

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 1 월 25 일 (25.01.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/019355 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/009117

(22) 국제출원일:

2023 년 6 월 29 일 (29.06.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0089823 2022 년 7 월 20 일 (20.07.2022) KR

(71) 출원인: 충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34134

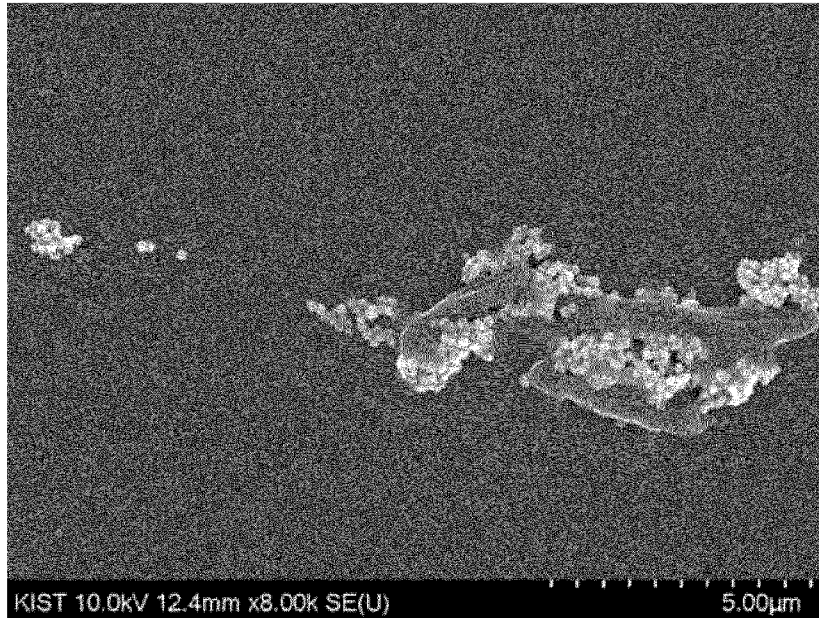
대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교), Daejeon (KR). 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이효진 (LEE, Hyo Jin); 34077 대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9, Daejeon (KR). 전홍진 (JEON, Heung Jin); 35404 대전광역시 서구 복수서로 50, 105-301, Daejeon (KR). 김솔비 (KIM, Solbi); 34201 대전광역시 유성구 상대북용로29번길 52, 101-703, Daejeon (KR). 서승범 (SUH, Seung Beum); 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5, Seoul (KR). 김세훈 (KIM, Sehoon); 02792 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 이현재 (LEE, Hyeon Jae); 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5, Seoul (KR). 이도희 (LEE, Dohee); 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5,

(54) Title: ANTI-CANCER STRAIN EXPRESSING STREP-TAG, ANTI-CANCER COMPOSITION UTILIZING SAME, ANTI-CANCER ADJUVANT, AND IMAGING ADJUNCT FOR TUMORS

(54) 발명의 명칭: 스트렙-태그를 발현하는 항암 균주, 이를 이용한 항암 조성물, 항암 어쥬번트 및 종양의 영상화 보조제

[도4]



(57) Abstract: The present invention relates to a gene construct characterized by encoding a fusion protein of flgM and strep-tag, wherein an anti-sigma factor flgM gene and a strep-tag-encoding gene are linked whereby the strep-tag can be expressed on the surface of an anti-cancer strain which is targeted to tumor sites to stimulate immune activity. The present invention also concerns an anti-cancer adjuvant and an imaging adjunct for tumors, wherein the anti-adjuvant is transformed by the gene construct, exhibits anti-cancer activity by itself, and can be effectively used for the diagnosis and treatment of tumor cells, in combination with an anti-cancer material or contrast agent labeled with a substance specifically reacting with the strep-tag.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/019355 A1

Seoul (KR). 서보금 (SEO, Bo Geum); 02792 서울특별시
서초구 잠원로 157, 120-401, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김원준 (KIM, Wonjoon); 35203 대전광역시
서구 둔산대로117번길 66, 골드벤처타워 205, Daejeon
(KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 종양부위에 표적화되어 면역활성을 자극할 수 있는 항암 군주의 표면에 스트렙-태그(strep-tag)를 발현할 수 있도록 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 strep-tag를 암호화하는 유전자가 연결되어 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물과, 이에 의해 형질전환되어 그 자체로 항암 활성을 나타내고 strep-tag와 특이적으로 반응하는 물질로 표지된 항암물질 또는 조영제와 함께 종양세포의 진단과 치료에 유용하게 사용될 수 있는 항암 어쥬먼트 및 종양의 영상화 보조제에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 스트렙-태그를 발현하는 항암 균주, 이를 이용한 항암 조성물, 항암 어쥬버트 및 종양의 영상화 보조제 기술분야

- [1] 본 발명은 종양부위에 표적화되어 면역활성을 자극할 수 있는 항암 균주의 표면에 스트렙-태그(strep-tag)를 발현하고/하거나 분비할 수 있도록 Strep-tag를 발현시키기 위한 유전자 구조물과, 이에 의해 형질전환되어 그 자체로 항암 활성을 나타내고 strep-tag와 특이적으로 반응하는 물질로 표지된 항암물질 또는 조영제와 함께 종양세포의 진단과 치료에 유용하게 사용될 수 있는 항암 어쥬버트 및 종양의 영상화 보조제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 세포의 증식 활동이 멈추지 않아 주변 조직으로 파고들어 정상세포를 파괴하는 것에 의해 결국에는 생명을 위협하는 질환이다. 노화에 의해 인체의 조절 능력이 낮아짐에 따라 암에 취약해지게 되어, 현대 고령화 사회에서 암은 2007년 이래 전체 사망원인 중 부동의 1위를 차지하며 2위인 심장질환 사망률의 2배를 넘어섰다.
- [3] 질병의 치료에 가장 효과적인 대응 체계는 면역력을 강화하는 것이나, 암세포는 외부 침입자가 아니기 때문에 인체의 면역반응을 회피한다. 특정 바이러스 또는 박테리아는 정상세포보다 암세포에 더 많이 감염되고, 감염된 박테리아가 면역세포의 공격대상이 될 수 있다. 이에 일부러 특정 바이러스 또는 박테리아를 감염시켜 인체 면역반응을 자극함으로써 암세포에 대항할 수 있도록 하는 항암 치료 방법들이 제시되었다. 그러나 시겔라(Shigella), 콜레라균(Vibrio cholera), 병원성 대장균(pathogenic E. coli)과 같은 감염성 세균들은 장관의 세포에 침투할 뿐, 면역반응을 일으키는 중요한 기관인 간과 비장에는 도달하지 못한다. 이와 대조적으로 살모넬라균은 림프절을 통하여 비장과 간에 침투하여 전신 면역반응을 자극시킬 수 있다. 구체적으로, Leschner 등(J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773)은 CT26 종양을 갖는 마우스를 대상으로 형광을 나타내는 살모넬라균을 정맥주사로 감염시킨 후, 시간에 따른 감염 경로를 추적하였다. 그 결과 감염 직후에는 마우스의 혈액을 통해 전신이 감염된 것을 보여주었고, 감염 20분 후에는 비장과 간에 살모넬라균이 축적되었으며, 24시간 후에는 종양 조직에만 살모넬라균이 집중적으로 축적되어 있음을 관측하였다. 이는 살모넬라균이 비장과 간에서 전신 면역반응을 자극한 후, 암에 표적화되어 국부적 면역을 활성화시키는 것에 의해 다른 균주들에 비해 항암면역치료에 보다 효과적으로 사용될 수 있음을 시사한다.
- [4] 하지만 살모넬라균은 식중독을 유발하는 대표적인 균으로, 종양이 아닌 다른 조직에 감염되는 경우 비정상적인 숙주 반응으로 인한 패혈증을 유발하여 생명

을 위협할 수 있다. 미국 예일대학 연구팀은 살모넬라를 유전자 조작하면 종양을 공격하는 특성은 유지하면서 독성만 제거하여 약독화할 수 있으며, 상기 약독화된 살모넬라의 주입을 통해 면역 자극을 유도하여 종양을 억제할 수 있다고 발표하였다. 이에 약독화 살모넬라에 항암 특성을 갖는 물질을 발현할 수 있도록 형질전환한 균주들에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 그러나 약독화된 살모넬라는 생존성이 낮고 면역유발능 역시 저하될 뿐 아니라 돌연변이로 인하여 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환되어 패혈증을 일으킬 우려가 있으므로 안전성을 위한 추가적인 장치가 필요하다.

- [5] 약독화된 살모넬라의 낮은 면역유발능을 보완하기 위하여, 항암치료에 도움이 되는 물질들을 추가로 발현 또는 억제시킬 수 있는 살모넬라 균주들을 개발하고, 이를 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 이루어졌다. 등록특허 제10-0852687호는 약독화된 살모넬라 균주내에 종양괴사인자 알파단백질 벡터를 형질도입한 종양괴사인자 알파를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 대해 게시하였으며, 등록특허 제10-1750007호는 L-아스파라기나아제가 종양 사이트에서 선택적으로 발현될 수 있는 약독화 살모넬라 균주를 이용한 고형암 치료제에 대해 게시하였다. 상기와 같은 살모넬라 균주들은 항암 물질의 발현에 의해 항암 활성을 추가적으로 보완하기는 하였으나, 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환되어 패혈증을 유발할 위험성은 여전히 지니고 있다. 또한 체내에서 항암 물질을 발현시키는 경우, 항암 물질의 생리적 활성에 의해 살모넬라 균주 자체가 사멸될 수 있으므로, 항암 물질과 살모넬라의 항암 효능을 동시에 발현하기 위해서는 살모넬라 균주가 종양 부위에 표적화된 후 안정적으로 생존하면서 항암물질을 지속적으로 발현 및 분비할 수 있어야 한다.

- [6] 스트랩-태그(Strep-tag)는 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 가공된 스트렙타비딘인 스트렙-타틴(strep-tactin)에 대해 강한 결합을 나타내는 8개의 아미노산으로 구성되어 있는 합성 펩타이드로, 제조합 단백질의 N- 혹은 C- 말단에 융합이 가능하다. Strep-tag와 스트렙-타틴(strep-tactin) 등의 특이적 상호작용을 이용하면 strep-tag를 포함한 단백질을 세포 용해물에서 한번에 분리할 수 있는 장점이 있기 때문에, 특정 단백질의 검출 또는 정제에 유용하게 사용되고 있다. 그러나, 체내에서 strep-tag의 특이적 결합을 이용할 수 있도록 strep-tag를 발현하는 항암 균주에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 종래기술의 문제를 해결하기 위하여, 균주의 표면에 strep-tag를 안정적으로 발현하거나/하고 분비할 수 있도록 하는 유전자 구조물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 구조물에 의해 형질전환되어 표면에 strep-tag를 발현하거나/하고 분비하면서 종양 부위에 표적화되어, 그 자체로 종양에 대한 면역

항암 활성을 나타내는 항암 제조합 균주와 이를 함유하는 항암 조성물을 제공하는 것이다.

- [9] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 균주의 표면에 발현되고/되거나 분비되는 strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 항암물질 또는 종양의 영상화를 위한 조영제를 종양 부위로 표적화시켜 표지물질의 항암효능 또는 영상화 효능을 향상시킬 수 있는 항암 어쥬번트(adjutant) 또는 종양 영상화 어쥬번트를 제공하는 것이다.

- [10] 본 발명은 또한 상기 종양 영상화 어쥬번트를 이용한 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 strep-tag를 암호화하는 유전자가 연결되어 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물에 관한 것이다.
- [12] 본 명세서에서 별도의 정의가 없다면, 본 명세서에 사용되는 모든 과학적 및 기술적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미로 정의된다. 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.
- [13] 본 발명의 유전자 구조물에 의해 발현되는 flgM과 strep-tag의 융합단백질(이하, "flgM-Strep-tag"라 칭함)은 Strep-tag과 마찬가지로 아비딘 또는 스트렙타비딘과 결합하는 것이 가능하여 strep-tag와 flgM-Strep-tag의 생물학적 동등성을 입증할 수 있었다. Strep-tag의 특별한 이점은 크기가 작고 생화학적으로 거의 불활성이라는 점이다. 따라서 생화학적으로 활성을 갖는 물질을 발현하도록 형질전환된 균주들이 해당 물질의 발현으로 인한 농축의 영향으로 생존력이 저하되는 것과는 달리, Strep-tag의 발현은 균주의 생존을 위협하지 않아 안정적인 발현이 가능하다. 본 발명의 유전자 구조물은 균주에 형질전환되어 균주의 표면에 flgM-Strep-tag를 발현하고/하거나 분비하도록 하는 것에 특징이 있다.
- [14] 본 발명의 유전자 구조물에서 상기 flgM 유전자와 strep-tag를 암호화하는 유전자는 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결될 수 있다. 하기 실시예에서는 GGSS-HIS*6 또는 GGGGS-HIS*6로 이루어진 아미노산 서열을 암호화하는 유전자 서열을 갖는 링커를 매개로 연결된 서열번호 1 또는 2의 구조물을 예시하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자라면 링커의 길이나 서열을 적절하게 변형하는 것은 용이할 것이다.
- [15] 발현 효율을 향상시키기 위하여 본 발명의 유전자 구조물의 전단에는 샤인-달가노(shine-dalgarno) 서열을 배치할 수 있다. 또한 본 발명의 유전자 구조물을 벡터에 도입할 수 있도록 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있음은 당연하다.

- [16] 본 발명은 또한 상기 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 "벡터"는 적합한 숙주내에서 본 발명의 유전자 구조물을 발현시킬 수 있도록 작동가능하게 연결된 DNA 제조물로, 플라스미드, 파지 입자 또는 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 본 발명의 명세서에서 플라스미드와 벡터는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 상기 발현 벡터는 유전자 구조물의 서열에 따라 효율이 높은 것을 선택하여 사용할 수 있음은 당연하다.
- [17] 아울러, 본 발명은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 상기 유전자 구조물에 의해 형질전환되어 균주의 표면에 융합단백질 flgM-Strep-tag를 발현하거나, flgM-Strep-tag를 분비하거나 혹은 표면에 flgM-Strep-tag를 발현하면서 분비하며, 종양세포에 표적화되는 것을 특징으로 하는 항암 재조합 균주에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 종양에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 인체에 무해한 균주라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 이러한 균주의 예로는 대장균이나 약독화 살모넬라균, 시겔라, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물(유익균), 프로바이오틱스 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [18] 균주가 flgM-Strep-tag를 발현하는 것만으로는 Strep-tag의 결합성을 이용할 수 없다. Strep-tag와 Strep-tag에 특이적인 표지물질의 결합을 이용하기 위해서는 균주의 표면에 flgM-Strep-tag가 발현되거나 혹은 균주의 체외로 분비될 수 있어야 한다. 균주의 표면에 flgM-Strep-tag가 발현된다는 것은 균주의 체외로 분비되지 않고 예를 들어 앵커링에 의해 균주에 부착되어 있으면서 외부 물질과 결합이 가능한 상태인 것을 의미한다. flgM-Strep-tag가 분비되는 경우에는 분비된 물질이 다른 곳이 이동/확산되어 표적능이 저하될 수 있으므로 균주의 표면에 발현되는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 재조합 균주는 상기 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현 벡터를 사용하여 형질전환할 수 있다. 형질전환 방법은 통상의 방법에 따르며, 예를 들어 칼슘 클로라이드 방법, 전기천공법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 상기 재조합 균주는 flgM의 작동에 의하여 단순히 세포 내에서 본 발명의 유전자 구조물이 암호화하는 flgM-Strep-tag를 발현하는 것에 그치지 않고, 표면에 발현하고/하거나 세포 외로 분비하는 것을 특징으로 한다. 전술한 바와 같이 Strep-tag는 생화학적으로 거의 불활성이기 때문에 세포 내에 발현된 GM-CSF로 인하여 균주가 사멸되지 않고 안정적이고 지속적으로 융합단백질을 발현/분비할 수 있다.
- [19] 본 명세서에서 "유도성 프로모터에 작동가능하게 연결"되었다고 하는 것은 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있음을 의미한다. 상기 유도성 프로모터는, 예를 들어 tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터, T7 프로모터, pBAD 프로모터, Tet 프로모터, trc 프로모터, pepT 프로모터, sulA 프로모터, pol 11(dinA) 프로모터, ruv 프로모터, uvrA 프로모터, uvrB 프로모터, uvrD 프로모터, umuDC 프로모터, lexA 프로모터, cea

프로모터, *caa* 프로모터, *recN* 프로모터, *pagC* 프로모터, *hip* 프로모터, *ansB* 프로모터 또는 *pflE* 프로모터 일 수 있다.

- [20] 특히 본 발명의 균주는 약독화 살모넬라 균주일 수 있다. 살모넬라 균주는 다른 균주들과는 달리 간과 비장에 침투하여 전신 면역반응을 자극할 수 있으므로 면역 항암 활성이 더욱 우수하다. "약독화"란 살아있는 병원체의 독성을 인위적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극하여 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 살모넬라의 약독화 초래 유전자는 당업계에 잘 알려져 있으며, *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*, *pml*, *rpsL*, *hemA*, *rfc*, *poxA*, *galU*, *cdt*, *pur*, *ssa*, *guaA*, *guaB*, *fliD*, *flgK*, *flgL*, *relA* 및 *spoT*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 기능상실에 의해 달성될 수 있다. 생체 내 적용 시 야생형으로의 환원을 방지하고, 독성을 더욱 약화시키기 위하여 상기 유전자 중 둘 이상의 유전자 기능을 상실시킬 수 있다.
- [21] 특히 약독화 살모넬라 균주에서 *flgM*-Strep-tag를 발현시키는 경우, 운동성이 억제되거나 더 나아가 운동성을 상실함을 확인할 수 있었다. 이는 종양부위에 표적화 된 후 *flgM*-Strep-tag를 발현시키는 것에 의해 다른 장기로의 이동이 제한되기 때문에 안정성 측면이 크게 개선됨을 의미한다. 구체적으로 상기 균주는 2023년 6월 26일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁한 기탁번호 KCTC15484BP의 S-*flgM*-streptag-pBAD18-ASD+/BRD509 *asd*- 균주일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명은 또한 상기 항암 제조합 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항암 제조합 균주는 그 자체로 종양 부위에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내기 때문에 항암 조성물로 사용될 수 있다.
- [23] 본 발명의 조성물은 항암용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다.
- [24] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령, 성별 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg·일~10g/kg·일이다.
- [25] 이에 더하여 본 발명은 상기 항암 제조합 균주를 유효성분으로 함유하며 strep-tag에 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 항암제와 병용투여되는 것을 특징으로 하는 항암 어쥬먼트에 관한 것이다. 상기 strep-tag에 특이적으로 결합하는 물질로는 아비딘, 스트렙타비딘, 스트렙-타틴을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 균주는 종양 세포에 표적화된 후 유도 물질에 의해 균주의 표면에 *flgM*-Strep-tag 융합단백질의 형태로 strep-tag를 균주의 표면에 발현하

거나/하고 분비하여 strep-tag에 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 항암제를 종양에 표적화시킬 수 있다. 따라서 다른 장기에 미치는 항암제의 부작용을 최소화하고 항암 활성을 증가시킬 수 있으며, 더 적은 용량으로도 항암활성을 나타낼 수 있도록 하여 부작용으로 인한 환자들의 부담을 줄일 수 있다. 항암제로는 그 자체로 종양 세포에 표적화되는 능력이 없거나 적으면서 항암활성을 나타내는 나노입자, 항체, 항암단백질 또는 소분자 물질로서 strep-tag와 특이적인 결합을 하는 물질로 표지될 수 있다면 어떤 것이든 무방하다.

- [26] 본 발명의 항암 재조합 균주는 또한 strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 조영제와 병용 투여되어 조영제를 종양 부위에 표적화시키는 것에 의해 종양 조직의 영상화 효능을 향상시킬 수 있는 종양 영상화 어쥬번트로 사용될 수 있다. 상기 조영제로는 방사성 핵종, 형광 표지, 효소 표지, 화학 발광 마커, 금 제제 및 자성 제제로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 조영제의 종류에 따라 영상화 방식을 결정하는 것은 당업자에게는 용이할 것이다. 본 발명의 종양 영상화 어쥬번트는 단순히 종양의 영상화 효능을 향상시키는 데 그치지 않고 그 자체로 항암 활성을 나타내기 때문에 암 환자들에게 더욱 유익한 효과를 나타낼 수 있다.

- [27] 본 발명의 종양 영상화 어쥬번트는 암 진단을 위한 정보 제공에 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어 암 진단을 위한 정보 제공은 (A) 암 의심 환자 또는 항암 치료 중인 환자에 본 발명의 종양 영상화 어쥬번트를 투여하여 종양세포에 표적화하는 단계; (B) 상기 종양 영상화 어쥬번트의 재조합 균주에서 flgM과 strep-tag 융합단백질의 발현을 유도하는 단계; (C) Strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 조영제를 투여하는 단계; 및 (D) 상기 조영제를 검출하여 영상화 하는 단계를 포함하는 방법에 의해 이루어질 수 있다. 그러나 상기 단계에 한정되는 것은 아니며, 균주 및 조영제의 종류 및 특성에 따라 예를 들어 상기 (B) 단계와 (C) 단계가 동시에 이루어지거나, 혹은 (A) 단계와 (C) 단계가 동시에 이루어지거나 별도의 단계가 추가되는 등 적절한 변형이 이루어질 수 있음은 당연하다.

발명의 효과

- [28] 이상과 같이 본 발명의 유전자 구조물에 의하면, 종양세포에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내는 항암 균주에 도입되어 strep-tag와 생물학적으로 동등한 기능을 갖는 flgM-strep-tag를 균주의 표면에 발현하거나/하고 분비하도록 할 수 있다.
- [29] 따라서 본 발명의 유전자 구조물이 도입된 항암 재조합 균주는 그 자체로 항암 활성을 나타낼 수 있을 뿐 아니라, 종양 표적화 기능이 없으나 strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 항암제 또는 조영제와 병용 투여하는 것에 의해 항암제 또는 조영제의 종양에 표적화시켜 항암 효능 및 종양 영상화 효능을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 flgM-Strep-tag 융합단백질의 발현을 위한 플라스미드 제작을 위하여 디자인된 일 실시예의 DNA 염기서열을 보여주는 도면.
- [31] 도 2는 flgM-Strep-tag 융합단백질의 발현을 위한 플라스미드 제작을 위하여 디자인된 다른 실시예의 DNA 염기서열을 보여주는 도면.
- [32] 도 3은 상기 플라스미드로 형질전환된 균주의 배양액 중 flgM-Strep-tag의 양을 정량한 전기영동 사진.
- [33] 도 4는 본 발명의 일 실시예의 균주의 표면에 Strep-tag가 발현되었음을 보여주는 SEM 이미지 및 정량 그래프.
- [34] 도 5는 본 발명의 일 실시예의 균주에 의해 Strep-tag가 발현되었음을 보여주는 형광 이미지 및 히스토그램.
- [35] 도 6은 flgM-Strep-tag 융합단백질의 발현 유도에 의한 균주의 이동성 억제를 보여주는 이미지.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [37] [실시예]
- [38] 실시예 1 : Strep-tag 발현을 위한 플라스미드의 제작
- [39] 기저체와 후크를 통해 세포 밖으로 분비되는 flgM 단백질과 strep-tag를 융합시킨 플라스미드를 제작하였다.
- [40] 먼저 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 유전자를 디자인하였다. 야생형 살모넬라의 flgM DNA 염기서열(flgM anti-sigma-28 factor FlgM [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2] Gene ID: 1252690, Locus tagSTM1172 NC_003197.2 (1257036..1257341, complement))과 Strep-tag의 아미노산 서열(Nature Protocols volume 2, pages 1528-1535 (2007))을 살모넬라 코돈 최적화를 통하여 변환한 DNA 서열과 링커를 통해 결합하였다. 링커는 GGGGS 링커 또는 GGSS 링커와 6개의 히스티딘이 연결된 링커를 사용하였으며, strep-tag는 GGSS 링커에 의해 두 개의 strep-tag가 연결된 트윈 strep-tag가 발현되도록 구성하였다. flgM 유전자의 발현을 높이기 위해, flgM 유전자 앞에 14개의 샤인-달가노(shine dalgarno) 서열을 삽입하였으며, 클로닝을 위해 맨 앞에는 NheI site를 삽입하고, strep-tag의 종결 코돈 뒤에는 SacI site를 삽입하였다. 도 1과 도 2는 각각 상기 과정을 통해 디자인된 flgM-GGGGS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag와 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 염기서열을 보여준다. 해당 서열의 유전자 합성을 (주)코스모진텍에 의뢰하여 합성하였다. 이중 제한효소 사

이트 및 샤인-달가노 서열을 제외한 서열이 융합단백질 flgM와 strep-tag의 융합단백질을 암호화하는 유전자(서열번호 1 및 서열번호 2)에 해당한다.

- [41] 위에서 합성한 flgM-GGGGS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag와 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag를 각각 NheI(쥬다카라)과 SacI(쥬다카라) 10U씩을 사용하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 전기영동하고 Gel extraction kit(Qiagen)로 400 bp의 DNA를 추출하여 각각의 융합단백질 flgM-Strep-tag에 대한 insert DNA를 얻었다.
- [42] pBad18 asd 플라스미드(충남대 임현만 교수님 연구실에서 분양)와 NheI 및 SacI 효소 각각 10U를 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 반응산물을 PCR purification kit(Qiagen)로 정제하여 벡터 DNA를 얻었다. 벡터 DNA를 두 가지 flgM-Strep-tag insert와 25°C에서 30분간 각각 ligation(Invitron)시키고, DH5a 컴피턴트 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37°C에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 각각 선별하였다. 선별된 콜로니의 candidate 6개씩을 선별하여 NheI 및 SacI 각 10U와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 400bp band의 생성을 확인하였다. (주)코스모진텍에 의뢰하여 해당 candidate의 염기서열을 분석하여 각각 서열번호 1 또는 2의 유전자 삽입을 확인하고 flgM-Strep-tag 분비를 위한 flgM-GGGGS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드와 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드를 확립하였다.
- [43] 실시예 2 : flgM-Strep tag 융합단백질을 발현하는 약독화 살모넬라 균주 제작
- [44] 1) 약독화 살모넬라 균주의 형질전환 및 flgM-Strep tag 융합단백질의 분비 확인
- [45] 실시예 1에서 제조된 flgM-GGGGS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드와 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드를 각각 사용하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전환하고, 배양액에서 flgM-Strep tag 융합단백질의 발현을 검사하여 융합단백질의 분비를 확인하였다. 약독화 살모넬라 균주로는, aroA aroD asd- 균주(충남대 임현만 교수로부터 분양)를 사용하였다.
- [46] 형질전환된 각 균주의 단일 콜론을 LB amp 액체배지에 접종한 후 37°C에서 12~16시간 진탕배양하였다. 이후 신선한 LB amp 액체배지에 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 희석한 후 37°C에서 2시간 진탕배양하였다. 진탕배양에 의해 OD₆₀₀이 0.4~0.6이 되면 아라비노스(arabinose)를 최종 농도가 0.2 w%가 되도록 처리하고, 37°C에서 5시간 추가로 진탕배양시켰다. 비교를 위해서 대조균은 아라비노스를 처리하지 않고 동일 조건에서 진탕배양시켰다. 배양액을 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.2 μm 필터로 여과하여 균을 완전히 제거하였다.
- [47] 균이 제거된 상층액으로부터 웨스턴블랏을 통해 배양액 중 flgM-Strep-tag의 양을 확인하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 전기영동 사진으로, 1, 3 레인은 아라비노스를 처리하지 않은 실험균의 배양액, 2, 4 레인은 아라비노스를 처리한 실험균의 배양액에서 융합단백질의 검출 결과를 보여준다. 도 3에서 두 균주 모두 아라비노스를 처리한 경우 배양액에서 융합단백질이 검출되었다. 또한 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드에 의해 형질전환된 살모넬라

균주는 flgM-GGGGS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드에 의해 형질전환된 살모넬라 균주에 비해 flgM-Strep-tag 융합단백질의 분비능이 현저하게 우수하였다. flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드에 의해 형질전환된 균주를 *S-flgM-streptag-pBAD18-ASD+/BRD509 asd*-로 명명하였으며, 2023년 6월 26일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC15484BP).

[48] 이하에서는 *S-flgM-streptag-pBAD18-ASD+/BRD509 asd*- 균주를 사용하여, flgM-Strep-tag 융합단백질 발현에 의한 효능을 검정하였다.

[49] 2) 살모넬라 균주 표면에 strep-tag의 발현 검정

[50] 상기 1)에서 제작된 flgM-Strep-tag 융합단백질을 발현하는 약독화 살모넬라 균주의 단일 콜론을 20 mL LB amp 액체 배지에 넣고 37°C에서 16시간 배양하였다. 신선한 LB amp 액체배지 20 mL에 상기 배양액 200 μ l를 넣어 희석한 후, 37°C에서 OD₆₀₀이 0.4~0.6이 되도록 2시간 추가로 배양하였다. 이후, 아라비노스 20% (w/v)을 200 μ l를 넣어 최종 농도가 0.2%가 되도록 한 후 37도에서 6시간 동안 배양하였다. 대조군에는 동일한 양의 PBS를 넣어주었다. 배양 6시간 후 OD₆₀₀ 1.0인 배양 시료 2 mL를 취하여 배지로 3회 세척(원심분리 4200 rpm, 5분)하여 OD₆₀₀ 1.0의 1.0 mL 박테리아 시료를 준비하였다.

[51] 이와 별도로 200 nm 직경의 스트렙타비딘이 코팅된 나노입자(한밭대학교 최진실 교수님 제공) 0.25g을 1 mL PBS에 현탁하여 나노입자 용액을 준비하였다.

[52] 위에서 준비한 박테리아 시료 50 μ l와 나노입자 용액 50 μ l를 상온에서 30분 동안 볼텍스 믹서를 사용하여 600 rpm에서 혼합하였다. 30분 후 4200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 4% glutaraldehyde 0.1 mL를 넣고 풀어준 후 냉장고에 밤새 방치하여 고정시켰다.

[53] 고정된 박테리아 용액 4 μ l를 웨이퍼에 적가하고 37°C 진공에서 2시간 건조한 후 10 mA에서 20초간 플라티늄 코팅하여 FE-SEM(Regulus8230)으로 관측하였다. 도 4는 촬영된 SEM 이미지로 나노입자가 박테리아의 표면에 클러스터 형태로 부착된 것을 확인할 수 있다. 이는 박테리아 표면에 Strep-tag가 발현되며, 표면에 발현된 strep-tag와 나노입자의 스트렙타비딘의 결합에 의해 나노입자가 균주의 표면에 부착되며, 균주로부터 분비된 strep-tag가 크로스링커로 작용하여 스트렙타비딘이 코팅되어 있는 나노입자의 클러스터 형성을 야기하기 때문이라고 사료된다. 반면, 대조군에서는 살모넬라 표면에 나노입자가 부착되어 있는 것이 확인되지 않았다(데이터 미도시).

[54] 3) 형광 분석에 의한 strep-tag의 발현 검정

[55] 염료로 Streptavidin, flamma 648(BioActs) 사용하여 Cy5의 형광 신호를 관찰하는 것에 의해 추가로 strep-tag의 발현을 확인하였다. 이를 위하여 상기 나노입자를 사용한 실험과 동일한 방법에 의해 준비한 OD₆₀₀ 1.0의 박테리아 시료 170 μ l와 PBS 20 μ l 및 100 μ g/mL 염료 용액 10 μ l를 암실 조건에서 500 rpm의 속도로

볼텍스 믹서를 사용하여 혼합하였다. 살모넬라 균주에 결합하지 않은 염료를 제거하기 위하여 1시간 후 8000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 200 μ l의 이동성 배지로 재현탁하여 현광 현미경으로 촬영하였다. 도 5의 A는 명시야 현미경 이미지 및 형광 촬영 이미지를 보여주는 것이고, B는 RGB값을 gray scale로 변화시켜서 gray level intensity의 평균값을 아라비노스에 의한 유도 유무에 따라 측정 비교한 히스토그램이다. 도 5의 (A)에서 확인할 수 있듯이, 아라비노스를 첨가하지 않은 경우에는 Cy5의 형광이 거의 관측되지 않았으나, 아라비노스에 의해 strep-tag의 발현을 유도하는 경우 Cy5의 형광이 강하게 관측되어 살모넬라 균주에 strep-tag가 발현되었음을 확인할 수 있었다. (B)의 히스토그램에서도 아라비노스에 의해 strep-tag의 발현을 유도한 경우 아라비노스가 첨가되지 않은 군보다 gray level intensity가 밝은 부분에서 관측되는 것을 확연하게 보여준다.

[56] 4) 살모넬라 균주의 이동성 검정

[57] 도 4의 SEM 이미지에서 살모넬라 균주의 편모가 관측되지 않음에 따라, 실제 strep-tag의 발현 유도가 살모넬라의 이동성에 영향을 미치는 지 이동성을 검정하였다.

[58] 이동성 검정은 soft agar tryptone plate를 사용하였다(per liter: 10g Bacto tryptone(BD:211705), 5g NaCl(주)바이오세상 S1009), and 3g Bacto agar(BD:214010)). Arabinose를 0.2% 포함하거나 포함하지 않는 각각의 soft agar tryptone plate에 pBAD18 asd+ /aroA aroD asd- 플라스미드로 형질전환된 살모넬라 균주와(1), 실시예 2에서 제작한 flgM-GGSS-HIS*6-streptag-GGSS-streptag 플라스미드로 형질전환된 살모넬라 균주(2)의 콜로니 한 개씩을 멸균된 이쑤시개를 이용하여 서로 떨어진 위치에 이식하였다. 이후 37°C에서 5시간 배양하여 이동성을 확인하였다. 도 6은 그 결과를 보여주는 것으로, flgM-Strep-tag 융합단백질의 발현에 의해 살모넬라 균주의 이동성이 상실되는 것을 보여준다.

[59]

[60]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약

규칙 7.1에 준하여 발행된 국제양식
미 생 물 기 탁 증

수 신 : 전홍진
전홍진, 대한민국 대전광역시 서구 복수서로 50

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 부여된 식별표시 :	국제 기탁기관에 의해 부여된 수탁번호 :
S-flgM-streptag-pBAD18-ASD+/BRD509 asd-	KCTC 15484BP
II. 과학적 성질 및 분류학상 위치	
상기 I 의 조건하에서 식별되는 당해 미생물은 하기에 의해 수반된다: [] 과학적 성질 [] 분류학상의 위치 (해당되는 곳에 x 표시)	
III. 수령 및	
상기 I 의 조건하에서 식별되는 당해 미생물을 2023 년 6 월 26 일자로 당 국제기탁기관이 수탁받았다.	
IV. 재기탁 신청의 수령	
_____에 당 국제기탁기관에 의하여 수탁된 상기 I의 조건하에서 식별되는 당해 미생물 및 _____에 수탁된 원기탁을 부다페스트 조약에 의거하여 재기탁 요청	
V. 국제기탁기관	
명 칭: 생물자원센터 주 소: 한국생명공학연구원(KRIBB) 56212 진라북도 정읍시 입신길 181 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 지닌 사람의 서명 : 생물자원센터장 김성건 일 자 : 2023. 6. 26

청구범위

- [청구항 1] 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 strep-tag를 암호화하는 유전자가 연결되어 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 flgM 유전자와 strep-tag를 암호화하는 유전자는 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결된 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
서열번호 1 또는 서열번호 2로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.
- [청구항 4] 청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 하나의 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현백터.
- [청구항 5] 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 청구항 1의 유전자 구조물에 의해 형질전환되어 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 균주의 표면에 발현하거나, flgM과 strep-tag의 융합단백질을 분비하거나 또는 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 균주의 표면에 발현하면서 분비하며, 종양세포에 표적화되는 것을 특징으로 하는 항암 재조합 균주.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 균주는 약독화 살모넬라 균주인 것을 특징으로 하는 항암 재조합 균주.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 균주는 유도성 프로모터에 의해 flgM과 strep-tag의 융합단백질을 발현할 때 운동성이 억제되거나 또는 상실되는 것을 특징으로 하는 항암 재조합 균주.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서,
상기 균주는 기탁번호 KCTC15484BP의 균주인 것을 특징으로 하는 항암 재조합 균주.
- [청구항 9] 청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항의 항암 재조합 균주를 함유하는 항암 조성물.
- [청구항 10] 청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항의 재조합 균주를 함유하며, strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 항암제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 항암 어쥬먼트.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질은 아비딘, 스트렙타비딘 또는 스트렙-타틴인 것을 특징으로 하는 항암 어쥬먼트.
- [청구항 12] 청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항의 재조합 균주를 함유하며, strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 조영제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 종양 영상화 어쥬먼트.

- [청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질은 아비딘, 스트렙타비딘 또는 스트렙-타틴인 것을 특징으로 하는 종양 영상화 어쥬번트.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서,
상기 조영제는 방사성 핵종, 형광 표지, 효소 표지, 화학 발광 마커, 금 제제 및 자성 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 종양 영상화 어쥬번트.
- [청구항 15] (A) 암 의심 환자 또는 항암 치료 중인 환자에 청구항 14의 종양 영상화 어쥬번트를 투여하여 종양세포에 표적화하는 단계;
(B) 상기 종양 영상화 어쥬번트의 재조합 균주에서 flgM과 strep-tag 융합 단백질의 발현을 유도하는 단계;
(C) Strep-tag와 특이적으로 결합하는 물질로 표지된 조영제를 투여하는 단계; 및
(D) 상기 조영제를 검출하여 영상화하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

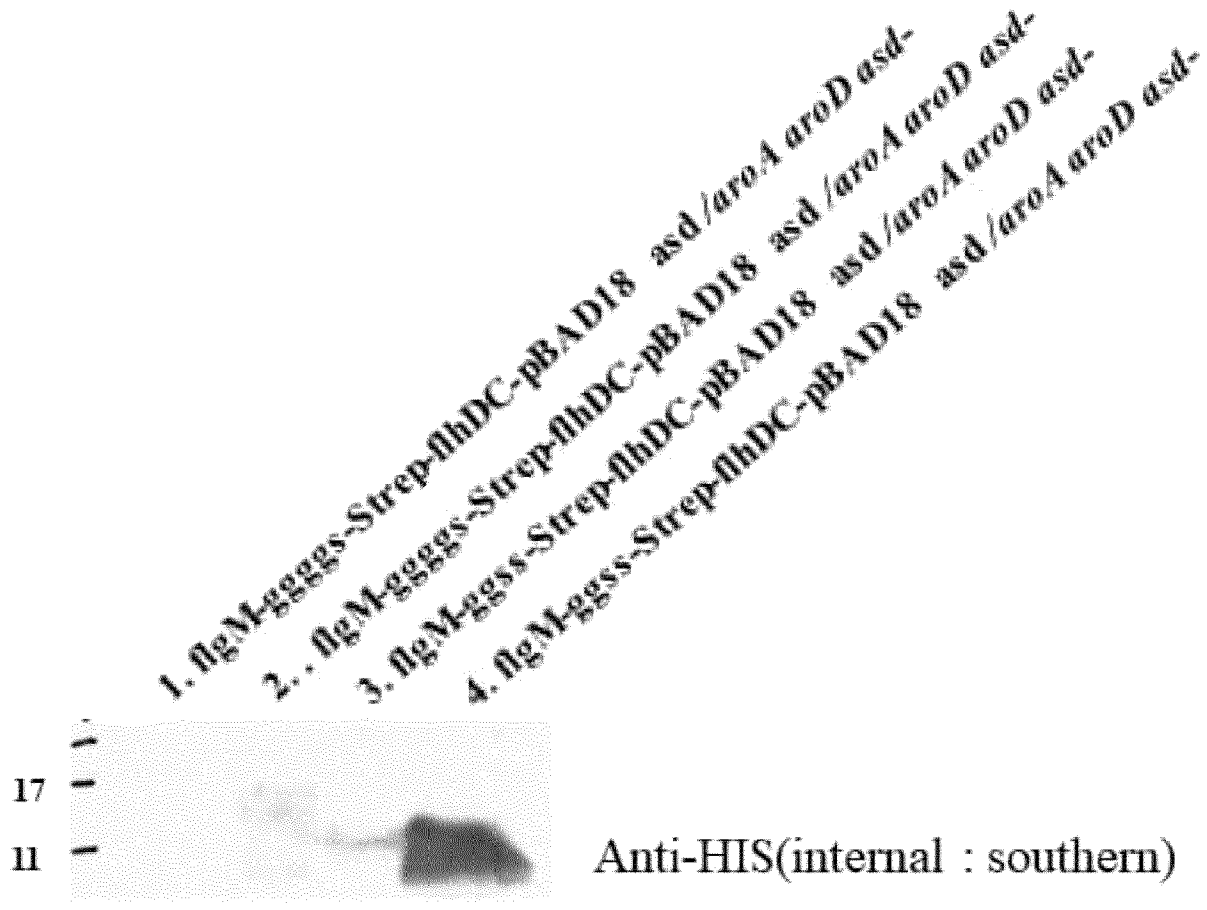
[도 1]

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCT
ATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGCGAA
ACCAGCGACACGCCGGTACAAAAACGCTCAGGAAAAACGTCCGCCGCGACGA
GCGCCAGCGTAACGTTAAGCGACGCGCAAGCGAAGCTCATGCAGCCAGGCGTCAGC
GACATTATAATGGAACGCGTCGAAGCATTAAAAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAA
AAATGGATACGGGAAAAATAGCAGACTCGCTCATTCGCGAGGCGCAGAGCTACTTAC
AGAGTAAAAAAGggcgggcgagcaccagccatcatcatcatcatcagggcggaatttgc
gagcTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAGAAAGGCGCAGCAGCTGGAGCCACCCGCAG
TTCGAGAAAtaaGAGCTC

[도2]

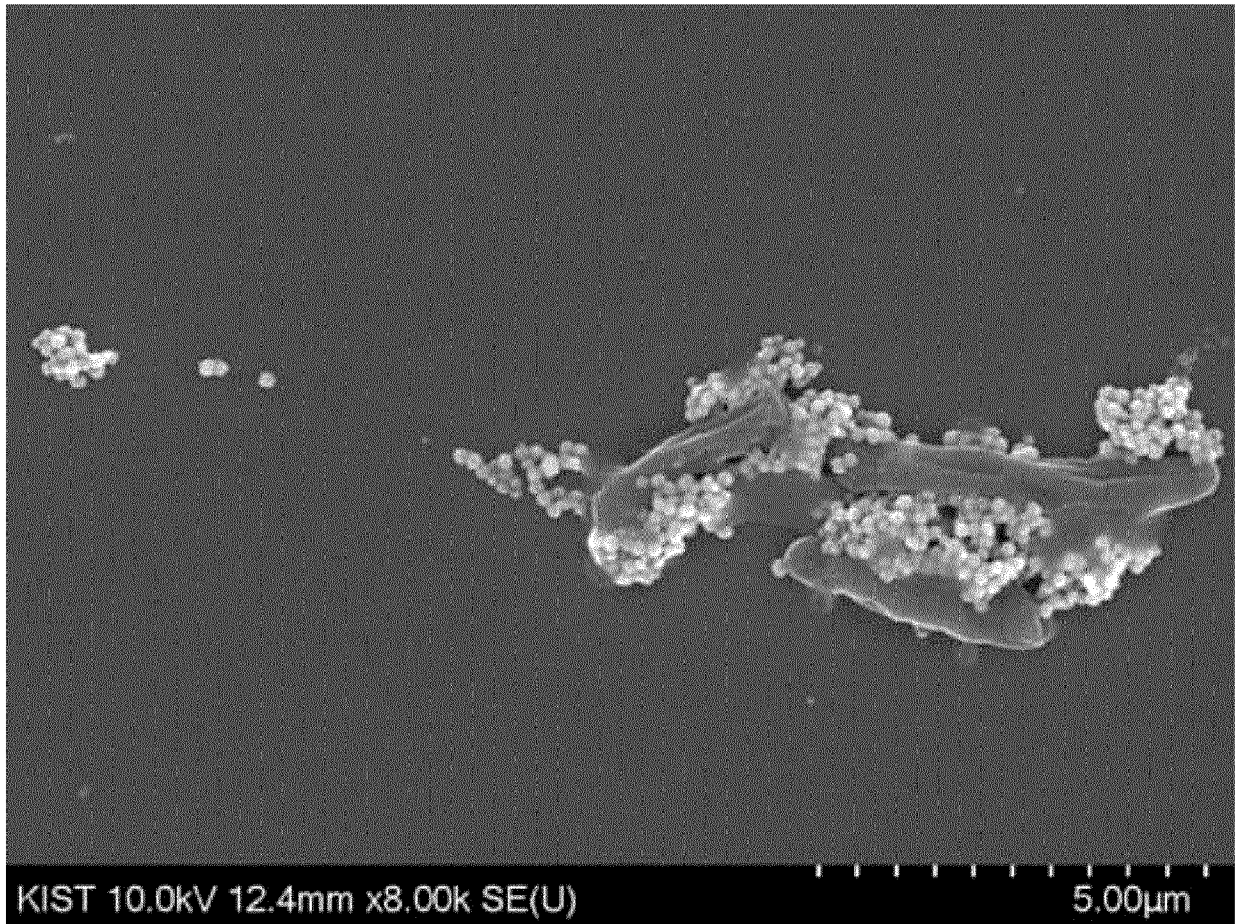
GCTAGCAGGAGGTTTGATCCT
ATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGCGAA
ACCAGCGACACGCCGGTACAAAACGCGTCAGGAATAACGTCCGCCGCGACGA
GCGCCAGCGTAACGTTAAGCGACGCGCAAGCGAAGCTCATGCAAGCCAGGCGTCAGC
GACATTAATATGGAACGCGTCGAAGCATTAATAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAA
AAATGGATACGGGAAATAAGCAGACTCGCTCATTGCGAGGCGCAGAGCTACTTAC
AGAGTAAAAAagggcagcagcaccagccatcatcatcatatagcggcggaatttgcgag
cTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAGAAAGGCGGCAGCAGCTGGAGCCACCCGCGAGTTC
GAGAAAtaaGAGCTC

[도3]

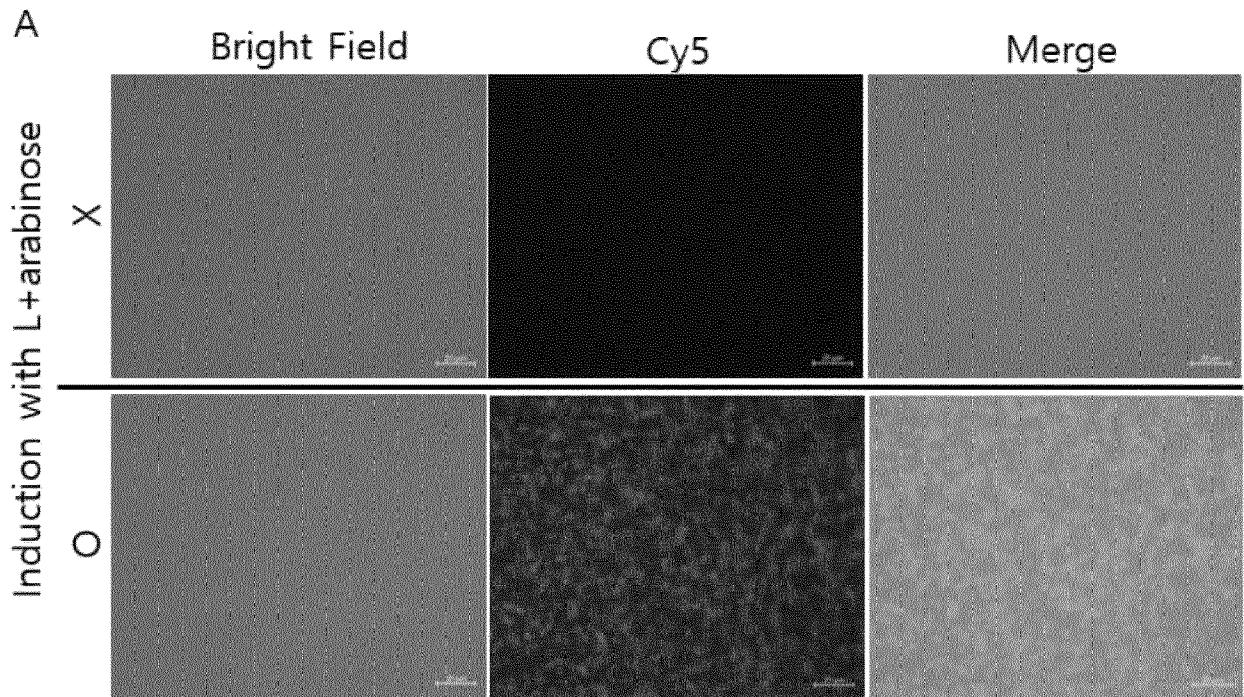


Lane 2, 4 arabinose induction(final 0.2%)

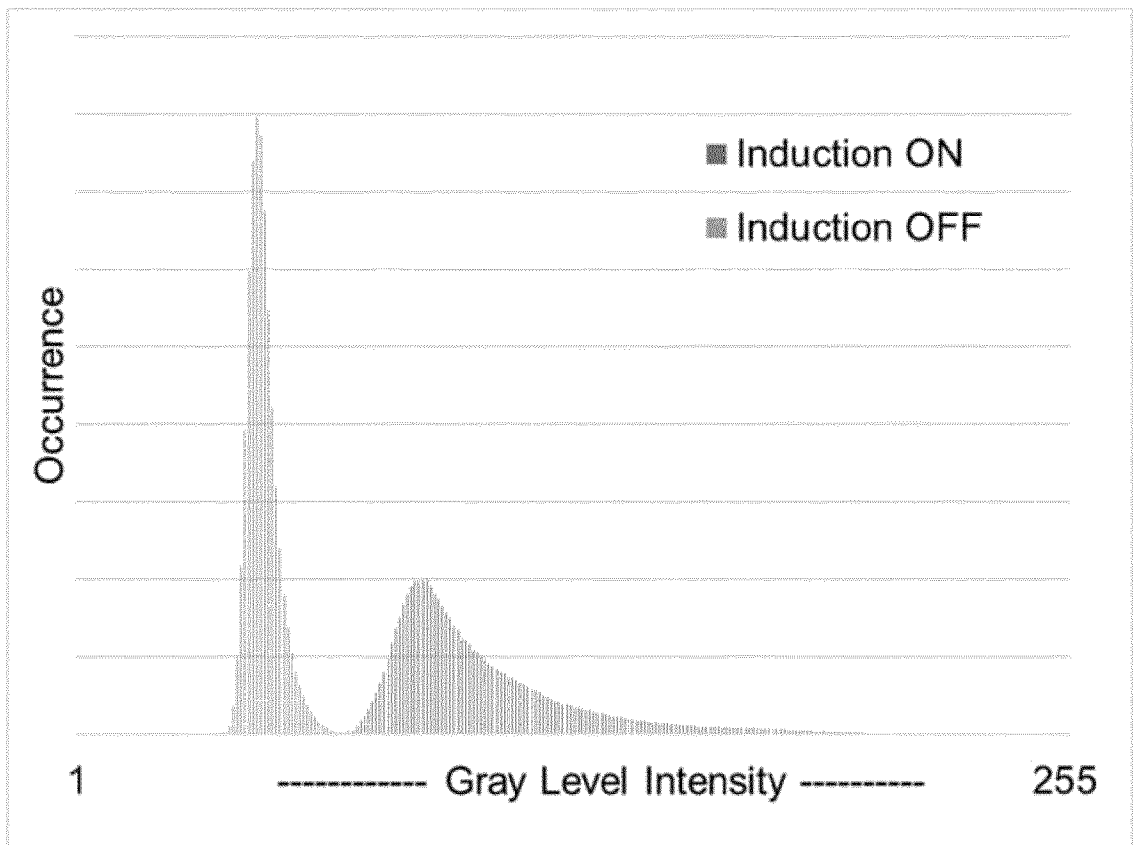
[도4]



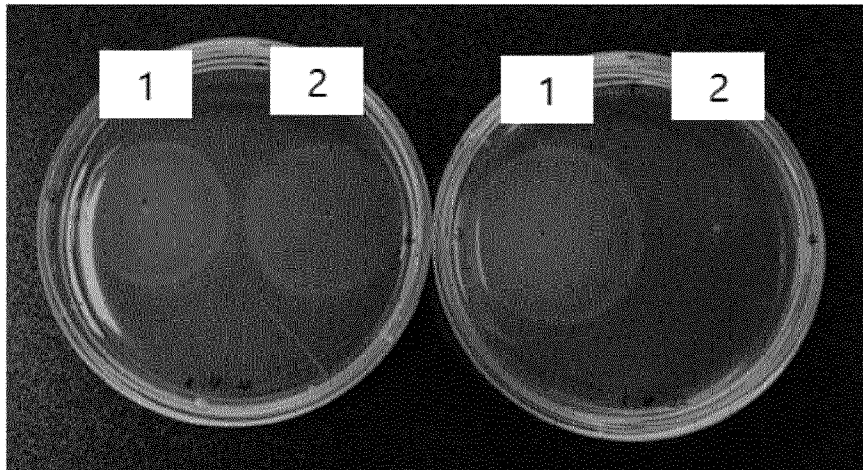
[도5]



B



[도6]

Motility assay**Arabinose****-****+****1. pBAD18 *asd*⁺ /*aroA aroD asd*⁻****2 *flgM*-GGSS – HIS*6- streptag- GGSS- streptag *asd*⁺ /*aroA aroD asd*⁻**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; C12R 1/42(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/62(2006.01); A61K 39/112(2006.01); A61K 51/00(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: flgM, strep-tag, 균주(strain), 종양(cancer), 치료(therapy), 영상화(imaging)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	GUO, Shukui et al. Analysis of factors that affect FlgM-dependent type III secretion for protein purification with Salmonella enterica serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology. 2014, vol. 196, no. 13, pp. 2333-2347. See abstract; and pages 2335, 2342 and 2345.	1-7,9-15 8
Y	BECKER, Annegret et al. Functionalization of gold-nanoparticles by the Clostridium perfringens enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique. Scientific Reports. 2018, vol. 8, article no. 14963, pp. 1-15. See page 2.	1-7,9-15
A	SINGER, Hanna M. et al. Selective purification of recombinant neuroactive peptides using the flagellar type III secretion system. mBio. 2012, vol. 3, no. 3, e00115-12, pp. 1-9. See entire document.	1-15
A	SCHMIDT, Thomas Gm et al. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. Nature Protocols. 2007, vol. 2, no. 6, pp. 1528-1535. See entire document.	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2023		Date of mailing of the international search report 25 September 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009117

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0095528 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 25 August 2011 (2011-08-25) See entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009117

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/009117

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-2011-0095528	A	25 August 2011	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; C12R 1/42(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/62(2006.01); A61K 39/112(2006.01); A61K 51/00(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: flgM, strep-tag, 균주(strain), 종양(cancer), 치료(therapy), 영상화(imaging)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	GUO, SHUKUI 등, 'Analysis of factors that affect FlgM-dependent type III secretion for protein purification with Salmonella enterica serovar Typhimurium', Journal of Bacteriology, 2014, 196권, 13호, 페이지 2333-2347 요약; 페이지 2335, 2342, 2345 참조.	1-7,9-15 8
Y	BECKER, ANNEGRET 등, 'Functionalization of gold-nanoparticles by the Clostridium perfringens enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique', Scientific Reports, 2018, 8권, article no. 14963, 페이지 1-15 페이지 2 참조.	1-7,9-15
A	SINGER, HANNA M. 등, 'Selective purification of recombinant neuroactive peptides using the flagellar type III secretion system', mBio, 2012, 3권, 3호, e00115-12, 페이지 1-9 전체 문헌 참조.	1-15
A	SCHMIDT, THOMAS GM 등, 'The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins', Nature Protocols, 2007, 2권, 6호, 페이지 1528-1535 전체 문헌 참조.	1-15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년09월25일 (25.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월25일 (25.09.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

