



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월06일

(11) 등록번호 10-1954389

(24) 등록일자 2019년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/81 (2006.01) C07K 14/39 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7009284

(22) 출원일자(국제) 2012년10월05일

심사청구일자 2017년02월14일

(85) 번역문제출일자 2014년04월08일

(65) 공개번호 10-2014-0069112

(43) 공개일자 2014년06월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/069757

(87) 국제공개번호 WO 2013/050551

국제공개일자 2013년04월11일

(30) 우선권주장

11184323.1 2011년10월07일

유럽특허청(EPO)(EP)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006089329 A2*

Nucleic Acids Research. Vol. 36, No. 12, e76
(2008.06.06.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

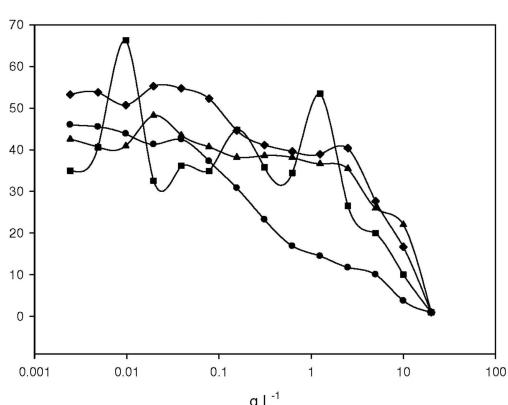
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 조절가능한 프로모터

(57) 요 약

본원 발명은, a) 재조합 진핵 세포주를, 조절가능한 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계, b) 상기 세포주를, 상기 프로모터를 활성화하는 보충 탄소원의 부재 또는 제한된 양으로 배양하여, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 목적 단백질(POI)의 생산을 유도하는 단계 및 c) POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하는, 조절가능한 프로모터 및 상기 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 진핵 세포주를 배양하여 목적 단백질(POI)을 생산하는 방법, 및 분리된 조절가능한 프로모터 및 각각의 발현 시스템을 제공한다.

대 표 도 - 도14

(72) 발명자

마우러, 마이클

오스트리아, 에이-1030 비엔나, 라벤가쎄 11
에이/405

프리엘호퍼, 롤랜드

오스트리아, 1200 비엔나, 클로스터노이부르크 스
트라쎄 49/2/12

클라인, 요아힘

스위스, 씨에이치-3930 비스프, 테르비너슈트라세
5비

웡거, 자나

스위스, 씨에이치-3930 비스프, 마트마텐슈트라세
1에이

(30) 우선권주장

12171006.5 2012년06월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/544,451 2011년10월07일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

조절가능한 프로모터 및 상기 프로모터의 전사 조절하에 목적 단백질(POI)을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 자체물을 포함하는 재조합 진핵 세포주를 배양하여 POI를 생산하는 방법으로서,

- a) 상기 세포주를 상기 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계로서, 상기 기초 탄소원이 세포 성장에 적합한 탄소원인 단계,
- b) 상기 세포주를 상기 프로모터를 활성화(de-repressing)하는 보충 탄소원의 부재하에 또는 제한된 양으로 배양하여, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 20%의 전사율로 POI의 생산을 유도하는 단계, 및
- c) POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하며,

상기 프로모터는

i) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5), 또는 pG8(서열번호 6); 및

ii) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5), 또는 pG8(서열번호 6) 중 어느 하나, 또는 적어도 200bp의 길이를 가지는 이의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지는, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 서열

로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기초 탄소원이 글루코즈, 글리세롤, 에탄올, 이들의 혼합물 및 복합 영양 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 보충 탄소원이 6탄당, 이당, 알콜, 또는 이들의 혼합물인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

- (i) 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이거나,
- (ii) 상기 이당이 사카로즈이거나,
- (iii) 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- (iv) 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이고, 상기 이당이 사카로즈이거나,
- (v) 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이고, 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- (vi) 상기 이당이 사카로즈이고, 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- (vii) 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이고, 상기 이당이 사카로즈이고, 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 단계 b)가, 배양 배지 중에 보충 탄소원을 제공하지 않거나, 제한된 양 또는 1g/L 이하의 양으로 제공하는 공급 배지를 사용하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 제한된 양의 보충 탄소원이, 비성장 속도(specific growth rate)를 0.02h^{-1} 내지 0.2h^{-1} , 또는 0.02h^{-1} 내지 0.15h^{-1} 의 범위 내로 유지하도록 성장 제한하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 야생형 진핵 세포에서 G1(서열번호 7), G3(서열번호 8), G4(서열번호 9), G6(서열번호 10), G7(서열번호 11) 및 G8(서열번호 12)으로 이루어진 군에서 선택되는 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것이거나,

상기 프로모터 서열 중 어느 하나 또는 적어도 200bp의 길이를 가지는 이의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 기능적 활성 변이체인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프로모터가 (i) pG1(서열번호 1)이거나, (ii) pG1(서열번호 1)과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지거나, 적어도 200bp 길이를 가지는 pG1의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, pG1의 기능적 활성 변이체인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 기능적 활성 변이체는 모 뉴클레오티드 서열 (parent nucleotide sequence)을 상기 서열 내에서 또는 상기 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체 및 페키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 진핵 종 (eukaryotic species)으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 pG1(서열번호 1), pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주가 포유동물, 곤충, 효모, 사상균 및 식물 세포주로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, POI가 이종성 단백질이거나, 항체 또는 이의 단편, 효소 및 펩티드를 포함하는 치료학적 단백질, 단백질 항생물질, 독소 융합 단백질, 탄수화물-단백질 접합체, 구조 단백질, 조절 단백질, 백신 및 백신 유사 단백질 또는 입자, 공정 효소(process enzyme), 성장 인자, 호르몬 및 사이토킨, 또는 POI의 대사물질로부터 선택된 이종성 단백질인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 프로모터는,

모 뉴클레오티드 서열 (parent nucleotide sequence)을 상기 서열 내에서 또는 상기 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체 및 페키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 진핵 종 (eukaryotic species)으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 군에서 선택되는, pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)의 기능적 활성 변이체로서,

상기 기능적 활성 변이체는 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6) 중 어느 하나 또는 적어도 200bp의 길이를 가지는 이의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 프로모터가 pG1(서열번호 1), pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 15

목적 단백질(POI)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된, 분리된 프로모터 핵산으로서, 상기 프로모터 핵산은 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 서열로 자연적으로 발견되지 않고,

상기 프로모터 핵산은

- a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6); 및
- b) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6) 중 어느 하나 또는 적어도 200bp의 길이를 가지는 이의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 서열

로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 포함하며,

상기 핵산이, 재조합 진핵 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 20%의 전사율로 상기 세포에서 POI를 발현시킬 수 있는 탄소원 조절 가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터를 포함하는,

분리된 프로모터 핵산.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 프로모터는,

모 뉴클레오티드 서열 (parent nucleotide sequence)을 상기 서열 내에서 또는 상기 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 진핵 종 (eukaryotic species)으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 군에서 선택되는, pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)의 기능적 활성 변이체로서,

상기 기능적 활성 변이체는 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6) 중 어느 하나 또는 적어도 200bp의 길이를 가지는 이의 일부분과 적어도 80%의 서열 동일성을 가지며, 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

분리된 프로모터 핵산.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 프로모터가 pG1(서열번호 1), pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)로 이루어진 군에서 선택되는, 분리된 프로모터 핵산.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항의 프로모터 핵산을 포함하는 벡터로서, 목적 단백질(POI)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 상기 프로모터의 전사 조절 하에 있고, 상기 프로모터 핵산은 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 서열로 자연적으로 발견되지 않는, 벡터.

청구항 19

제18항의 벡터를 포함하는 재조합 진핵 세포.

청구항 20

제19항의 재조합 진핵 세포를 사용하여 목적 단백질 (POI)를 생산하는 방법.

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조절가능한 프로모터 및 조절가능한 프로모터의 조절하에 진핵 세포 배양으로 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 재조합 단백질의 성공적인 생산은 진핵 숙주를 이용하여 달성되었다. 가장 유명한 예는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 등의 효모, 아스페길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*) 또는 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 등의 사상균, 또는, 예를 들면, CHO 세포 등의 포유동물 세포이다. 몇몇 단백질의 생산은 높은 속도로 용이하게 달성되지만, 다수의 기타 단백질은 상대적으로 낮은 수준으로만 수득된다.

[0003] 숙주 생물체에서 유전자의 이종 발현은 일반적으로 숙주 생물의 안정한 형질전환을 가능하게 하는 백터를 필요로 한다. 백터는 코딩 서열의 5' 말단에 인접한 기능적 프로모터를 갖는 유전자를 제공한다. 이에 의해 전사가 조절되고, 이러한 프로모터 서열에 의해 개시된다. 현재까지 사용된 대부분의 프로모터는 통상 세포 내에 고농도로 존재하는 단백질을 코딩하는 유전자에서 유래되었다.

[0004] 제EP0103409A2호는 해당 작용 경로에서 특정 효소의 발현과 관련된 효모 프로모터의 용도, 즉 피루베이트 키나제, 트리오세포스페이트 이소미라제, 포스포글루코즈 이소미라제, 포스포르글리세레이트 뮤타제, 헥소키나제 1 및 2, 글루코키나제, 포스포프력토즈 키나제, 알돌라제 및 해당계 조절 유전자의 용도를 개시한다.

[0005] 국제공개공보 제WO 97/44470호는 번역 신장 인자 1(TEF1) 단백질 및 효모에서 단백질의 이종 발현에 적합한 리보솜 단백질 S7을 위해 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터의 효모 프로모터를 개시하고, 제EP1951877A1호는 이종 단백질의 생산을 위한 피. 파스토리스(*P. pastoris*) TEF1 프로모터의 용도를 개시한다.

[0006] 국제공개공보 제WO2005003310호는 유지성 효모 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 또는 포스포글리세레이트 뮤타제의 프로모터를 사용하여 효모에서 목적 코딩 서열을 발현시키는 방법을 제공한다.

[0007] 피키아 파스토리스의 메탄올 대사 경로에 관여하는 유전자로부터 유래하는 프로모터 서열은 미국 특허 제US4808537호 및 제US4855231호(알콜 옥시다제 AOX1, AOX2) 및 제US6730499B1호(포름알데히드 데하이드로게나제 FLD1)에 개시되어 있다. 제US20080153126A1호는 AOX1 프로모터에 기반하는 돌연변이형 프로모터 서열을 포함한다.

[0008] AOX1 프로모터는 단지 메탄올에 반응하여 유도되고, 예를 들면, 글루코즈 또는 에탄올 등의 기타 탄소원에 의해 억제된다. 메탄올은, 이의 독성 및 가연성에 대해 잠재적으로 위험하기 때문에, 특정 제품의 제조에서 사용하기에 적합하지 않다는 단점이 있다. 따라서, AOX1 프로모터의 대안이 요구되고 있다.

[0009] 제US2008299616A1호는 피. 파스토리스에서 이종 유전자 발현을 위해 말레이트 신타제(MLS1) 유전자의 조절 서열을 도입하고, 이는 글루코즈를 포함하는 배지에서 억제되고 글루코즈 고갈 조건 또는 아세테이트가 존재하는 경우에 억제된다. 그러나, 이 시스템은, MLS1 프로모터가 활성화된 조건하에 낮은 활성과 함께 약하기 때문에, 효율적 생산 방법에 적합하다고는 간주되지 않는다.

[0010] 슔러 및 슔러(Scholer and Schuller)[참조: Mol. Cell Biol. 1994 14(6):3613-22]는 이소시트레이트 리아제 유전자 ICL1의 조절 영역을 기재하고, 이는 발효 성장 조건으로부터 비-발효 성장 조건까지 세포 전달 후에 활성화된다.

[0011] 제W02008063302A2호는 이종성 단백질을 발현을 위해 피. 파스토리스의 ADH1(알콜 데하이드로게나제), ENO1(에놀라제) 및 GUT1 유전자로부터 유래하는 신규 유도성 프로모터의 용도를 기재하고, 제CN1966688A호는 피. 파스토리스 오메가 3-지방산 데하이드로게나제 프로모터 서열을 기재하고, 제WO002007117062A1호는 형광체 제한에 의해 유도되는 피. 파스토리스 유래된 자가-유도성 NPS 프로모터를 기재한다.

- [0012] 제WO2008128701A2호는 신규한 프로모터의 용도를 기재하고, 여기서 피. 파스토리스의 THI3(티아민 대사) 유전자로부터 유래하는 프로모터는 티아민을 함유하는 배지에서 억제되고, 티아민 고갈시에 활성화된다.
- [0013] 제US2009325241A1호는 크실로즈-유도성 프로모터(FAS2 프로모터)를 사용하여 효모 세포에서 에탄올 생산 방법을 기재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 고수율로 분리할 수 있는 발효 생성물을 생산하는 개량된 재조합 진핵 세포주를 제공하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 목적은 간단하고 효율적인 재조합 생산 방법에 적합한 대체 조절 요소를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 목적은 특허청구된 대상에 의해 해결된다.
- [0016] 본 발명에 따라, a) 재조합 진핵 세포주를, 조절가능한 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계,
- [0017] b) 상기 세포주를, 상기 프로모터를 활성화(de-repressing)하는 보충 탄소원의 부재하에 또는 제한된 양으로 배양하여, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 목적 단백질(POI)의 생산을 유도하는 단계 및
- [0018] c) POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하는,
- [0019] 조절가능한 프로모터 및 상기 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 진핵 세포주를 배양하여 목적 단백질(POI)을 생산하는 방법이 제공된다.
- [0020] 상기 배양 단계는 구체적으로 상기 탄소원의 존재하에, 따라서 상기 탄소원을 포함하는 배양 배지에서, 또는 보충 탄소원의 부재하에서도 상기 단계 b)에서 세포주를 배양하는 것을 포함한다.
- [0021] 상기 POI의 생산 유도는, 상기 POI의 추가의 번역 및 임의의 발현을 구체적으로 포함하는, 전사의 유도를 구체적으로 지칭한다.
- [0022] 상기 전사율은 구체적으로 상기 프로모터의 완전한 유도시에 수득된 전사체의 양을 지칭한다. 상기 프로모터는, 배양 조건이, 예를 들면, 0.4g/L 미만, 바람직하게는 0.04g/L 미만, 특히 0.02g/L 미만의 글루코즈 농도에서 대략 최대 유도를 제공하는 경우, 활성화 및 완전히 유도된 것으로 간주된다. 완전히 유도된 프로모터는, 천연 pGAP 프로모터와 비교하여, 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 적어도 100%의 전사율, 또는 적어도 150% 또는 적어도 200%의 보다 높은 전사율을 바람직하게 나타낸다. 전사율은, 예를 들면, 하기 실시예 부분에 기재된 바와 같이 리포터 유전자(예: eGFP)의 전사체의 양에 의해 측정될 수 있고, 이는, 클론을 용액에서 배양하는 경우, 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 50%의 pG1 프로모터의 상대적으로 높은 전사율을 나타낸다. 또는, 전사율은, 마이크로어레이 데이터가 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 완전 유도된 상태에서 억제된 및 활성화된 상태와 높은 신호 강도 사이의 발현 수준의 차이를 나타내는, 마이크로어레이 상에서의 전사 강도에 의해 측정될 수 있다. 이러한 마이크로어레이 데이터는 구체적으로, 각각의 값을 천연 pGAP와 비교하여, pG1의 경우에 200% 이상, pG3 및 pG4의 경우에 30% 이상, pG6의 경우에 60% 이상, pG7의 경우에 30% 이상, pG8의 경우에 20% 이상의 전사율을 나타낸다. 종래 기술의 프로모터 MLS1 또는 ICL1은 너무 약하고, 따라서 본 발명의 목적에 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다.
- [0023] 상기 천연 pGAP 프로모터는 구체적으로, 비변형된(비-재조합) 또는 재조합 진핵 세포를 포함하여, 동일한 종 또는 균주의 천연 진핵 세포와 동일한 방식으로 상기 재조합 진핵 세포에서 활성적이다. 이러한 천연 pGAP 프로모터는 통상 내인성 프로모터이고, 따라서 진핵 세포와 동종성인 것으로 이해되고, 비교 목적을 위한 표준 또는 기준 프로모터로서 사용된다.
- [0024] 예를 들면, 피. 파스토리스의 천연 pGAP 프로모터는, 예를 들면, 도 13에 제시된 서열: 피. 파스토리스의 천연

pGAP 프로모터 서열(GS115)(서열번호 13)을 갖는 피. 파스토리스에서 GAPDH의 발현을 조절하기 위해 사용된 바와 같이 피. 파스토리스에서 비변형된 내인성 프로모터 서열이다. 피. 파스토리스가 본 발명에 따라 POI를 생산하는 숙주로서 사용되는 경우, 본 발명에 따르는 프로모터의 전사 강도 또는 전사율은 피. 파스토리스의 이러한 천연 pGAP 프로모터와 비교된다.

[0025] 또 다른 예로서, 에스. 세레비지애의 천연 pGAP 프로모터는 에스. 세레비지애에서 GAPDH의 발현을 조절하기 위해 사용된 바와 같이 에스. 세레비지애에서 비변형된 내인성 프로모터 서열이다. 에스. 세레비지애가 본 발명에 따르는 POI를 생산하는 숙주로서 사용되는 경우, 본 발명에 따르는 프로모터의 전사 강도 또는 전사율은 에스. 세레비지애의 이러한 천연 pGAP 프로모터와 비교된다.

[0026] 따라서, 본 발명에 따르는 프로모터의 상대적 전사 강도 또는 속도는 POI를 생산하는 숙주로서 사용되는 동일한 종 또는 균주 세포의 천연 pGAP 프로모터과 통상 비교된다.

[0027] 특정 양태에 따르면, 기초 탄소원은 보충 탄소원과는 상이하고, 예를 들면, 양적 및/또는 질적으로 상이하다. 양적 차이는 프로모터 활성을 억제 또는 활성화하는 다양한 조건을 제공할 수 있다.

[0028] 추가의 특정 양태에 따르면, 기초 및 보충 탄소원은 바람직하게는 상이한 농도에서 분자 또는 탄수화물의 동일한 유형을 포함한다. 추가의 특정 양태에 따르면, 탄소원은 2개 이상의 상이한 탄소원의 혼합물이다.

[0029] 진핵 세포 배양에 적합하게 사용된 유기 탄소의 모든 종류를 사용할 수 있다. 특정 양태에 따르면, 탄소원은 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈 등의 6탄당, 사카로즈 등의 이당, 글리세롤 또는 에탄올 등의 알콜 또는 이들의 혼합물이다.

[0030] 특히 바람직한 양태에 따르면, 기초 탄소원은 글루코즈, 글리세롤, 에탄올 또는 이들의 혼합물 및 복합 영양 물질로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직한 양태에 따르면, 기초 탄소원은 글리세롤이다.

[0031] 추가의 특정 양태에 따르면, 보충 탄소원은 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 및 만노즈 등의 6탄당, 사카로즈 등의 이당, 글리세롤 또는 에탄올 등의 알콜 또는 이들의 혼합물이다. 바람직한 양태에 따르면, 보충 탄소원은 글루코즈이다.

[0032] 구체적으로, 본 방법은 기초 탄소원으로 글리세롤을 사용하고 보조 탄소원으로 글루코즈를 사용할 수 있다.

[0033] 활성화 조건은 적합하게는 특정 수단에 의해 달성될 수 있다. 단계 b)는 제한된 양으로 보조 탄소원을 제공하지 않는 공급물 배지를 임의로 사용한다.

[0034] 구체적으로는, 공급물 배지는 화학적으로 정의되고 메탄올을 포함하지 않는다.

[0035] 공급물 배지는 액체 형태 또는 또 다른 형태(예: 정제) 또는 기타 지속 방출 수단, 또는 기체(예: 이산화탄소)로 배양 배지에 첨가될 수 있다. 여전히 바람직한 양태에 따라, 세포 배양 배지에 첨가된 보충 탄소원의 제한된 양은 심지어 0일 수 있다. 바람직하게는, 배양 배지 중의 보충 탄소원의 농도는 0-1g/L이고, 바람직하게는 0.6g/L 미만, 보다 바람직하게는 0.3g/L 미만, 보다 바람직하게는 0.1g/L 미만, 바람직하게 1 내지 50mg/L, 보다 바람직하게는 1 내지 10mg/L, 특히 바람직하게는 1mg/L 또는 그 이하, 예를 들면, 적합한 표준 분석으로 측정, 예를 들면, 성장 세포 배양에 의한 소비시에 배양 배지 중의 잔류 농도로 측정된 바와 같은 검출 한계 미만이다.

[0036] 바람직한 방법에 있어서, 보충 공급원의 제한된 양은 생산 단계의 말기 또는 발효 공정의 산출에서, 바람직하게는 발효 생성물의 수거시에 발효 브로쓰에서 측정된 바와 같은 검출 한계 미만인 세포 배양물 중의 잔류량을 제공한다.

[0037] 바람직하게는, 보충 탄소원의 제한된 양은 특정한 성장 속도를 0.02h^{-1} 내지 0.2h^{-1} , 바람직하게는 0.02h^{-1} 내지 0.15h^{-1} 범위로 유지하기 위해 성장 제한된다.

[0038] 본 발명의 특정 양태에 따라, 프로모터는 피키아 파스토리스 프로모터 또는 이의 기능적 활성 변이체이다.

[0039] 본원에서, 본 발명에 따르는 프로모터는 항상 본원에 기재된 서열 및 이의 기능적 활성 변이체를 지칭해야 한다. 하기에 상세히 설명된 바와 같이, 이러한 변이체는 피키아 파스토리스 이외의 종으로부터 유래하는 상동체 및 유사체를 포함한다.

[0040] 본 발명에 따르는 방법은, 예를 들면, 야생형 또는 재조합 진핵 세포에서 특이적 유전자의 전사를 조절할 수 있

는 피. 파스토리스의 야행성 프로모터 또는 이의 기능적 활성 변이체인 프로모터, 예를 들면, 선택된 유전자에 대한 야생형 프로모터를 사용할 수 있고, 상기 유전자는 (고친화성) 글루코즈 운반체를 코딩하는 G1(서열번호 7), G3(서열번호 8), 미토콘드리아 알데히드 테하이드로게나제를 코딩하는 G4(서열번호 9), G6(서열번호 10), 주요 촉진인자 당 운반체 부류의 구성원을 코딩하는 G7(서열번호 11), 또는 Gt1_Pac2 상과의 구성원을 코딩하는 G8(서열번호 12) 또는 이의 기능적 활성 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명에 따라, 야생형 효모 세포 중의 이러한 유전자중의 하나와 자연적으로 관련될 수 있는 프로모터 또는 이의 기능적 활성 변이체가 특히 제공된다.

[0042] 특정한 양태에 따라, 세포주는 포유류, 곤충, 효모, 사상균 및 식물 세포주, 바람직하게는 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0043] 구체적으로, 효모는 피키아(Pichia), 칸디다(Candida), 토룰로프시스(Torulopsis), 아르술라(Arxula), 헨세눌라(Hensenula), 야로위아(Yarrowia), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 사카로마이세스(Saccharomyces), 코마가타엘라(Komagataella), 바람직하게는 메틸로트로픽(methylotrophic) 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0044] 특히 바람직한 효모는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 코마가타엘라 파스토리스(*Komagataella pastoris*), 케이. 파피(*K. phaffii*) 또는 케이. 슈도파스토리스(*K. pseudopastoris*)이다.

[0045] 추가의 특정 양태에 따라, 당해 프로모터는 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련되지 않는다.

[0046] 구체적으로, POI는 진핵 세포 단백질, 바람직하게는 포유동물 단백질이다.

[0047] 본 발명에 따라 생산된 POI는 다량체 단백질, 바람직하게는 이합체 또는 사량체일 수 있다.

[0048] 본 발명의 한 가지 양태에 따라, POI는 바람직하게는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 치료학적 단백질, 효소 및 펩티드, 단백질 항생물질, 독소 융합 단백질, 탄수화물-단백질 접합체, 구조적 단백질, 조절 단백질, 백신 및 백신 유사 단백질 또는 입자, 공정 효소, 성장 인자, 호르몬 및 사이토킨 또는 POI의 대사물질로부터 선택된 재조합 또는 이종성 단백질이다.

[0049] 특정 POI는 항체 등의 항원 결합 분자 또는 이의 단편이다. 특정 POI 중에는 모노클로날 항체(mAb), 면역글로불린(Ig) 또는 면역글로불린 부류 G(IgG), 중쇄 항체(HcAb') 또는 이들의 단편, 예를 들면, 단편-항원 결합(Fab), Fd, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 이의 조작된 변이체, 예를 들면, Fv 이량체(디아바디), Fv 삼량체(트리아바디), Fv 사량체 또는 미니바디 및 VH 또는 VHH 또는 V-NAR 등의 단일-도메인 항체와 같은 항체이다.

[0050] 특정 양태에 따르면, 발효 생성물은 POI, 대사물질 또는 이의 유도체를 사용하여 제조된다.

[0051] 본 발명의 또 다른 국면에 따르면, 세포의 천연 pGAP와 비교하여 적어도 15%의 전사 강도를 갖는 탄소원 조절 가능한 프로모터의 전사 조절하에 재조합 진핵 세포에서 POI의 발현을 조절하는 방법으로서, 상기 발현은 탄소원을 제한하는 조건하에 유도되는 방법이 제공된다. 탄소원 조절가능한 프로모터는 바람직하게는 기준 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 20%의 전사 강도, 및 구체적으로는 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 전사율에 대해 상기 한 바와 같은 전사 강도를 갖는다. 따라서, 완전하게 유도된 프로모터는 바람직하게는, POI를 생산하기 위해 선택된 진핵 세포에서 측정된 바와 같이, 당해 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여, 적어도 15%의 전사 강도, 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 적어도 100% 또는 심지어 적어도 150% 또는 적어도 200%의 보다 높은 전사 강도를 갖는다.

[0052] 바람직한 양태에서, 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 보다 바람직하게는 5배, 보다 보다 바람직하게는 적어도 10배, 보다 보다 바람직하게는 20배, 보다 보다 바람직하게는 적어도 30, 40, 50 또는 100 배인, 활성화된 상태에서의 전사 활성 또는 전사 강도를 갖는 이러한 프로모터가 사용된다.

[0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 탄소원 조절가능한 프로모터의 전사 조절하에 재조합 진핵 세포에서 POI를 생산하는 방법으로서, 상기 프로모터는 상기한 바와 같은 전사 강도, 즉 당해 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사 강도를 갖는 방법이 제공된다. 탄소원 조절가능한 프로모터는 바람직하게는, 기준 pGAP 프로모터와 비교하여, 적어도 20%의 전사 강도, 보다 바람직하게는 당해 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 적어도 100% 또는 심지어 적어도 150% 또는 적어도 200%의 보다 높은 전사 강도를 갖는다. 바람직한 양태에서, 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 보

다 바람직하게는 5배, 보다 더 바람직하게는 적어도 10배, 보다 바람직하게는 적어도 20배, 보다 바람직하게는 적어도 30, 40, 50 또는 100배인, 활성화된 상태에서의 전사 활성을 갖는 이러한 프로모터가 사용된다.

[0054] 본 발명에 따르는 특히 바람직한 방법에서, 당해 프로모터는

a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6);

b) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)에 대해 적어도 60% 상동성을 갖는 서열;

c) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)에 대해 엄격한 조건하에 하이브리드화하는 서열; 및

d) 상기 a), b) 또는 c)로부터 유래하는 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 조절가능한 프로모터이고,

[0059] 상기 프로모터는, 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 재조합 진핵 세포에서 POI를 발현할 수 있는 탄소원 조절가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터이다.

[0060] 구체적으로는, pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)의 변이체는 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp, 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오티드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기능적 활성 변이체이다.

[0061] 본 발명에 따르는 바람직한 프로모터의 기능적 활성 변이체의 일부는 pG1, pG3, pG4, pG6, pG7 또는 pG8 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 임의의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편, 예를 들면, 3' 말단으로부터 5' 말단까지의 소정 범위, 예를 들면, 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 수득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오티드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편이다.

[0062] 예시적 변이체는 이러한 단편, 예를 들면, 3' 말단 서열을 포함하여, 200 내지 1000bp 범위, 바람직하게는 250 내지 1000bp 범위, 보다 바람직하게는 300 내지 1000bp 범위의 특정 길이를 갖는 단편을 포함하거나 이들로 이루어진 기능적 활성인 것으로 입증된다. 예를 들면, pG1의 기능적 활성 변이체는 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 따라서 뉴클레오티드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오티드 서열이다.

[0063] 본 발명의 또 다른 국면에 따르면,

[0064] a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6),

[0065] b) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 적어도 60% 상동성을 갖는 서열,

[0066] c) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 엄격한 조건하에 하이브리드화하는 서열 및

[0067] d) 상기 a), b) 또는 c)로부터 유래하는 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산으로서,

[0068] 상기 핵산은 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 재조합 진핵 세포에서 POI를 발현할 수 있는 탄소원 조절가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터를 포함하는, 단리된 핵산이 제공된다.

- [0069] 구체적으로는, pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)의 변이체는 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp, 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모뉴클레오티드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기능적 활성 변이체이다.
- [0070] 본 발명에 따르는 프로모터의 바람직한 기능적 활성 변이체의 일부는 pG1, pG3, pG6, pG7 또는 pG8 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 임의의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편, 예를 들면, 3' 말단으로부터 5' 말단까지의 소정 범위, 예를 들면, 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 수득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오티드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편이다.
- [0071] 예시적 변이체는 이러한 단편, 예를 들면, 3' 말단 서열을 포함하여, 200 내지 1000bp 범위, 바람직하게는 250 내지 1000bp 범위, 보다 바람직하게는 300 내지 1000bp 범위의 특정 길이를 갖는 단편을 포함하거나 이들로 이루어진 기능적 활성인 것으로 입증된다. 예를 들면, pG1의 기능적 활성 변이체는 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 따라서 뉴클레오티드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0072] 탄소원 조절가능한 프로모터는 바람직하게는 상기한 바와 같은 전사 강도, 바람직하게는 기준 pGAP 프로모터과 비교하여 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 적어도 100%, 또는 심지어 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 150% 또는 적어도 200%의 보다 높은 전사 강도를 갖는다. 바람직한 양태에서, 활성화된 상태에서 전사 활성을 갖는 이러한 프로모터가 사용되고, 이는 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 보다 바람직하게는 5배, 보다 더 바람직하게는 적어도 10배, 보다 바람직하게는 적어도 20배, 보다 바람직하게는 적어도 30, 40, 50 또는 100배이다. 적합하게, 본 발명에 따른 특이적 프로모터는 이러한 방법에서 사용된다.
- [0073] 그러나, 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 본 발명에 따르는 프로모터를 포함하는 발현 작제물로서, 상기 프로모터가 POI의 코딩 서열과 자연적으로 관련되지 않는, 발현 작제물이 제공된다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따르는 작제물을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따르는 작제물 또는 벡터를 포함하는 재조합 진핵 세포에 관한 것이다.
- [0076] 구체적으로는, 세포는 포유동물, 곤충, 효모, 사상균 및 식물 세포주, 바람직하게는 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0077] 효모는 적합하게는, 피키아, 칸디다, 토풀로프시스, 아르술라, 헨세놀라, 야로위아, 글루이베로마이세스, 사카로마이세스, 코마가타엘라, 바람직하게는 메틸로트로픽 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0078] 바람직하게는, 효모는 피키아 파스토리스, 코마가타엘라 파스토리스, 케이. 파파이 또는 케이. 슈도파스토리스이다.
- [0079] 특정 양태에 따르면, 제한된 탄소원의 조건에 대해 과량의 탄소원의 존재하에 보다 높은 특이적 성장 속도를 갖는 세포가 사용된다.
- [0080] 본 발명의 또 다른 측면은 POI의 생산을 위한 본 발명의 재조합 진핵 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0081] 본 발명의 추가의 측면에 따르면,
- [0082] a) 진핵 세포를 세포 성장 조건하에 배치 배지에서 탄소원의 존재하에 배양하는 단계,
- [0083] b) 상기 세포를 보충 탄소원의 제한된 양의 존재하에 유가식(fedbatch) 배지에서 배양하는 단계,

- [0084] c) 단계 a) 및 b)의 세포 배양물의 샘플을 제공하는 단계 및
- [0085] d) 상기 샘플에서 전사 분석을 수행하여, 단계 a)의 세포보다 단계 b)의 세포에서, 보다 높은 전사 강도를 나타내는 조절가능한 프로모터를 동정하는 단계를 포함하는, 진핵 세포로부터 탄소원 조절가능한 프로모터를 스크리닝 또는 동정하는 방법이 제공된다.
- [0086] 상기 보다 높은 전사 강도는 완전 유도된 상태에서 전사 강도에 의해 측정될 수 있고, 이는, 예를 들면, 글루코즈-제한된 케모스타트(chemostat) 배양 조건하에 수득되고, 이는 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 보다 바람직하게는 적어도 5배, 보다 더 바람직하게는 적어도 10배, 보다 더 바람직하게는 20배, 보다 바람직하게는 적어도 30, 40, 50 또는 100배이다.
- [0087] 바람직하게는, 전사 분석은 바람직하게는 DNA 마이크로어레이, RNA 서열분석 및 전사체 분석을 사용하는 정량적 또는 반-정량적이다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG1(서열번호 1)이다.
 도 2는 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG3(서열번호 2)이다.
 도 3은 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG4(서열번호 4)이다.
 도 4는 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG6(서열번호 3)이다.
 도 5는 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG7(서열번호 5)이다.
 도 6은 피. 파스토리스의 프로모터 서열 pG8(서열번호 6)이다.
 도 7은 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G1(서열번호 7)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 8은 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G3(서열번호 8)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 9는 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G4(서열번호 9)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 10은 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G6(서열번호 10)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 11은 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G7(서열번호 11)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 12는 피. 파스토리스의 GS115 게놈 G8(서열번호 12)의 유전자의 코딩 서열이다.
 도 13은 피. 파스토리스의 천연 pGAP 프로모터 서열(GS115)(서열번호 13)이다.

#	명칭	PAS [*]	PIPA [*]	GS115 설명
pGAP	TDH3	PAS_chr2-1_0437	PIPA02510	글리세르알테히드-3-포스페이트 데하이드로케나제

* PAS: 피. 파스토리스 GS115 중의 ORF 명칭; PIPA: 피. 파스토리스 유형 균주 DSMZ70382의 ORF 명칭

도 14는 pG1(원형), pG3(삼각형), pG4(다이아몬드형) 및 pG6(사각형) 프로모터의 활성화 특성을 나타낸다: 최대 전사 활성은 pG1의 경우에 대략 0.04g 글루코즈/L 이하에서 달성되고, 모든 기타 pG 프로모터는 대략 4g/L 이하에서 도달한다. 상이한 프로모터의 상대적 유도 거동을 비교하기 위해, 데이터는 각각의 값을 각각의 프로모터 작제물의 D20 값으로 나눔으로써 정규화했다. 따라서, 데이터는 상대적 형광 값이고, D20에서의 데이터 점은 1.0이다.

도 15는 프로모터 서열 pG1; 피. 파스토리스의 pG1a-f(서열번호 41 내지 46)의 기능적 활성 변이체이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0089] 본 명세서 전체에 걸쳐 사용되는 특정 용어는 다음의 의미를 가진다.
 [0090] 본원에서 사용된 용어 "탄소원"은 숙주 생물 또는 생산 세포주에 의해 대사될 수 있는 것 등의 미생물의 에너지

원으로서 바람직한 발효가능한 탄소 기질, 일반적으로 공급원 탄수화물, 복합 영양 물질 등과 같이 특히 정제된 형태 또는 원료 물질로 제공되는, 단당류, 올리고당류, 다당류, 글리세롤을 포함한 알콜류로 이루어진 그룹으로부터 선택된 공급원을 의미한다. 탄소원은 단일 탄소원으로 또는 상이한 탄소원의 혼합물로서 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0091] 본 발명에 따라 사용된 "기저 탄소원"은 일반적으로 진핵 세포의 영양원 등의 세포 성장에 적합한 탄소원이다. 기초 탄소원은 기초 배지 또는 복합 배지 등의 배지에 제공될 뿐만 아니라, 정제된 탄소원을 함유하는 화학적으로 규정된 배지에 제공될 수 있다. 기초 탄소원은 특히 배양 공정의 성장기 동안 세포 증식을 제공하는 양으로 통상 제공되어, 예를 들면, 표준 부배양 단계 동안 90% 초과, 바람직하게는 95% 초과의 생존율을 나타내는, 예를 들면, 적어도 5g/L 세포 건조 중량, 바람직하게는 10g/L 세포 건조 중량, 또는 적어도 15g/L의 세포 건조 중량의 세포 밀도를 수득한다.

[0092] 본 발명에 따르면, 기초 탄소원은, 예를 들면, 유가식 배양 공정에서 세포주의 성장 상 동안, 생물량을 증가시키는 에너지를 제공하는 과량으로 이해되는, 과량 또는 과잉량으로 사용된다. 이러한 과잉량은 특히, 측정가능하고 보충 탄소원의 제한된 양을 공급하는 동안보다 통상 적어도 10배 높은, 바람직하게는 적어도 50배 또는 적어도 100배 높은 발효 브로쓰 중의 잔류 농도를 달성하기 위해 제한된 양의 보충 탄소원의 과량으로 존재한다.

[0093] 유가식 공정 중의 공급물 배지 등의 세포 배양 배지와 관련하여 용어 "화학적으로 규정된"은, 모든 화학적 성분 및 펩티드가 공지되어 있는, 생산 세포주의 시험판내 세포 배양에 적합한 성장 배지를 의미한다. 통상적으로, 화학적으로 규정된 배지는 동물-유래의 성분을 완전히 포함하지 않고, 순수한 및 일관된 세포 배양 환경을 나타낸다.

[0094] 본 발명에 따라 사용된 바와 같은 "보충 탄소원"은 특히 배양 공정의 생산 단계에서 생산 세포주에 의한 발효 생성물의 생성을 촉진하는 보충 기질이다. 생산 단계는 구체적으로 성장 단계, 예를 들면, 배치식, 유가식 및 연속식 배양 공정에 따른다. 보충 탄소원은 특히 유가식 공정의 공급물에 포함될 수 있다.

[0095] 탄소원의 "제한된 양" 또는 "제한된 탄소원"은 본원에서 생산 단계 또는 생산 방식에서 생산 세포주를 유지하기 위해 필요한 탄소원의 양으로 이해된다. 이러한 제한된 양은 유가식 공정에서 사용될 수 있고, 여기서 탄소원은 공급물 배지에 함유되고, 낮은 성장 속도로 생물량을 유지하면서 POI를 생성하기 위해 지속된 에너지 전달을 위한 낮은 공급 속도로 배양물에 공급된다. 공급물 배지는 세포 배양물의 생산 단계 동안 발효 브로쓰에 통상 첨가된다.

[0096] 보충 탄소원의 제한된 양은, 예를 들면, 표준(탄수화물) 분석으로 측정되는 바와 같이 소정의 임계치 이하 또는 검출 한계 이하인, 세포 배양 브로쓰 중의 보충 탄소원의 잔류량에 의해 측정될 수 있다. 잔류량은 일반적으로 발효 생성물을 회수할 때에 발효 브로쓰에서 측정될 수 있다.

[0097] 보충 탄소원의 제한된 양은 또한, 시간당 계산된 평균 양을 측정하기 위해, 예를 들면, 배양 시간당 전체 배양 공정(예: 유가식 단계)에 걸쳐 첨가된 양에 의해 측정된 바와 같이, 발효기에 대한 보충 탄소원의 평균 공급 속도를 정의함으로써 측정될 수 있다. 이러한 평균 공급 속도는 세포 배양물에 의해 보충 탄소원의 완전한 사용을 보장하기 위해 낮게 유지되고, 예를 들면, $0.6\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ (초기 발효 용적(L) 및 시간(h)당 탄소원(g)) 내지 $25\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$, 바람직하게는 $1.6\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 내지 $20\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 로 유지된다.

[0098] 보충 탄소원의 제한된 양은 또한 생산 공정 전 또는 동안 특정한 성장 속도를 측정함으로써 결정될 수 있고, 여기서 특정한 성장 속도는 생산 단계 동안 낮게 유지되고, 예를 들면, 0.02 h^{-1} 내지 0.20 h^{-1} 범위, 바람직하게는 0.02 h^{-1} 내지 0.15 h^{-1} 범위로 유지된다.

[0099] 본원에서 사용된 용어 "세포주"는 장기간에 걸쳐 증식하는 능력을 획득한 특정 세포 유형의 확립된 클론을 지칭한다. 용어 "숙주 세포주"는 이러한 폴리펩티드에 의해 매개된 폴리펩티드 또는 세포 대사물질을 생산하는 대사 경로의 내인성 또는 재조합 유전자 또는 생성물을 발현하는데 사용되는 세포주를 지칭한다. "생산 숙주 세포주" 또는 "생산 세포주"는 POI 등의 생산 공정의 생성물을 수득하기 위해 생물반응기에서 배양을 위한 즉시 사용가능한 세포주인 것으로 통상 이해된다. 용어 "진핵 숙주" 또는 "진핵 세포주"는, POI 또는 숙주 세포 대사물질을 생산하기 위해 배양될 수 있는, 모든 진핵 세포 또는 생물체를 의미한다. 이는 당해 용어가 인간을 포함하지 않는 것으로 이해된다.

[0100] 용어 "발현" 또는 "발현 시스템" 또는 "발현 카세트"는, 이들 서열로 형질전환 또는 형질감염된 숙주가 인코딩

된 단백질 또는 숙주 세포 대사물질을 생성할 수 있도록, 작동가능한 연결 중에 목적하는 코딩 서열 및 조절 서열을 함유하는 핵산 분자를 지칭한다. 형질전환을 수행하기 위해, 발현 시스템은 벡터에 포함될 수 있지만, 관련 DNA는 또한 숙주 염색체 내로 통합될 수 있다. 발현은, 폴리펩티드 또는 대사물질을 포함하는, 분비 또는 비-분비 발현 생성물을 지칭할 수 있다.

[0101] 본원에서 사용된 "발현 작제물" 또는 "벡터"는 적합한 숙주 생물체에서 클로닝된 재조합 뉴클레오티드 서열, 즉 재조합 유전자의 전사 및 이들의 mRNA의 번역에 요구되는 DNA 서열로서 정의된다. 발현 벡터는 일반적으로, 구성 요소가 함께 작동적으로 연결되어 있는, 숙주 세포에서 자가 복제 기원, 선택가능한 마커(예를 들면, 아미노산 합성 유전자, 또는 제오신, 카나마이신, G418 또는 하이그로마이신 등의 항생물질에 대한 내성을 부여하는 유전자), 다수의 제한 효소 절단 부위, 적합한 프로모터 서열 및 전사 터미네이터를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "플라스미드" 및 "벡터"는 자가 복제하는 뉴클레오티드 서열, 및 뉴클레오티드 서열을 통합하는 개념을 포함한다.

[0102] 본 발명과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "변이체"는 특정 상동성 또는 유사성을 갖는 임의의 서열을 지칭한다. 변이체 프로모터는, 예를 들면, 프로모터 서열 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)으로부터 돌연변이유발에 의해 유래되어, 재조합 세포주에서 프로모터로서 사용하기에 적합한 서열을 생성한다. 이러한 변이체 프로모터는 소정의 특성을 갖는 라이브러리 구성원을 선택하여 돌연변이 서열의 라이브러리로부터 수득할 수 있다. 변이체 프로모터는 동일하거나 개선된 특성, 예를 들면, 억제 및 활성화 조건하에 증가된 분화 효과와 함께 POI 생산의 유도에 있어서 개선된 특성을 가질 수 있다. 변이체 프로모터는 또한, 예를 들면, 피키아 파스토리스 이외의 진핵 종으로부터 또는 피키아 이외의 속, 예를 들면, 케이. 라크티스(*K. lactis*), 제트. 로우시이(*Z. rouxii*), 피. 스티피티스(*P. stipitis*), 에이치. 폴리모르파(*H. polymorpha*)로부터 유래할 수 있다. 구체적으로는, 상응하는 피. 파스토리스 유전자와 유사한 유전자와 자연적으로 관련된 유사한 프로모터 서열은 자체로서 또는 이의 기능적 활성 변이체를 생산하기 위한 모 서열로서 사용될 수 있다. 구체적으로는,

[0103] - pG1과 유사한 프로모터는 G1(고친화력 글루코즈 운반체; 피. 파스토리스 GS115 설명: 추정 운반체, 당 운반부류의 구성원; 코딩 서열 서열번호 7)과 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0104] - pG3과 유사한 프로모터는 G3(코딩 서열 서열번호 8)와 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0105] - pG4와 유사한 프로모터는 G4(피. 파스토리스 GS115: 예측된 미토콘드리아 알데하이드 데하이드로제나제; 코딩 서열 서열번호 9)와 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0106] - pG6과 유사한 프로모터는 G6(코딩 서열 서열번호 10)와 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0107] - pG7과 유사한 프로모터는 G7(피. 파스토리스 GS115 : 주요 촉진인자 당 운반체 부류의 구성원; 코딩 서열번호 11)과 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0108] - pG8과 유사한 프로모터는 G8(피. 파스토리스 GS115: Gt11_Pac2 상파의 구성원; 코딩 서열 서열번호 12)과 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 한다.

[0109] 이러한 유사한 프로모터 서열 또는 이의 기능적 활성 변이체의 특성은 표준 기술을 사용하여 측정할 수 있다.

[0110] 본원에서 사용되는 뉴클레오티드 또는 프로모터 서열의 "기능적 활성" 변이체는 당해 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단의 어느 하나 또는 모두에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 서열의 변형을 유발하는 서열을 의미하고, 여기서 상기 변형은 당해 서열의 활성에 영향을 미치지 않는다(특히 순상).

[0111] 구체적으로는, 본 발명에 따르는 프로모터 서열의 기능적 활성 변이체는

[0112] - 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체,

[0113] - 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서, 바람직하게는 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp, 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는(즉, 이들을 포함하거나 이들로 이루어진), 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오티드 서열을

변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체; 및

[0114] - 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기능적 활성 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0115] 특히 바람직한 기능적 활성 변이체는, 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는(즉, 이를 포함하거나 이들로 이루어진), 변형에 의해 본 발명에 따르는 프로모터로부터 유래된 것들 및/또는 당해 프로모터 서열의 단편이다.

[0116] 본 발명에 따르는 바람직한 프로모터의 기능적 활성 변이체의 일부는, 예를 들면, pG1, pG3, pG4, pG6, pG7 또는 pG8 프로모터 뉴클레오티드 서열 중 하나의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편, 예를 들면, 3' 말단으로부터 상이한 5' 말단까지의 소정 범위, 예를 들면, 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp 또는 적어도 1000bp의 뉴클레오티드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 수득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오티드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열의 3' 말단을 포함하는 단편이다.

[0117] 예시적 변이체는 이러한 단편, 예를 들면, 3' 말단 서열을 포함하여, 200 내지 1000bp 범위, 바람직하게는 250 내지 1000bp 범위, 보다 바람직하게는 300 내지 1000bp 범위의 특정 길이를 갖는 단편을 포함하거나 이들로 이루어진 기능적 활성인 것으로 입증된다. 예를 들면, pG1의 기능적 활성 변이체는 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 따라서 뉴클레오티드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오티드 서열이다.

[0118] 본원에서 사용된 바와 같은 프로모터와 관련하여 용어 "조절가능한"은, 배치 배양의 성장 단계에서 탄소원(영양 기질)의 과량의 존재하에 진핵 세포에서 억제되고, 예를 들면, 탄소량의 감소시, 예를 들면, 유가식 전략에 따라 배양물에 성장 제한 탄소원(영양 기질)의 공급시에 활성화되어 생산 세포주의 생산 단계에서 강력한 프로모터 활성을 나타내는 프로모터를 지칭한다. 이와 관련하여, 용어 "조절가능한"은 "탄소원-제한 조절가능한" 또는 "글루코즈-제한 조절가능한" 것으로 이해되며, 이는 세포에 의해 용이하게 소비되도록 탄소 소비, 감소, 부족 또는 고갈에 의해 또는 탄소원의 제한된 첨가에 의한 프로모터의 활성화를 지칭한다.

[0119] 본 발명에 따르는 기능적 활성 프로모터는, 세포 성장 조건(성장 단계)하에 침묵 또는 억제되고, 생산 조건(생산 단계)하에 활성화 또는 탈-억제되어, 탄소원의 제한에 의해 생산 세포주에서 POI 생산을 유도하는데 적합한 비교적 강력한 조절가능한 프로모터이다. 따라서, 프로모터의 기능적 활성 변이체는 적어도 이러한 조절가능한 특성을 갖는다.

[0120] 본 발명에 따르는 조절가능한 프로모터의 강도는, 높거나 낮은 빈도로 당해 프로모터에서 발생하는 전사 개시의 효율성에 의해 나타내어지는, 이의 전사 강도를 지칭한다. 전사 강도가 보다 높을수록, 보다 빈번한 전사가 당해 프로모터에서 발생할 것이다. 프로모터 강도는, 소정 mRNA 서열이 얼마나 자주 전사되어, 다른 유전자에 비해 일부 유전자로 전사되는 높은 우선순위를 효과적으로 제공하고 전사체의 보다 높은 농도를 유도하는지를 결정하기 때문에 중요하다. 예를 들면, 대량으로 요구되는 단백질을 코딩하는 유전자는 통상적으로 상대적으로 강력한 프로모터를 갖는다. RNA 폴리머라제는 한번에 1회 전사 작업을 수행할 수 있기 때문에, 이의 작업이 효율적으로 되도록 우선 순위를 매겨야 한다. 프로모터 강도의 차이는 이러한 우선순위를 가능하게 하도록 선택된다. 본 발명에 따라서, 조절가능한 프로모터는 완전히 유도된 상태에서 비교적 강력하고, 이는 대략 최대 활성 상태로서 통상 이해된다. 상대적 강도는 표준 프로모터, 예를 들면, 숙주 세포로서 사용된 세포의 각각의 pGAP 프로모터와 관련하여 통상 결정된다. 전사 빈도는, 적합한 분석, 예를 들면, RT-PCR 또는 노던 블로팅으로 전사체의 양에 의해 측정된 바와 같은 전사율로서 통상 이해된다. 예를 들면, 본 발명에 따르는 프로모터의 전사 강도는 피. 파스토리스의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 피. 파스토리스인 숙주 세포에서 측정된다.

[0121] pGAP 프로모터는, 글루코즈 상에서 성장할 수 있는 임의의 미생물에 존재하는 구성 프로모터인 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로제나제(GAPDH)를 인코딩하는 gap 유전자의 발현을 개시한다. GAPDH(EC 1\2\1\12), 즉 해당작용의 중요한 효소는 이화 및 동화작용 탄수화물 대사에 중요한 역할을 한다.

[0122] 본 발명에 따르는 조절가능한 프로모터는, 종종 "상동성 pGAP 프로모터"라고 불리우는, 숙주 세포에서 천연

pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율 또는 전사 강도에 의해 반영되는, 비교적 높은 전사 강도를 나타낸다. 바람직하게는, 전사율 또는 강도는 적어도 20%, 특히 바람직한 경우에 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 및 적어도 100%, 또는 보다 높은, 예를 들면, POI을 생산하는 숙주 세포로서 선택된 진핵 세포에서 측정된 바와 같이, 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 150% 또는 적어도 200%이다.

[0123] 유도된 상태에서 pG1, pG3, pG4, pG6, pG7 또는 pG8 프로모터 중 하나의 적어도 전사 강도를 갖는 조절가능한 프로모터가 특히 바람직하다. 참고로서 pGAP 프로모터를 사용하는 비교용 전사 강도는 표준 수단에 의해, 예를 들면, 세포 배양물에서 마이크로어레이 등을 사용하여 전사체의 양을 측정함으로써, 예를 들면, 재조합 세포에서 각 유전자 발현 생성물의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 예시적 시험은 실시예 부분에서 설명되어 있다.

[0124] 구체적으로, 본 발명에 따르는 프로모터는 글루코즈 및 글루코즈 제한의 존재하에 이의 강도를 비교하여 시험에서 측정한 바와 같이 상이한 프로모터 강도로 조절가능한 탄소원이고, 이는 비교적 높은 글루코즈 농도, 바람직하게는 적어도 10g/L, 바람직하게는 20g/L에서 여전히 억제되는 것을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명에 따르는 프로모터는 당해 프로모터를 완전히 유도하는 제한된 글루코즈 농도 및 글루코즈 역치 농도에서 완전히 유도되고, 여기서 역치는 20g/L 미만, 바람직하게는 10g/L, 1g/L 미만, 심지어 0.1g/L 미만, 또는 50mg/L 미만이고, 바람직하게는 40mg/L의 글루코즈 농도에서 천연 상동성 pGAP 프로모터의 적어도 50%의 완전 전사 강도를 갖는다.

[0125] 바람직하게는, 상이한 프로모터 강도는 소정의 탄소원 역치 이하의 유도 조건으로 전환시에 POI 생산의 개시에 의해 측정되고, 억제된 상태에서의 강도와 비교된다. 전사 강도는, 활성화 조건하에 대략 최대 활성을 나타내는, 완전히 유도된 상태에서의 강도로서 통상 이해된다. 상이한 프로모터 강도는, 예를 들면, 억제 조건과 비교하여 또는 전사체의 양에 의해 활성화 조건하에서 재조합 숙주 세포주에서 POI 생산의 효율성 또는 수율에 따라 결정된다. 본 발명에 따르는 조절가능한 프로모터는 바람직한 상이한 프로모터 강도를 갖고, 이는, 유도 배율로 또한 이해되는, 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 보다 바람직하게는 5배, 보다 더 바람직하게는 적어도 10배, 보다 더 바람직하게는 20배, 보다 바람직하게는 적어도 30, 40, 50 또는 100배이다. 이러한 상이한 프로모터 강도는 개시된 실시예에 의해 설명된 바와 같은 시험으로 측정될 수 있다.

[0126] 종래 기술의 프로모터(MLS1 프로모터 또는 ICL1 프로모터)는 2배 유도보다 현저히 낮은 상이한 프로모터 강도를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 종래 기술의 프로모터는 pGAP 프로모터 표준과 비교하여 약 5%의 프로모터 강도와 함께 산업적 POI 생산에 유용하지 않다. 이는 본 발명에 따르는 프로모터과 직접 비교하여 실증되었다.

[0127] 용어 "상동성"은 2개 이상의 뉴클레오티드 서열이 어느 정도, 100%에 근접한 정도 이하까지 상응하는 위치에서 동일하거나 보존된 염기쌍을 갖는지를 나타낸다. 상동성 서열은 일반적으로 적어도 약 50% 뉴클레오티드 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 60% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 70% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 80% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 동일한, 보다 바람직하게는 적어도 약 95% 동일성을 갖는다.

[0128] 본 발명에 따르는 상동성 프로모터 서열은 바람직하게는, 예를 들면, 각각의 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 영역을 포함하는, 뉴클레오티드 서열의 적어도 특정 부분, 바람직하게는 각각의 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 말단 이하의 특정한 길이를 갖는 부분, 예를 들면, 적어도 200bp, 바람직하게는 적어도 250bp, 바람직하게는 적어도 300bp, 보다 바람직하게는 적어도 400bp, 적어도 500bp, 적어도 600bp, 적어도 700bp, 적어도 800bp, 적어도 900bp 또는 적어도 1000bp 길이를 갖는 부분에 피. 파스토리스의 pG1, pG3, pG4, pG6, pG7 또는 pG8 프로모터 뉴클레오티드 서열 중의 어느 하나와 특정의 상동성, 및 피키아 파스토리스 이외의 종으로부터 유래하는 유사체를 갖는다. 구체적으로, 적어도 이들 부분은 바람직하게는, 각각의 프로모터 뉴클레오티드 서열의 3' 말단 서열을 포함하는, 300 내지 1000bp 범위 내에서 상동성이다.

[0129] 유사한 서열은 통상 다른 종 또는 균주로부터 유래한다. 이는 피키아 파스토리스 이외의 종으로부터 유래하는 본 발명의 유사한 프로모터 서열 중 어느 하나가 상동성 서열, 즉 본원에 기재된 바와 같은 특정 상동성을 갖는 서열을 포함할 수 있는 것으로 명시적으로 이해된다. 따라서, 용어 "상동성"은 또한 유사한 서열을 포함할 수 있다. 한편, 이는 본 발명이 또한 특정 상동성을 포함하는 유사한 서열 및 상동체를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0130] 유전자의 뉴클레오티드 서열과 관련하여 "퍼센트(%) 동일성"은, 필요에 따라, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성

하기 위해 및 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존 치환체를 고려하지 않고서, 당해 서열의 정렬 및 갭의 도입 후에, DNA 서열 중의 뉴클레오티드와 동일한 후보 DNA 서열 중의 뉴클레오티드의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 뉴클레오티드 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은, 예를 들면, 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 당업자의 범위 내에 있는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 당업자는, 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 모든 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0131] 본 발명과 관련하여 사용되는 용어 "돌연변이유발"은, 비-코딩 또는 코딩 영역 중의 적어도 하나의 변화를 갖는 이의 변이체를 수득하기 위해, 예를 들면, 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 및/또는 치환을 통해, 뉴클레오티드 서열의 돌연변이체를 제공하는 방법을 지칭한다. 돌연변이유발은 랜덤, 반-랜덤 또는 부위 지시된 돌연변이를 통해 이루어질 수 있다. 통상적으로, 거대 랜덤화 유전자 라이브러리는 고도의 유전자 다양성으로 생산되고, 이는 구체적으로 목적하는 유전자형 또는 표현형에 따라 선택될 수 있다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "목적 단백질(POI)"은 숙주 세포에서 재조합 기술에 의해 생산되는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 더욱 구체적으로는, 단백질은 숙주 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 폴리펩티드 (즉, 이종성 단백질)일 수 있거나, 숙주 세포에 대해 천연적일 수 있지만(즉, 숙주 세포에 대해 상동성 단백질), 예를 들면, POI를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 자가 복제 벡터를 사용한 형질전환에 의해, 또는 숙주 세포의 계놈 내로 POI를 인코딩하는 핵산 서열의 하나 이상의 카페의 재조합 기술에 의한 통합으로, 또는, 예를 들면, 프로모터 서열의 POI를 인코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열의 재조합 변형에 의해 생산된다. 몇몇 경우, 본원에 사용된 용어 POI는 재조합에 의해 발현된 단백질에 의해 매개된 바와 같은 숙주 세포에 의한 임의의 대사 생성물을 지칭한다.

[0133] 본원에서 사용된 용어 "재조합"은 "유전자 조작에 의해 또는 유전자 조작의 결과로서 제조되는" 것을 의미한다. 따라서, "재조합 미생물"은 적어도 하나의 "재조합 핵산"을 포함한다. 재조합 미생물은 구체적으로 발현 벡터 또는 클로닝 벡터를 포함하거나, 재조합 핵산 서열을 함유하도록 유전자 조작되어 있다. "재조합 단백질"은 숙주에서 각각의 재조합 핵산을 발현시킴으로써 생산된다. "재조합 프로모터"는 본원에 기재된 바와 같은 기능적 활성 프로모터로서 사용하기에 적합한 유전자 조작된 비-코딩 뉴클레오티드 서열이다.

[0134] 놀랍게도, 진핵 세포는 탄소원의 이용가능성을 제한함으로써 POI의 생산을 유도할 수 있음이 밝혀졌다. 탄소 고갈 조건은 본 기술분야에서 지금까지 알려져 있지 않은 강력한 프로모터 활성의 유도를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 당 제한하에 억제되는 제US2008299616A1호에 기재된 바와 같은 피키아 파스토리스의 MLS1 프로모터는 실제로 POI 생산을 위한 상대적으로 약한 조절가능한 프로모터였다. 따라서, 피. 파스토리스의 이러한 강력한 조절가능한 프로모터는 특히 재조합 POI 생산을 위해 동정될 수 있고 진핵 생산 세포주에서 사용될 수 있다는 것은 놀라운 일이다.

[0135] 피. 파스토리스의 GS115 균주의 9.43Mbp 계놈 서열이 결정되고 제US20110021378A1호에 개시되어 있지만, 프로모터 서열 등의 개개 서열의 특성은 상세히 조사되어 있지 않다. 예를 들면, 본원에 기재된 pG4 서열(서열번호 4)는 제US20110021378A1호에서 프로모터 서열로 동정되었지만, 이의 조절가능한 특성 또는 탄소 고갈 조건에서의 이의 사용은 알려지지 않았다. 이러한 프로모터가 본 발명에 따르는 방법에서 효과적으로 사용될 수 있다는 것은 놀라운 일이다. 산업적 규모의 POI 생산에 사용된 바와 같은 종래 기술의 조절가능한 프로모터는 메탄을 대사 경로로부터 주로 유래하며, 종종 바람직하지 않은 POI 생산을 유도하기 위해 메탄을 첨가를 필요로 했다. 본 발명에 따르는 방법은 증강된 발현에 의해 생산 증가를 제공하고, 특히 메탄을 함유하지 않는 화학적으로 규정된 배지를 사용하는 경우, 특정 프로모터 조절에 기인하여 감소된 오염 위험을 갖는다는 잇점을 갖는다.

[0136] 본 발명에 따르는 조절가능한 프로모터는 프로모터 억제 및 활성화 조건의 확립에 적합한 매우 특정한 배양 배지의 사용시에만 이들의 조절가능한 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 피. 파스토리스는 산업적 생산 공정의 조건하에 성공적으로 배양될 수 있다. 먼저, 글리세롤 등의 기초 탄소원 상에서의 배치 배양을 사용하고, 글루코즈 등의 보충 탄소원의 제한된 공급물을 사용한 유가식을 사용했다. 샘플은 1차 배치 단계의 말기에 근접하여, 및 예를 들면, 보충 탄소원의 제한된 양을 사용하여 제한된 성장 조건에서 취했다. DNA 마이크로어레이를 사용한 전사체 분석은 보충 탄소원에 대해 강력하게 활성적이고 과잉 탄소, 즉 과량의 기초 탄소원의 존재하에 약하거나 불활성인 특이적 유전자를 나타냈다. 적어도 6개의 프로모터 서열은 본 발명에 따르는 조절가능한 프로모터, 즉 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 및 pG8(서열번호 6)로서 동정되었다. 종래 기술의 필적하는 MLS1 또는 ICL1 프로모터는 단지 약했고, pG1 프로모터 강도의 1/10 미만이고 검출가능한 조절이 없다.

- [0137] 기저 탄소원 상에서 재조합 유전자 발현을 억제하는 특징 및 제한된 보충 탄소원 상에서 강력한 발현, 즉 기질 변화에 의한 유도는 발효 과정에서 확인될 수 있다.
- [0138] 개선된 재조합 단백질 생산을 제공할 수 있는 본 발명에 따르는 조절 서열로 사용될 수 있는 뉴클레오티드 서열은 다양한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 본 발명에 따르는 프로모터의 기원은 바람직하게는 효모 세포, 가장 바람직하게는 피키아 속 또는 피. 파스토리스 종 등의 메틸로트로피 효모의 것이고, 이어서 프로모터는 적합한 변이체, 예를 들면, 돌연변이체 또는 유사체를 생산하기 위한 모 서열로서 사용될 수 있다.
- [0139] 일련의 효모 세포, 특히 일련의 피키아 균주는 탄소 고갈 조건하에 단백질 생산에 적합한 각각의 프로모터 서열, 또는 상이한 종의 각각의 유사체를 수득하는데 적합할 수 있는 것으로 생각된다.
- [0140] 상동체 및 유사체 등의 기능적 활성 변이체를 포함하는 동정된 피. 파스토리스 프로모터의 변이체는 표준 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 프로모터는, 예를 들면, 변화된 발현 수준 및 조절 특성을 갖는 프로모터 변이체를 생성하기 위해 변형시킬 수 있다.
- [0141] 예를 들면, 프로모터 라이브러리는, 상이한 발효 전략하에서 이들의 발현을 위한 변이체를 분석하고 적합한 변이체를 선택함으로써, 예를 들면, 진핵 세포에서 유전자 발현을 미세 조정하기 위한 모 분자로서 사용될 수 있는, 본 발명에 따르는 프로모터 서열의 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 변이체의 합성 라이브러리는, 예를 들면, 선택된 POI를 생산하기 위한 요건에 합치하는 프로모터를 선택하기 위해 사용할 수 있다. 이러한 변이체는 진핵 숙주 세포에서 증가된 발현 효율 및 탄소원의 고갈시에 고도의 발현을 가질 수 있다.
- [0142] 상이한 발효 전략은 본 발명에 따르는 단계 a) 등의 성장 단계와 단계 b) 등의 생산 단계를 구별할 것이다.
- [0143] 성장 및/또는 생산은 적합하게는 배치식 방식, 유가식 방식 또는 연속식 방식으로 수행할 수 있다. 배치식, 유가식, 연속식, 교반 탱크 반응기 또는 에어리프트 반응기를 포함하는 임의의 적합한 생물반응기가 사용될 수 있다.
- [0144] 파일럿 또는 산업 규모로 발효 공정을 제공하는 것이 유리하다. 산업 공정 규모는 바람직하게는 적어도 10L, 특히 적어도 50L, 바람직하게는 적어도 1m^3 , 바람직하게는 적어도 10m^3 , 가장 바람직하게는 적어도 100m^3 의 용적을 사용할 것이다.
- [0145] 산업 규모의 생산 조건이 바람직한데, 이는 수일의 전형적 공정 시간을 사용하는 100L 내지 10m^3 의 반응기 용적으로 유가식 배양, 또는 대략 0.02 내지 0.15h^{-1} 의 희석 속도로 대략 50 내지 1000L 이상의 발효기 용적으로 연속식 공정을 지칭한다.
- [0146] 적절한 배양 기술은 배치 단계로 개시하는 생물반응기에서의 배양, 이어서 높은 비성장 속도에서 짧은 지수 유가식 단계, 이어서 추가로 낮은 비성장 속도에서 유가식 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 적합한 배양 기술은 배치 단계, 이어서 낮은 희석 속도에서 연속 배양 단계를 포함할 수 있다.
- [0147] 본 발명의 바람직한 양태는 생물량을 제공하기 위한 배치 배양, 이어서 고수율 POI 생산을 위한 유가식 배양을 포함한다.
- [0148] 예를 들면, 세포주는 생물량을 수득하기 위해 글리세롤 또는 글루코즈 상에서 본 발명의 단계 a)로 성장시킬 수 있다.
- [0149] 적어도 1g/L 세포 건조 중량, 보다 바람직하게는 적어도 10g/L 세포 건조 중량, 바람직하게는 적어도 20g/L 세포 건조 중량의 세포 밀도를 수득하기 위해 성장 조건하에 생물반응기에서 본 발명에 따르는 숙주 세포주를 배양하는 것이 바람직하다. 파일럿 또는 산업적 규모로 생물량 생산의 이러한 수율을 제공하는 것이 유리하다.
- [0150] 생물량 축적을 가능하게 하는 성장 배지, 특히 기초 성장 배지는 통상적으로 탄소원, 질소원, 황 공급원 및 인산염 공급원을 포함한다. 일반적으로, 이러한 배지는 또한 미량 원소 및 비타민을 추가로 포함하고, 아미노산, 웨톤 또는 효모 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0151] 바람직한 질소원은 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 또는 NH_3 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 포함한다.
- [0152] 바람직한 황 공급원을 MgSO_4 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 또는 K_2SO_4 를 포함한다.
- [0153] 바람직한 인산염 공급원은 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 또는 H_3PO_4 또는 NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 또는 K_2HPO_4 를 포함한다.

- [0154] 또한, 전형적 배지 성분은 KCl, CaCl₂, 및 미량 원소, 예를 들면, Fe, Co, Cu, Ni, Zn, Mo, Mn, I, B를 포함한다.
- [0155] 바람직하게는, 배지는 비타민 B₇가 보충된다.
- [0156] 피. 파스토리스를 위한 전형적 성장 배지는 글리세롤 또는 글루코즈, NH₄H₂PO₄, MgSO₄, KCl, CaCl₂, 비오틴 및 미량 원소를 포함한다.
- [0157] 생산 단계에서, 생산 배지는 구체적으로 보충 탄소원의 제한된 양으로 사용된다.
- [0158] 바람직하게는, 숙주 세포주는 적합한 탄소원을 갖는 무기 배지에서 배양되고, 이에 의해 단리 공정을 현저히 단순화시킨다. 바람직한 무기 배지의 예는, 예를 들면, 영양요구성을 보충하기 위해, 사용가능한 탄소원(예를 들면, 글루코즈, 글리세롤 또는 메탄올), 매크로 원소(칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 염화물, 황산염, 인산염) 및 미량 원소(구리, 요오드, 망간, 몰리브덴, 코발트, 아연 및 철 염, 봉산)를 함유하는 염 및 임의로 비타민 또는 아미노산을 함유하는 것이다.
- [0159] 세포는 목적하는 POI의 발현을 수행하기에 적합한 조건하에 배양되고, 이는 발현 시스템 및 발현된 단백질의 성질에 따라, 예를 들면, 당해 단백질이 신호 웨티드에 융합되는지의 여부 및 당해 단백질이 가용성 또는 막-결합되는지의 여부에 따라 세포 또는 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 배양 조건은 숙주 세포의 종류 및 사용된 특정 발현 벡터를 포함하는 요인에 따라 달라질 것이다.
- [0160] 본 발명에 따르는 프로모터에 의한 POI 생산의 유도는 바람직하게는 탄소 및 에너지의 유일한 공급원으로서 제한된 양으로 보충 탄소원 상에서 세포를 배양함으로써 조절된다. 세포는 탄소 제한된 조건하에 매우 서서히 성장하지만, 조절가능한 프로모터의 조절하에 POI를 고수율로 생산한다.
- [0161] 프로모터 활성의 차이는 구체적으로는 억제된 상태와 비교하여 활성화된 상태에서 적어도 2배, 바람직하게는 적어도 5배, 보다 바람직하게는 적어도 10배, 보다 바람직하게는 적어도 20배, 보다 바람직하게는 30, 40, 50 또는 100배이다.
- [0162] 본 발명에 따르는 적합한 프로모터 서열을 임의로 추가로 바람직한 조절 서열과 함께 선택함으로써, 비교가능한 조건하에, 프로모터 활성 또는 전사 강도에 의해 표시되거나, 생산 세포와 상동성인 GAP 프로모터, 천연 pGAP와 비교하여 프로모터 강도에 의해 조절되거나, 피. 파스토리스로부터 단리되는, 적어도 동일한 또는 적어도 약 1.5배, 또는 적어도 약 2배 또는 적어도 약 5배, 10배, 또는 적어도 약 15배 이하의 활성을 제공할 수 있다.
- [0163] 전형적인 생산 배지는 보충 탄소원, 및 추가로 NH₄H₂PO₄, MgSO₄, KCl, CaCl₂, 비오틴 및 미량 원소를 포함한다.
- [0164] 예를 들면, 발효 이외에 보충 탄소원의 공급물은 50중량% 이하의 발효가능한 당과 함께 탄소원을 포함할 수 있다. 보충 배지의 낮은 공급 속도는 세포 성장에 대한 생성물 억제의 효과를 제한할 수 있고, 따라서 기질 제공에 기반한 높은 생산 수율이 가능해질 것이다.
- [0165] 발효는 바람직하게는 3 내지 7.5의 pH에서 수행된다.
- [0166] 전형적인 발효 시간은 20°C 내지 35°C, 바람직하게는 22°C 내지 30°C의 온도에서 약 24 내지 120시간이다.
- [0167] 일반적으로, 본원에서 지칭되는 재조합 핵산 또는 생물체는 당업자에게 공지된 재조합 기술에 의해 생산할 수 있다. 본 발명에 따르면, 당업자의 기술 범위 내의 통상의 분자생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌[참조: Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)"]에 충분히 설명되어 있다.
- [0168] 본 발명의 바람직한 양태에 따르면, 재조합 작제물은 프로모터 및 관련 유전자를 벡터 내로 결찰시킴으로써 수득된다. 이를 유전자는 이러한 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킴으로써 숙주 세포 계놈 내로 안정하게 통합될 수 있다.
- [0169] 발현 벡터는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 클로닝 벡터, 변형된 클로닝 벡터, 및 구체적으로 설계된 플라스미드를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 바와 같은 바람직한 발현 벡터는 숙주 세포에서 재조합 유전자의 발현에 적합한 임의의 발현 벡터일 수 있고, 숙주 생물에 따라 선택된다. 재조합 발현 벡터는, 숙주 벡터로도 불리우는, 숙주 생물체의 계놈에서 복제가능하거나 계놈 내로 통합가능한 임의의 벡터일 수 있다.
- [0170] 본 발명에 있어서, 벡터로서는 pPUZZLE로부터 유래되는 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.

- [0171] 적절한 발현 벡터는 일반적으로는 전핵 숙주 세포에서 POI를 인코딩하는 DNA의 발현에 적합한 추가의 조절 서열을 포함한다. 조절 서열의 예는 작동인자, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 및 전사 및 변역 개시 및 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 조절 서열은 발현되는 DNA 서열에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [0172] 숙주 세포에서 재조합 뉴클레오티드 서열의 발현을 가능하게 하기 위해, 발현 벡터는, 예를 들면, 신호 웨티드 유전자의 상류에 존재하는, 코딩 서열의 5' 말단에 인접한 본 발명에 따르는 프로모터를 제공할 수 있다. 따라서, 전사는 이러한 프로모터 서열에 의해 조절되고 개시된다.
- [0173] 신호 웨티드는 이종성 신호 웨티드 또는 천연 및 이종성 신호 웨티드의 하이브리드일 수 있고, 구체적으로는 단백질을 생산하는 숙주 생물체에 대해 이종성 또는 동종성일 수 있다. 신호 웨티드의 기능은 POI가 분비되어 세포질내 망상조직으로 도입하게 하는 것이다. 통상적으로, 이는 혈장 막 외부로 단백질의 수송을 유도하는 짧은 (3 내지 60개 아미노산 길이) 웨티드 쇄이고, 이에 의해 이종성 단백질을 분리 및 정제하는 것이 용이해진다. 일부 신호 웨티드는, 단백질이 수송된 후, 신호 웨티다제 의해 단백질로부터 절단된다.
- [0174] 예시적 신호 웨티드는 예스. 세레비지애 알파-접합 인자 프레프로(prepro) 웨티드로부터의 신호 서열 및 피. 파스토리스 산 포스파타제 유전자(PH01)로부터의 신호 웨티드이다.
- [0175] 프로모터 서열은, 당해 프로모터가 코딩 서열의 전사를 조절하는 경우, 코딩 서열에 작동적으로 연결되어 있는 것으로 이해된다. 프로모터 서열이 코딩 서열에 자연적으로 연결되어 있지 않은 경우, 이의 전사는 천연(야생형) 세포 중의 프로모터에 의해 조절되지 않거나, 당해 서열은 상이한 연속 서열과 재결합된다.
- [0176] 관련 서열의 기능을 증명하기 위해, 하나 이상의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터는 POI의 발현을 유도하도록 작제될 수 있고, 발현된 수율은 통상의 조절 요소를 갖는 작제물과 비교된다. 실험 절차에 대한 상세한 설명은 하기 실시예에서 발견된다. 동정된 유전자는 특이적 뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 피. 파스토리스로부터 PCR에 의해 증폭시키고, 발현 벡터 내로 클로닝시키고, 예를 들면, 다양한 상이한 POI의 고수준 생산을 위해, 효모 벡터 및 피. 파스토리스 균주를 사용하여 전핵 세포주 내로 형질전환시킨다. 이와 같이 생산된 재조합 POI의 양에 대한 본 발명에 따르는 프로모터의 효과를 평가하기 위해, 전핵 세포주는, 통상의 비-탄소원 조절 가능한 프로모터, 예를 들면, 각각의 세포에서 표준 pGAP 프로모터를 포함하는 균주와 비교하여 진탕 플라스크 실험 및 유가식 또는 케모스타트 밸효로 배양할 수 있다. 특히, 프로모터의 선택은 재조합 단백질 생산에 큰 영향을 미친다.
- [0177] 미생물에 의한 재조합 DNA 단편의 흡수를 위한 바람직한 형질전화 방법은 화학적 형질전환, 전기천공 또는 원형 질체에 의해 형질전환을 포함한다. 본 발명에 따르는 형질전환체는, 이러한 벡터 DNA, 예를 들면, 플라스미드 DNA를 숙주 내로 도입하고, 관련 단백질 또는 숙주 세포 대사물질을 고수율로 발현시키는 형질전환체를 선택함으로써 수득할 수 있다.
- [0178] POI는 이와 같이 수득된 형질전환체를 적절한 배지에서 배양하고, 발현된 생성물 또는 대사물질을 배양물로부터 단리하고, 이를 적합한 방법으로 임의로 정제함으로써 재조합 숙주 세포주를 사용하여 생산할 수 있다.
- [0179] 본 발명에 따르는 형질전환체는 이러한 벡터 DNA, 예를 들면, 플라스미드 DNA를 숙주 내로 도입하고, POI 또는 숙주 세포 대사물질을 고수율로 발현시키는 형질전환체를 선택함으로써 수득할 수 있다. 숙주 세포는 전기 펠스법, 원형질체 방법, 리튬 아세테이트 방법 및 이의 변형 방법 등과 같이 전핵 세포의 형질전환에 통상 사용되는 방법으로 외래 DNA를 도입할 수 있도록 처리된다. 피. 파스토리스는 바람직하게는 전기천공에 의해 형질전환된다.
- [0180] 본 발명에 따르는 바람직한 숙주 세포주는 본 발명에 따라 사용된 유전적 특성을 유지하고, 생산 수준은 높게, 예를 들면, 약 20세대 배양, 바람직하게는 적어도 30세대, 보다 바람직하게는 적어도 40세대, 가장 바람직하게는 적어도 50세대 배양 후에도 적어도 μg 수준으로 유지된다. 안정한 재조합체 숙주 세포는, 산업적 규모 생산을 위해 사용되는 경우에 큰 잇점이 있는 것으로 생각된다.
- [0181] 본 발명의 방법에 따라 POI의 생산을 위하 몇몇 상이한 접근방식이 바람직하다. 물질은, 관련 단백질 및 상기 한 바와 같은 조절 요소 중의 적어도 하나를 코딩하는 재조합 DNA를 함유하는 발현 벡터로 전핵 숙주 세포를 형질전환시키고, 형질전환된 세포의 배양물을 제조하고, 전사 및 POI 생산을 유도하고, 밸효 공정의 생성물을 회수함으로써 발현되고, 처리되고, 임의로 분비될 수 있다.
- [0182] POI는 바람직하게는 적어도 1mg/L, 바람직하게는 적어도 10mg/L, 바람직하게는 적어도 100mg/L, 가장 바람직하게는 적어도 1g/L의 수율을 생성하는 조건을 사용하여 발현된다.

- [0183] 본 발명에 따르는 숙주 세포는 바람직하게는 하기 시험에 의해 이의 발현 능력 또는 수율에 대해 시험된다: ELISA, 활성 분석, HPLC 또는 기타 적합한 시험.
- [0184] 본원에 개시된 방법은 바람직하게는 분비된 형태로 또는 세포내 생성물로서 POI의 발현을 가능하게 하는 조건하에 상기 재조합 숙주 세포를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이어서, 재조합에 의해 생산된 POI 또는 숙주 세포 대사물질은 세포 배양 배지로부터 단리될 수 있고, 당업자에게 공지된 기술에 의해 추가로 정제될 수 있다.
- [0185] 본 발명에 따라 생산된 POI는 통상적으로 당해 기술분야의 기술 상태를 사용하여 단리되고 정제될 수 있고, 이는 목적하는 POI 농도의 증가 및/또는 적어도 하나의 불순물 농도의 감소를 포함한다.
- [0186] POI가 세포로부터 분비되는 경우, 이는 당해 기술분야의 기술 상태를 사용하여 세포 배지로부터 단리 및 정제될 수 있다. 숙주 세포로부터 재조합 발현 생성물의 분비는, 효모 세포가 파쇄되어 세포내 단백질을 방출하는 경우에 발생하는 단백질의 복잡한 혼합물이 아닌 배양 상청액으로부터 회수되기 때문에, 정제 공정의 촉진을 포함하는 이유에서 일반적으로 유리하다.
- [0187] 또한, 배양된 형질전환체 세포는 초음파 또는 기계적, 효소적 또는 화학적으로 파쇄되어, POI가 분리 및 정제되는, 목적하는 POI를 함유하는 세포 추출물을 수득할 수 있다.
- [0188] 재조합 폴리펩티드 또는 단백질 생성물을 수득하는 분리 및 정제 방법으로서는, 용해도 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 염석(salting out) 및 용매 침전), 문자량 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 초음파 및 겔 전기영동), 전하 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피), 특이적 친화성을 이용하는 방법(예를 들면, 친화성 크로마토그래피), 소수성 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 역상 고성능 액체 크로마토그래피) 및 등전점 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 등전점 전기영동) 등의 방법이 사용될 수 있다.
- [0189] 고도로 정제된 생성물은 오염 단백질을 본질적으로 함유하지 않고, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 또는 적어도 98%, 100% 이하의 순도를 갖는다. 정제된 생성물은 세포 파편으로부터 세포 배양 상청액 등의 정제에 의해 수득할 수 있다.
- [0190] 단리 및 정제 방법으로서는 하기 표준 방법이 바람직하다: 세포 파괴(POI가 세포내에서 수득되는 경우), 세포(파편) 분리 및 정밀여과 또는 접선 유통 필터(TFF)에 의한 세척 또는 원심분리, 침전 또는 열 처리에 의한 POI 정제, 효소적 소화에 의한 POI 활성화, 크로마토그래피, 예를 들면, 이온 교환(IEX), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 친화성 크로마토그래피, 크기 배제(SEC) 또는 HPLC 크로마토그래피에 의한 POI 정제, 농축의 POI 침전 및 한외여과 단계에 의한 세척.
- [0191] 분리 및 정제된 POI는 통상의 방법, 예를 들면, 웨스턴 블로팅, HPLC, 활성 분석 또는 ELISA에 의해 동정될 수 있다.
- [0192] POI는 임의의 진핵, 원핵 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 이는 분비된 단백질 또는 세포내 단백질일 수 있다. 본 발명은 또한 천연 발생 단백질의 기능적 유사체, 기능적 등가 변이체, 유도체 및 생물학적 활성 단편의 재조합 생산을 제공한다. 기능적 유사체는 바람직하게는 서열의 기능적 특성과 동일하거나 상응하고 이러한 특성을 갖는다.
- [0193] 본원에서 지칭되는 POI는 바람직하게는 치료적, 예방적, 진단적, 분석적 또는 산업적 사용을 위해 진핵 숙주 세포와 동종성이거나 이종성인 생성물일 수 있다.
- [0194] POI는 바람직하게는 진핵 세포, 바람직하게는 효모 세포에서 바람직하게는 분비된 단백질로서 생산되는 이종성 재조합 폴리펩티드 또는 단백질이다. 바람직하게 생산된 단백질의 예는 면역글로불린, 면역글로불린 단편, 아프로테닌, 조직 인자 경로 억제제 또는 기타 프로테아제 억제제, 및 인슐린 또는 인슐린 전구체, 인슐린 유사체, 성장 호르몬, 인터류킨, 조직 플라스미노겐 활성화제, 형질전환 성장 인자 a 또는 b, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드 1(GLP-1), 글루카곤-유사 펩티드 2(GLP-2), GRPP, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 XIII, 혈소판 유래된 성장 인자 1, 혈청 알부민, 효소, 예를 들면, 리파제 또는 프로테아제, 또는 천연 단백질과 유사한 기능을 갖는 기능적 유사체, 기능적 등가 변이체, 유도체 및 생물학적 활성 단편이다. POI는 천연 단백질과 구조적으로 유사할 수 있고, C- 및 N-말단 중의 어느 하나 또는 둘 다에 또는 천연 단백질의 측쇄에 하나 이상의 아미노산의 부가, 천연 아미노산 서열 중의 하나 또는 다수의 상이한 부위에서 하나 이상의 아미노산의 치환, 천연 단백질의 하나 또는 두 말단에서 또는 아미노산 서열 중의 하나 또는 몇몇 부위에서 하나 이상의 아미노산의 결실, 또는 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 삽입에 의해 천연 단백질로

부터 유래할 수 있다. 이러한 변형은 상기 언급한 몇몇 단백질에 대해 공지되어 있다.

[0195] 또한, POI는, 상기 생화학적 반응의 생성물 또는 몇몇 반응의 캐스케이드를 수득할 목적, 예를 들면, 숙주 세포의 대사물질을 수득할 목적으로, 숙주 세포에서 생화학적 반응을 제공하는 기질, 효소, 억제제 또는 보조인자로부터 선택될 수 있다. 예시적 생성물은 비타민(예: 리보플라빈), 유기산 및 알콜일 수 있고, 이는 본 발명에 따르는 재조합 단백질 또는 POI의 발현 후에 증가된 수율로 수득될 수 있다.

[0196] 일반적으로, 재조합 생성물을 발현하는 숙주 세포는 POI의 재조합 발현에 적합한 임의의 진핵 세포일 수 있다.

[0197] 바람직한 포유동물 세포의 예는 BHK, CHO(CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHO-K1, CHOK1SV, CHO-S), HeLa, HEK293, MDCK, NIH3T3, NS0, PER.C6, SP2/0 및 VERO 세포이다.

[0198] 본 발명에 따라 숙주 세포로서 사용된 바람직한 효모의 예는, 이로써 한정되지 않지만, 사카로마이세스 속(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지애), 페키아 속(예를 들면, 페. 파스토리스 또는 페 메타노리카), 코마가타엘라 속(케이. 파스토리스, 케이. 슈도파스토리스 또는 케이. 파파이), 한세눌라 폴리모르파 또는 클루이베로마이세스 락티스를 포함한다.

[0199] 보다 새로운 문헌은 페키아를 코마가타엘라 파스토리스, 코마가타엘라 파파이 및 코마가타엘라 슈도파스토리스로 분할하여 개명한다. 본원에서 페키아 파스토리스는 모든 코마가타엘라 파스토리스, 코마가타엘라 파파이 및 코마가타엘라 슈도파스토리스에 대해 동의어로 사용된다.

[0200] 바람직한 효모 숙주 세포는 메틸로트로픽 효모, 예를 들면, 페키아 또는 코마가타엘라, 예를 들면, 페키아 파스토리스, 또는 코마가타엘라 파스토리스, 또는 케이. 파파이, 또는 케이. 슈도파스토리스로부터 유래된다. 숙주의 예는 효모, 예를 들면, 페. 파스토리스를 포함한다. 페. 파스토리스의 예는 균주 CBS 704(= NRRL Y-1603 = DSMZ 70382), CBS 2612(= NRRL Y-7556), CBS 7435(= NRRL Y-11430), CBS 9173-9189(CBS 균주: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands), 및 DSMZ 70877(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)를 포함할 뿐만 아니라, 인비트로겐(Invitrogen)사의 균주, 예를 들면, X-33, GS115, KM71 및 SMD1168을 포함한다. 에스. 세레비지애 균주의 예는 W303, CEN.PK 및 BY-시리즈(EUROSCARF collection)을 포함한다. 상기한 모든 균주는 형질전환체를 생산하고 이종성 유전자를 발현시키기 위해 성공적으로 사용되었다.

[0201] 본 발명에 따르는 바람직한 효모 숙주 세포, 예를 들면, 페. 파스토리스 또는 에스. 세레비지애 숙주 세포는 이 종성 또는 재조합 프로모터 서열을 함유하고, 이는 생산 숙주와는 상이한, 페. 파스토리스 또는 에스. 세레비지 애로부터 유래될 수 있다. 또 다른 특정 양태에서, 본 발명에 따르는 숙주 세포는 숙주 세포와 동일한 속, 종 또는 균주로부터 기원하는 프로모터를 포함하는 본 발명에 따르는 재조합 발현 자체물을 포함한다.

[0202] 프로모터는 본 발명에 따르는 프로모터, 또는 숙주 세포에서 전사 활성을 나타내고 숙주와 동종 또는 이종성인 단백질을 인코딩하는 유전자로부터 유래할 수 있는 임의의 기타 DNA 서열일 수 있다. 당해 프로모터는 바람직하게는 숙주 세포와 동종성인 단백질을 인코딩하는 유전자로부터 유래된다.

[0203] 예를 들면, 본 발명에 따르는 프로모터는 효모, 예를 들면, 에스. 세레비지애로부터 유래될 수 있고, 효모에서 POI의 발현에 사용될 수 있다. 특히 바람직한 양태는 페. 파스토리스 생산자 숙주 세포주에서 재조합 POI를 생산하는 방법에 사용하기 위해 페. 파스토리스로부터 기원하는 본 발명에 따르는 프로모터에 관한 것이다. 뉴클레오티드 서열의 상동성 기원은 동일한 속 또는 종의 숙주 세포 내로 이의 도입을 촉진시키고, 따라서 가능하게는 산업적 제조 공정에서 증가된 수율로 POI의 안정한 생산을 가능하게 한다. 또한, 기타 적합한 효모 또는 기타 진균 또는 기타 생물체, 예를 들면, 척추동물 또는 식물 유래의 프로모터의 기능적 활성 변이체를 사용할 수 있다.

[0204] POI가 숙주 세포에 상동성인 단백질, 즉 숙주 세포에서 자연적으로 발생하는 단백질인 경우, 숙주 세포에서 POI의 발현은 이의 천연 프로모터 서열을 본 발명에 따르는 프로모터 서열과 교환함으로써 조절할 수 있다.

[0205] 이러한 목적은, 예를 들면, 부위 특이적 재조합을 가능하게 하는 표적 유전자의 상동성 서열, 숙주 세포에 적합한 프로모터 서열 및 선택가능한 마커를 포함하는 재조합 DNA 분자를 사용한 숙주 세포의 형질전환에 의해 달성할 수 있다. 부위 특이적 재조합은 당해 프로모터 서열을 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결하기 위해 수행한다. 이는 천연 프로모터 서열 대신에 본 발명에 따르는 프로모터 서열로부터 POI의 발현을 초래한다.

[0206] 본 발명의 특히 바람직한 양태에서, 프로모터 서열은 POI의 천연 프로모터 서열과 비교하여 증가된 프로모터 활

성을 갖는다.

- [0207] 본 발명에 따라, POI를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 본 발명에 따르는 프로모터 서열을 포함하는 피. 파스토리스 세포주를 제공하는 것이 바람직하다.
- [0208] 본 발명에 따르면, 본 발명에 따르는 프로모터를 포함하고 POI를 인코딩하는 목적 유전자를 도입할 수 있는, 본 발명에 따르는 와일드카드 벡터 또는 숙주 세포를 또한 제공할 수 있다. 따라서, 와일드카드 세포주는 이의 발현 능력을 특징으로 하는 예비형성된 숙주 세포주이다. 이는, 예를 들면, 부위-특이적 리콤비나제-매개된 카세트 교환을 사용하여, POI 생산을 위해, 생산자 세포주를 생성하는 혁신적 "와일드카드" 플랫폼 전략에 따른다. 이러한 신규 숙주 세포는, 예를 들면, 재현가능한 고효율적 생산 세포주를 수득하기 위해, 수일 내에 소정의 게놈 발현 핫 스팟 내로 목적 유전자(GOI)의 클로닝을 용이하게 한다.
- [0209] 바람직한 양태에 따르면, 본 발명에 따르는 방법은, 세포당 단일 카피 또는 복수 카피로, 숙주 세포의 게놈 내로의 통합에 적합한 플라스미드 상에 제공되는, POI를 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드 서열을 사용한다. POI를 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드 서열도 또한 세포당 단일 카피 또는 복수 카피로 자가 복제 플라스미드 상에 제공될 수 있다.
- [0210] 본 발명에 따르는 바람직한 방법은, 진핵 발현 벡터, 바람직하게는 효모 발현 벡터인 플라스미드를 사용한다. 발현 벡터는, 이로써 한정되지 않지만, 클로닝 벡터, 변형된 클로닝 벡터 및 특이적으로 설계된 플라스미드를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같은 바람직한 발현 벡터는 숙주 세포에서 재조합 유전자의 발현에 적합한 임의의 발현 벡터일 수 있고, 숙주 생물체에 따라 선택된다. 재조합 발현 벡터는, 숙주 벡터로도 불리우는, 숙주 생물체의 게놈 내에서 복제가능하거나 게놈 내로 통합가능한 임의의 벡터, 예를 들면, 본 발명에 따르는 DNA 작제물을 함유하는 효모 벡터일 수 있다. 바람직한 효모 발현 벡터는 한세놀라, 퍼키아, 칸디다 및 토풀로프시스 속으로 나타내어지는 메틸로트로픽 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효모에서 발현시키기 위한 것이다.
- [0211] 본 발명에 있어서, 벡터로서는 pPICZ, pGAPZ, pPIC9, pPICZalpha, pGAPZalpha, pPIC9K, pGAPHiS 또는 pPUZZLE로부터 유래된 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0212] 본 발명의 바람직한 양태에 따르면, 재조합 작제물은 관련 유전자를 벡터에 결찰시킴으로써 수득된다. 이들 유전자는 이러한 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킴으로써 숙주 세포 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 당해 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드는, 이렇게 수득된 형질전환체를 적절한 배지에서 배양하고, 배양물로부터 발현된 POI를 단리하고, 발현된 생성물에 적절한 방법으로 이를 정제하여 특히 오염 단백질로부터 POI를 분리함으로써 재조합 숙주 세포주를 사용하여 생산될 수 있다.
- [0213] 발현 벡터는 하나 이상의 표현형 선택가능한 마커, 예를 들면, 항생물질 내성을 부여하거나 독립영양 요구를 공급하는 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 효모 벡터는 효모 플라스미드로부터의 복제 기원, 자가 복제 서열(ARS), 또는 달리는, 숙주 게놈 내로의 통합에 사용된 서열, 프로모터 영역, 폴리아데닐화를 위한 서열, 전사 종결을 위한 서열 및 선택가능한 마커를 통상 함유한다.
- [0214] 예를 들면, 전구화 서열 및/또는 POI를 코딩하는 DNA 서열, 프로모터 및 터미네이터를 각각 결찰시키고, 통합 또는 숙주 복제에 필요한 정보를 함유하는 적합한 벡터 내로 이들을 삽입하는데 사용된 공정은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: J. Sambrook et al., "Molecular Cloning 2nd ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]에 기재되어 있다.
- [0215] 본 발명에 따르는 조절 요소 및/또는 POI를 통합 표적으로 사용하는 벡터는, 조절 요소 및/또는 POI를 코딩하는 전체 DNA 서열을 함유하는 DNA 작제물을 먼저 제조한 다음, 이어서 이러한 단편을 적합한 발현 벡터 내로 삽입하거나, 개개 요소에 대한 유전자 정보, 예를 들면, 신호, 리더 또는 이종성 단백질을 함유하는 DNA 단편을 삽입한 다음, 결찰시킴으로써 작제할 수 있다.
- [0216] 또한, 다중클로닝 부위를 갖는 벡터인 다중클로닝 벡터는 본 발명에 따라 사용될 수 있고, 여기서 목적하는 이 종성 유전자는 발현 벡터를 제공하기 위해 다중클로닝 부위에 도입될 수 있다. 발현 벡터에서, 프로모터는 POI 유전자의 상류에 배치되고, 당해 유전자의 발현을 조절한다. 다중클로닝 벡터의 경우, POI 유전자는 다중클로닝 부위에 도입되기 때문에, 당해 프로모터는 다중클로닝 부위의 상류에 배치된다.
- [0217] 본 발명에 따르는 재조합 숙주 세포를 수득하기 위해 제공된 DNA 작제물은 확립된 표준 방법, 예를 들면, 포스포르아미다이트 방법에 의해 합성에 의해 제조할 수 있다. 또한, DNA 작제물은, 예를 들면, 게놈 또는 cDNA 라

이브리리를 제조하고 표준 기술[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989]에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용한 하이브리드화에 의해 본 발명의 폴리펩티드의 일부 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열을 스크리닝함으로써 수득된, 게놈 또는 cDNA 기원의 것일 수 있다. 마지막으로, DNA 작제물은, 합성, 게놈성 또는 cDNA 기원의 단편, 필요에 따라, 전체 DNA 작제물의 다양한 부분에 상응하는 단편을 표준 기술에 따라 어닐링함으로써 제조한, 혼합된 합성 및 게놈성, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 게놈성 및 cDNA 기원의 것일 수 있다.

- [0218] 또 다른 바람직한 양태에서, 효모 발현 벡터는, 예를 들면, 상동성 재조합에 의해 효모 게놈에 안정하게 통합할 수 있다.
- [0219] 세포를 본 발명에 따르는 조절 요소 및/또는 POI 유전자로 형질전환시킴으로써 수득된 본 발명에 따르는 형질전환 숙주 세포는 바람직하게는 이종성 단백질을 발현하는 부담 없이 거대 세포 수로 효율적으로 성장하는 조건하에 먼저 배양할 수 있다. 세포주가 POI 발현을 위해 제조되는 경우, 배양 기술은 발현 생성물을 생산하기 위해 선택된다.
- [0220] 하기 정의의 대상은 본 발명의 양태로 고려된다:
1. a) 재조합 진핵 세포주를, 조절가능한 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계,
 2. b) 상기 세포주를, 상기 프로모터를 활성화하는 보충 탄소원의 부재 또는 제한된 양으로 배양하여, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 목적 단백질(POI)의 생산을 유도하는 단계, 및
 3. c) POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하는,
- [0221] 조절가능한 프로모터 및 상기 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 진핵 세포주를 배양하여 목적 단백질(POI)을 생산하는 방법.
- [0222] 2. 정의 1에 있어서, 기초 탄소원이 글루코즈, 글리세롤, 에탄올 및 복합 영양 물질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0223] 3. 정의 1 또는 2에 있어서, 보충 탄소원이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈와 같은 6탄당, 사카로즈와 같은 이당, 글리세롤 또는 에탄올과 같은 알콜, 또는 이들의 혼합물인, 방법.
- [0224] 4. 정의 1 내지 3 중의 어느 하나에 있어서, 기초 탄소원이 글리세롤이고, 보충 탄소원이 글루코즈인, 방법.
- [0225] 5. 정의 1 내지 4 중의 어느 하나에 있어서, 단계 b)가, 보충 탄소원을 제공하지 않거나 배양 배지 중에 제한된 양, 바람직하게는 0 내지 1g/L로 제공하는 공급 배지를 사용하는, 방법.
- [0226] 6. 정의 5에 있어서, 공급물 배지가 화학적으로 규정되고 메탄올을 포함하지 않는, 방법.
- [0227] 7. 정의 1 내지 6 중의 어느 하나에 있어서, 제한된 양의 보충 탄소원이, 비성장 속도(specific growth rate)를 $0.02h^{-1}$ 내지 $0.2h^{-1}$, 바람직하게는 $0.02h^{-1}$ 내지 $0.15h^{-1}$ 의 범위 내로 유지하기 위해 성장 제한하는, 방법.
- [0228] 8. 정의 7에 있어서, 보충 공급원의 제한된 양이 검출 한계 미만인 세포 배양물 중의 잔류량을 제공하는 방법.
- [0229] 9. 정의 1 내지 8 중의 어느 하나에 있어서, 프로모터가 야생형 진핵 세포에서 유전자의 전사를 조절할 수 있고, 상기 유전자가 G1(서열번호 7), G3(서열번호 8), G4(서열번호 9), G6(서열번호 10), G7(서열번호 11) 및 G8(서열번호 12) 또는 이의 기능적 활성 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0230] 10. 정의 9에 있어서, 상기 기능적 활성 변이체가, 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오티드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0231] 11. 정의 9 또는 10에 있어서, pG1의 기능적 활성 변이체가 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0232] 12. 정의 1 내지 11 중의 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 피키아 파스토리스 프로모터 또는 이의 기능적 활성 변이체인, 방법.

- [0236] 13. 정의 1 내지 12 중의 어느 하나에 있어서, 상기 세포주가 포유동물, 곤충, 효모, 사상균 및 식물 세포주, 바람직하게는 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0237] 14. 정의 13에 있어서, 상기 효모가 피키아, 칸디다, 토풀로프시스, 아르슬라, 한세눌라, 야로위아, 클루이베로 마이세스, 사카로마이세스, 코마가타엘라, 바람직하게는 메틸로트로픽 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0238] 15. 정의 14에 있어서, 상기 효모가 피키아 파스토리스, 코마가타엘라 파스토리스, 케이. 파피이 또는 케이. 슈도파스토리스인, 방법.
- [0239] 16. 정의 1 내지 15 중의 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련되지 않는, 방법.
- [0240] 17. 정의 1 내지 16 중의 어느 하나에 있어서, POI가, 바람직하게는 항체 또는 이의 단편, 효소 및 웨티드를 포함하는 치료학적 단백질, 단백질 항생물질, 독소 융합 단백질, 탄수화물-단백질 접합체, 구조 단백질, 조절 단백질, 백신 및 백신 유사 단백질 또는 입자, 공정 효소, 성장 인자, 호르몬 및 사이토킨, 또는 POI의 대사물질로부터 선택된 이종성 단백질인, 방법.
- [0241] 18. 정의 1 내지 17 중의 어느 하나에 있어서, POI가 진핵 단백질, 바람직하게는 포유동물 단백질인, 방법.
- [0242] 19. 정의 1 내지 18 중의 어느 하나에 있어서, POI가 다량체 단백질, 바람직하게는 이량체 또는 사량체인, 방법.
- [0243] 20. 정의 1 내지 19 중의 어느 하나에 있어서, POI가 항체 또는 이의 단편과 같은 항원 결합 분자인, 방법.
- [0244] 21. 정의 1 내지 20 중의 어느 하나에 있어서, 발효 생성물이 POI, 이의 대사물질 또는 유도체를 사용하여 제조되는, 방법.
- [0245] 22. 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사 강도를 갖는 탄소원 조절가능한 프로모터의 전사 조절하에 재조합 진핵 세포에서 POI의 발현을 조절하는 방법으로서, 상기 발현이 탄소원을 제한하는 조건 하에 유도되는, 방법.
- [0246] 23. 탄소원 조절가능한 프로모터의 전사 조절하에 재조합 진핵 세포에서 POI를 생산하는 방법으로서, 상기 프로모터가 당해 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사 강도를 갖는, 방법.
- [0247] 24. 정의 1 내지 23 중의 어느 하나에 있어서, 상기 조절가능한 프로모터가
- [0248] a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6);
- [0249] b) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 적어도 60% 상동성을 갖는 서열;
- [0250] c) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 염격한 조건하에 하이브리드화하는 서열; 및
- [0251] d) 상기 a), b) 또는 c)로부터 유래하는 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하고,
- [0252] 상기 프로모터가, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 재조합 진핵 세포에서 POI를 발현시킬 수 있는 탄소원 조절가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터인, 방법.
- [0253] 25. 정의 24에 있어서, 상기 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)의 변이체가, 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오티드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기능적 활성 변이체인, 방법.
- [0254] 26. 정의 24 또는 25에 있어서, pG1의 기능적 활성 변이체가 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는,

방법.

[0255] 27. a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6);

[0256] b) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 적어도 60% 상동성을 갖는 서열;

[0257] c) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6)과 염격한 조건하에 하이브리드화하는 서열; 및

[0258] d) 상기 a), b) 또는 c)로부터 유래하는 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산으로서,

[0259] 상기 핵산이, 상기 세포의 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 적어도 15%의 전사율로 재조합 진핵 세포에서 POI를 발현시킬 수 있는 탄소원 조절가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터를 포함하는, 분리된 핵산.

[0260] 28. 정의 27에 있어서, 상기 pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 8)의 변이체가, 적어도 약 60% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp의 뉴클레오티드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오티드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기능적 활성 변이체인, 핵산.

[0261] 29. 정의 27 또는 28에 있어서, pG1의 기능적 활성 변이체가 pG1a(서열번호 41), pG1b(서열번호 42), pG1c(서열번호 43), pG1d(서열번호 44), pG1e(서열번호 45) 및 pG1f(서열번호 46)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 핵산.

[0262] 30. 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 정의 27 내지 29 중의 어느 하나에 따르는 핵산을 포함하는 발현 작제물로서, 상기 핵산이 POI를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 자연적으로 연결되지 않는, 발현 작제물.

[0263] 31. 정의 30에 따르는 작제물을 포함하는 벡터.

[0264] 32. 정의 30의 작제물 또는 정의 31의 벡터를 포함하는 재조합 진핵 세포.

[0265] 33. 정의 31에 있어서, 포유동물, 곤충, 효모, 사상균 및 식물 세포주, 바람직하게는 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 세포.

[0266] 34. 정의 32에 있어서, 상기 효모가 피키아, 칸디다, 토풀로프시스, 아르슬라, 한세눌라, 야로위아, 클루이베로 마이세스, 사카로마이세스, 코마가타엘라, 바람직하게는 메틸로트로핀 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 세포.

[0267] 35. 정의 34에 있어서, 상기 효모가 피키아 파스토리스, 코마가타엘라 파스토리스, 케이. 파피이 또는 케이. 슈도파스토리스인, 세포.

[0268] 36. 정의 32 내지 35 중의 어느 하나에 있어서, 제한된 탄소원의 조건과 비교하여 과잉량의 탄소원의 존재하에 보다 높은 비성장 속도를 갖는, 세포.

[0269] 37. a) 진핵 세포를 세포 성장 조건하에서 배치 배양으로 탄소원의 존재하에 배양하는 단계,

[0270] b) 상기 세포를 제한된 양의 보충 탄소원의 존재하에 유가식(fed batch) 배양으로 추가로 배양하는 단계,

[0271] c) 단계 a) 및 b)의 세포 배양물의 샘플을 제공하는 단계 및

[0272] d) 상기 샘플에서 전사 분석을 수행하여, 단계 a)의 세포보다 단계 b)의 세포에서 보다 높은 전사 강도를 나타내는 조절가능한 프로모터를 동정하는 단계를 포함하는, 진핵 세포로부터 탄소원 조절가능한 프로모터를 동정하는 방법.

[0273] 38. 정의 37에 있어서, 전사 분석이 바람직하게는 DNA 마이크로어레이, RNA 서열분석 및 전사체 분석을 사용하여 정량적 또는 반-정량적인, 방법.

[0274] 특정 예는, 글리세롤 배치 배지 및 글루코즈 유가식 배지를 사용하여, 리포터 단백질을 생산하는 재조합 생산

피. 파스토리스의 유가식 발효에 관한 것이다. 비교 프로모터 활성은 본 발명에 따르는 프로모터가 재조합 단백질 생산을 유도하기 위해 성공적으로 활성화될 수 있는 것을 증명한다.

[0275] 추가의 예에 따라, 인간 혈청 알부민(HSA)은 글루코즈-제한 유도된 프로모터의 조절하에 POI로서 생산되고, HSA 수율 및 유전자 카피수가 측정된다.

[0276] 또 다른 예에 따라, 본 발명에 따르는 프로모터의 조절하에 HSA를 발현하는 피. 파스토리스 균주의 유가식 배양이 수행되었다. 글루코즈-제한 조건하에 프로모터 활성의 유도는, 억제된 상태와 비교하여, pG1으로 120배 이상 및 pG6으로 20배 이상인 것으로 밝혀졌다.

[0277] 추가의 예는 pG1 및 pG6 프로모터의 전사 조절하에 모델 단백질로서 돼지 카복시펩티다제의 발현을 참조한다.

[0278] 추가의 예는 본 발명에 따르는 프로모터의 변이체, 예를 들면, 300 내지 1000bp 범위의 길이를 갖는 pG1의 단편의 기능적 활성을 입증한다. 추가의 실험은 보다 짧은 pG1의 단편이 유사한 설정, 예를 들면, 200 내지 1000bp 범위의 단편 또는 250 내지 1000 bp 범위의 단편에서 기능적으로 활성적임을 나타냈다.

[0279] 상술한 기재는 하기 실시예를 참조로 하여 보다 완전히 이해될 것이다. 그러나, 이러한 실시예는 본 발명의 하나 이상의 양태를 실시하는 단순한 대표적 방법이고, 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

실시예

[0281] 다음의 실시예는 신규한 조절가능한 프로모터를 동정하고 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 이들의 발현 특성을 분석하는데 사용된 물질 및 방법을 설명한다.

[0282] 실시예 1: 글루코즈 제한 조건으로 피. 파스토리스(*P. pastoris*)에서 강하고 효율적으로 조절된 유전자의 동정

[0283] 글루코즈 제한 조건으로 강하고 효율적으로 조절된 유전자 및 이를 각각의 피. 파스토리스의 프로모터를 동정하기 위해, 유전자 발현 패턴의 분석은 마이크로어레이를 사용하여 수행했다. 글리세롤 배치(과잉의 탄소원)에서 성장된 피. 파스토리스 세포를 글루코즈가 성장 제한(케모스타트)되는 조건에서 배양한 세포와 비교하고, 이에 의해 일반적으로 유가식 방식으로 수행되는 단백질 생산 공정 과정을 시뮬레이팅했다.

[0284] a) 균주

[0285] 보충물 부재하에 최소 배지에서 성장시킬 수 있는 야생형 피. 파스토리스 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 사용했다.

[0286] b) 피. 파스토리스의 배양

[0287] 발효는 최종 작업 용적 2.5L로 미니포스(Minifors) 반응기(Infors-HT, 스위스)로 수행하였다.

[0288] 다음 배지를 사용했다:

[0289] 리터당 함유된 PTM₁ 미량 염 보존액

[0290] 6.0g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08g NaI, 3.36g MnSO₄ · H₂O, 0.2g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02g H₃BO₃, 0.82g CoCl₂, 20.0g ZnCl₂, 65.0g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g 비오틴 및 5.0ml H₂SO₄ (95%-98%).

[0291] 리터당 함유된 글리세롤 배지

[0292] 2g 시트르산 1수화물(C₆H₈O₇ · H₂O), 39.2g 글리세롤, 20.8g의 NH₄H₂PO₄, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 1.6g KC1, 0.022g CaCl₂ · 2H₂O, 0.8mg 비오틴 및 4.6ml PTM₁ 미량 염 보존액. HC1을 첨가하여 pH를 5로 설정하였다.

[0293] 리터당 함유된 글리세롤 유가식 배지

[0294] 632g 글리세롤, 8g MgSO₄ · 7H₂O, 22g KC1 및 0.058g CaCl₂ · 2H₂O.

[0295] 리터당 함유된 케모스타트 배지

[0296] 2g 시트르산 1수화물($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 99.42g 글루코즈 1수화물, 22g $NH_4H_2PO_4$, 1.3g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.4g KCl, 0.02g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4mg 비오린 및 3.2ml PTM1 미량 염 보존액. HCl을 첨가하여 pH를 5로 설정하였다.

[0297] 용해된 산소를 교반기 속도(500 내지 1250rpm)으로 DO = 20%에서 조절했다. 통기 속도는 $60Lh^{-1}$ 공기였고, 온도는 25°C로 조절하고, pH 설정값 5는 NH_4OH (25%)를 첨가하여 조절했다.

[0298] 발효를 개시하기 위해, 1.5L 배치 배지를 발효조로 멸균 여과시키고, 피. 파스토리스는 출발 광학 밀도(OD 600) 1로 접종했다(YPG에서 밤새 예비배양으로부터, 180rpm, 28°C). 약 25시간의 배치 단계는 약 20g/L의 무수 생물량 농도에 도달하고, 글루코즈 배지와 함께 10시간 지수 유가식을 계속한 후, 무수 생물량 농도 약 50g/L를 유도한다. 이어서, 용적은 1.5L로 감소되고, 케모스타트 배양을 $0.15Lh^{-1}$ 의 공급/수거 속도로 개시하여 $\mu = 0.1$ 의 일정한 성장률을 유도했다. 발효는 케모스타트 개시 후 50시간에 종료했다.

[0299] 이러한 발효는 신뢰가능한 마이크로어레이 분석에 필요한 생물학적 복제물을 수득하기 위해 3회 수행했다.

[0300] 케모스타트 동안 탄소 제한된 조건(검출가능한 잔류 글루코즈 없음)은 배양 상청액의 HPLC 분석에 의해 확인하였다.

c) 샘플링

[0302] 샘플을 글리세롤 배치 단계의 말기 및 글루코즈 케모스타트의 정상 상태 조건에서 채취했다. 광학 밀도 또는 효모 건조 질량의 측정, 정성적 현미경 검사 및 세포 생존률 분석으로서 통상적 샘플링은 각 발효 동안 함께 수행했다. 마이크로어레이 분석을 위해, 샘플을 채취하여 다음과 같이 처리했다: 최적의 급냉을 위해, 9mL 세포 배양액을 즉시 4.5mL 냉동 5% 폐놀(Sigma) 용액(무수 에탄올 중)과 혼합하고, 등분했다. 각 2mL를 예비냉각된 채혈관(GE 헬스케어, NJ)에서 원심분리하고(1분간 13200rpm), 상청액을 완전히 제거하고, 튜브를 RNA 정제까지 -80°C에서 저장했다.

d) RNA 정제 및 마이크로어레이 하이브리드화를 위한 샘플 제조

[0304] RNA는 공급자의 지시(암비온사, 미국)에 따라 TRI 시약을 사용하여 단리했다. 세포 펠릿을 TRI 시약 중에 재현 탁시키고, 40초 동안 $5ms^{-1}$ 에서 패스트프렙(FastPrep) 24(엠.피. 바이오메디컬스, CA)를 이용하여 유리 비드로 균질화시켰다. 클로로포름의 첨가 후, 샘플을 원심분리하고, 모든 RNA는 이소프로판올을 첨가하여 수상으로부터 침전시켰다. 펠릿을 70% 에탄올로 세척하고, 건조시키고, RNase 비함유 물에 재현탁시켰다. RNA 농도는 나노드롭 1000 분광광도계(나노드롭 프로덕츠, DE)를 사용하여 OD260를 측정하여 결정했다. 샘플로부터 잔류 DNA는 DNA 비함유 키트(암비온사, CA)를 이용하여 제거하였다. 10 μ g RNA와 등가의 샘플 용적을 RNase 비함유 물에서 50 μ L로 희석시킨 다음, DNase 완충제 I 및 rDNase I를 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 배양했다. DNase 불활성화 시약의 첨가 후, 샘플을 원심분리하고, 상청액을 새로운 튜브로 옮겼다. RNA 농도를 상술한 바와 같이 다시 측정했다. 추가로, RNA의 통합성은 RNA 나노 칩(아질런트사)을 사용하여 분석했다. 샘플의 하이브리드화에 대한 증폭 및 표지화로부터 마이크로어레이의 유동을 모니터링하기 위해, 키트 중 스파이크(아질런트, 제품 번호: 5188-5279)를 양성 대조군으로 사용했다. 그것은 자체의 RNA 샘플과 함께 증폭되고, 표지되고 공하이브리드화된 아데노바이러스로부터의 10개의 상이한 폴리아데닐화 전사물을 함유한다. 샘플은 퀴크 앰프 라벨링 키트(애질런트, 제품 번호: 5190-0444)를 사용하여 Cy 3 및 Cy 5로 표지했다. 따라서, 정제된 샘플 RNA 500ng 을 8.3 μ L RNase 비함유 물에서 희석하고, 2 μ L 스파이크 A 또는 B, 및 1.2 μ L T7 프로모터 프라이머를 첨가했다. 혼합물을 65°C에서 10분 동안 변성시키고, 아이스에서 5분 동안 유지시켰다. 이어서, 8.5 μ L cDNA 마스터 믹스(샘플당: 4 μ L 5x 제1 스트랜드 완충액, 2 μ L 0.1M DTT, 1 μ L 10mM의 dNTP 믹스, 1 μ L MMLV-RT, 0.5 μ L RNase out)를 첨가하고, 40°C에서 2시간 동안 배양한 후, 15분 동안 65°C로 옮기고, 아이스에 5분 동안 정치시킨다. 전사 마스터 믹스(샘플당: 15.3 μ L 뉴클레아제 비함유 물, 20 μ L 전사 완충액, 6 μ L 0.1M DTT, 6.4 μ L 50% PEG, 0.5 μ L RNase 억제제, 0.6 μ L 무기 포스파타제, 0.8 μ L T7 RNA 폴리머라제, 2.4 μ L 시아닌 3 또는 시아닌 5)를 제조하고, 각 튜브에 첨가하고, 2시간 동안 40°C에서 배양했다. 수득된 표지된 cRNA를 정제하기 위해, RNeasy 미니 키트(퀴아젠, 카탈로그 번호 74104)를 사용했다. 샘플은 -80°C에서 저장했다. cRNA 농도 및 표지 효율의 정량화는 나노드롭 분광광도계로 수행했다.

[0305] e) 마이크로어레이 분석

[0306] 글루코즈 제한 케모스타트 배양에서 강력한 효율적 조절된 유전자를 동정하기 위해, 이의 3개의 생물학적 샘플 복제물은 동일한 참조 및 하나의 염료 스왑(dyeswap)과 각각 비교했다. 참조 샘플은 글리세를 배치 배양 샘플을 동일량으로 조합하여 생성했다.

[0307] 유전자 발현 하이브리드화 키트(아질런트, 카탈로그 번호 5188-5242)를 표지된 샘플 cRNA의 하이브리드화용으로 사용했다. 하이브리드화 샘플을 제조하기 위해, 각 300ng cRNA(Cy3 및 Cy5) 및 6 μL 10배 차단제는 뉴클레아제 비함유 물을 사용하여 최종 용적 24 μL로 희석했다. 1 μL 25배 단편화 완충액을 첨가한 후, 혼합물을 30분 동안 60°C에서 배양했다. 이어서, 25 μL GEX 하이브리드화 완충액 HI-RPM을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 13,200rpm으로 1분 동안 원심분리한 후, 샘플을 아이스 위에서 냉각시키고, 즉시 하이브리드화용으로 사용했다. 내부에(in-house) 설계된 피. 파스토리스 특이적 올리고뉴클레오티드 어레이(AMAD-ID: 026594, 8x15K 커스텀 어레이, 아질런트)를 사용했다. 마이크로어레이 하이브리드화는 마이크로어레이 하이브리드화 챔버 사용자 가이드(아질런트, G2534A)에 따라 수행했다. 첫째, 가스켓 슬라이드는 덮지 않고 챔버 베이스 위에 두고 아질런트 라벨이 위로 직면하게 했다. 샘플(어레이당 40 μL)을 8개의 정사각형 각각의 중앙에 부하했다. 이어서, 마이크로어레이 슬라이드를 조심스럽게 가스켓 슬라이드(아래를 향하는 아질런트 라벨) 위에 조심스럽게 놓고, 챔버 커버를 위에 배치하고, 클램프로 고정했다. 하이브리드화는 65°C에서 17시간 동안 하이브리드화 오븐에서 수행했다. 스캐닝 전에, 마이크로어레이 칩을 세척했다. 따라서, 챔버는 분해되었고, 샌드위치 슬라이드는 세척 완충액 1에 침지시키면서 서로 분리시켰다. 마이크로어레이에는 세척 완충액 1과 함께 다른 접시로 직접 옮기고, 1분 동안 세척하고, 세척 완충액 2(온도 적어도 30°C)로 옮기고, 다시 1분 동안 세척했다. 슬라이드 가장자리를 조직과 접촉시켜 마이크로어레이 슬라이드를 건조시킨 후, 이를 슬라이드 홀더(위를 향하는 아질런트 라벨)에 넣었다. 슬라이드 홀더는 캐러셀(carousel)에 넣고, 스캐닝을 개시했다.

[0308] f) 데이터 수집 및 마이크로어레이 데이터의 통계학적 평가

[0309] 이미지는 G2565AA 마이크로어레이 스캐너(아질런트)로 50nm의 해상도로 스캐닝하고, 아질런트의 특징 추출 9.5 소프트웨어에 개입시켰다. 아질런트의 특징 추출 9.5는 스팟 강도의 정량화용으로 사용되었다. 이어서, 원래의 평균 스팟 강도 데이터는 추가의 표준화 및 데이터 분석을 위한 오픈 공급원 소프트웨어 R에 개입시켰다.

[0310] 데이터 전처리 및 표준화를 위해, R 패키지 림마(limma), vsn 및 마레이(marray)를 사용했다. 강도 데이터는 배경 보정되지 않았고, VSN으로 표준화되지 않았고, 표준화 후, 이를 Cy3 채널에 대해 Cy5 채널의 log2 비율로 전환시켰다. 시차 발현은 limma 패키지의 lmfit과 eBayes 함수를 사용하여 계산했다.

[0311] 마이크로어레이 데이터는, 강력하게 발현되고 효율적으로 조절된 유전자를 동정하기 위해, 유도된 상태로 억제된 발현 수준의 높은 차이(배율 변화) 뿐만 아니라 유도된 상태에서 높은 신호 강도 모두를 갖는 항목을 검색했다. 선택된 유전자 목록은 유도 상태의 신호 강도를 억제 상태의 신호 강도로 나눔을 의미하는 배율 변화와 함께 표 1에 나타낸다. pGAP 및 pMLS1, pICL1의 데이터는 참조로 추가한다.

[0312] 표 1: 추가 특성화용으로 선택된 프로모터 및 대조군으로서의 pGAP, ICL1 및 MLS1의 마이크로어레이 데이터

명칭	주석/ 효모 상동체	유전자 식별자	배율 변화	강도*	강도/전사 강도의 %
pGAP	TDH3	PAS_chr2-1_0437	0.79	41052.5	100.0
pG1	-	PAS_chr1-3_0011	29.86	86312.9	210.2
pG3	YPR127W	PAS_chr4_0550	2.66	15644.4	38.1
pG4	-	PAS_chr4_0043	2.57	15664.8	38.2
pG6	ALD4	PAS_chr2-1_0853	2.10	26888.4	65.5
MLS1	MLS1	PAS_chr4_0191	0.81	1446.9	3.5
ICL1	ICL1	PAS_chr1-4_0338	1.71	2574.3	6.3
pG7	HXT6	PAS_chr1-4_0570	3.3	13336.5	32.5
pG8	SFL1	PAS_chr1-3_0165	2.1	9929.1	24.2

[0313]

[0314] * 그런 채널에서 유도된 상태

[0315] 실시예 2: 세포내 발현된 리포터 유전자로서 eGFP를 사용하여 피. 파스토리스에서 신규 동정된 프로모터의 비교 프로모터 활성 연구

[0316] 글루코즈 제한 조건에서 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 공정의 배치 단계(프로모터의 억제된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후(rich) 배지로 수행하였고, 공정의 글루코즈 제한 유가식 단계(프로모터의 유도된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 최소 배지 및 글로코즈 공급물 비드에 의한 주배양을 수행했다.

[0317] a) 균주 & 발현 벡터

피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용했다. 균주의 형질전환은 이. 콜라이(E. coli)(pUC19)를 위한 복제 기원, 이. 콜라이 및 효모에서 선택을 위한 항생물질 내성 카세트(제오신에 대해 내성을 부여하는 Sh ble 유전자), 다중 클로닝 부위 및 에스. 세레비지애 CYC1 전사 터미네이터로 이루어진 목적 유전자(GOI)를 위한 발현 카세트, 및 피. 파스토리스 게놈(3' AOX1 영역)으로 통합하기 위한 유전자좌를 포함하는, pPUZZLE로 명명된 내부 벡터를 사용하여 수행되었다[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29].

[0319] b) GOI로서 eGFP를 함유하는 pPUZZLE 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1, pG3, pG4 및 pG6의 증폭 및 클로닝

[0320] 신규 동정된 프로모터 서열 및 이들의 각각의 유전자 목록을 표 2에 나타낸다. 개시 코돈 ATG까지 각각의 유전자의 5'-비 코딩 영역의 1000bp는 표 2에 제시된 프라이머를 사용하여 프로모터 서열로서 PCR(Phusion Polymerase, New England Biolabs)에 의해 증폭시켰다. 이러한 서열은 pPUZZLE 발현 벡터 pPM1aZ10_eGFP에 클로닝하여 pPM1aZ10_pG1_eGFP, pPM1aZ10_pG3_eGFP, pPM1aZ10_pG4_eGFP 및 pPM1aZ10_pG6_eGFP를 생성했다. 또한, 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 프로모터의 통상 사용된 프로모터(피. 파스토리스의 pGAP, 본원에서 서열번호 25)를 함유하는 벡터 pPM1aZ10_pGAP_eGFP를 참조로서 사용했다. 프로모터는 ApaI 및 SbfI 제한 부위(표 2 및 3 참조)를 사용하는 eGFP 유전자의 개시 코돈의 상류에 삽입했다. 프로모터 서열의 정확성을 생거(Sanger) 서열분석에 의해 확인했다.

[0321]

표 2: 프로모터의 PCR 증폭용 프라이머

명칭	표적	서열	T _M	제한 부위
pG1_fw	pG1	서열번호 14 GATAGGGCCCCAAACATTGCT CCCCCTAGTCTC	70.8	ApaI
pG1_back	pG1	서열번호 15 GATACCTGCAGGAAGGGTGGAA TTTTAAGGATCTTTAT	69.8	SbfI
pG3_fw	pG3	서열번호 16 GATAGGGCCCCAGCAATCCAGT AACCTTTCTGAAT	70.4	ApaI
pG3_back	pG3	서열번호 17 GATACCTGCAGGTGAGTTCAAT AAATTGTCGGGA	70.2	SbfI
pG4_fw	pG4	서열번호 18 GATAGGGCCCTGGACTGTTCAAT TTGAAGTCGATG	70.4	ApaI
pG4_back	pG4	서열번호 19 GATACCTGCAGGGATAAAGGTA AGGGAAAAAGCAA	70	SbfI
pG6_fw	pG6	서열번호 20 GATAGGGCCCAGACCAGCAGTTT AACTACCGCAAATC	70.6	ApaI
pG6_back	pG6	서열번호 21 GATACCTGCAGGCTTTCTTG CAAGGAAAAATC	70.7	SbfI
pG7_fw	pG7	서열번호 22 GATAGGGCCCAATTGATTAAGTTCAAGT GAAATTTCACAAAC	69.1	ApaI
pG7_back	pG7	서열번호 23 GATACCTGCAGGATTATATTATGGGAATAATGAAGAGAAGG	70.9	SbfI
pG8_fw	pG8	서열번호 24 GATAGGGCCCTGCACAACCATTGCCAGTAAGG	71.5	ApaI
pG8_back	pG8	서열번호 25 GATACCTGCAGGTTTAGAAGAGGGAGAACCTAGATTGG	70.4	SbfI

[0322]

표 3: 증폭 프라이머, 클로닝 효소 및 클로닝된 프로모터 길이

프로모터	5'프라이머	3'프라이머	클로닝 효소		단편
			5'	3'	
pG1	pG1 fw	pG1 back	ApaI	SbfI	988
pG3	pG3 fw	pG3 back	ApaI	SbfI	1011
pG4	pG4 fw	pG4 back	ApaI	SbfI	1022
pG6	pG6 fw	pG6 back	ApaI	SbfI	1022
pG7	pG7 fw	pG7 back	ApaI	SbfI	1022
pG8	pG8 fw	pG8 back	ApaI	SbfI	1022

[0324]

c) 프로모터 활성을 분석하기 위한 피. 파스토리스에서 eGFP의 발현

[0325]

모든 플라스미드는 전기천공 적격 피. 파스토리스에서 전기천공(2kV, 4mm, GenePulser, BioRad) 전에 3' AOX 계놈 통합 영역 내에서 AscI로 선형화했다.

[0326]

양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL 제오신(Invivogen, CA)을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 웨튼, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 상에서 수행했다. 콜로니 PCR은 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용되었다. 따라서, 계놈 DNA는 피. 파스토리스 콜로니를 5분 동안 각각 쿠킹 및 동결시켜 수득하고, 적합한 프라이머와 함께 PCR에 직접 적용했다. 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 웨튼, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)로 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여, 10ml YP 배지(1리터당: 20g 웨튼, 10g 효모 추출물) 및 2 글루코즈 공급물 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 0.1을 갖는 주배양물을 접종했다. 글루코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = 1.63 * t₀.74[mg/Disc]에 의해 기재되는 이러한 공급물 비드의 느린 글루코즈 방출 동역학에 기인하여 달성되었다. 샘플은 예비배양 말기 및 주배양물의 접종후 24시간 및 48시간에 취했다. 세포 밀도는 OD600을 측정함으로써 결정되었고, eGFP 발현은 문헌[참조: Stadlmayr et al.; J. Biotechnology 2010 Dec;150(4):519-29]에 기재된 유동 세포계수법으로 분석했다. 각 샘플에 대해, 10,000개의 세포를 분석했다. 피. 파스토리스의 자가

형광성은 비형질전환된 피. 파스토리스 야생형 세포를 사용하여 측정하고, 신호로부터 감산했다. 상대적 eGFP 발현 수준(세포 크기와 관련된 형광 강도)는 구성 pGAP 프로모터의 조절하에 eGFP를 발현하는 클론의 eGFP 발현 수준의 백분율로 제시된다.

[0328] 추가의 유사한 연구는 프로모터 pG7 및 pG8로 수행한다. 클로닝은, 야생형 피. 파스토리스 균주 X-33(Invitrogen)이 pPM1aZ10_pG7_eGFP 및 pPM1aZ10_pG8_eGFP의 형질전환용으로 사용되는 것을 제외하고는 실시 예 2b에 기재된 바와 같이 수행한다. 사용되는 프라이머 및 클로닝 단편은 표 2 및 3에 수록된다. 결과는 표 4에 제시된다.

[0329] 표 4: 신규 프로모터의 조절하에 피. 파스토리스 클론을 발현시키는 eGFP의 스크리닝 결과; 제시된 데이터(형광 /세포 크기)는 pGAP에 관련된다;

	예비 배양		주배양	
	배치 말기	stdev	48h	stdev
pG1	7.6	0.2	242.8	59.5
pG3	-5.1	2.4	25.4	5.5
pG4	-6.3	0.2	113.6	26.3
pG6	3.3	0.8	158.9	146.9
pG7	49.4	7.4	115.7	16.2
pG8	0.8	4.1	36.1	21.1

[0330]

d) 선택된 eGFP 발현 클론에서 eGFP 유전자 카피 수(GCN)의 측정

[0332] 발현 강도는 종종 피. 파스토리스 게놈에 통합되는 발현 카세트의 수와 상관된다. 따라서, eGFP의 유전자 카피 수를 측정했다. 게놈 DNA는 DNeasy 혈액 및 조직 키트(퀴아젠, 카탈로그 번호 69504)를 사용하여 분리했다. 유전자 카피 수는 정량적 PCR을 사용하여 결정했다. 따라서, SensiMix SYBR 키트(바이오라인, QT605-05)를 사용하였다. 센시 믹스(Sensi Mix) SYBR을 프라이머 및 샘플과 혼합하고, 실시간 PCR 사이클러(로터 진, Qiagen)에서 실시간 분석을 위해 적용했다. 프라이머의 목록은 표 5에 제시한다. 모든 샘플은 3회 또는 4회 분석했다. 로터 진 소프트웨어는 데이터 분석용으로 사용했다. 악틴 유전자 ACT1은 캘리브레이터로서 사용하였다. 결과를 표 6에 나타낸다.

[0333] 표 5: 실시간 PCR에 의한 유전자 카피 수 측정용 프라이머

GCN	pGAP eGFP 형광/크기의 %			
	예비 배양		주배양	
			24h	48h
pG1#8	1	7.32	33.00	184.30
pG1#9	1	7.73	33.96	303.21
pG1#12	2	7.75	33.32	240.92
pG6#48	1	3.45	2.07	56.11
pG6#50	2	4.00	23.18	327.14
pG6#53	1	2.52	9.78	93.51

[0334]

[0335] 표 6: 스크리닝 결과(pGAP와 관련된 형광/세포 크기) 및 pG1 및 pG6의 조절하에 eGFP를 발현하는 선택된 피. 파스토리스 클론의 유전자 카피 수

GCN	pGAP eGFP 형광/크기의 %			
	예비 배양		주배양	
			24h	48h
pG1#8	1	7.32	33.00	184.30
pG1#9	1	7.73	33.96	303.21
pG1#12	2	7.75	33.32	240.92
pG6#48	1	3.45	2.07	56.11
pG6#50	2	4.00	23.18	327.14
pG6#53	1	2.52	9.78	93.51

[0336]

[0337] e) 하나의 eGFP 클론의 유가식 발효에서 pG1 프로모터 강도 분석

- [0338] 유가식 발효는 최종 작업 용적 0.7L로 DASGIP 반응기로 수행했다.
- [0339] 다음 배지를 사용했다:
- [0340] 리터당 함유된 PTM₁ 미량 염 보존액
- [0341] 6.0g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08g NaI, 3.36g MnSO₄ · H₂O, 0.2g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02g H₃BO₃, 0.82g CoCl₂, 20.0g ZnCl₂, 65.0g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g 비오틴 및 5.0ml H₂SO₄ (95%-98%).
- [0342] 리터당 함유된 글리세롤 배치 배지
- [0343] 2g 시트르산 1수화물(C₆H₈O₇ · H₂O), 39.2g 글리세롤, 12.6g NH₄H₂PO₄, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.9g KCl, 0.022g CaCl₂ · 2H₂O, 0.4mg 비오틴 및 4.6ml PTM₁ 미량 염 보존액. HCl을 첨가하여 pH를 5로 설정하였다.
- [0344] 리터당 함유된 글리세롤 유가식 배지
- [0345] 464g 글루코즈 1수화물, 5.2g MgSO₄ · 7H₂O, 8.4g KCl 및 0.28g CaCl₂ · 2H₂O, 0.34mg 비오틴 및 10.1ml PTM₁ 미량 염 보존액.
- [0346] 용해된 산소를 교반기 속도(400 내지 1200rpm)으로 DO = 20%에서 조절했다. 통기 속도는 24Lh⁻¹ 공기였고, 온도는 25°C에서 조절하고, pH 설정 값 5는 NH₄OH(25%)를 첨가하여 조절했다.
- [0347] 발효를 개시하기 위해, 400mL 배치 배지를 발효조에서 멸균 여과시키고, 피. 파스토리스 클론 pG1_eGFP#8을 출발 광학 밀도(OD 600) 1로 접종했다(예비배양으로부터). (약 20g/L의 무수 생물량 농도에 도달하는) 약 25시간의 배치 단계에는 7시간 동안 지수 공급 및 13시간 동안 일정한 공급 속도 15g/L로 개시하는 글루코즈 제한 유가식을 수행하여 최종 무수 생물량 농도 약 100g/L를 유도한다. 샘플은 배치 및 유가식 단계 동안 취했고, 플레이트 판독기(Infinite 200, Tecan, CH)를 사용하여 eGFP 발현에 대해 분석했다. 따라서, 샘플을 광학 밀도(OD600) 5로 희석시켰다. 결과는 생물반응기당 상대적 형광(FL/r)으로서 표 7에 나타낸다.
- [0348] 표 7: 최적화된 유가식 발효에서 pGAP 또는 pG1의 조절하에 eGFP를 발현시키는 2개의 상이한 피. 파스토리스의 생물반응기당 상대적 형광

pGAP_eGFP#2		pG1_eGFP#8	
t [h]	FL/r	t [h]	FL/r
-1.7	176.77	-0.38	131.95
0.0	166.52	0.00	108.76
0.5	199.59	0.28	100.35
1.0	195.94	0.62	121.36
1.5	173.68	1.12	161.16
2.0	219.00	1.62	162.69
3.0	321.14	2.12	148.34
7.0	494.60	3.12	205.20
19.1	1150.96	7.12	373.08
20.0	1000.37	19.70	1745.65
		21.12	1831.52

- [0349]
- [0350] 실시예 3: 세포외 발현된 리포터 유전자로서 인간 혈청 알부민(HSA)을 사용하는 피. 파스토리스에서 신규 동정된 프로모터의 비교 프로모터 활성 연구
- [0351] 글루코즈 제한 조건에서 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 공정의 배치 단계(프로모터의 억제된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후 배지로 수행하였고, 공정의 글루코즈 제한 유가식 단계(프로모터의 유도 상태)를 시뮬레이팅하는 - 최소 배지 및 글루코즈 공급물 비드에 의한 주배양을 수행했다.

[0352] a) 균주 & 발현 벡터

- [0353] 피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용했다. 균주의 형질전환은 pPUZZLE라 명명되는 내부 벡터를 사용하여 수행되었고[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29], 양성

형질전환체의 선택은 제오신 내성을 기초로 했다. 인간 혈청 알부민(HSA)의 분비 발현을 위해, 이의 자연 분비 리더를 사용했다.

[0354] b) 내부 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1, pG3, pG4 및 pG6의 증폭 및 클로닝

[0355] 실시예 2b에서 증폭된 4개의 프로모터는 pPUZZLE 발현 벡터 pPM1aZ10_HSA에 클로닝하여 pPM1aZ10_pG1_HSA, pPM1aZ10_pG3_HSA, pPM1aZ10_pG4_HSA 및 pPM1aZ10_pG6_HSA를 유도했다. 또한, 글리세르알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제 프로모터의 통상 사용된 프로모터(pGAP)를 함유하는 벡터 pPM1aZ10_pGAP_HSA를 참조로 사용했다. 프로모터는 ApaI 및 SbfI 제한 부위(표 3 참조)를 사용하여 HSA 유전자의 개시 코돈의 상류에 삽입했다. 프로모터 서열의 정확성은 생거 서열분석에 의해 확인했다.

[0356] c) 신규 동정된 글루코즈 제한 유도 프로모터의 조절하에 피. 파스토리스에서 HSA의 발현

[0357] 모든 플라스미드는 피. 파스토리스에서 (피. 파스토리스를 위한 표준 형질전환 프로토콜을 사용하여) 전기천공전에 Ascl 제한 효소를 사용하여 선형화했다. 양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL 제오신을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 웨톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 플레이트 상에서 수행했다. 콜로니PCR은 실시예 2c에 기재된 바와 같이 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용되었다.

[0358] HSA 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 웨톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 YP 배지(1리터당: 20g 웨톤, 10g 효모 추출물) 및 글루코즈 공급 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글로코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = $1.63 * t^{0.74}$ [mg/Disc]에 의해 기재된 이러한 공급물 비드의 느린 글로코즈 방출 동역학에 기인하여 달성되었다. 샘플은 예비배양 말기 및 주배양물의 접종 후 24시간 및 48시간에 취했다. 생물량 농도는 OD600 또는 습윤 세포 중량을 측정하여 결정했다. 배양물 상청액 중의 HSA 농도는 공급자의 지침 메뉴얼에 따라 인간 알부민 ELISA 정량화 세트(카탈로그 번호 E80-129, 베틸 라보라토리즈, 텍사스, 미국)에 의해 정량화했다. HSA 표준은 40ngmL⁻¹의 개시 농도로 사용했다. 샘플은 따라서 샘플 희석액(50mM 트리스-HCl, 140mM NaCl, 1%(w/v)의 BSA, 0.05%(v/v)의 트윈20, pH8.0)으로 희석시켰다. 각 작제물의 일부 클론의 스크리닝으로부터의 HSA 역가는 표 8에 나타낸다.

[0359]

표 8: pGAP, pG1 및 pG6의 조절하에 피. 파스토리스 클론을 발현하는 HSA의 스크리닝 결과

클론	HSA 역가 [mg L ⁻¹]	
	예비 배양	주배양 48h
pGAP_HSA #1	6.9	9.0
pGAP_HSA #2	9.0	8.6
pGAP_HSA #3	6.6	9.2
pGAP_HSA #4	18.9	20.4
pGAP_HSA #5	9.6	8.3
pGAP_HSA #6	10.8	8.8
pG1_HSA #19	0.6	6.9
pG1_HSA #20	0.6	6.7
pG1_HSA #21	0.1	7.0
pG1_HSA #22	-	-
pG1_HSA #23	1.3	13.5
pG1_HSA #24	1.1	13.7
pG1_HSA #25	0.5	8.9
pG1_HSA #26	0.5	9.2
pG1_HSA #27	0.6	7.3
pG1_HSA #28	0.6	6.1
pG1_HSA #29	0.6	6.4
pG1_HSA #30	0.6	7.1
pG6_HSA #31	0.3	1.8
pG6_HSA #32	0.3	1.7
pG6_HSA #33	0.3	2.0
pG6_HSA #34	0.4	2.0
pG6_HSA #35	0.2	2.2
pG6_HSA #36	0.3	2.5
pG6_HSA #37	0.3	2.3
pG6_HSA #38	0.2	1.5
pG6_HSA #39	0.7	-
pG6_HSA #40	0.2	2.4
pG6_HSA #41	0.4	-
pG6_HSA #42	-	1.9

[0360]

d) HSA 유전자 카피 수의 측정

[0361]

계놈 DNA의 분리 및 qPCR 측정은 표 9에 제시된 프라이머를 사용하여 실시해 2d에서와 같이 수행했다. 결과는 표 10에 나타낸다.

[0362]

표 9: 실시간 PCR에 의한 유전자 카피 수 측정을 위한 프라이머

프라이머	표적	서열	생성물 길이
PpACT1_Up	Act	서열번호 30 CCTGAGGCTTGTCCACCCATCT	148 bp
PpACT1_Low	Act	서열번호 31 GGAACATAGTAGTACCACCGGACATAACGA	148 bp
PpHSA_Up	HSA	서열번호 32 AAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGT	135 bp
PpHSA_Low	HSA	서열번호 33 ACTCTGTCACTTACTGGCGTTTCATG	135 bp

[0363]

표 10: pGAP, pG1 및 pG6의 조절하에 HSA를 발현시키는 피. 파스토리스 클론의 스크리닝 및 유전자 카피 수 결과

클론	GCN	HSA mgL^{-1} 주배양	GCN 주배양당 HSA mgL^{-1}	평균	STDEV
pGAP_HSA#3	1	9.2	9.2	9.22	0.95
pGAP_HSA#4	2	20.4	10.2		
pGAP_HSA#5	1	8.3	8.3		
pG1_HSA#20	1	6.6	6.6	6.81	0.13
pG1_HSA#21	1	7.0	7.0		
pG1_HSA#23	2	13.5	6.8		
pG1_HSA#24	2	13.7	6.8		
클론	GCN	HSA mgL^{-1} 주배양	GCN 주배양당 HSA mgL^{-1}	평균	STDEV
pG6_HSA#36	1	2.5	2.5	2.07	0.52
pG6_HSA#37	1	2.3	2.3		
pG6_HSA#38	1	1.5	1.5		

[0366]

e) pG1 및 pG6 프로모터의 조절하에 HSA를 발현하는 피. 파스토리스 균주의 유가식 배양

[0368]

발효는 0.7L의 최종 작업 용적을 갖는 DASGIP 생물반응기에서 수행했다. 균주 pG1_HSA#23은 2개의 HSA 유전자 카피를 갖고, 균주 pG6_HSA#36은 단지 하나의 HSA 유전자 카피를 수반했다. 따라서, pGAP의 조절하에 HSA를 발현시키는 2개의 상이한 피. 파스토리스 균주(하나의 HSA 유전자 카피를 갖는 pGAP_HSA#3, 및 2개의 HSA 유전자 카피를 갖는 pGAP_HSA#4)를 참조로서 배양했다. 모든 발효는 이중으로 실시했다.

[0369]

다음 배지를 사용했다:

[0370]

리터당 함유된 PTM₁ 미량 염 보존액

[0371]

6.0g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08g NaI, 3.36g MnSO₄ · H₂O, 0.2g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02g H₃BO₃, 0.82g CoCl₂, 20.0g ZnCl₂, 65.0g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g 비오틴 및 5.0ml H₂SO₄ (95%-98%).

[0372]

리터당 함유된 글리세롤 배치 배지

[0373]

39.2g 글리세롤, 27.9g H₃PO₄(85%), 7.8g MgSO₄ · 7H₂O, 2.6g KOH, 9.5g K₂SO₄, 0.6g CaSO₄ · 2H₂O, 0.4mg 비오틴 및 4.6ml PTM₁ 미량 염 보존액. 발효조에서 멸균 여과 후 pH를 5.85로 조정하였다.

[0374]

리터당 함유된 글루코즈 유가식 배지

[0375]

550g 글루코즈 1수화물, 6.5g MgSO₄ · 7H₂O, 10g KCl, 0.35g CaCl₂ · 2H₂O, 0.4mg 비오틴 및 12ml PTM₁ 미량 염 보존액.

[0376]

용해된 산소를 교반기 속도(400 내지 1200rpm)로 DO = 20%에서 조절했다. 통기 속도는 24l h⁻¹ 공기였고, 온도는 25°C에서 조절하고, pH 설정값 5.85는 NH₄OH(25%)를 첨가하여 조절했다.

[0377]

발효를 개시하기 위해, 400mL 배지 배지를 발효조에서 멸균 여과시키고, 피. 파스토리스를 출발 광학 밀도(OD 600) 1로 접종했다(예비배양으로부터). 약 25시간의 배지 단계는 약 20g/L의 무수 생물량 농도에 도달하고, 글루코즈 배지에 의한 일정한 유가식(약 100시간 동안)을 수행하여 무수 생물량 농도 약 100g/L를 유도한다. 배지 동안 pH는 5.8이었고, 발효 내내 5.85로 유지하였다. 샘플은 배지 및 유가식 단계 동안 취했다. HSA 농도는 실시예 3c에 기재된 바와 같이 인간 알부민 ELISA 정량화 세트(Bethyl, 카탈로그 번호 E80-129)를 사용하여 정량화했다. 생물량 농도 및 HSA 역가는 표 11에 제시하고, 배지의 말기(pG1 및 pG6을 위한 억제 조건) 및 유가식의 말기(pG1 및 pG6을 위한 유도 조건)에 생성물 수율(생물량당 분비된 HSA의 양, HSA/YDM)은 표 12에 제시한다. 이에 의해, 유도 전략을 확인할 수 있었다. pGAP 유도된 클론과 대조적으로, pG1 및 pG6는 (글리세롤 배지 중) 탄소원 과잉하에 억제되어, 검출가능한 HSA를 거의 나타내지 않는다. pG1 및 pG6의 유도는 유가식 단계의 개시로 C-제한 조건으로 스위칭시 발생했다. pG1(HSA/YDM)의 유도는 억제된 상태와 비교하여 120배 이상이었고, pG6의 유도는 억제된 상태와 비교하여 20배 이상인 반면, pGAP에 대한 변화는 거의 관찰되지 않았다 (배지 단계와 비교하여 HSA/YDM에서 3배 증가).

[0378]

표 11: pGAP, pG1 또는 pG6의 조절하에 HSA를 발현하는 피. 파스토리스의 7개 발효의 배지 말기 및 유가식에서

효모 건식 질량 및 HSA 역가

클론	발효 #	배치 말기			유가식 말기		
		시간 [h]	YDM [gL ⁻¹]	HSA 역가 [mgL ⁻¹]	시간 [h]	YDM [gL ⁻¹]	HSA 역가 [mgL ⁻¹]
pG1#23	A041	-1.1	24.7	0.5	99.6	125.3	328.6
pG1#23	A048	-0.3	23.9	0.5	108.4	128.6	277.6
pG6#36	A045	-0.1	23.5	0.3	104.7	125.2	21.8
pG6#36	A049	-0.3	24.4	0.3	108.4	129.0	26.9
pGAP#4	A044	-0.1	23.6	11.2	104.7	129.1	141.4
pGAP#4	A051	-0.9	24.1	9.0	96.9	118.2	114.9
pGAP#3	A050	-0.9	24.2	5.0	96.9	117.7	57.8

[0379]

[0380]

표 12: pGAP, pG1 또는 pG6의 조절하에 HSA를 발현하는 피. 파스토리스의 7개 발효의 배치 말기 및 유가식에서 효모 건식 질량당 HSA 역가

	GCN HSA	배치의 말기		유가식의 말기		유도 배율
		평균 HSA/YDM	SD	평균 HSA/YDM	SD	
pG1#23	2	0.02	0.00	2.39	0.33	121.06
pG6#36	1	0.01	0.00	0.19	0.02	21.39
pGAP#4	2	0.42	0.07	1.03	0.09	3.16
pGAP#3	1	0.21		0.49		

[0381]

[0382]

실시예 4: 세포내 발현된 리포터 유전자로서 eGFP를 사용하는 피. 파스토리스에서 신규 동정된 프로모터의 각종 글루코즈 농도에서 비교 프로모터 활성 연구

[0383]

각종 글루코즈 농도에서 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후 배지로 수행했고(프로모터의 억제된 상태), 탄소원으로서 최소 배지 및 글루코즈를 사용하는 주배양(프로모터의 유도 상태)을 수행했다.

[0384]

a) 균주 & 발현 벡터

[0385]

피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용했다. 균주의 형질전환은 pPUZZLE라 명명되는 내부 벡터를 사용하여 수행되었고[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29], 양성 형질전환체의 선택은 제오신 내성을 기초로 했다.

[0386]

b) GOI로서 eGFP를 함유하는 pPUZZLE 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1, pG3, pG4 및 pG6의 증폭 및 클로닝

[0387]

증폭 및 클로닝은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행한다.

[0388]

c) 프로모터 활성을 분석하기 위한 피. 파스토리스에서 eGFP의 발현

[0389]

형질전환 및 클론 선택은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행한다.

[0390]

발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 펫톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 10ml YP 배지(1리터당: 20g 펫톤, 10g 효모 추출물) 및 탄소원으로서 글루코즈에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글루코즈는 20 내지 0.001gL⁻¹의 각종 농도로 사용한다.

[0391]

샘플을 주배양물의 접종후 1 내지 8시간 후에 취했다. eGFP 발현은 문헌[참조: Stadlmayr et al.; J.

Biotechnology 2010 Dec;150(4):519-29]에 기재된 바와 같이 유동 세포계수법으로 분석하고, 양성 형질변환체의 선택은 제오신 내성을 기초했다. 각 샘플에 대해, 10,000세포를 분석한다. 피. 파스토리스의 자가 형광은 형질전환되지 않은 피. 파스토리스 야생형 세포를 사용하여 측정한다.

[0392] 실시예 5: 세포외 발현된 리포터 유전자로서 돼지 카복시펩티다제 B(CpB)를 사용하여 피. 파스토리스에서 신규 동정된 프로모터의 비교 프로모터 활성 연구

[0393] 글루코즈 제한 조건하에 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 공정의 배치 단계(프로모터의 억제된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후 배지로 수행하였고, 공정의 글루코즈 제한 유가식 단계(프로모터의 유도 상태)를 시뮬레이팅하는 - 최소 배지 및 글루코즈 공급물 비드에 의한 주배양을 수행한다.

[0394] a) 균주 & 발현 벡터

[0395] 피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용한다. 균주의 형질전환은 pPUZZLE라 명명되는 내부 벡터를 사용하여 수행하고[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29], 양성 형질변환체의 선택은 제오신 내성을 기초로 했다. 돼지 카복시펩티다제 B(CpB)의 분비 발현을 위해, 효모 알파 접합 인자 리더를 사용한다.

[0396] b) 내부 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1, pG3, pG4 및 pG6의 증폭 및 클로닝

[0397] 실시예 2b에서 증폭된 2개의 프로모터는 pPUZZLE 발현 벡터 pPM1aZ30_aMF_CpB에서 클로닝하여 pPM1aZ30_pG1_aMF_CpB 및 pPM1aZ30_pG6_aMF_CpB를 유도했다. 또한, 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 프로모터의 통상 사용된 프로모터(pGAP)를 함유하는 벡터 pPM1aZ10_pGAP_CPB를 참조로 사용했다. 프로모터는 ApaI 및 SbfI 제한 부위를 사용하여 CpB 유전자의 개시 코돈의 상류에 삽입했다. 프로모터 서열의 정확성은 생거 서열분석에 의해 확인했다.

[0398] c) 신규 동정된 글루코즈 제한 유도 프로모터의 조절하에 피. 파스토리스에서 CpB의 발현

[0399] 플라스미드는 피. 파스토리스에서 (피. 파스토리스를 위한 표준 형질전환 프로토콜을 사용하여) 전기천공 전에 SpeI 또는 SapI 제한 효소를 사용하여 선형화했다. 양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL의 제오신을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 펩톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 플레이트 상에서 수행한다. 콜로니 PCR은 실시예 2c에 기재된 바와 같이 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용된다.

[0400] CpB 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 YP 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물) 및 글루코즈 공급 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글루코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = $1.63 * t^{0.74}$ [mg/Disc]에 의해 기재된 이러한 공급물 비드의 느린 글루코즈 방출 동역학에 기인하여 달성되었다. 샘플은 예비배양 말기 및 주배양물의 접종 후 24시간 및 48시간에 취했다. 생물량 농도는 OD600 또는 습윤 세포 중량을 측정하여 결정했다. 배양물 상청액 중의 CpB 농도는, CpB에 의한 힙푸릴-L-아르기닌의 힙푸르산으로의 전환에 기초하여, 효소 검정으로 정량화한다. 반응 동력학은 반응이 개시될 때 허타치 U-2910 분광광도계를 사용하여 25°C에서 254nm에서 흡수를 모니터링하여 측정한다. 샘플 및 표준을 분석 완충액(25mM Tris, 100mM HCl, pH 7.65)으로 완충시키고, 활성화 완충액(0.01mgL⁻¹ 트립신, 300mM Tris, 1 μ M ZnCl₂, pH 7.65)을 사용하여 활성화시킨다. 트립신 부재하의 활성화 완충액은 음성 대조군으로서 샘플 대신 사용한다. 반응은 기질 용액(분석 완충액 중의 1mM 힙푸릴-L-아르기닌)을 첨가하여 개시한다.

[0401] d) pG6 프로모터의 조절하에 CpB를 발현하는 피. 파스토리스의 유가식 배양

- [0402] 유가식 발효는 실시예 3e에 기재된 바와 같이 수행한다. 클론 pPM1aZ10_pG6_CpB#4는 배치에서 검출가능한 CpB를 생산하지 않고, 유가식 말기에 210mg/L 이상의 CpB를 생성했다.
- [0403] 실시예 6: 세포외 발현된 리포터 유전자로서 인간 혈청 알부민(HSA)을 사용하여 피. 파스토리스 다중카피 클론에서 신규 동정된 프로모터 pG1 및 pG6의 비교 프로모터 활성 연구
- [0404] 글루코즈 제한 조건하에 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 공정의 배치 단계(프로모터의 억제된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후 배지로 수행하였고, 공정의 글루코즈 제한 유가식 단계(프로모터의 유도 상태)를 시뮬레이팅하는 - 최소 배지 및 글로코즈 공급물 비드에 의한 주배양을 수행한다.
- [0405] a) 균주 & 발현 벡터
- [0406] 피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용한다. 균주의 형질전환은 pPUZZLE라 명명되는 내부 벡터를 사용하여 수행하고[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29], 양성 형질전환체의 선택은 제오신 내성을 기초로 한다. 인간 혈청 알부민(HSA)의 분비 발현을 위해, 이의 천연 분비 리더를 사용한다.
- [0407] b) 내부 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1 및 pG6의 증폭 및 클로닝
- [0408] 실시예 2b에서 증폭된 2개의 프로모터는 pPUZZLE 발현 벡터 pPM1nZ30_HSA에서 클로닝하여 pPM1nZ30_pG1_HSA 및 pPM1nZ30_pG6_HSA를 유도했다.
- [0409] 프로모터는 ApaI 및 SbfI 제한 부위를 사용하여 HSA 유전자의 개시 코돈의 상류에 삽입했다. 프로모터 서열의 정확성을 생거 서열분석에 의해 확인했다.
- [0410] c) 신규 동정된 글루코즈 제한 유도 프로모터의 조절하에 피. 파스토리스에서 HSA의 발현
- [0411] 모든 플라스미드는 피. 파스토리스에서 (피. 파스토리스를 위한 표준 형질전환 프로토콜을 사용하여) 전기천공전에 Ascl 제한 효소를 사용하여 선형화했다. 양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL의 제오신을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 펩톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 플레이트 상에서 수행한다. 유전자 카피 수 증폭은 문헌[참조: Marx et al.; FEMS Yeast Res. 2009 Dec;9(8):1260-70]에 기재된 바와 같이 수행한다. 콜로니 PCR은 실시예 2c에 기재된 바와 같이 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용된다.
- [0412] HSA 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 YP 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g의 효모 추출물) 및 글루코즈 공급 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글로코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = 1.63 * t0.74[mg/Disc]에 의해 기재된 이러한 공급물 비드의 느린 글로코즈 방출 동역학에 기인하여 달성된다. 샘플을 예비배양 말기 및 주배양물의 접종후 24시간 및 48시간에 취했다. 생물량 농도는 OD600 또는 습윤 세포 중량을 측정하여 결정한다. 배양물 상청액 중의 HSA 농도는 공급자 지침 메뉴얼에 따라 인간 알부민 ELISA 정량화 세트(카탈로그 번호 E80-129, 베틸 라보라토리즈, TX, USA)로 정량화한다. HSA 표준을 400ngmL⁻¹의 개시 농도로 사용한다. 샘플은 샘플 희석액(50mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1% (w/v) BSA, 0.05%(v/v) 트윈20, pH 8.0)으로 상응하게 희석시킨다. 실시예 3c로부터 다수의 다중카피 클론 및 단일 카피 클론의 스크리닝으로부터의 HSA 역가를 표 13에 제시한다.

[0413]

표 13: pGAP, pG1 및 pG6의 조절하에 HSA를 발현시키는 피. 파스토리스 다중카피 클론의 스크리닝 결과

클론	HSA 역가 (mg/L)
pPM1aZ10_pG1_HSA#23	8.20
pPM1nZ30_pG1_HSA#C2	19.55
pPM1nZ30_pG1_HSA#4*1000	21.59
pPM1nZ30_pG1_HSA#5*1000	21.33
pPM1nZ30_pG1_HSA#X4	27.22
pPM1nZ30_pG1_HSA#X5	6.90
pPM1aZ10_pG6_HSA#36	1.55
pPM1nZ30_pG6_HSA#C6	14.12
pPM1nZ30_pG6_HSA#2*1000	15.85
pPM1nZ30_pG6_HSA#X5	11.52
pPM1nZ30_pG6_HSA#X8	7.87

[0414]

[0415]

d) HSA 유전자 카피 수의 측정

[0416]

계놈 DNA의 분리 및 qPCR 측정은 표 9에 제시된 프라이머를 사용하여 실시예 2d에서와 같이 수행한다. 결과를 표 14에 제시한다.

[0417]

표 14: pGAP, pG1 및 pG6의 조절하에 HSA를 발현시키는 선택된 피. 파스토리스 다중카피 클론의 스크리닝 및 유전자 카피 수 결과

클론	GCN	HSA mgL^{-1} 주배양	GCN 주배양당 HSA mgL^{-1}
pPM1nZ30_pG1_HSA#4*1000	11	21.59	1.89
pPM1nZ30_pG1_HSA#X4	17	27.22	1.64
pPM1nZ30_pG6_HSA#C6	12	14.12	1.23
pPM1nZ30_pG6_HSA#2*1000	6	15.85	2.50

[0418]

e) pG1 및 pG6 프로모터의 조절하에 HSA를 발현시키는 다중카피 피. 파스토리스의 유가식 배양

[0420]

유가식 발효를 실시예 3e에 기재된 바와 같이 수행한다. 클론 pPM1nZ30_pG1_HSA#4*1000 및 pPM1nZ30_pG6_HSA#C6은 유가식 말기에 각각 1060 및 728mg/L의 HSA에 도달한다.

[0421]

실시예 7: 세포외 발현된 리포터 유전자로서 항체 단편(Fab)을 사용하여 피. 파스토리스에서 신규 동정된 프로모터 pG1의 비교 프로모터 활성 연구

[0422]

글루코즈 제한 조건하에 신규 동정된 프로모터의 특성을 분석하기 위해, 진탕 플라스크 스크리닝을 다음과 같이 수행했다: 24시간 동안 예비배양은 공정의 배치 단계(프로모터의 억제된 상태)를 시뮬레이팅하는 - 탄소원으로 글리세롤을 함유하는 농후 배지로 수행하고, 공정의 글루코즈 제한 유가식 단계(프로모터의 유도 상태)를 시뮬레이팅하는 - 최소 배지 및 글루코즈 공급 비드에 의한 주배양을 수행한다.

[0423]

a) 균주 & 발현 벡터

[0424]

피. 파스토리스 야생형 균주(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)를 숙주 균주로서 사용한다. 균주의 형질전환은 pPUZZLE라 명명되는 내부 벡터를 사용하여 수행하고[참조: Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010 Dec;150(4):519-29], 양성 형질전환체의 선택은 제오신 내성을 기초로 한다. 항체 Fab 단편의 분비 발현을 위해, 효모 알파 접합 인자 리더를 사용한다.

[0425]

b) 내부 발현 벡터에서 신규 동정된 프로모터 pG1의 증폭 및 클로닝

[0426]

실시예 2b에서 증폭된 pG1 프로모터는 실시예 5b에 기재된 바와 같이 GOI로서 Fab를 함유하는 pPUZZLE 발현 벡터를 사용한다.

터에서 클로닝한다. 프로모터는 ApaI 및 SbfI 제한 부위를 사용하여 Fab 유전자의 개시 코돈의 상류에 삽입한다. 프로모터 서열의 정확성은 생거 서열분석에 의해 확인했다.

[0427] c) 신규 동정된 글루코즈 제한 유도 프로모터 pG1의 조절하에 피. 파스토리스에서 Fab의 발현

[0428] 플라스미드는 피. 파스토리스에서 (피. 파스토리스를 위한 표준 형질전환 프로토콜을 사용하여) 전기천공 전에 SpeI 또는 SapI 제한 효소를 사용하여 선형화했다. 양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL의 제오신을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 텐톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 플레이트 상에서 수행한다. 콜로니 PCR은 실시예 2c에 기재된 바와 같이 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용된다.

[0429] Fab 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 텐톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종한다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 YP 배지(1리터당: 20g 텐톤, 10g 효모 추출물) 및 글루코즈 공급 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글로코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = $1.63 * t^{0.74}$ [mg/Disc]에 의해 기재된 이러한 공급물 비드의 느린 글로코즈 방출 동역학에 기인하여 달성된다. 샘플을 예비배양 말기 및 주배양물의 접종후 24시간 및 48시간에 취했다. 생물량 농도는 OD600 또는 습윤 세포 중량을 측정하여 결정한다. Fab 발현 수준은 염소에 생성된 항-인간 카파 경체(결합된 및 비함유)-알칼리성 포스파타제 항체를 사용하여 ELISA로 정량화한다. pGAP 및 pG1의 조절하에 다수의 Fab 발현 클론의 스크리닝으로부터의 Fab 역가를 표 15에 제시한다.

표 15: pGAP 및 pG1의 조절하에 Fab를 발현시키는 피. 파스토리스 클론의 스크리닝 결과

	Fab (mg/L)
pPM1dZ30_pGAP_Fab#2	0.00
pPM1dZ30_pGAP_Fab#5	0.70
pPM1dZ30_pGAP_Fab#7	0.68
pPM1aZ30_pG1_Fab#2	2.02
pPM1aZ30_pG1_Fab#3	0.70
pPM1aZ30_pG1_Fab#4	1.10
pPM1aZ30_pG1_Fab#5	0.00
pPM1aZ30_pG1_Fab#6	0.56
pPM1aZ30_pG1_Fab#9	0.66
pPM1aZ30_pG1_Fab#10	1.80
pPM1aZ30_pG1_Fab#11	1.64
pPM1aZ30_pG1_Fab#12	2.31
pPM1aZ30_pG1_Fab#13	2.35
pPM1aZ30_pG1_Fab#14	2.27
pPM1aZ30_pG1_Fab#15	1.60
pPM1aZ30_pG1_Fab#16	1.45
pPM1aZ30_pG1_Fab#B9	2.89
pPM1aZ30_pG1_Fab#B10	2.32
pPM1aZ30_pG1_Fab#B11	6.45
pPM1aZ30_pG1_Fab#B12	3.24
pPM1aZ30_pG1_Fab#B13	2.57
pPM1aZ30_pG1_Fab#B14	3.14
pPM1aZ30_pG1_Fab#B15	3.23
pPM1aZ30_pG1_Fab#B16	2.61
pPM1aZ30_pG1_Fab#C1	10.58
pPM1aZ30_pG1_Fab#C2	1.46
pPM1aZ30_pG1_Fab#C3	12.38
pPM1aZ30_pG1_Fab#C4	9.91
pPM1aZ30_pG1_Fab#C5	1.96
pPM1aZ30_pG1_Fab#C6	2.87
pPM1aZ30_pG1_Fab#C7	7.03
pPM1aZ30_pG1_Fab#C8	6.37

[0431]

[0432] d) pG1 프로모터의 조절하에 Fab를 발현시키는 피. 파스토리스 균주의 유가식 배양

[0433] 유가식 발효는 실시예 3e에 기재된 바와 같이 유사하게 수행하지만, 실시예 2e에 기재된 바와 같은 글로코즈 유가식이 사용된다. 클론 pPM1aZ30_pG1_Fab#C4 및 pPM1aZ30_pG1_Fab#C7은 유가식의 말기에 각각 165 및 131mg/L Fab에 도달한다.

[0434]

실시예 8: 신규 동정된 프로모터의 최대 용적 생산성에서 비증식 속도를 조절하는 지수 유가식 발효

[0435]

신규 동정된 프로모터의 조절하에 리포터 유전자를 발현시키는 피. 파스토리스의 케모스타트 배양은 상이한 성장 속도에서 특정의 용적 생산성을 결정하는데 사용된다. 문헌[참조: Maurer et al.; Microb Cell Fact. 2006 Dec 11:5:37]에 기재된 바와 같이, 지수 유가식 발효를 사용하여, 전체 공급 단계 동안 개선된 생산을 위한 특정 성장 속도에서 피. 파스토리스를 성장시킬 수 있다. 이에 의해, 공간-시간 수율을 최적화할 수 있다. 최적화된 공급물을 적용하고, 유가식 단계의 공간-시간 수율은 35% 이상으로 향상되었다.

[0436]

실시예 9: 프로모터/전사 강도의 측정: 세포내 발현된 리포터 유전자로서 eGFP를 사용하여 상이한 글루코즈 농도에 대한 프로모터 조절을 동정하기 위한 비교 프로모터 활성 연구

[0437]

프로모터의 조절 특성은 상기 프로모터의 조절하에 eGFP를 발현하는 클론을 스크리닝하여 분석한다. 따라서, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g의 펫톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여 OD600 0.01의 주배양물을 10mL의 YP 배지(1리터당: 20g 펫톤, 10g 효모 추출물) 및 상이한 농도(20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0.020, 0.010, 0.005 및 0.002g/L)의 글루코즈에서 접종시킨다. 샘플을 6시간 후에 취하고, 문헌[참조: Stadlmayr et al.; J Biotechnol. 2010 Dec;150(4):519-29]에 기재된 바와 같이 유동 세포계수법으로 분석했다. 세포 크기에 관련된 형광(1.5 배율의 전방 산란)을 각각의 세포/데이터 점에 대해 계산하고, 이의 기하학적 평균을 사용하여 상이한 글루코즈 농도로 생산된 eGFP의 발현 수준을 비교한다. pGAP의 조절하에 eGFP를 발현하는 클론을 참조로서 사용한다(피. 파스토리스의 pGAP, 본원에서 서열번호 25). 피. 파스토리스의 자가 형광은 형질전환되지 않은 피. 파스토리스 야생형 세포를 사용하여 측정하고, 신호로부터 감산된다. 표 16은 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 약 40mg/L 글루코즈 이하에서 pG1 프로모터의 완전한 유도 및 이의 전사 강도를 나타낸다.

[0438]

표 16: 상이한 글루코즈 농도(20-0.002g/L)에서 pG1 프로모터의 조절하에 eGFP를 발현시키는 피. 파스토리스의 상대적 eGFP 발현(pGAP와 관련)

pGAP의 %	글루코즈 (g/L)
14.7	20
17.4	10
23.7	5
25.4	2.5
28.2	1.25
30.6	0.625
36.9	0.3125
44.5	0.15625
50.9	0.078125
56.2	0.0390625
55.0	0.0195313
57.5	0.0097656
59.2	0.0048828
59.6	0.0024414

[0439]

추가의 유사한 연구는 활성화된 프로모터 pG1, pG3, pG4, pG6 및 pG7의 상대적 전사 강도를 비교하기 위해 수행했다. 프로모터 중 하나의 조절하에 eGFP를 발현하는 클론을 YPG(20g/L의 글리세롤, 억제된 상태)에서 배양한 다음, 상이한 양의 글루코즈(20 내지 0.002g/L(D20, D10,...D0.002), 유도된 상태)를 함유하는 YP 배지에서 접종하고, 5 내지 6시간 동안 배양하였다. 세포를 유동 세포계수법으로 분석하고, 결과를 다음과 같이 평가했다: 형광은 각 세포에 대해 세포 크기(배율 1.5의 전방 산란)에 관련되고, 이의 기하학적 평균을 상이한 글루코즈 농도의 비교용으로 사용했다. 이러한 스크리닝의 결론 결과는 도 14에 나타내고, 여기서 다이아그램은 글루코즈 제한 조절 가능한 프로모터의 유도 거동의 우수한 이미지를 제공하는 상대 형광에 대한 대수 글루코즈 농도를 나타낸다. 도 14는 천연 pGAP 프로모터와 비교하여 약 40mg/L 글루코즈 이하에서 pG1 프로모터의 완전한 유도 및 약 4g/L 이하에서 프로모터 pG3, pG4 및 pG6의 완전한 유도 및 전사 강도를 나타낸다. pG7의 유도 거동은 pG1(데이터가 제시되지 않음)과 유사하다. pG8을 사용한 이전의 결과에 기초하여, 이의 유도 거동은 기타 프로모터의 범위 내에 있는 것으로 가정된다.

- [0441] 실시예 10: 글루코즈 농도 스크리닝 분석에서 종래 기술 pICL1 및 pMLS1 프로모터와 pG1의 비교.
- [0442] 비교 프로모터 활성 연구는 본 발명에 따르는 pG1 프로모터와 비교하기 위한 기준으로 pICL1 및 pMLS1 프로모터를 사용하여 실시예 9에 따라 수행한다.
- [0443] pICL1과 pMLS1 프로모터 모두의 활성은 높은(D20: 20g/L/억제) 또는 낮은(D0.04: 0.04g/L의 유도 = 활성화)에서 유의차 없이 매우 약한 것으로 밝혀졌다. 임의의 경우에서, 활성은 동일한 셋팅에서 억제된 pG1 프로모터의 활성보다 훨씬 작다. 결과는 pGAP 프로모터에 대한 프로모터 활성(%)으로 표 17에 나타낸다.
- [0444] 표 17 : 20g/L 글루코즈(D20) 또는 0.04g/L(D0.04)를 함유하는 배지에서 증식시킨 pG1, pICL1 및 pMLS1 각각의 조절하에 eGFP를 발현하는 균주의 상대적 형광.

	D20/억제	D0.04/유도
pG1#8	9.95 +/- 2.60	48.41 +/- 2.76
pICL1	2.68 +/- 1.78	5.07 +/- 0.90
pMLS1	-1.26 +/- 0.54	0.58 +/- 0.22

- [0445]
- [0446] 실시예 11: pG1의 변이체의 비교
- [0447] pG1 프로모터의 짧은 변이체를 실시예 2a에 기재된 바와 같이 클로닝하고, 실시예 2c에 기재한 바와 유사하지만, 24-웰 플레이트(Whatman, UK, Art. Nr. 7701-5110) 및 전체의 것 대신 공급 비드의 3/4(12mm, Kuhner, CH)을 사용하는 다운스케일 셋업으로 스크리닝한다. pG1 및 pGAP의 조절하에 발현하는 클론을 대조군으로 사용한다. pG1의 전방 프라이머 및 길이 및 이의 변이체는 표 18에 수록된다. pG1 및 pG1 변이체 a-f의 조절하에 eGFP를 발현하는 상대적 형광에서 유의차는 없었다.
- [0448] 표 18: pG1 및 이의 변이체: pG1 서열(서열번호 1)에서 전방 프라이머 및 5' 개시 및 3' 말단 위치. pG1a-f의 서열은 도 15(서열번호 41-46)를 참조한다.

프로모터	프라이머	5	3	길이 (bp)
pG1	GATAGGGCCCCAACATTGCTCCCCCTAGTCTC 서열번호 34	36	1001	988
pG1a	GATAGGGCCCGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAG 서열번호 35	143	1001	881
pG1b	GATAGGGCCCCCATATTCACTAGTAGGTGTTCTGCAC 서열번호 36	338	1001	686
pG1c	GATAGGGCCCTGCAGATAGACTCAAGATCTCAGG 서열번호 37	509	1001	515
pG1d	GATAGGGCCCGACCCGTTTCGTGACAATT 서열번호 38	632	1001	392
pG1e	GATAGGGCCCCGGATAAGAGAATTGTTGATTAT 서열번호 39	674	1001	350
pG1f	GATAGGGCCCGCTGCTCCATATTTCCGG 서열번호 40	719	1001	305

- [0449]

도면**도면1**

pG1 (서열번호 1)

ATTTCCACCCCCATCCCAGTAGAATGTAGGGTCCCCAACACATTGCTCCCCCTAG
 TCTCCAGGGAAATGTAATATACTGCTAATAGAAAACAGTAAGACGCTCAGTTGT
 CAGGATAATTACGTTGACTGTAGTAAAACAGGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACG
 AGAGTTTTTACGGCGCCCATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCA
 CTACTTCAAAGGTTCTGCTATAACGAACCAGTTAACCAACCTCGCTTT
 GACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACATCAAGTACCCCTAGTCTGTCTGAATGCTCC
 TTCCATATTCACTAGGTGTTCTGCACTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGC
 CAATAGCGCGTTCATATGCGCTTTACCCCTCTTGTCAAGCGAAAATGCCT
 GTAAGATTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGGCTAATTCCCT
 GAAAAAAACTGCAGATAGACTCAAGATCTCAGGGATTCCACTATTGGTATTCTG
 ATATGTTTTCTGATATGCATCAAACCTTAATCTAAACCTGAATCTCCGCTATT
 TTTTTTTTTTTGATGACCCGTTTGTGACAAATTAAATTCCAACGGGGTCTT
 GTCCGGATAAGAGAATTGGTATTATCCGTTGGATAATGGACGCCGTGCTCC
 ATATTTTCCGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCAGAATTCCGGGGATTACG
 GATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAACGCCAAGTCTTACATTGTCAGTC
 TCGTGCAGTATGTCAATAATAAACAGATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCA
 GCTTGACCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCA
 CTTGGATGCAGTGAGTTGGAGTATAAAAGATCCTAAAATTCCACCCCTT

도면2

pG3 (서열번호 2)

GTAATAGCGGCAGCAATCCAGTAACCTTCTGAATAGCAGAGCCTTAACAAAA
 TAATGGCCAGGGTAAAAAATCGAACATTGACACCAAAATAAGACTTGTGTTA
 TAAGTCTAACAAAGTCCGAATTGGAGCTAACGGTGGCGTTGCTGGATAT
 TCAATAATGGTAGAATGTTGCTGCGGGTATATGACAGAGCGTGAAACACACTGAA
 CAAGGTAAATGGAACACAGCAATTGCAATATGGGGGAGGGATAGTCAAGAACAAA
 GCAGCAATGCAAAGTACTGAATATTCTCAAAGCCAAAGGTCAGTGGTTCA
 ACGACAAAGTCTGTTGGTATAGCTTGGAACAAAAGGACACCGAAAGACTCGAC
 AGCGCCCACAAATACAGCGTTGAGAAGAACGAATTGATTGCTCCAGAGCTCTA
 ATAGTCAGAACGATACCCCAACCTCCGAGCAACGTTAGCACATGACCTAAC
 AGGCGAAGTGAAGAGTCTGGAATAACGACACCCAGTCAGTTTCTGAGCTCCT
 GGTGGGATTGGTAGAAGCATTGATTGCTTGGAGTGGTTTATTGAAGATGGT
 GTGAAGCCATTGCTAAAGAGTCGGAGTTGCTTGGTTAGGTTGTTAGCAA
 AGGAGGAAAAGCTCGCCGTTGAAAGTCCCAGGTAGTTCGCGTGTGAGGCCAG
 CCAGGGAAAGCTCCTCGGTACTTTTCTTGCAGGTTCCGGACGGATTAA
 GCTCGGGTTATGAGGGGGCGGTAGCCAATTCCGGACACAATTGCGTCGCA
 GCTAGTCACCCGCCATAAATACGCAGGATTGAGGTAATAACATCGATAGTCTT
 AGTAATTAATACAATTCACTAGTGGCAATTGGCAACATGACGTAAGGCCACTGTT
 TCTATAAAAGGGGATGAATTTCATGTTTGAGGCCTCCGGACAATTATTGAA
 CTCAA

도면3

pG4 (서열번호 4)

TGGACTGTTCAATTGAAAGTCGATGCTGACGATGTCAAGAGAGATGCTAATTATA
 TTTGTCATTGCTGGTTACACTGGAAACGCTACTTTGTTGGCGGAAACTCTACCA
 GTTGGCCGTCATGTAACGATGTCGTTCTGGCCGTGACCGTTAACACGAA
 CATAACCAATGACAAATCCACTACAGGTCTAGTCATATGGAGGCAATTGGTACC
 TTACTTCTTGATGTCCCAAGTGGGCTTAACGCTGGTACTAACAAATGTCTCG
 TTTGTCACTACAAACTCCGAGGTAAATAAAGGATTCTGTGGGATTCTCAAGTT
 TGTTTGAAGTTGAACAGGTTATAAGCATATCGTCGCTGTCCACAATTGAAT
 CATTATTGTTGCAGATAACATGAACAAAGTGTGAACCTGGACCCATTACTACAAT
 TCCCACGCAACCGTTGTTCAAAGCCATATTTTGACAATTGTTCGTTACACC
 CCCAGTTGATGTACATCGCTTGAATGATGTGTGCCCCGAGTATTTCCATATT
 CAGCTGAATCGTATACTCAACCAATATCTGGGGTATACTTTATGTAACCTATA
 CAAATCAACTATACTATTCACCTTCGACCAATCATCTCCATCTGTTAAGTTT
 GCTCCTATATCCCTGACCCATCACCATGATTCCGCTAACGGTTCTCCTC
 TACATCGTCCCTTTGGAGAGGGTGTTCAGTTGACATTCAAATTACCCCCCGC
 CATCACGCGCAACCGAGACCGCACCCGAATTTACAAATTACCCACACCC
 ATACTCCACCACTATGAGGGTTATTAGAACTGATCACGTATAAATACCACCGCAAG
 TTCCAAGGGATGTTCTCTCCAATTGCAATCATATTGACTCTTCTA
 GTTCAGATTAATTCTTACACTTGCTTTCCCTTACCTTATCC

도면4

pG6 (서열번호 3)

AGACCAGCAGTTAACTACGCAAATCCACAGGAATTCTACATCACAATACCAATG
 GTAATACCACGACGTCAAGGAATGGAAACGACGACTTGGAGGAAGACTTCGTCAA
 CCTCTGCGGAGTACCCGAGGCTAACGACAATAAGAAGAAAAAAAAAGAAAAGCG
 GTGGGGGAGGGATTATAAGGATTATGTAACCCAGGGTACCGTTCTATAC
 ATATTAAGGATTATTAGACAATCGATGAAATCGGCATCAAACGGATGGAGT
 ATAGTGTCCGATAATCGGATAATCATCTTGCAGGGAGCCGCTTGGTTGG
 TGAGAGGAGTGAAATATGTCCTCCTCACCAAGAATCGCGATATCAGCACCTG
 TGGGGACACTATTGCCCTCCCTCCAAACCTCGATGTGGTAGTGCTTATTAT
 ATTGATTACATTGATTACATAGCTAACCCCTGCCTGGTCAAGTTGAGCTCCGAA
 TTCCAATATTAGAAAATGCCTGCAAGATAACCTCGGTATGGCGTCCGACCCCGC
 TTAATTATTTAACTCCTTCCAACGAGGACTCGTAATTGGATTAGGGAGTTGA
 GAAACGGGGGGTCTTGATACCTCCTCGATTCAGATCCCACCCCTCTCAGTCCC
 AAGTGGGACCCCGTGGCGTGAATGCGCCACTTAGTTTTCGATGTA
 AACGCCGGTGTCCGTCATTAAAGTCGACAGACTAGGGTGAACCTTACCAATT
 GTCGCACTCCGTCTCCTCGGAATAGGGGTGTAGTAATTCTGCAGTAGTGCAATT
 TTACCCCGCCAAGGGGGCGAAAAGAGACGACCTCATACGCATTCTCCAGTC
 GCTCTACGCTACAGCACCGACGTAGTTAACCTCCATATAAAGCAATT
 GCCATTCCCTGAAAACCTTAACCTCTGCTTTCTGATTTCCTGCCAAAGA
 AAAG

도면5

pG7 (서열번호 5)

AATTGATTAAGTCAGTCAAACCGCTACACAACAGGACAACGGAG
 TTAGAAAAATCCGATGTAGTGAAACGGCTAGCACGGTCCGCTTCACCGGGCAG
 ACCCGGGTTCGACTCCGGCATCGGAGTTATTTCCATTCGTTCTTAGAGTA
 TTCTCCTCAGCATGCCCTGAATTTCCTTTCCATGTGTCCTTCA
 CTTTTTACAGTTCTCGTGATGTTAATTGGCTACACAAAAGCTGCCACACGA
 AACCTTAATCACGAAAAACTATACAGCCTCACTAACCGTAGCCCCATAATATGT
 TGTCACGTGTTGGGACTACCTGTAGACTCTCATACCCACTCCGTCTTCT
 CCAACAATTAACGCAGTACCGAGATTATCAGCAGACTCAAATTGGCAAACACT
 GTATTTTCTGCCGATAATTATGGGCTCAGGCCTCACGTTCTGTTA
 CTTGAAGAATATTGGCTGCCGAAAAGTGGTAAGGACAACCCCTTTAATTGGA
 TCCAGTTTCCGAAATGTTCCGATCCGTACGTACATCCGAAGCCGTACATTTCA
 ACTCAATCTACGTAGCTTGGACTCAGCGCTCTGGAATTGCCAGGACAGTTAC
 TTGAGTTGATATTCCCTGTAGATTGTTGCTTCCAAAATTGAGGCTTCG
 TTTGAAAAGTGGAACTCTGGTCGCTAGATCACTTCATGCCTATTTCACGGAAAAA
 TAAGTGGTACTATGCACCCCTAAACCTAAAGAAAAACGGAAAAATTACCCAAAA
 CCTGGTGATTTTCGCCCTTCTTTATCGAGTTTCTTCTTGCTG
 CCAAATTCTCCTGACCTAGCGTCCCCGGAAAAATTAACTACTTAAGGACCG
 AATGAGCCCCAGCTTCCCCTCTTCATTATCCCCATAATATAAT

도면6

pG8 (서열번호 6)

CTGCACAACCATTGCCAGTAAGGACGAAGAGAAGGGCCCACTACCCAAAATTCA
 GATAACGTCTTCATACCATGCAGCGACGCCCTACAAGACGCTGTCAAGACATGCCA
 ACTTCAACGAAGTGAACCTAACACATTGATCGGGAAATTGACCACCAAGGGAAAT
 GCTGGTTGAGGCTGGAAGCGTTGCCAGTGTCTGAGGGAACTGGACCGAAAGTT
 TAGTAATGCATAAGAGGATATATAGGAATGCAGTAATAATTAGTACCCATTAA
 GTGGGCTAAGCCATTGGAAGGCCGCTGACTGATGGTGGTCTTCATTAG
 ATAGTGCATTGCAACTACCGTCTGAGATTGAGTTGATGTGAAGCTCCAGCGCC
 AAAACAGTATAAGAACCTTCTCCGCATTATTGTTCTCGTAAAGTTGTGA
 AGAAAACAGGGTAGTGCAGATTAGTTGTAATGCGCATAGGATGGTCATT
 GACTTCTTCCTCGAAAGAGCCACACCGTTAGCTAAAAAGGACGCGCATCTACC
 CCAAAATAGAATGTGGGAAATAGGACGCGCAACTCCTCTCAATCACTGGACGT
 CAGAAAAACAAATGCGCAATCGAGTCACCCCTCCGTGATACCCCTCGTAC
 CTCTCCGTCTATTGACAGCGTCTCCCATGACGTTCAATCACTTAGAAAAGA
 TTTCGTTTTCTTCATTACAGATCTCATCTCTGCAAGGGTCTGGAGGAC
 ATCACCAATCTCGACTCCATAACTTAGTCCTGAGTTATTTACGCTTCATCTGA
 TGAGTAGGAAGAAAAGTTCACGAAATTCCCCGCCAACCTGCCCTCGAATA
 AGCAGCCACTCTCCTCTGCCCATAGTAAGCTTGCAGGCCCCAACCTGGCC
 AGAAACTTAAATATGCCAAACAATCTCCCCAATCTAAGTTCTCCCTTTCTAAAA
 A

도면7

G1 (서열번호 7)

ATGCCTCGTTTCTAAACAACCAACAGTAAAGATGATGACGCCTTGGGAAG
 AGCTAGAGCTCTAAATTTCAGGGCAAAGTTATGATAAATTCCAAAAACTTACAA
 TATCTACGCTATTGCAATAACAGCCACCGTTCTGGACTGATGTTGGTTTGTAA
 TTTCTTCTGTGTCCTCGTTGTAAGTCAGGATCATTACAGAAAATCTCAACCGT
 CCCGACAGTTGACGCAAGGGGTATCACCGCAAGTATGGCTGGAGGTTCTTCT
 TGGGTTCGTTATTTCTGACTTCCAGGATATCTTGGAAAGAAGAGTTGCTCTG
 CATATGTGCAGTGTCCTCTGGATTATCGGGGCCATTCTCAATGCGCTGCACAAA
 ACCAAGGTATGCTGATCGCAGGGAGATTGATTTCCGGTATCGGTGTCGGGTTGG
 TTCAGCTTCAGCTCAGTCTATTGTTCTGAAGTTGCTCCAGCAAAGATTAGAGGAA
 TGATTGGAGGATTATTCATTTCTGCACTGTGGGTATCATGATAATGTTTATA
 TCGGATATGGATGTCACTACATTGACGGCGTTGCATCATTAGACTGGCCTGGGG
 TTTGCAAATGGTCCAGGTCTTATTCTTGGTCGGTGTATTCTCCTTGAGT
 CTCCAAGATGGCTGGCTAACACCACACCGCTGGGAAGACGAGTTGAGGTTATTG
 CTAATGTTGTCAAAAGGTGACAGAGAAAACGCCGATGTGCGTCTGCAATTGGA
 TGAAGTTCAGGAGCAACTATTGATTGACAAAGATGCTTCTGATTTGGTTACCTG
 ATTTGTTAAGAAAGATTGTATCAAACGTACCTTCATTGGAGTGTCAAGTG
 TGGCAACAACTTGTGGTATTAAATGTTCAATGTAACGGTGTATCTTCCA
 AATGGCTGGTTTACTGAAATGTGGCGTTGGTATCGTCCTCAATTCAATATGTT
 TGAATGTTGTTATGACTGTTCCAGCTTGTATGGACCGTATAGGCAGACGA
 CCCCTACTAATTGGTGGTGGTATTTCATGTGTTGGCTGGTATCTGCAATTGGTT
 GATTATTAGGCACCTACTCTGAACCAATTGAAAATTCAGCGGTGATGATACTGTC
 AGAATTACTATTGCTGACCGACAAGGCTGCAGCAAGGGGTGTTATTGCTGTT
 CCTATCTATTGCTGCTCCTTGCTCCAACCTGGGTATCTGCAATTGGTT
 GCCTCTGAAATTTCACACACAGACAAAGAGCAAAGGGAGCAGCATTGCTGCCT
 CCGCTAAGGATTTCAACTTGCCTTGGCTATGTTGCTGCCATCAGCCTTAGA
 AACATTACATGGAAGACTTACATCATTGGAGTATTTGCTGCTTAACAATC
 CATGTTTCTTACAATTCCAGAAACAGAGGTAAGACTTGGAAAGAAATTGATCA
 AATGTTAAGGACAATATTCCAGCTTGGAGAAGTGCTCGTACGTTCCAGATATGC
 CAATTTCACAAAGAGAAGGTAGTACTGAGCATGCAGAAATGCTCCAGC
 TCGTCCGAAAAGCCTGATGGTTAGGAAGAGGAATCTGTATAA

도면8

G3 (서열번호 8)

ATGGTAGTTGCAATCGAAGGTGGTACAGGCCTAGGCCTTATGAATCTTACTTGGA
AACCAACTCCAACCCCAATTGATGATGCAATTGAGACAATTAGATATGCTGTTGAG
GAAGCTGGTGTCAAGATACTTGAACGGAGGAGAGTTCTACAACCTTCCTTGTGATT
CAAACCTGAATTGCAAGTACATTCAAGGAATTGCAAAAAGTACCCGAGCTATAT
AAAAAGGTGAGTCTGCGTAAAGGTGCTGTCAGTTGGTCGATGTGAGCCCCG
ATTCTTCCCCGGAGAACCTTGAAAATCGATTCAAACATAACCAAAACATTGCCG
AACAACTCCTGCCAATTGAGCCTGCTAGAATCGATAAACGTTACTCCATTGA
GGAGACAATAAAGAATCTCTCAAGTTCGTCGAAGATGGCAGAATTGGAGGTATT
TCACTTAGTGAAGTTGGTGCTGACACTATCAGAAGAGCTGCGAAAGTGGCTCCCA
TCGCCTGTGAGTGGAGTTCTATTGACTAGAGATATTCTCATAATGGA
GTTCTGCTGCTTGAGGATTGAACATTCTATTGCCTACAGTCCCTGGG
AAGAGGATTTGACTGAAACGATAAACAGCAAAGCTGACATTCTGAAGGTGAT
ATCAGGTTAAGTTGGAAAGATTCAATGACGATGAAGTTATTGAACACAATTGAA
ACTTGTTCACGGTTGAAAAAGATAGCCGACAAAAAAGGAGTCACATTGGCTCAAT
TGTCTCTGCGTGGTTACGAAAGTTGGAGATAAACACGTCAAGGTGCTTCTATT
CCAAGCTGCTCATCTCCTCGTAGAGTTGCAGAAAACACAAAAGAGATTCCATTGA
CTGATAGCGAGTTCCAGGAGATTACTGACTTGCAGAGTCGGTTCCAATCAAAGG
TGGTCGTTACAACAAAGCAAGTGAGGCTGTTCTAACGGTTAG

도면9

G4 (서열번호 9)

ATGACATTGCTCCTCCCTAGAATCGAGATTGACCTCCTAACGGATTGAAGTA
 CACTCAACCATTGGGACTCTCATCAACAATGAGTTGTTGAAGGTGTAGAGGGAA
 AAGCTCTTACCACTGATCAATCCTTGATGAGACTAAAATAACCCAAGTTGGGA
 AGCTTCTGCAGCGGATGTTGACCGTGTGATGCCGCTGAAGATGCTTCAC
 AACTCCGTATGGGCTACTCAGGACCCATTAGAGAGGGGAAAGCTGATGAACAAAT
 TGGCAGACCTTATCGATCGTACTCAACATCTGGCTGGTATCGAATCCATCGA
 CAATGGTAAGGCCTACCTCTGCCAGGGTGTGTTACTCTGCTGTCAACTAC
 ATCAGATCCTGTGCTGGATGGCCGACAAGATTTGGGAAACGTTGTTGATTCCG
 GAAACACCCACCTTAACTTGGTAAAGAGAGGCCATTGGGTGTTGTTGACAAAT
 TATCCCATGGAACCTTCCTCCTGATGTTGGCTTGGAAAGTTGGGACCTGCGCTG
 GCCACAGGTAAACACTGTTGTTGAAGACTGCCGAGTCTACCCCTGTCGGGTT
 TATACGTTGCCAAATTGATCAAGGAGGCCGGTTCCACCTGGTGTGGTTAACAT
 TCTCAGTGGTTCGGTAACCCAGCTGGAGCTGCCATCGCTGCTCATCCCAGAAC
 AAGAAGATTGCTTCACCGGATCCACTGCAACAGGCCGTAAGATCATGGAAGCAG
 CCGCTAAATCTAACCTGAAAAAGTCACTTGGAACTAGGTGGTAAATCTCAAAC
 ATTGTGTTGAAGATGCTGATATCCAGAACAGACTATCCATAACATTATTTGGGAA
 CTTCTCAATTCTGGTGAAGTCTGTTGCAGGTTCCAGAGTCTACATTCAAGACA
 CTGTGTATGAAGAAGTGCCTGAAGCCTCAAGAAGGGAGACTGATAACGTTAAGGT
 TGGTGGACCATTGAAAGAAGGTGTCTCCAAGGGCCTCAGACCTCTGAGTTGCAA
 CTTAACAGAACCTTAGTTACATCAAACACGGTAAGGATGAAGGTGCTCGTGTAA
 TACCGGTGGTTCAAGATAACCGTAACCGAGGTTACTACATTAAGCCCACAATT
 CTGACGTTACTGAAGACATGAAGATTGTCAGGGAGGAGATTTGGTCTGTGGT
 TACTATCACTAACGTTCTACCGTGGATGAGGTTGGATATGCCAACACACCA
 ACTATGGTCTAGCTGCTGGTATTCACACAAACACTGAACAAAGCCATTGATGTT
 GCCAGTAGAATCAAGGCGGGTGTGTTGGATTAACACCTACAACGATTCCACC
 ACATGGTCTTCGGAGGTTATGGAGAATCTGGTATTGGCAGAGCTGGTGC
 TGAGGCTTGATAACTACACTCAAGCCAAGGCTACAGAATTGCTTACACTCCTG
 AACATAAGTAG

도면10

G6 (서열번호 10)

ATGCTTAGAACTTCTCCAGCTACTAAGAAAGCTCTCAAGTCGCAGATTAACGCCTT
 CAACGTTGCTGCCTTGAGATTCTACTCCTCATTCGCCTTGAGGTTCCAATTACCT
 TGCCAAACGGTAAGACCTACAATCAGCCAACAGGTTGTTATCAACAATGAGTTC
 GTTCCCTCTAACGCAAGGTAAGACCTTGCTGTTAAACCCCTCCACTGAGGAGGA
 GATTACTCACGTCTACGAGTCCAGAGAGGACGACGTTGAGTTAGCCGTTGCAGC
 CGCTCAAAAGGCTTCGACTCAACCTGGCCACCCAGGACCCTGCTGAGAGAGG
 TAAGGTCTTGAAACAAGTTGGCTGACCTGATCGAGGAGCACTTGAGACCCCTGCC
 GCCATCGAGTCCTGGACAACGGTAAGGCCATTCCCTCCGCTAGAGGTGATGTTG
 GTCTGGTTGTCGCTACTTGAAGTCCTGTGCCGGTGGCCGACAAGGTTTCG
 GTAGAGTTGTTGAAACCGGAAGCTCCCACCTCAACTACGTTAGAAGAGAGGCCATT
 GGGTGTGTTGGTCAGATTATCCATGGAACCTTCCTCTTGATGTGGTCCCTGG
 AAAGTTGGTCCAGCTTGGCCACTGGTAACACTGTTGTCCTGAAGACAGCCGAGT
 CTACTCCTCTGTCGCCCTGTACGTTCCAATTGGTCAAGGAGGCCGGTATCCC
 AGCTGGTGTCCACAACATTGTGTCGGTCAACGATGCTAACATTAAGCAAGCTGTC
 GTCACATCATGAAGGCTGCTGCCGAATCCAACCTGAAGAAGGTTACTTGGAGTT
 GGGTGGTAAATCTCCTAACATCGTGTCAACGATGCTAACATTAAGCAAGCTGTC
 GCCAACATCATCCTCGGTATTTACTACAACCTGGAGAAGGTTGTTGTCGGTTC
 CAGAGTTATGTTCAATCCGGTATTTACGACGAGCTTGGCCGAATTCAAGACTG
 CTGCTGAGAATGTCAAGGTTGGTAACCCATTGACGAGGACACCTTCAAGGTGC
 TCAAACCTCTCAGCAACAATTGGAGAAGATTTGGGTTGAGCGTGGTAAG
 AAGGACGGTGCTACTTGATTACTGGTGGTGGCAGATTAGGTGACAAGGGTTACT
 TCGCCAGCCAATCTCGGTGATGTTACACCAGAGATGGAGATTGTCAAGGA
 AGAGATCTTGGTCCTGTTGCACTATCAGCAAGTTGACACCATTGATGAGGTTG
 TCGACCTGCTAACGACTCTCAATACGGCTTGCTGGTATCCACTCTGACGA
 TATCAACAAGGTCAATTGACGTTGCTGCTAGAATCAAGTCCGGTACCGTGTGGTC
 AACACCTACAACGATTCCACCAAATGGTCCATTGGTGGGATTTGGCCAATCCG
 GTATTGGTCGTGAGATGGGTGTTGAAGCTTGAAAACACACCCAATACAAGGC
 TATCCGTGTCAAGATCAACCACAAGAACGAGTAA

도면11

G7 (서열번호 11)

ATGAGTTAACAGATATCCAAGGTGATCAAGGTGACAATGAAAAGATACGCCA
 TTGAGAGCAGTCCCTCCAATGAGCAAATAAAAGATATTGAGGCTCCGGCCGA
 CAACAAAAGTGAACTAGACATCCCAGTCAAACCCAAGGGTCTATATCTTGGTGT
 CTGTGTTATGTCCTCTAGTCGCATTCGGTGGTTCTGTTGGTGGATACCGG
 TACCATCTCAGGTTCTGTTAACATGTCGACTTACGAGACGTTCTGGACAGTTA
 ACGGTGAAACGTATTACCTTCTAAAGTGAGAGTTGGTTAATTGTTCTATTTCA
 ACATTGGTTGTGCTATCGAGGTGTCACTCTAGGTAAACTGGTGACATTTGGGG
 TAGAAAGAAGGCTTGATGTTGTCATGGTCATCTATATGGTCGGTATTTGATTC
 AAATTGCTTCCATTGACAATGGTACCAAGTATTGGAAGAATTATTGCAGGT
 CTGGCCGTCGGTGCAGTTCCGTTTATCCCCATGTTCATCAGTGAGACTTCTC
 CTAACACATCAGAGGTTCTTAGTCTCCTGCTACCAATTATGATTACAGCCGGT
 ATTTTCTGGGTTACTGTACCACTACGGAACCAAGACTTACACCGACTCCACCCA
 ATGGAGAGGTTCTGGGATTGTGTTGCTGGGCCATTCTGATGATTGTTGGTA
 TGACCTTCATGCCAGAGTCCCCACGTTCTGGTTGAGGTTAACAGAGTCGACGA
 GGCTATGAAGTCCATTGCCAGAGTTAACAGGTCTATCGACGATCCATCTGTC
 TACAATGAGATGAGACTTATTCTGACGGTATTGAGAAGGAGAACGGCTGGTA
 GCGTTCTGGGGTGAAGTGTCACTGGTAAGCCAAAGATTCTACCGTCTATTG
 ATTGGTATTTCATGCAATCTTGCAACAATTGACCGTAACAACATTCTTCTAC
 TACGGAACTACCATTTCAGGCTGCGGATTGGACGATTCTTCAAACCTTCTAT
 CATTCTGGTGGTCAATTGCTTCCACATTCTAGGTATCTACACCATGGATAA
 ATTGGTAGAAGAAGAACACTTTAGGAGGTTCTGGAGCCATGGTTGTTGGT
 TCATTTTCAGTCCCGTGGTCAAGTCTCTTATGAGAACGGTAAGGATGATCCA
 TCCAAACCAGCAGGTAAACGCCATGATTGTCCTCACCTGTCTGTTCAATTCTT
 TGATGTACCTGGCTCCAGGTGTTCTGCGTTGTCTGAAACCTACCCACTT
 AGAATTAGATCCAAGGGTATGGCCATCGCTCAAGGTTCCAATTGGCTTGGGTT
 TCCTCATTGCCCTCTTCACTCCATTATCTCAGGTGCCATTGATTGCTACGGT
 TACGTCTTATGGGATGACTCTGTTGCCCTCTTGTACTTCTCGTT
 GAAACCAAGGGTCTGCGCTGGAAGACGTTGATGAGAAGTCTATGAGAACCTTACCT
 TCGGAAGAGCATATGCATACAGCCACACGATTAAAGACAAGGGCGCCCTATAA

도면12

G8 (서열번호 12)

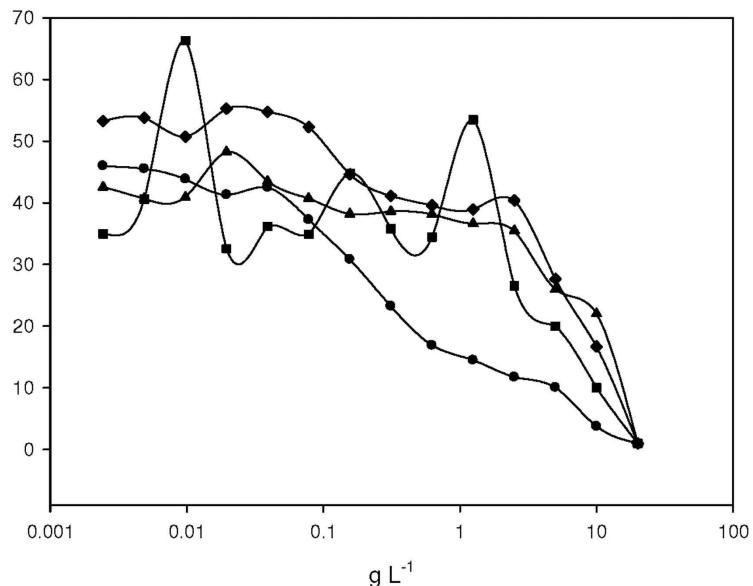
ATGCCCTATCCTACCTATCAGGGCTACATATCTACCACTGGCGACCGTGA
 TCGTGATCCAGGCAGCTAAATAACCATTGAATCTTCCCCGAAGACCAAGA
 GAAAGAGAGCGAGATGGCTAATACGATCAGGTACGTATTGTTGTCGAGC
 AACGGTCTCATATCAAACGATGGACCGATGGTATCCCCTGGTCTCATCTAGAGT
 CCTTGGAAAGTTCTGTTGATCGGGACTGGACAAGGATACCCCAAAAACTCG
 CAAAGTGACGAAGATACTGAGGAGGGAGAAAGAGGCGAAAGACTCTGTGGAT
 GTAACCGATCCAAATACCAGGCAGTTGGTGGATCATTGGTACTTCCTATGACT
 TCAAAAGAGGATGGACTTATTAAAAAAACACTCTCCTTGACTTCCAGACCGGTGCT
 AATGAAGAAAGGGAAACAGTCACTTGATTAGTTATTACTCCGGAAGATGTAAC
 GAACCATCGTTGAACAGGCCGTGACAATCCATATCTGCCAATATCACTGTT
 CAGAGTCATTATTGACTGCCCTGAGAGAGAGTACCCCTGGAGGAAGAGCAACGTC
 TGATGACGAGCTTCTTAGTCAGAAGTAACTCGTTAGAGTACCAAGAGGTACCAA
 TGAACATATCTATGTCTTACCTTATCAACTCCACTTCTGAACACAGGAGTAA
 ACTCAACTACCCAGCTGCAACAGCAACAACTACAACAACAACAGCAACAGCA
 ACAGCAGCAGCAACAACAGCAGCAACAACAGCAACCGGTAGCATCCCTCCAAA
 ATTTGATGGATCCTTCTATTACAACAGGGTGTAAATTCCAGTTCTCATTGGA
 CCAAAAAATGGGAAGTAGCAATTGTTGATTAACAATTGGTTCTGCAAATTGTT
 CAGAATCAAATGGGCTATCGGTTATCGGACCTCACAGGGATATGACGAACAAAG
 TCCAGCAACGAGTTACTTGAATGAACGTTGA

도면13

pGAP (서열번호 13)

CTTTTTGTAGAAATGTCTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAAT
 ATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGG
 TAAAACCTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGCTCTCCCTCTCTCCT
 CCACCGCCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTCTCTGCTGGAGAGCTTCTAC
 GGCCCCCTGCAATGCTCTCCAGCATTACGTTGCGGGTAAACGGAGGT
 CGGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCGGCCGTCGCTGGCAA
 TAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAATCGAATAT
 AAAAGGCGAACACCTTCCAATTGGTTCTCTGACCCAAAGACTTAAATT
 AATTATTGTCCTATTCAATCAATTGAACAATCACCTGCAGGCC

도면14



도면15a

pG1a (서열번호 41)

GGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTACGGCGCCGCCATATTGGGC
 CGTGTAAAACAGCTTGAACCCCCACTACTTCAAAGGTTCTGTTGCTATAACACGA
 ACCATGTTAACCAACCTCGCTTTGACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACATCAA
 GTACCCTAGTCTGCTGAATGCTCCTTCCATATTCAAGTAGGTGTTCTGCACTT
 TTGCATGCACTGCGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTCATATGCGCTTTACCC
 CCTCTTGTCAAGCGAAAATGCCTGTAAGATTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTA
 GCTGAAGTACAACAGGCTAATCCCTGAAAAAACTGCAGATAGACTCAAGATCTC
 AGGGATTCCCCTTGTATTCTGATATGTTTCCCTGATATGCATCAAAACTCT
 AATCTAAACCTGAATCTCGCTTGTATTGTTGTTGATTGACCCGTTCTG
 GACAAATTAAATTCCAACGGGGTCTGTCCGGATAAGAGAATTGTTGATTATC
 CGTTGGATAATGGACGCCCTGCTCCATATTTCCGGTTATTACCCACCTGGAA
 GTGCCAGAATTTCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATA
 CGCCAAGTCTTACATTGTTGCAGTCTCGTGCAGTATGTCAATAATAACAAG
 ATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCGCCATAGCTAGGCATAGC
 CAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCACTGAGTTGGAGTATAA
 AAGATCCTAAATTCCACCCCTT

도면15b

pG1b (서열번호 42)

CCATATTCAAGTAGGTGTTCTGCACCTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAA
TAGCGCGTTCATATGCGCTTTACCCCTCTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTA
AGATTGGTGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGGCTAATTCCCTGAA
AAAACCTGCAGATAGACTCAAGATCTCAGGGATCCCCTACTATTGGTATTCTGATA
TGTTTTCTGATATGCATCAAAACTCTAACCTAACTGAATCTCCGCTATTTTT
TTTTTTTTTGATGACCCGTTTCGTGACAAATTAAATTCCAACGGGGTCTGTC
CGGATAAGAGAATTITGTTGATTATCCGTTGGATAATGGACGCCCTGCTCCATA
TTTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCTGGAGAATTCCGGGGATTACGGA
TAATACGGTGGCTGGATTAATTAAACGCAAGTCTTACATTGTTGCAGTC
GTGCGAGTATGTCAATAATAACAAGATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCAGC
TTGACCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACT
TGGATGCAGTGAGTTGGAGTATAAAAGATCCTAAATTCCACCCCTT

pG1c (서열번호 43)

CTGCAGATAGACTCAAGATCTCAGGGATCCCCTACTATTGGTATTCTGATATGTT
TTCCCTGATATGCATCAAAACTCTAACCTAACTGAATCTCCGCTATTTTTTT
TTTTTGATGACCCGTTTCGTGACAAATTAAATTCCAACGGGGTCTGCTCCGGA
TAAGAGAATTITGTTGATTATCCGTTGGATAATGGACGCCCTGCTCCATATTTTT
CCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCTGGAGAATTCCGGGGATTACGGATAATA
CGGTGGCTGGATTAATTAAACGCAAGTCTTACATTGTTGCAGTCCTGCG
AGTATGTCAATAATAACAAGATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCAGCTTGAC
CCGCCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTGGAT
GCAGTGAGTTGGAGTATAAAAGATCCTAAATTCCACCCCTT

도면15c

pG1d (서열번호 44)

GACCCCGTTTCGTGACAAATTAACTTCAACGGGGCTTGTCGGATAAGAGAA
 TTTGTTGATTATCCGTCGGATAAATGGACGCCCTGCTCCATATTTCCGGTTAT
 TACCCCACCTGGAAGTGCCAGAATTTCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTC
 TGGATTAATTAAACGCCAAGTCTTACATTGTTGCAGTCTCGTGCAGTATGTG
 CAATAATAAACAAAGATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCAGCTGACCCGCCAT
 AGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACGGATGCAGTGAG
 TTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCCTT

pG1e (서열번호 45)

CCGGATAAGAGAATTGGTTGATTATCCGTCGGATAAATGGACGCCCTGCTCCAT
 ATTTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCAGAATTTCGGGGATTACGG
 ATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAAACGCCAAGTCTTACATTGTTGCAGTCT
 CGTGCAGTATGTGCAATAATAAACAAAGATGAGCCAATTATTGGATTAGTTGCAG
 CTTGACCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCAC
 TTGGATGCAGTGAGTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCCTT

pG1f (서열번호 46)

GCCTGCTCCATATTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCAGAATTTCGG
 GGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAAACGCCAAGTCTTACATT
 GTTGCAGTCTCGTGCAGTATGTGCAATAATAAACAAAGATGAGCCAATTATTGG
 TTAGTTGCAGCTGACCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTA
 GATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCAC
 CCTT

서 열 목 록

- <110> LONZA LTD
- <120> REGULATABLE PROMOTER
- <130> IPA140194-AT
- <150> EP 11184323.1
- <151> 2011-10-07
- <150> US 61/544,451
- <151> 2011-10-07
- <150> EP 12171006.5
- <151> 2012-06-06
- <160> 46
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1001
- <212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 1

atttccaccc ccatcccaagt agaatgttagg gtccccaaac atttgctccc cctagtcctc 60
aggaaaaatgt aaaatatact gctaatacgaa aacagtaaga cgctcagttg tcaggataat 120
tacgttgcac tggataaaaa caggaatctg tattgttaga aagaacgaga gtttttacg 180

gcggccat attggccgt gtgaaaacag cttgaaccc cactacttc aaaggctcg	240
ttgctataca cgaaccatgt ttaaccaacc tcgcgttga cttagactgaa gtcacggtt	300
aacaatcaag taccctagtc tgtctgaatg ctcccttcca tattcagtag gtgttcttg	360
cactttgca tgcactgcgg aagaattagc caatagcgcg tttcatatgc gctttaccc	420
cctctttgt caagcgaaa atgcctgtaa gatttgtgg gggtgtgagc cgtagctga	480
agtacaacag gctaattccc tgaaaaaact gcagatagac ttcaagatct caggattcc	540
cactatttgg tattctgtata tggtttctt gatatgcata aaaactctaa tctaaaacct	600

aatctccgc tattttttt tttttttga tgaccccggtt ttcgtgacaa attaattcc 660
aacggggctct tgtccggata agagaatttt gtttgattat ccgttcggat aaatggacgc 720
ctgctccata ttttccggt tattaccca cctggaagtgc cccagaattt tccggggatt 780
acggataata cggtggctcg gattaattaa tacgccaagt cttacatTTT gttgcagctc 840
cgtgcgagta tgtgcaataa taaacaagat gagccaattt attggattag ttgcagctg 900
accccgccat agcttaggcat agccaagtgc tatgggtgtt agatgatgca ctggatgca 960
gtgagtttg gagtataaaa gatccttaaa attccacccct t 1001

<210> 2

<211> 1000

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 2

gttaaatagcg gcagcaatcc agtaaccttt tctgaatagc agagccttaa ctaaaataat	60
ggccagggtt aaaaattcga aatttgacac caaaaataaa gacttgtcgt tataagtctt	120
aacaaagtcc gcaattttgg agctaacggt ggcgggtgct gggatattca ataatggtag	180
aatgttgctg cggttatatg acagagcgtg aaacacactg aacaaggtaa atggaacaac	240
agcaattgca atatggggga ggatagtcaa gaacaaagca gcaatggcaa agtactgaat	300
atcttc当地 gccaaaaaggccatggttt caacgc当地aa gctt当地gg tatagtctt当地	360

gaacaaaagg acacccgaaag actcgacagc gcccacaaat acagcgttgt agaagaacga 420

attgattgct ccagagcttc taatagttag aagatacccc aaaccccgaa gcaacgttag	480
cacatgacct aagaaccagg cgaagtggaa agtctggaa aacgacaccc agtcagttt	540
tcctgagctc ctggggat tggtagaac atttgattt cttggagttt ttttatttga	600
agatggtgtt gaagccattt tgctaaaga gtcggagttt tgcttttagg gttttaag	660
caaaggagga aaaactgcgc cgtttgaagt cccaggtgt ttgcgtgt aggccagcca	720
gggaaagctt cttcggtac tttttttt tttgcagggtt ccggacggat taagcttgg	780

gttatgaggg gggcggtac caattccgga cacaatattt cgtcgacgt agtcaccccg	840
ccataaatat acgcaggatt gaggtataaa catcgatgt cttagtaatt aatacaattc	900
agtggcaat ttggcaacat gacgttaaggcc cactgttgtt ctataaaagg ggatgaattt	960
tcatgtttt gaggcctccc ggacaatttta ttgaactcaa	1000

<210> 3

<211> 1001

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 3

agaccagcag tttaactacg caaatccaca ggaatttcta catcacaata ccaatggtaa	60
taccacgacg tcaaggaatg gaaacgacga cttggagaa gacttcgtca acctcttgcg	120

gagtaaccgaa ggctaagaca ataagaagaa aaaaaaaaaga aaagcggtgg gggagggatt	180
attaaataag gattatgtaa ccccaggta cgggtctata catatthaag gattatttag	240
gacaatcgat gaaatcgca tcaaaacttggaa tgggagttata gtgtccggat aatcgataa	300
atcatcttgc gaggagccgc ttgggttgggtt ggtgagagga gtgaaatatg tgtcttc	360
cccaagaatc gcgatatcgac caccctgtgg gggacactat tggctccctt cccaaacctt	420
cgtatgtttaa gtgttttattt atattgatta cattgattac atagctaaac cctgcgttgtt	480
tgcaagttga gctccgaattt ccaatatttga taaaatgcctt gcaagataac ctcgtatgg	540

cgtccgaccc cgcttaattt ttttaactcc ttccaaacgaa ggacttcgtt atttttgtt	600
agggagttga gaaacgggggtt gtcttgatac ctcctcgatt tcagatccca cccctctca	660
gtcccaagtgtt ggaccccccgtt cggccgtt gaaatgcgtcac tttttttttt ttgcgtgtt	720
aacgccgtt tccgtcaattt aaaagtgcgtt gacttaggggtt aactttacca tttttgtcg	780
actccgtctc ctcggatag gggtgttagt attctgcgtt agtgcattt ttaccccgcc	840
aagggggggc gaaaagagac gacctcatca cgcattctcc agtgcgtctc tacgcctaca	900
gcaccgacgtt agttaactttt ctccatata taaagcaattt gccattcccc ttggaaatttt	960

aacctctgct ttttcttgat ttttccttgc ccaaagaaaa g 1001
<210> 4
<211> 1000
<212> DNA
<213> Pichia pastoris
<400> 4

tggactgttc aatttgaagt cgatgctgac gatgtcaaga gagatgctca attatatttgc	60
tcatttgctg gttacactgg aaacgctact ttgttggcg gaaactctac cagttggcc	120
gtccatgtaa acgatgtcgt tctggccgt gaccgttca acacgaacat aaccaatgac	180
aaatccactt acaggcttag ttcatatgga ggcaatttgtt accttacttc tttggatgtc	240
ccaagtgggg cttaaacgtc tggtactaac aatgtctcgt ttgtcaactac aaactccgag	300
gtaaataaaag gattcttgcg ggattctctc aagttgttt ggaagttgtt acaggtttat	360
aagcatatcg tgcgttgc cacaattgaa tcatttattt ttgcgagata catgaacaaa	420
gtgtgaactg ggaccattt ctacaattcc cacgcaaccg ttgttcaaa gccccatattt	480
tttgacaattt gttcggttac acccccagg ttgttgcattt cgcttgcattt gatgtgttgc	540
ccggagtattt ttccatattt agcttgcattt cgtatactca accaatatctt ggggtatacc	600
ttttatgtaa cctataaaaa tcaactatac tatttgcattt ttgcaccaat catctcccat	660
cttgcattttt ttgcatttgc atatccctga ccctgacatc acccatgattt ccgcgtcaacg	720
gttctccctt acatcgcccc tctttggag agggtgttca gtttgcattt caaatttaccc	780
cccgccatca cgcgcacccg agacccgcacc cccgaattttt cacaatttac cccacaccct	840
atactccacc actatgaggg ttatttttttgc ttttttttttgc aatcatattt ctgactttt ctgttgcattt	900
caagggatcg ttttttttttgc ttttttttttgc aatcatattt ctgactttt ctgttgcattt	960
ttaattccctt tacatttttttttgc ttttttttttgc acctttatcc	1000
<210> 5	
<211> 1000	
<212> DNA	
<213> Pichia pastoris	
<400> 5	
aattgattaa gttcagtgaa atttcaaacc gctatacaca acaggacaac tttgagtttgc	60
gaaaaatccg atgttagtgc acggctagca cggccggctt tcaccggca gaccgggtt	120
cgactcccg catcggtt ttttttttttgc ttttttttttgc tagatgtttt tcctcagcat	180
gccccccctga attttttttttgc ttttttttttgc gtcccatattt tccactttttt ttacagttttt	240

cctcgatg ttaattggct acacaaaagc tgccacacga aacctaatac acgaaaaact 300
 atacagcct cactaatccg tagccccata atatgttgc cacgtgttgc tgggtactac 360
 ctgttagactc tcataccca ctccgtttt ctccaacaat taacgcagta ccgagattta 420
 tcagcagact caaattggc aaactctgtt ttttccttg cccgcataat ttatgggtct 480

caggcctcca cgtttccgtt ttacttgaag aatattggct gcggaaaaag tggtaaggac 540
 aacccccttt taattggatc cagttttcc gaaatgttcc gatccgtacg tcatctccga 600
 agccgtacat ttctactcaa tctacgtacg tttggactca gcgcctcgg aattgccagg 660
 acagtttact ttagttgata ttcccttgc gattgtgtc ttcttttcc aaaatttgag 720
 gcttcgtttg aaaagtggaa tctggcgtt agatcacttc atgccttattt ttacggaaa 780
 aataagtggt actatgcacc ccttaaacct aaagaaaaac ggaaaaattt ccccaaaacc 840
 tggtgatgtt ttcccccctt ttcttttat ccgagttttt ctttttctt gtctgccaaa 900

ttccctcctt gaccttagcg tccccggaaa aaattaacta ctttaaggacc gaatgagccc 960
 cagctttcc ccttctcttc attattcccc ataataataat 1000

<210> 6

<211> 1000

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 6

ctgcacaacc attgcccgtt aggacgaaga gaaggccca ctacccaaaa ttcaggataa 60
 cgttttcata ccatgcagcg acgcctacaa gacgctgtca agacatgcca acttcaacga 120
 agtgaacttt aacacattga tcggaaattt gaccaccaag ggaatgctgg ttgaggctgg 180
 aagcgttgc agtgcctga ggaaactggc ccgaaagttt agtaatgcat aagaggatat 240

atataggaaat gcagtaataa tattagtacc cattaagtgg gctaaggccat tggaaggccg 300
 tctgactgat ggtgggttc ttctcattt gatagtgcattt ttgcaactac cgtctgagat 360
 ttagtttgcgtt gtgaagctcc agcgccaaaaa cagtataaga accttatctc cgcattattt 420
 ttcttgcgtt aaagtttgcgtt tgaagaaaca ggggtagttt cgcagattttt ttgtaatatg 480
 cgcattttttt gggcatttgcgtt cttttttcccg cggaaagagcc acaccgttag ctaaaaaagg 540
 acgcgcattt accccaaaaat agaatgtggg gaaataggac ggcacacttc ctctcaatca 600
 ctggacgtca gaaaaacaaa tgcgcatacg agtcaccctc cgtgataaccc tccgtataac 660

ccctctccg tctattctga cagcgcttcc ccatgacgtt tcaatctact tagaaaaagat 720
 ttctttttt ttcccttcaa ttacacgtatc tcatcttgcgtt caagggtctg gaggacatca 780

ccaatctgcg actccataac ttagtcctga gtttatattt acgttcatac tgatgatgg 840
 gaagaaaaag tticacgaaa tccccccgc aacttgcct tcgaaataag cagccactct 900
 ccttctgccc atagtaagct tgcgcgaggc cccaaacttgg ccagaaactt taaatatgcc 960
 aaacaatctc ccccaatcta agttctccct cttctaaaaaa 1000

<210> 7

<211> 1662

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 7

atgtcctcg ttttctaaa caaccaaaca gtaaagatga tgacgcctt ggaaagagct 60
 agagctctaa atttcaggg caaagttat gataaatttc caaaaactta caatatctac 120
 gctattgcaa taacagccac cgttctgga ctgatgtcg gtttgatat ttcttctgt 180
 tcctcggtcg taagttagga tcattacaga aactacttca accgtcccga cagtttgacg 240
 caaggggta tcaccgcaag tatggctgga gtttcttct tgggttcgtt attttcttct 300
 gacttccagg atatcttgg aagaagagtt gctctgcata tgtgcagtgt cctctggatt 360
 atcggggcca ttcttcaatg cgctgcacaa aaccaaggta tgctgatcgc agggagattg 420

atttccggta tcgggtcg gttgggtca gcttcagctc cagtcatttgc ttctgaagtt 480
 gctccagcaa agatttagagg aatgatttggaa ggattatttc aattttctgt cactgtgggt 540
 atcatgataa tttttatcgatatggaa tgcactaca ttgacggcgt tgcatcattt 600
 agactggcct ggggttgca aatggttcca ggttatttc tttggtcgg ttttttttc 660
 cttcctgagt ctccaagatg gctggctaac cacaaccgct gggaaagacgc agttgaggtt 720
 attgctaatg ttgttgcataa aggtgacaga gaaaacgcgg atgtgcgtt gcaattggat 780
 gaagttcagg agcaactattt gattgacaaa gatgctctg atttggta ctttgcatttgc 840

ttaagaagattgtatcaa acgtacccatc attggagtgt cagtcagaatgtt gggcaacaa 900
 ctttggta ttaatgttgc aatgtactac gttgtgtatc tttccaaat ggctgggttt 960
 actggaaatg tggcggttgtt atcgtcctca attcaatatg tttgaatgt tttatgtact 1020
 gttccagctt ttttctaat ggaccgtata ggcagacgac ccctactaat tggcggttgtt 1080
 attttcatgt gtattggct gtttggagtgc gcaggattat taggcactta ctctgaacca 1140
 attgaaaattt tcagcggtga tgatactgtc agaattacta ttctgacca gcacaaggct 1200
 gcagcaagggtt gtttattgc ctgttccat ctattcgatgt gtcctttgc tccaaacctgg 1260

ggtatctgca ttgggttta tgcctctgaa atttcaaca acagacaaag agcaaaggaa 1320

gcagcatttgc	ctgcctccgc	taactggatt	ttcaacttg	cctggctat	gttcgtgcca	1380
tcagcctta	gaaacattac	atggaagact	tacatcattt	ttggagttt	ttcggtctgc	1440
ttaacaatcc	atgtttctt	acaattccc	gaaaccagag	gtaagacttt	ggaagaaatt	1500
gatcaaatgt	ttaaggacaa	tattccagct	tggagaagt	cttcgtacgt	tccagatatg	1560
ccaatttca	acaaagagaa	ggttagtatct	actgagcatg	cagaaaatgc	ttccagctcg	1620
tccgaaaaag	ccttgatggt	tcaggaagag	gaatctgtat	aa		1662

<210> 8

<211> 987

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 8

atggtagtttgc	aatcgaagg	tggtagtttgc	ttggcctta	tgaatcttac	ttggaaacca	60
actccaaccc	caatttgc	tgcatttgc	tgcatttgc	acaatttagat	atgctgttgc	120
gtcagatact	tgcacggagg	agagttctac	aactttcc	ttgattcaaa	cctgaatttgc	180
cagtagatcc	agggatttgc	aaaaaggtac	cccgagctat	ataaaaaggt	gagtttgc	240
gtaaaaaggttgc	ctgtcagtttgc	ggtcgtatgt	agccccgatt	cttcccccgg	gaaccttgc	300
aaatcgatttgc	caaacataac	caaacatttgc	ccgaaacaact	tctgcatttgc	ttttgagcct	360

gctagaatcg	ataaacgttgc	ctccatttgc	gagacaataa	agaatcttc	taagttcg	420
gaagatggca	gaatttggagg	tatttcaatttgc	agtgaagtttgc	gtgtgtcac	tatcagaaga	480
gctgcgaaag	tggctccat	cgcctgtgt	gaagtggagt	tttctctatt	gactagagat	540
attcttcata	atggagtttgc	tgctgttgt	gaggatttgc	acattccat	tattgcctac	600
agtcccttgc	gaagaggatttgc	tttgacttgc	acgataaaaca	gcaagactga	cattccttgc	660
ggtgatatca	ggtaagtttgc	ggaaagatttgc	aatgacgttgc	aagtttgc	acacaatttgc	720
aaacttgc	acggttttgc	aaagatagcc	gacaaaaaaag	gagtcacatttgc	ggctcaatttgc	780

tctttgcgt	ggttacgaaa	gtttggagat	aaacacgtca	aggtgtttcc	tattccaagg	840
tgctcatctc	ctcgtagagt	tgcagaaaac	acaaaagaga	tttccttgac	tgtatgcgag	900
ttccaggaga	ttactgactt	tgcagagtgc	gttccaatca	aaggtggcgt	ttacaacaaa	960
gcaagtggagg	ctgttcttaa	cggttag				987

<210> 9

<211> 1506

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 9

```
atgacatttgcctccctt agaattcgag attgaccccttc ctaacggattt gaagtacactt 60  
caaccattttgg gactcttcatt caacaatggat ttttgttgaagg gtgttagaggg aaagcttttta 120
```

ccagtgtatca atccttgtga tgagactaaa ataacccaag ttggaaagc ttctgcagcg	180
gatgttgacc gtgctgtga tgccgctgaa gatgcttca acaactccgt atggctact	240
caggacccat tagagagggg aaagctgatg aacaattgg cagaccttat cgatcgtgac	300
ttcaacatct tggctggat cgaatccatc gacaatggta aggcctatac ctctgcccag	360
ggtgatgtta ctcttgcgtt caactacatc agatcctgtg ctggatggc cgacaagatt	420
ttggaaacg ttgttgattc cggaaacacc caccttaact tggttaaaag agagccattg	480
ggtgttgtgg gacaaattat cccatggaaac ttccctctcc tgatgtggc ttggaaagtgg	540

ggacctgcgc tggccacagg taacactgtt gtttgaaga ctgccgagtc taccctctg	600
tcgggttat acgttgccaa attgatcaag gaggccggtt tcccacctgg tgtggtaac	660
attctcagtg gttcggtaa cccagctgga gctgccatcg ctgctcatcc cagaatcaag	720
aagattgcct tcaccggatc cactgcaaca ggccgtaaga tcatggaagc agccgctaaa	780
tctaacctga aaaaagtcac ttggacta ggtggtaaat ctccaaacat tgtgtttgaa	840
gatgctgata tccagaagac tatccataac attatttgg gaatcttctt caattcttgt	900
gaagtctgtt gtgcaggatc cagagtctac attcaagaca ctgtgtatga agaagtgttt	960

gaaggcttca	agaaggagac	tgataacgtt	aagggtggtg	gaccattcga	agaaggtgc	1020
ttccaagggc	ctcagaccc	tgagttgcaa	cttaacagaa	tccttagtta	catcaaacac	1080
ggtaaggatg	aaggtgctcg	tgttaattacc	ggtggttcaa	gataccgtaa	ccgaggttac	1140
tacattaagc	ccacaatttt	tgctgacgtt	actgaagaca	tgaagattgt	caaggaggag	1200
atttttggtc	ctgtggttac	tatcactaag	ttctctaccg	tggatgaggt	tgttggatat	1260
gccaacaaca	ccaaactatgg	tctagctgct	ggtattcaca	caaacaactt	gaacaaagcc	1320
attgatgttg	ccagtagaaat	caaggcggtt	gtcggttggaa	ttaacacct	caacgatttc	1380

caccacatgg ttccttcgg aggttatgga gaatctggta ttggcagaga gcttgtgtct 1440
gaggcttgg ataactacac tcaagccaag gctatcagaa ttgcttacac tcctgaacat 1500
aagttag 1506

<210> 10

<211> 1578

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 10

atgcttagaa ctctccagc tactaagaaa gctctaagt cgcatattaa cgcctcaac	60
gttgctgcct ttagattcta ctcctcattt ccttgcagg ttccaatttt cttgcacaaac	120
gttaagacct acaatcagcc aacaggttt tttatcaaca atgagtttgt tccttcaag	180

caaggtaaga ccttgctgt tttaaccct tccactgagg aggagattac tcacgtctac	240
gagtccagag aggacgacgt tgagttagcc gttgcagccg ctcaaaaggc tttcgactca	300
acctggtcca cccaggaccc tgctgagaga ggttaaggct tgaacaagtt ggctgacctg	360
atcgaggagc actctgagac cttgccccc atcgacttct tggacaacgg taaggccatt	420
tcctccgcta gagggtatgt tggctgttt gtgcctact tgaagtcctg tgccgggtgg	480
gccgacaagg tttcggtag agttgttcaa accggaagct cccacttcaa ctacgtttaga	540
agagagccat tgggtgtttt tggtcagatt atcccatgga actttctct tctgtatgtgg	600

tcctggaaag ttggccagc ttggccact ggtaacactg ttgtcctgaa gacagccgag	660
tctactcctc tgccgcct gtacgttcc caattggtca aggaggccgg tatcccagct	720
ggtgtccaca acattgtgtc cgggttcgtt aagattactg gtgaagctat tgctactcat	780
cctaagatca agaagggtgc cttcaactgtt tctaccgcca ctggcggtca catcatgaag	840
gctgctgccc aatccaactt gaagaagggtt actttggagt tgggtggtaa atctcctaacc	900
atcggttca acgtgtctaa cattaagcaa gctgtcgcca acatcatctt cggattttac	960
tacaactctg gagaaggttt ttgtgctgtt tccagagttt atgttcaatc cggattttac	1020

gacgagctt tggccgaaatt caagactgt gctgagaatg tcaagggttgg taaccatttc	1080
gacgaggaca cttccaagg tgctcaaacc tctcagcaac aattggagaa gattttgggt	1140
ttcggttggc gtggtaagaa ggacgggtgtt actttgatta ctgggtgggg cagatttaggt	1200
gacaagggtt acttcgtcca gccaactatc ttccgtgtt ttagaccaga gatggagatt	1260
gtcaaggaag agatctttgg tcctgttgc actatcgttca agtttgcacac cattgtatgt	1320
gttgcgacc ttgtcaacga ctctcaatac ggtcttgctg ctggtatcca ctctgacgtt	1380
atcaacaagg tcattgacgt tgctgctaga atcaagtccg gtaccgtgtt ggtcaacacc	1440

tacaacgatt tccaccaat ggttccattt ggtggatttg gccaatccgg tattgggttgt	1500
gagatgggtt ttgtcaacgtt ggaaaactac acccaataca aggctatccg tgtcaagatc	1560
aaccacaaga acgagtaa	1578

<210> 11

<211> 1614

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 11

atgagttcaa cagatatcca aggtgatcaa ggtgacaatg aaaagatata cgccatttag	60
agcagtcctt ccaatgagca aataaaagat attcaigagg ctccggccga caacaaaagt	120
gaactagaca tcccagtcaa acccaagggt tcctataatct tggtgtctgt gttatgtctt	180

ctagtcgcatt tcggtggtt cgtgttcgggt tggttaccg gtaccatctc aggtttcggtt	240
aacatgtctg actttacgag acgtttcgga cagtttaacg gtgaaacgta ttaccttct	300
aaagttagag ttggtttaat tttttctatt ttcaacatgt gttgtgtat cggaggtgtc	360
actcttagta aacttggtga catttgggtt agaaaagaagg cttttagtggt cgtcatggtc	420
atctatatgg tcggtatttt gattcaaatt gcttccattt gacaatggta ccagtatttc	480
atttggaaatttatttgcagg tctggccgtc ggttgcgtttt ccgttttata ccccatgttc	540
atcagtgaga ctttccttaa acacatcaga ggttccttag tctcctgcta ccaattaatg	600

attacagccg gtatatttctt gggttactgt accacttacg gaaccaagac ttacaccgac	660
tccacccaaat ggagagttcc ttgggattt tgtttgcattt gggccattct gatgattttt	720
ggtagatgacct tcatgccaga gtccccacgt ttcttgggtt aggttaacag agtcgacgag	780
gctatgaagt ccattgccag agttaacaag gtctctatcg acgatccatc tgttacaat	840
gagatgagac ttatttctga cggattttttttag aaggagaagg aggctggtag cgtttcttgg	900
ggtagactgt tcactggtaa gccaaagatt ttctaccgtc tatttttttttcatg	960
caatcttgc aacaatttgc acgttacaaac tatttttttctt actacggAAC taccattttc	1020

aaggctgtcg gattggacga ttctttccaa acttctatca ttcttgggtt tgtcaatttt	1080
gtttccacat tccttaggtt ctacaccatg gataaatttg gtatggaaag aacacttttta	1140
ggaggttctg gagccatgggt tggttgggtt gtcattttca gttccgttgg tgtcaagtct	1200
ctttatgaga acggtaagga tgatccatcc aaaccaggcag gtaacccat gattgttttc	1260
acctgtctgt tcattttctt ctggcatgt acctgggttc caggtttttt cgtcggtgt	1320
tctgaaacctt accccacttag aatttagatcc aagggtatgg ccatcgctca aggttccaat	1380
tggctttggg gtttcctcat tgccttcttcc actccattta tctcagggtgc cattgatttc	1440

gcctacggtt acgttttat gggatgtact ctgttcgcct tttttttgt gtacttttc	1500
gttcctgaaa ccaagggtct gtgcgtggaa gacgttggatg aagtctatga gaacccattacc	1560
ttcggaaagag catatgcata cagccacacg attaaagaca agggccctt ataa	1614

<210> 12

<211> 1032

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 12

atggccitat ctcttaccta tcagggctac atatctacca ctggcgacgc gttgatcg	60
atccaggcag ctctaaataa ccatttgaat cttttcccc gaagaccaag agaaagagag	120
cgagatggc taatacgtc aggtaacgtt ttttttttgcagcaacgtcgtcatatc	180

aaacgatgga ccgatggtat cccctggct ccatcttagag tccttgaaa gtttttgt	240
tatcggaac tggacaagga taccggaaa aactcgaaa gtgacgaa tactgaggag	300
gggagaaga ggcgaaagac ttctgtggat gtaaccgtc caaataccag gcagtgg	360
ggatcatgg tgacttccta tgacttcaa gaggatggac ttattaaaaa aacactctcc	420
ttgactttcc agacgggtgc taatgaagaa agggaaacag tgcaactgtat tagtattat	480
actccggaag atgtaacgaa ccatcgttt aacaggccgt ctgacaatcc atatctggcc	540
aatatcaactt tttcagatgc attattgact gccttgagag agagtaccct tggaggaaga	600

gcaacgtctg atgacgagct ttcttagtc agaagtaact cgtagagta ccaagaggta	660
ccaatgaaca tatctatgtc ttacctta tcaactccac tttcctgaa cacaggagta	720
aactcaacta cccagctgca acagcaacaa ctacaacaac aacaacagca acagcaacag	780
cagcagcaac aacagcagca acaacagcaa ccggtagcat ccctccaaa atttgcgtt	840
tccttctat tacaacaggg tggatattca gttccttatt tcatggatca aaaaatggga	900
atgtcaatt cgtggattaa caattggttt cgtccaaatt cgtcagaatc aaatggctt	960
tcggttatcg gacctcacaa gggatatgac gaacaaagtc cagcaacgag ttatacttg	1020

aatgaacgtt ga	1032
---------------	------

<210> 13

<211> 491

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 13

ctttttgtt gaaatgtttt ggtgtcctcg tccaaatcagg tagccatctc tggaaatatct	60
ggctccgtt caactccgaa cgacctgctg gcaacgtaaa attctccggg gtaaaactta	120
aatgtggagt aatggacca gaaacgtctc ttcccttctc ttccttcca cggcccgtt	180
ccgtccctag gaaatttac tctgctggag agcttcttct acggccccc tgcagcaatg	240
ctcttccctt cattacgtt cgggtaaaac ggaggtcggtt taccggaccc agcagccag	300

gatggaaaa	gtccggccg	tcgctggcaa	taatagcggg	cggacgcatt	tcatgagatt	360			
attggaaacc	accagaatcg	aatataaaag	gcgaacacct	ttcccaattt	tggttctcc	420			
tgacccaaag	actttaattt	taatttattt	gtccctattt	caatcaattt	aacaactatc	480			
acctgcaggc	c					491			
<210> 14									
<211> 34									
<212> DNA									
<213> artificial									
<220><223> Primer									
<400> 14									
gatagggccc						caaacatttgc	ctccccctag	tctc	34
<210> 15									
<211> 39									
<212> DNA									
<213> artificial									
<220><223> Primer									
<400> 15									
gataacctgca						ggaagggtgg	aattttaagg	atcttttat	39
<210> 16									
<211> 36									
<212> DNA									
<213> artificial									
<220><223> Primer									
<400> 16									
gatagggccc						cagcaatcca	gtaacctttt	ctgaat	36
<210> 17									
<211> 36									
<212> DNA									
<213> artificial									
<220><223> Primer									
<400> 17									
gataacctgca						ggttgagttc	aataaatgt	ccggga	36
<210> 18									
<211> 35									

<212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer

<400> 18
 gatagggccc tggactgttc aatttgaagt cgatg 35
 <210> 19
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 19
 gatacctgca ggggataaag gtaaggaaa aaagcaa 37
 <210> 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 20
 gatagggccc agaccagcag tttaactacg caaatc 36
 <210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 21
 gatacctgca ggctttctt tggcaagga aaaatc 36
 <210> 22
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 22
 gatagggccc aattgattaa gttcagtcaaatttcaaac 39

<210>	23	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223>	Primer	
<400>	23	
gataacctgca ggattatatt atgggata atgaagagaa gg		42
<210>	24	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223>	Primer	
<400>	24	
gatagggccc ctgcacaacc attgccagta agg		33
<210>	25	
<211>	40	
<212> DNA		
<213>	artificial	
<220><223>	Primer	
<400>	25	
gataacctgca gtttttaga agagggagaa cttagattgg		40
<210>	26	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223>	Primer	
<400>	26	
cctgaggctt tttccaccc atct		24
<210>	27	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223>	Primer	
<400>	27	

ggaacatagt agtaccaccc gacataaacga	30
<210> 28	
<211> 22	
<212> DNA	
<213>	
artificial	
<220><223> Primer	
<400> 28	
tcggccgacca ctaccagcag aa	22
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Primer	
<400> 29	
accatgtgat cgcgcttctc gtt	23
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Primer	
<400> 30	
cctgaggctt tggccaccc atct	24
<210> 31	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220>	
><223> Primer	
<400> 31	
ggaacatagt agtaccaccc gacataaacga	30
<210> 32	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> artificial	

<220><223> Primer
<400> 32
aacaccttagga aaagtggca gcaaatgt 28
<210> 33
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 33
actctgtcac ttactggcgt tttctcatg 29
<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<
400> 34
gatagggccc caaacatttgc tccccctag tctc 34
<210> 35
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 35
gatagggccc ggaatctgtat ttttttagaaa gaacgagag 39
<210> 36
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 36
gatagggccc ccatattcag taggtgttc ttgcac 36
<210> 37
<211> 36
<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 37

gatagggccc ctgcagatag acttcaagat ctcagg	36
-----------------------------------------	----

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 38

gatagggccc gaccccgtt tcgtgacaaa tt	32
------------------------------------	----

<210> 39

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 39

gatagggccc ccggataaga gaattttgtt tgattat	37
------------------------------------------	----

<210> 40

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 40

gatagggccc gcctgctcca tattttccg g	31
-----------------------------------	----

<210> 41

<211> 859

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 41

ggaatctgta ttgttagaaa gaacgagagt ttttacggc gccgccatat tggccgtgt	60
-----------------------------------------------------------------	----

gaaaacagct tgaaacccca ctacttcaa aggttctgtt gctatacacg aaccatgttt	120
------------------------------------------------------------------	-----

aaccaacctc	gctttgact	tgactgaagt	catcggttaa	aatcaagta	ccctagtctg	180
tctgaatgct	ccttccata	ttcagtaggt	gtttcttgc	ctttgcgt	cactgcggaa	240
gaattagcca	atagcgcgtt	tcatatgcgc	ttttacccc	tctttgtca	agcgaaaat	300
gcctgttaga	tttgtgggg	gtgtgagccg	ttagctgaag	tacaacaggc	taattccctg	360
aaaaaaactgc	agatagactt	caagatctca	gggattccca	ctatttgta	ttctgatatg	420
tttttcctga	tatgcatcaa	aactctaata	taaaacctga	atctccgcta	ttttttttt	480
tttttgatg	accgggtttt	cgtgacaaat	taattccaa	cgggtcttg	tccggataag	540
agaattttgt	ttgattatcc	gttcggataa	atggacgcct	gctccatatt	tttccggta	600
ttacccacc	tggaaagtgcc	cagaattttc	cggggattac	ggataatacg	gtggcttgaa	660
ttaattaata	cgcctttttt	tacatggat	tgcagtctcg	tgcgagttatg	tgcaataata	720
aacaagatga	gccaatttat	tggatttagtt	gcagttgac	ccggccatag	ctaggcatag	780
ccaagtgc	tgggttttag	atgatgcact	tggatgcagt	gagtttgaa	gtataaaaga	840
tccttaaaat	tccaccctt					859
<210>	42					
<211>	664					
<212>	DNA					
<213>	artificial					
<220><223>	promoter variant					
<400>	42					
ccatattcag	taggttttc	ttgcacttt	gcatgcactg	cggaaagaatt	agccaaatgc	60
gcgtttcata	tgcgtttta	ccccctctt	tgtcaagcgc	aaaatgcctg	taagatttg	120
tgggggtgtg	agccgttagc	tgaagtacaa	caggctaatt	ccctgaaaaa	actgcagata	180
gacttcaaga	tctcaggat	tcccactatt	tggattctg	atatgtttt	cctgatatgc	240
atcaaaaactc	taatctaaaa	cctgaatctc	cgctattttt	ttttttttt	tgtatgacccc	300
gttttcgtga	caaattaatt	tccaaacgggg	tcttgcgg	ataagagaat	tttgggttgc	360
tatccgttcg	gataaatgga	cgcctgctcc	atattttcc	ggttattacc	ccacctggaa	420
gtgcccgaaa	tttccgggg	attacggata	atacgggtgt	ctggatata	taatacgcca	480
agtcttacat	tttgttgcag	tctcggtcg	gtatgtgca	taataaaca	gatgagccaa	540
tttattttttt	tagttgcagc	ttgacccgc	catagctagg	catagccaag	tgctatgggt	600
gttagatgtat	gcacttggat	gcagtgagtt	ttggagtata	aaagatcctt	aaaattccac	660
cctt						664

<210> 43

<211> 493

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 43

ctgcagatag acttcaagat ctcaggatt cccactattt ggtattctga tatgttttc	60
ctgatatgca tcaaaactct aatctaaaac ctgaatctcc gctattttt tttttttt	120
gatgaccccg tttcgtgac aaattaattt ccaacgggt ctgtccgga taagagaatt	180
ttgttigatt atccggtcg attaatggac gcctgtcca tattttccg gttattaccc	240
cacctggaag tgcccagaat ttccgggaa ttacggataa tacgggtgc tggattaatt	300

aatacgccaa gtcttacatt ttgttgcaagt ctgcgtgcgag tatgtgaat aataaacaag	360
atgagccaat ttattggatt agttgcagct tgaccccgcc atagctaggc atagccaagt	420
gctatgggtg ttagatgtatg cacttggatg cagttagttt tggagttaa aagatccta	480
aaattccacc ctt	493

<210> 44

<211> 370

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 44

gaccgggtt tcgtgacaaa ttaattcca acggggctt gtccggataa gagaatttg	60
tttgattatc cggtcgata aatggacgcc tgctccatat tttccgggtt attacccac	120

ctggaagtgc ccagaattt ccggggatta cggataatac ggtggctgg attaattat	180
acgccaagtc ttacattttgc ttgcagtctc gtgcgagtat gtgcataat aaacaagatg	240
agccaaatttgc ttggattatgt tgcaatgtgc cccggccata gctaggcata gccaaatgt	300
atgggtgtta gatgtgcac ttggatgcag tgatgtttgg agtataaaag atcctaaaa	360
ttccaccctt	370

<210> 45

<211> 328

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 45

ccggataaga gaatttgtt tgattatccg ttccggataaa tggacgcctg ctccatat 60

ttccggttat taccccacct ggaagtgccc agaatttcc ggggattacg gataatacg 120

tggctctggat taattaatac gcagaatctt acatttgtt gcagtcgt gcgagatgt 180

gcaataataa acaagatgag ccaatttatt ggattagtg cagcttgacc ccgcctagc 240

taggcatacg caagtgcata ggggtttaga tcatgcactt ggtgcagtg agtttggag 300

tataaaagat cttaaaatt ccaccctt 328

<210> 46

<211> 283

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 46

gcctgctcca tattttccg gttattaccc cacctggaag tgcccaaat tttccggga 60

ttacggataa tacgggtggc tggattaatt aatacgccaa gtcttacatt ttgttgcagt 120

ctcggtcgag tatgtcaat aataaacaag atgagccaa ttattggatt agttgcagct 180

tgaccggcc atagctaggc atagccaaat gctatgggtg ttagatgatg cacttggatg 240

cagtgagttt tggagtataa aagatccta aaattccacc ctt 283