



(12) **Veröffentlichung**

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2024/019354**
in der deutschen Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2
IntPatÜbkG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2023 002 425.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR2023/009113**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.06.2023**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **25.01.2024**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **17.04.2025**

(51) Int Cl.: **C12N 15/62** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12R 1/42 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
10-2022-0089805 **20.07.2022** **KR**

(71) Anmelder:
**Korea Institute of Science and Technology, Seoul,
KR; The Industry & Academic Cooperation in
Chungnam National University (IAC), Daejeon, KR**

(74) Vertreter:
**GILLE HRABAL Partnerschaftsgesellschaft mbB
Patentanwälte, 40593 Düsseldorf, DE**

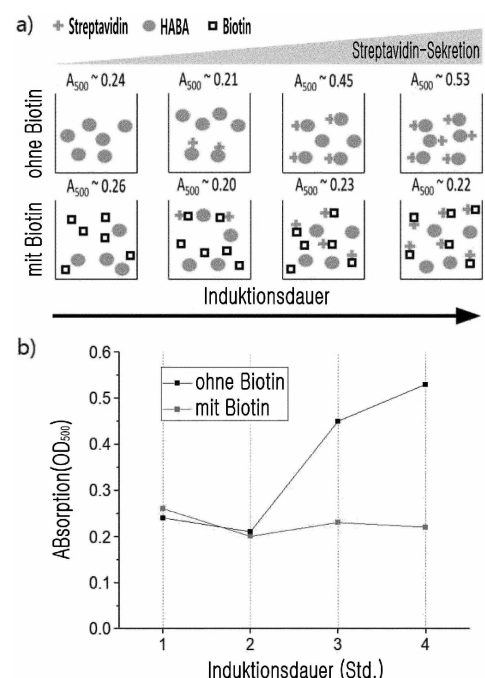
(72) Erfinder:
**Lee, Hyo Jin, Daejeon, KR; Jeon, Heung Jin,
Daejeon, KR; Suh, Seung Beum, Seoul, KR; Kim,
Sehoon, Seoul, KR; Lee, Dohee, Seoul, KR**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Antikrebsstamm, der ein Streptavidin-Fusionsprotein mit Biotinbindungsfähigkeit sezerniert, antineoplastische Zusammensetzung unter Verwendung desselben, antineoplastisches Adjuvans und Hilfsmittel zur Tumorbildgebung**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Genkonstrukt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Anti-Sigma-Faktor-flgM-Gen und ein für Streptavidin kodierendes Gen verbunden sind, um für ein Fusionsprotein aus flgM und Stv mit Biotinbindungsfähigkeit zu kodieren, das die Expression und Sekretion eines Streptavidin-Fusionsproteins mit Biotinbindungsfähigkeit in einem Antikrebsstamm ermöglicht, der auf Tumorbereiche abzielt und die Immunaktivität stimulieren kann, sowie ein antineoplastisches Adjuvans und ein Hilfsmittel zur Tumorbildgebung, das nicht nur selbst antineoplastische Aktivität aufweist, sondern auch zusammen mit antineoplastischen Mitteln oder Kontrastmitteln, die mit Biotin markiert sind, das spezifisch mit Streptavidin reagiert, nützlich für die Diagnose und Behandlung von Tumorzellen verwendet werden kann.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Genkonstruktion, die es ermöglicht, ein Streptavidin-Fusionsprotein mit Biotinbindungsfähigkeit in einem Antikrebsstamm zu exprimieren und zu sezernieren, der auf Tumorbereiche abzielt und die Immunaktivität stimulieren kann, sowie ein antineoplastisches Adjuvans und ein Hilfsmittel zur Tumorbildgebung, das nützlich für die Diagnose und Behandlung von Tumorzellen verwendet werden kann, nicht nur in Verbindung mit der antineoplastischen Aktivität selbst, sondern auch zusammen mit antineoplastischen Mitteln oder Kontrastmitteln, die mit Biotin markiert sind, das spezifisch mit Streptavidin reagiert.

Stand der Technik

[0002] Krebs ist eine Erkrankung, die letztendlich das Leben bedroht, indem die Vermehrungsaktivität der Zellen nicht aufhört und in das umliegende Gewebe eindringt, wodurch normale Zellen zerstört werden. Da die Regulierungsfähigkeit des Körpers durch das Altern abnimmt und dadurch anfälliger für Krebs wird, ist Krebs in der heutigen alternden Gesellschaft seit 2007 die unbestrittene Todesursache Nummer eins und hat eine mehr als doppelt so hohe Sterblichkeitsrate wie Herzerkrankungen, die an zweiter Stelle stehen.

[0003] Das effektivste Reaktionssystem zur Behandlung von Krankheiten ist die Stärkung der Immunität, aber Krebszellen umgehen die Immunreaktion des Körpers, da sie keine externen Eindringlinge sind. Bestimmte Viren oder Bakterien infizieren Krebszellen häufiger als normale Zellen, und die infizierten Bakterien können zum Ziel von Immunzellen werden. Daher wurden Methoden zur Krebsbehandlung vorgeschlagen, bei denen der Körper absichtlich mit bestimmten Viren oder Bakterien infiziert wird, um die Immunreaktion des Körpers zu stimulieren und so gegen Krebszellen vorzugehen. Infektiöse Bakterien wie Shigella, Vibrio cholera und pathogene E. coli dringen jedoch nur in die Darmzellen ein und erreichen nicht die Leber und Milz, die wichtige Organe für die Immunreaktion sind. Im Gegensatz dazu kann Salmonella durch die Lymphknoten in Milz und Leber eindringen und eine systemische Immunreaktion stimulieren. Konkret verfolgten Leschner et al. (J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773) den Infektionsweg im Zeitverlauf, nachdem sie Mäusen mit CT26-Tumoren fluoreszierende Salmonellen intravenös injiziert hatten. Die Ergebnisse zeigten, dass unmittelbar nach der Infektion eine systemische Infektion durch das Blut der Mäuse vorlag, nach 20 Minuten Salmonellen in Milz und Leber akkumulierten und nach 24 Stunden Salmonellen nur noch kon-

zentriert im Tumorgewebe vorhanden waren. Dies deutet darauf hin, dass Salmonella im Vergleich zu anderen Stämmen effektiver in der Immuntherapie gegen Krebs eingesetzt werden kann, da es nach der Stimulation einer systemischen Immunreaktion in Milz und Leber auf den Krebs abzielt und die lokale Immunität aktiviert.

[0004] Salmonella ist jedoch ein typischer Erreger von Lebensmittelvergiftungen, der bei einer Infektion anderer Gewebe als Tumoren durch eine abnormale Wirtsreaktion eine lebensbedrohliche Sepsis verursachen kann. Ein Forscherteam der Yale University in den USA berichtete, dass gentechnisch veränderte Salmonellen ihre tumorangreifenden Eigenschaften beibehalten und gleichzeitig ihre Toxizität durch Abschwächung beseitigt werden können, und dass die Injektion dieser abgeschwächten Salmonellen eine Immunstimulation induzieren und Tumore unterdrücken kann. Daher werden aktiv Studien zu transformierten Stämmen durchgeführt, die es abgeschwächten Salmonellen ermöglichen, antineoplastische Substanzen zu exprimieren. Abgeschwächte Salmonellen haben jedoch eine geringe Überlebensfähigkeit und reduzierte immunstimulierende Fähigkeit, und es besteht die Sorge, dass der abgeschwächte Stamm durch Mutation in wilde Salmonellen umgewandelt werden und eine Sepsis verursachen könnte, sodass zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind.

[0005] Um die geringe immunstimulierende Fähigkeit abgeschwächter Salmonellen zu kompensieren, wurden Studien durchgeführt, um Salmonella-Stämme zu entwickeln, die zusätzliche Substanzen exprimieren oder hemmen können, die bei der Krebsbehandlung hilfreich sind, und diese in der Krebsbehandlung einzusetzen. Das koreanische Patent Nr. 10-0852687 offenbart einen Salmonella-Stamm, der Tumornekrosefaktor-alpha exprimiert, der durch Transformation eines Tumornekrosefaktor-alpha-Proteinvektors in einen abgeschwächten Salmonella-Stamm hergestellt wurde, und eine antineoplastische therapeutische Zusammensetzung, die diesen enthält. Das koreanische Patent Nr. 10-1750007 offenbart ein Therapeutikum für solide Tumore unter Verwendung eines abgeschwächten Salmonella-Stamms, bei dem L-Asparaginase selektiv an der Tumorstelle exprimiert werden kann. Die oben genannten Salmonella-Stämme haben zwar die antineoplastische Aktivität durch Expression antineoplastischer Substanzen zusätzlich verstärkt, bergen aber immer noch das Risiko, dass der abgeschwächte Stamm in wilde Salmonellen umgewandelt wird und eine Sepsis verursacht. Wenn antineoplastische Substanzen im Körper exprimiert werden, kann der Salmonella-Stamm selbst durch die physiologische Aktivität der antineoplastischen Substanz absterben, sodass der Salmonella-Stamm nach der Targetierung des Tumorbere-

reichs stabil überleben und die antineoplastische Substanz kontinuierlich exprimieren und sezernieren können muss, um die Anti-Krebs-Wirksamkeit sowohl der antineoplastischen Substanz als auch der Salmonellen gleichzeitig zu gewährleisten.

[0006] Streptavidin hat eine sehr schnelle Bindungsgeschwindigkeit mit Biotin und eine sehr starke Bindungskraft ($K_d = 10^{-15}$ M), die wenig durch pH, Temperatur oder organische Lösungsmittel beeinflusst wird, und wird daher nützlich für den Nachweis oder die Reinigung bestimmter Proteine verwendet. Die koreanische Patentanmeldung Nr. 10-2022-0058461 offenbart, dass ein Gen, das für Streptavidin kodiert, in eine auf Krebs abzielende Wirtszelle eingeführt werden kann, um bei der Krebsdiagnose verwendet zu werden. In diesem Patent konnte jedoch die Expression von Streptavidin nur durch eine bestimmte Struktur des Genkonstrukts erhöht werden, während die Bindungsfähigkeit an Biotin erhalten blieb, da bei alleiniger Einführung des Streptavidin-Gens die Expression gering war und bei zusätzlicher Einführung von Maltose-bindendem Protein zur Erhöhung der Expression die Bindungsfähigkeit an Biotin abgeschwächt wurde. Außerdem verblieb das Streptavidin nach diesem Genkonstrukt im periplasmatischen Raum der Wirtszelle und wurde nicht sezerniert. Wenn Streptavidin jedoch nur im Inneren des Stamms verbleibt, bindet es nur an Biotin-haltige Substanzen, die vom Stamm aufgenommen wurden, was die Nutzbarkeit eher verringert, und insbesondere wenn es als antineoplastisches Adjuvans verwendet wird, wird das extern verabreichte antineoplastische Mittel nicht auf die Tumorzellen, sondern auf das Innere der Wirtszelle abgezielt, wodurch es schwierig ist, eine antineoplastische Wirksamkeit zu erreichen. Außerdem kann die Akkumulation des exprimierten Streptavidins in der Wirtszelle, da es nicht sezerniert werden kann, auch das Überleben der Wirtszelle beeinflussen.

Inhalt der Erfindung

Technische Aufgabe

[0007] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, zur Lösung der Probleme des Standes der Technik ein Genkonstrukt bereitzustellen, das die stabile Expression und Sekretion eines Fusionsproteins mit Biotinbindungsfähigkeit ermöglicht.

[0008] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, einen antineoplastischen rekombinanten Stamm und eine diesen enthaltende antineoplastische Zusammensetzung bereitzustellen, der durch das oben genannte Konstrukt transformiert wurde, ein Fusionsprotein mit Biotinbindungsfähigkeit sezerniert und auf den Tumorbereich abzielt, wodurch er

selbst eine immunologische antineoplastische Aktivität gegen den Tumor aufweist.

[0009] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein antineoplastisches Adjuvans oder ein Tumorbildgebungs-Adjuvans bereitzustellen, das die antineoplastische Wirksamkeit oder die Bildgebungswirksamkeit verbessern kann, indem es extern verabreichte, mit Biotin verbundene antineoplastische Mittel oder mit Biotin verbundene Kontrastmittel für die Tumorbildgebung auf den Tumorbereich abzielt.

[0010] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Bereitstellung von Informationen für die Krebsdiagnose unter Verwendung des oben genannten Tumorbildgebungs-Adjuvans bereitzustellen.

Technische Lösung

[0011] Um die oben genannten Ziele zu erreichen, betrifft die vorliegende Erfindung ein Genkonstrukt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Anti-Sigma-Faktor-flgM-Gen und ein für Streptavidin (im Folgenden als 'Stv' abgekürzt) kodierendes Gen verbunden sind, um für ein Fusionsprotein aus flgM und Stv (im Folgenden als 'flgM-Stv' abgekürzt) zu kodieren. Insbesondere ist das durch das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung exprimierte flgM-Stv dadurch gekennzeichnet, dass es Biotinbindungsfähigkeit besitzt.

[0012] Sofern in dieser Beschreibung nicht anders definiert, haben alle wissenschaftlichen und technischen Begriffe, die in dieser Beschreibung verwendet werden, die gleiche Bedeutung, die dem Fachmann auf dem Gebiet, zu dem die Erfindung gehört, allgemein verständlich ist. Außerdem wird bei der Erklärung der Erfindung auf eine detaillierte Erklärung des bekannten Standes der Technik im Zusammenhang mit der Erfindung verzichtet, wenn diese die wesentlichen Aspekte der Erfindung unnötig verschleiern könnte.

[0013] Das durch das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung exprimierte flgM-Stv kann in sezernierter Form oder innerhalb des flgM-Stv exprimierenden Stamms wie Streptavidin an Biotin binden, wodurch die biologische Äquivalenz von Streptavidin und flgM-Stv hinsichtlich der Biotinbindungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte.

[0014] In dem Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung können das flgM-Gen und das für Stv kodierende Gen direkt verbunden sein oder über einen Linker verbunden sein. In den folgenden Beispielen werden die SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 der Konstrukte beispielhaft dargestellt, die über einen Linker verbunden sind, der für eine Aminosäurese-

quenz bestehend aus HIS*6-SGG (SEQ ID NO: 5) oder GGSSSS-HIS*6-SGG (SEQ ID NO: 6) kodiert, sind aber nicht darauf beschränkt. Die folgenden Beispiele zeigen, dass beide Stämme flgM-Stv unabhängig von der Linkerlänge exprimierten und die Expressionseffizienz je nach Linkerlänge variieren kann. Daher ist es selbstverständlich, dass eine weitere Linker-Optimierung durchgeführt werden kann, um eine bessere Expressionseffizienz zu erreichen, aber für den Fachmann ist es einfach, die Länge oder Sequenz des Linkers entsprechend zu modifizieren.

[0015] Um die Expressionseffizienz zu verbessern, kann eine Shine-Dalgarno-Sequenz am 5'-Ende des Genkonstrukts der vorliegenden Erfindung platziert werden. Es ist auch selbstverständlich, dass geeignete Restriktionsenzyme am 5'- und 3'-Ende platziert werden können, um das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung in einen Vektor einzuführen. In den folgenden Beispielen wurde zur einfacheren Detektion des Fusionsproteins ein doppelter His-Tag in der Mitte und ein Flag-Tag am Ende exprimiert, dies ist jedoch nicht essentiell, und die Art der Tags kann je nach Bedarf variiert werden.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen rekombinanten Expressionsvektor, der das oben genannte Genkonstrukt enthält. In der vorliegenden Erfindung ist ein „Vektor“ ein DNA-Konstrukt, das funktionell mit dem Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung verbunden ist, um es in einem geeigneten Wirt zu exprimieren, und kann ein Plasmid, ein Phagenpartikel oder ein potenzielles genomisches Insert sein. In der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die Begriffe Plasmide und Vektoren manchmal austauschbar verwendet. Es ist selbstverständlich, dass der Expressionsvektor je nach Sequenz des Genkonstrukts mit hoher Effizienz ausgewählt und verwendet werden kann.

[0017] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen antineoplastischen rekombinanten Stamm, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er durch das oben genannte, funktionell mit einem induzierbaren Promotor verbundene Genkonstrukt transformiert wurde, ein flgM-Stv mit Biotinbindungsfähigkeit exprimiert und sezerniert und auf Tumorzellen abzielt. Der Stamm der vorliegenden Erfindung ist bekanntermaßen auf Tumore abzielend und weist eine immunologische antineoplastische Aktivität auf, und es kann jeder Stamm verwendet werden, der für den Menschen ungefährlich ist. Beispiele für solche Stämme sind *Escherichia coli*, abgeschwächte *Salmonellen*, *Shigella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria*, *Clostridium* oder Darmbakterien (nützliche Bakterien), Probiotika usw., sind aber nicht darauf beschränkt.

[0018] Der rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung kann unter Verwendung eines rekombi-

nanten Expressionsvektors, der das oben genannte Genkonstrukt enthält, transformiert werden. Die Transformationsmethode folgt konventionellen Methoden und kann beispielsweise die Calciumchlorid-Methode, Elektroporation usw. verwenden, ist aber nicht darauf beschränkt. Der rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass er durch die Wirkung von flgM das durch das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung kodierte flgM-Stv nicht nur in der Zelle exprimiert, sondern auch nach außerhalb des Stamms sezerniert. Da flgM-Stv sezerniert wird, wird es im Körper nicht über eine bestimmte Konzentration hinaus angereichert, auch wenn der Stamm flgM-Stv kontinuierlich exprimiert, sodass das Überleben des Stamms durch das exprimierte flgM-Stv nicht gefährdet wird und eine stabile Expression möglich ist.

[0019] Darüber hinaus kann der Stamm der vorliegenden Erfindung die Bindung von flgM-Stv und Biotin durch die Sekretion von flgM-Stv mit Biotinbindungsfähigkeit breiter nutzen. Wenn flgM-Stv nur im Inneren des Stamms exprimiert wird und vorhanden ist, muss die extern verabreichte mit Biotin verbundene Substanz in den Stamm aufgenommen werden, um an Biotin binden zu können. Daher akkumuliert die mit Biotin verbundene Substanz im Inneren des Stamms und kommt nicht direkt mit den Tumorzellen in Kontakt. Wenn der Stamm dagegen auf den Tumor abzielt und flgM-Stv nicht nur exprimiert, sondern auch an die Tumorzellen sezerniert, kann er die mit Biotin verbundene Substanz auf den Tumor abzielen und direkt auf die Tumorzellen wirken lassen. Auch wenn sich das sezernierte flgM-Stv teilweise ausbreitet, wird es in höchster Konzentration im Tumor vorhanden sein, auf den der Stamm abzielt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Avidin-ähnliche Proteine bei Injektion in vivo schnell im Serum abgebaut werden, sodass auch das vom Stamm sezernierte und in Bereiche außerhalb des Tumors diffundierte flgM-Stv schnell abgebaut wird und seine Biotinbindungsfähigkeit verliert, wodurch es die Targetierung der mit Biotin verbundenen Substanz nicht beeinflusst.

[0020] In dieser Beschreibung bedeutet „funktionell mit einem induzierbaren Promotor verbunden“, dass die Funktion des verbundenen Gens durch eine Induktorsubstanz geschaltet werden kann. Der induzierbare Promotor kann beispielsweise ein tac-Promotor, lac-Promotor, lacUV5-Promotor, lpp-Promotor, pL_A-Promotor, pR_A-Promotor, rac5-Promotor, amp-Promotor, recA-Promotor, SP6-Promotor, trp-Promotor, T7-Promotor, pBAD-Promotor, Tet-Promotor, trc-Promotor, pepT-Promotor, sulA-Promotor, pol11(dinA)-Promotor, ruv-Promotor, uvrA-Promotor, uvrB-Promotor, uvrD-Promotor, umuDC-Promotor, lexA-Promotor, cea-Promotor, caa-Promotor, recN-

Promotor, pagC-Promotor, hip-Promotor, ansB-Promotor oder pflE-Promotor sein.

[0021] Insbesondere kann der Stamm der vorliegenden Erfindung ein abgeschwächter Salmonella-Stamm sein. Im Gegensatz zu anderen Stämmen kann Salmonella in Leber und Milz eindringen und eine systemische Immunreaktion stimulieren, wodurch die immunologische antineoplastische Aktivität überlegen ist. „Abschwächung“ bedeutet die künstliche Abschwächung der Toxizität eines lebenden Pathogens, wobei Gene, die am essentiellen Metabolismus des Pathogens beteiligt sind, mutiert werden, sodass es im Körper keine Krankheit verursachen kann und nur das Immunsystem stimuliert, um Immunität zu induzieren. Die für die Abschwächung von Salmonella verantwortlichen Gene sind in der Fachwelt gut bekannt und können durch Funktionsverlust eines oder mehrerer Gene erreicht werden, die aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus aroA, aroC, aroD, aroE, Rpur, htrA, ompR, ompF, ompC, galE, cya, crp, cyp, phoP, phoQ, rfaY, dksA, hupA, sipC, clpB, clpP, clpX, pab, nadA, pncB, pmi, rpsL, hemA, rfc, poxA, galU, cdt, pur, ssa, guaA, guaB, flhD, flgK, flgL, relA und spoT. Um eine Reversion zum Wildtyp bei der In-vivo-Anwendung zu verhindern und die Toxizität weiter abzuschwächen, können zwei oder mehr der oben genannten Gene funktionell inaktiviert werden.

[0022] Insbesondere konnte bei der Expression von flgM-Stv in einem abgeschwächten Salmonella-Stamm festgestellt werden, dass die Geißeln verschwanden, wodurch die Motilität gehemmt oder sogar verloren ging. Dies bedeutet, dass sich der Sicherheitsaspekt erheblich verbessert, da die Bewegung zu anderen Organen durch die Expression von flgM-Stv nach der Targetierung des Tumorbereichs eingeschränkt wird. Konkret kann der Stamm der Stamm S-flgM-streptavidin-pBAD18-ASD+/BRD509 asdmit der Hinterlegungsnummer KCTC15482BP sein, der am 26. Juni 2023 beim Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, hinterlegt wurde, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine antineoplastische Zusammensetzung, die den oben genannten antineoplastischen rekombinanten Stamm als Wirkstoff enthält. Der antineoplastische rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung kann als antineoplastische Zusammensetzung verwendet werden, da er selbst auf den Tumorbereich abzielt und eine immunologische antineoplastische Aktivität aufweist.

[0024] Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann nach bekannten Verfahren im pharmazeutischen Bereich zur Verwendung als Arzneimittel hergestellt werden und kann allein oder in

Mischung mit pharmazeutisch akzeptablen Trägern, Hilfsstoffen, Verdünnungsmitteln usw. verwendet werden.

[0025] Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann als orale oder parenterale Darreichungsform formuliert werden. Die Dosis des Wirkstoffs der vorliegenden Erfindung kann je nach Absorption der aktiven Komponente im Körper, Darreichungsform, Alter, Geschlecht und Zustand des Patienten, Schweregrad der Symptome usw. entsprechend ausgewählt werden, und die Verabreichung kann einmal täglich oder in mehreren geteilten Dosen erfolgen. Die allgemeine Dosis beträgt 0,001 mg/kg·Tag bis 10 g/kg·Tag.

[0026] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein antineoplastisches Adjuvans, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es den oben genannten antineoplastischen rekombinanten Stamm als Wirkstoff enthält und zusammen mit einem antineoplastischen Mittel verabreicht wird, das mit einer Substanz markiert ist, die spezifisch an Stv bindet. Als Substanz, die spezifisch an Stv bindet, kann beispielsweise Biotin genannt werden, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0027] Wie oben beschrieben, zielt der Stamm der vorliegenden Erfindung auf Tumorzellen ab und sezerniert nach Induktion durch eine Induktorsubstanz flgM-Stv mit Biotinbindungsfähigkeit an die Tumorzellen, sodass bei gemeinsamer Verabreichung mit einem antineoplastischen Mittel in Biotin-gebundener Form das antineoplastische Mittel auf die Tumorzellen abgezielt werden kann. Dadurch können die Nebenwirkungen des antineoplastischen Mittels auf andere Organe minimiert und die antineoplastische Aktivität erhöht werden, und eine antineoplastische Aktivität kann auch mit einer geringeren Dosis erreicht werden, wodurch die Belastung der Patienten durch Nebenwirkungen reduziert werden kann. Auf diese Weise kann der rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung als antineoplastisches Adjuvans verwendet werden, das zusammen mit einem antineoplastischen Mittel in Biotin-gebundener Form verabreicht wird. Als antineoplastische Mittel können alle Arten von Nanopartikeln, Antikörpern, antineoplastischen Proteinen oder niedermolekularen Substanzen verwendet werden, die selbst keine oder nur eine geringe Fähigkeit zur Targetierung von Tumorzellen haben, aber eine antineoplastische Aktivität aufweisen und mit einer Substanz markiert werden können, die spezifisch an Stv bindet. Wie aus den Ergebnissen der Tumorbildgebung mit Farbstoffen in den folgenden Beispielen ersichtlich ist, kann der rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung durch die Bindung von flgM-Stv und Biotin die Ausscheidung des antineoplastischen Mittels hemmen und so das antineoplastische Mittel als Retardpräparat wirken lassen.

[0028] Der antineoplastische rekombinante Stamm der vorliegenden Erfindung kann auch als Tumorbildgebungs-Adjuvans verwendet werden, das die Bildungseffizienz von Tumorgewebe verbessern kann, indem es zusammen mit einem Kontrastmittel in Biotin-gebundener Form verabreicht wird und das Kontrastmittel auf den Tumorbereich abzielt. Als Kontrastmittel können eines oder mehrere ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus radioaktiven Nukliden, Fluoreszenzmarkierungen, Enzymmarkierungen, Chemilumineszenzmarkern, Goldpräparaten und magnetischen Präparaten, und die Bestimmung des Bildgebungsverfahrens je nach Art des Kontrastmittels wird für den Fachmann einfach sein. Das Tumorbildgebungs-Adjuvans der vorliegenden Erfindung verbessert nicht nur die Effizienz der Tumorbildgebung, sondern weist auch selbst eine antineoplastische Aktivität auf, wodurch es für Krebspatienten noch vorteilhaftere Wirkungen erzielen kann.

[0029] Das Tumorbildgebungs-Adjuvans der vorliegenden Erfindung kann nützlich für die Bereitstellung von Informationen für die Krebsdiagnose verwendet werden. Beispielsweise kann die Bereitstellung von Informationen für die Krebsdiagnose durch ein Verfahren erfolgen, das umfasst: (A) Verabreichung des Tumorbildgebungs-Adjuvans der vorliegenden Erfindung an einen Krebsverdachtspatienten oder einen Patienten unter antineoplastischer Therapie zur Targetierung von Tumorzellen; (B) Induktion der Expression des Fusionsproteins aus flgM und Streptavidin im rekombinanten Stamm des Tumorbildgebungs-Adjuvans; (C) Verabreichung eines Kontrastmittels in Biotin-gebundener Form; und (D) Detektion und Bildgebung des Kontrastmittels. Die Schritte sind jedoch nicht darauf beschränkt, und je nach Art und Eigenschaften des Stamms und des Kontrastmittels können beispielsweise die Schritte (B) und (C) gleichzeitig durchgeführt werden, oder die Schritte (A) und (C) können gleichzeitig durchgeführt werden, oder zusätzliche Schritte können hinzugefügt werden, was selbstverständlich ist.

Wirkungen der Erfindung

[0030] Wie oben beschrieben, ermöglicht das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung die Sekretion eines Fusionsproteins mit Biotinbindungsfähigkeit, wenn es in einen antineoplastischen Stamm eingeführt wird, der auf Tumorzellen abzielt und eine immunologische antineoplastische Aktivität aufweist.

[0031] Daher kann der antineoplastische rekombinante Stamm, der das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung enthält, nicht nur selbst eine antineoplastische Aktivität aufweisen, sondern auch als antineoplastisches Adjuvans oder Tumorbildgebungs-Adjuvans verwendet werden, das die antineoplastische Wirksamkeit und die Tumorbildgebungs-

wirksamkeit verbessern kann, indem es zusammen mit antineoplastischen Mitteln oder Kontrastmitteln, die keine Tumor-Targetierungsfunktion haben, aber mit Biotin verbunden sind, verabreicht wird und das antineoplastische Mittel oder Kontrastmittel durch die spezifische Bindung von Biotin und Streptavidin auf den Tumor abzielt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 ist eine Zeichnung, die die Aminosäuresequenz von monomerem Streptavidin und dem Linker zeigt.

Fig. 2 ist eine Zeichnung, die die DNA-Basensequenz eines Ausführungsbeispiels zeigt, die für die Herstellung eines Plasmids zur Expression des flgM-Stv-Fusionsproteins entworfen wurde.

Fig. 3 ist eine Zeichnung, die die DNA-Basensequenz eines anderen Ausführungsbeispiels zeigt, die für die Herstellung eines Plasmids zur Expression des flgM-Stv-Fusionsproteins entworfen wurde.

Fig. 4 ist ein Elektrophorese-Foto, das die Quantifizierung von flgM-Stv im Kulturmedium des mit den oben genannten Plasmiden transformierten Stamms zeigt.

Fig. 5 ist ein schematisches Diagramm und ein Ergebnisgraph des HABA-Assays, der die Biotinbindungsfähigkeit des von einem Ausführungsbeispiel des Stamms der vorliegenden Erfindung sezernierten flgM-Stv zeigt.

Fig. 6 ist ein Fluoreszenzmikroskop-Bild und ein Quantifizierungsgraph, der die Ergebnisse des Biotin-Aufnahme-Assays für ein Ausführungsbeispiel des Stamms der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 7 ist ein Bild und ein Graph, der die Ergebnisse der Tumorbildgebung unter Verwendung eines Ausführungsbeispiels des Stamms der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 8 ist ein Bild, das die Hemmung der Motilität des Stamms durch Induktion der Expression von flgM-Stv zeigt.

Fig. 9 ist ein TEM-Bild, das die morphologischen Veränderungen des Stamms nach Induktion der Expression von flgM-Stv zeigt.

Beste Art zur Ausführung der Erfindung

[0032] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der beigefügten Zeichnungen und Ausführungsbeispiele näher erläutert. Diese Zeichnungen und Ausführungsbeispiele dienen jedoch nur der beispielhaften Erläuterung des Inhalts und Umfangs der technischen Idee der vorliegenden Erfindung und sind nicht als Einschränkung oder Änderung des

technischen Umfangs der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Basierend auf diesen Beispielen wird es für den Fachmann selbstverständlich sein, dass im Rahmen der technischen Idee der vorliegenden Erfindung verschiedene Modifikationen und Änderungen möglich sind.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1: Herstellung eines Plasmids zur Expression des Streptavidin-Fusionsproteins

[0033] Es wurde ein Plasmid hergestellt, das flgM-Protein, das durch das Basalkörper- und Hakensystem nach außen sezerniert wird, mit Stv fusioniert.

[0034] Zunächst wurde ein Gen entworfen, das ein Fusionsprotein aus flgM und Stv exprimieren kann. Der Aminosäuresequenz des monomeren Stv (SEQ ID NO: 3) wurde eine Flag-Tag-Sequenz (SEQ ID NO: 4) zur Detektion hinzugefügt, und als Linker für die Fusion mit dem flgM-Protein wurde ein Linker mit 6 Histidinen (SEQ ID NO: 5) oder ein GS-Linker mit 6 Histidinen (SEQ ID NO: 6) verwendet. **Fig. 1** zeigt die Verbindung des Linkers mit monomerem Stv und Flag-Tag.

[0035] Die DNA-Basensequenz von flgM des Wildtyp-Salmonella (flgM Anti-Sigma-28-Faktor FlgM [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2] Gen-ID: 1252690, Locus tag STM1172 NC_003197.2 (1257036..1257341, complement)) wurde mit der DNA-Sequenz verbunden, die durch Salmonella-Codon-Optimierung aus der Aminosäuresequenz des monomeren Streptavidins (His-streptavidin-Flag oder His-GS LINKER-streptavidin-Flag in **Fig. 1**) umgewandelt wurde. Um die Expression des flgM-Gens zu erhöhen, wurden 14 Shine-Dalgarno-Sequenzen (SEQ ID NO: 7) vor dem flgM-Gen eingefügt, und für das Klonieren wurde eine NheI-Site am 5'-Ende eingefügt und eine SacI-Site nach dem Stopcodon des Flag-Tags eingefügt. **Fig. 2** und **Fig. 3** zeigen jeweils die Basensequenzen von flgM-his-streptavidin-flag tag und flgM-GS LINKER-his-streptavidin-flag tag, die durch diesen Prozess entworfen wurden. In **Fig. 2** und **Fig. 3** sind die für flgM kodierende Sequenz und die für Stv kodierende Sequenz getrennt dargestellt. Die Gensynthese wurde bei Cosmo Genetech Co., Ltd. in Auftrag gegeben. Die Sequenzen ohne die Restriktionsenzym-Sites und Shine-Dalgarno-Sequenz entsprechen den Genen (SEQ ID NO: 1 und 2), die für das Fusionsprotein aus flgM und Stv (im Folgenden als „flgM-Stv“ bezeichnet) kodieren.

[0036] Die jeweils synthetisierten flgM-his-streptavidin-flag tag und flgM-GS LINKER-his-streptavidin-flag tag wurden mit je 10U NheI (Takara) und SacI (Takara) bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt

und DNA von etwa 760 bp wurde mit einem Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert, um Insert-DNA für jedes flgM-Stv-Fusionsprotein zu erhalten.

[0037] Das pBad18 asd Plasmid (von Prof. Lim Hun-man, Chungnam National University) wurde mit je 10U NheI und SacI bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, und das Reaktionsprodukt wurde mit einem PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, um Vektor-DNA zu erhalten. Die Vektor-DNA wurde mit den beiden flgM-Stv Inserts bei 25°C für 30 Minuten jeweils ligiert (Invitron) und in DH5a kompetente Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB amp Festmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert, um Antibiotika-resistente Kolonien jeweils zu selektieren. Je 6 Kandidaten-Kolonien wurden ausgewählt und mit je 10U NheI und SacI bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, und die Bildung einer 760 bp Bande wurde durch Elektrophorese bestätigt. Die Nukleotidsequenz dieser Kandidaten wurde von Cosmo Genetech Co., Ltd. analysiert, um die Insertion der Gene mit den SEQ ID NO: 1 oder 2 zu bestätigen und die Plasmide flgM-his-streptavidin-flag tag und flgM-GS linker-his-streptavidin-flag tag zur Sekretion von flgM-Stv zu etablieren.

Ausführungsbeispiel 2: Herstellung eines abgeschwächten Salmonella-Stamms, der flgM-Stv mit Biotinbindungsfähigkeit sezerniert

1) Transformation des abgeschwächten Salmonella-Stamms und Bestätigung der Sekretion von flgM-Stv

[0038] Ein abgeschwächter Salmonella-Stamm wurde mit den in Ausführungsbeispiel 1 hergestellten Plasmiden flgM-his-streptavidin-flag tag und flgM-GS linker-his-streptavidin-flag tag transformiert und die Expression des flgM-Stv-Fusionsproteins wurde bestätigt. Als abgeschwächter Salmonella-Stamm wurde ein aroA aroD asd- Stamm (von Prof. Lim Hun-man, Chungnam National University) verwendet.

[0039] Eine Einzelkolonie jedes transformierten Stamms wurde in LB amp Flüssigmedium angeimpft und bei 37°C für 12-16 Stunden unter Schütteln inkubiert. Danach wurde in frischem LB amp Flüssigmedium auf OD₆₀₀ 0,05 verdünnt und bei 37°C für 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 durch Schüttelinkubation wurde Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 0,2 w% zugegeben und bei 37°C für weitere 5 Stunden unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle wurde ohne Arabinose-Zugabe unter identischen Bedingungen inkubiert. Der Kulturüberstand wurde durch Zentrifugation bei 3000 rpm abgetrennt und durch einen 0,2 µm Filter filtriert, um die Bakterien vollständig zu entfernen.

[0040] Die Menge an flgM-Stv im zellfreien Überstand wurde mittels Western Blot bestimmt. **Fig. 4** zeigt das Elektrophorese-Foto der Ergebnisse, wobei Spuren 1, 2 den mit flgM-his-streptavidin-flag tag Plasmid und Spuren 3, 4 den mit flgM-GS linker-his-streptavidin-flag tag Plasmid transformierten Stamm zeigen, und Spuren 1, 3 den Kulturüberstand der Versuchsgruppe ohne Arabinose-Behandlung und Spuren 2, 4 den Kulturüberstand der Versuchsgruppe mit Arabinose-Behandlung zeigen. **Fig. 4** zeigt, dass bei beiden Stämmen das Fusionsprotein im Kulturüberstand nach Arabinose-Behandlung nachgewiesen wurde, und der mit flgM-GS linker-his-streptavidin-flag tag Plasmid transformierte Salmonella-Stamm eine deutlich überlegene Sekretionsfähigkeit für das flgM-Stv-Fusionsprotein im Vergleich zum mit flgM-his-streptavidin-flag tag Plasmid transformierten Salmonella-Stamm aufwies. Daher wurde der Stamm mit überlegener flgM-Stv-Sekretionsfähigkeit, der mit flgM-GS linker-his-streptavidin-flag tag Plasmid transformiert wurde, als S-flgM-streptavidin-pBAD18-ASD+/BRD509 asd- bezeichnet und am 26. Juni 2023 beim Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology hinterlegt (Hinterlegungsnummer KCTC15482BP).

[0041] Im Folgenden wurde der Stamm S-flgM-streptavidin-pBAD18-ASD+/BRD509 asd- verwendet, um die Wirksamkeit der Expression des flgM-Stv-Fusionsproteins zu testen.

2) Bestätigung der Biotinbindungsfähigkeit von flgM-Stv (HABA-Assay)

[0042] Die Biotinbindungsfähigkeit von flgM-Stv wurde unter Verwendung von HABA (2-(4'-HydroxyAzoBenzene)Benzoic Acid) bestätigt. Der durch die Bindung von HABA und Streptavidin gebildete Komplex absorbiert Licht bei 500 nm. Wenn daher das in den Kulturüberstand sezernierte flgM-Stv die Bindungsfähigkeit von Streptavidin beibehält, sollte es in Lösung an HABA binden und die Absorption bei 500 nm erhöhen. Da Biotin außerdem stärker an Streptavidin bindet als HABA, sollte bei ausreichender Biotin-Konzentration in der Lösung und wenn flgM-Stv die Biotinbindungsfähigkeit von Streptavidin beibehält, flgM-Stv an Biotin binden und keinen Komplex mit HABA bilden, wodurch keine Änderung der Absorption bei 500 nm auftreten sollte.

[0043] Konkret wurde eine Einzelkolonie des in 1) hergestellten flgM-Stv-Fusionsprotein exprimierenden abgeschwächten Salmonella-Stamms in 20 mL LB amp Flüssigmedium gegeben und bei 37°C für 16 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde in frischem LB amp Flüssigmedium auf OD₆₀₀ 0,05 verdünnt und bei 37°C für weitere 2 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 kultiviert. Danach wurden 200 µL 20% (w/v) Arabinose zugegeben, um eine Endkonzentra-

tion von 0,2% zu erreichen, und bei 37°C unter Kultivierung wurden stündlich 1 mL Kulturproben entnommen. Der Kontrolle wurde das gleiche Volumen PBS zugegeben. Der Kulturüberstand wurde durch Zentrifugation bei 3000 rpm abgetrennt und durch einen 0,2 µm Filter filtriert, um die Bakterien vollständig zu entfernen. Zu 100 µL des zellfreien Kulturüberstands wurden HABA-Reagenz und 100 µL Biotin-Lösung (1 mg/50 mL) gegeben und für 1 Stunde bei 600 rpm unter Verwendung eines Vortexmischers gemischt. Der Kontrolle wurden statt Biotin 100 µL PBS zugegeben und unter identischen Bedingungen gemischt. Nach 1 Stunde wurde der OD₅₀₀-Wert gemessen.

[0044] **Fig. 5** zeigt das schematische Diagramm und den Ergebnisgraphen des HABA-Assays zur Bestätigung der Biotinbindungsfähigkeit von flgM-Stv. Bei den Ergebnissen der Proben ohne Biotin-Zugabe zeigte sich bis 2 Stunden nach Arabinose-Induktion keine Änderung der Absorption bei 500 nm, danach stieg die Absorption allmählich an, was die Komplexbildung mit HABA zeigt. Dies bedeutet erstens, dass flgM-Stv wie Streptavidin eine Bindungsfähigkeit zu HABA besitzt, und zweitens, dass flgM-Stv spätestens 2 Stunden nach Arabinose-Induktion sezerniert zu werden beginnt. Bei Zugabe von Biotin zur Lösung gab es keine Änderung der Absorption bei 500 nm, was beweist, dass flgM-Stv stark an Biotin bindet.

[0045] Dies bestätigte, dass das sezernierte flgM-Stv wie Streptavidin eine starke Bindung mit Biotin eingeht.

3) Bestätigung der Biotinbindungsfähigkeit des flgM-Stv exprimierenden Stamms (Biotin-Aufnahme-Assay)

[0046] Die Biotinbindungsfähigkeit des transformierten rekombinanten Stamms selbst wurde mittels Biotin-Aufnahme-Analyse bewertet. Dafür wurde das Pellet verwendet, das zusammen mit dem Überstand nach Zentrifugation der zu verschiedenen Zeitpunkten in 2) entnommenen Proben erhalten wurde. Das als Pellet abgetrennte Bakterienpellet wurde in 1 mL PBS resuspendiert. Es wurden 100 µL einer mit Biotin konjugierten Fluoreszenzsonde (Bioacts cat# RFP0613, Anregungs-/Emissionswellenlänge = 749nm/774nm) Lösung (1 mg/5mL) zugegeben und für 1 Stunde bei 600 rpm auf einem Vortexmischer gemischt, die Proben gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. **Fig. 6** zeigt die Fluoreszenzmikroskopie-Bilder und den mit ImageJ-Software quantifizierten Graphen. Aus **Fig. 6** ist ersichtlich, dass bei dem Stamm, bei dem die Expression von flgM-Stv durch Arabinose induziert wurde, ein Fluoreszenzsignal durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an Biotin gemessen wurde und der Anteil mit der Induktionszeit zunahm.

4) Tumorbildgebung

[0047] Die Verwendbarkeit des Stamms der vorliegenden Erfindung für die Targetierung von Biotin-gebundenen Substanzen auf Tumore wurde durch in-vivo-Tumorbildgebungsanalyse bestätigt.

[0048] Konkret wurden 4T1-Zellen mit 5×10^5 Zellen / 60 μ L PBS subkutan in den linken Oberschenkel von Balb/c-Nacktmäusen (weiblich) injiziert und für 2 Wochen kultiviert, um Tumore zu induzieren. Diesen Mäusen wurde der Stamm S-flgM-streptavidin-pBAD18-ASD+/BRD509 asd- in einer Konzentration von 5×10^6 cfu / 60 μ L PBS intravenös injiziert. 72 Stunden nach Injektion des Stamms wurden 200 μ L 20% (w/v) Arabinose intraperitoneal injiziert, und 4 Stunden später wurden 20 μ L einer mit Biotin konjugierten Fluoreszenzsonden-Lösung (20 μ g/mL), identisch mit der in 3) verwendeten, subkutan in den Tumorbereich injiziert. Anschließend wurden die Mäuse unter Inhalationsnarkose gesetzt und das Fluoreszenzsignal zu verschiedenen Zeitpunkten mittels IVIS (in vivo imaging system) überprüft.

[0049] Fig. 7 zeigt, dass trotz Injektion der gleichen Menge an Fluoreszenzsonde das Fluoreszenzsignal durch die Bindung von Biotin und flgM-Stv, die die Ausscheidung des Farbstoffs hemmt, nicht nur länger anhält, sondern auch insgesamt ein höheres Signal beobachtet wird. Dies bedeutet, dass die gleiche Bildgebungsempfindlichkeit auch bei drastischer Reduzierung der für die Tumorbildgebung erforderlichen Kontrastmittelmengen erreicht werden kann. Auch bei Verwendung zur Targetierung von antineoplastischen Mitteln deutet dies darauf hin, dass durch die Targetierung des antineoplastischen Mittels die gleiche Wirksamkeit im Tumorbereich auch mit einer geringeren Menge des antineoplastischen Mittels erreicht werden kann, wodurch nicht nur Nebenwirkungen reduziert werden können, sondern auch eine Retardwirkung durch Hemmung der Ausscheidung des antineoplastischen Mittels erzielt werden kann.

5) Motilitätstest des Salmonella-Stamms

[0050] Während der Kultivierung des Stamms wurde eine interessante Beobachtung gemacht, dass die Expression von flgM-Stv die Motilität des Stamms zu beeinflussen schien. Daher wurde die Motilität des Stamms in Abhängigkeit von der flgM-Stv-Expression formal unter Verwendung von Soft Agar Tryptone Platten (pro Liter: 10g Bacto Tryptone(BD:211705), 5g NaCl(Biosesang S1009), und 3g Bacto Agar(BD:214010)) getestet.

[0051] Auf Soft Agar Tryptone Platten mit oder ohne 0,2% Arabinose wurden jeweils eine Kolonie des mit pBAD18 asd+ /aroA aroD asd-Plasmid transformierten Salmonella-Stamms (1) und des S-flgMstreptavi-

din-pBAD18-ASD+/BRD509 asd- Stamms (2) mit einem sterilen Zahnstocher an voneinander entfernten Stellen inokuliert. Anschließend wurde bei 37°C für 5 Stunden inkubiert, um die Motilität zu überprüfen. Fig. 8 zeigt die Ergebnisse, die den Verlust der Motilität des Salmonella-Stamms durch die Expression von flgM-Stv demonstrieren.

[0052] Zur Untersuchung der Ursache des Motilitätsverlusts wurde die Morphologie des Stamms vor und nach der Arabinose-Induktion mittels TEM analysiert. Die TEM-Bilder in Fig. 9 zeigen, dass die Flagellen des Salmonella-Stamms nach der Induktion der flgM-Stv-Expression durch Arabinose verschwinden. Da die Flagellen von Salmonella für die Bewegung zuständige Organe sind, wird durch deren Verschwinden auch die Motilität verloren.

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMRegister aufgerufen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- KR 10-0852687 [0005]
- KR 10-1750007 [0005]
- KR 10-2022-0058461 [0006]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Leschner et al. (J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773 [0003])

Patentansprüche

1. Ein Genkonstrukt, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Anti-Sigma-Faktor-flgM-Gen und ein für Streptavidin kodierendes Gen verbunden sind, um für ein Fusionsprotein aus flgM und Stv zu kodieren, das Biotinbindungsfähigkeit aufweist.

2. Genkonstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das flgM-Gen und das für Streptavidin kodierende Gen direkt verbunden sind oder über einen Linker verbunden sind.

3. Genkonstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es aus der Sequenznummer 1 oder Sequenznummer 2 besteht.

4. Ein rekombinanter Expressionsvektor, der ein Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält.

5. Ein antineoplastischer rekombinanter Stamm, der **dadurch gekennzeichnet** ist, dass er durch das mit einem induzierbaren Promotor funktionell verbundene Genkonstrukt nach Anspruch 1 transformiert ist, ein Fusionsprotein aus flgM und Streptavidin mit Biotinbindungsfähigkeit exprimiert und sezerniert und auf Tumorzellen abzielt.

6. Antineoplastischer rekombinanter Stamm nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Stamm ein abgeschwächter Salmonella-Stamm ist.

7. Antineoplastischer rekombinanter Stamm nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Stamm bei Expression des Fusionsproteins aus flgM und Streptavidin durch den induzierbaren Promotor in seiner Motilität gehemmt oder diese verliert.

8. Antineoplastischer rekombinanter Stamm nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Stamm der Stamm mit der Hinterlegungsnummer KCTC15482BP ist.

9. Eine antineoplastische Zusammensetzung, enthaltend einen antineoplastischen rekombinanten Stamm nach einem der Ansprüche 5 bis 8.

10. Ein antineoplastisches Adjuvans, das einen rekombinanten Stamm nach einem der Ansprüche 5 bis 8 enthält und zusammen mit einem antineoplastischen Mittel in Biotin-gebundener Form verabreicht wird.

11. Antineoplastisches Adjuvans nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass es das antineoplastische Mittel auf Tumorzellen abzielt und als Retardpräparat wirkt.

12. Ein Tumorbildgebungs-Adjuvans, das einen rekombinanten Stamm nach einem der Ansprüche 5 bis 8 enthält und zusammen mit einem Kontrastmittel in Biotin-gebundener Form verabreicht wird.

13. Tumorbildgebungs-Adjuvans nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Kontrastmittel eines oder mehrere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus radioaktiven Nukliden, Fluoreszenzmarkierungen, Enzymmarkierungen, Chemilumineszenzmarkern, Goldpräparaten und magnetischen Präparaten ist.

14. Ein Verfahren zur Bereitstellung von Informationen für die Krebsdiagnose, umfassend:
(A) Verabreichung des Tumorbildgebungs-Adjuvans nach Anspruch 12 an einen Krebsverdachtspatienten oder einen Patienten unter antineoplastischer Therapie zur Targetierung von Tumorzellen;
(B) Induktion der Expression des Fusionsproteins aus flgM und Streptavidin im rekombinanten Stamm des Tumorbildgebungs-Adjuvans;
(C) Verabreichung eines Kontrastmittels in Biotin-gebundener Form; und
(D) Detektion und Bildgebung des Kontrastmittels.

Es folgen 8 Seiten Zeichnungen

Fig. 1

1. Streptavidin – Monomer form (Seq ID NO: 3)

EFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTL
TGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLT YEGG
SGPATEQQGQDTFTKVKPSAAS

2. streptavidin-Flag

EFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTL
TGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLT YEGG
SGPATEQQGQDTFTKVKPSAASGSDYKDDDDK

Seq ID NO: 3

Seq ID NO: 4

3. His-streptavidin-Flag

Seq ID NO: 5

HHHHHHSGGEFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGT
GCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINT
QWNLT YEGGSGPATEQQGQDTFTKVKPSAASGSDYKDDDDK

Seq ID NO: 3

Seq ID NO: 4

4. His-GS LINKER-his-streptavidin-Flag

Seq ID NO: 6

GGSSSSHHHHHHSGGEFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYE
NRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGA
EARINTQWNLT YEGGSGPATEQQGQDTFTKVKPSAASGSDYKDDDDK

Seq ID NO: 3

Seq ID NO: 4

Fig. 2

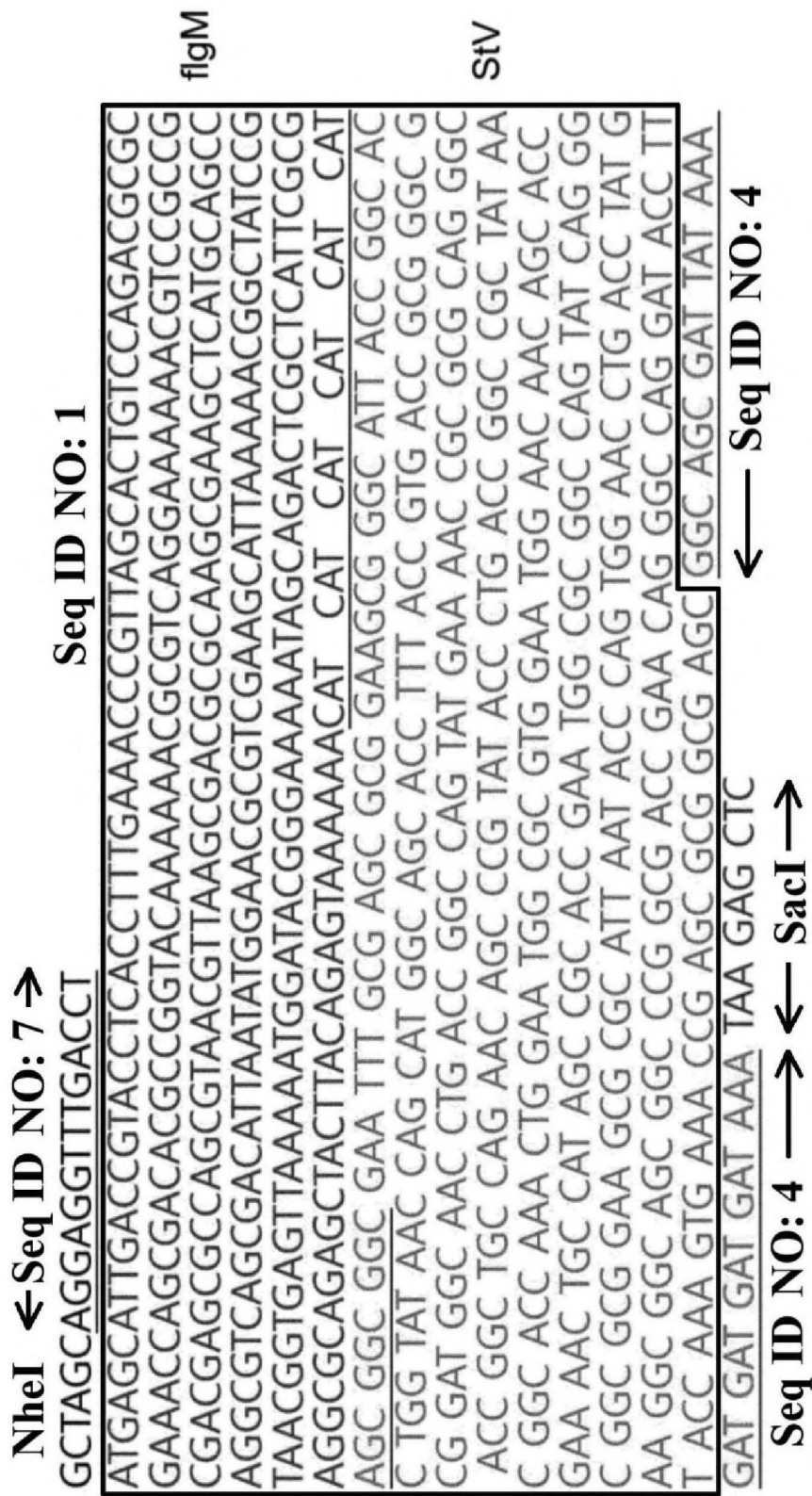


Fig. 3

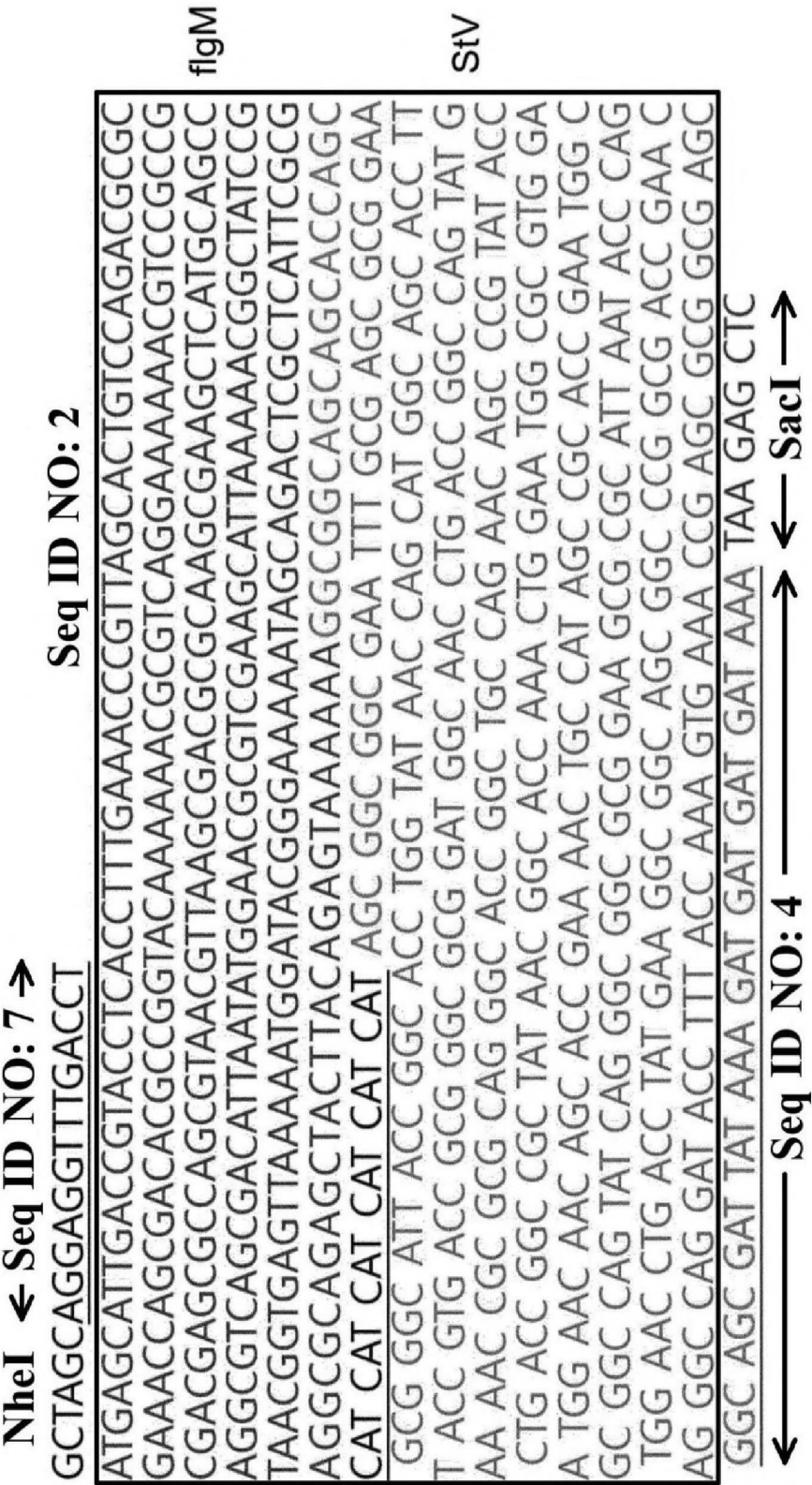


Fig. 4

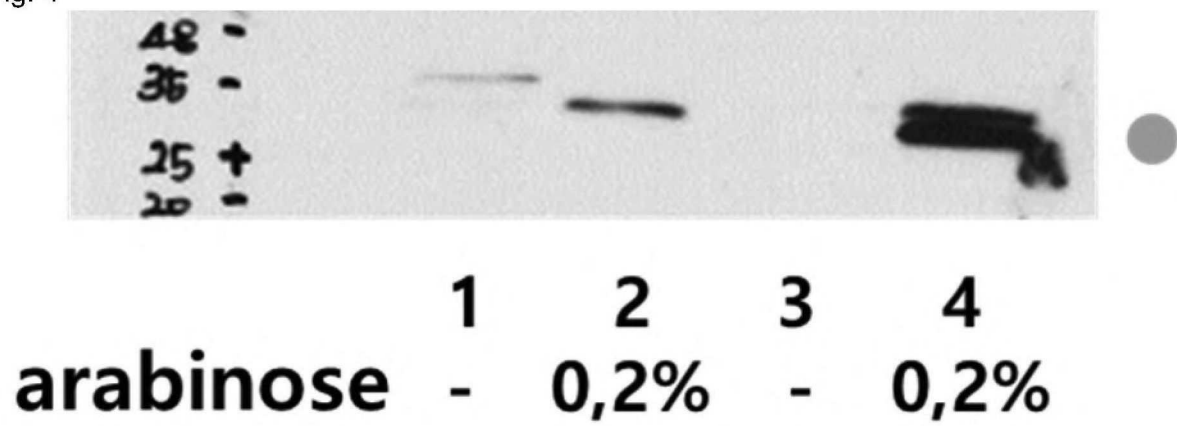


Fig. 5

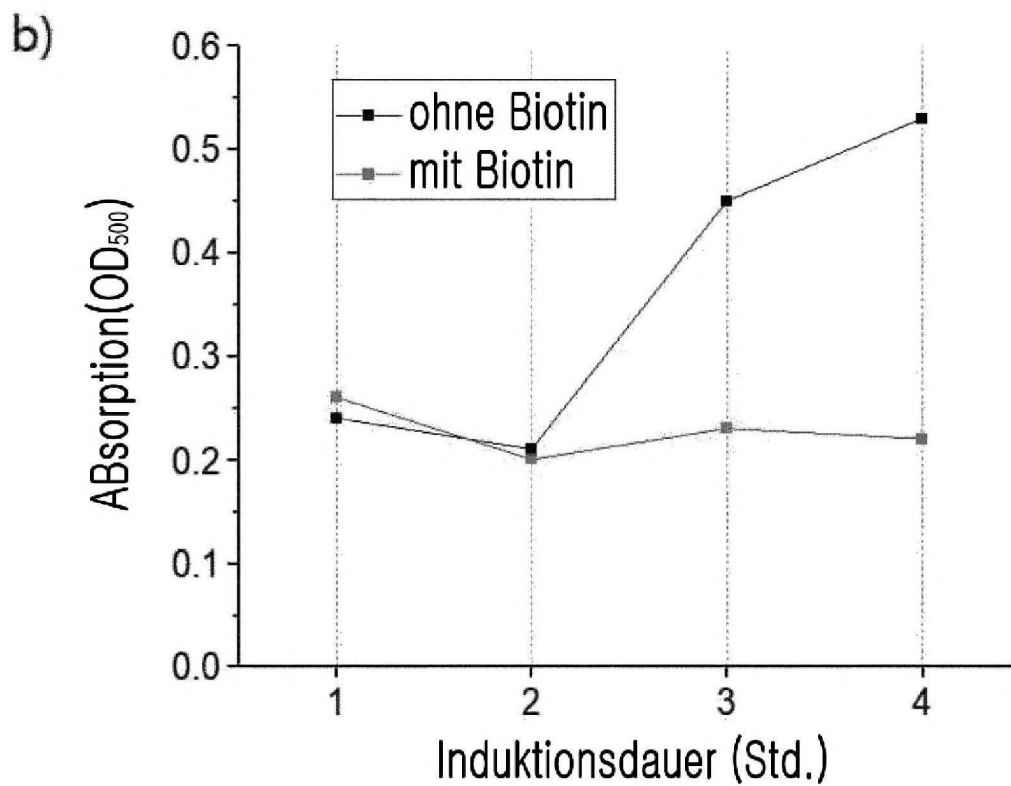
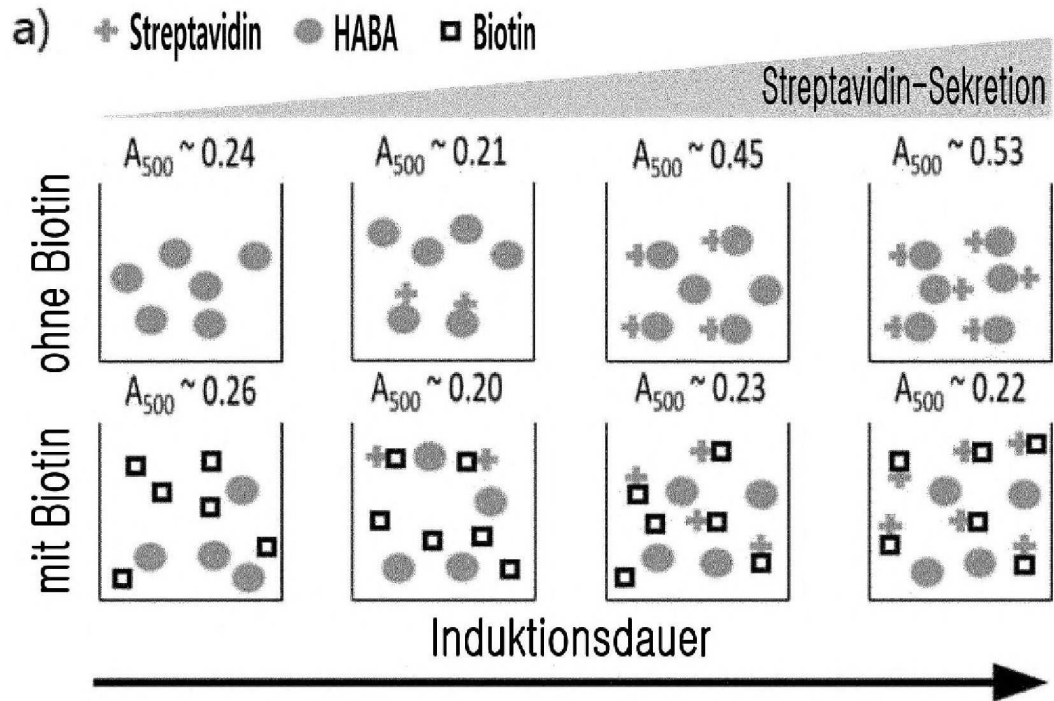


Fig. 6

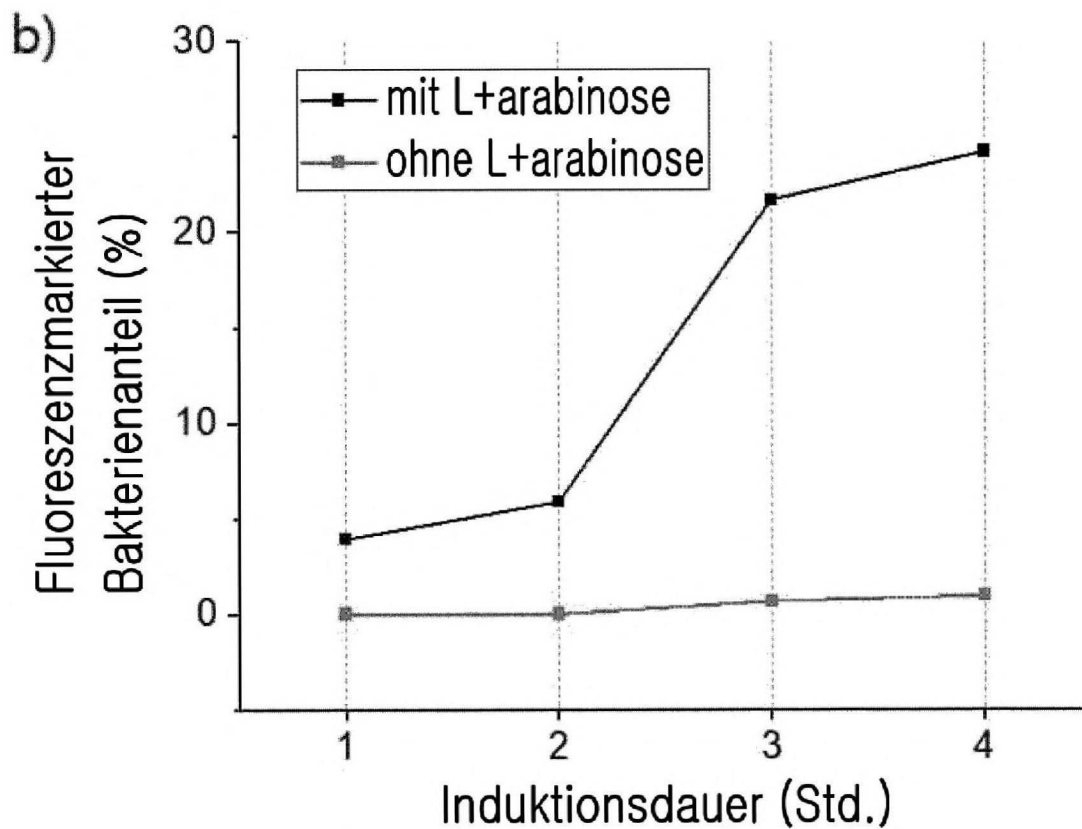
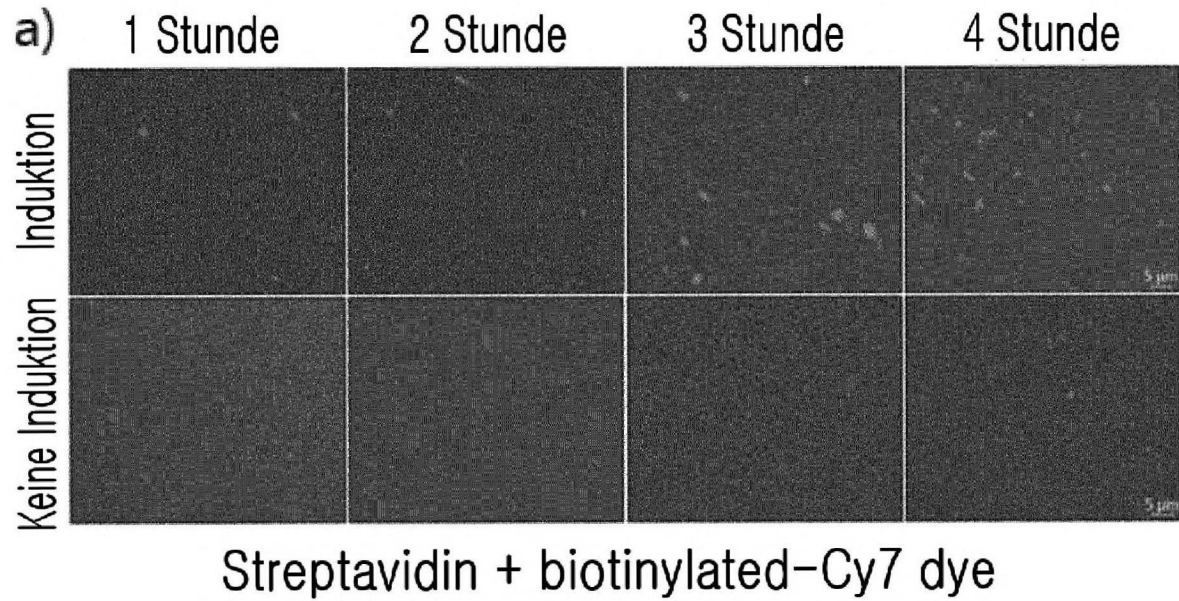


Fig. 7

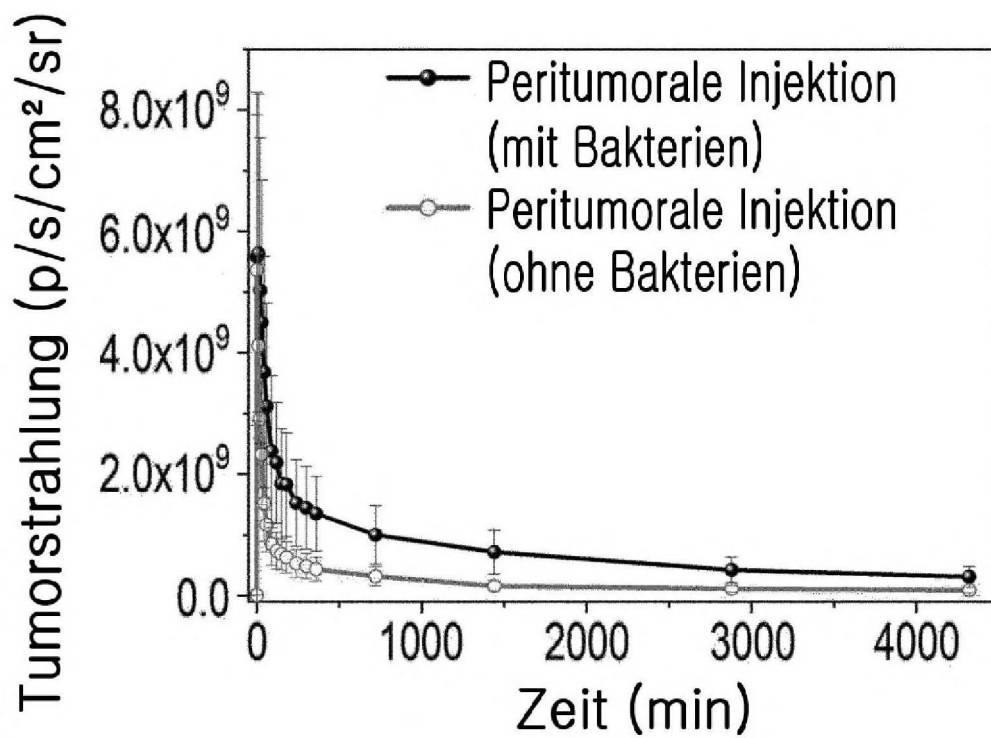
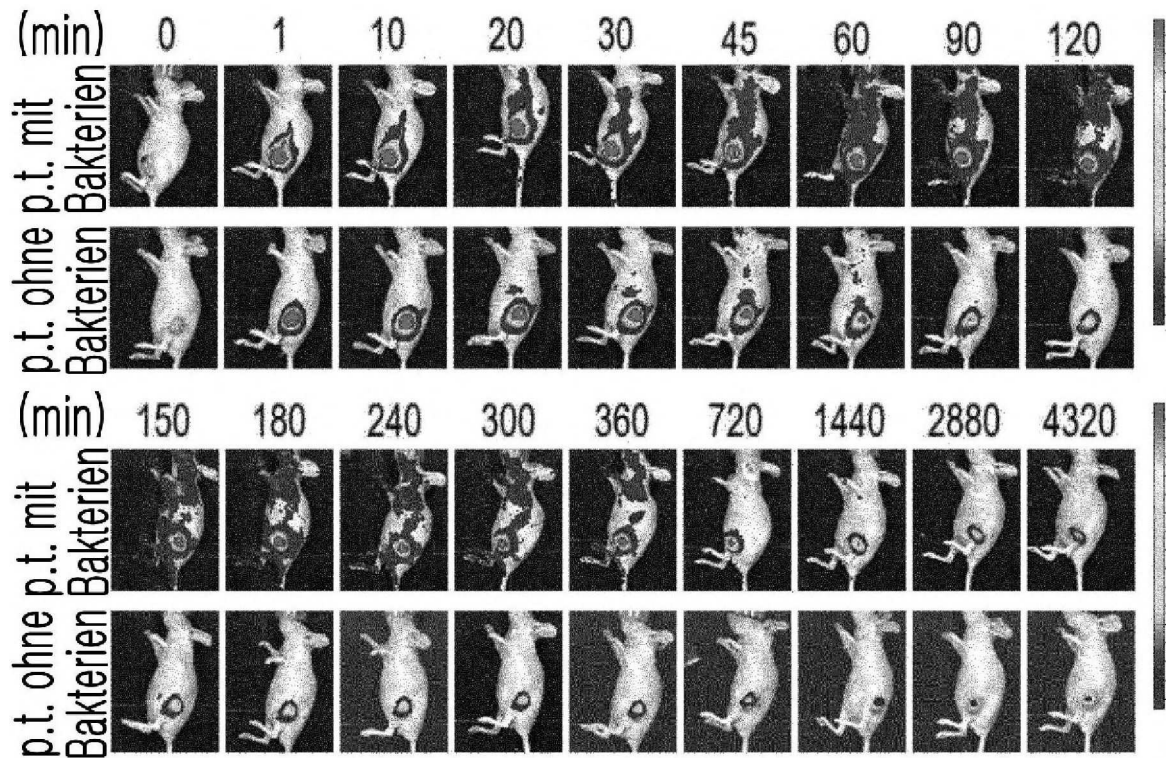


Fig. 8

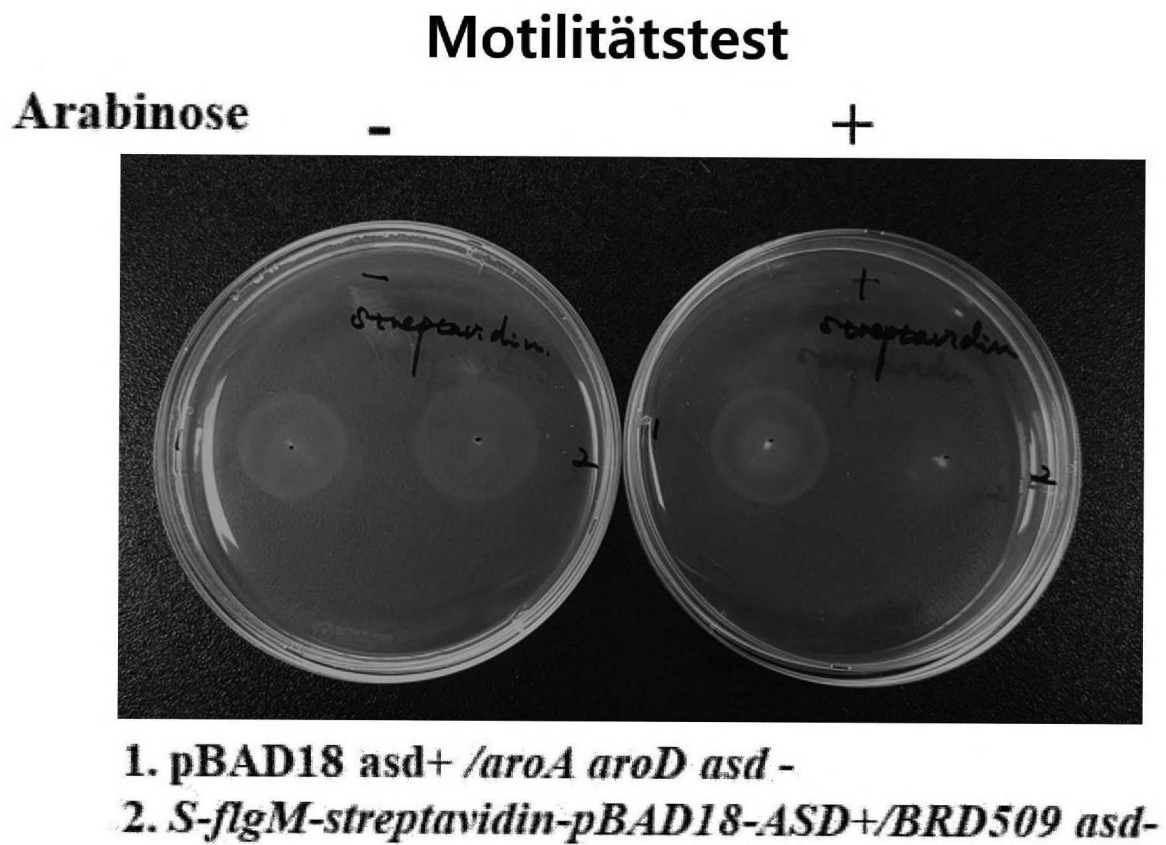


Fig. 9

