

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 9 월 15 일 (15.09.2022) **WIPO | PCT**

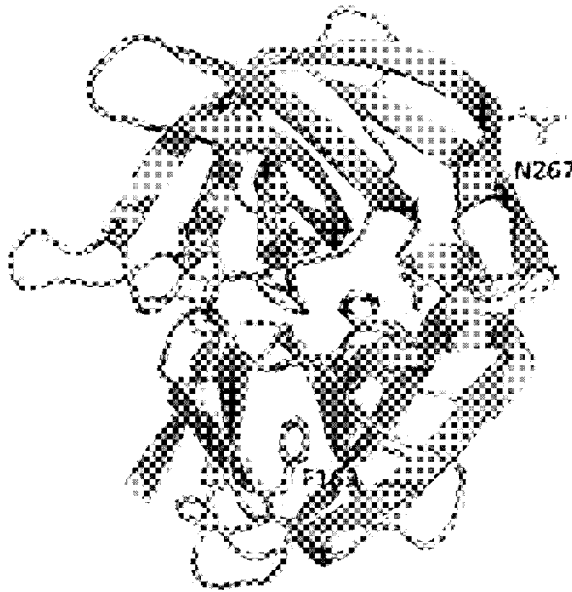


(10) 국제공개번호
WO 2022/191653 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 9/52 (2006.01) *A23K 10/14* (2016.01)
C12N 15/52 (2006.01) *A23K 10/16* (2016.01)
C12N 15/75 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/003415
- (22) 국제출원일: 2022 년 3 월 11 일 (11.03.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0032885 2021 년 3 월 12 일 (12.03.2021) KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (**CJ CHEILJEDANG CORPORATION**) [KR/KR]: 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이주희 (**LEE, Joo Hee**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 조아라 (**CHO, A-Ra**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 지창준 (**Ji, Chang Jun**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인한얼 (**HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW**); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE VARIANT

(54) 발명의 명칭: 신규 세린 프로테아제 변이체



(57) Abstract: The present application relates to a novel serine protease variant.

(57) 요약서: 본 출원은 신규한 세린 프로테아제 변이체에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/191653 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규 세린 프로테아제 변이체

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 세린 프로테아제 변이체에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 단백질 분해효소(protease)는 생체내에서 소화, 흡수, 방어 등의 다양한 기능을 하고 있으며 활성 자리의 구조에 따라 세린 단백질 분해효소(serine protease), 시스테인 단백질 분해효소(cystein protease), 아스파테이트 단백질 분해효소(aspartic protease) 그리고 메탈로단백질 분해효소(metalloprotease)로 구분된다. 그 중 세린 프로테아제(또는 세린 엔도펩티다아제)는 주로 활성 부위에 활성 세린 잔기를 공통적으로 갖는 것을 특징으로, 세린이 프로테아제의 활성 부위에서 친핵성 아미노산으로 작용하여 단백질 내 펩티드 결합을 절단하는 효소이다(Hedstrom, 2002. Chem Rev 102: 4501-4524).
- [4] 세린 프로테아제는 그 용도가 다양하여 혈전의 용해 등과 같은 인류의 질병 치료 이외에도 의류용 세제의 성분, 콘택트렌즈 세정제의 성분으로 이용될 뿐만 아니라 우유 단백질의 변형, 견 섬유의 고무질 제거(silk degumming), 가죽의 침지(soaking), 제모(unhairing), 올리고 펩타이드 합성 및 폐 Xray 필름으로부터 은의 회수, 사료 및 식품의 제조와 개선(한국공개특허 10-2005-0068750호) 등에 다양하게 이용되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 보다 뛰어난 산업적 경제성 및 효능을 확보하기 위하여 열안정성, 활성 등의 측면에서 개선된 세린 프로테아제가 요구되는 실정이다.
[6]

과제 해결 수단

- [7] 본 출원의 목적은 세린 프로테아제 변이체를 제공하는 것이다.
[8] 본 출원의 다른 목적은 상기 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
[9] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 세린 프로테아제 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 1 이상을 포함하는, 미생물을 제공하는 것이다.
[10] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 사료용 조성물을 제공하는 것이다.
[11]

발명의 효과

[12] 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 기존 세린 프로테아제에 비해 우수한 활성을 가지므로 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 씨모비피다 푸스카 유래 세린 프로테아제 변이체의 3차 구조에서 변이가 도입된 잔기의 위치를 나타낸 것이다.

[15]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[16] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[17] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[18]

[19] 본 출원의 하나의 양태는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다.

[20] 본 출원의 용어 "세린 프로테아제(serine protease)"는 프로테아제의 하위그룹에 속하며 단백질 분해 활성을 갖는 효소를 의미한다. 구체적으로, 세린 프로테아제는 펩티드 결합을 가수분해함으로써 단백질을 분해하고 기본적으로 활성 부위에 활성 세린 잔기를 갖는 효소일 수 있으며, 보다 구체적으로 세 작용기 촉매(catalytic triad)라고 칭해질 수 있는 아미노산 잔기인 히스티딘, 아스파테이트와 세린의 공간 배치를 갖는 효소일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[21] 본 출원의 세린 프로테아제는, 이에 제한되지는 않으나, 씨모비피다(*Thermobifida*) 속, 노카르디옵시스(*Nocardiopsis*) 속, 액티노루기스포라(*Actinorugispora*) 속, 또는 스피넉티노스포라(*Spinactinospora*) 속 미생물 유래인 것일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서 상기 세린 프로테아제의 야생형은 씨모비피다 푸스카(*Thermobifida fusca*), 씨모비피다 셀룰로실리티카(*Thermobifida cellulositica*), 씨모비피다 할로톨러런스(*Thermobifida halotolerans*), 액티노루기스포라 엔도피티카(*Actinorugispora endophytica*), 스피넉티노스포라 알칼리톨러런스(*Spinactinospora alkalitolerans*), 노카르디옵시스 컴포스타(*Nocardiopsis composta*), 또는 노카르디옵시스 포텐스(*Nocardiopsis potens*) 유래 세린 프로테아제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[22] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제는 서열번호 31로 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기

서열번호 31의 아미노산 서열은 서열번호 40 또는 서열번호 2로부터 유래하는 아미노산 서열일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[23] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제는 서열번호 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기 서열번호 49 내지 54의 아미노산 서열은 서열번호 67 내지 72 중 어느 하나의 아미노산 서열로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[24] 본 출원의 세린 프로테아제는 전술한 아미노산 서열과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함할 수 있다. 또한, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산 서열은 서열번호 31 및 49 내지 54로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나 또는 상기 서열번호 31 및 49 내지 54로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[25] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[26]

[27] 본 출원에서 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[28] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나

(homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

- [29] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO et al.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [30] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [31] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.

[32]

- [33] 일 구현예로, 본 출원에서 제공하는 세린 프로테아제 변이체는, 상기에서 설명한 세린 프로테아제 활성을 갖는 단백질 중, 특이적 위치의 아미노산이 치환되어, 효소 활성이 변이 전 단백질 대비 100% 초과되는 변이체를 의미할 수 있다.
- [34] 하나의 구체예로, 본 출원에서 제공하는 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 야생형 효소 대비, 약 100% 초과, 구체적으로 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 약 150%, 약 160%, 약 170%, 약 180%, 약 190%, 또는 약 200% 이상의 증가된 효소 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 상기 용어 "약(about)"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 본 출원에서 용어, "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 지칭한다. 변이체는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이하다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 폴리펩티드 서열 중 하나를 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 단백질(native protein)에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다.
- [37] 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질 (mature protein)의 N- 및/또는 C- 말단으로부터 일부분이 제거되거나, 혹은 부가된 변이형을 포함할 수 있다.
- [38] 상기 용어 "변이체"는 변형/변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.
- [39] 상기 변이체는 천연의 야생형 또는 비변형 단백질 대비 변이된 단백질의 활성이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 전하를 띠는 결사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중

양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파테이트를 포함하고; 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 비극성 아미노산(nonpolar amino acid)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린을 포함하고, 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산은 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하고, 상기 아미노산 중 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함한다. 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더)서열과 컨쥬게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트 될 수 있다.

[41]

[42] 본 출원에서 용어, "세린 프로테아제 변이체"는 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

[43]

본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31의 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열과 60% 이상 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[44]

일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31의 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[45]

한편, 서열번호 31의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및 116번 아미노산은 서열번호 49 내지 54의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및 116번 아미노산에 대응하므로, 서열번호 31을 기준으로 아미노산의 위치에 대해 기재한 내용은 서열번호 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열의 12번 아미노산 및 116번 아미노산에도 동일하게 적용될 수 있다.

[46]

일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 54의 12번

아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 52 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

구체적으로 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 54의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 54의 아미노산 서열과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[47] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 54 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열 내 N-말단으로부터 12번 위치, 116번 위치, 또는 12번 및 116번 위치에 상응하는 아미노산 모두가 다른 아미노산으로 치환된 단백질일 수 있다. 상기 '다른 아미노산'은 치환 전과는 다른 아미노산을 의미하며, 치환 전의 아미노산을 제외한 아미노산이던 제한되지 않는다.

[48] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 51 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열에서 12번 위치의 페닐알라닌(phenylalanine)이 글리신(glycine), 알라닌 (alanine), 아르기닌 (arginine), 아스파테이트 (aspartate), 시스테인 (cysteine), 글루탐산 (glutamate), 아스파라긴 (asparagine), 글루타민 (glutamine), 히스티딘 (histidine), 프롤린 (proline), 세린 (serine), 타이로신 (tyrosine), 이소류신 (isoleucine), 류신 (leucine), 라이신 (lysine), 트립토판 (tryptophan), 발린 (valine), 메티오닌 (methionine) 또는 쓰레오닌 (threonine)으로 치환되거나/되고, 116번 위치의 아스파라긴이 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파테이트, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘, 프롤린, 세린, 타이로신, 이소류신, 류신, 라이신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 메티오닌 또는 쓰레오닌으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[49] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 52 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열에서 12번 위치의 프롤린 (proline)이 페닐알라닌(phenylalanine), 글리신(glycine), 알라닌 (alanine), 아르기닌 (arginine), 아스파테이트 (aspartate), 시스테인 (cysteine), 글루탐산 (glutamate), 아스파라긴 (asparagine), 글루타민 (glutamine), 히스티딘 (histidine), 세린 (serine), 타이로신 (tyrosine), 이소류신 (isoleucine), 류신 (leucine), 라이신 (lysine), 트립토판 (tryptophan), 발린 (valine), 메티오닌 (methionine) 또는 쓰레오닌 (threonine)으로 치환되거나/되고, 116번 위치의 아스파라긴이 글리신, 알라닌, 아르기닌,

아스파테이트, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘, 프롤린, 세린, 타이로신, 이소류신, 류신, 라이신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 메티오닌 또는 쓰레오닌으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [50] 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열에서 12번 위치에 상응하는 아미노산이 타이로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 아르기닌(R)으로 치환되거나, 116번 위치에 상응하는 아미노산이 아스파테이트(D), 세린(S), 쓰레오닌(T) 또는 글리신(G)으로 치환되거나, 또는 서열번호 31의 아미노산 서열에서 12번 및 116번 위치에 상응하는 아미노산이 각각 타이로신(Y) 및 아스파테이트(D); 타이로신(Y) 및 세린(S); 세린(S) 및 아스파테이트(D); 세린(S) 및 쓰레오닌(T); 또는, 알라닌(A) 및 글리신(G)으로 치환된 것을 포함하는 단백질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 52 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열에서 12번 위치의 프롤린이 타이로신, 알라닌, 세린 또는 아르기닌으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 상기 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열에서 12번 및/또는 116번 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는, 상기 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 것은 자명하다.
- [52] 또한, 상기 변이체는 위에서 설명한 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열 또는 상기 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열에서, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 포함한다.
- [53] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 31의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는, 서열번호 32 내지 39에서 선택되는 어느 하나의 서열번호로 기재되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 49의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 55 또는 56의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [55] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 50의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 57 또는 58의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [56] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 51의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 59 또는 60의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 52의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 61 또는 62의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 53의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 63 또는 64의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 일 구현예로, 상기 변이체 중 서열번호 54의 아미노산 서열에서 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 65 또는 66의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나(consisting essentially of) 또는 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 12번째 및/또는 116번째 위치에 상응하는 위치에서 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열과 60%, 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%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지며, 세린 프로테아제 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [61]
- [62] 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 변이 전의 폴리펩티드, 천연의 야생형 폴리펩티드 또는 비변형 폴리펩티드에 비해 활성이 강화된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된

- 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [63] 또한 본 출원의 변이체와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 12번째 및/또는 116번째 아미노산의 변이 또는 이에 상응하는 위치의 변이 이외에 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [64]
- [65] 한편, NCBI Reference Sequence WP_016188200.1 (서열번호 40)의 mature region은 본 출원의 서열번호 31에 상응하며, 서열번호 40에서 signal peptide만을 제외한 서열은 본 출원의 서열번호 2에 상응한다.
- [66] 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는, 전술한대로 서열번호 31의 12번, 116번에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 세린 프로테아제의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있음은 자명하다. 또한, 당업자라면 당업계에 알려진 서열 얼라인먼트를 통해 본 출원의 서열번호 31의 N-말단으로부터 12번, 116번 위치가 서열번호 40의 193, 297번 위치, 서열번호 2의 163, 267번 위치에 상응하는 것임을 알 수 있으며, 서열번호 31이 서열번호 2 및 서열번호 40에 포함되는 것을 알 수 있다.
- [67] 따라서 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는, 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 서열번호 2 및 서열번호 40에 대해서, 서열번호 31의 12, 116번에 상응하는 위치의 아미노산 (서열번호 2에서 163 및/또는 267번째 아미노산, 서열번호 40에서 193 및/또는 297번째 아미노산)이 치환된 변이체를 포함한다. 또한 본 출원에서 서열번호 31 및 이의 12, 116번째 아미노산에 대해 설명한 내용을 서열번호 2 및 이의 163, 267번째 아미노산, 서열번호 40 및 이의 193, 297번째 아미노산에 적용할 수 있다.
- [68] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31의 12 및/또는 116번에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 2와 적어도 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 것일 수 있다. 다른 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 2의 163 및/또는 267번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 2와 60% 이상 100% 미만의 서열 상동성을 갖는 것일 수 있으며, 서열번호 3 내지 10 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열과 60% 이상의 서열 상동성을 갖는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 한편 서열번호 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는

폴리펩티드에서 서열번호 49 내지 54의 N-말단으로부터 12번 및/또는 116번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 변이체 역시 본 출원의 세린 프로테아제의 범위에 포함되는 것은 자명하다.

- [70] 상기 서열번호 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 서열은, 예를 들어 GenBank Accession: KUP96625.1(서열번호 67), NCBI Reference Sequence: WP_068687914.1(서열번호 68), NCBI Reference Sequence: WP_133739400.1(서열번호 69), NCBI Reference Sequence: WP_179641868.1(서열번호 70), NCBI Reference Sequence: WP_184391208.1(서열번호 71), 또는 NCBI Reference Sequence: WP_017594871.1(서열번호 72) 등에 기재된 아미노산 서열일 수 있다.
- [71] 당업자라면 당업계에 알려진 서열 얼라인먼트를 통해 서열번호 67 내지 72에서 서열번호 49 내지 54의 N-말단으로부터 12번 및/또는 116번 위치에 상응하는 아미노산을 확인하여, 서열번호 49 내지 54의 N-말단으로부터 12번 및/또는 116번 위치에 대해 설명한 내용을 적용할 수 있다.
- [72] 일 구현예로 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 12번 및/또는 116번 위치에 상응하는 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 67 내지 72 중 어느 하나의 아미노산 서열과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다.
- [73] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 12번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 70 내지 72 중 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 116번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.
- [74] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 67로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 198번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 67과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 49의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 49와 70%

이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 67로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 302번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

- [75] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 68로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 178번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 68과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 50의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 50과 70% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 68로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 282번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

- [76] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 69로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 207번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 69와 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 51의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 51과 70% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 69로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 311번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

- [77] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 203번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 70과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 52의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 52와 70% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 303번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

- [78] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 71로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 201번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는

것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 71과 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 53의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 53과 70% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 71로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 304번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

- [79] 일 구현예로, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 72로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 201번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 72와 60% 이상, 예를 들어 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%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변이체는 서열번호 54의 12번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 54와 70% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 72로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 304번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 더 포함할 수 있다.

[80] 그러나, 이에 제한되지 않는다.

[81]

- [82] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 단백질 또는 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 단백질 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조(reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다. 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 31과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 31의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.

- [83] 이러한 정렬에는 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 다중 서열

정렬(Multiple sequence alignment)을 통해 상응하는 아미노산 잔기를 식별할 수 있다. 당업계에 알려진 다중 서열 정렬 프로그램의 예시로 MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation; 3.5 버전 이상; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (6.857 버전 이상; Katoh and Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) 등의 프로그램 및 ClustalW를 사용하는 EMBOSS EMMA (1.83 이상; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22 : 4673-4680) 등이 있으며, 상기 프로그램 각각의 기본 매개 변수를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[84]

[85] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[86] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[87] 본 출원의 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 강화된 활성을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 출원에서 야생형 세린 프로테아제를 코딩하는 유전자는 써모비피다(*Thermobifida*) 속, 노카르디옵시스(*Nocardiosis*) 속, 액티노루기스포라(*Actinorugispora*) 속, 또는 스펀액티노스포라(*Spinactinospora*) 속 미생물 유래일 수 있고, 구체적으로 써모비피다 푸스카(*Thermobifida fusca*), 써모비피다 셀룰로실리티카(*Thermobifida cellulosilytica*), 써모비피다 할로톨러런스(*Thermobifida halotolerans*), 액티노루기스포라 엔도피티카(*Actinorugispora endophytica*), 스펀액티노스포라 알칼리톨러런스(*Spinactinospora alkalitolerans*), 노카르디옵시스 컴포스타(*Nocardiosis composta*), 또는 노카르디옵시스 포텐스(*Nocardiosis potens*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[88] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[89] 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 변이체, 구체적으로는 서열번호 32 내지 39 및 서열번호 55 내지 66 중에서 선택되는 어느 하나의

서열번호로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이와 상동성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [90] 일 구현예로, 상기 서열번호 32 내지 39 중에서 선택되는 어느 하나의 서열번호로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 41 내지 48에서 선택되는 어느 하나의 서열번호로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [91] 또한, 전술한대로 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 31 및 49 내지 54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 상기 서열의 12번 및/또는 116번에 상응하는 위치의 아미노산이 치환된 변이체를 포함하므로, 이러한 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또한 본 출원의 범위에 포함됨은 자명하다.
- [92] 일 예로, 서열번호 2 및 서열번호 40에서 서열번호 31의 12번 및/또는 116번에 상응하는 위치의 아미노산(서열번호 2에서 163 및/또는 267번째 아미노산, 서열번호 40에서 193 및/또는 297번째 아미노산)이 치환된 변이체 또한 본 출원의 세린 프로테아제의 범위에 포함되므로, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또한 본 출원의 범위에 포함된다. 예를 들어, 상기 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 3 내지 10 중에서 선택되는 어느 하나의 서열번호로 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 23 내지 30에서 선택되는 어느 하나의 서열번호로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [93] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 31 및 49 내지 54 중 선택되는 어느 하나의 N-말단으로부터 12번 아미노산 및/또는 116번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체의 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [94] 상기 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 공지된 문헌에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1X SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1X SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1X SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다. 그러나 이에

- 제한되는 것은 아니며, 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [95] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 폴리뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있다.
- [96] 구체적으로, 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [97] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다.
- [98]
- [99] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [100] 본 출원의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [101] 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [102] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 제조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계, pET계 및 pUB110계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177,

pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pSM704 벡터 등을 사용할 수 있다. 본 출원에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

- [103] 일 구현예로, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 변이형 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[104]

- [105] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 하나 이상을 포함하는 숙주세포를 제공한다.

- [106] 상기 숙주세포는, 구체적으로, 미생물 일 수 있다.

- [107] 상기 세린 프로테아제 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 벡터 중 하나 이상을 포함하는 미생물은, 구체적으로 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 제조되는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[108]

- [109] 상기 미생물은 세린 프로테아제 변이체를 발현하는 미생물 일 수 있다.

- [110] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는/하는"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미할 수 있다. 본 출원의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 세린 프로테아제 변이체일 수 있다.

- [111] 구체적으로, "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다.

[112]

- [113] 본 출원의 미생물은 재조합 미생물일 수 있다. 상기 재조합은 형질전환과 같은 유전적 변형(genetically modification)에 의해 이루어질 수 있다.

- [114] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를

포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 형질전환 하는 방법은 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , 또는 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 천연 수용성(natural competence)(예를 들어, 문헌[Perry and Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297] 참조) 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[115]

[116] 상기 재조합 미생물은, 본 출원의 세린 프로테아제 활성이 강화된 것일 수 있다.

[117] 상기 "활성의 강화"는 미생물이 가진 특정 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미할 수 있다. "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미할 수 있다.

[118] 구체적으로, 본 출원에서 상기 단백질 변이체의 활성 강화는, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법, 염색체상의 세린 프로테아제 활성을 갖는 자연형 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 단백질 변이체를 코딩하는 유전자로 대체하는 방법, 상기 단백질 변이체의 활성이 강화되도록 상기 변이체를 코딩하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법 중 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [119] 다음으로, 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현 조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [120] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 프로모터가 연결될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 공지된 강력한 프로모터의 예에는 *cj1* 내지 *cj7* 프로모터(US 7662943 B2), *lac* 프로모터, *trp* 프로모터, *trc* 프로모터, *tac* 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, P_L 프로모터, *tet* 프로모터, *gapA* 프로모터, *SPL7* 프로모터, *SPL13(sm3)* 프로모터 (US 10584338 B2), *O2* 프로모터(US 10273491 B2), *tkl* 프로모터 및 *yccA* 프로모터 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [121] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [122] 이와 같은 단백질 활성의 도입 및 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 최소 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 500%, 최대 1000% 또는 2000%까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [123]
- [124] 본 출원의 숙주세포 또는 미생물은 본 출원의 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 벡터를 포함하여 세린 프로테아제 변이체를 발현하는 미생물일 수 있으면 모두 가능하다. 구체적으로, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 엔테로박테리아(*Enterobacteria*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 또는 바실러스 속 등의 미생물 균주가 포함될 수 있으며, 구체적으로 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*), 바실러스 아미롤리케파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis*), 대장균(*Escherichia coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillusoryzac*) 등의 균주일 수 있고, 보다 구체적으로는 바실러스

섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[125]

[126] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체를 제조하는 방법을 제공한다.

[127] 본 출원의 변이체를 제조하는 방법은 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 1 이상을 포함하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[128] 본 출원에서, 용어 "배양"은 상기 숙주 세포를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에서 알려진 적절한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[129] 본 출원에서 용어, "배지"는 상기 숙주 세포를 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 숙주 세포의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 숙주 세포의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 숙주 세포를 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[130] 일 구현예로, 본 출원의 변이체를 제조하는 방법은 상기 배양단계에서 발현되는 본 출원의 변이체를 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[131] 다른 하나의 구체예로, 상기 배양단계에서 발현된 변이체는 본 발명이 속하는 분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 회수될 수 있다. 예를 들어, 변이체는 수집, 원심분리, 여과, 추출, 분무-건조, 증발 또는 침전을 포함하나 이들에 한정되지 않는 통상적인 절차에 의해 영양 배지로부터 회수될 수 있다.

[132] 상기 회수 방법은 본 출원의 숙주 세포의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 변이체를 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 및 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 숙주 세포로부터 변이체를 회수할 수 있다.

[133] 다른 하나의 구체예로, 배양단계에서 숙주 세포에 의해 발현되는 변이체는 회수되지 않을 수 있다. 상기 구체예에서, 변이체를 발현하는 숙주 세포 자체를 변이체의 공급원으로 사용할 수 있다.

[134]

- [135] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 사료용 조성물을 제공한다.
- [136] 본 출원의 사료용 조성물에 포함되는 세린 프로테아제 변이체는 이를 발현하는 미생물 자체가 포함되거나, 혹은 이를 발현하는 미생물로부터 분리 정제된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [137] 본 출원의 "사료용 조성물"은 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 사료는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하다.
- [138] 상기 사료용 조성물은, 사료 첨가제 일 수 있다.
- [139] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [140] 본 출원의 사료용 조성물은 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산 및 사과산 등과 같은 유기산; 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염, 폴리인산염(중합인산염)등과 같은 인산염; 폴리페놀, 카테킨(catechin), 알파-토코페롤, 로즈메리 추출물(rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등과 같은 천연 항산화제;로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [141] 본 출원의 사료용 조성물은 아미노산, 무기염류, 비타민, 향생물질, 향균물질, 향산화, 향곰팡이 효소 및 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들어, 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들어, 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들어, 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들어, 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들어, 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병예방제 등과 같은 첨가제;로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [142] 본 출원의 사료용 조성물은 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 제올라이트, 육분 또는 미강 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [143] 본 출원의 사료용 조성물은 상기 세린 프로테아제 변이체 외의 효소 제제를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 리파아제(lipase)와 같은 지방 분해효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α -1,4-glycoside bond)을

가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

- [144] 본 출원의 사료용 조성물은 동물에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제로서, 탑 드레싱으로서 또는 이들을 가축 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다. 또한 당해 기술분야에서 통상적으로 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.
- [145] 본 출원의 사료용 조성물이 사용될 수 있는 동물은 예를 들어 식용우, 젖소, 송아지, 돼지, 돼지새끼, 양, 염소, 말, 토끼, 개, 고양이 등과 같은 가축, 병아리, 알닭, 가정용 닭, 수탉, 오리, 거위, 칠면조, 메추라기, 작은새 등과 같은 가금류를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [146] 본 출원의 사료용 조성물에 포함되는 본 출원의 세린 프로테아제 변이체의 양은 특별히 한정되지 않고 그 목적에 따라 적절히 조절할 수 있다. 일 구현예로, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려진 바와 같이 가축의 소화관에서 장기간 생존하면서 단백질원 물질을 분해하기에 적합한 양으로 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [147]
- [148] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 식품 조성물을 제공한다. 상기 프로테아제 단백질은 액체 또는 고체 형태의 식품 조성물에 사용이 가능할 수 있다. 또한, 상기 식품은 분말, 환, 음료, 차 또는 일반 식품의 첨가물일 수 있다.
- [149] 일 구현예로, 상기 식품은 유제품, 배변용 또는 다이어트용 건강기능식품, 고혈압 예방용 기능성 건강기능식품 등 프로테아제를 필요로 하는 식품군일 수 있다.
- [150] 다른 구현예로, 상기 프로테아제 변이체는 다양한 식품 조성물에 포함되어 식품의 가용화 또는 연화제, 육질 개질제로서 사용될 수 있다. 그 밖에 다양한 구현예로서, 제빵 과정에 첨가되어, 글루텐 망을 파괴하는 단계에서 사용될 수 있다. 또는, 식품 단백질(예를 들어, 우유 중의 단백질)을 가수분해하는데 사용될 수 있다. 또는, 렌더링, 향료 제조, 쓴맛 저감, 에멀전화 특성 변화, 생체활성(bioactive) 펩타이드 생성, 단백질의 알레르기 유발 항원 감소 등의 용도로서 다양한 식품 조성물에 포함되어 사용될 수 있으나, 이는 일 예시로, 전술한 용도에 제한되지 않는다.
- [151] 상기 식품 조성물 내의 세린 프로테아제 변이체의 양은, 목적하는 바에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있다.

[152]

[153] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 세제 조성물을 제공한다.

[154] 본 출원에 따른 세제 조성물은 1부 및 2부 수성 세제 조성물, 비수성 액체 세제 조성물, 성형 고체(cast solid), 과립 형태, 입자 형태, 압축 정제, 겔, 페이스트 또는 슬러리 형태일 수 있다. 상기 세제 조성물은 음식물의 찌든 때, 음식물 잔류막 및 기타 소량의 식품 조성물 제거에 이용 될 수 있다.

[155] 본 출원에 따른 세제 조성물은 단단한 표면을 세정하는 세제 조성물, 직물을 세정하는 세제 조성물, 설거지용 세제 조성물, 구강 세정용 세제 조성물, 의치 세정용 세제 또는 콘택트 렌즈 세정 용액과 같은 형태로 제공될 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

[156]

[157] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 약학 조성물을 제공한다.

[158] 본 출원의 약학 조성물은, 소화기의 질환, 소화 이상, 소화기 수술 후의 비정상적 질환을 개선하기 위한 소화 효소용 약학적 조성물, 혈전에 직접 작용하여 피브린을 용해시키는 혈전 용해제 내지는 항혈전용 조성물, 생체내 방어 시스템으로서 작용하여 염증성 물질 또는 괴사 조직을 제거하는 소염제 또는 수술 또는 외상후 부종을 경감시키기 위한 소염제로서의 용도를 포함한다.

[159] 상기 약학적 조성물은, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[160]

[161] 본 출원의 세린 프로테아제 변이체 또는 이를 발현하는 미생물은, 전술한 용도 외에도 예를 들어 화장품, 피혁 가공, 약제, 진단제, 폐기물 관리 및 학술 연구용 화학제 제조 등의 용도로 사용될 수 있다. 다만 상기 용도는 일 예시이며, 그 밖에 당업계에 알려진 단백질성 물질의 변성, 분해 또는 제거와 관련된 임의의 용도로 사용 될 수 있다.

[162]

발명의 실시를 위한 형태

[163] 이하 본 출원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나

이들 실시예 및 실험예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[164]

[165] 실시예 1. *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제 변이체 선별

[166] 실시예 1-1: *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제 라이브러리 제작

[167] *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제의 mature region에 해당하는 아미노산(서열번호 31)을 암호화하는 유전자에 error-prone PCR을 통해 랜덤 변이를 도입하였다. Error prone PCR은 Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech, Cat# 630703)을 사용하였으며, PCR 조건은 [표1]과 같다. 하기 조건으로 진행 시, 6.2mutations/Kb의 빈도로 변이가 삽입됨을 확인하였다.

[168]

[169] [표1]

조성	함량	비고
주형 DNA	0.5ng	서열번호 1
프라이머_정방향	5uM	서열번호 11
프라이머_역방향	5uM	서열번호 12
10X Titanium Taq buffer	5uL	
MnSO ₄	640uM	
dGTP	40uM	
50X Diversify dNTP mix	1uL	
50X dNTP mix	1uL	
Titanium Taq Polymerase	1uL	
Total	50uL	Adjust to 50ul with DW
PCR 조건		
I. 94 °C	30sec	II, III 50사이클 반복
II. 94 °C	30sec	
III. 68 °C	1min	
IV. 68 °C	1min	
V. 4 °C	∞	

[170] 상기 과정을 통해 얻은 PCR fragment는 [표2]에 표기한 프라이머를 이용하여 증폭한 벡터에 In-FusionR HD cloning kit (clontech)을 이용하여 라이게이션한 후, DH5α에 형질전환하여 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니로부터 플라스미드를 정제하여 약 5*10⁴ 사이즈의 라이브러리를 확보하였다.

[171] [표2]

주형 DNA(pBE-S-TAP)	서열번호 1
프라이머_정방향	서열번호 13
프라이머_역방향	서열번호 14

[172]

[173] 실시예 1-2: *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제 라이브러리 스크리닝

[174] 실시예 1-1에서 제작된 프로테아제 라이브러리를 단백질 분비가 용이한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) LB700 균주에 형질전환하여 스크리닝을 진행하였다. 스크리닝은 총 2단계에 걸쳐서 진행하였다. 1단계는 라이브러리를 형질전환한 바실러스 서브틸리스 균주를 2% 스킴밀크 플레이트에 도말한 후, 형성된 halo 사이즈를 기준으로 선별하는 방식이다. 바실러스 서브틸리스 형질전환은 Groningen method를 따라서 진행하였고, 스크리닝에 사용한 스킴밀크 플레이트 조성은 [표3]과 같다.

[175]

[176] [표3]

조성	함량	비고
M9 minimal salts	11.28 g	BD, cat#248510
Agar	20 g	
Skim milk	20 g	BD, cat#232100
50%Glucose	20 g	
1M MgSO ₄	2 mM	
1M CaCl ₂	0.1mM	
Kanamycin	50ug/ml	

[177] (1L 기준)

[178] 2단계는 1단계에서 1차적으로 선별된 콜로니를 Azocasein 발색을 통해 선별하는 방식이다. 96 deep well 플레이트에 카나마이신 항생제가 포함된 BHI(Brain Heart Infusion, bd, cat#53286) 액체배지를 넣고, 1단계에서 선별된 콜로니를 접종하여 37°C 20-24시간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통해 효소가 포함되어 있는 상등액을 얻고, 상등액과 기질인 2%(w/v) Azocasein을 동량으로 섞은 후, 37°C에서 1시간 반응을 진행하였다. 효소 반응액에 10% TCA(Trichloro acetic acid)를 3배 볼륨으로 첨가하여 반응을 중단시키고, 원심분리를 통해 응고된 단백질을 제거하였다. NaOH를 동량으로 섞어 발색반응을 진행 후, 440nm에서 흡광을 측정함으로써 발색 정도를 비교하였다. 이 과정을 통해 야생형 세린 프로테아제 대비 흡광도가 150% 이상 증가된

콜로니를 선별하였다.

[179]

[180] 실시예 2. 선별된 변이체 제조 및 활성 평가

[181] 실시예 2-1: 변이체 제작

[182] 스크리닝을 통해서 선별된 변이체의 시퀀스 분석결과 서열번호 31의 12번째 아미노산(페닐알라닌, Phe), 116번째 아미노산(아스파라긴, Asn)이 각각 타이로신(Tyr), 아스파테이트(Asp)으로 치환되어 있음을 최종적으로 확인하였다. [도 1]에는 서열번호 2를 기준으로 상기 변이의 위치를 표시하였다. 선별된 변이 2종(F12, N116)은 site directed mutagenesis를 통해서 pBE-S-TAP 플라스미드에 단독변이 형태로 재도입한 후, double 변이 및 single 변이 형태의 활성을 야생형의 활성과 비교 평가하였다. 변이체 제작시 사용한 프라이머는 [표4]와 같다.

[183]

[184] [표4]

TAP_F12Y_F	서열번호 15
TAP_F12Y_R	서열번호 16
TAP_N116D_F	서열번호 17
TAP_N116D_R	서열번호 18

[185]

[186] 실시예 2-2: 활성평가

[187] 상기 제작된 플라스미드를 바실러스 서브틸리스 LB700 균주에 형질전환 하여 발현시킨 후, N-SUCCINYL-ALA-ALA-PRO-PHE-P-NITROANILIDE(Sigma, cat#S7388, 이하 SUC-AAPF-pNA로 표기) 펩타이드를 기질로 하여 활성평가를 진행하였다. 형질전환 된 바실러스 서브틸리스 균주를 카나마이신 항생제가 포함된 BHI 배지에 접종하여 37°C에서 20-24시간 배양 후, 세포를 제외하고 배양액 일부를 25mM Tris-HCl(pH7.5) buffer, 1mM Suc-AAPF-pNA와 섞은 후, 37°C에서 30분간 반응하였다. 상기의 반응액은 410nm에서 흡광을 측정하였다. 효소 생성물인 para-nitroaniline의 문헌에 알려진 extinction coefficient는 410nm에서 $8,800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이며, 이를 토대로 효소의 유닛을 환산하였다(Barrett, A. J., Cathepsin G. Methods Enzymol., 80, Pt. C, 561-565, (1981)). 측정된 활성은 [표5]와 같다.

[188]

[189] [표5]

	효소활성 (unit/ml)
야생형	16.3
F12Y	34.0
F12YN116D	63.8

[190] 측정 결과, pH7.5, 37°C 조건에서 야생형 대비 F12Y, F12YN116D 변이 각각 약 2.1배, 3.9배 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[191]

[192] 실시예 2-3: 열안정성 평가

[193] 변이체 도입시 열안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.

[194] 구체적으로, 실시예 2-2에서 활성평가를 진행한 동일 샘플을 상온, 70°C, 80°C, 90°C의 온도 조건에서 각각 5분간 정치 후, 효소 활성을 측정하였다. 측정된 활성은 [표 6]과 같다.

[195]

[196] [표6]

	효소활성 (unit/ml)			
열처리 조건	RT, 5분	70°C 5분	80°C 5분	90°C 5분
야생형	16.3	15.9	10.6	0.3
F12Y	34.0	34.7	22.8	0.1
F12YN116D	63.8	63.3	41.7	0.1

[197]

[198] 측정 결과, F12Y, F12YN116D 변이는 80°C에서도 야생형 대비 각각 약 2배 및 약 4배의 효소 활성을 유지하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 고온에서도 활성이 높게 유지되는 것을 확인하였는 바, 산업적으로 유용하게 사용 될 수 있다.

[199]

[200] 실시예 3. 포화 변이 라이브러리(Saturation mutagenesis library) 제작 및 선별

[201] 실시예 3-1. F12, N116 잔기 포화 변이 라이브러리 제작

[202] 앞서 선별한 변이체인 F12, N116 잔기를 타이로신, 아스파테이트 이외의 다른 잔기로 치환하여 활성에 미치는 영향을 확인하고자 2개의 잔기에 대하여 포화 변이 라이브러리를 제작하였다.

[203] pBE-S-TAP를 주형으로 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14 프라이머를 각각 이용하여 두 개의 PCR fragment를 얻었고, In-Fusion HD cloning kit를 이용하여 라이게이션한 후, DH5 α 에 형질전환하여 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니로부터 플라스미드를 정제하여 약 4x10³ 사이즈의 라이브러리를 확보하였다.

[204]

[205] [표7]

주형 DNA(pBE-S-TAP)	서열번호 1
Saturation mutagenesis_F_1	서열번호 19
Saturation mutagenesis_R_1	서열번호 20
Saturation mutagenesis_F_2	서열번호 21
Saturation mutagenesis_R_2	서열번호 22

[206] 실시예 3-2: 포화 변이 라이브러리 스크리닝 및 활성 평가

[207] 실시예 3-1에서 제작된 포화 변이 라이브러리는 실시예 1-2에서 언급한 것과 동일한 방법으로 스크리닝을 진행하였다. 스크리닝을 통해 F12YN116D 변이체 대비 활성이 동등 또는 증가한 변이체를 선별하였고, 이 변이체들에 대해 서열 분석 및 Suc-AAPF-pNA를 기질로 하여 활성 평가를 진행하였다.

[208]

[209] [표8]

	효소활성 (unit/ml)
야생형	23.52
F12YN116D	65
F12YN116S	77.35
F12SN116D	61.75
F12SN116T	117.65
F12AN116G	94.9
F12A	94.25
F12R	58.5

[210] 확인 결과, F12, N116 잔기는 실시예 2에서 확인한 타이로신, 아스파테이트 이외에도 F12S, F12A, F12R, N116S, N116T, N116G 등의 다른 아미노산으로 치환되어도 활성이 증가하는 결과를 보였다.

[211]

[212] 실시예 3-3: F12S 변이체의 제조 및 활성 평가

[213] site-directed mutagenesis를 통해 F12S 단독 변이체를 pBE-S-TAP 플라스미드에 도입한 후, 이 단일 변이의 활성을 야생형과 비교하였다.

[214] Suc-AAPF-pNA를 기질로 하여 F12S 변이체의 활성 평가를 진행하였다.

[215] [표9]

	효소 활성 (Unit/mL)
야생형	23.0
F12S	34.5

[216] 측정 결과, F12S 변이체의 활성은 약 1.5배 증가한 것을 확인하였다.

[217]

[218] 실시예 4. *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제 유사 단백질의 12번, 116번 잔기 영향성 확인

[219] 실시예 4-1: 야생형 및 변이체 제작

[220] 서열번호 31번과 서열 상동성을 갖는 다른 세린 프로테아제에서도 서열번호 31의 12번, 116번에 상응하는 아미노산 잔기가 활성 증가에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 각각 87.2%, 81.8%, 81.3%, 73.8%, 69.9%, 66.7%의 서열 상동성을 갖는 세린 프로테아제의 12번, 116번 잔기를 타이로신(Y), 아스파테이트(D)로 치환한 후, 야생형과 활성을 비교하였다. 각 세린 프로테아제의 유래 및 서열 정보는 [표10]과 같다.

[221]

[222] [표10]

유래	서열번호	서열번호 31과 상동성 (%)	서열번호 54와 상동성 (%)
<i>Thermobifida fusca</i>	서열번호 31	-	66.7
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	서열번호 49	87.2	65.1
<i>Thermobifida halotolerans</i>	서열번호 50	81.8	61.3
<i>Actinorugispora endophytica</i>	서열번호 51	81.3	64
<i>Spinactinospora alkalitolerans</i>	서열번호 52	73.8	75.4
<i>Nocardiopsis composta</i>	서열번호 53	69.9	86.6
<i>Nocardiopsis potens</i>	서열번호 54	66.7	-

[223] 각 세린 프로테아제의 12번, 116번 잔기를 타이로신(Y)과 아스파테이트(D)로 치환하여, 서열 번호 55번-66번의 변이체를 제작하였다.

[224]

[225] 실시예 4-2: 활성평가

[226] 상기 제작된 플라스미드를 바실러스 서브틸리스 LB700 균주에 형질전환하여 발현 시킨 후, 실시예 2-2에서 언급한 활성 측정법과 동일한 방법으로 활성평가를 진행하였다. 측정된 활성은 [표 11]과 같다.

[227]

[228] [표11]

유래	변이형	activity (U/ml)
Thermobifida cellulosilytica	WT	13.6
	F12Y	16.3
	F12YN116D	29.1
Thermobifida halotolerans	WT	4.0
	F12Y	6.3
Actinorugispora endophytica	WT	10.4
	F12Y	14.0
Spinactinospora alkalitolerans	WT	2.0
	P12Y	2.6
Nocardiopsis composta	WT	12.1
	P12Y	26.5
Nocardiopsis potens	WT	33.1
	P12Y	86.3

[229] 측정 결과, *Thermobifida fusca* 유래 세린 프로테아제와 마찬가지로 이와 서열 상동성을 갖는 6종의 단백질 역시, 12번 잔기에 변이 도입 시 활성이 증가함을 확인하였다. 이를 통해 12번, 116번 잔기는 세린 프로테아제 효소 활성화에 중요한 잔기이며, 서열번호 31을 통해 확인한 바와 마찬가지로 이를 다른 아미노산으로 치환함으로써 효소활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였는 바, 본 출원의 세린 프로테아제 변이체는 효소활성이 증가되어 산업적으로 유용하게 사용될 수 있다.

[230]

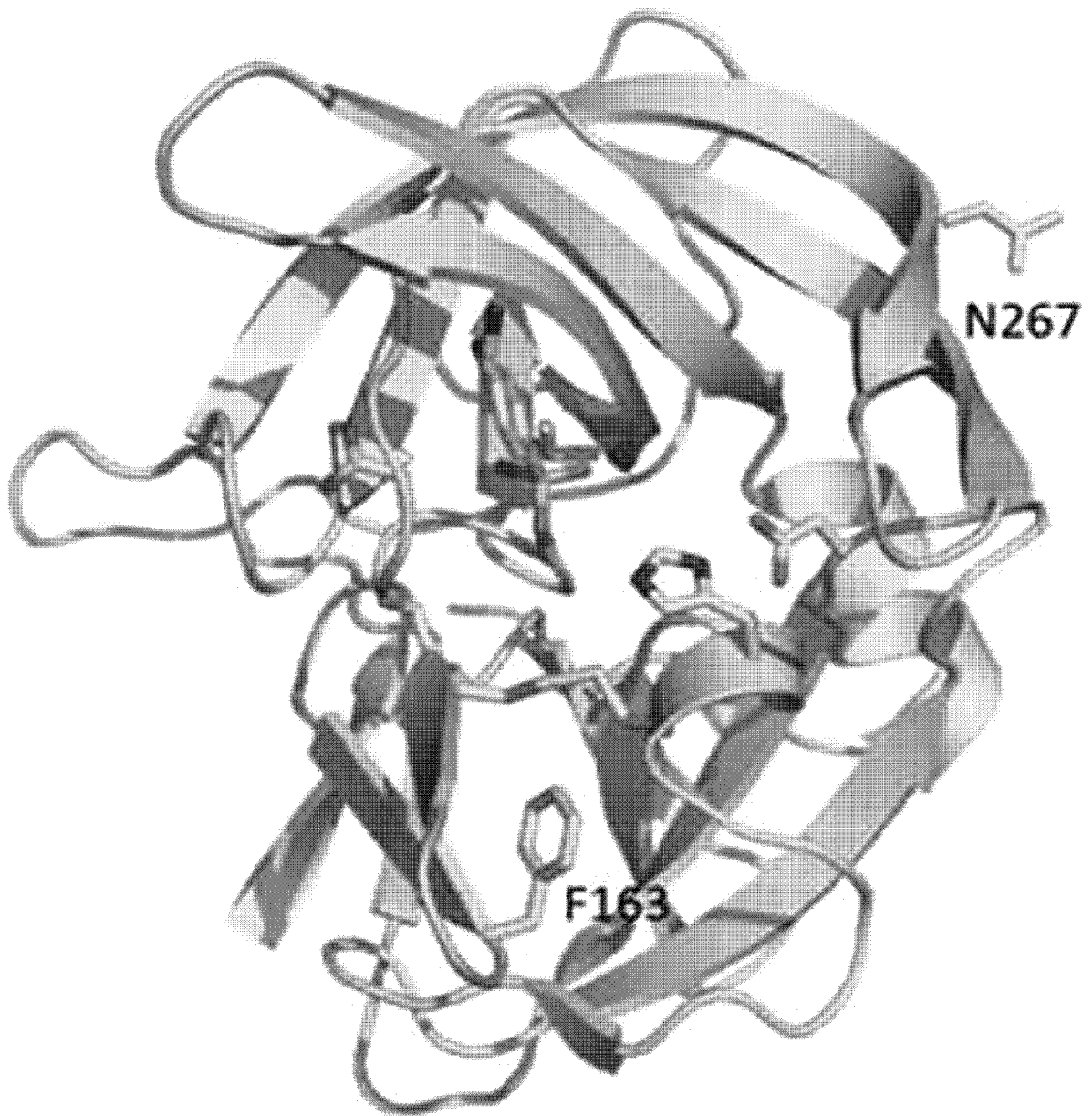
[231] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 12번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하고, 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열과 60% 이상 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 116번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 추가적으로 포함하는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 54로 기재되는 아미노산 서열과 75% 이상 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 12번째 위치에 상응하는 아미노산은 친수성(hydrophilic) 아미노산, 비극성 아미노산(nonpolar amino acid) 또는 염기성 아미노산으로 치환된, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 12번째 위치에 상응하는 아미노산은 타이로신(Y, tyrosine), 알라닌(A, Alanine), 세린(S, Serine) 또는 아르기닌(R, Arginine)으로 치환된, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 71 또는 72로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 201번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 기준으로 203번 위치에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 세린 프로테아제 변이체는 서열번호 70 내지 72 중 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 9] 제2항에 있어서, 116번째 위치에 상응하는 아미노산은 친수성(hydrophilic) 아미노산, 비극성 아미노산(nonpolar amino acid) 또는 산성 아미노산으로 치환된, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 116번째 위치에 상응하는 아미노산은 아스파테이트(D, aspartate), 세린(S, Serine), 쓰레오닌(T, Threonine), 또는 글리신(G, Glycine)으로 치환된, 세린 프로테아제 변이체.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 13] 제12항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

- [청구항 14] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 세린 프로테아제 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 1 이상을 포함하는, 숙주세포.
- [청구항 15] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 세린 프로테아제 변이체; 및 이를 발현하는 미생물 중 하나 이상을 포함하는, 조성물.

[도1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/003415

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/52(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; A23K 10/14(2016.01)i; A23K 10/16(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/52(2006.01); A23J 3/34(2006.01); A23K 1/16(2006.01); C12N 15/00(2006.01); C12N 9/48(2006.01);
C12P 21/06(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 세린 프로테아제(serine protease), 치환(substitution), 아미노산(amino acid), 서열(sequence), 상동성(identity)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	NCBI. GenBank accession no. WP_067965505.1. S1 family peptidase [Nocardiopsis trehalosi] 17 April 2020. See entire document.	1,3,4,6-8,11-15 2,5,9,10
A	US 9441215 B2 (NOVOZYMES A/S) 13 September 2016 (2016-09-13) See entire document.	1-15
A	US 619177 B2 (NOVOZYMES A/S) 14 April 2020 (2020-04-14) See entire document.	1-15
A	US 7618801 B2 (JONES, B. E. et al.) 17 November 2009 (2009-11-17) See entire document.	1-15
A	US 9801398 B2 (NOVOZYMES A/S) 31 October 2017 (2017-10-31) See entire document.	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 2022

Date of mailing of the international search report

15 June 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/003415

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/003415

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	9441215	B2	13 September 2016	AU	2014-214032	A1	09 July 2015
				CN	104968211	A	07 October 2015
				EP	2953481	A2	16 December 2015
				MX	2015010078	A	25 January 2016
				US	2015-0344860	A1	03 December 2015
				WO	2014-122161	A2	14 August 2014
				WO	2014-122161	A3	20 November 2014
US	619177	B2	14 April 2020	AU	2015-357195	A1	25 May 2017
				AU	2015-357195	B2	13 June 2019
				CA	2967538	A1	09 June 2016
				CN	107002111	A	01 August 2017
				EP	3227456	A1	11 October 2017
				NZ	731727	A	20 December 2019
				US	2019-0032102	A1	31 January 2019
				WO	2016-087427	A1	09 June 2016
US	7618801	B2	17 November 2009	BR	PI0818800	A2	14 October 2014
				CA	2703842	A1	07 May 2009
				CN	101842480	A	22 September 2010
				CN	101842480	B	10 July 2013
				EP	2205730	A1	14 July 2010
				EP	2205730	B1	17 December 2014
				JP	2011-501961	A	20 January 2011
				JP	5256296	B2	07 August 2013
				KR	10-2010-0075983	A	05 July 2010
				MX	2010004371	A	20 May 2010
				RU	2010121929	A	10 December 2011
				RU	2486244	C2	27 June 2013
				US	2009-0111161	A1	30 April 2009
				US	2010-0095987	A1	22 April 2010
				US	2011-0081711	A1	07 April 2011
				US	7879788	B2	01 February 2011
				US	8076468	B2	13 December 2011
				WO	2009-058679	A1	07 May 2009
US	9801398	B2	31 October 2017	AU	2013-213601	A1	24 July 2014
				AU	2013-213601	B2	14 December 2017
				AU	2013-213601	B8	18 January 2018
				BR	112014017919	A2	27 June 2017
				CN	104350149	A	11 February 2015
				EP	2807254	A1	03 December 2014
				EP	2807254	B1	02 August 2017
				ES	2644007	T3	27 November 2017
				MX	2014008764	A	27 August 2014
				US	2014-0363538	A1	11 December 2014
				WO	2013-110766	A1	01 August 2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/52(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; A23K 10/14(2016.01)i; A23K 10/16(2016.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/52(2006.01); A23J 3/34(2006.01); A23K 1/16(2006.01); C12N 15/00(2006.01); C12N 9/48(2006.01); C12P 21/06(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세린 프로테아제(serine protease), 치환(substitution), 아미노산(amino acid), 서열(sequence), 상동성(identity)																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. WP_067965505.1, S1 family peptidase [Nocardiopsis trehalosi] 2020.04.17 전체 문헌</td> <td>1,3,4,6-8,11-15 2,5,9,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 9441215 B2 (NOVOZYMES A/S) 2016.09.13 전체 문헌</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 619177 B2 (NOVOZYMES A/S) 2020.04.14 전체 문헌</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 7618801 B2 (JONES, B. E. 등) 2009.11.17 전체 문헌</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 9801398 B2 (NOVOZYMES A/S) 2017.10.31 전체 문헌</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X A	NCBI, GenBank accession no. WP_067965505.1, S1 family peptidase [Nocardiopsis trehalosi] 2020.04.17 전체 문헌	1,3,4,6-8,11-15 2,5,9,10	A	US 9441215 B2 (NOVOZYMES A/S) 2016.09.13 전체 문헌	1-15	A	US 619177 B2 (NOVOZYMES A/S) 2020.04.14 전체 문헌	1-15	A	US 7618801 B2 (JONES, B. E. 등) 2009.11.17 전체 문헌	1-15	A	US 9801398 B2 (NOVOZYMES A/S) 2017.10.31 전체 문헌	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X A	NCBI, GenBank accession no. WP_067965505.1, S1 family peptidase [Nocardiopsis trehalosi] 2020.04.17 전체 문헌	1,3,4,6-8,11-15 2,5,9,10																		
A	US 9441215 B2 (NOVOZYMES A/S) 2016.09.13 전체 문헌	1-15																		
A	US 619177 B2 (NOVOZYMES A/S) 2020.04.14 전체 문헌	1-15																		
A	US 7618801 B2 (JONES, B. E. 등) 2009.11.17 전체 문헌	1-15																		
A	US 9801398 B2 (NOVOZYMES A/S) 2017.10.31 전체 문헌	1-15																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2022년06월15일(15.06.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년06월15일(15.06.2022)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373																		

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 9441215 B2	2016/09/13	AU 2014-214032 A1	2015/07/09
		CN 104968211 A	2015/10/07
		EP 2953481 A2	2015/12/16
		MX 2015010078 A	2016/01/25
		US 2015-0344860 A1	2015/12/03
		WO 2014-122161 A2	2014/08/14
		WO 2014-122161 A3	2014/11/20
US 619177 B2	2020/04/14	AU 2015-357195 A1	2017/05/25
		AU 2015-357195 B2	2019/06/13
		CA 2967538 A1	2016/06/09
		CN 107002111 A	2017/08/01
		EP 3227456 A1	2017/10/11
		NZ 731727 A	2019/12/20
		US 2019-0032102 A1	2019/01/31
		WO 2016-087427 A1	2016/06/09
US 7618801 B2	2009/11/17	BR PI0818800 A2	2014/10/14
		CA 2703842 A1	2009/05/07
		CN 101842480 A	2010/09/22
		CN 101842480 B	2013/07/10
		EP 2205730 A1	2010/07/14
		EP 2205730 B1	2014/12/17
		JP 2011-501961 A	2011/01/20
		JP 5256296 B2	2013/08/07
		KR 10-2010-0075983 A	2010/07/05
		MX 2010004371 A	2010/05/20
		RU 2010121929 A	2011/12/10
		RU 2486244 C2	2013/06/27
		US 2009-0111161 A1	2009/04/30
		US 2010-0095987 A1	2010/04/22
		US 2011-0081711 A1	2011/04/07
		US 7879788 B2	2011/02/01
		US 8076468 B2	2011/12/13
		WO 2009-058679 A1	2009/05/07
US 9801398 B2	2017/10/31	AU 2013-213601 A1	2014/07/24
		AU 2013-213601 B2	2017/12/14
		AU 2013-213601 B8	2018/01/18
		BR 112014017919 A2	2017/06/27
		CN 104350149 A	2015/02/11
		EP 2807254 A1	2014/12/03
		EP 2807254 B1	2017/08/02
		ES 2644007 T3	2017/11/27
		MX 2014008764 A	2014/08/27
		US 2014-0363538 A1	2014/12/11
		WO 2013-110766 A1	2013/08/01