



등록특허 10-2373954



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월14일
(11) 등록번호 10-2373954
(24) 등록일자 2022년03월08일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
C12N 15/67 (2006.01) *C07K 14/39* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)
C07K 14/39 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7032074

(22) 출원일자(국제) 2015년04월16일
심사청구일자 2020년03월23일

(85) 번역문제출일자 2016년11월17일

(65) 공개번호 10-2017-0002453

(43) 공개일자 2017년01월06일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/058242

(87) 국제공개번호 WO 2015/158808
국제공개일자 2015년10월22일

(30) 우선권주장
14165186.9 2014년04월17일
유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자
베링거 인겔하임 에르체파우 게엠베하 운트 코 카
게
오스트리아 빈 아-1121 독토르 베링거-가제 5-11
빌리도젠 게엠베하
오스트리아 그람바흐 파르크링 18 (우: 8074)
론자 리미티드
스위스 3930 비스프 론자슈트라쎄

(72) 발명자
가세르, 브리기테
오스트리아 에이-1050 빈 젠타가쎄 34/16
마타노비흐, 디트하르트
오스트리아 에이-1120 빈 이그나즈가쎄 7/3
부세티스, 마르쿠스
오스트리아 에이-1120 빈 제노가쎄 12/10

(74) 대리인
특허법이다나

(56) 선행기술조사문현
KR101472273 B1
KR1020120134116 A*
WO2009027539 A1
WO2010012424 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 보조 담백질을 과발현하도록 조작된 재조합 숙주세포

(57) 요약

본 발명은 재조합 생명공학, 특히 단백질 발현 분야의 기술이다. 본 발명은 대략적으로 숙주세포로부터 목적 단백질 (protein of interest(POI))을 발현시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 목적 단백질을 발현 및/ 또는 분비할 수 있는 숙주세포의 능력을 향상시키는 것 및 단백질 발현을 위한 숙주세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세포 배양 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 식료품 또는 의약적 목적의 분자를 생산하기 위하여 세포를 배양시키는 것에 관한 것이다.

대표 도 - 도 1a

(52) CPC특허분류

C12P 21/00 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포로서,

상기 숙주세포는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를
과발현하도록 조작되어 있고,

상기 보조 단백질은 목적 단백질의 수율을 증가시키는 것인, 숙주세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 보조 단백질은 조작하기 전의 숙주세포에 비해 모델 단백질 SDZ-Fab(서열번호 25 및 26)
또는 HyHEL-Fab(서열번호 29 및 30)의 수율을 증가시키는 것인, 숙주세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는, 상기 숙주세포의 유전체에 삽입되어(integrated)
있거나, 벡터 또는 플라스미드에 함유되어 있는, 숙주세포.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 과발현은, (i) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는
재조합 프로모터를 이용하거나 (ii) 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 변형시켜
달성되는 것인, 숙주세포.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 숙주세포는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 한세눌라 폴리모르파
(*Hansenula polymorpha*), 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*),
피키아 메탄올리카(*Pichia methanolica*), 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*), 코마가타엘라(*Komagataella*),
또는 스키조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*)인, 숙주세포.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 1
개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 그 이상의 추가 보조 단백질을 추가로 과발현하는, 숙주세포.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 숙주세포는, 서열번호 10, 11 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백
질을 암호화하는, 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작되어 있는, 숙주세포.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 목적 단백질을 암호화하는 이종 (heterologous) 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 숙주세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 목적 단백질은 효소, 치료 단백질, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제, 또는 항체 또는 항체 단편인, 숙주세포.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 숙주세포는

- (i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하고, 추가적으로 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하거나, 또는
- (ii) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하고, 추가적으로 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작된, 숙주세포.

청구항 11

제1항에 따른 숙주세포를 포함하는 목적 단백질 제조용 조성물.

청구항 12

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현시키는 것을 포함하고,

상기 보조 단백질은 목적 단백질의 수율을 증가시키는 것인, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 인비트로 (*in vitro*) 방법.

청구항 13

- 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 상기 보조 단백질은 목적 단백질의 수율을 증가시키는 것이고;
- 상기 숙주세포가 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 조작하고; 및
- 보조 단백질 및 목적 단백질을 과발현하도록 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 인비트로 방법.

청구항 14

- 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 상기 보조 단백질은 목적 단백질의 수율을 증가시키는 것이고, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하며; 및
- 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서

목적 단백질을 제조하는 인 비트로 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 방법은 세포 배양물로부터 목적 단백질을 분리하는 것을 추가로 포함하는, 인 비트로 방법.

청구항 16

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주세포는 서열번호 10, 11, 또는 12로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작되는 것인, 인 비트로 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 재조합 생명공학, 특히 단백질 발현 분야의 기술이다. 본 발명은 대략적으로 숙주세포로부터 목적 단백질 (protein of interest(POI))을 발현시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 목적 단백질을 발현 및/ 또는 분비할 수 있는 숙주세포의 능력을 향상시키는 것 및 단백질 발현을 위한 숙주세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세포 배양 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 식료품 또는 의약적 목적의 분자를 생산하기 위하여 세포를 배양시키는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

목적 단백질(POI)의 성공적인 생산은 원핵세포 및 진핵세포 숙주 모두로부터 이루어져 왔다. 가장 널리 알려진 숙주의 예로는 *Escherichia Coli*와 같은 세균, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* 또는 *Hansensula polymorpha*와 같은 효모, *Aspergillus awamori* 또는 *Trichoderma reesei*와 같은 곰팡이, 또는 CHO 세포와 같은 포유류 세포가 있다. 몇몇 단백질의 수율은 손쉽게 높은 수준에 도달할 수 있었던 반면, 그 밖의 많은 단백질들은 상대적으로 낮은 수준으로 생산되었다.

[0003]

재조합 단백질의 분비를 향상시키기 위하여, 하나의 전략은 단백질의 접힘 및 프로세싱에 관련된 숙주의 분비 기전을 표적으로 하는 것이다.

[0004]

이종 단백질의 수율을 증가시키기 위한 수단으로서, 단백질 이황화물 이성질화효소(PDI)를 암호화하는 cDNA 및 이종 이황화-결합 단백질을 암호화하는 cDNA의 동시 발현이 WO 93/25676에서 최초로 제안되었다. WO 93/25676은 안티스타신(antistasin) 및 진드기 항응고 단백질의 재조합 발현은 PDI와의 동시 발현에 의해 증가될 수 있음을 보고하였다.

[0005]

WO 94/08012는 예를 들어, KAR2/Bip, 또는 PDI 샤파론 단백질과 같은 Hsp70 샤파론 단백질의 발현을 증가시켜 과발현된 단백질의 분비를 증가시키는 방법을 제공하였다.

[0006]

WO 05/0617818 및 WO 06/067511은 2 μm-Based 발현 플라스미드를 이용하여 효소에서 목적하는 이종 단백질의 생산방법을 제공하였다. 이는 하나 또는 그 이상의 샤파론 단백질(들)과 이종 단백질의 유전자를 동일한 플라스미드 상에 동시 발현시킨 경우, 이종 단백질의 수율이 현저하게 증가됨을 입증하였다.

[0007]

WO 2008/128701 A2는 BMH1, BFR2, COG6, COY1, CUP5, IMH1, KIN2, SEC31, SSA4 및 SSE1 단백질 중 하나를 이용하여 진핵 세포로부터 POI의 분비를 증가시키는 발현 시스템을 기술하였다.

[0008]

단백질 생산을 증가시키기 위한 다른 접근법은 비접힘 단백질 반응 (UPR)을 활성화하는 전사인자인 HAC1의 과발현에 기초한다. 전사적 분석은 330개 이상의 유전자들이 HAC1에 의해 조절됨을 밝혀냈고, 이를 대다수는 분비 또는 분비 소기관의 발생과 관련되어 있었다. WO 01/72783은 비접힘 단백질 반응 (UPR)의 유도에 의한 진핵 세포로부터 분비되는 이종 단백질의 양을 증가시키는 방법을 기술하였으며, 상기 UPR은 HAC1, PTC2, 및 IRE1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 동시 발현에 의해 조절된다.

[0009]

Wentz et al.은 적절한 선택압의 적용에 의해 분비가 증진된 균주를 동정하기 위하여 *Saccharomyces*

cerevisiae 효모의 표면 발현된 유전자 라이브러리를 이용하였다. 효모 cDNA인 CCW12, SED1, CWP2, RPP0는 온도 의존적으로 scTCR의 표면발현을 향상시킴을 확인할 수 있었다. ERO1은 20°C에서 유도시킬 때, 단백질 분비를 향상시켰다(Wentz et al., Appl. Environ. Microbiol. (2007) 73(4):1189-1198).

[0010] Liu et al.(Biotechnol. Prog. (2006), 22:1090-1095)은 피카아 파스토리스에서 Kar2의 동시-과발현은 rhG-CSF의 발현을 5.6배 증가시킴을 보여주었다. KAR2와 Sec63, PDI1 및 YDJ1의 조합은 2.8, 6.7 및 5.94 배의 증가를 이끌었다. Blatt et al에 의해 실시된 실험에서, KAR2 (BiP)의 동시-과발현은 피카아 파스토리스에서 A33scFv 발현을 2배 증가시켰다. KAR2와 PDI1의 조합은 긍정적인 KAR2의 효과를 거의 없앴다(Blatt et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 74:381-389).

[0011] Guerfall et al.은 피카아 파스토리스에서 내인성 HAC1 과발현의 효과를 조사하였다. 또한, HAC1은 항시적 및 유도적으로 과발현되었다. 모든 경우에서, 유도된 UPR의 결과로서 증가된 KAR2 발현이 확인되었다. HAC1의 유도적 방법의 과발현은 4번 중 1번의 단백질 분비 증가와, 4번 중 3번의 단백질 분비 감소를 이끌었던 반면, 전장 HAC1의 항시적 과발현은 미약하거나 효과가 전혀 없었다 (Guerfall et al., Microbial Cell Factories, (2010), 9:49).

[0012] Sleep et al.에서 LHS-1의 동시-과발현은 rHA의 농도를 증가시킴을 보여주었다. LH1은 SIL1, JEM1 및 SCJ1과 조합되었으나, 농도는 JEM1만 동시-과발현시킨 경우에 비해 낮았다. 동일한 시점에서 SIL1, LHS1 및 JEM1의 동시-과발현은 배양 배지에 의존하여, GM-CSF 발현은 1.45배 증가시켰고, rHA 발현은 약 1.1 및 2배 증가시켰다 (Sleep et al. Applied and Environmental Microbiology, (2008) 74(24):7759-7766).

[0013] US 2009221030 A1은 트리코더마 레세이에서, 다양한 보조 단백질, 그 중에서도, BIP1의 과발현, 단독 및 다른 보조 단백질 그 중에서도 LHS1과의 조합을 기술하였다. BIP1 단독은 가장 높은 발현량을 얻었으며, 반면 BIP1과 LHS1의 조합은 8% 더 낮은 분비 단백질의 농도로 이어졌다.

[0014] US 8,440,456은 피카아 파스토리스의 유전체 서열을 제공하였으며, 신호 단백질, 샤페론 및 프로모터를 암호화하는 염기서열을 개시하였다. 이는 상기 염기서열과 14개 fml 샤페론들을 과발현시킬 수 있는 유전적으로 조작된 효모를 포함하는 발현 벡터를 개시하였다. 특히, ROT1, SHR3 및 SIL1은 실험을 위해 선별되었으나, SIL1의 발현은 관찰되지 않았고, ROT 또는 SHR3의 과발현은 이종 단백질의 분비를 현저하게 향상시키는데 실패하였다.

[0015] 숙주세포에서 단백질의 높은 수율은 접힘, 이황화 결합의 형성, 당화, 세포 내 수송, 또는 세포로부터의 유리와 같은 하나 또는 그 이상 각각의 단계에서 제한될 수 있다. 숙주 유기체의 전체 유전체 DNA 서열을 이용할 수 있을지도, 이와 관련된 수많은 기작들은 여전히 완벽하게 이해되지 못하고 있고, 현재 최신의 기술 지식에 기초 하여서도 예측될 수 없다.

[0016] 숙주세포의 목적 단백질 생산 및/또는 분비할 수 있는 능력을 향상시키는 방법에 대한 지속적인 필요가 있었다. 본 발명에 따른 어느 하나의 목적은 간이하고 효율적이며, 산업상으로 적합하게 이용할 수 있는, 숙주세포에서 재조합 단백질의 수율을 증가시키는 새로운 방법을 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 이러한 목적을 달성할 수 있는 숙주세포를 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 이러한 숙주세포를 제공하는데 이용될 수 있는 신규한 보조 단백질 및 상기 보조 단백질을 암호화하는 서열을 동정(identify)하는 것이다.

[0017] 본 발명에서 사용된 단수 형태, "한(a)", "한(an)" 및 "그(the)"는 문맥상 명백히 다르게 명시하지 않는 한 복수 형태를 포함함을 주지해야 한다. 따라서, 예를 들어, "숙주세포 (a host cell)" 또는 "방법 (a method)"은 하나 또는 그 이상의 숙주세포 또는 방법을 각각 포함하고, "그 방법(the method)"은 여기에서 기술된 그 방법으로부터 변형 또는 치환될 수 있는 것으로 업계에서 통상의 기술자에게 알려진 동등한 단계 및 방법을 포함한다. 이와 유사하게, "방법들 (methods)" 또는 숙주세포들 (host cells)"은 "숙주세포 (a host cell)" 또는 방법 (a method)를 각각 포함한다.

[0018] 달리 명시하지 않으면, 일련의 요소들의 앞에 오는 용어 "적어도"는 일련의 매 요소를 지칭하는 것으로 이해된다. 당업자는 더 이상의 통상적 실험을 하지 않고도 여기에서 기술된 본 발명의 구현예에 대한 많은 균등물들을 인지하거나 알아낼 수 있을 것이다. 이와 같은 균등물들은 본 발명에 포함되는 것으로 본다.

[0019] 용어 "및/또는"은 어디에서 사용되는지에 관계없이 "및", "또는" 및 "상기" 용어에 연결되는 모든 요소 또는 요소들의 다른 어떤 조합"의 의미를 포함한다. 예를 들어, A, B, 및/또는 C는 A, B, C, A+B, A+C, B+C, 및 A+B+C를 의미한다.

[0020] 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 ±20% 이내, 바람직하게는 ±10% 이내, 더욱 바람직하게는 ±

5% 이내를 의미한다. 그 지정된 숫자도 포함한다. 예를 들면 약 20은 20을 포함한다.

[0021] 용어 "이하" 또는 "이상"은 지정된 숫자를 포함한다. 예를 들어, 20 이하는 20보다 적거나 같음을 의미하고, 20 이상은 20보다 많거나 같음을 의미한다.

[0022] 이하 본 발명의 명세서와 청구범위에 달리 명시가 없다면, 용어 "포함하다(comprise, comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 다른 용어는 정해진 정수(integers) 또는 단계 또는 정수 그룹 또는 단계들뿐 아니라, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 그룹 또는 단계들도 포함함을 내재하고 있는 것으로 이해되어야 할 것이다. 본 발명에서 사용된 용어 "포함하는(comprising)"은 "함유하는(containing)" 또는 "포함하는(including)"으로 치환되어 사용될 수 있거나 때때로 용어 "가진(having)"으로 사용될 수 있다. 본 발명에서 "로 구성된(consisting of)"이 사용되는 경우, 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 제외한다. 본 발명에서 "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이 사용되는 경우, 실질적으로 청구항의 기본적이고 신규한 특성에 영향을 주지 않는 물질 또는 단계를 배제하지 않는다. 본 발명에서 각각의 경우에, 용어 "포함하는(comprising)", "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)" 및 "구성되는(consisting of)" 중 어느 하나는 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에서 기술된 대표적인 구현예에서, 본 명세서는 본 발명의 방법 및/또는 과정을 특정 단계의 배열로 나타낼 수 있다. 그러나 상기 방법 또는 과정의 범위는 하기 기술된 특정 단계의 순서에 의존하는 것은 아니고, 상기 방법 또는 순서는 특정 단계의 배열에 한정되는 것은 아니다. 당업계의 일반적인 기술로 평가된 바와 같이, 단계의 다른 배열도 가능할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기술된 특정 단계의 순서는 청구범위의 제한으로서 구축된 것이 아니다. 추가적으로, 본 발명의 방법 및/또는 과정에 관한 청구범위에 기재된 순서는 이들 단계의 수행을 제한하는 것은 아니며, 당업계의 일반적인 기술은 본 발명의 사상 및 범위를 여전히 유지하면서, 손쉽게 이들의 배열을 변형시킬 수 있도록 평가할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 특히 본 발명에 기술된 방법론, 프로토콜, 재료, 시약 및 물질 등에 제한되지 않고 달라질 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위한 것이며, 청구항에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0025] 본 명세서의 전반에 걸쳐 인용된 모든 출판물 및 특허문헌(모든 특허 문헌, 특히 출원, 과학 출판물, 제조업체의 사양, 설명서 등)은 본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된다. 본 명세서의 어떠한 기재도 선행 발명에 의해 본 발명이 그러한 공개보다 선행할 자격이 없다고 인정하는 것으로 해석될 수 없다. 참조로 인용된 자료가 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 한도 내에서, 본 명세서가 이러한 자료를 대체할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 본 발명은 폴리뉴클레오티드 서열 ("본 발명의 폴리뉴클레오티드")의 발현, 바람직하게 과발현은 목적 단백질(POI)의 수율 증가로 이어진다는 놀라운 발견에 기초하였다. 본 발명은 숙주세포를 조작하여 목적 단백질의 수율을 향상시킴에 유용한 방법 및 물질을 제공하며, 이들은 새롭게 동정된 하나 또는 그 이상의 보조 단백질들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 과발현하도록 한다.

[0027] 용어 "수율"은 본 발명에서 기술된 POI 또는 모델 단백질(들)의 양을 나타내며, 특히 SDZ-Fab (서열번호 25 및 26) 및 HyHEL-Fab (서열번호 29 및 30) 각각, 이들은, 예를 들어, 조작된 숙주세포로부터 수득되고, 증가된 수율은 상기 숙주세포의 증가된 POI의 생산 또는 분비의 양에 기인할 수 있다. 수율은 mg POI/g 숙주세포의 바이오매스 (세포 건조 중량 또는 세포 함수 중량으로 측정)로 나타낼 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "농도"는 생산된 POI 또는 모델 단백질의 양과 유사한 의미를 나타내며, mg POI/L 배양물의 상청액으로 나타낼 수 있다. 수율의 증가는 조작되기 전의 숙주세포, 예를 들어, 비-조작된 숙주세포로부터 얻은 수율과 조작된 숙주세포로부터 얻은 수율을 비교하여 확인될 수 있다.

[0028] 바람직하게, 본 발명에서 기술된 모델 단백질에 대한 문단에서 사용된 "수율"은 실시예 5c에 기술된 바와 같이 확인된다. 따라서, 본 발명에서 기술된 모델 단백질에 대한 문단에서 사용된 "수율"은 또한 "Fab 수율" 또는 "Fab 농도"를 나타낸다. Fab 농도는 mg/L로, Fab 수율은 mg/g 바이오매스(세포 건조 중량 또는 세포 함수 중량으로 측정)로 주어진다.

[0029] 간략하게, 모델 단백질 HyHEL-Fab 및 SDZ-Fab를 발현하는 피키아 파스토리스 균주 CBS7435mut^s pPM2d_pAOX

HyHEL 및/또는 CBS7435mut^s pPM2d_pAOX SDZ (이들의 제조는 실시예 1 참고) 각각은 본 발명에서 기술된 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 조작되었다. 동시-과발현을 위해, 보조 단백질을 암호화하는 상기 유전자는 피카아 파스토리스 GAP 프로모터의 조절 하에서 복제되었고, 실시예 4에서 기술된 바와 같이 Fab를 생산하는 균주로 형질전환되었다. 저발현을 위해, Fab를 생산하는 균주의 유전체에서 K0 표적을 암호화하는 유전자 또는 이의 기능적 상동체는 넉아웃 (Knocked out)되었다 (실시예 6 참고), 조작된 세포는 10g/L 글리세롤 및 50µg/ml 지오신(Zeocin)을 함유하는 YP-배지에서 25°C로 밤새도록 배양되었다 (실시예 5a 참고). 이러한 배양물의 부분표본 (2.0의 최종 OD₆₀₀에 상응)은 20g/L 포도당 및 포도당 정제를 함유하는 합성 M2 배지로 옮겨지고 (실시예 5a에 기술), 25°C에서 25시간 동안 인큐베이션되었다. 배양물은 세척되고 합성 M2 배지에서 재부유되었으며, 이의 부분표본 (4.0의 최종 OD₆₀₀에 상응)은 5g/L 메탄올이 첨가된 합성 M2 배지로 옮겨졌다. 메탄올(5g/L)은 12시간마다 3번씩 첨가되었다. 48시간 후, 원심분리에 의해 세포를 수득하였다. 바이오 매스는 1mL 세포 혼탁액으로부터 유래한 세포 펠릿의 중량을 측정하여 확인되었다. 상청액은 각각 ELISA를 통해 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab를 정량화하는데 이용되었다. 특히, 항-인간 IgG 항체 (예를 들어, ab7497 Abcam)는 코팅 항체로 이용되었고, 예를 들어, 염소 항-인간 항-인간 IgG (Fab 특이적) 항체 (예를 들어, Sigma A8542, 알칼라인 포스파타제가 결합됨)는 검출 항체로 이용되었다. 상용화된 인간 Fab/Kappa, IgG 단편은 시험 표준으로서, 100ng/ml의 시작 농도로 이용되었고, 결과적으로, 상청액 샘플은 회색되었다. 수율의 증가는 폴리펩티드를 과발현하도록 세포를 조작하기 전 및 후, 목적 단백질 수율의 비교에 기초하여 확인될 수 있다. 본 실시예에서 보여주고 있는, 모델 단백질 SDZ-Fab 및/또는 HyHEL-Fab 관련 표준 시험은 수율의 차이를 확인하는데 이용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0030]

첫 번째 양태로서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 새롭게 발견된 보조 단백질 및 상기 단백질 또는 단백질들의 POI 수율 증가를 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명은, 이에 제한되는 것은 아니나, HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, 또는 HP10 또는 이들의 기능적 상동체들에 기초한다. 기능적 상동체의 의미는 본 출원의 후단에 정의된다. 보조 단백질 HP1 내지 HP9의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 내지 9 및 162에 목록화되어 있다. 본 발명에서 기술된 바와 같이, 이러한 단백질들은 본 발명에서 단수 또는 복수의 형태로서, 상호 교환적으로 나타낼 수 있고, 명시적으로 달리 언급하지 않는 한, 단수 형태로 이해되어야 한다.

[0031]

본 발명은 추가적으로 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 (이하에서 "본 발명의 폴리뉴클레오티드", 또는 "본 발명의 폴리뉴클레오티드들"로 나타냄) 및 상기 폴리뉴클레오티드 각각 또는 조합의 목적 단백질의 수율을 증가시키기 위한 용도에 관한 것이다. 상기 폴리뉴클레오티드(들)은 숙주세포에 도입될 수 있고, 또는 만일 상기 세포에 이미 존재하는 경우, 이를 과발현시키는 방법으로 조작될 수 있다. 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162 또는 이들의 기능적 상동체 중 어느 하나를 암호화한다. 상기 폴리뉴클레오티드의 예시로는 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 163으로 명시된다.

[0032]

본 발명은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 또는 서열번호 163을 포함하거나, 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어지는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하고, 선택적으로, 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 이종인 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 또한, 본 발명은 서열번호 1-9 또는 162 중 어느 하나를 포함하는 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 2를 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 3을 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 4를 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 5를 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 6을 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 7을 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 8을 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 9를 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의

기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 162를 포함하는 폴리펩티드 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 몇몇의 구현예에서, 본 발명은 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 163으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[0033] 보다 바람직하게, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 또는 서열번호 163과 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0034] 본 발명은 염색체, 또는 플라스미드, 미니-플라스미드, YAC, BAC, 코스미드, 또는 이 밖의 벡터 등으로 숙주세포에 삽입하기 위한 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열의 용도를 제공한다. 상기 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 형질전환 또는 형질주입을 통하여 도입될 수 있다. 추가적으로, 본 발명은 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하기 위한 폴리뉴클레오티드 서열의 용도를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 분리된 서열번호 1-9 또는 162 중 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 1의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 2의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 3의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 4의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 5의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 6의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 7의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 8의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 9의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 서열번호 162의 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 또는 이의 기능적 상동체를 제공한다. 추가적인 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열의 분리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0036] 두 번째 양태로서, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0037] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0038] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 2

로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0039] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0040] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0041] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0042] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0043] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

[0044] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.

- [0045] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.
- [0046] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는다.
- [0047] 바람직한 구현예로서, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포 내 모델 단백질 SDZ-Fab (서열번호 25의 중쇄 및 서열번호 26의 경쇄; 도 2) 또는 HyHEL-Fab (서열번호 29의 중쇄 및 서열번호 30의 경쇄; 도 2)의 수율은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다. 조작되기 전의 숙주세포는 본 발명의 보조 단백질을 과발현하지 않고, 조작 후에는 적합한 배양 조건 하에서 보조 단백질을 과발현할 수 있다. 놀랍게도, 실시예에 기술된 예시적인 재조합 숙주세포는 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 수율을 적어도 20% (1.2배) 증가시킬 수 있었다. 몇몇의 예로서, 실시예 7에 나타낸 바와 같이, 상기 수율은 140% 가량 증가되었다.
- [0048] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.
- [0049] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 2와 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.
- [0050] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 3과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.
- [0051] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 4와 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델

단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0052]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 5와 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0053]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 6과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0054]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 7과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0055]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 8과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0056]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 9과 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0057]

바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 162와 적어도 30% 서열 상동성을 갖고, 상기 보조 단백질을 과발현하도록 조작되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 보조 단백질이 과발현된 경우, 숙주세포에서 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 생산은 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 적어도 200% 증가할 수 있다.

[0058]

세 번째 양태로서, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 조작된 숙주세포의 용도를 제공한다. 상기 숙주세포는 하나 또는 그 이상의 POI(s)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위하여 유리하게 사용될 수 있고, 이후, POI를 발현하기 위한 적합한 조건 하에서 배양될 수 있다.

- [0059] 네 번째 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는다.
- [0060] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0061] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 2와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0062] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 3과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0063] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 4와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0064] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 5와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0065] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 6과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0066] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 7과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0067] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를

암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 8과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.

[0068] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 9와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.

[0069] 바람직하게, 상기 방법은 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 162와 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다.

[0070] 다섯 번째 양태로서, 본 발명은,

[0071] - 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것이며;

[0072] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0073] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0074] 단백질의 수율을 증진시키는 방법의 문단에서, "조작하는 단계" 및 "재조합하는 단계"의 순서는 "재조합하는 단계"가 "조작하는 단계"보다 앞서듯이 선택적으로 바뀔 수 있다. 특히, 본 발명에서 기술한 바와 같이, 목적 단백질의 수율은 보조 단백질이 과발현되거나 및/또는 KO 단백질이 저발현될 때, 증가된다.

[0075] 바람직하게, 본 발명은,

[0076] - 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

[0077] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0078] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0079] 바람직하게, 본 발명은,

[0080] - 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

- [0081] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및
- [0082] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0083] 바람직하게, 본 발명은,
- [0084] - 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,
- [0085] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및
- [0086] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0087] 바람직하게, 본 발명은,
- [0088] - 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,
- [0089] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및
- [0090] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0091] 바람직하게, 본 발명은,
- [0092] - 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,
- [0093] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및
- [0094] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0095] 바람직하게, 본 발명은,
- [0096] - 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,
- [0097] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및
- [0098] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0099] 바람직하게, 본 발명은,

[0100] - 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

[0101] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0102] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0103] 바람직하게, 본 발명은,

[0104] - 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

[0105] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0106] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0107] 바람직하게, 본 발명은,

[0108] - 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

[0109] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0110] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0111] 바람직하게, 본 발명은,

[0112] - 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며,

[0113] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고; 및

[0114] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0115] 여섯 번째 양태로서, 본 발명은,

[0116] - 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된 숙주세포를 제공하고, 여기에서 상기 기능

적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것이며;

[0117] - 보조 단백질을 과발현하고, 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0118] 바람직하게, 본 발명은,

[0119] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

[0120] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0121] 바람직하게, 본 발명은,

[0122] 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

[0123] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0124] 바람직하게, 본 발명은,

[0125] 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

[0126] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0127] 바람직하게, 본 발명은,

[0128] 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

[0129] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0130] 바람직하게, 본 발명은,

- [0131] 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
- [0132] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0133] 바람직하게, 본 발명은,
- [0134] 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
- [0135] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0136] 바람직하게, 본 발명은,
- [0137] 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
- [0138] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0139] 바람직하게, 본 발명은,
- [0140] 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
- [0141] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0142] 바람직하게, 본 발명은,
- [0143] 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

리뉴클레오티드를 포함하고;

[0144] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0145] 바람직하게, 본 발명은,

[0146] 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 숙주세포를 조작하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 여기에서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하고;

[0147] - 보조 단백질을 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는, 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0148] 1) 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포로서, 상기 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것인, 숙주세포.

[0149] 2) 상기 1 항목의 숙주세포로서, 바람직하게 상기 보조 단백질 또는 기능적 상동체가 과발현된 경우, 조작하기 전의 숙주세포에 비해 모델 단백질 SDZ-Fab(서열번호 25 및 26) 및/또는 HyHEL-Fab(서열번호 29 및 30)의 수율을 적어도 20% 증가시키는 것인, 숙주세포.

[0150] 3) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 과발현은 보조 단백질 또는 기능적 상동체를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드의 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 복제물을 상기 숙주세포 내 갖음으로써 달성되는 것인, 숙주세포.

[0151] 4) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 숙주세포의 유전체에 삽입되는, 숙주세포.

[0152] 5) 상기 4 항목의 숙주세포로서, 상기 삽입은 이소성(ectopically) 및/또는 정상 유전자자리 내인, 숙주세포.

[0153] 6) 상기 5 항목의 숙주세포로서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 유전체의 AOX1, GAP, ENO1, TEF, HIS4, TYR1, HIS3, LEU2, URA3, LYS2, ADE2, TRP1, GAL1, 또는 ADH1 유전자자리에 삽입되는, 숙주세포.

[0154] 7) 상기 1,2, 또는 3 항목의 숙주세포로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 벡터 또는 플라스미드 내에 함유되는, 숙주세포.

[0155] 8) 상기 7 항목의 숙주세포로서, 상기 벡터는 YIp형 벡터, YEplid형 벡터, YRp형 벡터, YCp형 벡터, pGPD-2, pAO815, pGAPZ, pGAPZ α, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, pPICZ, pPICZ α, pPIC3K, pHWO10, pPUZZLE, 또는 2 μm 플라스미드인, 숙주세포.

[0156] 9) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 과발현은 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 재조합 프로모터를 이용하여 달성되는, 숙주세포.

[0157] 10) 상기 9 항목의 숙주세포로서, 상기 프로모터는 PAOX1, PTPI, PPGK, PGAPDH, PLAC, PGAL, PPGI, PGAP, PTEF, PEN01, PTPI, PRPS2, PRPS7, PRPS31, PRPL1, PFLD, PICL, PTHI, PSSA1, PHSP90, PKAR2, PGND1, PGPM1, PTKL1, PPIS1, PFET3, PFTR1, PPHO8, PNMT1, PMCM1, PUBI4, PRAD2, PPET9, PFMD, PGAL1, PADH1, PADH2/GAP, PCUP1, 또는 PMAL인, 숙주세포.

[0158] 11) 상기 9 항목의 숙주세포로서, 상기 폴리뉴클레오티드의 과발현은 프로모터 활성을 향상시키는 인핸서를 이용하여 달성되는 것인, 숙주세포.

- [0159] 12) 상기 11 항목의 숙주세포로서, 상기 인핸서는 효모 상위활성 서열(yeast upstream activation sequence) UAS/GAL인, 숙주세포.
- [0160] 13) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 숙주세포는 피키아 파스토리, 한세눌라 폴리모르파, 트리코더마 래세이, 사카로마이세스 세레비지애, 클루이베로마이세스 락티스, 야로위아 리포리티카, 피키아 메탄올리카, 캔디다 보이디니이, 및 코마가타엘라, 및 스키조사카로마이세스 품베인, 숙주세포.
- [0161] 14) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로부터 선택된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 그 이상의 보조 단백질들 또는 이의 기능적 상동체들이 과발현된, 숙주세포.
- [0162] 15) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 숙주세포는 서열번호 10, 11, 또는 12로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 단백질을 암호화하는, 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작된, 숙주세포.
- [0163] 16) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주세포.
- [0164] 17) 상기 16 항목의 숙주세포로서, 상기 목적 단백질은 효소, 치료 단백질, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제, 바람직하게, 해독 효소인, 숙주세포.
- [0165] 18) 상기 17 항목의 숙주세포로서, 상기 치료 단백질은 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 숙주세포.
- [0166] 19) 앞선 항목들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 과발현은 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 변형시켜 달성되는, 숙주세포.
- [0167] 20) 앞선 청구항들 중 어느 하나의 숙주세포로서, 상기 숙주세포는,
- [0168] (i) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체, 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하거나,
- [0169] (ii) 서열번호 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체, 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하거나,
- [0170] (iii) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체, 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하고, 추가적으로 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하거나, 또는
- [0171] (iv) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체, 또는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하고, 추가적으로 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작된, 숙주세포.
- [0172] 21) 목적 단백질을 제조하기 위한 전술한 항목 중 어느 하나의 숙주세포의 용도.
- [0173] 22) 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법으로서, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현시키는 것을 포함하고, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것인, 방법.
- [0174] 23) 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증진시키는 방법으로서,
- [0175] - 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된 숙주세포를 제공하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것이며;
- [0176] - 상기 숙주세포에서 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 재조합하고;

- [0177] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체 및 목적 단백질을 과발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하고; 및 선택적으로,
- [0178] - 상기 세포 배양물로부터 목적 단백질을 분리하는 것을 포함하는, 방법.
- [0179] 24) 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법으로서,
- [0180] - 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된 숙주세포를 제공하고, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%의 서열 상동성을 갖는 것이며, 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하며;
- [0181] - 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 과발현하고 목적 단백질을 발현하도록 적합한 조건 하에서 상기 숙주세포를 배양하고; 및 선택적으로,
- [0182] - 상기 세포 배양물로부터 목적 단백질을 분리하는 것을 포함하는, 방법.
- [0183] 25) 상기 22-24 항목들 중 어느 한 항의 방법으로서, 여기서 상기 숙주세포는 서열번호 10, 11, 및/또는 12로 나타내는 아미노산 서열과 적어도 50% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작되는 것인, 방법.
- [0184] 26) 상기 25 항목의 방법으로서, 상기 저발현은,
- [0185] a) 프로모터 또는 서열번호 10, 11 및/또는 12의 다른 유전자-조절 서열을 변형하거나, 및/또는
- [0186] b) 서열번호 10, 11, 및/또는 12의 암호화 서열을 변형시켜 상기 서열번호에 의해 암호화된 단백질의 생체(in vivo) 반감기/안정성을 감소시키는 것에 의해 달성되는 것인, 방법.
- [0187] 27) 상기 22-25 항목들 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 과발현은 보조 단백질 또는 기능적 상동체를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드의 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 복제물을 상기 숙주세포 내 갖음으로써 달성되는 것인, 방법.
- [0188] 28) 상기 22-26 항목들 중 어느 한 항의 방법으로서, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 숙주세포의 유전체에 삽입되는, 방법
- [0189] 29) 상기 28 항목의 방법으로서, 상기 삽입은 이소성(ectopically) 및/또는 정상 유전자자리 내인, 방법.
- [0190] 30) 상기 28 항목의 방법으로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 유전체의 AOX1, GAP, ENO1, TEF, HIS4, TYR1, HIS3, LEU2, URA3, LYS2, ADE2, TRP1, GAL1, 또는 ADH1 유전자자리에 삽입되는, 방법.
- [0191] 31) 상기 22-27 항목들 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 벡터 또는 플라스미드 내에 함유되어 있는, 방법.
- [0192] 32) 상기 31 항목의 방법으로서, 상기 벡터는 YIp형 벡터, YEplac型 벡터, YRp형 벡터, YCp형 벡터, pGPD-2, pA0815, pGAPZ, pGAPZ α, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, pPICZ, pPICZ α, pPIC3K, pHW010, pPUZZLE, 또는 2 μm 플라스미드인, 방법.
- [0193] 33) 상기 22 내지 32 항목들 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 과발현은 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 재조합 프로모터를 이용하여 달성되는, 방법.
- [0194] 34) 상기 33 항목의 방법으로서, 상기 프로모터는 PAOX1, PTPI, PPGK, PGAPDH, PLAC, PGAL, PPGI, PGAP, PTEF, PEN01, PTPI, PRPS2, PRPS7, PRPS31, PRPL1, PFLD, PICL, PTHI, PSSA1, PHSP90, PKAR2, PGND1, PGPM1, PTKL1, PPIS1, PFET3, PFTR1, PPH08, PNMT1, PMCM1, PUB14, PRAD2, PPET9, PFMD, PGAL1, PADH1, PADH2/GAP, PCUP1, 또는 PMAL인, 방법.
- [0195] 35) 상기 33 항목의 방법으로서, 상기 폴리뉴클레오티드의 과발현은 프로모터 활성을 향상시키는 인핸서를 이용하여 달성되는 것인, 방법.
- [0196] 36) 상기 35 항목의 방법으로서, 상기 인핸서는 효모 상위활성 서열(yeast upstream activation sequence) UAS/GAL인, 방법.
- [0197] 37) 상기 22 내지 36 항목들 중 어느 한 항의 방법으로서, 상기 숙주세포는 피키아 파스토리, 한세놀라 폴리모

르파, 트리코더마 레세이, 사카로마이세스 세레비지애, 클루이베로마이세스 락티스, 야로위아 리포리티카, 피키아 메탄올리카, 캔디다 보이디니이, 및 코마가타엘라, 및 스키조사카로마이세스 폼베인, 방법

- [0198] 38) 상기 22 내지 37 항목들 중 어느 한 항의 방법으로서, 상기 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로부터 선택된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 그 이상의 보조 단백질들 또는 이의 기능적 상동체들이 과발현된, 방법.
- [0199] 39) 상기 22 내지 38 항목들 중 어느 한 하나의 방법으로서, 상기 목적 단백질은 효소, 치료 단백질, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제, 바람직하게, 해독 효소인, 방법
- [0200] 40) 상기 39 항목의 방법으로서, 상기 치료 단백질은 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 방법.
- [0201] 41) 상기 22 내지 40 항목 중 어느 하나의 방법으로서, 바람직하게 상기 보조 단백질 또는 기능적 상동체가 과발현된 경우, 조작하기 전의 숙주세포에 비해 모델 단백질 SDZ-Fab 및/또는 HyHEL-Fab의 수율을 적어도 20% 증가시키는 것인, 방법.
- [0202] 42) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열로서, 여기에서 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는, 폴리뉴클레오티드 서열.
- [0203] 43) 상기 42 항목의 분리된 폴리뉴클레오티드 서열로서, 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 163 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 100% 서열 상동성을 갖는, 폴리뉴클레오티드 서열.
- [0204] 44) 숙주세포 내 삽입을 위한 상기 42 또는 43 항목에 따른 분리된 폴리뉴클레오티드 서열의 용도
- [0205] 45) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 30% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.
- [0206] 46) 목적 단백질을 제조하기 위한 상기 45 항목에 따른 분리된 폴리펩티드의 용도.
- [0207] 47) 목적 단백질을 제조하기 위한 상기 42 또는 43 항목에 따른 폴리뉴클레오티드의 용도.
- [0208] 48) 숙주세포를 제조하기 위한 상기 42 또는 43 항목에 따른 폴리뉴클레오티드의 용도.
- [0209] 49) 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%의 목적 단백질 및 상기 42 또는 43 항목에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 이종 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 조성물.

도면의 간단한 설명

- [0210] 도 1은 HP1, HP2, HP 3, HP 4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, HP10, K01, K02 및 K03의 아미노산 서열 및 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
도 2는 모델 단백질 SDZ-Fab 및 HyHEL-Fab의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 및 폴리뉴클레오티드 서열을 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0211] 본 발명은 목적 단백질의 분비를 증가시키는 보조 단백질 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9 및 HP10의 발현에 대한 놀라운 발견에 기초하였다. 상기 각 보조 단백질의 아미노산 서열 및 이들에 상응하는 실시예에서의 명칭은 하기 표 1에 목록화되었다.

[0212]

[표 1]

보조 단백질 (HP) 및 선택적인 명칭 ('xx')	명칭 (<i>S. cerevisiae</i> 로 추정되는 유사체)	아미노산 서열 (서열번호)	폴리뉴클레오티드 (서열번호)	실시예에서의 명칭 (표 7 참조)
HP1 ('56')		서열번호 4	서열번호 16	PP7435_Chr3-0607
HP2 ('2')		서열번호 1	서열번호 13	PP7435_Chr3-0933
HP3 ('3')	SBH1	서열번호 2	서열번호 14	PP7435_Chr2-0220
HP4 ('27')	CPR6	서열번호 3	서열번호 15	PP7435_Chr3-0639
HP5 ('4')	MXR2	서열번호 5	서열번호 17	PP7435_Chr4-0108
HP6 ('54')	MDR1	서열번호 7	서열번호 19	PP7435_Chr1-1225
HP7 ('55')		서열번호 8	서열번호 20	PP7435_Chr1-0667
HP8 ('40')	-	서열번호 6	서열번호 18	PP7435_Chr1-1232
HP9 ('60')	-	서열번호 9	서열번호 21	PP7435_Chr4-0448
HP10 ('34')	SEC61	서열번호 162	서열번호 163	PP7435_Chr1-0204

[0213]

[0214]

특히, 피키아 파스토리스 내 분비 보조 인자를 스크리닝하기 위하여, 동정된 55개 후보 유전자를 대상으로 실험동(wet lab) 발현 실험을 통해 검증하여 주요 후보 유전자를 선정하였다. 주요 후보 유전자는 하기 기술된 바와 같이 조작하기 전의 숙주세포, 예를 들어, 상기 주요 후보 유전자를 과발현하지 않는 피키아 파스토리아스 균주에 비해 하기 기술된 바와 같이 두 모델 단백질 SDZ-Fab#9 및/또는 HyHEL-Fab#8의 수율을 20% 또는 그 이상 향상시키는 유전자였다. 결국, 상기 55개의 유전자 중에서 9개의 주요 후보 유전자들이 동정되었다. 4개의 주요 후보 유전자들, 예를 들어, PP7435_Chr3-0607, PP7435_Chr3-0933, PP7435_Chr2-0220 (SBH1), PP7435_Chr3-0639 (CPR6)는 두 모델 단백질 SDZ-Fab 및 HyHEL Fab 모두에 대하여 20% 이상의 분비 및/또는 발현 향상을 보였다. 추가 5개의 후보 유전자들 (PP7435_Chr4-0108 (MXR2), PP7435_Chr1-1232, PP7435_Chr1-1225 (MDR1), PP7435_Chr1-0667, PP7435_Chr4-0448)은 각각 이들이 과발현되었을 때, 두 모델 단백질 SDZ-Fab 및 HyHEL Fab 중 하나에 대하여 >20-30% 분비 수율 향상을 보였다.

[0215]

한편, 3개의 추가 후보 유전자들, 예를 들어, K01 (FL08), K02 (HCH1), K03 (SCJ1)가 동정 되었고, 예를 들어, 분비 및/또는 발현을 향상시키기 위하여 이들을 네-아웃시킴으로써 발현을 저해하거나 바람직하게 없앤 경우, deltaK01은 두 모델 단백질들의 수율을 향상시켰고, deltaK02 및 deltaK03은 HyHEL-Fab의 수율을 향상시켰다.

[0216]

상기 스크리닝의 기초는 피키아 파스토리스 생산 균주 및 피키아 파스토리스 비생산 균주의 전사인자 프로파일 간 직접 비교였으며, 그 결과, 55개의 유전자를 동정하였다. 이들 유전자들은 다양한 대사 기전과 관련된 것이며, 다른 기능을 갖거나 알려지지 않은 기능을 가지고 있다. 따라서, 상기 유전자 또는 이로부터 암호화된 단백질로부터 상기 획득한 보조 인자의 특성에 대한 뚜렷한 정보는 알 수는 없었다. 따라서, 실제 조건 하에서, 잠재적인 분비 보조 인자가 실제로 보조 인자인지 여부를 검증하기 위한 시험을 수행하여야 하였다. 그러나, 단지 상기 유전자들은 생산 균주에서 향상된 전사인자 발현에 의해 동정되었기 때문에, 잠재적인 보조 인자가 실제 보조 인자일지는 확실하지 않았다. 실제, 잠재적 보조 인자는 단백질 분비에 대한 아무런 긍정적 효과가 없을 수 있으며, 심지어 부정적 영향을 지닐 수도 있다. 이러한 점은 본 발명자들에 의해 실제 관찰되었으며, 55개의 유전자들 중 동정된 샤페론을 암호화하는, 분비를 향상시킬 것으로 일용 예측되는 두 유전자(SCJ1, HCH1)는 이와 반대되는 결과를 보였다. 따라서, 각 유전자에 대한 시험을 필요로 하였고, 약 60개의 유전자 중 하나에 의해 암호화되면서, 실제 분비 보조 인자인 단백질에 대한 어떠한 정보도 존재하지 않았다.

[0217]

이러한 이유로, "실제" 분비 보조 인자인 유전자를 발견하는 것은 간단한 문제가 아니며, 즉, 이용 가능한 어떠한 정보도 없는 상태에서 단지 스크리닝에서의 유전자/단백질 서열 또는 동정된 단백질의 기능으로부터 이를 발견하는 것은 본 발명자들에 의한 독창적인 선택을 필요로 한다.

[0218]

또한 과발현된 상기 주요 후보 유전자들의 특징적인 점은 하기 기술한 바와 같다- 이들은 일반적인 분비 보조 단백질이 아니며, 예를 들어, 단백질 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지지 않은 기능을 갖거나, 기능이 알려지지 않은 단백질을 암호화하는 유전자이다.

[0219]

넉-아웃되는 유전자와 관련하여-샤페론 (K02, K03) 유래 유전자는 과발현이 이로울 것으로 예상되어왔으나, 실제, 긍정적인 효과를 지니는 것은 결실이었다. K01은 뺑 효모에서 응집시키는 역할을 하는바, 상기 K01의 결실이 단백질 분비를 향상시킨다는 점은 예상할 수 없었다. 뺑 효모에서 응집은 이배체인 뺑 효모가 균사형으로

(filamentously) 성장하거나, 반수체인 세포가 침습적인 성장하는 현상으로서, 이들 세포가 응집한다. 그러나 숙련된 기술자도 응집 유전자의 넉-아웃이 단백질 분비를 증진시킨다고 추정할 수 없다.

[0220] 본 발명에서 사용되는 "보조 단백질"은 목적 단백질의 수율을 향상시키는 단백질을 의미한다. 상기 용어는 넓게 이해될 수 있고, 샤페론 또는 샤페론 유사 단백질로 제한되는 것은 아니다. 본 발명으로부터 명백히 개시하고 있는 바와 같이, 본 발명의 목적 단백질은 이들의 기능이 다양하다. 본 발명의 보조 단백질은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 상동체를 포함한다. 상기 목적 단백질은 또한 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 보조 단백질은 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 또는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9의 기능적 상동체 각각을 암호화하는 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21의 변이체 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다. 상기 보조 단백질은 또한 서열번호 163 또는 서열번호 162의 기능적 상동체를 암호화하는 서열번호 163의 변이체의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다. 본 발명의 목적상, 용어 "보조 단백질"은 각각 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, 및 HP10의 기능적 상동체를 역시 포함하는 것으로 의미된다. 예를 들어, 보조 단백질 HP1은 서열번호 4를 암호화하는 아미노산 서열 또는 서열번호 4를 암호화하는 서열의 기능적 상동체를 포함한다. 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는다.

[0221] 본 발명에서 사용되는 용어, 폴리펩티드의 "상동체" 또는 "기능적 상동체"는 이들의 일차, 이차, 삼차 구조에서 상응하는 위치에 동일하거나 보존되는 잔기를 갖는 폴리펩티드를 의미하는 것일 수 있다. 상기 용어는 상동체 폴리펩티드를 암호화하는 둘 또는 그 이상의 뉴클레오티드로 확장될 수도 있다. 특히, 본 발명의 보조 단백질에 대한 폴리펩티드 상동체는 본연의 전장 서열 또는 이들의 어떤 단편에 관하여 적어도 30%의 아미노산 서열 상동성을 갖는다. 바람직하게, 상동성 폴리펩티드는 본연의 복합체(compound) 또는 전장 복합체의 구체적으로 한정된 어느 하나의 단편과 적어도 35% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 40% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 45% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 50% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 55% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 60% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 65% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 70% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 75% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 80% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 85% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 적어도 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 아미노산 서열 상동성과 같이 적어도 90% 아미노산 서열 상동성, 보다 바람직하게 95% 아미노산 서열 상동성을 갖는다. 보조 단백질로서의 기능이 이러한 상동체로 증명된 경우, 상기 상동체는 "기능적 상동체"로 명명된다. 기능적 상동체는 상기 보조 단백질로서 동일하거나 실질적으로 동일한 기능, 예를 들어, 본 발명에서 기술한 바와 같이, 모델 단백질 SDZ-Fab 및/또는 HyHEL-Fab의 수율을 증가시키는 기능을 수행한다. 상기 기능은 당업계에서 알려진 어세이 또는 바람직하게 실시예 7에 기술한 모델 단백질을 이용한 어세이, 또는 실시예 5c, 특히, "Fab 농도" 또는 "Fab 수율"의 문단에서 기술한 방법에 의해 테스트될 수 있다. 상기 본 발명에 의해 제공되는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162 또는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162의 기능적 상동체를 암호화한다.

[0222] 일반적으로, 상동체는 당업계의 어느 돌연변이 생성 과정, 예를 들어 부위 특이적 돌연변이 생성, 합성 유전자 컨스트럭션, 반-합성 유전자 컨스트럭션, 우발적 돌연변이 생성, 혼성(shuffling) 등을 이용하여 제조될 수 있다. 부위 특이적 돌연변이 생성은 모체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에서 하나 또는 그 이상의 정해진 부위에 하나 또는 그 이상 (예를 들어, 다수)의 돌연변이가 도입되는 기술이다. 부위 특이적 돌연변이 생성은 목적하는 돌연변이를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 PCR에 의해 *in vitro* 상에서 이루어질 수 있다. 부위 특이적 돌연변이 생성은 모체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 내 부위에서 제한효소를 통해 절단하고, 뒤이어 폴리뉴클레오티드 내 돌연변이를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 접합하는 것을 포함하는 카세트 돌연변이 생성에 의해 *in vitro* 상에서 수행될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드를 자르는 제한효소와 상기 올리고뉴클레오티드는 동일한 것이며, 이는 플라스미드의 점착성 말단 및 서로간 연결에 의한 삽입을 가능하게 한다. 예를 들어, Scherer and Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; and Barton et al, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966을 참조하라. 부위 특이적 돌연변이 생성은 기술적으로 알려진 방법, 예를 들어, 미국 특허 공개번호 2004/0171 154; Storici et al, 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al, 1998, Nat. Med. 4: 285-290; and Calissano and Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16에 의해 *in vivo* 상에서 이루어질 수 있다. 합성 유전자 컨스트럭션은 목적 폴리펩티드를 암호화하기 위하여, 설계된 폴리뉴클레오티드 문자의 *in vitro* 상 합성을 수반한다. 유전자 합성은 Tian et al.

(2004, *Nature* 432: 1050–1054)에 기술된 멀티플렉스 마이크로칩-기반 기술, 및 이와 유사한 기술과 같이 수많은 기술을 이용하여 수행될 수 있고, 상기 올리고뉴클레오티드는 빛에 의해 작동되는 미세유체 칩에 의해 합성되고 조립된다. 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입이 이루어질 수 있고, 돌연변이 생성, 재조합, 및/또는 혼성의 알려진 방법을 이용하여 테스트될 수 있으며, Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241:53–57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152–2156; WO 95/17413; 또는 WO 95/22625에 개시된 관련 스크리닝 과정이 뒤어어 진행될 수 있다. 이용될 수 있는 다른 방법으로 실수 유발 PCR, 파지 디스플레이 (예를 들어, et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832–10837; 미국 특허번호. 5,223,409; WO 92/06204) 지역(region) 특이적 돌연변이 생성 (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7:127)을 포함한다. 돌연변이 생성/혼성 방법은 대용량 처리 기술, 숙주세포에 의해 발현되는 복제되고 돌연변이된 폴리펩티드의 활성을 검출하기 위한 자동화된 스크리닝 방법(Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893–896)과 결합될 수 있다. 활성화 폴리펩티드를 암호화하는 돌연변이된 DNA 문자는 숙주세포로부터 정상으로 회복될 수 있고, 당업계의 표준화 방법을 이용하여 빠르게 시퀀싱할 수 있다. 이러한 방법은 폴리펩티드 내 개개의 아미노산 잔기에 대한 중요성을 빠르게 확인 가능하게 한다. 반-합성 유전자 컨스트럭션은 합성 유전자 컨스트럭션 및/또는 부위 특이적 돌연변이 생성, 및/또는 임의돌연변이 생성, 및/또는 혼성의 조합에 의해 이루어진다. 반합성 컨스트럭션은 PCR 기술과 조합하여, 합성되는 폴리뉴클레오티드 단편을 활용하는 과정이 특징적이다. 따라서, 유전자의 정해진 지역은 새롭게 합성되는 반면, 이외 다른 지역은 부위-특이적 돌연변이 생성 프라이머를 이용하여 증폭될 수 있고, 이외 다른 지역은 실수 유발 PCR 또는 비-실수 유발 PCR 증폭이 실시될 수 있다. 뒤이은 폴리뉴클레오티드는 혼성이 실시될 수 있다. 선택적으로, 상동체들은 미생물과 가깝게 또는 멀리 관련된 cDNA 라이브러리 스크리닝에 의해 천연 시료로부터 얻어질 수 있다.

[0223]

서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162의 상동체의 기능은 상동체 서열이 삽입된 카세트를 발현시키며, 실시예에서 이용된 모델 단백질 또는 특정 POI 중 어느 하나와 같이 시험 단백질을 암호화하는 서열로 숙주세포를 형질전환시키고, 및 확인된 조건 하에서 모델 단백질 또는 POI의 수율 차이를 확인하여 테스트되었다.

[0224]

기능적 상동체는 보조 단백질의 생물학적 활성 단편일 수 있다. 일반적으로, 단백질의 생물학적 활성 단편은 전장 단백질의 활성과 유사하거나 비교될 수 있는 생물학적 활성을 갖는 단편을 의미하는 것일 수 있다. 이러한 단편 또는 변이체는 예를 들어, 내부 결실뿐만 아니라 아미노- 및/또는 카르복시 말단 결실에 의해 생산될 수 있다.

[0225]

첫 번째 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162 또는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162의 기능적 상동체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 상기 분리된 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 163 중 어느 하나를 포함한다. 바람직하게, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 163 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0226]

추가적 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0227]

용어, "분리된"은 자연적으로 발생할 수 없는 형태 또는 조건의 물질을 의미한다. 분리된 물질의 비제한적 실시예는 (1) 비-자연적으로 발생한 어느 하나의 물질, (2) 어느 하나의 물질, 이에 제한되는 것은 아니나, 효소, 변이체, 핵산, 단백질, 웨პ티드, 보조인자를 포함하며, 이들은 특성과 관련되고 자연적으로 발생한 하나 또는 그 이상 또는 전부의 구성이 적어도 부분적으로 제거되어 있다; (3) 자연적으로 발견되는 물질과 비교하여 인간에 의해 변형된 어느 하나의 물질; 또는 (4) 자연적으로 관련된 다른 구성 (예를 들어, 숙주세포에서의 재조합 산물; 물질을 암호화하는 유전자의 다수 복제물; 및 물질을 암호화하는 유전자와 자연적으로 관련된 프로모터보다 보다 강력한 프로모터의 이용)에 의해 물질의 양을 증가시키도록 변형된 어느 하나의 물질을 포함한다.

[0228]

본 발명은 숙주세포로의 삽입을 위하여 앞에서 언급되었던 분리된 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나의 용도를 제공한다. 선택적으로, 숙주세포 내 상기 폴리뉴클레오티드가 이미 존재한다면, 숙주세포는 후술한 바와 같이 과발현되는 방식으로 조작될 수 있다. 또 다른 양태로서, 본 발명은 숙주세포로부터 목적 단백질의 수율 증가를 위한 상기 폴리펩티드의 용도에 관한 것으로, 상기 POI를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 상기 폴리뉴클레오티드와 동시 발현된다.

- [0229] "서열 상동성" 또는 "% 상동성"은 표준화된 알고리즘을 이용하여 정렬된 적어도 두 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 사이에 일치하는 잔기의 퍼센트를 나타낸다. 이러한 알고리즘은 두 서열간 정렬을 최적화하기 위하여 표준화, 및 재현할 수 있는 방식으로 비교되는 서열간 차이를 삽입할 수 있고, 따라서 보다 의미있는 상기 두 서열의 비교를 이를 수 있게 한다. 본 발명의 목적상, 두 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드간 서열 상동성은 NCBI BLAST program version 2.2.29 (Jan-06-2014) (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402)에 의해 결정된다. 두 아미노산 서열의 서열 상동성은 하기 파라미터의 blastp 세트에 의해 확인된다: Matrix: BLOSUM62, Word Size: 3; Expect value: 10; Gap cost: Existence = 11, Extension = 1; Filter = low complexity activated; Filter String: L; Compositional adjustments: 조건적인 구성적 스코어 메트릭스 조정. 본 발명의 목적상, 두 뉴클레오티드 서열간 서열 상동성은 하기 예시적인 파라미터에서 blastn 세트의 NCBI BLAST program version 2.2.29 (Jan-06-2014)를 이용하여 확인된다: Word Size: 11; Expect value: 10; Gap costs: Existence = 5, Extension = 2; Filter = low complexity activated; Match/Mismatch Scores: 2,-3; Filter String: L; m.
- [0230] 두 번째 양태로서, 본 발명은 본 발명의 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된 숙주세포를 제공한다. 상기 보조 단백질은 HP1 내지 HP9(서열번호 1-9) 및 HP10(서열번호 162), 각각, 또는 이들의 기능적 상동체 중 어느 하나를 포함한다.
- [0231] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과 30% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되어 있다.
- [0232] 용어 "폴리뉴클레오티드 발현"은 폴리뉴클레오티드가 mRNA로 전사되고, 상기 mRNA가 폴리펩티드로 번역되는 경우를 의미한다. 용어 "과발현하다"는 일반적으로, 관찰되는 발현 수준이 참고 표준에 비해 증가하거나 동일한 양인 경우를 나타낸다. 본 발명에서 용어 "과발현하다", "과발현하는", "과발현되는" 및 "과발현"은 유전자 산물 또는 폴리펩티드의 발현이 유전적 변형 전의 숙주세포 또는 유전적으로 변형되지 않은 비교 가능한 숙주세포의 동일한 유전자 산물 또는 폴리펩티드의 발현에 비해 높은 수준인 경우를 나타낸다. 만일 숙주세포가 주어진 유전자 산물을 포함하지 않는다면, 발현을 위하여 숙주세포 내로 상기 유전자 산물을 유도하는 것이 가능하다; 이 경우, 용어 "과발현"은 어느 검출 가능한 발현을 포함한다.
- [0233] 본 발명에서 사용되는, "조작된" 숙주세포는 유전자 조작, 예를 들어 인간의 개입을 이용하여 조작된 숙주세포이다. 숙주세포가 주어진 단백질을 "과발현하도록 조작된" 경우, 숙주세포는 목적 단백질, 또는 이의 기능적 상동체를 발현, 바람직하게 과발현하는 능력을 갖도록 조작되고, 이에 따라 조작 전의 동일한 조건 하에서의 숙주세포에 비해 주어진 단백질, 예를 들어 목적 단백질 또는 모델 단백질의 발현은 증가된다.
- [0234] 본 발명의 숙주세포의 문단에서 사용되는 "조작되기 전"은 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 조작되지 않은 숙주세포를 의미한다. 상기 용어는 또한 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하지 않는 숙주세포 또는 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작되지 않은 숙주세포를 의미한다.
- [0235] 본 발명에서 사용되는 용어 "재조합"은 본 발명의 숙주세포에 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드가 구비된, 예를 들어 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 조작되는 것을 의미한다. 상기 재조합은 예를 들어 형질전환 또는 형질주입 또는 숙주세포에 폴리뉴클레오티드를 도입할 수 있는 당업계에 알려진 어느 다른 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다.
- [0236] 과발현
- [0237] 과발현은 구체적으로 후술된 바와 같이 당업자에게 알려진 어느 기술로 달성될 수 있다. 일반적으로, 과발현은 유전자의 전사/번역 증가, 예를 들어 유전자 복제수 증가 또는 유전자 발현과 연관된 조절 서열 또는 부위의 변경 또는 변형을 통하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 과발현은 조절 서열 (예를 들어, 프로모터)과 작동가능하도록 연결된 목적 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드의 복제물을 도입하여 달성될 수 있다. 예를 들어 상기 유전자는 고발현 수준에 도달하기 위하여 항시적 고발현 프로모터 및/또는 강력한 유비퀴터스 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있을 수 있다. 이러한 프로모터는 내인성 프로모터 또는 재조합 프로모터일 수 있다. 선택적으로, 상기 프로모터는 발현이 항시적으로 이루어지고자 조절 서열이 제거될 수 있다. 어느 프로모터의 경우, 유전자 본연의 프로모터가 유전자의 발현 증가 및 유전자의 항시적 발현을 이끄는 이종 프로모터로 치환될 수 있다. 예를 들어, 보조 단백질은 동일한 조건에서 배양된 조작

되기 전의 숙주세포에 비해, 상기 숙주세포에 의해 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300% 이상 과발현될 수 있다. 추가적으로 유도성 프로모터의 사용은 숙주세포 배양 과정에서 발현 증가를 가능하게 한다. 또한 과발현은 예를 들어, 특정 유전자의 염색체 위치 변형, 특정 유전자, 예를 들어 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결 부위 부근의 핵산 서열 변경, 유전자의 번역 및/또는 유전자의 전사와 관련된 단백질(예를 들어, 조절 단백질, 억제자, 인핸서, 전사인자 활성자 등)의 변형, 또는 기술적으로 특정 유전자 발현을 저해하는 전통적인 다른 수단(이에 제한되는 것은 아니나, 안티센스 핵산 분자의 사용, 예를 들어 과발현되는 목적 유전자의 발현을 저해하는 전사 인자에 대한 유전자를 결실 또는 변이시키거나, 리프레서 단백질의 발현을 차단)에 의해 달성될 수 있다. mRNA의 수명을 연장시키는 것 또한 발현 수준을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 어떤 종결 지역은 mRNA의 반감기를 연장하는데 이용될 수 있다(Yamanishi et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2011) 75:2234 and US 2013/0244243). 만일 다수의 유전자 복제물이 포함되는 경우, 상기 유전자는 다양한 복제수의 플라스미드에 위치할 수 있거나 염색체에 도입되고 증폭될 수 있다. 만일 숙주세포가 보조 단백질을 암호화하는 유전자 산물을 포함하지 않는 경우, 상기 유전자 산물을 발현을 위해 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 이러한 경우, "과발현"은 당업자로부터 알려진 어느 방법을 이용하여 유전자 산물을 발현하는 것을 의미한다.

[0238]

이러한 당업자는 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), EP 0 472 869, US 4,601,893, Schwarzer and Puhler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001- 1007 (1993)), WO 96/15246, Malumbres et al. (Gene 134, 15- 24 (1993)), JP-A-10-229891, Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) 및 Makrides (Microbiological Reviews 60, 512-538 (1996)), 이 중에서도 유전자 및 분자 생물학에서 널리 알려져 있는 서적으로부터 관련 지침을 찾을 수 있다.

[0239]

보조 단백질

[0240]

본 발명의 보조 단백질은 본질적으로 피키아 파스토리스 CBS7435 균주로부터 분리된다. 메틸영양체 효모 피키아 파스토리스 (*Komagataella phaffii*) CBS7435는 일반적으로 이용되는 피키아 파스토리스 재조합 단백질 생산 숙주의 모 균주이다. 상기 숙주세포의 전체 유전자 서열은 Kuberl et al. (J Biotechnol. (2011) 154(4):312-20)에 기술된다. 본 발명에서 동정된 목적 단백질을 암호화하는 유전자는 단백질 수율에 미치는 이로운 효과와는 연관이 없는 것으로 알려져 왔다.

[0241]

다른 미생물에서도 상기 유전자들이 존재하는 바, 상기 보조 단백질은 넓은 범위의 숙주세포에서 과발현시킬 수 있을 것으로 추측할 수 있었다. 따라서 종 또는 속 본연의 서열을 이용하는 것을 대신하여, 상기 보조 단백질 서열은 다른 원핵 또는 진핵 유기체들로부터 수득 또는 유래될 수 있다. 상기 보조 단백질을 암호화하는 외부 DNA 서열은 다양한 시료, 예를 들어 식물, 곤충, 곰팡이 또는 포유류 종, 바람직하게 사카로미케스 강, 바람직하게 사카로미케스 목, 바람직하게 사카로미케스 과, 바람직하게 사카로미케스 종으로부터 수득될 수 있고, 바람직하게 코마가타엘라 속으로부터 수득될 수 있다.

[0242]

HP1-HP10

[0243]

특히, 본 발명은 보조 단백질 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, 또는 HP10 또는 이들의 조합 또는 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, 또는 HP10 또는 이들의 조합의 기능적 상동체를 과발현할 수 있는 유전적으로 변형된 숙주세포를 나타낸다. 이러한 조합을 반영하여 조작된 숙주세포는 바람직한 구현예에서 예상되어진다. 바람직하게 이러한 숙주세포는 본 발명에서 기술된 바와 같은 방법 및 용도에 적용된다. 조합은 2 또는 그 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상을 포함하고, 보조 단백질 또는 기능적 상동체는 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, HP10으로부터 선택된다.

[0244]

이와 같이, 조합은 HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP8, HP9, HP10 또는 이의 기능적 상동체로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 보조 단백질(들) 및 K01, K02, K03으로부터 선택되는 K0 단백질의 조합을 포함한다. 이러한 조합을 반영하여 조작된 숙주세포는 바람직한 구현예에서 예상되어 진다. 바람직하게 이러한 숙주세포는 본 발명에서 기술된 바와 같은 방법 및 용도에 적용된다. "반영된"은 당업자가 본 발명의 교시 사항에 따라 보조 단백질은 과발현시키는 반면, K0 단백질은 저발현시키는 것을 의미한다.

[0245]

그러나, 보조 단백질 HP3 (서열번호 2) 또는 이의 기능적 상동체 및 HP1 (서열번호 4) 또는 이의 기능적

상동체, 또는 보조 단백질 HP10 (서열번호 162) 또는 이의 기능적 상동체 및 HP3 (서열번호 2) 또는 이의 기능적 상동체의 구체적인 조합은 본 발명의 방법과 용도에 바람직하게 적용될 수 있는 본 발명의 숙주세포의 바람직한 구현예이다.

[0246] 또한, 보조 단백질 HP2 (서열번호 1) 또는 이의 기능적 상동체 및 HP3 (서열번호 2) 또는 이의 기능적 상동체 및 K0 단백질 K01 (서열번호 10), 또는 보조 단백질 HP2 (서열번호 1) 또는 이의 기능적 상동체 및 HP1 (서열번호 4) 또는 이의 기능적 상동체 및 K0 단백질 K01 (서열번호 10)의 구체적인 조합은 본 발명의 방법과 용도에 바람직하게 적용될 수 있는 본 발명의 숙주세포의 바람직한 구현예이다.

[0247] 바람직하게, 본 발명은 목적 단백질을 제조하기 위한 재조합 숙주세포를 제공하며, 상기 숙주세포는 서열번호 1과 적어도 40% 서열 상동성, 서열번호 2와 적어도 45% 서열 상동성, 서열번호 3과 적어도 50% 서열 상동성, 서열번호 4와 적어도 45% 서열 상동성, 서열번호 5와 적어도 50% 서열 상동성, 서열번호 6과 적어도 45% 서열 상동성, 서열번호 7과 적어도 40% 서열 상동성, 서열번호 8과 적어도 40% 서열 상동성, 서열번호 9와 적어도 40% 서열 상동성 또는 서열번호 162와 적어도 45% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된다. 상기 숙주세포는 본 발명에서 기술한 방법 및 용도에 적용된다.

[0248] 목적 단백질

[0249] 본 발명에서 사용되는 용어 "목적 단백질 (POI)"은 숙주세포에서 재조합 기술에 의해 생산된 단백질을 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 단백질은 숙주세포에서 자연 발생되지 않은 폴리펩티드, 예를 들어 이종 단백질, 또는 숙주세포 본연의 폴리펩티드, 예를 들어 숙주세포에 대한 상동성 단백질일 수 있으며, 상기 단백질은 POI를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 자가-복제 벡터로 형질전환되거나, POI를 암호화하는 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 복제물을 재조합 기술에 의해 숙주세포의 유전체로 도입되거나, POI를 암호화하는 유전자의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 서열)을 재조합 변형시켜 생산될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에서 기술된 목적 단백질은 당업계에서 널리 알려진 재조합 발현의 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0250] 숙주세포

[0251] 본 발명에서 사용되는 "숙주세포"는 단백질의 발현 및 선택적으로 단백질의 분비를 할 수 있는 세포를 나타낸다. 이러한 숙주세포는 본 발명의 방법에 적용된다. 이러한 목적, 즉 숙주세포에서 폴리펩티드를 발현하기 위하여, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 세포에 존재하거나 도입된다. 본 발명에 따른 숙주세포는 원핵 또는 진핵세포일 수 있다. 당업계에서 평가되고 있는 바와 같이, 원핵세포는 핵 부근의 막 (핵막)이 부족한 반면, 진핵세포는 핵막을 가지고 있다. 진핵세포의 예시로서, 이에 제한되는 것은 아니라, 척추동물 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 동물 세포, 비척추동물 세포, 식물 세포, 선충류 세포, 곤충 세포, 줄기 세포, 곰팡이 세포, 효모 세포를 포함한다.

[0252] 효모 세포의 예로서, 이에 제한되는 것은 아니라, 사카로미케스 종 (예를 들어, 사카로미케스 세레비지애, 사카로미케스 클루이베리, 사카로미케스 우바름), 코마가타엘라 종 (코마가타엘라 파스토리스, 코마가타엘라 슈도파스토리스, 또는 코마가타엘라 파피), 클루이베로마이세스 종 (예를 들어, 클루이베로마이세스 락티스, 클루이베로마이세스 마르시아누스), 캔디다 종 (캔디다 유틸리스, 캔디사 카카오이), 지오토리쿰 종 (예를 들어, 지오토리쿰 퍼멘탄스) 뿐만 아니라 한세눌라 폴리모르파 및 야로위아 리포리티카를 포함한다.

[0253] 상기 피키아 종은 특히 흥미롭다. 피키아는 피키아 파스토리스, 피키아 메탄올리카, 피키아 클루이베리, 및 피키아 안구스타를 포함하는 수많은 종을 포함한다. 가장 바람직하게는 피키아 파스토리스이다.

[0254] 전술한 피키아 파스토리스는 다시 나뉘어지며, 코마가타엘라 파스토리스 및 코마가타엘라 파피로 다시 명명된다. 따라서 피키아 파스토리스는 코마가타엘라 파스토리스 및 코마가타엘라 파피 모두와 동일한 것을 의미한다.

[0255] 본 발명에서 유용한 피키아 파스토리스 균주의 예시로는 X33 및 이의 아형들 GS115, KM71, KM71H; CBS7435 (mut+) 및 이의 아형들 CBS7435 mut^s, CBS7435 mut^sΔArg, CBS7435 mut^sΔHis, CBS7435 mut^sΔArg, ΔHis, CBS7435 mut^s PDI⁺, CBS 704 (=NRRL Y-1603 = DSMZ 70382), CBS 2612 (=NRRL Y-7556), CBS 9173-9189 및 DSMZ 70877 뿐만 아니라 이들의 변이체들이 있다.

[0256] 에스체리키아 콜리의 예시로는 에스체리키아 콜리 K12 균주로부터 유래하는 것을 포함하며, 구체적으로, HMS

174, HMS174 (DE3), NM533, XL1-Blue, C600, DH1, HB101, JM109 뿐만 아니라, B-균주로부터 유래한 것, 구체적으로 BL-21, BL21 (DE3) 등을 포함한다.

[0257] 추가적인 바람직한 구현예에 따르면, 상기 숙주세포는 피키아 파스토리스, 한세눌라 폴리모르파, 트리코더마 레세이, 사카로마이세스 세레비지애, 클루이베로마이세스 락티스, 야로위아 리포리티카, 피키아 메탄올리카, 캔디다 보이디니이 및 코마가타엘라, 및 스키조사카로마이세스 품ベ이다. 상기 숙주세포는 또한 우스틸라고 마이디스 (*Ustilago maydis*) 유래일 수 있다.

[0258] 바람직하게, 상기 숙주세포에 의해 발현되는 보조 단백질은 동일한 세포로부터 유래하거나, 동일한 종, 속, 과의 세포로부터 재조합된다. 본 발명에서 사용되는 "재조합"은 인간 개입에 의한 유전적 물질의 변경을 나타낸다, 전형적으로, 재조합은 복제 및 재조합을 포함하는 분자 생물학적 (재조합 DNA 기술) 방법에 의해 바이러스, 세포, 플라스미드 또는 벡터 내 DNA 또는 RNA가 조작되는 것을 나타낸다. 재조합 세포, 폴리펩티드, 또는 핵산은 자연적으로 발생한 대응물 ("야생형")과 어떻게 상이한지 전형적으로 기술될 수 있다. "재조합 세포" 또는 "재조합 숙주세포"는 상기 세포의 본연의 것이 아닌 핵산 서열을 포함하도록 유전적으로 변경된 세포 또는 숙주세포를 나타낸다.

[0259] 본 발명에서 사용되는 용어 "제조하다" 또는 "제조하는"은 목적 단백질이 과발현되도록 하는 과정을 나타낸다. "목적 단백질을 제조하기 위한 숙주세포"는 목적 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 도입될 수 있는 숙주세포를 나타낸다. 본 발명에서 재조합 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함하는 것을 필요로 하지 않는다. 목적하는 뉴클레오티드 서열을 삽입하기 위한 숙주세포가 제공될 수 있는지는 예를 들어, 키트를 사용하여 당업자에 의해 평가되었다.

[0260] 본 발명에서 사용되는 용어 "뉴클레오티드 서열" 또는 "핵산 서열"은 DNA 또는 RNA를 나타낸다. "핵산 서열" 또는 "폴리뉴클레오티드 서열" 또는 간단히 "폴리뉴클레오티드"는 5'에서 3'으로 리딩되는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 염기의 단일 또는 이중-가닥 폴리머를 나타낸다. 이는 자가-복제 플라스미드, DNA 또는 RNA의 감염성 폴리머, 또는 비-기능적 DNA 또는 RNA를 포함한다.

[0261] 용어 "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산과 유사한 기능을 갖는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체를 나타낸다. 자연 발생 아미노산은 유전적 암호에 의해 암호화된 것으로서, 상기 아미노산은 이후에 예를 들어 하이드록시프롤린, Y-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린으로 변형될 수 있다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기초적 화학구조, 예를 들어, 수소, 카르복시기, 아미노기, 및, 호모세린, 노어루신, 메티오닌 셀록사이드, 메티오닌 메틸 셀포니움과 같은 R 기와 결합된 탄소를 갖는 화합물을 나타낸다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노어루신) 또는 변형된 웨პ티드 골격을 가지나, 자연 발생 아미노산과 같이 동일한 기초적 화학 구조를 지니고 있다. 아미노산 모사체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 차이가 있는 구조를 갖는 화학적 화합물이나, 자연 발생 아미노산과 유사한 기능을 지니고 있다.

[0262] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용된다. 용어 "폴리펩티드"는 둘 또는 그 이상의 아미노산, 전형적으로 적어도 3개, 바람직하게 적어도 20개, 보다 바람직하게 적어도 30개와 같이, 적어도 50개의 아미노산을 포함하는 단백질 또는 웨პ티드를 나타낸다. 따라서, 폴리펩티드는 아미노산 서열을 포함하고, 따라서, 때때로 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 "폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드"로 나타낸다. 따라서 본 발명의 용어 "폴리펩티드 서열"은 "아미노산 서열"과 상호 교환적으로 사용된다. 전술한 바와 같이, 과발현은 하나 또는 그 이상의 선택된 보조 단백질의 추가 복제물의 삽입에 의해 달성된다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포마다 단일 또는 다수 복제물로 존재할 수 있다. 상기 복제물은 서로간 인접하거나 멀리 떨어져 있을 수 있다. 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 목적 단백질을 암호화하는 재조합 뉴클레오타이드를 이용하여, 숙주세포의 유전체에 세포마다 단일 또는 다수의 복제물로 도입되는데 적합한 하나 또는 그 이상의 플라스미드를 제공한다.

[0263] 상기 복제물은 서로간 인접하거나 멀리 떨어져 있을 수 있다. 한 구현예에서, 과발현은 폴리뉴클레오티드의 하나 또는 다수의 복제물, 예를 들어, 숙주세포마다 상기 폴리뉴클레오티드의 2, 3, 4, 5, 6, 또는 그 이상의 복제물의 발현에 의해 달성될 수 있다. 바람직하게, 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 제공하는 전사적 및 번역적 조절 서열과 작동가능하게 연결된다. 본 발명에서 사용되는 용어 "전사적 조절 서열"은 유전자 핵산 서열과 관련이 있으며, 유전자의 전사를 조절하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 본 발명에서 사용되는 용어 "번역적 조절 서열"은 유전자 핵산 서열과 관련이 있으며, 유전자의 번역을 조절하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 전사적 및/또는 번역적 조절 서열은 플라스미드 또는 벡터 내 위치하거나, 숙주

세포의 염색체 내 삽입될 수 있다. 전사적 및/또는 번역적 조절 서열은 조절하는 서열의 동일한 핵산 분자에 위치된다. 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP1 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.

- [0264] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP2 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0265] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP3 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0266] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP4 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0267] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP5 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0268] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP6 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0269] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP7 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0270] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP8 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0271] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP8 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0272] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP9 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0273] 바람직하게, 과발현은 숙주세포마다 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 HP10 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 가짐으로써 달성될 수 있다.
- [0274] 상기 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 POI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게 숙주세포의 유전체에 삽입된다. 용어 "유전체"는 일반적으로 DNA (또는 특정 바이러스 종에서 RNA)에서 암호화된 유기체의 모든 유전적 정보를 나타낸다. 이는 염색체, 플라스미드 또는 벡터, 이를 둘 모두 내 존재할 수 있다. 바람직하게, 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 세포의 염색체 내 삽입될 수 있다.
- [0275] 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 이의 자연적인 유전자자리 내 삽입될 수 있다. "자연적인 유전자자리 (Natural locus)"는 특정 염색체 상 자리로서, 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 위치된다. 예를 들어, HP1 내지 10의 자연적인 유전자자는 표 1에 나타내었다. 그러나, 또 다른 구현예에서, 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포의 유전체 내 자연적 유전자자리가 아닌 이소성으로 삽입된다. 용어 "이소성 삽입"은 일반적인 염색체 유전자자리가 아닌 다른 부위에서 미생물의 유전체로 핵산이 삽입되는 것, 예를 들어 미리 결정되거나 우발적인 삽입을 나타낸다. 선택적으로, 상기 보조 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 자연적 유전자자리 및 이소성으로 삽입될 수 있다.
- [0276] 효모 세포에 있어서, 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바람직한 유전자자리, 예를 들어 AOX1, GAP, ENO1, TEF, HIS4 (Zamir et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA (1981) 78(6):3496-3500), HO (Voth et al. Nucleic Acids Res. 2001 June 15; 29(12): e59), TYR1 (Mirisola et al., Yeast 2007; 24: 761-766), His3, Leu2, Ura3 (Taxis et al., BioTechniques (2006) 40:73-78), Lys2, ADE2, TRP1, GAL1, ADH1 또는 5S 리보솜 RNA의 통합체 상에 삽입될 수 있다.
- [0277] 다른 구현예에서, 상기 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 POI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 또는 벡터에 삽입될 수 있다. 용어 "플라스미드" 및 "벡터"는 독자적으로 복제하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 유전체에 삽입한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 당업자는 사용되는 숙주세포에 의존하여 적합한 플라스미드 또는 벡터를 이용할 수 있다.

- [0278] 바람직하게, 플라스미드는 진핵세포 발현 벡터이며, 바람직하게 효모 발현 벡터이다.
- [0279] 플라스미드는 예를 들어, 재조합 유전자 및 적합한 숙주 유기체 내 이들 mRNA의 번역과 같이 복제된 재조합 뉴클레오티드 서열의 전사를 위해 사용될 수 있다. 또한 플라스미드는 J. Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)에 기술된 바와 같이, 당업계에 알려져 있는 기술에 의해 표적 폴리뉴클레오티드를 숙주세포로 삽입하는데 이용될 수도 있다. "플라스미드"는 일반적으로 숙주세포 내 독자적인 복제를 위한 개시점, 선택적 마커, 수많은 제한 효소 절개 부위, 적합한 프로모터 서열, 및 전사 종결인자를 포함하고, 상기 구성들은 함께 작동 가능하도록 연결되어 있다. 목적 단백질의 서열을 암호화하는 폴리펩티드는 숙주세포에서 폴리펩티드의 발현을 위한 전사 또는 번역 조절 서열이 작동 가능하게 연결되어 있다.
- [0280] 어느 핵산 분자가 또 하나의 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓여 있을 때, 상기 핵산은 "작동 가능하게 연결"되어 있는 것이다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 발현에 영향을 주는 경우, 프로모터는 재조합 유전자의 암호화 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것이다.
- [0281] 대부분의 플라스미드는 세균 세포마다 오직 하나의 복제물이 존재한다. 그러나, 몇몇의 플라스미드에서는 많은 복제 수가 존재한다. 예를 들어, 플라스미드 CoIE1은 전형적으로 에스체리키아 콜리 내 염색체마다 10 내지 20 플라스미드 복제물이 존재한다. 만일 본 발명의 뉴클레오티드 서열이 플라스미드 내 포함되어 있다면, 상기 플라스미드는 숙주세포마다 20-30, 30-100 또는 그 이상의 복제수를 갖는다. 플라스미드의 많은 복제수에 따라, 세포에 의한 보조 단백질들의 과발현이 가능하게 된다.
- [0282] 수많은 적합한 플라스미드 또는 벡터들이 당업계에 알려져 있고, 다수는 상업적으로 이용 가능하다. 적합한 벡터의 예시는 Sambrook et al, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), 및 Ausubel et al, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997)에 제시되어 있다.
- [0283] 본 발명의 벡터 또는 플라스미드는 인공 효모 염색체를 포함하고 이는 이형 DNA 서열 (예를 들어, 3000kb 크기의 DNA 서열)을 포함하도록 유전적으로 변형될 수 있는 DNA 컨스트럭트로 나타내며, 짧은 사슬 중합체, 중심립, 및 복제의 개시점(복제 개시점) 서열을 포함한다.
- [0284] 본 발명의 벡터 또는 플라스미드는 또한 인공 박테리아 염색체를 포함하고, 이는 이종 DNA 서열 (예를 들어, 3000kb 크기의 DNA 서열)을 포함하도록 유전적으로 변형될 수 있는 DNA 컨스트럭트로 나타내며, 복제의 개시점 서열 (Ori)을 포함하고, 하나 또는 그 이상의 헬리카제 (예를 들어 parA, parB, parC)를 포함할 수 있다.
- [0285] 숙주로서 효모를 사용하는 플라스미드의 예시로는 YIp형 벡터, YEp형 벡터, YRp형 벡터, YCp형 벡터, pGPD-2, pAO815, pGAPZ, pGAPZ α, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, pPICZ, pPICZ α, pPIC3K, pHWO10, pPUZZLE and 2 μm 플라스미드를 포함한다. 이러한 벡터들은 알려져 있으며, 예를 들어, Cregg et al., Mol Biotechnol. (2000) 16(1):23-52에 기술되어 있다.
- [0286] 숙주로서 에스체리키아 콜리를 사용하는 플라스미드의 예시는 pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pVC119, pSP64, pSP65, pTZ-18R/-18U, pTZ-19R/-19U, pGEM-3, pGEM-4, pGEM-3Z, pGEM-4Z, pGEM-5Zf(-), 및 pBluescript KSTM (Stratagene)을 포함한다. 에스체리키아 콜리에서 발현을 위한 적합한 플라스미드의 예시는 pAS, pKK223 (Pharmacia), pMC1403, pMC931, 및 pKC30을 포함한다.
- [0287] 프로모터
- [0288] 재조합 세포에서 내인성 폴리펩티드의 과발현은 전사적 또는 번역적 조절인자, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐레이션 신호인자, 전사 종결인자, 내부 리보솜 유입점(IRES) 등의 변형에 의해 달성될 수 있고, 이는 숙주세포에서 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 가능하게 한다. 이러한 서열은 전사와 관련된 세포성 단백질과 특히 상호작용을 한다(Maniatis et al., Science, 236: 1237-1245 (1987)). 예시적인 서열들은 예를 들어, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)에 기술되었다.
- [0289] 예를 들어, 재조합 세포에서 내인성 보조 단백질의 과발현은 프로모터의 변형, 예를 들어, 높은 수준의 발현에 도달하기 위한 보조 단백질과 작동가능 하게 연결된 내인성 프로모터에 대한 강력한 프로모터로의 교체에 의해 달성될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 또는 항시적일 수 있다. 내인성 프로모터의 변형은 당업계의 방법을 이용한 돌연변이 또는 상동성 재조합에 의해 수행될 수 있다.

- [0290] 보조 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드의 과발현은 당업계에 다른 방법, 예를 들어 Marx et al., 2008 (Marx, H., Mattanovich, D. and Sauer, M. *Microb Cell Fact* 7 (2008): 23), and Pan et al., 2011 (Pan et al., *FEMS Yeast Res.* (2011) May; (3):292-8.)에 기술된 바와 같이 내인성 조절 지역을 유전적으로 변형시켜 달성될 수 있고, 이러한 방법은, 예를 들어, 보조 단백질의 발현을 증가시키는 재조합 프로모터의 삽입을 포함한다. 형질전환은 Cregg et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376-3385에 기술되어 있다. "재조합" 프로모터는 서열의 발현을 유도하는 것으로 나타낸다. 본 발명에서 사용되는 재조합 프로모터는 주어진 서열에 대한 본연의 프로모터가 아니며, 예를 들어, 상기 프로모터는 자연 발생 프로모터("본연"의 프로모터)와 다르다. 이러한 프로모터는 때때로 이종 프로모터로도 나타낸다.
- [0291] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로모터"는 특정 유전자의 전사를 돋는 지역을 나타낸다. 프로모터는 전형적으로 프로모터가 존재하지 않은 경우의 발현된 재조합 산물의 양에 비해 뉴클레오티드 서열로부터 발현된 재조합 산물의 양을 증가시킨다. 하나의 유기체로부터 프로모터는 다른 유기체 기원의 서열로부터 재조합 산물 발현을 향상시키도록 이용될 수 있다. 프로모터는 당업계의 방법(예를 들어, Datsenko et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(12): 6640-6645 (2000))을 이용하여 상동성 재조합에 의해 숙주세포 염색체로 삽입될 수 있다. 추가적으로, 하나의 프로모터 엘리먼트는 동시에 결합된 다수의 서열에 대한 발현 산물의 양을 증가시킬 수 있다. 따라서, 하나의 프로모터 엘리먼트는 하나 또는 그 이상의 재조합 산물의 발현을 향상시킨다.
- [0292] 프로모터 활성을 이의 전사적 효율에 의해 평가될 수 있다. 이는 프로모터 유래 mRNA 전사체의 양의 측정, 예를 들어, 노던 블롯팅, 정량적 PCR에 의해 직접적으로 확인될 수 있고, 프로모터로부터 발현된 유전자 산물의 양을 측정하여 간접적으로 확인될 수 있다.
- [0293] 프로모터는 "유도성 프로모터" 또는 "항시적 프로모터"일 수 있다. "유도성 프로모터"는 특정 인자의 존재 또는 부존재에 의해 유도될 수 있는 프로모터를 나타내며, "항시적 프로모터"는 이와 관련된 유전자 또는 유전자들의 계속적인 전사를 가능하게 하는 비조절된 프로모터를 나타낸다.
- [0294] 바람직한 구현예에서, 보조 단백질 및 POI 모두를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 유도성 프로모터에 의해 유도된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 보조 단백질 및 POI 모두를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 항시적 프로모터에 의해 유도된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 보조 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 항시적 프로모터에 의해 유도되고, POI는 유도성 프로모터에 의해 유도된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 보조 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 유도성 프로모터에 의해 유도되고, POI는 항시적 프로모터에 의해 유도된다. 실시예서와 같이, HP는 항시적 GAP 프로모터에 의해 유도되고, POI는 유도성 AOX1 프로모터에 의해 유도된다. 일 구현예로서, 보조 단백질 및 POI를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터 활성 및/또는 발현 양상의 관점에서 동일한 프로모터 또는 유사한 프로모터에 의해 유도된다.
- [0295] 수많은 유도성 프로모터가 당업계에 알려져 있다. 상기 프로모터들은 Gatz, *Curr. Op. Biotech.*, 7: 168 (1996) 및 Gatz, *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89 (1997)에 기술되어 있다. 예시로는 테트라사이클린 리프레서 시스템, Lac 리프레서 시스템, 구리-유도성 시스템(예를 들어 PR1 시스템), 글루코코르티코이드-유도성 (Aoyama et al., 1997), 알코올-유도성 시스템, 예를 들어 AOX 프로모터 및 ecdisome-유도성 시스템을 포함한다. 또한 포함되는 프로모터로 설폰아마이드-유도성(U.S. Patent No. 5,364,780) 및 알코올-유도성 시스템 (WO 97/06269 and WO 97/06268) 및 글루타티온 S-트랜스퍼라제 프로모터가 있다.
- [0296] 효모 숙주세포에서 이용하기 위한 적합한 프로모터 서열은 Mattanovich et al., *Methods Mol. Biol.* (2012) 824:329-58에 기술되어 있고 삼탄당인산 이성질체화 효소 (TPI), 포스포글리세르산 인산화 효소 (PGK), 글리세르알데하이드-3-탈수소화 효소 (GAPDH or GAP) 및 이들의 변이체, 락타아제 (LAC) 및 갈락토시다제 (GAL), 피키아파스토리스 글루코스-6-포스페이트 이성질체화 효소 프로모터 (PPGI), 3-포스포글리세르산 인산화 효소 프로모터 (PPGK), 글리세롤 포스페이트 탈수소화 효소 프로모터 (PGAP), 번역 신장 인자 프로모터 (PTEF), 및 피키아파스토리스 에놀라아제 1의 프로모터 (PENO1), 삼탄당인산 이성질체화 효소 (PTPI), 르리보솜 소단위 단백질들 (PRPS2, PRPS7, PRPS31, PRPL1), 알콜 산화 효소 프로모터 (PAOX) 또는 변형된 특성을 갖는 이들의 변이체, 포름알데하이드 탈수소화 효소 프로모터 (PFLD), 이소구연산염 분해 효소 프로모터 (PICL), 알파-케토이소카프로에이트 탈탄산 효소 프로모터 (PTHI), 열충격 단백질 패밀리 구성들 (PSSA1, PHSP90, PKAR2), 6-포스포글루콘산 탈수소화 효소 (PGND1), 포스포글리세르산 뮤타아제 (PGPM1), 케톨전달효소 (PTKL1), 포스파티딜이노시톨 합성 효소 (PPIS1), 폐로-02-산화 환원 효소 (PFET3), 고-친화적 철 투과 효소 (PFTR1), 억제 가능한 알칼라인 인산 가수분해효소 (PPHO8), N-미리스토일 전달 효소 (PNMT1), 폐로문 반응 전사 인자 (PMCM1), 유비퀴틴 (PUB14), 단리 가닥의 DNA 혼산내부 가수분해 효소 (PRAD2), 미코콘드리아성 내막의 주요 ADP/ATP 교환수송체 프로모터

(PPET9) (WO2008/128701) 및 포름산 탈수소효소 (FMD) 프로모터와 같은 해당 효소를 포함한다. 특히, GAP 프로모터, AOX 프로모터 또는 GAP 또는 AOX 프로모터 유래의 프로모터가 바람직하다. AOX 프로모터는 메탄올에 의해 유도될 수 있고, 예를 들어 포도당에 의해 억제될 수 있다.

[0297] 적합한 프로모터의 추가적인 예시로는 사카로마이세스 세레비지애 에놀라아제 (ENO-1), 사카로마이세스 세레비지애 갈락토스인산화효소 (GAL1), 사카로마이세스 세레비지애 알콜 탈수소화 효소/글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소화 효소 (ADH1, ADH2/GAP), 사카로마이세스 세레비지애 삼탄당인산 이성질체화 효소 (TPI), 사카로마이세스 세레비지애 메탈로티오네인 (CUP1), 및 사카로마이세스 세레비지애 3-포스포글리세르산 인산화효소 (PGK), 및 말타아제 유전자 프로모터 (MAL)를 포함한다.

[0298] 효모 숙주세포의 다른 유용한 프로모터는 Romanos et al., 1992, Yeast 8:423-488에 개시되어 있다.

[0299] 에스체리키아 콜리를 숙주로 이용하기 위한 플라스미드 내 적합한 프로모터는 T7 프로모터, T5 프로모터, 트립토판 (trp) 프로모터, 락토오스 (lac) 프로모터, 트립토판/락토오스 (tac) 프로모터, 지질단백질 (lpp) 프로모터, 및 λ 파지 PL 프로모터를 포함한다.

[0300] 바람직하게, 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 프로모터는 상기 보조 유전자의 프로모터에 내재하지 않을 수 있다. 바람직하게, 재조합 프로모터는 보조 단백질 유전자의 내인성 프로모터를 대신하여 사용될 수 있다.

[0301] 인헨서

[0302] 바람직한 구현예에서, 과발현은 보조 단백질의 발현을 유도하는 프로모터 활성을 향상시키는 인헨서를 사용하여 달성될 수 있다. 전사적 인헨서는 상대적으로 방향 및 위치 독립적이며, 상기 인헨서는 5' 및 3' 방향 전사 단위를 갖고, 인트론 내부 뿐만 아니라, 암호화 서열 자체 내부에서 발견된다. 상기 인헨서는 암호화 서열의 5' 또는 3' 위치에서 발현 벡터 내로 스플라이싱될 수 있으나, 바람직하게 프로모터로부터 5' 위치에 위치할 수 있다. 대부분의 효모 유전자는 오직 하나의 UAS를 포함하며, 이는 일반적으로 캡 (Cap) 위치에 몇 백개의 염기쌍 내부에 존재하므로, 대부분의 효모 인헨서 (UAS)가 프로모터의 3'에 위치하는 경우 제대로 기능을 발휘할 수 없을 수 있으나, 고등의 진핵세포의 인헨서는 프로모터의 5' 및 3'에서도 기능을 발휘할 수 있다.

[0303] 현재, 많은 인헨서 서열은 포유류 유전자 (globin, RSV, SV40, EMC, elastase, albumin, a-fetoprotein 및 insulin) 유래로 알려져 있다. 또한 진핵세포 바이러스 유래의 인헨서, 예를 들어, SV40 후기 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 개시점의 후면에 존재하는 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 사용할 수도 있다. 사카로마이세스 세레비지애 유래 UAS/Gal 시스템과 같은 효모 인헨서는 상위 활성 서열 (UASs)로 명명되기도 하며, 이는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용될 수 있다 (유럽 특허번호 0317254 및 Rudoni et al., The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, (2000), 32(2):215-224에 기술).

[0304] 바람직한 구현예에서, 본 발명에서 개시된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 이상 형태의 보조 단백질이 과발현될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로부터 선택되는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 이상의 보조 단백질 또는 이의 기능적 유도체를 과발현하도록 조작되며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162와 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는다.

[0305] 목적 단백질

[0306] 목적 단백질 및 보조 단백질의 동시 발현을 위한 적합한 조건 하에서, 숙주세포가 배양될 경우, 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로 표시되는 아미노산 또는 이의 기능적 상동체를 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하고, 목적 단백질을 발현할 것으로 추측되며, 상기 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162의 서열번호 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는다.

[0307] 본 발명에서 사용되는 용어 "목적 단백질 (POI)"은 숙주세포에서 재조합 기기술 수단에 의해 생산된 단백질을 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 단백질은 숙주세포에서 자연 발생되지 않은 폴리펩ти드, 예를 들어 각종 단백질일 수 있거나, 숙주세포 본연의 폴리펩티드, 예를 들어, 숙주세포에 대한 상동성 단백질일 수도 있으나, 상기 숙주세포는 POI를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 자가-복제 벡터로 형질전환되거나, 숙주세포의 유전체로 POI를 암호화하는 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 복제물로 재조합시키는 기술에 의해 삽입되거나, POI를 암호화하는 유전자의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 조절 서열, 예를 들어 프로모터 서열의 재조합 변형에

의해 생산될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에서 나타내는 목적 단백질은 당업자에게 널리 알려진 재조합 발현의 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0308] 목적 단백질(POI)에 대한 제한은 없다. 상기 POI는 일반적으로 진핵세포성 또는 원핵세포성 폴리펩티드, 이들의 변이체 또는 유도체이다. 상기 POI는 어느 하나의 진핵세포성 또는 원핵세포성 단백질일 수 있다. 목적 단백질의 예시로는 Schmidt, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2004), 65: 363-372 or in Kirk et al., Curr. Opin. Biotechnol. (2002), 13: 345-351에 기술되어 있다. Schmidt의 표 1과 표 2 및 Kirk et al.의 표 1에 언급된 어느 하나의 단백질은 본 발명에서 사용된 용어 "POI"에 포함된다. 상기 단백질은 자연적으로 분비되는 단백질 또는 세포 내 단백질, 예를 들어, 자연적으로 분비되지 않는 단백질일 수 있다. 본 발명은 또한 단백질의 생물학적 활성 단편을 포함한다. 또 다른 구현예에서, POI는 아미노산 사슬 또는 복합체, 예를 들어 이량체, 삼량체, 헤테로 이량체, 다합체 또는 저중합체 상태로 존재할 수 있다.

[0309] 목적 단백질은 영양제, 음식물, 소화제, 보충물로서 사용되는 단백질, 예를 들어 식료품, 사료, 또는 화장품일 수 있다. 상기 식료품은 예를 들어, 부용, 디저트, 시리얼 바, 과자, 스포츠 음료, 식품, 또는 다른 영양 제품일 수 있다. 바람직하게, 상기 목적 단백질은 식품 첨가제이다.

[0310] 또 다른 구현예로서, 목적 단백질은 동물 사료로 사용될 수 있다. POI는 진균독소 분해 효소와 같이 해독 효소일 수 있다. 해독 효소는 독소를 분해하여 이의 독성을 저해하는 효소를 의미한다. 진균독소는 옥수수에 손쉽게 대량 서식하는 곰팡이에 의해 생산되는 독성 2차 산물이며, 옥수수에 유해하고 인간 또는 동물에 건강상 문제를 야기하는 능력으로 특징되어 진다. 진균독소 분해 효소는 아플라톡신, 테톡시자임, 제아랄레논 에스터라제, 제아랄레논 락토나제, 제아랄레논 하이드로라아제, 퓨모니신 카르복실에스터라제, 퓨모니신 아미노트렌스퍼라제, 아미노폴리올 아민 옥시다제, 데옥시니바레놀 에폭사이드 하이드로라아제를 포함한다. POI는 또한 오크라독소 유사체, 또는 맥각 알칼로이드를 분해하는 효소일 수 있다. 오크라독소는 아스퍼ਜيل러스 또는 페니실린 과의 여러 곰팡이에서 2차 산물로서 생산되는 진균독소 그룹이고, 이소쿠마린의 유도체로 이루어진 약 유기산이다. 알려져 있는 오크라독소는 세 종류가 있으며, A, B, 및 C로 표기된다. 오크라독소 A는 오크라독소과에서 가장 흔하며, 따라서 가장 일반적으로 검출되고, 또한 독성이 가장 강하다. 오크라독소는 시리얼 및 전분이 풍부한 다른 식품에 존재하는, 신독성, 기형발생, 간독성 및 발암성 진균독소이다. 맥각 알칼로이드는 아마이드 결합을 포함하는 화합이며, 예를 들어, 에르고코르닌, 에르고코르니닌, 에르고크리스틴, 에르고메트린, 에르고신, 에르고타민 및 에르고아미닌을 포함한다. 이러한 화합물은 인간 및 가축을 포함하는 살아있는 유기체에 유해하다. 이러한 효소의 예시로는 오크라톡신 아미다제, 에로고타민 하이드롤라아제, 에르고타민 아밀라제를 포함한다. 진균독소 분해 효소는 사료의 진균독소 오염을 조절할 수 있어 동물 사료에 유용하다.

[0311] POI의 추가적 예시로는, 락토페린, 라이소자임, 락토페리신, 락토히드린, 카파-카제인, 햅토코린, 락토페록시다아제, 우유 단백질과 같은 항균 단백질 급성기 단백질, 예를 들어 감염 반응에 의해 가축으로부터 정상적으로 생산되는 단백질, 및 라이소자임 및 락토페린과 같은 작은 항균 단백질을 포함한다. 다른 예시로는 살균 단백질, 항바이러스 단백질, 급성기 단백질 (감염 반응에 의해 가축으로부터 유도), 프로바이오틱 단백질, 세균 발육 억제 단백질 및 양이온성 항균 단백질을 포함한다.

[0312] "사료"는 비-인간 동물에 의해 섭취, 흡수, 소화되기 적합한 어느 하나의 자연적 또는 인위적 음식, 식품, 또는 이와 유사한 물질, 또는 식품의 성분을 의미한다. "사료 첨가제"는 일반적으로 사료에 첨가되는 물질을 나타낸다. 이는 전형적으로, 하나 또는 그 이상의 비타민, 미네랄, 효소 및 적절한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 본 발명의 목적상, 식품 첨가제는 효소 또는 그 밖의 단백질일 수 있다. 식품 첨가제로 사용될 수 있는 효소의 예시로는 프로테아제, 리파아제, 락타아제, 펩틴 메틸 에스터라제, 펩틴나아제, 트렌스글루타민나아제, 아밀라제, 베타-글루코나이아제, 아세토락테이트 데카르복시라제 및 라카제를 포함한다.

[0313] "식품 첨가제"는 일반적으로 음식에 첨가되는 물질을 나타낸다. 이는 전형적으로 하나 또는 그 이상의 비타민, 미네랄, 효소 및 적절한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 본 발명의 목적상, 식품 첨가제는 는 효소 또는 그 밖의 단백질일 수 있다. 식품 첨가제로 사용될 수 있는 효소의 예시로는 프로테아제, 리파아제, 락타아제, 펩틴 메틸 에스터라제, 펩틴나아제, 트렌스글루타민나아제, 아밀라제, 베타-글루코나이아제, 아세토락테이트 데카르복시라제 및 라카제를 포함한다.

[0314] 몇몇 구현예에서, 식품 첨가제는 항균 단백질, 예를 들어 (i) 항균 우유 단백질 (인간 또는 비-인간), 락토페린, 라이소자임, 락토페리신, 락토히드린, 카파-카제인, 햅토코린, 락토페록시다아제, 알파-1-안티트립신, 및 IgA와 같은 면역 글로불린, (ii) 급성기 단백질, 예를 들어 C-반응성 단백질 (CRP); 락토페린; 라이소자임; 혈청 아밀로이드 A(SAA); 페리틴; 햅토클로빈 (Hp); 보체 2-9, 특히 보체-3; 세로무코이드; 셀룰로플라즈민 (Cp);

15-케토-13,14-다이하이드로-프로글렌дин F2 알파 (PGFM); 피브리노겐 (Fb); 알파(1)-산 글라이코단백질(AGP); 알파(1)-안티트립신; 만노오스 결합 단백질; 리포사카라이드 결합 단백질; 알파-2 마크로글로불린 및 다양한 디펜신, (iii) 항균 웨პ티드, 예를 들어 세크로핀, 마구진, 디펜신, 타치플레신, 파라신 I, 부포린 I, PMAP-23, 모로네시딘, 아노풀린, 감비신, 및 SAMP-29, 및 (iv) 다른 항균 단백질(들), CAP37, 그레눌리신, 분비성 백혈구 프로테아제 억제자, CAP18, 유비퀴시딘, 소의 항균 단백질-1, Ace-AMP1, 타치플레신, 큰 디펜신, Ac-AMP2, Ah-AMP1, 및 CAP18를 포함한다.

[0315] 효소

POI는 효소일 수 있다. 바람직한 효소는 세제, 전분, 연료, 직물, 수지 및 종이, 오일, 퍼스널 케어 제품의 제조, 또는 제빵, 유기 합성 등 산업상 응용을 위해 사용될 수 있다. 이러한 효소의 예시로는, 얼룩 제거 및 세탁을 위한 프로테아제, 리파아제, 만난나제 및 셀룰로오즈; 전분의 액화 및 당화를 위한 풀루라네이스 아밀라아제, 아미노글루코시다제; 글루코스에서 프룩토스로 전환을 위한 글루코스 이성질화 효소; 사이클로덱스트린 생산을 위한 사이클로덱스트린-글라이코실트랜스퍼라제; 연료 및 전분에서 점성의 감소를 위한 사일라네이스; 제빵에서 반죽 안정성 및 조절을 위한 아밀라아제, 사일라네이스, 리파아제, 포스포리파아제, 글루코스 옥시다아제, 리폭시게나아제, 트랜스글루타민나아제; 데님 마감 및 목화 연화를 위한 셀룰라아제; 직물의 축소를 위한 아밀라아제; 정련을 위한 펙트산 분해효소; 표백 종결을 위한 카탈라제; 표백을 위한 라카제; 과도한 염색을 제거하기 위한 폐옥시다아제; 수지 및 종이 생산에서 리파아제, 프로테아제, 아밀라아제, 시알라네이스, 셀룰로스; 에스터교환을 위한 리파아제 및 지방과 오일의 처리 과정에서 고무성분 제거를 위한 포스포리파아제 및 포스포리파아제; 유기 합성에서 카이럴성 알콜 및 아마이드의 분해를 위한 리파아제; 반합성 폐니실린 합성을 위한 아실라제, 광학이성질성 카르복시산 합성을 위한 니트릴라아제; 가죽 생성을 위한 프로테아제 및 리파아제; 퍼스널 케어 제품 제조를 위한 아미노글루코시다제, 글루코스 옥시다아제, 및 폐옥시다아제를 포함한다 (Kirk et al., Current Opinion in Biotechnology (2002) 13:345-351 참조)

[0317] 치료 단백질

POI는 치료 단백질일 수 있다. POI는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 하기 구체적으로 기술한 바와 같이, 항체 또는 항체 단편, 성장 인자, 호르몬, 효소, 백신 등 생물 약제학상의 물질로서 적합한 단백질일 수 있다.

[0319] 상기 POI는 자연적으로 분비되는 단백질 또는 세포 내 단백질, 예를 들어 자연적으로 분비되지 않는 단백질일 수 있다. 또한 본 발명은 기능적 상동체의 제조합 산물, 기능적 동등체 변이, 유도체 및 자연적으로 분비 또는 자연적으로 분비되지 않은 단백질의 생물학적 활성 단편을 제공한다. 기능적 상동체는 바람직하게 동일하거나 이에 상응하는 서열의 기능적 특징을 갖는다.

[0320] POI는 구조적으로 본연의 단백질과 구조적으로 유사하고, 본연 단백질의 C- 및 N- 말단 또는 측쇄 모두 또는 각각에 하나 또는 그 이상의 아미노산의 삽입, 본연의 아미노산 서열 내 하나 또는 수많은 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환, 또는 본연의 단백질 말단 또는 아미노산 서열 내 다양한 위치 모두 또는 각각에서 하나 또는 그 이상의 아미노산의 결실, 또는 본연의 아미노산 서열 내에서 하나 또는 그 이상의 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산의 삽입에 의해 본연의 단백질로부터 유래될 수 있다. 전술한 다양한 단백질에 대한 이러한 변형은 당업계에 널리 알려져 있다.

[0321] 바람직하게, 목적 단백질은 포유류 폴리펩티드 또는 보다 바람직하게 인간 폴리펩티드이다. 특히 어느 폴리펩티드, 단백질, 단백질 변이체, 융합 단백질 및/또는 이의 단편을 나타내는 바람직한 치료 단백질은 포유류에 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 치료 단백질은 세포에 대하여 이종인 것을 필요로 하지 않음이 예상될 수 있다. 본 발명의 세포에 의해 생산될 수 있는 단백질의 예시로는 이에 제한되는 것은 아니나, 효소, 조절 단백질, 수용체, 웨პ티드 호르몬, 성장인자, 사이토카인, 스캐폴드 결합 단백질 (예를 들어, 안티칼린스), 구조 단백질, 림포카인, 부착 분자, 수용체, 막 또는 단백질 수송체 및 아고니스트 또는 안타고니스트 역할을 하며, 및/또는 치료 또는 진단 용도를 갖는 단백질이다. 또한 목적 단백질은 백신화, 백신, 항원-결합 단백질, 면역 자극 단백질로 사용하기 위한 항원일 수 있다. 이는 또한 항체의 항원-결합 단편일 수 있고, 상기 단편은 기술적으로 알려진 적합한 항원-결합 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 이에 제한되는 것은 아니나, Fv(VL 및 VH를 포함하는 분자), 단일-사슬 Fv (scFV)(웨პ티드 링커로 연결된 VL 및 VH를 포함하는 분자), Fab, Fab', F(ab')₂, 단일 도메인 항체(sdAb)(단일 가변 도메인 및 3 CDR을 포함하는 분자) 및 이들의 다가 항체일 수 있다. 상기 항체 또는 이의 단편은 쥐의, 인간의, 인간화된 것이거나 키메릭 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 치료 단백질의 예시는 항체, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 재조합 항체, 항체 단편, 예를 들어, Fab',

$F(ab')2$, Fv, scFv, di-scFvs, bi-scFvs, tandem scFvs, bispecific tandem scFvs, sdAb, nanobodies, V_H, 및 V_L, 또는 인간 항체, 인간화 항체, 키메릭 항체, IgA 항체, IgD 항체, IgE 항체, IgG 항체, IgM 항체, intrabody, minibody 또는 monobody를 포함한다.

[0322] 이러한 치료 단백질은 이에 제한되는 것은 아니라, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자, hGH, tPA, 사이토카인, 예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18와 같은 인터류킨, 인터페론 (IFN) 알파, IFN 베타, IFN 감마, IFN 오메가 또는 IFN 타우, 종양 피사인자 (TNF) TNF 알파 및 TNF 베타, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 및 VEGF를 포함한다.

[0323] 바람직한 구현예에서, 상기 단백질은 항체이다. 용어 "항체"는 에피토프와 결합하고, 인식하는 특정 형태의 문자구조를 포함하는 어느 하나의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 것으로 의도되며, 하나 또는 그 이상의 비공유 결합 상호작용은 상기 문자구조와 에피토프간 복합체를 안정화한다. 전형적인 항체 분자는 면역글로불린이고, 모든 유래, 예를 들어 인간, 설치류, 토끼, 소, 양, 돼지, 개, 다른 포유류들, 닭, 다른 조류 등 유래의 모든 형태의 면역글로불린, 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 등이 항체로 여겨질 수 있다. 기술된 서열을 암호화하는 수많은 항체; 및 그 밖의 항체들은 당업계에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0324] 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편은 기술적으로 알려진 방법에 의해 생산될 수 있다. 일반적으로, 항체-생산 세포는 목적 항원 및 면역원에 민감하다. 항체 생산 세포로부터 동정된 전령 RNA는 PCR 증폭을 이용하여 cDNA를 제조하는데 주형으로 이용된다. 벡터의 라이브러리, 최초의 항원을 특이성을 각각 보유하는 하나의 중쇄 유전자 및 하나의 경쇄 유전자를 포함하며, 이는 증폭된 면역글로불린 cDNA의 적절한 부분을 발현 벡터로 삽입하여 제조된다. 결합성 라이브러리는 중쇄 유전자 라이브러리와 경쇄 유전자 라이브러리의 조합에 의해 구축된다. 복제된 라이브러리는 중쇄 및 경쇄 (항체 분자의 Fab 단편 또는 항원 결합 단편과 비슷함)를 동시에 발현한다. 이러한 유전자를 전달하는 벡터는 숙주세포를 동시에 형질전환시킨다. 항체 유전자의 합성이 형질전환된 숙주에서 유도될 때, 중쇄 및 경쇄 단백질은 자가 조립되어 항체 또는 면역원을 검출할 수 있는 활성 항체를 생산한다.

[0325] 관심 서열을 암호화하는 항체는 본연의 서열뿐만 아니라 유전적 암호화의 축소에 의해 개시된 핵산과 일치하지 않은 핵산, 및 이의 변이체를 포함한다. 변이된 폴리펩티드는 아미노산 (aa) 치환, 삽입 또는 결실을 포함한다. 아미노산의 치환은 보존적 아미노산 치환일 수 있고, 예를 들어, 해당 위치의 변경과 같이 비-필수적 아미노산의 제거를 위하여, 또는 기능적으로 필수적이지 않은 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 치환 또는 제거하여 잘못된 접힘의 최소화를 위하여 치환될 수 있다. 변이체는 단백질의 특정 지역 (예를 들어, 기능적 도메인, 분해성 아미노산 잔기 등)의 생물학적 활성을 향상시키거나 보유하기 위하여 설계될 수 있다. 변이체는 또한, 본 발명에서 전술한 폴리펩티드의 단편, 특히 기능적 도메인과 상응하는 생물학적 활성 단편 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 복제된 유전자의 *in vitro* 돌연변이 생성 기술은 알려져 있다. 본 발명의 대상은 치료 물질로서 보다 적합하기 위하여, 보편적인 문자 생물학적 기술을 이용하여 단백질 가수분해 저하에 대한 저항성을 향상시키거나 용해성을 최적화하도록 변형시킨 폴리펩티드를 포함한다.

[0326] 키메릭 항체는 다양한 경쇄 또는 중쇄 부위(VL 및 VH)의 조합에 의한 재조합 기술에 의해 제조될 수 있고, 다른 종 유래의 경쇄 또는 중쇄 불변 부위를 포함하는 어느 한 종의 항체 생산 세포로부터 수득된다. 전형적으로, 뚜렷한 인간 도메인 항체를 생산하기 위하여, 키메릭 항체는 설치류 또는 토끼의 가변 부위 및 인간 불변 부위를 활용한다. 이러한 키메릭 항체의 생산은 당업계에 널리 알려져 있고, 표준화된 기술(미국 특허 번호 5,624,659에 기술)에 의해 달성될 수 있다.

[0327] 인간화된 항체는 인간-유사 면역글로불린 도메인을 광범위하게 포함하고, 동물-유래 항체의 상보적 결정 지역만을 포함하도록 조작된다. 이는 모노클로날 항체의 가변 부위에서 높은 변화가 일어나는 고리의 서열을 조사하고 이를 인간 항체 사슬의 구조와 일치시킴으로써 달성될 수 있다. 한편, 폐시얼리 복합체(facially complex), 상기 과정이 실제로 가장 간편한 방법이다. 미국 특허 번호 6,187,287를 참조.

[0328] 완전한 형태의 면역글로불린 (또는 이들의 재조합 복제물)에 더하여, 에피토프 결합 부위 (예를 들어, $F(ab')2$, $F(ab')2$, 또는 다른 단편)를 포함하는 면역글로불린 단편이 합성될 수 있다. "단편" 또는 최소의 면역글로불린은 재조합 면역글로불린 기술을 활용하여 설계될 수 있다. 예를 들어 본 발명에서 사용하기 위한 "Fv" 면역글로불린은 경쇄 가변 부위 및 중쇄 가변 부위의 합성에 의해 생산될 수 있다. 항체의 조합 예를 들어, 두 개의 뚜렷한 Fv 특이성을 포함하는 2가 항체 절편(diabody) 또한 고려될 수 있다.

[0329] 면역글로불린은 번역 후 과정으로 변형될 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물에서 활용될 수

있는, 화학적 링커, 또는 형광 염료, 효소, 기질, 화학 발광 모이어티 등과 같은 검출 가능한 모이어티, 또는 스트렙트아비틴, 아비틴, 비오틴 등과 같은 특정 결합 모이어티를 첨가할 수 있다.

[0330] 치료 단백질의 추가적인 예시로는 혈액 응고 인자 (VII, VIII, IX), 푸사리움 유래 알칼라인 프로테아제, 칼시토닌, CD4 수용체 다베포이에틴, DNase (낭포성 섬유증), 에리트로포이에틴, 유트로핀 (인간 성장 호르몬 유래), 여포 자극 호르몬 (폴리트로핀), 젤라틴, 글루카곤, 글루코세레브로시다아제 (고서병), A.niger 유래 글루코아밀라아제, A.niger 유래 글루코스 옥시다아제, 성선 자극 호르몬, 성장 인자 (GCSF, GM-CSF), 성장 호르몬 (소마토트로핀), 간염 B 백신, 히루딘, 인간 항체 단편, 인간 아포지질단백질 AI, 인간 칼시토닌 전구체, 인간 콜라게나아제 IV, 인간 표피 성장 인자, 인간 인슐린-유사 성장 인자, 인간 인터류킨 6, 인간 라미닌, 인간 프로-아포지질단백질 AI, 인간 혈청 알부민인슐린, 인슐린 및 뮤테인스, 인슐린, 인터페론 알파 및 뮤테인스, 인터페론 베타, 인터페론 감마(뮤테인), 인터류킨 2, 항체 호르몬, 모노클로날 항체 5T4, 마우스 콜라겐, OP-1 (골신생, 신경보호 인자), 오프렐베킨 (인터류킨 11-아고니스트), 오가노포스포하이드롤라제, PDGF-아고니스트, 피테이스, 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 재조합 플라스미노겐-활성자 G, 스테필로카이나아제, 줄기 세포 인자, 티타누스 독소 단편, 조직-플라스미노겐- 활성자, 및 종양 피사 인자를 포함한다 (Schmidt, Appl Microbiol Biotechnol (2004) 65:363-372 참고).

[0331] 선도 서열

[0332] 목적 단백질은 숙주세포로부터 상기 POI의 분비를 야기하는 선도 서열과 결합될 수 있다. 발현 벡터 내 이러한 분비 선도 서열의 존재는 재조합 발현 및 분비를 위한 목적 단백질이 자연적으로 분비되지 않고, 자연적 분비 선도 서열이 부족하거나, 자연적 분비 선도 서열이 없는 뉴클레오타이드 서열만 복제된 경우 필요로 한다. 일반적으로, 숙주세포부터 POI의 분비를 효과적으로 야기하는 분비 선도 서열이 본 발명에서 사용될 수 있다. 상기 분비 선도 서열은 효모 기원일 수 있으며, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애의 MFa와 같은 효모 알파-인자 또는 효모 포스파타아제일 수 있고, 포유류, 식물 또는 그 밖의 생물 유래일 수 있다. 적합한 분비 선도 서열의 선택은 당업자에게 명백하다. 선택적으로, 발현 벡터 내 뉴클레오타이드 서열 또는 발현 벡터 내 복제된 자연적 선도 서열을 포함하는 POI를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 복제되기 전, 상기 분비 선도 서열은 당업자에게 알려져 있는 전통적인 복제 기술에 의해, 재조합 발현을 위한 POI를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 내 융합되어 있을 수 있다. 이러한 경우, 발현 벡터 내 분비 선도 서열은 필요로 하지 않는다.

[0333] POI(s)를 암호화하는 재조합 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, 보조 단백질을 암호화하는 재조합 뉴클레오타이드 서열은 세포마다 단일 또는 다수 복제 수를 갖는 하나 또는 그 이상의 자율적 복제 플라스미드 상에 제공될 수 있다.

[0334] 선택적으로, POI를 암호화하는 재조합 뉴클레오타이드 서열 및 보조 단백질을 암호화하는 재조합 뉴클레오타이드 서열은 세포마다 단일 또는 다수의 복제수를 갖는 동일한 플라스미드 상에 존재한다.

[0335] KO 단백질의 저발현

[0336] 본 발명자들은 또한 하기 네아웃 (KO) 단백질로 나타낸 다양한 단백질을 동정하였으며, 상기 KO 단백질은 K01, K02, K03 및 이의 기능적 상동체를 포함하며, 숙주세포로부터 이들의 발현은 목적 단백질의 수율에 부정적 영향의 미침이 관찰되었다. KO 단백질은 아미노산 서열 서열번호 10, 11 또는 12를 갖는 단백질 또는 이의 기능적 상동체이며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 10, 11, 또는 12로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30%, 예를 들어 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다. 또한, KO 단백질을 암호화하는 유전자의 변형, 예를 들어 돌연변이 또는 결실은 POI의 수율을 증가시킬 수 있음이 관찰되었다. 이러한 개시는 동정된 유전자를 저발현하도록 숙주세포를 조작하여 POI의 수율을 추가로 향상시키는데 유용한 방법 및 물질을 제공한다. 단일 K01, K02, K03 유전자 또는 이의 기능적 상동체가 숙주세포에 존재한다면, 이들은 POI의 수율 향상을 위해 변형될 수 있다. KO 단백질의 존재는 제공된 서열을 고려하여 당업계에 알려진 어느 하나의 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0337] 단백질은 표 2에 목록화되었다.

[0338]

[표 2]

KO 단백질	명칭 (<i>S. cerevisiae</i> 로 추정되는 유사체)	아미노산 서열	폴리뉴클레오티드	실시예에서의 명칭
KO1	FLO8	서열번호 10	서열번호 22	PP7435_Ch4-0252
KO2	HCH1	서열번호 11	서열번호 23	PP7435_Ch3-1062
KO3	SCJ1	서열번호 12	서열번호 24	PP7435_Ch1-0176

[0339]

[0340]

바람직하게, 숙주세포는 서열번호 10, 11, 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 KO 단백질 또는 이의 기능적 상동체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 저발현하도록 조작될 수 있으며, 상기 기능적 상동체는 서열번호 10, 11 또는 12로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는다. 예를 들어, 숙주세포는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포는 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 저발현하도록 조작될 수 있다.

[0341]

바람직하게, KO1, KO2, 및/또는 KO3 가/들이 저발현되면, 숙주세포 내 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 수율이 KO 단백질을 저발현하도록 조작되기 전의 숙주세포와 비교하여, 적어도 1% 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 또는 적어도 300% 증가될 수 있다.

[0342]

용어 "저발현하다"는 일반적으로 KO 단백질을 저발현하도록 조작하기 전의 숙주세포인, 참고 표준에서 관찰되는 발현 수준에 비해 그 발현 양이 감소한 경우를 나타낸다. 본 발명에서 용어, "저발현하다", "저발현하는", "저발현되는" 및 "저발현"은 유전자 산물 또는 폴리펩티드의 발현이 유전적 변형 전의 숙주세포 또는 유전적으로 변형되지 않은 비교 가능한 숙주세포의 동일한 유전자 산물 또는 폴리펩티드의 발현에 비해 낮은 수준인 경우를 나타낸다. 유전자 산물 또는 폴리펩티드의 비 발현도 용어 "저발현"에 포함된다.

[0343]

저발현은 하나 또는 그 이상의 KO1, KO2 및 KO3 또는 기능적 상동체의 발현을 억제하는 어느 하나의 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 이들의 기능을 실현할 수 없게 한다. 저발현의 수단은 유전자 서열의 돌연변이 생성, 서열의 파괴, 삽입, 추가, 돌연변이생성, 대조 서열의 발현 변형 등에 의한 유전자 억제 (예를 들어, RNAi 유전자 안티센스), 넥-아웃, 발 수준의 변화, 발현 패턴의 변화를 포함할 수 있다.

[0344]

바람직하게, 저발현은 숙주세포에서 KO 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 넥-아웃하여 달성될 수 있다. 유전자는 전체 또는 일부의 암호화 서열을 결실시켜 넥아웃시킬 수 있다. 넥아웃 유전자를 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, Kuhn and Wurst (Eds.), 유전자 넥아웃 프로토콜(분자 생물학적 방법), Humana Press (March 27, 2009)를 참고할 수 있다. 유전자는 상기 유전자 서열 전체 또는 일부를 제거하여 넥아웃될 수 있다. 선택적으로, 유전자는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 저항성 유전자를 삽입하여 넥-아웃 또는 불활성화될 수 있다. 선택적으로, 유전자는 상기 유전자의 프로모터를 불활성화하여 넥-아웃 또는 불활성화될 수 있다.

[0345]

한 구현예로서, 저발현은 숙주세포에서 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 파괴하여 달성될 수 있다.

[0346]

"파괴"는 파괴되기 전의 본래 서열과 비교하여 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 추가, 결실, 치환되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 변화이다.

[0347]

"삽입" 또는 "추가"는 파괴되기 전의 본래 서열과 비교하여 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 추가되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 변화이다.

[0348]

"결실"은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 각각 제거되는(예를 들어, 부재되는) 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 변화로 정의된다. 결실은 전체 서열의 결실, 일부 암호화 서열의 결실, 단일 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 결실을 포함한다.

[0349]

"치환"은 일반적으로 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 다른 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기로의 대체를 나타낸다. "치환"은 부위-특이적 돌연변이, 우발적 돌연변이의 생성, 겹프트 듀플렉스 (gapped duplex) 접근법에 의해 수행될 수 있다 (미국특허 번호 4,760,025; Moring et al., Biotech. (1984) 2:646 ; and Kramer et al.,

Nucleic Acids Res., (1984) 12:9441 참조).

- [0350] 바람직하게, 유전자의 파괴는 틀 이동 돌연변이, 조기 종결 코돈, 임계 잔기의 점 돌연변이, 넌센스 또는 이 밖의 비기능성 단백질 산물로의 번역을 초래한다.
- [0351] 또 다른 구현예에서, 저발현은 상기 폴리펩티드와 작동 가능하게 연결된 프로모터를 파괴하여 달성될 수 있다. 프로모터는 하위 유전자의 전사를 직접적으로 관여한다. 주어진 서열의 발현을 위하여, 상기 프로모터는 필요적으로, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 또는 종결 서열, 번역 시작 또는 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성자 서열과 같은 다른 발현 조절 서열과 함께 있을 수 있다. 따라서, 상기 발현 조절 서열 중 어느 하나를 파괴하는 것 또한 상기 폴리펩티드의 발현 저해를 가능하게 한다.
- [0352] 또 다른 구현예에서, 저발현은 전사후 유전자 억제(PTGS)에 의해 달성될 수 있다. 상기 기술은 당업계에서 일반적으로 사용되는 것이며, PTGS는 이종 RNA 서열, 빈번하게 유전자 파괴에 필요한 안티센스의 발현을 통하여 유전자의 발현 수준을 저해시킨다(Lechtreck et al., J. Cell Sci (2002). 115:1511-1522; Smith et al., Nature (2000). 407:319-320; Furhmann et al., J. Cell Sci (2001). 114:3857-3863; Rohr et al., Plant J (2004). 40(4):611-210).
- [0353] "저발현"은 유전자 발현을 낮추는 당업계에 알려져 있는 기술에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드와 작동 가능하게 연결된 프로모터는 낮은 프로모터 활성을 갖는 또 다른 프로모터로 대체될 수 있다. 프로모터 활성은 이의 전사 효율에 의해서 평가될 수 있다. 상기 활성은 예를 들어 노던 블롯팅, 정량적 PCR에 의한 프로모터로부터 mRNA 전사체의 양의 측정을 통해 직접적으로 확인될 수 있고, 또는 프로모터로부터 발현되는 유전자 산물의 양의 측정을 통해 간접적으로 확인될 수 있다. 또 다른 구현예에서 저발현은 KO 단백질이 기능성을 지닐 수 있는 적합한 접힘이 이루어지지 않도록, 발현되는 KO 단백질의 접힘을 방해하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 KO 단백질의 이황화 결합 형성을 제거하거나, 알파 나선 구조 또는 베타 병풍 구조의 형성을 파괴하도록 도입될 수 있다.
- [0354] 추가적인 양태로서, 본 발명은 목적 단백질 제조를 위한 조작된 숙주세포의 용도를 제공한다. 상기 숙주세포는 하나 또는 그 이상의 POI(s)를 암호화하는 폴리펩티드를 도입하기 위해 유리하게 사용될 수 있고, 이후, POI를 발현하기 위한 적합한 조건 하에서 배양될 수 있다. 이러한 용도의 구체적인 사항은 본 발명의 방법과 관련된 후단에서 기술되어 있다.
- [0355] 보조 단백질 및 POI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 하나의 벡터 내에 관련 유전자 각각을 연결하여 숙주세포 내에서 재조합될 수 있다. 유전자를 전달하는 단일 벡터 또는 두 개의 분리된 벡터, 어느 하나의 벡터는 보조 단백질 유전자 및 다른 벡터는 POI 유전자를 전달하는 벡터로 구성이 가능하다. 이들 유전자는 이러한 벡터 또는 벡터들을 이용하여 숙주세포를 형질전환하여 숙주세포 유전체에 삽입될 수 있다. 몇몇 구현예에서는, 보조 단백질을 암호화하는 유전자들은 유전체에 삽입되고, POI를 암호화하는 유전자는 플라스미드 또는 벡터에 삽입된다. 몇몇 구현예에서는, POI 및 보조 단백질을 암호화하는 유전자는 유전체에 삽입된다. 몇몇 구현예에서는, POI를 암호화하는 유전자 및 보조 단백질을 암호화하는 유전자는 플라스미드 또는 벡터에 삽입된다. 만일 POI를 암호화하는 다수의 유전자들이 이용되는 경우, POI를 암호화하는 몇몇 유전자는 유전체에 삽입되는 반면, 다른 유전자들은 같거나 다른 플라스미드 또는 벡터에 삽입된다. 만일 보조 단백질을 암호화하는 다수의 유전자들이 이용되는 경우, 보조 단백질을 암호화하는 몇몇 유전자는 유전체에 삽입되는 반면, 다른 유전자들은 같거나 다른 플라스미드 또는 벡터에 삽입된다. 추가적인 교시는 본 발명의 하기 단락에서 찾을 수 있다.
- [0356] 일반적으로, 목적 단백질은 재조합 숙주세포를 사용하여, 적합한 배지에서 숙주세포를 배양하고, 상기 배양물로부터 발현된 POI를 분리하고, 발현된 산물에 적합한 방법에 의해 정제, 특히 세포로부터 POI를 분리하여 생산될 수 있다.
- [0357] 추가적인 양태로서, 본 발명은 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증가시키는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 것을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 보조 단백질을 암호화한다.
- [0358] 본 발명에서 사용되는 용어 "숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증가시키는 것"은 과발현된 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이 없는 것을 제외하고 동일한 조건에서 동일한 POI를 발현하는 동일한 세포와 비교할 때, 목적 단백질의 수율이 증가되는 것을 의미한다.
- [0359] 당업자에 의해 평가된 바와 같이, 본 발명의 보조 단백질의 과발현은 POI의 수율 증가로 나타내어 진다.

따라서, 증가된 수준의 목적 단백질을 발현하는 숙주세포에 대하여, 만일 숙주세포 내 보조 단백질이 존재하지 않는다면, 숙주세포 내 하나 또는 여러 보조 단백질을 발현시키고, 또는 만일 보조 단백질을 암호화하는 유전자가 숙주세포 내 이미 존재한다면, 상기 세포 내 보조 단백질의 발현 수준을 증가시킴으로써, 본 발명이 적용 가능하다.

[0360] 추가적인 양태로서, 본 발명은 숙주세포에서 목적 단백질의 수율을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 보조 단백질을 발현 또는 과발현하도록 숙주세포를 조작하는 것, (ii) 목적 단백질을 암호화하는 이종 뉴클레오티드를 상기 숙주세포에서 재조합하는 것, 및 (iii) 보조 단백질 및 목적 단백질을 발현하기 위한 적합한 조건에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함한다. 언급된 (i) 및 (ii) 단계는 반드시 언급된 순서에 의해 수행되어야하는 것은 아니다. 상기 언급된 (ii) 단계를 우선 수행하고, 이후에 (i)을 수행하는 것도 가능하다. 단계 (i)에서, 숙주세포는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 162 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 30% 서열 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작될 수 있다.

[0361] 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어 보조 단백질 및/또는 POI, 프로모터, 인핸서, 선도 서열 등을 조작하기 위해 사용되는 과정은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 예를 들어, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)에 기술되어 있다.

[0362] 보조 단백질 또는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 같이 외부 또는 표적 폴리뉴클레오티드는 다양한 수단, 예를 들어 상동성 재조합 또는 삽입 부위에서 표적 서열 특이적인 혼성 재조합 효소를 사용하여 염색체 내 삽입될 수 있다. 상기 기술된 외부 또는 표적 뉴클레오티드는 전형적으로 벡터 ("삽입 벡터") 내 존재한다. 이러한 벡터들은 전형적으로 상동성 재조합에 이용되기 전에 원형 및 선형화되어 있다. 선택적으로, 외부 또는 표적 뉴클레오티드는 이후, 숙주세포로 재조합되는 fusion PCR에 의해 결합된 DNA 단편 또는 합성적으로 구축된 DNA 단편일 수 있다. 상동 재조합 부위(homology arms)에 더하여, 벡터는 선택 또는 스크리닝을 위한 마커, 복제 개시점, 및 다른 엘리먼트들을 포함할 수 있다. 또한 우발적 또는 비-표적화된 삽입을 초래하는 이종 재조합을 이용하는 것도 가능하다. 이종 재조합은 현저하게 다른 서열을 지닌 DNA 문자간 재조합을 나타낸다. 재조합의 방법은 당업계 알려져 있고, 예를 들어 Boer et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) 77:513-523에 기술되어 있다. 또한 *Principles of Gene Manipulation and Genomics* by Primrose and Twyman (7th edition, Blackwell Publishing 2006)은 효모 세포의 유전자 조작에 대하여 나타내고 있다.

[0363] 보조 단백질 및/또는 POI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 또한 발현 벡터 상에 존재할 수 있다. 이러한 벡터는 당업계에 알려져 있고, 이미 상술된 바 있다. 발현 벡터에서 프로모터는 이종 단백질을 암호화하는 유전자의 상위에 위치하고, 유전자의 발현을 조절한다. 다중-복제 벡터는 특히 이의 다중 복제 부위로 인해 유용하다. 발현을 위하여, 프로모터는 일반적으로 다중 복제 부위의 상위에 위치한다. 보조 단백질 및/또는 POI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위한 벡터는 우선, 전체 보조 단백질 및/또는 POI를 암호화하는 전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 컨스트럭트를 제조하고, 이후 상기 컨스트럭트를 적합한 발현 벡터에 삽입하거나, 개별 엘리먼트, 예를 들어 선도 서열, 표적 DNA 서열에 대한 유전정보를 포함하는 DNA 단편을 삽입하고, 이후 이를 연결하여 구축될 수 있다. 단편의 제한효소에 의한 절단 또는 연결에 대한 대안으로서, 부착 부위 (att) 또는 효소에 기초한 재조합 기술이 DNA 서열을 벡터로 삽입하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 Landy (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58:913-949에 기술되어 있고, 당업자에게 알려져 있다.

[0364] 본 발명에 따른 숙주세포는 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터 또는 플라스미드를 세포 내 도입하여 수득될 수 있다. 진핵세포를 형질감염 또는 형질전환하거나, 원핵 세포를 형질전환하기 위한 기술은 당업계에 알려져 있다. 이러한 기술로는 지질 소포 매개 흡수, 열 충격 매개 흡수, 칼슘 포스페이트 매개 형질감염 (칼슘 포스페이트/DNA 동시 발현), 변형된 바이러스, 예를 들어 변형된 아데노바이러스를 이용한 바이러스성 감염, 미세주사 및 전기 천공을 포함할 수 있다. 원핵세포의 형질전환을 위한 기술로는 열 충격 매개 흡수, 세균성 원생 동물과 정상세포간 융합, 미세주사 및 전기 천공을 포함할 수 있다. 식물 형질전환을 위한 기술로는 아그로박테리움, 예를 들어 *A. tumefaciens*에 의한 매개 전환, 급속 추진형 텅스텐 또는 금 미세투사물, 및 전기 천공, 미세주사 및 폴리에틸렌 글리콜 매개 흡수를 포함한다. 상기 DNA는 단일 또는 이중 가닥일 수 있고, 선형 또는 원형, 느슨하거나 초나선형 DNA일 수 있다. 포유류 형질전환을 위한 다양한 기술로서, 예를 들어, Keown et al. (1990) *Processes in Enzymology* 185:527-537에 개시되어 있다.

[0365] 추가적 양태로서, 본 발명은 (i) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 162로 표시되는 아미노산 서열과

적어도 30% 서열 상동성을 갖는 보조 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하도록 조작된 숙주세포를 제공하고, 여기서 상기 숙주세포는 목적 단백질을 암호화하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하며, ii) 목적 단백질을 발현하고 보조 단백질을 과발현하는 적합한 조건 하에서 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는 숙주세포에서 목적 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0366]

본 발명에서 개시된 방법은 POI 및 보조 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 상기 재조합 숙주세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 것으로 이해된다. 재조합되어 생성된 POI는 상기 세포 또는 세포 배지로부터 발현 시스템 및 발현 단백질의 특성, 예를 들어, 신호 웨პ티드에 융합되는 단백질인지 여부, 및 수용성 또는 막 결합 단백질인지 여부에 따라 분리될 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 배양 조건은 숙주세포의 형태, 특히 적용되는 발현 벡터를 포함하는 요소에 따라 다양할 수 있다. 신호 웨პ티드는 일반적으로 양 전하를 띠는 N-말단, 뒤이어 소수성 코어, 뒤이어 신호 웨პ티다아제로 알려져 있는 효소의 인식 부위를 포함한다. 상기 효소는 전좌 과정 동안 단백질로부터 신호 웨პ티드를 절단한다. 상기 단백질은 소포체에서 골지체로 전달되고, 이후, 단백질의 특성에 따라, 수많은 분비 기작의 경로 중 하나에 따르게 된다. 예를 들어, 상기 단백질은 배양 배지에 분비될 수 있고, 상기 세포의 표면에 부착되어 있을 수 있다. 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포질 도메인을 포함하는 수용체들은 세포 막에 부착될 수 있는 단백질의 예시들이며, 세포외 도메인만이 세포의 바깥 쪽에 위치한다. 어떤 분비 단백질의 선도 서열은 신호 단백질의 C-말단에 위치하고, 신호 단백질의 절개 이후, 성숙한 목적 단백질로부터 처리(가공)되는 웨პ티드를 포함한다. 이러한 선도 서열은 종종 프리프로(prepro) 웨პ티드로 나타내며, 프리(pre) 지역은 신호 서열이고, 프로(pro) 지역은 선도 서열의 남은 부위를 나타낸다.

[0367]

하나의 예시로서, 효모 α -인자 선도 서열로서, 신호 웨პ티드 (C- 말단 신호 웨პ티다아제 인식 부위 AlaLeuAla를 포함), 뒤이어 KEX2 프로테아제 처리 부위를 구성하는 염기성 아미노산 쌍 LysArg를 포함하는 프로 지역, 뒤이어 프로 지역의 C 말단에 웨პ티드 GluAlaGluAla를 포함한다. 선도 서열의 처리는 KEX2 프로테아제의 Lys와 Arg 잔기 사이의 절단에 의한, 신호 웨პ티다아제의 신호 웨პ티드 제거를 포함한다. 상기 GluAlaGluAla 잔기는 뒤이어 STE13 유전자의 산물인 웨პ티다아제에 의해 제거된다 (Julius et al., Cell (1983) 32:839). 상기 효모 α -인자 선도 서열은 미국 특허 4,546,082에 기술되어 있다. 효모 세포에 의해 자연적으로 분비되는 단백질로부터 유래한 신호 웨პ티드는 효모에서 이종 단백질 생산을 위한 재조합 발현 시스템으로 이용되어 왔다. 효모 발현 시스템에서 포유류 신호 웨პ티드의 사용도 보고된 바 있으나, 어떤 포유류 신호 웨პ티드는 효모에서 이종 단백질의 분비를 촉진하는데 효과적이지 않다.

[0368]

상기 표현, "목적하는 폴리웨პ티드가 발현되기에 적합한 조건 하에서 배양하는 것"은 목적하는 폴리웨პ티드를 수득하거나 목적하는 화합물의 산물을 수득하기에 적절하거나 충분한 조건 (예를 들어, 온도, 압력, pH, 기간 등) 하에서 미생물을 유지 및/또는 성장시키는 것을 나타낸다.

[0369]

보조 단백질(들) 및/또는 POI의 형질전환에 의해 수득되는 본 발명에 따른 숙주세포는 바람직하게 이종 단백질의 발현에 대한 부담없이, 많은 세포 수로 효과적인 성장이 가능한 조건에 배양될 수 있다. 목적 단백질 발현을 위하여 상기 세포들이 제조된 경우, 적합한 배양 조건은 선택되고, 목적 단백질의 생산은 최적화된다.

[0370]

예를 들어, 보조 단백질(들) 및/또는 POI(s)를 위하여 다른 프로모터 및/또는 복제물 및/또는 삽입 부위를 이용할 경우, 보조 단백질의 발현은 POI(s)의 발현과 관계된 시점 및 유도 수준의 관점에서 조절될 수 있다. 예를 들어, POI(s)의 유도 전, 보조 단백질(들)이 우선 발현될 수 있다. POI(s)의 번역 초기에, 보조 단백질이 이미 존재하는 경우 이점을 갖는다. 선택적으로, 보조 단백질(들) 및 POI(s)는 동일한 시점에 유도될 수 있다.

[0371]

유도성 프로모터는 유도 자극이 가해지는 순간, 활성화되도록 사용될 수 있고, 상기 프로모터의 조절 하에서 유전자의 전사를 직접 관여할 수 있다. 유도 자극이 있는 성장 조건에서, 일반적으로, 상기 세포는 정상 조건에 비해, 보다 느리게 성장되고, 상기 배양물은 종전 단계에서 많은 수의 세포로 이미 성장되어 있으므로, 전체로서 배양 시스템은 많은 양의 이종 단백질을 생산한다. 유도 자극은 바람직하게 적절한 시료 (예를 들어, AOX-프로모터를 위한 메탄올)의 첨가 또는 적절한 영양성분(예를 들어, MET3-프로모터를 위한 메티오닌)의 제거이다. 또한, 열 또는 삼투압 증진용 시약뿐만 아니라 에탄올, 메틸아민, 카드뮴 또는 구리의 추가도 발현을 유도할 수 있다. 본 발명에 따른 숙주세포는 바람직하게, 적어도 1g/L의 세포 밀도, 바람직하게 적어도 10g/L의 세포 건조 중량, 보다 바람직하게 적어도 50g/L의 세포 건조 중량률을 얻을 수 있는 최적화된 성장 조건 하의 바이오리액터에서 배양된다. 이는 생체 분자의 실험실 규모뿐만 아니라 견본 또는 산업 규모의 수율을 달성하는데 이점이 있다.

[0372]

본 발명에 따르면, 보조 단백질과의 동시-발현에 기인하여, 심지어 상기 목적 단백질의 바이오매스가 낮은 경우에도, 높은 수율로 POI를 수득할 수 있다. 따라서, mg POI/g 건조 바이오매스로 측정되는 높은 수율은 1 내지

200의 범위, 예를 들어 50 내지 200, 예를 들어 100-200로서, 실험실, 견본, 및 산업 규모에서 실현될 수 있다. 본 발명에 따른 숙주세포의 산물의 구체적인 수율은, 보조 단백질의 과발현이 없는 산물의 발현에 비해, 적어도 1.1배, 보다 바람직하게 적어도 1.2배, 적어도 1.3배, 적어도 1.4배의 증가, 몇몇의 경우에는 2배 이상의 증가를 제공한다.

[0373] 본 발명에 따른 숙주세포는 표준화 시험, 예를 들어 ELISA, 활성 어세이, HPLC, 표면 플라즈마 공명(Biocore), 웨스턴 블로트, 모세관 전기영동(Caliper), 또는 SDS-Page에 의해 숙주세포의 발현/분비 능력 또는 수율이 테스트 될 수 있다.

[0374] 바람직하게, 상기 세포는 적합한 탄소원을 포함하는 최소 배지에서 배양될 수 있고, 이에 따라, 분리 과정이 현격하게 간소화된다. 예를 들어, 최소화 배지는 활용 가능한 탄소원 (예를 들어, 포도당, 글리세롤, 에탄올 또는 메탄올), 대량 원소 (칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모니움, 클로라이드, 철레이트, 포스페이트) 및 미량 원소 (구리, 요오드, 망간, 몰리브덴산염, 코발트, 및 철 염, 및 보론산)를 포함하는 염을 포함한다.

[0375] 효모 세포의 경우, 상기 세포는 하나 또는 그 이상의 전술한 발현 백터로 형질전환될 수 있다. 이는 이배체 균주를 형성하고, 및 유도성 프로모터에 적합하게 변형된 전통적인 영양 배지에서 배양되며, 형질전환체를 선별하거나 목적하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭시킨다. 효모의 성장에 적합한 수많은 최소 배지는 당업계 알려져 있다. 이러한 배지를 중 어느 하나는 염 (예를 들어, 소듐 클로라이드, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 베퍼 (예를 들어, HEPES, 시트릭산 및 포스페이트 베퍼), 뉴클레오사이드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항체, 미량 원소, 비타민, 및 포도당 또는 등가의 에너지원이 필수적으로 첨가될 수 있다. 이 밖의 필수적 첨가제는 당업자에게 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등의 조건은 발현을 위해 선별된 숙주세포에서 종래 이용된 조건일 수 있고, 이는 당업자에게 알려져 있다. 다른 형태의 숙주세포에 대한 세포 배양 조건도 알려져 있고, 당업자에 의해 손쉽게 결정될 수 있다. 다양한 미생물에 대한 배양 배지의 설명은, 예를 들어, American Society for Bacteriology (Washington D.C, USA, 1981) 핸드북 "Manual of Methods for General Bacteriology"에 포함되어 있다.

[0376] 세포는 액체 배지에서 배양 (예를 들어, 유지 및/또는 성장)될 수 있고, 바람직하게 연속적 또는 간헐적으로, 전통적인 배양 방법, 예를 들어 정치 배양, 시험관 배양, 진탕 배양 (예를 들어, 회전식 진탕 배양, 진탕 플라스크 배양 등), 환기 교반 배양, 발효일 수 있다. 몇몇의 구현예에서 세포는 진탕 플라스크 또는 딥 웰 플레이트에서 배양될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는 바이오리액터 (예를 들어, 바이오리액터 배양 과정)에서 배양될 수 있다. 배양 과정은, 이에 제한되는 것은 아니라, 회분식 배양, 유가 배양, 및 연속적인 배양의 방법을 포함한다. 용어 "회분법" 및 "회분식 배양"은 배지, 영양, 보충 첨가제 등의 조성물이 배양 초기에 설정되어 있고, 배양 기간 동안 변경하지 않는 폐쇄적 시스템을 나타낸다; 그러나 이러한 배양은 배지의 과도한 산성화 및/또는 세포 사멸을 막기 위하여 pH 및 산소와 같은 인자의 조절이 가능할 수도 있다. 용어 "유가법" 및 "유가 배양"은 배양 과정에서 첨가(예를 들어, 정기적 또는 연속적인 첨가)되는 하나 또는 그 이상의 기질 또는 보충 제가 제외된 회분식 배양을 나타낸다. 용어 "연속법" 및 "연속적인 배양"은 바이오리액터에 정해진 배양 배지가 연속적으로 첨가되고, 목적하는 산물을 회수하기 위하여, 사용된 동일한 양 또는 "조건화된" 배지가 즉시 제거되는 시스템을 나타낸다. 이러한 수많은 배양 기술들은 발전해오고 있으며, 당업계에 널리 알려져 있다.

[0377] 몇몇의 구현예에서, 세포는 약 12 내지 24시간 동안 배양되고, 다른 구현예에서, 세포는 약 24 내지 36시간, 약 36 내지 48시간, 약 48시간 내지 72시간, 약 72 내지 96시간, 약 96 내지 120시간, 약 120 내지 144시간, 또는 144시간 이상의 기간 동안 배양된다. 다른 구현예에서, 배양은 목적하는 목적 단백질의 생산 수율에 이를 때까지의 충분한 기간 동안 이어진다.

[0378] 전술된 방법은 발현된 POI를 분리하는 단계를 포함한다. 만일, POI가 세포로부터 분리되면, 최신의 기술을 이용하여 배양 배지로부터 분리되고 정제될 수 있다. 세포로부터 POI의 분비는 일반적으로, 세포가 파괴되고 세포 내 단백질이 분비되어 생성된 결과물인, 단백질의 복합체 혼합물보다는, 배양물의 상청액으로부터 이들의 산물을 회수하는 것이 보다 바람직하다. 프로테아제 억제제, 예를 들어 페닐 메틸 설포닐 플루오라이드 (PMSF)는 정제 과정에서 단백질 분해성 퇴화를 억제하고, 항생제는 우발적인 오염물의 성장을 막기 위하여 포함될 수 있다. 상기 조성물은 당업계의 방법에 의해 농축, 여과, 투석될 수 있다. 선택적으로, 배양된 숙주세포는 세포 추출물에 포함된 목적 단백질을 수득하기 위하여, 초음파적으로, 기계적으로, 효소적으로, 또는 화학적으로 파쇄될 수 있고, 상기 목적 단백질은 분리 및 정제될 수 있다.

[0379] POI를 수득하기 위한 분리 및 정제 방법은 예를 들어, 염석, 용매 석출과 같이 용매의 차이를 활용한 방법, 초여과 및 젤 전기영동과 같이 분자량의 차이를 활용한 방법, 이온-교환 크로마토그래피와 같이 전기적 전하의 차

이를 활용한 방법, 친화 크로마토그래피와 같이 특정 친화력 차이를 활용한 방법, 가역상 고성능 액상 크로마토그래피와 같이 소수성의 차이를 활용한 방법, 등전점 전기영동과 같이 등전점의 차이를 활용한 방법에 기초할 수 있다. 특정 정제 단계는 바람직하게, 함께 발현되어 POI 제조물을 오염시킬 수 있는 보조 단백질을 제거하기 위하여 실시된다.

[0380] 분리 또는 정제된 POI는 전통적인 방법, 예를 들어 웨스턴 블로트, 단백질의 활성에 대한 특정 어세이와 같이 전통적인 방법에 의해 동정될 수 있다. 정제된 POI의 구조는 아미노산 분석, 아미노-말단 분석, 일차 구조 분석 등에 의해 정해질 수 있다. POI는 약학적 조성물의 활성 성분 또는 사료 또는 식품 첨가제로서의 필수요건을 충족시킬 수 있도록 대량 및 높은 정제율로 수득되는 것이 바람직하다.

[0381] 여기에서 본 발명은 특정한 방법론, 프로토콜, 또는 시약에 한정되지 않으며 그러한 것들은 다양하게 변할 수 있음으로 이해된다. 여기에서 제공된 논의 및 실시예들은 오로지 특정 구현예를 설명하기 위한 목적으로 제시되며 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 오로지 청구항에 의해서만 정의된다.

[0382] 달리 명시하지 않으면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학적 용어는 당해 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본 발명에서 기술한 용어와 동일 또는 동등한 방법, 장치 및 물질이 본 발명의 관행 또는 실험으로 사용될 수 있다 할지라도, 바람직한 방법, 장치 및 물질은 여기 본 발명에서 기술한 바와 같다.

[0383] 본 발명에서 언급한 모든 공개 문헌은 기술 또는 개시를 목적으로 하며, 예를 들어, 상기 공개 문헌들에 기술된 세포주, 컨스트럭트 및 방법론은 본 발명에서 기술된 발명과 연관지어 사용될 수 있다. 상기 공개 문헌은 종전에 개시되었던 것이며, 상기의 전체 내용은 오로지 본 출원일 전에 개시된 것이다. 본 발명자들은 선행 발명의 인해 본 발명의 개시가 이보다 앞설 자격이 없다는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0384] 본 발명의 실시예는 당업계의 일반적인 기술자에게 본 발명의 제조와 이용하기 위한 방법을 완전히 개시 및 기술하고자 제공하는 것으로서, 이로써 본 발명 및 청구항 기재의 범위를 한정하기 위한 의도는 아니다. 상용되는 수치 (예를 들어, 양, 온도, 농도 등)에 대한 정확성을 확보하고자 노력하였으나, 몇몇 실험적 오차 및 변수는 허용되어야 한다. 달리 명시하지 않으면, 부분은 중량에 대한 부분, 분자량은 평균 분자량, 온도는 섭씨 온도; 및 압력을 대기 또는 대기 부근의 압력이다.

[0385]

실시예

[0386] [0387] 이하의 실시예는 새롭게 동정된 보조 단백질 각각은, 이들의 과발현에 따라 재조합 단백질의 농도 (mg/L 부피당 산물) 및 수율 (mg/g 바이오매스당 산물, 바이오매스는 세포 건조 중량 또는 세포 함수 중량으로 측정됨)이 증가됨을 입증하고자 하였다. 실시예와 같이, 피카아 파스토리스 효모에서 재조합 항체 Fab 단편 및 재조합 효소의 수율은 증가된다. 진탕 배양 (진탕 플라스크 또는 딥웰 플레이트에서 수행됨) 및 실험 규모의 유가 배양에서 긍정적인 효과를 보여주었다.

실시예 1. *P. pastoris* 균주의 발생

[0388] a) 항체 Fab 단편 HyHEL을 분비하는 *P. pastoris*의 구축

[0389] *P. pastoris* CBS7435 (유전체는 CBS Kuberl et al. 2011에 의해 시퀀싱됨) mut^S 변이체가 숙주 균주로 사용되었다. pPM2d_pGAP 및 pPM2d_pAOX 발현 벡터는 WO 2008/128701A2에 기술된 pPuzzle_ZeoR 벡터 골격의 유도체로서, PUC19 세균성 복제 개시점 및 Zeocin 항생제 저항성 카세트로 이루어진다. 이종 유전자의 발현은 *P. pastoris* 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소화효소 (GAP) 프로모터 또는 알콜 산화효소 (AOX) 프로모터, 각각, 및 *S. cerevisiae* CYC1 전사 종결 인자에 의해 매개된다. 항체 Fab 단편 HyHEL의 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)는 (도 2) 벡터 DNA 주형 (N-말단 *S. cerevisiae* 알파 결합인자 신호 선도 서열과 목적 유전자를 전달)으로부터 표 3의 HyHEL-HC 및 HyGEL-LC에 대한 프라이머를 이용하여 증폭되었고, 이를 각각은 *SbfI* 및 *SfiI*으로 절단된 벡터 pPM2d_pGAP 및 pPM2d_pAOX 모두에 연결되었다. 상기 LC 단편은 pPM2d_pGAP 및 pPM2d_pAOX의 변이체에 연결되었고, 여기서 이후 선형화를 가능하게 하기 위하여, 상기 프로모터 부위 내 하나의 제한효소 부위가 교체되었고 (pPM2d_pGAP에서 *AvrII* 대신 *NdeI*, pPM2d_pAOX에서 *Bpu1102I* 대신 *Bsu36I*), 상기 HC 단편은 변형되지 않은 벡터에 연결되었다. 경쇄 및 중쇄의 서열을 검증한 후, 두 사슬의 발현 카세트는 양립할 수 있는 제한 효소 *MreI* 및 *AgeI*를 이용하여 하나 벡터 상에서 조합되었다.

[0391] 전기천공법에 의해 *P. pastoris*로 삽입하기 전(standard transformation protocol described in Gasser et al. 2013. Future Microbiol. 8(2):191-208), 플라스미드는 *Nde*I 제한 효소(pPM2d_pGAP) 또는 *Bsu*36I 제한 효소(pPM2d_pAOX)를 사용하여 각각 선형화되었다. 50 μg/mL의 Zeocin을 함유하는 YPD 플레이트 (리터당: 10g 효모 추출액, 20g 웨톤, 20g 포도당, 20g agar-agar) 상에서 양성 형질전환체의 선별을 실시하였다. 콜로니 PCR이 변형된 플라스미드의 존재를 확인하는데 사용되었다. 따라서, 각각 5분간 *P. pastoris* 콜로니를 가열 및 동결하고, 적절한 프라이머로 PCR을 실시하여 유전체 DNA를 수득하였다.

[0392] b) 항체 Fab 단편 SDZ을 분비하는 *P. pastoris* 균주의 구축

[0393] 항체 Fab 단편 SDZ의 경쇄 (LC) 및 중쇄(HC)는 (도 2)는 벡터 DNA 주형 (N-말단 알파 결합인자 신호 선도 서열과 목적 유전자를 전달)으로부터 표 3의 SDZ-HC 및 SDZ-LC에 대한 프라이머를 이용하여 증폭되었고, 이들 각각은 *Sbf*I 및 *Sfi*I으로 절단되고 *Bsu*36I 제한효소 부위를 갖는, 벡터 pPM2d_pAOX 또는 pPM2d_pAOX의 변이체에 각각 연결되었다. 경쇄 및 중쇄의 서열을 검증한 후, 두 사슬의 발현 카세트는 양립할 수 있는 제한 효소 *Mre*I 및 *Age*I을 이용하여 하나 벡터 상에서 조합되었다.

[0394] 전기천공법에 의해 *P. pastoris*로 삽입하기 전(standard transformation protocol described in Gasser et al. 2013. Future Microbiol. 8(2):191-208), 플라스미드는 *Bsu*36I 제한 효소를 사용하여 각각 선형화되었다. 50 μg/mL의 Zeocin을 함유하는 YPD 플레이트 (리터당: 10g 효모 추출액, 20g 웨톤, 20g 포도당, 20g agar-agar) 상에서 양성 형질전환체의 선별을 실시하였다. 콜로니 PCR이 변형된 플라스미드의 존재를 확인하는데 사용되었다. 따라서, 각각 5분간 *P. pastoris* 콜로니를 가열 및 동결하고, 적절한 프라이머로 PCR을 실시하여 유전체 DNA를 수득하였다.

[0395] 표 3은 SDZ LC 및 HC 뿐만 아니라, HyHEL LC 및 HC의 PCR 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 나타낸다 (알파-결합인자_정방향(Alpha-mating factor_forward)은 Fab 사슬 전체의 증폭을 위한 정방향 프라이머이다.).

[표 3]

프라이머	부착된 제한효소 부위	서열
Alpha-mating factor_forward*	<i>Sbf</i> I	ACTACCTGCAGGCAGAACGATGAGATTCCCATC 서열번호 33
HyHEL-HC backward	<i>Sfi</i> I	TCATGGCCGAGGCAGGCCCTATTACTTGTACAGG ACTTTGGCTC 서열번호 34
HyHEL-LC backward	<i>Sfi</i> I	CTATGGCCGAGGCAGGCCCTATTAAACACTCACCTC TGTTG 서열번호 35
SDZ-HC back	<i>Sfi</i> I	TATCGGCCGAGGCAGGCCCTATTACTTACCTGGG GACAAG 서열번호 36
SDZ-LC back	<i>Sfi</i> I	CTATGGCCGAGGCAGGCCCTATTAAACACTCACCTC TGTTG 서열번호 37

[0397]

실시예 2 케모스태트 배양

[0399] 배양은 최대 10L의 작업 액량(working volume)을 갖는 1.4 L DASGIP 리액터 (Eppendorf, Germany)에서 실시되었다.

[0400] 하기의 배지가 이용되었다:

[0401] 하기를 함유하는 PTM1 미량 염 저장 용액 (리터당): 6.0 g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08 g NaI, 3.36 g MnSO₄ · H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02 g H₃BO₃, 0.82 g CoCl₂, 20.0 g ZnCl₂, 65.0 g FeSO₄ · 7H₂O, 및 5.0 mL H₂SO₄ (95 %-98 %).

[0402] 하기를 함유하는 글리세롤 회분 배지 (리터당): 2 g Citric acid monohydrate (C₆H₈O₇ · H₂O), 39.2 g Glycerol, 20.8 g NH₄H₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 1.6 g KC1, 0.022 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.8 mg 비오틴 및 4.6 mL PTM1 미량 염 저장 용액. HCl을 첨가하여 pH 5로 조정하였다.

[0403] 하기를 함유하는 포도당 케모스태트 배지 (리터당): 2.5 g Citric acid monohydrate (C₆H₈O₇ · H₂O), 55.0 g

glucose monohydrate, 21.8 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g KCl, 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.0 mg 비오틴 및 2.43 mL PTM1 미량 염 저장 용액. HCl을 첨가하여 pH 5로 조정하였다.

[0404] 하기를 함유하는 메탄올/글리세롤 캐모스태트 배지 (리터당): 2.5 g Citric acid monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 8.5 g methanol, 50.0 g glycerol, 21.8 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g KCl, 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.0 mg 비오틴 및 2.43 mL PTM1 미량 염 저장 용액. HCl을 첨가하여 pH 5로 조정하였다.

[0405] 용존 산소는 교반 속도 (400–1200 rpm) 및 환기 속도 (12–72 표준상태의 리터/시간 (sL/h))에서 DO=20%로 조절되었고, 온도는 25°C, pH 설정은 NH_4OH (25%)를 첨가하여 5로 조정되었다. 생성되는 거품은, 필요한 경우 거품방지제(5% Glanapon 2000)를 첨가하여 조절되었다.

[0406] 배양을 시작하기 위하여, 0.4 L 회분 배지를 멸균 여과시키고 멸균된 작업대에 있는 발효조로 옮겼으며, 여기에 1의 광학 밀도 (OD_{500})로 시작되도록 접종되었다 (50 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin을 포함하는 YPG에서 180 rpm, 28°C로 밤새도록 전-배양시킨 *P. pastoris*로부터). 약 24시간의 회분 단계는 약 20g/L 농도의 건조 바이오매스에 도달하게 하였고, 이후, 40 mL/h ($\mu\text{D}=0.1/\text{h}$)의 캐모스태트 배지를 일정하게 공급함과 동시에 배지를 일정하게 제거하여 전체 부피가 일정하게 유지되도록 하였다. 약 25g/L의 건조 바이오매스 농도는 7 잔류 시간 (70 시간)후 도달하였으며, 이 때, 마이크로어레이 실험을 위한 샘플이 수거되고 배양이 종결되었다. 캐모스태트 배양은 각각의 생산 균주 (포도당 캐모스태트 배지를 이용한 CBS7435 pGAP HyHEL-Fab 및 메탄올/글리세롤 캐모스태트 배지를 이용한 CBS7435mut^S pAOX HyHEL-Fab) 및 비생산 야생형 대조 균주 (CBS7435 pGAP control 및 CBS7435mut^S pAOX control)에 대해 3회 실시하여, 믿을 만한 마이크로어레이 분석에 필요한 생물학적 복제물을 수득하였다.

[0407] 샘플은 약 70시간 후, 캐모스태트의 정상 상태 조건에서 수거되었다. 광학 밀도 또는 효모 건조 중량, 정성적인 현미경 관찰, 세포 생존 능력 검사와 같은 통상적인 샘플의 처리가 배양과 함께 진행되었다. 마이크로어레이 분석을 위하여 샘플은 수거되고 하기와 같이 처리되었다: 최적의 퀸칭을 위하여, 9mL 세포 배양 브로스는 즉시 4.5mL의 차가운 5% 폐놀 (Sigma) 용액 (에탄올 abs 내)과 혼합되었고, 사용할 만큼 분주되었다. 2mL의 각 용액은 예냉된 수집 퓨브 (GE healthcare, NJ),에서 원심분리되었으며 (1분간 13,200 rpm), 상청액은 완전히 제거되고 세포 펠릿을 포함하는 상기 퓨브는 RNA 분리 전까지 -80°C에서 보관되었다.

0408] 실시예 3. 마이크로 어레이 & 전사체 실험을 위한 데이터 분석

a) RNA 분리 및 마이크로어레이 혼성을 위한 샘플의 제조

[0409] 제조사의 지침 (Ambion US)에 따른 TRI 시약을 이용하여, 캐모스태트 샘플 세포로부터 RNA를 분리하였다. 세포 펠릿은 TRI 시약에 재현탁되었고, 40초 동안 5m s^{-1} 속도의 FastPrep 24 (M.P. Biomedicals, CA)을 이용하여 글라스 비드로 균질화되었다. 클로로포름을 첨가한 후, 상기 샘플은 원심분리되고, 전체 RNA는 이소프로판올의 첨가에 의해 수상으로부터 침전되었다. 상기 펠릿은 70% 에탄올로 세척되었고, 건조된 뒤 RNase 제거 증류수 (RNase free water)에 재현탁되었다. RNA 농도는 Nanodrop 1000 분광 광도계 (NanoDrop products, DE)를 이용하여 OD_{260} 을 측정하여 확인되었다. 상기 샘플로부터 잔존하는 DNA는 DNA free Kit (Ambion CA)를 이용하여 제거되었다. 10 μg RNA와 같은 부피의 샘플은 RNAse free water에서 50 μL 로 희석되었으며, 이후 DNase buffer I 및 rDNase I이 첨가되었고 37°C에서 30분간 인큐베이션되었다. DNase 불활성 시약을 첨가한 후, 샘플은 원심분리되고, 상청액은 새로운 퓨브로 옮겨졌다. RNA 농도는 상기 전술한 바와 같이 재차 확인되었다. 추가적으로, RNA 순도는 RNA 나노 칩(Agilent)를 이용하여 분석되었다. 증폭 및 표지된 샘플의 혼성물 (혼합물)로부터 마이크로어레이의 결과를 모니터링하기 위하여, Spike In Kit (Agilent, Product Nr.: 5188-5279)이 양성 대조군으로 사용되었다. 상기 대조군은 아데노바이러스 유래의 10개의 다른 폴리아데닐화된 전사체로서, 증폭 및 표지되고 상기 RNA 샘플과 함께 혼성되었다. 상기 샘플은 Quick Amp Labelling Kit (Agilent, Prod. Nr.5190-0444)을 이용하여 Cy3 및 Cy5로 표지되었다. 따라서 500ng의 정제된 RNA 샘플은 8.3 μL RNAse free water에 희석되었고, 2 μL Spike A 또는 B, 및 1.2 μL T7 프로모터 프라이머가 첨가되었다. 상기 혼합물은 65°C에서 10분간 변성되었고, 5분간 아이스에서 보관되었다. 이후 8.5 μL cDNA mastermix (샘플당: 4 μL 5x first strand buffer, 2 μL 0.1 M DTT, 1 μL 10 mM dNTP mix, 1 μL MMLV-RT, 0.5 μL RNase out)이 첨가되고, 40°C에서 2시간 동안 인큐베이션된 뒤, 65°C에서 15분간 옮기고 아이스에 5분간 보관되었다. 상기 전사체 mastermix (샘플당: 15.3 μL nuclease free water, 20 μL transcription buffer, 6 μL 0.1 M DTT, 6.4 μL 50% PEG, 0.5 μL RNase Inhibitor, 0.6 μL inorg. phosphatase, 0.8 μL T7 RNA Polymerase, 2.4 μL Cyanin 3 또는 Cyanin 5)가 제조되고, 각각의 퓨브에 첨가되었으며, 40°C에서 2시간 동안 인큐베이션되었다. 수

득한 표지된 cRNA를 정제하기 위하여, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat.No. 74104)가 사용되었다. 샘플은 80°C에서 보관되었다. cRNA 농도 및 표지 효율의 정량화는 Nanodrop 분광 광도계에서 실시되었다.

[0411] b) 마이크로어레이 분석

[0412] Gene Expression Hybridisation Kit (Agilent, Cat. No. 5188-5242)가 표지된 샘플 cRNAs의 혼성을 위해 사용되었다. 혼성화 샘플의 제조를 위하여, 300 ng cRNA (Cy3 and Cy 5) 및 6 μ L 10 배 차단제를 nuclease free water에 희석시켜 최종 부피가 24 μ L에 이르도록 하였다. 1 μ L 25배 파쇄 베퍼를 첨가한 후, 상기 혼합물을 60 °C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 25 μ L GEX 혼성 베퍼 HI-RPM이 반응을 정지시키기 위하여 첨가되었다. 13,200rpm으로 1분간 원심분리한 뒤, 상기 샘플은 아이스에서 냉각되었고, 즉시 혼성을 위하여 사용되었다. 인-하우스 설계된, *P. pastoris* 특이적 올리고뉴클레오티드 어레이 (AMAD-ID: 034821, 8x15K custom arrays, Agilent)가 사용되었다. 마이크로어레이 혼성은 마이크로어레이 혼성 챔버 사용자 가이드 (Agilent G2534A)에 의해 실시되었다. 우선, 게스킷 슬라이드를 벗겨내고 챔버 기저부에 옮겨두었으며, Agilent 표지가 위를 향하도록 하였다. 샘플 (어레이당 40 μ L)는 8 제곱의 챔버 각각의 중앙에 로딩되었다. 이후, 마이크로어레이 슬라이드는 조심스럽게 게스킷 슬라이드 위에 두었고 (Agilent 표지가 아래를 향함), 챔버 커버가 놓여지고 클램프로 고정화되었다. 모든 샘플은 염료 스왑 방식으로 참조 샘플 군에 대하여 혼성화되었다. RNA 샘플 군은 동량의 다양한 배양물 유래의 RNA를 조합하여 제조되었다. 혼성은 65°C에서 17시간 동안 혼성화 오븐 내에서 진행되었다. 결과를 확인하기 전, 상기 마이크로어레이 칩은 세척되었다. 따라서, 상기 챔버는 해체되었고, 샌드위치 슬라이드가 세척 베퍼 1 내 잡겨있는 동안 각각으로부터 분리되었다. 마이크로어레이에는 바로 세척 베퍼 1이 있는 다른 접시로 옮겨졌고, 1분간 세척되었다. 세척 베퍼 2로 옮겨지고(적어도 30°C 온도), 1분간 세척되었다. 얇은 종이로 슬라이드를 가장 부위만을 건드려 마이크로어레이 슬라이드를 건조시킨 후, 슬라이드 홀더에 두었다 (Agilent 표지가 위를 향함). 슬라이드 홀더에서 결과의 스캐닝이 시작되었다.

[0413] c) 데이터 획득 및 마이크로어레이 데이터의 통계학적 평가

[0414] 이미지는 G2565AA Microarray scanner (Agilent)를 사용하여 50 nm의 해상도로 스캐닝되었고, 그 결과는 Agilent Feature Extraction 9.5 software로 가져왔다. Agilent Feature Extraction 9.5은 점 강도의 정량화를 위하여 상용되었다. 추가적인 정규화 및 데이터 분석을 위하여, 원시 평균 점 강도의 데이터는 오픈 소스 소프트웨어 R로 옮겨졌다.

[0415] 차등 발현 값을 산출하기 전에, 상기 강도 데이터는 정규화되었다 (배경의 수정은 없었고, Loess 슬라이드 정규화 방법 내 및 Aquantile 슬라이드 정규화 방법이 사용되었다.). 차등 발현 값과 연관된 P-value는 적합한 선형 모델(limma R package)을 사용하여 산출되었고, 뒤이어, Benjamini 및 Yekutieli (limma R package 방법에 의해)의 방법을 이용하여 수많은 실험에 적용되었다. 이들 각각의 대조군에 대한 HyHEL-Fab 생산 균주의 Log2 배 변화를 산출하였다.

[0416] 마이크로어레이 데이터는 HyHEL-Fab를 생산하는 CBS7435의 캐모스태트의 3회 배양물과 이의 비생산 대조 숙주간 발현 수준(배수값 변화 >1.5)에서의 유의차 (p-value<0.05)를 기준으로 확인하였다.

[0417] 표 4는 HyHEL-Fab를 생산하는 *P. pastoris*의 마이크로어레이 분석에 따른 상향 조절 유전자를 나타내었다.

[0418]

[표 4]

유전자 식별자 <i>P. pastoris</i> CBS7435	마이크로어레이 프로브 명칭	대조군 대비 CBS7435 pPM2d_pGAP HyHEL 내 전사체 수준의 배수 변화	대조군 대비 CBS7435 pPM2d_pAOX HyHEL 내 전사체 수준의 배수 변화
PAS_chr4_0822	Pipas_chr4_0822	1.20	8.27
PP7435_Ch4-1007	Pipas_chr4_0009	2.68	5.56
PP7435_Ch3-0183	Pipas_chr3_0987	2.17	5.47
PP7435_Ch1-1225	Pipas_chr1-4_0431	2.48	4.76
PP7435_Ch4-0976	PIPA00444	2.27	4.22
PP7435_Ch2-0351	Pipas_chr2-2_0331	1.74	4.10
PP7435_Ch1-0941	Pipas_chr1-4_0167	0.93	3.12
PP7435_Ch3-0933	Pipas_chr3_0288	2.06	3.11
PAS_chr3_0401	Pipas_chr3_0401	2.59	2.92
PP7435_Ch1-1232	Pipas_chr1-4_0681	1.57	2.79
PP7435_Ch4-0294	Pipas_chr4_0673	2.11	2.70
PP7435_Ch1-0667	Pipas_chr1-1_0348	2.02	2.69
PP7435_Ch3-0607	Pipas_chr3_0598	2.02	2.59
PP7435_Ch2-0722	Pipas_chr2-1_0566	1.13	2.50
PP7435_Ch2-0842	Pipas_chr2-1_0454	4.16	2.43
PAS_chr3_0821	Pipas_chr3_0821	1.40	2.18
PP7435_Ch2-0501	Pipas_chr2-1_0887	2.69	2.18
PP7435_Ch2-0220	Pipas_chr2-2_0210	1.27	2.17
PP7435_Ch3-0278	Pipas_chr3_0895	1.06	2.09
PP7435_Ch4-0108	Pipas_chr4_0843	1.80	2.04
PP7435_Ch2-1019	Pipas_chr2-1_0287	1.52	2.04
PP7435_Ch3-1062	Pipas_chr3_0170	1.75	1.96
PP7435_Ch4-0448	Pipas_chr4_0972	2.31	1.95
PP7435_Ch3-0837	Pipas_chr3_0377	1.38	1.87
PP7435_Ch1-0176	Pipas_chr1-3_0174	1.70	1.84
PP7435_Ch3-0156	Pipas_chr3_1014	1.30	1.84
PP7435_Ch4-0582	Pipas_chr4_0403	1.34	1.82
PP7435_Ch2-0638	Pipas_chr2-1_0642	2.35	1.78
PP7435_Ch3-0639	Pipas_chr3_0567	1.70	1.73
PP7435_Ch2-0866	Pipas_chr2-1_0433	1.36	1.71
PP7435_Ch2-0028	Pipas_chr2-2_0031	1.70	1.71
PP7435_Ch1-1009	Pipas_chr1-4_0229	4.09	1.70
PP7435_Ch2-0848	Pipas_chr2-1_0448	1.39	1.70
PP7435_Ch1-0470	Pipas_chr1-1_0160	1.39	1.69
PP7435_Ch1-0077	Pipas_chr1-3_0080	1.31	1.68
PP7435_Ch1-1220	Pipas_chr1-4_0428	1.49	1.68
PP7435_Ch1-0571	Pipas_chr1-1_0276	2.18	1.68

[0419]

PP7435_Ch1-0204	Pipas_chr1-3_0202	0.71	1.67
PP7435_Ch4-0182	Pipas_chr4_0775	1.22	1.65
PP7435_Ch4-0320	Pipas_chr4_0650	1.26	1.65
PP7435_Ch3-0548	Pipas_chr3_0652	2.29	1.62
PP7435_Ch2-1300	Pipas_chr2-1_0002	3.71	1.62
PP7435_Ch1-1077	Pipas_chr1-4_0294	1.46	1.61
PP7435_Ch4-0699	Pipas_chr4_0299	1.43	1.61
PP7435_Ch2-0729	Pipas_chr2-1_0560	1.12	1.56
PP7435_Ch4-0923	Pipas_chr4_0093	0.94	1.53
PP7435_Ch1-0592	Pipas_chr1-1_0276	1.59	1.52

[0420]

[0421]

실시예 4 동정된 유전자를 과발현하는 균주의 제조

[0422]

Fab 분비에 대한 긍정적인 효과를 조사하기 위하여, 동정된 유전자는 두 Fab 생산 균주: 마이크로어레이 데이터를 기반으로 하는 CBS7435 pPM2d_pAOX HyHEL (실시예 3) 및 CBS7435 pPM2d_pAOX SDZ (제조는 실시예 1 참조)에

서 과발현되었다.

[0423] a) pPM2aK21 발현 벡터에서 동정된 잠재적 분비 보조 유전자의 증폭 및 복제

[0424] 개시 코돈으로부터 종결 코돈 방향으로 표 5에 표시된 프라이머를 이용한 PCR (Phusion Polymerase, New England Biolabs)을 실시하여 실시예 3에서 동정된 유전자는 증폭되었다. 상기 서열은 두개의 제한 효소 *SbfI* 및 *SfiI*를 지닌 pPM2aK21 발현 벡터의 MSC 내에 복제되었다. pPMKaK21는 pPM2d (실시예 1a에 기술됨)의 유도체로서, AOX 종결인자 서열 (본래의 AOX 종결 유전자 자리에 삽입하기 위하여), *E. coli* (pUC19) 복제를 위한 개시점, *E. coli* 및 효모의 선별을 위한 항체 저항 카세트 (*kanMX*는 카나마이신 및 G418에 대한 저항성을 부여함), GAP 프로모터, 다중 복제 부위 (MCS)로 이루어진 목적 단백질 (GOI)을 위한 발현 카세트, *S. cerevisiae CYC1* 전사 종결 인자로 이루어진다. 유전자 서열은 Sanger 시퀀싱에 의해 검증되었다.

[표 5]

유전자 식별자 (ORF name CBS7435)	정방향 프라이머(<i>SbfI</i> 부착) 서열번호 38	역방향 프라이머 (<i>SfiI</i> 부착)
PAS_chr4_0822	CTTGCCTGCAGGATGCTAACGGCCAGTTGGTC 서열번호 38	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCAGCAGTATTCCC ACCGAATC 서열번호 39
PP7435_Chr4-1007	CTTGCCTGCAGGATGTCAGTTCAATTGTTATA GCAGC 서열번호 40	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCATATAAAAGGTT TATCATAATTCTCATCCTCAG 서열번호 41
PP7435_Chr3-0183	GAAACCTGCAGGATGTCGAATTGTTGCTAAA ATTAACATTC 서열번호 42	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTTAGGCAGTTGGA ACGTTC 서열번호 43
PP7435_Chr1-1225	GAAACCTGCAGGATGTCATCTATTACTGCGT GACAGC 서열번호 44	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCATGGCCCGCA TATCTAG 서열번호 45
PP7435_Chr4-0976	GACACCTGCAGGATGTCGAATCCTCCAGTATC TCTCTAGTTG 서열번호 46	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTAGATACATCCCA AAAGTGCACCG 서열번호 47
PP7435_Chr2-0351	GATACCTGCAGGATGATCCTGGTTCAAGTTGG G 서열번호 48	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTAAAGTTGCTG CAGCATTGAGAG 서열번호 49
PP7435_Chr1-0941	CTTGCCTGCAGGATGGGTTGCTTAGTTTGT CTGG 서열번호 50	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTATTGTATACGT GCTGTGGAGCC 서열번호 51
PP7435_Chr3-0933	CTTGCCTGCAGGATGTTAAACAAGCTGTTCA GCAAACTC 서열번호 52	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTAGCTGGCAAGG GTAATTGTCTC 서열번호 53
PAS_chr3_0401	GACACCTGCAGGATGGCTCTAAACACCCAAG G 서열번호 54	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCAAAAAAACAAAT CTCAAAATCTCCAG 서열번호 55
PP7435_Chr1-1232	GTACCCCTGCAGGATGACCAAGGAAAATGAAGC C 서열번호 56	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTTATTTTCTCAA TTCAGCCAG 서열번호 57
PP7435_Chr4-0294	GAAACCTGCAGGATGCTGTTGTCACATACCAT GATACTTC 서열번호 58	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTTAAGATTGCTTCT TTTGAGATTGG 서열번호 59
PP7435_Chr1-0667	GAAACCTGCAGGATGACGGACTATGTCACCTC TAAGCG 서열번호 60	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTATAATCTCCCTC CAGGGG 서열번호 61
PP7435_Chr3-0607	GAAACCTGCAGGATGTCGTCGATGCTGTGGA G 서열번호 62	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCAAATAATGCTAC ATTGCGTTCTTC 서열번호 63
PP7435_Chr2-0722	CTTGCCTGCAGGATGTCCTATACTCGGACAAC AAAGAG 서열번호 64	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTTACGTGTATCCGC TTCCTCTGTAC 서열번호 65
PP7435_Chr2-0842	GATACCTGCAGGATGAACTTGACCTAATTACA TTACTATTCGC 서열번호 66	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTAGAACCCACATT GATTGGATACTG 서열번호 67
PAS_chr3_0821	GAAACCTGCAGGATGTCGTTACACCTTCTA GGCG 서열번호 68	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTCAGACTCTACTCA TCATTTGTCTTCCTC 서열번호 69
PP7435_Chr2-0501	GAAACCTGCAGGATGATGTACAGGAACCTTAAT AATTGCTACTGC 서열번호 70	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTAACACTCTATGA GGTCTACAATGTCCAAC 서열번호 71
PP7435_Chr2-0220	CATGCCTGCAGGATGTCAGCAATTCCAGG AGGAC 서열번호 72	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTTAGTTGATCAACT TTCTGTCACTGCTAG 서열번호 73
PP7435_Chr3-	GACACCTGCAGGATGAGTGGTGACCATAAGAG	GATCGGCCGAGGCAGGGCCTACTGTGTACCAT

[0426]

0278	CTTTACG 서열번호 74	ACCGATCCAATCC 서열번호 75
PP7435_Ch4-0108	CTTGCCTGCAGGATGACTAACTGGAAAGCGAT ATTGACTCC 서열번호 76	GATCGGCCGAGGCCCTAGTTCTCTTC ACCTGAAATTTAGGC 서열번호 77
PP7435_Ch2-1019	GCAACCTGCAGGATGTCTTATGCCCTCAGTT CAAC 서열번호 78	GATCGGCCGAGGCCCTCAATAGATCTTT TCTTTCATCAAAACTCAAC 서열번호 79
PP7435_Ch3-1062	GATACCTGCAGGATGGGGTGCACAACCTAA TAAC 서열번호 80	GATCGGCCGAGGCCCTAGGTACTATGCT GAACATCCTGAGTATGAG 서열번호 81
PP7435_Ch4-0448	GAAACCTGCAGGATGAGATTTCTAACGTCGTT TTAACTGC 서열번호 82	GATCGGCCGAGGCCCTACAAGGCAAAG ACTCCGAAAGTG 서열번호 83
PP7435_Ch3-0837	GACACCTGCAGGATGACTGTGCCTGATCTGAA AGAAAC 서열번호 84	GATCGGCCGAGGCCCTCAGGCCAGCGCA ACG 서열번호 85
PP7435_Ch1-0176	CTTGCCTGCAGGATGAAGATATGGCTGGTACTT CTTTAGTTTTG 서열번호 86	GATCGGCCGAGGCCCTACAATTGCTCTC TAATTTGTTGCG 서열번호 87
PP7435_Ch3-0156	CTTGCCTGCAGGATGGGAGCTTCCAGTCG 서열번호 88	GATCGGCCGAGGCCCTATTCTATCATAAA CTTCTCTATGGTGGC 서열번호 89
PP7435_Ch4-0582	CTTGCCTGCAGGATGGGATCCTTTCAATTCTC TCAC 서열번호 90	GATCGGCCGAGGCCCTACTTGGAGACA GATCTCCACCTAAC 서열번호 91
PP7435_Ch2-0638	GAAACCTGCAGGATGACCAAGTCAAGGATTTT GGATC 서열번호 92	GATCGGCCGAGGCCCTATATGCTATCAA CCATCTCCATCAAATAAC 서열번호 93
PP7435_Ch3-0639	GACACCTGCAGGATGACTCCCCGTTCTCATATT TTC 서열번호 94	GATCGGCCGAGGCCCTACTCAAAGAAC TTAGACAAAGCAGCTTCTC 서열번호 95
PP7435_Ch2-0866	GATCCCTGCAGGATGGCAGAAGAAGAAC 서열번호 96	GATCGGCCGAGGCCCTAATTAGTAATAC TTGCTCTATTCCTGGTACAAC 서열번호 97
PP7435_Ch2-0028	GAACCTGCAGGATGATTTGAGCAAGCTGTC GTTTAGAC 서열번호 98	GATCGGCCGAGGCCCTATTATTAACAA TGACATCATCTCAAACCTG 서열번호 99
PP7435_Ch1-1009	CTTGCCTGCAGGATGGGTGCCATTGGAATG 서열번호 100	GATCGGCCGAGGCCCTATTGAGAACAT TCGATATCCAATC 서열번호 101
PP7435_Ch2-0848	GATACCTGCAGGATGCTACCATTTCGTACGAC GTG 서열번호 102	GATCGGCCGAGGCCCTATAACTCTCCAT TCTCTCGTGCATC 서열번호 103
PP7435_Ch1-0470	GATCCCTGCAGGATGAAAATTAAGTCATTG CTTCTCTTTTAC 서열번호 104	GATCGGCCGAGGCCCTATAGCTCTGGT GTAATAACTGGGG 서열번호 105
PP7435_Ch1-0077	CTTGCCTGCAGGATGTCTAACCCCTACAAGCTG ATAGGTGAG 서열번호 106	GATCGGCCGAGGCCCTTAATCTCTCCAG CAGGTATCTCATCC 서열번호 107
PP7435_Ch1-1220	CTTGCCTGCAGGATGAATCAATTCTCTAGCTT CACAAAGTAAAC 서열번호 108	GATCGGCCGAGGCCCTACTCGGTTAATG GTCCGAGTGC 서열번호 109
PP7435_Ch1-0571	GACACCTGCAGGATGAGTTAGGAAAGACAA CAAACAAAAG 서열번호 110	GATCGGCCGAGGCCCTAGAAGGCAGCT TCATCATCG 서열번호 111
PP7435_Ch1-0204	CTTGCCTGCAGGATGAGCAGCTTCAGAGTTCA GAATTGG 서열번호 112	GATCGGCCGAGGCCCTACAGATCAACG AATCC 서열번호 113
PP7435_Ch4-0182	GATACCTGCAGGATGAACATCTTGAATCCTA GGTAAGTTTC 서열번호 114	GATCGGCCGAGGCCCTATTCTGGCAGCT TGAATTTC 서열번호 115
PP7435_Ch4-0320	CTTGCCTGCAGGATGTCCACAACTACTAAGAA AAACAAGAACAGG 서열번호 116	GATCGGCCGAGGCCCTACCATGCACCC TCCCTCTC 서열번호 117

PP7435_Ch3-0548	CTTGCCTGCAGGATGTCAGAGGAGTAAGAAC ACAAACAG 서열번호 118	GATCGGCCGAGGCCCTCAATTATTCTAG GTTTTTGGTTCG 서열번호 119
PP7435_Ch2-1300	GTACCCCTGCAGGATGATGGCAAGTCCAACCG 서열번호 120	GATCGGCCGAGGCCCTACACAACGCTG GTTG 서열번호 121
PP7435_Ch1-1077	CTTGCCTGCAGGATGAGTAACCAAGTATAATCC GTATGAGCG 서열번호 122	GATCGGCCGAGGCCCTATCTCCCCAGT TTCCGACAC 서열번호 123
PP7435_Ch4-0699	GTTACCTGCAGGATGTCTACAGAGAACAAAGC AGAGACAAAC 서열번호 124	GATCGGCCGAGGCCCTATTCTGGCTTC AGCGTTGC 서열번호 125
PP7435_Ch2-0729	CTTGCCTGCAGGATGTAAACCTAATATCCACA ATAAGTGGGTG 서열번호 126	GATCGGCCGAGGCCCTAAGCAGGAGCA GATAACCAAGC 서열번호 127
PP7435_Ch4-0923	CTTGCCTGCAGGATGGGTAGAAGGAAATAGA GATAAAATCCG 서열번호 128	GATCGGCCGAGGCCCTCAGCTCTTCTAG TCACACTGCTTG 서열번호 129
PP7435_Ch1-0592	CTTGCCTGCAGGATGTCACTCAACTGTCCATT ATCTTCG 서열번호 130	GATCGGCCGAGGCCCTACTCGTCTTCT TGTGCTCTC 서열번호 131

b) Fab를 생산하는 *P. pastoris* 균주 내 동정된 유전자의 동시 발현

[0430] Fab를 과발현하는 *P. pastoris* 균주 CBS7435mut^S pAOX HyHEL-Fab 및 CBS7435mut^S pAOX SDZ-Fab는 실시 예 3에서 동정되고, 실시예 4a에서 복제된 유전자의 동시발현을 위한 숙주세포로 사용되었다. Fab를 생산하는 균주로 형전환하기 전, 상기 실시예 3에서 동정된 분리 보조 유전자를 포함하는 pPM2aK21 벡터는 AOX 종결인자 서열 내에서 제한효소 *Ascl*로 선형화되었다. 양성 형질전환체는 G418을 포함하는 YPD 아가 플레이트 상에서 선별되었다.

[0431] 실시예 5 Fab 발현에 대한 스크리닝

[0432] 소-규모의 스크리닝에 있어서, 분비 보조 유전자 각각에 대한 8 내지 12개의 형질전환체를 비-조작된 모 숙주와 비교 실험하였고, 세포 성장, Fab 농도 및 Fab 수율의 효과에 기초하여 이들의 순위를 부여하였다. PP7435_Ch3-0933, PP7435_Ch3-0220, PP7435_Ch3-0639, PP7435_Ch1-1232, PP7435_Ch1-1225, PP7435_Ch3-0607, PP7435_Ch4-0448, PP7435_Ch4-0108, PP7435_Ch1-0667의 경우, 매우 우수한 효과를 확인하였다 (적어도 1.2배의 Fab 농도 또는 수율의 증가).

[0433] 이후, 실시예 7에서, 모든 이러한 복제물 (PP7435_Ch1-0667 제외)은 균주 개량을 검증하기 위하여 생산 과정의 조절 하에서 바이오리액터 내 배양되었다.

[0434] a) Fab 생산 피키아 파스토리스 균주의 소 규모 배양

[0435] 10 g/L 글리세롤 및 50 µg/mL Zeocin을 포함하는 2mL YP-배지 (10g/L 효모 추출물, 20g/L 템톤)에 *P. pastoris* 균주의 단일 콜로니가 접종되었고, 25°C에서 밤새도록 성장되었다. 이러한 배양물의 부분 표본 (2.0의 최종 OD₆₀₀에 상응)을 20 g/L 포도당 및 포도당 정제 (Kuhner, Switzerland; CAT# SMFB63319)를 포함하는 2mL의 합성 스크리닝 배지 M2 (배지 조성물은 하기에 기재)로 옮기고, 24 딥웰 플레이트 내 170 rpm, 25°C, 25 시간 동안 배양되었다. 상기 배양물은 원심분리에 의해 한번 세척되었고, 이후 펠릿은 합성 스크리닝 배지 M2에서 재현탁되었으며, 부분 표본 (4.0의 최종 OD₆₀₀에 상응)은 새로운 24 딥웰 플레이트 내 2mL의 합성 스크리닝 배지 M2로 옮겨졌다. 실온, 2500xg에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 수득하고 분식을 실시하기 전, 메탄올 (5g/L)은 48시간 동안 12시간마다 반복적으로 첨가되었다. 바이오매스는 1mL 세포 부유액 당 세포 중량을 측정하여 확인되었고, 상청액 내 재조합 분비 단백질의 확인은 하기 실시예 5b-6c에 기술하였다.

[0436] 리터 당 하기를 함유하는 합성 스크리닝 M2 : 22.0 g Citric acid monohydrate 3.15 g (NH₄)₂PO₄, 0.49 g MgSO₄*7H₂O, 0.80 g KCl, 0.0268 g CaCl₂*2H₂O, 1.47 mL PTM1 미량 금속, 4 mg Biotin; pH는 KOH (고체)를 사용하여 5로 조정하였다.

[0437] b) SDS-PAGE & 웨스턴 블롯 분석

[0438] 단백질 젤 분석을 위하여, 12 % Bis-Tris 또는 4-12 % Bis-Tris gels 및 MOPS 러닝 버퍼 (모두 Invitrogen 유래)를 이용한 NuPAGE® Novex® Bis-Tris 시스템이 사용되었다. 전기영동 후, 상기 단백질은 은 염색에 의해 가시화되거나, 웨스턴 블롯 분석을 위해 니트로셀룰로스 막으로 옮겨졌다. 따라서 상기 단백질은 제조사의 지침에 따른 습식(tank) 전사를 위하여, XCell II™ Blot Module을 사용하여 니트로셀룰로스 막에 일렉트로 블로팅시켰다. 차단시킨 후, 웨스턴블롯은 하기의 항체에 의해 검출되었다: Fab 경쇄 : 항-인간 카파 경쇄 (결합 또는 비결합)-알칼라인 포스포스파타아제 (AP) 결합된 항체, Sigma A3813 (1:5,000); Fab 중쇄: 1:1,000으로 희석된 마우스 항-인간 IgG 항체 (Ab7497, Abcam) 및 항-마우스 IgG (Fc 특이적)- 1:5,000으로 희석된 이차 항체로서, 염소에서 생산된 알칼라인 포스포스파타아제 항체 (A1418, Sigma) .

[0439] AP-결합체는 NBT/BCIP 시스템, 또는 HRP-결합체는 chemoluminescent Super Signal West Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)에 기초한 colorimetric AP detection kit (BioRad)에 의해 검출되었다.

[0440] c) ELISA에 의한 Fab의 정량화

[0441] ELISA에 의한 순수 Fab의 정량화는, 코팅 항체로서 항-인간 IgG 항체 (ab7497, Abcam), 검출 항체로서 알칼라인 포스포스파타아제 결합된 항체 (Sigma A8542)를 사용하여 실시하였다. 인간 Fab/kappa IgG 단편 (Bethyl P80-115)은 최초 농도 100ng/mL를 표준으로 사용되었고, 이에 따라 상청액 샘플은 희석되었다. 검출은 pNPP (Sigma S0942)으로 실시되었다. 코팅-, 희석-, 세척 버퍼는 PBS (2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄.2 H₂O, 2.7 mM g KCl, 8 mM NaCl, pH 7.4)에 기초하였고, 이에 따라 BSA (1% (w/v)) 및/또는 Tween20 (0.1% (v/v))가 추가되었다.

[0442] 실시예 6 선별에 의해 동정된 유전자를 저발현하는 균주의 제조

[0443]

실시예 3에서 동정된 몇몇의 유전자는, HyHEL-Fab를 생산하는 *P. pastoris* 숙주 균주에서 과발현될 때 (실시예 4 및 5), Fab의 분비를 감소시킨다. 이러한 두 유전자는 샤페론을 암호화하며, 사이토솔릭 샤페론 (cytosolic chaperone) PP7435_Ch3-1062 (K02) 및 ER-거주 샤페론(ER-resident chaperone) PP7435_Ch1-0176 (K03)으로 명명된다. 샤페론은 일반적으로 발현/분비 향상 효과를 갖는 것으로 여겨지는바, 이러한 발견은 매우 놀라운 것이다. 놀랍게도, PP7435_Ch1-0176의 과발현은 비-조작된 HyHEL-Fab 또는 SDZ-Fab 모 생산 균주에 비해 80% 이하로 Fab 농도 및 수율을 감소시켜 부정적인 효과를 나타냈다. 또한 PP7435_Ch3-1062의 과발현은 비-조작된 모 균주에 비해 80% 이하로 HyHEL Fab 농도 및 수율을 감소시켰다. 따라서, 이러한 유전자 (PP7435_Ch1-0176/SCJ1, PP7435_Ch3-1062/HCH1)는 두 숙주 균주에서 파괴되었다. 전사체학 실험(실시예 3)에서 많은 응집-관련 유전자들이 강력하게 하향-조절 (배수값 변화 <0.66)됨을 확인한 후, 응집 전사 인자 PP7435_Ch4-0252/FL08이 추가적으로 넉-아웃 표적으로 선택되었다.

[0444]

Fab를 과생산하는 *P. pastoris* 균주 CBS7435mut^S pAOX HyHEL-Fab 및 CBS7435mut^S pAOX SDZ-Fab는 숙주 균주로 사용되었다: 파괴된 유전자 자리를 갖는 형질전환체를 생산하기 위하여, Heiss *et al.* (2013) [Appl Microbiol Biotechnol. 97(3):1241-9.]에 기술된 스플릿 마커 카세트 접근법이 사용되었다. G418 첨가 배지에서 성장될 수 있는 형질전환체의 유전체 DNA, 및 파괴 카세트 바깥 프라이머 (표 6)를 사용한 PCR을 통해 양성 넉-아웃 균주의 검증이 실시되었다.

[0445]

표 6은 넉-아웃 카세트의 구축을 위해 사용된 모든 프라이머를 목록화하였다 (넉-아웃 표적마다 2 중복 스플릿 마커 카세트): 프라이머 쌍, A_forward/A_backward, B_forward/B_backward, C_forward/C_backward, D_forward/ D_backward은 PCR을 통한 단편 A, B, C, 및, D를 증폭하기 위하여 사용되었다 (Phusion Polymerase, New England Biolabs). 단편 A는 유전체 *P. pastoris* DNA로부터 증폭된 것으로서, 각 ATG (표적 유전자의)의 5' 방향으로 1700bp에서 시작하여, ATG의 5' 방향으로 200bp까지이다. 단편 D는 유전체 *P. pastoris* DNA로부터 증폭된 것으로서, 각 ATG (표적 유전자의)의 3' 방향으로 200bp에서 시작하여, ATG의 3' 방향으로 1700bp까지이다. 단편 B는 KanMX 선별 마커 카세트의 앞 2/3로 이루어지고, pPM2aK21 백터 DNA 주형으로부터 증폭된다. 단편 B는 KanMX 선별 마커 카세트의 뒤 2/3로 이루어지고, pPM2aK21 백터 DNA 주형으로부터 증폭된다. 단편 A 및 B는 프라이머 A_forward 및 B_backward를 이용한 오버랩 PCR에 의해 함께 어닐링된다 (AB). 단편 C 및 D는 프라이머 C_forward 및 D_backward를 이용한 오버랩 PCR에 의해 함께 어닐링된다 (CD). 넉-아웃 균주를 제조하기 위하여, Fab 생산 숙주세포는 전체 0.5 μg 단편 AB 및 CD의 DNA로 형질전환되었고, 또한 모두 중첩되었다. 세포는 500 μg/mL G418을 포함하는 YPD 아가 플레이트에서 선별되었다. 양성 넉-아웃 복제물은 프라이머 쌍 check_forward (primer A_forward 서열은 5' 부위 부근에 결합) 및 check_backward (primer D_backward 서열은 3' 부위 부근에 결합)을 사용한 PCR에 의해 검증되었다. 400 bp 부위 (ATG 부근)이 KanMX 카세트로 교체됨에 따라, 양성 넉-아웃 균주의 PCR 밴드는 야생형 서열의 균주에 비해 크게 관찰되었다.

[0446]

[표 6]

유전자 식별자	프라이머	서열
PP7435_Chr4-0252	A_forward	CGAACATCCATCACCAAAACAC 서열번호 132
	A_backward	GTTGTCGACCTGCAGCGTACGGTGTGCGCGAAATG 서열번호 133
	B_forward	CATTTCGCGAACACCGTACGGCTGCAGGTCGACAA 서열번호 134
	B_backward	CGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATG 서열번호 135
	C_forward	AAGCCCGATGCCAGAGTTG 서열번호 136
	C_backward	CGTCTTGGCAAATTGATCAGTGATCTGATATCACCTA 서열번호 137
	D_forward	TAGGTGATATCAGATCCACTGATCAATTGCCAAGAGACG 서열번호 138
	D_backward	GAECTGTTGCGATTGCTGGTG 서열번호 139
	check_forward	ATCCAGGACACGCTCATCAAG 서열번호 140
PP7435_Chr1-0176	check_backward	GTGTGTGCTCTGGAATTGGATC 서열번호 141
	A_forward	AGAGGAGGTTGAATGCGAAGAAG 서열번호 142
	A_backward	GTTGTCGACCTGCAGCGTACTCTGGTAGCTTATGGCAGTAGTTA C 서열번호 143
	B_forward	GTAACTACTGCCATATAAGCTACCAGAAGTACGCTGCAGGTCGACA AC 서열번호 144
	B_backward	CGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATG 서열번호 145
	C_forward	AAGCCCGATGCCAGAGTTG 서열번호 146
	C_backward	CTCGGGATCACCAAGCACAAAGTGGATCTGATATCACCTA 서열번호 147
	D_forward	TAGGTGATATCAGATCCACTTGTGCTGGTGATCCGAG 서열번호 148
	D_backward	TCAAAGTATGCTGGGAAGAATGG 서열번호 149
PP7435_Chr3-1062	check_forward	TGGATTGTCTCGGAGGCG 서열번호 150
	check_backward	TACTATGACTATGGAGACCTGGGTG 서열번호 151
	A_forward	TGAAGCATCCCACCCACTG 서열번호 152
	A_backward	GTTGTCGACCTGCAGCGTACCCCTCGCAGACTGTAATTATTGGC 서열번호 153
	B_forward	GCCAATAATTACAGTCTCGGAAGGGTACGCTGCAGGTCGACAAC 서열번호 154
	B_backward	CGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATG 서열번호 155
	C_forward	AAGCCCGATGCCAGAGTTG 서열번호 156
	C_backward	GTGACTTTGACGGTTGCAGATACAGTGGATCTGATATCACCTA 서열번호 157
	D_forward	TAGGTGATATCAGATCCACTGTATCTGCAACCGTCAAAGTCAAC 서열번호 158
[0447]	D_backward	TTCTCTCTGATTATCGGTCTTTTC 서열번호 159
	check_forward	TGGCAGATGACTTCACAAACG 서열번호 160
	check_backward	GTGGCATTTCATAACGACATCTC 서열번호 161

[0448]

실시예 7 유가 배양

[0449]

소-규모 배양에서 가장 우수한 효과 (적어도 1.2 배 모델 단백질의 수율 증가)를 보였던 실시예 5 및 6에 따른 보조 단백질로 조작된 균주를 유가 바이오리액터 배양에서 분석하여, 생산 균주의 개량을 검증하였다. 두 가지의 프로토콜이 사용되었다.

[0450]

a) 유가 배양 프로토콜 A

[0451]

유가 배양은 1.0 L의 최대 부피를 갖는 1.4 L DASGIP 리액터 (Eppendorf, Germany)에서 수행되었다. 배양 온도는 25°C로 조절되었고, pH는 25% 암모늄 하이드라이드를 첨가하여 5.0으로 조정되었으며, 용존 산소 농도는 400 내지 1200의 교반 속도 조절 하에서 20% 이상으로 유지되었고, 환기 속도는 24 내지 72 sL/h 였다.

[0452]

유가 배양을 위한 접종물은 20 g/L glycerol 및 50 µg/mL Zeocin를 포함하는 100mL의 YP 배지를 포함하는 진탕 플라스크에서 배양되었고, 약 24시간 동안 180rpm 및 28°C에서 배양되었다. 상기 배양물은 1.0의 최초 광학 밀도 (600nm) 및 바이오리액터 내 0.4L의 최초 부피로서 접종하는데 사용되었다. 상기 배양은 약 24시간 후 마무리되었고, 처음으로 염 성분(10mL)이 주어졌다.

- [0453] 이후, 글리세롤 유가 용액은 5시간 동안 5mL/h의 일정한 속도로 제공되었다. 이후, 상기 배양물에 메탄올 (2g)이 첨가되고, 염 성분(10 mL)이 주어졌다. 배양물 내 용존 산소의 증가에 의해 메탄올의 소비를 확인한 후, 메탄올 유가 용액의 연속적인 공급이 공급 속도 1.0 g/h로 시작되었다. 10 mL의 염 성분은 새로 형성된 10g의 바이오매스마다 주어졌고, 이는 ~43g 메탄올 공급 배지에 상응한다. 바이오매스의 농도가 증가함에 따라, 메탄올 공급 속도는 증가되었고, 이때, 메탄올 축적은 배양물 내 용존 산소의 감작스런 증가 또는 짧은 기간 동안의 공급 차단에 의해 제거될 수 있었다. 메탄올의 최종 공급 속도는 2.5 g/h였다.
- [0454] 샘플은 Fab의 정량화 및 바이오매스 확인을 위하여 자주 수거되었다 (실시예 6에 기술). 약 10시간 후, 세포 밀도가 100g/L 세포 건조 중량 이상이 되었을 때, 배양물은 수득되었다.
- [0455] 상기 배지는 하기와 같다:
- [0456] 하기를 함유하는 회분 배지(리터당): 2.0 g citric acid, 12.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.022 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.9 g KCl, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 g glycerol, 4.6 mL PTM1 미량 염 저장 용액. pH는 25% HC1에 의해 5.0으로 설정되었다.
- [0457] 하기를 함유하는 글리세롤 유가 용액(리터당): 623 g glycerol, 12 mL PTM1 미량 염 저장 용액 및 40 mg biotin. PTM1 조성물은 실시예 1에 주어졌다.
- [0458] 하기를 함유하는 순수 메탄올 유가 용액 (리터당): 12 mL PTM1 미량 염 저장 용액 및 40 mg biotin.
- [0459] 하기를 함유하는 염 성분 용액(리터당): 20.8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 41.6 KCl, 1.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- [0460] b) 유가 배양 프로토콜 B
- [0461] 각각의 균주는 50 mL의 YPhyG로 채워져 있는, 넓은-목, 칸막이를 지니며, 덮혀 있는 300 mL 진탕 플라스크에 접종되었고, 28°C에서 110rpm으로 밤새도록 교반되었다 (전-배양물 1). 전-배양 2 (넓은-목, 칸막이를 지니며, 덮혀 있는 300 mL 진탕 플라스크 내 100 mL YPhyG)는 전-배양물 1로부터 OD600 (600nm에서 측정된 광학 밀도)이 늦은 오후 (배가 시간: 약 2시간)에 약 20에 도달하도록 접종되었다. 전-배양물 2의 인큐베이션 역시 28°C에서 110rpm으로 실시되었다.
- [0462] 유가 배양은 1.0 L의 최대 부피를 갖는 바이오리액터 (Minifors, Infors, Switzerland)에서 수행되었다. 모든 바이오리액터 (약 5.5 pH에서 400mL BSM-배지로 채워짐)는 OD600이 2일때, 전-배양물 2로부터 각각 접종되었다. 일반적으로, 바이오매스를 생산하기 위하여 글리세롤 상에서 성장된 *P. pastoris* 및 배양물은 글리세롤이 공급된 후 뒤이어 메탄올이 공급되었다.
- [0463] 최초의 회분 단계에서, 온도는 28°C로 설정되었다. 생산 단계의 시작 전, 낮은 기간에 걸쳐 온도는 25°C로 감소되었고, 이러한 수준은 낮은 과정 동안 유지되었으며, 이러한 과정 동안 pH는 5.0으로 떨어졌고, 이러한 수준은 유지되었다. 산소 포화도는 전체 과정 동안 30%로 설정되었으며 (연속적인 조절: 교반, 흐름, 산소 공급) 교반은 700 내지 1200 rpm으로 적용되었고, 공기의 흐름 (flow)은 1.0-2.0 L/min의 범위로 선택되었다. 25% 암모늄을 사용하여 pH는 5.0으로 조정되었다. 생성되는 거품은, 필요한 경우 거품 방지제 5% Glanapon 2000를 첨가하여 조절되었다.
- [0464] 회분 단계 동안, 바이오매스는 110-120g/L의 함수 세포 중량 (WCW)에 이를 때까지 생성된다 ($\mu = 0.30/\text{h}$). 보편적인 회분 단계 (바이오매스 생성)는 14시간 동안 지속된다. 6 g/(L*h)의 일정한 속도 글리세롤-공급은 11시간 후 시작되었고, 5시간 동안 지속되었다. 첫 샘플 채취 시점은 16시간째 (이하에서는 "0 시간"의 유도 시간으로 명명함)였다.
- [0465] 전체 290g의 메탄올이 약 95 시간 동안 제공되었다 (식 $1 + 0.04 * t$ (g/L)에 의해 선형으로 증가하는 공급 속도).
- [0466] 샘플은 하기의 과정에 의해 다양한 시점에 수거되었다: 첫 3mL의 샘플화된 배양 브로스는 (실린지 이용) 폐기되었다. 1mL의 새롭게 수득된 샘플(3-5mL)은 1.5mL 원심분리 튜브에 옮겨졌고, 13,200 rpm (16,100g)에서 5분간 원심분리되었다. 상청액은 조심스럽게 분리된 바이알로 옮겨졌다.
- [0467] 1 mL의 배양 브로스는 에펜돌프 바이알에서 13,200rpm으로 5분간 원심분리되었고, 생성된 상청액은 제거되었다. 상기 바이알의 중량을 측정하였고 (정확도 0.1mg), 빈 바이알의 용기는 세포 함수 중량을 수득하는데 이용되었다.

[0468] 상기 배지는 하기와 같다:

[0469] 하기를 함유하는 *YPhyG* 전배양 배지 (리터당): 20 g Phytone-Peptone, 10 g Bacto-Yeast Extract, 20 g glycerol

[0470] 회분 배지: 하기를 함유하는 변형된 염기성 염 배지 (BSM)(리터당): 13.5mL H₃PO₄ (85%), 0.5 g CaCl · 2H₂O, 7.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 9 g K₂SO₄, 2 g KOH, 40 g glycerol, 0.25 g NaCl, 4.35 mL PTM1, 8.7 mg biotin, 0.1 mL Glanapon 2000 (antifoam)

[0471] 하기를 함유하는 글리세롤 공급 용액: 600 g glycerol, 12 mL PTM1

[0472] 하기를 함유하는 메탄올 공급 용액: 순수 메탄올

[0473] c) 결과

[0474] 표 7은 유가 생산 과정에서, 과발현된 경우, Fab를 생산하도록 조작되지 않은 대조 균주에 비해 *P. pastoris*의 Fab 분비 증가를 보여준 유전자를 목록화하였다. Fab 산물 농도는 ELISA (실시예 5c)에 의해 정량화되었다. 바이오매스는 세포 함수 중량 또는 세포 건조 중량으로 확인되었다. Fab 산물 농도 및 수율의 변화는 대조군에 대한 상대적인 배수 값으로 나타내었다. 이러한 배수 값은, 직접적인 비교를 위하여 성장 및 샘플화된 AOX HyHEL 및 AOX SDZ 모 속주에 비해, 유가 생산 과정에서 산물의 농도 및 수율이 향상됨을 보여준다.

[0475] [표 7]

유전자 식별자	속주 균주	Fab 농도 배수 변화	Fab 수율 배수 변화	배양시간	프로토콜
PP7435_Chr3-0933	CBS7435 pAOX HyHEL	2.24	2.38	109 h	B
	CBS7435 pAOX SDZ	1.21	1.38	111 h	B
PP7435_Chr2-0220	CBS7435 pAOX HyHEL	2.48	1.91	111 h	B
	CBS7435 pAOX SDZ	1.64	1.55	137 h	A
PP7435_Chr3-0639	CBS7435 pAOX HyHEL	1.62	1.41	109 h	B
	CBS7435 pAOX SDZ	1.17	1.20	111 h	B
PP7435_Chr1-1232	CBS7435 pAOX SDZ	1.13	1.22	111 h	B
PP7435_Chr1-1225	CBS7435 pAOX SDZ	1.39	1.74	111 h	B
PP7435_Chr3-0607	CBS7435 pAOX HyHEL	2.28	1.67	111 h	B
	CBS7435 pAOX SDZ	1.48	1.35	141 h	A
PP7435_Chr4-0448	CBS7435 pAOX HyHEL	1.65	2.21	111 h	B
PP7435_Chr4-0108	CBS7435 pAOX HyHEL	1.82	2.41	109 h	B

[0476]

[0477] 나타낸 바와 같이, 목록화된 모든 서열은 이들의 과발현에 의해 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab 수율이 적어도 20% (배수 값>1.2) 증가되었다.

[0478] 표 8은 유가 생산 과정에서, Fab를 생산하도록 조작되지 않은 대조 균주에 비해, *P. pastoris*의 Fab 분비 증가를 보여주는 결실된 유전자를 목록화하였다. 상기 Fab 산물은 ELISA (실시예 5c)에 의해 정량화되었다. Fab 산물 농도 및 수율의 변화는 대조군에 대한 상대적인 배수 값으로 나타내었다.

[0479] [표 8]

유전자 식별자	속주 균주	Fab 농도 배수 변화	Fab 수율 배수 변화	배양시간	프로토콜
PP7435_Chr4-0252	CBS7435 pAOX HyHEL	1.45	1.65	119 h	A
	CBS7435 pAOX SDZ	1.35	1.46	113 h	A
PP7435_Chr1-0176	CBS7435 pAOX HyHEL	1.35	1.28	111 h	A
PP7435_Chr3-1062	CBS7435 pAOX HyHEL	1.29	2.09	89 h	B

[0480]

[0481] 나타낸 바와 같이, 목록화된 모든 서열은 이들의 저발현에 의해 모델 단백질 SDZ-Fab 또는 HyHEL-Fab의 Fab 농도(mg/L) 또는 Fab 수율(mg/바이오매스)이 적어도 28% (배수 값 >1.28) 증가될 수 있었다.

실시예 8: HPs 및 HPs와 KO 단백질의 조합

[0483] 과발현 표적 유전자의 조합을 위하여, 항시적인 pGAP 프로모터 조절 하에서 HP3 ('3') 또는 HP10 ('34')을 과발현하는 CBS7435mutS pAOX SDZ-Fab 균주가 사용되었다 (실시예 4a 및 b에 이들의 제조가 기술). 상기의 과발현과 저발현 표적 유전자와의 조합을 위하여, KO1 유전자 자리가 파괴된 CBS7435mutS pAOX SDZ-Fab 균주가 사용되었다 (실시예 6에 기술). 모든 균주에서 모델 단백질 SDZ-Fab를 암호화하는 플라스미드는 선별 마커인 Zeocin을 기초로 하였고, 여기서 HP 또는 KO 유전자 자리의 파괴를 위해 사용된 카세트를 동시에 발현하기 위한 플라스미드는 동시-방향성 loxP 인식 부위의 측면에 위치한 KanMX 저항성 카세트를 지니도록 하였다.

[0484] HP 또는 KO 카세트로 형질전환하기에 앞서서, 마커 유전자 발현 카세트 (KanMX- loxP 부위 측면)는 Cre 재조합 효소에 의해 재사용되었다. 따라서 기초 균주는 에피좀성 pTAC_Cre_HphMX4 플라스미드로 형질전환되었고, 이는 *S. cerevisiae* TPI 프로모터 조절하에서 Cre 재조합효소를 발현하였으며, 이는 배양 배지 내 존재하는 hygromycin(Hyg)에 의해 선택 압력만큼 일시적으로 *P. pastoris* 내 유지되었다. 형질전환체는 28°C에서 2일 동안 YPD/Zeo/Hyg 아가 플레이트에서 성장되었고, 28°C에서 추가 2일 동안 성장을 위한 선택적 아가 배지에서 복제되었다. 2-3회 플레이팅 후, G148 및 Hyg 상에서 성장하는 능력을 상실한 복제 산물만을 24 딥웰 플레이트 (DWP) 스크리닝을 위해 선택하였다 (실시예 5a에 기술). Fab 농도 및 수율은 실시예 5c에서 기술하였다. Fab 수율 및/또는 농도 면에서 가장 우수한 균주는 HP 단백질을 과발현하는 다른 플라스미드로 형질전환되었다 (실시예 4a 및 b). HP 또는 KOs가 조합된 형질전환체는 선택적 아가 배지 (Zeo 및 G418 포함) 상에서 선별되었고, 실시예 5에 기술한 바와 같이 Fab 분비를 스크리닝하였다. 추가적인 재조합 단계를 위하여, 전술한 과정을 반복하였고, 따라서, 3개의 조합 등으로 이루어진 균주가 제조되었다. 모든 스크리닝 실험에서, 모 균주(=앞선)는 참조로서 사용되었다.

[0485] 상기의 결과는 하기와 같다. - 표 9

[표 9]

	모 균주 대비		본래 균주 대비	
	FC 농도	FC 수율	FC 농도	FC 수율
	평균	평균	평균	평균
HP3 ('3') HP1 ('56')	2.09 (n=16)	(n=16)	(n=11)	(n=11)
HP10 ('34') HP3 ('3')	1.63 (n=16)	1.6 (n=16)	n.a.	n.a.
KO1 HP2 ('2') HP3 ('3')	1.51 (n=8)	1.33 (n=8)	n.a.	n.a.
KO1 HP2 ('2') HP1 ('56')	1.42 (n=8)	1.33 (n=8)	n.a.	n.a.

[0487]

[0488] "본래 균주"는 각각 HP 또는 네-아웃이 없는 *P. pastoris* 균주 pAOX-SDZ-Fab#9를 의미한다.

[0489] "모 균주"는 각각 이후 HP 또는 KO에 의한 형질전환을 위한 숙주세포로서의 역할을 수행하는 SDZ-Fab를 발현하는 *P. pastoris* 균주 (예를 들어, HP3 및 HP1의 조합에 대한 HP3만을 과발현하는 균주, HP3 또는 HP1을 갖는 KO1 HP2의 조합에 대한 HP2 과발현, KO1 네-아웃을 갖는 균주)를 의미한다. 본래 균주 및 모 균주 모두와 비교하여, 이들 각각에 대한 조합은 모델 단백질 SDZ-Fab의 Fab 농도 증가로 이어짐을 확인할 수 있었다. 모 균주와의 비교에 의한 상기 Fab 농도의 증가는, HPs 또는 HPs 및 KO 단백질의 조합을 통해, 예시적인 POI인 모델 단백질 SDZ-Fab의 수율을 보다 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

도면**도면 1a****HP1 ("56") 아마노산 서열 (서열번호 4)**

MSSDAVEQLENFQLIKFDRFDPSTQSTIRIARSPKPI PVKVVIVGDGGCGKTCLNNVFATGTFPEAYVPTIIENV
VITLVTPTGQIAAVTLWDTAGQEYDRLRPLSYSVDVLLCYSIDNLSTFHNVADKWPPEVAHCPNTPIILVG
TKSDMRRHQKSQPHFVSPQDSQLARQMGAVMNIECSAKEVSNVNIVFDAAVSYCLNSRPKTRGDNDNNRSNRR
LSRAKRASMFIRGKDVSSTS GNSREE LVEYDQDGLAIIPDRKKRKCSII

HP2 ("2") 아마노산 서열 (서열번호 1)

MLNKLFIAILIVITAVIGETTSSTTASLSESPTLVWVITGTDASGRLLATTQSAYTQQFSQLYSSIAPSSGSIGL
GTIQGTVGIVRTYETITLAS

HP3 ("3") 아마노산 서열 (서열번호 2)

MSTAIPGGQRTLAKRRAANLDKKQDE PTSARSAGAGGSSTMLKLYTDEAQGLKVDPLIVLVLAVGFIFSVIGLH
VVAKLTGKLIN

HP4 ("27") 아마노산 서열 (서열번호 3)

MTPRSHIFFDIDISINNNQPGARIIFELNDIVPKTAENFRALSTGEKIGKSGKPLHYKGSTFHRIIKDFMVQGGDF
TNGNGTGGESEIYGEKEFEDNFQLTHDKPFLLSMANAGPGTNGSQFFITVPTPHLDNKHVVFGKVIAKGATVRKI
ERNSEGEAPIOEPVIEDCGLPEDADLTISDETGDKYEEVLKDNEINIDI DDFEQVYQAITEIKELGTKYFKNGDT
KIAFEKYQKAANYLLEYIPLS DLSEEQSSKLELLKTSVFSNVALAGLKVSFKKDITKYATLVIEDESADAKSKG
YYRGRGSAYSSLKEDDSAISDFQKALELSPGDPAIQSLSQRTTKARKDRLAKEKAALSKFFE

HP5 ("4") 아마노산 서열 (서열번호 5)

MNWKA ILTPAQYQVLRGGTERPYTGQYVNFKKNGTYLCSGCQTPLYKSGTKFDSSCGWPAYEALPGAVKRIE
DNSLGMRRIEIRCSKCDGHLGHVFEGEGFDTPTDSRHCVNSISLKFQGEEN

HP6 ("54") 아마노산 서열 (서열번호 7)

MSHILLRDSEFWGRTIYHLSKHRYFSFPEEKDGFIAPKYYLNMDQVSIHAES EKNIVEGLVDT SNS SLEEVKTTR
VIVWDDEYDQKENPQNWSLLKCFVFEVGI LIVAVYMGSAIYTPGIEDIMRDLNVSRTVATLPLT L FVIGYAVG
PMIFSPMSEHPAIGRTIIXVWLIFIAILQI PTALTNIAGFCILRFIGGFFASPALATGPASVGDVIAIPHLPV
GLGLWSICAVCGPSLGPLEGAIFSQLVSWRCFWELLITSGLFLIVLGFTLPETYVPTLLYRKARRIRALTKNEL
IISKGELDIQDRTAKEVLINECLWRPVDISFRDPVVLMINLYISMVSYIWIWEAFPIVFLIEIYGFSLIGM GASF
AGILIGVLICSACTYACHTFARRIIANETIHPEFFVPGAIIGGCIMPTGIFTLGWTATKSVHVIWPIIIGSLF
AAGGYLIFQTLFNYLAMSFPRYMASAFAGNDLFRSFSASVFPFLFGHALYANLGSEKFPVGWSV LGFITVAMIA
IPVTPMRYGPRLRANSRYAGP

HP7 ("55") 아마노산 서열 (서열번호 8)

MTDYVTSKRPDNVLNWTSIHVSSWIGETIPEIDPSLLQNFLEHDIAGDVLPYLKSEDLKEIGINELKHRISIKKN
IHELLVSNKEHIDTSILSDTATELGLTLLTNKFITQMANRKNVVDSTHHSNNRRLTEQFNKLRKDLLPPIFKWIK
ETQPLPTPENTHFANMGSVFAASPVEHTSGESTLSNPSLSTINAGEGVNSAVAGQSLSGRKP TLSSRRQSHALSPTG
EHNVSSSSPSTGNFETLNGERPNLRSASSGSQEHTENELLKPLRVKADEPCYKVIQNAMKRGHL SVDDWRKYAL
VICYGDEERVLGLHEKPGSI FKEKDQKQNP AIMLRQIDTNNDQNHIETPGGRL

도면 1b**HP8 ("40") 아마노산 서열 (서열번호 6)**

MTTNGQKRQK TRKPLLINA F VMGCAGLQNP GLWKHPKDSS HRFNQIDHWT YLA KLA EKGK
 FNALFIADVL GGYDVYKGPE NLATPAVAGA QWPVTEPSAV VSAMA AVTTN LAFGVTFSTI
 SEAPYHFARR LSTLDHLTKG RIGWNVVSSY LE SAARNLIN GEKLDEHDQR YLKAE EYIQI
 VYELLSSWR DDAVVLDKKA GVYTDPTRFR KINFEGKKF VPGPHIVDPT PQRLPVILQA
 GTSKVGKEFA AKHAEIVFVI SFSPDDLKPK IAEVRQLAKE KFGRNHDDIK FVALATPVIG
 ATHELAEEKY QELLSYGDIE GAQALFGGGWT GIDL SQYGED EELGNVSSNA MRGAVQNWTK
 AIPNEKRWTR KVIAKQITVG GLCPAFVGT EETIADELEHW SDHAGLDGFN FTYAVNLSF
 EEIVEDLI PV LQRRGLAQKE YPNPETGST F RKNLFGTDVF PSTHFPAYNLR WRAGVSKEEF
 EKSLNATTNW YSSFARSGAL GELHNTCRIL YLQIVVKYKVR LRVRSEGNSI PFAKMTKENE
 AKRQKTSQPK AKKQLIINA F MSGSSGNQSP GLWSYPGDKS TEYTL LDYWV ELAQKLEKAK
 FHSIFIAFDL GGYDVYNGPG NYSAAAKSGA QFPMIEPSAA VTAMAAATKS ITFGVTFSTI
 SEAPYHFARR LGTL DLLTNG RVGWNI VSSY LDSAARNLIN GEPLFLHADR YKRAE EFLQV
 VYRLFLSSWR DDAYKLDKKT RTFADPKLIR TIDHVGEFFN VPGPQFLPPT PQRLPLILQA
 GTSKVGMDYA AKHAEVVF LA SFDPESLQEK IKTVRDIAET KYNRFRDSIK FLILITVIA
 DTIHEDAVKRY EDLASYADLE GAQALFSGWT GIDIGKYGED EPLEHVESNA IKSHVKNWTK
 FKDNKPARK DIAKQIGVGG SGPLL VGSVQ EIADELERWA EVSDL DGFNF AYADY PQTDFD
 DIEKL LPEL NKRGVFWDDY KIPGGTFRES VFGRKFVDKD HPAYDLRWRS DQTREEFEKK
 LAELEKK

HP9 ("60") 아마노산 서열 (서열번호 9)

MRF SNVVL TAI AAA AGVQADE ALYTVF YNDVT ENAQEYL SYIQANTAAGFT DLLS LYTELATY TDDS YTSIFTEED
 FPASELSS FVVLNPWYSSRIEPQVAAAETGE SEE ESETGE ESETGE ETETETGSESE SESE SETSATGTGTG
 TSASESAETETSTDAAVSIDHPKSTLLMGLTA AVVSITFGVFA L

HP10 ("34") 아마노산 서열 (서열번호 162)

MSSFRVLDLV KPFTPFLPEV ISPERKVPFQ QKLMWTGVTL LIFLVMSEIP LYGITSSDSS
 DPLFWLRRML ASN RGTILMEL GISPIVTSGM VFQLLQGQI LDVN MENKAD RELFQTAQKV
 FAI LLSIGQA TVYVLTGMYG PPGE LGVGVC LLLVLQLVFA GIVVILLDEL LQKGYGLGSG
 ISLFM ATNIC EQI FWKTFAP TTVNRGRGKE FEGAFISFFF LILT KDKKR ALLES FYRDN
 APNMFQVIAT LVVFFT VVYL QGFRLEIPVK STRQRPYGT YPIRLFTSN MPIMLQSALT
 SNIFIISQML YSHFPDNAFV KLIGTWEAQP GSQALFAASG LAYYMOPPPMS LSQALLDPIK
 TVYVVFVLT TCAIFS KTIWI EISGSSPRDV AKQFKDQGLV IAGHR DATVY KELKKIIPTA
 AAFGGATIGA LSVVSDLLGT LSGTSILLA VTTI YGYYEL AVKEGGFSKG GPSGFVDL

도면 1c**HP1 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 16)**

ATGTCGTCTGATGCTGGAGCAACTGAAAACCTCCAGTTGATCAAGTTCGACAGATTGATCCTTCAACGCAA
 TCGACTATCAGAATACGGCGATCTCCAAACCAATTCCAGTCAGGTCTGATAGTGGGAGATGGATGGATGG
 AAGACAATGCTTCTCAATGTTGCACTGGAACGTTCCCTGAGGCCTATGTCcccACAATCATAGAAAATGTG
 GTTATTACATTGGTGACCCCCAAGTGGCAGATAGCTGCCGTTACTCTGTGGGATACTGCAGGGCAAGAGATAC
 GACAGATTGAGACCCTAACGCTACTCCGACGTTGACGTGCTCTGCTGTCTACAGCATAGACAATCTGTCACC
 TTTCATAATGTGGCCGACAAATGGTACCCAGAAGTGGCACATTGGTCAAAACACCCGATCATCTGGTAGGT
 ACCAAATCTGATATGCGCGTCATCAAGAGAGTCAGCGCACTTTGATCTCCCGAGGATTCGTCGAGTTGGCA
 AGGCAGATGGGGCACTGATGAACATCGAGTTCTGCGAAGGAGGTTCAAAACGTCAATATCGTTTTGATGCT
 GCTGTCGACTGTTGAGTAACAGCAGGCCAAGAACAGGGGATAATGACAACAAATAGGAGAACAGACGG
 CTAAGTAGAGCCAAGCGAGCCAGATGTTAAAGGGATGTTAAGCTCAACGTCAGGAAACTCTCGGGAA
 GAACTTGTGAATACGATCAAGATGGGTGGCAATAATACCGACAGAAAGAAACGAAATGTAGCATTATTGTA

HP2 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 13)

ATGTTAAACAAAGCTGTTCAATTGCAATACTCATAGTCATCACTGCTGTCATAGGCGAGACGACTACGTCATCTACC
 ACTGCCAGTCCTCGAAAGCCCTACTCTGGTTGGGTAAGTGGCACTGATGCAAGTGGGAGATGGCAACTACA
 CAGTCGCTTACACTCAACAGTTTCAAGTATACTCATCCATAGCATCTCCATCAAGTGGTAGCATAGGCTG
 GGTACTATCCAGGGACTGTTGAAATTGTCAGAACATATGAGAACATTACCTTGCAGCTAA

HP3 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 14)

ATGTCACAGCAATTCCAGGAGGACAGAGAACGTTAGCTAAAAGAAGAGCAGCAAACCTGGATAAGAACAGGGAT
 GAACCAACCTCCGCCAGATCTGCCGCTGGAGGTTCTTCGCTTACCATGCTAAAGTTGACACAGACGAGGCC
 CAAGGTTGAAAGTTGATCCTTAATTGTTCTTGTCTTGCTGTTGTTCAAGTGTGTCATTGGTGTGACCTT
 GTTGTGCTAACGCTGACAGGAAAGTTGATCAACTAA

HP4 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 15)

ATGACTCCCCGTCTCATATTTCTTGACATCTCCATCAACAACCAGCCAGCTGGCAGAATAATTGGAGCTC
 TTCAATGCAATTGTTCTTAAGACAGCAGAGAATTAGAGCTTATCTACTGGTGGAGAAATTGAGATGAAATTCCAATTGACTCAT
 GGAAACCACTGCACTACAAGGGTCTACTTCTCATAGGATCATTAAGGATTATGGTACAAGGTGGTGTGACTT
 ACCAACGGTAACCGGTACTGGAGGCATACCATATATGGAAAAATTGAGATGAAATTCCAATTGACTCAT
 GACAAACCGTCTCTCTCATGGCAACAGCTGGACAGGAACTAATGGATCCAGTTTTATCACCCACCGTT
 CCTACTCCCTCATGGATAACAAGCAGTGTGTTGGAAAGATAATTGCTGGTAAAGCCACAGTTAGAAAGATT
 GAAAGAAAATCCGAAGGTGAAGCTCCAATTGAAACCCGTTGTCATTGAGGACTGTGGTAACCTCCAGAACAGCAG
 GATTGACCATCTCGACGAGACTGGAGACAAGTATGAGGAAATTCTGAAAGATAATGAGAACATAGACATCGAT
 GACTTGAACAGGTCTACCAGGCCACTCTGAAATCAAAGATTGGTACAAAGTATTCAAAATTGGTACACC
 AAAATCGCCTCGAAAAGTATCAAAGGCTGTAATTATTGCTGAAATACATACCATCAGATTATCAGAGGAA
 CAGAGCTCTAAGTTGGAGCTGCTAAAACATCTGCTCTCTCAACGTCGTTGGCAATTGGCTGGACTGAAAGTTCCAAG
 TTCAAGAACACGATTAAGTATGCCACATTGGTCATTGAGGATGAATCTGCGGATGCAAAGGCCAAGTCCAAAGGC
 TACTACCGTAGAGGAAGTGCTACAGCTACTGAAAAGAGCAAGATTGAGCCATCTCAGATTCCAGAAAGGACTT
 GAATTATCCCAGGTGATCCCAATTAGCCAATCTACAAAAGAACACGAAGGCCAGAAAAGACCGTCTTGCC
 AAAGAGAAAAGCTGTTGCTAAGTTCTTGAGTAG

도면 1d**HP5 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 17)**

```

ATGACTAACTGAAAGCGATAATTGACTCCCGCTCAATACCAAGTCCTCCGTTGGCGGAACAGAAAAGACCGTAT
ACCGGACAGTAATGTAACTTCAAGAAAAATGGAACCTACTTGTGAGTGGGTGCAAACCTCCGCTTACAAGAAGT
GGCACAAAATTGATTCATTTGTGGTGGCTGCATCTATGAAGCATACCTGGAGCAGTTAACGAATAGAA
GACAATTGCTTGGAAATGCGAAGAATAGAAATCAGATGCTCAAATGTGATGGACATCTGGCATGTTTGAG
GGTGAGGGATTGACACTCCAACAGATTCCAGACATGTGCAACAGCATCAGCCTAAAATTCAAGGTGAAAGAA
GAGAACTAA

```

HP6 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 19)

```

ATGTCATCTATTACTGCGTGACAGCTTTGGGAAGGACATCTACCACCTGAGTAAACACAGGTATTCTCT
TTCCCTGAAGAGAAAAGATGGTTCATGCTCTGAAAGACTACCTGAAATATGGACAAAGTATCGATACATGCT
GAATCTGAGAAAAATATGTTGAAGGTTGGTAGACACTTCAAAATTCTCGTGGAGGAAGTAAAGACCACTAGA
GTCATAGTCGACTGGGATGAAATGATTCAGAAAGAAAATCCAAAATGGACCTCGCTTTAAAGTGCTTCGTT
GTTTGTGAGTGGGAATCTAACCGTAGCTGTTATATGGATCTGCAATTACACTCCGGTATAGAAGATATT
ATGAGAGATCTCAATGTTAGCAGAACGGTGGCAACACTTCCATTAACTCTGTTGTGATTGGATACGCTGTTGGT
CCAATGATATTCTCCCCATGTCGAGCACTCCGCTATCGAAGGACAAAGATAATATGTTGGACCTGTTGATA
TTTGCTATACTACAAATCCCAAGGCCCTGACCAACTAACATGCTGTTGAGGTTATTGGAGGG
TTTTGCGTCAACGCACTAGCTACAGGCTCAGCTTCTGAGGTGATGTTATTGCAATCCGCACTTGCTGTA
GGGTTAGGCTTGGAGTATCTGCTGTTGTGGCTCTGGTTCTGTTAATTACCTCTGGACACTTTGGAGCCATAATTCCC
CTTGTGAGTTGGAGGTGGTCTCTGGTTCTGTTAATTACCTCTGGACACTTTAGTCTTGGCTTCACT
TTACCAAGAAACGATATGTAACCAACCTCTTACAGAAAGGCTAGGAGGCTACGAGCATAACAAAAACGAACTG
ATTATCAGCAAAGGGAGTTAGATATTCAAGGACAGAACTGCAAGGAAGTTTGATTGAATGCTTATGGAGGCCA
GTCGACATATCATTAGAGACCCGTTGCTCTGATGATAAATCTTACATTCAATGGTTATTCTTATGGTAC
ATTGGTTGAGCTTGGATCTGCTGTTGTGAGATATACTGGAITCAGCCTTATTGGATATGGAGCTAGTTT
GCCGGAACTTAAATGGGTCTTAATGCTCGCGTGTATTGCTGCGTGTATGTTACTTTGCAAGAAGA
ATAATTGCAAACGAAACCATTCATCCTGACTCTTGTACCGGGCGCTATTGGAGGTGCAATAATGCCACT
GGAATCTTATTGGATGGACTGCCACAAAAGTGTCCACTGGATTGTAACCTATAAATAGGTAGCGGTTATT
GCTGCTGGTGGTTCTCATTTCCAGACACTCTCAACTACCTTGCAATGCTTTCCTAGATACATGGCATCA
GCTTTGCGGAAATGATCTTCAGGTCTTCTGCCAGTGTGTTCCACTGTTGGACATGCACTATATGCC
AACTGGGATCCGAAAAGTCTCTGTTGGTTGGGTTCTCTGTAACGGGGTTCATCACTGTTGCAATGATCGCA
ATTCCAGTAACCTTCAAGGATATGGTCCAAGATTGCGTGCATAATTCTAGATATGCCGGCCATGA

```

HP7 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 20)

```

ATGACGGACTATGTCACTTCAAGCGGCCAGATAACGTGCTCAATTGGCAAGTATTGATGTATGTCCTGGATA
GGGGAGACTATTCTGAGATCGATCAAGTCACTCCAAATTTTAACTGAAACATGACATTGCGGGAGATGTTCTA
CCTCACTGAACTCTGAGAATCTGAAGAAATGGGATCAACGAGCTCAAGCACAGAAATCTCTATAAAAAGAAC
ATTCAAGAACCTCTGAGCAATGAAACACATTGATACCGATTCATCAGACACGGCTACCGAGCTAGGA
ACTTGTGATACTGACTAATAAAATCATAACCCAGATGGCGAACAGAAAGAATGTTGAGATGATTCACATCAT
TCGAATAACAGAAGGCTCACTGAACTGTTAATAAGCTTCGCAAAGATCTTGGCGATACTCAAATGGATCAAG
GAGACCCAACCAATTACCCACTCCAGAGAAATCACATTGCAAAATATGGGTCAGTACGACATCTCTGGAG
CATACTTCAGGTGAGTCACATGCTAACCCAGCTAACACCCATCAATGCTGGCGAAGGAGTGAACCTGCA
GTTGCGAGGGCAATCTCGGGAGGAAACCTACATTATCCTCCAGAAGACAACTCACATGCTTGTCTCCAACCTGGT
GAACACCTGAATGTTGTCATCATCTCCCTGACGGGGAAATTGAAACCTCTGAATGGAGAAAAGACCAATCTT
AGATCTGCTTCGTCAGGATCACAGGAACATACTGAGAACGAACTATTGAAAGCCGTTGAGAGTTAAAGCAGATGAG
CCTGCTATAAGGTGATTGAGATGCAATGCAAGGAGACATGGCTTACATGAGTATGGGAGTATGCTTGTG
GTCATCTGCTATGGAGATGAGAAGAACGAGTACTAGGCTTACATGAAACACCTGGGAGTATCTCAAGGAACCTAAA
GATCAGAAAACAGAAATCTGCAATCATGCTTCGCAAATTGACACTAATAATGACGATCAGAACCATATTGAAACC
CTGGAGGGAGATTATGA

```

도면 1e

HP8 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 18)

ATGACTACAAACGGCCAGAAAAGACAAAAAAACTCGCAAACCACCTTGTCAACGCATTGTCATGGGAT
 GTGCTGGGTTACAGAATCCTGGTTATGGAAGCATCCCAAGGACTCATCCCAGATAATCAGATTGA
 TCACTGGACTTATTGGCCAAGTTAGGCCAAAAGGGGAAGTTTAATGCGCTCTCATGGCGACGTCTTG
 GGTGGCTATGATGTCACAAAGGACCTGAGAAATTAGCCACTCTGCTGGCTGGAGCCAGTGGCCTG
 TCACCGAGCCAGTGTGTGGTCCGCCATGGCTGCAGTCACAACTAATTGGCGTTGGAGTGACGTT
 CTCTACTATCAGCGAGGCCCTCATTTGCCAGAAGACTGTCACATTAGACCACTGACCAAGGGT
 AGAATAGGATGGAATGTTGTTCATCTTACTGGAGAGTGTGCTGTAACCTTGTGAATGGTAAAAAT
 TGGACGAGCATGACCAAAAGATACTTGAAGAGTACATTCAAAATAGTTATGAGCTGTGTTATAC
 GTCTGGAGAGATGATGCACTAGTTTAGACAAGAAAGCTGGTGTAACTGACCCAAACAGATTGCA
 AAGATCAACTTGAAGTAAATTTCAAGATTCCGGGACCACATATTGTTGACCCACCTCAAAGAC
 TGCTGTGATCTCAAGCTGGACTCTCAAAAGTTGCTTAAGGAGTGTGCTAAGCATGCGAGATTGT
 GTTGTCAATTTCATTTCTCAGATGATTGAAACCCAAAGATTGAGAAGTGTCAACTGGCCAAAGAA
 AAGTTGGTAGAAACCGACGATATTAAGTTGTTGCCCCTTGCAACCCCTTTAATGGAGGCCACATG
 AACTAGCTGAAGAAAGTACCAAGAGTACTAAGTATGGTGTATTGAAGGTGCTCAAGCCTTATTG
 AGGGTGGACTGGCATGACCTCTCAATGGCGAACATGAGAAGAACTAGGAAATGTTAGTTCCAATGCT
 ATGCGTGGCCGTGACAAACTGAGCTAAAGCAATTCAAATGAGAAGCGTGGACACGTAAGGTTATTG
 CTAACACAGATTACCGTGGTGGCTAGGCTTCTAGGCTAACATGGAAACCCAGAAGAAATCGCCGATGAGCT
 GGAAACACTGGTCCGACCCAGCTGGTGGGAAATCAACTTCAACTTATGCTGTCACCCGGCTTCTTTC
 GAAGAGATAGTGGAAAGACTTGATTCAGTTCTCACGGAAAGAGGGTGGCCCAAAGGAATACCCAAATC
 CAGAAACTGGAAGCACATTCTGTAACACCTTTGGAACAGACTTTGTAACATCTACCCACCCAGCTTA
 TAACCTAAAGTGGAGGGCTGGTGTCAAGGAAAGAATTGCAAAAGTCCCTAAACGCCAACAAATTGG
 TATTCCAGTTTCGCTAGGTGCTAGGTGAATTGCTATAACATGCAAGGATTCTCTATCTCCAAA
 TAGTGAATAATAATAGGCTTCGAGTCCGTTCAAGGGAAATGCTATCCCTTCGCCAAATGACCAA
 GGAAATGAACCCAAGAGGCAAGAAAACCTCTCAACAAAAGCGAAGAACAAATTGATTATCAATGCTTTC
 ATGTCAGGCTCTCGGGTAACCAATGCCAGGACTGTGGCTGACCTGGAGACAAATCAACAGAGTATA
 CTACCCCTAATTACTGGGTGGAGTTGCTCAAAAGCTGGAAAAGCCAAATTCCATTCTATCTCATTTG
 CGATGTTCTGGGTGGATATGACGTTAACATGGACCTGGAAACTACAGTGTGCTGCAAAATCTGGTGCC
 CAATTCCAATGATTGACCAACTGCTGCAAGTTACTGCTGCAATGGCTGCTACCAAGTCATAACGTTCG
 GAGTGACTIONTCCACTATAAGTGAGGCACTTATCATTTGCAAGAAGATTGGGAACCTTGTAGATGCT
 GACAAACGGAAAGAGTCGGCTGGAATATGCTCTTCGTTACCTTGACAGTGGCCAGAAAATCTTTGAAT
 GGAGAACCACTCCCTCCATGCAAGACCGTTATAAGAGAGGCCAGAAGATTCTTACAAGTTGATATGGT
 TATTCCCTTCTTCATGGAGAGACGATGCTTATAATTGGATAAGAAAACAGAACCTTGCTGACCCAAA
 ACTTATTAGAACATGACCACTGGAGAGTCTTCATGTCAGGCTCCAGGGCCCCAGTCTTACCAACCCACT
 CCTCAGAGACTACCGCTGATTTCGCAAGGCTGGTACTTCAAGGTTGGTATGGATTATGCTGCAAAACATG
 CAGAGGTTGCTTTTAGCTCATTTGACCCAGAGTCACTCCAAGAAAAATCAAAACAGTGAGAGATAT
 CGCTGAAAACCAAGTACAACAGACCAAAGAGATCAACCAAATTCTAATTGATAACAGTAGTCATAGCT
 GATACACACGAAGAGTGGCGTGAAGAGATACGAAGAGATCTCGCCAGTTATGCTGATCTGGAGGGCCCAAG
 CACTGTTCTGGGTTGGACTGGAATAGATAATTGGAAAGTATGGTGAAGATGAACCTCTTGAGCAITGG
 ATCTAACGCTTAAAGAGCACTGTTAAGAACATGGACTAAAGTCAAGGACAATAAGCTTAGAGCCAGAAAA
 GATATCGCTAAACAGATTGGAGTTGGAGGGCTAGGTCCTTACTGGTTGGATCTGTACAAGAGATGCC
 ACGAGCTTGAGAGATGGCAAGACTCTGACCTCGATGGCTTAACTTCGCTTACGAGATTACCCCA
 AACTTTGATGATACTTGAACAAACTGCTTCCAGAGTTGAACAAAGAGGGTGTGTTCTGGGATGATTAT
 AAAATTCCAGGGAAACCTTCAGAGAGGCGTGTGGAGAGAAAGTTGTTGATAAGGATCATCTGCTT
 ATGATCTGAGATGGAGAAGTGAACCAACTAGGGAGGAGTTGAAAAGAAACTGGCTGAATTGGAGAAAA
 ATAA

도면 1f

HP9 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 21)

ATGAGATT TTCTAACGTCGTTTAACTGCATAATGCCGCTGCCGGCTACAGGCAGATGAAGCCCTTACACTGTG
TTCTACAATGTAGTCACTGAGAACGCCAAGAGTATCTGCTTACATCCAGGCCAATACTGCGGCTGGTTCACT
GACCTCTTGAGTCTGTACACTGAACTGGCCACTTACACCGACGATTCTTACACAAGTATCTTACTGAGGAGGAT
TTCCCTGCGAGCAGAACCTTACATCGTTCTGTGTTAACCTGCCATGGTATTCTCCTCAGAAATTGGGCCACAAGTGTGCG
GCTGCTGAACTGGTGGAAAAGTGGAGGAGATCAGAGACTGGTGAAGCTGGAGAACATCAGAGACTGGTGGAGGAG
ACAGAAACTGAGACTGGATCTGAGCTTGAATCTGAGTCTGAGATCTGAAATCGGAGACTCTCCGACTTGGCACTGGC
ACCTCCCTCTGAGACGCCGGAGACTGAAACTCTTACCCAGCCTGCTGTGCTACTGAGTCAACCCAAAGTCCACC
TTATTGATGGTTTGAATGCCAGTGTCACTTGGAGTCTTGCCTTGAA

HP10 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 163)

ATGAGCAGCTCAGAGTTAGACTTGGTAAAGCCCTTACCCATTCTGCCGTAGGGTATCTCTCGAGAAGAGGGTCCCTTTCACAAGAAGTGTCCCCTTTCACAAGAAGTGTGACTTGAGACTCTCTGATCTCTTGCTATGAGTGAAATTCCTCTGATCTGATCTCTGACTCTCTGACCTTGTGACCTTGTGTTTGTGCTGTATGATGTGCTGCTTCAAGAGGAACCTGTGAGGTAGTGTATCTCTGATCTGTCATCTCTGAAATGGTGTCCAACTGCTGAGGAATCCAATCTGGACGTGAACATGGAAAACAAAGCAGACAGAGAGTTGTTCCAACATGCTCAAAAGTGTGTCGCCATTGTGCTGAGTATCGGACAAGTACTGTTATGTTTAACTGGAAATGTAATGGCCCCCTGGTGTGAACTAGGGAGTGTGTCCTGCTTTGTGTTCTTCATACTGGTGTGTCAGGTTATGTTGTCATTTGTCATTTGTCATGGTCATTTGTTGGATGAACCTTACAAAAAGGTTACGGTTTAGGAAGTGGAAATTCTCTTTCATGGCACCAACATTTGTGAGCAGATTGTTGGAAGACTTTGCTCTTACCCACGGTTAACCGTGTGGAAGGGTAAAGGGATTGGAAGGAGCTTCAITCTTCTTTCACCTGTATCTTGACCAAGAAGGACAAGAAGAGAGCTGTTGGATCATTTTACAGACGACAACGCTCCAAACATGTCCAAGTTATGTCATCTTGTGTCCTTCTTACCGTIGTCTATCTCAGGGCTTCGTTGGAGATTCAGGTTAAGTCTACCGTCAAAGAGGTCTTACCGAACATTCACCAATCAGAATGTCATCTACATCACAATCACATGTCCTACATGTCATCTTACCGTCAAAGGACTTACATTGGAACTTGGGACGTCACACCTGGTGTAACTGCTCCGGGATTAGCTTACATGCAGGCTCCAAATGTCCTGAGTCAGGTTTATAGACCTATCAGACTGTCGTACGTGTTGTTTGTGACCTTGTGCTCTTCTCAAGACATGTCGTTGGAGATTCAGGTTACGGGATCTCCCTCAGGAGACAGTGTACTGTTTACAAGGAGGTGAAAGAAGATTATACCAACAGCCGTCGATTTGGAGGTGCCAACATTTGGTCACTTCTCCGTTGTTTCCGACCTTGTGACTTACAGGTTAAGGAGGTGAAAGAAGATTATACCAACAGCCGAACCTTCACTTCTTGGCTGTACAACCATCTATGGTTACTACGAGTTGGCTGTGTTAAGGAGGTGTTAAGGAGGTGTTCTCAAGGGTGGACCTCTGTCATGTCATGTA

도면 1g**KO1 아마노산 서열 (서열번호 10)**

MNKPNNGSE QQPPSRGMKQES GGPVTS STTPGTNTGLENSHSMGADME PDVGATSPRHLLNGYIYDYLVKSNMQNL
 ADQFAQETELLEDLTIVPMDTPSGYLLEWWMVFWDLFNARLKORGSKAHQYIQLNMLRQQQRTMRNTARVQKV
 PLRPHTQS SPSMSQTFTIPQQPQQQAQGQQHAQAQAOVQAHQQAQHQAQAVPVQPQQHQLGGQTQQQOSINTGSP
 AGPNAINRSVQHLAQQQMNNHLRQQATATTQOPIPQONIPSNNQQGPTGYPSTSPSRRPRLLSNESGASAPSVMTKS
 QLQGVPAINSQQPHQQQQQVGPPNQHQGQSSSFYSGMP PQGVVPHQFNPQQYANMLARQQHVQAQQQVQLQQVQH
 VOOOROOODDOOHRLSAGSGPHPSFGVFOOPP PMSNHNOVMINQGETTFDPHSPYAOPNQYPOPOQOOOOOOOOOO
 QQQQPQQQQQQQQQQQQPPPPRQPQRQQAMAMAPLPHSTSAAGTPHS STTPRFSQPGFVYQQPLPASQPQHSP
 PSSIQQPELVPTPGSQHQQIAQPQSQSHQQSQSOSASKIVGIQEYQKELMMLEKQNKQRHDMACKKGSGHFS
 NFDPipeHTPPPEPKFNVNVMILLPPONS AVVTKNTPGTS PGTTQNTAHST GNTSAGSTPNVVAVRKKKEPAKKKA
 KKATEPPTPTTPQTPIAARTHQNSTGIPGNNAATKRKRKEPLVDQTVSPNLNEASKSTKTGKISSQTDFTGSDN
 GFLQDFGDTGPPGTDDME FDFNSFLNNETGEPNSTTIHFDNVFNWEGTEAGDL

KO2 아마노산 서열 (서열번호 11)

MVHNPNNNWHWDKNCLPWAWSYFQEVLPTQKNDAYEIVVTSVLDVGDLCDVTQRKGVTKCIFDLKIQVSATV
 KVNTNSEVEEISYTWTLPLEVHDQDEDEYEYVIEGNLDHKSIIRKLTLTKEKLSKFQQALIDAHTQDVQHST

KO3 아마노산 서열 (서열번호 12)

MKIWLVLVLLVFATVFAETDYKVLGVAKNADEKDIKKAYRSLSKKFHDPDKNPGDDEAAQKFQIVGEAYDVLGDPE
 KRQYDRFGAEGLDSRQEWFHDPFDMFQQFFGGGQHHRGKPKGKSSLHLEFSLQDFYNGASNDRFRIEMONICE
 TCGSGGSQDGKVHQCDTCKGHGRVQVQTQFQGGMQRFETICPKCSGTGNLITHCKKCQGNRVRGPRIHNVHL
 GAGTSRNHVEILEGQGDQSPDWIAGDLQIMFKEKAEGNMGYRIGNNLYRDEALTKEALHGGWERQIAFLDKIE
 NTITLSKKKGEVVVVGQVDTIKGRGMPLHHDYDEHGDLFIKYHIIYPQQIRDEL

KO1 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 22)

ATGAACAAAGCCAAACGGGCTGAACAACAACCACCGTCACCGGGAATGAAGCAAGAGTCAGGAGGCCAGTTACT
 TCATCTACGACGCCGGTACCAACTTGCCTAGAAAAACTCTCATTCCATGGGGCGGATATGGAGCTGATGTT
 GGTGCTACCTCTCTCGCATTTCTTAATGGGTACATTACGATTATTAGTCAAATCTAACATGCAAATTG
 GCTGATCAATTGCCCAGAGACGGACTCTAGAACAGACTTGACAGTACCAATGGATACGCCTTCAGGCTAT
 CTTCTAGAAATGGTGGATGGTATTCTGGGACCTTTCAATGCCGCCAAAGCAACGGGTTTCACAGAAGGCCAC
 CAGTATATTCAGTGAACATGCTACGAAACAGCAACAGGACCATGCGAAATACAGCCCGTGTCAAAGTC
 CCAGTTGAGGCCAACACCCAATCATCCCTTAATGTACAGACTTTATTCACAGCACCTCAAACAGCAAGCA
 CAGGGACAAACAGCACGCCAGGCTCAAGCCAAAGTCAGCACATCAGCAAGGCCAACACACAGCGCAGCACAA
 GTGCCAGTGCACCGCAACAGCACCAAGCTAGGAGGCAAACCTAACAGCAGCAATCCATTAAACACTGGTCTCCT
 GCGGGTCAAATGCTATCAACTCGCTGTTAACACT TAGCACAAACACAGATGAATCACCTTCGCCAGCAGGCG
 ACTGCCCACACTACGCAACAAACATTCCCATGAAATACTCCCATCAAACCAACAGGGCTCTACAGGCCTTATCCT
 ACTTCCCCCTCAAGAAGACCGAGATTACTGCTAACGGAATCGGGTGCAGTGCACCCCTCTGAAATGACAAAGTC
 CAGCTCCAAGGAGTCCCTCCACAACACACAGCAGCAAGGTCAAGGGTACGGGCTCTAACAT
 CAAGGTCAATCTCTTCAAGGGTCTGCTCAAGGGGCGTGGTCTCATCAGTCAATCCTCAG
 CAGTATGCCAATATGCTAGCAAGACAACAGCATGTCAGCTAACACAGGTTCAAGTCAACAGGGTCCAAACAT
 GTACAACAGAGACAACAGCAAGACCAACAAACACCCGCTGTCGGCGGTTCAAGGGGCAACCTTCATTTGGC
 GTTTTCACAACACCTCTCCGATGTCAAACCTAAATCAGGTCAATGATCAATCAGCAGGGAGAAAATTGAT
 CCACATTCTCCATATGCTCAACCTAACGGGTAACCCCCAGCCACAGCAACAAACACAGCAACAAACAA
 CAAACAGCAGCAACCCGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAACAGAAGCAGCAACACACACAGCAG
 CCTCAGCGCCAAACAAGCGATGGCATGGCTCTCTGCTCACTCTACTCTGCGGCCGGTACTCCTCACTCGTCC
 ACCACACCTAGATTCTCGCAACCTGGTCTGTTATCAGCAGCTTACCTGCACTCAACCGCAACATTCTCCG
 CCTTCTTCTATTCAAGCAGCCGGAGCTAGTCCAACCTCAGGGTACAACATCAGCAAATAGCACAACCACAAATCA

도면 1h

CAGAGCCAACACCAGCAATCGAACAGTCTCAATCAAGTGTTCTAAAATTGTAGGTATAACAGGAGTATCAGAAA
GAGCTAATGATGCTTGAGAACAGAACACAGCGTCATGACATGGCATGTAAGAAGGGAAAGCAGGGCATTTCCT
AACTTTGATCCAATTCCAGAGCACACACCGCCGAACAAAAATTAAATGTGATGTAATGCTCCCTCCCCAGAAC
TCTGCAGTGGTCACAGAGAACACTCCCGGAACCTCACCTGGTACACAAACTCAAACACTGCACATAGTACTGGT
AACACTTCAGGGGTCTACACCAAATAATGTCGACCTGTACGAAAGAAAAAGGAGCCAGCTAAAGAAGGCA
AAGAAAGCTACTGAGCCCCGACTCCCACTACTCCACAGACTCCAAATTGCACTAGGACACATCAAACACTCTACA
GGCGGCATTCCTGGTAATAATGCTGCTACTAAGCGACGAAACGGAGCCGCTGGTGTGATCAAACACTGTTCACCT
AACCTTAACGAAGCTTCAAGAACAGCGAAACCAAGGAAATTTCATCTCAAACACTGACTTACAGGTTCTGACAA
GGATTCTTACAGGATTGGCATGGAACTGGTCCCTCCACTGGAACCGATGATATGGAATTGATTTAACAGT
TTCTTAATAACGAACACTGGCGAACCTAATAGTCAACCATTGACAATGTATTCAATTGGGAGAAGGT
ACCGAAGCCGGAGATTATAG

KO2 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 23)

ATGGTGTTGCACAAACCTAAATACTGGCACTGGGTCGACAAGAACTGCCCTTGGGCCAAAAGCTACTTTGAG
GAAGTCCTTCCAAACCCACTCGAGAAGATGACGCCATGAAATAGTGGTAACATCTGTGGACCTTGAGATGGA
GACTGCGATGTCACTCAACGTAAGGTGTTACCAAATGTTAGTGTGATCTGAAGATACAGGTATCTGCAACCGTC
AAAGTCAACACGAACTGGAAGTAGAGGAGATCAGTTATACAGTGACATTACCTGAACCTGGTGCACGACAGGAC
GAGGATGAATATGAATACGTAATAGAGGGAAATTGGATCACAGTCTCAAATTAGAAAGCTACTCCTCTG
TTGACCGAGAAGTTATCAAAGCTTGTAGACGCTCATACTCAGGATGTTAGCATAGTACCTAG

KO3 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 24)

ATGAAGATATGGCTGGTACTCTTTAGTTTTGCCACGGTGTGCCCAGACAGATTATATAAAGTTCTGG
GTAGCTAAAATGCGGATGAAAAGATATCAAGAAGGCCATCAGATCGTTGAGTAAGAAGTTCTGATCCAGATAAG
AACCCGGGTGATGATGAAGCCGCTCAAAGTCATTCAAGTTGGAGAAGCTTATGATGTGTTGGTGTGATCCCGAG
AAGCGTCAAAGGTTGACAGATTGGAGCAGAGGACTGGACTCAAGACAGGAACAATTCCATGATCCATTGAC
ATGTTCAACAGTTCTCGGAGGGTGGACAGCAACAGAGGCAAACCAAAGGGTAAGAGTTCTGTTACAT
TTAGAATTCAAGACTTTACAATGGTGTGCTAGTAACGACTTAAAGTCAAATGACATTGCAAAAGGGCACGGGCTGTTG
ACTTGTCTGGATCAGGTTACAAGACGGAAAGTTCAATCAATGTGACACTTGCAGGAAAGGGCACGGGCTGTTG
CAAACGAGACAGTTGGGGTGGCATGCAACAGAGGTTGAAACAATTGCCAAAATGTCAGGAACAGGAAAT
CTGATCACTCACAAGTGTAAAGAAATGCCAAGGAAACCGTGTAGTTAGAGGACCCAGAATTCAACATGCAATTG
GGGGCGGGAACTAGTAGGAAACCATGTTGAGATCTGGAAAGGTCAAGGGAGACAGTCTCCAGACTGGATTGCAAGGT
GATCTACAAATCATGTCAGGAGAAAGCCGAAGGCAACATGGGTATAAGAGAATAGGAAACACTGTACAGA
GACGAAGCAATTACGCTGAAAGAGGCATTGCAATGGTGGCTGGAGAGACAAATTGCGTTTGTGAAAAAATAGAG
AACACGATTACTCTTCCAAAGAAGAAAGGAGGGTAGTTGACGGCCAAGTAGACACCATCAAGGTAGAGGG
ATGCCATTACATGACCACTATGACGAACATGGTGATCTTTATCAAGTACCATATCATTACCCGAAACAAATT
AGAGACGAAATTGIGA

도면2a**SDZ-Fab HC 아마노산 서열 (서열번호 25)**

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNNTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLFINTTIAA
KEEGVSLKREQLVQSGGLVQPGGSRLSCAASGFTFSHYWMSWRQAPGKGLEWVANIEQDGSEKYYVDSVK
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLEGHLHGDKYFDLWGRGLTVVSSASTKGPSVFLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSVHFTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPP

SDZ-Fab LC 아마노산 서열 (서열번호 26)

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNNTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLFINTTIAA
KEEGVSLKRAIOLTQSPSSLSASVGDRVILTCRASQGVSSALAWYQQPKGAKPLIYDASSLESGVPSRFSGS
GSGPDFTLTISSLQPEDFATYFCQQFNSYPLTFGGTKLEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSITLSDKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SDZ-Fab HC 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 27)

ATGAGATTCCCACTATTTCACCGCTGCTTGTGCCTCCTCTGCATTGGCTGCCCTGTTAACACTACC
ACTGAAGACGAGACTGCTCAAATTCCAGTGAAGCAGTTATCGTTACTCTGACCTTGAGGGTGAATTCGACGTC
GCTGTTTGCCTTCTCTACTCCACTAACACGGTTGTTGTCATTAACACCAACTATCGCTTCAATTGCTGCT
AAGGAAGAGGGTGTCTCTCGAGAAGAGAGAGGTCAAATTGGTCCAATCTGGTGGAGGATTGGTTCAACCAGGT
GGATCTCTGAGATTGTCTTGCTGCTCTGGTTTACCTTCTCTCACTACTGGATGTCATGGTTAGACAAGCT
CCTGGTAAGGGTTTGAATGGGTGCTAACATCGAGCAAGATGGATCAGAGAAGTACTACGTTGACTCTGTTAAG
GGAAGATTCACTATTTCCCGTGATAACCCAAGAACTCTTGTAACCTGCAATGAACCTCCCTAGAGCTGAGGAT
ACTGCTGTCTACTTCTGTGCTAGAGACTTGGAGGTTTGCTATGGTGTAGGGTTACTTGACTTTATGGGTAGAGG
ACTCTTGTCACCGTTTCATGCCTCTACCAAGGACCTCTGTGTTCCATTAGCTCATGTTCCAGATCCACC
TCCGAATCTACTGCAGCTTGGGTGTTGTAAGGACTACTTCTCTGAAACCTGACTGTCTCTGGAACTCT
GGTGCCTTGACTCTGGTGTACACCTTCTGAGTTTGCACTGAGTTGACTCTGTTACTCTGTGCTCTCAGTT
GTCACTGTTCTCTCCTCATCTTGGTACCAAGACCTACACTTGCAACGTTGACCATAAGCCATCAATACCAAG
GTGACAAGAGAGTTGAGTCAAGTATGGTCCACCTttaa

SDZ-Fab LC 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 28)

ATGAGATTCCCACTATTTCACCGCTGCTTGTGCCTCCTCTGCATTGGCTGCCCTGTTAACACTACC
ACTGAAGACGAGACTGCTCAAATTCCAGTGAAGCAGTTATCGTTACTCTGACCTTGAGGGTGAATTCGACGTC
GCTGTTTGCCTTCTCTACTCCACTAACACGGTTGTTGTCATTAACACCAACTATCGCTTCAATTGCTGCT
AAGGAAGAGGGTGTCTCTCGAGAAGAGAGCTATCCAGTTGACTCAATCACCATCTCTTGTGCTCTGTT
GGTGATAGAGTCATCCTGACTTGTGTCATCTCAAGGGTTTCTCAGCTTGTGTTGACCAACAAAAGCCA
GGTAAAGCTCAAAGTTGCTGATCTACGACGCTTCATCCCTGAAATCTGGTGTCTTCACGTTTCTGGATCT
GGATCAGGTCTCTGATTTCACTCTGACTATCTCATCCCTCACAGAAGACTTTGCTACCTACTCTGTCAACAG
TTCAACTCTAACCTTGGACCTTGGAGGTGGAACTAAGTTGGAGATCAAGAGAACTGTTGCTGACCATCAGTG
TTCACTTTCTCCATCTGAGTGAACTGAAGCTGGTACTGCATCTGGTGTGCTACTGAACAACTCTAC
CCAAGAGAAGCTAAGGTCAATGGAAGGTGACAATGCCCTGCAATCTGGTAACTCTCAAGAGTCTGTTACTGAG
CAAGACTCTAAGGACTCTACTTACTCCCTTCTGACTTGCTAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAG
GTTCACCGCTTGAGGTTACTCACCAAGTTGCTCTCCGTTACCAAGTCTTCAACAGAGGTGAATGCTAA

도면2b

HyHEL-Fab HC 아마노산 서열 (서열번호 29)

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNNTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLFINTTIAA  

KEEGVSLEKRDVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITSDYWSWIRKFPGNRLEYMGYVSYSGSTYYNPSLKS  

RISITRDT SKNQQYLDLNSVITEDTATYYCANWDGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSPFPLAPSSKSTSGGTAALGC  

LVKDYFPE FVIVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS  

CDK
```

HyHEL-Fab LC 아마노산 서열 (서열번호 30)

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNNTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLFINTTIAA  

KEEGVSLEKRDIVLTQSPATLSVTPGSVSLSCRASQSIGNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGS  

GSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQQSNWSPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY  

PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFSNRGEC
```

HyHEL-Fab HC 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 31)

```
ATGAGATTCCCATCTATTTCACCGCTGTCTGTCTGTGCTGCCCCTCTGCATTGGCTGCCCCTGTTAACACTACC  

ACTGAAGACGAGACTGCTCAAATTCCAGCTGAAGCAGTTATCGGTTACTCTGACCCTTGAGGGTGATTCGACGTC  

GCTGTTTGCTTCTCTAACTCCACTAACACGGTTGTTGTTCATTTAACACCACTATCGCTCCATTGCTGCT  

AAGGAAGAGGGTGTCTCTCCGAGAAAGAGAGCAGCTCAATTGCAAGAATCTGGTCCATCCTGGTTAACGCATCC  

CAGACTTTGTCCTTGACTGTTCGTTACTGGTGACTCCATCACTCTGACTACTGGTCCTGGATCAGAAAGTTC  

CCAGGTAACAGATTGGAGTACATGGGTTACGTTTCTTACTCCGGTGCTTCATACTACAAACCCATCCTGAAGTC  

AGAATCTCCATCACTAGAGAACTTCCAAGAACCCAGTACTACTTGGACTTGAATCTCGTTACTACTGAGGACA  

GCTACTTAACTACTGTGCTACTGGGACGGTGACTATTGGGTCAAGGTACTTGGTTACTGTTTCCTCCGCTTCC  

ACTAAGGGTCATCTGTTTTCATTGGCTCCATCCTCCAAGTTACTTCAGGTGGTACTGTGCTTGGGTTGT  

TTGGTTAAGGACTACTTCCCAGAGCCAGTTACTGTTTCTTGAACTCCGGTGCTTGATACTTCCGGTGTCACACT  

TTCCCAGCTGTCTGCAATCTCCGGTCTGTACTCCTGTCCTCGGTTGTTACTGTCCTTCCTCTTGGGT  

ACTCAAACATTACATCTGTAACGTTAACACAAGCCATCCAACACTAAGGTTGACAAGAGAGTTGAGCAAGTC  

TGTGACAAGTAGAATAG
```

HyHEL-Fab LC 폴리뉴클레오티드 서열 (서열번호 32)

```
ATGAGATTCCCATCTATTTCACCGCTGTCTGTCTGTGCTGCCCCTCTGCATTGGCTGCCCCTGTTAACACTACC  

ACTGAAGACGAGACTGCTCAAATTCCAGCTGAAGCAGTTATCGGTTACTCTGACCCTTGAGGGTGATTCGACGTC  

GCTGTTTGCTTCTCTAACTCCACTAACACGGTTGTTGTTCATTTAACACCACTATCGCTCCATTGCTGCT  

AAGGAAGAGGGTGTCTCTCCGAGAAAGAGAGCAGCTGTTGACTCAATCCCAGCTACTTGTCCCGTTACTCCA  

GGTAACCTCCGGTTCTGTGCTGAGGCTTCCAGTCATCGGAACAACTTGACTGGTACTCAGCAGAAAGTC  

CACGAGTCCCCAAGACTGTTGATCAAGTACGCTTCCAATCCATCTCCGGTATCCCAATCTAGATTCTGGTT  

GTTCCGGTACTGACTTCACTTGTCCATCACCCGTTGAGACTGAGGACTTCGGTATGTACTTCTGCAGAA  

TCCAACCTCTGGCCATACACTTTGGTGGTGACTAAGTGGAGATCAAGAGAACCTGTGTCCTACCGTT  

TTCATCTTCCCACCATCTGACGAGCAGTTGGAGACTCTGGTACTGTTCCGGTTTTTGTGTGACAAACTTCTAC  

CCAAGAGAAGCTAAGGTTCAGTGGAAGGGTGACAACGCTTGCAACTCCGGTAACTCCAAGAGTCCGTACTGAA  

CAAGACTCCAAGGACTCTACTTACTCCTTGCTTCAAGGCTGACTACGAGAAGCACAAGGTTACGGAGCACAAG  

GTTTACGCTTGAGGTTACTCACCAGGGTTGTCTCCTCCCAGTAACTAAGTCCTCAACAGAGGTGAGGTTAA  

TAG
```

(밀줄 및 이탈릭체: *S. cerevisiae*-알파 결합 인자 프리프로 서열)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim RCV GMBH & CO KG

Sandoz AG

VTU Technology GmbH

Lonza Ltd

<120> RECOMBINANT HOST CELL ENGINEERED TO OVEREXPRESS HELPER PROTEINS

<130> I16010C0060

<150> EP14165186

<151> 2014-04-17

<160> 163

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 1

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

1 5 10 15

Ile Gly Glu Thr Thr Ser Ser Thr Thr Ala Ser Leu Ser Glu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Thr Thr Gln Ser Ala Tyr Thr Gln Gln Phe Ser Gln Leu Tyr Ser Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Val Gly Ile Val Arg Thr Tyr Glu Thr Ile Thr Leu Ala Ser

85 90 95

<210> 2

<211> 86

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 2

Met Ser Thr Ala Ile Pro Gly Gly Gln Arg Thr Leu Ala Lys Arg Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ala Gln Gly Leu Lys Val Asp Pro Leu Ile Val Leu Val Leu Ala

50	55	60
Val Gly Phe Ile Phe Ser Val Ile Gly Leu His Val Val Ala Lys Leu		
65	70	75
Thr Gly Lys Leu Ile Asn		

85	85	85
<210> 3		
<211> 361		
<212> PRT		
<213> Pichia pastoris		
<400> 3		

Met Thr Pro Arg Ser His Ile Phe Phe Asp Ile Ser Ile Asn Asn Gln

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

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

130	135	140
Ala Thr Val Arg Lys Ile Glu Arg Asn Ser Glu Gly Glu Ala Pro Ile		
145	150	155
Glu Pro Val Val Ile Glu Asp Cys Gly Glu Leu Pro Glu Asp Ala Asp		
165	170	175

Leu Thr Ile Ser Asp Glu Thr Gly Asp Lys Tyr Glu Glu Val Leu Lys

180 185 190

Asp Asn Glu Asn Ile Asp Ile Asp Asp Phe Glu Gln Val Tyr Gln Ala

195 200 205

Ile Thr Glu Ile Lys Glu Leu Gly Thr Lys Tyr Phe Lys Asn Gly Asp

210 215 220

Thr Lys Ile Ala Phe Glu Lys Tyr Gln Lys Ala Ala Asn Tyr Leu Leu

225 230 235 240

Glu Tyr Ile Pro Ser Asp Leu Ser Glu Glu Gln Ser Ser Lys Leu Glu

245 250 255

Leu Leu Lys Thr Ser Val Phe Ser Asn Val Ala Leu Ala Gly Leu Lys

260 265 270

Val Ser Lys Phe Lys Asp Thr Ile Lys Tyr Ala Thr Leu Val Ile Glu

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Lys Asp Glu Asp Ser Ala Ile Ser Asp

305 310 315 320

Phe Gln Lys Ala Leu Glu Leu Ser Pro Gly Asp Pro Ala Ile Ser Gln

325 330 335

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

340 345 350

Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Phe Glu

355 360

<210> 4

<211> 274

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 4

Met Ser Ser Asp Ala Val Glu Gln Leu Glu Asn Phe Gln Leu Ile Lys

1 5 10 15

Phe Asp Arg Phe Asp Pro Ser Thr Gln Ser Thr Ile Arg Ile Ala Arg

20 25 30

Ser Pro Lys Pro Ile Pro Val Lys Val Val Ile Val Gly Asp Gly Gly

35 40 45

Cys Gly Lys Thr Cys Leu Leu Asn Val Phe Ala Thr Gly Thr Phe Pro

50 55 60

Glu Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Glu Asn Val Val Ile Thr Leu Val

65 70 75 80

Thr Pro Thr Gly Gln Ile Ala Ala Val Thr Leu Trp Asp Thr Ala Gly

85 90 95

Gln Glu Glu Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Ser Asp Val Asp

100 105 110

Val Val Leu Leu Cys Tyr Ser Ile Asp Asn Leu Ser Thr Phe His Asn

115 120 125

Val Ala Asp Lys Trp Tyr Pro Glu Val Ala His Phe Cys Pro Asn Thr

130 135 140

Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Ser Asp Met Arg Arg His Gln Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Met Gly Ala Val Met Asn Ile Glu Cys Ser Ala Lys Glu Val Ser

180 185 190

Asn Val Asn Ile Val Phe Asp Ala Ala Val Ser Tyr Cys Leu Ser Asn

195 200 205

Ser Arg Pro Lys Thr Arg Gly Asp Asn Asp Asn Asn Arg Ser Asn Arg

210 215 220

Arg Leu Ser Arg Ala Lys Arg Ala Ser Met Phe Ile Arg Gly Lys Asp

225 230 235 240

Val Ser Ser Thr Ser Gly Asn Ser Arg Glu Glu Leu Val Glu Tyr Asp

245 250 255

Gln Asp Gly Leu Ala Ile Ile Pro Asp Arg Lys Lys Arg Lys Cys Ser

260	265	270
Ile Ile		
<210> 5		
<211> 127		
<212>		
> PRT		
<213> <i>Pichia pastoris</i>		
<400> 5		
Met Thr Asn Trp Lys Ala Ile Leu Thr Pro Ala Gln Tyr Gln Val Leu		
1	5	10
Arg Leu Gly Gly Thr Glu Arg Pro Tyr Thr Gly Gln Tyr Val Asn Phe		
20	25	30
Lys Lys Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ser Gly Cys Gln Thr Pro Leu Tyr		
35	40	45
Lys Ser Gly Thr Lys Phe Asp Ser Ser Cys Gly Trp Pro Ala Phe Tyr		
50	55	60
Glu Ala Leu Pro Gly Ala Val Lys Arg Ile Glu Asp Asn Ser Leu Gly		
65	70	75
Met Arg Arg Ile Glu Ile Arg Cys Ser Lys Cys Asp Gly His Leu Gly		
85	90	95
His Val Phe Glu Gly Glu Phe Asp Thr Pro Thr Asp Ser Arg His		
100	105	110
Cys Val Asn Ser Ile Ser Leu Lys Phe Gln Gly Glu Glu Asn		
115	120	125
<210> 6		
<211> 1027		
<212> PRT		
<213> <i>Pichia pastoris</i>		
<400> 6		
Met Thr Thr Asn Gly Gln Lys Arg Gln Lys Thr Arg Lys Pro Leu Leu		
1	5	10
Ile Asn Ala Phe Val Met Gly Cys Ala Gly Leu Gln Asn Pro Gly Leu		

20	25	30
Trp Lys His Pro Lys Asp Ser Ser His Arg Phe Asn Gln Ile Asp His		
35	40	45
Trp Thr Tyr Leu Ala Lys Leu Ala Glu Lys Gly Lys Phe Asn Ala Leu		
50	55	60
Phe Ile Ala Asp Val Leu Gly Gly Tyr Asp Val Tyr Lys Gly Pro Glu		
65	70	75
Asn Leu Ala Thr Pro Ala Val Ala Gly Ala Gln Trp Pro Val Thr Glu		
85	90	95
Pro Ser Ala Val Val Ser Ala Met Ala Ala Val Thr Thr Asn Leu Ala		
100	105	110
Phe Gly Val Thr Phe Ser Thr Ile Ser Glu Ala Pro Tyr His Phe Ala		
115	120	125
Arg Arg Leu Ser Thr Leu Asp His Leu Thr Lys Gly Arg Ile Gly Trp		
130	135	140
Asn Val Val Ser Ser Tyr Leu Glu Ser Ala Ala Arg Asn Leu Leu Asn		
145	150	155
Gly Glu Lys Leu Asp Glu His Asp Gln Arg Tyr Leu Lys Ala Glu Glu		
165	170	175
Tyr Ile Gln Ile Val Tyr Glu Leu Leu Ser Ser Trp Arg Asp Asp		
180	185	190
Ala Val Val Leu Asp Lys Lys Ala Gly Val Tyr Thr Asp Pro Thr Arg		
195	200	205
Phe Arg Lys Ile Asn Phe Glu Gly Lys Phe Phe Lys Val Pro Gly Pro		
210	215	220
His Ile Val Asp Pro Thr Pro Gln Arg Leu Pro Val Ile Leu Gln Ala		
225	230	235
Gly Thr Ser Lys Val Gly Lys Glu Phe Ala Ala Lys His Ala Glu Ile		
245	250	255
Val Phe Val Ile Ser Phe Ser Pro Asp Asp Leu Lys Pro Lys Ile Ala		
260	265	270

Glu Val Arg Gln Leu Ala Lys Glu Lys Phe Gly Arg Asn His Asp Asp
 275 280 285
 Ile Lys Phe Val Ala Leu Ala Thr Pro Val Ile Gly Ala Thr His Glu
 290 295 300
 Leu Ala Glu Glu Lys Tyr Gln Glu Leu Leu Ser Tyr Gly Asp Ile Glu

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

 370 375 380
 Ala Phe Val Gly Thr Pro Glu Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu His Trp
 385 390 395 400
 Ser Asp His Ala Gly Leu Asp Gly Phe Asn Phe Thr Tyr Ala Val Asn
 405 410 415
 Pro Leu Ser Phe Glu Glu Ile Val Glu Asp Leu Ile Pro Val Leu Gln
 420 425 430
 Arg Arg Gly Leu Ala Gln Lys Glu Tyr Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser

 435 440 445
 Thr Phe Arg Lys Asn Leu Phe Gly Thr Asp Phe Val Pro Ser Thr His
 450 455 460
 Pro Ala Tyr Asn Leu Arg Trp Arg Ala Gly Val Ser Lys Glu Glu Phe
 465 470 475 480
 Glu Lys Ser Leu Asn Ala Thr Thr Asn Trp Tyr Ser Ser Phe Ala Arg
 485 490 495
 Ser Gly Ala Leu Gly Glu Leu His Asn Thr Cys Arg Ile Leu Tyr Leu

 500 505 510
 Gln Ile Val Lys Tyr Lys Tyr Arg Leu Arg Val Arg Ser Glu Gly Asn

515 520 525

Ser Ile Pro Phe Ala Lys Met Thr Lys Glu Asn Glu Ala Lys Arg Gln

530 535 540

Lys Thr Ser Gln Pro Lys Ala Lys Lys Gln Leu Ile Ile Asn Ala Phe

545 550 555 560

Met Ser Gly Ser Ser Gly Asn Gln Ser Pro Gly Leu Trp Ser Tyr Pro

565 570 575

Gly Asp Lys Ser Thr Glu Tyr Thr Thr Leu Asp Tyr Trp Val Glu Leu

580 585 590

Ala Gln Lys Leu Glu Lys Ala Lys Phe His Ser Ile Phe Ile Ala Asp

595 600 605

Val Leu Gly Gly Tyr Asp Val Tyr Asn Gly Pro Gly Asn Tyr Ser Ala

610 615 620

Ala Ala Lys Ser Gly Ala Gln Phe Pro Met Ile Glu Pro Ser Ala Ala

625 630 635 640

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

645 650 655

Phe Ser Thr Ile Ser Glu Ala Pro Tyr His Phe Ala Arg Arg Leu Gly

660 665 670

Thr Leu Asp Leu Leu Thr Asn Gly Arg Val Gly Trp Asn Ile Val Ser

675 680 685

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

690 695 700

Pro Leu His Ala Asp Arg Tyr Lys Arg Ala Glu Glu Phe Leu Gln Val

705 710 715 720

Val Tyr Arg Leu Phe Leu Ser Ser Trp Arg Asp Asp Ala Tyr Lys Leu

725 730 735

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

740 745 750

Asp His Val Gly Glu Phe Phe Asn Val Pro Gly Pro Gln Phe Leu Pro

755 760 765

Pro Thr Pro Gln Arg Leu Pro Leu Ile Leu Gln Ala Gly Thr Ser Lys
 770 775 780
 Val Gly Met Asp Tyr Ala Ala Lys His Ala Glu Val Val Phe Leu Ala
 785 790 795 800
 Ser Phe Asp Pro Glu Ser Leu Gln Glu Lys Ile Lys Thr Val Arg Asp
 805 810 815
 Ile Ala Glu Thr Lys Tyr Asn Arg Pro Arg Asp Ser Ile Lys Phe Leu
 820 825 830
 Ile Leu Ile Thr Val Val Ile Ala Asp Thr His Glu Asp Ala Val Lys
 835 840 845
 Arg Tyr Glu Asp Leu Ala Ser Tyr Ala Asp Leu Glu Gly Ala Gln Ala
 850 855 860
 Leu Phe Ser Gly Trp Thr Gly Ile Asp Ile Gly Lys Tyr Gly Glu Asp
 865 870 875 880
 Glu Pro Leu Glu His Val Glu Ser Asn Ala Ile Lys Ser His Val Lys
 885 890 895
 Asn Trp Thr Lys Phe Lys Asp Asn Lys Pro Arg Ala Arg Lys Asp Ile
 900 905 910
 Ala Lys Gln Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Pro Leu Leu Val Gly Ser
 915 920 925
 Val Gln Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu Arg Trp Ala Glu Val Ser Asp
 930 935 940
 Leu Asp Gly Phe Asn Phe Ala Tyr Ala Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Asp
 945 950 955 960
 Asp Ile Ile Glu Lys Leu Leu Pro Glu Leu Asn Lys Arg Gly Val Phe
 965 970 975
 Trp Asp Asp Tyr Lys Ile Pro Gly Gly Thr Phe Arg Glu Ser Val Phe
 980 985 990
 Gly Arg Lys Phe Val Asp Lys Asp His Pro Ala Tyr Asp Leu Arg Trp
 995 1000 1005
 Arg Ser Asp Gln Thr Arg Glu Glu Phe Glu Lys Lys Leu Ala Glu

1010	1015	1020
Leu Glu Lys Lys		
1025		
<210> 7		
<211> 546		
<212> PRT		
<213> Pichia pastoris		
<400> 7		
Met Ser His Leu Leu Leu Arg Asp Ser Phe Trp Gly Arg Thr Ile Tyr		
1	5	10
His Leu Ser Lys His Arg Tyr Phe Ser Phe Pro Glu Glu Lys Asp Gly		
20	25	30
Phe Ile Ala Pro Glu Lys Tyr Tyr Leu Asn Met Asp Gln Val Ser Ile		
35	40	45
His Ala Glu Ser Glu Lys Asn Ile Val Glu Gly Leu Val Asp Thr Ser		
50	55	60
Asn Ser Ser Leu Glu Glu Val Lys Thr Thr Arg Val Ile Val Asp Trp		
65	70	75
Asp Glu Tyr Asp Gln Lys Glu Asn Pro Gln Asn Trp Ser Ser Leu Leu		
85	90	95
Lys Cys Phe Val Val Phe Glu Val Gly Ile Leu Thr Val Ala Val Tyr		
100	105	110
Met Gly Ser Ala Ile Tyr Thr Pro Gly Ile Glu Asp Ile Met Arg Asp		
115	120	125
Leu Asn Val Ser Arg Thr Val Ala Thr Leu Pro Leu Thr Leu Phe Val		
130	135	140
Ile Gly Tyr Ala Val Gly Pro Met Ile Phe Ser Pro Met Ser Glu His		
145	150	155
Pro Ala Ile Gly Arg Thr Thr Ile Tyr Val Trp Thr Leu Phe Ile Phe		
165	170	175
Ala Ile Leu Gln Ile Pro Thr Ala Leu Thr Thr Asn Ile Ala Gly Phe		
180	185	190

Cys Ile Leu Arg Phe Ile Gly Gly Phe Phe Ala Ser Pro Ala Leu Ala
 195 200 205
 Thr Gly Pro Ala Ser Val Gly Asp Val Ile Ala Ile Pro His Leu Pro
 210 215 220
 Val Gly Leu Gly Leu Trp Ser Ile Cys Ala Val Cys Gly Pro Ser Leu
 225 230 235 240

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

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

 Ile Gly Met Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ile Leu Ile Gly Val Leu Ile
 370 375 380
 Cys Ser Ala Cys Tyr Cys Tyr Ala Cys His Val Thr Phe Ala Arg Arg
 385 390 395 400
 Ile Ile Ala Asn Glu Thr Ile His Pro Glu Phe Phe Val Pro Gly Ala
 405 410 415
 Ile Ile Gly Gly Cys Ile Met Pro Thr Gly Ile Phe Ile Leu Gly Trp
 420 425 430

 Thr Ala Thr Lys Ser Val His Trp Ile Val Pro Ile Ile Gly Ser Gly

435	440	445
Leu Phe Ala Ala Gly Gly Tyr Leu Ile Phe Gln Thr Leu Phe Asn Tyr		
450	455	460
Leu Ala Met Ser Phe Pro Arg Tyr Met Ala Ser Ala Phe Ala Gly Asn		
465	470	475
Asp Leu Phe Arg Ser Phe Ser Ala Ser Val Phe Pro Leu Phe Gly His		
485	490	495
Ala Leu Tyr Ala Asn Leu Gly Ser Glu Lys Phe Pro Val Gly Trp Gly		
500	505	510
Ser Ser Val Leu Gly Phe Ile Thr Val Ala Met Ile Ala Ile Pro Val		
515	520	525
Thr Phe Met Arg Tyr Gly Pro Arg Leu Arg Ala Asn Ser Arg Tyr Ala		
530	535	540
Gly Pro		
545		
<210> 8		
<211> 355		
<212> PRT		
<213> <i>Pichia pastoris</i>		
<400> 8		
Met Thr Asp Tyr Val Thr Ser Lys Arg Pro Asp Asn Val Leu Asn Trp		
1	5	10
Thr Ser Ile His Val Ser Ser Trp Ile Gly Glu Thr Ile Pro Glu Ile		
20	25	30
Asp Pro Ser Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu His Asp Ile Ala Gly Asp		
35	40	45
Val Leu Pro Tyr Leu Lys Ser Glu Asp Leu Lys Glu Ile Gly Ile Asn		
50	55	60
Glu Leu Lys His Arg Ile Ser Ile Lys Lys Asn Ile His Glu Leu Leu		
65	70	75
Val Ser Asn Glu Lys His Ile Asp Thr Ser Ile Leu Ser Asp Thr Ala		
85	90	95

Thr Glu Leu Gly Thr Leu Ile Leu Thr Asn Lys Phe Ile Thr Gln Met
 100 105 110
 Ala Asn Arg Lys Asn Val Val Asp Asp Ser Thr His His Ser Asn Asn
 115 120 125
 Arg Arg Leu Thr Glu Gln Phe Asn Lys Leu Arg Lys Asp Leu Leu Pro
 130 135 140
 Ile Phe Lys Trp Ile Lys Glu Thr Gln Pro Leu Pro Thr Pro Glu Asn
 145 150 155 160
 Thr His Phe Ala Asn Met Gly Ser Val Pro Ala Ser Pro Val Glu His
 165 170 175
 Thr Ser Gly Glu Ser Thr Leu Ser Asn Pro Ser Leu Ser Thr Ile Asn
 180 185 190
 Ala Gly Glu Gly Val Asn Ser Ala Val Ala Gly Gln Ser Leu Gly Arg
 195 200 205
 Lys Pro Thr Leu Ser Ser Arg Arg Gln Ser His Ala Leu Ser Pro Thr
 210 215 220
 Gly Glu His Leu Asn Val Ser Ser Ser Pro Ser Thr Gly Asn Phe
 225 230 235 240
 Glu Thr Leu Asn Gly Glu Arg Pro Asn Leu Arg Ser Ala Ser Ser Gly
 245 250 255
 Ser Gln Glu His Thr Glu Asn Glu Leu Leu Lys Pro Leu Arg Val Lys
 260 265 270
 Ala Asp Glu Pro Cys Tyr Lys Val Ile Gln Asn Ala Met Lys Arg His
 275 280 285
 Gly Leu Ser Val Asp Asp Trp Arg Lys Tyr Ala Leu Val Ile Cys Tyr
 290 295 300
 Gly Asp Glu Glu Arg Val Leu Gly Leu His Glu Lys Pro Gly Ser Ile
 305 310 315 320
 Phe Lys Glu Leu Lys Asp Gln Lys Gln Asn Pro Ala Ile Met Leu Arg
 325 330 335
 Gln Ile Asp Thr Asn Asn Asp Asp Gln Asn His Ile Glu Thr Pro Gly

340	345	350
Gly Arg Leu		
355		
<210> 9		
<211> 194		
<212> PRT		
<213> Pichia pastoris		
<400> 9		
Met Arg Phe Ser Asn Val Val Leu Thr Ala Ile Ala Ala Ala Gly Val		
1	5	10
15		
Gln Ala Asp Glu Ala Leu Tyr Thr Val Phe Tyr Asn Asp Val Thr Glu		
20	25	30
Asn Ala Gln Glu Tyr Leu Ser Tyr Ile Gln Ala Asn Thr Ala Ala Gly		
35	40	45
Phe Thr Asp Leu Leu Ser Leu Tyr Thr Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Asp		
50	55	60
Asp Ser Tyr Thr Ser Ile Phe Thr Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ser Glu		
65	70	75
60		
Leu Ser Ser Phe Val Val Asn Leu Pro Trp Tyr Ser Ser Arg Ile Glu		
85	90	95
Pro Gln Val Ala Ala Ala Glu Thr Gly Glu Ser Glu Glu Ser Glu		
100	105	110
Thr Gly Glu Ser Glu Glu Ser Glu Thr Gly Glu Glu Thr Glu Thr		
115	120	125
Glu Thr Gly Ser Glu Ser Glu Ser Glu Ser Glu Thr Ser Ala		
130	135	140
Thr Gly Thr Gly Thr Gly Thr Ser Ala Ser Glu Ser Ala Glu Thr Glu		
145	150	155
160		
Thr Ser Thr Asp Ala Ala Val Ser Ile Asp His Pro Lys Ser Thr Leu		
165	170	175
Leu Met Gly Leu Thr Ala Ala Val Val Ser Ile Thr Phe Gly Val Phe		
180	185	190

Ala Leu

<210> 10

<211> 806

<212> PRT

<213> *Pichia pastoris*

<400> 10

Met Asn Lys Pro Asn Gly Ser Glu Gln Gln Pro Pro Ser Arg Gly Met

1 5 10 15

Lys Gln Glu Ser Gly Gly Pro Val Thr Ser Ser Thr Thr Pro Gly Thr

20 25 30

Asn Thr Gly Leu Glu Asn Ser His Ser Met Gly Ala Asp Met Glu Pro

35 40 45

Asp Val Gly Ala Thr Ser Pro Arg His Leu Leu Asn Gly Tyr Ile Tyr

50 55 60

Asp Tyr Leu Val Lys Ser Asn Met Gln Asn Leu Ala Asp Gln Phe Ala

65 70 75 80

Gln Glu Thr Glu Leu Leu Glu Thr Asp Leu Thr Val Pro Met Asp Thr

85 90 95

Pro Ser Gly Tyr Leu Leu Glu Trp Trp Met Val Phe Trp Asp Leu Phe

100 105 110

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

115 120 125

Gln Leu Asn Met Leu Arg Gln Gln Gln Arg Thr Met Arg Asn Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Met Ser Gln Thr Phe Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ala Gln

165 170 175

Gly Gln Gln His Ala Gln Ala Gln Val Gln Ala His Gln Gln

180 185 190

Ala Gln His His Ala Gln Ala Gln Val Pro Val Gln Pro Gln Gln His

195

200

205

Gln Leu Gly Gly Gln Thr Gln Gln Gln Ser Ile Asn Thr Gly Ser

210

215

220

Pro Ala Gly Pro Asn Ala Ile Asn Ser Arg Val Gln His Leu Ala Gln

225 230 235 240

Gln Gln Met Asn His Leu Arg Gln Gln Ala Thr Ala Thr Thr Gln Gln

245

250

255

Pro Ile Pro Gln Gln Asn Ile Pro Ser Asn Gln Gln Gly Pro Thr Gly

260

265

270

Pro Tyr Pro Thr Ser Pro Ser Arg Arg Pro Arg Leu Leu Ser Asn Glu

275

280

285

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

290

295

300

Val Pro Pro Ser Gln Gln Pro His Gln Gln Gln Gly Gln Gln Val Gly

305 310 315 320

Pro Pro Asn Gln His Gln Gly Gln Ser Ser Ser Phe Tyr Ser Gly Met

325

330

335

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

340

345

350

Ala Asn Met Leu Ala Arg Gln Gln His Val Gln Ala Gln Gln Val

355

360

365

Gln Leu Gln Gln Val Gln His Val Gln Gln Arg Gln Gln Asp Gln

370

375

380

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

385 390 395 400

Val Phe Gln Gln Pro Pro Met Ser Asn His Asn Gln Val Met Ile

405

410

415

Asn Gln Gln Gly Glu Thr Phe Phe Asp Pro His Ser Pro Tyr Ala Gln

420

425

430

Pro Asn Gly Tyr Pro Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

435

440

445

Gln Gln Gln Gln Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 450 455 460
 Gln Lys Gln Gln Pro Pro Pro Pro Arg Gln Pro Gln Arg Gln Gln

465 470 475 480
 Ala Met Ala Met Ala Pro Leu Pro His Ser Thr Ser Ala Ala Gly Thr
 485 490 495
 Pro His Ser Ser Thr Thr Pro Arg Phe Ser Gln Pro Gly Pro Val Tyr
 500 505 510

Gln Gln Pro Leu Pro Ala Ser Gln Pro Gln His Ser Pro Pro Ser Ser
 515 520 525

Ile Gln Gln Pro Glu Leu Val Pro Thr Pro Gly Ser Gln His Gln Gln

530 535 540
 Ile Ala Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gln His Gln Gln Ser Gln Gln Ser
 545 550 555 560
 Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Val Gly Ile Gln Glu Tyr Gln Lys Glu
 565 570 575
 Leu Met Met Leu Glu Lys Gln Asn Lys Gln Arg His Asp Met Ala Cys
 580 585 590
 Lys Lys Gly Ser Gly His Phe Ser Asn Phe Asp Pro Ile Pro Glu His

595 600 605
 Thr Pro Pro Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Val Met Leu Pro Pro Gln
 610 615 620
 Asn Ser Ala Val Val Thr Lys Asn Thr Pro Gly Thr Ser Pro Gly Thr
 625 630 635 640
 Gln Thr Gln Asn Thr Ala His Ser Thr Gly Asn Thr Ser Ala Gly Ser
 645 650 655
 Thr Pro Asn Asn Val Ala Pro Val Arg Lys Lys Glu Pro Ala Lys

660 665 670
 Lys Lys Ala Lys Lys Ala Thr Glu Pro Pro Thr Pro Thr Pro Gln
 675 680 685
 Thr Pro Ile Ala Ala Arg Thr His Gln Asn Ser Thr Gly Gly Ile Pro

690	695	700	
Gly Asn Asn Ala Ala Thr Lys Arg Arg Lys Arg Glu Pro Leu Val Asp			
705	710	715	720
Gln Thr Val Ser Pro Asn Leu Asn Glu Ala Ser Lys Ser Thr Lys Thr			
725	730	735	
Gly Lys Ile Ser Ser Gln Thr Asp Phe Thr Gly Ser Asp Asn Gly Phe			
740	745	750	
Leu Gln Asp Phe Gly Asp Gly Thr Gly Pro Pro Thr Gly Thr Asp Asp			
755	760	765	
Met Glu Phe Asp Phe Asn Ser Phe Leu Asn Asn Glu Thr Gly Glu Pro			
770	775	780	
Asn Ser Ser Thr Ile His Phe Asp Asn Val Phe Asn Trp Gly Glu Gly			
785	790	795	800
Thr Glu Ala Gly Asp Leu			
805			
<210> 11			
<211> 149			
<212> PRT			
<213> Pichia pastoris			
<400> 11			
Met Val Val His Asn Pro Asn Asn Trp His Trp Val Asp Lys Asn Cys			
1	5	10	15
Leu Pro Trp Ala Lys Ser Tyr Phe Gln Glu Val Leu Pro Asn Thr Thr			
20	25	30	
Gln Lys Asn Asp Ala Tyr Glu Ile Val Val Thr Ser Val Asp Leu Val			
35	40	45	
Asp Gly Asp Cys Asp Val Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Lys Cys Ile			
50	55	60	
Phe Asp Leu Lys Ile Gln Val Ser Ala Thr Val Lys Val Asn Thr Asn			
65	70	75	80
Ser Glu Val Glu Glu Ile Ser Tyr Thr Val Thr Leu Pro Glu Leu Val			
85	90	95	

His Asp Gln Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Tyr Val Ile Glu Gly Asn Leu

100 105 110

Asp His Lys Ser Gln Ile Arg Lys Leu Leu Thr Pro Leu Leu Thr Glu

115 120 125

Lys Leu Ser Lys Phe Gln Gln Ala Leu Ile Asp Ala His Thr Gln Asp

130 135 140

Val Gln His Ser Thr

145

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Lys Phe His Pro

35 40 45

Asp Lys Asn Pro Gly Asp Asp Glu Ala Ala Gln Lys Phe Ile Gln Val

50 55 60

Gly Glu Ala Tyr Asp Val Leu Gly Asp Pro Glu Lys Arg Gln Arg Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Pro Phe Asp Met Phe Gln Gln Phe Phe Gly Gly Gln Gln

100 105 110

His Arg Gly Lys Pro Lys Gly Lys Ser Ser Leu Leu His Leu Glu Phe

115 120 125

Ser Leu Gln Asp Phe Tyr Asn Gly Ala Ser Asn Asp Phe Arg Ile Glu

130 135 140

Met Gln Asn Ile Cys Glu Thr Cys Ser Gly Ser Gln Asp Gly
 145 150 155 160
 Lys Val His Gln Cys Asp Thr Cys Lys Gly His Arg Val Val Gln
 165 170 175
 Thr Arg Gln Phe Gly Gly Met Gln Gln Arg Phe Glu Thr Ile Cys
 180 185 190
 Pro Lys Cys Ser Gly Thr Gly Asn Leu Ile Thr His Lys Cys Lys Lys
 195 200 205
 Cys Gln Gly Asn Arg Val Val Arg Gly Pro Arg Ile His Asn Val His
 210 215 220
 Leu Gly Ala Gly Thr Ser Arg Asn His Val Glu Ile Leu Glu Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Asp Gln Ser Pro Asp Trp Ile Ala Gly Asp Leu Gln Ile Met Phe
 245 250 255
 Lys Glu Lys Ala Glu Gly Asn Met Gly Tyr Arg Arg Ile Gly Asn Asn
 260 265 270
 Leu Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Lys Glu Ala Leu His Gly Gly
 275 280 285
 Trp Glu Arg Gln Ile Ala Phe Leu Asp Lys Ile Glu Asn Thr Ile Thr
 290 295 300
 Leu Ser Lys Lys Gly Glu Val Val Val Asp Gly Gln Val Asp Thr
 305 310 315 320
 Ile Lys Gly Arg Gly Met Pro Leu His Asp His Tyr Asp Glu His Gly
 325 330 335
 Asp Leu Phe Ile Lys Tyr His Ile Ile Tyr Pro Gln Gln Ile Arg Asp
 340 345 350
 Glu Leu

<210> 13
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> Pichia pastoris

<400> 13

atgttaaaca agctgttcat tgcaatactc atagtcatca ctgctgtcat	aggcgagacg	60
actacgtcat ctaccactgc cagtctctcc gaaagcccta ctctggttt	ggtgactggc	120
actgaigcaa gtggagatt ggcaactaca cagtcgttt acactcaaca	gtttcacag	180

ttatactcat ccatagcatc tccatcaagt ggttagcatag gcctgggtac	tatccagggg	240
actgttgaa ttgtcagaac atatgagaca attacccttgcagctaa		288

<210> 14

<211> 261

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 14

atgtctacag caattccagg aggacagaga acgttagcta aaagaagagc	agcaaacttg	60
gataagaac agatgaacc aacctccgcc agatctgccg gtgctggagg	ttcttcgtct	120
accatgctaa agttgtacac agacgaggcc caaggttga aagttgatcc	ttaattgtt	180
cttgcgtttt ctgttggttt catttcagt gtcattggtt tgcacgttgt	tgctaagctg	240

acagggaaagt tgcataacta a		261
--------------------------	--	-----

<210> 15

<211> 1086

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 15

atgactcccc gttctcatat tttctttgac atctccatca acaaccagcc	agctggcaga	60
ataatcttg agctttcaa tgacattgtt cctaagacag cagagaattt	tagacttta	120
tctactggtg agaaaggat aggttaagtct gggaaaccat tgcactacaa	gggttctact	180
ttccatagga tcattaagga ttttatggta caaggtggtg actttaccaa	cggtaacggt	240
actggaggcg aatccatata tggagaaaaaaa tttgaagatg aaaattcca	attgactcat	300

gacaaaccgt tcctctctc tatggcaaac gctggaccag gaactaatgg	atcccgat	360
tttatcacca ccgttcctac tcctcatctg gataacaagc atgttagtgtt	tggaaaagta	420
attgttgta aagccacagt tagaaagatt gaaagaaact ccgaaggta	agctccaatt	480
gaacccttg tcattgagga ctgtggtaa cttccagaag acgcagattt	gaccatctcc	540
gacgagactg gagacaagta tgaggaagtt ctgaaagata atgagaacat	agacatcgat	600
gacttgaac aggtctacca ggccatcaact gaaatcaaag aattgggtac	aaagtatttc	660

aaaaatggtg acacccaaaat cgcccttcgaa aagtatcaaa aggctgctaa ttatttgctg 720

gaatacatac catcagattt atcagaggaa cagagctcta agttggagct gctaaaaaca	780
tctgtcttct ccaacgtggc attggctgga ctgaaagttt ccaagtcaa agacacgatt	840
aagtatgccat cattggcat tgaggatgaa tctgcggatg caaaggccaa gtccaaaggc	900
tactaccgtt gaggaagtgc ttacagctca ctgaaagacg aagattcagc catctcagat	960
ttccagaaaactttaattt atccccaggat gatcctgcaa ttagccaatc tctacaaaga	1020
accacgaagg ccagaaaaga ccgtcttgcc aaagagaaaag ctgcttgtc taagttctt	1080
gagtag	1086

<210> 16

<211> 825

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 16

atgtcgtctg atgctgtgga gcaacttcaa aacttccagt tcatcaagtt cgacagattc	60
gatccttcaa cgcaatcgac tatcagaata gcgcgatctc ccaaaccat tccagtcaag	120
gttgtatag tggagatgg tggatgtgga aagacatgtc ttctaatgt ctttgccact	180
ggaacgttcc tgaggcgta tgtccccaca atcatagaaa atgtggttat tacattggtg	240
accccaactg gccagatagc tgccgttact ctgtggata ctgcaggcaga agaagagtac	300
gacagattga gacccctaag ctactccgac gttgacgtgg tcttgctgtc ctacagcata	360

gacaatctgt ccacccttca taatgtggcc gacaatggc acccagaagt ggcacatttt	420
tgtccaaaca caccgatcat ctggtaggt accaaatctg atatgcggcg tcatcagaag	480
agtccagccgc actttgtatc tccccaggat tcgtcgcagt tggcaaggca gatggggca	540
gtgtatgaaca tcgagtggtc tgcaaggag gttcaaaacg tcaatatcgt ttttgtatc	600
gtgtgtcgtaactgtttagt taacagcagg cccaagacca gaggggataa tgacaacaat	660
aggagtaaca gacggctaag tagagccaa cgagccagca tgttataag gggtaaggat	720
gttagctcaa cgtcaggaaa ctctcgggaa gaaatgttgt aatacgatca agatgggttg	780

gcaataatac cggacagaaaa gaaacgc当地 825

<210> 17

<211> 384

<212> DNA

<400> 17

atgactaact ggaaagcgat attgactccc gctcaatacc aagtccctcg tttggcggaa	60
acagaaaagac cgtataccgg acagtatgtg aacttcaaga aaaatggAAC ctacttgtgt	120
agtgggtgtc aaactccgct ttacaaaagt ggcacaaaaat ttgattcatc ttgtggttgg	180
cctgcattct atgaagcatt acctggagca gttaaacgaa tagaagacaa ttcgcttggaa	240
atgcgtaaaa tagaaatcag atgctccaaa tgtgtatggac atcttggcca tgtttttgag	300

ggtagggat ttgacactcc aacagattcc agacattgtg tcaacagcat cagcctaaaa 360
tttcaagggtg aagaagagaaa ctaa 384

<210> 18

<211> 3084

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 18

atgactacaa acggccagaa aagacaaaaa actcgcaaac cactttgat caacgcatt	60
gtcatggat gtgctggtt acagaatcct ggtttatgga agcatccaa ggactcatcc	120
catagattt atcagatttga tcactggact tatttggcca agtttagccga aaaggggaag	180
ttaaatgcgc ttcatcattgc cgacgtcttg ggtggctatg atgtctacaa aggaccttag	240

aatttagcca ctcctgtgt ggctggagcc cagtggcctg tcaccgagcc cagtgttgt	300
gtctccgcca tggctgcagt cacaactaac ttggcgtttg gagtgacgtt ctctactatc	360
agcgaagccc cctatcattt tgccagaaga ctgtccactt tagaccactt gaccaagggt	420
agaataggat ggaatgttgt ttcatcttac ttggagagtg ctgctcgtaa cctttgaat	480
ggtaaaaaat tggacgagca tgaccaaaga tacttggaaag ctgaagagta cattcaaata	540
gttatgagc tggatgttata gtcttgaga gatgtatgcag tagttttaga caagaaagct	600
gggtttata ctgacccaaac aagatttcga aagatcaact ttgaaggtaa attttcaaa	660

gttccgggac cacatattgt tgaccccacc cctcaaagac tgcctgtat tcttcaagct	720
ggtaacttcta aagttggtaa ggagtttgct gctaaggcatg ccgagatgt gtttgtcatt	780
tcattttctc cagatgattt gaaacccaag attgcagaag ttctgtcaact ggccaaagaa	840
aagtttggtt gaaaccacga cgatattaag ttgttgccc ttgcaacccc tgttattgga	900
gcccacatg aactagctga agaaaagtac caagagttac taagttatgg tgatattgaa	960
ggtgctcaag ctttatttgg agggtggact ggcattgacc tctctcaata tggcgaagat	1020
gaagaacttag gaaatgttag ttccaatgt atgcgtggcg ctgtacaaaa ctggactaaa	1080

gcaattccaa atgagaagcg ttggacacgt aaggttattg ctaaacagat taccgttgtt	1140
ggtcttagtc cagtttcgt tgaaaccca gaagaaatcg ccgatgagct ggaacactgg	1200
tccgaccacg ctggtttggc cgattcaac ttcaattatg ctgtcaaccc gctttttc	1260
gaagagatag tgaaagactt gattccagt cttcagcgaa gaggttgcc cccaaaggaa	1320
tacccaaatc cagaaactgg aagcacattc cgtaaaaacc ttttggAAC agactttgt	1380
ccatctaccc acccagctta taacttaaga tggagggctg gtgtgtccaa ggaagaattc	1440
gaaaagtccc taaacgccac aacaaattgg tattccagtt tcgcttagtc aggtgctcta	1500
ggtaattgc ataatacatg caggattctc tatctccaaa tagtgaataa taaatatagg	1560
cttcgagtc gttcagaagg gaatagcatc cccttcgc aaatgaccaa ggaaaatgaa	1620
gccaagaggc agaaaacctc tcaaccaaaa gcgaagaagc aattgattat caatgtttc	1680
atgtcaggct cttcggtaa ccaatgcgc ggactgttgt cgtaccctgg agacaatca	1740
acagagtata ctaccctaga ttactgggtg gagttagctc aaaagctgga aaaggccaaa	1800
ttccattcta ttttatttc cgtgttctg ggtggatatg acgttacaa tggacctgga	1860
aactacagtg ctgctgcaaa atctggtgcc caatttccaa tgattgaacc aagtgctgca	1920
gttactgccat tggtgtgtgc taccaagtca ataacgttcg gagtgacttt ttccactata	1980
agtgaggcac ctatcattt tgcaagaaga ttggaaactt tagatctgt gacaaacggaa	2040
agagtccgct ggaatatcgt ctttcgtat ctgcacatgc ccgcacaaaa tctttgaat	2100
ggagaaccac tccctctcca tgcagaccgt tataagagag ccgaagaatt cctacaagtt	2160
gtatatcggt tattccttc ttcatggaga gacgtgttccatgataatggta taagaaaacc	2220
agaacctttg ctgacccaaa acttattaga actatgcacc acgttggaga gttttcaat	2280
gtcccaggcc cccagttctt accacccact cctcagagac taccgtgtat tttcaggct	2340
ggtaattccaa agtttgttat ggattatgtc gcaaaacatg cagaggttgtt cttttagct	2400
tcatatgacc cagagtcaact ccaagaaaaa atcaaaacag tgagagatat cgctgaaacc	2460
aagtacaaca gaccaagaga ttcaatcaaa ttcttaattt tgataacagt agtcatagct	2520
gatacacacg aagatgccgt gaagagatac gaagatctcg ccagttatgc tgatctggaa	2580
ggggcccaag cactgttcag tggttgact ggaatagata ttggaaagta tggtgaagat	2640
gaacctttg agcatgtgga atctaacgtt attaagagcc atgttaagaa ctggactaag	2700
ttcaaggaca ataaggcttag agccagaaaa gatatgccta aacagattgg agttggaggc	2760
tcaggtccct tactgttgg atctgtacaa gagatagccg acgagcttgc gagatggc	2820
gaagtctctg acctcgatgg cttaacttc gcttacgcag attacccca aactttgtat	2880
gatatcatttgg aaaaactgtc tccagagttg aacaagagag gtgtgttctg ggtgttgc	2940

aaaattccag gtggaacctt cagagagacgtgttgaa gaaagttcgatgataaggat
 catcctgctt atgatctgag atggagaagt gaccaaacta gggaggagtt tgaaaagaaa
 ctggctgaat tggagaaaaa ataa

3000

3060

3084

<210> 19

<211> 1641

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 19

atgtctcatc tattactgctc tgacagctt tggggaaagga ccatctacca tctgagtaaa
 cacaggtatt tctctttcc tgaagagaaa gatggttca ttgctcctga aaagtactac
 ctgaatatgg accaagtatc gatacatgtc gaatctgaga aaaatatagt ggaaggttg
 gtagacactt caaattcttc gttggaggaa gtaaagacca cttagtcat agtcgactgg
 gatgaatatg atcagaaaga aaatccccaa aactggagct cgctttaaa gtgcctcggt
 gttttgaag tggaatctt aaccgttagct gtttatatgg gatctgcaat ttacactccc
 ggtatagaag atattatgag agatctcaat gtttagcagaa cggtgccaac acttccatta

60

120

180

240

300

360

420

accttgtttt tgattggata cgctgtgggt ccaatgatat tctcccccgt gtctgagcat
 cccgctatcg gaaggacaac gatataatgtc tggaccctgt tcataattgc tataactaca
 atcccaacgg ccctgaccac taacattgtc ggatttgca tttttaggtt tattggaggg
 tttttcggtt caccaggatt agctacaggt ccagcttcgt taggtgtatgt tattgcaatc
 ccgcacttgc ctgttaggggtt aggcctttgg agtatactgtc ctgtttgtgg tccttctcta
 ggaccactt ttggagccat atttccaa cttgtgagtt ggaggtgggtt cttctgggtt
 ctgttaatta cctctggac actattata gttctggct tcactttacc agaaacgtat

480

540

600

660

720

780

840

gtaccaaccc ttctttacag aaaggctagg aggctacgag cattaacaaa aaacgaactg
 attatcagca aaggggagtt agatattcag gacagaactg ccaaggaagt tttgattgaa
 tgcttatgga gcccagtgcga catatcatc agagaccccg ttgtcttgat gataaatctt
 tacatttcaa tggtttattc tatttggtagt atttgggtt aagcgtttcc tattgtattc
 ttagagat atggattcag ctttattgga atgggagcta gtttgcgg aatcttaatt
 ggtgtcttaa tatgctctgc gtgctattgc tatgcgtgtc atgttacttt tgcaagaaga
 ataattigcaa acgaaaccat tcattcgttag ttcttggtagt cggcgctat tattggaggt

900

960

1020

1080

1140

1200

1260

tgcataatgc ccactggaat ctttatggggatggactg ccacaaaag tgtccactgg
 attgtaccta taataggttag cggtttatgtt gctgctgggtt gttatctcat tttccagaca

1320

1380

ctcttcaact acttgcaat gtcttcct agatacatgg catcagctt tgccggaaat	1440
gatctttca ggtcctttc tgccagtgtt ttcccactgt ttggacatgc actatatgcc	1500
aacttggat ccgaaaagtt ccctgttgtt tgggttctt ctgtactggg gttcatcact	1560
gttcaatga tcgcaattcc agtaacttcc atgagatatg gtccaagatt gcgtgcaaatt	1620
tctagatatg ccgggcccatt a	1641

<210> 20

<211> 1068

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 20

atgacggact atgtcacttc taagcggcca gataacgtgc tcaattggac aagtattcat	60
gtatcgctt ggatagggga gactattcct gagatcgatc caagtctact ccaaaattt	120
ttagaacatg acattgcggg agatgttcta ccctacttga agtctgaaga tctgaaggaa	180
attgggatca acgagctcaa gcacagaatc tctataaaaa agaacattca tgaacttctt	240
gtgagcaatg aaaagcacat tgataccagt attctatcag acaccgctac cgagcttagga	300
actttgatac tgactaataa attcataacc cagatggcga acagaaagaa tggtagat	360

gattccactc atcattcgaa taacagaagg ctcactgaac agttaataa gcttcgaaa	420
gatctttgc cgatattcaa atggatcaag gagacccaa cattaccac tccagagaat	480
acacattcg caaatatggg ttcagtagcca gcatctcctg tggagcatac ttcaggtgag	540
tcaacattgt ctaacccag tctaagcacc atcaatgctg gcgaggagt gaactctgca	600
gttgcagggc aatctctcg gaggaaacct acattatcct ccagaagaca atcacatgct	660
ttgtctccaa ctggtaaca cctgaatgtg tcatcatcat ctcctcgac gggaaat	720
gaaactctga atggagaaag accaatctt agatctgctt cgtcaggatc acaggaacat	780

actgagaacg aactattgaa gccgttgaga gttaaagcag atgagcctt cttataagg	840
attcagaatg ccatgaaaag acatggctta tcggtagatg attggcgcaaa gtatgc	900
gtcatctgct atggagatga agaacgagta ctaggcttac ataaaaacc tggagatc	960
ttcaaggaac tcaaagatca gaaacagaat cctgcaatca tgcttcgtca aattgacact	1020
aataatgacg atcagaacca tattgaaacc cctggaggaa gattatga	1068

<210> 21

<211> 585

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 21

atgagattt ctaacgtcgt ttaactgca attgccgtg ccggcgata ggcagatgaa	60
---	----

gcccttaca ctgtgttcta caatgatgtc actgagaacg cccaaggagta tctgtttac	120
atccaggcca atactgcggc tggttcaact gacctttga gtctgtacac tgaactggcc	180
acttacaccg acgattctta cacaagtatc ttactgagg aggattccc tgcgagcga	240
ctttcatcgt tcgttgtaa cctgccatgg tattcctcca gaattgagcc acaagttcg	300
gctgctgaaa ctggtaaag tgaggaggaa tcagagactg gtgaaagtga ggaagaatca	360
gagactggtg aggagacaga aactgagact ggatctgagt ctgaatctga gtctgaatcg	420
gagacctccg ctactggcac tggcactggc accctccct ctgagagcgc ggagactgaa	480

acttctaccg acgctgctgt gtctatcgat cacccaaagt ccaccttatt gatgggttt	540
actgccgcag ttgtcagttt cacttcgga gtcttgccct tgtaa	585

<210> 22

<211> 2421

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 22

atgaacaaggc caaacgggtc tgaacaacaa ccaccgtcac gcgaaatgaa gcaagagtca	60
ggaggcccag ttacttcata tacgacgccc ggtaccaata ctggcttaga aaactctcat	120
tccatggggg cgatatgga gcctgatgtt ggtgtacctt ctctcgcca tcttcttaat	180
gggtacattt acgattttt agtcaaattt aacatgcaaa atttggctga tcaatttgcc	240

caagagacgg agctttttaga aacagacttg acagtaccaa tggatacgcc ttcaggctat	300
cttcttagaat ggtggatggt attctggac ctttcaatg cccgcctaaa gcaacgggt	360
tcacagaagg cccaccagta tattcagttt aacatgtcac gacaacagca acagaggacc	420
atgcgaaata cagccgtgt taaaaagtc ccttttggc cacacacccaa atcatctct	480
tcaatgtcac agacttttat tccacagcag cctcaacagc aagcacaggg acaacagcac	540
gccaggctc aagccaaagt gcaaggcat cagcaagccc aacaccacgc gcaggcaca	600
gtgccagtgc aaccgcaaca gcaccagta ggaggccaaa ctcaacagca gcaatccatt	660

aacactgggt ctctcgccc tccaaatgtt atcaactcgc gtgttcaaca cttagcacaa	720
caacagatga atcacctcg ccagcaggcg actgccacta cgcaacaacc tatcccgaa	780
cagaatatcc catcaaaccat acagggtctt acaggccctt atcctacttc cccttcaaga	840
agaccgagat tactgtctaa cgaatcggtt gcaagtgcac cctctgtat gacaaagtca	900

cagctccaag gagtccctcc ctcacaacaa ccacaccgc agcaaggta gcaggtggc	960
ccccctaatac aacatcaagg tcaatcttct tcctttatt cgggcatgcc tcctcaaggg	1020
gtcggttcc tcatacgtt caatcctcag cagtatgcc aatgctagc aagacaacag	1080
catgtacaag ctcaacaaca ggttcagttt caacagggtcc aacatgtaca acagagacaa	1140
cagcaagacc aacaacaaca ccgcctgtcc gcccgttac cggggcaccc ttcatggc	1200
gttttcaac aacctctcc gatgtcaaac cataatcagg tcatgtcaa tcagcaggga	1260
gaaactttt ttgatccaca ttctccatat gctcaacctt acgggtaccc ccagccacag	1320
caacaacaac aacaacagca acaacaacaa caacagcagc aaccgcaaca gcagcagcag	1380
cagcagcagc aacagaagca gcaaccacca ccaccacac gacagctca ggcacaacaa	1440
gcgatggcca tggctcctt gctcactt acttctgccc ccggtaactcc tcactcgcc	1500
accacaccta gattctcgca acctggctt gtttatcagc agccttacc tgcatctcaa	1560
ccgcaacatt ctccgccttc ttctatttag cagccggagc tagttccaaac tccagggtca	1620
caacatcagc aaatagcaca accacaatca cagagccaaac accagcaatc gcaacagtct	1680
caatcaagtg ttctaaaat tgttaggtata caggagtatc agaaagagct aatgatgttt	1740
gagaaacaga acaaacagcg tcatgacatg gcatgtaaag aggaaagcgg gcattttct	1800
aactttagtc caattccaga gcacacaccc cccgaaccaa aatthaatgt gaatgtatg	1860
ctccctcccc agaactctgc agtggtaacg aagaataactc ccggaaacttc acctggta	1920
caaactcaaa acactgcaca tagtactggt aacacttctg cggggctac accaaataat	1980
gtcgacactg tacgaaagaa aaaggagcc gctaaaaaga aggcaaaagaa agctactgag	2040
cccccgactc ccactactcc acagactcca attgcagcta ggacacatca aaactctaca	2100
ggcggcattc ctgtaataa tgctgctact aagcgcacaa aacgggagcc gctgggtgat	2160
caaactgttt cacctaacct taacgaagct tccaagtcaa caaagaccgg aaaaatttca	2220
tctcaaactg actttacagg ttctgacaat ggattttac aggattttgg cgatggaaact	2280
ggtccctccca ctggaaccga tgatatggaa tttgatttttta acagtttct taataacgaa	2340
actggcgaac ctaatagttc aaccattcat tttgacaatg tattcaattt gggagaaggt	2400
accgaagccg gagatttata g	2421
<210> 23	
<211> 450	
<212> DNA	
<213> Pichia pastoris	
<400> 23	

atggtgtgc acaaccctaa taactggcac tgggtcgaca agaactgcct tccttggcc	60
aaaagctact ttccagaatg cttccaaac accactcaga agaatgacgc ctatgaaata	120
gtggtaacat ctgtggacct tgttagatgga gactgcgtg tcactcaacg taaagggttt	180
accaaataatgtt ttttgatct gaagatacag gtatctgcaa ccgtcaaagt caacacgaa	240
agtgaagtag aggagatcag ttatacagtg acattacctg aactggtgca cgaccaggac	300
gaggatgaat atgaatacgt aatagaggga aatttggatc acaagtcata aattgaaag	360
ctactcactc ctctgttgac cgagaagttt tcaaagtttca aacaagcttt gatagacgct	420
catactcagg atgtttagca tagtacctag	450
<210> 24	
<211> 1065	
<212> DNA	
<213> Pichia pastoris	
<400> 24	
atgaagatat ggctggtaact tcttttagtt tttgccacgg tggttggcgaa gacagattat	60
tataaaatgttcc ttggagtagc taaaaatgca gatgaaaaaaat atatcaagaa ggcctacaga	120
tcgtttagta agaagtttca tccagataag aacccgggtg atgatgaagc cgctcaaaag	180
ttcattcaag ttggagaagc ttatgtatgtg ctgggtgatc ccgagaagcgt tcaaaggat	240
gacagatttg gacgagaagg actggactca agacaggaac aattccatga tccatggac	300
atgttcaac agtttttcgg aggaggtgaa cagcaacaca gaggcaaacca aaaggtaag	360
atgttccatgt tacatggaa attcgtcta caagactttt acaatggtgc tagtaacgac	420
ttttagaatcg aatgcagaa tatctgtgaa acttggatctg gatcaggttc acaagacggg	480
aaagttcatc aatgtgacac ttgcaaaaggg cacggcggtg ttgttcaaac gagacagttt	540
ggtgtggca tgcaacagag gtttggaaaca atttggccaa aatgtttagg aacagggaaat	600
ctgatcactc acaagtgtaa gaaatgcca ggaaaccgtg tagtttaggg acccagaatt	660
cacaatgtgc atttgggggc gggaaactgtt aggaaccatg ttgagatctt ggaaggtag	720
ggagaccgtt ctccagactg gattgcaggat gatctacaaa tcatgttcaa ggagaaagcc	780
gaaggcaaca tgggtatag aagaatagga aacaacctgtt acagagacga agcattaacg	840
ctgaaagagg cattgcatttgg tggctggag agacaaatgtt cgttttggaa taaaatagag	900
aacacgatata ctcttccaa gaagaaaggaa gaggtggtag ttgacggcca agtagacacc	960
atcaagggtt gagggtggcc attacatgac cactatgacg aacatggtga tctctttatc	1020
aagtaccata tcatttaccc gcaacaaattt agagacgaat tgtga	1065

<210> 25

<211> 312

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

100 105 110

Thr Phe Ser His Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

115 120 125

Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Glu Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr

130 135 140

Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

145 150 155 160

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

165 170 175

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Leu Glu Gly Leu His Gly Asp Gly

180 185 190

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

195 200 205

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser

210 215 220

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

225 230 235 240

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

245 250 255

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

260 265 270

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr

275 280 285

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg

290 295 300

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

305 310

<210> 26

<211> 299

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

85	90	95
----	----	----

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Leu Thr Ile

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Phe

165	170	175
-----	-----	-----

Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

180	185	190
-----	-----	-----

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

195	200	205
-----	-----	-----

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

245	250	255
-----	-----	-----

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

260	265	270
-----	-----	-----

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

275	280	285
-----	-----	-----

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

290	295	
-----	-----	--

<210> 27

<211> 939

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

atgagattcc catctatTTT caccgctgtc ttgtcgctg ctcctctgc attggctgcc	60
cctgttaaca ctaccactga agacgagact gctcaaattc cagctgaagc agttatcggt	120
tactctgacc ttgagggtga ttgcacgtc gctgtttgc cttctctaa ctccactaac	180
aacggttgt tttcattaa caccactatc gttccattt ctgctaagga agagggtgtc	240
tctctcgaga agagagaggt ccaattggtc caatctggtg gaggatttgt tcaaccaggt	300

ggatctctga gattgtcttg tgctgcttct ggTTcacct tctctacta ctggatgtca	360
tgggttagac aagtcctgg taagggttg gaatgggttg ctaacatcga gcaagatgga	420
ttagagaagt actacgttga ctctgttaag ggaagattca ctatTTCCG tgataacgcc	480
aagaacttct tttacacttca aatgaactcc ctttagactg aggataactgc ttgttacttc	540
tgtgcttagag acttggagg ttgcattgtt gatggttact tcgacttatg gggttagaggt	600
actttgtca ccgttcatc tgccttacc aaaggacctt ctgtgtccc attagctcca	660
tgttccagat ccaccccgta atctactgca gctttgggtt gtttgtgaa ggactacttt	720

cctgaaccag tgactgtctc ttggaaactct ggtgtttga cttctgggt tcacacctt	780
cctgcagttt tgcagtcattc tggctgtac tctctgtct cagttgtcac tgTTCTCC	840
tcatctttt gtaccaagac ctacacttgc aacgttgacc ataagccatc caataccaag	900
gttgacaaga gagttgagtc caagttatgtt ccaccttaa	939

<210> 28

<211> 900

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

atgagattcc catctatTTT caccgctgtc ttgtcgctg ctcctctgc attggctgcc	60
cctgttaaca ctaccactga agacgagact gctcaaattc cagctgaagc agttatcggt	120

tactctgacc ttgagggtga ttgcacgtc gctgtttgc cttctctaa ctccactaac	180
aacggttgt tttcattaa caccactatc gttccattt ctgctaagga agagggtgtc	240
tctctcgaga agagagctat ccagttgact caatcaccat cttttgtc tgctctgtt	300
ggatgttagag tcatcctgac ttgtcgta tctcaagggtt tttcctcagc tttagctgg	360
taccaacaaa agccaggtaa agctccaaag ttgctgatct acgacgcttc atccctgaa	420
tctgggttcc ttccacgttt ctctggatct ggatcagggtc ctgatttcac tctgactatc	480

tcatcccttc aaccagaaga ctttgctacc tacttctgtc aacagttcaa ctcttaccct 540

ttgaccttg gaggtggAAC taagtggAG atcaagAGAA ctgttgtGC accatcAGTG 600

ttcatcttc ctccatctGA tgAGCAACTG aAGTCTGGTA ctgcATCTGT tGTCtGCTTA 660

ctgaacaACT tctACCCAAG agaAGCTAAG gtCCAAATGGA aggttGACAA tgcCTTGCAA 720

tctggtaACT ctcaAGAGTC tGTTACTGAG caAGACTCTA aggACTCTAC ttACTCCCTT 780

tcttccacct tgacttGTC taaggctGAT tacgagaAGC acaaggTTA cgcttGtgAG 840

gttactcACC aaggTTGTC ttctcCTGTT accaAGTCTT tcaacAGAGG tgaatGCTAA 900

<210> 29

<211> 303

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20	25	30
----	----	----

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

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

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

50	55	60
----	----	----

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

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

Ser Leu Glu Lys Arg Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu

85	90	95
----	----	----

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

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

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

<210> 30
<211> 299
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 30

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

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

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 85 90 95
 Ser Val Thr Pro Gly Asn Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 100 105 110
 Ser Ile Gly Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
 115 120 125
 Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
 130 135 140
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
 145 150 155 160
 Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
 165 170 175
 Asn Ser Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 180 185 190
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 195 200 205
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 210 215 220
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 225 230 235 240
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 245 250 255
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 260 265 270
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 275 280 285
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

290	295	
<210> 31		
<211> 915		
<212> DNA		
<213> artificial		
<220><223> Synthetic Construct		
<400> 31		
atgagattcc catctatTTT caccgctgtc ttgttcgcTG cctcctCTGc attggctGCC	60	
cctgttaaca ctaccactga agacgagact gctcaaattc cagctgaagc agttatcggt	120	
 tactctgacc ttgagggtga ttgcacgtc gctgtttgc cttctctaa ctccactaac	180	
aacggtttgt tttcattaa caccactatc gttccatG ctgctaaggA agagggtgtc	240	
tctctcgaga agagagacgt tcaattgcaA gaatctggtc catccttggt taagccatcc	300	
cagactttgt cttgacttg ttccgttact ggtgactcca tcacttctGA ctactggtcc	360	
tggatcagaa agttcccagg taacagattg gagtacatgg gttacgtttc ttactccggt	420	
ttccactact acaacccatc cttgaagtcc agaatctcca tcactagaga cacttccaag	480	
aaccagtact acttggactt gaactccgtt actactgagg acactgctac ttactactgt	540	
 gctaactggg acggtgacta ttggggtaa ggtactttgg ttactgtttc ctccgcttcc	600	
actaagggtc catctgtttt tccattggct ccattctcca agtctacttc aggtggtaact	660	
gctgcttgg gtgtttggta aggactac ttcccagagc cagttactgt ttcttggAAC	720	
tccgggtctt tgactccgg tgTTcacact ttcccgAGTC tcttgcAAtc ctccgggtctg	780	
tactccttgt ctccgttgt tactgttct tcttctctt tggtactca aacttacatc	840	
tgtaacgtta accacaagcc atccaacact aaggTTgaca agagagtta gccaaggTCC	900	
tgtgacaagt aatag	915	
 <210> 32		
<211> 903		
<212> DNA		
<213> artificial		
<220><223> Synthetic Construct		
<400> 32		
atgagattcc catctatTTT caccgctgtc ttgttcgcTG cctcctCTGc attggctGCC	60	
cctgttaaca ctaccactga agacgagact gctcaaattc cagctgaagc agttatcggt	120	
tactctgacc ttgagggtga ttgcacgtc gctgtttgc cttctctaa ctccactaac	180	

aacggttgt tggcattaa caccactatc gttccatg ctgctaagga agagggtgtc	240
tcttcgaga agagagacat cgtttgact caatccccag ctacttgcgta cgttactcca	300
ggtaactccg ttcccttgcgta ctgttagagct tcccaacttccgtaacaa cttgcactgg	360
tatcagcaga agtctcacga gtccccaaaga ctgttgatca agtacgcttc ccaatccatc	420
tccggtatcc catctagatt ctctgggtct gggtccggta ctgacttcac tttgtccatc	480
aactccgttg agactgagga ctccggatg tacttctgtc agcaatccaa ctccctggcca	540
tacacttttgggtgtac taagttggag atcaagagaa ctgttgctgc tccatccgtt	600
ttcatcttcc caccatctga cgagcagtggta aagtctggta ctgcttccgt tggttttttgg	660
ttgaacaact tc当地caag agaagctaag gttcagtggaa aggttgacaa cgcctigcaa	720
tccggtaact cccaaagagtc cgttactgaa caagactcca aggactctac ttactccttg	780
tcctccactt tgactttgtc caaggctgac tacgagaagc acaagggtta cgcttgtgag	840
gttactcacc agggtttgc ctcccccaggta actaagtcttcaacagagg tgagtgttaa	900
tag	903
<210> 33	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 33	
actacctgca ggcgaaacga tgagattccc atc	33
<210> 34	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 34	
tcatggccga ggccggcccta ttacttgtca caggacttgc gctc	44
<210> 35	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 35

ctatggccga ggcggcccta ttaacactca cctctgttg 39

<210> 36

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

tatcgccga ggcggcccta ttacttacct gggacaag 39

<210> 37

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

ctatggccga ggcggcccta ttaacactca cctctgttg 39

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

cttcctgca ggatgctaac ggccagttgg tc 32

<210> 39

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

gatcgccga ggcggcccta gcagtattcc caccagaatc 40

<210> 40

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<220><223>

> Synthetic Construct

<400> 40

cttgcctgca ggatgtcagt tcatttcgtt atagcagc 38

<210> 41

<211> 52

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

gatcgccgaa ggcggccctca tataaaagggt ttatcataat tctcatcctc ag 52

<210> 42

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

gaaacctgca ggatgtctga atttgttgc taaaattaaca ttc 43

<210> 43

<211> 36

<212> DNA

<213>

> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

gatcgccgaa ggcggccctta ggcgggttggaa acgttc 36

<210> 44

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

gaaacctgca ggatgtctca tctattactg cgtgacagc 39

<210> 45

<211> 37

<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 45	
gatcgccgaa ggcggcctca tggccggca tatctag	37
<210> 46	
<211>	
> 43	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 46	
gacacctgca ggatgtctga atcctccagt atctctctag ttg	43
<210> 47	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 47	
gatcgccgaa ggcggcccta gatacatccc aaaagtgcac cg	42
<210> 48	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 48	
gataacctgca ggatgatcct gggttcagtt tggtt	34
<210> 49	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 49	
gatcgccgaa ggcggcccta aaagtttgcgcagcatttg aag	43

<210>	50	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	50	
cttcctgca ggatgggttg cttagattt tgtctgg		37
<210>	51	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	51	
gatcgccga ggcggcccta ttgtatacg tgctgtggag cc		42
<210>	52	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	52	
cttcctgca ggatgttaaa caagctgttc attgcaatac tc		42
<210>	53	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	53	
gatcgccga ggcggcccta gctggcaagg gtaattgtct c		41
<210>	54	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	54	

gacacctgca ggatggctcc tcaaacacca agg	33
<210> 55	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 55	
gatcgccgaa ggcggcctca aaaaaacaat ctc当地atct ccag	44
<210> 56	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 56	
gtaccctgca ggatgaccaa ggaaaatgaa gcc	33
<210> 57	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 57	
gatcgccgaa ggcggccta tttttctcc aattcagcca g	41
<210> 58	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 58	
gaaacctgca ggatgctgtt gtcacatacc atgataactc	40
<210> 59	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> artificial	

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

gatcgccgaa ggcggcctta agattgcttc ttttgagat tgg 43

<210> 60

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

gaaacctgca ggatgacgga ctatgtcact tctaagcg 38

<210> 61

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 61

gatcgccgaa ggcggcctca taatctccct ccaggggg 37

<210> 62

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

gaaacctgca ggatgtcgta tgatgctgtg gag 33

<210> 63

<211> 46

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 63

gatcgccgaa ggcggcctca aataatgcta catttgcgtt tctttc 46

<210> 64

<211> 39

<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 64	
cttgcctgca ggatgtctta tacgtcgac aacaaagag	39
<210> 65	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 65	
gatcggccga ggcggcctta cgtgtatcg cttcctctgt ac	42
<210> 66	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 66	
gataacctgca ggatgaactt gtacctaatt acattactat tcgc	44
<210> 67	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 67	
gatcggccga ggcggcctta gaacccacat tgatttgat actg	44
<210> 68	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 68	
gaaacctgca ggatgtcggt atcaacctt ctaggcg	37
<210> 69	

<211> 47
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 69
gatcgccga ggcggcctca gactctactc atcattttgt ctccctc 47

<210> 70
<211> 44
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 70
gaaacctgca ggatgtatc caggaactta ataattgcta ctgc 44

<210> 71
<211> 48
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 71
gatcgccga ggcggcccta acactctatg aggtctacaa tgtccaac 48

<210> 72
<211> 37
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 72
catgcctgca ggatgtctac agcaattcca ggaggac 37

<210> 73
<211> 46
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 73

gatcgccgaa ggcggcctta gttgatcaac ttccgtca gcttag	46
<210> 74	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 74	
gacacctgca ggatgagtgg tgaccataag agctttacg	39
<210> 75	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 75	
gatcgccgaa ggcggcctta ctgtgtacca taccgatcca atcc	44
<210> 76	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 76	
cttgcctgca ggatgactaa ctggaaagcg atattgactc c	41
<210> 77	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 77	
gatcgccgaa ggcggcctta gttcttttc tcaccttcaa attttagc	49
<210> 78	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 78	
gcaacctgca ggatgtctta tcgcctcag tttcaac	37
<210> 79	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 79	
gatcgccga ggcggctca atagatctt ttctttcat caaaactcaa c	51
<210> 80	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 80	
gataacctgca ggatggtggt gcacaaccct aataac	36
<210> 81	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 81	
gatcgccga ggcggcccta ggtactatgc tgaacatcct gagtatgag	49
<210> 82	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 82	
gaaacctgca ggatgagatt ttctaacgtc gtttaactg c	41
<210> 83	
<211> 42	
<212> DNA	

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 83

gatcgccga ggcggccta caaggcaaag actccgaaag tg 42

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 84

gacacctgca ggatgactgt gcctgatctg aaagaaac 38

<210> 85

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 85

gatcgccga ggcggccta ggccagcgca acg 33

<210> 86

<211> 46

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 86

cttgcctgca ggatgaagat atggctggta cttcttttag ttttg 46

<210> 87

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 87

gatcgccga ggcggccta caattcgct ctaatttggt gcg 43

<210> 88

<211> 31	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 88	
cttgcctgca ggatggagca ggttccagtc g	31
<210> 89	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 89	
gatcgccga ggcggccta ttcatcataa acttcttcta tggtggc	47
<210> 90	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 90	
cttgcctgca ggatggatcc ttttcaatt cttctcac	38
<210> 91	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 91	
gatcgccga ggcggcccta ctggagac agatcttcca ctttaac	47
<210> 92	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 92	
gaaacctgca ggatgaccag tcaaggattt ttggatc	37

<210> 93	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 93	
gatcgccga ggcggcccta tatgctatca accatctcca tcaaataac	49
<210> 94	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 94	
gacacctgca ggatgactcc cggttctcat atttc	36
<210> 95	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 95	
gatcgccga ggcggcccta ctcaaagaac tttagacaaag cagcttctc	50
<210> 96	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 96	
gatccctgca ggatggcaga agaagaacc	29
<210> 97	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 97	
gatcgccga ggcggcccta attagtaata ctgcgttcta tttcctggta caac	54
<210> 98	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 98	
gaaccctgca ggatgattt gagcaagctg tcgttagac	40
<210> 99	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 99	
gatcgccga ggcggcccta ttatataaca atgacatcat cttcaaactc g	51
<210> 100	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 100	
cttgcctgca ggatgggtgc catttgaatg	30
<210> 101	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 101	
gatcgccga ggcggcccta ttgcagaaca ttgcataatcc aatc	44
<210> 102	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> artificial	

<220><223> Synthetic Construct

<400> 102

gataacctgca ggatgctacc atttcgta gacgtg

36

<210> 103

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 103

gatcggccga ggcggcccta taactctcca ttctcctcgta gatc

45

<210> 104

<211> 47

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 104

gatccctgca ggatgaaaat attaagtgca ttgcttcttc ttttac

47

<210> 105

<211> 44

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 105

gatcggccga ggcggcccta tagctttgg tgtaataact gggg

44

<210> 106

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 106

cttgcctgca ggatgtctaa accctacaag ctgatagtg ag

42

<210> 107

<211> 45

<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 107	
gatcgccgaa ggcggcctta attttctcca gcaggtatct catcc	45
<210> 108	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 108	
cttgccgtca ggatgaatca attttctcta gcttcacaag taaac	45
<210> 109	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 109	
gatcgccgaa ggcggcccta ctcggttaat ggtccgagtgc	41
<210> 110	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 110	
gacacctgca ggatgagttt taggaaagac aacaaacaaa ag	42
<210> 111	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 111	
gatcgccgaa ggcggcctta gaaggcagct tcatacatcg	39

<210>	112	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	112	
cttcctgca ggatgagcag cttcagagtt ctagacttgg		40
<210>	113	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	113	
gatcgccga ggcggccta cagatcaacg aatcc		35
<210>	114	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	114	
gataacctgca ggatgaacat cttagaattc ctagtaagt ttcc		44
<210>	115	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	115	
gatcgccga ggcggccta ttctggcagc ttgaatttc		39
<210>	116	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	116	

cttgcctgca ggatgtccac aactactaag aaaaacaaga acagg	45
<210> 117	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 117	
gatcgccgaa ggcggccta ccatgcaccc ttccctctc	39
<210> 118	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 118	
cttgcctgca ggatgtcaga ggagtaagaa ccacaaacag	40
<210> 119	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 119	
gatcgccgaa ggcggccta atttattcta ggttttgg ttcgg	45
<210> 120	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 120	
gtaccctgca ggatgtatggc aagtccaacc g	31
<210> 121	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> artificial	

<220><223> Synthetic Construct	
<400> 121	
gatcgccgaa ggcggccgc aacaacgctg gttg	34
<210> 122	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 122	
cttgcctgca ggatgagtaa ccagtataat ccgtatgagc ag	42
<210> 123	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 123	
gatcgccgaa ggcggcccta tttccccag tttccgacac	40
<210> 124	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 124	
gttacctgca ggatgtctac agagaacaaa gcagagacaa aac	43
<210> 125	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 125	
gatcgccgaa ggcggcccta ttctttgct tcagcgttg c	41
<210> 126	
<211> 44	
<212> DNA	

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 126

cttgcctgca ggatgttaaa cttatatcc acaataagtg ggtg 44

<210> 127

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 127

gatcgccgaa ggcggccta agcaggagca gataaccaag c 41

<210> 128

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 128

cttgcctgca ggatggtag aaggaaaata gagataaatc cg 42

<210> 129

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 129

gatcgccgaa ggcggccta gtcacactgc ttg 43

<210> 130

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 130

cttgcctgca ggatgtcact tcaactgtcc attatctcg 40

<210> 131

<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 131	
gatcgccga ggcggcccta ctgcgtccttc ttgttgctct tctc	44
<210> 132	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 132	
cgaacatcca tcaccaaaac ac	22
<210> 133	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 133	
gttgtcgacc tgcatcgatc ggtgttgccg cgaaatg	37
<210> 134	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 134	
catttcgcgg caacaccgtt cgttcgtt cgtttttttt	37
<210> 135	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 135	

cggtgagaat ggcaaaagct tatg

24

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 136

aagcccgatg cgccagagtt g

21

<210> 137

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 137

cgtctttgg gcaaatttat cagtggatct gatatcacca t a

41

<210> 138

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 138

taggtgatat cagatccact gatcaatttg cccaagagac g

41

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 139

gactgttgcg attgctggtg

20

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 140

atccaggaca cgctcatcaa g 21

<210> 141

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 141

gtgttgctc tggaaattgga tc 22

<210> 142

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 142

agaggagggtt gaatgcgaag aag 23

<210> 143

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 143

gttgtcgacc tgcacgatc ttctggtag cttatatggc agtagttac 49

<210> 144

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 144

gtaactactg ccatataagc taccagaag tacgctgcag gtgcacaac 49

<210> 145

<211> 24

<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 145	
cggtgagaat ggcaaaagct tatg	24
<210> 146	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 146	
aagcccgatg cggcagagtt g	21
<210> 147	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 147	
ctcgggatca ccaagcacaa gtggatctga tatcaccta	39
<210> 148	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 148	
tagtgatata cagatccact tgtgcttggatcccgag	39
<210> 149	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 149	
tcaaagtatg ctggaaagaa tgg	23
<210> 150	

<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	150	
tggattgtct cggaggcg		18
<210>	151	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	151	
tactatgact atggagacc tgggtg		26
<210>	152	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	152	
tgaagcatcc caccactg		19
<210>	153	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	153	
gttgtcgacc tgcagcgtac ctttcgcaga ctgttaattat tggc		44
<210>	154	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220><223> Synthetic Construct		
<400>	154	

gccaataatt acagtctgcg aagggtacgc tgcaggcga caac	44
<210> 155	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 155	
 cggtgagaat ggcaaaagct tatg	24
<210> 156	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 156	
 aagcccgatg cgccagagtt g	21
 <210> 157	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 157	
 gttgactttg acggttgcag atacagtggatctgatataatca ccta	44
<210> 158	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 158	
 taggtgatataatccact gtatctgcaa ccgtcaaagt caac	44
<210> 159	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 159

ttctctcctt gattatcggt ctctttc 27

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 160

tggcagatga cttcacaaac g 21

<210> 161

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 161

gtggcatctt tcataacgac atctc 25

<210> 162

<211> 478

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 162

Met Ser Ser Phe Arg Val Leu Asp Leu Val Lys Pro Phe Thr Pro Phe

1 5 10 15

Leu Pro Glu Val Ile Ser Pro Glu Arg Lys Val Pro Phe Gln Gln Lys

20 25 30

Leu Met Trp Thr Gly Val Thr Leu Leu Ile Phe Leu Val Met Ser Glu

35 40 45

Ile Pro Leu Tyr Gly Ile Thr Ser Ser Asp Ser Ser Asp Pro Leu Phe

50 55 60

Trp Leu Arg Met Met Leu Ala Ser Asn Arg Gly Thr Leu Met Glu Leu

65 70 75 80

Gly Ile Ser Pro Ile Val Thr Ser Gly Met Val Phe Gln Leu Leu Gln

85	90	95
----	----	----

Gly Ile Gln Ile Leu Asp Val Asn Met Glu Asn Lys Ala Asp Arg Glu

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Gln Ala Thr Val Tyr Val Leu Thr Gly Met Tyr Gly Pro Pro Gly Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Gly Val Gly Val Cys Leu Leu Val Leu Gln Leu Val Phe Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Ile Val Val Ile Leu Leu Asp Glu Leu Leu Gln Lys Gly Tyr Gly

165	170	175
-----	-----	-----

Leu Gly Ser Gly Ile Ser Leu Phe Met Ala Thr Asn Ile Cys Glu Gln

180	185	190
-----	-----	-----

Ile Phe Trp Lys Thr Phe Ala Pro Thr Thr Val Asn Arg Gly Arg Gly

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Glu Phe Glu Gly Ala Phe Ile Ser Phe Phe His Leu Ile Leu Thr

210	215	220
-----	-----	-----

Lys Lys Asp Lys Lys Arg Ala Leu Leu Glu Ser Phe Tyr Arg Asp Asn

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ala Pro Asn Met Phe Gln Val Ile Ala Thr Leu Val Val Phe Phe Thr

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

Arg Gln Arg Gly Pro Tyr Gly Thr Tyr Pro Ile Arg Leu Phe Tyr Thr

275	280	285
-----	-----	-----

Ser Asn Met Pro Ile Met Leu Gln Ser Ala Leu Thr Ser Asn Ile Phe

290	295	300
-----	-----	-----

Ile Ile Ser Gln Met Leu Tyr Ser His Phe Pro Asp Asn Ala Phe Val

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

Ala Ala Ser Gly Leu Ala Tyr Tyr Met Gln Pro Pro Met Ser Leu Ser

340 345 350

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Ile Lys Thr Val Val Tyr Val Val Phe Val

355 360 365

Leu Thr Thr Cys Ala Ile Phe Ser Lys Thr Trp Ile Glu Ile Ser Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ile Pro Thr Ala Ala Ala Phe Gly Gly Ala Thr Ile Gly Ala Leu Ser

420 425 430

Val Val Ser Asp Leu Leu Gly Thr Leu Gly Ser Gly Thr Ser Ile Leu

435 440 445

Leu Ala Val Thr Thr Ile Tyr Gly Tyr Tyr Glu Leu Ala Val Lys Glu

450 455 460

Gly Gly Phe Ser Lys Gly Gly Pro Ser Gly Phe Val Asp Leu

465 470 475

<210> 163

<211> 1437

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 163

atgagcagct tcagagttct agacttggtt aagccttta cccatttct gcctgaggtt	60
atctctccag agagaaaggt ccccttcaa cagaagtta tggactgg agtcacttt	120
ctgatcttct tggcatgag taaaattccc ctgtatggta tcacttcaag tgactcctct	180
gaccctttgt ttggctgcg tatgatgttg gcctctaaca gaggaacgct gatggagttt	240
ggtatctctc ctattgtcac ttctggatg gtgttccaac tggcaggaaatccaaatc	300

ttggacgtga acatggaaaa caaaggcagac agagagttgt tccaaactgc tcaaaaagtgc	360
ttcgccattt tgctgagttt cggacaagct actgtttatg ttttaactgg aatgtatggc	420
ccccctgggt aactaggagt tgggtctgt ctttggatg ttcttcaatt ggttttgc	480
ggtattgtgg tcatggatg ggtgaactc ttacaaaaag gttacggttt aggaagtggaa	540

atttcttt tcatggcac caacatgtt gagcagattt tttggaagac ttttgcct	600
accaccgtta accgtgaaag aggtaggaa ttgtggag ctttcatttc ttcttcac	660
ctgatcttga ccaagaagga caagaagaga gctctgttgg aatcattttta cagagacaac	720
gctccaaaca tttccaagt tattgtact ctgtcgct tttcacgt tgtctatctt	780
caggcgttcc gttggagat tccagttaag tctaccgtc aaagagggtcc ttacggaact	840
tacccaatca gattgttcta cacatccaaac atgccaatca tttacaatc cgcttgacc	900
tcaaacattt tcattatttc ccagatgtt tattcacact tccctgacaa tgccttggtt	960
aagctcattt gaaatggga agctcaacct ggttcagcac aactgttgc tgcctcggtt	1020
tttagcctact acatgcagcc tccaatgtcc ctgagtcagg ctttatttgc ccctatcaag	1080
actgtcgctt acgttgttggt ttttttgacc acttgtgcca tttctccaa gacatggatt	1140
gagatttcgg gatttcccc aagagacgtt gctaagcaat tcaaagacca aggattggtt	1200
attgtggac acagagatgc tactgttac aaggagggttga agaagattat accaacagcc	1260
gctgcatttgc gagggtccac aattggtca ctgtcgcttgc ttccgaccc ttgggtact	1320
tttaggttcgg gaacctccat cttttgggtt gttacaacca tctatggta ctacgagtttgc	1380
gctgttaagg aagggtggttt ttcaaagggtt ggaccctctg gattcggttga tctgtaa	1437