



등록특허 10-2715513



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월14일

(11) 등록번호 10-2715513

(24) 등록일자 2024년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/255* (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0195650

(22) 출원일자 2023년12월28일

심사청구일자 2023년12월28일

(56) 선행기술조사문헌

US20030031683 A1*

J. Milk Sci. Biotechnol., 2018, 36(4), pp. 208-219.*

Korean J. Food Sci. An. 2017, 37(1), pp. 134-138.*

KR1020200108667 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)

(72) 발명자

방일수

광주광역시 동구 조선대길 7, 연구동 4212호 (서석동)

정혜원

광주광역시 남구 금당로3길 8-4, 102동 9층 1006호 (진월동, 협진훼미리)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 9 항

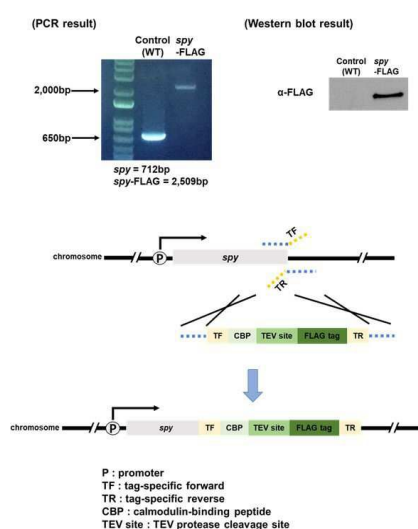
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **재조합 살모넬라주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 Spy(spheroplast protein y) 단백질 코딩 유전자를 보유하고 rpoE 유전자가 결손된 Spy-외부단백질 분비 살모넬라속 균주에 관한 것으로 본 발명에 따른 살모넬라속 균주는 Spy 단백질에 의한 병독성이 감쇄됨과 동시에 Spy 단백질의 구조 및 샤페론 기능을 통해 병원성 바이러스, 질병 치료 단백질, 항원 에피토프 등과 같은 외부 단백질과 융합하면 구조적 안정성을 유지하므로 약독화 생균 백신 등의 기능을 제공할 수 있다. 나아가 여타 생명공학에서 활용될 수 있는 단백질 전달체, 약물 전달체 및 항원-항체 반응 기반 기술로 활용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/00 (2023.05)

C07K 14/255 (2013.01)

A61K 2039/522 (2013.01)

A61K 2039/523 (2013.01)

A61K 2039/6068 (2013.01)

C07K 2319/40 (2013.01)

C12R 2001/42 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485019431

과제번호 ARQ202101648003

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 실내공기생물학적위해인자관리기술개발사업

연구과제명 실내공기 생물 유해인자에 의한 세포 및 생물체 반응 평가를 위한 다각적 모델링 기
법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 조선대학교 산학협력단

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Spy(spheroplast protein y) 단백질을 코딩 유전자를 보유하고 *rpoE* 유전자가 결손되며, 상기 Spy 단백질 코딩 유전자의 3' 말단에 외부 단백질 코딩 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 형질 도입된 살모넬라속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 살모넬라속 균주는 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 엔테리카 또는 살모넬라 엔테리티 디스인, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 CBP(Calmodulin binding peptide) tag, His-tag (Histidine tag), Myc-tag, FLAG-tag, SUMO-tag (small ubiquitin-like modifier tag), CYD-tag (covalent yet dissociable NorpD peptide tag), HPC-tag(heavy chain of protein C tag), GST-tag(glutathione s transferase), Intein-tag, MBP-tag(maltose binding protein) 및 HA-tag (hemagglutinin-tag)으로 구성된 군 으로부터 선택되는 적어도 하나의 태그 펩타이드를 포함하는, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 트립신 절단 부위(trypsin cleavage site), 트롬빈 절단 부위 (thrombin cleavage site), 엔테로키나아제 절단 부위 (enterokinase cleavage site), 인자 Xa 절단 부위 (Factor Xa cleavage site), 콜라게나아제 절단 부위 (collagenase cleavage site) 및 TEV 프로테아제 절단부 위 (TEV protease cleavage site)로 구성된 군 으로부터 선택되는 적어도 하나의 단백질 분해성 절단부위를 포함 하는, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 박테리에 포함되거나 균주의 염색체에 삽입되는, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 Spy-외부단백질이 균주 내부 및 외부에 분비되는, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 외부 단백질은 항원, 항체, 항체 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 수송단백질, 리셉터, 리셉터의 단편, 생체방어 유도물질, 저장단백질, 이동단백질(movement protein), 익스플로이티브 프로틴(exploitive protein) 및 리포터 단백질로 구성되는 군 으로부터 선택되는 적어도 하나인, Spy-외부단백질의 생산방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

Spy(spheroplast protein y) 단백질 코딩 유전자를 보유하고 *rpoE* 유전자가 결손되며, 상기 Spy 단백질 코딩 유전자의 3' 말단에 외부 단백질 코딩 유전자 및 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 CBP-TEV-FLAG tag를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 형질 도입된 살모넬라속 균주를 포함하는, 약물 전달체.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 약물은 상기 균주 내에 내재되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질인, 약물 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 살모넬라속 균주에 관한 것으로 보다 상세하게는 Spy-외부단백질을 분비하는 재조합 살모넬라주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일부 세균 종은 종양 내에서 증식하고 축적되는 것을 선호하는 것으로 보고된 바 있다. 더구나, 세균은 다종의 치료용 단백질을 동시에 운반하고 발현할 수 있는 능력을 포함하는 유리한 특성들을 가지고 있고, 항생제에 의해 용이하게 제거될 수 있기 때문에, 이러한 점은 세균 치료법이 질병 치료에 있어서 희망적인 새로운 전략이 될 수 있음을 시사한다.

[0003] 그 중에서 살모넬라를 이용한 단백질 및 핵산분자 등 치료용 고분자를 선택적으로 전달하는 데 있어서, 유전자의 발현의 조절이 매우 중요하다. 살모넬라는 주변세포질(periplasm) 공간 내에서만 발현되는 Spy 단백질을 보유하고 있고, Spy단백질은 세포내 손상된 단백질을 복구하는 샤페론 기능을 하는 것으로 확인되었다. 최근 밝혀진 Spy 구조는 작은 아기침대 모양의 dimer 구조로 유연성이 높을 것으로 예상되어 많은 종류의 기질 단백질에 샤페론 혹은 carrier 단백질로 작용할 것으로 예상되고 있다.

[0004] 그러나 Spy 단백질은 세포질내에는 존재하지 않고 주변세포질 공간 내에서만 위치하는 단백질로 아직까지 세균으로부터 Spy 단백질 생산 및 분비를 유도하는 기술은 밝혀진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Arch Microbiol. 2015 Dec;197(10):1117-27(doi: 10.1007/s00203-015-1151-y)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 Spy(spheroplast protein y) 단백질 코딩 유전자를 보유하고 *rpoE* 유전자가 결손된, Spy-외부단백질을 분비하는 살모넬라속 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 Spy-외부단백질을 분비하는 살모넬라속 균주를 배양하는 단계를 포함하는 단백질 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 Spy-외부단백질을 분비하는 살모넬라속 균주를 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 1. Spy(spheroplast protein y) 단백질 코딩 유전자를 보유하고 *rpoE* 유전자가 결손된, 살모넬라속 균주.
- [0010] 2. 위 1에 있어서, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 엔테리카 또는 살모넬라 엔테리티디스인, 살모넬라속 균주.
- [0011] 3. 위 1에 있어서, 상기 균주에 외부 단백질 코딩 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 형질도입된, 살모넬라속 균주.
- [0012] 4. 위 3에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 CBP(Calmodulin binding peptide) tag, His-tag (Histidine tag), Myc-tag, FLAG-tag, SUMO-tag (small ubiquitin-like modifier tag), CYD-tag (covalent yet dissociable NorpD peptide tag), HPC-tag(heavy chain of protein C tag), GST-tag(glutathione s transferase), Intein-tag, MBP-tag(maltose binding protein) 및 HA-tag (hemagglutinin-tag)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 태그 펩타이드를 포함하는, 살모넬라속 균주.
- [0013] 5. 위 3에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 트립신 절단 부위(trypsin cleavage site), 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 엔테로키나아제 절단 부위 (enterokinase cleavage site), 인자 Xa 절단 부위 (Factor Xa cleavage site), 콜라게나아제 절단 부위 (collagenase cleavage site) 및 TEV 프로테아제 절단부위 (TEV protease cleavage site)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 단백질 분해성 절단부위를 포함하는, 살모넬라속 균주.
- [0014] 6. 위 3에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 상기 Spy 단백질 코딩 유전자의 N-말단, C-말단 또는 양말단에 결합된, 살모넬라속 균주.
- [0015] 7. 위 3에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 박테리에 포함되거나 균주의 염색체에 삽입되는, 살모넬라속 균주.
- [0016] 8. 위 3에 있어서, 상기 Spy 단백질 또는 상기 외부 단백질이 결합된 Spy-외부단백질이 균주 내부 및 외부에 분비되는, 살모넬라속 균주.
- [0017] 9. 위 3에 있어서, 상기 외부 단백질은 항원, 항체, 항체 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 수송단백질, 리셉터, 리셉터의 단편, 생체방어 유도물질, 저장단백질, 이동단백질(movement protein), 익스플로이티브 프로틴(exploitive protein) 및 리포터 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 살모넬라속 균주.
- [0018] 10. 위 1 내지 9 중 어느 하나의 살모넬라속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 단백질의 생산방법.
- [0019] 11. 위 10에 있어서, 상기 단백질은 Spy 단백질 또는 Spy-외부단백질인, 단백질의 생산방법.
- [0020] 12. 위 1 내지 9 중 어느 하나의 살모넬라속 균주를 포함하는, 약물 전달체.
- [0021] 13. 위 12에 있어서, 상기 약물은 상기 균주 내에 내재되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질인, 약물 전달체.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 Spy-외부단백질 분비 살모넬라속 균주는 Spy 단백질에 의한 병독성이 감쇄됨과 동시에 Spy 단백질의 구조 및 샤페론 기능을 통해 병원성 바이러스, 질병 치료 단백질, 항원 에피토프 등과 같은 외부 단백질과 융합하면 구조적 안정성을 유지하므로 약독화 생균 백신 등의 기능을 제공할 수 있다.
- [0023] 나아가 여타 생명공학에서 활용될 수 있는 단백질 전달체, 약물 전달체 및 항원-항체 반응 기반 기술로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG tag 재조합 살모넬라주의 제조 모식도이다.
- 도 1b는 Spy-CBP-TEV-FLAG 융합 염기서열(서열번호 3)을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 chromosomal Spy-FLAG 재조합 살모넬라주가 주변세포질(A) 및 세포용해물 및 세포분비물(B)에 분비된 Spy-FLAG 융합단백질의 면역블롯 결과를 나타낸 도이다. 살모넬라주가 동물에 감염하기 위해 필요한 단백질을 분비하는 주요 환경으로 알려진 SPI-1 및 SPI-2 배양 배지에서 배양한 결과이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 chromosomal Spy-FLAG 재조합 살모넬라주의 *rpoE* 유전자 결손 돌연변이체 제조 모식도이다.

도 3b는 *rpoE* 유전자의 개시코돈으로부터 224 bp부터 180 bp가 결손되고 그 자리에 chloramphenicol cassette가 삽입된 염기서열(서열번호 5)을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 *rpoE* 유전자가 결손된 chromosomal Spy-FLAG 재조합 살모넬라주의 배양액으로 분비된 Spy-FLAG 융합단백질의 면역블롯 결과를 나타낸 도이다. *rpoE* 유전자 결손 돌연변이체의 Spy-FLAG 융합단백질 분비량과 비교하여 상대적으로 적은 야생형 살모넬라주의 Spy-FLAG 융합단백질 분비량을 동시에 나타낼 수 없으므로 도 4의 하부에 별도로 면역블롯 결과를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 신규 살모넬라속 균주에 관한 것으로, 상세하게는 세균의 고유 공간인 주변세포질(periplasm) 공간 내에서 발현되는 Spy 단백질을 세균 외부로 다량 분비하는 살모넬라속 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0026] “Spy(Spheroplast protein y) 단백질”은 138개의 아미노산을 가진 작은 주변세포질(periplasm) 샤페론 단백질로서, 박테리아 도메인 계통에만 존재하며 많은 그람음성균과 폐렴구균 *Streptococcus pneumonia*를 포함하는 일부 그람양성균, *Mycobacterium tuberculosis* 등의 병원균 등이 Spy 단백질을 갖고 있다. Spy 단백질은 *E. coli*가 여러 자극에 의해 세포벽이 일부 제거되는 spheroplast가 형성될 때, 세포질내에는 존재하지 않고 주변 세포질 공간 내에서만 위치하는 단백질로 처음 확인되었다(Hagenmaier et al., 1997; Quan et al., 2011).
- [0027] Spy 단백질은 4개의 α -helix의 긴 hairpin과 같은 구조로 독특한 접힘구조를 형성함으로써 유연성을 지니고 있기 때문에 많은 종류의 기질 단백질의 구조 안정화에 기여하고 샤페론 혹은 carrier 단백질로 작용할 수 있을 것으로 예상되고 있다(Quan et al., 2011).
- [0028] 본 발명자들은 Spy 단백질의 구조 및 샤페론 기능을 통해 병원성 바이러스, 질병 치료 단백질, 항원 에피토프 등과 같은 외부 단백질과 융합시 구조적 안정성을 유지하면서 세균 외부로 전달하거나 이 특성을 이용하여 항체 생산을 동시에 유도할 수 있을 것으로 기대하고 Spy-외부단백질 분비 살모넬라 균주를 구현할 수 있는지 확인하였다.
- [0029] 이에 본 발명자들은 살모넬라 균주의 염색체상에서 *Spy* 유전자 말단 부위와 CBP-TEV-FLAG tag 코딩 유전자가 융합된 살모넬라주를 제조하고 배양한 결과 세포용해물(Cell lysate)에서 Spy-FLAG 단백질이 검출되고 세균 배양액으로 분비되는 것을 성공적으로 확인하고, 추가적으로 *rpoE* 유전자를 결손시킨 살모넬라주를 배양한 결과 다량의 Spy-FLAG 단백질이 세균 밖으로 분비된 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명은 Spy(spheroplast protein y) 단백질 코딩 유전자를 보유하고 *rpoE* 유전자가 결손된, 살모넬라속 균주에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 상기 살모넬라속 균주는 외부 단백질 코딩 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 형질도입된 균주일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 “유전자(gene)”는 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 특정의 아미노산 서열(폴리펩타이드)을 코딩하는 핵산 분자에 제한되지 않고, 특정 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 것으로 해석된다. 실질적인 동일성은 본 발명의 유전자가 코딩하는 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 90%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다. 또한, 동일성을 가지는 폴리펩타이드는 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가되는 아미노산 서열의 폴리펩타이드를 포함한다. 그러한 폴리펩타이드는 1 개 이상의 아미노산 잔기가 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 이루어지며 아미노산 잔기의 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가의 수가 적은 것이 바람직하다.
- [0034] 상기 유전자는 2개 이상이 작동가능하게 연결될 수 있다. “작동가능하게 연결된(operably linked)”은 일반적인 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다.

- [0035] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 세포 내에서 단백질 발현을 위한 최소의 엘리먼트(element)만을 포함하는 핵산분자일 수 있고, 바람직하게는 본 발명에 언급되는 구성요소들을 최소의 필수 구성요소로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 CBP(Calmodulin binding peptide) tag, His-tag (Histidine tag), Myc-tag, FLAG-tag, SUMO-tag (small ubiquitin-like modifier tag), CYD-tag (covalent yet dissociable NorpD peptide tag), HPC-tag(heavy chain of protein C tag), GST-tag(glutathione s transferase), Intein-tag, MBP-tag(maltose binding protein) 및 HA-tag (hemagglutinin-tag)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 태그 펩타이드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 트립신 절단 부위(trypsin cleavage site), 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 엔테로키나아제 절단 부위 (enterokinase cleavage site), 인자 Xa 절단 부위(Factor Xa cleavage site), 콜라게나아제 절단 부위 (collagenase cleavage site) 및 TEV 프로테아제 절단부위 (TEV protease cleavage site)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 단백질 분해성 절단부위를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 외부 단백질 코딩 유전자가 작동 가능하게 순차적으로 연결된 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 Spy 단백질 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 제조합 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 순차적 펩타이드 친화성(SPA, Sequential Peptide Affinity) 태그일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시예에서 상기 SPA 태그는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 CBP-TEV-FLAG tag일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 살모넬라속 균주에 존재하는 Spy 단백질 코딩 유전자의 N-말단, C-말단 또는 양말단에 결합할 수 있고 바람직하게는 C-말단에 결합할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에서 유전자 컨스트럭트는 벡터에 포함되거나 균주의 염색체에 삽입될 수 있고 바람직하게는 염색체에 삽입될 수 있다. 상기 벡터에 포함은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 유전자 컨스트럭트를 작동적 연결할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다. 상기 염색체 삽입은 통상의 상동성 제조합 방법, 트랜스포존 매개 유전자 삽입 또는 Cre-LoxP 제조합 시스템을 사용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따르면 유전자 컨스트럭트는 3개의 변형된 FLAG 서열(3X FLAG)과 CBP로 구성된 이중 친화성 태그를 사용하며, TEV 프로테아제 절단 부위로 분리된 순차적 펩타이드 친화성 태그(SPA-tag)로 구성되고 살모넬라속 균주의 염색체상에 도입되어 Spy 단백질 코딩 유전자의 C-말단에 결합될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면 야생형 살모넬라 티피뮤리움 염색체에 도입하여 Spy 유전자 C-말단에 SPA-tag (CBP-TEV-FLAG tag) 코딩 유전자를 융합한 살모넬라주를 배양한 결과 세포용해물 및 세균 분비물에서Spy-CBP-TEV-Flag tag 융합단백질이 검출되었다.
- [0045] 본 발명에서 살모넬라속 균주는 Spy 단백질 또는 외부 단백질이 결합된 Spy-외부단백질을 균주 내부 및 외부에 분비할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 외부 단백질은 항원, 항체, 항체 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 수송단백질, 리셉터, 리셉터의 단편, 생체방어 유도물질, 저장단백질, 이동단백질(movement protein), 익스플로이티브 프로틴(exploitive protein) 및 리포터 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 외부 단백질은 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 *rpoE* 유전자는 살모넬라속 균주의 일부 유전자군 전사 개시를 도모하는 시그마 인자(Sigma E)를 코딩하는 유전자이다. *rpoE* 유전자가 결손된 살모넬라 균주는 실험동물(생쥐) 병독성이 상실되는 것으로 알려져 있다(Crouch ML et al., 2005).
- [0048] 또한 본 발명에 따른 살모넬라속 균주가 세포 밖으로 분비하는 Spy 단백질은 결합된 외부단백질로 인해 살모넬라주의 병독성에 필요한 Spy의 본래 기능이 제한되므로 살모넬라주의 병독성 감쇄 효과를 나타낼 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, *rpoE* 유전자가 결손된 살모넬라주는 Spy-CBP-TEV-Flag tag 융합단백질 분비가 크게 증가하는 것으로 확인되어 본 발명의 살모넬라속 균주는 단백질 전달 또는 약독화 생백신 균주로서의 활용

뿐만 아니라 Spy-외부단백질 대량생산 기술에 적용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

- [0050] 본 발명에 따른 살모넬라속 균주에 병원성 바이러스, 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프 등의 외부 단백질을 도입하여 Spy 단백질과 융합하면 Spy 단백질의 구조 및 사폐론 기능을 통해 외부 단백질의 구조적 안정성을 유지하면서 외부로 전달할 수 있는 단백질 전달체, 약독화 생균 백신 등의 기능성을 제공할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 살모넬라속 균주는 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 또는 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella Enteritidis*)일 수 있고, 바람직하게는 살모넬라 티피뮤리움일 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 전술한 살모넬라속 균주를 배양하는 단계를 포함하는 단백질 생산방법에 관한 것이다. 상기 단백질은 Spy 단백질 또는 Spy-외부단백질일 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또한 전술한 살모넬라속 균주를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다. 상기 약물은 본 발명에 따른 살모넬라속 균주 내에 내재되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 질병 치료용 단백질은 항암 단백질, 성장인자, 사이토카인, 항체, 케모카인 수용체 또는 혈관생성인자 일수 있다. 예를 들어 상기 항암 단백질은 단백질 독소, 암항원에 특이적인 항체 또는 상기 항체의 단편, 종양억제 유전자(tumor suppressor gene) 또는 항혈관생성인자(antiangiogenic factor)일 수 있다. 이 때, 상기 단백질 독소는 보툴리눔 독소(Botulinum toxin), 테타누스 독소(Tetanus toxin), 시가 독소(Shiga toxin), 디프테리아 독소(Diphtheria toxin, DT), 리신(ricin), 슈도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin, PE), 사이토라이신 A(cytolysin A, ClyA), r-Gelolin일 수 있다. 예를 들어 상기 성장인자는 간세포 성장인자(HGF), 혈관상피 성장인자(VEGF), 신경 성장인자(NGF), 뇌 유래 신경 성장인자(BDNF), 섬유아세포 성장인자(FGF) 뇌 유래 신경영양인자(BDNF), 인슐린 유사 성장인자(IGF), 형질전환 성장인자(TGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 뼈 유래 성장인자(BMP), 콜로니 자극인자(CSF), 표피 성장 인자(EGF), 각질세포 성장 인자(Keratinocyte growth factor, KGF) 와 같은 성장인자일 수 있다. 예를 들어 상기 사이토카인은 IL-2, IL-4, TNF, IF- γ , G-CSF, GM-CSF 등일 수 있다. 예를 들어 상기 혈관생성인자는 VEGF(vascular endothelial growth factor), 안지오포이에틴 1(angiotensin 1, Ang1), 안지오포이에틴2(Ang2), 형질전환 성장인자- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 인테그린(integrin), 혈관 내피 캐드헤린(VE-cadherin), 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator, PA), 에프린(efrin), AC-133, 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 단핵구 주화성 단백질-1(MCP-1, monocyte chemotactic protein-1), 섬유아세포 성장인자(FGF) 또는 태반성장인자(placenta growth factor, PIGF)일 수 있다. 상기 종양 억제 유전자는 종양의 발생을 억제하는 유전자로서, 대표적으로 VHL(von Hippel Lindau), APC(Adenomatous polyposis coli), CD95(cluster of differentiation 95), ST5(Suppression of tumorigenicity 5), YPEL3(Yippee like 3), ST7(Suppression of tumorigenicity 7) 및 ST14(Suppression of tumorigenicity 14)를 들 수 있다. 상기 항신혈관생성 단백질은 항-VEGF 항체, 안지오타틴(angiotatin), 엔도스타틴(endostatin), 아포리포르테인의 크링글 V 도메인 등을 들 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 항원 에피토프는 항체, 응고 인자 및 대체 요법에서 사용되는 단백질로 이루어진 균으로부터 선택되는 치료적 단백질로부터 유래된 것일 수 있다. 또는 단리된 단백질로부터 유래되거나, 또는 단백질의 아미노산 서열 또는 이의 단편을 포함하는 합성 펩티드로부터 유래되고, 상기 단리된 단백질은 종양, 세포내 병원체, 자기 항원, 생물학적 단백질, 알레르겐 또는 만성 염증 유발원으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0057] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 상세히 설명한다.
- [0058] **재료 준비**
- [0059] 본 발명에 사용된 살모넬라 티피뮤리움 야생형(WT) 모균주, 돌연변이 균주, 형질전환에 사용된 플라스미드 및 프라이머는 표 1에 정리하였다.

표 1

Strains	Genotype
IB1	<i>S. Typhimurium</i> 14028s, Wild-type
IB1026	$\Delta spy :: CM$
IB1894	$\Delta spy :: CM / pBAD30-spy$
IB1930	WT / <i>ppstS-gfp</i>

IB2183	$\Delta spy :: CM / ppstS-gfp$
IB2184	$\Delta ssaV :: CM / ppstS-gfp$
IB2190	$\Delta spy :: CM sipC :: Tn5 lacZY$
IB2191	$\Delta spy :: CM sipA :: Tn5 lacZY$
IB2192	$\Delta spy :: CM invF :: Tn5 lacZY$
IB2365	<i>spy-SPA</i>
IB2702	<i>spy-SPA ΔrpoE :: CM</i>
Plasmid	
pBAD30	Gene expression vector
pJL148	Plasmid carrying the sequential peptide affinity (SPA) tag
pTP233	Plasmid encoding IPTG-inducible lamda red recombinase
Oligonucleotides	
<i>spy</i> linker	F-SacI: 서열번호 6 (ATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA)
	R-XbaI: 서열번호 7 (TATTCTAGAAGGACGGCTATAAGATTCTC)
MCS † of pBAD plasmid (flanking)	F: 서열번호 8 (TCGCAACTCTCTACTGTTTC)
	R: 서열번호 9 (AGACCGCTTCTGCGTTCTGA)
MCS † of pFPV25 plasmid (flanking)	F: 서열번호 10 (GGCTCTTCTTGAGTTTGAAC)
$\Delta rpoE :: CM$	F: 서열번호 11 (GATTCTTTCCGGGGGATAGTGCTTTTATACCTGGTTGT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC)
	R: 서열번호 12 (AAGGTGATTGCCATACGTAAATCTCCGGGAGGGACTCA ACATATGAATATCCTCCTTAG)
<i>rpoE</i> (flanking)	F: 서열번호 13 (TGCTTGCTCATAGTGC GGCT)
	R: 서열번호 14 (AGAACGGCATGCTCTGCCA)
<i>spy</i> -SPA-TF	서열번호 15 (ACGCCCGCGCAAGAAGGTAAATGCCTGCTGCGGCAGAA TCCATGGAAAAGAGAAG)
<i>spy</i> -SPA-TR	서열번호 16 (TGTTGTCGACAAGACCGGCGTCTTAAATTATGCGGAAAG CATATGAATATCCTCCTTAG)
<i>spy</i> (flanking)	F: 서열번호 17 (TGCTATATCATGCTGTTGTA)
	R: 서열번호 18 (AGGACGGCTATAAGATTCTC)
꺾Multi-cloning site.	

[0061] 균주 배양을 위한 배지로는 Luria-Bertani(LB) 영양배지를 사용하였다. 사용한 모든 균주는 모두 진탕 배양기 (HST, Korea)에서 37℃, 220 rpm 조건으로 배양하여 사용하였으며, 항생제는 ampicillin(200 μg/mL, AP), chloramphenicol(20 μg/mL, CM)을 배지에 넣어 사용하였다.

[0063] 실시예 1: 재조합 살모넬라속 균주

[0064] 1-1. 플라스미드 재조합 살모넬라주의 Spy 단백질 외부 분비 확인

[0065] 살모넬라속 균주의 Spy 단백질 생성을 관찰하기 위해 *Spy* 유전자 녹아웃 돌연변이 살모넬라주를 이용하여 Spy 단백질 발현 플라스미드 클론을 형질전환시킨 살모넬라주를 제조하였다.

[0066] 구체적으로, Spy 단백질 발현 플라스미드 클론을 만들기 위해 살모넬라 티피뮤리움 14028s를 주형으로 하여 정제된 염색체에서 *Spy* 프로모터 부분에 해당하는 유전자를 증폭시키기 위해 제한효소 자리 염기를 붙인 *spy* linker F-SacI 및 *spy* linker R-XbaI 프라이머쌍을 사용하였다. iPFU 중합효소(iNtRON)를 이용해 PCR 증폭한 다음 생성된 PCR 산물은 정제한 뒤 SacI 및 XbaI로 분해하고 동일한 효소로 처리한 pBAD30 플라스미드에 결합시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 형질전환된 콜로니들의 플라스미드를 분리하고, 삽입유전자의 염기서열을 확인한 후 *Spy* 유전자 녹아웃 돌연변이 살모넬라 균주에 형질전환하였다.

[0067] 모균주와 형질전환된 *Spy* 유전자 녹아웃 돌연변이 살모넬라주를 SPI-1 및 SPI-2 유전자 발현을 유도하는 조건 (LB 배지에서 하룻밤 배양한 배양액을 0.3M NaCl(LBN)을 함유한 LB와 저마그네슘 미니멈(MgM) 배지에 1:100으로 희석하여 [170mM Mes(2-N-모폴리노 에탄설폰산), 5mM KCl, 7. 5mM (NH₄)₂SO₄, 0.5mM K₂SO₄, 1mM KH₂PO₄, 8μM MgCl₂, 38mM 글리세롤, 0.1% 카사미노산, pH 5.8])에서 각각 배양하였다.

[0068] LC-MS/MS 분석 결과 하기 표 2에서 보는 바와 같이, Spy 단백질 발현 플라스미드 클론을 형질전환시킨 *spy* 유전자 돌연변이 살모넬라주는 Spy 단백질을 세균 외부로 분비함을 확인하였다.

표 2

Strain	Accessions	Protein	mol%
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88067.1	Spy	6.0911
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88926.1	STM14_2476	3.9264
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY89758.1	FljB	3.6921
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88172.1	SseB	3.4579
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88383.1	STM14_1912	2.8894
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88044.1	GapA	2.4271
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY90116.1	Pgk	2.1272
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY91356.1	HupA	2.0991
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY87983.1	PagC	2.0616
<i>Δspy/pSpy</i> -#1	ACY88898.1	STM14_2448	1.9616

[0069]

[0070]

[0071] 1-2. 염색체상 재조합 살모넬라주의 Spy 단백질 외부 분비 확인

[0072] 살모넬라 균주가 자연적인 유전자 조절 하에서 Spy 단백질을 분비할 수 있는지 추가로 확인하기 위해 야생형 살모넬라주 염색체상의 *spy* 유전자 (서열번호 1) 말단에 세 개의 FLAG 태그 서열(3X FLAG)로 구성된 외부 펩타이드 SPA(Sequential Peptide Affinity) tag를 융합하였다.

[0073] 구체적으로 CBP(Calmodulin binding peptide)-TEV site(TEV protease cleavage site)-FLAG tag로 구성된 CBP-TEV-FLAG코딩 유전자(서열번호 2)를 프라이머쌍(*spy*-SPA-TF 및 *spy*-SPA-TR)과 pJL148 플라스미드를 템플릿으로 사용하여 PCR 증폭하였다. 생성된 DNA 산물을 박테리오파지 λ-매개 재조합 방법의 프로토콜에 따라 살모넬라 티피뮤리움(WT) 14028s의 염색체에 삽입하여 Spy 유전자의 종결코돈에 융합한 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주(*spy*-FLAG)를 제작하였다(도 2a). *spy* 유전자 말단에 CBP-TEV-FLAG코딩 유전자가 결합된 융합 서열은 도 2b에 도시하였다.

[0074] CBP-TEV-FLAG tag가 없는 야생형 살모넬라주(WT) 및 chromosomal Spy-FLAG 재조합 살모넬라주를 실시예 1-1과 같이 SPI-1 또는 SPI-2 유도 조건에서 배양하였다. 배양된 살모넬라주를 면역 블롯팅하기 전에 SDS-PAGE(12%)로 단백질 샘플을 분리하고 항-FLAG 모노클로날 항체를 사용하여 Spy-FLAG를 검출하였다. 내부 로딩 대조군으로 항-rRNA 중합효소 β-subunit을 사용하였으며, β-lactoglobulin은 분비 및 침강 단백질들의 정량 검정 방법으로 사용되었다.

[0075] 도 2의 A를 살펴보면, C-말단에 CBP-TEV-FLAG 태그가 부착된(Spy-FLAG) Spy 단백질이 살모넬라 티피뮤리움 균주의 주변세포질(periplasm)에서 검출되어 성공적으로 발현 및 국소화되었음이 확인되었다.

[0076] 또한 도 2의 B를 살펴보면 세균을 제거한 배양액에서 얻은 단백질 샘플에서도 Spy-FLAG 융합단백질이 검출되어 세균 외부로 분비 및 국소화된 것을 확인하였다. 이러한 결과로 본 발명에 따른 기술에 의해 천연 살모넬라속 균주가 박테리아 외 공간으로 SPY 단백질을 분비할 수 있음을 확인하였다.

[0078] 실시예 2: *rpoE* 결손 돌연변이체의 Spy 단백질 외부 분비 확인

[0079] 실시예 1-2의 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주에서 추가적으로 세균의 일부 유전자군의 전사 개시를 도모하는 시그마 인자 Sigma E 유전자인 *rpoE*를 결손시킨 돌연변이체를 제조하였다.

[0080] *rpoE* 코딩 유전자(서열번호 4)는 살모넬라균 염색체에서 576bp의 염기를 갖는다. 박테리오파지 λRed 재조합

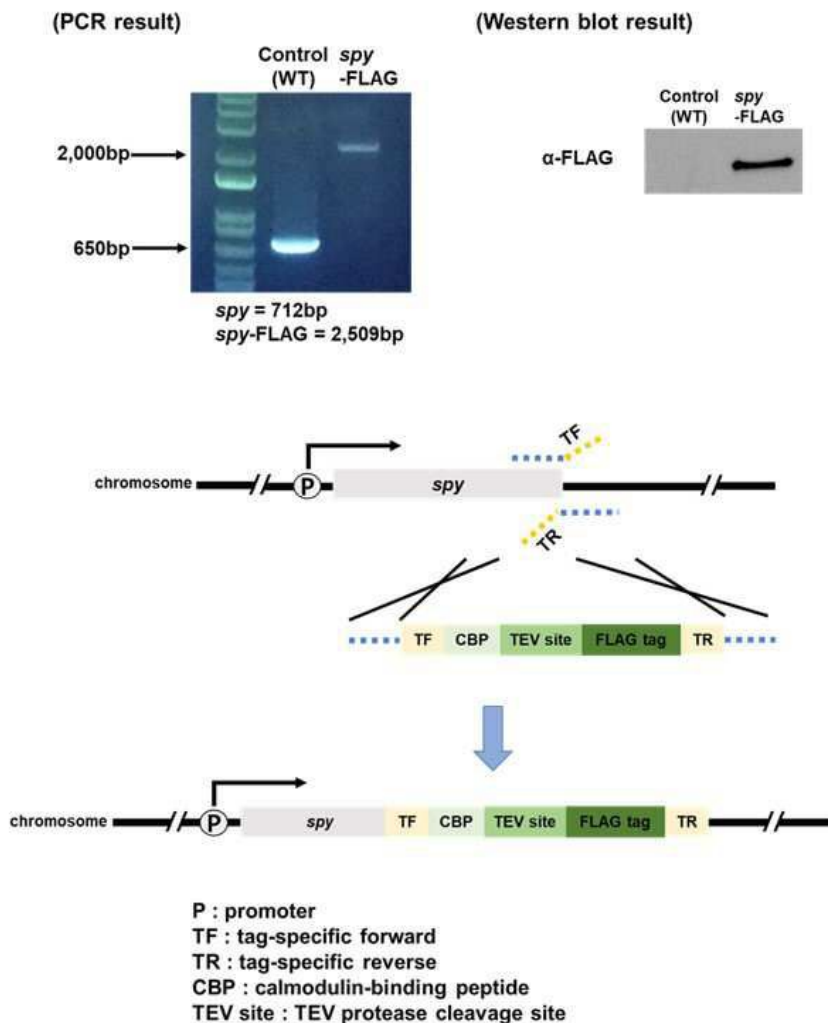
방법을 이용한 단일 단계 유전자 돌연변이 방법을 사용하여, *rpoE* 유전자를 결손(*rpoE*-CM mutant; 서열번호 5) 시켰다. *rpoE* 유전자의 개시코돈으로부터 224 bp부터 180 bp가 결손되고 그 자리에 약 1 kbp 크기의 chloramphenicol cassette를 삽입하였다(도 3b). 그 다음 *rpoE* 유전자를 포함하는 외부 DNA 프라이머를 이용하여 PCR을 시행한 결과, 그 크기가 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주는 2509 bp이며 *rpoE* 결손 돌연변이주는 1696 bp의 PCR 산물을 생산함에 따라 *rpoE* 가 결손된 살모넬라 돌연변이주가 정상적으로 만들어졌음을 확인하였다(도 3).

[0081] 야생형 (WT), chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주(WT spy-FLAG) 그리고 *rpoE* 유전자를 결손시킨 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라 돌연변이주(*rpoE* spy-FLAG)를 배양하여 분비 단백질을 면역블롯한 결과를 도 4에 도시하였다. *rpoE* 돌연변이주의 정상적인 밴드 확인을 위한 노출 조건에선 야생형 (WT) 및 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주(WT spy-FLAG)의 밴드 확인에 한계가 있어 야생형 (WT) 및 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주(WT spy-FLAG)의 경우 각 균주 샘플량을 1:16 의 농도비율 조건에서 밴드 존재를 확인하였다.

[0082] 도 4에 나타난 바와 같이 야생형 (WT)은 spy-FLAG 밴드가 확인되지 않은 반면 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라주(WT spy-FLAG)와 *rpoE* 유전자를 결손시킨 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라 돌연변이주(*rpoE* spy-FLAG)의 경우 spy-FLAG 밴드가 확인되었다. 특히 *rpoE* 유전자를 결손시킨 chromosomal Spy-CBP-TEV-FLAG 재조합 살모넬라 돌연변이주의 경우 spy-FLAG 용합단백질 검출량이 500배 이상 크게 증가한 것을 확인할 수 있다.

도면

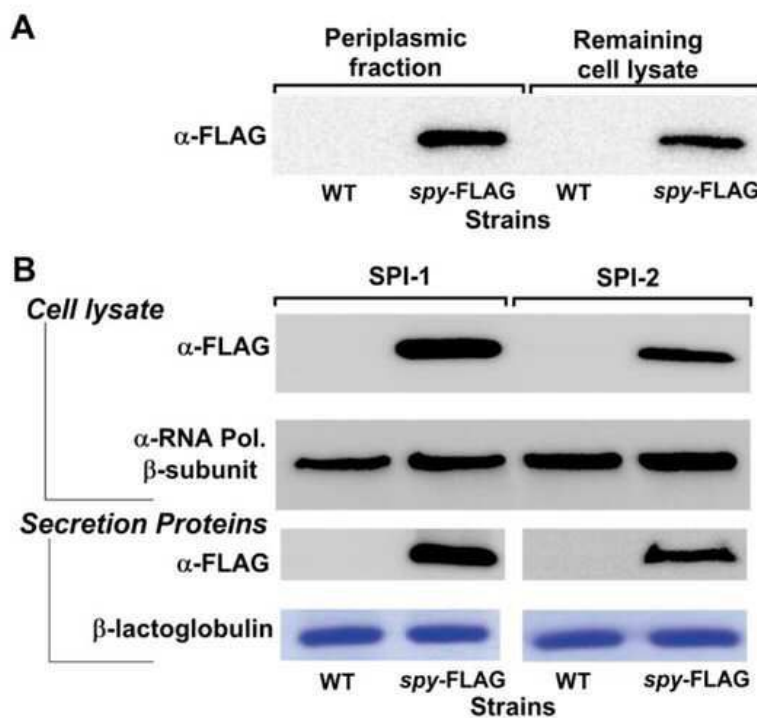
도면1a



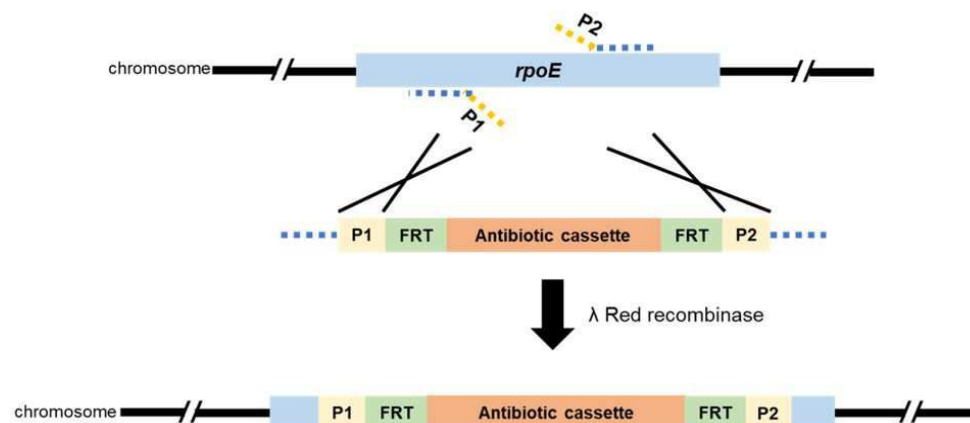
도면1b

ATG CGT AAA CTG ACT GCT CTA TTT GTT GCC TCT ACC CTG GCG ATG GGT GCT GCG AAT CTC
GCT CAT GCC GCT GAG ACT ACC ACC GCC GCG CCA GCG GAT GCG AAG CCA ATG ATG CAG CAT
AAA GGT AAA TTT GGC CCA CAT CAC GAT ATG ATG TTT AAA AAC CTG AAC CTG ACG GAC GCA
CAG AAG CAA CAA ATT CGC GAC ATT ATG AAA GCG CAG CGC GAG CAA ATG AAA CGT CCG CTG
CTG GAA GAG CGT CGC GCC ATG CAT GAT ATT ATC GCC AGC GAT ACC TTC GAT AAA GCC AAA **spy**
GCC GAA GCG CAA ATT ACG AAA ATG GAA GCG CAG CGC AAG GCC AAT ATG CTG GCG CAT ATG
GAA ACC CAG AAT AAA ATT TAT AAC GTT CTG ACG CCG GAG CAG AAA AAG CAA TAT AAC GCT
AAT TTT GAG AAG CGT CTG ACG GAA CGC CCG GCG CAA GAA GGT AAA ATG CCT GCT GCG GCA
GAA TCC ATG GAA AAG AGA AGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC CGC **CBP**
TTT AAG AAA ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT GAT TAT GAT ATT CCA ACT ACT GCT AGC GAG **TEV site**
AAT TTG TAT TTT CAG GGT GAG CTC GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT GAT TAT AAA GAT CAT **3X FLAG**
GAC ATC GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG

도면2



도면3a



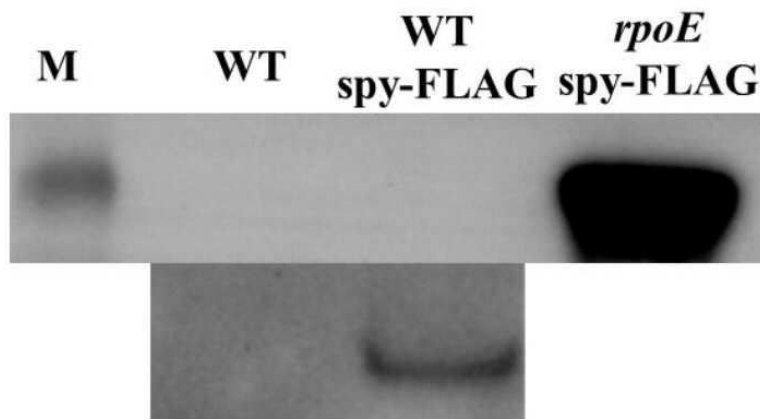
도면3b

```

ATGAGCGAGCAGTTAACGGACCAGGTCCTGGTTGAACGGGTCCAGAAGGG
AGATCAGAAAGCCTTTAACTTACTGGTAGTGCCTACCAGCATAAAGTGG
CGAGTCTGGTTTCCCGCTATGTGCCATCGGGCGACGTTCCCGATGTCGTA
CAGGAATCATTATTATAAGGCCTATCGCGCGCTGGATTCTTCCGGGGGGA
TAGTGCTTTTTATACCTGGTTGT
GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACCTTCATTTAAATGGCGCGCTTACGCCCCGCCCTGC
CACTCATCGCAGTACTGTTGTATTCATTAAGCATCTGCCGACATGGAAGC
CATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTG
TCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTT
GTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGAT
TGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCC
AGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTG
CCGGAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTT
GCTCATGGAACGGTGAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGC
TCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTATCAGGCG
GGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTCTTTA
CGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTA
CATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTG
GGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATTTAGCTT
CCTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACCTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGAT
CTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTC
TCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACAC
CAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTAGGCGCGCC
GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACTAAGG
AGGATATTCATATG
TTGAGTCCCTCCCGAAGATTTACGTATGGCAATCACCTTACGGGAGCTG
GATGGCCTGAGCTATGAAGAGATAGCGGCTATCATGGATTGTCCGGTGGG
GACGGTGCGTTACGTATCTTCCGGGCGCGGGAAGCTATTGATAATAAAG
TTCAACCGCTTATCAGGCGTTGA
    
```

CM
cassette

도면4



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0021

【변경전】

13. 위 12에 있어서, 상기 약물은 상기 균주 내에 내제되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질인, 약물 전달체.

【변경후】

13. 위 12에 있어서, 상기 약물은 상기 균주 내에 내제되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질인, 약물 전달체.

【직권보정 2】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0053

【변경전】

본 발명은 또한 전술한 살모넬라속 균주를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다. 상기 약물은 본 발명에 따른 살모넬라속 균주 내에 내제되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질일 수 있다.

【변경후】

본 발명은 또한 전술한 살모넬라속 균주를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다. 상기 약물은 본 발명에 따른 살모넬라속 균주 내에 내제되거나 상기 균주가 분비하는 질병 치료용 단백질 또는 항원 에피토프가 결합된 Spy-외부단백질일 수 있다.

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.