



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0070237
(43) 공개일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01) C12P 5/00 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7009683
(22) 출원일자(국제) 2018년09월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년04월02일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2018/051074
(87) 국제공개번호 WO 2019/046941
국제공개일자 2019년03월14일
(30) 우선권주장
62/554,494 2017년09월05일 미국(US)

(71) 출원인
인메드 파마슈티컬스 인코포레이티드
캐나다 브이6썸 1에스4 브리티시 컬럼비아 밴쿠버
그랜빌 스트리트 넘버340-200
(72) 발명자
아야카르 소날 알
캐나다 브이6티 2지3 브리티시 컬럼비아 밴쿠버
오소유스 크레센트 321-2875
파와르 산딕 브이
캐나다 브이6엠 1티6 브리티시 컬럼비아 밴쿠버
웨스트 39번 애비뉴 205-2151
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

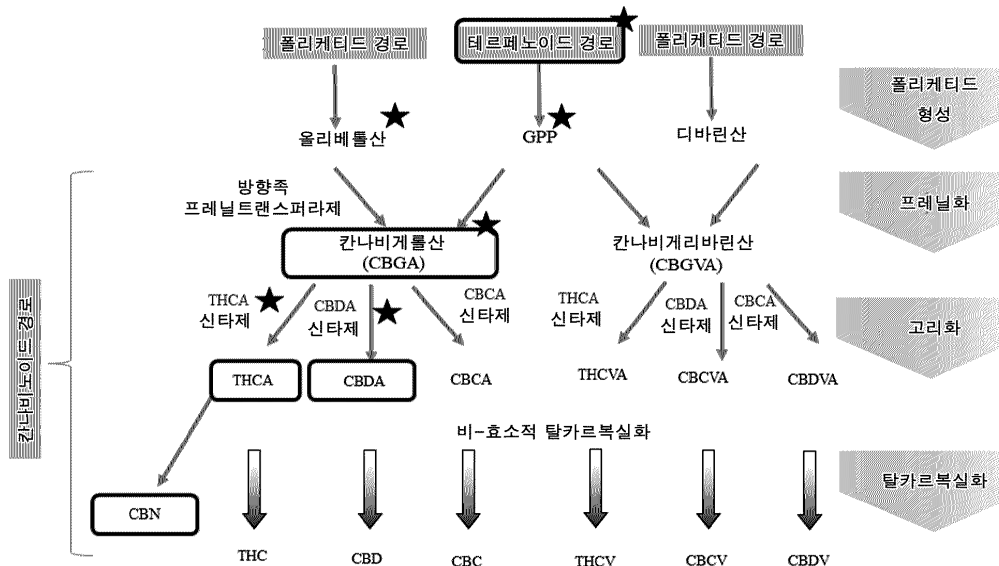
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 칸나비노이드 생성물의 생합성을 위한 대장균의 대사 조작

(57) 요약

숙주 세포에서의 테르페노이드의 생성을 위한 방법 및 조성물이 본원에서 제공된다. 일부 경우에, 상기 테르페노이드는 칸나비노이드이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/1205 (2013.01)

C12N 9/1241 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12P 17/06 (2013.01)

C12P 5/007 (2013.01)

C12P 7/22 (2013.01)

C12P 7/42 (2013.01)

(72) 발명자

헤일럼 스티븐 제이

캐나다 브이5와이 1브이7 브리티시 컬럼비아 밴쿠버 웨스트 13번 애비뉴 146 넘버102

호사인 사자드

캐나다 브이6엑스 3과4 브리티시 컬럼비아 리치먼드 애크로이드 로드 108-8611

야다브 비크라마디티아 지

캐나다 브이6엑스 0에이치6 브리티시 컬럼비아 밴쿠버 로스 드라이브 611-3462

로이 프로티바 알

캐나다 브이5엑스 1엠4 브리티시 컬럼비아 밴쿠버 이스트 49번 애비뉴 2-3558

스리바스타바 사르베쉬 케이

캐나다 브이6티 0에이5 브리티시 컬럼비아 밴쿠버 웨스트브룩 몰 2600 넘버67

명세서

청구범위

청구항 1

발현 카세트로서,

2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF 효소가 하기 ispDF 효소와 적어도 하나의 아미노산이 상이한, 발현 카세트: 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 헤 파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 테 니트리피칸스 DSM 1251 수덴_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터가 구성성분 프로모 터인, 발현 카세트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터가 유도가능 프로모 터인, 발현 카세트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF 효소가 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3의 300개 인접 아미노 산과 적어도 50% 또는 55% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 발현 카세트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산이 코돈 적합화된, 발현 카세트.

청구항 7

제1항에 있어서, dxs, idi, 및 ispE로 이루어진 군으로부터 선택된 효소의 하나 이상, 둘 이상, 또는 모두를 코 딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 8

제1항에 있어서, dxs 및 idi를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 9

제1항에 있어서, dxs, idi, 및 ispE를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 2작용성 ispDF가 CJ-ispDF와 31% 이하 유사한, 발현 카세트.

청구항 11

플라스미드로서,

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 발현 세트를 포함하는 플라스미드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 플라스미드가 이소프렌 신타제 (ispS)를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함하는 플라스미드.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 플라스미드가 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함하는 플라스미드.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 GPP 신타제가 진핵생물로부터 유래된 GPP 신타제인, 플라스미드.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 GPP 신타제가 식물-유래 GPP 신타제인, 플라스미드.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 GPP 신타제를 코딩하는 핵산이 코돈 적합화된, 플라스미드.

청구항 17

제13항에 있어서, GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트가 라이코펜 합성 경로의 하나 이상의 성분 (예: crtE, crtI, 및/또는 crtB) 또는 모노테르펜 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 플라스미드.

청구항 18

제13항에 있어서, GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트가 카렌 신타제, 미르센 신타제, 또는 리모넨 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 플라스미드.

청구항 19

제13항에 있어서, GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트가 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 플라스미드.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 칸나비노이드 신타제가 칸나비스 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 플라스미드.

청구항 21

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 발현 카세트 및/또는 제11항 내지 제20항 중 어느 한 항의 플라스미드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 22

숙주 세포로서,

- a. 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트; 및
- b. 테르페노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 테르페노이드 신타제가 이소프렌 신타제인, 숙주 세포.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 테르페노이드 신타제가 라이코펜 합성 경로의 성분인, 숙주 세포.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 테르페노이드 신타제가 칸나비노이드 신타제인, 숙주 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 칸나비노이드 신타제가 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제, 바람직하게는 칸나비스 속의 신타제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 칸나비노이드 신타제가 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된 절단된 칸나비노이드 신타제이고, 상기 절단은 신호 펩티드의 전부 또는 일부의 결실인, 숙주 세포.

청구항 28

제22항에 있어서, GPP 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 29

제22항에 있어서, a) 또는 b)의 발현 카세트가 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 숙주 세포.

청구항 30

제22항에 있어서, 상기 숙주 세포가 하나 이상의 발현 카세트(들) 중 적어도 하나를 포함하지 않는 대조 세포에 비해 MEP 경로를 통한 보다 높은 플럭스를 나타내는, 숙주 세포.

청구항 31

제22항에 있어서, 상기 숙주 세포가 ispC, ispE, ispG, 또는 ispH; 이들의 조합; 또는 이들 모두를 코딩하는 이중 핵산을 포함하지 않는, 숙주 세포.

청구항 32

제22항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 원핵생물인, 숙주 세포.

청구항 33

제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, a) 및/또는 b)의 발현 카세트가 상기 숙주 세포의 게놈으로 통합된, 숙주 세포.

청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 프로모터에 작동가능하게 연결된 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터가 구성성분 프로모터인, 숙주 세포.

청구항 35

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 프로모터에 작동가능하게 연결된 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터가 유도가능 프로모터인, 숙주 세포.

청구항 36

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트가 단일 플라스미드 내에 존재하거나 또는 단일 장소에서 상기 숙주 세포의 게놈으로 삽입된, 숙주 세포.

청구항 37

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트가 상이한 플라스미드 내에 있거나 또는 상이한 장소에서 상기 숙주 세포의 게놈으로 삽입된, 숙주 세포.

청구항 38

제22항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 올리베톨산 (OA)을 추가로 포함하는, 숙주 세포.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 올리베톨산이 상기 숙주 세포에 대해 외생적인, 숙주 세포.

청구항 40

제22항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 하나 이상의 글리코실화 경로 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 41

제22항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, 및 atoDA로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 모두에서 결실을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 42

표적 대사 생성물을 얻는 방법으로서,

제22항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포를, 하나 이상의 숙주 세포 발현 카세트에서 발현을 유도하기에 적합한 조건 하에 적합한 배지에서 배양하고, 이어서 배양된 세포 또는 소비된 배지를 수확하고, 그에 의해 상기 표적 대사 생성물을 얻는 것을 포함하는, 표적 대사 생성물을 얻는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 대사 생성물이 칸나비노이드인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 칸나비노이드가 THCA, CBDA, CBCA, CBN, THC, CBD, 또는 CBC, 또는 이들의 하나 이상의 혼합물인, 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 대사 생성물이 테르페노이드이거나 또는 이소프렌인 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 배양된 세포를 수확하고 용해시키고, 그에 의해 세포 용해물을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 방법이 상기 세포 용해물로부터 표적 대사 생성물을 정제하고, 그에 의해 정제된 표적 대사 생성물을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 48

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 소비된 배양 배지로부터 표적 대사 생성물을 정제하고, 그에 의해 정제된 표적 대사 생성물을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 정제된 표적 대사 생성물이 칸나비노이드이고 상기 방법이 상기 칸나비노이드를 제약 조성물 중에서 제제화하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 50

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 정제된 표적 대사 생성물이 칸나비노이드이고 상기 방법이 정제된 칸나비노이드의 염, 전구약물, 또는 용매화물을 형성하는 것을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국출원 번호 62/554,494의 우선권을 청구하고, 이것의 내용은 그 전체가 모든 목적상 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 리스트

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 리스트를 포함하고, 여기서 전체적으로 참조로 포함된다. 상기 ASCII 카피는 2018년 10월 17일에 형성되었으며, NMD-003_PCT_SL.txt 명칭을 갖고, 109,691 바이트 크기를 갖는다.

배경 기술

[0005] 식물 칸나비스 사티바(*Cannabis sativa*)의 선상 트리콤은 다양한 테르페노이드계 화학 화합물 (칸나비노이드)을 축적한다. 천연 생성물로부터 유래된 이들 식물은 동물 및 인간 신체 전반에 걸쳐 나타나는 칸나비노이드 수용체 (CB1 및 CB2)에 직접적으로 상호작용할 수 있다. CB-1 수용체는 신경계에서 주로 나타나고, CB-2 수용체는 면역계, 또는 면역-유래 세포에서 지배적으로 나타난다.

[0006] 칸나비노이드, 및 그의 유도체는, 치료 가능성을 갖는 여러 특성을 갖는다. 칸나비노이드를 사용한 CB-1 및/또는 CB-2 수용체의 활성화 또는 블록킹은 하류 신호전달 및 대사 경로, 이어서 시냅스 전달, 예컨대 통증 및 말초, 면역 반응, 및 염증에서의 다른 감각 신호의 전달에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 치료적 목적을 위한 천연 및 합성 칸나비노이드의 사용에 관심이 있다. 그러나, 낮은 추출 수율, 및 높은 분리 비용은 자연-유래 칸나비노이드의 사용을 비경제적으로 만든다. 유사하게, 칸나비노이드 생성의 완전 합성 방법은 이들 화합물의 복잡성으로 인해 방해받는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 당업계에 공지된 칸나비노이드의 생성을 위한 이중 시스템은, 이후에 시험관내 효소-촉매화된 반응에서 칸나비노이드 생성물을 생성하기 위해 사용되는, 칸나비노이드 신타제 효소의 생성 및 분비를 위한 진행 숙주 유기체에 의존한다. 예를 들어 미국특허 번호 9,587,212; 9,512,391; 9,394,512; 9,526,715; 9,359,625를 참조하며, 이들 각각은 THCA 신타제 또는 CBDA 신타제를 분비하는 재조합 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 사용한 칸나비노이드의 제조를 위한 방법 및 조성물 및 생물반응기를 기재한다. 그러나, 불행히도, 이 시스템은 분비된 효소에 대한 적합한 기질을 생성하기 위한 추가의 수단을 필요로 한다. 따라서, 생체내에서 칸나비노이드의 생성을 위한 비용-효율적인 이중 시스템을 개발하는 것에 대한 오랫동안 느껴진 충족되지 않은 필요성이 존재한다.

과제의 해결 수단

[0008] 칸나비노이드, 및 테르페노이드의 생성을 위한 방법, 조성물, 및 숙주 세포가 본원에 기재된다.

[0009] 하나의 측면에서, 본 발명은 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는, 발현 카세트가 존재하는 숙주 세포에서 MEP 경

로를 통한 플럭스를 증가시킨다. MEP 경로를 통한 증가된 플럭스는 게라닐 포스페이트 (GPP), 파르네실 피로포스페이트 (FPP), 게라닐게라닐 피로포스페이트 (GGPP), 테르페노이드, 이소프렌, 라이코펜, 칸나비노이드 (예: CBGA), 모노테르펜, 세스퀴테르펜, 디테르펜, 및/또는 카로테노이드의 하류 생성을 증가시키기에 적합한 이소프레노이드 전구체의 생성을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 발현 카세트는 임의로 라이코펜 합성 경로의 성분 (예: crtE, crtI, 및/또는 crtB), 이소프렌 신타제, GPP 신타제 (예: ispA 또는 식물 유래 GPP 신타제), 모노테르펜 신타제, 및/또는 칸나비노이드 신타제를 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 하기 ispDF 효소와 적어도 하나의 아미노산이 상이하다: 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 헤파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 테니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소는 하기 ispDF 효소 중 임의의 하나와 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95% 이하의 동일성을 갖는다: 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 헤파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 테니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 디폴트 BLAST 2.7.0 단백질:단백질 정렬 셋팅을 사용시 CJ-ispDF와 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 또는 25% 이하 유사하다.

[0011] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터는 유도가능 프로모터이다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터는 구성성분 프로모터이다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3의 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 또는 300개 인접 아미노산과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산은 코돈 적합화된다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 dxs, idi, 및 ispE로 이루어진 군으로부터 선택된 효소의 하나 이상, 둘 이상, 또는 모두를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 dxs 및 idi, 및 임의로 GPP 신타제 (예: ispA 또는 식물 유래 GPP 신타제), 모노테르펜 신타제, 및/또는 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 dxs, idi, 및 ispE, 및 임의로 GPP 신타제 (예: ispA 또는 식물 유래 GPP 신타제), 모노테르펜 신타제, 및/또는 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제, 바람직하게는 칸나비스(*Cannabis*) CBGA 신타제이다.

[0013] 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된 절단된 칸나비노이드 신타제이고, 여기서 절단은 신호 펩티드의 전부 또는 일부의 결실이다.

[0014] 하나의 양태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 발현 카세트 양태, 구현예, 경우, 또는 예 중 임의의 것에 따른 적어도 1, 2, 3개, 또는 그 초과 발현 카세트, 또는 이들의 단편(들)을 포함하는 플라스미드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 발현 카세트 양태, 구현예, 경우, 또는 예 중 임의의 하나에 따른 적어도 2, 3, 4개, 또는 그 초과 발현 카세트, 또는 이들의 단편(들)을 포함하는 복수의 플라스미드를 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 플라스미드들은 이소프렌 신타제 (ispS)를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 플라스미드들은 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 구현예에서, GPP 신타제는 진핵생물로부터 유래된 GPP 신타제이다. 일부 구현예에서, GPP 신타제는 식물-유래 GPP 신타제이다. 일부 구현예에서, GPP 신타제는, 예를 들어, 숙주 세포에서의 발현에 대해, 코돈 적합화된다.

[0016] 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 플라스미드들은 라이코펜 합성 경로의 하나 이상의 성분 (예: crtE, crtI, 및/또는 crtB), 디테르펜 신타제, 세스퀴테르펜 신타제, 또는 모노테르펜 신타제를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 플라스미드들은 카렌 신타제, 미르센 신타제, 또는 리모넨 신타제를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 플라스미드들은 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 포함한다.

- [0017] 일부 경우에, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는, 예를 들어, 칸나비스, CBGA 신타제이다. 일부 구현예에서, 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된 절단된 칸나비노이드 신타제이고, 여기서 절단은 신호 펩티드의 전부 또는 일부의 결실이다.
- [0018] 하나의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 발현 카세트(들) 중 임의의 하나 이상, 및/또는 본원에 기재된 플라스미드(들) 중 임의의 하나 이상을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 하나 이상의 발현 카세트(들) 중 하나 이상, 또는 모두는 하나의 장소, 또는 복수의 장소에서 숙주 세포의 게놈으로 통합된다.
- [0019] 하나의 양태에서, 본 발명은 a). 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트; 및 b.) 테르페노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 구현예에서: i.) 칸나비노이드 신타제, ispDF, 또는 프로모터 중 하나 또는 둘 다는 숙주 세포에 대해 이중이고/거나; ii.) 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산은 작동가능하게 연결된 프로모터에 대해 이중이고/거나; 및/또는 iii.) 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산은 작동가능하게 연결된 프로모터에 대해 이중이다.
- [0020] 일부 구현예에서, 테르페노이드 신타제는 이소프렌 신타제이다. 일부 구현예에서, 테르페노이드 신타제는 라이코펜 신타제 경로의 성분 (예: crtI, crtE, 또는 crtB)이다. 일부 구현예에서, 라이코펜 합성 경로의 성분을 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포는 crtI, crtE, 및 crtB를 코딩하는 하나 이상의 핵산(들)을 포함하고, 여기서 crtI, crtE, 및 crtB는 동일한 또는 상이한 발현 카세트 내에 있다.
- [0021] 일부 구현예에서, 테르페노이드 신타제는 칸나비노이드 신타제이다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 사티바 칸나비노이드 신타제이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CBGA 신타제를 코딩하는 핵산 및 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된 또 다른 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산, 또는 이들 둘 또는 모두를 코딩하는 하나 이상의 핵산의 조합을 포함한다.
- [0022] 숙주 세포가 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제이다. 일부 경우에, CBGA 신타제 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포는 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및/또는 CBCA 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하고, 여기서 각각의 칸나비노이드 신타제는 동일한 또는 상이한 발현 카세트 내의 프로모터에 독립적으로 작동가능하게 연결된다.
- [0023] 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제, 또는 적어도 하나의 코딩된 칸나비노이드 신타제는 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제로 이루어진 군으로부터 선택된 절단된 칸나비노이드 신타제이고, 여기서 절단은 신호 펩티드의 전부 또는 일부의 결실이다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제는 막횡단 또는 막-연합 영역의 전부 또는 일부의 결실을 포함하고, 그에 따라 칸나비노이드 신타제는 막-연합되지 않는다.
- [0024] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 구현예에서, a) 또는 b)의 발현 카세트는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 ispC, ispE, ispG, ispH, 또는 이들의 조합, 또는 이들 모두를 코딩하는 이중 핵산을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 ispC, ispG, ispH, 이들의 조합, 또는 이들 모두를 코딩하는 이중 핵산을 포함하지 않는다.
- [0025] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 원핵생물, 예컨대 에스케리키아, 판테오아, 바실루스, 코리네박테리움, 또는 락토코쿠스 속의 원핵생물이다. 일부 구현예에서, 세포는 에스케리키아 콜라이 (대장균), 판테오아 시트레아, 씨. 글루타미쿰, 바실루스 서브틸리스, 또는 엘. 락티스이다.
- [0026] 일부 구현예에서, a) 및/또는 b)의 발현 카세트는 숙주 세포의 게놈으로 통합된다. 일부 구현예에서, a)의 발현 카세트는 숙주 세포의 게놈으로 통합되고, b)의 발현 카세트는 통합되지 않거나, 숙주 세포의 게놈 내의 상이한 장소에서 통합된다. 일부 구현예에서, b)의 발현 카세트는 숙주 세포의 게놈으로 통합되고, a)의 발현 카세트는

통합되지 않거나, 숙주 세포의 게놈 내의 상이한 장소에서 통합된다. 일부 구현예에서, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트는 동일한, 또는 상이한 장소에서 숙주 세포의 게놈으로 통합된다.

[0027] 일부 구현예에서, a) 및/또는 b)의 발현 카세트는 숙주 세포 내의 플라스미드 상에 존재한다. 일부 구현예에서, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트는 숙주 세포 내의 플라스미드 상에 존재한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 a) 및/또는 b)의 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 a)의 발현 카세트를 포함하는 플라스미드, 및/또는 b)의 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 포함한다. 일부 구현예에서, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트는 동일한 플라스미드 내에 있다. 일부 구현예에서, a)의 발현 카세트는 b)의 발현 카세트와 상이한 플라스미드 내에 있다.

[0028] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트는 또한 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 동일한 프로모터를 포함한다. 일부 경우에, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 구성성분 프로모터에 작동가능하게 연결된 칸나비노이드 신타제 (예: CBGA 신타제)를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 유도가능 프로모터에 작동가능하게 연결된 칸나비노이드 신타제 (예: CBGA 신타제)를 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터는 구성성분 프로모터이다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터는 유도가능 프로모터이다. 숙주 세포가 상이한 칸나비노이드 신타제를 포함하는 둘 이상의 발현 카세트를 포함하는 일부 구현예에서, 각각의 발현 카세트는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 구성성분 프로모터를 포함하고, 각각의 발현 카세트는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 유도가능 프로모터를 포함하거나, 하나 이상의 발현 카세트(들)는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 구성성분 프로모터를 포함하고, 하나의 발현 카세트(들)는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 유도가능 프로모터를 포함한다.

[0030] 숙주 세포가 상이한 칸나비노이드 신타제를 포함하는 둘 이상의 발현 카세트를 포함하는 일부 구현예에서, 각각의 발현 카세트는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 유도가능 프로모터를 포함한다. 숙주 세포가 상이한 칸나비노이드 신타제를 포함하는 둘 이상의 발현 카세트를 포함하는 일부 구현예에서, 적어도 하나의 발현 카세트는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 유도가능 프로모터를 포함한다. 숙주 세포가 상이한 칸나비노이드 신타제를 포함하는 둘 이상의 발현 카세트를 포함하는 일부 구현예에서, 적어도 하나의 발현 카세트는 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된 구성성분 프로모터를 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3의 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 또는 300개 인접 아미노산과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 하기 ispDF 효소와 적어도 하나의 아미노산이 상이하다:에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 헤파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 데니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소는 하기 ispDF 효소 중 임의의 하나와 50%, 80%, 90%, 또는 95% 이하 동일하다:에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 헤파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 데니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409.

[0033] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 dxs, ispC, ispD, ispE, ispF, ispG, ispH, 및 idi로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 MEP 경로 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하거나 추가로 포함한다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 dxs, ispC, ispD, ispE, ispF, ispG, ispH, 및 idi로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 MEP 경로 효소를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 dxs 및 idi를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 ispE를 코딩하는 핵산을 추가로

포함한다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 dxs, idi, 및 ispE를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 ispC, ispE, ispF, ispG, 또는 isph 중 하나 이상, 또는 모두를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트는 ispC, ispF, ispG, 또는 isph중 하나 이상, 또는 모두를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는다.

[0034] 일부 경우에, 숙주 세포는 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트를 포함하지 않는 대조 세포에 비해 보다 높은 발현 수준의 하나 이상의 MEP 경로 유전자를 포함한다. 일부 경우에, 숙주 세포는 2작용성 ispDF 효소를 포함하는 발현 카세트를 포함하지 않는 대조 세포에 비해 보다 높은 발현 수준의 dxs 및 idi를 포함한다. 일부 경우에, 숙주 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 발현 카세트(들) 및/또는 하나 이상의 플라스미드(들) 중 적어도 하나를 포함하지 않는 대조 세포에 비해 MEP 경로를 통한 보다 높은 플럭스를 나타낸다.

[0035] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 경우에, a)의 발현 카세트는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, b)의 발현 카세트는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트는 상이한 발현 카세트이다. 일부 경우에, a)의 발현 카세트 및 b)의 발현 카세트는 동일한 발현 카세트이다.

[0036] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 올리베톨산 (OA)을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 올리베톨산은 숙주 세포에 대해 외생적이다. 예를 들어, OA는, 숙주 세포가 배양되는 배지에 외생 적용될 수 있다.

[0037] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 하나 이상의 글리코실화 경로 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하고, 여기서: a) 글리코실화 경로 유전자는 숙주 세포에 대해 이중이거나; b) 프로모터는 숙주 세포에 대해 이중이거나; c) 프로모터는 하나 이상의 글리코실화 경로 유전자 중 하나 이상에 대해 이중이거나; 또는 d) 발현 카세트는 숙주 세포에 대해 이중이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, 및 atoDA로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 모두에서 결실을 포함한다.

[0038] 제2 양태에서, 본 발명은 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포를 제공하고, 여기서 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3의 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 또는 300개 인접 아미노산과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3과 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 dxs, ispC, ispD, ispE, ispF, ispG, isph, 및 idi로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 MEP 경로 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함하고, 여기서: a) 프로모터는 하나 이상의 MEP 경로 효소에 대해 이중이거나; b) 프로모터 또는 하나 이상의 MEP 경로 효소는 숙주 세포에 대해 이중이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 dxs 및 idi를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 dxs, idi, 및 ispE를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 ispS를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 GPP 신타제 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, 및 atoDA로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 모두에서 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 칸나비노이드 신타제를 추가로 포함한다.

[0041] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 원핵생물, 예컨대 에스케리키아, 판테오아, 바실루스, 코리네박테리움, 또는 락토코쿠스 속의 원핵생물이다. 일부 구현예에서, 세포는 에스케리키아 콜라이 (대장균), 판테오아 시트레아, 씨. 글루타미쿰, 바실루스 서브틸리스, 또는 엘. 락티스이다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 양태, 구현예, 경우, 또는 예 중 임의의 하나에 따른 숙주 세포를, 하나 이상의 숙주 세포 발현 카세트에서 발현을 유도하기에 적합한 조건 하에 적합한 배지에서 배양하고, 이어서 배양된 세포 또는 소비된 배지를 수확함으로써, 표적 대사 생성물을 얻는 것을 포함하는, 표적 대사 생성물 (예: 테르페노이드 또는 칸나비노이드)을 얻는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기재

된 양태, 구현예, 경우, 또는 예 중 임의의 하나에 따른 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하고, 대사 생성물은 칸나비노이드이다. 일부 구현예에서, 칸나비노이드는 THCA, CBDA, CBCA, CBN, THC, CBD, 또는 CBC, 또는 하나 이상의 이들의 혼합물이다.

[0043] 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 양태, 구현예, 경우, 또는 예 중 임의의 하나에 따른 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하고, 대사 생성물은 테르페노이드 또는 이소프렌이다. 일부 구현예에서, 방법은 배양된 세포를 수확하고 용해시킴으로써, 세포 용해물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포 용해물로부터 표적 대사 생성물을 정제함으로써, 정제된 표적 대사 생성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 소비된 배지로부터 표적 대사 생성물을 정제함으로써, 정제된 표적 대사 생성물을 생성하는 것을 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 정제된 표적 대사 생성물은 칸나비노이드이고, 방법은 칸나비노이드를 제약 조성물 중에서 제제화하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 정제된 표적 대사 생성물은 칸나비노이드이고, 방법은 정제된 칸나비노이드의 염, 전구약물, 또는 용매화물을 형성하는 것을 포함한다.

[0045] 참조 포함

[0046] 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허, 및 특허 출원은, 각각의 개별적 공개문헌, 특허, 및 특허 출원이 참조로 포함된다고 구체적 및 개별적으로 지시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 칸나비스 사타바에서의 칸나비노이드 합성의 개요를 나타내는 다이어그램이다.

도 2는 대장균에서 이소프레노이드 전구체의 생합성을 위한 메발로네이트-독립적 (MEP) 경로의 도시이다. 기질 및 생성물은 상단에 나타내었고 하기와 같다: G3P (글리세르알데히드 3-포스페이트), DOXP (1-데옥시-D-크실룰로스 5-포스페이트), MEP (2-C-메틸에리트ρί톨 4-포스페이트), CDP-ME (4-디포스포시티딜-2-C-메틸에리트ρί톨), CDP-MEP (4-디포스포시티딜-2-C-메틸-D-에리트ρί톨 2-포스페이트), MECPP (2-C-메틸-D-에리트ρί톨 2,4-시클로디포스페이트), HMBPP ((E)-4-히드록시-3-메틸-부트-2-에닐 피로포스페이트), IPP (이소펜테닐 디포스페이트), DMAPP (디메틸알릴 디포스페이트), GPP (게라닐 피로포스페이트). 상응하는 효소는 저부에 나타내었고 하기와 같다: dxs (DOXP 신타제), ispC (DOXP 리덕타제), ispD (2-C-메틸-D-에리트ρί톨 4-포스페이트 시티딜트랜스퍼라제), ispE (4-디포스포시티딜-2-C-메틸-D-에리트ρί톨 키나제), ispF (2-C-메틸-D-에리트ρί톨 2,4-시클로디포스페이트 신타제), ispG (HMB-PP 신타제), ispH (HMB-PP 리덕타제), 및 idi (이소펜테닐/디메틸알릴 디포스페이트 이소머라제).

도 3a-b는 숙주 세포에서의 MEP 경로 과발현에 대한 2개의 상이한 발현 카세트의 도시이다.

도 4는 숙주 세포에서의 dxs, ispD, idi, 및 ispF의 이중 발현을 보여주는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

도 5는 숙주 세포에서의 칸나비게롤산 신타제 (CBGAS)의 이중 발현에 대한 발현 카세트를 나타낸다.

도 6은 대장균 숙주 세포에서의 폴리히스티딘 (6x-His)-표지된 방향족 프레닐트랜스퍼라제(서열 번호 43으로 기재된 “6x-His”)의 발현 및 정제를 보여주는 SDS 페이지(PAGE) 겔을 나타낸다. 정화된 세포 용해물을 정제하지 않고 로딩하였다. a: 유도되지 않은 세포 용해물; b-f: 1 mM IPTG로 유도된 세포의 용해물; c-f: 분획을 통한 니켈-NTA 컬럼 유동.

도 7은 칸나비게롤산 (CBGA)의 시험관내 생성을 보여주는 크로마토그램이다. a 라인은 0.0625 μ g/mL에서의 CBGA 표준에 대한 크로마토그램이고; b는 CBGAS-유도된 세포 용해물, 올리베톨산 (OA), 및 GPP를 함유하는 반응 혼합물이고, c는 GPP가 없는 것 이외에는 동일한 반응 혼합물이다.

도 8은 대장균에서의 칸나비게롤산 (CBGA)의 생체내 생성을 보여주는 크로마토그램이다. a 라인은 0.5 μ g/mL에서의 CBGA 표준에 대한 크로마토그램이고; b는 OA 및 GPP 보충된 CBGAS-발현 대장균의 성장으로부터의 소비된 배지이고, c는 OA가 없는 것 이외에는 동일한 반응 혼합물이다.

도 9는 대장균에서의 Δ (9)-테트라히드로칸나비놀산 신타제 (THCAS)의 생성에 대한 발현 카세트의 도시이다.

도 10은 THCAS 발현 카세트 및 샤페론 공동-발현 카세트를 함유하는 숙주 세포의 도시이다.

도 11은 THCAS 발현 카세트 및 이중 글리코실화 시스템에 대한 발현 카세트를 함유하는 숙주 세포의 도시이다.

도 12는 낮은 카피-수 CBGAS 발현 카세트의 도시이다.

도 13은 메발로네이트-독립적 경로 발현 카세트 및 GPP 신타제 (GPPS) 및 CBGAS 발현 카세트를 함유하는 숙주 세포의 도시이다.

도 14는 대장균에서의 지시된 발현 구성물에 대한 적합화된 유도제 농도의 표를 나타낸다. 도 15는 상이한 유도제 농도 하에서의 대장균의 OD 측정을 나타낸다. 균주 B-D는 GPPS CBGAS 발현 카세트 pBAD33_GPPS_CBGAS를 함유한다. 균주 F-J는 pBAD33_GPPS_CBGAS 발현 카세트 및 MEP 경로 발현 카세트 pTRC_RDE (도 13에 나타냄) 둘 다를 함유한다.

도 16은 pBAD33_GPPS_CBGAS의 발현 또는 pBAD33_GPPS_CBGAS 및 pTRC_RDE의 공동-발현 후 세포 용해물의 SDS 페이지 분석의 결과를 나타낸다.

도 17은 지시된 유도제 농도로 유도된 발현 배양물로부터의 세포 용해물 중의 상이한 단백질 농도를 나타낸다. 균주 A-D는 플라스미드 pBAD33_GPPS_CBGAS를 함유한다. 균주 E-J는 플라스미드 pBAD33_GPPS_CBGAS 및 pTRC_RDE를 함유한다.

도 18은 pTRC_RDE* 발현 구성물(construct)을 함유하는 균주에서 ispDF의 발현 후 세포 용해물의 SDS 페이지 분석의 결과를 나타낸다.

도 19는 네이티브(native) ispD 및 ispF (ispD-ispF)(서열 번호 42) 및 씨. 제주니 ispDF (CJ-ispDF)(서열 번호 41)를 사용한 메타게노믹스(metagenomics) 스크리닝 검정 (ispDF1)(서열 번호 1)으로부터 식별된 2작용성 ispDF 효소의 단백질 서열 정렬을 나타낸다.

도 20은 pTRC_RDEE 및 pTRC_RDE*E 발현 구성물을 나타낸다. pTRC_RDE*E는 ispD 및 ispF 효소 대신에 2작용성 ispDF 효소를 함유한다.

도 21은 MEP 경로를 통한 증가된 플럭스에 대해 시험된 구성물 및 균주의 개요를 나타낸다.

도 22는 이소프렌 생성에 대한 구성물 및 데이터를 나타낸다. 구성물 SA04는, ispDF를 코딩하는 핵산이 코돈 적합화된 것을 제외하고는, 구성물 SA03과 동일하다.

도 23은 대장균의 4개의 상이한 균주에서의 라이코펜 생성을 나타낸다. SA01: pAC-LYC; SA02: pAC-LYC 및 pTRC-RDE; SA03: pAC-LYC 및 pTRC-RDEE; SA04: pAC-LYC 및 pTRC-RDE*; 및 SA05: pAC-LYC 및 pTRC-RDE*E.

도 24는 라이코펜의 생성을 나타낸다.

도 25는 모노테르펜 카렌의 생성에 대한 구성물 및 데이터를 나타낸다.

도 26은 2작용성 효소 ispDF1, ispDF2, 및 ispDF3의 펩티드 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 메발로네이트-독립적 (MEP) 경로를 변경시키는 것에 의한 테르페노이드의 증가된 생성을 위한 대사 조작 전략이 본원에 기재된다. MEP, 또는 테르페노이드, 경로는, 상업적으로 가치있는 테르페노이드 및 다른 화합물을 생성하기 위한 다양한 하류 과정에서 사용될 수 있는 생성물인 게라닐 피로포스페이트 (GPP)를 생성한다.

[0049] 또한, 네이티브 대장균 ispD 및 ispF에 의해 수행되는 반응 둘 다를 촉매할 수 있는 2작용성 효소 ispDF가 본원에 기재된다. 2작용성 효소는 다양한 시험관내 또는 생체내 이소프렌, 테르페노이드, 또는 칸나비노이드 생성 시스템에서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 대사 조작 전략은, ispDF와 함께 또는 이것 없이, 이중 숙주 세포에서 이소프렌, GPP, 또는 하류 테르페노이드의 생성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0050] GPP는 칸나비노이드 경로의 제1 효소, 칸나비게롤산 신타제 (CBGAS), 방향족 프레닐트랜스퍼라제 효소에 대한 기질이다 (도 1). CBGAS는 기질 GPP 및 올리베톨산 (OA)을 사용하여 칸나비게롤산 (CBGA)을 생성한다. 일부 경우에, CBGA는, THCA 신타제 (THCAS)에 의해 촉매화된 반응을 통해 Δ^9 -테트라히드로칸나비놀산 (THCA)을, 또는 CBDA 신타제 (CBDAS)에 의해 촉매화된 반응을 통해 칸나비디올산 (CBDA)을 생성하는 것과 같은, 추가의 시험관내 또는 생체내 효소-촉매화된 반응에 대한 기질로서 사용될 수 있다. 칸나비노이드의 생성에 대한 추가의 경로는 Thakur et al., Life Sciences, 78 (2005) 454-466에 기재된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. Thakur 등의 문헌은 그 전체가 모든 목적상 본원에 참조로 포함되며, 이는 본원에 기재된 효소, 생성물, 효소 기질, 경로 및 그의 부분, 및 합성 체계를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0051] 일부 구현예에서, 기질 CBGA, THCA, CBDA, CBCA, THCVA, CBCVA, CBDVA, 및 이들의 조합이 관여하는 하류 효소-촉매화된 반응의 생성물은, 예를 들어 도 1에 도시된 바와 같이, 다양한 칸나비노이드를 생성하기 위한 화학적, 효소적, 또는 열적 수단을 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 탈카르복실화될 수 있다.
- [0052] 정의
- [0053] 하기 약어가 본원에서 사용된다: "G3P"는 글리세르알데히드 3-포스페이트를 의미하고; "DOXP"는 1-데옥시-D-크실룰로스 5-포스페이트를 의미하고; "MEP"는 2-C-메틸에리트리톨 4-포스페이트를 의미하고; "CDP-ME"는 4-디포스포시틸-2-C-메틸에리트리톨을 의미하고; "CDP-MEP"는 4-디포스포시틸-2-C-메틸-D-에리트리톨 2-포스페이트를 의미하고; "MECPP"는 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-시클로디포스페이트를 의미하고; "HMBPP"는 (E)-4-히드록시-3-메틸-부트-2-에닐 피로포스페이트를 의미하고; "IPP"는 이소펜테닐 디스포스페이트를 의미하고; "DMAPP"는 디메틸알릴 디포스페이트를 의미하고; "GPP"는 게라닐 피로포스페이트를 의미한다.
- [0054] "DXP 경로" 및 "MEP 경로"는 메발로네이트-독립적 경로로서 또한 공지된 비-메발로네이트 경로를 지칭한다. MEP 경로의 유전자는 *dxs*, *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG*, *ispH*, 및 *idi*이다. DXP 또는 MEP 경로 유전자 또는 유전자 생성물, 또는 이를 코딩하는 핵산과 관련하여, 유전자는, 예를 들어, 이중 핵산이 존재하는 숙주 세포의 네이티브 유전자, 그의 코돈 적합화된 버전, 상이한 유기체로부터 유래된 (예: 코돈 적합화된) 유전자, 또는 그의 오르토로그(orthologue)일 수 있다.
- [0055] "*dxs*"는 DOXP 신타제를 지칭하고; "*ispC*"는 DOXP 리덕타제를 지칭하고; "*ispD*"는 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제를 지칭하고; "*ispE*"는 4-디포스포시틸-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제를 지칭하고; "*ispF*"는 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-시클로디포스페이트 신타제를 지칭하고; "*ispG*"는 HMB-PP 신타제를 지칭하고; "*ispH*"는 HMB-PP 리덕타제를 지칭하고; "*idi*"는 이소펜테닐/디메틸알릴 디포스페이트 이소머라제를 지칭하고; "*ispA*"는, DMAPP + IPP를 GPP로, 또한 GPP + IPP를 파르네실 피로포스페이트로 전환시킬 수 있는, "GPP 신타제"로도 공지된 파르네실 디포스페이트 신타제를 지칭한다.
- [0056] 용어 "*ispDF*"는 2개의 상이한 활성 자리를 갖고 *ispD* 활성 (EC 2.7.7.60) 및 *ispF* 활성 (EC 4.6.1.12)을 나타내는 2작용성 단일-쇄 효소를 지칭한다. 전형적으로, *ispDF*는 자연 발생 2작용성 효소 또는 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입, 또는 치환과 같은 하나 이상의 변형을 갖는 자연 발생 2작용성 효소의 유도체이다. 일부 경우에, 유전자는 식물-유래, 또는 칸나비스 유전자이다. 일부 경우에, 유전자는 대장균 유전자, 또는 그의 오르토로그이다.
- [0057] "OA"는 올리베톨산을 지칭하고; "CBGA"는 칸나비게룰산을 지칭하고; "CBNA"는 칸나비네룰산을 지칭하고; ; "칸나비놀"또는 "CBN"은 6,6,9-트리메틸-3-펜틸벤조[c]크로멘-1-올을 지칭하고; "CBGVA"는 칸나비게리바린산을 지칭하고; "THCA"는 Δ^9 이성질체를 포함한 테트라히드로칸나비놀산을 지칭하고; "CBDV"는 칸나비디바린을 지칭하고; "CBC"는 칸나비크로멘을 지칭하고; "CBCA"는 칸나비크로멘산을 지칭하고; "CBCV"는 칸나비크로메바린을 지칭하고; "CBG"는 칸나비게룰을 지칭하고; "CBGB"는 칸나비게로바린을 지칭하고; "CBE"는 칸나비엘소인을 지칭하고; "CBL"은 칸나비시클룰을 지칭하고; "CBV"는 칸나비바린을 지칭하고; "CBT"는 칸나비트리올을 지칭하고; "THCV"는 테트라히드로칸나비바린 (THCV)을 지칭하고; "THC"는 테트라히드로칸나비놀을 지칭하고, " Δ^9 -THC"는 Δ^9 -테트라히드로칸나비놀을 지칭하고; "CBDA"는 칸나비디올산을 지칭한다.
- [0058] 본원에서 사용되는 바와 같이 "MEP 경로를 통한 증가된 플럭스"는 IPP 및/또는 DMAPP의 증가된 생성을 지칭한다. 전형적으로, IPP 및/또는 DMAPP의 생성은, 반응물로서 IPP 및/또는 DMAPP를 활용하는 리포터 효소의 작용에 의해 형성된 생성물을 검출함으로써 간접적으로 결정된다. 예를 들어, MEP 경로를 통한 증가된 플럭스는 리포터로서 이소프렌 신타제 (*ispS*)를 사용함으로써 증가된 이소프렌 생성으로서 검출될 수 있다. 또 다른 예로, MEP 경로를 통한 증가된 플럭스는 리포터로서 GPP 신타제를 사용함으로써 증가된 GPP 생성으로서 검출될 수 있다. 일부 경우에, GPP 생성은 리포터 효소를 사용하여 검출된다. 예를 들어, 증가된 GPP 생성은 GPP 신타제 효소 및 라이코펜 신타제 리포터 효소를 사용하여 증가된 라이코펜 생성을 검출함으로써 검출될 수 있고, 이로써 MEP 경로를 통한 증가된 플럭스를 검출한다. 또 다른 예로, 증가된 GPP 생성은 GPP 신타제 효소 및 모노테르펜 (예: 리모넨, 카렌, 미르센) 신타제 리포터 효소를 사용하여 증가된 모노테르펜 (예: 리모넨, 카렌, 미르센) 생성을 검출함으로써 검출될 수 있고, 이로써 MEP 경로를 통한 증가된 플럭스를 검출한다. 또 다른 예로, 증가된 GPP 생성은 GPP 신타제 효소 및 칸나비노이드 (예: CBGA) 신타제 리포터 효소를 사용하여 증가된 칸나비노이드 (예: CBGA) 생성을 검출함으로써 검출될 수 있고, 이로써 MEP 경로를 통한 증가된 플럭스를 검출한다. 전형적으로, 증가는, 시험 균주에서의 하나 이상의 이중 발현 카세트가 없는 대조 균주에 비해 적어도 10%이다.

일부 경우에, 증가는, 시험 군주에서의 하나 이상의 이중 발현 카세트가 없는 대조 군주에 비해 적어도 2배이다.

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "칸나비디올", "CBD" 또는 "칸나비디올들"은 하기 화합물 중 하나 이상을 지칭하며, 특정 다른 입체이성질체 또는 입체이성질체들이 특정되지 않는 한, 화합물 " Δ^2 -칸나비디올"을 포함한다. 이들 화합물은 하기와 같다: (1) Δ^5 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-5-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); (2) Δ^4 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-4-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); (3) Δ^3 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-3-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); (4) $\Delta^{3,7}$ -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸렌시클로헥스-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); (5) Δ^2 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-2-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); (6) Δ^1 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-1-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올); 및 (7) Δ^6 -칸나비디올 (2-(6-이소프로페닐-3-메틸-6-시클로헥센-1-일)-5-펜틸-1,3-벤젠디올).

[0060] 이들 화합물은 하기에 언급되는 바와 같이 하나 이상의 키랄 중심 및 2개 이상의 입체이성질체를 갖는다: (1) Δ^5 -칸나비디올은 2개의 키랄 중심 및 4개의 입체이성질체를 갖고; (2) Δ^4 -칸나비디올은 3개의 키랄 중심 및 8개의 입체이성질체를 갖고; (3) Δ^3 -칸나비디올은 2개의 키랄 중심 및 4개의 입체이성질체를 갖고; (4) $\Delta^{3,7}$ -칸나비디올은 2개의 키랄 중심 및 4개의 이성질체를 갖고; (5) Δ^2 -칸나비디올은 2개의 키랄 중심 및 4개의 입체이성질체를 갖고; (6) Δ^1 -칸나비디올은 2개의 키랄 중심 및 4개의 입체이성질체를 갖고; (7) Δ^6 -칸나비디올은 1개의 키랄 중심 및 2개의 입체이성질체를 갖는다. 바람직한 구현예에서, 칸나비디올은 구체적으로 D^2 -칸나비디올이다. 구체적으로 언급되지 않는 한, "칸나비디올" "CBD" 또는 "칸나비디올들" 또는 상기에 언급된 구체적인 칸나비디올 화합물 (1)-(7) 중 임의의 것의 언급은 언급에 의해 포함된 모든 화합물의 모든 가능한 입체이성질체를 포함한다. 하나의 구현예에서, " Δ^2 -칸나비디올"은 이중 시스템에서 부분적으로 또는 전적으로 생성된 Δ^2 -칸나비디올 입체이성질체의 혼합물일 수 있다.

[0061] 용어 "이소프레노이드" 또는 "테르페노이드"는, 선형 및 시클릭 테르페노이드를 포함한, 하나 이상의 5-탄소 이소프렌 빌딩 블록을 포함하는 임의의 화합물을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "테르펜"은 테르페노이드 및 이소프레노이드와 상호교환가능하다. 테르펜이 산화 또는 탄소 사슬의 재배열 등에 의해 화학적으로 변형된 경우, 생성된 화합물은 일반적으로 테르페노이드로 언급되며 또한 이소프레노이드라고도 불리운다.

[0062] 테르페노이드는, 참조로서 5 및 10개의 탄소의 군을 사용하여, 존재하는 탄소 원자의 수에 따라 명명될 수 있다. 예를 들어 헤미테르페노이드 (C5)는 1개의 이소프렌 단위를 갖고 (절반-테르페노이드); 모노테르페노이드 (C10)는 2개의 이소프렌 단위를 갖고 (1개의 테르페노이드); 세스퀴테르페노이드 (C15)는 3개의 이소프렌 단위를 갖고 (1.5개의 테르페노이드); 디테르페노이드 (C20)는 4개의 이소프렌 단위를 갖는다 (또는 2개의 테르페노이드). 전형적으로, 모노테르페노이드는 C10 테르페노이드 전구체 게라닐 피로포스페이트 (GPP)로부터 자연에서 생성된다. 유사하게, "시클릭 모노테르펜"은 시클릭 또는 방향족 테르페노이드 (즉, 고리 구조를 포함함)를 지칭한다. 이는 2개의 이소프렌 빌딩 블록, 전형적으로 GPP로부터 만들어진 다. 선형 모노테르펜은 게라니올, 리날로올, 오시멘, 및 미르센을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 시클릭 모노테르펜 (모노시클릭, 바이시클릭 및 트리시클릭)은 리모넨, 피넨, 카렌, 테르피네올, 테르피놀렌, 펠란드렌, 투젠, 트리시클렌, 보르네올, 사비넨, 및 캄펜을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0063] "테르페노이드 신타제"는 하나의 테르페노이드 또는 테르페노이드 전구체의 또 다른 테르페노이드 또는 테르페노이드 전구체로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 지칭한다. 예를 들어, GPP 신타제는, 예를 들어 테르페노이드 전구체 IPP 및 DMAPP로부터의 GPP의 형성을 촉매하는 효소이다. 유사하게, FPP 신타제는, 예를 들어 GPP 및 IPP로부터의 FPP의 생성을 촉매하는 효소이다. 테르펜 신타제는 프레닐 디포스페이트 (예컨대 GPP)의 이소프레노이드 또는 이소프레노이드 전구체로의 전환을 촉매하는 효소이다. 용어는 선형 및 시클릭 테르펜 신타제 둘 다를 포함한다.

[0064] "시클릭 테르페노이드 신타제"는 고리 구조를 제공하도록 테르페노이드 또는 테르페노이드 전구체를 변형시키는 반응을 촉매할 수 있는 효소를 지칭한다. 예를 들어, 시클릭 모노테르페노이드 신타제는 기질로서 선형 모노테

르펜을 사용하여 시클릭 또는 방향족 (고리-함유) 모노테르페노이드 화합물을 생성할 수 있는 효소를 지칭한다. 일례는, 이는 선형 모노테르펜 전구체 GPP로부터의 시클릭 모노테르펜 사비넨의 형성을 촉매할 수 있는 사비넨 신타제이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "테르펜 신타제"는 테르페노이드 신타제와 상호교환가능하다.

[0065] 프레닐 트랜스퍼라제 또는 이소프레닐 트랜스퍼라제 효소 (또한 프레닐 또는 이소프레닐 신타제라 불림)는 테르페노이드 또는 이소프레노이드 화합물의 피로포스페이트 전구체의 생성을 촉매할 수 있는 효소이다. 예시적 프레닐 트랜스퍼라제 또는 이소프레닐 트랜스퍼라제 효소는, 적합한 기질의 존재 하에 게라닐 디포스페이트 (GPP) 또는 파르네실 디포스페이트 (FPP)의 형성을 촉매할 수 있는 ispA이다.

[0066] "칸나비노이드 신타제"는 하기 활성 중 하나 이상을 촉매하는 효소를 지칭한다: CBGA의 THCA, CBDA, 또는 CBCA로의 고리화; CBGVA의 THCVA, CBCVA, CBDVA로의 고리화, CBGA를 형성하는 올리베톨산의 프레닐화, 및 이들의 조합. 예시적 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 속의 식물에서 자연 발생으로 나타나는 것들, 예컨대 칸나비스 사티바의 THCA 신타제, CBDA 신타제, 및 CBCA 신타제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0067] 예시적 이소프레노이드, 테르페노이드, 칸나비노이드, 및 MEP 경로 폴리펩티드 및 핵산은 KEGG 데이터베이스에 기재된 것들을 포함한다. KEGG 데이터베이스는 수많은 예시적 이소프레노이드, 테르페노이드, 칸나비노이드, 및 MEP 경로 폴리펩티드 및 핵산의 아미노산 및 핵산 서열을 함유한다 (예를 들어, "genome.jp/kegg/pathway/map/map00100.html"의 월드-와이드 웹 및 그 안의 서열을 참조하며, 이들 각각은, 특히 이소프레노이드, 테르페노이드, 칸나비노이드, 및 MEP 경로 폴리펩티드 및 핵산의 아미노산 및 핵산 서열과 관련하여 그 전체가 참조로 포함된다). 신호 펩티드 및 이를 코딩하는 핵산을 함유하는 본원에 기재된 폴리펩티드는, 신호 펩티드가 제거되거나 다른 방식으로 부재하는 절단된 버전을 추가로 나타내는 것으로 이해된다.

[0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이종"은 자연적으로 함께 나타나지 않는 임의의 두 성분을 지칭한다. 예를 들어, 작동가능하게 연결된 프로모터에 대하여 이종인 유전자를 코딩하는 핵산은, 특정 계능에서 작동가능하게 연결된 프로모터에 의해 그의 자연 상태에서 (예를 들어, 유전적으로 변형되지 않은 세포 내에서) 제어되지 않는 발현을 갖는 핵산이다. 본원에서 제공되는 바와 같이, 비-자연 발생 프로모터에 작동가능하게 연결된 모든 유전자는 "이종"으로 고려된다. 유사하게, 숙주 세포에 대해 "이종"인 유전자는, 특정 유기체의 유전적으로 변형되지 않은 세포에서 나타나지 않는 또는 상이한 계능 또는 비-계능 (예: 플라스미드) 위치에서 나타나는, 또는 유전적으로 변형되지 않은 세포에서 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자이다. 추가로, 숙주 세포에 대해 "이종"인 프로모터는, 특정 유기체의 유전적으로 변형되지 않은 세포에서 나타나지 않는 또는 상이한 계능 또는 비-계능 (예: 플라스미드) 위치에서 나타나는, 또는 유전적으로 변형되지 않은 세포에서 상이한 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터이다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 카세트"는 적어도 하나의 표적 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭하며, 여기서 프로모터는 적어도 하나의 작동가능하게 연결된 유전자에 대해 이종이거나, 프로모터는 이것이 존재하는 숙주 세포에 대해 이종이거나, 또는 적어도 하나의 작동가능하게 연결된 유전자는 숙주 세포에 대해 이종이거나, 또는 이들의 조합이다.

[0070] "염"은 본 발명의 방법에서 사용되는 화합물의 산 또는 염기 염을 지칭한다. 제약상 허용가능한 염의 예시적 예는 무기 산 (염산, 브롬화수소산, 인산 등) 염, 유기 산 (아세트산, 프로피온산, 글루탐산, 시트르산 등) 염, 4급 암모늄 (메틸 아이오다이드, 에틸 아이오다이드 등) 염이다. 제약상 허용가능한 염은 비-독성임이 이해된다. 적합한 제약상 허용가능한 염에 대한 추가의 정보는 문헌 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985에서 찾아볼 수 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "용매화물"은 용매화 (용매 분자와 용질의 분자 또는 이온의 조합)에 의해 형성된 화합물, 또는 용질 이온 또는 분자, 즉, 본 발명의 화합물과 하나 이상의 용매 분자로 이루어진 응집물을 의미한다. 물이 용매인 경우, 상응하는 용매화물은 "수화물"이다. 수화물의 예는, 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 육수화물, 및 다른 물-함유 종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 화합물의 제약상 허용가능한 염, 및/또는 전구약물 또한 용매화물 형태로 존재할 수 있음이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 용매화물은 전형적으로, 본 발명의 무수 화합물에 의한 수분의 자연 흡수를 통해 또는 화합물의 제조의 부분인 수화에 의해 형성된다. 일반적으로, 모든 물리적 형태는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

[0072] 따라서, 본 발명에 따른 방법에서 제조되는 또는 본 발명에 따른 조성물 중에 포함되는 비제한적으로 칸나비노이드 또는 테르페노이드와 같은 치료 활성제가 충분히 산성인, 충분히 염기성인, 또는 충분히 산성이고 충분히 염기성인 작용기를 갖는 경우, 이들 기 또는 기들은 그에 따라 임의의 무기 또는 유기 염기, 및 무기 및 유

기 산과 반응하여 제약상 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 예시적 제약상 허용가능한 염은, 무기 또는 유기 산 또는 무기 염기와 약리 활성 화합물의 반응에 의해 제조된 염, 예컨대 술페이트, 피로술페이트, 비술페이트, 술파이트, 비술파이트, 포스페이트, 모노히드로젠포스페이트, 디히드로젠포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 이소부티레이트, 카프로에이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말레에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥신-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 히드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 술포네이트, 크실렌술포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -히드록시부티레이트, 글리콜레이트, 타르트레이트, 메탄-술포네이트, 프로판술포네이트, 나프탈렌-1-술포네이트, 나프탈렌-2-술포네이트, 및 만델레이트를 포함한 염을 포함한다. 약리 활성 화합물이 하나 이상의 염기성 작용기를 갖는 경우, 요망되는 제약상 허용가능한 염은 당업계에서 이용가능한 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 무기 산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등으로의, 또는 유기 산, 예컨대 아세트산, 말레산, 숙신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글리콜산, 살리실산, 피라노시딜산, 예컨대 글루쿠론산 또는 갈락투론산, 알파-히드록시산, 예컨대 시트르산 또는 타르타르산, 아미노산, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산, 방향족 산, 예컨대 벤조산 또는 신남산, 술포산, 예컨대 p-톨루엔술포산 또는 에탄술포산 등으로의 유리 염기의 처리에 의해 제조될 수 있다. 약리 활성 화합물이 하나 이상의 산성 작용기를 갖는 경우, 요망되는 제약상 허용가능한 염은 당업계에서 이용가능한 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 무기 또는 유기 염기, 예컨대 아민 (1급, 2급 또는 3급), 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 등으로의 유리 산의 처리에 의해 제조될 수 있다. 적합한 염의 예시적 예는, 아미노산, 예컨대 글리신 및 아르기닌, 암모니아, 1급, 2급 및 3급 아민, 및 시클릭 아민, 예컨대 피페리딘, 모르폴린 및 피페라진으로부터 유래된 유기 염, 및 나트륨, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 망가니즈, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유래된 무기 염을 포함한다.

[0073] 본원에서 사용되는 바와 같이 "조성물"은 특정된 성분을 특정된 양으로 포함하는 생성물, 뿐만 아니라 특정된 양의 특정된 성분의 조합으로부터 생성된 임의의 생성물을 포함하도록 의도된다. "제약상 허용가능한"이란, 담체, 희석제 또는 부형제가 제제의 다른 성분과 상용성이고 그의 수용자에게 유해하지 않아야 함을 의미한다.

[0074] "제약상 허용가능한 부형제"는 대상체에 대한 활성제의 투여 및 대상체에 의한 활성제의 흡수를 보조하는 물질을 지칭한다. 본 발명에서 유용한 제약 부형제는, 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제, 코팅, 감미제, 향미제 및 착색제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 당업자는 다른 제약 부형제가 본 발명에서 유용함을 인식할 것이다.

[0075] 일부 경우에, 보호 기가 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 화합물 중에 또는 본 발명에 따른 조성물 중에 포함될 수 있다. 이러한 보호 기의 사용은 생체내에서 일어날 수 있고 화합물을 분해할 수 있는 후속 가수분해 또는 다른 반응을 막기 위한 것이다. 보호될 수 있는 기는 알콜, 아민, 카르보닐, 카르복실산, 포스페이트, 및 3급 아민을 포함한다. 알콜 보호를 위해 유용한 보호 기는, 아세틸, 벤조일, 벤질, β -메톡시에톡시에틸 에테르, 디메톡시트리틸, 메톡시메틸 에테르, 메톡시트리틸, p-메톡시벤질 에테르, 메틸티오메틸 에테르, 피발로일, 테트라히드로피라닐, 테트라히드로푸란, 트리틸, 실릴 에테르, 메틸 에테르, 및 에톡시에틸 에테르 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 아민 보호를 위해 유용한 보호 기는, 카르보벤질옥시, p-메톡시벤질카르보닐, t-부틸옥시카르보닐, 9-플루오렌메틸옥시카르보닐, 아세틸, 벤조일, 벤질, 카르바메이트, p-메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, p-메톡시페닐, 토실, 트리클로로에틸 클로로포르메이트, 및 술포아미드를 포함한다. 카르보닐 보호를 위해 유용한 보호 기는, 아세탈, 케탈, 아실랄, 및 디티안을 포함한다. 카르복실산 보호를 위해 유용한 보호 기는, 메틸 에스테르, 벤질 에스테르, t-부틸 에스테르, 2,6-이치환된 페놀의 에스테르, 실릴 에스테르, 오르토에스테르, 및 옥사졸린을 포함한다. 포스페이트 기 보호를 위해 유용한 보호 기는, 2-시아노에틸 및 메틸을 포함한다. 말단 알킬렌 보호를 위해 유용한 보호 기는, 프로파르길 알콜 및 실릴 기를 포함한다. 다른 보호 기는 당업계에 공지되어 있다.

[0076] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전구약물"은, 투여 후, 일부 화학적 또는 생리적 과정을 통해 생물학적 활성 화합물을 생체내에서 방출하는 전구체 화합물을 지칭한다 (예를 들어, 전구약물은 생리적 pH 도달시 또는 효소 작용을 통해 생물학적 활성 화합물로 전환될 수 있음). 전구약물 자체는 요망되는 생물학적 활성을 갖지 않거나 가질 수 있다. 따라서, 용어 "전구약물"은 제약상 허용가능한 생물학적 활성 화합물의 전구체를 지칭한다. 특정 경우에, 전구약물은, 전구약물이 유래된 모(parent) 화합물에 비해 개선된 물리적 및/또는 전달 특성을 갖는다. 전구약물은 종종 포유류 유기체에서 용해도, 조직 적합성, 또는 지연 방출의 이점을 제공한다.

(H.Bundgard, Design of Prodrugs (Elsevier, Amsterdam, 1988), pp. 7-9, 21-24). 전구약물에 관한 논의가 T.Higuchi et al., "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems," ACS Symposium Series, Vol. 14 및 in E.B.Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design (American Pharmaceutical Association & Pergamon Press, 1987)에서 제공된다. 전구약물의 예시적 이점은 그의 물리적 특성, 예컨대 장기간 저장 동안 향상된 약물 안정성을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0077] 용어 "전구약물"은 또한, 전구약물이 대상체에게 투여될 때 생체내에서 활성 화합물을 방출하는 임의의 공유 결합된 담체를 포함하도록 의도된다. 본원에 기재된 바와 같은 치료 활성 화합물의 전구약물은, 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 또는 본 발명에 따른 조성물 중에 포함된 칸나비노이드, 테르페노이드, 및 다른 치료 활성 화합물을 포함한 치료 활성 화합물 중에 존재하는 하나 이상의 작용기를, 변형이 일상적 조작 또는 생체내에서 분열되어 모 치료 활성 화합물을 생성하는 방식으로 변형시킴으로써 제조될 수 있다. 전구약물은, 활성 화합물의 전구약물이 대상체에게 투여될 때, 분열되어 각각 유리 히드록시, 유리 아미노, 또는 유리 메르캅토 기를 형성하는 임의의 기에 히드록시, 아미노, 또는 메르캅토 기가 공유 결합된 화합물을 포함한다. 전구약물의 예는, 알코올의 포르메이트 또는 벤조에이트 유도체 또는 반응을 위해 이용가능한 아민 작용기를 갖는 치료 활성제의 아세트아미드, 포름아미드 또는 벤즈아미드 유도체 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0078] 예를 들어, 치료 활성제 또는 치료 활성제의 제약상 허용가능한 형태는 카르복실산 작용기를 함유하는 경우, 전구약물은 카르복실산 기의 수소 원자가 C₁₋₈ 알킬, C₂₋₁₂ 알카노일옥시메틸, 4 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 1-(알카노일옥시)에틸, 5 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알카노일옥시)에틸, 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알콕시카르보닐옥시메틸, 4 내지 7개의 탄소 원자를 갖는 1-(알콕시카르보닐옥시)에틸, 5 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알콕시카르보닐옥시)에틸, 3 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 N-(알콕시카르보닐)아미노메틸, 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 1-(N-(알콕시카르보닐)아미노)에틸, 3-프탈리드, 4-크로토노락토닐, 감마-부티로락톤-4-일, 디-N,N(C₁-C₂)알킬아미노(C₂-C₃)알킬 (예컨대 (3-디메틸아미노)에틸), 카르바모일-(C₁-C₂)알킬, N,N-디 (C₁-C₂)알킬카르바모일-(C₁-C₂)알킬 및 피페리디노-, 피롤리디노-, 또는 모르폴리노(C₂-C₃)알킬 등의 기로 치환되어 형성된 에스테르를 포함할 수 있다.

[0079] 유사하게, 개시된 화합물 또는 화합물의 제약상 허용가능한 형태가 알코올 작용기를 함유하는 경우, 전구약물은 알코올 기의 수소 원자를 (C₁-C₆)알카노일옥시메틸, 1-((C₁-C₆))알카노일옥시)에틸, 1-메틸-1-((C₁-C₆)알카노일옥시)에틸 (C₁-C₆)알콕시카르보닐옥시메틸, N(C₁-C₆)알콕시카르보닐아미노메틸, 숙시노일, (C₁-C₆)알카노일, α-아미노(C₁-C₄)알카노일, 아릴아실 및 α-아미노아실, 또는 α-아미노아실-α-아미노아실 등의 기로 치환되어 형성될 수 있고, 여기서 각각의 α-아미노아실 기는 독립적으로 자연 발생 L-아미노산, P(O)(OH)₂, P(O)(O(C₁-C₆)알킬)₂ 또는 글리코실 (탄수화물의 헤미아세탈 형태의 히드록실 기의 제거로부터 형성되는 라디칼)로부터 선택된다.

[0080] 개시된 화합물 또는 상기 화합물의 제약상 허용가능한 형태가 아민 작용기를 포함하는 경우, 전구약물은 아민 기 내의 수소 원자가 R-카르보닐, RO-카르보닐, NRR'-카르보닐, C(OH)C(O)OY¹, C(OY²)Y³, C(Y⁴)Y⁵ 등의 기로 치환되어 형성될 수 있되, R 및 R'은 각각 독립적으로 (C₁-C₁₀)알킬, (C₃-C₇)시클로알킬, 벤질이거나, 또는 R-카르보닐은 천연 α-아미노아실 또는 천연 α-아미노아실-천연 α-아미노아실이고, Y¹은 H, (C₁-C₆)알킬 또는 벤질이고, Y²는 (C₁-C₄) 알킬이고, Y³은 (C₁-C₆)알킬, 카르복시(C₁-C₆)알킬, 아미노(C₁-C₄)알킬 또는 모노-N 또는 디-N,N(C₁-C₆)알킬아미노알킬이고, Y⁴는 H 또는 메틸이고 Y⁵는 모노-N 또는 디-N,N(C₁-C₆)알킬아미노, 모르폴리노, 피페리딘-1-일 또는 피롤리딘-1-일이다.

[0081] 전구약물 시스템의 사용은 하기 문헌에 기재되어 있다: T.Jarvinen et al., "Design and Pharmaceutical Applications of Prodrugs" in Drug Discovery Handbook (S.C. Gad, ed., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2005), ch.17, pp. 733-796. 전구약물 구성 및 사용에 대한 다른 대안은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에 따른 방법 또는 제약 조성물이 칸나비노이드, 테르페노이드, 또는 다른 치료 활성제의 전구약물을 사용하거나 포함하는 경우, 화합물의 전구약물 및 대사물은 당업계에 공지된 일상적 기술을 사용하여 식별될 수 있다. 예를 들어, Bertolini et al., J. Med. Chem., 40, 2011-2016 (1997); Shan et al., J. Pharm.Sci., 86 (7), 765-767; Bagshawe, Drug Dev. Res., 34, 220-230 (1995); Bodor, Advances in Drug Res., 13, 224-331

(1984); Bundgaard, Design of Prodrugs (Elsevier Press 1985); Larsen, Design and Application of Prodrugs, Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen et al., eds., Harwood Academic Publishers, 1991); Dear et al., J. Chromatogr.B, 748, 281-293 (2000); Spraul et al., J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 10, 601-605 (1992); and Prox et al., Xenobiol., 3, 103-112 (1992)을 참조한다.

[0082] 칸나비노이드

[0083] 칸나비노이드는 피부를 포함한 인간 신체 전반에 걸쳐 세포 내에서 칸나비노이드 수용체를 활성화시키는 것으로 공지된 화학물질의 군이다. 파이토칸나비노이드는 칸나비스 식물로부터 유래된 칸나비노이드이다. 이들은 식물로부터 단리되거나 합성적으로 생성될 수 있다. 엔도칸나비노이드는 인간 신체에서 나타나는 내생 칸나비노이드이다. 정통 파이토칸나비노이드는 벤조피란 모이어티를 갖는 ABC 트리시클릭 테르페노이드 화합물이다.

[0084] 칸나비노이드는 세포의 표면 상에 존재하는 칸나비노이드 수용체와의 상호작용에 의해 그의 효과를 발휘한다. 지금까지, 2종의 칸나비노이드 수용체, CB1 수용체 및 CB2 수용체가 식별되었다. 이들 2종의 수용체는 약 48% 아미노산 서열 동일성을 공유하고, 상이한 조직 내에 분포하고 또한 상이한 신호전달 메커니즘을 갖는다. 이들은 또한 작동제 및 길항제에 대한 이들의 민감성에 있어 상이하다.

[0085] 따라서, 칸나비노이드의 생체내 생성을 위한 유전자, 프로모터, 및 발현 카세트를 스크리닝하고 식별하기 위한 시험관내 및 생체내 방법이 본원에 기재된다.

[0086] 전형적으로, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 숙주 세포에서의 하나 이상의 테르페노이드, 예컨대 칸나비노이드의 생성, 또는 증가된 생성, 또는 숙주 세포에서의 하나 이상의 테르페노이드 또는 칸나비노이드 전구체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에, 테르페노이드 또는 칸나비노이드 또는 그의 전구체는, 정제되고/거나, 유도체화되고/거나 (예를 들어 전구약물, 용매화물, 또는 염을 형성하거나, 전구체로부터 표적 테르페노이드 또는 칸나비노이드를 형성함), 제약 조성물 중에서 제제화될 수 있다.

[0087] 본 발명의 방법에 따라 및/또는 본 발명의 조성물을 사용하여 생성될 수 있는 칸나비노이드는 파이토칸나비노이드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 칸나비노이드는, 칸나비놀, 칸나비디올, Δ^9 -테트라히드로칸나비놀 (Δ^9 -THC), 합성 칸나비노이드 HU-210 (6aR,10aR)-9-(히드록시메틸)-6,6-디메틸-3-(2-메틸옥탄-2-일)-6H,6aH,7H,10H,10aH-벤조[c]이소크로멘-1-올), 칸나비디바린 (CBDV), 칸나비크로멘 (CBC), 칸나비크로메바린 (CBCV), 칸나비게롤 (CBG), 칸나비게로바린 (CBGV), 칸나비엘소인 (CBE), 칸나비시클롤 (CBL), 칸나비바린 (CBV), 및 칸나비트리올 (CBT)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한 다른 칸나비노이드는, 예컨대 테트라히드로칸나비바린 (THCV) 및 칸나비게롤 모노메틸 에테르 (CBGM)를 포함한다. 추가의 칸나비노이드는 칸나비크로멘산 (CBCA), Δ^9 -테트라히드로칸나비놀산 (THCA); 및 칸나비디올산 (CBDA)을 포함하고; 이들 추가의 칸나비노이드는 이들의 구조 내의 카르복실산 기의 존재에 의해 특성화된다.

[0088] 또한 다른 칸나비노이드는 나빌론, 리모나반트, JWH-018 (나프탈렌-1-일-(1-펜틸인돌-3-일)메탄), JWH-073 나프탈렌-1-일-(1-부틸인돌-3-일)메탄, CP-55940 (2-[(1R,2R,5R)-5-히드록시-2-(3-히드록시프로필)시클로헥실]-5-(2-메틸옥탄-2-일)페놀), 디메틸헵틸피란, HU-331 (3-히드록시-2-[(1R)-6-이소프로페닐-3-메틸-시클로헥스-2-엔-1-일]-5-펜틸-1,4-벤조퀴논), SR144528 (5-(4-클로로-3-메틸페닐)-1-[(4-메틸페닐)메틸]-N-[(1S,2S,4R)-1,3,3-트리메틸비시클로[2.2.1]헵탄-2-일]-1H-피라졸-3-카르복사미드), WIN 55,212-2 ((11R)-2-메틸-11-[(모르폴린-4-일)메틸]-3-(나프탈렌-1-카르보닐)-9-옥사-1-아자트리시클로[6.3.1.0^{4,12}]-도데카-2,4(12),5,7-테트라엔), JWH-133 ((6aR,10aR)-3-(1,1-디메틸부틸)-6a,7,10,10a-테트라히드로-6,6,9-트리메틸-6H-디벤조[b,d]피란), 레보나트라돌, 및 AM-2201 (1-[(5-플루오로펜틸)-1H-인돌-3-일]-(나프탈렌-1-일)메탄)을 포함한다. 다른 칸나비노이드는 Δ^8 -테트라히드로칸나비놀 (Δ^8 -THC), 11-히드록시- Δ^9 -테트라히드로칸나비놀, Δ^{11} -테트라히드로칸나비놀, 및 11-히드록시-테트라칸나비놀을 포함한다.

[0089] 또 다른 대안에서는, 칸나비노이드 전구체의 생성 및 추가의 유도체화 (예를 들어 합성 수단에 의한)에 의해 이들 칸나비노이드의 유사체 또는 유도체가 얻어질 수 있다. 합성 칸나비노이드는 미국 특허 번호 9,394,267 (Attala et al.); 미국 특허 번호 9,376,367 (Herkenroth et al.); 미국 특허 번호 9,284,303 (Gijssen et al.); 미국 특허 번호 9,173,867 (Travis); 미국 특허 번호 9,133,128 (Fulp et al.); 미국 특허 번호 8,778,950 (Jones et al.); 미국 특허 번호 7,700,634 (Adam-Worrall et al.); 미국 특허 번호 7,504,522 (Davidson et al.); 미국 특허 번호 7,294,645 (Barth et al.); 미국 특허 번호 7,109,216 (Kruse et al.); 미국 특허 번호

6,825,209 (Thomas et al.); 및 미국 특허 번호 6,284,788 (Mittendorf et al.)에 기재된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다:

- [0090] 또 다른 대안으로, 칸나비노이드는 엔도칸나비노이드 또는 그의 유도체 또는 유사체일 수 있다. 엔도칸나비노이드는 아난다미드, 2-아라키도노일글리세롤, 2-아라키도닐 글리세릴 에테르, N-아라키도노일 도파민, 및 비로다민을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 엔도칸나비노이드의 다수의 유사체가 공지되어 있고, 이는 7,10,13,16-도코사테트라에노일에탄올아미드, 올레아미드, 스테아로일에탄올아민아미드, 및 호모- γ -리놀레노일에탄올아민을 포함하며, 이것 또한 공지되어 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 방법 및 조성물에서 생성된 칸나비노이드는, CB2 칸나비노이드 수용체에 대해 선택적이거나, 2개의 칸나비노이드에 대해 비-선택적이어서, CB1 칸나비노이드 수용체 또는 CB2 칸나비노이드 수용체에 결합한다. 일부 경우에, 본 발명에 따른 방법 및 조성물에서 생성된 칸나비노이드는 CB2 칸나비노이드 수용체에 대해 선택적이다. 일부 경우에, 칸나비노이드, 또는 칸나비노이드의 혼합물 중의 하나의 칸나비노이드는 CB2의 길항제 (예: 선택적 또는 비-선택적 길항제)이다. 일부 경우에, 본 발명에 따른 방법 및 조성물에서 생성된 칸나비노이드는 CB2 칸나비노이드 수용체에 대해 선택적이다. 일부 경우에, 칸나비노이드, 또는 칸나비노이드의 혼합물 중의 하나의 칸나비노이드는 CB1의 길항제 (예: 선택적 또는 비-선택적 길항제)이다.
- [0092] 발현 카세트
- [0093] 숙주 세포에서 하나 이상의 표적 유전자를 발현시키기에 적합한 발현 카세트가 본원에 기재된다. 본원에 기재된 발현 카세트는 플라스미드의 성분이거나 숙주 세포 계능에 통합될 수 있다. 단일 플라스미드가 하나 이상의 본원에 기재된 발현 카세트를 함유할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 둘 이상의 발현 카세트가 기재되는 경우, 대안적으로 둘 이상의 발현 카세트 중 적어도 2개가 조합되어 발현 카세트의 수를 감소시킬 수 있음이 이해된다. 유사하게, 다수의 표적 유전자가 단일 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것으로 기재되고, 그에 따라 단일 발현 카세트의 성분으로서 기재되는 경우, 단일 발현 카세트는 단일 기재된 발현 카세트의 오버랩핑 또는 비-오버랩핑 서브세트를 함유하는 둘 이상의 발현 카세트로 세분될 수 있음이 이해된다.
- [0094] 본원에 기재된 발현 카세트는 당업계에 공지된 바와 같은 적합한 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 프로모터는 구성성분 프로모터이다. 다른 경우에, 프로모터는 유도가능 프로모터이다. 바람직한 구현예에서, 프로모터는 T5 프로모터, T7 프로모터, Trc 프로모터, Lac 프로모터, Tac 프로모터, Trp 프로모터, 팀 프로모터, λ P_L 프로모터, λ P_R 프로모터, λ P_RP_L 프로모터, 아라비노스 프로모터 (araBAD) 등이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 Zaslaver et al., Nat Methods.2006 Aug;3(8):623-8에 기재된 대장균 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 문헌은 특히 본원에 기재된 관심 핵산, 표적 유전자, 숙주 세포, 및 이들의 조합의 발현에 대한, 프로모터, 발현 카세트 (플라스미드 포함)와 관련하여, 그 전체가 참조로 포함된다. 다양한 숙주 세포에서 하나 이상의 표적 유전자의 발현을 추진하기에 유용한 프로모터는 많고 당업자에게 친숙하다 (예를 들어, WO 2004/033646; U.S. 8,507,235; U.S. 8,715,962; 및 WO 2011/017798, 및 그에 인용된 참조문헌을 참조한다, 이들 각각은, 특히 본원에 기재된 관심 핵산, 표적 유전자, 숙주 세포, 및 이들의 조합의 발현에 대한, 프로모터, 플라스미드를 비롯한 발현 카세트와 관련하여, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0095] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 적합한 숙주 세포에서 MEP 경로의 하나 이상의 유전자의 발현, 및/또는 MEP 경로의 하나 이상의 생성물의 생성에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, MEP 경로 플럭스는, 강한 구성성분 또는 유도가능 이중 프로모터에 대한 내생 유전자 (또는 그의 카피)의 작동가능 연결 및/또는 유전자 카피 수의 증폭에 의한 숙주 세포의 하나 이상의 내생 성분의 과발현에 의해 증가된다. 따라서, 하나의 구현예에서, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 대장균에서, 내생 MEP 경로 유전자는 dxs, ispC, ispD, ispE, ispF, ispG, ispH, 및 idi이다.
- [0096] 일부 경우에, 발현 카세트의 프로모터는 MEP 경로의 둘 이상의 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 발현 카세트의 프로모터는 MEP 경로의 셋 이상의 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 발현 카세트의 프로모터는 MEP 경로의 4, 5, 6개 또는 모든 8개 유전자를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 발현 카세트에 제공되는 MEP 경로의 유전자는 대장균 유전자이다. 다른 경우에, 발현 카세트에 제공되는 MEP 경로의 유전자 중 하나 이상은 야생형 대장균에 대해 이종이다. 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자는 제1 발현 카세트에 제공되고, MEP 경로의 하나 이상의 유전자는 제2 발현 카세트에 제공된다. 바람직한 구현예에서, dxs 및 idi에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다.

- [0097] 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하고 추가로 GPP 신타제, 칸나비노이드 신타제, 또는 이소프렌 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하고 추가로 THCA 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하고 추가로 CBGA 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하고 추가로 CBCA 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일부 경우에, MEP 경로의 하나 이상의 유전자를 코딩하고 추가로 CBDA 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다.
- [0098] 일부 구현예에서, 2작용성 ispDF 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유하는 발현 카세트가 제공된다. ispDF 유전자는 숙주 세포에서 네이티브 ispD 및/또는 ispF의 과발현에 추가로, 또는 그에 대한 대안으로서 사용될 수 있다. 일부 경우에, 핵산은 하기 아미노산 서열을 갖는 ispDF 단백질을 코딩한다 (서열 번호1):
- [0099] MIALQRSLSMHVTAI IAAAGEGRRLGAPLPKQLLDIGGRSILERSVMAFARHERIDDVIVLPPALAAAPPDWIAASGRVPAVHVVS GGERRQDSVANAFDR VPAQSDVVLVHDAARPFVTAELISRAIDGAMQHGAIVAVPVRDVKRVDPDGEHPVITGTIPRDTIYLAQTPQAFRRDVLGAAVALGRSGVSATDEAMLAE QAGHRVHVVEGDPANVKITTSADLDQARQLRSABAARI GTGYDLHRLIEGRPLIIGGVAVPCDKGALGHSDADVACHAVIDALLGAAGAGNVGQHYPTDTP RWKGASSIGLLRDALRLVQERGFTVENVDVCVVLPRPKIAPFIPETIRARIAGALGIDPERSVKGTNEGVDVAVGRGEAIAAHAVALLSES.
- [0100] 다른 구현예에서, ispDF 핵산은 서열 번호 1에 대하여 적어도 32%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 ispDF 단백질을 코딩한다. 또한 다른 구현예에서, ispDF 핵산은 서열 번호 1의 적어도 300개 인접 아미노산에 대하여 적어도 32%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 ispDF 단백질을 코딩한다.
- [0101] 일부 경우에, 2작용성 ispDF는 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 해파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블 유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 데니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 및 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409의 적어도 300개 인접 아미노산과 75% 이하 동일한 1차 아미노산 서열을 갖는다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF는 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 HP1020, 에이치. 필로리 J99 jhp0404, 에이치. 필로리 HPAG1 HPAG1_0427, 에이치. 해파티쿠스 HH1582, 에이치. 아시노니키스 st.쉬바 Hac_1124, 더블 유. 숙시노게네스 DSM 1740 WS1940, 에스. 데니트리피칸스 DSM 1251 수텐_1487, 씨. 제주니 아종 제주니 NCTC 11168 Cj1607, 씨. 제주니 RM1221 CJE1779, 씨. 제주니 아종 제주니 81-176 CJJ81176_1594, 또는 씨. 페투스 아종 페투스 82-40 CFF8240_0409가 아니다.
- [0102] 2작용성 ispDF는 플라스미드 내의 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 대안적으로, 2작용성 ispDF는 이종 숙주 세포의 계놈으로 통합된 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 일부 경우에, 이종 프로모터는 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 추가로 또는 대안적으로, 숙주 세포는 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산에 대해 이중일 수 있다.
- [0103] 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산은 MEP 경로 유전자를 코딩하는 핵산을 함유하는 상기 발현 카세트 중 임의의 하나와 같은 MEP 경로 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산은 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산은 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 일부 경우에, 2작용성 ispDF를 코딩하는 핵산은 이소프렌 신타제를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다.
- [0104] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 적합한 숙주 세포에서 MEP 경로에서 생성된 전구체로부터의 GPP의 생성에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, GPP 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. GPP 신타제는 MEP 경로의 유전자를 코딩하는 핵산을 또한 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, GPP 신타제는 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산을 또한 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 일부 경우에, GPP 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 발현 카세트의 프로모터는 또한 칸나비노이드 신타제에 작동가능하게 연결된다. 추가로, 또는 대안적으로, GPP 신타제는 GPP 신타제를 코딩하는 핵산을 또한 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, GPP 신타제는 이소프렌 신타제를 코딩하는 핵산을 또한 함유하는 발현 카세트 내에 있을 수 있다.

- [0105] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 숙주 세포에서 칸나비노이드의 생성에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 칸나비노이드 신타제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 속의 식물에 대해 내생적인 칸나비노이드 신타제, 또는 그의 오르토로그일 수 있다. 일부 경우에, 칸나비노이드 신타제는 칸나비스 사티바 또는 칸나비스 인디카(*Cannabis indica*)에 대해 내생적인 칸나비노이드 신타제, 또는 그의 오르토로그일 수 있다. 일부 경우에, 칸나비노이드 신타제는 CBGA 신타제, THCA 신타제, CBDA 신타제, 또는 CBCA 신타제 (예: 칸나비스 속의 식물에 대해 내생적인 것, 또는 그의 오르토로그)이다.
- [0106] 칸나비노이드 신타제는 숙주에서 발현을 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 막횡단 또는 신호 펩티드 도메인은 절단될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, 하나 이상의 글리코실화 자리가 결실 (예를 들어, 1차 아미노산 서열의 돌연변이에 의해)될 수 있다. 유사하게, 그의 네이티브 숙주에서 네이티브 단백질 내의 분자내 디설파이드 결합에서 나타나는 하나 이상의 또는 모든 시스테인이, 예를 들어, 세린으로 돌연변이될 수 있다. 유사하게, 그의 네이티브 숙주에서 네이티브 단백질 내의 분자간 디설파이드 결합에서 나타나는 하나 이상의 또는 모든 시스테인이, 예를 들어, 세린으로 돌연변이될 수 있다.
- [0107] 숙주 세포
- [0108] 상기 발현 카세트, 및 이들의 조합 중 임의의 것을, 적합한 숙주 세포 내로 도입하고, 표적 테르페노이드 또는 칸나비노이드의 생성에 사용할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 예컨대 에스케리키아, 판테오아, 코리네박테리움, 바실루스, 또는 락토코쿠스 속의 원핵생물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 원핵생물 숙주 세포는, 에스케리키아 콜라이 (대장균), 판테오아 시트레이, 씨. 글루타미쿰, 바실루스 서브틸리스, 및 락토코쿠스 락티스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 발현 카세트는 하나 이상의 표적 유전자 (예: MEP 경로 유전자, 칸나비노이드 신타제 유전자, *ispA*, *ispS*, *ispDF*, 또는 GPP 신타제)를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터 (예: 이중 프로모터)를 포함하고, 여기서 하나 이상의 표적 유전자를 코딩하는 핵산은 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포에 대해 코돈 적합화된다.
- [0109] 일부 경우에, 숙주 세포는 MEP 경로의 하나 이상의 생성물, 예컨대 DMAPP 및/또는 IPP를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 MEP 경로 발현 카세트를 함유하는 숙주 세포는, MEP 경로 발현 카세트를 함유하지 않는 숙주 세포에 비해 증가된 양의 MEP 경로 생성물, 예컨대 DMAPP 및/또는 IPP를 포함할 수 있다.
- [0110] 일부 경우에, 숙주 세포는 MEP 경로의 하류인 하나 이상의 생성물을 포함할 수 있다. 예를 들어, GPP 신타제 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포는, GPP 신타제 발현 카세트가 없는 숙주 세포에 비해 증가된 양의 GPP를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 이소프렌 신타제 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포는, 이소프렌 신타제 발현 카세트가 없는 숙주 세포에 비해 증가된 양의 이소프렌을 포함할 수 있다.
- [0111] 또한 또 다른 예로, 칸나비노이드 신타제 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포는, 칸나비노이드 신타제 발현 카세트가 없는 숙주 세포에 비해 증가된 양의 칸나비노이드를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBGA이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBCA이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBDA이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 THCA이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBN이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBD이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 THC이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBC이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 THCV이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBDV이다. 일부 경우에, 칸나비노이드는 CBCV이다.
- [0112] 유사하게, 숙주 세포는, 숙주 세포가 발현 카세트로부터의 발현을 유도하기에 적합한 조건 하에 배양되는 경우 비-유도 조건에 비해 발현 카세트에 의해 코딩되는 하나 이상의 효소의 생성물의 상승된 양을 포함할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 유도제의 부재 하에 (예를 들어, IPTG, 아라비노스 등의 부재 하에) 배양된 동일한 숙주 세포에 비해 유도시 증가된 DMAPP 및/또는 IPP를 나타낼 수 있다. 또 다른 예로, 숙주 세포는 유도제의 부재 하에 (예를 들어, IPTG, 아라비노스 등의 부재 하에) 배양된 동일한 숙주 세포에 비해 유도시 증가된 GPP를 나타낼 수 있다. 또 다른 예로, 숙주 세포는 유도제의 부재 하에 (예를 들어, IPTG, 아라비노스 등의 부재 하에) 배양된 동일한 숙주 세포에 비해 유도시 증가된 이소프렌을 나타낼 수 있다. 또 다른 예로, 숙주 세포는 유도제의 부재 하에 (예를 들어, IPTG, 아라비노스 등의 부재 하에) 배양된 동일한 숙주 세포에 비해 유도시 증가된 칸나비노이드를 나타낼 수 있다.
- [0113] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 올리베톨산 (OA)을 포함한다. OA는, 숙주 세포를 OA를 함유하는 배지 내에서 배양함으로써 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 디바린산 (DVA)을 포함한다. DVA는, 숙주 세포를 DVA를 함유하는 배지 내에서 배양함으로써 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

- [0114] 일부 구현예에서, 숙주 세포는, MEP 경로를 통한 플럭스를 감소시키는 내생 효소를 코딩하는 하나 이상의 유전자의 발현을 제거하거나 감소시키도록 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는, MEP 경로를 통한 플럭스를 감소시키는 내생 효소의 양 또는 활성을 제거하거나 감소시키도록 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 피루베이트 및 글리세르알데히드-3 포스페이트 (G3P)는 MEP 경로dml 초기 효소 dxs의 기질이다. 피루베이트 및 G3P를 소비하는 내생 경로는, 피루베이트 및 G3P의 양을 증가시키고 그에 따라 MEP 경로를 통한 플럭스를 증가시키도록 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 경우에, ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, 및 atoDA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 숙주 세포 내생 유전자 또는 유전자 생성물은 피루베이트 또는 G3P 수준을 증가시키도록 변형된다.
- [0115] 배양 방법
- [0116] 본 발명은 또한, 표적 대사 생성물을 생성하는, 유도 조건 하에 적합한 배지 내에서 본 발명에 따른 숙주 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 표적 대사 생성물은 칸나비노이드, 테르페노이드, 또는 그의 전구체일 수 있다. 방법은 대사산물을 소비된 배지 및/또는 숙주 세포에 집중시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0117] 생성된 미생물을, 요망되는 유기-화학 화합물의 생성을 위해 연속적으로 (예를 들어 WO 05/021772에 기재된 바와 같이) 또는 불연속적으로 배치식 방법으로 (배치 재배) 또는 유가식(fed-batch) 또는 반복된 유가식 방법으로 배양할 수 있다. 공지된 재배 방법에 대한 일반적 성질의 요약은 하기 교본에서 이용가능하다: 키미엘 (Chmiel)에 의한 교본 (Bioprozeßtechnik.1 : Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) 또는 스토르하스(Storhas)에 의한 교본 (Bioreaktoren and periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).
- [0118] 사용되는 배지 또는 발효 배지는 적합한 방식으로 각각의 균주의 요구를 만족시켜야 한다. 다양한 미생물에 대한 배지의 설명은 문헌 "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)에 제공되어 있다. 용어 배지 및 발효 배지는 상호교환가능하다.
- [0119] 탄소 공급원으로서, 당 및 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 락토스, 프룩토스, 말토스, 당밀, 사탕 무 또는 사탕 수수 가공처리로부터의 수크로스-함유 용액, 전분, 전분 가수분해물, 및 셀룰로스; 오일 및 지방, 예컨대 대두유, 해바라기유, 땅콩유 및 코코넛 지방; 지방 산, 예컨대 팔미트산, 스테아르산, 및 리놀레산; 알코올, 예컨대 글리세롤, 메탄올, 및 에탄올; 및 유기 산, 예컨대 아세트산 또는 락트산을 사용할 수 있다.
- [0120] 질소 공급원으로서, 유기 질소-함유 화합물, 예컨대 펩톤, 이스트 추출물, 육류 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두분, 및 우레아; 또는 무기 화합물, 예컨대 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄을 사용할 수 있다. 질소 공급원은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.
- [0121] 인 공급원으로서, 인산, 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염을 사용할 수 있다.
- [0122] 배양 배지는, 성장을 위해 필수적인, 예를 들어, 금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 및 철의 클로라이드 또는 술페이트, 예컨대, 황산마그네슘 또는 황산철 형태의 염을 추가로 포함할 수 있다. 마지막으로, 필수 성장 인자, 예컨대 아미노산, 예를 들어 호모세린 및 비타민, 예를 들어 티아민, 비오틴 또는 판토텐산이, 상기 언급된 기질에 추가로 사용될 수 있다.
- [0123] 상기 출발 물질은 단일 배치 형태로 배양물에 첨가되거나 적합한 방식으로 재배 동안 공급될 수 있다.
- [0124] 배양물의 pH는 적합한 방식으로 염기성 화합물, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아, 또는 수성 암모니아; 또는 산성 화합물, 예컨대 인산 또는 황산을 사용함으로써 제어될 수 있다. pH는 일반적으로 6.0 내지 8.5, 바람직하게는 6.5 내지 8의 값으로 조정된다. 발포를 제어하기 위해, 예를 들어, 지방 산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용할 수 있다. 플라즈미드의 안정성을 유지하기 위해, 배지에, 예를 들어 항생제와 같은 적합한 선택적 물질을 첨가할 수 있다. 배양은 바람직하게는 호기적 조건 하에 수행된다. 이들 조건을 유지하기 위해, 산소 또는 산소-함유 기체 혼합물, 예컨대 공기를 배양물 중에 도입한다. 과산화수소 풍부화된 액체를 사용할 수도 있다. 배양은, 적절한 경우, 승압, 예를 들어 0.03 내지 0.2 MP a의 승압에서 수행된다. 배양물의 온도는 통상적으로 20 °C 내지 45 °C, 또한 바람직하게는 25 °C 내지 40 °C, 특히 바람직하게는 30 °C 내지 37 °C이다. 배치식 또는 유가식 방법에서, 재배는 바람직하게는, 회수되기에 충분한 요망되는 양의 유기-화학 화합물이 형성될 때까지 계속된다. 이 목표는 통상적으로 10시간 내지 160시간 내에 달성된다. 연속적 방법에서는, 보다 긴 재배 시간이 가능하다. 미생물의 활성은 발효 배지 및/또는 상기 미생물의 세포 내의 유기-화학 화합물의 농축 (축적)을 제공한다.

- [0125] 적합한 배양 배지의 예는 특허 특허 US 5,770,409, US 5,990,350, US 5,275,940, WO 2007/012078, US 5,827,698, WO 2009/043803, US 5,756,345 및 US 7,138,266에서 찾아볼 수 있다.
- [0126] 크로마토그래피, 바람직하게는 역상 크로마토그래피에 의해 대사산물을 분리함으로써 배양 동안 1회 이상 농도를 측정하기 위한 표적 대사 생성물의 분석을 수행할 수 있다.
- [0127] 검출은 광도측정 (흡수, 형광)으로 수행될 수 있다.
- [0128] 농도 (단위 부피 당 형성된 표적 대사 생성물), 수율 (소비된 단위 탄소 공급원 당 형성된 표적 대사 생성물), 형성물 (단위 부피 및 시간 당 형성된 표적 대사 생성물) 및 비형성물(specific formation) (단위 건조 세포 물질 또는 건조 바이오매스(biomass) 및 시간 당 표적 대사 생성물 또는 단위 세포 단백질 및 시간 당 형성된 화합물) 또는 다른 공정 파라미터 및 이들의 조합의 군으로부터 선택된 파라미터 중 하나 이상에 대하여, 본 발명에 따른 하나 이상의 발현 카세트를 함유하는 숙주 세포를 사용한 배양 방법의 성능은, 본 발명에 따른 발현 카세트를 함유하지 않는 숙주 세포를 사용한 배양 방법을 기준으로 하여, 적어도 0.5%, 적어도 1%, 적어도 1.5%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100%만큼 증가될 수 있다. 이는 대규모 산업적 공정에 있어 매우 가치있는 것으로 고려된다.
- [0129] 이에 따라 표적 대사 생성물을 함유하는 생성물은 액체 또는 고체 형태로 제공되거나 생성되거나 회수될 수 있다.
- [0130] 소비된 배지는, 숙주 세포가 특정 시간 동안 특정 온도에서 배양되었던 배지를 의미한다. 배양 동안 사용되는 배지 또는 배지들은, 요망되는 표적 대사 생성물의 생성 및 전형적으로 전파 및 생존력을 보장하는 모든 물질 또는 성분을 포함한다. 배양이 완료되면, 이에 따라 생성된 소비된 배지는 하기의 것을 포함한다: a) 미생물의 바이오매스 (세포 매스)로서, 상기 미생물의 세포의 전파로 인해 생성된 것인 바이오매스; b) 배양 동안 형성된 요망되는 표적 대사 생성물; c) 배양 동안 가능하게 형성되는 유기 부산물; 및 d) 배양 동안 소비되지 않은, 예를 들어, 비타민, 예컨대 비오틴 또는 엽, 예컨대 황산마그네슘과 같은, 출발 물질의 또는 사용된 배지의 구성 성분.
- [0131] 유기 부산물은, 특정 요망되는 화합물에 추가로 배양에서 사용된 미생물에 의해 생성되고 임의로 분리되는 물질을 포함한다. 소비된 배지는 배양 용기 또는 발효 탱크로부터 제거되고, 적절한 경우 수집되고, 액체 또는 고체 형태의 표적 대사 생성물을 함유하는 생성물을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 가장 간단한 경우에, 발효 탱크로부터 제거된 표적 대사 생성물-함유 소비된 배지 자체가 회수 생성물을 구성한다.
- [0132] 일부 경우에, 표적 대사 생성물 (예: 테르페노이드, 칸나비노이드, 또는 그의 전구체)의 회수는, a) 부분적 (> 0% 내지 < 80%) 내지 완전한 (100%) 또는 실질적으로 완전한 (> 80%, > 90%, > 95%, > 96%, > 97%, > 98%, 또는 > 99%) 물의 제거; b) 부분적 (> 0% 내지 < 80%) 내지 완전한 (100%) 또는 실질적으로 완전한 (> 80%, > 90%, > 95%, > 96%, > 97%, > 98%, 또는 > 99%) 바이오매스의 제거로, 후자는 임의로 제거 전에 불활성화된다; c) 부분적 (> 0% 내지 < 80%) 내지 완전한 (100%) 또는 실질적으로 완전한 (> 80%, > 90%, > 95%, > 96%, > 97%, > 98%, > 99%, > 99.3%, 또는 > 99.7%), 배양 동안 형성된 유기 부산물의 제거; 및 d) 부분적 (> 0%) 내지 완전한 (100%) 또는 실질적으로 완전한 (> 80%, > 90%, > 95%, > 96%, > 97%, > 98%, > 99%, > 99.3%, 또는 > 99.7%), 소비된 배지로부터, 배양에서 소비되지 않은, 출발 물질의 또는 사용된 발효 배지의 구성성분의 제거로 이루어진 군으로부터 선택된 방안 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 이는 요망되는 표적 대사 생성물의 농도 또는 정제를 달성한다. 요망되는 함량의 상기 표적 대사 생성물을 갖는 조성물은 이러한 방식으로 분리된다.
- [0133] 부분적 (> 0% 내지 < 80%) 내지 완전한 (100%) 또는 실질적으로 완전한 (> 80% 내지 < 100%) 물의 제거 (방안 a))는 또한 건조로서 언급된다.
- [0134] 방법의 하나의 변형에서, 완전한 또는 실질적으로 완전한, 물의, 바이오매스의, 유기 부산물의, 또한 사용된 발효 배지의 소비되지 않은 구성성분의 제거는, 요망되는 표적 대사 생성물의 순수 (> 80 중량%, > 90 중량%) 또는 고순도 (> 95 중량%, > 97 중량%, 또는 > 99 중량%) 생성물을 제공한다. 방안 a), b), c) 및 d)에 대한 풍부한 기술적 지시가 선행 기술에서 이용가능하다.
- [0135] 요건에 따라, 바이오매스는, 예를 들어, 원심분리, 여과, 경사분리(decantation) 또는 이들의 조합과 같은 분리 방법에 의해 소비된 배지로부터 완전히 또는 부분적으로 제거되거나, 그 안에 완전히 남겨질 수 있다. 적절한

경우, 바이오매스 또는 바이오매스-함유 소비된 배지는, 예를 들어 열 처리 (가열)에 의해 또는 알칼리 또는 산의 첨가에 의해, 적합한 공정 단계 동안 불활성화된다.

[0136] 하나의 절차에서, 바이오매스는, 제로 (0%) 또는 최대 30%, 최대 20%, 최대 10%, 최대 5%, 최대 1% 또는 최대 0.1% 바이오매스가 제조된 생성물 중에 남아있도록 완전히 또는 실질적으로 완전히 제거된다. 추가의 절차에서, 바이오매스는, 모든 (100%) 또는 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 99.9% 초과 바이오매스가 제조된 생성물 중에 남아있도록 제거되지 않거나, 단지 작은 비율로 제거된다. 따라서, 본 발명에 따른 하나의 방법에서, 바이오매스는 > 0% 내지 < 100%의 비율로 제거된다. 마지막으로, 발효 후에 얻어진 발효 브로스(broth)는, 바이오매스의 완전한 또는 부분적 제거 전 또는 후에, 최종 생성물의 취급 특성을 개선시키도록, 예를 들어, 염산, 황산, 또는 인산 등의 무기 산; 또는 예를 들어, 프로피온산 등의 유기 산에 의해 산성 pH로 조정될 수 있다 (GB 1,439,728호 또는 EP 1 331220). 바이오매스의 완전한 함량으로 발효 브로스를 산성화할 수도 있다. 마지막으로, 브로스는 또한, 중아황산나트륨 (NaHC03, GB 1,439,728) 또는 또 다른 염, 예를 들어 아황산의 압모늄, 알칼리 금속, 또는 알칼리 토금속 염을 첨가함으로써 안정화될 수 있다.

[0137] 바이오매스의 제거 동안, 소비된 배지 내에 존재하는 임의의 유기 또는 무기 고체는 부분적으로 또는 완전히 제거될 수 있다. 소비된 배지 중에 용해된 유기 부산물, 및 용해된 발효 배지 (출발 물질)의 소비되지 않은 구성 성분은, 생성물 중에 적어도 부분적으로 (> 0%), 일부 경우에는 적어도 25%의 정도로, 일부 경우에는 적어도 50%의 정도로, 또한 일부 경우에는 적어도 75%의 정도로 남아있을 수 있다. 적절한 경우, 이들은 또한 생성물 중에 완전히 (100%) 또는 실질적으로 완전히 남아있으며, 이는 > 95% 또는 > 98% 또는 > 99%를 의미한다.

[0138] 이어서, 물을 소비된 배지로부터 제거할 수 있거나, 또는 상기 소비된 배지를, 예를 들어, 회전 증발기, 박막 증발기, 강하-막 증발기의 사용과 같은 공지된 방법에 의해, 역삼투에 의해 또는 나노여과에 의해 증점 또는 농후화시킬 수 있다. 이어서, 이 농축된 소비된 배지를, 동결 건조, 분무 건조, 분무 과립화의 방법에 의해 또는 예를 들어 PCT/EP2004/006655에 따라 기재된 바와 같은, 순환 유동층에서와 같은 다른 방법에 의해 자유-유동 생성물, 특히 미세 분말 또는 바람직하게는 조대 과립까지 후처리할 수 있다.

[0139] 제약 조성물

[0140] 표적 대사 생성물은 제약 조성물 중으로 제제화될 수 있다. 일부 경우에 소비된 배지 또는 농축된 소비된 배지, 또는 본원에 기재된 배양 방법에서 얻어진 소비된 배지 또는 바이오매스로부터의 부분적으로 또는 완전히 정제된 표적 대사 생성물은 제약 조성물 중으로 제제화된다.

[0141] 본 발명에 따른 제약 조성물은 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다. 피부 적용을 위해 의도된 국소 조성물에서의 사용에 적합한 이러한 부형제는, 보존제; 농후화제; 완충액; 액체 담체; 등장화제; 습윤제, 가용화제, 및 유화제; 산성화제; 향산화제; 알칼리화제; 운반제; 킬레이팅제; 착물화제; 용매; 현탁화제 또는 점도-증가제; 오일; 침투 향상제; 중합체; 경화제; 단백질; 탄수화물; 및 벌크제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0142] 제약 제제의 업계에서 일반적으로 공지된 바와 같이, 특정 부형제는, 부형제의 농도, 조성물 중의 다른 부형제, 조성물의 물리적 형태, 조성물 중의 활성제의 농도, 조성물의 의도된 투여 방식, 및 다른 인자에 따라, 특정 제약 조성물에서 이들 기능 중 하나 이상을 충족할 수 있다. 하기 카테고리에서의 특정 부형제의 언급은 또 다른 카테고리 또는 카테고리들에서의 부형제의 가능한 사용을 배제하도록 의도되지 않는다.

[0143] 액체 담체는, 식염수, 인산염 완충 식염수, 글리세롤, 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된 액체 담체일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0144] 농후화제는, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된 농후화제일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0145] 등장화제는, 만니톨 및 소르비톨; 염화나트륨; 및 염화칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리알콜일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0146] 습윤제, 가용화제, 또는 유화제는 일반적으로 계면활성제이다. 전형적으로, 계면활성제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제트늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 도쿠세이트 나트륨, 노녹시놀 9, 노녹시놀 10, 옥톡시놀 9, 폴록사머, 폴리옥실 35 피마자유, 폴리옥실 40, 수소화된 피마자유, 폴리옥실 50 스테아레이트, 폴리옥실 10 올레일 에테르, 폴리옥실 20, 세토스테아릴 에테르, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 나트륨 라우릴 술페이트, 소르비탄 모노라우레이트, 소르비탄 모노올레이트, 소르비탄 모노팔미테이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 킬록사폴, 아카시아, 콜레스테롤,

디에탄올아민, 글리세릴 모노스테아레이트, 라놀린 알콜, 레시틴, 모노- 및 디-글리세리드, 모노에탄올아민 (부가물), 올레산 (부가물), 올레일 알콜 (안정화제), 폴록사머, 폴리옥시에틸렌 50 스테아레이트, 폴리옥실 35 피마자유, 폴리옥실 40 수소화된 피마자유, 폴리옥실 10 올레일 에테르, 폴리옥실 20 세토스테아릴 에테르, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 프로필렌 글리콜 디아세테이트, 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 나트륨 라우릴 술페이트, 나트륨 스테아레이트, 소르비탄 모노라우레이트, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 모노팔미테이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 스테아르산, 트리에탄올아민, 유화 왁스, 세토마크로골, 및 세틸 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0147] 국소 적용을 위한 제약 조성물은 연화제를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "연화제"는 피부 또는 다른 점막을 연화시키고, 부드럽게 하고, 그의 지질 함량을 개선시키는 소수성 작용제를 지칭한다. 사용하기에 적합한 연화제의 예는 이소스테아르산 유도체, 이소프로필 팔미테이트, 라놀린 오일, 디이소프로필 디메레이트, 디이소프로필 아디페이트, 디메틸 이소소르비드, 말레이트 대두유, 옥틸 팔미테이트, 이소프로필 이소스테아레이트, 세틸 알콜, 세틸 락테이트, 세틸 리시놀레에이트, 토크페릴 아세테이트, 아세틸화 라놀린 알콜, 세틸 아세테이트, 페닐 트리메티콘, 글리세릴 올레에이트, 토크페릴 리놀레에이트, 밀 배아 글리세리드, 아라키딜 프로피오네이트, 미리스틸 락테이트, 데실 올레에이트, 프로필렌 글리콜 리시놀레에이트, 이소프로필 라놀레이트, 펜타에리트리톨 테트라스테아레이트, 네오펜틸글리콜 디카프릴레이트/디카프레이트, 수소화된 코코-글리세리드, 이소노닐 이소노나노에이트, 이소트리데실 이소노나노에이트, 미리스틸 미리스테이트, 트리아이소세틸 시트레이트, 옥틸 도데칸올, 옥틸 히드록시스테아레이트, 포도씨유, 하나 이상의 세라미드, 시클로메티콘, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 다른 적합한 연화제의 다른 예는 또한 Cosmetic Bench Reference, pp. 1.19-1.22 (1996)에서 찾아볼 수 있다. 당업자는 다른 연화제가 본 발명에서 유용함을 인지할 것이다.

[0148] 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 용액, 벤제토늄 클로라이드, 벤조산, 벤질 알콜, 부틸 파라벤, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 크레졸, 데히드로아세트산, 디아졸리디닐 우레아, 에틸파라벤, 메틸파라벤, 메틸파라벤 나트륨, 페놀, 페닐에틸 알콜, 페닐머큐릭 아세테이트, 페닐머큐릭 니트레이트, 칼륨 벤조에이트, 칼륨 소르베이트, 프로필파라벤, 프로필파라벤 나트륨, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 데히드로아세트에이트, 나트륨 프로피오네이트, 소르브산, 티메로살, 및 티몰로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0149] 조성물은 아세트산, 암모늄 카르보네이트, 암모늄 포스페이트, 붕산, 시트르산, 락트산, 인산, 칼륨 시트레이트, 칼륨 메타포스페이트, 칼륨 포스페이트 일염기성, 나트륨 아세테이트, 나트륨 시트레이트, 나트륨 락테이트 용액, 이염기성 나트륨 포스페이트, 일염기성 나트륨 포스페이트, 나트륨 비카르보네이트, 트리스 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술포산), HEPES (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술포산), ACES (2-[(2-아미노-2-옥소에틸)아미노]에탄술포산), ADA (N-(2-아세트아미도)2-이미노디아세트산), AMPSO (3-[(1,1-디메틸-2-히드록시에틸아미노)-2-프로판술포산), BES (N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄술포산, 비신 (N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신), 비스-트리스 (비스-(2-히드록시에틸)이미노-트리스(히드록시메틸)메탄, CAPS (3-(시클로헥실아미노)-1-프로판술포산), CAPSO (3-(시클로헥실아미노)-2-히드록시-1-프로판술포산), CHES (2-(N-시클로헥실아미노)에탄술포산), DIPSO (3-[N,N-비스(2-히드록시에틸아미노)-2-히드록시-프로판술포산), HEPPS (N-(2-히드록시에틸피페라진)-N'-(3-프로판술포산), HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-히드록시프로판술포산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술포산), 트리에탄올아민, 이미다졸, 글리신, 에탄올아민, 포스페이트, MOPSO (3-(N-모르폴리노)-2-히드록시프로판술포산), PIPES (피페라진-N,N'-비스(2-에탄술포산), POPSO (피페라진-N,N'-비스(2-히드록시프로판술포산), TAPS (N-트리스[히드록시메틸]메틸-3-아미노프로판술포산), TAPSO (3-[N-트리스(히드록시메틸)메틸아미노]-2-히드록시-프로판술포산), TES (N-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술포산), 트리신 (N-트리스(히드록시메틸)메틸글리신), 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올, 및 2-아미노-2-메틸-1-프로판올로 이루어진 군으로부터 선택된 완충액을 포함할 수 있다.

[0150] 전형적으로, 산성화제는 아세트산, 시트르산, 푸마르산, 염산, 희석된 염산, 말산, 질산, 인산, 희석된 인산, 황산, 및 타르타르산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0151] 전형적으로, 향산화제는 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 차아인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 나트륨 아스코르베이트, 중아황산나트륨, 나트륨 포름알데히드 술폭실레이트, 나트륨 메타비술파이트, 나트륨 티오술페이트, 이산화황, 및 토크페롤로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0152] 전형적으로, 알칼리화제는 강한 암모니아 용액, 암모늄 카르보네이트, 디에탄올아민, 디이소프로판올아민, 수산

화칼륨, 나트륨 비카르보네이트, 나트륨 보레이트, 나트륨 카르보네이트, 수산화나트륨, 및 트롤아민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0153] 운반체는 옥수수유, 광유, 땅콩유, 참깨유, 정균 염화나트륨 및 정균수로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0154] 킬레이팅제는 에테레이트 이나트륨, 에틸렌디아민테트라아세트산, 시트르산, 및 살리실레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0155] 착물화제는 에틸렌디아민테트라아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산의 염, 젠티스산 에탄올아미드, 및 옥시퀴놀린 술페이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0156] 용매는 아세톤, 에탄올, 희석된 알콜, 아밀렌 수화물, 벤질 벤조에이트, 부틸 알콜, 사염화탄소, 클로로포름, 옥수수유, 면실유, 에틸 아세테이트, 글리세롤, 헥실렌 글리콜, 이소프로필 알콜, 메틸 이소부틸 케톤, 광유, 올레산, 땅콩유, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 카르보네이트, 프로필렌 글리콜, 참깨유, 물, 멸균수, 및 정제수로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0157] 전형적으로, 현탁화제 및/또는 점도-증가제는 아카시아, 아가, 알긴산, 알루미늄 모노스테아레이트, 벤토나이트, 정제된 벤토나이트, 마그마 벤토나이트, 카르보머, 카르보머 934p, 카르복시메틸셀룰로스 칼슘, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨 12, 카라기난, 미세결정 및 카르복시메틸셀룰로스 나트륨 셀룰로스, 텍스트린, 젤라틴, 구아 검, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 메틸셀룰로스, 펙틴, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리비닐 알콜, 포비돈, 프로필렌 글리콜 알기네이트, 이산화규소, 콜로이달 이산화규소, 나트륨 알기네이트, 트라가칸트, 비검, 및 크산탄 겔으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0158] 전형적으로, 오일은 아라키스유, 광유, 올리브유, 참깨유, 면실유, 홍화유, 옥수수유, 및 대두유로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0159] 전형적으로, 침투 향상제는 모노히드록시 또는 폴리히드록시 알콜, 일가 또는 다가 알콜, 포화 또는 불포화 지방 알콜, 포화 또는 불포화 지방 에스테르, 포화 또는 불포화 디카르복실산, 에센셜 오일, 포스파티딜 유도체, 세팔린, 테르펜, 아미드, 에테르, 케톤, 및 우레아로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0160] 전형적으로, 중합체는 셀룰로스 아세테이트, 알킬 셀룰로스, 히드록시알킬셀룰로스, 아크릴 중합체 및 공중합체, 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 및 폴리무수물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0161] 전형적으로, 경화제는 수소화된 피마자유, 세토스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 세틸 에스테르 왁스, 경질 지방, 파라핀, 폴리에틸렌 부형제, 스테아릴 알콜, 유화 왁스, 화이트 왁스, 및 옐로우 왁스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0162] 전형적으로, 단백질은 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민 (HSA), 재조합 인간 알부민 (rHA), 젤라틴, 및 카세인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0163] 전형적으로, 탄수화물은 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스, 라피노스, 멜레지토스, 말토텍스트린, 텍스트란, 전분, 만니톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨, 소르비톨, 및 미오이노시톨로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0164] 전형적으로, 벌킹제는 폴리펩티드 및 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0165] 조성물은 피부용 국소 진정제, 국소 항-염증제, 국소 항-박테리아제, 국소 항-진균제, 국소 스테로이드, 및 국소 항산화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0166] 피부용 국소 진정제는 전형적으로 캠퍼마일 및 알로에를 포함하고; 다른 국소 진정제가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.
- [0167] 국소 항-염증제는 전형적으로 디클로페낙, 케토프로펜, 이부프로펜, 피록시캄, 및 인도메타신을 포함하고; 다른 국소 항-염증제가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.
- [0168] 국소 항-박테리아제는 전형적으로 바시트라신, 폴리믹신 B, 에리트로마이신, 나트륨 술파세타미드, 은 술파디아진, 레타파몰린, 무피로신, 네오마이신, 및 프라복신을 포함하고; 다른 국소 항-박테리아제가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.
- [0169] 국소 항-진균제는 전형적으로 벤조산, 살리실산, 운데실렌산, 케토코나졸, 니스타틴, 나프티핀, 톨나프테이트,

미코나졸, 에코나졸, 시클로피록스, 옥시코나졸, 세르타코나졸, 에피코나졸, 테르비나핀, 타바보롤, 클로트리마졸, 술코나졸, 및 부테나핀을 포함하고; 다른 국소 항-진균제가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.

[0170] 국소 스테로이드는 전형적으로 히드로코르티손, 트리암시놀론, 플루오시놀론, 프레드니카르베이트, 데소니드, 베타메타손, 할시노니드, 디플로라손, 플루오시놀론, 클로베타솔, 데속시메타손, 모메타손, 클로코르톨론, 플루티카손, 플루오시노니드, 플루란트레놀리드, 알클로메타손, 및 할로베타솔을 포함하고; 다른 국소 스테로이드가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.

[0171] 국소 항산화제는 전형적으로 비타민 C, 비타민 E, 및 L-셀레노메티오닌을 포함하고; 다른 국소 항산화제가 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다.

[0172] 다른 활성제가 포함될 수 있다.

[0173] 대안적으로, 다수의 이들 추가의 작용제, 예컨대 국소 항-염증제, 국소 항-박테리아제, 국소 항-진균제, 국소 스테로이드, 및 국소 항산화제는, 상기에 기재된 바와 같은 하나 이상의 부형제를 포함하는 하나 이상의 추가의 제약 조성물에서와 같이, 별도로 투여될 수 있다.

[0174] 상기에 기재된 바와 같은 전구약물의 사용을 포함한 일부 대안에서, 칸나비노이드 및 테르페노이드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본 발명에 따른 방법 및 조성물에서 사용되는 치료 활성 화합물은, 하나 이상의 컨쥬게이션 파트너를 치료 활성 화합물에 공유 가교시킴으로써 형성된다. 많은 작용기의 조합의 가교에 적합한 시약은 당업계에 공지되어 있다.

[0175] 예를 들어, 친전자성 기가, 단백질 또는 폴리펩티드 내에 존재하는 것들을 포함한, 많은 작용기와 반응할 수 있다. 반응성 아미노산 및 친전자체의 다양한 조합이 당업계에 공지되어 있고 이것이 사용될 수 있다. 예를 들어, 티올 기를 함유하는 N-말단 시스테인이 할로젠 또는 말레이미드와 반응할 수 있다. 티올 기는 많은 수의 커플링제, 예컨대 알킬 할라이드, 할로아세틸 유도체, 말레이미드, 아지리딘, 아크릴로일 유도체, 아릴화제, 예컨대 아릴 할라이드 등과의 반응성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 이들은 G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques"(Academic Press, San Diego, 1996), pp. 146-150에 기재되어 있다.

[0176] 시스테인 잔기의 반응성은 이웃하는 아미노산 잔기의 적절한 선택에 의해 적합화될 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기에 인접한 히스티딘 잔기는 시스테인 잔기의 반응성을 증가시킬 것이다. 반응성 아미노산 및 친전자성 시약의 다른 조합이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 말레이미드가, 특히 보다 높은 pH 범위에서, 아미노기, 예컨대 리신의 측쇄의 e-아미노기와 반응할 수 있다. 또한 아릴 할라이드가 이러한 아미노기와 반응할 수 있다. 할로아세틸 유도체가 히스티딘의 이미다졸릴 측쇄 질소, 메티오닌의 측쇄의 티오에테르 기, 및 리신의 측쇄의 .엡실론.-아미노기와 반응할 수 있다. 리신의 측쇄의 e-아미노기와 반응하는 많은 다른 친전자성 시약이 공지되어 있고, 이는 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 아실 아지드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 술폰일 클로라이드, 에폭시드, 옥시란, 카르보네이트, 이미도에스테르, 카르보디이미드, 및 무수물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들은 G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques"(Academic Press, San Diego, 1996), pp. 137-146에 기재되어 있다.

[0177] 추가로, 아스파르테이트 및 글루타메이트의 것들과 같은 카르복실레이트 측쇄와 반응하는 친전자성 시약이 공지되어 있고, 이는 예컨대 디아조알칸 및 디아조아세틸 화합물, 카르보닐딜미다졸, 및 카르보디이미드이다. 이들은 G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques" (Academic Press, San Diego, 1996), pp. 152-154에 기재되어 있다. 또한, 세린 및 트레오닌의 측쇄에서의 것들과 같은 히드록실기와 반응하는 친전자성 시약이 공지되어 있고, 이는 반응성 할로알칸 유도체를 포함한다. 이들은 G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques"(Academic Press, San Diego, 1996), pp. 154-158에 기재되어 있다. 또 다른 대안적 구현예에서는, 친전자체 및 친핵체(즉, 친전자체와 반응성인 분자)의 상대적 위치가 역전되고, 그에 따라 단백질이 친핵체와 반응성인 친전자성기를 갖는 아미노산 잔기를 갖고, 표적화 분자는 그 안에 친핵성기를 포함한다. 이는 상기에 기재된 바와 같은 히드록실아민(친핵체)과 알데히드(친전자체)의 반응을 포함하지만, 그 반응보다 더 일반적이고; 다른 기가 친전자체 및 친핵체로서 사용될 수 있다. 적합한 기는 유기 화학에서 널리 공지되어 있고, 추가로 상세히 기재될 필요는 없다.

[0178] 가교를 위한 반응성 기의 추가의 조합이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노기, 아미노 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 아실 아지드, N-히드록시숙신이미드(NHS) 에스테르, 술폰일 클로라이드, 알데히드, 글리옥살, 에폭시드, 옥시란, 카르보네이트, 알킬화제, 이미도에스테르, 카르보디이미드, 및 무수물

과 반응할 수 있다. 티올 기가 할로아세틸 또는 알킬 할라이드 유도체, 말레이미드, 아지리딘, 아크릴로일 유도체, 아실화제, 또는 다른 티올 기와 산화 및 혼합 디설피드의 형성에 의해 반응할 수 있다. 카르복시 기가 디아조알칸, 디아조아세틸 화합물, 카르보닐디이미다졸, 카르보디이미드와 반응할 수 있다. 히드록실 기가 에폭시드, 옥시란, 카르보닐디이미다졸, N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트, N-히드록시숙신이미딜 클로로포르메이트, 페리오테이트 (산화물 위한), 알킬 할로젠, 또는 이소시아네이트와 반응할 수 있다. 알데히드 및 케톤 기가 히드라진, 슈프(Schiff) 염기 형성 시약, 및 다른 기와 환원성 아미노화 반응 또는 만니히(Mannich) 축합 반응에서 반응할 수 있다. 가교 반응에 적합한 또한 다른 반응이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 가교 시약 및 반응은 G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques"(Academic Press, San Diego, 1996)에 기재되어 있다.

[0179] 본 발명에 따른 제약 조성물의 단위 용량 중에 포함된, 비제한적으로 상기에 기재된 바와 같은 칸나비노이드 또는 테르페노이드와 같은 주어진 치료 활성제의 양은, 특정 화합물, 질환 상태 및 그의 중증도, 치료를 필요로 하는 대상체의 정제 (예: 체중)와 같은 인자에 따라 달라질 것이지만, 그럼에도 불구하고 당업자에 의해 일상적으로 결정될 수 있다. 선택된 투여량 수준은, 특정 치료제의 활성, 투여 방식, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 병태의 중증도, 대상체에게 영향을 주는 다른 건강 고려사항, 및 대상체의 간 및 신장 기능의 상태를 포함한 다양한 약동학적 인자에 따라 달라진다.

[0180] 이는 또한, 치료의 지속기간, 사용되는 특정 치료제와 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 뿐만 아니라 치료되는 대상체의 연령, 체중, 병태, 일반적 건강 및 이전 병력, 및 유사 인자에 따라 달라진다. 최적 투여량을 결정하는 방법은 당업계에, 예를 들어, Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000에 기재되어 있다. 주어진 세트의 병태에 대한 최적 투여량은 작용제에 대한 실험 데이터를 고려하여 종래의 투여량-결정 시험을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있다.

[0181] 본 발명의 조성물 또는 본 발명에 따라 사용되는 조성물은, 제약 조성물의 제조에 대해 일반적으로 공지된 기술을 사용하여, 예를 들어, 종래 기술, 예컨대 혼합, 용해, 과립화, 당제(dragee)-제조, 부양(levitating), 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조에 의해 제조될 수 있다. 제약 조성물은, 활성 화합물의 조제물로의 가공처리를 용이하게 하는 부형제 및 보조제로부터 선택될 수 있는, 하나 이상의 생리학상 허용가능 담체를 사용하여 종래 방식으로 제제화될 수 있다.

[0182] 본 발명에 따른 제약 조성물은 통상적으로 다수회로 대상체에게 투여된다. 단일 투여량 사이의 간격은 1주마다, 1개월마다 또는 1년마다일 수 있다. 간격은 또한 당업계에 널리 공지된 치료적 반응 또는 다른 파라미터에 의해 지시되는 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 대안적으로, 제약 조성물은 지속 방출 제제로서 투여될 수 있고, 이 경우에는 보다 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도수는 제약 조성물 중에 포함된 약리 활성제의 대상체에서의 반감기에 따라 달라진다. 투여량 및 투여 빈도수는, 치료가 예방적인지 치료적인지에 따라 달라질 수 있다.

[0183] 예방적 적용에서는, 비교적 낮은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 대상체는 이들의 남은 생애 동안 계속해서 치료를 수용할 수 있다. 치료적 적용에서는, 질환의 진행이 감소되거나 종료될 때까지, 또한 바람직하게는 대상체가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 대상체는 예방적 요법을 투여받을 수 있다.

[0184] Nardella에게 허여된 미국 특허 번호 6,573,292, Nardella에게 허여된 미국 특허 번호 6,921,722, Chao et al.에게 허여된 미국 특허 번호 7,314,886, 및 Chao et al.에게 허여된 미국 특허 번호 7,446,122는, 암을 포함한 다수의 질환 및 병태 치료에서의 다양한 약리 활성제 및 제약 조성물의 사용 방법, 및 이러한 약리 활성제 및 제약 조성물의 치료적 효과를 결정하는 방법을 개시하며, 이들 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0185] 참조문헌

[0186] 하기 공개문헌이 본원에 참조로 포함된다. 이들 공개문헌은 하기에 제공되는 번호로 본원에서 언급된다. 공개문헌의 이 목록 내의 임의의 공개문헌의 포함은 본원에서 언급되는 임의의 공개문헌이 선행 기술임을 인정하는 것으로 간주되어선 안된다.

[0187] • JAMA.2006; 295(7):761-775

[0188] • Comput Struct Biotechnol J, 2012, 3, 1-11

[0189] • Biotechnol.Bioeng.2004 88, 909-915.

[0190] • Science 2002, 298 (5599), 1790-3.

[0191] 실시예

[0192] 실시예 1: 대장균에서 MEP 경로의 조작

[0193] MEP 경로를 그의 열역학적 유리성 및 적합한 박테리아 숙주 시스템의 이용가능성에 대해 선택하였다. MEP 경로는 숙주 대장균에 대해 네이티브이다. 대장균 BL21 (DE3)을 이 실험에서 발현 숙주로서 선택하였다. MEP 경로에서 속도-제한 효소를 코딩하는 유전자를 과발현시켜 칸나비노이드 전구체의 생성을 최대화하였다.

[0194] MEP 경로의 4개 단계는 가장 느리고 낮은 플럭스를 겪는다. 이들 속도-제한 단계를 촉매하는 효소의 과발현은 MEP 경로를 통한 플럭스를 개선시키고 하류 테르페노이드 생합성을 증가시키는 것으로 보고되었다. 따라서, 칸나비노이드 (도 1)에 대한 전구체 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 및 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP)의 생성을 최대화하기 위해, 라이코펜, 모노테르펜, 또는 이소프렌 경로, 비-메발로네이트 경로를 조작하여 4개의 상이한 속도-제한 유전자 *dxs*, *ispD*, *ispF* 및 *idi*의 추가 카피를 도입하였다 (도 2).

[0195] 이 과정을 폴리머라제 사슬 반응 (PCR) 및 제한 소화 및 겔찰을 통한, T7 프로모터 및 p15A 복제 기점을 갖는 벡터 백본으로의 클로닝을 통해 단계적 방식으로 수행하여, 적절한 배향을 갖는 유전자 카세트를 구성하였다. 이어서, 전체 유전자 카세트를 Trc 프로모터 및 pBR322 복제 기점을 갖는 pTrc-trGPPS(CO)-LS 플라스미드 (도 3)로 서브-클로닝하여 유전자 발현을 제어하는 폭넓은 윈도우 및 이소프레노이드 전구체의 생성을 얻었다. 이어서, pTrc 프로모터 및 선택 마커 유전자와 함께 유전자 카세트를 유도가능 추가 카피로서 대장균 염색체로 통합하여 이소프레노이드 전구체의 과생성을 제공하였다. MEP 경로 발현 카세트의 대략적 맵을 도 3에 나타내었다. 속도 제한 효소의 과발현은 SDS 페이지 분석에 의해 확인된다 (도 4).

[0196] 유사하게, GPP 신타제를, 예를 들어, 식물 공급원으로부터 클로닝하고, 대장균에서 발현시켜 GPP, 칸나비노이드 신타제 CBGA 신타제의 기질 및 모노테르펜 신타제, 예컨대 카렌, 미르센, 또는 리모넨 신타제의 기질을 생성한다. 또한, 올리베히산, CBGA 신타제의 기질의 합성을 위한 폴리케티드 경로를 클로닝하고, 대장균에서 발현시키거나, 또는 올리베히산을 외생 공급한다. 따라서, CBGA의 생성에 대한 경로가 원핵생물 숙주 세포에서 재현된다.

[0197] 실시예 2: 대장균에서의 하류 경로 칸나비노이드 신타제 유전자의 클로닝 및 발현

[0198] 도입:

[0199] 칸나비게롤산 (CBGA)은 다른 칸나비노이드의 합성에 대한 모 화합물이다. CBGA는, CBGA 신타제 (방향족 프레닐 트랜스퍼라제 패밀로부터의 효소)에 의해 촉매화된 올리베히산 (OA) 및 게라닐 피로포스페이트 (GPP)로부터의 효소적 반응에 의해 생성된다. 이 프레닐화된 생성물 (CBGA)의 고리화는 추가로 3개의 상이한 옥시도시클라제에 의해 촉매화된 3개의 상이한 칸나비노이드 생성물을 제공한다. Δ^9 -테트라히드로칸나비놀산 (THCA) 신타제, 칸나비디올 (CBDA) 신타제, 및 칸나비크로멘산 (CBCA) 신타제는 각각 Δ^9 -테트라히드로칸나비놀산 (THCA), 칸나비디올산 (CBDA) 및 칸나비크로멘산 (CBCA)의 형성을 촉매한다. 미생물 숙주 (대장균)에서의 이들 칸나비노이드 생성물의 생합성은 THCA 신타제, CBGA 신타제, CBCA 신타제, CBDA 신타제, 및 이들의 조합의 클로닝, 발현, 및 활성 결정을 포함한다. 전형적으로, 칸나비노이드 생성물은, 임의로 THCA 신타제, CBCA 신타제, 및 CBDA 신타제 중 하나 이상과 조합되어, 적어도 CBGA 신타제를 발현하는 미생물 숙주에서 생성된다.

[0200] CBGA 신타제

[0201] 대장균에 대해 코돈 적합화된, 칸나비스 사티바로부터의 CBGA 신타제 유전자를, 강한 IPTG 유도가능 T5 프로모터에 작동가능하게 연결된 플라스미드 벡터로 성공적으로 클로닝하였다. 플라스미드는 높은 카피 pUC 복제 기점을 함유하고, 카나마이신 내성이다. CBGA 신타제에 대한 플라스미드 구성을 도 5에 나타내었다. 대장균에서의 CBGA 신타제의 발현은 SDS 페이지 분석에 의해 확인되었다 (도 6). CBGAS의 발현 확인 후, 효소 용액에 대한 기질 (OA 및 GPP)의 외생 첨가에 의해 효소의 활성을 결정하고, 내부 개발 HPLC 방법을 사용하여 생성물 프로파일링을 수행하였다. 정화된 세포 용해물을 37 °C에서 OA 및 GPP의 혼합물에 첨가함으로써 프레닐화 반응을 수행하고, 에틸 아세테이트를 사용하여 반응 혼합물을 추출하고, HPLC 상에서 진행시켜 생성물 형성을 측정하였다. (도 7) 결과는, CBGAS가 대장균에서 발현될 수 있고, CBGA로의 기질 OA 및 GPP와의 프레닐화 반응을 촉매할 수 있음을 나타내었다.

[0202] 또 다른 실험에서, CBGA 활성을 생체내에서 시험하였다. 이 실험에서는, IPTG의 첨가에 의해 로그-기 성장

(OD₆₀₀ = 0.6) 도달시 CBGAS 발현 플라스미드를 함유하는 숙주 세포를 배양하고 유도하였다. 유도기 동안 세포에 GPP 및 OA를 공급하고, 밤새 성장시켰다. 이어서 세포 현탁액을 원심분리하고, 이어서 상청액을 HPLC에 주입하여 CBGA 형성을 확인하였다. 도 8은 대장균에서 생성된 (낮은 카피 플라스미드, pBAD33 사용) CBGA의 검출에 대한 HPLC 크로마토그램을 나타낸다. 생성된 CBGA의 농도는 5 mL 배양물로부터 대략 1.2 µg/ml로 계산되었다.

[0203] THCA 신타제 (THCAS)

[0204] 강한 IPTG 유도가능 T5 프로모터의 제어 하에 THCA 신타제 유전자를 또한 높은 카피, 카나마이신 내성, 플라스미드로 클로닝하였다. 유전자 삽입은 PCR 및 유전자 시퀀싱에 의해 확인되었다. THCA 신타제 유전자에 대한 생성된 발현 카세트의 개략도를 도 9에 나타내었다. THCA 신타제의 발현을 IPTG 유도에 의해 수행하고, 세포 용해물을 SDS 페이지에 의해 분석하여 발현을 확인하였다. 그러나, THCA 신타제는 대장균으로 성공적으로 발현되지 않았다.

[0205] THCA 신타제 유전자는 8개의 글리코실화 자리 및 28개의 아미노산 신호 펩티드를 N 말단에 갖는 단백질의 플라비닐화된 옥시다제를 코딩한다. 글리코실화된 막횡단 단백질의 생성에 대한 대장균의 이들 제한은 단백질의 THCA 신타제 부류의 활성 형태를 발현시키기 어렵게 만든다. 이 제한을 극복하기 위해, 단백질 발현이 시토솔에서 나타나는 것을 보장하기 위해 신호 펩티드 없이 유전자를 발현하도록, 단백질 폴딩을 보조하고 활성 단백질의 생성을 증가시키기 위해 모듈식 샤페론과 함께 유전자를 공동-발현하도록 (예: 도 10), 또한 단백질 폴딩을 보조하기 위해 글리코실화 기관과 공동-발현하도록 (예: 도 11) 다중-인자 전략을 디자인하였다. CBDA 신타제 (CBDAS) 또한 동일한 부류의 단백질에 포함되고, 따라서 CBDA 신타제 발현을 위해서도 동일한 전략이 적용될 것이다. 유사하게, CBCA 신타제 (CBCAS)는 네이티브 신호 서열을 갖는 글리코실화된 단백질이고, 따라서 CBCA 신타제 발현을 위해서도 동일한 전략이 적용될 것이다. 연구의 이 부분은 진행 하에 있고, THCAS와 관련하여 다음 접근이 고려되고, 당업자는 이들 접근이 또한 CBDAS 및 CBCAS에 적용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0206] 절단된 THCAS

[0207] THCAS는 코딩된 N 말단으로부터 28개 아미노산 (유전자 서열의 5' 말단으로부터 84 bp)을 제거함으로써 절단된다.

[0208] 샤페론 플라스미드와의 공동-발현

[0209] THCA 신타제 유전자를, 이것이 샤페론 시스템 및 글리코실화 시스템을 갖는 플라스미드와의 공동-발현을 위한 상이한 및 상용성인 복제 기점을 가짐을 확인하도록 pTRC 프로모터의 제어 하에, pBR322 복제 기점, 암피실린 내성을 갖는 플라스미드 상으로 클로닝하였다 (도 11). 신호 펩티드를 갖는, 또한 갖지 않는 THCAS를, 대장균에서 단백질 폴딩에서 구별되는, 그러나 협동적인 역할을 하는, 대장균에서의 2개의 주요 샤페론 경로 성분, DnaK-DnaJ-GrpE 및 GroE1-GroES와 공동-발현시킨다. 대장균은 그의 네이티브 샤페론 시스템을 갖지만, 재조합 단백질의 높은 수준의 생성은 내생 샤페론 시스템을 포화시킬 수 있고 비생산적 응집을 초래할 수 있다. 이들 조건 하에, 폴딩에 대해 제한적인 분자 샤페론의 세포내 농도 증가는 봉입체 형성을 감소시킬 수 있다. 일본의 다카하시 유라(Takahashi Yura) 그룹은 상이한 프로모터 하에 2개의 샤페론 경로를 갖는 pACYC184-기반 플라스미드를 구성하였다. 이 플라스미드 (pG-KJE8), 또는 그의 유도체는 숙주 세포에서 활성 THCA 신타제의 생성에 대한 조건을 식별하기 위해 사용된다.

[0210] 글리코실화 시스템과의 공동-발현

[0211] 글리코실화는 대장균에서 THCA 신타제의 증가된 발현, 폴딩, 프로세싱, 용해도, 및/또는 활성을 위해 요구될 수 있다. 불행히도, 대장균은 네이티브 단백질 글리코실화 시스템을 갖지 않는다. pgI 시스템이라 불리는, 캄필로박테르 제주니(Campylobacter jejuni)로부터의 N 글리코실화 시스템은, 대장균에서 성공적으로 발현되었다. 씨. 제주니 pgI 시스템 유전자를 갖는 플라스미드가 제공된다. 이 플라스미드, 또는 그의 유도체는 숙주 세포에서 활성 THCA 신타제의 생성에 대한 조건을 식별하기 위해 사용된다 (도 11).

[0212] 실시예 3: 칸나비노이드 경로 유전자의 발현의 최적화

[0213] 대장균에서 CBGA의 내생 생성을 최적화하기 위해, CBGA 신타제를, CBGA의 생성을 위해 요구되는, 기질 GPP 및 OA를 제공하도록 폴리케티드 경로 성분 및 또는 MEP 경로, GPP 신타제와 동시에 공동-발현시킨다.

[0214] 공동-발현 후보는 하기의 것을 포함한다:

- [0215] • IPP 및 DMAPP를 생성하기 위한 MEP 경로와의 공동-발현
- [0216] • IPP 및 DMAPP로부터 내생적으로 GPP를 공급하기 위한 GPP 신타제와의 공동-발현
- [0217] • 내생 올리베톨산 (OA) 공급을 위한 폴리케티드 경로와의 공동-발현.
- [0218] 대장균에서 2개의 상이한 플라스미드의 공동-발현을 위해, 낮은 또는 중간 카피 수를 갖는 플라스미드를 사용하여 세포 성장에 대한 유해 효과를 감소시켰고, 상용성 복제 기점을 사용하여 2개 이상의 플라스미드의 유지를 보장하였고, 플라스미드 각각의 엄중한 선택을 위해 독립적 항생제 선택을 사용하였다. 따라서, CBGA 신타제 유전자를 낮은 카피 플라스미드 pBAD33으로 클로닝하였다. 낮은 카피 CBGA 신타제 발현 플라스미드의 개략도를 나타내었다 (도 12). 클로닝된 CBGAS 유전자를 제한 소화 및 시퀀싱에 의해 확인하였다. GPP 신타제 및 MEP 경로를 갖는 CBGAS의 공동-발현을 위해, GPP 신타제를 pBAD33에서 CBGAS의 상류에서 클로닝하고, 이어서 pTRC-RDE와 공동-변환시켰다 (도 13). 공동-변환 후, OD₆₀₀이 0.6에 도달하면 세포를 항생제 선택과 함께 성장시키고 유도하였다. 유도제 농축물의 양을 도 14에 기재하였다.
- [0219] 유도제 첨가 후, 세포를 밤새 성장시켰다. OD₆₀₀을 측정하여 단백질 생성시 세포 생존력을 검사하였다. 상이한 배양물에 대한 OD₆₀₀ 비교를 도 15에 나타내었다. pBAD33_GPPS_CBGAS를 갖는 균주를 10, 15 및 20 mM의 농도로 아라비노스에 의해 유도하였다. pBAD33_GPPS_CBGAS 및 pTRC-RDE를 갖는 균주를 상이한 농도 조합의 아라비노스 및 IPTG로 유도하였다. 세포 용해 후 단백질을 추출하고, 단백질의 농도를 브래드포드(Bradford) 방법을 사용하여 측정하였다. 단백질의 유도 및 발현을 SDS 페이지에 의해 검사하였다 (도 16). 총 추출된 단백질 농도를 플롯팅하여 (도 17) SDS 페이지 상의 발현 데이터와 비교하였다. 유도제 농도 증가에 따라 총 단백질 농도는 증가하는 것으로 나타났고, 이는 세포 집단수 및 성장과 반비례한다.
- [0220] 리(Lee) 등은 아라비노스의 유도에 대한 IPTG의 개입을 발견하였다. 따라서 CBGAS의 발현을 상이한 조합의 아라비노스 및 IPTG 농도로 검사하였다. 세포가 10 mM 아라비노스 및 0.5 mM IPTG로 유도된 경우 총 단백질 농도는 보다 높은 것으로 나타났다. 다중 플라스미드 유지는 DNA, RNA, 및 단백질 합성으로부터의 세포에 대한 대사 부담 뿐만 아니라 세포가 생성해야 하는 항생제 내성 단백질의 총 수를 증가시키고, 요망되는 최종 생성물의 낮은 생성을 초래한다. 또한 상이한 유도제들 사이의 밸런스 유지는 또한 최종 생성물에 대한 비-제한가능 생성 수준을 제공할 것이다. 이 제한을 극복하기 위해, 전체 유전자 카세트들, MEP 경로 및 GPPS 및 CBGAS 오페론을 함께 갖는 단일 플라스미드 상에서 구성한다. 추가로 또는 대안적으로, MEP 경로, GPPS, 및/또는 CBGAS를 숙주 세포 게놈으로 통합한다.
- [0221] 실시예 4:MEP 경로 상의 2작용성 ispDF 유전자의 메타게놈 스크리닝 및 클로닝
- [0222] 토양 박테리아로부터의 환경 메타게놈을 스크리닝하여 대안적 MEP 경로 유전자를 식별하였다. 상응하는 대장균 오르토로그에 비해 상당히 더 활성인 비-메발로네이트 경로에서의 신규한 2작용성 효소를 식별하였다. 새로운 2작용성 효소는 단일 폴리펩티드 스캐폴드 상으로 IspD 및 ispF의 활성 자리를 공동-국소화하였다. 2작용성 유전자의 활성을 카나미노이드 합성 대신에 라이코펜 생성에 대해 평가하였다. 유전자를 ispDF라 칭하고, 동일한 강한 RBS를 사용하여 ispD 및 ispF를 ispDF로 대체하여 pTrc-RDE 오페론에서 클로닝하였다. 이 조작된 플라스미드를 pTrc-RDE^{*}라 칭하고, 대장균에서 변환시켰다 (DE3). ispD 및 ispF의 활성 자리를 공동-국소화한 2개의 추가의 메타게노믹스 2작용성 효소를 각각 ispDF2, 및 ispDF3이라 칭하였다.
- [0223] 단백질 발현 연구
- [0224] 플라스미드 pTrc-RDE 및 pTrc-RDE^{*}를 보유하는 균주를 IPTG로의 유도에 의해 단백질 발현에 대해 시험하였다. 세포를 37 °C에서 LB 브로스에서 성장시켜 0.6의 OD₆₀₀에 도달하였고, 배지 내로의 IPTG의 첨가에 의해 유도하였고, 이어서 배양물을 30 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 배양물로부터 수확된 세포를 용해시키고, 전체 단백질을 추출하였다. 총 단백질 농도를 브래드포드 방법으로 추정하고, SDS-페이지 겔 상에서 진행시켰다. 가시화를 위해 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) G-250으로 염색하였다. 발현시 pTrc-RDE 및 pTrc-RDE^{*} 플라스미드는 둘 다 SDS-페이지 상에서 경로 효소에 상응하는 밴드를 나타내었다. 유도된 세포 용해물의 SDS-페이지 분석에 의해 ispDF 발현이 나타났다 (도 18).
- [0225] ispDF 모델링: 캄필로박테르 제주니로부터의 2작용성 ispDF는 CJ-ispDF로서 보고되었다. 본 발명자들의 연구에서

보고된 IspDF (ispDF1)를 스위스 모델을 사용하여 CJ-ispDF로 모델링하였다. 이는 대략 31% 서열 유사성을 보유한다. 그의 CJ-ispDF 및, 네이티브 ispD 및 ispF와의 정렬은 상이한 아미노산을 나타낸다 (도 19). 이는 ispDF가 신규한 것이고 보고된 바 없음을 시사한다. 활성 자리 공동-국소화에 대한 보다 많은 분석이 수행되고 있다.

[0226] 플랫폼 균주의 기능 분석:

[0227] 조작된 대장균 균주를, C5 이소프레노이드 전구체의 라이코펜으로의 전환을 위해 하류 유전자를 함유하는 플라스미드로 변환시켰다. 라이코펜 생합성 유전자를 구성성분 프로모터의 제어 하에 클로닝하였다. 라이코펜 발현 플라스미드는 낮은 카피였고, 공동-발현에 대한 복제 기점의 상용성을 가졌다.

[0228] ispD, ispF 및 ispE 효소는 2개의 연속적 촉매 단계를 통해 채널 대사산물에 대한 다성분 복합체를 형성한다고 보고되어 있다. 이를 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 두 오페론에서 계놈으로부터 증폭된 네이티브 ispE 유전자를 클로닝하였다. 변종 플라스미드를 pTrc-RDE 및 pTrc-RDE*에 대해 각각 pTrc-RDEE 및 pTrc-RDE*E라 칭하였다 (도 20). 또한 이들 변종 둘 다에서, 하기에 기재되는 바와 같은 라이코펜 생성에 대한 기능성을 시험하였다.

[0229] 실시예 5: MEP 경로의 하나 이상의 성분의 이중 발현을 통한 테르페노이드 생합성 증가

[0230] 상이한 구성물을 생성하고, 증가된 테르페노이드 생합성을 위한 능력에 대해 시험하였다 (도 21).

[0231] 이소프렌 합성

[0232] 대장균의 하기 균주를 제공하였다: 모 대조 균주 (BL21); 아라비노스 프로모터에 작동가능하게 연결된 이소프렌 신타제 (ispS)를 코딩하는 발현 카세트를 함유하는 대조 균주 SA01; Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된 dxs, ispD, ispF, 및 idi를 코딩하는 RDE 발현 카세트 및 SA01 내의 발현 카세트를 함유하는 균주 SA02; 및 Trc 프로모터 균주에 작동가능하게 연결된 dxs, ispDF1, 및 idi를 코딩하는 RDE* 발현 카세트 및 SA01 내의 발현 카세트를 함유하는 균주 SA03 (도 22, 좌측). SA03에서, 명칭 ispDF1-는, ispDF1을 코딩하는 핵산이 이중 숙주 세포에서 증가된 발현을 위해 코돈 적합화되지 않음을 나타내며, ispDF+ (도 22에 나타내지 않음)는 효소를 코딩하는 핵산이 코돈 적합화됨을 나타낸다. 배양물을 밀봉 유리 배양 튜브에서 30 °C에서 230 rpm으로 성장시켰다. 배양물을 OD600 0.6 도달 후에 유도하고, 20 h 동안 추가로 인큐베이션하였다. 0.05mM IPTG 및 10 mM 아라비노스를 유도제로서 사용하였다. 배양물 헤드 스페이스를 GC-MS에 의해 분석하였다. 샘플을 70 °C로 가열한 후 주입하였다. 보정 곡선을 사용하여 이소프렌을 정량화하였다. 본원에 기재된 균주에 의한 이소프렌 생성을 도 22 우측에 나타내었다.

[0233] 라이코펜 합성

[0234] 플라스미드 pAC-LYC (Addgene 플라스미드 #53270)를 얻었다. 이 플라스미드는 라이코펜 합성 유전자 crtE, crtI, 및 crtB에 작동가능하게 연결된 구성성분 프로모터를 갖는 발현 카세트를 함유한다. Cunningham FX Jr, et al., Plant Cell.1994 Aug;6(8):1107-21을 참조한다. 대장균의 하기 균주를 제공하였다: 모 대조 균주 (BL21(DE3)); 상기에 기재된 RDE 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 플라스미드 pAC-LYC를 함유하는 균주 RDE; 상기에 기재된 RDE* 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 플라스미드 pAC-LYC를 함유하는 균주 RDE* (DF1-); 코돈 적합화된 ispDF1을 코딩하는 핵산을 갖는 RDE* 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 플라스미드 pAC-LYC를 함유하는 균주 RDE* (DF1+); 코돈 적합화된 ispDF2를 코딩하는 핵산을 갖는 RDE* 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 플라스미드 pAC-LYC를 함유하는 균주 RDE* (DF2+); 및 코돈 적합화된 ispDF3을 코딩하는 핵산을 갖는 RDE* 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 플라스미드 pAC-LYC를 함유하는 균주 RDE* (DF3+). 생성된 추가의 균주는 pAC-LYC를 함유하는 SA01; pAC-LYC 및 pTrc-RDE를 함유하는 SA02; pAC-LYC 및 pTrc-RDEE를 함유하는 SA03; pAC-LYC 및 pTrc-RDE*를 함유하는 SA04; 및 pAC-LYC 및 pTrc-RDE*E를 함유하는 SA05를 포함한다. ispDF1, ispDF2, 및 ispDF3의 서열을 도 26에 나타내었다.

[0235] 라이코펜 생성을 위해, SA01-SA05의 시드 배양물을 30 °C에서 밤새 LB 배지 내에서 성장시켰다. 이어서, 이들 배양물을 신선한 배지로 0.2의 광학 밀도로 희석하고, IPTG에 의해 유도하였다. 생성 배양물을 250rpm으로 광차단 진탕시키며 30 °C에서 20h 동안 인큐베이션하였다. 4mL의 배양물을 2mL의 아세톤으로 추출함으로써 라이코펜 추출을 수행하였다. 아세톤 추출물을 HPLC 상에서 분석하였다. HPLC 방법: 컬럼-C18, 이동 상-메탄올:테트라히드로푸란:물 (66:30:4), 유속 - 1mL/min, 포토다이오드 어레이 검출기를 사용하여 472nm 파장에서 검출, 라이

코펜 피크를 내부 라이코펜 표준으로 확인하였다. 도 23은 IPTG 유도가 라이코펜 생성을 증가시킴을 보여준다. 최적 유도 수준은 상이한 균주에서 상이하다.

[0236] 제2 실험에서는, 배양물을 LB에서 밤새 30 °C에서 성장시켰다. 이어서 이들 배양물을 LB로 0.2의 OD600로 희석하였다. 이들을 IPTG로 유도하고, 30 °C에서 24 h 동안 성장시켰다. 2 mL의 배양물을 5 min 동안 8000 rpm으로 원심분리하여 세포 펠릿을 생성하였다. 세포 펠릿으로부터의 라이코펜을 55 °C에서 15 min 동안 1 mL 아세톤으로 추출하였다. 이어서, 혼합물을 14000 rpm으로 원심분리하였다. 생성된 상청액을, 1 mL/min의 유속으로 메탄올, 테트라히드로푸란 및 물 (66:30:4)의 혼합물로 등용매 용리 방법을 사용하여 HPLC에 의해 C-18 컬럼 상에서 분석하였다. 라이코펜 피크에서 HPLC 곡선 하의 면적으로서 라이코펜 수율을 측정하였다. 피크를 내부 표준으로 확인하였다. 면적을 0 μ M IPTG를 갖는 RDE 균주에 대하여 정규화하였다. 결과를 도 24에 나타내었다.

[0237] 모노테르펜 합성

[0238] 도 25 상단은 숙주 세포에서 모노테르펜의 생성을 위한 구성물을 나타낸다. 구성물은 T7 프로모터에 작동가능하게 연결된 dxs, 코돈 적합화된 ispDF1 (DF1+), 및 idi를 코딩하는 MEP 경로 플랫폼 오페론; 및 Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된 GPP 신타제 및 모노테르펜 신타제를 코딩하는 모노테르펜 오페론을 포함한다. 이 실험에서, 모노테르펜 신타제는 카렌 신타제였다.

[0239] 배양물을 LB + 0.5% 이스트 추출물에서 밤새 30 °C에서 성장시켰다. 이어서, 이들 배양물을 2mM 염화마그네슘 보충된 배지로 0.2의 OD600로 희석하고, 37 °C에서 인큐베이션하고, 이어서 0.8의 OD600에서 IPTG로 유도하였다. 배양물을 10% 도데칸으로 오버레이하였다. 표준 곡선을 사용하여 GC-MS 상에서 모노테르펜 농도를 분석하였다. 결과를 도 25 저부에 나타내었다. 각각 리모넨 신타제, 및 미르센 신타제를 사용하여 모노테르펜 리모넨 및 미르센의 성공적인 생성이 또한 달성되었다. IspDF2+; ispDF3+; 및 dxs, ispD, ispF, 및 idi 또한 모노테르펜의 증가된 생성을 지지할 수 있었다.

[0240] 예시적 서열

[0241] 본 출원에서 언급되는 예시적 서열은 하기 표에 기재된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다:

진뱅크 수탁/칸나비스 전사체 ID/기타 ID	유전자/효소의 전체 명칭	약어
AB057805.1	테트라히드로칸나비놀산 신타제	THCAS
AB292682.1	칸나비디올산 신타제 - 수송 펌프의 존재	CBDS
IM00002.1	칸나비디올산 신타제 II -수송 펌프의 부재	CBDS II
FK28436.1	방향족 프레닐트랜스퍼라제 / 게라닐피로포스페이트 올리베롤레이트 게라닐트랜스퍼라제	PT
JN679224.1	올리베롤산 시클라제	OAC
AB164375.1	올리베롤 신타제	OLS
JN717233.1 FK04797.1	아실-환산화 효소 1	AAE1
JN717235.1 FK13710.1	아실-환산화 효소 3	AAE3
FK04410.1	히드로퍼옥시드 리아제	HPL
FK08276.1	리폭시게나제	LOX1
IM00001.1	데사투라제	DS
AA073863	카엔 신타제	모노TS
EFF14228	1-데옥시-D-크실로로스-5-포스페이트 신타제	Dxs
WP_072972099	2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시틸릴트랜스퍼라제	IspD/MCT
WP_086589482	2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-시클로디포스페이트 신타제	IspF/MDS
WP_115903881	이소펜테닐-디포스페이트 엘라-이소머라제	Idi
AF513112.1	게라닐 디포스페이트 신타제	GFPS
WP_053287215	게라닐 트랜스퍼라제	IspA
WP_414715	1-데옥시-D-크실로로스 5-포스페이트 리덕토이소머라제	IspC/DXR
EGT67781	4-디포스포시틸릴-2-C-메틸에리트리톨 키나제	IspE/CMK
ANK02812	4-히드록시-3-메틸부트-2-엔-1-일 디포스페이트 신타제	IspG/HDS
AAL38655	4-히드록시-3-메틸부트-2-엔일 디포스페이트 리덕타제	IspH/HDR
AAA24819.1	파이토ene 신타제	CrtE
AAA24820.1	파이토엔 메틸트랜스퍼라제	CrtI
AAA24821	프레파이토엔 피로포스페이트 신타제	CrtB
Q50L36	이소프렌 신타제	IspS

[0242]

[0243] 유전자의 일부는 진뱅크 데이터베이스로부터 유래되며, 다른 것은 칸나비스 게놈 브라우저 (genome.cbr.utoronto.ca/cgi-bin/hgGateway)로부터 유래된다. IM00001.1은 칸나비스 mRNA 및 EST의 공공 서열로부터 생성되는 데사투라제를 나타내는 서열 ID이다.

[0244] 예시적 서열을 하기에 제공한다.

[0245] >AB057805.1| 테트라히드로칸나비놀산 신타제 (THCAS)에 대한 칸나비스 사티바 mRNA, 완전한 cds

[0246] ATGAATTGCTCAGCATTTTCCTTTTGGTTTGGTTCAAAATAAT

[0247] ATTTTCTTTCTCTCATTCATATCCAAATTTCAATAGCTAATCCTCGAGAAACTTCCTTAAATGCTTC

[0248] TCAAACATATTTCCCAACATGTAGCAAATCCAAACTCGTATACACTCAACACGACCAATTGTATATGT

[0249] CTATCCTGAATTCGACAATACAAATCTTAGATTCTCTGATACAACCCCAAAACCACTCGTTATTGT

[0250] CACTCCTTCAAATAACTCCCATATCCAAGCAACTATTTATGCTCTAAGAAAGTTGGCTTGAGATTCTGA

[0251] ACTCGAAGCGGTGGCCATGATGCTGAGGGTATGCTCATATCTCAAGTCCCATTTGTTGTAGTAGACT

[0252] TGAGAAACATGCATTTCGATCAAAATAGATGTTTCATAGCCAAACTGCGTGGGTGAAGCCGGAGCTACCT

[0253] TGGAGAAGTTTATTATTGGATCAATGAGAAGATGAGAATCTTAGTTTTCTGGTGGGTATTGCCCTACT

[0254] GTTGGCGTAGGTGGACACTTTAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATGCGAAATTATGGCCTTGCGGCTG

[0255] ATAATATTATTGATGCACACTTAGTCAATGTTGATGGAAGAGTTCTAGATCGAAATCCATGGGAGAAGA

[0256] TCTGTTTTGGGCTATACGTGGTGGTGGAGGAGAAACTTTGGAATCATTGCAGCATGGAATCAAACCTG

[0257] GTTGCTGTCCCATCAAAGTCTACTATATTCAGTGTTAAAAAGAACATGGAGATACATGGGCTTGTC AAGT

[0258] TATTTAACAAATGGCAAAATATTGCTTACAAGTATGACAAAGATTTAGTACTCATGACTCACTTCATAAC

[0259] AAAGAATATTACAGATAATCATGGGAAGAATAAGACTACAGTACATGGTTACTTCTCTCAATTTTTCAT

[0260] GGTGGAGTGGATAGTCTAGTCGACTTGATGAACAAGAGCTTTCCTGAGTTGGGTATTAAAAAACTGATT

[0261] GCAAAGAATTTAGCTGGATTGATACAACCATCTTCTACAGTGGTGTGTAAATTTTAACACTGCTAATTT

[0262] TAAAAAGGAAATTTTGCTTGATAGATCAGCTGGGAAGAAGACGGCTTCTCAATTAAGTTAGACTATGTT

[0263] AAGAAACCAATTCAGAAACTGCAATGGTCAAAATTTTGAAAAAATTATATGAAGAAGATGTAGGAGCTG

[0264] GGATGTATGTGTTGTACCTTACGGTGGTATAATGGAGGAGATTTCAGAATCAGCAATTCATTCCCTCA

[0265] TCGAGCTGGAATAATGTATGAACTTTGGTACACTGCTTCTGGGAGAAGCAAGAAGATAATGAAAAGCAT

[0266] ATAAACTGGGTTCGAAGTGTATAATTTTACGACTCCTTATGTGTCCCAAAATCCAAGATTGGCGTATC

[0267] TCAATTATAGGGACCTTGATTTAGGAAAACTAATCATGCGAGTCTTAATAATTACACACAAGCACGTAT

[0268] TTGGGGTGAAAAGTATTTTGGTAAAAATTTTAACAGGTTAGTTAAGGTGAAAACATAAGTTGATCCCAAT

[0269] AATTTTTTTAGAAACGAACAAAGTATCCACCTCTTCCACCGCATCATCATTA (서열 번호 4)

[0270] > AB292682.1 | 수송 펩티드를 갖는 칸나비디올산 신타제 (CBDAS)에 대한 칸나비스 사티바 CBDAS mRNA

[0271] ATGAAGTGCTCAACATTCTCCTTTTGGTTTGTGTTGCAAGATAATATTTTCTTTTCTCATTCAATATCC

[0272] AAACCTCCATTGCTAATCCTCGAGAAACTTCTTAAATGCTTCTCGCAATATATTTCCCAATAATGCAAC

[0273] AAATCTAAAACCTCGTATACACTCAAAACAACCCATTGTATATGTCTGTCTTAAATTCGACAATACACAAT

[0274] CTTAGATTACCTCTGACACAACCCAAAACCACTGTTATCGTCACTCCTTCACATGTCTCTCATATCC

[0275] AAGGCACTATTCTATGCTCCAAGAAAGTTGGCTTGAGATTGCAACTCGAAGTGGTGGTCATGATTCTGA

[0276] GGGCATGTCTACATATCTCAAGTCCCATTTGTTATAGTAGACTTGAGAAACATGCGTTCAATCAAAATA

[0277] GATGTTCATAGCCAAACTGCATGGGTTGAAGCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTTTATTATTGGGTTAATG

[0278] AGAAAAATGAGAATCTTAGTTTGGCGGCTGGGTATTGCCCTACTGTTTGCAGGAGTGACACTTTGGTGG

[0279] AGGAGGCTATGGACCATTGATGAGAACTATGGCCTCGCGGCTGATAATATCATTGATGCACACTTAGTC

[0280] AACGTTATGGAAGAGTGCTAGATCGAAAATCTATGGGGGAAGATCTCTTTTGGGCTTTACGTGGTGGTG

[0281] GAGCAGAAAGCTTCGGAATCATTGTAGCATGGAAAATTAGACTGGTTGCTGTCCCAAAGTCTACTATGTT

[0282] TAGTGTTAAAAAGATCATGGAGATACATGAGCTTGCAAGTTAGTTAACAAATGGCAAAATATTGCTTAC

[0283] AAGTATGACAAAGATTTATTACTCATGACTCACTTCATAACTAGGAACATTACAGATAATCAAGGAAGA

[0284] ATAAGACAGCAATACACACTTACTTCTTTCAGTTTTCCTTGGTGGAGTGGATAGTCTAGTCGACTTGAT

[0285] GAACAAGAGTTTCTGAGTTGGGTATTAAAAAACGGATTGCAGACAATTGAGCTGGATTGATACTATC

[0286] ATCTTCTATAGTGGTGTGTAAATTACGACACTGATAATTTAACAAGGAAATTTTGCTTGATAGATCCG

[0287] CTGGGCAGAACGGTGCTTTCAAGATTAAGTTAGACTACGTTAAGAAACCAATTCAGAATCTGTATTTGT

[0288] CCAAATTTTGAAAAAATTATATGAAGAAGATATAGGAGCTGGGATGTATGCGTTGTACCCTTACGGTGGT

[0289] ATAATGGATGAGATTTTCAAGATCAGCAATTCATTCCCTCATCGAGCTGGAATCTTGATGAGTTATGGT

[0290] ACATATGTAGTTGGGAGAAGCAAGAAGATAACGAAAAGCATCTAAACTGGATTAGAAATATTTATAACTT

[0291] CATGACTCCTTATGTGTCCAAAAATCCAAGATTGGCATATCTCAATTATAGAGACCTTGATATAGGAATA

[0292] AATGATCCCAAGAATCCAATAATTACACACAAGCACGTATTTGGGGTGAGAAGTATTTTGGTAAAAATT

[0293] TTGACAGGCTAGTAAAAGTGAAAACCTGGTTGATCCCAATAACTTTTTAGAAACGAACAAAGCATCCC

[0294] ACCTCTTCCACGGCATCGTCATTAA (서열 번호 5)

[0295] >IM00002.1 | 수송 펩티드가 없는 칸나비디올산 신타제 II (CBDASII)에 대한 칸나비스 사티바 CBDAS mRNA

[0296] ATGAATCCTCGAGAAAACCTTCCTTAAATGCTTCTCGCAATATATTCCCAATAATGCAACAAATCTAAAAC

[0297] TCGTATACACTCAAAACAACCCATTGTATATGTCTGTCTAAATTCGACAATACACAATCTTAGATTCAC

[0298] CTCTGACACAACCCCAAAACCACTTGTATCGTCACTCCTTCACATGTCTCATATCCAAGGCACTATT

[0299] CTATGCTCCAAGAAAGTTGGCTTGCAGATTGGAAGTCGAAGTGGTGGTCATGATTCTGAGGGCATGTCCT

[0300] ACATATCTCAAGTCCCATTTGTTATAGTAGACTTGAGAAACATGCGTTCAATCAAAATAGATGTTTCATAG

[0301] CCAAACCTGCATGGGTTGAAGCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTTTATTATTGGGTTAATGAGAAAAATGAG

[0302] AATCTTAGTTTGGCGGCTGGGTATTGCCCTACTGTTTGGCGAGGTGGACACTTTGGTGGAGGAGGCTATG

[0303] GACCATTGATGAGAACTATGGCCTCGCGGCTGATAATATCATTGATGCACACTTAGTCAACGTTTCATGG

[0304] AAAAGTGCTAGATCGAAAATCTATGGGGGAAGATCTCTTTTGGGCTTTACGTGGTGGTGGAGCAGAAAGC

[0305] TTCGGAATCATTGTAGCATGGAATAATAGACTGGTTGCTGTCCCAAAGTCTACTATGTTTAGTGTTAAAA

[0306] AGATCATGGAGATACATGAGCTTGTCAAGTTAGTTAACAAATGGCAAAATATTGCTTACAAGTATGACAA

[0307] AGATTTATTACTCATGACTCACTTCATAACTAGGAACATTACAGATAATCAAGGGAAGAATAAGACAGCA

[0308] ATACACACTTACTTCTCTCAGTTTTCCTTGGTGGAGTGGATAGTCTAGTCGACTTGATGAACAAGAGTT

[0309] TTCCTGAGTTGGGTATTAACCAAGGATTGCAGACAATTGAGCTGGATTGATACTATCATCTTCTATAG

[0310] TGGTGTGTGAAATTACGACACTGATAATTTTAAACAGGAAATTTTGCTTGATAGATCCGCTGGGCAGAAC

[0311] GGTGCTTTCAAGATTAAGTTAGACTACGTTAAGAAACCAATTCCAGAATCTGTATTTGTCCAAATTTTGG

[0312] AAAAAATTATGAAGAAGATATAGGAGCTGGGATGTATGCGTTGTACCTTACGGTGGTATAATGGATGA

[0313] GATTTTCAGAATCAGCAATTCATTCCCTCATCGAGCTGGAATCTTGATGAGTTATGGTACATATGTAGT

[0314] TGGGAGAAGCAAGAAGATAACGAAAAGCATCTAACTGGATTAGAAATATTTATAACTTCATGACTCCTT

[0315] ATGTGTCCAAAAATCCAAGATTGGCATATCTCAATTATAGAGACCTTGATATAGGAATAAATGATCCCAA

[0316] GAATCCAAATAATTACACACAAGCACGTATTTGGGGTGAGAAGTATTTTGGTAAAAATTTTGACAGGCTA

[0317] GTAAAAGTGAAAACCTGGTTGATCCCAATAACTTTTTAGAAACGAACAAAGCATCCACCTCTTCCAC

[0318] GGCATCGTCATTAA (서열 번호 6)

[0319] > PK28436.1 | 방향족 프레닐트랜스퍼라제 (PT) 또는 게라닐피로포스페이트 올리베톨레이트 게라닐트랜스퍼라제

[0320] ATGGGACTCTCATCAGTTTGTACCTTTTCATTTCAAACCTAATTACCATACTTTATTAATCCTCACAATA

[0321] ATAATCCCAAAACCTCATTATTATGTTATCGACACCCCAAAACACCAATTAATACTCTTACAATAATTT

[0322] TCCCTCTAAACATTGCTCCACCAAGAGTTTTCATCTACAAAACAAATGCTCAGAATCATTATCAATCGCA

[0323] AAAAAATTCATTAGGGCAGCTACTACAAATCAAACCTGAGCCTCCAGAATCTGATAATCATTAGTAGCAA

[0324] CTAAATTTTAACTTTGGGAAGGCATGTTGGAAACTTCAAAGACCATATACAATCATAGCATTTACTTC

[0325] ATGCGCTTGTGATTGTTTGGGAAAGAGTTGTTGCATAACACAAATTAATAAGTTGGTCTCTGATGTTT

[0326] AAGGCATTCTTTTTTTTGGTGGCTATATTATGCATTGCTTCTTTTACAACCTACCATCAATCAGATTACG

[0327] ATCTTCACATTGACAGAATAAACAGCTGATCTACCACTAGCTTCAGGGGAAATATCAGTAAACACAGC

[0328] TTGGATTATGAGCATAATTGTGGCACTGTTTGGATTGATAATAACTATAAAAAATGAAGGGTGGACCACTC

[0329] TATATATTTGGCTACTGTTTTGGTATTTTTGGTGGGATTGTCTATTCTGTTCCACCATTAGATGGAAGC

[0330] AAAATCCTTCCACTGCATTTCTTCTCAATTTCTGGCCCATATTATTACAAATTTACATTTTATTATGC

[0331] CAGCAGAGCAGCTCTTGGCCTACCATTGAGTTGAGGCCTTCTTTACTTTCTGCTAGCATTTATGAAA

[0332] TCAATGGGTTTCAGCTTTGGCTTTAATCAAAGATGCTTCAGACGTTGAAGGCGACACTAAATTTGGCATAT

[0333] CAACCTTGGCAAGTAAATATGGTTCAGAACTTGACATTATTTGTTCTGGAATTGTTCTCCTATCCTA

[0334] TGTGGCTGCTATACTTGCTGGGATTATCTGGCCCCAGGCTTTCAACAGTAACGTAATGTTACTTTCTCAT

[0335] GCAATCTTAGCATTTTGGTTAATCCTCCAGACTCGAGATTTGCGTTAACAAATTACGACCCGGAAGCAG

[0336] GCAGAAGATTTTACGAGTTCATGTGGAAGCTTTATTATGCTGAATATTTAGTATATGTTTCATATAA (서열 번호 7)

[0337] > JN679224.1 | 칸나비스 사티바 올리베톨산 시클라제 (OAC) mRNA, 완전한 cds

[0338] ATGGCAGTGAAGCATTTGATTGTATTGAAGTTCAAAGATGAAATCACAGAAGCCAAAAGGAAGAATTTT

[0339] TCAAGACGTATGTGAATCTTGTGAATATCATCCAGCCATGAAAGATGTATACTGGGGTAAAGATGTGAC

[0340] TCAAAAGAATAAGGAAGAAGGGTACACTCACATAGTTGAGGTAACATTTGAGAGTGTGGAGACTATTCAG

[0341] GACTACATTATTCATCCTGCCCATGTTGGATTGGAGATGTCTATCGTTCTTTCTGGGAAAACTTCTCA

[0342] TTTTGGACTACACACCACGAAAGTAG (서열 번호 8)

[0343] > AB164375.1 | 올리베톨 신타제 (OLS)에 대한 칸나비스 사티바 OLS mRNA, 완전한 cds

[0344] ATGAATCATCTTCGTGCTGAGGGTCCGGCCTCCGTTCTCGCCATTGGCACCGCCAATCCGGAGAACATTT

[0345] TATTACAAGATGAGTTTCTGACTACTATTTTCGCGTCACCAAAAGTGAACACATGACTCAACTCAAAGA

[0346] AAAGTTTCGAAAAATATGTGACAAAAGTATGATAAGGAAACGTAACGTGTTTCTTAAATGAAGAACACCTA

[0347] AAGCAAAACCAAGATTGGTGGAGCAGGAGATGCAAACTCTGGATGCACGTCAAGACATGTTGGTAGTTG

[0348] AGGTTCCAAAACCTGGGAAGGATGCTTGTGCAAAGGCCATCAAAGAATGGGGTCAACCAAGTCTAAAAT

[0349] CACTCATTTAATCTTCACTAGCGCATCAACCACTGACATGCCCCGTGCAGACTACCATTGCGCTAAGCTT

[0350] CTCGGACTGAGTCCCTCAGTGAAGCGTGTGATGATGTATCAACTAGGCTGTTATGGTGGTGAACCGTTC

[0351] TACGCATTGCCAAGGACATAGCAGAGAATAACAAAGGCGCACGAGTTCTCGCCGTGTGTTGTGACATAAT

[0352] GGCTTGCTTGTTTCGTGGGCCTTCAGAGTCTGACCTCGAATTACTAGTGGGACAAGCTATCTTTGGTGAT

[0353] GGGGCTGCTGCGGTGATTGTTGGAGCTGAACCCGATGAGTCAGTTGGGAAAGGCCGATATTGAGTTGG

[0354] TGTCAACTGGGCAAAACAATCTTACCAAACTCGGAAGGAACTATTGGGGACATATAAGGGAAGCAGGACT

[0355] GATATTTGATTTACATAAGGATGTGCCTATGTTGATCTCTAATAATATTGAGAAATGTTTGATTGAGGCA

[0356] TTTACTCCTATTGGGATTAGTGATTGGAACCTCATATTTTGGATTACACCCAGGTGGGAAAGCTATTT

[0357] TGGACAAAGTGGAGGAGAAGTTGCATCTAAAGAGTGATAAGTTTGTGGATTACGTCATGTGCTGAGTGA

[0358] GCATGGGAATATGTCTAGCTCAACTGTCTTGTGTTTATGGATGAGTTGAGGAAGAGGTCGTTGGAGGAA

[0359] GGGAACTTACCCTGGAGATGGATTTGAGTGGGGTGTCTTTTGGGTTTGGACCAGGTTTGAAGTGTG

[0360] AAAGAGTGGTCGTGCGTAGTGTTCATCAAAATATTA (서열 번호 9)

[0361] > JN171233.1 | PK04797.1 | 아실-활성화 효소 1 (AAE1)

[0362] ATGGGTAAGAATTACAAGTCCCTGGACTCTGTTGTGGCCTCTGACTTCATAGCCCTAGGTATCACCTCTG

[0363] AAGTTGCTGAGACACTCCATGGTAGACTGGCCGAGATCGTGTGTAATTATGGCGCTGCCACTCCCCAAAC

[0364] ATGGATCAATATTGCCAACCATATTCTGTCGCTGACCTCCCCCTCTCCCTGCACCAGATGCTCTTCTAT

[0365] GGTTCGTATAAAGACTTTGGACCTGCCCTCCTGCTTGGATACCCGACCCGGAGAAAGTAAAGTCCACCA

[0366] ATCTGGGCGCACTTTTGGAGAAGCGAGGAAAAGAGTTTTTGGGAGTCAAGTATAAGGATCCCATTCAAG

[0367] CTTTTCTCATTTCCAAGAATTTTCTGTAAGAAACCTGAGGTGTATTGGAGAACAGTACTAATGGATGAG

[0368] ATGAAGATAAGTTTTTCAAAGGATCCAGAATGTATATTGCGTAGAGATGATGACATTAATAATCCAGGGG

[0369] GTAGTGAATGGCTTCCAGGAGGTATCTTAACTCAGCAAAGAATTGCTTGAATGTAAATAGTAACAAGAA

[0370] ATTGAATGATACAATGATTGTATGGCGTGATGAAGGAAATGATGATTTGCCTCTAAACAAATTGACACTT

[0371] GACCAATTGCGTAAACGTGTTTGGTTAGTTGGTTATGCACTTGAAGAAATGGGTTTGGAGAAGGGTTGTG

[0372] CAATTGCAATTGATATGCCAATGCATGTGGATGCTGTGGTTATCTATCTAGCTATTGTTCTTGCGGGATA

[0373] TGTAGTTGTTTCTATTGCTGATAGTTTTTCTGCTCCTGAAATATCAACAAGACTTCGACTATCAAAAGCA

[0374] AAAGCCATTTTACACAGGATCATATTATTCGTGGGAAGAAGCGTATTCCTTATACAGTAGAGTTGTGG

[0375] AAGCCAAGTCTCCCATGGCCATTGTTATTCCTGTAGTGGCTCTAATATTGGTGCAGAATTGCGTGATGG

[0376] CGATATTTCTTGGGATTACTTTCTAGAAAGAGCAAAAGAGTTTAAAAATTGTGAATTTACTGCTAGAGAA

[0377] CAACCAGTTGATGCCTATACAAACATCCTCTTCTCATCTGGAACAACAGGGGAGCCAAAGGCAATTCCAT

[0378] GGACTCAAGCAACTCCTTTAAAAAGCAGCTGCAGATGGGTGGAGCCATTGGACATTAGGAAAGGTGATGT

[0379] CATTGTTTGGCCCACTAATCTTGGTTGGATGATGGGTCTTGGCTGGTCTATGCTTCACTCCTTAATGGG

[0380] GCTTCTATTGCCTTGTATAATGGATCACCACCTGTTTCTGGCTTTGCCAAATTGTGCAGGATGCTAAAG

[0381] TAACAATGCTAGGTGTGGTCCCTAGTATTGTTCGATCATGGAAGTACCAATTGTGTTAGTGGCTATGA

[0382] TTGGTCCACCATCCGTTGCTTTTCTCTTCTGGTGAAGCATCTAATGTAGATGAATACCTATGGTTGATG

[0383] GGGAGAGCAAACTACAAGCCTGTTATCGAAATGTGTGGTGGCACAGAAATTGGTGGTGCATTTTCTGCTG

[0384] GCTCTTTCTTACAAGCTCAATCATTATCTTCATTTAGTTTCAATGTATGGGTGCACTTTATACATACT

[0385] TGACAAGAATGGTTATCCAATGCCTAAAAACAACCAGGAATTGGTGAATTAGCGCTTGGTCCAGTCATG

[0386] TTTGGAGCATCGAAGACTCTGTTGAATGGTAATCACCATGATGTTATTTTAAGGGAATGCCTACATTGA

[0387] ATGGAGAGGTTTTAAGGAGGCATGGGGACATTTTGGAGCTTACATCTAATGGTTATTATCATGCACATGG

[0388] TCGTGCAGATGATACAATGAATATTGGAGGCATCAAGATTAGTTCATAGAGATTGAACGAGTTTGTAAAT

[0389] GAAGTTGATGACAGAGTTTTTCGAGACAACTGCTATTGGAGTGCCACCTTTGGGCGGTGGACCTGAGCAAT

[0390] TAGTAATTTTCTTTGTATTAAGAGATTCAAATGATACAACCTATTGACTTAAATCAATTGAGGTTATCTTT

[0391] CAACTTGGGTTTACAGAAGAACTAAATCCTCTGTTCAAGGTCACTCGTGTGTGCCTCTTTCATCACTT

[0392] CCGAGAACAGCAACCAACAAGATCATGAGAAGGGTTTTGCGCCAACAATTTTCTCACTTTGAATGA (서열 번호 10)

[0393] > JN717235.1 | PK13710.1| 아실-활성화 효소 3 (AAE3)

[0394] ATGGAGAAATCTGGGTATGGAAGAGACGGTATTTACAGGTCTCTGAGACCACCTCTACACCTCCCCAACA

[0395] ACAACAACCTCTCAATGGTTTCATTCTTTTTCAGAACTCATCTTCATACCCACAAAAGCCAGCTCTCAT

[0396] TGATTCCGAAACCAACAAATACTCTCCTTTTCCCACTTCAAATCTACGGTTATCAAGGTCTCCCATGGC

[0397] TTTCTCAATCTGGGTATCAAGAAAAACGACGTCGTCTCATCTACGCCCTAATTCTATCCACTTCCCTG

[0398] TTTGTTTCTTGAATTATAGCCTCTGGAGCCATTGCCACTACCTCAAATCCTCTTACACAGTTTCCGA

[0399] GCTTTCCAAACAGGTCAAGGATTCCAATCCCAAACTCATTATCACCGTTCCTCAACTCTTGGAAGTA

[0400] AAGGGTTTCAATCTCCCCACGATTCTAATTGGTCCTGATTCTGAACAAGAATCTTCTAGTGATAAAGTAA

[0401] TGACCTTTAACGATTGGTCAACTAGGTGGGTCGTCCTGGCTCAGAATTTCCAATTGTTGATGATTTTAA

[0402] GCAGAGTGACACTGCTGCGCTATTGTACTCATCTGGCACACGGAATGAGTAAAGGTGTGGTTTGGACT

[0403] CACAAAACTTCATTGCCTCTTCTTTAATGGTGACAATGGAGCAAGACCTAGTTGGAGAGATGGATAATG

[0404] TGTTTCTATGCTTTTGGCAATGTTTCATGTATTTGGTTTGGCTATCATCACCTATGCTCAGTTGCAGAG

[0405] AGGAAACACTGTTATTTCAATGGCGAGATTTGACCTTGAGAAGATGTTAAAAGATGTGGAAGTATAAA

[0406] GTTACCCATTGTGGGTTGTGCCTCCTGTGATACTGGCTCTGAGTAAGAACAGTTTGGTGAAGAAGTTTA

[0407] ATCTTTCTTCTATAAAGTATATTGGCTCTGGTGCAGCTCCTTTGGGCAAAGATTTAATGGAGGAGTGCTC

[0408] TAAGGTGTTCCTTATGGTATTGTTGCTCAGGGATATGGTATGACAGAACTTGTTGGGATTGTATCCATG

[0409] GAGGATATAAGAGGAGGTAAACGAAATAGTGGTTCAGCTGGAATGCTGGCATCTGGAGTAGAAGCCCAGA

[0410] TAGTTAGTGTAGATACACTGAAGCCCTTACCTCCTAATCAATTGGGGGAGATATGGGTGAAGGGGCCTAA

[0411] TATGATGCAAGGTTACTTCAATAACCCACAGGCAACCAAGTTGACTATAGATAAGAAAGGTGGGTACAT

[0412] ACTGGTGATCTTGATATTTTGATGAAGATGGACATCTTTATGTTGTTGACCGTATAAAAGAGCTCATCA

[0413] AATATAAAGGATTCAGGTTGCTCCTGCTGAGCTTGAAGGATTGCTTGTTTCTCACCTGAAATACTCGA

[0414] TGCTGTTGTGATCCCATTTCTGATGCTGAAGCGGTGAAGTCCAGTTGCTTATGTTGTGCGCTCTCCC

[0415] AACAGTTCATTAACCGAAAAATGATGTGAAGAAATTTATCGCGGGCCAGGTTGCATCTTTCAAAGATTGA

[0416] GAAAAGTAACATTTATAAACAGTGTCGCGAAATCTGCTTCGGGGAAAAATCCTCAGAAGAGAACTCATTCA

[0417] GAAAGTACGCTCCAACATGTGA (서열 번호 11)

[0418] > PK04410.1 | 히드로퍼옥시드 리아제 (HPL)

[0419] ATGTCTTTTATGATGAGCATGAATCCTTCTCCCTCCTCGCCACCGCCACCGTTATCGTCGCCGTCGGAAT

[0420] CTTCTCAACGCCGTC AACACTGCCAGTCCGTACGATCCCGGGAAGCTACGGATGGCCGTTACTGGGGCC

[0421] CATCTCGGACCGGTTAGACTACTTCTGGTTCCAAGGCCAGATACGTTTTCAGAAAAAGAGTAGAGAAA

[0422] TACAAGAGCACAGTGTTCCGTACCAACATACCCCCGACCTTTCTTTCTTCAGCGTTAATCCGAACATTG

[0423] TGGCCGTGCTGGACTGTAATCATTTTCTCATCTTTTCGACATGGAAATGTCGAGAAAAAGAATGTTCT

[0424] TGTGGAGATTTTCATGCCAGTGTC AATTACACTGGTGATATTAGGGTTGGAGCTTATCTCGACACTTCT

[0425] GAACCACAACACGCTAAGGTTAAGAACTTCGCAATGGATGTACTAAAACAAAGCTCGAAGATATGGGTGG

[0426] GAGAACTGACATCAATCTGTCGACGATGTGGGACACAATAGAAAAAGCGTATCTGAGAAATCATCCTC

[0427] ATCCTACTTAGCCCCACTTCAAAAGTTCTTGTTCAACTTCCTGGTCAAGTGTCTAATTGGTGCTGACCCT

[0428] TCCAACTCCCCAAGATTGCAGAGTCTGGCTACATCATGCTCGACCGATGGTTAGCCTTCCAGCTCCTTC

[0429] CCACTATCAAGATTGGGATCCTTCAGCTCTTGAGGAGCTTTTCATTCACTCTTTTGCCATCCTTTTTT

[0430] CTTGGTCAGTGGTGACTACAATAACCTCTCCAGTTTGTAGAGGAATATGGTAAAGAAATAGTAGCGAGA

[0431] GGTGAAACCGAGTTCGGGCTGAGTAAACAAGAAGCGATTCAACCTTCTCTCATTTTGGGTTTCAACG

[0432] CCTTCGGGGGATTCTCTATATTCTACCGAGCTACTGGGCACCGTGGCGAGTGACACAACCGATCTACA

[0433] ACAAAGACTGGTCAAAGAAGTCAGACAAAATGGCGGGTCAACTCTGACGTTTGACTCGATCAAAGAAATG

[0434] CCACTCGTTCAATCGGTCGTGTACGAGACTCTCCGGCTCAATCCACCTGTTCCGCTCCAATTCGCCAGGG

[0435] CCAGGAAGGACTTCCGGCTCAGCTCGCACGACGCGCCTTCGAGGTGAAGAAAGGCGAGCTCCTATGCGG

[0436] GTTTCAAAGCCTTGTTATGAGGGACCCAAAAATATTCTCGGAACCGAGTCGTTTCATTGGGGACCGGTTTC

[0437] ATGAAAGATAAAGGTCTCTTAGATTATCTTTACTGGTCCAATGGACCTCAAACCGGTGTGCCAGCGTCA

[0438] CCAATAAGCAATGCGCGGGAAAAGATATCGTCACGCTTACGGCTTGTTTGATCTTGGCTTACACCTTCG

[0439] TCGTTATGACTCCATCAGCGGGAGCTCAAGTTCAATCACAGCCCTTAAAAAGGCTTAA (서열 번호 12)

[0440] > PK08276.1 | 리폭시게나제 (LOX1)

[0441] ATGTTGAAGCCTCCTCATCAAGTAGTTCAAAATTTGAAATATGAGAAAACCTAGTTCTTTTGAACAAGC

[0442] CATTTCATCCATGGCTACAACGGGGCTATTATCGGTGTCAACTCTCGGCTATTTCCAGTAAAAACCTAAAAAC

[0443] CAAAAGACGAGTCGCTTCATCATCATCATCATCTCCCGGAACCAAAAACATTATTAAAGCTTCTTTA

[0444] TTTTCTCCAATGGAGAAGAATAACAGCTAGGGTTTCGGTTAGTGTGGCGGTACAACGTGTGACTCCAA

[0445] AGTTTTGGAGATTTGAATTGTCTGAGAAAATCCAAGATGGACGTGATAGGCTTGAGGATCTTCTAGGGCT

[0446] AAACCTCTTAAAGTATTGAGCTTGTTAGTACTCAAAAAGATCCAGTAACGGGGAAGAGCGAACGGTTAA

[0447] GGTTCCTCAAAAAGGCCCACTTTAACATATTTTCATCAAGTGATGTAAATACGAAGCGAAATTTGACA

[0448] TACCAAAAGATTTTGGAGAAGTGGGTGCTATAATCGTCGAAAATGATTTTGAAAGAGAAATTTTTTAAA

[0449] GAATATTATACTCGAAGACTTGCCCTCCGAACCAAGCACCTTGAATTCTCTTGCAACTCGTGGGTTGAG

[0450] TCCAAACATGATGTCCTACTGATCAACACAAGAGAGTCTTCTTCTCTAATAAGTGTACCTACCATCAC

[0451] AAACACCAAGTGGGATAAAAGAATTGAGAAAAATTGCATTGGAAAAATTTGAGAGGAGATGGAAAAGGAGA

[0452] GAGGAAGAAGTAAAGAGTTTATGATTATGATGTGTATAATGATCTTGACAAACCGGACAACAATGAT

[0453] GACCTAAAAAGACCTATTCTTGGCGGATCAAAAAGATTCCCTTATCCTAGGCGTTGTAGAACCGGACGGC

[0454] CTCCAACTGAAACTGATCCATTATCTGAGTCAAGGATTAGTGATTTTTATGTACCAAGAGATGAAGAATT

[0455] TGCAGAGTGAAGCAAAGTAATTTAGTTTGAAGACTGTATACTCAGTAATACATGCAGTGATTCCCAT

[0456] CTCAGACAAGTCTTAATTGATGAAAAATTTCCATACTTCACTGCCATTGATGTTCTCTATGATGAAGGCA

[0457] TTAAATCCCTTCTAATGCTGAAAAGACCTTAATTCAAACCATCAAAAATGTCAATGCAAGAATATACAA

[0458] AACTGTTTCTGATGCTGATGATTTTTTACAGTTTCAGCAGCCTCCAACCATGGACAAGGACAAATTCCTC

[0459] TGGTTTAGAGATGAAGAGTTTGTAGACAACTATTGCCGTCTCAACCTTGCTGCATTGAATTGGTTA

[0460] AGGAGTGGCCTTTGAAAAGTGAACCTTGACCCACAATCTATGGCCACCAGAGTCAAAAATCACCACAGA

[0461] ATTGGTTGAGAAATTCATCAAAGTATATGGCTACAATAATTAATGAGGCTTTAAAGAAAAAAATG

[0462] TTCATGTTGGATTACCATGATGATTATTACCATATGTTAGCAAAGTAAGGGAACCTGGAAAAATAAACCT

[0463] TGTATGGATCAAGAACACTTTTTTCTTGACTCCTTATGGTACATTGTTGCCTTTGCCATTGAATTGAT

[0464] TCGGCCACCGATGGATGGTAAGCCGCAATGGAAGGAAGTCTACACCCGATGAATTGGCATTCTACCGAT

[0465] CTTTGGCTTTGGAGACTCGAAAAGCTCATGTCCTTGCTCATGATTCCGGTGTTTCATCAACTCGTTAGTC

[0466] ACTGGCTAAGAACACATTGTGCAGTTGAGCCATATATAATTGCAACAAATAGACAATTGAGTGCAATGCA

[0467] TCCTATCCATAGATTATTGAAGCCACATTTTAGATACACAATGGAGATTAATGCTCTTGCTCGAGAAAGT

[0468] TTGATCAATGCAGGTGGTATCATCGAAACAGCATTGACCTGGAAAAATATTCTATGGAGTTAAGCTCCG

[0469] TCATGTACGACAAACAATGGCGATTGATCTACAAGCATTGCCAGCTGACCTAATTCATAGAGGAATGGC

[0470] TGTGAGGACAAGGATAGTGAACATGGTGTAAGAGTAATAATTGAAGATTACCTTACGCCAACGACGGT

[0471] CTTCTCATATGGAGCTCCATCAACAATGGGTTACTGACTACGTCAACCACTACTACCTACCTCCAGTG

[0472] AGGTAGAGCGCGACGAAGAATTACAAGCATGGTGGACAGAGATCAGAACTGTAGGTCACGCTGACAAGAA

[0473] AGACGCACCTGGGTGGCCTGACTTAAAAACGAAACAAGATCTCATAGACATTGTCACAAACATGGCATGG

[0474] ACAGCATCAGCTCACCATGCAGCTGTCAACTTTGGACAATATGCTTACGCTGGCTATTTCCCTAACCGAC

[0475] CAACCATAACAAGAACTGTTATGCCGTCAGAAGAGAAGGAGTATAACCTAGATGCGTGGAACACTTCAA

[0476] AAATAGTCCTGAAGACGCCCTTTTGAAGTGCTTACCTACGCAATTACAAGCAGGCCTAGTTGTGGCCGTG

[0477] TTAGACGTGTTGTCTACTCACTCGCCAGACGAAGAGTATCTTGGAGACAAGATGGAACCCCTCGTGGGGCT

[0478] CGAATCTTGTATAGCGGAAGCTTTTAATCGGTTCAATAAGAGGATGAACGAGATTGAAAGTATCATTAA

[0479] TGAAAAGAATGATAATGAGAATTTAAGGAATAGACATGGAGCTGGAATTTTGTCTTATGAACTTCTCAAG

[0480] CCCTTTTCTGAGCCTGGTGTCTACTAACAAGGTATTCATATAGCATATCTATTTGA (서열 번호 13)

[0481] > IM00001.1 | 데사투라제 (DS) 코딩 서열

[0482] ATGGGAGCCGGTGGCAAAATAGTAGACTTGAGCGAGCACCACACACCACCATTCACACTAAGCC

[0483] AACTCAAGAAAGCCATTCCACCCATTGCTTCAACCATTCTCTTCTTCGTTCTTCTCATGTCCTTCA

[0484] AGACCTTTTTTCTCCTTTTTGTCTACTACATAGCAACCTCTTACTTCCATCTTCTCCACACCCGCTC

[0485] CAATACTTAGCTTGCCACTTTATTGGATCTTCCAAGGCAGCATTTTTGCTGGTATTGGGTCTTGGTC

[0486] ATGATTGTGGTCACCAAGCTTTCAGTGACCACCAATGGGTGGATGACACcGTTGGCTTTGTCTCCACTC

[0487] CGCTCTTCTCTTCCATACTTCTCTTTTAAGTATAGTCATCGTCGCCATCATTCAAACATCGGCTCCCTT

[0488] GAACATGATCAATTGTTTGTTCAGTCCCCGAATCTCAAATCGCATGGCTCTACAAACgTTACTTGGACA

[0489] ATCCACTAGGAAGAGCCCTAAAGCTTTCACATAGTGTTCCTTGGTTtTCCTTTGTACTTAGGTTCAA

[0490] TCTTACAGGCAAAACcATATGATCGTTaTGCATGTCAATTATGATCCTTACTCTCCACTCTACTCAAAAAGT

[0491] GAAAGGCTTCATATATTGATTTCAGATATCGGTGTTTTCATCACCACATTaGTGTTATACCAGCTTGGCT

[0492] CGACTAAAGGgTTGAGTTGGCTTGTGTTTCATGTATGGGGTGCCATTGTTTACAGGGAATAGCATCCTTGT

[0493] GACAATCGCATACTTGAATCATACTCACCTTCATTGCCTCATTATGACTCGTCaGAGTGGGATTGGTTG

[0494] AAAGGAGCATGTCAACAACTGATCGAACTATGGATCAATTCTCAATAGGGTTTTCCATCACCTTACAG

[0495] ATGCTCATATGGCACACCATTTATTCGCAACAATACCTCACTACCATGCAAATGAAGCCACCAAAGTTAT

[0496] CAAATCCATATTGGGAGAATACTACTCTTTTGATGATACTCCAATAATTAAAGCTCTTTGGAGAGAGACT

[0497] AAGGAGTGTGTCTATATTGAGCCAAATCATGAATCTTCTCCTAATAATAACAAAGGTGTTTCTGGTACA

[0498] ACAACAAGTTCTGA (서열 번호 14)

[0499] > PK10442.1 | 케라닐 피로포스페이트 (GPP) 신타제 큰 서브유닛 | GPP 신타제 1su

[0500] ATGAGCACTGTAAATCTCACATGGGTTCAAACCTGTTCCATGTTCAACCAAGGAGGTAGATCCAGATCCT

[0501] TATCAACTTTCAATCTCAATCTCTACCACCTTTGAAAAAACCCCTTTTCAATCCAAACCCCAAAACA

[0502] AAAACGACCCACTTCACCATTTTCATCAATCTCAGCTGTTCTAACCAGCAAGAAGCCGTTAAAGAAGGC

[0503] GATGAAGAAAAATCCATCTTCAATTTCAAGTCTTACATGGTCCAAAAAGCCAACTCAGTCAACCAAGCTT

[0504] TAGACTCAGCCGTTTTGCTCAGAGATCCATTATGATACACGAGTCCATGCGTTACTCACTCCTCGCCGG

[0505] AGGAAAACGAGTCAGACCCATGCTCTGTCTCTCAGCCTGTGAACTCGTAGGCGGAAAGAATCCGTAGCC

[0506] ATGCCGGCTGCCTGCGCCGTCGAAATGATCCACACCATGTCTCTAATCCACGACGACCTCCCTTGTATGG

[0507] ACAACGATGACCTCCGCCGTGGAAGCCACAAACCACAAAGTCTTCGGAGAAGACGTGGCCGTTTTAGC

[0508] CGGCGATGCACTTTTAGCCTTTGCTTTTGAGCACATGGCGGTCTCTACCGTTGGTGTTCGGCAGCCAAG

[0509] ATGTGCAGGGCGATTGGTGAGCTTGCTAAGTCAATTGGGTCAGAAGGATTAGTGGCTGGTCAAGTGGTTG

[0510] ATATTGATTCAGAGGGTTTGGCTAATGTTGGGCTTGAACAACCTTGAGTTCATTCATCTCCATAAGACTGG

[0511] GGCTCTTCTAGAAGCTTCTGTTGTTTTGGGGGCTATTCTTGGTGGTGGTACAGATGAAGAAGTTGAAAA

[0512] CTTAGGAGCTTTGCTAGGTGATTGGCTTGCTTTTTTCAGGTTGTTGATGACATTCTTGATGTGACTAAAT

[0513] CTTCTCAAGAATTGGGTAACCTGCTGGGAAAGATTGGTGGCTGATAAGGTTACTTATCCAAGGCTAAT

[0514] GGGTATTGACAAATCAAGAGAATTTGCTGAGCAATTGAACACAGAAGCCAAACAGCATCTTCTGGTTTT

[0515] GATCCCATAAAGGCTGCTCCTTTAATTGCTTTGGCTAATTATATTGCTTATAGGCAAAATTGA (서열 번호 15)

[0516] > PK15935.1 | 케라닌 피로포스페이트 (GPP) 신타제 작은 서브유닛 | GPP 신타제 ssu

[0517] ATGGCGGTTTATAATCTATCAATTAATTGCAGTCCAAGATTTGTTCATCATGTTTACGTTCCACATTTCA

[0518] CATGTAAATCCAATAAGTCGTTAAGTCACGTACCCATGAGAATAACCATGTCCAAACAGCATCATCATT

[0519] TTATTTTGCCCTCCACAACAGCCGATGTAGATGCCCATCTCAAGCAATCCATCACTATCAAGCCACCACTC

[0520] TCAGTTCACGAGGCCATGTACAATTTTCATCTTTTCCACACCTCCGAATTTAGCACCGTCATTGTGCGTGG

[0521] CGGCGTGTGAGCTTGTGCGGGGCCACCAGGACCAGGCCATGGCAGCAGCCTCCGCCTTGCGCGTCATCCA

[0522] CGCAGCCATCTTCACTCATGACCACCTCCCTTTAACGGGCAGGCCAATCCAACAAGTCCTGAGGCAGCG

[0523] ACCCACAATTTCTTACAACCCAAATATTAGCTCCTTCTCCCGACGCAATTGTACCTTTTGGGTTTCAAT

[0524] TGTGTCGAATTTCTGATGACCTTACCATAATAAATCAGATCGGATTTTGCAGGTCATTGTAGAGTTCAC

[0525] ACGCACCTTTGGATCACGAGGAATATTGATGCTCAATACCATGAGAAGCTAGCCAGTAGATTTGACGTT

[0526] GATAGTCATGAAGCCAAACTGTCGGGTGGGGCCATTATCCCTCTTTGAAGAAGGAAGGTGCGATGCATG

[0527] CATGCCGTGCTGCATGTGGGGCCATTCTTGAGAGGCACATGAAGAAGAGGTTGAGAAGTTGAGAACTTT

[0528] TGGTCTTTATGTGGGCATGATTAAGGATATGCCAATAGATTTATAATGAGCAGCACAGAAGAAAAGAAA

[0529] GAAGCAGATAGAATCATCGAGGAGTTAACCAATTTGGCTCGCCAGGAATAAAATATTTTCGATGGGAGAA

[0530] ACTTAGAGCCATTTTCAACCTTTCTTTTTCGTCTATAG (서열 번호 16)

[0531] > PK17903.1 | 케라닌 피로포스페이트 (IPP) 이소머라제

[0532] ATGGGAGACTCTGCCGACGCTGGAATGGACGCTGTCCAGAGACGCCTTATGTTTGATGATGAATGCATTC

[0533] TAGTGGATGAGAATGACCGAGTTGTTGGTCATGATACAAAATATAACTGTCACTTGATGGAAAAGATTGA

[0534] AAAGGATAATTTGCTACACAGGGCTTTCAGTGTGTTCTTGTTCAACTCAAAATATGAGTTGCTTCTTCAG

[0535] CAACGTTCTGCAACAAAGGTAACATTTCCCTCTTGTGTGGACAAACACCTGTTGTAGCCACCCGCTCTACC

[0536] GTGAATCTGAGCTTATCGATGAGGAGTCCCTTGGAGCAAGGAATGCAGCACAGAGAAAGCTTTTAGATGA

[0537] GCTGGGTATTCCTGCTGAAGATGTGCCAGTTGATCAATTTACCCCACTAGGCAGGATGCTGTACAAAGCT

[0538] CCTTCTGATGGCAATGGGGCGAGCATGAACCTTGATTACCTGCTCTTCATCGTCCGGATGTTAGTGTCA

[0539] ATCCAAATCCAGATGAAGTAGCTGATATCAAGTATGTAAACCGGACGAGTTGAAAGAGTTGTTGAGGAA

[0540] AGCAGATGCTGGGGAAGGAGGCTTGAAGCTATCCCTTGGTTTCAGACTGGTTGTGGATAATTTCTTGTTT

[0541] AAGTGGTGGGACCATGTTGAGAAAGGCACACTTAAGGAAGTTGCTGATATGAAAACCATTCACAAGTTGA

[0542] CTAA (서열 번호 17)

[0543] > PK16122.1 | 1-테옥시크실룰로스-5-포스페이트 신타제 1 (DXS1)

[0544] ATGGCGTTTTGTGCATTATCATTTCTGCTCATATTAGCCGGGCAACTACACCAGCACCTTCAGATCTTC

[0545] ACAAATCTAGTTCTTTCTCTTCTCGGTTTTATTGGGGAGCAGATCTGCTGAGGCCATCTCAATACAAGGT

[0546] CAGGAAAATACAAAGTGGGGTTTATGCATCACTGTCAGAAAGTGGAGAATATCACTCAAGGAGACCACCA

[0547] ACTCCTCTCTTGGACACCATAAATTATCCAATTCATATGAAAAATCTCTCTGTTAAGGAGCTTAAACAAC

[0548] TATCAGATGAACTAAGGTCTGATGTCATCTTCAACGTTTCTAACACCGGGGGTACCTGGGCTCAAGCCT

[0549] TGGTGTGTTGAGCTTACTGTGGCTCTTCATTTTGTCTTCAATACTCCTCAGGATAGGATACTATGGGAT

[0550] GTTGGTCATCAGTCTTACCCTCATAAAATTCTGACTGGAAGAAGAGATAAGATGCACACCATGAGGCAGA

[0551] CCAACGGGTTAGCCGGATTCACTAAGCGGTCTGAGAGTGAATATGATTGTTTTGGGACTGGTCATAGTTC

[0552] TACCACCATCTCAGCTGGCTTGGGAATGGCTGTGGAAGGGATCTTAAAGGAAGAAAGAATAATGTTGTG

[0553] GCTGTCATAGGTGATGGTGCCATGACAGCAGGTCAAGCTTATGAAGCCATGAATAATGCCGGGTACCTTG

[0554] ATTCCGACATGATTATTATTCTTAACGACAATAAACAGGTTTCTTTACCTACTGCCTCTCTTGATGGGCC

[0555] CATACCACCTGTTGGAGCTTTGAGTAGTCTCAGTAGGCTGCAATCAAACAGGCCTCTTAGAGAACTA

[0556] AGAGAAGTAGCCAAGGGAGTTACTAAACAAATAGGTGGATCAGTACATGAATTGGCTGCAAAAGTTGATG

[0557] AATATGCTCGTGGAATGATAAGTGGTCTGGCTCAACATTGTTTGAGGAGCTTGGACTCTATTATATTGG

[0558] TCCAGTTGATGGTCAACAATAGATGATCTTGTTTCCATACTAGAGGAGGTTAAGAGCACTAAACAACA

[0559] GGTCCAGTCTTGATCCATTGCATCACTGAGAAAGGAAGAGGATATCCATATGCAGAGAAAGCTGCTGATA

[0560] AGTATCATGGGGTGCCAAGTTTGATCCAGCAACTGGAAGCAATTCAAAGGCACTTCTAACACACAGTC

[0561] ATACACTACATACTTTGCTGAGGCTTTGGTTGCAGAAGCAGAGGCAGACAAAGATGTTGTGGCCATCCAT

[0562] GCTGCAATGGGTGGTGGAACAGGCTTGAATCTCTTCCTTCGCCGTTTTCCAACAAGATGTTTGTGTTG

[0563] GGATAGCAGAACAGCATGCTGTTACTTTGCTGCTGGTTTGGCTTGCGAGGGCCTTAAGCCGTTTTGTGC

[0564] AATTTACTCATCTTTTCATGCAGCGAGCTATGATCAGGTAGTACATGATGTTGATTGTCAGAAGTTGCCG

[0565] GTGAGATTTGCAATGGACAGAGCTGGACTTGTGGGGCCGACGGCCCTACACATTGTGGTGCTTTTGATG

[0566] TTACTTTCATGGCATGCCTCCCAAACATGGTTGTGATGGCTCCTTCCGATGAGGCAGAGCTCTCCACAT

[0567] GGTGGCCACCCTGCTGCCATAGATGACAGACCAAGTTGTTTCCGTTACCCAGAGGAAATGGAATTGGT

[0568] GTTCCATTACCTCAAGGGAATAAAGGAACTCCTCTTGAGATCGGAAAAGGCAGGGTATTGGTTGAAGGGG

[0569] AAAGAGTAGCACTTCTAGGCTATGGAACAGCAGTTCAGAGTTGTTTGGCTGCTGCAGCCTTAGTAGAACC

[0570] TCACGGTCTACGGCTAACAGTTGCTGATGCACGATTTTGCAAGCCTTTGGATCATGCCCTCATTGCGGAA

[0571] CTAGCGAAAAATCACGAGGTTTTGATTACAGTGGAAGAAGGATCTATAGGAGGTTTTGGATCTCATGTTG

[0572] CTCAGTTTATGGCCCTTGATGGCCTTCTTGATGAAAAACAAAGTGAGACCAATTGTTCTTCTGACCG

[0573] ATACATCGACCACGGTTCGCCTGCTGATCAATATGTCGACGCGGGTCTCACGCCACCTCACATTGCAGCC

[0574] ACAGTTTTCAATGTACTAGGACAAACAAGAGAGGCCTTGAAGGTTATGACAACATGA (서열 번호 18)

[0575] > PK26473.1 | 1-테옥시크실롤로스-5-포스페이트 신타제 2 (DXS2)

[0576] ATGGCGGTTTCTGGTTTCATTGTACCAATCATTCATTCCTTTCACAACTTAAATCTCCACAGCCAT

[0577] ATTACAGTTCCAACAACAGTTGAGTTAAGGGTGAGAGGATCTCTTGTAGCTCAGATGATGGGAAGG

[0578] AAAATTCATCAGCAAAGAAAAAGATGAATGGAAAAATCAAGTATTCCAGTGAAAAACCAATCACTCCATTG

[0579] CTTGATACAGTCAATTACCCAGTTCACATGAAGAATTTATCCACACAGGATCTTGAACAGCTAGCAGCAG

[0580] AGCTTAGAGCAGATGTAGTCCATACAGTATCAAAAACAGGTGGTCATCTGAGTGCAAGCTTGGGAGTTGT

[0581] GGAGCTCACTGTAGCACTGCATCATGTTTTCAATACCCCTGATGATAAAATCATATGGGATGTTGGACAT

[0582] CAGACATACCCGCATAAGATTCTTACAGGAAGGAGGTCTCAAATGCATACCATTAGAAAGACTTCTGGTC

[0583] TAGCAGGGTTTCCAAAAGAGATGAGAGTGTTCACGATGCTTTCGGTGCAGGTCACAGTTCTACAAGCAT

[0584] ATCAGCAGGCCTTGGCATGGCAGTTGCCAGGGATCTTCTGGGAAAGAAGAACAGTGTGTTTCTGTGATT

[0585] GGAGATGGGGCCATGACTGCAGGAATGGCATATGAAGCCATGAATAATGCCGGCTACTTGGACGCCAACT

[0586] TGATTGTTGATTAAACGACAATAAACAAGTTTCTTTACCAACTGCTACTCTTGATGGTCCTGCAACCCC

[0587] AGTGGGAGCTCTAAGTGGTGCTTTGACTAAGCTTCAAGCAAGCACCAAGTTCAGAAAACTTCGCGAAGCT

[0588] GCGAAAACCATCACAAAACAAATGGAGGGCCAGCACATGAAGTTGCAGCTAAAGTAGATGAGTATGCTA

[0589] GAGGAATGATAAGTGCTTCTGGGTCAACACTCTTTGAGGAGCTTGGGTGTATTATATTGGTCCGGTGGA

[0590] TGGACATAATGTTGGAGATTTAGTCACCATTTTTGAGAAAGTGAAATCAATGCCAGCGCCAGGACCAGTC

[0591] TTGATCCACATCGTCACAGAGAAAGGAAAGGCTATCCCCAGCTGAAGTAGCACCTGATAAAATGCATG

[0592] GAGTTGTAAAGTTTGACCAACAACAGGAAAGCAATTTAAGTCCAAATCGTCGACACTTTCATATACTCA

[0593] ATACTTGTCTGAATCTCTAATAAAAGAAGCTGAAGAAGATGACAAGATTGTTGCCATACACGCAGCAATG

[0594] GGTGGTGGCACTGGTCTCAATTATTTCCAGAAGAAATTCCTGATCGTTGCTTTGATGTGGGGATTGCTG

[0595] AGCAACATGCTGTACGTTTGCAGCTGGATTAGCTGCAGAGGGTCTCAAACCATTCTGTGCCATATACTC

[0596] ATCATTCCTGCAACGAGGATATGATCAGGTTGCACATGATGTAGACCTTCAAAAATTACCTGTCCGTTTT

[0597] GCATTGGATAGAGCTGGCATGGTTGGCGCAGATGGGCCTACCCACTGCGGTGCATTGATATCACCTACA

[0598] TGGCCTGCTTGCCCAACATGGTTGTCATGGCTCCATCAGATGAGGCTGAACTTATGCACATGGTGGCCAC

[0599] AGCAACAGCTATAGATGACAGACCCAGTTGCTTCAGGTTTCCAAGGGGCAATGGAATTGGAGCAAAGCTT

[0600] CCAGCTAATAATAAGGAACATACTTGAGATTGGAAAAGGCAGAATATTAATGGAAGGCAGCAGAGTAG

[0601] CTATTTTGGGTTATGGTTCTATTGTTTCAGCAATGTGTGGAAGCTGCAAGCATATTAAGAAAACAAGACAT

[0602] TTCAGTGACAGTAGCTGATGCAAGATTTTGCAAACCATTGGATACAAATCTCATAAGACGGTTAGCCAAC

[0603] GAGCATGAAATCCTAATCACTGCCGAAGAAGTTCTATTGGAGGCTTTGGGTCTCATGTGTCACACTTTC

[0604] TAAGCTTAAGTGGACTTCTTGATGGGTCTTTAAAGTTGAGAGCAATGGTTCTTCCTGATAGATACATTGA

[0605] CCATGGATCACCCCAAGATCAGACTGAAACAGCCGGGCTCTCCTCGAGGCATATATCTGCAACAGTCTTA

[0606] TCTCTCTGGGGAAGCCCAAGGAAGCACTTCAGTTCATGTAA (서열 번호 19)

[0607] > PK04218.1 | 1-테옥시-D-크실로스 5-포스페이트 리덕토이소머라제 (XDR)

[0608] ATGGCTCTGAACTTGTTATCCCCAGCTGAAGTGAAGGCTCTATCCTTTTGGACTCCACCAAGTCCACCC

[0609] GCTTCCCTAAGCTGTGTCCAGGTGGAATTACTTTGCATAGAAAGGATTGCAGAGTACCACTTAGAAGAAG

[0610] AGTTCATTGTTGTTGCAGCAACCTCTCCAGCTTGGCCAGGAAGAGCTATTCCAGAGCAAGATCTTTGT

[0611] AATTGGAATGTCCAAAGCCTATATCTATTATTGGCTCTACTGGCTCTATAGGAACTCAGACACTGGACA

[0612] TTGTGGCAGAGAAATCCAGATAAATTCAGAATAGTGGGACTTGCAGCTGGTTCGAATGTGACACTTCTTGC

[0613] AGACCAGGTGAAGAGATTCAAGCCTCAAATAGTTGCTCTTAGAAATGAATCATTAAATTGGTGAACATAAAA

[0614] GAGGCCTTAGCTGATGTGAAGAAATGCCGAAATTATTCCTGGGGAACAAGGAGTAATTGAGGTTGCC

[0615] GGCACCCAGATGCAGTCACAGTGGTTACAGGAATAGTAGGTTGTGCTGGATTACAGCCTACAGTTGCTGC

[0616] AATTGAGGCAGGTAACACATAGCTTTAGCCAATAAAGAGACCCTGATTGCTGGAGGTCCATTTCATCCTT

[0653] TGCTGCAACAGCCCTATGGGCAGCAAATCAGTTCAATGGTGTCTTGTACTGAAAAGGAATTGCAAGAA

[0654] TGGTCAAGTGAGATTGGTTCAGATGTTCTTTCTTTCTCCCAAGGGGCAGCCTATTGTACAGGTCGAG

[0655] GTGAGGTTGTTTCAGGATATTCTACCACTGTACCATTAACATTCCCATGGTTCATAAAGCCCCAGA

[0656] AGCATGTTCAACAGCCGAAGTTTATAAGCGTTTTTCGGTTGGATAAAACCAGTAATAGTGATCCTTTACAA

[0657] TTGCTCCACAAGATCTCAAGTGATGGAATAAGTCAAGATGTCTGCATCAATGACTTAGAACCTCCTGCCT

[0658] TTGAAGTTCTTCCATCTCTTAAGAGATTGAAACAGCGTATAATTGCAGCTAGTCGTGGACAATATGATGC

[0659] TGTTTTATGTCTGGGAGTGGAAGCACCATTGTCGGGGTCGGTTCCCGAGATCCACCTCAGTTTATATAT

[0660] GATGATGAGGACTACAAGGATGTGTTTTTGTGAGGCCAACTTCTGACTCGAGAAGCAATGAATGGT

[0661] ACAAAGAACCTGCTTCAGCTAGCGCTTGAGCCCTCAGATGATTTCTCTCGTAATTTTCTCCTCTGT

[0662] CGAGTAA (서열 번호 22)

[0663] > PK25433.1 | 2-C-메틸-D-에리트ρί톨 2:4-시클로디포스페이트 신타제 (MDS)

[0664] ATGGCGGCGGCGACGGCAACACCACTCTGTGCTTCAACTCTCCACCACACTACTCCAATACCTCCCCA

[0665] AATCATTCAATCACTCCCATTTACAGTCGCAGTCCCGAGAAATCTCTCTCATCGTCTCAATTCATC

[0666] TCTAAGACAATCGAAAACGACGCGCTTTTCGGCTCTGCCTTCTGTATCGGCCGCGGACCAACGCTTTG

[0667] AACGCTGAGCAAGCTCCGCTGAGGTATCTGCTACTCCCTCAAAGGCTCTTCTTTTCGGGTGGTCATG

[0668] GGTTCGACCTTCATCGATTGGAGCCTGGGTATCCTTTGATAATTGGAGGTATTAATATACCTCATGAGAA

[0669] AGGTTGCGAAGCTCATTCTGATGGGGATGTTTTGCTTCATTGTGTAGTTGATGCTATTTGGGTGCTTTG

[0670] GGGCTTCTGATATTGGTCAAATTTTCCCTGATTCTGATCCCAAATGGAAAGGGCTGCATCATCAGTTT

[0671] TCATCAAAGAAGCTGTGAGACTGATGCATGAGGCAGGTTATGAGCTTGGAATTTAGATGCAACATTAAT

[0672] TCTTCAAAGACCAAGTTAAGTCCACACAAGGAAGCTATCAGAGCCAACTTGCTGAACTTCTAGGAGCT

[0673] GACCCTGCAGTTGTTAATCTGAAAGCGAAAACCTCACGAAAAGGTCGATAGTCTCGGGGAAAAATCGAAGCA

[0674] TCGCTGCTCACACTGTGGTTCTTCTTATGAAAAAATAG (서열 번호 23)

[0675] > PK23068.1 | 4-히드록시-3-메틸부트-2-엔-1-일 디포스페이트 신타제 (HDS)

[0676] ATGGCTTCTGGAGCTGTACCAGCATCAATTTTCATGTCTGAAAAGCAGAGACTCTGGCTTGAGCTTTGCTA

[0677] AAAGTTCTGATTTTGTGAGGCTTTCTGATTTAAAGAGGGTTGGTTCATCTAGAACAAGAGTTTCAGTTAT

[0678] CCGAAATTCGAATCTGGTTCAGATATTGCTGAACTTCAGCCTGCATCAAAAGGAAGCCCTCTATTAGTT

[0679] CCTAGACAGAAGTACTGTGAATCCTTACACAAAACCTGTTAGGAGGAAAACGCGAACTGTGATGGTGGGAA

[0680] ATGTGGCTCTTGGCAGTGAGCATCCCATAGAATTCAAACGATGACGACAAATGATACCAAGGATGTTGC

[0681] TGGAACAGTTGAAGAGGTGATGAGAATAGCTGATAAGGGAGCTGATATTGTTTCGGATAACAGTTCAGGGA

[0682] AGAAAAGAAGCAGATGCTTGTTCGAAATAAAAAATTCACTTGTGCAGAAGAATTATAATATACCTCTTG

[0683] TGGCAGATATTCATTTTGTCTCCCCAGTTGCATTAAGAGTTGCTGAATGCTTCGATAAAATTCGTGTCAA

[0684] TCCTGGAAATTTTCGCTGACAGACGGGCTCAGTTTGAGACGCTCGAGTACACAGACGACGACTATCAGAAA

[0685] GAACTTGAGCATATTGAGCAGGTTTTTCTCCATTGGTTGAGAAATGTAAGAAATATGGTAGAGCAATGC

[0686] GTATCGGGACAAACCATGGGAGTCTTTCAGATCGTATCATGAGCTACTATGGAGATTCTCCAAGGGGAAT

[0687] GGTGTAATCTGCATTTGAGTTTGAAGGATTGCGCGAAGTTGGATTTCATAATTTTGTGTTTTTCGATG

[0688] AAAGCAAGCAACCCAGTTGTCATGGTTCAGGCGTATCGTCTACTTGTGCTGAAATGTATGTCCAGGGCT

[0689] GGGACTATCCACTTCACTTGGGAGTTACTGAAGCGGGAGAAGGTGAGGATGGACGAATGAAATCTGCAAT

[0690] TGGCATCGGGACCCCTTCTTCAGGATGGTTTGGGTGATACTATCAGGGTTTCACTCACCGAACCGCCGAG

[0691] GAGGAGATTGATCCCTGCAGAAGGTTGGCCAATTTGGGTACAAAAGCAGCTGATCTTCAGCAAGGAGTGG

[0692] CTCCATTTGAAGAGAAGCACAGGCATTATTTTGATTTTCAACGACGAACTGGTCAACTGCCTCTACAGAA

[0693] GGAGGGCGATGAGGTTGACTATAGAGGTGCTCTGCACCGTGATGGTTCTGTTCTCATGTCTAGTGTCTCTC

[0694] AATAACTTAAAGATGCCCCGAGCTCTATACAGGTCACTAGCAGCAAAGCTTGTCTCGGGATGCCATTTA

[0695] AGGATCTGGCAACAGTAGACTCCATCTTATTGAGACAACCTCCACCTATTGACGATGACAACGCTCGATT

[0696] AGCTCTCAAAAGATTGATAGACATAAGTATGGGGGTCATAACTCCTTTGTCGGAGCAGCTAACAAAGCCA

[0697] TTGCCAAATGCTATGGTTTTGGTAAATCTTAAGGAGTTATCATCTGGTGCACACAAGCTTTTGCCAGAAG

[0698] GCACGCGTTTGGTTGTATCCTTGCGCGGTGATGAACCTTACGAAGAAGTGGAGATTCTCAAAGGGGTGA

[0699] TGATGTTGTATGATTCTTCATGATCTTCCGTTTCGATGAACATAAAATTAGCAGAGTCCACTCAGCAAGA

[0700] AGATTATTTGAGTATCTATCAGATAATTCTCTTAACTTTCTGTAAATACACCACATTCAATTTCCAAATG

[0701] GAATCCACAGGGATGACTTAGTCATCGGTGCAGGTAGCAACGCTGGTGCCCTTTTAGTAGATGGACTCGG

[0702] GGACGGTATCCTCTTAGAAGCCCCAGATCAGGATTTTCGATTTTCTTAGAAATACTTCTTTCAACCTACTT

[0703] CAAGGTTGTAGAATGCGAAATACAAAGACGGAGTATGTCTCGTGCCCATCCTGCGGTAGAACTTTGTTTG

[0704] ACCTTCAAGAAATCAGCGCAGAGATTCGAGAGAAGACATCACACCTGCCCGGTGTCTCAATTGCAATCAT

[0705] GGGTTGCATTGTTAATGGACCCGGAGAGATGGCTGATGCAGACTTCGGTTATGTCGGTGGTGTCTCCCGGA

[0706] AAGATTGACCTTTATGTTGAAAGACGGTAGTGCAGCGTGAATCGCAATGGAACAAGCGACCGATGCAT

[0707] TGATTGAGCTAATAAAAGATCATGGCCGATGGGTTGAACCACCCTCGGACGAAGAATGA (서열 번호 24)

[0708] > PK13726.1 | 4-히드록시-3-메틸부트-2-에닐 디포스페이트 리덕타제 (HDR)

[0709] ATGTCGATCACTTTCCAGCTCTGCCGGATTCCAATCCGTACCGACCTCGCCTTGGCGGAGCCTCTCTCCG

[0710] TAACCGGAACCTCCGCTGCCGGAACCTTTTCGTCATCCGATGCGCCGGCGAGTCATCTTCAACGGCAGC

[0711] AGATTCTGATTTTCGATGCGAAAGTGTTCGTAAGAACTTGGTCCGAAGCAAGAACTACAATCGGAAAGGT

[0712] TTTGGCCATAAGGAAGAGACCCTTCAACTCATGGACAGCGAGTACACCAGTGATATTATAAGACTTTGA

[0713] AGGATAATGGAAATGAGTACAGGTGGGGGAACGTGACGGTAAAAATTGGCCGAAGCATATGGGTTTTGCTG

[0714] GGGTGTGGAGCGAGCTGTCCAAATTGCTTACGAAGCAAGGAAACAGTTCCCCGAAGAAAAGATTGGATT

[0715] ACAAACGAAATTATTCATAATCCGACAGTCAACAAGAGACTAGAGGAAATGAAAGTGGAAAAATATTCCAA

[0716] TTGATGAAGGGAGGAAACAATTTGAGATTGTAAACAAGGGTGATGTTGTGATATTGCCTGCTTTTGGTGC

[0717] TGGAGTGGATGAGATGTTGGCTTTGAGTGATAGGAATGTTCAAATGTTGATACCACATGCCATGGGTT

[0718] TCCAAGGTTTGAATACAGTCGAGAAACATAAGAAAGGTGAATACACTTCCATTATTCATGGTAAATATG

[0719] CTCATGAGGAGACTATAGCTACTGCATCTTTTGCTGGAACCTTACATTATTGTAAAGAACATGAAAGAGGC

[0720] AATGTATGTCTGTGATTATATTCTTGGCGGTCAACTTGATGGATCCAGCTCAACAAGAGAGGAGTTTATG

[0721] GAGAAATTTAAGAAATGCAGTTTCTAAGGGATTGATCCTGACAAACATCTTGTGAAGGCTGGTATTGCAA

[0722] ATCAGACTACAATGCTCAAGGGGGAACCGAAGAGATTGGGAACTGGTTGAGAGGACTATGATGCAAAA

[0723] GTACGGAGTTGAAAAATTAATGAACACTTCCAAAGCTTTAACAACAAATTTGCGATGCAACCCAAGAGCGT

[0724] CAAGATGCAATGTACAAGATGGTGGAGGAACGTATTGACCTTATGTTAGTTGTTGGAGGATGGAACCTCTA

[0725] GTAACACTTCTCATCTACAAGAGATTGCAGAGGAACGAGGTATTCCTCGTATTGGATTGACAGTGAACA

[0726] GAGAATAGGTCTCGAAACAAGATAGCCTACAAGCTAAATCATGGAGAGTTGGTTGAGAAAGAGAACTGG

[0727] TTACCAGAGGGTCCCATCACGGTCGGTGAACATCAGGTGCTTCTACTCCAGATAAGGTTGTGAAGATG

[0728] TTCTCATCAAGGTGTTTGACCTTAAGAGCGAAGAAGCTTTGCAAGTTGCTTAG (서열 번호 25)

[0729] > AA073863| 카렌 신타제 모노TS

[0730] MSVISILPLASKSCLYKSLMSSTHELKALCRPIATLGMCRRGKSVMASKSTSLTTAVSDDGVQRRIGDHH

[0731] SNLWDDNFIQSLSSPYGASSYGERAERLIGEVKEIFNSLSRTDGELVSHVDDLQLHLSMVDNVERLGIDR

[0732] HFQTEIKVSLDYVYSWSEKGIGSGRDICTDLNNTALGFRIRLRHGYTVFPDVFEHFKDQMGRACSDN

[0733] HTERQISSILNLFASRLIAFPGEKVMEEAEIFSATYLKEALQTIPTVSSLSQEIQYVLQYRWHSNLPRLEA

[0734] RTYIDILQENTKNQMLDVNTKKVLELAKLEFNIFHSLQQNELKSVSRWWKESGFPDLNFIHRHVEFYTL

[0735] VSGIDMEPKHCTFRLSFVKMCHLITVLDDMYDTFGTIDELRLFTAIVKRWDPTTECLPEYMKGVYTVLY

[0736] ETVNEMAQEAQKSQGRDTLSYVRQALEAYIGAYHKEAEWISSGYLPTFDEYFENGKVSSGHRITLQPTF

[0737] MLDIPFPHHVLQEIFPSKFNDFACSLRLRGDTRCYQADRARGEAEASCISCYMKDNPSTQEDALNHIN

[0738] NMIEETIKKLNWELLKPDNNVPISSKKHAFDINRGLHHFYNYRDGYTVASNETKNLVIKTVLEPVPM (서열 번호 26)

[0739] >EFF14228 1-데옥시-D-크실룰로스-5-포스페이트 신타제 Dxs [에스케리키아 콜라이 B354]

[0740] 1 mmsfdiakyp tlalvdstqe lrlpkeslp klcdelrryl ldsvsrssgh fasglgtvel

[0741] 61 tvalhyvynt pfdqliwdvg hqayphkilt grrdkigtir qkgglhpfpw rgeseydvl

[0742] 121 vghsstsisa gigiavaaek egknrrtvcv igdgaitagm afeamnhagd irpdmlvln

[0743] 181 dnemsisenv galnnhlaql lsgklysslr eggkkvfsgv ppikellkrt eehikgmvpv

[0744] 241 gtlfeelgfn yigpvdghdv lglttlknm rdlkgpqflh imtkkgrgye paekdpitfh

[0745] 301 avpkfdpssg clpkssgglp syskifgdwl cetaakdnkl maitpamreg sgmvefsrkf

[0746] 361 pdryfdvaia eqhavtfaag laiggykpiv aiystflqra ydqlvhdvai qklpvlfaid

[0747] 421 ragivgadgq thqgafdlsy lrcipemvim tpsdenecrq mlytgyhynd gpsavryprg

[0748] 481 navgveltpl eklpigkiv krrgeklail nfgtlmpeaa kvaeslnatl vdmrfvklpd

[0749] 541 ealilemaas healvtveen aimggagsgv nevlmahrkp vpvlniglpd ffipqgtqee

[0750] 601 mraelgladaa gmeakikawl a (서열 번호 27)

[0751] >WP_072972099 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 IspD/MCT

[0752] 1 matthldvca vvpaaagfrr mqtecpcqyl signqtileh svhallahpr vkrvviais

[0753] 61 gdsrfaqlpl anhpqitvvd ggderadsvl aglkaagdaq wvlvhdaarp clhqddlarl

[0754] 121 lalsetsrtg gilaapvrtd mkraepgkna iahtvdrngl whaltpqffp relldcltr

[0755] 181 alnegatitd easaleycgf hpqlvegrad nikitrtedl alaefyltrt ihqent (서열 번호 28)

[0756] >WP_086589482 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-시클로디포스페이트 신타제 IspF/MDS

[0757] 1 mrighgfdvh afggegpiii ggvripyekg llaahsdgdva lhaltdallg aaalgdigkl

[0758] 61 fpdtdpafkg adsrellrea wrriqakgyt lgnidvtiaa qapkmlhip qmrvfiaedl

[0759] 121 gchmddvvnk attteklgft grgegiacea vallikatk (서열 번호 29)

[0760] >WP_115903881 이소펜테닐-디포스페이트 델타-이소머라제 Idi

- [0761] 1 mqtehvilln aqgvptgtle kyaahtr lhlafsswlf nakgllvtr ralskkawpg
- [0762] 61 vwtncvghp qlgesnedav irrccryelgv eitppesiyp dfryratdps givenecpv
- [0763] 121 faarttsalq inddevmdyq wcdladilh idatpwafsp wvmqatnre arkrlsaftq
- [0764] 181 lk (서열 번호 30)
- [0765] >AF513112.1 게라닐 디포스페이트 신타제 GPPS
- [0766] MAYSAMATMGYNGMAASCHTLHPTSPKPFHGASTSLEAFNGEHMGLRGYSKRKLSSYKNPASRSSNATVAQLLNPPQKGKKAVERDFNKMDSKAMTVNE
ALNKAIPRLYPQKIYESMRYSLLAGGKRVPLCIAACELVGGTEELAIPTACAIEMIHTMSLMHDDLPCIDNDLRRGKPTNHKIFGEDTAVTAGNALHSY
AFEHIAVSTSKTVGADRILRMVSELGRATGSEGMGGQMVDAIEGDPSSIDLQTLWEIHIHKTAMLECSVVCAGAIIGGASEIVIERARRYARCVGLLFQV
DDILDVTKSSDELGTAGKDLISDKATYPKLMGLEKAKEFSDELLNRAKGELSCFDPVKAAPLLGLADYVAFRQN (서열 번호 31)
- [0767] >WP_053287215 게라닐 트랜스퍼라제 IspA
- [0768] 1 mdfpqleac vkqanqalsr fiaplpfqnt pvvetmqyga lggkrlrpf lvyatghmfg
- [0769] 61 istntldapa aavecihays lihddlpamd dddlrrglpt chvkfgeana ilagdalqtl
- [0770] 121 afsilsdadm pevsdrdris miselasag iagmcggqal dldaegkhvp ldalerihrh
- [0771] 181 ktgaliraav rlgalsagdk grralpvdik yaesiglafq vqddildvvg dtatlgkrqg
- [0772] 241 adqqlgksty pallgleqar kkardlidda rsqlqlaeq sltdsaleal adyiiqrnk (서열 번호 32)
- [0773] >NP_414715 1-테옥시-D-크실룰로스 5-포스페이트 리덕토이소머라제 IspC/DXR
- [0774] 1 mkqltilgst gsigcstldv vrhnpehfrv valvagknt rmveqcelfs pryavmddea
- [0775] 61 sakllktmlq qqgsrtevlv gqqaacdmaa ledvdqmaa ivgaagllpt laairagkti
- [0776] 121 llankeslvt cgrlfmdavk qskaqlpvd sehnaifqsl ppiqhnlgy adleqngvvs
- [0777] 181 illtgsggpf retplrdlat mtpdqacrhp nwsmgrkiskv dsatmmnkgf eyiearwlfv
- [0778] 241 asasqmevli hpqsvihsmv ryqdgsvlaq lgepdmrtpi ahtmawpnrsv nsgvklpdlfc
- [0779] 301 kl염faap dydrypclkl ameafegqqa attalnaane itvaaflaq irftdiaaln
- [0780] 361 lsvlekmdmr epqcvddvls vdanarevar kevmrlas (서열 번호 33)
- [0781] >EGT67781 4-디포스포시티딜-2-C-메틸에리트ρί톨 키나제 IspE/CMK
- [0782] 1 mrtqwpaspak lnlflyitgq radgyhtlqt lfqlfydgt isielrddgd irltptveg
- [0783] 61 ehednlivra arlliktaad sgrlptgsga nisidkrlpm ggglggssn aatvlvalny
- [0784] 121 lwqcglsmda laemgltlga dvpvfvrga afaegvgeil tpsdppekwy lvahpgvsip
- [0785] 181 tpvifkdpel prntpkrsie tllkcefsnd ceviarkrfr evdavlswll eyapsrltgt
- [0786] 241 gacvfaefdt esearqvleq apewlmgfva kgvnlspthr aml (서열 번호 34)
- [0787] >ANK02812 4-히드록시-3-메틸부트-2-엔-1-일 디포스페이트 신타제 IspG/HDS
- [0788] 1 mhnqapiqrr kstriyvgnv pigdgapiav qsmtnttrtd veatvnqika lervgdivr
- [0789] 61 vsvptmdaae afklikqqvn vplvadihfd yrialkvaey gydclring nigneerim
- [0790] 121 vvdcardkni pirigvnags lekdlqeky eptpqalles amrhvdhldr lnfdqfkvs
- [0791] 181 kasdvflave syrlakqid qplhlgitea ggarsgavks aiglglilse gigdtlrsl
- [0792] 241 aadpveeikv gfdilkslri rsginfiac ptcscrqfdv igtvnaleqr lediitpmdv
- [0793] 301 siigcvvngp gealvstlgv tggknksgly edgvrkdrld nndmidqla rirakasqld

- [0794] 361 earridvqqv ek (서열 번호 35)
- [0795] >AAL38655 4-히드록시-3-메틸부트-2-에닐 디포스페이트 리덕타제 IspH/HDR
- [0796] 1 mqillanprg fcagvdrais ivenalaiyg apiyvrhevv hnryvvdslr ergaifieqi
- [0797] 61 sevpdgaili fsahgvsqav rneaksrdlt vfdatcplvt kvhmevaras rrgesilig
- [0798] 121 haghpevegt mgqysnpegg mylvespddv wkltvkneek lsfmtqtlls vddtsdvida
- [0799] 181 lkrfcpkivg prkddicyat tnraqeavral aeqaevvlvv gsknssnsnr laelaqrmgk
- [0800] 241 rafliddakd iqeewvkev cvgvtagasa pdilvqnvva rlqqlgggea iplegreeni
- [0801] 301 vfevpkelrv direvd (서열 번호 36)
- [0802] >AAA24819.1 파이토엔 신타제 CrtE
- [0803] 1 mvsgskagvs phreievmrq siddhlagll petdsqdivs lamregvmap gkiripllml
- [0804] 61 laardlryqg smptlildlac avelthtasl mlddmpcmdn aelrrgqptt hkkfgesvai
- [0805] 121 lasvgllska fgliaatgdl pgerraqavn elstavgvqg lvlgqfrdl n daaldrtpda
- [0806] 181 ilstnhlktg ilfsamlqiv aiasasspst retlhafald fgqafqlld lrdhpetgk
- [0807] 241 drnkdagkst lvnrlgadaa rqlrehids adkhltfacp qggairqfmh lwfghhladw
- [0808] 301 spvmkia (서열 번호 37)
- [0809] >AAA24820.1 파이토엔 테히드로게나제 CrtI
- [0810] 1 mkktvvigag fgglalairl qaagiptvll eqrkpggra yvwhdqgftf dagptvitdp
- [0811] 61 talealftla grrmedyvr lvpkpfyrlc wesgktdya ndsaeleaqi tqfnprdvge
- [0812] 121 yrrflaysqa vfqegyrlrg svpflsfrdm lragpqlkl qawqsvyqsv srfiedehlr
- [0813] 181 qafsfsllv ggnpfttssi ytlihalere wgvwfpegt galvngmvkl ftdlggeiel
- [0814] 241 narveelvva dnrsvqvr l dgrifdtdav asnadvvnty kklghhpvg qkraaalerk
- [0815] 301 smsnslfvlv fglmqphsql ahhticfgr yrelideift gsaladdfsl ylhspcvtdp
- [0816] 361 slappgcasf yvlapvphlg napldwaqeg pkldrdrifdy leerympglr sqlvtqrift
- [0817] 421 padfhdtlda hlgsafsieplltqsaawfrp hnrdsdianl ylvagathpg agipgvvasa
- [0818] 481 kataslmied lq (서열 번호 38)
- [0819] >AAA24821.1 프레파이토엔 피로포스페이트 신타제 [판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)] CrtB
- [0820] MSQPPLLDHATQTMANGSKSFATAAKLFDPATRRSVLMLYTWCRCDDVIDDQTHGFASEAAAAEEATQRLARLRTLTLAAFEAGAEMQDPFAAFQEVALTH
GITPRMALDHLDFAMQVAQTRYVTFEDTLRYCYHVAGVVGLMMARVMGVRDERVLDRACDLGLAFQLTNIARDIIDDAAIDRCYLP AEWLQDAGLTPENYA
ARENRAALARVAERLIDAAEPYI SSQAGLHDLPPRCAWIATARSVYREIGIKVKAAGGSAWDRRQHTSKGEIAMLMAAPGQVIRAKTTTRVTPRAGLWQ
RPV (서열 번호 39)
- [0821] >sp|Q50L36.1|ISPS_POPAL RecName: 전체=이소프렌 신타제, 클로로플라스틱; 짧은=PaIspS; IspS.
- [0822] MATELLCLHRPISLTHKLFRNPLPKVIQATPLTLKLRCVSTENVSFTEETETARRSANYEPNSWDYDYLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVREINNEKA
EFLTLELIDNVQRLGLGYRFESDIRGALDRFVSSGGFVAVTKTSLHGTALESFRLRLQHGFEVSQEAFFSGFKDQNGNFLENLKEDIKAILSLEYASFLALEG
ENILDEAKVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVNHLELPLHRRTOQRL EAVWSIEAYRKEDANQVLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWWRRVGLATKLHF
ARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFTIIDDYDVGTLDELELFTDAVERWDVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPY
LTKAWADLCNAFLQEAKWLYNKSTPTFDYFGNAWKSSSGPLQLVFAYFAVQNIKKEEIEENLQKYHDTISRP SHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCY
MRTKGI SEELATESVMNLIDETWKKMNKEKLGGS LFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITEPILPFER (서열 번호 40)
- [0823] * * *

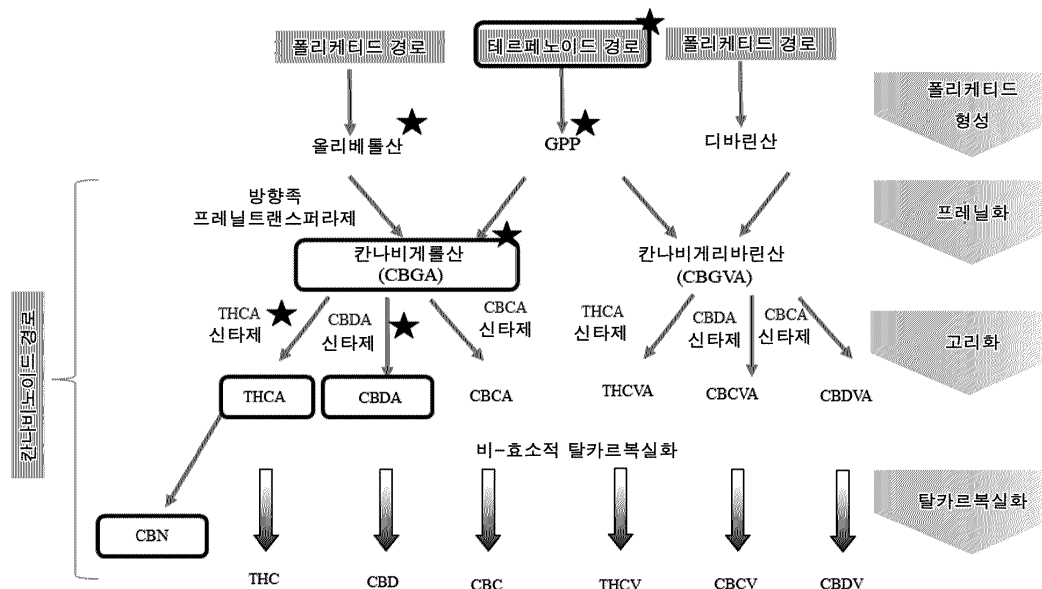
[0824] 본원에 설명적으로 기재된 발명은, 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재 하에 적합하게 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는" "포함한" "함유하는" 등은 확장적으로 제한 없이 이해된다. 추가로, 본원에서 사용된 용어 및 표현은 설명적이며 비제한적 용어로서 사용되었고, 이러한 용어 및 표현의 사용에서 차후에 나타내고 기재되는 임의의 등가물 또는 임의의 이들의 부분을 배제하려는 의도는 없으며, 청구된 발명의 범주 내에서 다양한 변형이 가능함이 인식된다.

[0825] 따라서, 본 발명을 바람직한 구현에 및 임의적 특징에 의해 구체적으로 개시하였지만, 개시된 본원 발명의 변형 및 변화가 당업자에 의해 이루어질 수 있고, 이러한 변형 및 변화는 본원에 개시된 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주됨을 이해하여야 한다. 본 발명은 본원에서 광범위하게, 또한 일반적으로 기재되었다. 일반적 개시내용의 범주 내에 포함되는 보다 좁은 종 및 하위 그룹 각각 또한 이들 발명의 부분을 형성한다. 이는, 삭제된 물질이 구체적으로 존재하는지 여부에 관계없이, 부류로부터 임의의 주제를 제거하는 단서 또는 부정적 제한을 갖는 각 발명의 일반적 설명을 포함한다.

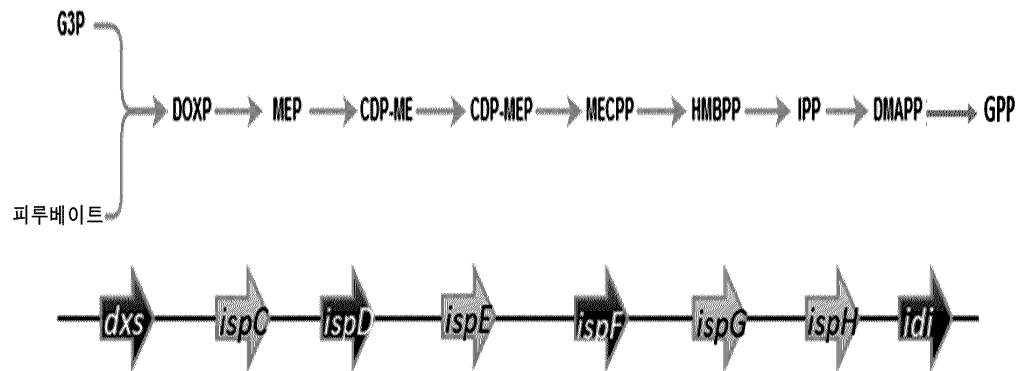
[0826] 추가로, 본 발명의 특징 또는 양태가 마쿠쉬(Markush) 그룹으로 기재되는 경우, 당업자는, 본 발명이 또한 이로써 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 구성원들의 하위군으로 기재됨을 인식할 것이다. 또한, 상기 설명은 예시적 및 비제한적인 것으로 의도됨을 이해하여야 한다. 상기 설명을 검토함에 따라 많은 구현예가 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범주는, 상기 설명과 관련하여 결정되지 않아야 하며, 그 대신에, 첨부된 청구범위와 함께, 이러한 청구범위가 부여되는 등가물의 전체 범주와 관련하여 결정되어야 한다. 특허 공개문헌 및 데이터베이스 (예: 진뱅크) 수탁 번호에 의해 참조되는 내용을 포함한, 모든 논문 및 참조문헌의 개시내용은, 본원에 참조로 포함된다.

도면

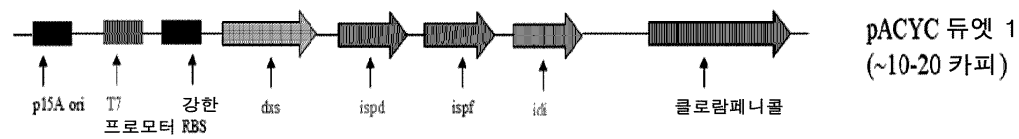
도면1



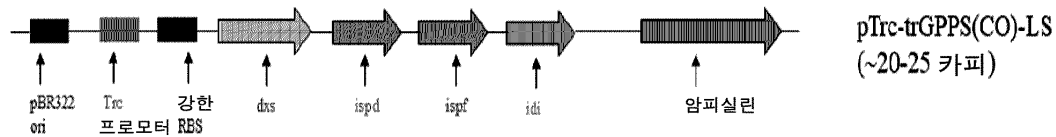
도면2



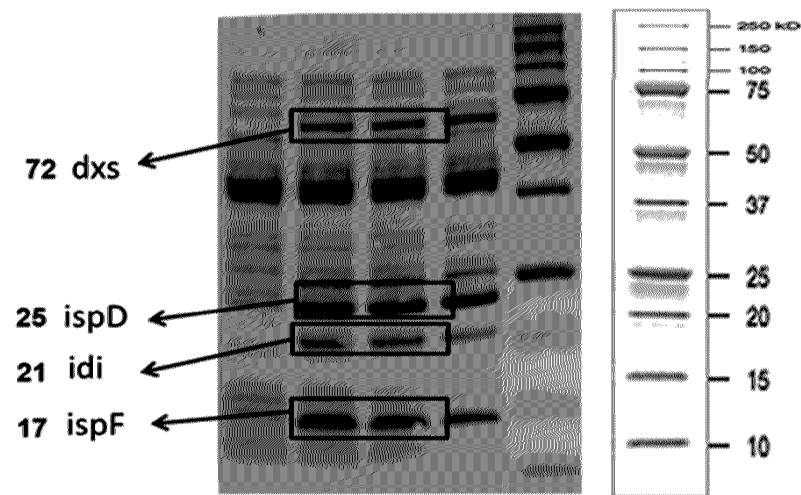
도면3a



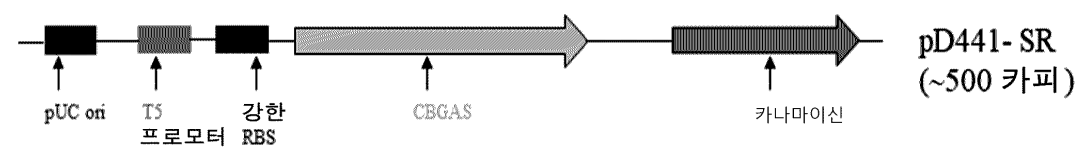
도면3b



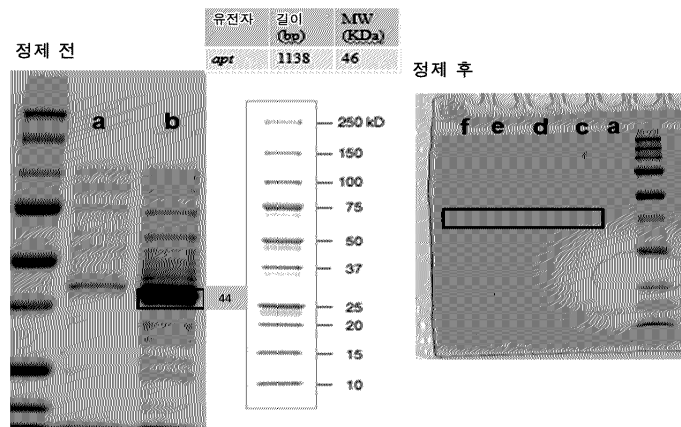
도면4



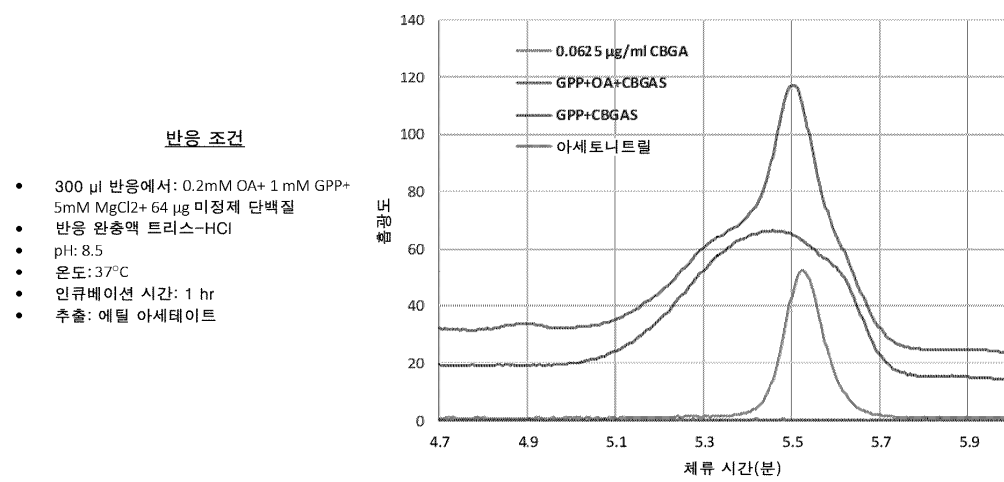
도면5



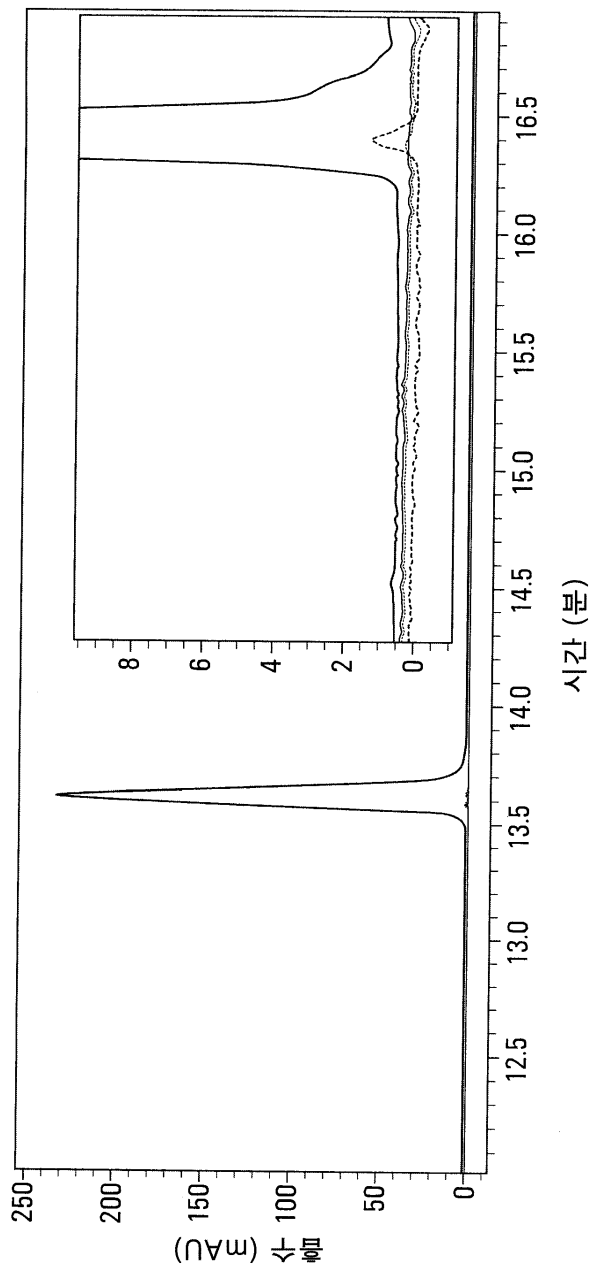
도면6



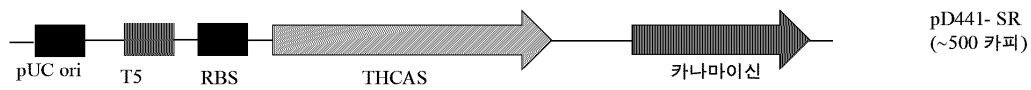
도면7



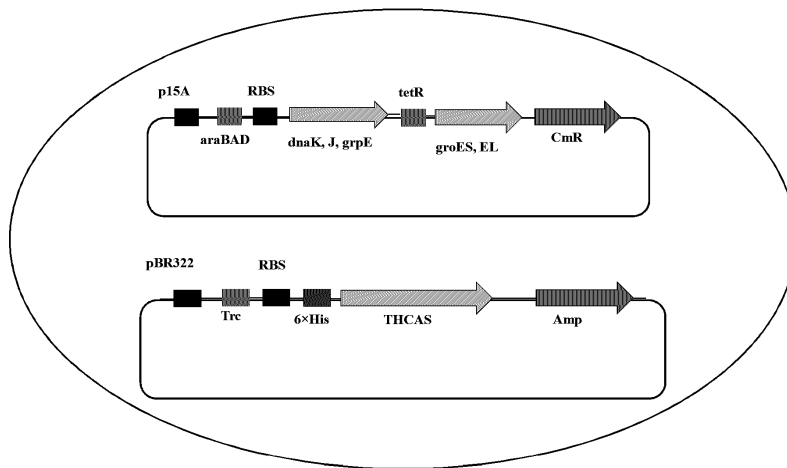
도면8



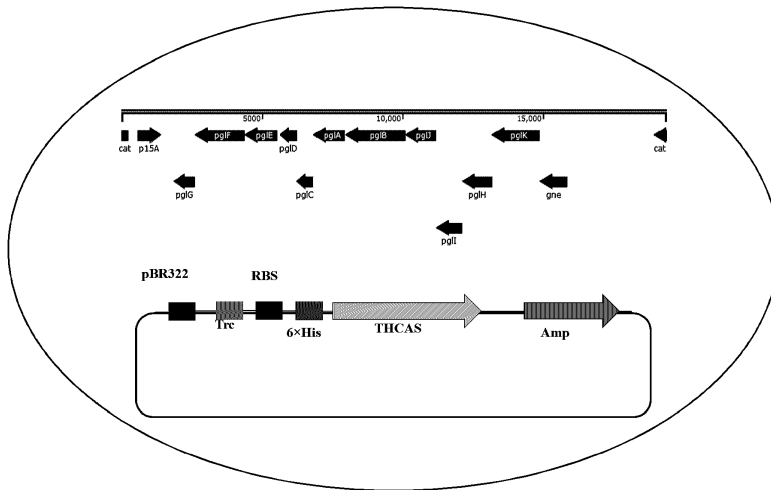
도면9



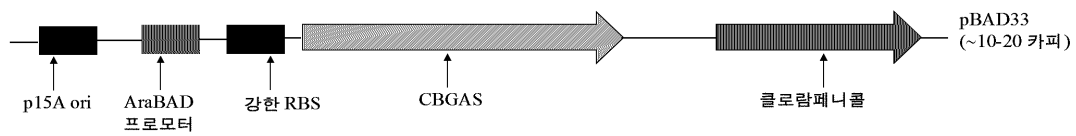
도면10



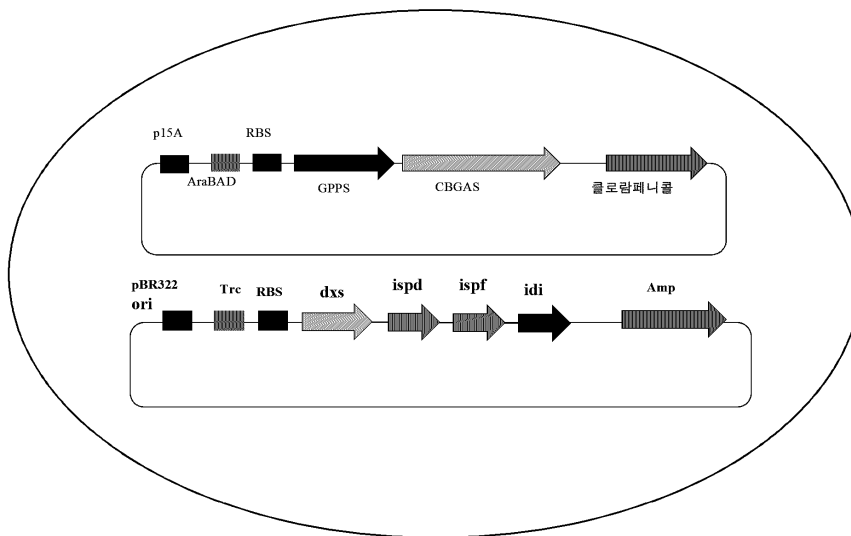
도면11



도면12



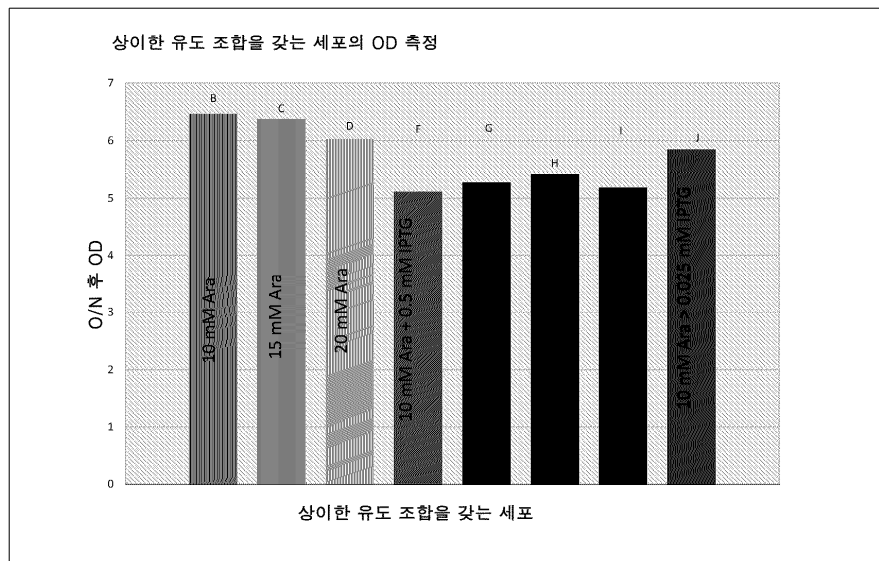
도면13



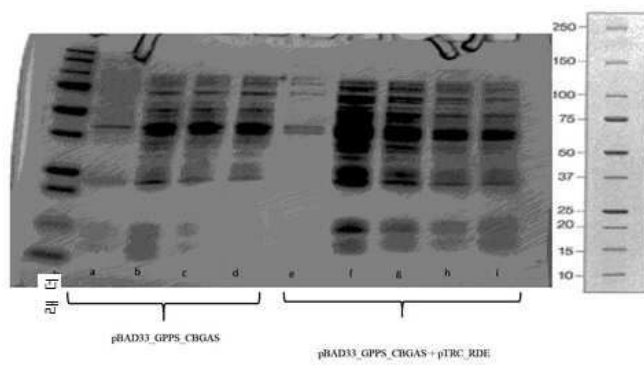
도면14

	균주명	유도제 농도
a	pBAD33_GPPS_CBGAS	유도되지 않음
b	pBAD33_GPPS_CBGAS	10 mM 아라비노스
c	pBAD33_GPPS_CBGAS	15 mM 아라비노스
d	pBAD33_GPPS_CBGAS	20 mM 아라비노스
e	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	유도되지 않음
f	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	10 mM 아라비노스 + 0.5 mM IPTG
g	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	15 mM 아라비노스 + 0.1 mM IPTG
h	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	15 mM 아라비노스 + 0.1 mM IPTG
i	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	10 mM 아라비노스 + 0.025 mM IPTG
j	pBAD33_GPPS_CBGAS + pTRC_RDE	0.025 mM IPTG 및 4시간 후 10 mM 아라비노스

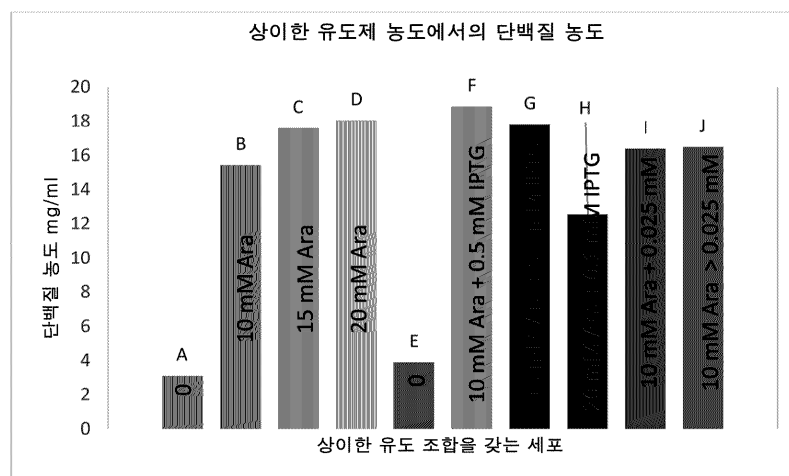
도면15



도면16



도면17



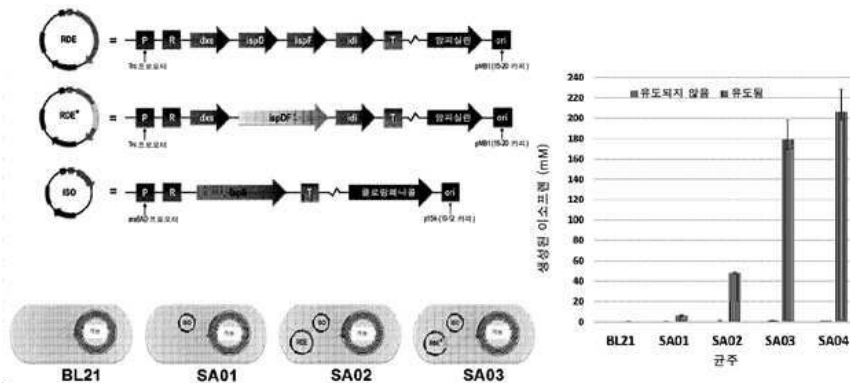
도면21



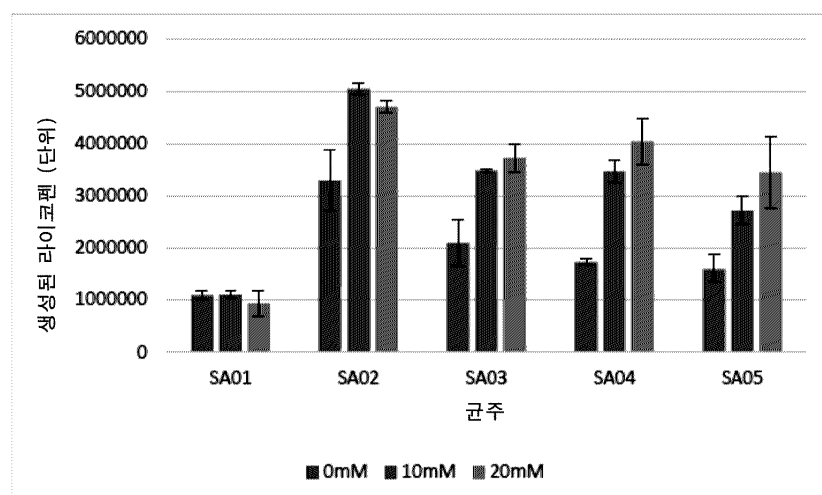
사용된 플라스미드 백본 (Plasmid backbones used)

플라스미드	Ori	프로모터	항생제 마커
MEP 경로 유전자	pBR322	trc	암피실린
라이코펜 생합성 경로	pET15A	내생	클로람페니콜
이소프렌 신타제	pET15A	pBAD	클로람페니콜
MEP 경로 유전자 + GPPS + MonoTS	pBR322	trc	암피실린

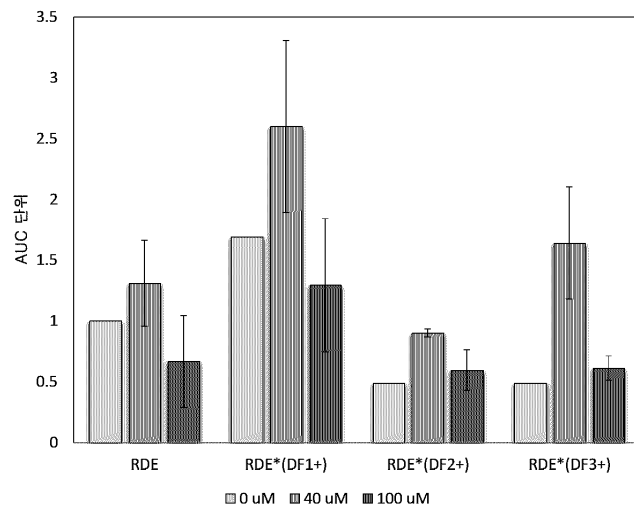
도면22



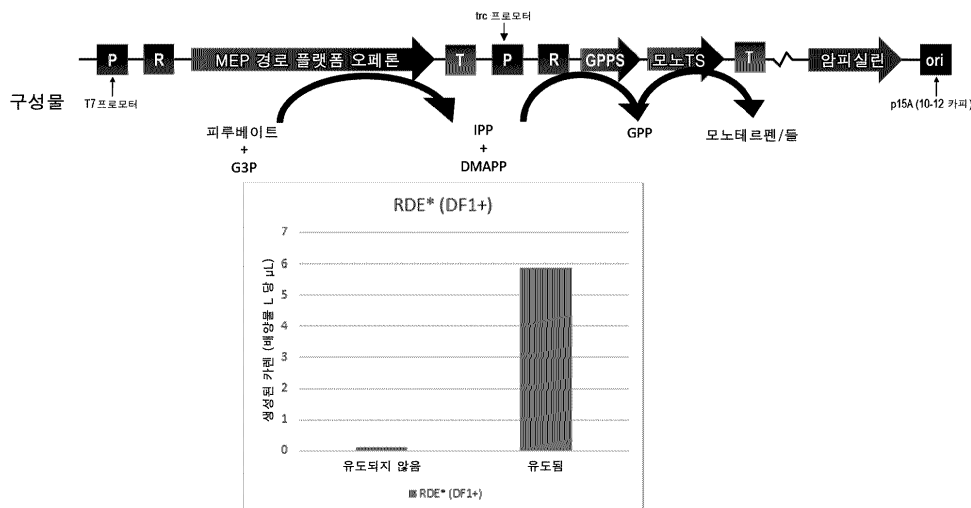
도면23



도면24



도면25



도면26

IspDF1

MIALQRSLSMHVTAIIAAAGGRRGLGAPLPKQLLDIGGRSILERSVMAFARHERIDVIVLPPALAAAPPDWIAASGRVPAVHVSGGERRQDSV ANAFDRVPAQSDVVLVHDAARPFVTAELISRAIDGAMQHGAIVAVPVRDVTVKRVDPDGEHPVITGTIPRDTIYLAQTPQAFRRDVLGAVALGR SGVSATDEAMLAEQAGHRVHVVEGDPANVKITTSADLDQARQLRSVAARIGTGYDLHRLIEGRPLIIGGVAVPCDKGALGHSDADVACHAVID ALLGAAGAGNVGQHYPTDTPRWKGASSIGLLRDALRLVQERGFTVENVDVVCVLERPKIAPFPIEIRARIAGALGIDPERVSVKGKTNEGVDVAVG RGEAIAHAVALLES

IspDF2

MQVTAIIAAGGRRGFGGVPKQLVGVGGRPILERTVAFLGHPAIEVHVVALPAELMADPPAYLRAAPKIRLVAGGVQRQDSVRQAFQAANE QSDVIVIHDAARPFASADLISRTIAAAEGGAALAAVPAARDTVKRGAFAGRTGPAGRQAVEGAPLLVVAETLPRDSIYLAQTPQAFRRDVLRLDAL ALGEAGSEATDEATLAERAGHIVRLVEGEPANIKITTPDDLVAEAIARGTGERAVGERAAFRIGAGYDLHRLVEGRPLVGGVTIPFERGLLGHSDA DAICHAVTDAVLGAAAAGDIGRHFDPDSDPKWRDWSSIDLLRRASAIVKGGRYAIANVDVAIERPKLAPFLDEMRAVAGAIAGVAVGIGKG TNEGLGELGRGEAIAVHVALHLL

IspDF3

MVHVSAIIAAGGRRGFGGVPKQLLLGGVPILKRTVDAFLRGYPFIEVIVALPAEFVANPPDYLDDVIVVEGGARRQDSVANAFRAVAPSAQV VVHDAARPLVTPSLIERTVDAVAKHGAIAALRATDTVKRGDASRVIRGTLPRDEIFLAQTPQAFRAGVLRDALAASAADATDEAMLAEQAGH HVRLVDGDPRLNKITTPEDLEMAERLIGARNTAGAMRIGNGYDLHRLVTGRPLVGGVTIPFEKGLQGHSDADAVCHAITDAILGAASAGDIGRH FPDTPAWKDAKSIVLLQQAQIVSRAGYAIANLDVVIAQQPKLVPHIDAIRHSVAHALGIDVQQVSVKGKTNEGVDVSMGAGESIAVHVALQLG HS

서열 목록

<110> INMED PHARMACEUTICALS INC.

<120> METABOLIC ENGINEERING OF E. COLI FOR THE BIOSYNTHESIS OF
CANNABINOID PRODUCTS
<130> NMD-003/PCT
<140> PCT/CA2018/051074
<141> 2018-09-05
<150> 62/554,494
<151> 2017-09-05
<160> 43
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 1

Met Ile Ala Leu Gln Arg Ser Leu Ser Met His Val Thr Ala Ile Ile

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

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

Arg Asp Thr Val Lys Arg Val Asp Pro Asp Gly Glu His Pro Val Ile

145 150 155 160

Thr Gly Thr Ile Pro Arg Asp Thr Ile Tyr Leu Ala Gln Thr Pro Gln

165 170 175

Ala Phe Arg Arg Asp Val Leu Gly Ala Ala Val Ala Leu Gly Arg Ser

180 185 190

Gly Val Ser Ala Thr Asp Glu Ala Met Leu Ala Glu Gln Ala Gly His

195 200 205

Arg Val His Val Val Glu Gly Asp Pro Ala Asn Val Lys Ile Thr Thr

210 215 220

Ser Ala Asp Leu Asp Gln Ala Arg Gln Arg Leu Arg Ser Ala Val Ala

225 230 235 240

Ala Arg Ile Gly Thr Gly Tyr Asp Leu His Arg Leu Ile Glu Gly Arg

245 250 255

Pro Leu Ile Ile Gly Gly Val Ala Val Pro Cys Asp Lys Gly Ala Leu

260 265 270

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

275 280 285

Leu Gly Ala Ala Gly Ala Gly Asn Val Gly Gln His Tyr Pro Asp Thr

290 295 300

Asp Pro Arg Trp Lys Gly Ala Ser Ser Ile Gly Leu Leu Arg Asp Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Cys Val Val Leu Glu Arg Pro Lys Ile Ala Pro Phe Ile Pro Glu Ile

340 345 350

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

355 360 365

Val Lys Gly Lys Thr Asn Glu Gly Val Asp Ala Val Gly Arg Gly Glu

370 375 380

Ala Ile Ala Ala His Ala Val Ala Leu Leu Ser Glu Ser

385	390	395
<210>	2	
<211>	407	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide	
<400>	2	
Met	Gln Val Thr Ala Ile Ile Ala Ala Gly Gly Arg Gly Arg Arg Phe	
1	5	10 15
Gly Gly Gly Val Pro Lys Gln Leu Val Gly Val Gly Gly Arg Pro Ile		
	20	25 30
Leu Glu Arg Thr Val Ala Ala Phe Leu Gly His Pro Ala Ile His Glu		
	35	40 45
Val Val Val Ala Leu Pro Ala Glu Leu Met Ala Asp Pro Pro Ala Tyr		
	50	55 60
Leu Arg Ala Ala Pro Lys Pro Ile Arg Leu Val Ala Gly Gly Val Gln		
65	70	75 80
Arg Gln Asp Ser Val Arg Gln Ala Phe Gln Ala Ala Asn Glu Gln Ser		
	85	90 95
Asp Val Ile Val Ile His Asp Ala Ala Arg Pro Phe Ala Ser Ala Asp		
	100	105 110
Leu Ile Ser Arg Thr Ile Ala Ala Ala Ala Glu Gly Gly Ala Ala Leu		
	115	120 125
Ala Ala Val Pro Ala Arg Asp Thr Val Lys Arg Gly Ala Phe Ala Ala		
	130	135 140
Gly Arg Thr Gly Pro Ala Gly Arg Gln Ala Val Glu Gly Ala Pro Leu		
145	150	155 160
Leu Val Val Ala Glu Thr Leu Pro Arg Asp Ser Ile Tyr Leu Ala Gln		
	165	170 175
Thr Pro Gln Ala Phe Arg Arg Asp Val Leu Arg Asp Ala Leu Ala Leu		
	180	185 190
Gly Glu Ala Gly Ser Glu Ala Thr Asp Glu Ala Thr Leu Ala Glu Arg		

195 200 205
Ala Gly His Ile Val Arg Leu Val Glu Gly Glu Pro Ala Asn Ile Lys
210 215 220
Ile Thr Thr Pro Asp Asp Leu Leu Val Ala Glu Ala Ile Ala Arg Gly

225 230 235 240
Thr Gly Glu Arg Ala Val Gly Glu Arg Ala Ala Phe Arg Ile Gly Ala
245 250 255
Gly Tyr Asp Leu His Arg Leu Val Glu Gly Arg Pro Leu Val Leu Gly
260 265 270
Gly Val Thr Ile Pro Phe Glu Arg Gly Leu Leu Gly His Ser Asp Ala
275 280 285
Asp Ala Ile Cys His Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Gly Ala Ala Ala
290 295 300

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

370 375 380
Asn Glu Gly Leu Gly Glu Leu Gly Arg Gly Glu Ala Ile Ala Val His
385 390 395 400
Ala Val Ala Leu Leu His Leu

405

<210> 3

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 3

Met Val His Val Ser Ala Ile Ile Ala Ala Gly Gly Arg Gly Glu Arg
1 5 10 15

Phe Gly Gly Pro Gln Pro Lys Gln Leu Leu Leu Gly Gly Val Pro
20 25 30

Ile Leu Lys Arg Thr Val Asp Ala Phe Leu Arg Gly Tyr Pro Phe Ile
35 40 45

Glu Val Ile Val Ala Leu Pro Ala Glu Phe Val Ala Asn Pro Pro Asp
50 55 60

Tyr Leu Asp Asp Val Ile Val Val Glu Gly Gly Ala Arg Arg Gln Asp
65 70 75 80

Ser Val Ala Asn Ala Phe Arg Ala Val Ala Pro Ser Ala Gln Val Val
85 90 95

Val Ile His Asp Ala Ala Arg Pro Leu Val Thr Pro Ser Leu Ile Glu
100 105 110

Arg Thr Val Asp Ala Ala Val Lys His Gly Ala Ala Ile Ala Ala Leu
115 120 125

Arg Ala Thr Asp Thr Val Lys Arg Gly Asp Ala Ser Arg Val Ile Arg
130 135 140

Gly Thr Leu Pro Arg Asp Glu Ile Phe Leu Ala Gln Thr Pro Gln Ala
145 150 155 160

Phe Arg Ala Gly Val Leu Arg Asp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ser Ala
165 170 175

Ala Asp Ala Thr Asp Glu Ala Met Leu Ala Glu Gln Ala Gly His His
180 185 190

Val Arg Leu Val Asp Gly Asp Pro Arg Asn Leu Lys Ile Thr Thr Pro
195 200 205

Glu Asp Leu Glu Met Ala Glu Arg Leu Ile Gly Ala Arg Asn Thr Ala
210 215 220

Gly Ala Met Arg Ile Gly Asn Gly Tyr Asp Leu His Arg Leu Val Thr
225 230 235 240

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

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

370 375 380

<210> 4
 <211> 1638
 <212> DNA
 <213> Cannabis sativa
 <400> 4

atgaattgct cagcattttc cttttggttt gtttgcaaaa taatatTTTT ctttctctca 60
 ttccatatcc aaatttcaat agctaatacct cgagaaaact tccttaaag cttctcaaaa 120
 catattccca acaatgtagc aaatccaaaa ctggtatata ctcaacacga ccaattgtat 180
 atgtctatcc tgaattcgac aatacaaaat cttagattca tctctgatac aaccccaaaa 240
 ccaactcgta ttgtcaactc ttcaaataac tcccatatcc aagcaactat tttatgctct 300

 aagaaagttg gcttgcagat tcgaactcga agcgggtggc atgatgctga gggtatgtcc 360
 tacatatctc aagtccatt tgtttagta gacttgagaa acatgcattc gatcaaaata 420
 gatgttcata gccaaactgc gtgggttgaa gccggagcta cccttgaga agtttattat 480
 tggatcaatg agaagaatga gaatcttagt tttcctggtg ggtattgccc tactgttggc 540

gtaggtggac acitttagtgg aggaggctat ggagcattga tgcgaaatta tggccttgcg	600
gctgataata ttattgatgc acacttagtc aatgttcatg gaaaagtctt agatcgaaaa	660
tccatgggag aagatctgtt ttgggctata cgtgggtgtg gaggagaaaa ctttgaatc	720
attgcagcat ggaaaatcaa actggttgct gtcccatcaa agtctactat attcagtgtt	780
aaaaagaaca tggagataca tgggcttgct aagttattta acaaatggca aaatattgct	840
tacaagtatg acaaagattt agtactcatg actcacttca taacaaagaa tattacagat	900
aatcatggga agaataagac tacagtacat ggttacttct cttcaatttt tcatggtgga	960
gtggatagtc tagtcgactt gatgaacaag agctttcctg agttgggtat taaaaaaact	1020
gattgcaaag aatttagctg gattgataca accatcttct acagtgggtg tgtaaatTTT	1080
aacactgcta atTTTaaaa ggaaattttg cttgatagat cagctgggaa gaagacggct	1140
ttctcaatta agttagacta tgTTaagaaa ccaattccag aaactgcaat ggtcaaaatt	1200
ttggaaaaat tatatgaaga agatgttaga gctgggatgt atgtgttgta cccttacggt	1260
ggtataatgg aggagatttc agaatcagca attccattcc ctcatcgagc tggaataatg	1320
tatgaacttt ggtacactgc ttcttgggag aagcaagaag ataatgaaaa gcatataaac	1380
tgggttcgaa gtgtttataa ttttacgact ctttatgtgt cccaaaatcc aagattggcg	1440
tatctcaatt atagggacct tgatttagga aaaactaatc atgcgagtcc taataattac	1500
acacaagcac gtatttgggg tgaaaagtat ttTgtaaaa attttaacag gttagttaag	1560
gtgaaaacta aagttgatcc caataatttt tttagaaacg aacaaagtat cccacctctt	1620
ccaccgcac atcattaa	1638
<210> 5	
<211> 1635	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 5	
atgaagtgtc caacattctc cttttggttt gtttgcaaga taatatTTT ctttttctca	60
ttcaatatcc aaacttccat tgctaatact cgagaaaact tccttaaatg cttctcgcaa	120
tatatccca ataatgcaac aaacttaaaa ctctatata ctcaaaacaa cccattgtat	180
atgtctgtcc taaattcgac aatacacaat cttagattca cctctgacac aacccccaaa	240
ccacttgta tcgtactcc ttcacatgtc tctcatatcc aaggcactat tctatgtcc	300
aagaaagttg gcttgcatg tcgaactcga agtgggtgtc atgattctga gggcatgtcc	360
tacatatctc aagtccatt tgttatagta gacttgagaa acatgcgttc aatcaaaata	420

gatgttcata gccaaactgc atgggttgaa gccggagcta cccttgaga agtttattat	480
tgggttaatg agaaaaatga gaatcttagt ttggcgctg ggtattgcc tactgtttgc	540
gcagggtggac actttggtgg aggaggctat ggaccattga tgagaaacta tggcctcgcg	600
gctgataata tcattgatgc acacttagtc aacgttcatg gaaaagtgt agatcgaaaa	660
tctatggggg aagatctctt ttgggcttta cgtggtggtg gagcagaaag cttcggaatc	720
attgtagcat ggaaaattag actggttgct gtcccaaagt ctactatgt tagtgtaaa	780
aagatcatgg agatacatga gcttgtcaag ttagttaaca aatggcaaaa tattgcttac	840
aagtatgaca aagatttatt actcatgact cacttcataa ctaggaacat tacagataat	900
caagggaaga ataagacagc aatacacact tacttctctt cagttttcct tgggtggagt	960
gatagtctag tcgacttgat gaacaagagt tttctgagt tgggtattaa aaaaacggat	1020
tgcagacaat tgagctggat tgatactatc atcttctata gtggtgttgt aaattacgac	1080
actgataatt ttaacaagga aattttgctt gatagatccg ctgggcagaa cgggtgcttc	1140
aagattaagt tagactacgt taagaaacca attccagaat ctgtatttgt ccaaattttg	1200
gaaaaattat atgaagaaga tataggagct gggatgtatg cgttgtaccc ttacggtggt	1260
ataatggatg agatttcaga atcagcaatt ccattccctc atcgagctgg aatcttgat	1320
gagttatggt acatatgtag ttgggagaag caagaagata acgaaaagca tctaaactgg	1380
attagaaata ttataactt catgactcct tatgtgtcca aaaatccaag attggcatat	1440
ctcaattata gagaccttga tataggaata aatgatccca agaatccaaa taattacaca	1500
caagcacgta ttgggggtga gaagtatttt ggtaaaaatt ttgacaggct agtaaaagt	1560
aaaacctggt ttgatcccaa taactttttt agaaacgaac aaagcatccc acctcttcca	1620
cggcatcgtc attaa	1635
<210> 6	
<211> 1554	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 6	
atgaatcctc gagaaaactt ccttaaatgc ttctcgcaat atattccaa taatgaaca	60
aatctaaaac tcgtatacac tcaaaacaac ccattgtata tgtctgtcct aaattcgaca	120
atacacaatc ttagattcac ctctgacaca accccaaaac cacttggtat cgtcactcct	180
tcacatgtct ctcatatcca aggcaactatt ctatgtctcca agaaagttag ctgcagatt	240
cgaactcgaa gtggtgggtca tgattctgag ggcattgtcct acatatctca agtcccattt	300

gttatagtag acttgagaaa catgcgttca atcaaaatag atgttcatag ccaaactgca	360
tgggttgaag ccggagctac ccttgagaa gtttattatt gggtaaatga gaaaaatgag	420
aatcttagtt tggcggctgg gtattgccct actgtttgcg caggtggaca ctttggtgga	480
ggaggctatg gaccattgat gagaaactat ggcctcgcgg ctgataatat cattgatgca	540
cacttagtca acgttcatgg aaaagtgcct gatcgaaaat ctatggggga agatctcttt	600
tgggctttac gtgggtgggg agcagaaaagc ttcggaatca ttgtagcatg gaaaattaga	660
ctggttgctg tcccaaagtc tactatgttt agtggtaaaa agatcatgga gatacatgag	720
cttgtcaagt tagttaacaa atggcaaaat attgcttaca agtatgacaa agatttatta	780
ctcatgactc acttcataac taggaacatt acagataatc aagggaagaa taagacagca	840
atacacactt acttctcttc agttttcctt ggtggagtgg atagtctagt cgacttgatg	900
aacaagagtt ttcctgagtt ggggtattaaa aaaacggatt gcagacaatt gagctggatt	960
gatactatca tcttctatag tgggtgtgta aattacgaca ctgataattt taacaaggaa	1020
atgttgcttg atagatccgc tgggcagAAC ggtgctttca agattaagtt agactacgtt	1080
aagaaaccaa ttccagaatc tgtatttctc caaatTTTgg aaaaattata tgaagaagat	1140
ataggagctg ggatgtatgc gttgtaccct tacgggtgga taatggatga gatttcagaa	1200
tcagcaattc cattccctca tcgagctgga atcttgtatg agttatgga catatgtagt	1260
tgggagaagc aagaagataa cgaaaagcat ctAAactgga ttagaaatat ttataacttc	1320
atgactcctt atgtgtccaa aaatccaaga ttggcatatc tcaattatag agacctgat	1380
ataggaataa atgatccaa gaatccaaat aattacacac aagcacgtat ttggggtgag	1440
aagtatTTTg gtaaaaattt tgacaggcta gtaaaagtga aaaccctggt tgatcccaat	1500
aactTTTTta gaaacgaaca aagcatccca cctcttcac ggcatcgtca ttaa	1554
<210> 7	
<211> 1188	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 7	
atgggactct catcagtttg taccttttca tttcaaacta attaccatac tttattaaat	60
cctcacaata ataatcccaa aacctcattt ttatgttata gacaccccaa aacaccaatt	120
aaatactctt acaataattt tccctctaaa cattgtctca ccaagagttt tcatctacaa	180
aacaaatgct cagaatcatt atcaatcgca aaaaattcca ttagggcagc tactacaaat	240
caaactgagc ctccagaatc tgataatcat tcagtagcaa ctaaaatttt aaactttggg	300

aaggcatgtt ggaaacttca aagaccatat acaatcatag catttacttc atgcgcttgt	360
ggattgtttt ggaaagagtt gttgcataac acaaatttaa taagttggtc tctgatgttc	420
aaggcattct ttttttgggt ggctatatta tgcattgctt cttttacaac taccatcaat	480
cagatttacg atcttcacat tgacagaata aacaagcctg atctaccact agcttcaggg	540
gaaatatcag taaacacagc ttggattatg agcataattg tggcactgtt tggattgata	600
ataactataa aaatgaaggg tggaccactc tatatatitg gctactgttt tggatatttt	660
ggtgggattg tctattctgt tccaccattt agatggaagc aaaatccttc cactgcattt	720
cttctcaatt tcttggccca tattattaca aatttcacat tttattatgc cagcagagca	780
gctcttggcc taccatttga gttgaggcct tcttttactt tcttgctagc atttatgaaa	840
tcaatgggtt cagctttggc tttaatcaaa gatgcttcag acgttgaagg cgacactaaa	900
tttggcatat caaccttggc aagtaaatat ggttccagaa acttgacatt attttgttct	960
ggaattgttc tctatccta tgtggctgct atacttgctg ggattatctg gccccaggct	1020
ttcaacagta acgtaatgtt actttctcat gcaatcttag catitttggtt aatcctccag	1080
actcgagatt ttgcgttaac aaattacgac ccggaagcag gcagaagatt ttacgagttc	1140
atgtggaagc tttattatgc tgaatattta gtatatgttt tcatataa	1188
<210> 8	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 8	
atggcagtga agcatttgat tgtattgaag ttcaaagatg aaatcacaga agcccaaaag	60
gaagaatttt tcaagacgta tgtgaatctt gtgaatatca tcccagccat gaaagatgta	120
tactggggta aagatgtgac tcaaaagaat aaggaagaag ggtacactca catagttag	180
gtaacatttg agagtgtgga gactattcag gactacatta ttcacctgc ccatgttga	240
tttggagatg tctatcgctt tttctgggaa aaacttctca tttttgacta cacaccacga	300
aagtag	306
<210> 9	
<211> 1158	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 9	
atgaatcctc ttcgtgctga ggggtccggcc tccgttctcg ccattggcac cgccaatccg	60

gagaacattt tattacaaga tgagtttctt gactactatt ttcgcgtcac caaaagtga	120
catatgactc aactcaaaga aaagtttcga aaaatatgtg acaaaagtat gataaggaaa	180
cgtaactgtt tcttaaatga agaacaccta aagcaaaacc caagattggt ggagcacgag	240
atgcaaactc tggatgcacg tcaagacatg ttggtagtgt aggttccaaa acttggaag	300
gatgcttgtg caaaggccat caaagaatgg ggtcaacca agtctaaaat cactcattta	360
atcttcacta gcgcataaac cactgacatg cccggtgcag actaccattg cgctaagctt	420
ctcggactga gtcctcagt gaagcgtgtg atgatgtatc aactaggctg ttatggtggt	480
ggaaccgttc tacgcattgc caaggacata gcagagaata acaaaggcgc acgagttctc	540
gccgtgtgtt gtgacataat ggcttgcttg tttcgtgggc cttcagagtc tgacctgaa	600
ttactagtgg gacaagctat ctttggatgat ggggctgctg cggtgattgt tggagctgaa	660
cccgatgagt cagttgggga aaggccgata tttgagtgg tgtcaactgg gcaacaatc	720
ttaccaaact cggaaggaac tattggggga catataaggg aagcaggact gatattgat	780
ttacataagg atgtgcctat gttgatctct aataatattg agaaatgttt gattgaggca	840
tttactccta ttgggattag tgattggaac tccatatatt ggattacaca cccagtgagg	900
aaagctattt tggacaaagt ggaggagaag ttgcatctaa agagtgataa gtttgtgat	960
tcacgtcatg tgcgtagtga gcatgggaat atgtctagct caactgtctt gtttgttatg	1020
gatgagtga ggaagaggtc gttggaggaa gggaagtcta ccactggaga tggatttgag	1080
tggggtgttc tttttgggtt tggaccaggt ttgactgtcg aaagagtgg cgtgcgtagt	1140
gttcccatca aatattaa	1158
<210> 10	
<211> 2166	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 10	
atgggtaaga attacaagtc cctggactct gttgtggcct ctgacttcat agccctaggt	60
atcacctctg aagttgctga gacactccat ggtagactgg ccgagatcgt gtgtaattat	120
ggcgtgccca ctcccaaac atggatcaat attgccaacc atattctgtc gcctgacctc	180
cccttctccc tgcaccagat gctcttctat ggttgctata aagactttgg acctgccct	240
cttgcttga taccgaccc ggagaaagta aagtcacca atctgggcgc acttttggag	300
aagcgaggaa aagagttttt gggagtcaag tataaggatc ccatttcaag cttttctcat	360
ttccaagaat ttctgtgaag aaacctgag gtgtattgga gaacagtact aatggatgag	420

atgaagataa gtttttcaaa ggatccagaa tgtatatgc gtagagatga tgacattaat 480
aatccagggg gtagtgaatg gcttccagga ggttatctta actcagcaaa gaattgcttg 540
aatgtaaata gtaacaagaa attgaatgat acaatgattg tatggcgtga tgaaggaaat 600
gatgatttgc ctctaaacaa attgacactt gaccaattgc gtaaacgtgt ttggttagtt 660

ggttatgcac ttgaagaaat gggtttggag aagggttgtg caattgcaat tgatatgcca 720
atgcatgtgg atgctgtggt tatctatcta gctattgttc ttgcgggata ttagttgttt 780
tctattgctg atagtttttc tgctcctgaa atatcaacaa gacttcgact atcaaaagca 840
aaagccattt ttacacagga tcatattatt cgtgggaaga agcgtattcc cttatacagt 900
agagtgtggg aagccaagtc tcccatggcc attgttattc cttgtagtgg ctctaattt 960
ggtgcagaat tgcgtgatgg cgatatttct tgggattact ttctagaaag agcaaaagag 1020
tttaaaaatt gtgaatttac tgctagagaa caaccagtgt atgcctatac aaacatcctc 1080

ttctcatctg gaacaacagg ggagccaaag gcaattccat ggactcaagc aactccttta 1140
aaagcagctg cagatgggtg gagccatttg gacattagga aaggatgatg cattgtttgg 1200
cccactaatc ttggttggat gatgggtcct tggctggtct atgcttcact ccttaatggg 1260
gcttctattg ccttgtataa tggatcacca ctgtttctg gctttgcaa atttgtcag 1320
gatgctaaag taacaatgct aggtgtggtc cctagtattg ttcgatcatg gaaaagtacc 1380
aattgtgtta gtggctatga ttgggtccacc atccgttgct tttcctcttc tgggtgaagca 1440
tctaattgat atgaatacct atggttgatg gggagagcaa actacaagcc tgttatcgaa 1500

atgtgtggtg gcacagaaat tgggtggtgca ttttctgctg gctctttctt acaagctcaa 1560
tcattatctt catttagttc acaatgtatg ggttgcactt tatacatact tgacaagaat 1620
ggttatccaa tgcctaaaaa caaaccagga attggtgaat tagcgcttgg tccagtcatg 1680
tttggagcat cgaagactct gttgaatggt aatcaccatg atgtttattt taagggaatg 1740
cctacattga atggagaggt tttaaggagg catggggaca tttttgagct tacatctaatt 1800
ggttattatc atgcacatgg tcgtgcagat gatacaatga atattggagg catcaagatt 1860
agttccatag agattgaacg agtttgaat gaagttgatg acagagtttt cgagacaact 1920

gctattggag tgccaccttt gggcgggtgga cctgagcaat tagtaatttt ctttgtatta 1980
aaagattcaa atgatacaac tattgactta aatcaattga ggttatcttt caacttgggt 2040
ttacagaaga aactaaatcc tctgttcaag gtcactcgtg ttgtgcctct ttcactcatt 2100
ccgagaacag caaccaacaa gatcatgaga agggttttgc gccacaatt ttctcacttt 2160
gaatga 2166

<211> 1632

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 11

atggagaaat ctgggtatgg aagagacggt atttacaggt ctctgagacc acctctacac 60

ctccccaaca acaacaacct ctcaatggtt tcattccttt tcagaaactc atcttcatac 120

ccacaaaagc cagctctcat tgattccgaa accaaccaaa tactctcctt ttcccacttc 180

aaatctacgg ttatcaaggt ctcccatggc ttctcaatc tgggtatcaa gaaaaacgac 240

gtcgtttctc tctacgcccc taattctatc cacttccctg tttgtttcct tgggaattata 300

gcctctggag ccattgccac tacttcaaat cctctctaca cagtttccga gctttccaaa 360

caggtcaagg attccaatcc caaactcatt atcaccgttc ctcaactctt ggaaaaagta 420

aagggtttca atctccccac gattctaatt ggtcctgatt ctgaacaaga atcttctagt 480

gataaagtaa tgacctttaa cgatttggtc aacttaggtg ggtcgtctgg ctcagaattt 540

ccaattgttg atgattttaa gcagagtgc actgctgcgc tattgtactc atctggcaca 600

acgggaatga gtaaagggtg ggttttgact cacaaaaact tcattgcctc ttctttaatg 660

gtgacaatgg agcaagacct agttggagag atggataatg tgtttctatg ctttttgcca 720

atgtttcatg tatttgggtt ggctatcatc acctatgctc agttgcagag aggaaacact 780

gttatttcaa tggcgagatt tgaccttgag aagatgttaa aagatgtgga aaagtataaa 840

gttaccatt tgtgggttgt gcctcctgtg atactggctc tgagtaagaa cagtttggtg 900

aagaagttta atctttcttc tataaagtat attggctctg gtgcagctcc ttggggcaaa 960

gatttaatgg aggagtgcct taaggttgtt ccttatggta ttgttgctca gggatatggt 1020

atgacagaaa ctgtgggat tgtatccatg gaggatataa gaggaggtaa acgaaatagt 1080

ggttcagctg gaatgctggc atctggagta gaagcccaga tagttagtgt agataactg 1140

aagcccttac ctctaatac attgggggag atatgggtga aggggcctaa tatgatgcaa 1200

ggttacttca ataaccaca ggcaaccaag ttgactatag ataagaaagg ttgggtacat 1260

actggtgatc ttggatatat tgatgaagat ggacatcttt atgttgttga ccgtataaaa 1320

gagctcatca aatataaagg atttcaggtt gctcctgctg agcttgaagg attgcttgtt 1380

tctcacctg aaatactga tgctgttggt atccatttc ctgatgctga agcgggtgaa 1440

gtcccagttg cttatgttgt gcgctctccc aacagttcat taaccgaaaa tgatgtgaag 1500

aaatttatcg cgggccaggt tgcactcttc aaaagattga gaaaagtaac atttataaac 1560

agtgtcccga aatctgcttc ggggaaaatc ctgagaagag aatcattca gaaagtacgc 1620

tccaacatgt ga	1632
<210> 12	
<211> 1458	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 12	
atgtctttta tgatgagcat gaatccttct cctcctcgc caccgccacc gttatcgtcg	60
ccgtcggaat cttcctcaac gccgtcaaca ctgccagtc gtacgatccc gggaagctac	120
ggatggccgt tactggggcc catctcggac cggttagact acttctggtt ccaaggccca	180
gatacgtttt tcagaaaaag agtagagaaa tacaagagca cagtgttccg taccaacata	240
ccccgacct ttcttttctt cagcgttaat ccgaacattg tggccgtgct ggactgtaaa	300
tcattttctc atcttttcga catggaaatt gtcgagaaaa agaattgtct tgttggagat	360
ttcatgcccc gtgtcaatta cactggatgat attagggttg gagcttatct cgacacttct	420
gaaccacaac acgctaaggt taagaacttc gcaatggatg tactaaaaca aagctcgaag	480
atatgggtgg gagaactgac atcaaatctg tcgacgatgt gggacacaat agaaaaagac	540
gtatctgaga aatcatcctc atcctactta gccccacttc aaaagtctt gttcaacttc	600
ctggtcaagt gtctaattgg tgctgacct tccaactccc ccaagattgc agagtctggc	660
tacatcatgc tcgaccgatg gttagccttc cagctccttc ccactatcaa gattgggatc	720
cttcagcttc ttgaggagct ttccattcac tcttttgct atcctttttt ctgggtcagt	780
ggtgactaca ataacctctc cagttttgta gaggaatatg gtaagaaat agtagcgaga	840
ggtgaaaccg agttcgggct gagtaaaca gaagcgattc acaaccttct cttcattttg	900
ggtttcaacg cttcggggg attctctata ttctaccga gcctactggg caccgtggcg	960
agtacacaa ccgatctaca acaaagactg gtcaaagaag tcagacaaaa tggcgggtca	1020
actctgacgt ttgactcat caaagaaatg ccactcgttc aatcggtcgt gtacgagact	1080
ctccggctca atccacctgt tccgtccaa ttcccgagg ccaggaagga cttccggctc	1140
agctcgcacg acgcggcctt cgaggtgaag aaaggcgagc tcctatgcgg gtttcaaagc	1200
cttgttatga gggacccaaa aatattctcg gaaccggagt cgttcattgg ggaccggttc	1260
atgaaagata aaggtctctt agattatctt tactggcca atggacctca aaccggtgtg	1320
cccagctca ccaataagca atgcgcggga aaagatatcg tcacgttac ggcttgtttg	1380
atcttggctt acaccttcgc tcgttatgac tccatcagcg ggagctcaag ttcaatcaca	1440
gcccttaaaa aggcttaa	1458

<210> 13
 <211> 2787
 <212> DNA
 <213> Cannabis sativa
 <400> 13

atgttgaagc ctccatca agtagttcaa aatttgaaat atgagaaaac cctagtcttt 60

ttgaacaagc cattcatcca tggctacaac ggggttatta tcggtgtcaa ctctcggcta 120

tttccagtaa aacctaaaac caaaagacga gtcgttcat catcatcatc atcatctccc 180

ggaacaaaa acattattaa agcttcttta ttttctccaa tggagaagaa gaatacagct 240

agggtttcgg ttagtgtggc ggtacaacgt gtgactccaa agttttggag atttgaattg 300

tctgagaaaa tccaagatgg acgtgatagg cttgaggatc ttctagggtt aaactcttta 360

agtattgagc ttgttagtac tcaaaaagat ccagtaacgg ggaaagagcg aacggttaaa 420

ggttttccaa aaaggcccaa ctttaacata ttttcatcaa gtgatgtaaa atacgaagcg 480

aaatttgaca taccaaaaga ttttggagaa gtgggtgcta taatcgctga aaatgatatt 540

gaaagagaaa tattttttaa gaattattata ctgaagact tgccctccga accaagcacc 600

cttgaattct cttgcaactc gtgggttcag tccaaacatg atgtccctac tgatcaaacac 660

aagagagtct tcttctctaa taagtgttac ctaccatcac aaacaccaag tgggataaaa 720

gaattgagaa aaattgcatt ggaaaatttg agaggagatg gaaaaggaga gaggaagaag 780

aatgaaagag tttatgatta tgatgtgtat aatgatcttg gacaaccgga caacaatgat 840

gacctaaaaa gacctattct tggcggatca aaagaattcc cttatcctag gcgtttgtaga 900

accggacggc ctccaactga aactgatcca ttatctgagt caaggattag tgatttttat 960

gtaccaagag atgaagaatt tgcagaagtg aagcaaagta attttagttt gaagactgta 1020

tactcagtaa tacatgcagt gattccata ctgagacaag tcttaattga tgaaaatttc 1080

ccatacttca ctgccattga tgttctctat gatgaaggca ttaaaatccc ttctaagtct 1140

gaaaagacct taattcaaac catcaaaaat gtcaatgcaa gaatatacaa aactgtttct 1200

gatgctgatg attttttaca gtttcagcag cctccaacca tggacaagga caaattcttc 1260

tggtttagag atgaagagtt ttgtagacaa actattgccg gtctcaacc ttgctgcatt 1320

gaattggtta aggagtggcc tttgaaaagt gaacttgacc ccacaatcta tggcccacca 1380

gagtcaaaaa tcaccacaga attggttgag aaattcatca aagtatatgg ctacaataat 1440

attaatgagg ctttaaaaga aaaaaaattg ttcatgttgg attaccatga tgtattatta 1500

ccatatgtta gcaaagtaag ggaactggaa aataaaacct tgtatggatc aagaacactt 1560

tttttcttga ctccctatgg tacattgttg cctttggcca ttgaattgat tcggccaccg	1620
atggatggta agccgcaatg gaaggaagtc tacaccccg tgaattggca ttctaccgat	1680
ctttggcttt ggagactcgc aaaagctcat gtccttgctc atgattccgg tgttcatcaa	1740
ctcgttagtc acitggctaag aacacattgt gcagttgagc cataataat tgcaacaaat	1800
agacaattga gtgcaatgca tcctatccat agattattga agccacattt tagatacaca	1860
atggagatta atgctcttgc tcgagaaagt ttgatcaatg caggtggat catcgaaaca	1920
gcatttgcac ctggaaaata ttctatggag ttaagctccg tcatgtacga caaacaatgg	1980
cgattcgatc tacaagcatt gccagctgac ctaattcata gaggaatggc tgttggaggac	2040
aaggatagtg aacatgggtg aagagtaata attgaagatt acccttacgc caacgacggt	2100
cttctcatat ggagctccat caaacaatgg gttactgact acgtcaacca ctactaccct	2160
acctccagtg aggtagagcg cgacgaagaa ttacaagcat ggtggacaga gatcagaact	2220
gtaggtcacg ctgacaagaa agacgcacct ggggtggcctg acttaaaaac gaaacaagat	2280
ctcatagaca ttgtcacaaa catggcatgg acagcatcag ctcaccatgc agctgtcaac	2340
tttggacaat atgcttacgc tggctatttc cctaaccgac caaccataac aagaactgtt	2400
atgccgtcag aagagaagga gtataacctt gatgcgtgga aacacttcaa aaatagtcct	2460
gaagacgccc ttttgaagtg cttacctacg caattacaag caggcctagt tgtggccgtg	2520
ttagacgtgt tgtctactca ctgccagac gaagagtatc ttggagacaa gatggaaccc	2580
tcgtggggct cgaatcttgt tatagcggaa gcttttaatc ggttcaataa gaggatgaac	2640
gagattgaaa gtatcattaa tgaaaagaat gataatgaga atttaaggaa tagacatgga	2700
gctggaattt tgccttatga actttctcaag cccttttctg agcctgggtg cactaacaag	2760
ggtattccat atagcatatc tatttga	2787
<210> 14	
<211> 1134	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 14	
atgggagccg gtggcaaaaa tagtagactt gagcgagcac cacacaccac accaccattc	60
acactaagcc aactcaagaa agccattcca ccccatgtct tcaaccattc tcttcttctg	120
tccttctctc atgtccttca agaccttttt ttctcctttt tgttctacta catagcaacc	180
tcttacttcc atcttctccc acaccgctc caatacttag cttggccact ttattggatc	240
ttccaaggca gcatttttgc tggatatttg gtccttggtc atgattgtgg tcaccaagct	300

ttcagtgaacc accaatgggt ggatgacacc gttggctttg tccctccactc cgctcttctc	360
ttcccatact tctcttttaa gtatagtcac cgtcgccatc attcaaacat cggtccctt	420
gaacatgac aattgtttgt tccagtcacc gaattcctaaa tcgcatggct ctacaaacgt	480
tacttggaac atccactagg aagagcccta aagctttcca ctatagtgtt ccttggtttt	540
cctttgtact taggtttcaa tcttacaggc aaaccatatg atcgttatgc atgtcattat	600
gacccctact ctccactcta ctcaaaaagt gaaaggttc atatattgat ttcagatata	660
ggtgttttca tcaccacatt agtgtttatc cagcttggct cgactaaagg gttgagttgg	720
cttgtgttca tgtatggggt gccattgttt acagggaata gcacccctgt gacaatcgca	780
tacttgaac atactcacc ttcatgtcct cattatgact cgtcagagtg ggattggttg	840
aaaggagcat tgtcaacaac tgatcgaaac tatggatcaa ttctcaatag ggttttccat	900
cacctacag atgctcatat ggcacacat ttattcgca caatacctca ctacatgca	960
aatgaagcca ccaaagtat caaatccata ttgggagaat actactcttt tgatgatact	1020
ccaataatta aagctctttg gagagagact aaggagtgtg tctatattga gccaaatcat	1080
gaatcttctc ctaataataa caaagggttt ttctggtaca acaacaagtt ctga	1134
<210> 15	
<211> 1113	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 15	
atgagcactg taaatctcac atgggttcaa acctgttcca tgttcaacca aggaggtaga	60
tccagatcct tatcaacttt caatctcaat ctctaccacc ctttgaaaaa aacacccttt	120
tcaatccaaa ccccaaaaaca aaaacgacc acttcacat ttctcatcaat ctacagctgtt	180
ctaaccgagc aagaagccgt taaagaaggc gatgaagaaa aatccatctt caatttcaag	240
tcttacatgg tccaaaaagc caactcagtc aaccaagctt tagactcagc cgttttgctc	300
agagatccca ttatgatata cgagtcctatg cgttactcac tctcgccgg agggaaacga	360
gtcagacca tgctctgtct ctacgctgt gaactcgtag gcggaaaaga atccgtagcc	420
atgccggtg cctgcgctgt cgaaatgatc cacacatgt ctctaacca cgacgacctc	480
ccttgatagg acaacgatga cctcgccgt ggaaagccca caaaccacaa agtcttcgga	540
gaagacgtgg ccgttttagc cggcgatgca cttttagcct ttgcttttga gcacatggcg	600
gtctctaccg ttggtgttcc ggcagccaag attgtcaggg cgattggtga gcttgctaag	660
tcaattgggt cagaaggatt agtggtgtgt caagtgttg atattgattc agagggtttg	720

gctaagtgtg ggcttgaaca acttgagttc attcatctcc ataagactgg ggctcttcta 780
gaagcttctg ttgttttggg ggctattctt ggtgggtgta cagatgaaga agttgaaaaa 840
cttaggagct ttgctaggtg tattggcttg ctttttcagg ttgttgatga cattcttgat 900
gtgactaaat ctctcaaga attgggtaaa actgctggga aagatttggg ggctgataag 960
gttacttate caaggctaata gggatttgac aaatcaagag aatttgctga gcaattgaac 1020

acagaagcca aacagcatct ttctggtttt gatcccataa aggetgctcc ttttaattgct 1080
ttggctaatt atattgctta taggcaaaat tga 1113

<210> 16

<211> 948

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 16

atggcggttt ataactatc aattaattgc agtccaagat ttgttcatca tgtttacgtt 60
ccacatttca catgtaaatc caataagtcg ttaagtcacg tacccatgag aataaccatg 120
tccaaacagc atcatcatc ttattttgcc tccacaacag ccgatgtaga tgcccatctc 180
aagcaatcca tcatatcaa gccaccactc tcagttcacg aggccatgta caatttcac 240

ttttccacac ctccgaattt agcacgtca ttgtgcgtgg cggcgtgtga gcttgtcggg 300
ggccaccagg accaggccat ggcagcagcc tccgccttgc gcgtcatcca cgcagccatc 360
ttactcatg accacctccc tttaacgggc aggcccaatc caacaagtcc tgaggcagcg 420
accacaatt cttaacaacc aaatattcag ctcttctc cggacgcaat tgtacctttt 480
gggttcgaat tgttggccaa ttctgatgac cttaaccata ataaatcaga tcggattttg 540
cgggtcattg tagagttcac acgcaccttt ggatcacgag gaactattga tgctcaatac 600
catgagaagc tagccagtag atttgacgtt gatagtcag aagccaaaac tgtcgggtgg 660

ggccattatc cctctttgaa gaaggaaggt gcgatgcatg catgcgctgc tgcattgtggg 720
gccattcttg gagaggcaca tgaagaagag gttgagaagt tgagaacttt tggcttttat 780
gtgggcatga ttcaaggata tgccaataga ttataatga gcagcacaga agaaaagaaa 840
gaagcagata gaatcatcga ggagttaacc aatttgctc gccaggaact aaaatatttc 900
gatgggagaa acttagagcc attttcaacc tttctttttc gtctatag 948

<210> 17

<211> 705

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 17

atgggagact ctgccgacgc tggaatggac gctgtccaga gacgccttat gtttgatgat	60
gaatgcattc tagtggatga gaatgaccga gttgttggtc atgatacaaa atataactgt	120
cacttgatgg aaaagattga aaaggataat ttgctacaca gggctttcag tgtgttcttg	180
ttcaactcaa aatatgagtt gcttcttcag caacgttctg caacaaaggt aacattccct	240
cttgtgtgga caaacacctg ttgtagccac ccgctctacc gtgaatctga gcttatcgat	300
gaggagtccc ttggagcaag gaatgcagca cagagaaagc ttttagatga gctgggtatt	360
cctgtcgaag atgtgccagt tgatcaattt accccactag gcaggatgct gtacaaagct	420
ccttctgatg gcaaatgggg cgagcatgaa cttgattacc tgctcttcat cgtccgggat	480
gttagtgtca atccaaatcc agatgaagta gctgatatca agtatgtaaa ccgggacgag	540
ttgaaagagt tgttgaggaa agcagatgct ggggaaggag gcttgaagct atccccttgg	600
ttcagactgg ttgtggataa tttcttgttc aagtgggtgg accatgttga gaaaggcaca	660
cttaaggaag ttgctgatat gaaaaccatt cacaagttga cttaa	705

<210> 18

<211> 2157

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 18

atggcgtttt gtgcattatc atttctgct catattagcc gggcaactac accagcacct	60
tcagatcttc acaaatctag ttctttctct tctcggtttt attggggagc agatctgctg	120
aggccatctc aatacaaggt caggaaaata caaagtgggg tttatgcac actgtcagaa	180
agtggagaat atcactcaag gagaccacca actcctctct tggacaccat aaattatcca	240
attcatatga aaaatctctc tgtaaggag cttaaacac tatcagatga actaaggtct	300
gatgtcatct tcaacgttcc taacaccggg ggtcacctgg gctcaagcct tgggtgtgtt	360
gagcttactg tggtcttcca ttttgtcttc aatactctc aggataggat actatgggat	420
gttggtcac agtcttacc tcataaaatt ctgactggaa gaagagataa gatgcacacc	480
atgaggcaga ccaacgggtt agccggattc actaagcgg ctgagagtga atatgattgt	540
tttgggactg gtcatagttc taccaccatc tcagctggct tgggaatggc tgttggaagg	600
gatcttaaag gaagaaagaa taatgttgtg gctgtcatag gtgatggtgc catgacagca	660
ggtcaagctt atgaagccat gaataatgcc ggttaccttg attccgacat gattattatt	720
cttaacgaca ataaacaggt ttctttacct actgcctctc ttgatgggcc cataccacct	780

gttggagctt tgagtagtgc tctcagtagg ctgcaatcaa acaggcctct tagagaacta	840
agagaagtag ccaagggagt tactaaacaa ataggtggat cagtacatga attggctgca	900
aaagttgatg aatatgctcg tggaatgata agtggttctg gctcaacatt gttttaggag	960
cttggactct attatattgg tccagttgat ggtcacaata tagatgatct tgtttccata	1020
ctagaggagg ttaagagcac taaaacaaca ggtccagtct tgatccattg catcactgag	1080
aaaggaagag gatatccata tgcagagaaa gctgctgata agtatcatgg ggtggccaag	1140
tttgatccag caactggaaa gcaattcaaa ggcaattcta acacacagtc atacactaca	1200
tactttgctg aggcctttgg tgcagaagca gaggcagaca aagatgttgt ggccatccat	1260
gctgcaatgg gtggtggaac aggccttgaat ctcttcttc gccgttttcc aacaagatgt	1320
tttgatgttg ggatagcaga acagcatgct gttactttcg ctgctggttt ggcttgcgag	1380
ggccttaagc cgttttgtgc aatttactca tctttcatgc agcgagccta tgatcaggta	1440
glacatgatg ttgatttgca gaagttgccg gtgagatttg caatggacag agctggactt	1500
gttggggccg acggccctac acattgtgtt gcttttgatg ttactttcat ggcatgcctc	1560
ccaaacatgg ttgtgatggc tccttccgat gaggcagagc tcttccacat ggttgccacc	1620
gctgctgcca tagatgacag accaagttgt ttccgttacc ccagaggaaa tggaaattggt	1680
gttcattac ctcaaggga taaaggaact cctcttgaga tcggaaaagg cagggtattg	1740
gttgaagggg aaagagtagc acttctaggc tatggaacag cagttcagag ttgtttggct	1800
gctgcgcct tagtagaacc tcacggtcta cggctaacag ttgctgatgc acgattttgc	1860
aagcctttgg atcatgccct cattcgcgaa ctagegaaaa atcacgaggt ttgattaca	1920
gtggaagaag gatctatagg aggtttttgga tctcatgttg ctgagtttat ggcccttgat	1980
ggccttcttg atggaaaaac aaagtggaga ccaattgttc ttctgaccg atacatcgac	2040
cacggttcgc ctgctgatca atatgtcgac gcgggtctca cgccacctca cattgcagcc	2100
acagttttca atgtactagg acaacaaga gaggccttga aggttatgac aacatga	2157
<210> 19	
<211> 2142	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 19	
atggcggttt ctggttcatt cattgtacca aatcattcat tcctttcaca acttaaatct	60
ccacagccat attacagttc caacaacag ttgagtttaa gggtagagagg atctctttgt	120
agctcagatg atggggaagg aaaattcatc agcaaagaaa aagatgaatg gaaaatcaag	180

tattccagtg aaaaaccaat cactccattg cttgatacag tcaattaccc agttcacatg	240
aagaatttat ccacacagga tcttgaacag ctgacagcag agcttagagc agatgtagtc	300
catacagtat caaaaacagg tggatcatctg agtgcaagct tgggagttgt ggagctcact	360
gtagcactgc atcatgtttt caatacccct gatgataaaa tcatatggga tgttggacat	420
cagacatacc cgcataagat tcttacagga aggaggtctc aaatgcatac cattagaaag	480
acttctggtc tagcagggtt tcccaaaaga gatgagagtg tttacgatgc tttcggtgca	540
ggtcacagtt ctacaagcat atcagcaggc cttggcatgg cagttgccag ggatcttctg	600
ggaaagaaga acagtgttgt ttctgtgatt ggagatgggg ccatgactgc aggaatggca	660
tatgaagcca tgaataatgc cggctacttg gacgccaact tgattgttgt attaaacgac	720
aataaacaag ttcttttacc aactgctact cttgatggtc ctgcaacccc agtgggagct	780
ctaagtggtg ctttgactaa gcttcaagca agcaccaagt tcagaaaact tcgcgaagct	840
gcgaaaacca tcacaaaaca aattggaggg ccagcacatg aagttgcagc taaagtagat	900
gagtatgcta gaggaatgat aagtgttctt gggtaacac tctttgagga gcttgggttg	960
tattatattg gtccggtgga tggacataat gttggagatt tagtcacat ttttgagaaa	1020
gtgaaatcaa tgccagcgcc aggaccagtc ttgatccaca tcgtcacaga gaaagggaaa	1080
ggctatcccc cagctgaagt agcacctgat aaaatgcatg gatttgtaaa gtttgacca	1140
acaacaggaa agcaatttaa gtccaaatcg tcgacacttt catatactca atactttgct	1200
gaatctctaa taaaagaagc tgaagaagat gacaagattg ttgccataca cgcagcaatg	1260
ggtgggtgga ctggtctcaa ttatttccag aagaaatttc ctgatcgttg ctttgatgtg	1320
gggattgctg agcaacatgc tgtcacgttt gcagctggat tagctgcaga gggcttcaaa	1380
ccattctgtg ccatatactc atcattctct caacgaggat atgatcaggt tgcacatgat	1440
gtagaccttc aaaaattacc tgtccgtttt gcattggata gagctggcat ggttggcgca	1500
gatgggccta cccactgcgg tgcatttgat atcacctaca tggcctgctt gcccaacatg	1560
gttgtcatgg ctccatcaga tgaggtgaa cttatgcaca tgggtggccac agcaacagct	1620
atagatgaca gaccagttg cttcagggtt ccaaggggca atggaattgg agcaaagctt	1680
ccagctaata ataaaggaac tatacttgag attggaaaag gcagaatatt aatggaaggc	1740
agcagagtag ctattttggg ttatggttct attgttcagc aatgtgtgga agctgcaagc	1800
atattaaaga aacaagacat ttcagtgaca gtagctgatg caagattttg caaacattg	1860
gatacaaatc tcataagacg gttagccaac gagcatgaaa tcctaatac tgccgaagaa	1920
ggttctattg gaggccttgg gtctcatgtg tcacacttc taagcttaag tggacttctt	1980

gatgggtctt taaagttgag agcaatgggt cttcctgata gatacattga ccatggatca	2040
ccccaaagatc agactgaaac agccgggctc tcctcgaggc atatatctgc aacagtctta	2100
tctctcttgg ggaagcccaa ggaagcactt cagttcatgt aa	2142
<210> 20	
<211> 1425	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 20	
atggctctga acttgttata ccagctgaa gtgaaggctc tatccttttt ggactccacc	60
aagtccacc gcttcctaa gctgtgtcca ggtggaatta ctttgcataa aaaggattgc	120
agagtaccac ttagaagaag agttcattgt tcgttgcagc aacctctcc agcttggcca	180
ggaagagcta ttccagagca agatctttgt aattggaatg tcccaaagcc tatatctatt	240
atggctctga ctggctctat aggaactcag aactggaca ttgtggcaga gaatccagat	300
aaattcagaa tagtgggact tgcagctggt tcgaatgtga cacttcttgc agaccaggtg	360
aagagattca agcctcaaat agttgtctct agaaatgaat cattaattgg tgaactaaaa	420
gaggccttag ctgatgtgga agaaatgcc gaaattattc ctggggaaca aggagtaatt	480
gaggttgccc ggcaccaga tgcagtcaca gtggttacag gaatagtagg ttgtgctgga	540
ttacagccta cagttgtctg aattgaggca ggtaaacaca tagcttttagc caataaagag	600
acctgattg ctggaggtcc attcactctt cctctagctc acaagcataa cataaaaatt	660
cttctgccc attcagaaca ttcggcaata ttccagtgt tccagggtt gcctgatggt	720
gcactacggc gtatcatttt gacagcatct gggggagctt tcagagattg gccggttgaa	780
aagctaaaag atgttaaggt tgctgatgct ctgaaacatc caaactggcc gggatatggga	840
aagaaagtca ctattgattc tgctaccctt ttcaacaagg gtctggaagt cattgaagcc	900
cattatctat tcggagcaga ctatgacgat attgacattg tgattcaccc agaagctatt	960
atacactcta tgattgaaac acaggattct tctgttctgg ctgagtagg gtggcctgac	1020
atgcatatac cgatttctta tactatgtca tggccagaca gaataactg ttctgaagta	1080
acttgccctc gacttgatct ttgcaagctt ggttcgtga ccttaggag tcctgacaac	1140
cagaagtacc catccataga tcttgccctat tctgctggac gtgctggggg caccatgact	1200
ggagttctca gtgcagccaa tgagaaagct gtagagatgt ttattgatga gaagataagt	1260
tatcttgaaa tcttcaaagt tgttgagcta acatgagaca agcatgac agagatggtg	1320
acttcacctt ctcttgatga aattatccac tatgactcgt gggcacgaga gtatgcaact	1380

actagtttga agagtctctc cagtccaaga cctgttacag catga 1425

<210> 21

<211> 918

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 21

atggcgttac ttgcaatgga ccttactttc tcttctgctt ctctttcttc ttcttcttac 60

aatgtctctc ctctactatt tcttcttatt cgcccatcct ctcaatccat tgttcgattc 120

ccagtccatg aggtgggatt cagggggaaa tgcagaattt ccaagataag gttcgctcgc 180

tgctctgcaa atgttggcca aaagcctggg gttgtggaaa agaaaagcgt ttcggtggtt 240

cttctggcag gtgggaaggg taaacggatg ggggccaaca tgccaaagca gtatcttcca 300

cttttagggc aaccaattgc actgtatagc ttctacactt tttctaaaat gattgaagtg 360

actgaaattg ttgtagtttg tgatccctct tacgaggata tctttgaaga ttccaaagtc 420

aagatccatg ttggacttaa attcgtcttg cctggaaagg aaagacagga ttcagtttat 480

agtggacttc aggcaattga tccaaactct aagcttgtgt gcattcacga ttctgctaga 540

cctttggtaa caacagaaga agttaaaaag gtcattgaag atggttggtt gcatggagca 600

gctgtacttg gtgttctgt caaagctaca atcaaagagg caaacaatgc atcttttgta 660

actaaaacgt tggagaggaa aaaactttgg gaaatgcaga caccacaggt gatcaaacc 720

gagttgctca aggaaggatt tgagcttgta aatagggaaa atctggaagt gactgatgat 780

gtgtctatag tggaacacct tggacatcct gtatatataa ctgaaggtgc ttacaccaac 840

atcaaggtta ctactccaga tgatttattg ctgctggaga gattattgag tatgaactct 900

gtgaaggctg ttgcataa 918

<210> 22

<211> 1197

<212> DNA

<213> Cannabis sativa

<400> 22

atggcttctt ctcatattct ctgccacaac aacgttttta atctttctcc caatcctttt 60

aggaacaggg gtctctcttc cttaactca aatgggtttt gtttttttgg ttcgaaatct 120

agaatttcga ggccttcac tctcaaaatt gtggtttctg aaagaagaca agttgagata 180

gtttatgatg ctgatgaaag gataaacaaa ttggctgatg tagtggacaa ggaagcgcct 240

ctttctaggc tcactctttt ctcaccttgc aagattaatg ttttcttgag aataactagc 300
 aaaaggaag atgggtatca tgatttggca tcctctttc acgtgataag tcttgagat 360
 gtgcttaagt tctctttgtc tccttcaaca aagaaagatt ctttgtcaac gaatgcctct 420
 ggggtaccac ttgatgatag aaatttgatt atcaaggccc ttaatcttta ccgaaagaaa 480
 actggtacaa acaataactt ttggattcat ctgacaaga aagtgccac tggagcaggg 540
 ctaggtggtg ggagcagcaa tgctgcaaca gccctatggg cagcaaatca gttcaatggt 600

tgtcttgta ctgaaaagga attgcaagaa tggcaagtg agattggtc agatgttcct 660
 ttctttttct cccaaggggc agcctattgt acaggtcgag gtgaggttgt tcaggatatt 720
 ctaccacctg taccattaaa cattcccatg gttctcataa agccccaga agcatgttca 780
 acagccgaag ttataagcg ttttcggttg gataaaacca gtaatagtga tcctttacaa 840
 ttgtccaca agatctcaag tgatggaata agtcaagatg tctgcatcaa tgacttagaa 900
 cctcctgcct ttgaagtctt tccatctctt aagagattga aacagcgtat aattgcagct 960
 agtcgtggac aatatgatgc tgtttttatg tctgggagtg gaagcaccat tgcggggtc 1020

ggttccccag atccacctca gtttatatat gatgatgagg actacaagga tgtgtttttg 1080
 tcagaggcca actttctgac tcgagaagca aatgaatggt acaaagaacc tgcttcagct 1140
 agcgttcta gcccttcaga tgatttctct cgtaattttt cctcctctgt cgagtaa 1197

<210> 23
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Cannabis sativa
 <400> 23

atggcggcgg cgacggcaac accactctgt gcttcaactc ttccaccaca ctactccaat 60
 acctccccc aatcattcaa tcactcccat ttcacagtcg cagttcccag aaatctcttc 120
 tcatcgtcct caatttcate tctaagacaa tcgaaaacga cgccgcttcc ggctctgcct 180

tctgtatcgg ccgccgcgac caccgctttg aacgtgagc aagctccgtc tgaggatatct 240
 gctactccct caaaggtctt tccttttcgg gttggtcatt gggttgacct tcatcgattg 300
 gagcctgggt atcctttgat aattggaggt attaatatac ctcatgagaa aggttgcgaa 360
 gctcattctg atggggatgt tttgcttcat tgttagttg atgctatttt ggggtgctttg 420
 gggcttctctg atatttgtca aattttccct gattctgac ccaaatggaa aggggctgca 480
 tcatcagttt tcatcaaaga agctgtgaga ctgatgatg aggcaggtta tgagcttgga 540
 aatttagatg caacattaat tcttcaaaga ccaaagttaa gtccacacaa ggaagctatc 600

agagccaact tgictgaact tctaggagct gaccctgcag ttgttaatct gaaagcgaaa	660
actcacgaaa aggtcgaatag tctcggggaa aatcgaagca tcgctgctca cactgtggtt	720
cttcttatga aaaaatag	738
<210> 24	
<211> 2229	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 24	
atggcttctg gagctgtacc agcatcaatt tcatgtctga aaagcagaga ctctggcttg	60
agctttgcta aaagtctga ttttgtgagg ctttctgatt taaagagggt tggttcatct	120
agaacaagag tttcagttat ccgaaattcg aatcctgggt cagatattgc tgaacttcag	180
cttgcatcaa aaggaagccc tctattagtt cctagacaga agtactgtga atccttacac	240
aaaactgtta ggaggaaaac gcgaactgtg atggtgggaa atgtggctct tggcagttag	300
catccataa gaattcaaac gatgacgaca aatgatacca aggatgttgc tggaaacagtt	360
gaagagggtga tgagaatagc tgataaggga gctgatatg ttcggataac agttcaggga	420
agaaaagaag cagatgcttg tttcgaaata aaaaattcac ttgtgcagaa gaattataat	480
atactcttg tggcagatat tcattttgc cccccagttg cattaagagt tgctgaatgc	540
ttcgataaaa ttcgtgtcaa tcctggaaat ttcgctgaca gacgggctca gtttgagacg	600
ctcgagtaca cagacgacga ctatcagaaa gaacttgagc atattgagca ggttttttct	660
ccattgggtg agaaatgtaa gaaatatggt agagcaatgc gtatcgggac aaacatggg	720
agtctttcag atcgatcat gagctactat ggagattctc caagggaat ggttgaatct	780
gcatttgagt ttgcaaggat ttgccggaag ttggatttcc ataattttgt gttttcgatg	840
aaagcaagca acccagttgt catggttcag gcgtatcgtc tacttggtgc tgaaatgtat	900
gtccagggtc gggactatcc acttcacttg ggagttactg aagcgggaga aggtgaggat	960
ggacgaatga aatctgcaat tggcatcggg acccttcttc aggatggttt gggtgatact	1020
atcagggttt cactcaccga accgcccag gagagattg atccctgcag aaggttggcc	1080
aatttgggta caaaagcagc tgatcttcag caaggagtgg ctccatttga agagaagcac	1140
aggcattatt ttgattttca acgacgaact ggtcaactgc ctctacagaa ggagggcgat	1200
gaggttgact atagagggtc tctgcaccgt gatggttctg ttctcatgtc agtgtctctc	1260
aataacttaa agatgccga gtcctatac aggtcactag cagcaaagct tgcgtcggg	1320
atgccattta aggatctggc aacagtagac tccatcttat tgagacaact tccacctatt	1380

gacgatgaca acgctcgtatt agctctcaaa agattgatag acataagtat gggggtcata	1440
actcctttgt cggagcagct aacaaagcca ttgccaaatg ctatggtttt ggtaaatctt	1500
aaggagttaa catctgggtgc acacaagctt ttgccagaag gcacgcgttt ggttgtatcc	1560
ttgcgcgggtg atgaacctta cgaagaactg gagattctca aaggggttga tgatgttgtt	1620
atgattcttc atgatcttcc gttcgatgaa cataaaatta gcagagtcca ctcagcaaga	1680
agattatitg agtatctatc agataattct cttacttctc ctgtaataca ccacattcaa	1740
tttccaaatg gaatccacag ggatgactta gtcacgggtg caggtagcaa cgctgggtgcc	1800
cttttagtag atggactcgg ggacgggtatc ctcttagaag cccagatca ggatttcgat	1860
tttcttagaa atacttcttt caacctactt caaggttgta gaatgcgaaa taaaaagacg	1920
gagtatgtct cgtgcccatc ctgcggtaga actttgtttg accttcaaga aatcagcgca	1980
gagattcgag agaagacatc acacctgccc ggtgtctcaa ttgcaatcat ggggttcatt	2040
gttaatggac ccggagagat ggctgatgca gacttcggtt atgtcgggtg tgctcccga	2100
aagattgacc tttatgttgg aaagacggta gtgcagcgtg gaatcgcaat ggaacaagcg	2160
accgatgcat tgattcagct aataaaagat catggccgat gggttgaacc accctcggac	2220
gaagaatga	2229
<210> 25	
<211> 1383	
<212> DNA	
<213> Cannabis sativa	
<400> 25	
atgtcgatca ctttcagct ctgccggatt ccaatccgta ccgacctcgc cttggcggag	60
cctctctccg taaccggaac cctccgctgc cggaaacctt tcgtcatccg atgcgccggc	120
gagtcacttt caacggcagc agattctgat ttcatgcca aagtgttccg taagaacttg	180
gtccgaagca agaactaca tcggaaaggt ttggccata aggaagagac cttcaactc	240
atggacagcg agtacaccag tgatattata aagactttga aggataatgg aatgagtac	300
aggtggggga acgtgacggt aaaattggcc gaagcatatg gggtttgctg ggggtgtggag	360
cgagctgtcc aaattgctta cgaagcaagg aaacagttcc ccgaagaaaa gatttggatt	420
acaaacgaaa ttattcataa tccgacagtc aacaagagac tagaggaaat gaaagtggaa	480
aatattccaa ttgatgaagg gaggaacaa tttagattg taaacaaggg tgatgttgtg	540
atattgcctg cttttgggtc tggagtggat gagatgttgg ctttgagtga taggaatgtt	600
caaatgttgg ataccacatg cccatgggtt tccaaggttt ggaatacagt cgagaacat	660

aagaaaggtg aatacacttc cattattcat ggtaaataatg ctcatgagga gactatagct 720
actgcatctt ttgctggaac ttacattatt gtaaagaaca tgaaagaggc aatgtatgtc 780

tgtgattata ttcttggcgg tcaacttgat ggatccagct caacaagaga ggagtttatg 840
gagaaattta agaatgcagt ttctaaggga ttgatcctg acaaacatct tgtgaaggct 900
ggtattgcaa atcagactac aatgctcaag ggggaaaccg aagagattgg gaaactggtt 960
gagaggacta tgatgcaaaa gtacggagtt gaaaacatta atgaacactt ccaaagcttt 1020
aacacaattt gcgatgcaac ccaagagcgt caagatgcaa tgtacaagat ggtggaggaa 1080
cgtattgacc ttatgttagt tgttggagga tggaactcta gtaacacttc tcatctacaa 1140
gagattgcag aggaacgagg tattccctcg tattggattg acagtgaaca gagaataggt 1200

cctggaaca agatagccta caagctaaat catggagagt tggttgagaa agagaactgg 1260
ttaccagagg gtcccatcac ggtcggtgta acatcaggtg cttctactcc agataaggtt 1320
gtggaagatg ttctcatcaa ggtgtttgac ctttaagagcg aagaagcttt gcaagttgct 1380
tag 1383

<210> 26
<211> 627
<212> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 26

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

1 5 10 15

Lys Ser Leu Met Ser Ser Thr His Glu Leu Lys Ala Leu Cys Arg Pro

20 25 30

Ile Ala Thr Leu Gly Met Cys Arg Arg Gly Lys Ser Val Met Ala Ser

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ile Gly Asp His His Ser Asn Leu Trp Asp Asp Asn Phe Ile Gln

65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Pro Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Gly Glu Arg Ala Glu

85 90 95

Arg Leu Ile Gly Glu Val Lys Glu Ile Phe Asn Ser Leu Ser Arg Thr

100 105 110
 Asp Gly Glu Leu Val Ser His Val Asp Asp Leu Leu Gln His Leu Ser
 115 120 125
 Met Val Asp Asn Val Glu Arg Leu Gly Ile Asp Arg His Phe Gln Thr
 130 135 140
 Glu Ile Lys Val Ser Leu Asp Tyr Val Tyr Ser Tyr Trp Ser Glu Lys
 145 150 155 160

 Gly Ile Gly Ser Gly Arg Asp Ile Val Cys Thr Asp Leu Asn Thr Thr
 165 170 175
 Ala Leu Gly Phe Arg Ile Leu Arg Leu His Gly Tyr Thr Val Phe Pro
 180 185 190
 Asp Val Phe Glu His Phe Lys Asp Gln Met Gly Arg Ile Ala Cys Ser
 195 200 205
 Asp Asn His Thr Glu Arg Gln Ile Ser Ser Ile Leu Asn Leu Phe Arg
 210 215 220
 Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Gly Glu Lys Val Met Glu Glu Ala Glu

 225 230 235 240
 Ile Phe Ser Ala Thr Tyr Leu Lys Glu Ala Leu Gln Thr Ile Pro Val
 245 250 255
 Ser Ser Leu Ser Gln Glu Ile Gln Tyr Val Leu Gln Tyr Arg Trp His
 260 265 270
 Ser Asn Leu Pro Arg Leu Glu Ala Arg Thr Tyr Ile Asp Ile Leu Gln
 275 280 285
 Glu Asn Thr Lys Asn Gln Met Leu Asp Val Asn Thr Lys Lys Val Leu
 290 295 300

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

355 360 365
Lys Met Cys His Leu Ile Thr Val Leu Asp Asp Met Tyr Asp Thr Phe

370 375 380
Gly Thr Ile Asp Glu Leu Arg Leu Phe Thr Ala Ala Val Lys Arg Trp
385 390 395 400

Asp Pro Ser Thr Thr Glu Cys Leu Pro Glu Tyr Met Lys Gly Val Tyr
405 410 415

Thr Val Leu Tyr Glu Thr Val Asn Glu Met Ala Gln Glu Ala Gln Lys
420 425 430

Ser Gln Gly Arg Asp Thr Leu Ser Tyr Val Arg Gln Ala Leu Glu Ala
435 440 445

Tyr Ile Gly Ala Tyr His Lys Glu Ala Glu Trp Ile Ser Ser Gly Tyr
450 455 460

Leu Pro Thr Phe Asp Glu Tyr Phe Glu Asn Gly Lys Val Ser Ser Gly
465 470 475 480

His Arg Ile Ala Thr Leu Gln Pro Thr Phe Met Leu Asp Ile Pro Phe
485 490 495

Pro His His Val Leu Gln Glu Ile Asp Phe Pro Ser Lys Phe Asn Asp
500 505 510

Phe Ala Cys Ser Ile Leu Arg Leu Arg Gly Asp Thr Arg Cys Tyr Gln

515 520 525
Ala Asp Arg Ala Arg Gly Glu Glu Ala Ser Cys Ile Ser Cys Tyr Met

530 535 540
Lys Asp Asn Pro Gly Ser Thr Gln Glu Asp Ala Leu Asn His Ile Asn

545 550 555 560
Asn Met Ile Glu Glu Thr Ile Lys Lys Leu Asn Trp Glu Leu Leu Lys

565 570 575
Pro Asp Asn Asn Val Pro Ile Ser Ser Lys Lys His Ala Phe Asp Ile

580 585 590
Asn Arg Gly Leu His His Phe Tyr Asn Tyr Arg Asp Gly Tyr Thr Val

595 600 605

Ala Ser Asn Glu Thr Lys Asn Leu Val Ile Lys Thr Val Leu Glu Pro
610 615 620
Val Pro Met
625
<210> 27
<211> 621
<212> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 27
Met Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp
1 5 10 15
Ser Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu
20 25 30
Cys Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser
35 40 45
Gly His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu
50 55 60
His Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly
65 70 75 80
His Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile
85 90 95
Gly Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly
100 105 110
Glu Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile
115 120 125
Ser Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn
130 135 140
Arg Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met
145 150 155 160
Ala Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu
165 170 175
Val Val Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala

180	185	190	
Leu Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser			
195	200	205	
Leu Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys			
210	215	220	
Glu Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro			
225	230	235	240
Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp			
245	250	255	
Gly His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp			
260	265	270	
Leu Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly			
275	280	285	
Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys			
290	295	300	
Phe Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro			
305	310	315	320
Ser Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys			
325	330	335	
Asp Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly			
340	345	350	
Met Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala			
355	360	365	
Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly			
370	375	380	
Gly Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala			
385	390	395	400
Tyr Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu			
405	410	415	
Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His			
420	425	430	
Gln Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val			

435 440 445
Ile Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr

450 455 460
Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly
465 470 475 480

Asn Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly
485 490 495

Lys Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe
500 505 510

Gly Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala
515 520 525

Thr Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile
530 535 540

Leu Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn
545 550 555 560

Ala Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala
565 570 575

His Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe
580 585 590

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

595 600 605
Ala Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610 615 620

<210> 28

<211> 236

<212> PRT

<213> Cannabis sativa

<400> 28

Met Ala Thr Thr His Leu Asp Val Cys Ala Val Val Pro Ala Ala Gly

1 5 10 15

Phe Gly Arg Arg Met Gln Thr Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Ile

20 25 30

Gly Asn Gln Thr Ile Leu Glu His Ser Val His Ala Leu Leu Ala His

35 40 45

Pro Arg Val Lys Arg Val Val Ile Ala Ile Ser Pro Gly Asp Ser Arg

50 55 60

Phe Ala Gln Leu Pro Leu Ala Asn His Pro Gln Ile Thr Val Val Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Asp Ala Gln Trp Val Leu Val His Asp Ala Ala Arg Pro Cys Leu

100 105 110

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

115 120 125

Thr Gly Gly Ile Leu Ala Ala Pro Val Arg Asp Thr Met Lys Arg Ala

130 135 140

Glu Pro Gly Lys Asn Ala Ile Ala His Thr Val Asp Arg Asn Gly Leu

145 150 155 160

Trp His Ala Leu Thr Pro Gln Phe Phe Pro Arg Glu Leu Leu His Asp

165 170 175

Cys Leu Thr Arg Ala Leu Asn Glu Gly Ala Thr Ile Thr Asp Glu Ala

180 185 190

Ser Ala Leu Glu Tyr Cys Gly Phe His Pro Gln Leu Val Glu Gly Arg

195 200 205

Ala Asp Asn Ile Lys Ile Thr Arg Pro Glu Asp Leu Ala Leu Ala Glu

210 215 220

Phe Tyr Leu Thr Arg Thr Ile His Gln Glu Asn Thr

225 230 235

<210> 29

<211> 159

<212> PRT

<213> Cannabis sativa

<400> 29

Met Arg Ile Gly His Gly Phe Asp Val His Ala Phe Gly Gly Glu Gly

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

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

145 150 155

<210> 30
<211> 182
<212> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 30

Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
1 5 10 15
Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
20 25 30
Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
35 40 45

Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn
50 55 60
Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
65 70 75 80
Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
85 90 95
Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
100 105 110
Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
115 120 125
Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
130 135 140
Ala Asp Ile Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro
145 150 155 160
Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser
165 170 175
Ala Phe Thr Gln Leu Lys
180
<210> 31
<211> 381
<212>
> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 31
Met Ala Tyr Ser Ala Met Ala Thr Met Gly Tyr Asn Gly Met Ala Ala
1 5 10 15
Ser Cys His Thr Leu His Pro Thr Ser Pro Leu Lys Pro Phe His Gly
20 25 30
Ala Ser Thr Ser Leu Glu Ala Phe Asn Gly Glu His Met Gly Leu Leu
35 40 45
Arg Gly Tyr Ser Lys Arg Lys Leu Ser Ser Tyr Lys Asn Pro Ala Ser
50 55 60
Arg Ser Ser Asn Ala Thr Val Ala Gln Leu Leu Asn Pro Pro Gln Lys

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

325 330 335
 Leu Met Gly Leu Glu Lys Ala Lys Glu Phe Ser Asp Glu Leu Leu Asn
 340 345 350

 Arg Ala Lys Gly Glu Leu Ser Cys Phe Asp Pro Val Lys Ala Ala Pro
 355 360 365
 Leu Leu Gly Leu Ala Asp Tyr Val Ala Phe Arg Gln Asn
 370 375 380
 <210> 32
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Cannabis sativa
 <400> 32
 Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
 20 25 30

 Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
 35 40 45
 Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Ile Ser Thr Asn
 50 55 60
 Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
 85 90 95
 Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

 100 105 110
 Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
 115 120 125
 Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
 130 135 140
 Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
 145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 33

<211> 398

<212> PRT

<213> Cannabis sativa

<400> 33

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1 5 10 15

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu
35 40 45

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu
50 55 60

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

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

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn
325 330 335

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg
340 345 350

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

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn
370 375 380

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser
385 390 395

<210> 34
<211> 283
<212> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 34

Met Arg Thr Gln Trp Pro Ser Pro Ala Lys Leu Asn Leu Phe Leu Tyr
1 5 10 15

Ile Thr Gly Gln Arg Ala Asp Gly Tyr His Thr Leu Gln Thr Leu Phe
20 25 30

Gln Phe Leu Asp Tyr Gly Asp Thr Ile Ser Ile Glu Leu Arg Asp Asp
35 40 45

Gly Asp Ile Arg Leu Leu Thr Pro Val Glu Gly Val Glu His Glu Asp
50 55 60

Asn Leu Ile Val Arg Ala Ala Arg Leu Leu Ile Lys Thr Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ser Gly Arg Leu Pro Thr Gly Ser Gly Ala Asn Ile Ser Ile Asp Lys
85 90 95

Arg Leu Pro Met Gly Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ser Ser Asn Ala Ala
100 105 110

Thr Val Leu Val Ala Leu Asn Tyr Leu Trp Gln Cys Gly Leu Ser Met
115 120 125

Asp Glu Leu Ala Glu Met Gly Leu Thr Leu Gly Ala Asp Val Pro Val

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

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

 245 250 255
 Val Leu Glu Gln Ala Pro Glu Trp Leu Asn Gly Phe Val Ala Lys Gly
 260 265 270
 Val Asn Leu Ser Pro Leu His Arg Ala Met Leu
 275 280

 <210> 35
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Cannabis sativa
 <400> 35

 Met His Asn Gln Ala Pro Ile Gln Arg Arg Lys Ser Thr Arg Ile Tyr
 1 5 10 15
 Val Gly Asn Val Pro Ile Gly Asp Gly Ala Pro Ile Ala Val Gln Ser

 20 25 30
 Met Thr Asn Thr Arg Thr Thr Asp Val Glu Ala Thr Val Asn Gln Ile
 35 40 45
 Lys Ala Leu Glu Arg Val Gly Ala Asp Ile Val Arg Val Ser Val Pro
 50 55 60

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

305 310 315 320
 Thr Gly Gly Asn Lys Lys Ser Gly Leu Tyr Glu Asp Gly Val Arg Lys
 325 330 335
 Asp Arg Leu Asp Asn Asn Asp Met Ile Asp Gln Leu Glu Ala Arg Ile
 340 345 350
 Arg Ala Lys Ala Ser Gln Leu Asp Glu Ala Arg Arg Ile Asp Val Gln
 355 360 365
 Gln Val Glu Lys
 370
 <210> 36
 <211> 316
 <212> PRT

 <213> Cannabis sativa
 <400> 36
 Met Gln Ile Leu Leu Ala Asn Pro Arg Gly Phe Cys Ala Gly Val Asp
 1 5 10 15
 Arg Ala Ile Ser Ile Val Glu Asn Ala Leu Ala Ile Tyr Gly Ala Pro
 20 25 30
 Ile Tyr Val Arg His Glu Val Val His Asn Arg Tyr Val Val Asp Ser
 35 40 45
 Leu Arg Glu Arg Gly Ala Ile Phe Ile Glu Gln Ile Ser Glu Val Pro
 50 55 60

 Asp Gly Ala Ile Leu Ile Phe Ser Ala His Gly Val Ser Gln Ala Val
 65 70 75 80
 Arg Asn Glu Ala Lys Ser Arg Asp Leu Thr Val Phe Asp Ala Thr Cys
 85 90 95
 Pro Leu Val Thr Lys Val His Met Glu Val Ala Arg Ala Ser Arg Arg
 100 105 110
 Gly Glu Glu Ser Ile Leu Ile Gly His Ala Gly His Pro Glu Val Glu
 115 120 125
 Gly Thr Met Gly Gln Tyr Ser Asn Pro Glu Gly Gly Met Tyr Leu Val

 130 135 140

Glu Ser Pro Asp Asp Val Trp Lys Leu Thr Val Lys Asn Glu Glu Lys
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Met Thr Gln Thr Thr Leu Ser Val Asp Asp Thr Ser Asp
 165 170 175
 Val Ile Asp Ala Leu Arg Lys Arg Phe Pro Lys Ile Val Gly Pro Arg
 180 185 190
 Lys Asp Asp Ile Cys Tyr Ala Thr Thr Asn Arg Gln Glu Ala Val Arg
 195 200 205

Ala Leu Ala Glu Gln Ala Glu Val Val Leu Val Val Gly Ser Lys Asn
 210 215 220
 Ser Ser Asn Ser Asn Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Arg Met Gly Lys
 225 230 235 240
 Arg Ala Phe Leu Ile Asp Asp Ala Lys Asp Ile Gln Glu Glu Trp Val
 245 250 255
 Lys Glu Val Lys Cys Val Gly Val Thr Ala Gly Ala Ser Ala Pro Asp
 260 265 270
 Ile Leu Val Gln Asn Val Val Ala Arg Leu Gln Gln Leu Gly Gly Gly

 275 280 285
 Glu Ala Ile Pro Leu Glu Gly Arg Glu Glu Asn Ile Val Phe Glu Val
 290 295 300
 Pro Lys Glu Leu Arg Val Asp Ile Arg Glu Val Asp
 305 310 315

<210> 37
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> Cannabis sativa
 <400> 37

Met Val Ser Gly Ser Lys Ala Gly Val Ser Pro His Arg Glu Ile Glu
 1 5 10 15
 Val Met Arg Gln Ser Ile Asp Asp His Leu Ala Gly Leu Leu Pro Glu
 20 25 30
 Thr Asp Ser Gln Asp Ile Val Ser Leu Ala Met Arg Glu Gly Val Met

35 40 45
 Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Leu Leu Met Leu Leu Ala Ala Arg
 50 55 60
 Asp Leu Arg Tyr Gln Gly Ser Met Pro Thr Leu Leu Asp Leu Ala Cys
 65 70 75 80
 Ala Val Glu Leu Thr His Thr Ala Ser Leu Met Leu Asp Asp Met Pro
 85 90 95

 Cys Met Asp Asn Ala Glu Leu Arg Arg Gly Gln Pro Thr Thr His Lys
 100 105 110
 Lys Phe Gly Glu Ser Val Ala Ile Leu Ala Ser Val Gly Leu Leu Ser
 115 120 125
 Lys Ala Phe Gly Leu Ile Ala Ala Thr Gly Asp Leu Pro Gly Glu Arg
 130 135 140
 Arg Ala Gln Ala Val Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val Gly Val Gln Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Leu Gly Gln Phe Arg Asp Leu Asn Asp Ala Ala Leu Asp Arg

 165 170 175
 Thr Pro Asp Ala Ile Leu Ser Thr Asn His Leu Lys Thr Gly Ile Leu
 180 185 190
 Phe Ser Ala Met Leu Gln Ile Val Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Pro
 195 200 205
 Ser Thr Arg Glu Thr Leu His Ala Phe Ala Leu Asp Phe Gly Gln Ala
 210 215 220
 Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Arg Asp Asp His Pro Glu Thr Gly Lys
 225 230 235 240

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

290 295 300

Lys Ile Ala

305

<210> 38

<211> 492

<212> PRT

<213> Cannabis sativa

<400> 38

Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Thr Val Leu Leu Glu Gln

20 25 30

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Trp His Asp Gln Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Thr Ala Leu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Val Lys Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Thr

85 90 95

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Ala Glu Leu Glu Ala Gln Ile Thr Gln

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ala Val Phe Gln Glu Gly Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Val Pro Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Ala Trp Gln Ser Val Tyr Gln Ser Val Ser Arg Phe Ile Glu Asp

165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly

180 185 190

Asn Pro Phe Thr Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu

195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val

210 215 220

Asn Gly Met Val Lys Leu Phe Thr Asp Leu Gly Gly Glu Ile Glu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Arg Leu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Asp Thr Asp Ala Val Ala Ser

260 265 270

Asn Ala Asp Val Val Asn Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Gly His His Pro

275 280 285

Val Gly Gln Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu Arg Lys Ser Met Ser Asn

290 295 300

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn Gln Pro His Ser Gln Leu

305 310 315 320

Ala His His Thr Ile Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

325 330 335

Glu Ile Phe Thr Gly Ser Ala Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu

340 345 350

His Ser Pro Cys Val Thr Asp Pro Ser Leu Ala Pro Pro Gly Cys Ala

355 360 365

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

370 375 380

Asp Trp Ala Gln Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Asp Tyr

385 390 395 400

Leu Glu Glu Arg Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln

405 410 415

Arg Ile Phe Thr Pro Ala Asp Phe His Asp Thr Leu Asp Ala His Leu

420 425 430

Gly Ser Ala Phe Ser Ile Glu Pro Leu Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe

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

485 490
 <210> 39
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Cannabis sativa
 <400> 39
 Met Ser Gln Pro Pro Leu Leu Asp His Ala Thr Gln Thr Met Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ala Lys Leu Phe Asp Pro Ala Thr
 20 25 30
 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Thr Trp Cys Arg His Cys Asp Asp
 35 40 45
 Val Ile Asp Asp Gln Thr His Gly Phe Ala Ser Glu Ala Ala Ala Glu

50 55 60
 Glu Glu Ala Thr Gln Arg Leu Ala Arg Leu Arg Thr Leu Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Glu Gly Ala Glu Met Gln Asp Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln
 85 90 95
 Glu Val Ala Leu Thr His Gly Ile Thr Pro Arg Met Ala Leu Asp His
 100 105 110
 Leu Asp Gly Phe Ala Met Asp Val Ala Gln Thr Arg Tyr Val Thr Phe
 115 120 125
 Glu Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu
 130 135 140
 Met Met Ala Arg Val Met Gly Val Arg Asp Glu Arg Val Leu Asp Arg
 145 150 155 160

Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp
165 170 175
Ile Ile Asp Asp Ala Ala Ile Asp Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Glu Trp
180 185 190
Leu Gln Asp Ala Gly Leu Thr Pro Glu Asn Tyr Ala Ala Arg Glu Asn
195 200 205
Arg Ala Ala Leu Ala Arg Val Ala Glu Arg Leu Ile Asp Ala Ala Glu
210 215 220
Pro Tyr Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Gly Leu His Asp Leu Pro Pro Arg
225 230 235 240
Cys Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Arg Ser Val Tyr Arg Glu Ile Gly
245 250 255
Ile Lys Val Lys Ala Ala Gly Gly Ser Ala Trp Asp Arg Arg Gln His
260 265 270

Thr Ser Lys Gly Glu Lys Ile Ala Met Leu Met Ala Ala Pro Gly Gln
275 280 285
Val Ile Arg Ala Lys Thr Thr Arg Val Thr Pro Arg Pro Ala Gly Leu
290 295 300
Trp Gln Arg Pro Val
305
<210> 40
<211> 595
<212> PRT
<213> Cannabis sativa
<400> 40
Met Ala Thr Glu Leu Leu Cys Leu His Arg Pro Ile Ser Leu Thr His
1 5 10 15
Lys Leu Phe Arg Asn Pro Leu Pro Lys Val Ile Gln Ala Thr Pro Leu
20 25 30
Thr Leu Lys Leu Arg Cys Ser Val Ser Thr Glu Asn Val Ser Phe Thr
35 40 45
Glu Thr Glu Thr Glu Ala Arg Arg Ser Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser

50 55 60
 Trp Asp Tyr Asp Tyr Leu Leu Ser Ser Asp Thr Asp Glu Ser Ile Glu
 65 70 75 80
 Val Tyr Lys Asp Lys Ala Lys Lys Leu Glu Ala Glu Val Arg Arg Glu
 85 90 95

 Ile Asn Asn Glu Lys Ala Glu Phe Leu Thr Leu Leu Glu Leu Ile Asp
 100 105 110
 Asn Val Gln Arg Leu Gly Leu Gly Tyr Arg Phe Glu Ser Asp Ile Arg
 115 120 125
 Gly Ala Leu Asp Arg Phe Val Ser Ser Gly Gly Phe Asp Ala Val Thr
 130 135 140
 Lys Thr Ser Leu His Gly Thr Ala Leu Ser Phe Arg Leu Leu Arg Gln
 145 150 155 160
 His Gly Phe Glu Val Ser Gln Glu Ala Phe Ser Gly Phe Lys Asp Gln

 165 170 175
 Asn Gly Asn Phe Leu Glu Asn Leu Lys Glu Asp Ile Lys Ala Ile Leu
 180 185 190
 Ser Leu Tyr Glu Ala Ser Phe Leu Ala Leu Glu Gly Glu Asn Ile Leu
 195 200 205
 Asp Glu Ala Lys Val Phe Ala Ile Ser His Leu Lys Glu Leu Ser Glu
 210 215 220
 Glu Lys Ile Gly Lys Glu Leu Ala Glu Gln Val Asn His Ala Leu Glu
 225 230 235 240

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

His Phe Ala Arg Asp Arg Leu Ile Glu Ser Phe Tyr Trp Ala Val Gly

305 310 315 320

Val Ala Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Asp Cys Arg Asn Ser Val Ala Lys

325 330 335

Met Phe Ser Phe Val Thr Ile Ile Asp Asp Ile Tyr Asp Val Tyr Gly

340 345 350

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

355 360 365

Val Asn Ala Ile Asn Asp Leu Pro Asp Tyr Met Lys Leu Cys Phe Leu

370 375 380

Ala Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Glu Ile Ala Tyr Asp Asn Leu Lys Asp

385 390 395 400

Lys Gly Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Leu Thr Lys Ala Trp Ala Asp Leu

405 410 415

Cys Asn Ala Phe Leu Gln Glu Ala Lys Trp Leu Tyr Asn Lys Ser Thr

420 425 430

Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Phe Gly Asn Ala Trp Lys Ser Ser Ser Gly

435 440 445

Pro Leu Gln Leu Val Phe Ala Tyr Phe Ala Val Val Gln Asn Ile Lys

450 455 460

Lys Glu Glu Ile Glu Asn Leu Gln Lys Tyr His Asp Thr Ile Ser Arg

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Ile Ala Arg Gly Glu Thr Ala Asn Ser Val Ser Cys Tyr Met Arg

500 505 510

Thr Lys Gly Ile Ser Glu Glu Leu Ala Thr Glu Ser Val Met Asn Leu

515 520 525

Ile Asp Glu Thr Trp Lys Lys Met Asn Lys Glu Lys Leu Gly Gly Ser

530 535 540

Leu Phe Ala Lys Pro Phe Val Glu Thr Ala Ile Asn Leu Ala Arg Gln

545 550 555 560
 Ser His Cys Thr Tyr His Asn Gly Asp Ala His Thr Ser Pro Asp Glu
 565 570 575
 Leu Thr Arg Lys Arg Val Leu Ser Val Ile Thr Glu Pro Ile Leu Pro
 580 585 590
 Phe Glu Arg

 595
 <210> 41
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Campylobacter jejuni
 <400> 41
 Met Ser Glu Met Ser Leu Ile Met Leu Ala Ala Gly Asn Ser Thr Arg
 1 5 10 15
 Phe Asn Thr Lys Val Lys Lys Gln Phe Leu Arg Leu Gly Asn Asp Pro
 20 25 30
 Leu Trp Leu Tyr Ala Thr Lys Asn Leu Ser Ser Phe Tyr Pro Phe Lys
 35 40 45
 Lys Ile Val Val Thr Ser Ser Asn Ile Thr Tyr Met Lys Lys Phe Thr

 50 55 60
 Lys Asn Tyr Glu Phe Ile Glu Gly Gly Asp Thr Arg Ala Glu Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Leu Glu Leu Ile Asp Ser Glu Phe Val Met Val Ser Asp
 85 90 95
 Val Ala Arg Val Leu Val Ser Lys Asn Leu Phe Asp Arg Leu Ile Glu
 100 105 110
 Asn Leu Asp Lys Ala Asp Cys Ile Thr Pro Ala Leu Lys Val Ala Asp
 115 120 125

 Thr Thr Leu Phe Asp Asn Glu Ala Leu Gln Arg Glu Lys Ile Lys Leu
 130 135 140
 Ile Gln Thr Pro Gln Ile Ser Lys Thr Lys Leu Leu Lys Lys Ala Leu
 145 150 155 160

Asp Gln Asn Leu Glu Phe Thr Asp Asp Ser Thr Ala Ile Ala Ala Met
 165 170 175
 Gly Gly Lys Ile Trp Phe Val Glu Gly Glu Glu Asn Ala Arg Lys Leu
 180 185 190
 Thr Phe Lys Glu Asp Leu Lys Lys Leu Asp Leu Pro Thr Pro Ser Phe
 195 200 205
 Glu Ile Phe Thr Gly Asn Gly Phe Asp Val His Glu Phe Gly Glu Asn
 210 215 220
 Arg Pro Leu Leu Leu Ala Gly Val Gln Ile His Pro Thr Met Gly Leu
 225 230 235 240
 Lys Ala His Ser Asp Gly Asp Val Leu Ala His Ser Leu Thr Asp Ala
 245 250 255
 Ile Leu Gly Ala Ala Gly Leu Gly Asp Ile Gly Glu Leu Tyr Pro Asp
 260 265 270
 Thr Asp Met Lys Phe Lys Asn Ala Asn Ser Met Glu Leu Leu Lys Gln
 275 280 285
 Ala Tyr Asp Lys Val Arg Glu Ile Gly Phe Glu Leu Ile Asn Ile Asp
 290 295 300
 Ile Cys Val Met Ala Gln Ser Pro Lys Leu Lys Asp Phe Lys Gln Ala
 305 310 315 320
 Met Gln Ser Asn Ile Ala His Thr Leu Asp Leu Asp Glu Phe Arg Ile
 325 330 335
 Asn Val Lys Ala Thr Thr Thr Glu Lys Leu Gly Phe Ile Gly Arg Lys
 340 345 350
 Glu Gly Met Ala Val Leu Ser Ser Val Asn Leu Lys Tyr Phe Asp Trp
 355 360 365
 Thr Arg Leu
 370
 <210> 42
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 42

Met Ala Thr Thr His Leu Asp Val Cys Ala Val Val Pro Ala Ala Gly

1 5 10 15

Phe Gly Arg Arg Met Gln Thr Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Ile

20 25 30

Gly Asn Gln Thr Ile Leu Glu His Ser Val His Ala Leu Leu Ala His

35 40 45

Pro Arg Val Lys Arg Val Val Ile Ala Ile Ser Pro Gly Asp Ser Arg

50 55 60

Phe Ala Gln Leu Pro Leu Ala Asn His Pro Gln Ile Thr Val Val Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Asp Ala Gln Trp Val Leu Val His Asp Ala Ala Arg Pro Cys Leu

100 105 110

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

115 120 125

Thr Gly Gly Ile Leu Ala Ala Pro Val Arg Asp Thr Met Lys Arg Ala

130 135 140

Glu Pro Gly Lys Asn Ala Ile Ala His Thr Val Asp Arg Asn Gly Leu

145 150 155 160

Trp His Ala Leu Thr Pro Gln Phe Phe Pro Arg Glu Leu Leu His Asp

165 170 175

Cys Leu Thr Arg Ala Leu Asn Glu Gly Ala Thr Ile Thr Asp Glu Ala

180 185 190

Ser Ala Leu Glu Tyr Cys Gly Phe His Pro Gln Leu Val Glu Gly Arg

195 200 205

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

210 215 220

Phe Tyr Leu Thr Arg Thr Ile His Gln Glu Asn Thr Met Arg Ile Gly

225 230 235 240

His Gly Phe Asp Val His Ala Phe Gly Gly Glu Gly Pro Ile Ile Ile

245 250 255

Gly Gly Val Arg Ile Pro Tyr Glu Lys Gly Leu Leu Ala His Ser Asp

260 265 270

Gly Asp Val Ala Leu His Ala Leu Thr Asp Ala Leu Leu Gly Ala Ala

275 280 285

Ala Leu Gly Asp Ile Gly Lys Leu Phe Pro Asp Thr Asp Pro Ala Phe

290 295 300

Lys Gly Ala Asp Ser Arg Glu Leu Leu Arg Glu Ala Trp Arg Arg Ile

305 310 315 320

Gln Ala Lys Gly Tyr Thr Leu Gly Asn Val Asp Val Thr Ile Ile Ala

325 330 335

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

340 345 350

Ala Glu Asp Leu Gly Cys His Met Asp Asp Val Asn Val Lys Ala Thr

355 360 365

Thr Thr Glu Lys Leu Gly Phe Thr Gly Arg Gly Glu Gly Ile Ala Cys

370 375 380

Glu Ala Val Ala Leu Leu Ile Lys Ala Thr Lys

385 390 395

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag

<400> 43

His His His His His His

1 5