



등록특허 10-2536221



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월23일
(11) 등록번호 10-2536221
(24) 등록일자 2023년05월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/02 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 21/02 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7034453
- (22) 출원일자(국제) 2017년05월03일
심사청구일자 2020년04월23일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월28일
- (65) 공개번호 10-2019-0003651
- (43) 공개일자 2019년01월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/060484
- (87) 국제공개번호 WO 2017/191165
국제공개일자 2017년11월09일
- (30) 우선권주장
62/330,973 2016년05월03일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
WO2009062789 A1
Cell, Vol. 87, 415-426, November 1, 1996
J. Dairy Sci. 99:783-795

(73) 특허권자
론자 리미티드
스위스 3930 비스프 론자슈트라쎄

(72) 발명자
베지, 제임스
영국 씨티2 7엔제트 켄트주 캔터베리 더 레지스트
리 더 유니버시티 오브 켄트
스메일, 크리스토퍼 마크
영국 씨티1 3엔에프 켄트주 캔터베리 에설버트 로
드 37
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

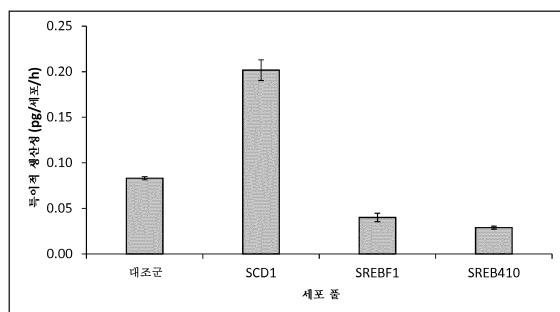
심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 단백질 생산을 위한 지질 대사의 조정

(57) 요약

본 개시내용은 재조합 산물, 예컨대 차세대 생물제제의 개선된 생산 및 품질을 달성하기 위해 지질 대사를 조정하기 위한 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 본원에 기재된 바와 같은 지질 대사의 조정은, 예를 들어, 본원에 기재된 지질 대사 조정제를 세포 또는 무세포 시스템 내로 도입하는 것을 포함한다. 또한, 개선된 생산 능력 및 개선된 산물 품질을 수반한 조작된 세포, 이러한 세포를 조작하는 방법, 및 상기 세포로부터의 산물을 포함하는 제제 및 혼합물이 본 개시내용에 의해 포괄된다.

대 표 도 - 도16b



(52) CPC특허분류

C07K 16/00 (2013.01)
C12N 5/0682 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
C12N 9/0083 (2013.01)
C12N 9/0097 (2013.01)
C12Y 114/19001 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)

(72) 발명자

나이트, 타냐

영국 씨티6 5디에이 켄트주 켄트 헤르네 베이 킹스
로드 32

영, 로버트

영국 에스엘1 버크셔주 슬라우 배쓰 로드 228 론자
바이올로직스 피엘씨 리서치 앤드 테크놀로지

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 재조합 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서,

(i) 스테아로일 CoA 데세투라제-1 (stearoyl CoA desaturase-1; SCD1) 또는 그의 기능적 단편 또는 이소형을 포함하는 제1 지질 대사 조정제 (lipid metabolism modulator; LMM)를 코딩하는 제1 외인성 핵산; 및

상기 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산

을 포함하는 진핵 세포를 제공하는 단계,

(ii) 상기 세포를 제1 LMM 및 상기 재조합 폴리펩티드가 발현되는 조건 하에 배양하는 단계

를 포함함으로써 재조합 폴리펩티드를 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩티드가

i) 치료용 폴리펩티드,

ii) 항체 또는 그의 단편, 모노클로날 항체, 또는 이중특이적 분자, 및/또는

iii) 호르몬, 혈액 응고 (clotting) 또는 응고 (coagulation) 인자, 시토카인 또는 성장 인자, 융합 단백질 및 단백질 백신으로부터 선택된 것

인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 LMM이 이러한 제1 LMM을 갖지 않은 세포와 비교 시 재조합 폴리펩티드의 증가된 생산 수율 또는 생산 속도를 제공하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 LMM이 이러한 제1 LMM을 갖지 않은 세포와 비교 시 미스폴딩되거나 또는 언폴딩된 재조합 폴리펩티드에 대한 적절하게 폴딩된 산물의 증가된 비를 제공하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 LMM이 서열식별번호: 3의 아미노산 서열, 또는 그의 기능적 단편과의 적어도 80% 동일성 또는 적어도 90% 동일성을 갖거나; 또는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열, 또는 그의 기능적 단편과 1개 이상의 아미노산 잔기 내지 50개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포가 스테롤 조절 요소-결합 전사 인자 1 (SREBF1) 또는 그의 기능적 단편 또는 이소형을 포함하는 제2 LMM을 코딩하는 제2 외인성 핵산을 추가로 포함하며, 상기 단계 (ii)에서 세포가 제2 LMM이 발현되는 조건 하에 배양되는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 제2 LMM이 서열식별번호: 1 또는 34에 상응하는 SREBF1의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 26, 27, 또는 36에 상응하는 그의 기능적 단편과의 적어도 80% 동일성 또는 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 서열식별번호: 1 또는 34에 상응하는 SREBF1의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 26, 27, 또는 36에 상응하는 그의 기능적 단편과 1개 이상의 아미노산 잔기 내지 50개 이하의 아미노산 잔기만

큼 상이한 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 제2 LMM이 이러한 제2 LMM을 갖지 않은 세포와 비교 시 재조합 폴리펩티드의 증가된 생산 수율 또는 생산 속도를 제공하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 폴리펩티드의 생산이 제1 LMM이 없는 세포에 의해 생산된 재조합 폴리펩티드의 수준 또는 수량과 비교 시 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배만큼 증가된 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 LMM을 코딩하는 핵산이 세포의 염색체 계놈 내로 통합되고 LMM이 안정적으로 발현되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 것인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 폴리펩티드를 적어도 하나의 세포성 성분 또는 배지 성분으로부터 분리하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산이 제1 LMM을 코딩하는 제1 외인성 핵산을 도입한 후에 도입되는 것인 방법.

청구항 14

스테아로일 CoA 데새투라제-1 (stearoyl CoA desaturase-1; SCD1) 또는 그의 기능적 단편 또는 이소형을 포함하는 제1 지질 대사 조정제 (lipid metabolism modulator; LMM)를 코딩하는 제1 외인성 핵산; 및

재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산

을 포함하는 진핵 세포로서,

상기 제1 외인성 핵산이 세포의 염색체 계놈 내로 통합되며, 상기 재조합 폴리펩티드가

i) 치료용 폴리펩티드,

ii) 항체 또는 그의 단편, 모노클로날 항체, 또는 이중특이적 분자, 및/또는

iii) 호르몬, 혈액 응고 (clotting) 또는 응고 (coagulation) 인자, 시토카인 또는 성장 인자, 항체 분자, 융합 단백질 및 단백질 백신인

진핵 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, 포유동물 세포인 진핵 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, CHO 세포인 진핵 세포.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 LMM이 이러한 제1 LMM을 갖지 않은 세포와 비교 시 재조합 폴리펩티드의 증가된 생산 수율 또는 생산 속도를 제공하는 것인 진핵 세포.

청구항 18

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 LMM이 이러한 제1 LMM을 갖지 않은 세포와 비교 시 미스풀딩 되거나 또는 언풀딩된 재조합 폴리펩티드에 대한 적절하게 폴딩된 산물의 증가된 비를 제공하는 것인 진핵 세포.

청구항 19

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 세포를 관심 치료용 재조합 폴리펩티드의 생산에 사용하는 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2016년 5월 3일에 출원된 미국 가출원 번호 62/330973을 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본 원에 참조로 포함된다.

발명의 분야

[0004] 본 개시내용은 세포의 지질 대사 경로를 조정하고, 산물, 예를 들어, 재조합 단백질의 생산을 위하여 세포 및 세포주를 조작하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 재조합 치료용 단백질은 세포 발현 시스템, 예를 들어, 포유동물 세포 발현 시스템에서 흔히 발현된다. 2014년에, 시장 승인된 바이오 의약품의 총수는 212개였고, FDA에 의해 시장 승인된 치료용 산물의 56%가 포유동물 세

포주에서 생산된다. 그러나, 생산과 관련된 높은 비용은 세계 보건 비용을 증가시키는 원인이 된다.

[0006] 더욱이, 차세대 단백질 생물제제 (NGB), 예컨대 차세대 융합 단백질, 다량체성 당단백질, 또는 차세대 항체는 종종, 복잡하고/하거나 비-자연 구조를 가지며, 모노클로날 항체와 같은 분자보다 발현하기가 더 어려운 것으로 입증된다. 현재의 숙주 세포주는 NGB의 효율적인 합성 및 분비를 위한 경로를 진화시키지 않아, 상당히 감소된 성장과 낮은 생산성이 초래되고, 종종 불량한 산물 품질 속성을 갖는 산물이 초래된다. 따라서, 이들 NGB는 발현하기 어려운 것으로 간주되어, 생산성과 산물 품질이 임상 및 시장 요구를 충족시키기 못한다.

[0007] 따라서, 최종 산물 품질을 유지하면서도 재조합 생물학적 치료제를 신속하고 효율적이면서도 비용면에서 효과적으로 개발 및 생산해야 하는 필요성이 증가하고 있다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 부분적으로, 하나 이상의 지질 대사 경로의 성분의 과다발현에 의해 지질 대사 경로를 조정하면, 재조합 폴리펩티드 산물을 생산하는 세포의 생산성과 산물 품질이 증가된다는 발견 내용에 근거한다. 따라서, 예를 들어, 하나 이상의 지질 대사 경로를 조정함으로써 지질 대사를 조정하는 것을 이용하여, 보다 고 수율의 산물을 생산하고 개선된 품질의 산물을 생산하는 세포 및 무세포 시스템을 조작할 수 있다는 것이 입증된다. 중요하게도, 본 개시내용은 지질 대사와 연관된 둘 이상의 프로세스 또는 경로를 조정하는 포괄적인 조절제를 사용함으로써 지질 대사의 포괄적인 조절을 특징으로 하며, 이로 인해 다수의 하류 효과가 개선된 산물 생산 및 품질을 달성하게 한다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 재조합 산물 또는 차세대 생물제제 (예를 들어, 융합 단백질, 이중특이적 또는 다중-포맷 항체 분자, 다량체성 단백질, 및 글리코실화된 단백질)의 개선된 생산을 위하여, 및 이러한 산물을 생산하는데 더 효율적인 시스템 (예를 들어, 세포주 또는 무세포 시스템)의 개발을 위하여 특히 유용하다.

[0009] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 산물을 특정 세포에서 생산하는 방법을 특징으로 한다. 실시양태에서, 이러한 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포를 제공하고, 이러한 세포를, 예를 들어, 상기 변형에 의한 지질 대사의 조정에 적합한 조건 하에 배양하고, 그에 의해 산물을 생산하는 것을 포함한다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 무세포 시스템, 예를 들어, 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포 또는 세포주로부터 유래된 무세포 시스템을 제공하고; 이러한 무세포 시스템을, 산물의 생산에 적합한 조건 하에 놓아둠으로써 이러한 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 생산하는 것을 포함하는, 상기 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 무세포 시스템에서 생산하는 방법을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 무세포 시스템은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포 또는 세포주로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 무세포 시스템은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포 또는 세포주로부터의 하나 이상의 성분, 예를 들어, 소기관 또는 소기관의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 지질 대사 조정제 (LMM)를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하고, 여기서 상기 세포 또는 세포주는 LMM, 예를 들어, SREBF1, SREBF2, SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, SCD5, 또는 그의 기능적 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 LMM을 발현한다. 일부 실시양태에서, LMM은 생산된 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드 (NGB)의 생산, 예를 들어, 생산 수율과 생산 속도를 증가시키는 특징; 및 산물의 품질을 증가시키는 특징, 예를 들어, 응집을 감소시키는 특징, 글리코실화 불균질성을 감소시키는 특징, 단편화를 감소시키는 특징, 및 적절하게 폴딩된 산물 대 미스폴딩되거나 또는 언폴딩된 산물의 비를 증가시키는 특징으로 이루어진 군으로부터 선택된 무세포 시스템의 하나 이상의 특징을 변경시킨다.

[0011] 본원에 기재된 방법 또는 조성물 중 임의의 것을 사용하여 생산될 수 있는 산물의 예는 재조합 산물, 또는 적어도 하나의 부분 또는 모이어티가 유전 공학의 결과인 산물을 포함한다. 본원에 기재된 재조합 산물은 진단 또는 치료 목적에 유용할 수 있다. 한 실시양태에서, 산물은 폴리펩티드, 예컨대 항체 분자 (예를 들어, 이중특이적 또는 다중-포맷 항체 분자), 융합 단백질, 또는 단백질-접합체; 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA 분자); 또는 지질-캡슐화된 입자 (예를 들어, 엑소솜 또는 바이러스 유사 입자)를 포함한다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은, 예를 들어, 상업적 또는 치료적 용도로 다량으로 또는 충분한 품질로 생산하기 어려운 산물, 예컨대 차세대 생물제제 (예를 들어, 융합 단백질, 이중특이적 또는 다중-포맷 항체 분자, 다량체성 단백질, 및 글리코실화된 단백질)에 특히 유용할 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 산물을 생산하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 세포는 이러한 산물을 발현한다. 한 실시양태에서, 상기 세포는 본원에 기재된 산물, 예를 들어, 표 2 또는 3으로부터 선택된 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 산물의 부가의 예는 "산물"

이란 제목의 섹션에 기재된다.

[0012] 지질 대사를 조정하는 본원에 개시된 변형은 지질 대사 조정제 (LMM)의 발현을 증가 또는 감소시키거나, 또는 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시키는 작용제 또는 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 핵산, 예를 들어, LMM을 코딩하는 핵산, 또는 LMM의 발현을 억제 또는 감소시키는 억제성 핵산이다.

[0013] 한 실시양태에서, 상기 변형은 LMM의 발현을 증가시키고, LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 세포에서, LMM 또는 외인성 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 형성시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 이러한 형성은 지질 대사 조정제를 코딩하는 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 형성은 LMM을 코딩하는 내인성 핵산의 발현을 증가시키는 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 방법 및 조성물 중 임의의 것에 사용하기 적합한 LMM의 예는 "지질 대사의 조정" 및 "지질 대사 조정제"란 제목의 섹션에 추가로 기재된다.

[0014] 한 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 2개 이상의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 지질 대사를 조정하는 1개 이상의 제2 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 변형은 제2 LMM, 예를 들어, 제1 변형의 LMM과 상이한 LMM을 코딩하는 제2 외인성 핵산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 외인성 핵산과 제1 외인성 핵산은 동일한 핵산 분자 상에 배치된다. 한 실시양태에서, 제2 외인성 핵산과 제1 외인성 핵산은 상이한 핵산 분자 상에 배치된다. 한 실시양태에서, 제2 변형은 이러한 제2 변형을 갖지 않은 세포와 비교 시 산물의 증가된 생산 또는 개선된 품질을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 세포에서, 제2 LMM 또는 제2 외인성 LMM을 코딩하는 제2 외인성 핵산을 형성시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 이러한 형성은 제2 LMM을 코딩하는 제2 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 형성은 LMM을 코딩하는 내인성 핵산의 발현을 증가시키는 제2 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다.

[0015] 본원에 기재된 방법 또는 조성물 중 임의의 것에 의해 지질 대사를 조정하는 것은 하기 중 어느 하나 이상을 변경시키는 것, 예를 들어 증가 또는 감소시키는 것을 포함하거나 또는 그를 유발할 수 있다:

i) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 발현 (예를 들어, 전사 및/또는 번역);

ii) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 활성 (예를 들어, 효소적 활성);

iii) 세포에 존재하는 지질 (예를 들어, 인지질, 또는 콜레스테롤)의 양;

iv) 지질 뗏목의 양 또는 지질 뗏목 형성의 속도;

v) 세포 막 (예를 들어, 혈장 막, 소포 막, 또는 소기관 막)의 유동성, 침투성, 및/또는 두께;

vi) 포화 지질의 불포화 지질로의 전환 또는 불포화 지질의 포화 지질로의 전환;

vii) 포화 지질 또는 불포화 지질, 예를 들어, 단일불포화 지질의 양;

viii) ER 활성을 증가시키는 유리한 조성을 획득하기 위한 세포 내의 지질의 조성;

ix) ER (예를 들어, ER의 크기, ER 막 표면, 또는 ER을 구성하고/하거나 ER 내에 상주하는 단백질 및 지질의 양)의 확장;

x) 골지 (예를 들어, 골지의 수 및 크기, 골지 표면, 또는 골지 내에 상주하는 단백질 및 분자의 수 또는 양)의 확장;

xi) 분비 소포의 양 또는 분비 소포의 형성;

xii) 산물의 분비 양 또는 분비 속도;

xiii) 중식 능력, 예를 들어, 중식 속도;

xiv) 배양물 생육력 또는 세포 생존율;

xv) 막 수용체의 활성화;

xvi) 언폴딩된 단백질 반응 (UPR);

- [0032] xvii) 산물의 생산 수율 또는 생산 속도;
- [0033] xviii) 산물 품질 (예를 들어, 응집, 글리코실화 불균질성, 단편화, 적절한 폴딩 또는 어셈블리, 번역 후 변형, 또는 디슬피드 결합 스크램블링); 및/또는
- [0034] xix) 세포 성장/증식 또는 세포 특이적 성장 속도.
- [0035] 이러한 실시양태에서, 세포의 전술된 특징들 중 임의의 것의 증가 또는 감소는 변형을 갖지 않은 세포와의 비교에 의해 결정될 수 있다.
- [0036] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 상기 변형을 갖지 않은 세포와 비교 시 산물의 생산을 증가시켜 준다. 생산 증가는 세포에 의해 생산된 산물의 증가된 양, 수율 또는 수량 및/또는 증가된 생산 속도로써 특징지울 수 있으며, 여기서 생산 속도는 시간 경과에 따른 산물의 양과 동일하다. 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 생산은, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에 의한 생산과 비교 시 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 85%, 또는 100%, 또는 그 초과만큼; 또는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에 의한 생산과 비교 시 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배만큼 증가된다.
- [0037] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 또한, 상기 변형을 갖지 않은 세포와 비교 시 개선된 산물의 품질 (즉, 산물 품질)을 유발할 수 있다. 산물의 품질 (즉, 산물 품질)에 있어서의 개선은 하기 중 하나 이상으로써 특징지울 수 있다: 응집 (예를 들어, 응집체 또는 응집 상의 감소); 적절한 폴딩 또는 어셈블리 (예를 들어, 미스폴딩되거나 또는 언폴딩된 산물; 또는 부분적으로 어셈블리되거나 또는 디스어셈블리된 산물의 감소); 번역 후 변형 (예를 들어, 글리코실화 불균질성, 더 높은 백분율의 목적하거나 또는 미리 결정된 번역 후 변형 상의 증가 또는 감소); 단편화 (예를 들어, 단편화 상의 감소); 디슬피드 결합 스크램블링 (예를 들어, 디슬피드 결합 스크램블링에 기인한 원하지 않는 이소형 또는 구조의 감소). 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 품질은, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에 의한 생산과 비교 시, 예를 들어, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 85%, 또는 100%만큼 증가되거나; 또는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에 의해 생산된 산물의 품질과 비교 시 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배만큼 증가된다.
- [0038] 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 산물을 생산하는 방법은 ER 프로세싱 능력 (ER 확장) 또는 분비를 개선시키는 변형을 세포 내로 도입하는 단계; 상기 세포, 또는 세포의 자손으로부터, 또는 상기 세포, 또는 세포의 자손에 의해 컨디셔닝된 배지로부터 산물을 수득하는 단계; 이러한 산물을 적어도 하나의 세포성 또는 배지 성분으로부터 분리하는 단계; 및/또는, 예를 들어, 활성을 대해 또는 구조적 모이어티의 존재에 대해 상기 산물을 분석하는 단계를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 부가 단계를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 PDI, BiP, ERO, 또는 XBP1을 코딩하는 핵산을 도입함으로써 ER 프로세싱 능력 (또는 ER 확장)을 개선시키는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 SNARE 기구 또는 분비 경로에 수반되는 다른 기구를 조정함으로써, 예를 들어, SNARE 성분을 코딩하는 핵산을 도입함으로써, 분비 능력 또는 분비 속도를 개선시키기 위한 부가의 단계를 추가로 포함한다.
- [0039] 지질 대사의 조정
- [0040] 본 개시내용은 지질 대사를 조정하기 위한 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 변형은 신생 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 포화 또는 탈포화, 지방산 신장, 및 인지질 생합성을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 지질 대사 경로의 조정, 예를 들어, 증가를 유발한다.
- [0041] 지질 대사를 조정하는데 적합한 본원에 기재된 변형은 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시키는 외인성 핵산; 또는 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시키는 LMM, LMM 폴리펩티드, 또는 다른 분자의 도입을 포함한다. 본 개시내용은, 예를 들어, 지질 대사와 연관된 성분의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시킴으로써 지질 대사를 조정하기 위한 지질 대사 조절제의 용도를 특징으로 한다. 실시양태에서, LMM이 본원에 기재된 포괄적인 조절제이다.
- [0042] 한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은, 예를 들어, 포괄적인 조절제의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시킴으로써 지질 대사의 포괄적인 조절을 유발한다. 이러한 포괄적인 조절제는 하나 이상의 경로에서 충분히 상류에 있는 문자이므로, 다수의 하류 효과에 영향을 미칠 수 있으며, 예를 들어, 상이한 지질 대사 프로세스 또는 경로의 2개 이상, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 그 초과의 성분의 발현 또는 활성을 증가시킬 수

있다. 지질 대사 프로세스 또는 경로의 성분은 지질 분자의 합성, 분해, 신장, 또는 구조적 입체형태에 수반되는 효소, 보조인자, 또는 다른 분자를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0043] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 포괄적인 조절체는 지질 대사의 성분, 예를 들어, 표 1로부터 선택된 지질 대사 유전자 산물의 발현을 상향조절하는, 예를 들어, 증가시키는 전사 인자이다. 한 예로서, 포괄적인 조절체는 둘 이상의 지질 관련 유전자 산물, 예를 들어, 지질 생합성에 수반되는 효소와 지질 분자의 포화 수준에 수반되는 효소의 발현을 증가시킨다.

[0044] 본원에 기재된 방법 또는 조성을 중 임의의 것에서, LMM은 하기 중 임의의 것을 포함한다: 지질 대사의 포괄적인 조절체, 예를 들어, 지질 대사 유전자를 상향조절하는 전사 인자, 또는 신생 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 포화 또는 탈포화, 지방산 신장, 또는 인지질 생합성 경로에서 일정 역할을 하는 성분(예를 들어, 효소, 보조인자, 또는 분자).

[0045] 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체는 지질 대사 유전자 산물의 발현을 매개하는, 예를 들어, 상향조절하는 전사 조절체, 예를 들어, 전사 인자를 포함한다. 지질 대사 유전자 산물의 예는 지질 대사의 포괄적인 조절체, 예를 들어, 지질 대사 유전자를 상향조절하는 전사 인자인 표 1에 제공된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1, 또는 SREBF2, 또는 그의 기능적 단편 또는 유사체를 포함한다. 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체는 SREBF1의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1 또는 34, 또는 그의 기능적 단편, 예를 들어, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 또는 서열식별번호: 36과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 34, 또는 그의 기능적 단편, 예를 들어, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 또는 서열식별번호: 36과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 서열식별번호: 2 또는 32로부터 선택된 핵산 서열, 또는 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 또는 서열식별번호: 36을 코딩하는 핵산 중 임의의 것과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0047] 한 실시양태에서, LMM은 SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 또는 SCD5, 또는 그의 기능적 단편 또는 유사체를 포함한다. 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체는 SCD1의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 3, 또는 그의 기능적 단편과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SCD1의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 3, 또는 그의 기능적 단편과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 서열식별번호: 4로부터 선택된 핵산 서열 중 임의의 것과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0048] 한 실시양태에서, LMM은 표 1에 제공된 성분 또는 그의 기능적 단편 중 임의의 것을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 표 1에 제공된 성분 또는 그의 기능적 단편 중 임의의 것의 아미노산 서열과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 표 1에 제공된 성분 또는 그의 기능적 단편 중 임의의 것의 아미노산 서열과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 표 1에 제공된 성분 또는 그의 기능적 단편 중 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열과의 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0049] 한 실시양태에서, 상기 변형은 지질 대사 유전자 산물, 예를 들어, 표 1로부터 선택된 지질 대사 유전자 산물을 코딩하는 핵산의 발현을 증가시키는 시스 또는 트랜스 조절 요소를 포함한다.

[0050] 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 플라스미드 또는 벡터를 포함한다.

[0051] 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 형질감염(예를 들어, 전기천공), 형질도입, 또는 본원에 기재된 임의의 다른 전달 방법에 의해 세포 내로 도입된다.

[0052] 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 세포의 염색체 게놈 내로 통합된다. 한 실시양태에서, LMM은 안정적으로 발현된다.

[0053] 한 실시양태에서, 지질 대사 조정체를 코딩하는 핵산은 세포의 염색체 게놈 내로 통합되지 않는다. 한 실시양태에서, LMM은 일시적으로 발현된다.

[0054] 산물

본원에 기재된 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 단백질; 핵산 분자, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자; 다량 체성 단백질 또는 복합체; 지질-캡슐화된 입자, 예를 들어, 바이러스 유사 입자, 소포, 또는 엑소솜; 또는 다른 분자, 예를 들어, 지질을 포함한다. 실시양태에서, 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드이다. 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 단백질; 또는 복잡하고/하거나 비-자연 구조를 갖는 단백질, 예컨대 차세대 생물제제, 예를 들어, 이중특이적 항체 분자, 융합 단백질, 또는 글리코실화된 단백질을 발현하기 어려울 수 있다.

[0056] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에서, 산물을 생산하는 방법은 이러한 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 세포 내로 도입하는 것을 추가로 포함한다.

[0057] 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포를 제공한 후에 도입된다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 세포를, 예를 들어, 상기 변형에 의한 지질 대사의 조정에 적합한 조건 하에 배양한 후에 도입된다.

[0058] 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포를 제공하기 이전에 도입된다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 세포를, 예를 들어, 상기 변형에 의한 지질 대사의 조정에 적합한 조건 하에 배양하기 이전에 도입된다.

[0059] 본원에 기재된 조성물, 제제, 또는 방법 중 임의의 것에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드 또는 항체 분자, 예를 들어, 항체 또는 그의 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 이중특이적 항체 분자, 예를 들어, BiTE (이중특이적 T 세포 인케이저), DART (이중 친화도 재표적화 또는 재유도 T 세포)이다.

[0060] 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 표 2 또는 3으로부터 선택된다.

[0061] 실시양태에서, 산물은 세포에 의해 안정적으로 발현된다. 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 세포의 염색체 게놈 내로 통합된다. 또 다른 한편으론, 산물은 세포에 의해 일시적으로 발현된다. 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 세포의 염색체 게놈 내로 통합되지 않는다.

[0062] 숙주 세포

[0063] 본원에는 본원에 기재된 산물을 생산하기 위한 세포 및 이러한 세포를 조작하는 방법이 제공된다.

[0064] 본원에 기재된 조성물, 제제, 또는 방법 중 임의의 것에서, 세포는 진핵 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 또는 식물 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 설치류 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. CHO 세포의 예는 CHO-K1, CHOK1SV, 포텔리젠틱(Potelligent) CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, 익시드(Exceed) (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, 또는 CHO 유래 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0065] 본원에 기재된 조성물, 제제, 또는 방법 중 임의의 것에서, 세포는 HeLa, HEK293, H9, HepG2, MCF7, Jurkat(Jurkat), NIH3T3, PC12, PER.C6, BHK, VERO, SP2/0, NS0, YB2/0, EB66, C127, L 세포, COS, 예를 들어, COS1 및 COS7, QC1-3, CHO-K1, CHOK1SV, 포텔리젠틱 CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, 익시드 (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, 및 CHOZN으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0066] 한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 이외의 진핵 세포, 예를 들어, 곤충, 식물, 효모, 또는 조류 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 원핵 세포이다.

[0067] 한 측면에서, 본 개시내용은 지질 대사 조정제를 코딩하는 외인성 핵산을 특정 세포 내로 도입하거나 또는 이러한 세포에서 형성시킴으로써, 증가된 생산 능력 및/또는 개선된 생산 품질을 갖는 세포를 조작하는 것을 포함하는, 증가된 생산 능력 및/또는 개선된 생산 품질을 갖는 (예를 들어, 하나 이상의 개선된 산물을 품질을 수반한 산물을 생산하는) 세포를 조작하는 방법을 특징으로 한다. 실시양태에서, 지질 대사 조정제를 코딩하는 외인성 핵산은 형질감염, 형질도입, 예를 들어, 바이러스 형질도입, 전기천공, 뉴클레오팩션, 또는 리포팩션에 의해 세포 내로 도입된다. 실시양태에서, 지질 대사 조정제를 코딩하는 외인성 핵산은 세포의 염색체 게놈 내로 통합된다. 실시양태에서, 상기 방법은 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 세포 내로 도입하는 것을 추가로 포함한다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 도입

하기에 앞서 도입된다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 도입한 후에 도입된다.

[0068] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포를 제공하고, 이러한 세포 새로 본원에 기재된 LMM을 도입함으로써, 예를 들어, LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 도입함으로써 생산된 세포를 특징으로 한다.

[0069] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 특징으로 한다.

[0070] 한 측면에서, 본 개시내용은 LMM을 생산하도록 조작된 세포를 특징으로 하며, 여기서 이러한 LMM은 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 차세대 생물제제 (NGB)의 발현을 조정한다. 한 실시양태에서, 상기 세포는 CHO 세포이다.

[0071] 한 측면에서, 본 개시내용은 LMM을 생산하도록 조작된 CHO 세포를 특징으로 하며, 여기서 이러한 LMM은 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 차세대 생물제제 (NGB)의 발현을 조정한다.

[0072] 한 측면에서, 본 개시내용은 LMM 및 NGB를 발현하도록 조작된 CHO 세포를 특징으로 하며, 여기서 상기 집단은 NGB의 고 수준 발현을 위하여 선택되었다.

[0073] 한 측면에서, 본 개시내용은 LMM을 발현하도록 조작된 CHO 세포를 특징으로 하며, 여기서 LMM은 CHO 세포의 하나 이상의 특징을 조정하고, 이와 같이 조작된 CHO 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특징의 조정에 근거하여 선택된다:

i) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 발현 (예를 들어, 전사 및/또는 번역);

ii) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 활성 (예를 들어, 효소적 활성);

iii) 세포에 존재하는 지질 (예를 들어, 인지질, 또는 콜레스테롤)의 양;

iv) 지질 뗏목의 양 또는 지질 뗏목 형성의 속도;

v) 세포 막 (예를 들어, 혈장 막, 소포 막, 또는 소기관 막)의 유동성, 침투성, 및/또는 두께;

vi) 포화 지질의 불포화 지질로의 전환 또는 불포화 지질의 포화 지질로의 전환;

vii) 포화 지질 또는 불포화 지질, 예를 들어, 단일불포화 지질의 양;

viii) ER 활성을 증가시키는 유리한 조성을 획득하기 위한 세포 내의 지질의 조성;

ix) ER (예를 들어, ER의 크기, ER 막 표면, 또는 ER을 구성하고/하거나 ER 내에 상주하는 단백질 및 지질의 양)의 확장;

x) 골지 (예를 들어, 골지의 수 및 크기, 골지 표면, 또는 골지 내에 상주하는 단백질 및 분자의 수 또는 양)의 확장;

xi) 분비 소포의 양 또는 분비 소포의 형성;

xii) 산물의 분비 양 또는 분비 속도;

xiii) 중식 능력, 예를 들어, 중식 속도;

xiv) 배양물 생육력 또는 세포 생존율;

xv) 막 수용체의 활성화;

xvi) 언폴딩된 단백질 반응 (UPR);

xvii) 산물의 생산 수율 또는 생산 속도;

xviii) 산물 품질 (예를 들어, 응집, 글리코실화 불균질성, 단편화, 적절한 폴딩 또는 어셈블리, 번역 후 변형, 또는 디슬퍼드 결합 스크램블링); 및/또는

xix) 세포 성장/증식 또는 세포 특이적 성장 속도.

[0093] 본원에 기재된 방법 또는 세포, 예를 들어, 조작된 세포 중 임의의 것에서, 세포는 SREBF1, SREBF2, SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 및 SCD5, 또는 그의 기능적 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 LMM을 발현하거나 또는 그를 포함한다.

- [0094] 본원에 기재된 방법 또는 세포, 예를 들어, 조작된 세포 중 임의의 것에서, 세포는 산물, 예를 들어, 재조합 산물, 예를 들어, 이중특이적 항체, 융합 단백질, 또는 글리코실화된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 차세대 생물제제를 발현하거나 또는 그를 포함한다.
- [0095] 본원에 기재된 방법 또는 세포, 예를 들어, 조작된 세포 중 임의의 것에서, 세포는 CHO-K1, CHOK1SV, 포텔리젠틱 CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, 익시드 (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, 또는 CHO 유래 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CHO 세포이다.
- [0096] 조성물 및 제제
- [0097] 한 측면에서, 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 방법에 의해 만들어진 본원에 기재된 산물의 제제를 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이러한 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 적어도 70, 80, 90, 95, 98 또는 99%가 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된다. 한 실시양태에서, 상기 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 응집된다. 한 실시양태에서, 상기 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 산물의 단편이다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 방법에 의해 만들어진 폴리펩티드, 예를 들어, 표 2 또는 표 3의 폴리펩티드의 제제를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법에 사용된 세포는 CHOK1, CHOK1SV, 포텔리젠틱 CHOK1SV, CHO GS 녹아웃, CHOK1SV GS-KO, CHOS, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, 또는 CHO 유래 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CHO 세포이다.
- [0099] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 세포, 예를 들어, 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포와, 이러한 세포에 의해 생산된 산물을 포함하는 혼합물을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물은 산물의 중량 또는 수를 기준으로, 상기 변형을 수반하지 않는 경우에 관찰되는 것보다 더 높은 농도, 예를 들어, 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 또는 30% 더 높은 농도 하의 산물을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 응집된다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 산물의 단편이다. 일부 실시양태에서, 산물은 재조합 폴리펩티드, 예를 들어, 표 2 또는 표 3의 재조합 폴리펩티드이다.
- [0100] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 세포의 배양에 의해 컨디셔닝된 배지의 제제를 특징으로 하며, 여기서 상기 세포는 지질 대사를 조정하는 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 산물은 중량 또는 수를 기준으로, 상기 변형을 수반하지 않는 경우에 관찰되는 것보다 더 높은 농도, 예를 들어, 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 또는 30% 더 높은 농도로 상기 제제에 존재한다. 한 실시양태에서, 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된다. 한 실시양태에서, 상기 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 응집된다. 한 실시양태에서, 상기 제제 중의 산물의 중량 또는 수를 기준으로 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 산물의 단편이다. 일부 실시양태에서, 산물은 재조합 폴리펩티드, 예를 들어, 표 2 또는 표 3의 재조합 폴리펩티드이다.
- [0101] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 등가의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기재된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히, 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 또한, 물질, 방법, 및 예는 단지 예시적이고 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 표제, 소제목 또는 넘버링되거나 또는 문자가 있는 요소, 예를 들어, (a), (b), (i) 등은 단지 읽기 쉽게 하기 위해 제시된 것이다. 본 명세서에서 표제 또는 넘버링되거나 또는 문자가 있는 요소를 사용하더라도 단계 또는 요소가 알파벳순으로 수행될 필요가 없거나 또는 단계 또는 요소가 반드시 서로 분리되어 있어야 할 필요는 없다. 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 이점은 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0102] 도 1은 대조군 발현 벡터 (Ctrl)로 별도로 형질감염되거나, 또는 그의 C-말단에서 V5 에피토프 태그와 융합된 SCD1 (SCD1-V5) 또는 그의 C-말단에서 V5 에피토프 태그와 융합된 SREBF1 (SREBF1-V5)을 코딩하는 것으로 별도로 형질감염된, F1p-In CHO 조작된 세포 풀의 수득된 일련의 면역형광 영상이다. 상기 풀은 항-V5 1차 항체 및

2차 항-마우스 FITC 항체 (중간 영상) 뿐만 아니라 DAPI (왼쪽 영상)로 영상화하였고, 왼쪽 영상과 중간 영상 둘 다의 오버레이 (오른쪽 칼럼)가 제시된다. 영상은 레이카(Leica) 공초점 현미경을 사용하여 생성시켰다.

도 2는 대조군 발현 벡터 (Ctrl)로 형질감염되거나, 또는 SCD1-V5 또는 SREBF1-V5를 코딩하는 것으로 형질감염된, CHOK1SV 글루타민 신테타제 녹아웃 (GS-KO) 세포 풀의 수득된 일련의 면역형광 영상을 도시한다. 상기 풀은 항-V5 1차 및 항-마우스 2차 TRITC 항체 (중간 영상) 뿐만 아니라 DAPI (왼쪽 영상)로 영상화하였고, 왼쪽 영상과 중간 영상 둘 다의 오버레이 (오른쪽 칼럼)가 또한 제시된다. 영상은 레이카 공초점 현미경을 사용하여 생성시켰다.

도 3a, 3b, 및 3c는 재조합 Fc 융합 단백질 (Fc 융합 단백질 또는 FP로서 지칭되기도 함) (도 3a) 또는 eGFP (도 3b)를 발현하기 어려운 플라스미드로 일시적 형질감염시킨 후 CHO Flp-In™ 세포 풀에서 발현된 외인성 SCD1-V5 및 SREBF1-V5의 결정을 도시한다. 도 3c는 형질감염되지 않고 안정적으로 발현하는 CHO Flp-In™ 세포 풀에서 발현된 외인성 V5-태그부착된 SCD1 및 SREBF1의 결정을 도시한다. Fc 융합 단백질로 전기천공한 후 96시간에 수득된 세포 용해물 뿐만 아니라 표시된 V5-태그부착된 지질 대사 조정제 (LMM), SCD1 또는 SREBF1을 단독으로 발현하는 세포 풀 상에서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 항-V5 1차 항체 및 항-마우스 HRP 접합된 2차 항체를 사용하여 V5-태그부착된 LMM 및 항-β-액틴 또는 항 L7a의 발현을 검출한 다음 (표시된 바와 같음), 항-마우스 및 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체 각각과의 노출을, LMM 검출을 위한 부하 대조군으로서 사용하였다.

도 4는 바이셀(ViCell) 세포 계수기를 사용하여 결정된 바와 같이, eGFP-함유 구축물 JB3.3으로의 형질감염 후 LMM SCD1-V5 및 SREBF1-V5를 안정적으로 과다발현하도록 조작된 CHO Flp-In 세포 풀의 생육성 세포 농도를 도시한다 (n=2).

도 5a 및 5b는 대조군, SCD1-V5, SREBF1-V5 및 SREBF410-V5 과다발현성 CHOK1SV GS-KO 세포 풀을 eGFP 함유 플라스미드로 형질감염시킨 후 24, 48, 72, 및 96시간 하에서의 세포 배양 농도 및 배양물 생육력을 도시한다. 도 5a는 세포 농도를 도시한다. 하부 칼럼은 생육성 세포 농도를 나타내는 반면, 전체 칼럼은 세포의 총 농도를 나타내고; 하부 오차 막대는 생육성 세포의 표준 편차를 나타내는 반면, 상부 오차 막대는 총 세포 농도의 표준 편차를 나타낸다. 도 5b는 도 5a에 나타낸 데이터에 근거한 배양물 생육력을 도시한다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 특별한 시점의 대조군 값과 비교한 양측 T-검정을 이용하여 통계적 유의성을 계산하였다: *양측 T-검정을 이용한 생육성 세포 농도 유의성 [p<0.05]. [†]양측 T-검정을 이용한 총 세포 농도 유의성 [p<0.05] (n=3).

도 6a, 6b 및 6c는 FACS칼리버(FACSCalibur) 기기 [BD 바이오사이언스(Biosciences)]를 사용하여 생성된 유동 세포 계수 데이터를 도시한다. eGFP 함유 플라스미드로 형질감염시킨 후 24, 48, 72 및 96시간 하에서 중앙 (도 6a), 기하 평균 (도 6b) 및 산술 평균 (도 6c) 값을 획득하였으며, 여기서 샘플은 대조군, SCD1-V5 또는 SREBF1-V5 과다발현성 Flp-In CHO 세포 풀로부터 채집하였다 (n=2).

도 7a, 7b 및 7c는 FACS칼리버 기기 (BD 바이오사이언스)를 사용하여 생성된 유동 세포 계수 데이터를 도시한다. eGFP 함유 플라스미드로 형질감염시킨 후 24, 48, 72 및 96시간 하에서 중앙 (도 7a), 기하 평균 (도 7b) 값을 획득하였으며, 여기서 샘플은 대조군, SCD1-V5, SREBF1-V5 또는 SREBF410-V5 과다발현성 CHOK1SV GS-KO 유래 세포로부터 채집하였다. 도 7c는 측정된 산술 평균 형광에 총 세포 농도 ($\times 10^6 / \text{ml}$)를 곱함으로써 계산된 바와 같은 배양물 1 ml당 총 형광을 도시한다. 오차 막대는 표준 편차를 표시한다. 특별한 시점의 대조군 값과 비교한 양측 T-검정을 이용하여 통계적 유의성을 계산하였다 (n=3). *는 통계상 유의적인 값을 표시한다 [p<0.05]. 데이터는 FACS칼리버 (BD 바이오사이언스)를 사용하여 생성되었다.

도 8a 및 8b는 항체 A 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 구축물의 일시적인 형질감염 후 SCD1-V5 및 SREBF1-V5를 안정적으로 과다발현하는 CHO Flp-In 세포에서의 항체 A 생산을 도시한다. 도 8a는 항-중쇄 1차 항체 및 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체를 사용함으로써 검출된 바와 같이, 항체 A에 상응하는 밴드를 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 8b는 단백질 A HPLC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 세포 풀로부터 생성된 값과 비교 시 LMM 조작된 세포 풀에서의 항체 생산에 있어서의 평균 변화 배수를 도시한다.

도 9a 및 9b는 Fc 융합 단백질을 코딩하는 핵산 구축물의 일시적인 형질감염 후 SCD1-V5 및 SREBF1-V5를 안정적으로 과다발현하는 CHO Flp-In 세포 풀에서의 상기 Fc 융합 단백질의 생산을 도시한다. 도 9a는 항-중쇄 1차 항체 및 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체를 사용함으로써 검출된 바와 같은 Fc 융합 단백질을 대표하는 밴드를 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 9b는 단백질 A HPLC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 세포 풀로부터 생성된 값과

비교 시 LMM 조작된 세포 풀에서의 Fc 융합 단백질 생산에 있어서의 평균 변화 배수를 도시한다.

도 10a 및 10b는 형질감염 후 48, 72 및 96 h 하에서 항체 A 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 구축물의 일시적인 형질감염 후 SCD1-V5, SREBF1-V5 및 SREBF410-V5를 안정적으로 과다발현하는 CHO GS KO 세포 풀에서, 및 대조군의 기능없는(Nu11) CHOK1SV GS-KO 세포 풀 (LMM 작용제 없이, 선별 GS 유전자만을 발현하는 비어있는 플라스미드를 사용하여 생산된 세포의 대조군 풀)에서 잘 발현된 항체 A의 생산을 도시한다. 도 10a는 항-중쇄 1차 항체 및 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체를 사용함으로써 검출된 바와 같은 항체 A를 대표하는 밴드를 보여주는 웨스턴 블로트이다. 도 10b는 단백질 A HPLC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 세포 풀에서 생성된 값과 비교 시 LMM 조작된 세포 풀에서의 항체 생산에 있어서의 평균 변화 배수를 도시한다.

도 11a 및 11b는 Fc 융합 단백질을 코딩하는 핵산 구축물의 일시적인 형질감염 후 SCD1-V5 및 SREBF1-V5를 안정적으로 과다발현하는 CHOK1SV GS-KO 세포 풀에서 또는 대조군 세포 풀에서 Fc 융합 단백질을 발현하기 어려운 상대적 생산을 도시한다. 도 11a는 항-중쇄 1차 항체를 사용한 다음, 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체와 함께 노출시킴으로써 검출된 바와 같은, 일시적으로 생산된 융합 단백질의 웨스턴 블로트를 도시한다. 도 11b는 단백질 A HPLC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 세포 풀과 비교 시 LMM 조작된 세포 풀에서의 Fc 융합 단백질 생산에 있어서의 평균 변화 배수를 도시한다.

도 12a 및 12b는 대조군 (비어있는), SCD1-V5, SREBF1-V5 또는 SREBF410-V5 유전자 중 하나를 함유하는 플라스미드 구축물로 일시적으로 형질감염시킨, 항체 A를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주로부터 48 및 72시간 후에 수거된 상등액으로부터 항체 A 생산의 분석을 도시한다. 도 12a는 상기 세포로부터의 상등액의 웨스턴 블로트를 도시하고; 항체 A는 항-중쇄 1차 항체를 사용한 다음 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체와 함께 노출시킴으로써 검출되었다. 도 12b는 밴드가 형질감염 후 168시간 하에 상등액에 존재하는 항체 A의 상대적 수준을 나타내는 쿠마시(Coomassie) 분석을 도시한다.

도 13은 대조군 (비어있는), SCD1-V5, SREBF1-V5 또는 SREBF410-V5 유전자 중 하나를 함유하는 플라스미드 구축물로 일시적으로 형질감염시킨, 항체 A를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주로부터 48, 72, 96 및 144시간 후에 수거된 상등액으로부터 항체 A 생산의 분석을 도시한 것이며, 여기서 단백질 A 옥텟(Octet) 분석을 사용하여 용적 항체 농도를 결정하였다 (n=2).

도 14는 대조군 (비어있는), SCD1-V5, SREBF1-V5 또는 SREBF410-V5 유전자 중 하나를 함유하는 플라스미드 구축물로 일시적으로 형질감염시킨, 항체 A를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주로부터 48, 72, 96 및 144시간 후에 수거된 상등액 샘플로부터 FC 융합 단백질의 분석을 도시한 것이며, 여기서 생육성 세포 수 및 단백질 A 역가 측정을 사용하여 FC 융합 단백질의 특이적 생산성을 결정하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다 (n=3).

도 15a 및 15b는 대조군, SCD1-V5 또는 SREBF1-V5 함유 벡터로 안정적으로 통합되고 연속해서 항체 A 구축물로 안정적으로 통합된 CHO 세포 풀로부터 48, 72, 96 및 144시간 후에 수거된 상등액 샘플로부터 항체 A 생산의 분석을 도시한다. 도 15a는 용적 항체 농도를 도시한 반면, 도 15b는 항체 A의 특이적 생산성을 도시한다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다 (n=3).

도 16a 및 16b는 대조군, SCD1-V5, SREBF1-V5 또는 SREBF410-V5 함유 벡터로 안정적으로 통합되고 연속해서 FC 융합 단백질 구축물로 안정적으로 통합된 CHO 세포 풀로부터 48, 72, 96 및 144시간 후에 수거된 상등액 샘플로부터 FC 융합 단백질 생산의 분석을 도시한다. 도 16a는 용적 FC 융합 단백질 농도를 도시한 반면, 도 16b는 FC 융합 단백질의 특이적 생산성을 도시한다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다 (n=3).

도 17a는 형질감염 후 48 및 96 h 하에 이뮤노시토카인 및 LMM 없음 (대조군), SCD1, SREBF1 또는 SREBF411 유전자의 발현에 적절한 유전자를 코딩하는 핵산 구축물의 일시적인 형질감염 후 CHO GS KO 세포로부터의 이뮤노시토카인 발현의 웨스턴 분석을 도시한다. 상등액 샘플을 감소시키고, 항-중쇄 1차 항체를 사용한 다음 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체에 노출시킴으로써 존재하는 밴드를 검출하였다. 하부 밴드는 천연 중쇄 항체를 나타내는 반면, 상부 밴드는 시토카인과 융합된 중쇄 분자를 표시한다. 도 17b는 형질감염 후 96시간에 수득된 샘플의 상대적 이뮤노시토카인 존재량을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 현재 및 차세대 생물제제 둘 다가 환자에게 치료 효능을 지속적으로 제공함에 따라, 치료용으로 높은 수준의 품질을 갖는 다양한 차세대 생물학적 산물에 대한 수요 뿐만 아니라 생산 세포주의 효율적인 개발 및 효율적인 생산 수단이 단계적으로 확대될 것이다. 더욱이, 많은 차세대 생물제제가 관련 기술분야에 공지된 통상적인 발현

기술을 사용해서는 통상적인 세포주에서 발현 및 생산되기가 어렵다. 현재의 방법은 이를 산물을 다량으로 생산하고 임상용에 필요한 높은 수준의 품질로 생산하는데 충분하지 않다. 따라서, 본 개시내용은 현재의 생산방법으로부터 수득된 수율 및 품질과 비교 시 개선된 품질을 수반한 산물, 예를 들어, 차세대 생물제제를 더 높은 수율로 수득하기 위한 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 또한, 재조합 산물을 생산하기 위해 현재 사용되고 있는 세포 발현 시스템과 비교 시 개선된 생산성, 산물 품질, 강건함, 및/또는 배양물 생육력을 수반한 세포 또는 세포주를 조작하는데 유용하다.

[0104] 정의

[0105] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 등가의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 바람직한 물질 및 방법이 본원에 기재된다. 본 발명을 설명하고 청구하는데 있어서, 그것이 정의되는 방법에 따라서 다음 용어가 사용될 것이며, 여기서 특정 정의가 제공된다.

[0106] 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특별한 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0107] 단수 형태는 그 대상물의 하나 또는 둘 이상 (즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 한 예로서, "세포"는 하나의 세포 또는 둘 이상의 세포를 의미할 수 있다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같은 "지질 대사 경로의 성분"은 직접적 또는 간접적으로, 지질을 합성하거나, 지질을 분해하거나, 지질을 하나의 지질 종에서 또 다른 지질 종으로 전환시키거나, 또는 지질을 변형시키는 분자, 폴리펩티드, 또는 효소를 지칭한다. 한 실시양태에서, 상기 성분은 효소 기질, 효소 반응 산물, 또는 효소 보조인자일 수 있다. 한 실시양태에서, 지질 대사 경로의 성분은 LMM이다. 한 실시양태에서, 지질 대사 경로의 성분이 표 1에 제공된다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같은 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 내부에서 자연적으로 생산되거나 또는 그로부터의 임의의 물질을 지칭한다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부에서 생산되거나 또는 그 내로 도입된 임의의 물질을 지칭한다. 따라서, "외인성 핵산"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부에서 생산되거나 또는 그 내로 도입되는 핵산을 지칭한다. 실시양태에서, 외인성 핵산의 서열은 이러한 외인성 핵산이 도입되는 유기체, 세포, 조직, 또는 시스템 내부에서 자연적으로 생산되지 않거나, 또는 자연적으로 발견되지 않을 수 있다. 실시양태에서, 비-자연적으로 발생하는 산물, 또는 비-자연적으로 발생하는 부분을 함유하는 산물이 본원에 기재된 숙주 세포와 관련해서 외인성 물질이다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같은 "형성하는 것"은 세포 내로 도입되거나, 세포 내에서 합성되거나, 또는 세포 내에 위치하는 LMM 또는 외인성 LMM을 코딩하는 핵산을 유발하는 임의의 다른 프로세스를 지칭한다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같은 "이종"은 상이한 종으로부터의 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 내로 도입될 때, 하나의 종으로부터의 임의의 물질을 지칭한다. 실시양태에서, 이종 물질은 또한, 하나 또는 다수의 종으로부터의 부분 또는 비-자연적으로 발생하는 부분을 포함하는 물질을 포함한다. 한 예로서, 핵산이 융합 단백질을 코딩하며, 여기서 융합 단백질의 일부분이 인간이고, 융합 단백질의 일부분이 박테리아이며, 융합 단백질의 일부분이 비-자연적으로 발생하며, 상기 핵산이 인간 세포 내로 도입되는 실시양태에서, 상기 핵산은 이종 핵산이다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같은 "지질 대사 경로"는 지질 또는 지질 관련 분자의 합성, 지질 또는 지질 관련 분자의 신장, 지질 또는 지질 관련 분자의 분해, 지질 또는 지질 관련 분자의 막 내로의 혼입, 지질 또는 지질 관련 분자의 포화 상태 (예를 들어, 포화되거나 또는 불포화된다), 또는 지질 또는 지질 관련 분자의 화학적 구조의 전환 또는 변형 (예를 들어, 재에스테르화)과 연관된 프로세스를 지칭한다. 한 실시양태에서, 지질 대사 경로는 지질 합성, 지질 신장, 지질 분해, 막 조성 또는 유동성 상의 변화, 지질 뗏목의 형성 또는 조정, 또는 지질의 변형 또는 전환 (예를 들어, 지질의 포화 또는 탈포화, 또는 지질의 재에스테르화)을 유발한다. 지질 대사 경로의 예는 신생 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 포화, 지방산 탈포화, 지방산 신장, 및 인지질 생합성, 및 언폴딩된 단백질 반응을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같은 "지질 대사 조정제" 또는 "LMM"은 하기 중 하나 이상을 조정하는, 예를 들어, 증가 또는 감소시키는 분자, 유전자 산물, 폴리펩티드, 또는 효소를 지칭한다: 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 발현

(예를 들어, 전사 또는 번역); 지질 대사 경로에 수반되는 성분, 예를 들어, 유전자 산물의 활성 (예를 들어, 효소적 활성); 세포에 존재하는 지질의 수준 또는 양; 지질 띻목의 수준 또는 양 또는 지질 띻목 형성의 속도; 세포 막, 예를 들어, 혈장 막 또는 소기관 막의 유동성, 침투성, 또는 두께; 포화 지질의 불포화 지질로의 전환 또는 그반대의 경우; 세포 내에서의 포화 지질 또는 불포화 지질, 예를 들어, 단일불포화 지질의 수준 또는 양; ER의 활성에 유리한 영향을 미치는 유리한 지질 조성을 달성하기 위한 지질 조성; ER의 확장; 골지의 확장; 분비 소포의 수준 또는 양 또는 분비 소포 형성; 분비 수준 또는 분비 속도; 막 수용체 (예를 들어, ATR (예를 들어, 문헌 [The increase of cell-membranous phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acid residues induces phosphorylation of p53 through activation of ATR. Zhang XH, Zhao C, Ma ZA. J Cell Sci. 2007 Dec 1;120(Pt 23):4134-43 PMID: 18032786; ATR (ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase) is activated by mild hypothermia in mammalian cells and subsequently activates p53. Roobol A, Roobol J, Carden MJ, Bastide A, Willis AE, Dunn WB, Goodacre R, Smales CM. Biochem J. 2011 Apr 15;435(2):499-508. doi: 10.1042/BJ20101303. PMID: 21284603] 참조) 및 SREPB (예를 들어, 문헌 [Int J Biol Sci. 2016 Mar 21;12(5):569-79. doi: 10.7150/ijbs.14027. eCollection 2016. Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury. Zhang Y, Ma KL, Ruan XZ, Liu BC] 참조); 및 부가의 수용체 (예를 들어, 문헌 [Biochim Biophys Acta. 2016 Mar 17. pii: S1388-1981(16)30071-3. doi: 10.1016/j.bbapplied.2016.03.019] 참조))의 활성화 또는 불활성화; 및/또는 언폴딩된 단백질 반응 (UPR). 한 실시양태에서, LMM은 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 전사 조절제, 예를 들어, 전사 인자를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1 또는 그의 기능적 단편 (예를 들어, SREBF-410)을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 효소를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SCD1 또는 그의 기능적 단편을 포함한다.

[0115]

"지질 대사를 조정하는 변형"이란 표현에서 본원에 사용된 바와 같은 "변형"은 본원에 기재된 지질 대사 경로의 성분, 예를 들어, 유전자 산물의 발현 또는 활성 상의 증가 또는 감소를 가져올 수 있는 작용제를 지칭한다. 실시양태에서, 상기 변형은 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성을 증가시키며, 예를 들어, 이러한 변형의 부재 하에서의 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성과 비교 시, 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성에 있어서, 예를 들어, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 또는 그 초과의 증가를 유발한다. 실시양태에서, 상기 변형은 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성을 감소시키며, 예를 들어, 이러한 변형의 부재 하에서의 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성과 비교 시, 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성에 있어서, 예를 들어, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 또는 그 초과의 감소를 유발한다. 지질 대사 경로의 성분의 발현 또는 활성이 감소되는 일부 실시양태에서, 상기 성분은 지질 대사 경로의 부정적인 조절제이다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 지질 대사 조정제를 코딩하는 이종 또는 외인성 핵산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은, 예를 들어, 세포를 작은 분자 또는 폴리펩티드의 존재 하에 배양함으로써 세포 내로 도입되어 세포의 지질 대사를 조정할 수 있는 외인성 지질 대사 조정제, 예를 들어, 작은 분자 또는 폴리펩티드이다.

[0116]

본원에서 상호 교환적으로 사용된 바와 같은 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드", 및 "핵산 분자"는 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 또는 그의 DNA 또는 RNA의 조합물, 및 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 가닥 형태의 그의 중합체를 지칭한다. 용어 "핵산"은 유전자, cDNA, 또는 mRNA를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 합성 (예를 들어, 화학적으로 합성되거나 또는 인공적) 또는 재조합이다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 자연 뉴클레오티드의 유사체 또는 유도체를 함유하는 분자를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 특별한 핵산 서열은 또한, 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 변성 코돈 치환), 대립 유전자, 오르소로그, SNP, 및 상보적 서열 뿐만 아니라 명시적으로 표시된 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 변성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 생성시킴으로써 달성될 수 있다 (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0117]

본원에서 상호 교환적으로 사용된 바와 같은 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 펩티드 결합에 의해, 또는 펩티드 결합 이외의 수단에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야만 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의

최대 수에 대한 제한은 없다. 한 실시양태에서, 단백질은 2개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 폴리펩티드로 구성될 수 있으며, 각각의 폴리펩티드는 공유 또는 비공유 결합/상호 작용에 의해 또 다른 것과 연합된다. 폴리펩티드는 웨프티드 결합에 의해 또는 웨프티드 결합 이외의 수단에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 웨프티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, 상기 용어는 관련 기술분야에서, 예를 들어, 웨프티드, 올리고웨프티드 및 올리고머로서 흔히 지칭되기도 하는 짧은 쇄와, 관련 기술분야에서 단백질 (이에는 많은 유형이 있다)로서 일반적으로 지칭되는 더 긴 쇄 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 특히, 예를 들어, 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동인 폴리펩티드, 올리고웨프티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다.

[0118] "재조합 산물"은 세포 또는 무세포 시스템에 의해 생산될 수 있는 산물을 지칭한다. 이러한 산물은 분자, 핵산, 폴리펩티드, 또는 그의 임의의 혼성체일 수 있다. 재조합 산물은 산물의 생산 또는 발현을 제어하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 산물의 적어도 하나의 성분이 유전 공학에 의해 형성된 것이다. 재조합 산물을 생성하거나 또는 재조합 산물을 코딩하는 구축물을 생성하기 위해 본원에 사용된 바와 같은 유전 공학은 관련 기술분야에 공지된 재조합 DNA 발현 기술 (예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology]에 기재된 바와 같음); 부위 지정, 주사, 또는 무작위 돌연변이유발; CRISPR-기반 전략을 이용하는 게놈 변형 전략; 및 징크 평거 뉴클레아제 (ZFN)-기반 전략을 포함한다. 한 예로서, 재조합 산물이 핵산인 실시양태에서, 재조합 핵산의 적어도 하나의 뉴클레오티드, 또는 재조합 핵산의 생산, 예를 들어, 전사를 제어하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 유전 공학에 의해 형성되었다. 한 실시양태에서, 재조합 산물은 재조합 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 재조합 산물은 자연적으로 발생하는 산물이다. 한 실시양태에서, 재조합 산물은 비-자연적으로 발생하는 산물, 예를 들어, 합성 산물이다. 한 실시양태에서, 재조합 산물의 일부분이 자연적으로 발생하는 반면, 재조합 산물의 또 다른 부분이 비-자연적으로 발생한다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 산물의 제1 부분은 하나의 자연적으로 발생하는 분자인 반면, 재조합 산물의 또 다른 부분은 제1 부분과 상이한 또 다른 자연적으로 발생하는 분자이다.

[0119] "재조합 폴리펩티드"는 본원에 기재된 세포에 의해 생산될 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 재조합 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오티드, 또는 폴리펩티드의 발현을 제어하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 (세포 또는 전구 세포의) 유전 공학 또는 조작에 의해 형성된 것이다. 예를 들어, 적어도 하나의 뉴클레오티드가 변경되며, 예를 들어, 이는 세포 내로 도입되었거나 또는 유전적으로 조작된 재배열의 산물이다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 서열은 폴리펩티드 또는 단백질의 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형과 상이하지 않다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 또는 단백질의 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형의 서열과 상이하다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드와 세포는 동일한 종으로부터의 것이다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 세포의 내인성 게놈에 의해 코딩된 폴리펩티드와 동일하거나 또는 이와 실질적으로 동일하거나, 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 이하만큼 상이하다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드와 세포는 동일한 종으로부터의 것이며, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드이고 세포는 인간 세포이다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드와 세포는 상이한 종으로부터의 것이며, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드이고 세포는 비-인간, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, CHO, 다른 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 진균 세포, 바이러스 세포, 또는 박테리아 세포이다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 세포에 대해 외인성이며, 달리 말하면, 세포는 제1 종으로부터의 것이고 재조합 폴리펩티드는 제2 종으로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 합성 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 비-자연적으로 발생하는 공급원으로부터 유래된다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드 또는 단백질의 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형으로부터의 아미노산 서열에 있어서 상이하지 않는 인간 폴리펩티드 또는 단백질이다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개 이하의 아미노산 잔기에서 인간 폴리펩티드 또는 단백질의 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형과 상이하다. 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 그의 아미노산 잔기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 또는 15% 이하에서 인간 폴리펩티드의 자연적으로 발생하는 이소형과 상이하다. 재조합 폴리펩티드의 일부분이 인간 폴리펩티드의 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형의 일부분으로부터 유래된 서열을 포함하는 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 일부분은 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 또는 20개 이하의 아미노산 잔기만큼, 또는 그의 아미노산 잔기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 또는 15%만큼 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이소형의 상응하는 부분과 상이하다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은 "상동", "동일성", 또는 "유사성"은 두 중합체성 분자, 예를 들어, 두 핵산 분자, 예컨대 두 DNA 분자 또는 두 RNA 분자, 또는 두 폴리펩티드 분자 간의 서브유닛 서열 동일성을 지칭한다. 두 분

자 둘 다 내의 서브유닛 위치가 동일한 단량체성 서브유닛에 의해 점유되는 경우; 예를 들어, 두 DNA 분자 각각에서의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 그 위치에서 상동이거나 또는 동일하다. 두 서열 간의 상동성은 매칭되거나 또는 상동인 위치의 수의 직접 함수인데; 예를 들어, 두 서열 내의 위치의 절반 (예를 들어, 10개 서브유닛 길이의 중합체 내의 5개 위치)이 상동인 경우, 이러한 두 서열은 50% 상동이고; 위치의 90% (예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 또는 상동인 경우, 그러한 두 서열은 90% 상동이다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "차세대 생물제제" 또는 "NGB"는 세포를 포함하는 생물학적 조성물 또는 세포에 의해 생산된 조성물을 지칭한다. 생물학적 조성물은 적어도 하나의 자연 성분을 수반한 조성물, 적어도 하나의 자연 성분과 적어도 하나의 비-자연 성분을 수반한 조성물, 적어도 하나의 자연 성분과 적어도 하나의 자연 구조를 수반한 조성물, 및 적어도 하나의 자연 성분과 적어도 하나의 비-자연 구조를 수반한 조성물, 또는 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 차세대 생물제제는 종종, 복잡하고/하거나 비-자연 구조를 포함한다. 차세대 생물제제의 예는 융합 단백질, 효소 또는 재조합 효소, 단백질 또는 재조합 단백질, 연장된 반감기를 수반한 재조합 인자, 장시간 작용하는 치료를 수반한 성장 호르몬, 다량체성 당단백질, 차세대 항체, 항체 단편, 또는 항체-유사 단백질 (ALP), 소포, 엑소솜, 리포솜, 바이러스, 및 바이러스 유사 입자, 뮤신, 나노입자, 세포의 추출물, 및 시약으로서 사용되는 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특히 출원, 및 간행물의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명이 특이적 측면과 관련하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 측면 및 변동이 본 발명의 진정한 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고안될 수 있다는 것이 명백하다. 첨부된 청구범위는 이러한 측면 및 등가 변동 모두를 포함하는 것으로 해석된다.

지질 대사의 조정

[0124] 본 개시내용은, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 유발하는 변형을 세포 또는 무세포 시스템 내로 도입함으로써, 이러한 세포 또는 무세포 시스템에서 지질 대사를 조정하기 위한 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 실시양태에서, 본 개시내용은 지질 대사에 수반되는 경로 또는 프로세스, 예를 들어, 신생 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 포화 또는 탈포화, 지방산 신장, 및 인지질 생합성 경로의 다수 측면에 영향을 미치는 포괄적인 조절제의 사용을 특징으로 한다. 한 예로서, 포괄적인 조절제는 하나 이상의 지질 대사 경로 또는 프로세스에서 상류이므로, 포괄적인 조절제는 지질 대사의 여러 가지, 예를 들어, 둘 이상의 하류 프로세스 또는 하류 성분에 영향을 미친다. 한 실시양태에서, 포괄적인 조절제는 상이한 지질 대사 프로세스 또는 경로에 수반되는 1개 초과, 예를 들어, 2개 이상의 표적 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있는 전사 인자이다. 따라서, 임의의 이론에 얹매이고자 한 것은 아니지만, 본원에 기재된 바와 같은 포괄적인 조절제의 사용은 지질 대사의 단일 표적 또는 다른 성분만을 조정하는 하류 이펙터(effector)의 사용과 비교 시 세포의 생산 능력, 강건함, 및 생존율을 상당히 증가시킬 수 있다. 임의의 이론에 얹매이고자 한 것은 아니지만, 세포의 생산 능력, 산물 품질, 및 강건함을 개선시키는데 수반되는 더 많은 프로세스에 영향을 미침으로써 다중 지질 대사 경로의 포괄적 또는 보다 광범위한 조정이 세포의 생산 능력을 증가시키는 것으로 믿어진다.

[0125] 본원에 기재된 바와 같은 지질 대사 경로는 지질 또는 지질 관련 분자의 합성, 분해, 전환, 또는 변형에 관한 프로세스를 지칭한다. 지질 분자는 지방산, 글리세롤지질, 글리세로인지질, 인지질, 사카로리피드, 스팽고지질, 및 스테롤 지질, 예를 들어, 콜레스테롤, 및 폴리케티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 지질 대사 경로의 예는 신생 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 포화, 지방산 탈포화, 지방산 신장, 및 인지질 생합성을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포를 제공한다. 지질 대사를 조정하는 변형은 지질 대사에 수반되는 성분의 발현을 증가 또는 감소시키는 작용제일 수 있다. 한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 지질 대사 조정제 (LMM)를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 이러한 실시양태에서, LMM을 코딩하는 외인성 핵산은 본원에 기재된 핵산 전달 방법 또는 기술, 예를 들어, 형질도입 또는 형질감염 중 임의의 것에 의해 세포 내로 도입된다.

[0126] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 지질 대사를 조정하는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형을 포함하는 세포를 제공한다. 세포가 지질 대사를 조정하는 2개 이상의 변형을 포함하는 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 각각의 변형은 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM을 코딩하는 2개 이상의 외인성 핵산 각각은 동일한 핵산 분자 내에 위치될 수 있거나, 또는 2개 이상의 상이한 핵산 분자 상에 위치된다. 세포가 LMM을 코딩하는 2개 이상의 핵산 서열을 포함하는 상기 실시양태에서, 이러한 LMM은 서로 상이한데, 예를 들어, 상이한 폴리펩ти드 서열을 코딩하거나 또는 상이한 기능을 갖는다.

- [0127] 실시양태에서, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 도입 및 발현함으로써, 세포에서 지질 대사를 조정하는 것은 하기 중 하나 이상을 변경, 예를 들어, 증가 또는 감소시킨다:
- [0128] i) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 발현 (예를 들어, 전사 및/또는 번역);
- [0129] ii) 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 활성 (예를 들어, 효소적 활성);
- [0130] iii) 세포에 존재하는 지질 (예를 들어, 인지질, 또는 콜레스테롤)의 양;
- [0131] iv) 지질 뗏목의 양 또는 지질 뗏목 형성의 속도;
- [0132] v) 세포 막 (예를 들어, 혈장 막, 소포 막, 또는 소기관 막)의 유동성, 침투성, 및/또는 두께;
- [0133] vi) 포화 지질의 불포화 지질로의 전환 또는 불포화 지질의 포화 지질로의 전환;
- [0134] vii) 포화 지질 또는 불포화 지질, 예를 들어, 단일불포화 지질의 양;
- [0135] viii) ER 활성을 증가시키는 유리한 조성을 획득하기 위한 세포 내의 지질의 조성;
- [0136] ix) ER (예를 들어, ER의 크기, ER 막 표면, 또는 ER을 구성하고/하거나 ER 내에 상주하는 단백질 및 지질의 양)의 확장;
- [0137] x) 골지 (예를 들어, 골지의 수 및 크기, 골지 표면, 또는 골지 내에 상주하는 단백질 및 분자의 수 또는 양)의 확장;
- [0138] xi) 분비 소포의 양 또는 분비 소포의 형성;
- [0139] xii) 산물의 분비 양 또는 분비 속도;
- [0140] xiii) 중식 능력, 예를 들어, 중식 속도;
- [0141] xiv) 배양물 생육력 또는 세포 생존율;
- [0142] xv) 막 수용체의 활성화;
- [0143] xvi) 언폴딩된 단백질 반응 (UPR);
- [0144] xvii) 산물의 생산 수율 또는 생산 속도;
- [0145] xviii) 산물 품질 (예를 들어, 응집, 글리코실화 불균질성, 단편화, 적절한 폴딩 또는 어셈블리, 번역 후 변형, 또는 디슬피드 결합 스크램블링); 및/또는
- [0146] xix) 세포 성장/중식 또는 세포 특이적 성장 속도.
- [0147] 실시양태에서, 지질 대사의 조정은 상기 열거된 특성을 중 임의의 것에서의 증가를 유발하며, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포와 비교 시 상기 열거된 특성을 중 임의의 것에서의 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%, 또는 그 초과, 또는 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 또는 그 초과의 증가를 유발한다. 실시양태에서, 지질 대사의 조정은 상기 열거된 특성을 중 임의의 것에서의 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%, 또는 그 초과, 또는 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 또는 그 초과의 감소를 유발한다.
- [0148] 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 하나 이상의 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시킨다. 지질 대사를 조정하는 변형이 지질 대사 경로의 성분의 발현, 예를 들어, 전사 또는 번역 상의 증가, 또는 이러한 성분의 활성 상의 증가를 유발하는 실시양태에서, 그러한 성분은 지질 대사 경로의 긍정적인 조절체이다. 지질 대사를 조정하는 변형이 지질 대사 경로의 성분의 발현, 예를 들어, 전사 또는 번역 상의 감소, 또는 이러한 성분의 활성 상의 감소를 유발하는 실시양태에서, 그러한 성분은 지질 대사 경로의 부정적인 조절체이다. 지질 대사 경로의 유전자의 발현, 예를 들어, 전사 및/또는 번역을 정량화하기 위한 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 상기 유전자를 코딩하는 mRNA의 양을 정량화하는 것; 또는 유전자 산물, 또는 폴리펩티드의 양을 정량화하는 것; PCR-기반 검정, 예를 들어, 정량적 실시간 PCR; 노던 블롯; 또는 마이크로어레이를 포함한다. 지질 대사 경로의 성분, 예를 들어, 지질 대사 경로의 효소의 활성을 정량화하기 위한 검정은 지질 대사 경로의 특별한 성분에 대해 특이적일 것이다.

[0149]

세포의 지질 대사의 조정이 이러한 세포 내의 지질의 수준 또는 양에 있어서의 증가를 유발하는 실시양태에서, 상기 세포 내의 지질의 총 수준 또는 총 양이 증가될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 내에서의 하나 이상의 종의 지질, 예를 들어, 인지질 또는 콜레스테롤의 수준 또는 양이 증가될 수 있다. 세포 내의 지질 (예를 들어, 전체 또는 선택 지질 종)의 수준 또는 양에 있어서의 증가는 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하지 않은 세포와 비교 시, 지질 대사의 조정 후의 세포, 예를 들어, 살아있는 세포 내에서의 지질의 수준 또는 양에 있어서 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 증가를 포함한다. 세포 내의 지질의 수준 또는 양을 정량화하기 위한 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 효소적 검정 및 산화 검정, 및 특별한 구획 (예를 들어, 소기관) 내에서 또는 전체 세포로부터의 지질 성분의 질량 분광분석법에 의한 측정을 포함한다.

[0150]

한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 증가된 세포 생존율을 유발한다. 예를 들어, 세포 생존율은 세포 아폽토시스, 예를 들어, 사멸되었거나 죽은 세포의 수 또는 양을 결정하거나 또는 정량화함으로써 측정될 수 있다. 세포 생존율 상의 증가는 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하지 않은 세포와 비교 시, 지질 대사의 조정 후의 세포, 예를 들어, 살아있는 세포의 수에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 증가를 포함한다. 또 다른 한편으로, 세포 생존율 상의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포와 비교 시, 지질 대사의 조정 후의 아폽토시스 세포의 수에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과의 감소를 포함한다. 세포 생존율 또는 아폽토시스를 검출하기 위한 방법, 예를 들어, 아넥신(Annexin) V 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원의 실시예에 기재되어 있다.

[0151]

한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 증가된 배양물 생육력을 유발한다. 예를 들어, 배양물 생육력은 살아있는 세포, 예를 들어, 배양 중이거나 또는 세포 집단 내에서의 살아있는 세포, 또는 생육성 것과 관계된 특징, 예를 들어, 증식 마커, 무손상 DNA, 또는 아폽토시스 마커를 표시하는 않는 특징을 갖는 세포의 수 또는 양을 결정하거나 또는 정량화함으로써 측정될 수 있다. 배양물 생육력 상의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포와 비교 시, 지질 대사의 조정 후의 세포, 예를 들어, 살아있는 세포의 수에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배, 또는 그 초과의 증가를 포함한다. 배양물 생육력을 결정하기 위한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원의 실시예 3에 기재되어 있다. 배양물 생육력을 평가하기 위한 다른 방법은 트립판 블루 배제 방법에 이어 혈구계 또는 바이셀 [베크만 쿨터(Beckman-Coulter)]을 사용하여 계수하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 생육성 바이오매스를 결정하기 위한 다른 방법은 고주파 임피던스 또는 커페시턴스를 사용하는 방법 (예를 들어, 문헌 [Carvell and Dowd, 2006, Cytotechnology, 50:35-48]), 또는 라マン(Raman) 분광법을 사용하는 방법 (예를 들어, 문헌 [Moretto et al., 2011, American Pharmaceutical Review, Vol. 14])을 포함한다.

[0152]

한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 증가된 세포 증식을 유발한다. 예를 들어, 증식할 수 있는 세포의 능력은 세포의 수, 세포 배가, 또는 세포의 성장 속도를 정량화하거나 또는 계수함으로써 측정될 수 있다. 또 다른 한편으로, 증식하는 세포는 세포의 계놈 함량 (예를 들어, 복제하는 DNA)의 분석에 의해, 예를 들어, 유동 세포 계수 분석, 또는 증식 마커, 예를 들어, 세포 주기에 수반되는 인산화된 시클린-CDK 복합체인 Ki67의 존재에 의해 확인될 수 있다. 증식할 수 있는 능력 상의 증가는 지질 대사의 조정 후, 세포의 수, 또는 증식 마커를 발현하는 세포의 수에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배, 또는 그 초과의 증가를 포함한다. 또 다른 한편으로, 증식할 수 있는 능력 상의 증가는 지질 대사의 조정 후, 세포의 배가 또는 성장 속도에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배, 또는 그 초과의 증가를 포함한다. 세포 계수는 세포 계수 기계를 사용하거나, 또는 혈구계를 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0153]

한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 생산 능력, 예를 들어, 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율, 또는 생산 속도에서의 증가를 유발한다. 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에 의해 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율과 비교 시, 지질 대사의 조정 후에 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과만큼의 증가를 포함한다. 생산 속도 상의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포의 생산 속도와 비교 시, 지질 대사의 조정 후에 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율에 있어서의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과만큼의 증가를 포함한다. 한 실시양태에서, 생산 속도는 특이적 시간 단위에서 생산된 산물의 양, 수량, 또는 수율을 결정함으로써 결정된다.

[0154]

한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형은 산물의 품질, 예를 들어, 응집, 글리코실화 상태 또는 불균질성, 단편화, 적절한 폴딩 또는 어셈블리, 번역 후 변형, 또는 디슬피드 결합 스크램블링에 있어서의 증가를 유발한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 비-응집된 산물의 양 또는 수량의 증가, 비-응집된 산물 대 응집된 산물의 비의 증가, 또는 응집된 산물의 양 또는 수량의 감소를 포함한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된 산물의 양 또는 수량의 증가, 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된 산물 대 미스폴딩되거나, 언폴딩되거나, 부분적으로 어셈블리되거나 또는 비-어셈블리된 산물의 비의 증가, 또는 미스폴딩되거나, 언폴딩되거나, 부분적으로 어셈블리되거나 또는 비-어셈블리된 산물의 양 또는 수량의 감소를 포함한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 비-단편화된 또는 완전한 길이의 산물의 양 또는 수량의 증가, 또는 단편화된 산물의 양 또는 수량의 감소를 포함한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 기능적 산물의 양 또는 수량의 증가, 또는 비-기능적 또는 기능 장애를 일으킨 산물의 양 또는 수량의 감소를 포함한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 글리칸 불균질성의 증가 또는 감소를 포함한다. 산물의 품질에서의 증가는, 예를 들어, 지질 대사의 조정을 수반하지 않은 세포에서 관찰된 것과 비교 시 지질 대사의 조정 후, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과의, 기능적 산물의 양 또는 수량의 증가, 또는 비-기능적 또는 기능 장애를 일으킨 산물의 양 또는 수량의 감소를 포함한다.

[0155]

지질 대사 조정제

[0156]

본원에 기재된 바와 같은, 지질 대사의 조정은 LMM을 발현하거나 또는 도입함으로써, 또는 LMM의 조절을 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, LMM은, 예를 들어, LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 도입함으로써 또는 프로모터 요소 또는 다른 조절 전사 요소의 도입에 의해 발현을 증가시킴으로써 세포에서 과다발현된다. 또 다른 실시양태에서, LMM의 발현 또는 활성은, 예를 들어, LMM의 억제제 또는 외인성 억제 핵산, 예를 들어, RNA 간섭제를 도입함으로써 억제되거나 또는 감소된다. 억제 핵산의 예는 LMM, 예를 들어, LMM을 코딩하는 mRNA를 표적으로 하는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM의 활성 또는 발현은 번역 후 변형, 또는 LMM 활성 또는 발현을 조절하는 다른 내인성 조절 메커니즘을 변경시킴으로써 증가 또는 감소된다. 번역 후 변형에 의한 조절은 인산화, SUMO화, 유비퀴틴화, 아세틸화, 메틸화, 또는 글리코실화를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 이는 LMM 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 한 예로서, 번역 후 변형의 조절은 LMM을 변형시키는 효소 또는 분자의 조정을 통하여 달성되거나, 또는 번역 후 변형이 더 자주 또는 구성적으로 발생할 수 없거나 또는 발생하지 않도록 LMM의 변형을 통하여 달성될 수 있다. LMM의 조절은 또한, LMM 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있는, 예를 들어, miRNA 조절, 단백질 절단, 특이적 이소형의 발현, 교대 스플라이싱, 및 분해 중 하나 이상을 증가 또는 감소시킬 수 있는 내인성 조

절 메커니즘을 조정하는 것을 포함할 수 있다.

[0157]

한 실시양태에서, LMM은 지질 대사 경로의 성분의 발현, 예를 들어, 전사, 또는 활성을 조정, 예를 들어, 증가 또는 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, LMM은 지질 또는 지질 관련 분자의 합성, 분해, 신장, 또는 구조적 입체형태 (예를 들어, 포화 또는 탈포화, 또는 에스테르화)를 조정, 예를 들어, 증가 또는 감소시킨다. 지질 대사 경로의 예시적인 성분 및/또는 LMM이 열거되지만, 표 1에 열거된 것으로 제한되지 않는다.

[0158]

표 1. 지질 대사 경로 및 그의 성분/유전자 산물

경로	성분/유전자 산물
포괄적인 지질 대사 조절인자	SREBF1 (스테롤 조절 요소-결합 전사 인자 1) SREBF2 (스테롤 조절 요소-결합 전사 인자 2) PRMT5
신생 지질생성	FAS (지방산 신타제) ACC (아세틸-coA 카르복실라제) ACL (ATP 시트레이트 리아제)
지방산 재에스테르화	DGAT (디글리세리드 아실트랜스퍼라제) GPAT (글리세롤 3-포스페이트 아실트랜스퍼라제) LPL (지단백질 리파제)
인지질 생합성	AGPAT (1-악틸-sn-글리세롤-3-포스페이트 O-아실트랜스퍼라제) AGNPR (아실/알킬글리세론-포스페이트 리덕타제) CCT (포스포콜린 시티딜트랜스퍼라제) CDS (포스파티데이트 시티딜릴트랜스퍼라제) CEPT (디아실글리세롤 콜린/에탄올아민포스포트랜스퍼라제) CERT (세라미드 전달 단백질) CGT (N-아실스핑고신 갈락토실트랜스퍼라제) CPT (디아실글리세롤 콜린포스포트랜스퍼라제) CLS (카르디올리핀 신타제) CRD (세라미다제) GNPAT (글리세론-포스페이트 O-아실트랜스퍼라제) KDSR (3-케토스핑가닌 리덕타제) LCS (폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제) PAP (포스파티드산 포스파타제) PEMT (포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제) PGP (포스파티딜글리세로포스파타제) PGS (CDP-디아실글리세롤-글리세롤-3-포스페이트 3-포스파티딜트랜스퍼라제) PIS (CDP-디아실글리세롤-이노시톨 3-포스파티딜트랜스퍼라제) PSD (포스파티딜 세린 테카르복실라제) PSS1 (포스파티딜세린 신타제 1) PSS2 (포스파티딜세린 신타제 2) SGMS (세라미드 콜린 포스포트랜스퍼라제) SNAT (스핑고신 N-아실트랜스퍼라제)

[0159]

	SPK (스팽가닌 키나제) SPP (스팽고신-1-포스페이트 포스파타제) SPT (세린 C-팔미토일트랜스페라제)
지방산 탈포화	SCD1 (스테아로일 CoA 데세투라제-1) SCD2 (스테아로일 CoA 데세투라제-2) SCD3 (스테아로일 CoA 데세투라제-3) SCD4 (스테아로일 CoA 데세투라제-4) SCD5 (스테아로일 CoA 데세투라제-5) PED (플라스마닐에탄올아민 데세투라제)
SREBF1 및 다른 경로의 조절	S1P (부위-1 프로테아제) S2P (부위-2 프로테아제) SCAP (SREBF 절단-활성화 단백질) INSIG1 (인슐린 유도된 유전자 1) INSIG2 (인슐린 유도된 유전자 2) HMG CoA 리덕타제 (2-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제) PPAR 수용체, 예를 들어, PPAR α , PPAR γ

[0160]

한 실시양태에서, LMM은, 예를 들어, 표 1에 제공된, 지질 대사 경로에 수반되는 성분, 예를 들어, 유전자 산물과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성 또는 상동성을 포함하거나; 또는, 예를 들어, 표 1에 제공된, 지질 대사 경로에 수반되는 성분, 예를 들어, 유전자 산물의 아미노산 서열과 1, 2, 또는 3개 또는 그의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.

[0162]

한 실시양태에서, LMM은, 예를 들어, 표 1에 제공된, 지질 대사 경로에 수반되는 성분의 기능적 단편을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 LMM의 기능적 단편은 LMM의 하나 이상의 기능적 도메인을 포함할 수 있다. 한 예로서, 전사 인자인 LMM의 기능적 단편은 DNA 결합 도메인 및 트랜스 활성화 도메인을 포함한다. 한 예로서, 효소인 LMM의 기능적 단편은 효소적 활성을 수반한 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 LMM의 기능적 단편은 완전한 길이의 LMM의 기능적 활성, 예를 들어, 이러한 기능적 활성의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 보유한다. LMM의 기능적 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 실험적으로 결정될 수 있거나, 또는 기능적 도메인의 서열 상동성에 근거한 알고리즘을 사용하여 예측될 수 있다. 예시적인 LMM이 아래에 추가로 기재된다.

[0163]

본원에 기재된 방법의 실시양태 중 임의의 것에서, LMM은 전사 조절제이다. 한 실시양태에서, LMM은 DNA와 결합하거나 또는 DNA와 결합하는 복합체에서 연합되고, 지질 대사에 수반되는 하나 이상의 유전자 산물의 전사를 위해 RNA 폴리머라제를 동원하거나 또는 이러한 폴리머라제를 동원하는 복합체에서 연합되는 전사 인자 또는 전사 활성화제이다. 한 실시양태에서, LMM은 스테롤 결합 요소 및/또는 E-박스 프로모터 서열과 결합한다. 한 실시양태에서, LMM은 스테롤 조절 요소 결합 인자 1 (SREBF1) 또는 스테롤 조절 요소 결합 인자 2 (SREBF2) 또는 그의 기능적 단편 또는 이소형을 포함한다.

[0164]

실시양태에서, LMM은 포괄적인 전사 활성화제 또는 전사 인자를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은, 예를 들어, 표 1에 제공된 바와 같은, 지질 대사 경로의 2개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 초과의 성분의 전사를 조정할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, LMM은 둘 이상의 지질 대사 경로의 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개, 또는 그 초과의 성분 (예를 들어, 표 1에 제공된 바와 같은 성분 및 경로)의 전사를 조정할 수 있다.

[0165]

스테롤 조절 요소 결합 인자 1 (SREBF1)은 표적 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 E-박스 프로모터 서열 (문헌 [Hagen, Rodriguez-Cuenca et al. 2010]) 및 스테롤 조절 요소 (SRE)와 결합함으로써 지질생성, 지방산 재에스테르화, 지방산 탈포화 및 신장, 및 인지질 생합성에 수반되는 유전자의 전사를 상향조절하는 포괄적인 전사 활성화제이다. SREBF1 유전자 자체의 전사는 유전자의 프로모터 영역 내에 다른 전사 조절성 요소 중에서 스테롤 조절 요소 (SRE)가 존재함으로서 내인성으로 조절된다. 더욱기, 인산화, 유비퀴틴화, SUMO화, 아세틸화, 지방산-매개된 변형 및 단백질 분해적 프로세싱을 포함한 다수의 번역 후 조절성 메커니즘으로 인해,

SREBF1을 중심으로 단단히 제어되었지만 적응 가능한 생체 항상성 시스템이 만들어진다.

[0166]

완전한 길이의 SREBF1이 합성되고, 이는 주로 소포체 (ER)에 국재된다. 막 일체형 SREBF1은 SREBF1이 골지로 이동하는 것을 촉진시켜 줄 수 있는 SREBF 절단-활성화 단백질 (SCAP)과 복합체를 형성한다. 그러나, 높은 스템을 수준 (특히, 콜레스테롤)이 존재하는 경우, SCAP 상의 입체형태적 변화가 유도되며, 이는 막 일체형 단백질 insig (인슐린 유도된 유전자)와의 결합을 도와주므로, 이러한 복합체의 이동을 억제시켜 준다. 스템의 부재 하에서는, insig가 SCAP와 결합하지 않으므로, COPII 매개된 소포 형성을 허용해 주고, 연속해서 SREBF:SCAP 복합체가 골지로 이동할 수 있게 해준다. 순차적인 단백질 분해적 절단은, 세포질에 즉각 존재하지만 핵으로 이동하는 SREBF1의 N-말단 기본 나선 루프 나선 류신 지피 (bHLH)를 유리시키는 부위-1 프로테아제 (S1P) 및 부위-2 프로테아제 (S2P) 단백질에 의해 매개된 골지에서 발생한다. 상기와 같이 절단된 SREBF1 상에 존재하는 리신 잔기는 유비퀴틴화되고 26S 프로테아솜에 의해 분해되지만, 이러한 유비퀴틴화는 핵으로의 이동을 허용해 주는 리신 잔기의 아세틸화를 통하여 억제될 수 있다. 최종적으로, 핵 SREBF1은 신생 지질생성 [지방산 신타제 (FAS) 및 아세틸 coA 카르복실라제 (ACC)], 지방산 재에스테르화 [디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제 (DGAT), 글리세롤-3-포스페이트 (GPAT) 및 지단백질 리파제 (LPL)], 인지질 생합성 [CTP:포스포콜린 시티딜 릴트랜스퍼라제 (CCT)], 지방산 탈포화 [스테아로일-coA 데제투라제 1 (SCD1)]에 대해 책임이 있는 수많은 유전자의 상류에서 스템 조절 요소 (SRE) 서열과 결합할 수 있다. 핵 SREBF1은 또한, 완전한 길이의 SREBF1 유전자 자체의 전사를 활성화시킬 수 있지만, 이는 또한, 상기 유전자의 상류에 또한 위치한 간 X 수용체 (LXR) 프로모터 서열의 활성화에 의존적이다 ([Brown, Goldstein 1997- BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L., 1997. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. Cell, 89(3), pp. 331-340] [Hagen, Rodriguez-Cuenca- HAGEN, R.M., RODRIGUEZ-CUENCA, S. and VIDAL-PUIG, A., 2010. An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. FEBS letters, 584(12), pp. 2689-2698]).

[0167]

한 실시양태에서, LMM은 SREBF1, 그의 이소형, 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. SREBF1에 대한 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

```
MDELAFGEAALEQTLAEMCELDATAVLNDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDAPYAGGETGDTGPSSPGANSPEFSSASL
ASSLEAFLGGPKVTAPLSPPSAPAALKMYPVSVPSPGPGIKEEPVPLTILQPAAPQPSPTLLPPSFAPPVQL
SPAPVLYSSLPSGFSGTLPGNQQOPPSSLPLAPAPGVLPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPV
VLQPHFIKADSLLLTAVKTDAAGATVKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVTDKLPIHRLAAGSKA
LGSAQSRSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIIDYIRFLQHSNQKLQENLTLSAH
KSKSLKDLVSAACGSGGGTDVSMEGMKPEVVETLTPPPSDAGSPSQSSPLSFGRASSSGGDSEPDSPADEFEDSQVKA
QRPLPSHSRGMLDRSRALCVLAFLCLTCNPLASLFGWGILTPSDATGTHRSSGRSMLAEESRDGSNWQTQWLLPPLVW
LANGLLVLACLALLFVYGEPVTRPHSGPAVHFWRHRKQADLQLARGDFPQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSL
LWNLIRHLLQRLWVGRWLQAGQAGGLLRDRGLRKDARASARDAAVVYHKLHQLHAMGKYTGHHLAASNLLALSALNLAE
CAGDAISMATLAEIYVAALRVKTSLPRALHFLTRFFLSSARQACIAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFVDGDWAVHG
APPESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFREHLLERALNCIAQPSPGAADGDREFSDALGYLQLLNSCSDAAGAPACSFVSVS
SSMAATTGPDVAKWWASLTAVVIHWLRRDEEAERLYPLVHEIPQVLQDTERPLPRAALYSFKAARALLDHRKVES
SPASLAICEKASGYLRDSLASTPTGSSIDKAMQLLLCDLLIVARTSLWQRQQSPASVQAHGTSGNPQASALELRGF
QHDLSSILRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASPARTHQLLDRSLRRAGSSKGTTAELEPRPTWREHTEALL
LASCYLPPAFLSAPGQRMMSMLAEAARTVEKLGDHRLLLDCQMLLRLGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 1)
```

[0168]

[0169]

SREBF1에 대한 뉴클레오티드 서열이 아래에 제공된다:

```

atggacgagctggcctcggtgaggcggtctggAACAGACACTGGCCGAGATGTGCGAACTGGACACAGCGGTTT
gaacgacatcgaaAGACATGCTCCAGCTCATCAACAACAAAGACAGTGAATTCCCAGCCTGTTGACGCCCTATG
CTGGGGGTGAGACAGGGGACACAGGCCAGCAGGCCAGGTGCCAACCTCCTGAGAGCTCTTCTGCTCTG
GCCTCCTCTCGGAAGCCTTCCTGGAGGACCCAAGGTGACACCTGCAACCTTGTCCCCTCACCATCGGACCCGC
TGCTTAAAGATGTAACCGTCCGTGCCCCCTTCCCCTGGGATCAAAGAGGAGCCAGTGCACACTACCA
TCCTACAGCCTGAGCGCCACAGCGTCACCGGGACCCCTCCTGCAGCTCCAGGACCCCTCCAGGAAACACTCAGGCC
AGCCTGCGCCGCTGGTTACTCGAGCCTGCAGGCTCAGGGACCCCTGCACACCCAGTCCAAGCTTGG
ACCATCTAGCCTCCGCTGGCCCTGCACCAAGGAGTCTTGCCCACCCCTGCACACCCAGTCCAAGCTTGG
CCTCCAGCAGCGCTGCCAGCCTAGCAAGAACACTGTGACCTCACAGGTCCAGCAGGTCCAGT
GTACTGCAGCCACACTCATCAAGGCAGACTCACTGCTGACAGCTGTGAAGACAGATGCAGGAGGCCACCGTGA
GACTGCAGGCATCGACCCCTGGCTCCTGGCACAGCGCTGAGGAGCCCTGAGACCCCTGGTAGTGGAGGGA
CCATCTGGCCACAGTACCTTGGTTGTGGACACAGACAACACTGCCACCGACTCGCAGCTGGCAGCAAGGCC
CTAGGCTCAGCTCAGAGGCCGTGGTAGAGCAGCACAGGCCACATGCCACTGCAATTGAGAAGCCTACCGGTCTTCTATCAA
TGACAAGATTGGAGGACTCAAAGACACTGGTAGGAGGACTGAAGCAGTGAATAATGTGTCTTGCGCAAGG
CCATCGACTACATCCGCTTCTGCAGCACAGCAACCAGAAGCTCAAGCAGGAGAACCTGACCCATCGAAGTGCACAC
AAAAGCAAATCACTGAAGGACCTGGTAGCTGTGCAGTGGAGGAGGACAGATGTGTATGGAGGGCATGAA
ACCGAAGTGGTAGGAGCCTTACCCCTCACCCCTCAGACGCCGCTCACCCCTCCAGAGTAGCCCTTGTCTTGG
GCAGCAGAGCTAGCAGCAGTGGTAGTGTACTCTGAGGCCAGCTTGCAGGCCTTGGAGTAGCCAGGTCAAAGCC
CAGCGCTGCCACACAGCGAGGAGCATCTGGACCCTGGCCCTGTGTACTGGCCTTGTGT
GACTGCAATCCTTGGCCTCGCTTCCTGGCTGGGGCATTCTCACTCCCTGTATGCTACGGGTACACACCGTAGTT
CTGGCGCAGCATGCTGGAGGAGCAGAGATGGCTTAATTGGACCCAGTGGTAGCTGCCACCCCTAGTCTGG
CTGGCCAATGGACTACTAGTGTGGCCTGTTCTCTGTCTATGGGAACCTGTGACTAGGCCACACTC
TGGCCCGGTGACTACCTCTGGAGACATCGAACAGACTGACCTGGATTGGCCGGGAGATTCCCCCAGGCTG
CTCAACAGCTGGCTGGCCTGCAAGCGCTGGCCGCCCCCTGCCACCTCAAACCTGGATCTGGCCTGCAGTCTG
CTTGGACCTCATCCGCCACCTGCTCAGCTCTGGTGGCCCTGGCTGGCAGGCCAGGGGGCTGCT
GAGGGACCGTGGCTGAGGAAGGGATGCCCTGCAAGTGGCCGGATGGCTGTGTCTACCTAGCTGACCCAG
TGCATGCCATGGCAAGTACACAGGAGGACATCTGCTGCTTCAAACCTGGCACTAAGTGCCTCAACCTGGCTGAG
TGCGCAGGAGATGCTATCTCATGGCAACACTGGCAGAGATCTATGTGGCAGCGCCCTGGGGTCAAACCGACCT
CCCAAGAGGCCCTGCACTTCTGACACGTTCTCCTGAGCAGCGCCGCCAGGCTGCCTAGCACAGAGCGCTCG
TGCTCTGGCCATGCACTGGCTCTGCCACCTGTAGGTCACTGGCTTCTTGTGGACGGGACTGGGCCGTGACGGT
GCCCGGGAGGAGCTGTACAGCGTGGTAGGAAACCCAGTGGATCCCTGGCTGGCAGGTGACCCGGTATTCCGTGA
ACATCTCTAGAGCGAGCTGTAAGTGTATTGCTCAGCCAGGCCAGGGGAGCTGACGGAGACAGGGAGTTCTAG
ATGCCCTGGATATCTGCAAGTTCTGCAATAGCTGTTCTGATGCTGCCGGCTCTGCTGCAAGTTCTGTCA
TCCAGCATGGCTGCCACACTGGCCAGACCCAGTGGCCAAGTGGTAGGCTACTGACAGCTGTGGTAGCCACTG
GCTGAGGCGGGATGAAAGAGGGAGCTGAGCGCTGTACCCACTGGTAGAGCATATCCCCAGGTGCTGCAGGACACTG
AGAGACCCCTGCCAGGGAGCTCTGTACTCTTCAAGGCTGCCGGCTCTGCTGGACCACAGAAAGGTGAAATCT
AGCCCAGCCAGCTGGCATCTGTGAGAAGGCCAGTGGTAGCTGCCGGACAGCTTACGCCCTACACCAACTGGCAG
TTCCATTGACAAGGCCATGCACTGGCTCTGTGTACTCTTGTGGCCCTGACAGCTCTGTGGCAGCGGGCAGC
AGTCACCGCTCAGTCCAGGGTAGCTCACCGTACCGAGCAATGGACCCAGGCCCTCTGTCTGGAGCTGCGTGGTT
CAACATGACCTGAGCAGCCTGCGGCCGGTGGCACAGAGCTTCCGGCTGTATGGAGGAGGGTATTCTACATGAGG
CACAGCTGGCTGTAGGGAGGAGCAAGTCTGCCGGACACACCAAGCTCTGGATCGCAGTCTGAGGAGGGAG
GTTCCAGTGGCAAGAGGAGGACTACAGCTGAGCTGGAGGCCACGGCCACATGGCCGGAGCACACCGAGGCCCTGCTG
TTGGCATCTGTATCTGCCCTGCCTCTGTGGCTCTGGAGCGAATGAGCATGCTGGCCGGAGGCCAGCAG
CACCGTAGAGAAGCTTGGCATCCGGCTACTGCTGGACTGCCAGCAGATGCTCTGCCCTGGGGGGGGGAACCA
CCGTCACTTCCAGCTAG (SEQ ID NO: 2)

```

[0170]

한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 1과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 1과 1, 2, 또는 3개 또는 그의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.

[0172]

SREBF1의 이소형은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이는 이소형 a 및 이소형 b 뿐만 아니라 종 또는 세포 특이적, 예를 들어, CHO 세포 특이적인 이소형, 예컨대 이소형 c를 포함한다. SREBF1 이소형 a에 대한 아미노산 서열 [진뱅크(GenBank) 수탁 번호 NP_001005291.2]이 아래에 제공된다:

MDEPPFSEAALEQALGEPCDLDAALLTDIEGEVGAGRGRANGLDAPRAGADRGAMDCTFEDMLQLINNQD
 SDFPGLFDPPYAGSGAGGTDPASPDTSPPGSLSPPPATLSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQQPATPLKMY
 PSMPAFSPGPGIKEESVPLSILQTPTPQPLPGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLYPSPPGFSTGSPPGN
 TQQPLPGLFLASPPGVPPVSLHTQVSVPQQLLTVAAPTAAPVTTVTTSQIQQVPVLLQPHFIKADSL
 LLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTQTPGLPTLVSQGTILATVPLVVDAEKLPINRLAAGSKAPASAQS
 RGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIIDYIRFLQHSNQKLQENSLRTA
 VHKSKSLKDVLVSACGSGGNTDVLMEGVKTVEDEDTLTPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGGGSDSEPD
 SPVFEDSKAKPEQRPSLHSRGMLDRSRLALCLTVFLCLSCNPLASLLGARGLPSDSTSVDHSPGRNVL
 GTESRDGPWAQWLPPVVWLLNGLLVSLVLLFVYGEPVTRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLARGDFAQ
 AAQQLWIALRALGRPLPTSHLDLACSLLWNLIRHLLQRLWGRWLAGRAGGLQQDCALRVDASASARDAA
 LVYHKLHQLHTMGKHTGGHLATNLALSALNLAECAGDAVSATLAEIYVAAALRVKTSPLRALHFTRF
 FLSSARQACLAQSGSVPPAMQWLCHPVGRFFVDGDWSVLSTPWESLYSLAGNPVPLAQVTQLFREHLL
 ERALNCTVQPNPSGSADGDKEFSDALGYLQLLNSCDAAGAPAYSFSISSLMMATTGVDPVAKWWASLT
 AVVIHWLRRDEAAERLCPLVEHLPRLQESERPLPRAALFKAARALLGCAKAESGPASLTICEKASG
 YLQDSLATTTPASSSIDKAVQLFLCDLLLVRVTSWRQQQPPAPAPAQGTSSRPQASALELRGFQRDLSS
 LRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASPTRTHQLLDRSLRRAGPGKGGAVALAEPRPRTREHAEAL
 LLASCYLPPGFLSAPGQRVGMIAEAARTLEKLGDRLLHDCQQLMRLGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 28)

[0173]

[0174]

SREBF1 이소형 a (진뱅크 수탁 번호 NM_001005291.2)에 대한 핵산 서열, 또는 mRNA 서열이 아래에 제공된다:

AGCAGAGCTGCGGCCGGGGAAACCCAGTTCCGAGGAACCTTCGCGGCCGCCGGGCCCTCTGAGGCC
 AGGGCAGGACACGAACGCCGGAGCGGCCGCGACTGAGAGGCCGGGCCGCCGGCGCTGCCATGGACGAGCCACCAT
 TCAGCGAGGCAGCTTGAGCAGCGCTGGCGAGCGCTGCGATCTGAGCGCCGCTGCTGACCGACAT
 CGAAGGTGAAGTCGGCGGGAGGGTAGGGCAACGCCCTGGACGCCAAGGGCGGGCGAGATCGC
 GGAGCCATGGATTCGACTTCAAGACATGCTCAGCTATCAACAACCAAGACAGTGACTTCCCTGGCC
 TATTGACCCACCCATGCTGGAGTGGGGCAGGGGGCACAGACCCCTGCCAGCCCCGATACCAGCTCCCC
 AGGCAGCTTGCTCCACCTCTGCCACATTGAGCTCTCTTGAAGCCTCTGAGCGGGCCAGGCA
 GCGCCCTCACCCCTGCCACAGCTGCACTCCATTGAAGATGTACCCGTCCATGCCGCTT
 TCTCCCTGGGCTGGTATCAAGGAAGAGTCAGTGCCTGAGCATCTGCAGACCCCCACCCACAGCC
 CCTGCCAGGGCCCTCTGCCACAGAGCTCCAGCCCCACCGCAGTTCACTCCACCCCTGTG
 TTAGGCTACCCAGCCCTCGGGAGGCTCTACAGGAAGCCCTCCGGAACACCCAGCAGCCGCTGC
 CTGGCTGCCACTGGCTTCCCGCAGGGTCCCGTCTCTTGACACCCAGGTCCAGAGTGTGGT
 CCCCCAGCAGCTACTGACAGTCACAGCTGCCACGGCAGCCCCCTGTAACGACCAACTGTGACCTCGCAG
 ATCCAGCAGGTCCGGTCTGCTGCAGCCCCACTTCATCAAGGCAGACTCGCTGCTGACAGCCATGA

[0175]

[0176]

[0177]

SREBF1 이소형 b (진뱅크 수탁 번호 NP_004167.3)에 대한 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

```
MDEPPFSEAALEQALGEPCDLDAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGFLFDPPYAGSGAGGTDPAS PDTSSPG
SLSPPPATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQPAPTPLKMYPSMPAFSPGPGIKEESVPLSILQTPTPQPL
PGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLYPSPPGGFSTGSPPGNTQQQLPGLPLASPPVPPVSLHTQVQSVVP
QQLLTVTAAPTAAPTTVTSQIQQVPVLQPHFIKADSLLLTMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGP
LPTLVSQGTILATVPLVDAEKLPIRNLQAGSKAPASAQRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLV
VGTEAKLNKSAVLRAKIDYIIRFLQHNSNQKLQENLSLRTAVHKSKSLKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTE
VEDTLLTPPSDAGSPFQSSPLSLSRGSGSGSDSEPDSPVFEDSKAKPEQRPSLHSRGMLDRSRLAL
CTLVFLCLSCNPFLASLLGARGLPSFTTSVYHSPGRNVLGTESRDGPFWAQLLPPVVWLLNGLLVLS
LVLLFVYGEPTVTRPHSGPAVYFWRHRSQADLLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLLWN
LIRHLLQRLWVGRWLAGRAGLQQDCALRVDASASARDAAALVYHKLHQLHTMGKHTGGHLTATNLALSAL
NLAECAAGDAVSATLAEIYVAALRVKTSPLPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPAMQWLCHPVGHR
FFVGDGWSVLSTPWESLYSLAGNPVDPPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQPNPSPGSADGDKEFSDALGYL
QLLNSCSDAAGAPAYSFSISSLMMATTGVDPVAKWWASLTAVVIHLLRRDEEAERLCPLVEHLPRLVQE
SERPLPRAALHSFKAARALLGCAKAEKGPSLICEKASGYLQDSLATTTPASSSIDKAVQLFLCDLLLVV
RTSLWRQQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRDSSLRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASP
TRTHQLLDRSLRRAGPGKGKGGVAELEPRPTRREHAELLASCYLPFGFLSAPQRVGMLAEAARTLE
KLGDRLLHDQCQMLMRLGGTTVTSS (SEQ ID NO: 30)
```

[0178]

SREBF1 이소형 b (진뱅크 수탁 번호 NM_004176.4)에 대한 핵산 서열, 또는 mRNA 서열이 아래에 제공된다:

```
AGCAGAGCTGCCCGGGGAAACCCAGTTCCGAGGAACTTCGCGCCGCCGGCCCTCTGAGGCC
AGGCAGGACACGAACCGCGGGAGCGGGCGACTGAGAGCCGGGGCCGCGCGCTCCCTAGGA
AGGCCGCTACGAGCGGGCGCCGGCGAGCGCTGGCGAGCCGTGCGATCTGGACGCCGCTGACCGACAT
TCAGCGAGGCGGCTTGGAGCAGGCGCTGGCGAGCCGTGCGATCTGGACGCCGCTGACCGACAT
CGAACATGCTTCAGCTTACAACAAACAGACAGTGACTTCCCTGGCCTATTGACCCACCTATGCT
GGGAGTGGGGCAGGGGGCACAGACCCCTGCCAGCCCCGATAACAGCTCCCCCAGGCAGCTTGCTCCACCTC
CTGCCACATTGAGCTCCTCTTGAGCAGCTCCCTGAGCGGGCGCAGGCAGGCCCTACCCCCCTGTCCCC
TCCCCAGCCTGCACTTCAAGGAGTGTACCCGTCATGCCCTGGCAGGGCTTCTCCCCCTGGTATC
AAGGAAGAGTCAGTGCCTAGCATCTGAGCACCCCCACAGCCCTGCCAGGGGCTCCTGC
CACAGAGCTTCCAGCCCCAGCCCCACCGCAGTTCAAGCTCCACCCCTGTGTTAGGCTACCCCAGCCCTCC
GGGAGGCTTCTACAGGAAGCCCTCCGGGAACACCCAGCAGCCGCTGCCCTGCCACTGGCTCC
CCGCCAGGGTCCGCCGTCTCTTGACACCCAGGTCCAGAGTGTTGGTCCCCCAGCAGCTACTGACAG
TCACAGCTGCCACGGCAGCCCCGTAAACGACCAGTGTGACCTCGCAGATCCAGCAGGTCCGGTCC
GCTGCAGCCCCACTTCATCAAGGCAGACTCGCTGCTCTGAGCAGCATGAAGACAGCGAGCCACTGTG
AAGCGGGCAGGGTCTCAGTCCCTGGTCTGGCACCACGTGAGCAGACAGGGCTTGGCAGACCTGGTGA
GTGGCGGAACCATCTGGCAACAGTCCCCTGGCTGTAGATGGGAGAGAGCTGCTATCAACCGCTCGC
AGCTGGCAGCAAGGCCCCGGCCTCTGGCAGAGCCGGAGAGAGACGGCACAGCCCACACGCCATTGAG
AACGCCTACCGCTCCTCCATCAATGACAAATCATTGAGCTCAAGGATCTGGTGGGACTGAGGCAA
AGCTGAATAAATCTGCTGTCTTGCACAGGCCATCGACTACATTCGCTTCTGCAACACAGCAACCAGAA
ACTCAAGCAGGAAACCTAAGTCTGCGCAGTGTCCACAAAGCAAATCTGAGGATCTGGTGTG
GCCTGTGGCAGTGGAGGAAACAGACGTGTCATGGAGGGGTGAAGACTGAGGTGGAGGACACACTGA
CCCCACCCCCCTGGATGCTGGCTACCTTCCAGAGCAGCCCTTGTCCCTGGCAGCAGGGCAGTGG
CAGCGGTGGCAGTGGCAGTGACTCGCTGGAGCAGCCCTGAGCAGGACAGCAAGGCAAAGCCAGAG
CAGCGGCCGTCTGCACAGCCGGGGCATGGACCCCTGGCCCTGGCCCTGTGACGCTCGTCTTCC
TCTGGCTGTCTGCAACCCCTTGGCTCTGGCTGGGAGAGAGCTGGCTGGCTGCTCTGGCTGGCTTCTTTG
TCTACGGTGAGCCAGTCACACGGCCCCACTCAGGCCCGCTGTACTCTGGAGGCATCGAAGCAGGC
TGACCTGGACCTGGCCGGGGAGACTTGGCCAGGCTGCCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAGGGACTG
GGCGGCCCTGCCACCTCCCACCTGGACCTGGCTTGAGCCTCCATCCGTACCTGC
```

[0180]

TCGACGCGTCTGGGTGGCCGCTGGCTGGCAGGCCGGCAGGGGCCCTGCAGCAGGACTGTGCTCTGCG
 AGTGGATGCTAGCGCACGCCAGACGCAGCCCTGGCTACCCATAAGCTGCACCAGCTGCACACCATG
 GGGAAAGCACACAGGGGGCACCTCACTGCCACCAACCTGGCGTGAGTGCCTGAACCTGGCAGAGTGTG
 CAGGGGATGCCGTGCTGGCGACCGCTGGCGAGATCTATGTGGGGCTGCATTGAGAGTGAAGACCAAG
 TCTCCCAGGGGCTTCGATTTCTGACACCTTCTCCATGGCAGTGCCCCGCCAGGCTGCTGGCACAG
 AGTGGCTCAGTGCCTCTGCCATGCAGTGGCTTGCCACCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 ACTGGTCCGGTGCCTAGTACCCCATGGGGAGGGCTGTACAGCTTGGCGGGGAACCCAGTGGGGGGGGGG
 CCAGGTGACTCAGCTATCCGGGAACATCTTAGAGCAGGACTGAACCTGTGTGACCCAGCCAAACCCC
 AGCCCTGGGTGAGCTGAGGGGACAAGGAATTCTGGATGCCCTGGGTACTCGAGCTGCTGAACAGCT
 GTTCTGATGCTGCGGGGCTCTGCTCACAGCTTCTCCATCAGTCCAGCATGGCCACCAACCGGGCGT
 AGACCCGGTGGCCAAGTGGTGGGCCCTCTGACAGCTGTGGTATCCACTGGCTGCGGGGGATGAGGAG
 GCGGGCTGAGCGGGCTGCGCCGCTGGGGAGCACCTGCCCGGGGGCTGCGAGGAGCTGAGAGACCCCTGC
 CCAGGGCAGCTGCTGACTCTCCAGGCTGCCGGGGGGCTGCTGGGCTGTGCGAACGGCAGAGTCTGGTCC
 AGCCAGCCCTGACCATCTGAGAAGGGCAGTGGGTAACCTGCAGGACACGCTGGCTACACACCCAGGAC
 AGCTCATTGACAAAGGGCGTCAGCTGTTCTGTGACCTGCTTCTGTGGTGCACCCAGCCTGTGGC
 GGCAGCAGCAGCCCCCCCCGG
 TGAGCTGCGTGGCTTCAACGGGACCTGAGCAGCCTGAGGGCGCTGGCACAGAGCTTCCGGGGCCATG
 CGGAGGGTGTCTACATGAGGCCACGGCCGGCTGATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TCCTGACCGCAGTCTGAGGGCGGGCAGGCCGGGTGGCAAAGGAGGCGGGTGGCGAGCTGGAGCC
 GCGGGCCACCGCGGGAGCACCGCGGGAGGCTGTGCTGGCTCTGCTACCTGCCCGGGCTTCCCTG
 TCGCGCGCCGGGGAGCACCGCTGGGATCTGCTGGCTGAGGGCGGCCACACTCGAGAACGCTTGGCAGTCGCC
 GGCTGCTGACGACTGTGAGCAGATGCTCATGCCCTGGGGCGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CCCCTGCTCCGGCTGACCCCCCTGCTCATGGGCAACTTGGTCTGGTGCAGCTTCTGTCTGCTGCG
 AGCTTGAAGGCCAGGAGCTGCAAGAGACTTGGCTCCACAGTTCGACCTGCGCTGCTGTGTGCGCT
 TCGCGGTGGAAGGCCAGGGGGCGCATCTGACCCCTAAGACCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TGGCGGATGGGGCACTGCAGGG
 GTGGCTTTTCTCTGTACAGGGAAAGAGAGAGGGTACATTCCCTGTGCTGACGGAAAGCCAATTGG
 CTGGGGGAGCTGCAACAGGGCTCTGCCAGGCCAGAGGGCTCTCTGGCTGGGGAGAGAGACGTGTA
 TAGTGTAGGTGAGCTGCTGGCTGAGGAGCTCTGGCTGAGGAGCTCTGGCTACTTGGCTTTGCAAAACTTT
 TTTCTAGATGAGAATTGGTACAGAGAATTAAAAATGAAATTATTATAATCTGGGTTTGTGTCTT
 CAGCTGATGGATGTGCTGACTAGTGAGAGTGTGGGGCCCTCCCCAGCAGCTAGGGAAAGGCTTCCCT
 CCCCTCCGGCCACAAAGCTACACAATTAACTTAGCTCTCCGATGTTGTTGTTGTTAGTGGGGAGGAG
 TGGGGAGGGCTGGCTGATGGCTCCAGCCACCTGTTCCCCCTGCTCCAGGGCAGATGGTGGGCTG
 GTCAACCCCTAGGGCTCCATGGGGCTAGTGTGCTCTGACCTCCAGCTGTGCCCCATCAGGTCCC
 TGGGGCGACGGGAGGATGGACTGACTTCCAGGACCTGGTGTGACAGGAGCTACAGCTGGGTCTCCC
 TGCAGGAAAGTCTGGCACGCTCACCTCCCCATCCCGGCCCCCTGGCATCTCACAGCAAAGAACGCTCCT
 CCCCTCCGGACCTGCCACACTGGAGAGGGGGGACAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CGACTCCCCTGACTCCTCATGCCCTCCCCCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TGG
 TTATTGACTTTTTTTTTTTTTCTGAATGCACTGTTTTTACTCTTAAGGGAAAATAAACATC
 TTTAGAAACAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 31)

[0181]

[0182]

SREBF1 이소형 c (진뱅크 수탁 번호 NM_001244003)에 대한 핵산 서열, 또는 CDS가 아래에 제공된다:

ATGGACGAGCTGCCTTCGGTAGGGCGCTGTGGAACAGGCCTGGACGAGCTGGCGACTGGACGCCGACTGCT
GACCGACATCCAAGACATGCTCAGCTCATCAACAACCAGACAGTGACTTCCCTGGCTGTTGATTCCCCCTATG
CAGGGGGCGGGGAGAGACACAGAGCCCACCAGGCCCTGGTCCAAGTCTCTGAGAGCTGTCTTCTCTGCTTCC
CTGGGTTCTCTGGAAAGCCTCTGGGGAACCAAGGCAACACCTGCATCCTGTCCCTGTGCCGCTGCATC
CACTGCTTAAAGATGTACCGTCTGTCCCCCTCTCCCTGGGCTGGAAATCAAAGAAGAGCCAGTGCACACTCA
CCATCCTGCAGCCCCAGCAGCACGCCATCACCAGGGACCCCTCTGCCCTCGAGTTCCCTCCACCACCCCTGCAG
CTCAGGCCGGCTCTGTCTGGGTATTCTAGCCTCCTCAGGCTTCCTCAAGGACCTTCTCTGGAAATACCAACA

[0183]

GCCACCATCTAGCCTGTCACTGGCCTGCACCAGGAGTCTGCCCATCTCTTACACACCCAGGTCCAGAGCTCAG
 CCTCCCAGCAGCCACTGCCAGCCTAACAGCCCCTAGAACAAACCACTGTGACCTCACAGATCCAGGGTCCCAGTC
 GTACTGCAGCCACATTCAAGGCAGATTCACTGCTACTGACAACGTAAAACAGATAACAGGAGCCACGATGAA
 GACGGCTGGCATCGTAGCTTACGCTAGGCCCTGGCACAGCGTGCAGGCAGGCCCTTGCAAGACCTGGTGAGTGGTGGGA
 CCATCCTGGCACAGTACCATGGTTGGATACAGACAAACTGCCATCCATCGACTGGCAGCTGGCAGCAAGGCC
 CTGGGCTCAGCTCAGAGCGTGGTGAGAAGCGCACAGCCCACAATGCCATTGAGAAGCGTACCGTCTATCAA
 TGACAAGATTGTGGAGCTCAAAGACCTGGTGGCACTGAGGCAAAGCTGAATAAACTGCCGTCTGGCAAGG
 CCATCGACTATATCCGCTTACAGCACAGAACAGCTAACAGAGAACCTGCCCTGGCAATGCCGCT
 CACAAAAGCAAATCCCTGAAGGACCTGGTGTGGCAGTGCAGGAGGACAGAGATGTGGCTATGGAGGGTGT
 GAAGCCTGAGGTGGTGGATACGCTGACCCCTCCACCCCTCAGACGCTGGCTGCCCTCCAGAGTAGCCAGGTGAAA
 GCCCAACGGCTGCACAGTCATGGCATGCTGGACCGCTCCCGCCTAGCCCTGTGTCGCTGGCTTCCTGTGCTGAC
 CTGCAACCCCTGGCATCAGTGTGGCTGGGATCAGTGGCTGGCAGTGCAGGAGAACCTGCCCTGGCAACACCAGCTCTG
 GGGTAGCATGCTGGAGGCCAGAGCAGAGATGGCTTAATTGGACCCAGTGGTGCTGCCACCCCTAGTCTGGCTG
 GCCAATGGACTACTAGTGTGGCTGCCTGGCTTCTCTTTGTCTATGGGAAACCTGTGACCCGGCACACACTAG
 CCCAGCTGTACACTCTGGAGACATCGAACAGGCTGACCTGGACTTGGCTGGGAGATTGCCCAGGCTGCTC
 AGCAGCTGTGGCTGCCCTGCAGGCATTGGACGGCCCTGCCACCTGAACCTAGACTTGGCTGCAGCTGCTT
 TGGAACCTCATCCGCCACCTGCTGCAGCGCTCTGGGTTGGCGCTGGCTGGCAGGCCGGCTGGGGCTTGCGGAG
 AGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACTGCGAGATGGCTCGTCTACCATAAGCTGCACCAGCTGC
 ATGCCATGGCAAATACACAGGAGGGCACCTATTGCTTAACCTGGACTGAGTGGCTGCTGCCCTGAGGTCAAGACCAGTCCC
 GCAGGAGATGCTGTATCCATGGCAACGCTGGCAGAGATCTATGTGCTGCTGCCCTGAGGTCAAGACCAGTCCC
 AAGAGCCTTGCACTTTGACACGTTCTCCTGAGTAGTGGCCACCGTTCTCTGTGGATGGGACTGGCTGTGCATGGGCC
 CTCTTGCCATGCAGTGGCTTGCCACCCCTGAGGCCACAGGCTGGCTGGGACAGCTGACTATTCTGCGAAC
 TCTCTGGAGAGAGCACTGAACGTATTGCTAACCCAGCCGGGACAGCTGATGGAGACAGGGAGTTCTGACG
 CACTTGGATACTGCAGTTGCTAAATCGCTGTGATGCTGTCGGGACTCCTGCCCTGCAGCTCTGTCAAGCTCC
 AGCATGGCTTCCACCAACGGCACAGACCCAGTGGCAAGTGGTGGCCTACTGACGGCTGTTGATCCACTGGCT
 GCGGGGGATGAAGAGGCAGCTGAGCGCTATAACCGCTGGTAGAGCGTATGCCCACTGCTGAGACTGAGA
 GACCCCTGCCCAAGGCAGCTGTACTCCCTCAAGGCTGCCGGCTCTGCTGGACACAGAAAAGTGGAGTCTGGC
 CCAGCCAGCCTGGCATCTGTGAGAAGGCCAGCGGTACTTGCGGGACAGCTAGCCCTCCACCAACTGGCAGCTC
 CATTGACAAGGCATGCAGCTGCTCTGTGATCTACTTCTTGCGGCCGACTAGTATGTGGCAGCGCCAGCAGT
 CACCAGCCTCAGCCAGGTAGCTCACAGTGCAGCAATGGATCTCAGGCCCTCCGCTTGGAGCTTGTGAGGTTCAA
 CAGGACCTGAGCAGCCTGAGGCCTGGCACAGAACCTCCGGCTGCTATGAGGAGAGTGTGCTACAGGAGGCCAC
 AGCTCGGCTGATGGCAGGGCAAGTCCCTGCCGGACACACCAGCTCTGGACCGAAGTCTGGGGAGGCCGG
 CCAGTGGCAAAGGGAGCACTGTAGCTGGAGCTGCCACATGGCGGGAGCACAGAGGCCCTGTGCTG
 GCCTCCTGCTATCTGCCACCTGCCCTCTGCGCCCTGGACAGCAAATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCACGCAC
 TGTAGAGAAGCTTGGTGTACCGCTACTGCTTGACTGCCAGCAGATGCTTCTGCCCTGGCGGTGGGACCACTG
 TCACCTCCAGCTAA (SEQ ID NO: 32)

[0184]

[0185]

SREBF1 이소형 c (진뱅크 수탁 번호 NM_001244003)에 대한 핵산 서열, 또는 mRNA 서열이 아래에 제공된다:

CTCCTGCGAAGCTGGGGCGCCGCATGGACGAGCTGCCCTCGGTGAGCGGCTGTGGAACAGCGCTGGA
 CGAGCTGGCGAAGTGGACGCCACTGTCAGCGACATCCAAGACATGCTTCAGCTCATCAACAACCAAGACAGTG
 ACTTCCCTGGCTGTTGATTCCCCATGCAGGGGGCGGGCAGGAGACACAGAGCCCACCAGCCCTGGTGCCAAC
 TCTCCTGAGAGCTGCTTCCTGCTCCCTGGGTTCTCTGGAAGCCTCTGGGGAAACCCAAGGCAACACC
 TGCATCCTGCCCCGTGCGTCTGCATCCACTGCTTAAAGATGTACCCGTCTGTGCCCCCTCTCCCTGGC
 CTGGAATCAAAGAAGAGGCCAGTGCCACTCACCATCCTGCAGCCCCAGCACAGCCATCACCAAGGGACCCCTG
 CCTCCGAGTTCCCTCCACCACCCCTGCAGCTCAGCCGGCTCTGTGCTGGGTTATTCTAGCCTCCCTCAGGCTT
 CTCAGGGACCTCCTGAAATACCCAACAGCCACCCTAGCCTGTCAGTACCTAGCCCTGCAACCAGGAGTCTGCC
 TCTCTTACACACCCAGGTCCAGAGCTCAGCCTCCAGCAGCCACTGCCAGCCTCAACAGCCCTAGAACAAAC
 GTGACCTCACAGATCCAGCGGGTCCAGTGTACTGCAGCACATTCACTCAAGGCAGATTCACTGCTACTGACAAC
 TGTAACACAGATACAGGAGCCACGATGAAGACGGCTGGCATCAGTACCTAGCCCTGGCACAGCCGTGAGGCAG
 GCCCCTTGAGACCCCTGGTGAAGTGGTGGGACATCCTGCCACAGTACCAATTGGTGTGGATAACAGACAAACTGCC
 ATCCATCGACTGGCAGCTGCAGCAAGGCCCTGGCTCAGCTCAGAGCCGTGGTGAAGACGCACAGCCACATGC
 CATTGAGAAGCCTACCCTGCTTCAATGACAAGATTGTGGAGCTAAAGACCTGGTGGTGGGACTGAGGCAA
 AGCTGAATAAATCTGCCGTCTGCGAAGGCCATCGACTATATCCGTTTACAGCACAGCAACCAGAACGCTCAAG
 CAGGAGAACCTGGCCCTGCGAAATGCCCTCACAAAAGCAATCCCTGAAGGACCTGGTGTGCCCTGGAGTGC
 AGGAGGCACAGATGTGGCTATGGAGGGTGTGAAGCCTGAGGTGGATACGCTGACCCCTCCACCCCTCAGACGCTG
 GCTGCCCTCCAGTAGCAGCTGGCCCTGGCAGAGGTAGCAGCAGTGGTGGCAGTGACTCGAGCCTGAC
 AGCCCAGTCTTGAGGATAGCCAGGTGAAGCCCAACGGCTGCACAGTCATGGCATGCTGGACCCTCCGCCCTAGC
 CCTGTGTGCGCTGGTCTTCCTGTCTGACCTGCAACCCCTGGCATCAGTGTGGCTGGGCTGGCTTCTCTCTTGTCTA
 CCAGTGCCTCTGGTGCACACCACAGCTGGCGTAGCATGCTGGAGGCCAGAGCAGAGATGGCTTAATTGGACC
 CAGTGGTTGCTGCCACCCCTAGCTGGCTGGCAATGGACTACTAGTGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTTCTCTCT
 TGGGAACCTGTGACCCGGCACACACTAGCCCAGCTGCTCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAAGGATTGGCTGAC
 TGGCTGGGGAGATTTGCCAGGTGCTCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAAGGATTGGGACGCCCTGCCAC
 TCGAACCTAGACTGGCCTGCAACCTCATCCGCCACCTGCTGCAAGCGTCTGGGTTGGCCCTG
 GCTGGCAGGCCGGCTGGGGCTTGCGAGAGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACTGCTGGAGATGCG
 CTCTCGTCTACCATAAGCTGCACCGACTGCACTGGCAAAATACACAGGAGGGCACCTCATTGCTTAACCTG
 GCACAGTGGCTGGGAGACTGGCTAGTGGCTCTTGCCATGCACTGGCTGGCTGGCCACCCCTGAGGCCACCGTTCT
 TGCTGCCCTGAGGGTCAAGACCAGTCTCCAAGAGCCTGCACTTTGACACGTTCTCTGAGTAGTGGCCGCC
 AGGCTGCCCTGGCACAGAGTGGCTAGTGGCTCTTGCCATGCACTGGCTGGCTGGCCACCCAGTGGATCCCT
 GTGGATGGGACTGGCTGTGCACTGGCCCCACAGGAGAGCCCTGACAGCGTGGCTGGGAACCCAGTGGATCCCT
 CGCCCAGGTACTGACTATTCTGCAACATCTTGGAGAGAGCAGTGAACGTGATTGCTCAACCCAGCCGGGA
 CAGCTGATGGAGACAGGGAGTTCTGACGCACCTGGATACCTGCACTGGTAACTGCTGCTGTGATGCTGCGG
 ACTCCTGCCCTGCAAGCTCTGTCAGCTCCAGCATGGCTCCACCAACGGCACAGACCCAGTGGCAAGTGGTGGC

[0186]

CTCACTGACGGCTGTGGTATCCACTGGCTGCCGGGATGAAGAGGCAGCTGAGGCCCTACCCGCTGGTAGAGC
 GTATGCCCACTGCTGCCAGAGACTGAGAGACCCCTGCCCAAGGCAGCTGTACTCCTCAAGGCTGCCGGCT
 CTGCTGGACCACAGAAAAGTGGAGTCTGGCCAGCCAGCCTGGCCATCTGTGAGAAGGCCAGCGGGTACTTGCGGG
 CAGCTTAGCCGCTCCACCAACTGGCAGCTCCATTGACAAGGCATGCCAGCTGCTCTGTGTGATCTACTTCTGTG
 CCCGACTAGTGTGGCAGCGCCAGCAGTCACCGCCTAGCCAGGTAGCTCACAGTGCCAGCAATGGATCTCAG
 GCCCTCGCTTGAGCTTCGAGGTTCCAACAGGACCTGAGCAGCCTGAGGCGCTTGGCACAGAACTCCGCCCTGC
 TATGAGGAGAGTGTGCTACAGAGGCCACAGCTCGGCTGATGGCAGGGCAAGTCTGCCGGACACACCAGCTCC
 TGGACCGAAGTGTGCGAGGGCGGGCGGCCAGTGGCAAAGGAGGGACTGTAGCTGAGCTGGAGCCTCGACCCACA
 TGGCGGGAGCACAGAGGCCCTGCTGGCTCCTGCTATCTGCCACCTGCCCTGTGCGGCCCTGGACAGCA
 AATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCAGCAGTGTAGAGAAGCTGGTGTACATGCCACTGCTGACTGCCAGCAGA
 TGCTTCTGCCCTGGCGGGAGGACACTGTCACTTCCAGCTAAACCTGGATGGTCTCCCCAGTATTAGAGGCC
 TAAGGACCTTGTCACTGGCTGTGGCTCCAGAGAGGGTGAACAGCAAGCAGGCCACCTTGTGACTGGCAC
 TGACAAATCTAGAAATTGCAAGAGGCTGCACTGGCCCAATGCCACCCCTTGCTGCTGTAGGCACCTTTCTGTCT
 ATGGAAAGGAAACCTTCCCTAGCTGAGGGCCACCCCTGCTGAGGCTCTACCCACTCCTGGAAAGACTTGTATATA
 GTGTAGATCCAGCTGAGCCAGTTCTGTCAGGCTCATGTAACTTAACCTTATTTCATAGGT
 TGAGAAATTTGTACAGAAAATTAAAAAGTGAATTAGTATA (SEQ ID NO: 33)

[0187]

[0188]

SREBF1 이소형 c (진뱅크 수탁 번호 NM_001244003)에 대한 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

```
MDELPFGEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQDSDFPGLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPESLSSPAS
LGSSLEAFLGEPKATPASLPVPSASTALKMYPSPVPPSPGPGIKEPVPLTILQPPAAQPSPTLLPPSFPPPPLQ
LSPAPVLGYSSLPSGFSGTLPGNTQQPPSSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQQPLPASTAPRTTVTSQIQRVPV
VLQPHFIKADSLLLTVKTDTGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPIHRLAAGSKA
LGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAIDYIRFLQHSNQKLQENLALRNAA
HKSLSLKDLVSACGSAGGTDVAMEGVKPEVVDTLTTPPSDAGSPSQSSPLSLGSRGSSGGSDEPDSPFEDSQVK
AQRLHSHGMGRSRLALCALVFLCLTCNPLASLFGWGI PGPSASAGAHSSGRSMLEAESRDGSNWTQWLLPVLVW
ANGLLVIACIALLFVYGEPVTRPHTSPA VHFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSL
WNLIRHLLQRLWVGRWLAGRAGGLRRDCGLRMDARASARDAA LVYHKLHQLHAMGKYTGHHIASNLALSALNIAEC
AGDAVSMATLAEIYVAA ALRVKTS LPRALHFLTRFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGH RFFVDGDWA VHGA
PQESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFCEHLLERALNCIAQPSPTADGDREFSDALGYLQLLNRCSDAVGTPACSFVSS
SMASTTGTDPVAKWWASLTAVVIHWLRRDEEAERLYPLVERMPHV LQETERPLPKAALYSFKAARALLDHRKV ESG
PASLAICEKASGYLRDLSAAPPTGSSI DKAMQLLCDLLL VARTSMWORQOSPASA QVAHSASNGSQASALELRGFQ
QDLSSLRRLAQNFRPAMRRVFLHEATARLMAGASPARTHQLLDRS LIRRAGSSKG GTVAELEPRPTWREHTE ALL
ASCYLPPAFI SAPGQQMSMLAEAARTVEKLGDHRLLLDCQM LLRLGGTTVTSS (SEQ ID NO: 34)
```

[0189]

[0190]

말단절단된 SREBF1 이소형 c (진뱅크 수탁 번호 NM_001244003), 예를 들어, SREB411에 대한 핵산 서열, 또는 mRNA 서열이 아래에 제공된다:

```
atggacgagctgccttcggtgaggccgtgtggAACAGGCCGCTGGACGAGCTGGCGCAACTGGACGCCGCACTGCT
gaccgacatccaagacatgc ttca gctcatcaaca accaaga ca agt gacttccctggcctgtttgattccccatcg
caggggccggggcaggagacacagagcccaccagccctggc caactctcctgagagcttgttctccctgtcc
ctgggtccctctggaa agccttcggggaa ccccaaggcaac acctgc atccctgtccctgtccctgtcc
cactgcttaa agatgtaccgtctgtgcccccttcctccctggcctggaatcaaaga aga gac gccc agt gccc actca
ccatcctgcaggcccccagcagc acagccatcaccaggaccctc tgcctccgagttccctccaccaccctgcag
ctcagcccgcttcgtgctgggtattctagc ttccctcaggcttcaggcttcaggacccttc tggaaatcccaaca
gccaccatctagc ctgtcactggcctctgc accaggatctc gccc atctt acac acccagg tcc cag a gtc
cctcccagcagccactgccc agcctcaac agccctagaaca accactgtgac ctac agatccagcggg tcc cag tc
gtactgcagccacatttcatcaaggc agattactgctactgacaactgtaaa acagatacaggagccacatgaa
gacggctggcatc agt tac ttagccctggcacagccgtgcaggcaggcccttgcagaccctggtagtgg tgg
ccatcctggccacagtaccatgggtgatc agacaa actgccc atccatc gactggc agctggc agcaaggcc
ctgggctcagctc agagccgtggtagaa agcgc acaggccacaatgccattgagaagcgc taccg tcc tctatcaa
tgacaagattgtggagctcaagacctgggtggcactgaggcaagctgaataaatctgcgtcttgcgcaagg
ccatc gactata tccgctt acagc acagca acca agctca agcaggaga acctggccctgc gaa atg cc gct
caca a a agca a atccctgaaggac ctgggtcggcctgtggc agtgcaggaggc aca gatgtggctatggagggtgt
g (SEQ ID NO: 35)
```

[0191]

[0192]

말단절단된 SREBF1 이소형 c (진뱅크 수탁 번호 NM_001244003), 예를 들어, SREB411에 대한 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

```
MDELPFGEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQDSDFPGLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPESLSSPAS
LGSSLEAFLGEPKATPASLPVPSASTALKMYPSPVPPSPGPGIKEPVPLTILQPPAAQPSPTLLPPSFPPPPLQ
LSPAPVLGYSSLPSGFSGTLPGNTQQPPSSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQQPLPASTAPRTTVTSQIQRVPV
VLQPHFIKADSLLLTVKTDTGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPIHRLAAGSKA
LGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAIDYIRFLQHSNQKLQENLALRNAA
HKSLSLKDLVSACGSAGGTDVAMEGV (SEQ ID NO: 36)
```

[0193]

[0194]

한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 이소형의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 28, 30, 34, 또는 36과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 이소형의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 28, 30, 34, 또는 36과 1, 2, 또는 3개 또는 그의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.

- [0195] 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 34과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 34와 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.
- [0196] 또 다른 실시양태에서, LMM은 SREBF1 또는 그의 이소형, 예를 들어, 말단절단된 SREBF1의 기능적 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 기능적 단편, 예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 34의 기능적 단편, 또는 SREBF1 이소형, 예를 들어, 서열식별번호: 28, 30, 또는 36의 기능적 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 기능적 도메인, 예를 들어, SREBF1의 트랜스 활성화 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 나선-루프-나선 (HLH) 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 핵 내로 전위될 수 있고/있거나 SREBF1 표적 유전자의 전사를 개시할 수 있는 SREBF1의 기능적 단편을 포함한다.
- [0197] 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 N-말단 410개 아미노산 (본원에서 SREBF410으로서 지칭되기도 함), 예를 들어, 서열식별번호: 1의 아미노산 1-410을 포함한다. SREBF1의 N-말단 410개 아미노산의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:
- ```
MDELAFGEAALEQT LAEMCELD TAVLNDI EMLQLINNQDSDFPGLFDAPYAGGETGDTGPSSPGANS PESFSSASL
ASSLEAFLGGPKVTPAPLSPPPSAPAALKMYPVS FSPSPGPGIKEEPVPLTILQPAAPQPSPGTLLPPSFAPPVQL
SPAPV LGYSSLPSFGSGTLP GNTQQPSSLPLAPAPGVLPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPV
VLQPHFIKADSL LL TAVKT D AGATVKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPIHRLAAGSKA
LGSAQS RGEKRTA HNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRFLQHSNQKLQENLTLSAH
KSKSLKDLV SACGS GGTDV SMEGM (SEQ ID NO:26)
```
- [0198] 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 N-말단 410개 아미노산의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 26과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 N-말단 410개 아미노산의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 26과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.
- [0200] 또 다른 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 아미노산 91-410, 예를 들어, 서열식별번호: 1의 아미노산 91-410을 포함한다. SREBF1의 위치 91-410에서의 아미노산의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:
- ```
MPAPLSPPPSAPAALKMYPVS FSPSPGPGIKEEPVPLTILQPAAPQPSPGTLLPPSFAPPVQLS PAPV LGYSSLPS  
GFSGTLP GNTQQPSSLPLAPAPGVLPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPV VLQPHFIKADSL  
LTAVKT D AGATVKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPIHRLAAGSKA QSRGEKRTA  
HNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRFLQHSNQKLQENLTLSAH KSKSLKDLV SACG  
SGGGTDV SMEGM (SEQ ID NO: 27)
```
- [0202] 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1의 위치 91-410에서의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 27과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF1의 위치 91-410에서의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 27과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 한 실시양태에서, LMM은 SREBF1 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는; 예를 들어, 아미노산 서열 서열식별번호: 1 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는 핵산 서열과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 서열식별번호: 2의 핵산과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함한다.
- [0203] 또 다른 실시양태에서, LMM은 SREBF2 또는 그의 기능적 단편과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SREBF2 또는 그의 기능적 단편과 1, 2, 또는 3개 또는 과의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다.
- [0204] 한 실시양태에서, LMM은 효소를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 포화 지방산을 불포화 지방산으로 전환시켜 주는 효소를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 포화 지방산을 단일불포화 지방산, 예를 들어 1개의 이중 결합을 수반한 지방산으로 전환시켜 주는 효소를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 포화 지방산을 다중 불포화 지방산, 예를 들어, 2개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 이중 결합을 수반한 지방산으로 전환시켜 주는 효소를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 스테아로일 CoA 테새투라제 1 (SCD1), 스테아로일 CoA 테새

투라제 2 (SCD2), 스테아로일 CoA 테새투라제 3 (SCD3), 스테아로일 CoA 테새투라제 4 (SCD4), 스테아로일 CoA 테새투라제 5 (SCD5), 그의 이소형, 또는 그의 기능적 단편을 포함한다.

[0205] SCD1은 포화 지방산 (SFA)을 단일불포화 지방산 (MUFA)으로 전환시키는데 책임이 있는 속도 제한 효소이다. 상기 유전자의 발현을 세포 생존율, 중식 및 종양 형성 특성의 증가와 연계시킨 연구로 인해 최근 수년간 SCD1에 대한 관심이 증가하였다 (Angelucci, Maulucci et al. 2015) (Igal 2011). SCD1은 또한, 세포성 대사 속도 제어와 전반적인 지질생성 둘 다에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 후자는 주요 생합성 경로 조절제 아세틸-CoA 카르복실라제 (ACC)와의 직접적인 상호 작용을 통하여 제어될 뿐만 아니라, SFA가 ACC를 억제하는 것으로 공지되기 때문에 지질 생합성을 증가시키기 위해 효소 기능성을 촉진시켜 주는 MUFA로의 SFA의 전환을 통하여 제어된다 (Igal 2010). SCD1의 주요 조절은 전사 활성화를 통해서이며, 이로써 전사 인자, 예컨대 SREBF1이 유전자의 프로모터 영역 내의 SRE 서열과 결합한다. SCD1은 막 일체형 단백질로서 ER 내에 내인성으로 위치되며, 여기서 SCD1은 SFA의 MUFA로의 전환을 촉매하는 그의 효소적 기능을 수행한다. SFA의 MUFA로의 전환에 있어서의 그의 역할 (예를 들어, MUFA 대 SFA의 비의 상향조절)은 지질 뗏목 도메인 상의 감소를 조절할 수 있으며, 이는 결국 막 유동성 증가를 유발할 수 있다. 이러한 막 유동성과 막 지질 조성에 있어서의 변화는 또한, 소포 형성에 영향을 미칠 수 있으므로, 세포성 소통과 ER 크기 또는 형태 (예를 들어, ER 확장)에 영향을 미칠 수 있다. SCD1 유전자의 녹다운이 또한, 언풀딩된 단백질 반응을 상향조절하는 것으로 밝혀졌다 (Ariyama, Kono et al. 2010). 더욱이, SCD1은 세포성 팔미트산을 부정적으로 조절하며, 이는 결국, ACC의 강력한 부정적 조절제이다. SCD1은 또한, AMP 활성화된 단백질 키나제 (AMPK)의 인산화 상태를 제어하며, 결과적으로 인산화 할 수 있는 그의 능력이 저하되므로, 지질 합성 프로세스에서 속도 제한 효소인 ACC를 억제한다. 마지막으로, SFA의 탈포화는 세포 사멸을 야기할 수 있는 그의 축적을 방지시킨다. 따라서, SCD1의 조정이 지질 생합성, 세포 생존율 및 중식 속도의 증가를 유발한다 ([Hagen, Rodriguez-Cuenca et al.], [Scaglia, Chisholm et al. 2009]).

[0206] 한 실시양태에서, LMM은 SCD1을 포함한다. SCD1의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

```
MPAHMLQEISSSYTTTTITAPPSGNEREKVTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDPTYQDEEGPPPKLEYVWRN
IILMVLLHLGGLYGIILVPSCKLYTCLFGIFYYMTSALGITAGAHLRWSHRTYKARLPLRIFLIIANTMAF
QNDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGKLDMSDLKAEKLVMFQRRY
YKPGLLLMLMCFILPTLVPWYCWGETFVNLSFLRYTLVLNATWLVSAAHLYGYRPYDKNIQSRENILV
SLGAVGEGFHNYHHTFPFDYSASEYRWHINFTTFIDCMALGLAYDRKKVSKATVLARIKRTGDGSHKSS
(SEQ ID NO: 3)
```

[0207]

[0208] SCD1의 뉴클레오티드 서열이 아래에 제공된다:

```
atgccccggccacatgtccaagagatctccaggatcttacacgaccaccaccatcactgcacccctcc
ggaaatgaacgagagaaggtaagacgggtgcggccctccacatggaaagaagacatccgtcctgaaatgaa
gatattcagcagcccccacatcaggatgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
atttcatggctctgtgcacttgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
tgccctttcgggattttctactatcatgaccaggcgcttgggggggggggggggggggggggggggggggggg
cacaagaacttacaaggcacggctggccatgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
gacgtgtacgaatgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
tcccgccgtggcccttcttcacgtgggtgggtgtgcgcacccgggggggggggggggggggggggggggggggg
ggcgaaaaactggacatgtgtgcacatgtgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
ggcctctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
agctgttcgttagcacctttgtgcataactctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
catctctatggatatgcggccatcgacaagaacatcaatccgggagaatatcctgggtttccctgggtgcc
gtggcgaggggcttccacaactaccaccacacccccccttcgactactctgtccagtgagtaccgctggcac
atcaacttcaccacgttcttcatcgactgcacggctggctggccctggcttacgaccggaaagaaatgttct
aaggctactgttttagccaggatagaagaactggagacgg gagtccacaagagtagctga
(SEQ ID NO: 4)
```

[0209]

[0210] 한 실시양태에서, LMM은 SCD1의 아미노산 서열; 예를 들어, 서열식별번호: 3과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SCD1의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 3과 1, 2, 또는 3개 또는 그의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 한 실시양태에서, LMM은 SCD1의 기능적 단편, 예를 들어, 서열식별 번호: 3의 기능적 단편을 포함한다.

[0211]

한 실시양태에서, LMM은 SCD1 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는; 예를 들어, 아미노산 서열 서열식별번호: 3 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는 핵산 서열과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 서열식별번호: 4의 핵산과의 적어

도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0212] 또 다른 실시양태에서, LMM은 SCD2, SCD3, SCD4, SCD5, 또는 그의 기능적 단편의 아미노산 서열과의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 포함하거나; 또는 SCD2, SCD3, SCD4, SCD5, 또는 그의 기능적 단편의 아미노산 서열과 1, 2, 또는 3개 또는 그의 아미노산 잔기 내지 50,, 40, 30, 20, 15, 또는 10개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이하다. 또 다른 실시양태에서, LMM은 적어도 포함한다.

[0213] 또 다른 실시양태에서, LMM은 SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 또는 SCD5의 기능적 단편, 예를 들어, 말단절단된 SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 또는 SCD5를 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 또는 SCD5의 기능적 단편, 예를 들어, 서열식별번호: 3의 기능적 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, LMM은 SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, 또는 SCD5의 기능적 도메인, 예를 들어, 포화 지방산을 단일불포화 지방산으로 전환시키기 위한 효소적 활성을 갖는 도메인을 포함한다.

[0214] 둘 이상의 아미노산 또는 핵산 서열의 맥락에서 퍼센트 동일성은 동일한 둘 이상의 서열을 지칭한다. 두 서열이 다음 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정된 바와 같은 지정된 영역에 걸쳐, 또는 비교 원도에 걸쳐 최대 상응도를 위해 비교 및 정렬되는 경우에, 명시된 영역에 걸쳐, 또는 명시되지 않는 경우에는 전체 서열에 걸쳐, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 명시된 백분율로 갖는다면 (예를 들어, 60% 동일성, 임의로 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성) 이러한 두 서열은 "실질적으로 동일하다". 일부 실시양태에서, 정렬은 캡 또는 삽입된 서열을 유발할 수 있으며, 여기서 서열 유사성은 이러한 캡 또는 삽입된 서열을 플랭킹하는 명시된 영역에 대하여 결정될 수 있거나, 또는 서열 유사성은 캡 또는 삽입된 서열을 포함하는 영역 전체에 걸쳐 결정될 수 있다. 임의로, 동일성은 길이가 적어도 약 50개 아미노산 또는 뉴클레오티드, 100개 아미노산 또는 뉴클레오티드, 150개 아미노산 또는 뉴클레오티드인 영역에 걸쳐 존재한다. 보다 바람직하게, 동일성은 길이가 약 200개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드, 또는 약 500개 또는 1000개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드인 영역에 걸쳐 존재한다.

[0215] 서열 비교를 위해, 하나의 서열이 전형적으로 참조 서열로서 작용하며, 이와 하나 이상의 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우에는, 시험 서열과 참조 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요한 경우, 하위서열 좌표가 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 디풀트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 대체 파라미터를 지정할 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 근거하여, 참조 서열과 비교한 시험 서열에 대한 퍼센트 서열 동일성을 계산한다. 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위해 서열을 최적으로 정렬하는 것은, 예를 들어, 문헌 [Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌 [Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌 [Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 검색 방법, 이를 알고리즘의 컴퓨터화된 구현 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 수동 정렬 및 육안 검사 (예를 들어, 문헌 [Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology] 참조)에 의해 시행될 수 있다. 다수의 서열 정렬은 클러스탈(Clustal)W, 클러스탈 오메가, 및 MAFFT와 같은 알고리즘에 의해 수행될 수 있다. 둘 이상의 서열 간의 관계를 비교하기 위한 다른 알고리즘은 은닉 마르코프(Hidden Markov) 모델을 포함한다. 은닉 마르코프 모델은 특별한 뉴클레오티드 (또는 아미노산) 유형이 또 다른 유형 (숨겨진 확률 경로)을 따르는 확률을 설명하는 모델이다. 이는 실제로 알고리즘이 아닌 확률론적 모델이다. 알고리즘 (또는 이러한 알고리즘을 구현하는 프로그램)의 예는 HMMER일 수 있다 (<http://hmmer.org/>).

[0216] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 2가지 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이는 문헌 [Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402]; 및 [Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생명과학 정보 센터 (NCBI)를 통해 공개적으로 입수 가능하다.

0217] 산물

[0218] 본원에는 고 수율의 산물 및/또는 개선된 산물 품질을 생산할 수 있는 세포 또는 무세포 발현 시스템을 조작 및 제조하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 본원에 기재된 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 단백질; 핵산 분자, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자; 다양체성 단백질 또는 복합체; 지질-캡슐화된 입자, 예를 들어, 바이

러스 유사 입자, 소포, 또는 엑소솜; 또는 다른 분자, 예를 들어, 지질을 포함한다. 실시양태에서, 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드이다. 실시양태에서, 산물은 엑소솜이다. 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 단백질, 또는 복잡하고/하거나 비-자연 구조를 갖는 단백질, 예컨대 차세대 생물제제, 예를 들어, 이중 특이적 항체 분자, 융합 단백질, 또는 글리코실화된 단백질을 발현하기 어려울 수 있다.

[0219] 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 또는 조성물에 의해 생산된 세포 또는 세포주는 의학적 병태, 장애 또는 질환의 치료에 유용한 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 생산한다. 의학적 병태, 장애 또는 질환의 예는 대사 질환 또는 장애 (예를 들어, 대사 효소 결핍증), 내분비 장애 (예를 들어, 호르몬 결핍증), 지혈의 조절이상, 혈전증, 조혈 장애, 폐 장애, 위장 장애, 자가면역 질환, 면역 조절이상 (예를 들어, 면역결핍증), 불임증, 이식, 암, 및 감염성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0220] 실시양태에서, 산물은 외인성 단백질, 예를 들어, 세포에 의해 자연적으로 발현되지 않는 단백질이다. 한 실시양태에서, 이러한 단백질은 하나의 종으로부터의 것인 반면, 세포는 상이한 종으로부터의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 단백질은 비-자연적으로 발생하는 단백질이다.

[0221] 다른 실시양태에서, 산물은 세포에 의해 내인성으로 발현되는 단백질이다. 한 실시양태에서, 산물은 내인성 또는 자연 수준에서 세포에 의해 내인성으로 발현되는 단백질이다. 본원에 기재된 본 방법 및 조성물은 내인성 산물, 예를 들어, 세포에 의해 자연적으로 생산되는 자연적으로 발생하는 산물의 생산 및 품질을 증가시키기 위해 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 단백질을 코딩하는 외인성 핵산이 세포 내로 도입되고 이에 의해 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 세포에 의해 내인성으로 발현되는 산물의 발현을 증가시키는 외인성 핵산이 세포 내로 도입된다. 한 예로서, 외인성 핵산은 세포의 내인성 산물의 발현을 제어하는 프로모터 (예를 들어, SRF 프로모터 서열; 예를 들어, 문헌 [The transcription factor Ap-1 regulates monkey 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase promoter activity in CHO cells. Nanjidsuren T, Min KS. BMC Biotechnol. 2014 Jul 30;14:71. doi: 10.1186/1472-6750-14-71. PMID: 25073972] 참조)를 활성화시키는 서열을 포함한다.

[0222] 재조합 산물은 치료용 산물이거나, 또는 예를 들어, 약물 스크리닝에 유용한 진단용 산물일 수 있다. 치료 또는 진단용 산물은 항체 분자, 예를 들어, 항체 또는 항체 단편, 융합 단백질, 호르몬, 시토카인, 성장 인자, 효소, 당단백질, 지단백질, 리포터 단백질, 치료용 웨პ티드, 또는 이들 중 임의의 것의 구조적 및/또는 기능적 단편 또는 혼성체를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 다른 실시양태에서, 치료용 또는 진단용 산물은 합성 폴리펩티드이며, 예를 들어, 여기서 전체 폴리펩티드 또는 그의 일부분은 임의의 자연적으로 발생하는 폴리펩티드, 예를 들어, 상기 기재된 자연적으로 발생하는 폴리펩티드로부터 유래되지 않거나 또는 이러한 폴리펩티드에 대한 임의의 서열 또는 구조적 유사성을 갖는다.

[0223] 한 실시양태에서, 재조합 산물은 항체 분자이다. 한 실시양태에서, 재조합 산물은 치료용 항체 분자이다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 산물은 진단용 항체 분자, 예를 들어, 영상화 기술 또는 진단 시험에 유용한 모노클로날 항체이다.

[0224] 본원에 사용된 바와 같은 항체 분자는 항원과 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 분자로부터 유래된 단백질, 또는 폴리펩티드 서열이다. 실시양태에서, 항체 분자는 완전한 길이의 항체 또는 항체 단편이다. 항체 및 다중 포맷 단백질은 폴리클로날 또는 모노클로날, 다중 또는 단일 쇄, 또는 무손상 이뮤노글로불린일 수 있고, 자연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체는 이뮤노글로불린 분자의 사량체일 수 있다. 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 항체는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 IgA, IgG, IgD, 또는 IgE 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다.

[0225] "항체 단편"은 무손상 항체의 적어도 하나의 부분, 또는 그의 재조합 변이체를 지칭하고, 표적, 예컨대 항원에 대한 항체 단편의 인식 및 특이적 결합을 부여하기에 충분한, 무손상 항체의 항원 결합 도메인, 예를 들어, 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, scFv 항체 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb (VL 또는 VH), 낙타의 VHH 도메인; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체, 예컨대 헌지 영역에서 디슬피드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, 및 항체의 단리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항원 결합 단편은 또한, 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv 내로 혼입될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005] 참조). 항원 결합 단편은 또한, 폴리펩티드, 예컨대 피브로넥틴 유형 III (Fn3)에 근거한 스캐폴드 내로 이식될 수 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기재하고 있는 미국 특허 번호 6,703,199 참조).

[0226] 본원에 기재된 방법을 사용하여 생산될 수 있는 예시적인 재조합 산물은 아래의 표에 제공된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0227]

표 2. 예시적인 재조합 산물

치료용 단백질 유형	치료제	상표명
호르몬	에리트로포이에틴, 에포에인- α 다르베포에틴- α 인슐린 성장 호르몬 (GH), 소마토트로핀 인간 여포-자극 호르몬 (FSH) 인간 용모성 고나도트로핀 루트로핀- α 글루카곤 성장 호르몬 방출 호르몬 (GHRH) 세크레틴 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 티로트로핀	에포겐, 프로크리트 아라네스프 휴몰린, 노보린 제노프로핀, 휴마트로핀, 노르디트로핀, 노비비트로핀, 누트로핀, 옴니트로핀, 프로트로핀, 시아젠, 세로스팀, 말트로핀 고날-F, 폴리스팀 오비드렐 루베리스 글카겐 제레프 카이로스팀 (인간 웨პ티드), 세크레풀로 (웨지 웨პ티드) 티로겐
혈액 응고/응고 인자	인자 VIIa 인자 VIII 인자 IX 항트롬빈 III (AT-III) 단백질 C 농축물	노보세븐 비오클레이트, 헬릭세이트, 코게네이트, 리콤비네이트, 레팩토 배네픽스 트롬베이트 III 세프로틴
시토카인/성장 인자	유형 I 알파-인터페론 인터페론 - α n3 (IFN α n3) 인터페론 - β 1a (rIFN- β) 인터페론 - β 1b (rIFN- β) 인터페론 - γ 1b (IFN γ) 알데스류킨 (인터류킨 2(IL2), 표피 흥선세포 활성화 인자; ETAF 팔리페르민 (각질세포 성장 인자; KGF) 베캅레민 (헬소판-유래 성장 인자; PDGF) 아나킨라 (재조합 IL1 길항제)	인페Zen 알페론 N 아보넥스, 레비프 베타세론 액티뮨 프로류킨 케피반스 레그라넥스 안릴, 키네레트
항체 분자	베마시주맙 (VEGFA mAb) 세톡시맙 (EGFR mAb) 파니투무맙 (EGFR mAb) 알лем투주맙 (CD52 mAb) 리톡시맙 (CD20 키메라 Ab) 트라스투주맙 (HER2/Neu mAb) 아바타셉트 (CTLA Ab/Fc 융합물) 아달리무맙 (TNF α mAb) 인플릭시맙 (TNF α 키메라 mAb) 알레파셉트 (CD2 융합 단백질) 에팔리주맙 (CD11a mAb)	아마스틴 에르비톡스 벡티빅스 캄파트 리툭산 헤르셉틴 오랜시아 휴미라 레미케이드 아메비브

[0228]

	나탈리주맙 (인테그린 $\alpha 4$ 서브유닛 mAb) 에클리주맙 (C5mAb) 무로도납-CD3	랍티바 티사브리 솔리리스 오르토클론, OKT3
기타: 융합 단백질/단백질 백신/펩티드	B형 간염 표면 항원 (HBsAg) HPV 백신 OspA 항-레서스(Rh) 이뮤노글로불린 G 에푸비르티드 거미줄, 예를 들어, 피브리온 에타네르셉트 (TNF 수용체/Fc 융합물) 세르구투주맙 아무날류킨	엔게리스, 리콤비박스 HB 가르다실 LYM에릭스 로필락 푸제온 QMONOS 엔브렐

[0229]

[0230]

표 3. 부가의 예시적인 재조합 산물: 이중특이적 포맷

명칭 (다른 명칭, 후원 단체)	BsAb 포맷	표적	제안된 작용 메커니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
카투막소맙 (례모맙®, 프레제니우스 바이오테크, 트리온 파마, 네오팜)	BsIgG: 트리오맙	CD3, EpCAM	종양에 대한 T 세포의 재표적화, Fc 매개된 이펙터 기능	EU에서 승인됨	EpcAM 양성 종양 중의 악성 복수
에르투막소맙 (네오비이 바이오테크, 프레제니우스 바이오테크)	BsIgG: 트리오맙	CD3, HER2	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I/II	진행성 고형 종양
블리나투모맙 (블린사이토®, AMG 103, MT 103, MEDI 538, 암젠)	BiTE	CD3, CD19	종양에 대한 T 세포의 재표적화	USA에서 승인됨 상 II 및 III 상 II 상 I	전구 B-세포 ALL ALL DLBCL NHL
REGN1979 (례제네론)	BsAb	CD3, CD20			
솔리토맙 (AMG 110, MT110, 암젠)	BiTE	CD3, EpCAM	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	고형 종양
MEDI 565 (AMG 211, 메드이뮨, 암젠)	BiTE	CD3, CEA	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	위장 선암종
RO6958688 (로슈)	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, 바이엘; 암젠)	BiTE	CD3, PSMA	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	전립선암
MGD006 (매크로제닉스)	DART	CD3, CD123	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	AML
MGD007 (매크로제닉스)	DART	CD3, gpA33	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	결장직장암
MGD011 (매크로제닉스)	DART	CD19, CD3			
SCORPION (에멀젼트 바이오솔루션즈, 트루비온)	BsAb	CD3, CD19	종양에 대한 T 세포의 재표적화		
AFM11 (아피메드 테라퓨틱스)	TandAb	CD3, CD19	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I	NHL 및 ALL
AFM12 (아피메드 테라퓨틱스)	TandAb	CD19, CD16	종양 세포에 대한 NK 세포의 재표적화		
AFM13 (아피메드 테라퓨틱스)	TandAb	CD30, CD16A	종양 세포에 대한 NK 세포의 재표적화	상 II	호지킨 림프종
GD2 (바바라 앤 카르마노스 암 연구소)	BsAb가 미리 부하된 T	CD3, GD2	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I/II	신경모세포종 및 골육종

[0231]

명칭 (다른 명칭, 후원 단체)	BsAb 포맷	표적	제안된 작용 메커니즘	개발 단계	결환 (또는 건강한 지원자)
	세포				
pGD2 (바바라 앤 카르마노스 암 연구소)	BsAb가 미리 부하된 T 세포	CD3, Her2	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 II	전이성 유방암
EGFRBi-보강된 자가 활성화된 T 세포 (로저 윌리암스 메디칼 센터)	BsAb가 미리 부하된 T 세포	CD3, EGFR	EGFR-양성 종양에 대한 자가 활성화된 T 세포	상 I	폐 및 다른 고형 종양
항-EGFR-보강된 활성화된 T-세포 (바바라 앤 카르마노스 암 연구소)	BsAb가 미리 부하된 T 세포	CD3, EGFR	EGFR-양성 종양에 대한 자가 활성화된 T 세포	상 I	결장 및 췌장암
rM28 (대학 병원 뒤팽겐)	텐덤 scFv	CD28, MAPG	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 II	전이성 흑색종
IMCgp100 (이뮤노코어)	ImmTAC	CD3, 펩티드 MHC	종양에 대한 T 세포의 재표적화	상 I/II	전이성 흑색종
DT2219ARL (NCI, 미네소타 대학)	디프테리아 독소와 연결된 2 scFv	CD19, CD22	종양에 대한 단백질 독소의 표적화	상 I	B 세포 백혈병 또는 림프종
XmAb5871 (젠크로)	BsAb	CD19, CD32b			
NI-1701 (노브이뮨)	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (메리맥)	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (메리맥)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (메루스)	BsAb	HER2, HER3			
NA (메루스)	BsAb	CD3, CLEC12A			
NA (메루스)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (메루스)	BsAb	PD1, 개시되지 않음			
NA (메루스)	BsAb	CD3, 개시되지 않음			
둘리고투주맙 (MEHD7945A, 제넨테크, 로슈)	DAF	EGFR, HER3	2 수용체의 차단, ADCC	상 I 및 II 상 II	두경부암 결장직장암
LY3164530 (엘리 릴리)	개시되지 않음	EGFR, MET	2 수용체의 차단	상 I	진행성 또는 전이성 암
MM-111 (메리맥)	HSA 바디	HER2, HER3	2 수용체의 차단	상 II	위 및 식도암

명칭 (다른 명칭, 후원 단체)	BsAb 포맷	표적	제안된 작용 메커니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
파마슈티칼즈)				상 I	유방암
MM-141, (메리백 파마슈티칼즈)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	2 수용체의 차단	상 I	진행성 고형 종양
RG7221 (RO5520985, 로슈)	크로스Mab	Ang2, VEGF A	2 혈관신생촉진의 차단	상 I	고형 종양
RG7716 (로슈)	크로스Mab	Ang2, VEGF A	2 혈관신생촉진의 차단	상 I	습성 AMD
OMP-305B83 (온코메드)	BsAb	DLL4/VEGF			
TF2 (이뮤노메딕스)	독 앤 락	CEA, HSG	PET 또는 방사선영상화를 위해 종양을 미리 표적화함	상 II	결정직장, 유방 및 폐암
ABT-981 (암비에)	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	2 염증유발 시토카인의 차단	상 II	골관절염
ABT-122 (암비에)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	2 염증유발 시토카인의 차단	상 II	류마티스성 관절염
COVA322	IgG-파노머	TNF, IL17A	2 염증유발 시토카인의 차단	상 I/II	플라크 건선
SAR156597 (사노피)	4가 이중특이적 텐덤 IgG	IL-13, IL-4	2 염증유발 시토카인의 차단	상 I	특발성 폐 섬유증
GSK2434735 (GSK)	이중-표적화 도메인	IL-13, IL-4	2 염증유발 시토카인의 차단	상 I	(건강한 지원자)
오조랄리주맙 (ATN103, 암린스)	나노바디	TNF, HSA	염증유발 시토카인의 차단; 반감기를 증가시키기 위해 HSA와 결합한다	상 II	류마티스성 관절염
ALX-0761 (미크 세로노, 암린스)	나노바디	IL-17A/F, HSA	2 염증유발 시토카인의 차단; 반감기를 증가시키기 위해 HSA와 결합한다	상 I	(건강한 지원자)
ALX-0061 (암비에, 암린스)	나노바디	IL-6R, HSA	염증유발 시토카인의 차단; 반감기를 증가시키기 위해 HSA와 결합한다	상 I/II	류마티스성 관절염
ALX-0141 (암린스, 에딩팜)	나노바디	RANKL, HSA	골 흡수의 차단; 반감기를 증가시키기 위해 HSA와 결합한다	상 I	폐경기 골 손실
RG6013/ACE910 (츄가이, 로슈)	ART-Ig	인자 IXa, 인자 X	혈장 응고	상 II	혈우병

[0233]

[0234]

한 실시양태에서, 산물은 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개 이하의 아미노산 잔기에서 표 2 또는 3으로부터의 폴리펩티드와 상이하다. 또 다른 실시양태에서, 산물은 그의 아미노산 잔기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 또는 15% 이하에서 표 2 또는 3으로부터의 폴리펩티드와 상이하다.

[0235]

한 실시양태에서, 산물은 핵산 분자, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자, 또는 그의 혼성체이다. 한 실시양태에서, 산물은 오리가미 핵산 분자, 예를 들어, 오리가미 DNA이며, 여기서 이러한 핵산 분자는 미리 결정된 2차, 3차, 또는 4차 구조를 갖는다. 한 실시양태에서, 오리가미 핵산 분자는 기능적 활성을 갖는다. 한 실시양태에서, 산물은 지질 막 내에 캡슐화된 오리가미 핵산 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 지질 막은 그것을 생산한 숙주 세포의 세포 막 또는 세포 막의 성분을 포함한다. 한 실시양태에서, 지질-캡슐화된 DNA는 문헌 ["Cloaked DNA nanodevices survive pilot mission", April 22, 2014, Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University website]에 기재된 바와 같다.

[0236]

다른 재조합 산물은 비-항체 스캐폴드 또는 대체 단백질 스캐폴드, 예컨대, DAR핀, 애피바디 및 애드넥틴을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0237]

다른 예시적인 치료용 또는 진단용 단백질은 문헌 [Leader et al., "Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification", Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7:21-39]의 표 1-10에 기재되고,

문헌 [Walsh, "Biopharmaceutical benchmarks 2014", *Nature Biotechnology*, 2014, 32:992-1000] (각각 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 바와 같은 임의의 단백질; 또는 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드의 임의의 접합체, 변이체, 유사체 또는 기능적 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0238] 핵산

또한 본원에는 본원에 기재된 재조합 산물 및 지질 대사 조정제를 코딩하는 핵산, 예를 들어, 외인성 핵산이 제공된다. 목적하는 LMM 또는 재조합 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예컨대, 예를 들어 표준 기술을 사용하여, 목적하는 핵산 서열, 예를 들어, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 핵산 서열을 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 이러한 핵산 서열을 유도시키거나, 또는 상기 핵산 서열을 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접적으로 단리함으로써 수득될 수 있다. 또 다른 한편으론, LMM 또는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 클로닝되는 것이 아니라 합성적으로 생산될 수 있다. 재조합 DNA 기술 및 기술분야는 고도로 진보되어 있으며, 관련 기술분야에 널리 확립되어 있다. 따라서, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열의 지식을 갖는 통상의 기술자는 LMM 또는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 용이하게 계획하거나 생성할 수 있다.

[0240] LMM SREBF1 및 SCD1을 코딩하는 예시적인 핵산 서열이 본원에서 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 4로서 각각 제공된다.

[0241] 목적하는 폴리펩티드, 예를 들어, LMM 또는 재조합 폴리펩티드의 발현은 전형적으로, 목적하는 폴리펩티드 또는 그의 일부분을 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동적으로 연결시키고, 그 구축물을 발현 벡터 내로 흔입함으로써 달성된다. 벡터는 진핵 또는 원핵 세포 내로의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 다른 조절 요소, 예컨대 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 프로모터, 선별 마커, 또는 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절 또는 확인에 유용한 태그를 함유한다.

[0242] LMM 또는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 수많은 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 과지미드, 과지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특별한 관심 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 서열 분석 벡터를 포함한다. 실시양태에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY] 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별성 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193). 바이러스로부터 유래된 벡터가 장기간 유전자 전달을 달성하는데 적합한 도구이며, 이는 상기 벡터가 트랜스진의 장기간의 안정적인 통합과 딸 세포에서의 그의 증식을 허용하기 때문이다.

[0243] 벡터는 또한, 본원에 기재된 실시양태 중 임의의 것에서, 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 분비를 촉진시키는 시그널 서열, 폴리아데닐화 시그널, 전사 종결인자 (예를 들어, 소의 성장 호르몬 (BGH) 유전자로부터의 것), 에피솜 복제 및 원핵생물에서의 복제를 허용해 주는 요소 (예를 들어, SV40 기점 및 ColE1 또는 관련 기술분야에 공지된 기타), 및/또는 선별을 허용해 주는 요소, 예를 들어, 선별 마커 또는 리포터 유전자.

[0244] 한 실시양태에서, 폴리펩티드, 예를 들어, LMM 또는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 폴리펩티드, 예를 들어, LMM 또는 재조합 폴리펩티드의 발현을 위한 전사 개시를 가능하게 하는 폴리머라제의 동원에 대해 책임이 있는 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 적합한 프로모터 서열은 통상적으로, 다량의 전사를 구동시키므로 표적 외인성 mRNA의 다수 카피를 전달시켜 주는 인핸서와 연관이 있다. 실시양태에서, 프로모터는 시토메갈로바이러스 (CMV) 주요 즉발형 프로모터 (문헌 [Xia, Bringmann et al. 2006]) 및 SV40 프로모터 (문헌 [Chernajovsky, Mory et al. 1984])를 포함하며, 둘다 그들의 이름이 같은 바이러스 또는 이로부터 유래된 프로모터로부터 유래된다. 라우스 육종 바이러스 장 말단 반복 서열 (RSV-LTR) 및 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMLV) LTR을 포함한, 포유동물 세포에서 발현 벡터 내에 봉입시 전사를 구동시키기 위해 덜 흔한 몇 가지 다른 바이러스 프로모터가 성공적으로 이용되었다 (Papadakis, Nicklin et al. 2004). 또 다른 실시양태에서, 특이적 내인성 포유동물 프로모터를 활용하여 관심 유전자의 구성적 전사를 구동시킬 수 있다 (Pontiller, Gross et al. 2008). CHO 특이적 차이니즈 햄스터 신장 인자 1-알파 (CHEF1α) 프로모터는 바이러스 기반 서열에 대한 대안을 고 수율로 제공하였다 (Deer, Allison

2004).

[0245] 비-포유동물 세포, 예를 들어, 진균, 곤충, 및 식물 세포에서의 발현에 적합한 다른 프로모터가 또한, 관련 기술분야에 공지되어 있다. 진균 또는 효모 숙주 세포에서 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는 트리코더마 레에세이(*Trichoderma Reesei*)의 진균 유전자, 메탄올 유도성 알콜 옥시다제 (AOX 프로모터), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 트립토판 생합성 (trpC 프로모터), 아스페르길루스 니거 변종 아와모리 (*Aspergillus niger var. awamori*) 플루코아밀라제 (glaA), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 갈락토키나제 (GAL1)로부터 수득된 프로모터; 글루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) Plac4-PBI 프로모터, 또는 PCT 공개 공보 WO 2005/100573에 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 곤충 세포에서 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는 T7 lac 프로모터 및 폴리헤드린 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 식물 세포에서 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는 콜리플라워 모자이크 바이러스 프로모터 CaMV35S를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 원핵 숙주 세포, 예를 들어, 박테리아 세포에서 본 발명의 핵산 구축물의 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는 이. 콜라이(*E. coli*) lac 오페론, 이. 콜라이 tac 프로모터 (흔성체 프로모터; 문헌 [DeBoer et al., PNAS, 1983, 80:21-25]), 이. 콜라이 rec A, 이. 콜라이 araBAD, 이. 콜라이 tetA, 및 원핵 베타-락타마제로부터 수득된 프로모터이다. 적합한 프로모터의 다른 예는 바이러스 프로모터, 예컨대 박테리오파지로부터의 프로모터를 포함하며, 이는 T7 프로모터, T5 프로모터, T3 프로모터, M13 프로모터, 및 SP6 프로모터를 포함한다.

[0246] 프로모터 이외에도, 본원에 기재된 벡터는 전사 속도를 상향조절해 주는 전사 인자를 동원할 수 있는, 코어 프로모터에 근접한 특이적 뉴클레오티드 모티프 영역인, 상기 언급된 바와 같은 인핸서 영역을 추가로 포함할 수 있다 (Riethoven 2010). 프로모터 서열과 유사하게, 이를 영역은 종종 바이러스로부터 유래되고, 프로모터 서열, 예컨대 hCMV 및 SV40 인핸서 서열 내에 포함되거나, 또는 아데노바이러스 유래 서열과 같은 것을 부가적으로 포함할 수 있다 (Gaillet, Gilbert et al. 2007).

[0247] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리펩티드, 예를 들어, LMM 또는 재조합 산물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 선별 마커를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 선별성 마커는 글루타민 신테타제 (GS); 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR), 예를 들어, 메토트렉세이트 (MTX)에 대한 내성을 부여해 주는 효소; 또는 항생제 마커, 예를 들어, 항생제, 예컨대: 히그로마이신, 네오마이신 (G418), 제오신, 푸로마이신, 또는 블라스티시딘에 대한 내성을 부여해 주는 효소를 포함한다.

[0248] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 재조합 산물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 본원에 기재된 재조합 산물을 코딩하는 핵산을 함유하는 세포(들)를 확인하는데 유용한 선별 마커를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 선별 마커는 본원에 기재된 바와 같이, 재조합 산물을 코딩하는 핵산 서열이 게놈 내로 통합되는 것을 함유하는 세포(들)를 확인 또는 선별하는데 유용하다. 재조합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 통합시킨 세포(들)의 확인은 상기 산물을 안정적으로 발현하는 세포 또는 세포주를 선별 및 조작하는데 유용할 수 있다.

[0249] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 LMM을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 LMM을 코딩하는 핵산 서열의 부위 특이적 통합에 대한 메커니즘을 포함한다. 예를 들어, 상기 벡터는 F1p-In™ 시스템과 화합성이고; F1p 리컴비나제의 존재 하에 목적하는 서열, 예를 들어, LMM을 코딩하는 핵산 서열을, F1p-In 세포, 예를 들어, F1p-In CHO 세포의 게놈에 존재하는 목적하는 부위, 예를 들어, 2개의 FRT 부위 사이에서 재조합 및 후속 통합시키는 것을 지시하는 2개의 FRT 부위 (특이적 뉴클레오티드 서열을 포함한다)를 포함한다. 목적하는 산물을 코딩하는 핵산의 부위 특이적 통합에 사용되는 다른 시스템은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어, Cre-lox 리컴비나제 시스템, 또는 CRISPR/CAS-매개된 전략이다.

[0250] 사용하기 적합한 벡터는 상업적으로 이용 가능하고, 이는 GS 발현 시스템™, GS 엑스시드(Xceed™) 유전자 발현 시스템, 또는 론자 바이오로직스, 인크(Lonza Biologics, Inc)로부터 입수 가능한 포텔리젠티® CHOK1SV 테크놀로지와 연합된 벡터 (예를 들어, pCon 벡터)를 포함한다. 부가의 벡터는 다른 상업적으로 이용 가능한 벡터, 예컨대, pcDNA3.1/Zeo, pcDNA3.1/CAT, pcDNA3.3TOPO [써모 피셔(Thermo Fisher); 이전에는 인비트로젠 (Invitrogen)]; pTarget, HaloTag [프로메가(Promega)]; pUC57 [진스크립트(GenScript)]; pFLAG-CMV [시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)]; pCMV6 [오리젠(Origene)]; 또는 pBK-CMV/ pCMV-3Tag-7/ pCMV-Tag2B [스트라타젠 (Stratagene)]를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

세포 및 세포 배양

[0252] 한 측면에서, 본 개시내용은 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 재조합 폴리펩티드를 생산하는 세포 또

는 세포주를 조작하거나 또는 만들기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 개선된, 예를 들어, 증가된 생산성 및 산물 품질을 수반한 세포 또는 세포주를 조작하거나 또는 만들기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 개선된 생산성 및 산물 품질과 연관된 특징이 본원에, 예를 들어, "지질 대사의 조정"이란 제목의 섹션에 기재되어 있다.

[0253] 실시양태에서, 세포는 포유동물 또는 비-포유동물 세포, 예를 들어, 곤충 세포, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 고세균 세포, 예를 들어, 아르카에아 (*Archaea*)의 종으로부터의 세포, 또는 박테리아 세포이다. 실시양태에서, 세포는 인간, 마우스, 래트, 차이니즈 햄스터, 시리아 햄스터, 원숭이, 유인원, 개, 오리, 말, 앵무새, 흰족제비, 어류 또는 고양이로부터의 것이다. 실시양태에서, 세포는 동물 세포이다. 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포 또는 설치류 세포, 예를 들어, 햄스터 세포, 마우스 세포, 또는 래트 세포이다. 실시양태에서, 세포는 원핵 세포, 예를 들어, 박테리아 세포이다. 실시양태에서, 세포는 악티노박테리아(*Actinobacteria*)의 종, 예를 들어, 미코박테륨 투베르콜로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)이다.

[0254] 한 실시양태에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 CHO-K1, CHOK1SV, 포텔리젠틱 CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, 익시드 (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, 또는 CHO 유래 세포이다. CHO FUT8 녹아웃 세포는, 예를 들어, 포텔리젠틱® CHOK1 SV (론자 바이오로직스, 인크.)이다.

[0255] 또 다른 실시양태에서, 세포는 HeLa, HEK293, HT1080, H9, HepG2, MCF7, Jurkat, NIH3T3, PC12, PER.C6, BHK (새끼 햄스터 신장 세포), VERO, SP2/0, NS0, YB2/0, Y0, EB66, C127, L 세포, COS, 예를 들어, COS1 및 COS7, QC1-3, CHO-K1, CHOK1SV, 포텔리젠틱 CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, 익시드 (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, 또는 CHO 유래 세포, 또는 그로부터 유래된 임의의 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 세포 중 임의의 것의 분화된 형태이다. 한 실시양태에서, 세포는 배양 중인 임의의 1차 세포로부터 유래된 세포이다.

[0256] 실시양태에서, 세포는 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 산물을 생산하는, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나이다. 실시양태에서, 세포는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드, 예를 들어, 표 2 또는 3으로부터 선택된 재조합 폴리펩티드를 발현하는, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나이다.

[0257] 실시양태에서, 세포 배양은 배지식 배양, 공급-배지식 배양, 인출 및 충전식 배양, 또는 연속식 배양으로서 수행된다. 실시양태에서, 세포 배양은 부착식 배양이다. 실시양태에서, 세포 배양은 혼탁 배양이다. 한 실시양태에서, 세포 또는 세포 배양물은 재조합 폴리펩티드의 발현을 위해 생체 내에 놓아두며, 예를 들어, 모델 유기체 또는 인간 대상체 내에 놓아둔다.

[0258] 한 실시양태에서, 배양 배지에는 혈청이 없다.

[0259] 포유동물 세포주에 적합한 다른 배지 및 배양 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,633,162에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 실험실 플라스크 또는 저밀도 세포 배양을 위한 및 특별한 세포 유형의 필요에 적응시킨 표준 세포 배양 배지의 예는, 예를 들어: 로즈웰 파크 기념 연구소 (RPMI) 1640 배지 (문헌 [Morre, G., The Journal of the American Medical Association, 199, p. 519 f. 1967]), L-15 배지 (문헌 [Leibovitz, A. et al., Amer. J. of Hygiene, 78, 1p. 173 ff, 1963]), 둘백코 변형 이글 배지 (DMEM), 이글 최소 필수 배지 (MEM), 햄 F12 배지 (문헌 [Ham, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sc.53, p288 ff. 1965]); 또는 알부민, 트랜스페린 및 레시틴이 결여된 이스코브스 변형된 DMEM (문헌 [Iscoves et al., J. Exp. med. 1, p. 923 ff., 1978])이다. 예를 들어, 햄 F10 또는 F12 배지는 CHO 세포 배양을 위해 특별히 설계되었다. CHO 세포 배양에 특별히 적응시킨 다른 배지는 EP-481 791에 기재되어 있다. 다른 적합한 배양 방법이 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 활용된 숙주 세포와 재조합 폴리펩티드 산물에 좌우될 수 있다. 세포에 의해 발현될 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 발현 및 생산에 적합한 조건을 결정하거나 또는 최적화하는 것은 통상의 기술자의 기술 수준 내에 있다.

세포를 조작하고 산물을 생산하는 방법

[0260] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 개선된 생산성 및 개선된 산물 품질을 수반한 세포 또는 세포주를 조작하는데 유용하다. 실시양태에서, 특정 세포의 지질 대사가 조정되도록 이러한 세포가 변형된다. 예를 들어, LMM을 코딩하는 외인성 핵산이 세포 내로 도입된다. 세포는 연속적으로, LMM의 발현 및 지질 대사의 LMM-매개된 조정에 적합한 조건 하에 배양된다. 그의 지질 대사가 조정된 세포의 특징은, 본원에, 예를 들어, "지질 대사의 조

정"이란 제목의 색션에 기재되어 있다.

- [0262] 일부 실시양태에서, 세포는 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 내인성 산물의 발현을 증가시키는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 이러한 실시양태 중 임의의 것에서, 산물을 코딩하거나 또는 내인성 산물의 발현을 증가시키는 외인성 핵산은 지질 대사의 변형, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM을 코딩하는 외인성 핵산의 도입에 앞서 도입된다. 또 다른 한편으로, 다른 실시양태에서, 산물을 코딩하거나 또는 내인성 산물의 발현을 증가시키는 외인성 핵산은 지질 대사의 변형, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM을 코딩하는 외인성 핵산의 도입 후에 도입된다. 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 산물은 치료용 또는 진단용 단백질이다. 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 산물은 표 2 또는 3으로부터 선택된다.
- [0263] 목적하는 폴리펩티드 또는 단백질, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM 또는 본원에 기재된 산물을 발현하기 위해 세포를 유전적으로 변형시키거나 또는 조작하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이는, 예를 들어, 형질감염, 형질도입 (예를 들어, 바이러스 형질도입), 또는 전기천공을 포함한다.
- [0264] 핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 외인성 핵산 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포액션, 입자 충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포의 생성 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY] 참조.
- [0265] 핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 외인성 핵산 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산 시스템, 예컨대 거대 문자 복합체, 나노 캡슐, 미세구, 비드, 및 지질 기반 시스템 (수중유 에멀션, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜 포함)을 포함한다. 시험관내 및 생체 내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다. 표적화된 나노 입자 또는 다른 적합한 서브-마이크론 크기의 전달 시스템으로 폴리뉴클레오티드를 전달하는 것과 같은, 핵산의 최신 기술 표적화 전달을 위한 다른 방법이 이용 가능하다.
- [0266] 목적하는 폴리펩티드, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM 및/또는 산물에 대한 서열을 함유하는 핵산이 세포 내로 전달되고, 재조합을 통하여 그의 게놈 내로 통합될 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 재조합 세포는 목적하는 폴리펩티드, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM 및/또는 산물을 안정적으로 발현할 수 있으므로, 장기간에 걸쳐 일관되고 효율적인 단백질 생산을 가능하게 한다. 관심 유전자가 숙주 염색체와 동시에 복제되기 때문에 연장된 발현을 유도하기 위해 단 하나의 DNA 전달 프로세스만 필요하다는 사실을 포함하여, 상기 관심 유전자의 안정적인 통합을 수반하는 몇 가지 이점이 있는데; 이는 상기 유전자가 부가의 기구에 대한 필요성 없이도 한 세대에서 그 다음 세대로 전이된다는 것을 의미한다. 이로써 또한 이론적으로는, 배치식 대 배치식 발효 전체에 걸쳐 더 일관된 산물과 수율이 유발된다. 이에 따라, 안정한 발현 방법은 본원에 기재된 지질 대사를 조정하는 변형, 예를 들어, LMM을 코딩하는 외인성 핵산의 도입 없이 생성된 것과 비교 시 높은 산물 수율을 생성시킬 수 있다.
- [0267] 목적하는 폴리펩티드, 예를 들어, 본원에 기재된 LMM 및/또는 산물을 안정적으로 과다발현하는 재조합 세포주를 확립시키기 위한 프로토콜은 전형적으로, 무작위 부위에서 선형화된 DNA (통상적으로 플라스미드 기반)를 무작위 재조합에 의해 촉진된 숙주 게놈 내로 통합시키는 것을 수반한다. 숙주 게놈의 특이적 영역에서 발현 카세트의 통합을 증진시키는 부위 특이적 프로토콜이 또한 개발되고 구현되었다 (O'Gorman, Fox et al. 1991). 이들 프로토콜은 종종, 부위 특이적 재조합할 수 있는 리컴비나제를 이용하며, 이는 F1p-In™ 시스템 (예를 들어, F1p-In CHO 세포를 활용한다), CHOK1SV F1p 세포주 (론자) (문헌 [Zhang L. et al. (2015). Biotechnol. Prog. 31:1645-5; 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다]에 기재된 바와 같음), 또는 Cre-lox 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0268] 상기 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 산물 및/또는 LMM을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 형질감염된 폴로부터 성공적으로 발현하는 세포의 선별을 촉진시켜 주는 선별 마커를 추가로 포함한다 (Browne, Al-Rubeai 2007). 수많은 선별 방법이 상업적으로 이용 가능하지만, 이들 중 가장 흔히 사용되고 있는 것은 메토트렉세이트 (MTX) 및 룬자의 글루타민 신테타제 (GS) 시스템이다 (Bebbington, Renner et al. 1992, Lai, Yang et al. 2013). 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)는 엽산을 테트라히드로폴레이트로 전환시키는데 책임이 있는 단백질이고, 글리신, 푸린, 및 티미딜산을 생성시키는 필수 생합성 경로에 필요하다. MTX는 DHFR 활성을 억제시키기 위해 사용될 수 있으므로, 안정적으로 형질감염된 배양물에 DHFR를 봉입시키는 것을 이용하여, 안정적으로 통합된 세포를 선별할 수 있는데; 재조합 DHFR을 충분히 성공적으로 발현하는 세포만이 MTX를 이용한 선별에 살아

남을 것이다 (Cacciatore, Chasin et al. 2010). 흔히 이용되고 있는 또 다른 선별 방법은 글루타메이트 및 암모니아로부터 글루타민의 합성에 대해 책임이 있는 효소인 GS를 사용하는 것이며, 글루타민이 포유동물 세포 생존에 절대 필요하기 때문에, 충분한 GS가 결여된 세포는 배양시 살아 남지 못할 것이다. 초기에는, GS의 억제제인 메티오닌 솔포시민 (MSX)을 부가하는 것이, CHOK1SV 세포 내에서의 내인성 GS의 존재가 세포 생존을 유지하기에 충분하지 않으므로, 부가의 GS를 발현하는 세포만이 재조합 구축물의 안정적 통합을 통해 선별 프로세스에서 살아남게 해준다는 것을 보장해 준다. 론자 등은 내인성 GS 유전자가 녹다운/녹아웃되어 모든 세포가 소멸되는 CHO 숙주 세포주를 지금 확립하였으며, 이러한 세포주는 배지에서 외인성 글루타민의 존재 없이는 관심 구축물과 성공적으로 통합되지 못한다 (Fan, Kadura et al. 2012). 특별한 선별제에 대한 내성을 유도해 내므로 이러한 내성 유전자를 정착시킨 세포만이 선별 프로세스에서 살아남을 것인 다른 많은 선별 방법이 이용 가능한데; 이는 히그로마이신, 네오마이신, 블라스티시딘 및 제오신을 포함한다 (Browne, Al-Rubeai 2007). 실시양태에서, LMM을 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 벡터와, 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 벡터는 상이한 선별 마커를 추가로 포함한다.

[0269]

안정적으로 발현하는 세포 풀을 성공적으로 회수한 후, 단일 세포로부터 유래되는 개별 클론을 단리하면, 높은 산물 수율 및 품질이 가능한 세포주, 또는 높은 산물 수율과 높은 품질 산물의 최고의 능력을 수반한 세포주의 선별이 촉진된다. 세포 특성에 있어서의 차이는 세포에서 관찰된 이질성, 및 재조합 DNA의 수와 특이적 통합 부위(들) 둘 다와 연관이 있는 것으로 예상된다. 따라서, 다중 클론을 신속하게 평가하고 연속해서 고 발현성 세포를 선별해 주는 클로날 스크리닝 특성이 개발되었다. 형광 활성화 세포 분류법 (FACS)은 형광 강도에 근거하여 세포를 신속하게 분류할 수 있으므로 고 발현성 클론을 선별하기 위해 이용될 수 있는 방법이다. 관심 단백질의 형광성 태그부착 (문헌 [Powell, Weaver 1990]), 재조합 유전자와 공동 발현된 세포 표면 분자의 형광성 태그부착 (문헌 [Holmes, Al-Rubeai 1999]), 및 관심 유전자와 공동 발현된 eGFP 발현에 근거한 형광 강도의 검출 (문헌 [Meng, Liang et al. 2000])을 수반하는 몇 가지 프로토콜이 확립되었다. 이들 방법을 이용하여 관찰된 높은 형광 강도는 높은 수준의 재조합 단백질 생산을 암시하므로, 이들 세포는 재조합 세포 풀로부터 우선적으로 선별될 수 있다. 고 발현성 재조합 클론을 단리하기 위한 FACS-기반 선별 방법은 세포와 연합된 상태로 유지되는 재조합 산물에 더 적합하고; 포유동물 발현된 바이오 치료용 재조합 단백질 산물이 분비되기 때문에, 분비된 재조합 단백질에 대한 클론의 선별에 더 적절한 방법이 개발되었다. 예를 들어, 클론픽스(ClonePix)는 재조합 산물이 집락 주위의 배지 내로 분비되고 플루오레신 이소티오시아네이트 (FITC)와 연합되므로 집락 둘레에 형광 후광을 창출시키는 것에 근거하여, 반고체 배지 상에서 성장한 클론을 골라내는 자동화 집락 선별 방법이다 (Lee, Ly et al. 2006). 클론은 집락 주위의 후광의 형광 강도에 근거하여 선별된다. 생산성에 대한 특별한 관심을 동반한 목적하는 생물학적 특성에 근거하여 재조합 세포를 신속하게 단리하는 다른 많은 클론 선별 프로토콜이 확립되었고, 이는 문헌 [Browne and Al-Rubeai (Browne, Al-Rubeai 2007)]에서 고찰된다. 본원에 기재된 바와 같이 선별된 클론을 확장시키면, 세포주가 생성된다.

[0270]

한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 개선된 생산성을 수반한 세포를 생성시킨다. 세포의 개선된 생산성 또는 생산 능력은 생산되는 산물의 더 높은 수율 또는 양, 및/또는 증가된 생산 속도를 포함한다 (일정 시간 단위에 걸쳐 생산된 산물의 수율 또는 양에 의해 결정된 바와 같음). 한 실시양태에서, 세포의 생산성, 예를 들어, 산물을 생산할 수 있는 능력의 개선은, 예를 들어, 지질 대사 경로가 조정되지 않은 세포에 의해 생산된 산물의 양, 수준, 또는 수량과 비교 시, 생산된 산물의 양, 수준, 또는 수량과 비교 시, 생산된 산물의 양, 수준, 또는 수량에 있어서의 증가, 예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 증가; 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배, 또는 그 초과의 증가를 유발한다. 한 실시양태에서, 세포의 생산성, 예를 들어, 산물의 생산 속도의 개선은, 예를 들어, 지질 대사 경로가 조정되지 않은 세포에 의해 생산된 산물의 생산 속도와 비교 시, 산물의 생산 속도에 있어서의 증가, 예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 증가; 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 50배, 또는 그 초과의 증가를 유발한다.

[0271]

세포를 조작하기 위한 본원에 기재된 방법은 높은 생산 세포 또는 높은 생산 세포주를 생성한다. 높은 생산 세포 또는 세포주는 참조 세포, 또는 본원에 기재된 방법에 의해 선별 또는 조작되지 않은 세포와 비교 시 재조합 폴리펩티드 산물을 더 높은 수율로 생산할 수 있다. 실시양태에서, 높은 생산 세포주는 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L, 또는 100 g/L 또는 그 초과의 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드 산물을 생산할 수 있다. 실시양태에서, 높은 생산 세포주는 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400

mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L, 또는 그 초과의 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드 산물을 생산한다. 생산된 산물의 수량은 세포 유형, 예를 들어, 종, 및 발현될 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드에 매우 좌우될 수 있다. 한 예로서, 모노클로날 항체를 발현하는 높은 생산 CHO 세포는 적어도 1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 또는 25 g/L의 모노클로날 항체를 생산할 수 있다.

[0272] 본원에는 현재 관련 기술분야에 공지된 통상적인 방법을 사용해서는 세포 또는 무세포 시스템에서 발현 또는 생산하기 어려운 산물의 발현에 특히 유용할 수 있는 방법 및 조성물이 기재된다. 따라서, 이와 같이 발현하기 어려운 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 차세대 생물제제를 생산하는 생산 세포주는 적어도 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L, 50 mg/L, 55 mg/L, 60 mg/L, 65 mg/L, 70 mg/L, 75 mg/L, 80 mg/L, 85 mg/L, 90 mg/L, 95 mg/L, 또는 100 mg/L 또는 그 초과를 생산할 수 있다. 발현하기 어려운 단백질에 대하여 본원에 기재된 방법 및 조성물에 의해 달성된 생산 능력 (예를 들어, 산물의 수율, 양, 또는 수량, 또는 산물의 생산 속도)은 본원에 기재된 바와 같은 지질 대사를 조정하는 변형을 갖지 않은 세포 또는 시스템의 생산 능력과 비교 시, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 또는 그 초과만큼 증가될 수 있다.

[0273] 생산되거나 또는 분비된, 예를 들어, 배양 배지 내로 분비된 산물의 양, 수준, 또는 수량을 정량화하기 위한 검정은 단백질 정량화 검정, 예컨대 브래드포드(Bradford) 단백질 검정, SDS-PAGE 분석, 면역블롯팅, 예를 들어, 웨스턴 블롯, 및 예를 들어, 나노 드롭 장치를 사용하는 자동화 수단을 포함한다. 증가된 단백질 생산을 측정하기 위한 다른 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 재조합 단백질 생산 상의 증가는 ELISA에 의해 조직 배양 배지 내에서의 농도를 측정함으로써 소규모로 결정될 수 있다 (Smales et al. 2004 Biotechnology Bioengineering 88:474-488). 이는 또한, 예를 들어 배지 중의 재조합 모노클로날 항체 (mAb) 농도의 고 처리량 결정을 위하여, 포르테바이오(ForteBio) 옥텟에 의해 정량적으로 결정될 수 있거나 (문헌 [Mason et al. 2012 Biotechnology Progress 28:846-855]), 또는 단백질 A HPLC에 의해 대규모로 결정될 수 있다 (Stansfield et al. 2007 Biotechnology Bioengineering 97:410-424). 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드의 생산을 결정하기 위한 다른 방법은 세포 중의 산물, 특히 재조합 폴리펩티드의 특이적 생산 속도 (qP) 및/또는 생육성 세포 농도에 필수적인 (IVC) 시간을 지칭할 수 있다. 실시양태에서, 생산을 결정하는 방법은 qP를 결정하는 것과 IVC를 결정하는 것의 조합을 포함한다. 배양 배지 중의 폴리펩티드의 농도로서 정의되는 재조합 폴리펩티드 생산 또는 생산성은 문헌 [Porter et al. 2010 Biotechnology Progress 26:1446-1455]에 따라서 계산된, 이들 두 파라미터 (qP 및 IVC)의 함수이다. 단백질 생산을 측정하는 방법이 또한, 본원에 제공된 실시예 내의 추가 세부사항에 기재되어 있다.

[0274] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 개선된 산물 품질을 수반한 세포를 생성한다. 한 실시양태에서, 산물의 품질의 개선은, 예를 들어, 지질 대사 경로가 조정되지 않은 세포에 의해 생산된 산물의 양, 수준, 또는 수량과 비교 시, 산물 품질에 있어서의 증가, 예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%, 또는 그 초과의 증가; 또는 산물 품질에 있어서의 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배, 또는 그 초과의 증가를 유발한다. 이러한 산물 품질에 있어서의 증가는, 예를 들어, 하기 중 하나 이상에 의해 예시될 수 있다:

i) 비-응집된 산물의 양 또는 수량의 증가 (또는 응집된 산물의 양 또는 수량의 감소);

[0275] ii) 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된 산물의 양 또는 수량의 증가 (또는 미스폴딩되거나, 언폴딩되거나, 부분적으로 어셈블리되거나 또는 비-어셈블리된 산물의 양 또는 수량의 감소), 또는 적절하게 폴딩되거나 어셈블리된 산물 대 언폴딩되거나, 미스폴딩되거나, 부분적으로 어셈블리되거나 또는 비-어셈블리된 산물의 비의 증가;

[0276] iii) 완전한 길이의 산물의 양 또는 수량의 증가 (또는 산물의 단편화의 감소);

[0277] iv) 목적하는 번역 후 변형의 증가 (또는 변형되지 않거나 또는 부정확하게 변형된 산물의 감소);

[0278] v) 글리칸 불균질성의 증가 또는 감소 (예를 들어, 글리코실화된 산물에 대함);

[0279] vi) 기능적 산물의 양 또는 수량의 증가 (또는 비-기능적 또는 기능 장애를 일으킨 산물의 양 또는 수량의 감소), 또는 기능적 산물 대 비-기능적 또는 기능 장애를 일으킨 산물의 비의 증가; 및/또는

- [0281] vii) 디슬피드 결합 스크램블링의 증가 또는 감소 (예를 들어, 항체 분자 산물에 대하여, 예를 들어, 증가되거나 또는 감소된 디슬피드 결합 스크램бл링에 대한 결과로서 목적하는 이소형 또는 구조의 증가 또는 감소).
- [0282] 본원에 기재된 바와 같이 생산된 세포 또는 세포주의 산물 품질, 예를 들어, 산물 품질의 개선을 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 발현된 재조합 폴리펩티드 산물의 1차 서열의 충실도를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 질량 분광분석법이다. 적절하게 폴딩된 산물, 예를 들어, 발현된 재조합 폴리펩티드의 양 또는 농도의 증가는 원편광 이색성에 의해 또는 발현된 재조합 폴리펩티드의 내재적 형광을 평가함으로써 결정될 수 있다. 기능적 산물의 양 또는 농도의 증가는 재조합 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 실제에 따라서 다양한 기능적 검정을 사용하여 시험될 수 있다. 예를 들어, 항체는 ELISA 또는 다른 면역친화 검정에 의해 시험될 수 있다. 산물 품질에 있어서의 증가를 결정하는, 예를 들어, 응집, 번역 후 변형, 디슬피드 결합 스크램블링을 결정하는 다른 방법은 크기 배제 크로마토그래피, 고 성능 액체 크로마토그래피, 동적 광 산란 (DLS) 접근 방식, 및 단백질 전기영동 (PAGE) 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0283] 실시양태에서, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 산물을 생산하는 방법은 상기 언급된 바와 같이, 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하도록 조작된 세포를 제공하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 세포는 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 지질 대사를 조정하는 변형을 포함하는 상기 조작된 세포 내로 도입된다. 또 다른 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 LMM을 코딩하는 외인성 핵산의 도입에 앞서 세포 내로 도입된다. 산물을 코딩하는 외인성 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 산물을 안정적으로 발현하는, 예를 들어, 과다발현하는 세포의 효율적인 선별을 위한 선별 마커를 추가로 포함한다.
- [0284] 일부 실시양태에서, 산물의 발현, 예를 들어, 산물의 전사, 번역, 및/또는 분비, 또는 산물의 품질, 예를 들어, 1차 서열의 적절한 폴딩 및/또는 충실도를 개선시키기 위한 부가의 단계를 수행할 수 있다. 이러한 부가의 단계는 산물 발현 또는 산물 품질을 개선시키는 작용제를 도입하는 것을 포함한다. 실시양태에서, 산물 발현 또는 산물 품질을 개선시키는 작용제는 작은 문자, 폴리펩티드, 또는 단백질 폴딩을 개선시키는 폴리펩티드, 예를 들어, 샤프롱 단백질을 코딩하는 핵산일 수 있다. 실시양태에서, 단백질 폴딩에 도움이 되는 작용제는 샤프롱 단백질, 예를 들어, BiP, PD1, 또는 ERO1을 코딩하는 핵산을 포함한다 (Chakravarthi & Bulleid 2004; Borth et al. 2005; Davis et al. 2000). 산물의 수율 및 품질을 개선시키는 다른 부가의 단계는 전사 인자, 예컨대 XBP1 및 ATF6의 과다발현 (문헌 [Tigges & Fussenegger 2006; Cain et al. 2013; Ku et al. 2008]) 및 렉틴 결합 샤프롱 단백질, 예컨대 칼넥신 및 칼레티콜린의 과다발현을 포함한다 (Chung et al. 2004). 본원에 기재된 단백질 폴딩, 산물 품질, 및 산물 수율에 도움이 되거나 또는 이를 개선시키는 작용제의 과다발현은 이러한 작용제를 코딩하는 외인성 핵산의 도입에 의해 달성될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 산물 발현 또는 산물 품질을 개선시키는 작용제는 산물의 발현 또는 산물의 품질을 증가시키기 위해 세포 배양물에 부가될 수 있는 작은 문자이며, 예를 들어, DMSO이다. 한 실시양태에서, 세포가 정상적으로 성장하는 온도보다 더 낮은 온도, 예를 들어, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 또는 10°C 더 낮은 온도에서 세포를 배양하는 것이 생산성을 개선시킬 수 있다.
- [0285] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 높은 생산성을 가지거나 또는 높은 품질 산물을 생산하는 세포를 확인하기 위한 부가의 선별 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, FACS 선별을 활용하여, 목적하는 특징, 예를 들어, 단백질 폴딩 단백질, 예를 들어, 샤프롱의 보다 높은 발현을 수반한 특이적 세포를 선별할 수 있다.
- [0286] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드 산물을 회수 또는 회복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 재조합 폴리펩티드가 세포로부터 분비되는 실시양태에서, 상기 방법은 세포, 세포 집단, 또는 세포가 배양된 배양 배지로부터 재조합 폴리펩티드를 회복, 수집, 또는 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 폴리펩티드가 세포 내에 있는 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드 산물의 정체는 세포에 의해 생산된 재조합 폴리펩티드가 하기 중 임의의 것 중 하나 이상으로부터 분리되는 것을 포함한다: 숙주 세포 단백질, 숙주 세포 핵산, 숙주 세포 지질, 및/또는 숙주 세포로부터의 다른 부스러기.
- [0287] 실시양태에서, 본원에 기재된 프로세스는 실질적으로 순수한 단백질 산물을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은, "실질적으로 순수한"이란 발열성 물질이 실질적으로 없고/없거나, 핵산이 실질적으로 없고/없거나 숙주 세포로부터의 내인성 세포성 단백질 효소 및 성분, 예컨대 폴리머라제, 리보솜 단백질, 및 샤프롱 단백질이 실질

적으로 없다는 것을 의미한다. 실질적으로 순수한 단백질 산물은 숙주 세포로부터의 오염성 내인성 단백질, 핵산, 또는 다른 거대 분자를, 예를 들어, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만 함유한다.

[0288] 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 회수 및 정제 방법은 관련 기술분야에 널리 확립되어 있다. 재조합 폴리펩티드 산물을 회수하는 경우에는, 물리적 또는 화학적 또는 물리화학적 방법이 사용된다. 이러한 물리적 또는 화학적 또는 물리화학적 방법은 여과 방법, 원심분리 방법, 초원심분리 방법, 추출 방법, 동결 건조 방법, 침전 방법, 크로마토그래피 방법 또는 그의 둘 이상의 방법의 조합일 수 있다. 실시양태에서, 크로마토그래피 방법은 크기 배제 크로마토그래피 (또는 겔 여과), 이온 교환 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 및/또는 다중 모드 크로마토그래피 중 하나 이상을 포함한다.

실시예

[0289] 본 발명은 다음 실험적 실시예를 참조로 하여 상세히 추가로 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되며, 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 것이 아니다. 따라서, 본 발명은 다음 실시예에 제한되는 것으로 해석되서는 안되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0290] 추가의 설명 없이도, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 전술한 설명 및 다음 예시적 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 활용하고 청구된 방법을 실시할 수 있다고 여겨진다. 다음 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 구체적으로 지적하고, 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것으로 해석되서는 안된다.

실시예 1: 지질 대사 조정제를 과다발현하는 안정한 세포의 생성

[0291] CHO 세포에서 2개의 지질 대사 조정제인 SCD1 및 SREBF1의 과다발현의 효과를 조사하기 위해, 이들 유전자를 성공적으로 클로닝하였고, 부위 지정 접근 방식을 사용하여 부착 CHO F1p-In 세포 내로 안정적으로 통합시켰으며, 무작위 통합 접근 방식을 사용하여 혼탁 GS 녹아웃 (GSKO) CHO 세포 내로 안정적으로 통합시켰다.

SCD1 및 SREBF1 함유 FRT 벡터의 분자 클로닝

[0292] 각각의 단백질의 C-말단에 V5/His 태그를 수반하는 경우와 수반하지 않는 경우 둘 다의 SCD1 및 SREBF1 단백질의 발현을 촉진시키는 FRT 기반 벡터를 생성시키기 위해 분자 클로닝을 수행하였다. 이들 벡터를 써모 피셔의 상업적으로 이용 가능한 F1p-In 숙주 CHO 세포 풀과 연계해서 사용하면, 관심 유전자의 부위 특이적 통합이 가능해져 안정한 CHO 부착 세포 풀을 생성시킬 수 있다. 표 4에 기재된 프라이머를 푸션(Phusion®) 폴리머라제 기반 PCR 반응에 사용하여 이들 유전자를 증폭시켜, 표 4에 상세히 열거되기도 한 제한 부위에 의해 플랭킹된 이중 가닥 DNA 단편이 생성되도록 하였다. SCD1 및 SREBF1 유전자를 마우스 P19 유래된 cDNA 및 오리젠 마우스 cDNA 클론 (NCBI 수탁 번호 NM_011480)으로부터 각각 증폭시켰다.

[0293] 표적 유전자의 성공적인 증폭 후, 적절한 제한 효소를 사용하여 FRT-V5 벡터 뿐만 아니라 이전에 생성된 관심 유전자의 PCR 산물에 대하여 이중 제한 소화를 수행하였다. 후속 형질전환 전에 라이케이션물을 밤새 인큐베이션하였고, 이로써 생성된 접락 상에서 미니프렙 정제를 수행하였다.

SCD1 및 SREBF1 과다발현성 부착 F1p-In CHO 세포의 생성

[0294] 전술된 FRT-기반 구축물을 써모 피셔의 상업적으로 이용 가능한 부착 F1p-In CHO 세포와 연계해서 사용하여 안정한 세포 풀을 생성시켰다. 관심 유전자 및 비어있는 FRT 구축물 (대조군 세포 풀을 생성하기 위해 사용됨)을 함유하는 FRT 벡터를 리컴비나제 함유 pOG44 벡터와 함께 F1p-In 세포 내로 공동 형질감염시켰다. FRT 벡터 및 F1p-In CHO 계놈에 존재하는 리컴비나제 부위가 부위 특이적 재조합을 개시시키고, 선별제로서 히그로마이신을 사용하여 성공적인 클론을 단리할 수 있다. 부위 특이적 방식으로 안정적으로 발현하는 재조합 CHO 부착 세포 풀을, 예를 들어, 써모 피셔의 참고문헌 및 프로토콜 웹사이트로부터 입수 가능한, 예를 들어, 써모 피셔의 F1p-In 매뉴얼에 기재된 바와 같이, 제조업자의 지시에 따라서 생성시켰다. 이러한 방법을 사용하여 대조군, SCD1-V5, 및 SREBF1-V5 F1p-In CHO 폴리클로날 세포 풀을 생성 및 회수하였다.

SCD1 및 SREBF1의 pcDNA3.1 벡터 내로의 분자 클로닝

[0295] SCD1, SREBF1 또는 말단절단된 SREBF1 유전자 중 하나를 수반한 산업상 관련성이 있는 CHO 혼탁 세포에서 안정

적으로 통합되므로, 과다발현되는 발현 벡터를 생성시켰다. pcDNA3.1V5-His/TOPO 벡터는 적절한 CMV 프로모터 및 하류 다중 클로닝 부위로 이루어져서, 관심 유전자의 발현을 촉진시켜 주고, 또한 게놈 내로의 DNA의 통합 후 성공적인 클론의 선별을 위해 활용될 수 있는 네오마이신 유전자의 발현을 가능하게 해주는 요소를 포함한다.

[0301]

초기에는, 푸션® PCR 프로토콜을 사용하여, 제한 부위가 그로써 생성되는 PCR 산물의 플랭크에 동시에 부가되도록 설계된, 표 4에 표시된 프라이머를 사용하여 SCD1, SREBF1 및 SREBF1 말단절단물을 증폭시켰다. 이전에 생성된 SCD1-FRT 벡터를 주형으로서 사용하여 SCD1 유전자를 증폭시킨 반면, 오리젠 마우스 cDNA (NCBI 수탁 번호 NM_011480)를 사용하여 SREBF1 유전자 및 그의 말단절단물을 증폭시켰다. SREB410으로서 본원에 지칭된 SREBF1 말단절단물은 SREBF1의 나선-루프-나선 (HLH) 도메인을 포함하는 410개 아미노산 길이의 폴리펩티드 서열을 코딩한다. 이러한 도메인은 완전한 길이의 단백질로부터 내인성으로 절단되어, 이러한 단편이 핵으로 이동할 수 있게 되고, 앞서 그 개요가 설명된 바와 같은 후속 유전자 전사 활성화가 허용된다. 핵 내에 직접적으로 국한되는 단백질 (상기 서열에 의해 코딩됨)을 발현시키고, 이로써 내인성 프로세싱을 필요로 하지 않으면서 전사 활성화제로서의 그의 기능을 수행하는 것을 목적으로 상기 영역을 증폭시키는 프라이머를 설계하였다.

[0302]

이중 제한 소화를 적절히 정제된 PCR 산물 (표 4 참조), 및 pcDNA3.1/V5-His/TOPO (여기서, 프라이머는 정지 코돈 없이 유전자를 증폭시켰다) 상에서 수행하여, V5 및 His 태그를 코딩하는 인 프레임(in-frame) 서열 내로의 연속 팬독을 허용하였다. 이로써 생성되는 DNA 단편을 라이케이션하여 V5-His 태그를 수반한 SCD1, SREBF1 또는 SREB410 유전자를 함유하는 벡터를 산출하였다. 이들 반응물을 형질전환시켰고, 이로써 생성된 수많은 집락 상에서 미니 프렙을 수행하였다. 제한 소화를 수행하였고, 이로써 생성된 DNA 단편을 아가로스 겔 상에서 실행하여 샘플이 성공적이었는지를 확인하였다.

[0303]

SCD1 및 SREBF1 과다발현성 혼탁 GSKO CHO 세포의 생성

[0304]

앞서 합성된 pcDNA3.1V5-His/TOPO 유래 구축물로 안정적으로 형질감염된, 화학적으로 규정된 단백질 및 무혈청 배지에서 성장한 혼탁 CHOK1SV GS-KO 세포 풀을 생성시켜, 산업상 관련성이 있는 세포주에서의 상기 삽입된 유전자의 구성적 발현의 효과를 조사하였다. 이를 달성하기 위해, 혼자의 CHOK1SV GS-KO 숙주 세포주를 사용하여 안정한 통합을 수행하였다. 초기에는, SCD1-V5, SREBF1-V5, SREB410-V5 및 대조군 (비어있는 pcDNA3.1V5-His/TOPO) 구축물을 PvuI 제한 효소 (NEB)로 밤새 소화시킴으로써 선형화하였다. 선형화한 후, 에탄올 침전을 사용하여 DNA를 정제하였고, CHOK1SV GS-KO 세포를, 20 mL의 최종 용적을 만들기 위해 37°C 하에 CD-CHO 배지 (씨도 피셔)를 함유하는 T75 플라스크에 즉시 옮기기 전에 20 µg DNA 및 1 x 10⁷ 개의 생육성 세포를 사용하여 전기천공하였다. 플라스크를 24시간 동안 공기 대기 중 5% CO₂를 수반한 37°C 하의 가습 정적 인큐베이터에 놓아두었다. G418 [멜포드(Melford)] 선별제의 농축된 스톡을 CD-CHO 배지에서 희석시켰고, 이러한 스톡 5 mL를 상기 T75 플라스크에 부가하며 온화하게 혼합하여 25 mL 총 용적 중 750 µg/mL의 최종 농도를 산출하였다. 3 내지 4일마다 세포 계수를 수행하여 성장 및 배양률 생육력을 결정하였고, CD-CHO 배지 중의 750 µg/ml G418을 원심분리 및 재혼탁에 의해 대략 6일마다 갱신하였다. 세포를 125 mL 에를렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크에 옮기고, 일단 세포가 2 x 10⁵ 개의 생육성 세포/mL의 농도에 도달하면 일상적인 혼탁 세포 배양을 확립하였다.

[0305]

표 4. 프라이머 서열의 요약

프라이머 명칭	프라이머 서열 (5'-3')	제한부위	SEQ ID NO:
eGFP SV40 For	TAT GCTAGC <u>GGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA</u>	NheI, KpnI*	5
SREBF1 For FRT	TAT GGTACC ATGGACGAGCT	KpnI	6
SREBF1 Rev FRT	ATA GGGCCC TTAGCTGGAA	ApaI	7
SREBF1 V5 For FRT	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	8
SREBF1 V5 Rev	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	ApaI	9
SCD1 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	10
SCD1 Rev FRT	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	Xhol	11
SCD1 V5 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	12
SCD1 V5 Rev FRT	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	Xhol	13
SREBF1 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	14
SREBF1 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTAGCTGAAAGTGACGGTGGTCC	XbaI	15
SREBF1 V5 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	16
SREBF1 V5 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTGCTGAAAGTGACGGTGGTCC	XbaI	17
SREB410 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	18
SREB410 Rev 3.1	ATA TCTAGA TCACATGCCCTCCATAGACACATCTGTG	XbaI	19
SREB410 V5 For	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	20
SREB410 V5 Rev	ATA TCTAGA CTCATGCCCTCCATAGACACATCTGTG	XbaI	21
SCD1 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	22
SCD1 Rev 3.1	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	Xhol	23
SCD1 V5 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	24
SCD1 V5 Rev 3.1	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	Xhol	25

[0306]

실시예 2: LMM을 과다발현하는 안정한 세포에서의 LMM의 발현 분석

[0307]

대조군 (비어있는 pcDNA5 FRT), SCD1-V5 또는 SREBF1 V5 중 하나와 안정적으로 통합된 안정한 Flp-In CHO 세포풀의 확립 후, 안정적으로 외인성 통합된 유전자의 발현과, 부가적으로 상기 발현된 단백질의 세포내 위치 둘다를 확증하기 위한 면역형광을 수행하였다. 대조군, SCD1-V5 및 SREBF1-V5 세포주를, 10% FBS로 보충된 햄 영양 혼합 F12 배지 중의 24 웰 플레이트에서 웨들당 2×10^5 개의 생육성 세포로 시딩하였다. 샘플을 메탄올 고정시키고, 먼저 항-V5 항체 (마우스에서 생성됨 - 시그마 V8012)에 노출시킨 다음 연속해서 항-마우스 FITC 2차 접합체 (염소에서 생성됨 - 시그마 F0257)에 노출시켰다. 더욱이, 세포를 DAPI 염색제 ($10 \mu\text{g/mL}$ 작동 스톡)에 노출시켜 세포성 DNA를 염색시켰으며, 이로써 핵이 강조 표시되었다. 이로써 생성된 면역형광 영상이 도 1에 도시된다.

[0308]

SCD1-V5 및 SREBF1-V5 세포주에 FITC 염색이 존재하는 것은 외인성/재조합 유전자가 성공적으로 발현되었고, 더 우기 SCD1-V5 및 SREBF1-V5 단백질의 세포성 국재화가 분명하게 드러났다는 것을 보여준다. 구성적으로 발현된 SCD1-V5 단백질이 세포 전반에 걸쳐 풍부하게 존재하였으며, 그 영상은 그들이 세포질 및 ER에 국재된다는 것을 보여준다. 반대로, SREBF1-V5 단백질은 훨씬 더 적은 양으로 발현되었지만, 그것은 핵 둘레에 고리를 형성하면서 핵 주변에 매우 두드러지게 위치하였다. V5 에피토프 서열을 상기 유전자의 3' 말단에 부가하였고, SREBF1의 자연 조절로 인해, 특이적 도메인이 절단되고 세포 내에 재위치된다는 것을 고려하는 것이 중요하다. 이와 같이 절단된 성숙한 bHLH (기본 나선 루프 나선) 영역이 특히 중요한데, 이는 지질 생합성 및 입체형태에 영향을 미치는 많은 유전자의 전사 활성화에 대해 책임이 있기 때문이다. 이러한 영역이 유전자의 5' 말단에서 코딩되기 때문에, 이러한 영역은 3' V5 태그의 염색시 검출될 수 없을 것이므로, 번역된 단백질의 구성적으로 발현되고 절단된 부분 중 어떠한 것이 상기 영상화된 세포에 존재하는지의 여부를 결정하는 것은 불가능하다.

[0309]

세포내 V5-태그부착된 안정한 단백질의 염색을 수행하여, 조작된 CHOK1SV GS-KO 혼탁 세포주에 SCD1-V5 및 SREBF1-V5가 존재하는지를 결정하였다. 이를 세포를 24 웰 플레이트 내의 커버슬립에 부착시키기 위해, 커버슬립을 먼저, 폴리-L-리신으로 처리하고, 세포를 웨들당 2×10^5 개의 세포로 시딩하며, 5% CO_2 환경 정적 가습 인큐베이터에서 37°C 하에 밤새 인큐베이션하였다. 메탄올 고정 및 투파화 후, 항-V5 (마우스에서 생성됨 - 시그마 V8012)를 항-마우스 TRITC (염소에서 생성됨 - T5393) 2차 항체와 접합시켰다. 이로써 생성된 영상이 도 2

에 도시된다.

[0311] 항-V5 항체, 항-마우스 HRP 접합된 2차 항체를 사용하여 웨스턴 블로트을 수행하였고, 적절한 검출 시스템을 사용하여, V5 태그를 수반한 지질 구축물의 발현을 추가로 확증하였다. 등가 량의 전체 단백질 (브래드포드 검정을 이용하여 결정됨)을 SDS-PAGE를 위해 부하한 다음 니트로셀룰로스 상으로 웨스턴 블로팅하였다. 이로써 생성된 블로트이 도 3a, 3b, 및 3c에 도시되었으며, V5 태그만이 SCD1 구축물을 발현하는 세포에서 검출되었다. 그러나, SREBF1 구축물을 이용하여 달성된 낮은 수준의 발현은 이러한 구축물을 발현하는 세포주에서는 V5의 검출이 결여되었다는 것을 설명해줄 수 있다.

실시예 3: LMM을 과다발현하는 안정한 세포의 성장 특징

[0313] 본 실시예에서는, LMM을 과다발현하도록 조작된 2개의 상이한 세포주인 CHO F1p-In™ 및 CHOK1SV GS-KO (론자 바이오로직스) 세포주에서 성장 특징, 예전대 생육성 세포 계수치, 세포 수, 및 배양물 생육력을 평가하였다. LMM-조작된 세포주는 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성되었다. 비어있는 V5 태그부착된 발현 벡터를 발현하도록 대조군 세포주를 조작하였다. eGFP 코딩 발현 벡터를 전기천공에 의해 LMM-조작된 세포주 내로 형질감염시켰다. 1×10^7 개의 생육성 LMM-조작된 F1p-In CHO 세포 또는 CHOK1SV GS-KO 세포 및 20 μg 의 플라스미드 DNA (eGFP 코딩 발현성 벡터)를 사용하여 전기천공을 수행하였고, 이를 세포를 햄 영양 혼합 F12 배지에서 약 20 또는 32 mL의 최종 용적이 되도록 희석시켰다. 바이셀 세포 계수기를 사용하여 생육성 세포 농도를 결정하였고, eGFP 코딩 발현 벡터의 형질감염 후 24, 48, 72, 및 96시간에 기록하였다.

[0314] SCD1 및 SREBF1을 발현하도록 조작된 F1p-In™ 세포에 대한 결과가 도 4에 도시된다. SCD1 및 SREBF1을 과다발현하는 세포는 일반적으로, 모든 시점 전반에 걸쳐 대조군 세포와 비교 시 생육성 세포 농도에 있어서 일부 증가를 나타내었다.

[0315] SCD1, SREBF1, 및 SREBF410을 발현하도록 조작된 CHOK1SV GS-KO 세포에 대한 결과가 도 5a 및 5b에 도시된다. 총 세포 농도와 비교한 생육성 세포 농도가 도 5a에 도시되며, 생육성 세포 농도는 하부 칼럼으로써 나타내었고, 전체 칼럼은 계수된 세포의 총 수를 나타낸다. 도 5a에 도시된 바와 같이, LMM (SCD1 및 SREBF1)의 발현으로 인해, 모든 시점 전반에 걸쳐 생육성 세포 수와 총 세포 수가 일반적으로 증가된다. 48, 72 및 96 시간까지는, 생육성 세포 농도와 총 세포 농도가 SCD1 및 SREBF1-조작된 세포에서 상당히 더 높았다. 96시간에는, SCD1 및 SREBF1-조작된 세포에 대한 생육성 세포 계수치가 대조군 세포보다 1×10^6 개 세포/mL 초과하여 더 높았다. 배양물 생육력을 또한 계산하였고, 이는 도 5b에 도시된다. LMM-조작된 세포는 일반적으로, 대조군 세포와 비교 시 배양물 생육력에 있어서 증가를 나타내었다.

실시예 4: LMM을 과다발현하는 안정한 세포에서의 증가된 eGFP 유도 형광

[0317] 본 실시예에는, 실시예 1에 기재된 바와 같이, LMM을 안정적으로 발현하도록 조작된 CHO-F1p-In™ 및 CHOK1SV GS-KO 세포주에서 재조합 단백질을 생산하기 위한 생산 능력을 평가하였다. LMM-조작된 세포를 실시예 3에 기재된 바와 같이 eGFP 코딩 발현 벡터로 형질감염시켰고, 형질감염 후 24, 48, 72, 및 96시간에 유동 세포계수법에 의해 생산된 eGFP의 양을 측정함으로써 생산 능력을 평가하였다. FACS칼리버 (BD 바이오사이언스) 기기를 사용하여 세포의 eGFP-매개된 형광을 측정하였고, 여기에 제시된 데이터를 생성시켰다.

[0318] eGFP의 생산은 V5-태그부착된 SCD1 및 SREBF1을 발현하도록 조작된 F1p-In 세포에서 측정되었다. 도 6a, 6b, 및 6c는 명시된 시점에서 유동 세포계수법을 이용하여 기록된 LMM-조작된 F1p-In 세포의 중앙 형광, 기하 평균 형광, 및 산술 평균 형광을 각각 도시한다. 중앙 형광, 기하 평균 형광, 및 산술 평균 형광에 대한 이들 값은 SCD1 과다발현성 세포에서 증가됨으로써, SCD1을 안정적으로 발현하는 세포가 대조군 세포와 비교 시 더 많은 eGFP를 생산할 수 있다는 것을 입증해 준다.

[0319] eGFP의 생산은 V5-태그부착된 SCD1, SREBF1, 및 SREBF410을 발현하도록 조작된 CHOK1SV GS-KO 세포에서 측정되었다. 중앙 형광이 도 7a에 도시되고 기하 평균 형광이 도 7b에 도시된다. SREBF1을 과다발현하도록 조작된 세포에 대해서는 증가된 중앙 형광 및 기하 평균 형광이 관찰되었다.

[0320] CHOK1SV GS-KO 유래 세포주에서 관찰된 세포 농도 및 증식 특성 상의 차이를 고려하기 위해, 측정된 산술 평균 형광에 총 세포 농도 ($1 \text{ mL} \times 10^6$ 개)를 곱함으로써 배양물 1 mL당 총 형광을 계산하였고, 이와 같이 계산된 값이 도 7c에 도시된다. 도 7c에 도시된 바와 같이, SCD1 과다발현성 세포는 대조군 세포와 비교 시 형질감염 후 24시간에 상당히 증가된 양의 재조합 단백질 (eGFP)을 생산하였다. SREBF1 과다발현성 세포는 일반적으로, 대조군 세포와 비교 시 시험된 모든 시점에서 증가된 양의 eGFP를 생산하였고, 형질감염 후 72 및 96시간에는 상

당히 증가된 양을 생산하였다.

[0321] 집합적으로, 이들 데이터는 LMM, 예컨대 SCD1 및 SREBF1을 발현하도록 조작되는 세포는 일시적으로 발현된 재조합 단백질, 예컨대 eGFP의 생산 능력을 증가시킨다는 것을 보여준다. 더욱이, 측정된 형광에 의해 입증되는 바와 같이, 생산된 세포는 지질 대사를 조정하는 변형을 갖지 않은 세포와 비교 시 정확하게 풀딩되고 기능적인 eGFP를 증가시킴으로써, 지질 대사의 조정이 생산 수율과 품질 둘 다를 증가시킨다는 것을 입증해 준다.

실시예 5: LMM을 과다발현하는 안정한 세포에서의 개선된 생산성

[0323] 실시예 4에 기재된 실험과 유사하게, LMM을 안정적으로 발현하는 세포주를 대상으로 하여, 상이한 산물, 예컨대 모델 IgG4 항체 분자 (본원에서 항체 A로서 지칭됨) 및 융합 단백질 (본원에서 Fc 융합 단백질 또는 FP로서 지칭됨)의 생산 능력에 관하여 평가하였다.

[0324] V5-태그부착된 SCD1 및 SREBF1을 안정적으로 발현하는 Flp-In 세포 (실시예 1에 기재된 바와 같이 조작됨)를, 항체 A 또는 Fc 융합 단백질을 코딩하는 발현 벡터로 전기천공하였다. 전기천공 후, 배양 상등액 중의 재조합 항체 A 및 FP의 수량을 웨스턴 블로팅에 의해 전기천공 후 24, 48, 72, 및 96시간에 결정하였다. 항-중쇄 1차 항체, 항-토끼-HRP 접합된 2차 항체, 및 적절한 검출 시약을 사용하여 항체 A (도 8a) 및 Fc 융합 단백질 (도 9a)을 검출하였다. 항체 A 및 Fc 융합 단백질의 생산에 있어서의 평균 변화 배수가 단백질 A HPLC에 의해 결정되었고, 이는 도 8b 및 9b에 각각 도시되었다. 외인성 SCD1을 발현하는 세포주는 재조합 단백질 둘 다를 수반하는 대조군 세포주와 비교 시 증가된 생산성을 명확하게 보여주었다. 더욱이, 이러한 효과는 분석된 24, 48, 72, 및 96시간 시점 전반에 걸쳐 일관되었다.

[0325] SCD1, SREBF1, 및 SREBF410 구축물을 안정적으로 발현하는 론자의 CHOK1SV GS-KO (엑스시드™) 세포 (실시예 1에 기재된 바와 같이 조작됨)를 2개의 재조합 단백질, 즉 모델 IgG4 (항체 A) 및 Fc 융합 단백질로 일시적으로 형질감염시켰다. 전기천공 후, 항-중쇄 1차 항체, 항-토끼-HRP 접합된 2차 항체, 및 적절한 검출 시약을 사용하여 웨스턴 블로팅에 의해 96시간까지 24시간마다 배양 상등액 중의 재조합 항체 A 및 FP의 수량을 결정하였다 (도 10a 및 11a). 항체 A 및 Fc 융합 단백질의 생산에 있어서의 평균 변화 배수가 단백질 A HPLC에 의해 결정되었고, 이는 도 10b 및 11b에 각각 도시되었다. 외인성 SCD1, SREBF1, 및 SREBF410을 발현하는 CHOK1SV GS-KO 세포주는 재조합 단백질 둘 다를 수반하는 대조군 세포주와 비교 시 증가된 생산성을 명확하게 보여주었다 (도 10b 및 11b). 더욱이, 이러한 효과는 분석된 48, 72, 및 96시간 시점 전반에 걸쳐 일관되었다.

[0326] SCD1, SREBF1, 및 SREBF410 구축물을 안정적으로 발현하는 론자의 CHOK1SV GS-KO (엑스시드™) 세포 (실시예 1에 기재된 바와 같이 조작됨)를 2개의 재조합 단백질, 즉 모델 IgG4 (항체 A) 및 Fc 융합 단백질로 안정적으로 형질감염시켰다. 도 15a 및 16a는 0.2×10^6 개의 생육성 세포/ml로 초기 시딩한 후 48, 96, 144 및 192시간에 항체 A 및 FC 융합 단백질 각각의 용적 생산성을 나타낸다. 그 결과는 SCD1 과다발현성 세포 풀이 재조합 분자 둘 다의 절대 수율을 개선시킨다는 것을 나타낸다. 더욱이, 세포 수를 포함하는 계산 시, 재조합 분자 둘 다의 특이적 생산성이 SCD1 과다발현성 세포 풀에서 또한 크게 증가되었다 (도 15b 및 16b).

[0327] 이들 결과는 집합적으로, LMM, 예컨대 SCD1, SREBF1, 및 SREBF1의 기능적 단편 (SREBF410)을 발현하도록 조작되는 세포는 일시적으로 발현된 재조합 단백질, 예컨대 항체 분자 및 융합 단백질의 생산 능력을 증가시킨다는 것을 보여준다.

실시예 6: 확립된 생산 세포주를 개선시킴

[0329] 실시예 4 및 5는 LMM을 안정적으로 발현하는 세포주가 재조합 산물, 예컨대 GFP, 항체 분자, 또는 융합 단백질을 일시적으로 발현하는 경우에 개선된 생산을 갖는다는 것을 명확하게 보여준다. 본 실시예에서는, 확립된 세포주에서 재조합 산물의 기존의 안정적인 수율 증강에 대한 LMM의 효과를 결정하기 위한 분석을 수행하였다.

[0330] 모델 IgG4 항체 분자 (항체 A)를 안정적으로 발현하도록 이전에 조작시킨 CHO121 세포를 사용하였다. V5-태그부착된 SCD1, SREBF1 및 말단절단된 SREBF1 (SREBF410)을 코딩하는 구축물이, 항체 A를 안정적으로 발현하는 세포에서 일시적으로 발현되었다. 대조군 세포는 비어있는 V5 태그 벡터로 형질감염시켰다. 세포로부터의 상등액을 48, 72, 및 168시간에 수거하였다. 항-중쇄 1차 항체 (시그마 19764)를 사용한 다음, 항-토끼 HRP 접합된 2차 항체 (시그마 A6154)를 사용함으로써 생산된 항체 A의 양을 결정하기 위한 웨스턴 블로팅 분석을 수행하였고, 그 결과가 도 12a에 도시된다. 도시된 바와 같이, LMM인 SCD1 및 SREBF410의 발현은 LMM의 도입 후 48시간과 72시간 둘 다에서 대조군과 비교 시 세포에 의해 생산된 항체 A의 양에 있어서의 증가를 유발하였다. 세포로부터의 상등액을 쿠마시 분석하여, LMM의 도입 후 168시간에 생산된 항체 A의 양을 나타내었고, 이는 LMM 일시적

발현 (SCD1 및 SREBF410)으로 인해 재조합 단백질의 생산이 개선되었다는 것을 입증해 준다 (도 12b). 도 13은 형질감염 후 48, 72, 96 및 144시간에서 SCD1 및 SREBF410 함유 플라스미드로의 일시적인 형질감염 후 평균 산물 역가에 있어서의 현저한 증가를 강조 표시하는 단백질 A HPLC를 사용하는 항체 A의 정량적 분석을 도시한다. 도 14는 산물 역가 및 생육성 세포 수를 결정하기 위한 단백질 A 분석을 사용하여 특이적 생산성을 결정하는 FC 융합 단백질의 정량적 분석을 도시한다. 이러한 데이터는 LMM 요소를 함유하는 백터로 일시적으로 형질감염된 세포의 평균 특이적 생산성 상의 증가를 나타내며, SREBF1 함유 구축물이 가장 높은 평균 값을 산출한다.

[0331] 이들 결과는 확립된 세포주에서의 지질 대사의 조정이 확립된 수율과 비교 시 생산 능력을 추가로 개선시킬 수 있다는 것을 보여준다.

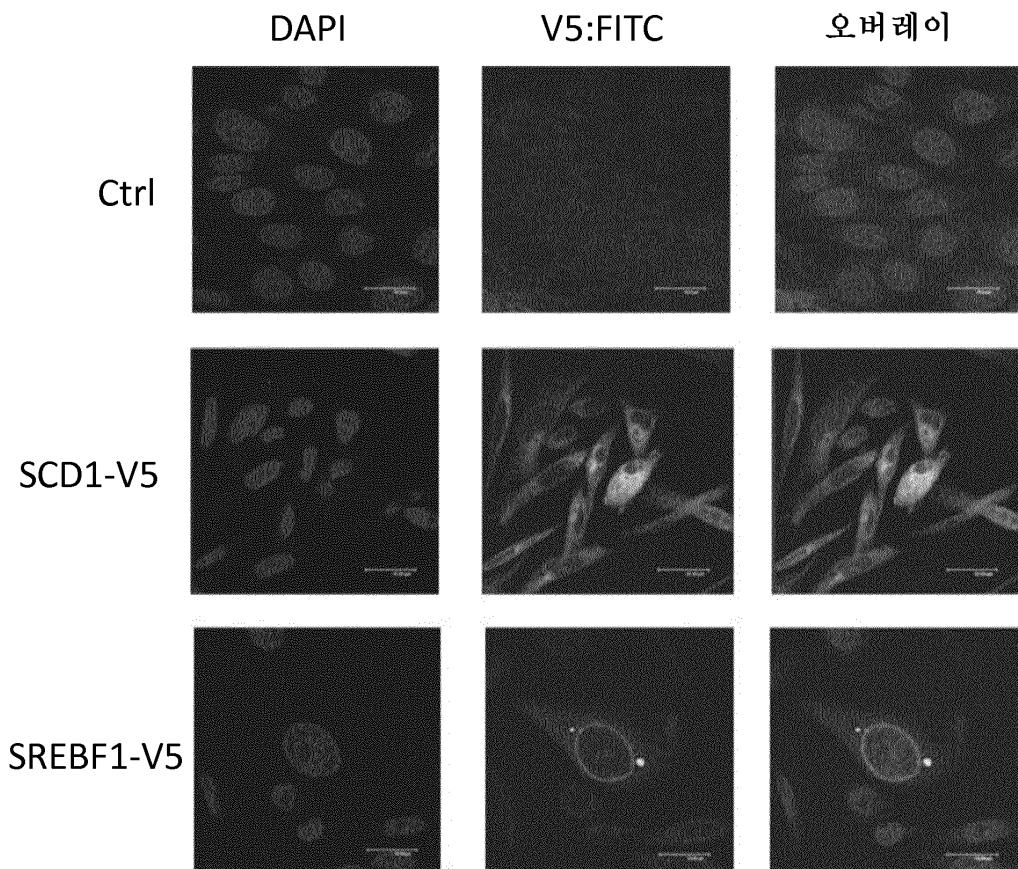
실시예 7: 재조합 유전자와 LMM의 동시 도입에 의한 개선된 생산성

[0333] 대조군 (LMM 없음), SCD1, SREBF1 또는 SREBF411 (SREBF1 유래 서열은 CHO 특이적이었다; NM_001244003, 서열식 별번호: 34 및 36) 중 하나와 예시적인 이뮤노시토카인 둘 다의 적절한 발현을 위한 유전자로 구성되는 플라스미드/구축물을 생성시켰다. 이어서, 이들 구축물을 사용하여 론자의 CHOK1SV GS-KO 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 도 17a는 형질감염 후 48 및 96시간에 수거된 상동액의 웨스턴 분석을 도시한다. 사용된 상동액 샘플을 감소시켰고, 항-중쇄 1차 항체 및 HRP 접합된 항-토끼 2차 항체로 프로빙하여 천연 중쇄 (하부 밴드) 및 시토카인 용합된 중쇄 (상부 밴드)를 강조 표시함으로써 일시적 산물을 검출하였다. 상기와 같이 형질감염된 구축물에 SCD1, SREBF1 및 SREBF411 유전자를 봉입시키면, 형질감염 후 48시간과 96시간 둘 다에서 양쪽 밴드 강도가 증가되었다. 더욱이, 도 17b는 단백질 A 분석을 사용하여 형질감염 후 96시간에 수득된 샘플의 정량적 분석을 도시한다. 이뮤노시토카인의 상대적 존재량은 웨스턴 분석에 제시된 데이터를 지지해 준다 (도 17a).

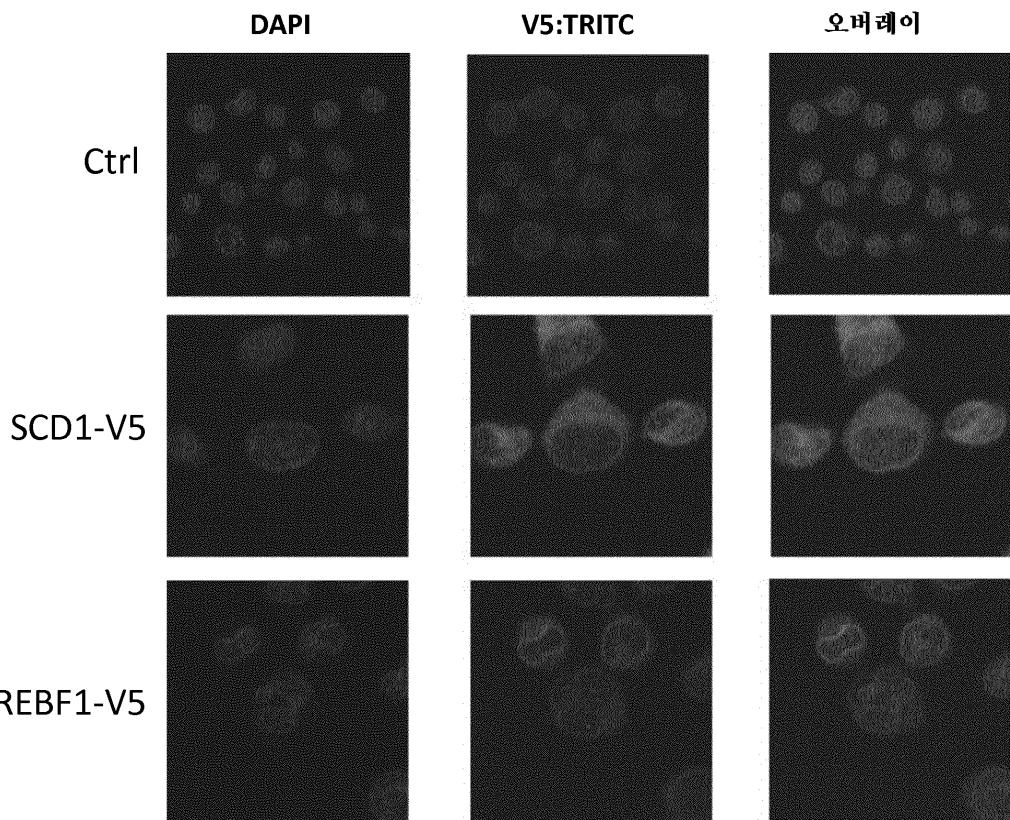
[0334] 이들 데이터는 LMM, 예컨대 SCD1, SREBF1, 및 SREBF1의 기능적 단편 (SREBF411)을 재조합 산물 유전자와 동시에 봉입시키면 생산 능력을 개선시킬 수 있다는 것을 보여준다.

도면

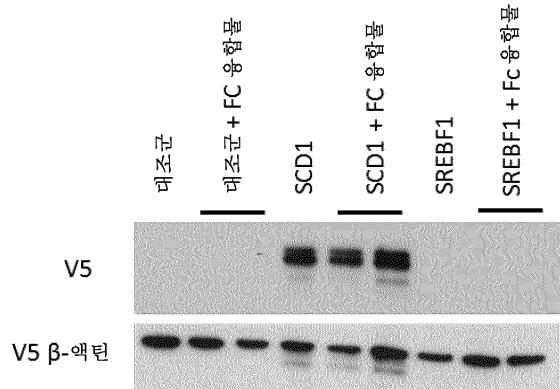
도면1



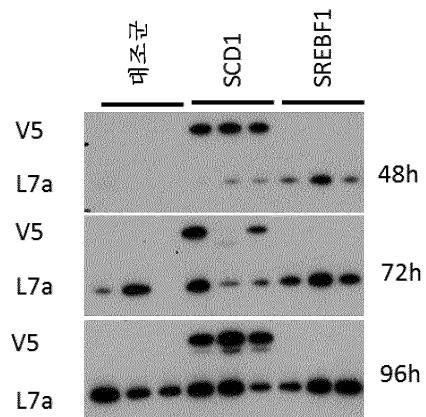
도면2



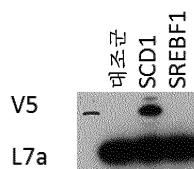
도면3a



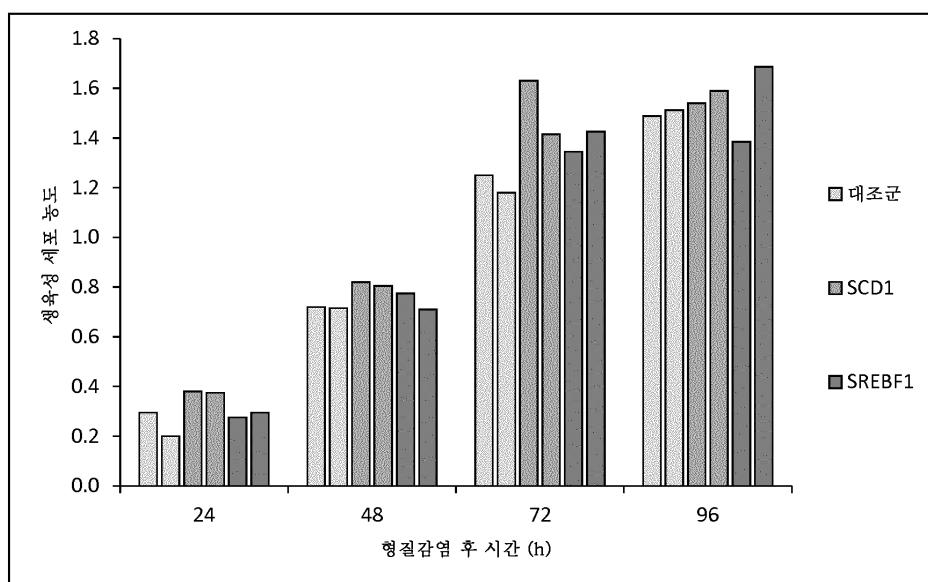
도면3b



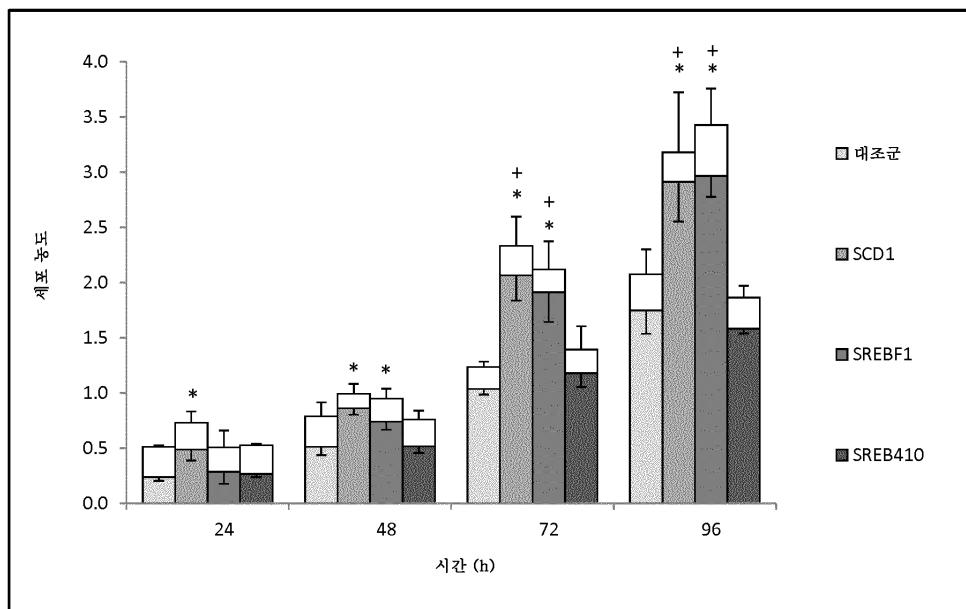
도면3c



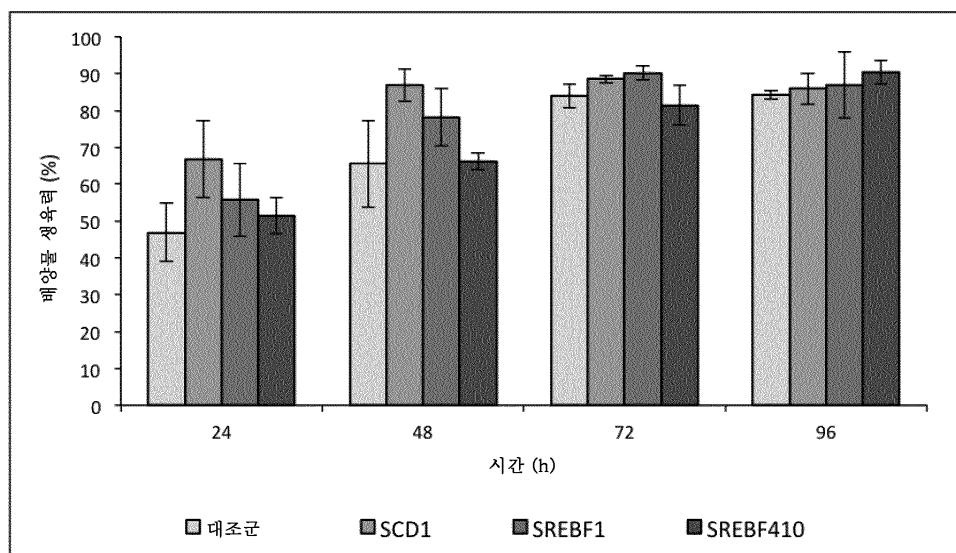
도면4



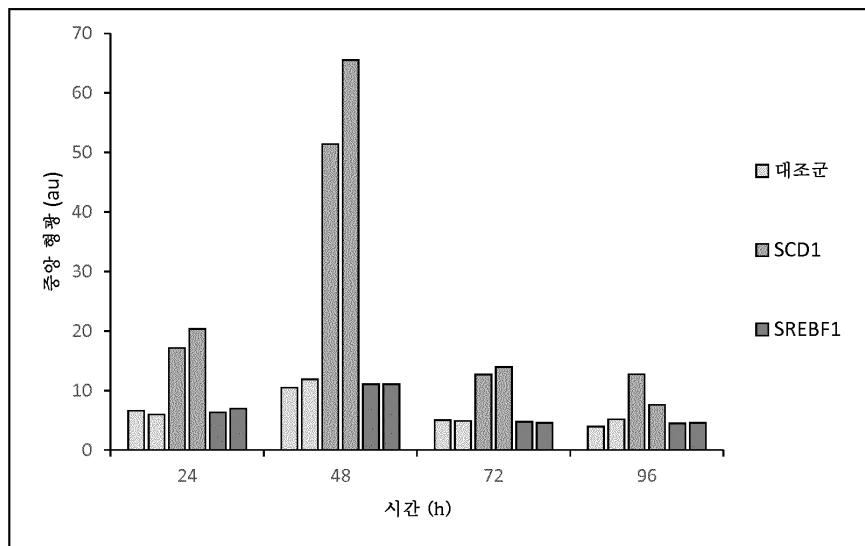
도면5a



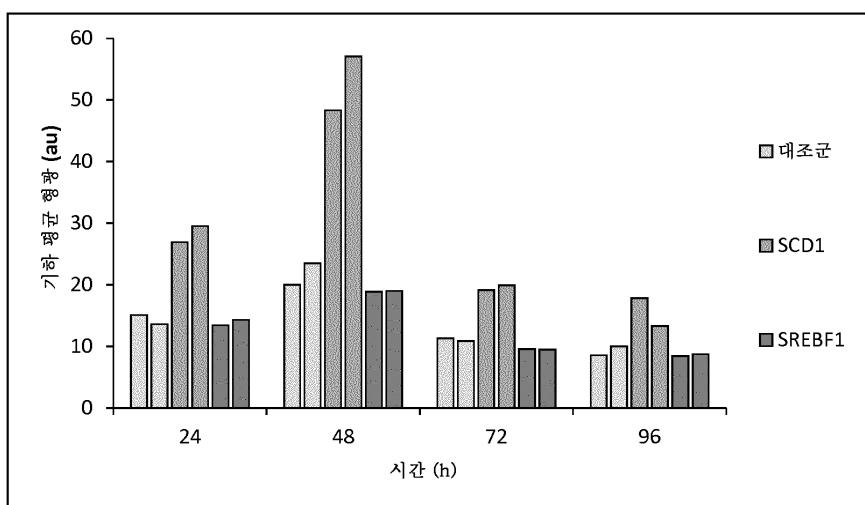
도면5b



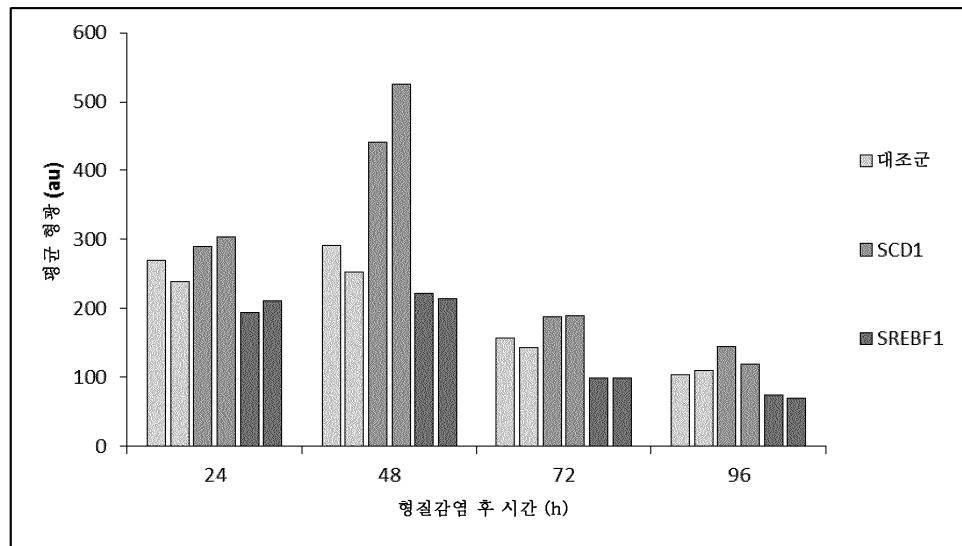
도면6a



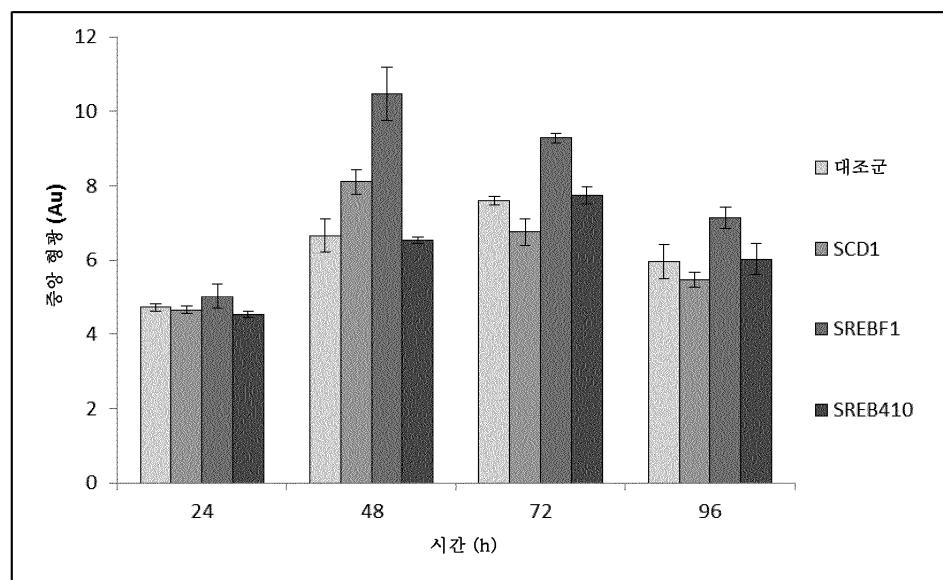
도면6b



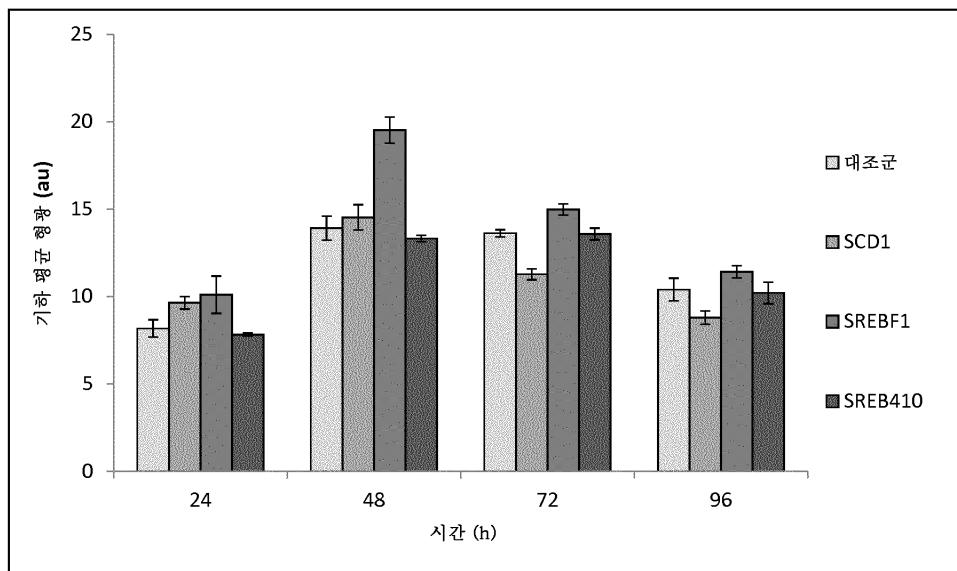
도면6c



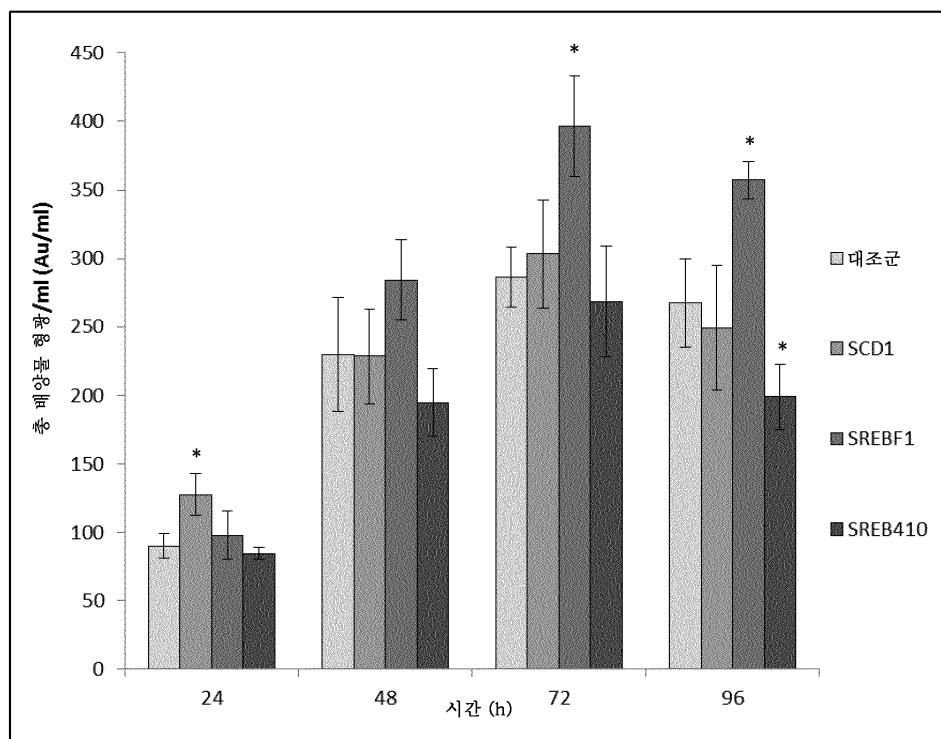
도면7a



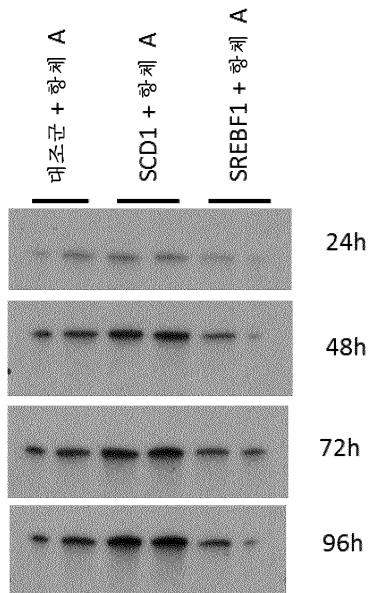
도면7b



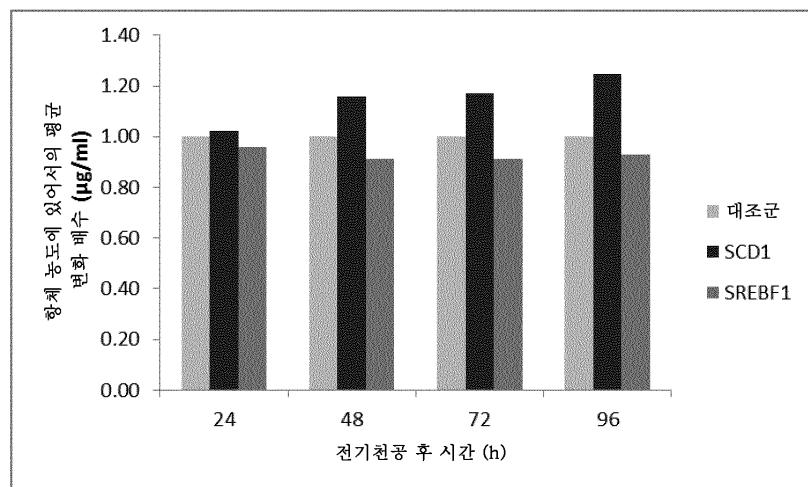
도면7c



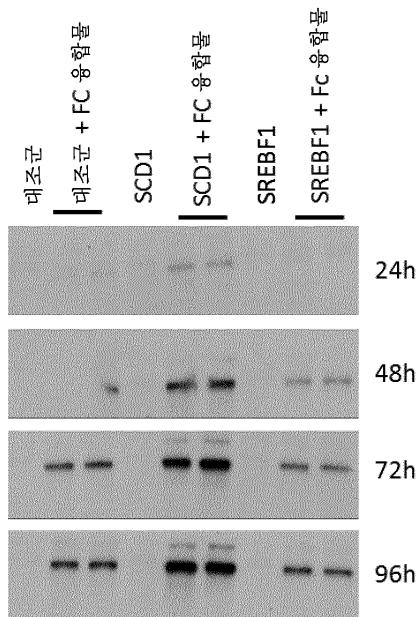
도면 8a



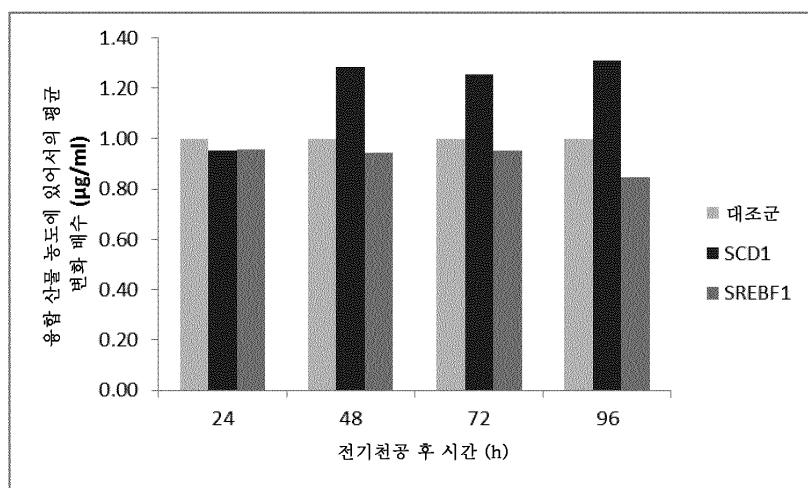
도면 8b



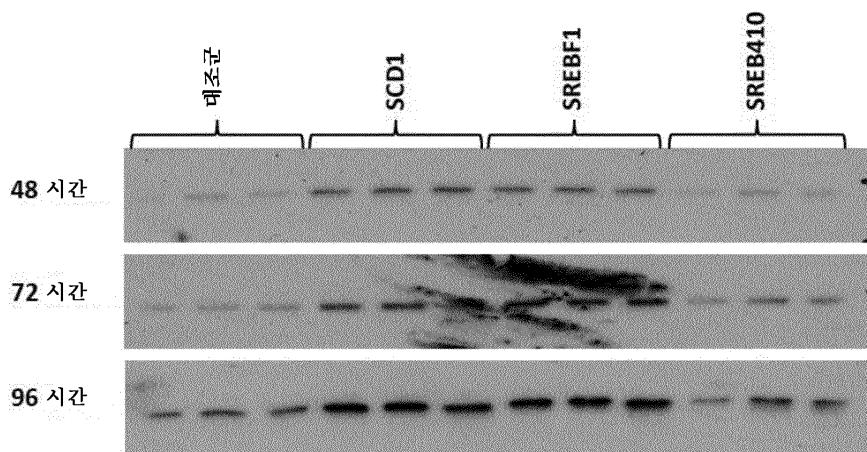
도면9a



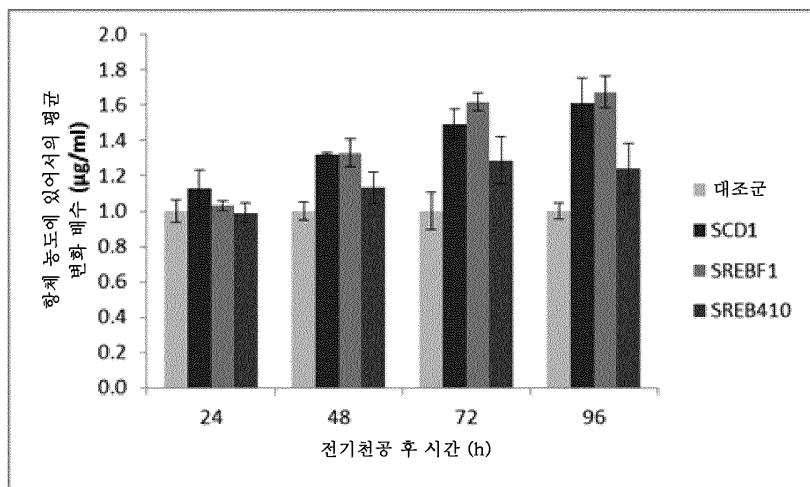
도면9b



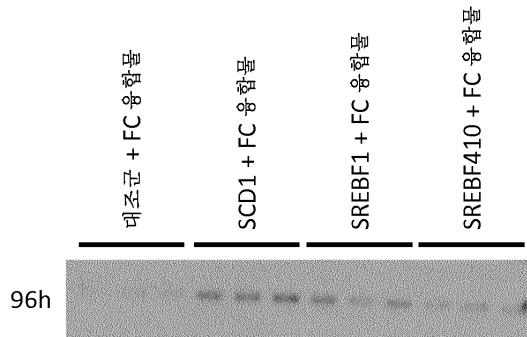
도면10a



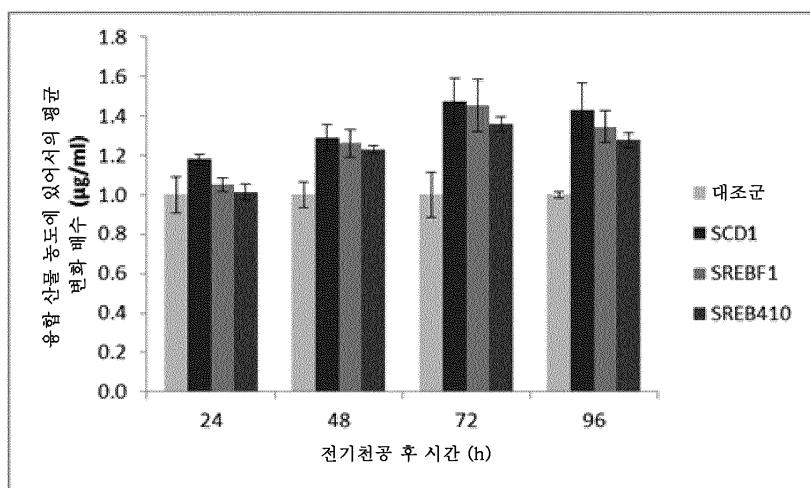
도면10b



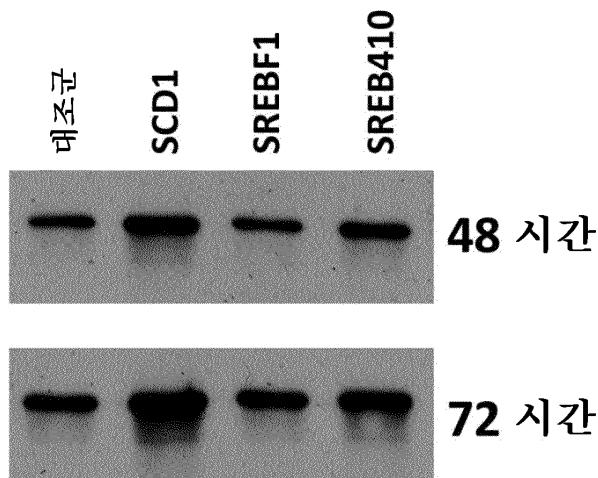
도면11a



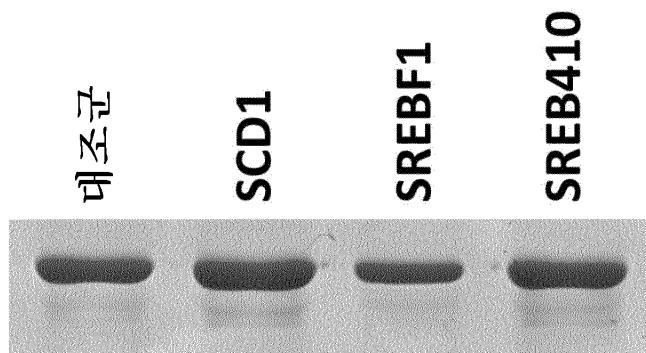
도면11b



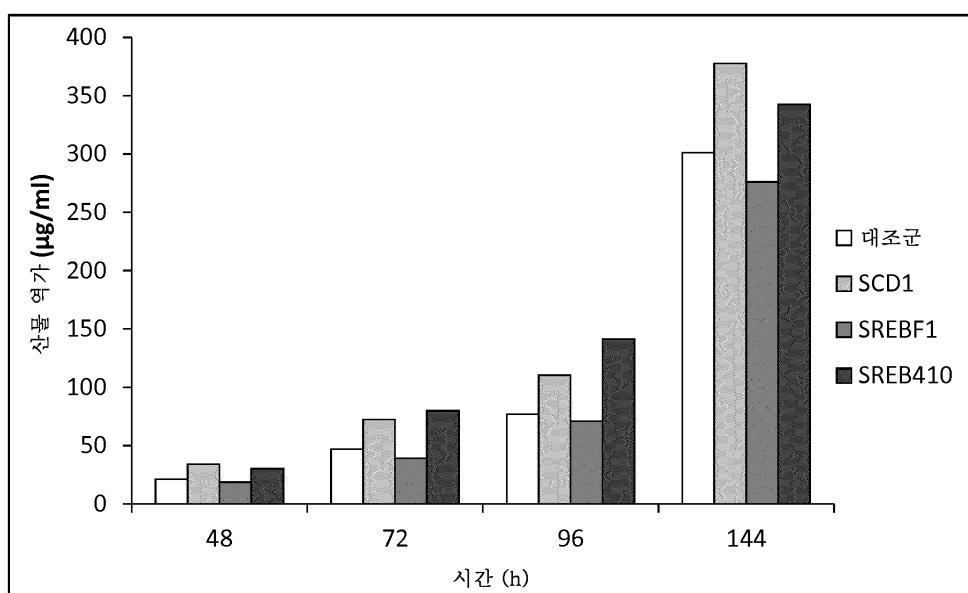
도면 12a



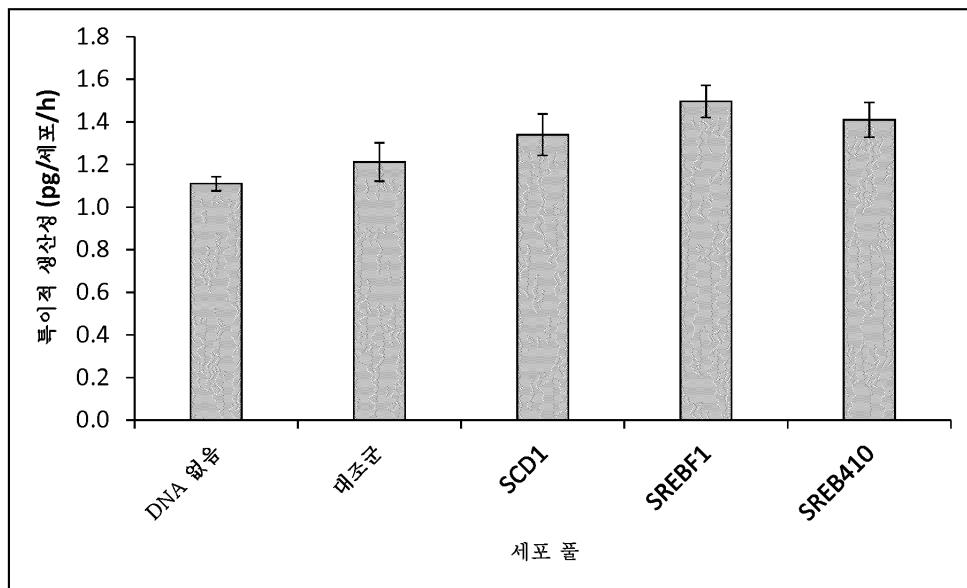
도면 12b



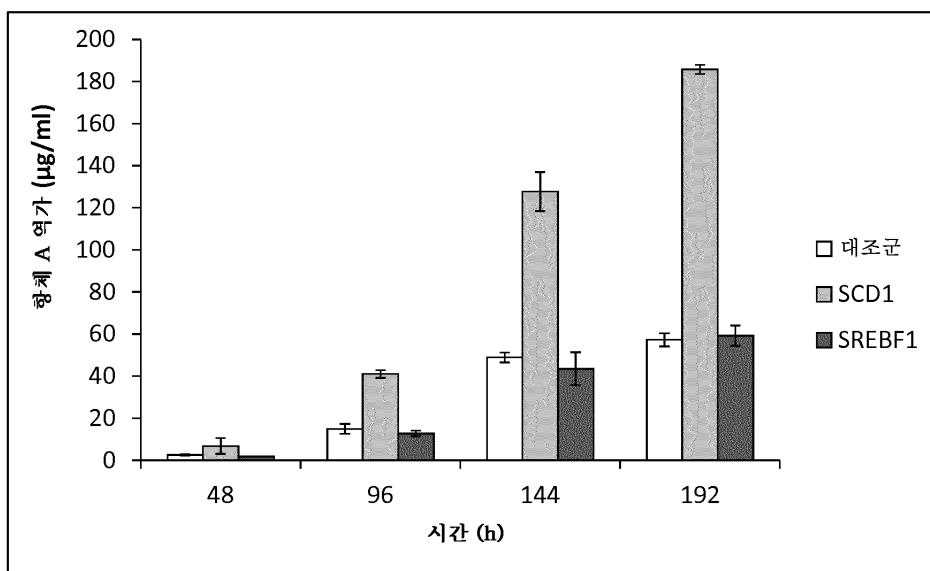
도면13



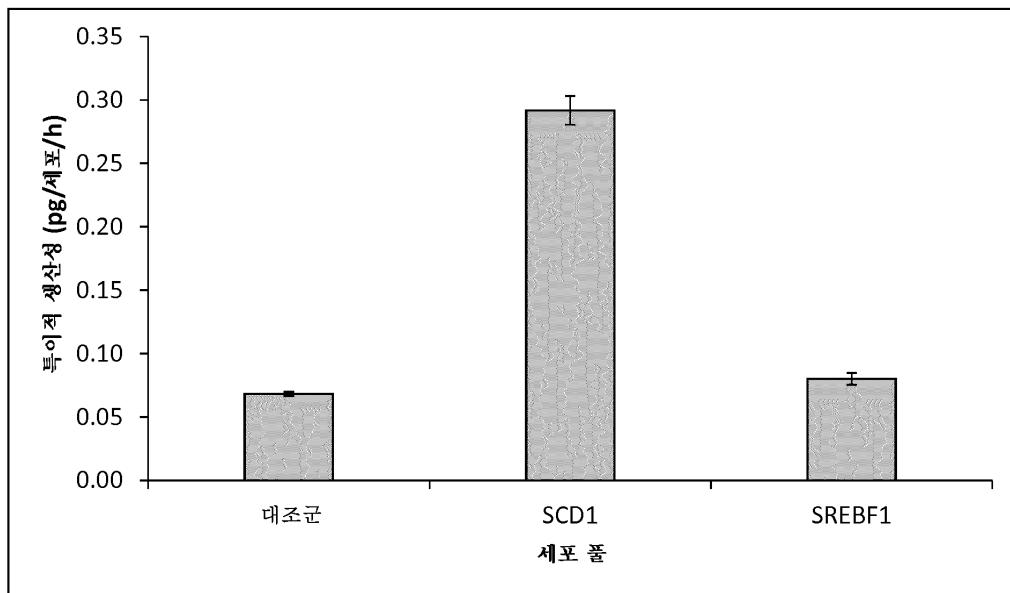
도면14



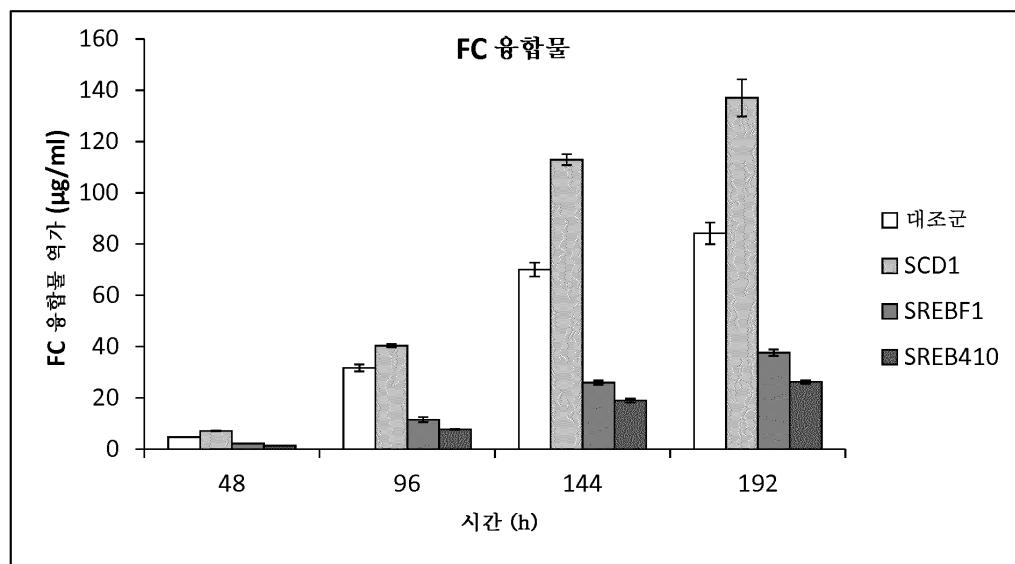
도면15a



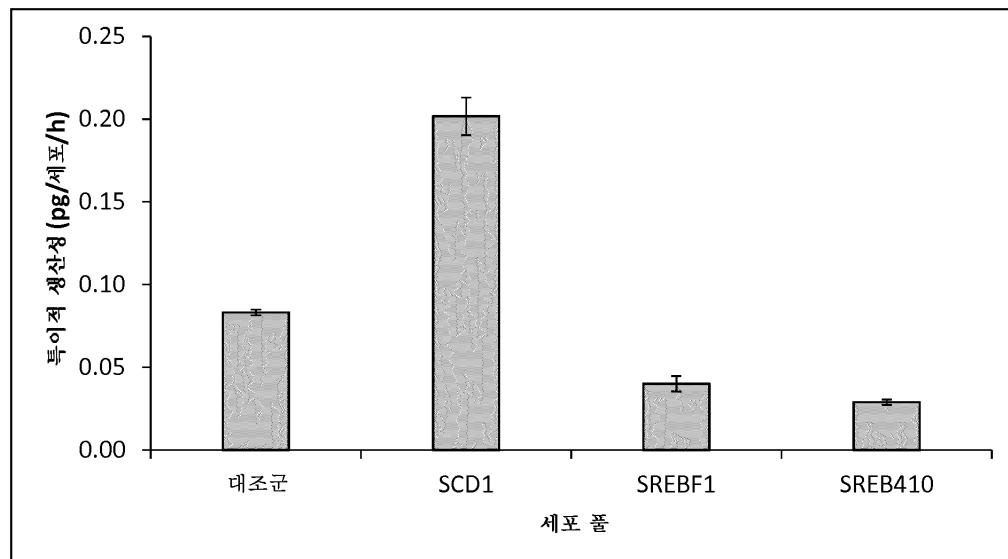
도면15b



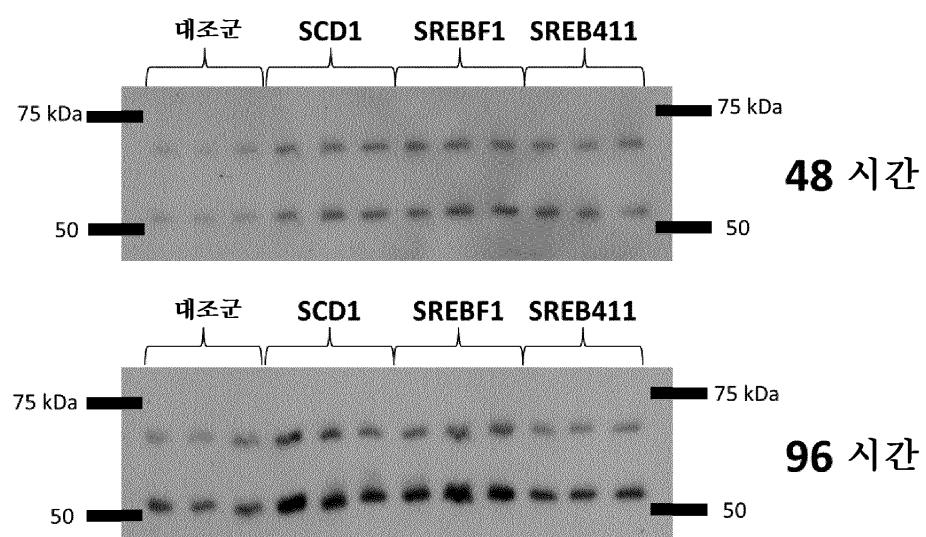
도면16a



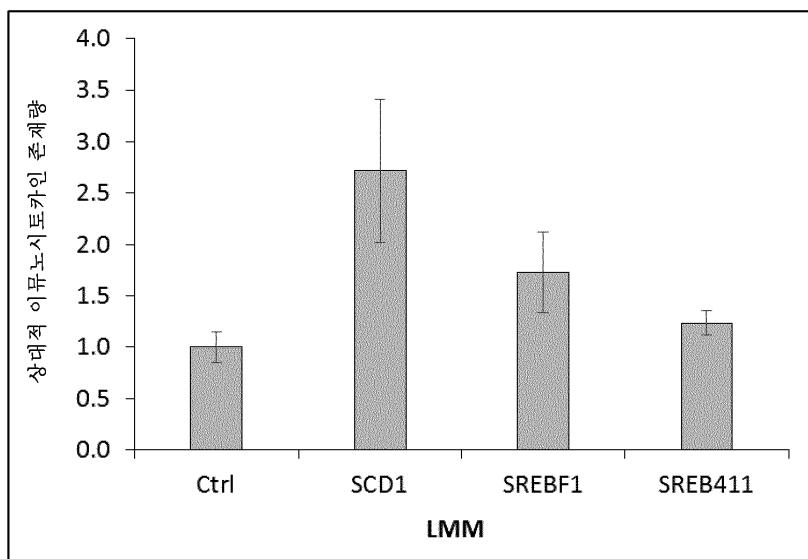
도면16b



도면17a



도면17b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LONZA LTD

<120> MODULATION OF LIPID METABOLISM FOR PROTEIN PRODUCTION

<130> L2082-7003WO

<140> PCT/EP2017/060484

<141> 2017-05-03

<150> 62/330,973

<151> 2016-05-03

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1134

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Asp Glu Leu Ala Phe Gly Glu Ala Ala Leu Glu Gln Thr Leu Ala

1 5 10 15

Glu Met Cys Glu Leu Asp Thr Ala Val Leu Asn Asp Ile Glu Asp Met

20

25

30

Leu Gln Leu Ile Asn Asn Gln Asp Ser Asp Phe Pro Gly Leu Phe Asp

35 40 45

Ala Pro Tyr Ala Gly Gly Glu Thr Gly Asp Thr Gly Pro Ser Ser Pro

50 55 60

Gly Ala Asn Ser Pro Glu Ser Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Ala Phe Leu Gly Gly Pro Lys Val Thr Pro Ala Pro Leu Ser

85 90 95

Pro Pro Pro Ser Ala Pro Ala Ala Leu Lys Met Tyr Pro Ser Val Ser

100 105 110

Pro Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu Glu Pro Val Pro Leu Thr

115 120 125

Ile Leu Gln Pro Ala Ala Pro Gln Pro Ser Pro Gly Thr Leu Leu Pro

130 135 140

Pro Ser Phe Pro Ala Pro Pro Val Gln Leu Ser Pro Ala Pro Val Leu

145 150 155 160

Gly Tyr Ser Ser Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Thr Leu Pro Gly Asn

165 170 175

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

180 185 190

Leu Pro Thr Pro Ala Leu His Thr Gln Val Gln Ser Leu Ala Ser Gln

195 200 205

Gln Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Pro Arg Thr Asn Thr Val Thr Ser

210 215 220

Gln Val Gln Gln Val Pro Val Val Leu Gln Pro His Phe Ile Lys Ala

225 230 235 240

Asp Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Lys Thr Asp Ala Gly Ala Thr Val

245 250 255

Lys Thr Ala Gly Ile Ser Thr Leu Ala Pro Gly Thr Ala Val Gln Ala

260 265 270

Gly Pro Leu Gln Thr Leu Val Ser Gly Gly Thr Ile Leu Ala Thr Val

275	280	285
Pro Leu Val Val Asp Thr Asp Lys Leu Pro Ile His Arg Leu Ala Ala		
290	295	300
Gly Ser Lys Ala Leu Gly Ser Ala Gln Ser Arg Gly Glu Lys Arg Thr		
305	310	315
Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser Ser Ile Asn Asp Lys		
325	330	335
Ile Val Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly Thr Glu Ala Lys Leu Asn		
340	345	350
Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr Ile Arg Phe Leu Gln		
355	360	365
His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu Thr Leu Arg Ser Ala		
370	375	380
His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val Ser Ala Cys Gly Ser Gly		
385	390	395
Gly Gly Thr Asp Val Ser Met Glu Gly Met Lys Pro Glu Val Val Glu		
405	410	415
Thr Leu Thr Pro Pro Ser Asp Ala Gly Ser Pro Ser Gln Ser Ser		
420	425	430
Pro Leu Ser Phe Gly Ser Arg Ala Ser Ser Ser Gly Ser Asp Ser		
435	440	445
Glu Pro Asp Ser Pro Ala Phe Glu Asp Ser Gln Val Lys Ala Gln Arg		
450	455	460
Leu Pro Ser His Ser Arg Gly Met Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu		
465	470	475
Cys Val Leu Ala Phe Leu Cys Leu Thr Cys Asn Pro Leu Ala Ser Leu		
485	490	495
Phe Gly Trp Gly Ile Leu Thr Pro Ser Asp Ala Thr Gly Thr His Arg		
500	505	510
Ser Ser Gly Arg Ser Met Leu Glu Ala Glu Ser Arg Asp Gly Ser Asn		
515	520	525

Trp Thr Gln Trp Leu Leu Pro Pro Leu Val Trp Leu Ala Asn Gly Leu

530 535 540
Leu Val Leu Ala Cys Leu Ala Leu Leu Phe Val Tyr Gly Glu Pro Val

545 550 555 560
Thr Arg Pro His Ser Gly Pro Ala Val His Phe Trp Arg His Arg Lys

565 570 575
Gln Ala Asp Leu Asp Leu Ala Arg Gly Asp Phe Pro Gln Ala Ala Gln

580 585 590
Gln Leu Trp Leu Ala Leu Gln Ala Leu Gly Arg Pro Leu Pro Thr Ser

595 600 605
Asn Leu Asp Leu Ala Cys Ser Leu Leu Trp Asn Leu Ile Arg His Leu

610 615 620
Leu Gln Arg Leu Trp Val Gly Arg Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Gly

625 630 635 640
Leu Leu Arg Asp Arg Gly Leu Arg Lys Asp Ala Arg Ala Ser Ala Arg

645 650 655
Asp Ala Ala Val Val Tyr His Lys Leu His Gln Leu His Ala Met Gly

660 665 670
Lys Tyr Thr Gly Gly His Leu Ala Ala Ser Asn Leu Ala Leu Ser Ala

675 680 685
Leu Asn Leu Ala Glu Cys Ala Gly Asp Ala Ile Ser Met Ala Thr Leu

690 695 700
Ala Glu Ile Tyr Val Ala Ala Leu Arg Val Lys Thr Ser Leu Pro

705 710 715 720
Arg Ala Leu His Phe Leu Thr Arg Phe Phe Leu Ser Ser Ala Arg Gln

725 730 735
Ala Cys Leu Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Leu Ala Met Gln Trp Leu

740 745 750
Cys His Pro Val Gly His Arg Phe Phe Val Asp Gly Asp Trp Ala Val

755 760 765
His Gly Ala Pro Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Val Ala Gly Asn Pro Val

770	775	780
Asp Pro Leu Ala Gln Val Thr Arg Leu Phe Arg Glu His Leu Leu Glu		
785	790	795
Arg Ala Leu Asn Cys Ile Ala Gln Pro Ser Pro Gly Ala Ala Asp Gly		
805	810	815
Asp Arg Glu Phe Ser Asp Ala Leu Gly Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
820	825	830
Cys Ser Asp Ala Ala Gly Ala Pro Ala Cys Ser Phe Ser Val Ser Ser		
835	840	845
Ser Met Ala Ala Thr Thr Gly Pro Asp Pro Val Ala Lys Trp Trp Ala		
850	855	860
Ser Leu Thr Ala Val Val Ile His Trp Leu Arg Arg Asp Glu Glu Ala		
865	870	875
Ala Glu Arg Leu Tyr Pro Leu Val Glu His Ile Pro Gln Val Leu Gln		
885	890	895
Asp Thr Glu Arg Pro Leu Pro Arg Ala Ala Leu Tyr Ser Phe Lys Ala		
900	905	910
Ala Arg Ala Leu Leu Asp His Arg Lys Val Glu Ser Ser Pro Ala Ser		
915	920	925
Leu Ala Ile Cys Glu Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Arg Asp Ser Leu Ala		
930	935	940
Ser Thr Pro Thr Gly Ser Ser Ile Asp Lys Ala Met Gln Leu Leu Leu		
945	950	955
Cys Asp Leu Leu Val Ala Arg Thr Ser Leu Trp Gln Arg Gln Gln		
965	970	975
Ser Pro Ala Ser Val Gln Val Ala His Gly Thr Ser Asn Gly Pro Gln		
980	985	990
Ala Ser Ala Leu Glu Leu Arg Gly Phe Gln His Asp Leu Ser Ser Leu		
995	1000	1005
Arg Arg Leu Ala Gln Ser Phe Arg Pro Ala Met Arg Arg Val Phe		
1010	1015	1020

Leu His Glu Ala Thr Ala Arg Leu Met Ala Gly Ala Ser Pro Ala

1025 1030 1035

Arg Thr His Gln Leu Leu Asp Arg Ser Leu Arg Arg Arg Ala Gly

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

Thr Trp Arg Glu His Thr Glu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Cys Tyr

1070 1075 1080

Leu Pro Pro Ala Phe Leu Ser Ala Pro Gly Gln Arg Met Ser Met

1085 1090 1095

Leu Ala Glu Ala Ala Arg Thr Val Glu Lys Leu Gly Asp His Arg

1100 1105 1110

Leu Leu Leu Asp Cys Gln Gln Met Leu Leu Arg Leu Gly Gly Gly

1115 1120 1125

Thr Thr Val Thr Ser Ser

1130

<210> 2

<211> 3405

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atggacgagc tggcttcggtgaggcgtt ctggaaacaga cactggccga gatgtgcgaa 60

ctggacacag cggtttgaa cgacatcgaa gacatgtcc agctcatcaa caaccaagac 120

agtgacttcc cgggcctgtt tgacgcccc tatgctgggttgagacagg ggacacaggc 180

cccagcagcc caggtgccaa ctctccttag agcttcttt ctgtttctt ggcctccct 240

ctggaaaggct tcctggagg acccaagggtg acacactgcac cttgtcccc tccaccatcg 300

gcacccgctg cttaaagat gtacccgtcc gtgtccccctt tttccctgg gcctggatc 360

aaagaggaggc cagtgccact caccatccta cagcctgcag cgccacagcc gtcaccgggg 420

accctccctgc ctccgagctt cccgcacca cccgtacagc tcagccctgc gcccgtctg 480

ggttactcga gcctgccttc aggcttctca gggacccttc caggaaacac tcagcagcca 540

ccatctagcc tgccgctggc ccctgcacca ggagtcttc ccacccctgc cctgcacacc 600

cagggtccaaa gcttggcctc ccagcagecg ctgccagcct cagcagcccc tagaacaaac	660
actgtgacct cacaggcca gcaggtccca gttgtactgc agccacactt catcaaggca	720
gactcactgc tgtgacagc tgtgaagaca gatgcaggag ccaccgtgaa gactgcaggc	780
atcagcaccc tgggtccctgg cacagccgtg caggcaggc cccgtcagac cctggtagt	840
ggagggacca tcttggccac agtaccttg gttgtggaca cagacaaact gcccatccac	900
cgactcgcag ctggcagcaa ggcccttaggc tcagtcaga gccgtggta gaagcgcaca	960
gcccacaatg ccattgagaa gcgcctaccgg tcttctatca atgacaagat tgtggagctc	1020
aaagacactgg tggtggcac tgaagcaaag ctgaataaat ctgctgtctt gcgcaggcc	1080
atcgactaca tccgcttctt gcagcacagc aaccagaagc tcaagcagga gaaccgtacc	1140
ctacgaagtg cacacaaaag caaatcactg aaggacctgg tgtcagctt gggcagtgg	1200
ggaggcacag atgtgtctat ggagggcatg aaaccgaaag tggtggagac gcttaccct	1260
ccaccctcag acgcggcgc accctccag agtagccct tgtctttgg cagcagagct	1320
agcagcagtg gtggtagtga ctctgagccc gacagtccag ccttgagga tagccaggc	1380
aaagcccagc ggctgccttc acacagccga ggcatgctgg accgctcccg cctggccctg	1440
tgtgtactgg ctttctgtg tctgacactgc aatccttgg cctcgcttt cggtggg	1500
attctactc cctctgatgc tacgggtaca caccgttagt ctggcgccag catgtggag	1560
gcagagagca gagatggctc taattggacc cagtggtgc tgccacccct agtctggctg	1620
gccaatggac tactagtgtt ggcctgctt gctcttctt ttgtctatgg ggaacctgt	1680
actaggccac actctggccc ggctgtacac ttctggagac atcgcaaaca agctgacact	1740
gatttggccc ggggagattt cccccaggt gctcaacagc tggtggctgc cctgcaagcg	1800
ctggccggc ccctgcccac ctcaaacctg gatctggcct gcagtctgt ttggAACCTC	1860
atccgccacc tgctccagcg tctctgggtg ggccgctggc tggcaggcca ggccggggc	1920
ctgctgaggg accgtggct gagaaggat gcccgtgcca gtgccccggta tgccgttgtt	1980
gtctaccata agtgcacca gtcgtcatgcc atggcaagt acacaggagg acatcttgc	2040
gcttctaacc tggcactaag tgccctcaac ctggctgagt ggcaggaga tgctatctcc	2100
atggcaacac tggcagagat ctatgtggca gcccgttga gggtaaaaac cagcctccca	2160
agagccctgc acttcttgac acgtttcttcc ctgagcagcg cccgcccaggc ctgcctagca	2220
cagagcggct cgggtccctt tgccatgcag tggctctgcc accctgtagg tcaccgttc	2280
tttgtggacg gggactggc cgtgcacggt gccccccgg agaggctgta cagcgtggct	2340
gggaaccctg tggatccgct ggcccagggt accccggctat tccgtgaaca tctcttagag	2400
cgagcgttga actgtattgc tcagcccagc ccagggcag ctgacggaga cagggagttc	2460

tcagatgccc ttggatatct gcagttgcta aatagctgtt ctgatgctgc cggggctcct	2520
gcttgcaagg tctctgtcag ctccagcatg gctgccacca ctggcccaga cccagtgcc	2580
aagtgggtggg cctcaactgac agctgtggt atccactggc tgaggcggga tgaagaggca	2640
gctgagcgct tgtacccact ggttagagcat atccccagg tgtgcagga cactgagaga	2700

ccccctgcca gggcagctct gtactccttc aaggctgccc gggctctgct ggaccacaga	2760
aagggtggaaat cttagccagc cagcctggcc atctgtgaga aggccagtgg gtacactgcgg	2820
gacagcttag cctctacacc aactggcagt tccattgaca aggccatgca gctgctcctg	2880
tgtgatctac ttcttgtggc ccgtaccagt ctgtggcagc ggcagcagtc accagctca	2940
gtccagtag ctacggtagc cagcaatgga ccccaaggct ctgctctgga gctgcgtgg	3000
ttccaaacatg acctgagcag cctgcggcgg ttggcacaga gcttccggcc tgctatgagg	3060
agggtattcc tacatgaggc cacagctgg ctgatggcag gagcaagtcc tgccggaca	3120

caccagctcc tggatcgcag tctgaggagg agggcaggtt ccagtggcaa aggaggcact	3180
acagctgagc tggagccacg gcccacatgg cgggagcaca ccgaggccct gctgtggca	3240
tcctgctatc tgccccctgc cttcctgtcg gctcctggc agcgaatgag catgctggcc	3300
gaggcggcac gcacccgtaga gaagcttggc gatcacccgc tactgctgga ctgcccagcag	3360
atgctctgc gcctggcgg cgaaaccacc gtcacttcca gctag	3405

<210> 3

<211> 355

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Pro Ala His Met Leu Gln Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Thr

1	5	10	15												
Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Asn	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Lys

20	25	30													
Thr	Val	Pro	Leu	His	Leu	Glu	Glu	Asp	Ile	Arg	Pro	Glu	Met	Lys	Glu

35	40	45													
Asp	Ile	His	Asp	Pro	Thr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Glu	Gly	Pro	Pro	Pro	Lys

50	55	60													
Leu	Glu	Tyr	Val	Trp	Arg	Asn	Ile	Ile	Leu	Met	Val	Leu	Leu	His	Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Gly Leu Tyr Gly Ile Ile Leu Val Pro Ser Cys Lys Leu Tyr Thr
 85 90 95
 Cys Leu Phe Gly Ile Phe Tyr Tyr Met Thr Ser Ala Leu Gly Ile Thr
 100 105 110
 Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr Lys Ala Arg Leu
 115 120 125
 Pro Leu Arg Ile Phe Leu Ile Ala Asn Thr Met Ala Phe Gln Asn

 130 135 140
 Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His His Lys Phe Ser
 145 150 155 160
 Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly Phe Phe Ser
 165 170 175
 His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala Val Lys Glu Lys
 180 185 190
 Gly Gly Lys Leu Asp Met Ser Asp Leu Lys Ala Glu Lys Leu Val Met

 195 200 205
 Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Leu Leu Met Cys Phe Ile
 210 215 220
 Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Cys Trp Gly Glu Thr Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Phe Val Ser Thr Phe Leu Arg Tyr Thr Leu Val Leu Asn Ala
 245 250 255
 Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly Tyr Arg Pro Tyr

 260 265 270
 Asp Lys Asn Ile Gln Ser Arg Glu Asn Ile Leu Val Ser Leu Gly Ala
 275 280 285
 Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Phe Pro Phe Asp Tyr
 290 295 300
 Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr Thr Phe Phe Ile
 305 310 315 320
 Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg Lys Lys Val Ser

325	330	335	
Lys Ala Thr Val Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser His			
340	345	350	
Lys Ser Ser			
355			
<210> 4			
<211> 1068			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 4			
atgcggccc acatgctcca agagatctcc agttttaca cgaccaccac caccatca			60
gcacctccct ccggaaatga acgagagaag gtgaagacgg tgccctcca cctgaaagaa			120
gacatccgtc ctgaaatgaa agaagatatt cacgacccca cctatcagga tgaggaggga			180
ccccggccca agctggagta cgtctggagg aacatcatc tcatggctt gctgcacttg			
ggaggccctgt acggatcat actggttccc tcctgcaagc tctacacctg cctttcgaa			240
attttctact acatgaccag cgctctggc atcacagccg gggctcatcg cctctggagc			300
cacagaacctt acaaggcacg gtcgccttg cggatctcc ttatcattgc caacaccatg			360
gcgttccaga atgacgtgta cgaatggcc cgagatcacc ggcgcacca caagtctca			420
gaaacacacg ccgaccctca caattccgc cgtggcttct tttctctca cgtgggttgg			480
ctgcttgtgc gcaaacadcc ggctgtcaaa gagaagggcg gaaaactgga catgtctgac			540
ctgaaagccg agaagctggt gatgttccag aggaggtact acaagcccg cctcctgctg			
atgtgcttca tcctgcccac gctggtgccc tggtactgct gggcgagac tttgtaaac			600
agccctgtcg ttagcacctt cttgcgatac actctggtgc tcaacgccac ctggctggtg			660
aacagtgcgg cgcatctcta tggatatgc ccctacgaca agaacattca atccggag			720
aatatcctgg ttccctggg tgccgtggc gagggcttcc acaactacca ccacaccc			780
cccttcgact actctgccag tgagtaccgc tggcacatca acttcaccac gttcttcata			840
gactgcatgg ctgcctggg cctggcttac gaccgaaaga aagtttctaa ggctactgtc			900
tttagccagga ttaagagaac tggagacggg agtcacaaga gtagctga			
			960
<210> 5			
<211> 35			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 5

tatgctagcg gtaccatggt gagcaaggc gagga 35

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 6

tatgtacca tggacgagct 20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 7

atagggccct tagctggaa 19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 8

tatgcggccg catggacgag 20

<210> 9

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 9

atactcgagc ggctacttt

20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 10

tatggtagcc tgcggcc

18

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 11

atactcgagt cagctactt tgt

23

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 12

tatggcacca tgccggcc	18
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"	
<400> 13	
atactcgagc ggctactctt	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"	
<400> 14	
tatgcggccg catggacgag	20
<210> 15	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"	
<400> 15	
atatctagac tagctggaag tgacggtggt tcc	33
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 16

tatgcggccg catggacgag	20
-----------------------	----

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400>

> 17

atatctagac tgctggaagt gacggtggtt c	31
------------------------------------	----

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 18

tatgcggccg catggacgag	20
-----------------------	----

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 19

atatctagat cacatgccct ccatagacac atctgtg	37
--	----

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 20

tatgcggccg catggacgag 20

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 21

atatctagac tcatgccctc catagacaca tctgtg 36

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 22

tatggatcca tgccggcc 18

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 23

atactcgagt cagctactct tgt 23

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 24

tatgg tacca tgccggcc 18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 25

atactcgagc ggctactttt 20

<210> 26

<211> 410

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Met Asp Glu Leu Ala Phe Gly Glu Ala Ala Leu Glu Gln Thr Leu Ala

1	5	10	15
Glu	Met	Cys	Glu
Leu	Asp	Thr	Ala
			Val
			Leu
			Asn
			Asp
			Ile
			Glu
			Asp
			Met

20	25	30	35
Leu	Gln	Leu	Ile
	Leu	Asn	Asn
		Gln	Asp
		Ser	Ser
		Asp	Phe
			Pro
			Gly
			Leu
			Phe
			Asp

40	45	50	55	60
Ala	Pro	Tyr	Ala	Gly
				Glu
				Thr
				Gly
				Asp
				Thr
				Gly
				Pro
				Ser
				Ser

55	60	65	70
Gly	Ala	Asn	Ser
		Pro	Pro
			Gly
			Leu
			Asp
			Ser
			Ser

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

Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser Ser Ile Asn Asp Lys

325 330 335

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

340 345 350

Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr Ile Arg Phe Leu Gln

355 360 365

His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu Thr Leu Arg Ser Ala

370 375 380

His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val Ser Ala Cys Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Thr Asp Val Ser Met Glu Gly Met

405 410

<210> 27

<211> 320

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Pro Ala Pro Leu Ser Pro Pro Pro Ser Ala Pro Ala Ala Leu Lys

1 5 10 15

Met Tyr Pro Ser Val Ser Pro Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu

20 25 30

Glu Pro Val Pro Leu Thr Ile Leu Gln Pro Ala Ala Pro Gln Pro Ser

35 40 45

Pro Gly Thr Leu Leu Pro Pro Ser Phe Pro Ala Pro Pro Val Gln Leu

50 55 60

Ser Pro Ala Pro Val Leu Gly Tyr Ser Ser Leu Pro Ser Gly Phe Ser

65 70 75 80

Gly Thr Leu Pro Gly Asn Thr Gln Gln Pro Pro Ser Ser Leu Pro Leu

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Gly Val Leu Pro Thr Pro Ala Leu His Thr Gln Val

100 105 110

Gln Ser Leu Ala Ser Gln Gln Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Pro Arg

115 120 125

Thr Asn Thr Val Thr Ser Gln Val Gln Gln Val Pro Val Val Leu Gln

130 135 140

Pro His Phe Ile Lys Ala Asp Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Lys Thr

145 150 155 160

Asp Ala Gly Ala Thr Val Lys Thr Ala Gly Ile Ser Thr Leu Ala Pro

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ile Leu Ala Thr Val Pro Leu Val Val Asp Thr Asp Lys Leu Pro

195 200 205

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

210 215 220

Arg Gly Glu Lys Arg Thr Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg

225 230 235 240

Ser Ser Ile Asn Asp Lys Ile Val Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly

245 250 255

Thr Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp

260 265 270

Tyr Ile Arg Phe Leu Gln His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn

275 280 285

Leu Thr Leu Arg Ser Ala His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val

290 295 300

Ser Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Asp Val Ser Met Glu Gly Met

305 310 315 320

<210> 28

<211> 1177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Asp Glu Pro Pro Phe Ser Glu Ala Ala Leu Glu Gln Ala Leu Gly

1	5	10	15
Glu Pro Cys Asp Leu Asp Ala Ala Leu Leu Thr Asp Ile Glu Gly Glu			
20	25	30	
Val Gly Ala Gly Arg Gly Arg Ala Asn Gly Leu Asp Ala Pro Arg Ala			
35	40	45	
Gly Ala Asp Arg Gly Ala Met Asp Cys Thr Phe Glu Asp Met Leu Gln			
50	55	60	
Leu Ile Asn Asn Gln Asp Ser Asp Phe Pro Gly Leu Phe Asp Pro Pro			
65	70	75	80
Tyr Ala Gly Ser Gly Ala Gly Gly Thr Asp Pro Ala Ser Pro Asp Thr			
85	90	95	
Ser Ser Pro Gly Ser Leu Ser Pro Pro Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser			
100	105	110	
Leu Glu Ala Phe Leu Ser Gly Pro Gln Ala Ala Pro Ser Pro Leu Ser			
115	120	125	
Pro Pro Gln Pro Ala Pro Thr Pro Leu Lys Met Tyr Pro Ser Met Pro			
130	135	140	
Ala Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu Glu Ser Val Pro Leu Ser			
145	150	155	160
Ile Leu Gln Thr Pro Thr Pro Gln Pro Leu Pro Gly Ala Leu Leu Pro			
165	170	175	
Gln Ser Phe Pro Ala Pro Pro Gln Phe Ser Ser Thr Pro Val			
180	185	190	
Leu Gly Tyr Pro Ser Pro Pro Gly Gly Phe Ser Thr Gly Ser Pro Pro			
195	200	205	
Gly Asn Thr Gln Gln Pro Leu Pro Gly Leu Pro Leu Ala Ser Pro Pro			
210	215	220	
Gly Val Pro Pro Val Ser Leu His Thr Gln Val Gln Ser Val Val Pro			
225	230	235	240
Gln Gln Leu Leu Thr Val Thr Ala Ala Pro Thr Ala Ala Pro Val Thr			
245	250	255	

Thr Thr Val Thr Ser Gln Ile Gln Gln Val Pro Val Leu Leu Gln Pro
 260 265 270
 His Phe Ile Lys Ala Asp Ser Leu Leu Leu Thr Ala Met Lys Thr Asp
 275 280 285

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

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

Leu Arg Thr Ala Val His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val Ser
 420 425 430
 Ala Cys Gly Ser Gly Gly Asn Thr Asp Val Leu Met Glu Gly Val Lys
 435 440 445
 Thr Glu Val Glu Asp Thr Leu Thr Pro Pro Ser Asp Ala Gly Ser
 450 455 460
 Pro Phe Gln Ser Ser Pro Leu Ser Leu Gly Ser Arg Gly Ser Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ser Glu Pro Asp Ser Pro Val Phe Glu Asp
 485 490 495
 Ser Lys Ala Lys Pro Glu Gln Arg Pro Ser Leu His Ser Arg Gly Met

500	505	510
Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Cys Thr Leu Val Phe Leu Cys Leu		
515	520	525
Ser Cys Asn Pro Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Arg Gly Leu Pro Ser		
530	535	540
Pro Ser Asp Thr Thr Ser Val Tyr His Ser Pro Gly Arg Asn Val Leu		
545	550	555
Gly Thr Glu Ser Arg Asp Gly Pro Gly Trp Ala Gln Trp Leu Leu Pro		
565	570	575
Pro Val Val Trp Leu Leu Asn Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Leu Val		
580	585	590
Leu Leu Phe Val Tyr Gly Glu Pro Val Thr Arg Pro His Ser Gly Pro		
595	600	605
Ala Val Tyr Phe Trp Arg His Arg Lys Gln Ala Asp Leu Asp Leu Ala		
610	615	620
Arg Gly Asp Phe Ala Gln Ala Ala Gln Gln Leu Trp Leu Ala Leu Arg		
625	630	635
640		
Ala Leu Gly Arg Pro Leu Pro Thr Ser His Leu Asp Leu Ala Cys Ser		
645	650	655
Leu Leu Trp Asn Leu Ile Arg His Leu Leu Gln Arg Leu Trp Val Gly		
660	665	670
Arg Trp Leu Ala Gly Arg Ala Gly Gly Leu Gln Gln Asp Cys Ala Leu		
675	680	685
Arg Val Asp Ala Ser Ala Ser Ala Arg Asp Ala Ala Leu Val Tyr His		
690	695	700
Lys Leu His Gln Leu His Thr Met Gly Lys His Thr Gly Gly His Leu		
705	710	715
720		
Thr Ala Thr Asn Leu Ala Leu Ser Ala Leu Asn Leu Ala Glu Cys Ala		
725	730	735
Gly Asp Ala Val Ser Val Ala Thr Leu Ala Glu Ile Tyr Val Ala Ala		
740	745	750

Ala Leu Arg Val Lys Thr Ser Leu Pro Arg Ala Leu His Phe Leu Thr
 755 760 765

Arg Phe Phe Leu Ser Ser Ala Arg Gln Ala Cys Leu Ala Gln Ser Gly
 770 775 780

Ser Val Pro Pro Ala Met Gln Trp Leu Cys His Pro Val Gly His Arg
 785 790 795 800

Phe Phe Val Asp Gly Asp Trp Ser Val Leu Ser Thr Pro Trp Glu Ser
 805 810 815

Leu Tyr Ser Leu Ala Gly Asn Pro Val Asp Pro Leu Ala Gln Val Thr
 820 825 830

Gln Leu Phe Arg Glu His Leu Leu Glu Arg Ala Leu Asn Cys Val Thr
 835 840 845

Gln Pro Asn Pro Ser Pro Gly Ser Ala Asp Gly Asp Lys Glu Phe Ser
 850 855 860

Asp Ala Leu Gly Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Ser Cys Ser Asp Ala Ala
 865 870 875 880

Gly Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Ser Met Ala Thr Thr
 885 890 895

Thr Gly Val Asp Pro Val Ala Lys Trp Trp Ala Ser Leu Thr Ala Val
 900 905 910

Val Ile His Trp Leu Arg Arg Asp Glu Glu Ala Ala Glu Arg Leu Cys
 915 920 925

Pro Leu Val Glu His Leu Pro Arg Val Leu Gln Glu Ser Glu Arg Pro
 930 935 940

Leu Pro Arg Ala Ala Leu His Ser Phe Lys Ala Ala Arg Ala Leu Leu
 945 950 955 960

Gly Cys Ala Lys Ala Glu Ser Gly Pro Ala Ser Leu Thr Ile Cys Glu
 965 970 975

Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Gln Asp Ser Leu Ala Thr Thr Pro Ala Ser
 980 985 990

Ser Ser Ile Asp Lys Ala Val Gln Leu Phe Leu Cys Asp Leu Leu Leu

995	1000	1005
Val Val Arg Thr Ser Leu Trp	Arg Gln Gln Gln Pro	Pro Ala Pro
1010	1015	1020
Ala Pro Ala Ala Gln Gly Thr	Ser Ser Arg Pro Gln	Ala Ser Ala
1025	1030	1035
Leu Glu Leu Arg Gly Phe Gln	Arg Asp Leu Ser Ser	Leu Arg Arg
1040	1045	1050

Leu Ala Gln Ser Phe Arg Pro	Ala Met Arg Arg Val	Phe Leu His
1055	1060	1065
Glu Ala Thr Ala Arg Leu Met	Ala Gly Ala Ser Pro	Thr Arg Thr
1070	1075	1080
His Gln Leu Leu Asp Arg Ser	Leu Arg Arg Arg Ala	Gly Pro Gly
1085	1090	1095
Gly Lys Gly Gly Ala Val Ala	Glu Leu Glu Pro Arg	Pro Thr Arg
1100	1105	1110

Arg Glu His Ala Glu Ala Leu	Leu Leu Ala Ser Cys	Tyr Leu Pro
1115	1120	1125
Pro Gly Phe Leu Ser Ala Pro	Gly Gln Arg Val Gly	Met Leu Ala
1130	1135	1140
Glu Ala Ala Arg Thr Leu Glu	Lys Leu Gly Asp Arg	Arg Leu Leu
1145	1150	1155
His Asp Cys Gln Gln Met Leu	Met Arg Leu Gly Gly	Gly Thr Thr
1160	1165	1170

Val Thr Ser Ser

1175

<210> 29

<211> 5012

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

agcagagctg cggccggggg aacccagttt ccgaggaact tttcgccggc gccggggcgc	60
ctctgaggcc agggcaggac acgaacgcgc ggagcggcgg cggcgaactga gagccggggc	120

cgcggcggcg ctccctagga agggccgtac gaggcggcgg gcccggcgg cctccggag	180
gaggcggctg cccatggac gagccacct tcagcgagc ggcttggag cagggctgg	240
gcgagccgtg cgatctggac gcggcgctgc tgaccgacat cgaaggtgaa gtcggcgg	300
ggagggtag gccaaacggc ctggacgcc caagggcggc cgagatcgc ggagccatgg	360
attgcactt cgaagacatg cttcagctt tcaacaacca agacagtgc ttccctggcc	420
tatttgaccc accctatgt gggagtgggg cagggggcac agaccctgcc agccccata	480
ccagctcccc aggagcttg tctccaccc ctggccacatt gagtcctct cttgaagcct	540
tcctgagcgg gccgcaggca gcgcctcac ccctgtcccc tccccagcct gcaccactc	600
cattgaagat gtacccgtcc atgcccgtt tctccctgg gcctggatc aaggaagagt	660
cagtgccact gagcatcctg cagaccccca ccccacagcc cctgccagg gcccctctgc	720
cacagagctt cccagcccca gccccacccg agttcagtc caccctgtg ttaggttacc	780
ccagccctcc gggaggcttc tctacaggaa gcccctccgg gaacacccag cagccgtgc	840
ctggccgtcc actggcttcc ccgcagggg tcccggccgt ctccctgcac acccagggtcc	900
agagtgttgt cccccagcag ctactgacag tcacagctgc ccccacggca gcccctgtaa	960
cgaccactgt gacctcgacatccaggagg tcccggctt gctgcagccc cacttcatca	1020
aggcagactc gtcgttctg acagccatga agacagacgg agccactgtg aaggcggcag	1080
gtctcagtcc cctggctctt ggcaccactg tgccagacagg gccttgcgg accctggta	1140
gtggcggAAC catttggca acagtccac tggctgtaga tgccggagaag ctgcctatca	1200
accggctcgc agctggcagc aaggccccgg cctctgccca gagccgtgga gagaagcgca	1260
cagcccaaa cggcatttag aagcgctacc gtcctccat caatgacaaa atcattgagc	1320
tcaaggatct ggtggtggc actgaggcaa agctgaataa atctgtgtc ttgcgcagg	1380
ccatcgacta cattcgctt ctgcaacaca gcaaccagaa actcaagcag gagaaccta	1440
gtctgcccac tgctgtccac aaaagcaaatt ctctgaagga tctgggtgtc gcctgtggca	1500
gtggagggaa cacagacgtc ctcatggagg gcgtgaagac tgaggtggag gacacactga	1560
ccccacccccc ctggatgtt ggctcaccc tccagagcag ccccttgcctt cttggcagca	1620
ggggcagtgg cagcggtggc agtggcagt actcgaggcc tgacagccca gtcttgggg	1680
acagcaaggc aaagccagag cagcgccgt ctctgcacag ccggggcatg ctggaccgt	1740
cccgccctggc cctgtgcacg ctgcgttcc tctgcgtgc ctgcaacccc ttggccctct	1800
tgctggggc ccggggcattt cccagccct cagataccac cagcgctac catagccctg	1860
ggcgcaacgt gctgggcacc gagagcagag atggccctgg ctggccctgg tggctgtgc	1920
ccccagtggt ctggctgctc aatggcgtt tggctgtgc tctcttggtt cttcttttgc	1980

tctacggta gccagtcaca cggccccact cagggccgc cgtgtacttc tggaggcatc	2040
gcaagcaggc tgacctggac ctggcccgaa gagactttgc ccaggctgcc cagcagctgt	2100
ggctggccct gcgggcactg ggccggcccc tgcccacctc ccacctggac ctggcttgcata	2160
gcctccctcg gaacctcatc cgtcacctgc tgcagcgctc ctgggtggc cgctggctgg	2220
caggccggc agggggcctg cagcaggact gtgcgtcg agtggatgtc agcggcagcg	2280
cccgagacgc acccctggtc taccataagc tgcaccagct gcacaccatg ggaaagcaca	2340
caggcgggca cctcaactgcc accaacctgg cgctgagtgcc cctgaacactg gcagagtgt	2400
caggggatgc cgtgtctgtc gcgacgctgg ccgagatcta tgtggccgt gcattgagag	2460
tgaagaccag tctccacgg gccttgcatt ttctgacacg cttttctgc agcagtgc	2520
cccgaggctg cctggcacag agtggctcg tgcctcctgc catgcagtgg ctctgccacc	2580
ccgtggcca ccgtttcttc gtggatggg actggccgt gctcagtacc ccatggaga	2640
gcctgtacag ctggccggg aaccctggg acccccggc ccaggtgact cagctattcc	2700
ggaaacatct ctagagcga gcactgaact gtgtgaccca gccaacccc agccctgggt	2760
cagctgtatgg ggacaaggaa ttctcgatg ccctcggtt cctgcagctg ctgaacagct	2820
gttctgtatgc tgcggggcct cctgcctaca gcttctccat cagttccagc atggccacca	2880
ccaccggcgt agaccgggtg gccaagtggg gggcctctc gacagctgtg gtgatccact	2940
ggctgcggcg ggtgaggag gggctgagc ggctgtccc gctggtgag cacctgccc	3000
gggtgtgcgca ggagtctgag agaccctgc ccagggcagc tctgcactcc ttcaaggctg	3060
cccgccct gctggctgt gccaaggcag agtctggcc acccagctg accatctgt	3120
agaaggccag tgggtacctg caggacagcc tggctaccac accagccagc agtccattg	3180
acaaggccgt gcagctgttc ctgtgtgacc tgcttctgt ggtgcgcacc agcctgtggc	3240
ggcagcagca gccccggcc ccggcccccag cagcccaggg caccagcagc aggccccagg	3300
cttccgcct ttagctgcgt ggcttcaac gggacctgag cagcctgagg cggctggcac	3360
agagcttcgg gccccccatg cggagggtgt tcctacatga ggccacggcc cggctgtatgg	3420
cggggccag ccccacacgg acacaccagg tcctcgaccg cagtctgagg cggccggcag	3480
gccccggtgtt caaaggaggc ggggtggcgg agctggagcc gggcccaacg cggccggagc	3540
acgcggaggc ctgtgtgcgt gcctccctgtc acctgcccc cggcttccctg tcggccccc	3600
ggcagcgcgtt gggcatgctg gctgaggcgg cgcgcacact cgagaagctt ggcgatcgcc	3660
ggctgctgca cgactgtcag cagatgctca tgccctggg cggtgaggacc actgtcactt	3720

ccagctagac cccgtgtccc cggcctcagc acccctgtct ctagccactt tggtcccgtg	3780
cagttctgt cctgcgtcga agctttgaag gccgaaggca gtcaagaga ctctggcctc	3840
cacagttcga cctgcggctg ctgtgtgcct tcgcggtgga aggcccagg ggcgcgatct	3900
tgaccctaag accggcgcc atgatggtgc tgacctctgg tggccgatcg gggcactgca	3960
ggggccgagc cattttgggg ggccccctc cttgctctgc aggcaccta gtggctttt	4020
tcctcctgt tacagggaaag agaggggtac atttccctgt gctgacggaa gccaacttgg	4080
ctttcccgga ctgcaaggcag ggctctgccc cagaggcctc tctctccgtc gtggagaga	4140

gacgtgtaca tagtgttaggt cagcgtgctt agcctctga cctgaggctc ctgtgctact	4200
ttgccttttcaaaactttat tttcatagat tgagaagttt tgtacagaga attaaaaatg	4260
aaattattta taatctgggt tttgtgtctt cagctgatgg atgtgctgac tagtgagagt	4320
gcttgggcccc tccccccagca cctaggaaa ggcttccctt cccctccgg ccacaaggta	4380
cacaactttt aacttagctc ttcccgatgt ttgtttgtta gtgggaggag tggggaggc	4440
tggctgtatg gcctccagcc tacctgttcc ccctgctccc agggcacatg gttggctgt	4500
gtcaaccctt agggcctcca tgggtcagt tgtcccttct cacctccag ctctgtcccc	4560

atcaggtccc tgggtggcac gggaggatgg actgacttcc aggacctgtt gtgtgacagg	4620
agctacagct tgggtctccc tgcaagaagt ctggcacgtc tcacccccc catccggcc	4680
cctggtcata tcacagcaaa gaagcctctt ccctccggac ctgccggcac actggagagg	4740
gggcacaggg gccccggagg tttctgttc tgtgaaaggc cgactccctg actccattca	4800
tgccccccccccccc cccagccctt cccttcattt ccattccccca acctaagcc tggccggct	4860
cccaagctgaa tctggtcgga atccacggc tgcaatttt ccaaaacaat cgttgtatct	4920
ttatttgactt tttttttttt tttttctga atgcaatgac tgtttttac tcttaaggaa	4980

aataaacatc ttttagaaac aaaaaaaaaaa aa	5012
--------------------------------------	------

<210> 30

<211> 1147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Asp Glu Pro Pro Phe Ser Glu Ala Ala Leu Glu Gln Ala Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Cys Asp Leu Asp Ala Ala Leu Leu Thr Asp Ile Glu Asp Met

20 25 30

Leu Gln Leu Ile Asn Asn Gln Asp Ser Asp Phe Pro Gly Leu Phe Asp

35	40	45
----	----	----

Pro Pro Tyr Ala Gly Ser Gly Ala Gly Gly Thr Asp Pro Ala Ser Pro
 50 55 60
 Asp Thr Ser Ser Pro Gly Ser Leu Ser Pro Pro Pro Ala Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Glu Ala Phe Leu Ser Gly Pro Gln Ala Ala Pro Ser Pro
 85 90 95
 Leu Ser Pro Pro Gln Pro Ala Pro Thr Pro Leu Lys Met Tyr Pro Ser
 100 105 110

Met Pro Ala Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu Glu Ser Val Pro
 115 120 125
 Leu Ser Ile Leu Gln Thr Pro Thr Pro Gln Pro Leu Pro Gly Ala Leu
 130 135 140
 Leu Pro Gln Ser Phe Pro Ala Pro Ala Pro Pro Gln Phe Ser Ser Thr
 145 150 155 160
 Pro Val Leu Gly Tyr Pro Ser Pro Pro Gly Gly Phe Ser Thr Gly Ser
 165 170 175

Pro Pro Gly Asn Thr Gln Gln Pro Leu Pro Gly Leu Pro Leu Ala Ser
 180 185 190
 Pro Pro Gly Val Pro Pro Val Ser Leu His Thr Gln Val Gln Ser Val
 195 200 205
 Val Pro Gln Gln Leu Leu Thr Val Thr Ala Ala Pro Thr Ala Ala Pro
 210 215 220
 Val Thr Thr Thr Val Thr Ser Gln Ile Gln Gln Val Pro Val Leu Leu
 225 230 235 240

Gln Pro His Phe Ile Lys Ala Asp Ser Leu Leu Leu Thr Ala Met Lys
 245 250 255
 Thr Asp Gly Ala Thr Val Lys Ala Ala Gly Leu Ser Pro Leu Val Ser
 260 265 270
 Gly Thr Thr Val Gln Thr Gly Pro Leu Pro Thr Leu Val Ser Gly Gly
 275 280 285

Thr Ile Leu Ala Thr Val Pro Leu Val Val Asp Ala Glu Lys Leu Pro
 290 295 300

Ile Asn Arg Leu Ala Ala Gly Ser Lys Ala Pro Ala Ser Ala Gln Ser
 305 310 315 320

Arg Gly Glu Lys Arg Thr Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg
 325 330 335
 Ser Ser Ile Asn Asp Lys Ile Ile Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly
 340 345 350

Thr Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp
 355 360 365

Tyr Ile Arg Phe Leu Gln His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn
 370 375 380

Leu Ser Leu Arg Thr Ala Val His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu
 385 390 395 400

Val Ser Ala Cys Gly Ser Gly Gly Asn Thr Asp Val Leu Met Glu Gly
 405 410 415

Val Lys Thr Glu Val Glu Asp Thr Leu Thr Pro Pro Pro Ser Asp Ala
 420 425 430

Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Leu Ser Leu Gly Ser Arg Gly Ser
 435 440 445

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ser Glu Pro Asp Ser Pro Val Phe
 450 455 460

Glu Asp Ser Lys Ala Lys Pro Glu Gln Arg Pro Ser Leu His Ser Arg
 465 470 475 480

Gly Met Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Cys Thr Leu Val Phe Leu
 485 490 495

Cys Leu Ser Cys Asn Pro Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Arg Gly Leu
 500 505 510

Pro Ser Pro Ser Asp Thr Thr Ser Val Tyr His Ser Pro Gly Arg Asn
 515 520 525

Val Leu Gly Thr Glu Ser Arg Asp Gly Pro Gly Trp Ala Gln Trp Leu

530	535	540
Leu Pro Pro Val Val Trp Leu Leu Asn Gly Leu Leu Val Leu Val Ser		
545	550	555
Leu Val Leu Leu Phe Val Tyr Gly Glu Pro Val Thr Arg Pro His Ser		
565	570	575
Gly Pro Ala Val Tyr Phe Trp Arg His Arg Lys Gln Ala Asp Leu Asp		
580	585	590
Leu Ala Arg Gly Asp Phe Ala Gln Ala Ala Gln Gln Leu Trp Leu Ala		
595	600	605
Leu Arg Ala Leu Gly Arg Pro Leu Pro Thr Ser His Leu Asp Leu Ala		
610	615	620
Cys Ser Leu Leu Trp Asn Leu Ile Arg His Leu Leu Gln Arg Leu Trp		
625	630	635
Val Gly Arg Trp Leu Ala Gly Arg Ala Gly Gly Leu Gln Gln Asp Cys		
645	650	655
Ala Leu Arg Val Asp Ala Ser Ala Ser Ala Arg Asp Ala Ala Leu Val		
660	665	670
Tyr His Lys Leu His Gln Leu His Thr Met Gly Lys His Thr Gly Gly		
675	680	685
His Leu Thr Ala Thr Asn Leu Ala Leu Ser Ala Leu Asn Leu Ala Glu		
690	695	700
Cys Ala Gly Asp Ala Val Ser Val Ala Thr Leu Ala Glu Ile Tyr Val		
705	710	715
Ala Ala Ala Leu Arg Val Lys Thr Ser Leu Pro Arg Ala Leu His Phe		
725	730	735
Leu Thr Arg Phe Phe Leu Ser Ser Ala Arg Gln Ala Cys Leu Ala Gln		
740	745	750
Ser Gly Ser Val Pro Pro Ala Met Gln Trp Leu Cys His Pro Val Gly		
755	760	765
His Arg Phe Phe Val Asp Gly Asp Trp Ser Val Leu Ser Thr Pro Trp		
770	775	780

Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Ala Gly Asn Pro Val Asp Pro Leu Ala Gln
 785 790 795 800
 Val Thr Gln Leu Phe Arg Glu His Leu Leu Glu Arg Ala Leu Asn Cys
 805 810 815

Val Thr Gln Pro Asn Pro Ser Pro Gly Ser Ala Asp Gly Asp Lys Glu
 820 825 830

Phe Ser Asp Ala Leu Gly Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Ser Cys Ser Asp
 835 840 845

Ala Ala Gly Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Ser Met Ala
 850 855 860

Thr Thr Thr Gly Val Asp Pro Val Ala Lys Trp Trp Ala Ser Leu Thr
 865 870 875 880

Ala Val Val Ile His Trp Leu Arg Arg Asp Glu Glu Ala Ala Glu Arg
 885 890 895

Leu Cys Pro Leu Val Glu His Leu Pro Arg Val Leu Gln Glu Ser Glu
 900 905 910

Arg Pro Leu Pro Arg Ala Ala Leu His Ser Phe Lys Ala Ala Arg Ala
 915 920 925

Leu Leu Gly Cys Ala Lys Ala Glu Ser Gly Pro Ala Ser Leu Thr Ile
 930 935 940

Cys Glu Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Gln Asp Ser Leu Ala Thr Thr Pro
 945 950 955 960

Ala Ser Ser Ser Ile Asp Lys Ala Val Gln Leu Phe Leu Cys Asp Leu
 965 970 975

Leu Leu Val Val Arg Thr Ser Leu Trp Arg Gln Gln Gln Pro Pro Ala
 980 985 990

Pro Ala Pro Ala Ala Gln Gly Thr Ser Ser Arg Pro Gln Ala Ser Ala
 995 1000 1005

Leu Glu Leu Arg Gly Phe Gln Arg Asp Leu Ser Ser Leu Arg Arg

1010 1015 1020

Leu Ala Gln Ser Phe Arg Pro Ala Met Arg Arg Val Phe Leu His

1025	1030	1035
Glu Ala Thr Ala Arg Leu Met	Ala Gly Ala Ser Pro	Thr Arg Thr
1040	1045	1050
His Gln Leu Leu Asp Arg Ser	Leu Arg Arg Arg Ala	Gly Pro Gly
1055	1060	1065

Gly Lys	Gly Gly Ala Val Ala	Glu Leu Glu Pro Arg	Pro Thr Arg
1070	1075	1080	
Arg Glu His Ala Glu Ala Leu	Leu Leu Ala Ser Cys	Tyr Leu Pro	
1085	1090	1095	
Pro Gly Phe Leu Ser Ala Pro	Gly Gln Arg Val Gly	Met Leu Ala	
1100	1105	1110	
Glu Ala Ala Arg Thr Leu Glu	Lys Leu Gly Asp Arg	Arg Leu Leu	
1115	1120	1125	

His Asp Cys Gln Gln Met Leu	Met Arg Leu Gly Gly	Gly Thr Thr
1130	1135	1140
Val Thr Ser Ser		
1145		

<210> 31

<211> 4922

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

agcagagctg cggccggggg aaccagttt ccgaggaact tttcgccggc gccggggcc	60
ctctgaggcc agggcaggac acgaacgcgc ggagcggcgg cggcactga gagccggggc	120
cgcggcggcg ctccctagga agggccgtac gaggcggcgg gcccggcgg cctccggag	180
gaggcggctg cgccatggac gagccacct tcagcgaggc ggcttggag caggcgctgg	240

gcgagccgtg cgatctggac gcggcgctgc tgaccgacat cgaagacatg cttagctta	300
tcaacaacca agacagtgac ttccctggcc tatttgaccc accctatgct gggagtgggg	360
cagggggcac agaccctgcc agccccgata ccagctcccc aggcagcttg tctccacctc	420
ctgccccatt gagctcctt cttgaagcct tcctgagcgg gccgcaggca ggcgcctc	480
ccctgtcccc tccccagcct gcacccactc cattgaagat gtacccgtcc atgcccgett	540
tctccccctgg gcctggatc aaggaagagt cagtgccact gagcatcctg cagaccccca	600

ccccacagcc cctgccagg gcccctgc cacagagctt cccagcccc gccccaccgc	660
agttcagctc caccctgtg ttaggctacc ccagccctcc gggaggcttc tctacaggaa	720
gccctcccg gaacacccag cagccgctgc ctggcctgcc actggcttc ccgcagggg	780
tcccgccgt ctccctgcac acccaggctc agagtgttgtt ccccgacgac ctactgacag	840
tcacagctc ccccacggca gcccctgtaa cgaccactgt gacctcgac atccagcagg	900
tcccggtctt gctgcagccc cacttcatca aggacgactc gctgcttctg acagccatga	960
agacagacgg acccactgtg aaggcggcag gtctcagttcc cctggctct ggcaccactg	1020
tgcagacagg gccttgccg accctggta gtggcggAAC catctggca acagtcccac	1080
tggtcgtaga tgccgagaag ctgcctatca accggctcgc agctggcagc aaggccccgg	1140
cctctgcca gagccgtgga gagaagcgcac cagccacaa cgcattgag aagcgctacc	1200
gctcctccat caatgacaaa atcattgagc tcaaggatct ggtggtggc actgaggcaa	1260
agctgaataa atctgctgtc ttgcgcaggccatcgacta cattcgctt ctgcaacaca	1320
gcaaccagaa actcaaggcag gagaacctaa gtctcgcac tgcgtccac aaaagcaaatt	1380
ctctgaagga tctgggtcg gcctgtggca gtggaggaa cacagacgtc ctcatggagg	1440
gcgtgaagac tgaggtggag gacacactga ccccaccccc ctggatgt ggctcacctt	1500
tccagagcag cccctgtcc cttggcagca gggcagtgg cagcgggtggc agtggcagtg	1560
actcggagcc tgacagccca gtctttgagg acagcaaggc aaagccagag cagccggcgt	1620
ctctgcacag cggggcatg ctggaccgt cccgcctggc cctgtgcacg ctcgtcttcc	1680
tctgcctgtc ctgcaacccc ttggcctct tgctggggc cgggggctt cccagcccc	1740
cagataccac cagcgtctac catagccctg ggcgcacgt gctggcacc gagacgag	1800
atggccctgg ctggggccag tggctgtgc ccccagtgtt ctggctgtc aatggctgt	1860
tgggtgtcg ctccctggta cttcttttgc tctacggta gccagtcaca cggccccact	1920
caggccccgc cgtgtacttc tggaggcatc gcaaggcagc tgacctggac ctggccccgg	1980
gagactttgc ccaggctgcc cagcagctgt ggctggccct gggggcactg ggccggcccc	2040
tgcacccaccc ccaactggac ctggcttgc ta gcctccttc gaaacctcatc cgtcacctgc	2100
tgcagcgtct ctgggtggc cgctggctgg caggccggc agggggctg cagcaggact	2160
gtgcgtcg agtggatgtc agcgcacgc cccgagacgc agccctggc taccataagc	2220
tgcacccatgc gcacaccatg gggaaagcaca caggccggca cttactgac accaacctgg	2280
cgctgagtgc cttgtacccgt gcagagttgtc cagggatgc cgtgtctgt ggcacgtgg	2340

ccgagatcta tgtggcggt gcattgagag tgaagaccag tctccacgg gccttgatt	2400
ttctgacacg ctcttcctg agcagtgcc gcccggctg cctggcacag agtggctcag	2460
tgcctcctgc catgcagtgg ctctgccacc ccgtggcca ccgtttctc gtggatgggg	2520
actggtcgt gctcagtacc ccatggaga gcctgtacag ctggccgg aaccaggtag	2580
acccctggc ccaggtgact cagctattcc ggaaacatct ctagagcga gcactgaact	2640
gtgtgaccca gccaaacccc agccctgggt cagctgatgg ggacaaggaa ttctcgatg	2700
ccctcggtta cctgcagctg ctgaacagct gttctgatgc tgccccggct cctgcctaca	2760
gccttcctcat cagttccagc atggccacca ccaccggcgt agaccgggtg gccaagtgg	2820
gggcctctct gacagctgtg gtatccact ggctggcg ggatgaggag gcccgtgagc	2880
ggctgtgccc gctgggtggag cacctgcccc gggtgtcgca ggagtctgag agaccctgc	2940
ccagggcage tctgactcc ttcaaggctg cccggccct gctggctgt gccaaggcag	3000
agtctggtcc acccagcctg accatctgtg agaaggccag tgggtacctg caggacagcc	3060
tggctaccac accagccagc agctccattt acaaggccgt gcagctgttc ctgtgtgacc	3120
tgcttcttgt ggtgcgcacc agcctgtggc ggcagcagca gccccggcc ccggcccccag	3180
cagcccaggg caccagcagc aggccccagg cttccgcct tgagctgcgt ggctccaac	3240
gggacctgag cagctgagg cggctggcac agagttccg gcccgcatt cgagggtgt	3300
tcctacatga gcccacggcc cggctgatgg cggggccag ccccacacgg acacaccagc	3360
tcctcgaccg cagtctgagg cggcgccag gccccggtg caaaggaggc gcggtggcg	3420
agctggagcc gcccacccacg cggcgccagc acgcggaggc ttgctgtcg gcctctgt	3480
acctggccccc cgcttcctg tcggccccc ggcagcgcgt gggcatgtcg gctgaggcgg	3540
cgcgcacact cgagaagctt ggcatcgcc ggctgtcgca cgactgtcag cagatgtca	3600
tgccctggg cgggtggacc actgtcaatt ccagctagac cccgtgtccc cggcctcagc	3660
acccctgtct ctggccattt tggccctgt cagcttctgt cctgcgtcg agctttaag	3720
gccgaaggca gtgcagaga ctctggcctc cacagttcgatcc cctgcgtcg ctgtgtgc	3780
tgcgggtgga aggcccgagg ggcgcgtatct tgaccctaag accggccggcc atgatggtgc	3840
tgacctctgg tggccgatcg gggactgca gggccgagc catttgggg ggccccctc	3900
cttgcgtgc aggcacctta gtggctttt tcctctgt tacagggaaag agaggggtac	3960
atttccctgt gctgacggaa gccaacttgg ctttccgga ctgcaagcag ggctctgccc	4020
cagaggcctc tcttcggcgtc gtgggagaga gacgtgtaca tagttaggt cagcgtgttt	4080
gcctctgtat cctggggctc ctgtgtact ttgcctttt caaactttat tttcatagat	4140
tgagaagttt tgtacagaga attaaaaatg aaattattta taatctgggt tttgtgttt	4200

cagctgatgg atgtgctgac tagtgagagt gcttggccc tccccagca cctaggaaa	4260
ggcttccct cccctccgg ccacaaggta cacaacttt aacttagctc ttcccgatgt	4320
ttgttgtta gtgggaggag tggggaggc tggctgtatg gcctccagcc tacctgtcc	4380
ccctgctccc agggcacatg gttggcigt gtcaaccctt agggctcca tgggtcagt	4440
tgtcccttct cacctccag ctctgtcccc atcaggccc tgggtggcac gggaggatgg	4500
actgacttcc aggacctgtt gtgtgacagg agctacagct tgggtctccc tgcaagaagt	4560
ctggcacgtc tcacccccc catccggcc cctggcatc tcacagcaaa gaaggctcct	4620
ccctccgcac ctggccac actggagagg gggcacaggg gcgggggagg tttcctgttc	4680
tgtgaaaggc cgactccctg actccatca tgccccccc cccagccct cccttcattc	4740
ccattccccca acctaagcc tggccggct cccagctgaa tctggtcgga atccacggc	4800
tgcaagattt ccaaacaat cgttgtatct ttattgactt tttttttt tttttctga	4860
atgcaatgac tttttttac tcttaaggaa aataaacatc ttttagaaac aaaaaaaaaa	4920
aa	4922
<210> 32	
<211> 3402	
<212> DNA	
<213> Cricetulus griseus	
<400> 32	
atggacgagc tgccttcgg tgaggcggct gtggAACAGG cgctggacga gctggcgaa	60
ctggacgccc cactgctgac cgacatccaa gacatgcttc agtcatcaa caaccaagac	120
agtgacttcc ctggcgttt tatgcagggg gcggggcagg agacacagag	180
cccaccagcc ctggtgccaa ctctcctgag agcttgtttt ctcctgcttc cctgggttcc	240
tctctggaag cttccctggg ggaacccaag gcaacacctg catcctgtc ccctgtgccg	300
tctgcattca ctgtttaaa gatgtacccg tctgtcccc cttctcccc tgggcctgga	360
atcaaagaag agccagtgcc actcaccatc ctgcagcccc cagcagcaca gccatcacca	420
gggacctcc tgcctccgag ttccctcca ccacccctgc agtcagccc ggctcctgt	480
ctgggttatt ctgccttcc ttcaggcttc tcagggaccc ttctggaaa taccaacag	540
ccaccatcta gcctgtcact ggcctctgca ccaggagtct cggccatctc tttacacacc	600
cagggtccaga gctcagcctc ccagcagcca ctgccagcct caacagcccc tagaacaacc	660
actgtgacct cacagatcca ggggtccca gtcgtactgc agccacattt catcaaggca	720
gattcactgc tactgacaac tgtaaaaaca gatacaggag ccacgatgaa gacggctggc	780

atcagtacct tagccctgg cacagccgtg caggcaggcc cttgcagac cctggtagt	840
gttgggacca tcctggccac agtaccattt gttgtggata cagacaact gcccattcat	900
cgactggcag ctggcagcaa ggccctggc tcagctaga gccgtggta gaagcgcaca	960
gcccacaatg ccattgagaa gcgctaccgt tccttatca atgacaagat tgtggagtc	1020
aaagacctgg tggtggcac tgaggcaaag ctgaataat ctgccgttt gcgcaaggcc	1080
atcgactata tccgcttctt acagcacagc aaccagaagc tcaagcagga gaacctggcc	1140
ctgcgaaatg ccgctcacaa aagcaaatcc ctgaaggacc tgggtcgcc ctgtggcagt	1200
gcaggaggca cagatgtggc tatggagggt gtgaaggctg aggtggtgga tacgctgacc	1260
cctccaccct cagacgctgg ctgcctcc cagatgtacc cttgtccct cgccagcaga	1320
ggttagcagca gtggtggcag tgactcggag cctgacagcc cagtcttga ggatagccag	1380
gtgaaagccc aacggctgca cagtcatggc atgctggacc gtcctgcctt agccctgtgt	1440
gcgcgtgtct tcctgtgtct gacctgcaac ccctggcat cactgttgg ctggggcatc	1500
cccggtccct ccagtgcctc tggtgacac cacagcttg ggctgtcat gctggaggcc	1560
gagagcagag atggctctaa ttggacccag tgggtgtgc caccctagt ctggctggcc	1620
aatggactac tagtgttggc ctgcctggct ttctctttg tctatggga acctgtgacc	1680
cggccacaca ctggccacaca tggatgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc	1740
ttggctgggg gagatgttgc ccaggctgtc cagcagctgt ggctggccct gcaggcattt	1800
ggacggcccc tggccaccc tggatgttgc ccaggctgtc cagcagctgt ggctggccct	1860
cgccacactgc tggatgttgc ccaggctgtc cagcagctgt ggctggccct	1920
cgagagact gtggactgag aatggatgca cgtgccatgt ctgcgtatgc ggctctcg	1980
taccataagc tgcaccagct gcatgccatg ggcaaataca caggaggcc cctcattgt	2040
tctaaccctgg cactgagtgc cctgaacctg gccgagtgcg caggatgc tgtatccatg	2100
gcaacgtgg cagagatcta tggatgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc	2160
gcctgtact ttttgcacacg ttttttttgc agtagtgccc gccaggctg cctggcacatg	2220
agtggctcag tggatgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2280
gtggatgggg actggatgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2340
aaccctgtgg atccctcgcc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2400
gcactgtact gtggatgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2460
gacgcacttg gataccctgca gtttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2520
tgcagttctt ctgtcgttgc ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2580
tggatggggccct ctttttttgc tctatggga acctgtgacc cgtggctgg	2640

gagcgcctat	acccgcgttgt	agagcgatgc	ccccacgtgc	tgcaggagac	tgagagaccc	2700
ctgccaagg	cagctctgta	ctccttcaag	gctgcccggg	ctctgctgga	ccacagaaaa	2760
gtggagtcgt	gcccagccag	cctggccatc	tgtgagaagg	ccagcgggta	cttgcgggac	2820
agcttagccg	ctccaccaac	tggcagctcc	attgacaagg	ccatgcagct	gctccgtgt	2880
gatctacttc	ttgtggcccg	cactagtatg	tggcagcgcc	agcagtcacc	agcctcagcc	2940
caggtagctc	acagtgccag	caatggatct	caggcctccg	cttggagct	tcgaggttc	3000
caacaggacc	tgagcgcct	gaggcgcttg	gcacagaact	tccggctgc	tatgaggaga	3060
gtgttcctac	acgaggccac	agctcggtct	atggcagggg	caagtcctgc	ccggacacac	3120
cagtcctgg	accgaagtct	gcggaggcgg	gccggctcca	gtggcaaagg	aggcactgt	3180
gctgagctgg	agcctcgacc	cacatggcgg	gagcacacag	aggccttgct	gctggcctcc	3240
tgctatctgc	cacctgcctt	cctgtcgcc	cctggacagc	aatgagcat	gttggctgag	3300
gcagcacgca	ctgtagagaa	gcttgggtat	catcgctac	tgcttgactg	ccagcagatg	3360
cttctgcgcc	tggcggtgg	gaccactgtc	acttccagct	aa		3402
<210> 33						
<211> 3816						
<212> DNA						
<213> Cricetulus griseus						
<400> 33						
ctcctgcgaa	gcctggcggt	cgccgccc	atggacgagc	tgccttgcgg	tgaggcgct	60
gtggaacagg	cgctggacga	gctggcgaa	ctggacgccc	cactgctgac	cgacatccaa	120
gacatgcttc	agctcatcaa	caaccaagac	agtgacttcc	ctggcctgtt	tgattcccc	180
tatgcagggg	gcggggcagg	agacacagag	ccaccagcc	ctgggtccaa	ctctcttgag	240
agcttgtctt	ctcctgcttc	cctgggttcc	tctctggaag	cttccctggg	ggaacccaag	300
gcaacacctg	catccttgcc	ccctgtgccc	tctgcattca	ctgctttaaa	gatgtacccg	360
tctgtgcccc	ccttctcccc	tggccctgga	atcaaagaag	agccagtgcc	actcaccatc	420
ctgcagcccc	cagcagcaca	gccatcacca	gggaccctcc	tgcctccgag	tttccctcca	480
ccacccctgc	agctcagccc	ggctcctgtt	ctgggttatt	ctagcctcc	ttcaggcttc	540
tcagggaccc	ttcctggaaa	tacccaacag	ccaccatcta	gcctgtca	ggcctctgca	600
ccaggagct	cgcccatctc	tttacacacc	caggtccaga	gtcagcctc	ccagcagcc	660
ctgccagct	caacagcccc	tagaacaacc	actgtgaccc	cacagatcca	gcgggtccca	720
gtcgtaactgc	agccacattt	catcaaggca	gattcaactgc	tactgacaac	tgtaaaaaca	780

gatacaggag ccacgatgaa gacggctggc atcagtacct tagcccctgg cacagccgtg	840
caggcaggcc cttgcagac cctggtgagt ggtgggacca tcctggccac agtaccattg	900
gttgtggata cagacaaact gccccatccat cgactggcag ctggcagcaa ggccctggc	960
tcagctcaga gccgtggta gaagcgcaca gcccacaatg ccattgagaa gcgcgtaccgt	1020
tcctctatca atgacaagat tgtggagtc aaagacctgg tggggcac tgaggcaag	1080
ctgaataaat ctgccgttt gcgcaggcc atcgactata tccgcttctt acagcacagc	1140
aaccagaagc tcaaggcagga gaacctggcc ctgcgaaatg ccgctcacaa aagcaaatcc	1200
ctgaaggacc tgggtcgcc ctgtggcagt gcaggaggca cagatgtggc tatggaggt	1260
gtgaagctg agggtgtgga tacgctgacc cctccaccct cagacgctgg ctcgccctcc	1320
cagagtagcc cttgtccct cggcagcaga ggtagcagca gtgggtggcag tgactcgag	1380
cctgacagcc cagtcttga ggatagccag gtgaaagccc aacggctgca cagtcatggc	1440
atgctggacc gctccgcct agccctgtgt gcgcgtgtct tcctgtgtct gacctgcaac	1500
cccttggcat cactgttgg ctggggcatc cccggccctt ccagtgcctc tgggcacac	1560
cacagctctg ggcgttagcat gctggaggcc gagagcagag atggctctaa ttggaccag	1620
tgggtgtgc caccctagt ctggctggcc aatggactac tagtgtggc ctgcctggct	1680
cttccttttgc tctatggga acctgtgacc cggccacaca ctagcccage tgtacacttc	1740
tggagacatc gcaaacaggc tgacctggac ttggctcggt gagatttgc ccaggctgct	1800
cagcagctgt ggctggccct gcaggcatttgg gacggcccc tgeccacactc gaacctagac	1860
ttggcctgca gcctgcttttgc gaaacctatc cgccacactgc tgacgcgtct ctgggtggc	1920
cgctggctgg caggccggc tggggcttg cggagagact gtggactgag aatggatgca	1980
cgtgccagtgc ctggagatgc ggctctcgatc taccataagc tgacccagct gcatgccatg	2040
ggcaaataca caggagggca cctcattgtct tctaaccctgg cactgagtgcc cctgaacctg	2100
gccgagtgcg caggagatgc tgtatccatg gcaacgcgtgg cagagatcta tgtggctgct	2160
gccctgaggg tcaagaccatc tctcccaaga gcctgtcaact ttttgacacg tttttccctg	2220
agttagtgcggc gccaggccctg cttggcacatc agtggctcag tgcctttgc catgcgtgg	2280
ctctgcccacc ctgtaggcca cctggcttttc gtggatgggg actgggtgt gcatgggtgcc	2340
ccacaggaga gcctgtacatc cttggagaga gcactgaact gtattgtca acccagcccc	2400
gggacagctg atggagacatc ggagttctct gacgcacttg gatacctgca gttgttaat	2460
cgctgtctg atgtgtcggt gactcctggcc tgcagttct ctgtcagctc cagcatggct	2520
cgctgtctg atgtgtcggt gactcctggcc tgcagttct ctgtcagctc cagcatggct	2580

tccaccacgg gcacagaccc agtggccaag tggtgggcct cactgacggc tgtggtgc 2640

cactggctgc ggcgggatga agaggcagct gagcgcttat acccgcttgt agagcgtatg
 ccccacgtgc tcgaggagac tgagagaccc ctgccaagg cagcttgta ctcctcaag
 gctgcccggt ctctgctgga ccacagaaaa gtggagtctg gcccagccag cctggccatc
 tgtgagaagg ccagcggta cttgcggac agcttagccg ctccaccaac tggcagctcc
 attgacaagg ccatgcagct gtcctgtgt gatctacttc ttgtggcccg cactagtatg
 tggcagcgcc agcagtacc accctcagcc caggtagctc acagtgccag caatggatct
 caggcctccg ctggagact tcgaggatcc caacaggacc tgagcagcct gaggcgcttg 3060

gcacagaact tccggcctgc tatgaggaga gtgttctac acgaggccac agctggctg
 atggcagggg caagtccctgc cggcacacac cagctcctgg accgaagtct gcggaggccg
 gccggctcca gtggcaaagg aggcactgta gctgagctgg agcctcgacc cacatggccg
 gagcacacag aggccttgct gctggcctcc tgctatctgc cacctgcctt cctgtcgcc
 cctggacagc aaatgagcat gttggcttag gcagcacgca ctgtagagaa gcttgggtat
 catcggtac tgcttgactg ccagcagatg cttctgcgcc tggcggtgg gaccactgtc
 acttccagct aaaccttggaa tggctcccc agtattagag gcccttaagg acctttgtca 3480

ctggctgtgg tcgtccagag agggtgagcc tgacaagcaa tcaggatcat gccgacctct
 agtacaaat ctggaaattt cagaggctgc actggccaa tgccaccctc ttgcttgta
 ggcacctttt tcctgtccta tggaaaggaa cttttccct agctgagggc caccctgtcc
 tgaggcttc acccactctt ggaagacttg tatatagtgt agatccagct gagccagtt
 cctgtgcagg ctcatgtact actttaactt ttgcaaactt tattttcata gtttgagaaa
 ttttgcacag aaaataaaaa agtggaaattt tttata 3816

<210> 34

<211> 1133

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 34

Met Asp Glu Leu Pro Phe Gly Glu Ala Ala Val Glu Gln Ala Leu Asp

1 5 10 15

Glu Leu Gly Glu Leu Asp Ala Ala Leu Leu Thr Asp Ile Gln Asp Met

20 25 30

Leu Gln Leu Ile Asn Asn Gln Asp Ser Asp Phe Pro Gly Leu Phe Asp

35 40 45

Ser Pro Tyr Ala Gly Gly Ala Gly Asp Thr Glu Pro Thr Ser Pro

50 55 60

Gly Ala Asn Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gly Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Phe Leu Gly Glu Pro Lys Ala Thr Pro Ala Ser Leu

85 90 95

Ser Pro Val Pro Ser Ala Ser Thr Ala Leu Lys Met Tyr Pro Ser Val

100 105 110

Pro Pro Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu Glu Pro Val Pro Leu

115 120 125

Thr Ile Leu Gln Pro Pro Ala Ala Gln Pro Ser Pro Gly Thr Leu Leu

130 135 140

Pro Pro Ser Phe Pro Pro Pro Leu Gln Leu Ser Pro Ala Pro Val

145 150 155 160

Leu Gly Tyr Ser Ser Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Thr Leu Pro Gly

165 170 175

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

180 185 190

Val Ser Pro Ile Ser Leu His Thr Gln Val Gln Ser Ser Ala Ser Gln

195 200 205

Gln Pro Leu Pro Ala Ser Thr Ala Pro Arg Thr Thr Thr Val Thr Ser

210 215 220

Gln Ile Gln Arg Val Pro Val Val Leu Gln Pro His Phe Ile Lys Ala

225 230 235 240

Asp Ser Leu Leu Leu Thr Thr Val Lys Thr Asp Thr Gly Ala Thr Met

245 250 255

Lys Thr Ala Gly Ile Ser Thr Leu Ala Pro Gly Thr Ala Val Gln Ala

260 265 270

Gly Pro Leu Gln Thr Leu Val Ser Gly Gly Thr Ile Leu Ala Thr Val

275 280 285

Pro Leu Val Val Asp Thr Asp Lys Leu Pro Ile His Arg Leu Ala Ala
 290 295 300
 Gly Ser Lys Ala Leu Gly Ser Ala Gln Ser Arg Gly Glu Lys Arg Thr
 305 310 315 320

 Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser Ser Ile Asn Asp Lys
 325 330 335
 Ile Val Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly Thr Glu Ala Lys Leu Asn
 340 345 350
 Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr Ile Arg Phe Leu Gln
 355 360 365
 His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu Ala Leu Arg Asn Ala
 370 375 380

 Ala His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val Ser Ala Cys Gly Ser
 385 390 395 400
 Ala Gly Gly Thr Asp Val Ala Met Glu Gly Val Lys Pro Glu Val Val
 405 410 415
 Asp Thr Leu Thr Pro Pro Ser Asp Ala Gly Ser Pro Ser Gln Ser
 420 425 430
 Ser Pro Leu Ser Leu Gly Ser Arg Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Asp
 435 440 445

 Ser Glu Pro Asp Ser Pro Val Phe Glu Asp Ser Gln Val Lys Ala Gln
 450 455 460
 Arg Leu His Ser His Gly Met Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Cys
 465 470 475 480
 Ala Leu Val Phe Leu Cys Leu Thr Cys Asn Pro Leu Ala Ser Leu Phe
 485 490 495
 Gly Trp Gly Ile Pro Gly Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ala His His Ser
 500 505 510

 Ser Gly Arg Ser Met Leu Glu Ala Glu Ser Arg Asp Gly Ser Asn Trp
 515 520 525
 Thr Gln Trp Leu Leu Pro Pro Leu Val Trp Leu Ala Asn Gly Leu Leu

530	535	540
Val Leu Ala Cys Leu Ala Leu Leu Phe Val Tyr Gly Glu Pro Val Thr		
545	550	555
Arg Pro His Thr Ser Pro Ala Val His Phe Trp Arg His Arg Lys Gln		
565	570	575
Ala Asp Leu Asp Leu Ala Arg Gly Asp Phe Ala Gln Ala Ala Gln Gln		
580	585	590
Leu Trp Leu Ala Leu Gln Ala Leu Gly Arg Pro Leu Pro Thr Ser Asn		
595	600	605
Leu Asp Leu Ala Cys Ser Leu Leu Trp Asn Leu Ile Arg His Leu Leu		
610	615	620
Gln Arg Leu Trp Val Gly Arg Trp Leu Ala Gly Arg Ala Gly Gly Leu		
625	630	635
Arg Arg Asp Cys Gly Leu Arg Met Asp Ala Arg Ala Ser Ala Arg Asp		
645	650	655
Ala Ala Leu Val Tyr His Lys Leu His Gln Leu His Ala Met Gly Lys		
660	665	670
Tyr Thr Gly Gly His Leu Ile Ala Ser Asn Leu Ala Leu Ser Ala Leu		
675	680	685
Asn Leu Ala Glu Cys Ala Gly Asp Ala Val Ser Met Ala Thr Leu Ala		
690	695	700
Glu Ile Tyr Val Ala Ala Leu Arg Val Lys Thr Ser Leu Pro Arg		
705	710	715
Ala Leu His Phe Leu Thr Arg Phe Phe Leu Ser Ser Ala Arg Gln Ala		
725	730	735
Cys Leu Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Leu Ala Met Gln Trp Leu Cys		
740	745	750
His Pro Val Gly His Arg Phe Phe Val Asp Gly Asp Trp Ala Val His		
755	760	765
Gly Ala Pro Gln Glu Ser Leu Tyr Ser Val Ala Gly Asn Pro Val Asp		
770	775	780

Pro Leu Ala Gln Val Thr Arg Leu Phe Cys Glu His Leu Leu Glu Arg
 785 790 795 800
 Ala Leu Asn Cys Ile Ala Gln Pro Ser Pro Gly Thr Ala Asp Gly Asp
 805 810 815
 Arg Glu Phe Ser Asp Ala Leu Gly Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Arg Cys
 820 825 830

Ser Asp Ala Val Gly Thr Pro Ala Cys Ser Phe Ser Val Ser Ser Ser
 835 840 845
 Met Ala Ser Thr Thr Gly Thr Asp Pro Val Ala Lys Trp Trp Ala Ser
 850 855 860
 Leu Thr Ala Val Val Ile His Trp Leu Arg Arg Asp Glu Glu Ala Ala
 865 870 875 880
 Glu Arg Leu Tyr Pro Leu Val Glu Arg Met Pro His Val Leu Gln Glu
 885 890 895

Thr Glu Arg Pro Leu Pro Lys Ala Ala Leu Tyr Ser Phe Lys Ala Ala
 900 905 910
 Arg Ala Leu Leu Asp His Arg Lys Val Glu Ser Gly Pro Ala Ser Leu
 915 920 925
 Ala Ile Cys Glu Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Arg Asp Ser Leu Ala Ala
 930 935 940
 Pro Pro Thr Gly Ser Ser Ile Asp Lys Ala Met Gln Leu Leu Cys
 945 950 955 960

Asp Leu Leu Leu Val Ala Arg Thr Ser Met Trp Gln Arg Gln Gln Ser
 965 970 975
 Pro Ala Ser Ala Gln Val Ala His Ser Ala Ser Asn Gly Ser Gln Ala
 980 985 990
 Ser Ala Leu Glu Leu Arg Gly Phe Gln Gln Asp Leu Ser Ser Leu Arg
 995 1000 1005
 Arg Leu Ala Gln Asn Phe Arg Pro Ala Met Arg Arg Val Phe Leu
 1010 1015 1020

His Glu Ala Thr Ala Arg Leu Met Ala Gly Ala Ser Pro Ala Arg

1025	1030	1035
Thr His Gln Leu Leu Asp Arg Ser	Leu Arg Arg Arg	Ala Gly Ser
1040	1045	1050
Ser Gly Lys Gly Gly Thr Val Ala	Glu Leu Glu Pro	Arg Pro Thr
1055	1060	1065
Trp Arg Glu His Thr Glu Ala Leu	Leu Ala Ser	Cys Tyr Leu
1070	1075	1080

Pro Pro Ala Phe Leu Ser Ala	Pro Gly Gln Gln Met	Ser Met Leu
1085	1090	1095
Ala Glu Ala Ala Arg Thr Val	Glu Lys Leu Gly Asp	His Arg Leu
1100	1105	1110
Leu Leu Asp Cys Gln Gln Met	Leu Leu Arg Leu Gly	Gly Gly Thr
1115	1120	1125
Thr Val Thr Ser Ser		
1130		

<210> 35

<211> 1233

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 35

atggacgagc tgccttcggt gaggcggt gtggAACAGG cgctggacga gctggcgaa	60
ctggacgccc cactgctgac cgacatccaa gacatgcttc agctcatcaa caaccaagac	120
agtgacttcc ctggcctgtt tattcccc tatgcagggg gggggcagg agacacagag	180
ccaccagcc ctggtgccaa ctctccttag agcttgtctt ctccctgttc cctgggttcc	240
tctctggaag cttcctggg gaaacccaag gcaacacctg catcctgtc ccctgtgcgg	300
tctgcatacca ctgtttaaa gatgtacccg tctgtgcccc cttctcccc tggcctgga	360
atcaaagaag agccagtgcc actcaccatc ctgcagcccc cagcagcaca gccatcacca	420

gggaccctcc tgccctcgag ttccctcca ccacccctgc agctcagcccc ggctccgttg	480
ctgggttatt ctgccttcc ttcaaggcttc tcaggaccc ttctggaaa tacccaaacag	540
ccaccatcta gcctgtcact ggcctctgca ccaggagctc cgcccatctc tttacacacc	600
cagggtccaga gtcagcctc ccagcagcca ctgccagcct caacagcccc tagaacaacc	660
actgtgacct cacagatcca gcggtccca gtcgtactgc agccacattt catcaaggca	720

gattcactgc tactgacaac tgtaaaaaca gatacaggag ccacgatgaa gacggctggc 780
 atcagtacct tagccctgg cacagccgtg caggcaggcc cttgcagac cctggtgagt 840

ggtgggacca tcctggccac agtaccattg gttgtggata cagacaaact gcccatccat 900
 cgactggcag ctggcagcaa ggccctggc tcagtcaga gccgtggta gaagcgcaca 960
 gcccacaatg ccattgagaa gcgctaccgt tcctctatca atgacaagat tgtggagctc 1020
 aaagacctgg tggtggcac tgaggcaaag ctgaataat ctgccgttt gcgcaaggcc 1080
 atcgactata tccgcttctt acagcacagc aaccagaagc tcaagcagga gaacctggcc 1140
 ctgcgaaatg ccgctcacaa aagcaaatcc ctgaaggacc tggtgtcggc ctgtggcagt 1200
 gcaggaggca cagatgtggc tatggagggt gtg 1233

<210> 36

<211> 411

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 36

Met Asp Glu Leu Pro Phe Gly Glu Ala Ala Val Glu Gln Ala Leu Asp

1 5 10 15

Glu Leu Gly Glu Leu Asp Ala Ala Leu Leu Thr Asp Ile Gln Asp Met

20 25 30

Leu Gln Leu Ile Asn Asn Gln Asp Ser Asp Phe Pro Gly Leu Phe Asp

35 40 45

Ser Pro Tyr Ala Gly Gly Ala Gly Asp Thr Glu Pro Thr Ser Pro

50 55 60

Gly Ala Asn Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gly Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Phe Leu Gly Glu Pro Lys Ala Thr Pro Ala Ser Leu

85 90 95

Ser Pro Val Pro Ser Ala Ser Thr Ala Leu Lys Met Tyr Pro Ser Val

100 105 110

Pro Pro Phe Ser Pro Gly Pro Ile Lys Glu Glu Pro Val Pro Leu

115 120 125

Thr Ile Leu Gln Pro Pro Ala Ala Gln Pro Ser Pro Gly Thr Leu Leu

130	135	140
Pro Pro Ser Phe Pro Pro Pro Pro Leu Gln Leu Ser Pro Ala Pro Val		
145	150	155
Leu Gly Tyr Ser Ser Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Thr Leu Pro Gly		
165	170	175
Asn Thr Gln Gln Pro Pro Ser Ser Leu Ser Leu Ala Ser Ala Pro Gly		
180	185	190
Val Ser Pro Ile Ser Leu His Thr Gln Val Gln Ser Ser Ala Ser Gln		
195	200	205
Gln Pro Leu Pro Ala Ser Thr Ala Pro Arg Thr Thr Thr Val Thr Ser		
210	215	220
Gln Ile Gln Arg Val Pro Val Val Leu Gln Pro His Phe Ile Lys Ala		
225	230	235
Asp Ser Leu Leu Leu Thr Thr Val Lys Thr Asp Thr Gly Ala Thr Met		
245	250	255
Lys Thr Ala Gly Ile Ser Thr Leu Ala Pro Gly Thr Ala Val Gln Ala		
260	265	270
Gly Pro Leu Gln Thr Leu Val Ser Gly Gly Thr Ile Leu Ala Thr Val		
275	280	285
Pro Leu Val Val Asp Thr Asp Lys Leu Pro Ile His Arg Leu Ala Ala		
290	295	300
Gly Ser Lys Ala Leu Gly Ser Ala Gln Ser Arg Gly Glu Lys Arg Thr		
305	310	315
Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser Ser Ile Asn Asp Lys		
325	330	335
Ile Val Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly Thr Glu Ala Lys Leu Asn		
340	345	350
Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr Ile Arg Phe Leu Gln		
355	360	365
His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu Ala Leu Arg Asn Ala		
370	375	380

Ala His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val Ser Ala Cys Gly Ser
385 390 395 400
Ala Gly Gly Thr Asp Val Ala Met Glu Gly Val
405 410