



(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
W02006089329 A2*
Nucleic Acids Research. Vol. 36, No. 12, e76
(2008.06.06.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
론자 리미티드
스위스 3930 비스프 론자슈트라쎄
(72) 발명자
마타노비치, 디트하드
오스트리아, 에이-1120 비엔나, 이그나츠가쎄 7/3
개서, 브리지트
오스트리아, 에이-1050 비엔나, 젠타가쎄 34/16
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

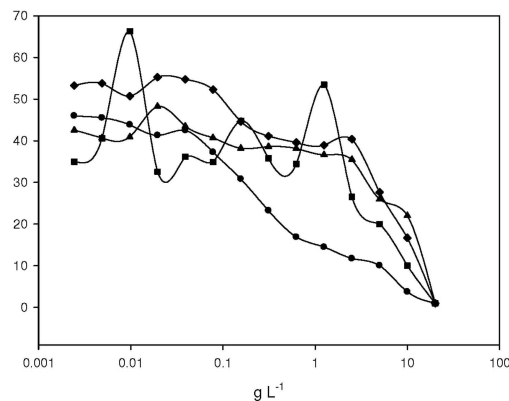
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 조절가능한 프로모터

(57) 요약

본원 발명은, a) 재조합 진행 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 진행 세포주를 배양하여 목적 단백질(POI)을 생산하는 방법, 및 분리된 조절가능한 프로모터 및 각각의 발현 시스템을 제공한다.

대표도 - 도14



(72) 발명자

마우러, 마이클

오스트리아, 에이-1030 비엔나, 라벤가췌 11
에이/405

프리엘호퍼, 톨랜드

오스트리아, 1200 비엔나, 클로스터노이부르크 스트라췌 49/2/12

클라인, 요아힘

스위스, 씨에이치-3930 비스프, 테르비너슈트라췌 5비

헥거, 자나

스위스, 씨에이치-3930 비스프, 마트마텐슈트라췌 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 작제물을 포함하는 재조합 진핵 세포주를 배양하여 POI를 생산하는 방법으로서,

- 상기 세포주를 상기 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계로서, 상기 기초 탄소원이 세포 성장에 적합한 탄소원인 단계,
- 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
- POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하며,

상기 프로모터는

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

- 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이거나,
- 상기 이당이 사카로즈이거나,
- 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이고, 상기 이당이 사카로즈이거나,
- 상기 6탄당이 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 만노즈이고, 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- 상기 이당이 사카로즈이고, 상기 알콜이 글리세롤 또는 에탄올이거나,
- 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 피키아 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 이중성 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 이중성 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 피키아 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 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된, 분리된 프로모터 핵산으로서, 상기 프로모터 핵산은 POI를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 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 뉴클레오타이드 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 조절가능한 프로모터인 기능적 활성 프로모터를 포함하는,

분리된 프로모터 핵산.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 프로모터는,

모 뉴클레오타이드 서열 (parent nucleotide sequence)을 상기 서열 내에서 또는 상기 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형시킴으로써 획득할 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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열이 상기 프로모터의 전사 조절 하에 있고, 상기 프로모터 핵산은 POI를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 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 진행 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 한세놀라 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 이중 발현은 일반적으로 숙주 생물의 안정한 형질전환을 가능하게 하는 벡터를 필요로 한다. 벡터는 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 이소머라제, 포스포글루코즈 이소머라제, 포스포글리세레이트 뮤타제, 헥소키나제 1 및 2, 글루코키나제, 포스포프럭토스 키나제, 알돌라제 및 해당계 조절 유전자의 용도를 개시한다.
- [0005] 국제공개공보 제WO 97/44470호는 번역 신장 인자 1(TEF1) 단백질 및 효모에서 단백질의 이중 발현에 적합한 리보솜 단백질 S7을 위해 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터의 효모 프로모터를 개시하고, 제EP1951877A1호는 이중 단백질의 생산을 위한 피. 파스토리스(*P. pastoris*) TEF1 프로모터의 용도를 개시한다.
- [0006] 국제공개공보 제WO2005003310호는 유지성 효모 야로위아 리폴리티카(*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 이중 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] 솔러 및 솔러(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] 제WO2008063302A2호는 이중성 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] 제W02008128701A2호는 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 프로모터와 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 야생형 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 탈하이드로게나제를 코딩하는 G4(서열번호 9), G6(서열번호 10), 주요 촉진인자 당 운반체 부류의 구성원을 코딩하는 G7(서열번호 11), 또는 Gti1_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 이중성 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 조절가능한 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 상기한 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
- [0055] a) pG1(서열번호 1), pG3(서열번호 2), pG4(서열번호 4), pG6(서열번호 3), pG7(서열번호 5) 또는 pG8(서열번호 6);
- [0056] 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;
- [0057] 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
- [0058] 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% 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오타이드 서열을 변형시킴으로써 획득할 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 뉴클레오타이드 서열 중의 임의의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 획득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오타이드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오타이드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오타이드 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% 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 중의 임의의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 수득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오타이드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오타이드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 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, 토룰로프시스, 아르술라, 헨세넨라, 야로위아, 글루이베로마이세스, 사카로마이세스, 코마가타엘라, 바람직하게는 메틸로트로픽 효모로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0078] 바람직하게는, 효모는 피키아 파스토리스, 코마가타엘라 파스토리스, 케이. 파피이 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 배치에서 탄소원의 존재하에 배양하는 단계,
- [0083] b) 상기 세포를 보충 탄소원의 제한된 양의 존재하에 유가식(fedbatch) 배치에서 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 더 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	글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제

* 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 활성화는 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 작동물의 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 진행 세포의 영양원 등의 세포 성장에 적합한 탄소원이다. 기저 탄소원은 기저 배지 또는 복합 배지 등의 배지에 제공될 뿐만 아니라, 정제된 탄소원을 함유하는 화학적으로 규정된 배지에 제공될 수 있다. 기저 탄소원은 특히 배양 공정의 성장기 동안 세포 증식을 제공하는 양으로 통상 제공되어, 예를 들면, 표준 부배양 단계 동안 90% 초과, 바람직하게는 95% 초과와 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, 기저 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 시험관내 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, 0.02h^{-1} 내지 0.20h^{-1} 범위, 바람직하게는 0.02h^{-1} 내지 0.15h^{-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 "진행 숙주" 또는 "진행 세포주"는, POI 또는 숙주 세포 대사물질을 생산하기 위해 배양될 수 있는, 모든 진행 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 게놈을 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 획득할 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. 락티스(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 운반 부류의 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 알데히드 탈하이드로게나제; 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 서열 서열번호 11)과 유사한 유전자와 자연적으로 관련되는 것을 특징으로 하고;

[0108] - pG8과 유사한 프로모터는 G8(피. 파스토리스 GS115: Gti1_Pac2 상과의 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 활성화에 영향을 미치지 않는다(특히 손상).

[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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 중 하나의 단편, 바람직하게는 프로모터 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 길이를 갖는 특정 길이를 수득하기 위해, 5' 말단 영역의 특정 길이 및 결실, 예를 들면, 5' 말단에서 뉴클레오타이드 서열의 컷-오프를 갖는 프로모터 뉴클레오타이드 서열 중의 하나로부터 유래하는 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 1001 이하의 3' 말단 서열을 포함하는 300 내지 1000bp 범위 내의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0118] 본원에서 사용된 바와 같은 프로모터와 관련하여 용어 "조절가능한"은, 배치 배양의 성장 단계에서 탄소원(영양 기질)의 과량의 존재하에 진행 세포에서 억제되고, 예를 들면, 탄소량의 감소시, 예를 들면, 유기식 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 블롯팅으로 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 탈하이드로게나제(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, POI를 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 뉴클레오타이드 서열이 어느 정도, 100%에 근접한 정도 이하까지 상응하는 위치에서 동일하거나 보존된 염기쌍을 갖는지를 나타낸다. 상동성 서열은 일반적으로 적어도 약 50% 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열의 3' 영역을 포함하는, 뉴클레오타이드 서열의 적어도 특정 부분, 바람직하게는 각각의 프로모터 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 중의 어느 하나와 특정의 상동성, 및 피키아 파스토리스 이외의 종으로부터 유래하는 유사체를 갖는다. 구체적으로, 적어도 이들 부분은 바람직하게는, 각각의 프로모터 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드와 동일한 후보 DNA 서열 중의 뉴클레오타이드의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 및/또는 치환을 통해, 뉴클레오타이드 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 게놈 내로 POI를 인코딩하는 핵산 서열의 하나 이상의 카피의 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 뉴클레오타이드 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 게놈 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 메탄올 대사 경로로부터 주로 유래하며, 종종 바람직하지 않은 POI 생산을 유도하기 위해 메탄올 첨가를 필요로 했다. 본 발명에 따르는 방법은 증강된 발현에 의해 생산 증가를 제공하고, 특히 메탄올을 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 마이크로레이를 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 메틸로트로픽 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 1m³, 바람직하게는 적어도 10m³, 가장 바람직하게는 적어도 100m³의 용적을 사용할 것이다.
- [0145] 산업 규모의 생산 조건이 바람직한데, 이는 수일의 전형적 공정 시간을 사용하는 100L 내지 10m³의 반응기 용적으로 유가식 배양, 또는 대략 0.02 내지 0.15h⁻¹의 회석 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 회석 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, 펩톤 또는 효모 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0151] 바람직한 질소원은 NH₄H₂PO₄ 또는 NH₃ 또는 (NH₄)₂SO₄를 포함한다.
- [0152] 바람직한 황 공급원은 MgSO₄ 또는 (NH₄)₂SO₄ 또는 K₂SO₄를 포함한다.
- [0153] 바람직한 인산염 공급원은 NH₄H₂PO₄, 또는 H₃PO₄ 또는 NaH₂PO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 또는 K₂HPO₄를 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, 붕산)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 펩티드에 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 역제의 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℃ 내지 35℃, 바람직하게는 22℃ 내지 30℃의 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. 이들 유전자는 이러한 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킴으로써 숙주 세포 계통 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 계통에서 복제가능하거나 계통 내로 통합가능한 임의의 벡터일 수 있다.
- [0170] 본 발명에 있어서, 벡터로서는 pPUZZLE로부터 유래되는 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.

- [0171] 적절한 발현 벡터는 일반적으로는 진핵 숙주 세포에서 POI를 인코딩하는 DNA의 발현에 적합한 추가의 조절 서열을 포함한다. 조절 서열의 예는 작동인자, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 및 전사 및 번역 개시 및 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 조절 서열은 발현되는 DNA 서열에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [0172] 숙주 세포에서 재조합 뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 하기 위해, 발현 벡터는, 예를 들면, 신호 펩티드 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 펩티드는 이중성 신호 펩티드 또는 천연 및 이중성 신호 펩티드의 하이브리드일 수 있고, 구체적으로는 단백질 생산하는 숙주 생물체에 대해 이중성 또는 동종성일 수 있다. 신호 펩티드의 기능은 POI가 분비되어 세포질내 망상조직으로 도입하게 하는 것이다. 통상적으로, 이는 혈장 막 외부로 단백질의 수송을 유도하는 짧은 (3 내지 60개 아미노산 길이) 펩티드 쇄이고, 이에 의해 이중성 단백질을 분리 및 정제하는 것이 용이해진다. 일부 신호 펩티드는, 단백질이 수송된 후, 신호 펩티다제 의해 단백질로부터 절단된다.
- [0174] 예시적 신호 펩티드는 에스. 세레비지에 알파-접합 인자 프레프로(prepro) 펩티드로부터의 신호 서열 및 피. 파스토리스 산 포스포타제 유전자(PHO1)으로부터의 신호 펩티드이다.
- [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 뉴클레오타이드 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 진핵 세포주 내로 형질전환시킨다. 이와 같이 생산된 재조합 POI의 양에 대한 본 발명에 따르는 프로모터의 효과를 평가하기 위해, 진핵 세포주는, 통상의 비-탄소원 조절가능한 프로모터, 예를 들면, 각각의 세포에서 표준 pGAP 프로모터를 포함하는 균주와 비교하여 진탕 플라스크 실험 및 유가식 또는 케모스타트 발효로 배양할 수 있다. 특히, 프로모터의 선택은 재조합 단백질 생산에 큰 영향을 미친다.
- [0177] 미생물에 의한 재조합 DNA 단편의 흡수를 위한 바람직한 형질전환 방법은 화학적 형질전환, 전기천공 또는 원형질체에 의해 형질전환을 포함한다. 본 발명에 따르는 형질전환체는, 이러한 벡터 DNA, 예를 들면, 플라스미드 DNA를 숙주 내로 도입하고, 관련 단백질 또는 숙주 세포 대사물질들 고수율로 발현시키는 형질전환체를 선택함으로써 수득할 수 있다.
- [0178] POI는 이와 같이 수득된 형질전환체를 적절한 배지에서 배양하고, 발현된 생성물 또는 대사물질을 배양물로부터 분리하고, 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 펄스법, 원형질체 방법, 리튬 아세테이트 방법 및 이의 변형 방법 등과 같이 진핵 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 위해 몇몇 상이한 접근방식이 바람직하다. 물질은, 관련 단백질 및 상이한 바와 같은 조절 요소 중의 적어도 하나를 코딩하는 재조합 DNA를 함유하는 발현 벡터로 진핵 숙주 세포를 형질전환시키고, 형질전환된 세포의 배양물을 제조하고, 전사 및 POI 생산을 유도하고, 발효 공정의 생성물을 회수함으로써 발현되고, 처리되고, 임의로 분리될 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 축진을 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 방법으로서, 용해도 차이를 이용하는 방법(예를 들면, 염석(salting out) 및 용매 침전), 분자량 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 방법으로서 하기 표준 방법이 바람직하다: 세포 파괴(POI가 세포내에서 수득되는 경우), 세포(파편) 분리 및 정밀여과 또는 접선 유동 필터(TFF)에 의한 세척 또는 원심분리, 침전 또는 열 처리에 의한 POI 정제, 효소적 소화에 의한 POI 활성화, 크로마토그래피, 예를 들면, 이온 교환(IX), 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 블롯팅, HPLC, 활성 분석 또는 ELISA에 의해 동정될 수 있다.
- [0192] POI는 임의의 진행, 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 진행 숙주 세포와 동종성이거나 이종성인 생성물일 수 있다.
- [0194] POI는 바람직하게는 진행 세포, 바람직하게는 효모 세포에서 바람직하게는 분비된 단백질로서 생산되는 이종성 재조합 폴리펩티드 또는 단백질이다. 바람직하게 생산된 단백질의 예는 면역글로불린, 면역글로불린 단편, 아프로티닌, 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 세레비지에), 피키아 속(예를 들면, 피. 파스토리스 또는 피. 메타노리카), 코마가타엘라 속(케이. 파스토리스, 케이. 슈도파스토리스 또는 케이. 파피이), 한세놀라 폴리모르파 또는 클루이베로마이세스 락티스를 포함한다.
- [0199] 보다 새로운 문헌은 피키아를 코마가타엘라 파스토리스, 코마가타엘라 파피이 및 코마가타엘라 슈도파스토리스로 분할하여 개명한다. 본원에서 피키아 파스토리스는 모든 코마가타엘라 파스토리스, 코마가타엘라 파피이 및 코마가타엘라 슈도파스토리스에 대해 동의어로 사용된다.
- [0200] 바람직한 효모 숙주 세포는 메틸로트로픽 효모, 예를 들면, 피키아 또는 코마가타엘라, 예를 들면, 피키아 파스토리스, 또는 코마가타엘라 파스토리스, 또는 케이. 파피이, 또는 케이. 슈도파스토리스로부터 유래된다. 숙주의 예는 효모, 예를 들면, 피. 파스토리스를 포함한다. 피. 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, 인비트로젠(Invitrogen)사의 균주, 예를 들면, X-33, GS115, KM71 및 SMD1168을 포함한다. 에스. 세레비지에 균주의 예는 W303, CEN.PK 및 BY-시리즈(EUROSCARF collection)을 포함한다. 상기한 모든 균주는 형질전환체를 생산하고 이중성 유전자를 발현시키기 위해 성공적으로 사용되었다.
- [0201] 본 발명에 따르는 바람직한 효모 숙주 세포, 예를 들면, 피. 파스토리스 또는 에스. 세레비지에 숙주 세포는 이중성 또는 재조합 프로모터 서열을 함유하고, 이는 생산 숙주와는 상이한, 피. 파스토리스 또는 에스. 세레비지에로부터 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 작제물을 포함한다.
- [0202] 프로모터는 본 발명에 따르는 프로모터, 또는 숙주 세포에서 전사 활성을 나타내고 숙주와 동종 또는 이중성인 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. 세레비지에로부터 유래될 수 있고, 효모에서 POI의 발현에 사용될 수 있다. 특히 바람직한 양태는 피. 파스토리스 생산자 숙주 세포주에서 재조합 POI를 생산하는 방법에 사용하기 위해 피. 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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열을 사용한다. POI를 인코딩하는 재조합 뉴클레오타이드 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 복제가가능하거나 게놈 내로 통합가능한 임의의 벡터, 예를 들면, 본 발명에 따르는 DNA 작제물을 함유하는 효모 벡터일 수 있다. 바람직한 효모 발현 벡터는 한세놀라, 피키아, 칸디다 및 토룰로프시스 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 결합시킴으로써 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 분리하고, 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 결합시키고, 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 이중성 단백질을 함유하는 DNA 단편을 삽입한 다음, 결합시킴으로써 작제할 수 있다.
- [0216] 또한, 다중클로닝 부위를 갖는 벡터인 다중클로닝 벡터는 본 발명에 따라 사용될 수 있고, 여기서 목적하는 이중성 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, 포스포아미다이트 방법에 의해 합성에 의해 제조할 수 있다. 또한, DNA 작제물은, 예를 들면, 게놈 또는 cDNA 라

이브러리를 제조하고 표준 기술[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989]에 따라 합성 올리고뉴클레오타이드 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 이중성 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:
- [0221] 1. a) 재조합 진행 세포주를, 조절가능한 프로모터를 억제하는 기초 탄소원으로 배양하는 단계,
- [0222] 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
- [0223] c) POI를 생산 및 회수하는 단계를 포함하는,
- [0224] 조절가능한 프로모터 및 상기 프로모터의 전사 조절하에 POI를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 진행 세포주를 배양하여 목적 단백질(POI)을 생산하는 방법.
- [0225] 2. 정의 1에 있어서, 기초 탄소원이 글루코즈, 글리세롤, 에탄올 및 복합 영양 물질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0226] 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.
- [0227] 4. 정의 1 내지 3 중의 어느 하나에 있어서, 기초 탄소원이 글리세롤이고, 보충 탄소원이 글루코즈인, 방법.
- [0228] 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.
- [0229] 6. 정의 5에 있어서, 공급물 배지가 화학적으로 규정되고 메탄올을 포함하지 않는, 방법.
- [0230] 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.
- [0231] 8. 정의 7에 있어서, 보충 공급원의 제한된 양이 검출 한계 미만인 세포 배양물 중의 잔류량을 제공하는 방법.
- [0232] 9. 정의 1 내지 8 중의 어느 하나에 있어서, 프로모터가 야생형 진행 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.
- [0233] 10. 정의 9에 있어서, 상기 기능적 활성 변이체가, 적어도 약 60% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오타이드 서열을 변형시킴으로써 수득할 수 있는 상동체, 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 이외의 종으로부터 유래하는 유사체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.
- [0234] 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.
- [0235] 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, 토룰로프시스, 아르술라, 한세놀라, 야로위아, 클루이베로마이세스, 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 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, 성장 인자, 호르몬 및 사이토킨, 또는 POI의 대사물질로부터 선택된 이중성 단백질인, 방법.
- [0241] 18. 정의 1 내지 17 중의 어느 하나에 있어서, POI가 진행 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 진행 세포에서 POI의 발현을 조절하는 방법으로서, 상기 발현이 탄소원을 제한하는 조건하에 유도되는, 방법.
- [0246] 23. 탄소원 조절가능한 프로모터의 전사 조절하에 재조합 진행 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 엄격한 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 진행 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 취득할 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 엄격한 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% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 상동체, 바람직하게는 적어도 200bp의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 서열 내에서 또는 당해 서열의 원위 말단 중의 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 모 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 정의 27 내지 29 중의 어느 하나에 따르는 핵산을 포함하는 발현 작제물로서, 상기 핵산이 POI를 인코딩하는 뉴클레오타이드 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, 토룰로프시스, 아르술라, 한세놀라, 야로위아, 클루이베로마이세스, 사카로마이세스, 코마가타엘라, 바람직하게는 메틸로트로픽 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 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.

[0280] 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 이들 각각의 피. 파스토리스의 프로모터를 동정하기 위해, 유전자 발현 패턴의 분석은 마이크로어레이를 사용하여 수행했다. 글리세롤 배지(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 배지

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

[0293] 리터당 함유된 글리세롤 유가식 배지

[0294] 632g 글리세롤, 8g MgSO₄ · 7H₂O, 22g KCl 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 비오틴 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℃로 조절하고, pH 설정값 5는 $NH_4OH(25\%)$ 를 첨가하여 조절했다.
- [0298] 발효를 개시하기 위해, 1.5L 배지 배지를 발효조로 멸균 여과시키고, 피. 파스토리스는 출발 광학 밀도(OD 600) 1로 접종했다(YPG에서 밤새 예비배양으로부터, 180rpm, 28℃). 약 25시간의 배지 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 획득하기 위해 3회 수행했다.
- [0300] 케모스타트 동안 탄소 제한된 조건(검출가능한 잔류 글루코즈 없음)은 배양 상청액의 HPLC 분석에 의해 확인하였다.
- [0301] c) 샘플링
- [0302] 샘플을 글리세롤 배지 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 급생을 위해, 9mL 세포 배양액을 즉시 4.5mL 빙냉 5% 페놀(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℃에서 저장했다.
- [0303] 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 재현탁시키고, 40초 동안 $5ms^{-1}$ 에서 패스트프랩(FastPrep) 24(엠펙. 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. $10\mu g$ RNA와 등가의 샘플 용적을 RNase 비함유 물에서 $50\mu L$ 로 희석시킨 다음, DNase 완충제 I 및 rDNase I를 첨가하고, 37℃에서 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 퀵 앰프 라벨링 키트(아질런트, 제품 번호: 5190-0444)를 사용하여 Cy 3 및 Cy 5로 표지했다. 따라서, 정제된 샘플 RNA 500ng을 $8.3\mu L$ RNase 비함유 물에서 희석하고, $2\mu L$ 스파이크 A 또는 B, 및 $1.2\mu L$ T7 프로모터 프라이머를 첨가했다. 혼합물을 65℃에서 10분 동안 변성시키고, 아이스에서 5분 동안 유지시켰다. 이어서, $8.5\mu L$ cDNA 마스터 믹스(샘플당: $4\mu L$ 5x 제1 스트랜드 완충액, $2\mu L$ 0.1M DTT, $1\mu L$ 10mM의 dNTP 믹스, $1\mu L$ MMLV-RT, $0.5\mu L$ RNase out)를 첨가하고, 40℃에서 2시간 동안 배양한 후, 15분 동안 65℃로 옮기고, 아이스에 5분 동안 정치시킨다. 전사 마스터믹스(샘플당: $15.3\mu L$ 뉴클레아제 비함유 물, $20\mu L$ 전사 완충액, $6\mu L$ 0.1M DTT, $6.4\mu L$ 50% PEG, $0.5\mu L$ RNase 억제제, $0.6\mu L$ 무기 포스파타제, $0.8\mu L$ T7 RNA 폴리머라제, $2.4\mu L$ 시아닌 3 또는 시아닌 5)를 제조하고, 각 튜브에 첨가하고, 2시간 동안 40℃에서 배양했다. 수득된 표지된 cRNA를 정제하기 위해, RNeasy 미니 키트(키아젠, 카탈로그 번호 74104)를 사용했다. 샘플은 -80℃에서 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 글리세롤 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 μ L 10배 차단제는 뉴클레아제 비함유 물을 사용하여 최종 용적 24 μ L로 희석했다. 1 μ L 25배 단편화 완충액을 첨가한 후, 혼합물을 30분 동안 60°C에서 배양했다. 이어서, 25 μ L 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 μ L)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. 마이크로어레이는 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 lmfilt과 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 나눈을 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] * 그린 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 글루코즈 공급물 비드에 의한 주배양을 수행했다.
- [0317] a) 균주 & 발현 벡터
- [0318] 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. 세레비지에 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 정 확성은 생거(Sanger) 서열분석에 의해 확인했다.

[0321] 표 2: 프로모터의 PCR 증폭용 프라이머

명칭	표적	서열	T _m	제한 부위
pG1_fw	pG1	서열번호 14 GATAGGGCCCCAAACATTTGCT CCCCCTAGTCTC	70.8	ApaI
pG1_back	pG1	서열번호 15 GATACCTGCAGGAAGGGTGGAA TTTAAAGGATCTTTAT	69.8	SbfI
pG3_fw	pG3	서열번호 16 GATAGGGCCCCAGCAATCCAGT AACCTTTCTGAAT	70.4	ApaI
pG3_back	pG3	서열번호 17 GATACCTGCAGGTTGAGTTCAAT AAATTGTCCGGGA	70.2	SbfI
pG4_fw	pG4	서열번호 18 GATAGGGCCCTGGACTGTTCAAT TTGAAGTCGATG	70.4	ApaI
pG4_back	pG4	서열번호 19 GATACCTGCAGGGGATAAAGGTA AGGGAAAAAAGCAA	70	SbfI
pG6_fw	pG6	서열번호 20 GATAGGGCCCAGACCAGCAGTTT AACTACGCAAATC	70.6	ApaI
pG6_back	pG6	서열번호 21 GATACCTGCAGGCTTTTCTTTGGG CAAGGAAAAATC	70.7	SbfI
pG7_fw	pG7	서열번호 22 GATAGGGCCCAATTGATTAAGTTCAGTGAAATTTCAAAC	69.1	ApaI
pG7_back	pG7	서열번호 23 GATACCTGCAGGATTATATTATGGGGAATAATGAAGAGAAGG	70.9	SbfI
pG8_fw	pG8	서열번호 24 GATAGGGCCCTGCACAACCATGCCAGTAAGG	71.5	ApaI
pG8_back	pG8	서열번호 25 GATACCTGCAGGTTTTTAGAAGAGGGAGAACTTAGATTGG	70.4	SbfI

[0322]

[0323] 표 3: 증폭 프라이머, 클로닝 효소 및 클로닝된 프로모터 길이

프로모터	5' 프라이머	3' 프라이머	클로닝 효소		단편 길이
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]

[0325] c) 프로모터 활성을 분석하기 위한 피. 파스토리스에서 eGFP의 발현

[0326] 모든 플라스미드는 전기천공 적격 피. 파스토리스에서 전기천공(2kV, 4mm, GenePulser, BioRad) 전에 3' AOX 게놈 통합 영역 내에서 AscI로 선형화했다.

[0327] 양성 형질전환체의 선택은 25μg/mL 제오신(Invivogen, CA)을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 펩톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 상에서 수행했다. 콜로니 PCR은 형질전환된 플라스미드의 존재를 보장하기 위해 사용되었다. 따라서, 게놈 DNA는 피. 파스토리스 콜로니를 5분 동안 각각 쿨링 및 동결시켜 수득하고, 적합한 프라이머와 함께 PCR에 직접 적용했다. 발현 스크리닝을 위해, 단일 콜로니를 예비배양물로서 액체 YPG-Zeo 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)로 접종했다. 약 24시간 후, 예비배양물을 사용하여, 10ml YP 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물) 및 2 글루코즈 공급물 비드(Kuhner, CH)에서 OD600 0.1을 갖는 주배양물을 접종했다. 글루코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = $1.63 * t0.74[\text{mg/Disc}]$ 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 실시예 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;

	예비배양		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]

[0331] 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(키아젠, 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 %		
		예비배양	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 %		
		예비배양	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℃에서 조절하고, pH 설정값 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: 세포의 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 배치 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, 글리세르알데히드 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) 전기천공 전에 AscI 제한 효소를 사용하여 선형화했다. 양성 형질전환체의 선택은 25 μ g/mL 제오신을 함유하는 YPD 플레이트(1리터당: 10g 효모 추출물, 20g 펩톤, 20g 글루코즈, 20g 한천-한천) 플레이트 상에서 수행했다. 콜로니 PCR은 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 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 HSA 농도는 공급자의 지침 메뉴얼에 따라 인간 알부민 ELISA 정량화 세트(카탈로그 번호 E80-129, 벤틀 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]	
	예비배양	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]

[0361] d) HSA 유전자 카피 수의 측정

[0362] 게놈 DNA의 분리 및 qPCR 측정은 표 9에 제시된 프라이머를 사용하여 실시예 2d에서와 같이 수행했다. 결과는 표 10에 나타낸다.

[0363] 표 9: 실시간 PCR에 의한 유전자 카피 수 측정을 위한 프라이머

프라이머	표적	서열	생성물 길이
PpACT1_Up	Act	서열번호 30 CCTGAGGCTTTGTTCACCCATCT	148 bp
PpACT1_Low	Act	서열번호 31 GGAACATAGTAGTACCACCGGACATAACGA	148 bp
PpHSA_Up	HSA	서열번호 32 AAACCTAGGAAAAGTGGGAGCAAATGT	135 bp
PpHSA_Low	HSA	서열번호 33 ACTCTGTCACCTACTGGCGTTTCTCATG	135 bp

[0364]

[0365] 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]

[0367]

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 241h⁻¹ 공기였고, 온도는 25℃에서 조절하고, pH 설정값 5.85는 NH₄OH(25%)를 첨가하여 조절했다.

[0377]

발효를 개시하기 위해, 400mL 배치 배지를 발효조에서 멸균 여과시키고, 피. 파스토리스를 출발 광학 밀도(OD 600) 1로 접종했다(예비배양으로부터). 약 25시간의 배치 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. 배치 동안 pH는 5.8이었고, 발효 내내 5.85로 유지하였다. 샘플은 배치 및 유가식 단계 동안 취했다. HSA 농도는 실시예 3c에 기재된 바와 같이 인간 알부민 ELISA 정량화 세트(Bethyl, 카달로그 번호 E80-129)를 사용하여 정량화했다. 생물량 농도 및 HSA 역가는 표 11에 제시하고, 배치의 말기(pG1 및 pG6을 위한 억제 조건) 및 유가식의 말기(pG1 및 pG6을 위한 유도 조건)에 생물량 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 배치 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(배치 단계와 비교하여 HSA/YDM에서 3배 증가).

[0378]

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

효모 건식 질량 및 HSA 역가

클론	발효 #	배치 말기			유가식 말기		
		시간 [h]	YDM [g/L]	HSA 역가 [mg/L]	시간 [h]	YDM [g/L]	HSA 역가 [mg/L]
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

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	SD	유가식의 말기		유도 배율
		평균 HSA/YDM		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		

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

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.

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 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.

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

증폭 및 클로닝은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행한다.

c) 프로모터 활성을 분석하기 위한 피. 파스토리스에서 eGFP의 발현

형질전환 및 클론 선택은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행한다.

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 10ml YP 배지(1리터당: 20g 펩톤, 10g 효모 추출물) 및 탄소원으로서 글루코즈에서 OD600 1의 주배양물을 접종했다. 글루코즈는 20 내지 0.001g/L⁻¹의 각종 농도로 사용한다.

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 내성에 기초했다. 각 샘플에 대해, 10,000세포를 분석한다. 피. 파스토리스의 자가 형광은 형질전환되지 않은 피. 파스토리스 야생형 세포를 사용하여 측정한다.

[0392] 실시예 5: 세포의 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 배치 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 형질전환체의 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 25μg/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 히타치 U-2910 분광광도계를 사용하여 25℃에서 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, 1μM 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 배지에서 검출가능한 CpB를 생산하지 않고, 유가식 말기에 210mg/L 이상의 CpB를 생성했다.
- [0403] 실시예 6: 세포의 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 배치 및 글루코즈 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 정확성은 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) 전기천공 전에 AscI 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. 글루코즈 제한 성장 조건은 다음 식: (글루코즈) = $1.63 * t \cdot 0.74[\text{mg/Disc}]$ 에 의해 기재된 이러한 공급물 비드의 느린 글루코즈 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, 벤틀 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]

[0419] 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: 세포의 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 리터를 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 벡

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 펩톤, 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 펩톤, 10g 효모 추출물, 12.6g 글리세롤 및 25mg 제오신)에서 접종한다. 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 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 경쇄(결합된 및 비함유)-알칼리성 포스파타제 항체를 사용하여 ELISA로 정량화한다. pGAP 및 pG1의 조절하에 다수의 Fab 발현 클론의 스크리닝으로부터의 Fab 역가를 표 15에 제시한다.

[0430] 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 글루코즈 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 특성의 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 펩톤, 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 펩톤, 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]
- [0440] 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 다이어그램은 글루코즈 제한 조절가능한 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	GATAGGGCCCCAAACATTTGCTCCCCCTAGTCTC 서열번호 34	36	1001	988
pG1a	GATAGGGCCCGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAG 서열번호 35	143	1001	881
pG1b	GATAGGGCCCCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCAC 서열번호 36	338	1001	686
pG1c	GATAGGGCCCTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGG 서열번호 37	509	1001	515
pG1d	GATAGGGCCCGACCCCGTTTTCGTGACAAAT 서열번호 38	632	1001	392
pG1e	GATAGGGCCCGGATAAGAGAATTTTGTGATTAT 서열번호 39	674	1001	350
pG1f	GATAGGGCCCGCTGCTCCATATTTTCCGG 서열번호 40	719	1001	305

[0449]

도면

도면1

pG1 (서열번호 1)

ATTTCACCCCCATCCCAGTAGAATGTAGGGTCCCCAACATTTGCTCCCCCTAG
TCTCCAGGGAATGTAAATATACTGCTAATAGAAAACAGTAAGACGCTCAGTTGT
CAGGATAATTACGTTGCACTGTAGTAAACAGGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACG
AGAGTTTTTTACGGCGCCGCCATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCA
CTACTTTCAAAGTTCTGTTGCTATACACGAACCATGTTTAACCAACCTCGCTTTT
GACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACAATCAAGTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCC
TTTCCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGC
CAATAGCGGTTTCATATGCGCTTTTACCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCT
GTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGGCTAATCCCT
GAAAAAAGTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTG
ATATGTTTTTCTGATATGCATCAAACTCTAATCTAAACCTGAATCTCCGCTATT
TTTTTTTTTTTTGATGACCCCGTTTTCTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTT
GTCCGGATAAGAGAATTTGTTTGATTATCCGTTCCGATAAATGGACGCCTGCTCC
ATATTTTCCGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCGAGATTTTCCGGGGATTACG
GATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTCAGTC
TCGTGCGAGTATGTGAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCA
GCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCA
CTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAATTCACCCCTT

도면2

pG3 (서열번호 2)

GTAAATAGCGGCAGCAATCCAGTAACCTTTTCTGAATAGCAGAGCCTTAACTAAAA
TAATGGCCAGGGTAAAAAATTCGAATTTGACACCAAAAATAAAGACTTGTGTTA
TAAGTCTTAACAAAGTCCGCAATTTTGAGCTAACGGTGGCGGTTGCTGGGATAT
TCAATAATGGTAGAATGTTGCTGCGGGTATATGACAGAGCGTGAAACACACTGAA
CAAGGTAAATGGAACAACAGCAATTGCAATATGGGGGAGGATAGTCAAGAACAAA
GCAGCAATGGCAAAGTACTGAATATTCTCAAAGCCAAAAGGTCCAGTGTTTCA
ACGACAAAGTCTTGTTGGTATAGCTTTGGAACAAAAGGACACCGAAAGACTCGAC
AGCGCCACAAATACAGCGTTGTAGAAGAACGAATTGATTGCTCCAGAGCTTCTA
ATAGTCAGAAGATACCCCAAACCTCCGAGCAACGTTAGCACATGACCTAAGAACC
AGGCGAAGTGAAGAGTCTGGAATAACGACACCCAGTCAGTTTTTCTGAGCTCCT
GGTGGGATTGGTAGAAGCATTTGATTTGCTTGAGTGGTTTTATTTGAAGATGGT
GTTGAAGCCATTGTTGCTAAAGAGTCGGAGTTTTGCTTTAGGGTTTGTTAAGCAA
AGGAGGAAAACTGCGCCGTTTGAAGTCCCAGGTAGTTTCGCGTGTGAGGCCAG
CCAGGGAAAGCTTCCTTCGGTACTTTTTTTTCTTTTGCAGGTTCCGGACGGATTAA
GCTTCGGGTTATGAGGGGGGCGGTAGCCAATTCCGGACACAATATTGCGTCGCA
GCTAGTCACCCCGCCATAAATATACGCAGGATTGAGGTAATAACATCGATAGTCTT
AGTAATTAATACAATTCAGTGGCGAATTTGGCAACATGACGTAAGGCCCACTGTTG
TCTATAAAAGGGATGAATTTTCATGTTTTTGAAGCCTCCCGGACAATTTATTGAA
CTCAA

도면3

pG4 (서열번호 4)

TGGACTGTTCAATTTGAAGTCGATGCTGACGATGTCAAGAGAGATGCTCAATTATA
TTTGTCAATTTGCTGGTTACACTGGAAACGCTACTTTTGTGGCGGAAACTCTACCA
GTTTGGCCGTCCATGTAAACGATGTGCTTCTGGGCCGTGACCGTTTCAACACGAA
CATAACCAATGACAAATCCACTTACAGGTCTAGTTCATATGGAGGCAATTGGTACC
TTACTTCTTTGGATGTCCCAAGTGGGGCTTTAACGTCTGGTACTAACAATGTCTCG
TTTGTCACTACAACTCCGAGGTAAATAAAGGATTCTTGTGGGATTCTCTCAAGTT
TGTTTGGAAGTTGTAACAGGTTTATAAGCATATCGTGCGCTTGTCCACAATTGAAT
CATTTATTGTTGCGAGATACATGAACAAAGTGTGAAGTGGGACCCATTACTACAAT
TCCCACGCAACCGTTGTTTCAAAGCCCATATTTTTTGACAATTGTTTCGTTACACC
CCCAGTTTGATGTACATCGCTTGCAATGATGTGTGTCCCGGAGTATTTCCATATT
CAGCTTGAATTCGTATACTCAACCAATATCTGGGGGTATACTTTTATGTAACCTATA
CAAATCAACTATACTATTTACCTTTGACCAATCATCTCCCATCTTGTTAAGTTTT
GCTTCCTATATCCCTGACCCTGACATCACCCTGATTCCGCTCAACGGTCTCCTC
TACATCGTCCCTCTTTTGGAGAGGGTGTTCAGTTTGACATTCAAATTACCCCCCGC
CATCACGCGCAACCGAGACCGCACCCCGAATTTTCAAAATTACCCACACCCT
ATACTCCACCACTATGAGGGTTATTAGAAGTATCAGTATAAATACCACCGCAAG
TTCCCAAGGGATCGTGTCTCTTCTCCAATTGCAATCATATTTCTGACTCTTTCTA
GTTGAGATTAATTCCTTACACTTGCTTTTTTCCCTTACCTTATCC

도면4

pG6 (서열번호 3)

AGACCAGCAGTTTAACTACGCAAATCCACAGGAATTTCTACATCACAATACCAATG
GTAATACCACGACGTCAAGGAATGGAAACGACGACTTGGAGGAAGACTTCGTCAA
CCTCTTGCGGAGTACCCGAGGCTAAGACAATAAGAAGAAAAAAGAAAAAGCG
GTGGGGGAGGGATTATTAATAAGGATTATGTAACCCAGGGTACCGTTCTATAC
ATATTTAAGGATTATTTAGGACAATCGATGAAATCGGCATCAAAGTGGATGGGAGT
ATAGTGTCCGATAATCGGATAAATCATCTTGCGAGGAGCCGCTTGTTGGTTGG
TGAGAGGAGTGAAATATGTGTCTCTCACCCAGAATCGCGATATCAGCACCCCTG
TGGGGGACACTATTGGCCTCCCTCCCAAACCTTCGATGTGGTAGTGCTTTATTAT
ATTGATTACATTGATTACATAGCTAAACCCTGCCTGGTTGCAAGTTGAGCTCCGAA
TTCCAATATTAGTAAAAATGCCTGCAAGATAACCTCGGTATGGCGTCCGACCCCGC
TTAATTATTTTAACTCCTTTCCAACGAGGACTTCGTAATTTTGGATTAGGGAGTTGA
GAAACGGGGGGTCTTGATACCTCCTCGATTTTCAATCCCACCCCTCTCAGTCCC
AAGTGGGACCCCTCGGCCGTGAAATGCGCGCACTTTAGTTTTTTTTCGCATGTA
AACGCCGGTGTCCGTCAATTAAGATCGCAGACTAGGGTGAAGTTTACCATTTT
GTCGCACTCCGTCTCCTCGGAATAGGGGTGTAGTAATTCTGCAGTAGTGCAATTT
TTACCCCGCCAAGGGGGGGCGAAAAGAGACGACCTCATCACGCATTCTCCAGTC
GCTCTCTACGCCTACAGCACCGACGTAGTTAACTTTCTCCCATATATAAGCAATT
GCCATTCCCCTGAAAACCTTAACCTCTGCTTTTTCTTGATTTTCTTGCCCAAAGA
AAAG

도면5

pG7 (서열번호 5)

AATTGATTAAGTTTCAGTGAAATTTCAAACCGCTATACACAACAGGACAACTTTGAG
TTTAGAAAAATCCGATGTAGTGTAACGGCTAGCACGGTCCGCTTTCACCGGGCAG
ACCCGGGTTCCGACTCCCGGCATCGGAGTTTATTTTTCCATTCGTTCTTTAGAGTA
TTCTCCTCAGCATGCCCCCTGAATTTTTCTTTTTCCATGTGTCCCATTTTTCCA
CTTTTTTTACAGTTTTCTCGTGATGTTAATTGGCTACACAAAAGCTGCCACACGA
AACCTTAATCACGAAAACTATACAGCCTTCACTAATCCGTAGCCCCATAATATGT
TGTCACGTGCTGTTGGGTACTACCTGTAGACTCTCATACCCCACTCCGTCTTTCT
CCAACAATTAACGCAGTACCGAGATTTATCAGCAGACTCAAATTGGGCAAACTCT
GTATTTTTCTTGCCCCGATAATTTATGGGTCTCAGGCCTCCACGTTTCCTGTTTA
CTTGAAGAATATTGGCTGCGGAAAAAGTGGTAAGGACAACCCCCCTTTTAATTGGA
TCCAGTTTTTCCGAAATGTTCCGATCCGTACGTCATCTCCGAAGCCGTACATTTTC
ACTCAATCTACGTAGCTTTGGACTCAGCGCTCCTGGAATTGCCAGGACAGTTTAC
TTGAGTTGATATTCCCTTGATAGATTGTGTGCTTCTTTTTCCAAAATTTGAGGCTTCG
TTTGAAAAGTGGAATCTGGTCGCTAGATCACTTCATGCCTATTTTTCACGGAAAAA
TAAGTGGTACTATGCACCCCTTAAACCTAAAGAAAAACGAAAAATTACCCCAAAA
CCTGGTGATGTTTTCGCCCCCTTCTTTTTATCCGAGTTTTTCTTTTTCTTGCTG
CCAAATTCCTCTCCTGACCTTAGCGTCCCCGAAAAAATTAATACTTAAGGACCG
AATGAGCCCCAGCTTTTCCCCTTCTCTTCATTATTTCCCAATAATATAAT

도면6

pG8 (서열번호 6)

CTGCACAACCATTGCCAGTAAGGACGAAGAGAAGGCCCACTACCCAAAATTCAG
GATAACGTCTTCATACCATGCAGCGACGCCTACAAGACGCTGTCAAGACATGCCA
ACTTCAACGAAGTGAACTTTAACACATTGATCGGGAAATTGACCACCAAGGGAAT
GCTGGTTGAGGCTGGAAGCGTTGCCAGTGTCTGAGGGAAGTGGACCGAAAGTT
TAGTAATGCATAAGAGGATATATAGGAATGCAGTAATAATATTAGTACCCATTAA
GTGGGCTAAGCCATTGGAAGGCCGTCTGACTGATGGTGGTGTCTTCTCATTTAG
ATAGTGCATTTGCAACTACCGTCTGAGATTGAGTTTGATGTGAAGCTCCAGCGCC
AAAACAGTATAAGAACCTTATCTCCGCATTATTGTTCTTGCGTAAAAGTTTGTGTGA
AGAAACAGGGGTAGTTGCGCAGATTAGTTGTAATATGCGCATAGGATGGGTCATT
GACTTCTTTCTCGAAAGAGCCACACCGTTAGCTAAAAAAGGACGCGCATCTACC
CCAAAATAGAATGTGGGGAAATAGGACGCGCAACTTCCTCTCAATCACTGGACGT
CAGAAAAACAAATGCGCAATCGAGTACCCTCCGTGATACCCTCCGTGATACCCC
CTCTCCGTCTATTCTGACAGCGTCTCCCCATGACGTTTCAATCTACTTAGAAAAGA
TTTCGTTTTTTTTCTTCAATTACACGATCTCATCTTCTGCAAGGGTCTGGAGGAC
ATCACCATCTGCGACTCCATAACTTAGTCCTGAGTTTATTTACGCTTCATCTGA
TGAGTAGGAAGAAAAAGTTTCACGAAATTCGCCCGCAACTTGCCCTTCGGAATA
AGCAGCCACTCTCCTTCTGCCCATAGTAAGCTTGCGCGAGGCCCAACTTGGCC
AGAACTTTAAATATGCCAAACAATCTCCCCAATCTAAGTTCTCCCTCTTCTAAAA
A

도면7

G1 (서열번호 7)

ATGTCCTCGTTTTTTCTAAACAACCAAACAGTAAAGATGATGACGCCTTTGGGAAG
 AGCTAGAGCTCTAAATTTTCAGGGCAAAGTTTATGATAAATTTCCAAAACTTACAA
 TATCTACGCTATTGCAATAACAGCCACCGTTTCTGGACTGATGTTTCGGTTTTGATA
 TTTCTTCTGTGTCCTCGTTTCGTAAGTCAGGATCATTACAGAACTACTTCAACCGT
 CCCGACAGTTTGACGCAAGGGGGTATCACCGCAAGTATGGCTGGAGGTTCTTTCT
 TGGGTTTCGTTATTTTCTTCTGACTTCCAGGATATCTTTGGAAGAAGAGTTGCTCTG
 CATATGTGCAGTGTCTCTGGATTATCGGGGCCATTCTTCAATGCGCTGCACAAA
 ACCAAGGTATGCTGATCGCAGGGAGATTGATTTCCGGTATCGGTGTCGGGTTTGG
 TTCAGCTTCAGCTCCAGTCTATTGTTCTGAAGTTGCTCCAGCAAAGATTAGAGGAA
 TGATTGGAGGATTATTTCAATTTTCTGTCACTGTGGGTATCATGATAATGTTTTATA
 TCGGATATGGATGTCACTACATTGACGGCGTTGCATCATTTAGACTGGCCTGGGG
 TTTGCAAAATGGTTCCAGGTCTTATTCTTTTGGTCGGTGTATTCTTCCTTCCTGAGT
 CTCCAAGATGGCTGGCTAACCACAACCGCTGGGAAGACGCAGTTGAGGTTATTG
 CTAATGTTGTTGCAAAAGGTGACAGAGAAAACGCCGATGTGCGTCTGCAATTGGA
 TGAAGTTCAGGAGCAACTATTGATTGACAAAGATGCTTCTGATTTTGGTTACCTTG
 ATTTGTTTAAGAAAGATTGTATCAAACGTACCTTCATTGGAGTGTGAGCTCAAGTG
 TGGCAACAACTTTGTTGTTAATGTTGCAATGTACTACGTTGTGTATCTCTTCCA
 AATGGCTGGTTTTACTGGAAATGTGGCGTTGGTATCGTCCTCAATTCAATATGTTT
 TGAATGTTGTTATGACTGTTCCAGCTTTGTTTCTAATGGACCGTATAGGCAGACGA
 CCCCTACTAATTGGTGGTGGTATTTTCATGTGTATTTGGCTGTTTGGAGTGGCAG
 GATTATTAGGCACCTTACTCTGAACCAATTGAAAATTTTCAGCGGTGATGATACTGTC
 AGAATTACTATTCTGACCAGCACAAAGGCTGCAGCAAGGGGTGTTATTGCCTGTT
 CCTATCTATTTCGTGTGCTCCTTTGCTCCAACCTGGGGTATCTGCATTTGGGTTTAT
 GCCTCTGAAATTTTCAACAACAGACAAAGAGCAAAGGGAGCAGCATTTGCTGCCT
 CCGCTAACTGGATTTTCAACTTTGCCTTGGCTATGTTTCGTGCCATCAGCCTTTAGA
 AACATTACATGGAAGACTTACATCATTTTTGGAGTATTTTCGTTCTGCTTAACAATC
 CATGTTTTCTTACAATTTCCAGAAACCAGAGGTAAGACTTTGGAAGAAATTGATCA
 AATGTTTAAGGACAATATTCCAGCTTGGAGAAGTGCTTCGTACGTTCCAGATATGC
 CAATTTTCAACAAAGAGAAGGTAGTATCTACTGAGCATGCAGAAAATGCTTCCAGC
 TCGTCCGAAAAAGCCTTGATGGTTCAGGAAGAGGAATCTGTATAA

도면8

G3 (서열번호 8)

ATGGTAGTTGCAATCGAAGGTGGTACAGGCTTAGGCCTTATGAATCTTACTTGGA
AACCAACTCCAACCCCAATTGATGATGCAATTGAGACAATTAGATATGCTGTTGAG
GAAGCTGGTGTGAGATACTTGAACGGAGGAGAGTTCTACAACCTTTCCTCTTGATT
CAAACCTGAATTTGCAGTACATTCAGGAATTTGCAAAAAGGTACCCCGAGCTATAT
AAAAAGGTGAGTCTGTGCGTAAAAGGTGCTGTCAGTTTGGTCGATGTGAGCCCCG
ATTCTTCCCCGGAGAACCTTGAAAAATCGATTTCAAACATAACCAAACATTTGCCG
AACAACTTCCTGCCAATTTTTGAGCCTGCTAGAATCGATAAACGTTACTCCATTGA
GGAGACAATAAAGAATCTCTCTAAGTTCGTCGAAGATGGCAGAATTGGAGGTATT
TCACTTAGTGAAGTTGGTGTGACACTATCAGAAGAGCTGCGAAAGTGGCTCCCA
TCGCCTGTGTGGAAGTGGAGTTTTCTCTATTGACTAGAGATATTCTTCATAATGGA
GTTCTTGCTGCTTGTGAGGATTTGAACATTCTATTATTGCCTACAGTCCCTGGG
AAGAGGATTTTTGACTGGAACGATAAACAGCAAAGCTGACATTCTGAAGGTGAT
ATCAGGTTAAGTTTGAAAGATTCAATGACGATGAAGTTATTGAACACAATTTGAA
ACTTGTTACGGTTTGAAAAAGATAGCCGACAAAAAAGGAGTCACATTGGCTCAAT
TGTCTCTTGCCTGGTTACGAAAGTTTGAGAGATAAACACGTCAAGGTGCTTCCTATT
CCAAGCTGCTCATCTCCTCGTAGAGTTGCAGAAAACACAAAAGAGATTTCTTGA
CTGATAGCGAGTTCCAGGAGATTACTGACTTTGCAGAGTCGGTTCCAATCAAAGG
TGGTCGTTACAACAAAGCAAGTGAGGCTGTTCTTAACGGTTAG

도면9

G4 (서열번호 9)

ATGACATTTGCTCCTCCCTTAGAATTCGAGATTGACCTTCCTAACGGATTGAAGTA
CACTCAACCATTGGGACTCTTCATCAACAATGAGTTTGTTGAAGGTGTAGAGGGA
AAGCTCTTACCAGTGATCAATCCTTGATGAGACTAAAATAACCCAAGTTTGGGA
AGCTTCTGCAGCGGATGTTGACCGTGCTGTTGATGCCGCTGAAGATGCTTTCAAC
AACTCCGTATGGGCTACTCAGGACCCATTAGAGAGGGGAAAGCTGATGAACAAAT
TGGCAGACCTTATCGATCGTGACTTCAACATCTTGGCTGGTATCGAATCCATCGA
CAATGGTAAGGCCTATACCTCTGCCCAGGGTGATGTTACTCTTGCTGTCAACTAC
ATCAGATCCTGTGCTGGATGGGCCGACAAGATTTGGGAAACGTTGTTGATTCCG
GAAACACCCACCTTAACCTGGTTAAAAGAGAGCCATTGGGTGTTGTGGGACAAAT
TATCCCATGGAACCTTCTCTCCTGATGTTGGCTTGGAAGTTGGGACCTGCGCTG
GCCACAGGTAACACTGTTGTTTTGAAGACTGCCGAGTCTACCCCTCTGTCGGGTT
TATACGTTGCCAAATTGATCAAGGAGGCCGTTTCCACCTGGTGTTGTTAACAT
TCTCAGTGGTTTCGGTAACCCAGCTGGAGCTGCCATCGCTGCTCATCCCAGAATC
AAGAAGATTGCTTTCACCGGATCCACTGCAACAGGCCGTAAGATCATGGAAGCAG
CCGCTAAATCTAACCTGAAAAAAGTCACTTTGGAAGTAGGTGGTAAATCTCCAAAC
ATTGTGTTTGAAGATGCTGATATCCAGAAGACTATCCATAACATTATTTTGGGAAT
CTTCTTCAATTCTGGTGAAGTCTGTTGTGCAGGTTCCAGAGTCTACATTCAAGACA
CTGTGTATGAAGAAGTGCTTGAAGCCTTCAAGAAGGAGACTGATAACGTTAAGGT
TGGTGGACCATTCGAAGAAGGTGTCTTCCAAGGGCCTCAGACCTCTGAGTTGCAA
CTTAACAGAAATCCTTAGTTACATCAAACACGGTAAGGATGAAGGTGCTCGTGAAT
TACCGGTGGTTCAAGATACCGTAACCGAGGTTACTACATTAAGCCCACAATTTTG
CTGACGTTACTGAAGACATGAAGATTGTCAAGGAGGAGATTTTGGTCCTGTGGT
TACTATCACTAAGTTCTCTACCGTGGATGAGGTTGTTGGATATGCCAACAACACCA
ACTATGGTCTAGCTGCTGGTATTCACACAAACAACCTTGAACAAAGCCATTGATGTT
GCCAGTAGAATCAAGGCGGGTGTCGTTTGGATTAACACCTACAACGATTTCCACC
ACATGGTTCCTTTCGGAGGTTATGGAGAATCTGGTATTGGCAGAGAGCTTGGTGC
TGAGGCTTTGGATAACTACACTCAAGCCAAGGCTATCAGAATTGCTTACACTCCTG
AACATAAGTAG

도면10

G6 (서열번호 10)

ATGCTTAGAACTTCTCCAGCTACTAAGAAAGCTCTCAAGTCGCAGATTAACGCCTT
CAACGTTGCTGCCTTGAGATTCTACTCCTCATTGCCTTGCAGGTTCCAATTACCT
TGCCAAACGGTAAGACCTACAATCAGCCAACAGGTTTGTATCAACAATGAGTTC
GTTCTTCTAAGCAAGGTAAGACCTTTGCTGTTTTAAACCCTTCCACTGAGGAGGA
GATTACTCACGTCTACGAGTCCAGAGAGGACGACGTTGAGTTAGCCGTTGCAGC
CGCTCAAAAGGCTTTCGACTCAACCTGGTCCACCCAGGACCCTGCTGAGAGAGG
TAAGGTCTTGAACAAGTTGGCTGACCTGATCGAGGAGCACTCTGAGACCCTTGCC
GCCATCGAGTCCTTGACAACGGTAAGGCCATTTCTCCGCTAGAGGTGATGTTG
GTCTGGTTGTGCCTACTTGAAGTCCTGTGCCGTTGGGCCGACAAGGTTTTCG
GTAGAGTTGTTGAAACCGGAAGCTCCCACTTCAACTACGTTAGAAGAGAGCCATT
GGGTGTTTGTGGTCAGATTATCCCATGGAACCTTCTCTCTGATGTGGTCCTGG
AAAGTTGGTCCAGCTTTGGCCACTGGTAACACTGTTGTCCTGAAGACAGCCGAGT
CTACTCCTCTGTCCGCCCTGTACGTTTCCCAATTGGTCAAGGAGGCCGGTATCCC
AGCTGGTGTCCACAACATTGTGTCCGTTTCGGTAAGATTACTGGTGAAGCTATT
GCTACTCATCCTAAGATCAAGAAGGTTGCCTTCACTGGTTCTACCGCCACTGGTC
GTCACATCATGAAGGCTGCTGCCGAATCCAACCTGAAGAAGGTTACTTTGGAGTT
GGGTGGTAAATCTCCTAACATCGTGTTCAACGATGCTAACATTAAGCAAGCTGTC
GCCAACATCATCCTCGGTATTTACTACAACCTCTGGAGAAGTTTGTGTGCTGGTTC
CAGAGTTTATGTTCAATCCGGTATTTACGACGAGCTTTTGGCCGAATTCAAGACTG
CTGCTGAGAATGTCAAGGTTGGTAACCCATTGACGAGGACACCTTCCAAGGTGC
TCAAACCTCTCAGCAACAATTGGAGAAGATTTTGGGTTTCGTTGAGCGTGGTAAG
AAGGACGGTGCTACTTTGATTACTGGTGGTGGCAGATTAGGTGACAAGGGTACT
TCGTCCAGCCAACATCTTCGGTGATGTTACACCAGAGATGGAGATTGTCAAGGA
AGAGATCTTTGGTCCTGTTGTCACTATCAGCAAGTTTGACACCATTGATGAGGTTG
TCGACCTTGCTAACGACTCTCAATACGGTCTTGCTGCTGGTATCCACTCTGACGA
TATCAACAAGGTCATTGACGTTGCTGCTAGAATCAAGTCCGGTACCGTGTGGGTC
AACACCTACAACGATTTCCACCAAATGGTTCATTCCGGTGGATTTGGCCAATCCG
GTATTGGTCGTGAGATGGGTGTTGAAGCTTTGGAAAACCTACACCCAATACAAGGC
TATCCGTGTCAAGATCAACCACAAGAACGAGTAA

도면11

G7 (서열번호 11)

ATGAGTTCAACAGATATCCAAGGTGATCAAGGTGACAATGAAAAGATATACGCCA
TTGAGAGCAGTCCCTCCAATGAGCAAATAAAAGATATTCATGAGGCTCCGGCCGA
CAACAAAAGTGAAGTAGACATCCCAGTCAAACCCAAGGGTTCCTATATCTTGGTGT
CTGTGTTATGTCTTCTAGTCGCATTCCGGTGGTTTCGTGTTCCGGTGGGATACCGG
TACCATCTCAGGTTTCGTAAACATGTCTGACTTTACGAGACGTTTCGGACAGTTTA
ACGGTGAAACGTATTACCTTTCTAAAGTGAGAGTTGGTTTAATTGTTTCTATTTTCA
ACATTGGTTGTGCTATCGGAGGTGTCACTCTAGGTAACTTGGTGACATTGGGG
TAGAAAAGAAGGCTTTGATGTTCTCATGGTCATCTATATGGTCGGTATTTTGATTC
AAATTGCTTCCATTGACAAATGGTACCAGTATTTTATTGGAAGAATTATTGCAGGT
CTGGCCGTCGGTGCAGTTTCCGTTTTATCCCCATGTTTCATCAGTGAGACTTCTC
CTAAACACATCAGAGGTTCCCTAGTCTCCTGCTACCAATTAATGATTACAGCCGGT
ATTTTCTTGGGTTACTGTACCACTTACGGAACCAAGACTTACACCGACTCCACCCA
ATGGAGAGTTCCTTTGGGATTGTGTTTCGCTTGGGCCATTCTGATGATTGTTGGTA
TGACCTTCATGCCAGAGTCCCCACGTTTCTTGGTTGAGGTAAACAGAGTCGACGA
GGCTATGAAGTCCATTGCCAGAGTTAACAAGGTCTCTATCGACGATCCATCTGTC
TACAATGAGATGAGACTTATTTCTGACGGTATTGAGAAGGAGAAGGAGGCTGGTA
GCGTTTCTTGGGGTGAAGTGTTCCTGTAAGCCAAAGATTTTCTACCGTCTATTG
ATTGGTATTTTCATGCAATCTTTGCAACAATTGACCGGTAACAACCTATTTCTTCTAC
TACGGAACCTACATTTTCAAGGCTGTCGGATTGGACGATTCTTCCAACTTCTAT
CATTCTTGGTGTGTCATTTTGCTTCCACATTCCTAGGTATCTACACCATGGATAA
ATTTGGTAGAAGAAGAACACTTTTAGGAGGTCTGGAGCCATGGTTGTTTGGTTGG
TCATTTTCAGTTCGGTTGGTGTCAAGTCTCTTTATGAGAACGGTAAGGATGATCCA
TCCAAACCAGCAGGTAACGCCATGATTGTCTTACCTGTCTGTTTCTTTCTTCTT
TGCATGTACCTGGGCTCCAGGTGTTTTGTCGTTGTGTCTGAAACCTACCACTT
AGAATTAGATCCAAGGGTATGGCCATCGCTCAAGGTTCCAATTGGCTTTGGGGTT
TCCTCATTGCCTTCTTCACTCCATTTATCTCAGGTGCCATTGATTCGCCTACGGT
TACGTCTTTATGGGATGTACTCTGTTGCCTTCTTCTTGTGTACTTCTCGTTCCT
GAAACCAAGGGTCTGTCGCTGGAAGACGTTGATGAAGTCTATGAGAACCTTACCT
TCGGAAGAGCATATGCATACAGCCACACGATTAAAGACAAGGGCGCCCTATAA

도면12

G8 (서열번호 12)

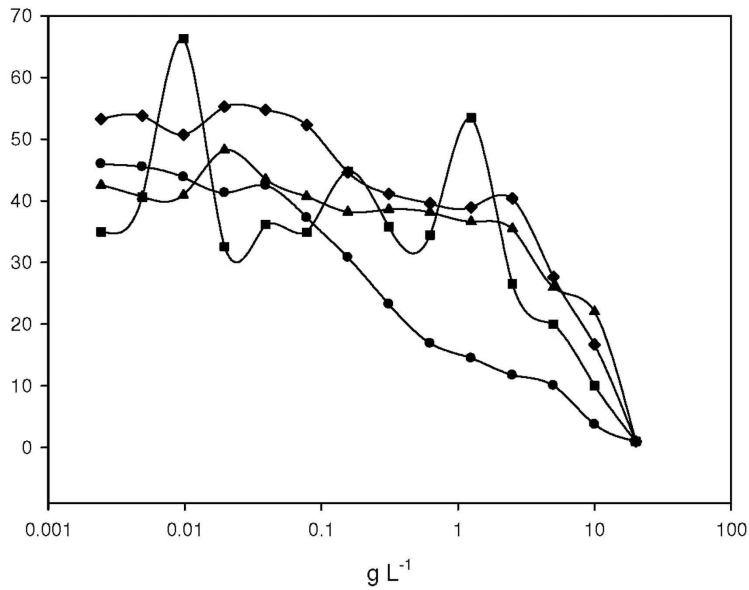
ATGGCCCTATCTCCTACCTATCAGGGCTACATATCTACCACTGGCGACGCGTTGA
TCGTGATCCAGGCAGCTCTAAATAACCATTTGAATCTTCTTCCCGAAGACCAAGA
GAAAGAGAGCGAGATGGGCTAATACGATCAGGTAACGTATTTGTTTTGTGAGC
AACGGTCTCATATCAAACGATGGACCGATGGTATCCCCTGGTCTCCATCTAGAGT
CCTTGGAAGTTCTTGTTGTATCGGGAAGTGGACAAGGATACCCCCAAAACTCG
CAAAGTGACGAAGATACTGAGGAGGGGAGAAAGAGGCGAAAGACTTCTGTGGAT
GTAACCGATCCAAATACCAGGCAGTTGGTGGGATCATTGGTGACTTCCTATGACT
TCAAAGAGGATGGACTTATTAACCACTCTCCTTGACTTTCCAGACCGGTGCT
AATGAAGAAAGGGAAACAGTGCACTTGATTAGTTATTATACTCCGGAAGATGTAAC
GAACCATCGTTTGAACAGGCCGTCTGACAATCCATATCTGGCCAATATCACTGTTT
CAGAGTCATTATTGACTGCCTTGAGAGAGAGTACCCTTGAGGAAGAGCAACGTC
TGATGACGAGCTTTCTTTAGTCAGAAGTAAGTCTGTTAGAGTACCAAGAGGTACCAA
TGAACATATCTATGTCTTTACCTTTTCAACTCCACTTTCTTGAACACAGGAGTAA
ACTCAACTACCCAGCTGCAACAGCAACAACACTACAACAACAACAGCAACAGCA
ACAGCAGCAGCAACAACAGCAGCAACAACAGCAACCGGTAGCATCCCTTCCAAA
ATTTGATGGATCCTTTCTATTACAACAGGGTGTAAATCCAGTTCCTCATTTCATGGA
CCAAAAATGGGAAGTAGCAATTCGTGGATTAACAATTGGTTTCGTCCAAATTCGT
CAGAATCAAATGGGCTATCGGTTATCGGACCTCACAAGGGATATGACGAACAAAG
TCCAGCAACGAGTTATACTTTGAATGAACGTTGA

도면13

pGAP (서열번호 13)

CTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAAT
ATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGG
TAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACAGAAACGTCTTCCCTTCTCTCTCCTT
CCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTAC
GGCCCCCTTGACAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAACGGAGGT
CGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAA
TAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGAAACCAACGAAATCGAATAT
AAAAGGCGAACACCTTCCCAATTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTT
AATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACATCACCTGCAGGCC

도면14



도면15a

pG1a (서열번호 41)

GGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTTTACGGCGCCGCCATATTGGGC
 CGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCACTACTTTCAAAGGTTCTGTTGCTATACACGA
 ACCATGTTTAACCAACCTCGCTTTTGACTTGACTGAAGTCATCGGTAAACAATCAA
 GTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCCTTTCCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTT
 TTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCTTTTACCC
 CCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTA
 GCTGAAGTACAACAGGCTAATTCCTGAAAAAACTGCAGATAGACTTCAAGATCTC
 AGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCTGATATGCATCAAACTCT
 AATCTAAAACCTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTTTTTTTTATGATGACCCCGTTTTCGT
 GACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCGGGATAAGAGAATTTTGTGATTATC
 CGTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCACCTGGAA
 GTGCCCAGAATTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATA
 CGCCAAGTCTTACATTTTGTGAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAACAAG
 ATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGC
 CAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAA
 AAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

도면15b

pG1b (서열번호 42)

CCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAA
TAGCGCGTTTCATATGCGCTTTTACCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTA
AGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGGCTAATTCCTGAA
AAACTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATA
TGTTTTTCTGATATGCATCAAACTCTAATCTAAACCTGAATCTCCGCTATTTTT
TTTTTTTTTTGATGACCCCGTTTTCTGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTC
CGGATAAGAGAATTTTGTGATTATCCGTTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATA
TTTTCCGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTCCGGGGATTACGGA
TAATACGGTGGTCTGGATTAATTAACGCCAAGTCTTACATTTTGTGCACTCTC
GTGCGAGTATGTGCAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGC
TTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACT
TGGATGCAGTGAGTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAATTCACCCCTT

pG1c (서열번호 43)

CTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTT
TTTCCTGATATGCATCAAACTCTAATCTAAACCTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTT
TTTTTTGATGACCCCGTTTTCTGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCGGGA
TAAGAGAATTTTGTGATTATCCGTTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTT
CCGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTCCGGGGATTACGGATAATA
CGGTGGTCTGGATTAATTAACGCCAAGTCTTACATTTTGTGCACTCTCGTGCG
AGTATGTGCAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGAC
CCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGAT
GCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAATTCACCCCTT

도면15c

pG1d (서열번호 44)

GACCCCGTTTTCTGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCCGGATAAGAGAA
TTTTGTTTGATTATCCGTTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTCCGGTTAT
TACCCACCTGGAAGTGCCGAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTC
TGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTCAGTCTCGTGCGAGTATGTG
CAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCAT
AGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAG
TTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

pG1e (서열번호 45)

CCGGATAAGAGAATTTTGTTCGTTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCAT
ATTTTCCGGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCGAGAATTTTCCGGGGATTACGG
ATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTCAGTCT
CGTGCGAGTATGTGCAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAG
CTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCAC
TTGGATGCAGTGAGTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

pG1f (서열번호 46)

GCCTGCTCCATATTTTCCGGTTATTACCCACCTGGAAGTGCCGAGAATTTTCCG
GGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTT
GTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAACAAGATGAGCCAATTTATTGGA
TTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTA
GATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCAC
CCTT

서열 목록

- <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 ccatccagc agaagttagg gtccccaac atttgcctcc cctagctccc	60
agggaatgt aaaatatact gctaataaga aacagtaaga cgctcagttg tcaggataat	120
tacgttcgac tgtagtaaaa caggaatctg tattgttaga aagaacgaga gttttttacg	180
gcgcgcgcat attgggcccgt gtgaaaacag cttgaaaccc cactactttc aaaggttctg	240
ttgctataca cgaacatgt ttaaccaacc tcgcttttga cttgactgaa gtcacgcgtt	300
aacaatcaag taccctagtc tgtctgaatg ctcttttcca tattcagtag gtgtttcttg	360
cacttttgca tgactgcgg aagaattagc caatagcgcg tttcatatgc gcttttacct	420
cctcttttgt caagcgcaa atgcctgtaa gatttggtgg gggtgtgagc cgttagctga	480
agtacaacag gctaattccc tgaaaaaact gcagatagac ttcaagatct cagggattcc	540
cactatttgg tattctgata tgtttttcct gatatgcac aaaactctaa tctaaacct	600
gaatctccgc tatttttttt ttttttttga tgaccccggt ttcgtgacaa attaatctcc	660
aacggggctt tgcccgata agagaatttt gtttgattat ccgttcggat aaatggacgc	720
ctgctccata tttttccgtt tattaccca cctggaagtg cccagaattt tccggggatt	780
acggataata cgggtgtctg gattaattaa tacgccaagt cttacatttt gtgcagctc	840
cgtgcgagta tggcaataa taaacaagat gagccaattt attggattag ttgcagcttg	900
accccgccat agctaggcat agccaagtgc tatgggtgtt agatgatgca cttggatgca	960
gtgagttttg gagtataaaa gatccttaaa attccacct t	1001

<210> 2

<211> 1000

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 2

glaaatagcg gcagcaatcc agtaaccttt tctgaatagc agagccttaa ctaaaataat	60
ggccagggtg aaaaattcga aatttgacac caaaaataaa gacttgctgt tataagtctt	120
aacaaagtcc gcaattttgg agctaaccgt ggcggttgct gggatattca ataattgtag	180
aatgttgctg cgggtatatg acagagcgtg aaacacactg aacaaggtaa atggaacaac	240
agcaattgca atatggggga ggatagtcaa gaacaaagca gcaatggcaa agtactgaat	300
attctccaaa gccaaaaggt ccagtggttt caacgacaaa gtcttggttg tatagctttg	360
gaacaaaagg acaccgaaag actcgacagc gccacaaat acagcgttgt agaagaacga	420

attgattgct ccagagcttc taatagtcag aagatacccc aaacctccga gcaacgttag 480
cacatgacct aagaaccagg cgaagtgaag agtctggaat aacgacaccc agtcagtttt 540
tcctgagctc ctggtgggat tggtagaagc atttgatttg cttggagtgg ttttatttga 600
agatgggtgtt gaagccattg ttgctaaaga gtcggagtgt tgcttttagg gtttgtaag 660
caaaggagga aaaactgcgc cgtttgaagt cccaggtagt ttcgcgtgtg aggccagcca 720
gggaaagctt ctttcggtac tttttttct tttgcagggt cggacggat taagcttcgg 780

gttatgaggg gggcggtagc caattccgga cacaatattg cgtcgcagct agtcaccccg 840
ccataaatat acgcaggatt gagtaataa catcgatagt cttagtaatt aatacaattc 900
agtggcgaat ttggcaacat gacgtaaggc ccactgttgt ctataaaagg ggatgaattt 960
tcatgttttt gaggcctccc ggacaattta ttgaactcaa 1000

<210> 3
<211> 1001
<212> DNA
<213> Pichia pastoris
<400> 3

agaccagcag ttttaactacg caaatccaca ggaatttcta catcacaata ccaatggtaa 60
taccacgacg tcaaggaatg gaaacgacga cttggaggaa gacttcgtca acctcttgcg 120

gagtacccga ggctaagaca ataagaagaa aaaaaaaga aaagcgggtgg gggagggatt 180
attaaataag gattatgtaa ccccagggtg cgttctata catatttaag gattatttag 240
gacaatcgat gaaatcggca tcaaaactgga tgggagtata gtgtccggat aatcggataa 300
atcatcttgc gaggagccgc ttggttggtt ggtgagagga gtgaaatatg tgtctcctca 360
cccaagaatc gcgatatcag caccctgtgg gggacactat tggcctccct cccaaacctt 420
cgatgtggta gtgctttatt atattgatta cattgattac atagctaaac cctgcctggt 480
tgcaagttag gctccgaatt ccaatattag taaatgcct gcaagataac ctcggtatgg 540

cgtcggacce cgttaatta ttttaactcc tttccaacga ggacttcgta atttttgatt 600
agggagttag gaaacggggg gtcttgatac ctctcgtatt tcagatccca cccctctca 660
gtcccaagtg ggacccccct cggccgtgaa atgcgcgcac tttagttttt ttcgcatgta 720
aacgccggtg tccgtcaatt aaaagtcgca gactagggtg aactttacca tttttgtcgc 780
actccgtctc ctcggaatag ggggtgtagt attctgcagt agtgcaattt ttaccccgcc 840
aagggggggc gaaaagagac gacctcatca cgcattctcc agtcgctctc tacgctaca 900
gcaccgacgt agttaacttt ctccatata taaagcaatt gccattcccc tgaaaacttt 960

aacctctgct ttttcttgat ttttccttgc ccaaagaaaa g 1001

<210> 4

<211> 1000

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 4

tggactgttc aatttgaagt cgatgctgac gatgtcaaga gagatgctca attatatttg 60

tcatttctgt gttacactgg aaacgctact tttgttggcg gaaactctac cagtttggcc 120

gtccatgtaa acgatgtcgt tctgggccgt gaccgtttca acacgaacat aaccaatgac 180

aaatccactt acaggtctag ttcatatgga ggcaattggg accttacttc ttgggatgtc 240

ccaagtgggg cttaacgtc tggactaac aatgtctcgt ttgtcactac aaactccgag 300

gtaaataaag gattcttctg ggattctctc aagtttgttt ggaagtgtga acaggtttat 360

aagcatatcg tgcgcttctc cacaattgaa tcatttattg ttgcgagata catgaacaaa 420

gtgtgaactg ggaccattta ctacaattcc cagcaaccg ttgtttcaaa gcccatattt 480

tttgacaatt gtttcgttac acccccagtt tgatgtacat cgcttgcaat gatgtgtgtc 540

ccggagtatt ttccatatcc agcttgaatt cgtatactca accaatatct ggggggtatac 600

ttttatgtaa cctatacaaa tcaactatac tatttcacct ttcgaccaat catctcccat 660

cttgtaagt ttgcttctct atatccctga cctgacatc acccatgatt ccgtcaacg 720

gttctcctct acatcgtccc tcttttggag aggggtgttc gtttgacatt caaattaccc 780

cccgccatca cgcgcaaccg agaccgcacc cccgaatttt cacaaattac cccacacct 840

atactccacc actatgaggg ttattagaac tgatcacgta taaataccac cgcaagtcc 900

caagggatcg tgttcttctt ctccaattgc aatcatattt ctgactcttt ctagttcaga 960

ttaattcctt tacacttgct ttttccctt acctttatcc 1000

<210> 5

<211> 1000

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 5

aattgattaa gttcagttaa atttcaaacc gctatacaca acaggacaac tttagattta 60

gaaaaatccg atgtagtgtg acggctagca cggtcgctt tcaccgggca gaccggggtt 120

cgactcccgg catcggagt ttttttcca tttcgttctt tagagtattc tcctcagcat 180

gccccctga attttctt ttttccatgt gtccatttt tccacttttt ttacagtttt 240

cctcgtgatg ttaattggct acacaaaagc tgccacacga aaccttaatc acgaaaaact	300
atacagcctt cactaatccg tagccccata atagtgtgtc cacgtgctgt tgggtactac	360
ctgtagactc tcatacccca ctccgtcttt ctccaacaat taacgcagta ccgagattta	420
tcagcagact caaattgggc aaactctgta tttttccttg cccgcataat ttatgggtct	480
caggcctcca cgtttcctgt ttacttgaag aatattggct gcgaaaaag tggttaaggac	540
aacccccctt taattggatc cagtttttcc gaaatgttcc gatccgtacg tcattctccga	600
agccgtacat tticactcaa tctacgtagc ttggactca gcgctcctgg aattgccagg	660
acagtttact tgagttgata ttcccttgta gattgtgtgc ttcttttcc aaaatttgag	720
gcttcgtttg aaaagtggaa tctggtcgct agatcacttc atgcctatct ttcacggaaa	780
aataagtgtt actatgcacc ccttaaacct aaagaaaaac ggaaaaatta ccccaaaccc	840
tggtgatgtt tttcgccctt ttctttttat ccgagttttt cttttttctt gtctgcaaaa	900
ttctctcct gaccttagcg tccccgaaa aaattaacta ctttaaggacc gaatgagccc	960
cagcttttcc ctttctcttc attattcccc ataataaat	1000
<210> 6	
<211> 1000	
<212> DNA	
<213> Pichia pastoris	
<400> 6	
ctgcacaacc attgccagta aggacgaaga gaaggcccca ctacccaaaa ttcaggataa	60
cgtcttcata ccatgcagcg acgcctacaa gacgtgtca agacatgcca acttcaacga	120
agtgaacttt aacacattga tctggaaatt gaccaccaag ggaatgctgg ttgaggctgg	180
aagcgttgcc agtgtctga gggaactgga ccgaaagtct agtaatgcat aagaggatat	240
atataggaat gcagtaataa tattagtacc cattaagtgg gctaagccat tgggaaggccg	300
tctgactgat ggtgggtgtc ttctcattta gatagtgcac ttgcaactac cgtctgagat	360
tgagtttgat gtgaagctcc agcgccaaaa cagtataaga accttatctc cgcattattg	420
ttcttgcgta aaagtttgtg tgaagaaaca ggggtagtgt cgcagattag ttgtaatatg	480
cgcataggat gggtcattga cttcttttct cgaagagacc acaccgttag ctaaaaaagg	540
acgcgcatct accccaaaat agaattgtggg gaaataggac gcgcaacttc ctctcaatca	600
ctggacgtca gaaaaacaaa tgcgcaatcg agtcaccctc cgtgataccc tccgtgatac	660
ccctctccg tctattctga cagcgtctcc ccatgacgtt tcaatctact tagaaaagat	720
ttcgtttttt ttctcttcaa ttacacgac tcattctctg caagggtctg gaggacatca	780

ccaatctgcg aciccataac ttagtcctga gtttataattt acgcttcac tgatgagtag 840
gaagaaaaag ttccacgaaa ttccccgcc aacttgccct tcggaataag cagccactct 900
ccttctgccc atagtaagct tgcgcgaggc cccaacttgg ccagaaactt taaatatgcc 960
aaacaatctc cccaatcta agttctccct cttctaaaaa 1000

<210> 7

<211> 1662

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 7

atgtcctcgt tttttctaaa caaccaaaca gtaaagatga tgacgccttt gggaagagct 60
agagctctaa attttcaggg caaagtttat gataaatctt caaaaactta caatatctac 120
gctattgcaa taacagccac cgtttctgga ctgatgttcg gttttgatat ttcttctgtg 180
tcctcgttcg taagtcagga tcattacaga aactacttca accgtcccgga cagtttgacg 240
caagggggta tcaccgcaag tatggctgga ggttctttct tgggttcgtt attttcttct 300
gacttccagg atatctttgg aagaagagtt gctctgcata tgtgcagtgt cctctggatt 360
atcggggcca ttcttcaatg cgctgcacaa aaccaaggta tgctgatcgc agggagattg 420

atttccggta tcgggtgctgg gtttgggttca gcttcagctc cagtctattg ttctgaagtt 480
gctccagcaa agattagagg aatgattgga ggattatttc aattttctgt cactgtgggt 540
atcatgataa tgttttatat cggatatgga tgtcactaca ttgacggcgt tgcattcattt 600
agactggcct ggggtttgca aatggttcca ggtcttattc ttttggctcg tgtattcttc 660
cttctgagt ctccaagatg gctggctaac cacaaccgt gggaagacgc agttgaggtt 720
attgctaatt ttgttgcaaa aggtgacaga gaaaacgccg atgtgcgtct gcaattggat 780
gaagttcagg agcaactatt gattgacaaa gatgcttctg attttgggtta ccttgatttg 840

tttaagaaag attgtatcaa acgtaccttc attggagtgt cagctcaagt gtggcaacaa 900
cttttggtta ttaatgttgc aatgtactac gttgtgtatc tcttccaaat ggctgggttt 960
actggaaatg tggcgttggg atcgtcctca attcaatatg ttttgaatgt tgttatgact 1020
gttcagctt tgtttcta ggcacctata ggcagacgac ccctactaat tgggtggtggt 1080
attttcatgt gtatttggct gtttggagtgc gcaggattat taggcactta ctctgaacca 1140
attgaaaatt tcagcgggtga tgatactgtc agaattacta ttcctgacca gcacaaggct 1200
gcagcaagggt gtgttattgc ctgttcttat ctattcgtgt gctcctttgc tccaacctgg 1260

ggtatctgca ttgggtttta tgcctctgaa attttcaaca acagacaaag agcaaaggga 1320

gcagcatttg ctgcctccgc taactggatt ttcaactttg ccttggctat gttcgtgcca 1380
 tcagccttta gaaacattac atggaagact tacatcattt ttggagtatt ttcgttctgc 1440
 ttaacaatcc atgttttctt acaattccca gaaaccagag gtaagacttt ggaagaaatt 1500
 gatcaaatgt ttaaggacaa tattccagct tggagaagtg cttcgtacgt tccagatatg 1560
 ccaattttca acaaagagaa ggtagtatct actgagcatg cagaaaatgc ttccagctcg 1620
 tccgaaaaag ccttgatggt tcaggaagag gaatctgtat aa 1662

<210> 8

<211> 987

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 8

atggtagttg caatcgagg tggtagcaggc ttaggcctta tgaatcttac ttggaaacca 60
 actccaacc caattgatga tgcaattgag acaattagat atgctgttga ggaagctggt 120
 gtcagatact tgaacggagg agagttctac aactttctc ttgattcaaa cctgaatttg 180
 cagtacattc aggaatttgc aaaaaggtac cccgagctat ataaaaaggt gagtctgtcg 240
 gtaaaaggtg ctgtcagttt ggtcagatgt agccccgatt cttccccgga gaaccttgaa 300
 aaatcgattt caaacataac caaacatttg ccgaacaact tctgccaat ttttgagcct 360

gctagaatcg ataaacgtta ctccattgag gagacaataa agaatctctc taagtctgc 420
 gaagatggca gaattggagg tatttcactt agtgaagtgt gtgctgacac tatcagaaga 480
 gctgcgaaag tggctcccat cgcctgtgtg gaagtggagt tttctctatt gactagagat 540
 attcttcata atggagtctt tgctgcttgt gaggatttga acattcctat tattgcctac 600
 agtccttgg gaagaggatt tttgactgga acgataaaca gcaaagctga cattcctgaa 660
 ggtgatatca ggtaagtgt ggaaagattc aatgacgatg aagtattga acacaatttg 720
 aaactgttc acggtttgaa aaagatagcc gacaaaaaag gattcacatt ggctcaattg 780

tctcttgctt ggtaacgaaa gtttggagat aaacacgtca aggtgcttcc tattccaagc 840
 tgctcatctc ctgtagagt tgcagaaaac aaaaagaga tttccttgac tgatagcgag 900
 ttccaggaga ttactgactt tgcagagtcg gttccaatca aagtggttcg ttacaacaaa 960
 gcaagtgagg ctgttcttaa cggtttag 987

<210> 9

<211> 1506

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 9

atgacatttg ctctccctt agaattcgag attgaccttc ctaacggatt gaagtacact	60
caaccattgg gactcttcat caacaatgag ttgttgaag gtgtagagg aaagctctta	120
ccagtgatca atccttgta tgagactaaa ataaccaag tttgggaagc tctgcagcg	180
gatgttgacc gtgctgtga tgccgtgaa gatgctttca acaactccgt atgggctact	240
caggacccat tagagagggg aaagctgatg aacaaattgg cagaccttat cgatcgtgac	300
ttcaacatct tggctggat cgaatccatc gacaatgga aggcctatac ctctgccag	360
ggtgatgtta ctcttgctgt caactacatc agatcctgtg ctggatgggc cgacaagatt	420
ttgggaaacg ttgttgattc cggaacacc caccttaact tggttaaaag agagccattg	480
ggtgttgtgg gacaaattat cccatggaac ttctctctcc tgatgttggc ttggaagtgtg	540
ggacctgccc tggccacagg taacactgtt gttttgaaga ctgccgagtc taccctctg	600
tccgggttat acgttgccaa attgatcaag gaggccggtt tcccacctgg tgtggttaac	660
attctcagtg gtttcggtaa cccagctgga gctgccatcg ctgctcatcc cagaatcaag	720
aagattgctt tcaccggatc cactgcaaca ggccgtaaga tcatggaagc agccgctaaa	780
tctaactga aaaaagtcac ttggaacta ggtggtaaat ctccaacat tgtgtttgaa	840
gatgctgata tccagaagac tatccataac attatatttg gaatcttctt caattctggt	900
gaagtctgtt gtgcaggttc cagagtctac attcaagaca ctgtgtatga agaagtgctt	960
gaagccttca agaaggagac tgataacgtt aaggttggtg gaccattcga agaagtgctc	1020
ttccaagggc ctgagacctc tgagttgcaa cttaacagaa tccttagtta catcaaacac	1080
ggtaaggatg aaggtgctcg tgtaattacc ggtggttcaa gataccgtaa ccgaggttac	1140
tacattaage ccacaatttt tgctgacgtt actgaagaca tgaagattgt caaggaggag	1200
atTTTTGGTC ctgtggttac tatcactaag ttctctaccg tggatgaggt tgttgatat	1260
gccacaaca ccaactatgg tctagctgct ggtattcaca caacaactt gaacaaagcc	1320
attgatgttg ccagtagaat caagcgggt gtcgtttgga ttaacaccta caacgatttc	1380
caccacatgg ttcttttcgg aggttatgga gaatctggta ttggcagaga gcttggtgct	1440
gaggctttgg ataactacac tcaagccaag gctatcagaa ttgcttacac tcctgaacat	1500
aagtag	1506

<210> 10

<211> 1578

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 10

atgcttagaa ctctccagc tactaagaaa gctctcaagt cgcagattaa cgccttcaac	60
gttgctgcct tgagattcta ctctcattg cctttgcagg ttccaattac ctgccaac	120
ggtaagacct acaatcagcc aacaggtttg ttatcaaca atgagttcgt tccttctaag	180
caaggtaga cctttgctgt tttaaacct tccactgagg aggagattac tcacgtctac	240
gagtccagag aggacgacgt tgagttagcc gttgcagccg ctcaaaaggc ttctgactca	300
acctggcca cccaggaccc tgctgagaga ggtaaggctc tgaacaagtt ggctgacctg	360
atcgaggagc actctgagac ccttgccgcc atcgagtcct tggacaacgg taaggccatt	420
tcctccgcta gaggtgatgt tggctctggt gtcgcctact tgaagtcctg tgccggttgg	480
gccgacaagg ttttcggtag agttgttgaa accggaagct cccacttcaa ctacgttaga	540
agagagccat tgggtgtttg tggtcagatt atcccatgga actttcctct tctgatgtgg	600
tcttgaaaag ttgtccagc tttggccact ggtaacactg ttgtcctgaa gacagccgag	660
tctactctc tgtccgcct gtacgtttcc caattggtca aggaggccgg tatccagct	720
ggtgtccaca acattgtgtc cggtttcggg aagattactg gtgaagctat tgctactcat	780
cctaagatca agaaggttgc ctctactggt tctaccgcca ctggtcgtca catcatgaag	840
gctgctgccg aatccaactt gaagaagggt actttggagt tgggtggtaa atctcctaac	900
atcgtgttca acgatgctaa cattaagcaa gctgtcgcca acatcatcct cggtatttac	960
tacaactctg gagaagtttg ttgtgctggt tccagagttt atgttcaatc cggtatttac	1020
gacgagcttt tggccgaatt caagactgct gctgagaatg tcaaggttgg taaccattc	1080
gacgaggaca cctccaagg tgctcaaacc tctcagcaac aattggagaa gattttgggt	1140
ttcgttgagc gtggtagaag ggacggtgct actttgatta ctggtgggtg cagattaggt	1200
gacaagggtt acttcgtcca gccaaactatc ttcggtgatg ttacaccaga gatggagatt	1260
gtcaaggaag agatctttgg tctgttgtc actatcagca agtttgacac cattgatgag	1320
gtgtcgacc ttgctaacga ctctcaatac ggtcttgctg ctggtatcca ctctgacgat	1380
atcaacaagg tcattgacgt tgctgctaga atcaagtccg gtaccgtgtg ggtcaacacc	1440
tacaacgatt tccaccaaat ggttcattc ggtggatttg gccaatccgg tattggtcgt	1500
gagatgggtg ttgaagcttt ggaaaactac acccaatata aggctatccg tgtcaagatc	1560
aaccacaaga acgagtaa	1578

<210> 11

<211> 1614

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 11

atgagttcaa cagatatcca aggtgatcaa ggtgacaatg aaaagatata cgccattgag	60
agcagtcctt ccaatgagca aataaaagat attcatgagg ctccggccga caacaaaagt	120
gaactagaca tcccagtcaa acccaagggt tcctatatct tgggtgtctgt gttatgtctt	180
ctagtgcgat tcggtgggtt cgtgttcggt tgggataccg gtaccatctc aggtttcgtt	240
aacatgtctg actttacgag acgtttcggg cagtttaacg gtgaaacgta ttacctttct	300
aaagtgagag ttggtttaat tgtttctatt ttcaacattg gttgtgctat cggaggtgtc	360
actctaggta aacttgggta catttggggt agaaagaagg ctttgatgtt cgtcatggtc	420
atctatatgg tcggtatttt gattcaaatt gcttcattg acaaatggta ccagtatttc	480
attggaagaa ttattgcagg tctggccgtc ggtgcagttt ccgtttttat ccccatgttc	540
atcagtgaga ctctcctaa acacatcaga ggttccttag tctcctgcta ccaattaatg	600
attacagccg gtattttctt gggttactgt accacttacg gaaccaagac ttacaccgac	660
tccaccaat ggagagtcc tttgggattg tgtttcgctt gggccattct gatgattgtt	720
ggtatgacct tcatgccaga gtccccacgt ttcttgggtg aggttaacag agtcgacgag	780
gctatgaagt ccattgccag agttaacaag gtctctatcg acgatccatc tgtctacaat	840
gagatgagac ttatttctga cggtatigag aaggagaagg aggctggtag cgtttcttgg	900
ggtgaactgt tcaactgtaa gccaaagatt ttctaccgtc tattgattgg tattttcatg	960
caatctttgc aacaattgac cggtaacaac tatttcttct actacggaac taccattttc	1020
aaggctgtcg gattggacga ttctttccaa acttctatca ttcttgggtg tgtcaatttt	1080
gcttccacat tcctaggtat ctacaccatg gataaatttg gtagaagaag aacactttta	1140
ggaggttctg gagccatggt tgtttgtttg gtcattttca gttccgttgg tgtcaagtct	1200
ctttatgaga acggtaagga tgatccatcc aaaccagcag gtaacgcat gattgtcttc	1260
acctgtctgt tcattttctt ctttgcattg acctgggctc cagggtgttt cgtcgttgtg	1320
tctgaaacct acccacttag aattagatcc aagggtatgg ccacgctca aggttccaat	1380
tggctttggg gtttctcat tgccttcttc actccattta tctcaggtgc cattgatttc	1440
gcctacggtt acgtctttat gggatgtact ctgttcgcct tcttctttgt gtacttcttc	1500
gttctgaaa ccaagggtct gtcgttgaa gacgttgatg aagtctatga gaaccttacc	1560
ttcggaagag catatgcata cagccacacg attaaagaca agggcgccct ataa	1614

<210> 12

<211> 1032

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 12

atggccctat ctctaccta tcagggttac atatctacca ctggcgacgc gttgatcgtg	60
atccaggcag ctctaaataa ccatttgaat cttcttcccc gaagaccaag agaaagagag	120
cgagatgggc taatacgatc aggtaacgta tttgtttttg tcgagcaacg gtctcatatc	180
aaacgatgga ccgatgggat cccctgggtct ccatctagag tccttggaaa gttcttgttg	240
tatcggggaa tggacaagga tacccecaaa aactcgcaaa gtgacgaaga tactgaggag	300
gggagaaaga ggcgaaagac ttctgtggat gtaaccgatc caaataccag gcagtgtgtg	360
ggatcattgg tgacttccta tgacttcaaa gaggatggac ttattaaaaa aacactctcc	420
ttgactttcc agaccgtgac taatgaagaa agggaaacag tgcacttgat tagttattat	480
actccggaag atgtaacgaa ccatcgtttg aacaggccgt ctgacaatcc atatctggcc	540
aatatcactg tttcagagtc attattgact gccttgagag agagtlacct tggaggaaga	600
gcaacgtctg atgacgagct ttcttttagtc agaagtaact cgttagagta ccaagaggta	660
ccaatgaaca tatctatgtc tttaccttta tcaactccac tttccttgaa cacaggagta	720
aactcaacta cccagctgca acagcaacaa ctacaacaac aacaacagca acagcaacag	780
cagcagcaac aacagcagca acaacagcaa ccggtagcat cccttccaaa atttgatgga	840
tcctttctat tacaacaggg tgtaattcca gtctctcatt tcatggacca aaaaatggga	900
agtagcaatt cgtggattaa caattggttt cgtccaaatt cgtcagaatc aaatgggcta	960
tcggttatcg gacctacaa gggatatgac gaacaaagtc cagcaacgag ttatactttg	1020
aatgaacgtt ga	1032

<210> 13

<211> 491

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 13

cttttttgta gaaatgtctt ggtgtcctcg tccaatcagg tagccatctc tgaaatatct	60
ggctccgttg caactccgaa cgacctgctg gcaacgtaaa attctccggg gtaaaactta	120
aatgtggagt aatggaacca gaaacgtctc ttcccttctc tctccttcca ccgccgtta	180
ccgtccctag gaaattttac tctgtctggag agcttcttct acggccccct tgcagcaatg	240
ctcttcccag cattacgttg cgggtaaaaac ggaggtcgtg tacccgacct agcagcccag	300

ggatggaaaa gtcccgccg tcgctggcaa taatagcggg cggacgcatg tcatgagatt 360
attggaaacc accagaatcg aatataaaag gcgaacacct ttccaattt tggtttctcc 420
tgacccaaag actttaaat taatttattt gtccctattt caatcaattg aacaactatc 480
acctgcaggc c 491

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 14
gatagggcc caaacatttg ctccccctag tctc 34
<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 15
gatacctgca ggaagggtgg aattttaagg atcttttat 39
<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 16
gatagggcc cagcaatcca gtaacctttt ctgaat 36
<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Primer
<400> 17
gatacctgca gggtgagttc aataaattgt ccggga 36
<210> 18
<211> 35

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 18

gatagggcc tggactgttc aatttgaagt cgatg 35

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 19

gatacctgca ggggataaag gtaaggga aaagcaa 37

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 20

gatagggcc agaccagcag tttactacg caaatc 36

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 21

gatacctgca ggcttttctt tgggcaagga aaaatc 36

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer

<400> 22

gatagggcc aattgattaa gttcagtga atttcaaac 39

<210> 23
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 23
 gatacctgca ggattatatt atggggaata 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
 gatacctgca ggtttttaga agaggagagaa cttagattgg 40
 <210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 26
 cctgaggett tgttcacccc atct 24
 <210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 27

ggaacatagt agtaccaccg gacataacga 30

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213>

artificial

<220><223> Primer

<400> 28

tcgccgacca 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 tgttccaccc atct 24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<220>

><223> Primer

<400> 31

ggaacatagt agtaccaccg gacataacga 30

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer
 <400> 32
 aaacctagga aaagtgggca 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
 gataggggccc caaacatttg ctccccctag tctc 34
 <210> 35
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 35
 gataggggccc ggaatctgta ttgtagaaa gaacgagag 39
 <210> 36
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 36
 gataggggccc ccatattcag taggtgtttc 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 gaccccgttt tcgtgacaaa tt 32

<210> 39
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 39
 gatagggccc ccggataaga gaattttggt tgattat 37

<210> 40
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Primer
 <400> 40
 gatagggccc gcctgctcca tatttttccg g 31

<210> 41
 <211> 859

<212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> promoter variant
 <400> 41
 ggaatctgta ttgttagaaa gaacgagagt tttttacggc gccgccatat tgggccgtgt 60
 gaaaacagct tgaaacccca ctactttcaa aggttctgtt gctatacacg aaccatgttt 120

aaccaacctc gcttttgact tgactgaagt catcggttaa caatcaagta ccctagtctg	180
tctgaatgct cctttccata ttcagtaggt gtttcttgca cttttgcatg cactgcggaa	240
gaattagcca atagcgcgtt tcatatgcgc ttttaccccc tcttttgtca agcgcaaaat	300
gcctgtaaga ttigtgtggg gtgtgagccg ttagctgaag tacaacaggc taattccctg	360
aaaaaactgc agatagactt caagatctca gggattccca ctatttggtt ttctgatatg	420
tttttcctga tatgcatcaa aactetaatc taaaacctga atctccgcta tttttttttt	480
ttttttgatg accccgtttt cgtgacaaat taatttccaa cggggtcttg tccggataag	540
agaattttgt ttgattatcc gttcggataa atggacgcct gctccatatt tttccggtta	600
ttaccccacc tggaagtgcc cagaattttc cggggattac ggataatacg gtggtctgga	660
ttaattaata cgccaagtct tacattttgt tgcaagtctg tgcgagtatg tgcaataata	720
aacaagatga gccaatttat tggattagtt gcagcttgac ccgccatag ctaggcatag	780
ccaagtgcta tgggtgttag atgatgcact tggatgcagt gagttttgga gtataaaaga	840
tccttaaaat tccaccctt	859
<210> 42	
<211> 664	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> promoter variant	
<400> 42	
ccatattcag taggtgtttc ttgcactttt gcatgcactg cggaagaatt agccaatagc	60
gcgtttcata tgcgctttta cccctctttt tgtcaagcgc aaaatgcctg taagatttgg	120
tgggggtgtg agccgttagc tgaagtacaa caggctaatt ccctgaaaaa actgcagata	180
gacttcaaga tctcagggat tcccactatt tggatattctg atatgttttt cctgatatgc	240
atcaaaaactc taatctaaaa cctgaatctc cgctattttt tttttttttt tgatgacccc	300
gttttcgtga caaattaatt tccaacgggg tcttgtccgg ataagagaat ttgtttgat	360
tatccgttcg gataaatgga cgctgtctcc atatttttcc gggtattacc ccacctggaa	420
tgcccagaa ttttcggggg attacggata atacggtggt ctggattaat taatacgcca	480
agtcctacat ttgtttgcag tctctgtcga gtatgtgcaa taataaaca gatgagccaa	540
tttattggat tagttgcagc ttgacccgc catagctagg catagccaag tgctatgggt	600
gtagatgat gcacttggat gcagtgagtt ttggagtata aaagatcctt aaaattccac	660
cctt	664

<210> 43

<211> 493

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 43

```
ctgcagatag acttcaagat ctcagggatt ccactatatt ggtattctga tatgtttttc 60
ctgatatgca tcaaaactct aatctaaaac ctgaatctcc gctatTTTTT tttttttttt 120
gatgaccccg ttttcgtgac aaattaattt ccaacggggt cttgtccgga taagagaatt 180
ttgtttgatt atccgttcgg ataaatggac gcctgctcca ttttttccg gttattaccc 240
cacctggaag tgcccagaat tttccgggga ttacggataa tacggtggtc tggattaatt 300

aatacgccaa gtcttacatt ttgttcgagt ctgctgcgag tatgtgcaat aataaacaag 360
atgagccaat ttattggatt agttgcagct tgaccccgcc atagctagcc atagccaagt 420
gctatgggtg ttagatgatg cacttggatg cagtgagttt tggagtataa aagatcctta 480
aaattccacc ctt 493
```

<210> 44

<211> 370

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 44

```
gaccccgttt tcgtgacaaa ttaatttcca acggggtctt gtccggataa gagaattttg 60
tttgattatc cgttcgataa aatggacgcc tgcctcatat ttttccggtt attacccac 120

ctggaagtgc ccagaatttt ccggggatta cggataatac ggtggtctgg attaattaat 180
acgccaagtc ttacattttg ttgcagtctc gtgcgagtat gtgcaataat aaacaagatg 240
agccaattta ttggattagt tgcagcttga ccccgccata gctaggcata gccaaagtgc 300
atgggtgtta gatgatgcac ttggatgcag tgagttttgg agtataaaaag atccttaaaa 360
ttccaccctt 370
```

<210> 45

<211> 328

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 45

```
ccggataaga gaatTTTgtt tgattatccg ttcggataaa tggacgcctg ctccatattt    60

ttccggttat taccccaact ggaagtgcc agaattttcc ggggattacg gataatacgg    120
tggtctggat taattaatac gccaagtctt acattttgtt gcagtctcgt gcgagtatgt    180
gcaataataa acaagatgag ccaatttatt ggattagtgt cagcttgacc ccgcatagc    240
taggcatagc caagtgtat ggggtgttaga tgatgcactt ggatgcagtg agttttggag    300
tataaaagat ccttaaaatt ccaccctt    328
```

<210> 46

<211> 283

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> promoter variant

<400> 46

```
gcctgtccca tatTTTccg gttattacc cacctggaag tgcccagaat ttccgggga    60

ttacggataa tacggtggtc tggattaatt aatacgcaa gtcttacatt ttgttcagt    120
ctcgtgcgag tatgtgcaat aataaacaag atgagccaat ttattggatt agttgcagct    180
tgaccccgcc atagctagc atagccaagt gctatgggtg ttagatgatg cacttggatg    240
cagtgagttt tggagtataa aagatcctta aaattccacc ctt    283
```