

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0125490
(43) 공개일자 2021년10월18일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/74 (2006.01) C07J 5/00 (2006.01)
 C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
 C12P 33/02 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 C12N 15/74 (2013.01)
 C07J 5/0053 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7025032</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년02월07일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년08월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/053167</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/161317
 국제공개일자 2020년08월13일</p> <p>(30) 우선권주장
 19305153.9 2019년02월08일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 사노피
 프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54</p> <p>(72) 발명자
 라데만, 클라우스 토비아스
 독일 65926 프랑크푸르트 인두스트리파크 회흐스
 트 사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴
 트 디파트먼트 내</p> <p>야노차, 베른트
 독일 65926 프랑크푸르트 인두스트리파크 회흐스
 트 사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴
 트 디파트먼트 내</p> <p>(<i>뒷면에 계속</i>)</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 이윤기</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 스테로이드의 1,2-탈수소화를 위한 미생물의 생명공학적 최적화**(57) 요약**

본 발명은 유전자 변형된 박테리아 및 그의 산업적 용도, 특히 스테로이드의 1,2-탈수소화에서의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 9/001 (2013.01)

C12P 33/02 (2013.01)

C12Y 101/01053 (2013.01)

C12Y 103/99004 (2013.01)

(72) 발명자

라쎄, 한스-팔크

독일 65926 프랑크푸르트 인두스트리파크 회호스트
사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴트 디
파트먼트 내

리쑤, 세바스티안

독일 65926 프랑크푸르트 인두스트리파크 회호스트
사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴트 디
파트먼트 내

명세서

청구범위

청구항 1

20-베타-히드록시스테로이드 데히드로게나제 (20 β -HSDH)를 코딩하는 유전자의 발현이 Δ 1-데히드로게나제 활성 및 20- β -데히드로게나제 활성을 갖는 상응하는 비변형된 박테리아와 비교하여 감소 또는 억제된 것인 유전자 변형된 박테리아.

청구항 2

제1항에 있어서, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자가 불활성화 또는 결실된 것인 유전자 변형된 박테리아.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자가 돌연변이된 것인 유전자 변형된 박테리아.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자가 말단절단된 것인 유전자 변형된 박테리아.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아가 노카르디오이다세아에(*Nocardioideae*) 과로부터의 것인 유전자 변형된 박테리아.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, Δ 1-데히드로게나제 활성을 갖지만, 비변형된 박테리아와 비교하여 20- β -데히드로게나제 활성이 감소되거나 없는 유전자 변형된 박테리아.

청구항 7

a) Δ 1-데히드로게나제 활성 및 20- β -데히드로게나제 활성을 갖는 박테리아를 제공하는 단계; 및

b) 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결실시키는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형된 박테리아의 제조 방법.

청구항 8

a) 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드를 제공하는 단계; 및

b) 상기 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드를 1,2-탈수소화된 스테로이드를 획득하기에 충분한 조건 하에 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 박테리아 또는 그의 추출물과 접촉시키는 단계

를 포함하는, 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드가 코르티코스테로이드인 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드가 히드로코르티손이고, 상기 방법이 프레드니솔론의 제조를 위한 것인 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1,2-탈수소화된 스테로이드를 회수하고 정제하는 단계를 추가

로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 20 β -탈수소화된 스테로이드의 제거 단계를 포함하지 않는 방법.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 1,2-탈수소화된 스테로이드를 제약 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물이 Δ 1-데히드로게나제 활성을 갖는 것인 방법.

청구항 15

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물이 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 박테리아의 세포-용해에 의해 수득되고, 임의로 세포-용해 생성물이 Δ 1-데히드로게나제 활성을 농축시키기 위해 또는 Δ 1-데히드로게나제 활성의 정제를 용이하게 하기 위해 분획화된 것인 방법.

발명의 설명

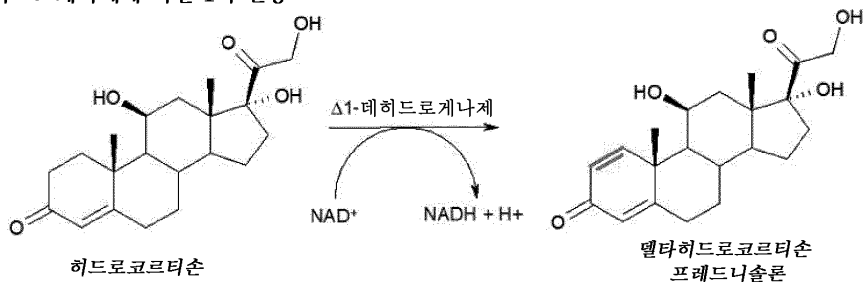
기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 변형된 박테리아 및 그의 산업적 용도, 특히 스테로이드의 1,2-탈수소화에서의 용도에 관한 것이다.

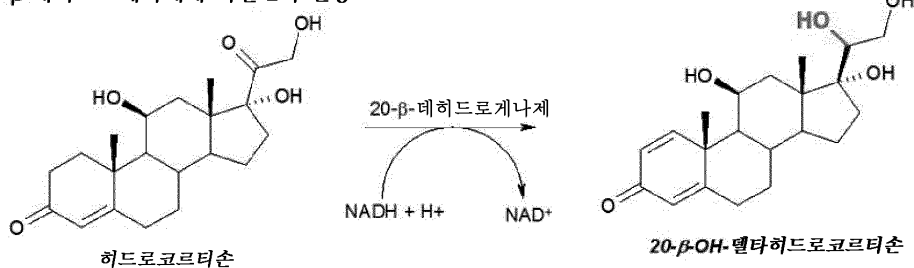
배경 기술

[0002] 스테로이드의 1,2-탈수소화 (Δ 1-탈수소화로도 명명됨)는 적절한 효소 시스템을 갖는 박테리아를 사용한 생체변환에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 전환은 노카르디오이다세아에(*Nocardioideae*) 과의 미생물에 의해 촉매될 수 있으며, 이 미생물은 박테리아 현탁액으로서 또는 박테리아 현탁액의 세포-용해 후 상청액으로서 제조되고 사용된다. 불행하게도, 미생물은 또한 스테로이드 분자 상에서 제2 (원치않는) 반응을 촉매하는 효소를 발현하며, 이 반응은 위치 20에서의 케토-기의 환원이고 본원에서 "20-OH 불순물"로 불리는 부산물의 생성을 유도한다. 이들 2가지 반응이 히드로코르티손의 예로 하기에 개략화된다.

Δ 1-데히드로게나제에 의한 1차 반응



20- β -데히드로게나제에 의한 2차 반응



[0003] 스테로이드에서 위치 20에서의 케토-환원을 유도하는 효소 20 β -HSDH (20-베타-히드록시스테로이드 데히드로게

나제)가 이러한 부반응을 담당하는 것으로 확인되었다.

[0005] 본 발명자들은 본 발명에 이르러 부반응 활성을 담당하는 유전자를 확인하였고, 이러한 활성이 없는 미생물을 유전자 조작하였다. 이는 스테로이드 전환에 사용되는 경우에, 원치않는 부산물을 더 이상 생성하지 않고, 본 발명에 따른 상기 유전자 조작된 미생물은 임의의 잠재적 성숙 단계(들) 없이 스테로이드 전환에 직접 사용될 수 있다. 원치않는 부산물을 제거하기 위한 추가의 생성물 정제 단계가 또한 생략될 수 있다. 생체변환의 생성물은 생성 후에 바로 사용될 수 있다. 결론적으로, 이는 보다 높은 생성물 수율, 보다 높은 생성물 품질 및 보다 간단한 제조 공정을 가져온다.

발명의 내용

[0006] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 20β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현이 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성 및 20β -데히드로게나제 활성을 갖는 상응하는 비변형된 박테리아와 비교하여 감소 또는 억제된 것인 유전자 변형된 박테리아에 관한 것이다.

[0007] 본원에 사용된 용어 "상응하는 비변형된 박테리아"는 나중에 유전자 변형에 적용되는 비변형된 박테리아와 동일한 균주의 박테리아를 나타낸다.

[0008] 용어 "박테리아"는 원핵 미생물을 의미한다. 비변형된 박테리아는 20β -HSDH 활성 및 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖는다. 한 실시양태에서, 박테리아는 악티노미세탈레스(Actinomycetales) 목, 클로스트리디알레스(Clostridiales) 목, 아에로모나달레스(Aeromonadales) 목, 파스테우렐라레스(Pasteurellales) 목, 바실라레스(Bacillales) 목, 락토바실라레스(Lactobacillales) 목, 비피도박테리알레스(Bifidobacteriales) 목 및 코리오박테리알레스(Coriobacteriales) 목 중에서 선택된 목으로부터의 것이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 박테리아는 악티노미세탈레스 목으로부터의 것이다. 예를 들어, 박테리아는 노카르디오이데스아에(Nocardioidiaceae), 예컨대 노카르디오이데스 심플렉스(*Nocardioides simplex*), 스트렙토미세탈레스아에(Streptomycetaceae), 예컨대 스트렙토미세스 알부스(*Streptomyces albus*) 또는 미코박테리아세아에(Mycobacteriaceae), 예컨대 미코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 특히 미코박테리움 아비움 아종 과라투베르쿨로시스(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) MAP4일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 박테리아는 노카르디오이데스아에 과로부터의 것, 바람직하게는 노카르디오이데스이고, 가장 바람직하게는 박테리아는 노카르디오이데스 심플렉스이다.

[0009] 용어 "노카르디오이데스아에 과로부터의 박테리아"는 이러한 과로부터의 20β -HSDH 활성 및 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖는 임의의 박테리아, 예컨대, 예를 들어 악티노폴리모르파(Actinopolymorpha), 아에로미크로비움(Aeromicrobium), 플린데르시엘라(Flindersiella), 프리드만니엘라(Friedmanniella), 크리브벨라(Kribbella), 마르모리콜라(Marmoricola), 마이크로프루이나(Micropruina), 무미아(Mumia), 노카르디오이데스(Nocardioides), 피멜로박터(Pimelobacter), 프로피오니시셀라(Propioniceella), 프로피오니시모나스(Propioniceimonas), 텡게리미세스(Tenggeriomyces) 또는 써마스포르미세스(Thermasporomyces) 속의 박테리아를 의미한다. 바람직하게는 노카르디오이데스아에 과로부터의 박테리아는 노카르디오이데스 심플렉스 (이전에 아르트로박터 심플렉스(*Arthrobacter simplex*) 또는 코리네박테리움 심플렉스(*Corynebacterium simplex*) 또는 피멜로박터 심플렉스(*Pimelobacter simplex*)로 명명됨)이다. 바람직하게는 박테리아는 노카르디오이데스 심플렉스 ATCC6946이다. 다른 바람직한 박테리아는 프리드만니엘라 플라바(*Friedmanniella flava*) (분류(Taxonomy) ID:1036181), 프리드만니엘라 사가미하렌시스(*Friedmanniella sagamiharensis*) (분류 ID:546874), 노카르디오이데스 도크도넨시스(*Nocardioides dokdonensis*) FR1436 (분류 ID:1300347), 노카르디오이데스 리안첸젠시스(*Nocardioides lianchengensis*) (분류 ID:1045774), 노카르디오이데스 사이크로톨레란스(*Nocardioides psychrotolerans*) (분류 ID:1005945), 노카르디오이데스 스체와넨시스(*Nocardioides szechuanensis*) (분류 ID:1005944), 코리네박테리움 코일레아에(*Corynebacterium coyleae*) (분류 ID:53374), 코리네박테리움 글리시니필룸(*Corynebacterium glyciniphilum*) AJ 3170 (분류 ID:1404245), 코리네박테리움 크로펜스테티이(*Corynebacterium kroppenstedtii*) DSM 44385 (분류 ID:645127), 코리네박테리움 로위이(*Corynebacterium lowii*) (분류 ID:1544413), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*) (분류 ID:185761), 코리네박테리움 비타에루미니스(*Corynebacterium vitaeruminis*) DSM 20294 (분류 ID:1224164), 아에로미크로비움 마리눔(*Aeromicrobium marinum*) DSM 15272 (분류 ID:585531), 노카르디오이데스 루테우스(*Nocardioides luteus*) (분류 ID:1844), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*) YIM 70093 = DSM 44683 (분류 ID:1121362), 코리네박테리움 마리스(*Corynebacterium maris*) DSM 45190 (분류 ID:1224163), 코리네박테리움 리에겔리이(*Corynebacterium riegelii*) (분류 ID:156976)를 포함한다.

- [0010] 용어 "유전자"는 1종 이상의 단백질 또는 효소의 전부 또는 일부를 구성하는 특정한 아미노산 서열을 코딩하거나 또는 그에 상응하는 DNA 서열을 의미하고, 예를 들어 유전자가 발현되는 조건을 결정하는 조절 DNA 서열, 예컨대 프로모터 서열을 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 특히, 용어 유전자는 단백질을 코딩하는 게놈 서열, 즉 조절인자, 프로모터, 인트론 및 엑손 서열을 포함하는 서열에 대해 의도될 수 있다.
- [0011] 본원에 사용된 용어 "20 β -HSDH를 코딩하는 유전자"는 임의의 박테리아의 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자에 상응한다. 바람직하게는 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1 서열과 적어도 60% 동일성을 갖고, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 1 서열과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과 동일성을 갖는다. 한 실시양태에 따르면, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자는 서열식별번호: 3 서열과 적어도 60% 동일성을 갖고, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 3 서열과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과 동일성을 갖는다.
- [0012] "참조 서열과 적어도 x% 동일성을 갖는 유전자"는 핵산 서열이 그의 전체 길이에 걸쳐 참조 서열의 각 100개 뉴클레오티드당 최대 100-x개 뉴클레오티드 변경만큼 참조 서열과 상이한 것으로 의도된다. 다시 말해서, 참조 서열과 적어도 x% 동일성을 갖는 서열을 갖는 핵산을 수득하기 위해서는, 대상 서열 내 뉴클레오티드의 최대 100-x%가 삽입되거나, 결실되거나, 또 다른 아미노산 또는 뉴클레오티드로 치환될 수 있다.
- [0013] 참조 서열에 대해 "적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한" 핵산 서열은 참조 서열과 비교하여 돌연변이(들), 예컨대 결실(들), 삽입(들) 및/또는 치환(들)을 포함할 수 있다. 치환의 경우에, 치환은 바람직하게는 번역된 아미노산 서열 내 침묵 치환 또는 보존적 치환을 유도하는 치환에 상응한다.
- [0014] 2개 이상의 서열의 동일성을 비교하는 방법은 과학계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 위스콘신 서열 분석 패키지 버전 9.1에서 이용가능한 프로그램, 예를 들어 BESTFIT 및 GAP 프로그램이 2개의 서열 사이의 동일성 백분율을 결정하는데 사용될 수 있다. BESTFIT는 스미스와 워터맨(Smith and Waterman)의 "국부 상동성" 알고리즘을 사용하고, 2개의 서열 사이의 최상의 단일 유사성 영역을 찾아낸다. 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 다른 프로그램, 예를 들어 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol Biol. 48:443-453]에 기재된 니들만과 분쉬 알고리즘에 기초한 Needle 프로그램이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 이는 예를 들어 폴리뉴클레오티드 서열 비교를 위해 하기 파라미터를 사용한다: 비교 매트릭스: DNAFULL; 갭 개방 페널티 = 10, 갭 연장 페널티 = 0.5, 말단 갭 페널티: 거짓, 말단 갭 개방 페널티 = 10, 말단 갭 연장 페널티 = 0.5.
- [0015] 용어 "유전자 변형된"은 유전 물질, 예를 들어 DNA, RNA, cDNA에서의 임의의 검출가능한 변화 또는 이러한 변화의 임의의 과정, 메카니즘 또는 결과를 의미한다. 이는 유전자의 구조 (예를 들어, DNA 서열)가 변경된 유전자 돌연변이, 임의의 돌연변이 과정으로부터 발생한 임의의 유전자 또는 DNA, 및 변형된 유전자 또는 DNA 서열에 의해 발현된 임의의 발현 생성물 (예를 들어, 단백질 또는 효소)을 포함한다. 일반적으로, 돌연변이는 대상체에 의해 발현된 핵산 또는 폴리펩티드의 서열을 대조군 집단에서 발현된 상응하는 핵산 또는 폴리펩티드와 비교함으로써 상기 대상체에서 확인된다.
- [0016] 용어 "20 β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현이 감소 또는 억제된 것"은 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자에 의해 코딩되는 메신저 RNA (mRNA) 및/또는 단백질의 발현 수준의 감소 또는 억제를 의미한다. 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현은 비변형된 박테리아와 비교하여 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%만큼 감소될 수 있다. 바람직하게는 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현은 100%만큼 감소되고, 따라서 발현의 억제에 상응한다.
- [0017] 유전자 또는 핵산의 발현 수준은 특히 직접 혼성화 기반 검정 및 증폭-기반 검정을 포함한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0018] 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현은 이 유전자의 불활성화 또는 결실에 의해, 비변형된 박테리아와 비교하여 감소 또는 억제될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자는 돌연변이되고, 바람직하게는 말단절단된다.
- [0019] 바람직하게는 유전자 변형된 박테리아는 어떠한 외인성 DNA도 포함하지 않는다.
- [0020] 유전자의 불활성화, 결실 또는 말단절단을 위한 실험실 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [0021] 본원에서 의도된 바와 같이, 20 β -HSDH를 코딩하는 유전자가 돌연변이 및/또는 말단절단된 경우에, 이는 완전히 기능적인 20 β -HSDH 단백질을 코딩하지 않을 수 있지만, 동일한 조건에서 측정된 상응하는 천연 20 β -HSDH 단백질의 활성보다 더 낮은 활성을 갖는 20 β -HSDH 단백질을 코딩하며, 특히 코딩된 20 β -HSDH 단백질은 활성을 갖지 않을 수 있다.

- [0022] 본 발명에 따른 유전자 변형된 박테리아는 바람직하게는 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖지만, 비변형된 박테리아와 비교하여 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성이 감소되거나 없다.
- [0023] 따라서, 본 출원에서 자명한 바와 같이, 본 발명은 유전자 변형된 박테리아에 관한 것이며, 여기서
- [0024] - 상응하는 비변형된 박테리아는 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성 및 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성을 갖고,
- [0025] - 적어도 1개의 유전자 변형은 $20\text{-}\beta$ -히드록시스테로이드 데히드로게나제 ($20\beta\text{-HSDH}$)를 코딩하는 유전자의 감소 또는 억제된 발현을 유도하고,
- [0026] - 바람직하게는 상기 유전자 변형된 박테리아는 그의 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 유지한다.
- [0027] 바람직하게는, 본 발명에 따른 유전자 변형된 박테리아는 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖지만, 유전자 변형으로 인해, 비변형된 박테리아와 비교하여 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성이 감소되거나 없다.
- [0028] 본 발명의 제2 측면은
- [0029] a) $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성 및 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성을 갖는 박테리아를 제공하는 단계; 및
- [0030] b) $20\beta\text{-HSDH}$ 를 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결실시키는 단계
- [0031] 를 포함하는, 본 발명에 따른 유전자 변형된 박테리아의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 유전자 변형된 박테리아의 제조 방법의 단계 b는 $20\beta\text{-HSDH}$ 를 코딩하는 유전자의 돌연변이, 말단절단 또는 결실로 이루어질 수 있다. 돌연변이 또는 말단절단은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법에 의해, 바람직하게는 $20\beta\text{-HSDH}$ 를 코딩하는 유전자의 이중 교차에 의해 실시될 수 있다.
- [0033] 바람직하게는 수득된 유전자 변형된 박테리아는 어떠한 외인성 DNA도 포함하지 않는다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0035] a) 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드를 제공하는 단계; 및
- [0036] b) 상기 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드를 1,2-탈수소화된 스테로이드를 수득하기에 충분한 조건 하에 본 발명에 따른 박테리아 또는 그의 추출물과 접촉시키는 단계
- [0037] 를 포함하는, 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0038] 바람직하게는 본 발명에 따른 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법에 사용되는 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는 코르티코스테로이드이다.
- [0039] 특정한 실시양태에서, 방법에 사용되는 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는 프로게스테론, 테스토스테론, 안드로스텐디온 또는 이들 분자의 유도체이며, 이들은 위치 1,2에서 탈수소화되지 않은 6개의 탄소 원자의 고리 A를 함유하는 스테로이드-스캐폴드를 함유한다.
- [0040] 특정한 실시양태에서, 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는
- [0041] - 11베타 17,21-트리히드록시프레그-4-엔-3,20-디온 (히드로코르티손)이고, 상기 방법이 11베타,17알파,21-트리히드록시-1,4-프레그나디엔-3,20-디온 (프레드니솔론)의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0042] - 17알파,21-디히드록시-4-프레그넨-3,11,20-트리온 (코르티손)이고, 상기 방법이 17알파,21-디히드록시-1,4-프레그나디엔-3,11,20-트리온 (프레드니손)의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0043] - 프레그-4-엔-3,20-디온이고, 상기 방법이 프레그나-1,4-디엔-3,20-디온의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0044] - 11베타,17,21-트리히드록시-6알파-1,4-프레그넨-3,20-디온 (6-메틸-히드로코르티손)이고, 11베타,17알파,21-트리히드록시-6알파-메틸-1,4-프레그나디엔-3,20-디온 (6-메틸프레드니솔론)의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0045] - 9,11-데히드로코르텍솔론이고, 상기 방법이 1,2-9,11-데히드로코르텍솔론의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0046] - 9,11 데히드로코르텍솔론-17,21-디아세테이트이고, 상기 방법이 1,2-9,11 데히드로코르텍솔론의 제조를 위한 것이거나; 또는
- [0047] - 9,11-16,17-데히드로코르텍솔론-21-아세테이트이고, 상기 방법이 1,2-9,11-16,17-데히드로코르텍솔론-21-아세테이트의 제조를 위한 것이거나; 또는

- [0048] - 16-알파-메틸히드로코르티손이고, 상기 방법이 16-알파-메틸프레드니솔론의 제조를 위한 것이다.
- [0049] 한 실시양태에서, 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법의 단계 b)는 본 발명에 따른 박테리아의 추출물을 사용하여 수행된다. 상기 추출물은 우선적으로 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖고, 우선적으로 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성이 감소되거나 없다. 특히 이러한 추출물은 본 발명에 따른 박테리아의 세포-용해에 의해 수득될 수 있고, 임의로 세포-용해 생성물이 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 농축시키기 위해 또는 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성의 정제를 용이하게 하기 위해 분획화될 수 있다.
- [0050] 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법은 상기 1,2-탈수소화된 스테로이드를 회수하고 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 바람직하게는 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법은 20β -탈수소화된 스테로이드의 제거 단계를 포함하지 않는다. 실제로 이 단계는 20β -HSDH를 코딩하는 유전자의 발현이 유의하게 감소된 경우에 불필요할 수 있다.
- [0052] 추가로 1,2-탈수소화된 스테로이드의 제조 방법은 1,2-탈수소화된 스테로이드를 제약 조성물로 제제화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드로부터 1,2-탈수소화된 스테로이드를 제조하기 위한 본 발명에 따른 박테리아 또는 그의 추출물의 용도에 관한 것이다.
- [0054] 상기 추출물은 우선적으로 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 갖고, 우선적으로 $20\text{-}\beta$ -데히드로게나제 활성이 감소되거나 없다. 특히 이러한 추출물은 본 발명에 따른 박테리아의 세포-용해에 의해 수득될 수 있고, 임의로 이 후 세포-용해 생성물이 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성을 농축시키기 위해 또는 $\Delta 1$ -데히드로게나제 활성의 정제를 용이하게 하기 위해 분획화될 수 있다.
- [0055] 바람직하게는 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는 코르티코스테로이드이다.
- [0056] 특정한 실시양태에서, 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는 프로게스테론, 테스토스테론, 안드로스텐디온 또는 이들 분자의 유도체이며, 이들은 위치 1,2에서 탈수소화되지 않은 6개의 탄소 원자의 고리 A를 함유하는 스테로이드-스캐폴드를 함유한다.
- [0057] 특정한 실시양태에서, 1,2-탈수소화되지 않은 스테로이드는
- [0058] - 11베타 17,21-트리히드록시프레그-4-엔-3,20-디온 (히드로코르티손)이고, 11베타,17알파,21-트리히드록시-1,4-프레그나디엔-3,20-디온 (프레드니솔론)이 제조되거나; 또는
- [0059] - 17알파,21-디히드록시-4-프레그넨-3,11,20-트리온 (코르티손)이고, 17알파,21-디히드록시-1,4 프레그나디엔-3,11,20-트리온 (프레드니손)이 제조되거나; 또는
- [0060] - 프레그-4-엔-3,20-디온이고, 프레그나-1,4-디엔-3,20-디온이 제조되거나; 또는
- [0061] - 11베타,17,21-트리히드록시-6알파-1,4-프레그넨-3,20-디온 (6-메틸-히드로코르티손)이고, 11베타,17알파,21-트리히드록시-6알파-메틸-1,4-프레그나디엔-3,20-디온 (6-메틸프레드니솔론)이 제조되거나; 또는
- [0062] - 9,11-데히드로코르텍솔론이고, 1,2-9,11-데히드로코르텍솔론이 제조되거나; 또는
- [0063] - 9,11 데히드로코르텍솔론-17,21-디아세테이트이고, 1,2-9,11 데히드로코르텍솔론이 제조되거나; 또는
- [0064] - 9,11-16,17-데히드로코르텍솔론-21-아세테이트이고, 1,2-9,11-16,17-데히드로코르텍솔론-21-아세테이트가 제조되거나; 또는
- [0065] - 16-알파-메틸히드로코르티손이고, 16-알파-메틸프레드니솔론이 제조된다.
- [0066] 본원에 사용된 용어 "제약 조성물"은 1,2-탈수소화된 스테로이드와 다른 화학적 성분, 예컨대 생리학상 적합한 담체 및 부형제와의 제제를 지칭한다. 제약 조성물의 목적은 유기체에 대한 상기 1,2-탈수소화된 스테로이드의 투여를 용이하게 하는 것이다.
- [0067] 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해, 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 분쇄, 가루화, 당의정-제조, 연화, 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0068] 전형적으로, 제약 조성물은 본 발명의 1,2-탈수소화된 스테로이드 및 제약상 허용되는 비히클을 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 의해 추가로 예시될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1: 이중-교차에 의한 유전자 불활성화의 개략적 표현. 말단절단된 형태의 관심 유전자 (문자 "T"를 포함하는 화살표), 이에 플랭킹된 2개의 상동 솔더 (사각형을 포함하는 박스) 및 아프라마이신 내성 및 β -글루쿠로니다제의 유전자 (수직선 및 파상선을 포함하는 화살표)를 갖는 플라스미드는 박테리아의 염색체와 접촉하게 되고, 상동 솔더 중 1개는 염색체 내 각각의 서열과 재조합한다 (단계 1). 이 단계는 중간 단일 교차 구축물의 형성을 유발하며, 전체 플라스미드는 게놈 내로 통합된다 (점선에 의해 둘러싸임). 이어서 균주는 관심 유전자의 2개의 변이체를 함유하고, 아프라마이신에 대한 내성 및 β -글루쿠로니다제 활성을 나타낸다. 여러 라운드의 배양 (단계 2) 후에, 2개의 남아있는 상동 솔더는 서로 상호작용하고 (점선), 이중 교차가 발생한다 (단계 3). 이어서 수득된 균주는 말단절단된 형태의 유전자 (문자 "T"를 포함하는 화살표)만을 함유한다.

도 2: 엔. 심플렉스를 사용하여 히드로코르티손으로부터 프레드니솔론을 제조하기 위한 전형적인 방법 후에 수득된 생성물의 HPLC-크로마토그램. 화살표는 20-OH 프레드니솔론 불순물을 가리킨다.

도 3: 엔. 심플렉스의 이중 교차 돌연변이체 NOSIM5169를 사용하여 히드로코르티손으로부터 프레드니솔론을 제조하기 위한 전형적인 방법 후에 수득된 생성물의 HPLC-크로마토그램. 화살표는 20-OH 프레드니솔론 불순물이 통상적으로 관찰되는 위치를 가리킨다.

[서열 목록]

서열식별번호: 1은 엔. 심플렉스의 NOSIM5169의 서열에 상응한다.

서열식별번호: 2는 엔. 심플렉스의 NOSIM3735의 서열에 상응한다.

서열식별번호: 3은 미코박테리움 아비움 아종 파라투베르쿨로시스 MAP4의 20 β -HSDH 유전자의 서열에 상응한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 실시예:

[0072] 엔. 심플렉스의 게놈을 분석하여, NOSIM5169 (서열식별번호: 1 서열에 상응함) 및 NOSIM3735 (서열식별번호: 2 서열에 상응함)로 불리는, 20 β -HSDH에 대한 2개의 가능한 유전자를 찾아냈다. 이들은 둘 다 미코박테리움 아비움 아종 파라투베르쿨로시스 MAP4의 20 β -HSDH를 담당하는 유전자의 서열 (서열식별번호: 3 서열에 상응함)과 유사성을 공유한다.

[0073] 1. 플라스미드 구축 (NOSIM5169)

[0074] NOSIM5169의 불활성화를 위한 플라스미드를 하기와 같이 구축하였다: 2.0 및 1.7 kbp 크기의 상동 솔더를 PCR에 의해 증폭시켰다. 한 솔더의 증폭에 사용된 프라이머는 XbaI 및 EcoRV 제한 부위를 함유하였고, 제2 상동 솔더에 대한 프라이머는 EcoRV 및 EcoRI 제한 부위를 함유하도록 설계되었다.

[0075] 후속적으로, 솔더를 제1 플라스미드 내로 클로닝하였다.

[0076] 새로운 제2 플라스미드를 수득하기 위해, 히그로마이신 내성에 대한 유전자를 EcoRV 제한 부위 내로 평활-말단 클로닝하였다.

[0077] 히그로마이신 내성 유전자가 없는 플라스미드를 "제2 플라스미드-hyg"로 명명하였다.

[0078] 2. 엔. 심플렉스에 대한 전기천공 프로토콜

[0079] 프로토콜은 아르트로박터에 대해 기재된 절차에 기초한다 (Zhang et al., 2011). 전기적격 세포의 제조를 위한 최적화된 절차는 하기와 같았다: 엔. 심플렉스의 세포를 20 ml의 LB+Ph (LB는 용원성 브로쓰를 나타내고, Ph는 포스포마이신을 나타냄) 내에 접종하고, 정지기에 도달할 때까지 배양하였다. 이어서 사전배양물로부터의 1% 접종물을 신선한 LB 배지 내에 접종하고, 광학 밀도가 600 nm에서 0.4-0.5에 근접할 때까지 배양하였다. 이어서 암피실린 (Ap) 및 글리신을 각각 30 μ g/l 및 5 g/l의 최종 농도로 첨가하고, 배양을 계속하였다. 3시간 후, 배양물을 얼음 상에 놓고, 원심분리 (4500 rpm, 6분, 4°C)에 의해 수거하였다. 빙냉 전기천공 완충제 (0.5 M 소르비톨, 10% 글리세롤) 중에서 3회 세척한 후, 세포를 원심분리에 의해 100배 농축시켰다. 최종적으로, 현탁액을 60 μ l 분취물로 분배하고, 얼음 상에 저장하였다 (이 프로토콜을 엔. 심플렉스 NOSIM5169-hyg의 생성에

사용하였음).

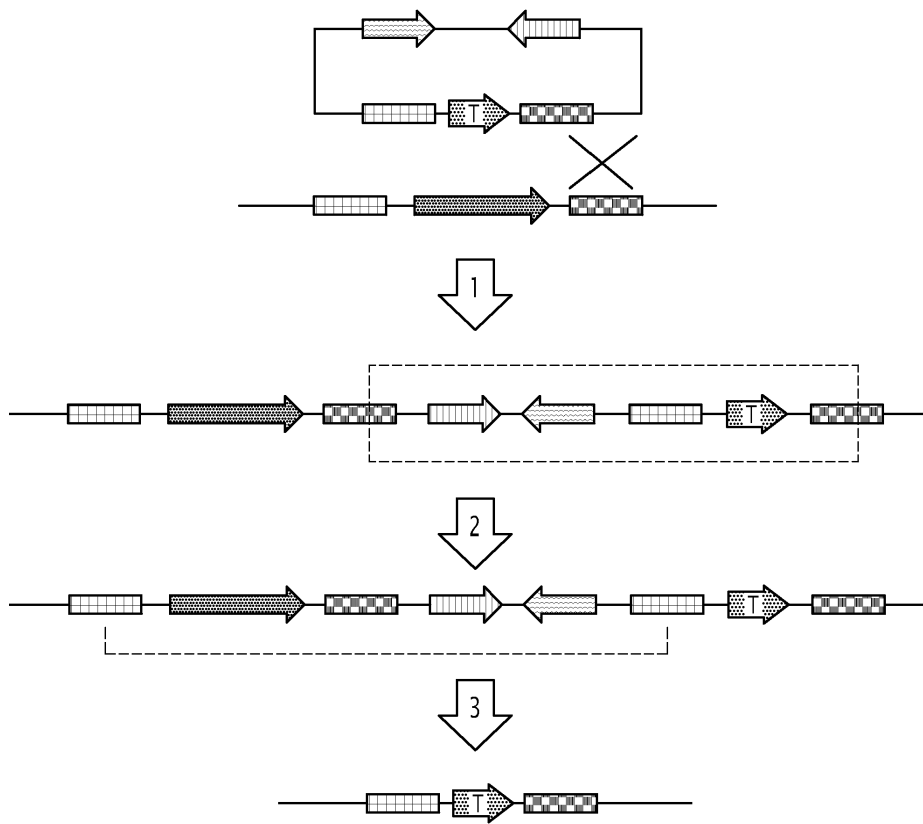
- [0080] 대안적으로, 에스. 알부스 ATCC 21838에 대한 프로토콜 (Izumikawa et al., 2003)이 적용될 수 있다. 이 경우에, 전기적격 세포의 제조를 위한 절차를 엔. 심플렉스 생리학에 적합하도록 변형시켰다: 엔. 심플렉스의 정지기 사전배양물로부터의 1% 접종물을 신선한 LB+Ph 배지 내에 접종하고, 배양하였다. 광학 밀도가 600 nm에서 0.4-0.5에 근접하였을 때, 배양물을 원심분리 (4500 rpm, 6분, 4℃)에 의해 수거하고, 멸균 빙냉수로 3회 세척하였다. 이어서 균사체를 25 ml의 차가운 전기천공 완충제 (10% 수크로스, 15% 글리세롤) 중에 현탁시키고, 리소자임 (0.5 mg/ml)을 보충하였다. 37℃에서 20분 인큐베이션한 후, 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 전기천공 완충제 중에 100배 농축시켰다. 최종적으로, 현탁액을 60 µl 분취물로 분배하고, 얼음 상에 저장하였다.
- [0081] 두 경우 모두에서 최적화된 전기천공 절차는 하기와 같았다: 전기적격 세포를 500 ng의 DNA (이. 콜라이(*E. coli*) GB2005로부터 제조됨)와 혼합하고, 혼합물을 사전냉각된 전기천공 큐벳 (0.1 cm 전극) 내로 옮겼다. 에펜도르프 펄스를 2.1 kV/cm로 사용하여 단일 펄스에 혼합물을 적용하였다. 전기 펄스 직후에, 세포 현탁액을 800 µl의 실온 회복 배지 (SOC)를 함유하는 에펜도르프 튜브 내로 옮기고, 30℃에서 12시간 동안 850 rpm으로 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 형질전환된 세포의 선택을 위해, 아프라마이신 (Am)을 함유하는 LB 한천 플레이트 상에 박테리아의 연속 희석물을 스프레딩하였다. 각각의 실험 세트에서, 플라스미드 DNA의 첨가를 생략함으로써 음성 대조군을 제조하였다.
- [0082] 3. 단일 교차 돌연변이체 (NOSIM5169)
- [0083] 균주 엔. 심플렉스에 제2 플라스미드를 전기천공으로 도입한 후에, 단일 교차 형질전환체를 수득하고, LB+Am+X-Gluc 한천 플레이트 상에 패치를 댄다 (개략적 표현에 대해서는 도 1 참조) (X-Gluc는 1수화물, X-GlcA를 나타냄). 아프라마이신 상에서 성장할 수 있고 β-글루쿠로니다제 (GUS) (예를 들어, 문헌 [Myronovskiy et al., 2011]) 반응을 수행할 수 있다는 것은 형질전환체가 단일 교차 돌연변이체라는 것을 확인시켜 주었다. 이 후, 돌연변이체를 100 ml의 LB+Ph 배지에 접종하고, 28℃, 200 rpm에서 48시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0084] 4. 이중 교차 돌연변이체 (NOSIM5169)
- [0085] 이어서 1 ml의 배양물을 신선한 LB+Ph 배지 내로 옮기고, 동일한 조건에서 추가 48시간 동안 인큐베이션하였다. 이 단계를 수회 반복하였다. 마지막 인큐베이션 후에, LB+X-Gluc 한천 플레이트 상에 돌연변이체의 연속 희석물을 제조하였다.
- [0086] GUS-활성을 나타내지 않은 돌연변이체를 새로운 LB+X-Gluc 상에 옮기고, 다시 한번 검사하였다. GUS-활성의 부재는 이들 돌연변이체에서 이중 교차가 발생하였고 이들이 플라스미드 백본을 상실하였다는 것을 의미하였다.
- [0087] 제2 시험을 통과한 돌연변이체를 LB에서 성장시키고, 이들의 gDNA를 단리한 다음, 엔. 심플렉스의 염색체 DNA에 상동인 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 분석하였다.
- [0088] 5. 외래 DNA가 없는 이중 교차 돌연변이체 (NOSIM5169)
- [0089] 제2 플라스미드 대신 "제2 플라스미드-hyg"를 사용하여 형질전환을 수행하였다. 항생제 내성 (히그로마이신 내성) 유전자의 존재는 이중 교차 돌연변이체의 추가의 확인을 용이하게 할 수 있다. 그러나, 이러한 내성 유전자는 엔. 심플렉스의 계통에서 불활성인 것으로 나타났다.
- [0090] 따라서, 이중 교차 후 수득된 돌연변이체는 어떠한 외인성 DNA도 함유하지 않을 것으로 추정되고, 추가의 산업적 용도에 이용가능할 것이다 (도 1).
- [0091] "제2 플라스미드-hyg"를 엔. 심플렉스 내로 도입한 후에, 아프라마이신 내성 콜로니를 수득하였다.
- [0092] 이 돌연변이체를 LB+Ph 배지에서 6회 배양으로 계대배양한 다음, LB+X-Gluc 상에 배양물의 연속 희석물을 제조하였다.
- [0093] 아프라마이신 상에서 성장할 수 없고 GUS-활성을 갖지 않은 수득된 콜로니를 PCR에 의한 추가의 분석에 노출시켰다. NOSIM5169에 인접한 엔. 심플렉스의 gDNA의 영역에 상동인 2개의 프라이머를 사용하여 증폭을 수행하였다.
- [0094] 6. NOSIM3735의 불활성화
- [0095] 불활성화된 NOSIM3735를 갖는 균주의 구축을 위해, 이전에 기재된 방법은 적용될 수 없었으며, 이는 NOSIM3735 상류의 DNA 영역이 PCR에 의한 그의 증폭에 접근불가능하였기 때문이다. 이러한 난제를 극복하기 위해, 엔. 심

플렉스 게놈의 단편을 함유하는 코스미드 라이브러리를 주문하고, 서열분석하였다.

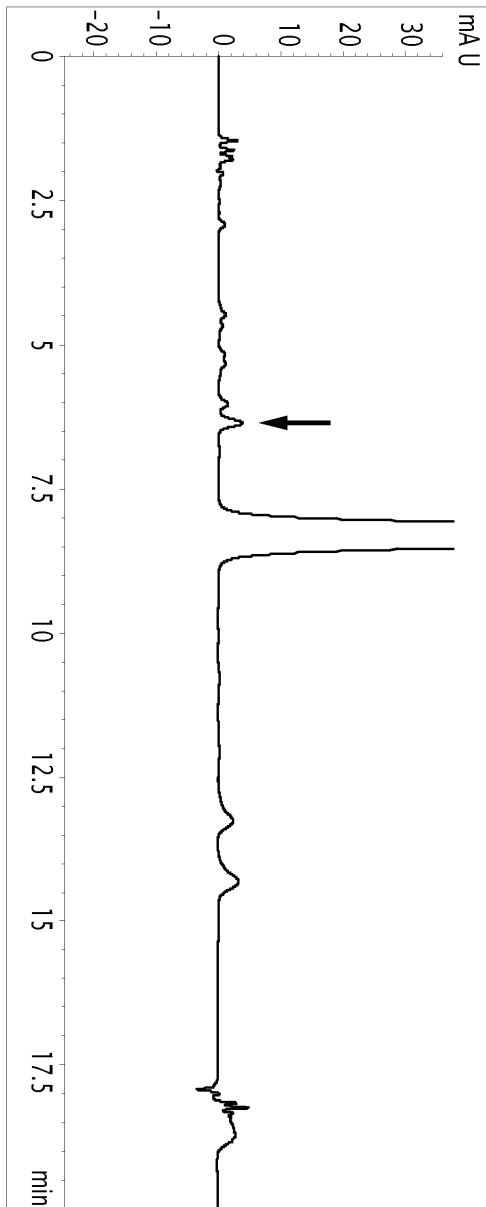
- [0096] NOSIM3735를 불활성화시키기 위해, 유전자를 함유하는 코스미드 라이브러리로부터 적절한 코스미드를 확인하고 (콘스탄츠 소재 GATC 바이오테크(GATC Biotech)에 의한 대략 1500개 코스미드의 생어 서열분석), 유전자를 이. 콜라이에서의 λ -매개 재조합을 사용하여 클로람페니콜 (Cm) 내성 유전자 cat로 대체하였다 (예를 들어, 문헌 [Murphy, 1998]). 이어서 변형된 코스미드를 BamHI 엔도뉴클레아제에 의해 소화시켰다. 이러한 방식으로, 단편의 혼합물을 수득하고, 이들 중에서 NOSIM3735 대신에 cat-유전자를 함유한 단편에 엔. 심플렉스 게놈과의 상동 재조합을 위한 2개의 3-kb 솔더를 플랭킹하였다. 단편을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고, 7-8kb-분획을 정제하고, BamHI-선형화 플라스미드 내로 라이게이션하였다. cat-유전자를 갖는 구축물을 함유한 돌연변이체를 선택하기 위해 LB+Am+Cm을 성장 배지로서 사용하였다. 수득된 돌연변이체를 PCR 및 서열분석에 의해 분석하였다. 수득된 플라스미드 중 하나를 NOSIM3735의 불활성화에 추가로 사용하였다.
- [0097] NOSIM5169의 불활성화에 대해 이전에 적합화된 프로토콜에 따라 불활성화를 수행하였다 (항목 2 및 하기 참조).
- [0098] 이 돌연변이체를 LB+Ph 배지에서 수회 배양으로 계대배양한 다음, LB+X-Gluc 상에 배양물의 연속 희석물을 제조하였다.
- [0099] 아프라마이신 상에서 성장할 수 없고 GUS-활성을 갖지 않은 수득된 콜로니를 PCR에 의한 추가의 분석에 노출시켰다. NOSIM3735에 인접한 엔. 심플렉스의 gDNA의 영역에 상동인 2개의 프라이머를 사용하여 증폭을 수행하였다.
- [0100] 7. 히드로코르티손에 대한 NOSIM3735 및 NOSIM5169의 사용
- [0101] 히드로코르티손으로부터 프레드니솔론을 제조하기 위한 전형적인 방법에 클론을 사용하였다.
- [0102] 간략하게, 히드로코르티손을 테트라히드로푸란 중 메나디온-용액과 혼합하였다. 이어서 이 현탁액을 pH 8.0으로 조정된 포스페이트 완충제 중에 혼합하였다. 이어서 박테리아 현탁액을 첨가하였다. 교반 하에 30℃에서 인큐베이션한 후에, 인산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 프레드니솔론의 증가를 측정하고, HPLC에 의해 분석하였다.
- [0103] 워터스-엑스브리지(Waters-Xbridge) RP18-칼럼에 의해 이동상으로서 물/아세트니트릴 구배를 사용하여 HPLC-크로마토그램을 수득하였다 (크로마토그램은 도 2-3에 제시됨).
- [0104] 대안적으로, 20-OH-부산물 생성의 활성 검정을 실시하였다. 프레드니솔론을 pH 8.0의 포스페이트-완충제 중에 현탁시키고, 박테리아 현탁액과 함께 인큐베이션하였다. 60분 후에, 인산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이어서 20-OH 케토화된 생성물의 잠재적 증가를 HPLC에 의해 측정하였다.
- [0105] NOSIM5169의 말단절단은 20 β -HSDH 활성을 완전히 억제하여 20-OH 불순물 없이 프레드니솔론을 수득하도록 하였다 (도 3).
- [0106] NOSIM3735 유전자를 녹아웃시켰지만, 균주는 야생형 균주와 동일한 반응을 나타냈고, 이 유전자를 녹아웃시키는 것에 의해 원치않는 부반응이 턴오프될 수도 없었다.
- [0107] 참고문헌 목록:
- Izumikawa, M.; Murata, M.; Tachibana, K.; Ebizuka, Y. and Fujii, I. (2003): Cloning of Modular Type I Polyketide Synthase Genes from Salinomycin Producing Strain of *Streptomyces albus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 3401-3405.
- Murphy, K.C. (1998): Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. J. Bacteriol. 180: 2063-2071.
- Myronovskyi, M.; Welle, E.; Fedorenko, V. and Luzhetskyy, A. (2011): Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Reporter in Actinomycetes. Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2011, 5370-5383.
- Zhang, H.; Li, Y.; Chen, X.; Sheng, H. and An, L. (2011): Optimization of electroporation conditions for Arthrobacter with plasmid PART2, Journal of Microbiological Methods, 84: 114-120.
- [0108]

도면

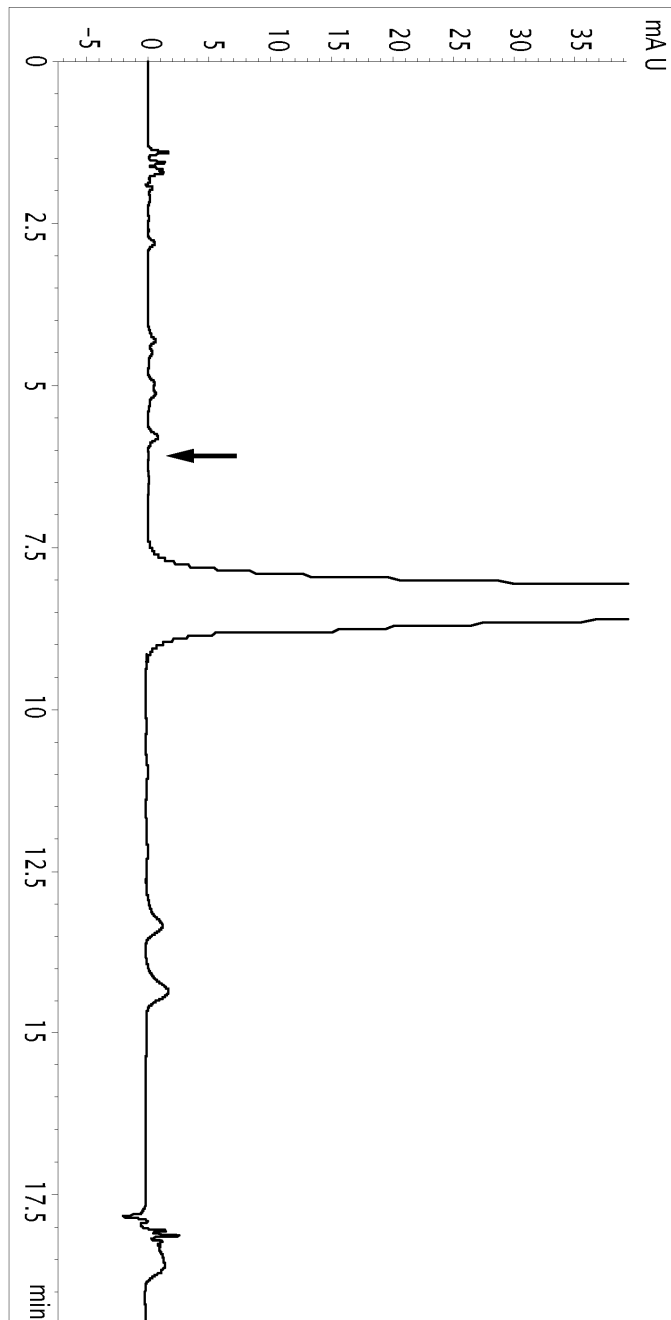
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI

<120> Biotechnological optimisation of microorganisms

<130> BET17P1750

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 748

<212> DNA

<213> Nocardiodides simplex

<400> 1

```

ggtcgtcctc gtcaccggag gcgcccgcgg gctggggcgc gccttcgccc gcggcatcgt      60
cgcccgccggc ggccgggtcg tcatcggcga cctgctggac gacgaggcgc ccgccgtcgc      120
cgacgagctc ggccggcgcc cccgtacgt ccacctgac gtcaccagcg aggagtcctg      180
ggaggccgcc gtcgcccga gcgtcgacgc ctccggccgg ctcgacgggc tggtaacaa      240

cgccggcatc tcggccaccg gccagctgac cgccgacgag ccgaccgacg tcttcgccg      300
gatcatcgag atcaacctga tcgccgtcca caccgggctg cgccgctcg tcccccgat      360
gcggacggcg ggccggcggt cgatcgtcaa catctcgtcg gcccggggcc tgatgggcat      420
ggcgatgacc agcggctacg gcgcccga gtggggcgtg cgccgggtca gcaagatcgc      480
ggcggtcgag ctcggtcgcg accggatccg ggtcaactcg gtgcaccccg gcatggtcct      540
gacgccgatg accgccccga ccgggatcgt cgccgacgag ggccgcttcc cgaacaaccc      600
gtaccagcgg gtcggccggc ccgaggagct cgtgggtgcg gtcgtccacc tgctgagcga      660

cgccgctcg tacacgaccg gcgcccagct cgccgtcgac ggccgctgga ccgccggtcc      720
gtcgggtggag tacatcgag gtcggtga      748

```

<210> 2

<211> 825

<212> DNA

<213> Nocardiodides simplex

<400> 2

```

gtgccgtgg ccggcaccct gcccgcgcgc ccgcccggac ggccgttcat tggggccatg      60
accagatcc agggcccgac gaaccgctcc accactccc gccgctcgc cgaccgctc      120
gtcatcgtga cgggaggagc ccgcccgcgc ggccgcccct gcgtgcgcgc actcgtcgcc      180
gagggcgccc ggggtggtgt cgccgacgtc ctgaggccg aggcgagcgc cctcgtcgcc      240

gcgctggggg agcggacggc gtacgtcccg ctcgactga cgagcgagga ggctggcag      300
cacggtcgc cgccggccga ggagcgctt ggccggtct cgggactcgt caacaacgc      360
ggcatcgtgc acatgaccc gatcgagacc ctgagcgagg ccgactacc gcgggtgatc      420
gacgtcaacc aggtcggcgt ctctctcggc atgaaggcgg tcatcggtc gatcgggcgc      480
cgggggggcg gtcgatcgt caacatctcc tcgaccggcg ggctggtcgc ctactcccg      540

```

atcctcgggt acgtcgctc gaagtgggcc gtgcgcggca tgaccaagac cgccgcgcag	600
gagctcggcc ccgacggcat ccgggtcaac tcggtgcacc ccggcatcgt cgcctccgcg	660
atgaccgga gtcgcgaccg ctcccacgag caggtcagga cccagccgt ggcgcgggcg	720
gcggaccgt ccgagatcgg cgcgctcgtg ctcttcctga tctcggagga gtccagctac	780
agcaccggct cggagttcgt cgccgacggg ggcttcacct cgctc	825
<210> 3	
<211> 741	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium avium	
<400> 3	
gtgggacggg tagacggcaa ggttgcgtg atcagcgggg gcgcccgcgg catgggcgcc	60
gagcacgcgc ggctgctggc ggccgagggc gccaaagtgg tgatcggcga catcctcgac	120
gacgagggca aggccgtggc cgacgagatc ggcgactcgg tgcgtacgt ccacctggac	180
gtcaccagc ccgaccagtg ggacgccgc gtcgaaaccg ccgtcggcga attcggaag	240
ctcaacgtgt tggtaacaa cgccggcacc gtgcgctcg ggccgctgaa gagcttcgat	300
ctggccaagt ggcagaaggt gattgacgtc aacctgaccg gcaccttcct gggcatgcgg	360
gtggccgtcg agccgatgat cgccggccgc ggccgctcga tcatcaacat ctctccatc	420
gaggggctgc gcggtgcgc catggtgcac ccctacgtcg cctccaagtg gggcgtgcgc	480
ggcctggcga agtccgcgc gctggagctg gcgccgcaca acatccgggt caactccgtg	540
caccccggt tcatccgcac ccgatgacc aaacacctgc ccgacgacat ggtgaccgtc	600
ccgtcggcc gtccggccga gtcccgcgag gtgtcgact tcgtcttgtt cctggccagc	660
gacgagtcgt cgtacgcgac cggcagcgaa ttctgatgg acggcggact ggtcaccgac	720
gtgccgcaca agcagttcta g	741