



(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) 선행기술조사문현

US20110045513 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 노은주

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

(57) 요 약

본 발명의 주제는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각이며, 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 불활성화되었다. 성숙 아스페르길루스 오리재 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) 선행기술조사문현

JP2012029677 A

JP2012055229 A

KR1020130038914 A

US20080220460 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

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: 2로 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 N346으로 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-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 위에서 8일 동안 80°C에서의 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: 1에 따른 글리코실화된 FAD-GDH와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1에 따른 FAD-GDH는 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 M_w/M_n 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 N346으로 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 N2S를 갖고, 또한 SEQ ID No: 3에 따른 FAD-GDH이거나 그의 활성 조각인, 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드의

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 M_w/M_n 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 N168W로 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 N168W로 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 수득 가능한, 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 M_w/M_n 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 M_w/M_n 의 비율로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 나타내는 조성물을 포함하는, 생체외 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 오리재 (*Aspergillus oryzae*) FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 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: 1에 따른 글리코실화된 FAD-GDH와 비교시 개선된 건조 조건 하의 온도 안정성을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1에 따른 FAD-GDH는 아스페르길루스 오리재에서의 발현에 의해 수득가능하고,

[0005]

- 여기서 성숙 아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 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 40년 전으로 거슬러 올라간다.

글루코스 옥시다제를 이용하는 혈액 글루코스 센서에서, 혈액 글루코스 수준은 산화에 의해 글루코스를 D-글루코노-d-락тон으로 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°C에서 15 분 동안 처리 후에 약 89%의 잔류 활성을 가져서, 양호한 열 안정성을 나타낸다. WO-A1 2006/101239는 이러한 효소의 유전자 서열 및 아미노산 서열을 개시한다.
- [0010] 야생형 FAD-GDH에서 유래하는 FAD-GDH보다 액체에서 개선된 열 안정성을 갖는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소 (FAD-GDH)로서, 바람직하게는 진핵생물, 더욱 바람직하게는 사상균류, 더욱더 바람직하게는 아스페르길루스균류에서 유래하는 수식된 FAD-GDH, 및, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 첨가된 일차 구조를 갖는 FAD-GDH가 US-B2 7,662,600에 의해 제공된다.
- [0011] US 2008/220460 A1은 야생형 FAD-GDH에 비해 개선된 열 안정성을 갖는 아스페르길루스균류, 예를 들어 아스페르길루스 오리재 또는 아스페르길루스 테레우스 (*Aspergillus terreus*)에서 유래하는 수식된 FAD-GDH를 개시한다. US 2008/220460 A1은 대장균에서 유전자 재조합에 의해 생산되는 수식된 FAD-GDH에 초점을 맞춘다. 따라서, 상기 FAD-GDH는 글리코실화되지 않은 효소 변이체이며, 이는 US 2008/220460 A1에서 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 뉴클레오티드 서열에 대한 특정 수식에 대해 침묵한다.
- [0012] FAD-GDH의 일부 용도에서 건조 조건 하의 열 안정성은 매우 중요하다. 예를 들어, 혈액-글루코스 측정을 위한 테스트 스트립의 경우 건조 화학 하에서의 FAD-GDH의 효소 특성이 개선될 필요가 있다.
- [0013] 본 발명의 주제는 개선된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 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 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소이다:
- (a) 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 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) 상기 (a)에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소와 약 80% (바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%) 이상의 아미노산 서열 일치성을 나타내는 글리코실화되어 있는 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소, 여기서 성숙아스페르길루스 오리재 FAD-GDH 야생형 서열 SEQ ID No: 2 (야생형)에 따른 N2; N168 및 N346으로 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
- (c) (a) 또는 (b)에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 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 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% (바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%) 이상을 나타내고, (a)에 따른 FAD-GDH의 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 8일 동안 80°C에서의 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.
- [0019] 명세서 전체에서 백분율 값은 절대값이 아니고, ±5%의 약간의 오차 범위를 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 6에 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 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소를 의미한다.

[0021] 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 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 N346으로 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, 이를 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, 이를 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 신호펩티드 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 디뉴클레오티드 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 디뉴클레오티드 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 3에 따라 측정되는 효소 활성을 나타낸다.

[0026] 전체 명세서에서 용어 "건조 조건(들)"은 구체적으로 아래 제시된 실시예 7에 따른 시험 조건과 관련되며, 즉, 그에 제한되는 것은 아니나, 각각의 동결건조된 샘플은 건조제 (분자체 3A, MS 551, Grace)의 존재 하에 80°C에 8일 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 8일 동안 80°C에서의 인큐베이션 후에 계산되고 비스트레스 동결건조물과 비교되는, 동결건조된 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 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 8일 동안 80°C에서 인큐베이션되지 않은 효소 부분이다. "비스트레스 동결건조물"은 온도 안정성이 동결건조 뒤에 측정됨을 의미한다. 이는 비스트레스 동결건조물이 온도 안정성을 측정하기 전에 저장되지도 않고, 처리되지도 않음을 의미한다. 건조 조건 하의 온도 안정성은, 그에 제한되는 것은 아니나, 실시예 7에 따라 측정될 수 있다.

[0029] 또 다른 구체적 구현예에서 본 발명은 또한 본원에서 SEQ ID No. 3 내지 6 하에 서열이 제공되는 서열과 기능성 등가물인 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소를 예전한다. 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 6에 제공되는 것과 하나 이상의 아미노산이 상이한, 아미노

산 서열 문자이다.

[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 문자의 경우에도 같다.

[0032] 추가의 구체적 구현예에서 SEQ ID No. 13 에 제시된 뉴클레오티드 문자의 기능성 등가물은 상기 DNA 서열 또는 SEQ ID No. 13 의 서열에 실질적으로 상보적인 서열에 의해 인코딩되는, RNA 문자이다.

[0033] 본 발명의 맥락에서 용어 "RNA 문자" 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 문자의 선형 중합체를 언급한다.

[0034] 본 발명의 맥락에서 "건조제" 는 예를 들어, 그에 제한되는 것은 아니라, 실리카겔, 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 오리재에서의 발현에 의해 수득가능하고

[0037] - 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 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 군일한 글리코실화 패턴 (더 작은 분자량 분포를 가짐) 을 나타내며, 여기서 상기 SEQ ID No: 1 에 따른 FAD-GDH 는 아스페르길루스 오리재에서의 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 오리재 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, M_w/M_n 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 N346으로 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-GDH를 포함하는 조성물은 1,02 미만의 M_w/M_n 의 비율, 더욱 바람직하게는 1,01 미만의 M_w/M_n 의 비율을 갖는 상기 조성물 중 상기 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포를 나타내고/거나, 여기서 상기 수식된 FAD-GDH의 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] $(M_w(\text{글리코실화된 효소}) - M_w(\text{글리코실화되지 않은 단백질 서열에 따른 효소})) * 100\%$. 표 3에 따른 예시된 효소에 대해 하기가 계산될 수 있다 (실시예 4 참고):

[0044] FAD-GDH 변이체 1 (SEQ ID No: 3):

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

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

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

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

[0049] 본 발명의 하나의 구체적 구현예에서 1) 동결건조 및 동결건조된 효소의 분자체 (3A, MS551, Grace) 위에서 8일 동안 80°C에서의 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 N346으로 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 Val을 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 N346으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 상기 하나 이상의 아스파라긴 잔기는 Arg, Asp, Gln, Glu, Gly His, Lys, Met, Pro, Ser, 및 Thr을 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 조각이 제공되며, 여기서 N2; N168 및 N346으로 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 또 다른 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 또 다른 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 이해 한다. 모든 위에 언급된 및 모든 이후 언급되는 수식된 본 발명에 따른 FAD-GDH 의 경우에도 같다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 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 또 다른 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 또 다른 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 또 다른 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%, 더욱 바람직하게는 80%, 가장 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 또 다른 구체적 구현예는 본 발명에 따른 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수 소효소 또는 그의 기능성 조각을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드이며, 단, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 2에서의 아스파라긴 잔기가 세린 잔기로 대체되어 있음.
- [0066] SEQ ID No: 5, 여기서 위치 168에서의 아스파라긴 잔기가 2개의 아미노산, 즉 세린 및 프롤린 잔기로 대체되어 있음.
- [0067] SEQ ID No: 6, 여기서 위치 346에서의 아스파라긴 잔기가 아스파르트산 잔기로 대체되어 있음.
- [0068] 본 발명의 또 다른 구체적 구현예는 관련 서열 또는 그의 동종 서열에 대한 제한이 없이 본 발명에 의해 제공되는 하나 이상의 수식된 FAD-GDH를 포함하는 조성물이다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 구체적 구현예는 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 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 또 다른 구현예는 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터이다. 그러나, 본 발명에 따르면 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 (추가의 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 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 조정을 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. 선별 가능한 마커로서, 암피실린 저항성, 또는 카나마이신 저항성이 편리하게 이용될 수 있다. 모든 이를 물질은 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하다.
- [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 Press에 기재되어 있다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 구현예는 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 또 다른 구현예는 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 또 다른 구체적 구현예는 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 또 다른 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 ER에서 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 소재 (*Aspergillus sojae*), 아스페르길루스 오리재 (*Aspergillus oryzae*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 한세눌라 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 입수가능한 피키아 파스토리스 X33 또는 피키아 파스토리스 KM71H를 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.: 01에 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 7,494,794에 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 소재 및 아스페르길루스 오리재로부터 선택될 수 있다. 적합한 숙주는 효모 균주 예를 들어 피키아 파스토리스, 사카로마이세스 세레비지애 및 한세눌라 폴리모르파로부터 선택될 수 있다. 적합한 피키아 숙주 세포는, 예를 들어, Invitrogen (5791 Van Allan Way, Carlsbad, CA 92008, USA)로부터 입수가능한 피키아 파스토리스 X33 또는 피키아 파스토리스 KM71H를 포함한다.
- [0085] 본 발명에 따른 수식된 FAD-GDH가 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 조작은 본 발명에 따른 상기 수식된 FAD-GDH를 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 세레비지애 또는 한세눌라 폴리모르파 또는 사상 균류 예컨대 아스페르길루스 니게르 또는 아스페르길루스 소재일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 구체적 구현예는 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-GDH의 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 구현예는 N168K, N168P, N168Y, 또는 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 구현예는 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-GDH의 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 구현예에서 본 발명의 폴리펩티드는 수식된 FAD-GDH에 대해 코딩하는 DNA 서열을 발현하는 숙주 세포에서의 생산에 의해 수득된다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 수식된 FAD-GDH에 대해 코딩하는 DNA 서열에 의해 인코딩되는 mRNA의 시험관내 변역에 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/변역 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, 젤 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 생체외 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-GDH에 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 구현예는 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., Bioseensors 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 에폭시 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 오리재 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 오리재 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)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 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 8 일 동안 80°C에서의 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 오리재에서의 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 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.

티드 의존성 글루코스 탈수소효소 또는 그의 활성 조각에 관한 것이며, 여기서 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, 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 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, N168P, N168SP, 및 N346D 중 하나 이상을 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 M_w/M_n 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 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 N168W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단일 치환을 갖는 아스페르길루스 오리재 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 생체외 샘플에서 글루코스를 탐지, 확인 또는 측정하는 방법에 관한 것이며, 상기 탐지, 확인 또는 측정은 생체외 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 생체외 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 Germany로부터 수득되었고, 공급자에 의해 제공되는 지시에 따라 사용되었다. DNA의 정제, 특성분석 및 클로닝에 이용되는 작업 및 방법은 당업계에 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**

피카아 파스토리스에서의 FAD-GDH 변이체의 재조합 발현에 적합한 벡터를 생성하기 위해, 플라스미드 pBluescript SK (Stratagene, La Jolla) 의 유도체 새로 결찰된 합성 FAD-GDH 야생형 유전자 (SEQ ID No: 7) 를 사용했다. 첫번째 단계에서, 제한 엔도뉴클레아제 *Xba*I 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 *Xba*I 자리 및 3'-말단에 *Age*I 자리를 포함하는 인접 서열을 추가했다. 증폭 후에 PCR 산물을 제한 엔도뉴클레아제 *Xba*I 및 *Age*I (New England Biolabs) 로 가수분해하고, *Xba*I/*Age*I 가수분해된 발현 벡터 pPICZ αA (Invitrogen) 새로 결찰시켜 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 표에 제시된 돌연변이유발성 프라이머 쌍과 함께 Quick Change II 자리-지정 돌연변이유발 키트 (Stratagene, La Jolla) 를 제조사의 지침에 따라 사용했다.

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, 피카아 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 μ g 의 선형화된 pPICZ αA 로 전기천공에 의해 트랜스펙션시켰다. 모든 실험 단계를 제조사의 지침에 따라 수행했다. 트랜스펙션된 세포를 100 μ g/ml, 250 μ g/ml 또는 500 μ g/ml Zeocin 을 선별 마커로서 함유하는 YPD 야가 플레이트 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 텍스트로스 (글루코스)) 위로 플레이팅하고, 28°C 에서 2 - 3 일 동안 인큐베이션했다.

[0132] 트랜스펙션된 피카아 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°C 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 발효를 새로 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 살레이트의 첨가에 의해 2.5 M 농도의 암모늄 살레이트로 조정했다. 약 1h 동안 실온에서 인큐베이션 후에, 용액을 원심분리하고, 침강물을 폐기했다. 맑은 상청액을 1000 ml 폐널 세파로스 칼럼에 적용했다. 칼럼을 3 L 의 20 mM 칼륨 포스페이트 완충액 pH 7.5 및 2.5 M 의 암모늄 살레이트 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 살레이트 농축물의 선형 구배에 의해 용리했다. FAD-GDH 를 함유하는 분획을 수집하고, 정제하고, 한외 여과/한외 투석에 의해

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

[0137] 실시예 3

[0138] 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 털수소효소 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-100을 포함), 163 mM PMS 용액, 6.8 mM 2,6-디클로로페놀 인도페놀 (DCPIP) 용액, 1 M D-글루코스 용액, 15.6 mL의 위에 언급된 PIPES 완충액, 0.2 mL의 DCPIP 용액 및 4 mL의 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-100을 포함), 163 mM PMS 용액, 6.8 mM 2,6-디클로로페놀 인도페놀 (DCPIP) 용액, 1 M D-말토스 또는 D-자일로스 용액, 15.6 mL의 위에 언급된 PIPES 완충액, 0.2 mL의 DCPIP 용액 및 4 mL의 D-말토스 또는 D-자일로스 용액을 혼합하여 반응제를 만들었다.

[0143] 효소 활성 및 당질 특이성의 측정 조건

[0144] 2.9 mL의 각각의 반응 시약을 5 분 동안 37°C에서 예비가열했다. 0.1 mL FAD-GDH 용액을 첨가하고 서서히 혼합했다. 분광계를 레퍼런스로서 물을 사용하여 5 분 동안 37°C에서 600 nm로 보정했다. 분당 흡광도 변화 ($\Delta OD_{시험}$)를 선형부로부터 확인했다. 블랭크 시험으로서, FAD-GDH 용액 대신 FAD-GDH 용액의 용매를 시약에 첨가한 점을 제외하고는 상기와 동일한 방식으로, 분당 흡광도 변화 ($\Delta OD_{블랭크}$)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 μ mol의 DCPIP를 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) = $\{-(\Delta OD_{시험} - \Delta OD_{블랭크}) \times 3.0 \times \text{회석률}\} / (16.3 \times 0.1 \times 1.0)$

[0148] 상기 등식에서, 3.0은 각각의 반응 시약 + 효소 용액의 양 (mL)이고, 16.3은 본 발명의 활성을 측정하기 위한 조건 하의 밀리몰 분자 흡수 계수 (cm⁻¹/마이크로몰)이고, 0.1은 효소 용액의 양 (mL)이고, 1.0은 셀의 광학 광 경로 (cm)이다.

[0149] 실시예 4

[0150] SEC-RALS에 의한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 털수소효소의 분자량 분포

[0151] 50 mM 칼륨포스페이트 완충액 pH 6.9와 300 mM NaCl 중 약 10 mg/mL의 농도를 갖는 10 μ L의 단백질 용액을 G3000SWXL TSK겔 칼럼 (30 cm, Tosoh Biosep)에 적용했다. HPLC 펌프의 유속은 0.7 mL/min였다. Viscotek Triple 탐지기의 보정을 위해, 소 혈청 알부민 (Albumin RPLA4, Art.-Nr. 11 726 544, Roche Diagnostics GmbH)의 갖 제조한 용액을 사용했다. 0.185의 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 1이다.

[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)

실시예 5

[0157] C-니트로소아닐린 매개체를 이용한 FAD-GDH 활성 검정

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).

용액 2 (S2)

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

용액 3 (S3)

[0163] 물 중 1 M 글루코스.

효소 용액

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

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

측정 절차

표 2

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

[0169]

[0170] 20 min 동안 25°C에서 724 nm에서 흡수의 측정.

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

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:

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

[0175]

[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**

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 3에 따라 측정했다.

[0185] 실시예 7[0186] **건조 조건 하의 온도 안정성**

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°C에 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/mL로 회석하고, 부드러운 볼텍싱으로 완전히 용해시켰다. 샘플을 실온에서 정확히 1 시간 동안 재구성을 위해 저장하고, 그 후 얼음으로 냉각시켰다. 이러한 저장액에 기초하여, 빙냉 작업 완충액에서 회석을 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]

실시예 4에 따른 SEC-RALS에 의한 수식된 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 의존성 글루코스 탈수소효소의 분자량 분포

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

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

[0194] **실시예 7에 따른 건조 조건 하의 온도 안정성**

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

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

[0197]

서열 목록

SEQ ID No: 1

KNTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
 WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
 YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSRSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
 DVNGGKMRGFNIYPSTLDVNLNREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEEA
 IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILESGVGNPTILKNNITPRVDLPTVG
 ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFNETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSNG
 HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
 PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLEIPATAADEKWVEWL
 KANYRSNFHPVGTAAAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTSNRVVDASVLPFQVCGLCSTLYAVAE
 RASDLIKEAKSA

SEQ ID No: 2 (야생형) FAD-GDH 야생형 서열

KNTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
 WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
 YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSRSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
 DVNGGKMRGFNIYPSTLDVNLNREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEEA
 IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILESGVGNPTILKNNITPRVDLPTVG
 ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFNETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSNG
 HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
 PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLEIPATAADEKWVEWL
 KANYRSNFHPVGTAAAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTSNRVVDASVLPFQVCGLVSTLYAVAE
 RASDLIKEAKSA

SEQ ID NO: 3 (N2S)

KSTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
 WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLLPY
 YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSRSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
 DVNGGKMRGFNIYPSTLDVNLNREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEEA
 IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILESGVGNPTILKNNITPRVDLPTVG
 ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFNETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSNG
 HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA

[0198]

PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTNSNRVVDASVLPFQVCGHILVSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 4 (N168P)

KNTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLPY
YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSGSLASGPLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILELSGVGNPTILKNNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSNG
HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPTA
PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLEIPATAADEKWVEWL
KANYRSNFHPVGTAAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTNSNRVVDASVLPFQVCGHILVSTLYAVAE
RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 5 (N168SP)

KNTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLPY
YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSGSLASGPLSVALNRTFQAAGVPWV
EDVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEE
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILELSGVGNPTILKNNITPRVDLPTV
GENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGNETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSN
GHMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLLPFARGNIHISSNDPT
APAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLEIPATAADEKWVEW
LKANYRSNFHPVGTAAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTNSNRVVDASVLPFQVCGHILVSTLYAVA
ERASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 6 (N346D)

KNTTYYDYIVVGGGTGLVVANRLSENPDVSVLLLEAGASVFNNPDVTNANGYGLAFGSAID
WQYQSIQSYAGGKQQVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLGNEGWTWKDLPY
YLKSENLTAPSSQVAAGAAYNPAVNGKEGPLKVGWSGSLASGNLSVALNRTFQAAGVPWVE
DVNGGKMRGFNIYPSTLDVDLNVREDAARAYYFPYDDRKNLHLLENTTANRLFWKNGSAEEA
IADGVEITSADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSPLILELSGVGNPTILKNNITPRVDLPTVG
ENLQDQFNNGMAGEGYGVLAGASTVTYPSISDVFGDETDSIVASLRSQSLSDYAAATVKVSNG

[0199]

HMKQEDLERLYQLQFDLIVKDKVPIAEILFHPGGGNAVSSEFWGLPFARGNIHISNDPTA
 PAAINPNYFMFEWDGKSQAGIAKYIRKILRSAPLNKLIAKETKPGLSEIPATAADEKWEWL
 KANYRSNFHPVGTAMMPRSIGGVVDNRLRVYGTSNVRVVDASVLPFQVCGLVSTLYAVAE
 RASDLIKEDAKSA

SEQ ID No: 7 (FAD-GDH Ⓛ생형)

5' -AAGAACACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGGAGGCAGCACAAGTGGTCTTGTGGT
 CGCAAATCGCCTTCTGAGAACCCGATGTCTCCGTTCTGCTTGAGGCCGTGCTTCTG
 TGTCAACAAACCCGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTGGCTGGCCATC
 GACTGGCAGTACCGTCTATAACCAAAGCTATGCAGGAGGAAACAGCAAGTTCTGCGTGC
 TGGTAAGGCCCTGGAGGAACCAGTACAATCAATGGATGGCCTATACCCGCCAGAGGATG
 TCCAGATTGACGTTGGCAGAAACTTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCTCCTACCA
 TACTACCTGAAGAGTGAAACTTGACGCCCTACAGCTCTCAGGTTGCTGGCGCTGC
 TTATAACCCGCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCTCTCAAGGTGGCTGGTCGGAAAGCCTGG
 CCTCCGGTAATCTGTCAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTCCATGGGTT
 GAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCCCTCGACGTTGA
 CCTCAATGTCCCGAAGATGCAGCCGGATACTACTTCCCTATGATGACAGGAAGAAC
 TTCACCTGCTGGAGAACACCAGTGCACGCCCTTCTGGAAAGAACGGCTCTGCTGAGGAA
 GCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGCATGAAA
 GAAAGAGGTCATCTCTGCTGGTGCCTCGCGTCTCTCATCGAGCTTCAGGAG
 TTGGAAAACCAACCACCTCTCAAAAAGAACACATAACCCACGTGTCGATCTCCCACCGTT
 GGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACACGGCATGGCTGGCAAGGATAACGGCTCCTTGC
 CGGTGCCTCAACCGTACCTACCCCTCATCTCGACGTCTCGGTAAACGAGACTGACTCTA
 TCGTTGCATCTCCGATCTCAACTCTCGACTACGCCGCCGACCGTCAAGGTCAAC
 GGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGGCCCTACCCAGCTCAACATTGACCTCATCGTCAA
 GGACAAGGTCCTATGCCGAGATCCTCTCCACCCCGTGGAAACGCCGTGCTCC
 AATTCTGGGCTTGCTCCCTCGCCGTTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGACCCGACT
 GCTCCCGCCCATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCCAGGCCGG
 TATCGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGACGGCACCATTGAACAAACTATTGCGAAGG
 AAACCAAGCCGGTCTCTGAGATTCCGGCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGTTGAATGG
 CTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACCTCCACCCGTCGGAACCTGCTGCCATGATGCCCTCG
 CATGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACCGAGCAATGTTCCGTCG
 ATGCGTCTGCTGCCCTCCAGGTTGCGGCCACTTGGTAGCACGCTTATGCCGTTGCC
 GAGCGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAG-3'

[0200]

SEQ ID No: 8 (정방향 프라이며 $\Delta XhoI$)

5'-ggtctccctcattctttagctttcaggagttgg-3'

SEQ ID No: 9 (역방향 프라이며 $\Delta XhoI$)

5'- ccaactcctgaaagctaaagaatgagaggagacc-3'

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

5'-AAGAACACTACGACATACGACTACATCGTTGAGGAGGCAGGCGGACAAGTGGTCTTGTGGT
 CGCAAATCGCCTTCTGAGAACCCGATGTCTCGTTCTGCTTGAGGCCGGTCTCTG
 TGTCAACAAACCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCTTGGCTCGGCCATC
 GACTGGCAGTACAGTCTATAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTCTGCGTGC
 TGGTAAGGCCCTGGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGGCCTATACCCGCGCAGAGGATG
 TCCAGATTGACGTTGGCAGAAACTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCTCCTACCA
 TACTACCTGAAGAGTGAAACATTGACGGCCCTACAGCCTCTCAGGTTGCTGGCGCTGC
 TTATAACCCCTGCCGTGAATGAAAAGAAGGTCTCTCAAGGTGGCTGGTGGAAAGCCTGG
 CCTCCGGTAATCTGTCAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCAAGCCGCTGGTGTCCATGGGTT
 GAGGATGTCAATGGAGGCAAGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCCCTGACGTTGA
 CCTCAATGTCGGCAAGATGCAAGCCGGCATACTACTTCCCTATGATGACAGGAAGAAC
 TTCACCTGCTGGAGAACACCAGTGCACCGCCTTCTGGAAGAACGGCTCTGCTGAGGAA
 GCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCGTGTGGCTCCCTCTCATTCTGAGCTTCAGGAG
 TTGGAACCCAACCATCCTCAAAAAGAACATAACCCACGTGTCGATCTCCCACCGTT
 GGGGAGAACCTCAAGACCAGTTCAACAAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCGCTTGC
 CGGTGCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCGACGTCTCGGTAAACGAGACTGACTCTA
 TCGTTGCATCTCCGATCTCAACTCTCGACTACGCCGCGACCGTCAAGGTCAAC
 GGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGGCCCTACAGCTCAACATTGACCTCATCGTCAA
 GGACAAGGTCCTATGCCGAGATCCTCTTCCACCCGGTGGAAACGCCGTGCTCCCG
 AATTCTGGGCTTGCTCCCTCGCCGTGGCACATCCACATTAGCTCAATGACCCACT
 GCTCCCGCCCATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCAGGCCGG
 TATGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGACCGCACCATTGAACAAACTATTGCGAAGG
 AACCAAGCCGGTCTCTGAGATTCCGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGTTGAATGG
 CTCAAGGCTAACTATGTTCAACTTCCACCCGTCGAACTGCTGCCATGATGCCCTGTT
 CATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACCAAGCAATGTTCGCGTAG

[0201]

ATGCGTCTGCCCTCCAGGTTGCGGCCACTGGTTAGCACGTTATGCCGGCC
GACCGCGTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTAGCTTAG-3'

SEQ ID No: 11 (정방향 프라이머)

5'-ATGCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAAGAACACTACGACATACGACTACATC-3'

SEQ ID No: 12 (역방향 프라이머)

5'-GCATACCGGTCTCTCGTAAGTGCCAACTTGAACTGAGGAACAGTCATGCTAAGGCT
ACAAACTCATTAAGCACTCTCGCATCCTCCTTAATC-3'

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

5'-ATGAGATTCCTCAATTTACTGCTGTTATTGAGCATCCTCCGATTAGCTGC
TCCAGTCACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTACCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTGCATTTCACAGCACAAATAAC
GGGTTATTGTTATAAATACACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGTATCTCT
CGAGAAAAGAAAGAACACTACGACATACGACTACATCGTTGTGGAGGCGGCACAAGTGGTC
TTGTTGTCGCAAATGCCCTCTGAGAACCCGATGTCCTCCGTTCTGCTGAGGCCGGT
GCTCTGTGTTCAACAACCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGCCCTTGGCTC
GGCCATCGACTGGCAGTACCGACTCTATTAAACCAAAGCTATGCAGGAGGTAAACAGCAAGTTC
TGCCTGCTGGTAAGGCCCTGGAGGAACCACTACAATCAATGGAATGCCATACCCGCGCA
GAGGATGTCCAGATTGACGTTGGCAGAAACTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAAACCTTGACGCCCTACCGACTCTCAGGTTGCTGCTG
GCGCTGCTTATAACCCGCTGAATCTGTCAGTTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGG
AGCCTGGCCTCCGTAATCTGTCAGTTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGG
ATGGGTTGAGGATGTCATGGAGGAAGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCCCTCG
ACGTTGACCTCAATGTCGCGAAGATGCGCCGGCATACTACTTCCCTATGATGACAGG
AAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACCAACCACTGCCAACCGCTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTG
ATGCAAAGAAAAGAGGTCAATCTGCTGGCTCCGCTCATTCTGAGCT
TCAGGAGTTGGAAACCAACCATCCTCAAAAGAACACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
CACCGTTGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATAACGGCG
TCCTTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCCGACGTCTCGGTAACGAGACT
GACTCTATCGTTGCACTCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGACCGTCAAGGT
CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACCAAGCTCCAATTGACCTCA

[0202]

TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATGCCGAGATCCTCTTCCACCCGGTGGTGGAAACGCCGTG
 TCCCTCGAATTCTGGGCTTGTCTCCCTCGCCGTGGCAACATCACATTAGCTCCAATGA
 CCCGACTGCTCCGCCATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
 AGGCCGGTATGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGT
 TGAATGGCTCAAGGCTAACTATGTTCCAATTCCACCCGTCGGAACTGCTGCCATGATGC
 CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACAGCAATGTTCGC
 GTCGTAGATGCGTCTGCTGCCCTCCAGGTTGCAGGCCACTTGGTTAGCACGCTTATGC
 CGTGCCGAGCCGCTCCGACTTGAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 14

5' -CTCTCGAGAAAAGAAAGTCCACTACGACATACGAC-3'

SEQ ID No: 15

5' -GTCGTATGTCGTAGTGGACTTTCTTCGAGAG-3'

SEQ ID No: 16

5' -ATGAGATTCCTCAATTAACTGCTGTTTATTGAGCATCCTCCGATTAGCTGC
 TCCAGTCACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
 ACTCAGATTTAGAAGGGATTCGATGTTGCTGTTTGCCTTCAACAGCACAAATAAC
 GGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGTATCTCT
 CGAGAAAAGAAGTCCACTACGACATACGACTACATCGTTGAGGCGGCACAAGTGGTC
 TTGTTGTCGAAATGCCCTTCTGAGAACCCGATGTCCTCCGTTCTGCTTGAGGCCGGT
 GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTGGCTC
 GGCCATCGACTGGCAGTACCAAGTCTATTAAACAAAGCTATGCAGGAGGAAACAGCAAGTTC
 TGCGTGTGGTAAGGCCCTGGAGGAACCAGTACAATCAATGGAATGGCCTAACCGCGCA
 GAGGATGTCCAGATTGACGTTGGCAGAAACTTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
 CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAACGGACTTACCGAGCTCTCAGGTGCTGCTG
 GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGTCTCAAGGTGGCTGGTGGGA
 AGCCTGGCCTCCGGTAATCTGTCAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCAAGCCGCTGGTGTCC
 ATGGGTTGAGGATGTCATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCACCATCCACCCCTCG
 ACGTTGACCTCAATGTCCCGAAGATGCAGCCGGCATACTACTTCCCTATGATGACAGG
 AAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACACCACTGCCAACCGCTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
 TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTACTCGTGTGC
 ATGCAAAGAAAAGAGGTCACTCATCTGCTGGTGCCTCGGGTCTCCTCATTCTTGAGCTT

[0203]

TCAGGAGTTGAAACCAACCATCCTCAAAAGAACACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
 CACCGTTGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATAACGGCG
 TCCTTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCGACGTCTCGGTAAACGAGACT
 GACTCTATCGTTGCATCTCTCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGACCGTCAAGGT
 CAGCAACGGCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACAGCTCAATTGACCTCA
 TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATGCCAGATCCTCTCCACCCGGTGGAAACGCCGTG
 TCCTCGAATTCTGGGCTTGCCTCCCTCGCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
 CCCGACTGCTCCGCCATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
 AGGCCGGTATGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGAGCGCACCATTGAACAAACTTATT
 GCAGAAGGAAACCAAGCCGGTCTCTGAGATTCCGGCACTGCTGCGGATGAGAAGTGGGT
 TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTCCAACCTCCACCCGGTGGAACTGCTGCCATGATGC
 CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACAGCAATGTTGCG
 GTCGTAGATGCGTCTGCTGCCCCAGGTTGCGGCCACTTGGTTAGCACGCTTATGC
 CGTGCGAGCCGCTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 17

5' -GCCTGGCCTCCGGTCCTCTGTCAGTTGCTC-3'

SEQ ID No: 18

5' -GAGCAACTGACAGAGGACCGGAGGCCAGGC-3'

SEQ ID No: 19

5' -ATGAGATTCCTCAATTTTACTGCTGTTTATTGCAAGCATTCCCGCATTAGCTGC
 TCCAGTCACACTACAACAGAAGATGAAACGGCAAATTCCGGCTGAAGCTGTATCGGTT
 ACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTGCCATTCCAACAGCACAAATAAC
 GGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
 CGAGAAAAGAAAGAACACTACGACATACGACTACATCGTGTGGAGGCCACAAGTGGTC
 TTGTGGTCGCAAATGCCCTCTGAGAACCCCGATGTCCTCGTTCTGCTTGAGGCCGGT
 GCTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGCCCTTGGCTC
 GGCCATCGACTGGCAGTACCAAGCTATTAAACCAAGCTATGCAGGAGGAAACAGCAAGTTC
 TGCGTGTGGTAAGGCCCTGGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGCCATACCCGCGCA
 GAGGATGTCCAGATTGACGTTGGCAGAAACTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
 CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAACCAACTTGACGCCCTACCAAGCTCTCAGGTTGCTGCTG
 GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGCTCTCAAGGTCGGCTGGTCGGGA
 AGCCTGGCCTCCGGTCCTGTCAGTTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTCC

[0204]

ATGGGTTGAGGATGTCATGGAGGCAAGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCCCTCG
 ACGTTGACCTCAATGTCGGAGATGCAAGCCGGGATACTACTTCCCTATGATGACAGG
 AAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACACCACTGCCAACCGCTTCTGGAAGAACGGCTCTGC
 TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGC
 ATGCAAAGAAAAGAGGTCATCATCTCTGCTGGTGCCTGCGGTCTCCTCTCATTCTGAGCTT
 TCAGGAGTTGAAACCCAACCACCTCTCAAAAAGAACACATAACCCCACGTGTGATCTCCC
 CACCGTGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATAACGGCG
 TCCTTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCGACGTCTCGTAACGAGACT
 GACTCTATCGTTGCATCTCTCGATCTCAACTCTCGACTACGCCCGCGACCGTCAAGGT
 CAGCAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACCAGCTCCAATTGACCTCA
 TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATCGCGAGATCCTTCCACCCCGTGGTGGAAACGGCGTG
 TCCTCCGAATTCTGGGCTTGCTTCCCTCGCCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
 CCCGACTGCTCCCGCCGACATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
 AGGCCGGTATGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGAGCACCATTGAACAAAATTATT
 GCGAAGGAAACCAAGCCGGTCTCTGAGATTCCGCCACTGCTGGGATGAGAAAGTGGGT
 TGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTCCAACCTCCACCCCGTGGAACTGCTGCCATGATGC
 CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACCAAGCAATGTCGC
 GTCGTAGATGCGCTGTCCCTGCCCTCCAGGTTGGGCCACTTGGTTAGCACCGCTTATGCG
 CGTTGCCAGCGCCTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 20

5' -GGGAAGCCTGGCCTCCGGTTCTCCTCTGTCAGTTGCTCTGAACCG-3'

SEQ ID No: 21

5' -CGGTTCAAGAGCAACTGACAGAGGAGAACGGAGGCCAGGCTTCCC-3'

SEQ ID No: 22

5' -ATGAGATTCCTTCATTTACTGCTGTTTATTGCAAGCATTCCCGCATTAGCTGC
 TCCAGTCACACTACAAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGTT
 ACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTGCCATTCCAACAGCACAAATAAC
 GGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
 CGAGAAAAGAAGAACACTACGACATACGACTACATCGTGTGGAGGCGGCACAGGGTC
 TTGTTGGTCGCAAATGCCCTTCTGAGAACCCCGATGTCCTCCGTTCTGCTGAGGCCGGT
 GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTGGCTC
 GGCCATCGACTGGCAGTACCAAGTCTATTAAACCAAAGCTATGCAGGAGTAAACAGCAAGTTC

[0205]

TCGTGCTGGTAAGGCCCTGGAGGAACCACTACAATCAATGGAATGGCCTATAACCGCGCA
 GAGGATGTCCAGATTGACTTGGCAGAAAACCTGGAAACGAAGGTGGACGTGAAAGATCT
 CCTACCATACTACCTGAAGAGTGAAAACCTGACGGCCCTACCAGCTCAGGTGCTGCTG
 GCGCTGCTTATAACCGCCGTGAATGAAAAGAAGGCCTCTCAAGGTCGGCTGGCGGAA
 AGCCTGGCCTCGGTTCTCTGTCAAGGTGCTCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGT
 TCCATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGAAGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCC
 TCGACGTTGACCTCAATGTCCCGAAGATGCAAGCCCCGATACACTTCCCTATGATGAC
 AGGAAGAACCTCACCTGCTGGAGAACACCACTGCCAACCGCTTTCTGAAAGAACGGCTC
 TGCTGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTG
 TGCATGCAAAGAAAGAGGTATCATCTGCTGGTGCCTGCGTCTCCTCTCATTCTGAG
 CTTCAGGAGTTGAAACCCAAACATCCTCAAAAAGAACACATAACCCACGTGTCGATCT
 CCCCACCGTTGGGGAGAACCTCCAAGACAGTTCAACAAACGGCATGGCTGGGAAGGATACG
 GCGCTTGCCTGGCTCAACCGTGACCTACCCCTCATCTCCGACGTCTCGGTAAACGAG
 ACTGACTCTATCGTTGATCTCTCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCGCCGACCGTCAA
 GGTCAAGCAACGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACAGCTCAATTGACC
 TCATCGTCAAGGACAAGGTCCATCGCCGAGATCCTCCACCCGGTGGAAACGCC
 GTGCTCTCGAATTCTGGGCTGCTCCCTCGCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCAA
 TGACCCGACTGCTCCGCCATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGA
 GCCAGGCCGGTATCGCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGAGCGCACCATTGAACAAACTT
 ATTGCGAAGGAAACCAAGCCGGTCTCTGAGATTCCGGCCACTGCTGCGGATGAGAAGTG
 GGTGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTCCAACCTCCACCCGTCGGAACGTGCCATGA
 TGCCTCGTCCATTGGTGGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACCGAACATGTT
 CGCGTCTGAGATGCGTCTGCTGCCCTCCAGGTTGCGGCCACTGGTTAGCACGCTTTA
 TGCCGTTGCCGAGCGCCTCCGACTTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

SEQ ID No: 23

5' -CCGACGTCTCGGTGACGAGACTGACTCTATCG-3'

SEQ ID No: 24

5' -CGATAGAGTCAGTCTCGTCACCGAACGACGTCGG-3'

SEQ ID No: 25

5' -ATGAGATTCCTCAATTCTACTGCTGTTTATTGAGCATCCTCCGATTAGCTGC
 TCCAGTCAACACTACAACAGAACGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTATCGGTT
 ACTCAGATTTAGAAGGGATTTCGATGTTGCTGTTGCCATTCCAACAGCACAAATAAC

[0206]

GGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCT
 CGAGAAAAGAAGAACACTACGACATACGACTACATCGTGTGGGAGGCAGCACAAGTGGCT
 TTGTGGTCGCAAATCGCCTTCTGAGAACCCGATGTCTCCGTTCTGCTTGAGGCCGGT
 GCTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGTAACGGTTATGGATTGGCCTTGGCTC
 GGCCATCGACTGGCAGTACCAAGTCTATTAAACCAAAAGCTATGCAGGAGGTAACAGCAAGTTC
 TCGGTGCTGGTAAGGCCCTGGAGGAACCAAGTACAATCAATGGAATGGCCTATAACCGCGCA
 GAGGATGTCCAGATTGACGTTGGCAGAAACCTGGAAACGAAGGTTGGACGTGGAAAGATCT
 CCTACCATACTACCTGAAGAGTGGAAACACTTGACGGCCCTACCAGCTCTCAGGGTGTGCTG
 GCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGAAAAGAAGGTCTCTCAAGGTGGCTGGCTGG
 AGCCTGGCCTCCGGTAATCTGTCAGTTGCTGAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGT
 ATGGGTTGAGGATGTCAATGGAGGCAAGGATGCGTGGCTCAACATCTACCCATCCACCC
 ACGTTGACCTCAATGTCGCGAAGATGCGAGCCGGCATACTACTTCCCTATGATGACAGG
 AAGAACCTTCACCTGCTGGAGAACCAACTGCCAACCGCCTTCTGGAAGAACGGCTG
 TGAGGAAGCTATTGCGGATGGTGTGAGATCACCTCCGCTGATGGCAAGGTCACTCGTGTGC
 ATGCAAAGAAAGAGGTCACTCATCTGCTGGTGCCTGCGGTCTCTCATTCTGAGCTT
 TCAGGAGTTGAAACCCAACCATCCTAAAAAGAACAAACATAACCCACGTGTCGATCTCCC
 CACCGTTGGGAGAACCTCCAAGACCAGTTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCG
 TCCCTGCCGGTGCCTCAACCGTGACCTACCCCTCCATCTCGACGCTTCGGTGACGAGACT
 GACTCTATCGTTGCATCTCCGATCTCAACTCTCGACTACGCCGCCGACCGTCAAGGT
 CAGCAACGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGAGCGCCTCTACAGCTCCAATTGACCTCA
 TCGTCAAGGACAAGGTCCCTATGCCAGATCCTCTCCACCCGGTGGAAACGCCGTG
 TCCTCCGAATTCTGGGCTTGCTTCCCTCGCCGTGGCAACATCCACATTAGCTCCAATGA
 CCCGACTGCTCCGCCACATCAACCTAACTACTTATGTTGAATGGGACGGCAAGAGCC
 AGGCCGGTATGCCAAGTACATCAGGAAGATTCTCCGAGCGCACATTGAACAAACTTATT
 GCGAAGGAAACCAAGGCCGGTCTCTGAGGATTCGGCACTGCTGCGGATGAGAACAGGGT
 TGAATGGCTCAAGGCTAACTATGTTCAACTTCCACCCGGTGGAAACTGCTGCCATGATGC
 CTCGTTCCATTGGTGGCGTTGATAACCGTCTCCGGTCTATGGTACAGCAATGTTCGC
 GTCGTAGATGCCGTGCTGCCCTCCAGGTTGCCACTTGTTAGCACGCTTATG
 CGTGCCGAGCCGCTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAA-3'

[0207]

도면 설명

[0208]

도 1:

[0209]

피키아 발현 벡터 pPICZ αA:

[0210]

PAOX1 = AOX1 프로모터 (관심의 유전자의 전사를 개시함)

[0211]

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

[0212]

TAOX1 = AOX1 터미네이터 (관심의 유전자의 전사를 정지시킴)

[0213]

Zeo = 제오마이신 저항성 유전자 - 선별 마커

[0214]

ColE1 = 복제 원점 (대장균에서의 클로닝을 허용함)

[0215]

도 2:

[0216]

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

[0217]

도 3:

[0218]

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

[0219]

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

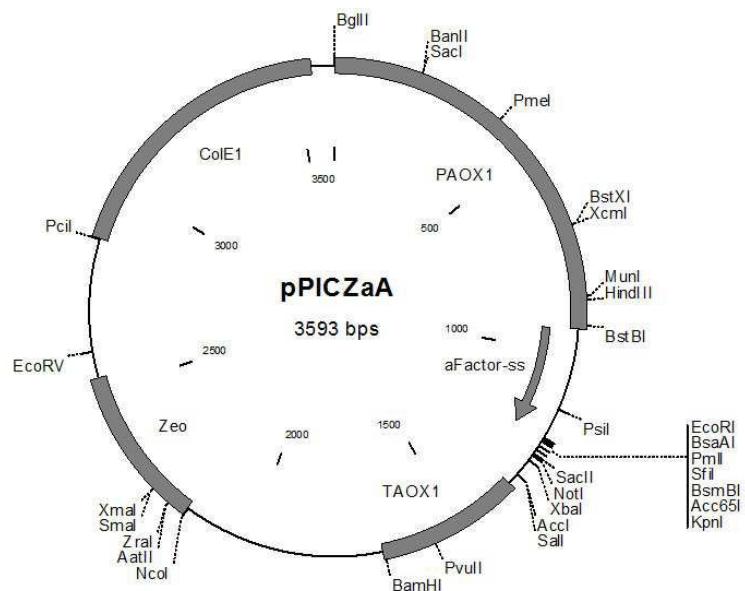
원에 개시된 본 발명에 다양한 치환 및 수식이 가해질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 본원에서 설명적으로 기재된 본 발명은 적합하게는 본원에서 본질적인 것으로서 구체적으로 개시되지 않은 요소 또는 요소들, 또는 제한 또는 제한들의 부재 하에 실시될 수 있다.

[0221]

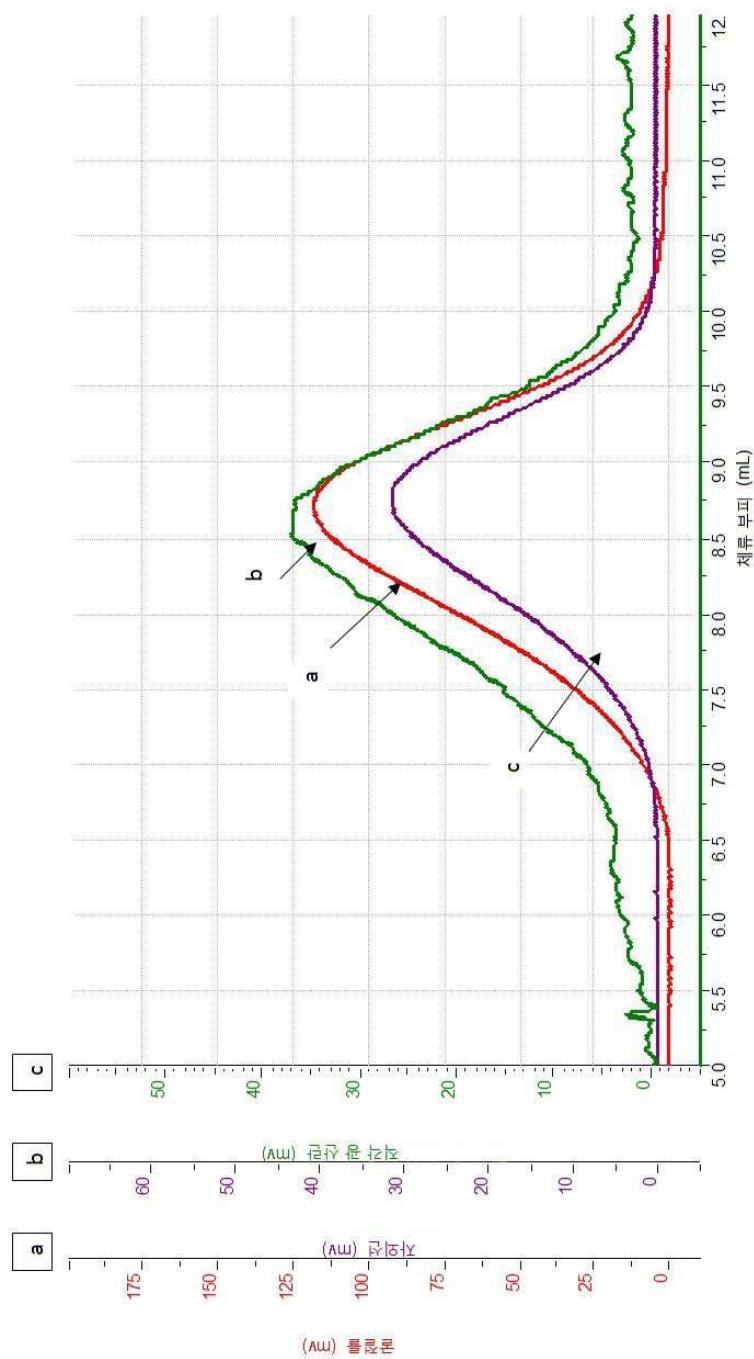
본원에 설명적으로 기재된 방법 및 과정은 적합하게는 단계들의 상이한 순서로 실시될 수 있고, 본원 또는 첨부된 청구항에 제시된 단계들의 순서에 반드시 제한되지는 않는다. 또한 본문이 명백히 다르게 지시하지 않는 한 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 단수형은 복수형을 포함하고, 복수형은 단수형을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 어떤 경우에도 특허는 본원에서 구체적으로 개시된 구체적 실시예 또는 구현예 또는 방법에 제한되는 것으로 해석되면 안된다. 본 발명은 본원에서 광범위하고 일반적으로 기재되었다. 이용된 용어 및 표현은 제한이 아닌 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 구현예 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

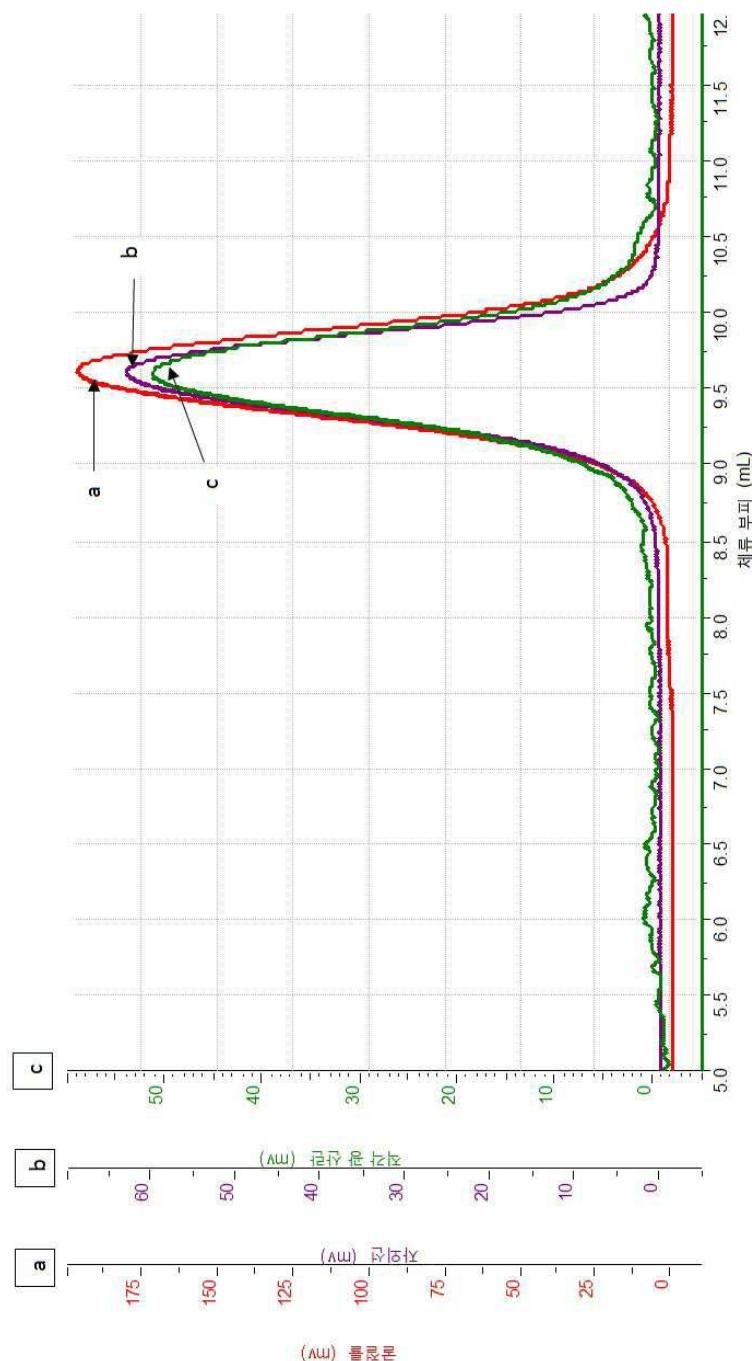
도면1



도면2



도면3



서 열 목록

- <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 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 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 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 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 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 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

<210>	5	565	570													
<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																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							80
Arg	Ala	Gly	Lys	Ala	Leu	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							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

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 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
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 Tyr Asp Tyr Ile Val Val 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	Thr	Ile	Asn	Gly	Met	Ala	
85															
Tyr	Thr	Arg	Ala	Glu	Asp	Val	Gln	Ile	Asp	Val	Trp	Gln	Lys	Leu	Gly
100															
Asn	Glu	Gly	Trp	Thr	Trp	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Ser
115															
Glu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala
130															
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															
Phe	Gln	Ala	Ala	Gly	Val	Pro	Trp	Val	Glu	Asp	Val	Asn	Gly	Gly	Lys
180															
Met	Arg	Gly	Phe	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Thr	Leu	Asp	Val	Asp	Leu	Asn
195															
Val	Arg	Glu	Asp	Ala	Ala	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Asp	Asp	Arg
210															
220															

Lys	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Ala	Asn	Arg	Leu	Phe	Trp
225															
Lys	Asn	Gly	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Glu	Ile	Thr
245															
Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Val	Thr	Arg	Val	His	Ala	Lys	Lys	Glu	Val	Ile
260															
Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Ser	Pro	Leu	Ile	Leu	Glu	Leu	Ser	Gly
275															
Val	Gly	Asn	Pro	Thr	Ile	Leu	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 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 ctacatcggtt gtgggaggcg gcacaagtgg tcttgggtc	60
gcaaatcgcc ttctcgagaa ccccgatgtc tccgttcttc tgcttgaggc cggtgttct	120
gtgttcaaca acccggacgt aaccaacgt aacggttatg gattggcctt tggctggcc	180
atcgactggc agtaccagtc tattaacca agctatgcag gaggtaaaca gcaagttctg	240
cgtgctggta aggccttgg aggaaccagt acaatcaatg gaatggccta taccgcgca	300
gaggatgtcc agattgacgt ttggcagaaa cttggaaacg aagggtggac gtggaaagat	360
ctcctaccat actacctgaa gagtgaaaac ttgacggccc ctaccagctc tcagggtgct	420
gctggcgctg ctataaccc tgccgtaat ggaaaagaag gtctctcaa ggtcggtgg	480
tcgggaagcc tggctccgg taatctgtca gttgtctga accgtacgtt ccaagccgt	540
gggttccat ggggtgagga tgtcaatgga ggcaagatgc gtggcttcaa catctacca	600
tccaccctcg acgttgcact caatgtccgc gaagatgcag cccggcata ctacttcct	660
tatgtatgaca ggaagaacctt tacctgtcg gagaacacca ctgccaaccg cctttctgg	720
aagaacggct ctgctgagga agctattgcg gatgggtgtcg agatcacctc cgctgatggc	780
aaggtcactc gtgtgcattgc aaagaaagag gtcatcatct ctgctgggtc cctgcggct	840
cctctcatc tcgagcttgc aggagttggaa aacccaacca tcctaaaaaa gaacaacata	900
accccacgtg tcgatctccc caccgttggg gagaacctcc aagaccagt caacaacggc	960
atggctggcg aaggatacgg cgtccttgc ggtgcctcaa ccgtgaccta ccctccatc	1020
tccgacgtct tcggtaacga gactgactct atcggtgcatt ctctccgatc tcaactctcc	1080
gactacgcgc cccgcgaccgt caaggtcagc aacggccaca tgaaggcagga ggacctttag	1140
cgcctctacc agctccaatt tgacctatc gtcaaggaca aggtccctat cggcgagatc	1200
ctcttccacc cccgtgggtgg aaacgcccgtg tcctccgaat tctggggctt gcttccatc	1260
gcccgtggca acatccacat tagctccaaat gacccgactg ctccgcgc catcaaccct	1320
aactacttta tggctgaatgg gacggcaag agccaggccg gtatgcctaa gtacatcagg	1380
aagattctcc gcagcgcacc attgaacaaa cttattgcga agggaaaccaa gcccggctc	1440
tctgagattc cggccactgc tgcggatgag aagtgggttg aatggctcaa ggctaaactat	1500
cgttccaact tccacccgtt cggaaactgtc gccatgtgc ctgcgttccat tgggtggctt	1560

gttgataacc	gtctccgggt	ctatggtacc	agcaatgttc	gcgtcgtaga	tgcgtctgtc	1620
ctgcccttcc	aggttgcgg	ccacttggtt	agcacgctt	atgccgttgc	cgagcgcgct	1680
tccgacttga ttaaggagga tgcgaagagt gcttag						1716
<210>	8					
<211>	34					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	forward primer	XhoI				
<400>	8					
ggtctcctct	cattctttag	ctttcaggag	ttgg			34
<210>	9					
<211>	34					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	reverse primer	XhoI				
<400>	9					
ccaactcctg	aaagctcaag	aatgagagga	gacc			34
<210>	10					
<211>	1716					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	wild type FAD-GDH	XhoI				
<400>	10					
aagaacacta	cgacatacga	ctacatcggt	gtggaggcg	gcacaagtgg	tcttgtggtc	60
gcaaatcgcc	tttctgagaa	ccccgatgtc	tccgttcttc	tgcttgaggc	cggtgtttct	120
gtgttcaaca	accggacgt	aaccaacgct	aacggttatg	gattggcctt	tggctcgccc	180
atcgactggc	agtaccagtc	tattaaccaa	agctatgcag	gaggtaaaca	gcaagttctg	240
cgtgctggta	aggcccttgg	aggaaccagt	acaatcaatg	gaatggccta	tacccgcgca	300
gaggatgtcc	agattgacgt	ttggcagaaa	cttggaaacg	aaggttggac	gtggaaagat	360
ctcctaccat	actacctgaa	gagtgaaaac	ttgacggccc	ctaccagctc	tcaggttgct	420
gctggcgctg	cttataaccc	tgccgtgaat	ggaaaagaag	gtcctctcaa	ggtcggtgg	480
tcgggaagcc	tggcctccgg	taatctgtca	gttgctctga	accgtacgtt	ccaagccct	540

ggtgtccat gggttgagga tgtcaatgga ggcaagatgc gtggcttcaa catctaccca	600
tccaccctcg acgttgacct caatgtccgc gaagatgcag cccggcata ctacttcct	660
tatgtatgaca ggaagaacct tcacctgctg gagaacacca ctgccaaccg cctttctgg	720
aagaacggct ctgttgagga agctattgcg gatggtgtcg agatcacctc cgctgtatggc	780
aaggtcactc gtgtgcatgc aaagaaaagag gtcatcatct ctgctggtgc cctgcggct	840
cctctcattc ttgagcttgc aggagttgga aacccaacca tcctaaaaaa gaacaacata	900
accccacgtg tcgatctccc caccgttggg gagaacctcc aagaccagt caacaacggc	960
atggctggcg aaggatacgg cgtccttgcc ggtgcctcaa ccgtgaccta cccttcata	1020
tccgacgtct tcggtaacga gactgactct atcggtgc tctccgatc tcaactctcc	1080
gactacgccc cccgaccgt caaggtcagc aacggccaca tgaaggcagga ggaccctttag	1140
cgccttacc agtcataatt tgacctatc gtcaaggaca aggtccctat cgccgagatc	1200
ctcttccacc ccgttggtgg aaacgcccgtg tcctccaat tctgggctt gcttcccttc	1260
gcccgtggca acatccacat tagctccaat gacccgactg ctcccgccgc catcaaccct	1320
aactacttta ttttcaatg ggacggcaag agccaggccg gtatcgccaa gtacatcagg	1380
aagattctcc gcagcgcacc attgaacaaa cttattgcga agggaaaccaa gcccgtctc	1440
tctgagattc cggccactgc tgccgtatgag aagtgggttg aatggctaa ggctaaat	1500
cgttccaact tccacccgtt cgaaactgct gccatgtatgc ctgcgttccat tggggcggtt	1560
gttgataacc gtctccgggtt ctatggtacc agcaatgttc gctgtatgtc	1620
ctgccttcc aggtttcgcc ccacttggtt agcacgttt atgcgttgc cgagcgcgt	1680
tccgacttga ttaaggagga tgcgaagagt gcttag	1716
<210> 11	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 11	
atgcctcgag aaaaagagagg ctgaagctaa gaacactacg acatacgact acatc	55
<210> 12	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	

<400> 12

gcataccgtt cttctcgtaa gtgcccaact tgaactgagg aacagtcatg tctaaggcta 60

caaactcatt aagcactt cgcacccctcc ttaatc 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 ctcaatttt tactgctgtt ttattcgacatccctccgc attagctgct 60

ccagtcacaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaatc cggctgaagc tgtcatcggt 120

tactcagatt tagaagggaa tttcgatgtt gctgtttgc catttccaa cagcacaat 180

aacgggttataa tactactatt gccagcatg ctgctaaaga agaagggt 240

tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttggtt aggccgcaca 300

agtggctttg tggcgcaaa tcgccttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt 360

gaggccgggtt ctctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggatt 420

gccttggctt cggccatcgatcgactac cagttatcca accaaagcta tgcaggaggt 480

aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggagggaa ccagttacaat caatggatg 540

gcctataccc ggcgagagga tgtccagatt gacggttggc agaaacttgg aaacgaaggt 600

tggacgtgga aagatctctt accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggccttacc 660

agctctcagg ttgtgtgtt cgtgtttat aaccctgccc tgaatggaaa agaaggctt 720

ctcaaggctcg gctggcggtt aaccctggcc tccggtaatc tgtcagttgc tctgaaccgt 780

acgttccaag ccgttgtgtt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc 840

ttcaacatct accatccac cctcgacgtt gacctcaatg tccgcgaaga tgcagccgg 900

gcataactact tcccttatga tgacaggaag aacccttacc tgctggagaa caccactgcc 960

aaccgcctt tctggaaagaa cggctctgtt gaggaagcta ttgcggatgg tgtcgagatc 1020

acctccgtt atggcaaggt cactcggtt catgcaaaaga aagaggcatcatctctgt 1080

ggtgccttc ggtctccctt cattttgtt ctttcaggag ttggaaaccc aaccatcc 1140

aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccc ttggggagaa cctccaagac 1200

cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgatcc ttgcggatgg ctcaaccgt 1260

acctaccctt ccatctccga cgtttcggtt aacgagactg actctatcgt tgcatctctc 1320

cgatctaac tctccgacta cgccgcccgc accgtcaagg tcagcaacgg ccacatgaag	1380
caggaggacc ttgagcgcct ctaccagtc caatttgacc tcatcgtaa ggacaaggtc	1440
cctatcgccg agatcctttt ccaccccggt ggtggaaacg ccgtgtcctc cgaattctgg	1500
ggcttgcttc cttcgcccg tggcaacatc cacattagct ccaatgaccc gactgctccc	1560
gccgccccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggatc	1620
gccaagtaca tcaggaagat tctccgcagc gcaccattga acaaacttat tgcgaaggaa	1680
accaagcccg gtctctctga gattccggcc actgctgccc atgagaagtgg ggttgaatgg	1740
ctcaaggcta actatcggttca actatccac cccgtcgaa ctgctgccat gatgcctcgt	1800
tccatgggtg gcttgggttga taaccgtctc cgggtctatg gtaccagcaa tggtcgctc	1860
gtagatgcgt ctgtcctgcc cttccagggtt tgccggccact tggttagcac gctttatgcc	1920
gttgcgagc ggcgttccga cttgattaag gaggatgcga agagtgccta a	1971
<210> 14	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 14	
ctctcgagaa aagaaaatcc actacgacat acgac	35
<210> 15	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 15	
gtcgtagtgc gtatggact ttctttctc gagag	35
<210> 16	
<211> 1971	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> resulting DNA sequence	
<400> 16	
atgagatttc cttaattt tactgctttt ttattcgacat cttccgcattt attagctgt	60

gttgcgcgac gcgttccga cttgattaag gaggatgcga agagtgccta a	1971
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 17	
gcctggcctc cggcctctg 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 ctcaatttt tactgctgtt ttattcgacatcctccgc attagctgct	60
ccagtcaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt	120
tactcagatt tagaagggaa tttcgatgtt gctgtttgc cattttccaa cagcacaaat	180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcatg ctgctaaaga agaagggtta	240
tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgcccaggcaca	300
agtggcttg tggcgcaaa tcgccttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt	360
gaggccggtg cttctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg	420
gccttggct cggccatgca ctggcagttac cagtttattt accaaagcta tgcaggaggt	480
aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc cttggaggaa ccagtacaat caatggatg	540
gcctataccgcgcgagaggtgtccagatt gacgttggc agaaacttgg aaacgaaggt	600
tggacgtgga aagatctcctt accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccttacc	660

agctctcagg ttgctgctgg cgctgcttat aaccctgccg tgaatggaaa agaaggctct	720
ctcaaggctcg gctggctggg aaccctggcc tccggcttc tgcagggtc tctgaaccgt	780
acgttccaag ccgctgggt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc	840
ttcaacatct acccatccac cctcgacgtt gaccctaatt tccgcagaaga tgcagccgg	900
gcatactact tcccttatga tgacaggaag aacccttacc tgctggagaa caccactgcc	960
aaccgcctt tctggaagaa cggctctgtc gaggaagcta ttgcggatgg tgtcgagatc	1020
acctccgctg atggcaaggt cactcggtg catgcaaaga aagaggtcat catctctgtc	1080
ggtgccctgc ggtctccctt catttttagt ctttcaggag ttgaaaccc aaccatccctc	1140
aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccacgg ttggggagaa cctccaagac	1200
cagttcaaca acggcatggc tggcgaagga tacggcgcc ttgcgggtgc ctcaaccgtg	1260
acctaaccctt ccattccgaa cgtttcggtt aacgagactg actctatcgat tgcatctc	1320
cgatctcaac tctccgacta cgccgccgac accgtcaagg ttagcaacgg ccacatgaag	1380
caggaggacc ttgagcgccctt ctaccagtc caatttgcacc tcatcgtaa ggacaaggtc	1440
cctatcgccg agatcctttt ccaccccggtt ggtggaaacgg ccgtgtccctc cgaatttgc	1500
ggcttgcgttc cttcgcccg tggcaacatc cacattagct ccaatgaccc gactgctccc	1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatgggacg gcaagagcca ggccggatcc	1620
gccaagtaca tcaggaagat tctccgcaggc gcaccattga acaaacttat tgcgaaggaa	1680
accaagcccg gtctctgtt gattccggcc actgctgccc atgagaagtg gtttgaatgg	1740
ctcaaggctta actatcggtt caacttccac cccgtcgaa ctgctgccat gatgcctcg	1800
tccattgggtt gcggtgttga taaccgtctc cgggtctatg gtaccagcaa tggcgctc	1860
gttagatgcgt ctgtctgtcc cttccagggtt tgccggact tggtagcac gctttatgcc	1920
gttggccgagc gcgctccgaa cttgattaag gaggatgcga agagtgccta a	1971
<210> 20	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 20	
ggaaagcctg gcctccgggtt ctccctgtc agttgtctg aaccg	45
<210> 21	
<211> 45	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer pairs

<400> 21

cggttcagag caactgacag aggagaacgg gaggccaggc ttccc 45

<210> 22

<211> 1974

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> resulting DNA sequence

<400> 22

atgagattc ctcaatttt tactgctgtt ttattcgag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgtttgc catttccaa cagcacaat 180

aacgggttat tggtaataaa tactactatt gccagcatg ctgctaaaga agaagggtat 240
 tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttgtgg aggccgcaca 300
 agtggcttg tggcgcaaa tcgccttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt 360
 gaggccggtg ctctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgctaacgg ttatggattg 420
 gccttggct cgccatcga ctggcagttac cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt 480
 aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtacaat caatggaatg 540
 gcctatacccg gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt 600

tggacgtgga aagatctcct accataactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccttacc 660
 agctctcagg ttgctgctgg cgctgcttat aaccctgccg tgaatggaaa agaaggctct 720
 ctcaaggtcg gctggtcggg aaccctggcc tccggttctc ctctgtcagt tgctctgaac 780
 cgtacgttcc aaccgcgtgg tggccatgg gttgaggatg tcaatggagg caagatgcgt 840
 ggcttcaaca tctacccatc caccctcgac gttgacctca atgtccgcga agatgcagcc 900
 cgggcatact acttccctta tggatgacagg aagaaccttc acctgctggc gaacaccact 960
 gccaaccggcc ttttctggaa gaacggctct gctgaggaag ctattgcggc tggtgtcgag 1020

atcacctccg ctgatggcaa ggtcactcgt gtgcattgca agaaagaggt catcatctct 1080
 gctgggtcccc tgcggctcc tctcatttt gagcttcag gagttggaaa cccaaaccatc 1140
 ctcaaaaaga acaacataac cccacgtgtc gatctccca cccgtggggaa gaacctccaa 1200
 gaccaggttca acaacggcat ggctggcgaa ggatacggcg tccttgcggc tgcctcaacc 1260

gtgacctacc ctccatctc cgacgtttc ggtaacgaga ctgacttat cggtcatct	1320
ctccgatctc aactctccga ctacgcccgc ggcgggtca aggtcagcaa cggccacatg	1380
aaggcaggagg accttgagcg ccttaccag ctccaatttg acctcatgt caaggacaag	1440
gtccctatcg ccgagatctt cttccacccc ggtggggaa acggcggtc ctccgaattc	1500
tgggcttgc ttcccttcgc ccgtggcaac atccacatata gctccaatga cccgactgct	1560
cccgccgcca tcaaccctaa ctactttatg ttcaatggg acggcaagag ccaggccgt	1620
atcggcaagt acatcaggaa gattctccgc agcgccat tgaacaaact tattgcgaag	1680
gaaaccaagc ccggctctc tgagattccg gccactgctg cggatgagaa gtgggttcaa	1740
tggctcaagg ctaactatcg ttccaaatcc caccctgtcg gaactgctgc catgtatgc	1800
cgttccattt gtggcggtgt tgataaccgt ctccgggtct atggtaaccag caatgttcgc	1860
gtcgtagatg cgtctgtcct gcccttccag gtttgcggcc acttggttag cacgtttat	1920
gccgttgcgg agcgcgttc cgacttgatt aaggaggatg cgaagagtc ttaa	1974
<210> 23	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 23	
ccgacgtttt cgggtgacgag actgactcta tcg	33
<210> 24	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutagenic primer pairs	
<400> 24	
cgtatagatgc agtctcgta ccgaagacgt cggt	33
<210> 25	
<211> 1971	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> resulting DNA sequence	
<400> 25	

atgagattc cttaattt tactgcttt ttattcgag catcctccgc attagctgt	60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaatc cggtgaagc tgtcatcggt	120
tactcagatt tagaagggaa tttcgatgtt gctgtttgc catttccaa cagcacaat	180
aacgggttat tgttataaa tactactatt gccagcatg ctgctaaaga agaagggtat	240
tctctcgaga aaagaaagaa cactacgaca tacgactaca tcgttggtt aggccgcaca	300
agtggcttg tggcgcaaa tcgccttct gagaaccccg atgtctccgt tcttctgctt	360
gaggccggtg ctctgtgtt caacaacccg gacgtaacca acgtaacgg ttatggatttgc	420
gccttggct cggccatcga ctggcgtac cagtctatta accaaagcta tgcaggaggt	480
aaacagcaag ttctgcgtgc tggtaaggcc ctggaggaa ccagtacaat caatggatgt	540
gcctataccc gcgcagagga tgtccagatt gacgtttggc agaaacttgg aaacgaaggt	600
tggacgtgga aagatctcct accatactac ctgaagagtg aaaacttgac ggcccctacc	660
agctctcagg ttgtgtgtt cgctgttat aaccctgccc tgaatggaaa agaaggctt	720
ctcaaggctcg gctggtcggg aagcctggcc tccgtaatc tgtcagttgc tctgaaccgt	780
acgttccaag ccgtgggtt tccatgggtt gaggatgtca atggaggcaa gatgcgtggc	840
ttcaacatct acccatccac cctcgacgtt gacctaatttgc tccgcaaga tgcagccgg	900
gcatactact tcccttatga tgacaggaag aaccccttacc tgctggagaa caccactgcc	960
aaccgcctt tctggaaagaa cggctctgtt gaggaaagcta ttggatgg tgtcgagatc	1020
accccgctg atggcaaggt cactcggtt catgcaaaaga aagaggcttcat catctctgt	1080
ggtcccctgc ggtctccctt catttttgcgtt ctttcaggag ttggaaaccc aaccatcctc	1140
aaaaagaaca acataacccc acgtgtcgat ctccccaccg ttggggagaa cctccaagac	1200
cagttcaaca acggcatggc tggcgaaaggtaacggcgatcc ttggcggtgc ctcaaccgtt	1260
acctaccctt ccatctccga cgtttcggtt gacgagactg actctatctgt tgcatctctc	1320
cgtatctcaac tctccgacta cgcgcgcgc accgtcaagg tcaagcaacgg ccacatgaag	1380
caggaggacc ttgagcgcctt ctaccagtc caatttgcacc tcatgtcaa ggacaaggtc	1440
cctatcgcccg agatcctt ccaccccggtt ggtggaaacg cctgtccctc cgaatttctgg	1500
ggcttgcgttcccttccgc tggcaacatc cacattagct ccaatgaccc gactgtccc	1560
gccgccatca accctaacta ctttatgttc gaatggacg gcaagagcca ggccggatc	1620
cccaagtaca tcaggaatgttctccgcgcacaccattat tgcgaaggaa	1680
accaagcccg gtctctgtt gattccggcc actgctggg atgagaagtgg ggttgaatgg	1740
ctcaaggcttcaactatcggttcaacttccac cccgtcgaa ctgtccat gatgcctgtt	1800
tccattgggttgcgttgcgttcaaccgttccgcgttccgtatgttaccagcaa tggtcggtt	1860

gttagatgcgt ctgtcctgcc cttccaggtt tgcggccact tggttagcac gctttatgcc	1920
gttgccgagc gcgcattccga cttgattaag gaggatgcga agagtgctta 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