ATG	+	192	hypothetical protein	Salmonella phage 9NA	7E-35	92	YP_009101200.1
ORF 30	13202	13558	ATG	+	357	hypothetical protein	Escherichia phage ST2	5E-03	41	ASH99344.1
ORF 31	13530	13682	ATG	+	153	hypothetical protein	Salmonella phage 9NA	5E-11	76	YP_009101202.1
ORF 32	13666	13983	GTG	+	318	hypothetical protein	Edwardsiella phage PEi21	5E-15	35	YP_008869247.1
ORF 33	14020	14973	ATG	+	954	head morphogenesis protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	0	90	APU92784.1
ORF 34	14962	15228	ATG	+	267					
ORF 35	15225	15467	ATG	-	243	hypothetical protein	Salmonella phage PSL SP-	4E-15	43	YP_008240217.1

[379] [표44]

【표 44】

							076			
ORF 36	154 12	156 66	ATG	-	255	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VmeM-32	1E-11	47	ALY07066.1
ORF 37	156 72	159 47	ATG	-	276	hypothetical protein	Salmonella phage FSL SP-062	5E-51	82	AGP89307.1
ORF 38	159 47	162 43	ATG	-	297	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	2E-53	81	APU92788.1
ORF 39	166 44	170 54	ATG	+	411	putative serine protease	Vibrio phage 1.251.0._ICN.261.55.E5	2E-23	42	AUR98457.1
ORF 40	170 54	183 10	ATG	+	1257	coil containing protein	Vibrio phage 1.250.0._ICN.261.55.E11	9E-13	31	AUR98360.1
ORF 41	183 10	187 17	ATG	+	408	major virion structural protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	3E-72	83	APU92791.1
ORF 42	187 33	197 52	ATG	+	1020	major capsid protein	Salmonella phage SNA	0	86	YP_009101210.1
ORF 43	198 15	202 01	ATG	+	387	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	2E-17	37	APU92793.1
ORF 44	205 13	206 00	ATG	+	88					
ORF 45	207 97	212 07	ATG	+	411	hypothetical protein	Salmonella phage FSL SP-062	6E-71	76	AGP89323.1
ORF 46	212 07	215 81	ATG	+	375	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	6E-68	80	YP_009101213.1
ORF 47	215 81	220 09	ATG	+	429	neck protein	Vibrio phage 1.033.0._ICN.222.49.B8	4E-21	40	AUR83305.1
ORF 48	220 06	224 28	ATG	+	423	hypothetical protein	Salmonella phage FSL SP-062	2E-89	90	AGP89326.1
ORF 49	224 45	239 02	ATG	+	1458	major tail protein	Salmonella phage SNA	0	84	YP_009101217.1
ORF 50	240 01	244 23	ATG	+	423	putative tail assembly chaperone	Salmonella phage SNA	2E-73	77	YP_009101219.1
ORF 51	247 46	276 61	GTG	+	2916	tail length tape measure protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	0	78	APU92802.1
ORF 52	276 64	281 67	ATG	+	504	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sergei	9E-103	81	APU92894.1
ORF 53	281 64	286 70	ATG	+	507	enolase-like protein	Salmonella phage	3E-110	90	APU92804.1

[380] [표45]

【표 45】

							vB_SenS_Sasha			
ORF 54	26667	29026	ATG	+	360	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	3E-65	76	YP_009101223.1
ORF 55	29019	31556	ATG	+	2538	putative tail tip protein	Salmonella phage vB_SenS_Sergei	0	65	APU92897.1
ORF 56	31553	35239	ATG	-	3687	tail spike protein	Klebsiella phage May	3E-172	34	AUG87959.1
ORF 57	35268	35591	ATG	+	324	putative holin or antiholin	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	9E-54	78	APU92808.1
ORF 58	35588	36148	ATG	+	561					
ORF 59	36163	36390	ATG	+	228	putative holin or anti-holin	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	2E-32	80	APU92810.1
ORF 60	36387	36785	ATG	+	399	putative i-spanin component	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	7E-76	83	APU92811.1
ORF 61	36850	37083	ATG	-	234	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	3E-43	87	YP_009101230.1
ORF 62	37067	38398	ATG	-	1332	putative DNA methylase	Salmonella phage SNA	0	74	YP_009101231.1
ORF 63	38388	38738	ATG	-	351	nucleoside 2-deoxyribosyltransferase	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	3E-76	94	APU92815.1
ORF 64	38738	39121	ATG	-	384	NinX	Salmonella phage SNA	2E-50	69	YP_009101233.1
ORF 65	39114	39650	ATG	-	537	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	2E-126	97	YP_009101234.1
ORF 66	39691	41574	ATG	-	1884	DNA polymerase	Salmonella phage PSL SP-062	0	91	AGF89344.1
ORF 67	41654	42514	ATG	-	861	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	3E-174	80	YP_009101236.1
ORF 68	42527	43672	ATG	-	1146	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	0	92	YP_009101237.1
ORF 69	43672	44466	ATG	-	795	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	1E-162	89	YP_009101238.1
ORF 70	44580	44729	ATG	+	150	178 gene product	Salmonella phage PVP-SE1	1E-03	47	YP_004893985.1
ORF 71	44726	46390	GTG	+	1665	putative helicase DEXDc superfamily protein	Salmonella phage SNA	0	99	YP_009101240.1
ORF 72	46433	46939	ATG	+	507	putative exonuclease	Salmonella phage SNA	4E-112	92	YP_009101241.1
ORF 73	46936	47427	ATG	+	492	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	2E-119	99	YP_009101242.1

[381] [표46]

【표 46】

ORF 74	47424	47597	ATG	+	174	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	5E-31	96	YP_009101243.1
ORF 75	47601	48164	ATG	+	564	HNH endonuclease	Cronobacter phage vB_CsaM_GAP32 Escherichia phage slur01	1E-36	39	YP_009201632.1
ORF 76	48161	50515	ATG	+	2355	putative P4 family primase	Salmonella phage SNA	0	92	YP_009101244.1
ORF 77	50584	50793	ATG	+	210	hypothetical protein	Salmonella phage FSL SP-062	3E-31	71	AGF83357.1
ORF 78	50790	51017	ATG	+	228	hypothetical protein	Salmonella phage GJL01	2E-21	58	ARB06685.1
ORF 79	51014	51226	ATG	+	213	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	6E-28	70	YP_009101245.1
ORF 80	51227	51484	ATG	+	258					
ORF 81	51488	52228	GTG	+	741	hypothetical protein	Yersinia phage phiR201	2E-26	67	YP_007237006.1
ORF 82	52230	52391	ATG	+	162	putative lipoprotein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	0.002	35	APU92828.1
ORF 83	52384	53076	ATG	+	693	putative C-5 cytosine DNA methylase	Salmonella phage SNA	5E-151	90	YP_009101248.1
ORF 84	53063	53260	ATG	+	198	hypothetical protein	Salmonella phage SNA	7E-39	95	YP_009102489.1
ORF 85	53253	53468	ATG	+	216	hypothetical protein	Salmonella phage vB_SenS_Sasha	2E-17	74	APU92836.1
ORF 86	53465	53782	ATG	+	318					
ORF 87	53799	54725	GTG	-	927	hypothetical protein	Salmonella phage FSL SP-062	2E-53	49	AGF83369.1

[382] 도 31 및 상기 표 42 내지 46에서 보는 바와 같이, 상기 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 선형의 dsDNA(linear dsDNA)를 포함하며, 87개의 ORF로 구성되어 있었다.

[383] 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP의 서열을 기존의 박테리오파지의 서열과 대조한 결과, 본 발명에 따른 박테리오파지와 유사성을 갖는 박테리오파지는 검출되지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP는 기존에 발견되지 않은 신규한 박테리오파지에 해당함을 알 수 있다.

[384]

[385] 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지

않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

[386]

[387] [수탁번호(1)]

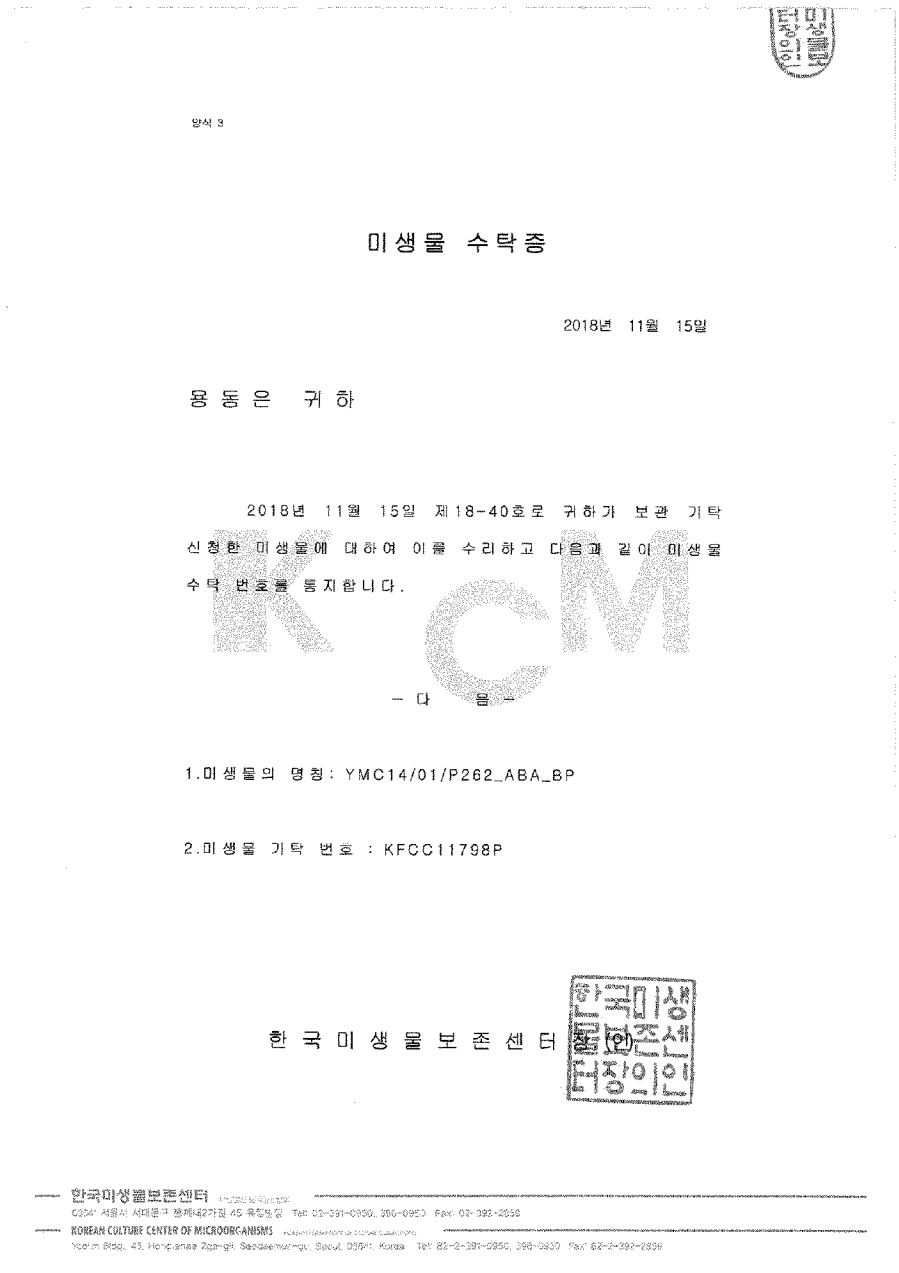
[388] 박테리오파지 YMC14/01/P262_ABA_BP

[389] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

[390] 수탁번호 : KFCC11798P

[391] 수탁일자 : 20181115

[392]



양식 3

미생물 수탁증

2018년 11월 15일

용 동 은 귀 하

2018년 11월 15일 제18-40호로 귀하가 보관 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁 번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1.미생물의 명칭 : YMC14/01/P262_ABA_BP

2.미생물 기탁 번호 : KFCC11798P

한 국 미 생 물 보 존 센 터 장

한국미생물보존센터

[393] [수탁번호(2)]

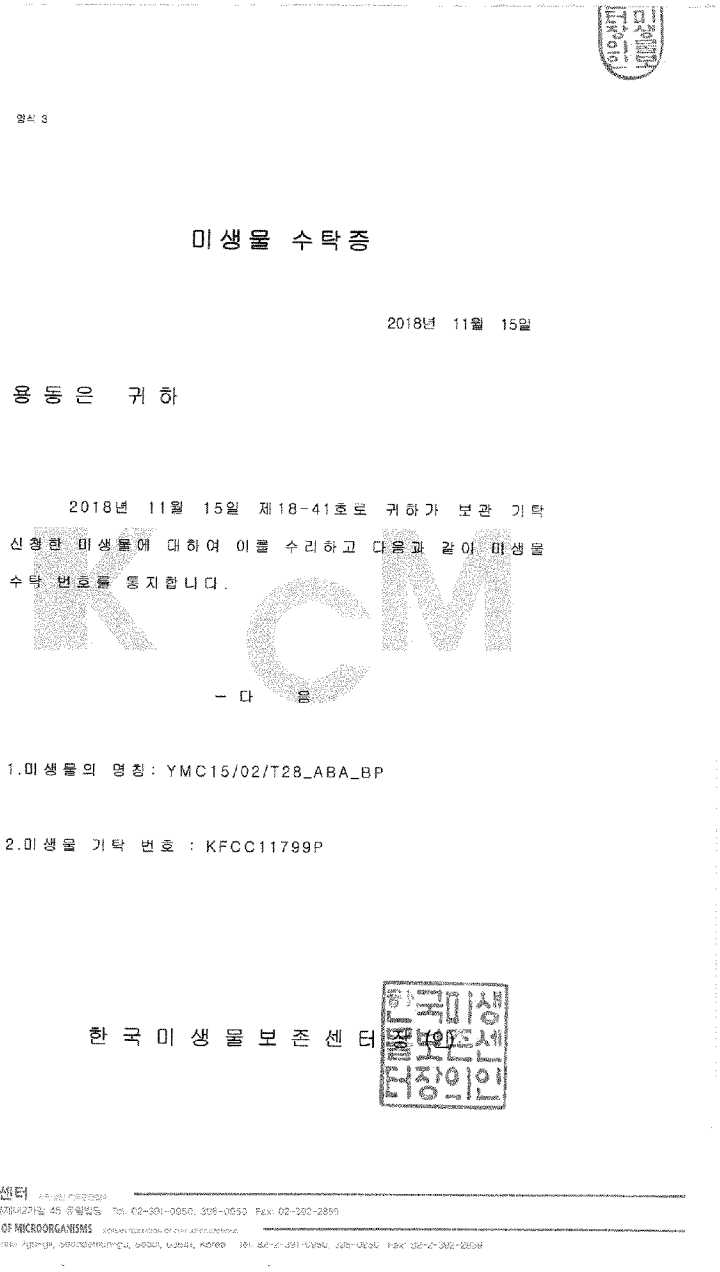
[394] 박테리오파지 YMC15/02/T28_ABA_BP

[395] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

[396] 수탁번호 : KFCC11799P

[397] 수탁일자 : 20181115

[398]



양식 3

미생물 수탁증

2018년 11월 15일

용동은 귀하

2018년 11월 15일 제18-41호로 귀하가 보관 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁 번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1.미생물의 명칭 : YMC15/02/T28_ABA_BP

2.미생물 기탁 번호 : KFCC11799P

한 국 미 생 물 보 존 센 터 장

한국미생물보존센터

[399] [수탁번호(3)]

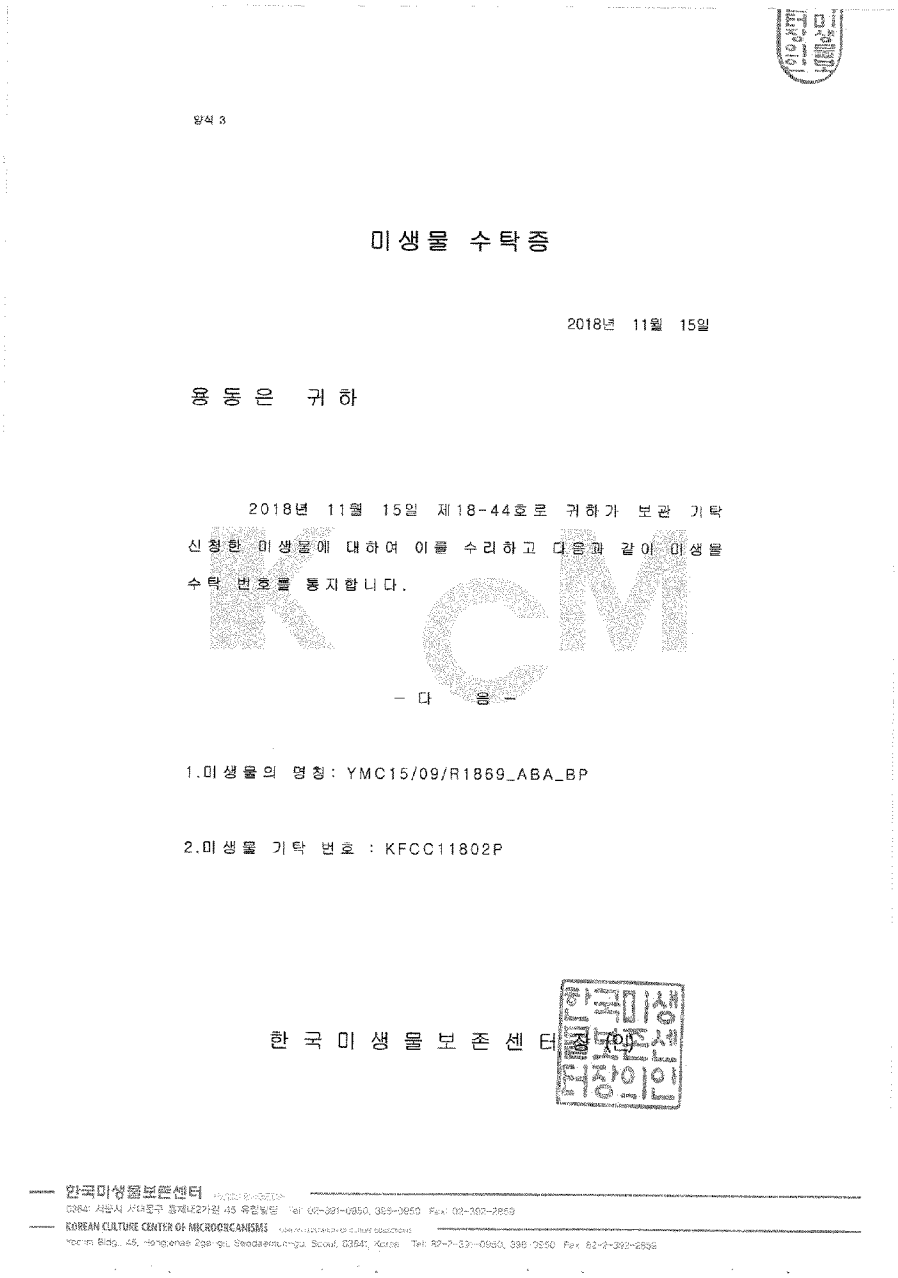
[400] 박테리오파지 YMC15/09/R1869_ABA_BP

[401] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

[402] 수탁번호 : KFCC11802P

[403] 수탁일자 : 20181115

[404]



양식 3

미생물 수탁증

2018년 11월 15일

용 동 은 귀 하

2018년 11월 15일 제18-44호로 귀하가 보관 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁 번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1.미생물의 명칭 : YMC15/09/R1869_ABA_BP

2.미생물 기탁 번호 : KFCC11802P

한 국 미 생 물 보 존 센 터 장 귀하

한국미생물보존센터
KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

[405] [수탁번호(4)]

[406] 박테리오파지 YMC17/01/P6_KPN_BP

[407] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

[408] 수탁번호 : KFCC11804P

[409] 수탁일자 : 20181115

[410]

양식 3

미생물 수탁증

2018년 11월 15일

용동은 귀하

2018년 11월 15일 제18-46호로 귀하가 보관 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁 번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1.미생물의 명칭: YMC17/01/P6_KPN_BP

2.미생물 기탁 번호 : KFCC11804P

한국미생물보존센터장(인)

한국미생물보존센터
KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

산업상 이용가능성

[411] 본 발명은 세균, 특히는 항생제에 대한 내성을 보이는 세균을 용균시키는 신규한 박테리오파지에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 아시네토박터 속 세균은 아시네토박터 바우마니 (*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 헤모리티쿠스 (*Acinetobacter haemolyticus*), 아시네토박터 주니 (*Acinetobacter junii*), 아시네토박터 존스니 (*Acinetobacter johnsonii*), 아시네토박터 리워피 (*Acinetobacter lwoffii*), 아시네토박터 라디오레시스텐스 (*Acinetobacter radioresistens*), 아시네토박터 우르신지 (*Acinetobacter ursingii*), 아시네토박터 쉰들러리 (*Acinetobacter schindleri*), 아시네토박터 파르부스 (*Acinetobacter parvus*), 아시네토박터 베이리 (*Acinetobacter baylyi*), 아시네토박터 보우베티 (*Acinetobacter bouvetii*), 아시네토박터 토우너리 (*Acinetobacter towneri*), 아시네토박터 탄도이 (*Acinetobacter tandoii*), 아시네토박터 그리몬티 (*Acinetobacter grimontii*), 아시네토박터 셰른버지아 (*Acinetobacter tjernbergiae*) 및 아시네토박터 게르너리(*Acinetobacter gerneri*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 박테리오파지.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 아시네토박터 속 세균은 아시네토박터 바우마니 (Acinetobacter baumannii)인, 박테리오파지.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 아시네토박터 속 세균은 항생제 내성 세균인, 박테리오파지.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 항생제는 콜리스틴(Colistin), 에리트로마이신(Erythromycin), 암피실린(Ampicillin), 반코마이신(Vancomycin), 리네졸리드(Linezolid), 메티실린(Methicillin), 옥사실린(Oxacillin), 세포탁심(Cefotaxime), 리팜피신(Rifampicin), 아미카신(Amikacin), 겐타마이신(Gentamicin), 아미카신(Amikacin), 카나마이신(Kanamycin), 토브라마이신(Tobramycin), 네오마이신(Neomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세프타지딤(Ceftazidime), 세파핌(Cefepime), 세프타로린(Ceftaroline), 세프토비프롤(Ceftobiprole), 아즈트레오남(Aztreonam), 피페라실린(Piperacillin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 티게사이클린(Tigecycline), 이의 배합체 및 이들의 유도체로 구성된

군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 박테리오파지.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 클렙시엘라속 세균은 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae), 클렙시엘라 오자에나에(Klebsiella ozaenae), 클렙시엘라 리노스클레로마티스(Klebsiella rhinoscleromatis), 클렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca), 클렙시엘라 플란티콜라(Klebsiella planticola) 및 클렙시엘라 테리게나(Klebsiella terrigena)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 박테리오파지.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 클렙시엘라속 세균은 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae)인, 박테리오파지.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 클렙시엘라속 세균은 항생제 내성 세균인, 박테리오파지.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 항생제는 카바페넴(Carbapenem)계 항생제인, 박테리오파지.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지의 명칭은 YMC14/01/P262_ABA_BP이고, 기탁번호는 KFCC11798P인, 박테리오파지.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어지는, 박테리오파지.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 단백질을 포함하는, 박테리오파지.

[청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 유전체를 포함하는 것인, 박테리오파지.

[청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지의 명칭은 YMC15/02/T28_ABA_BP이고, 기탁번호는 KFCC11799P인, 박테리오파지.

[청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 8로 표시되는 염기 서열로 이루어지는, 박테리오파지.

[청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 9 내지 11 중 어느 하나의 단백질을 포함하는, 박테리오파지.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 12 내지 14 중 어느 하나로 표시되는

유전체를 포함하는 것인, 박테리오파지.

[청구항 18] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지의 명칭은 YMC15/09/R1869_ABA_BP이고,
기탁번호는 KFCC11802P인, 박테리오파지.

[청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 15로 표시되는 염기 서열로 이루어지는,
박테리오파지.

[청구항 20] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 16 및 17 중 어느 하나의 단백질을
포함하는, 박테리오파지.

[청구항 21] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 18 및 19 중 어느 하나로 표시되는
유전체를 포함하는 것인, 박테리오파지.

[청구항 22] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지의 명칭은 YMC17/01/P6_KPN_BP이고, 기탁번호는
KFCC11804P인 박테리오파지.

[청구항 23] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 20으로 표시되는 염기 서열로 이루어지는
것인, 박테리오파지.

[청구항 24] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 21 및 22중 어느 하나의 단백질을
포함하는, 박테리오파지.

[청구항 25] 제1항에 있어서,
상기 박테리오파지는 서열번호 23 및 24 중 어느 하나로 표시되는
유전체를 포함하는 것인, 박테리오파지.

[청구항 26] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 항생용 조성물.

[청구항 27] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 사료 첨가용 조성물.

[청구항 28] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 음용수 첨가제.

[청구항 29] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 소독제.

[청구항 30] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 세척제.

[청구항 31] 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를
유효성분으로 포함하는, 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는
클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용

약학적 조성물.

[청구항 32] 제31항에 있어서,
상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 질환은 C형 간염, 수족구병, 임질, 클라미디아, 연성하감, 성기단순포진, 첨규콘딜롬, 반코마이신내성황색포도알균감염증, 반코마이신내성장알균감염증, 메티실린내성황색포알균감염증, 다제내성녹농균감염증, 다제내성아시네토박터바우마니균감염증, 카바페넴내성장내속균종감염증, 장관감염증, 급성호흡기감염증 및 엔테로바이러스감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인, 약학적 조성물.

[청구항 33] 제31항에 있어서,
상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 및 이하선염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인, 약학적 조성물.

[청구항 34] 치료 또는 예방이 필요한 대상에, 항생용 조성물을 투여하기 위한 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지의 용도.

[청구항 35] 사료 첨가용 조성물의 제조에 사용하기 위한 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지의 용도.

[청구항 36] 음용수 첨가제의 제조에 사용하기 위한 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지의 용도.

[청구항 37] 소독제의 제조에 사용하기 위한 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지의 용도.

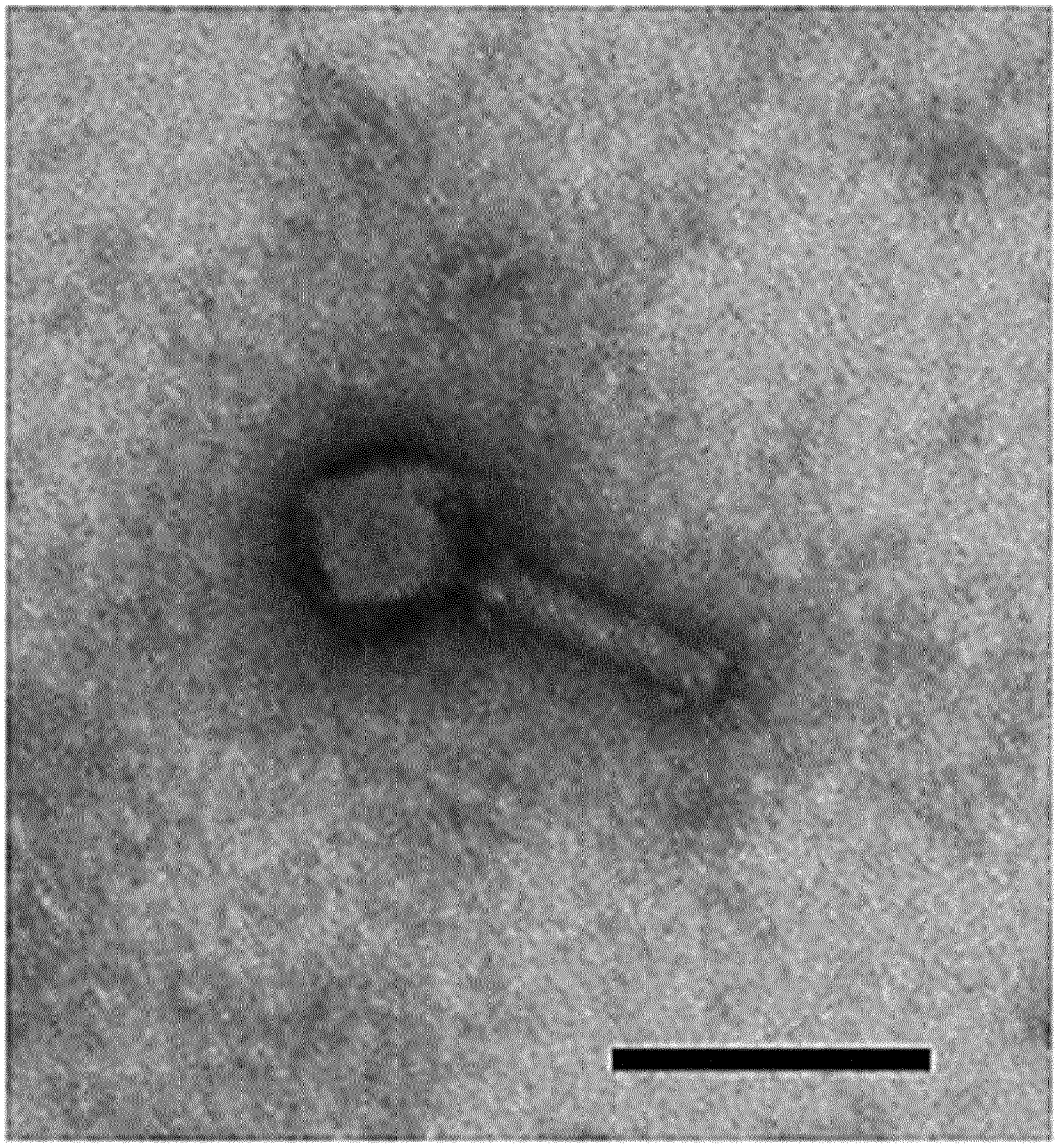
[청구항 38] 세척제의 제조에 사용하기 위한 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지의 용도.

[청구항 39] 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에 제1항 내지 제25항 중에서 선택된 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 투여하는 단계를 포함하는, 아시네토박터(Acinetobacter) 속 또는 클렙시엘라(Klebsiella) 속 세균에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법.

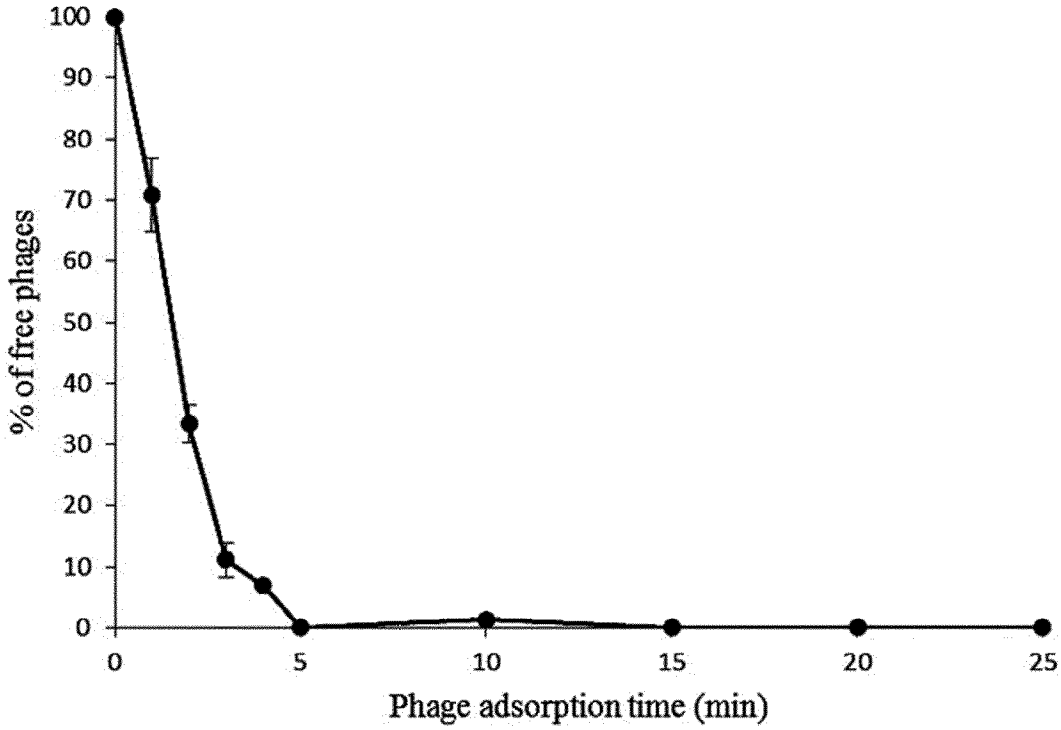
[청구항 40] 제39항에 있어서,
상기 아시네토박터 속 세균에 의해 유발되는 질환은 C형 간염, 수족구병, 임질, 클라미디아, 연성하감, 성기단순포진, 첨규콘딜롬, 반코마이신내성황색포도알균감염증, 반코마이신내성장알균감염증, 메티실린내성황색포알균감염증, 다제내성녹농균감염증, 다제내성아시네토박터바우마니균감염증, 카바페넴내성장내속균종감염증, 장관감염증, 급성호흡기감염증 및 엔테로바이러스감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인, 예방 또는 치료 방법.

[청구항 41] 제39항에 있어서,
상기 클렙시엘라 속 세균에 의해 유발되는 질환은 폐렴, 요로감염,
창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염,
설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 및
이하선염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인, 예방 또는 치료 방법.

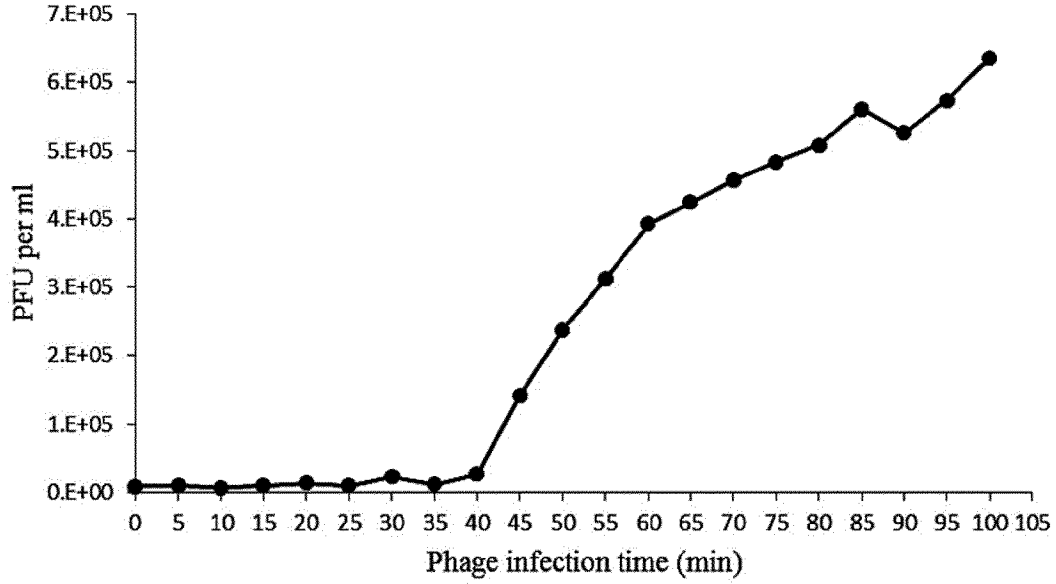
[도1]



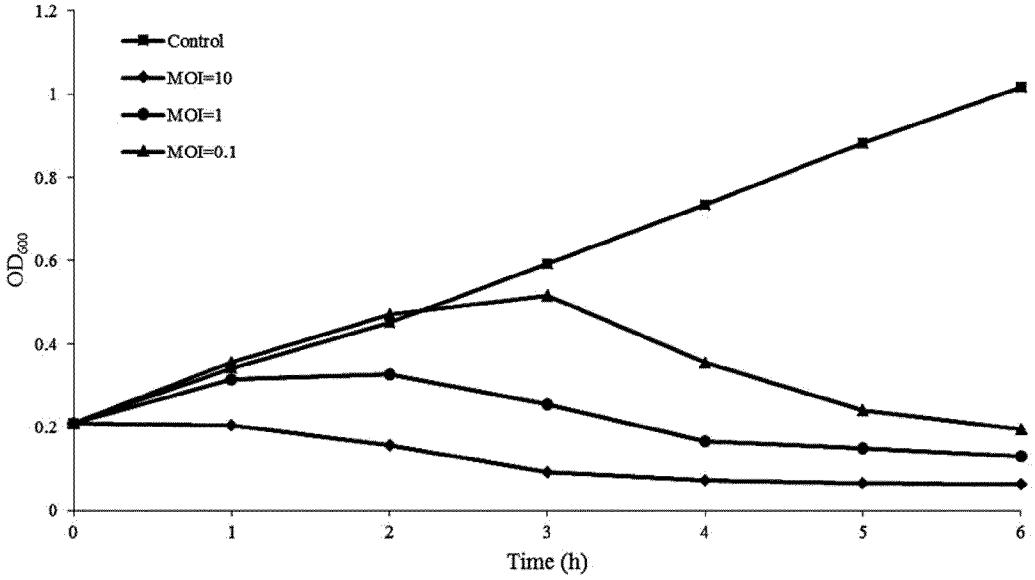
[도2]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% of free phages
0
5
10
15
20
25
Phage adsorption time (min)

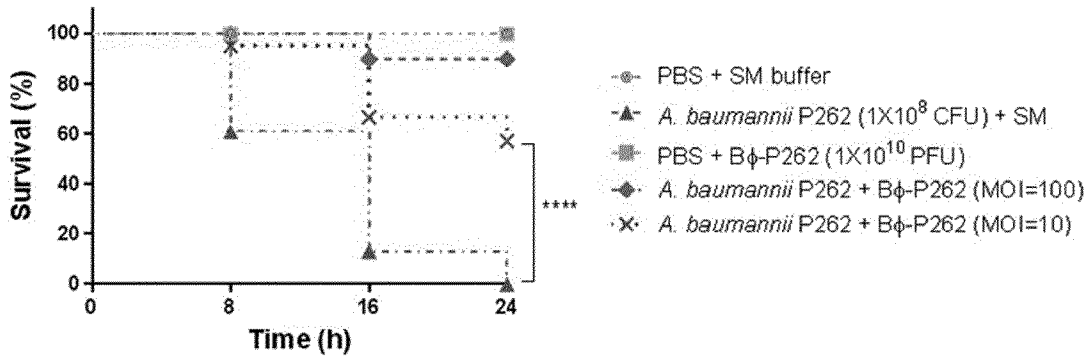
[도3]


7.E+05
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
PFU per ml
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
Phage infection time (min)

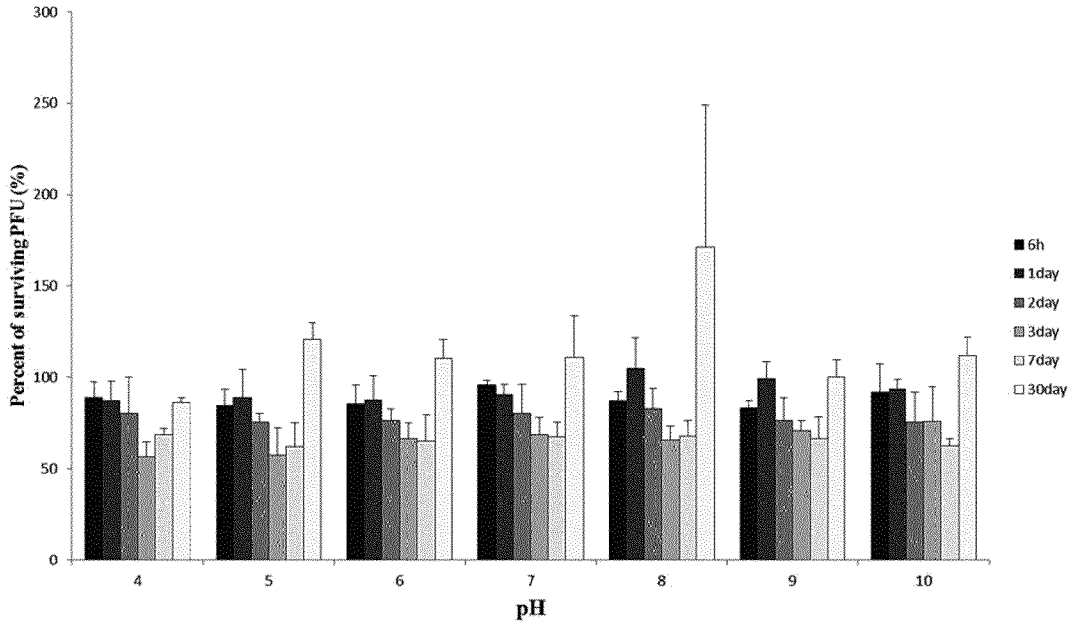
[도4]


Control
MOI=10
MOI=1
MOI=0.1
OD600
Time (h)

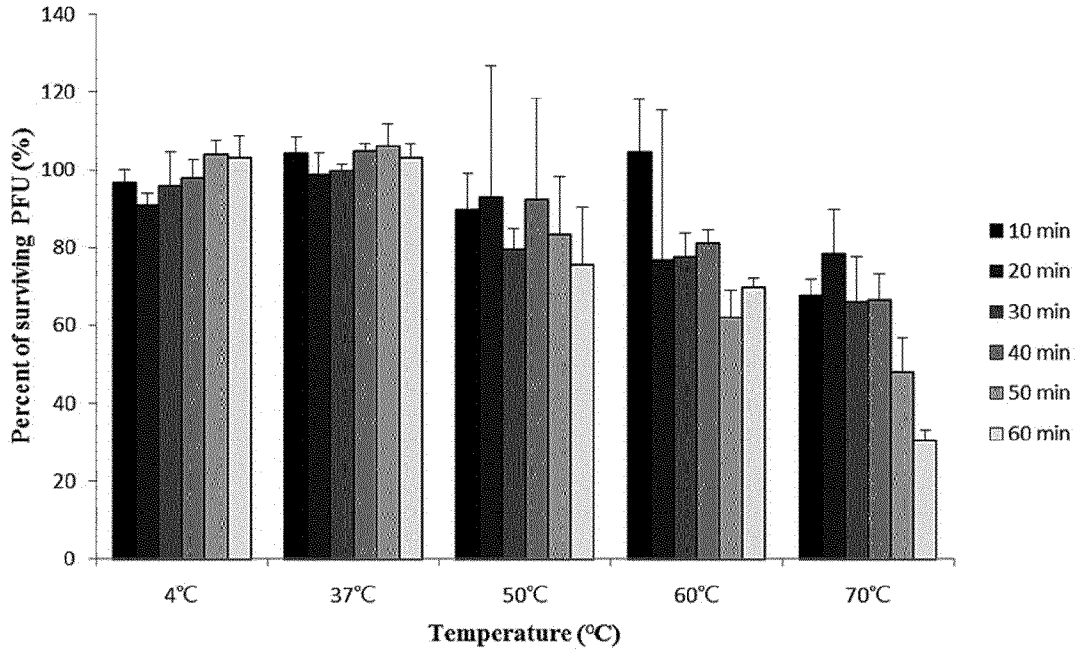
[도5]


Survival (%)
Time (h)
****
PBS + SM buffer
A. baumannii P262 (1X10^8 CFU) + SM
PBS + Bϕ-P262 (1X10^10 PFU)
A. baumannii P262 + Bϕ-P262 (MOI=100)
A. baumannii P262 + Bϕ-P262 (MOI=10)

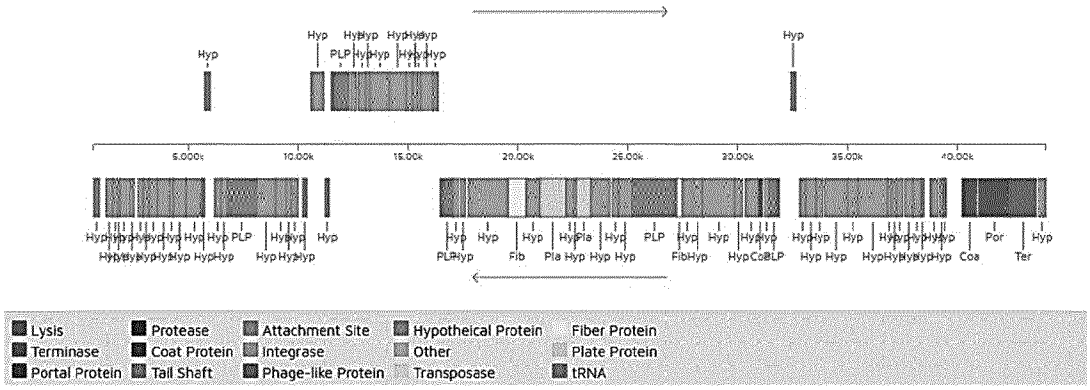
[도6]


Percent of surviving PFU (%)
pH
6h
1day
2day
3day
7day
30day

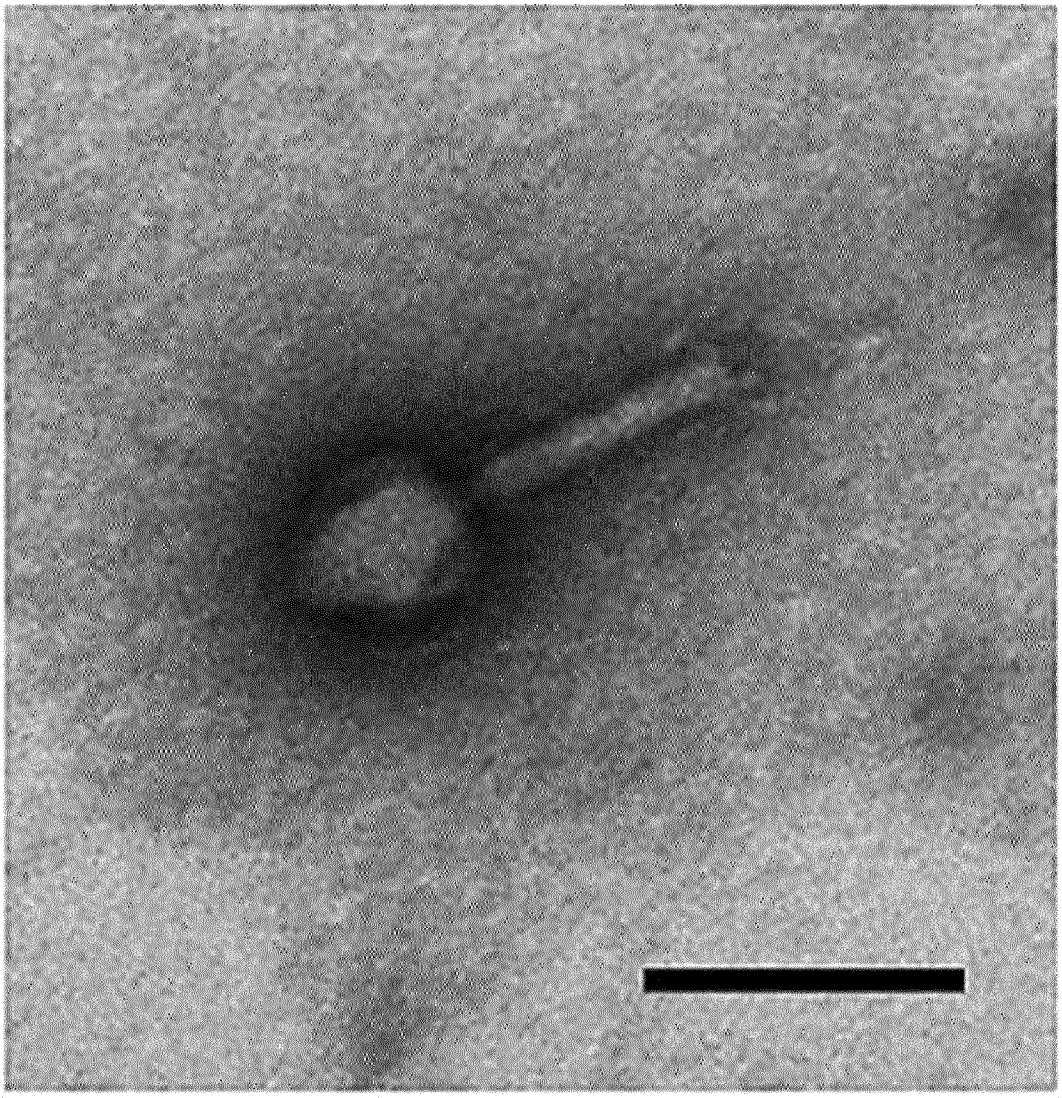
[도7]


Percent of surviving PFU (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
4℃
37℃
50℃
60℃
70℃
Temperature (℃)
10 min
20 min
30 min
40 min
50 min
60 min

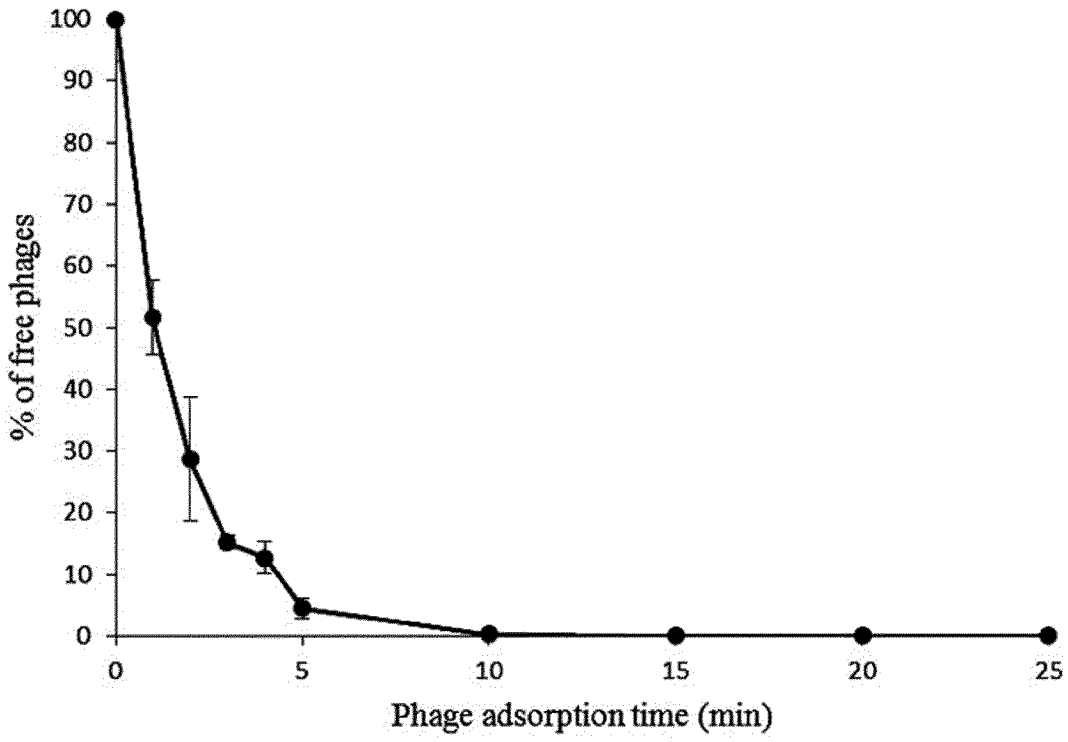
[도8]


Lysis
Terminase
Portal Protein
Protease
Coat Protein
Tail Shaft
Attachment Site
Integrase
Phage-like Protein
Hypotheical Protein
Other
Transposase
Fiber Protein
Plate Protein
tRNA

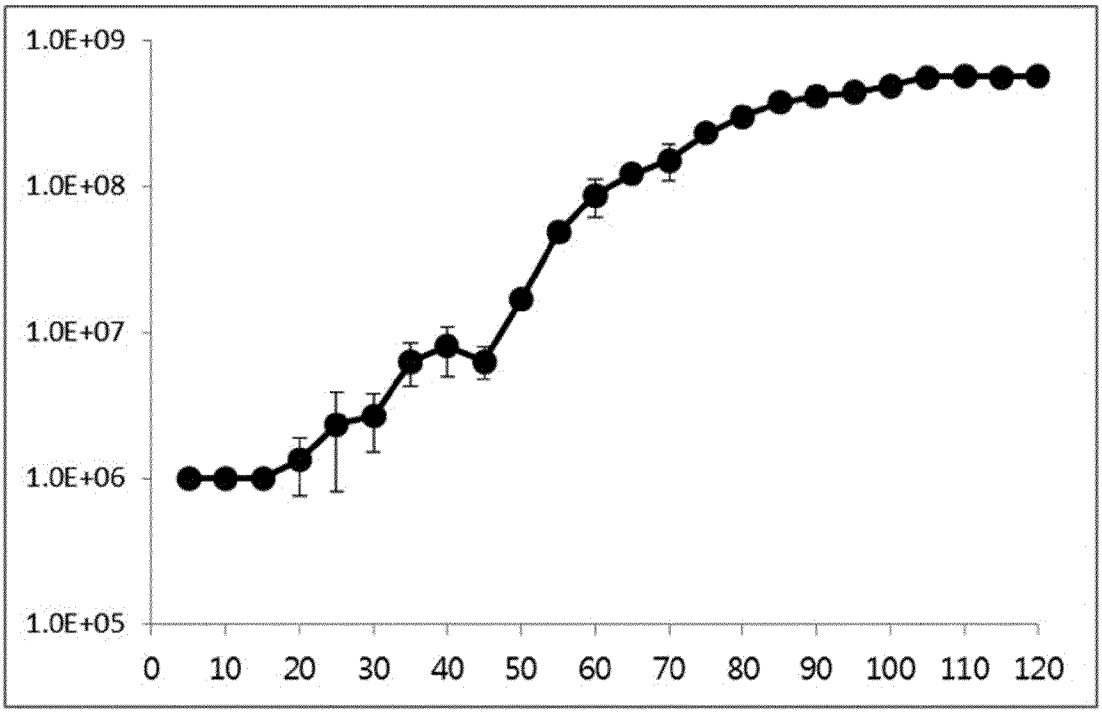
[도9]



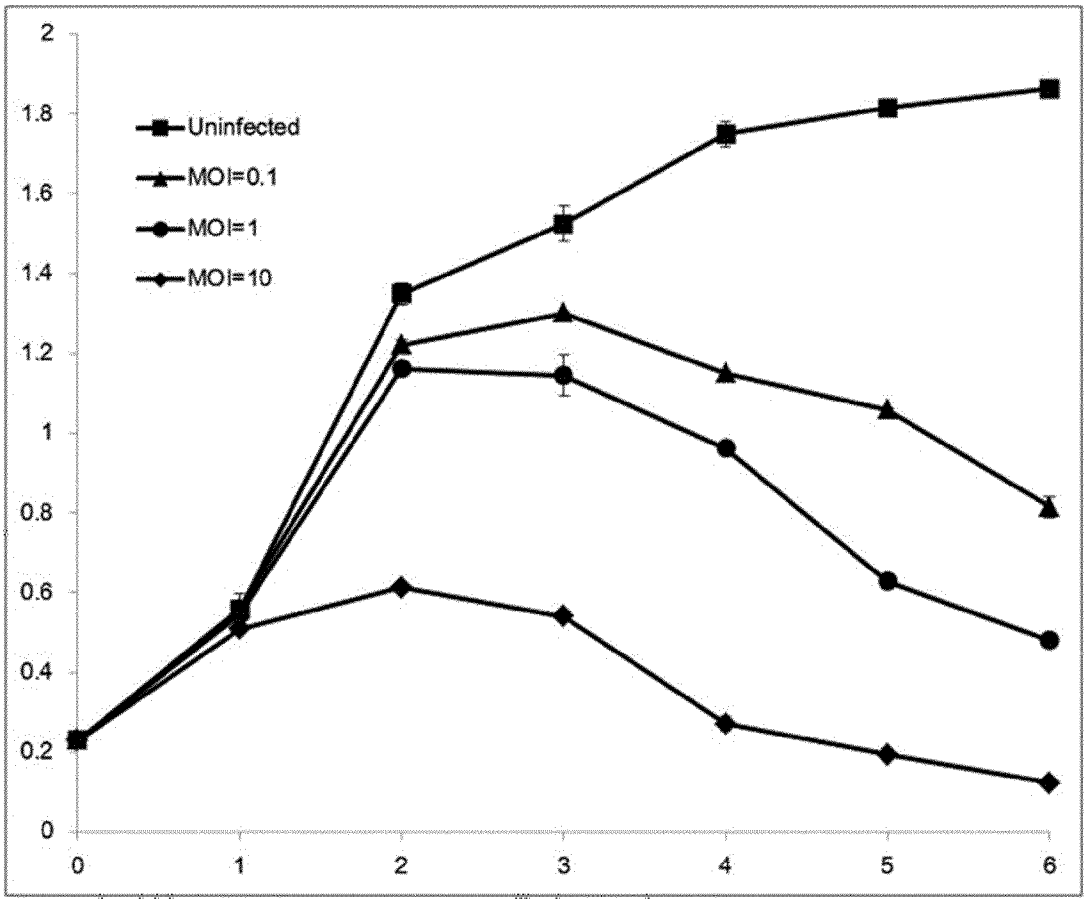
[도10]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% of free phages
0
5
10
15
20
25
Phage adsorption time (min)

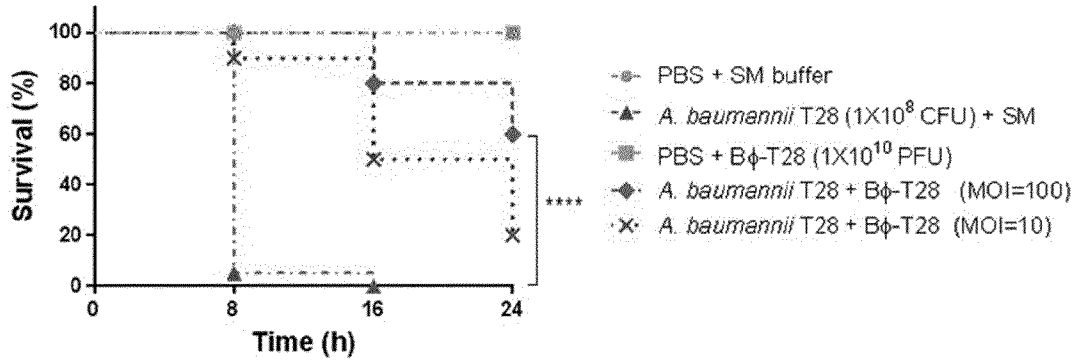
[도11]


1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120

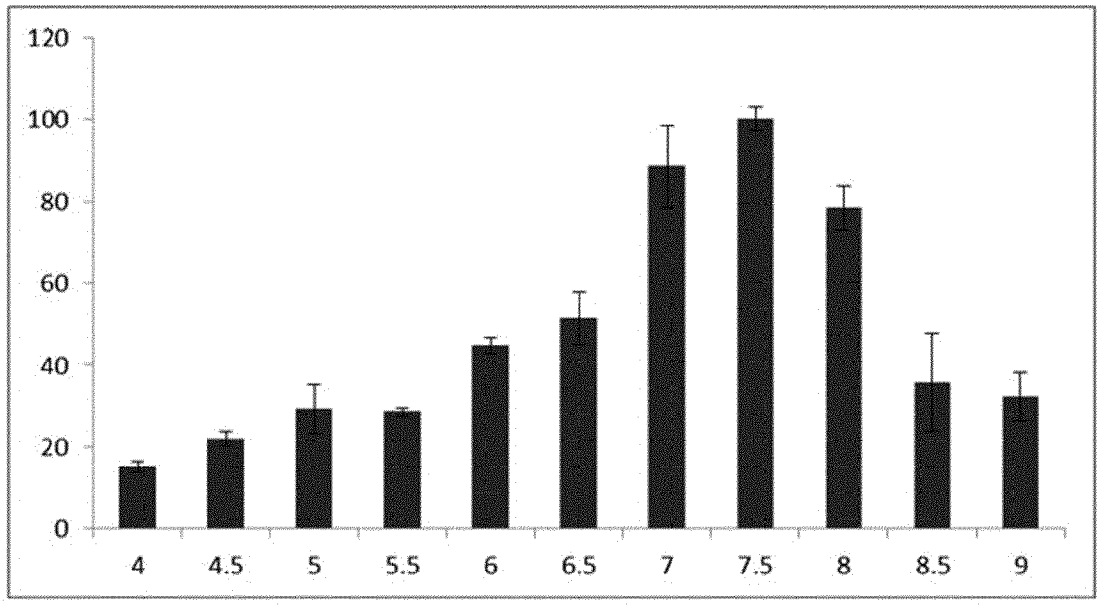
[도12]


Uninfected
MOI=0.1
MOI=1
MOI=10
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
1
2
3
4
5
6

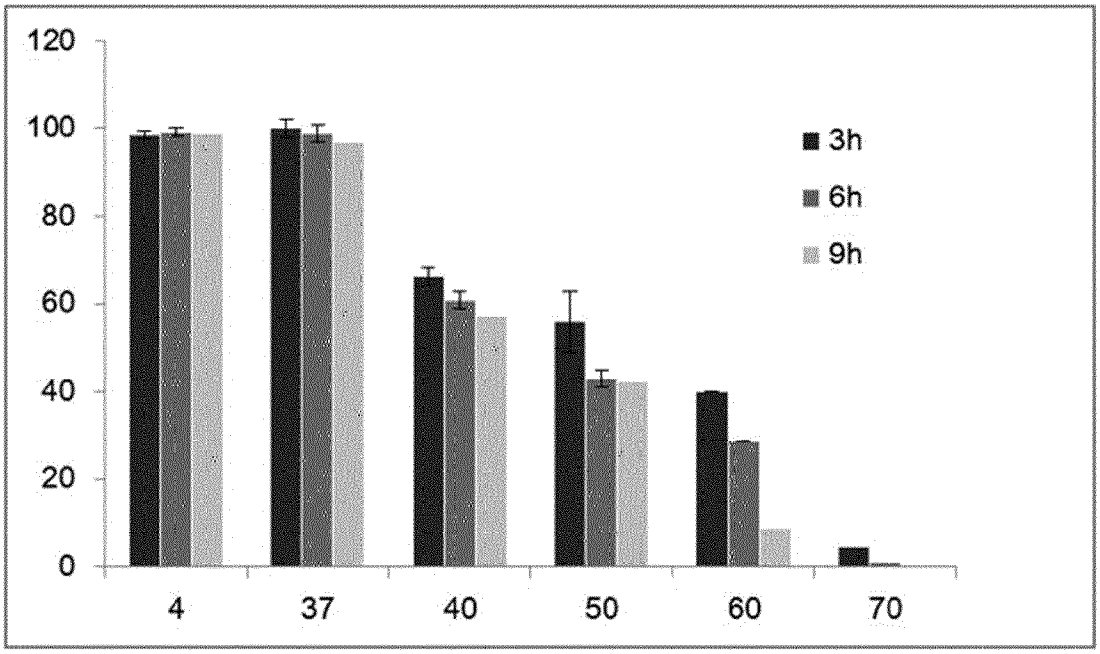
[도13]


Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
8
16
24
Time (h)
****
PBS + SM buffer
A. baumannii T28 (1X10^8 CFU) + SM
PBS + Bϕ-T28 (1X10^10 PFU)
A. baumannii T28 + Bϕ-T28 (MOI=100)
A. baumannii T28 + Bϕ-T28 (MOI=10)

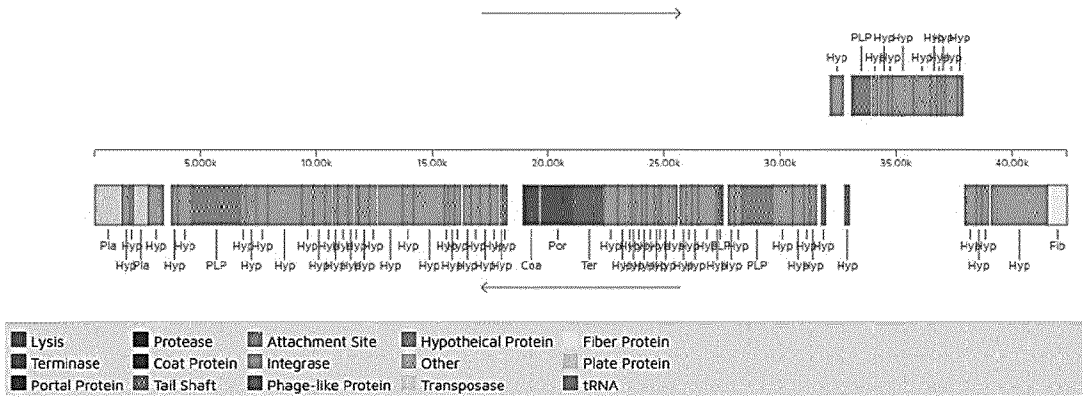
[도14]


120
100
80
60
40
20
0
4
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
8.5
9

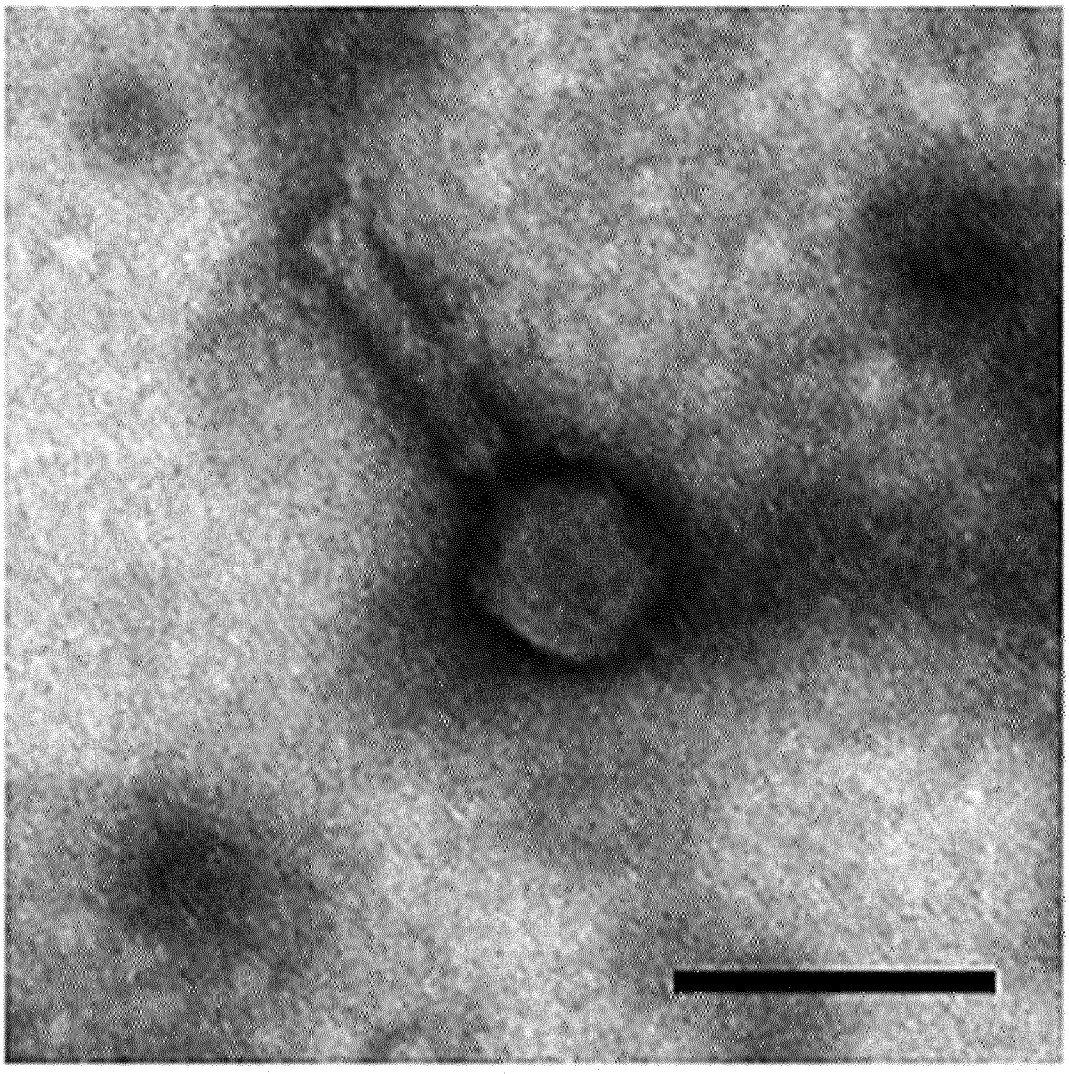
[도15]


120
100
80
60
40
20
0
3h
6h
9h
4
37
40
50
60
70

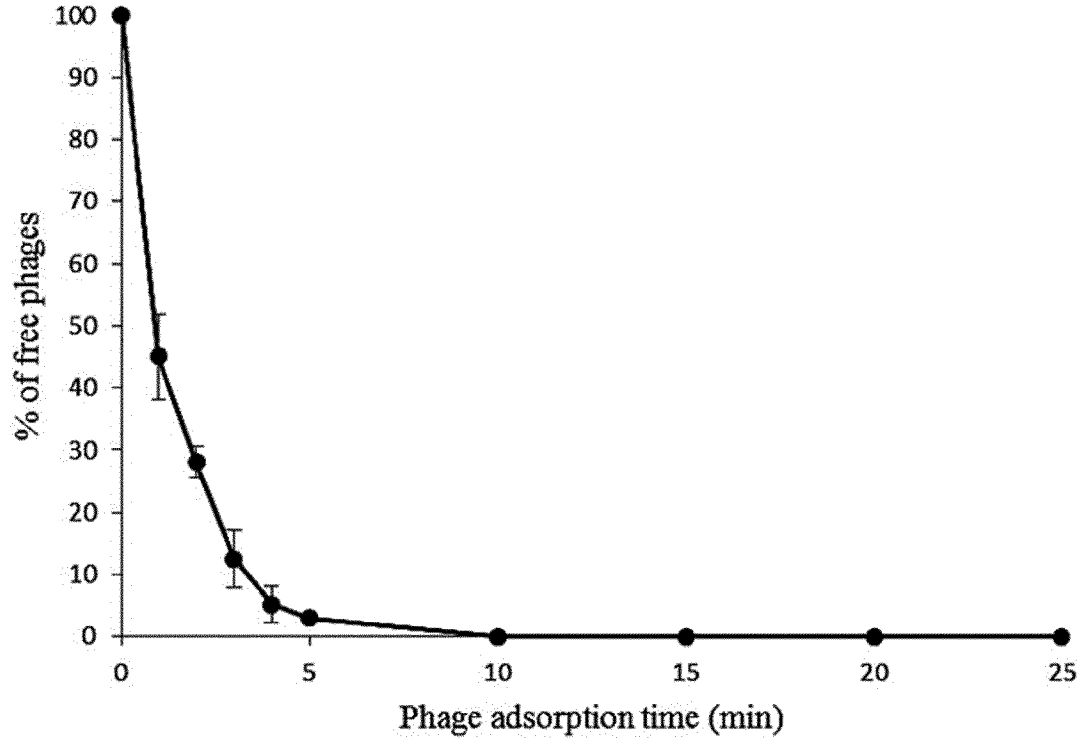
[도16]


5.000k
10.00k
15.00k
20.00k
25.00k
30.00k
35.00k
40.00k
Lysis
Terminase
Portal Protein
Protease
Coat Protein
Tail Shaft
Attachment Site
Integrase
Phage-like Protein
Hypothetical Protein
Other
Transposase
Fiber Protein
Plate Protein
tRNA

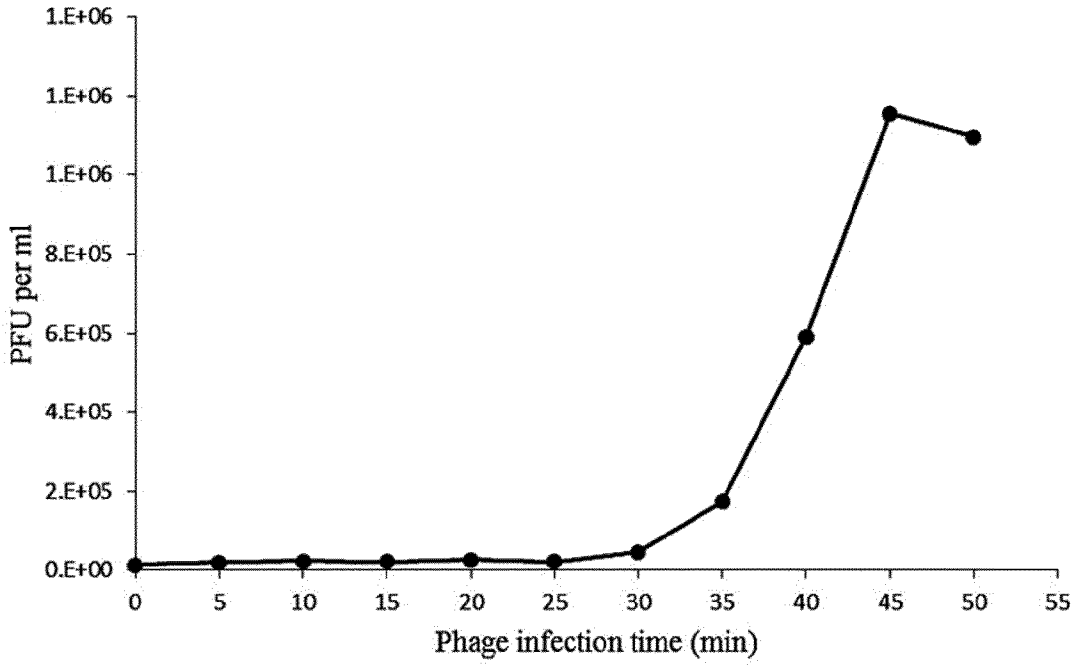
[도17]



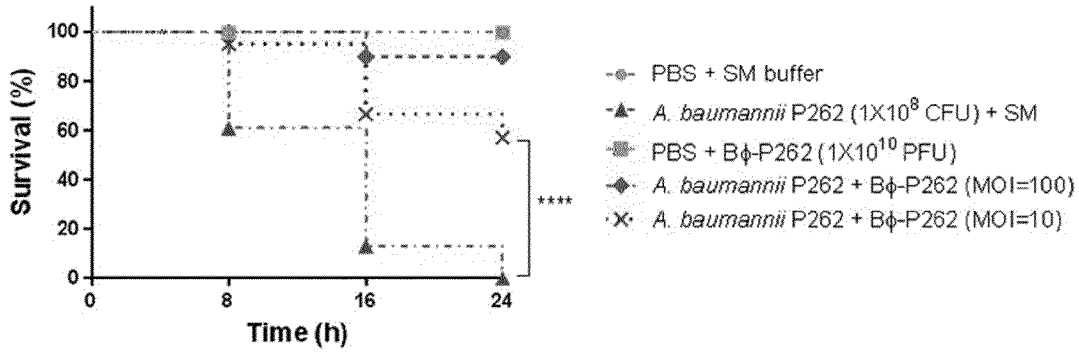
[도18]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% of free phages
0
5
10
15
20
25
Phage adsorption time (min)

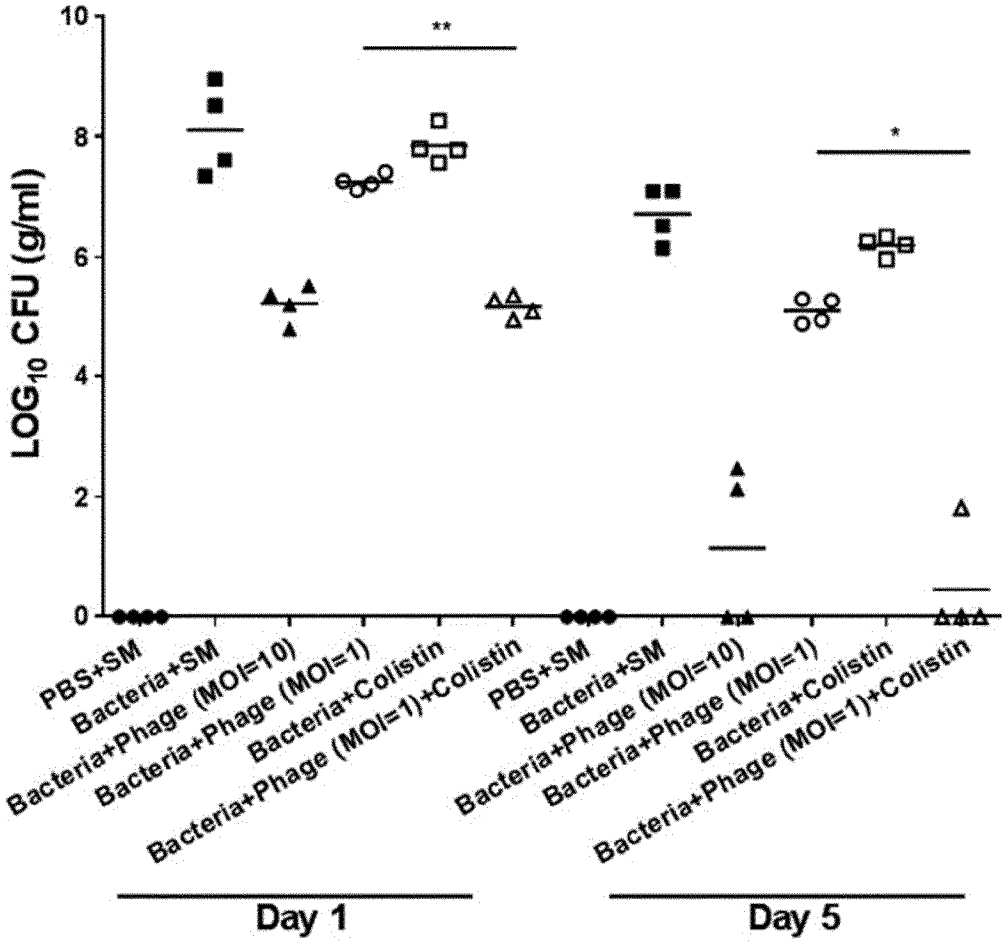
[도19]


1.E+06
1.E+06
1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
PFU per ml
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Phage infection time (min)

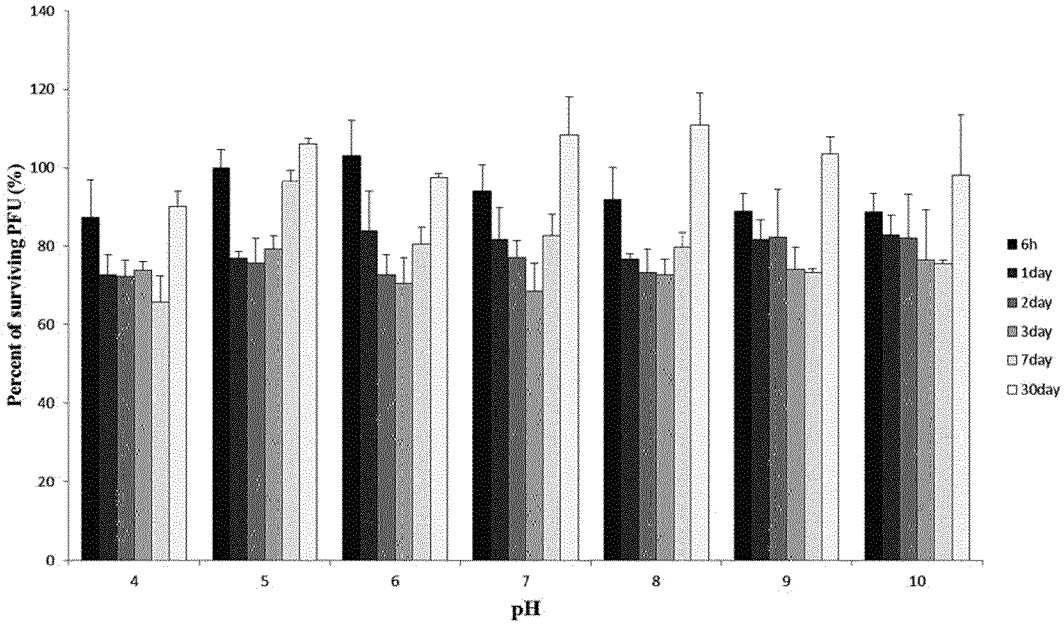
[도20]


Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
8
16
24
Time (h)
****
PBS + SM buffer
A. baumannii P262 (1X10^8 CFU) + SM
PBS + Bϕ-P262 (1X10^10 PFU)
A. baumannii P262 + Bϕ-P262 (MOI=100)
A. baumannii P262 + Bϕ-P262 (MOI=10)

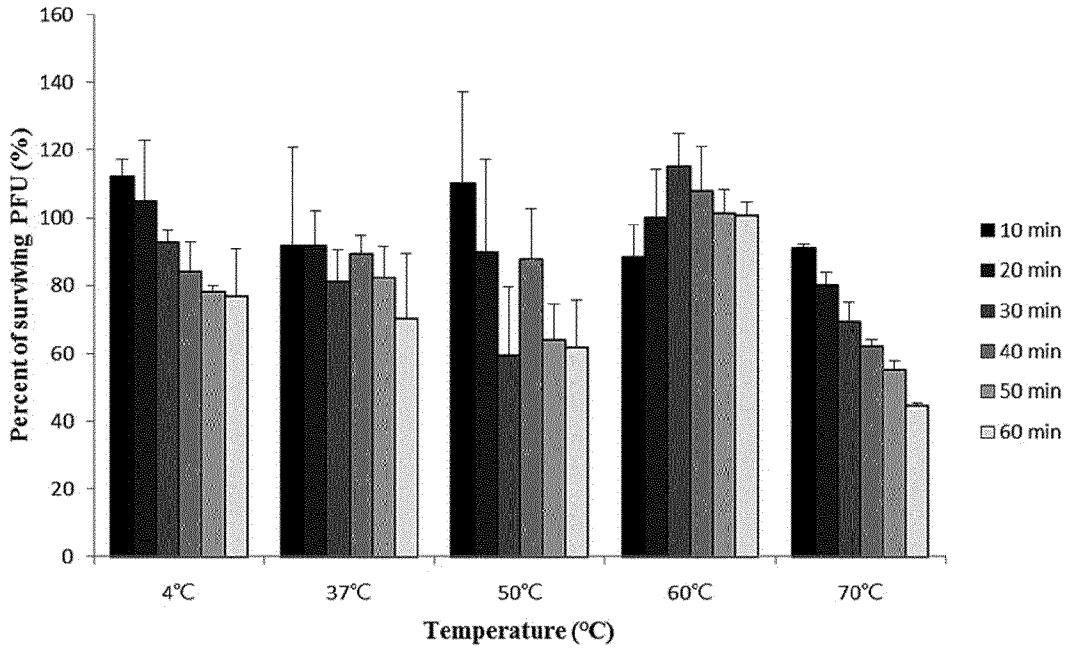
[도21]


LOG10 CFU (g/ml)
10
8
6
4
2
0
**
*
PBS+SM
Bacteria+SM
Bacteria+Phage (MOI=10)
Bacteria+Phage (MOI=1)
Bacteria+Colistin
Bacteria+Phage (MOI=1)+Colistin
Day 1
Day 5

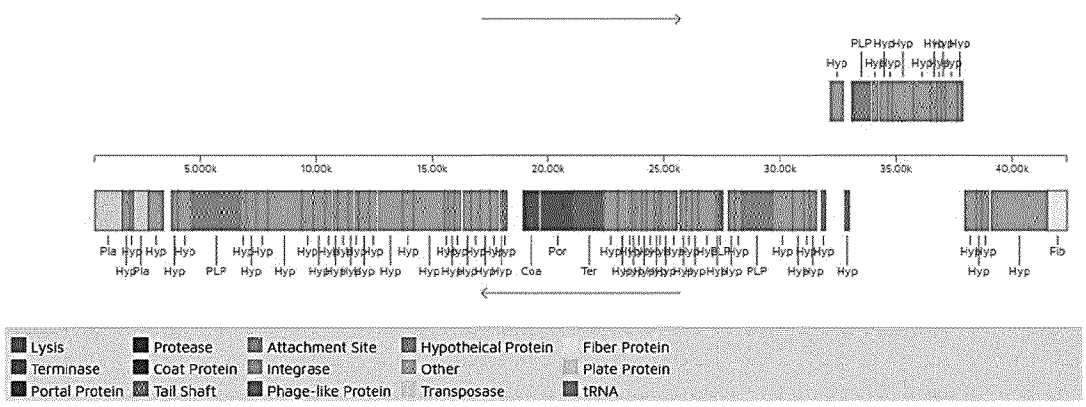
[도22]


Percent of surviving PFU (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
pH
6h
1day
2day
3day
7day
30day

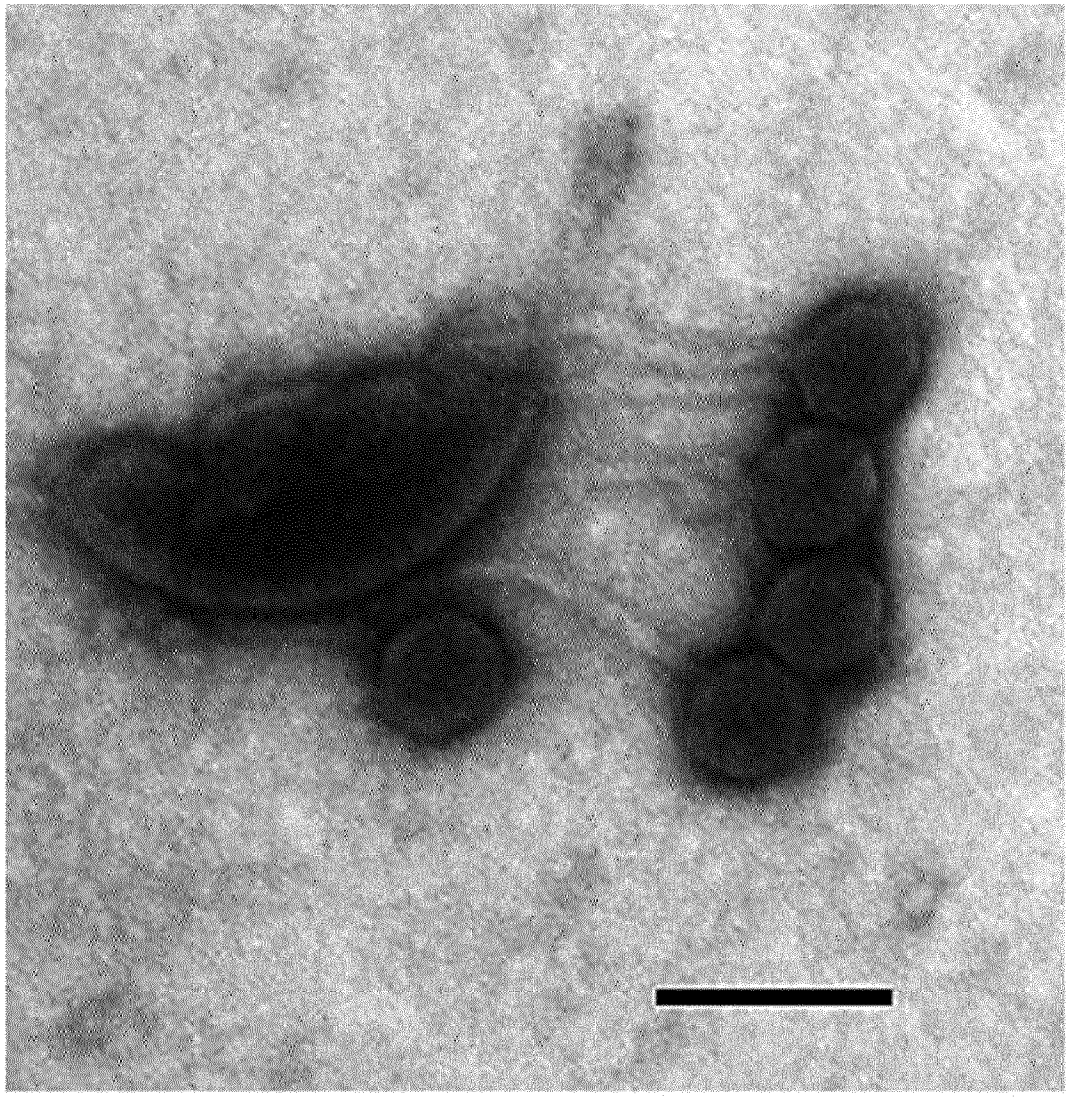
[도23]


Percent of surviving PFU (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
4℃
37℃
50℃
60℃
70℃
Temperature (℃)
10 min
20 min
30 min
40 min
50 min
60 min

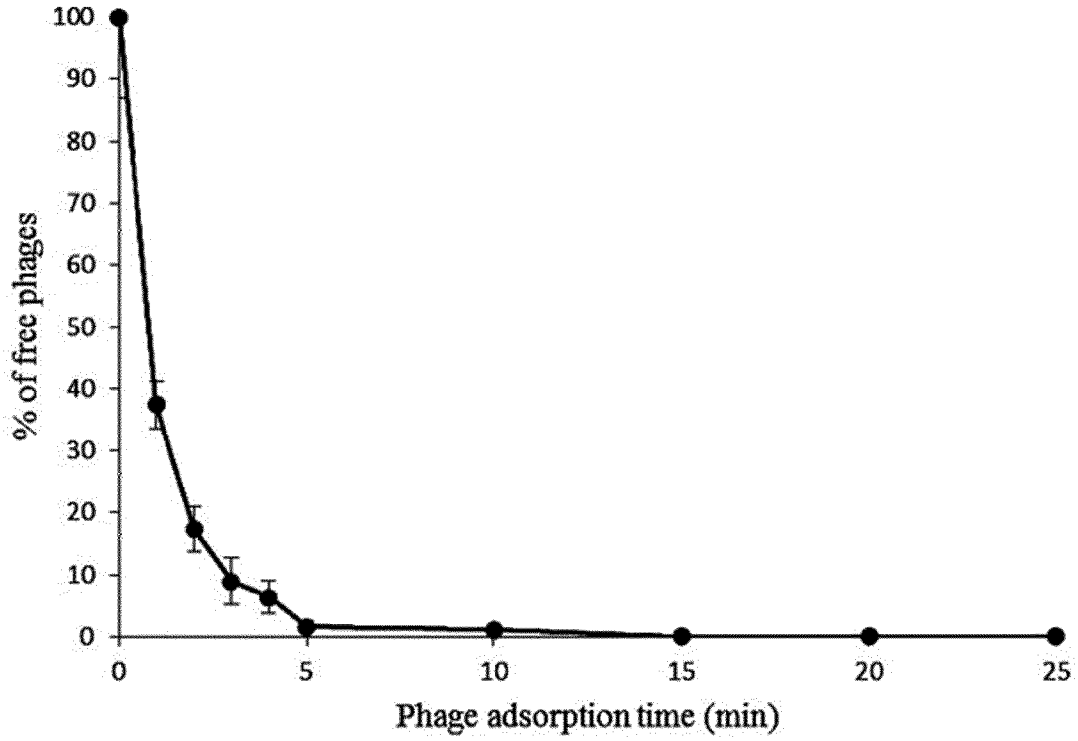
[도24]


5.000k
10.00k
15.00k
20.00k
25.00k
30.00k
35.00k
40.00k
Lysis
Protease
Attachment Site
Hypotheical Protein
Fiber Protein
Terminase
Coat Protein
Integrase
Other
Plate Protein
Portal Protein
Tail Shaft
Phage-like Protein
Transposase
tRNA

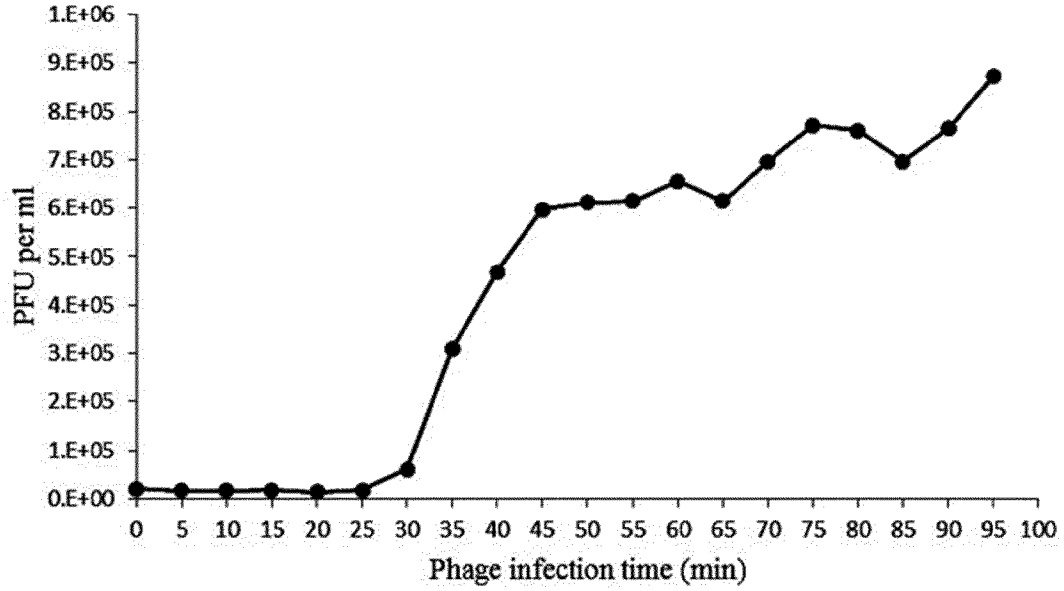
[도25]



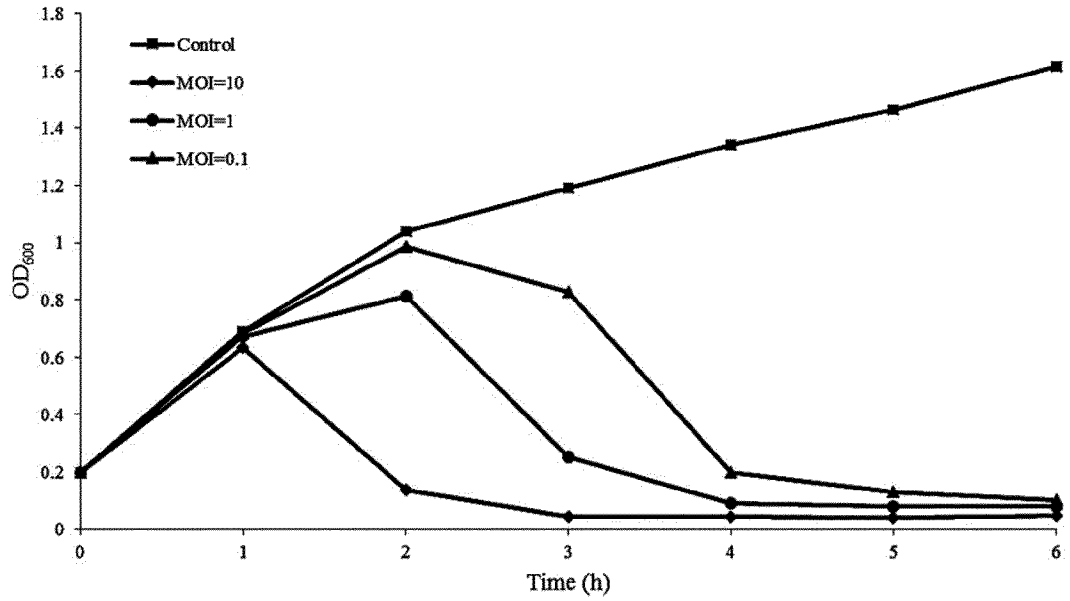
[도26]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% of free phages
0
5
10
15
20
25
Phage adsorption time (min)

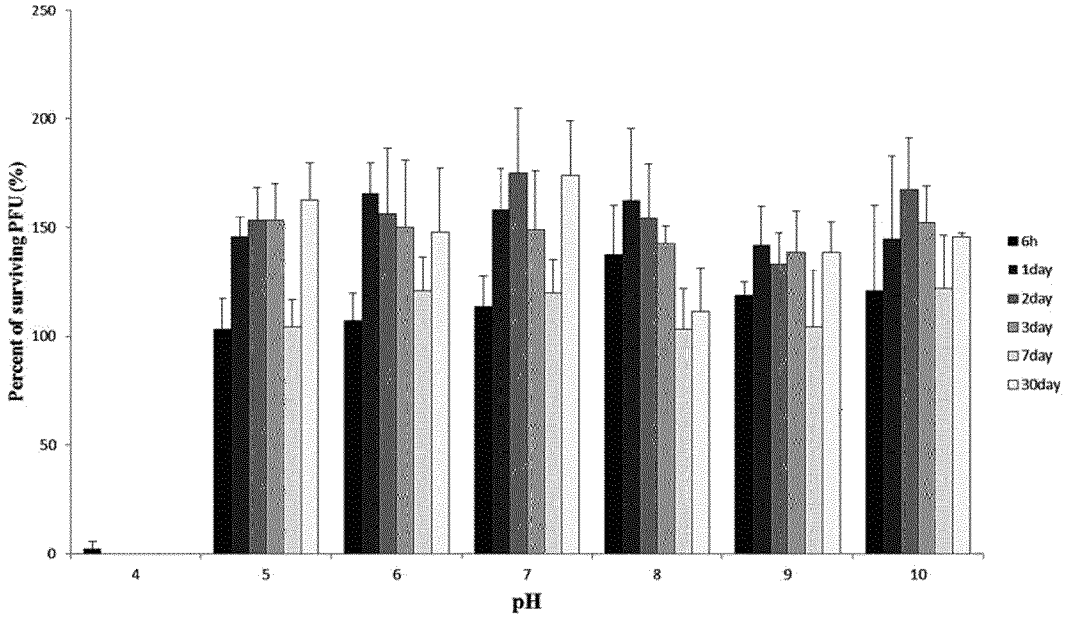
[도27]


1.E+06
9.E+05
8.E+05
7.E+05
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
PFU per ml
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
Phage infection time (min)

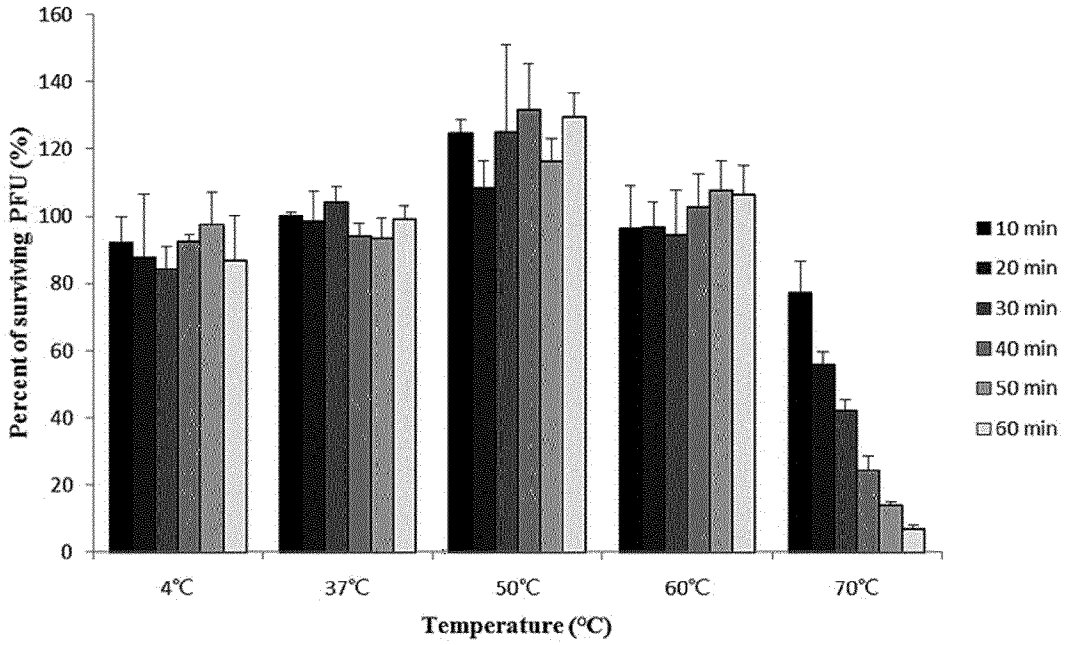
[도28]


Control
MOI=10
MOI=1
MOI=0.1
OD600
Time (h)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
0
1
2
3
4
5
6

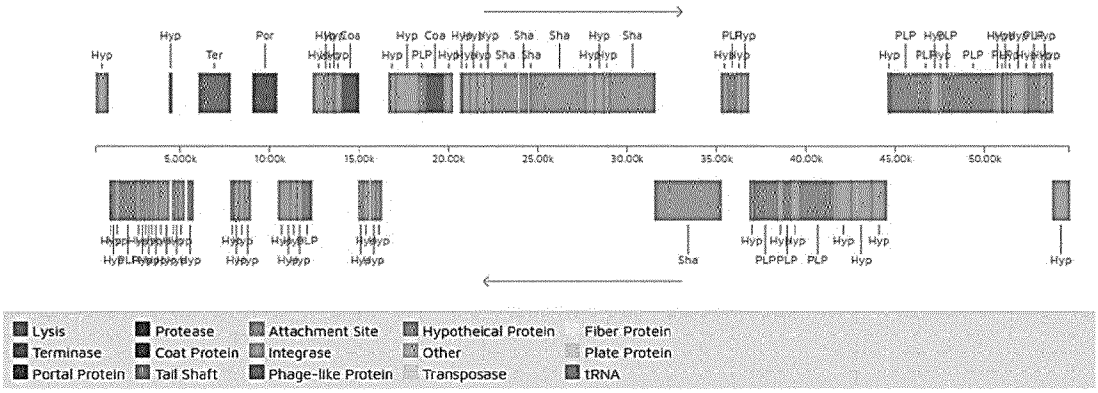
[도29]


Percent of surviving PFU (%)
pH
6h
1day
2day
3day
7day
30day
0
50
100
150
200
250
4
5
6
7
8
9
10

[도30]


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Percent of surviving PFU (%)
4℃
37℃
50℃
60℃
70℃
Temperature (℃)
10 min
20 min
30 min
40 min
50 min
60 min

[도31]


Lysis
Terminase
Portal Protein
Protease
Coat Protein
Tail Shaft
Attachment Site
Integrase
Phage-like Protein
Hypotheical Protein
Other
Transposase
Fiber Protein
Plate Protein
tRNA