

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 7월 25일 (25.07.2024)



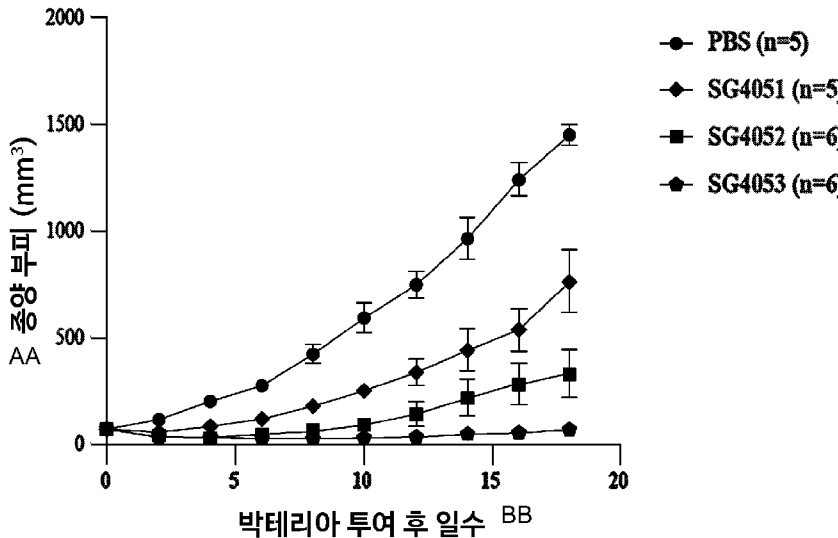
(10) 국제공개번호
WO 2024/155027 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 14/255 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) C12R 1/42 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/000597
- (22) 국제출원일: 2024년 1월 12일 (12.01.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0006245 2023년 1월 16일 (16.01.2023) KR
- (71) 출원인: 주식회사 오디세우스바이오 (ODYSSEUS BIO CO., LTD.) [KR/KR]; 58128 전라남도 화순군 화순읍 서양로 264, 의생명과학융합센터 기초연구동 (M5) 408-1호, Jeollanam-do (KR).
- (72) 발명자: 김광수 (KIM, Kwangsoo); 61697 광주광역시 남구 서문대로 812번길 10, 101동 1203호, Gwangju (KR). 이종은 (LEE, Jong-eun); 06544 서울특별시 서초구 신반포로 270, 117동 1801호, Seoul (KR). 최솔 (CHOY, Sol); 07000 서울특별시 동작구 사당로 27길 130, 102동 402호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 에스알비 (SRB IP & LAW FIRM); 06130 서울특별시 강남구 강남대로94길 53, 4층, Seoul (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,

(54) Title: ATTENUATED SALMONELLA GALLINARUM EXPRESSING FLIC OR FLIC-HIL2 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: FLIC 또는 FLIC-HIL2 발현 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도

[도14]

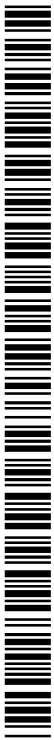


AA ... Tumor volume (mm³)
BB ... Days after bacteria administration

(57) Abstract: The present invention relates to an attenuated Salmonella gallinarum expressing FliC or FliC-hiL2 and use thereof. The Salmonella strain according to the present invention has excellent immune activity and exhibits excellent anti-cancer efficacy, and thus can be used as a therapeutic agent for cancer together with or independently of existing anti-cancer drugs.

(57) 요약서: 본 발명은 FliC 또는 FliC-hiL2 발현 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 면역 활성능이 우수하고, 우수한 항암 효능을 나타내어, 기존 항암제와 함께 또는 독립적으로 암의 치료제로 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2024/155027 A1

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))

명세서

발명의 명칭: FLIC 또는 FLIC-HIL2 발현 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC, 또는 FliC와 융합된 IL-2 단백질을 발현하는 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 면역 활성화능 및 종양 관련 질환의 치료에 이용될 수 있는 균주 및 상기 균주를 형질전환시킬 수 있는 벡터 또는 핵산에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 2021년 암으로 사망한 사람은 인구 10만명당 161.1명으로 전체 사망자의 26.0%가 암으로 사망하고 있다. 따라서, 암은 가장 일반적인 사망원인이라 할 수 있으며, 국가암정보센터에 따르면 전국 단위 암발생통계를 산출하기 시작한 1999년 이후 최근까지 그 발병률은 증가되고 있다.
- [3] 암 관련 질환의 발병률 증가 요인으로는 대기오염 등 환경오염물질의 증가와 같은 환경적 요인 및 식생활의 서구화에 따른 고지방식의 섭취, 음주 및 흡연과 같은 개인적인 요인의 증가에 따른다. 따라서, 암의 조기 예방 및 치료를 위한 항암 소재 개발의 중요성이 더욱더 중요해지고 있다. 또한, 뚜렷한 치료 방법이 없는 난치성 암종의 경우, 발병률은 낮지만 사망률이 높으므로 치료제 개발이 시급하다. 다만, 화합물 기반의 항암제는 암세포 외에도 전신에 작용하는 비특이성을 나타내는 경우가 많으므로, 부작용의 발생이 문제점으로 지적되고 있다.
- [4] 한편, 박테리아 감염이 항암효과를 보인다는 보고 이후, 항종양 박테리아 균주 개발에 관련된 연구가 급격히 증가하였다. 최근 20년 동안 연구된 항종양 박테리아는 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 클로스트리디움 (*Clostridium*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 시겔라 (*Shigella*), 비브리오 (*Vibrio*), 리스테리아 (*Listeria*), 에스케리키아 (*Escherichia*) 및 살모넬라 (*Salmonella*) 등이다. 다만, 이와 같은 균주를 사용한 암 치료의 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않은 상황이다.
- [5] 제시된 다양한 균주 중, 기존 개발된 약독화 살모넬라 균주의 경우 암 세포뿐만 아니라 다양한 정상 장기에 분포하여 암세포 표적화율이 낮아, 균주 자체에 의한 부작용이 문제되고 있다. 특히, 면역 기능이 약화된 환자나 노약자의 경우 약독화 살모넬라 균주에 의해서도 치명적인 패혈증이 유발될 수 있어, 치료 효과를 고려한다고 해도 개선책이 요구된다. 따라서, 종양 표적능 및 생체 내 안정성이

월등히 높으면서도 암 치료에 효과적으로 사용할 수 있는 새로운 균주의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에 본 발명자들은 약독화 되어 투여 대상에서 살모넬라 균주에 의한 문제가 발생되지 않으면서도, FliC 발현을 통해 TLR5 수용체를 자극함에 따라 면역 활성 능력이 우수하고, 이에 따른 항암 활성이 우수한 살모넬라 균주를 제작하였다.
- [7] 이에, 본 발명의 목적은 살모넬라 균주 (*Salmonella Sp*)에 도입되어, 살모넬라 균주의 면역 활성능 및 항종양 효능을 증강시키는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 면역 활성능 및 항종양 효능이 우수한 살모넬라 균주를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 활성능 및 항종양 효능이 우수한 살모넬라 균주를 포함하는 암의 치료, 예방 완화 또는 억제용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명은 본 발명은 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC, 또는 FliC와 융합된 IL-2 단백질을 발현하는 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 기존 살모넬라 균주 대비 증강된 면역 활성능을 가지며, 우수한 항암 효능을 나타낸다.
- [11] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [12]
- [13] 본 발명의 일 양태는, 살모넬라 균주에 도입되어, 살모넬라 균주의 면역 활성능 및 항종양 효능을 증강시키는 폴리뉴클레오타이드로, 폴리뉴클레오타이드는 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드이다.
- [14] 본 명세서 상의 용어“폴리뉴클레오타이드”은 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 폴리뉴클레오타이드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 약독화 살모넬라 균주인 것일 수 있다.
- [16] 본 명세서 상의 용어 “약독화”는 균주의 병원성이 감소하도록 변형된 것을 의미한다. 따라서, 본 발명에 있어서 살모넬라 균은 약독화에 의하여 종양 세포 이외의 정상 세포에서 균주의 병원성에 의해 나타날 수 있는 세포 독성 및 기타 부작용의 방지가 가능하다. 약독화 균주는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 약독화는 균주가 숙주 세포에서 생존하도록 하는 독성인자 (virulence factor)의 결실 또는 파괴에 의해 달성될 수 있으며, *pab*,

proBC, nadA, pncB, pmi, rpsL, ompR, htrA, hemA, rfc, poxA, galU, aro, galE, cya, crp, cdt, pur, phoP, phoQ, ssa, guaA, guaB, clpP, clpX, fliD, flgK, flgL, relA, spoA 및 *spoT* 유전자, 및 *ssaV, sseBCD, ssrAB, sopB, sseF, sseG*를 포함한 살모넬라 패소제니시티 아일랜드 (salmonella pathogenicity island, SPI)에 암호화된 유전자들의 결실에 의해 달성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[17] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)인 것일 수 있다.

[18] 본 명세서 상의 용어 “살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)”은 살모넬라 균의 일종으로, 형태학적으로는 그람음성, 단간 균으로 살모넬라 중에서 운동성이 없는 것이 특징이다. 종래 박테리아를 이용한 항암표적치료 연구에 이용 빈도가 가장 높은 살모넬라 균주는 살모넬라 티피뮤리움이며, 살모넬라 티피뮤리움의 감염에 따른 병원성을 고려하여 반드시 약독화 후 연구에 이용된다. 살모넬라 속은 혈청학적 분류법에 따라 대략 2500종으로 분류될 만큼 다양하며 이중 일부 균주가 숙주 특이적 병원성을 보유하고 있다고 보고되었다. 예를 들어, 살모넬라 티피 (*salmonella Typhi*) 및 살모넬라 파라티피 (*salmonella paratyphi*)는 인간을 숙주로 하는 병원 기전을 보유하고, 특히, 살모넬라 티피뮤리움 (*salmonella typhimurium*)은 인간을 포함하여 소, 돼지, 양, 말, 설치류 등에 감염하여 병증을 유발한다고 보고되었다. 따라서, 살모넬라 티피뮤리움 (*salmonella typhimurium*)은 약독화 시에도 여전히 병원성에 대한 우려가 존재하는 상황으로 항암제나 기타 약물로서 인간을 포함한 대상에게 투여하는 것은 부적절한 면이 존재한다. 반면, 살모넬라 갈리나룸 (*salmonella gallinarum*)은 오직 조류에만 특이적으로 감염하여 병원성을 나타낸다고 알려져 있으며, 살모넬라 갈리나룸 (*salmonella gallinarum*)의 경우, 살모넬라 티피뮤리움 (*salmonella typhimurium*)과 달리 추가적인 약독화가 이루어진 경우 인간을 포함한 대상에서 병원성을 나타낼 가능성은 현저하게 낮다. 따라서, 본 발명의 약독화 살모넬라 갈리나룸 균주는 인간에게 가장 안전하면서도 종양의 진단 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[19] 본 명세서 상의 용어 “FliC”는 박테리아에서 발견되는 편모 필라멘트 구조 단백질의 의미이다. FliC 단백질은 톨유사수용체 5 (Toll-like receptor 5)를 자극하여 면역활성을 높일 수 있다. 한편 야생형 살모넬라 갈리나룸의 경우 FliC를 발현 및 분비하지 못하기 때문에 톨유사수용체 5를 자극함에 따라 대상 내에서 면역활성을 높일 수는 없으나, 본 발명에 따른 살모넬라 갈리나룸 균주는 야생형 살모넬라 균주가 발현하지 않는 FliC 유전자를 발현함에 따라 투여 대상 내에서 면역활성을 증강시킬 수 있다. 또한, 살모넬라 균주 자체가 가진 항암 효과와 동반 상승 작용을 통해 항암 치료 효능을 배가시킬 수 있다 (실시예 3 내지 4 참조). 이때, FliC 단백질은 본 발명에 따라 형질전환된 약독화 살모넬라 갈리나룸 내에서 3형 분비 시스템 (type III secretion system)을 통해 분비될 수 있다. FliC는 운동성이 없는 야생형 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella Gallinarum*)에서 발현되지 않으며, 본 발명에 따라 형질전환되어 FliC 단백질을 발현하는 약독화 살모넬라 균주는 FliC

를 발현함에 따라 TLR5 수용체를 활성화시키는 효과는 가지면서도, 단순히 FliC 단백질 발현할 뿐, 편모 등을 생산할 수는 없어 대상체 내에서 병원성을 일으킬 가능성이 낮은 장점을 가진다.

[20] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.

[21] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인터루킨-1 베타 (Interleukin-1 beta; IL-1 β), 인터루킨-10 (interleukin-10; IL-10), 인터루킨-15 (interleukin-15; IL-15), 인터루킨-7 (interleukin-7; IL-7), 인터루킨-21 (interleukin-21; IL-21), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor-alpha; TNF- α), 인터페론 감마 (Interferon- γ ; IFN γ)로 이루어진 그룹에서 하나 이상을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)과 융합 (fusion)된 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인터루킨-1 베타 (Interleukin-1 beta; IL-1 β), 인터루킨-10 (interleukin-10; IL-10), 인터루킨-15 (interleukin-15; IL-15), 인터루킨-7 (interleukin-7; IL-7), 인터루킨-21 (interleukin-21; IL-21), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor-alpha; TNF- α), 인터페론 감마 (Interferon- γ ; IFN γ)로 이루어진 그룹에서 하나 이상과 융합된 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 것일 수 있다.

[24] 따라서, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 FliC와 IL-2를 동시에 발현할 수 있으며, 특히, FliC와 융합된 IL-2 단백질을 발현하는 것일 수 있다. 상기 FliC와 융합된 IL-2 단백질을 발현하는 본 발명의 살모넬라 균주는 FliC 발현을 통해 대상에서 TLR5 수용체 자극을 통한 면역 활성화 촉진 능력을 가지면서도, IL-2를 통해서 종양내 CD3⁺ T 세포 (CD3⁺, CD8⁺)를 선택적으로 증가시켜 면역 세포 활성화능력이 우수하다 (실시예 7 참조). 한편, 전술한 바와 같이 FliC는 살모넬라 균주내에서 3형 분비 시스템 (type III secretion system)을 통해 분비될 수 있기 때문에, 이와 융합된 IL-2 단백질 또한 FliC와 함께 3형 분비 시스템을 통해 살모넬라 균주 외부로 분비될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 FliC와 IL-2 단백질을 그람 음성균에서 2형 분비 시스템 (type II secretion system)이 아닌 3형 분비 시스템을 통해 분비할 수 있고, 이에 따라, 2형 분비 시스템으로 분비되는 경우 별도로 요구되는 후속 처리과정이 불필요하여 목적하는 단백질의 생산 수율 또한 우수하다 (실시예 5 참조). 구체적으로, FlaB 단백질의 경우 일반적으로 2형 분비 시스템에 따라 분비되어 세포벽과 세포막 사이의 주변세포질공간 (periplasmic space) 사이에 존재하는 단백질을 세포벽 외부로 이송시키기 위하여 PelB 단백질

이 보유한 신호 서열 (Signal sequence)을 융합하여 이용하는 경우가 존재한다. 다만, 본 발명의 경우 전술한 바와 같이 3형 분비 시스템을 통해 살모넬라 균주 외 부로 FliC와 함께 이에 융합된 IL-2를 별도의 PelB 단백질의 서열을 이용하여 외 부로 이송시킬 필요가 없다.

- [25] 본 명세서 상의 용어, "발현"은 폴리펩티드의 생성에 관여하는 임의의 단계, 예를 들어 전사, 전사 후 변형, 번역, 번역 후 변형, 및 분비 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 한편, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 FliC 또는 FliC와 IL-2를 동시에 발현할 수 있을 뿐만 아니라, FliC 또는 FliC와 IL-2의 발현에 그치는 것이 아니라 FliC 및/또는 IL-2를 분비하고 생산하는 것이 가능하며, 특히 FliC와 융합된 IL-2 단백질을 발현하는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 구현예에서, FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 구현예에서, FliC와 융합된 인터루킨-2를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [28] 본 명세서 상의 용어 "실질적인 동일성"은 각각의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열이 각각의 뉴클레오타이드 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드인 것일 수 있다.
- [29] 본 발명의 다른 양태는, 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된, 살모넬라 균주이다.
- [30] 본 발명에 있어서, 살모넬라 균주는 벡터를 통해 형질전환되고, 약독화된 살모넬라 균주인 것일 수 있다.
- [31] 본 명세서 상의 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함하며, 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태 또는 이를 포함하는 벡터의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다.

- [32] 본 명세서상의 용어 "벡터 (vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다.
- [33] 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 사용되는 벡터면 제한 없이 사용될 수 있다. 구체적으로, 벡터는 pAWP89, pBAD, pCES208, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등의 플라스미드, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등의 파지 또는 SV40 등의 바이러스 벡터를 이용하여 제작될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34] 본 발명에 있어서 재조합 벡터의 미생물 (숙주 세포) 내로의 운반 (도입)은 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [35] 형질전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)인 것일 수 있다.
- [37] 본 발명자들은 형질전환한 균주를 psg FLIC을 운반하는 약독화 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) SG4052 균주 [Attenuated *Salmonella Gallinarum* carrying psgFliC (sg4052)]로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean korean collection for type cultures; KCTC)에 2023.01.04자로 기탁하여 수탁번호 KACC 15269BP를 부여받았다.
- [38] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 수탁번호 KACC 15269BP로 기탁된 균주인 것일 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는, 구아노신 4인산 (Guanosine tetraphosphate, ppGpp) 합성효소를 암호화하는 유전자, 살모넬라 병원성유전자 군 2 (*Salmonella pathogenicity island 2*)의 전사 활성인자 *ssrA/B* 및 Gifsy 2 prophage 유전자로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나의 유전자가 결실된 것일 수 있다.
- [40] 본 명세서상의 용어 "ppGpp"는 구아노신 4인산 (Guanosine tetraphosphate)를 의미하며, 구아노신 5'-이인산 3'-이인산 (guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate) 또는 구아노신 3'5'-비스파이로인산 (guanosine 3'5'-bispyrophosphate)으로 혼용되어 사용될 수 있다. ppGpp는 세포 내 신호 전달 물질로, 살모넬라 갈리나룸 균

주의 독성을 나타내도록 하는 유전자 중 특히 살모넬라 패소제니시티 아일랜드 (Salmonella Pathogenicity Island, SPI)에 암호화된 것들의 발현을 유도한다. 또한, 본 발명에서 구아노신 4인산 (Guanosine tetraphosphate, ppGpp) 합성효소를 암호화하는 유전자는 *relA* 및 *spoT* 유전자를 의미할 수 있다.

- [41] *relA* 및 *spoT* 유전자의 동시 결실은 유전자의 전사 또는 번역, 유전자 산물의 활성의 손상 (impairment)을 초래하는 *relA* 및 *spoT* 유전자의 변형 (modifications)에 의해 달성될 수 있다. 이러한 유전자 변형은 ppGpp 합성효소 코딩 서열 (CDS)의 불활성화뿐만 아니라 이의 프로모터의 불활성화도 포함할 수 있다.
- [42] 살모넬라 갈리나룸 균주의 계놈 상에서 목적인 유전자만의 특이적 불활성화는 유전자를 코딩하는 전체 또는 하나 이상의 부분 영역에서 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통한 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 이형 서열 (heterogenous sequence)의 삽입에 의하여, 유전자의 절단 (truncation), 넌센스 돌연변이 (nonsense mutation), 틀이동 돌연변이 (frameshift mutation), 미스센스 돌연변이 (missense mutation) 등이 발생할 수 있다. 이와 같은 유전자의 특이적 불활성화는 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 한편, 유전자의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발 (mutagenesis) 방법을 통하여 수행될 수 있다. 예를 들어, *relA* 및 *spoT* 유전자의 결실은 PCR 돌연변이 유발법 및 카세트 돌연변이 유발법으로 수행될 수 있다.
- [43] 본 명세서 상의 용어, "type III 분비 시스템 (T3SS)"은 유전체 상에 연속적으로 배열되어 있는 *ssrA* 및 *ssrB* 유전자에 의해 조절된다. *ssrB*는 전사 조절자로 막 단백질인 *ssrA*에 의해 인산화되어 활성을 가진다. 따라서, 살모넬라 갈리나룸 유전체 상에서 상기 *ssrA* 및/또는 *ssrB*의 제거를 통한 기능 상실은 살모넬라 패소제니시티 아일랜드 2 (salmonella pathogenicity island 2, SPI2)에 포함된 오페론 및 유전자들 전체를 불활성화시키는 결과를 나타낼 수 있다. 살모넬라는 숙주로의 감염 후 SPI2로 인코딩된 type III 분비 시스템 (T3SS)를 배포하여 숙주 세포 기능을 수정하고 숙주 세포 내에서 번식한다.
- [44] 본 발명에서, Gifsy 1 및 2는 박테리아를 표적으로 하는 바이러스 (박테리오파지, bacteriophage)를 의미한다. 본 발명자들은 야생형 살모넬라 갈리나룸의 유전체 검사 결과에 따라 Gifsy 2 *prophage*를 코딩하는 전체 유전자 서열이 포함되어 있는 것을 확인하였으며, 살모넬라 유전체 내에 삽입되어 있는 상기 유전자의 결실로 살모넬라의 병원성을 낮출 수 있다.
- [45] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 *glmS* 유전자가 결실된 것일 수 있다.
- [46] *glmS* 유전자가 결실된 살모넬라 갈리나룸 균주는 펩티도글리칸 합성 성분인 D-glucosamine (GlcN) 또는 N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)이 부족하여 동물에

서 용해될 수 있으므로, 항생제 내성 유전자 대신 *glmS* 유전자는 살모넬라 갈리나룸 균주의 선택적 결정 인자로 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 *relA*, *spoT*, *ssrAB*, Gifsy 2 prophage 및 *glmS* 유전자가 결실된 것일 수 있다.

[48] 본 발명의 일 구현예에서, 벡터는 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.

[49] 본 발명의 일 구현예에서, 벡터는 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)과 융합 (fusion)된 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.

[50] 본 발명자들은 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)과 융합 (fusion)된 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 형질전환한 균주를 psg FLIC-hIL2를 운반하는 약독화 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) SG4052 균주 [Attenuated *Salmonella Gallinarum* carrying psgFliC-hIL2 (sg4053)]로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean korean collection for type cultures; KCTC)에 2023.01.04자로 기탁하여 수탁번호 KACC 15270BP를 부여받았다.

[51] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는 수탁번호 KACC 15270BP로 기탁된 균주인 것일 수 있다.

[52] 본 발명의 일 구현예에서, 벡터는 인터루킨-1 베타 (Interleukin-1 beta; IL-1 β), 인터루킨-10 (interleukin-10; IL-10), 인터루킨-15 (interleukin-15; IL-15), 인터루킨-7 (interleukin-7; IL-7), 인터루킨-21 (interleukin-21; IL-21), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor-alpha; TNF- α), 인터페론 감마 (Interferon- γ ; IFN γ)로 이루어진 그룹에서 하나 이상을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.

[53] 본 발명의 또 다른 양태는, 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는, 암의 치료, 예방, 완화 또는 억제용 약제학적 조성물이다.

[54] 본 명세서에서 용어, “유효성분으로 포함하는”이란 본 발명에 따른 약제학적 조성물이 약독화된 살모넬라 균주를 암 또는 종양 관련 질환에 대한 완화, 억제, 예방 또는 치료 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.

[55] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는, 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 것일 수 있다.

- [56] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라 균주는, 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)와 융합 (fusion)된 필라멘트 구조 단백질 (Fliament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 것일 수 있다.
- [57] 본 발명의 일 구현예에서, 살모넬라균주는 인터루킨-1 베타 (Interleukin-1 beta; IL-1 β), 인터루킨-10 (interleukin-10; IL-10), 인터루킨-15 (interleukin-15; IL-15), 인터루킨-7 (interleukin-7; IL-7), 인터루킨-21 (interleukin-21; IL-21), 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor-alpha; TNF- α), 인터페론 감마 (Interferon- γ ; IFN γ)로 이루어진 그룹에서 하나 이상과 융합된 필라멘트 구조 단백질 (Fliament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 것일 수 있다.
- [58] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 예를 들어, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [59] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 율활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 경구 및 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 경막 내 투여, 안구 투여, 피부 투여 및 경피 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 투여량이 정해질 수 있으며, 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량으로 결정 또는 처방될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 mg/kg 일 수 있다.
- [62] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [63] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여될 수도 있다. 예를 들어, 유

효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 수 있으나, 이는 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[64] 본 명세서 상의 용어 “암의 치료”는 암을 억제하는 모든 작용을 포함하는 것을 의미하며, 구체적으로 암세포의 주기 조절 작용 또는 암세포의 아포토시스 (apoptosis) 유도 작용을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[65] 본 발명의 일 구현예에서, 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 교모세포종 또는 골수암으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

발명의 효과

[66] 본 발명은 FliC 또는 FliC-hIL2 발현 살모넬라 균주, 그리고 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 면역 활성능이 우수하고, 우수한 항암 효능을 나타내어, 기존 항암제와 함께 또는 독립적으로 암의 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[67] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 야생형 살모넬라 갈리나룸의 플라젤린 생합성 연계 유전자들의 변이 확인 결과를 나타내는 도면이다.

[68] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 세균 운동성 분석 (bacterial motility assay)을 통해 살모넬라 티피뮤리움 (WT, ST) 그리고 살모넬라 갈리나룸의 운동성을 확인한 결과를 나타내는 사진이다.

[69] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 Flagella operon에 연계된 *flhD/C*, *flaE*, 그리고 *FliC*의 mRNA 수준 (level)을 살모넬라 티피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸에서 QPCR 방법을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[70] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 유래 FliC의 3형 분비 시스템 (type III secretion system)을 통한 분비능 확인결과를 나타내는 도면이다.

[71] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 sgFliC의 세포내 그리고 세포외 분비능을 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

[72] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 sgFliC의 톨유사수용체 (Toll like receptor 5; TLR 5) 자극능을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[73] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4052 균주의 투약에 따른 종양 크기 감소 확인 결과를 나타낸 그래프이다.

[74] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4052 균주의 투약에 따른 생존율 증가 확인 결과를 나타낸 그래프이다.

- [75] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4052 균주의 투약에 따른 종양내 M1 그리고 M2 대식세포 (Macrophage)의 분포 확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [76] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 인간 IL-2 (Human IL-2), sgFliC 및 sgFliC-hIL2의 구조 예측 결과를 나타낸 도면이다.
- [77] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 sgFliC 및 sgFliC-hIL2의 단백질 발현 검출한 결과를 나타낸 도면이다.
- [78] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 sgFliC, sgFliC-hIL2의 IL2 기능 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- [79] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 sgFliC, sgFliC-hIL2의 TRL5 활성능을 평가한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [80] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4053 균주의 투약에 따른 종양 크기 변화를 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [81] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4053 균주의 투약에 따른 생존율 변화를 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [82] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4053 균주의 투약에 따른 종양내 대식세포 (Macrophage)의 분포를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [83] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 살모넬라 갈리나룸 SG4053 균주의 투약에 따른 종양내 T 세포 분포를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [84] 살모넬라 균주에 도입되어, 상기 살모넬라 균주의 면역 활성능 및 항종양 효능을 증강시키는 폴리뉴클레오타이드로,
- [85] 상기 폴리뉴클레오타이드는 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.

발명의 실시를 위한 형태

- [86] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[87]

- [88] **실시예 1: 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)의 운동성 및 FliC 발현 분석**

- [89] 야생형 살모넬라 갈리나룸의 전장 유전체 분석 (whole genome sequencing)을 통해 플라젤린 (flagellin) 생합성에 연관된 유전자들의 돌연변이를 확인하였고 이를 도 1에 나타내었다.

- [90] 이어서, 야생형 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) 및 야생형 살모넬라 티피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*)의 운동성을 세균 운동성 분석 (bacterial motility assay)을 통해 검증하였고, 이를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 나타나듯이,

야생형 살모넬라 티피뮤리움과 달리 야생형 살모넬라 갈리나룸은 운동성은 없는 것으로 확인되었다.

[91] 플라젤린 생합성에 연관된 대표적 유전자인 *flhD/C* (Class I), *flgE* (Class II), 그리고 *FliC* (Class III)의 mRNA 수준 (level)을 QPCR 방법을 통해 확인하였고, 이를 도 3에 나타내었다. 이때, 살모넬라 티피뮤리움의 *flhD/C*, *flgE*, 그리고 *FliC*는 본 실험의 대조군으로 사용하였다. 도 3에서 확인할 수 있듯이, 야생형 살모넬라 갈리나룸의 *flhD/C* 그리고 *flgE* 유전자 발현 수준은 대조군에 비해 대략 30% 그리고 50%가 감소되는 것이 확인되었으며, 약독화 살모넬라 갈리나룸의 *fliC*의 발현은 검출되지 않았다. 이러한 결과는, 살모넬라 갈리나룸에서 플라젤린 생합성에 연관된 대부분의 유전자가 비 활성화 또는 낮은 발현을 보이고 있는 것을 의미한다. 종합하여, 살모넬라 갈리나룸의 플라젤린의 발현 결여는 필요한 시그마 factor의 결여 때문인 것으로 유추된다.

[92]

[93] **실시예 2: 살모넬라 갈리나룸 유래 *FliC*의 type III secretion 의존적 세포외 분비능 확인**

[94] Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)의 *FliC*는 type III secretion system (T3SS)를 통해 세포외로 분비되어 TLR 5 신호를 자극 하지만 운동성에는 연관되지 않음이 알려져 있다. 또한 살모넬라 티피뮤리움의 필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)로 알려진 *FliC*는 세포 외부로 분비되는 것이 알려져 있다.

[95] sg*FliC*는 야생형 살모넬라 갈리나룸에서 생산되지 않음이 확인되었다 (도 3 참조). 따라서, sg*FliC* 과발현 컨스트럭트 (psg*FliC*) 와 Control 컨스트럭트 (Mock) 각각을 야생형 살모넬라 갈리나룸 (SG. WT) 그리고 *FlhD/C* 변이 살모넬라 갈리나룸 (SG*flhD/C*)에 형질 전환하고, sg*FliC*의 생산 및 각각 박테리아의 세포 외부로 분비되는지 확인하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[96] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 야생형 살모넬라 갈리나룸의 sg*FliC*는 세포 외부 (bacterial cultured media)에서 검출되었지만, 플라젤린 생합성의 상위 유전자인 *flhD/C*가 결핍된 살모넬라 갈리나룸 균주에서는 매우 낮은 수준으로 검출되었다. 이러한 결과는 야생형 살모넬라 갈리나룸에서 플라젤린은 생성되지 못하지만, T3SS는 유지되고 있음을 의미한다.

[97]

[98] **실시예 3: sg*FliC* 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸의 항종양 효능 평가**

[99] sg*FliC*의 항종양 효능을 평가하기 위해 하기 표 1의 서열을 갖는 psg*FliC*를 약독화 살모넬라 갈리나룸 균주인 SG4048 (Δ *relA*, Δ *spot*, Δ *ssrAB*, Δ Gifsy 2 prophage, Δ *glmS*)를 형질 전환하여 sg*FliC* 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸 균주를 제작하였다 (SG4052). 그리고, 상기 SG4052 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean korean collection for type cultures; KCTC)에 2023.01.04자로 기탁하여 수탁번호 KACC 15269BP를 부여받았다. 또한 Mock을 SG4048에 형질 전환하

여 이후 실험의 대조군으로 활용이 가능한 균을 제작하였다 (SG4051). sgFliC는 SG4052의 세포질 그리고 세포 외부에서 강하게 검출되었으며, SG4051에서는 검출되지 않았다 (도 5 참조).

[100]

[101] [표1]

서열번호	명명	서열목록 (5'→3')	비고
1	fliC	CTTTTGATGATAAAACCAAAAACGAGAG TGCGAAACTTTCTGATTTGGAAGCAAAC AATGCTGTTAAGGGCGAAAGTAAAATTA CAGTAAATGGGGCTGAATATACTGCTAA CGCCACGGGTGATAAGATCACCTTAGCT GGCAAACCATGTTTATTGATAAAACAG CTTCTGGCGTAAGTACATTAATCAATGA AGACGCTGCCGCAGCCAAGAAAAGTAC CGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCT GCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTTCGTT CTTCTCTGGGGGCAATTCAAACCGTTT TGATTCAGCCATTACCAACCTTGGCAAT ACGGTAACCAATCTGAACTCCGCGCGTA GCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAAC GGAAGTTTCTAATATGTCTAAAGCGCAG ATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCT GGCGCAGGCTAACGACTACAAAGACCA TGACGGTGATTATAAAGATCATGACATC GATTACAAGGATGACGATGACAAGTAG	
2	fliC_AA	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSSAIE RLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKG LTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNL QRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQQ RLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQ VGANDGETITIDLQKIDVKSGLDGFNVN GPKEATVGDLSKFKNVTGYDTYAAGAD KYRVDINSGAVVTDAAAPDKVYVNAAN GQLTTDDAENNTAVDLFKTTKSTAGTAE AKAIAGAIKGGKEGDTFDYKGVFTFTIDTK TGDDGNGKVSTTINGEKVTLTVADIATGA TDVNAATLQSSKNVYTSVVNGQFTFDDK	

	TKNESAKLSBLEANNAVKGESKITVNGA EYTANATGDKITLAGKTMFIDKTASGVST LINEDAAAkkSTANPLASIDSALSskVDA VRSSLGAIQNRFDsAITNLGNTVTNLNSA RSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSV LAQANDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	
--	---	--

[102]

[103] SG4052로부터 분비되는 sgFliC의 TLR 5 활성능 평가를 위해 mouse TLR 5가 선택적으로 강하게 발현하는 세포주인 HEK293/mTLR5 세포주를 이용한 QUANTI-Blue SEAP assay 방법을 사용하였다. SG4051 그리고 SG4052를 Overnight (O/N) 성장시킨 후 각각의 박테리아 배양 배지 (Bacterial cultured media)를 분리한 후, 이를 센트리콘 (centricon)을 사용하여 농축하였다. TLR 5 활성능 검사의 양성 대조군으로 FLA-ST (Flagellin from the *Salmonella Typhimurium*)을 사용하였다.

[104] 실험 결과 도 6에서 확인할 수 있듯이, FLA-ST 그리고 SG4052의 배양 배지 처리에 따른 TLR5는 활성화되는 것이 확인되었으며, SG4051 cultured media 처리군의 것은 그 활성이 관찰되지 않았다. 이때, SG4052의 배양 배지를 처리하였을 때는 동일 농도가 처리된 FLA-ST 보다 상대적으로 높은 TLR5 자극성을 갖는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 psgFliC를 통해 발현되는 FliC는 살모넬라 티피뮤리움의 FliC와 같은 TLR5 활성능을 보유하였다는 것을 보여준다. 또한, FliC가 포함된 약독화 살모넬라 갈리나룸의 세포외 구성 물질을 처리하였을 때 FliC 단독 처리에 비해 TLR5의 자극능력을 배가시킬 수 있음이 확인되었다.

[105] SG4052처리에 따른 종양 치료 능력을 평가하기 위해 마우스 대장암 유래 세포주인 CT26를 이용한 대장 종양 형성 마우스를 제작하였다. CT26 bearing mice에 SG4052 (1×10^8 cfu/mice, Intravenous route)를 단회 투여하였고, 2일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. PBS 그리고 SG4051 처리 군은 본 실험의 대조군을 사용하였으며, 동일하게 2일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다 (도 7 참조). 또한, 모든 그룹의 생존을 최대 60일 동안 관찰하여 각 그룹의 생존율을 확인하였다 (도 8 참조). 실험 결과, 도 7에서 확인할 수 있듯이, PBS 처리군에 비해 SG4051 처리군의 종양 크기는 평균 38%이 감소되었으며, PBS 처리군에 비해 SG4052 처리군의 종양 크기는 평균 76%가 감소됨이 확인되었다 (18 days after bacterial infection). 또한, 도 8에서 확인할 수 있듯이, 각 그룹 간의 생존율은 PBS 처리군에 비해 SG4051 처리군은 최대 10일 생존능 연장을, 그리고 PBS 처리군에 비해 SG4052 처리군은 최대 32일 이상 연장된다는 것이 확인되었다. 특히, SG4052 처리군 중 1마리의 종양이 완전히 사라졌으며, 이러한 결과는 단순한 약독화 살모넬라 갈리나룸 처리에 비해 sgFliC 발현 약독화 살모넬라 갈리나룸이 증강된 치료능을 갖는 것을 보여주는 결과이다.

[106]

[107] 실시예 4: sgFliC 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸의 M1 대식세포 (macrophage) 활성화 능력 확인

[108] SG4052 증감된 치료 효능이 M1 대식세포의 분포에 증감을 유도하는지 평가하였다. PBS, SG4051, 그리고 SG4052를 CT26 tumor bearing mice에 투약하였고, 접종 후 8일 뒤에 종양 조직을 적출하였다. 종양으로부터 분리된 단일 세포들을 CD45 인지 자성 비드 (Magnetic bead)를 통해 면역 세포만을 일차로 분리하였고, 이후 대식 세포 특이적 마커를 인식하는 항체로 염색한 후 FACs 분석을 통해 대식 세포 분포를 측정하였다 (도 9 참조).

[109] 실험 결과, 도 9에 나타나듯이, PBS 처리군에 비해 SG4051 처리군의 M1 대식 세포 (MHC II⁺, CD206⁺)의 분포가 평균 0.7배 증가, 그리고 PBS 처리군에 비해 SG4052 처리군에서 M1 대식세포의 분포가 평균 4.5배 증가됨이 확인되었다, 면역 억제 활성을 갖는 M2 대식세포 (MHC II⁺, CD206⁺)의 분포의 경우 PBS 처리군에 비해 SG4051 그리고 SG4052 처리군 모두에서 평균 3배의 감소가 확인되었다. 반면 CD4⁺ 와 CD8⁺ T세포의 활성화는 변화시키지 않았다. 이러한 결과는, SG4052의 개선된 종양 치료 효능의 기전은 면역 활성화 능력을 보유한 M1 대식세포의 분포 증가에 기인 한 것임을 증명한다.

[110]

[111] 실시예 5: sgFliC-hIL2 개발 및 이의 효능 평가

[112] 세포의 분비능을 보유한 FliC에 CD8⁺ T 세포 활성능력을 보유한 human IL-2(hIL2)를 결합시켜 세포의 분비가 가능 하면서도 TLR5 및 CD8⁺ T 세포의 자극 원성을 모두 보유한 신규 단백질을 생산 및 분비하는 약독화 살모넬라 갈리나룸을 생산하였다.

[113] 우선적으로, sgFliC 말단에 hIL2을 접합하였을 때 각각의 구조에 영향을 주는 지를 구조 예측 프로그램 (Alphafold program, version II)을 통해 확인하였다 (도 10 참조). 확인 결과, sgFliC (Green) 와 hIL2 (Red)가 결합된 융합 단백질 (chimeric protein)은 서로의 구조에 영향이 없는 것으로 확인되었고, sgFliC 유전자 서열 말단에 야생형 hIL2 유전자 서열을 접합시켜 sgFliC 그리고 야생형 hIL2가 연결된 신규 단백질을 생성하는 컨스트럭트를 제작하였다 (psgFliC-hIL2). 제작된 psgFliC-hIL2를 SG4048에 형질 전환하여 하기 표 2의 서열을 갖는 sgFliC-hIL2를 생산 및 분비하는 약독화 살모넬라 갈리나룸을 제작하였다 (SG4053). 그리고, SG4053 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean korean collection for type cultures; KCTC)에 2023.01.04자로 기탁하여 수탁번호 KACC 15270BP를 부여받았다.

[114]

[115] [표2]

서열번호	명명	서열목록 (5'→3')	비고
------	----	--------------	----

<p>3</p>	<p>fliC_IL2</p>	<p>CTTTTGATGATAAAACCAAAAACGAGA GTGCGAAACTTTCTGATTTGGAAGCAAA CAATGCTGTTAAGGGCGAAAGTAAAAT TACAGTAAATGGGGCTGAATATACTGCT AACGCCACGGGTGATAAGATCACCTTAG CTGGCAAACCATGTTTATTGATAAAAC AGCTTCTGGCGTAAGTACATTAATCAAT GAAGACGCTGCCGCAGCCAAGAAAAGT ACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATT CTGCATTGTCAAAGTGGACGCAGTTTCG TTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAACCGT TTTGATTCAGCCATTACCAACCTTGGCA ATACGGTAACCAATCTGAACTCCGCGCG TAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCA ACGGAAGTTTCTAATATGTCTAAAGCGC AGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGT TCTGGCGCAGGCTAACGGTGGCGGTGGT GCTAGCGCACCTACTTCAAGTTCTACAA AGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTT ACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAAT GGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAAC TCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAA CATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAA ACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTC AAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAG CTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACC CAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAA CAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGA GACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAAC AGATGGATTACCTTTAGCCAAAGCATCA TCTCAACACTGACTGACTACAAAGACCA TGACGGTGATTATAAAGATCATGACATC GATTACAAGGATGACGATGACAAGTAG</p>	
<p>4</p>	<p>fliC_IL 2_AA</p>	<p>MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSSAI ERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNI KGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINN</p>	

	NLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEI QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQM KIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGF NVNGPKEATVGDLDKSSFKNVTGYDTYAA GADKYRVDINSGAVVTDAAAPDKVYVN AANGQLTTDDAENNTAVDLFKTTKSTAG TAEAKAIAGAIKGGKEGDTFDYKGVFTF IDTKTGDDGNGKVSTTINGEKVTLTVAD IATGATDVNAATLQSSKNVYTSVVNGQF TFDDKTKNESAKLSDLEANNAVKGESKI TVNGAEYTANATGDKITLAGKTMFIDKT ASGVSTLINEDAAAANKSTANPLASIDSA LSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTV TNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQ QAGTSVLAQANGGGGASAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQS IISTLTDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	
--	--	--

[116]

[117] sgFliC-hIL2 발현 및 분비능은 웨스턴 블랏 (western blot) 방법을 통해 검증하였으며, SG4051을 본 실험의 음성 대조군으로 그리고 SG4052는 본 실험의 양성 대조군으로 사용하였다 (도 11 참조). 결과적으로, sgFliC-hIL2는 세포질과 세포 외부에서 강하게 검출되었다. 또한, 양성 대조군으로 사용한 sgFliC와 그 발현 및 분비능을 비교하였을 때 유사함이 확인되었다. 이러한 결과는 sgFliC는 TLR 5 자극원의 특성 이외에도 단백질을 세포 외부로 이동시키는 전달체 능력을 보유하고 있다는 것을 보여준다.

[118]

다음으로, sgFliC-hIL2 융합 단백질의 각자의 독립된 기능을 평가하였다. hIL2의 기능 검사를 위해 Mouse spleen으로부터 분리된 lymphocyte cell line (HT-2)를 도입하였다. HT-2는 IL-2에 의존적 성장을 하는 특성을 보유한 세포주이기 때문에 HT-2 세포 성장에는 반드시 IL-2 또는 IL-2가 포함된 미디어 (ConA, Corning)를 사용해만 한다. HT-2 세포주에 SG4052 (SG4048 carrying psgFliC), SG4053 (SG4048 carrying psgFliC-hIL2)의 cultured media를 각각 1mg/ml로 처리하였고, 24시간 이후 cell viability assay (MTT)를 수행하였다. 본 실험에서는 PBS 처리군을 음성 대조군으로, 그리고 Con A 처리군을 양성 대조군으로 사용하였으며, 세포 생존율 (cell viability)은 양성 대조군의 성장을 100%로 지정하여 다른 실험군의

성장을 비교하였다. 결과적으로, SG4053의 Cultured media (1 mg/ml)가 처리되었을 경우 양성 대조군과 유사한 성장이 관찰되었으며, 음성 대조군 및 SG4052의 배양 배지가 처리된 군에서는 성장이 관찰되지 않았다 (도 12 참조). 이러한 결과는 sgFliC-hIL2의 단백질이 IL2 기능을 보유하였다는 것을 증명한다.

[119] 이어서, sgFliC-hIL2의 TLR5 활성능을 검사하였다. 본 실험에서는 mouse TLR 5가 선택적으로 강하게 발현하는 세포주인 HEK293/mTLR5 세포주가 활용되었고, SG4051 배양 배지 처리군 (1mg/ml)을 음성 대조군으로, FLA-ST (1ng/ml)를 양성 대조군으로 사용하였다. SG4052 그리고 SG4053 각각의 배양 배지 (1mg/ml)를 HEK293/mTLR5 세포주에 처리하고 24시간 이후 QUANTI-Blue SEAP assay를 수행하였다. 결과적으로, SG4053의 배양 배지 처리군에서 양성 대조군과 유사 또는 높은 활성이 관찰되었다 (도 13 참조). 이러한 결과는 약독화 살모넬라 갈리나룸으로부터 분비되는 sgFliC-hIL2가 TLR 5 활성 능을 보유하였다는 것을 보여준다.

[120]

[121] 실시예 6: sgFliC-IL2 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸의 항종양 효능 평가

[122] SG4053처리에 따른 종양 치료 능력을 평가하기 위해 CT26 bearing mice를 제작하였다. PBS 처리 군을 본 실험의 음성 대조군을 사용하였으며, SG4051 또는 SG4052 처리군을 본 시험의 양성 대조군으로 사용하였다. 상기 실시예와 동일하게 2일 간격으로 종양의 크기를 18일 동안 측정하였고 (도 14 참조), 각 그룹의 생존율을 확인하였다 (도 15 참조).

[123] 실험 결과, PBS 처리군에 비해 SG4051 처리군의 종양 크기는 평균 38%, PBS 처리군에 비해 SG4052 처리군의 종양 크기는 평균 69% 그리고 PBS 처리군에 비해 SG4053 처리군의 종양 크기는 평균 84%가 각각 감소됨이 확인되었다. 또한, 각 그룹 간의 생존율은 PBS 처리군에 비해 SG4051 처리군은 최대 10일, PBS 처리군에 비해 SG4052 처리군은 최대 35일 이상, 그리고 PBS 처리군에 비해 SG4053 처리군은 최대 42일 이상 연장된다는 것이 확인되었다. 특히, SG4052 처리군 중 1마리, SG4053 처리군 중 3마리에서 종양이 완전히 사라진 것이 확인되었다. 이러한 결과는 약독화 살모넬라 갈리나룸으로부터 분비된 sgFliC-hIL2가 기존 약독화 살모넬라 갈리나룸 또는 sgFliC 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸의 대비 그 치료 능이 극대화되었다는 것을 보여준다.

[124]

[125] 실시예 7: sgFliC-IL2 분비 약독화 살모넬라 갈리나룸의 면역 세포 활성 능력 평가

[126] 상기 실시예 6에서 확인된 바와 같이, SG4053으로부터 분비되는 sgFliC-IL2는 CT26 bearing mice에서 증강된 치료 효능을 갖는다. 이에, SG4053의 개선된 치료 능력의 기전이 종양 내 면역 세포 활성에서 기인하는지 조사하였다.

[127] 면역 세포 분포 변화 관찰을 위해 CT26 bearing mice에 PBS (100 ml/ mice), SG4051 (1×10^8 cfu / mice), SG4052 (1×10^8 cfu / mice), 그리고 SG4053 (1×10^8

cfu / mice)을 투약하였고, 투약 후 8일 뒤에 종양 조직으로부터 단일 세포를 분리하였다. CD45 인지 자성 비드를 통해 회수된 CD45⁺ 림프구 (lymphocyte)들에 면역 세포 특이적 마커를 인지하는 특이 항체를 통해 염색하였다. 이후, FACs 분석을 통해 각각의 면역 세포의 분포는 분석되었다. 종양 내 대식세포, M1 (F4/80⁺, MHC II⁺, CD206⁺) 또는 M2 (F4/80⁺, MHC II⁺, CD206⁺)의 분포 결과는 도 16에 나타내었다. 실험 결과, 도 16에서 확인할 수 있듯이, SG4052로부터 분비되는 sgFliC 그리고 SG4053으로부터 분비되는 sgFliC-IL2는 종양내 M1 대식세포의 분포를 음성 대조군에 비해 평균 4.5배 그리고 9.4배를 증가시켰다. SG4051 (SG4048 carrying pMock)의 경우 음성 대조군에 비해 M1 Macrophage의 분포를 평가 1.7배 증가시켰지만, 그룹 간의 비교 (P-Value)에서 그 차이는 나타나지 않았다. 또한, SG4051에 비해 SG4052의 M1 대식세포의 증가는 평균 2.64배, 그리고 SG4051에 비교하여 SG4053의 M1 대식세포는 평균 5.5배가 증가한 것이 관찰되었다. 면역 활성화 억제의 기능을 갖는 M2 대식세포의 감소 현상은 SG4051, SG4052, 그리고 SG4053이 처리된 모든 그룹에서 공통적으로 감소되었지만 (PBS vs SG4051: 평균 65%, PBS vs SG4052: 평균 69%, PBS vs SG4053: 평균 72%), SG4051, SG4052, 그리고 SG4053의 그룹 간의 상대적 비교에서는 그 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 약독화 살모넬라 갈리나룸으로부터 분비되는 sgFliC 또는 sgFliC-hIL2는 면역 활성화 능력을 보유한 M1 대식세포의 분포를 선택적으로 증가시키지만, M2 대식세포 분포의 감소에는 직접적 영향이 없음을 설명한다.

- [128] 이어서, 증강된 치료 효능의 기전이 T 세포 분포의 변화에 그 기인하는지 확인하였다. 종양 내 CD4⁺ T 세포(CD3⁺,CD4⁺), CD8⁺ T 세포(CD3⁺,CD8⁺), Effector CD8⁺ T 세포 (CD3⁺,CD8⁺,CD44^{High},CD62L^{Low}), 그리고 CD8⁺/CD4⁺ ratio의 분포를 분석하였고, 그 결과를 도 17에 나타내었다. 종양내 CD4⁺ T 세포 분포는 PBS 처리군과 비교하여 SG4051, SG4052, 그리고 SG4053 처리군에서 특이적 증가 또는 감소는 관찰되지 않았다. SG4053의 투약에 따라 종양내 CD8⁺ T 세포 그리고 Effector CD8⁺ T세포의 분포는 증가되었다. 또한, 종양내 CD8⁺/CD4⁺ ratio 분석을 통해 CD8⁺ T 세포의 비율의 증가가 확인되었다. 이러한 결과는 약독화 살모넬라 갈리나룸에 의해 분비되는 sgFliC-hIL2가 종양내 CD8⁺ T 세포를 선택적으로 증가시킨다는 것과, 증가된 CD8⁺ T 세포가 SG4053처리에 따른 증강된 치료 효능의 대표 기전이라는 것을 보여준다.

산업상 이용가능성

- [129] 본 발명은 FliC 또는 FliC-hIL2 발현 약독화 살모넬라 갈리나룸 그리고 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 면역 활성화능이 우수하고, 우수한 항암 효능을 나타내어, 기존 항암제와 함께 또는 독립적으로 암의 치료제로 사용될 수 있다.

0-1	Form PCT/RO/134 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2)	ePCT-Filing Version 4.12.006 MT/FOP 20231213/1.1
0-1-1	우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	
0-2	국제출원번호	PCT/KR2024/000597
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	PP230074

1	아래 표시된 사항은 발명의 설명 내의 아래 부분에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것이다.	
1-1	단락번호	37
1-3	기탁표시	KACC 한국 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행 대한민국 한국 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 166 2023년 01월 04일 (04.01.2023) KACC 15269BP
1-3-1	기탁기관명	
1-3-2	기탁기관 주소	
1-3-3	기탁 일자	
1-3-4	기탁 번호	
1-4	추가 표시 사항	
1-5	표시사항은 다음 지정국을 위한 것이다.	모든 지정국
1-6	추가 표시 사항 이러한 표시는 추후 국제 사무국(IB)에 제출된다.	
2	아래 표시된 사항은 발명의 설명 내의 아래 부분에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것이다.	
2-1	단락번호	50
2-3	기탁표시	KACC 한국 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행 대한민국 한국 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 166 2023년 01월 04일 (04.01.2023) KACC 15270BP
2-3-1	기탁기관명	
2-3-2	기탁기관 주소	
2-3-3	기탁 일자	
2-3-4	기탁 번호	
2-4	추가 표시 사항	
2-5	표시사항은 다음 지정국을 위한 것이다.	모든 지정국
2-6	추가 표시 사항 이러한 표시는 추후 국제 사무국(IB)에 제출된다.	

청구범위

- [청구항 1] 살모넬라 균주에 도입되어, 상기 살모넬라 균주의 면역 활성화능 및 항종양 효능을 증강시키는 폴리뉴클레오타이드로, 상기 폴리뉴클레오타이드는 필라멘트 구조 단백질 (Fliament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)인 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 FliC와 융합된 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 FliC와 융합된 인터루킨-2를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 6] 필라멘트 구조 단백질 (Fliament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된, 살모넬라 균주.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)인 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 수탁번호 KACC 15269BP로 기탁된 균주인 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는, 구아노신 4인산 (Guanosine tetraphosphate, ppGpp) 합성효소를 암호화하는 유전자, type III 분비 시스템 (type III secretion system, T3SS)의 기능을 유도하는 유전자 및 Gifsy 2 prophage 유전자가 결실된 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 glmS 유전자가 결실된 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 relA, spoT, ssrAB, Gifsy 2 prophage 및 glmS 유전자가 결실된 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 12] 제6항에 있어서, 상기 벡터는 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 수탁번호 KACC 15270BP로 기탁된 균주인 것인, 살모넬라 균주.
- [청구항 14] 필라멘트 구조 단백질 (Fliament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는, 암의 치료, 예방, 완화 또는 억제용 약제학적 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는,

필라멘트 구조 단백질 (Filament structural protein)인 FliC를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 것인, 암의 치료, 예방, 완화 또는 억제용 약제학적 조성물.

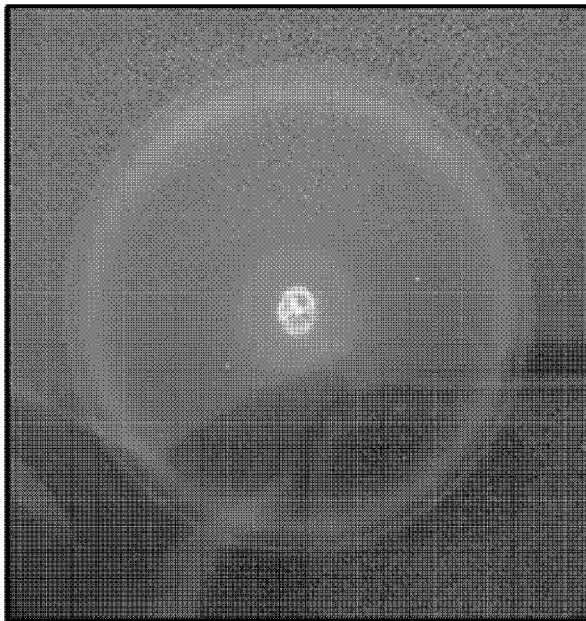
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 교모세포종 또는 골수암으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인 것인, 암의 치료, 예방, 완화 또는 억제용 약제학적 조성물.

[도 1]

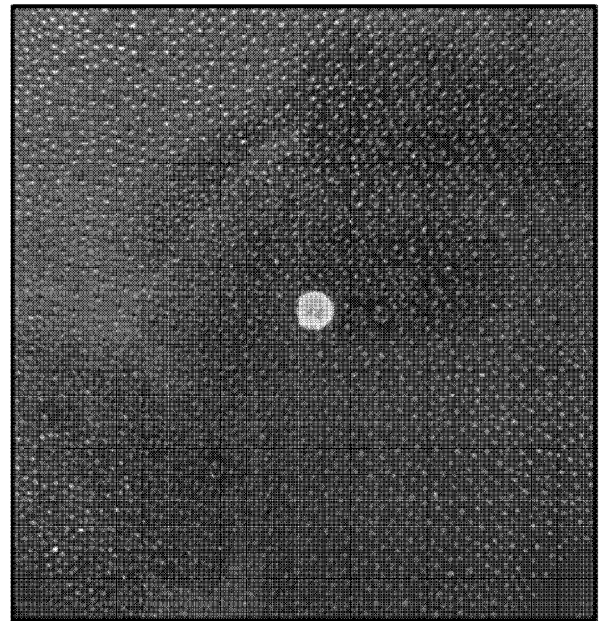
유전자	변이 위치	결과	유전자 기능
FlgI	Ser 109	정지	기초 바디 P링 (Basal body P ring)
FlgK	Glu 125	정지	후크-필라멘트 접합 (Hook-filament junction)
FlhA	Glu 331	정지	수송 장치 (Export apparatus); 독성 동족체 (virulence homolog)
FlhB	뉴클레오타이드 756 내지 952	결실	FliK 돌연변이 억제 (Suppress FliK mutation); 독성 동족체 (virulence homolog)
MotB	뉴클레오타이드 687	프레임시프트-1	모터 회전 (Motor rotation)
FliK	뉴클레오타이드 824, 825	프레임시프트-2	후크 길이 조절 (Hook length control)

[도 2]

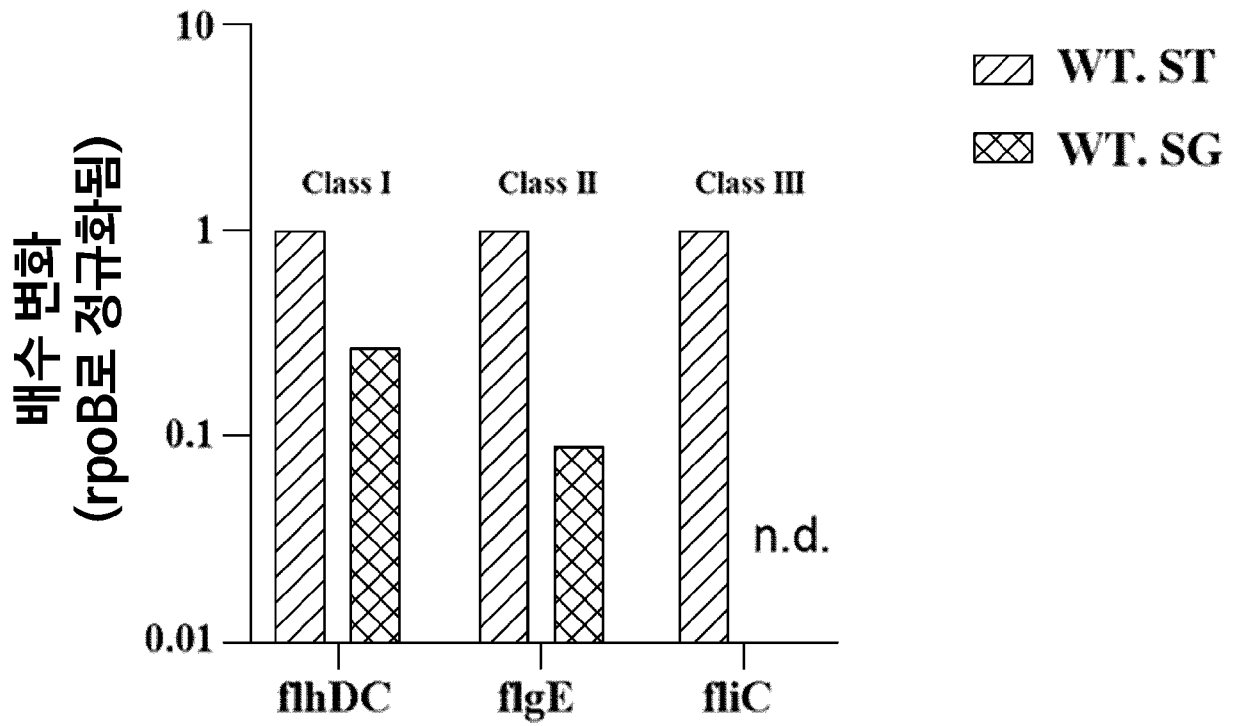
살모넬라 티피뮤리움 (WT. ST)



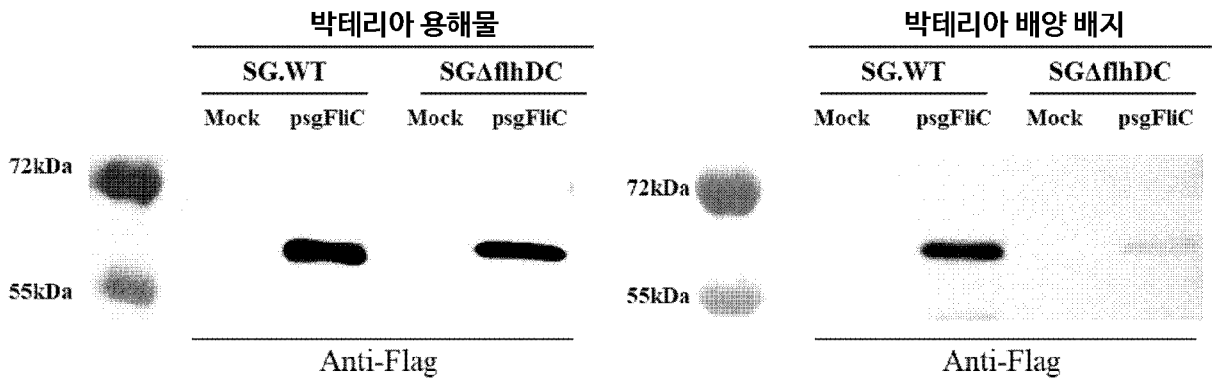
살모넬라 갈리나룸 (WT. SG)



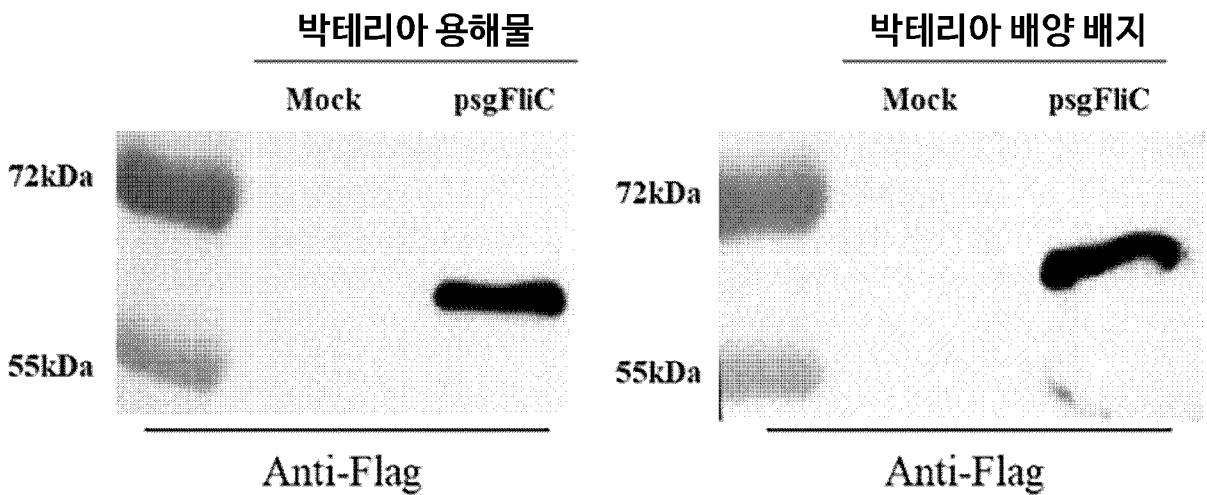
[도3]



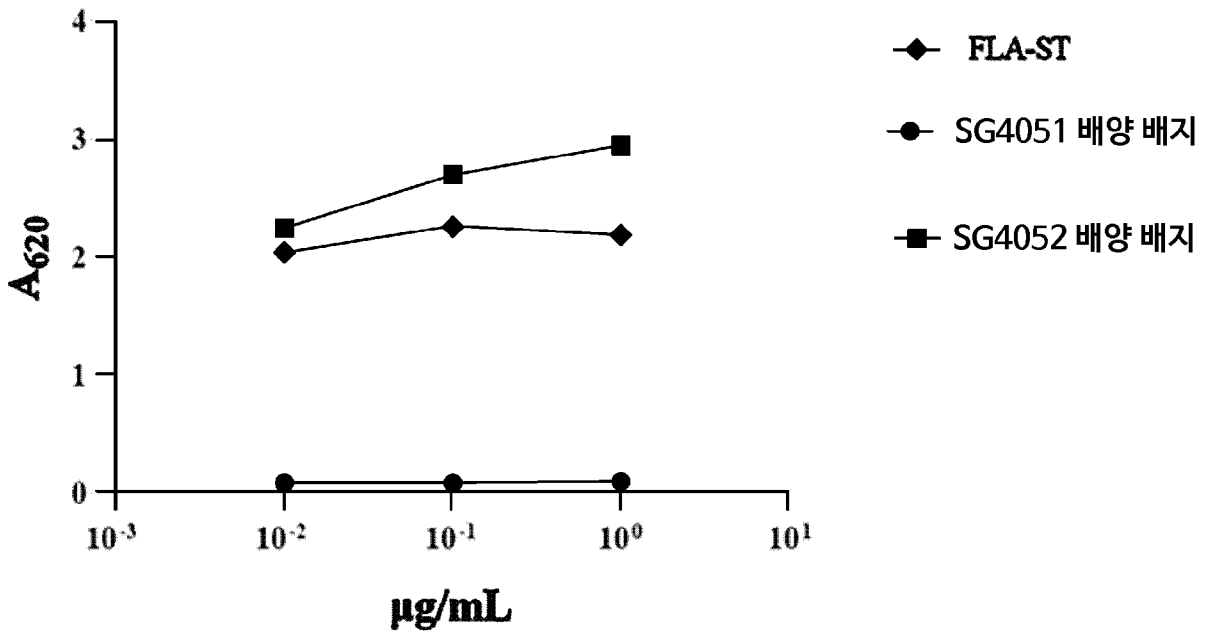
[도4]



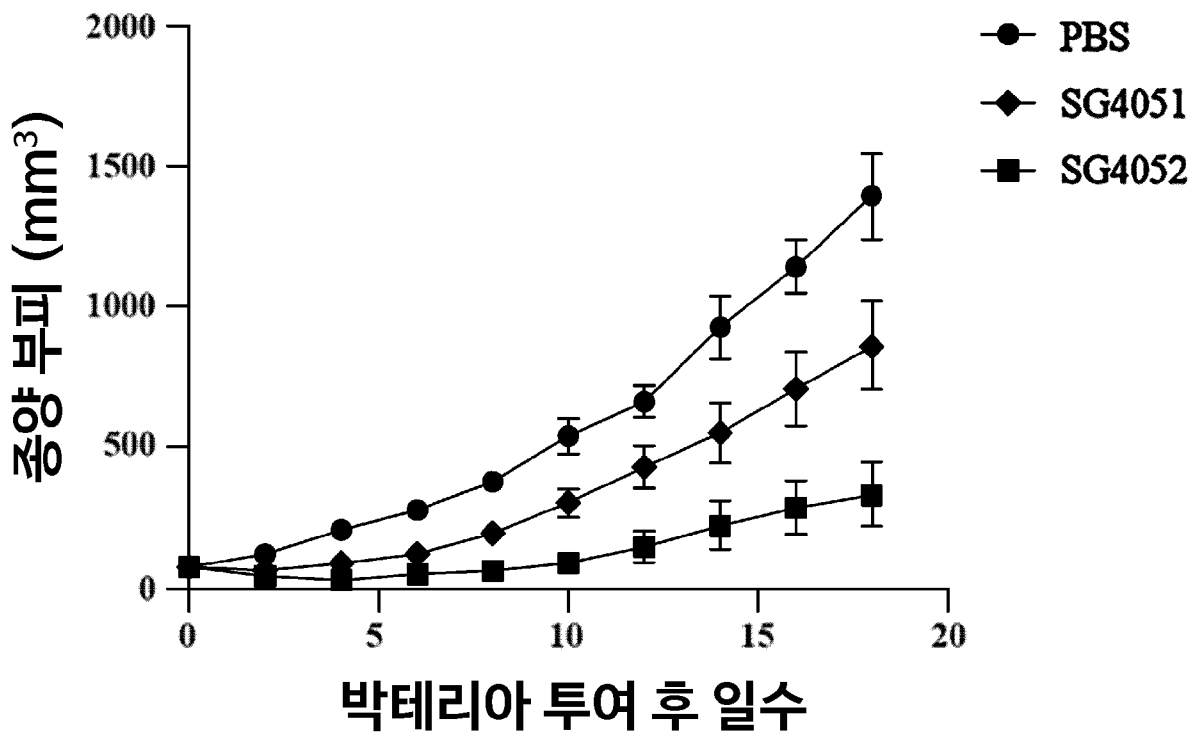
[도5]



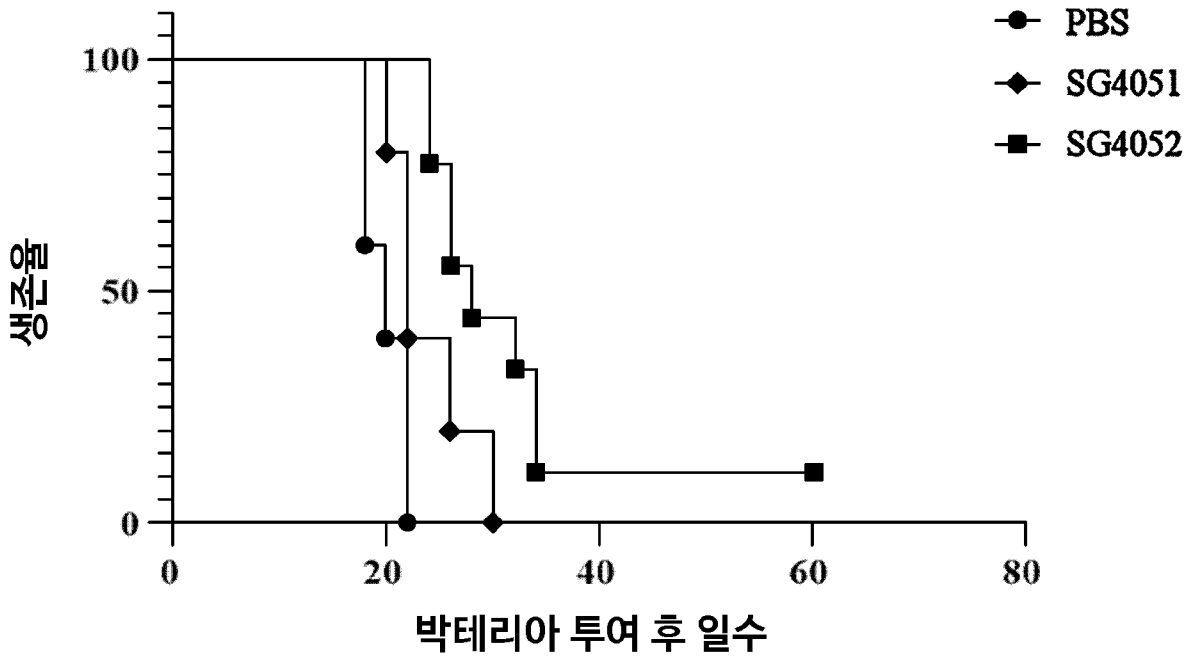
[도6]



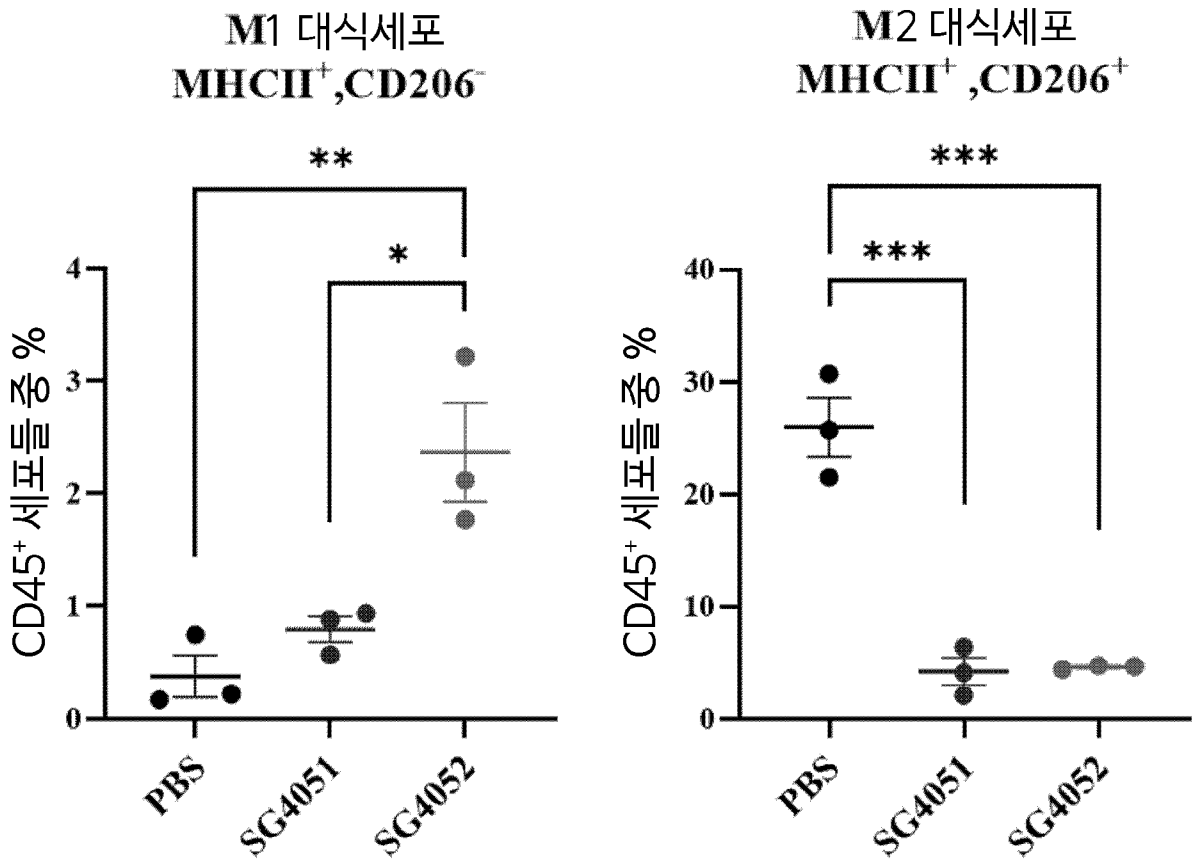
[도7]



[도8]



[도9]

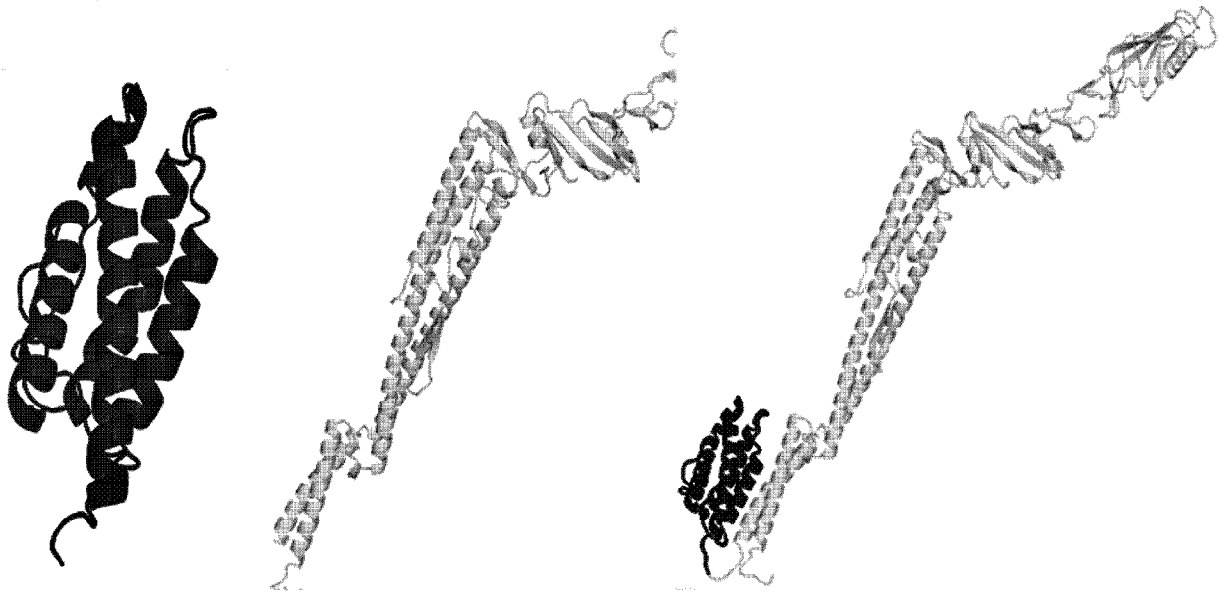


[도10]

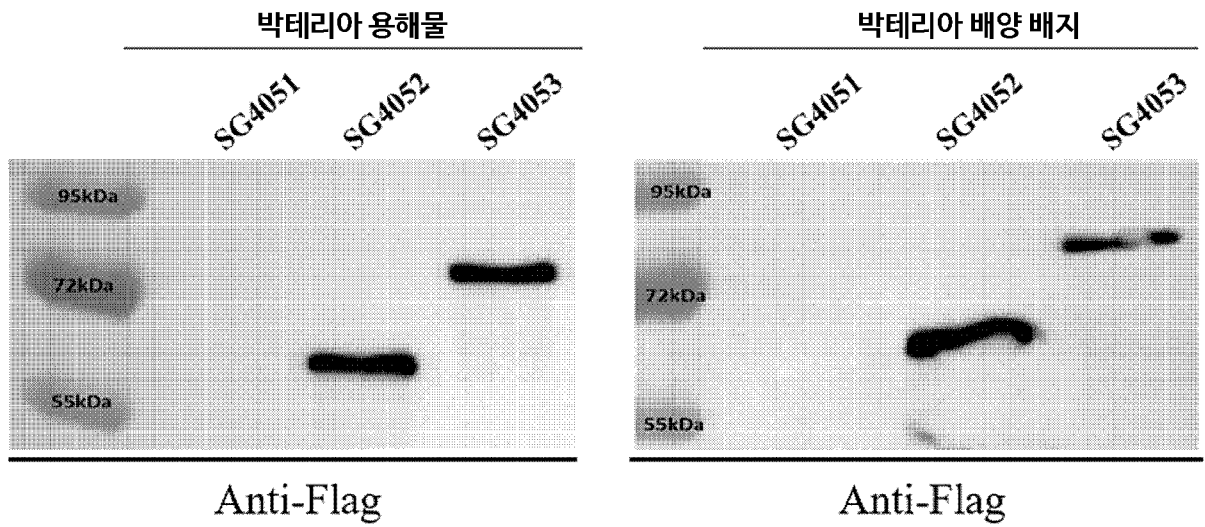
Human IL-2
(hIL2)

sgfliC

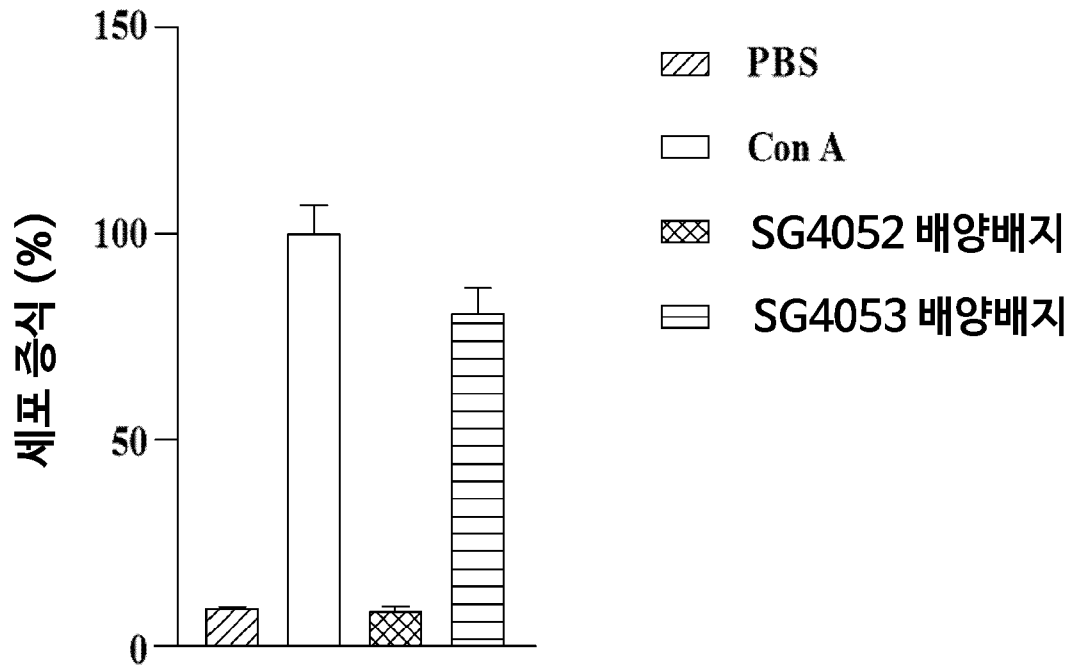
sgfliC-hIL2



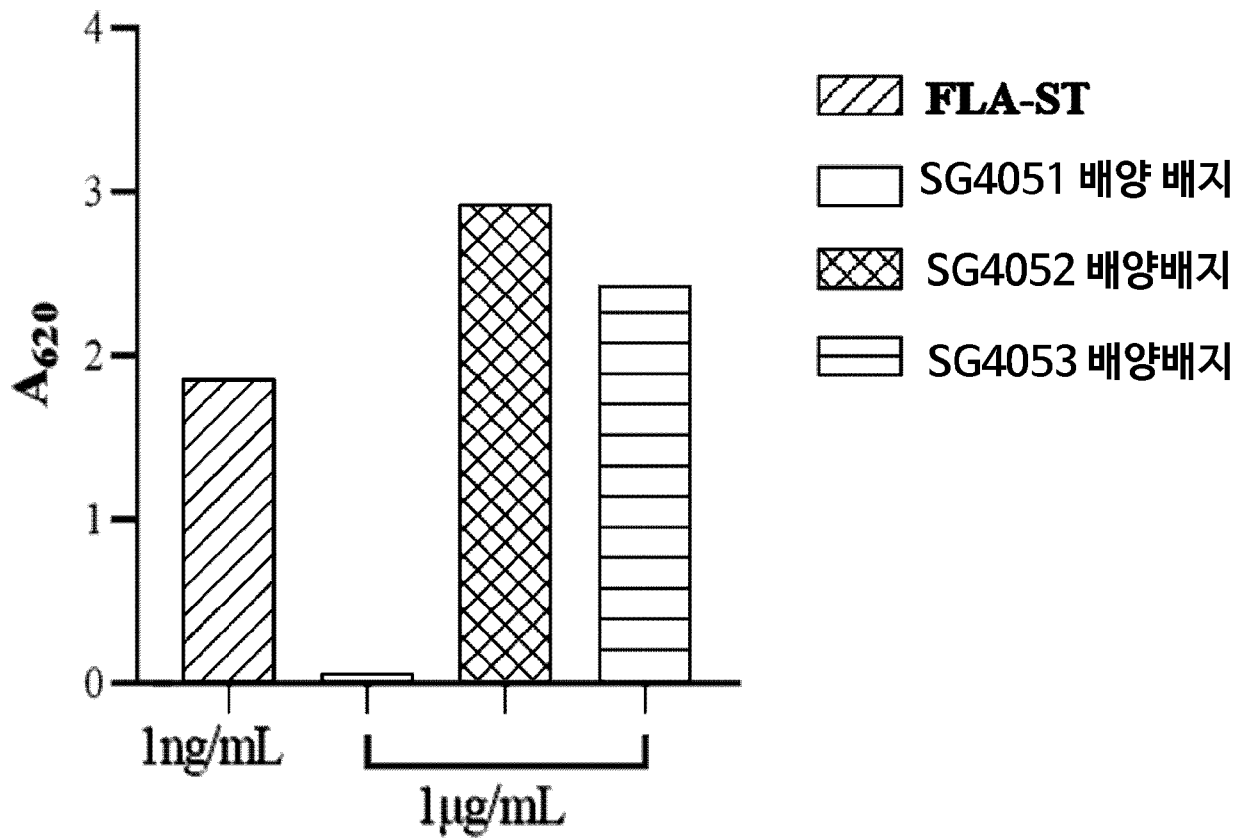
[도11]



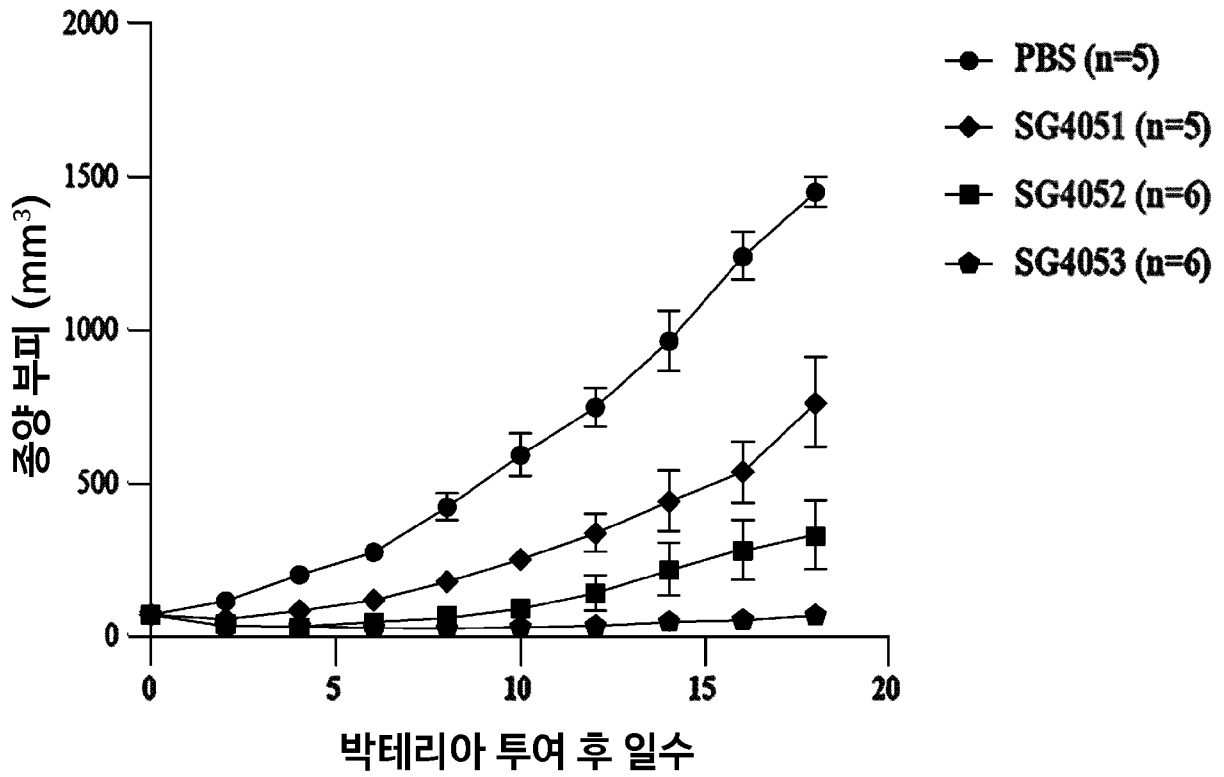
[도12]



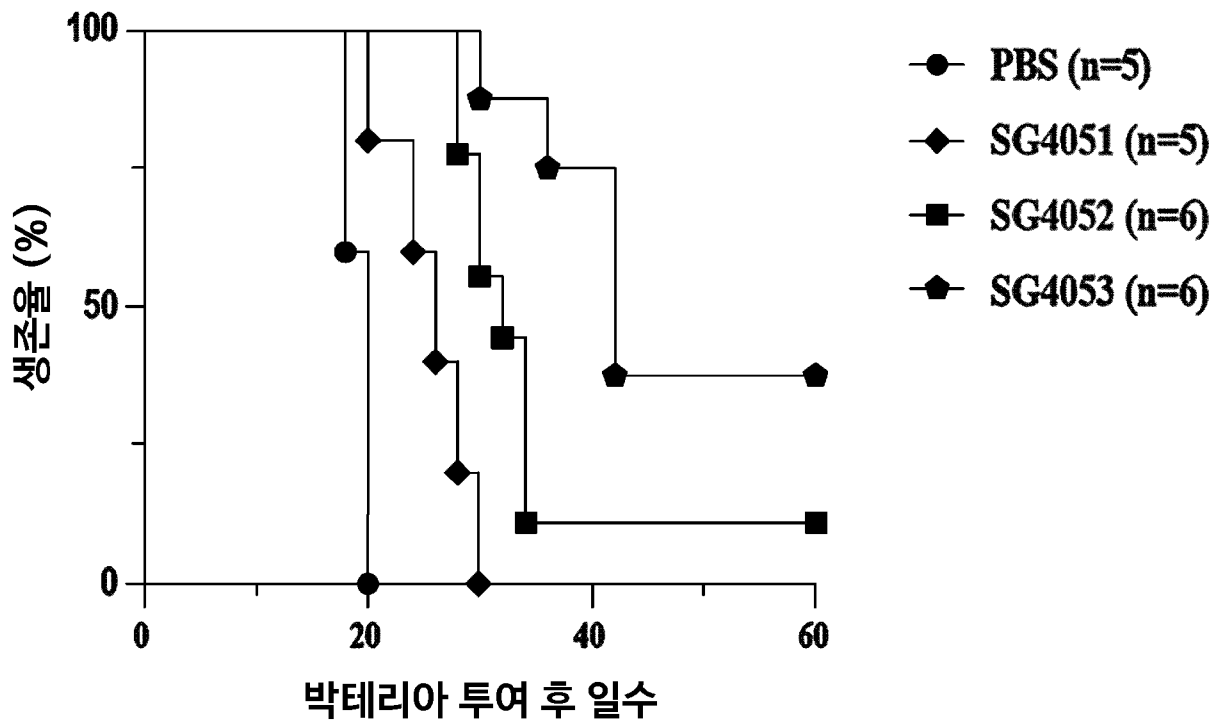
[도13]



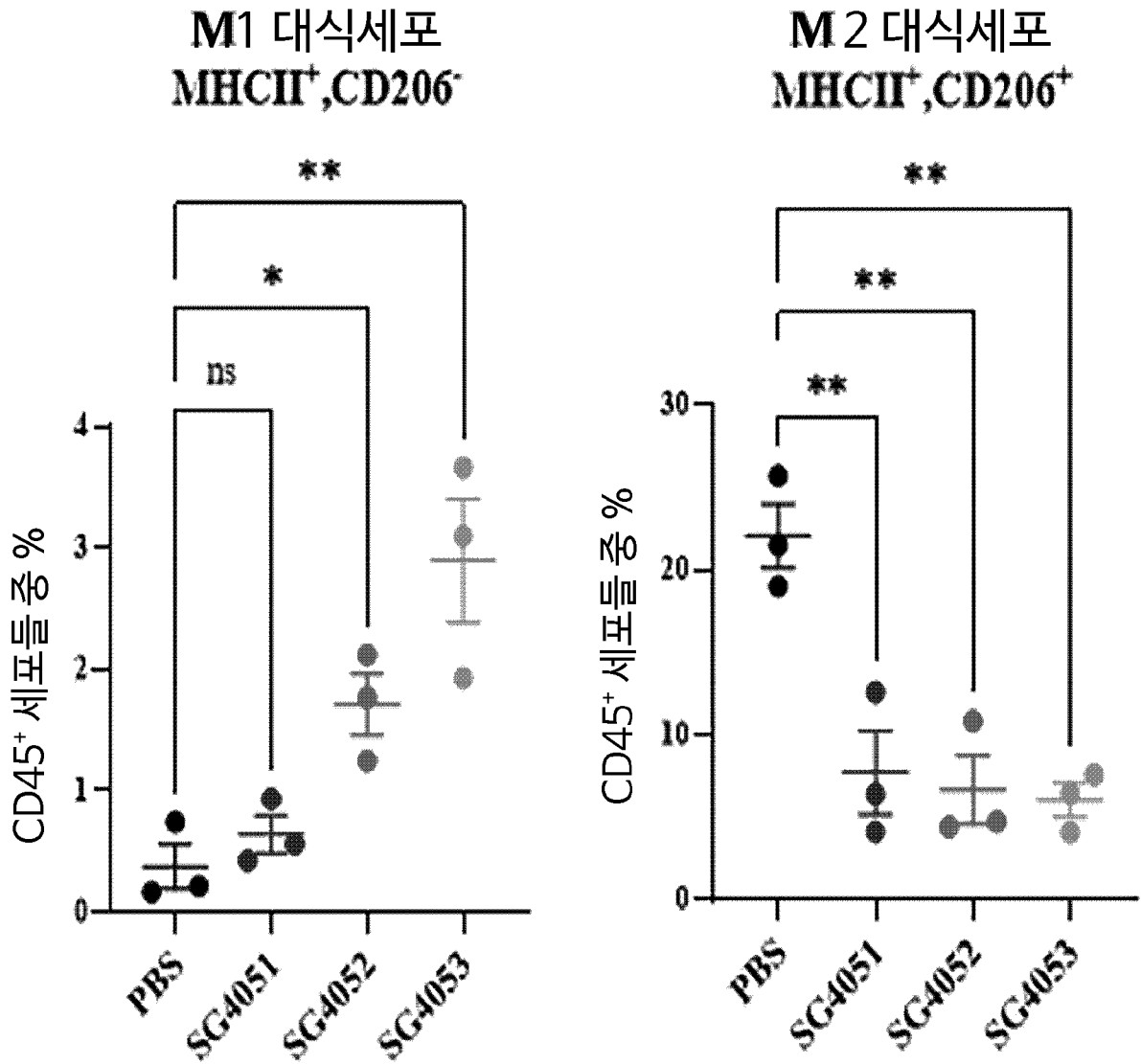
[도14]



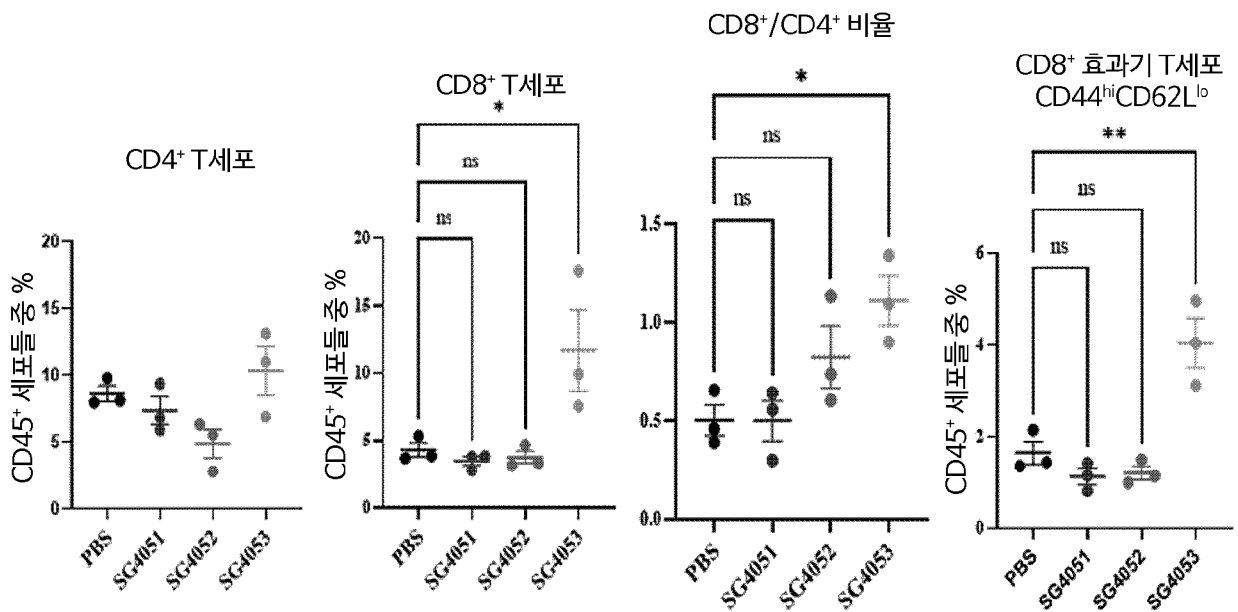
[도15]



[도 16]



[도 17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/000597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/255(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; C12N 1/36(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 35/00(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) C07K 14/255(2006.01); A23K 10/16(2016.01); A61K 35/74(2006.01); C07K 1/22(2006.01); G01N 33/50(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: FljC(flagella filament structural protein), 살모넬라 갈리나룸(Salmonella gallinarum), 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2), 약독화(attenuation), 항종양(anti-tumor)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111285924 A (SOUTH CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 16 June 2020 (2020-06-16) See claims 1 and 2; and paragraph [0066].	1-16
A	KR 10-2022-0167577 A (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY) 21 December 2022 (2022-12-21) See claim 1.	1-16
A	HAJAM, I. A. et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin into Salmonella Gallinarum bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2018, vol. 199, pp. 61-69. See abstract.	1-16
A	KR 10-2022-0149313 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY et al.) 08 November 2022 (2022-11-08) See claims 1, 2 and 12-15.	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 02 May 2024		Date of mailing of the international search report 02 May 2024
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/KR2024/000597

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/KR2024/000597

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111285924	A	16 June 2020	None			
KR	10-2022-0167577	A	21 December 2022	KR	10-2588101	B1	11 October 2023
KR	10-2022-0149313	A	08 November 2022	KR	10-2592184	B1	23 October 2023
KR	10-1548734	B1	01 September 2015	KR	10-1548734	B1	01 September 2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/255(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; C12N 1/36(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/42(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/255(2006.01); A23K 10/16(2016.01); A61K 35/74(2006.01); C07K 1/22(2006.01); G01N 33/50(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: FliC (flagella filament structural protein), 살모넬라 갈리나룸(Salmonella gallinarum), 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2), 약독화(attenuation), 항종양(anti-tumor)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 111285924 A (SOUTH CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 2020.06.16 청구항 1, 2; 단락 [0066]	1-16
A	KR 10-2022-0167577 A (전북대학교산학협력단) 2022.12.21 청구항 1	1-16
A	HAJAM, I. A. 등, Incorporation of membrane-anchored flagellin into Salmonella Gallinarum bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens, Veterinary Immunology and Immunopathology, 2018년, 199권, 페이지 61-69 abstract	1-16
A	KR 10-2022-0149313 A (전남대학교산학협력단 등) 2022.11.08 청구항 1, 2, 12-15	1-16
A	KR 10-1548734 B1 (전남대학교산학협력단) 2015.09.01 청구항 1, 4, 8	1-16
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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	국제조사보고서 발송일	
2024년05월02일 (02.05.2024)	2024년05월02일 (02.05.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제1기재란 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:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 111285924 A	2020/06/16	없음	
KR 10-2022-0167577 A	2022/12/21	KR 10-2588101 B1	2023/10/11
KR 10-2022-0149313 A	2022/11/08	KR 10-2592184 B1	2023/10/23
KR 10-1548734 B1	2015/09/01	KR 10-1548734 B1	2015/09/01