



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월31일
(11) 등록번호 10-1850178
(24) 등록일자 2018년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/04 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12Q 1/54 (2006.01) G01N 33/66 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7030170
(22) 출원일자(국제) 2013년05월03일
심사청구일자 2014년10월28일
(85) 번역문제출일자 2014년10월28일
(65) 공개번호 10-2015-0001775
(43) 공개일자 2015년01월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/059313
(87) 국제공개번호 WO 2013/164477
국제공개일자 2013년11월07일
(30) 우선권주장
12166703.4 2012년05월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
US20110045513 A1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 15 항

(73) 특허권자
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
뒤셀 하르트무트
독일 82444 솔레도르프 뤼르자움슈트라쎄 11아
마이어 토마스
독일 81373 뮌헨 드라헨제슈트라쎄 12
타케 미하엘
독일 80689 뮌헨 가이젠펠더 슈트라쎄 7
(74) 대리인
특허법인코리아나

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 글리코실화된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소

(57) 요약

본 발명의 주제는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각이며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었다. 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각은 하기 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 갖는다.

(56) 선행기술조사문헌

JP2012029677 A

JP2012055229 A

KR1020130038914 A

US20080220460 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각:

(a) 글리코실화되어 있는 SEQ ID No: 2 로 이루어진 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소, 그러나 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었음; 및

(b) (a) 에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 활성 조각,

단, (b) 에 따른 조각에서 상기 잠재적 글리코실화 자리(들)을 제거 또는 불활성화시키는 상기 치환(들)은 (a) 에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소와 비교할 때 보존되어 있고, 단, (b) 에 따른 조각은 (a) 에 따른 FAD-GDH 의 효소 활성의 80% 이상을 나타내고, (a) 에 따른 FAD-GDH 의 건조 조건 하의 온도 안정성의 80% 이상을 나타내며, 여기서 표현 "건조 조건 하의 온도 안정성을 나타낸다" 는 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 위에서 8 일 동안 80℃ 에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 자체 및 동결건조된 조성물에 포함되었을 때의 잔류 활성을 의미하고,

상기 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그의 활성 조각이 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 가짐.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소는 SEQ ID No: 1 에 따른 글리코실화된 FAD-GDH 와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리재에서의 발현에 의해 수득가능한, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50 % 미만의 글리코실화도 및 1.02 미만의 Mw/Mn 의 비율로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 나타내는, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 오직 하나가 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화된, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은, 하기 치환 N2S 를 갖고, 또한 SEQ ID No: 3 에 따른 FAD-GDH 이거나 그의 활성 조각인, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의

존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 포함하는, 생체 외 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하기 위한 조성물로서, 여기서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50 % 미만의 글리코실화도 및 1.02 미만의 Mw/Mn 의 비율로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 나타내는 조성물.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드로서, 단, N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제 8 항에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터.

청구항 10

제 9 항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포로서, 단, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않고, 단, 상기 숙주 세포는 글리코실화 능력이 있고, 대장균 균주가 아닌 숙주 세포.

청구항 11

제 10 항에 따른 형질전환주를 배양하는 것을 포함하는, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각의 생산 방법.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각의 생산 방법에 의해 글리코실화 능력이 있는 숙주 세포에서 수득가능한, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각, 또는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 포함하며, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50 % 미만의 글리코실화도 및 1.02 미만의 Mw/Mn 의 비율로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 나타내는 조성물을 사용하여 생체외 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는 방법으로서, 상기 탐지, 확인 또는 측정이 생체외 샘플을 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각 또는 조성물, 각각과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 글루코스의 탐지, 확인 또는 측정이 센서 또는 테스트 스트립 장치를 사용하여 수행되는 방법.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각, 또는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 포함하며, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50 % 미만의 글리코실화도 및 1.02 미만의 Mw/Mn 의 비율로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 나타내는 조성물을 포함하는, 생체의 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하기 위한 장치.

청구항 16

제 10 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 N-연결 글리코실화를 위한, 글리코실화 능력이 있는 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 간략한 설명

[0002] 본 발명의 주제는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 이며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었다.

[0003] 특히, 본 발명의 주제는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 이며, 여기서:

[0004] - 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소는 SEQ ID No: 1 에 따른 글리코실화된 FAD-GDH 와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리제에서의 발현에 의해 수득가능하고,

[0005] - 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 하나 이상의 아미노산에 의해 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었다.

[0006] 본 발명은 또한 상기 효소를 인코딩하는 동일한 핵산, 벡터, 숙주 세포를 생산하는 방법, 상기 효소를 사용하여 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는 방법, 및 상기 효소를 포함하는 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 혈액 글루코스의 자기-모니터링은 당뇨병 환자가 그들의 평상시 글루코스 수준을 자각하고 그것을 그들의 치료에 사용하는데 중요하다. 글루코스 기질을 갖는 효소는 혈액 글루코스 자기-모니터링을 위한 센서로서 이용된다. 그러한 효소의 예는 글루코스 옥시다제 (EC 1.1.3.4) 를 포함한다. 글루코스 옥시다제는 글루코스에 매우 특이적이고 높은 열 안정성을 갖는 장점을 갖는다. 이러한 이유로, 글루코스 옥시다제는 혈액 글루코스 센서에서 효소로서 사용되어 왔다. 그러한 특성의 첫번째 공표는 40 년 전으로 거슬러 올라간다.

글루코스 옥시다제를 이용하는 혈액 글루코스 센서에서, 혈액 글루코스 수준은 산화에 의해 글루코스를 D-글루코노-d-락톤으로 전환하는 과정에서 생성되는 전자가 매개체를 통해 전극으로 전도될 때 측정된다. 그러나, 글루코스 옥시다제는 반응에 의해 생성되는 양성자를 산소에게 전달해서, 용존 산소가 측정값에 악영향을 미치게 하는 경향이 있다는 점에서 문제가 있다.

[0008] 그러한 문제를 해결하기 위해, 예를 들어, NAD(P) 의존성 글루코스 탈수소효소 (EC 1.1.1.47) 또는 피롤로퀴놀린 퀴논 (이후 명세서에서 "PQQ" 로도 언급됨) 의존성 글루코스 탈수소효소 (EC1.1.5.2 (예전의 EC1.1.99.17)) 가 혈액 글루코스 센서에서 효소로서 사용된다. 그들은 용존 산소의 영향에서 자유로운 장점을 갖는다.

그러나, 전자, 즉, NAD(P) 의존성 글루코스 탈수소효소 (이후 명세서에서 "NADGDH" 로도 언급됨) 는 불량한 안정성을 갖고, 다루기 힘들어서, 조효소의 첨가를 요구한다. 후자, 즉, PQQ 의존성 글루코스 탈수소효소 (이후 명세서에서 "PQQGDH" 로도 언급됨) 는 불량한 기질 특이성을 가져서 글루코스 이외의 당류, 예컨대 말토스 및 락토스에 반응함으로써, 측정값의 정확도를 저하시키는 단점을 갖는다.

- [0009] 나아가, WO-A1 2004/058958 은 아스페르길루스-플라빈-결합된 글루코스 탈수소효소를 개시한다. 이러한 효소의 자일로스에 대한 활성은 글루코스에 대한 활성의 오직 10% 이므로, 자일로스 내성 시험을 받는 사람의 혈액 글루코스 수준을 측정하는 경우, 측정값의 정확도가 악화될 수 있다. 이러한 효소는 50℃ 에서 15 분 동안 처리 후에 약 89% 의 잔류 활성 비율을 가져서, 양호한 열 안정성을 나타낸다. WO-A1 2006/101239 는 이러한 효소의 유전자 서열 및 아미노산 서열을 개시한다.
- [0010] 야생형 FAD-GDH 에서 유래하는 FAD-GDH 보다 액체에서 개선된 열 안정성을 갖는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 로서, 바람직하게는 진핵생물, 더욱 바람직하게는 사상 균류, 더욱더 바람직하게는 아스페르길루스 균류에서 유래하는 수식된 FAD-GDH, 및, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 첨가된 일차 구조를 갖는 FAD-GDH 가 US-B2 7,662,600 에 의해 제공된다.
- [0011] US 2008/220460 A1 은 야생형 FAD-GDH 에 비해 개선된 열 안정성을 갖는 아스페르길루스 균류, 예를 들어 아스페르길루스 오리제 또는 아스페르길루스 테레우스 (*Aspergillus terreus*) 에서 유래하는 수식된 FAD-GDH 를 개시한다. US 2008/220460 A1 은 대장균에서 유전자 재조합에 의해 생산되는 수식된 FAD-GDH 에 초점을 맞춘다. 따라서, 상기 FAD-GDH 는 글리코실화되지 않은 효소 변이체이며, 이는 US 2008/220460 A1 에서 또한 오직 액체 조건 하에 스크리닝되었다. 그러므로, 이 문헌은 잠재적 글리코실화 자리의 제거 또는 불활성화의 결과로서 개선된 건조 조건 하의 열 안정성을 갖는, 글리코실화되어 있는 FAD-GDH 변이체를 수득하기 위한 뉴클레오타이드 서열에 대한 특정 수식에 대해 침묵한다.
- [0012] FAD-GDH 의 일부 용도에서 건조 조건 하의 열 안정성은 매우 중요하다. 예를 들어, 혈액-글루코스 측정을 위한 테스트 스트립의 경우 건조 화학 하에서의 FAD-GDH 의 효소 특성이 개선될 필요가 있다.
- [0013] 본 발명의 주제는 개선된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소를 제공하는 것이었다. 건조 조건 하의 온도 안정성의 관점에서 개선된 효소를 제공하는 것이 특히 관심의 대상이었다.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0014] 본 발명의 주제는 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소이다:
- [0015] (a) 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었음; 및
- [0016] (b) 상기 (a) 에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소와 약 80% (바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%) 이상의 아미노산 서열 일치성을 나타내는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었음; 및
- [0017] (c) (a) 또는 (b) 에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소의 활성 (기능성) 조각,
- [0018] 단, (b) 에 따른 FAD-GDH 또는 (c) 에 따른 조각에서 상기 잠재적 글리코실화 자리(들)을 제거 또는 불활성화시키는 상기 치환(들)은 (a) 에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소와 비교할 때 보존되어 있고, 단, (b) 에 따른 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 (c) 에 따른 조각은 (a) 에 따른 FAD-GDH 의 효소 활성의 80% (바람직하게는 90 %, 더욱 바람직하게는 95%) 이상을 나타내고, (a) 에 따른 FAD-GDH 의 건조 조건 하의 온도 안정성의 80% (바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%) 이상을 나타내며, 여기서 표현 "건조 조건 하의 온도 안정성을 나타낸다" 는 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8 일 동안 80℃ 에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 자체 및 동결건조된 조성물에 포함되었을 때의 잔류 활성을 의미함.
- [0019] 명세서 전체에서 백분율 값은 절대값이 아니고, ±5% 의 약간의 오차 범위 를 포함하는 상대값으로 이해될 것이

다. 당업자는 그러한 편차가 본 발명의 주제의 관점에서 명백함을 인식한다.

- [0020] 용어 "그의 활성 조각(들)" 또는 동의어 "그의 기능성 조각(들)" 은 SEQ ID No. 3 내지 6 에 따른 상응하는 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실되어 있으나, 본 발명의 의미에서 효소 활성 및 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성과 관련하여 본질적 특성을 여전히 나타내는, 본 발명에 따른 임의의 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소를 의미한다.
- [0021] 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소는 선행 기술의 FAD-GDH 와 비교할 때 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타낸다.
- [0022] 이는 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화됨으로써 달성되었다. 위에서 (a) 아래 개요서술된 본 발명에 따른 FAD-GDH 와 80% (바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%) 이상의 아미노산 서열 일치성을 나타내는 FAD-GDH 도 또한 본 발명의 주제인 것으로 이해될 것이며, 단, 그들은 동일한 치환(들)을 나타내고 본 발명에 따른 FAD-GDH 와 본질적으로 동일한 특성을 나타내며, 이들 본질적 특성은 효소 활성 및 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성이다. 동일한 치환(들)을 나타내고 본 발명에 따른 FAD-GDH 와 본질적으로 동일한 특성을 나타내는 상기 본 발명에 따른 FAD-GDH 의 조각도 또한 포함되는 것으로 이해될 것이며, 이들 본질적 특성은 효소 활성 및 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성이다.
- [0023] 서열 일치성은 BLAST 알고리즘, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. 1990. J. Mol. Biol. 215:403; Altschul, S.F. et al. 1997. Nucleic Acid Res. 25:3389-3402) 에 의해 측정될 수 있다. 위에 언급된 아미노산 서열 일치성의 백분율은 상기 BLAST 알고리즘에 의한 서열 일치성의 측정을 언급하며, 여기서 상동성이 측정되는 영역은 (a) 에 따른 수식된 FAD-GDH 의 전체 서열이고, 여기서 (a) 에 따른 FAD-GDH 의 상기 서열은 레퍼런스 서열이다.
- [0024] 명세서 및 상응하는 청구항 전체에서 "서열(들)" 과 관련하여 용어 "성숙" 은 신호전달 서열, 예를 들어 신호 펩티드 또는 그의 등가물이 전혀 첨가되지 않은 각각의 단백질 서열(들)의 미가공 서열 포맷을 언급한다.
- [0025] 명세서 전체에서 용어 "온도 안정성" 은 본원에서 제공되는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 가 그것의 온도 변화, 특히 그것의 온도 증가에 따른 그것의 선천 생물물리학적 및 생화학적 특성의 면에서의 변화에 저항하는 능력을 언급한다. 이러한 맥락에서, 100% 온도 안정성은 효소의 특별히 정의된 특성에 관하여 특정 기간 (t) 에 걸쳐 온도에 노출되기 전의 효소와 비교할 때 선천 생물물리학적 및 생화학적 특성에 변화가 발생하지 않음을 반영할 것이다. 이와 같이, 본원에서 제공되는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각은 특정 기간 (t) 에 걸쳐 온도에 노출되는 동안 그것의 선천 효소 활성을 보존하고, 그에 제한되는 것은 아니나, 예시적으로 구체적 구현예로서 실시예 3 에 따라 측정되는 효소 활성을 나타낸다.
- [0026] 전체 명세서에서 용어 "건조 조건(들)" 은 구체적으로 아래 제시된 실시예 7 에 따른 시험 조건과 관련되며, 즉, 그에 제한되는 것은 아니나, 각각의 동결건조된 샘플은 건조제 (분자체 3A, MS 551, Grace) 의 존재 하에 80℃ 에 8 일 동안 노출되었다.
- [0027] 전체 명세서 및 상응하는 청구항의 맥락에서 표현 "건조 조건 하에서 온도 안정성을 나타낸다" 는 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8 일 동안 80℃ 에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 자체 및 동결건조된 조성물에 포함되었을 때의 잔류 활성을 의미한다.
- [0028] "비스트레스 동결건조물 (unstressed lyophilizate)" 은 동결건조되었으나 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8 일 동안 80℃ 에서 인큐베이션되지 않은 효소 부분이다. "비스트레스 동결건조물" 은 온도 안정성이 동결 건조 후에 측정됨을 의미한다. 이는 비스트레스 동결건조물이 온도 안정성을 측정하기 전에 저장되지도 않고, 처리되지도 않음을 의미한다. 건조 조건 하의 온도 안정성은, 그에 제한되는 것은 아니나, 실시예 7 에 따라 측정될 수 있다.
- [0029] 또다른 구체적 구현예에서 본 발명은 또한 본원에서 SEQ ID No. 3 내지 6 하에 서열이 제공되는 서열과 기능성 등가물인 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소를 예견한다. 본 발명의 맥락에서 기능성 등가물은, 특히 효소 활성 및 건조 조건 하의 열 안정성의 면에서, 동일 또한 유사한 기능을 갖는 단백질/효소를 인코딩하는, 서열 SEQ ID No. 3 내지 6 에 제공되는 것과 하나 이상의 아미노산이 상이한, 아미노

산 서열 분자이다.

- [0030] 본 발명의 추가의 구체적 구현예에서 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 기능성 등가물은 SEQ ID No. 3 내지 6 과 상동성인 아미노산 서열이다. 본 발명의 구체적 구현예에서 상동성의 정도 또는 백분율은 SEQ ID No. 3 내지 6 과 적어도 80, 90, 95, 99 또는 100% 이며; 단, 그들은 위에서 (a) 아래 개요서술된 것과 동일한 치환을 나타내고, 본 발명에 따른 FAD-GDH 와 본질적으로 동일한 특성을 나타내며, 이들 본질적 특성은 효소 활성 및 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성이다. 동일한 치환을 나타내고, 본 발명에 따른 FAD-GDH 와 본질적으로 동일한 특성을 나타내는 본 발명에 따른 상기 FAD-GDH 의 활성 조각도 또한 포함되는 것으로 이해될 것이며, 이들 본질적 특성은 효소 활성 및 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성이다.
- [0031] 정확히 동일한 단백질/효소를, SEQ ID No. 13 또는 그의 상보적 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열로 코딩하는, 기능성 등가물 뉴클레오티드 서열 분자의 경우에도 같다.
- [0032] 추가의 구체적 구현예에서 SEQ ID No. 13 에 제시된 뉴클레오티드 분자의 기능성 등가물은 상기 DNA 서열 또는 SEQ ID No. 13 의 서열에 실질적으로 상보적인 서열에 의해 인코딩되는, RNA 분자이다.
- [0033] 본 발명의 맥락에서 용어 "RNA 분자" 는 SEQ ID No. 3 내지 6 에 따른 본원에서 제공되는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 단백질 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하는, 단일-가닥인, 리보뉴클레오티드 분자의 선형 중합체를 언급한다.
- [0034] 본 발명의 맥락에서 "건조제" 는 예를 들어, 그에 제한되는 것은 아니나, 실리카 겔, 칼슘 설페이트, 칼슘 클로라이드 및 분자체와 같은 건조제이다.
- [0035] 특히, 본 발명의 주제는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH), 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이며, 여기서:
- [0036] - 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소는 SEQ ID No: 1 에 따른 글리코실화된 FAD-GDH 와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리제에서의 발현에 의해 수득가능하고
- [0037] - 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 하나 이상의 아미노산에 의해 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었다.
- [0038] 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 는 글리코실화되어 있다. 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각은 SEQ ID No: 1 에 따른 글리코실화된 FAD-GDH 와 비교시 더욱 균일한 글리코실화 패턴 (더 작은 분자량 분포를 가짐) 을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리제에서의 발현에 의해 수득가능하다. 또다른 구체적 구현예에서, 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각은 약 103 876 의 분자 중량 평균 분자량 (M_w) 및 약 99 901 의 수 평균 분자량 (M_n) 을 나타낸다. 중량 평균 분자량 (M_w) 및 수 평균 분자량 (M_n) 은 Viscotek Triple Detektors (굴절률 (RI) 및 직각 광 산란 (RALS)) 의 미가공 데이터로부터 소프트웨어를 이용하여 계산된다. M_w/M_n 의 비율은 다분산성이고, 단백질의 크기 분포를 제시한다. 단순분산 단백질은 M_w/M_n 값이 1 이다.
- [0039] 이와 같이, 본 발명의 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각을 포함하는 조성물은 다음과 같은 상기 조성물 중 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포를 나타낸다: 약 103 876 의 중량 평균 분자량 (M_w) 및 약 99 901 의 수 평균 분자량 (M_n). 그러한 조성물은 본 발명의 또다른 구현예이다.
- [0040] 나아가, 본 발명의 하나의 구현예는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 하나 이상

이 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었고; 여기서 글리코실화도는 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만, 더욱 바람직하게는 30% 미만이고/거나, Mw/Mn 의 비율은 1,02 미만, 더욱 바람직하게는 1,01 미만이다 (이들 값의 계산에 대해 예를 들어 실시예 4 참고).

[0041] 더욱이, 본 발명의 주제는 또한 수식된 FAD-GDH 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 하나 이상의 아미노산에 의해 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었고; 여기서, 상기 수식된 FAD-GDH 를 포함하는 조성물은 1,02 미만의 Mw/Mn 의 비율, 더욱 바람직하게는 1,01 미만의 Mw/Mn 의 비율을 갖는 상기 조성물 중 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포를 나타내고/거나, 여기서 상기 수식된 FAD-GDH 의 글리코실화도는 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만, 더욱 바람직하게는 30% 미만이다. 그러한 조성물은 본 발명의 또다른 구현예이다.

[0042] 글리코실화도는 하기 식에 따라 계산될 수 있다:

[0043] $(Mw(\text{글리코실화된 효소}) - Mw(\text{글리코실화되지 않은 단백질 서열에 따른 효소})) \times 100\%$. 표 3 에 따른 예시된 효소에 대해 하기가 계산될 수 있다 (실시예 4 참고):

[0044] FAD-GDH 변이체 1 (SEQ ID No: 3):

[0045] $(76333-61461)/61461 \times 100\% = 24\%$

[0046] 아스페르길루스로부터의 FAD-GDH (SEQ ID No: 1):

[0047] $(103876-61592)/61592 \times 100\% = 69\%$.

[0048] 이는 본 발명에 따른 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 조각이 SEQ ID No: 1 에 따른 글리코실화된 FAD-GDH 와 비교시 더욱 균일한 글리코실화 패턴 (더 작은 분자량 분포를 가짐) 을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리재에서의 발현에 의해 수득가능하고/거나, 본 발명에 따른 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 조각은 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 와 비교시 더 낮은 글리코실화도를 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리재에서의 발현에 의해 수득가능함을 의미한다.

[0049] 본 발명의 하나의 구체적 구현예에서 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8 일 동안 80°C 에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각의 잔류 활성은 80% 이상, 바람직하게는 84% 이상이다.

[0050] 효소 활성은, 그에 제한되는 것은 아니나, 예시적으로 실시예 3 i) 에 따라 측정될 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 수식된 FAD-GDH 또는 그의 활성 조각의 당질 특이성은 글리코실화된 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 의 당질 특이성과 대략 동일하며, 즉 말토스에 대해 0,5% 미만, 갈락토스에 대해 13% 미만이다; 당질 특이성의 계산에 대해 실시예 3 ii) 를 참고한다.

[0052] 구체적 구현예에서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 상기 하나 이상의 아스파라긴 잔기는 Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 및 Val 을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 의해 치환되었다. 더욱 구체적 구현예에서 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 상기 하나 이상의 아스파라긴 잔기는 Arg, Asp, Gln, Glu, Gly His, Lys, Met, Pro, Ser, 및 Thr 을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 의해 치환되었다.

[0053] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각 이 제공되며, 여기서 N2; N168 및 N346 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 잔기 중 오직 하나의 아스파라긴은 하나 이상의 아미노산에 의해 치환되었으며, 이는 상응하는 글리코실화 표적 자리의 불활

성화 (또는 결실) 를 초래한다.

- [0054] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 상기 구현예에 따라 제공되며, 여기서 상기 아스파라긴 잔기는 S, P, SP 또는 D 에 의해 치환되었다.
- [0055] 본 발명에 따르면 구체적 구현예는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 하기 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 갖는다. 이러한 맥락에서 N168SP 는 SEQ ID No: 2 (야생형) 에 따른 위치 168 에서의 아스파라긴 잔기가 세린 (S) 및 프롤린 (P) 으로 치환되었음을 의미한다.
- [0056] 본 발명의 특히 구체적인 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 제공되며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 하기 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 갖는다.
- [0057] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각은 하기 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 오직 하나를 갖는다.
- [0058] 당업자는 상기 수식된 FAD-GDH 가 앞서 언급된 치환과 상이한 추가의 수식을 갖거나 갖지 않을 수 있음을 이해한다. 모든 위에 언급된 및 모든 이후 언급되는 수식된 본 발명에 따른 FAD-GDH 의 경우에도 같다.
- [0059] 본 발명의 또다른 특히 구체적인 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 제공되며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 SEQ ID No: 3 에 따른 특별한 치환 N2S 를 갖는다.
- [0060] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 제공되며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 SEQ ID No: 4 에 따른 치환 N168P 를 갖는다.
- [0061] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 제공되며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 SEQ ID No: 5 에 따른 하기 치환 N168SP 를 갖는다.
- [0062] 본 발명의 또다른 구체적 구현예에서 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그와 80% 이상 (바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상) 의 서열 상동성을 나타내는 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각이 제공되며, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소는 SEQ ID No: 6 에 따른 하기 치환 N346D 를 갖는다.
- [0063] 본 발명에 의해 포괄되는 것은 또한 모든 위에 언급된 효소와 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95% 의 서열 상동성을 나타내는 효소이며, 단, 특히 특징적 효소 활성 및, 특히 건조 조건 하의, 온도 안정성은 상기 효소 활성이, 그에 제한되는 것은 아니나, 예시적으로 실시예 3 i) 에 따라 측정될 때, 서열 SEQ ID No. 3 내지 6 에 따른 제공되는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소에 대해 명세서 전체에서 언급되는 바와 본질적으로 동일하게 유지된다.

- [0064] 본 발명의 또다른 구체적 구현에는 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드이며, 단, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 인코딩하지 않는다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 분자 또는 서열 목록 부분에 명백히 나열된 하기 서열에 대해 인코딩하는 그의 상응하는 유전자일 수 있다:
- [0065] SEQ ID No: 3, 여기서 위치 2 에서의 아스파라긴 잔기가 세린 잔기로 대체되어 있음.
- [0066] SEQ ID No: 5, 여기서 위치 168 에서의 아스파라긴 잔기가 2 개의 아미노산, 즉 세린 및 프롤린 잔기로 대체되어 있음.
- [0067] SEQ ID No: 6, 여기서 위치 346 에서의 아스파라긴 잔기가 아스파르트산 잔기로 대체되어 있음.
- [0068] 본 발명의 또다른 구체적 구현에는 관련 서열 또는 그의 동종 서열에 대한 제한이 없이 본 발명에 의해 제공되는 하나 이상의 수식된 FAD-GDH 를 포함하는 조성물이다.
- [0069] 본 발명의 또다른 구체적 구현에는 DNA 또는 RNA 분자 또는 본 발명에 의해 제공되는 상응하는 유전자인 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물이다. 그러나, 본 발명에 따르면 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않는다.
- [0070] 본 발명의 또다른 구현에는 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터이다. 그러나, 본 발명에 따르면 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않는다. 상기 발현 벡터는 숙주 세포에서 그것의 발현을 지시할 수 있는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되어 있을 수 있다. 이 연구에서 특정 벡터는 발현 벡터 pPICZ αA (Invitrogen) 였다. 이 플라스미드는 발현 구축물의 클로닝을 위한 대장균 (pUC 복제 원점) 에서의 복제 뿐만 아니라 AOX1 프로모터/AOX1 터미네이터 서열 (추가적 세부사항에 대해 도 1 참고) 의 사용에 의한 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 에서의 재조합 유전자 발현을 허용한다.
- [0071] 본 발명에서 유용한 발현 벡터는 전형적으로는 복제 원점 (ori), 선별을 위한 항생제 저항성, 발현을 위한 프로모터 및 수식된 FAD-GDH 유전자 변이체의 전부 또는 일부를 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따르면 상기 유전자 변이체는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않는다.
- [0072] 발현 벡터는 당업계에 알려진 기타 DNA 서열, 예컨대 신호 서열 (더 나은 폴딩, 주변세포질 내로의 수송 또는 분비를 위한), 발현의 더 나은 조절을 위한 유도인자, 또는 클로닝을 위한 절단 자리를 또한 포함할 수 있다. 선별된 발현 벡터의 특징은 이용될 숙주 세포와 화합성이어야 한다. 적합한 복제 원점 예컨대 CoIE1 플라스미드 복제 원점이 사용될 수 있다. 적합한 프로모터는, 예를 들어, *lac* 및 *trp* 를 포함한다. 또한 발현 벡터가 선별 마커에 대해 코딩하는 서열 예컨대 항생제 저항성 유전자를 포함하는 것이 바람직하다. 선별가능한 마커로서, 암피실린 저항성, 또는 카나마이신 저항성이 편리하게 이용될 수 있다. 모든 이들 물질은 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하다.
- [0073] 요망되는 코딩 및 제어 서열을 함유하는 적합한 발현 벡터는 당업계에 공지된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축될 수 있으며, 상기 기술 중 다수는 Sambrook *et al.*, in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press 에 기재되어 있다.
- [0074] 본 발명의 또다른 구현에는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포이다. 본 발명에 따르면 상기 숙주 세포가 글리코실화에 적합해야 한다는 것을 당업자는 이해한다. 그러므로, 본 발명에 따르면 상기 숙주 세포는 전제조건으로서, 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 내인성 글리코실화 효소를 갖고 있다.
- [0075] 따라서, 본 발명의 또다른 구현에는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포이며, 단, 상기 숙주 세포는, 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 글리코실화 능력이 있다.

- [0076] 본 발명의 또다른 구체적 구현에는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포이며, 단, 상기 숙주 세포는 내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 글리코실화 능력이 있고, 상기 숙주 세포는 대장균 균주가 아니다.
- [0077] "글리코실화 효소" 는 탄수화물, 즉 글리코실 공여체가 또다른 분자의 히드록실 또는 기타 기능성 기에 부착되는 반응을 촉진한다. 이는 글리칸을 단백질, 지질, 또는 기타 유기 분자에 부착하는 효소 과정이다. 글리코실화는 번역동시 및 번역후 수식의 형태이다. 조면 ER 에서 합성되는 대부분의 단백질은 글리코실화를 겪는다. 그것은 효소-지시 자리-특이적 과정이며, 이는 "글리케이션" 의 비효소적 화학 반응과 대조적이다.
- [0078] 본 발명에 따르면 "내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 글리코실화 능력이 있는 숙주 세포" 는, 그에 제한되는 것은 아니나, 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*), 아스페르길루스 소제 (*Aspergillus sojae*), 아스페르길루스 오리재 (*Aspergillus oryzae*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 한세놀라 폴리모르파 (*Hansenula polymorpha*) 에서 유래하는 숙주 세포이며, 적합한 피키아 숙주 세포는, 그에 제한되는 것은 아니나, Invitrogen (5791 Van Allan Way, Carlsbad, CA 92008, USA) 로부터 입수가 가능한 피키아 파스토리스 X33 또는 피키아 파스토리스 KM71H 를 포함한다.
- [0079] 당업자는 선천 대장균 균주가 일반적으로 글리코실화 시스템을 결여하고, 그러므로 글리코실화된 단백질을 발현하지 않음을 인식한다. 대장균 균주는 글리코실화 시스템 (예를 들어 캄필로박테르 제주니의 N-연결 글리코실화 시스템) 이 유전자 조작에 의해 도입된 경우에만 당단백질을 생산할 수 있다.
- [0080] 숙주 세포는 바람직하게는 본 발명에 따른 하나 이상의 돌연변이를 갖는 수식된 FAD-GDH 효소에 대해 코딩하는 DNA 서열 중 하나의 전부 또는 일부를 포함하는 발현 벡터를 함유한다.
- [0081] SEQ ID No.: 01 에 따른 효소는 아스페르길루스 오리재에서 발현될 수 있고, 예를 들어 일본 특허 JP 2010/239969, US-A1 20090259024,
- [0082] US-A 20090155848, US-A1 020080090278; US-A1 20080020426, US-A1 20080014612, US-A1 20080014611, US-A1 20080003628, US-B2 7,871,805, US-B2 7,741,100,
- [0083] US-B2 7,655,130, US-B2 7,553,649 및 US-B2 7,494,794 에 기재된 바와 같이 발현될 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 재조합 생산은 당업계에 알려진 숙주에서 수행될 수 있다. 적합한 숙주는 사상 균류 균주 예를 들어 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 소제 및 아스페르길루스 오리재로부터 선택될 수 있다. 적합한 숙주는 효모 균주 예를 들어 피키아 파스토리스, 사카로마이세스 세레비지에 및 한세놀라 폴리모르파로부터 선택될 수 있다. 적합한 피키아 숙주 세포는, 예를 들어, Invitrogen (5791 Van Allan Way, Carlsbad, CA 92008, USA) 로부터 입수가 가능한 피키아 파스토리스 X33 또는 피키아 파스토리스 KM71H 를 포함한다.
- [0085] 본 발명에 따른 수식된 FAD-GDH 가 앞서 언급된 수식(들)과 상이한 추가의 수식을 갖거나 갖지 않을 수 있음을 당업자는 이해한다.
- [0086] 구체적 구현예에서 본 발명에 따른 수식된 FAD-GDH 또는 그의 기능성 조각은 본 발명에 따른 상기 수식된 FAD-GDH 를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 효모, 특히 피키아 파스토리스에서 발현시킴으로써 수득가능하다.
- [0087] 발현 벡터는 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 숙주 세포 내에 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터에 의한 숙주 세포의 형질전환은 폴리에틸렌 글리콜 매개 원형질 형질전환 방법 (상기 Sambrook et al. 1989) 에 의해 수행될 수 있다. 그러나, 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 다른 방법들, 예를 들어, 전기천공, 탄도 DNA 주입, 또는 원형질 융합이 또한 이용될 수 있다.
- [0088] 적합한 숙주 세포는, 그에 제한되는 것은 아니나, 효모 세포 예컨대 피키아 파스토리스, 사카로마이세스 세레비지에 또는 한세놀라 폴리모르파 또는 사상 균류 예컨대 아스페르길루스 니게르 또는 아스페르길루스 소제일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 구체적 구현에는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포이며, 여기서 상기 숙주 세포는 효모, 특히 피키아 파스토리스이다.
- [0090] 수식된 FAD-GDH 변이체를 함유하는 발현 벡터가 적당한 숙주 세포 내에 도입되면, 숙주 세포는 요망되는 수식된 FAD-GDH 변이체의 발현을 허용하는 조건 하에 배양될 수 있다. 수식된 FAD-GDH 의 전부 또는 일부에 대해

코딩하는 DNA 서열을 포함하는 요망되는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포는 항생제 선별 또는 영양요구성 돌연변이체의 상보성 및 최소 배지로부터의 선별에 의해 쉽게 확인될 수 있다 (J. Sambrook, D. W. Russell: "Molecular Cloning: a laboratory manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor, New York (2001)). 수식된 FAD-GDH 변이체의 발현은 상이한 방법 예컨대 FAD-GDH mRNA 전사체의 생산 측정, 유전자 산물의 면역학적 탐지 또는 유전자 산물의 효소 활성의 탐지에 의해 확인될 수 있다. 바람직하게는, 효소적 검정이 적용된다.

[0091] 본 발명의 DNA 서열을 발현함에 있어서 모든 발현 벡터 및 DNA 조절 서열이 동일하게 잘 기능하지는 않는다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 또한, 모든 숙주 세포가 동일한 발현 시스템으로 동일하게 잘 기능하지는 않을 것이다. 그러나, 당업자는 과도한 실험 없이 본원에서 제공되는 안내를 사용하여 발현 벡터, DNA 조절 서열, 및 숙주 세포 중에서 적당한 선별을 수행할 것이다. 이와 관련하여 본 발명의 또다른 구체적 구현에는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 제공하며, 단, 상기 숙주 세포는 내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 글리코실화 능력이 있고, 상기 숙주 세포는 대장균 균주가 아니라고 이해될 것이다.

[0092] 본 발명의 또다른 구현에는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각의 제조 방법이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 형질전환주를 배양하는 것을 포함한다.

[0093] 본 발명은 또한 본 발명의 숙주 세포를 본 발명의 수식된 FAD-GDH 의 생산에 적합한 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 본 발명의 FAD-GDH 변이체의 제조 방법에 관한 것이다. 박테리아 숙주 세포의 경우, 전형적인 배양 조건은 탄소 및 질소 공급원, 적당한 항생제 및 유도제 (사용되는 발현 벡터에 따라) 를 함유하는 액체 배지이다. 전형적인 적당한 항생제는 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린 (뿐만 아니라 피키아 파스토리스의 경우 제오마이신) 등을 포함한다. 전형적인 유도제는 IPTG, 글루코스, 락토스 (대장균의 경우) 뿐만 아니라 피키아 파스토리스의 경우 메탄올 등을 포함한다.

[0094] 본 발명의 또다른 구현에서 본 발명의 폴리펩티드는 수식된 FAD-GDH 에 대해 코딩하는 DNA 서열을 발현하는 숙주 세포에서의 생산에 의해 수득된다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 수식된 FAD-GDH 에 대해 코딩하는 DNA 서열에 의해 인코딩되는 mRNA 의 시험관내 번역에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, DNA 서열이 위에 기재된 바와 같이 합성되고 적합한 발현 벡터 내에 삽입될 수 있으며, 이러한 벡터가 결국 시험관내 전사/번역 시스템에서 사용될 수 있다.

[0095] 무세포 펩티드 합성 시스템에서 발현을 촉진할 수 있는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 위에 정의 및 기재된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 본 발명의 또다른 구체적 구현예를 나타낸다.

[0096] 예를 들어 위에 기재된 절차에 의해 생산된 폴리펩티드는 그 후 다양한 통상적 단백질 정제 기술을 사용하여 단리 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 절차 예컨대 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피가 이용될 수 있다.

[0097] 따라서 본 발명의 또다른 주제는 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각이다.

[0098] 본 발명의 개선된 FAD-GDH 변이체의 주된 응용 중 하나는 당뇨병 환자의 생체의 샘플에서 혈액-글루코스 수준을 모니터링하는 테스트 스트립에 있어서의 용도이다. 물론 많은 종류의 샘플이 조사될 수 있다. 바람직하게는 체액 예컨대 혈청, 혈장, 장액 또는 소변이 그러한 샘플의 바람직한 공급원이다.

[0099] 본 발명의 FAD-GDH 변이체는 테스트 스트립에서 사용하기에 특히 적합하며, 이는 그것이 선행 기술에 따른 FAD-GDH 에 비해 더 작은 분자량 분포를 갖는 더욱 균일한 글리코실화 패턴 뿐만 아니라 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내기 때문이다. 용어 "건조 조건 하의" 는 위에서 정의되었다.

[0100] 본 발명의 또다른 주제는 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각을 사용하여 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는 방법이며, 상기 탐지, 확인 또는 측정은 샘플을 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각과 접촉시키는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 상기 방법의 구체적 구현에는 상기 글루코스의 탐지, 확인 또는 측정이 센서 또는 테스트 스트립 장치를 사용하여 수행되는 방법이다.

- [0101] 또한 본 발명의 범위에 속하는 것은 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각을, 특히 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는데 요구되는 기타 시약과 함께, 포함하는 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하기 위한 장치이다.
- [0102] 본 발명의 개선된 열 안정성을 갖는 FAD-GDH 변이체는 또한 샘플 또는 반응기 중 글루코스의 온라인 모니터링을 위한 바이오센서에서 유리하게 사용될 수 있다 (D'Costa, E. J., *et al.*, *Biosensors* 2 (1986) 71-87; Laurinavicius, V., *et al.*, *Analytical Letters* 32 (1999) 299-316; Laurinavicius, V., *et al.*, *Monatshefte fuer Chemie* 130 (1999) 1269-1281; Malinauskas, A. *et al.*, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 100 (2004) 395-402). 이러한 목적을 위해, FAD-GDH 변이체는, 예를 들어, 글루코스 농도의 더욱 정확한 확인을 위해 산화환원반응 전도성 예폭시 네트워크를 함유하는 오스뮴 착물로 산소-둔감성 유리질 전극을 코팅하는데 사용될 수 있다 (상기 Ye *et al.*, 1993).
- [0103] 위에 언급된 것들을 고려하여, 본 발명의 추가의 구체적 양상은 다음과 같다:
- [0104] 첫번째 양상에서 본 발명은 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소에 관한 것이다:
- [0105] (a) 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기는 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었음; 및
- [0106] (b) 상기 (a)에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소와 약 80% 이상의 아미노산 서열 일치성을 나타내는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기는 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었음; 및
- [0107] (c) (a) 또는 (b)에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 활성 조각, 단, (b)에 따른 FAD-GDH 또는 (c)에 따른 조각에서 상기 잠재적 글리코실화 자리(들)를 제거 또는 불활성화시키는 상기 치환(들)은 (a)에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소와 비교할 때 보존되어 있고, 단, (b)에 따른 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 (c)에 따른 조각은 (a)에 따른 FAD-GDH의 효소 활성의 80% 이상을 나타내고, (a)에 따른 FAD-GDH의 건조 조건 하의 온도 안정성의 80% 이상을 나타내며, 여기서 표현 "건조 조건 하의 온도 안정성을 나타낸다"는 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8일 동안 80℃에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH) 자체 및 동결건조된 조성물에 포함되었을 때의 잔류 활성을 의미함.
- [0108] 두번째 양상에서 본 발명은 첫번째 양상에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소는 SEQ ID No: 1에 따른 글리코실화된 FAD-GDH와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1에 따른 FAD-GDH는 아스페르길루스 오리제에서의 발현에 의해 수득가능하다.
- [0109] 세번째 양상에서 본 발명은 첫번째 또는 두번째 양상에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50% 미만의 글리코실화도, 및/또는 1.02 미만의 Mw/Mn의 비율을 나타낸다.
- [0110] 네번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 세번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 N2; N168 및 N346으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아스파라긴 잔기 중 오직 하나가 글리코실화에 적합하지 않은 하나 이상의 아미노산으로 치환됨으로써, 이 위치에서의 잠재적 글리코실화 자리가, 각각, 제거 또는 불활성화되었다.
- [0111] 다섯번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 네번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오

티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 하기 치환 N2S, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 갖는다.

- [0112] 여섯번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 다섯번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 하기 치환 N2S (SEQ ID No: 3) 를 갖는다.
- [0113] 일곱번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 여섯번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각은 50 % 미만의 글리코실화도, 및/또는 1,02 미만의 Mw/Mn 의 비율을 나타낸다.
- [0114] 여덟번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 여섯번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 단, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하지 않는다.
- [0115] 아홉번째 양상에서 본 발명은 여덟번째 양상에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0116] 열번째 양상에서 본 발명은 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리제 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형) 에서 유래하는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 대해 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 제 9 양상에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이며, 단, 상기 숙주 세포는 내인성 글리코실화 효소를 가짐으로써 특히 N-연결 글리코실화를 위한, 글리코실화 능력이 있고, 상기 숙주 세포는 대장균 균주가 아니다.
- [0117] 열한번째 양상에서 본 발명은 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 열번째 양상에 따른 형질전환주를 배양하는 것을 포함한다.
- [0118] 열두번째 양상에서 본 발명은 열한번째 양상의 방법에 의해 수득가능한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이다.
- [0119] 열세번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 여섯번째 양상, 또는 열두번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각 또는 일곱번째 양상에 따른 조성물을 사용하여 생체의 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는 방법에 관한 것이며, 상기 탐지, 확인 또는 측정은 생체의 샘플을 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각 또는 조성물, 각각과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0120] 열네번째 양상에서 본 발명은 열세번째 양상의 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 글루코스의 탐지, 확인 또는 측정은 센서 또는 테스트 스트립 장치를 사용하여 수행된다.
- [0121] 열다섯번째 양상에서 본 발명은 첫번째 내지 여섯번째 양상, 또는 열두번째 양상 중 어느 하나에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각, 또는 일곱번째 양상에 따른 조성물을 포함하는 생체의 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하기 위한 장치에 관한 것이다.
- [0122] 하기 실시예에서, 모든 시약, 제한 효소, 및 그밖의 물질은 다른 상업적 출처가 명시되지 않으면 Roche Diagnostics Germany 로부터 수득되었고, 공급자에 의해 제공되는 지시에 따라 사용되었다. DNA 의 정제, 특성분석 및 클로닝에 이용되는 작업 및 방법은 당업계에서 잘 알려져 있고 (Ausubel, F., *et al.*, in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley), 당업자의 필요에 따라 조정될 수 있다.
- [0123] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 설명한다. 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라, 본 발명을 더 이해할 수 있게 하려는 것이다.
- [0124] **실시예**

[0125] **실시예 1**

[0126] **수식된 FAD-GDH 의 발현**

[0127] 피키아 파스토리스에서의 FAD-GDH 변이체의 재조합 발현에 적합한 벡터를 생성하기 위해, 플라스미드 pBluescript SK (Stratagene, La Jolla) 의 유도체 내로 결합된 합성 FAD-GDH 야생형 유전자 (SEQ ID No: 7) 를 사용했다. 첫번째 단계에서, 제한 엔도뉴클레아제 *XhoI* 에 대한 고유 인지 자리를 Quick Change II 자리-지정 돌연변이유발 키트 (Stratagene, La Jolla) 및 SEQ ID No: 10 을 초래하는 돌연변이유발성 프라이머 (SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9) 를 사용하여 침묵 돌연변이에 의해 제거했다. 이러한 구축물을 주형으로서 사용하여 SEQ ID No: 11 및 SEQ ID No: 12 를 갖는 PCR 프라이머를 사용하는 PCR 증폭에 의해 5'-말단에 *XhoI* 자리 및 3'-말단에 *AgeI* 자리를 포함하는 인접 서열을 추가했다. 증폭 후에 PCR 산물을 제한 엔도뉴클레아제 *XhoI* 및 *AgeI* (New England Biolabs) 로 가수분해하고, *XhoI/AgeI* 가수분해된 발현 벡터 pPICZ αA (Invitrogen) 내로 결합시켜 α-인자 신호 서열, 단백질가수분해 절단 자리 (KEX2) 및 성숙 FAD-GDH 에 대해 코딩하는 융합 유전자 (SEQ ID No: 13) 를 수득했다.

[0128] 단일 아미노산 치환을 도입하기 위해 SEQ ID No: 13 을 보유하는 pPICZ αA 를 자리-지정 돌연변이유발을 위한 주형으로서 사용했다. 개별 치환을 위해 표 에 제시된 돌연변이유발성 프라이머 쌍과 함께 Quick Change II 자리-지정 돌연변이유발 키트 (Stratagene, La Jolla) 를 제조사의 지침에 따라 사용했다.

[0129] **표 1: 아미노산 치환, 돌연변이유발성 프라이머 쌍 및 결과적인 서열**

AA 치환	돌연변이유발성 프라이머 쌍	결과적인 DNA 서열
N2S	SEQ ID No: 14 SEQ ID No: 15	SEQ ID No: 16
N168P	SEQ ID No: 17 SEQ ID No: 18	SEQ ID No: 19
N168SP	SEQ ID No: 20 SEQ ID No: 21	SEQ ID No: 22
N346D	SEQ ID No: 23 SEQ ID No: 24	SEQ ID No: 25

[0130]

[0131] 상응하는 재조합 발현 균주를 생성하기 위해, 피키아 파스토리스 균주 X33 (Invitrogen) 의 전기천공적격 세포 (electrocompetent cell) 를 상응하는 FAD-GDH 변이체 (SEQ ID No: 16, No: 19, No: 22 및 No: 25, 각각) 를 인코딩하는 DNA 를 보유하는 5 - 10 μg 의 선형화된 pPICZ αA 로 전기천공에 의해 트랜스펙션시켰다. 모든 실험 단계를 제조사의 지침에 따라 수행했다. 트랜스펙션된 세포를 100 μg/ml, 250 μg/ml 또는 500 μg/ml Zeocin 을 선별 마커로서 함유하는 YPD 아가 플레이트 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 텍스트로스 (글루코스)) 위로 플레이트팅하고, 28℃ 에서 2 - 3 일 동안 인큐베이션했다.

[0132] 트랜스펙션된 피키아 파스토리스 클론의 생산성을 시험하기 위해, 다수의 단일 콜로니를 선별 플레이트로부터 골라내고, 4 ml 의 BMMY 배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 100 mM 칼륨 포스페이트, pH 6.0, 1.34% 효모 질소 베이스 (YNB, Invitrogen), 0.0004% 비오틴) 에 접종했다. 0.5% 메탄올을 매일 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도했다. 배양물을 7 일까지 200 rpm 및 28℃ 에서 접종했다. 세포 밀도를 분광광도법으로 측정했다 (O.D.₆₀₀). 상청액에서 FAD-GDH 활성을 분광광도 효소 검정으로 측정했다.

[0133] 마지막으로 상이한 FAD-GDH 변이체의 정제 및 생화학적 특성분석에 충분한 물질을 수득하기 위해 최상의 생산자를 10 L 발효물 내로 옮겼다.

[0134] **실시예 2**

[0135] **수식된 FAD-GDH 의 정제**

[0136] 발효물로부터의 1L 블랭크 필터링된 상청액을 한외 여과/한외 투석에 의해 0.05 L 로 농축시키고, 20 mM 칼륨 포스페이트 완충액을 사용하여 pH 7.5 로 조정했다. 그 후, 상청액을 고체 암모늄 설페이트의 첨가에 의해 2.5 M 농도의 암모늄 설페이트로 조정했다. 약 1h 동안 실온에서 인큐베이션 후에, 용액을 원심분리하고, 침강물을 폐기했다. 맑은 상청액을 1000 ml 페닐 세파로스 칼럼에 적용했다. 칼럼을 3 L 의 20 mM 칼륨 포스페이트 완충액 pH 7.5 및 2.5 M 의 암모늄 설페이트 농축물로 세정한 후, FAD-GDH 를 20 mM 칼륨 포스페이트 완충액 pH 7.5 (5 L) 후에 20 mM 칼륨 포스페이트 완충액 pH 7.5 및 2.5 M 의 암모늄 설페이트 농축물의 선형 구배에 의해 용리했다. FAD-GDH 를 함유하는 분획을 수집하고, 정제하고, 한외 여과/한외 투석에 의해

약 0.05 L 로 농축시키고, 20 mM Tris/HCl 완충액 pH 8.5 에서 농축시켰다. 샘플을 500 ml Q-세파로스 칼럼에 적용하고, 2.5 L 의 20 mM Tris/HCl 완충액 pH 8.5 로 세정하고, 20 mM Tris/HCl 완충액 pH 8.5 와 100 mM NaCl 의 선형 구배 (5 L) 에 의해 용리했다. FAD-GDH 함유 분획을 수집하고, 정제하고, 한외 여과/한외투석에 의해 100 mM PIPES 완충액 pH 7.1 중 약 50 mg/ml 의 단백질 농도로 농축시켰다. 결과적인 샘플을 동결건조시켰다.

[0137] 실시예 3

[0138] 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 기능성 조각의 효소 활성 및 당질 특이성

[0139] i) 효소 활성의 측정 (기질로서 1M D-글루코스)

[0140] 50 mM PIPES 완충액 용액 pH 6.5 (0.1 % Triton X-100 을 포함), 163 mM PMS 용액, 6.8 mM 2,6-디클로로페놀 인도페놀 (DCPIP) 용액, 1 M D-글루코스 용액, 15.6 ml 의 위에 언급된 PIPES 완충액, 0.2 ml 의 DCPIP 용액 및 4 ml 의 D-글루코스를 혼합하여 반응제를 만들었다.

[0141] ii) 당질 특이성의 측정 (기질로서 1M 말토스 또는 1M 자일로스)

[0142] 50 mM PIPES 완충액 용액 pH 6.5 (0.1 % Triton X-100 을 포함), 163 mM PMS 용액, 6.8 mM 2,6-디클로로페놀 인도페놀 (DCPIP) 용액, 1 M D-말토스 또는 D-자일로스 용액, 15.6 ml 의 위에 언급된 PIPES 완충액, 0.2 ml 의 DCPIP 용액 및 4 ml 의 D-말토스 또는 D-자일로스 용액을 혼합하여 반응제를 만들었다.

[0143] 효소 활성 및 당질 특이성의 측정 조건

[0144] 2.9 ml 의 각각의 반응 시약을 5 분 동안 37°C 에서 예비가열했다. 0.1 ml FAD-GDH 용액을 첨가하고 서서히 혼합했다. 분광계를 레퍼런스로서 물을 사용하여 5 분 동안 37°C 에서 600 nm 로 보정했다. 분당 흡광도 변화 ($\Delta OD_{\text{시험}}$) 를 선형부로부터 확인했다. 블랭크 시험으로서, FAD-GDH 용액 대신 FAD-GDH 용액의 용매를 시약에 첨가한 점을 제외하고는 상기와 동일한 방식으로, 분당 흡광도 변화 ($\Delta OD_{\text{블랭크}}$) 를 확인했다. 이와 같이 수득된 값으로부터, FAD-GDH 활성을 하기 등식에 의해 계산했다. 본 발명에서, 1 단위 (U) 의 FAD-GDH 활성은 하기의 존재시 분당 1 μmol 의 DCPIP 를 감소시키는 효소의 양으로서 정의되었다

[0145] i) 효소 활성의 측정을 위한 200 mM D-글루코스

[0146] ii) 효소 활성의 측정을 위한 200 mM D-말토스 또는 D-자일로스.

[0147] 활성 (U/ml) = $\{-(\Delta OD_{\text{시험}} - \Delta OD_{\text{블랭크}}) \times 3.0 \times \text{회석률}\} / \{16.3 \times 0.1 \times 1.0\}$

[0148] 상기 등식에서, 3.0 은 각각의 반응 시약 + 효소 용액의 양 (ml) 이고, 16.3 은 본 발명의 활성을 측정하기 위한 조건 하의 밀리몰 분자 흡수 계수 ($\text{cm}^2/\text{마이크로몰}$) 이고, 0.1 은 효소 용액의 양 (ml) 이고, 1.0 은 셀의 광학 경로 (cm) 이다.

[0149] 실시예 4

[0150] SEC-RALS 에 의한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포

[0151] 50 mM 칼륨포스페이트 완충액 pH 6.9 와 300 mM NaCl 중 약 10 mg/ml 의 농도를 갖는 10 μl 의 단백질 용액을 G3000SWXL TSK겔 칼럼 (30 cm, Tosoh Biosep) 에 적용했다. HPLC 펌프의 유속은 0.7 ml/min 였다. Viscotek Triple 탐지기의 보정을 위해, 소 혈청 알부민 (Albumin RPLA4, Art.-Nr. 11 726 544, Roche Diagnostics GmbH) 의 갓 제조한 용액을 사용했다. 0.185 의 dn/dc 값을 모든 샘플의 평가에 사용했다. 소프트웨어 OmniSEC 4.7.0 (Malvern Instruments) 을 사용하여 평가를 수행했다. 중량 평균 분자량 (M_w) 및 수 평균 분자량 (M_n) 을 Viscotek Triple Detektors (굴절률 (RI) 및 직각 광 산란 (RALS)) 의 미가공 데이터로부터 소프트웨어를 이용하여 계산했다. M_w/M_n 의 비율은 다분산성이고, 단백질의 크기 분포를 제시한다. 단순분산 단백질은 M_w/M_n 값이 1 이다.

[0152] Haney, Max: Basics of GPC/SEC with threefold detection, LaborPraxis 28, 50-53 (2004)

[0153] Wanda K. Hartmann *et al.*; Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection, Analytical Biochemistry

325, 227-239 (2004)

[0154] Heinzmann, Gerhard; Tartsch, Bernd GPC/SEC - three eyes can see more

[0155] GIT Spezial Separation 27, 21-24 (2007)

[0156] **실시예 5**

[0157] **C-니트로소아닐린 매개체를 이용한 FAD-GDH 활성 측정**

[0158] **용액 1 (S1)**

[0159] 100 mM Pipes 완충액 pH 7.1 중 25 mM N,N-비스-(히드록시에틸)-3-메톡시-니트로소아닐린 히드로클로라이드, (CAS 733686-00-5) 와 5%(w/v) PVP (폴리비닐피롤리돈 USP K25, FLUKA #81399).

[0160] **용액 2 (S2)**

[0161] 물 중 포화 ~15% (w/v) 2,18 포스포몰리브덴산, 나트륨 염 ((Na₆[P₂Mo₁₈O₆₂] *24 H₂O) CAS 50811-90-0, Honeywell Specialty Chemicals, Article No. 04137).

[0162] **용액 3 (S3)**

[0163] 물 중 1 M 글루코스.

[0164] **효소 용액**

[0165] 100 mM Pipes 완충액 pH 7.1 에 10 mg/ml 동결건조된 효소를 용해시킨다.

[0166] 이를 100 mM Pipes 완충액 pH 7.1 에 약 1:100 로 희석하여 0.02-0.05 ΔE/min 의 비율을 수득한다.

[0167] **측정 절차**

[0168] **표 2**

S1	1000 μl
S2	50 μl
S3	33 μl
효소 용액	50 μl

[0170] 20 min 동안 25℃ 에서 724 nm 에서 흡수의 측정.

[0171] $\epsilon_{724\text{ nm}} = 27.5 \text{ [mmol}^{-1} * 1 * \text{cm}^{-1}]$

[0172] **글루코스 K_M-값**

[0173] 반응 혼합물 중 글루코스 농도는 S3 중 글루코스 농도를 변화시킴으로써 0.1 - 170 mM 범위에서 달라졌다.

[0174] K_M 값의 계산을 위해 측정된 FAD-GDH 활성을 Michaelis-Menten 등식에 적합 (fit) 시켰다:

[0175]
$$V = \frac{V_{\text{최대}} * c}{K_M + c}$$

[0176] L. Michaelis, M.L. Menten: Die Kinetik der Invertinwirkung

[0177] Biochem. Z. 49, 333 - 369 (1913)

[0178] v = 측정된 FAD-GDH 활성

[0179] V_{최대} = 최대 FAD-GDH 활성

[0180] K_M = Michaelis-Menten 상수 (단위 mM)

[0181] c = 글루코스 농도 (단위 mM)

[0182] **실시예 6**

[0183] **액체 중 온도 안정성**

[0184] 1 ml 의 100 mM Pipes 완충액 pH 7.1 당 10 mg 의 동결건조된 효소를 용해시켰다. 이러한 용액의 1 ml 의 분취물을 밀폐 플라스틱 바이알 내에 저장하고, 온도 조절되는 수조에서 12 일까지 인큐베이션했다. 효소 활성을 실시예 3 에 따라 측정했다.

[0185] **실시예 7**

[0186] **건조 조건 하의 온도 안정성**

[0187] 유리 용기의 비어있을 때의 중량을 분석용 저울에 의해 측정했다. 10 mg 의 동결건조된 효소 샘플을 칭량했다. 내부 공간 및 환경의 제어되는 기체 교환이 보장되지만 샘플이 용기를 벗어나는 것을 방지하는 방식으로 모든 용기를 플러그로 밀폐했다. 샘플을 건조제 (분자체 3A, MS 551, Grace) 의 존재 하에 데시케이터 내에서 8 일 동안 80℃ 에 노출시켰다. 이러한 기간 후에, 샘플을 실온으로 냉각시키고, 환경과의 기체 교환을 추가로 허용했다. 그 후, 용기를 완전히 밀폐하고, 각각의 중량을 측정했다. 효소의 원래의 양의 의존하여, 샘플을 초순수 물로 최종 농도 10 mg/ml 로 희석하고, 부드러운 볼텍싱으로 완전히 용해시켰다. 샘플을 실온에서 정확히 1 시간 동안 재구성을 위해 저장하고, 그 후 얼음으로 냉각시켰다. 이러한 저장액에 기초하여, 빙냉 작업 완충액에서 희석을 수행하고, 그 후 활성을 확인했다.

[0188] **결과**

[0189] **표 3: 예시적 분자량 분포 SEQ ID No.1 vs. SEQ ID No.3**

샘플 Id	M _w	M _n	M _w /M _n
아스페르길루스로부터의 FAD-GDH (SEQ ID No: 1)	103 876	99 901	1.040
FAD-GDH (SEQ ID No: 3) 변이체 1; N2S	76 333	76 147	1.002

[0190]

[0191] **실시예 4 에 따른 SEC-RALS 에 의한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포**

[0192] 그래프: 아스페르길루스로부터의 FAD-GDH (SEQ ID No: 1), 도 2 참고.

[0193] 그래프: FAD-GDH (SEQ ID No: 3) 변이체 1; N2S, 도 3 참고.

[0194] **실시예 7 에 따른 건조 조건 하의 온도 안정성**

[0195] 레퍼런스: SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH: 67 +/- 5%

[0196] N2S 수식 (변이체 1): SEQ ID No: 3 에 따른 FAD-GDH: 79 +/- 5%

[0197]

서열 목록

SEQ ID No: 1

KNTTTYDYIVVGGTSGLVVANRLSENPDSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSINQSYAGGKQOVL RAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSRSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYFFPYDDRKNLHLENTTANRLF WKNGSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLRSQLSDYAAATVKVSNG
HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAAMP RSIGGVVDNRLRVYGT SNVRVVDASVLPFQVCGHLCSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 2 (야생형) FAD-GDH 야생형 서열

KNTTTYDYIVVGGTSGLVVANRLSENPDSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSINQSYAGGKQOVL RAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSGLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYFFPYDDRKNLHLENTTANRLF WKNGSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLRSQLSDYAAATVKVSNG
HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAAMP RSIGGVVDNRLRVYGT SNVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID NO: 3 (N2S)

KSTTTYDYIVVGGTSGLVVANRLSENPDSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSINQSYAGGKQOVL RAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSGLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYFFPYDDRKNLHLENTTANRLF WKNGSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLRSQLSDYAAATVKVSNG
HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA

[0198]

PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAAMPERSIGGVVDNRLRVYGTSNVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 4 (N168P)

KNTTTYDYIVVGGGTSGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIHQSYAGGKQQLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPKVGVSGSLASGPLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLENTTANRLFKNWSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLSQLSDYAAATVKVSNG
HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAAMPERSIGGVVDNRLRVYGTSNVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 5 (N168SP)

KNTTTYDYIVVGGGTSGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIHQSYAGGKQQLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPKVGVSGSLASGSPSVALNRTFQAAGVPWV
EDVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLENTTANRLFKNWSAEE
AIADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTV
GENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLSQLSDYAAATVKVSN
GHMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSEFWGLLPFARGNIHISSNDPT
APAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWVEW
LKANYRSNFHPVGTAAAMPERSIGGVVDNRLRVYGTSNVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVA
ERASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 6 (N346D)

KNTTTYDYIVVGGGTSGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIHQSYAGGKQQLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
YLKSENLTAPTSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPKVGVSGSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLENTTANRLFKNWSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEV IISAGALRSPLILELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGDETDSIVASLSQLSDYAAATVKVSNG

[0199]

HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
 PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIKETKPGLEIPATAADEKWVEWL
 KANYRSNFHPVGTAAAMPRSIGGVVDNRLRVYGTSNVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVAE
 RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 7 (FAD-GDH 야생형)

5' -AAGAACACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTCTTGTGGT
 CGCAAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGGTGCTTCTG
 TGTTCAACAACCCGGAGCTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTCGGCCATC
 GACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTCTGCGTGC
 TGGTAAGGCCCTTGGAGGAACAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCAGAGGATG
 TCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAAACGAAGTTGGACGTGGAAGATCTCCTACCA
 TACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTGGCGCTGC
 TTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGTCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGAAGCCTGG
 CCTCCGGTAATCTGTCTAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTTCATGGGTT
 GAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCTCGACGTGA
 CCTCAATGTCCGGAAGATGCAGCCCGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGGAAGAACC
 TTCACCTGCTGGAGAACCACCTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGCTGAGGAA
 GCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGCATGCAAA
 GAAAGAGGTATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCGGTCTCCTCTCATTCTCGAGCTTTCAGGAG
 TTGGAACCCCAACCATCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTGTGATCTCCCCACCGTT
 GGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCGTCCCTTGC
 CGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAGACTGACTCTA
 TCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGCGACCGTCAAGGTCAGCAAC
 GGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCTCTACCAGCTCCAATTTGACCTCATCGTCAA
 GGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCCGTGTCTCCG
 AATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGACCCGACT
 GCTCCCGCCGCCATCAACCCTAACCTACTTTATGTTTGAATGGGACGGCAAGAGCCAGGCCGG
 TATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGACGCGACCATTTGAACAACTTATTGCGAAGG
 AAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGTTGAATGG
 CTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACCTTCCACCCCGTCGGAACGCTGCCATGATGCCTCGTTC
 CATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTGCGTCGTAG
 ATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTGGCGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGCCGTTGCC
 GAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAG-3'

[0200]

SEQ ID No: 8 (정방향 프라이머 $\Delta XhoI$)

5'-ggctctcctctcattcttgagctttcaggagttgg-3'

SEQ ID No: 9 (역방향 프라이머 $\Delta XhoI$)

5'-ccaactcctgaaagctcaagaatgagaggagacc-3'

SEQ ID No: 10 (야생형 FAD-GDH $\Delta XhoI$)

5'-AAGAACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTCTTGTGGT
CGCAAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGGTGCTTCTG
TGTTCAACAACCCGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTCGGCCATC
GACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTCTGCGTGC
TGGTAAAGGCCCTTGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCAGAGGATG
TCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAACGAAGGTGGACGTGGAAGATCTCCTACCA
TACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTGGCGCTGC
TTATAACCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGTCTCTCAAGGTCGGCTGGTGGGAAGCCTGG
CCTCCGGTAATCTGTGCTGCTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTCCATGGGTT
GAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCTCGACGTTGA
CCTCAATGTCCGCAAGATGCAGCCCGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGGAAGAACC
TTCACCTGCTGGAGAACCACCTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGCTGAGGAA
GCTATTGCGGATGGTGTGCGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGCATGCAAA
GAAAGAGGTCATCATCTCTGCTGGTGGCTGCGGTCTCTCTCATCTTGAGCTTTCAGGAG
TTGGAACCCCAACCATCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTGTCGATCTCCCCACCGTT
GGGGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCGTCCTTGC
CGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAGACTGACTCTA
TCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGACCGTCAAGGTGAGCAAC
GGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACCAGTCCAATTTGACCTCATCGTCAA
GGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCCGTGTCTCCG
AATTCTGGGGCTTGTCTCCCTTCGCCCCTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGACCCGACT
GCTCCCGCCGCCATCAACCCTAACTACTTTATGTTGGAATGGGACGGCAAGAGCCAGGCCGG
TATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGACGCGACCATTTGAACAACTTATTGCGAAGG
AAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGTGAATGG
CTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACCTCCACCCCGTGGAACTGCTGCCATGATGCCTCGTTC
CATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTGCGTCGTAG

[0201]

ATGCGTCTGTCCTGCCCTTCCAGGTTTGGCGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGCCGTTGCC
GAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAG-3'

SEQ ID No: 11 (정방향 프라이머)

5'-ATGCCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAAGAACACTACGACATACGACTACATC-3'

SEQ ID No: 12 (역방향 프라이머)

5'-GCATACCGGTCTTCTCGTAAGTGCCCAACTTGAAGTGAAGAACAGTCATGTCTAAGGCT
ACAAACTCATTAAGCACTCTTCGCATCCTCCTTAATC-3'

SEQ ID No: 13 (FAD-GDH 야생형 유전자 + α -인자 신호 서열 및 KEX2 자리)

5'-ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTGGCATTTCCTAACAGCACAAATAAC
GGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGAACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTC
TTGTGGTCGCAAAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGT
GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC
TGCGTGCTGGTAAGGCCCTTGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCA
GAGGATGTCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTG
GCGCTGCTTATAACCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGA
AGCCTGGCCTCCGGTAATCTGTCAAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTTC
ATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCTCG
ACGTTGACCTCAATGTCCGCGAAGATGCAGCCCGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGG
AAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACCACCTGCCAACCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACCTCGTGTGC
ATGCAAAGAAAGAGGTATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCGGTCTCCTCTCATTTCTTGAGCTT
TCAGGAGTTGGAACCCCAACATCCTCAAAAAGAACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
CACCGTTGGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCG
TCCTTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAGACT
GACTCTATCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGCGACCGTCAAGGT
CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACCAGCTCCAATTTGACCTCA

[0202]

TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCCGTG
TCCTCCGAATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCCCCTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
CCCGACTGCTCCCGCCGCCATCAACCCCTAACTACTTTATGTTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
AGGCCGGTATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGCAGCGCACCATTTGAACAAACTTATT
GCGAAGGAAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGT
TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTTCCAACTTCCACCCCGTCGGAAGTCTGCCATGATGC
CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTTCGC
GTCGTAGATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTTCGGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGC
CGTTGCCGAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 14

5' -CTCTCGAGAAAAGAAAGTCCACTACGACATACGAC-3'

SEQ ID No: 15

5' -GTCGTATGTCGTAGTGGACTTTCTTTTCTCGAGAG-3'

SEQ ID No: 16

5' -ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
GGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGTCCACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGCGGGCACAAAGTGGTC
TTGTGGTTCGAAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGGT
GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC
TGCGTGCTGGTAAGGCCCTTGGAGGAACCAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCA
GAGGATGTCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAAACGAAGGTGGACGTGGAAAGATCT
CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAGAACTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTG
GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGTCCCTCAAGGTGCGCTGGTCGGGA
AGCCTGGCCTCCGGTAATCTGTCTGCTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTTC
ATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCTCG
ACGTTGACCTCAATGTCCGGAAGATGCAGCCCGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGG
AAGAACCCTCACCTGCTGGAGAACCACTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGCGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGC
ATGCAAAGAAAGAGGTATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCGGTCTCCTCTCATCTTGAGCTT

[0203]

TCAGGAGTTGGAAACCAACCATCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
CACC GTTGGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCG
TCCTTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAGACT
GACTCTATCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGCGACCGTCAAGGT
CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACCAGCTCCAATTTGACCTCA
TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCCGTG
TCCTCCGAATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
CCC GACTGCTCCCGCCGCCATCAACCCTAACTACTTTATGTTGGAATGGGACGGCAAGAGCC
AGGCCGGTATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGAGCGCACCATTTGAACAACTTATT
GCGAAGGAAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAAGTGGGT
TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTCCAATTCCACCCCGTCGGAAGTCTGCTCCATGATGC
CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTTCGC
GTCGTAGATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTGCGGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGC
CGTTGCCGAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 17

5' -GCCTGGCCTCCGGTCTCTGTCAAGTTGCTC-3'

SEQ ID No: 18

5' -GAGCAACTGACAGAGGACCGGAGGCCAGGC-3'

SEQ ID No: 19

5' -ATGAGATTTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
GGGTTATTGTTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGAACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTC
TTGTGGTTCGCAAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTCTTCTGCTTGAGGCCGGT
GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC
TGCGTGCTGGTAAGGCCCTTGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCA
GAGGATGTCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAACTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTG
GCGCTGCTTATAACCCGTCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGA
AGCCTGGCCTCCGGTCTCTGTCAAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTTC

[0204]

ATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCTCG
ACGTTGACCTCAATGTCCGCGAAGATGCAGCCCGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGG
AAGAACCTTACCTGCTGGAGAACACCACTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGCGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACCTCGTGTGC
ATGCAAAGAAAGAGGTATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCGGTCTCCTCTCATTCTTGAGCTT
TCAGGAGTTGGAACCCAACCATCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
CACCGTTGGGGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCG
TCCTTGCCGGTGCTCAACCGTGACCTACCCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAGACT
GACTCTATCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTAGCCGCGCGACCGTCAAGGT
CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGACCTTGAGCGCTCTACCAGCTCCAATTTGACCTCA
TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAACGCCGTG
TCCTCCGAATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCGCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
CCCGACTGCTCCCGCCGATCAACCCTAACTACTTTATGTTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
AGGCCGGTATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGCAGCGCACCATTTGAACAACTTATT
GCGAAGGAAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGT
TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACTTCCACCCCGTCGGAAGTCTGCCATGATGC
CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTTCGC
GTCGTAGATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTGGCGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGC
CGTTGCCGAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 20

5'-GGGAAGCCTGGCCTCCGGTTCTCCTCTGTCAAGTGGCTCTGAACCG-3'

SEQ ID No: 21

5'-CGGTTCAAGCAACTGACAGAGGAGAACCGGAGGCCAGGCTTCCC-3'

SEQ ID No: 22

5'-ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
GGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGAACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTC
TTGTGGTCGCAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGGT
GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC

[0205]

TGCGTGCTGGTAAGGCCCTTGAGGAACCAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCA
 GAGGATGTCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGAAACGAAGTTGGACGTGGAAGATCT
 CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGGCCCCCTACCAGCTCTCAGGTTGCTGCTG
 GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGA
 AGCCTGGCCTCCGGTTCTCTCTGTGAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGT
 TCCATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCC
 TCGACGTTGACCTCAATGTCCGCGAAGATGCAGCCCCGGGCATACTACTTCCCTTATGATGAC
 AGGAAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACACCACTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTC
 TGCTGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACCTCGTG
 TGCATGCAAAGAAAGAGGTCATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCCGTCTCTCTCATTCTTGAG
 CTTTCAGGAGTTGGAACCCAACCATCCTCAAAAAGAACATAACCCACGTGTCGATCT
 CCCCACCGTTGGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACG
 GCGTCCTTGCCGGTGCCCTCAACCGTGACCTACCCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTAACGAG
 ACTGACTCTATCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGCGACCGTCAA
 GGTGAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGACCTTGAGCGCCTCTACCAGCTCCAATTTGACC
 TCATCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCC
 GTGTCTCCGAATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCAA
 TGACCCGACTGCTCCCGCGCCATCAACCCTAACTACTTTATGTTTGAATGGGACGGCAAGA
 GCCAGGCCGGTATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGACGCGCACCATTGAACAAACTT
 ATTGCGAAGGAAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTG
 GGTTGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTCCAATTCCACCCCGTCGGAAGTGTGCCATGA
 TGCCCTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTT
 CGCGTCGTAGATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTGCGGCCACTTGGTTAGCACGCTTTA
 TGCCGTTGCCGAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCCAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 23

5'-CCGACGTCTTCGGTGACGAGACTGACTCTATCG-3'

SEQ ID No: 24

5'-CGATAGAGTCAGTCTCGTCACCGAAGACGTCGG-3'

SEQ ID No: 25

5'-ATGAGATTTCCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
 TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTATCGGTT
 ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCACAGCACAAATAAC

[0206]

GGGTTATGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGAACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCGGCACAAGTGGTC
TTGTGGTCGCAATCGCCTTTCTGAGAACCCCGATGTCTCCGTTCTTCTGCTTGAGGCCGGT
GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCAGTCTATTAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC
TGCGTGCTGGTAAGGCCCTTGGAGGAACAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCA
GAGGATGTCCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAACGAAGGTGGACGTGGAAGATCT
CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGTGCTGCTG
GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGA
AGCCTGGCCTCCGGTAATCTGTCTGCTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTTC
ATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCCTCG
ACGTTGACCTCAATGTCCGGAAGATGCAGCCGGGCATACTACTTCCCTTATGATGACAGG
AAGAACCTTACCTGCTGGAGAACCACCTGCCAACCGCCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGC
ATGCAAGAAAGAGGTATCATCTCTGCTGGTGCCCTGCGGTCTCCTCTCATTTCTGAGCTT
TCAGGAGTTGGAACCCAACCATCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
CACCGTTGGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCG
TCCTTGCCGGTGCTCAACCGTGACCTACCTTCCATCTCCGACGTCTTCGGTGACGAGACT
GACTCTATCGTTGCATCTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGCGACCGTCAAGGT
CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCTCTACCAGCTCCAATTTGACCTCA
TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCCGAGATCCTCTTCCACCCCGGTGGTGGAAACGCCGTG
TCCTCCGAATTCTGGGGCTTGCTTCCCTTCGCCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
CCCGACTGCTCCCGCCGCCATCAACCCCTAACTACTTTATGTTGCAATGGGACGGCAAGAGCC
AGGCCGGTATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGCAGCGCACCATGAACAACTTATT
GCGAAGGAAACCAAGCCCGGTCTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGT
TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACTTCCACCCCGTGGAACTGCTGCCATGATGC
CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGTCTATGGTACCAGCAATGTTCGC
GTGCTAGATGCGTCTGTCTGCCCTTCCAGGTTTGGCGCCACTTGGTTAGCACGCTTTATGC
CGTTGCCGAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

[0207]

[0208] **도면 설명**

[0209] 도 1:

[0210] 피키아 발현 벡터 pPICZ αA:

[0211] PAOX1 = AOX1 프로모터 (관심의 유전자의 전사를 개시함)

[0212] αFactor-ss = α-인자 신호 서열을 인코딩하는 유전자 (관심의 유전자가 이 서열에 인 프레임 융합되어 있음; 상응하는 폴리펩티드가 피키아 파스토리스에 의해 배양 배지 내로 분비됨)

[0213] TAOX1 = AOX1 터미네이터 (관심의 유전자의 전사를 정지시킴)

[0214] Zeo = 제오마이신 저항성 유전자 - 선별 마커

[0215] ColE1 = 복제 원점 (대장균에서의 클로닝을 허용함)

[0216] 도 2:

[0217] SEC-RALS 에 의한 SEQ No. 1 에 따른 FAD-GDH 의 분자량 분포.

[0218] 도 3:

[0219] SEC-RALS 에 의한 SEQ No. 3 (변이체 1; N2S) 에 따른 FAD-GDH 의 분자량 분포.

[0220] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 구체적 구현예를 대표하고 오직 예시적이고 본 발명의 범위에 대한 제한으로서 이해되지 않는다. 다른 목적, 양상, 및 구현예는 이 명세서를 고려하여 당업자에게 명백할 것이고, 첨부된 청구항에 의해 정의되는 본 발명의 범위 안에 포함된다. 본 발명의 범위 및 의미에서 벗어나지 않으면서 본

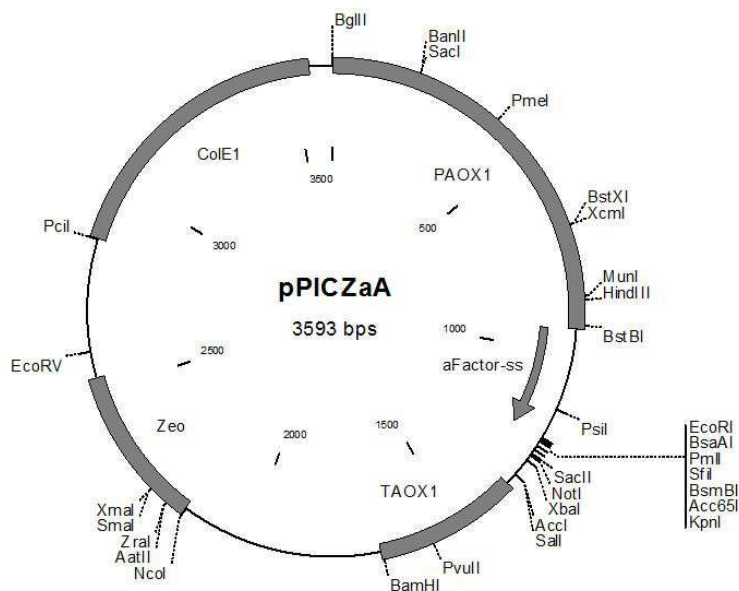
원에 개시된 본 발명에 다양한 치환 및 수식이 가해질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 본원에서 설명적으로 기재된 본 발명은 적합하게는 본원에서 본질적인 것으로서 구체적으로 개시되지 않은 요소 또는 요소들, 또는 제한 또는 제한들의 부재 하에 실시될 수 있다.

[0221]

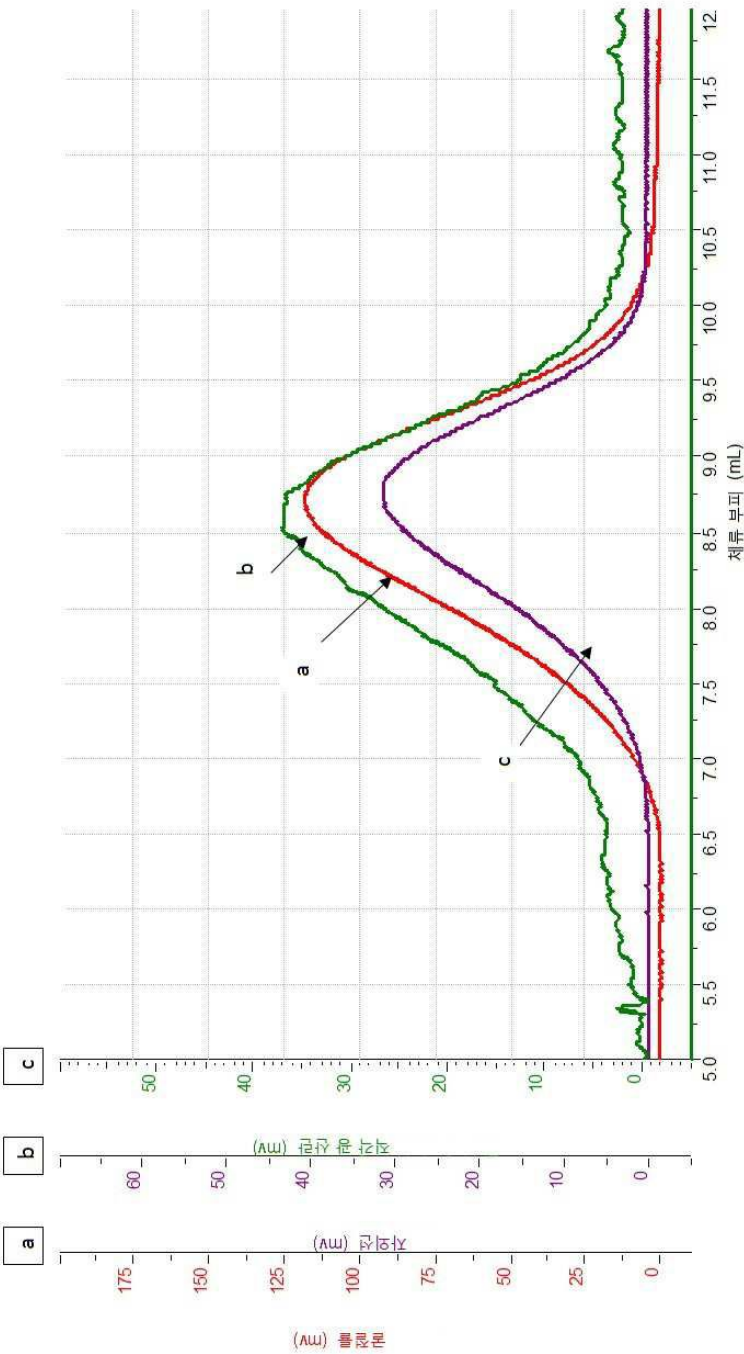
본원에 설명적으로 기재된 방법 및 과정은 적합하게는 단계들의 상이한 순서로 실시될 수 있고, 본원 또는 첨부된 청구항에 제시된 단계들의 순서에 반드시 제한되지는 않는다. 또한 본문이 명백히 다르게 지시하지 않는 한 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 단수형은 복수형을 포함하고, 복수형은 단수형을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 어떤 경우에도 특허는 본원에서 구체적으로 개시된 구체적 실시예 또는 구현에 또는 방법에 제한되는 것으로 해석되면 안된다. 본 발명은 본원에서 광범위하고 일반적으로 기재되었다. 이용된 용어 및 표현은 제한이 아닌 설명을 위해 사용되고, 그러한 용어 및 표현의 사용시 제시 및 기재된 특색 또는 그의 일부의 어떠한 등가물도 배제할 의도가 없으나, 청구된 본 발명의 범위 안에서 다양한 변형이 가능하다고 인식된다. 이와 같이, 본 발명은 그것의 상응하는 구현에 및 임의적 특색에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 변형 및 변이가 당업자에 의해 취해질 수 있고, 그러한 변형 및 변이는 첨부된 청구항에 의해 정의되는 본 발명의 범위 안에 속하는 것으로 여겨진다고 이해될 것이다.

도면

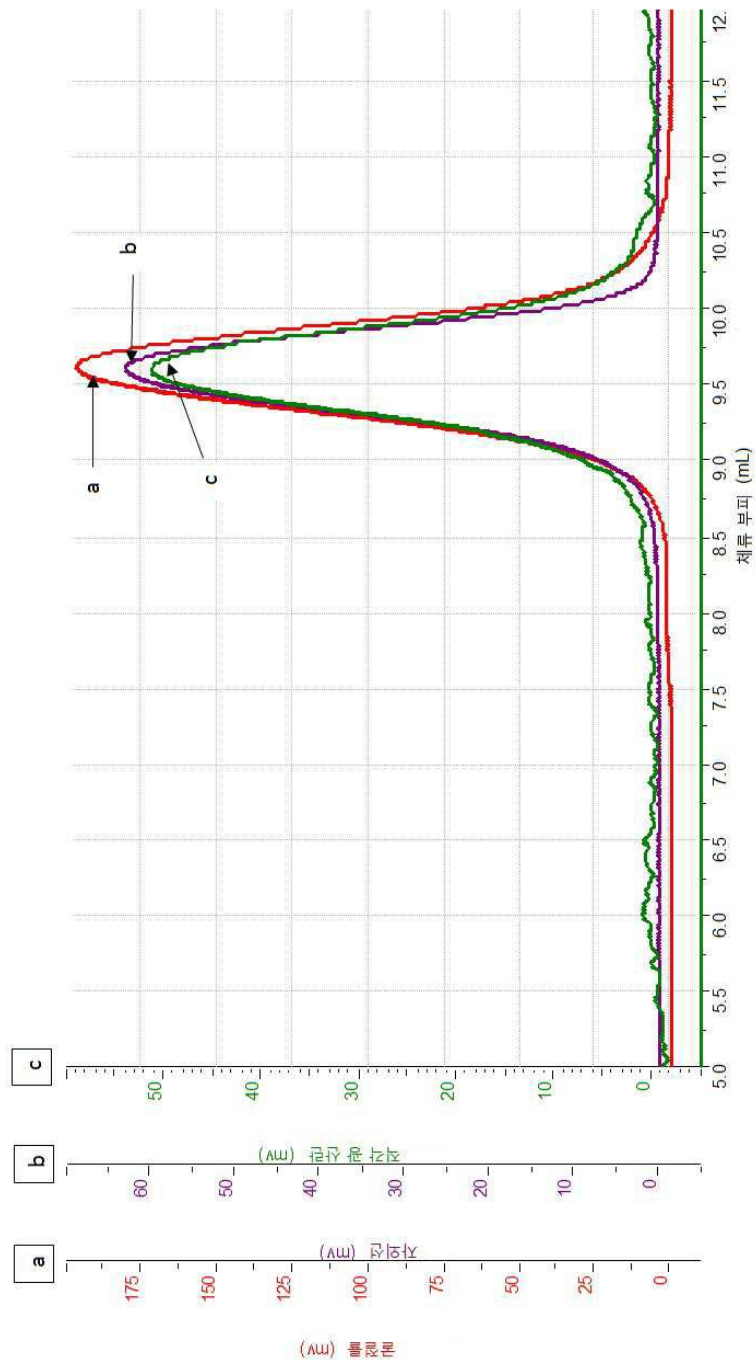
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
Roche Diagnostics GmbH
- <120> A glycosilated modified flavin adenine dinucleotide dependent
glucose dehydrogenase
- <130> R75002PCT
- <140> PCT/EP2013/059313
- <141> 2013-05-03

<150> EP 12166703.4
 <151> 2012-05-03
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> point mutations of *Aspergillus oryzae* wild-type sequence
 <400> 1

Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser

1	5	10	15
Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val			
20	25	30	
Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr			
35	40	45	
Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln			
50	55	60	
Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu			
65	70	75	80

Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Asn Gly Met Ala			
85	90	95	
Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly			
100	105	110	
Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser			
115	120	125	
Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala			
130	135	140	
Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp			

145	150	155	160
Ser Arg Ser Leu Ala Ser Gly Asn Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg Thr			
165	170	175	

Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly Lys
 180 185 190
 Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu Asn
 195 200 205
 Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp Arg
 210 215 220

 Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe Trp
 225 230 235 240
 Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile Thr
 245 250 255
 Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val Ile
 260 265 270
 Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser Gly
 275 280 285
 Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg Val

 290 295 300
 Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val Thr
 325 330 335
 Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn Glu Thr Asp Ser Ile Val
 340 345 350
 Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val Lys
 355 360 365

 Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr Gln
 370 375 380
 Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu Ile
 385 390 395 400
 Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp Gly
 405 410 415
 Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp Pro
 420 425 430

Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp Asp

435 440 445
Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Arg

450 455 460
Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly Leu

465 470 475 480
Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp Leu

485 490 495
Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala Met

500 505 510

Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val Tyr
515 520 525

Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe Gln
530 535 540

Val Cys Gly His Leu Cys Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala
545 550 555 560

Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala
565 570

<210> 2

<211> 571

<212> PRT

<213> Aspergillus oryzae

<400> 2

Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val
20 25 30

Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr
35 40 45

Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln
50 55 60

Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu

65 70 75 80

Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Asn Gly Met Ala

85 90 95

Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly

100 105 110

Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser

115 120 125

Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala

130 135 140

Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp

145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Asn Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg Thr

165 170 175

Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly Lys

180 185 190

Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu Asn

195 200 205

Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp Arg

210 215 220

Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe Trp

225 230 235 240

Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile Thr

245 250 255

Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val Ile

260 265 270

Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser Gly

275 280 285

Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg Val

290 295 300

Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn Gly

305 310 315 320
 Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val Thr
 325 330 335
 Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn Glu Thr Asp Ser Ile Val
 340 345 350
 Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val Lys

 355 360 365
 Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr Gln
 370 375 380
 Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu Ile
 385 390 395 400
 Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp Gly
 405 410 415
 Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp Pro
 420 425 430

 Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp Asp
 435 440 445
 Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Arg
 450 455 460
 Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp Leu
 485 490 495
 Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala Met

 500 505 510
 Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val Tyr
 515 520 525
 Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe Gln
 530 535 540
 Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala
 545 550 555 560
 Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala

565

570

<210> 3

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N2S

<400> 3

Lys Ser Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val

20 25 30

Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr

35 40 45

Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln

50

55

60

Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu

65 70 75 80

Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Asn Gly Met Ala

85 90 95

Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly

100 105 110

Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser

115 120 125

Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala

130 135 140

Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp

145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Asn Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg Thr

165 170 175

Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly Lys

180 185 190

Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu Asn

195 200 205

Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp Arg

210 215 220

Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe Trp

225 230 235 240

Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile Thr

245 250 255

Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val Ile

260 265 270

Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser Gly

275 280 285

Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg Val

290 295 300

Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn Gly

305 310 315 320

Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val Thr

325 330 335

Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn Glu Thr Asp Ser Ile Val

340 345 350

Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val Lys

355 360 365

Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr Gln

370 375 380

Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu Ile

385 390 395 400

Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp Gly

405 410 415

Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp Pro

420 425 430

Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp Asp

435 440 445
 Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Arg
 450 455 460
 Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp Leu

485 490 495
 Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala Met
 500 505 510
 Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val Tyr
 515 520 525
 Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe Gln
 530 535 540
 Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala
 545 550 555 560

Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala

565 570

<210> 4

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N168P

<400> 4

Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val

20 25 30

Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr

35 40 45

Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln

50 55 60

Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu

65	70	75	80
Arg Ala Gly Lys	Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr	Ile Asn Gly Met	Ala
	85	90	95
Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly			
100	105	110	
Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser			
115	120	125	
Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala			
130	135	140	
Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp			
145	150	155	160
Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Pro Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg Thr			
165	170	175	
Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly Lys			
180	185	190	
Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu Asn			
195	200	205	
Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp Arg			
210	215	220	
Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe Trp			
225	230	235	240
Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile Thr			
245	250	255	
Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val Ile			
260	265	270	
Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser Gly			
275	280	285	
Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg Val			
290	295	300	
Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn Gly			
305	310	315	320

Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val Thr

325 330 335

Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn Glu Thr Asp Ser Ile Val

340 345 350

Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val Lys

355 360 365

Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr Gln

370 375 380

Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu Ile

385 390 395 400

Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp Gly

405 410 415

Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp Pro

420 425 430

Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp Asp

435 440 445

Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Arg

450 455 460

Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly Leu

465 470 475 480

Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp Leu

485 490 495

Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala Met

500 505 510

Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val Tyr

515 520 525

Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe Gln

530 535 540

Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala

545 550 555 560

Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala

565 570

<210> 5

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N168SP

<400> 5

Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val

20 25 30

Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr

35 40 45

Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln

50 55 60

Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu

65 70 75 80

Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Asn Gly Met Ala

85 90 95

Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly

100 105 110

Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser

115 120 125

Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala

130 135 140

Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp

145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg

165 170 175

Thr Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly

180 185 190

Lys Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu

195	200	205	
Asn Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp			
210	215	220	
Arg Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe			
225	230	235	240
Trp Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile			
245	250	255	
Thr Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val			
260	265	270	
Ile Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser			
275	280	285	
Gly Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg			
290	295	300	
Val Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn			
305	310	315	320
Gly Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val			
325	330	335	
Thr Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn Glu Thr Asp Ser Ile			
340	345	350	
Val Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val			
355	360	365	
Lys Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr			
370	375	380	
Gln Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu			
385	390	395	400
Ile Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp			
405	410	415	
Gly Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp			
420	425	430	
Pro Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp			
435	440	445	

Asp Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu

450

455

460

Arg Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly

465

470

475

480

Leu Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp

485

490

495

Leu Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala

500

505

510

Met Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val

515

520

525

Tyr Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe

530

535

540

Gln Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg

545

550

555

560

Ala Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala

565

570

<210> 6

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N346D

<400> 6

Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val Gly Gly Gly Thr Ser

1

5

10

15

Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asn Pro Asp Val Ser Val

20

25

30

Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe Asn Asn Pro Asp Val Thr

35

40

45

Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser Ala Ile Asp Trp Gln

50

55

60

Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly Gly Lys Gln Gln Val Leu

65	70	75	80
Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Asn Gly Met Ala			
	85	90	95
Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp Val Trp Gln Lys Leu Gly			
	100	105	110
Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser			
	115	120	125
Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln Val Ala Ala Gly Ala Ala			
	130	135	140
Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp			
145	150	155	160
Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Asn Leu Ser Val Ala Leu Asn Arg Thr			
	165	170	175
Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu Asp Val Asn Gly Gly Lys			
	180	185	190
Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr Leu Asp Val Asp Leu Asn			
	195	200	205
Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr Phe Pro Tyr Asp Asp Arg			
	210	215	220
Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr Ala Asn Arg Leu Phe Trp			
225	230	235	240
Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Glu Ile Thr			
	245	250	255
Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His Ala Lys Lys Glu Val Ile			
	260	265	270
Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu Ile Leu Glu Leu Ser Gly			
	275	280	285
Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn Asn Ile Thr Pro Arg Val			
290	295	300	
Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp Gln Phe Asn Asn Gly			
305	310	315	320

Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Thr Val Thr
325 330 335

Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asp Glu Thr Asp Ser Ile Val
340 345 350

Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr Ala Ala Ala Thr Val Lys
355 360 365

Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp Leu Glu Arg Leu Tyr Gln
370 375 380

Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys Val Pro Ile Ala Glu Ile
385 390 395 400

Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val Ser Ser Glu Phe Trp Gly
405 410 415

Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His Ile Ser Ser Asn Asp Pro
420 425 430

Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr Phe Met Phe Glu Trp Asp
435 440 445

Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Arg
450 455 460

Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys Glu Thr Lys Pro Gly Leu
465 470 475 480

Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu Lys Trp Val Glu Trp Leu
485 490 495

Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro Val Gly Thr Ala Ala Met
500 505 510

Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp Asn Arg Leu Arg Val Tyr
515 520 525

Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala Ser Val Leu Pro Phe Gln
530 535 540

Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala
545 550 555 560

Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser Ala
565 570

<210> 7
 <211> 1716
 <212> DNA
 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 7

aagaacacta cgacatacga ctacatcggt gtgggaggcg gcacaagtgg tcttgtggtc	60
gcaaatcgcc ttcttgagaa ccccgatgtc tccgttcttc tgcttgaggc cgggtgttct	120
gtgttcaaca acccgagctt aaccaacgct aacggttatg gattggcctt tggtcggcc	180
atcgactggc agtaccagtc tattaaccaa agctatgcag gaggtaaaca gcaagtcttg	240
cgtgctggta aggcccttgg aggaaccagt acaatcaatg gaatggccta taccgcgca	300
gaggatgtcc agattgacgt ttggcagaaa ctgggaaacg aaggttggac gtggaaagat	360
ctcctacat actacctgaa gagtgaatac ttgacggccc ctaccagctc tcaggttgct	420
gtggcgctg cttataaccc tgccgtgaat ggaaaagaag gtcctctcaa ggtcggctgg	480
tcgggaagcc tggcctccgg taatctgtca gttgctctga accgtacgtt ccaagccgt	540
ggtgttccat ggggtgagga tgtcaatgga ggcaagatgc gtggcttcaa catctacca	600
tccaccctcg acgttgacct caatgtccgc gaagatgcag cccgggcata ctactccct	660
tatgatgaca ggaagaacct tcacctgtcg gagaacacca ctgccaaccg cttttctgg	720
aagaacggct ctgtgagga agctattgct gatggtgtcg agatcacctc cgctgatggc	780
aaggtcactc gtgtgcatgc aaagaaagag gtcacatctc ctgtggtgc cctgcggtct	840
cctctcattc tcgagcttcc aggagtggga aaccaacca tctcaaaaa gaacaacata	900
acccacgtg tcgatctccc caccgttggg gagaacctcc aagaccagtt caacaacggc	960
atggctggcg aaggatacgg cgtccttgcc ggtgcctcaa ccgtgacctc ccttccatc	1020
tccgactctc tcggtaacga gactgactct atcgttgcat ctctccgac tcaactctcc	1080
gactacgccg ccgcgacctt caaggtcagc aacggccaca tgaagcagga ggaccttgag	1140
cgctctacc agctccaatt tgacctcacc gtcaaggaca aggtccctat cgccgagatc	1200
ctcttcacc ccggtgggtg aaacgccgtg tctccgaat tctggggctt gcttcccttc	1260
gcccgtggca acatccacat tagctccaat gaccgactg ctcccgccgc catcaacct	1320
aactacttta tggtcgatg ggacggcaag agccaggccg gtatcgcaa gtacatcagg	1380
aagattctcc gcagcgcacc attgaacaaa ctatttcga aggaaccaa gcccgtctc	1440
tctgagattc cggccactgc tgcggtgag aagtgggttg aatggctcaa ggctaactat	1500
cgttccaact tccacccgt cggaactgct gccatgatgc ctggttccat tgggtggcgtt	1560

gttgataacc gtctccgggt ctatggtagc agcaatgttc gcgtcgtaga tgcgtctgtc 1620
ctgcccttcc aggtttgcgg ccacttgggt agcacgcttt atgccgttgc cgagcgcgct 1680

tccgacttga ttaaggagga tgcgaagagt gcttag 1716

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer XhoI
<400> 8
ggctctctct cattcttgag ctttcaggag ttgg 34
<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer XhoI
<400> 9
ccaactctg aaagctcaag aatgagagga gacc 34
<210> 10
<211> 1716

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> wild type FAD-GDH XhoI
<400> 10
aagaacacta cgacatacga ctacatcgtt gtgggaggcg gcacaagtgg tcttgtggtc 60
gcaaategcc tttctgagaa ccccgatgtc tccgttcttc tgcttgaggc cgggtcttct 120
gtgttcaaca acccggacgt aaccaacgct aacggttatg gattggcctt tggctcggcc 180
atcgactggc agtaccagtc tattaaccaa agctatgcag gaggtaaaca gcaagttctg 240
cgtgctggta aggcccttgg aggaaccagt acaatcaatg gaatggccta taccgcgca 300
gaggatgtcc agattgacgt ttggcagaaa ctgggaaacg aaggttggac gtggaaagat 360

ctcctacat actacctgaa gagtgaacac ttgacggccc ctaccagctc tcaggttgc 420
gtcggcgctg cttataaccc tgccgtgaat ggaaaagaag gtcctctcaa ggtcggctgg 480
tcgggaagcc tggcctccgg taatctgtca gttgctctga accgtacgtt ccaagccgct 540

gggtgttccat gggttgagga tgtcaatgga ggcaagatgc gtggcttcaa catctaccca 600
tccaccctcg acgttgacct caatgtccgc gaagatgcag cccgggcata ctacttcct 660
tatgatgaca ggaagaacct tcacctgtg gagaacacca ctgccaaccg cttttctgg 720
aagaacggct ctgtgagga agctattgcg gatggtgtcg agatcacctc cgctgatggc 780

aaggtcactc gtgtgcatgc aaagaaagag gtcacatctt ctgtggtgc cctgcggtct 840
cctctcattc ttgagcttcc aggagttaga aacccaacca tctcaaaaa gaacaacata 900
acccacgtg tcgatctccc caccgttggg gagaacctcc aagaccagtt caacaacggc 960
atggctggcg aaggatacgg cgctcttgcc ggtgcctcaa ccgtgacctc cccttccatc 1020
tccgacgtct tcggtaacga gactgactct atcggtgcat ctctccgac tcaactctcc 1080
gactacgccg ccgcgacct caaggtcagc aacggccaca tgaagcagga ggaccttgag 1140
cgctctacc agctccaatt tgacctcctc gtcaaggaca aggtccctat cgccgagatc 1200

ctcttcacc cgggtggtag aaacgccgtg tctccgaat tctggggctt gcttccttc 1260
gcccgtggca acatccacat tagctccaat gacccgactg ctcccgcgc catcaaccct 1320
aactacttta tggtcgatg ggacggcaag agccaggccg gtatcgcaa gtacatcagg 1380
aagattctcc gcagcgacc attgaacaaa ctattgcga aggaaccaa gcccgtctc 1440
tctgagattc cggccactgc tgcggatgag aagtgggtg aatggctcaa ggctaactat 1500
cgttccaact tcaccccggt cggaactgct gccatgatgc ctggttccat tgggtggcgtt 1560
gttgataacc gtctccgggt ctatgtacc agcaatgttc gcgtcgtaga tgcgtctgtc 1620

ctgcccttc aggtttgcgg ccacttggtt agcacgttt atgccgttgc cgagcgcgt 1680
tccgacttga ttaaggagga tgcgaagagt gcttag 1716

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 11

atgcctcgag aaaagagagg ctgaagctaa gaacactacg acatacgact acatc 55

<210> 12

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 12

gcataccggt cttctcgtaa gtgccaact tgaactgagg aacagtcatt tctaaggcta 60

caaactcatt aagcactctt cgcacccctc ttaate 96

<210> 13

<211> 1971

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAD-GDH wild type gene + -factor signal sequence and KEX2 site

<400> 13

atgagatttc ctccaatttt tactgctgtt ttattcgag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc 120

tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cttttccaa cagcacaaat 180

aacgggttat tgttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240

tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgtggg aggcggcaca 300

agtggctctg tggctgcaaa tcgcttttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt 360

gaggccggtg cttctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg 420

gcctttggct cggccatcga ctggcagtag cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt 480

aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtaaat caatggaatg 540

gcctataccc gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt 600

tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc 660

agctctcagg ttgtctctgg cgctgcttat aaccctgccg tgaatggaaa agaaggtcct 720

ctcaaggctg gctggctggg aagcctggcc tccgtaatac tgtcagttgc tctgaaccgt 780

acgttccaag ccgctgggtg tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc 840

ttcaacatct accatccac cctcgacgtt gacctcaatg tccggaaga tgcagcccgg 900

gcatactact tccttatga tgacaggaag aaccttcacc tgctggagaa caccactgcc 960

aaccgccttt tctggaagaa cggctctgct gaggaagcta ttgcggatgg tgcgagatc 1020

acctccgctg atggcaaggt cactcgtgtg catgcaaaga aagaggtcat catctctgct 1080

ggtgccttgc ggctcctct cattcttgag ctttcaggag ttggaaccc aaccatctc 1140

aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccg ttggggagaa cctccaagac 1200

cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgtcc ttgccggtgc ctcaaccgtg 1260

acctaccctt ccatctccga cgtcttcggc aacgagactg actctatcgt tgcattctc 1320

cgatctcaac tctccgacta cgccgccg accgtcaagg tcagcaacgg ccacatgaag 1380
caggaggacc ttgagcgct ctaccagctc caatttgacc tcatcgtcaa ggacaaggtc 1440
cctatcgccg agatcctctt ccaccccggt ggtggaaacg ccgtgtcttc cgaattctgg 1500

ggcttgcttc ccttcgcccg tggcaacatc cacattagct ccaatgacct gactgctccc 1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggtatc 1620
gccaagtaca tcaggaagat tctccgcagc gcaccattga acaaacttat tgcgaaggaa 1680
accaagcccc gtctctctga gattccggcc actgctgcgg atgagaagtg ggttgaatgg 1740
ctcaaggcta actatcgttc caattccac ccgctcgaa ctgctgcat gatgcctcgt 1800
tcattggtg gcgttgtga taaccgtctc cgggtctatg gtaccagaa tgttcgctc 1860
gtagatgcgt ctgtcctgcc cttccagggt tgcggccact tggtagcac gctttatgcc 1920

gttgcggagc gcgtttccga cttgattaag gaggatgcga agagtgtta a 1971

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mutagenic primer pairs
<400> 14

ctctcgagaa aagaaagtc actacgacat acgac 35

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mutagenic primer pairs
<400> 15

gtcgtatgtc gtagtggact ttcttttctc gagag 35

<210> 16
<211> 1971

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> resulting DNA sequence
<400> 16

atgagatttc cttcaatttt tactgtgttt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt	120
tactcagatt tagaagggga tttcgaatgt gctgttttgc catittccaa cagcacaaat	180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta	240
tctctcgaga aaagaaagtc cactacgaca tacgactaca tcgttgtggg aggcggcaca	300
agtggctctt tggtcgcaaa tcgcctttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt	360
gaggccggtg cttctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg	420
gcctttggct cggccatcga ctggcagtac cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt	480
aaacagcaag ttcctgcgtc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtacaat caatggaatg	540
gcctatacc gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt	600
tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc	660
agctctcagg ttgctgctgg cgctgcttat aacctgccg tgaatggaaa agaaggtcct	720
ctcaaggctg gctggctggg aagcctggcc tccggtaatc tgtcagttgc tctgaaccgt	780
acgttccaag ccgctgggtt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc	840
ttcaacatct acccatccac cctcgacgtt gacctcaatg tccgcgaaga tgcagcccgg	900
gcatactact tcccttatga tgacaggaag aaccttcacc tgcctggagaa caccactgcc	960
aaccgccttt tctggaagaa cggctctgct gaggaagcta ttgcggatgg tgtcgagatc	1020
acctccgctg atggcaaggt cactcgtgtg catgcaaaga aagaggtcat catctctgct	1080
ggtgcctcgc ggtctcctct cattcttgag ctttcaggag ttggaaacct aaccatcctc	1140
aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccg ttggggagaa cctccaagac	1200
cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgtcc ttgccggtgc ctcaaccgtg	1260
acctaccctt ccatctccga cgtcttcggt aacgagactg actctatcgt tgcattcttc	1320
cgatctcaac tctccgacta cgccgccg cgctcaagg tcagcaacgg ccacatgaag	1380
caggaggacc ttgagcgctt ctaccagctc caatttgacc tcatcgtcaa ggacaaggtc	1440
cctatcgccg agatctctt ccaccccggt ggtggaaacg ccgtgtctc cgaattctgg	1500
ggcttgcttc cttcgcccc tggcaacatc cacattagct ccaatgacct gactgtccc	1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggtatc	1620
gccaaagta tcaggaagat tctccgcagc gcaccattga acaaacttat tgcgaaggaa	1680
accaagcccc gtctctctga gattccggcc actgctcggg atgagaagtg ggttgaatgg	1740
ctcaaggcta actatcgttc caacttcac ccgctcgaa ctgctgccat gatgcctcgt	1800
tccattgggtg gcgttgtta taacctctc cgggtctatg gtaccagcaa tgttcgcgtc	1860
glagatgcgt ctgtcctgcc cttccaggtt tgcggccact tggtagcac gctttatgcc	1920

gttgccgagc gcgcttccga cttgattaag gaggatgcga agagtgccta a 1971

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer pairs

<400> 17

gcctggcctc cggctctctg tcagttgctc 30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer pairs

<400> 18

gagcaactga cagaggaccg gaggccaggc 30

<210> 19

<211> 1971

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> resulting DNA sequence

<400> 19

atgagatttc cttcaatttt tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggtgaagc tgtcatcggt 120

tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180

aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240

tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgtggg aggcggcaca 300

agtggctctg tggtcgcaaa tcgcctttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt 360

gaggccggtg cttctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgtaacgg ttatggattg 420

gcctttggct cggccatcga ctggcagtac cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt 480

aaacagcaag ttctgcgtgc tggttaaggcc cttggaggaa ccagtacaat caatggaatg 540

gcctatacc gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt 600

tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc 660

agctctcagg ttgctgctgg cgctgcttat aacctgccg tgaatggaaa agaaggtcct 720
ctcaaggctg gctggctggg aagcctggcc tccggtcttc tgtcagttgc tctgaaccgt 780
acgttccaag ccgctggtgt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc 840
ttcaacatct acccatccac cctcgacgtt gacctcaatg tccgcgaaga tgcagcccgg 900

gcatactact tcccttatga tgacaggaag aaccttcacc tgctggagaa caccactgcc 960
aacgcctttt tctggaagaa cggtcttgcg gaggaagcta ttgcggatgg tgtcgagatc 1020
acctccgctg atggcaaggt cactcgtgtg catgcaaaga aagaggatcat catctctgct 1080
ggtgcccctgc ggtctctctt cattcttgag ctttcaggag ttggaaccc aaccatcttc 1140
aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccg ttggggagaa cctccaagac 1200
cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgctc ttgccggtgc ctcaaccgtg 1260
acctaccctt ccattctcga cgtcttcggt aacgagactg actctatcgt tgcattcttc 1320

cgatctcaac tctccgacta cgccgccgag accgtcaagg tcagcaacgg ccacatgaag 1380
caggaggacc ttgagcgctt ctaccagctc caatttgacc tcattcgtcaa ggacaaggtc 1440
cctatcgccg agatcctctt ccaccccggt ggtggaaacg ccgtgtcttc cgaattcttg 1500
ggcttgcttc ccttcgcccc tggcaacatc cacattagct ccaatgacct gactgtctcc 1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggtatc 1620
gccaaagtaca tcaggaagat tctccgcagc gcaccattga acaaacttat tgcgaaggaa 1680
accaagcccc gtctctctga gattccggcc actgctgcgg atgagaagtg ggttgaatgg 1740

ctcaaggcta actatcgctt caacttccac ccgctcgaa ctgctgcat gatgcctcgt 1800
tccattgggtg gcgttgttga taaccgtctc cgggtctatg gtaccagcaa tgttcgcgtc 1860
gtagatgcgt ctgtctgcc cttccaggtt tgcggccact tggttagcac gctttatgcc 1920
gttgccgagc gcgttccga cttgattaag gaggatgcga agagtgtta a 1971

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer pairs

<400> 20

gggaagcctg gcctccggtt ctctctgtc agttgctctg aaccg 45

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer pairs

<400> 21

cggttcagag caactgacag aggagaaccg gaggccaggc ttccc 45

<210> 22

<211> 1974

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> resulting DNA sequence

<400> 22

atgagatttc cttcaatttt tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120

tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180

aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240

tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgtggg aggcggcaca 300

agtggctctt tggtcgcaaa tcgcttttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt 360

gaggccgggtg ctctctgtgt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg 420

gcctttggct cggccatcga ctggcagtac cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt 480

aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtacaat caatggaatg 540

gcctataccg gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt 600

tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc 660

agctctcagg ttgctgctgg cgctgcttat aaccctgccg tgaatggaaa agaaggtcct 720

ctcaaggtcg gctggctcgg aagcctggcc tccggttctc ctctgtcagt tgctctgaac 780

cgtacgttcc aagccgctgg tgttccatgg gttgaggatg tcaatggagg caagatgcgt 840

ggcttcaaca tctaccatc caccctcgac gttgacctca atgtccgga agatgcagcc 900

cgggcatact acttccctta tgatgacagg aagaaccttc acctgctgga gaacaccact 960

gccaaaccgc ttttctggaa gaacggctct gctgaggaag ctattgcgga tgggtgtcgag 1020

atcacctccg ctgatggcaa ggtcactcgt gtgcatgcaa agaaagaggt catcatctct 1080

gctggtgccc tgcggtctcc tctcattctt gagctttcag gagttggaaa cccaaccatc 1140

ctcaaaaaga acaacataac cccacgtgtc gatctcccca ccgttgggga gaacctccaa 1200

gaccagttca acaacggcat ggctggcgaa ggatacggcg tccttgccgg tgcctcaacc 1260

gtgacctacc ctccatctc cgacgtcttc ggtaacgaga ctgactctat cgttgcatct 1320
ctccgatctc aactctccga ctacccgcc gcgaccgtca aggtcagcaa cggccacatg 1380
aagcaggagg accttgagcg cctctaccag ctccaatttg acctcatcgt caaggacaag 1440

gtccctatcg ccgagatcct ctccacccc ggtgggtggaa acgccgtgtc ctccgaattc 1500
tggggcttgc ttcccttcgc ccgtggcaac atccacatta gctccaatga cccgactgct 1560
cccgcgcga tcaaccctaa ctactttatg ttcgaatggg acggcaagag ccaggccggt 1620
atcgccaagt acatcaggaa gattctccgc agcgcacat tgaacaaact tattgcgaag 1680
gaaaccaagc ccggtctctc tgagattccg gccactgctg cggatgagaa gtgggttgaa 1740
tggtcaagg ctaactatcg ttccaacttc caccctctcg gaactgctgc catgatgcct 1800
cgttcattg gtggcgttgt tgataaccgt ctccgggtct atggtaccag caatgttcgc 1860

gtcgtagatg cgtctgtcct gcccttccag gtttgcggcc acttggttag cacgtttat 1920
gccgttgccg agcgcgcttc cgacttgatt aaggaggatg cgaagagtgc ttaa 1974

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mutagenic primer pairs
<400> 23

ccgacgtctt cggtagacgag actgactcta tcg 33
<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mutagenic primer pairs
<400> 24
cgatagagtc agtctcgtca ccgaagacgt cgg 33

<210> 25
<211> 1971
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> resulting DNA sequence
<400> 25

atgagatttc cttaatttt tactgctgtt ttattcgag catcctccgc attagctgct	60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc	120
tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat	180
aacgggttat tgttataaaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta	240
tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgtggg aggcggcaca	300
agtggctttg tggctgcaaa tcgcctttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt	360
gaggccgggtg ctctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg	420
gcctttggct cggccatcga ctggcagtag cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt	480
aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtacaat caatggaatg	540
gcctataccc gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt	600
tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc	660
agctctcagg ttgtctgtgg cgctgcttat aaccctgccg tgaatggaaa agaaggtcct	720
ctcaaggtag gctggctggg aagcctggcc tccggtaatc tgtcagttgc tctgaaccgt	780
acgttccaag ccgtgggtgt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc	840
ttcaacatct accatccac cctcgacgtt gacctcaatg tccgcgaaga tgcagcccg	900
gcatactact tcccttatga tgacaggaag aaccttcacc tgctggagaa caccactgcc	960
aaccgccttt tctggaagaa cggctctgct gaggaagcta ttgcggatgg tgtcgagatc	1020
acctccgctg atggcaaggt cactcgtgtg catgcaaaga aagaggtcat catctctgct	1080
ggtgccctgc ggtctctctt cattcttgag ctttcaggag ttggaaaccc aaccatctc	1140
aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccg ttggggagaa cctccaagac	1200
cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgctc ttgccggtgc ctcaaccgtg	1260
acctaccctt ccattctcga cgtcttcggg gacgagactg actctatcgt tgcattcttc	1320
cgatctcaac tctccgacta cgccgccgag accgtcaagg tcagcaacgg ccacatgaag	1380
caggaggacc ttgagcgctt ctaccagctc caatttgacc tcatcgtcaa ggacaaggtc	1440
cctatcgccg agatctctt ccaccccggt ggtggaaacg ccgtgtcttc cgaattctgg	1500
ggcttgcttc ccttcgcccc tggcaacatc cacattagct ccaatgacct gactgtcccc	1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggtatc	1620
gccaaagtaca tcaggaagat tctccgcagc gcaccattga acaaaattat tgcgaaggaa	1680
accaagcccc gtctctctga gattccggcc actgctgcgg atgagaagtg ggttgaatgg	1740
ctcaaggcta actatgttcc caatttccac ccgctcgga ctgctgcat gatgcctcgt	1800
tccattgggtg gcgttgttga taaccgtctc cgggtctatg gtaccagcaa tgttcgcgtc	1860

gtagatgcgt ctgtcctgcc cttccagggt tgcggccact tggtttagcac gctttatgcc 1920
gttgccgagc gcgcttcga cttgattaag gaggatgcga agagtgccta a 1971

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1의 9째 줄

【변경전】

(c) (a) 에 따른

【변경후】

(b) (a) 에 따른

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1의 13째 줄

【변경전】

단, (c) 에 따른 조각은

【변경후】

단, (b) 에 따른 조각은

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1의 11째 줄

【변경전】

단, (c) 에 따른 조각에서

【변경후】

단, (b) 에 따른 조각에서