



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월05일
(11) 등록번호 10-2018863
(24) 등록일자 2019년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7012291
(22) 출원일자(국제) 2013년10월08일
심사청구일자 2018년10월08일
(85) 번역문제출일자 2015년05월11일
(65) 공개번호 10-2015-0064209
(43) 공개일자 2015년06월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/063804
(87) 국제공개번호 WO 2014/058830
국제공개일자 2014년04월17일
(30) 우선권주장
61/713,245 2012년10월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080069993 A
KR1020080113226 A

(73) 특허권자
서트로 바이오파마, 인크.
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 스
위트 150 유타 애비뉴 310
(72) 발명자
타노스, 크리스토퍼 디.
미국 94920 캘리포니아 티뷰론 메도우 힐 درا이
브 38
머레이, 크리스토퍼 제이.
미국 95073 캘리포니아 쇼켈에도 올리브 스프링스
로드 700
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 24 항

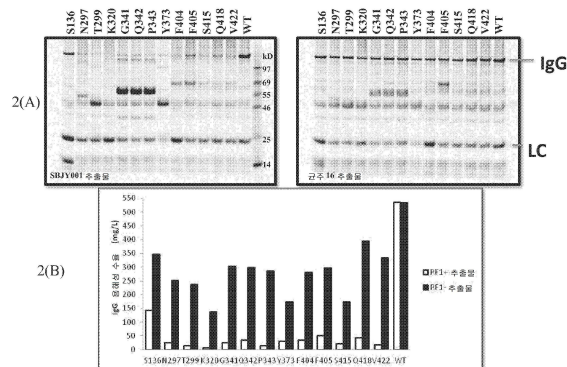
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 개선된 발현을 위해 박테리아 추출물 중 선택 단백질의 단백질분해 불활성화

(57) 요약

본 발명은 프로테아제 OmpT1에 의해 절단될 수 있는 변형된 단백질을 제공한다. 단백질은 OmpT1 절단 부위를 혼입하기 위해 노출된 표면 모티프에서 변형될 수 있다. 변형된 단백질을 엔코딩하는 핵산, 변형된 단백질을 발현시키는 박테리아 세포, 및 변형된 RF1을 함유하는 무세포 합성 시스템이 또한 제공된다. 본 발명은 변형된 단백질을 OmpT1과 접촉시킴에 의해 무세포 합성 시스템에서 변형된 단백질의 유해한 활성을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 무세포 합성 시스템에서 앰버 코돈에서의 RF1 경쟁을 감소시키는 방법, 및 무세포 합성 시스템에서 단백질을 발현시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 변형된 단백질을 이용하여 앰버 코돈에서 혼입되는 비-천연 아미노산을 갖는 단백질을 수율을 증가시킬 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/6424 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

C12Y 304/21 (2013.01)

(72) 발명자

양, 준하오

미국 94306 캘리포니아 팔로알토 이스트 찰스턴 로
드 428

스티븐슨, 헤더

미국 95129 캘리포니아 새너제이 윈딩 웨이 4648

명세서

청구범위

청구항 1

외막 단백질 T1 (OmpT1)에 의해 절단가능한 기능성 방출 인자 1 단백질 (RF1) 변이체로서, SEQ ID NO:1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 야생형 RF1의 아미노산 287-304에 상응하는 스위치 루프 영역 내에 위치하는 OmpT1 절단 부위를 포함하고, 스위치 루프 영역이 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형되는, 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 2개의 인접한 염기성 아미노산이 아르기닌 및 리신을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택되는 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 스위치 루프 영역이 3개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 4

제3항에 있어서, 위치 296에 있는 천연 아스파라긴이 3개의 인접한 염기성 아미노산들 중 하나를 대신하는 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 5

제1항에 있어서, 변형된 단백질과 야생형 단백질이 OmpT1을 발현하는 박테리아로부터의 무세포 추출물에 유사한 농도로 존재할 때, OmpT1에 의한 절단 활성이 30℃에서 30분 후에 SEQ ID NO:1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 야생형 RF1의 50%를 초과하는 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 6

제1항에 있어서, 스위치 루프 영역이 하기로 구성된 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 기능성 RF1 단백질 변이체:

QQAEASTRR**K**LLGSGDRS (SEQ ID NO:5),

QQAEASTRR**R**LLGSGDRS (SEQ ID NO:6),

QQAEASTRR**N**KLGSGDRS (SEQ ID NO:7),

QQAEASTRR**N**RLGSGDRS (SEQ ID NO:8),

QQAEASTRR**N**VLGSGDRS (SEQ ID NO:9),

QQAEASTRR**N**LKGSGDRS (SEQ ID NO:10),

QQAEASTRR**N**LRGSGDRS (SEQ ID NO:11),

QQAEASTRR**K**KLGSGDRS (SEQ ID NO:12),

QQAEASTRR**K**RLLGSGDRS (SEQ ID NO:13),

QQAEASTRR**K**VLGSGDRS (SEQ ID NO:14),

QQAEASTRR**R**KLGSGDRS (SEQ ID NO:15),

QQAEASTRR**R**RLGSGDRS (SEQ ID NO:16),

QQAEASTRR**R**VLGSGDRS (SEQ ID NO:17),

QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:18),
 QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:19),
 QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:20),
 QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:21),
 QQAEASTRRRRKSGGDRS (SEQ ID NO:22),
 QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:23),
 QQAEASTRRRRKSGGDRS (SEQ ID NO:24), 및
 QQAEASTRRKKKSGGDRS (SEQ ID NO:25).

청구항 7

제1항에 있어서, 스위치 루프 영역이 하기로 구성된 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 기능성 RF1 단백질 변이체:

QARRGSTRNLLGGGDRS (SEQ ID NO:26);
 QQARRGTRNLLGGGDRS (SEQ ID NO:27);
 QQAARRGRNLLGGGDRS (SEQ ID NO:28);
 QQAEARRGRNLLGGGDRS (SEQ ID NO:29);
 QQAEAARRGNLLGGGDRS (SEQ ID NO:30);
 QQAEASARRGLLGGGDRS (SEQ ID NO:31);
 QQAEASTARRGLGGGDRS (SEQ ID NO:32);
 QQAEASTRARRGGGDRS (SEQ ID NO:33);
 QQAEASTRRARRGGGDRS (SEQ ID NO:34);
 QQAEASTRRNARRGGGDRS (SEQ ID NO:35);
 QQAEASTRRNLARRGGDRS (SEQ ID NO:36);
 QQAEASTRRNLLARRGRS (SEQ ID NO:37);
 QQAEASTRRNLLGARRGS (SEQ ID NO:38);
 QQAEASTRRNLLGSARRG (SEQ ID NO:39); 및
 QQAEASTRRNLLGSGARR (SEQ ID NO:40).

청구항 8

제1항에 있어서, 스위치 루프 영역이 하기로 구성된 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 기능성 RF1 단백질 변이체:

QQAWLAARRGRGGGDRS (SEQ ID NO:41);
 QQAEWLAARRGRGGGDRS (SEQ ID NO:42);
 QQAEAWLAARRGRGGGDRS (SEQ ID NO:43);
 QQWGGRWARKKGTIGDRS (SEQ ID NO:44);
 QQAWGGRWARKKGTIDRS (SEQ ID NO:45); 및
 QQAEWGGRWARKKGTIRS (SEQ ID NO:46).

청구항 9

외막 단백질 T1 (OmpT1) 및 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체 둘 모두를 발현시키는 박테리아 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 박테리아 세포가 이. 콜라이(*E. coli*)인 박테리아 세포.

청구항 11

하기의 단계를 포함하는 무세포 합성 추출물을 제조하는 방법:

- i) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체를 발현시키는 OmpT1 양성 박테리아를 배양하는 단계; 및
- ii) 박테리아를 용해시켜 무세포 합성 추출물을 생성하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, OmpT1 양성 박테리아가 이. 콜라이인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 박테리아의 산화성 포스포릴화 시스템이 세포 용해 후에 그리고 관심 단백질의 합성 동안에 활성인 채로 남아 있는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 무세포 합성 시스템이 관심 단백질의 앰버 코돈에 비-자연 아미노산을 배치하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체를 엔코딩하는 핵산.

청구항 16

하기를 단일 반응 혼합물에 포함하는 무세포 합성 시스템:

- i) 단백질을 엔코딩하는 핵산 주형을 번역하기에 충분한 박테리아 용해물에서 비롯된 구성요소;
- ii) 관심 단백질을 엔코딩하고 적어도 하나의 앰버 코돈을 갖는 핵산 주형;
- iii) 앰버 코돈에 상보적인 tRNA; 및
- iv) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 17

제16항에 있어서, 반응 혼합물이 비-천연 아미노산 및 상응하는 아미노산 합성효소를 추가로 포함하고, 합성효소는 앰버 코돈에 상보적인 tRNA에 비-천연 아미노산을 적재할 수 있는 무세포 합성 시스템.

청구항 18

제16항에 있어서, 시스템이 활성 산화성 포스포릴화 시스템을 통해 ATP를 생성하는 무세포 합성 시스템.

청구항 19

하기를 포함하는, 무세포 합성 시스템에서 단백질을 발현시키는 방법:

- i. 핵산 주형을, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체를 포함하는 박테리아 추출물과 조합시키는 단계; 및
- ii. 핵산 주형으로부터 단백질을 발현시키는 단계.

청구항 20

박테리아 세포의 유전체에 통합된 제15항의 핵산을 포함하는 박테리아 세포.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 기능성 RF1 단백질 변이체가 mRNA 서열의 정지 코돈을 인지하고 번역을 종결하는 활성을 갖는 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 24

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 스위치 루프 영역은 아미노산 서열의 상응하는 위치에 있는 야생형 아미노산을 대신하는 염기성 아미노산을 포함하도록 변형되는, 기능성 RF1 단백질 변이체.

청구항 25

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체를 포함하는 박테리아 세포.

청구항 26

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 기능성 RF1 단백질 변이체를 포함하는 박테리아 세포 추출물.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후-참조

[0002] 본 특허 출원은 그 전문이 본원에 참조로서 포함되는 2012년 10월 12일 출원된 US 특허 출원 61/713,245호에 대

한 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 무세포 합성 기법(cell free synthesis technology), 및 특히 박테리아 추출물에서 선택 단백질의 단백질분해 불활성화에 관한 것이다. 바람직한 용도는 규정된 아미노산 잔기에 혼입된 비-자연 아미노산을 갖는 폴리펩티드의 수율을 증가시키는 것이다.

배경 기술

[0005] 시험관내 단백질 합성을 위한 박테리아 무세포 추출물의 이용은 통상적인 생체내 단백질 발현 방법에 비해 여러 이점을 제공한다. 무세포 시스템은 세포의 전부는 아니지만 대부분의 대사 자원을 한 단백질의 독점적인 생산으로 유도할 수 있다. 더욱이, 시험관내 세포벽 및 막 구성요소의 결여는 합성 환경의 제어를 가능케 하므로 유리하다. 그러나, 무세포 추출물의 효율은 직접 또는 간접적으로 단백질 합성을 억제하는 박테리아 단백질에 의해 감소될 수 있다. 따라서, 단백질 합성의 효율을 감소시키는 요망되지 않는 단백질의 불활성화는 무세포 추출물 중 요망되는 단백질의 수율을 증가시킬 것이다. 예를 들어, 단백질 합성의 효율을 감소시키는 단백질의 불활성화는 규정된 아미노산 잔기에 혼입된 비-자연 아미노산을 갖는 폴리펩티드의 수율을 증가시킬 것이다. 폴리펩티드로의 비-자연 아미노산 (nnAA)의 도입은 단백질의 생물학적 다양성 및 기능을 증가시키는데 유용하다. 규정된 아미노산 잔기에 혼입된 nnAA를 갖는 폴리펩티드를 생산하는 한 접근법은 단백질 번역 동안 신생 폴리펩티드의 앰버 (정지) 코돈에 nnAA를 도입하기 위해 nnAA, 아미노아실화 직각 CUA 함유 tRNA를 이용하는 것이다. 그러나, 앰버 코돈에 nnAA를 혼입하는 것은 정상적으로 정지 코돈을 인지하고 번역을 종결시키는 자연 박테리아 종결 복합체에 의해 억제될 수 있다. 방출 인자 1 (RF1)은 mRNA 서열의 앰버 코돈을 인지함에 의해 번역의 종결을 촉진하는 종결 복합체 단백질이다. RF1의 앰버 정지 코돈 인지는 비-자연 아미노산 혼입의 부위에서 조기 트렁케이션 생성물을 촉진하여, 단백질 수율을 감소시킬 수 있다. 따라서, RF1의 활성을 감소시키는 것은 재조합 단백질로의 nnAA 혼입을 증가시킬 수 있다.

[0006] nnAA 혼입은 다음 세 가지 방식으로 RF1 활성을 감소시킴에 의해 증가될 수 있음이 이전에 밝혀졌다: 1) RF1의 중화 항체 불활성화, 2) RF1의 유전체 녹아웃 (RF2 강화 균주에서), 및 3) 친화성 크로마토그래피에 의한 제거용 단백질 태그 (키틴 결합 도메인 및 His 태그)를 함유하는 RF1을 발현하도록 공학처리된 균주를 이용한 RF1의 부위 특이적 제거. 본 발명은 RF1 아미노산 서열에 단백질분해 절단 부위를 도입시킴에 의해 RF1을 불활성화시키는 신규한 방법을 기재한다. 절단 부위는 박테리아 세포 성장 동안 프로테아제에 접근불가능한 것이 아니라, 박테리아 세포가 용해되어 무세포 추출물을 생성할 때 프로테아제에 의해 절단된다. 따라서, 앰버 코돈에 혼입된 nnAA를 갖는 전장 폴리펩티드의 수율은 본원에 기재된 변형된 RF1 변이체를 발현하는 박테리아 세포 추출물에서 증가한다.

발명의 내용

[0007] 발명의 간략 개요

[0008] 본 발명은 외막 단백질 T1 (OmpT1) 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 변형된 재조합 표적 단백질을 제공한다. OmpT1 절단 부위는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함한다. 일부 구체예에서, 표적 단백질은 표적 단백질의 표면 노출된 모티프에 OmpT1 절단 부위를 도입하도록 변형된다. OmpT1이 이염기성 잔기들 사이를 높은 효율로 절단하므로, 자연 표면 노출된 모티프는 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다. 표적 단백질은, 예를 들어 정상적인 세포 성장 및/또는 생존에 필요한 필수 단백질일 수 있다.

[0009] 일부 구체예에서, 표면 노출된 모티프는 단백질의 모티프 영역이 비복합체화될 때 적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는다. 일부 구체예에서, 표면 노출된 모티프는 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적(total solvent accessible surface area)을 갖는다. 일부 구체예에서, 표적 단백질은 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합이 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Phi 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 위치하도록 변형된다.

[0010] 한 양태에서, 본 발명은 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도록 재조합적으로 변형된 필수적인 표적 단백질 및 OmpT1 둘 모두를 발현시키는 박테리아 세포를 제공한다. 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 표면 노출된 모티프 내에 위치하고 자연 모티프는 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 박테리아 세포는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도

록 제조합적으로 변형된 필수적인 표적 단백질을 발현시키는데, 이 때 결합은 단백질이 비복합체화될 때 적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치하는 단백질의 위치에 존재한다. 일부 구체예에서, 박테리아 세포는, 결합이 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치하는 단백질의 위치에 있는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도록 제조합적으로 변형된 필수적인 표적 단백질을 발현한다. 한 구체예에서, 박테리아 세포는, 결합이 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Φ 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Ψ 각을 나타내는 단백질의 위치에 있는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도록 제조합적으로 변형된 필수적인 표적 단백질을 발현한다. 한 구체예에서, 박테리아 세포는 이. 콜라이(*E. coli*)이다.

- [0011] 일부 구체예에서, 필수적인 표적 단백질은 RF1, RF2, RNase, 티오레독신 환원효소, 글루타로독신 환원효소, 글루타티온 환원효소, 아미노산 분해 효소, 폴리포스페이트 키나제, 또는 한랭 쇼크 단백질로부터 선택된다.
- [0012] 두 번째 양태에서, 본 발명은 시험관내 무세포 합성 시스템에서 변형된 필수적인 표적 단백질의 유해한 활성을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은,
- [0013] i) 변형된 필수적인 표적 단백질을 발현시키는 OmpT1 양성 박테리아를 배양하는 단계로서, 상기 단백질이 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도록 변형되고 단백질이 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형되는 단계;
- [0014] ii) 박테리아를 용해시켜 무세포 합성 추출물을 생성하는 단계;
- [0015] iii) 필수적인 표적 단백질을 무손상 단백질을 50%만큼 감소시키기에 충분한 양의 OmpT1과 접촉시키는 단계;
- [0016] iv) 핵산 주형을 추출물에 첨가하는 단계로서, 주형이 관심 단백질을 코딩하는 단계; 및
- [0017] v) 무세포 합성 시스템이 관심 단백질을 생성하도록 하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0018] 상기 방법의 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 단백질이 비복합체화될 때 적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치한다. 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치한다. 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Φ 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Ψ 각을 나타내는 단백질의 위치에 존재한다.
- [0019] 상기 방법의 일부 구체예에서, 박테리아의 산화성 포스포릴화 시스템은 세포 용해 후에 그리고 관심 단백질의 합성 동안에 활성인 채로 남아 있다. 한 구체예에서, 무세포 합성 시스템은 관심 단백질의 앰버 코돈에 비-자연 아미노산을 배치한다.
- [0020] 세 번째 양태에서, 본 발명은 외막 단백질 T1 (OmpT1)에 의해 절단될 수 있는 기능성 방출 인자 1 단백질 (RF1)을 제공하고, 이 때 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 287-304에 상응하는 스위치 루프 영역 내에 위치하고 스위치 루프 영역은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 2개의 인접한 염기성 아미노산은 아르기닌 및 리신으로부터 독립적으로 선택된다. 다른 구체예에서, 스위치 루프 영역은 3개의 인접한 염기성 아미노산을 갖도록 변형된다. 일부 구체예에서, 위치 296에 있는 천연 아스파라긴은 3개의 인접한 염기성 아미노산들 중 하나를 대신한다. 변형된 기능성 RF1 단백질은 야생형 RF1 보다 빠른 속도로 OmpT1에 의해 절단된다. 예를 들어, 한 구체예에서, OmpT1에 의한 변형된 RF1의 절단 활성은, 변형된 단백질과 야생형 단백질이 OmpT1을 발현하는 박테리아로부터의 무세포 추출물에 유사한 농도로 존재할 때, 30°C 에서 30분 후에 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)보다 50% 더 크다.
- [0021] 일부 구체예에서, OmpT1에 의해 절단될 수 있는 기능성 RF1은 스위치 루프 영역에 OmpT1 절단 펩티드를 함유한다.
- [0022] 네 번째 양태에서, 본 발명은 외막 단백질 T1 (OmpT1)에 의해 절단될 수 있는 기능성 방출 인자 1 단백질 (RF1)을 엔코딩하는 핵산을 제공하고, 이 때 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 287-304에 상응하는 RF1의 스위치 루프 영역 내에 위치하고 스위치 루프 영역은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다.
- [0023] 다섯 번째 양태에서, 본 발명은 시험관내 무세포 합성 시스템에서 앰버 코돈에서의 RF1 경쟁을 감소시키는 방법

을 제공하고, 상기 방법은,

- [0024] i) 외막 단백질 T1 (OmpT1)에 의해 절단될 수 있는 기능성 방출 인자 1 단백질 (RF1)을 발현시키는 OmpT1 양성 박테리아를 배양하는 단계;
- [0025] ii) 박테리아를 용해시켜 무세포 합성 추출물을 생성하는 단계;
- [0026] iii) 추출물의 RF1 단백질을 무손상 RF1 단백질을 50%만큼 감소시키기에 충분한 양의 OmpT1과 접촉시키는 단계;
- [0027] iv) 핵산 주형을 추출물에 첨가하는 단계로서, 주형이 관심 단백질을 코딩하고 앰버 코돈을 포함하는 단계; 및
- [0028] v) 무세포 합성 시스템이 관심 단백질을 생성하도록 하는 단계를 포함하며,
- [0029] 이 때 RF1 단백질은 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 287-304에 상응하는 스위치 루프 영역 내에 위치한 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 갖고 스위치 루프 영역은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다.
- [0030] 상기 방법의 한 구체예에서, OmpT1 양성 박테리아는 이. 콜라이(*E. coli*)에서 비롯된다. 일부 구체예에서, 박테리아의 산화성 포스포릴화 시스템은 세포 용해 후에 그리고 관심 단백질의 합성 동안에 활성인 채로 남아 있다. 다른 구체예에서, 무세포 합성 시스템은 관심 단백질의 앰버 코돈에 비-자연 아미노산을 배치한다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 본 발명은,
- [0032] i) 단백질을 엔코딩하는 핵산 주형을 번역하기에 충분한 박테리아 용해물에서 비롯된 구성요소;
- [0033] ii) 관심 단백질을 엔코딩하고 적어도 하나의 앰버 코돈을 갖는 핵산 주형;
- [0034] iii) 앰버 코돈에 상보적인 tRNA; 및
- [0035] iv) 외막 단백질 T1 (OmpT1)에 의해 절단될 수 있는 기능성 방출 인자 1 (RF1) 단백질을 단일 반응 혼합물에 포함하는 무세포 합성 시스템을 제공하고, 이 때 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 287-304에 상응하는 RF1의 스위치 루프 영역 내에 위치하고 스위치 루프 영역은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다.
- [0036] 일부 구체예에서, 무세포 합성 시스템 반응 혼합물은 비-천연 아미노산 및 상응하는 아미노산 합성효소를 추가로 포함하고, 합성효소는 앰버 코돈에 상보적인 tRNA에 비-천연 아미노산을 적재할 수 있다. 일부 구체예에서, 무세포 합성 시스템은 활성 산화성 포스포릴화 시스템을 통해 ATP를 생성한다.
- [0037] 또한 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0038] i. 핵산 주형을, 야생형 RF1 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 287-303에 상응하는 스위치 루프 영역 내에 위치하는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합에서 OmpT1에 의해 절단된 RF1 단백질을 포함하고 스위치 루프 영역이 단백질 합성을 허용하는 조건하에 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된 박테리아 추출물과 조합시키고;
- [0039] ii. 핵산 주형으로부터 단백질을 발현시키는 것을 포함하는, 무세포 합성 시스템에서 단백질을 발현하는 방법을 제공한다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 OmpT1에 의해 절단될 수 있는 기능성 RF1을 코딩하는 유전체적으로 통합된 서열을 포함하는 박테리아 세포를 제공한다.
- [0041] 도면의 간단한 설명
- [0042] 도 1은 OmpT 절단 부위를 함유하는 변형된 RF1 단백질 변이체가 OmpT 활성이 결여된 무세포 추출물에 첨가될 때 야생형 RF1 활성을 지님을 도시한다. Fc 단백질 (Fc_S378TAG)의 위치 S378에 도입되는 앰버 코돈에 비-자연 아미노산을 첨가할 때 역제를 감소시키는 (사슬 종결을 증가시킴) 외인성 RF-1 변이체의 능력을 결정하였다. 도 1(A) 라인 1은 외생적으로 첨가되지 않은 RF1을 갖는 대조 추출물이다. 추출물은 감소된 앰버 역제를 발생시켜, 트렁케이션된 Fc (겔에서 아래쪽 밴드)를 생성하는 야생형 RF1을 함유한다. 라인 2는 외생적으로 첨가된 야생형 (WT) RF1을 함유하는 대조 추출물이다. 야생형 RF1의 첨가는 앰버 역제에 있어서 추가 감소를 발생시켜, 상대적으로 더 트렁케이션된 Fc를 생성한다. 라인 3-7은 본 발명의 상이한 RF1 변이체를 함유하는 무세포 추출물을 나타낸다. 5개의 모든 변이체가 RF1 활성을 갖는다. 도 1(B)는 RF1 변이체의 상대 활성을 나타내고, 여기서 첨가된 WT RF1 활성은 100 퍼센트로 설정되고, 첨가되지 않은 RF1은 0 퍼센트로 설정된다.

- [0043] 도 2는 변형된 RF1 변이체 (A18)를 발현하도록 공학처리된 박테리아 균주로부터의 무세포 추출물이 야생형 RF1을 발현하는 박테리아 균주에 비해, nnAA가 중쇄의 다양한 위치에 도입될 때 전장 IgG의 수율에서의 실질적인 증가를 생성함을 나타낸다. 2(A) 좌측 패널: 무손상 OmpT 및 야생형 RF1을 함유하는 SBJY001 추출물. 2(A) 우측 패널: 무손상 OmpT 및 RF1 변이체 A18을 함유하는 SBHS016 추출물 (균주 16). 전장 (무손상) IgG의 밴드 세기는 균주 16 추출물에서 더 강한데, 이는 트렁케이션된 단백질이 감소하며 nnAA의 혼입이 실질적으로 증가함을 나타낸다. 2(B)는 중쇄의 지시된 위치에 nnAA를 함유하는 단백질의 IgG 용해 수율이 균주 16 추출물에서 실질적으로 증가함을 나타내는데, 이는 RF1 변이체 A18의 OmpT 절단이 덜 트렁케이션된 중쇄를 발생시킴을 나타낸다. "RF1+" (RF1 양성) 추출물은 OmpT에 의해 절단되지 않은 균주 001로부터의 RF1을 지칭한다. "RF1-" (RF1 음성) 추출물은 OmpT 절단 부위를 포함하도록 변형되어, OmpT 활성화에 의해 분해되는 균주 16으로부터의 RF1을 지칭한다.
- [0044] 도 3은 변형된 RF1 변이체 (A18)를 발현하도록 공학처리된 박테리아 균주로부터의 무세포 추출물이 중쇄의 지시된 위치에서 nnAA의 증가된 혼입에 상응하는 앰버 억제에서의 실질적인 증가를 생성함을 나타낸다. 3(A) 좌측 패널: 무손상 OmpT 및 야생형 RF1을 함유하는 SBJY001 추출물. 3(A) 우측 패널: 무손상 OmpT 및 RF1 변이체 A18을 함유하는 SBHS016 (균주 16) 추출물. 전장 (무손상) 중쇄 (Hc)의 밴드 세기는 균주 16 추출물에서 더 강한데, 이는 트렁케이션된 단백질이 감소하며 nnAA의 혼입이 실질적으로 증가함을 나타낸다. 3(B)는 중쇄의 지시된 위치에 nnAA를 함유하는 단백질의 앰버 억제가 균주 16 추출물에서 실질적으로 증가함을 나타내는데, 이는 RF1 변이체 A18의 OmpT 절단이 증가된 앰버 억제를 발생시킴을 나타낸다. "RF1+" (RF1 양성) 추출물은 OmpT에 의해 절단되지 않은 균주 001로부터의 RF1을 지칭한다. "RF1-" (RF1 음성) 추출물은 OmpT 절단 부위를 포함하도록 변형되어, OmpT 활성화에 의해 분해되는 균주 16으로부터의 RF1을 지칭한다.
- [0045] 정의
- [0046] "아미노아실화" 또는 "아미노아실레이트"는 tRNA가 아미노아실기를 화합물에 첨가시킨 결과인 이의 올바른 아미노산을 "적재하는" 전체 과정을 지칭한다. 본 발명에 속하는 것처럼, 아미노아실화를 겪거나 아미노아실화된 tRNA는 아미노산을 적재한 것이고, 아미노아실화를 겪거나 아미노아실화된 아미노산은 tRNA 분자에 적재된 것이다.
- [0047] "아미노아실-tRNA 합성효소" 또는 "tRNA 합성효소" 또는 "합성효소" 또는 "aaRS" 또는 "RS"는 아미노산과 tRNA 분자 간의 공유 연결을 촉매화하는 효소를 지칭한다. 이는 에스테르 결합을 통해 부착된 그 개별적인 아미노산을 갖는 tRNA 분자인 "적재된" tRNA 분자를 발생시킨다.
- [0048] "코돈"은 특정한 천연 발생 아미노산, 비-자연 아미노산, 또는 번역 중지 (폴리펩티드 사슬 종결) 신호를 지정하는 핵산 주형에서의 3개의 연속적인 뉴클레오타이드의 그룹을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 아미노산은 하나를 초과하는 코돈에 의해 명시될 수 있다.
- [0049] 앰버 코돈은 대부분의 유기체에서 폴리펩티드 번역을 종결시키는 역할을 하는 RNA의 폴리펩티드 사슬-종결 서열 (UAG)이다 (DNA에서 TAG). 적절한 tRNA가 이의 동족체 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 적재되는 경우 앰버 코돈은 또한 단백질원성 아미노산 피롤리신을 엔코딩할 수 있다.
- [0050] "앰버 코돈 tRNA" 또는 "앰버 억제제 tRNA" 또는 "앰버 항-코돈 tRNA"는 앰버 코돈에 결합하는 tRNA를 지칭한다.
- [0051] "인접한 아미노산"은 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 아미노산의 바로 앞에 있거나 서로의 뒤에 오는 아미노산을 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드의 일차 아미노산 서열의 위치 2에 있는 아미노산은 1 및 3의 위치에 있는 아미노산과 인접한 것이다. "2개의 인접한 염기성 아미노산"은 폴리펩티드의 일차 아미노산 서열에서 또 다른 염기성 아미노산의 바로 앞에 있거나 뒤에 오는 하나의 염기성 아미노산을 지칭한다. 예를 들어, RF1 아미노산 서열의 위치 295에 있는 염기성 아미노산 Arg (R)은 RF1 아미노산 서열의 위치 296에 도입된 K 또는 R과 같은 염기성 아미노산에 인접할 수 있다.
- [0052] "박테리아 유래 무세포 추출물"은 mRNA를 폴리펩티드로 번역할 수 있는 시험관내 반응 혼합물의 제조물을 지칭한다. 혼합물은 리보솜, ATP, 아미노산, 및 tRNA를 포함한다. 이들은 용해된 박테리아, 정제된 구성요소 또는 둘 모두의 조합으로부터 직접 유래될 수 있다.
- [0053] "염기성 아미노산"은 pK_a 미만의 pH 값에서 극성이고 양으로 하전되며 매우 친수성이다. 중성 pH에서 염기성 아미노산의 예는 아르기닌 (Arg = R), 리신 (Lys = K), 및 히스티딘 (His = H)을 포함한다.

- [0054] "무세포 합성 시스템"은 생물학적 추출물 및/또는 정의된 시약을 포함하는 반응 믹스에서 폴리펩티드의 시험관 내 합성을 지칭한다. 반응 믹스는 거대분자의 생산을 위한 주형, 예컨대 DNA, mRNA 등; 합성되는 거대분자에 대한 모노머, 예컨대, 아미노산, 뉴클레오티드 등; 및 합성에 필요한 보조인자, 효소 및 다른 시약, 예컨대 리보솜, 적재되지 않은 tRNA, 비천연 아미노산이 적재된 tRNA, 중합효소, 전사 인자 등을 포함할 것이다.
- [0055] 용어 "절단 활성이 야생형 RF1의 50%를 초과한다"는 본원에 기재된 변형된 단백질의 절단 활성이 명시된 조건하에 야생형 단백질의 절단율의 50%를 초과함을 나타낸다. 예를 들어, 절단율은 변형된 단백질 및 야생형 단백질이 OmpT를 발현하는 박테리아로부터의 무세포 추출물에 유사한 농도로 존재할 때 (예컨대, 0.1-1.0 마이크로몰의 농도) 30℃에서 30분 후에 야생형 단백질의 절단율의 50%를 초과할 수 있다.
- [0056] 용어 "유해 활성"은 무세포 추출물에서 단백질 합성 동안 단백질의 수율을 감소시키는 활성을 지칭한다. 예를 들어, 유해 활성은 무세포 합성 시스템에서 세포 전사 및/또는 번역을 억제할 수 있다. 유해 활성은 무세포 합성 반응에서 생산된 디설파이드 결합된 단백질의 효율적인 단백질 폴딩에 필요한 GSSG의 효소적 환원을 포함할 수 있다. 유해 활성은 또한, 폴리펩티드 연장이 도입된 정지 코돈에서 조기에 종결되도록, 방출 인자에 의한 조기 사슬 종결을 포함할 수 있다.
- [0057] "표적 단백질"은 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 변형된 단백질, 또는 nnAA를 포함하도록 변형된 단백질이다. "필수적인 표적 단백질"은 박테리아 세포 또는 진핵생물 세포와 같은 세포의 정상 성장 및/또는 생존에 필요한 단백질이다.
- [0058] "기능성 방출 인자 1 (RF1) 단백질"은 야생형 또는 비변형된 RF1 단백질과 동일하거나 실질적으로 유사한 활성을 보유하는 RF1을 지칭한다. 기능성 RF1 활성은, 예를 들어, 변형된 RF1 단백질을 발현하는 박테리아의 성장율을 측정하고, 성장율을 야생형 또는 비변형된 RF1 단백질을 발현하는 박테리아와 비교함에 의해 시험될 수 있다. OmpT 절단 부위를 함유하도록 변형된 그 밖의 단백질의 기능적 활성은, 예를 들어, 변형된 단백질을 발현하는 박테리아의 성장율을 측정하고, 성장율을 야생형 또는 비변형된 RF1 단백질을 발현하는 박테리아와 비교함에 의해 유사하게 결정될 수 있다. 기능성 RF1 활성은 또한, 예를 들어, 표적 단백질을 엔코딩하는 mRNA의 명시된 위치에서 nnAA의 각각 tRNA 혼입을 감소시켜, 조기 사슬 종결의 양을 증가시키는 (즉, 트렁케이션된 단백질의 양을 증가시키는) 변형된 RF1 단백질의 능력에 의해 시험될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 문맥에서 "~을 포함하도록 변형된"이라는 용어는 단백질 또는 폴리펩티드 서열에서 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실, 또는 변형된 단백질을 엔코딩하는 핵산 서열에서의 상응하는 치환, 첨가, 또는 결실을 나타낸다. 변형된 단백질은 야생형 단백질 서열로부터의 동일한 수의 아미노산을 대신하는 아미노산 치환, 야생형 서열에 첨가된 아미노산, 또는 야생형 서열로부터 결실된 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질은 아미노산 서열의 상응하는 위치에 있는 야생형 아미노산(들)을 대신하는 염기성 아미노산을 포함하도록 변형될 수 있다. 단백질은 또한 OmpT 절단 서열과 같은 공지된 프로테아제 절단 서열인 아미노산 서열을 포함하도록 변형될 수 있다.
- [0060] "비-천연" 또는 "비-자연" 아미노산은 모든 단백질에 대한 빌딩 블록인 20개의 천연 발생 아미노산들 중 하나는 아니지만 그럼에도 불구하고 이들이 단백질에 혼입되도록 생물학적으로 공학처리될 수 있는 아미노산을 지칭한다. 비-자연 아미노산은 D-펩티드 거울상이성질체 또는 20개의 천연 발생 아미노산들 중 하나의 임의의 번역후 변형을 포함할 수 있다. 광범하게 다양한 비-자연 아미노산이 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 비-자연 아미노산은 비-자연 아미노산의 요망되는 특성, 예컨대 독성, 생체내분포(biodistribution), 또는 반감기와 같은 단백질의 생물학적 특성, 구조적 특성, 분광 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매적 특성, 다른 분자와 반응하는 능력 (공유 또는 비공유적으로) 등을 변형시키는 것과 같은 비-자연 아미노산의 기능에 기반하여 선택될 수 있다. 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 비-자연 아미노산은 티로신 아미노산의 비-자연 유사체; 글루타민 아미노산의 비-자연 유사체; 페닐알라닌 아미노산의 비-자연 유사체; 세린 아미노산의 비-자연 유사체; 트레오닌 아미노산의 비-자연 유사체; 알킬, 아릴, 아실, 아지도, 시아노, 할로, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실, 알케닐, 알킬닐, 에테르, 티올, 설폰, 셀레노, 에스테르, 티오산, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭, 에논, 이민, 알데하이드, 하이드록시아민, 케토, 또는 아미노 치환된 아미노산, 또는 이의 임의의 조합물; 광활성화가능 가교제를 갖는 아미노산; 스핀-표지된 아미노산; 형광성 아미노산; 신규한 작용기를 갖는 아미노산; 또 다른 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호작용하는 아미노산; 금속 결합 아미노산; 금속-함유 아미노산; 방사성 아미노산; 광케이지(photocaged) 및/또는 광이성질화성(photoisomerizable) 아미노산; 바이오틴 또는 바이오틴-유사체 함유 아미노산; 글리코실화 또는 탄수화물 변형된 아미노산; 케토 함유 아미노산; 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르를 포함하는 아미노산; 중원자 치환된 아

미노산; 화학적으로 절단가능하거나 광절단가능한 아미노산; 연장된 측쇄를 갖는 아미노산; 독성기를 함유하는 아미노산; 당 치환된 아미노산, 예컨대, 당 치환된 세린 등; 탄소-연결된 당-함유 아미노산, 예컨대, 당 치환된 세린 등; 탄소-연결된 당-함유 아미노산; 산화환원-활성 아미노산; 알파-하이드록시 함유 산; 아미노산을 함유하는 아미노 티오산; 알파, 알파-이치환된 아미노산; 베타-아미노산; 프탈린 이외의 사이클릭 아미노산 등을 포함할 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0061] "핵산 주형"은 폴리펩티드가 번역될 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함한다. DNA 핵산 주형은 먼저 RNA로 전사되어야 하고, RNA는 폴리펩티드로 번역되는 것이 당업자에게 이해될 것이다. DNA는 생체내 또는 시험관내에서 RNA로 전사될 수 있다. DNA 주형의 시험관내 전사 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다. 일부 구체예에서, DNA 주형은 동시적인 시험관내 전사 및 번역을 겪는다.

[0062] "외막 단백질 T1" (OmpT1)은 표면 막 세린 프로테아제이고, 그람-음성 박테리아의 옴틴(omptin) 패밀리에 속한다. OmpT1은 항균 펩티드를 절단하고, 인간 플라스미노겐을 활성화시키고, 일부 이중성 재조합 단백질을 분해시키는 것으로 알려져 있다. OmpT1 및 이의 동족체는 합성 기질을 이염기성 잔기들 사이에서 높은 촉매적 효율로 절단한다. 이염기성 잔기를 함유하는 서열의 절단은 항생 펩티드 및 콜리신의 불활성화, 트랜스(in trans)의 박테리아 막 단백질의 단백질분해, 및 이. 콜라이 발현된 재조합 단백질의 분해에 중요한 것으로 나타났다. 본 발명의 상황에서, OmpT1은 세포의 외막에 위치하여, 무손상 박테리아 세포 내부에 위치하는 잠재적인 기질 단백질과 접촉하는 않는다는 점에서 특정한 이점을 지닌다.

[0063] 용어 "박테리아의 산화성 포스포릴화 시스템이 활성인 채로 남아 있다"는 단백질 합성 동안 활성 산화성 포스포릴화를 나타내는 박테리아 용해물을 지칭한다. 예를 들어, 박테리아 용해물은 ATP 합성효소 및 산소의 환원을 이용하여 ATP를 생성할 수 있다. 당 분야에 공지된 다른 번역 시스템이 또한 단백질 합성 동안 활성 산화성 포스포릴화를 이용할 수 있음이 이해될 것이다. 산화성 포스포릴화의 활성화는 전자 운반 사슬 억제제와 같은 특수한 억제제를 이용한 경로의 억제에 의해 설명될 수 있다.

[0064] "번역"은 RNA 주형이 천연 및/또는 비-자연 아미노산을 함유하는 폴리펩티드로 전환되는 과정을 지칭하고, 당 분야에 잘 알려져 있다. 번역은 리보솜이 RNA 주형, 일반적으로 FMet 코돈 (예컨대, AUG)에 부착되는 개시 단계, 및 적재된 tRNA 분자의 안티코돈이 RNA 주형의 코돈과 페어링되는 연장 단계로서, 리보솜이 RNA 주형 아래로 이동하면서 반복되는 연장 단계를 수반한다. 각각의 tRNA 안티코돈이 이의 상응하는 코돈과 페어링됨에 따라, 각각의 tRNA 분자에 적재된 아미노산의 아미노기는 선행 아미노산의 카르복실기에 펩티드 결합을 통해 공유적으로 연결된다. 일반적으로, 번역은 또한 리보솜이 번역 정지 코돈과 만나서, 사슬 신장 및 리보솜으로부터 폴리펩티드의 방출을 종료시키는 종결 단계를 포함한다. 그러나, 본원에 기재된 방법에서, RNA 주형은 nnAA가 적재된 tRNA의 안티코돈 CUA에 의해 인지되는, 앰버 정지 코돈 UAG를 갖는 ORF를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에서, 앰버 코돈이 번역을 종결시키도록 반드시 기능하는 것은 아니다.

[0065] "번역 시스템"은 시험관내에서 mRNA를 폴리펩티드로 번역할 수 있는 구성요소의 혼합물을 지칭한다. 번역 시스템은 무세포 추출물, 재구성된 세포 용해물, 또는 시험관내에서 mRNA를 폴리펩티드로 번역할 수 있는 구성요소의 정제된 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법에서 무세포 추출물 또는 세포 용해물은 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)(이. 콜라이)로부터 유래될 수 있다. 번역 시스템은 또한 정제되고 재구성된 시험관내 번역 시스템을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한 단백질 합성 동안 활성 산화성 포스포릴화를 나타내는 번역 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 번역 시스템은 ATP 합성효소를 이용하여 ATP를 생성할 수 있다. 번역 시스템은 또한 적어도 하나의 핵산 주형을 포함할 수 있다. 핵산 주형은 번역 시스템을 이용하여 단백질로 동시에 전사되고 번역될 수 있다.

[0066] "재구성된 리보솜 번역 시스템"은 그 전문이 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Tan et al., *Methods* 36, 279-290 (2005), and Forster et al., U.S. Patent No. 6,977,150]에 기재된 대로, 시험관내 mRNA와 같은 핵산 분자를 번역할 수 있는 정제된 구성요소의 혼합물을 지칭한다.

[0067] "자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합"은 OmpT1에 의해 절단될 수 있는 펩티드 결합이다.

[0068] "표면 노출된 모티프"는 단백질 분자의 외부에 존재하는 도메인이다. 표면 노출된 모티프는 일반적으로, 예를 들어 OmpT1과 같은 세린 프로테아제에 의한 단백질 분해 절단에 더욱 접근할 수 있다. 당업자는 표면 노출된 모티프가 여러 방식으로 정의될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 표면 노출된 모티프에는 종종 알파 헬릭스 또는 베타 시트와 같은 이차 구조가 결합되어 있다. 추가로, 표면 노출된 모티프는 종종, 심지어 상동성 단백질 서열 간에도, 현저한 양의 아미노산 서열 상동성을 공유하지 않는다. 그러나, 당업자는 pymol 분자 모델

링 소프트웨어에 내장된 GetArea 알고리즘을 이용하여 관심 단백질의 영역에 접근할 수 있는 상대 표면적을 계산할 수 있다 (인터넷 사이트 pymolwiki.org/index.php/Get_Area를 참조하라).

- [0069] "적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프"는 표면 노출된 모티프에서 개별 원자의 이동성을 나타낸다. 표면 노출된 모티프의 원자는 단백질의 코어에 있는 원자보다 이동성을 더 가질 수 있다. B-인자는 일반적으로 단백질과 같은 구조의 상이한 부분의 상대적인 진동 운동을 나타낸다. 낮은 B-인자를 갖는 원자는 잘-정렬되어 있는 단백질의 일부에 속하므로 비교적 낮은 이동성을 갖는다. 큰 B-인자를 갖는 원자는 일반적으로 비교적 유연한 단백질의 일부에 속하므로, 상대적으로 높은 이동성을 갖는다. B-인자가 높을수록, 단백질 구조에서 개별 원자의 위치 오류가 관찰될 가능성이 크다. 예를 들어, 40 내지 60의 B-인자는 1.0 옹스트롬 이하의 위치 오류가 관찰될 수 있음을 시사한다. 60 초과의 B-인자는 원자가 그 관찰된 위치의 1.0 옹스트롬 내에 있을 것 같지 않음을 시사한다. (예컨대, 인터넷 사이트 wiki.cmbi.ru.nl/index.php/B-factor를 참조하라). B-인자는 다음과 같이 계산된다:

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2$$

[0070]

- [0071] 상기 식에서, U_i^2 는 원자 i의 평균 제곱 변위이다. 이는 하기 식에 의해 푸리에 변환에 대한 원자 i의 기여도에 가중치 인자를 생성한다:

$$\exp\left(-B_i \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}\right)$$

[0072]

- [0073] U_i 가 증가함에 따라, B_i 가 증가하고 산란에 대한 원자의 기여도는 감소한다. 예컨대, pldserver1.biochem.queensu.ca/~rlc/work/teaching/definitions.shtml. 인터넷 사이트를 참조하라. B-인자는 \AA^2 의 단위로 측정된다.

- [0074] 용어 "라마찬드란 플롯"은 단백질 구조에서 각각의 아미노산 잔기에 대한 백본 이면 각 ψ (Psi) 대 ϕ (Phi)를 가시화하는 방법을 나타낸다. Phi 및 Psi 각을 계산하는 방법은 예컨대 문헌[Lovell, S.C. et al., Proteins: Structure, Function, and Genetics, 50:437-450 (2003), and Chen, V.B. et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, Acta Crystallographica D66: 12-21 (2010)]에 기재되어 있다. 라마찬드란 플롯에서 Phi 및 Psi 각은 상기 참고문헌을 참조하여 결정될 수 있거나, 편의상, 인터넷에서 자유롭게 사용할 수 있는 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어, kinemage.biochem.duke.edu의 MOLPROBITY 서버에 좌표 파일 또는 PDB 파일을 업로드할 수 있다 (상기 Chen, V.B. et al.을 참조하라). 대안적으로, 인터넷 사이트 boscoh.com/ramaplot에서 사용가능한 라마찬드란 플롯 익스플로러를 이용할 수 있다.

- [0075] 용어 "총 용매 접촉 표면적" (SASA)은 용매에 접근할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드의 표면적을 지칭한다. 용매가 접촉할 수 있는 표면적은 옹스트롬 제곱의 단위로 기재될 수 있고, Shrake & Rupley에 의해 개발된 '롤링 볼(rolling ball)' 알고리즘을 이용하여 계산될 수 있다 (Shrake, A; Rupley, JA. (1973). "Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin". *J Mol Biol* **79** (2): 351-71.). 용매가 접촉할 수 있는 표면적은 또한 문헌[Fraczkiewicz, R. and Braun, W., "Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules," *J. Comp. Chem.*, 19:319-333 (1998)]에 기재된 대로 계산될 수 있다. 편의상, 인터넷에서 자유롭게 사용가능한 소프트웨어 프로그램을 이용하여 총 용매 접촉 표면적을 계산할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Fraczkiewicz, R. and Braun, W. (Id)]에 기재된 대로 단백질 분자의 용매가 접촉할 수 있는 표면적(용매화 에너지)을 계산하기 위해, PDB (단백질 데이터베이스) 포맷의 원자 좌표를 입력하고, 물 프로브의 요망되는 반경을 지정함에 의해 (파라미터: 물 프로브의 반경 = 1.4) 텍사스 유니버시티의 메디컬 브랜치의 웹사이트 curie.utmb.edu/getarea.html에서 발견된 소프트웨어 루틴 GETAREA를 이용할 수 있다.

- [0076] 용어 "스위치 루프 영역"은 RF1의 도메인 3 및 4를 연결시켜 도메인 3의 GGQ 모티프를 50S 서브유닛의 펩티딜 트랜스퍼라제 센터(PTC)에서 펩티딜-tRNA 에스테르 결합과 접촉되게 배치시키는 단단한 연결을 형성하는 표면 노출된 모티프를 나타낸다. 종결 복합체에 의한 정지 코돈의 인지는 스위치 루프 영역의 재배열 형태를 안정화

시키고, 이는 도메인 3을 PTC로 유도한다. 스위치 루프의 재배열은 헬릭스 α7의 재배향 및 연장을 발생시켜 GGQ 모티프를 PTC에 도킹시킨다. 문헌[Korostelev, A. et al., "Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1," *EMBO Journal* (2010) 29, 2577-2585]을 참조하라. RF1의 스위치 루프 영역은 SEQ ID NO:1의 아미노산 287 내지 304에 상응하고, 다음 아미노산 서열 287-QQAEASTRRNLLGSGDRS-304 (SEQ ID NO:4)를 포함한다.

[0077] "야생형" 단백질은 자연 또는 천연 발생 단백질의 아미노산 서열 및/또는 기능 활성을 갖는 변형되지 않은 단백질이다. 예를 들어, 야생형 RF1 단백질은 SEQ ID NO:1의 서열을 지닐 수 있다. "대조 단백질"은 야생형 단백질 또는 미리 변형된 단백질일 수 있다.

[0078] "자연 아미노산"은 유전자 코드에 의해 엔코딩되는 하나 이상의 천연 발생 아미노산을 나타낸다. "내인성 자연 아미노산"은 용해물을 생성하는데 사용되는 숙주 세포에 의해 생성된 자연 아미노산을 나타낸다.

[0079] "비-자연 아미노산" ("nnAA")은 R이 천연 아미노산을 정의하는 20개의 가장 일반적인 치환기 중 어느 하나가 아닌 화학식 $\text{NH}_3-(\text{CR})-\text{COOH}$ 를 갖는 화학적 구조를 나타낸다.

[0080] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열들의 문맥에서 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 각각 문헌 [Altschul et al. (*J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990)], 및 문헌 [Altschul, et al. (*Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997)]에 기재된 BLAST 및 PSI-BLAST 알고리즘을 이용하여 측정하는 경우, 비교 원도를 통한 최대 대응, 또는 지정된 영역에 대해 비교하고 정렬할 때, 동일하거나 명시된 백분율 (예컨대, 지정된 영역에 대해 60% 동일성, 임의로 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일성)의 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 나타낸다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 정보메이션을 통해 공개적으로 사용할 수 있다 (인터넷 사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하라). 이러한 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬할 때 일부 양의-값 임계 점수 T와 일치하거나 만족시키는 질의 시퀀스에서의 길이 W의 짧은 단어를 식별함에 의해 높은 점수의 서열 쌍 (HSP)을 식별하는 것을 수반한다. T는 근처 단어 점수 임계값으로서 지칭된다 (Altschul et al., 상술한). 이러한 초기 근처 단어 히트(hit)는 검색을 시작하기 위한 씨드로서 기능하여 이들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾는다. 단어 히트는 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 각 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 점수는, 뉴클레오티드 서열의 경우, 파라미터 M (일치하는 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 N (일치하지 않는 잔기에 대한 페널티 점수; 항상 <0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 채점 매트릭스를 이용하여 누적 점수를 계산한다. 각 방향에서의 단어 히트의 연장은 누적 정렬 점수가 달성된 이의 최대 값에서 양 X만큼 떨어질 때; 누적 점수가 하나 이상의 음성-점수 잔기 정렬의 누적으로 인해 0 또는 그 미만 이 될 때; 또는 어느 한 서열의 끝에 도달할 때 중지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 단어길이 (W) 11, 기대치 (E) 10, M=5, N=-4 및 양 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 단어길이 3, 및 기대치 (E) 10을 이용하고 BLOSUM62 채점 매트릭스 (문헌 [Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989]을 참조하라)는 정렬치 (B) 50, 기대치 (E) 10, M=5, N=-4, 및 양 가닥의 비교를 이용한다.

[0081] "서열 동일성의 백분율"은 비교 원도 상에 최적으로 정렬된 2개의 서열을 비교함에 의해 결정되며, 이 때 비교 원도의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열 (첨가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 첨가 또는 결실 (즉, 겹)을 포함할 수 있다. 백분율은 양 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 얻고, 일치하는 위치의 수를 비교 원도의 총 위치의 수로 나누고 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함에 의해 계산된다.

[0082] 본원에서 사용되는 "비교 원도"는 2개의 서열을 최적으로 정렬한 후 서열을 동일한 수의 연속하는 위치의 참조 서열과 비교할 수 있는 20 내지 600개, 일반적으로 약 50 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100 내지 약 150개로 구성된 군으로부터 선택되는 연속하는 위치의 수 중 어느 하나의 세그먼트에 대한 언급을 포함한다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다.

[0083] BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 간의 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (예컨대 문헌 [Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-87, 1993]을 참조하라). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 최소 합계 확률(P(N))인데, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 일치가 우연히 발생할 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은 시험 핵산과 참조 핵산의 비교에서 최소 합계 확률이 약 0.2 미만,

전형적으로 약 0.01 미만, 보다 전형적으로 약 0.001 미만일 때 참조 서열과 유사한 것으로 고려된다.

[0084] 서열 동일성의 백분율을 폴리펩티드에 관해 사용할 때, 달리 동일하지 않은 하나 이상의 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환만큼 상이할 수 있는데, 보존적 아미노산 치환에서 제 1 아미노산 잔기는 유사한 전하 또는 소수성 또는 친수성 특성과 같은 유사한 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 치환되어, 폴리펩티드의 기능 특성을 변화시키지 않는 것으로 인지된다. 폴리펩티드 서열이 보존적 치환에 있어서 상이할 경우, 퍼센트 서열 동일성은 치환의 보존적 특성을 보장하도록 상향 조정될 수 있다. 그러한 조정은, 예를 들어 오히려 전체 불일치보다 부분 불일치로서 보존적 치환을 채점하여 서열 동일성 백분율을 증가시키는 널리 공지된 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산에 점수 1을 주고, 비-보존적 치환에 점수 0을 줄 때, 보존적 치환은 0과 1 사이의 점수를 받는다. 보존적 치환의 채점은 문헌[Pearson et al. (Meth. Mol. Biol. 24:307-331, 1994)]에 기재된 알고리즘을 이용하여 계산될 수 있다. 정렬은 또한 간단한 육안 검사 및 서열의 수동 정렬에 의해 수행될 수 있다.

[0085] 특정 폴리뉴클레오티드 서열에 관해 이용될 때 용어 "보존적으로 변형된 변이"는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 엔코딩하는 상이한 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 폴리뉴클레오티드가 아미노산 서열을 엔코딩하지 않는 경우, 본질적으로 동일한 서열을 나타낸다. 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 많은 수의 기능적으로 동일한 폴리뉴클레오티드가 임의의 주어진 폴리펩티드를 엔코딩한다. 예를 들어, 코돈 CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌을 엔코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 아르기닌이 지정되는 모든 위치에서, 코돈은 엔코딩되는 폴리펩티드를 변경시키지 않으며 기재된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 그러한 뉴클레오티드 서열 변이가 "보존적으로 변형된 변이"의 일종으로 고려되는 "침묵 변이"이다. 이와 같이, 단백질 변이체를 엔코딩하는 본원에 기재된 각각의 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 모든 가능한 침묵 변이를 나타낼 수 있다. 폴리뉴클레오티드에서 보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 UUG를 제외한 각각의 코돈은 표준 기법에 의해 기능적으로 동일한 분자를 산출하도록 변형될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 따라서, 엔코딩되는 폴리펩티드의 서열을 변화시키지 않는 폴리뉴클레오티드의 각각의 침묵 변이는 함축적으로 본원에 기재된 것이다.

[0086] 더욱이, 엔코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산 (전형적으로 10% 미만, 및 일반적으로 1% 미만)을 변경, 첨가 또는 결실시키는 개별적인 치환, 결실 또는 첨가는, 만약 변경이 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산의 치환을 발생시킨다면, 보존적으로 변형된 변이로서 고려될 수 있음이 이해될 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 아미노산 치환은 당 분야에 잘 알려져 있고, 하기 6개의 그룹을 포함하는데, 이들 각각은 서로에 대해 보존적 치환으로 고려되는 아미노산을 포함한다:

[0087] 1) 알라닌 (Ala, A), 세린 (Ser, S), 트레오닌 (Thr, T);

[0088] 2) 아스파르트산 (Asp, D), 글루탐산 (Glu, E);

[0089] 3) 아스파라긴 (Asn, N), 글루타민 (Gln, Q);

[0090] 4) 아르기닌 (Arg, R), 리신 (Lys, K)

[0091] 5) 이소류신 (Ile, I), 류신 (Leu, L), 메티오닌 (Met, M), 발린 (Val, V); 및

[0092] 6) 페닐알라닌 (Phe, F), 티로신 (Tyr, Y), 트립토판 (Trp, W).

[0093] 2개 이상의 아미노산 서열 또는 2개 이상의 뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열이 서로, 또는 주어진 비교 원도 상에서 참조 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 공유할 때 "실질적으로 유사한" 것으로 고려된다. 2개 이상의 단백질은 또한 이들이 아미노산 서열에 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 아미노산 치환을 혼입시키는 경우 실질적으로 유사한 것으로 고려된다.

[0094] "프로모터"는 전사의 개시로부터 업스트림 또는 다운스트림에 위치한 핵산 주형의 서열 요소를 지칭한다. 프로모터 서열은 전사를 개시하는 RNA 중합효소 및 기타 단백질의 인지 및 결합에 관여한다. 프로모터의 예는 T7, SP6 및 T3 박테리오파지 프로모터를 포함한다.

[0095] "5' 비번역되는 영역"은 핵산 주형에서 개방형 해독틀의 업스트림 또는 5'측에 위치한 핵산 서열을 나타낸다. RNA에서, 5' 비번역되는 영역은 핵산 주형에 존재하는 번역 개시 코돈에 선행한다. DNA에서, 5' 비번역되는 영역은 RNA로 전사되고 번역 개시 코돈에 대해 5'측에 위치하는 핵산 서열을 나타낸다. DNA에서, 번역 개시 코돈

은 전형적으로 ATG이고, RNA에서, 번역 개시 코돈은 전형적으로 AUG이다.

- [0096] "일차 아미노산 서열"은 펩티드 결합에 의해 폴리펩티드에 함께 연결되는 아미노산 잔기의 순서를 나타낸다. 아미노산 잔기의 순서는 일반적으로 폴리펩티드의 아미노 말단 끝에서 시작하여 폴리펩티드의 카르복시 말단 끝까지 계속되는 것으로 언급된다. 일차 아미노산 서열은 핵산 주형에서 RNA 코돈의 뉴클레오티드 서열에 의해 결정된다.
- [0097] "개방형 해독틀"은 관심 폴리펩티드로 번역되는 핵산 주형의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 본원에서 사용되는 개방형 해독틀 (ORF)은 nnAA가 적재된 tRNA에 결합하는 규정된 아미노산 잔기에 상응하는 적어도 하나의 코돈을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 코돈은 앰버 코돈일 수 있다.
- [0098] "이소억셉팅(isoaccepting) 센스 tRNA"는 동일한 아미노산에 대한 대안적인 코돈에 결합하는 상이한 tRNA 종을 나타낸다.
- [0099] "tRNA" 또는 "트랜스퍼 RNA"는 번역 동안 단백질 합성의 리보솜 부위에 있는 성장 폴리펩티드 사슬에 특정 아미노산을 운반하는 소형 RNA 분자를 나타낸다. tRNA는 상응하는 mRNA 코돈과 페어링된 3개의 염기 코돈을 함유한다. 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서, 아미노산은 다수의 tRNA와 결합할 수 있지만, 각 유형의 tRNA 분자는 단지 한 유형의 아미노산과 결합할 수 있다.
- [0100] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 이용되며, 펩티드 결합에 의해 연결되는 2개 이상의 아미노산을 함유하는 화합물을 나타낸다. 단백질은 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 함유할 수 있다.
- [0101] 용어 "단백질이 비복합체화될 때"는 단백질이 다른 분자, 예컨대 단백질, 리간드, 효소 기질 또는 억제제 복합체, 리보솜, 결합된 항체 또는 항체 단편, RNA 및 DNA와의 복합체의 일부일 때, 단백질의 구조, 또는 단백질 구조의 일부, 영역 또는 도메인이 아닌 용해 상태의 단백질의 구조, 또는 용해 상태의 단백질 구조의 일부, 영역 또는 도메인을 나타낸다. 상기 용어는 또한 표면 노출된 모티프를 포함하는 아미노산과 같은 용해 상태의 단백질 도메인의 구조를 나타낸다.
- [0102] 어떠한 양을 수식할 때 본원에서 사용되는 용어 "약"은 단백질 합성 또는 X-선 결정학 실험에서와 같이, 당업자가 전형적으로 만나게 되는 그 양에서의 변동을 나타낸다. 예를 들어, 용어 "약"은, 배치 또는 샘플 내부와 사이에서, 주어진 분석 기술에 대한 측정에서 발생하는 정상적인 변동을 의미한다. 따라서, 용어 약은 5% 또는 10% 변동과 같이 측정된 값의 1-10%의 변동을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 양은 "약"이라는 용어에 의해 수식된 양 또는 수식되지 않은 양을 포함하는 그러한 양에 대한 평가를 포함한다.
- [0103] 발명의 상세한 설명
- [0104] 도입
- [0105] 본 발명은 OmpT1에 의해 절단될 수 있는 OmpT1 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 재조합적으로 변형된 표적 단백질을 제공한다. OmpT1 절단 부위는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함한다. 한 구체예에서, 표적 단백질은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 표적 단백질은 표적 단백질의 표면 노출된 모티프에 OmpT1 절단 부위를 도입하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 단백질 또는 표면 노출된 모티프가 비복합체화될 때 (즉, 용해 상태로 자를 수 있고/거나 다른 분자를 포함하는 거대분자 구조의 일부가 아님) 적어도 50 Å²의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프에 위치한다. 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 약 25 Å² 내지 약 225 Å²의 총 용매 접촉 표면적(SASA)을 갖는 표면 노출된 모티프에 위치한다. 일부 구체예에서, 표적 단백질은 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합이 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180°의 Phi 각 또는 0° 내지 +180°의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 위치하도록 변형된다.
- [0106] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 구체예는 관심 단백질 도메인(들)에 대한 구조 정보를 필요로 한다. 그러나, 표면 루프는 종종 무질서하므로, 결정 구조는 관심 표적 단백질에 대해 이용되지 못할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 상동성 모델은 구조 정보의 부재하에 약 25 Å² 내지 약 225 Å²의 SASA, 또는 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180°의 Phi 각 또는 0° 내지 +180°의 Psi 각을 예측하는 유사한 구조를 이용하여 만들어질 수 있다.
- [0107] 본 발명은 OmpT1 및 재조합적으로 변형된 표적 단백질 둘 모두를 발현시키는 박테리아 세포를 추가로 제공한다. 일부 구체예에서, 재조합적으로 변형된 표적 단백질은 필수 단백질, 예를 들어 정상적인 세포 성장 및/또는 생

존에 필요한 단백질이다.

[0108] 본원에 기재된 표적 단백질은 이들이 시험관내 무세포 합성 시스템에서 유해한 활성을 갖기 때문에 선택된다. 예를 들어, 표적 단백질은 관심 단백질을 엔코딩하는 핵산 주형의 전사 및/또는 번역을 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명은 표적 단백질을 OmpT1 프로테아제로 불활성화시킴에 의해 시험관내 무세포 합성 시스템에서 변형된 필수적인 표적 단백질의 유해한 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 변형된 필수적인 표적 단백질을 발현시키는 OmpT1 양성 박테리아를 배양하는 단계로서, 상기 표적 단백질이 표면 노출된 모티프에 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하는 OmpT1 절단 부위를 포함하도록 변형되는 단계; 박테리아를 용해시켜 무세포 합성 추출물을 생성하는 단계; 변형된 필수적인 표적 단백질을 무손상 표적 단백질의 양을 50%만큼 감소시키기에 충분한 양의 OmpT1과 접촉시키는 단계; 핵산 주형을 추출물에 첨가하는 단계로서, 주형이 관심 단백질을 코딩하는 단계; 및 무세포 합성 시스템이 관심 단백질을 생성하도록 하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 표적 단백질이 세포 성장 및/또는 생존에 중요할 수 있을 때, 세포 성장 동안 변형된 표적 단백질 및 OmpT1 프로테아제의 공간 분리에 유리한 한편, 박테리아 세포가 파괴 및 용해되어 무세포 추출물을 생성할 때 표적 단백질은 OmpT1에 의해 절단된다.

[0109] 상기 방법의 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 단백질 또는 표면 노출된 모티프가 비복합체화될 때 적어도 50 Å²의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치한다. 예를 들어, 표면 노출된 모티프는 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200 Å² 또는 그 초과인 B 인자를 갖거나, 약 50 내지 약 200 Å², 약 50 내지 약 150 Å², 약 50 내지 약 100 Å², 약 60 내지 약 200 Å², 약 60 내지 약 150 Å², 또는 약 60 내지 약 100 Å²의 범위일 수 있다. 상기 방법의 일부 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 약 25 Å² 내지 약 225 Å²의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프 내에 위치한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 총 용매 접촉 표면적은 약 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 또는 225 Å²이다 (여기서 용어 "약"은 선행하는 각 값을 수식한다). 상기 방법의 한 구체예에서, 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합은 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180°의 Phi 각 또는 0° 내지 +180°의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 존재한다. 상기 기재된 대로, 구조 정보의 부재하에, 상동성 모델은 약 25 Å² 내지 약 225 Å²의 SASA, 또는 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180°의 Phi 각 또는 0° 내지 +180°의 Psi 각을 예측하는 유사한 구조를 이용하여 만들어질 수 있다.

[0110] 상기 언급된 관심 단백질은 아미노산 서열의 규정된 위치에 비-자연 아미노산 (nnAA)을 혼입하도록 공학처리된 단백질을 포함한다. 단백질로의 nnAA의 도입은 바람직한 특성을 갖는 단백질을 발생시킬 수 있다. nnAA를 관심 단백질 또는 폴리펩티드에 도입하는 한 방법은 단백질 번역 동안 신생 폴리펩티드 사슬에 nnAA를 도입하기 위해 앰버 (정지) 코돈을 인지하는 아미노아실화 직각 tRNA를 이용하는 것이다. 그러나, 안에 도입된 nnAA를 갖는 단백질의 수율은 mRNA 서열에서 종결 또는 정지 코돈을 인지함에 의해 번역의 종결을 촉진하는 번역 종결 복합체의 단백질에 의해 감소될 수 있다. 방출 인자 1 (RF1)은 종결 복합체의 일부이고, UAG (앰버) 정지 코돈을 인지한다. 앰버 코돈의 RF1 인지는 nnAA 혼입 부위에서 조기 사슬 종결을 촉진시킬 수 있고, 이는 요망되는 단백질의 수율을 감소시킨다. 본원에 기재된 방법은 박테리아 세포 용해물에서 RF1의 기능 활성을 감소시킴에 의해 이러한 문제를 해결한다. 따라서, 일부 구체예에서, 필수적인 표적 단백질은 RF1이다. RF1의 기능 활성은 OmpT1 프로테아제 절단 부위를 RF1에 도입시킴에 의해 감소된다. OmpT1은 무손상 박테리아의 세포 외막에 위치하는 효소이다. 따라서, 변형된 RF1은 무손상 세포에서 OmpT1을 위한 기질로서 이용될 수 없다. 예를 들어, 박테리아 용해물에서와 같이, 박테리아 막이 파괴되면, OmpT1 효소는 도입된 절단 부위에서 변형된 RF1과 접촉하여 이를 절단할 수 있으므로, RF1의 기능 활성을 감소시킨다. 상기 방법은 UGA 정지 코돈을 인지하는 RF2와 같은 번역 종결 복합체에서 발견되는 다른 방출 인자에 이용될 수 있다. 상기 방법은 또한 RNase 효소와 같이, 시험관내 번역 동안 mRNA를 분해하는 단백질에 이용될 수 있다. 추가로, 상기 방법은 일반적으로 관심 단백질의 전사 및/또는 번역을 억제하는 박테리아 추출물의 임의의 단백질에 이용될 수 있다.

[0111] 일반적인 방법

[0112] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 실무자는 특히 당 분야의 정의 및 용어에 대해 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Green, M.R., and Sambrook, J., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), and Ausubel, F. M., et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 99), John Wiley & Sons, New York (2012)]을 참조한다. 표준 방법은 또한 RNA 조작 및 분석에 대한 상세한 방법을 기재하고 있고 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Bindereif, Schon, & Westhof (2005) Handbook of RNA Biochemistry, Wiley- VCH, Weinheim, Germany]에 표시된다. 재조합 핵산을 제조하기 위한 적절한 분자 기법의 예, 및 많은 복제 실험을 통한 기술을 사람에게 전달하기에 충분한 지시서는 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Green, M.R., and Sambrook, J., (Id.); Ausubel, F. M., et al., (Id.); Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology (Volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1987); and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, Calif. 1990)]에서 발견된다.

[0113] 단백질 정제, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 및 결정화 방법은 문헌[Coligan et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York]에 기재된다. 무세포 합성 방법은 문헌[Spirin & Swartz (2008) Cell-free Protein Synthesis, Wiley- VCH, Weinheim, Germany]에 기재되어 있다. 무세포 합성을 이용하여 비-자연 아미노산을 단백질에 혼입시키는 방법은 문헌[Shimizu et al (2006) FEBS Journal, 273, 4133-4140]에 기재되어 있다.

[0114] PCR 증폭 방법은 당 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc. San Diego, Calif., 1990]에 기재되어 있다. 증폭 반응은 전형적으로 증폭되어야 하는 DNA, 열안정성 DNA 중합효소, 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트 (dNTP), 반응 완충제 및 마그네슘을 포함한다. 통상적으로 요망되는 열 주기의 수는 1 내지 25회이다. 프라이머 설계 및 PCR 조건의 최적화 방법은 당 분야에 잘 알려져 있고 문헌[Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, Wiley, 2002, and Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, 1990]과 같은 표준 분자 생물학 텍스트에서 찾아볼 수 있다. 컴퓨터 프로그램은 필요한 특이성 및 최적 증폭 특성을 갖는 프라이머의 설계에 유용하다 (예컨대, Oligo Version 5.0 (National Biosciences)). 일부 구체예에서, PCR 프라이머는 벡터의 특수한 제한 효소 부위로의 증폭된 DNA 단편의 삽입을 촉진하기 위해, 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 추가로 함유할 수 있다. 제한 부위가 PCR 프라이머의 5' 말단에 첨가되어야 하는 경우, 효소에 의한 더욱 효율적인 절단이 가능하도록 소수 (예컨대, 2 또는 3개)의 여분의 5' 염기를 포함시키는 것이 바람직하다. 일부 구체예에서, PCR 프라이머는 후속적인 시험관내 전사가 가능하도록 T7 또는 SP6과 같은 RNA 중합효소 프로모터 부위를 또한 함유할 수 있다. 시험관내 전사 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다 (예컨대, 문헌[Van Gelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1663-1667, 1990; Eberwine et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:3010-3014, 1992]을 참조하라).

[0115] OMPT1 절단가능한 단백질

[0116] 본 발명은 OmpT1과 같은 단백질분해 효소에 의해 절단되고 불활성화될 수 있는 표적 단백질을 제공한다. 단백질은 프로테아제에 의해 절단되기 위해, 단백질분해 절단 부위를 단백질에 도입하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 변형된 표적 단백질에 도입되는 절단 부위는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합이고, 자를 수 있는 OmpT1은 표적 단백질의 표면 노출된 모티프에 도입된다. OmpT1에 의해 인지되는 절단 부위는 2개의 인접한 염기성 잔기를 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 표적 단백질은 pH 7.0에서 양으로 하전된 2개의 인접한 염기성 잔기를 포함하도록 변형된다.

[0117] **OmpT1 절단 부위를 적어도 50 Å²의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프에 도입하기 위한 단백질의 변형**

[0118] 일부 구체예에서, 표적 단백질은 표적 단백질 또는 모티프 영역의 아미노산 서열이 비복합체화될 때 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 적어도 50 Å²의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프에 도입하도록 변형된다. 적어도 50 Å²의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프의 위치는 여러 방식으로 결정될 수 있다. B 인자는 결정학 단백질 데이터뱅크 (PDB) 파일에서 각 원자에 대해 제공된다. 표면 노출된 모티프의 B 인자는 pymol 분자 모델링 소프트웨어에 내장된 GetArea 알고리즘을 이용하여 계산될 수 있다 (인터넷 사이트 pymolwiki.org/index.php/Get_Area를 참조하라). 대안적으로, 단백질의 X-선 결정학 구조를 이용할 수 없으나, 단백질의 NMR 구조를 이용할 수 있는 경우, 랜덤 코일 지수 (RCI)를 큰 B-인자 대신 이용할 수 있다 (문헌[Berjanskii, M.V., et al., Application of the random coil index to studying protein flexibility, *J Biomol NMR*. 2008 Jan;40(1):31-48. Epub 2007 Nov 6]을 참조하라).

- [0119] 표적 단백질을 변형시켜 OmpT1 절단 부위를 적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프에 도입하기 위해, 단백질의 X-선 결정학 구조로부터의 B 인자를 아미노산 서열로 맵핑할 수 있고, 서열은 큰 B 인자를 갖는 부위(들)에 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하도록 재조합적으로 변형된다. 그 후 재조합적으로 변형된 표적 단백질은 OmpT1을 함유하는 세포 추출물에서 단백질의 분해에 대해 시험될 수 있다. 일부 구체예에서, B 인자는 적어도 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 \AA^2 이다. 일부 구체예에서, B 인자는 약 50 내지 약 200 \AA^2 , 또는 약 50 내지 약 150 \AA^2 , 또는 약 50 내지 120 \AA^2 이다. 본원에 기재된 범위는 끝점들 사이의 모든 값을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0120] **OmpT1 절단 부위를 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프에 도입하기 위한 단백질의 변형**
- [0121] 일부 구체예에서, 표적 단백질은 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프에 도입하도록 변형된다. 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프의 위치는 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Fraczkiewicz, R. and Braun, W., "Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules," J. Comp. Chem., 19, 319-333 (1998)]에 기재된 대로 소프트웨어 루틴 GETAREA를 이용하여 교차 원자의 용매-노출 정점을 찾을 수 있다. 이에 따라, PDB (단백질 데이터베이스) 포맷의 원자 좌표를 입력하고, 물 프로브의 요망되는 반경을 지정하고, 텍사스 유니버시티의 메디컬 브랜치의 웹사이트 curie.utmb.edu/getarea.html (파라미터: 물 프로브의 반경 = 1.4)에서 제공된 형태를 이용하여 요망되는 수준의 아웃풋을 지정함에 의해 GETAREA 소프트웨어를 이용하여 단백질 분자의 용매가 접촉할 수 있는 표면적 (용매화 에너지)을 계산할 수 있다. 총 용매 접촉 표면적을 결정하는 다른 방법은 문헌 [Eisenberg, D. and McLachlan, A.D. (1986) *Nature*, **319**, 199; Markley, J.L.; et al. (1998) *Pure & Appl. Chem.*, **70**, 117; and Wesson, L. and Eisenberg, D. (1992) *Protein Sci.*, **1**, 227]에 기재되어 있다.
- [0122] **OmpT1 절단 부위를 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Phi 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 도입하기 위한 단백질의 변형**
- [0123] 일부 구체예에서, 표적 단백질은 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Phi 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 도입하도록 변형된다. 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Phi 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치의 선정은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. Phi 및 Psi 각을 계산하는 방법은 예컨대 문헌 [Lovell, S.C. et al., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 50:437-450 (2003)]에 기재되어 있다. 라마찬드란 플롯에서 Phi 및 Psi 각은 인터넷 사이트 kinemage.biochem.duke.edu의 MOLPROBITY 서버에 좌표 파일 또는 PDB 파일을 업로드함에 의해 결정될 수 있다 (문헌 [Chen, V.B., et al., (2010) *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. *Acta Crystallographica D66*: 12-21]을 참조하라). 대안적으로, 인터넷 사이트 boscoh.com/ramaplot에서 사용가능한 라마찬드란 플롯 익스플로러를 이용할 수 있다.
- [0124] 본원에 기재된 변형된 단백질은 이들이 무세포 합성 시스템에서 단백질의 생산을 억제할 수 있으므로 선택된다. 따라서, 일부 구체예에서, 본원에 기재된 변형된 단백질은 박테리아 무세포 추출물 중 전장 단백질의 생산을 감소시킨다. 예를 들어, 단백질 RF1 및 RF2는 mRNA에서 정지 코돈을 인지하고 폴리펩티드 사슬의 번역을 종결시키는 종결 복합체의 일부이다. 번역의 조기 종결은 비-자연 아미노산을 본원에 기재된 무세포 번역 시스템을 이용하여 단백질에 혼입시킬 때 바람직하지 않다. 종결 복합체에 의한 정지 코돈의 인지를 감소시키는 것은 nnAA를 혼입한 단백질의 수율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, RF1 및/또는 RF2 단백질, 또는 이의 기능성 동족체는 RF1 및/또는 RF2 단백질, 또는 이의 기능성 동족체가 비복합체화될 때 적어도 50 \AA^2 의 B 인자를 갖는 표면 노출된 모티프에 OmpT1 절단 부위를 함유하도록 변형된다. 일부 구체예에서, RF1 및/또는 RF2 단백질, 또는 이의 기능성 동족체는 약 25 \AA^2 내지 약 225 \AA^2 의 총 용매 접촉 표면적을 갖는 표면 노출된 모티프에 OmpT1 절단 부위를 함유하도록 변형된다. 일부 구체예에서, RF1 및/또는 RF2 단백질, 또는 이의 기능성 동족체는 라마찬드란 플롯에서 0° 내지 -180° 의 Phi 각 또는 0° 내지 $+180^\circ$ 의 Psi 각을 나타내는 단백질의 위치에 OmpT1 절단 부위를 함유하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 변형된 기능성 단백질은 RF1 (SEQ ID NO:1) 또는 RF2 (SEQ ID NO:2)와 실질적으로 유사하다.

- [0125] RF1 단백질은 이. 콜라이로부터의 RF1 야생형 원형 단백질 (SEQ ID NO:1) 뿐만 아니라 다형성 변이 및 재조합적으로 생성된 유전자를 포함한다. RF1 단백질은 야생형과 실질적으로 동일한 생물학적 활성 또는 기능 활성 (예컨대, 어느 쪽이든 적어도 80%)을 갖고/거나, 원형 단백질 RF1과 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 갖고/거나, 원형 단백질 SEQ ID NO:1에 대해 생성된 폴리클로날 항체와 결합하는 것으로 정의된다.
- [0126] 폴리클로날 항체에 대한 RF1 단백질의 결합에 관해, RF1 단백질은 지정된 면역검정 조건하에 백그라운드의 적어도 2배의 특이성으로 특정 항체에 결합할 것이고, 이 때 항체는 샘플에 존재하는 다른 단백질에 실질적으로 현저한 양으로 결합하지 않는다. 예를 들어, RF1 (SEQ ID NO:1)에 대해 발생한 폴리클로날 항체, 또는 이의 아이소형(isoform) 또는 부분은, RF1의 다형성 변이체를 제외하고는, RF1과는 특이적으로 면역반응성이고 다른 단백질과는 그렇지 않은 그러한 폴리클로날 항체만을 수득하도록 선택될 수 있다. 다양한 면역검정 포맷을 이용하여 특정한 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 고체-상 ELISA 면역검정이 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택하기 위해 통상적으로 이용된다 (예컨대, 특이적 면역반응성을 결정하는데 이용될 수 있는 면역검정 포맷 및 조건의 설명에 대해 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies*, A Laboratory Manual (1988)]을 참조하라). 통상적으로, 특수한 또는 선택적인 반응은 백그라운드 신호 또는 노이즈의 적어도 2배이고 보다 통상적으로 백그라운드 보다 10 내지 100배 더 클 것이다.
- [0127] 실시예에 기재된 대로, RF1은 기능성 OmpT1 절단 부위를 표면 노출된 모티프에 도입하도록 성공적으로 변형되었다. 그러나, RF1로의 추정 이염기성 OmpT1 절단 부위의 도입이 항상 OmpT1에 의해 효율적으로 절단될 수 있는 단백질을 발생시키는 것은 아니었다. 예를 들어, 단일한 아미노산 치환 M74R, E76K, E84K, A85R, E87R, E108R, T293R 및 S304K를 기존의 Arg 또는 Lys 옆에 있는 RF1의 루프 영역에 도입시켜 이염기성 절단 부위를 생성하였다. 그러나, 이러한 변이체는 RF1 변이체가 OmpT1 양성 세포 추출물에서 발현되었을 때 효율적으로 절단되지 않았다. 따라서 본 발명은 단백질이 OmpT1과 같은 프로테아제에 의해 절단될 수 있도록 RF1과 같은 단백질을 변형시킬 수 있다는 예기치 않은 결과를 제공한다.
- [0128] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 도입된 절단 부위는 OmpT1-유사 효소 활성을 갖는 효소에 의해 절단될 수 있고, 이 때 효소 활성은 OmpT1의 기능성 동족체 또는 단편으로부터, 또는 OmpT1-유사 활성을 갖도록 변형된 단백질로부터 비롯된다.
- [0129] **OmpT1에 의해 변형되지 않은 단백질의 절단**
- [0130] 본원에 기재된 단백질은 또한 내인성 OmpT1 프로테아제 절단 부위를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 변형되지 않은 단백질 또는 야생형 단백질은 OmpT1에 의해 절단될 수 있는 자를 수 있는 OmpT1 펩티드 결합을 포함하는 이염기성 아미노산 서열을 함유한다. OmpT1에 의한 단백질의 절단은 정제된 단백질을 OmpT1을 발현시키는 박테리아 무세포 추출물과 인큐베이션하고, 그 안의 절단 양을 OmpT1을 발현하지 않는 무세포 추출물에서 검출된 절단 양과 비교함에 의해 시험될 수 있다. 일부 구체예에서, 내인성 OmpT1 절단 부위를 함유하는 변형되지 않은 단백질은 정상 세포 성장 또는 기능에 필수적이거나 필요하지만, 무세포 추출물에서 단백질의 번역을 억제한다. 따라서, 본 발명은 OmpT1을 이용한 절단에 의해 변형되지 않은 단백질을 선택적으로 불활성화시키는 방법을 제공하고, 이 때 불활성화 시점은, 단백질이 세포 성장 동안에는 기능성이지만 OmpT1을 발현시키는 세포-추출물에서는 불활성화되도록 제어될 수 있다.
- [0131] **주형**
- [0132] 본 발명의 단백질을 생성하려면 핵산 주형이 필요하다. 본 발명에 대한 주형을 이용하여 자를 수 있는 OmpT1 절단 부위를 포함하도록 변형된 단백질을 생성한다. 본 발명에 대한 주형을 또한 이용하여 무세포 시스템에서 발현되는 관심 단백질을 생성한다. 무세포 단백질 합성을 위한 주형은 mRNA 또는 DNA일 수 있다. 주형은 임의의 특정한 관심 유전자에 대한 서열을 포함할 수 있고, 전장 폴리펩티드 또는 이의 임의의 길이의 단편을 엔코딩할 수 있다. 단백질 합성 주형으로서 기능하는 핵산은 임의로 천연원으로부터 유래되거나, 합성 또는 재조합 핵산일 수 있다. 예를 들어, DNA는 재조합 DNA, 예컨대, 플라스미드, 바이러스 등일 수 있다.
- [0133] 한 구체예에서, DNA 주형은 OmpT1 절단 부위를 포함하는 표적 단백질을 엔코딩하는 ORF를 포함한다. 예를 들어, ORF는 정상 세포 성장 및 생존에 필요하지만, 그 활성이 무세포 추출물에서 단백질의 수율을 직접 또는 간접적으로 감소시키는 변형된 표적 단백질을 엔코딩할 수 있다. 따라서, ORF는 종결 복합체의 단백질 구성요소, 예컨대 RF1 또는 RF2 또는 이의 변형된 변이체를 엔코딩할 수 있다. ORF는 또한 RNA 주형을 분해시키는 RNase를 엔코딩할 수 있다.
- [0134] 또 다른 구체예에서, DNA 주형은 비-자연 아미노산을 혼입하도록 변형된 관심 단백질을 엔코딩하는 ORF를 포함

한다. 따라서, ORF는 아미노산 서열의 규정된 위치에 nnAA를 혼입시키는 생물학적 중요성을 갖는 임의의 단백질을 엔코딩할 수 있다. 그러한 관심 단백질의 비제한적인 예는 항체, 호르몬, 사이토카인, 및 바이러스 단백질을 포함한다. 본 발명은 비-자연 아미노산의 혼입을 위한 센스 코돈을 이용하여, 당 분야에서 일반적으로 발견되는 각각 구성요소의 요건을 회피한다. 이러한 구체예에서, ORF는 적어도 하나의 이소억셉팅 센스 코돈을 포함한다. ORF는 비-자연 아미노산이 적재된 tRNA를 인지하는 규정된 아미노산 잔기에 상응하는 하나의 코돈을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, ORF는 비-자연 아미노산이 적재된 tRNA에 결합하는 앰버 코돈 (UAG)을 포함한다. 다른 구체예에서, 주형은 비-자연 아미노산이 관심 단백질에 혼입되도록 선택되는지와 무관하게 완전한 기능성 단백질을 번역할 수 있다.

[0135] 관심 ORF를 포함하는 DNA 주형은 적어도 하나의 프로모터 및 비제한적으로 억제물질, 활성화제, 전사 및 번역 인핸서, DNA-결합 단백질 등을 포함하는 하나 이상의 다른 조절 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 본원에서 사용되는 적합한 양의 DNA 주형은 DNA를 널리 공지된 클로닝 벡터 및 숙주에서 증폭시킴에 의해, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 생성될 수 있다.

[0136] DNA 주형은 크로마토그래피 매질에 높은 친화성으로 결합하는 폴리-아미노산 태그와 같은, 발현된 단백질을 분리하고 정제하는데 유용한 아미노산 서열을 엔코딩하는 핵산 서열에 인 프레임(in frame)으로 연결된 관심 ORF를 추가로 포함할 수 있다. 폴리-아미노산 태그는 ORF의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치하여, 발현된 단백질에 각각 아미노-말단 또는 카르복실 말단 태그를 발생시킬 수 있다. 한 구체예에서, ORF는 폴리-히스티딘 태그를 엔코딩하는 서열에 인 프레임으로 연결된다.

[0137] 한 구체예는 박테리아 용해물을 이용한다. DNA 주형은 요망되는 단백질-엔코딩 DNA를 프로모터 서열 및 박테리아 리보솜 결합 부위 (Shine-Delgarno 서열) 둘 모두에 작동가능하게 연결시킴에 의해 박테리아 발현을 위해 작제될 수 있다. 본 발명의 무세포 전사-번역 방법에서 DNA 주형과 함께 사용하기에 적합한 프로모터는 박테리아 추출물이 유래되는 박테리아의 생체내 전사를 촉진할 수 있는 임의의 DNA 서열을 포함한다. 숙주 세포 내에서 전사를 효율적으로 개시할 수 있는 프로모터가 바람직하다. 요망되는 단백질 및 요망되는 프로모터 및 Shine-Dalgarno (SD) 서열을 함유하는 DNA를 엔코딩하는 DNA는 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로, 요망되는 DNA 서열은 존재하는 클론으로부터 수득될 수 있거나, 이용할 수 있는 것이 아무것도 없는 경우, DNA 라이브러리를 스크리닝하고 라이브러리 클론으로부터 요망되는 DNA 서열을 작제함에 의해 수득될 수 있다.

[0138] 관심 단백질을 엔코딩하는 RNA 주형은 반응 혼합물의 리보솜이 mRNA에 결합하여 이를 번역할 수 있도록 요망되는 유전자의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 박테리아 리보솜 결합 부위 (SD 서열)를 갖는 mRNA를 발현하도록 작제된 벡터로 형질전환된 재조합 숙주 세포로부터 편리하게 생성될 수 있다. 따라서, 벡터는 RNA 주형 합성에 이용되는 특정한 숙주 세포에서 DNA의 전사를 촉진할 수 있는 임의의 프로모터를 지닌다.

[0139] 박테리아로부터 분해되지 않은 RNA를 추출하는 것은 어렵기 때문에, 고등 진핵생물 세포 배양액이 RNA 주형의 생성에 바람직하다. 원칙적으로, 척추동물 및 무척추동물 세포 배양액 둘 모두를 포함하는 임의의 고등 진핵생물 세포 배양액이 실행가능하다. RNA 주형은 숙주 세포 배양액으로부터 추출된 총 세포 RNA 분획에서 편리하게 분리될 수 있다. 총 세포 RNA는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 숙주 세포로부터 분리될 수 있다. 요망되는 RNA 주형은 RNA 주형이 진핵생물 숙주 세포에 의해 인지되는 폴리아데닐화 신호를 이의 3' 말단에 함유하도록 설계되는 경우 세포 mRNA의 대부분과 함께 분리될 수 있다. 따라서, 숙주 세포는 폴리아데닐레이트 (폴리 (A)) 테일을 갖는 RNA 주형을 생성할 것이다. 폴리아데닐화 mRNA는 당 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 올리고데옥시티미딜레이트 (올리고 (dT))-셀룰로스 컬럼 상에서 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 RNA의 벌크로부터 분리될 수 있다. 요망되는 단백질을 엔코딩하는 mRNA의 크기가 알려진 경우, mRNA 제조물은 RNA의 아가로스 겔 전기영동에 의해 특정한 크기의 mRNA 분자에 대해 추가로 정제될 수 있다.

[0140] **OmpT1 절단 부위를 갖는 변형된 단백질의 발현**

[0141] 일단 핵산 주형이 생성되면, 주형을 이용하여 세포에서 OmpT1 절단 부위를 포함하는 재조합 표적 단백질을 발현하거나, 무세포 번역 시스템에서 변형된 재조합 표적 단백질을 합성한다. 예를 들어, 주형은 주형을 단백질로 번역하기에 충분한 조건하에 세포 용해물에 첨가될 수 있다. 세포 용해물은 박테리아 세포 또는 진핵생물 세포로부터 비롯될 수 있다. 그 후 발현된 단백질은 하기 기재된 대로 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 정제될 수 있다.

[0142] **활성을 시험하기 위한 정제 단백질**

- [0143] OmpT1 절단 부위를 함유하는 단백질은 당 분야의 표준대로 정제될 수 있다. 본 발명의 단백질은 비제한적으로 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 또는 염기 추출, 컬럼 크로마토그래피, 친화성 컬럼 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 렉틴 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 방법에 의해 회수되고 정제될 수 있다. 예를 들어, N-말단 히스티딘 태그를 포함하는 단백질은 니켈 및 코발트와 같은 금속 이온을 함유하는 친화성 매질을 이용하여 정제될 수 있다. 그 후 친화성 매질을 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하고, 결합된 단백질을 용리 및 회수한다. 일부 구체예에서, 폴리-히스티딘 태그된 단백질은 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC)를 이용하여 정제된다. 변형된 단백질은 또한 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 또는 고순도가 요구되는 경우 다른 적합한 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 바람직한 정제 방법은 실시예 1에 제공된다.
- [0144] 정제 후에, OmpT1 절단 부위를 함유하는 단백질은 관련 폴리펩티드의 요망되는 형태와 상이한 형태를 지닐 수 있다. 이에 따라, 정제된 단백질은 바람직한 단백질 형태를 발생시키는 조건에 적용될 수 있다. 다양한 정제/단백질 폴딩 방법이 문헌[Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification (Academic Press, Inc. N.Y. 1990); Bollag et al., Protein Methods, 2nd Edition, (Wiley-Liss, N.Y. 1996)]과 같이 당 분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변성 및 환원시킨 후 폴리펩티드가 바람직한 형태로 재-폴딩되게 하는 것이 때로 바람직할 수 있다. 예를 들어, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE, 및/또는 사페론을 관심 번역 생성물에 첨가할 수 있다. 단백질을 환원, 변성 및 복원시키는 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다. 예컨대, 문헌[Debinski et al., J. Biol. Chem. 268:14065-70 (1993); Buchner et al., Anal. Biochem. 205:263-70 (1992)]을 참조하라.
- [0145] **OmpT1 절단 부위를 갖는 변형된 단백질의 기능적 생물학적 활성의 확인**
- [0146] 본원에 기재된 변형된 단백질의 요망되는 용도에 따라, 변형된 단백질이 변형되지 않은 야생형 단백질과 유사한 생물학적 활성을 갖는 것이 중요할 수 있다. 예를 들어, 변형되어야 하는 단백질이 박테리아의 정상 성장에 중요한 경우, 세포가 용해되어 번역을 위한 무세포 용해물이 생성될 때까지 단백질의 정상 활성 수준을 유지하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 자연 또는 야생형 단백질과 유사한 생물학적 활성을 갖는 OmpT1 절단 부위를 함유하는 변형된 단백질을 제공한다. 야생형의 활성 수준 또는 야생형과 유사한 활성 수준을 보유하는 변형된 단백질은 본원에서 기능성 단백질로서 언급된다. 단백질의 비활성도는 기능성 검정에서 활성 수준을 결정함에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 존재하는 단백질의 양을 비-기능성 검정, 예컨대 면역블롯팅, ELISA, 코마시 또는 은 염색된 겔 상에서의 정량 등으로 정량하고, 총 단백질에 대한 생물학적으로 활성인 단백질의 비를 결정함에 의해 단백질의 비활성도를 결정할 수 있다. 일반적으로, 이렇게 정의된 비활성도가 야생형 단백질의 적어도 약 50%이거나, 야생형 단백질의 활성 보다 적어도 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 그 초과인 경우 변형된 단백질은 야생형 단백질과 유사하다. 예컨대, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)]을 참조하라.
- [0147] 변형된 단백질의 기능 활성은 다양한 방식으로 시험될 수 있다. 예를 들어, 변형된 단백질을 발현시키는 박테리아의 성장율은 야생형, 대조 또는 변형되지 않은 단백질을 발현시키는 박테리아의 성장율에 비교될 수 있다. 변형된 단백질의 기능 활성은 또한 mRNA 주형의 정지 코돈에서 번역을 종결시키는 변형된 단백질의 능력을 결정함에 의해 시험될 수 있다. 번역의 종결은 트렁케이션된 단백질을 발생시키므로, 변형된 단백질의 상대 활성은, 실시예에 기재되고 도 1에 도시된 대로, 트렁케이션된 단백질 및 전장 단백질의 양을 측정하고, 전장 단백질에 대한 트렁케이션된 단백질의 비를 야생형 단백질에서 발생한 것과 비교함에 의해 정량될 수 있다. 변형된 단백질은 전장 단백질에 대한 트렁케이션된 단백질의 비가 야생형 단백질을 이용한 전장 단백질에 대한 트렁케이션 단백질의 비 보다 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과일 때 야생형 단백질과 유사한 활성을 갖는다.
- [0148] **변형된 단백질이 OmpT1에 의해 절단될 수 있는지 확인**
- [0149] 일단 변형된 단백질이 야생형 또는 변형되지 않은 단백질과 유사한 생물학적 활성을 갖는다고 결정되면, 변형된 단백질은 OmpT1에 의해 절단되는지 여부를 결정하기 위해 시험된다. 본 발명의 변형된 단백질이 OmpT1에 의해 절단되는지를 시험하는 한 방법은 OmpT1 절단 부위를 함유하는 제조된 단백질을 기능성 OmpT1을 함유하는 무세포 추출물에 첨가하는 것이다. 만약 변형된 단백질이 OmpT1에 의해 절단되면, 겔 전기영동 (예컨대, SDS-PAGE) 동안 무손상 단백질 보다 낮은 겔보기 분자량으로 이동할 것이다. 변형된 단백질은 방사성 표지를 변형된 단백질에 혼입하기에 적합한 조건하에 번역 반응에서 ¹⁴C와 같은 방사성 표지를 포함함에 의해 검출될 수 있다. 방

사성 표지된 단백질의 이동은, 예를 들어, 겔의 오토라디오그래프 상에서 가시화될 수 있다. OmpT1에 의한 변형된 단백질의 절단은 또한, 예를 들어, 단백질을 겔에서 고체 지지체로 운반하고, 지지체를 무손상 및 절단된 단백질에 결합하는 항체와 접촉시키고, 결합된 항체를 검출가능한 표지를 이용하여 가시화하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출될 수 있다.

[0150] OmpT1에 의한 절단 활성은 OmpT1에 의한 변형된 단백질의 절단 양 및 절단율을 변형되지 않은 단백질의 절단 양 및 절단율과 비교함에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, OmpT1에 의한 변형된 단백질의 절단율은 명시된 조건하에 야생형 단백질의 절단율 보다 50% 더 클 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 변형된 단백질의 절단율은 변형된 단백질 및 야생형 단백질이 OmpT1을 발현하는 박테리아로부터의 무세포 추출물에서 유사한 농도(예컨대, 0.1-1.0 마이크로몰의 농도)로 존재할 때 30℃에서 30분 후에 야생형 단백질의 절단율 보다 50% 더 크다. 일부 구체예에서, 변형된 단백질이 OmpT1을 발현하는 박테리아로부터의 무세포 추출물에 0.1-1.0 마이크로몰의 농도로 존재할 때 30℃에서 60분 후에 90%를 초과하는 변형된 단백질이 OmpT1에 의해 절단된다.

[0151] 본원에 기재된 변형된 단백질에 도입된 OmpT 절단 부위는 OmpT-유사 효소 활성을 지니는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드에 의해 절단될 수 있는 것이 이해될 것이다. 필요한 것은 오직 OmpT1-유사 효소가 OmpT 절단 부위를 함유하도록 변형된 단백질을 절단할 수 있다는 것이다. 예를 들어, OmpT-유사 단백질분해 활성은 야생형 또는 자연 OmpT1, 또는 이의 기능성 동족체 또는 단편에 의해 제공될 수 있다. OmpT-유사 활성은 또한 OmpT1과 실질적으로 동일하거나 실질적으로 유사한 단백질에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, OmpT-유사 활성을 갖는 단백질은 OmpT1과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 지닐 수 있다. 일부 구체예에서, OmpT-유사 활성을 갖는 단백질은 SEQ ID NO:3과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 동일하다. 일부 구체예에서, OmpT1 활성을 갖는 단백질은 OmpT1 및 이의 변이체에 결합하는 폴리클로날 항체에 의해 특이적으로 결합한다. OmpT1 및 이의 기능성 변이체에 결합하는 폴리클로날 항체의 선택은 RF1에 결합하는 폴리클로날 항체를 선택함에 의해 본원에 기재된 대로 수행될 수 있다.

[0152] **OmpT1 절단가능한 단백질을 이용한 박테리아의 형질전환**

[0153] 일단 변형된 필수적인 표적 단백질이 상기 기재된 대로 야생형 기능을 보유하고 OmpT1에 의해 절단될 수 있음이 결정되면, 변형된 단백질을 엔코딩하는 핵산은 박테리아로 형질전환된다. 박테리아는 박테리아의 유전체에 핵산을 혼입하기에 적합한 조건하에 핵산으로 형질전환될 수 있다. 예를 들어, 박테리아는 실시예에 기재된 대로, 올리고뉴클레오타이드-매개된 대립유전자 교체를 이용하여 본원에 기재된 OmpT1 절단 부위를 엔코딩하는 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 형질전환될 수 있다. 박테리아 유전체에 요망되는 돌연변이의 혼입은, 예를 들어, 실시예에 기재된 대로, 미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR을 이용하여 형질전환된 콜로니를 스크리닝함에 의해 결정될 수 있다.

[0154] **무세포 번역 시스템에서 단백질의 수율을 증가시키기 위한 OmpT1 절단가능한 단백질의 이용**

[0155] OmpT1 절단 부위를 갖는 변형된 표적 단백질은 활성 OmpT1 프로테아제를 함유하는 박테리아 세포 추출물에서 발현될 때 효율적으로 분해된다. 본 발명의 다양한 용도 중에서, OmpT1에 의해 절단될 수 있게 변형된 억제성 단백질의 신중한 선택은 무세포 합성 시스템의 생산성을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 한 바람직한 용도에서, OmpT1에 의한 선택된 표적 단백질의 절단은 무세포 추출물에서 비-자연 아미노산을 혼입한 전장 단백질의 번역 효율을 개선시킬 수 있다. 특정한 구체예에서, 비-자연 아미노산은 mRNA 주형에 도입된 앰버 코돈에서 혼입된다. 상기 기재된 대로, 앰버 코돈에서의 비-자연 아미노산의 혼입은 RF1 및 RF2와 같은 종결 복합체 단백질에 의해 억제될 수 있다. 따라서, 특히 바람직한 구체예에서, OmpT1에 의한 RF1 및/또는 RF2의 절단 및 불활성화는 앰버 코돈에 비-자연 아미노산을 혼입하도록 공학처리된 단백질의 수율을 증가시킬 수 있다.

[0156] **비-자연 아미노산**

[0157] 상기 기재된 대로, 한 바람직한 용도에서, OmpT1에 의한 변형된 표적 단백질의 분해는 무세포 합성 시스템에 비-자연 아미노산을 혼입한 단백질의 수율을 증가시킨다. 본 발명에 이용되는 비-자연 아미노산은 전형적으로 아미노산의 하나 이상의 화학적으로 변형된 유도체 또는 유사체를 포함하는데, 여기서 화학 구조는 화학식 NH₃-(CR)-COOH를 갖고, 이 때 R은 천연 아미노산을 정의하는 20개의 표준 치환기들 중 어느 하나가 아니다. 적합한 비-자연 아미노산 유도체는 예컨대 Bachem Inc., (Torrance, CA); Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA); Senn Chemicals (Dielsdorf, Switzerland); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); Synthetec, Inc (Albany, OR)와 같은 판매처에서 시판된다. 바람직하게는, 비-자연 아미노산은 글리신, 티로신, 글루타민, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 프롤린, 트립토판, 류신, 메티오닌, 리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 발린, 이소류신, 아스파르

트산, 글루탐산, 시스테인, 히스티딘의 유도체 및/또는 유사체, 뿐만 아니라 베타-아미노산 및 동족체, BOC-보호된 아미노산, 및 FMOC-보호된 아미노산을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0158] 아직 시판되지 않는 비-자연 아미노산 유도체, 유사체 및 미메틱의 생성은 여러 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 한 방법은 당 분야에 공지된 유기 화학 방법을 이용하여 관심 비-자연 아미노산을 합성하는 것인 한편, 또 다른 방법은 당 분야에 공지된 화학효소 합성 방법을 이용하는 것이다. 예컨대, 문헌[Kamphuis *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 672:510-527, 1992; Ager DJ and Fotheringham IG, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 4:800-807, 2001; and Weiner *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 39:1656-1691, 2010; *Asymmetric Syntheses of Unnatural Amino Acids and Hydroxyethylene Peptide Isosteres*, Wieslaw M. Kazmierski, ed., *Peptidomimetics Protocols*, Vol. 23, 1998; and *Unnatural Amino Acids*, Kumar G. Gadamasetti and Tamim Braish, ed., *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, Vol. 2, 2008]을 참조하라.
- [0159] 당업자는 예를 들어 문헌[Wieslaw M. Kazmierski, ed., *Peptidomimetics Protocols*, Vol. 23, 1998; Wang L *et al.*, *Chemistry and Biology*, 16:323-336, 2009; and Wang F, Robbins S, Guo J, Shen W and Schultz PG., *PLoS One*, 5:e9354, 2010]에 기재된 대로, 다수의 절차 및 프로토콜이 비-자연 아미노산의 합성에 이용될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0160] 비-자연 아미노산은 비-자연 L- 및 D-알파 아미노산을 포함할 수 있다. L-알파 아미노산은, 비제한적으로, 알킨과 에틸 이미노아세테이트의 수소화 컨쥬게이션의 로뎀-촉매화된 C-C 결합 형성을 통한 수소-매개된 환원 커플링과 같은 당 분야에 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있다 (Kong *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127:11269-11276, 2005). 대안적으로, 대사 공학에 의한 반합성 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 발효 절차를 이용하여 재-공학처리된 시스테인 생합성 경로를 갖는 이. 콜라이로부터 비-자연 아미노산을 합성할 수 있다. (문헌[Maier TH, *Nature*, 21:422-427, 2003]을 참조하라). 알파-아미노산의 라세미 혼합물은 비대칭 Strecker 합성 (Zuend *et al.*, *Nature*, 461:968-970 (2009)에 기재됨)을 이용하거나 대규모 합성을 위해 트랜스아미나제 효소 (Taylor *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 16:412-419, 1998에서 발견됨)를 이용하여 생성될 수 있다. 바이사이클릭 삼차 알파-아미노산은 사이클릭 에테르 친전자체를 이용한 글리신-유래 Schiff 염기 또는 니트로아세테이트의 알킬화 이후에 NH₄OH에서 산-유도 개환 및 고리화에 의해 생성될 수 있다 (문헌[Strachan *et al.*, *J. Org. Chem.*, 71:9909-9911 (2006)]을 참조하라).
- [0161] 비-자연 아미노산은 대사에 현저하게 안정하고, 느린 미생물 분해를 나타내며, 프로테아제 및 펩티다제에 본질적으로 안정한 베타-아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 베타 아미노산의 합성의 예는 문헌[Tan CYK and Weaver DF, *Tetrahedron*, 58:7449-7461, 2002]에 기재되어 있다.
- [0162] 일부 예에서, 비-자연 아미노산은 비제한적으로 3차-부톡시카르보닐-(Boc) 또는 (9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐 (Fmoc)-보호된 아미노산을 포함하는, 고체상 펩티드 합성에 일반적으로 이용되는 화학적으로 변형된 아미노산을 포함한다. 예를 들어, 류신, 메티오닌, 트레오닌, 트립토판 및 프롤린의 Boc 유도체는 문헌[Saladino *et al.*, *J. Org. Chem.*, 64:8468-8474, 1999]에 기재된 대로 선택적인 3,3-디메틸디옥시란 측쇄 산화에 의해 생성될 수 있다. 알파-아미노산의 Fmoc 유도체는 에틸 니트로아세테이트의 알킬화 및 유도체로의 전환에 의해 합성될 수 있다 (문헌[Fu *et al.*, *J. Org. Chem.*, 66:7118-7124, 2001]을 참조하라).
- [0163] 본 발명에 이용될 수 있는 비-자연 아미노산은 비제한적으로 20개 표준 아미노산 치환기의 비-자연 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 당업자는 다양한 비-자연 아미노산의 합성이 당 분야에 공지된 화학적 및 화학효소적 방법의 배열을 수반할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구체예에서, 비-자연 아미노산은 각각의 비-자연 아미노산의 특정한 유도체에 특이적인 당 분야에 공지된 절차에 따라 합성될 수 있다. 문헌[Sycheva *et al.*, *Microbiology*, 76:712-718, 2007]은 비-자연 아미노산 노르발린 및 노르류신을 합성하는 절차를 기재하고 있다. 디알릴화 프롤린 유도체는 실제 입체선택적 합성에 의해 제조될 수 있다 (문헌[Belvisi *et al.*, *Tetrahedron*, 57:6463-6473, 2001]을 참조하라). 예를 들어, 트립토판 유도체는 문헌[Janczuk *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 43:4271-4274, 2002]에 기재된 인도의 이테르븀 트리플레이트 촉매화된 친전자성 치환에 의해 합성될 수 있고, 5-아릴 트립토판 유도체의 합성은 문헌[Wang *et al.*, *Tetrahedron*, 58:3101-3110, 2002]에 상세되어 있다. 비-자연 세린 유사체는 일차 알코실 라디칼의 베타-단편화에 의해 제조될 수 있다 (문헌[Boto *et al.*, *J. Org. Chem.*, 72:7260-7269, 2007]을 참조하라). 대안적으로, 페닐세린 합성을 위한 절차는 문헌[Koskinen *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 36:5619-5622, 1995]에 기재되어 있다. L-페닐글리신의 합성을 위한 절차는 문헌[Cho *et al.*, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, 11:299-305, 2006]에 기재되어 있다. 그리고 D-4-하이드록시페닐글리신을 합성하기 위한 화학효소적 방법은 문헌[Yu *et al.*, *Folia Microbiol (Praha)*, 54:509-15; 2009]에 기재되어

있다. 2-나프틸알라닌 또는 Boc-보호된 2-나프틸알라닌의 생산의 비제한적인 예는 문헌[Boaz *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 9:472-478; 2005]에 상세되어 있다. 아이오도-L-티로신 및 p-벤조일-L-페닐알라닌의 합성은 문헌[Hino N, *Nat. Protoc.*, 1:2957-2962, 2007]에 기재되어 있다.

[0164] **적재된 tRNA**

[0165] 요망되는 폴리펩티드에 본원에 기재된 비-자연 아미노산을 혼입시키기 위해, 상기 기재된 aa는 이소억셉팅 센스 또는 앰버 코돈 tRNA에 적재되어야 한다. 본원에서 사용되는 tRNA 적재 반응은 요망되는 이소억셉팅 센스 코돈 또는 앰버 코돈 tRNA가 이들의 개별적인 관심 아미노산으로 아미노아실화되는 시험관내 tRNA 아미노아실화 반응을 지칭한다. tRNA 적재 반응은 이소억셉팅 센스 tRNA인 적재 반응 혼합물을 포함하고, 본 발명에서 사용되는 대로, 천연 또는 비-자연 아미노산을 포함할 수 있다. tRNA 적재 반응은 무세포 번역 반응과 동일한 반응에서 동일반응계내 발생할 수 있거나, 적재된 tRNA가 그 후 무세포 번역 반응에 첨가되는 분리된 반응에서 발생할 수 있다.

[0166] tRNA 적재 반응에 이용되는 tRNA 분자는 적합한 5' 및 3' 프라이머의 존재하에 PCR에 의한 증폭 이후에 선택된 임의의 tRNA에 대한 합성 DNA 주형으로부터 합성될 수 있다. 그 후 T7-프로모터 서열을 함유하는 생성된 이중가닥 DNA 주형은 T7 RNA 중합효소를 이용하여 시험관내 전사되어 tRNA 분자를 생성할 수 있고, 이는 후속하여 tRNA 적재 반응에 첨가된다.

[0167] tRNA 적재 반응은 단백질 합성 반응으로부터 분리된 요망되는 아미노산으로 센스 코돈 또는 앰버 코돈 tRNA 분자를 아미노아실화하는 임의의 반응일 수 있다. 이러한 반응은 추출물, 인공 반응 혼합물, 또는 둘 모두의 조합물에서 발생할 수 있다. 적합한 tRNA 아미노아실화 반응 조건은 당업자에게 널리 알려져 있다. 전형적으로, tRNA 아미노아실화는 6.5 내지 8.5 범위의 pH 값, 0.5-10 mM 고에너지 포스페이트 (예컨대 ATP), 5-200 mM MgCl₂, 20-200 mM KCl을 갖는 생리학적 완충제에서 수행된다. 바람직하게는, 반응은 환원제 (예컨대 0-10 mM 디티오프레이톨)의 존재하에 수행된다. 아미노아실-tRNA 합성효소가 외생적으로 첨가되는 경우, 합성효소의 농도는 전형적으로 1-100 nM이다. 당업자는 이러한 조건이 tRNA 아미노아실화를 최적화하기 위해, 예컨대 미리 선택된 아미노산에 대한 높은 특이성, 높은 수율, 및 가장 낮은 교차 반응성을 위해 변화될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다.

[0168] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 이소억셉팅 또는 앰버 tRNA는 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 적재된다. tRNA 적재 반응은 적재되는 이소억셉팅 센스 tRNA에 특이적인 자연 아미노아실-tRNA 합성효소, 공학처리된 아미노아실-tRNA 합성효소, 또는 하나를 초과하는 유형의 아미노산을 tRNA 분자에 적재할 수 있는 "뒤섞인 (promiscuous)" 아미노아실 tRNA 합성효소를 이용할 수 있다. 뒤섞인 아미노아실-tRNA 합성효소는 그 자체로 공학처리될 수 있거나, 때로 자연에서 발견되는 내생적으로 생성되는 아미노아실-tRNA 합성효소를 포함할 수 있다. 아미노아실-tRNA 합성효소를 이용하여 이소억셉팅 tRNA에 자연 및 비-자연 아미노산을 적재하는 방법은 그 내용이 본원에 참조로서 포함되는 W02010/081110호에 기재되어 있다.

[0169] **번역 시스템**

[0170] 상기 기재된 적재된 이소억셉팅 센스 또는 앰버 tRNA는 이제 미리 선택된 (소정) 위치에 비-자연 아미노산을 갖는 요망되는 폴리펩티드 또는 단백질의 합성을 위한 핵산 주형과 더불어, 무세포 추출물, 세포 용해물, 또는 재구성된 번역 시스템을 포함할 수 있는 번역 시스템과 조합된다. 반응 혼합물은 아미노산, 뉴클레오타이드 등과 같은 합성하려는 거대분자에 대한 모노머, 및 리보솜, tRNA, 중합효소, 전사 인자 등과 같은 합성에 필요한 그러한 보조인자, 효소 및 다른 시약을 추가로 포함할 것이다. 무세포 추출물, 핵산 주형, 및 아미노산과 같은 상기 구성요소에 추가하여, 단백질 합성에 특히 요구되는 물질을 반응에 첨가할 수 있다. 상기 물질은 염, 폴린산, 사이클릭 AMP, 단백질 또는 핵산 분해 효소에 대한 억제제, 단백질 합성의 억제제 또는 조절제, 산화/환원 전위의 조절제, 비-변성 계면활성제, 완충제 구성요소, 스페르민, 스페르미딘, 푸트레신 등을 포함한다. 다양한 무세포 합성 반응 시스템은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예컨대 문헌[Kim, D.M. and Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 66:180-8 (1999); Kim, D.M. and Swartz, J.R. *Biotechnol. Prog.* 16:385-90 (2000); Kim, D.M. and Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 74:309-16 (2001); Swartz *et al.*, *Methods Mol Biol.* 267:169-82 (2004); Kim, D.M. and Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 85:122-29 (2004); Jewett, M.C. and Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:19-26 (2004); Yin, G. and Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:188-95 (2004); Jewett, M.C. and Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 87:465-72 (2004); Voloshin, A.M. and Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 91 :516-21 (2005)]을 참조하라. 요망되는 폴리펩티드의 무세포 합성

에 대한 추가 조건은 그 전문이 본원에 참조로서 포함되는 WO2010/081110호에 기재되어 있다.

[0171] 일부 구체예에서, DNA 주형은 시험관내 단백질 합성을 수행하는데 이용되고, RNA 중합효소는 DNA 주형의 향상된 전사를 제공하기 위해 반응 혼합물에 첨가된다. 본원에 사용하기 적합한 RNA 중합효소는 박테리아 추출물이 유래되는 박테리아에서 기능하는 임의의 RNA 중합효소를 포함한다. 다른 구체예에서, RNA 주형은 시험관내 단백질 합성을 수행하는데 이용되고, 반응 혼합물의 구성요소는 임의의 편리한 순서로 함께 혼합될 수 있지만, RNA 주형이 마지막에 첨가되어 뉴클레아제에 의한 RNA 주형의 가능한 분해가 최소화되는 순서로 혼합하는 것이 바람직하다.

[0172] 무세포 번역 시스템

[0173] 무세포 단백질 합성은 세포 기구의 촉매력을 활용할 수 있다. 시험관내 최대 단백질 수율은 수득하려면 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 아미노산과 같은 적절한 기질 공급, 항상성 환경, 촉매 안정성, 및 억제성 부산물의 제거 또는 회피가 필요하다. 시험관내 합성 반응의 최적화는 빠르게 성장하는 유기체의 생체내 상태를 재생성하는 것으로부터 혜택을 받는다. 본 발명의 일부 구체예에서, 따라서 무세포 합성은 산화성 포스포릴화가 활성화되는 반응, 즉 CYTOMIM™ 시스템에서 수행된다. CYTOMIM™ 시스템은 폴리에틸렌 글리콜의 부재하에 최적화된 마그네슘 농도를 이용한 반응 조건을 이용하여 정의된다. CYTOMIM™ 시스템은 단백질 합성을 억제하는 것으로 알려진 포스페이트를 축적하지 않는 반면, 통상적인 이차 에너지원은 포스페이트 축적을 일으킨다. CYTOMIM™ 시스템의 다양한 다른 특징들은 그 전문이 본원에 참조로서 포함되는 미국특허 7,338,789호에 개시된다.

[0174] 활성 산화성 포스포릴화 경로의 존재는 포스포에놀피루베이트, 크레아틴 포스페이트, 아세틸 포스페이트, 또는 당분해 중간체, 예컨대 글루코스, 글루코스-6-포스페이트, 및 피루베이트와 같은 이차 에너지원에 대한 요구의 결여에 의해 입증될 수 있다. 활성 산화성 포스포릴화 경로의 존재는 또한 전자 운반 사슬 억제제와 같은 억제제에 대한 경로의 민감성에 의해 입증될 수 있다. 전자 운반 사슬 억제제의 예는 2-헵틸-4-하이드록시퀴놀린-N-옥사이드 (HQNO), 2,4-디니트로페놀, 시아나이드, 아지드, 테노일트리플루오로아세톤, 및 카르보닐-시아나이드- α -클로로페닐하이드라존을 포함한다. 대안적으로, 한 구체예에서, 무세포 번역 시스템은 활성 산화성 포스포릴화 경로를 포함하지 않는다.

[0175] 시험관내, 또는 무세포, 단백질 합성은 통상적인 생체내 단백질 발현 방법에 비해 여러 이점을 제공한다. 무세포 시스템은 한 단백질의 독점적인 생산을 향해 세포의 대사 자원 단백질의 전부는 아니지만 대부분을 유도할 수 있다. 더욱이, 시험관내 세포벽 및 막 구성요소의 결여는 합성 환경의 제어를 가능케 하므로 유리하다. 예를 들어, tRNA 수준은 발현되는 유전자의 코돈 사용을 반영하도록 변화될 수 있다. 산화환원 전위, pH, 또는 이온 세기는 또한 세포 성장 또는 생존력의 문제가 존재하지 않으므로 생체내 단백질 합성보다 큰 유연성으로 변경될 수 있다. 더욱이, 정제되고, 적당하게 폴딩된 단백질 생성물의 직접 회수가 용이하게 달성될 수 있다.

[0176] 무세포 시스템의 생산성은 최근 약 5 $\mu\text{g/ml-hr}$ 에서 약 500 $\mu\text{g/ml-hr}$ 으로, 수백 배 넘게 향상되었다. 그러한 향상은 실험실-규모 연구를 위한 실제 기술인 시험관내 단백질 합성을 이루었고 높은-처리량 단백질 발현에 대한 플랫폼 기법을 제공한다. 이는 추가로 단백질 의약품의 생체내 대규모 상업적 생산에 대한 대안 수단으로서 무세포 기법의 사용에 대한 가능성을 나타낸다.

[0177] 용해물의 생성

[0178] 본 발명은 표적 단백질의 시험관내 번역을 위해 세포 용해물을 이용한다. 편의상, 용해물에 대한 공급원으로 이용되는 유기체를 공급 유기체 또는 숙주 세포로 지칭할 수 있다. 숙주 세포는 박테리아, 효모, 포유동물 또는 식물 세포, 또는 단백질 합성이 가능한 임의의 다른 유형의 세포일 수 있다. 용해물은 요망되는 단백질을 엔코딩하는 메신저 리보핵산 (mRNA)을 번역할 수 있는 구성요소를 포함하고, 임의로 요망되는 단백질을 엔코딩하는 DNA를 전사시킬 수 있는 구성요소를 포함한다. 그러한 구성요소는, 예를 들어, DNA-유도 RNA 중합효소 (RNA 중합효소), 요망되는 단백질을 엔코딩하는 DNA의 전사를 개시하는데 필요한 임의의 전사 활성화제, 트랜스퍼 리보핵산 (tRNA), 아미노아실-tRNA 합성효소, 70S 리보솜, N^{10} -포르밀테트라하이드로폴레이트, 포르밀메티오닌-tRNA^{Met} 합성효소, 펩티딜 트랜스퍼라제, 개시 인자, 예컨대 IF-1, IF-2, 및 IF-3, 신장 인자, 예컨대 EF-Tu, EF-Ts, 및 EF-G, 방출 인자, 예컨대 RF-1, RF-2, 및 RF-3 등을 포함한다.

[0179] 구체예는 용해물이 유래되는 박테리아 세포를 이용한다. 임의의 균주의 박테리아로부터 유래되는 박테리아 용해물이 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 박테리아 용해물은 다음과 같이 수득될 수 있다. 선택된 박테리아는 다수의 임의의 성장 배지에서 특정한 박테리아의 성장을 위해 당 분야에 잘 알려지고 실무자에 의해 용이하

게 최적화되는 성장 조건하에 발효 성장한다. 예를 들어, 합성을 위한 천연 환경은 글루코스 및 포스페이트를 함유하는 배지에서 성장한 박테리아 세포로부터 유래되는 세포 용해물을 이용하며, 여기서 글루코스는 적어도 약 0.25% (중량/부피), 보다 일반적으로 적어도 약 1%의 농도로 존재하고; 보통 약 4%를 넘지 않고, 더욱 일반적으로 약 2%를 넘지 않는다. 그러한 배지의 예는 2YTPG 배지이지만, 당업자는, 정의되고 정의되지 않은 둘 모두의 영양소 공급원을 이용하는, 이. 콜라이와 같은 박테리아의 성장에 적합한 수많은 공개된 배지가 존재하는 바와 같이, 많은 배양 배지가 이러한 목적에 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 발효 회수된 세포는, 세포 펠렛을 적합한 세포 현탁 배지에 현탁시키고, 초음파처리에 의해 현탁된 세포를 파괴하여, 현탁된 세포를 프렌치 프레스, 연속적인 흐름 고압 균질화, 또는 효율적인 세포 용해에 유용한 당 분야에 공지된 어떠한 다른 방법으로 파괴시킴에 의해 용해될 수 있다. 그 후 세포 용해물을 원심분리하거나 여과시켜 큰 DNA 단편을 제거한다.

[0180] 실시예

[0181] 실시예 1

[0182] 본 실시예는 OmpT1 프로테아제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 도입하기 위한 RF1 단백질의 변형을 기재한다.

[0183] 방법:

[0184] OMPT1 절단 부위를 RF1에 도입하기 위한 주형의 작제

[0185] PCR 기반 전략 전략을 이용하여 본원에 기재된 변형된 RF1 단백질을 엔코딩하는 핵산 주형에 요망되는 뉴클레오타이드 서열 변화를 도입하였다. Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (NEB)를 이용하여 제조자가 제안한 프로토콜에 따라 PCR 반응을 수행하였다. 일반적으로 2-단계 중첩 PCR을 수행하여, 하기에 보다 상세하게 기재된 대로, OmpT 절단 돌연변이를 RF1 엔코딩 유전자에 도입하였다. PCR 생성된 DNA 주형을 무세포 발현에 응용하기 위해 QIAquick PCR 정제 키트(QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. PCR 정제 후 변이체를 Mclab (South San Francisco, CA)에 의해 서열화하여 예상하는 돌연변이의 존재를 확인하였다.

[0186] 무세포 반응에서 DNA 주형의 분해를 방지하기 위한 GamS 단백질의 제조

[0187] DNA 주형으로부터의 전사 효율은 무세포 추출물에 존재하는 내인성 박테리아 엑소뉴클레아제에 의한 주형의 분해로 인해 감소될 수 있다. λ 파지 Gam 단백질 (GamS)의 짧은 형태는 RecBCD (엑소뉴클레아제 V)의 활성을 억제함에 의해 분해로부터 DNA 주형을 보호하는 것으로 알려져 있다 (문헌[Sitararman, K., Esposito, D., Klarmann, G., Grice, S. F. L., Hartley, J. L. and Chatterjee, D. K. 2004, A Novel Cell-free Synthesis System. J Biotechnol. 110: 257-263]을 참조하라). 따라서, GamS 단백질은 무세포 전사 반응 동안 PCR 주형을 안정화시키기 위해 본 실시예에 사용되었다. 제조된 GamS 단백질을 생성하기 위해, 프라이머 5'-ATATATCATATGAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAG-3' (SEQ ID NO:51), 및 5'-ATATATGTCGACTTAATGATGATGATGATGATGAGAACCCCTACCTCTGAATCAATATCAACCTGGTGGTG-3' (SEQ ID NO:52)에 의해 pKD46 (Datsenko, K. A. and Wanner, B. 2000, One-step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645)을 주형으로서 이용하여 GamS 유전자를 증폭시켜 C-말단 폴리-히스티딘 태그, GGSHHHHHH (SEQ ID NO:50)를 포함시켰다. GamS 유전자를 NdeI/SalI 제한 부위에서 무세포 발현 플라스미드 pYD317로 서브클로닝시켰다. GamS를 시험관내 발현시키고 90% 초과로 순도로 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC)에 의해 정제하였다 (데이터는 제시되지 않음). GamS 단백질을 -70°C에서 저장한 후 160mM 포타슘 아세테이트, 200 mM 소듐 클로라이드 및 10% 수크로스를 또한 함유하는 100mM 트리스-아세테이트 완충제 (pH 8.2)에서 이용하였다.

[0188] 박테리아 균주 및 플라스미드

[0189] SBJY001은 열린 무세포 단백질 생산에 최적화된 이. 콜라이 K12 유도체이다. SBJY001은 유도성 아라비노스 프로모터 하에 파지 λ Red 재조합효소 유전자를 함유하는 플라스미드 pKD46 (Coli Genetic Stock Center)으로 형질전환되었다.

[0190] SBHS002의 작제

[0191] SBHS002는 P1 형질도입을 이용하여 생성된 ompT 결실 이. 콜라이 균주이다. P1 용해물은 FRT 부위의 옆에 ompT::Kan^R 돌연변이를 함유하는 Keio 총괄 균주인 JW0554-1 (CGSC#8680)로부터 제조되었다. 그 후 JW0554-1 P1 용해물을 이용하여 P1 형질도입에 의해 SBJY001에 돌연변이를 도입시켰다. 콜로니는 30 μ g/ml의 카나마이

신을 지닌 LB 상에서 성장하여 카나마이신 내성에 대해 선택되었다. SBJY001ompT::Kan^R은 708-FLPe Cm^R 발현 플라스미드 (Gene Bridges)로 형질전환되었다. FLP 합성을 유도하고 콜로니를 카나마이신 내성의 손실에 대해 스크리닝하였다. 카나마이신 내성 콜로니를 서열화하여 ompT의 결실을 확인하였다. ompT 결실 균주를 SBHS002라고 지칭한다.

[0192] **N-말단 His-태깅된 RF1의 클로닝 및 발현**

[0193] N-말단 His-Tag 및 NdeI/SalI 제한 부위를 도입시킨 프라이머 5His-RF1: CATATGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGCTCTAAGCCTTCTATCGTTGCCAACTGGAAGCC (SEQ ID NO:138) 및 3RF1: GTCGACTTATTCCTGCTCGGACAACGCCGCCAG (SEQ ID NO:139)를 이용하여 RF1을 이. 콜라이 균주 A19 유전체 DNA로부터 증폭시켰다. 삽입물을 발현 벡터 pYD317로 라이게이션하고 서열화에 의해 확인하였다. RF1을 25 mL의 무세포 반응으로 플라스미드를 이용하여 발현하고, IMAC에 의해 정제하고, 완충제를 PBS로 교환하였다.

[0194] **무세포 추출물을 이용한 재조합 RF1 변이체의 절단**

[0195] 본원에 기재된 변형된 RF1 단백질이 OmpT에 의해 절단가능한 지를 시험하기 위해, 재조합 RF1 변이체를 OmpT와 함께 또는 OmpT 없이 세포 추출물과 인큐베이션시켰다. 외막에 무손상 ompT 프로테아제를 갖는 SBJY001 세포, 및 ompT가 결실된 SBHS002를 5 mL의 LB에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 50 µL의 각 배양액을 8,000rpm에서 2 분 동안 스핀 다운시키고 10 mM 트리스, 20 mM 암모늄 클로라이드 및 10 mM 마그네슘 클로라이드로 2회 세척하였다. 그 후 세포 펠렛을 50µL의 완충제에 재현탁시키고 10 µg의 정제된 재조합 이. 콜라이 RF1 단백질을 첨가하였다. 샘플을 37°C에서 인큐베이션하였다. 샘플을 8,000rpm에서 2분 동안 스핀 다운시켰다. RF1 단백질을 함유하는 상청액을 제거하고, SDS-PAGE 겔에서 진행시켰다.

[0196] **RF1 변이체의 무세포 발현**

[0197] 무세포 전사/번역 반응을 60 µl의 부피로 30°C에서 24 덤벨 플레이트 (Cat.No.95040470, Thermo Scientific)에서 4.5시간 동안 수행하였다. RF1 변이체 발현을 위한 PCR 주형 농도는 10 µg/ml였다. 반응 조성물은 8mM 마그네슘 글루타메이트, 130mM 포타슘 글루타메이트, 35mM 소듐 피루베이트, 1.2mM AMP, 각각 0.86mM의 GMP, UMP 및 CMP, 4mM 소듐 옥살레이트, 1mM 푸트레신, 1.5mM 스페르미딘, 15mM 포타슘 포스페이트, 1mM 티로신, 각각 2mM의 19개의 다른 아미노산, 100nM T7 RNA 중합효소, 30% (V/V) S30 세포-추출물도 포함하였다. 디설파이드 형성을 촉진하기 위해, S30 세포 추출물을 무세포 반응 전에 30분 동안 실온에서 50 µM IAM으로 처리하였다. 2mM 산화된 글루타티온 (GSSG) 및 1mM 환원된 글루타티온 (GSH)의 혼합물에 4.3 µM 이. 콜라이 디설파이드 이소머라제 DsbC도 첨가하였다. 무세포 발현된 RF1 변이체를 SDS-PAGE 및 오토라디오그래프로 분석하기 위해, 반응을 미량의 [¹⁴C]-류신 (300 µCi/mole; GE Life Sciences, NJ)의 존재하에 수행하였다. RF1 변이체는 박테리아 균주 SBJY001로부터 제조된 OmpT-양성 (OmpT+) 세포-추출물, 또는 박테리아 균주 SBHS002 (SBJY001ΔompT)로부터 제조된 OmpT-음성 (OmpT-) 세포-추출물에서 발현되었다. 무세포 반응에서 PCR 주형을 안정화시키기 위해, 1.4 µM GamS 단백질을 또한 첨가시켜 RecBCD의 활성을 억제하였다.

[0198] **SDS-PAGE 및 오토라디오그래피**

[0199] 변형된 RF1 단백질이 OmpT에 의해 절단가능한 지를 결정하기 위해, 상기 기재된 무세포 반응에서 번역된 RF1 단백질을 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피에 의해 분석하였다. ¹⁴C로 표지된 무세포 반응 샘플을 bench top 원심분리기에서 최대 속도로 원심분리하고, 4 µL의 상청액을 Invitrogen SDS-PAGE 샘플 로딩 완충제 및 물과 혼합시켰다. 샘플을 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE 겔에 로딩시키고, MES 진행 완충제로 약 45분 동안 진행시켰다. 그 후 겔을 건조시키고, 형광면(63-0034-86, GE healthcare, USA)에 밤새 노출시킨 후, Storm 460 (GE healthcare, USA)을 이용하여 스캔하였다.

[0200] **RF1로 OmpT 절단 부위의 도입**

[0201] RF1 서열에서 잠재적인 OmpT 절단 부위를 확인하기 위해, 단일한 Arg 또는 Lys 돌연변이를 기존의 Arg 또는 Lys 옆에 있는 RF1의 상이한 루프 영역에 도입시켰다. 루프 영역은 원핵생물 클래스 I 방출 인자의 서열 정렬에 기반하여 예측되었다 (문헌[Graille, M., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Scrima, N., Ulryck, N., Tilbeurgh, H. and Buckingham, R. H. 2005, Molecular Basis for Bacterial Class I Release Factor Methylation by PrmC. *Molecular Cell*. 20: 917-927]을 참조하라). 요망되는 변이체를 생성하기 위해, 돌연변이 서열은 정방향 및 역방향 올리고 프라이머의 중간에 설계되었다 (표 1). 제 1 단계 PCR에서, 5'-단편을 5chiT2PT7, 5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGACAGG-3' (SEQ ID NO:53), 및 역방향

프라이머 (표 1)를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 5' 단편은 T7 프로모터, N-말단 서열의 불변 영역 및 돌연변이 부위를 포함하였다. 3'-단편을 또한 정방향 프라이머 (표 1) 및 3chiT2TT7, 5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCGGTGAGTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGC-3' (SEQ ID NO:54)을 이용하여 제 1 단계에서 증폭시켰다. 3' 단편은 돌연변이 부위, 불변 C-말단 영역 및 T7 종결자 서열을 포함하였다. 제 2 단계 PCR에서, 5'-단편 및 3'-단편 DNA를 중첩 PCR에 의해 단일 프라이머 5chiT2,5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGG-3' (SEQ ID NO:55)를 이용하여 어셈블링하였다.

[0202] 먼저, 9개의 단일한 돌연변이 M74R, E76R, E84R, A85R, E87R, E108R, T293R, N296K 및 S304R을 기존의 Arg 또는 Lys 옆에 있는 루프 영역에 도입시켰다 (표 2). 이러한 RF1 변이체 및 WT RF1을 OmpT와 함께 또는 OmpT 없이 무세포 추출물에서 PCR 주형을 이용하여 발현시켰다. RF1 단백질을 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피에 의해 분석하였다. OmpT 음성 세포-추출물에서 발현될 때, 10개 모두의 RF1 변이체는 SDS-PAGE 상에서 완전한 전장 단백질을 나타내었다. 그러나, OmpT를 함유하는 세포-추출물에서 발현될 때, 변이체 N296R은 부분적으로 분해되는 한편 다른 변이체들은 분해되지 않은 전장 단백질에서 예상되는 바와 같이 이동하였다. N296은 RF1의 스위치 루프 영역에 위치하는데, 이는 프로테아제 분해에 의한 접근에 유연하고 용이하다.

[0203] 제 1 라운드의 스크리닝에서, 세포-추출물에서 OmpT에 의한 부분적인 분해를 위해 N296K가 선택되었다. 제 2 라운드의 스크리닝에서, 이중 돌연변이체 및 삼중 돌연변이체의 PCR 주형은 표 1에 나열된 프라이머와 상기 기재된 동일한 방법을 이용하여 생성되었다. 6개의 이중 돌연변이체 N296K/L297V, N296K/L297K, N296K/L297R, N296R/L297V, N296R/L297K, N296R/L297R, 및 2개의 삼중 돌연변이체 N296K/L297R/L298K 및 N296K/L297R/L298R (표 2)를 OmpT와 함께 또는 OmpT 없이 무세포 발현으로 시험하였다. 8개 모두의 이중 및 삼중 RF1 돌연변이체는 OmpT1에 의해 절단되었다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 변이체 중에서, N296K/L297R/L298R이 OmpT에 의한 분해에 가장 민감하였다.

[0204] 표 1. OmpT 절단 부위 스크리닝에 사용된 정방향 및 역방향 프라이머 서열

RF1 변이체	정방향	SEQ ID NO:
WT	GCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCGCAGG	56
M74R	GCTCGATGATCCTGAA <u>CGC</u> CGTGAGATGGCGCAGG	57
E76K	CGATGATCCTGAAATGCGTAAGATGGCGCAGGATGAAC	58
E84K	CAGGATGAACTGCGCAAAGCTAAAGAAAAAGCGAGCAAC	59
A85R	CAGGATGAACTGCGCGAACGTAAAGAAAAAGCGAGCAAC	60
E87R	GGATGAACTGCGCGAAGCTAAACGTAAGCGAGCAACTGGAAC	61
E108R	GCCAAAAGATCCTGATGACCGTCGTAACGCCTTCCTCG	62
T293R	CAACAGGCCGAAGCGTCTCGCCGTCGTAACCTGC	63
N296K	GCGTCTACCCGTCGTAACTGCTGGGGAGTGGCG	64
S304K	GGGAGTGGCGATCGCAAGGACCGTAACCGTACTTAC	65
N296K/L297V	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	66
N296K/L297K	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAAAGTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	67
N296K/L297R	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	68
N296R/L297V	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	69
N296R/L297K	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGCAAGTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	70
N296R/L297R	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGCGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	71
N296K/L297R/L298K	CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTAAGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC	72
N296K/L297R/L298R	CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTCGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC	73
역방향		
WT	CCTGGCCATCTCACGCATTTAGGATCATCGAGC	74
M74R	CCTGGCCATCTCACGCGTTAGGATCATCGAGC	75
E76K	GTTTCATCTGCGCCATCTTACGCATTTAGGATCATCG	76
E84K	GTTGCTCGCTTTTTCTTTAGCTTTCGCGAGTTCATCCTG	77
A85R	GTTGCTCGCTTTTTCTTTACGTTTCGCGAGTTCATCCTG	78
E87R	GTTCCAGTTGCTCGCTTTACGTTTAGCTTCGCGAGTTCATCC	79
E108R	CGAGGAAGGCGTTACGACGCTCATCAGGATCTTTGGC	80
T293R	GCAGGTTACGACGCGAGACGCTTCGGCCTGTTG	81
N296K	CGCCACTCCCAGCAGTTTACGACGGGTAGACGC	82
S304K	GTAAGTACGGTTACGGTCCTTGCGATCGCCACTCCC	83
N296K/L297V	GCTGCGATCGCCACTCCCAGAACTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	84
N296K/L297K	GCTGCGATCGCCACTCCCAGCTTTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	85
N296K/L297R	GCTGCGATCGCCACTCCCAGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	86
N296R/L297V	GCTGCGATCGCCACTCCCAGAACGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	87
N296R/L297K	GCTGCGATCGCCACTCCCAGCTTGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	88
N296R/L297R	GCTGCGATCGCCACTCCCAGACGGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	89
N296K/L297R/L298K	GGTCGCTGCGATCGCACTCCCCTTACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG	90
N296K/L297R/L298R	GGTCGCTGCGATCGCACTCCCCTGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG	91

[0205]

[0206] *돌연변이 서열은 밑줄로 표시된다.

[0207] 표 2. RF1의 단일, 이중 및 삼중 치환 변이체

번호	단일 치환 변이체
A-1	M74R
A-2	E76K
A-3	E84K
A-4	A85R
A-5	E87R
A-6	E108R
A-7	T293R
A-8	N296K
A-9	S304K
	이중 치환 변이체
A-11	N296K/L297V
A-12	N296K/L297K
A-13	N296K/L297R
A-14	N296R/L297V
A-15	N296R/L297K
A-16	N296R/L297R
	삼중 치환 변이체
A-17	N296K/L297R/L298K
A-18	N296K/L297R/L298R

[0208]

[0209] RF1의 스위치 루프 영역으로 OmpT 절단 펩티드의 삽입

[0210] 상기 기재된 아미노산 돌연변이를 도입시키기 위해, RF1은 또한 스위치 루프 영역의 야생형 서열을 공지된 OmpT 프로테아제-민감성 펩티드 서열로 교체하도록 변형된다 (문헌[Hwang, B., Varadarajan, N., Li, H., Rodriguez, S., Iverson, B. L. and Georgiou, G. 2007, Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpP. *J. Bacteriol.* 189: 522-530; McCarter, J. D., Stephens, D., Shoemaker, K., Rosenberg, S., Kirsch, J. F. and Georgiou, G. 2004, Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpT. *J. Bacteriol.* 186: 5919-5925]을 참조하라). 22개의 RF1 변이체를 작제하였고, 이를 표 3에 열거한다. 변이체 1 내지 14번은 OmpT 분해를 위해 ARRG (SEQ ID NO:47)를 함유하였다. 변이체 15번은 ARRG (SEQ ID NO:47) 대신 ARR를 함유하였는데, 그 이유는 이것이 스위치 로프의 끝에 있기 때문이다. 변이체 16번은 단일 돌연변이 N296R을 함유하였다. 변이체 17, 18 및 19번은 OmpT 절단 펩티드 WLAARRGRG (SEQ ID NO:48)를 함유하였다. 변이체 20, 21 및 22번은 또 다른 OmpT 절단 펩티드 WGRWARKKGTI (SEQ ID NO:49)를 함유하였다.

[0211] 돌연변이 서열은 표 4에 나열된 정방향 및 역방향 올리고 프라이머에서 설계되었다. 제 1 단계 PCR에서, 5'-단편은 PCR에 의해 프라이머 5chiT2PT7 및 역방향 프라이머 (표 4)를 이용하여 증폭되었다. 5' 단편은 T7 프로모터, N-말단 서열의 불변 영역 및 돌연변이 부위를 포함하였다. 3'-단편은 또한 제 1 단계에서 정방향 프라이머 (표 3) 및 3chiT2TT7을 이용하여 증폭되었다. 3' 단편은 돌연변이 부위, 불변 C-말단 영역 및 T7 종결자 서열을 포함하였다. 제 2 단계 PCR에서, 5'-단편 및 3'-단편 DNA를 중첩 PCR에 의해 상기 기재된 단일 프라이머 5chiT2를 이용하여 어셈블링하였다.

[0212] 22개의 RF1 변이체 (표 3)를 OmpT와 함께 또는 OmpT 없이 세포-추출물에서 PCR 주형을 이용하여 발현시켰다. ARRG (SEQ ID NO:47) 삽입 변이체 중에서, 9번이 OmpT 분해에 가장 높은 민감성을 나타내었다. OmpT 절단 펩티드 WLAARRGRG (SEQ ID NO:48)를 함유한 변이체 17, 18 및 19번은 OmpT에 의해 부분적으로 분해되었다. 그러나, 이들은 OmpT 절단 펩티드 WGRWARKKGTI (SEQ ID NO:49)를 함유한 변이체 20, 21 및 22번보다 훨씬 덜 민감하였다. 변이체 9, 20, 21 및 22번은 이러한 22개의 작제물에서 OmpT 분해에 가장 민감한 RF1 변이체로서 선택되었다.

[0213] 표 3. RF1의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열

번호	펩티드**	SEQ ID NO:
*0	QQAEASTRRNLLGSGDRS	4
1	QARRGSTRRNLLGSGDRS	26
2	QQARRGTRRNLLGSGDRS	27
3	QQAARRGRNLLGSGDRS	28
4	QQAEARRGRNLLGSGDRS	29
5	QQAEAAARRGNLLGSGDRS	30
6	QQAEASARRGLLGSGDRS	31
7	QQAEASTARRGLGSGDRS	32
8	QQAEASTRARRGGSGDRS	33
9	QQAEASTRRARRGSGDRS	34
10	QQAEASTRRNARRGGDRS	35
11	QQAEASTRRNLARRGDRS	36
12	QQAEASTRRNLLARRGRS	37
13	QQAEASTRRNLLGARRGS	38
14	QQAEASTRRNLLGSARRG	39
15	QQAEASTRRNLLGSGARR	40
16	QQAEASTRRRLLGSGDRS	6
17	QQAWLAARRGRGGSGDRS	41
18	QQAEWLAARRGRGGSGDRS	42
19	QQAEAWLAARRGRGGDRS	43
20	QQWGGRWARKKGTIGDRS	44
21	QQAWGGRWARKKGTIDRS	45
22	QQAEWGGRWARKKGTIRS	46

[0214]

[0215] *WT 스위치 루프 펩티드 서열 (Q287 내지 S304)

[0216] **삽입된 아미노산 또는 펩티드 서열은 밑줄로 표시된다.

[0217] 표 4. OmpT 절단 펩티드 삽입을 위한 정방향 및 역방향 프라이머 서열

표 4	정방향	SEQ ID NO:
0	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	92
1	GCCGCGGCTTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	93
2	GCCGCGGCTTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	94
3	GCCGCGGCTTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	95
4	GCCGAAGCAGCGCGTGGTCTGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	96
5	GCCGAAGCGGCGACGCGTGGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	97
6	GCCGAAGCGTCTGACGCGGCTGGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	98
7	GCCGAAGCGTCTACCCGCGACGCGTGGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	99
8	GCCGAAGCGTCTACCCGCGACGCGTGGTGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	100
9	GCCGAAGCGTCTACCCGCGTCTGACGCGGCTGGTAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	101
10	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACGCGACGCGTGGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	102
11	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGGCAGCGCGTGGTGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	103
12	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGCAGCGCGTGGTGGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	104
13	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGGCGACGCGTGGTAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	105
14	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCAGCGCGTGGTGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	106
15	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGCGACGCGTGGTGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	107
16	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTCGTCGCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	108
17	GCCTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	109
18	GCCGAATGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	110
19	GCCGAAGCGTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	111
20	TGGGGTGGCGGTTGGGCTCGCAAGAAAGTACTATTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	112
21	GCCTGGGGTGGCGGTTGGGCTCGCAAGAAAGTACTATTGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	113
22	GCCGAATGGGGTGGCGGTTGGGCTCGCAAGAAAGTACTATTGCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACTTCCCG	114

[0218]

	역방향	
0	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	115
1	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACACCGGCGTGCTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	116
2	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACGACGGGTACACGGCGTGCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	117
3	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACGACGACACCGGCGTGCGGCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	118
4	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACGACACCGGCGTGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	119
5	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGGTTACACGGCGTGCGGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGC ATTTCAGCAGC	120
6	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGACACCGGCGTGACAGCCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	121
7	GCTGCGATCGCCTACCCAGACACCGGCGTGCGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	122
8	GCTGCGATCGCCTACCCACACGGCGTGACGCGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	123
9	GCTGCGATCGCCTACACCGGCGTGACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	124
10	GCTGCGATCGCCTACACGGCGTGCGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	125
11	GCTGCGATACACCGGCGTGCGAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	126
12	GCTGCGACACGGGCGTGCGACGAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	127
13	GCTACACGGGCGTGCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	128
14	ACACGGGCGTGCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	129
15	ACGGGCGTGCGCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	130
16	GCTGCGATCGCCTACCCAGCAGACGACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAG CAGC	131
17	GCTGCGATCGCCTACCCGACGACCGGACGCGCTGCCAGCCAGGCGCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	132
18	GCTGCGATCGCCTGCCACGACCGGACGCGCTGCCAGCCATTGCGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	133
19	GCTGCGATCGCCGACGACCGGACGCGCTGCCAGCCAGCCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	134
20	GCTGCGATCGCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCACTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	135
21	GCTGCGATCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCAGGCGCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	136
22	GCTGCGAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCATTGCGCCTGTTGGCGTTTGGCATTTCAGC AGC	137

[0219]

[0220]

*돌연변이 서열은 밑줄로 표시된다.

[0221]

실시예 2

[0222]

RF1이 OmpT1 프로테아제에 의해 절단가능하게 성공적으로 변형되었는 지가 입증되면, 본 실시예는 변형된 RF1 및 무손상 OmpT1 둘 모두를 발현시키는 재조합 박테리아 균주의 작제를 기재한다. 본 실시예의 목적은 재조합 균주에 의해 발현되는 RF1 변이체가 OmpT1을 발현시키는 재조합 균주로부터의 무세포 추출물에서 절단됨을 나타내기 위한 것이다.

[0223]

올리고뉴클레오티드-매개된 대립유전자 교체

[0224]

본원에 기재된 변형된 RF1 단백질을 발현하는 박테리아 균주를 생성하기 위해, 올리고뉴클레오티드-매개된 대립유전자 교체 (OMAR)를 이용하여 RF1 돌연변이를 박테리아 유전체에 삽입하였다. OMAR 프로토콜은 종래에 보고된 프로토콜 (Wang and Church, *Methods in Enzymology*, 2011, 498, 409-426)로부터 적합화되었다. 간단히 말해, pKD46 플라스미드를 함유하는 SBJY001을 3ml LB 및 50 µg/mL 암피실린에서 30℃에서 OD₆₀₀ 0.3까지 성장시켰다. 그 후 세포를 1 mM L-아라비노스로 37℃에서 45분 동안 유도하였다. 세포 펠렛을 냉 10% 글리세롤로 2X 세척하고, 30 µL 냉 10% 글리세롤에 재현탁시켰다. 5µM의 각 올리고를 재현탁된 세포에 첨가하였다. 합성 올리고 (Integrated DNA Technologies)는 90개 염기 쌍의 길이였고 DNA 복제 동안 뒤진 가닥(lagging strand)을 어닐링하도록 설계되었다 (표 5를 참조하라). 세포를 1800V에서 5 ms 동안 1 mm 큐벳에서 전기천공시켰다. 그 후 이들을 3 mL LB 및 50 µg/ml Amp에 회수하였다. 상기 공정을 13 사이클 동안 반복하였다. 세포를 회식하고 LB 아가 플레이트에 플레이팅하고 37℃에서 밤새 성장시켰다.

[0225] **요망되는 돌연변이를 갖는 박테리아 균주를 확인하기 위한 MAMA PCR**

[0226] 박테리아 콜로니를 적합화된 미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR을 이용하여 스크리닝함으로써 RF1에 요망되는 돌연변이를 갖는 균주를 확인하였다 (Cha et. Al, *PCR Methods and Applications*, 1992, 2, 14-20). 간단히 말해, 보편적인 5' 프라이머를, 돌연변이체와 WT 콜로니를 구별하기 위해 각 돌연변이에 특이적인 3' 프라이머와 함께 이용하였다 (표 5를 참조하라). 올리고는 Eurofins MWG Operon에 주문하였다. Platinum® Blue PCR Supermix (Invitrogen)를 이용하여 MAMA PCR을 진행시켰다. PCR은 95℃ 3min, 30x (95℃ 15sec, 58℃ 20sec, 72℃ 1 min) 및 72℃ 5 min으로 진행되었다. PCR 생성물을 96 웰 E-겔 (Invitrogen) 상에서 진행시켜 임의의 밴드를 가시화하였다.

[0227] **추출 제조물 및 웨스턴 블롯**

[0228] 변형된 RF1 변이체를 함유하도록 공학처리된 균주 SBHS015, SBHS016 및 SBHS017을 500 mL TB에서 37℃로 진탕시키며 Tunair 진탕 플라스크에서 밤새 성장시켰다. 세포를 6000xg에서 15분 동안 펠렛화하였다. 세포 펠렛을 6 mL S30 완충제 (10 mM 트리스, 14 mM 마그네슘 아세테이트 및 60 mM 포타슘 아세테이트): 1 g 세포 펠렛으로 2X 세척하였다. 그 후 세포를 2 mL S30 완충제: 1 g 세포 펠렛에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포를 균질화기를 이용하여 용해시켰다. 그 후 추출물을 15,000xg에서 30분 동안 2X 정화시켰다. 추출물을 1, 2 또는 3시간 동안 30℃ 수조에서 활성화시켰다. 항-RF1 항체는 토끼에 정제된 재조합 이. 콜라이 RF1 단백질을 접종한 후 친화성 매트릭스를 이용하여 정제함에 의해 제조되었다 (YenZym Antibodies LLC). 항체의 특이성은 재조합 단백질의 ELISA 및 웨스턴 블롯을 이용하여 확인되었다. 세포 펠렛, 용해물 및 추출물 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 진행시키고 iBlot® 시스템 (Invitrogen)을 이용하여 PVDF 막으로 옮겼다. 일차 항-RF1 항체를 이용한 후 이차 항-토끼 알칼린-포스파타제 컨주게이션된 항체 (Invitrogen)를 이용하였다. 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-1-포스페이트 및 니트로블루 테트라졸륨 (Invitrogen)을 함유하는 알칼린-포스파타제 발색 기질을 이용하여 밴드를 가시화하였다.

[0229] 표 5. OMAR 및 MAMA PCR을 위한 올리고뉴클레오타이드의 서열.

올리고 명칭	올리고 서열 (5'에서 3')	SED ID NO:
1opRF1 KR (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCTgaaCCaAGacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCC	140
1opRF1 KRR (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCTgaaCCacgacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCC	141
1opRF1 KRK (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCTgaaCCcttacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGCC	142
3KR op-PCR (MAMA)	GCG ATC CCC TGA ACC AAG ACG C	143
3 KRR op-PCR (MAMA)	CGATCcCCTgaaCCacgacGc	144
3KRK op-PCR (MAMA)	TGCGATCcCCTgaaCCcttacGc	145
5 RF1 op-PCR (MAMA)	CGTGACGGGGATAACGAACGCC	146

[0230]

[0231] RF1의 돌연변이가 이들의 유전체에 성공적으로 통합된 3개의 재조합 박테리아 균주가 확인되었다. 균주 SBHS015는 RF1의 N296K/L297R 이중 돌연변이 변이체를 함유하며, 변이체 A13으로 불린다. 균주 SBHS016은 RF1의 N296K/L297R/L298R 삼중 돌연변이 변이체를 함유하며, 변이체 A18로 불린다. 균주 SBHS017은 RF1의 N296K/L297R/L298K 삼중 돌연변이 변이체를 함유하며, 변이체 A17로 불린다. 3개 모두의 균주는 또한 이들이 부모 균주 SBJY001로부터 유래되므로 무손상 OmpT1을 발현한다. 재조합 균주가 용해되고 다양한 기간 동안 인큐베이션될 때 (0, 1, 2 및 3시간), 변형된 RF1 단백질 변이체는 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되는 바와 같이,

무세포 추출물에 의해 시험되는 모든 시점에 효율적으로 절단되었다 (테이터는 제시되지 않음). 대조적으로, 균주 SBJY001에 의한 변형되지 않은 야생형 RF1의 절단은 동일한 기간 동안 검출되지 않았는데, 이는 야생형 RF1이 무손상 OmpT1을 함유하는 무세포 추출물에서 효율적으로 절단되지 않음을 나타낸다.

[0232] 이러한 실시예에는 재조합 박테리아 균주가 변형된 RF1 변이체를 발현하도록 공학처리되었고, RF1 변이체가 OmpT1 양성 균주로부터의 무세포 추출물에 의해 절단되었음을 입증한다.

[0233] 실시예 3

[0234] 실시예 3은 스위치 루프 영역에 OmpT1 절단 부위를 포함하도록 변형된 무손상 RF1 단백질이 야생형 RF1 기능을 지님을 나타낸다.

[0235] **재조합 RF1 변이체의 기능성 시험**

[0236] 본원에 기재된 재조합 RF1 변이체의 기능을 시험하기 위해, 앰버 코돈에서 번역을 종결시키는 RF1 변이체의 능력을 결정하였다. TAG 돌연변이를 갖는 Fc 단백질이 500 nM의 정제된 재조합 이. 콜라이 야생형 또는 돌연변이체 RF1 및 SBHS002 추출물 (OmpT 결실된 균주) 중 2 μ M의 비-천연 아미노산의 존재하에 발현되었다. 60 μ L의 무세포 반응을 14 C-Leu의 존재하에 30°C에서 5시간 동안 진행하였다. 최종 반응물을 원심분리시켜 용해성 분획을 얻고, 환원성 SDS-PAGE 겔에서 진행시키고, PVDF 막 (Invitrogen)으로 옮기고, 포스포스크린에 발색 노출시켰다. 포스포스크린은 Storm Imager를 이용하여 가시화되었고 ImageQuant를 이용하여 상대 밴드 세기를 결정하였다. 트렁케이션된 Fc 단백질의 양을 음성 대조군 (외생성 RF1 첨가되지 않음) 및 양성 대조군 (WT RF1 첨가됨)과 비교함에 의해 돌연변이체의 상대 활성을 결정하였다. 트렁케이션된 단백질 퍼센트를 방정식: (트렁케이션된 단백질 수 / 총 단백질 수) x 100%을 이용하여 결정하였다. 상대 RF1 활성을 방정식: [(변이체 트렁케이션된 단백질 - 음성 대조군 트렁케이션된 단백질) / (WT RF1 트렁케이션된 단백질 - 음성 대조군 트렁케이션된 단백질)] x 100%을 이용하여 결정하였다.

[0237] 도 1에 도시된 대로, 본원에 기재된 RF1 변이체는, 비-자연 아미노산 (pAzF)을 Fc 단백질의 위치 S378에서 도입된 앰버 코돈에 혼입시킬 때 번역의 트렁케이션에 의해 입증되는 바와 같이, RF1 활성을 지닌다. 특히, RF1 변이체 A13 (N296K/L297R 치환을 지님)은 야생형 RF1과 유사한 활성 수준을 지녔다.

[0238] 이러한 실시예에는 스위치 루프 영역에 OmpT 절단 부위를 포함하도록 변형된 무손상 RF1 단백질이 기능성 RF1 활성 (예컨대, 감소된 앰버 억제)을 지님을 입증한다.

[0239] 실시예 4

[0240] 실시예 4는 스위치 루프 영역에 OmpT1 절단 부위를 갖는 RF1 변이체를 포함하는 무세포 추출물을 이용한, 허셉틴(Herceptin) 단백질의 IgG 중쇄로의 비-천연 아미노산의 증가된 혼입을 입증한다. 무세포 추출물은 실시예 2에 기재된 박테리아 균주에서 비롯된다.

[0241] **방법**

[0242] **허셉틴 중쇄의 부위 지정 돌연변이유발**

[0243] nnAA를 허셉틴의 중쇄에 도입하기 위해, 허셉틴을 엔코딩하는 DNA 주형을 돌연변이시켜 코딩 서열의 상이한 위치에 앰버 코돈을 도입시켰다. DNA 주형으로서 C-말단에 허셉틴6xHis의 코딩 영역을 함유하는 pYD 플라스미드 및 센스 및 안티센스 방향 둘 모두에 앰버 코돈을 함유하는 합성 올리고뉴클레오타이드 (Operon)를 이용하여 부위 지정 돌연변이유발을 수행하였다 (표 6). 각 돌연변이의 올리고뉴클레오타이드를 DNA 주형 및 Phusion® 중합효소 (Thermo, Cat# F531s)와 20 μ L의 최종 부피로 혼합시켰다. 각 구성요소의 최종 농도는 1.5 mM MgCl₂ 및 200 μ M dNTP를 함유하는 HF 완충제 (Thermo)에서 0.16 μ M의 각 올리고뉴클레오타이드, 0.5 ng/ μ L의 주형 DNA, 0.02 U/ μ L의 Phusion® 중합효소였다. 혼합물을 98°C 5m, 18회 PCR 사이클 (98°C 30s, 55°C 1m, 72°C 4m), 72°C에서 10m 인큐베이션시키고, 4°C에서 16h 이내로 저장하였다. DpnI (NEB)를 혼합물에 0.6 U/ μ L의 최종 농도로 첨가하고 37°C 1h 동안 인큐베이션시켰다. 5 μ L의 각 혼합물을 제조 절차에 따라 50 μ L의 화학적 만능 이. 콜라이 세포로 형질전환시켰다 (Invitrogen, MultiShot™ 96-Well Plate TOP10). 형질전환된 세포를 200 μ L SOC(Invitrogen) 37°C 1h으로 회수하고 50 μ g/mL의 카나마이신 (Teknova)이 보충된 Luria-Bertani (LB) 아가 상에 플레이트하였다. 37°C에서 24h 후에, 콜로니를 Qpix2 (Genetix)를 이용하여 7.5% 글리세롤 및 50 μ g/mL 카나마이신을 갖는 200 μ L LB에 취하고, 37°C에서 24시간 동안 성장시키고, 20 μ L의 배양액을 회전환 증폭에 이용하여, T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'; SEQ ID NO:147) 및 T7 term (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'; SEQ

ID NO:148) 프라이머 (Sequetech)를 이용한 프라이머 연장에 의해 서열화하였다. 서열은 Sequencher (Gene Codes)에 의해 분석되었다.

표 6. 허셉틴의 지시된 위치에 앰버 코돈을 도입하기 위한 프라이머.

변이체	센스 올리고 (SEQ ID NO:)	안티센스 올리고 (SEQ ID NO:)
SP-00067_V422	CGTTGGCAGCAGGGTAATTAGTT CAGCTGCAGCGTTATG (149)	CATAACGCTGCAGCTGAACTAA TTACCCCTGCTGCCAACG (150)
SP-00127_S415	GCAAGCTGACCGTCGATAAATA GCGTTGGCAGCAGGGTAATG (151)	CATTACCCCTGCTGCCAACGCTA TTTATCGACGGTCAGCTTGC (152)
SP-00128_Q418	CGATAAAAGCCGTTGGTAGCAG GGTAATGTGTTTCAG (153)	CTGAACACATTACCCTGTACC AACGGCTTTTATCG (154)
SP-00114_P343	GCAAAGCGAAAGGCCAATAGCG TGAACCGCAGGTC (155)	GACCTGCGGTTTCAGCTATTGG CCTTTCGCTTTCG (156)
SP-00112_G341	GACGATCAGCAAAAGCGAAATAG CAACCGCGTGAACCGCAG (157)	CTGCGGTTTCAGCGGTTGCTAT TTCGCTTTGCTGATCGTC (158)
SP-00102_K320	GCTGAATGTAAAGAATACTAG TGCAAAGTGAGCAACAAGG (159)	CCTTGTGCTCATTGTCAGTAG TATTCITTACCAATCAGC (160)
SP-00066_F404	CTGGACAGCGACGGTAGCTAGT TTCTGTATAGCAAGCTG (161)	CAGCTTGCTATACAGAACTAG CTACCGTCGCTGTCCAG (162)
SP-00113_Q342	GCAAAGCGAAAGGCTAGCCGCG TGAACCGCAG (163)	CTGCGGTTTCAGCGGCTAGCCT TTCGCTTTCG (164)
SP-00096_T299	GTGAGGAACAATACAATAGCTA GTATCGCGTAGTGAGCGTGC (165)	GCACGCTCACTACGCGATACTA GCTATTGTATTGTTCTCAC (166)
SP-00120_Y373	GGTGAAAGGGCTTTTAGCCGAGC GACATCGC (167)	GCGATGTCGCTCGGCTAAAAGC CCTTCACC (168)
SP-00094_N297	CGCGTGAGGAACAATACTAGAG CACGTATCGCGTAGTG (169)	CACTACGCGATACGTGCTCTAG TATTGTTCCTCACGCG (170)
SP-00125_F405	GACAGCGACGGTAGCTTCTAGCT GTATAGCAAGCTGAC (171)	GTCAGCTTGCTATACAGCTAGA AGCTACCGTCGCTGTC (172)

추출 제조물

변형된 RF1 변이체 A18을 갖는 이. 콜라이 균주 SBHS016을 40-55 OD의 최종 밀도로 회수하고, Sharples Model AS14 원심분리기에서 14,000 g으로 10분 동안 원심분리시켜 소비된 배지를 제거하였다. 세포 페이스트를 6 mL/g 세포의 비율로 S30 완충제 (14mM MgAcO, 60mM KAcO, 10mM Tris)에 균질하게 재현탁시키고, 소비된 배지의 추가 제거를 위해 Sharples AS14를 이용하여 14,000 g에서 10분 동안 재원심분리시켰다. 생성된 정화된 세포 페이스트를 2mL/g 세포의 비율로 S30에 재현탁시키고, 세포를 17,000 psi에서 Avestin Emulsiflex C-55 균질화기를 통한 단일 통과에 의해 용해시켰다. 균질액을 14,000 g에서 각 30분 동안 2회 원심분리함에 의해 정화하고, 생성된 펠렛을 폐기하였다. 생성된 세포 추출 용액을 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션시킨 다음, 미립자 제거를 위해 Sharples AS14를 이용하여 14,000 g에서 다시 원심분리시켰다. 이러한 최종 용액을 LN₂에서 동결시키고, 무세포 단백질 합성이 요구될 때까지 -80℃에서 저장하였다.

무세포 추출물을 실온으로 해동시키고 50 uM 아이오도아세트아미드와 30분 동안 인큐베이션시켰다. 30% (v/v) 아이오도아세트아미드-처리된 추출물을 8 mM 마그네슘 글루타메이트, 10 mM 암모늄 글루타메이트, 130 mM 포타슘 글루타메이트, 35 mM 소듐 피루베이트, 1.2 mM AMP, 각 0.86 mM의 GMP, UMP, 및 CMP, 2 mM 아미노산 (티로신의 경우 1mM), 4 mM 소듐 옥살레이트, 1 mM 푸트레신, 1.5 mM 스페르미딘, 15 mM 포타슘 포스페이트, 100 nM T7 RNAP, 2.5 uM 이. 콜라이 DsbC, 5 uM 효모 PDI, 2 mM 산화된 (GSSG) 글루타티온 및 15 uM 효모 tRNA pN3F 아미노아실 tRNA와 함께 함유하는 무세포 반응을 30℃에서 10시간까지 진행시켰다. 합성된 단백질을 ¹⁴C로 표지하기 위해, 3.33% (v/v)의 1-[U-¹⁴C]-류신 (300 mCi/mmol; GE Life Sciences, Piscataway, NJ)를 또한 반응물에 첨가하였다. 중쇄 TAG 변이체 플라스미드 및 야생형 경쇄 플라스미드의 농도는 각각 7.5 ug/mL 및 2.5 ug/mL였다. 대조군으로서, 야생형 경쇄의 무세포 발현이 TAG 변이체로 동시에 수행되었다.

N297, T299, K320, G341, Q342, P343, Y373, F404, F405, S415, Q418, 및 V422를 포함하는 억제하기 어려운 12개 부위가 내부 연구에 기반하여 중쇄로부터 선택되었다. S136은 비교적 높은 억제능을 갖는 양성 대조군으로서 선택되었다. 균주 SBJY001 (야생형 RF1을 발현함) 및 SBHS016 (변형된 RF1을 발현함)으로부터의 2개의 세포 추출물을 이용하여, aaAA를 이러한 억제하기 어려운 부위로 혼입시키는 추출물의 능력을 비교하였다.

60 uL의 무세포 반응을 24 웰 플레이트에서 진행시켰다. 무세포 반응이 완료된 후에, TCA 침전을 수행하여 합성된 총 단백질 및 용해성 단백질을 측정하였다. 동시에, 비 환원성 및 환원성 겔은 오토라디오그래프를 검정을 위한 것이었다. 비 환원성 겔의 경우, 4 uL의 샘플, 8 uL의 DI H₂O 및 4 uL의 4X LDS 완충제 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 혼합시킨 후 겔에 로딩하였다. 환원성 겔의 경우, 4 uL의 샘플, 1 uL의 1 M DTT, 7 uL의 DI

H₂O 및 4 μ L의 4X LDS 완충제 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 혼합시키고 고온 블롯에서 70°C로 5분 동안 가열시켰다. 샘플을 4~12% Bis-Tris SDS-PAGE 겔 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 제조자의 권고에 따라 분석하였다. 겔을 건조시키고, 약 16시간 노출 후에 Storm 840 PhosphoImager를 이용하여 오토라디오그래피에 의해 분석하였다.

$$IgG \text{ 수율} = \frac{\text{비 환원성 겔로부터의 } IgG \text{ 전장 밴드 세기}}{\text{환원성 겔로부터의 모든 밴드 세기의 합}} \times [\text{용해성 단백질}]$$

상기 식에서, 밴드 세기는 ImageQuant™ 소프트웨어에 의해 결정되고 [용해성 단백질]은 TCA 침전 방법에 의해 예측되었다.

중쇄의 상이한 부위에서 앰버 코돈의 억제제는 환원성 SDS-PAGE 겔의 [¹⁴C]-오토라디오그래피에 의해 결정되었다. 전장 야생형 중쇄 및 억제된 중쇄 TAG 변이체는 SDS-PAGE 상에서 49 Kd로 진행된다. TAG 변이체의 억제되지 않은 (트렁케이션된) 중쇄는 저분자량으로 진행된다.

중쇄에서 TAG의 억제는 다음과 같이 예측된다:

$$\text{억제} = \frac{\text{억제된 중쇄 TAG 변이체의 밴드 세기}}{\text{야생형 중쇄의 밴드 세기}}$$

상기 식에서, 밴드 세기는 ImageQuant™ 소프트웨어에 의해 결정된다.

정제를 위한 물질을 생성하기 위해, 반응 규모를 동일한 조건하에 10cm 페트리 디시에서 1 mL로 확대하였다.

tRNA의 생산

모든 tRNA^{phe}_{CUA} 전사체의 전사는 하기 조건하에 수행되었다: 20-50 ng/ μ l pYD318-tRNA^{phe} AAA-HDV-T7trm, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM dNTP, 2.5 mM 스페르미딘, 1 U/ml PPIase, 2.5 mg/ml T7 RNA 중합효소, 및 40 mM Tris (pH 7.9). tRNA 분자를 XK50/100 컬럼에서 직렬 세파크릴 100 또는 300 수지를 이용한 겔 여과 크로마토그래피에 의해 부모 RNA 및 HDV 리보자임 RNA 생성물로부터 분리하였다. 크기조정 컬럼을 50 mM 트리스 (pH 6.5) 및 250 mM NaCl에서 현상하였다. tRNA를 함유하는 분획을 폴딩시키고, 1/10 부피의 3 M 소듐 아세테이트 (pH 5.2)와 혼합시키고, 동일한 양의 이소프로판올을 첨가시켜 RNA를 침전시켰다. tRNA를 펠렛으로서 저장하고 10 mM 트리스 (pH 6.5) 및 0.1 mM EDTA에 재현탁시켰다.

아미노아실화 반응에 사용되는 tRNA를 100 mM MES pH 5.5, 10 mM MgCl₂ 및 10 mM 2-메르캅토에탄올에서 T4 폴리뉴클레오티드 키나제와 1시간 동안 반응시켜 tRNA의 3' 말단에 2',3'-OH 기를 남기며 2',3'-사이클릭 포스페이트를 제거하였다. T4 PNK 처리된 tRNA를 페놀:클로로포름:이소아밀알콜 추출하고 무기 포스페이트 및 과량의 페놀을 제거하는 G25 컬럼을 이용하여 완충제 교환하였다. tRNA를 이소프로판올 또는 에탄올 침전시키고, 10 mM 트리스 (pH 6.5) 및 0.1 mM EDTA에 재현탁시켰다. tRNA를 70°C에서 20분 동안 가열시킴에 의해 tRNA를 재폴딩시켰다. 그 후 10 mM MgCl₂를 첨가하였고 혼합물은 천천히 실온과 평형을 이루었다.

균질한 3' 말단을 생산하는 동안, tRNA 전사체의 HDV 리보자임 절단은 후속하는 아미노아실화를 간섭하는 2'-3' 사이클릭 포스페이트 모이어티를 남긴다. 이는 T4 폴리뉴클레오티드 키나제 (PNK)를 이용하여 제거될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 40 μ M tRNA를 37°C에서 50 mM MES (pH 5.5), 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM EDTA 중 0.050 mg/ml의 PNK와 인큐베이션시켰다. 탈포스포릴화는 두 가지 상이한 방법으로 검정되었다. 탈포스포릴화는 변성 겔 전기영동을 이용하여 확인되었다. 보고된 대로, 탈포스포릴화된 tRNA는 산/우레아 겔 전기영동에서 감소된 이동성을 갖는다. 3 μ g의 탈포스포릴화된 tRNA를 함유하는 분취량을 로딩 완충제 (100 mM 소듐 아세테이트 (pH 5.2), 7 M 우레아, 1 mg/ml 브로모페놀 블루 염료)에서 2배 희석시키고, 6.5% 19:1 아크릴아미드, 100 mM 소듐 아세테이트 (pH 5.2), 7 M 우레아 겔 (40cm X 34 cm) 상에 로딩하고 40 W에서 밤새 전기영동시켰다. 겔을 0.06% 메틸렌 블루, 0.5 M 소듐 아세테이트 (pH 5.2)를 이용하여 30분 동안 염색하고, 탈이온수로 탈색시켰다. 두 검정 모두는 단 5분 후에 현저한 탈포스포릴화를 나타내었다. 1시간 후에 탈포스포릴화가 본질적으로 완료되면 70°C로 가열하고, 10 mM MgCl₂를 첨가한 다음, 실온까지 천천히 냉각시킴에 의해 tRNA를 재폴딩시켰다. RNA 농도를 Nano-Drop 1000 분광광도계 (Thermo Scientific)를 이용하여 측정하고 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0262] **앰버 억제제 tRNA 아미노아실화**

[0263] 비-천연 아미노아실화를 위한 조건은 50 mM HEPES pH 8.1, 40 mM KCl, 75 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 8-40 μM tRNA^{phe}_{CUA}, 10 mM DTT, 2 mM 아미노산 (pN₃F), 및 40 μM PheRS T415A D243A이다. tRNA^{phe}_{CUA}의 퍼센트 아미노아실화의 결정은 tRNA의 아미노아실화 및 비아미노아실화 모이어티의 HPLC HIC 용해에 의해 수행된다. 이러한 방법은 본 발명자들이, 가공된 후에 그리고 단백질로의 혼입을 위해 사용할 준비가 된 후에, tRNA의 아미노아실화 정도를 모니터링할 수 있게 한다. 반응물을 37°C에서 15분 동안 인큐베이션시키고 2.5 부피의 300 mM 소듐 아세테이트 pH 5.5로 켄칭시켰다. 켄칭된 샘플을 25:24:1 페놀:클로로포름:이소아밀 알콜 pH 5.2 (ambion)로 추출하고 2분 동안 볼텍싱시켰다. 그 후 이들을 14,000 rcf에서 10-30분 동안 4°C에서 원심분리시켜 수성상 (tRNA) 및 유기상 (단백질)을 분리시켰다. 수성상 (tRNA 함유)을 제거하고, 분자의 크기에 기반하여 분리시키는 미리-평형화된 (300 mM NaOAc) G25 sephadex 수지 크기 배제 컬럼에 첨가하였다. 용리물을 2.5 부피의 100% 에탄올과 혼합시키고, -80°C에서 15-30분 동안 인큐베이션하고, 12,000-14,000 rcf에서 30-45분 동안 원심분리시켰다. 이제 아미노아실화 tRNA는 펠렛으로 존재하며, 이는 -80°C에서 저장될 수 있거나 HPLC로의 주입 및/또는 OCFS 반응에서의 사용을 위해 약간 산성인 완충제에 재현탁될 수 있다.

[0264] HPLC C5 HIC 컬럼은 UV 추적이 0에서 변하지 않을 때까지 완충제 A (50 mM 포타슘 포스페이트 및 1.5 M 암모늄 설페이트 pH 5.7)에서 평형화된다. 1-10 μg tRNA를 100 μl의 2X 완충제 A (100 mM 포타슘 포스페이트 및 3 M 암모늄 설페이트)와 혼합한다. 샘플을 주입하고 50분에 걸쳐 완충제 A에서 완충제 B (50 mM 포타슘 포스페이트 및 5% 이소프로판올)로의 구배로 진행시킨다.

[0265] **pN₃F의 터보GFP TAG 돌연변이체로의 혼입**

[0266] 앰버 코돈 (정지 코돈)이 존재하는 작제물에서 그린 형광 단백질의 형광성을 모니터링하기 위해, 터보GFP를 엔코딩하는 DNA (Evrogen, Russia)를 본 발명자들의 OCFS 발현 벡터 pYD317로 클로닝시켰다. 터보GFP (pdb 2G6X)의 결정 구조에 따라 아미노산 리신 37, 티로신 50, 및 글루타메이트 205 (및 조합)에 상응하는 뉴클레오타이드에서 중첩 PCR 돌연변이유발에 의해 정지 코돈 (TAG)이 삽입되었다. 따라서, 적재된 tRNA를 이용한 정지 코돈의 임의의 억제는 형광을 발생시킬 것이다. 반응물을 30°C에서 분광광도계 (Molecular Devices, SpectraMaxM5)에서 5시간 동안 집착 커버 (VWR, 9503130)를 이용하여 인큐베이션하고 형광 세기를 10분 간격으로 측정하였다. λ_{Ex} = 476 nm 및 λ_{Em} = 510. 30% S30 추출물, 24 ug/mL T7 RNA 중합효소, 1mM L-티로신 (Sigma, T8566), 프리-믹스*, 10-60 μM pN₃F-tRNA^{phe}_{CUA} 또는 비적재된 tRNA^{phe}_{CUA}, 및 3nM 터보GFP 플라스미드를 DEPC-처리된 물 (G Biosciences, 786-109)에 함유하는 OCFS 반응 믹스를 25 μL의 최종 반응 부피에 대해 억제제를 지닌 마이크로플레이트에 즉시 첨가하였다. 정지 코돈 없이 터보GFP를 이용하는 양성 대조 반응을 이용하여 반응이 이전에 관찰된 것과 유사한 속도로 진행되는 것을 보장하는 한편, 터보GFP Y50TAG를 함유하는 반응도 tRNA 없이 진행하여 형광성이 검출되지 않음을 확실히 하였다 (음성 대조군). 억제 효율은 양성 대조군 형광성을 앰버 코돈 함유 주형 형광성과 비교함에 의해 계산되었다.

[0267] 도 2에 도시된 대로, OmpT1 및 야생형 RF-1을 발현하는 SBJY001 무세포 추출물에서 IgG 중쇄 TAG 변이체의 발현은 비교적 불충분한 용해성 전장 IgG의 수율을 발생시켰다. 대조적으로, OmpT1 및 삼중 치환 N296K/L297R/L298R을 함유하는 변형된 RF-1 단백질 (변이체 A18)을 발현시키는 SBHS016 무세포 추출물에서 IgG 중쇄 TAG 변이체의 발현은 비교적 높은 전장 IgG의 수율을 발생시켰다. 추가로, 도 3에 도시된 대로, SBJY001 무세포 추출물에서 IgG 중쇄 TAG 변이체의 발현은 비교적 불충분한 앰버 억제 (즉, 중쇄 단백질은 트렁케이션되었다)를 발생시켰다. 대조적으로, SBHS016 무세포 추출물에서 IgG 중쇄 TAG 변이체의 발현은 비교적 높은 앰버 억제 (즉, 중쇄 단백질이 훨씬 덜 트렁케이션되었다)를 발생시켰는데, 이는 도 2에서 관찰된 실질적으로 높은 전장 IgG의 수율에 상응한다.

[0268] 이러한 실시예는 RF1의 OmpT1 절단이, OmpT1에 의해 절단불가능한 무손상 RF1에 비해, 코딩 서열의 앰버 코돈에 요망되는 nnAA를 혼입한 중쇄 수율의 극적인 개선을 제공함을 입증한다.

[0269] 본원에 기재된 실시예 및 구체예는 단지 예시를 목적으로 하며, 그에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안될 것이고, 그러한 변형 또는 변화는 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되어야 함이 이해된다. 본원에서 인용되는 모든 공개문헌, 서열 수탁 번호, 특허, 및 특허 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0270]

서열 목록

SEQ ID NO:1

에스체리치아 콜라이 방출 인자 1 (RF1)

MKPSIVAKLEALHERHEEVQALLGDAQTIADQERFRALSREYAQLSDVSRCTDWQ
QVQEDIETAQMMLDDPEMREMAQDELREAKEKSEQLEQQLQVLLLPKDPDDERNA
FLEVRAGTGGDEAALFAGDLFRMYSRYAEARRWRVEIMSASEGEHGGYKEIIAKISG
DGVYGRLEKFESGGHRVQRPATESQGRIHTSACTVAVMPELPDAELPDINPADLRID
TFRSSGAGGQHVNTTDSAIRITHLPTGIVVECQDERSQHKNKAKALSVLGARIHAAE
MAKRQQAEASTRRNLLGSGDRSDRNRTYNFPQGRVTDHRINLTLYRLDEVMEGKLD
MLIEPIQEHQADQLAALSEQE

SEQ ID NO:2

에스체리치아 콜라이 방출 인자 2 (RF2)

MFEINPVNNRIQDLTERSVDLRGYLDYDAKKERLEEVNAELEQPDVWNEPERAQAL
GKERSSLEAVVDTLQMKQGLEDSGLLELAVEADDEETFNEAVAELDALEEKLAQ
LEFRRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQDWASMLERMYLRWAESRGFKTEIIEES
EGEVAGIKSVTIKISGDYAYGWLRTETGVHRLVRKSPFDSGGRRHTSFSSAFVYPEVD
DDIDIEINPADLRIDVYRTSGAGGQHVNRTEAVRITHIPTGIVTQCQNDRSQHKNKD
QAMQMKAKLYELEMQKNAEKQAMEDNKSIGWGSQIRSYVLDDSRICKDLRTGV
ETRNTQAVLDGSLDQFIEASLKAGL

SEQ ID NO:3

에스체리치아 콜라이 외막 단백질 T1 (OmpT) (신호 펩티드는 밑줄로 표시된다)

MRAKLLGIVLTTPIAISSFASTETLSFTPDNINADISLGTLSGKTKERVYLAEEGGRKVS
QLDWKFNNAAIIKGAINWDLMPQISIGAAGWTTLGSRRGNMVDQDWMDSNPGTW
TDESRHPTQLNYANEFDLNKGWLLNEPNYRLGLMAGYQESRYSFTARGGSYIYSS
EEGFRDDIGSFPNGERAIGYKQRFKMPYIGLTGSYRYEDFELGGTFKYSGWVESSDN
DEHYDPGKRITYRSKVKDQNYYSVAVNAGYYVTPNAKVYVEGAWNRVTNKKGNT
SLYDHNNNTSDYSKNGAGIENYNFITTAGLKYTF

SEQ ID NO:4

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역, 아미노산 287 내지 304

QQAEASTRRNLLGSGDRS

[0271]

SEQ ID NO:5

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRKLLGSGDRS

SEQ ID NO:6

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRRLGSGDRS

SEQ ID NO:7

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 L297K 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRNKLGSGDRS

SEQ ID NO:8

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 L297R 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRNRLGSGDRS

SEQ ID NO:9

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 L297V 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRNVLGSGDRS

SEQ ID NO:10

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 L298K 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRNLKGSGDRS

SEQ ID NO:11

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 L298R 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRNLRGSGDRS

SEQ ID NO:12

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297K 돌연변이, 아미노산 287 내지 304
QQAEASTRRKKLGSGDRS

[0272]

SEQ ID NO:13

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297R = A13 돌연변이, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRKRLGSGDRS

SEQ ID NO:14

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297V 돌연변이, 아미노산 287 내지 304

QQAEASTRRKVLGSGDRS

SEQ ID NO:15

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297V 돌연변이, 아미노산 287 내지 304

QQAEASTRRRKLGSGDRS

SEQ ID NO:16

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297R 돌연변이, 아미노산 287 내지 304

QQAEASTRRRRLGSGDRS

SEQ ID NO:17

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297V 돌연변이, 아미노산 287 내지 304

QQAEASTRRRVLGSGDRS

SEQ ID NO:18

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297K,L298K 돌연변이, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRKKKKGSGDRS

[0273]

SEQ ID NO:19

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297K,L298R 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRR**K**KRGSGDRS

SEQ ID NO:20

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297R,L298K = A17 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRR**K**KRGSGDRS

SEQ ID NO:21

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296K,L297R,L298R = A18 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRR**K**RRGSGDRS

SEQ ID NO:22

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297R,L298R 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRRRRRGSGDRS

SEQ ID NO:23

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297K,L298R 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRR**K**KRGSGDRS

SEQ ID NO:24

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297R,L298K 돌연변이, 아미노산

287 내지 304

QQAEASTRRRR**K**KRGSGDRS

[0274]

SEQ ID NO:25

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프 영역에서 N296R,L297K,L298K 돌연변이, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRR**KK**KGSGDRS

SEQ ID NO:26

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QARRGSTRRNLLGSGDRS

SEQ ID NO:27

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQARRGTRRNLLGSGDRS

SEQ ID NO:28

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAARRGRRNLLGSGDRS

SEQ ID NO:29

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEARRGRNLLGSGDRS

SEQ ID NO:30

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEAARRGNLLGSGDRS

[0275]

SEQ ID NO:31

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASARRGLGSGDRS

SEQ ID NO:32

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTARRGLGSGDRS

SEQ ID NO:33

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRARRGGSGDRS

SEQ ID NO:34

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRARRGGSGDRS

SEQ ID NO:35

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNARRGGDRS

SEQ ID NO:36

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNLARRGDRS

[0276]

SEQ ID NO:37

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNLLARRGRS

SEQ ID NO:38

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNLLGARRGS

SEQ ID NO:39

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNLLGSARRG

SEQ ID NO:40

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEASTRRNLLGSGARR

SEQ ID NO:41

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAWLAARRGRGSGDRS

SEQ ID NO:42

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산
287 내지 304

QQAEWLAARRGRGSGDRS

[0277]

SEQ ID NO:43

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산

287 내지 304

QQAEAWLAARRGRGGDRS

SEQ ID NO:44

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산

287 내지 304

QQWGGRWARKKGTIGDRS

SEQ ID NO:45

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산

287 내지 304

QQA WGGRWARKKGTIDRS

SEQ ID NO:46

방출 인자 1 (RF1)의 스위치 루프에서 삽입된 OmpT 절단 펩티드 서열, 아미노산

287 내지 304

QQAEWGGRWARKKGTIRS

SEQ ID NO:47

OmpT 절단 펩티드

ARRG

SEQ ID NO:48

OmpT 절단 펩티드

WLAARRGRG

SEQ ID NO:49

OmpT 절단 펩티드

WGGRWARKKGTI

SEQ ID NO:50

[0278]

λ 파지 Gam 단백질 (GamS)의 짧은 형태의 C-말단 서열

GGSHHHHHH

SEQ ID NO:51

λ 파지 Gam 단백질 (GamS) 유전자 증폭 프라이머의 짧은 형태

ATATATCATATGAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAG

SEQ ID NO:52

λ 파지 Gam 단백질 (GamS) 유전자 증폭 프라이머의 짧은 형태

ATATATGTCGACTTAATGATGATGATGATGATGAGAACCCCTACCTCTGAATCA
ATATCAACCTGGTGGTG

SEQ ID NO:53

T7 프로모터, N-말단 서열의 불변 영역 및 돌연변이 부위 제 1 단계 PCR 증폭 프라이머
5chiT2PT7을 포함하는 5'-단편

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGAC
AGG

SEQ ID NO:54

돌연변이 부위, 불변 C-말단 영역 및 T7 종결자 서열 제 1 단계 PCR 증폭 프라이머 3chiT2TT7
을 포함하는 3'-단편

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCGGTGAGTTTCTCCTTCATTACAGAA
ACGGC

SEQ ID NO:55

중첩 PCR에 의한 5'-단편 및 3'-단편에 대한 단일 프라이머 5chiT2

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGG

[0279]

SEQ ID NO:56

WT RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCGCAGG

SEQ ID NO:57

M74R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GCTCGATGATCCTGAACGCCGTGAGATGGCGCAGG

SEQ ID NO:58

E76K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGATGATCCTGAAATGCGTAAGATGGCGCAGGATGAAC

SEQ ID NO:59

E84K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CAGGATGAACTGCGCAAAGCTAAAGAAAAAGCGAGCAAC

SEQ ID NO:60

A85R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CAGGATGAACTGCGCGAACGTAAAGAAAAAGCGAGCAAC

SEQ ID NO:61

E87R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GGATGAACTGCGCGAAAGCTAAACGTAAGCGAGCAACTGGAAC

SEQ ID NO:62

E108R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GCCAAAAGATCCTGATGACCGTCGTAACGCCTTCCTCG

SEQ ID NO:63

T293R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CAACAGGCCGAAGCGTCTCGCCGTGTAACCTGC

[0280]

SEQ ID NO:64

N296K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GCGTCTACCCGTCGTAAACTGCTGGGGAGTGGCG

SEQ ID NO:65

S304K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

GGGAGTGGCGATCGCAAGGACCGTAACCGTACTTAC

SEQ ID NO:66

N296K/L297V RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:67

N296K/L297K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAAAGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:68

N296K/L297R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:69

N296R/L297V RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:70

N296R/L297K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCAAGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:71

N296R/L297R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머

CGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCCGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

SEQ ID NO:72

[0281]

N296K/L297R/L298K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머
CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTAAGGGGAGTGGCGATCGCAGCGAC
C

SEQ ID NO:73
N296K/L297R/L298R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 정방향 프라이머
CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTCGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGAC
C

SEQ ID NO:74
WT RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
CCTGCGCCATCTCACGCATTTTCAGGATCATCGAGC

SEQ ID NO:75
M74R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
CCTGCGCCATCTCACGGCGTTTCAGGATCATCGAGC

SEQ ID NO:76
E76K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GTTTCATCCTGCGCCATCTTACGCATTTTCAGGATCATCG

SEQ ID NO:77
E84K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GTTGCTCGCTTTTTTCTTTAGCTTTGCGCAGTTCATCCTG

SEQ ID NO:78
A85R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GTTGCTCGCTTTTTTCTTTACGTTTCGCGCAGTTCATCCTG

SEQ ID NO:79
E87R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GTTCCAGTTGCTCGCTTTTACGTTTAGCTTCGCGCAGTTCATCC

[0282]

SEQ ID NO:80

E108R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
CGAGGAAGGCGTTACGACGGCATCAGGATCTTTTGGC

SEQ ID NO:81

T293R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCAGGTTACGACGGCGAGACGCTTCGGCCTGTTG

SEQ ID NO:82

N296K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
CGCCACTCCCCAGCAGTTTACGACGGGTAGACGC

SEQ ID NO:83

S304K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GTAAGTACGGTTACGGTCCTTGCGATCGCCACTCCC

SEQ ID NO:84

N296K/L297V RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:85

N296K/L297K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:86

N296K/L297R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:87

N296R/L297V RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:88

[0283]

N296R/L297K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:89
N296R/L297R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

SEQ ID NO:90
N296K/L297R/L298K RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GGTCGCTGCGATCGCCACTCCCCTTACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG

SEQ ID NO:91
N296K/L297R/L298R RF1 변이체 OmpT 절단 부위 스크리닝 역방향 프라이머
GGTCGCTGCGATCGCCACTCCCGCGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG

SEQ ID NO:92
No. 0 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머
GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:93
No. 1 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머
CGCCGTGGTTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTA
ACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:94
No. 2 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머
GCACGCCGTGGTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:95
No. 3 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

[0284]

GCCGCACGCCGTGGTTCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

SEQ ID NO:96

No. 4 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCACGCCGTGGTTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

SEQ ID NO:97

No. 5 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGGCACGCCGTGGTAACTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

SEQ ID NO:98

No. 6 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTGCACGCCGTGGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

SEQ ID NO:99

No. 7 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCGCACGCCGTGGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

SEQ ID NO:100

No. 8 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTGCACGCCGTGGTGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTTCCCG

[0285]

SEQ ID NO:101

No. 9 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTGCACGCCGTGGTAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:102

No. 10 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACGCACGCCGTGGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:103

No. 11 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGGCCACGCCGTGGTGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:104

No. 12 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGCCACGCCGTGGTCGCAGCGACCGTA
ACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:105

No. 13 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGGCACGCCGTGGTAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:106

No. 14 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGCCACGCCGTGGTGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

[0286]

SEQ ID NO:107

No. 15 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGCACGCCGTGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:108

No. 16 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTCGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:109

No. 17 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:110

No. 18 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAATGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCAGTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:111

No. 19 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAAGCGTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

SEQ ID NO:112

No. 20 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

TGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGTACTATTGGCGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCG

[0287]

SEQ ID NO:113

No. 21 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCTGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTACTATTGATCGCAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCCG

SEQ ID NO:114

No. 22 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 정방향 올리고 프라이머

GCCGAATGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTACTATTTCGCGAGCGACCGT
AACCGTACTTACAACCTCCCCG

SEQ ID NO:115

No. 0 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:116

No. 1 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGAACCCACGGCGTGCTTG
GCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:117

No. 2 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTACCCACGGCGTGCTTGCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:118

No. 3 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGACCCACGGCGTGCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

[0288]

SEQ ID NO:119

No. 4 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACCACGGCGTGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:120

No. 5 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACCACGGCGTGCCGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:121

No. 6 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGACCACGGCGTGCAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:122

No. 7 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACCACGGCGTGCGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:123

No. 8 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCACCACGGCGTGCACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:124

No. 9 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삼입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTACCACGGCGTGCACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

[0289]

SEQ ID NO:125

No. 10 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACCACGGCGTGCGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:126

No. 11 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCACCACGGCGTGCCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:127

No. 12 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGACCACGGCGTGCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTG
GCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:128

No. 13 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTACCACGGCGTGCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:129

No. 14 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

ACCACGGCGTGCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:130

No. 15 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

ACGGCGTGCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

[0290]

SEQ ID NO:131

No. 16 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGACGACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:132

No. 17 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTCCCCGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCAGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:133

No. 18 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCACTGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCATTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:134

No. 19 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCACGCTTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:135

No. 20 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCGCCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCACTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:136

No. 21 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGATCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCAGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

[0291]

SEQ ID NO:137

No. 22 RF1 변이체 OmpT 절단 펩티드 삽입 역방향 올리고 프라이머

GCTGCGAAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCATTCGGCCTGTTGG
CGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

SEQ ID NO:138

RF1 증폭 프라이머 5His-RF1

CATATGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGCTCTAAGCCTTCTATCGTTGCCA
AACTGGAAGCC

SEQ ID NO:139

RF1 증폭 프라이머 3RF1

GTCGACTTATTCCTGCTCGGACAACGCCGCCAG

SEQ ID NO:140

올리고뉴클레오타이드-매개된 대립유전자 교체 (OMAR) PCR 올리고 1opRF1 KR

GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCaAGacGcTTtCGACGGGTA
GACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGC

SEQ ID NO:141

올리고뉴클레오타이드-매개된 대립유전자 교체 (OMAR) PCR 올리고 1opRF1 KRR

GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCacgacGcTTtCGACG
GGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGC

SEQ ID NO:142

올리고뉴클레오타이드-매개된 대립유전자 교체 (OMAR) PCR 올리고 1opRF1 KRK

GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCcttacGcTTtCGACGG
GTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTGGC

[0292]

SEQ ID NO:143

미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR 올리고 3KR op-PCR

GCG ATC CCC TGA ACC AAG ACG C

SEQ ID NO:144

미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR 올리고 3 KRR op-PCR

CGATCcCCtgaaCCacgacGc

SEQ ID NO:145

미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR 올리고 3KRK op-PCR

TGCGATCcCCtgaaCCcttacGc

SEQ ID NO:146

미스매치 증폭 돌연변이 검정 (MAMA) PCR 올리고 5 RF1 op-PCR

CGTGACGGGGATAACGAACGCC

SEQ ID NO:147

롤링 씨클 증폭 및 프라이머 연장 서열화 프라이머 T7

TAATACGACTCACTATAGG

SEQ ID NO:148

롤링 씨클 증폭 및 프라이머 연장 서열화 프라이머 T7 term

GCTAGTTATTGCTCAGCG

SEQ ID NO:149

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00067_V422 센스 올리고

CGTTGGCAGCAGGGTAATTAGTTCAGCTGCAGCGTTATG

SEQ ID NO:150

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00067_V422 안티센스 올리고

CATAACGCTGCAGCTGAACTAATTACCCTGCTGCCAACG

[0293]

SEQ ID NO:151

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00127_S415 센스 올리고
GCAAGCTGACCGTCGATAAATAGCGTTGGCAGCAGGGTAATG

SEQ ID NO:152

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00127_S415 안티센스 올리고
CATTACCCTGCTGCCAACGCTATTTATCGACGGTCAGCTTGC

SEQ ID NO:153

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00128_Q418 센스 올리고
CGATAAAAGCCGTTGGTAGCAGGGTAATGTGTTCAG

SEQ ID NO:154

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00128_Q418 안티센스 올리고
CTGAACACATTACCCTGCTACCAACGGCTTTTATCG

SEQ ID NO:155

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00114_P343 센스 올리고
GCAAAGCGAAAGGCCAATAGCGTGAACCGCAGGTC

SEQ ID NO:156

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00114_P343 안티센스 올리고
GACCTGCGGTTACGCTATTGGCCTTTCGCTTTC

SEQ ID NO:157

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00112_G341 센스 올리고
GACGATCAGCAAAGCGAAATAGCAACCGCGTGAACCGCAG

SEQ ID NO:158

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00112_G341 안티센스 올리고
CTGCGGTTACGCGGTTGCTATTTGCTTTGCTGATCGTC

[0294]

SEQ ID NO:159

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00102_K320 센스 올리고

GCTGAATGGTAAAGAATACTAGTGCAAAGTGAGCAACAAGG

SEQ ID NO:160

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00102_K320 안티센스 올리고

CCTTGTGCTCAGCTTGCAGTAGTATTCTTACCATTCAGC

SEQ ID NO:161

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00066_F404 센스 올리고

CTGGACAGCGACGGTAGCTAGTTCTGTATAGCAAGCTG

SEQ ID NO:162

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00066_F404 안티센스 올리고

CAGCTTGCTATACAGAACTAGCTACCGTCGCTGTCCAG

SEQ ID NO:163

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00113_Q342 센스 올리고

GCAAAGCGAAAGGCTAGCCGCGTGAACCGCAG

SEQ ID NO:164

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00113_Q342 안티센스 올리고

CTGCGGTTACGCGGCTAGCCTTTCGCTTTGC

SEQ ID NO:165

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00096_T299 센스 올리고

GTGAGGAACAATACAATAGCTAGTATCGCGTAGTGAGCGTGC

SEQ ID NO:166

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00096_T299 안티센스 올리고

GCACGCTCACTACGCGATACTAGCTATTGTATTGTTCTCAC

[0295]

SEQ ID NO:167

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00120_Y373 센스 올리고

GGTGAAGGGCTTTAGCCGAGCGACATCGC

SEQ ID NO:168

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00120_Y373 안티센스 올리고

GCGATGTCGCTCGGCTAAAAGCCCTTCACC

SEQ ID NO:169

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00094_N297 센스 올리고

CGCGTGAGGAACAATACTAGAGCACGTATCGCGTAGTG

SEQ ID NO:170

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00094_N297 안티센스 올리고

CACTACGCGATACGTGCTCTAGTATTGTTCTCACGCG

SEQ ID NO:171

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00125_F405 센스 올리고

GACAGCGACGGTAGCTTCTAGCTGTATAGCAAGCTGAC

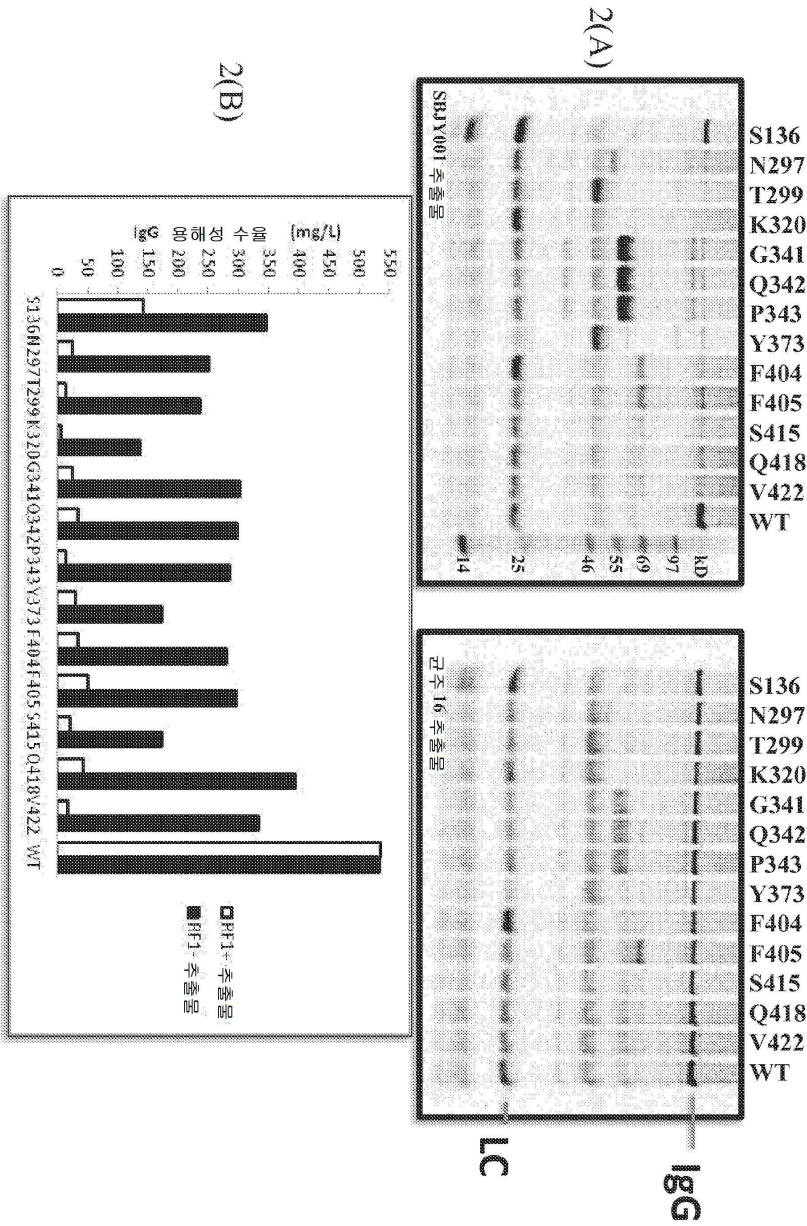
SEQ ID NO:172

부위 지정 돌연변이유발 변이체 SP-00125_F405 안티센스 올리고

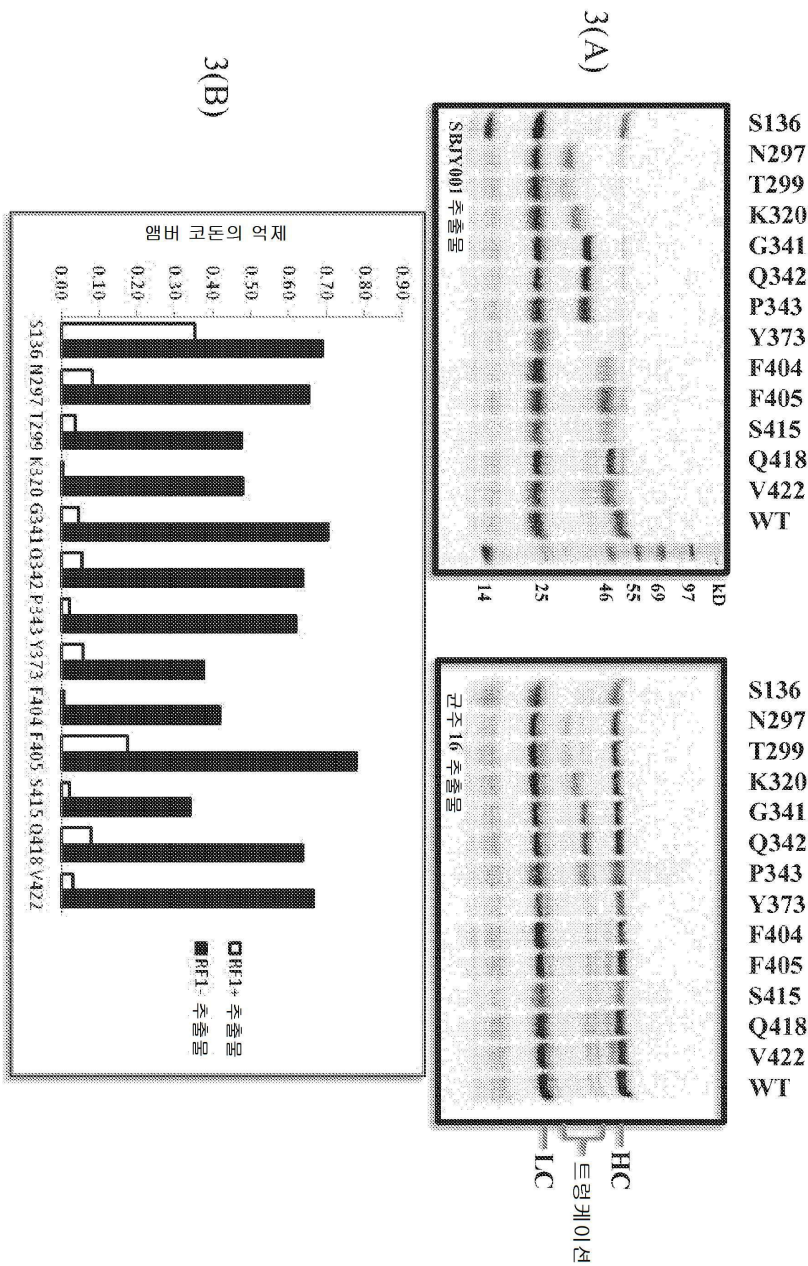
GTCAGCTTGCTATACAGCTAGAAGCTACCGTCGCTGTC

[0296]

도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Thanos, Christopher D.
Murray, Christopher J.
Yang, Junhao
Stephenson, Heather
Sutro Biopharma, Inc.

<120> Proteolytic Inactivation of Select Proteins
in Bacterial Extracts for Improved Expression

<130> 91200-889617

<140> WO Not yet assigned

<141> Not yet assigned

<150> US 61/713,245

<151> 2012-10-12

<160> 172

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213>

> Escherichia coli

<220>

<223> Release Factor 1 (RF1)

<400> 1

Met Lys Pro Ser Ile Val Ala Lys Leu Glu Ala Leu His Glu Arg His

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Arg Phe Arg Ala Leu Ser Arg Glu Tyr Ala Gln Leu Ser Asp Val

35 40 45

Ser Arg Cys Phe Thr Asp Trp Gln Gln Val Gln Glu Asp Ile Glu Thr

50 55 60

Ala Gln Met Met Leu Asp Asp Pro Glu Met Arg Glu Met Ala Gln Asp

65 70 75 80

Glu Leu Arg Glu Ala Lys Glu Lys Ser Glu Gln Leu Glu Gln Gln Leu

85 90 95

Gln Val Leu Leu Leu Pro Lys Asp Pro Asp Asp Glu Arg Asn Ala Phe

100 105 110

Leu Glu Val Arg Ala Gly Thr Gly Gly Asp Glu Ala Ala Leu Phe Ala

115 120 125

Gly Asp Leu Phe Arg Met Tyr Ser Arg Tyr Ala Glu Ala Arg Arg Trp

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

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

245 250 255
 Cys Gln Asp Glu Arg Ser Gln His Lys Asn Lys Ala Lys Ala Leu Ser
 260 265 270
 Val Leu Gly Ala Arg Ile His Ala Ala Glu Met Ala Lys Arg Gln Gln
 275 280 285
 Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ser Gly Asp Arg Ser
 290 295 300
 Asp Arg Asn Arg Thr Tyr Asn Phe Pro Gln Gly Arg Val Thr Asp His

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

<210> 2

<211> 365

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Release Factor 2 (RF2)

<400> 2

Met Phe Glu Ile Asn Pro Val Asn Asn Arg Ile Gln Asp Leu Thr Glu

1 5 10 15

Arg Ser Asp Val Leu Arg Gly Tyr Leu Asp Tyr Asp Ala Lys Lys Glu

20 25 30

Arg Leu Glu Glu Val Asn Ala Glu Leu Glu Gln Pro Asp Val Trp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Ala Val Val Asp Thr Leu Asp Gln Met Lys Gln Gly Leu Glu Asp Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Glu Ala Val Ala Glu Leu Asp Ala Leu Glu Glu Lys Leu Ala Gln

100 105 110

Leu Glu Phe Arg Arg Met Phe Ser Gly Glu Tyr Asp Ser Ala Asp Cys

115 120 125

Tyr Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Gly Gly Thr Glu Ala Gln Asp Trp

130 135 140

Ala Ser Met Leu Glu Arg Met Tyr Leu Arg Trp Ala Glu Ser Arg Gly

145 150 155 160

Phe Lys Thr Glu Ile Ile Glu Glu Ser Glu Gly Glu Val Ala Gly Ile

165 170 175

Lys Ser Val Thr Ile Lys Ile Ser Gly Asp Tyr Ala Tyr Gly Trp Leu

180 185 190

Arg Thr Glu Thr Gly Val His Arg Leu Val Arg Lys Ser Pro Phe Asp

195 200 205

Ser Gly Gly Arg Arg His Thr Ser Phe Ser Ser Ala Phe Val Tyr Pro

210 215 220
 Glu Val Asp Asp Asp Ile Asp Ile Glu Ile Asn Pro Ala Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Asp Val Tyr Arg Thr Ser Gly Ala Gly Gly Gln His Val Asn Arg
 245 250 255
 Thr Glu Ser Ala Val Arg Ile Thr His Ile Pro Thr Gly Ile Val Thr

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

 325 330 335
 Arg Thr Gly Val Glu Thr Arg Asn Thr Gln Ala Val Leu Asp Gly Ser
 340 345 350
 Leu Asp Gln Phe Ile Glu Ala Ser Leu Lys Ala Gly Leu
 355 360 365
 <210> 3
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Outer Membrane Protein T1 (OmpT1)
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(20)
 <223> signal peptide
 <400> 3
 Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile

 -20 -15 -10 -5

Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
 1 5 10
 Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
 15 20 25
 Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
 30 35 40
 Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu

 45 50 55 60
 Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
 65 70 75
 Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
 80 85 90
 Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
 95 100 105
 Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro

 110 115 120
 Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
 125 130 135 140
 Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
 145 150 155
 Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
 160 165 170
 Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg

 175 180 185
 Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
 190 195 200
 Glu Ser Ser Asp Asn Asp Glu His Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
 205 210 215 220
 Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
 225 230 235
 Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala

240 245 250
Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His

255 260 265
Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn

270 275 280
Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe

285 290 295

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> synthetic switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 4

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K mutation in the switch loop region

of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 5

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Leu Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 6

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

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> synthetic L297K mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 7

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Lys Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic L297R mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 8

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Arg Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic L297V mutation in the switch loop region
 of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304
 <400> 9
 Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Val Leu Gly Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Ser

<210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223>
 > synthetic L298K mutation in the switch loop region
 of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304
 <400> 10
 Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Lys Gly Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Ser

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic L298R mutation in the switch loop region
 of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304
 <400> 11

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297K mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 12

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Lys Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> synthetic N296K,L297R = A13 mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 13

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Arg Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297V mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 14

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Val Leu Gly Ser Gly Asp

1	5	10	15
Arg Ser			

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297V mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 15

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Arg Lys Leu Gly Ser Gly Asp

1	5	10	15
Arg Ser			

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> synthetic N296R,L297R mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 16

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

1	5	10	15
Arg Ser			

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R,L297V mutation in the switch loop region
of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 17

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Ser

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297K,L298K mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 18

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Lys Lys Gly Ser Gly Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Ser

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297K,L298R mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 19

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Lys Arg Gly Ser Gly Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Ser

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297R,L298K = A17 mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400>

> 20

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K,L297R,L298R = A18 mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 21

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Lys Arg Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R,L297R,L298R mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 22

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R,L297K,L298R mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 23

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Arg Lys Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R,L297R,L298K mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 24

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R,L297K,L298K mutation in the switch loop
region of Release Factor 1 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 25

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Arg Lys Lys Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 26

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

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 27

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

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
 in the switch loop region of Release Factor 1
 (RF1), amino acids 287 to 304
 <400> 28
 Gln Gln Ala Ala Arg Arg Gly Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Ser

<210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
 in the switch loop region of Release Factor 1
 (RF1), amino acids 287 to 304
 <400> 29
 Gln Gln Ala Glu Ala Arg Arg Gly Arg Asn Leu Leu Gly Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Ser

<210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
 in the switch loop region of Release Factor 1
 (RF1), amino acids 287 to 304

<400> 30

Gln Gln Ala Glu Ala Ala Arg Arg Gly Asn Leu Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 31

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Ala Arg Arg Gly Leu Leu Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 32

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

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 33

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Ala Arg Arg Gly Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 34

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Ala Arg Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted
in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 35

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Ala Arg Arg Gly Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 36

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Ala Arg Arg Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 37

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Ala Arg Arg Gly

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 38

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ala Arg Arg

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 39

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ser Ala Arg

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 40

Gln Gln Ala Glu Ala Ser Thr Arg Arg Asn Leu Leu Gly Ser Gly Ala

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 41

Gln Gln Ala Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 42

Gln Gln Ala Glu Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gly Arg Gly Ser Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 43

Gln Gln Ala Glu Ala Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gly Arg Gly Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 44

Gln Gln Trp Gly Gly Arg Trp Ala Arg Lys Lys Gly Thr Ile Gly Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 45

Gln Gln Ala Trp Gly Gly Arg Trp Ala Arg Lys Lys Gly Thr Ile Asp

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide sequence inserted

in the switch loop region of Release Factor 1

(RF1), amino acids 287 to 304

<400> 46

Gln Gln Ala Glu Trp Gly Gly Arg Trp Ala Arg Lys Lys Gly Thr Ile

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide

<400> 47

Ala Arg Arg Gly

1

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide

<400> 48

Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gly Arg Gly

1 5

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic OmpT cleavage peptide

<400> 49

Trp Gly Gly Arg Trp Ala Arg Lys Lys Gly Thr Ile

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic C-terminal sequence of short form of

lambda phage Gam protein (GamS)

<400> 50

Gly Gly Ser His His His His His His

1 5

<210> 51

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic short form of lambda phage Gam protein

(GamS) gene amplification primer

<400> 51

atatacata tgaacgctta ttacattcag gatcgtcttg ag

42

<210> 52

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic short form of lambda phage Gam protein

(GamS) gene amplification primer

<400> 52

atatatgtcg acttaatgat gatgatgatg atgagaaccc cctacctctg aatcaatata 60

aacctggtgg tg 72

<210> 53

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 5'-fragment including T7 promoter, constant region

of the N-terminal sequence and the mutation site first step

PCR amplification oligo primer 5chiT2PT7

<400> 53

gcgtactagc gtaccacgtg gctggtggcc gattcattaa tgcagctggc acgacagg 58

<210> 54

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 3'-fragment including mutation site, constant

C-terminal region and T7 terminator sequences first step PCR

amplification oligo primer 3chiT2TT7

<400> 54

gcgtactagc gtaccacgtg gctggtggcg gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc 60

<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 5'-fragment and 3'-fragment assembly

overlapping second step PCR single primer 5chiT2

<400> 55

gcgtactagc gtaccacgtg gctggtgg 28

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic WT RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer

<400> 56

gctcgatgat cctgaaatgc gtgagatggc gcagg 35

<210> 57

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic M74R RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer

<400> 57

gctcgatgat cctgaacgcc gtgagatggc gcagg 35

<210> 58

<211> 38

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E76K RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer

<400> 58

cgatgacatcct gaaatgcgta agatggcgca ggatgaac 38

<210> 59

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E84K RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer
<400> 59
caggatgaac tgcgcaaagc taaagaaaaa agcgagcaac 40
<210> 60
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> synthetic A85R RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer
<400> 60
caggatgaac tgcgcgaacg taaagaaaaa agcgagcaac 40
<210> 61
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> synthetic E87R RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer
<400> 61
ggatgaactg cgcgaaagcta aacgtaaaag cgagcaactg gaac 44
<210> 62
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> synthetic E108R RF1 variant OmpT cleavage site
screening forward primer
<400> 62
gccaaaagat cctgatgacc gtcgtaacgc cttcctcg 38
<210> 63
<211> 34

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic T293R RF1 variant OmpT cleavage site
 screening forward primer
 <400> 63
 caacaggccg aagcgtctcg ccgtcgtaac ctgc 34
 <210> 64
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic N296K RF1 variant OmpT cleavage site
 screening forward primer
 <400> 64
 gcgtctaccc gtcgtaaact gctggggagt ggcg 34
 <210> 65
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic S304K RF1 variant OmpT cleavage site
 screening forward primer
 <400> 65
 gggagtggcg atcgcaagga ccgtaaccgt acttac 36
 <210> 66
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic N296K/L297V RF1 variant OmpT cleavage
 site screening forward primer
 <400> 66

cgaagcgtct acccgtcgta aagttctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 67

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297K RF1 variant OmpT cleavage
site screening forward primer

<400> 67

cgaagcgtct acccgtcgta aaaagctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 68

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297R RF1 variant OmpT cleavage
site screening forward primer

<400> 68

cgaagcgtct acccgtcgta aacgtctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 69

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297V RF1 variant OmpT cleavage
site screening forward primer

<400> 69

cgaagcgtct acccgtcgtc gcgttctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 70

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297K RF1 variant OmpT cleavage
 site screening forward primer

<400> 70

cgaagcgtct acccgtcgtc gcaagctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 71

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297R RF1 variant OmpT cleavage
 site screening forward primer

<400> 71

cgaagcgtct acccgtcgtc gccgtctggg gaggggcgat cgcagc 46

<210> 72

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297R/L298K RF1 variant OmpT
 cleavage site screening forward primer

<400> 72

caggccgaag cgtctaccg tcgtaaact aaggggagtg gcatcgag cgacc 55

<210> 73

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> synthetic N296K/L297R/L298R RF1 variant OmpT
 cleavage site screening forward primer

<400> 73

caggccgaag cgtctaccg tcgtaaact cggggagtg gcatcgag cgacc 55

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic WT RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 74

cctgcgccat ctcacgcatt tcaggatcat cgagc 35

<210> 75

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic M74R RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 75

cctgcgccat ctcacggcgt tcaggatcat cgagc 35

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E76K RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 76

gttcacctg cgccatctta cgcatttcag gatcatcg 38

<210> 77

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E84K RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 77

gttgctcgct tttttcttta gctttgcgca gttcatcctg 40

<210> 78

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic A85R RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 78

gttgctcgct tttttcttta cgttgcgca gttcatcctg 40

<210> 79

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E87R RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 79

gttccagttg ctgctttta cgtttagctt cgcgagttc atcc 44

<210> 80

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E108R RF1 variant OmpT cleavage site
screening reverse primer

<400> 80

cgaggaaggc gttacgacgg tcatcaggat cttttggc 38

<210> 81

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic T293R RF1 variant OmpT cleavage site

screening reverse primer

<400> 81

gcaggttacg acggcgagac gcttcggcct gttg 34

<210> 82

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K RF1 variant OmpT cleavage site

screening reverse primer

<400> 82

cgccactccc cagcagttta cgacgggtag acgc 34

<210> 83

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic S304K RF1 variant OmpT cleavage site

screening reverse primer

<400> 83

gtaagtacgg ttacggtcct tgcgatcgcc actccc 36

<210> 84

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> synthetic N296K/L297V RF1 variant OmpT cleavage site

screening reverse primer

<400> 84

gctgcgatcg ccaactcccca gaactttacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 85

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297K RF1 variant OmpT cleavage
site screening reverse primer

<400> 85

gctgcatcg ccaactcccca gctttttacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 86

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297R RF1 variant OmpT cleavage
site screening reverse primer

<400> 86

gctgcatcg ccaactcccca gacgtttacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 87

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297V RF1 variant OmpT cleavage
site screening reverse primer

<400> 87

gctgcatcg ccaactcccca gaacgcgacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 88

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297K RF1 variant OmpT cleavage
site screening reverse primer

<400> 88

gctgcatcg ccaactcccca gcttgcgacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 89

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296R/L297R RF1 variant OmpT cleavage
site screening reverse primer

<400> 89

gtgcgatcg ccactcccca gacggcgacg acgggtagac gcttcg 46

<210> 90

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297R/L298K RF1 variant OmpT
cleavage site screening reverse primer

<400> 90

ggtcgctgcg atgccactc cccttacgtt tacgacgggt agacgcttcg gcctg 55

<210> 91

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic N296K/L297R/L298R RF1 variant OmpT
cleavage site screening reverse primer

<400> 91

ggtcgctgcg atgccactc ccgcgacgtt tacgacgggt agacgcttcg gcctg 55

<210> 92

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 0 RF1 variant OmpT cleavage peptide
insertion forward oligo primer

<400> 92

gccgaagcgt ctaccgctcg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 93

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 1 RF1 variant OmpT cleavage peptide
insertion forward oligo primer

<400> 93

cgccgtgggt ctaccgctcg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 94

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 2 RF1 variant OmpT cleavage peptide
insertion forward oligo primer

<400> 94

gcacgccgtg gtaccgctcg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 95

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 3 RF1 variant OmpT cleavage peptide
insertion forward oligo primer

<400> 95

gccgcacgcc gtggctgctg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 96

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 4 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 96

gccgaagcac gccgtggctg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 97

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 5 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 97

gccgaagcgg cagccgtgg taacctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 98

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 6 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 98

gccgaagcgt ctgcagccg tggctgctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 99

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 7 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 99

gccgaagcgt ctaccgcacg ccgtggtctg gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg

75

<210> 100

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 8 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 100

gccgaagcgt ctaccgtgc acgccgtggt gggagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg

75

<210> 101

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 9 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 101

gccgaagcgt ctaccgtcg tgcacgccgt ggtagtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg

75

<210> 102

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 10 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer
 <400> 102
 gccgaagcgt ctaccgctcg taacgcacgc cgtggtggcg atcgagcga ccgtaaccgt 60
 attacaact tcccg 75

<210> 103
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 11 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer
 <400> 103
 gccgaagcgt ctaccgctcg taacctggca cgcggtggtg atcgagcga ccgtaaccgt 60
 attacaact tcccg 75

<210> 104
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 12 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer
 <400> 104
 gccgaagcgt ctaccgctcg taacctgctg gcacgccgtg gtcgagcga ccgtaaccgt 60
 attacaact tcccg 75

<210> 105
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 13 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer
 <400> 105
 gccgaagcgt ctaccgctcg taacctgctg ggggcacgcc gtggtagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 106

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 14 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 106

gccgaagcgt ctaccgctcg taacctgctg gggagtgcac gccgtggtga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 107

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 15 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 107

gccgaagcgt ctaccgctcg taacctgctg gggagtggcg cacgccgtga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 108

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 16 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 108

gccgaagcgt ctaccgctcg tcgtctgctg gggagtggcg atcgacgcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 109

<211> 75

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 17 RF1 variant OmpT cleavage peptide
 insertion forward oligo primer
 <400> 109
 gcctggctgg cagcgcgtcg cggtcgtggc gggagtggcg atcgcagcga ccgtaaccgt 60

 acttacaact tcccg 75
 <210> 110
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 18 RF1 variant OmpT cleavage peptide
 insertion forward oligo primer
 <400> 110
 gccgaatggc tggcagcgcg tcgcggtcgt ggcagtggcg atcgcagcga ccgtaaccgt 60
 acttacaact tcccg 75
 <210> 111
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 19 RF1 variant OmpT cleavage peptide
 insertion forward oligo primer
 <400> 111
 gccgaagcgt ggctggcagc gcgtcgcggt cgtggcggcg atcgcagcga ccgtaaccgt 60
 acttacaact tcccg 75
 <210> 112
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic No. 20 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 112

tgggggtggcc gttgggctcg caagaaaggt actattggcg atcgcagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 113

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 21 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 113

gcctgggggtg gccgttgggc tcgcaagaaa ggtactattg atcgcagcga ccgtaaccgt 60
acttacaact tcccg 75

<210> 114

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 22 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion forward oligo primer

<400> 114

gccgaatggg gtggccgttg ggctcgcaag aaaggtacta ttcgcagcga ccgtaaccgt 60

acttacaact tcccg 75

<210> 115

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 0 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 115

gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 116

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 1 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 116

gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacg acgggtagaa ccacggcgtg cttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 117

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 2 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 117

gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacg acgggtacca cggcgtgcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 118

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 3 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 118

gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacg acgaccacgg cgtgcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 119

<211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 4 RF1 variant OmpT cleavage peptide
 insertion reverse oligo primer
 <400> 119
 gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacg accacggcgt gcttcggcct gttggcgttt 60

 tgccatttca gcagc 75
 <210> 120
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 5 RF1 variant OmpT cleavage peptide
 insertion reverse oligo primer
 <400> 120
 gctgcatcg ccaactcccca gcaggttacc acggcgtgcc gcttcggcct gttggcgttt 60
 tgccatttca gcagc 75
 <210> 121
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic No. 6 RF1 variant OmpT cleavage peptide

 insertion reverse oligo primer
 <400> 121
 gctgcatcg ccaactcccca gcagaccacg gcgtgcagac gcttcggcct gttggcgttt 60
 tgccatttca gcagc 75
 <210> 122
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 7 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 122

gctgcatcg cactcccca gaccacggcg tgcggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 123

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 8 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 123

gctgcatcg cactccccc cacggcgtgc acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 124

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 9 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 124

gctgcatcg cactaccac ggcgtagcgc acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc 75

<210> 125

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 10 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 125

gctgcgatcg ccaccacggc gtgcgttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 126

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 11 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 126

gctgcgatca ccacggcgtg ccaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 127

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 12 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 127

gctgcgacca cggcgtgccg gcaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 128

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 13 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 128

gctaccacgg cgtgccccca gcaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 129

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 14 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 129

accacggcgt gcactcccca gcaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc

75

<210> 130

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 15 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 130

acggcgtgcg ccactcccca gcaggttacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc

75

<210> 131

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 16 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 131

gctgcgatcg ccactcccca gcagacgacg acgggtagac gcttcggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc

75

<210> 132

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 17 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 132

gtg'gcgatcg cca'ctcccgc cacgaccgcg acgcgctgcc agccaggcct gttggcg'ttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 133

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 18 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 133

gtg'gcgatcg cca'ctgccac gaccgcgacg cgctgccagc cattcggcct gttggcg'ttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 134

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 19 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 134

gtg'gcgatcg ccg'ccacgac cgcgacgcgc tgccagccac gcttcggcct gttggcg'ttt 60
tgccatttca gcagc 75

<210> 135

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 20 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 135

gctgcgatcg ccaatagtagt ctttcttgcg agcccaacgg ccaccccact gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc 75

<210> 136

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 21 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 136

gctgcgatca atagtagctt tcttgcgagc ccaacggcca cccagggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc 75

<210> 137

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic No. 22 RF1 variant OmpT cleavage peptide

insertion reverse oligo primer

<400> 137

gtgcggaata gtacctttct tgcgagccca acggccaccc cattgggcct gttggcgttt 60

tgccatttca gcagc 75

<210> 138

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic RF1 amplification primer 5His-RF1

<400> 138

catatgcatc accatcacca tcacggtggt ggctctaagc cttctatcgt tgccaaactg 60

gaagcc 66

<210> 139
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic RF1 amplification primer 3RF1
 <400> 139
 gtcgacttat tcctgctcgg acaacgccgc cag 33
 <210> 140
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic Oligonucleotide-Mediated Allelic
 Replacement (OMAR) PCR oligo 1opRF1 KR
 <400> 140
 gggaagttgt aagtacggtt acggtcgctg cgatcccctg aaccaagacg ctttcgacgg 60
 gtagacgctt cggcctgttg gcgttttgcc 90
 <210> 141
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic Oligonucleotide-Mediated Allelic
 Replacement (OMAR) PCR oligo 1opRF1 KRR
 <400> 141
 gggaagttgt aagtacggtt acggtcgctg cgatcccctg aaccacgacg ctttcgacgg 60
 gtagacgctt cggcctgttg gcgttttgcc 90
 <210> 142
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic Oligonucleotide-Mediated Allelic
Replacement (OMAR) PCR oligo 1opRF1 KRK

<400> 142

gggaagttgt aagtacggtt acggtcgctg cgatcccctg aacccttacg ctttcgacgg 60

gtagacgctt cggcctgttg gcgttttgcc 90

<210> 143

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Mismatch Amplification Mutation Assay

(MAMA) PCR oligo 3KR op-PCR

<400> 143

gcgatcccct gaaccaagac gc 22

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Mismatch Amplification Mutation Assay

(MAMA) PCR oligo 3 KRR op-PCR

<400> 144

cgatcccctg aaccacgacg c 21

<210> 145

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Mismatch Amplification Mutation Assay

(MAMA) PCR oligo 3KRK op-PCR

<400> 145

tgcgatcccc tgaaccctta cgc 23

<210> 146

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Mismatch Amplification Mutation Assay
(MAMA) PCR oligo 5 RF1 op-PCR

<400> 146

cgtgacgggg ataacgaacg cc 22

<210> 147

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic rolling circle amplification and primer
extension sequencing primer T7

<400> 147

taatacgact cactatagg 19

<210> 148

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic rolling circle amplification and primer
extension sequencing primer T7 term

<400> 148

gctagttatt gctcagcg 18

<210> 149

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant
SP-00067_V422 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 149

cggttggcagc agggtaatta gttcagctgc agcgttatg 39

<210> 150

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00067_V422 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 150

cataacgctg cagctgaact aattaccctg ctgccaacg 39

<210> 151

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00127_S415 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 151

gcaagctgac cgtcgataaa tagcgttggc agcagggtaa tg 42

<210> 152

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00127_S415 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 152

cattaccctg ctgccaacgc tatttatcga cggtcagctt gc 42

<210> 153

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00128_Q418 sense oligo primer for introducing
amber codon in Herceptin

<400> 153

cgataaaagc cgttggtagc agggtaatgt gttcag 36

<210> 154

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00128_Q418 antisense oligo primer for
introducing amber codon in Herceptin

<400> 154

ctgaacacat taccctgcta ccaacggctt ttatcg 36

<210> 155

<211> 35

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00114_P343 sense oligo primer for introducing
amber codon in Herceptin

<400> 155

gcaaagcgaa aggccaatag cgtgaaccgc aggtc 35

<210> 156

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00114_P343 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 156

gacctgcggt tcacgctatt ggcctttcgc ttgc 35

<210> 157

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00112_G341 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 157

gacgatcagc aaagcgaaat agcaaccgcg tgaaccgcag 40

<210> 158

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00112_G341 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 158

ctgcggttca cgcggttgct atttcgcttt gctgacgctc 40

<210> 159

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00102_K320 sense oligo primer for introducing
amber codon in Herceptin

<400> 159

gctgaatggt aaagaatact agtgcaaagt gagcaacaag g 41

<210> 160

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00102_K320 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 160

ccttgttgct cactttgcac tagtattctt taccattcag c 41

<210> 161

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00066_F404 sense oligo primer for introducing
amber codon in Herceptin

<400> 161

ctggacagcg acggtagcta gtttctgtat agcaagctg 39

<210> 162

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00066_F404 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 162

cagcttgcta tacagaaact agctaccgtc gctgtccag 39

<210> 163

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00113_Q342 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 163

gcaaagcgaa aggctagccg cgtgaaccgc ag 32

<210> 164

<211> 32

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00113_Q342 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 164

ctgcggttca cgcggttagc ctttcgcttt gc 32

<210> 165

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00096_T299 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 165

gtgaggaaca atacaatagc tagtatcgcg tagtgagcgt gc 42

<210> 166

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00096_T299 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 166

gcacgctcac tacgcgatac tagctattgt attgttcctc ac 42

<210> 167

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00120_Y373 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 167

ggtgaagggc ttttagccga gcgacatcgc 30

<210> 168

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00120_Y373 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 168

gcgatgtcgc tcggctaaaa gcccttcacc 30

<210> 169

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00094_N297 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 169

cgcgtgagga acaataactag agcacgtatc gcgtagtgc

38

<210> 170

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00094_N297 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 170

cactacgcga tacgtgctct agtattgttc ctcacgcg

38

<210> 171

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00125_F405 sense oligo primer for introducing

amber codon in Herceptin

<400> 171

gacagcgacg gtagcttcta gctgtatagc aagctgac

38

<210> 172

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic site directed mutagenesis variant

SP-00125_F405 antisense oligo primer for

introducing amber codon in Herceptin

<400> 172

gtcagcttgc tatacagcta gaagctaccg tcgctgtc

38