(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0025075
(43) 공개일자 2021년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/40 (2006.01) *A61K 31/198* (2006.01)
A61K 31/4706 (2006.01) *A61K 31/525* (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/40 (2013.01)
A61K 31/198 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7002442
(22) 출원일자(국제) 2019년06월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년01월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/040008
(87) 국제공개번호 WO 2020/006528
국제공개일자 2020년01월02일
(30) 우선권주장
62/692,581 2018년06월29일 미국(US)

(71) 출원인
더 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스 하스피탈
미국 43205 오하이오주 콜럼버스 칠드런스 드라이브 700 룸 더블유172
(72) 발명자
굿맨 스티븐 데이비드
미국 오하이오 43205 콜럼버스 칠드런스 드라이브 700 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스 하스피탈 내
바칼레츠 로렌 오프렘칵
미국 오하이오 43205 콜럼버스 칠드런스 드라이브 700 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스 하스피탈 내
(74) 대리인
특허법인와이에스장

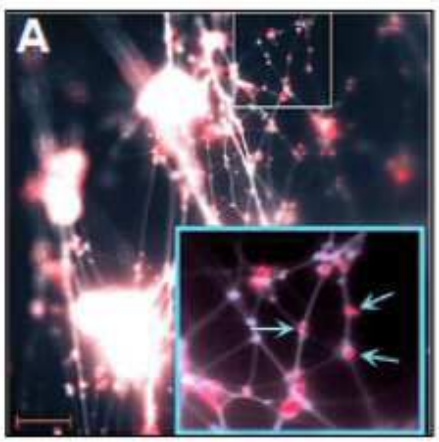
전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 **EPS를 매개하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 개시물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한 본원에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에 추가로 기재되어 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/4706 (2013.01)
A61K 31/525 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 31/04 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 2

대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 3

생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막의 형성을 방지하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 4

필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발되는 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 5

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 6

대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 7

생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막의 형성을 방지하기 위한 방법으로서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 8

필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 9

제1 항 또는 제5 항에 있어서, 접촉 단계는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방

법.

청구항 10

제1 항, 제5 항 또는 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제는 tRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 폴리아민 합성 또는 DNA로의 폴리아민의 결합을 억제하는 작용제의 억제자이며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리아민은 푸트레신, 스페르민, 카다베린, 1,3-다이아미노프로판 또는 스페르미딘의 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11 항에 있어서, 작용제는 폴리아민 유사체 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드, 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존] (MGBG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 선택적으로 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14 항에 있어서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스, 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체의 군으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제와 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉 단계는 양이온이 고갈된 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 17

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉 단계는 양이온이 고갈된 하나 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 18

제1 항 내지 제9 항 또는 제16 항 또는 제17 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제16 항 내지 제18 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제16 항 내지 제18 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제16 항 내지 제18 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 시험관 내에서 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉 단계는 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법으로서, 시험관 내에서 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉 단계는 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 25

전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 26

제22 항 또는 제25 항에 있어서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제22 항 또는 제25 항에 있어서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제22 항 또는 제25 항에 있어서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방

법으로서, 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따른 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 32

화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따른 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아닌, 방법.

청구항 33

제31 항 또는 제32 항에 있어서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제31 항 또는 제32 항에 있어서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제31 항 또는 제32 항에 있어서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따른 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따른 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제1 항 또는 제5 항에 있어서, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제38 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제2 항 내지 제39 항에 있어서, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제40 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제14 항 또는 제15 항에 있어서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 음전하를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제14 항 또는 제15 항에 있어서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 중성 전하를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제38 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 음전하를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제38 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 중성 전하를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제38 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 양전하를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제1 항 내지 제46 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 DNAse 효소의 투여의 부재 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제 중 하나, 둘, 또는 셋 이상을 포함하는 조성물.

청구항 49

제48 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 50

제48 항 또는 제49 항에 있어서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제는 폴리아민 유사체 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드, 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존](MGBG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판, 옥살리플라틴, 시스플라틴 및/또는 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 51

제48 항 또는 제49 항에 있어서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드, 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스 및/또는 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 52

제48 항 또는 제49 항에 있어서, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제

는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물, 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체, 및/또는 클로로퀸, 또는 이것들 중 어느 것의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 53

제48 항 또는 제49 항에 있어서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 54

제48 항 내지 제53 항 중 어느 한 항의 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트로서, 선택적으로 작용제는 조합되거나 별도로 포장되는, 키트.

청구항 55

제54 항에 있어서, 사용 설명서는 제1 항 내지 제47 항 중 어느 한 항의 방법을 실행하기 위한 방향을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2018년 6월 29일에 출원된 미국 가출원 번호 62/692,581에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **분야**

[0004] 본 개시물은 일반적으로 박테리아 세포외 폴리머 물질 (extracellular polymeric substance: EPS)을 제거하거나 억제하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 생물막은 의료, 농업, 및 산업 환경에서 중요한 역할을 한다. 생물막은 동물 및 식물 모두에서 상당 부분의 질환, 뿐만 아니라 산업 설비의 부착물(fouling)의 원인이 되고, 이와 같이 집중적인 연구 노력의 초점이 맞추어진다. 생물막의 박멸 또는 치료는 항미생물 효과기에 대한 물리적 장벽을 형성하는 세포외 매트릭스의 생산, 스트레스 요인에 덜 민감한 변화된 생리학, 및 생물막의 구성요소들 간의 협력적 상호작용을 포함한 여러 요인들로 인해 달성하는 것이 특히 어렵다. 생물막 매트릭스는 가변적으로 다당류, 단백질, 및, 아마도 보편적으로, 세포외 DNA (eDNA)로 구성된다. 미생물 생물막의 eDNA는 보호를 제공하는 세포외 매트릭스의 중요한 구성요소이다. DNA 분해 또는 구조를 안정화시키는 DNA 결합 단백질의 제거를 통해 생물막 eDNA 구조를 약화시키는 것은 생물막의 심각한 붕괴 및 체류 박테리아의 더 취약한 상태로의 방출을 초래한다.

[0006] 박테리아는 두 가지 별개의 상태로 자연에서 발견되는데; 부유성 박테리아는 자유 생활을 하지만, 공동체 아키텍쳐(community architecture)으로 발달하는 박테리아는 생물막이라고 불린다 (표면 상에서 또는 응집체로서). CDC 및 NIH는 모든 박테리아 감염의 대략 80%가 필수적인 생물막 상태를 수반한다고 추정한다. Dongari-Bagtzoglou et al. (2008) Expert Rev Anti Infect Ther. 6(2):201-8. 이것들은 많은 다른 것들 중에서 분비성 중이염 (otitis media: OM), 만성 부비동염 (chronic rhinosinusitis: CRS), 만성 폐 감염, 만성 상처 감염, 치주염(periodontitis), 방광염(cystitis), 및 의학적 이식물 및 내재 카테터(indwelling catheter)의 감염을 포함한다. 실제로, 소아과 진료를 찾는 가장 일반적인 이유 중 하나는 OM이고 [비피막형 해모필루스 인플루엔재(Nontypeable *Haemphilus influenzae*: NTHI), 스트렙토코쿠스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)에 의해 유발됨] 성인에서는, 방광염이며 [예를 들어, 요로 병원성 대장균(Uropathogenic *E. coli*: UPEC)]; 따라서 항생제 처방이 이들 불만사항에 대해 가장 일반적이다. 미국 내에서는, 매년 500,000명의 사망이 박테리아 생물막 감염의 직접적인 결과에 기인하는 것으로 추정된다. 경제적인 영향은 엄청나다 [만성 상처에 대해 $25B (10억), 치주염에 대해 $14B, OM에 대해 $5B, 및 방광염에 대해 $1B]. 생물막-매개된 질환의 세계적인 유병률, 특히 최우선 순위의 ESKAPE 병원체 (엔테로박터 종(*Enterobacter* spp.), 스타필로코쿠스 아우레우스(*staphylococcus aureus*), 클레브시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 엔테로코

쿠스 패시움(*Enterococcus faecium*)) 중에서, 항생제 저항성 박테리아 감염의 증가한 비율, 및 큰 재정적인 부담은 조직화된 박테리아 공동체에 의해 유발되는 저항성 감염을 치료하기 위한 신규한 접근법을 개발할 결정적인 필요성을 생성한다.

[0007] 따라서, 관련된 박테리아 감염을 치료하거나 사멸시키기 위해 생물막의 보호 장벽을 돌파하고 표면 및 수계에서 그것들을 제거할 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0008] 면역 클리어런스(cleanrance) 및 항미생물제로부터 생물막 내에 체류하는 박테리아를 보호하는 자가 생산된 세포외 매트릭스 (또는 세포외 폴리머 물질, EPS)는 병원성 생물막이 만성 및 재발성 감염을 유발하는데 필수적인데, 생물막이 이들 질환 유발 박테리아의 저항성 레저버(reservoir)의 역할을 하기 때문이다. EPS 구성요소는 개개의 박테리아 종에 특이적이지만, 보편적으로 생물막 내에 체류하는 박테리아로부터 유래된 세포외 DNA (eDNA)를 함유한다. 실제로, 다양한 속(genus)의 박테리아가 전형적으로 다종 생물막의 공유 공동체 아키텍처로 진입하며, 이것은 EPS가 모든 구성 종에 구조적으로 도움이 되지만, 모든 체류 박테리아에 의해 유래되거나, 또는 그것들에 사용 가능한 EPS 요소를 함유하는 것을 필요로 한다. 이 점에 있어서, 단종 및 다종 생물막의 EPS는 보편적인 기본 EPS의 일반적인 구조인 것으로 보이는 스캐폴드된(scaffolded) eDNA를 함유한다. 본원에 개시된 바와 같이, 출원인들은 이 eDNA-의존적 구조가 박테리아 DNA-결합 단백질의 편재한 DNABII 패밀리에 의해 안정화된다는 것을 발견하였다. 출원인들이 외인성 DNA 및 DNABII 단백질이 자유 생활 (부유성) 박테리아를 생물막의 공동체 아키텍처로 유도할 수 있다는 것을 보여주었지만, 이들 두 구성요소는 시그니처(signature) eDNA 스캐폴드를 개괄하기에는 불충분하다.

[0009] 출원인들은 폴리아민이 보편적인 eDNA-DNABII 의존적 EPS의 제3의 중요한 구성요소라는 것을 본원에 개시한다. 폴리아민은, DNA에 결합될 때, 뉴클레오타이드 포스페이트의 다가음이온성 전하를 중성화시키고 DNA 분자를 응축/응집시키는, 세포내 및 세포외 둘 다에 편재한 짧은 양전하 유기 분자이다. 중요하게, 출원인들은 폴리아민이 DNA를 가장 일반적인 반시계 방향(right handed) B형에서 뉴클레아제 저항성인 시계 방향(left handed) Z형 DNA로 유도할 수 있다는 것을 본원에 개시한다. 실제로, 뉴클레아제가 박테리아 생물막 형성을 방지할 수 있지만, 그것들은 성숙한 생물막을 붕괴시킬 수는 없다. 생물막이 성숙함에 따라, 그것들의 뉴클레아제 저항성의 획득은 (1) 폴리아민의 증가 및 (2) Z형 DNA의 출현 둘 다에 부수적으로 따른다.

[0010] 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에 기재되는데, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 본 개시물은 또한 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법에 관한 것으로, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제와 생물막을 시험관 내에서(in vitro) 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 양이온이 고갈된 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 것을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어지고, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 양이온이 고갈된 하나 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 것을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 접촉 단계는 시험관 내에서 또는 생체 내에서(in vivo) 이루어질 수 있다.

[0011] 한 구체예에서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 제2 구체예에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제3 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다.

[0012] 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에 추가로 기재되는데, HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성

단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 것을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어진다. 본 개시물은 또한 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법에 관한 것으로, 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 것을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어진다. 접촉 단계는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 이루어질 수 있다.

[0013] 또한 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 제공되는데, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다.

[0014] 본 개시물은 또한 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법에 관한 것으로, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다.

[0015] 본 개시물은 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법과 추가로 관련이 있는데, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다.

[0016] 상기 기재된 방법 중 어느 것에 대하여, 폴리아민은 푸트레신, 스페르민, 카다베린, 1,3-다이아미노프로판 또는 스페르미딘의 군으로부터 선택될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 기재된 방법에 대하여, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제는 tRNA이다. 또 다른 구체예에서, 작용제는 폴리아민 합성의 억제자 또는 DNA로의 폴리아민의 결합을 억제하는 작용제이다. 제2 구체예에서, 작용제는 폴리아민 유사체 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드, 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존] (MGBG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제3 구체예에서, 작용제는 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 선택적으로 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스, 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체의 군으로부터 선택된다. 제5 구체예에서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 제6 구체예에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제8 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제9 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순(net) 음전하를 갖는다. 또 다른 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 중성 전하를 갖는다.

[0017] 또한 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus: SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis: CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 제공되는데, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지는, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에 개시되며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여된다. 한 구체예에서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 제2 구체예에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제3 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[c]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 클로로퀸 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다.

[0018] HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지는, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 또한 본원에서 제공된다. 한 양태에서, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 결핵 (tuberculosis: TB)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 본 개시물은 또한 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지는, 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, 방법은 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여된다. 추가의 양태에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 특정 양태에서, 클로로퀸 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다. 추가의 양태에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[c]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다.

[0019] 본 개시물은 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지는, 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법과 추가로 관련이 있다. 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지는, 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법이 또한 본원에서 제공된다.

[0020] 상기 기재된 방법은 DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을, 생물막에 접촉시키거나, 또는 대안으로 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있으며, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 양태에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방

해하는 작용제는 순 음전하를 갖는다. 제2 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 중성 전하를 갖는다. 제3 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 양전하를 갖는다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여된다. 상기 기재된 방법은 DNAse 효소의 투여의 부재 하에 수행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1A - 1C: 폴리아민은 DNA 구조를 조절한다. (도 1A)** NTHI로 인한 급성 OM에 걸린 친칠라 중이에서 발견된 점막 생물막 EPS의 면역 형광 현미경 이미지 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37로부터 수정됨). DNABII 단백질 (회색 공) 및 eDNA (흰색 영역)에 대해 탐침됨. DNABII는 생체 내에서 생물막의 eDNA 가닥 정점에 국한된다. **(도 1B)** 일반적인 폴리아민의 화학적 구조 (Di Martino et al. (2013) Int J Med Microbiol. 303(8):484-91로부터 수정됨). **(도 1C)** DNA 단독 또는 폴리아민과 함께 인큐베이션된 후의 DNA의 원자력 현미경 이미지 (Iacomino et al. (2011) Biomacromolecules. 12(4):1178-86으로부터 수정됨). 폴리아민은 eDNA에서 두꺼운 섬유 형성 및 구조적 복잡성을 유도한다.

도 2A - 2B: 폴리아민은 eDNA 스캐폴드 구조를 유도한다. (도 2A) NTHI로 인한 급성 OM에 걸린 친칠라 중이에서 발견된 점막 생물막 EPS의 면역 형광 CLSM 이미지. 폴리아민 (흰색 점) [푸트레신 (Put), 카다베린 (Cad), 스페르미딘 (Spd)] 및 eDNA (흰색)에 대해 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 대비염색됨. 폴리아민은 생체 내에서 형성된 생물막의 eDNA 가닥에 국한되고; 스페르미딘이 생물막 EPS에서 가장 일반적인 폴리아민이다. **(도 2B)** DNA (5 μM) 및 스페르미딘 (700 μM)의 복합체 (상단) 및 DNA (5 μM), 스페르미딘 (700 μM), 및 HU (50 nM)의 복합체 (하단)의 투과 전자 현미경 이미지 (Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951 61로부터 수정됨). 유사한 구조가 DNA-폴리아민-IHF 복합체에 의해 형성된다. Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48(4):667-75. 폴리아민은 DNA 응축을 유도하고 DNABII 단백질과 조합되어 두꺼운 섬유를 형성한다.

도 3A - 3C: 폴리아민 합성 억제자는 생물막 형성을 감소시킨다. (도 3A) 다이사이클로헥실아민 (DCHA, 50 μM), 스페르미딘 (Spd) 신타제 억제자, Spd (1 mM), 또는 둘 다의 존재 하에 성장한 LIVE/DEAD® 염색된 NTHI 생물막의 COMSTAT 정량화. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트 (unpaired t-test), *P<0.05에 의해 평가되었다. 생물막의 평균 두께는 DCHA에 의해 감소하였지만, 외인성 Spd의 동시 추가는 생물막 형성을 복원하였다. **(도 3B)** DCHA (50 μM)의 존재 하에 3h 동안 성장한 NTHI 시험관 내 생물막에서 eDNA 스캐폴드 구조의 면역 형광 현미경 이미지. dsDNA (흰색 영역)에 대해 탐침됨. eDNA 스캐폴드 구조 생산은 폴리아민 합성의 억제에 의해 크게 감소된다. **(도 3C)** DCHA의 존재 하에 40h 동안 성장한 NTHI 시험관 내 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지. Spd (도 3C 하부 패널에서 흰색 점)에 대해 탐침되고 DAPI (회색 영역)로 대비염색됨. DCHA는 생물막 EPS로의 폴리아민 통합을 억제한다.

도 4A - 4B: 항-DNABII는 DNABII-폴리아민 (PA) 의존적 구조를 방해한다. (도 4A) DNA 구조는 게놈 DNA (gDNA; 2 μg/ml)를 함유한 완충액에서 40h 동안 스페르미딘 (300 μM) 및 HU (1 μM)를 인큐베이션하여 형성된다. DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조의 면역 형광 CLSM 이미지. DNABII 단백질 (흰색; 이미지의 우측에 표시됨)에 대해 탐침되고 DAPI (흰색; 이미지의 좌측에 표시됨)로 대비염색됨. DNABII 폴리아민 의존적 DNA 구조는 DNABII 단백질을 포함한다. **(도 4B)** EPS 구조는 24h 동안 **(도 4A)**에서와 같이 형성되었고 추가로 16h 동안 DNABII 항혈청 (이미지 아래에 표시됨)의 1:50 희석액이 처리되었다. 형광 발광 CLSM 이미지는 DAPI (흰색)로 염색되었다. DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조는 DNABII 단백질을 필요로 한다.

도 5: 양이온 교환체 포스포셀룰로스 (P11)는 NTHI 생물막 형성을 방해한다. NTHI 생물막 성장은 P11 (1%)이 정단(apical) 챔버에 추가되는 동안 트랜스웰(transwell) 플레이트 시스템의 기저측부 챔버에서 시작되었다. 스페르미딘 (1 mM) 및 HU (1 μM)가 분주시 추가되고 16h 동안 유지되었다. 생물막은 CLSM을 통해 가시화되고 COMSTAT에 의해 분석되었다. 평균 두께 (미도시)는 동일한 추세를 나타냈다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다. P11은 생물막 형성을 방지한다. 외인성 스페르미딘 및 HU는 함께 생물막 발달을 복원시키지만, 단독으로는 그렇지 않으며 (미도시), 이는 P11 항생물막 활성이 생물막 EPS로부터 구조적 구성요소 (폴리아민 및 DNABII 단백질)를 적정한 결과임을 시사한다.

도 6: 성숙한 생물막은 DNase에 의한 붕괴에 대해 저항성이다. DNase (Pulmozyme; 5 유닛)가 분주시 (방지) 또는 24h에 (붕괴) 각각의 시험관 내에서 수행된 NTHI 및 UPEC 생물막에 추가되었다. 총 40h 이후, 생물막은 LIVE/DEAD®로 염색되고, CLSM를 통해 가시화되고 COMSTAT에 의해 분석된다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다. DNase는 잔존 생물막을

방지할 수 있지만, 이것을 붕괴시킬 수 없다.

도 7A - 7D: DNABII 단백질 및 폴리아민 (PA)는 상승적으로 상호작용하여 DNase 저항성을 유도한다. (도 7A) 40h 동안 성장한 NTHI 시험관 내 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지. 스페르미딘 (진회색 공), HU (연회색 공)에 대해 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 대비염색됨. 폴리아민 및 DNABII 단백질은 시험관 내에서 생물막 EPS (흰색 공)에 공존한다. **(도 7B)** NTHI로 인한 급성 OM에 걸린 친칠라 중이에서 발견된 점막 생물막 EPS의 면역 형광 CLSM 이미지. 푸트레신 (흰색 공) 및 HU (연회색 공)에 대해 탐침되고, DAPI (진회색 영역)으로 대비염색됨. 폴리아민 및 DNABII 단백질은 생체 내에서 생물막의 eDNA 가닥 (흰색 영역)에 공존한다. **(도 7C)** 별도로 또는 함께 증가하는 수준의 스페르미딘 (Spd) 및 HU가 37℃에서 1.5h 동안 게놈 DNA (2 μg/ml)와 함께 인큐베이션된 후 이어서, 20분 동안 Pulmozyme®로 처리된다. DNA 분해는 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분석되었다. Spd 및 HU는 DNase 분해로부터 게놈 DNA를 상승적으로 보호한다. **(도 7D)** Spd (300 μM) 및 HU (1 μM)는 40h 동안 게놈 DNA (2 μg/ml)와 함께 인큐베이션된 후 이어서, 20 min 동안 Pulmozyme® 처리되었다. 구조는 LIVE/DEAD®로 염색되고 CLSM (흰색)에 의해 이미지화되었다. HU-Spd 의존적 DNA 구조는 DNase 처리에 대해 저항성이다.

도 8A - 8B: DNABII 및 폴리아민은 조합되어 B-DNA 형태를 Z-DNA 형태로 전환시킨다. (도 8A) DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조는 게놈 DNA (2 μg/ml)을 16h 동안 HU (1 μM) 및 스페르미딘 (300 μM)와 함께 인큐베이션함으로써 형성되었다. DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조의 면역 형광 CLSM 이미지. Z-DNA (흰색)에 대해 탐침되고 DAPI (진회색)로 염색되었다. 폴리아민 및 DNABII 단백질은 상승작용하여 B-DNA에서 Z-DNA로의 전환을 유도한다. **(도 8B) 상단:** Z-DNA 촉매의 농도를 증가시킴으로써 Z-DNA로 전환되는 B-DNA 기질의 원편광 이색성 스펙트럼(circular dichroism spectrum) (Jang et al. (2015) Sci Rep. 5:9943으로부터 수정됨). 250 nm 주위에서 음의 피크 및 280 nm 주위에서 양의 피크의 반전을 주목해야 한다. **하단:** 폴리 (dGdC) DNA (20 μg/ml)는 2h 동안 HU (15 μM)와 함께 인큐베이션되었고 CD 스펙트럼이 수집되었다. HU는 폴리 (dGdC)의 CD 스펙트럼을 Z-DNA 시그니쳐로 이동시킨다.

도 9: Z-DNA는 다수의 인간 병원체의 생물막 EPS 내에 존재한다. 상단: 1차 항체 없이 (1° 없음) 또는 Z-DNA 항체 (흰색)로 탐침된, 표시된 박테리아의 40h 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지. Z-DNA는 상이한 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS의 구성요소이다. **하단:** HU (흰색) 및 스페르미딘 (진회색) 항체로 탐침된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 공존은 (흰색)이다. DNABII 및 폴리아민 구성요소는 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS에 공존하며 Z-DNA 풍부함과 연관성이 있다.

도 10: Z-DNA 및 폴리아민은 UPEC 및 NTHI 생물막이 성숙함에 따라 풍부함이 증가한다. 다양한 형성 스테이지에서 UTI89 및 NTHI 시험관 내 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 항-Z-DNA (흰색), 또는 항-스페르미딘 (진회색)으로 탐침됨. 성숙한 생물막은 생물막 EPS 내에서 시간이 흐름에 따라 증가하는 양의 Z-DNA (흰색) 및 스페르미딘 (진회색)을 포함한다.

도 11: HU는 B-DNA에서 Z-DNA로의 전환 및 생물막 EPS로의 폴리아민의 통합을 필요로 한다. 40h NTHI 야생형 및 ΔHU 돌연변이 시험관 내 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 스페르미딘 (진회색) 또는 항-Z-DNA (흰색)로 탐침됨. HU의 부재 하에, 폴리아민 및 Z-DNA는 생물막 EPS 내에서 풍부함이 감소한다.

도 12: 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버 글라스 슬라이드 내의 보충된 BHI 배지에서 40 h 동안 성장되었다. 생물막은 세척되고, 표시된 1차 항체, 형광 2차 항체 (진회색 점)으로 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 염색되었다. 주: 하단 가장 왼쪽 이미지에서 최소 진회색 염색은 배경을 나타낸다. 푸트레신, 스페르미딘, 및 스페르민은 모두 생물막 매트릭스 전반에 걸쳐 존재하였다.

도 13: 비피막형 해모필루스 인플루엔재는 37℃ 및 5% CO_2에서 96웰 플레이트 내의 상기 나타난 바와 같이 첨가제를 함유하는 보충된 BHI 배지에서 16 h 동안 성장되었다. 성장은 490 nm에서의 분광 광도법적 흡광도 (왼쪽) 및 콜로니 형성 유닛의 계수 (오른쪽)에 의해 정량화되었다. 스페르미딘 신타제 억제자는 정상적인 성장에 영향을 미치지 않았다.

도 14: 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드 내의 아래에 각각의 막대로 표시된 바와 같이 첨가제를 함유하는 보충된 BHI 배지에서 40 h 동안 성장되었다. 생물막은 세척되고, LIVE/DEAD®로 염색되고, 고정되고, CLSM에 의해 이미지화되었다. 생물막 파라미터는 COMSTAT 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다. 다이사이클로헥실아민은 생물막 생물 발생을 억제하는 한편, 외인성 스페르미딘은 생물막 성장을 구제할 수 있었다.

도 15: 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드 내의 상기 표시된 첨가제를 함유하는 보충된 BHI 배지에서 40 h 동안 성장되었다. 생물막은 세척되고, 스페르미딘에 대한 1차 항체, 형광 2차 항체 (진회색 점)로 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 염색되었다. 스페르미딘 신타제 억제자는 생물막 매트릭스에서 스페르미딘의 존재를 감소시켰다.

도 16: 표면 부착된 비피막형 해모필루스 인플루엔재는 37℃ 및 5% CO_2에서 플루오로디쉬 커버글라스 접시 내의 상기 표시된 첨가제를 함유하는 보충된 BHI 배지에서 3 h 동안 성장되었다. 생물막은 세척되고, 이중 가닥 DNA에 대한 1차 항체 및 형광 2차 항체 (흰색)로 탐침되었다. 스페르미딘 신타제 억제자는 생물막 매트릭스 내에서 세포외 DNA 구조의 존재 및 복잡성 둘 다를 감소시켰다.

도 17A - 17D: 스페르미딘은 다수의 인간 병원체에 의해 형성된 생물막 EPS 내에 존재한다. (도 17A). HU (연회색) 및 스페르미딘 (진회색) 항체로 탐침된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 공존은 흰색이다. DNABII 및 폴리아민 구성요소는 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS에 공존한다. **(도 17B)** 스페르미딘 생합성의 다이사이클로헥실아민 (DCHA) 억제는 IF 신호의 감소로 표시되는 NTHI 및 UPEC 생물막에서의 스페르미딘 수준을 감소시키고, sBHI 대조군과 비교하여 평균 두께를 크게 감소시킨다 **(도 17C).** 퍼센트로 표시된 UPEC는 LB 대조군과 비교하여 평균 두께를 변화시킨다 **(도 17D).**

도 18A - 18B: 포스포셀룰로스는 시험관 내에서 생물막 형성 및 사전 형성된 NTHI 생물막 안정성에 대해 용량-의존적인 부정적인 효과를 나타낸다. (도 18A) 생물막 성장이 시작된 다음 24hr 동안 유지되고 16hr 동안 0 (SBHI 대조군), 0.1%, 1%, 및 5% (w/v)의 포스포셀룰로스 (P11)가 처리되었다. **(도 18B)** 생물막 성장이 시작된 다음 0 (sBHI 대조군), 0.1%, 1%, 및 5% (w/v)의 (P11)의 존재 하에 40hr 동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다.

도 19: 헤파린 세파로스는 시험관 내에서 NTHI 생물막 형성에 대한 부정적인 효과를 나타낸다. 생물막 성장이 시작된 다음 0 (sBHI 대조군) 또는 5% (w/v)의 헤파린 세파로스 수지의 존재 하에 40hr 동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다.

도 20: HU의 외인성 추가는 시험관 내에서 NTHI 생물막 안정성에 대한 포스포셀룰로스의 부정적인 효과를 구제한다. 생물막 성장이 시작되었고 24hr 동안 유지된 다음, 16hr 동안 표시된 바와 같이 처리되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되고 sBHI 대조군과 비교되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다.

도 21: $MgCl_2$의 외인성 추가는 시험관 내에서 NTHI 생물막 안정성에 대한 포스포셀룰로스의 부정적인 효과를 구제한다. 생물막 성장이 시작되었고 24hr 동안 유지된 다음, 16hr 동안 표시된 바와 같이 처리되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다.

도 22: 스페르미딘의 외인성 추가는 시험관 내에서 NTHI 생물막 안정성에 대한 포스포셀룰로스의 부정적인 효과를 구제한다. 생물막 성장이 시작되었고 24hr 동안 유지된 다음 16hr 동안 표시된 바와 같이 처리되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다.

도 23: P11 포스포셀룰로스의 양이온 고갈 효과는 생물막과의 직접적인 접촉을 필요로 하지 않는다. 생물막 성장이 트랜스웰 플레이트 시스템의 기저측부 챔버에서 시작되는 한편 0, 0.5, 1, 또는 1.5% (w/v) P11 포스포셀룰로스가 정단 챔버에 추가되었고 16hr 동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되고 sBHI 대조군과 비교되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다.

도 24: 스페르미딘의 외인성 추가는 생물막과의 직접적인 접촉을 필요로 하지 않으면서 P11 포스포셀룰로스의 양이온 고갈 효과를 감소시킨다. 생물막 성장이 트랜스웰 플레이트 시스템의 기저 챔버에서 시작되는 한편 0 또는 1.5% (w/v) P11 포스포셀룰로스가 정단 챔버에 추가되고 100, 500 또는 1000uM 스페르미딘의 존재 하에 16hr

동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되고 sBHI 대조군과 비교되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다. 괄호는 조건들 간의 통계적인 비교를 나타낸다.

도 25: 스페르미딘 및 DNABII의 외인성 추가는 생물막과의 직접적인 접촉 없이 P11 포스포셀룰로스의 양이온 고갈 효과를 감소시킨다. 생물막 성장이 트랜스웰 플레이트 시스템의 기저측부 챔버에서 시작되는 한편 0 또는 1.5% (w/v) P11 포스포셀룰로스가 정단 챔버에 추가되고 100uM 스페르미딘 또는 500nM HU의 존재 하에 또는 조합으로 16hr 동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되고 sBHI 대조군과 비교되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다. 괄호는 조건들 간의 통계적인 비교를 나타낸다.

도 26A - 26B: 양이온 교환 수지로 비생물(abiotic) 표면을 코팅하는 것은 용량-의존적인 방식으로 생물막 형성을 방지한다. 챔버 슬라이드가 표시된 바와 같이 P11 포스포셀룰로스 **(도 26A)** 또는 헤파린 세파로스 **(도 26B)** 용액으로 코팅되었다. 생물막 성장이 시작되었고 코팅된 슬라이드에서 40hr 동안 유지되었다. 생물막은 식염수로 세척되고 LIVE/DEAD® 염색으로 염색되었다. 이미지는 평균 두께 및 생물량을 계산하기 위해 COMSTAT로 분석되었다. 모든 이미지는 63X 대물렌즈로 캡쳐되었다. 막대는 SEM을 나타낸다.

도 27: 성숙한 생물막은 DNase에 의한 붕괴에 대해 저항성이다. DNase (Pulmozyme; 5 유닛)이 분주시 (방지) 또는 24 h에 (붕괴) 각각의 시험관 내에서 사전 형성된 NTHI 및 UPEC 생물막에 추가되었다. 총 40h 이후, 생물막은 LIVE/DEAD®로 염색되고, CLSM를 통해 가시화되고 COMSTAT에 의해 분석된다. 막대는 SEM을 나타낸다. 생물량에 대해 유의한 추세가 관찰되었다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 독립표본 t-테스트, *P<0.05; **P<0.01에 의해 평가되었다. DNase는 잔존 생물막을 방지할 수 있지만, 이것을 붕괴시킬 수는 없다.

도 28: Z-DNA 및 폴리아민은 UPEC 및 NTHI 생물막이 성숙함에 따라 풍부함을 증가시킨다. 다양한 성숙화 스테이지에서 시험관 내에서 형성된 UPEC 및 NTHI 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 항-Z-DNA (연회색), 또는 항-스페르미딘 (진회색)으로 탐침됨. 성숙한 생물막은 시간이 흐름에 따라 생물막 EPS 내에서 증가하는 양의 Z-DNA (연회색) 및 스페르미딘 (진회색)을 포함한다.

도 29: Z-DNA는 성숙한 병원성 균류 생물막에 존재한다. 시험관 내에서 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 형성된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, DAPI로 대비염색되고, 항-B-DNA, 항-Z-DNA로, 또는 1차 항체 (연회색) 없이 탐침됨. 성숙한 균류 생물막은 생물막 EPS 내에 Z-DNA (연회색)를 포함한다.

도 30: 항-Z-DNA 항체는 생물막 생물 발생을 자극한다. 항-Z-DNA 항체 (1 mg)가 분주시 NTHI 시험관 내 생물막에 추가되었다. 16 h 이후, 생물막은 LIVE/DEAD®로 염색되고, CLSM을 통해 가시화되고 COMSTAT로 분석되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 생물량에 대해 유의한 추세가 관찰되었다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 대응표본 t-테스트(paired t-test)에 의해 평가되었다. 항-Z-DNA 항체는 생물막 세포외 매트릭스를 안정화시켜, 생물막 생물 발생을 자극하는 반면에, B-DNA에 대한 항체 (예를 들어, 항-dsDNA)는 생물막 생물 발생을 자극하지 않는다.

도 31: DNase는 생물막 세포외 매트릭스 내에서 B-DNA를 분해하지만, Z-DNA는 분해하지 않는다. DNase (Pulmozyme; 5 유닛)이 시험관 내에서 사전 형성된 NTHI 생물막에 생물막 분주 후 24 h에 추가되었다. 총 40 h 이후, 생물막은 항-Z-DNA, 항-B-DNA로, 또는 1차 항체 없이 탐침되었으며, 이것들은 상응하는 2차 형광 항체의 사용을 통해 나타나고 CLSM을 통해 가시화되었다. DNase 처리는 B-DNA 형태의 eDNA 구조를 분해하지만, 생물막 세포외 매트릭스 내에서 광범위한 Z-DNA 형태의 eDNA를 나타낸다.

도 32: Z-DNA 형성은 뉴클레아제 분해로부터 DNA를 보호한다. 폴리(dG-dC) 기질은 상기 표시된 바와 같이 증가하는 농도의 NaCl, 스페르민, 또는 스페르미딘에서 염 활성화된 뉴클레아제 (SAN) 또는 DNase I와 함께 인큐베이션되었다. 분해 생성물은 겔 전기영동에 의해 가시화되었다. 고염 및 폴리아민은 Z-DNA 형태로의 전환을 통해 분해로부터 DNA를 보호한다.

도 33: DNABII 단백질 및 폴리아민은 생물막 세포외 매트릭스 내에 공존한다. 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드 내의 보충된 BHI 배지에서 성장되었다. 생물막은 세척되고, DNABII 단백질 (연회색) 또는 폴리아민 (진회색)에 대한 1차 항체, 형광 2차 항체로 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 염색되고, 형광 발광 현미경을 통해 가시화되었다. 폴리아민은 생물막 매트릭스에서 HU와

공존하지만 IHF와는 공존하지 않는다. HU를 생산할 수 없는 NTHI 균주는 생물막 매트릭스에서 폴리아민의 축적을 감소시켰다. DNABII 단백질 및 폴리아민은 상호작용하여 생물막 세포외 매트릭스를 안정화시킨다.

도 34A - 34B: DNABII 단백질은 Z-DNA 형태로 변화시킴으로써 DNA를 보호한다. (도 34A) 폴리(dG-dC) 기질은 상기 표시된 바와 같이 증가하는 농도의 NTHi HU에서 DNase I과 함께 인큐베이션되었다. 분해 생성물은 겔 전기영동에 의해 가시화되었다. HU는 DNA를 분해로부터 보호하였다. **(도 34B)** 상단: Z-DNA 촉매의 농도를 증가시킴으로써 Z-DNA로 전환되는 B-DNA 기질의 원편광 이색성 스펙트럼 (Rahmouni (1992) Mol Microbiol. 6(5):569-72로부터 수정됨). 250 nm 주위에서 음의 피크 및 280 nm 주위에서 양의 피크의 반전을 주목해야 한다. 하단: 폴리(dGdC) DNA (5 μg)는 2 h 동안 HU (15 μM)와 함께 인큐베이션되었고 CD 스펙트럼이 수집되었다. HU는 폴리(dGdC)의 CD 스펙트럼을 Z-DNA 시그니쳐로 이동시킨다.

도 35A - 35D: DNABII 단백질 및 폴리아민 (PA)은 상승적으로 상호작용하여 DNase 저항성을 유도한다. (도 35A) 증가하는 수준의 스페르미딘 (Spd) 및 HU는, 별도로 또는 함께, 37℃에서 1.5 h 동안 게놈 DNA (gDNA; 2 μg/ml)와 함께 인큐베이션된 후 이어서, 20 min 동안 Pulmozyme®로 처리되었다. DNA 분해는 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분석되었다. Spd 및 HU는 게놈 DNA를 DNase 분해로부터 상승적으로 보호한다. **(도 35B)** Spd (300 μM) 및 HU (1 μM)는 40 h 동안 게놈 DNA (2 μg/ml)와 함께 인큐베이션된 후 이어서, 20 min 동안 Pulmozyme®로 처리되었다. 구조는 LIVE/DEAD®로 염색되었고 CLSM (흰색)로 이미지화되었다. **(도 35C)** NTHI로 인한 실험적인 OM에 걸린 친칠라 중이에서 발견된 점막 생물막 EPS의 면역 형광 CLSM 이미지. 푸트레신 (진회색) 및 HU (연회색)에 대해 탐침되고, DAPI (회색)로 대비염색됨. HU-Spd 의존적 DNA 구조는 DNase 처리에 대해 저항성이다. 폴리아민 및 DNABII 단백질은 생물막 생체 내의 eDNA 상에 공존한다 (흰색). **(도 35D):** 증가하는 농도의 DNase가 분주시 (방지) 또는 24 h에 (붕괴) NTHI 또는 UPEC 생물막에 16 h 동안 추가되었다. 생물막은 염색되고, 고정되고, CLSM을 통해 가시화되고, COMSTAT에 의해 분석되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군 (DNase 없음)과 비교하여 독립표본 t-테스트, **P<0.01에 의해 평가되었다. DNase는 잔존 생물막의 형성을 방지할 수 있지만, 이것을 붕괴시킬 수는 없다.

도 36: Z-DNA는 다수의 인간 병원체의 생물막 EPS 내에 존재한다. 상단: 표시된 박테리아에 의해 형성된 40 h 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 1차 항체 없이 (1° 없음) 또는 Z-DNA-특이적 항체 (연회색)로 탐침됨. Z-DNA는 상이한 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS의 구성요소이다. 하단: HU (연회색) 및 스페르미딘 (진회색) 항체로 탐침된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 공존은 (흰색)이다. DNABII 및 폴리아민 구성요소는 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS에 공존하며 Z-DNA 풍부함과 연관성이 있다.

도 37: HMGB1은 생물막 세포외 매트릭스에서 Z-DNA 구조를 탈안정화시킨다. 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드 내의 보충된 BHI 배지에서 성장되었다. 24 h 이후, 생물막은 상기 표시된 바와 같이 처리되었다. 40 h 이후, 생물막은 세척되고, Z-DNA (연회색 점)에 대한 1차 항체, 형광 2차 항체로 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 염색되고, 형광 발광 현미경을 통해 가시화된다. HMGB1 처리는 생물막 매트릭스에서 Z-DNA 구조를 감소시킨다.

도 38A - 38C: HMGB1은 DNABII 단백질을 대체하며 이로써 NTHI 생물막을 붕괴시킨다. 비피막형 해모필루스 인플루엔재 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드 내의 보충된 BHI 배지에서 성장되었다. 24 h 이후, 생물막은 표시된 바와 같이 처리되었다. **(도 38A)** 40 h 이후, 생물막은 세척되고, DNABII 단백질 (연회색 점)에 대한 1차 항체, 형광 2차 항체로 탐침되고, DAPI (회색 영역)로 염색되고, 형광 발광 현미경을 통해 가시화되었다. **(도 38B)** 생물막 배양물의 배지가 수거되고 DNABII 단백질을 인식하는 1차 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 분석되었다. HMGB1 처리는 생물막 매트릭스의 DNABII 단백질을 대체하였다. **(도 38C)** 5 mg/mL HMGB1로 처리 후 LIVE/DEAD®로 염색되고 공초점(confocal) 현미경으로 가시화된 COMSTAT 정량화 NTHI 생물막. HMGB1은 DNABII 단백질을 대체함으로써 생물막을 붕괴시킨다.

도 39A - 39B: HMGB1은 OM의 실험 모델 (친칠라 숙주)에서 생물막 분해를 촉진한다. 희석액 또는 5 μg rHMGB1 또는 mHMGB1이 NTHI로 감염된 후 4일 및 5일에 친칠라의 중이에 직접적으로 전달되었다. 동물은 24 h 후에 희생되었고, 그것들의 중이가 이미지화되고 **(도 39A)** **(도 39A)**의 하단에서 기재된 기준을 기반으로 맹목적으로 점수가 매겨졌다 **(도 39B)**. 막대는 SEM을 나타낸다. ***P<0.001. 이미지 및 점수는 제자리에서(*in situ*) 기존의 NTHI 생물막의 HMGB1 촉진된 클리어런스를 입증한다.

도 40A - 40C: HMGB1은 부르콜데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*) 생물막을 붕괴시킨다. (도 40A) 부르콜데리아 세노세파시아(*B. cenocepacia*) 생물막은 37℃ 및 5% CO_2에서 8웰 챔버화된 커버글라스 슬라이드

내의 LB 배지에서 성장되었다. 24 h 이후, 생물막에 5 mg/mL HMGB1이 처리되었다. 총 40 h 이후, 생물막은 LIVE/DEAD®로 염색되고, CLSM을 통해 가시화되고 COMSTAT로 분석되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. **(도 40B)** C57BL/6 마우스는 10^7 CFU로 i.t. 감염되었고, 동시에 5 mg rHMGB1 또는 mHMGB1, C45S 비-염증 변이체를 받았다. 부르콜데리아 세노세파시아의 응집체는 α-부르콜데리아 세노세파시아 항체 (회색)로 탐침된 부분에서 형광 발광 현미경에 의해 볼 수 있었다. 18 h 이후, **(도 40C)** CFU가 BAL에서 정량화되었다. 막대는 SD를 나타낸다. *P<0.05, ***P<0.001. HMGB1 처리는 제자리에서 부르콜데리아 세노세파시아 생물막을 크게 붕괴시킨다.

도 41: HMGB1은 폴리아민-유도된 Z-DNA를 뉴클레아제 민감성 B-DNA 상태로 복귀시킨다. 폴리(dG-dC) 기질은 스페르미딘 및 HMGB1과 함께 인큐베이션되었다. 분해 생성물은 겔 전기영동에 의해 가시화되었다. HMGB1 처리는 스페르미딘-유도된 Z-DNA 기질에 대한 뉴클레아제 민감성을 복원시켰다.

도 42A - 42D: DNABII 단백질 및 폴리아민은 둘 다 양이온 교환체 (P11)-매개된 생물막 방지를 구제하는데 필요하다. (도 42A) NTHI 생물막 성장이 37℃, 5% CO_2에서 트랜스웰 플레이트 시스템의 기저측부 챔버에서 시작된 반면에 P11 수지가 정단 챔버에 추가되었고, 16 h 동안 인큐베이션되었다. **(도 42B)** 생물막은 염색되고, 고정되고, CLSM을 통해 가시화되고, COMSTAT에 의해 분석되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군 (P11 없음)과 비교하여 독립표본 t-테스트, ****P<0.0001에 의해 평가되었다. **(도 42C)** 스페르미딘 (Spd, 300 μM) 및 HU (500 nM)가 분주시 추가되었다. 생물막은 (도 42B)에서와 같이 정량화되었다. 대조군 (P11 없음)과 비교하여 **P<0.01, ***P<0.001, 및 ****P<0.0001. **(도 42D)** (도 42C)에서 정량화된 조건 하에 형성된 생물막의 대표적인 이미지, 오른쪽 상단에 평균 생물량. P11 추가는 용량-의존적 방식으로 생물막 형성을 방지한다. 외인성 스페르미딘 및 HU는 함께 생물막 발달을 복원시키지만 단독으로는 그렇지 않으며, 이것은 P11 항-생물막 활성이 직접적으로 접촉되지 않고 생물막 EPS로부터 떨어져 있는 구조적 구성요소 (폴리아민, DNABII 단백질)의 적정의 결과라는 것을 시사한다.

도 43A - 43B: B- 및 Z-DNA 항체의 특이성. (도 43A) 브롬화된 게놈 DNA (2 μg/mL) 및 폴리dGdC는 완충액에서 인큐베이션되었고 260nm 및 295nm에서 흡광도 값이 측정되고 A260/295 비율이 계산되었다. **>8.6**의 비율은 B-DNA (진회색)를 나타내는 한편, 거의 **3.2**의 값은 Z-DNA (흰색)를 나타낸다. **(도 43B)** ELISA 플레이트는 1 μg의 폴리 dGdC (B-DNA) 또는 브롬화된 폴리 dGdC로 코팅된 후 이어서 (Z-DNA Hindler at al. (2013) J Clin Microbiol. 51(6):1678-84.), 0.5% BSA로 블로킹되었다. 그 다음에 웰은 마우스 (ms) IgG1 (음성 대조군), 마우스 항-B-DNA, 또는 마우스 항-Z-DNA로 탐침되고 2차 염소 항-마우스 IgG-HRP로 검출되었다. TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)은 HRP 검출 (진회색 웰)에 사용된 색채학적 기질이었다. 항-B 및 항-Z 항체는 그것들 각각의 DNA 형태에 특이적이었다.

도 44: DNABII 단백질, 폴리아민, 및 eDNA (B- 및 Z-DNA)는 시간이 흐름에 따라 NTHI 생물막의 EPS 내에 꾸준히 축적된다. 다양한 형성 스테이지에서 NTHI 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지는 항-B-DNA 항체 (연회색; 왼쪽에서 첫 번째), 항-항-스페르미딘 (연회색; 왼쪽에서 두 번째), 항-DNABII (회색; 왼쪽에서 세 번째), 또는 항-Z-DNA (흰색; 왼쪽에서 네 번째)로 탐침되었다. 성숙한 생물막은 시간이 흐름에 따라 EPS 내에서 증가하는 양의 각각의 TEDS 구성요소를 포함한다.

도 45: 폴리아민 및 DNABII 단백질은 DNAse 저항성인 Z-DNA를 자극한다. 정제된 게놈 DNA (2 μg/ml)에 DNABII 단백질 (HU_{NTHI}, 500 nM) 및 스페르미딘 (300 μM)의 추가 및 37℃에서 16 h 동안 인큐베이션에 의해 데 노보(*de novo*) 형성된 EPS 스캐폴드 모방체의 면역 형광 이미지. 생물막 스캐폴드 모방체는 Pulmozyme® (DNase, 5 U/ml)과 함께 1 h 동안 인큐베이션된 다음 B-DNA (진회색) 및 Z-DNA (흰색)에 대해 탐침되었다. 기준자 10 μM. B-DNA 및 Z-DNA는 모방체 구조 내에서 관찰되었고 DNase 추가는 선택적으로 B-DNA를 제거하는 반면에 Z-DNA는 온전하게 유지되었다. 따라서, 폴리아민 및 DNABII 단백질은 eDNA를 B-DNA에서 Z-DNA로 전환시킴으로써 DNase-저항성 상태를 유도할 수 있다.

도 46: TEDS 및 Z-DNA는 다수의 인간 병원체에 의해 형성된 생물막 EPS 내에 존재한다. (A) 상단: 나이브 (naive) 또는 항-HU (회색) 및 항-스페르미딘 (Spd, 연회색) 항체로 탐침된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 공존은 흰색이다. 하단: 40 h 동안 표시된 박테리아로 형성된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지, 나이브 또는 항-B-DNA (진회색) 및 항-Z-DNA 항체 (흰색)로 탐침됨. 잘 특성화된, Z-DNA-특이적 단클론성 항체 (clone Z22 Heydorn et al. (2002) COMSTAT. Microbiology; 146; Yang et al. (2017) Paediatr Respir Rev. 21:65-7; Xu et al. (2016) Molecules; 21(8).)가 Z-DNA를 검출하는데 사용되었다. DNABII, 폴리아민, Z-DNA 및 B-DNA 구성요소는 모두 다수의 박테리아 생물막의 EPS에 존재한다. Z-DNA는 상이한 정상 상태 수준에서 다수의 박테리

아 생물막의 EPS의 필수적인 부분이다.

도 47A - 47B: Z-DNA는 *생체 내 및 생체 외(ex vivo) 샘플에 존재한다.* 왼쪽: **(도 47A)** 실험적 NTHI-유도된 OM 동안의 NTHI 생물막 및 **(도 47B)** 낭포성 섬유증에 걸린 환자의 가래 내의 Z-DNA (흰색) 및 B-DNA (진회색). 삽도 음성 대조군. 기준자 10 μm. 오른쪽: **(도 47A)** 실험적 NTHI-유도된 OM 동안의 NTHI 생물막 및 **(도 47B)** 낭포성 섬유증에 결린 환자의 가래 내의 DNABII 단백질 (회색) 및 스페르미딘 (Spd, 연회색). 삽도 음성 대조군. 기준자 10 μm. DNABII, 폴리아민, Z-DNA 및 B-DNA 구성요소는 모두 NTHI 생물막으로 감염된 친칠라 중이의 부분 내에 존재한다. Z-DNA는 상이한 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS의 필수적인 부분이다.

도 48A - 48B: 생물막에서 Z-DNA는 뉴클레아제-저항성 스캐폴드를 형성한다. (도 48A) 24 h 동안 표시된 박테리아 (*Kp* = 클레브시엘라 뉴모니애(*K. pneumoniae*))에 의해 형성된 생물막은 추가로 16 h 동안 DNase (Pulmozyme ®; 40 U/ml)와 함께 인큐베이션되었다. 생물막은 항-B-DNA (진회색) 및 항-Z-DNA (흰색) 항체로 탐침되었고 박테리아 세포막 염색 FM4-64™ (미도시)으로 대비염색되었다. **(도 48B)** B-DNA 또는 Z-DNA의 풍부함의 변화는 ImageJ를 사용하여 DNase의 부재 하에 (대조군) 형광 발광 강도에 의해 나누어진 DNase 추가 이후 B-DNA 또는 Z-DNA의 형광 발광 강도의 비율의 계산에 의해 정량화되었다. 형광 발광 강도는 FM4-64™-염색된 세포의 형광 발광 신호에 대해 표준화되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군 (DNase 없음, 점선)과 비교하여 대응표본 t-테스트, *P<0.05; ****P<0.0001에 의해 평가되었다. B-DNA는 DNase에 의해 분해되고, Z-DNA는 저항성이고 생물학 EPS의 구조적 온전성을 유지하는 역할을 한다.

도 49: Z-DNA 안정화는 생물막 형성을 자극한다. NTHI 및 UPEC 생물막 성장이 16 h 동안 나이브 또는 항-Z-DNA 항체 (5 mg/ml)의 존재 하에 시작되었다. 생물막은 염색되고, 고정되고, CLSM을 통해 가시화되고, COMSTAT에 의해 분석되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군 (항체 없음)과 비교하여 대응표본 t-테스트, *P<0.05, **P<0.01에 의해 평가되었다. 항-Z-DNA 항체는 용량-의존적 방식으로 생물막 형성을 자극하는 반면, 나이브 항체는 그렇지 않다.

도 50A - 50B: B-DNA에서 Z-DNA로의 전환의 평형 이동은 생물막 형성을 변화시킨다. 24 h 동안 형성된 NTHI 생물막은 추가로 16 h 동안 세륨 클로라이드 ($CeCl_3$) 또는 클로로퀸과 함께 인큐베이션되었고 면역 형광 CLSM에 의해 나이브 또는 항-Z-DNA (흰색)로 탐침되었다. **(도 50A)** NTHI 생물막의 대표적인 이미지는 1mM $CeCl_3$의 추가시 증가된 Z-DNA 풍부함을 나타냈다. **(도 50B)** NTHI 생물막의 대표적인 이미지는 1μM 클로로퀸의 추가시 감소된 Z-DNA 풍부함을 나타냈다.

도 51A - 51B: B-DNA에서 Z-DNA로의 전환의 평형 이동은 생물막 형성을 변화시킨다. 24h 동안 형성된 NTHI 생물막은 추가의 16h 동안 세륨 클로라이드 ($CeCl_3$) **(도 51A)** 또는 클로로퀸 **(도 51B)**과 함께 인큐베이션되었다. Z-DNA는 항-Z-DNA를 사용하여 IF 및 CLSM에 의해 측정되었고 세포는 막 염색 FM4-64로 염색되었다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군과 비교하여 대응표본 t-테스트, *P<0.05, **P<0.01에 의해 평가되었다. $CeCl_3$은 Z-DNA 및 생물막 형성을 증가시키는 반면, 클로로퀸은 Z-DNA 및 생물막 발달을 감소시켰다.

도 52A - 52B: RNA 항상성은 박테리아 생물막 발달을 조절한다. (도 52A) NTHI 생물막 성장이 16 h 동안 RNase A의 존재 하에 시작되었다. 생물막은 염색되고, 고정되고, CLSM을 통해 가시화되고, COMSTAT에 의해 분석되었다. RNase A의 추가는 아마도 Z-DNA로의 B-DNA의 세포외 전환을 위한 중요한 촉매인 폴리아민의 방출에 의해 생물막 형성을 용량-의존적 방식으로 자극하였다. **(도 52B)** 16 h 동안 형성된 NTHI 생물막은 tRNA와 함께 인큐베이션되었고 **(도 52A)**에서와 같이 분석되었다. 구아노신 모노포스페이트 (GMP)는 음성 대조군의 역할을 하였다. 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 대조군 (RNase A 또는 tRNA/GMP 없음)과 비교하여 대응표본 t-테스트, *P<0.05, **P<0.01에 의해 평가되었다. tRNA의 추가 (GMP는 아님)는 아마도 생물막 EPS로부터 폴리아민의 격리에 의해 초기 NTHI 생물막을 용량-의존적 방식으로 붕괴시켰다.

도 53: DNABII 및 폴리아민은 상승작용하여 B-DNA를 Z-DNA로 전환시킨다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여된다. 왼쪽: 게놈 DNA (2μg/mL)는 37℃에서 2h 동안 스페르미딘 (spd:300μM), HU (500nM), spd 및 HU 둘 다의 조합과 함께 인큐베이션되었다. 3.6M NaCl과 함께 gDNA의 인큐베이션은 양성 Z-DNA 대조군으로 사용되었다. 중간: gDNA (2μg/mL)는 Z-DNA를 유도하는 것으로 알려져 있는 증가된 농도의 세륨 클로라이드 ($CeCl_3$)와 함께 인큐베이션되었다. 오른쪽: 폴리(dGdC) (1μg)는 NaCl (3.6M), 클로로퀸 (100μM), 또는 NaCl 및 클로로퀸 둘 다의 조합과 함께 인큐베이션되었다. 클로로퀸은 Z-DNA로의 B-DNA의 전이를 방지한다. 260nm 및 295nm에서 흡광도 값이 측정되었고 A260/295 비율이 계산되었다. >8.6의 비율은 B-DNA를 나타내는 한편, 3.2 근

처의 값은 Z-DNA를 나타낸다. DNABII 및 폴리아민, 뿐만 아니라 $CeCl_3$는 상승작용하여 Z-DNA를 유도하는 반면, 클로로퀸은 잘 확립되고 검증된 분광 광도법적 흡광도 비율 검정에 따라 Z-DNA 전환을 방지하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시물이 속한 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에서 제공된 모든 뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 방향으로 제공된다. 본원에 기재된 임의의 방법 및 재료 또는 동등물이 본 개시물의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 특정 비-제한적 예시의 방법, 디바이스, 및 재료가 이제 기재된다. 본원에서 인용된 모든 기술 및 특허 간행물은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에서 어떠한 것도 개시내용은 선행 발명에 의해 이러한 개시물보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0023] 본 개시물의 실행은 달리 지시되지 않는 한 조작 배양, 면역학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 재조합 DNA의 통상적인 기술을 이용할 것이며, 이것들은 해당 분야의 기술범위 내에 있다. 예를 들어, Sambrook and Russell eds, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; 미국 특허 번호 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); and Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology 참조.

[0024] 범위를 포함한 모든 수명칭, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 적절하게 1.0 또는 0.1의 증분으로 또는 대안으로 +/- 15%, 또는 대안으로 10% 또는 대안으로 5% 또는 대안으로 2%의 변화에 의해 (+) 또는 (-)로 변화되는 근사치이다. 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 모든 수명칭은 용어 "약"에 의해 선행된다는 것을 이해해야 한다. 또한 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 본원에 기재된 시약은 단지 예시이고 이러한 것들의 동등물이 해당 분야에 공지되어 있다는 것을 이해해야 한다.

[0025] 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수형 "하나(a)", "하나(an)" 및"그(the)"는 문맥상 달리 분명하게 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "하나의 폴리펩타이드"는 복수의 폴리펩타이드를 포함하며, 그 혼합물을 포함한다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 나열된 요소들을 포함하지만, 다른 것들을 배제하는 것은 아니라는 것을 의미하도록 의도된다. "근본적으로 ~로 이루어진"은 조성물 및 방법을 정의하는데 사용될 때 의도된 사용을 위해 조합에 대한 임의의 근본적으로 중요한 다른 요소들을 배제하는 것을 의미한다. 따라서, 본원에서 정의된 바와 같이 근본적으로 요소들로 이루어진 조성물은 단리 및 정제 방법으로부터의 미량의 오염물질 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 포스페이트 완충된 식염수, 보존제, 등을 배제하지 않을 것이다. "~로 이루어진"은 다른 성분들의 미량 이상의 요소 및 본원에 개시된 조성물을 투여하기 위한 실질적인 방법 단계를 배제하는 것을 의미해야 한다. 이들 전이 용어 각각에 의해 정의된 구체예는 본 개시물의 범위 내에 있다.

[0027] "생물막"은 미생물이 분비 및/또는 방출하는 폴리머, 예컨대 DNA와 함께, 유기적이거나 무기적일 수 있는, 때때로 구조의 표면에 부착되는 미생물의 조직화된 공동체를 의도한다. 생물막은 미생물총(microbiotics) 및 항미생물제에 대해 매우 저항성이다. 그것들은 잇몸 조직, 치아, 및 수복물(restoration)에 의지해서 살며, 치주 플라크(plaque) 질환으로도 알려져 있는 우식(caries) 및 치주 질환을 유발한다. 그것들은 또한 만성 중이 감염을 유발한다. 생물막은 또한 치아 임플란트(implant), 스텐트(stent), 카테터 라인 및 콘택트 렌즈의 표면 상에서 형성될 수 있다. 그것들은 페이스메이커(pacemaker), 심장 판막 치환술(heart valve replacement), 인공 관절 및 다른 외과 수술용 임플란트에서도 자란다. 질병 통제 센터(The Centers for Disease Control)는 병원 내

(병원에서 획득한) 감염의 65% 이상이 생물막에 의해 유발되는 것으로 추정한다. 그것들은 만성 질 감염을 유발하고 불안정한(hobbled) 면역 시스템을 가진 사람들에서 생명을 위협하는 전신 감염으로 이어진다. 생물막은 또한 많은 실환에 수반된다. 예를 들어, 낭포성 섬유증 환자는 종종 항생제 저항성 생물막을 발생시키는 슈도모나스 감염에 걸린다.

[0028] 용어 "억제하는, 경쟁하는 또는 적정하는"은 미생물 생물막의 구성요소인 DNA/단백질 매트릭스의 형성의 감소를 의도한다.

[0029] "DNABII 폴리펩타이드 또는 단백질"은 DNA-결합 도메인으로 구성되며 따라서 미생물의 DNA에 대해 특이적인 또는 일반적인 친화도를 갖는 DNA 결합 단백질 또는 폴리펩타이드를 의도한다. 한 양태에서, 그것들은 작은 고랑(minor groove)에서 DNA에 결합한다. DNABII 단백질의 비-제한적 예는 통합 숙주 인자 (IHF) 단백질 및 대장균 균주 U93의 히스톤-유사 단백질 (HU)이다. 생물막과 관련이 있을 수 있는 다른 DNA 결합 단백질은 DPS (Genbank 접수 번호: CAA49169), H-NS (Genbank 접수 번호: CAA47740), Hfq (Genbank 접수 번호: ACE63256), CbpA (Genbank 접수 번호: BAA03950) 및 CbpB (Genbank 접수 번호: NP-418813)를 포함한다.

[0030] "IHF" 단백질의 "통합 숙주 인자"는 박테리오파지에 의해 DNA를 숙주 박테리아로 통합시키는데 사용되는 박테리아 단백질이다. 그것들은 또한 세포외 미생물의 DNA에 결합한다. 대장균에서 IHF 단백질 서브유닛을 암호화하는 유전자는 himA (Genbank 접수 번호: POA6X7.1) 및 himD (POA6Y1.1) 유전자이다. 이들 유전자에 대한 상동체는 다른 유기체에서 발견되었고, 다른 유기체의 이들 유전자에 상응하는 펩타이드는 해당 분야에, 예를 들어, 미국 특허 번호 8,999,291의 표 10에 개시되어 있다.

[0031] "HMGB1"은 DNA의 작은 고랑에 결합하고 이것을 왜곡시키는 것으로 보고된 고이동성 군 상자 (high mobility group box: HMGB) 1 단백질이고 작용제의 한 예이다. 재조합 또는 단리된 단백질 및 폴리펩타이드는 Atgenglobal, ProSpecBio, Protein1 and Abnova로부터 상업적으로 이용 가능하다. HMGB1은 3개의 도메인으로 구성된 215개의 아미노산 단백질의 작은 단백질 (대략 30 Kda)이다: 두 개의 양으로 대전된 도메인에서 각각 80개의 아미노산으로 구성된 A 및 B 상자 및 음으로 대전된 카르복실 말단에서 대략 30개의 연속적인 아스파르테이트 및 글루타메이트 잔기로 이루어진 산성 C 꼬리. 야생형 HMGB1의 폴리펩타이드 서열의 비-제한적 예는 하기 제공된다:

[0032] **MGKGDPKKPRRKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTM**
SAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYI_PPKGETKKKF_*KDPNAPKRPPSAFFLF*
CSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAEKLKEKYEKDIAAYRAK
*GKPDAAKKGVV*_KAEKSKKKKEEEEGEEDEEDEEEEEDEEDEDEEEDDDDE

[0033] 볼드체로 된 아미노산 (아미노산 1-70)은 A 상자 도메인을 나타낸다.

[0034] 이탤릭체로 된 아미노산 (아미노산 88-164)은 B 상자 도메인을 나타낸다.

[0035] 밑줄 그어진 아미노산 (아미노산 186-215)은 C-꼬리 도메인을 나타낸다. 이것들은 단편, 예를 들어, A 상자 도메인, B 상자 도메인, A 및 B 상자 도메인 (AB 상자 도메인), C-꼬리 도메인 및 N-도메인 (아미노산 1-185)의 비-제한적 예이다. 한 양태에서, 단편은 근본적으로 C-말단 도메인 또는 B 상자 도메인을 포함하는 폴리펩타이드로 이루어진다.

[0036] "HU" 또는 "대장균 균주 U93의 히스톤-유사 단백질"은 전형적으로 대장균과 관련이 있는 헤테로다이머 단백질의 클래스를 말한다. HU 단백질은 DNA 접합부에 결합하는 것으로 알려져 있다. 관련된 단백질은 다른 미생물로부터 단리되었다. 대장균 HU의 완전한 아미노산 서열은 Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem 103(3)447-481에 의해 보고되었다. HU 단백질에 대한 항체는 Abeam으로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0037] 용어 "표면 항원" 또는 "표면 단백질"은 박테리아 세포와 같은 세포의 표면 상의 단백질 또는 펩타이드를 말한다. 표면 항원의 예는 외막 단백질, 예컨대 OMP P5 (Genbank 접수 번호: YP-004139079.1), OMP P2 (Genbank 접수 번호: ZZX87199.1), OMP P26 (Genbank 접수 번호: YP-665091.1), rsPilA 또는 재조합 가용성 PilA (Genbank 접수 번호: EFU96734.1) 및 Type IV Pilin (Genbank 접수 번호: Yp-003864351.1)이다.

[0038] 용어 "해모필루스 인플루엔재(*Haemophilus influenzae*)"는, 예를 들어, 귀 감염, 눈 감염, 및 부비강염(sinusitis)과 같은 다수의 상이한 감염을 유발할 수 있는 병원성 박테리아를 말한다. 해모필루스 인플루엔재의 다수의 상이한 균주가 단리되었고 IhfA 유전자 또는 단백질을 갖는다. 해모필루스 인플루엔재의 상이한 균주의

일부 비-제한적 예는 Rd KW20, 86-028NP, R2866, PittGG, PittEE, R2846, 및 2019를 포함한다.

[0039] "미생물의 DNA"는 생물막을 생산하는 미생물의 단일 또는 이중 가닥 DNA를 의도한다.

[0040] 생물막을 "억제하는, 방지하는 또는 붕괴시키는" 것은 생물막의 구조의 예방적 또는 치료적 감소를 의도한다.

[0041] "구부러진(bent) 폴리뉴클레오타이드"는 다른 가닥과 쌍을 형성하지 않는 한 가닥에 작은 루프(loop)를 함유하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드를 의도한다. 일부 구체예에서, 루프는 1개의 염기 내지 약 20개의 염기의 길이, 또는 대안으로 2개의 염기 내지 약 15개의 염기의 길이, 또는 대안으로 약 3개의 염기 내지 약 12개의 염기의 길이, 또는 대안으로 약 4개의 염기 내지 약 10개의 염기의 길이이거나, 또는 대안으로 약 4, 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8, 또는 9, 또는 10개의 염기를 갖는다.

[0042] 진단 또는 치료의 "대상체"는 세포 또는 동물, 예컨대 포유동물, 또는 인간이다. 비-인간 동물은 진단 또는 치료되고 감염 또는 동물 모델의 대상이 되는 것, 예를 들어, 시미안(simian), 쥣과, 예컨대 래트, 마우스, 친칠라, 개과, 예컨대 개, 토끼과, 예컨대 토끼, 가축, 스포츠 동물, 및 애완동물이다. 용어 "대상체", "숙주", "개체", 및 "환자"는 동물, 전형적으로 포유류 동물을 나타내기 위해 본원에서 교체 가능하게 사용된다. 포유동물의 비-제한적 예는 인간, 비-인간 영장류 (예를 들어, 유인원, 긴팔원숭이, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이, 마카크(macaque), 등), 가정 동물 (예를 들어, 개 및 고양이), 농경용 동물 (예를 들어, 말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 기니피그)을 포함한다. 일부 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 포유동물은 임의의 연령 또는 임의의 발달기 (예를 들어, 성인, 10대, 아동, 유아, 또는 자궁내(in utero) 포유동물)일 수 있다. 포유동물은 수컷 또는 암컷일 수 있다. 일부 구체예에서 대상체는 인간이다.

[0043] 용어 "단백질", "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 둘 이상의 서브유닛 아미노산, 아미노산 유사체 또는 펩타이드 모방체(peptidomimetic)의 화합물을 나타내기 위해 교체 가능하게 및 광범위한 의미로 사용된다. 서브유닛은 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 서브유닛은 다른 결합, 예를 들어, 에스터, 에테르, 등에 의해 연결될 수 있다. 단백질 또는 펩타이드는 적어도 두 개의 아미노산을 함유해야 하고 단백질 또는 펩타이드 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에는 제한이 없다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 글리신과 D 및 L 광학 이성질체, 아미노산 유사체 및 펩타이드 모방체를 포함하는, 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산을 말한다.

[0044] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 교체 가능하게 사용되고 임의의 길이의 폴리머 형태의 뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 그것의 유사체를 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지되든 공지되지 않든, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 전령 RNA (mRNA), 운반 RNA, 리보솜 RNA, RNAi, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된(branched) 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오타이드의 조립 전에 또는 후에 전달될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 폴리머화 이후, 예컨대 라벨링 구성요소와의 컨쥬게이션(conjugation)에 의해 추가로 변형될 수 있다. 용어는 또한 이중 가닥 및 단일 가닥 분자 둘 다를 말한다. 달리 명시되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드인, 본원에 개시된 임의의 구체예는 이중 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 알려져 있거나 예측되는 두 개의 상보적인 각각의 단일 가닥을 모두 포함한다.

[0045] 폴리뉴클레오타이드는 네 개의 뉴클레오타이드 염기의 특정 서열로 구성된다: 아데닌 (A); 시토신 (C); 구아닌 (G); 티민 (T); 및 폴리뉴클레오타이드가 RNA일 때 티민 대신에 우라실 (U). 따라서, 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열"은 폴리뉴클레오타이드 분자의 알파벳 표현이다. 이 알파벳 표현은 중앙 처리 장치를 가진 데이터베이스로 입력되어 생물정보학 용도, 예컨대 기능유전체학 및 상동성 검색에용될 수 있다.

[0046] 용어 "단리된" 또는 "재조합"은 DNA 또는 RNA와 같은 핵산에 관하여 본원에 사용된 바와 같이 거대 분자, 뿐만 아니라 폴리펩타이드의 천연 공급원에 존재하는, 각각 다른 DNA 또는 RNA로부터 분리된 분자를 말한다. 용어 "단리된 또는 재조합 핵산"은 단편으로서 자연 발생되지 않고 자연 상태에서 발견되지 않는 핵산 단편을 포함한다. 용어 "단리된"은 또한 본원에서 다른 세포 단백질로부터 단리된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 및 단백질을 나타내는데 사용되고 정제된 및 재조합 폴리펩타이드 둘 다를 포함한다. 다른 구체예에서, 용어 "단리된 또는 재조합"은 구성요소, 세포 등으로부터 분리된 것을 의미하며, 여기서 세포, 조직, 폴리뉴클레오타이드, 펩

타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 항체 또는 이것들의 단편(들)은 일반적으로 자연에서 회합된다. 예를 들어, 단리된 세포는 유사하지 않은 표현형 또는 유전자형의 조직 또는 세포로부터 분리된 세포이다. 단리된 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 고유한 또는 자연 환경에서, 예를 들어, 염색체 상에서 회합되는 3' 및 5' 인접한 뉴클레오타이드로부터 분리된다. 당업자에게 분명한 것처럼, 비-자연 발생 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 항체 또는 이것들의 단편(들)은 그것을 자연 발생한 대응물과 구별하기 위해 "단리"가 필요한 것은 아니다.

[0047] 명시적인 나열 없이 그리고 달리 의도되지 않는 한, 본 개시물이 폴리펩타이드, 단백질, 폴리뉴클레오타이드 또는 항체와 관련될 때, 이러한 것들의 동등물 또는 생물학적 동등물은 본 개시물의 범위 내에 있도록 의도되는 것으로 추론되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 참조 단백질, 항체, 단편, 폴리펩타이드 또는 핵산을 언급하는 것이 원하는 구조 또는 기능성을 유지하면서 최소한의 상동성을 갖는 것들을 의도할 때 용어 "그것의 생물학적 동등물"은 "그것의 동등물"과 동의어인 것으로 의도된다. 본원에서 구체적으로 나열되지 않는 한, 본원에서 언급된 임의의 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 그것들의 동등물을 포함하는 것으로 고려된다. 한 양태에서, 동등한 폴리뉴클레오타이드는 기재된 방법에서 사용하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 엄중 조건 하에 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 보체에 혼성체화되는 것이다. 또 다른 양태에서, 동등한 항체 또는 항원 결합 폴리펩타이드는 적어도 70%, 또는 대안으로 적어도 75%, 또는 대안으로 적어도 80%, 또는 대안으로 적어도 85%, 또는 대안으로 적어도 90%, 또는 대안으로 적어도 95%의 친화도 또는 그 이상의 친화도로 참조 항체 또는 항원 결합 단편에 결합하는 것을 의도한다. 또 다른 양태에서, 그것의 동등물은 항원 틴더(tinder) 경쟁적 ELISA 검정으로의 항체 또는 항원 결합 단편의 결합과 경쟁한다. 또 다른 양태에서, 동등물은 적어도 약 80% 상동성 또는 동일성 및 대안으로, 적어도 약 85%, 또는 대안으로 적어도 약 90%, 또는 대안으로 적어도 약 95%, 또는 대안으로 98% 상동성 또는 동일성을 의도하고 참조 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산에 대한 실질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다.

[0048] 또 다른 서열에 대해 특정 퍼센트 (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 또는 95%)의 "서열 동일성"을 가진 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 영역 (또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 영역)은, 정렬될 때, 두 개의 서열을 비교하는데 있어서 염기 (또는 아미노산)의 퍼센트가 동일하다는 것을 의미한다. 정렬 및 퍼센트 상동성 또는 서열 동일성은 해당 분야에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1에 기재된 것들을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 구체예에서, 기본 파라미터가 정렬에 사용된다. 비-제한적 예시의 프로그램은 BLAST이며, 기본 파라미터를 사용한다. 특히, 예시의 프로그램은 BLASTN 및 BLASTP를 포함하며, 다음 기본 파라미터를 사용한다: 유전 암호=표준; 필터=없음; 가닥=둘 다; 컷오프(cutoff)=60; 예상치=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 서열; 분류 기준=높은 점수; 데이터베이스=비-중복, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. 이들 프로그램의 상세한 설명은 다음 인터넷 주소에서 발견될 수 있다: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. 서열 동일성 및 퍼센트 동일성은 그것들을 clustalW (다음 웹 주소에서 이용 가능함: align.genome.jp, 2011년 3월 7일에 마지막으로 접속함)에 통합시킴으로써 결정된다.

[0049] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 두 개의 펩타이드 또는 두 개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 말한다. 상동성은 비교의 목적을 위해 정렬될 수 있는 각각의 서열 내에서 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열 내의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 차지될 때, 분자는 상기 위치에서 상동성이다. 서열 간 상동성의 정도는 서열에 의해 공유되는 일치하거나 상동성인 위치의 수의 함수이다. "무관한" 또는 "비-상동성" 서열은 본 개시물의 서열 중 하나와 40% 미만의 동일성, 또는 대안으로 25% 미만의 동일성을 공유한다.

[0050] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 또한 엄중 조건 하에 혼성체화되는 두 개의 핵산 분자를 나타낼 수 있다.

[0051] "혼성체화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 반응하여 뉴클레오타이드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 말한다. 수소 결합은 왓슨 크릭(Watson-Crick) 염기 쌍 형성, 후그스테인 결합(Hoogstein binding)에 의해, 또는 임의의 다른 서열-특이적 방식으로 일어날 수 있다. 복합체는 듀플렉스(duplex) 구조를 형성하는 두 개의 가닥, 다중 가닥 복합체를 형성하는 세 개 이상의 가닥, 단일 자가 혼성체화 가닥, 또는 이것들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성체화 반응은 PCR 반응의 시작, 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오타이드의 효소적 분열과 같이 더 광범위한 공정에서 단계를 구성할 수 있다.

[0052] 엄중 혼성체화 조건의 예는 다음을 포함한다: 약 25℃ 내지 약 37℃의 인큐베이션 온도; 약 6XSSC 내지 약 10XSSC의 혼성체화 완충액 농도; 약 0% 내지 약 25%의 포름아미드 농도; 및 약 4XSSC 내지 약 8XSSC의 세척 용

액. 중간 혼성체화 조건의 예는 다음을 포함한다: 약 40℃ 내지 약 50℃의 인큐베이션 온도; 약 9XSSC 내지 약 2XSSC의 완충액 농도; 약 30% 내지 약 50%의 포름아미드 농도; 및 약 5XSSC 내지 약 2XSSC의 세척 용액. 고 엄중 조건의 예는 다음을 포함한다: 약 55℃ 내지 약 68℃의 인큐베이션 온도; 약 1XSSC 내지 약 0.1XSSC의 완충액 농도; 약 55% 내지 약 75%의 포름아미드 농도; 및 약 1XSSC, 0.1XSSC, 또는 탈염수의 세척 용액. 일반적으로, 혼성체화 인큐베이션 시간은 5분 내지 24시간이며, 세척 단계는 1, 2회, 또는 그 이상이고, 세척 인큐베이션 시간은 약 1, 2, 또는 15분이다. SSC는 0.15 M NaCl 및 15 mM 시트레이트 완충액이다. 다른 완충액 시스템을 사용하는 SSC의 동등물이 이용될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 mRNA로 전사되는 공정 및/또는 전사된 mRNA가 이후에 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질로 번역되는 공정을 말한다. 폴리뉴클레오타이드가 게놈 DNA로부터 유래되면, 발현은 진핵 세포에서 mRNA의 스플라이싱(splicing)을 포함할 수 있다.

[0054] 용어 "암호화하다"는 폴리뉴클레오타이드에 적용된 바와 같이 고유한 상태에서 또는 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 조작될 때 폴리펩타이드 및/또는 그것의 단편에 대한 mRNA를 생산하기 위해 전사 및/또는 번역될 수 있는 경우 폴리펩타이드를 "암호화한다"고 하는 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 안티센스(antisense) 가닥은 이러한 핵산의 보체이고, 암호화 서열은 그것으로부터 추정될 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료" 등은 본원에서 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미하는데 사용된다. 효과는 장애 및/또는 장애에 기인하는 역효과에 대한 부분적 또는 완전한 치유에 관하여 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 대상체에서 질환의 "치료하는" 또는 "치료"는 또한 (1) 질환의 증상에 취약하거나 또는 아직 질환의 증상을 나타내지 않는 대상체에서 증상 또는 질환이 발생하는 것을 예방하는 것; (2) 질환을 억제하거나 그것의 발달을 중지시키는 것; 또는 (3) 질환 또는 질환의 증상을 개선하거나 이것들의 퇴보를 유발하는 것을 나타낼 수 있다. 해당 분야에서 이해되는 바와 같이, "치료"는 임상 결과를 포함한, 유익한 또는 원하는 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 기술의 목적을 위해, 유익한 또는 원하는 결과는 검출 가능하든 검출 불가능하든 하나 이상의 증상의 완화 또는 개선, 병태 (질환을 포함함)의 정도의 약화, 병태 (질환을 포함함)의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 병태 (질환을 포함함)의 지연 또는 둔화, 병태 (질환을 포함함)의 진행, 개선 또는 경감, 진정 및 차도 (부분적이든 전체적이든) 중 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 양태에서, 치료는 예방을 배제한다. 질환이 SLE (전신 홍반성 루푸스) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)일 때, 치료의 증거는 염증, 및/또는 자가 면역 활성 또는 증상의 수준의 증거의 감소를 포함하였다.

[0056] 방지하는 것은 장애 또는 효과에 취약한 시스템 또는 대상체에서 시험관 내 또는 생체 내에서 장애 또는 효과를 방지하기 하려는 것이다. 이러한 것의 예는 생물막을 생산하는 것으로 알려져 있는 미생물로 감염된 시스템에서 생물막의 형성을 방지하는 것이다.

[0057] "조성물"은 활성제 및, 불활성이거나 (예를 들어, 검출 가능한 작용제 또는 라벨) 또는 보조제, 희석제, 바인더, 안정화제, 완충액, 염, 친유성 용제, 보존제, 보조제 등과 같이 활성인 또 다른 화합물 또는 조성물의 조합을 의미하고 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 담체는 또한 약학적 부형제 및 첨가제 단백질, 펩타이드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물 (예를 들어, 당, 예컨대 단당류, 다이-, 트라이-, 테트라-올리고당류, 및 올리고당류; 유도체화된 당, 예컨대 알디톨, 알돈산, 에스터화된 당 등; 및 다당류 또는 당 폴리머)을 포함하며, 이것들은 단독으로 또는 조합으로 존재할 수 있고, 중량 또는 부피 기준으로 단독 또는 1-99.99%의 조합을 포함한다. 예시의 단백질 부형제는 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민 (HSA), 재조합 인간 알부민 (rHA), 젤라틴, 카세인, 등을 포함한다. 대표적인 아미노산/항체 구성요소는 또한 완충 능력에 있어서 기능을 발휘할 수 있으며, 알라닌, 아르기닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파르테임, 등을 포함한다. 탄수화물 부형제는 또한 이 기술의 범위 내에 있도록 의도되며, 이것들의 예는 단당류, 예컨대 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스, 등; 이당류, 예컨대 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스, 등; 다당류, 예컨대 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분, 등; 및 알디톨, 예컨대 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨 (글루시톨) 및 미오이노시톨을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] "약학적 조성물"은 담체와 불활성 또는 활성인 활성제의 조합을 포함하도록 의도되어, 조성물을 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외에서 진단적 또는 치료적 사용에 적합하게 한다.

[0059] "약학적으로 허용 가능한 담체"는 본원에 개시된 조성물에서 사용될 수 있는 임의의 희석제, 부형제, 또는 담체를 말한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 이온 교환체, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백

질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드 규산, 마그네슘 트라이실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모 지방을 포함한다. 적합한 약학적 담체는 이 분야의 표준 참고서인 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company에 기재되어 있다. 그것들은 의도된 투여 형태, 즉, 경구 타블렛, 캡슐, 엘릭서(elixir), 시럽, 등에 관하여 선택될 수 있으며, 통상적인 약학적 실행과 일치한다.

[0060] 본 개시물에 따라 사용되는 조성물은 투여의 용이함 및 투약량의 균일성을 위해 투약 단위 형태로 포장될 수 있다. 용어 "단위 용량" 또는 "투약량"은 대상체에서 사용하기에 적합한 물리적으로 별개의 단위를 말하며, 각각의 단위는 투여, 즉, 적절한 경로 및 양생법에 관하여 원하는 반응을 생산하도록 계산된 사전 결정된 양의 조성물을 함유한다. 투여되는 양은 처리 횟수 및 단위 용량 둘 다에 따라서 원하는 결과 및/또는 보호에 따라 달라진다. 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 따라 달라지고 각각의 개체에 특유하다. 용량에 영향을 미치는 요인은 대상체의 육체적 및 임상적 상태, 투여 경로, 처리의 의도된 목적 (치유에 비해 증상의 완화), 특정 조성물의 효능, 안정성, 및 독성을 포함한다. 제제화할 때, 용액은 투약 제제과 호환 가능한 방식으로 및 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양으로 투여된다. 제제는 다양한 투약 형태, 예컨대 본원에 기재된 주사 용액의 유형으로 쉽게 투여된다.

[0061] 용어 "접촉하는"은 2개 이상 사이의 직접적인 또는 간접적인 결합 또는 상호작용을 의미한다. 직접적인 상호작용의 특정 예는 결합이다. 간접적인 상호작용의 특정 예는 하나의 실체물이 중개 분자에 작용하는 것으로, 이것은 결국 제2의 참조 실체물에 작용한다. 접촉은 본원에 사용된 바와 같이 용액에서, 고체상에서, 시험관 내에서, 생체 외에서, 세포에서 그리고 생체 내에서 이루어지는 것을 포함한다. 생체 내에서 접촉은 투여하는 것, 또는 투여라고 불릴 수 있다.

[0062] "생물학적 활성제" 또는 본원에 개시된 활성제는 단리된 또는 재조합 폴리펩타이드, 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 단리된 숙주 세포, 또는 항체, 뿐만 아니라 그것들 중 하나 이상을 포함하는 조성물 중 하나 이상을 의도한다.

[0063] "투여"는 1회 용량으로 치료 과정 전반에 걸쳐 연속적으로 또는 간헐적으로 효과를 얻을 수 있다. 투여의 가장 유효한 수단 및 투약량을 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고 치료에 사용된 조성물, 치료 목적, 치료되는 표적 세포, 및 치료되는 대상체에 따라 달라질 것이다. 단일 또는 다회수 투여가 수행될 수 있으며 투여 수준 및 패턴은 치료하는 의사에 의해 선택된다. 적합한 투약 제제 및 작용제를 투여하는 방법은 해당 분야에 공지되어 있다. 투여 경로가 또한 결정될 수 있고 가장 유효한 투여 경로를 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며 치료에 사용되는 조성물, 치료 목적, 치료되는 대상체의 건강 상태 또는 질환 스테이지, 표적 세포 또는 조직에 따라 달라질 것이다. 투여 경로의 비-제한적 예는 경구 투여, 비강 투여, 주사, 및 국소 적용을 포함한다.

[0064] 본 개시물의 작용제는 치료를 위해 임의의 적합한 투여 경로로 투여될 수 있다. 또한 최적의 경로는 수령체의 상태 및 연령, 및 치료되는 질환에 따라 달라질 것이다.

[0065] 용어 "유효량"은 원하는 효과를 달성하기에 충분한 양을 말한다. 치료적 또는 예방적 적용의 맥락에서, 유효량은 문제가 되는 병태의 유형 및 심각도 및 개개의 대상체의 특징, 예컨대 일반적인 건강 상태, 연령, 성별, 체중, 및 약학적 조성물에 대한 내성에 따라 다를 것이다. 면역원성 조성물의 맥락에서, 일부 구체예에서 유효량은 병원체에 대한 보호 반응을 일으키기에 충분한 양이다. 다른 구체예에서, 면역원성 조성물의 유효량은 항원에 대한 항체 생성을 초래하기에 충분한 양이다. 일부 구체예에서, 유효량은 필요로 하는 대상체에게 수동 면역을 부여하는데 필요한 양이다. 면역원성 조성물에 관하여, 일부 구체예에서 유효량은 상기 기재된 요인에 더하여 의도된 용도, 특정 항원 화합물의 면역원성의 정도, 및 대상체의 면역 시스템의 건강 상태/반응성에 따라 다를 것이다. 당업자는 이들 및 다른 요인에 따라 적절한 양을 결정할 수 있을 것이다.

[0066] 시험관 내 적용의 경우에, 일부 구체예에서 유효량은 문제의 적용의 크기 및 성질에 따라 다를 것이다. 또한 시험관 내 표적의 성질과 민감성 및 사용 방법에 따라 다를 것이다. 당업자는 이들 및 다른 고려사항에 기초하여 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 유효량은 구체예에 따라 조성물의 1회 이상의 투여를 포함할 수 있다.

[0067] "펩타이드 컨쥬게이트(conjugate)"는 하나 이상의 폴리펩타이드 및 또 다른 화학적 또는 생물학적 화합물의 공

유 또는 비-공유 결합에 의한 회합을 말한다. 비-제한적 예에서, 화학적 화합물과의 폴리펩타이드의 "컨쥬게이션"은 의도된 목적을 위해 폴리펩타이드의 안정성 또는 효험을 개선하였다. 한 구체예에서, 펩타이드는 담체에 컨쥬게이션되며, 담체는 리포솜, 미셀(micelle), 또는 약학적으로 허용 가능한 폴리머이다.

[0068] "리포솜"은 동심원 지질 이중층으로 이루어진 미세한 소포이다. 구조적으로, 리포솜은 크기가 다양하고 긴 튜브에서 구체의 형상을 가지며, 수백 옹스트롬(Angstrom)에서 밀리미터의 분수까지의 치수를 갖는다. 소포-형성 지질은 외층의 지질 조성물을 제공하는 최종 복합체의 명시된 정도의 유동성 또는 강성을 달성하도록 선택된다. 이들은 중성 (콜레스테롤) 또는 양극성이고 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜이노시톨 (PI), 및 스핑고미엘린 (SM) 및, 제한되는 것은 아니지만, 다이올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE)을 포함한 다른 유형의 양극성 지질을 포함하며, 14-22의 범위, 및 포화된 탄화수소 사슬 길이를 갖거나 또는 하나 이상의 이중 C=C 결합을 갖는다. 단독으로, 또는 다른 지질 구성요소와 조합하여 안정한 리포솜을 생산할 수 있는 지질의 예는 인지질, 예컨대 수소 첨가된 대두 포스파티딜콜린 (HSPC), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리조레시틴, 리조포스파티딜에탄올-아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 세팔린, 카르디오리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 다이스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 다이올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 다이팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 팔미토일오테오일포스파티딜콜린 (POPC), 팔리토일올레오일포스파티딜에탄올아민 (POPE) 및 다이올레오일포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도-트리에틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트 (DOPE-mal)이다. 리포솜으로 통합될 수 있는 추가적인 비-인 함유 지질은 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아이소프로필 미리스테이트, 트라이에탄올아민-라우릴 설페이트, 알킬-아릴 설페이트, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤 리시놀레에이트, 헥사데실 스테아레이트, 양쪽성 아크릴 폴리머, 폴리에틸옥실화된 지방산 아미드, 및 상기 언급된 양이온성 지질 (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol)을 포함한다. 음으로 대전된 지질은 포스파티드산 (PA), 다이팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 다이오테오일포스파티딜글리세롤 및 (DOPG), 다이세틸포스페이트를 포함한다. 전형적으로, 리포솜은 층상(lamellar) 구조의 전체적인 크기 및 성질에 기초하여 세 가지 범주로 나누어질 수 있다. 세 개의 분류는, New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine," December 1977에 의해 개발된 바와 같이 다중 층상 소포 (MLV), 작은 단일 층상 소포 (SUV) 및 큰 단일 층상 소포 (LUV)이다. 생물학적 활성제는 본원에 기재된 방법에 따른 투여를 위해 이와 같이 캡슐화될 수 있다.

[0069] "미셀"은 액상 콜로이드에 분산된 계면활성제 분자의 응집체이다. 수용액 중의 전형적인 미셀은 주위의 용제와 접촉된 친수성 "머리(head)" 영역과 응집체를 형성하여, 미셀 중심에 소수성 꼬리(tail) 영역을 격리시킨다. 이 유형의 미셀은 정상(normal phase) 미셀 (수중유 미셀)로 알려져 있다. 역미셀은 중심에 머리 군을 가지며 꼬리는 연장된다 (유중수 미셀). 미셀은 표적 세포 또는 조직에 효율적인 전달을 촉진하도록 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 항체 또는 조성물을 부착시키는데 사용될 수 있다.

[0070] 구절 "약학적으로 허용 가능한 폴리머"는 본원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드에 컨쥬게이션될 수 있는 화합물의 군을 말한다. 폴리펩타이드로의 폴리머의 컨쥬게이션은 생체 내 및 시험관 내에서 폴리펩타이드의 반감기를 연장시킬 수 있다는 것이 고려된다. 비-제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알콜, 셀룰로스 유도체, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 당, 폴리올 및 이것들의 혼합물을 포함한다. 생물학적 활성제는 본원에 기재된 방법에 따른 투여를 위해 약학적으로 허용 가능한 폴리머에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0071] "유전자 전달 비히클(vehicle)"은 숙주 세포로 삽입된 폴리뉴클레오타이드를 운반할 수 있는 임의의 분자로 정의된다. 유전자 전달 비히클의 예는 리포솜, 미셀, 천연 폴리머 및 합성 폴리머를 포함한 생체 적합성 폴리머; 지질단백질; 폴리펩타이드; 다당류; 지질다당류; 인공 바이러스 외피; 금속 입자; 및 박테리아, 또는 바이러스, 예컨대 바큘로바이러스(baculovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 및 레트로바이러스(retrovirus), 박테리오파지, 코스미드(cosmid), 플라스미드, 균류 벡터 및 다양한 진핵생물 및 원핵생물 숙주에서의 발현에 대해 기재된 분야에서 전형적으로 사용되고, 유전자 치료, 뿐만 아니라 간단한 단백질 발현에 사용될 수 있는 다른 재조합 비히클이다.

[0072] 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 유전자 전달 비히클을 사용하여 세포 또는 조직에 전달될 수 있다. "유전자 전달", "유전자 전송", "형질 도입", 등은 본원에 사용된 바와 같이 도입에 사용된 방법에 관계없이 숙주 세포로의 외인성 폴리뉴클레오타이드 (때때로 "전이유전자"라고 불림)의 도입을 나타내는 용어이다. 이러한 방법은 벡터-매개된 유전자 전송 (예를 들어, 바이러스 감염/트랜스펙션(transfection), 또는 다양한 다른 단백질-기반 또는 지질-기반 유전자 전달 복합체에 의해), 뿐만 아니라 "네이키드(naked)" 폴리뉴클레오타이드의 전달을 용이하게 하는 기술 (예컨대 전기천공법, "유전자 총(gene gun)" 전달 및 폴리뉴클레오타이드의 도입에 사용된 다양한 다른 기술)과 같이 다양한 널리 공지된 기술들을 포함한다. 도입된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포

에서 안정하게 또는 일과성으로 유지될 수 있다. 안정한 유지는 전형적으로 도입된 폴리뉴클레오타이드가 숙주 세포와 호환 가능한 복제 기원을 함유하거나 또는 숙주 세포의 레플리콘(replicon), 예컨대 염색체 외 레플리콘(예를 들어, 플라스미드) 또는 핵 또는 미토콘드리아 염색체로 통합되는 것을 필요로 한다. 해당 분야에 공지되고 본원에 기재된 바와 같이 많은 벡터가 포유류 세포로의 유전자의 전송을 매개할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "eDNA"는 병원성 생물막에 대한 구성요소로서 발견된 세포외 DNA를 말한다.

[0074] "플라스미드"는 염색체 DNA와 독립적으로 복제 가능한 염색체 DNA와 떨어져있는 염색체 외 DNA 분자이다. 많은 경우에, 그것은 원형 및 이중 가닥이다. 플라스미드는 미생물 집단 내에서 수평적 유전자 전송을 위한 메커니즘을 제공하고 전형적으로 주어진 환경 상태 하에서 선택적인 이점을 제공한다. 플라스미드는 경쟁적인 환경적 틈새(niche)에서 자연 발생한 항생제에 저항성을 제공하는 유전자를 운반할 수 있거나, 또는 대안으로 생산된 단백질은 유사한 상황에서 독소로 작용할 수 있다.

[0075] 유전자 조작에서 사용된 "플라스미드"는 "플라스미드 벡터"라고 불린다. 많은 플라스미드는 이러한 사용에 대해 상업적으로 이용 가능하다. 복제되는 유전자는 세포를 특정 항생제에 대해 저항성으로 만드는 유전자 및 그 부위에서 DNA 단편의 쉬운 삽입을 허용하는, 일반적으로 사용되는 여러 제한 부위를 함유하는 짧은 영역인 다중 클로닝 부위 (MCS, 또는 폴리링커(polylinker))를 함유하는 플라스미드의 카피(copy)에 삽입된다. 플라스미드의 또 다른 주요 용도는 대량의 단백질을 제조하는 것이다. 이 경우에, 연구원들은 관심 유전자를 가지고 있는 플라스미드를 함유하는 박테리아를 성장시킨다. 박테리아가 항생제 저항성을 부여하기 위한 단백질을 생산하는 것처럼, 삽입된 유전자로부터 대량의 단백질을 생산하는 것이 또한 유도될 수 있다. 이것이 유전자 또는 그것이 암호화하는 단백질을 대량 생산하는 싸고 쉬운 방법이다.

[0076] "효모 인공 염색체" 또는 "YAC"는 큰 DNA 단편 (100 kb보다 크고 3000 kb 이하)을 클로닝하는데 사용된 벡터를 말한다. 그것은 인공적으로 구성된 염색체이고 효모 세포에서 복제 및 보존에 필요한 텔로미어, 중심체, 및 복제 기원 서열을 함유한다. 초기 원형 플라스미드를 사용하여 만들어지면, 그것들은 제한 효소를 사용하여 선형화된 다음, DNA 리가제로 점착 말단의 사용에 의해 선형 분자 내에 서열 또는 관심 유전자를 추가할 수 있다. 효모 발현 벡터, 예컨대 YAC, YIp (효모 통합 플라스미드), 및 YEp (효모 에피솜 플라스미드)는 효모가 그 자체로 진핵 세포인 것처럼 번역 후 변형으로 진핵생물 단백질 생성물을 얻을 수 있으므로 매우 유용하지만, YAC는 BAC보다 더 불안정하여, 키메라 효과를 생산하는 것이 발견되었다.

[0077] "바이러스 벡터"는 재조합으로 생산된 바이러스 또는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 숙주 세포로 전달되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자로서 정의된다. 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus) 벡터, 알파바이러스(alphavirus) 벡터 등을 포함한다. 감염성 담배 모자이크 바이러스 (TMV)-기반 벡터는 단백질을 제조하는데 사용될 수 있고 담배 잎에서 그리피트신(Griffithsin)을 발현하는 것으로 보고되었다 (O'Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106(15):6099-6104). 알파바이러스 벡터, 예컨대 셈리키 삼림열 바이러스(Semliki Forest virus)-기반 벡터 및 신드비스 바이러스(Sindbis virus)-기반 벡터가 또한 유전자 치료 및 면역치료에 사용하기 위해 개발되었다. Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 및 Ying et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827 참조. 유전자 전송이 레트로바이러스 벡터에 의해 매개되는 양태에서, 벡터 작제물은 레트로바이러스 게놈 또는 그 일부, 및 치료 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 말한다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같이, "레트로바이러스 매개된 유전자 전송" 또는 "레트로바이러스 형질 도입"은 동일한 의미를 가지고 있고 세포에 들어가서 그 게놈을 숙주 세포 게놈으로 통합시키는 바이러스에 의해 유전자 또는 핵산 서열이 숙주 세포로 안정하게 전송되는 공정을 말한다. 바이러스는 일반적인 감염 메커니즘을 통해 숙주 세포로 들어갈 수 있거나 세포로 들어가기 위해 상이한 숙주 세포 표면 수용체에 결합하도록 변형될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 레트로바이러스 벡터는 바이러스 또는 바이러스-유사 진입 메커니즘을 통해 외인성 핵산을 세포로 도입시킬 수 있는 바이러스 입자를 말한다.

[0079] 레트로바이러스는 유전 정보를 RNA의 형태로 가지고 있지만; 바이러스가 세포를 감염시키면, RNA는 감염된 세포의 게놈 DNA로 통합되는 DNA 형태로 역전사된다. 통합된 DNA형태는 프로바이러스(provirus)라고 불린다.

[0080] 유전자 전송이 DNA 바이러스 벡터, 예컨대 아데노바이러스 (Ad) 또는 아데노-관련 바이러스 (AAV)에 의해 매개되는 양태에서, 벡터 작제물은 바이러스 게놈 또는 그 일부, 및 전이유전자를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 아데노바이러스 (Ad)는 50개가 넘는 혈청형을 포함하는, 비교적 잘 특성화된, 균질한 군의 바이러스이

다. 예를 들어, PCT 국제 출원 공개 번호 WO 95/27071 참조. Ad는 숙주 세포 게놈으로의 통합을 필요로 하지 않는다. 재조합 Ad 유래된 벡터, 특히 야생형 바이러스의 재조합 및 생성을 위한 가능성을 감소시키는 것들이 또한 구성될 수 있다. PCT 국제 출원 공개 번호 WO 95/00655 및 WO 95/11984, 야생형 AAV는 세포의 게놈으로 통합되는 높은 감염성 및 특이성을 갖는다. Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 및 Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 참조.

[0081] 프로모터 및 폴리뉴클레오타이드가 작동 가능하게 연결될 수 있는 클로닝 부위 둘 다를 함유하는 벡터는 해당 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 벡터는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 RNA를 전사시킬 수 있고, Stratagene (La Jolla, Calif.) 및 Promega Biotech (Madison, Wis.)와 같은 공급원으로부터 상업적으로 이용 가능하다. 발현 및/또는 시험관 내 전사를 최적화하기 위해서, 클론의 5' 및/또는 3' 비번역된 부분을 제거하거나, 추가하거나 또는 변화시켜 전사 또는 번역 수준에서 잠재적인 부적절한 번역 개시 코돈 또는 발현을 방해할 수 있는 다른 서열을 제거하는 것이 필요할 수 있다. 대안으로, 공통 리보솜 결합 부위는 시작 코돈의 바로 5'에 삽입되어 발현을 향상시킬 수 있다.

[0082] 유전자 전달 비히클은 또한 DNA/리포솜 복합체, 미셀 및 표적화된 바이러스 단백질-DNA 복합체를 포함한다. 표적화 항체 또는 그것의 단편을 또한 포함하는 리포솜이 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 세포 또는 세포 집단으로의 폴리뉴클레오타이드의 전달에 더하여, 세포 또는 세포 집단으로의 본원에서 기재된 단백질의 직접적인 도입은 단백질 트랜스펙션의 비-제한적 기술에 의해 실행될 수 있으며, 대안으로 본원에서 개시된 단백질의 발현을 향상시키고 및/또는 활성을 촉진하는 배양 조건은 다른 비-제한적 기술이다.

[0083] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체", "항체들" 및 "면역글로불린"은 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편 또는 그것들의 단일 사슬을 포함한다. 따라서 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩타이드를 포함한다. 용어 "항체", "항체들" 및 "면역글로불린"은 또한 임의의 아이소타입의 면역글로불린, 제한되는 것은 아니지만, Fab, Fab', $F(ab)_2$, Fv, scFv, dsFv, Fd 단편, dAb, VH, VL, VhH, 및 V-NAR 도메인; 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 카파 바디; 항체 단편으로부터 형성 다중특이적 항체 단편 및 하나 이상의 단리된 것들을 포함하는, 항원에 대한 특이적 결합을 유지하는 항체의 단편을 포함한다. 이러한 것들의 예는 중쇄 또는 경쇄의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 그것의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 (FR) 영역, 또는 그것들의 임의의 일부, 결합 단백질의 적어도 한 부분, 키메라 항체, 인간화된 항체, 단일 사슬 항체, 및 항체의 항원-결합 부분을 포함하는 융합 단백질 및 비-항체 단백질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 숙주 조직으로의 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 용어 "항-"은, 예를 들어, 항-DNABII, 항-IHF, 항-HU, 항-OMP P5와 같이, 단백질 명칭 앞에 사용될 때, 특정 단백질에 결합하고 및/또는 그것에 대한 친화도를 갖는 단클론성 또는 다클론성 항체를 말한다. 예를 들어, "항-IHF"는 IHF 단백질에 결합하는 항체를 말한다. 특이적 항체는 그것이 대항하여 발생한 단백질 이외의 단백질에 대한 친화도를 갖거나 그것에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-IHF는, IHF 단백질에 대하여 특이적으로 발생하였지만, 서열 상동성 또는 구조 상동성을 통해 관련이 있는 다른 단백질에도 결합할 수 있다.

[0084] 항체는 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 다클론성, 단클론성, 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 항체 단편일 수 있다. 항체는 임의의 적합한 생물학적 공급원, 예를 들어, 쥣과, 래트, 양 및 개과로부터 단리될 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같이, "단클론성 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻어진 항체를 말한다. 단클론성 항체는 고도로 특이적이며, 각각의 단클론성 항체가 항원상의 단일 결정요인에 대한 것이기 때문이다. 항체는, 예를 들어, 방사성 동위원소, 검출 가능한 생성물을 생성하는 효소, 형광 단백질, 등으로 검출 가능하게 라벨링될 수 있다. 항체는 다른 모이어티(moiety), 예컨대 특이적 결합 쌍의 구성원, 예를 들어, 비오틴 (비오틴-아비딘 특이적 결합 쌍의 구성원), 등에 추가로 컨쥬게이션될 수 있다. 항체는 또한, 제한되는 것은 아니지만, 폴리스티렌 플레이트 또는 비드, 등을 포함하는 고체 지지체에 결합될 수 있다.

[0086] 단클론성 항체는 해당 분야에 공지된 하이브리도마(hybridoma) 기술 또는 재조합 DNA 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 하이브리도마는 실험실에서 항체-생산 림프구 및 비-항체 생산 암 세포, 보통은 골수종(myeloma) 또는 림프종(lymphoma)의 융합으로부터 생산된 세포이다. 하이브리도마는 증식하여 지속적인 특이적 단클론성 항체의 샘플을 생산한다. 항체를 생성하거나 선택하기 위한 대안의 기술은 시험관 내에서 관심 항원에 림프구의 노출, 및 세포, 파지, 또는 유사한 시스템에서 항체 디스플레이 라이브러리의 스크리닝을 포함한다.

[0087] 용어 "인간 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 가진 항체를 포함하도록 의도된다. 본원에 개시된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 하지만, 용어 "인간 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 또 다른 포유류 종, 예컨대 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포함하도록 의도되는 것은 아니다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간에서 단백질의 실질적으로 보든 부분 (예를 들어, CDR, 프레임워크, C_L, C_H 도메인 (예를 들어, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), 힌지, (VL, VH))이 실질적으로 비-면역원성이며, 소수의 서열 변경 또는 변화를 갖는 항체를 말한다. 유사하게, 항체는 영장류 (원숭이, 바분(baboon), 침팬지, 등), 설치류 (마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 햄스터, 등)를 지정하고 다른 포유동물은 이러한 종, 아속, 속, 아과, 과 특이적 항체를 지정한다. 또한, 키메라 항체는 상기 중 임의의 조합을 포함한다. 이러한 변경 또는 변화는 선택적으로 비-변형된 항체에 비해 인간 또는 다른 종에서 면역원성을 유지하거나 감소시킨다. 따라서, 인간 항체는 키메라 또는 인간화된 항체와 별개이다. 인간 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비-인간 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 생산될 수 있다는 것이 지적된다. 또한, 인간 항체가 단일 사슬 항체일 때, 그것은 고유한 인간 항체에서 발견되지 않는 링커 펩타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역을 연결하는 링커 펩타이드, 예컨대 2 내지 약 8개의 글리신 또는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 링커 펩타이드는 인긴 기원인 것으로 간주된다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같이, 인간 항체는, 항체가 인간 면역글로불린 서열을 사용하여, 예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자를 가지고 있는 트랜스제닉(transgenic) 마우스를 변역화함으로써 또는 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝함으로써, 시스템으로부터 얻어지는 경우, 특정 생식계열 서열"로부터 유래된다". 인간 생식계열 면역글로불린 서열"로부터 유래된" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열에 비교함으로써 이와 같이 확인될 수 있다. 선택된 인간 항체는 전형적으로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열이 적어도 90% 동일하고 다른 종의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열 (예를 들어, 쥣과 생식계열 서열)과 비교하여 인간 항체를 인간의 것으로 확인하는 아미노산 잔기를 함유한다. 어떤 경우에는, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열이 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 전형적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 10개 미만의 아미노산의 차이를 나타낼 것이다. 어떤 경우에는, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 5개 이하, 또는 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산의 차이를 나타낼 수 있다.

[0089] "인간 단클론성 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 가진, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 용어는 또한 재조합 인간 항체를 의도한다. 이들 항체를 제조하는 방법은 본원에 기재된다.

[0090] 용어 "재조합 인간 항체", 본원에 사용된 바와 같이, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 단리된 모든, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉이거나 트랜스염색체(transchromosomal)인 동물 (예를 들어, 마우스) 또는 그것들로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 단리된 항체, 재조합, 결합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 다른 DNA 서열로의 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는다. 특정 구체예에서, 하지만, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용될 때, 생체 내 체세포 돌연변이 유발)의 대상이 될 수 있으며 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이것들과 관련이 있지만, 생체 내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로는 존재하지 않을 수 있는 서열이다. 이들 항체를 제조하는 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 키메라 항체는 경쇄 및 중쇄 유전자가 전형적으로 상이한 종에 속한 항체 가변 영역 및 불변 영역 유전자의 유전자 조작에 의해 구성된 항체이다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간화된 항체" 또는 "인간화된 면역글로불린"은 비-인간 면역글로불린으로부

터 유래된 최소한의 서열을 함유하는 인간/비-인간 키메라 항체를 말한다. 대개, 인간화된 항체는 수령체의 가변 영역의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 가진 비-인간 종 (공여체 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 또는 비-인간 영장류의 가변 영역의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수령체 항체)이다. 인간화된 항체는 수령체 항체 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부, 프레임워크 영역에서 하나 이상의 아미노산을 함유하는 비-인간 항체, 인간 항체의 상응하게 위치한 아미노산으로 치환된 불변 영역 또는 CDR을 선택적으로 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 그 항체의 비-인간화된 버전과 비교하여 인간 숙주에서 감소된 면역 반응을 생산할 것으로 예상된다. 인간화된 항체는 항원 결합 또는 다른 항체 기능에 대하여 실질적으로 아무 효과가 없는 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있다. 보존적 치환 분류는 글리신-알라닌, 발린-류신-아이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 세린-트레오닌 및 아스파라긴-글루타민을 포함한다.

[0093] 용어 "다클론성 항체" 또는 "다클론성 항체 조성물"은 본원에 사용된 바와 같이 상이한 B-세포주로부터 유래된 항체의 조제물을 말한다. 그것들은 각각 상이한 에피토프를 인식하는 특이적 항원에 대해 분비된 면역글로불린 분자의 혼합물이다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체 유도체"는 전장 항체 또는 항체의 단편을 포함하며, 예를 들어, 항체를 제2 분자에 연결시키기 위해 아미노산 중 하나 이상이 알킬화, 페길화, 아실화, 에스터 형성 또는 아미드 형성 등에 의해 화학적으로 변형된다. 이것은 페길화된 항체, 시스테인-페길화된 항체, 및 이것들의 변이체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "라벨"은 검출되는 조성물에 직접적으로 또는 간접적으로 컨쥬게이션된 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 화합물 또는 조성물, 예를 들어, N-말단 히스티딘 태그 (N-His), 자기적으로 활성인 동위원소, 예를 들어, ^{115}Sn, ^{117}Sn 및 ^{119}Sn, 비-방사성 동위원소, 예컨대 ^{13}C 및 ^{15}N, 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질, 예컨대 "라벨링된" 조성물을 생성하기 위한 항체를 의도한다. 용어는 또한 삽입된 서열의 발현시 신호를 제공하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 녹색 형광 단백질 (GFP) 등에 컨쥬게이션된 서열을 포함한다. 라벨은 그 자체로 (예를 들어, 방사성 동위원소 라벨 또는 형광 라벨) 검출 가능할 수 있거나, 또는 효소적 라벨의 경우에는, 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화에 촉매 작용할 수 있다. 라벨은 소규모 검출에 적합하거나 고처리량 스크리닝에 더 적합할 수 있다. 이와 같이, 적합한 라벨은 자기적 활성 동위원소, 비-방사성 동위원소, 방사성 동위원소, 형광 색소, 화학 발광 화합물, 염료, 및 효소를 포함한 단백질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 라벨은 간단하게 검출될 수 있거나 정량화될 수 있다. 간단하게 검출되는 반응은 일반적으로 존재만이 확인되는 반응을 포함하는 반면, 정량화되는 반응은 일반적으로 강도, 극성, 및/또는 다른 성질과 같이 정량화 가능한 (예를 들어, 수치적으로 보고 가능한) 값을 가진 반응을 포함한다. 발광 또는 형광 발광 검정에서, 검출 가능한 반응은 결합에 실제로 수반된 검정 구성요소와 회합된 발광단 또는 형광단을 사용하여 직접적으로, 또는 또 다른 (예를 들어, 리포터 또는 지표) 구성요소와 회합된 발광단 또는 형광단을 사용하여 간접적으로 생성될 수 있다. 신호를 생산하는 발광 라벨의 예는 생물 발광 및 화학 발광을 포함한다. 검출 가능한 발광 반응은 일반적으로 발광 신호의 변화, 또는 발생을 포함한다. 발광 라벨링 검정 구성요소에 대해 적합한 방법 및 발광단은 해당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6^{th} ed)에 기재되어 있다. 발광 프로브의 예는 애쿼린 및 루시퍼라제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역컨쥬게이트"는 제2의 작용제, 예컨대 세포독성제, 검출 가능한 작용제, 방사능제, 표적화 작용제, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 합성 항체, 반합성 항체, 또는 다중특이적 항체와 회합되거나 이것들에 연결된 항체 또는 항체 유도체를 포함한다.

[0097] 적합한 형광 라벨의 예는 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 에오신, 에리트로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라사이트 그린(Malacite green), 스틸벤, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 캐스케이드 블루(Cascade Blue)™, 및 텍사스 레드(Texas Red)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 적합한 광학 염료는 Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6^{th} ed.)에 기재되어 있다.

[0098] 또 다른 양태에서, 형광 라벨은 세포 또는 조직의 표면에 또는 그 위에 존재하는 세포 구성요소, 예컨대 세포 표면 마커로의 공유 부착을 촉진하도록 기능화된다. 적합한 작용기는, 제한되는 것은 아니지만, 아이소티오시아

네이트 기, 아미노 기, 할로아세틸 기, 말레이미드, 숙신이미딜 에스터, 및 설포닐 할리드를 포함하며, 이것들은 모두 형광 라벨을 제2 분자에 부착시키는데 사용될 수 있다. 형광 라벨의 작용기의 선택은 링커, 작용제, 마커, 또는 제2의 라벨링 작용제로의 부착 부위에 따라 다를 것이다.

[0099] "진핵 세포"는 모네라(monera)를 제외한 모든 생물계를 포함한다. 그것들은 박-결합된 핵을 통해 쉽게 구별될 수 있다. 동물, 식물, 균류, 및 원생생물은 진핵 생물 또는 세포가 내막 및 세포 골격에 의해 복합 구조로 조직화되는 유기체이다. 가장 특징적인 막-결합된 구조는 핵이다. 구체적으로 나열되지 않는 한, 용어 "숙주"는 진핵 생물 숙주를 포함하며, 예를 들어, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함한다. 진핵 생물 세포 또는 숙주의 비-제한적 예는 시미안, 소과, 돼지과, 쥣과, 래트, 조류, 파충류 및 인간이다.

[0100] "원핵 세포"는 보통 핵 또는 임의의 다른 막-결합된 세포 기관이 없고 두 개의 도메인, 박테리아 및 고세균류(archaea)로 나누어진다. 염색체 DNA에 더하여, 이들 세포는 또한 에피솜이라고 불리는 원형 루프에 유전 정보를 함유할 수 있다. 박테리아 세포는 매우 작고, 대략 동물 미토콘드리아의 크기이다 (직경이 약 1-2 μm이고 길이가 10 μm이다). 원핵 세포는 세 가지 주요 형상을 특징으로 한다: 막대 모양, 구형, 및 나선형. 진핵 생물과 같이 정교한 복제 공정을 통하는 대신에, 박테리아 세포는 이분법으로 나누어진다. 예는 바실루스(*Bacillus*) 박테리아, 대장균(*E. coli*) 박테리아, 및 살모넬라(*Salmonella*) 박테리아를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0101] "고유한" 또는 "천연" 항원은 에피토프를 함유하고, 천연 생물학적 공급원으로부터 단리되었고, 항원 수용체, 특히 T 세포 항원 수용체 (TCR)에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드, 단백질 또는 단편이다.

[0102] 용어 "항원" 및 "항원성"은 항체에 의해 인식되거나 그렇지 않으면 항체-리간드 쌍의 구성원으로서 작용하는 능력을 가진 분자를 말한다. "특이적인 결합"은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역과의 항원의 상호작용을 말한다. 항체-항원 결합은 생체 내에서 또는 시험관 내에서 일어날 수 있다. 당업자는 단백질, 핵산, 지방산, 지질, 지질다당류 및 다당류를 포함한 거대 분자가 항원으로 작용할 수 있는 가능성을 갖는다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 항체 리간드로 작용할 수 있는 가능성을 가진 단백질을 암호화하는 핵산이 반드시 항원을 암호화한다는 것을 추가로 이해할 것이다. 당업자는 항원이 전장 분자에 제한되는 것이 아니라, 부분적인 분자를 또한 포함할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 용어 "항원성"은 항원의 성질을 가진 분자에 대한 형용사 지시대상이다. 용어는 면역원성인 물질, 즉 면역원, 뿐만 아니라 면역학적 무반응성, 또는 아네르기(anergy)를 유도하는 물질, 즉, 아네르겐(anergen)을 포함한다.

[0103] "변화된 항원"은 상응하는 야생형 항원과 상이한 1차 서열을 가진 것이다. 변화된 항원은 합성 또는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있고, 예를 들어, 인산화, 글리코실화, 교차-결합, 아실화, 단백질 가수분해 분열, 항체 분자, 막 분자 또는 다른 리간드로의 연결에 의해 번역 중에 또는 후에 별도로 변형된 항원성 펩타이드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다 (Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320). 본원에 개시된 합성 또는 변화된 항원은 천연 에피토프와 동일한 TCR에 결합하도록 의도된다.

[0104] "면역 반응"은 광범위하게 외래 물질에 대한 림프구의 항원-특이적 반응을 말한다. 용어 "면역원" 및 "면역원성"은 면역 반응을 유도하는 능력을 가진 분자를 말한다. 모든 면역원은 항원이지만, 모든 항원이 면역원성인 것은 아니다. 본원에 개시된 면역 반응은 체액성 (항체 활성을 통해) 또는 세포-매개될 수 있다 (T 세포 활성화를 통해). 반응은 생체 내에서 또는 시험관 내에서 일어날 수 있다. 당업자는 단백질, 핵산, 지방산, 지질, 지질다당류 및 다당류를 포함한 다양한 거대 분자가 면역원성일 가능성을 가진다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 면역 반응을 유도할 수 있는 분자를 암호화하는 핵산이 반드시 면역원을 암호화한다는 것을 추가로 이해할 것이다. 당업자는 면역원이 전장 분자에 제한되는 것이 아니라, 부분적인 분자를 포함할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다.

[0105] 용어 "수동 면역"은 항체의 전송을 통한 한 대상체에서 다른 대상체로의 면역력의 전송을 말한다. 수동 면역은 모 항체가 태아로 전송될 때와 같이 자연적으로 발생할 수 있다. 수동 면역은 또한 항체 조성물이 비-면역 대상체에 투여될 때와 같이 인공적으로 일어날 수도 있다. 항체 공여체 및 수령체는 인간 또는 비-인간 대상체일 수 있다. 항체는 다클론성 또는 단클론성일 수 있고, 시험관 내에서 또는 생체 내에서 생성될 수 있으며, 정제되거나, 부분적으로 정제되거나, 또는 구체예에 따라 정제되지 않을 수도 있다. 본원에 기재된 일부 구체예에서, 수동 면역은 특정 항원을 특이적으로 인식하거나 이것에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 투여를 통해 필요로 하는 대상체에게 부여된다. 일부 구체예에서, 수동 면역은 특정 항원을 특이적으로 인식하거나 이것에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드의 투여를 통해 부여된다.

[0106] 본 개시물의 맥락에서, "리간드"는 폴리펩타이드이다. 한 양태에서, 용어 "리간드"는 본원에 사용된 바와 같이 또 다른 분자 상의 특이적 부위에 결합하는 임의의 분자를 말한다. 즉, 리간드는 단백질에 대한 면역 효과기 세포 또는 항체와의 반응에서 단백질의 특이성을 부여하거나 단백질에 대한 DNA와의 반응에서 단백질의 특이성을 부여한다. 한 양태에서 그것은 면역 효과기 세포 상의 상보적 결합 부위와 직접적으로 조합되는 단백질 내 리간드 부위이다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체에서 면역 반응을 유도하는"은 해당 분야에서 널리 이해되는 용어이고 대상체로 항원 (또는 에피토프)의 도입 전 면역 반응 (존재하면)에 비해 대상체로의 항원 (또는 에피토프)의 도입 후 항원 (또는 에피토프)에 대한 면역 반응에서 적어도 약 2배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 100배, 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 또는 그 이상의 증가가 검출되거나 측정될 수 있다는 것을 의도한다. 항원 (또는 에피토프)에 대한 면역 반응은 항원-특이적 (또는 에피토프-특이적) 항체의 생산, 및 표면 상에서 항원 (또는 에피토프)에 특이적으로 결합하는 분자를 발현하는 면역 세포의 생산을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 주어진 항원 (또는 에피토프)에 대한 면역 반응이 유도되었는지를 결정하는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 항원-특이적 항체는, 제한되는 것이 아니라, ELISA를 포함하여, 해당 분야에 공지된 다양한 면역 검정 중 어느 것을 사용해서도 검출될 수 있으며, 예를 들어, 샘플에서 고정된 항원 (또는 에피토프)로의 항체의 결합은 검출 가능하게 라벨링된 제2 항체 (예를 들어, 효소-라벨링된 마우스 항-인간 Ig 항체)로 검출된다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 교체 가능하게 사용된 "고체상 지지체" 또는 "고체 지지체"는 특정 유형의 지지체에 제한되지 않는다. 오히려 다수의 지지체가 이용 가능하고 당업자에게 공지되어 있다. 고체상 지지체는 실리카겔(silica gel), 수지, 유도체화된 플라스틱 필름, 유리 비드, 면직물, 플라스틱 비드, 알루미나 겔을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "고체 지지체"는 또한 합성 항원-제공 매트릭스, 세포, 및 리포솜을 포함한다. 적합한 고체상 지지체는 원하는 최종 용도 및 다양한 프로토콜에 대한 적합성에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 합성에 대하여, 고체상 지지체는 폴리스티렌 (예를 들어, Bachem Inc., Peninsula Laboratories, 등으로부터 얻어진 PAM-수지), POLYHIPE® 수지 (Aminotech, Canada로부터 얻어짐), 폴리아미드 수지 (Peninsula Laboratories로부터 얻어짐), 폴리에틸렌 글리콜로 이식된 폴리스티렌 수지 (TentaGel®, Rapp Polymere, Tubingen, Germany) 또는 폴리다이메틸아크릴아미드 수지 (Milligen/Biosearch, Calif.로부터 얻어짐)와 같은 수지를 나타낼 수 있다.

[0109] 고체상 지지체의 예는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암, 및 자철석을 포함한다. 담체의 성질은 어느 정도로 가용성이거나 불용성일 수 있다. 지지체 재료는 커플링된 분자가 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 또는 항체에 결합할 수 있는 한 사실상 임의의 가능한 구조적 구성형태를 가질 수 있다. 따라서, 지지체 구성형태는 비드에서와 같이 구형이거나, 또는 테스트 튜브의 내표면, 또는 막대의 외표면에서와 같이 원통형일 수도 있다. 대안으로, 표면은 시트(sheet), 테스트 스트립(test strip), 등 또는 대안으로 폴리스티렌 비드와 같이 평평할 수 있다. 당업자는 결합 항체 또는 항원에 적합한 많은 다른 담체를 알고 있거나, 일상적인 실험의 사용에 의해 그것을 확인할 수 있을 것이다.

[0110] 용어 "면역 반응을 조절하는 것"은 면역 반응을 유도 (증가, 유도)하고; 면역 반응을 감소 (저해)시키는 것을 포함한다. 면역 조절 방법 (또는 프로토콜)은 대상체에서 면역 반응을 조절하는 것이다.

[0111] **본 개시물을 수행하기 위한 방식**

[0112] **I. 생물막 구조 및 질환**

[0113] 만성 및 재발성 박테리아 감염을 지속하는 박테리아의 레저버는 표면에 부착되었고, 이 상태에서, 숙주 면역 시스템, 뿐만 아니라 항미생물제에 의해 클리어런스에 저항할 수 있는 박테리아의 공동체인 생물막에 있다. 실제로, 생물막 상태에서 박테리아는 전형적으로 항생제에 대해 자유 생활 또는 부유 상태의 동일한 박테리아보다 >1000배 더 저항성이다. Ceri et al. (1999) J Clin Microbiol. 37(6):1771-6. 생물막 박테리아가 클리어런스에 저항하는 능력은 환경적 위험에 대한 물리적 장벽으로 작용하는 반투과성 자가 제조된 매트릭스 또는 세포외 폴리머 물질 (EPS)을 생성할 뿐만 아니라, 이 저항성 상태를 향상시키기 위해 대사를 제한하는 변화된 생리학에 대한 조건을 생성한다. EPS의 구성요소가 각각의 박테리아에 특이적이고 단백질, 다당류, 지질 및 핵산을 포함하지만, EPS의 성질은 박테리아 속이 전체적으로 생산적으로 상호작용 (예를 들어, 대사 파트너로서)하기에 충분히 도움이 된다. 이것 때문에, 여러 최근의 발견들은 모든 진정세균(eubacteria)에 공통적인 보편적인 기본 EPS 구조의 가능성을 가져왔다. Whitchurch 및 동료들은 세포외 DNA (eDNA)가 공통적인 EPS 구성요소이고 박테

리아에 DNase로의 처리가 생물막 형성을 방지하기에 충분하다는 것을 보여주었다 (Whitchurch et al. (2002) Science. 295(5559)). 이 결과는 다수의 속에 대해 되풀이되었지만, DNase의 사용은 eDNA가 생활 주기 전반에 걸쳐 생물막에서 분명하다는 사실에도 생물막 분주 후 1 또는 2일 이상 잔존 생물막을 치료하는데 실패했다. 별도로, 출원인은 eDNA 의존적 EPS의 필수 구성요소로서 모든 진정세균에 공통적인 뉴클레오이드 회합 단백질 (nucleoid associated protein: NAP)의 유일한 패밀리인 DNABII 단백질을 사전에 확인하였다. 실제로, DNABII 단백질에 대한 항체는 대량의 배지로부터 DNABII 단백질을 적정하여 DNABII 단백질의 평형을 eDNA-결합된 상태에서 결합되지 않은 상태로 변화시키며, 이것은 지금까지 테스트된 모든 박테리아 생물막의 심각한 붕괴를 초래하고, 혼합된-종 생물막을 포함한다. Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44. 중요하게는, DNase와 달리, DNABII 단백질에 대한 항체로의 처리는 모든 생물막 발달 스테이지에서 효과적이며 이것은 eDNA-의존적 EPS가 생물막 연령에 관계없이 중요한 구조임을 입증한다. Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58. 그럼에도, eDNA 및 DNABII 패밀리의 구성원이 EPS의 필수적인 구성요소임을 알고 있고, 완전한 EPS 구조가 이해하기 어려운 것으로 입증되었음을 이해하기 때문에; DNABII 단백질 및 DNA는 시험관 내에서 기능적인 EPS 구조를 개괄하기에 불충분하다. 출원인은 본원에서 다수의 인간 병원체에 대해, 생물막이 성숙할 때 eDNA 의존적 EPS가 DNABII 단백질, 뿐만 아니라 폴리아민 둘 다에 의존적이며 이로 인해 eDNA가 B-DNA 입체구조에서 Z-DNA 입체구조로 변화된다는 것을 기재한다. 이 후자의 결과는 특히 DNase가 성숙한 생물막을 붕괴시키는 것에 실패했다는 것을 설명할 가능성이 크기 때문에 아주 흥미로우며; 뉴클레아제는 단지 더 고전적인 B형의 DNA를 분열시킨다.

[0114] *세포내 박테리아 뉴클레오이드*

[0115] 박테리아 내부의 DNA는 고도로 구성되고 DNA 복제, 회복, 전사, 및 재조합을 포함하는 모든 형태의 핵산 공정의 조절을 용이하게 한다. 진핵 세포와 달리, 박테리아는 히스톤이 없다. 대신에 박테리아 DNA는 부분적으로는 뉴클레오이드 회합된 단백질 (NAP)이라고 불리는 단백질의 클래스에 의해 구성된다. NAP는 일괄적으로 DNA에 결합하여 기능적인 구조를 생성한다. Dillon et al. (2010) Nat Rev Microbiol. 8(3):185-95. 속 전반에 걸쳐 존재하는 다수의 NAP 구성원들 중에서, 단지 DNABII 패밀리만이 모든 진정세균 사이에서 편재한다. Dey et al. (2017) Mol Phylogenet Evol. 107:356-66. 단백질의 DNABII 패밀리는 다이머 (종에 따라 호모다이머 또는 헤테로다이머)로서 기능하고 히스톤-유사 단백질 HU 및 IHF를 포함한다. HU는 이중 가닥 DNA (dsDNA)에 약하고 비-특이적으로 결합하고 이것들을 구부리지만 사전에 구부러진 또는 구성된 dsDNA3에 대해 훨씬 더 높은 친화도를 갖는다. IHF 유사한 HU는 사전에 구부러진/구성된 DNA에 대해 강력한 선호도로 DNA에 결합하고 이것을 구부린다. HU와 달리, IHF는 단지 프로테오박테리아(proteobacteria)에 의해서만 발현되고 또한 특이적인 DNA 공통 서열에 대해서 선호도를 나타낸다. Swinger et al. (2004) Curr Opin Struct Biol. 14(1):28-35.

[0116] *세포외 박테리아 뉴클레오이드*

[0117] '형질전환 원칙(transforming principle)'은 DNA의 결과였다는 발견 이래로 세포외 DNA (eDNA)는 생물학적 역할을 갖는 것으로 알려져있다. Avery et al. (1944) J Exp Med. 79(2):137-58. 실제로, eDNA가 또한 박테리아 생물막의 세포외 매트릭스 (세포외 폴리머 물질, EPS)에 중요하다. Gunn et al. (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46. 하지만, 생물막 eDNA의 구조, 및 eDNA 기능에 대한 상기 구조의 중요성은 지금까지는 조사되지 않았다.

[0118] *만성 및 재발성 감염은 박테리아 생물막의 결과이다*

[0119] 생물막은 세포 간 연락 및 수송 시스템에 의해 부유성 박테리아와 추가로 구별되지만, 가장 뚜렷한 특징은 반투과성 장벽으로 작용하고 변화된/둔화된 대사를 위한 환경을 생성함으로써 체류하는 생물막 박테리아를 보호하는 자가 제조된 EPS이며; 실제로 생물막 박테리아는 부유성 대응물보다 항생제에 대해 1000배보다 더 저항성이다. Ceri et al. (1999) J Clin Microbiol. 37(6):1771-6. 흥미롭게도, 각각의 박테리아의 EPS는 별개의 것이고 다양한 단백질, 지질, 다당류, 및 핵산으로 이루어진다. Gunn et al. (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46. 하지만, 생물막이 단일 종으로 이루어질 수 있지만, 일반적으로 만성 감염에서 및 언제나 그것들이 다수의 속으로 구성된 환경에서는, 이와 같이 생산적으로 상호작용하는 것이 가능할 필요가 있다 (예를 들어, 특이적 대사 파트너와 동시-응집). Stacy et al. (2016) Nat Rev Microbiol. 14(2):93-105; Wolcott et al. (2013) Clin Microbiol Infect. 19(2):107-12). 이 공동체 개념은 다양한 EPS 조성에도, 각각의 EPS는 생물막 내에서 다양한 박테리아가 상호작용할 수 있도록 충분히 수용되어야 한다는 것을 나타내며, 또한 생물막 EPS가 보편적인 기

본 구조를 가질 가능성이 크다는 것을 시사한다.

[0120] *eDNA 의존적 EPS는 보편적인 기본 아키텍처의 품질을 갖는다*

[0121] 다수의 기는 인간 및 생태계의 속 둘 다로부터 박테리아 생물막과 회합된 eDNA를 검사하고 스캐폴드 구조를 관찰하였다 **(도 1A)**. Jurcisek et al. (2017) Proc Natl Acad Sci U S A. 114(32):E6632-E41; Sena-Velez et al. (2016) PLoS One. 11(6):e0156695; Wang et al. (2015) Environ Microbiol Rep. 7(2):330-40. Whitchurch 및 동료들은 먼저 슈도모나스 애루기노사(*P. aeruginosa*) 생물막이 데옥시뉴클레아제 I (DNase) 처리에 의해 방지될 수 있다는 것을 보여주었으며 (Whitchurch et al. (2002) Science. 295(5559)), 이것은 eDNA가 EPS의 중요한 구조적 구성요소라는 것을 나타낸다. DNase가 많은 속에서 초기 생물막 형성을 억제할 수 있지만 (Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4; Martins et al. (2012) Mycoses. 55(1):80-5; Hymes et al. (2013) J Infect Dis. 207(10):1491-7)), 생물막이 성숙함에 따라 eDNA가 분명하게 지속된다는 사실에도 생물막은 시간이 흐름에 따라 DNase에 대해 저항성이 된다. Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Hall-Stoodley et al. (2008) BMC Microbiol. 8:173; Izano et al. (2009) Microb Pathog. 46(4):207-13; Kaplan et al. (2012) J Antibiot (Tokyo). 65(2):73-7; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Tetz et al. (2010) DNA Cell Biol. 29(8):399-405. 이 결과는 종종 eDNA가 EPS의 구조적 온전성에 더 이상 중요하지 않다는 의미로 해석되지만, 출원인은 eDNA가 지속될 뿐만 아니라, 주요 기본 EPS 구조가 된다는 것을 보여주었다. Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58.

[0122] *단백질의 DNABII 패밀리는 생물막 eDNA-스캐폴드된 EPS의 구조적 온전성을 유지하는 린치핀(linchpin)이다.*

[0123] 출원인들은 이전에 편재한 DNABII 단백질은 eDNA의 구조적 구성요소이지만, 아마도 다른 NAP는 아니며 (Devaraj et al. (2017) Microbiologyopen.), 제거되면, eDNA 구조가 붕괴된다는 것을 보여주었다. Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30. 실제로, DNABII 단백질은 생체 내에서 형성된 생물막의 eDNA 스캐폴드의 꼭지점 (사전에 구부러진 DNA)에 특이적으로 결합하는 반면에 DNABII 단백질에 대한 항체는 생물막 성숙함에 관계없이 eDNA-스캐폴드된 EPS의 구조를 약화시키기에 충분하고 결과로서 출원인들이 검사한 모든 종에 대해 단일 및 다중-종 생물막 둘 다의 심각한 붕괴를 유발한다는 것이 발견되었다 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30). Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58). 이 붕괴는 체류 박테리아를 부유 상태로 방출하여 항미생물 및 면역 민감성 상태로 만들며 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58), 이것은 생물막 구조에서 이 단백질 패밀리의 중요성 및 보편성을 입증한다. DNABII 패밀리와 DNA의 공지된 상호작용을 고려하면, 출원인들이 박테리아 생물막에서 관찰된 3차원 스캐폴드 유사 구조를 개괄하는 DNA와 DNABII 단백질만으로 조건을 생성할 수 없다는 것은 예상하지 못했다.

[0124] *폴리아민은 세포 내 및 세포 외에 편재하고 생물막의 eDNA-스캐폴드된 EPS 구조에 필요하다.*

[0125] 폴리아민은 전형적으로 중성 pH에서 양으로 대전된 (염기성) 다수의 1차 아민을 함유하는 짧은 유기 분자이고 일반적으로 아미노산을 탈카르복실화함으로써 유래된다 **(도 1B)**. Michael et al. (2016) Biochem J. 473(15):2315-29. 폴리아민은 자연에서 편재하고, 세포 내 및 세포 외 둘 다에서 mM 농도만큼 높은 것으로 발견되었으며 (Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99) 스페르미딘, 스페르민, 및 푸트레신이 가장 풍부하다. 폴리아민은 박테리아 생리학의 다수의 공정에 수반되고, 그것들은 아마도 다섯 가지 이유로 eDNA-스캐폴드된 EPS에 가장 중요하다. 첫 번째로, 그것들은 DNA에 결합하고 포스페이트 백본의 음전하를 중성화시키고, 결과로서 DNA 구조를 변화시킨다. Bachrach et al. (2005) Curr Protein Pept Sci. 6(6):559-66; Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46(3):595-603. 두 번째로, 폴리아민은 낮은 농도 (mM)에서 단백질-DNA 상호작용을 촉진하는 성향이 있지만 더 높은 농도(mM)에서는 방해하는 성향이 있으며, 한 가지 예외는 DNA가 두꺼운 섬유를 형성하게 하는 DNABII-DNA 상호작용이다. Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951 61. 세 번째로, 폴리아민 합성이 세포 외에서 발생한 이들 효과 중 일부로 생물막 형성 중에 유도되는 것으로 발견되었다 (지금까지 막테리아 막에서만 검사되었지만). Wilton et al. (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60(1):544-53. 네 번째로, 폴리아민과 DNA의 혼합물을 가시화하기 위한

원자력 현미경 (AFM) 실험은 생물막 eDNA 스캐폴드와 고도로 유사한 구조를 나타낸다 **(도 1C)**. 마지막으로, 폴리아민은 생리학적 농도 (100 μM)에서 취약한 서열에서 고유한 B형 DNA의 Z형 DNA로의 전환을 유도할 수 있다. Thomas et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14(16):6721-33; Thomas et al. (1988) J Mol Biol. 201(2):463-7.

[0126] *Z-DNA로의 B-DNA의 전환은 eDNA-스캐폴드된 EPS 뉴클레아제를 저항성으로 만들고 안정한 구조재를 생성하기 위한 신규한 수단일 수 있다.*

[0127] B-DNA 및 Z-DNA는 평형 상태로 존재하는 dsDNA의 별개의 입체구조이며 B-DNA는 대부분의 생리학적인 조건 하에서 우세하다. 퓨린 및 피리미딘 (특히 dGdC)을 대체하는 것은 고염 (몰 1가 또는 2가 양이온)에서 또는 음의 슈퍼코일 형성(supercoiling) 하에 Z-DNA로 존재하는데 더 취약하다. Pohl et al. (1983) Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 47 Pt 1:113-7; Pohl et al. (1986) Proc Natl Acad Sci U S A. 83(14):4983-7. 후자의 경우에, Z-DNA를 형성하는데 취약한 영역은 음의 슈퍼코일 형성이 일과성으로 유도될 때 전사 중에 B-DNA 옆에 잠시 병치될 수 있다. Rahmouni et al. (1992) Mol Microbiol. 6(5):569-72. B-DNA 염기가 우회전(right-handed) 나선 (10 bp/회전)을 채택하는 반면, Z-DNA는 좌회전(left-handed) 나선 (12 bp/회전)을 형성한다. Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. B-DNA는 두 개의 고랑 (큰 고랑 및 작은 고랑)을 갖고, 대부분의 상호작용하는 단백질은 더 큰 크기 및 각각의 뉴클레오타이드 염기에 대한 수소 결합 공여체 및 수용자를 구별하는 것으로 인해 큰 고랑에서 인식/결합한다. 그에 반해, Z-DNA에는 큰 고랑(major groove)이 없고, 상기 결합 접촉의 대부분은 볼록한 면에서 발견된다. Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. Z-DNA는 B-DNA의 작은 고랑에 상응하는 단일 고랑을 가지고 있다. 흥미롭게도, DNABII 단백질은 작은 고랑에서 결합하는 몇몇 DNA 결합 단백질 중 하나이며 (Kim et al. (2014) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 70(Pt 12):3273-89), 그것들이 Z-DNA에 결합할 수 있다는 것을 시사한다. eDNA를 B-DNA에서 Z-DNA로 변화시키는 것은 eDNA-스캐폴드된 EPS의 4개의 관찰과 일치한다. 첫 번째로, Z-DNA로의 변화는 생물막 EPS에 존재하는 조건 하에서 일어나고; 취약 서열은 생리학적 (100 mM) 농도의 일부 폴리아민 (스페르미딘 및 스페르민)의 존재 하에서 Z-DNA로 변화될 것이다. 두 번째로, Z-DNA는 응집되어 섬유를 형성하는 성향이 있다. Chaires et al. (1988) J Biomol Struct Dyn. 5(6):1187-207. 포스페이트 백본의 강력한 음전하 중성화 (예를 들어, 폴리아민)는 Z-DNA를 선호하는데 Z-DNA 백본에서의 포스페이트가 B-DNA에서보다 더 가깝지만 DNA 응집이 또한 허용된다. 세 번째로, Z-DNA는 B-DNA보다 더 강경하고 지속 길이는 거의 3배 증가하며 (Thomas et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1919-30) 출원인들이 eDNA 스캐폴드에서 관찰한 곧은 섬유와 일치한다 **(도 1A, 도 2, 도 3)**. 그리고 마지막으로, Z-DNA는 뉴클레아제 저항성이다. 기본형 B-DNA 결합 단백질과 달리, 단지 몇 개의 공지된 단백질이 Z-DNA를 인식한다 (Athanasiadis et al. (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80) (하지만, Z-DNA 대 B-DNA 식별 항체가 이용 가능하다). Bergen et al. (1987) J Immunol. 139(3):743-8. 흥미롭게도, Z-DNA 결합 단백질은 상동성이고, B-DNA보다 1,000 내지 10,000배 더 높은 친화도로 Z-DNA에 결합하고 (Herbert et al. (1996) J Biol Chem. 271(20):11595-8), 취약 서열에서 Z-DNA 입체구조를 유도하고, 적어도 ZBP1의 경우에, 미생물 DNA의 존재를 검출하는 선천적 면역 시스템의 일부이다. Athanasiadis et al. (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80. 중요하게는, 기질로서 B-DNA를 사용하는 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제)은 왓슨 크릭 염기 쌍 형성이 보존된다는 사실에도 Z 구성형태의 동일한 DNA 서열을 인식하여 그것에 대해 기능하는데 실패한다.

[0128] **II. 3부 접근법**

[0129] 출원인은 이전에 eDNA-DNABII 상호작용이 생물막 EPS의 구조적 온전성을 유지하는 역할을 하고 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Devaraj et al. (2017) Microbiologyopen.; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58), 이들 상호작용을 붕괴시키는 것이 생체 외에서 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9) 및 생체 내에서 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74-88) 긍정적인 결과로 이어진다는 것을 보여주었다. DNA 및 DNABII 단백질 둘 다가 필요한 것으로 나타났지만, 그것들은 EPS 스캐폴드 아키텍쳐를 개괄하기에 충분하지 않다. (1) eDNA, (2) DNABII 단백질, 및 새롭게 발견된 EPS 구성요소인, (3) 폴리아민의 존재 및 상대적인 위치에 의존적인 eDNA-DNABII 의존적 EPS의 3부 eDNA-의존적 스캐폴드 (TEDS)가 본원에 개시되어 있다.

[0130] 한 양태에서, 출원인은 eDNA 및 DNABII 단백질에 더하여, 폴리아민이 박테리아 생물막의 TEDS 구조의 필수적인 구성요소인 것을 보여준다. 두 번째로, 출원인은 이들 구성요소 셋 모두가 함께 보호적 생물막 상태에서 박테리아 속 중에서 생산적 상호작용을 조성할 수 있는 보편적인 EPS의 형성을 촉진한다는 것을 보여준다. 세 번째로, 이들 구성요소들을 사용하여, 출원인은 이 보편적인 구조를 정의 및 개괄하고 두꺼운 이중 가닥 DNA 섬유의 관

찰, 뉴클레아제 저항성 상태의 유도와 일치하는 증거를 제공하고, 이 상태가 구조적 종점으로서 Z-DNA를 필요로 하는지를 입증한다. 마지막으로, 이것은 개입을 위한 표적으로서 TEDS 구조 그 자체에 초점을 맞춘 진단적 및 치료적 개입을 제공한다.

[0131] **A. 폴리아민**

[0132] *폴리아민은 DNABII 단백질과 협력하여 eDNA 스캐폴드의 조립을 지시하는 기능을 한다.*

[0133] NTHI에 의해 유발된 급성 분비성 중이염의 친칠라 모델은 인간 질환의 과정 및 병리생리학을 충실하게 개괄하고 (Bakaletz et al. (2009) Expert Rev Vaccines. 8(8):1063-82) 중이의 저항성 생물막에 의존적이다. 이 모델을 사용하여, 출원인은 이전에 DNABII 단백질이 eDNA와 회합하며, 이것은 eDNA 가닥의 꼭지점에 위치하고 **(도 1A)** (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37) 이들 eDNA 가닥이 AFM에 의해 DNA로 가시화된 폴리아민과 두드러지게 유사하게 나타난다는 것을 보여주었다 **(도 1C)**. Iacomino et al. (2011) Biomacromolecules. 12(4):1178-86. DNABII 단백질은 시험관 내에서 mM 농도의 스페르미딘의 존재시 DNA에 결합하며 **(도 2B)**, 이것은 생물막 eDNA 스캐폴드 구조를 생산하기 위한 DNABII 단백질과 폴리아민 간의 잠재적인 상호작용의 조사로 이어졌다. 출원인은 출원인이 DNABII 단백질에 대해 사전에 관찰한 바와 같이 생물막 EPS 내에서 eDNA와 상호작용하는 폴리아민을 가시화하기 위해 고정되고 임베딩된(embedded) 중이 점막 생물막의 절편에서 면역 형광 공초점 레이저 주사 현미경법 (CLSM)을 수행하였다. 면역 형광 이미지는 eDNA 및 폴리아민이 점막 생물막 내에 존재하는 섬유를 따라 공존한다는 것을 보여주고 **(도 2A)** 시험관 내에서 DNABII 단백질 및 폴리아민으로 Hud 및 동료에 의해 관찰된 것들과 시각적으로 유사하다 (Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951 61) **(도 2B)**.

[0134] *폴리아민 생합성은 생물막 구조를 필요로 한다.*

[0135] 출원인은 광범위 작용 폴리아민 생합성 억제자 다이사이클로헥실아민 (DCHA)이 시험관 내에서 NTHI 생물막 생물 발생을 변화시키는지를 조사하였다. DCHA는 스페르미딘으로의 푸트레신의 전환을 촉진하는 효소인 스페르미딘 신타제 (Paulin et al. (1986) Antonie Van Leeuwenhoek. 52(6):483-90; Pegg et al. (1983) FEBS Lett. 155(2):192-6)를 억제한다. DCHA는 NTHI 성장에 영향을 미치지 않지만 (데이터 미도시), DCHA는 시험관 내에서 생물막 생물 발생을 감소시켜, LIVE/DEAD®-염색된 NTHI 생물막의 CLSM 이미지의 COMSTAT 분석에 의해 결정된 바와 같이 평균 두께 및 생물량을 감소시킨다 (Heydorn et al. (2000) Microbiology. 146 (Pt 10):2395-407) **(도 3A)**. 게다가, 출원인은 DCHA가 초기 생물막 발달에서 eDNA 스캐폴드의 생산을 억제한다는 것을 발견하였으며 **(도 3B)**, 이것은 폴리아민 생합성이 생물막 형성에 필요한 단계라는 것을 시사한다. 이들 결과를 지지하여, 출원인은 DCHA가 면역 형광에 의해 생물막 EPS로의 세포외 폴리아민 통합을 감소시켰고 **(도 3C)**, 생물막 생물 발생의 결함은 외인성 스페르미딘의 추가에 의해 보충될 수 있다는 것을 관찰하였다 **(도 3A)**. 종합해보면, 이들 결과는 EPS로의 폴리아민 통합이 왕성한 생물막 성장을 지지하는데 있어서 eDNA 스캐폴드의 발달 및 기능에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0136] *항-DNABII는 DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조를 붕괴시킨다.*

[0137] 면역 형광은 DNABII 단백질이 EPS 모방체 구조로 통합되는지를 결정하는데 사용되었다. 스페르미딘 (300 μM) 및 HU (1 μM)는 게놈 DNA (2 μg/ml)와 함께 인큐베이션되었다. EPS 모방체 구조는 나이브 (대조군) 또는 항-DNABII IgG, 형광 2차 항체로 탐침되고, DAPI로 염색되고, CLSM에 의해 이미지화된다. DNABII 단백질은 EPS 구조로 완전히 통합된다 **(도 4A)**. 그 다음에, EPS 모방체 구조가 형성되고, 항-DNABII 항체로 처리되고, DAPI로 염색되고, CLSM에 의해 이미지화된다. EPS 모방체의 항-DNABII 항체로 DNABII 단백질의 격리는 철저하게 응집체 구조의 풍부함 및 크기를 철저하게 감소시켰으며 **(도 4B)**, 이것은 DNABII 통합 및 DNA 구조적 안정성에 대한 그것의 중요성을 추가로 확인하였다.

[0138] *양이온-교환체 P11에 의한 NTHI 생물막 붕괴는 외인성 DNABII (HU) 및 스페르미딘 추가에 의해 방지될 수 있다.*

[0139] 포스포셀룰로스 (P11)는 양으로 대전된 분자, 예컨대 폴리아민 및 DNABII 단백질에 대해 높은 친화도를 갖는 음으로 대전된 수지이다. 박테리아 생물막 형성에 대한 이들 분자의 P11 격리의 효과를 결정하기 위하서, 출원인은 트랜스웰 시스템을 이용하였다. NTHI 성장은 기저측부 챔버에서 시작되는 한편 P11 (1% w/v)은 분주시 정단 챔버에 추가되었다. 16 h에, 생물막이 세척되고 LIVE/DEAD®로 염색되고 CLSM을 사용하여 이미지화되고, COMSTAT로 분석되었다. P11은 평균 두께 및 생물량을 크게 감소시켰다 **(도 5)**. P11 양이온 고갈이 폴리아민 및/또는 DNABII 단백질을 포함했는지를 결정하기 위해서, NTHI 성장이 1 mM 스페르미딘 및 1 μM HU의 외인성 추가로 기저측부 챔버에서 시작되는 한편, P11은 1% w/v로 정단 챔버에 추가되었다. 스페르미딘 및 HU는 생물막 매

트릭스의 구조적 구성요소를 필요로 하고 함께로만 P11에 의한 생물막 붕괴를 방지하였다 **(도 5)**; 개별적으로 HU 및 스페르미딘은 불충분하였다 (데이터 미도시).

[0140] *DNase는 성숙한 병원성 박테리아 생물막을 붕괴시킬 수 없다*

[0141] 출원인은, 표준 치료와 함께 폐 기능을 개선하기 위한 낭포성 섬유증 (CF) 환자의 관리에 사용되는 재조합 인간 DNase인 Pulmozyme®의 항생물막 효과를 평가하였다. Yang et al. (2017) Paediatr Respir Rev. 21:65-7. Pulmozyme®은 분주시 (생물막 방지) 또는 사전 형성된 생물막에 (생물막 붕괴) 추가되었다 (도 6). 결과로 생성된 생물막은 LIVE/DEAD®로 염색되었고 CLSM 및 COMSTAT 분석을 사용하여 평가되었다. 분주시 DNase의 추가는 미처리 생물막과 비교하여 NTHI 및 UPEC 생물막의 평균 두께 및 생물량을 크게 감소시켰다 **(도 6)**. 하지만, DNase는 성숙한 생물막을 붕괴시킬 수 없었으며 **(도 6)** 이것은 eDNA가 생물막이 발달함에 따라 뉴클레아제 분해에 대한 민감성을 상실했다는 것을 시사한다. 출원인은 생물막이 성숙함에 따라 eDNA는 뉴클레아제로부터 입체 구조적으로 보호되고 및/또는 eDNA는 그것을 뉴클레아제 분해에 대해 저항성으로 만들기 위해 신규한 구조를 취한다는 것을 제안한다.

[0142] *DNABII 단백질 및 폴리아민은 상승적으로 상호작용하여 DNA에 뉴클레아제 저항성을 부여한다*

[0143] 항-DNABII 및 항스페르미딘 항체로 탐침된 NTHI 생물막의 면역 형광은 폴리아민이 시험관 내에서 **(도 7A)** 및 생체 내에서 **(도 7B)** DNABII 단백질과 공존한다는 것을 나타낸다. 출원인은 DNABII 및 폴리아민이 eDNA와 상승적으로 상호작용하여 성숙한 생물막에 DNase 저항성을 부여하는 것으로 가정하였다. 시험관 내에서 상승작용을 테스트하기 위해서, 출원인은 NTHI 게놈 DNA (gDNA)를 HU (50 또는 100 nM) 및 DNase (0.5 유닛)의 존재 또는 부재 하에 스페르미딘 (10, 20, 50, 또는 100 μM)과 함께 인큐베이션하였다. 분해는 아가로스 겔 전기영동 및 UV 조명에 의해 평가되었다. 스페르미딘 (>100 μM) 및 HU (1 μM)는 개별적으로 gDNA를 보호하였지만, 혼합된 더 낮은 수준의 스페르미딘 (<50 μM) 및 HU (<100 nM)는 gDNA 분해를 상승적으로 억제하였으며 **(도 7C)** 뉴클레아제 저항성이 생물막 매트릭스 내 DNABII 단백질 및 폴리아민의 조합 때문이라는 것을 시사한다. 그 다음에, 출원인은 EPS 모방체 구조가 DNase에 대해 저항성인지를 테스트하기를 원했다. HU (1 μM) 및 스페르미딘 (300 mM)은 EPS 스캐폴드 모방체를 생성하기 위해 40 h 동안 gDNA (2 μg/ml)와 함께 인큐베이션된 후 이어서, DNase (5 유닛)로 처리되었다. CLSM에 의해 나타난 바와 같이, 이들 DNABII-폴리아민 의존적 DNA 구조는 성숙한 생물막과 유사하게 DNase에 대해 저항성이었다 **(도 7D)**.

[0144] **B. DNABII, 폴리아민, 및 DNA는 시험관 내에서 Z-DNA를 형성한다**

[0145] 폴리아민은 결합시 Z-DNA 취약 서열이 B-Z 평형을 Z-DNA 구성형태로 변화시키게 하지만, (Thomas et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14(16):6721-33; Thomas et al. (1988) J Mol Biol. 201(2):463-7), DNABII 단백질은 DNA를 구부리고 응축시킨다. 출원인의 시험관 내 DNase 분해 검정에서 HU 및 스페르미딘 결합에 의한 억제의 상승작용 (도 7), 및 Z-DNA가 DNase에 저항할 수 있는 능력으로 인해, 출원인은 EPS 모방체 구조가 Z-DNA를 함유할 것이라고 가정하였다. EPS 구조는 **도 4 & 도 7**에서와 같이 16 h 동안 gDNA로 형성되었다. 면역 형광 CLSM은 항-Z-DNA 항체로 탐침하여 실행되었으며, 이것은 Z-DNA의 존재를 확인하였다 (주: 흰색; **도 8A**). DNABII 단백질이 B-Z 평형에 영향을 미치는지를 결정하기 위해서, 출원인은 원편광 이색성 (CD)을 사용하였다. HU 및 폴리 (dGdC) DNA 기질의 혼합물은 특징적인 Z-DNA 스펙트럼과 유사하게 B-DNA 단독 타원율 피크의 반전을 나타낸다 (250 및 280 nm) (Jang et al. (2015) Sci Rep. 5:9943) **(도 8B)**.

[0146] *박테리아 생물막에서 EPS는 Z-DNA 및 폴리아민을 함유한다*

[0147] Z-DNA 및 폴리아민의 회합을 추가로 특성화하기 위해서, 출원인은 40 h 생물막에서 면역 형광을 수행하였다. 표시된 박테리아 병원체의 생물막은 항-DNABII 및 항-스페르미딘, 또는 항-Z-DNA 항체로 탐침된 후 CLSM에 의해 이미지화되는 한편; Z-DNA는 각각의 박테리아 병원체의 생물막 EPS 내에서 검출되었으며 **(도 9)** 분명히 종 사이에 계층이 존재하였다 (UPEC = 스타필로코쿠스 에피더미디스(*staphylococcus epidermidis*) < 클레브시엘라 뉴모니애 < NTHI). 모든 경우에, DNABII (HU) 및 스페르미딘 사이에 광범위한 공존할 뿐만 아니라 (주 흰색), Z-DNA 풍부함에 대해 상응한다. 출원인은 다양한 생물막 형성 스테이지 (24, 40, 및 90 h)에서 NTHI 및 UPEC 생물막을 더 검사하였고 스페르미딘 및 Z-DNA가 생물막 EPS 내에서 생물막의 연령에 따라 부수적으로 증가한다는 것을 관찰하였다 **(도 10)**. 이들 데이터는 Z-DNA 및 스페르미딘이 실제로 생물막 EPS의 온전한 부분이고 구조 및 DNase-저항성 상태에 기여할 가능성이 크다는 것을 시사한다.

[0148] *HU 결핍된 NTHI는 고유한 생물막을 형성하거나, 폴리아민을 통합하거나, B-DNA에서 Z-DNA로의 변화를 유도하는 데 실패한다*

[0149] 폴리아민이 시험관 내에서 **(도 7A & 도 9)** 및 생체 내에서 **(도 7B)** NTHI 생물막 EPS 내에서 HU와 공존하기 때문에, 출원인은 NTHI 생물막 EPS 내에서 폴리아민 및 Z-DNA의 통합에 있어서 HU의 역할을 평가하였다. HU 결핍된 NTHI (*hupA* 널(*null*); DHU)는 폴리아민 및 Z-DNA의 존재에 대하여 면역 형광을 통해 WT NTHI 생물막과 비교되었다. HU의 결여는 WT와 비교하여 생물막 EPS 내에서 폴리아민 및 Z-DNA를 크게 감소시켰으며 **(도 11)** 이것은 HU가 NTHI 생물막 EPS 내에서 폴리아민 및 Z-DNA의 존재에 필요하다는 것을 시사한다.

[0150] **III. 진단 및 치료 방법**

[0151] 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 제공된다. 한 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 또 다른 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 제공된다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 한 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 또 다른 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 제공된다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 둘 이상의 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 셋 이상의 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 한 양태에서 DNase의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다.

[0152] 본 개시물은 또한 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법에 관한 것으로, 한 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니고, 또 다른 양태에서, 작용제는 DNase의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법은 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니고, 또 다른 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 둘 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 셋 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로

근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법은 한 양태에서 DNase의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다.

[0153] 본 개시물은 추가로 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 둘 이상의 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse의 부재 하에 투여된다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 셋 이상의 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 한 양태에서 DNase의 부재 하에 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하고 유기체의 복제를 억제하는 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다.

[0154] 상기 기재된 방법들 중 어느 것에 대해서도, 폴리아민은 푸트레신, 스페르민, 카다베린, 1,3-다이아미노프로판 또는 스페르미딘의 군으로부터 선택될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 기재된 방법에 대해, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제는 tRNA이다. 또 다른 구체예에서, 작용제는 폴리아민 합성의 억제자 또는 DNA로의 폴리아민의 결합을 억제하는 작용제이다. 제2 구체예에서, 작용제는 폴리아민 유사체 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드, 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존] (MGBG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 율이들 화합물의 유도체는 동일한 질량 대 전하 비를 유지한다. 제3 구체예에서, 작용제는 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 선택적으로 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스, 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체의 군으로부터 선택된다. 한 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제의 유도체 또는 유사체는 순 음전하를 갖는 수지이다. 제5 구체예에서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 제6 구체예에서,

작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. 제7 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제8 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 화합물의 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다. 한 양태에서, 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다. 한 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 음전하를 갖는다. 또 다른 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 중성 전하를 갖는다.

[0155] 또한 본원에서 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 개시된다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 둘 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 개시된다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 셋 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 개시된다. 추가의 양태에서, 한 양태에서 DNase의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 B-DNA의 Z-DNA로의 전환을 방해하는 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 본원에서 개시된다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 구체예에서, 작용제는 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 제2 구체예에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. 제3 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 화합물의 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다. 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0156] 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 또한 본원에서 제공된다. 추가의 양태에서, DNAse는 작

용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. HMGB1의 생물학적 활성 단편은 A 상자, B 상자, 및/또는 AB 상자, C-말단 단편 또는 N-말단 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어질 수 있다. 특정 구체예에서, HMGB1의 생물학적 활성 단편은 DNA에 결합할 수 있는 B 상자 도메인을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어질 수 있다. 한 양태에서, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및/또는 TB로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 본 개시물은 또한 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 추가의 양태에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. 한 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 특정 양태에서, 화합물의 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다.

[0157] 본 개시물은 또한 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. HMGB1의 생물학적 활성 단편은 A 상자, B 상자, 및/또는 AB 상자, C-말단 단편 또는 N-말단 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어질 수 있다. 특정 구체예에서, HMGB1의 생물학적 활성 단편은 DNA에 결합할 수 있는 B 상자 도메인을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어질 수 있다. 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법이 또한 본원에서 제공된다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다.

[0158] 상기 기재된 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되는, DNA 결합

단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제의 투여 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, 투여된 DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 음전하를 갖는다. 제2 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 중성 전하를 갖는다. 제3 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 양전하를 갖는다.

[0159] 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에 기재된다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 하나 이상의 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 둘 이상의 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 셋 이상의 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 생물막을 한 양태에서 DNase의 부재 하에 접촉된 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량과 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 접촉 단계는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 이루어질 수 있다.

[0160] 본 개시물은 또한 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법에 관한 것으로, 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제와 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 방법에 따라 접촉되는, 양이온이 고갈된 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있으며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 방법에 따라 접촉되는, 양이온이 고갈된 하나 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0161] 또 다른 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이

루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있으며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서, DNAse는 방법에 따라 접촉되는, 양이온이 고갈된 둘 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0162] 추가의 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있으며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서, DNAse는 방법에 따라 접촉되는, 양이온이 고갈된 셋 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 추가의 양태에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법은 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있으며, 접촉 단계는 양이온이 고갈된 4개 이상, 또는 대안으로 5개 이상, 또는 대안으로 6개 이상, 또는 대안으로 7개 이상, 또는 대안으로 8개 이상, 또는 대안으로 9개 이상, 또는 대안으로 10개 이상의 작용제의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 한 구체예에서, 작용제는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서, DNAse는 방법에 따라 접촉되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 제2 구체예에서, 작용제는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. 제3 구체예에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제5 구체예에서, 작용제는 클로로퀸 또는 그것의 유도체를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 한 특정 양태에서, 화합물의 유도체는 DNA 염기 사이에 삽입되는 능력을 유지한다. 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0163] 또한 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에서 기재되는데 시험관 내에서 HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서 DNAse는 방법에 따라 접촉되는, HMGB1 단백질 또는 그것의 생물학적 활성 단편 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0164] 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태 DNA보다 B형 DNA를 친화도/결합력의 적어도 10배까지 인식한다. HMGB1의 생물학적 활성 단편은 A 상자, AB 상자, B 상자, C-말단 단편, 및/또는 N-말단 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어질 수도 있다. 특정 구체예에서, HMGB1의 생물학적 활성 단편은 DNA에 결합할 수 있는 B 상자 도메인을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어질 수 있다. 본 개시물은 또한 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법에 관한 것으로 시험관 내에서 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어지며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 클로로퀸 및 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체의 유효량으로 표면을 코팅하는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어진다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, 다클론성 또는 단클론성 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체는 Z 형태유도체는 Z 형태DNA를 친화도/결합력

의 적어도 10배까지 인식한다.

[0165] 상기 기재된 방법은 또한 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서 DNAse는 방법에 따라 접촉되는, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량과 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그 단계로 이루어지거나, 또는 추가로 그 단계로 이루어질 수 있다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 한 양태에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는, 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어질 수 있다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되는 순 음전하를 갖는다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 제2 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서 DNAse는 방법에 따라 접촉되는 순 중성 전하를 갖는다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 제3 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 양전하를 갖는다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0166] 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에서 제공되는데, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 접촉되지만, 또 다른 양태에서 DNAse는 방법에 따라 접촉되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제와 생물막을 접촉시키는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제와 접촉한 다음에 접촉된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 접촉 단계는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 이루어질 수 있다.

[0167] 또한 대상체에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 생물막으로 감염된 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0168] 또한 생물막 발달에 취약한 대상체에서 생물막 형성을 방지하기 위한 방법이 제공되는데, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0169] 또한 필요로 하는 대상체에서 생물막을 생산하는 박테리아에 의해 유발된 감염을 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 유기체의 복제를 억제하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0170] 한 양태에서, 작용제는 폴리아민 합성의 억제자 또는 DNA로의 폴리아민의 결합을 억제하는 작용제이다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 폴리아민의 비-제한적 예는 푸트레신, 스페르민, 카다베린, 1,3-다이아미노프로판 또는 스페르미딘을 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 폴리아민 유사체, 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드 (Boc Sciences), 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존] (메틸-GAG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판 (AKos Consulting & Solutions), 옥살리플라틴, 시스플라틴, 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염을 포함한다 (달리 지시되지 않는 한 이 단락의 모든 작용제는 Millipore Sigma로부터 상업적으로 이용 가능하다). 한 양태에서, 율이들 화합물의 유도체는 동일한 질량 대 전하 비를 유지한다.

[0171] 추가의 양태에서, 작용제는 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 선택적으로 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드를 포함한다 (각각의 클래스의 작용제의 다양한 대표적

인 화합물이 Millipore Sigma에서 이용 가능하다). 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 양이온 교환 수지의 비-제한적 예는 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스, 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체를 함유하는 수지를 포함한다. 한 구체예에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 음전하를 갖는다. 한 구체예에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 순 중성 전하를 갖는다.

[0172] 한 구체예에서, 생물막의 안정성을 억제하기 위한 방법이 본원에서 제공되는데, 시험관 내에서 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제와 생물막을 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉 단계는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 양이온이 고갈된 작용제로 표면을 코팅하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다.

[0173] 상기 방법의 한 양태에서, 작용제는 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해한다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 이러한 것들의 예는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함한다. 추가의 양태에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민 (Dervan et al. (1978) 100(6):1968-1970), 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드 (Rajecky et al. (2015); Le et al. (2004) 69(8):2768-2772), 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체의 군의 작용제를 포함한다 (달리 지시되지 않는 한 이 추가의 양태의 모든 작용제는 Millipore Sigma로부터 상업적으로 이용 가능하다). 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0174] 또한 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)으로 고통받고 있는 환자에서 생물막을 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 이러한 것들의 예는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함한다. 추가의 양태에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드, 비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체의 군의 작용제를 포함한다. 한 양태에서, 방법은 DNAse의 부재 하에 수행되고, 한 양태에서 CF의 처리는 DNAse의 부재 하에 수행된다. 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0175] 또 다른 양태에서, 화학요법을 받고 있거나 받은 적이 있는 환자에서 백금-기반 화학요법의 투여에 따르는 생물막 생산 감염을 치료하기 위한 방법이 본원에서 제공되며, 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 이러한 것들의 예는 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체를 포함한다. 추가의 양태에서, 작용제는 리보플라빈, 에티듐 브로마이드,비스(메티듐)스페르민, 다우노루비신, TMPyP4, 4차 벤조[*c*]펜안트리딘 알칼로이드, 퀸아크린, 9-아미노 아크리딘, 또는 그것의 유도체의 군의 작용제를 포함한다. 작용제는 HGMB1 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0176] 상기 언급된 방법은 한 양태에서, DNAse의 부재 하에 투여되지만, 또 다른 양태에서, DNAse가 투여되는, 생물막 (시험관 내일 때) 또는 DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물이 아니다. 추가의 양태에서, DNAse는 작용제를 투여한 다음에 투여된다. 한 특정 양태에서, DNAse는 Pulmozyme이다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 양전하를 갖는다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 음전하를 갖는다. 한 구체예에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 순 중성 전하를 갖는다.

[0177] 시험관 내에서 실행될 때, 방법은 본원에 개시된 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 항체, 숙주 세포, 소분자 및 조성물과 동일하거나, 유사하거나 또는 반대의 능력을 가진 작용제를 스크리닝하거나 확인하는데 유용하다. 대안으로, 그것들은 작용제가 미생물의 감염을 치료하는데 가장 적합한지 또는 치료가 유효했는지를 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, DNABII 폴리펩타이드와 미생물의 DNA 및 테스트되는 작용제를 함유하는 두 개의 샘플을 가짐으로써 새로운 작용제 또는 조합 요법을 스크리닝할 수 있다. 제2 샘플은 DNABII 폴리펩타이드와미생물의 DNA 및 활성인 것으로 알려져 있는 작용제, 예를 들어, 항-IHF 항체 또는 양성 대조군의 역할을 하기 위한

소분자를 함유한다. 추가의 양태에서, 여러 샘플이 제공되고 작용제는 임상적 설정에서 대상체를 치료하는데 유효할 가능성이 큰 최적의 용량을 결정하기 위해 희석 배수를 증가시키면서 시스템에 추가된다. 당업자에게 분명한 것처럼, DNABII 폴리펩타이드와 미생물의 DNA를 함유하는 음성 대조군이 제공될 수 있다. 추가의 양태에서, DNABII 폴리펩타이드와 미생물의 DNA는, 예를 들어, 서로 밀접하게 접촉될 때 신호를 방출하는 발광 분자로 검출 가능하게 라벨링된다. 샘플은 유사한 조건 하에 작용제가 DNABII 폴리펩타이드와 미생물의 DNA 간의 상호작용을 억제하거나, 경쟁하거나 또는 적정하는데 유효한 양의 시간 동안 함유된 다음 샘플은 발광 분자로부터의 신호의 방출에 대해 분석된다. 샘플이 신호를 방출하면, 작용제는 결합을 억제하는데 유효하지 않다.

[0178] 또 다른 양태에서, 시험관 내 방법은 소형 챔버 슬라이드(slide) 시스템에서 실행되며 감염을 유발하는 미생물(예컨대 박테리아) 단리물은 인간/동물로부터 단리된 다음 시험관 내에서 생물막으로 성장될 수 있다. 작용제(예컨대 항-DNABII 또는 IHF 항체) 또는 테스트 또는 잠재적인 작용제는 감염이 존재하는 대상체에게 전달될 때 상기 환자를 치료하는데 효과적일 가능성이 큰 최적의 용량을 찾기 위해 잠재적인 작용제 또는 항-DNABII 또는 IHF와 같은 작용제 (또는 다른 항체, 소분자, 작용제, 등)의 희석 배수를 증가시키거나 증가시키지 않으면서 단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합하여 배양물에 추가된다. 당업자에게 분명한 바와 같이, 양성 및 음성 대조군이 동시에 수행될 수 있다.

[0179] 추가의 양태에서, 방법은 고처리량 플랫폼에서 유동 세포에서 작용제 (예컨대 항-DNABII 또는 IHF 항체) 및/또는 잠재적인 작용제 (단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합으로)로 실행된다. 작용제 (예컨대 항-DNABII 또는 IHF 항체) 또는 잠재적 작용제 생물막은 감염이 존재하는 대상체에게 전달될 때 상기 환자를 치료하는데 유효할 가능성이 큰 최적의 용량을 찾기 위해 잠재적 작용제 또는 항-DNABII 또는 IHF와 같은 작용제 (또는 다른 항체, 소분자, 작용제, 등)의 희석 배수를 증가시키거나 증가시키지 않으면서 단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합으로 배양물에 추가된다. 생물막 단리물은 초음파 처리되어 DNABII 폴리펩타이드, 예컨대 미생물 DNA에 결합된 IHF로부터 생물막 박테리아를 분리시킨다. DNABII 폴리펩타이드-DNA 복합체는 플랫폼 상에서 항-DNABII 또는 IHF 항체에 의해 단리된다. 미생물 DNA가, 예를 들어, 염 세척으로 방출되고, 추가된 생물막 박테리아를 확인하는데 사용된다. 해방된 DNA는, 예를 들어, 시퀀싱된 PCR에 의해 확인된다. DNA가 해방되지 않으면, 작용제(들)은 성공적으로 수행되었거나 미생물 DNA에 결합되었다. DNA가 샘플에서 발견되면, 작용제는 DNABII 폴리펩타이드-미생물의 DNA 결합을 방해하지 않았다. 당업자에게 분명한 것처럼, 양성 및/또는 음성 대조군이 동시에 수행될 수 있다.

[0180] 상기 방법은 또한 진단 테스트로 사용될 수 있는데 주어진 박테리아 종이 다른 것들보다 하나의 작용제에 의해 생물막의 반전에 더 양호하게 반응하기 때문이고, 이 빠른 고처리량 검정 시스템은 당업자가 가능한 항-DNABII 또는 IHF-유사 작용제의 패널을 분석하여 군 중에서 가장 효과적인 것을 확인할 수 있게 한다.

[0181] 이들 방법의 이점은 병원 내 대부분의 임상 미생물학 실험실이 이미 액체 배지에서 (또는 부유성으로) 성장하는 박테리아를 사용하여 이러한 부류의 검정 (즉, MIC, MBC 값의 결정)을 수행하기 위한 장비를 갖추고 있다는 것이다. 당업자에게 분명한 것처럼, 박테리아는 일반적으로 그것들이 질환을 유발하고 있을 때 부유성 동족으로 성장하지 않는다. 대신에 그것들은 안정한 생물막으로서 성장하고 이들 생물막은 항생제, 항체 또는 다른 치료제에 의한 처리에 훨씬 더 저항성이다. 이 저항성이 대부분의 MIC/MBC 값에서 생체 내에서 효험을 정확하게 예측하는데 실패하는 이유이다. 따라서, 시험관 내에서 작용제의 어떤 "용량"이 박테리아 생물막을 반전시킬 수 있는지를 결정함으로써 (상기 기재된 바와 같이) 출원인의 전임상 검정이 개인 맞춤형 의약의 적용시에도 임상적 효험의 더 신뢰 가능한 예측 변수가 될 것이다.

[0182] 임상 설정에 더하여, 방법은 감염을 유발하는 미생물을 확인하고 및/또는 산업 설정에서 유효한 작용제를 확인하는데 사용될 수 있다. 따라서, 작용제는 산업 설정에서 생물막을 치료하거나, 억제하거나 또는 적정하는데 사용될 수 있다.

[0183] 상기 방법의 추가의 양태에서, 근본적인 감염의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있는 항생제 또는 항미생물이 순차적으로 또는 동시에 추가되어, 감염이 억제될 수 있는지 결정된다. 또한 생물막 억제를 위한 검정에 상실 복합체를 추가하기 전에 작용제를 미생물의 DNA 또는 DNABII 폴리펩타이드에 추가하는 것이 가능하다.

[0184] 친칠라와 같은 비-인간 동물에서 생체 내에서 실행될 때, 방법은 단독으로 또는 다른 작용제와 조합하여 생물막을 붕괴시키는데 사용될 수 있는 전임상 스크리닝을 제공한다.

[0185] 또 다른 양태에서, 작용제의 유효량을 대상체에게 투여하여, 미생물의 생물막을 억제하거나, 방지하거나 또는 붕괴시킴으로써 대상체에서 생물막을 억제하거나, 방지하거나 또는 붕괴시키는 방법이 본원에서 제공된다. 이러

한 대상체의 비-제한적 예는 포유동물, 예를 들어, 애완동물, 및 인간 환자를 포함한다.

[0186] 본원에 개시된 작용제 및 조성물은 다른 항미생물제 및/또는 표면 항원과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 한 특정 양태에서, 투여는 직접적인 주사에 의해 또는 예를 들어, 흡입에 의해 감염 부위에 국소적으로 이루어진다. 투여의 다른 비-제한적 예는 경피, 요도, 혀 밑, 직장, 질, 안구, 피하, 근육내, 복강내, 비강내, 흡입 또는 경구를 포함하는 하나 이상의 방법에 의한 것을 포함한다.

[0187] 본원에 개시된 방법에 의해 치료될 수 있는 미생물의 감염 및 질환은 유기체 스트렙토코쿠스 아갈락티애(*Streptococcus agalactiae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 트레포네메스(*Treponemes*), 덴티콜라(*denticola*), 팔리둠(*pallidum*), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 또는 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)에 의한 감염을 포함한다. 한 양태에서, 미생물의 감염은 해모필루스 인플루엔재 (비피막형), 모락셀라 카타랄리스, 스트렙토코쿠스 뉴모니애, 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 슈도모나스 애루기노사, 미코박테리아 결핵 중 하나 이상에 의한 것이다. 이들 미생물의 감염은 상기도, 중기도 및 하기도에 존재할 수 있다 (이염, 부비강염, 기관지염(bronchitis), 뿐만 아니라 만성 폐쇄성 폐 질환 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD)의 악화, 만성 기침, 낭포성 섬유증 (CF)의 합병증 및/또는 주요 원인 및/또는 공동체 획득 폐렴 (community acquired pneumonia: CAP)). 따라서, 본원에서 개시된 생체 내 방법을 실행함으로써, 이들 감염으로부터의 이들 질환 및 합병증이 또한 방지되거나 치료될 수 있다.

[0188] 감염은 또한 구강에서 일어날 수 있고 (우식, 치주염) 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 아그리게이티박터 악티노믹템코미탄스(*Aggregatibacter actinomvctemcomitans*)에 의해 유발될 수 있다. 감염은 또한 피부에 국소화될 수 있고 (습종(abscess), '스타프(*staph*)' 감염, 농가진(impetigo), 화상의 2차 감염, 라임 병(Lyme disease)) 스타필로코쿠스 아우레우스, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 슈도모나스 애루기노사 및 보렐리아 부르도르페리(*Borrelia burdorferi*)에 의해 유발될 수 있다. 요로 감염 (UTI)이 또한 치료될 수 있고 전형적으로 대장균(*Escherichia coli*)에 의해 유발된다. 위장관 (GI)의 감염 (설사, 콜레라(cholera), 담석증(gall stone), 위궤양(gastric ulcer))은 전형적으로 살모넬라 엔테리카 세로바르(*Salmonella enterica serovar*), 비브리오 콜레래(*Vibrio Cholerae*) 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 의해 유발된다. 생식관의 감염은 네이세리아 고노뢰애(*Neisseria gonorrhoeae*)를 포함하며 전형적으로 이것에 의해 유발된다. 감염은 방광 또는 내재 디바이스에서 이루어질 수 있으며 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)에 의해 유발된다. 전형적으로 다양한 박테리아에 의해 유발되되는 이식된 보철 디바이스, 예컨대 인공 고관절 또는 무릎 대체, 또는 치아 임플란트, 또는 의료 디바이스, 예컨대 펌프, 카테터, 스텐트, 또는 모니터링 시스템과 관련된 감염은 본원에 개시된 방법에 의해 치료될 수 있다. 이들 디바이스는 본원에 기재된 바와 같이 작용제로 코팅되거나 그것에 컨쥬게이션될 수 있다. 따라서, 본원에서 개시된 생체 내 방법을 실행함으로써, 이들 감염으로 인한 이들 질환 및 합병증이 또한 예방되거나 치료될 수 있다.

[0189] 스트렙토코쿠스 아갈락티애에 의해 유발된 감염은 또한 본원에 개시된 방법에 의해 치료될 수 있고 그것은 신생아에서 박테리아 패혈증의 주요 원인이 된다. 수막염(meningitis)을 유발할 수 있는 네이세리아 메닝기티디스에 의해 유발된 감염이 또한 치료될 수 있다.

[0190] 따라서, 본원에 개시된 방법에 적용 가능한 투여 경로는 비강내, 근육내, 요도, 기관내, 피하, 피내, 경피, 국소적 도포, 정맥내, 직장, 비강, 경구, 흡입, 및 다른 창자 및 비경구 투여 경로를 포함한다. 투여 경로는 원하는 경우 조합될 수 있거나, 작용제 및/또는 원하는 효과에 따라 조정될 수 있다. 활성제는 단일 용량 또는 다회 수 용량으로 투여될 수 있다. 이들 방법 및 전달에 적합한 경로의 구체예는 전신 또는 국소화된 경로를 포함한다. 일반적으로, 본원에 개시된 방법에 적합한 투여 경로는 직접 주사, 장, 비경구, 또는 흡입 경로를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0191] 흡입 투여 이외의 비경구 투여 경로는 국소적, 경피, 피하, 근육내, 안와내, 낭내, 척수내, 흉골내, 및 정맥내 경로, 즉, 소화관을 통한 것 이외의 임의의 투여 경로를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여는 억제제의 전신 또는 국소 전달에 영향을 미치도록 실행될 수 있다. 전신 전달이 요구되는 경우, 투여는 전형적으로 약학적 조제물의 침습성 또는 전신으로 흡수되는 국소 또는 점막 투여를 수반한다.

[0192] 본원에 개시된 작용제는 또한 장 투여에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 장 투여 경로는 경구 및 직장 (예를 들어, 좌제를 사용한) 전달을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0193] 피부 또는 점막을 통한 활성제의 투여 방법은, 제한되는 것은 아니지만, 적합한 약학적 조제물의 국소 도포, 경피성 전달, 경피 전달, 주사 및 상피 투여를 포함한다. 경피 전달을 위해서, 흡수 프로모터 또는 이온 영동법(iontophoresis)이 적합한 방법이다. 이온 영동 전달은 수 일 또는 그 이상의 기간 동안 상처받지 않은 피부를 통한 전기적 펄스(pulse)를 통해 지속적으로 제품을 전달하는 상업적으로 이용 가능한 "패치"를 사용하여 달성될 수 있다.

[0194] 본원에 개시된 방법의 다양한 구체예에서, 작용제는 흡입, 주사에 의해 또는 경구로 지속적으로, 매일, 적어도 하루에 1회 (QD) 투여되고, 다양한 구체예에서는 하루에 2회 (BID), 3회 (TID), 또는 심지어는 4회 투여된다. 전형적으로, 일일 치료적 유효 용량은 적어도 약 1 mg, 또는 적어도 약 10 mg, 또는 적어도 약 100 mg, 또는 약 200 내지 약 500 mg일 수 있고, 때때로, 화합물에 따라, 최대 약 1 g 내지 약 2.5 g일 수 있다.

[0195] 주입은 본원에 개시된 방법에 따라 캡슐, 타블렛, 경구 현탁액, 근육내 주사용 현탁액, 정맥내 투입용 현탁액, 국소 도포용 겔 또는 크림, 또는 관절내 주사용 현탁액을 사용하여 달성될 수 있다.

[0196] 본원에 기재된 조성물의 투약량, 독성 및 치료적 효험은, 예를 들어, LD50 (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에 치료적으로 유효한 용량)을 결정하기 위해 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학적 과정에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료적 지표이고 비율 LD50/ED50으로 표시될 수 있다. 특정 구체예에서, 조성물은 높은 치료적 지표를 나타낸다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 이러한 화합물을 감염되지 않은 세포에 잠재적인 손상을 최소화하여, 부작용을 감소시키기 위해 영향을 받은 조직의 부위로 표적화시키는 전달 시스템을 디자인하는데 주의를 기울여야 한다.

[0197] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투약량의 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투약량은, 특정 구체예에서, 독성이 거의 없거나 전혀 없이 ED50을 포함하는 계산 농도의 범위 내에 있다. 투약량은 이 범위 내에서 이용된 투약 형태 및 활용되는 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 방법에서 사용된 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효 용량은 초기에 세포 배양 검정으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정된 바와 같이 IC50 (즉, 증성의 절반-최대 억제를 달성하는 테스트 화합물의 농도)을 포함한 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장 내 수준은, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해, 측정될 수 있다.

[0198] 일부 구체예에서, 치료적 또는 예방적 효과를 달성하기에 충분한 조성물의 유효량은 투여 당 킬로그램 체중 당 약 0.000001 mg 내지 투여 당 킬로그램 체중 당 약 10,000 mg의 범위에 있다. 적합하게는, 투약량 범위는 투여 당 킬로그램 체중 당 약 0.0001 mg 내지 투여 당 킬로그램 체중 당 약 100 mg이다. 투여는 초기 용량으로 제공된 후 이어서, 1회 이상의 "부스터(booster)" 용량으로 제공될 수 있다. 부스터 용량은 초기 용량 이후 1일, 2일, 3일, 1주일, 2주일, 3주일, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월 또는 12개월에 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 부스터 용량은 투여 전 대상체의 반응을 평가한 후 투여된다.

[0199] 당업자는, 제한되는 것은 아니지만, 질환 또는 장애의 심각도, 이전의 치료, 대상체의 일반적인 건강 상태 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하는 특정 요인들이 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 투약량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다는 것을 인정할 것이다. 더욱이, 본원에 기재된 치료적 조성물의 치료적 유효량으로 대상체를 치료하는 것은 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0200] **항체 및 그 유도체**

[0201] 본 개시물은 또한 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 B DNA에 결합하고 및/또는 이것을 특이적으로 인식하여 이것에 결합하는 항체를 제공한다. 항체는 본원에 기재된 다양한 항체 중 어느 것도 될 수 있으며, 이러한 것의 비-제한적 예는 다클론성 항체, 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 베니어드(veneered) 항체, 디아바디, 인간화된 항체, 항체 유도체, 재조합 인간화된 항체, 또는 이것들 각각의 유도체 또는 단편을 포함한다. 한 양태에서, 단편은 항체의 CDR을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어진다. 한 양태에서, 항체는 검출 가능하게 라벨링되거나 또는 그것에 컨쥬게이션된 검출 가능한 라벨을 더 포함한다. 또한 본원에 개시된 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주가 제공된다. 상기 구체예 중 하나 이상을 포함하거나 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나 또는 추가로 그것들로 이루어진 조성물이 본원에 추가로 제공된다. 또한 항체 및 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 뿐만 아니라 항체 폴리펩타이드 및 그것의 단편을 재조합으로 생산하거나 화학적으로 합성하기 위한 방법이 제공된다. 항체 폴리펩타이드는 진핵 세포 또는 원핵 세포에서, 또는 해당 분야에 공지되고 본원에 기재된 다른

방법에 의해 생산될 수 있다.

[0202] 이 방법론의 변형은 동물의 최적의 생산 및 인도적인 치료를 위해 보조제의 변형, 투여 경로 및 부위, 부위 당 주사 부피 및 동물 당 부위의 수를 포함한다. 예를 들어, 보조제는 전형적으로 항원에 대한 면역 반응을 개선하거나 향상시키는데 사용된다. 대부분의 보조제는 주사 부위에 항원 디포(depot)를 제공하며, 이것은 배출 림프절로의 항원의 느린 방출을 허용한다. 다른 보조제는 큰 표면적에 대한 단백질 항원 분자의 농축을 촉진하는 계면활성제 및 면역자극 분자를 포함한다. 다클론성 항체 생성을 위한 보조제의 비-제한적 예는 프로인트 보조제(Freund's adjuvant), Ribi 보조제 시스템, 및 Titermax를 포함한다. 다클론성 항체는 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있으며 그 중 일부는 미국 특허 번호 7,279,559; 7,119,179; 7,060,800; 6,709,659; 6,656,746; 6,322,788; 5,686,073; 및 5,670,153에서 기재되어 있다.

[0203] 단클론성 항체는 해당 분야에 공지되고 문헌에 널리 기재되어 있는 통상적인 하이브리도마 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 하이브리도마는 적합한 불멸 세포주 (예를 들어, 골수종 세포주, 제한되는 것은 아니지만, 예컨대 Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, P3X63Ag8,653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MIA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 313, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O), 등, 또는 헤테로골수종(heteromyeloma), 이것들의 융합 생성물, 또는 임의의 세포 또는 그것들로부터 유래된 융합 세포, 또는 해당 분야에 공지된 임의의 다른 적합한 세포주 (다음 웹 주소, 예를 들어, atcc.org, lifetech.com의 것들 참조, 2007년 11월 26일에 마지막으로 접속됨)를, 항체 생산 세포, 제한되는 것은 아니지만, 예컨대 단리된 또는 클로닝된 비장, 말초 혈액, 림프, 편도선, 도는 다른 면역 또는 B 세포 함유 세포, 또는 내인성 또는 이종성 핵산으로서, 재조합 또는 내인성으로서 중쇄 또는 경쇄 불변 또는 가변 또는 프레임워크 또는 CDR 서열을 발현하는 임의의 다른 세포, 바이러스, 박테리아, 조류, 원핵 생물, 양서류, 곤충, 파충류, 어류, 포유류, 설치류, 말과, 양과, 염소, 양, 영장류, 진핵 생물, 게놈 DNA, cDNA, rDNA, 미토콘드리아 DNA 또는 RNA, 엽록체 DNA 또는 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 단일, 이중 또는 삼중 가닥, 혼성체화된 것, 등 또는 이것들의 임의의 조합과 융합시킴으로써 생산된다. 항체 생산 세포는 또한 관심 항원으로 면역화된 인간 또는 다른 적합한 동물의 말초 혈액으로부터 또는, 특정 구체예에서, 비장 또는 림프절로부터 얻어지고 관심 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 임의의 다른 적합한 숙주 세포는 또한 본 개시물의 항체를 암호화하는 이종성 또는 내인성 핵산, 이것들의 명시된 단편 또는 변이체를 발현하는데 사용될 수 있다. 융합된 세포 (하이브리도마) 또는 재조합 세포는 선택 배양 조건 또는 다른 적합한 공지된 방법을 사용하여 단리되고 한계 희석 또는 세포 분류, 또는 다른 공지된 방법에 의해 클로닝될 수 있다.

[0204] 필수적인 특이성의 항체를 생산하거나 단리시키는 다른 적합한 방법이 사용될 수 있으며, 제한되는 것은 아니지만, 펩타이드 또는 단백질 라이브러리 (제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, 박테리오파지, 리보솜, 올리고뉴클레오타이드, cDNA, 등, 디스플레이 라이브러리; 예를 들어, 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), BioInvent (Lund, Sweden), Affitech (Oslo, Norway)와 같은 다양한 상업적 판매사로부터 이용 가능함)로부터 재조합 항체를 선택하는 방법을 포함한다. 해당 분야에 공지된 방법은 특허 문헌에 기재되어 있으며 그 중 일부는 미국 특허 번호 4,704,692; 5,723,323; 5,763,192; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 및 5,976,862를 포함한다. 대안의 방법은 트랜스제닉 동물의 면역화에 의존한다 (예를 들어, 해당 분야에 공지된 바와 같이 및/또는 본원에 기재된 바와 같이 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 SCID 마우스, Nguyen et al. (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) Crit, Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) Mumma 93:154-161). 이러한 기술은, 제한되는 것은 아니지만, 리보솜 디스플레이 (Wanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130-14135); 단일 세포 항체 생산 기술 (예를 들어, 선택된 림프구 항체 방법 ("SLAM") (미국 특허 번호 5,627,052; Wen et al. (1987) J. Immunol 17:887-892; Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848); 겔 미적법 및 유동 세포 분석법 (Powell et al. (1990) Biotechnol. 8:333-337; 단일 세포 시스템 (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) J. Imm. Meth. 182:155-163; 및 Kenny et al. (1995) Bio. Technol. 13:787-790); B-세포 선택 (Steenbakkers et al. (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134)을 포함한다.

[0205] 본 개시물의 항체 유도체는 트랜스제닉 동물 또는 젖에서 이러한 항체를 생산하는 포유동물, 예컨대 염소, 소, 말, 양, 등을 제공하기 위해 적합한 숙주에 본원에 개시된 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전달함으로써 제조될 수 있다. 이들 방법은 해당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 및 5,304,489에 기재되어 있다.

[0206] 용어 "항체 유도체"는 항체 또는 단편의 선형 폴리펩타이드 서열에 대한 번역 후 변형을 포함한다. 예를 들어,

미국 특허 번호 6,602,684 B1은 향상된 Fe-매개된 세포 독성을 가진 전체 항체 분자, 항체 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 그렇게 생성된 당단백질을 포함한 항체의 변형된 글리콜 형태의 생성을 위한 방법을 기재한다.

[0207] 본원에 개시된 항체는 또한 공유 부착이 항체가 항-이디오타입 반응을 생성하는 것을 방지하지 않도록 항체로의 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 항체 유도체는, 제한되는 것이 아니라, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해 분열, 세포 리간드 또는 다른 단백질로의 연결, 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 추가적으로 유도체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0208] 항체 유도체는 또한 식물의 일부 또는 그것으로부터 배양된 세포에서 이러한 항체, 명시된 부분 또는 변이체를 생산하는 트랜스제닉 식물 및 배양된 식물 세포 (제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, 담배, 옥수수, 및 개구리밥)를 제공하기 위해 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드를 전달함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, Cramer et al. (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 및 그 안에 인용된 참고문헌에서는, 예를 들어, 유도성 프로모터를 사용하여 대량의 재조합 단백질을 발현하는 트랜스제닉 담배 잎의 생산을 기재하고 있다. 트랜스제닉 옥수수는 상업적인 생산 수준으로 다른 재조합 시스템으로부터 생산되거나 천연 공급원으로부터 정제된 것들과 동등한 생물학적 활성으로 포유류 단백질을 발현시키는데 사용되었다. 예를 들어, Hood et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 및 그 안에 인용된 참고문헌 참조. 항체 단편, 예컨대 단일 사슬 항체 (scFv)를 포함한 항체 유도체는 또한 담배 시드 및 감자 덩이줄기를 포함한 트랜스제닉 식물 시드(seed)로부터 대량으로 생산되었다. 예를 들어, Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109 및 그 안에 인용된 참고문헌 참조. 따라서, 항체는 또한 공지된 방법에 따라 트랜스제닉 식물을 사용하여 생산될 수 있다.

[0209] 항체 유도체는 또한, 예를 들어, 면역원성을 변형시키거나 또는 결합, 친화도, 온율(on-rate), 오프율(off-rate), 결합력, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소시키거나, 향상시키거나 또는 변형시키도록 외인성 서열을 추가함으로써 생산될 수 있다. 일반적으로, 비-인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부가 유지되지만 가변 영역 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산 또는 다른 아이소타입의 가변 또는 불변 영역으로 대체된다.

[0210] 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로 및 대부분은 실질적으로 수반된다. 항체의 인간화 또는 조작은, 제한되는 것은 아니지만, 미국 특허 번호 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 및 4,816,567에서 기재된 것들과 같은 임의의 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0211] 본 개시물의 키메라, 인간화된 또는 영장류화된 항체는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 제조된 참조 단클론성 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 관심 하이브리도마로부터 얻어지고 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 비-참조 (예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 함유하도록조작될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성하기 위해서, 쥣과 가변 영역이 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 인간 불변 영역에 연결될 수 있다 (미국 특허 번호 4,816,567). 인간화된 항체를 생성하기 위해서, 쥣과 CDR 영역이 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 인간 프레임워크에 삽입될 수 있다 (미국 특허 번호 5,225,539 및 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; 및 6,180,370). 유사하게, 영장류화된 항체를 생성하기 위해, 쥣과 CDR 영역은 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 영장류 프레임워크로 삽입될 수 있다 (WO 93/02108 및 WO 99/55369).

[0212] 부분적인 내지 완전한 인간 항체를 제조하기 위한 기술은 해당 분야에 공지되어 있고 임의의 이러한 기술이 사용될 수 있다. 한 구체예에 따르면, 완전한 인간 항체 서열은 인간 중쇄 및 경쇄 항체 유전자를 발현하도록 조작된 트랜스제닉 마우스에서 제조되었다. 상이한 클래스의 항체를 생산할 수 있는 이러한 트랜스제닉 마우스의 다수의 균주가 제조되었다. 원하는 항체를 생산하는 트랜스제닉 마우스의 B 세포는 원하는 항체의 지속적인 생산을 위한 하이브리도마 세포주를 제조하기 위해 융합될 수 있다 (예를 들어, Russel et al. (2000) Infection and Immunity April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) European J. of Immun. 30:534-540; Green (1999) J. of Immun. Methods 231:11-23; Yang et al. (1999A) J. of Leukocyte Biology 66:401-410; Yang (1999B) Cancer Research 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) Advanced Drug Reviews 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188(3):483-495; Jakobovits (1998) Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) Genomics 42:413-421; Sherman-Gold (1997) Genetic Engineering News 17(14); Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156; Jakobovits (1996) Weir's Handbook of Experimental

Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) Current Opinion in Biotechnology 6:561-566; Mendez et al. (1995) Genomics 26:294-307; Jakobovits (1994) Current Biology 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) Immunity 1(4):247-260; Jakobovits (1993) Nature 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(6):2551-2555; 및 미국 특허 번호 6,075,181. 참조).

[0213] 본원에 개시된 항체는 또한 키메라 항체를 생성하도록 변형될 수 있다. 키메라 항체는 항체의 중쇄 및 경쇄의 다양한 도메인이 하나 이상의 종의 DNA에 의해 암호화되는 것이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조.

[0214] 대안으로, 본원에 개시된 항체는 또한 베니어드 항체를 생성하도록 변형될 수 있다. 베니어드 항체는 제1 종의 항체가 제2 종에서는 면역원성이 아니며 이로 인해 항체의 면역원성을 감소시키도록 하나의 종의 항체의 외부의 아미노산 잔기가 제2 종과 현명하게 대체되거나 "베니어드"된 것이다. 단백질의 항원성이 주로 표면의 성질에 의존적이기 때문에, 항체의 면역원성은 일반적으로 또 다른 포유류 종 항체에서 발견되는 것들과 상이한 노출된 잔기를 대체함으로써 감소될 수 있다. 외부 잔기의 이 현명한 대체는 내부 도메인, 또는 도메인간 접촉에 대해서는 거의 효과가 없거나, 또는 전혀 효과가 없어야 한다. 따라서, 리간드 결합 성질은 가변 영역 프레임워크 잔기에 제한된 변화의 결론으로서 영향을 받지 않아야 한다. 공정은 "베니어링(veneering)"이라고 불리며 단지 항체의 외표면 또는 껍질만이 변화되고, 지지 잔기는 원상태로 유지된다.

[0215] "베니어링" 과정은 Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological interest, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health에 따르는 인간 항체 가변 도메인에 대한 이용 가능한 서열 데이터, 이 데이터베이스에 대한 업데이트, 및 다른 접속 가능한 미국 및 외국 데이터베이스 (핵산 및 단백질 둘 다)를 사용한다. 베니어드 항체를 생성하는데 사용된 방법의 비-제한적 예는 EP 519596; 미국 특허 번호 6,797,492를 포함하고; Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28(4-5):489-498에 개시되어 있다.

[0216] 용어 "항체 유도체"는 또한 두 개의 항원-결합 부위를 가진 작은 항체 단편인 "디아바디"를 포함하며, 단편은 동일한 폴리펩타이드 사슬 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. (예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448. 참조). 동일한 사슬에서 두 개의 도메인 사이에서 쌍을 형성하기에 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적인 도메인과 쌍을 형성하여 두 개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다 (또한 Chen et al.의 미국 특허 번호 6,632,926 참조, 여기에서는 모 항체의 초가변 영역으로 삽입된 하나 이상의 아미노산 및 항원에 대해 모 항체의 결합 친화도보다 적어도 약 2배 더 강력한 표적 항원에 대한 결합 친화도를 가진 항체 변이체가 개시되어 있다).

[0217] 용어 "항체 유도체"는 조작된 항체 분자, 단편 및 단일 도메인, 예컨대 scFv, dAbs, 나노바디, 미니바디, 유니바디, 및 아피바디를 더 포함하고 & Hudson (2005) Nature Biotech 23(9):1126-36; 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0211088; PCT 국제 출원 공개 번호 WO 2007/059782; 미국 특허 번호 5,831,012).

[0218] 용어 "항체 유도체"는 "선형 항체"를 더 포함한다. 선형 항체를 제조하는 과정은 해당 분야에 공지되어 있고 Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062에 기재되어 있다. 간략히 말하면, 이들 항체는 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 탠덤(tandem) Ed 세그먼트 (V_H-C_H1-VH-C_H1)의 쌍을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0219] 본원에 개시된 항체는, 제한되는 것은 아니지만, 단백질 A 정제, 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양으로부터 회수되고 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 ("HPLC")가 또한 정제에 사용될 수 있다.

[0220] 본 개시물의 항체는 자연 정제된 생성물, 화학적 합성 과정의 생성물, 재조합 기술에 의해, 예를 들어, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함한 진핵 생물 숙주, 또는 대안으로 상기 기재된 원핵 생물 숙주로부터 생산된 생성물을 포함한다. 많은 항체 생산 시스템이 Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 671-685에 기재되어 있다.

[0221] 테스트되는 항체가 단백질 또는 폴리펩타이드에 결합하면, 테스트되는 항체 및 이 개시물에 의해 제공되는 항체는 동등하다. 또한 과도한 실험 없이, 테스트되는 항체가 본원에 개시된 항체가 항체가 정상적으로 반응하는 단백질 또는 폴리펩타이드에 결합하는 것을 방지하는지를 결정함으로써 항체가 본원에 개시된 항체와 동일한 특이

성을 갖는지를 결정하는 것이 가능하다. 테스트되는 항체가 본원에 개시된 단클론성 항체에 의한 결합의 감소에서 나타난 바와 같이 본원에 개시된 항체와 경쟁하는 경우, 두 개의 항체는 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 가능성이 크다. 대안으로, 본원에 개시된 항체를 정상적으로 반응하는 단백질과 함께 사전 인큐베이션하고, 테스트되는 항체에서 항원에 결합하는 능력이 억제되는지를 결정할 수 있다. 테스트되는 항체가 억제되면, 아마 그것은 본원에 개시된 항체와 동일한, 또는 밀접하게 관련된 에피토프 특이성을 갖는다.

[0222] 용어 "항체"는 또한 모든 면역글로불린 아이소타입 및 서브클래스의 항체를 포함하도록 의도된다. 단클론성 항체의 특정 아이소타입은 초기 융합으로부터 선택함으로써 직접적으로 제조되거나, Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653 또는 Spira et al. (1984) J. Immunol. Methods 74:307에서 개시된 과정을 사용하여 클래스 스위치 변이체를 단리시키기 위한 형제자매(sib) 선택 기술을 사용함으로써 상이한 아이소타입의 단클론성 항체를 분비하는 모 하이브리도마로부터 2차적으로 제조될 수 있다. 대안으로, 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다.

[0223] 본원에 기재된 단클론성 항체의 특이성을 가진 다른 단클론성 항체의 단리는 또한 항-이디오타입 항체를 생산함으로써 당업자에 의해 달성될 수 있다. Herlyn et al. (1986) Science 232:100. 항-이디오타입 항체는 관심 단클론성 항체 상에 존재하는 독특한 결정요인을 인식하는 항체이다.

[0224] 본원에 개시된 일부 구체예에서, 검출 가능하게 또는 치료적으로 항체를 라벨링하는 것이 유용하다. 적합한 라벨은 상기 기재되어 있다. 이들 작용제에 항체를 컨쥬게이션하기 위한 방법이 해당 분야에 공지되어 있다. 단지 예시의 목적을 위해, 항체는 검출 가능한 모이어티, 예컨대 방사성 원자, 발색단, 형광단, 등으로 라벨링될 수 있다. 이러한 라벨링된 항체는 생체 내에서, 또는 단리된 테스트 샘플에서 진단 기술에 사용될 수 있다.

[0225] 저분자량 합텐으로 항체의 커플링은 검정에서 항체의 민감성을 증가시킬 수 있다. 합텐은 2차 반응에 의해 특이적으로 검출될 수 있다. 예를 들어, 합텐, 예컨대 비오틴을 사용하는 것이 일반적이며, 이것은 아비딘, 또는 디니트로페놀, 피리독살, 및 플루오레세인과 반응하고, 특이적인 항-합텐 항체와 반응할 수 있다. Harlow and Lane (1988) supra 참조.

[0226] 본 개시물의 항체의 가변 영역은 VH 및/또는 VL CDR 1, CDR 2 및/또는 CDR 3 영역 내에서 아미노산 잔기를 돌연변이시킴으로써 항체의 하나 이상의 결합 성질 (예를 들어, 친화도)를 개선하도록 변형될 수 있다. 돌연변이는 부위-관련 돌연변이 유발 또는 PCR-매개된 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있고 항체 결합, 또는 관심의 다른 기능적 성질에 대한 효과는 적절한 시험관 내 또는 생체 내 검정에서 평가될 수 있다. 특정 구체예에서, 보존적 변형이 도입되고 전형적으로 CDR 영역 내에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 잔기 가 변화된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 추가 또는 결실일 수 있다.

[0227] 프레임워크 변형은, 예를 들어, 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 "역돌연변이"시킴으로써 면역원성을 감소시키기 위해 항체에 대해 이루어질 수 있다.

[0228] 이에 더하여, 본원에 개시된 항체는 혈청 반감기, 보체 결합, Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존적 세포 독성과 같은 항체의 하나 이상의 기능적 성질을 변화시키기 위해 Fc 영역 내에서 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 변형은, 제한되는 것은 아니지만, 항체의 안정성을 증가시키거나 감소시키기 위해 경쇄 및 중쇄의 조립을 용이하게 하기 위한 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 수의 변화 (미국 특허 번호 5,677,425) 및 항체의 생물학적 반감기를 감소시키기 위한 Fc 힌지 영역에서의 아미노산 돌연변이 (미국 특허 번호 6,165,745)를 포함한다.

[0229] 추가적으로, 본원에 개시된 항체는 화학적으로 변형될 수 있다. 항체의 글리코실화는, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시키기 위해 항체 서열 내에서 하나 이상의 글리코실화 부위를 변형시킴으로써 변화될 수 있다 (미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861). 대안으로, 항체-의존적 세포-매개된 세포 독성을 증가시키기 위해, 감소된 양의 푸코실 잔기를 가진 하이포푸코실화된 항체 또는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 가진 항체는 변화된 글리코실화 메커니즘으로 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 얻어질 수 있다 (Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

[0230] 본원에 개시된 항체는 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에 항체 또는 그것의 단편을 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 PEG의 반응성 에스터 또는 알데하이드 유도체와 반응시킴으로써 생물학적 반감기를 증가시키도록 페길화될 수 있다. 항체 페길화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 폴리머)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응에 의해 수행될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질, 예컨대 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-

말레이미드를 유도체화하는데 사용된 PEG의 형태 중 어느 것도 포함하도록 의도된다. 페길화되는 항체는 아글리코실화된 항체일 수 있다. 단백질을 페길화하기 위한 방법은 해당 분야에 공지되어 있고 본원에 개시된 항체에 적용될 수 있다 (EP 0154316 및 EP 0401384).

[0231] 추가적으로, 항체는 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민에 항체의 항원-결합 영역을 컨쥬게이션시키거나 융합시킴으로써 결과의 분자의 반감기를 증가시키도록 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 접근법은, 예를 들어, EP 0322094 및 EP 0486525이 기재되어 있다.

[0232] 본 개시물의 항체 또는 그것의 단편은 진단제에 컨쥬게이션되고, 예를 들어, 질환의 발달 또는 진행을 모니터링하고 주어진 치료 양생법의 효험을 결정하기 위해 진단적으로 사용될 수 있다. 진단제의 예는 효소, 보결원자단(prosthetic groups), 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층촬영을 사용한 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출 가능한 물질은 항체 또는 그것의 단편에 직접적으로, 또는 해당 분야에 공지된 기술을 사용하여 링커를 통해 간접적으로 커플링되거나 컨쥬게이션될 수 있다. 적합한 효소의 예는 홀스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함한다. 적합한 보결원자단의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함한다. 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함한다. 발광 물질의 예는 루미놀을 포함한다. 생물 발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린, 및 애쿼린을 포함한다. 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, 인듐-111, 루테늄-171, 비스무트-212, 비스무트-213, 아스타틴-211, 구리-62, 구리-64, 구리-67, 이트륨-90, 아이오딘-125, 아이오딘-131, 인-32, 인-33, 스칸듐-47, 은-111, 갈륨-67, 프라세오디뮴-142, 사마륨-153, 테르븀-161, 디스프로슘-166, 홀뮴-166, 레늄-186, 레늄-188, 레늄-189, 납-212, 라듐-223, 악티늄-225, 철-59, 셀레늄-75, 아르세닉-77, 스트론튬-89, 몰리브덴-99, 로듐-1105, 팔라듐-109, 프라세오디뮴-143, 프로메튬-149, 에르븀-169, 이리듐-194, 금-198, 금-199, 및 납-211을 포함한다. 단클론성 항체는 항체와 공유 연결된 이기능성 킬레이트화제의 사용을 통해 방사성 금속 이온과 간접적으로 컨쥬게이션될 수 있다. 킬레이트화제는 아미티(amity) (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78); 설피드랄 기 (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120:217-262) of 아미노산 잔기 및 탄수화물 기 (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83:2632-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570)를 통해 부착될 수 있다.

[0233] 또한, 본 개시물의 항체 또는 그것의 단편은 치료제에 컨쥬게이션될 수 있다. 적합한 치료제는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 다이하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글로코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀론, 및 퓨로마이신, 대사길항물질 (예컨대 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 하이드록시유레아, 아스파라기나제, 젬시타빈, 클라드리빈), 알킬화제 (예컨대 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 다이브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예컨대 카르보플라틴, 항생제 (예컨대 닥티노마이신 (이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 디프테리아 독소 및 관련 분자 (예컨대 디프테리아 A 사슬 및 그것의 활성 단편 및 혼성체 분자), 리신 독소 (예컨대 리신 A 또는 탈글리코실화된 리신 A 사슬 독소), 콜레라 독소, 시가(Shiga)-유사 독소 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), LT 독소, C3 독소, 시가 독소, 백일해(pertussis) 독소, 파상풍(tetanus) 독소, 대두 보우만-비르크 프로테아제(soybean Bowman-Birk protease) 억제자, 슈도모나스 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 젤라닌, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카타(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 비터 멜론(momordica charantia) 억제자, 커신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제자, 젤로닌, 미토젤린, 레스트리에토신, 페노마이신, 에노마이신 독소 및 혼합된 독소를 포함한다.

[0234] 추가적인 적합한 컨쥬게이션된 분자는 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 안티센스 핵산, 억제 RNA 분자, 예컨대 siRNA 분자, 면역자극 핵산, 압타머, 리보자임, 트리플렉스(triplex) 형성 분자, 및 외부 가이드 서열을 포함한다. 압타머는 한정된 2차 및 3차 구조, 예컨대 줄기-루프 또는 G-4분자로 폴딩되는 길이가 15-50개 염기의 범위의 작은 핵산이고, ATP (미국 특허 번호 5,631,146) 및 테오필린 (미국 특허 번호 5,580,737)과 같은 소분자, 뿐만 아니라 역전사효소 (미국 특허 번호 5,786,462) 및 트롬빈 (미국 특허 번호 5,543,293)과 같은 거대

분자에 결합할 수 있다. 리보자임은 분자 내로 또는 분자 사이로 화학 반응을 촉진할 수 있는 핵산 분자이다. 리보자임은 전형적으로 표적 기질을 인식하고 결합한 다음 분열되어 핵산 기질을 분열시킨다. 트리플렉스 형성 기능 핵산 분자는 트리플렉스를 형성함으로써 이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산과 상호작용할 수 있으며, 여기서 DNA의 3개의 가닥은 왓슨 크릭 및 후그스틴(Hoogsteen) 염기 쌍 형성 둘 다에 의존적으로 복합체를 형성한다. 트리플렉스 분자는 높은 친화도와 특이성으로 표적 영역에 결합할 수 있다.

[0235] 기능적 핵산 분자는 표적 분자에 의해 소유되는 특정 활성의 효과기, 억제자, 조절자, 및 자극물질의 역할을 할 수 있거나, 또는 기능적 핵산 분자는 임의의 다른 분자와 독립적으로 데 노보 활성을 가질 수 있다.

[0236] 치료제는 다수의 이용 가능한 방법 중 어느 것을 사용하여 직접적으로 또는 간접적으로 항체에 연결될 수 있다. 예를 들어, 작용제는 이황화 결합을 통해, N-숙시닐 3-(2-피리딜디티오)프로프리오네이트 (SPDP)와 같은 교차-링커를 사용하여, 또는 항체의 Fc 영역에서 탄수화물 모이어티를 통해 (Yu et al. 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upeslacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)) 환원된 항체 구성요소의 힌지 영역에서 부착될 수 있다.

[0237] 항체에 치료제를 컨쥬게이션시키기 위한 기술은 널리 공지되어 있다 (Amon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.); Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," (1982) Immunol. Rev. 62:119-58).

[0238] 본원에 개시된 항체 또는 그것의 항원-결합 영역은 적어도 두 개 이상의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 또는 다중특이적 분자를 생성하기 위해 또 다른 기능적 분자, 예컨대 또 다른 항체 도는 수용체에 대한 리간드에 연결될 수 있다. 항체를 하나 이상의 다른 결합 분자, 예컨대 또 다른 항체, 항체 단편, 펩타이드 또는 결합 모방체에 연결하는 것은, 예를 들어, 화학적 커플링, 유전자 융합, 또는 비공유 회합에 의해 실행될 수 있다. 다중특이적 분자는 제1 및 제2 표적 에피토프에 더하여 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다.

[0239] 이중특이적 및 다중특이적 분자는 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 분자의 각각의 결합 유닛은 별도로 생성되고 서로 컨쥬게이션될 수 있다. 결합 분자가 단백질 또는 펩타이드일 때, 다양한 커플링제 또는 가교제가 공유 컨쥬게이션에 사용될 수 있다. 가교제의 예는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌다이말레이미드 (oPDM), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로학산-I-카르복실레이트 (설포-SMCC)를 포함한다 (Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). 결합 분자가 항체일 때, 그것들은 두 개의 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 설피드릴 결합에 의해 컨쥬게이션될 수 있다.

[0240] 본 개시물의 항체 또는 그것의 단편은 항체가 결합되어 "고갈" 항체를 형성하는 세포에 대해 독성인 모이어티에 연결될 수 있다.

[0241] 본원에 개시된 항체는 또한 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 이것은 표적 항원의 면역검정 또는 정제에 특히 유용하다. 이러한 고체 지지체는, 제한되는 것은 아니지만, 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함한다.

[0242] 항체는 또한 많은 상이한 담체에 결합될 수 있다. 따라서, 본 개시물은 또한 활성 또는 불활성인 항체 및 또 다른 물질을 함유하는 조성물을 제공한다. 널리 공지된 담체의 예는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 및 자철석을

포함한다. 담체의 성질은 본원에 개시된 목적을 위해 가용성 또는 불용성일 수 있다. 당업자는 단클론성 항체에 결합하기에 적합한 다른 담체를 알고 있거나, 또는 일상적인 실험을 사용하여 이러한 것들을 확인할 수 있다.

[0243] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 전장 항체이다.

[0244] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 단클론성 항체이다.

[0245] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 키메라 또는 인간화된 것이다.

[0246] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 Fab, F(ab)'2, Fab', scF_v, 및 F_v로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0247] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 Fc 도메인을 포함한다. 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 래트, 양, 소과, 개과, 고양이과 또는 토끼 항체이다. 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 인간 또는 인간화된 항체이거나 또는 인간에서 비-면역원성이다.

[0248] 본원에서 제공된 항체의 양태 중 일부에서, 항체는 인간 항체 프레임워크 영역을 포함한다.

[0249] 다른 양태에서, 본원에서 제공된 항체의 CDR에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 또 다른 아미노산과 치환된다. 치환은 아미노산의 동일한 패밀리 내에서의 치환의 의미에서 "보존적"일 수 있다. 자연 발생 아미노산은 다음 네 개의 패밀리로 나누어질 수 있고 보존적 치환은 상기 패밀리 내에서 일어날 것이다.

[0250] 1) 염기성 측쇄를 가진 아미노산: 리신, 아르기닌, 히스티딘.

[0251] 2) 산성 측쇄를 가진 아미노산: 아스파르트산, 글루탐산.

[0252] 3) 비대전된 극성 측쇄를 가진 아미노산: 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신.

[0253] 4) 비극성 측쇄를 가진 아미노산: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판, 시스테인.

[0254] 또 다른 양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체의 하나 이상의 CDR에 추가되거나 그것으로부터 결실된다. 이러한 추가 또는 결실은 CDR의 N 또는 C 말단에서 또는 CDR 내의 위치에서 일어난다.

[0255] 아미노산의 추가, 결실 또는 치환에 의해 항체의 CDR의 아미노산 서열을 변화시킴으로써, 표적 항원에 대한 결합 친화도의 증가와 같은 다양한 효과가 얻어질 수 있다.

[0256] 이러한 변화된 CDR 서열을 포함하는 본 개시물의 항체가 개시된 항체와 유사한 특이성 및 민감성을 가진 DNABII 단백질에 결합한다는 것을 인정해야 한다. 이것은 결합 검정의 방식으로 테스트될 수 있다.

[0257] 추가의 양태에서, 항체는 적절한 검정 및 스크리닝을 사용하여 결정된 바와 같이 면역우성 및 면역보호적인 것 둘 다를 특징으로 한다.

[0258] **항체를 이용한 기능적 분석**

[0259] 본원에 개시된 항체는 본원에 개시된 폴리펩타이드를 정제하고 생물학적으로 동등한 폴리펩타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 확인하는데 사용될 수 있다. 그것들은 또한 본원에 개시된 폴리펩타이드의 기능을 변화시키는 작용제를 확인하는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 다클론성 항혈청, 단클론성 항체, 및 해당 분야에서 실행되고 상기 기재된 것들에 익숙한 이들 조제물로부터 유래된 다양한 시약을 포함한다.

[0260] 확인된 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 활성을 중화시키는 항체는 또한 생체 내 및 시험관 내 테스트 시스템에 이러한 중화 항체를 추가함으로써 기능을 입증하기 위해 생체 내에서 및 시험관 내에서 사용될 수 있다. 그것들은 또한 본원에 개시된 폴리펩타이드의 활성을 조절하기 위한 약학적 작용제로서 유용하다.

[0261] 다양한 항체 조제물은 또한 시험관 내에서 또는 생체 내에서 세포를 테스트함으로써 확인된 유전자에 의해 암호화된 단백질의 발현을 입증하기 위해 ELISA 검정 또는 웨스턴 블롯과 같은 분석 방법에 사용될 수 있다. 대사 중에 프로테아제 분해에 의해 생성된 이러한 단백질의 단편은 또한 실험 샘플로부터 유래된 샘플과 함께 적절한 다클론성 항혈청을 사용하여 확인될 수 있다.

[0262] 본원에 개시된 항체는 백신 접종 또는 백신 접종을 부스트하기 위해, 단독으로 또는 펩타이드 또는 단백질-기반 백신 또는 수지상세포 기반 백신과 조합으로 사용될 수 있다.

[0263] **조성물**

[0264] 본 개시물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제, DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제 중 하나, 둘 이상, 셋 이상을 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진 조성물을 추가로 제공한다. 한 양태에서, 조성물은 HMB1 단백질, 그것의 단편 또는 동등물을 포함하지 않거나, 근본적으로 그것들로 이루어지지 않거나, 또는 추가로 그것들로 이루어지지 않는다. 또 다른 양태에서, 그것은 DNAse를 포함하거나, 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어진다. 추가의 양태에서, 그것은 DNAse를 포함하지 않거나, 근본적으로 그것으로 이루어지지 않거나, 또는 추가로 그것으로 이루어지지 않는다. 한 구체예에서, 조성물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제2 구체예에서, 조성물은 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제 및 DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제3 구체예에서, 조성물은 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제 및 DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제4 구체예에서, 조성물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제5 구체예에서, 조성물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제 및 DNA 결합 단백질 및/또는 항세균제로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제6 구체예에서, 조성물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제 및 DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다. 제7 구체예에서, 조성물은 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제 및 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진다.

[0265] 본 개시물의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 추가로 그것으로 이루어진다.

[0266] 한 양태에서, 생물막에서 DNA로의 폴리아민의 결합을 방해하는 작용제는 폴리아민 유사체 다이플루오로메틸오르니틴, 트랜스-4-메틸사이클로헥실아민, 사르도모지드, 메틸글리옥살-비스[구아닐하이드라존] (MGBG), 1-아미노옥시-3-아미노프로판, 옥살리플라틴, 시스플라틴 및/또는 다이사이클로헥실아민, 이것들 중 어느 것의 유도체, 또는 이것들의 염 중 하나 이상을 포함한다. 또 다른 양태에서, 생물막으로부터 양이온이 고갈된 작용제는 양이온 교환 수지, 아미노폴리카르복실산, 크라운 에테르, 아자크라운, 또는 크립탠드, 설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, P11 포스포셀룰로스 및/또는 헤파린 설페이트, 또는 이것들의 유도체 또는 유사체 중 하나 이상을 포함한다. 추가의 양태에서, 생물막 또는 그것의 국소 환경에서 Z-DNA로의 B-DNA의 전환을 방해하는 작용제는 HMGB1 단백질, 이것의 각각의 단편 또는 동등물, 항-B-DNA 항체 또는 그것의 단편 또는 유도체, 및/또는 클로로퀸, 또는 이것들 중 어느 것의 유도체 중 하나 이상을 포함한다. 한 특정 양태에서, DNA 결합 단백질로의 eDNA의 결합을 방해하는 작용제는 항-DNABII 항체, 항-IHF 항체 및/또는 항-HU 항체, 또는 이것들 각각의 단편 중 하나 이상을 포함한다.

[0267] 조성물이 추가로 제공된다. 조성물은 담체 및 본원에 개시된 단리된 폴리펩타이드, 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드, 본원에 개시된 벡터, 본원에 개시된 단리된 숙주 세포, 본원에 개시된 소분자 또는 본원에 개시된 항체 중 하나 이상을 포함한다. 담체는 고체 지지체 또는 약학적으로 허용 가능한 담체 중 하나 이상일 수 있다. 조성물은 보조제 또는 백신으로 투여하기에 적합한 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다. 한 양태에서, 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제, 담체 및/또는 보조제로 제제화된다. 이에 더하여, 본 개시물의 조성물의 구체예는 본원에 개시된 단리된 폴리펩타이드, 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드, 본원에 개시된 벡터, 소분자, 본원에 개시된 단리된 숙주 세포, 또는 본 개시물의 항체 중 하나 이상을 포함하며, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 물질로 제제화된다.

[0268] 경구 조제물에 대해, 본원에 기재된 단리된 또는 재조합 폴리펩타이드, 본원에 기재된 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 본원에 기재된 벡터, 본원에 기재된 단리된 숙주 세포, 소분자 또는 본원에 기재된 항체 중 임

의의 하나 이상은

[0269] 단독으로 또는, 예를 들어, 통상적인 첨가제, 예컨대 락토스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 바인더, 예컨대 결정질 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 붕해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨 카르복시메틸셀룰로스; 윤활제, 예컨대 탈크(talc) 또는 마그네슘 스테아레이트; 및 원하는 경우, 희석제, 완충제, 습윤제, 보존제 및 방향제와 함께 타블렛, 분말, 과립 또는 캡슐을 제조하기에 적절한 첨가제와 조합된 화합물을 포함하거나, 또는 근본적으로 이것들로 이루어진 본원에 개시된 약학적 제제에서 사용될 수 있다. 약학적 호환성 결합제, 및/또는 보조 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 타블렛, 알약, 캡슐, 트로키(troche), 등은 다음 성분, 또는 유사한 성질의 화합물 중 어느 것도 함유할 수 있다: 바인더, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 검 트래거칸트 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알진산, Primogel, 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 Sterotes; 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 방향제, 예컨대 박하, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지향 향료.

[0270] 경구 투여에 적합한 약학적 제제 및 단위 투여 형태는 만성 병태, 감염의 치료, 및 환자가 약물을 자가 투여하는 치료법에서 특히 유용하다. 한 양태에서, 제제는 소아 투여에 특이적이다.

[0271] 본 개시물은 본원에 개시된 단리된 폴리펩타이드, 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드, 본원에 개시된 벡터, 본원에 개시된 단리된 숙주 세포, 또는 본원에 개시된 항체 중 하나 이상을 수성 또는 비수성 용제, 예컨대 식물성 또는 다른 유사한 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고등 지방족 산의 에스터 또는 프로필렌 글리콜에; 및 원하는 경우, 통상적인 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장화제, 현탁화제, 에멀젼화제, 안정화제 및 보존제 또는 다른 항미생물제와 함께 용해시키거나, 현탁시키거나 에멀젼화함으로써 이것들을 본 개시물에 따라 주사용 조제물로 제제화될 수 있는 약학적 제제를 제공한다. 이러한 것들의 비-제한적 예는 항미생물제, 예컨대 표면 항원, 예를 들어, OMP P5, OMP 26, OMP P2, 또는 IV형 Pilin 단백질과 같은 다른 백신 구성요소 (Jurcisek and Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875 and Murphy, T F, Bakaletz, L O and Smeesters, P R (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126 참조) 및 항세균제이다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 정균적 물, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.), 또는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 비경구 투여용 조성물은 멸균 상태여야 하고 쉬운 주사성이 존재하는 정도로 유동성이어야 한다.

[0272] 본 개시물에 의해 제공된 에어로졸 제제는 흡입을 통해 투여될 수 있고 추진제 또는 비-추진제 기반일 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 약학적 제제의 구체예는 가압된 허용 가능한 추진제, 예컨대 다이클로로다이플루오로메탄, 프로판, 질소 등으로 제제화된 본원에 개시된 화합물을 포함한다. 흡입에 의한 투여를 위해, 화합물은 적합한 추진제, 예를 들어, 이산화탄소와 같은 기체를 함유하는 가압된 용기 또는 디스펜서, 또는 네뷸라이저로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달될 수 있다. 비-추진제의 비-제한적 예는 기계적인 힘에 의해 (즉, 피스톤을 손가락으로 누르거나 용기의 압축에 의해, 예컨대 용기 벽에 가해진 압축력 또는, 예를 들어, 탄성 주머니에 의해 벽 자체에 의해 가해지는 탄성력에 의해) 밀폐된 용기로부터 방출되는 펌프 스프레이이다.

[0273] 본원에 개시된 좌제는 본원에 개시된 화합물을 다양한 염기, 예컨대 에멀젼화 염기 또는 수용성 염기 중 어느 것과 혼합하여 제조될 수 있다. 본원에 개시된 화합물의 이 약학적 제제의 구체예는 좌제를 통해 직장으로 투여될 수 있다. 좌제는 체온에서 녹지만, 실온에서는 고체화되는 코코아 버터, 카르보왁스 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비히클을 포함할 수 있다.

[0274] 경구 또는 직장 투여를 위한 단위 투약 형태, 예컨대 시럽, 엘릭서, 및 현탁액이 제공될 수 있으며 각각의 투약 단위, 예를 들어, 작은 스푼, 큰 스푼, 타블렛 또는 좌제는 본원에 개시된 하나 이상의 화합물을 함유하는 조성물의 사전 결정된 양을 함유한다. 유사하게, 주사 또는 정맥내 투여를 위한 단위 투약 형태는 멸균수, 정사 식염수 또는 또 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 중의 용액으로서 조성물 중에 본원에 개시된 화합물을 포함할 수 있다.

[0275] 본원에 개시된 약학적 제제의 구체예는 본원에 개시된 단리된 폴리펩타이드, 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드, 본원에 개시된 벡터, 본 개시물에서 사용하기 위한 소분자, 본원에 개시된 단리된 숙주 세포, 또는 본원에 개시된 항체 중 하나 이상이 주사용 조성물에서 제제화되는 것들을 포함한다. 본원에 개시된 주사용 약학적 제제는 액체 용액 또는 현탁액으로서; 또는 주사 전에 액체 비히클 중의 용액, 또는 현탁액에 적합한 고체 형태로서 제조된다. 조제물은 도한 에멀젼화될 수 있거나 활성 성분은 본원에 개시된 약학적 제제의 다른 구체예에 따라 리포솜 비히클에 캡슐화될 수 있다.

[0276] 한 구체예에서, 본원에 개시된 단리된 폴리펩타이드, 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드, 본원에 개시된 벡터, 본원에 개시된 단리된 숙주 세포, 또는 본원에 개시된 항체 중 하나 이상은 지속적 전달 시스템에 의한 전달을 위해 제제화된다. 용어 "지속적 전달 시스템"은 본원에서 "제어된 전달 시스템"과 교체 가능하게 사용되고 카테터, 주사 디바이스, 등과 조합된 지속적인 (예를 들어, 제어된) 전달 디바이스 (예를 들어, 펌프)를 포함하며, 이것들 중 다수는 해당 분야에 공지되어 있다.

[0277] 기계적 또는 전기기계적 투입 펌프가 또한 본 개시물과 함께 사용하는데 적합할 수 있다. 이러한 디바이스의 예는, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852; 5,820,589; 5,643,207; 6,198,966; 등에서 기재된 것들을 포함한다. 일반적으로, 본원에 개시된 화합물의 전달은 다양한 보충 가능한 펌프 시스템 중 어느 것을 사용해서도 달성될 수 있다. 펌프는 시간이 흐름에 따라 일정하고, 제어된 방출을 제공한다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 화합물은 약물-불투과성 레저버 내 액체 제제 중에 있고, 개체에게 지속적인 방식으로 전달된다.

[0278] 한 구체예에서, 약물 전달 시스템은 적어도 부분적으로 이식 가능한 디바이스이다. 이식 가능한 디바이스는 해당 분야에 널리 공지된 방법 및 디바이스를 사용하여 임의의 적합한 이식 부위에서 이식될 수 있다. 이식 부위는 약물 전달 디바이스가 도입되고 위치하는 대상체의 체내의 부위이다. 이식 부위는 피하(subdermal), 피하, 근육내, 또는 대상체 체내의 다른 적합한 부위를 포함하지만, 반드시 이제 제한되는 것은 아니다. 일부 구체예에서는 약물 전달 디바이스의 이식 및 제거의 편의로 인해 피하 이식 부위가 사용된다.

[0279] 본 개시물에서 사용하기에 적합한 약물 방출 디바이스는 다양한 작동 방식 중 어느 것에도 기반을 둘 수 있다. 예를 들어, 약물 방출 디바이스는 확산성 시스템, 대류성 시스템, 또는 침식성 시스템 (예를 들어, 침식-기반 시스템)을 기반으로 할 수 있다. 예를 들어, 약물 방출 디바이스는 전기화학적 펌프, 삼투압 펌프, 전기삼투압 펌프, 증기압 펌프, 또는 삼투 폭발 매트릭스일 수 있으며, 예를 들어, 약물은 폴리머로 통합되고 폴리머는 약물-침윤된 폴리머 물질 (예를 들어, 생분해성 약물-침윤된 폴리머 물질)의 분해에 부수적인 약물 제제의 방출을 제공한다. 다른 구체예에서, 약물 방출 디바이스는 전기 확산 시스템, 전해질 펌프, 비등성(effervescent) 펌프, 압전 펌프, 가수분해 시스템, 등을 기반으로 한다.

[0280] 기계적 또는 전기기계적 투입 펌프를 기반으로 하는 약물 방출 디바이스가 또한 본 개시물과 함께 사용하는데 적합할 수 있다. 이러한 디바이스의 예는, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852; 등에서 기재된 것들을 포함한다. 일반적으로, 대상체 치료 방법은 다양한 보충 가능하고 교환 불가능한 펌프 시스템 중 어느 것을 사용해서도 달성될 수 있다. 시간이 흐름에 따라 일반적으로 더 일정하고, 제어되는 방출로 인해 펌프 및 다른 대류성 시스템이 이용될 수 있다. 일부 구체예에서는 더 일정한 제어된 방출 및 상대적으로 작은 크기의 조합된 이점으로 인해 삼투압 펌프가 사용된다 (예를 들어, PCT 국제 출원 공개 번호 WO 97/27840 및 미국 특허 번호 5,985,305 및 5,728,396 참조). 본 개시물에서 사용하는데 적합한 예시의 삼투압에 의해 구동되는 디바이스는 미국 특허 번호 3,760,984; 3,845,770; 3,916,899; 3,923,426; 3,987,790; 3,995,631; 3,916,899; 4,016,880; 4,036,228; 4,111,202; 4,111,203; 4,203,440; 4,203,442; 4,210,139; 4,327,725; 4,627,850; 4,865,845; 5,057,318; 5,059,423; 5,112,614; 5,137,727; 5,234,692; 5,234,693; 5,728,396; 등을 포함하지만, 반드시 이것들에 제한되는 것은 아니다. 본 개시물에 맞춰 조정될 수 있는 추가의 예시의 디바이스는 Synchromed 투입 펌프 (Medtronic)이다.

[0281] 일부 구체예에서, 약물 전달 디바이스는 이식 가능한 디바이스이다. 약물 전달 디바이스는 해당 분야에 널리 공지된 방법 및 디바이스를 사용하여 임의의 적합한 이식 부위에 이식될 수 있다. 본원에서 언급된 바와 같이, 이식 부위는 약물 전달 디바이스가 도입되고 위치하는 대상체의 신체 내의 부위이다. 이식 부위는, 제한되는 것은 아니지만, 피하, 피하, 근육내, 또는 대상체의 체내의 다른 적합한 부위를 포함한다.

[0282] 본원에 개시된 화합물에 적합한 부형제 비히클은, 예를 들어, 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올, 등, 및 이것들의 조합이다. 이에 더하여, 원하는 경우, 비히클은 습윤제 또는 에멀젼화제 또는 pH 완충제와 같은 소량의 보조 물질을 함유할 수 있다. 이러한 투약 형태를 제조하는 방법은 공지되어 있거나, 본 개시물을 고려하면 당업자에게 분명할 것이다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 17th edition, 1985 참조. 투여되는 조성물 또는 제제는 어떤 경우에도 치료되는 대상체에서 원하는 상태를 달성하기에 충분한 양의 화합물을 함유할 것이다.

[0283] 본 개시물의 조성물은 지속 방출 또는 제어된 방출 매트릭스를 포함하는 것들을 포함한다. 이에 더하여, 본 개시물의 구체예는 지속 방출 제제를 사용하는 다른 치료와 함께 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 지속 방출 매트릭스는 효소적 또는 산-기반 가수분해에 의해 또는 용해에 의해 분해 가능한 물질, 보통 폴리머로 만

들어진 매트릭스이다. 체내로 삽입되면, 매트릭스는 효소 및 체액에 의해 작용된다. 지속 방출 매트릭스는 바람직하게는 생체 적합 물질, 예컨대 리포솜, 폴리락티드 (폴리락트산), 폴리글리콜리드 (글리콜산의 폴리머), 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산 및 글리콜산의 코폴리머), 폴리 무수물, 폴리(오르토)에스터, 폴리펩타이드, 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예컨대 페닐아타닌, 티로신, 아이소류신, 폴리뉴클레오타이드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘으로부터 선택된다. 예시의 생분해성 매트릭스는 폴리락티드 매트릭스, 폴리글리콜리드 매트릭스, 및 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산 및 글리콜산의 코폴리머) 매트릭스를 포함한다.

[0284] 또 다른 구체예에서, 작용제 (뿐만 아니라 조합 조성물)는 제어된 방출 시스템에서 전달된다. 예를 들어, 본원에 개시된 화합물은 정맥내 투입, 이식 가능한 삼투압 펌프, 경피 패치, 리포솜, 또는 다른 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 펌프가 사용될 수 있다 (Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574). 또 다른 구체예에서, 폴리머 물질이 사용된다. 또 다른 구체예에서, 제어된 방출 시스템은 치료 표적, 즉, 간 가까이에 배치되며, 따라서 전신 용량의 일부만을 필요로 한다. 또 다른 구체예에서, 제어된 방출 시스템은 치료 표적 가까이에 배치되며, 따라서 전신 용량의 일부만을 필요로 한다. 다른 제어된 방출 시스템은 Langer (1990) Science 249:1527-1533에 의한 리뷰에서 논의된다.

[0285] 또 다른 구체예에서, 본 개시물의 조성물 (뿐만 아니라 조합 조성물과 별도로 또는 함께)은 흡수성 물질, 예컨대 봉합선, 붕대, 및 거즈로의 본원에 기재된 억제제의 침윤에 의해 형성되거나, 또는 고체상 물질, 예컨대 수술용 스테이플러, 지퍼 및 조성물을 전달하기 위한 카테터의 표면에 코팅된 것들을 포함한다. 이러한 유형의 다른 전달 시스템은 본 개시물을 고려하면 당업자에게 쉽게 분명해질 것이다.

[0286] 본 개시물은 미생물의 감염의 치료를 위해 숙주 (예를 들어, 인간)에 하나 이상의 작용제의 투여를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 구체예에서, 이들 본원에 개시된 방법은 약물 전달에 적합한 대부분의 임의의 이용 가능한 방법 및 경로에 걸쳐있으며, 생체 내 및 생체 외 방법, 뿐만 아니라 전신 및 국소화된 투여 경로를 포함한다.

[0287] **스크리닝 검정**

[0288] 본 개시물은 동등한 작용제, 예컨대 본원에 개시된 다클론성 항체에 대한 동등한 단클론성 항체 및 본원에 개시된 활성제 및 약학적 조성물의 활성 또는 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드 또는 펩타이드 생성물의 기능을 조절하는 다양한 작용제를 스크리닝하기 위한 방법을 제공한다. 본 개시물의 목적을 위해, "작용제"는 생물학적 또는 화학적 화합물, 예컨대 단순 또는 복합 유기 또는 무기 분자, 펩타이드, 단백질 (예를 들어, 항체), 폴리뉴클레오타이드 안티센스 또는 리보자임을 포함하려는 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다양한 화합물, 예를 들어, 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드와 같은 폴리머, 다양한 코어 구조에 기반한 합성 유기 화합물이 합성될 수 있고, 이것들은 용어 "작용제"에 또한 포함된다. 이에 더하여, 다양한 천연 공급원은 스크리닝을 위한 화합물, 예컨대 식물 또는 동물 추출물, 등을 제공할 수 있다. 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 본 발명의 스크리닝에 의해 확인된 작용제와 동일하거나 상이한 생물학적 활성을 가진 작용제는 단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합으로 사용된다는 것을 이해해야 한다.

[0289] 당업자에게 분명한 바와 같이, 적합한 세포가 미세 적정 플레이트에서 배양될 수 있고 여러 작용제는 유전자형 변화, 표현형 변화 또는 미생물 역가의 감소를 언급함으로써 동시에 분석될 수 있다.

[0290] 작용제가 DNA 또는 RNA 이외의 조성물, 예컨대 상기 기재된 소분자일 때, 작용제는 세포 배양물에 직접적으로 추가되거나 추가용 배양 배지에 추가될 수 있다. 당업자에게 분명한 바와 같이, 경험적으로 결정될 수 있는 "유효량"이 추가되어야 한다.

[0291] 작용제가 항체 또는 항원 결합 단편일 때, 작용제는 경쟁적 ELISA를 수행하기 위한 조건 하에서 상기 기재된 표적 항원 및 다클론성 항체와 접촉되거나 이것들과 함께 인큐베이션될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0292] 검정이 또한 대상체에서 수행될 수 있다. 대상체가 래트, 친칠라, 마우스 또는 시미안과 같은 동물일 때, 방법은 인간 환자에서 작용제의 임상 테스트 전에 사용될 수 있는 편리한 동물 모델 시스템을 제공한다. 이 시스템에서, 질환 또는 미생물 감염의 증상이 각각 동일한 감염을 가진 미처리 동물과 비교하여 감소되거나 제거되면, 후보 작용제는 잠재적인 약물이다. 또한 건강하거나 치료되지 않은 세포 또는 동물의 별도의 음성 대조군을 갖는 것이 유용할 수 있으며, 이것은 비교를 위한 근거를 제공한다.

[0293] 작용제 및 조성물은 약제의 제조시 및 통상적인 과정, 예컨대 약학적 조성물 중의 활성 성분에 따른 투여에 의해 인간 및 다른 동물의 치료에 사용될 수 있다.

[0294] **조합 요법**

[0295] 본 개시물의 조성물 및 관련된 방법은 다른 요법의 투여와 조합으로 사용될 수 있다. 이것들은 DNase 효소, 항생제, 항미생물제, 또는 다른 항체의 투여를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 양태에서, 작용제는 DNAse 효소의 부재 하에 투여된다.

[0296] 다른 구체예에서, 방법 및 조성물은 항생제 및/또는 항미생물제와 조합될 수 있다. 항미생물제는 박테리아, 균류, 또는 원생동물과 같은 미생물을 살해하거나 그것들의 성장을 억제하는 물질이다. 생물막은 일반적으로 항생제의 작용에 대해 저항성이지만, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 감염을 치료하기 위한 전통적인 치료 방법에 대해 생물막을 수반하는 감염을 민감하게 만드는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물과 조합된 항생제 또는 항미생물제의 사용은 항미생물 및/또는 생물막 환원제의 유효량을 감소시킨다. 본 개시물의 방법과 조합되는 항미생물제 및 항생제의 일부 비-제한적 예는 아목시실린, 아목시실린-클라불라네이트, 세프디니르, 아지트로마이신, 및 설파메톡사졸-트리메토프림을 포함한다. 생물막 환원제와 조합된 항미생물 및/또는 항생제의 치료적 유효 용량은 전통적인 방법에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 일부 구체예에서 생물막 환원제와 조합된 항미생물제의 용량이 평균 유효 용량이며 이것은 다른 박테리아 감염, 예를 들어, 감염의 병인이 생물막을 포함하지 않는 박테리아 감염에서 효과적인 것으로 나타났다. 다른 구체예에서, 용량은 평균 유효 용량의 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0,30, 0,35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0 또는 5배이다. 항생제 또는 항미생물제는 항-DNABII 항체의 추가 전에, 동시에, 또는 후에 추가될 수 있다.

[0297] 다른 구체예에서, 방법 및 조성물은 박테리아 감염을 치료하는 항체와 조합될 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물과 조합으로 유용한 항체의 한 예는 무관한 외막 단백질 (즉, OMP P5)에 대한 항체이다. 이 항체 단독으로의 처리는 시험관 내에서 생물막을 감소시킨다. 이 항체 및 생물막 환원제의 조합된 요법은 동일한 농도에서 단독으로 사용된 시약에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 큰 효과를 나타낸다. 생물막을 감소시키기 위해 생물막 환원제 또는 방법과 조합될 때 상승 효과를 생산할 수 있는 다른 항체는 항-rsPilA 항-OMP26, 항-OMP P2, 및 항-전체 OMP 조제물을 포함한다.

[0298] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 생물막 없이 박테리아 감염을 치료하는데 효과적인 일반적인 치료 양상에 대해 생물막을 수반하는 박테리아 감염을 민감하게 하는데 사용될 수 있지만 그렇지 않으면 생물막을 수반하는 박테리아 감염을 치료하는데 효과적이지 않다. 다른 구체예에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 생물막을 수반하는 박테리아 감염을 치료하는데 유효한 치료 양상과 조합으로 사용될 수 있지만, 이러한 추가적인 요법 및 생물막 환원제 또는 방법의 조합은 상승 효과를 생산하여 생물막 환원제 또는 추가적인 치료제의 유효 용량이 감소될 수 있다. 다른 경우에, 이러한 추가적인 요법 및 생물막 환원제 또는 방법의 조합은 치료가 향상되는 상승 효과를 생산한다. 치료의 향상은 감염을 치료하는데 요구되는 더 짧은 시간으로 입증될 수 있다.

[0299] 추가적인 치료적 처리는 생물막을 감소시키는데 사용된 방법 또는 조성물 이전에, 동시에, 또는 이후에 추가될 수 있고, 동일한 제제 내에 또는 별도의 제제로서 함유될 수 있다.

[0300] **키트**

[0301] 본원에 개시된 조성물 및 사용 설명서를 를 포함하거나, 대안으로 근본적으로 그것들로 이루어지거나, 또는 추가로 그것들로 이루어진 키트가 본원에서 제공된다. 한 양태에서, 사용 설명서는 본워에 개시된 방법 중 어느 것을 실행하기 위한 방향으로 제공된다. 한 양태에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 하나 이상, 두 개 이상, 또는 세 개 이상의 작용제는 키트 내에 독립적으로 또는 함께 포장된다.

[0302] 본원에서 기재된 바와 같이 시험관 내 및 생체 내 방법을 수행하는데 필요한 작용제 및 설명서를 함유하는 키트가 또한 요구된다. 따라서, 본 개시물은 본원에 개시된 바와 같이 포함될 수 있는 이들 방법을 수행하기 위한 키트, 뿐만 아니라 조직의 수거 및/또는 스크리닝의 수행, 및/또는 결과의 분석, 및/또는 본원에서 정의된 작용제의 유효량의 투여와 같이 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 설명서를 제공한다. 이것들은 단독으로 또는 다른 적합한 항미생물제와 조합으로 사용될 수 있다.

[0303] 다음 실시예는 본원에 개시된 구체예를 예시하려는 의도이며, 제한하려는 것은 아니다.

[0304] **실험 번호 1**

[0305] 폴리아민은 거의 모든 생 유기체에 의해 생산되고 이용되는 편재한 작은 지방족 폴리양이온이다. Michael et al. (2016) J Biol Chem. 291(29):14896-903; D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272(15):3777-87. 아미노산으로부터 유래되어, 그것들은 전사, 번역 전사 조절, 자가소모, 및 스트레스 저항성을 포함하는, 성장 및 증식에 대해 중심이 되는 다수의 세포 기능에서 역할을 수행한다. Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. 폴리아민 합성을 위한 다수의 경로가 존재하며, 대사 레퍼토리에서 그것들의 존재는 종마다 다르다. Michael et al. (2016) Biochem J. 473(15):2315-29. 정전기-매개된 상호작용의 비특이적 성질로 인해, 폴리아민 합성은 전사, 번역, 및 단백질 분해 메커니즘의 조합을 통해 엄격하게 조절된다. Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406.

[0306] 생 유기체에 의해 생산되는 다섯 가지 주요 폴리아민 분자가 존재한다: 스페르민, 스페르미딘, 푸트레신, 카다베린, 및 1,3-다이아미노프로판. Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. 추가적인 유형의폴리아민은 더 종-특이적 방식으로 생산된다. 각각의 폴리아민은 양이온 특성 및 전하의 분포를 나타내는 아민 기의 길이 및 개수의 차이로 인해 약간 상이한 속성을 갖는다. Michael et al. (2016) J Biol Chem. 291(29):14896-903. 이 차이는 폴리아민 활성에서 어느 수준의 특이성을 허용할 뿐 아니라, 폴리아민 응집체의 조립을 지시한다. D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; D'Agostino et al. (2006) IUBMB Life 58(2):75-82.

[0307] 폴리아민 기능은 폴리아민 농도의 조절 장애와 관련된 다수의 질환 상태에 의해 입증된 바와 같이 농도 의존적이다. Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. 일반적인 대사 과정은 폴리아민의 변화된 수준으로 인해 방해될 수 있고, 특정 과정은 폴리아민 수준의 특이적 또는 전체적인 변화에 의해 변화될 수 있다. 예를 들어, 특정 폴리아민 농도는 미생물의 생물막 생산에 대한 상이한 결과를 매개할 수 있다. 다수의 종에서, 세포내 폴리아민 수준이 생물막 생물 발생을 조절하고 이 조절은 특이적 폴리아민의 세포 내 감지 때문일 가능성이 크다. Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7; McGinnis et al. (2009) FEMS Microbiol Lett. 299(2):166-74; Wortham et al. (2010) Environ Microbiol. 12(7):2034-47. 이들 표현형을 매개하는 폴리아민은 종-특이적일 수 있다. 특이적 폴리아민을 생산할 수 있는 능력이 결여된 돌연변이 균주에서, 합성될 수 없는 폴리아민의 외인성 추가는 생물막 형성을 복원시키지만, 다른 폴리아민의 추가는 그렇지 않았다. 추가적으로, 문헌은 내인성 또는 높은 농도의 외인성 특이적 폴리아민 및 그것들의 유도체에 의해 억제되는 박테리아 생물막 형성의 예로 가득차 있지만, 다른 폴리아민은 효과가 없다. Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7; Goytia et al. (2013) FEMS Microbiol Lett. 343(1):64-9; Cardile et al. (2017) Adv Exp Med Biol. 973:53-70; Wang et al. (2016) J Bacteriol. 198(19):2682-91; Qu et al. (2016) Microbiologyopen. 5(3):402-12; Konai et al. (2015) Bioconjug Chem. 26(12):2442-53; Si et al. (2015) Appl Microbiol Biotechnol. 99(24):10861-70; Dewangan et al. (2014) Antimicrob Agents Chemother. 58(9):5435-47; Ding et al. (2014) Appl Environ Microbiol. 80(4):1498-506; Planet et al. (2013) MBio. 4(6):e00889-13. 하지만, 한 종을 억제하는 동일한 폴리아민은 생물막 생물 발생을 억제할 수 없고 다른 박테리아 종에서 생물막 생산에 필요할 수도 있다. Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7; McGinnis et al. (2009) FEMS Microbiol Lett. 299(2):166-74; Wortham et al. (2010) Environ Microbiol. 12(7):2034-47; Wang et al. (2016) J Bacteriol. 198(19):2682-91; Hobley et al. (2017) J Biol Chem. 292(29):12041-53; Ou et al. (2017) Mol Med Rep. 15(1):21-20; Nesse et al. (2015) Appl Environ Microbiol. 81(6):2226-32; Ramon-Perez et al. (2015) Microb Pathog. 79:8-16; Hobley et al. (2014) Cell. 156(4):844-54; Sakamoto et al. (2012) Int J Biochem Cell Biol. 44(11):1877-86; Burrell et al. (2010) J Biol Chem. 285(50):39224-38; Lee et al. (2009) J Biol Chem. 284(15):9899-907; Patel et al. (2006) J Bacteriol. 188(7):2355-63. 게다가, 균류 생물막 발달에서 폴리아민의 역할은 덜 잘 정의되어 있지만, 폴리아민 합성에서 칸디다 알비칸스 돌연변이는 생물막 생산에 불완전하고 폴리아민 합성 억제자로의 칸디다 알비칸스(*C. albicans*)의 처리는 생물막 성장에 부정적인 영향을 미친다. Chen et al. (2014) Mol Biosyst. 10(1):74-85; Liao et al. (2015) Int J Antimicrob Agents. 46(1):45-52.

[0308] eDNA 안정화의 하나의 잠재적인 공급원은 생물막 매트릭스에서 폴리아민의 존재이다. 폴리아민은 DNA 구조를 조절하고 (Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46(3):595-603) 외부의 개질제 또는 위험한 조건으로부터 DNA를 보호하는 것으로 관찰되었다. D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; Baeza et al. (1991) Orig Life Evol Biosph. 21(4):225-42; Nayvelt et al. (2010) Biomacromolecules. 11(1):97-105. 세포내 염색질 안정화에서 폴리아민의 역할은 잘 문서화되어 있다. Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46(3):595-603. 본원에서, 출원인은 세포외 폴리아민이 박테리아 생물막의 eDNA 구조를 안정화시키는 것으로 가정하였고 박테리아

생물막 공동체를 붕괴시키기 위한 수단으로서 폴리아민 함유량 및 세포 외에서 생물막 매트릭스에서 폴리아민이 eDNA에 결합하는 능력을 변화시키는 것을 보여준다. 출원인은 폴리아민의 합성의 억제 또는 길항작용이 박테리아 생물막을 확립하였고 폴리아민-고갈된 박테리아의 보충이 eDNA 구조를 복원시킨다는 것을 관찰하였다.

[0309] *폴리아민은 박테리아 생물막의 세포외 매트릭스에 존재한다*

[0310] 폴리아민이 생물막 매트릭스에 존재하는지를 결정하기 위해, 모델 인간 병원체로서, 출원인은 시험관 내에서 비피막형 해모필루스 인플루엔재 (NTHi) 생물막을 성장시키고 푸트레신, 스페르민, 또는 스페르미딘에 대한 항체로 면역 형광을 수행하였다. 생물막 세포외 매트릭스 내에서 폴리아민 국소화를 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 가시화하였다 (CLSM; **도 12**). 세 개의 폴리아민 모두를 생물막 전반에 걸쳐 면역 형광 현미경으로 검출하였다.

[0311] *폴리아민 합성 억제 또는 폴리아민 길항작용은 박테리아 생물막을 붕괴시킨다*

[0312] 다이사이클로헥실아민은 경쟁적 억제 메커니즘을 통해, 즉 푸트레신 기질과 단백질 상의 동일한 부위로의 결합을 통해 스페르미딘 신타제를 억제한다. 그러므로 출원인은 다이사이클로헥실아민이 NTHi 생물막 발달을 억제할 것으로 가정하였다. 먼저, 출원인은 10 mM 이하의 다이사이클로헥실아민이 NTHi 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다 (**도 13**). 하지만, 50 mM 다이사이클로헥실아민의 추가는 COMSTAT 분석에 의해 평가된 바와 같이 NTHi 생물막 형성을 크게 억제하여, 생물막 두께 및 생물량을 대략 40%만큼 감소시키는 한편 생물막 거칠기를 증가시켰다 (**도 14**). 다이사이클로헥실아민으로 처리된 잔류 NTHi 생물막에서 스페르미딘의 존재에 대한 후속 면역 형광 현미경법은 생물막 매트릭스에 존재하는 스페르미딘의 통계적으로 유의한 상응하는 감소를 나타냈다 (**도 15**). 다이사이클로헥실아민은 또한 초기 생물막 형성 중에 생산된 eDNA 스캐폴드 구조의 양 및 복잡성을 감소시켰다 (**도 16**). 다이사이클로헥실아민-처리된 NTHi 생물막으로의 1 mM 스페르미딘의 외인성 추가는 정상적인 생물막 두께, 생물량, 및 거칠기를 복원시켰으며 (**도 14**), 다이사이클로헥실아민이 생물막 세포외 매트릭스에서 스페르미딘 신타제 및 또는 외인성 스페르미딘의 경쟁적 억제자로서 기능하고 있다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 폴리아민 합성의 억제 또는 폴리아민 결합 부위로의 길항적 결합를 통해, 생물막 매트릭스에서 eDNA에 결합하는 세포외 폴리아민에 대한 화합물이 생물막 생물 발생의 방지 및 확립된 생물막의 붕괴에 대한 가능성을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0313] **실험 번호 2**

[0314] 모든 박테리아 감염성 질환 중 >80%의 발병은 질병 통제 예방 센터(Centers for Disease Control and Prevention)에 따라 질환 과정의 발병에서 필요한 생물막 상태를 포함하는 것으로 추정되었다. 생물막은 핵산, 단백질, 지질, 생폴리머 (Davies (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(2):114-22), 및 2가 양이온 (Cavaliere et al., (2014) Microbiology Open. 3(4):557-567)을 포함하는 세포 외 폴리머 물질 (EPS) 내에 임베딩된 구조화된 집단으로 진행되는 비생물 및 생물 표면에 부착된 박테리아 세포로 구성된다. EPS는 가혹한 환경 및 항생제 및 숙주 면역 효과기와 같은 항미생물제에 대한 보호 장벽으로 작용한다 (Devaraj et al., (2013), supra). 생물막 매트릭스의 중요한 구조적 및 건축학적 구성요소는 세포외 DNA (eDNA) 및 DNA-결합 단백질의 DNABII 패밀리 (IHF 및 HU)이다. DNABII 단백질은 eDNA에 높은 친화도로 결합하며, 이것은 생물막의 안정화를 허용한다. 항체 표적화 DNABII는 시험관 내에서 및 생체 내에서 체류 박테리아의 방출과 함께 생물막의 붕괴를 유도한다 (Novotny et al. (2016) *EBioMedicine*. (10):33-44); 및 Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunology*. 4 (6): 625-637). DNase 처리는 박테리아 종이 생물막을 형성하는 것을 방지할 수 있지만, 기존의 생물막에 대한 효과는 거의 없거나 전혀 없다 (Flemming and Wingender, (2010) *Nature Reviews Microbiology*. 8:623-633. 양으로 대전된 2가 양이온 (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} 및 Ca^{2+})은 인접한 음으로 대전된 DNA 분자 사이의 분자간 교차-결합을 매개한다. 이 상호작용은 DNA 구조 및 추후의 DNA-단백질 상호작용을 안정화시킨다 (Gueroult et al. (2012) *PLOS ONE*. (7)-7-e41704; 및 Tan and Chen, (2006) *Biophysical Journal*. (90): 1175-1190; Hackl et al. (2005) *International Journal of Biological Macromolecules* 35:175-191). 게다가, 생물막으로부터 Mg^{2+} 양이온의 제거는 항생제 처리에 대한 비피막형 해모필루스 인플루엔재 (NTHi)의 민감성을 증가시킨다 (Cavaliere et al. (2014) *Microbiology Open*. 3(4):557-567). 마지막으로, 폴리아민 (짧은 폴리양이온성 생물 기원 아민)은 또한 다수의 박테리아 종에 의한 생물막 형성에 중요하다 (Patel et al. (2006) *Journal of Bacteriology*. 2355-2363; and Hobley et al., (2017) *Journal of Biological Chemistry*. *292(29): 12041-12053*). 스페르미딘의 존재에 대해 탐침될 때 다수의 병원성 박테리아에 의해 형성된 생물막의 면역 형광 CLSM (IF) 이미지는 폴리아민이 박테리아 생물막의 EPS의 일부이고, 또한 그것들이 DNABII 단백질 HU와 공존한다는 것을 나타낸다 (**도 17A**). NTHI에서 효소 억제자 다이사이클로헥실아민 (DCHA)에 의한 스페르미딘 생합성 경로의 억제는 IF로 측정

된 바와 같이 스페르미딘 수준을 전체적으로 감소시키고 생물막 평균 두께를 크게 감소시켰으며, 따라서 폴리아민이 생물막의 안정성에 중요하다는 것을 나타낸다 (**도 17B 및 도 17C**).

[0315] 생물막을 형성하는 미생물의 능력은 매우 문제가 많으며 광범위한 산업에 편재해 있다. 예를 들어, 기계식 심장 밸브, 소변 카테터, 및 정맥 카테터의 병원에서 획득한 디바이스-관련 감염은 생물막 형성시 박테리아 오염의 결과이다 (Donlan, (2001) Emerging Infectious Diseases. 7(2):277-281). 농업 및 식품 가공 시설에서 생물막 형성을 제어하는 것이 또한 질환 및 광범위한 식품 손실의 예방에 중요하다. Chmielewski and Frank (2006) Compr Rev Food Sci F 2:22-32. 폐수 처리 시설이 또한 생물 부착, EPS의 축적 및 적절한 막 여과를 방지하는 미생물과 같은 생물막-매개된 문제를 발전시키며, 이것은 수질 오염으로 이어진다 (Wood et al., (2016) PNAS. E2802-E2811).

[0316] 양이온 교환 수지 (설포네이트, 설포프로필, 포스포셀룰로스, 또는 헤파린 세파로스)로 표면을 코팅하는 것 및/또는 이것들로 생물막을 처리하는 것은 EPS의 양으로 대전된 구성요소 (즉 폴리아민, 2가 금속 양이온 및 DNABII 단백질)를 표적화하기 위해 음으로 대전된 수지 화학의 성질을 이용한다. 이것은 생물막의 붕괴 및 생물 및 비생물 표면 둘 다에서의 방지를 초래한다. 본원에서 출원인은 양이온 교환 수지 P11 포스포셀룰로스 및 헤파린 세파로스가 생물막 형성을 방지하고 사전 형성된 생물막을 붕괴시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0317] *양이온 교환 수지는 사전 형성된 생물막 및 비피막형 해모필루스 인플루엔재 (NTHI)에 의한 생물막 형성에 부정적인 영향을 미친다.*

[0318] 출원인은 생물막을 침투할 수 없는 음으로 대전된 수지가 보편적으로 박테리아 생물막 형성에 필요한 양으로 대전된 분자 (즉 폴리아민, 2가 금속 양이온 및 DNABII 단백질)를 적정하는 작용을 할 수 있는지에 대한 의문을 가졌다. 두 개의 수지, 예를 들어, 포스포셀룰로스 (P11) 및 헤파린 세파로스를 선택하였는데, 이것들은 둘 다 이온 교환 크로마토그래피에 사용될 뿐만 아니라, DNABII 단백질의 친화도 정제에도 사용된 양이온 교환체이다 (Nash et al. (1987) *Journal of Bacteriology*. 4124-4127; and Vorgias and Wilson, (1991) *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purifcation*. 2(5-6):317-20).

[0319] 사전 형성된 생물막 상에서 양이온 교환 수지의 항-생물막 활성 (즉, 잔존 생물막을 붕괴시키는 능력)을 결정하기 위해, NTHI 성장을 시작하였고 24hr 동안 유지한 다음, 16hr 동안 0 (sBHI 대조군), 0.1, 1, 또는 5% (w/v) of P11 포스포셀룰로스로 처리하였다 (**도 18A**). 생물막 형성을 방지하기위한 양이온 교환 수지의 항-생물막 활성을 결정하기 위해서, NTHI 성장을 시작하였고 0 (sBHI 대조군), 0.1, 1, 및 5% w/v의 P11 포스포셀룰로스 (**도 18B**) 또는 5% (w/v) 헤파린 세파로스 (**도 19**)의 존재 하에 유지하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, 공초점 주사 현미경 (CSLM)으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. 도 18에서 나타난 바와 같이, P11 포스포셀룰로스는 사전 형성된 생물막 (붕괴될 수 있었음) 및 생물막 형성 (방지될 수 있었음) 둘 다에 대해 부정적인 효과를 나타냈으며 이것은 평균 두께 및 생물량의 감소로 나타났다. 헤파린 세파로스는 또한 생물막 형성에 대해 부정적인 효과를 나타내며 평균 두께 및 생물량의 감소가 관찰되었다 (**도 18**). 이들 데이터는 양이온 교환 수지는 시험관 내에서 생물막을 붕괴시키고 생물막 형성을 방지할 수 있다는 것을 시사한다.

[0320] *DNABII (HU)는 양이온-고갈된 사전 형성된 NTHi 생물막을 부분적으로 복원시킨다.*

[0321] DNABII 단백질의 제거가 관찰된 생물막 붕괴 및 방지에 대해 부분적으로 원인이 될 수 있다는 것을 결정하기 위해서, NTHI 성장을 시작하였고 0 (sBHI 대조군) 또는 1% P11 포스포셀룰로스 (w/v)의 존재 하에 24hr 동안 유지하였으며 16hr 동안 1 또는 5ug/mL로 HU 단백질을 외부에서 추가하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 19**에서 나타난 바와 같이, HU는 포스포셀룰로스 시험관 내에서 포스포셀룰로스의 부정적인 효과를 부분적으로 보상할 수 있다. 이들 데이터는 HU가 양이온 교환 수지에 의해 표적화된다는 것을 시사한다.

[0322] *2가 금속은 양이온-고갈된 사전 형성된 NTHI 생물막을 부분적으로 복원시킨다.*

[0323] Mg^{2+}가 양이온 고갈된 생물막을 복원시킬 수 있는지를 결정하기 위해, NTHI 성장을 시작하였고 0 (sBHI 대조군) 또는 1% P11 포스포셀룰로스 (w/v)의 존재 하에 24hr 동안 유지하였으며 16hr 동안 $MgCl_2$ (0-10 mM)를 외부에서 추가하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 20**에서 나타난 바와 같이, $MgCl_2$는 포스포셀룰로스 시험관 내에서 포스포셀룰로스의 붕괴 효과를 부분적으로 보상할 수 있다. 이들 데이터는 P11 포스포셀룰로스가 생물막 매트릭스로부

터 2가 금속을 고갈시킨다는 것을 시사한다.

[0324] *스페르미딘은 양이온 고갈된 사전 형성된 NTHI 생물막을 부분적으로 복원시킨다.*

[0325] 스페르미딘이 양이온-고갈된 생물막을 복원시킬 수 있는지를 결정하기 위해서, NTHI 성장을 시작하였고 0 (sBHI 대조군) 또는 1% P11 포스포셀룰로스 (w/v)를 24hr 동안 유지하였으며 16hr 동안 스페르미딘 (0-5 mM)을 외부에서 추가하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 21**에서 나타난 바와 같이, 스페르미딘은 시험관 내에서 포스포셀룰로스의 부정적인 효과를 부분적으로 보상할 수 있다. 이들 데이터는 P11 포스포셀룰로스가 생물막 매트릭스로부터 폴리아민을 고갈시킨다는 것을 시사한다.

[0326] *P11 포스포셀룰로스의 양이온 고갈 효과는 생물막과 직접적인 접촉을 필요로 하지 않는다.*

[0327] 생물막 형성의 감소가 직접적인 세포 접촉에 의존적인지를 결정하기 위해서, 정단 및 기저측부 챔버를 분리하는 막 내에서 0.4 μm의 공극 크기를 함유하는 트랜스웰 플레이트 시스템의 기저 챔버에서 NTHI 성장을 시작하였다. 이것은 두 개의 챔버 사이에서 소분자, 예를 들어, 단백질 (DNABII), 폴리아민 및 2가 금속 양이온의 확산을 허용하지만, 박테리아 세포는 아니다. 정단 챔버는 분주시 0 (sBHI 대조군), 0.5, 1, 또는 1.5% (w/v) P11 포스포셀룰로스를 함유하였고 16hr 동안 유지하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 22**에 나타난 바와 같이, 생물막 평균 두께 및 생물량의 용량-의존적 감소는 양이온 교환 수지와의 직접적인 접촉에 독립적이다.

[0328] *스페르미딘의 외부 추가는 트랜스웰 시스템에서 P11 포스포셀룰로스의 양이온 고갈 효과를 보상한다.*

[0329] 폴리아민 (스페르미딘)이 트랜스웰 시스템에서 직접적인 접촉 없이 P11 포스포셀룰로스에 의해 고갈되는지를 결정하기 위해, 0, 100, 500, 또는 1000 μM 스페르미딘을 함유하는 기저측부 챔버에서 NTHi 성장을 시작하는 한편, 0 (sBHI 대조군) 1.5 % (w/v) P11 포스포셀룰로스를 저단 챔버에 추가하고 16hr 동안 유지하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 23**에서 나타난 바와 같이, 스페르미딘은 단독으로 용량-의존적 방식으로 양이온-고갈된 생물막을 복원시킬 수 있다.

[0330] *스페르미딘 및 DNABII는 상승적으로 작용하여 비-접촉 매개된 P11 포스포셀룰로스 양이온-고갈된 생물막을 복원시킨다.*

[0331] P11 포스포셀룰로스 양이온-고갈된 생물막은 HU (**도 20**) 및 스페르미딘 (**도 22 및 도 24**)의 외부 추가에 의해 용량-의존적 방식으로 복원될 수 있다. **도 17A**에서 나타난 바와 같이, 면역 형광 CSLM은 스페르미딘 및 DNABII (HU)가 또한 다수의 병원성 박테리아 종에 의해 형성된 생물막에서 공존한다는 것을 나타낸다. 이로 인해, 출원인은 HU 및 스페르미딘이 시험관 내에서 상승적으로 작용하는지를 결정하기를 원했다. NTHi 성장을 100 μM 스페르미딘 또는 500nM HU, 또는 두 구성요소의 조합을 함유하는 트랜스웰 시스템의 기저측부 챔버에서 시작하였다. 0 또는 1.5% P11 포스포셀룰로스를 정단 챔버에 추가하고 16hr 동안 유지하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. **도 25**에서 나타난 바와 같이, 차선의 농도의 스페르미딘 및 HU 둘 다의 조합은 sBHI 대조군 생물막과 비교하여 상승 작용 방식으로 양이온-고갈된 생물막을 복원시킨다.

[0332] *양이온 교환 수지로 코팅된 비생물 표면은 용량-의존적 방식으로 생물막 형성을 방지한다.*

[0333] 유리 챔버 슬라이드를 0, 0.1, 1, 또는 5% P11 포스포셀룰로스 및 5% 헤파린 세파로스 (w/v)의 용액으로 코팅하였다. NTHI 성장을 시작하였고 코팅된 슬라이드에서 40hr 동안 유지하였다. 생물막을 식염수로 세척하고 LIVE/DEAD®로 염색하고, CSLM으로 가시화하고 COMSTAT로 분석하여 평균 두께 및 생물량을 결정하였다. 도 26은 P11 포스포셀룰로스 및 헤파린 세파로스 둘 다가 용량 의존적 방식으로 생물막 형성을 방지한다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 양이온 교환 수지로 표면을 코팅하는 것이 시험관 내에서 박테리아 부착 및 추후의 생물막 형성을 방지할 수 있다는 것을 시사한다.

[0334] **실험 번호 3**

[0335] 생물막은 독점적으로 박테리아, 독점적으로 효소 또는 둘 다의 미생물의 공동체로 이루어진다. 박테리아 병원체에 대해, 항생제가 치료의 제1 선이다. 생물막 내 박테리아 체류는 모든 박테리아 감염의 대략 80%의 발병에 크게 기여하고 만성 및 재발성 성질의 감염성 질환에 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 생물막 내 박테리아 체류는 항생제에 대하여 자유 생활 대응물보다 최대 1000배 이상 더 저항성이다. 이 저항성은 대부분 적대적인 환

경으로부터 체류 미생물을 보호하는 세포외 매트릭스 때문이다. 만성 및 재발성 성질의 생물막-매개된 박테리아 감염은 항생제의 과도한 사용을 요구하며, 그 결과, 다수의 항생제-저항성 박테리아의 냉정한 출현으로 이어졌다. 이 성장하는 항생제 저항성 표현형은 항생제 치료의 실패를 초래한다. 또한, 항생제의 주요 부작용은 그것들이 공생하는 미세생물군에 부정적으로 영향을 미친다는 것이며, 이것은 숙주에게 다수의 부작용 중 어느 것, 뿐만 아니라 2차 감염에 대한 민감성을 남길 수 있다. 이전에 출원인은 지금까지 연구된 모든 박테리아 생물막 매트릭스 내에서 보편적이 표적으로서 DNA 및 단백질의 DNABII 패밀리를 확인하였다. 출원인은 DNABII 단백질이 제거될 수 있으며 치료적 항체는 생물막의 구조적 붕괴 및체류 박테리아의 방출을 초래한다는 것을 보여주었다. 그에 반해, 효모 생물막은 DNABII 단백질을 발현하지 않지만 매트릭스의 일부인 세포외 DNA (eDNA)를 함유한다. 이러한 새로운 접근법은 현재의 치료적 기술보다 그것이 저항성 메커니즘을 발달시키기 위해 박테리아에 압력을 가하는 살균 활성을 가진 화합물에 의존하지 않지만, 생물막 세포외 매트릭스 구조를 표적화하며, 이로 인해 생물막의 붕괴 및 체류 박테리아의 취약한 접근 가능한 상태로의 방출을 초래한다는 점에서 개선된 것이다. 모든 생물막은, 구성요소 박테리아 또는 효모에 관계없이, B-DNA (세포 내에서 지배적인 기본형)로서 존재하는 이들 구조 보다는 DNA-의존적 구조를 생성하고, 생물막 매트릭스 내에 존재하는 가장 중요한 구조적 eDNA는 Z-DNA로 존재한다. 중요하게는, Z-DNA는 더 경식이며, 그것을 더 양호한 구조 물질로 만들고 Z-DNA는 B-DNA를 분해하는 효소인 뉴클레아제에 대해 완전히 저항성이다. 따라서, 임의의 잠재적인 요법의 표적은 변화되거나 (즉, B-DNA로 역전이되거나) 또는 붕괴될 때 현재의 요법의 효험을 강력하게 하는 생물막 매트릭스의 이전에는 인식되지 않은 구조적인 요소이다. 중요하게는, Z-DNA에 결합하는 단백질은 또한 Z-DNA를 안정화시킨다. Z-DNA는 생물막의 천연 구성요소이고, Z-DNA에 결합하는 항체는 생물막 성장을 촉진한다. 반대로, B DNA에 결합하는 분자는 B DNA를 안정화시키고 B-DNA의 Z-DNA로의 전환을 방지하여 생물막을 방지한다. 중요하게는, Z-DNA에 대한 항체의 형성을 자연적으로 유도하는 질환 상태는 생물막 형성, 예를 들어, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및/또는 낭포성 섬유증 (CF)을 촉진할 것이다. 따라서 SLE 환자에서 발달하는 만성 감염은, 부분적으로는, SLE 유래된 Z-DNA 항체의 결과이다. 이에 더하여, DNA를 손상시키는 일부 화학치료제, 예를 들어, 백금 기반 화학요법은 또한 DNA를 Z형으로 변화시킨다. 따라서 이들 작용제는 생물막 성장을 안정화시키거나 촉진하는데 기여한다. Z-DNA를 붕괴시키는 치료제를 지시하는 것은 는 SLE 및/또는 낭포성 섬유증 (CF) 및 만성 감염의 화학치료적 악화에 대한 새로운 치료적 접근법이다.

[0336] 생물막은 공동체 아키텍쳐 및 행동 (공동체 내 신호전달, 수송, 분업, 등)을 나타내는 표면에 응집되거나 부착된 미생물의 컬렉션이다. 이 공동체 아키텍쳐는 부분적으로는 위험한 조건에 대해 체류 미생물을 보호하는 자가 제조된 세포외 매트릭스에 의해 구별되며, 이것은 숙주에서 면역 시스템 및 항미생물제를 포함한다. 생물막은 동물 및 식물 둘 다에서, 뿐만 아니라 산업상으로, 예를 들어, 산업 장비의 부착물에서 상당 부분의 질환의 원인이 되고, 이와 같이 의료, 농업, 및 산업 환경에서의 중요성으로 인해 집중적인 연구 노력의 초점이 맞추어진다. Visick et al. (2016) J Bacteriol. 198(19):2553-63; Hoiby et al. (2017) APMIS. 125(4):272-5. 병원성 생물막의 박멸 또는 치료는 보호적 세포외 매트릭스의 생산을 포함한, 다수의 요인들로 인해 달성하는 것이 특히 어렵다. Hoiby et al. (2017) APMIS. 125(4):272-5. 생물막 매트릭스는 가변적으로 다당류, 단백질, 및 세포외 DNA (eDNA)로 구성된다. 박테리아 생물막의 eDNA는 보편적이고 세포외 매트릭스의 안정성 및 보호 기능에 필수적이다. Okshevsky et al. (2015) Crit Rev Microbiol. 41(3):341-52; Wilton et al. (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60(1):544-53. DNA 분해 또는 구조를 안정화시키는 DNA 결합 단백질의 제거를 통해 생물막 eDNA 구조를 약화시키면, 생물막의 심각한 붕괴 및 체류 박테리아의 더 취약한 상태로의 방출을 초래한다. Brandstetter et al. (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123(11):2626-32; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Baelo et al. (2015) J Control Release. 209:150-8; Brown et al. (2015) Front Microbiol. 6:699; Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4; Martins et al. (2012) Mycoses. 55(1):80-5; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37.

[0337] 생물막 온전성에서 eDNA의 중심적인 역할에 기초하여, 뉴클레아제 처리는 명백한 치료적 가능성을 가지고 있다. 실제로, 많은 박테리아가 내인성 분비된 뉴클레아제를 이용하여 생물막 구조를 조절하고 생물막으로부터의 분산을 매개한다. Cho et al. (2015) Infect Immun. 83(3):950-7; Kiedrowski et al. (2011) PLoS One. 6(11):e26714; Liu et al. (2017) Front Cell Infect Microbiol. 7:97; Steichen et al. (2011) Infect Immun. 79(4):1504-11. 하지만, 외인성 뉴클레아제는 생물막 형성의 시작시 투여될 때에만 전형적으로 효과적인

생물막 방지 활성을 나타내며, 확립된 생물막은 임의의 보통의 생물막 붕괴를 관찰하기 위해서 고농도의 뉴클레아제를 필요로 한다. Hall-Stoodley et al. (2008) BMC Microbiol. 8:173; Izano et al. (2009) Microb Pathog. 46(4):207-13; Kaplan et al. (2012) J Antibiot (Tokyo). 65(2):73-7; Tetz et al. (2010) DNA Cell Biol. 29(8):399-405. 낭포성 섬유증 환자에서, 만성 폐 감염이 이환율 및 사망률의 주요 공급원인 경우, 치료적 뉴클레아제는 주로 생물막 공동체를 형성하기 위해 박테리아에 의해 생산된 eDNA보다 숙주-유래된 eDNA에 의해 생성된 장애물에 대해 표적화되는 점액용해제로서 사용되고, 이들 뉴클레아제 (즉 Pulmozyme)는 단지 만성 감염의 확립 전에 삶의 매우 초기에 투여될 때 미생물 공동체를 변화시키는 것이 관찰되었다. Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4. 박테리아 생물막 eDNA가 뉴클레아제 분해에 대해 저항성이 되는 이유는 미결의 문제로 남아있다.

[0338] 왜 박테리아 생물막 eDNA가 외인성 뉴클레아제에 의해 불충분하게 분해되는지에 대한 많은 가정이 존재한다. 이들 가정들 중에서 박테리아가 뉴클레아제에 둔감한 형태로 eDNA의 구조를 활발하게 변화시킬 가능성이 존재한다. 뉴클레아제 저항성인 하나의 이러한 DNA 구조적 요소는 Z-DNA이며, 대안으로 좌회전 나선 형태이다. Z-DNA는 단지 시험관 내에서는 특정 조건 하에서 및 생체 내에서는 제한된 세포내 조건 하에서 기재되어 있지만, 정상 세포 생리학에서 Z-DNA에 대한 역할에 대한 증거가 증가하고 있으며, 특히 Z-DNA 결합 단백질의 확인은 다양한 세포내 과정을 조절한다. Wang et al. (2007) Front Biosci. 12:4424-38; Barraud et al. (2012) Curr Top Microbiol Immunol. 353:35-60. 평형을 원형 B-DNA에서 Z-DNA 형태로 변화시키기 위해서, 이중 나선의 음의 슈퍼코일링, 음으로 대전된 포스페이트-데옥시리보스 백본의 반발에 대응하기 위한 높은 양이온 농도, 및 구조를 안정화시키기 위한 Z-DNA 결합 단백질 상호작용을 포함한 추가적인 요인들이 필요하다 (Choi et al. (2011) Chem Soc Rev. 40(12):5893-909; Yang, et al. (2012) Curr Med Chem. 2012;19(4):557-68). 금속 양이온 및 폴리양이온성 폴리아민은 둘 다 특히 폴리(dG-dC) 지역에서 Z-DNA 형성을 유도하는 것이 가능하다 (D'Agostino et al. (2006) IUBMB Life. 58(2):75-82; Balasundaram et al. (1991) Mol Cell Biochem. 100(2):129-40). Thomas et al. (1991) J Biol Chem. 266(10):6137-41. 다른 한편으로, B-DNA로의 Z-DNA 역전이는 끼어들기 작용제 및 잠재적으로는, 진핵 생물 염색질 단백질, HMGB1에 의해 촉진되고 (Kim et al. (1993) Biopolymers. 33(11):1677-86; Mirau et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1931-41). Waga et al. (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153(1):334-9.

[0339] 생물막 매트릭스는 DNABII 패밀리의 박테리아 염색질 단백질에 의해 안정화된다. 이들 단백질은 eDNA 스캐폴드 애소 구부러진 DNA 구조를 차지하고, 그것들의 제거는 생물막의 붕괴 및 체류 박테리아의 방출을 초래한다. Brandstetter et al. (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123(11):2626-32; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74-88; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37. 추가적으로, 폴리아민은 DNA 구조를 조절하고 (Pasini et al. (2014) 아미노산. 46(3):595-603) 그것을 외부 개질제로부터 보호한다는 것이 관찰되었다. Baeza et al. (1991) Orig Life Evol Biosph. 21(4):225-42; D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; Nayvelt et al. (2010) Biomacromolecules. 11(1):97-105. 본원에서, 출원인은 세포외 폴리아민이 DNABII 단백질과 협력하여 박테리아 생물막 내의 eDNA에서 Z-DNA 구조를 유도한다는 것을 보여주었고 B-DNA로의 Z-DNA의 반전이 박테리아 생물막 구조를 약화시켜 통상적인 치료제에 민감하게 만들거나, 또는 그 자체에서 및 저절로 생물학을 붕괴시키는지를 확립한다.

[0340] *박테리아 생물막은 Z-DNA가 축적됨에 따라 뉴클레아제 붕괴에 대해 저항성이 된다.*

[0341] 비피막형 해모필루스 인플루엔재 (NTHi)는 급성 및 만성 기도 감염의 일반적인 원인이고, 이 유기체에 의해 유발된 질환은 그것의 만성에 대해서는 생물막 형성에 의존한다. Duell et al. (2016) FEBS Lett. 590(21):3840-53. 유사하게, 요로 병원성 대장균 (UPEC)은 요로 감염의 주요 유병 기생충이고 또한 만성 방광염을 유발하는 능력에 대해 생물막 생산에 의존한다. Blango et al. (2010) Antimicrob Agents Chemother. 54(5):1855-63. 시험관 내에서 뉴클레아제의 부재 또는 존재 하에 성장한 NTHi 및 UPEC 생물막은 뉴클레아제가 존재할 때 생물막 생물 발생에 대해 상당한 손상을 나타냈다 (**도 27**). 반대로, 이들 뉴클레아제로의 사전 확립된 생물막의 처리는 생물막 두께 또는 생물량을 감소시키지 않았으며, 생물막 매트릭스에서 뉴클레아제에 대한 eDNA의 저항성은 생물막이 성숙함에 따라 확립된다.

[0342] 출원인은 시험관 내에서 NTHi 및 UPEC 생물막이 발달함에 따라 그것들을 탐침하기 위해 Z-DNA에 대한 항체를 사

용하였다. 항체 염색 및 면역 형광 현미경법은 생물막이 성숙함에 따라 Z-DNA가 생물막 매트릭스를 기반으로 축적된다는 것을 나타냈으며 (**도 28**), 성숙한 생물막에서 증가된 뉴클레아제 저항성과 상응한다. 주요 균류 병원체 칸디다 알비칸스는 또한 생물막 세포외 매트릭스 내에서 Z-DNA를 함유하는 것으로 발견되었다 (**도 29**). 게다가, Z-DNA의 축적은 생물막-구성 과정에 중심이 되며, Z-DNA에 특이적으로 결합하는 (그러므로 그것을 안정화시키는) 항체로의 초기 생물막의 처리가 NTHi 생물막 생물 발생을 자극하는 한편, B-DNA에 대한 항체는 그렇지 않기 때문이다 (**도 30**). Z-DNA는 생물막 세포외 매트릭스에 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 부여할 가능성이 크며, 이것은 뉴클레아제로 처리된 생물막에 존재하는 eDNA 함유량 및 DNA의 형태를 검사함으로써 입증된다. 뉴클레아제 처리는 NTHi 생물막 세포외 매트릭스에서 B-DNA 가시화를 크게 감소시키는 한편, Z-DNA 존재는 더 분명해진다 (**도 31**).

[0343] *폴리아민 및 DNABII 단백질은 생물막 매트릭스에서 Z-DNA 구조를 안정화시키기 위해 협력한다.*

[0344] 폴리(dG-dC)로 구성된 올리고뉴클레오타이드 기질은 Z-DNA를 형성하는 성향이 있는 것으로 알려져 있고 (즉, 높은 NaCl 농도 또는 폴리아민의 존재로 인해) 이로 인해 뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호된다 (**도 32**). 따라서, 출원인은 또한 l_{295}/l_{260} 흡광도 비율의 분광광도법적 측정을 통해 폴리아민이 이 기질의 Z-DNA 형성을 유도한다는 것을 관찰하였다 (데이터 미도시). 폴리아민-매개된 eDNA 안정화에 더하여, 출원인은 이미 생물막 구조를 강화하는데 있어서 DNABII 박테리아 염색질 단백질의 중요성을 입증하였다. 현재, 출원인은 폴리아민 및 DNABII 단백질이 함께 eDNA 스캐폴드를 안정화시키는 기능을 하는지를 결정하는 것을 추구한다. 두 개의 관련된 폴리아민에 대한 항체, 스페르미딘 및 스페르민, 및 두 개의 DNABII 패밀리 단백질, IHF 및 HU를 인식하는 항체를 사용하여, 출원인은 먼저 면역 형광 현미경에 의해 생물막 매트릭스에서 폴리아민 및 DNABII 단백질의 분포를 가시화하였다. 출원인은 DNABII 단백질 (주로 HU)이 NTHi 생물막 세포외 매트릭스 내에서 폴리아민과 공존한다는 것을 발견하였다 (**도 33**). 게다가, HU를 발현할 수 없도록 조작된 NTHi 균주에 의해 형성되고 폴리아민-특이적 항체로 탐침된 생물막의 면역 형광 현미경은 HU가 생물막에서 일반적인 폴리아민 분포에 필요하다는 것을 입증하였다 (**도 33**).

[0345] NTHi DNABII 단백질은 생물막 매트릭스 온전성에서 중심적인 역할을 한다. Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37, 출원인은 그것들이 DNA 뉴클레아제 저항성에 기여할 수 있다고 상정하였다. 실제로, NTHi HU는 시험관 내에서 폴리(dG-dC) 기질에 뉴클레아제 저항성을 부여하고 폴리(dGdC) 기질을 Z-DNA 형태로 변화시킬 수 있었다 (**도 34**). Jang et al. (2015) Sci Rep. 5:9943. 생물막 매트릭스에서 NTHi HU 및 폴리아민의 공존의 관찰로 인해, 출원인은 그것들이 뉴클레아제 분해를 억제하는 능력에서 상승효과를 나타내는지를 테스트하였다. 단독으로 폴리(dG-dC) 기질을 보호하지 않는 폴리아민 및 HU의 농도에서, 두 개의 조합은 뉴클레아제 저항성을 부여하는 상승작용 능력을 입증하였다 (**도 35**). 폴리아민 및 DNABII 단백질의 공존, 및 그러므로 결과로 생성된 뉴클레아제 저항성 표현형을 또한 생체 내에서 실험적 분비성 중이염 동안에 중이에서 형성된 생물막에서 NTHI로 인해 관찰하였다 (**도 35**). 게다가, 생물막 세포외 매트릭스로의 DNABII 및 폴리아민 통합의 수준은 종마다 다르고 면역 혀오강에 의한 Z-DNA 검출 수준과 연관이 있다 (**도 36**). 종합해보면, 이들 결과는 박테리아 DNABII 단백질 및 내인성 폴리아민이 잠재적으로 생물막의 eDNA 스캐폴드 내에서 Z-DNA 구조적인 요소로의 전환 및 그것의 안정화를 통해 함께 상호작용하여 박테리아 생물막 매트릭스를 유지한다는 것을 시사한다.

[0346] *B-DNA로의 Z-DNA의 반전은 뉴클레아제 민감성을 복원시킨다.*

[0347] Z-DNA가 시간이 흐름에 따라 박테리아 생물막에 축적되고 이것이 왜 성숙한 생물막이 뉴클레아제 붕괴에 대해 저항성인지를 설명할 수 있다는 출원인의 신규한 결과를 이용하기 위해, 출원인은 B-DNA로의 Z-DNA의 평형을 변화시킬 수 있는 분자가 생물막을 조절할 수 있는지를 테스트하는 것을 추구하였다. 진핵 생물 염색질 단백질 HMGB1은 Z-DNA를 B-DNA로 전환시키는 것으로 보고되었다. Waga et al. (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153(1):334-9. 이와 같이, HMGB1로 처리된 NTHi 생물막의 면역 형광 현미경법은 감소된 Z-DNA 함유량을 나타냈다 (**도 37**). DNABII 단백질은 HMGB1 처리에 의해 생물막으로부터 방출되었으며 (**도 38**), DNABII-매개된 Z-DNA 안정화의 부재 하에 Z-DNA를 B-DNA로 복귀시키켜서 eDNA 구조를 탈안정화시키고 상당한 생물막 붕괴를 초래한다. 따라서, HMGB1 또는 비-염증 HMGB1 변이체를 가진 친칠라 중이에서 NTHI에 의해 유도된 급성 분비성 중이염의 치료는 부착 생물막의 효율적인 분해를 초래하였다 (**도 39**). HMGB1은 또한 시험관 내에서 낭포성 섬유증 폐 생물막 감염과 관련된 치명적인 기회주의적인 병원체인 부르콜데리아 세노세파시아에 의해 형성된 생물막을 붕괴시키는데 효과적이었지만, HMGB1의 예방적 투여는 마우스의 폐에서 부르콜데리아 세노세파시아 응집체

생물막 형성을 방지하였다 (**도 40**). 보호적 농도의 폴리아민의 존재 하에 폴리(dG-dC) 기질에 HMGB1의 추가는 뉴클레아제 민감도를 복원시켰다 (**도 41**).

[0348] 이들 조합된 데이터는 폴리아민 및 DNABII 단백질에 의한 Z-입체구조로의 DNA의 일부의 전환이 생물막의 세포외 매트릭스에서 구조적 물질에 대한 근거를 생성할 뿐만 아니라, 성숙한 생물막을 붕괴시키기 위한 통상적인 뉴클레아제에 대한 저항성을 설명한다는 것을 입증한다. Cho et al. (2015) Infect Immun. 83(3):950-7. 종합해보면, 이들 데이터는 그러므로 Z-DNA를 B-DNA로 또는 Z-DNA 구성형태의 생물막 eDNA를 B-DNA로 전환시킬 수 있는 방법 및 물질 (예를 들어, DNABII 단백질 또는 폴리아민을 제거하거나 억제함으로써)이 뉴클레아제 민감도를 복원시켜, 잠재적으로는 생체 내에서 성숙한 저항성 생물막에 대한 뉴클레아제의 활성을 강화시킬 수 있는 작용제의 개발을 허용한다는 것을 나타낸다. 이것은 또한 미생물의 생물막이 Z-DNA 함유량에 의해 확인되어, Z-DNA 정량화가 생물막 감염을 진단하는 잠재적으로 유용한 생체 마커가 된다는 것을 보여준다.

[0349] **실험 번호 4**

[0350] 이 실험은 낭포성 섬유증을 치료하기 위한 약물, 작용제 및 방법의 전임상 테스트를 위한 돼지과 모델을 제공한다. Stoltz et al. (2010) Science Translational Medicine 2(29):29-31 참조. 낭포성 섬유증은 CF 막관통 전도성 조절 인자 (CFTR이라고 불림) 음이온 채널을 암호화하는 유전자에서의 돌연변이로 인한 상염색체 열성 질환이다. 이 모델에서, "CFTR"이라고 불리는 유전자의 결합을 갖도록 특이적으로 교배되어 CF 돼지라고 불리는 돼지는 다수의 박테리아 종에 의한 하기도 감염을 포함한 CF 폐 질환의 홀마크(hallmark) 특징을 자발적으로 발달시킨다. 돼지는 폴리펩타이드와 같은 작용제 또는 다른 면역원성 작용제로 면역화되어 폐에서 박테리아 생물막을 박멸하는 항체의 형성을 유도한다. 이 실험은 실험 번호 1에서 나타난 바와 같이 활성 면역화 이후 친칠라의 중이 내에 체류하는 생물막을 박멸하기 위해 IHF에 항체를 전달하는 것과 유사하다. 항-IHF (또는 다른 작용제) 항체는 질환 및 관련된 병리학의 징후의 개선을 평가하기 위해 분무화(nebulization)에 의해 이들 돼지의 폐에 전달될 수 있다.

[0351] **실험 번호 5**

[0352] *TEDS의 형성에 기여하는 UPEC 폴리아민 합성 유전자를 확인한다.*

[0353] 단일 돌연변이의 대장균 Keio 콜렉션 (Baba et al. (2006) Mol Syst Biol. 2:2006 0008)을 사용하여, 돌연변이를 *speA* (아르기닌을 푸트레신 전구체, 아그마틴으로 전환시키는 데 필요한 아르기닌 탈카르복실화제), *speC* (오르니틴을 푸트레신으로 전환시키는 데 필요한 오르니틴 탈카르복실화제), *speD* (S-아데노실메티오닌을 SpeE 활성을 위해 프로필아민 공여체로 전환시키는 데 필요한 아데노실메티오닌 탈카르복실화제), 및 *speE* (푸트레신을 스페르미딘으로, 그리고 스페르미딘을 스페르민으로 전환시키는 데 필요한 아미노프로필트랜스퍼라제) 유전자 (Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99)를, 처음에는 단독으로, 그런 후에는 조합하여 UPEC UTI89 균주에 p1 파지 형질 도입에 의해 이동시켰다. 폴리아민을 생성할 수 있는 다중 경로로 인해, 이들 돌연변이는 생물막 표현형을 관찰하기 위해 조합될 수 있다 (예를 들어, SpeA 및 SpeD는 푸트레신 생합성의 두 별도 경로의 초기 효소이며; *speA* 및 *speD*의 이중 돌연변이는 푸트레신 합성을 폐기하기 위해 필요하다). 돌연변이를 정확한 염색체 위치에서의 삽입에 대해 PCR에 의해 확인한다. UPEC 균주를 규정된 시간 (8, 24, 48시간)에 생리학적 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 및 5 mM)의 첨가된 폴리아민 (스페르미딘, 스페르민, 또는 푸트레신)의 존재 또는 부재 하에서 본 출원인의 시험관 내 eDNA 스캐폴드 검정 및 생물막 형성 검정으로 확립한다 (Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99). 이들 검정은 풍부한 배지에서 폴리아민이 잔류할 가능성이 있기 때문에 풍부한 배지 (LB) 및 화학적으로 규정된 배지 (CDM; M9) 둘 다에서 수행한다. 초기 eDNA 구조를 dsDNA, DNABII 단백질, 및 폴리아민 (항-스페르미딘, 항-푸트레신, 항-카다베린)에 대해 프로빙한 면역 형광 현미경에 의해 평가하고, 구조의 복합성을 ImageJ의 FracLac 분석 플러그인에 의해 정량화한다 (Karperien et al. (1999-2013) FracLac for ImageJ.) 생물막 형성을 LIVE/DEAD®-염색된 생물막의 CLSM에 의해 평가하고 생물막 평균 두께, 생물량, 및 거칠기를 COMSTAT 분석에 의해 정량화한다. dsDNA, DNABII 단백질, 및 폴리아민에 대해 프로빙된 생물막의 eDNA 구조를 면역 형광 CLSM에 의해 평가한다. 모든 진정세균이 HU를 가지며, HU 고갈은 보편적으로 생물막 손상을 초래하기 때문에, 보존된 에피토프에 대해 지시된 항-HU 항체를 사용하여 DNABII 검출을 위한 속 전체에서의 HU의 포괄적인 인식을 할 수 있다. **도 46**은 나이브 또는 항-HU (회색) 및 항-스페르미딘 (Spd, 연회색) 항체로 프로빙된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지를 보여주며, 공존은 흰색으로 표시된다.

[0354] *TEDS의 형성에 기여하는 UPEC 폴리아민 유출 유전자를 확인한다*

[0355] Keio 콜렉션을 사용하여, *potE* (푸트레신-오르니틴 항포터) (Kashiwagi et al. (1992) Proc Natl Acad Sci U S

A. 89(10):4529-33), *cadB* (카다베린-리신 항포터) (Soksawatmaekhin et al. (2004) Mol Microbiol. 51(5):1401-12), *mdtJ* 및 *mdtI* (스페르미딘 유출에 중요한 다중약물 유출자) (Higashi et al. (2008) J Bacteriol. 190(3):872-8), 및 *sapB*, *sapC*, *sapD*, 및 *sapF* (푸트레신 유출에 중요한 ABC 트랜스포터) (Sugiyama et al. (2016) J Biol Chem. 291(51):26343-51) 유전자의 돌연변이를, 처음에는 단독으로 그런 후에는 조합하여 (유출자 활성의 중복을 극복하기 위함) UPEC UTI89에 이동시킨다. 결핍 생물막 표현형을 나타내는 돌연변이를 조합할 수 있다. UPEC를 규정된 시간에 및 첨가된 폴리아민 (스페르미딘, 스페르민, 푸트레신)의 존재 또는 부재 하에 본 출원인의 eDNA 스캐폴드 및 생물막 형성 검정으로 확립한다.

[0356] 폴리아민의 TEDS 및 생물막 발생에서의 역할을 폴리아민이 TEDS를 생성하기 위하여 eDNA 및 DNABII 단백질과 함께 기능하는 것을 보여줌으로써 측정한다. **도 42A - 42D**는 DNABII 단백질 및 폴리아민 둘 다 양이온 교환체 (P11)-매개된 생물막 방지를 구제하는 데 필요한 것을 보여준다. 한편 **도 44**는 DNABII 단백질, 폴리아민, 및 eDNA (B- 및 Z-DNA)가 시간이 흐름에 따라 NTHI 생물막의 EPS 내에 꾸준하게 축적되는 것을 보여준다. 게다가, **도 46**에서 나타낸 것과 같이, DNABII, 폴리아민, Z-DNA 및 B-DNA 구성요소는 전부 다중 박테리아 생물막의 EPS에 존재한다.

[0357] 출원인은 또한 **도 47A-B**에서 폴리아민, Z-DNA 및 B-DNA 구성요소가 전부 NTHI 생물막으로 감염된 친칠라 중이의 구획 내에 존재하는 것을 발견하였다. 이에 더하여, 출원인은 RNase A의 첨가가 아마도 B-DNA의 Z-DNA로의 세포외 전환에 대한 중요한 촉매인 폴리아민의 방출에 의해 생물막 형성을 용량-의존적 방식으로 자극하였고 (**도 52 A**), tRNA (GMP가 아님)의 첨가가 아마도 생물막 EPS로부터의 폴리아민의 격리에 의해 초기 NTHI 생물막을 용량-의존적 방식으로 파괴한 것 (**도 52 B**)을 보여주었다.

[0358] *조건부 배지에서 폴리아민을 정량화한다.*

[0359] 조건부 배지를 박테리아 생물막으로부터 수집하여 폴리아민 (푸트레신, 카다베린, 스페르미딘, 스페르민)의 농도를 측정한다. 폴리아민 방출을 8개의 저항성 생물막-형성 병원체 (이하 표준 8 균주로 언급함); ES*KAPE 병원체, NTHI, 및 UPEC (*는 대표적인 병원성 스타필로코쿠스로서 스타필로코쿠스 에피더미디스(*S. epidermidis*)의 사용을 나타내고 (Sabate et al. (2017) Front Microbiol. 8:1401), 스타필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*)가 면역 형광 검정을 혼란스럽게 할 수 있는 항체 결합 단백질 A를 생성한다고 한다면, 다루기 쉬운 곳에서, 이 분석은 스타필로코쿠스 아우레우스에 적용됨) 및 생물막 표현형을 세포외 폴리아민 농도와 연계시키기 위하여 변경된 생물막 EPS 구조를 보여주는 돌연변이 변이체의 임상 분리물에 대해 정량화한다. 생물막을 풍부한 배지 및 CDM에서 성장시키고, 다양한 시간 (0, 4, 8, 16 및 24시간)에 조건부 배지를 수집한다. 세포 유리 조건부 배지 (여과) 및 배지 샘플을 액체 N_2에서 보관을 위해 순간 냉동시킨다. 분석을 LC-MS/MS를 통해 OARDC 대사산물 분석 클러스터에 의해 수행한다 (Hakkinen et al. (2013) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 941:81-9; Liu et al. (2013) Anal Chim Acta. 791:36-45; Xu et al. (2016) Molecules. 21(8)).

[0360] *TEDS에서 폴리아민의 정상 상태의 역할을 확립한다.*

[0361] 폴리아민이 생물막 발생 전체에서 존재하는지를 시험관 내에서 측정한 후에, 이들 폴리아민이 eDNA 구조에 영향을 미치는지를 구별하기 위한 테스트를 수행한다. 출원인은 시딩에 첨가하였을 때 생물막 형성을 방지하지만 (Pulmozyme®과 유사하거나 더 나음) 스페르미딘에 대해 다양한 민감성을 가지는 (표 1) 일련의 뉴클레아제를 확인하였다. 시간이 흐름에 따라 eDNA 스캐폴드 및 생물막 형성 검정을 사용하여, 출원인은 이들 효소를 폴리아민 농도에 대한 정성 프로브로서 및 뉴클레아제 활성의 폴리아민-매개된 억제 또는 뉴클레아제 활성의 eDNA 구조-매개된 억제 (즉 Z-DNA와 같이 뉴클레아제 저항성 형태로의 전환) 사이를 구별하기 위하여 사용한다. 각각의 경우에, 생물막을 명시된 시간 (0, 4, 8, 16, 및 24시간) 동안 성장시킨 후 뉴클레아제로 처리하고 최종 40시간까지 인큐베이션한다. 생물막 환경에서의 뉴클레아제 활성에 대한 대조군으로서, 생물막으로부터의 조건부 배지에서 인큐베이션된 (0, 4, 8, 16, 및 24시간) 플라스미드 기질에 대한 뉴클레아제 활성을 측정하고, 그것에 대해 출원인은 폴리아민 구성요소 및 각각의 농도를 미리 측정하였다. 표준 8 균주에 대한 생물막 파괴를 앞서 기술된 것과 같이 평가하고 분석한다. **도 35 A-D**에서, 출원인은 DNABII 단백질이 DNase 저항성을 유도하기 위하여 폴리아민과 상조하는 것을 보여준다.

표 1

[0362] **생물막 형성을 방지하는 뉴클레아제 및 그것들의 스페르미딘 민감도**

효소	XhoI	DNase*	PstI	SapI	T4 Pol	NucB	Bal31
Spd 억제[#]	50 μm	300 μm	500 μm	10mM	10mM	>10mM	>10mM

[0363] *Pulmozyme: [#]스페르미딘은 10 μm-10mM에서 적정되어 농도를 결정하며 각각의 뉴클레아제는 게놈 DNA에서 <10% 활성으로 감소되었다.

[0364] *박테리아 생물막에서 DNA, DNABII, 및 폴리아민의 정상 상태 수준의 비율의 견고성을 테스트한다.*

[0365] 출원인이 eDNA, DNABII 단백질, 및 폴리아민이 각각 생물막의 TEDS를 유지하기 위해 필수적인 것을 보인 한편으로, 생물막 형성을 반복적으로 최대화하기 위해 상호작용하는 각 구성요소의 비율을 측정할 수 있다. 박테리아가 생물막을 형성할 때, 부유성/생물막 박테리아의 평형이 이루어진다. 실제로, 출원인은 이전에 DNABII 단백질이 UPEC 생물막을 제한하며 (Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35), 증가하는 농도의 DNABII 단백질이 용량 의존적 방식으로 부유성 박테리아를 생물막 상태로 유발하는 것 (Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35)을 밝혔다. HU가 결핍된 UPEC는 더 작은 생물막을 생성하지만 부유성 박테리아의 생물막 상태로의 구동에서 외인성 DNABII에 더 반응성이다 (Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35). 동시에, eDNA (DNase로)가 고갈된 UPEC 생물막은 외인성 DNABII 첨가시에도 더 이상 생물막 생물량을 증가시키지 않는다. 대도적으로, 외인성 DNABII 단백질 또는 DNA를 첨가하기 위한 어떠한 시도도 NTHI 생물막에 부정적인 영향을 미친다 (데이터 미도시). 출원인은 생물막 EPS가 DNA, DNABII 단백질, 및 폴리아민이 결핍되고, 그로써 이들 3가지 구성요소가 서로와 관련하여 최적 이하로 존재할 때, 박테리아는 우선적으로 부유성 상태로 분할된다고 가설을 세웠다. 마찬가지로, UPEC과 유사하게, 제한하는 구성요소(들)의 그것의 최적 비율로의 보충은 박테리아의 생물막 상태로의 분할을 개선해야 한다. 대조적으로, 전부 3개의 구성요소가 적절한 비율로 있을 때, 출원인이 NTHI에서 생각하는 것처럼, 이들 구성요소의 임의의 것의 보충은 적절한 비율을 파괴할 수 있고 생물막 형성에 부정적 영향을 미친다. 여기서 천연 UPEC 생물막에 대한 외인성 DNABII 단백질을 적정하고 생물막 및 부유성 박테리아의 비율을 측정한다. 생물막이 외인성 DNABII 단백질로 포화된 후에는, 폴리아민 및 염색체 DNA는 둘 다 박테리아를 생물막 상태로 추가로 분할하기 위해 달라진다.

[0366] 확인된 각각의 우세한 폴리아민 (또는 그것들의 조합)을 생물막이 CDM에서 성장할 때의 세포외 환경에서 측정된 농도로부터 10배 더 적거나 크게 농도를 다르게 함으로써 테스트한다. 출원인은 DNA, 폴리아민, 및 DNABII 단백질이 이것들의 적절한 비율로 첨가된다면, 부유성 박테리아를 생물막으로 유발시킬 것이라고 가설을 세웠다. 그러므로, WT UPEC 및 NTHI 및 이것들의 동종 유전자형 HU 결핍 균주 (IHF의 나머지 존재에도 불구하고, HU 결핍 균주는 계속해서 생물막 결핍 표현형을 나타냄)를 HU, DNA, 및 폴리아민의 최적 비율에 대해 또한 테스트한다. 시험관 내에서 생물막 형성 검정을 통한 조합 생물막 구성요소 첨가의 영향을 희석 플레이팅에 의한 생물막 단계에 대비하여 부유성 단계에 존재하는 박테리아의 상대적인 비율의 측정을 통해 평가한다 (Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35). 출원인은 **도 42A-D**에서 P11 첨가가 생물막 형성을 용량-의존적 방식으로 방지하는 것을 보여준다. 외인성 스페르미딘 및 HU는 함께 생물막 발생을 복원시키지만 단독으로는 그렇지 못하여, 이것은 P11 항-생물막 활성이 직접적인 접촉 없이 생물막 EPS로부터의 구조적 구성요소 (폴리아민, DNABII 단백질)의 적정의 결과임을 시사한다.

[0367] *TEDS에 바람직한 폴리아민이 있는지를 측정한다*

[0368] 상기에서 나타낸 것과 같이, 물리적으로 분리된 챔버에서 생물막은 양이온-교환체 P11에 의해 파괴될 수 있다. 중요하게는, 폴리아민 및 DNABII 단백질 둘 다 이런 파괴에 대응하기 위해 생물막 챔버에 다시 첨가될 수 있는 한편, 각각의 구성요소 자체로는 비효과적이다. 스페르민 및 스페르미딘이 푸트레신 또는 카다베린보다 효과적으로 DNA 구조를 조절하기 때문에 (Kabir et al. (2013) PLoS One. 8(7):e70510), 폴리아민을 상기 기술된 다양한 농도에서 단독으로 및 조합하여 특정 폴리아민이 TEDS 생성을 용이하게 하는지를 측정한다. HU를 이 실험 전체에서 규정된 농도 (상기 기술된 것과 같이 및 5배 낮거나 높은 농도)에서 첨가한다. 이 실험을 상기 기술한 것과 같이 표준 8 균주로 수행하여, 상기 기술된 시험관 내 생물막 검정을 사용하여 생물막 형성에 대한 다양한 폴리아민의 영향을 정량화한다.

[0369] *결과, 및 대체물*

[0370] 폴리아민 합성에서 결핍의 기여도 및 세포외 폴리아민의 정상 상태 수준에 미치는 유출 유전자의 기여도를 조사함으로써 TEDS 형성을 연구하기 위해 유전자 접근법을 적용할 수 있다. 결핍 생물막 표현형을 유발하는 단일 및 조합된 돌연변이를 확인하고 외인성 폴리아민으로 보충한다. 모델 시스템으로서의 UPEC의 선택은 그것의 임상적 중요성 (Subashchandrabose et al. (2015) Microbiol Spectr. 3(4)), eDNA-DNABII 의존성 EPS의 공개된 특성화 (Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35), 및 대장균 폴리아민 경로의 광범위한 공개된 이해 (Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99)를 토대로 하지만, 생물막 표현형을 조사하지는 않는다 (폴리아민의 세포내 역할에 대부분 초점을 맞춘 다른 박테리아에서의 생물막 표현형의 덜 포괄적인 유전자 분석). Di Martino et al. (2013) Int J Med Microbiol. 303(8):484-91; Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7. 생물막 발생 중에 어떤 폴리아민이 어느 조합으로 존재하고 임상적으로 중요한지에 따라, 생물막-형성 병원체를 결정한다. 자연적으로 생물막 발생에 기여하는 폴리아민이 드러난다. 생물막 형성을 방지하지만 폴리아민에 의해 다양한 정도로 억제되는 뉴클레아제를 사용하여 구성요소 폴리아민이 단순히 eDNA 구조에 결합하는지, 또는 결합하여 변경시키는지를 측정한다. 만약 폴리아민이 DNA 구조에 영향을 미치지 않는다면, 폴리아민이 시간에 따라 축적되기 때문에, 이들 뉴클레아제의 폴리아민에 대한 민감성에 관련된 생물막 파괴의 계층이 있을 것이다 (표 1). 만약 새로운 뉴클레아제-저항성 DNA 구조가 형성된다면, 폴리아민의 허용적인 농도에도 불구하고 뉴클레아제 기능이 없는 생물막 성숙기가 있을 것이다. qRT-PCR에 의한 및 미처리 생물막 및 가장 강력한 생물막 표현형 (생물막 상태로 분할된 박테리의 최대량)을 가지는 것들의 웨스턴 분석에 의한 폴리아민 및 DNABII 단백질의 정상 상태 수준의 생합성 유전자의 발현을 조사한다. 마지막으로, 내인성 폴리아민을 특정 조합의 폴리아민으로 대체하여 TEDS에서의 폴리아민의 왕성함을 테스트하여 생물막 발생에서 모든 폴리아민이 동등하게 효능이 있는지를 측정한다.

[0371] *3부 eDNA-의존적 스캐폴드의 발생에서 Z-DNA의 역할을 측정한다.*

[0372] 생물막이 성숙함에 따라, 생물막 EPS 내의 eDNA는 DNase-저항성이 된다. Z-DNA는 DNase 저항성이고 생물막이 성숙함에 따라 TEDS에서 축적되는 것으로 알려져 있다.

[0373] 다른 병원체를 단독으로, 규정된 혼합 생물막에서 및 인간 샘플에서 조사하여 Z-DNA가 박테리아 생물막 중에서 어느 정도로 보편적인지를 측정한다.

[0374] *단일 종 생물막에서 Z-DNA의 풍부함을 나타내고 Z-DNA가 폴리아민 및/또는 DNABII 단백질과 공존하는지를 측정한다*

[0375] 11개의 생물막 형성 병원체 (표준 8 및 하기의 이중 종 생물막인 3개 [모락셀라 카타랄리스(M. catarrhalis) (OM에서 일반적인 공동 병원체), 포르피로모나스 긴기발리스 (치주 병원체), 및 스트렙토코쿠스 고르도니 (*Streptococcus gordonii*, 경구 기회성 병원체)]를 사용하고, 항-Z-DNA 항체를 각 생물막 시기 (0, 4, 16, 24, 48, 및 96시간)로서 사용하여 면역 형광을 수행할 수 있다. 샘플을 Z-DNA-특이적 항체로 프로빙하고 나이브 항체 음성 대조군 및 B-DNA 특이적 항체와 비교하여 Z-DNA 존재를 엄격하게 확인한다. IgG-풍부한 항-폴리아민 및 항-DNABII 항혈청, 및 이것들의 각각의 나이브 IgG 대조군을 사용하여 병렬 실험을 수행하여, 모든 3개의 구성요소가 생물막 EPS 내에서 공존하는지를 측정한다. 생물막을 FM4-64와 같은 박테리아 외막 염색으로 대비염색하고, 일반 공급원으로부터의 고도로 교차 흡수되는 2차 항체로 항체 라벨링을 검출하며, CLSM에 의해 이미지화한다. 공존 정도를 ImageJ에서 Coloc 2 분석 플러그인을 사용하여 정량화한다. Z-DNA의 우세함이 박테리아의 생물막 상태로의 분할과 상관이 있는지를 조사하기 위하여, 부유성/생물막 박테리아의 비율을 본원에서 기술한 것과 같이 각 종에 대해 정량화한다.

[0376] *이중 종 생물막에서 Z-DNA의 풍부함을 측정하고 Z-DNA가 폴리아민 및/또는 DNABII 단백질과 공존하는지를 측정한다*

[0377] 이중 종 생물막을 조사하여 Z-DNA 함량, 분포, 및 폴리아민 및 DNABII 단백질과의 상호작용이 폴리미생물 환경의 맥락에서 생물막의 시기로 어떻게 변화되는지를 측정한다. 폴리미생물 조합은 질환에서 일어나는 것으로 알려져 있고 출원인이 시험관 내에서 경험한 것으로는 NTHI + 모락셀라 카타랄리스 (폴리미생물의 OM 생물막을 대표함), 포르피로모나스 긴기발리스(*P. gingivalis*) + 스트렙토코쿠스 고르도니(*S. gordonii*) (폴리미생물의 치주 생물막을 대표함) 29, 및 NTHI + 슈도모나스 애루기노사 (폴리미생물의 CF 및 만성 억제성 OM 생물막을 대표함)를 들 수 있다. 폴리미생물의 생물막 배양을 임상 관찰에 의해 지시된 것과 같이 접종한다; 예를 들어, 슈도모나스 애루기노사가 일반적으로 NTHI 감염 부위에서 이차 침입자이기 때문에, NTHI 생물막을 슈도모나스 애루기노사 접종 전에 확립한다. 결과로 생성된 폴리미생물의 생물막을 생물막 EPS에서의 폴리아민 및 DNABII 단백

질 존재뿐만 아니라 Z-DNA 함량에 대해 앞서 기술한 면역 형광에 의해 분석한다.

[0378] *이중 종 생물막에서 Z-DNA 정도를 확립하고 한 파트너가 eDNA, 폴리아민, 및 HU를 기여할 수 없을 때 Z-DNA가 폴리아민 및/또는 DNABII 단백질과 공존하는지를 측정한다.*

[0379] HU 결핍 NTHI 균주는 폴리아민 및 eDNA가 없는, 매트-유사 생물막을 형성한다. 일반적인 공동-감염 병원체, 슈도모나스 애루기노사 및 모락셀라 카타랄리스, 뿐만 아니라 WT NTHI (HU 돌연변이와 구별하기 위하여 *gfp* 발현 유전자를 운반함)와 쌍을 이룬 이 균주를 사용하여 각각의 WT 박테리아의 eDNA, HU, 및 폴리아민이 Z-DNA의 형성을 포함하는 NTHI 돌연변이의 결핍을 보충할 수 있는지를 측정한다. 생물막 형성을 상기와 같이 CLSM에 의해 정량화하고, EPS 구성요소 및 구조를 면역 형광 CLSM에 의해 분석한다. **도 46A**에서, 나이브 또는 항-HU (회색) 및 항-스페르미딘 (Spd, 연회색) 항체로 프로빙된 표시된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지가 도시되면, 공존은 흰색으로 표시된다.

[0380] *인간 샘플에서 Z-DNA의 검출.*

[0381] 출원인이 이전에 DNABII 단백질 및 폴리아민에 대해 수행한 것과 같이 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Idicula et al. (2016) Laryngoscope. 126(8):1946-51), OM에 걸린 아동으로부터 회수한 유출물 (Idicula et al. (2016) Laryngoscope. 126(8):1946-51), CF 가래 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9), 및 CRS에 걸린 성인으로부터의 흡인물을 포함한, 인간 생물막-관련 질환으로부터의 임상 샘플을 조사하고, Z-DNA가 존재하는지를 면역 형광 현미경에 의해 측정한다. 출원인은 상기 언급한 각각으로부터의 혼합-성별 임상 샘플에 접근하였고, 그것에 대해 출원인은 상응하는 미생물학적 데이터를 가지고 있다. 각각의 섹션 (동등한 수의 남성 및 여성 출처 임상 샘플을 테스트함)을 나이브 항체 대조군과 면역 형광을 비교하면서 다양한 농도의 Z-DNA-특이적 항체로 프로빙한다. 이전에 기술된 면역 형광에 의해 얼마나 많은 Z-DNA 검출이 폴리아민 및 DNABII 단백질과 공간적으로 상관이 있는지를 또한 조사한다. **도 46 A**에서, 출원인은 표시된 박테리아의 40시간 동안 형성되고, 나이브 또는 항-B-DNA (진회색) 및 항-Z-DNA 항체 (흰색)로 프로빙된 생물막의 면역 형광 CLSM 이미지를 도시한다. 잘 특성화되어 있는, Z-DNA-특이적 단클론성 항체 (클론Z2258,59,78)를 사용하여 Z-DNA를 검출한다. DNABII, 폴리아민, Z-DNA 및 B-DNA 구성요소는 전부 다중 박테리아 생물막의 EPS에 존재한다. Z-DNA는 상이한 정상 상태 수준에서 다수의 박테리아 생물막의 EPS의 필수적인 부분이다.

[0382] *TEDS의 발생에서 Z-DNA의 기능을 조사한다.*

[0383] 여기서 출원인은 TEDS에서 Z-DNA가 어느 정도로 통합 구조적 역할을 하는지를 측정한다.

[0384] *Z-DNA에 특이적인 뉴클레아제를 사용하여 TEDS를 프로브한다.*

[0385] 문헌 및 출원인의 데이터를 토대로, Z-DNA가 노화 생물막 내에서 축적되는 한편, 실질적인 B 형태 DNA가 유지될 가능성이 있으며 (데이터 미도시), 이것은 B-Z 인터페이스가 생물막 전역에 존재하는 것을 의미한다. Rich 및 공동연구자들은 인간 Z-DNA 결합 단백질 ADAR1의 N-말단 Z Z-DNA 결합 도메인을 유형 II 제한 엔도뉴클레아제 FokI의 C-말단 촉매적 F_N 도메인에 융합시킴으로써 Z-DNA 특이적 뉴클레아제를 생성하였고 (Kim et al. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A. 94(24):12875-9), 여기서 Z-DNA 결합 도메인은 B-특이적 뉴클레아제를 B-Z 접합부에 위치시킨다. 이중 hADAR1 Za 도메인 (잔기 133-209) 융합 (Zaa)을 통해 더 높은 Z-DNA 특이성을 나타내는 이 효소의 개선된 버전을 구성하고 생성하여, >95% 순도로 정제하고, 슈퍼코일 플라스미드에서 Z-DNA 삽입물의 소화에 의해 Z-DNA 절단 활성을 확인한다 (Shin et al. (2016) DNA Res.에서 기술된 것과 같음). 보완적인 접근법으로서, B-Z 접합부에서 초활성을 나타내는 효소인 S1 뉴클레아제를 사용한다 (Kim et al. (1996) J Biol Chem. 271(16):9340-6). 만약 Z-DNA가 TEDS의 구조적 온전성을 유지하는 데 중요하다면, 이들 뉴클레아제의 사용은 생물막을 파괴해야 한다. 이들 효소가 기능을 위해 Z-DNA를 필요로 하기 때문에, 이것들은 생물막 발생 전 과정을 통해 Z-DNA에 대한 프로브일 수 있고 Z-DNA의 존재를 측정하기 위한 (이에 더하여 면역 형광에 대한) 병렬 수단으로서 작용할 수 있다. 발생의 과정 (0, 8, 16, 24, 48, 및 96시간)을 통해 상기 언급된 B-Z 접합부 특이적 뉴클레아제의 생물막 형성을 억제하는 능력을 앞서 기술한 시험관 내 생물막 검정을 사용하여 조사한다. Z-DNA 트랙의 분해가 생물막 및 부유성 박테리아의 분할 변경을 초래하는지를 상기에서 측정한다. 표준 8 균주, 뿐만 아니라 출원인에 그것에 대해 Z-DNA 검출의 상대적인 우세함을 검출한 임의의 추가 종에 대한 이들 뉴클레아제의 항-생물막 활성을 평가한다.

[0386] *DNA를 B 형태로 유도하는 것이 TEDS에 영향을 미치는지를 측정한다*

[0387] B- 및 Z-DNA 사이의 평형은 삽입제 (예를 들어, 에티듐 브로마이드, 클로로퀸, DAPI (Kwakye-Berko et al.

(1990) Mol Biochem Parasitol. 39(2):275-8; Shafer et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12(11):4679-90; Kim et al. (1993) Biopolymers. 33(11):1677-86) 또는 DNA 결합 분자 (예를 들어, 네트롭신, 분지된 폴리아민)의 첨가로 추가로 B 형태로 유도될 수 있다 (Muramatsu et al. (2016) J Chem Phys. 145(23):235103; Zimmer et al. (1983) FEBS Lett. 154(1):156-60). 만약 Z-DNA가 TEDS의 구조적 온전성의 기초라면 이들 작용제는 생물막을 파괴해야 한다. 이런 가설을 테스트하기 위하여, 출원인은 Z-대-B-DNA 촉매 첨가가 생물막 형성을 방해하는지를 평가하기 위하여 시험관 내 생물막 검정을 사용하고, CLSM에 의해 생물막 억제, 희석 플레이팅에 의해 부유성/생물막 분할의 이동, 및 면역 형광 현미경에 의해 Z-DNA 함량의 변화를 평가한다. 각 화합물에 대한 최소 억제 농도 (MIC)를 마이크로플레이트 희석에 의해 측정할 수 있고, 그런 후 마이크로 이하 농도에서의 생물막 파괴 및 Z-DNA 반전의 용량-의존성을 측정할 수 있다. 이들 분자를 8 표준 균주에 대해 테스트하고, 최상의 항생물막 활성을 가진 3개 분자를 추가로, 출원인이 그것에 대해 Z-DNA 검출의 상대적 우세함을 관찰한 임의의 추가 종으로 조사하였다.

[0388] *DNA를 Z 형태로 유도하는 것이 TEDS에 영향을 미치는지를 측정한다*

[0389] B- 및 Z-DNA 사이의 평형은 폴리양이온 (예를 들어, 폴리아민)의 수준을 증가시킴으로써 (Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60), Z-DNA로 되기 쉬운 서열을 유도하는 단백질 (ADAR 단백질, ZBP 단백질, 폭스 바이러스 E3 단백질)의 Zα 도메인 패밀리의 구성원으로부터 유래한 외인성 재조합 Z 도메인을 Z-DNA에 첨가함으로써 (Athanasiadis et al. (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80), 또는 대체 퓨린 피리미딘 트랙 (예를 들어, HhaI, M.SssI, 및 M.CviPI 메틸 트랜스퍼라제)90의 시토신의 C5를 메틸화함으로써 Z-DNA 쪽으로 유도될 수 있다. 생물막 형성의 정도가 변화할 수 없는 한편, 생물학 형성 및 전체적인 구조의 동역학은 변화할 가능성이 있다. 상기에서 기술된 것과 같이, FokI 뉴클레아제 융합이 없는 경우에만, hADAR1로부터의 재조합 Zaa 도메인은 생성되고 재조합 단백질의 Z-DNA 결합 활성이 CD에 의해 확인된다. Zaa 도메인 (0, 0.5, 5, 또는 50 μM) 또는 메틸 트랜스퍼라제 (예를 들어, 0, 0.1, 1, 또는 10 U/mL의 HhaI 및 S-아데노실메티오닌)를 생물막 시딩에 첨가하고 표준 8 균주 및 그렇지 않으면 동종 유전자형의 HU 결핍 NTHI (그것의 생물막에 유의한 eDNA를 함유하지 않는 음성 대조군) 상에 시딩 후 4, 8, 16, 24, 48, 및 96시간째에 생물막 형성을 CLSM, 희석 플레이팅을 통한 부유성/생물막 분할의 이동, 및 면역 형광에 의해 관찰된 Z-DNA 축적을 사용하여 시험관 내 생물막 검정으로 평가한다.

[0390] *Z-DNA에 특이적으로 결합하는 DNABII의 능력을 측정한다.* 출원인이 HU가 DNA를 Z-DNA로 유도한다는 것을 밝힌 한편으로, DNABII 단백질, 폴리아민, 및 DNA가 Z-DNA를 상승적으로 형성하는지를 측정하기 위한 추가의 분석을 수행한다.

[0391] *IHF 및 HU가 폴리아민-유도된 Z-DNA의 존재 하에 DNA에 결합하는지를 측정한다*

[0392] Hud 및 공동 연구자들에 의한 광범위한 연구 (Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951-61)는 IHF 및 HU가 둘 다 스페르미딘의 존재 하에 DNA에 결합하여 그것의 구조를 두꺼운 섬유로 변화시키는 것을 밝혀냈다. 폴리아민 (0, 0.1, 0.5, 1, 및 5 mM의 다음: 푸트레신, 스페르미딘, 스페르민, 카다베린, 또는 상기 측정된 조합)의 존재 또는 부재 하에 규정된 DNA 기질 [Holliday 접합 DNA, IHF 공통 서열 (WATCAANNNNTTR, 여기서 W는 A 또는 T이고, N은 임의의 뉴클레오타이드이며 R은 퓨린임)을 함유한 35 bp 듀플렉스, 동일한 서열의 스크램블 버전, Z-DNA 전환이 되기 쉬운 35 bp (dGdC) 및 그렇지 않은 35 bp (dAdT)]이 Z-DNA를 형성할 것인지를 측정한다. 250 및 280 nm에서 특징적인 반전이 예상되는 CD 분광학에 의한 타원율 측정을 통한 Z-DNA 전환을 먼저 측정한다. 그런 후 사우스웨스턴 분석 (EMSA와 이어서 항-Z-DNA 및 항-DNABII 항체를 사용한 면역블롯 분석)에 의해 판단되는 바, DNABII 단백질의 각각의 기질에의 결합을 조사한다 (Goodman et al. (1989) Nature. 341(6239):251-4). CD 확인된 Z-DNA 전환을 나타낸 기질 (0.2 nM)을 50 mM HEPES 완충액 pH 7.0에서 5-500 nM의 DNABII 단백질과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 반응 혼합물을 전기영동에 의해 6% 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분해한다. ImageQuant 소프트웨어를 사용하여 밴드 세기를 정량화한다. 평형 해리 상수 (K_d)를 측정한다. Hung, et al. (2011) J Bacteriol. 193(14):3642-52. DNA 기질이 동위원소 교환적으로 표지되기 때문에, 생물막으로부터의 세포 유리 조건부 배지를 상기에서 주지한 동일한 박테리아 균주로부터의 폴리아민 및/또는 DNABII 단백질의 공급원 (0, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.5 v/v의 후속 반응 혼합물)으로서 또한 테스트할 수 있다.

[0393] *IHF 및 HU가 Z-DNA에 결합하는지를 측정한다*

[0394] IHF 및 HU가 Z-DNA에 직접적으로 결합하는지를 측정한다. DNABII 단백질 및 안정적인 Z-DNA 콘포머인 35 bp 브롬화된 (dGdC) DNA 기질로 EMSA를 수행한다. Herbert et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72. 이

실험은 브롬화된 DNA 기질이 Z-DNA 상태를 안정화시키기 위하여 폴리아민을 필요로 하지 않기 때문에 앞선 발견을 확장시킨다. 기질 DNA를 표지화하고 기술된 것과 같이 ^{32}P-dGTP, 5-브로모 dCTP, dGTP, 및 Klenow와 함께 인큐베이션한다 (Herbert et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72). 25-500 nM의 DNABII 단백질을 0.2 nM의 표지화된 DNA 기질과 함께 인큐베이션하고, 반응 혼합물을 6% 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서의 전기영동에 의해 분해하고, ImageQuant 소프트웨어에 의해 밴드 세기를 정량화하고, 평형 해리 상수 (K_d)를 측정한다.

[0395] *박테리아 생물막 파괴에서 EPS 구성요소 및 구조를 표적화하는 작용제의 유효성을 측정한다*

[0396] eDNA 및 DNABII가 생물막 파괴를 위한 공지된 표적인 한편, 여기서 출원인은 종래의 항미생물제의 존재 또는 부재 하에 폴리아민 및 Z-DNA 둘 다에 초점을 맞추었다. 출원인은 TEDS 구성요소 및 구조에 대해 지시된 작용제가 종래의 항미생물제와 상승적으로 작용할 것이라고 가설을 세웠다.

[0397] *EPS eDNA 스캐폴드의 이전에 발견된 구성요소 (항-DNABII 항체 및 뉴클레아제)를 표적화하는 작용제가 새롭게 발견된 TEDS 구성요소/구조 (즉 폴리아민 및 Z-DNA)를 표적으로 하는 작용제와 상승적인지를 측정한다*

[0398] TEDS의 전부 3개의 구성요소 또는 구조를 생물막 파괴에 대한 접근법으로서 단독으로 또는 조합하여 표적화한다. 출원인은 TEDS 내에서 다중 표적을 처리함으로써 출원인이 상승작용 및 그로써 하나의 표적을 단독으로 표적화하는 것보다 월등한 효험에 대한 더 큰 잠재력을 입증할 수 있을 것으로 가설을 세웠다.

[0399] *폴리아민, DNABII 단백질, 및/또는 B형 eDNA의 표적화*

[0400] 공지의 박테리아 폴리아민 합성 억제자 [다이사이클로헥실아민 (DCHA) (Mattila et al. (1984) Biochem J. 223(3):823-30), 다이플루오로메틸오르니틴 (DFMO) (Muth et al. (2014) J Med Chem. 57(2):348-63), 메틸글리옥살-비스(사이클로펜틸아미디노 하이드라존) (MGBCP)(Takaji et al. (1997) Lett Appl Microbiol. 25(3):177-80)]를 사용하여, 각각이 표준 8 균주에 의해 형성된 생물막을 파괴하는 능력을 구별되는 성숙화 시기 (0, 8, 24, 및 48시간)에 테스트한다. DCHA, DFMO, 및 MGBCP에 대한 MIC를 각 병원체에 대해 측정하고, MIC 아래에서의 100배 희석 시리즈의 파괴 활성에 대해 테스트한다. 각각의 억제자를 개별적으로 및 DNase (Pulmozyme®; 0, 0.1, 1 U/ml) 또는 HU (0, 150, 300 μg/ml)에 대해 지시된 IgG-풍부한 항혈청과 조합하여 테스트한다. 생물막을 LIVE/DEAD® 염색 및 앞서 정량화된 CLSM 및 생물막 파라미터에 의해 분석한다. 개별 처리 및 처리 없는 대조군과 비교한 각 처리 조합의 유효성을 평가한다. 이에 더하여, 생물막 및 부유성에서 남아 있는 CFU의 부분을 측정하여, 체류 박테리아의 임의의 사멸이 있는지 또는 단순히 생물막이 파괴된 것인지를 조사한다. 그런 후 저항성 가래 생물량을 파괴하는 능력에 대해 10명의 환자로부터의 CF 샘플 (인간 폴리미생물의 생물막-유사 공동체 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9)의 예임)에 대한 전부 8개의 병원체에 대해 5개의 가장 효과적인 조합을 테스트한다 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9). 간단히 설명하면, 가래 샘플을 24시간 동안 테스트하고 영상화한다. 미처리 대조군과 비교하여 탁도의 증가로써 판단되는 가래 샘플의 파괴를 사용하여 이전에 기술된 처리 유효성을 정량화한다 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9).

[0401] *Z-DNA, DNABII 단백질, 및/또는 B형 eDNA의 표적화.*

[0402] 측정된 최상의 Z-DNA 억제자/파괴자 (또는 이것들의 최상의 조합)를 사용하여, 마이크로 농도 이하의 농도에서 각각이 개별적으로 및 항-DNABII 항체 또는 DNase와 조합하여 성숙화의 상이한 시기에서 표준 8 균주에 의해 형성된 생물막을 파괴하는 능력을 테스트한다. 만약 상기에서 사용된 Z-DNA 특이적 뉴클레아제가 생물막 형성을 억제한다면, 이들 뉴클레아제를 항-DNABII 항체 또는 DNase와 함께 공동 투여한다. 생물막 파괴 활성 및 CF 가래 파괴를 위한 가장 효과적인 조합을 분석한다.

[0403] *폴리아민, Z-DNA, DNABII 단백질, 및 B형 eDNA의 표적화*

[0404] 폴리아민 합성 억제자 및 Z-DNA 억제자를 사용하여, 조합된 각각이 성숙화의 상이한 시기 (0, 8, 24, 및 48시간)에서 표준 8 균주의 각각에 의해 형성된 생물막을 파괴하는 능력을 테스트한다. 항-DNABII 항체 또는 DNase와 함께 폴리아민 억제자 및 Z-DNA 억제자로의 최상의 이중 처리를 또한 테스트한다. 각각의 처리 조합에 대한 생물막 파괴를 평가한다. 상위 3개의 조합을 CF 가래에 대해 테스트한다.

[0405] *TEDS 및 항미생물제에 대해 지시된 처리의 상승작용을 측정한다*

[0406] 항미생물제와 조합되었을 때 TEDS의 전부 3개의 구성요소 또는 구조를 표적화하는 것의 유효성을 조사한다.

[0407] *항미생물제로 TEDS를 표적화하는 것의 상승작용.*

[0408] 가장 효과적인 생물막 파괴 조합을 사용하여, 남아 있는 체류 생물막 박테리아 및 그것들의 각각의 부유성 박테리아가 항미생물제의 공동 투여에 의해 사멸될 수 있는지를 측정한다. 상기 측정된 항-DNABII 항체, DNase, 폴리아민 억제자, 및 Z-DNA 컨버터에 대한 다양한 농도 및 조합을 사용하여, 표준 8 균주에 대한 생물막 파괴 및 사멸을 위한 적절한 항생제의 첨가를 테스트한다. 각 병원체에 대해 MIC의 위 및 아래로 10배의 임상적으로 표시된 항생체를 공동 투여한다 (엔테로코쿠스 패시움(*E. faecium*)- 0.1, 1, 10 μg/ml 암피실린 (Weinstein et al. (2001) J Clin Microbiol. 39(7):2729-31); 스타필로코쿠스 아우레우스- 0.025, 0.25, 2.5 μg/ml 클린다마이신 (LaPlante et al. (2008) Antimicrob Agents Chemother. 52(6):2156-62); 스타필로코쿠스 에피더미디스 - 0.2, 2, 20 mg/ml반코마이신 (Pinheiro et al. (2016) Microb Drug Resist. 22(4):283-93); 클레브시엘라 뉴모니애- 0.4, 4, 40 μg/ml 세프타지딤/아비박탐 (Sader, et al. (2017) Antimicrob Agents Chemother. 61(9)); 아시네토박터 바우만니이(*A. baumannii*)- 0.3, 3, 30 μg/ml 메로페넴 (Liang et al. (2011) J Microbiol Immunol Infect. 44(5):358-63); 슈도모나스 애루기노사- 0.4, 4, 40 μg/ml 콜리스틴 (Hindler et al. (2013) J Clin Microbiol. 51(6):1678-84); 엔테로박터- 0.4, 4, 40 μg/ml 세페핌 (Rivera et al. (2016) Antimicrob Agents Chemother. 60(6):3854-5), NTHI- 0.1/0.05, 1/0.5, 10 μg/ml/5 mg/ml 아목시실린/클라불라네이트리튬31). 각각의 처리 조합에 대한 생물막 파괴 및 남아 있는 생존 가능한 분할을 평가하고 조합을 CF 가래에 대해 테스트한다.

[0409] 보편적인 TEDS의 이러한 더 나은 이해를 바탕으로, 출원인은 표준 단독 접근법으로서 생물막을 치료하는 잠재력을 예상하거나 또는 특정 병원체에 대한 생물막 파괴의 수술적 유효성을 최적화하기 위하여 종-특이적 생물막 구성요소 (예를 들어, 슈도모나스 애루기노사 다당류 알긴산염, Pel, 및 Psl (Gunn et al. (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46))를 표적으로 하는 전략과 이 접근법을 조합한다.

[0410] 출원인은 또한 결핵 (TB)에 대한 전임상 모델을 제공한다 (Ordway et al. (2010) Anti. Agents and Chemotherapy 54:1820 참조). 미생물 미코박테리움 투베르쿨로시스는 성장추세인 세계적인 유행의 원인이다. 현재 수치는 대략 8백만건의 새로운 TB 사례가 있고 연간 약 2백7십만명이 TB로 인해 사망하는 것을 시사한다. 이 미생물의 HIV를 가진 개체의 동시 감염으로서의 역할 (대략 4백5십만명의 HIV 감염자 중에서 약 1/3이 미코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*)로 동시 감염되는 것으로 추정됨)에 더하여, 분리물이 다중 약물에 대해 고도로 내성이 되었고 TB에 대한 새로운 약물이 25년 넘게 도입되지 않고 있는 것이 특히 문제가 된다. 이 동물 모델에서, SPF 기니피그를 장벽 콜로니에서 유지하고 에어로졸화된 분무를 통해 약 20 cfu의 미코박테리움 투베르쿨로시스 균주 Erdman K01 바실루스로 기니피그의 폐에 감염시킨다. 동물을 도전 후 25, 50, 75, 100, 125 및 150일에 박테리아 로드를 측정하고 조직병리 평가를 위한 조직의 회수를 위해 희생시켰다. TB의 고전적 신호를 발생하지 않은 마우스와 달리, 이 방식으로 도전된 기니피그는 인간 질환의 특징인 중심부 괴사가 있는 잘 조직화된 과립종을 발생시켰다. 추가로, 인간과 같이, 기니피그는 일차 병변 복합체의 일부로서 배액 림프절의 중증의 화농성 및 괴사성 림프절염을 나타냈다. 이 모델의 사용은 도전에 후속하여 이들 동물의 폐에서 형성되는 것으로 관찰되고 질환의 발병 및 만성 둘 다에 기여하는 것으로 여겨지는, 결과적으로 초래된 미코박테리움 투베르쿨로시스 생물막의 감소 및/또는 제거를 위한 예방뿐만 아니라 치료적 전략을 확인하고 식별하기 위한 전임상 스크린을 제공한다.

[0411] **실험 번호 6**

[0412] 카테터/내재 디바이스 생물막 감염의 다수의 동물 모델이 공지되어 있다. Otto (2009) Nature Reviews Microbiology 7:555 참조. 전형적으로 정상적인 피부 상재균(skin flora)으로 간주되지만, 미생물 스타필로코쿠스 에피더미디스는 다수가 핵심 기회 감염성 병원체로서 간주할 수 있는 것이 되었으며, 병원 내 감염의 원인인자 중에서 1위를 차지했다. 주로, 이 박테리아는 디바이스 삽입 중에 이 일반적인 피부 이주종(colonizer)에 의해 오염되는 내재 의료 디바이스에서 발달하는 대부분의 감염의 원인이 된다. 전형적으로 생명을 위협하는 것은 아니지만, 이들 생물막 감염의 빈도와 조합하여, 그것들의 치료와 관련된 어려움은 그것들을 심각한 공중 위생 문제로 만든다. 스타필로코쿠스 에피더미디스로 인한 혈관 카테터 관련 혈류 감염 단독의 치료와 관련된 현재의 비용은 미국에서 매년 20억 달러에 달한다. 스타필로코쿠스 에피더미디스에 더하여, 엔테로코쿠스 패칼리스(*E. faecalis*) 및 스타필로코쿠스 아우레우스가 또한 내재 의료 디바이스에서 발견된 오염이다. 토끼, 마우스, 기니피그 및 래트를 포함한, 카테터-관련 스타필로코쿠스 에피더미디스 감염의 여러 동물 모델이 존재하며 이것들 모두는 발병의 분자적 메커니즘을 연구하는데 사용되고 그것들을 예방 및/또는 치료제의 연구에 제공한다. 래트 경정맥 카테터는 엔테로코쿠스 패칼리스, 스타필로코쿠스 아우레우스 및 스타필로코쿠스 에피더미

디스 생물막 형성을 방해하는 요법을 평가하는데 사용되었다. 생물막 감소는 종종 세 가지 방식으로 측정된다 - (i) 카테터에 초음파 처리하고 CFU를 계산하거나, (ii) 카테터의 슬라이스를 절단하거나 단순하게 플레이트 위에 두고 점수를 매기거나, 또는 (iii) 생물막은 크리스탈 바이올렛 또는 또 다른 염료로 염색되고, 희석되고, CFU에 대신에 OD가 측정될 수 있다.

[0413] **실험 번호 7**

[0414] 본원에 기재된 방법은 비-면역 대상체에 수동 면역을 부여하는데 사용될 수 있다. 주어진 항원에 대한 수동 면역은 특정 항원을 특이적으로 인식하거나 이것에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 수송을 통해 부여될 수 있다. 항체 공여체 및 수령체는 인간 또는 비-인간 대상체일 수 있다. 추가적으로, 또는 대안으로, 항체 조성물은 특정 항원을 특이적으로 인식하거나 이것에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0415] 수동 면역은 면역원성 조성물의 투여가 수령체 대상체에 대한 위험을 제기하는 경우에 부여될 수 있으며, 수령체 대상체는 면역 손상되거나, 또는 수령체 대상체는 즉각적인 면역력을 필요로 한다. 면역원성 조성물은 선택된 투여 방식과 일치하는 방식으로 제조될 수 있다. 조성물은 전체 항체, 항원 결합 단편, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 생체 내에서 생성된 항체, 시험관 내에서 생성된 항체, 정제된 또는 부분적으로 정제된 항체, 또는 전체 혈청을 포함할 수 있다. 투여는 단일 용량의 항체 조성물을 포함할 수 있거나, 초기 투여 후 이어서 1회 이상의 부스터 용량의 투여를 포함할 수 있다. 부스터 용량은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 주 1회, 2주 1회, 3주 1회, 1개월 1회, 2개월 1회, 3개월 1회, 6개월 1회 또는 12개월 1회, 또는 초기 용량 이후 임의의 다른 시점에 제공될 수 있다. 부스터 용량은 대상체의 항체 역가의 평가 이후 투여될 수 있다.

[0416] ***동등물***

[0417] 본 개시물은 상기 구체예와 함께 기재되지만, 상기 언급된 설명 및 예는 예시하려는 의도이며 본 개시물의 범위를 제한하려는 것은 아니라는 것을 이해해야 한다. 본 개시물의 범위 내의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 개시물이 분야의 당업자에게 분명할 것이다.

[0418] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시물이 속한 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 제공된 모든 뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 방향으로 제공된다.

[0419] 본원에 예시로 기재된 구체예는 본원에 구체적으로 기재되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재 하에서 적합하게 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는", "포함하는", "함유하는", 등은 광범위하게 제한 없이 읽어져야 한다. 추가적으로, 본원에서 이용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 설명의 용어로서 사용되고, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서, 표시되고 기재된 특징의 임의의 동등물 또는 그 일부를 배제하려는 의도는 없지만, 본 개시물의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하다는 것을 인정해야 한다.

[0420] 따라서, 본 개시물은 특정 구체예 및 그 안에서 구체예들의 선택적인 특징, 변형, 개선 및 변화에 의해 구체적으로 개시되지만, 본원에서 개시된 것들은 당업자에 의해 재분류될 수 있다는 것을 이해해야 하고, 이러한 변형, 개선 및 변화는 본 개시물의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 본원에서 제공된 물질, 방법, 및 예는 특정 구체예를 대표하고, 예시하지만, 본 개시물의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0421] 본 개시물의 범위는 본원에서 광범위하게 및 일반적으로 기재되어 있다. 포괄적인 개시내용 내에 있는 각각의 더 좁은 종 및 아속의 분류는 또한 본 개시물의 일부를 형성한다. 부가된 물질이 본원에서 구체적으로 나열되는지 여부에 관계없이, 이것은 속으로부터 임의의 주제를 제거하는 단서 또는 부정적인 제한과 함께 포괄적인 설명을 포함한다.

[0422] 이에 더하여, 본 개시물의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 군(Markush group)에 관하여 기재되는 경우, 당업자는 본 개시물의 구체예가 또한 마쿠쉬 군의 임의의 개개의 구성원 또는 부분군에 관하여 기재될 수 있다는 것을 인정할 것이다.

[0423] 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 각각이 참고문헌에 개별적으로 포함되는 바와 같은 정도로 그 전문이 본원에 명백하게 포함된다. 분쟁의 경우에, 정의를 포함한 본 명세서가 우선될 것이다.

[0424] **참고문헌**

1. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat Rev Microbiol. 2010;8(3):185-95. doi: 10.1038/nrmicro2261. PubMed PMID: 20140026.
2. Dey D, Nagaraja V, Ramakumar S. Structural and evolutionary analyses reveal determinants of DNA binding specificities of nucleoid-associated proteins HU and IHF. Mol Phylogenet Evol. 2017;107:356-66. doi: 10.1016/j.ympev.2016.11.014. PubMed PMID: 27894997.
3. Swinger KK, Rice PA. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. Curr Opin Struct Biol. 2004;14(1):28-35. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003. PubMed PMID: 15102446.
4. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. J Exp Med. 1944;79(2):137-58. PubMed PMID: 19871359; PMCID: PMC2135445.
5. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.
6. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(2):201-8. doi: 10.1586/14787210.6.2.201. PubMed PMID: 18380602; PMCID: PMC2712878.
7. Steele L, Fawal H. 4th Decennial International Conference on nosocomial and healthcare-associated infections: a challenge for change. Am J Infect Control. 2000;28(3):207-10. doi: 10.1067/mic.2000.107275. PubMed PMID: 10840339.
8. Apicella MA. Bacterial otitis media, the chinchilla middle ear, and biofilms. J Infect Dis. 2009;199(6):774-5. PubMed PMID: 19434910.

[0425]

9. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. Ann Epidemiol. 2000;10(8):509-15. PubMed PMID: 11118930.

10. Mancl KA, Kirsner RS, Ajdic D. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. Wound Repair Regen. 2013;21(3):352-62. doi: 10.1111/wrr.12034. PubMed PMID: 23551419; PMCID: PMC3648594.

11. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(3):297-308. doi: 10.1586/eri.13.12. PubMed PMID: 23458769.

12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1771-6. PubMed PMID: 10325322; PMCID: PMC84946.

13. Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M. The biogeography of polymicrobial infection. Nat Rev Microbiol. 2016;14(2):93-105. doi: 10.1038/nrmicro.2015.8. PubMed PMID: 26714431; PMCID: PMC5116812.

14. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. Clin Microbiol Infect. 2013;19(2):107-12. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x. PubMed PMID: 22925473.

15. Jurcisek JA, Brockman KL, Novotny LA, Goodman SD, Bakaletz LO. Nontypeable Haemophilus influenzae releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(32):E6632-E41. doi: 10.1073/pnas.1705508114. PubMed PMID: 28696280; PMCID: PMC5559034.

16. Sena-Velez M, Redondo C, Graham JH, Cubero J. Presence of Extracellular DNA during Biofilm Formation by Xanthomonas citri subsp. citri Strains with Different Host Range. PLoS One. 2016;11(6):e0156695. doi: 10.1371/journal.pone.0156695. PubMed PMID: 27248687; PMCID: PMC4889101.

17. Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, Wozniak DJ, Ma LZ. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton

[0426]

in Pseudomonas aeruginosa. Environ Microbiol Rep. 2015;7(2):330-40. doi: 10.1111/1758-2229.12252. PubMed PMID: 25472701; PMCID: PMC4656019.

18. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science. 2002;295(5559):1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487. PubMed PMID: 11859186.

19. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.

20. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.

21. Hymes SR, Randis TM, Sun TY, Ratner AJ. DNase inhibits Gardnerella vaginalis biofilms in vitro and in vivo. J Infect Dis. 2013;207(10):1491-7. doi: 10.1093/infdis/jit047. PubMed PMID: 23431033; PMCID: PMC3627197.

22. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

23. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. BMC Microbiol. 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794.

24. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. Microb Pathog. 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864.

[0427]

25. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J Antibiot (Tokyo). 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.

26. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.

27. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. DNA Cell Biol. 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.

28. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.

29. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.

30. Devaraj A, Buzzo J, Rocco CJ, Bakaletz LO, Goodman SD. The DNABII family of proteins is comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable Haemophilus influenzae biofilm structure. Microbiologyopen. 2017. doi: 10.1002/mbo3.563. PubMed PMID: 29230970.

31. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.

32. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. Biochem J. 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594.

[0428]

33. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. Microbiol Rev. 1985;49(1):81-99. PubMed PMID: 3157043; PMCID: PMC373019.

34. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. Curr Protein Pept Sci. 2005;6(6):559-66. PubMed PMID: 16381604.

35. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.

36. Sarkar T, Petrov AS, Vitko JR, Santai CT, Harvey SC, Mukerji I, Hud NV. Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. Biochemistry. 2009;48(4):667-75. doi: 10.1021/bi8019965. PubMed PMID: 19132923.

37. Sarkar T, Vitoc I, Mukerji I, Hud NV. Bacterial protein HU dictates the morphology of DNA condensates produced by crowding agents and polyamines. Nucleic Acids Res. 2007;35(3):951 61. doi: 10.1093/nar/gkl1093. PubMed PMID: 17259223; PMCID: PMC1807954.

38. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225.

39. Thomas TJ, Messner RP. A left-handed (Z) conformation of poly(dA-dC).poly(dG-dT) induced by polyamines. Nucleic Acids Res. 1986;14(16):6721-33. PubMed PMID: 3748821; PMCID: PMC311676.

40. Thomas TJ, Messner RP. Structural specificity of polyamines in left-handed Z-DNA formation. Immunological and spectroscopic studies. J Mol Biol. 1988;201(2):463-7. PubMed PMID: 3418706.

41. Pohl FM. Salt-induced transition between two double-helical forms of oligo (dC-dG). Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1983;47 Pt 1:113-7. PubMed PMID: 6574834.

42. Pohl FM. Dynamics of the B-to-Z transition in supercoiled DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(14):4983-7. PubMed PMID: 3460079; PMCID: PMC323873.

[0429]

43. Rahmouni AR. Z-DNA as a probe for localized supercoiling in vivo. Mol Microbiol. 1992;6(5):569-72. PubMed PMID: 1552856.

44. Jovin TMS, D. M.; McIntosh, L. P. The Transition Between B-DNA and Z-DNA. Ann Rev Phys Chem. 1987;38:521-60.

45. Kim DH, Im H, Jee JG, Jang SB, Yoon HJ, Kwon AR, Kang SM, Lee BJ. beta-Arm flexibility of HU from Staphylococcus aureus dictates the DNA-binding and recognition mechanism. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014;70(Pt 12):3273-89. doi: 10.1107/S1399004714023931. PubMed PMID: 25478845.

46. Chaires JB, Norcum MT. Structure and stability of Z* DNA. J Biomol Struct Dyn. 1988;5(6):1187-207.doi: 10.1080/07391102.1988.10506463. PubMed PMID: 3271507.

47. Thomas TJ, Bloomfield VA. Chain flexibility and hydrodynamics of the B and Z forms of poly(dGdC). poly(dG-dC). Nucleic Acids Res. 1983;11(6):1919-30. PubMed PMID: 6835843; PMCID: PMC325846.

48. Athanasiadis A. Zalpha-domains: at the intersection between RNA editing and innate immunity. Semin Cell Dev Biol. 2012;23(3):275-80. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.11.001. PubMed PMID: 22085847.

49. Bergen HR, 3rd, Losman MJ, O'Connor T, Zacharias W, Larson JE, Accavitti MA, Wells RD, Koopman WJ. Specificity of monoclonal anti-Z-DNA antibodies from unimmunized MRL/Mp-lpr/lpr mice. J Immunol. 1987;139(3):743-8. PubMed PMID: 3496387.

50. Herbert A, Rich A. The biology of left-handed Z-DNA. J Biol Chem. 1996;271(20):11595-8. PubMed PMID: 8662853.

51. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.

52. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.

[0430]

53. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.

54. Bakaletz LO. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. Expert Rev Vaccines. 2009;8(8):1063-82. doi: 10.1586/erv.09.63. PubMed PMID: 19627188.

55. Iacomino G, Picariello G, Sbrana F, Di Luccia A, Raiteri R, D'Agostino L. DNA is wrapped by the nuclear aggregates of polyamines: the imaging evidence. Biomacromolecules. 2011;12(4):1178-86. doi: 10.1021/bm101478j. PubMed PMID: 21401020.

56. Paulin L, Lindberg LA, Poso H. Reversible inhibition of flagella formation after specific inhibition of spermidine synthesis by dicyclohexylamine in Pseudomonas aeruginosa. Antonie Van Leeuwenhoek. 1986;52(6):483-90. PubMed PMID: 3101591.

57. Pegg AE, Bitonti AJ, McCann PP, Coward JK. Inhibition of bacterial aminopropyltransferases by Sadenosyl- 1, 8-diamino-3-thiooctane and by dicyclohexylamine. FEBS Lett. 1983;155(2):192-6. PubMed PMID: 6406265.

58. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology. 2000;146 (Pt 10):2395-407. doi: 10.1099/00221287-146-10-2395. PubMed PMID: 11021916.

59. Yang CL, Chilvers M, Montgomery M, Nolan SJ. Dornase alfa for cystic fibrosis. Paediatr Respir Rev. 2017;21:65-7. doi: 10.1016/j.prrv.2016.09.001. PubMed PMID: 27769785.

60. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)2] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. Sci Rep. 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867.

[0431]

61. Segall AM, Goodman SD, Nash HA. Architectural elements in nucleoprotein complexes: interchangeability of specific and non-specific DNA binding proteins. EMBO J. 1994;13(19):4536-48. PubMed PMID: 7925295; PMCID: PMC395386.

62. Tjokro NO, Rocco CJ, Priyadarshini R, Davey ME, Goodman SD. A biochemical analysis of the interaction of Porphyromonas gingivalis HU PG0121 protein with DNA. PLoS One. 2014;9(3):e93266. doi: 10.1371/journal.pone.0093266. PubMed PMID: 24681691; PMCID: PMC3969353.

63. Ayala E, Downey JS, Mashburn-Warren L, Senadheera DB, Cvitkovitch DG, Goodman SD. A biochemical characterization of the DNA binding activity of the response regulator VicR from Streptococcus mutans. PLoS One. 2014;9(9):e108027. doi: 10.1371/journal.pone.0108027. PubMed PMID: 25229632; PMCID: PMC4168254.

64. Hung DC, Downey JS, Ayala EA, Kreth J, Mair R, Senadheera DB, Qi F, Cvitkovitch DG, Shi W, Goodman SD. Characterization of DNA binding sites of the ComE response regulator from Streptococcus mutans. J Bacteriol. 2011;193(14):3642-52. doi: 10.1128/JB.00155-11. PubMed PMID: 21602345; PMCID: PMC3133340.

65. Idicula WK, Jurcisek JA, Cass ND, Ali S, Goodman SD, Elmaraghy CA, Jatana KR, Bakaletz LO. Identification of biofilms in post-tympanostomy tube otorrhea. Laryngoscope. 2016;126(8):1946-51. doi: 10.1002/lary.25826. PubMed PMID: 27426942; PMCID: PMC4955598.

66. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.

67. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. Microbiol Spectr. 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162.

68. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. Microbiol Spectr. 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162.

[0432]

69. Justice SS, Li B, Downey JS, Dabdoub SM, Brockson ME, Probst GD, Ray WC, Goodman SD. Aberrant community architecture and attenuated persistence of uropathogenic Escherichia coli in the absence of individual IHF subunits. PLoS One. 2012;7(10):e48349. doi: 10.1371/journal.pone.0048349. PubMed PMID: 23133584; PMCID: PMC3485042.

70. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2006;2:2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050. PubMed PMID: 16738554; PMCID: PMC1681482.

71. Karperien A. FracLac for ImageJ 1999-2013. Available from: rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm.

72. Kashiwagi K, Miyamoto S, Suzuki F, Kobayashi H, Igarashi K. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(10):4529-33. PubMed PMID: 1584788; PMCID: PMC49116.

73. Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, Igarashi K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in Escherichia coli. Mol Microbiol. 2004;51(5):1401-12. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x. PubMed PMID: 14982633.

74. Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A, Kashiwagi K, Igarashi K. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in Escherichia coli. J Bacteriol. 2008;190(3):872-8. doi: 10.1128/JB.01505-07. PubMed PMID: 18039771; PMCID: PMC2223573.

75. Sugiyama Y, Nakamura A, Matsumoto M, Kanbe A, Sakanaka M, Higashi K, Igarashi K, Katayama T, Suzuki H, Kurihara S. A Novel Putrescine Exporter SapBCDF of Escherichia coli. J Biol Chem. 2016;291(51):26343-51. doi: 10.1074/jbc.M116.762450. PubMed PMID: 27803167; PMCID: PMC5159496.

76. Sabate Bresco M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, O'Mahony L, Richards RG, Moriarty TF. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. Front Microbiol. 2017;8:1401. doi: 10.3389/fmicb.2017.01401. PubMed PMID: 28824556; PMCID: PMC5539136.

[0433]

77. Hakkinen MR, Roine A, Auriola S, Tuokko A, Veskimae E, Keinanen TA, Lehtimaki T, Oksala N, Vepsalainen J. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013;941:81-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.009. PubMed PMID: 24185098.

78. Liu R, Li Q, Ma R, Lin X, Xu H, Bi K. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to identify potential markers for human hepatic cancer. Anal Chim Acta. 2013;791:36-45. doi: 10.1016/j.aca.2013.06.044. PubMed PMID: 23890604.

79. Xu H, Liu R, He B, Bi CW, Bi K, Li Q. Polyamine Metabolites Profiling for Characterization of Lung and Liver Cancer Using an LC-Tandem MS Method with Multiple Statistical Data Mining Strategies: Discovering Potential Cancer Biomarkers in Human Plasma and Urine. Molecules. 2016;21(8). doi: 10.3390/molecules21081040. PubMed PMID: 27517900.

80. Kabir A, Suresh Kumar G. Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. PLoS One. 2013;8(7):e70510. doi: 10.1371/journal.pone.0070510. PubMed PMID: 23894663; PMCID: PMC3722294.

81. Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. Int J Med Microbiol. 2013;303(8):484-91. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.008. PubMed PMID: 23871215.

82. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. Biotechnol Lett. 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324.

83. Kim YG, Kim PS, Herbert A, Rich A. Construction of a Z-DNA-specific restriction endonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(24):12875-9. PubMed PMID: 9371768; PMCID: PMC24231.

84. Shin SI, Ham S, Park J, Seo SH, Lim CH, Jeon H, Huh J, Roh TY. Z-DNA-forming sites identified by ChIP-Seq are associated with actively transcribed regions in the human genome. DNA Res. 2016. doi: 10.1093/dnares/dsw031. PubMed PMID: 27374614; PMCID: PMC5066173.

[0434]

85. Kim J, Yang C, DasSarma S. Analysis of left-handed Z-DNA formation in short d(CG)n sequences in Escherichia coli and Halobacterium halobium plasmids. Stabilization by increasing repeat length and DNA supercoiling but not salinity. J Biol Chem. 1996;271(16):9340-6. PubMed PMID: 8621598.

86. Kwakye-Berko F, Meshnick S. Sequence preference of chloroquine binding to DNA and prevention of Z-DNA formation. Mol Biochem Parasitol. 1990;39(2):275-8. PubMed PMID: 2320060.

87. Shafer RH, Brown SC, Delbarre A, Wade D. Binding of ethidium and bis(methidium)spermine to Z DNA by intercalation. Nucleic Acids Res. 1984;12(11):4679-90. PubMed PMID: 6739293; PMCID: PMC318867.

88. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Biopolymers. 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.

89. Muramatsu A, Shimizu Y, Yoshikawa Y, Fukuda W, Umezawa N, Horai Y, Higuchi T, Fujiwara S, Imanaka T, Yoshikawa K. Naturally occurring branched-chain polyamines induce a crosslinked meshwork structure in a giant DNA. J Chem Phys. 2016;145(23):235103. doi: 10.1063/1.4972066. PubMed PMID: 28010109.

90. Zimmer C, Marck C, Guschlbauer W. Z-DNA and other non-B-DNA structures are reversed to B-DNA by interaction with netropsin. FEBS Lett. 1983;154(1):156-60. PubMed PMID: 6299791.

91. Temiz NA, Donohue DE, Bacolla A, Luke BT, Collins JR. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. PLoS One. 2012;7(4):e35558. doi: 10.1371/journal.pone.0035558. PubMed PMID: 22530050; PMCID: PMC3328458.

92. Goodman SD, Nash HA. Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. Nature. 1989;341(6239):251-4. doi: 10.1038/341251a0. PubMed PMID: 2528697.

93. Herbert AG, Rich A. A method to identify and characterize Z-DNA binding proteins using a linear oligodeoxynucleotide. Nucleic Acids Res. 1993;21(11):2669-72. PubMed PMID: 8332463; PMCID: PMC309597.

[0435]

94. Shishido K, Sakaguchi R, Nosoh Y. Enhancement of S1 nuclease-susceptibility of negatively superhelical DNA by netropsin. Biochem Biophys Res Commun. 1984;124(2):388-92. PubMed PMID: 6093797.

95. Mattila T, Honkanen-Buzalski T, Poso H. Reversible inhibition of bacterial growth after specific inhibition of spermidine synthase by dicyclohexylamine. Biochem J. 1984;223(3):823 30. PubMed PMID: 6508744; PMCID: PMC1144368.

96. Muth A, Madan M, Archer JJ, Ocampo N, Rodriguez L, Phanstiel Ot. Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. J Med Chem. 2014;57(2):348-63. doi: 10.1021/jm401174a. PubMed PMID: 24405276.

97. Takaji S, Hibasami H, Imoto I, Hashimoto Y, Nakao K, Ikemura N, Taguchi Y, Nakashima K. Growth inhibition of Helicobacter pylori by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidinohydrazone). Lett Appl Microbiol. 1997;25(3):177-80. PubMed PMID: 9351259.

98. Weinstein MP. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. J Clin Microbiol. 2001;39(7):2729-31. doi: 10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001. PubMed PMID: 11427608; PMCID: PMC88224.

99. LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(6):2156-62. doi: 10.1128/AAC.01046-07. PubMed PMID: 18411321; PMCID: PMC2415789.

100. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Bartolomeu AR, Camargo CH, Cunha ML. Susceptibility Profile of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over a Period of 12 Years. Microb Drug Resist. 2016;22(4):283-93. doi: 10.1089/mdr.2015.0064. PubMed PMID: 26623676.

101. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Flamm RK. Antimicrobial Susceptibility Trends among Staphylococcus aureus Isolates from U.S. Hospitals: Results from 7

[0436]

Years of the Ceftaroline (AWARE) Surveillance Program, 2010 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9). doi: 10.1128/AAC.01043-17. PubMed PMID: 28630196; PMCID: PMC5571371.

102. Liang-Yu C, Kuo SC, Liu CY, Luo BS, Huang LJ, Lee YT, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Difference in imipenem, meropenem, sulbactam, and colistin nonsusceptibility trends among three phenotypically undifferentiated Acinetobacter baumannii complex in a medical center in Taiwan, 1997-2007. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(5):358-63. doi: 10.1016/j.jmii.2011.01.032. PubMed PMID: 21524973.

103. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1678-84. doi: 10.1128/JCM.03385-12. PubMed PMID: 23486719; PMCID: PMC3716094.

104. Rivera CG, Narayanan PP, Patel R, Estes LL. Impact of Cefepime Susceptible-Dose-Dependent MIC for Enterobacteriaceae on Reporting and Prescribing. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(6):3854-5. doi: 10.1128/AAC.00442-16. PubMed PMID: 27067319; PMCID: PMC4879407.

105. Dervan PB, Becker, MM. Molecular recognition of DNA by small molecules. Synthesis of bis(methidium)spermine, a DNA polyintercalating molecule. 1978;100(6):1968-1970

106. Rajecky, M (2015) Interaction of benzo[*c*]phenanthridine alkaloids with DNA. Retrieved from Masaryk University.

107. Le TN, et al., A Versatile Total Synthesis of Benzo[*c*]phenanthridine and Protoberberine Alkaloids Using Lithiated Toluamide−Benzonitrile Cycloaddition. 2004;69(8):2768-2772.

108. Michael AJ. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. J Biol Chem. 2016;291(29):14896-903. doi: 10.1074/jbc.R116.734780. PubMed PMID: 27268252; PMCID: PMC4946907.

109. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and

[0437]

conformation. FEBS J. 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.

110. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. J Mol Biol. 2015;427(21):3389-406. doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020. PubMed PMID: 26156863.

111. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. Biochem J. 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594.

112. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. IUBMB Life. 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821.

113. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. Biotechnol Lett. 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324.

114. McGinnis MW, Parker ZM, Walter NE, Rutkovsky AC, Cartaya-Marin C, Karatan E. Spermidine regulates Vibrio cholerae biofilm formation via transport and signaling pathways. FEMS Microbiol Lett. 2009;299(2):166-74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01744.x. PubMed PMID: 19694812.

115. Wortham BW, Oliveira MA, Fetherston JD, Perry RD. Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for Yersinia pestis biofilm formation. Environ Microbiol. 2010;12(7):2034-47. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02219.x. PubMed PMID: 20406298; PMCID: PMC3039482.

116. Goytia M, Dhulipala VL, Shafer WM. Spermine impairs biofilm formation by Neisseria gonorrhoeae. FEMS Microbiol Lett. 2013;343(1):64-9. doi: 10.1111/1574-6968.12130. PubMed PMID: 23506248; PMCID: PMC3651792.

117. Cardile AP, Woodbury RL, Sanchez CJ, Jr., Becerra SC, Garcia RA, Mende K, Wenke JC, Akers KS. Activity of Norspermidine on Bacterial Biofilms of Multidrug-Resistant Clinical Isolates Associated with Persistent Extremity Wound Infections. Adv Exp Med Biol. 2017;973:53-70. doi: 10.1007/5584_2016_93. PubMed PMID: 27864804; PMCID: PMC5438303.

[0438]

118. Wang Y, Kim SH, Natarajan R, Heindl JE, Bruger EL, Waters CM, Michael AJ, Fuqua C. Spermidine Inversely Influences Surface Interactions and Planktonic Growth in Agrobacterium tumefaciens. J Bacteriol. 2016;198(19):2682-91. doi: 10.1128/JB.00265-16. PubMed PMID: 27402627; PMCID: PMC5019071.

119. Qu L, She P, Wang Y, Liu F, Zhang D, Chen L, Luo Z, Xu H, Qi Y, Wu Y. Effects of norspermidine on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and eradication. Microbiologyopen. 2016;5(3):402-12. doi: 10.1002/mbo3.338. PubMed PMID: 26817804; PMCID: PMC4905993.

120. Konai MM, Adhikary U, Samaddar S, Ghosh C, Haldar J. Structure-Activity Relationship of Amino Acid Tunable Lipidated Norspermidine Conjugates: Disrupting Biofilms with Potent Activity against Bacterial Persisters. Bioconjug Chem. 2015;26(12):2442-53. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00494. PubMed PMID: 26452096.

121. Si X, Quan X, Wu Y. A small-molecule norspermidine and norspermidine-hosting polyelectrolyte coatings inhibit biofilm formation by multi-species wastewater culture. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(24):10861-70. doi: 10.1007/s00253-015-6943-0. PubMed PMID: 26350146.

122. Dewangan RP, Joshi S, Kumari S, Gautam H, Yar MS, Pasha S. N-terminally modified linear and branched spermine backbone dipeptidomimetics against planktonic and sessile methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5435-47. doi: 10.1128/AAC.03391-14. PubMed PMID: 24982082; PMCID: PMC4135887.

123. Ding Y, Peng N, Du Y, Ji L, Cao B. Disruption of putrescine biosynthesis in Shewanella oneidensis enhances biofilm cohesiveness and performance in Cr(VI) immobilization. Appl Environ Microbiol. 2014;80(4):1498-506. doi: 10.1128/AEM.03461-13. PubMed PMID: 24362428; PMCID: PMC3911039.

124. Planet PJ, LaRussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, Uhlemann AC, Boundy S, Goldberg J, Narechania A, Kulkarni R, Ratner AJ, Geoghegan JA, Kolokotronis SO, Prince A. Emergence of the epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on

[0439]

skin. MBio. 2013;4(6):e00889-13. doi: 10.1128/mBio.00889-13. PubMed PMID: 24345744; PMCID: PMC3870260.

125. Hobley L, Li B, Wood JL, Kim SH, Naidoo J, Ferreira AS, Khomutov M, Khomutov A, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Spermidine promotes Bacillus subtilis biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR. J Biol Chem. 2017;292(29):12041-53. doi: 10.1074/jbc.M117.789644. PubMed PMID: 28546427; PMCID: PMC5519356.

126. Ou M, Ling J. Norspermidine changes the basic structure of S. mutans biofilm. Mol Med Rep. 2017;15(1):210-20. doi: 10.3892/mmr.2016.5979. PubMed PMID: 27922663; PMCID: PMC5355703.

127. Nesse LL, Berg K, Vestby LK. Effects of norspermidine and spermidine on biofilm formation by potentially pathogenic Escherichia coli and Salmonella enterica wild-type strains. Appl Environ Microbiol. 2015;81(6):2226-32. doi: 10.1128/AEM.03518-14. PubMed PMID: 25595767; PMCID: PMC4345383.

128. Ramon-Perez ML, Diaz-Cedillo F, Contreras-Rodriguez A, Betanzos-Cabrera G, Peralta H, Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jan-Roblero J, Cancino Diaz JC. Different sensitivity levels to norspermidine on biofilm formation in clinical and commensal Staphylococcus epidermidis strains. Microb Pathog. 2015;79:8-16. doi: 10.1016/j.micpath.2014.12.004. PubMed PMID: 25549879.

129. Hobley L, Kim SH, Maezato Y, Wyllie S, Fairlamb AH, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Norspermidine is not a self-produced trigger for biofilm disassembly. Cell. 2014;156(4):844-54. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.012. PubMed PMID: 24529384; PMCID: PMC3969229.

130. Sakamoto A, Terui Y, Yamamoto T, Kasahara T, Nakamura M, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Michael AJ, Igarashi K, Kashiwagi K. Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(11):1877-86. doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.010. PubMed PMID: 22814172.

131. Burrell M, Hanfrey CC, Murray EJ, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential

[0440]

role in Bacillus subtilis biofilm formation. J Biol Chem. 2010;285(50):39224-38. doi: 10.1074/jbc.M110.163154. PubMed PMID: 20876533; PMCID: PMC2998088.

132. Lee J, Sperandio V, Frantz DE, Longgood J, Camilli A, Phillips MA, Michael AJ. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in Vibrio cholerae. J Biol Chem. 2009;284(15):9899-907. doi: 10.1074/jbc.M900110200. PubMed PMID: 19196710; PMCID: PMC2665113.

133. Patel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, Oliveira MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J Bacteriol. 2006;188(7):2355-63. doi: 10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006. PubMed PMID: 16547021; PMCID: PMC1428407.

134. Chen X, Wu H, Cao Y, Yao X, Zhao L, Wang T, Yang Y, Lv D, Chai Y, Cao Y, Zhu Z. Ion-pairing chromatography on a porous graphitic carbon column coupled with time-of-flight mass spectrometry for targeted and untargeted profiling of amino acid biomarkers involved in Candida albicans biofilm formation. Mol Biosyst. 2014;10(1):74-85. doi: 10.1039/c3mb70240e. PubMed PMID: 24150280.

135. Liao Z, ZhangGuan X, Zhu Z, Yao X, Yang Y, Jiang Y, Cao Y. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(1):45-52. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.021. PubMed PMID: 25937097.

136. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. J Bacteriol. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050.

137. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.

138. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.

[0441]

139. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the Candida albicans biofilm matrix and its contribution to biofilms. Mycopathologia. 2010;169(5):323-31. doi: 10.1007/s11046-009-9264-y. PubMed PMID: 20012895; PMCID: PMC3973130.

140. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.

141. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.

142. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.

143. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.

144. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.

145. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379.

146. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce

[0442]

bacterial clearance in vivo. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.

147. Novotny LA, Jurcisek JA, Ward MO, Jr., Jordan ZB, Goodman SD, Bakaletz LO. Antibodies against the majority subunit of type IV Pili disperse nontypeable Haemophilus influenzae biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. Mol Microbiol. 2015;96(2):276-92. doi: 10.1111/mmi.12934. PubMed PMID: 25597921; PMCID: PMC4423401.

148. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.

149. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.

150. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. J Control Release. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.

151. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. Campylobacter jejuni biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. Front Microbiol. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105.

152. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.

153. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms.

[0443]

Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.

154. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

155. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.

156. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. Orig Life Evol Biosph. 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678.

157. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsalainen J, Patel R, Keinanen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. Biomacromolecules. 2010;11(1):97-105. doi: 10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070.

158. Cavaliere R., Ball J. L., Turnbull L., and Whitchurch C. (2014). The biofilm matri destabilizers, EDTA, and DNAseI, enhance biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. Microbiology Open. 3(4):557-567.

159. Chmielewski R.A.N. and Frank J.F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 2. 22-32.

160. Devaraj A., Justice S.S., Bakaletz L.O. , and Goodman S.D. (2015). DNABII Proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Molecular Microbiology. 96 (6): 1119-1135.

161. Dongari-Bagtzoglou A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther.6(2):201-8. Donlan R.M.

[0444]

(2001). Biofilms and device-associated infections. Emerging Infectious Diseases. 7(2):277-281.

162. Flemming H. and Wingender J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 8:623-633

163. Goodman S.D., Obergfell K.P., Jurcisek J.A., Novotny L.A., Downey J.S., Ayala E.A., Tjokro N., Li B., Justice S.S., and Bakaletz L.O. (2011). Mucosal Immunology. 4 (6): 625-637.

164. Gueroult M., Boittin O., Mauffret O., Etchebest C., and Hartmann B. (2012). Mg 2+ in the Major Groove Modulates B-DNA Structure and Dynamics. PLOS ONE. (7)-7-e41704.

165. Hackl E. V., Kornilova S.V., and Blagoi Y. P. (2005) DNA structural transitions induced by divalent metals ions in aqueous solutions. International Journal of Biological Macromolecules 35:175-191.

166. Hobley L., Li B., Wood J.L., Kim S.H., Naidoo J., Ferreira A.S., Khomutov M., Khomutov A., Stanley-Wall N.R., and Michael A.J. (2017). Spermidine promotoes Bacillus subtilis biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR. Journal of Biological Chemistry. 292(29): 12041-12053.

167. Nash H. A., Robertson C. A., Flamm E., Weisberg R. A., and Miller H. I. (1987). Overproduction of Escherichia coli Integration Host Factor, a Protein with Nonidentical Subunits. Journal of Bacteriology. 4124-4127.

168. Novotny L.A., Jucisek J.A., Goodman S. D., and Bakaletz L.O. (2016). Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. EBioMedicine. (10) :33-44.

169. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., and Oliveira M.A. (2006). Polyamines Are Essential for the Formation of Plague Biofilm. Journal of Bacteriology. 2355-2363.

170. Tan Z-J. and Chen S-J. (2006). Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length. Biophysical Journal. (90): 1175-1190.

[0445]

171. Vorgias C. E., and Wilson K. S. (1991). A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from Escherichia coli. Protein Expression and Purifcation. 2(5-6):317-20.

172. Wood T.L. , Guha R., Tang. L., Geitner M., Kumar M., and Wood T.K. (2016). Living biofouling-resistant membranes as a model for the beneficial use of engineered biofilms. PNAS. E2802-E2811.

173. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. J Bacteriol. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050.

174. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.

175. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.

176. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit Rev Microbiol. 2015;41(3):341-52. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639. PubMed PMID: 24303798.

177. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225.

178. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.

179. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol

[0446]

Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.

180. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.

181. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.

182. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.

183. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379.

184. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.

185. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.

186. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.

[0447]

187. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. J Control Release. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.

188. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. Campylobacter jejuni biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. Front Microbiol. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105.

189. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.

190. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.

191. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

192. Cho C, Chande A, Gakhar L, Bakaletz LO, Jurcisek JA, Ketterer M, Shao J, Gotoh K, Foster E, Hunt J, O'Brien E, Apicella MA. Role of the nuclease of nontypeable Haemophilus influenzae in dispersal of organisms from biofilms. Infect Immun. 2015;83(3):950-7. doi: 10.1128/IAI.02601-14. PubMed PMID: 25547799; PMCID: PMC4333478.

193. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS One. 2011;6(11):e26714. doi: 10.1371/journal.pone.0026714. PubMed PMID: 22096493; PMCID: PMC3214024.

[0448]

194. Liu J, Sun L, Liu W, Guo L, Liu Z, Wei X, Ling J. A Nuclease from Streptococcus mutans Facilitates Biofilm Dispersal and Escape from Killing by Neutrophil Extracellular Traps. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:97. doi: 10.3389/fcimb.2017.00097. PubMed PMID: 28401067; PMCID: PMC5368189.

195. Steichen CT, Cho C, Shao JQ, Apicella MA. The Neisseria gonorrhoeae biofilm matrix contains DNA, and an endogenous nuclease controls its incorporation. Infect Immun. 2011;79(4):1504-11. doi: 10.1128/IAI.01162-10. PubMed PMID: 21300774; PMCID: PMC3067525.

196. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. BMC Microbiol. 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794.

197. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. Microb Pathog. 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864.

198. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J Antibiot (Tokyo). 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.

199. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. DNA Cell Biol. 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.

200. Wang G, Vasquez KM. Z-DNA, an active element in the genome. Front Biosci. 2007;12:4424-38. PubMed PMID: 17485386.

201. Barraud P, Allain FH. ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. Curr Top Microbiol Immunol. 2012;353:35-60. doi: 10.1007/82_2011_145. PubMed PMID: 21728134; PMCID: PMC3226063.

[0449]

202. Choi J, Majima T. Conformational changes of non-B DNA. Chem Soc Rev. 2011;40(12):5893-909. doi: 10.1039/c1cs15153c. PubMed PMID: 21901191.

203. Yang L, Wang S, Tian T, Zhou X. Advancements in Z-DNA: development of inducers and stabilizers for B to Z transition. Curr Med Chem. 2012;19(4):557-68. PubMed PMID: 22204344.

204. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. IUBMB Life. 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821.

205. Balasundaram D, Tyagi AK. Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. Mol Cell Biochem. 1991;100(2):129-40. PubMed PMID: 2008175.

206. Thomas TJ, Gunnia UB, Thomas T. Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)n insert. J Biol Chem. 1991;266(10):6137-41. PubMed PMID: 1848849.

207. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Biopolymers. 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.

208. Mirau PA, Kearns DR. The effect of intercalating drugs on the kinetics of the B to Z transition of poly(dG-dC). Nucleic Acids Res. 1983;11(6):1931-41. PubMed PMID: 6835844; PMCID: PMC325847.

209. Waga S, Mizuno S, Yoshida M. Nonhistone protein HMG1 removes the transcriptional block caused by left-handed Z-form segment in a supercoiled DNA. Biochem Biophys Res Commun. 1988;153(1):334-9. PubMed PMID: 3377790.

210. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.

211. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. Orig Life Evol Biosph. 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678.

[0450]

212. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. FEBS J. 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.

213. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsalainen J, Patel R, Keinanen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. Biomacromolecules. 2010;11(1):97-105. doi: 10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070.

214. Duell BL, Su YC, Riesbeck K. Host-pathogen interactions of nontypeable Haemophilus influenzae: from commensal to pathogen. FEBS Lett. 2016;590(21):3840-53. doi: 10.1002/1873-3468.12351. PubMed PMID: 27508518.

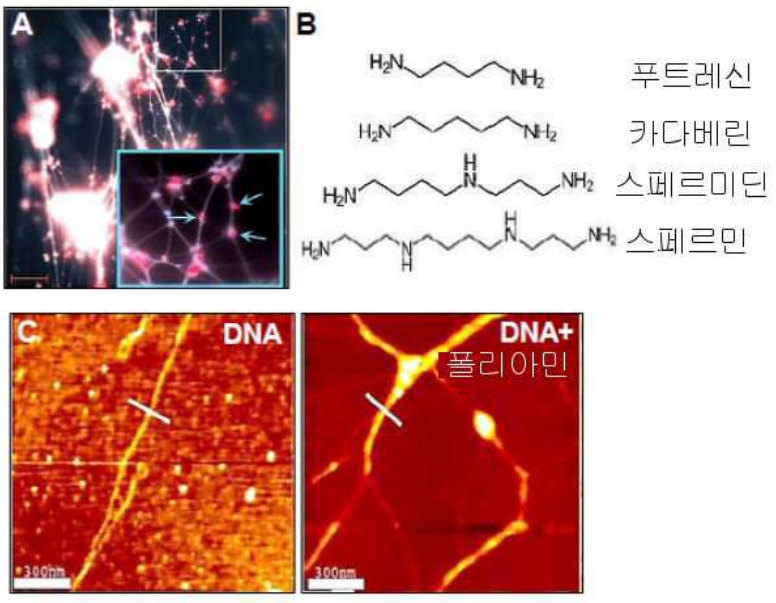
215. Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic Escherichia coli in the face of multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(5):1855-63. doi: 10.1128/AAC.00014-10. PubMed PMID: 20231390; PMCID: PMC2863638.

216. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)2] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. Sci Rep. 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867.

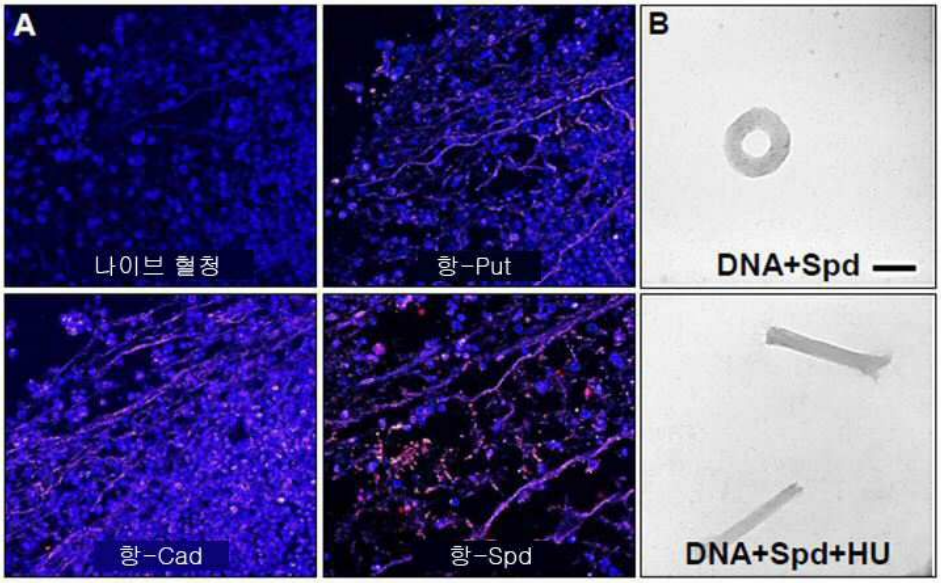
[0451]

도면

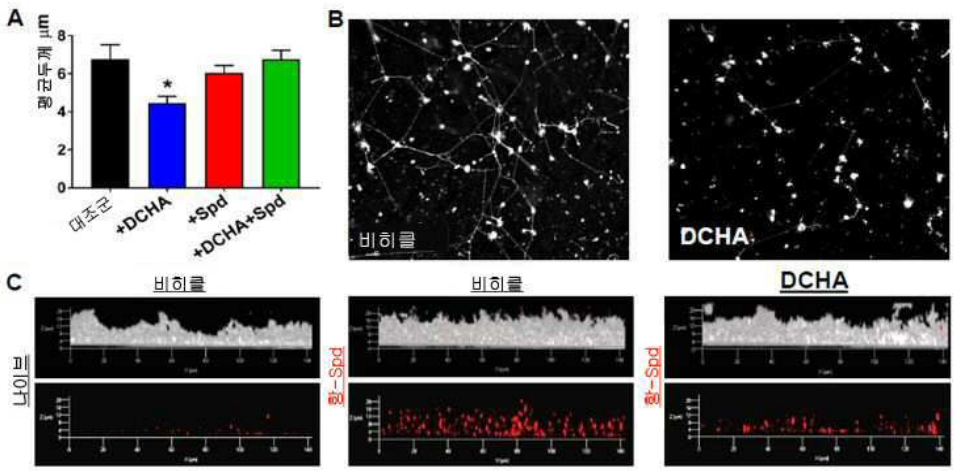
도면1



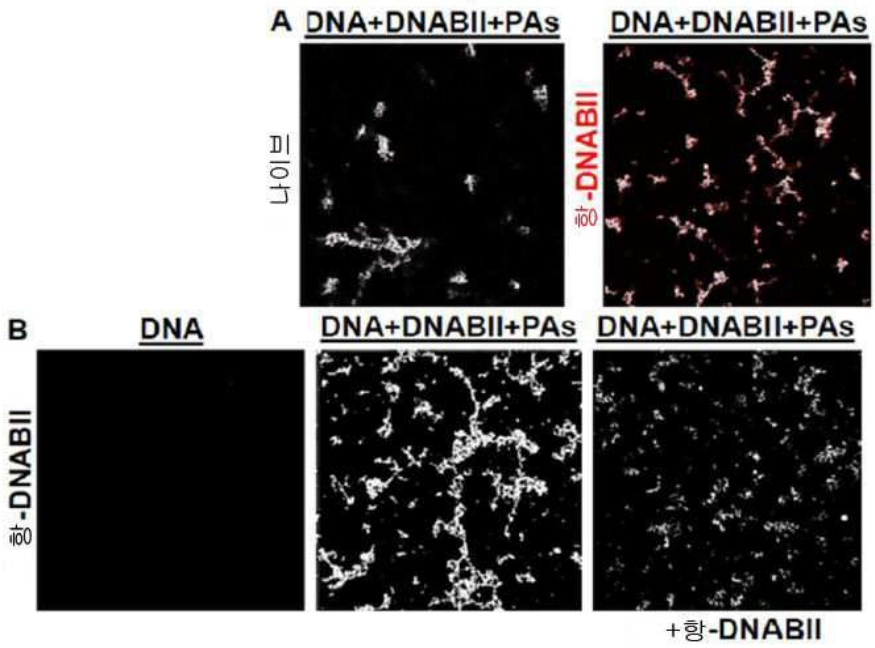
도면2


A
나이브 혈청
항-Put
B
DNA+Spd
항-Cad
항-Spd
DNA+Spd+HU

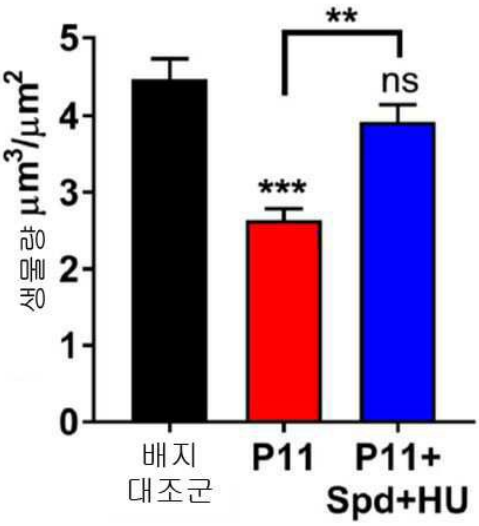
도면3


A
평균두께 μm
8
6
4
2
0
*
대조군
+DCHA
+Spd
+DCHA+Spd
B
비히클
DCHA
C
비히클
비히클
DCHA
피아
항-Spd
항-Spd

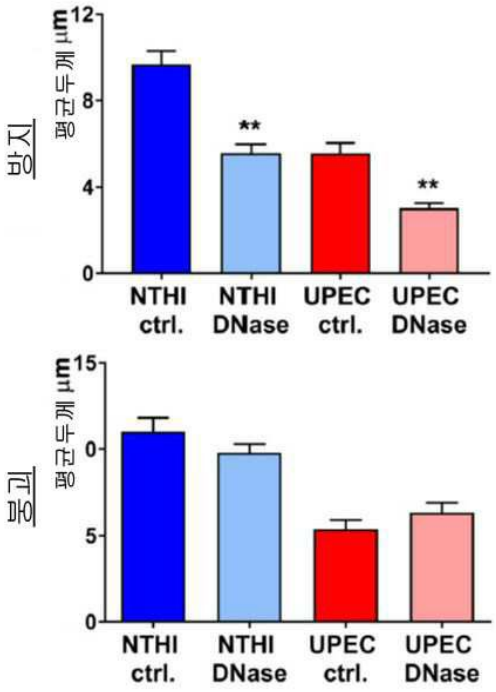
도면4


A
DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
피아나
항-DNABII
B
DNA
DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
항-DNABII
+항-DNABII

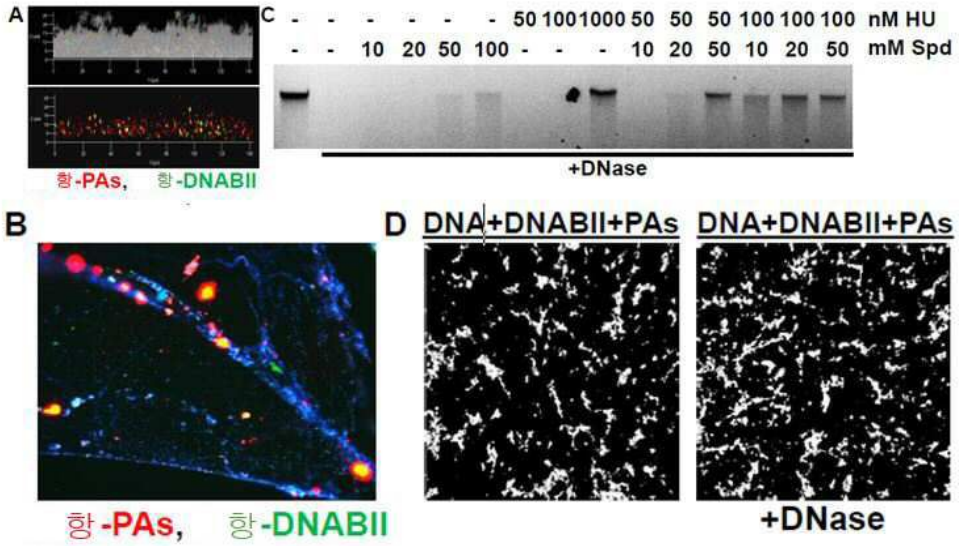
도면5


**
ns
***
생물량 μm³/μm²
5
4
3
2
1
0
배지
대조군
P11
P11+
Spd+HU

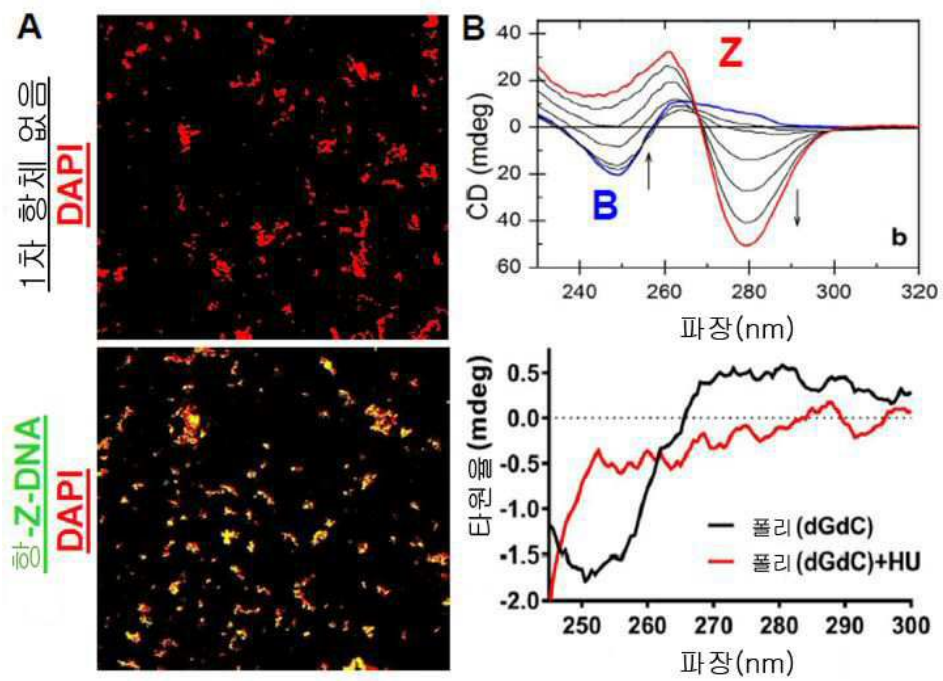
도면6


방지
평균두께 μm
12
8
4
0
**
**
NTHI ctrl.
NTHI DNase
UPEC ctrl.
UPEC DNase
농괴
평균두께 μm
15
0
5
0
NTHI ctrl.
NTHI DNase
UPEC ctrl.
UPEC DNase

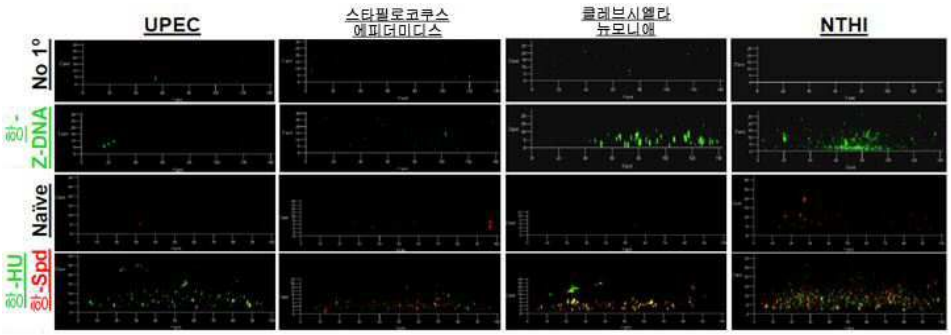
도면7


A
항-PAs,
항-DNABII
C
- - - - - - 50 100 1000 50 50 50 100 100 100 nM HU
- - 10 20 50 100 - - - 10 20 50 10 20 50 mM Spd
+DNase
B
항-PAs,
항-DNABII
D
DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
+DNase

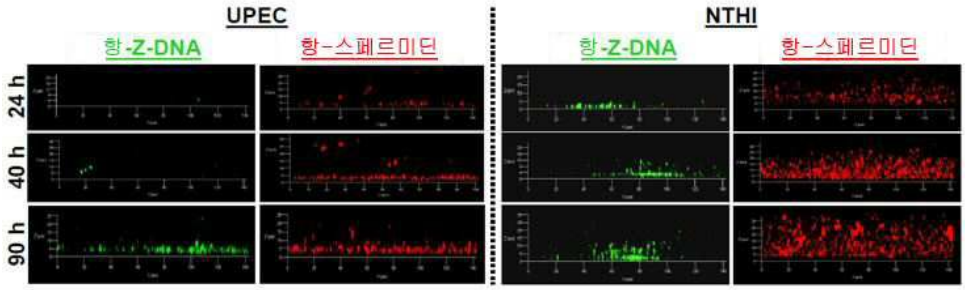
도면8


A
1차 항체 없음
DAPI
항-Z-DNA
DAPI
B
Z
B
CD (mdeg)
b
파장(nm)
타원율 (mdeg)
폴리 (dGdC)
폴리 (dGdC)+HU
파장(nm)

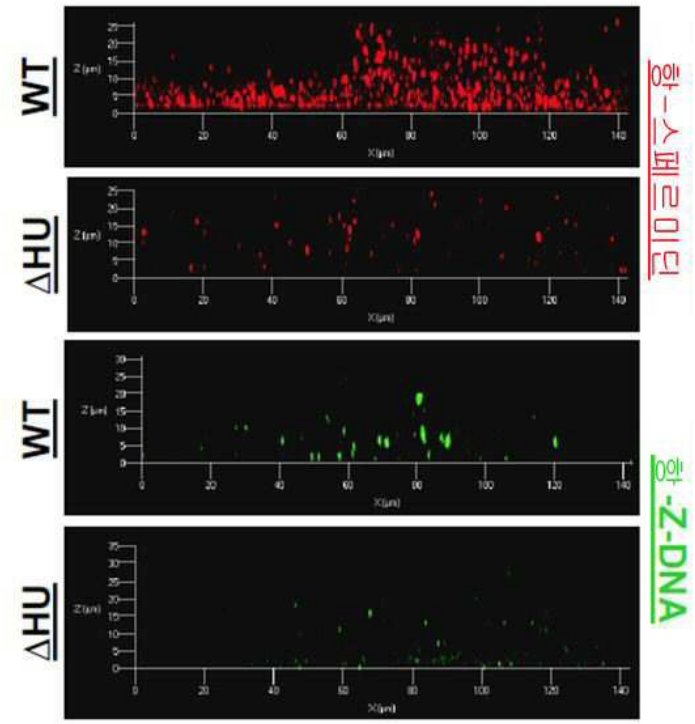
도면9


UPEC
스타필로코쿠스 에피더미디스
클레브시엘라 뉴모니애
NTHI
No 1°
항-Z-DNA
Naïve
항-HU
항-Spd

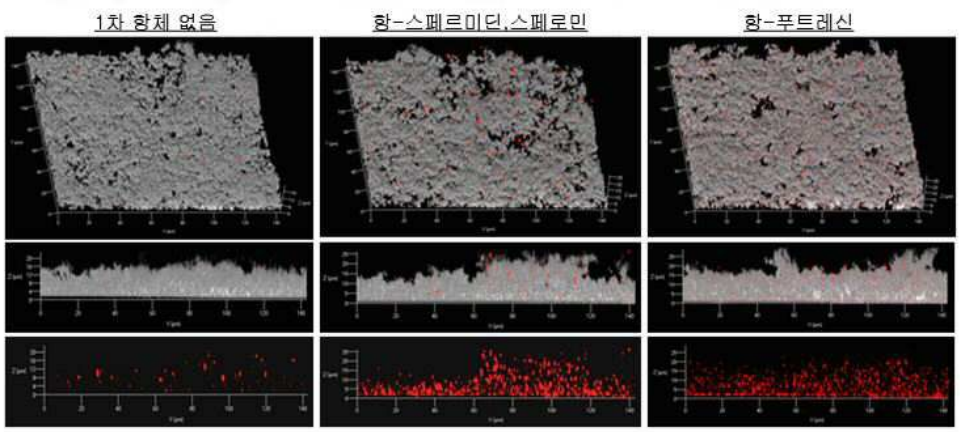
도면10


UPEC
NTHI
항-Z-DNA
항-스페르미딘
항-Z-DNA
항-스페르미딘
24 h
40 h
90 h

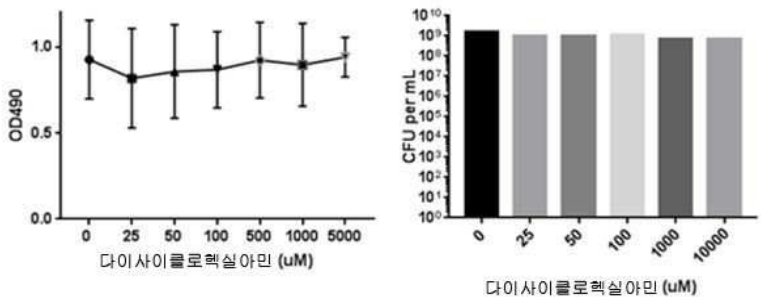
도면11



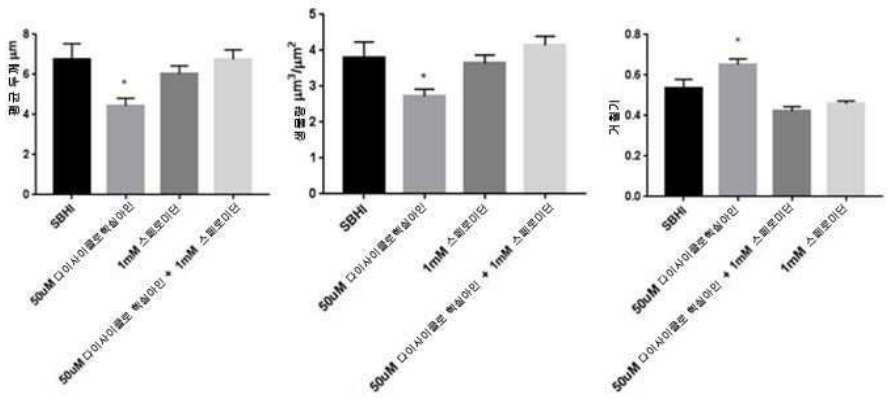
도면12



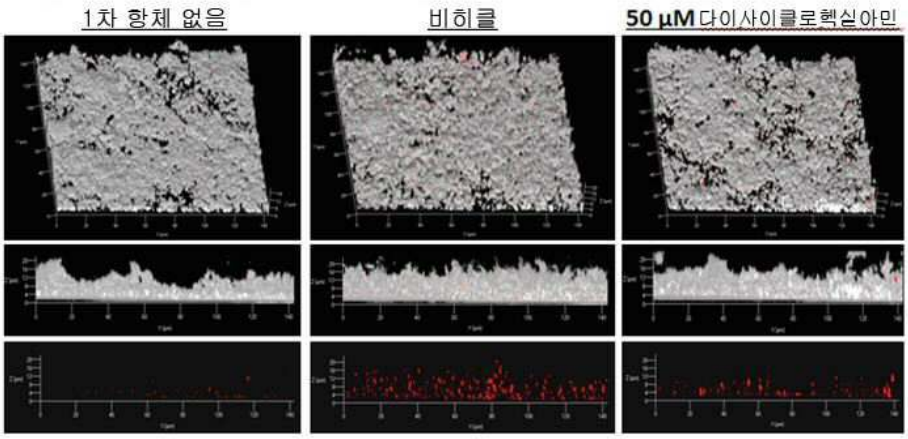
도면13



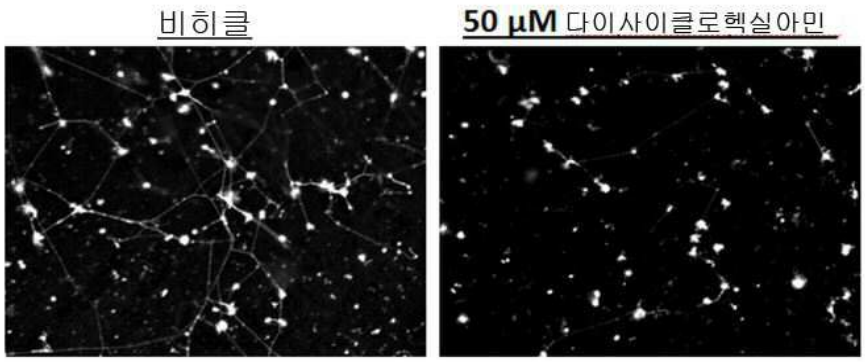
도면14



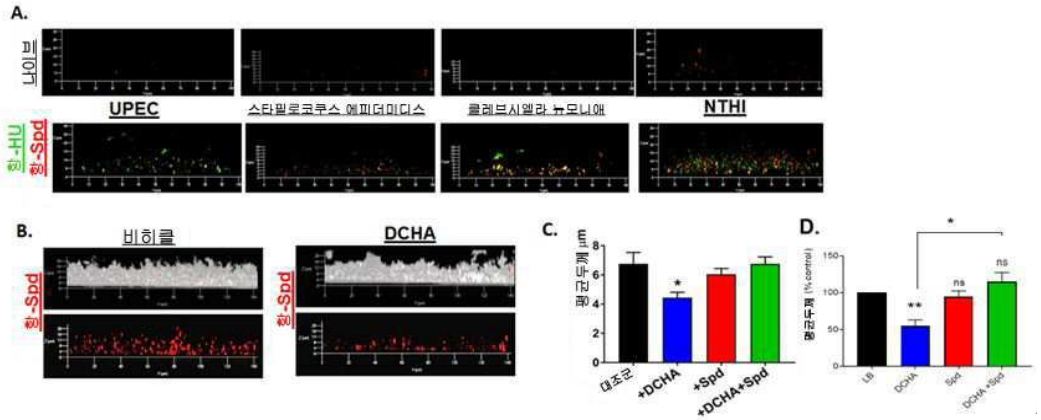
도면15



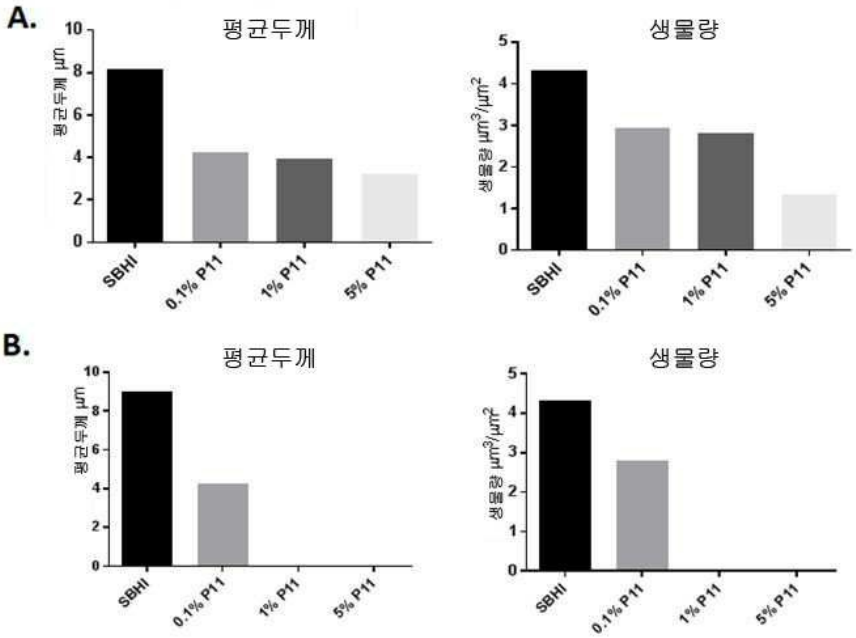
도면16



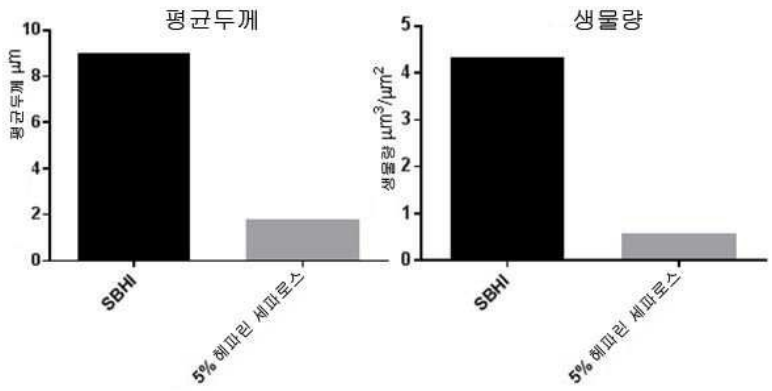
도면17



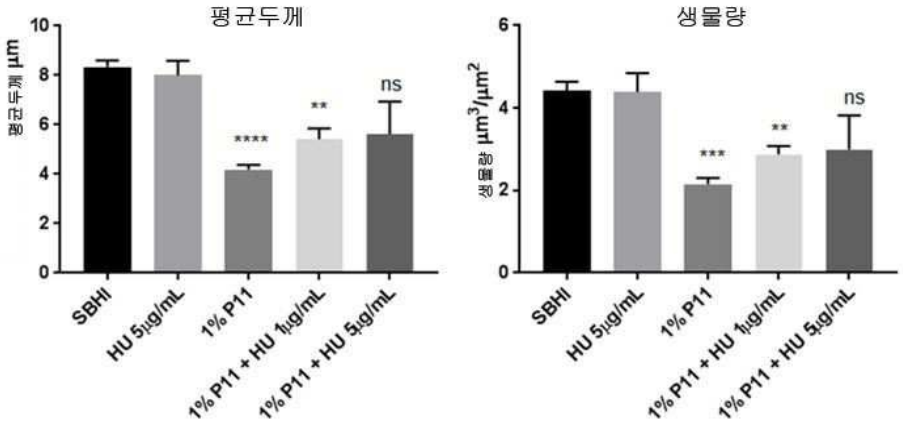
도면18



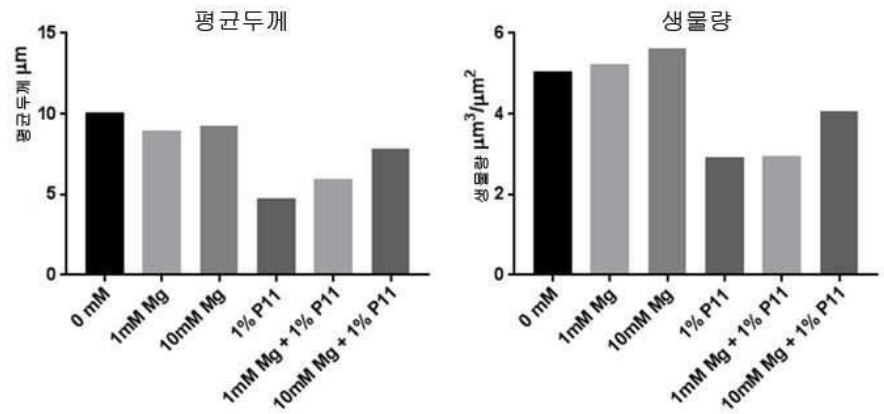
도면19



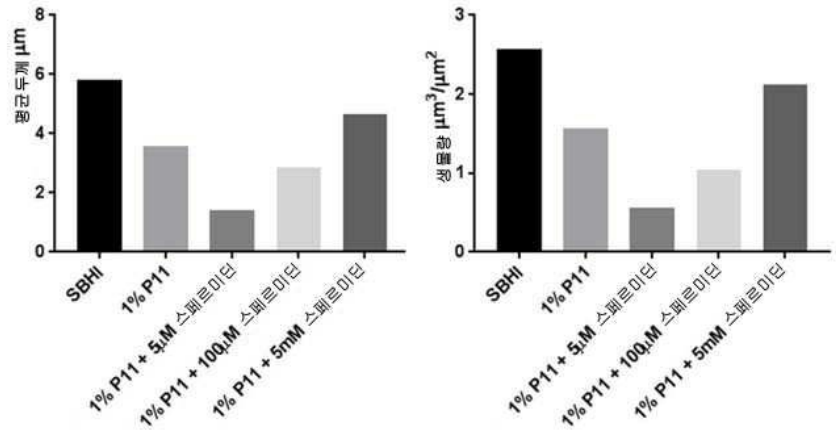
도면20



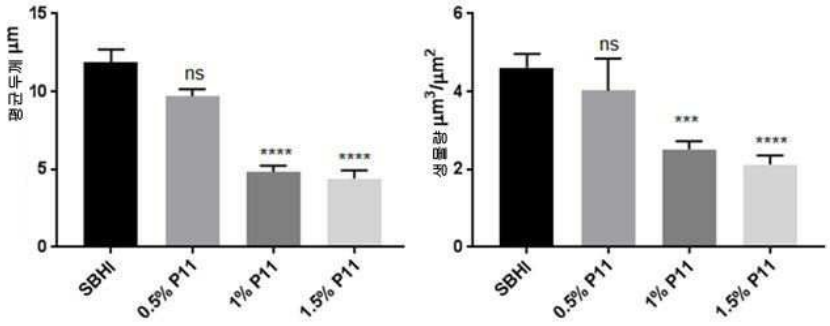
도면21



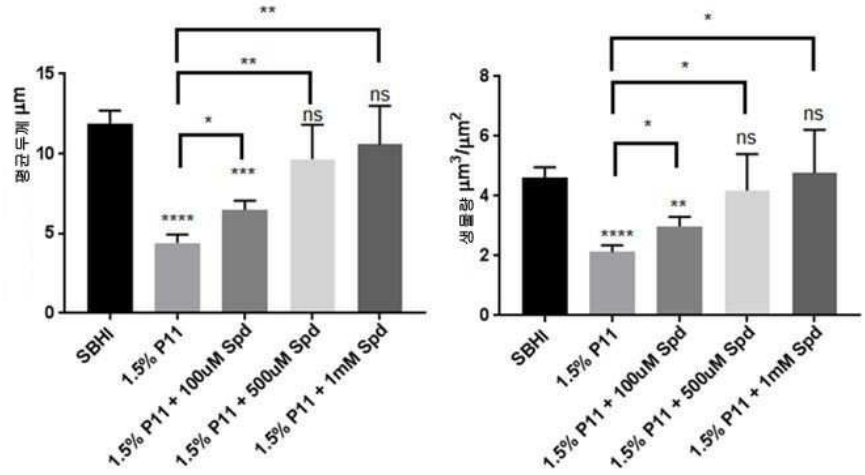
도면22



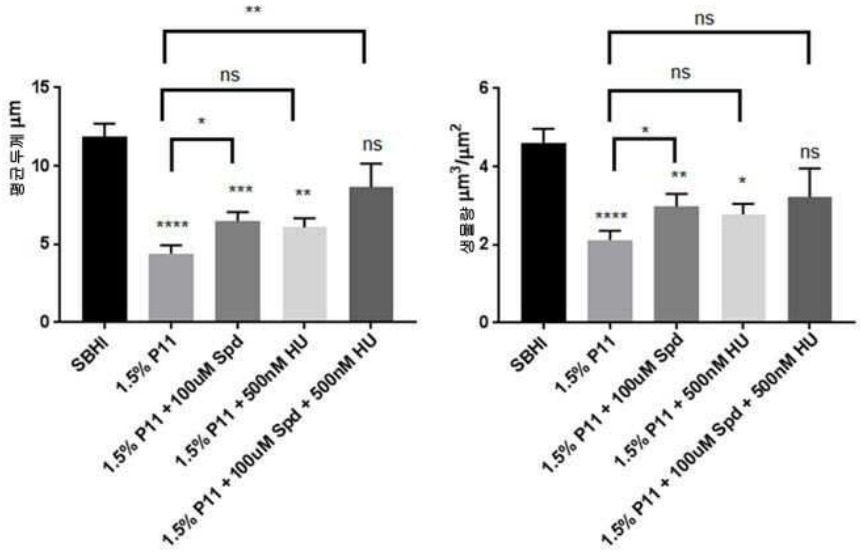
도면23



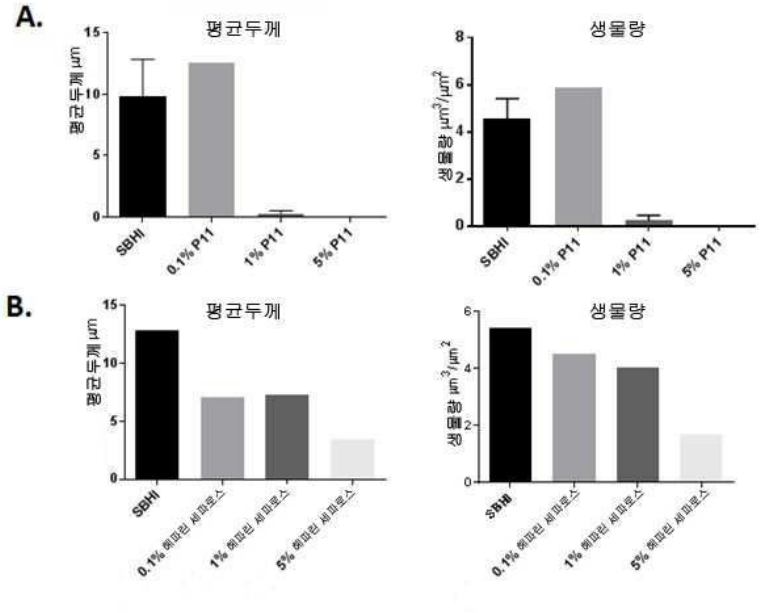
도면24



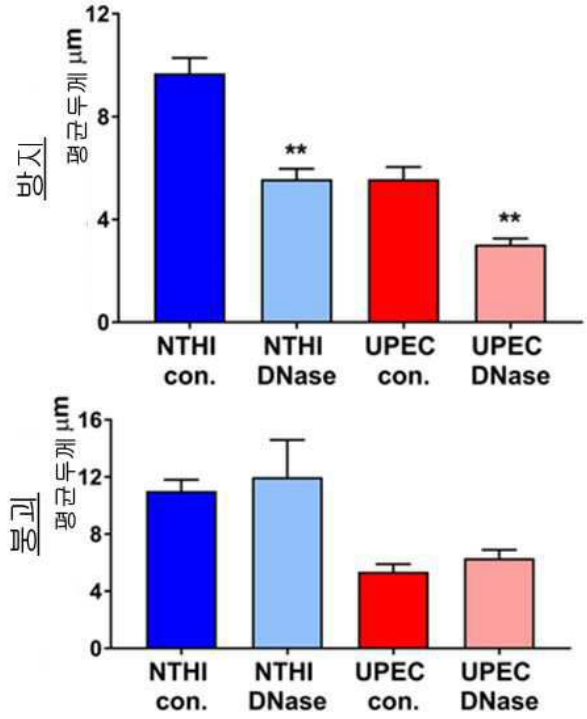
도면25



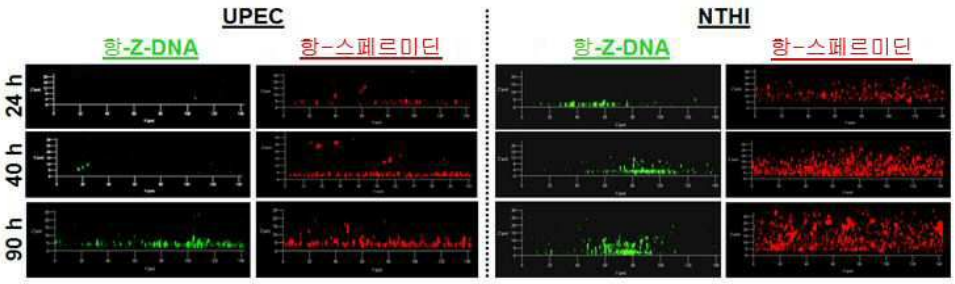
도면26


A.
평균두께
평균두께 μm
15
10
5
0
SBHI
0.1% P11
1% P11
5% P11
생물량
생물량 μm³/μm²
8
6
4
2
0
SBHI
0.1% P11
1% P11
5% P11
B.
평균두께
평균두께 μm
15
10
5
0
SBHI
0.1% 헤파린 세파로스
1% 헤파린 세파로스
5% 헤파린 세파로스
생물량
생물량 μm³/μm²
6
4
2
0
SBHI
0.1% 헤파린 세파로스
1% 헤파린 세파로스
5% 헤파린 세파로스

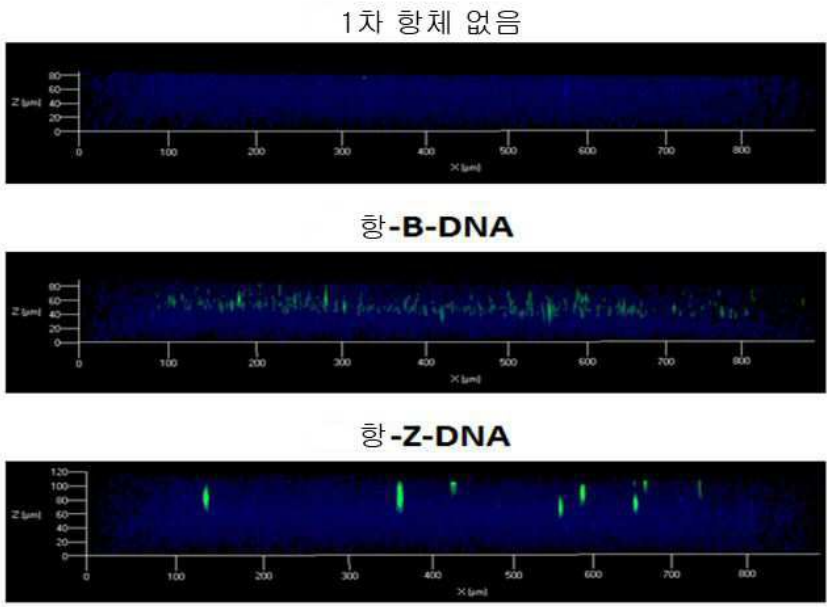
도면27


방지
평균두께 μm
12
8
4
0
**
**
NTHI con.
NTHI DNase
UPEC con.
UPEC DNase
홍괴
평균두께 μm
16
12
8
4
0
NTHI con.
NTHI DNase
UPEC con.
UPEC DNase

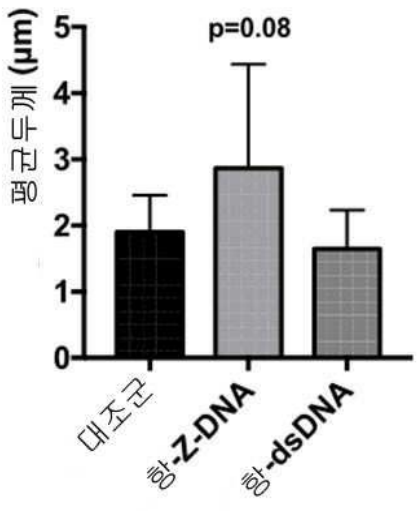
도면28



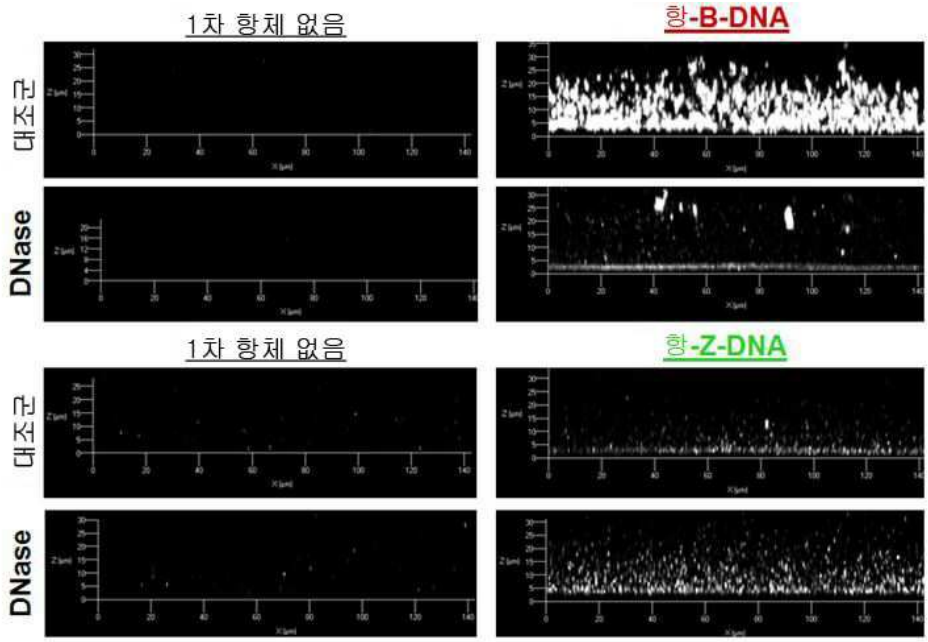
도면29



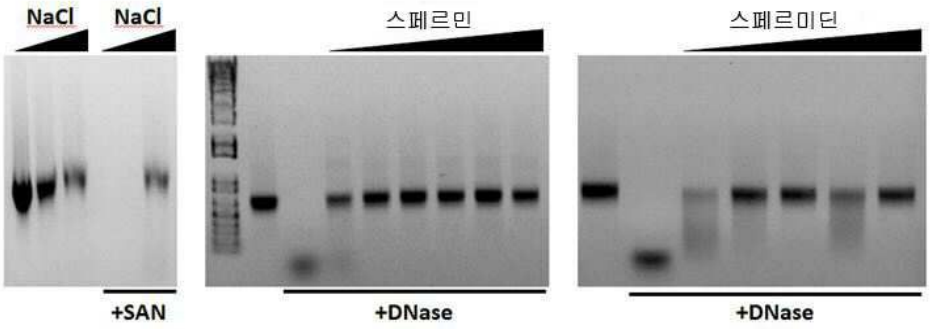
도면30



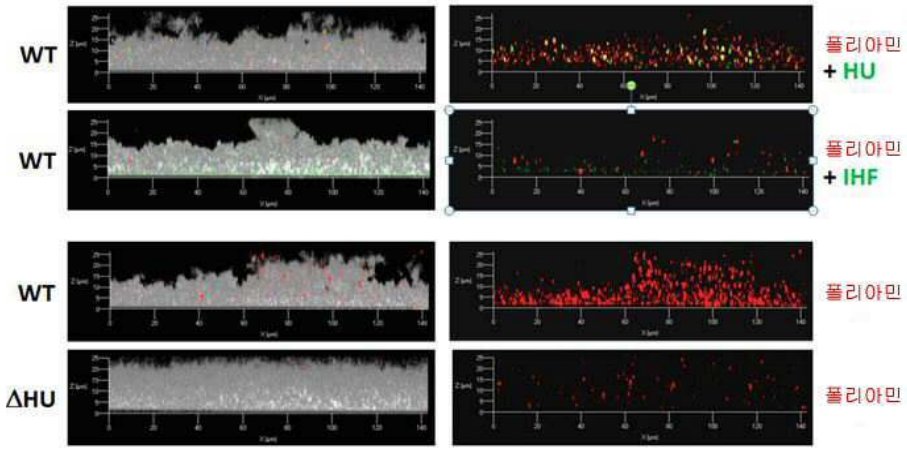
도면31



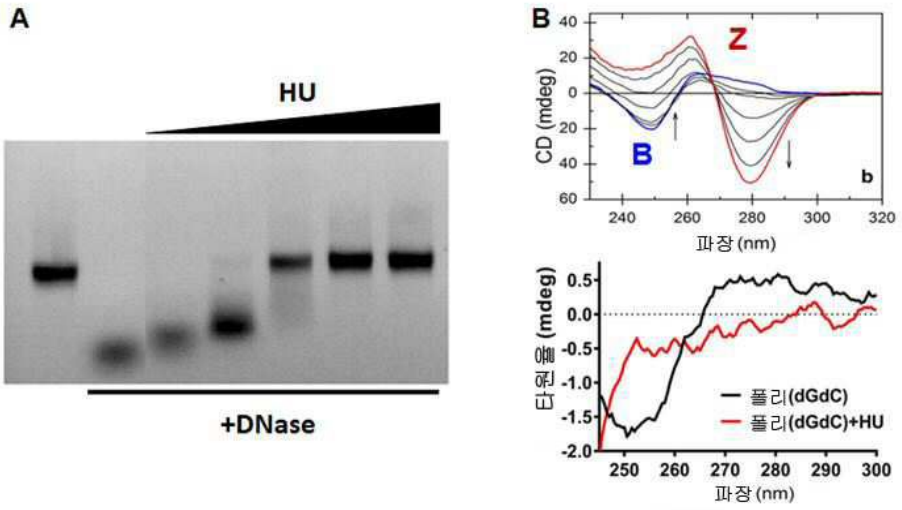
도면32



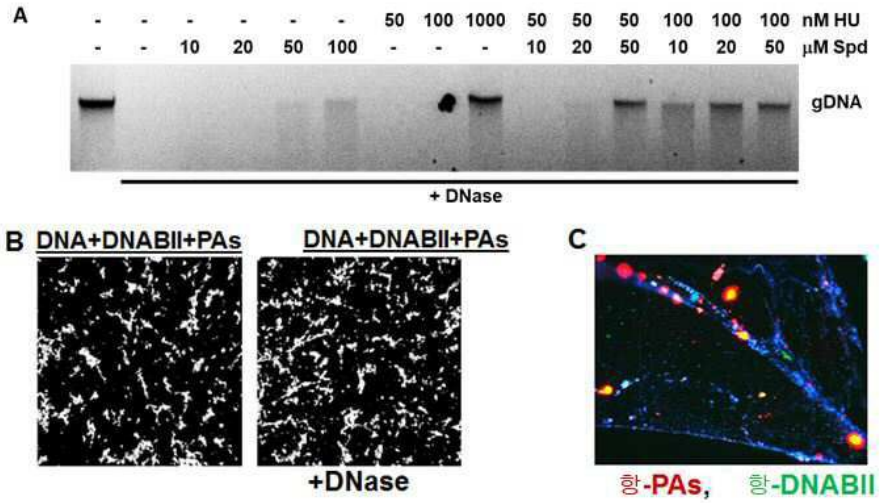
도면33

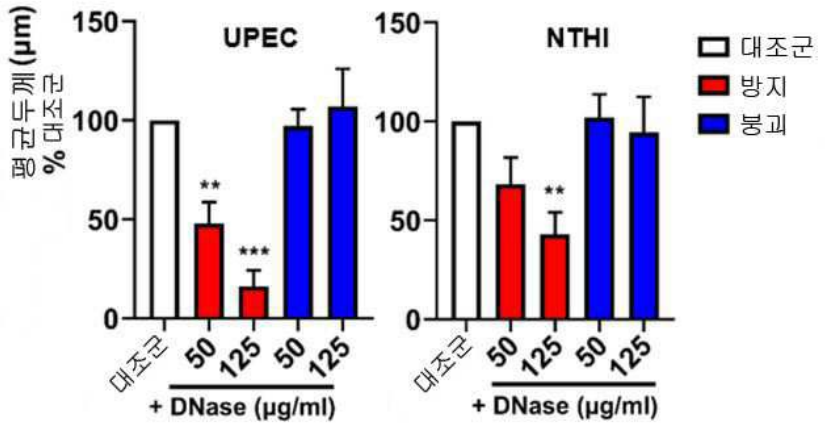


도면34

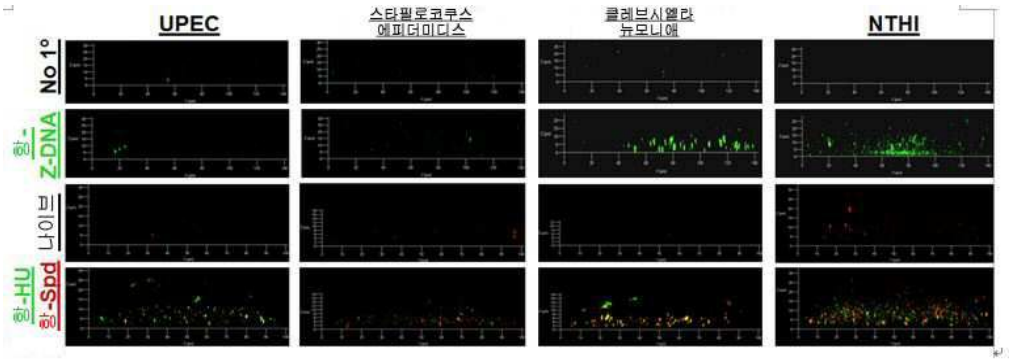

A
HU
+DNase
B
Z
B
CD (mdeg)
파장 (nm)
b
타원율 (mdeg)
폴리(dGdC)
폴리(dGdC)+HU
파장 (nm)

도면35

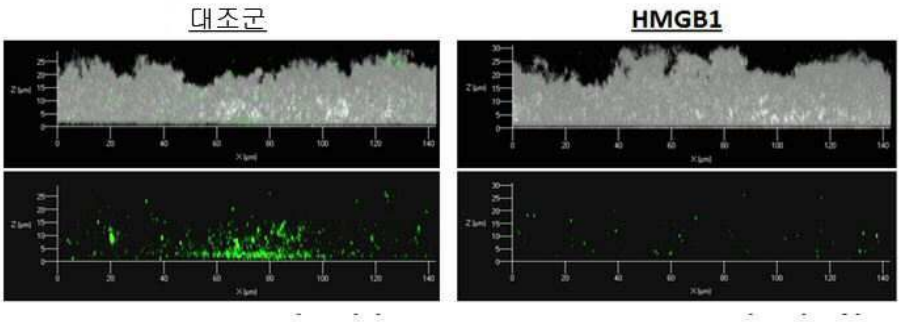

A
nM HU
μM Spd
gDNA
+ DNase
B DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
+DNase
C
항-PAs,
항-DNABII


평균두께 (μm)
% 대조군
UPEC
NTHI
대조군
방지
붕괴
대조군
50
125
50
125
+ DNase (μg/ml)

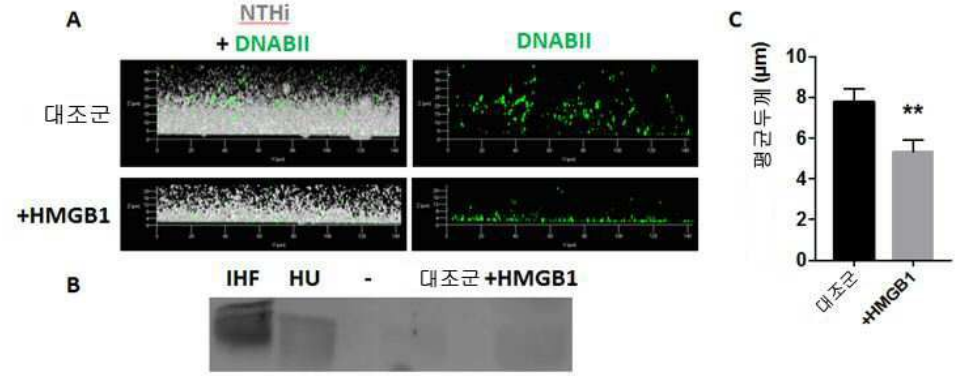
도면36



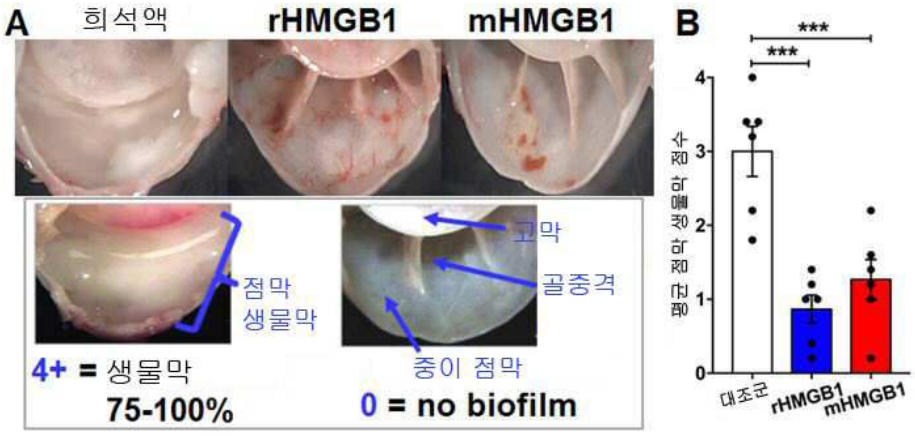
도면37



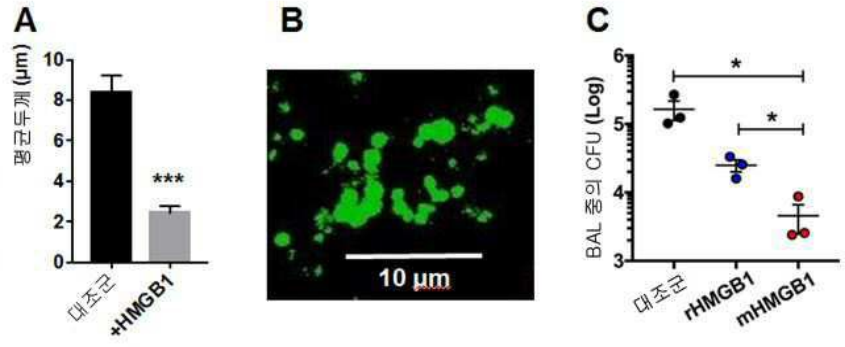
도면38



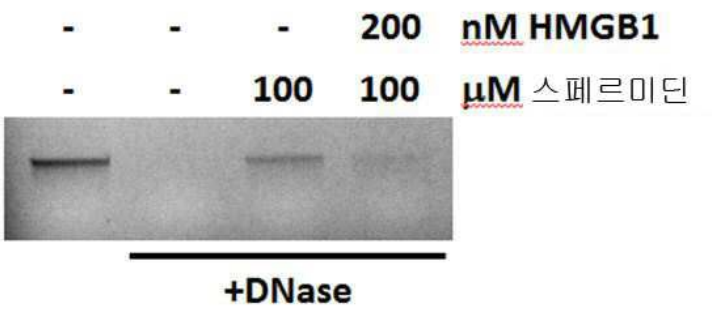
도면39



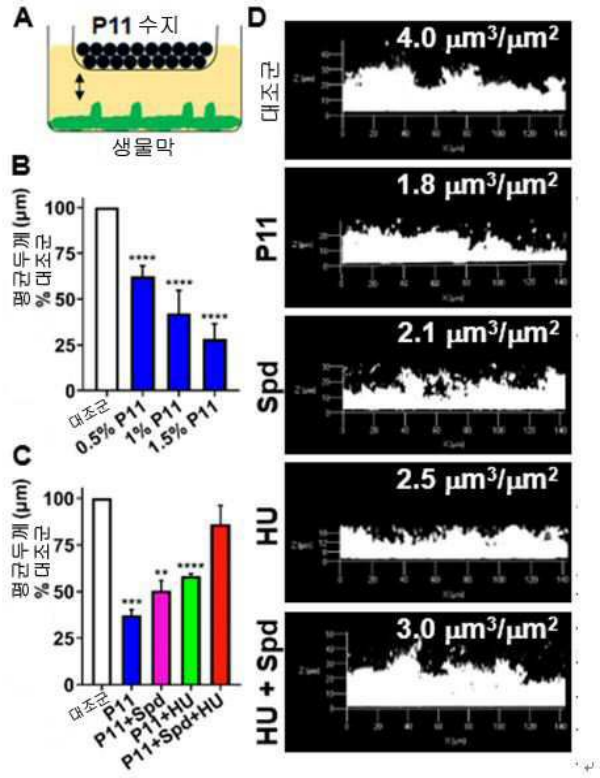
도면40



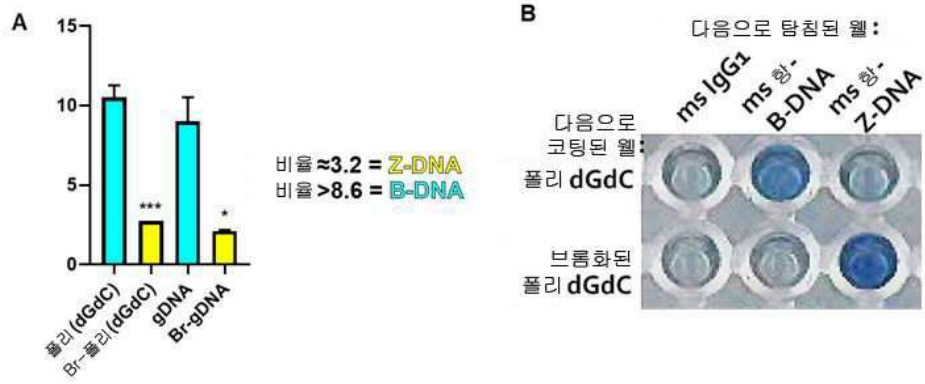
도면41



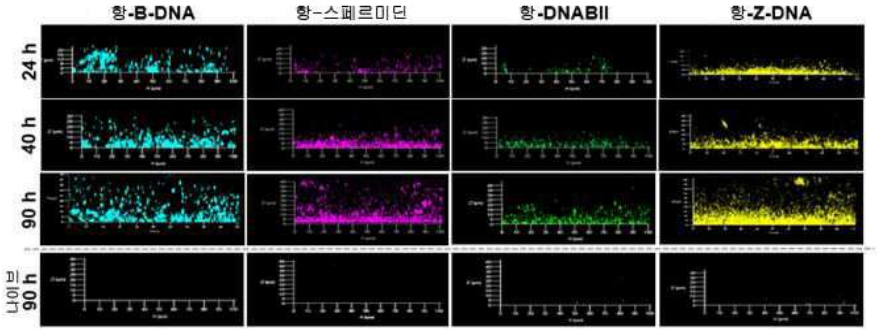
도면42



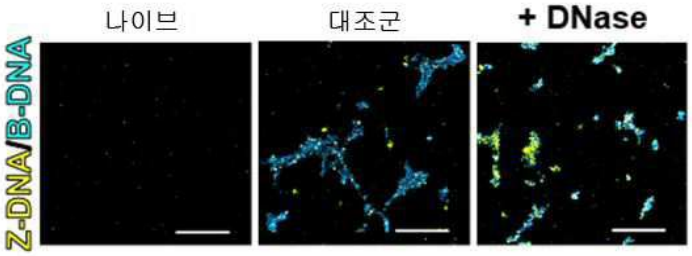
도면43



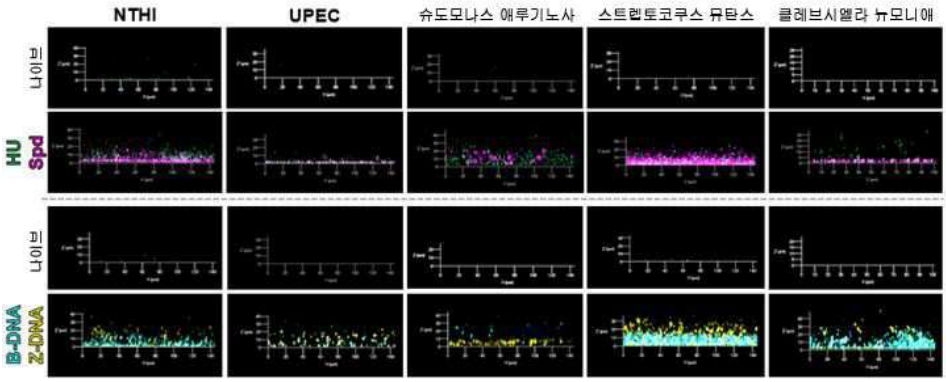
도면44



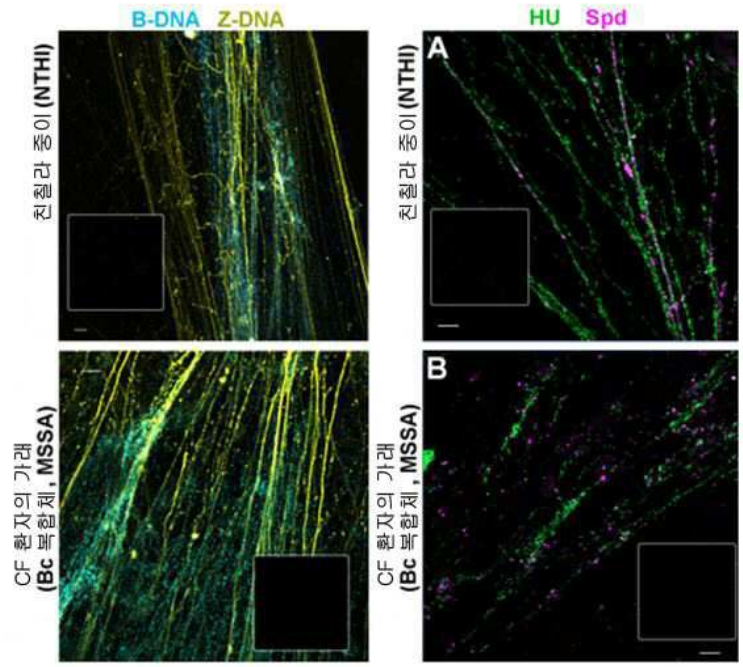
도면45



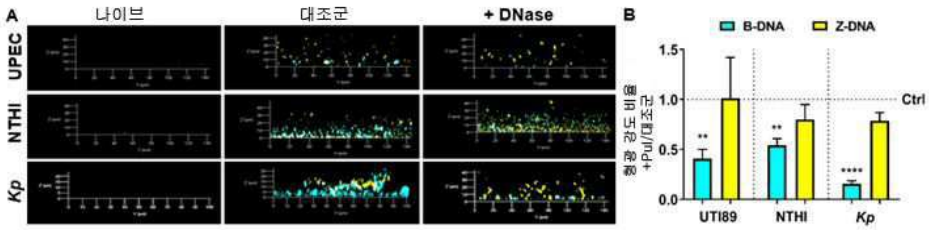
도면46



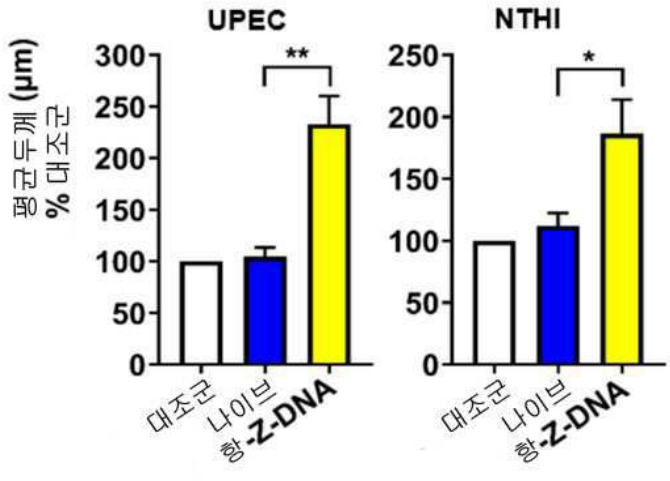
도면47



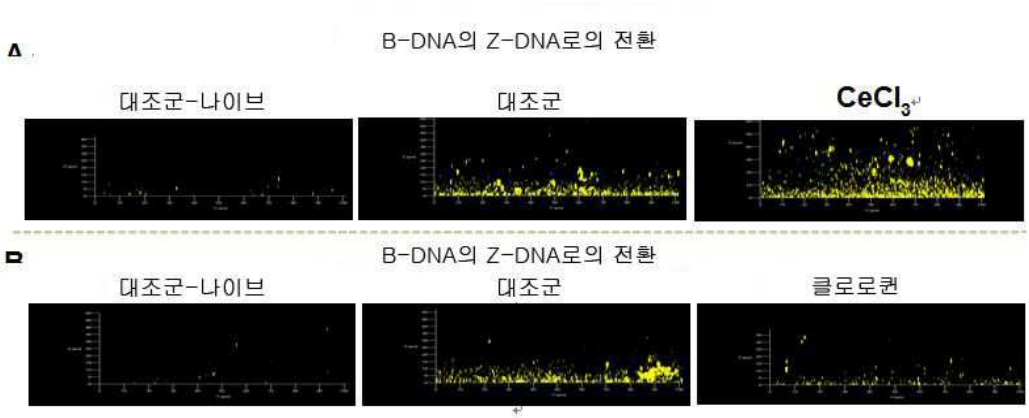
도면48



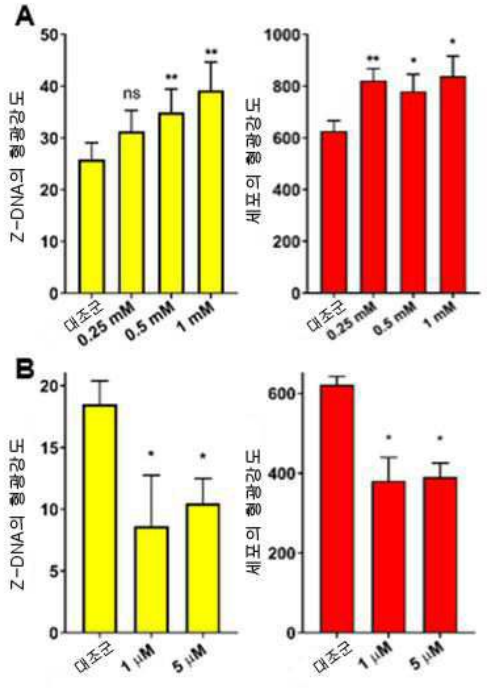
도면49



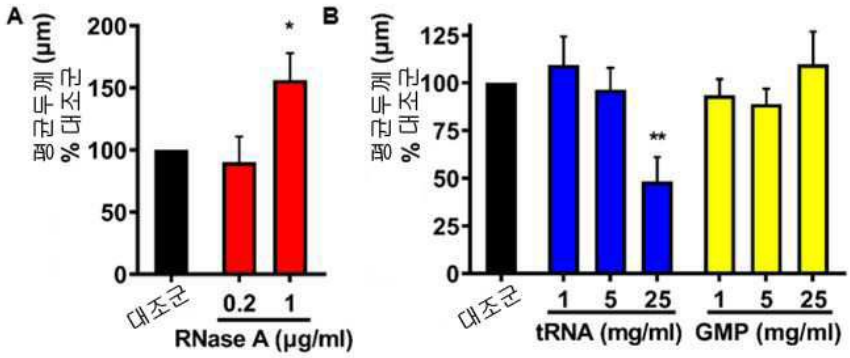
도면50



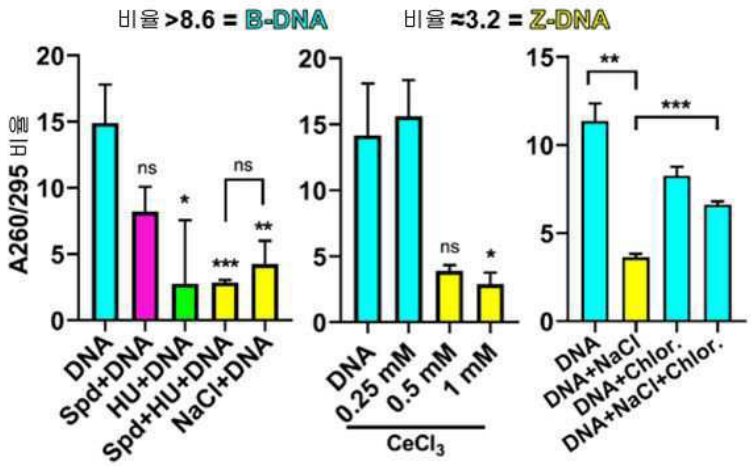
도면51



도면52



도면53



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MEDIATING EPS

<130> 106887-7410

<140> PCT/US2019/040008

<141> 2019-06-28

<150> 62/692,581

<151> 2018-06-29

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

HMGB1 protein

<400> 1

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Arg Lys Met Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130 135 140

Glu Lys Lys Ala Glu Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu
180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210 215

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(10)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 2

watcaannnn ttr 13