202400783

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202400783 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：112115666 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl.： *C12N7/00 (2006.01)* *A61K35/76 (2015.01)*
A61P31/06 (2006.01)

(30)優先權：2022/04/28 日本 2022-075078

(71)申請人：日商安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)
日本
國立大學法人東海國立大學機構 (日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM (JP)
日本

(72)發明人：安藤弘樹 ANDO, HIROKI (JP) ；松岡秀明 MATSUOKA, HIDEAKI (JP) ；松川浩二 MATSUKAWA, KOJI (JP) ；小野裕太郎 ONO, YUTARO (JP) ；滿仲翔一 MITSUNAKA, SHOICHI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：3 共 53 頁

(54)名稱

噬菌體

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性之噬菌體。本發明提供一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號 NITE BP-03513 ～ 03521 之任一者所特定之噬菌體之基因組所示的核酸序列。

It is an object of the present invention to provide a bacteriophage having lytic activity against Mycobacterium avium and/or Mycobacterium intracellulare. The present invention provides a bacteriophage having lytic activity against Mycobacterium avium and/or Mycobacterium intracellulare, wherein the genome of the bacteriophage contains the nucleic acid sequence of the genome of a bacteriophage identified by any of Accession Nos. NITE BP-03513 to NITE BP-03521.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

噬菌體

【英文發明名稱】

BACTERIOPHAGES

【中文】

本發明之課題在於提供一種對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性之噬菌體。本發明提供一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513～03521之任一者所特定之噬菌體之基因組所示的核酸序列。

【英文】

It is an object of the present invention to provide a bacteriophage having lytic activity against Mycobacterium avium and/or Mycobacterium intracellulare. The present invention provides a bacteriophage having lytic activity against Mycobacterium avium and/or Mycobacterium intracellulare, wherein the genome of the bacteriophage contains the nucleic acid sequence of the genome of a bacteriophage identified by any of Accession Nos. NITE BP-03513 to NITE BP-03521.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

噬菌體

【英文發明名稱】

BACTERIOPHAGES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種噬菌體及該噬菌體之用途。

【先前技術】

【0002】 非結核性分枝桿菌(Non-tuberculous mycobacteria：NTM)症係由除結核分枝桿菌、麻風分枝桿菌以外之分枝桿菌引起之感染症。NTM係存在於湖沼或土壤等之環境常駐菌，因氣溶膠等之吸入而引起呼吸道症狀。作為NTM之例，可例舉：鳥分枝桿菌(Mycobacterium avium(M. avium))、細胞內分枝桿菌(M. intracellulare)、偶然分枝桿菌(M. fortuitum)、龜分枝桿菌(M. chelonae)、戈登分枝桿菌(M. gordonae)、蘇爾加分枝桿菌(M. szulgai)、堪薩斯分枝桿菌(M. kansasii)、日內瓦分枝桿菌(M. genavense)等(Infection. 2004; 32: 257.)。其中，由包含鳥分枝桿菌及細胞內分枝桿菌之鳥分枝桿菌複合群(Mycobacterium avium complex：MAC)引起之感染症被稱為MAC症，其中尤其是肺感染症被稱為肺MAC症。

【0003】 包括NTM症之細菌感染症之治療方法一般為包含大環內酯系抗生素之多劑聯合療法，但近年來，已知一種利用噬菌體(bacteriophage)(以下亦稱為噬菌體(phage))之溶菌活性之噬菌體療法(Microorganisms. 2021; 9 (3): 596.)。例如，作為對鳥分枝桿菌顯現出溶

菌活性之噬菌體，報告了D29、TM4、ZoeJ(Journal of Medical Microbiology 2006; 55 (1): 37.、Microorganisms. 2021; 9 (3): 596.、Microb. Drug Resist. 2006; 12: 1.)。

【0004】噬菌體係以細菌作為宿主之病毒。感染了特定細菌之噬菌體將自身之基因組注入細菌內，利用宿主細菌之代謝機制使後代噬菌體增殖。其後，細菌之細胞壁被噬菌體基因組所攜帶之溶菌酶破壞，釋出後代噬菌體，並且宿主細菌死滅。

【0005】噬菌體大致可分為非溫和噬菌體(溶菌性噬菌體)及溫和噬菌體(溶原性噬菌體)(Scientifica (Cairo). 2014; 2014: 581639.)。非溫和噬菌體係不引入至宿主細菌DNA(Deoxyribo Nucleic Acid，去氧核糖核酸)而複製。於細菌內使後代噬菌體增殖，進行細菌之溶解及成熟噬菌體粒子之釋出。另一方面，溫和噬菌體於感染細菌後，引入至宿主細菌DNA，與宿主細菌DNA一起複製。若僅引入至宿主細菌DNA，則對宿主細菌無害，可維持溶原化狀態(噬菌體DNA引入至宿主細菌DNA，與宿主細菌DNA一起複製之狀態)。然而，若對溫和噬菌體施加紫外線等外部刺激，則溫和噬菌體會如非溫和噬菌體般釋出溶菌酶，進行宿主細菌之溶解及成熟噬菌體粒子之釋出。

【0006】亦報告有與溶原化之要素有關之基因缺失之噬菌體。例如，報告有整合酶基因缺失之噬菌體(Nat Med. 2019; 25 (5): 730.)或整合酶基因及免疫抑制基因缺失之噬菌體(mBio. 2021; 12 (3): e00973.)。

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0007】本發明之課題在於提供一種對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝

桿菌具有溶菌活性之噬菌體。本發明之另一課題在於提供一種用於預防或治療肺MAC症等非結核性分枝桿菌症之手段及方法，尤其是噬菌體及醫藥組合物。

[解決問題之技術手段]

【0008】 本發明人等於噬菌體之製作過程中反覆進行了極富創意之研究，結果獲得了新穎噬菌體及其等之溶原基因缺失之基因缺失株(實施例1)，並發現該噬菌體對鳥分枝桿菌及細胞內分枝桿菌具有溶菌活性(實施例2)，從而完成了本發明。進而，本發明人等發現包含由寄存編號NITE BP-03513、寄存編號NITE BP-03514、及寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之醫藥組合物與單獨之噬菌體相比，具有優異之殺菌活性(實施例3)。

【0009】 即，本發明可包含以下發明作為醫學上或產業上有用之物質或方法。

[1]一種噬菌體，其選自下述(1)～(9)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活

性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0010】 [2]如[1]所記載之噬菌體，其選自下述(1)～(9)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活

性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列。

【0011】 [3]如[1]或[2]所記載之噬菌體，其選自下述(1)～(9)：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(4)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(5)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(6)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(7)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(8)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(9)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-

03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【0012】 [4]一種噬菌體，其選自下述(1)～(9)：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體、或其繼代株；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體、或其繼代株；

(3)由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體、或其繼代株；

(4)由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體、或其繼代株；

(5)由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體、或其繼代株；

(6)由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體、或其繼代株；

(7)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體、或其繼代株；

(8)由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體、或其繼代株；及

(9)由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體、或其繼代株。

【0013】 [5]一種醫藥組合物，其包含如[1]至[4]中任一項所記載之噬菌體及藥學上容許之賦形劑。

[6]一種醫藥組合物，其包含至少2種如[1]至[4]中任一項所記載之噬菌體，且包含藥學上容許之賦形劑。

[7]一種醫藥組合物，其包含3種如[1]至[4]中任一項所記載之噬菌體，且包含藥學上容許之賦形劑。

[8]如[5]至[7]中任一項所記載之醫藥組合物，其係非結核性分枝桿菌症之預防或治療用醫藥組合物。

[9]如[8]所記載之醫藥組合物，其中非結核性分枝桿菌症係肺MAC症。

【0014】 [10]一種醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體及藥學上容許之賦形劑：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0015】 [11]如[10]所記載之醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列。

【0016】 [12]如[10]或[11]所記載之醫藥組合物，其包含下述(1)～

(3)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【0017】 [13]一種醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體及藥學上容許之賦形劑：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體、或其繼代株；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體、或其繼代株；及

(3)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體、或其繼代株。

【0018】 [14]如[10]至[13]中任一項所記載之醫藥組合物，其係非結核性分枝桿菌症之預防或治療用醫藥組合物。

[15]如[14]所記載之醫藥組合物，其中非結核性分枝桿菌症係肺MAC症。

[發明之效果]

【0019】 本發明之噬菌體及醫藥組合物係對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌顯現出溶菌活性，期待本發明之噬菌體及醫藥組合物可用於預防或治療肺MAC症等非結核性分枝桿菌症。

【圖式簡單說明】

【0020】 圖1表示溶菌斑之具體例。將藉由目視而顯現出透明、幾乎或完全無渾濁且輪廓清晰之溶菌斑者判定為+++，將顯現出有渾濁且輪

廓清晰之溶菌斑者判定為++，將顯現出有渾濁且輪廓不清晰之溶菌斑者判定為+。

圖2係表示噬菌體之經時溶菌活性之結果之曲線圖。縱軸表示菌落形成單位濃度(CFU/mL)，橫軸表示培養開始後之時間。LOQ(Limit Of Quantitation，定量限度)表示定量下限之值。

圖3係表示小鼠感染模型中之噬菌體之殺菌活性之結果的圖。縱軸表示肺中之菌落形成單位(CFU/肺)。LOQ表示定量下限之值。

【實施方式】

【0021】 以下對本發明進行詳述。以下實施方式係用於說明本發明之例示，不意味著將本發明僅限定於該實施方式。本發明可於不脫離其主旨之範圍內，以各種形態實施。

【0022】 <1.本發明之噬菌體>

於一個實施方式中，本發明提供一種新穎噬菌體。本發明之噬菌體係對非結核性分枝桿菌(NTM)尤其是引起肺MAC症之鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性之噬菌體(以下有時稱為「本發明之噬菌體」)。

【0023】 作為本發明之噬菌體之一例之D29溶原基因缺失株D29Δ係由本申請人基於用於專利微生物之寄存之布達佩斯條約之規定，於2021年8月26日國際寄存於作為國際寄存當局之獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03513)。

【0024】 作為本發明之噬菌體之一例之B1溶原基因缺失株B1Δ係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機

構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03514)。

【0025】 作為本發明之噬菌體之一例之Y2溶原基因缺失株Y2Δ係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03515)。

【0026】 作為本發明之噬菌體之一例之#33溶原基因缺失株#33Δ係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03516)。

【0027】 作為本發明之噬菌體之一例之#63溶原基因缺失株#63Δ係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03517)。

【0028】 作為本發明之噬菌體之一例之#105母株係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03518)。

【0029】 作為本發明之噬菌體之一例之#123母株係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03519)。

【0030】 作為本發明之噬菌體之一例之#33母株係由本申請人於

2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鐮足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03520)。

【0031】 作為本發明之噬菌體之一例之#63母株係由本申請人於2021年8月26日國際寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心(〒292-0818 日本千葉縣木更津市上總鐮足2-5-8 122號室)(寄存編號NITE BP-03521)。

【0032】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有選自由以下(1)～(9)所組成之群之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定

之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0033】本說明書中之「同一性」意指使用藉由NEEDLE程式(J. Mol. Biol., 1970, Vol. 48, p. 443.)檢索默認準備之參數而獲得之值同一性(Identity)。上述參數如下。

空位罰分(Gap penalty)＝10

擴展罰分(Extend penalty)＝0.5

矩陣(Matrix)＝EBLOSUM62

【0034】 本說明書中之「溶原基因」意指參與溶原化狀態之誘導及/或維持之基因。作為「溶原基因」之例，可例舉整合酶基因或免疫抑制基因、Cro基因等，具體之溶原基因及其序列資訊亦是公知的(Nat Med. 2019; 25 (5): 730.、mBio. 2021; 12 (3): e00973.、Cell. 2018; 172 (6): 1260.)。

【0035】 於本說明書中，「溶原基因缺失」意指1)至少1個溶原基因之全長自噬菌體之基因組序列缺失，或者2-1)自噬菌體之基因組序列藉由缺失、置換、插入、附加或其等之組合使至少1個溶原基因區域之一部分改型，藉此該噬菌體成為溶菌性噬菌體，或者2-2)該溶原基因之功能缺失。溶原基因之缺失可根據缺失之溶原基因之種類藉由該技術領域中公知之方法進行(例如Nat Med. 2019; 25 (5): 730.、mBio. 2021; 12 (3): e00973.、PLoS One. 2008; 3 (12): e3957.)。

【0036】 於本說明書中，「對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性」意指對屬於鳥分枝桿菌或細胞內分枝桿菌之至少1種細菌之菌株顯現出溶菌斑。對該等細菌之溶菌活性之確認可使用該技術領域中公知之方法及構件進行。例如，藉由使用本說明書之實施例2中記載之方法確認10^9 pfu/mL之噬菌體是否對鳥分枝桿菌或細胞內分枝桿菌顯現出溶菌斑，可確認噬菌體是否具有溶菌活性。

【0037】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有選自由以下(1)～(9)所組成之群之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定

之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬

菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0038】「整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失」意指1)整合酶基因及/或免疫抑制基因之全長自噬菌體之基因組序列缺失，或者2-1)自噬菌體之基因組序列藉由缺失、置換、插入、附加或其等之組合使整合酶基因及/或免疫抑制基因之一部分改型，藉此該噬菌體成為溶菌性噬菌體，或者2-2)整合酶基因及/或免疫抑制基因之功能缺失。如上所述，整合酶基因及免疫抑制基因等溶原基因之缺失可根據缺失之溶原基因之種類，藉由該技術領域中公知之方法進行(例如Nat Med. 2019; 25 (5): 730.、mBio. 2021; 12 (3): e00973.、PLoS One. 2008; 3 (12): e3957.)。

【0039】於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0040】於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸

序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0041】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0042】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0043】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0044】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0045】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其

對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0046】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0047】 於1個實施方式中，本發明之噬菌體含有如下噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0048】 本發明之噬菌體含有選自以下(1)～(9)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌

體之基因組之核酸序列；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列。

【0049】 本發明之噬菌體含有選自以下(1)～(9)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-

03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(4)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(5)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(6)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(7)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(8)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(9)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【0050】 本發明之噬菌體亦含有選自下述(1)～(9)之噬菌體：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體；

(3)由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體；

(4)由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體；

(5)由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體；

(6)由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體；

(7)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體；

(8)由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體；及

(9)由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體。

【0051】 本發明之噬菌體亦含有選自以下(1)～(9)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列；

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列；

(8)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列；以及

(9)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～

100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列。

【0052】 關於上述鹼基之缺失、置換、插入或附加等改型，複數個改型可連續，或複數個改型亦可存在於不同位置。

【0053】 於噬菌體之繼代培養、生產及/或複製之過程中，有可能產生噬菌體所含之基因組之核酸序列部分缺失、置換、插入及/或附加而成之噬菌體變異體。此種變異體亦包含於本發明之噬菌體中，只要該變異體對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性即可。

【0054】 本發明之噬菌體亦含有藉由上述寄存編號NITE BP-03513～03521之任一者所特定之噬菌體之繼代株，只要該噬菌體之繼代株對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性即可。

【0055】 於本說明書中，「繼代株」意指藉由對分讓之噬菌體進行繼代培養而獲得之噬菌體。

【0056】 本發明亦包括由本發明之噬菌體所含之基因組所構成之聚核苷酸(以下有時稱為「本發明之基因組」)。因此，本發明提供一種包含與由寄存編號NITE BP-03513～03517所特定之任一個噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列且整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失的噬菌體基因組之聚核苷酸，及包含與由寄存編號NITE BP-03518～03521所特定之任一個噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列的噬菌體基因組之聚核苷酸。於1個實施方式中，該聚核苷酸係編碼對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性之噬菌體之聚核苷酸。

【0057】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一

種基因組，其(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0058】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0059】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0060】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失。

【0061】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基

因缺失。

【0062】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0063】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0064】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其包含與由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0065】 於1個實施方式中，本發明之基因組含有如下基因組：一種基因組，其包含與由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上之同一性的核酸序列。

【0066】 本發明之基因組含有選自以下(1)～(9)之基因組：

(1)包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(2)包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(3)包含由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸

序列的基因組；

(4)包含由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(5)包含由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(6)包含由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(7)包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；

(8)包含由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組；及

(9)包含由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列的基因組。

【0067】 本發明之基因組含有選自以下(1)～(9)之基因組：

(1)係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(2)係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(3)係由：由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(4)係由：由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(5)係由：由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核

酸序列所構成的基因組；

(6)係由：由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(7)係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；

(8)係由：由寄存編號NITE BP-03520所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組；及

(9)係由：由寄存編號NITE BP-03521所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成的基因組。

【0068】 本發明之基因組可使用該技術領域中公知之一般技術、例如重組DNA技術(例如聚合酶鏈反應(PCR)擴增、選殖)、酵素或化學合成、或者其等之組合而製作。例如，藉由利用基因工程方法將包含本發明之基因組之部分鹼基序列之複數個聚核苷酸連結，可製作本發明之基因組。於1個實施方式中，本發明之基因組之全長或部分序列可包含於該技術領域中公知之載體中。

【0069】 本發明之噬菌體可藉由向上述寄存中心進行分讓請求而獲取。

【0070】 又，本發明之噬菌體可藉由該技術領域中公知之一般技術，讀解所分讓之噬菌體之基因組之核酸序列，基於該序列資訊而製作。例如，藉由電穿孔法將藉由上述方法製作之本發明之基因組導入至宿主細菌(例如為了獲得對分枝桿菌屬顯現出溶菌活性之噬菌體，使用分枝桿菌屬作為宿主細菌)。然後，將導入有基因組之細菌添加至疊層有軟瓊脂之平板，進行培養。其後，藉由空斑法獲得單一溶菌斑。將單一溶菌斑添加

至宿主細菌培養液中進行培養，藉由靜置或離心分離而獲得培養上清液，對所獲得之培養上清液進行過濾處理，藉此可製作本發明之噬菌體。又，為了製作本發明之噬菌體，可使用電穿孔DNA之噬菌體重組工程(BRED，Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA)(PLoS One. 2008; 3 (12): e3957.)使噬菌體基因組缺失溶原基因。

【0071】 本發明之噬菌體可藉由該技術領域中公知之一般培養、單離及精製方法而製備。例如，預先培養宿主細菌(包皮垢分枝桿菌、鳥分枝桿菌或細胞內分枝桿菌等)，使本發明之噬菌體感染該宿主細菌，於37℃下培養。培養後，對藉由靜置或離心分離所獲得之培養上清液進行過濾處理，藉此可獲得經精製之噬菌體。培養基可根據使用之細菌而適當選擇，例如於培養包皮垢分枝桿菌之情形時，可使用7H9培養基。於製備複數個噬菌體之情形時，可於不同宿主細菌中增殖，亦可於相同宿主細菌中增殖。

【0072】 進而，本發明之噬菌體可藉由進行該技術領域中公知之適當方法，而以各種形態(液體、冷凍乾燥等)保存。

【0073】 業者亦可基於本發明，製作本發明之噬菌體與肽、蛋白質或修飾劑之融合體，該等噬菌體融合體亦包含於本發明之噬菌體中。融合所用之肽、蛋白質或修飾劑並無特別限定，只要該噬菌體融合體對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性即可，例如可例舉：細胞穿膜肽、標籤肽、毒素、抗體或其抗原結合片段、脂質體、脂質、脂質奈米粒子、聚乙二醇、糖鏈、低分子化合物。肽、蛋白質或修飾劑可直接或間接與本發明之噬菌體融合。於間接融合之情形時，例如可利用連接子或標籤肽。

【0074】 業者可基於本發明之噬菌體之序列資訊、融合體所用之肽、蛋白質或修飾劑之資訊，使用該領域中公知之方法，容易地製作噬菌體融合體。例如，藉由使噬菌體感染對攜帶有編碼目標蛋白質之外源基因之質體進行轉形所得之宿主細菌，可製作融合有目標蛋白質之噬菌體粒子。

【0075】 <2.本發明之醫藥組合物及噬菌體之用途>

本發明之噬菌體對非結核性分枝桿菌(NTM)尤其是引起肺MAC症之鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性。由此，期待本發明之噬菌體對治療或預防非結核性分枝桿菌症(NTM症)尤其是肺MAC症有效。

【0076】 於另一態樣中，本發明提供一種本發明之噬菌體之用途，例如包含本發明之噬菌體作為有效成分之醫藥組合物(以下有時稱為「本發明之醫藥組合物」)。

【0077】 本發明之醫藥組合物包括包含本發明之噬菌體及藥學上容許之賦形劑之醫藥組合物。

【0078】 本發明之醫藥組合物可使用該領域中通常使用之賦形劑即藥劑用賦形劑或藥劑用載體等，藉由通常使用之方法而製備。作為該等醫藥組合物之劑型之例，例如可例舉注射劑、點滴用劑、粉末吸入劑、噴霧器等非經口劑，亦可藉由靜脈內投予或經肺投予等而投予。製劑化時，可於藥學上容許之範圍內根據該等劑型使用賦形劑、載體、或添加劑等。例如，本發明之醫藥組合物可藉由將本發明之噬菌體與藥學上容許之賦形劑混合或將本發明之噬菌體懸浮於藥學上容許之賦形劑中，而製造。

【0079】 本發明之醫藥組合物包括包含至少2種本發明之噬菌體且包含藥學上容許之賦形劑之醫藥組合物。

【0080】 本發明之醫藥組合物包括包含3種本發明之噬菌體且包含藥學上容許之賦形劑之醫藥組合物。

【0081】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物包括包含以下(1)～(3)之噬菌體及藥學上容許之賦形劑之醫藥組合物：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)溶原基因缺失；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0082】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物含有以下(1)～(3)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定

之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【0083】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物含有以下(1)～(3)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列。

【0084】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物含有以下(1)～(3)：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-

03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【0085】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物含有以下(1)～(3)：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體；及

(3)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體。

【0086】 於1個實施方式中，本發明之醫藥組合物含有以下(1)～(3)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列中1～5000個(例如1～1000個、1～500個、或1～100個)鹼基缺失、置換、插入或附加，或者藉由其等之組合而改型之核酸序列。

【0087】 關於上述鹼基之缺失、置換、插入或附加等改型，複數個改型可連續，或複數個改型亦可存在於不同位置。

【0088】 本發明之醫藥組合物亦可含有藉由上述寄存編號NITE BP-03513、寄存編號NITE BP-03514、或寄存編號NITE BP-03519之任一者所特定之噬菌體之繼代株，只要該噬菌體之繼代株對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性即可。

【0089】 有效投予量、投予次數及投予週期根據投予目的(治療或預防目的)、投予對象之症狀之程度或年齡、使用之製劑之劑型、或噬菌體之效價等而不同。例如，可使用約10^4～10^{14}斑形成單位(pfu)，作為單獨噬菌體之有效投予量或作為2種以上之複數種噬菌體之合計有效投予量。2種以上之複數種噬菌體之投予量之比率可根據患者之症狀之程度或年齡、使用之製劑之劑型、或噬菌體之效價等而適當進行調整。例如於醫藥組合物包含3種噬菌體之情形時，可大致等量(例如、3.3×10^3～3.3×10^{13} pfu)包含各噬菌體，亦可以不同比率包含各噬菌體。

【0090】 本發明之醫藥組合物可用作NTM症例如MAC症或肺MAC症之預防或治療劑。

【0091】 於本說明書中，「治療」意指至少一部分NTM症之症狀(例如咳、痰、血痰、發熱、呼吸困難、倦怠感、肺小結節、支氣管擴張等)改善，包括痰培養陰性之NTM症之進展或惡化停止、完全治癒等。於本說明書中，「預防」意指阻止未患NTM症之對象患NTM症，防止NTM症復發等。

【0092】 本發明包括包含本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物之NTM症例如MAC症或肺MAC症之預防或治療用醫藥組合物。

【0093】 又，本發明包括於對象中預防或治療NTM症例如MAC症或肺MAC症之方法，該方法包括投予治療有效量之本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物之步驟。於1個實施方式中，可向對象投予本發明之噬菌體之至少2種例如3種，複數種噬菌體可同時投予，亦可分開投予。

【0094】 進而，本發明包括用於預防或治療NTM症例如MAC症或肺MAC症之本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物。進而，本發明包括本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物於NTM症例如MAC症或肺MAC症之預防或治療用醫藥組合物之製造中之用途。

【0095】 於本發明中，投予噬菌體之對象並無限定，只要為哺乳動物即可，例如可例舉小鼠、大鼠、狗、豬、猴子、人等。例如向診斷為NTM症之對象、有患NTM症之風險之對象投予。

【0096】 又，本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物可與對NTM症之治療或預防有效之其他成分組合使用或投予，本發明之噬菌體或本發明之醫藥組合物亦可以與該其他有效成分之組合醫藥之形態而提供。

【0097】 以上對本發明進行了概括性記載，為了便於進一步理解，此處提供特定實施例作為參照。其等旨在例示，而並非限定本發明。

[實施例]

【0098】 關於使用市售之套組或試劑等之部分，除非特別說明，否則按照所附之操作流程進行實驗。又，為了方便起見，將濃度mol/L表示為M。例如，1 M氫氧化鈉水溶液意指1 mol/L之氫氧化鈉水溶液。

【0099】 <實施例1：噬菌體之製作>

藉由以下方法，從自然環境樣本中單離噬菌體。將自然環境樣本(日本之土壤)懸浮於含有1 mM $CaCl_2$、10 mM $MgSO_4$、68.4 mM NaCl之10

mM Tris-HCl(pH7.5)中。對懸浮液進行離心，分取上清液。藉由0.22 μm過濾器對上清液進行過濾。將過濾液與包皮垢分枝桿菌混合，使用7H9培養基振盪培養數小時～一晝夜。對培養液進行離心，分取上清液。藉由0.22 μm過濾器對上清液進行過濾。將過濾液與包皮垢分枝桿菌及含有0.6%軟瓊脂之7H9培養基加以混合，將其疊層於7H10板上。於37度下培養數日。採集培養基上出現之溶菌斑，作為母噬菌體。將獲得之母噬菌體稱為#33母株、#63母株、#105母株及#123母株。

【0100】 繼而，從自岡山大學分讓之噬菌體D29、B1及Y2(亦分別稱為D29母株、B1母株及Y2母株)以及藉由上述方法獲得之噬菌體#33母株及#63母株提取基因組，確定全鹼基序列。進行註解，鑑定溶原基因。藉由以下任一種方法，獲得作為溶原基因之整合酶基因及免疫抑制基因缺失之噬菌體。即，1)藉由Marinelli等(PLoS One. 2008; 3 (12): e3957.)之方法，使上述獲得之母噬菌體缺失溶原基因，藉此獲得目標基因缺失噬菌體。或者2)藉由基因工程方法，由具有該噬菌體基因組之部分鹼基序列之複數個聚核苷酸構建目標噬菌體基因組(具有溶原基因去除之鹼基序列)，藉由電穿孔法將該噬菌體基因組導入包皮垢分枝桿菌中，獲得目標基因缺失噬菌體。將獲得之噬菌體分別稱為D29溶原基因缺失株、B1溶原基因缺失株、Y2溶原基因缺失株、#33溶原基因缺失株及#63溶原基因缺失株。

【0101】 提取上述獲得之噬菌體之基因組，確定全鹼基序列。再者，藉由與母噬菌體之鹼基序列進行比較，確認整合酶基因及免疫抑制基因缺失。

【0102】 上述獲得之D29溶原基因缺失株、B1溶原基因缺失株、Y2溶原基因缺失株、#33溶原基因缺失株、#63溶原基因缺失株、#105母

株、#123母株、#33母株及#63母株之寄存編號分別為寄存編號NITE BP-03513、寄存編號NITE BP-03514、寄存編號NITE BP-03515、寄存編號NITE BP-03516、寄存編號NITE BP-03517、寄存編號NITE BP-03518、寄存編號NITE BP-03519、寄存編號NITE BP-03520及寄存編號NITE BP-03521。

【0103】 <實施例2：噬菌體之溶菌活性>

使作為目標細菌之克拉黴素耐藥性鳥分枝桿菌臨床分離株KCH-ASGF-MAC-53或KCH-ASGF-MAC-376(自近畿中央呼吸器中心(Kinki-Chuo Chest Medical Center)分讓)、或者克拉黴素耐藥性細胞內分枝桿菌臨床分離株KCH-ASGF-MAC-27或KCH-ASGF-MAC-90(自近畿中央呼吸器中心分讓)於7H10板(19 g/L Middlebrook 7H10 Agar(Difco)、6.3 g/L甘油、100 mL/L Middlebrook OADC Enrichment(Difco))上生長。藉由棉簽刮取細菌菌落，並懸浮於7H9培養基(4.7 g/L Middlebrook 7H9 Broth(Difco))。以使用分光光度計，細菌懸浮液為OD600＝1.5～2.0左右之方式，藉由7H9培養基進行調整。將700 μL細菌懸浮液與含有0.6%軟瓊脂之7 mL 7H9培養基(4.7 g/L Middlebrook 7H9 Broth(Difco)、6 g/L瓊脂糖、100 mL/L Middlebrook ADC Enrichment(Difco)、或4.7 g/L Middlebrook 7H9 Broth(Difco)、6 g/L瓊脂糖、100 mL/L Middlebrook OADC Enrichment(Difco))加以混合，將其疊層於7H10板(縱100 mm×橫140 mm×高14.5 mm)上。

【0104】 確認軟瓊脂完全固化後，藉由噬菌體緩衝液(含有1 mM $CaCl_2$、10 mM $MgSO_4$、68.4 mM NaCl之10 mM Tris-HCl(pH7.5))，將實施例1中記載之D29母株、D29溶原基因缺失株、B1母株、B1溶原基因

缺失株、Y2母株、Y2溶原基因缺失株、#33母株、#33溶原基因缺失株、#63母株、#63溶原基因缺失株、#105母株及#123母株稀釋至10^9 pfu/mL，滴加2.5 μL。於37℃下培養約3～7日。藉由目視確認有無溶菌斑。於確認有溶菌斑之情形時，將顯現出透明、幾乎或完全無渾濁且輪廓清晰之溶菌斑者判定為+++，將顯現出有渾濁且輪廓清晰之溶菌斑者判定為++，將顯現出有渾濁且輪廓不清晰之溶菌斑者判定為+(參照圖1)。再者，藉由初步研究，已確認於固化之軟瓊脂中僅添加噬菌體緩衝液亦不形成溶菌斑。

【0105】 將結果示於表1中。確認噬菌體D29母株、D29溶原基因缺失株、B1母株、B1溶原基因缺失株、Y2母株、Y2溶原基因缺失株、#33母株、#33溶原基因缺失株、#63母株、#63溶原基因缺失株、#105母株及#123母株對鳥分枝桿菌及細胞內分枝桿菌顯現出溶菌斑。

【0106】 [表1]

	克拉黴素耐藥性鳥分枝桿菌		克拉黴素耐藥性細胞內分枝桿菌	
	KCH-ASGF-MAC-53	KCH-ASGF-MAC-37	KCH-ASGF-MAC-27	KCH-ASGF-MAC-90
D29母株	+++	+++	+++	+++
D29溶原基因缺失株	+++	+++	+++	+++
B1母株	++	+++	+++	++
B1溶原基因缺失株	+++	+++	+++	+++
Y2母株	+	+	++	+++
Y2溶原基因缺失株	++	++	+++	+++
#33母株	+++	+++	+++	+++
#33溶原基因缺失株	+++	+++	+++	+++
#63母株	+++	++	++	++
#63溶原基因缺失株	+++	++	++	++
#105母株	+++	+++	+++	+++
#123母株	+	++	++	++

【0107】 根據以上，確認D29母株、D29溶原基因缺失株、B1母株、B1溶原基因缺失株、Y2母株、Y2溶原基因缺失株、#33母株、#33溶原基因缺失株、#63母株、#63溶原基因缺失株、#105母株及#123母株對鳥分枝桿菌及細胞內分枝桿菌具有溶菌活性。

【0108】 <實施例3：單獨噬菌體或噬菌體混合物之經時溶菌活性>

刮取於7H10板上生長之包皮垢分枝桿菌之約3個細菌菌落，懸浮於5 mL之含有0.05%Tween80(Nacalai Tesque)之7H9培養基中之後，於37℃下進行振盪培養，直至使用分光光度計，細菌懸浮液為OD600＝3以上。培養後，進行離心分離而去除上清液，使所得之沈澱物再懸浮於7H9培養基中，重複3次該操作，製成細菌懸浮液。將細菌懸浮液與含有0.6%軟瓊脂之7H9培養基混合，分別添加實施例1中記載之D29溶原基因缺失株、B1溶原基因缺失株、或#123母株(3株)並倒置混合，疊層於7H10板上。於軟瓊脂固化後，於37℃下培養約1日。向平板中添加10 mL噬菌體緩衝液，於室溫下靜置約4小時。藉由0.22 μm過濾器對平板之上清液進行過濾，獲得3株各自之噬菌體溶菌液。確定噬菌體溶菌液之pfu，於4℃下保管。

【0109】 藉由噬菌體緩衝液將3株各自之噬菌體溶菌液稀釋至1×10^{10} pfu/mL、或3×10^{10} pfu/mL。又，以合計為1×10^{10} pfu/mL、或合計為3×10^{10} pfu/mL之方式將各者等量混合，獲得3株之噬菌體混合物。將該等噬菌體溶液或噬菌體緩衝液以每孔10 μL添加於96孔板中。分別刮取於7H10板上於37℃下生長6日之2株鳥分枝桿菌(KCH-ASGF-MA-05(自近畿中央呼吸器中心分讓)、或ATCC 700898(自ATCC分讓))，懸浮於7H9培養基中。以使用分光光度計，最終OD600＝0.0025之方式，藉由7H9培養

基對細菌懸浮液進行調整，以每孔90 μL添加於96孔板中。於96孔板貼附平板密封件作為蓋，於37℃下培養。於培養後0、48、96、240小時算出菌落形成單位濃度(CFU/mL)。實施3次噬菌體之評價試驗。於各點，將3次試驗各自之菌落形成單位濃度(CFU/mL)換算成對數後，算出算術平均值±標準誤差(圖2)。對於240小時後之CFU/mL，以單向方差分析及Tukey法之多重比較之方式進行檢定(表2)。

【0110】 表2表示培養後240小時之菌落形成單位濃度(CFU/mL)之檢定結果。*表示若藉由Tukey多重比較檢定法以顯著水準未達5%進行檢定，則於任意兩群間可見有意義差($p<0.05$)，**表示藉由上述檢定法於任意兩群間可見有意義差($p<0.01$)，***表示藉由上述檢定法於任意兩群間可見有意義差($p<0.001$)，n.s.(not significant，不顯著)表示藉由上述檢定法未見有意義差。

【0111】 根據以上，確認到將培養後0小時與96小時之菌落形成單位濃度(CFU/mL)進行比較，結果3株各噬菌體、及噬菌體混合物對鳥分枝桿菌具有減少培養後0小時之細菌數之活性(圖2)。進而，確認到與使各噬菌體單獨發揮作用之情形相比，於以噬菌體混合物發揮作用之情形時，本活性長時間持續(圖2及表2)。

【0112】 [表2]

KCH-ASGF-MA-05	噬菌體混合物(每1.0×10^9 pfu/mL)(合計3.0×10^9 pfu/mL)	噬菌體混合物(每3.3×10^8 pfu/mL)(合計1.0×10^9 pfu/mL)	#123母株(1.0×10^9 pfu/mL)	B1溶原基因缺失株(1.0×10^9 pfu/mL)	D29溶原基因缺失株(1.0×10^9 pfu/mL)
噬菌體緩衝液	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
D29溶原基因缺失株	*	*	n.s.	n.s.	
B1溶原基因缺失株	n.s.	n.s.	n.s.		
#123母株	n.s.	*			

噬菌體混合物(每3.3×10^8 pfu/mL)(合計1.0×10^9 pfu/mL)	n.s.

ATCC 700898	噬菌體混合物(每1.0×10^9 pfu/mL)(合計3.0×10^9 pfu/mL)	噬菌體混合物(每3.3×10^8 pfu/mL)(合計1.0×10^9 pfu/mL)	#123母株(1.0×10^9 pfu/mL)	B1溶原基因缺失株(1.0×10^9 pfu/mL)	D29溶原基因缺失株(1.0×10^9 pfu/mL)
噬菌體緩衝液	***	***	n.s.	n.s.	n.s.
D29溶原基因缺失株	***	***	n.s.	n.s.	
B1溶原基因缺失株	***	**	n.s.		
#123母株	***	**			
噬菌體混合物(每3.3×10^8 pfu/mL)(合計1.0×10^9 pfu/mL)	n.s.				

【0113】 <實施例4：噬菌體混合物於小鼠感染模型中之效力>

刮取於7H10板上生長之包皮垢分枝桿菌之細菌菌落，並懸浮於LB(Luria-Bertani)培養基後，於37℃下進行擴增培養。培養後，分別添加藉由實施例3中記載之方法培養而獲得之D29溶原基因缺失株、B1溶原基因缺失株、或#123母株，於37℃下繼續培養約1日。藉由0.22 μm過濾器對培養後之上清液進行過濾，獲得3株各自之噬菌體溶菌液。繼而，藉由超速離心法對各溶菌液進行精製，獲得噬菌體溶液。

【0114】 使用超速離心法之精製：於各噬菌體溶菌液中添加DNaseI及RNaseA，以使各者之最終濃度為1 μg/mL，於室溫下靜置30分鐘。添加NaCl以使最終濃度為1 M，並溶解，於冰上或冰箱中靜置1小時。添加聚乙二醇8000以使最終濃度為10%w/v，並溶解，於冰上或冰箱中靜置2小時。於11000 g、10分鐘、4℃之條件下進行離心分離操作，去除上清

液，添加噬菌體緩衝液，使沈澱懸浮並回收。向回收之溶液中以每mL0.5 g添加氯化銫，使其平穩溶解，移至超速離心分離用容器。使用注射器將1.45 g/mL、1.5 g/mL、1.7 g/mL之各濃度之氯化銫溶液依序注入容器之底部。於22000 g、2小時、4℃之條件下進行離心分離操作，回收包含噬菌體之帶。包含回收後之噬菌體之溶液藉由透析置換為噬菌體緩衝液，製成噬菌體溶液。確定噬菌體溶液之pfu，於4℃下保管。

【0115】 於向小鼠投予之當日，將藉由上述記載之方法培養而獲得之D29溶原基因缺失株、B1溶原基因缺失株、及#123母株各自之噬菌體溶液調整為5×10^{11} pfu/mL。調整後，將各噬菌體溶液以1：1：1之比混合，製成噬菌體混合物之投予溶液。

【0116】 刮取於7H10板上於37℃下生長約4日之克拉黴素耐藥性細胞內分枝桿菌KCH-ASGF-MAC-475株(自近畿中央呼吸器中心分讓)，並懸浮於生理鹽水。懸浮後，以使用分光光度計，最終OD600＝0.005之方式，藉由生理鹽水對細菌懸浮液進行調整。向20隻裸小鼠(Jackson Laboratory Japan，BALB/c-nu(nu/nu)，7週，雌性)每隻鼻腔內投予40 μL細菌懸浮液，使肺內感染。於感染6～10日後、13～17日後、20～23日後、27～31日後之各日，每隻每日1次(共19次)鼻腔內投予20 μL噬菌體緩衝液或噬菌體混合物之投予溶液。於感染34日後，使小鼠安樂死，之後採集肺組織。使用gentleMACS™ Octo Dissociator(Miltenyi Biotec)於生理鹽水中粉碎肺組織，獲得粉碎溶液。算出粉碎溶液之菌落形成單位濃度(CFU/mL)，表示為肺中之細菌數(CFU/肺)(圖3)。

【0117】 圖3表示肺中之細菌數(CFU/肺)之檢定結果。表示若藉由無對應之t檢定法以顯著水準未達5%檢定兩群間之差，則於噬菌體混合物

投予組與噬菌體緩衝液投予組間可見有意義差($p<0.001$)。

【0118】 根據以上，確認於使用小鼠之活體內肺感染模型中，噬菌體之混合物具有殺菌活性。

[產業上之可利用性]

【0119】 期待本發明之噬菌體及醫藥組合物對預防或治療非結核性分枝桿菌症例如MAC症或肺MAC症有用。

【0120】 [寄存編號]

寄存編號NITE BP-03513(噬菌體D29溶原基因缺失株D29Δ，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03514(噬菌體B1溶原基因缺失株B1Δ，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03515(噬菌體Y2溶原基因缺失株Y2Δ，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03516(噬菌體#33溶原基因缺失株#33Δ，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03517(噬菌體#63溶原基因缺失株#63Δ，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03518(噬菌體#105母株，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03519(噬菌體#123母株，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03520(噬菌體#33母株，2021年8月26日寄存)

寄存編號NITE BP-03521(噬菌體#63母株，2021年8月26日寄存)

【生物材料寄存】

[主張利用生物材料1]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03513

[主張利用生物材料2]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03514

[主張利用生物材料3]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03515

[主張利用生物材料4]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03516

[主張利用生物材料5]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03517

[主張利用生物材料6]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03518

[主張利用生物材料7]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03519

[主張利用生物材料8]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03520

[主張利用生物材料9]

[寄存國家]JP日本

[寄存機構]獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利微生物寄存中心

[寄存日期]2021/08/26

[寄存號碼]NITE BP-03521

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種噬菌體，其選自下述(1)～(7)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列；以及

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【請求項2】

如請求項1之噬菌體，其選自下述(1)～(7)：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(4)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(5)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(6)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(7)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列。

【請求項3】

如請求項1或2之噬菌體，其選自下述(1)～(7)：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(4)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(5)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(6)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(7)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【請求項4】

一種噬菌體，其選自下述(1)～(7)：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體、或其繼代株；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體、或其繼代株；

(3)由寄存編號NITE BP-03515所特定之噬菌體、或其繼代株；

(4)由寄存編號NITE BP-03516所特定之噬菌體、或其繼代株；

(5)由寄存編號NITE BP-03517所特定之噬菌體、或其繼代株；

(6)由寄存編號NITE BP-03518所特定之噬菌體、或其繼代株；及

(7)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體、或其繼代株。

【請求項5】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之噬菌體及藥學上容許之賦形劑。

【請求項6】

一種醫藥組合物，其包含至少2種如請求項1至4中任一項之噬菌體，且包含藥學上容許之賦形劑。

【請求項7】

一種醫藥組合物，其包含3種如請求項1至4中任一項之噬菌體，且包含藥學上容許之賦形劑。

【請求項8】

如請求項5至7中任一項之醫藥組合物，其係非結核性分枝桿菌症之預防或治療用醫藥組合物。

【請求項9】

如請求項8之醫藥組合物，其中非結核性分枝桿菌症係肺MAC症。

【請求項10】

一種醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體及藥學上容許之賦形劑：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組(a)包含與由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列，且(b)整合酶基因及/或免疫抑制基因缺失；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含與由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列具有90%以上之同一性的核酸序列。

【請求項11】

如請求項10之醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；

(2)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列；以及

(3)一種噬菌體，其對鳥分枝桿菌及/或細胞內分枝桿菌具有溶菌活性，並且該噬菌體之基因組包含由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌

體之基因組之核酸序列。

【請求項12】

如請求項10或11之醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體：

(1)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；

(2)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成；及

(3)一種噬菌體，其中噬菌體之基因組係由：由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體之基因組之核酸序列所構成。

【請求項13】

一種醫藥組合物，其包含下述(1)～(3)之噬菌體及藥學上容許之賦形劑：

(1)由寄存編號NITE BP-03513所特定之噬菌體、或其繼代株；

(2)由寄存編號NITE BP-03514所特定之噬菌體、或其繼代株；及

(3)由寄存編號NITE BP-03519所特定之噬菌體、或其繼代株。

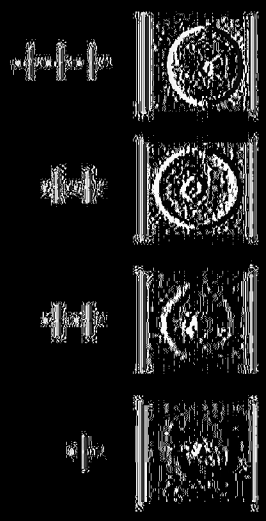
【請求項14】

如請求項10至13中任一項之醫藥組合物，其係非結核性分枝桿菌症之預防或治療用醫藥組合物。

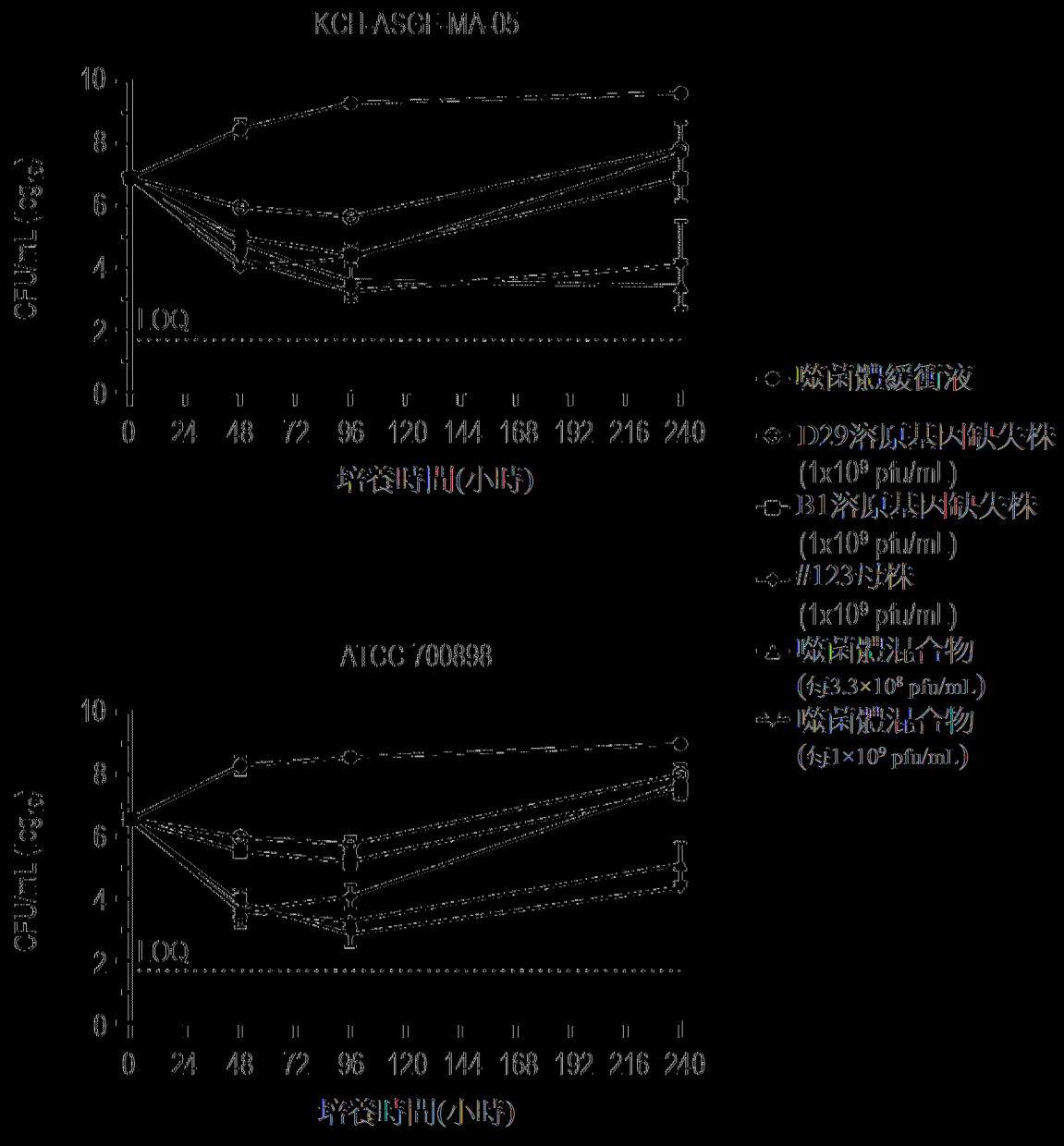
【請求項15】

如請求項14之醫藥組合物，其中非結核性分枝桿菌症係肺MAC症。

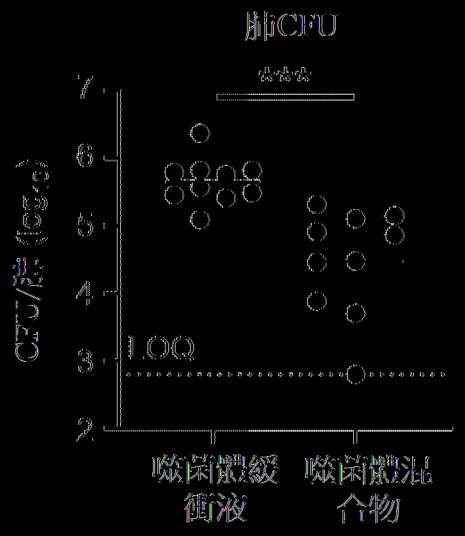
[發明圖式]



[圖1]


KCTC ASCC MA 05
CFU/mL (log)
10
8
6
4
2
0
LOQ
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240
培養時間(小時)
噬菌體緩衝液
D29溶原基因缺失株
(1x10⁹ pfu/ml)
B1溶原基因缺失株
(1x10⁹ pfu/ml)
#123母株
(1x10⁹ pfu/ml)
噬菌體混合物
(約3.3×10⁸ pfu/mL)
噬菌體混合物
(約1×10⁹ pfu/mL)
ATCC 700698
CFU/mL (log)
10
8
6
4
2
0
LOQ
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240
培養時間(小時)

[圖2]



N=10, 平均值
非配對檢定, ***: p<0.001

|(圖3)|