



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0075830  
(43) 공개일자 2020년06월26일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 38/44</i> (2006.01)<br/> <i>A61P 43/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/74</i> (2006.01)<br/> <i>C12N 15/75</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>A61K 48/0058</i> (2013.01)<br/> <i>A61K 38/44</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7010551<br/>                 (22) 출원일자(국제) 2018년09월13일<br/>                 심사청구일자 없음<br/>                 (85) 번역문제출일자 2020년04월10일<br/>                 (86) 국제출원번호 PCT/US2018/050957<br/>                 (87) 국제공개번호 WO 2019/055707<br/>                 국제공개일자 2019년03월21일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>                 62/558,346 2017년09월13일 미국(US)<br/>                 16/048,147 2018년07월27일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 지바이오틱스 컴퍼니<br/>                 미국 94105 캘리포니아주 샌프란시스코 2번 스트리트 181</p> <p>(72) 발명자<br/>                 애보트 재커리<br/>                 미국 94030 캘리포니아주 밀브레 링컨 서클 480 아파트먼트 3</p> <p>(74) 대리인<br/>                 특허법인코리아나</p> |
|--|---|

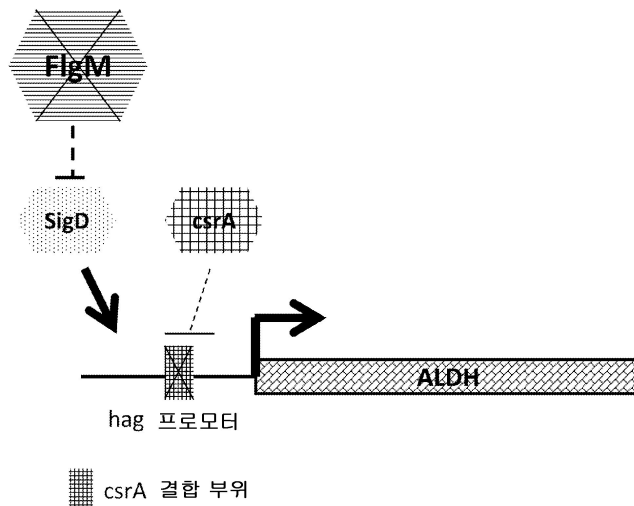
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 프로바이오틱 미생물에 대한 유전자 발현 시스템

(57) 요약

대상 폴리펩티드를 발현하는 재조합 미생물이 본원에 제공된다. 미생물은 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함할 수 있다. 플라겔린 프로모터 서열은 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 유전자 변형을 포함할 수 있다. 미생물은 또한 전사의 SigD 개시의 FlgM 억제를 감소시키는 유전자 변형을 포함할 수 있다. 표적 폴리펩티드는 알데히드 탈수소효소일 수 있다. 이러한 미생물은 알코올 숙취의 치료에 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61P 43/00* (2018.01)

*C12N 15/74* (2013.01)

*C12N 15/75* (2013.01)

*C12N 9/0008* (2013.01)

*C12Y 102/01003* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하도록 재조합 조작된 재조합 박테리아를 포함하는 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체의 소화관에 투여하는 것을 포함하는, 알코올 숙취의 예방 또는 치료 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 재조합 박테리아가 하기를 포함하는 방법:

- 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함함; 및
- 시그마 인자 억제제의 유전자 변형, 여기서 변형은 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사의 시그마 인자 개시의 억제를 감소시킴.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 박테리아가 *바실러스 (Bacillus)*, *비피도박테리움 (Bifidobacterium)*, *엔테로코쿠스 (Enterococcus)*, *에스케리차 (Escherichia)*, *락토바실러스 (Lactobacillus)*, *류코노스톡 (Leuconostoc)*, *페디오코쿠스 (Pediococcus)* 및 *스트렙토코쿠스 (Streptococcus)* 로부터 선택된 속에 속하는 방법.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서, (1) 박테리아가 *바실러스* 속에 속하고, (2) 플라젤린 유전자 프로모터가 CsrA BS1 결합 부위 및/또는 CsrA BS2 결합 부위의 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 변형된 *바실러스 hag* 프로모터이고, (3) 시그마 인자가 SigD 이고, (4) SigD 억제자가 *FlgM* 인 방법.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서, *hag* 프로모터가 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제 4 항에 있어서, *hag* 프로모터가 CsrA BS1 인식 서열, AGGA 의 변형을 포함하는 방법.

#### 청구항 7

제 4 항에 있어서, *hag* 프로모터가 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT [SEQ ID NO:2] 를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제 4 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 지점 돌연변이를 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제 4 항에 있어서, *hag* 프로모터가 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제 4 항에 있어서, *hag* 프로모터가 BS2 결합 부위의 변형을 포함하고, 여기서 변형은 뉴클레오티드 서열 ATTTAGGGAGGAA [SEQ ID NO:3] 를 포함하는 방법.

**청구항 11**

제 1 항에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 박테리아 알데히드 탈수소효소인 방법.

**청구항 12**

제 4 항에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 (1) *쿠프리아비두스 네카토르* (*Cupriavidus necator*) 유래의 AcoD 및 (2) *대장균* 유래의 AldB 로부터 선택되는 방법.

**청구항 13**

제 4 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 *flgM* 유전자의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는 방법.

**청구항 14**

제 4 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 2 차 또는 3 차 구조를 파괴하는 방법.

**청구항 15**

제 4 항에 있어서, 발현 구축물이 박테리아 염색체에 위치하는 방법.

**청구항 16**

제 1 항에 있어서, 알코올 소모 동안 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제 1 항에 있어서, 알코올 소모 개시 전 24 시간까지 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제 1 항에 있어서, 조성물이 경구로 투여되는 방법.

**청구항 19**

제 1 항에 있어서, 조성물이 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 저항성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질, 물, 캡슐 충전제 및 구미 (gummy) 물질로부터 선택되는 생리학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 20**

제 1 항에 있어서, 조성물이 재조합 박테리아의 약  $10^4$  내지 약  $10^{12}$  콜로니 형성 단위를 포함하는 방법.

**청구항 21**

하기를 포함하는 재조합 미생물:

a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함함; 및

b) 전사의 SigD 개시의 억제제를 감소시키는 *flgM* 유전자의 유전자 변형.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서, 폴리펩티드를 구성적으로 발현하는 재조합 미생물.

**청구항 23**

제 21 항에 있어서, 미생물이 프로바이오틱인 재조합 미생물.

**청구항 24**

제 21 항에 있어서, 미생물이 *바실러스 (Bacillus)*, *비피도박테리움 (Bifidobacterium)*, *엔테로코쿠스 (Enterococcus)*, *에스케리차 콜라이 (Escherichia coli)*, *락토바실러스 (Lactobacillus)*, *류코노스톡 (Leuconostoc)*, *페디오코쿠스 (Pediococcus)* 및 *스트렙토코쿠스 (Streptococcus)* 로부터 선택된 속에 속하는 재조합 미생물.

**청구항 25**

제 21 항에 있어서, 미생물이 *바실러스* 속에 속하는 재조합 미생물.

**청구항 26**

제 21 항에 있어서, 미생물이 *B. 서브틸리스*인 재조합 미생물.

**청구항 27**

제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 플라젤린 유전자 프로모터가 *hag* 프로모터인 재조합 미생물.

**청구항 28**

제 27 항에 있어서, *hag* 프로모터가 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하며, 여기서 유전자 변형은 CsrA BS1 결합 부위 및/또는 CsrA BS2 결합 부위의 변형 (예를 들어, 뉴클레오티드 치환, 삽입 또는 결실) 을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 29**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS1 인식 서열, AGGA 에 대한, 예를 들어 서열 AGAA 로의 하나 또는 복수 (예를 들어, 2 개, 3 개 또는 4 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 30**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 31**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 BS1 결합 부위, gcacaaggacgt 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 32**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS1 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 재조합 미생물.

**청구항 33**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 예를 들어 1, 2, 3, 4 개 또는 그 이상의 수소 결합 쌍을 제거하기 위해 수소 결합에 관여하는 서열 taagggcacaaggacgtgcctta [SEQ ID NO: 1] 내에 하나 또는 복수의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 34**

제 28 항에 있어서, 변형된 BS1 이 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT [SEQ ID NO: 2] 을 갖는 재조합 미생물.

**청구항 35**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 지점 돌연변이를 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 36**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 13-염기-쌍 BS2 결합 부위 내에 또는 BS2 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 37**

제 28 항에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 재조합 미생물.

**청구항 38**

제 28 항에 있어서, 변형된 BS2 가 뉴클레오티드 서열 ATTAGGGAGGAA [SEQ ID NO: 3] 을 갖는 재조합 미생물.

**청구항 39**

제 28 항에 있어서, BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 유전자 변형이 Shine-Dalgarno 서열 agggagga 내의 뉴클레오티드의 변경을 포함하지 않는 재조합 미생물.

**청구항 40**

제 21 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서, 플라질린 유전자 프로모터가 박테리아 염색체 또는 플라스미드에 위치하는 재조합 미생물.

**청구항 41**

제 21 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상 폴리펩티드가 알데히드 탈수소효소인 재조합 미생물.

**청구항 42**

제 41 항에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 *큐프리아비두스 네카토르* (*Cupriavidus necator*) 유래의 AcoD 이고, 하기 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 미생물:

```
MNMAEIAQLGVSNPYKQYENYIGGAWVPPAGGEYFESTTTPITGKPFTRVPRSGQQDVDA
ALDAAHAAKAAWARTSTTERANILNRIADRIEANLKLKLLAVAESIDNGKPVRETTAADLPLAVD
HFRYFAGCIRAQEGGISEIDADTIAYHFHEPLGVVQIIPWNFPLLMATWKLAPALAAGNCVV
LKPAEQTPASILVLMVIGDLLPPGWNVINGFGLEAGKPLASSPRISKVAFTGETTTGRLIM
QYASQNLIPVTLELGGKSPNIFEDVLAADDAFFDKALEGFAMFALNQGEVCTCPSRALIQE
SIYDRFMERALKRVAAIRQGHPLDTGTMIGAQASAEQLEKILSYIDLGRKEGAQCLTGGERN
VLDGDLAGGYVVKPTVFAGHNKMRIFQEEIFGPVSVTTFKDEEEALAIANDTLYGLGAGV
WTRDGARAFRMGRGIQAGRVWTNICYHAYPAHAFAFGGYKQSGIGRENHRMMLDHYQQTK
NLLVSYSPNALGFF [SEQ ID NO: 4].
```

**청구항 43**

제 41 항에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 예를 들어, 하기 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 알데히드 탈수소효소인 재조합 미생물:

MLRAAARFGPRLGRLLSAAATQAVPAPNQPEVFCNQIFINNEWHDVSRKTFPTVNPS  
 TGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAARAAFQLGSPWRRMDASHRGRLNRLADLIERDRTYLA  
 ALETLDNGKPYVISYLVLDLDMVLKCLRRYAGWADKYHGKTIPIDGDFFSYTRHEPVGVCG  
 QIIPWNFPLLMQAWKLGALATGNVVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPPGVVNVPG  
 FGPTAGAAIASHEDVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLLELGGKSPNIIMSDADM  
 DWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVERSVARAKSRVVGPNPFDSKTEQG  
 P  
 QVDETQFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGP  
 VMQILKFKTIEEVGRANNSTYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVVWVNCYDVFQAQS  
 PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS [SEQ ID NO: 5].

**청구항 44**

제 21 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 *flgM* 유전자의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 45**

제 21 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 *flgM*의 활성 부위를 인코딩하는 서열 중의 단일 돌연변이 또는 일련의 돌연변이를 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 46**

제 21 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 FlgM 2 차 구조를 정의하는 나선 중 하나에서와 같은 2 차 또는 3 차 구조를 파괴하는 재조합 미생물.

**청구항 47**

제 21 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 예를 들어 B. 서브틸리스 FlgM의 I-58, K-62, I-65, G-68, D-73, A-78로부터 선택된, FlgM 단백질의 C-말단에서 3 번째 또는 4 번째 나선 중의 아미노산을 변경하는 것을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 48**

제 21 항에 있어서, *flgM* 유전자 내의 유전자 변형이 예를 들어 B. 서브틸리스 FlgM의 I-3, G-7, S-10, V-11, A-40, K-41, M43, I-58, L-61, K-62, I-65, Y-70, K-71, V-72, D-73, A-74, H-76, I-77, A-78, N-80, M-81, I-82, N-83, F-84, Y-85, 및 K-86 으로부터 선택된, SigD에 대한 FlgM 결합에 참여하는 것으로 예측되는 하나 이상의 아미노산을 변경하는 것을 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 49**

알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하는 재조합 프로바이오틱 미생물.

**청구항 50**

제 49 항에 있어서, 미생물이 하기를 포함하는 재조합 프로바이오틱 미생물:

- a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및
- b) SigD 발현의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자 내의 유전자 변형.

**청구항 51**

제 50 항에 있어서, 플라젤린 유전자 프로모터가 프로모터로부터 전사된 mRNA의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 재조합 프로바이오틱 미생물.

**청구항 52**

대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 여기서 플라겔린 유전자 프로모터는 플라겔린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 53**

제 21 항 또는 제 49 항의 재조합 미생물을 배양하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

**청구항 54**

제 53 항에 있어서, 폴리펩티드를 단리하는 것을 추가로 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

**청구항 55**

생리학적으로 허용가능한 담체 및 재조합 프로바이오틱 미생물을 포함하는 조성물로서, 여기서 재조합 프로바이오틱 미생물은 하기를 포함하는 조성물:

- a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및
- b) 전사의 SigD 개시의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자의 유전자 변형.

**청구항 56**

제 55 항에 있어서, 플라겔린 유전자 프로모터가 플라겔린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 조성물.

**청구항 57**

제 55 항에 있어서, 대상 폴리펩티드가 알데히드 탈수소효소인 조성물.

**청구항 58**

제 55 항에 있어서, 생리학적으로 허용가능한 담체가 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 저항성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질, 물, 캡슐 충전제 및 구미 (gummy) 물질로부터 선택되는 조성물.

**청구항 59**

재조합 프로바이오틱 미생물의 약  $10^4$  내지 약  $10^{12}$  콜로니 형성 단위를 포함하는 제 55 항의 조성물의 단위 용량.

**청구항 60**

분석물을 대사하는 효소를 구성적으로 발현하는 미생물을 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 소화관 내 또는 순환 내 분석물의 대사 방법.

**청구항 61**

하기를 포함하는 표적 화합물의 제조 방법:

- a) 제 1 항의 재조합 미생물을 포함하는 배양물을 분석물과 접촉시키는 단계, 여기서 대상 폴리펩티드는 분석물이 기질인 효소임, 및
- b) 미생물을 배양하는 단계, 여기서 효소는 분석물의 표적 화합물로의 전환을 촉매함.

**청구항 62**

제 61 항에 있어서, 효소가 아밀라제, 리파제 및 프로테아제로부터 선택되는 표적 화합물의 제조 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] **주정부 후원 연구에 관한 진술**
- [0002] 없음
- [0003] **관련 출원에 대한 상호 참조**
- [0004] 본 출원은 2017 년 9 월 13 일자로 출원된 미국 가출원 62/558,346 및 2018 년 7 월 27 일자로 출원된 미국 출원 16/048,147 의 우선권 날짜의 이점을 주장하며, 그 전체 내용은 모두 본원에 참고로 포함된다.
- [0005] **서열 목록**
- [0006] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 2018 년 6 월 21 일에 생성된 ASCII 카피의 이름은 1642-001-US\_SL.TXT 이며 크기는 29,323 바이트이다.

**배경 기술**

- [0007] **배경기술**
- [0008] 알코올을 소모할 때, 혈류에서 이를 제거하기 위한 주요 경로는 간에서 알코올 탈수소효소 효소를 통한 아세트알데히드로의 산화를 통한 것이다. 아세트알데히드는 이어서 아세트알데히드 탈수소효소 효소를 통해 간에서 아세테이트로 산화된다. 알코올이 대량으로 및/또는 빠른 속도로 소모되면, 강한 독성의 중간체 아세트알데히드가 축적되어 혈류로 다시 방출될 수 있으며, 그 결과 높은 용해도로 인해 이것은 신체 곳곳에서 작용할 수 있다. 아세트알데히드는 공지된 발암물질일 뿐만 아니라, 이의 독성 영향은 알코올 숙취로 인한 많은 영향의 잘 연구되고 문서화된 원인이다. 실제로, 아세트알데히드 제거는 숙취 증상을 감소시키는 것으로 입증되었다. PMID: 16554376 (PubMed ID). 반대로, 아세트알데히드를 아세테이트로 산화시키는 신체의 능력이 화학적으로 (예를 들어, 디술피람으로) 또는 유전적으로 (예를 들어, 동아시아 집단에서 공통적인 아세트알데히드 탈수소효소 유전자의 단일 뉴클레오티드 다형성) 억제될 때, 극도로 증폭된 숙취 증상이 경험된다.
- [0009] 숙취로 인한 영향을 줄이거나 제거하거나 방지하려는 몇 가지 이전의 시도가 있었다. 일부는 흡수된 에탄올의 양을 효소적으로 또는 다르게 감소시키거나 신체로부터 에탄올 제거 속도를 증가시키려고 시도하였다 (특히 공개 US2009-0060894A1). 그러나, 이러한 방법에는 적어도 2 가지 잠재적 함정이 있다: (1) 그들의 작용 방법은 소비자의 혈중 알코올 함량 자체에 영향을 미치며, 이는 바람직하지 않을 수 있다; 그리고 (2) 아세트알데히드로의 에탄올 대사의 가속화는 아세트알데히드에 대한 신체의 노출을 증가시키고 증상을 악화시킬 수 있고/있거나 단지 숙취 증상을 예방하는 것보다는 숙취 증상을 일찍 유도할 수 있다. 요컨대, 에탄올-중심 전략은 아세트알데히드 독성 문제를 직접 해결하지 못한다.
- [0010] 보다 직접적으로, 다른 그룹들은 아세트알데히드 자체를 다루려고 시도했다. 미국 특허 공개 2013-0089535A1 은 구강에서 효소 체제를 사용하였다. 알코올 소모가 타액에서 아세트알데히드 농도를 증가시킨다는 증거가 있지만, 구강에서 제거된 아세트알데히드가 알코올 숙취를 담당하는 전신 아세트알데히드 독성에 중대한 영향을 줄 것 같지 않다.
- [0011] Sprince, H., et al. (*Protective action of ascorbic acid and sulfur compounds against acetaldehyde toxicity: implications in alcoholism and smoking*. Agents Actions, 1975. 5(2): p. 164-73) 은 소분자를 사용하여 아세트알데히드에 결합하고 제거하는 것을 언급한다 [1].
- [0012] 미국 특허 공개 2015-0087702A1 은 소분자를 사용하여 인간 효소의 속도 또는 발현을 증가시켜 아세트알데히드를 제거하는 것을 언급한다.
- [0013] 다른 그룹은 바실러스 또는 다른 박테리아 편모 조절 영역에 기반하여 (미국 특허 7888064B2, 유럽 특허 EP2235045B1), 또는 구체적으로 *flgM* 및 CsrA 를 조작함으로써 (일본 특허 JP5881352B2) 발현 시스템을 개발했다.
- [0014] Liu, Y. et al. (“Heterologous Expression of Aldehyde Dehydrogenase in *Lactococcus lactis* for Acetaldehyde Detoxification at Low pH”, *Appl Biochem Biotechnol*. 8 August 2017) 은 낮은 pH 에서 아세트알데히드의 산화를 촉매하기 위해 알데히드 탈수소효소 유전자 (*istALDH*) 를 발현시키기 위해 NIsin 제어식 발현 (NICE) 시스템으로의 락토코커스 락티스의 적용을 언급한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0015] [도면의 간단한 설명]
- [0016] 본 명세서에 포함되고 본 명세서의 일부를 형성하는 첨부 도면은 예시적인 구현예를 도시하고, 상세한 설명과 함께, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이들 구현예 및 기타 명백한 다른 구현예를 제조 및 이용할 수 있게 하는 역할을 한다. 본 발명은 하기 도면과 관련하여 보다 구체적으로 설명될 것이다:
- [0017] **도 1** 은 알데히드 탈수소효소 AldB 또는 AcoD 의 유도가 아세트알데히드의 신속한 제거를 초래한다는 것을 보여 준다. 샘플을 37°C 에서 200 mM 아세트알데히드와 함께 30 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 여과하고, 1:10 으로 희석하고, 동결시켰다. 이어서 해동된 샘플을 HPLC 상에서 실행하고 표준 곡선과 비교하여 잔류 아세트알데히드 농도를 계산하고, 이들 값을 여기에 제시한다. "아세트알데히드 10 mM" 은 기계에 있는 동안 아세트알데히드의 확실적 손실이 없음을 보장하기 위해 HPLC 실행 시작시 실행된 다음 다시 HPLC 실행 종료시 실행된 10 mM 아세트알데히드 표준을 지칭한다.
- [0018] **도 2A 및 2B** 는 GFP 의 발현이 pHyspank 프로모터의 제어 하에서 보다 변형된 *hag* 프로모터의 제어 하에서 5-10 배 더 강함을 보여준다. (A) *바실러스 서브틸리스* 균주 PY79 의 동결 스톱 (음성 대조군; "2시" 위치의 왼쪽 플레이트), *lacI* 억제제가 제거된 pHyspank 프로모터 하에서 GFP 를 발현하는 *B. 서브틸리스* ("11시" 위치의 오른쪽 플레이트) 및 변형된 *hag* 프로모터 하에서 GFP 를 발현하는 *B. 서브틸리스* ("11시" 위치에 좌측 플레이트, 및 "2시" 위치에 우측 플레이트) 를 LB 상에 패치 (patch) 하고 밤새 성장시켰다. 녹색 형광은 청색 LED 플래쉬라이트 및 주황색 필터로 가시화되었다. (B) *lacI* 억제제가 제거된 pHyspank 프로모터 하에서 GFP 를 발현하는 *B. 서브틸리스*의 배양물 (차트에서 어두운 회색 하단 라인; (A) 에서 "11시" 위치의 오른쪽 플레이트), 및 변형된 *hag* 프로모터 하에서 GFP 를 발현하는 *B. 서브틸리스* (그래프에서 밝은 회색 상단 라인; (A) 에서 "11시" 위치의 왼쪽 플레이트) 를 7 시간 동안 LB 브로스에서 개별 콜로니로부터 성장시키고, 형광 및 OD<sub>600</sub> 관독값을 2.5 시간에서 시작하여 90 분마다 측정했다.
- [0019] **도 3** 은 LB 에서 4.5 시간 동안 성장하고, 8% SDS-PAGE 겔에서 쿠마시 염색에 의해 총 단백질에 대해 용해 및 평가된 배양물로부터의 펠렛화된 세포 중의 단백질의 존재에 의한 GFP, AcoD 및 AldB 의 발현을 보여준다. 라인 1 은 Bio-Rad 만화경 단백질 표준 래더 (ladder) 이다. 라인 2 및 3 은 pHyspank 프로모터 하에서 AldB 를 발현하는 *B. 서브틸리스*의 미유도된 및 유도된 배양물 (각각) 이다. 라인 4 및 5 는 pHyspank 프로모터 하에서 AcoD 를 발현하는 *B. 서브틸리스*의 미유도된 및 유도된 배양물 (각각) 이다. 라인 6 은 *flgM* 결실된 그러나 *hag* 는 여전히 손상되지 않은 *B. 서브틸리스*의 배양물이다 (이중 단백질 발현에 대한 음성 대조군). 라인 7 은 변형된 *hag* 프로모터 하에서 GFP 를 발현하는 *B. 서브틸리스*의 배양물이다 (화살표로 표시되는 관심의 단백질 밴드). 라인 8, 9 및 10 은 변형된 *hag* 프로모터 하에서 n-말단 6x-히스티딘-태그된 AcoD (SEQ ID NO: 22 로 기재된 "6x-히스티딘"), 미태그된 AcoD, 및 n-말단 6x-히스티딘-태그된 AldB (SEQ ID NO: 22 로 기재된 "6x-히스티딘") (각각; 화살표로 나타난 관심의 단백질 밴드) 를 발현하는 *B. 서브틸리스*의 배양물이다.
- [0020] **도 4** 는 *hag* 유전자에 대한 프로모터 구조를 보여준다 [SEQ ID NO: 7]. 도면에서 확인되는 것은 하기와 같다: 프로모터 출발 위치 (화살표 및 "-182" 로 표시됨), SigD RNA 폴리머라제 결합 부위 (밑줄로 표시되고 "-10" 및 "-35" 로 표시됨), 전사 출발 부위 (화살표 및 "+1" 로 표시됨), CsrA 결합 부위 1 및 2 (괄호로 표시되고 "CsrA BS1/2" 로 표시됨), 방법에서 논의된 바와 같이 CsrA 결합을 방지하기 위해 G-to-A 지점 돌연변이를 표적으로 하기 위한 잔기 ("g"로 동그라미쳐짐) 및 Shine-Dalgarno 서열 (박스로 표시됨). ATG (서열 중 대문자) 는 *hag* 단백질 또는 임의의 이중 폴리펩티드에 대한 출발 코돈이다.
- [0021] **도 5** 는 5'-UTR 을 포함하는 *hag* mRNA 의 예측된 2 차 구조 [SEQ ID NO: 21] 를 보여준다 (비엔나 대학의 RNA 폴드 소프트웨어에 의해 생성된 폴드 예측; 인용: Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuboeck R, Hofacker IL. The Vienna RNA Websuite. Nucleic Acids Res. 2008). (A) 폴딩된 구조. (B) 2 개의 CsrA 결합 부위를 함유하는 mRNA 영역의 확대도. CsrA 에 의해 인식되는 두 결합 부위에 대한 줄기-루프 2 차 구조의 루프 중의 "AGGA" 모티프는 굵은 검은색 선으로 테두리쳐있다. 2 차 구조는 2 개의 결합 부위가 인접해 있음을 분명히 알 수 있기 때문에 중요하다. 따라서, 이들 2 개의 부위의 근접성을 방지하는 방식으로 2 차 구조에 영향을 미치는 변형은 결합 부위 또는 "AGGA" 인식 서열 자체에 대한 변형과 잠재적으로 동등한 CsrA 결

합에 대한 유해한 영향을 미칠 수 있을 것이다.

[0022] 도 6 은 hag 프로모터로부터의 발현의 탈-억제를 위한 전략을 보여준다. FlgM 유전자의 녹-아웃 ("X") 은 SigD 활성의 FlgM 억제를 방지한다. SigD 는 hag 프로모터 및 작동가능하게 연결된 ALDH 유전자의 전사를 활성화시킨다 (굵은 화살표). hag 프로모터 상의 csrA 결합 부위의 돌연변이 ("X") 는 리보솜 결합의 억제 및 ALDH 유전자의 번역을 감소시킨다. 이는 ALDH 단백질의 강력한 발현 (굵은 화살표) 을 초래한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0023] 요약

[0024] 하나의 양상에서 본원에 개시된 것은: a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함함; 및 b) 전사의 SigD 개시의 억제를 감소시키는 flgM 유전자의 유전자 변형을 포함하는 제조함 미생물이다. 하나의 구현예에서, 제조함 미생물은 폴리펩티드를 구성적으로 발현한다. 또다른 구현예에서, 미생물은 프로바이오틱이다. 또다른 구현예에서, 미생물은 바실러스 (*Bacillus*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 엔테로코쿠스 (*Enterococcus*), 에스케리차 (*Escherichia*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 페디오코쿠스 (*Pediococcus*) 및 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*) 로부터 선택된 속에 속한다. 또다른 구현예에서, 미생물은 바실러스 속에 속한다. 또다른 구현예에서, 미생물은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)) 이다. 또다른 구현예에서, 플라젤린 유전자 프로모터는 hag 프로모터이다. 또다른 구현예에서, hag 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하며, 여기서 유전자 변형은 CsrA BS1 결합 부위 및/또는 CsrA BS2 결합 부위의 변형 (예를 들어, 뉴클레오티드 치환, 삽입 또는 결실) 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 CsrA BS1 인식 서열, AGGA 에 대한, 예를 들어 서열 AGAA 로의 하나 또는 복수 (예를 들어, 2 개, 3 개 또는 4 개) 의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 BS1 결합 부위, gcacaaggacgt (SEQ ID NO: 8) 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12 개) 의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS1 의 줄기 및 루프 구조를 파괴한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 예를 들어 1, 2, 3, 4 개 또는 그 이상의 수소 결합 쌍을 제거하기 위해 수소 결합에 관여하는 서열 taagggcacaaggacgtgcctta (SEQ ID NO: 1) 내에 하나 또는 복수의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 변형된 BS1 은 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT (SEQ ID NO: 2) 를 갖는다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 CsrA BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 지점 돌연변이를 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 13-염기-쌍 BS2 결합 부위 내에 또는 BS2 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 ATTCAGGGAGGAA (SEQ ID NO: 9) 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13 개) 의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 유전자 변형은 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴한다. 또다른 구현예에서, 변형된 BS2 는 뉴클레오티드 서열 ATTTAGGGAGGAA (SEQ ID NO: 3) 을 갖는다. 또다른 구현예에서, BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 유전자 변형은 Shine-Dalgarno 서열 agggagga 내에 뉴클레오티드의 변경을 포함하지 않는다. 또다른 구현예에서, 플라젤린 유전자 프로모터는 박테리아 염색체 또는 플라스미드에 위치한다. 또다른 구현예에서, 대상 폴리펩티드는 알데히드 탈수소효소이다. 또다른 구현예에서, 알데히드 탈수소효소는 큐프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*) 유래의 AcoD 이고, 하기 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다:

MNMAEIAQLGVSNPYKQQYENYIGGAWVPPAGGEYFESTTTPITGKPFTRVPRSGQQDVDA  
ALDAAHAAKAAWARTSTTERANILNRIADRIEANLKLVAESIDNGKPVRETTAADLPLAVD  
HFRYFAGCIRAQEGGISEIDADTIAYHFHEPLGVVQIIPWNFPLLMATWKLAPALAAGNCVW  
LKPAEQTPASILVLMVEVIGDLLPPGVVNVINGFGLGKPLASSPRISKVAFTGETTTGRLIM  
QYASQNLIPVTELEGGKSPNIFEDVLAADDAFFDKALEGFAMFALNQGEVCTCPSRALIQE  
SIYDRFMERALKRVAAIRQGHPLDTGTMIGAQASAEQLEKILSYIDLGRKEGAQCLTGGERN  
VLDGDLAGGYVVKPTVFAGHNKMRIFQEEIFGPVWSVTTFKDEEEALAIANDTLYGLGAGV  
WTRDGARAFRMGRGIQAGRVWTNCYHAYPAHAFAFGGYKQSGIGRENHRMMLDHYQQTK  
NLLVSYSPNALGFF [SEQ ID NO: 4].

[0025]

[0026]

또다른 구현예에서, 알데히드 탈수소효소는 예를 들어, 하기 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 알데히드 탈수소효소이다:

MLRAAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQQPEVFCNQIFINNEWHDVSRKTFPTVNPS  
TGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAARAAFQLGSPWRRMDASHRGRLLNRLADLIERDRTYLA  
ALETLDNGKPYVISYLVLDLDMVLKCLRYAGWADKYHGKTIPIDGFFSYTRHEPVGVCG  
QIIPWNFPLLMQAWKLGALATGNVVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPPGVVNIIVPG  
FGPTAGAAIASHEDVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTELEGGKSPNIIMSDADM  
DWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVERSVARAKSRVVGPNPFDKTEQGP  
QVDETQFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGP  
VMQILKFKTIEEWGRANNSTYGLAAAVFTKDLKANYLSQALQAGTVWVNCYDVFGAQS  
PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS [SEQ ID NO: 5].

[0027]

[0028]

또다른 구현예에서, *f1gM* 유전자 내의 유전자 변형은 *f1gM* 유전자의 전부 또는 일부의 결실을 포함한다. 또다른 구현예에서, *f1gM* 유전자 내의 유전자 변형은 *f1gM*의 활성 부위를 인코딩하는 서열 내에 단일 돌연변이 또는 일련의 돌연변이를 포함한다. 또다른 구현예에서, *f1gM* 유전자 내의 유전자 변형은 FlgM 2 차 구조를 정의하는 나선 중 하나에서와 같은 2 차 또는 3 차 구조를 파괴한다. 또다른 구현예에서, *f1gM* 유전자 내의 유전자 변형은 예를 들어 B. 서브틸리스 FlgM의 I-58, K-62, I-65, G-68, D-73, A-78로부터 선택된, FlgM 단백질의 C-말단에서 3 번째 또는 4 번째 나선 중의 아미노산을 변경하는 것을 포함한다. 또다른 구현예에서, *f1gM* 유전자 내의 유전자 변형은 예를 들어 B. 서브틸리스 FlgM의 I-3, G-7, S-10, V-11, A-40, K-41, M43, I-58, L-61, K-62, I-65, Y-70, K-71, V-72, D-73, A-74, H-76, I-77, A-78, N-80, M-81, I-82, N-83, F-84, Y-85, 및 K-86 으로부터 선택된, SigD에 대한 FlgM 결합에 참여하는 것으로 예측되는 하나 이상의 아미노산을 변경하는 것을 포함한다.

[0029]

또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하는 재조합 프로바이오틱 미생물이다. 하나의 구현예에서, 미생물은 a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 b) SigD 발현의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자 내의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 플라젤린 유전자 프로모터는 프로모터로부터 전사된 mRNA의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다.

[0030]

또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다.

[0031]

또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 본원에 개시된 바와 같은 재조합 미생물을 배양하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법이다. 하나의 구현예에서, 방법은 추가로 폴리펩티드의 단리를 포함한다.

[0032]

또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 생리학적으로 허용가능한 담체 및 재조합 프로바이오틱 미생물을 포함하는 조성물로서, 여기서 재조합 프로바이오틱 미생물은 하기를 포함한다: a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중

뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 b) 전사의 SigD 개시의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자의 유전자 변형. 하나의 구현예에서, 플라겔린 유전자 프로모터는 플라겔린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 대상 폴리펩티드는 알데히드 탈수소효소이다.

또다른 구현예에서, 생리학적으로 허용가능한 담체는 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 저항성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질, 물, 캡슐 충전제 및 구미 (gummy) 물질로부터 선택된다.

[0033] 또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 재조합 프로바이오틱 미생물의 약  $10^4$  내지 약  $10^{12}$  콜로니 형성 단위를 포함하는, 본원에 개시된 조성물의 단위 용량이다.

[0034] 또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하는 미생물을 포함하는 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 알코올 숙취의 예방 또는 치료 방법이다. 또다른 구현예에서, 조성물은 대상체가 알코올을 소모하기 전, 동안 또는 후에 투여된다.

[0035] 또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 분석물을 대사하는 효소를 구성적으로 발현하는 미생물을 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 소화관 내 또는 순환 내 분석물의 대사 방법이다.

[0036] 또다른 양상에서 본원에 개시된 것은 하기 단계를 포함하는 표적 화합물의 제조 방법이다: a) 본원에 개시된 대상 폴리펩티드를 발현하는 재조합 미생물을 포함하는 배양물을 분석물과 접촉시키는 단계, 여기서 대상 폴리펩티드는 분석물이 기질인 효소임, 및 b) 미생물을 배양하는 단계, 여기서 효소는 분석물의 표적 화합물로의 전환을 촉매함. 하나의 구현예에서, 효소는 아밀라제, 리파제 및 프로테아제로부터 선택된다.

[0037] **상세한 설명**

[0038] **I. 개요**

[0039] 본원에 개시된 것은 아세트알데히드 탈수소효소 효소를 구성적으로 발현하도록 유전자 조작된 미생물, 예를 들어 박테리아이다. 아세트알데히드 탈수소효소 (ALDH)는 박테리아 세포에서 내부적으로 발현되며 효소의 분비가 아니라 아세트알데히드가 박테리아 내로 확산됨으로써, 그의 기질인 아세트알데히드에 대한 접근성을 획득한다. 아세트알데히드는 가용성이 높은 분자이며 세포막을 가로질러 수동적으로 확산될 수 있다. 효소의 내부 위치는, 박테리아 세포의 내부가 낮은 pH, 방어 또는 영양 목적으로 유리 부유 단백질을 분해하기 위해 모색하는 적대적인 박테리아 및 진핵 세포, NAD와 같은 효소적 보조-인자에 대한 높은 경쟁 및 세포의 프로테아제를 특징으로 하는, 소화관 내강의 혹독하고 가변적인 환경으로부터 보호되기 때문에 분비에 비해 기능적 이점을 제공한다.

[0040] *B. 서브틸리스*의 편모 조절 기작은 ALDH의 구성적이고 강력한 발현을 달성하도록 적응되었다. *B. 서브틸리스*는 몇 가지 양성 및 음성 조절제가 수반되는 정교한 시스템으로 운동성을 조절한다 [2]. 이 시스템의 기본 전략은 *hag*라고 불리는, 고도로 발현된 플라겔린 유전자의 음성 조절제를 제거하는 것이다.

[0041] *B. 서브틸리스* 플라겔린의 편모 서브유닛을 암호화하는 유전자는 *hag*이고, 따라서 이것은 둘다 강력한 전사적 프로모터와 리보솜 결합 부위를 사용하여, 올바른 조건에서 단일 박테리아 중의 수십만 카피로 생산된다 [3, 4].

[0042] 전사는 시그마 인자 SigD에 의해 매개되는데, 이는 FlgM 단백질에 의해 억제된다 [5]. *flgM*의 결실은 SigD의 구성적 발현 및 활성을 크게 향상시키고, 결과적으로 편모 오펜론 및 구체적으로 *hag* 유전자의 더 높고 더 많은 구성적 전사를 산출한다.

[0043] *hag* 유전자의 번역은 CsrA라고 불리는 단백질에 의해 전사 후 결합되고 억제되는 매우 강력한 리보솜 결합 부위에 의해 가능하다 [6]. 그러나, CsrA 결합 부위 내의 단일 지점 돌연변이는 그의 결합을 제거하고 Hag 단백질의 구성적 번역을 초래한다 [7].

[0044] *flgM* 유전자의 결실 및 CsrA-결합 부위 내의 단일 지점 돌연변이의 제조의 조합을 사용하여, *B. 서브틸리스* 수명 주기 동안 매우 높은 수준의 Hag 단백질을 구성적으로 달성할 수 있다. 유사하게, *hag* 유전자가 관심의 단백질을 인코딩하는 이중 유전자로 대체되면, 그 유전자는 높은 수준에서 구성적으로 전사되고 번역될 수 있다. 따라서, *hag* 유전자를 ALDH를 인코딩하는 유전자로 대체함으로써, *hag* 프로모터의 *flgM* 유전자의 결실 및 CsrA 결합 부위 내의 단일 지점 돌연변이의 제조로, *B. 서브틸리스* 중의 ALDH의 강력하고 구성적인 발현

이 달성되었다.

- [0045] 따라서, 특정 구현예에서 본원에 제공되는 것은 *flgM* 결실과 조합된 CsrA 의 결합 부위 내의 지점 돌연변이를 포함하는 미생물이다. 이러한 두 돌연변이를 제조함으로써, SigD-기반 또는 플라겔린 프로모터 시스템의 유용성은 억제를 제거하고 구성적 발현을 제조함으로써 크게 증가된다. 이론에 의해 제한되기를 원치 않으면서, 이것은 CsrA 가 많은 박테리아 중에서 만능 조절제이고 [8], 그의 결실이 세포에 많은 다른 잠재적으로 바람직하지 않은 표현형 효과를 가질 수 있기 때문에 이것이 CsrA 의 단순한 결실과 구별되는 것으로 여겨진다. 결합 부위 내에서만 지점 돌연변이를 제조함으로써, 돌연변이는 그것이 가질수도 있는 임의의 다른 표적으로부터 CsrA 억제를 제거하기 보다는, *hag* 프로모터의 CsrA 억제를 구체적으로 독특하게 배제한다.
- [0046] 이 전략은 임의의 원하는 폴리펩티드의 구성적 발현에 유용하다. 여기에는 개인의 소화관에서 또는 산업 공정에서 표적 분자의 생산에서 표적 분석물을 대사하는 다른 효소가 포함된다.
- [0047] **II. 정의**
- [0048] 본원에 사용된 용어 "프로바이오틱 미생물" 또는 "프로바이오틱 박테리아" 는 유효량으로 투여될 때 숙주에 건강 또는 건강 상의 이점을 부여하는 미생물 또는 박테리아를 지칭한다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "제조합 미생물" 또는 "제조합 박테리아" 는 자연에서 서로 정상적으로 부착되지 않은 부착된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물 또는 박테리아를 지칭한다.
- [0050] 둘 이상의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열 사이의 서열 관계를 기술하기 위해 사용된 용어는 "참조 서열", "~로부터 선택된", "비교 윈도우", "동일한", "서열 동일성 백분율", "실질적으로 동일한", "상보적" 및 "실질적으로 상보적인" 을 포함한다.
- [0051] "참조 서열"은 서열 비교의 기초로 사용되는 정의된 서열이며, 더 큰 서열, 예를 들어 완전한 cDNA, 단백질 또는 유전자 서열의 서브세트일 수 있다.
- [0052] 2 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 각각 (1) 2 개의 폴리뉴클레오티드 간에 유사한 서열 (즉, 완전한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 오직 일부) 또는 (2) 2 개의 폴리뉴클레오티드 사이에서 분기되는 서열을 포함할 수 있기 때문에, 2 개 (또는 이상) 의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 간의 서열 비교는 전형적으로 "비교 윈도우" 에 대해 2 개의 폴리뉴클레오티드의 서열을 비교하여 서열 유사성의 국소 영역을 확인하고 비교함으로써 수행된다.
- [0053] "비교 윈도우" 는 참조 서열과 비교되는 전형적으로 적어도 12 개의 연속 뉴클레오티드 또는 4 개의 연속 아미노산 잔기의 개념적 세그먼트를 지칭한다. 비교 윈도우는 종종 적어도 15 개 또는 적어도 25 개의 뉴클레오티드 또는 적어도 5 개 또는 적어도 8 개의 아미노산의 길이를 갖는다. 비교 윈도우는 두 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열 (부가 또는 결실을 포함하지 않음) 과 비교하여 약 20% 이하의 부가 또는 결실 (즉, 갭) 을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하기 위한 최적의 서열 정렬은 알고리즘의 컴퓨터화된 구현 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA - Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) 에 의해 또는 검사에 의해 수행될 수 있고, 다양한 방법 중 하나에 의해 생성된 최상의 정렬 (즉, 비교 윈도우에 대해 가장 높은 상동성 백분율을 초래함) 이 선택된다.
- [0054] 대상 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열은 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 길이에 걸쳐 최대 상응성을 위해 정렬될 때 두 서열이 동일한 경우 기준 서열과 "동일" 하다.
- [0055] 두 서열 사이의 "서열 동일성 백분율" 은 비교 윈도우에 걸쳐 2 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산이 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 비교 윈도우 내의 총 위치 수 (즉, 윈도우 크기) 에 의해 매칭된 위치 수를 나누고, 결과에 100 을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다.
- [0056] 달리 지정하지 않는 한, 두 서열을 비교하는데 사용되는 비교 윈도우는 더 짧은 서열의 길이이다.
- [0057] 방법은 문헌 [Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; Higgins & Sharp (1988) Gene 73:237-244; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989); Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Research 16:10881-90; Huang et al. (1992) Computer Applications in the Biosciences 8:155-65; 및 Pearson et al. (1994) Methods in Molecular Biology 24:307-31] 에 추가로 기재되어 있다. 정렬은 또한 종종 검사 및 수동 정렬에 의해 수행된다.
- [0058] 대상 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열이 비교 윈도우에 걸쳐 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 경우, 대상

뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열은 참조 서열과 "실질적으로 동일"하다. 따라서, 참조 서열과 적어도 80% 서열 동일성, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열이 또한 "실질적으로 동일"하다. 서로 동일한 2 개의 서열은 물론, 또한 "실질적으로 동일"하다.

- [0059] 특정 구현예에서, 대상 폴리뉴클레오티드는 참조 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 하이브리드화된다. "~에 특이적으로 하이브리드화" 또는 "특이적 하이브리드화" 또는 "~에 선택적으로 하이브리드화" 는, 서열이 복합 혼합물 (예를 들어, 총 세포) DNA 또는 RNA 에 존재하는 경우 엄격한 조건 하에서 특정 뉴클레오티드 서열에 대한 핵산 분자의 우선적 결합, 이중화 또는 하이브리드화를 지칭한다.
- [0060] "엄격한 조건" 이라는 용어는 프로브가 그의 표적 서브서열에 우선적으로 하이브리드화되고 다른 서열에 대해서는 덜 또는 전혀 그렇지 않은 조건을 지칭한다. 서던 및 노던 하이브리드화와 같은 핵산 하이브리드화 실험의 맥락에서 "엄격한 하이브리드화" 및 "엄격한 하이브리드화 세척 조건" 은 서열 의존적이고, 상이한 환경 파라미터에 따라 상이하다. 핵산의 하이브리드화에 대한 집중적인 지침은 문헌 [Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York] 에서 발견된다.
- [0061] 일반적으로, 매우 엄격한 하이브리드화 및 세척 조건은 정의된 이온 강도 및 pH 에서 특정 서열에 대한 열 용점 ( $T_m$ ) 보다 약  $5^\circ\text{C}$  낮도록 선택된다.  $T_m$  은 표적 서열의 50% 가 완벽하게 매칭되는 프로브에 하이브리드화되는 온도 (정의된 이온 강도 및 pH 하에서) 이다. 매우 엄격한 조건은 특정 프로브에 대한  $T_m$  과 동일하게 선택된다.
- [0062] 서던 또는 노던 블롯에서 필터 상에 100 개 초과 상보적 잔기를 갖는 상보적 핵산의 하이브리드화를 위한 엄격한 하이브리드화 조건의 예는  $42^\circ\text{C}$  에서 1 mg 의 헤파린을 함유하는 50% 포르말린이고, 하이브리드화는 밤새 수행된다. 매우 엄격한 세척 조건의 예는  $72^\circ\text{C}$  에서 약 15 분 동안 0.15 M NaCl 이다. 엄격한 세척 조건의 예는  $65^\circ\text{C}$  에서 15 분 동안 0.2X SSC 세척이다 (SSC 완충액에 대한 설명은 Sambrook et al. 참조). 종종, 백그라운드 프로브 신호를 제거하기 위해 높은 엄격성 세척에 앞서 낮은 엄격성 세척이 우선한다. 예를 들어, 100 개 초과 뉴클레오티드의 이중체에 대한 예시적인 중간 엄격성 세척은 15 분 동안  $45^\circ\text{C}$  에서 1x SSC 이다. 예를 들어, 100 개 초과 뉴클레오티드의 이중체에 대한 예시적인 낮은 엄격성 세척은 15 분 동안  $40^\circ\text{C}$  에서 4-6x SSC 이다. 일반적으로, 특정 하이브리드화 어세이에서 관련없는 프로브에 대해 관찰된 것보다 2x (또는 그 이상) 의 신호 대 잡음 비는 특정 하이브리드화의 검출을 나타낸다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "전사 조절 서열"은 작동가능하게 연결된 제 2 뉴클레오티드 서열의 전사를 조절하는 제 1 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0064] "프로모터"는 DNA 에서 뉴클레오티드 서열의 RNA 전사체로의 전사를 촉진시키기에 적어도 충분한 전사 조절 서열이다. 프로모터로부터 전사된 전사체는 전형적으로 전사 시작 부위의 프로모터 다운스트림으로부터의 서열뿐만 아니라 mRNA 의 경우 아미노산 서열을 인코딩하는 다운스트림 서열을 포함한다. 프로모터는 전사 시작 부위의 바로 업스트림에서 예측가능한 위치로 인해 가장 특성화된 전사 조절 서열이다. 프로모터는 RNA 폴리머라제의 인식, 결합 및 전사 개시 활성을 조절하는 서열을 포함한다. 이들 서열은 시스 작용할 수 있거나 트랜스 작용 인자에 반응할 수 있다. 조절의 특성에 따라, 프로모터는 구성적이거나 조절될 수 있다. 이들은 종종 2 개의 분리된 분절: 코어 및 확장 프로모터 영역을 갖는 것으로 기술된다.
- [0065] 코어 프로모터는 RNA 폴리머라제 인식, 결합 및 전사 개시에 충분한 서열을 포함한다. 코어 프로모터는 전사 시작 부위, RNA 폴리머라제 결합 부위 및 다른 일반적인 전사 결합 부위를 포함하고, 사전-개시 복합체 형태 및 일반적인 전사 기작이 어셈블리되는 곳이다. 사전-개시 복합체는 일반적으로 전사 시작 부위 (TSS) 의 50 개 뉴클레오티드 (nt) 내에 있다.
- [0066] 코어 프로모터는 또한 mRNA 를 폴리펩티드로 번역하는데 필요한 리보솜 결합 부위에 대한 서열을 포함한다.
- [0067] 연장된 프로모터 영역은 소위 근접 프로모터를 포함하며, 이는 전사 시작 부위의 약 250 개 뉴클레오티드 업스트림으로 (즉,  $-250$  nt) 연장된다. 이것은 특정 전사 인자 결합 부위와 같은 주요 조절 요소를 포함한다. 많은 유전자가 추가 업스트림에 위치한 전사 조절 요소를 갖는 것으로 밝혀졌다. 특히, 유전자의 대부분의 전사 조절 요소를 포함하는 단편은 전사 시작 부위의 700 nt 까지 또는 그 이상의 업스트림까지 확장될 수 있다 (예를 들어, U.S. 2007-0161031 참조). 특정 유전자에서, 전사 조절 서열은 전사 시작 부위의 수천 개

의 뉴클레오티드 업스트림에서 발견되었다.

- [0068] 본원에 사용된 바와 같이, 뉴클레오티드 서열은 전사 조절 서열이 세포에서 뉴클레오티드 서열의 전사를 조절하도록 기능할 때 전사 조절 서열과 "작동가능하게 연결"된다. 이것은 폴리머라제와 프로모터 사이의 상호작용을 통해 뉴클레오티드 서열의 전사를 촉진하는 것을 포함한다.
- [0069] 본원에 사용된 바와 같이, 제 1 뉴클레오티드 서열이 사실상 제 2 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결되지 않은 경우, 제 1 뉴클레오티드 서열은 제 2 뉴클레오티드 서열에 "이중"이다. 연장에 의해, 폴리펩티드는 프로모터와 이중인 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 경우 발현 제어 서열에 대해 "이중"이다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "상동체" 는 정의된 것 이외의 또다른 속 또는 종으로부터의 임의의 자연 발생 유전자, 또는 거의 동일한 폴딩 및 기능을 갖는 단백질을 인코딩하는 동일한 균주 또는 종에서의 별개의 유전자를 지칭한다. 연구에 따르면, 미생물 사이에서 논의된 유전자 또는 단백질에 대해 적어도 30% 아미노산 동일성을 갖는 단백질이 그러한 특성을 갖는다는 것이 밝혀졌다 (인용: PMID 23352839). 또한, 용어 "상동체" 는 논의된 유전자 또는 단백질에 대해 30% 미만의 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하지만, 동료-검토된 과학 저널에서 상기 유전자 또는 단백질의 상동체로서 확인된 유전자로 확장되었다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "오르소로그" 는 논의된 것으로부터 또다른 속 또는 종에서 발생하는 임의의 상동체를 지칭한다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "과라로그" 는 종종 유전자 복제의 결과로, 논의된 것과 동일한 균주 또는 종에서 발생하는 임의의 상동체를 지칭한다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "대립유전자 변이체" 는 유전자의 자연 발생 변이를 지칭한다.
- [0074] 본원에 사용된 용어 "인공 변이체" 는 자연 기능을 유지하면서 자연 발생 유전자 또는 단백질에 대한 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 유전자 또는 단백질을 지칭한다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "돌연변이" 는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열 중의 변경을 지칭한다. 돌연변이는 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환 (단일 뉴클레오티드 치환은 "SNV" 또는 "지점 돌연변이" 로 지칭됨), 하나 이상의 뉴클레오티드 부가 또는 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 및 이들 뉴클레오티드 변경으로 인한 (있는 경우) 아미노산 서열 중의 변화를 포함할 수 있다.
- [0076] 본원에 사용된 바와 같이, 박테리아 균주의 "유도체" 는 그 균주의 임의의 유전적으로 구별되는 버전이다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "대상체" 는 개인과 관련하여 사용될 때 개별 동물, 예를 들어 인간을 지칭한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "요법", "치료", "치료적 중재" 및 "개선" 은 증상의 중증도를 감소시키는 임의의 활성을 지칭한다. "치료하다" 및 "예방하다" 라는 용어는 절대적인 용어로 의도되지 않는다. 치료 및 예방은 발병 지연, 증상 개선, 증상 중증도 완화, 환자 생존 개선, 생존 시간 또는 비율 증가 등을 의미할 수 있다. 치료 효과는 치료를 받지 않은 개인 또는 개인의 집단 또는 치료 전 또는 치료 중 다른 시간대의 동일한 환자와 비교될 수 있다. 일부 양태에서, 질환의 중증도는 예를 들어 투여 전 개체 또는 치료를 받지 않는 대조군 개체와 비교하여 적어도 10% 감소된다. 일부 양태에서, 상태의 중증도는 적어도 25%, 50%, 75%, 80% 또는 90% 감소되거나, 일부 경우에는 표준 진단 기술을 사용하여 더 이상 검출될 수 없다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "프로바이오틱 조성물" 은 프로바이오틱 미생물 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 지칭한다. 전형적으로, 프로바이오틱 조성물은 그것이 투여되는 숙주 대상체에 건강 또는 건강 이점을 부여한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "생리적으로 허용가능한" 은 조성물의 다른 성분과 상용성이고 대상체에게 안전하게 투여될 수 있는 담체를 지칭한다. 프로바이오틱 조성물 및 이들의 제조 및 사용을 위한 기술은 본 개시 내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있다. 적합한 약리학적 조성물 및 이들의 투여 기술에 대한 상세한 목록은 교과서, 예컨대 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985; Brunton et al., "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," McGraw-Hill, 2005; University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," Lippincott Williams & Wilkins, 2005; and University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Principles of Pharmacy Practice," Lippincott Williams & Wilkins, 2008] 를 참조할 수 있다.
- [0081] 프로바이오틱 조성물은 액체 제형 또는 고체 제형일 수 있다. 프로바이오틱 조성물이 고체 제형인 경우, 이

는 정제, 흡인 정제, 추잉 정제, 추잉 검, 캡슐, 향낭, 분말, 과립, 코팅된 입자, 코팅된 정제, 장내코팅 정제, 장내코팅 캡슐, 용융 스트립 또는 필름으로서 제형화될 수 있다. 프로바이오틱 조성물이 액체 제형인 경우, 이는 경구 용액, 현탁액, 에멀전 또는 시럽으로서 제형화될 수 있다. 상기 조성물은 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 내성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 담체 물질을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0082] 본원에 사용되는 바와 같이, 프로바이오틱 조성물은 필요한 효과, 예를 들어 알코올 숙취의 치료 또는 예방이 달성되는 한, 식품 조성물, 식이 보충제, 기능성 식품, 의료 식품 또는 영양 제품으로서 제형화될 수 있다. 상기 식품 조성물은 음료, 요구르트, 주스, 아이스크림, 빵, 비스킷, 크래커, 시리얼, 건강 바, 스프레드, 구미 및 영양 제품으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 식품 조성물은 담체 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체 물질은 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 내성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0083] 용어 "유효량" 및 "유효 용량"은 장애 또는 상태를 개선시키는데 효과적인 작용제의 양을 지칭한다. 예를 들어, 주어진 파라미터에 대해, 유효량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 중 어느 하나, 또는 적어도 100%의 치료 효과의 증가 또는 감소를 나타낼 것이다. 효능은 또한 "~배" 증가 또는 감소로서 표현될 수 있다. 예를 들어, 유효량은 대조군에 대해 적어도 1.2 배, 1.5 배, 2 배, 5 배 또는 그 이상의 효과를 가질 수 있다.

[0084] 작용제의 유효량은 의도된 목표에 대해 결정된다. 용어 "단위 용량"은 대상체에 사용하기에 적합한 물리적 분리 단위를 지칭하며, 각 단위는 그의 투여와 관련하여 원하는 반응, 즉 적절한 경로 및 치료 요법을 생성하도록 계산된 소정량의 조성물을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 용량 둘 다에 따라 투여되는 양은 치료될 대상, 대상의 상태 및 원하는 보호에 따라 달라진다. 조성물의 정확한 양은 또한 실무자의 판단에 의존하며 각 개인에 따라 다르다.

[0085] 용어 "용량" 및 "투여량"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 용량은 각 투여에서 개체에게 제공되는 활성 성분의 양을 지칭한다. 본 발명의 경우, 용량은 박테리아의 수, 예를 들어 콜로니 형성 단위(CFU)의 양을 지칭할 수 있다. 투여량은 투여 빈도; 개체의 크기 및 내성; 상태의 심각성; 부작용 위험; 투여 경로를 포함하여 다수의 인자에 따라 달라질 것이다. 당업자는 상기 인자에 따라 또는 치료학적 진행에 기초하여 용량이 변경될 수 있음을 인식할 것이다. 용어 "투여량 형태"는 제약의 특정 형태를 지칭하며, 투여 경로에 의존한다. 예를 들어, 투여량은 액체, 예를 들어 구강 소비용 음료에 존재할 수 있다.

[0086] **III. 발현 구축물**

[0087] 플라젤린 프로모터로부터의 전사 억제 및 플라젤린 프로모터로부터의 mRNA 전사체의 번역 억제 중 하나 또는 둘 모두를 감소시키는 방법이 본원에서 고려된다.

[0088] 본원에 개시된 특정 폴리뉴클레오티드는 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열, 즉 발현되는 폴리펩티드와 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 전사 조절 서열, 예를 들어 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함한다. 특정 구현예에서, *hag* 프로모터는 *hag* 프로모터로부터의 mRNA의 전사 시, mRNA 번역의 CsrA 억제가 억제되는 식의 유전자 변형을 포함한다.

[0089] **A. 플라젤린 유전자 전사 조절 서열**

[0090] 많은 박테리아는 플라젤린 유전자 상동체를 갖는다. 유전자는 많은 이름으로 지어지며 그 중 일부 예는 다음과 같다: *B. 서브틸리스* 중의 *hag*; *대장균*, *바실러스 투린기엔시스*, 및 여러 *락토바실러스* 종 중의 *fliC*; 및 *레지오넬라* 종, *비브리오* 종, 및 *캠필로박터* 종 중의 *f1aA* 또는 *f1aB/C/D/E/F* 등.

[0091] 하나의 구현예에서, 플라젤린 유전자 프로모터는 *hag* 유전자 프로모터이다. 플라젤린 상동체는 *바실러스*, 예를 들어, *B. 서브틸리스* 중의 *hag* 이다. 또다른 구현예에서, 플라젤린 유전자 프로모터는 대상 단백질이 발현되는 미생물에 고유하다. 예를 들어, 이것은 발현 구축물이 박테리아 염색체에 위치하는 경우일 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 용어 "Hag" (또는 "*hag*" 또는 "*hag*")는 *B. 서브틸리스* 또는 동일하거나 다른 속, 종 또는 균주에 있는 임의의 상동체에서 "Hag"로 주석이 달린 단백질 (또는 이러한 단백질을 인코딩하는 유전자)을 지칭하고, 이는 편모를 어셈블리하는데 사용되는 "플라젤린"으로 더 일반적으로 알려진 구조적 서브유닛이다. 이것은 다른 속, 종 및 균주에서 여러 다른 이름으로 알려져 있다. 이것은 *B. 서브틸리스*에서 하기 서열에 의

해 정의된다:

atgagaattaaccacaatattgcagcgctaacacactgaaccgtttgtcttcaacaacagtgcgagcca  
 aaagaacatggagaaactttcttcaggctcttcgcatcaaccgtgcgggagatgacgcagcaggcttgcga  
 tctctgaaaaatgagaggacaaatcagaggtcttgaaatggcttctaaaactctcaagacggaatctct  
 cttatccaaacagctgaggggtgcattaactgaaactcatgcgatccttcaacgtgttcgtgagctagttgtca  
 agctggaacactggaactcaggacaaagcaactgattgcaatctattcaagatgaaatttcagctttaa  
 agatgaaatcgatggtatttcaaactgtacagaattcaatggtaagaattgctcgatggcacttacaagtt  
 gacacagctactcctgcaaatcaaaagaacttggtattccaaatcggagcaaatgctacacagcaaatctc  
 tgtaaatattgaggatattgggtgctgacgctcttggaaataaagaagctgatggttcaattgcagctcttcattc  
 agttaatgatcttgacgtaacaaaattcgcagataatgcagcagatactgctgatcgttgcggttcgatgctcaa  
 ttgaaagttggtgatgaagcgatcaaccaagtttcttcaacgtgctaagcttggtgcggtacaaaatcgtct  
 agagcacacaattaacaacttaagcgttctggtgaaaacttgacagctgctgagctcgtatccgtgacggt  
 gacatggctaaagagatgagcgaattcacaagaacaacattcttctcaggcttctcaagctatgcttgcct  
 aagcaaaccaacagccgcaaaacgtacttcaattattacgtaa [SEQ ID NO: 6].

[0093]

[0094]

본원에 사용된 용어 "*hag* 프로모터" 는 *바실러스* 속으로부터의 자연 발생 플라젤린 유전자 프로모터 동족체 및 그와 실질적으로 동일하거나 그에 특이적으로 하이브리드화되는 서열을 갖는 프로모터를 지칭한다. *B. 서브틸리스*에서, *hag* 프로모터는 *hag* 유전자의 시작 코돈의 273 염기-쌍 서열 5' 에 포함된다. 이것은 하기 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

ggaattgacgccccaaagcatattgatattcacaggaagaaatttacttgaccattcaggaagaaaataa  
 ccgtgcagcagcgttatccagcgtatgtgatctccgcattatcctcacaataaagtgaggattttttattttt  
**tattaa**caaaatcagagacaat**ccgatattaatgatgtagccgggaggaggcg**caaaagactcagc  
**cagttacaaaataagggcacaaggacgtg**ccttaacaacat**ttcaggagggaacaaaaca**ATG

[0095]

[0096]

[SEQ ID NO: 7] (여기서, "ATG" 는 *hag* 의 시작 코돈을 나타낸다). 시작 코돈 ATG 를 통해 TTAA (밑줄로 표시) 로 시작하는 볼드체 서열이 유전자 발현을 촉진하기에 충분할 것으로 예상된다.

[0097]

특히, *hag* 프로모터는 -35 SigD RNA 폴리머라제 결합 부위인 "ttaa" 서열 (밑줄로 표시됨) 및 -10 SigD RNA 폴리머라제 결합 부위인 "tccgatat"서열 (밑줄로 표시됨) 으로 정의된 SigD 인식 서열을 함유한다. 게다가, *hag* 는 서열 "gcacaaggacgt" [SEQ ID NO: 8] (고-친화성 결합 부위 1, 또는 "BS1") (밑줄로 표시됨) 및 "attcaggaggaa" [SEQ ID NO: 9] (저-친화성 결합 부위 2, 또는 "BS2") 에 의해 정의된 2 개의 CsrA 결합 부위를 갖는다. *hag* 프로모터는 또한 Shine-Dalgarno 서열 "agggagga"에 의해 정의된다. *hag* 프로모터의 전체 구조는 도 4 에 도시되어 있다.

[0098]

본원에 사용된 용어 "CsrA" ("탄소 저장 조절제 A") 는 *B. 서브틸리스* - 또는 또다른 속 또는 종의 임의의 상동체 또는 오르소로그, 또는 동일한 종의 파라로그에서 "CsrA" 로 주석이 달린 단백질 (또는 이러한 단백질을 인코딩하는 유전자) 을 지칭한다. CsrA 는 일부 종에서 상동적으로 RsmA 로서 지칭된다. CsrA 단백질은 루프 내에 공통 서열 AGGA 를 갖는 줄기-루프 RNA 모티프에 결합하여, 공통 서열을 포함하는 mRNA 에 도입된 뉴클레오티드 서열의 폴리펩티드로의 번역을 억제한다. CsrA 는 RNA 에 결합하여 번역을 방지함으로써 직접적으로 또는 다르게는 편모 발현을 조절하는 단백질을 인코딩하는 또다른 RNA 에 결합함으로써 간접적으로 *hag* 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 발현을 억제할 수 있다. CsrA 는 *B. 서브틸리스*에서 하기 서열에 의해 정의된다:

atgctagttttatcgcggaataaacaagcgaagcattcaaataggtgctgatattgaagtaaaagtgattgcg  
 gttgaaggggatcaagtgaagcttgaattgacgccccaaagcatattgatattcacaggaagaaattta  
 cttgaccattcaggaagaaaataaccgtgcagcagcgttatccagcgtatgtgatctccgcattatcctcaca  
 aaaaaagtga [SEQ ID NO: 10].

[0099]

[0100]

특정 구현예에서, 본 개시의 발현 구축물은 프로모터로부터 전사체, 예컨대 mRNA 로의 전사 시 mRNA 번역의 CsrA 억제를 억제하는 플라젤린 유전자 프로모터 내의 유전자 변형을 포함한다. 본 발명은 이러한 결과를 달성하기 위해 플라젤린 유전자 프로모터, 및 특히 *hag* 프로모터에 대한 몇몇 유전자 변형을 고려한다. 일

부 구현예에서, 번역의 CsrA 억제제를 억제하기 위해 hag 에 대한 유전자 변형은 BS1 또는 BS2 중 하나 또는 둘 다에서 줄기 및 루프 구조의 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실이다.

[0101] 유전자 변형은 CsrA BS1 결합 부위에 결합하기 위한 하나 이상의 지점 돌연변이일 수 있다. BS1 은 CsrA 인식 서열, AGGA 내의 하나 또는 복수 (예를 들어, 2 개, 3 개 또는 4 개) 의 뉴클레오티드를 변경함으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, BS1 의 AGGA 결합 모티프는 AGAA 로 변형될 수 있다. 대안적으로, 유전자 변형은 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이것은 예를 들어, BS1 결합 부위, gcacaaggacgt (SEQ ID NO: 8) 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12 개) 의 뉴클레오티드의 변형을 포함한다. 대안적으로, 유전자 변형은 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS1 의 줄기 및 루프 구조를 파괴할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 1, 2, 3, 4 개 또는 그 이상의 수소 결합 쌍을 제거하기 위해 수소 결합에 관련된 서열 **taagggcacaaggacgtgcctta** [SEQ ID NO: 1] 내에 하나 또는 복수의 돌연변이로 만들어질 수 있다. 하나의 구현예에서, 변형된 BS1 은 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT [SEQ ID NO: 2] 을 갖는다.

[0102] 유전자 변형은 CsrA BS2 결합 부위에 결합하기 위한 하나 이상의 지점 돌연변이일 수 있다. 이것은 13-염기-쌍 BS2 결합 부위 내에 또는 BS2 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13 개) 의 돌연변이를 포함한다. 이것은 또한 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 유전자 변형을 포함한다. 예를 들어, 변형된 BS2 는 뉴클레오티드 서열 ATTTAGGGAGGAA [SEQ ID NO: 3] 을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 변형은 Shine-Dalgarno 서열 agggagga 내의 뉴클레오티드의 변형을 포함하지 않는다.

[0103] 유전자 변형은 CsrA 결합을 억제하면서, mRNA 가 리보솜 결합 활성을 유지하고 번역을 허용하도록 선택됨을 인식할 것이다.

[0104] 이종 뉴클레오티드 서열은 플라겔린 프로모터와 이종성이다. 즉, 이것은 정상적으로 자연에서는 hag 프로모터의 제어 하에 있고, 전형적으로 그의 발현이 플라겔린 프로모터의 제어 하에 있지 않은 폴리펩티드를 인코딩하는 서열이다. 대상 폴리펩티드는 발현되기를 원하는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드는 알데히드 탈수소효소이다.

[0105] **B. 대상 폴리펩티드**

[0106] 이종 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 플라겔린 프로모터와 작동가능한 연결 하에 있을 수 있다. 예를 들어, 이종 뉴클레오티드 서열은 박테리아 염색체에 통합될 수 있다. 대안적으로, 이종 뉴클레오티드 서열은 미생물 내로 도입되는 플라스미드 중의 플라겔린 프로모터에 부착될 수 있다. 이종 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 PMID: 4994568 에 기재된 바와 같은 상동 재조합에 의한 hag 프로모터에 표적할 수 있다. 또다른 유용한 방법은 트랜스포존 기술을 수반한다. 트랜스포존은 염색체 중의 특정 서열에 표적할 수 있고 거기에 뉴클레오티드 서열을 삽입하고 부착할 수 있다. 트랜스포존 통합을 위한 재료는 예를 들어, Lucigen (Middleton, WI) 에서 이용가능하며, 이는 EZ-Tn5 트랜스포사제로 상품화되어 있다.

[0107] 발현의 대상이 되는 폴리펩티드 ("대상 폴리펩티드") 는 원하는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 다량의 폴리펩티드를 수득하려는 목적으로 구성적으로 발현되도록 요망되는 것들일 수 있다. 폴리펩티드는 생물학적 약물, 식품 단백질, 예컨대 알부민, 또는 생화학적 경로 중의 효소, 예컨대 알파-갈락토시다아제 A 일 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드는 동물의 소화관에서 발견될 것 같은 분석물을 대사하는 효소이다. 이러한 분석물은 섭취를 통해, 마이크로비옴에 의한 생성을 통해, 대상에 의한 생성을 통해, 또는 소화관의 막을 가로지르는 확산 또는 능동 수송을 통해 발견될 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 예를 들어, 디펩티딜 펩티다제 IV 와 같은 펩티다제; 및 인간 췌장 리파제와 같은 리파제를 포함한다.

[0108] 하나의 구현예에서, 폴리펩티드는 알데히드 탈수소효소이다. 본원에 사용된 용어 "알데히드 탈수소효소" 또는 "ALDH" 는 아세트알데히드를 기질로서 사용하고 이를 별개의 생성물로 촉매화하는 것으로 알려져 있거나 예측된 임의의 효소를 지칭한다. 가장 일반적으로 이것은 그 작용이 알데히드의 산화를 촉매화시키는 것으로 알려져 있거나 예측되는 효소이다. 일반적으로, 이는 보조 인자로서 NAD(P) 를 사용하여 알데히드의 카르복

실산으로의 산화를 촉매화하는 분류 EC 1.2.1.- 의 효소를 지칭한다. 여기에는 아세트알데히드를 아세테이트/아세트산으로 산화시키는 효소 (예를 들어, EC 1.2.1.3, 1.2.1.4 및 1.2.1.5) 및 코엔자임 A 를 아세틸-코엔자임 A 로 변환하는 아세틸화 효소 (예를 들어, EC 1.2.1.10) 가 포함된다. 또한 퀴논을 사용하는 효소 (예를 들어, 분류 EC 1.2.5.- 의 것), 또는 다른 미지의 수용체를 사용하는 효소 (예를 들어, 분류 EC 1.2.99.- 의 것) 를 포함하여, 다른 정의된 수용체를 사용하는 효소를 지칭한다.

[0109] 특정 구현예에서, 알데히드 탈수소효소는 인간 알데히드 탈수소효소 (예를 들어, ALDH2) 또는 비-인간 알데히드 탈수소효소 (예를 들어, AcoD 또는 AldB) 이다. 알데히드 탈수소효소는 박테리아 알데히드 탈수소효소일 수 있고, 이것이 발현되는 미생물은 박테리아이다. 알데히드 탈수소효소는 유전자가 발현되는 미생물에 고유할 수 있다.

[0110] 대상 폴리펩티드는 본원에 기술된 플라젤린 프로모터의 전사 조절 제어 하에 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 위치시킴으로써 발현된다. 많은 유전자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 NCBI, uniprot, KEGG, BRENDA 등과 같은 공개 이용가능한 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 이들 폴리펩티드의 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 분자 생물학 분야에 잘 알려진 방법에 의해 프로모터에 연결될 수 있다. 하나의 구현예에서, 대상 폴리펩티드는 lacZ 가 아니다.

[0111] **IV. 시그마 인자의 억제자의 파괴**

[0112] SigD 및 이의 상동체와 같은 시그마 인자는 플라젤린 합성을 개시한다. FlgM 및 이의 상동체는 시그마 인자 활성의 억제체로서 기능한다. 본 개시는 FlgM 과 같은 시그마 인자 억제체의 파괴에 의한 시그마 인자 활성의 탈-억제를 제공한다.

[0113] 본원에 사용된 용어 "FlgM" 은 전사를 위해 후기 편모 유전자로 RNA 폴리머라제를 동원하는 것을 담당하는 시그마 인자를 억제하는, *B. 서브틸리스*, 또는 또다른 속 또는 종의 임의의 상동체에서 "FlgM" 으로 주석이 달린 단백질 (또는 이러한 단백질을 인코딩하는 유전자) 을 지칭한다. 이 억제된 시그마 인자를 *B. 서브틸리스*에서는 SigD, *대장균*에서는 FliA 또는 상기 시그마 인자가 상동성을 갖는 다른 속 및 종에서의 시그마 28 과 같은 잠재적으로 다른 명칭으로 불린다. FlgM 은 *B. 서브틸리스*에서 하기의 서열에 의해 정의된다:

[0114] atgaaatcaatcaattggaacacaatccgtaatccatatcaaaaaattatgataagcaagcgggtgca  
aaaaactgttgcaaacctcaagataaaattgaaatttcacacaggctaagaaatgcaacatgcatcgg

[0115] acgcagtcactggttcacgacaggaaaaattgcgacagcttaagcgcgaaattgaaaacgggtcataca  
aagtagacgcaaatcatattgcgaaaaatgatgataattttataaaaagcaataa [SEQ ID NO: 11].

[0116] 본원에 사용된 용어 "SigD" 는 무엇보다도, 전사를 위해 후기 편모 유전자에 RNA 폴리머라제를 동원하는 것을 담당하는 *B. 서브틸리스*에서 시그마 인자 (또는 이를 인코딩하는 유전자) 를 지칭한다. "SigD" 는 또한 다른 종에서 상동체, 예컨대 *대장균*에서의 FliA, 또는 몇몇 종에서 시그마-28 의 더 넓은 표기를 지칭한다. SigD 는 *B. 서브틸리스*에서 하기의 서열에 의해 정의된다:

[0117] atgcaatcctgaattgaagatcaggtgctttggacgctggaaagagtggaagatcctaaagccgg  
tgacgacttaatgcgccgttacatgcccgtgtcacatcatgtaggcagaattctgtcggactgccgaaat  
cagtgcataaagacgatcttatgagccttggtatgcttggtttatgatgcccgtgaaaaattgaccccagc  
cgggacttaaaattgatacctacgctcgtttagaattcgcgcgcaatcatagacgggcttcgtaagaa  
gattggctgccagaacctcgcgcgaaaaaacaaaaagggtgaagcagcaattgaaaagcttgaaca  
gcggtatctcggaatgtatgcccgcggaaattgcagaggaactcggaaatgacggtacaggatgctgtgt  
caacaatgaatgaaggtttttgcaaatctgctgtcaattgatgaaaagctccatgatcaagatgacgggg  
aaaacattcaagtcagatgacagagatgacaaaaatggtccgctgaagaaaagattatgaaggatgaact  
gattgcacagcttgcgaaaaaattcacgaactctgaaaaagaacagctggttgcagttgttctacaa  
agaggagttgacactgacagaaatcggacaagtattaaatcttctacgtcccgcataatctcagatccattca  
aaggcattatttaaaatgaagaatctgctggaaaaagtgatacaataa [SEQ ID NO: 12].

[0118] FlgM 은 몇몇 잔기를 통해 SigD 에 결합하며, 대부분은 FlgM 단백질의 C-말단에서 4 번째 나선에 위치한다. 불활성화에 대한 표적은 *B. 서브틸리스* FlgM 의 I-58, K-62, I-65, G-68, D-73, A-78 에 상응하는 제 3 및 제 4 나선에서 고도로 보존된 잔기의 돌연변이일 것이다. 보다 광범위하게, SigD 에 대한 결합에 직접 관여되

는 26 개의 잔기 중 하나 또는 조합 (PMID: 15068809 에서 확인됨) 을 돌연변이시켜 활성이 감소되거나 무효화 되는 단백질을 잠재적으로 생성할 수 있다. 대안적으로, 2 차 또는 3 차 구조 -- 특히 2 차 구조를 정의하는 4 개의 나선 -- 를 파괴한 임의의 돌연변이 또는 돌연변이 조합은 SigD 를 억제하는 FlgM 의 능력을 잠재적으로 성공적으로 감소시키거나 약화시킬 수 있다.

[0119] 일부 구현예에서, 재조합 미생물은 FlgM 이 SigD 활성을 억제하는 능력을 감소시키는 유전자 변형을 포함한다. 특히, 하나의 이러한 유전자 변형은 생물학적 활성을 감소시키거나 제거하기 위한 FlgM 유전자의 부분적 또는 완전한 결실이다. 부분 결실은 단백질의 C-말단의 적어도 25% 를 인코딩하는 유전자의 일부의 결실을 포함할 수 있다.

[0120] 다른 유전자 변형은 예를 들어, 비활성 FlgM 단백질을 생성하는 프레임시프트 돌연변이, 또는 FlgM 프로모터의 파괴를 포함한다. 대안적으로, FlgM 은 이것을 기능적으로 비활성화시키거나 SigD 에 결합하거나 다르게는 억제하는 이것의 능력을 억제하는 지점 돌연변이에 의해 비활성화될 수 있다. 간접적으로, FlgM 은 ComK 또는 DegU 와 같은 활성화제에 민감하지 않게 하거나, 또는 억제제, 예컨대 ScoC 또는 프로테아제 Epr 및 Wpr 에 지나치게 민감하게 함으로써 파괴될 수 있다.

[0121] **V. 재조합 미생물**

[0122] 본원에서 사용하기 위해 고려되는 재조합 미생물은 발현을 위한 대상 폴리뉴클레오티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터 (플라젤린 유전자 프로모터는 유전자 변형되어 CsrA 번역 억제를 감소시킴); 및 임의로, SigD 발현의 억제를 감소시키기 위해 유전자 변형된 FlgM 유전자를 포함하는 발현 구축물을 적어도 포함하는 발현 시스템을 포함한다.

[0123] 재조합 미생물은 전형적으로 동물, 예를 들어 인간에 의한 섭취에 안전한 프로바이오틱 미생물이다. 프로바이오틱 미생물에는 제한 없이, *바실러스 (Bacillus)*, *비피도박테리움 (Bifidobacterium)*, *엔테로코쿠스 (Enterococcus)*, *에스케리치아 콜라이 (Escherichia coli)*, *락토바실러스 (Lactobacillus)*, *류코노스토크 (Leuconostoc)*, *페디오코쿠스 (Pediococcus)* 및 *스트렙토코쿠스 (Streptococcus)* 가 포함된다. 특히, 본 발명은 바실러스 속의 박테리아, 보다 특히 *B. 서브틸리스*의 사용을 고려한다. 미생물은, 예를 들어, ATCC (American Type Culture Collection) 또는 BGSC (Bacillus Genetic Stock Center) 를 포함하는 임의의 전형적인 공급원으로부터 얻을 수 있다.

[0124] 특정 구현예에서, 미생물은 진핵생물이 아니다. 예를 들어, 미생물은 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 와 같은 알코올 음료의 발효에 사용되는 진핵생물이 아니다.

[0125] **VI. 프로바이오틱 조성물**

[0126] 본원에는 또한 프로바이오틱 미생물을 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체에 본원에 제공된 바와 같은 재조합 미생물을 포함한다.

[0127] 특정 구현예에서, 프로바이오틱 조성물은 단위 용량으로 제공된다. 단위 용량은 전형적으로 적합한 담체에서 미생물의  $10^4$  내지  $10^{12}$  콜로니 형성 단위를 가질 것이다. 여기에는 본원에 기재된 임의의 유효 용량이 포함된다. 용량의 총 부피는 약 0.05 mL 내지 500 mL, 예를 들어 약 0.5 mL 내지 약 50 mL 또는 약 2.5 mL 내지 15 mL 일 수 있다.

[0128] **VII. 사용 방법**

[0129] 표적 분석물을 대사하고/하거나 숙주에 건강 또는 건강 이점을 제공하기 위해 재조합 미생물 및 프로바이오틱 조성물을 사용하는 방법이 또한 본원에 제공된다.

[0130] 숙주는 모든 동물이 될 수 있다. 이는 예를 들어 포유동물, 예를 들어 영장류, 예를 들어 인간을 포함한다. 포유류는 임의의 강, 예컨대, 우제목 (artiodactyla), 식육목 (carnivora), 고래목 (cetacean), 익수목 (chiroptera), 피익목 (dermoptera), 빈치목 (edentata), 바위너구리과 (hyracoidae), 식충목 (insectivore), 토류목 (lagomorpha), 유대목 (marsupialia), 단공목 (monotremata), 기제목 (perissodactyla), 유제목 (ungulate), 유린목 (pholidata) 및 기각류 (pinnipedia) 에 속할 수 있다.

[0131] 숙주는 의도된 결과를 생성하기에 효과적인 양으로 본 개시의 프로바이오틱 조성물을 섭취할 수 있다. 의도된 결과는 숙주의 소화관 내의 표적 분석물의 대사일 수 있다. 이 경우, 대상 폴리펩티드는 분석물을 프로세싱하는 효소일 수 있다. 특히, 본 발명은 알코올 숙취의 원인인 에탄올 대사 생성물인 아세트알데히드의

대사를 고려한다.

- [0132] 본원에 사용된 용어 "알코올 숙취" 는 알코올 소비에 의해 발생하고 탈수, 빈약한 수면, 비틀거림, 구역질, 구토, 두통, 불쾌감, 구강 건조, 빛 및 소리에 대한 민감성, 발한, 근육통, 설사, 복통, 위장 장애, 현기증, 불안, 우울증, 과민성 및 체내의 높은 아세트알데히드 농도 중 하나 이상을 특징으로 하는 상태를 지칭한다.
- [0133] 알코올 숙취의 예방 또는 치료, 예를 들어 완화는 알코올 섭취 전, 동안 또는 후에 대상체에게 본 발명의 프로바이오틱 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 조성물은 알코올 섭취 시작 24 시간, 18 시간, 12 시간, 11 시간, 10 시간, 9 시간, 8 시간, 7 시간, 6 시간, 5 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간 또는 1 시간 전 임의의 시간까지 섭취될 수 있다. 프로바이오틱 조성물은 알코올 소비 동안 투여될 수 있다. 프로바이오틱 조성물은 알코올 소모 12 시간, 11 시간, 10 시간, 9 시간, 8 시간, 7 시간, 6 시간, 5 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간 또는 1 시간 후 임의의 시간까지 또는 대상이 알코올 숙취 증상으로 고생하는 임의의 시간에 투여될 수 있다.
- [0134] 조성물은 경구 소모에 의해 또는 항문을 통해, 개체의 소화관 (예를 들어, 위 또는 내장) 에 투여될 수 있다. 비-생존보다는 생존 미생물이 개체에게 투여될 수 있다. 미생물은 알코올 음료와 상이한 조성물로 제공될 수 있으며, 즉 알코올 음료와 별도로 섭취될 수 있다. 이는 예를 들어, 조성물이 알코올의 소모 전에 투여되는 경우일 수 있다.
- [0135] 프로바이오틱의 유효량은 알코올 숙취 증상의 정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 재조합 박테리아의 투여량은 대상체의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적인 의학 상태 및 이전의 병력과 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 특정 구현예에서, 박테리아를 미생물의 약  $10^4$  내지 약  $10^{12}$  CFU,  $10^5$  내지  $10^{11}$  CFU,  $10^6$  내지  $10^{10}$  CFU,  $10^8$  내지  $10^{10}$  CFU 또는  $10^8$  내지  $10^{12}$  CFU ( "콜로니 형성 단위" ) 의 범위로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0136] 다른 구현예에서, 본원에 개시된 미생물은 원하는 조성물의 생산에 사용된다. 이러한 조성물을 생성하는 방법은 표적 분석물을 목적하는 조성물 또는 목적하는 조성물의 생성시 중간체로 변형시키는 효소를 구성적으로 발현시키는 재조합 미생물을 배양하는 것을 포함할 수 있다. 이 경우, 표적 분석물을 미생물 배양물에 첨가하고 효소 생성물을 생성하기에 충분한 시간 동안 인큐베이션한다.
- [0137] **실시예**
- [0138] **실시예 1**
- [0139] **방법:**
- [0140] 균주, 플라스미드 및 배지
- [0141] Bacillus Genetic Stock Center 로부터의 *B. 서브틸리스* 균주 PY79 (균주 1A747) 를 모든 조작에 사용했다. 여기에 사용된 모든 *B. 서브틸리스* 균주는 PY79 의 유도체이다.
- [0142] 달리 언급되지 않는 한, 박테리아를 LB 배지 (1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 0.5% 염화나트륨, [고체 배지인 경우 1.5% 아가]) 에서 성장시켰다. MLS 내성 선별을 위해, 1 ug/mL 에리트로마이신 및 25 ug/mL 린코마이신을 사용하였다. 형질전환 실험을 위해, 박테리아를 변형된 능력 (MC) 배지 (100 mM 포스페이트 완충액, 2% 글루코스, 3 mM 트리나트륨 시트레이트, 22 mg/L 철 암모늄 시트레이트, 0.1% 카세인 가수분해물, 0.16% 글루탐산, 3 mM 마그네슘 술페이트) 에서 성장시켰다.
- [0143] 유전자 변형의 제작에 사용되는 플라스미드는 pMiniMAD 이다 [9].
- [0144] pHyspank 프로모터 하에서 IPTG-유도 발현에 사용된 플라스미드는 pDR111 이다 [10]. 모든 유도에 1 mM IPTG 가 사용되었다.
- [0145] *flgM* 결실
- [0146] *B. 서브틸리스* Py79 로부터의 *flgM* 유전자의 ~800 염기 쌍 5' 및 3' 와 함께, PstI 제한 효소 인식 서열에 의해 분리된 *flgM* 의 코딩 서열의 첫번째 및 마지막 15 개 염기 쌍을 함유하는 (표 1 의 총 서열 참고) 시험관 내 전사된 이중-가닥 DNA 분자를 구축하였다. 이어서 pMiniMAD 를 프라이머 ZP24 및 ZP25 (표 1) 를 사용하여 선형화하였다. 이어서, 생성된 PCR 생성물 및 델타 *flgM* 서열을 함께 라이게이션하여 Gibson 어셈블리를 사용하여 pMiniMAD 델타-*flgM* 을 생성하였다 [11]. 생성된 플라스미드를 열 형질전환을 통해 대장균 내로 형질

전환시켰다. 시판 키트를 사용하여 플라스미드를 미니프랩하고, 그 미니프랩된 플라스미드를 DNA 공급원으로 사용하여 다음과 같이 결실을 수행하였다:

- [0147] i. PY79 의 단일 콜로니를 15 mL 시험관 중의 2 mL 의 MC 배지에 접종하였다
- [0148] ii. 37°C 에서 275 rpm 에서 4.5 시간 동안, 또는 기하 급수적으로 성장한 후 ~1 시간 동안 진탕 배양하면서 배양물을 성장시켰다
- [0149] iii. 400 uL 의 배양물을 새로운 15 mL 시험관으로 옮기고 1 ug 의 미니프랩된 플라스미드를 첨가하였다 (상기 설명됨)
- [0150] iv. DNA 가 있는 배양물을 37°C 에서 1.5 시간 동안 진탕기로 되돌렸다
- [0151] v. 배양물을 1 ug/mL 에리트로마이신 및 25 ug/mL 린코마이신을 함유한 LB 아가 상에 두었다
- [0152] vi. 37 °C 에서 밤새 인큐베이션하였다
- [0153] vii. 프라이머 ZP77 및 ZP78 을 사용하여 PCR 을 통해 돌연변이체 대립유전자에 대한 단리된 콜로니를 스크리닝 하고, 양성 콜로니를 항생제가 없는 3 mL LB 브로스에 접종하였다
- [0154] viii. 275 rpm 에서 진탕하면서 실온에서 밤새 성장시켰다
- [0155] ix. 항생제가 없는 LB 상에 10 uL 의 밤새 배양물을 단리 스트리킹 (Isolation streak) 하고 밤새 37°C 에서 성장시킨다. 항생제 선별의 결핍 때문에, 밤새 복제하는 동안 플라스미드가 손실될 수 있다. 이 플라스미드의 관찰된 안정성은 약 90% 이고, 이 단계에서 10 개 중 약 1 콜로니가 플라스미드를 잃는다.
- [0156] x. 항생제 (1 ug/mL 에리트로마이신 및 25 ug/mL 린코마이신) 가 있는 또는 없는 LB 상의 스트리킹 단리된 콜로니를 복제하고, 37°C 에서 밤새 성장시킨다.
- [0157] xi. 돌연변이체 대립유전자를 갖는 균주를 식별하도록 프라이머 ZP77 및 ZP78 로 항생제 민감성 콜로니를 PCR 스크리닝한다.

[0158] 표 1: 프라이머 및 구축된 유전자/대립유전자

프라이머	설명	서열
ZP24	Fwd pMiniMAD gibson 의 경우	CTGGCGTTACCCAACCTAATC [SEQ ID NO: 13]
ZP25	Rev pMiniMAD gibson 의 경우	CTTGCGTAATCATGGTCATAG [SEQ ID NO: 14]
ZP77	figM fwd	GAGGAAACAGGTGTGGAAGAAG [SEQ ID NO: 15]
ZP78	figM rev	GGTCATCTTCTGTCTGCGTG [SEQ ID NO: 16]
	델타 figM 대립유전자	CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAATAATGAGAAACAGTCAAA GAAAAAGAAAACAGAACGCCTGCTGTCAGAGTGCATTTTTGATA CAAAAAATAATTCAGCAGAAGGTATGAATATCATTTTAATAGAC GATCTTTATACAACAGGCGCCACCTTGCCTTCGAGCCCGCT GCTTATTAGAAAAGGAAAAGCCGCTTCAGTGCATCTTTACC TTGATCAGAAGCTAAATGATTCTGTTTTATGCCGATATAATCAC TAGAAATTGACACAGGCATATTATCTAATAAGGAGAAAAAAGA TGGGAGAAGTGGCTAATTGTCGAAATGCAATGCTTTATTTTA AAAACAAAGCTGCAAACCGTATGTCAGGCGTGTATTAAGGAAG AAGAAAAATCATTGAGACTGTCTATAAATTTTTAAGAAAACAGG AAAACCGGCAATCAACTTTGAGCCGGATAACTGAGGAAACAGG TGTGGAAGAAGAGCTGATATTGAAATTCATCAGGCAGAAGCGA ATTCAGATCACTCATCTTCTAATTTGGCATAACCCTTGTGAAAG GTGCGGGACATCGATTAGAGAAGGCAAGTTCTGCAAGGCTTGC CAGTCTGATATTAAGGATCAAATGGATCATTGTAACCACGAGGA TGCTCTGAAAATCGAGAAAAGAAAATAGTAAAAAGACACATACT ATGCCTATAATACCAAAAACAGCTGATTCCCTAAACTAACTGAA AACGCAGTCGATAAAAGGGTTAAGATTGTTTAAAGACTGCAACG GAAAGCGAGAGGAATCCTATGAAAATCAATCAACTGCAGTTTTA

[0159]

		<p>TAAAAAGCAATAAAAAAGGAGAAAGCCCATGTCAGCGAAGGCA  ATTATTGAACAATTGAAGCGACTTTGCGTTCTGCATGAGCACCT  GCTCACGCTGTCTGAAGAAAAGACGGAAGCGCTCAAAGCCGG  CAAAACAAAAGAGCTTTTCTAACATTTTGACAAAAGAGCAAAAT  ATATTCAAGCAATCACGCAGACAGAAGATGACCGGATCAAAAC  AACTTCGGCCTTTCTCGGATATAGCGAAAATAACTATTTCCG  CATGTATCGCCAAAACCTCAGGCAGTAAAAGGAAGAGCTGGA  ACAACTATACGAATCTCTTTCTCAAGTTCTCGGACGTCTGAAAA  AAGTAAATGAGATGAATAGGCAGCTGACAAGAGACGCGCTGCA  ATTCATCTCTATTTTCGTACGATATGCTGGTTCTAAGGAAAATA  CTTCAATTACAGCAAATCAATTAAGCTGAGCTGCCGAAAAGTA  GCAAAATGAAACTGTTTGATTCAAAGCTTAGCAGAAAGGAATT  CAGAAAATGACATCTACCTTTATGGGGCTTGAAACTGCAAGGC  GGGCGTTAAGCGCTCAGCAGGCAGCGTTAAGCACTACTGCAAA  TAACGTGGCAAATGCCAATACTGATGGTTATACAAGACAGCGG  GTCTCATTGGAGGCAACTGACTATTTCCCTGCTGTATCTAAAA  TGCAGAAAAACAGCGGGACAAATGGGTACGGGCGTTCAAGG  AAAATCAGTTGAGAGAATAAGAGATATCTTTCTTGACTACCAAT  ACCGTCTCAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATC [SEQ ID NO:  17]</p>
	<p>phag + GFP</p>	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTTCATACGA  AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAGAAGAACAATCATTCTT  TTTGAAAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAAGAAAACAGTTCGT  CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTCGTGGCACTGCAGT  CCGTCACCTTCAGAAAATCTTGCCTTATCGTCGTAAGTCCGTTT  ATCTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT  GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC  AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT  TATTGGCTCCCATTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG  CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT  TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGGAAAATAAACGAAG  CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTATTGCGGTT  GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGGAATTGACGCCCAAAGCATA  TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTTCAGGAAGAA  AATAACCGTGCAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT  TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTATTTTTGTATTAACA  AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG  CGAAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAGAACGT  GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGCGTAAAG  GAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTGTTGAATTA  GATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGG  GTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTACCCTAAATTTATT  TGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCAAC  TACTTTCCGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATC  ATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGG  TTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACT  ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGT</p>

[0160]

	<p>AATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAA  CATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATG  TATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAAC  TTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGC  AGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCC  TTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTG  AAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGT  TTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAC  AAATAATTTTAAAAAGACCTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTTAATT  TAAATTTCTATCTCCTAATCATTCTCATCCTGTCACTAATCAT  GATATAATAACCGGATTCTCCACTAATTTTTATAAATGTATTC  CATACAAGAAATCTAAAACAGAAGATTTTTTCCAAAAATATGTG  TAATCTTATCTCGACTTAGTCGATATAAACGATAGATTGGGGCA  TAGGGGATGATCAATTGAACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAA  CCTGTTTGGGATCGTTATGATACTCAAATACATAATCAGAAAGA  TAATGATAACGAGGTTCTGTTTCAAGTTTTCATATACCAATCT  TGCTGAAATGGTGGGGGAAATGAACAAGCTTTTGGAACCTTCG  CAAGTTCATCTGAAGTTCGAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATA  CTATGTAAAGGTAATAGAGGACTCTACAAATGAAGTGATCCGC  GAAATTCACCAAAACGGTGGCTTGATTTTTATGCGGCTATGAC  TGAATTTCTTGGGTATTTGTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGA  GTGGTTTGGATGGTCACAAGAATAACAGGTCTGGCGTCAGGA  ATGGATATAGATGATATCGTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAG  AGCGCCGCTTGATAAGCTGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAA  TGGCAGCGTGACAGCTATCGTGAAGTAACTCAAAAATAAAG  AATTGCAAGATTATATGTCTAAAAATACGTTGACATATCCGAGC  ACGTATCAGAGCAACTGGCGTTACCCAACCTTAATC [SEQ ID NO:  18]</p>
<p>phag + AcoD</p>	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTACATCGA  AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAAGAAGAACAATCATTCTT  TTTGAAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAGAAAAACAGTTCGT  CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTTCGTGGCACTGCAGT  CCGTCACTTCAGAAAATCTTGCGTTTATCGTCGTAAGTCCGTTT  ATCTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT  GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC  AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT  TATTGGCTCCCATTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG  CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT  TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGGAAAAATAACGAAG  CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTGATTGCGGTT  GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGAATTGACGCCCCAAAGCATA  TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTCAGGAAGAA  AATAACCGTGCAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT  TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTTATTTTTGTATTAACA  AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG  CGCAAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAAGAACGT  GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGAATATGGC</p>

[0161]

TGAAATCGCCCAGCTTGGAGTCTCAAACCCGTACAAACAACAG  
TACGAAAACATATTTGGCGGAGCTTGGGTTCCGCCGCGCGGTG  
GCGAATACTTTGAATCTACAACGCCGATTACGGGAAAACCTTTT  
ACAAGAGTTCCGCGCTCCGGCCAACAGGATGTGGACGCAGCG  
TTAGATGCTGCCCATGCAGCGAAAGCTGCCTGGGCTAGAACAT  
CAACAACGGAACGCGCCAATTTTTAAACCGCATCGCAGATCG  
TATTGAAGCGAATTTGAAACTGCTTGTGTGCGCGAAAGCATTG  
ACAACGGAAAACCTGTAAGAGAAACAACGGCAGCGGATCTGCC  
GCTTGCAGTGGACCATTTTCGTTATTTTGCAGGTTGCATCAGAG  
CACAAAGGAGCGGCATTAGCGAAATCGATGCAGACACAATTGC  
GTACCATTTTCATGAACCTCTGGGTGTTGTGGGCCAGATTATCC  
CGTGGAAATTTTCCCTTTATTGATGGCGACGTGAAACTGGCACC  
GGCGCTTGCTGCCGGAACCTGTGTCTACTTAAACCTGCAGAA  
CAAACACCGGCGTCTATCTTAGTTTTGATGGAAGTGATTGGCG  
ATCTGCTGCCGCGGGGCGTTGTGAATGTCATCAACGGTTTTGG  
CTTAGAAGCTGGCAAACCTTTGGCCTCAAGCCCGGTATTTCC  
AAAGTAGCTTTTACGGGTGAAACAACGACAGGCCGGTTAATCA  
TGCAATATGCATCACAGAATTTGATTCTGTTACTGGAACCT  
GGCGGAAAAAGCCCGAACATTTTCTTTGAAGATGTGTTAGCAG  
CGGATGACGCATTTTTCGACAAAGCGCTGGAAGGATTTGCAAT  
GTTTGCCTTAATCAAGGCGAAGTTTGACATGTCCTTACAGTG  
CTCTGATCCAGGAAAGCATTATGATCGGTTTATGGAAAGAGCC  
CTGAAACGCGTGGCTGCCATCAGACAAGGACATCCGCTTGACA  
CGGGAACAATGATTGGTGCTCAAGCCTCTGCAGAACAGTTAGA  
AAAAATCTTGTCTACATTGATCTGGGCAGAAAAGAAGGAGCA  
CAGTGCCTTACGGGTGGCGAACGCAATGTCCTGGATGGCGAC  
CTTGCAGGCGGCTATTACGTCAAACCTACAGTATTTGCGGGAC  
ATAACAAAATGCGCATCTTTCAAGAAGAAATTTTTGGCCCGGTC  
GTAAGCGTTACGACATTTAAAGATGAAGAAGAAGCACTGGCTAT  
GCCTAACGACAGTTATATGATTGGGTGCGGGCGTTTGGACA  
AGAGATGGAGCACGTGCGTTTTCGGATGGGAAGAGGTATTCAAG  
CTGGCCGCGTGTGGACGAATTGTTATCATGCTTACCCGGCCCA  
TGCAGCGTTTGGCGGATATAAACAGTCTGGCATCGGACGTGAA  
AACCATCGGATGATGTTGGATCATTACCAACAGACAAAAAATTT  
ATTGGTTTCTTACTCCCCGAACGCGTTGGGCTTTTTCTAATTTA  
AAAAAGACCTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTTAATTTAAATTTCTAT  
CTCCTAATCATTCTCATCCTGTCACTAACTCATGATATAATAAC  
CGGATTCTCCACTAACTTTTTATAAATGATTTCCATACAAGAAA  
TCTAAAACAGAAGATTTTTTTCCAAAAATATGTGTAATCTTATCT  
CGACTTAGTCGATATAAACGATAGATTGGGGCATAGGGGATGA  
TCAATTGAACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAACCTGTTGGG  
ATCGTTATGATACTCAAATACATAATCAGAAAGATAATGATAACG  
AGGTTCTGTTTCATCAAGTTTCATATACCAATCTTGCTGAAATG  
GTGGGGGAAATGAACAAGCTTTTGAACCTTCGCAAGTTCATC  
TGAAGTTCGAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATACTATGTAAG  
GTAATAGAGGACTCTACAAATGAAGTGATCCGCGAAATCCAC  
CAAAACGGTGGCTTGAATTTTATGCGGCTATGACTGAATTTCTT

[0162]

		<p>GGGTTATTTGTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGAGTGGTTTGAG          ATGGTCACAAGAATAACAGGTCTGGCGTCAGGAATGGATATAG          ATGATATCGTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAGAGCGCCGCT          TGATAAGCTGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAATGGCAGCGT          GACAGCTATCGTGAAGTAACTCAAAAATAAAAGAATTGCAAGA          TTATATGTCTAAAAATACGTTGACATATCCGAGCACGTATCAGA          GCAACTGGCGTTACCCAACCTAATC [SEQ ID NO: 19]</p>
	<p>phag + AldB</p>	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTACATACGA          AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAAGAAGAACAATCATTCTT          TTTGAAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAAGAAAACAGTTCGT          CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTTCGTGGCACTGCAGT          CCGTCACTTCAGAAAACTTTCGCTTTATCGTTCGTAAGTCCGTTT          ATCTTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT          GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC          AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT          TATTGGCTCCCATTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG          CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT          TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGGAAAAATAACGAAG          CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTGATTGCGGTT          GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGAATTGACGCCCCAAAGCATA          TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTCAGGAAGAA          AATAACCGTGCAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT          TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTTATTTTTGTATTAACA          AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG          CGCAAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAAGAACGT          GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGACCAATAA          TCCCCCTTCAGCACAGATTAAGCCCGGCGAGTATGGTTTCCCC          CTCAAGTTAAAAGCCCGCTATGACAACTTTATTGGCGGCGAAT          GGGTAGCCCCTGCCGACGGCGAGTATTACCAGAATCTGACGC          CGGTGACCGGGCAGCTGCTGTGCGAAGTGGCGTCTTCGGGCA          AACGAGACATCGATCTGGCGCTGGATGCTGCGCACAAAGTGAA          AGATAAATGGGCGCACACCTCGGTGCAGGATCGTGGCGGAT          TCTGTTTAAGATTGCCGATCGAATGGAACAAAACCTCGAGCTGT          TAGCGACAGCTGAAACCTGGGATAACGGCAAACCCATTCCGGA          AACCAGTGCTGCGGATGTACCGCTGGCGATTGACCATTCCGC          TATTTGCGCTCGTGTATTCCGGGCGCAGGAAGGTGGGATCAGTG          AAGTTGATAGCGAAACCGTGGCCTATCATTTCATGAACCGTTA          GCGTGGTGGGCGAGATTATCCCGTGGAACTTCCCGCTGCTG          ATGGCGAGCTGGAAAATGGCTCCCGCGCTGGCGGGCGGCAAC          TGTGTGGTGCTGAAACCCGCACGTCTTACCCCGCTTTCTGTAC          TGCTGCTAATGGAAATTGTCCGGTGATTTACTGCCGCCGGGCGT          GGTGAACGTGGTCAATGGCGCAGGTGGGGTAATTGGCGAATA          TCTGGCGACCTCGAAACGCATCGCCAAAGTGGCGTTTACCGGC          TCAACGGAAGTGGGCCAACAAATTATGCAATACGCAACGCAAA          ACATTATTCCGGTGACGCTGGAGTTGGGCGGTAAGTCGCCAAA          TATCTTCTTTGCTGATGTGATGGATGAAGAAGATGCCTTTTTCG          ATAAAGCGCTGGAAGGCTTTCGACTGTTGCCTTAACCAGGG</p>

[0163]

```
CGAAGTTTGCACCTGTCCGAGTCGTGCTTTAGTGCAGGAATCT
ATCTACGAACGCTTTATGGAACGCGCCATCCGCCGTGTCGAAA
GCATTCGTAGCGGTAACCCGCTCGACAGCGTGACGCAAATGG
GCGCGCAGGTTTCTCACGGCAACTGGAAACCATCCTCAACTA
CATTGATATCGGTAAAAAAGAGGGCGTGACGTGCTCACAGGC
GGGCGGCGCAAGCTGCTGGAAGGTGAACTGAAAGACGGCTAC
TACCTCGAACCGACGATTCTGTTTGGTCAGAACAATATGCGGG
TGTTCCAGGAGGAGATTTTTGGCCCGGTGCTGGCGGTGACCA
CCTTCAAAACGATGGAAGAAGCGCTGGAGCTGGCGAACGATAC
GCAATATGGCCTGGGCGCGGGCGTCTGGAGCCGCAACGGTAA
TCTGGCCTATAAGATGGGGCGGGCATAACAGGCTGGGCGCGT
GTGGACCAACTGTTATCACGCTTACCCGGCACATGCGGCGTTT
GGTGGCTACAAACAATCAGGTATCGGTGCGGAAACCCACAAGA
TGATGCTGGAGCATTACCAGCAAACCAAGTGCCTGCTGGTGAG
CTACTCGGATAAACCGTTGGGGCTGTTCTAATTTAAAAAAGAC
CTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTAATTTAAATTTCTATCTCCTAAT
CATTCTCATCTGTCATAACTCATGATATAATAACCGGATTCT
CCACTAATTTTTATAAATGTATTTCCATACAAGAAATCTAAAAC
AGAAGATTTTTTCCAAAAATATGTGTAATCTTATCTCGACTTAG
TCGATATAAACGATAGATTGGGGCATAGGGGATGATCAATTGA
ACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAACCTGTTTGGGATCGTTAT
GATACTCAAATACATAATCAGAAAGATAATGATAACGAGGTTCC
TGTTTCATCAAGTTTCATATAACCAATCTTGCTGAAATGGTGGGG
AAATGAACAAGCTTTTGGAACCTTCGCAAGTTCATCTGAAGTTC
GAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATACTATGTAAGGTAATAGA
GGACTCTACAAATGAAGTGATCCGCGAAATTCACCAAAAACGG
TGGCTTGATTTTTATGCGGCTATGACTGAATTTCTTGGGTTATTT
GTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGAGTGGTTTGAGATGGTCAC
AAGAATAACAGGCTGCGGTCAGGAATGGATATAGATGATATC
GTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAGAGCGCCGCTTGATAAGC
TGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAATGGCAGCGTGACAGCTA
TCGTGAAGTAACTCAAAAATAAAGAATTGCAAGATTATATGT
CTAAAAATACGTTGACATATCCGAGCACGTATCAGAGCAACTG
CGTTACCCAACCTTAATC [SEQ ID NO: 20]
```

[0164]

[0165] *hag* 의 *acoD*, *aldB* 또는 GFP 유전자로의 대체

[0166] *hag* 유전자의 800 개 염기 쌍 5' 및 3' 의 측면에, GFP, 또는 알데히드 탈수소효소 AcoD (*C. necator* 유래) 및 AldB (*대장균* 유래) 의 서열을 인코딩하는 이중 가닥 DNA 를 구축하였다 (서열은 표 1 참조). 또한, CsrA-결합 부위는 각 구축물이 자연 발생 "G" 를 "A" ("A" 돌연변이는 표 2 에서 이들 서열에서 강조표시됨) 로 변경하는, GFP/AcoD/AldB 코딩 서열의 정확하게 38 개 염기 쌍 5' 인 5' 측면 *hag* 상동체 중의 단일 지점 돌연변이를 가짐을 명시함으로써 파괴되었다. 이들은 Gibson 어셈블리를 통해 ZP24 및 ZP25 로 선형화된 pMiniMAD 플라스미드에 라이게이션되었다. 생성된 플라스미드를 열 형질전환을 통해 *대장균* 내로 형질전환시켰다. 시판 키트를 사용하여 플라스미드를 미니프렙하고, 그 미니프렙된 플라스미드를 DNA 공급원으로 사용하여 *f1gM* 결실에 대한 것과 동일한 프로토콜을 따라 염색체 변형을 하였다.

[0167] 프로모터 강도를 정량화하기 위한 GFP 어세이

[0168] 시험할 균주를 LB 플레이트 상에 스트리킹하고 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 밤새 성장으로부터의 단일 콜로니를 3 mL 의 LB 에 접종하고 1 mM IPTG 를 첨가하여 IPTG-유도성 pHyspank 프로모터 하에서 GFP 를 가진 *B. 서브틸리스*의 균주를 유도하였다. 균주를 275 rpm 에서 7 시간 동안 진탕시키면서 37°C 에서 성장시켰다. 시점은 2.5 시간, 4 시간, 5.5 시간 및 7 시간에 취하였다. 각 튜브로부터 200 uL 의 배양물을 빼내고 2 분 동안 13,000xg 에서 스핀다운시킨 다음, 펠렛을 200 uL 의 PBS 에 재현탁시켜 시점을 취하였다. 이어서, 이러한 재현탁물을 코스타르 블랙 96-웰 플레이트의 웰에 분취하고 형광계 (여기 485 nm; 방출 535 nm) 에서 판독하였다. 형광 판독 후, 각 웰의 100 uL 을 취하여 분광광도계 상의 600 nm 에서의 흡광도를 판독하여 형광을 배양물의 광학 밀도로 정규화시켰다.

[0169] 플레이트 가시화를 위해, 동결된 스톱을 LB 플레이트 상에 패치로 스트리킹하고 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 형광은 청색 LED 플래쉬라이트 (480 nm 파장) 및 주황색 필터로 가시화되었다.

[0170] ALDH 활성을 정량화하기 위한 HPLC 어세이

- [0171] 샘플 준비: LB 플레이트 상에서 37°C 에서 밤새 성장한 단일 콜로니를 4 mL 의 LB 배지에 접종하고 275 rpm 에서 진탕시키면서 1.75 시간 동안 OD<sub>600</sub> ~0.2 로 37°C 에서 성장시킨 다음, 각각 2 mL 의 2 개의 튜브로 분할하였다. 각 균주에 대해 하나의 튜브를 1 mM IPTG 로 유도하였고, 다른 튜브는 대조군으로서 유도하지 않고 남겨두었다. 유도 후 5 시간 (전체 성장 6.75 시간) 에, OD<sub>600</sub> 를 평가하고 (모든 균주는 OD<sub>600</sub> ~4 에 있었다), 배양물 1.5 mL 를 6000xG 에서 5 분 동안 스피ندا운시키고, 펠렛을 200 uL 의 PBS 에 재현탁시켰다. 22 uL 의 2M 아세트알데히드를 각 세포 튜브에 첨가하여 200 mM 아세트알데히드의 최종 농도를 제공하였다. 이어서 튜브를 37°C 에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 4°C 에서 10 분 동안 20,000xG 에서 스피ندا운시키고, 생성된 상청액의 150 uL 을 PBS 1350 uL 에 첨가하였다 (따라서, 아세트알데히드가 손실되지 않으면, 최종 농도는 이제 20 mM 이어야 한다). 이 희석된 상청액을 1.5 mL 마이크로원심분리 튜브에서 -20°C 로 동결시켰다.
- [0172] 표준 준비: 168 uL 의 아세트알데히드를 1332 uL 의 PBS 에 첨가하여 2M 스톱을 제조하고 -20°C 에서 동결시켰다. HPLC 에 대한 표준 곡선을 만들기 위한 샘플은 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM 표준의 최종 농도를 위해 이 2M 스톱으로부터 PBS 에 희석함으로써 실험 당일에 신선한 상태로 제조되었다. 각각의 표준은 샘플 전에 한 세트 실행 및 샘플 후에 한 세트 실행으로 이중으로 제조되었다. 이어서, 모든 표준 및 샘플을 헤드 공간을 제한하기 위해 목까지 채워진 HPLC 바이알에 로딩하였다. 표준은 아니지만 샘플을 0.2 um 필터를 통해 여과하여 HPLC 바이알에 로딩할 때 임의의 잔류 박테리아를 제거하였다.
- [0173] 샘플은 Aminex HPX-87H 컬럼이 있는 Shimadzu 시스템에서 실행되었다. 샘플을 0.6 mL/min 유속 및 50°C (컬럼 온도) 에서 0.005 M 황산 이동상으로 등용매 용출시켰다. 굴절률을 통해 샘플을 검출하였다.
- [0174] AcoD 발현의 정성적 분석 (코마시 (Coomassie) 염색)
- [0175] LB 플레이트 상에서 37°C 에서 밤새 성장으로부터의 단일 콜로니를 2.5 mL 의 LB 배지 (pHspank 프로모터를 갖는 균주에 대해 + 1 mM IPTG) 에 접종하고, 4.5 시간 동안 275 rpm 에서 진탕하면서 37°C 에서 성장시켰다. 각 배양물 1.5 mL 를 13,000xG 에서 2 분 동안 스피ندا운시키고 펠렛을 50 uL 의 용해 완충액 (20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 0.1% 리소자임, 0.01% RNaseA, 0.002% DNaseI 및 제조업체 사양에 따라 희석된 Roche EDTA-무함유 cOmplete 프로테아제 억제제 각테일 정제) 에 재현탁시켰다. 이어서 샘플을 37°C 수조에서 30 분 동안 용해 완충액에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50 uL 의 2x 라멜리 완충제를 샘플에 첨가하고, 샘플을 써모사이클러에서 5 분 동안 100°C 에서 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 13,000xG 에서 2 분 동안 스피ندا운시키고 10 uL 을 8% SDS-PAGE 겔에 로딩하고 140V 에서 1 시간 동안 실행시켰다. 이어서, 겔을 각각 5 분 동안 진탕시키면서 ddH<sub>2</sub>O 로 6 회 린스하였다. 이어서 쿠마시 브릴리언트 블루 염색에 진탕하면서 실온에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0176] 결과:
- [0177] *B. 서브틸리스*에서 이중으로 ALDH 유전자의 발현은 생리적으로 관련된 아세트알데히드 분해 속도를 초래한다.
- [0178] 기능성 아세트알데히드 탈수소효소를 이중으로 발현시키는 *B. 서브틸리스*의 능력을 평가하기 위해, IPTG 유도성인, pHyspank 프로모터의 제어 하에 아세트알데히드 탈수소효소 유전자를 인코딩하는 균주를 구축하였다. 문헌을 검토한 후 2 개의 상이한 아세트알데히드 탈수소효소를 선택하였다. 선별 기준은 하기와 같았다: 특성화된 효소 동역학 및 아세트알데히드에 대한 높은 특이성; 박테리아 기원; 비-병원성 박테리아 유래의; 가용성 단백질 생성물 (즉, 막-결합되지 않음); 및 알려진 아미노산 서열. 이러한 검색을 수행한 후, 여러 후보가 식별되었으며, 2 개가 이 기준에 가장 적합한 것으로 선별되었다. 첫 번째는 *C. necator* 유래의 *acoD* 유전자에 의해 엔코딩되는 AcoD 로서 [12], 이것은 ~4 uM 의 아세트알데히드에 대한 실험적으로 결정된 Km 을 갖고, 아세트알데히드를 아세테이트로 산화시키기 위한 그의 보조인자로서 NAD 를 사용한다. 두 번째는 대장균 유래의 *aldB* 유전자에 의해 엔코딩되는 AldB 로서 [13], 이것은 ~2.5 uM 의 실험적으로 결정된 Km 및 2 U/mg 의 Vmax 를 갖고, 그의 보조인자로서 NADP 를 사용한다.
- [0179] pHyspank 프로모터의 제어 하에 *acoD* 를 가진 *B. 서브틸리스* 및 pHyspank 프로모터의 제어 하에 *aldB* 를 가진 *B. 서브틸리스*를 IPTG 유도 하에 함께 성장시킨 다음, 실온에서 30 분 동안 200 mM IPTG 와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음 샘플을 여과하여 모든 박테리아를 제거하고 -20°C 에서 동결시켰다.
- [0180] 샘플을 해동하고 PBS 에서 1:10 으로 희석하고, HPLC 어세이 당일에 표준을 새로 제조하였다. 이어서, 모든 샘플을 HPLC 상에서 수행하여 아세트알데히드의 양을 정량화하였다. 튜브가 몇 시간 동안 기계에 있을 것이

고 순서상 나중에 샘플이 실행되는 것이 예러로 적게 보이지 않도록 하는 것이 바람직하므로, HPLC 실행 동안 아세트알데히드의 임의의 잠재적인 증발 또는 다른 확률적 손실을 제어하기 위해, 실행 시작에 하나 및 실행 종료에 하나씩, 두 세트의 표준을 실행하는 것 외에도, 10 mM 표준 아세트알데히드의 단일 준비를 실행 시작과 실행 종료시에 실행하였다 (즉, 동일한 튜브가 두 번 실행됨). 각 표준 샘플에 대한 곡선 아래 면적을 기준으로 표준 곡선이 생성되었으며, 가장 적합한 선은 > 0.99 의 R<sup>2</sup> 를 가졌다. 그 다음 이 라인에 대한 방정식을 사용하여 각 샘플에 대한 농도를 생성하였다. 본 어세이의 결과를 도 1 에 제시한다. 본질적으로 아세트알데히드 표준 실행 2 회에서 차이가 없었으며, 이는 실행 동안 샘플로부터 아세트알데히드의 중대한 확률적 손실이 없음을 나타낸다. 또한, 미유도된 박테리아를 갖는 샘플은 20 mM 표준과 잘 반응하는 아세트알데히드 수준을 가졌으며, 미유도된 박테리아는 자연 발생 기전에 의해 아세트알데히드를 효과적으로 제거하지 못한다는 것을 입증한다.

[0181] 그러나, AldB 또는 AcoD 가 유도되었을 때, 샘플은 아세트알데히드 농도에서 ~4 mM 및 ~8 mM (각각) 의 감소를 나타냈으며, 이는 단백질의 유도가 아세트알데히드의 제거를 야기한다는 것을 나타낸다.

[0182] flgM 결실 및 CsrA-결합 부위 지점 돌연변이의 조합은 hag 프로모터를 통한 강력하고 구성적인 이중 단백질 발현을 산출한다.

[0183] *B. 서브틸리스*에서 *hag* 유전자에 의해 인코딩된 플라젤린은 세포가 운동성이 유리하다고 결정할 때 매우 높은 수준으로 발현된다. 그러나, 편모의 제조는 세포에 대해 매우 영양학적으로 그리고 에너지적으로 비싸기 때문에, 운동성이 부적절할 때 수명 주기에서 때때로 Hag 의 생산을 억제하는 몇 가지 메커니즘을 가진다.

[0184] FlgM 은 *hag* 의 전사를 활성화시키는 시그마 인자 SigD 에 결합하고 이를 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서, *flgM* 의 결실은 전사 억제를 제거하고 구성적으로 높은 수준의 발현을 초래해야 한다. *hag* 의 단백질로의 번역은 CsrA 에 의해 전사 후에 추가로 억제되며, 이는 리보솜 결합 부위에서 *hag* 전사체에 결합하여, 리보솜 번역을 경쟁적으로 억제한다. 이 결합 부위에서의 단일 지점 돌연변이는 CsrA 결합을 배제하지만 리보솜 결합은 배제하지 않아, *hag* 전사체의 구성적 번역을 가능하게 한다.

[0185] 이 두 가지 주요 억제 메커니즘을 제거하면 이중 단백질의 강력하고 구성적인 발현을 산출할 것이라는 가설을 시험하기 위해, *flgM* 을 결실시키고, CsrA-결합 부위에 단일 지점 돌연변이를 만들고, *hag* 유전자를 발현 리포터, GFP 로 대체하였다. 플레이트 상의 이 균주의 형광을 탈-억제된 pHyspank 프로모터를 통해 GFP 를 발현하는 균주의 형광과 비교하였다 (*lacI* 은 구성적 발현을 확보하기 위해 이 구축물로부터 결실되었고, 델타 *lacI* 균주는 미손상 *lacI* 을 갖고 1 mM IPTG 로 유도된 균주와 유사한 수준의 GFP 발현을 갖는 것으로 나타났다 [데이터 제시하지 않음]). 나란히 스트리킹했을 때, 변형된 *hag* 발현 시스템의 2 개의 상이한 단리물은 pHyspank 발현 시스템보다 질적으로 훨씬 밝았다 (도 2a).

[0186] 그러나, 발현이 실제로 구성적인지를 확인하고, 이들 두 발현 시스템 사이의 차이를 정량화하기 위해, 브로쓰 성장 및 형광 시간 과정을 수행하였다. 균주를 LB 에서 성장시키고, OD<sub>600</sub> 및 형광을 성장 2.5 시간에 그리고 그 다음, 90 분마다 최대 7 시간까지 평가하였다 (도 2b). 실제로, 2.5 시간 후에 OD<sub>600</sub> 으로 정규화된 형광은 pHyspank 발현 시스템보다 변형된 *hag* 발현 시스템에서 ~4 배 더 높았다. 이는 4 시간 까지 ~10 배 로 증가하였고 평가된 7 시간 내내 ~10 배 더 높게 유지되었다.

[0187] 탈-억제된 hag 프로모터를 이용하여, pHyspank 보다 질적으로 높은 수준의 AcoD 가 생성된다.

[0188] GFP 에 특이적이지 않지만 알데히드 탈수소효소를 포함하여, 다른 이중 단백질 발현에 대해 이용될 수 있는 본 발명의 변형된 *hag* 프로모터를 통해 강력하고 구성적인 발현을 보장하기 위해, 2 개의 상이한 알데히드 탈수소효소 유전자들 2 개의 상이한 균주의 *hag* 유전자좌 내로 삽입하였다: *C. necator* 유래의 *acoD* 및 대장균 유래의 *aldB*. 이 균주는, pHyspank 프로모터를 통해 *acoD* 및 *aldB* 를 발현하는 균주 및 양성 대조군으로서 변형된 *hag* 프로모터를 통해 GFP 를 발현하는 균주와 함께 브로쓰 배양물에서 성장되었다. 박테리아를 펠렛화하고 용해시키고 용해물을 SDS-PAGE 겔에서 실행시키고 쿠마시 (Comassie) 를 사용하여 총 단백질에 대해 염색하였다. 예상한 바와 같이, GFP 에 대한 명백한 밴드가 있다 (도 3). 또한, 변형된 *hag* 프로모터를 통해 발현되는 경우 his-태그된 AcoD, 미태그된 AcoD, 및 his-태그된 AldB 에 대해 동등하게 밝은 밴드가 있다 (도 3). 그러나, 유도된 pHyspank 제어 하에서 AcoD 및 AldB 에 대해 예상된 크기의 희미한 밴드 만이 있다. 이 명백하게 낮은 수준의 발현에도 불구하고, HPLC 실험으로부터 이 수준이 생리학적으로 관련된 속도로 아세트알데히드의 제거에 충분하다는 것이 알려져 있다. 따라서, 쿠마시 염색은 변형된 *hag* 프로모터를 통해 생산되는 질적으로 명백한 더 많은 단백질이 있음을 입증하므로, 이 발현 시스템이 적어도 아세트알데

히드 제거 속도만큼 강력하지 않을 것으로 예상하는 것이 합리적이다.

[0189] 논의:

[0190] 효소적 접근법은 이들의 우수한 효능, 다재다능성 및 특이성으로 인해 소분자를 빠르게 대체하고 제약업계에서 표준이 되고 있다. 이것의 증거는 2017 년 생물학적 의약품 시장이 \$200B 이상이었고 향후 7 년 안에 두 배로 증가했다는 사실에서 볼 수 있다. 또한, 2016 년 가장 많이 팔린 10 대 의약품 중 8 개가 생물제제였다.

[0191] 그러나, 생물제제 약물을 제조하는 현재의 공정은 길고 비싸며, 일반적으로 소분자 약물을 제조하는데 사용되는 것과 유사한 사고 방식으로 접근한다. 이 강력한 종류의 약물을 더 광범위하게 사용할 수 있으려면 방법의 단계적 변화가 필요하다. 본 발명의 목적은 알코올 숙취를 위한 비용-효율적이고, 경구로 전달가능한 효소 요법을 만드는 것이다.

[0192] 도 1 에 도시된 바와 같이, 2 개의 상이한 이종 단백질의 세포내 발현은 아세트알데히드의 현저한 제거를 초래하였다. 실제로, 한밤중의 음주가 ~150  $\mu$ M 의 결합 아세트알데히드 수준을 유발한다고 가정하고 [14], 72 kg 인체에 약 15 L 의 세포외액이 있다면, 같은 양의 박테리아가 대략 3 시간 안에 15 L 로부터 150  $\mu$ M 의 아세트알데히드를 제거할 수 있을 것이다. 물론 이것은 "어림잡아 한" 계산이지만, 이들이 상대적으로 생리학적으로 관련된 비율을 나타낼 수 있다고 가정하는 것은 적어도 비합리적이지는 않다.

[0193] 또한, 비-박테리아 대조군은 하강이 단순한 증발 또는 일부 다른 제거 방법으로 인한 것이 아님을 나타내고, 미 유도된 대조군은 제거가 박테리아의 고유 기능이 아닌 ALDH 의 발현에 특이적이었음을 입증한다. 또한, 실험 시작 및 종료시 동일한 20 mM 표준 튜브의 재-판독은 임의의 하강이 HPLC 실험 동안 증발로 인한 것이 아니라는 것을 입증한다. 또한, 아세트알데히드의 제거는 알데히드 탈수소효소의 유도에 의존하여, 박테리아가 자연적으로 그 자체의 아세트알데히드를 제거하지는 않지만, 이종 발현된 아세트알데히드 탈수소효소를 필요로 한다는 것을 나타낸다.

[0194] FlgM 및 CsrA 억제를 제거함으로써, GFP 의 신속하고 강력한 발현이 해당 균주의 성장 주기 전반에 걸쳐 구성적으로 달성되었다. 이 수준이 pHyspank 프로모터를 사용하는 발현 수준보다 5-10 배 높다는 사실 - *B. 서브틸리스* 중의 발현에 대한 학문적 금본위제 - 는 발현 시스템의 유용성을 입증한다. 또한, 형광/OD<sub>600</sub> 비율이 전체 성장 곡선에 걸쳐 계속 증가하여 형광이 OD 보다 빠르게 증가하고 있음을 나타내며, 이는 각 세포가 더 많은 GFP 를 계속 생산하고 있음을 의미한다. 이것은 *flgM* 결실 및 CsrA-결합 부위 돌연변이가 구성적이고 강력한 발현을 초래한다는 가설과 일치한다. 발현이 성장 곡선 전체에 걸쳐 구성적이지 않은 경우 형광 대 OD<sub>600</sub> 의 비율은 절대 형광이 계속 상승하더라도 결국에는 정체되거나 하강할 것이다.

[0195] 또한, 생리학적으로 관련된 아세트알데히드 제거 속도의 입증은 pHyspank 프로모터를 사용하여 수행되었으며, 편집된 pHag 프로모터를 이용하는 본 발명의 시스템이 더 많은 단백질을 생성하고 필요한 아세트알데히드 제거 속도를 훨씬 더 충분히 초과해야 한다는 것을 나타낸다. 실제로, 쿠마시 겔에서 AcoD 의 밴드 밀도의 정성적 비교 (도 2b) 는 훨씬 우수한 단백질 발현을 나타내는 훨씬 더 강력한 단백질 밴드를 나타낸다.

[0196] 종합하면, 현재 기술되거나 실행되는 임의의 다른 전략과 구별되는 신체에서 아세트알데히드 제거를 위한 신규 시스템이 개발된다. 여기에는 효소적으로 아세트알데히드를 제거할 목적으로 이종 단백질을 구성적으로 발현하도록 조작된 식용 박테리아가 포함된다. 이것은 프로모터의 억제제의 제거에 의해 강화된, 강력한 플라겔린 프로모터의 장점을 취하는 이종 단백질 발현 전략을 이용한다.

[0197] 실시예 2

[0198] 대상체는 하기 변형을 가진 포자 제제 *B. 서브틸리스*의 1E9 CFU 의 물 현탁액을 섭취한다: FlgM 결실됨, 본원에 기재된 바와 같은 BS1 중의 돌연변이, *hag* 유전자는 본원에 기재된 바와 같이 AcoD 로 대체됨. 이 직후, 사람은 취침 전 다음 3 시간 동안 6 개의 알코올 음료 (5% 에탄올의 12 온스) 를 섭취한다. 전형적으로, 이 양의 알코올은 이 사람이 비틀거림, 심한 두통, 구역질, 불쾌감, 빛 및 소리에 대한 민감성, 현기증 및 과민성을 특징으로 하는 알코올 숙취를 초래한다. 이러한 증상은 전형적으로 사람이 수면을 취하는 동안 8 시간 이내에 설정되며 그 후 12 시간 동안 지속된다. 그러나, 그 사람은 8 시간 후에 전날 밤 소모된 에탄올의 대사로 인해 자신의 신체에 의해 과량의 아세트알데히드가 형성되지 않은 채 깨어났다. 따라서, 탈수로 인해 가벼운 비틀거림과 약간의 두통이 있지만, 숙취와 관련된 다른 증상은 크게 줄어들거나 전혀 없다.

- [0199] **예시적 구현예**
- [0200] 1. 알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하도록 재조합 조작된 재조합 박테리아를 포함하는 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체의 소화관에 투여하는 것을 포함하는, 알코올 숙취의 예방 또는 치료 방법.
- [0201] 2. 제 1 구현예에 있어서, 재조합 박테리아가 하기를 포함하는 방법: a) 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함함; 및 b) 시그마 인자 억제제의 유전자 변형, 여기서 변형은 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사의 시그마 인자 개시 억제제를 감소시킴.
- [0202] 3. 제 2 구현예에 있어서, 박테리아가 *바실러스 (Bacillus)*, *비피도박테리움 (Bifidobacterium)*, *엔테로코쿠스 (Enterococcus)*, *에스케리차 (Escherichia)*, *락토바실러스 (Lactobacillus)*, *류코노스톡 (Leuconostoc)*, *페디오코쿠스 (Pediococcus)* 및 *스트렙토코쿠스 (Streptococcus)* 로부터 선택된 속에 속하는 방법.
- [0203] 4. 제 2 구현예에 있어서, (1) 박테리아가 *바실러스* 속에 속하고, (2) 플라젤린 유전자 프로모터가 CsrA BS1 결합 부위 및/또는 CsrA BS2 결합 부위의 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 변형된 *바실러스* hag 프로모터이고, (3) 시그마 인자가 SigD 이고, (4) SigD 억제자가 FlgM 인 방법.
- [0204] 5. 제 4 구현예에 있어서, hag 프로모터가 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 방법.
- [0205] 6. 제 4 구현예에 있어서, hag 프로모터가 CsrA BS1 인식 서열, AGGA 의 변형을 포함하는 방법.
- [0206] 7. 제 4 구현예에 있어서, hag 프로모터가 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT [SEQ ID NO:2] 를 포함하는 방법.
- [0207] 8. 제 4 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 지점 돌연변이를 포함하는 방법.
- [0208] 9. 제 4 구현예에 있어서, hag 프로모터가 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 방법.
- [0209] 10. 제 4 구현예에 있어서, hag 프로모터가 BS2 결합 부위의 변형을 포함하고, 여기서 변형은 뉴클레오티드 서열 ATTTAGGGAGGAA [SEQ ID NO:3] 를 포함하는 방법.
- [0210] 11. 제 1 구현예에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 박테리아 알데히드 탈수소효소인 방법.
- [0211] 12. 제 4 구현예에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 (1) *쿠프리아비두스 네카토르 (Cupriavidus necator)* 유래의 AcoD 및 (2) *대장균* 유래의 AldB 로부터 선택되는 방법.
- [0212] 13. 제 4 구현예에 있어서, flgM 유전자 내의 유전자 변형이 flgM 유전자의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는 방법.
- [0213] 14. 제 4 구현예에 있어서, flgM 유전자 내의 유전자 변형이 2 차 또는 3 차 구조를 파괴하는 방법.
- [0214] 15. 제 4 구현예에 있어서, 발현 구축물이 박테리아 염색체에 위치하는 방법.
- [0215] 16. 제 1 구현예에 있어서, 알코올 소모 동안 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0216] 17. 제 1 구현예에 있어서, 알코올 소모 개시 전 24 시간까지 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0217] 18. 제 1 구현예에 있어서, 조성물이 경구로 투여되는 방법.
- [0218] 19. 제 1 구현예에 있어서, 조성물이 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 저항성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질, 물, 캡슐 충전제 및 구미 (gummy) 물질로부터 선택되는 생리학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 방법.
- [0219] 20. 제 1 구현예에 있어서, 조성물이 재조합 박테리아의 약  $10^4$  내지 약  $10^{12}$  콜로니 형성 단위를 포함하는 방법.
- [0220] 21. a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라젤린 유전자 프로모

터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라젤린 유전자 프로모터는 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함함; 및 b) 전사의 SigD 개시 억제를 감소시키는 flgM 유전자의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.

- [0221] 22. 제 21 구현예에 있어서, 폴리펩티드를 구성적으로 발현하는 재조합 미생물.
- [0222] 23. 제 21 구현예에 있어서, 미생물이 프로바이오틱인 재조합 미생물.
- [0223] 24. 제 21 구현예에 있어서, 미생물이 바실러스 (Bacillus), 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 엔테로코쿠스 (Enterococcus), 에스케리차 콜라이 (Escherichia coli), 락토바실러스 (Lactobacillus), 류코노스톡 (Leuconostoc), 페디오코쿠스 (Pediococcus) 및 스트렙토코쿠스 (Streptococcus) 로부터 선택된 속에 속하는 재조합 미생물.
- [0224] 25. 제 21 구현예에 있어서, 미생물이 바실러스 속에 속하는 재조합 미생물.
- [0225] 26. 제 21 구현예에 있어서, 미생물이 B. 서브틸리스인 재조합 미생물.
- [0226] 27. 제 21 내지 제 26 구현예 중 어느 하나에 있어서, 플라젤린 유전자 프로모터가 hag 프로모터인 재조합 미생물.
- [0227] 28. 제 27 구현예에 있어서, hag 프로모터가 플라젤린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하며, 여기서 유전자 변형은 CsrA BS1 결합 부위 및/또는 CsrA BS2 결합 부위의 변형 (예를 들어, 뉴클레오티드 치환, 삽입 또는 결실) 을 포함하는 재조합 미생물.
- [0228] 29. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS1 인식 서열, AGGA 에 대한, 예를 들어 서열 AGAA 로의 하나 또는 복수 (예를 들어, 2 개, 3 개 또는 4 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.
- [0229] 30. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 12-염기-쌍 BS1 결합 부위 내에 또는 BS1 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.
- [0230] 31. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 BS1 결합 부위, gcacaaggacgt 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.
- [0231] 32. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS1 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 재조합 미생물.
- [0232] 33. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 예를 들어 1, 2, 3, 4 개 또는 그 이상의 수소 결합 쌍을 제거하기 위해 수소 결합에 관여하는 서열 taagggcacaaggacgtgcctta [SEQ ID NO: 1] 내에 하나 또는 복수의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.
- [0233] 34. 제 28 구현예에 있어서, 변형된 BS1 이 뉴클레오티드 서열 GCACAAGAACGT [SEQ ID NO: 2] 을 갖는 재조합 미생물.
- [0234] 35. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 CsrA BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 지점 돌연변이를 포함하는 재조합 미생물.
- [0235] 36. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 13-염기-쌍 BS2 결합 부위 내에 또는 BS2 의 줄기-루프 2 차 구조의 줄기를 형성하는 결합 부위의 어느 한 측면 상의 주변 염기 내에 하나 또는 복수 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13 개) 의 유전자 변형을 포함하는 재조합 미생물.
- [0236] 37. 제 28 구현예에 있어서, 하나 이상의 유전자 변형이 수소 결합을 허용하는 상보성을 제거함으로써 BS2 의 줄기 및 루프 구조를 파괴하는 재조합 미생물.
- [0237] 38. 제 28 구현예에 있어서, 변형된 BS2 가 뉴클레오티드 서열 ATTTAGGGAGGAA [SEQ ID NO: 3] 을 갖는 재조합 미생물.
- [0238] 39. 제 28 구현예에 있어서, BS2 결합 부위에 대한 하나 이상의 유전자 변형이 Shine-Dalgarno 서열 agggagga 내의 뉴클레오티드의 변경을 포함하지 않는 재조합 미생물.

- [0239] 40. 제 21 내지 제 39 구현예 중 어느 하나에 있어서, 플라젤린 유전자 프로모터가 박테리아 염색체 또는 플라스미드에 위치하는 재조합 미생물.
- [0240] 41. 제 21 내지 제 40 구현예 중 어느 하나에 있어서, 대상 폴리펩티드가 알데히드 탈수소효소인 재조합 미생물.
- [0241] 42. 제 41 구현예에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 큐프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*) 유래의 AcoD 이고, 하기 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 미생물:
- ```
MNMAEIAQLGVSNPYKQYENYIGGAWVPPAGGEYFESTTPTITGKPFTRVPRSGQQDVDA
ALDAAHAAKAAWARTSTTERANILNRIADRIEANLKLVAESIDNGKPVRETAAADLPLAVD
HFRYFAGCIRAQEGGISEIDADTIAYHFHEPLGVVQIIPWNFPLLMATWKLAPALAAGNCVV
LKPAEQTPASILVLMVIGDLLPPGVVNVINGFGLEAGKPLASSPRISKVAFTGETTTGRLIM
QYASQNLIPVTLELGGKSPNIFFEDVLAADDAFFDKALEGFAMFALNQGEVCTCPSRALIQE
SIYDRFMERALKRVAAIRQGHPLDTGMTIGAQASAEQLEKILSYIDLGRKEGAQCLTGGERN
VLDGDLAGGYVVKPTVFAGHNKMRIFQEEIFGPVSVVTTFKDEEEALAIANDTYGLGAGV
WTRDGARAFRMRGRGIQAGRVWTNICYHAYPAHAAFGGYKQSGIGRENHRMMLDHYQQTG
NLLVSYSPNALGFF [SEQ ID NO: 4].
```
- [0242]
- [0243] 43. 제 41 구현예에 있어서, 알데히드 탈수소효소가 예를 들어, 다음과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 알데히드 탈수소효소인 재조합 미생물:
- ```
MLRAAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQQPEVFCNQIFINNEWHDAVSRKTFPTVNPS
TGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAARAAFQLGSPWRRMDASHRGRLNRLADLIERDRTYLA
ALETLNKGKPYVISYLVLDLDMVLKCLRYAGWADKYHGKTIPIDGDFFSYTRHEPVGVCG
QIIPWNFPLLMQAWKLGALATGNVVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPPGVVNIIVPG
FGPTAGAAIASHEDVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLLELGGKSPNIIMSDADM
DWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVERSVARAKSRVVGPNPFDSKTEQG
P
QVDETQFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGP
VMQILKFKTIEEVGRANNSTYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVNCYDVFGAQS
PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTKVPQKNS [SEQ ID NO: 5].
```
- [0244]
- [0245] 44. 제 21 구현예에 있어서, f1gM 유전자 내의 유전자 변형이 f1gM 유전자의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는 재조합 미생물.
- [0246] 45. 제 21 구현예에 있어서, f1gM 유전자 내의 유전자 변형이 f1gM 의 활성 부위를 인코딩하는 서열 중의 단일 돌연변이 또는 일련의 돌연변이를 포함하는 재조합 미생물.
- [0247] 46. 제 21 구현예에 있어서, f1gM 유전자 내의 유전자 변형이 F1gM 2 차 구조를 정의하는 나선 중 하나에서와 같은 2 차 또는 3 차 구조를 파괴하는 재조합 미생물.
- [0248] 47. 제 21 구현예에 있어서, f1gM 유전자 내의 유전자 변형이 예를 들어 B. 서브틸리스 F1gM 의 I-58, K-62, I-65, G-68, D-73, A-78 로부터 선택된, F1gM 단백질의 C-말단에서 3 번째 또는 4 번째 나선 중의 아미노산을 변경하는 것을 포함하는 재조합 미생물.
- [0249] 48. 제 21 구현예에 있어서, f1gM 유전자 내의 유전자 변형이 예를 들어 B. 서브틸리스 F1gM 의 I-3, G-7, S-10, V-11, A-40, K-41, M43, I-58, L-61, K-62, I-65, Y-70, K-71, V-72, D-73, A-74, H-76, I-77, A-78, N-80, M-81, I-82, N-83, F-84, Y-85, 및 K-86 으로부터 선택된, SigD 에 대한 F1gM 결합에 참여하는 것으로 예측되는 하나 이상의 아미노산을 변경하는 것을 포함하는 재조합 미생물.
- [0250] 49. 알데히드 탈수소효소를 구성적으로 발현하는 재조합 프로바이오틱 미생물.

- [0251] 50. 제 49 구현예에 있어서, 미생물이 a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 b) SigD 발현의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자 내의 유전자 변형을 포함하는 재조합 프로바이오틱 미생물.
- [0252] 51. 제 50 구현예에 있어서, 플라겔린 유전자 프로모터가 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 재조합 프로바이오틱 미생물.
- [0253] 52. 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 여기서 플라겔린 유전자 프로모터는 플라겔린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0254] 53. 제 21 구현예 또는 제 49 구현예의 재조합 미생물을 배양하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.
- [0255] 54. 제 53 구현예에 있어서, 폴리펩티드를 단리하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0256] 55. 생리학적으로 허용가능한 담체 및 재조합 프로바이오틱 미생물을 포함하는 조성물로서, 여기서 재조합 프로바이오틱 미생물은 하기를 포함하는 조성물: a) 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 플라겔린 유전자 프로모터를 포함하는 발현 구축물을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 b) 전사의 SigD 억제의 억제를 감소시키는 FlgM 유전자 내의 유전자 변형.
- [0257] 56. 제 55 구현예에 있어서, 플라겔린 유전자 프로모터가 플라겔린 유전자 프로모터로부터 전사된 mRNA 의 번역의 CsrA 억제를 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 조성물.
- [0258] 57. 제 55 구현예에 있어서, 대상 폴리펩티드가 알데히드 탈수소효소인 조성물.
- [0259] 58. 제 55 구현예에 있어서, 생리학적으로 허용가능한 담체가 락트산 발효 식품, 발효 유제품, 저항성 전분, 식이 섬유, 탄수화물, 단백질 및 글리코실화 단백질, 물, 캡슐 충전제 및 구미 (gummy) 물질로부터 선택되는 조성물.
- [0260] 59. 재조합 프로바이오틱 미생물의 약 104 내지 약 10<sup>12</sup> 콜로니 형성 단위를 포함하는 제 55 구현예의 조성물의 단위 용량.
- [0261] 60. 분석물을 대사하는 효소를 구성적으로 발현하는 미생물을 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 소화관 내 또는 순환 내 분석물의 대사 방법.
- [0262] 61. 하기 단계를 포함하는 표적 화합물의 제조 방법: a) 제 1 구현예의 재조합 미생물을 포함하는 배양물을 분석물과 접촉시키는 단계, 여기서 대상 폴리펩티드는 분석물이 기질인 효소임, 및 b) 미생물을 배양하는 단계, 여기서 효소는 분석물의 표적 화합물로의 전환을 촉매함.
- [0263] 62. 제 63 구현예에 있어서, 효소가 아밀라제, 리파제 및 프로테아제로부터 선택되는 방법.

[0264] 참고문헌

1. Sprince, H., et al., *Protective action of ascorbic acid and sulfur compounds against acetaldehyde toxicity: implications in alcoholism and smoking*. Agents Actions, 1975. **5**(2): p. 164-73.
2. Mukherjee, S. and D.B. Kearns, *The structure and regulation of flagellin Bacillus subtilis*. Annu Rev Genet, 2014. **48**: p. 319-40.
3. Guttenplan, S.B., S. Shaw, and D.B. Kearns, *The cell biology of peritrichous flagellin Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2013. **87**(1): p. 211-29.
4. Macnab, R.M., *Genetics and biogenesis of bacterial flagella*. Annu Rev Genet, 1992. **26**: p. 131-58.
5. Caramori, T., et al., *Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1996. **178**(11): p. 3113-8.
6. Yakhnin, H., et al., *CsrA of Bacillus subtilis regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (hag) by blocking ribosome binding*. Mol Microbiol, 2007. **64**(6): p. 1605-20.
7. Mukherjee, S., et al., *CsrA-FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2011. **82**(2): p. 447-61.

[0265]

8. Vakulskas, C.A., et al., *Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2015. **79**(2): p. 193-224.
9. Chen, R., et al., *Role of the sigmaD-dependent autolysins in Bacillus subtilis population heterogeneity*. J Bacteriol, 2009. **191**(18): p. 5775-84.
10. Ben-Yehuda, S., D.Z. Rudner, and R. Losick, *RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles*. Science, 2003. **299**(5606): p. 532-6.
11. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
12. Jendrossek, D., A. Steinbuchel, and H.G. Schlegel, *Three different proteins exhibiting NAD-dependent acetaldehyde dehydrogenase activity from Alcaligenes eutrophus*. Eur J Biochem, 1987. **167**(3): p. 541-8.
13. Ho, K.K. and H. Weiner, *Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(3): p. 1067-73.
14. Salaspuro, M., *Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences*. Addict Biol, 1997. **2**(1): p. 35-46.

[0266]

[0267]

본 출원 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "~ 일 수 있다" 라는 단어는 의무적 의미 (즉, 필수적이라는 의미) 보다는 허용적 의미 (즉, 가능성을 갖는 의미) 로 사용된다. "포함하다", "포함하는" 및 "포함되다" 등의 단어는 포함하지만 이에 제한되지 않는 것을 의미한다. 본 출원 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 요소" 에 대한 언급은 하나 이상의 요소, 예컨대 "하나 이상" 에 대한 다른 용어 및 구절의 사용에도 불구하고 2 개 이상의 요소의 조합을 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "또는" 은 비-배타적, 즉 "및" 및 "또는" 을 모두 포함한다.

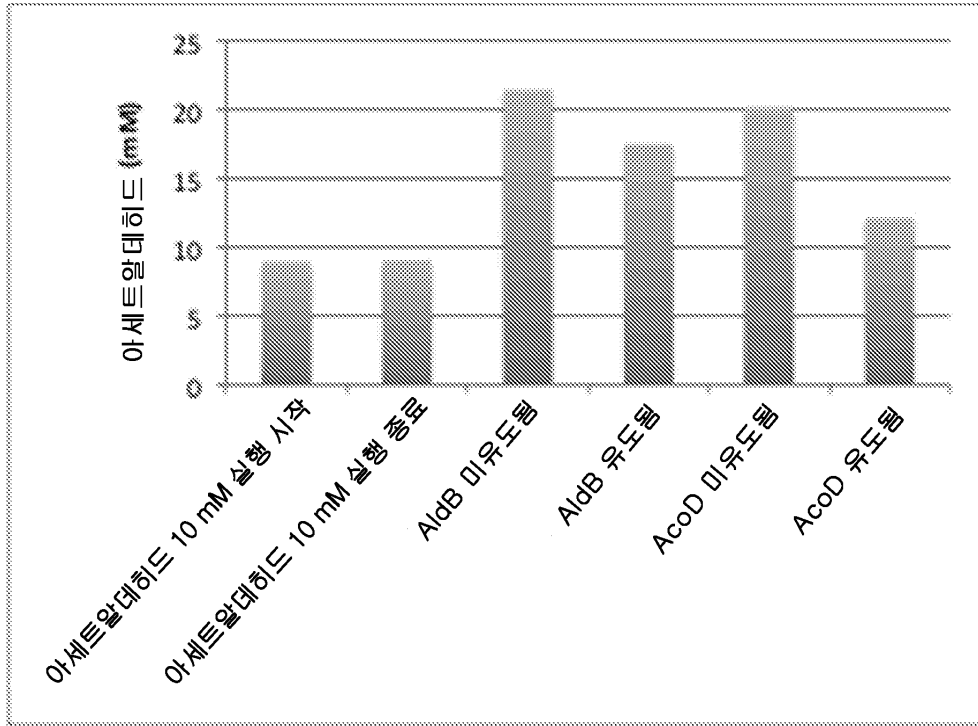
[0268]

본 기재의 구현예가 본원에 제시 및 기재되어 있지만, 상기와 같은 구현예는 단지 예로서 제공된 것이라는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 본 개시가 명세서 내에 제공된 특정 예에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서는 전술한 명세서를 참조하여 설명되었지만, 본 구현예의 설명 및 예시는 제한적인 의미로 해석되어서는 안된다. 이제 본 기재를 벗어나지 않으면서 수많은 변형, 변경, 및 치환이 당업자에게 일어날 것이다. 또한, 본 개시의 모든 양상은 다양한 조건 및 변수에 의존하는 본 명세서에서 설명된 특정 묘사,

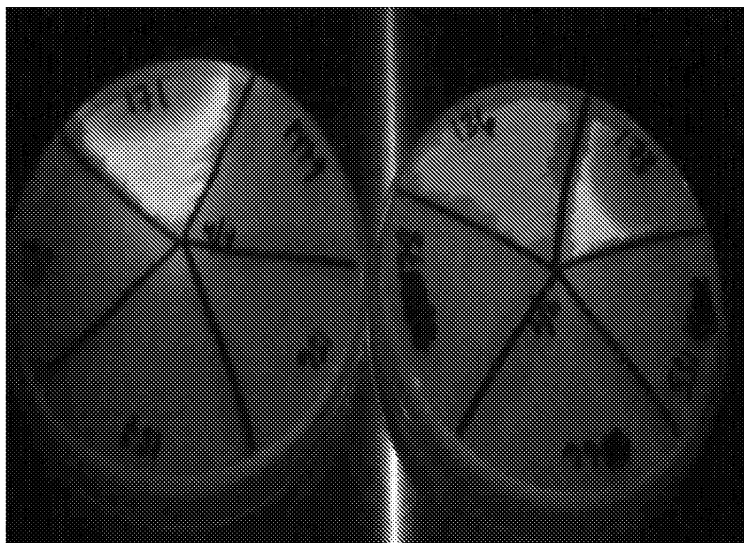
구성 또는 상대적인 비율로 제한되지 않는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 기재된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시함에 있어서 이용될 수 있음이 이해되어야 한다. 그러므로 본 개시는 또한 그러한 대안, 변형, 변이 또는 등가물을 모두 포함하는 것으로 고려된다. 하기 청구항이 본 발명의 범주를 규정하고, 이들 청구항의 범주 내의 방법 및 구조 및 이들의 균등물은 이에 의해 포괄되도록 의도된다.

**도면**

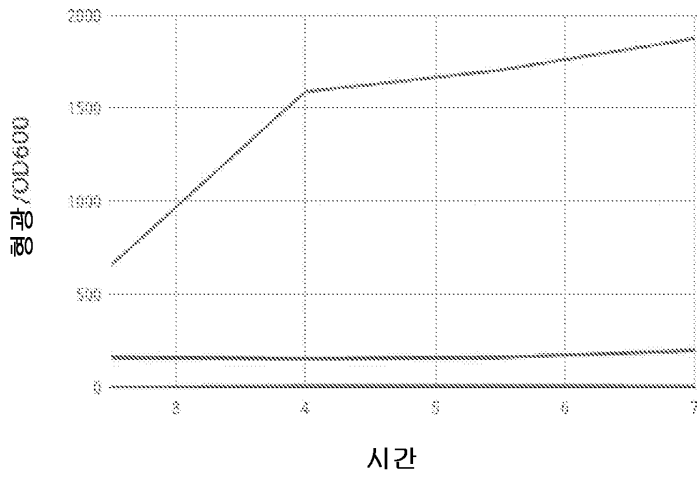
**도면1**



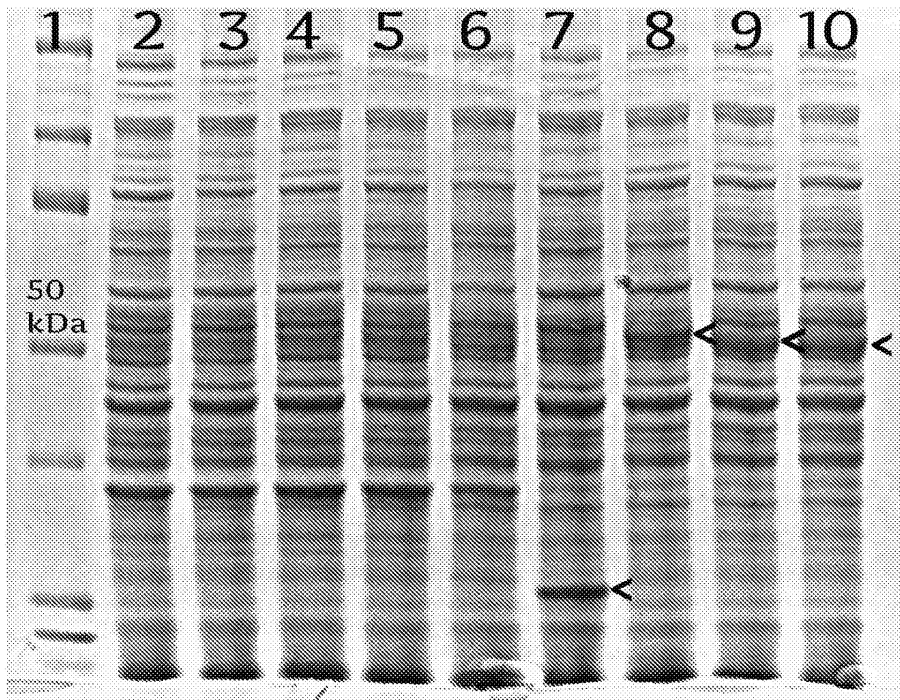
**도면2a**



도면2b

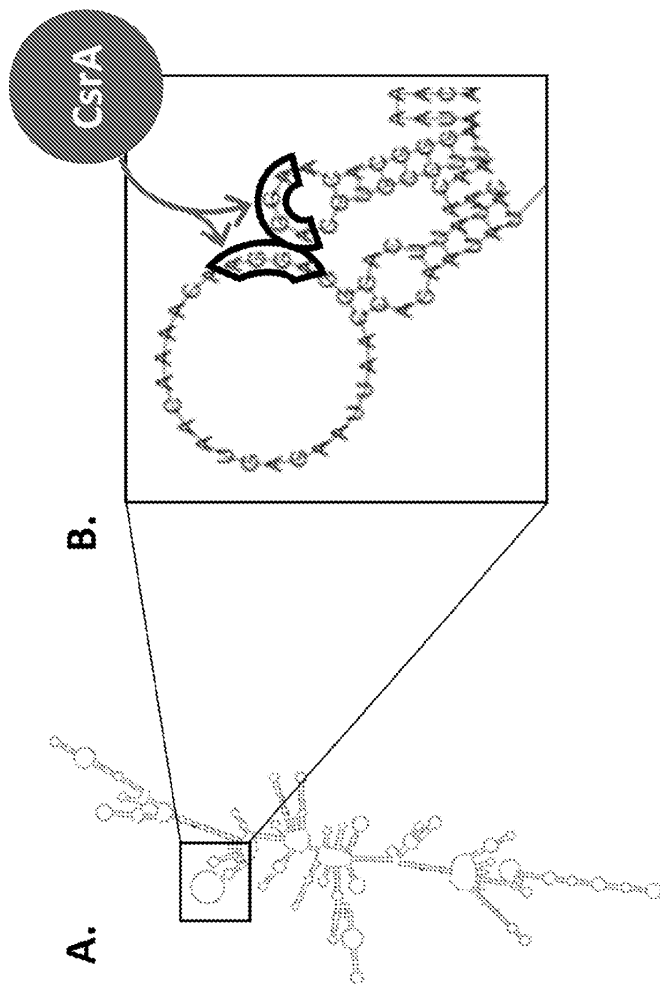


도면3

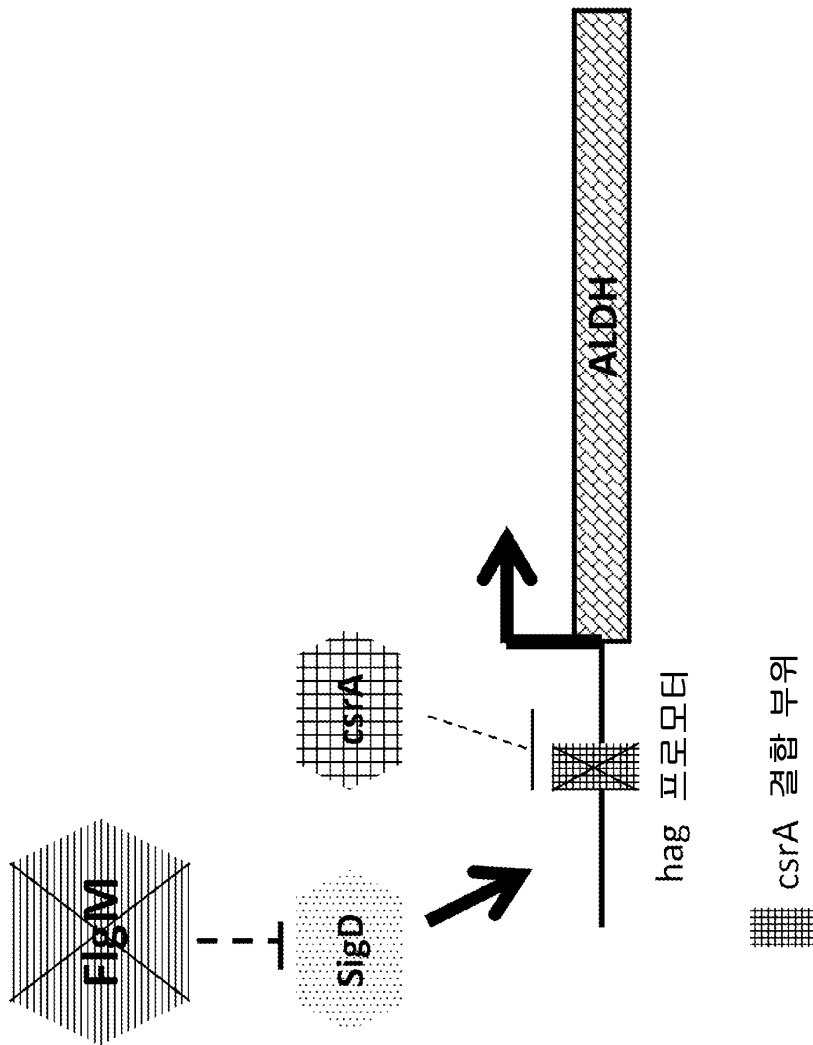




도면5



도면6



서열목록

- <110> ZBIOTICS COMPANY
- <120> GENE EXPRESSION SYSTEM FOR PROBIOTIC MICROORGANISMS
- <130> 1642-001-US
- <140> PCT/US2018/050957
- <141> 2018-09-13
- <150> 62/558,346
- <151> 2017-09-13
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis

<400> 1  
 taagggcaca aggacgtgcc tta 23  
 <210> 2  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2  
 gcacaagaac gt 12  
 <210> 3  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3  
 atttagggag gaa 13  
 <210> 4  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Cupriavidus necator

<400> 4  
 Met Asn Met Ala Glu Ile Ala Gln Leu Gly Val Ser Asn Pro Tyr Lys  
 1 5 10 15

Gln Gln Tyr Glu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Trp Val Pro Pro Ala Gly  
 20 25 30

Gly Glu Tyr Phe Glu Ser Thr Thr Pro Ile Thr Gly Lys Pro Phe Thr  
 35 40 45

Arg Val Pro Arg Ser Gly Gln Gln Asp Val Asp Ala Ala Leu Asp Ala  
 50 55 60

Ala His Ala Ala Lys Ala Ala Trp Ala Arg Thr Ser Thr Thr Glu Arg  
 65 70 75 80

Ala Asn Ile Leu Asn Arg Ile Ala Asp Arg Ile Glu Ala Asn Leu Lys



340 345 350  
 Leu Ser Tyr Ile Asp Leu Gly Arg Lys Glu Gly Ala Gln Cys Leu Thr  
 355 360 365

Gly Gly Glu Arg Asn Val Leu Asp Gly Asp Leu Ala Gly Gly Tyr Tyr

370 375 380  
 Val Lys Pro Thr Val Phe Ala Gly His Asn Lys Met Arg Ile Phe Gln  
 385 390 395 400

Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Ser Val Thr Thr Phe Lys Asp Glu  
 405 410 415

Glu Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Leu Gly Ala  
 420 425 430

Gly Val Trp Thr Arg Asp Gly Ala Arg Ala Phe Arg Met Gly Arg Gly  
 435 440 445

Ile Gln Ala Gly Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Ala Tyr Pro Ala  
 450 455 460

His Ala Ala Phe Gly Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Ile Gly Arg Glu Asn  
 465 470 475 480

His Arg Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Leu Leu Val  
 485 490 495

Ser Tyr Ser Pro Asn Ala Leu Gly Phe Phe  
 500 505

<210> 5

<211> 517

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Leu Arg Ala Ala Ala Arg Phe Gly Pro Arg Leu Gly Arg Arg Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Ala Ala Thr Gln Ala Val Pro Ala Pro Asn Gln Gln Pro  
 20 25 30

Glu Val Phe Cys Asn Gln Ile Phe Ile Asn Asn Glu Trp His Asp Ala  
 35 40 45

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



<213> Bacillus subtilis  
 <400> 6  
 atgagaatta accacaatat tgcagcgctt aacacactga accgtttgtc ttcaaacaac 60  
 agtgcgagcc aaaagaacat ggagaaactt tcttcaggtc ttcgcatcaa cegtgcggga 120  
 gatgacgcag caggtcttgc gatctctgaa aaaatgagag gacaaatcag aggtcttgaa 180  
 atggcttcta aaaactctca agacggaatc tctcttatcc aaacagctga gggatgcatta 240  
 actgaaactc atgcgatcct tcaactgtt cgtgagctag ttgttcaagc tggaaacact 300  
  
 ggaactcagg acaaagcaac tgatttcaa tctattcaag atgaaatc agctttaaca 360  
 gatgaaatcg atggtatttc aaatcgtaca gaattcaatg gtaagaaatt gctcgaaggc 420  
 acttacaag ttgacacagc tactcctgca aatcaaaaga acttggatt ccaaactgga 480  
 gcaaagtcta cacagcaaat ctctgtaa attgaggata tgggtgctga cgctcttga 540  
 attaaagaag ctgatggttc aattgcagct cttcattcag ttaatgatct tgacgtaaca 600  
 aaattcgcag ataatgcagc agatactgct gatatcggtt tcgatgctca attgaaagtt 660  
 gtgatgaag cgatcaacca agtttcttct caactgcta agcttgggtgc ggtacaaaat 720  
  
 cgtctagagc acacaattaa caactaagc gcttctggtg aaaacttgac agctgctgag 780  
 tctcgatcc gtgacgttga catggctaaa gagatgagcg aattcacaaa gaacaacatt 840  
 ctttctcagg ctctcaagc tatgettgct caagcaaacc aacagccgca aaactgactt 900  
 caattattac gttaa 915  
 <210> 7  
 <211> 276  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 7  
 ggaattgagc ccccaaagca tattgatatt cacagaaag aaatttactt gaccattcag 60  
 gaagaaaata accgtgcagc agcgttatcc agcgaatgga tctccgatt atcctcacia 120  
  
 aaaaagtgag gatTTTTTTA tttttgtatt acaaaaatca gagacaatcc gatattaatg 180  
 atgtagccgg gaggaggcgc aaaagactca gccagttaca aaataagggc acaaggacgt 240  
 gccttaacaa catattcagg gaggaacaaa acaatg 276  
 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus subtilis

<400>	8	
	gcacaaggac gt	12
<210>	9	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	9	
	attcaggag gaa	13
<210>	10	
<211>	225	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	10	
	atgctagttt tatcgcgaa aataaacgaa gcgattcaaa taggtgctga tattgaagta	60
	aaagtgattg cggttgaagg ggatcaagtg aagcttggaa ttgacgcccc aaagcatatt	120
	gatattcaca gaaagaaat ttacttgacc attcaggaag aaaataaccg tgcagcagcg	180
	ttatccagcg atgtgatctc cgattatcc tcacaaaaaa agtga	225
<210>	11	
<211>	267	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	11	
	atgaaaaatca atcaatttgg aacacaatcc gttaatccat atcaaaaaaa ttatgataag	60
	caagcgggtgc aaaaaactgt tgcacaacct caagataaaa ttgaatttc atcacaggct	120
	aaagaaatgc aacatgcatc cgacgcagtc actggttcac gacaggaaaa aattgvcgag	180
	cttaaagcgc aaattgaaaa cgggtcatalc aaagtagacg caaatcatat tgcgaaaaat	240
	atgattaatt ttataaaaa gcaataa	267
<210>	12	
<211>	765	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	12	
	atgcaatcct tgaattatga agatcagggtg ctttggacgc gctggaaaga gtggaaagat	60

cctaaagccg gtagcactt aatgcgccgt tacatgccgc ttgtcacata tcatgtaggc 120

agaatttctg tcggactgcc gaaatcagtg cataaagacg atcttatgag ccttggtatg 180

cttggtttat atgatgcct tgaaaaattt gaccccagcc gggacttaaa atttgatacc 240

tacgcctcgt ttagaattcg cggcgcaatc atagacgggc ttcgtaaaga agattggctg 300

cccagaacct cgcgcgaaaa aacaaaaaag gttgaagcag caattgaaaa gcttgaacag 360

cggtatcttc ggaatgtatc gcccgcggaa attgcagagg aactcggaat gacggtacag 420

gatgtcgtgt caacaatgaa tgaaggtttt tttgcaatc tgctgtcaat tgatgaaaag 480

ctccatgac aagatgacgg ggaaaaacatt caagtcatga tcagagatga caaaaatggt 540

ccgcctgaag aaaagattat gaaggatgaa ctgattgcac agcttgcgga aaaaattcac 600

gaactctctg aaaaagaaca gctggttgc agtttgttct acaaagagga gttgacactg 660

acagaaatcg gacaagtatt aaatctttct acgtcccga tatctcagat ccattcaaag 720

gcattattta aattaagaa tctgctggaa aaagtgatac aataa 765

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 13

ctggcgttac ccaacttaat c 21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 14

cttggcgtaa tcatggtcat ag 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 15

gaggaaacag gtgtggaaga ag 22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 16

ggtcatcttc tgtctgctg 20

<210> 17

<211> 1650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 17

ctatgacat gattacgcca agtgaataat gagaacagc caaagaaaa gaaaacagaa 60

cgctgctgt cagagtgcac ttttgataca aaaaataatt cagcagaagg tatgaatac 120

atTTtaatag acgatcttta tacaacagc gccaccttgc acttcgcagc ccgctgctta 180

ttagaaaaag gaaaagccgc ttcagtgtca tcttttacct tgatcagaag ctaaagatt 240

ctgtttttat gccgatataa tcaactagaa ttgacacagg catattatct aataaggaga 300

aaaaaagatg ggagaactgg ctaattgtcc gaaatgcaat gctttatTTT taaaaacaaa 360

gctgcaaacc gtatgtcagg cgtgtattaa ggaagaagaa aatcatttg agactgtcta 420

taaatTTTta agaaaacagg aaaaccggca atcaactttg agccggataa ctgaggaaac 480

aggtgtggaa gaagagctga tattgaaatt catcaggcag aagcgaattc agatcactca 540

tcttctaata ttggcatacc cttgtgaaag gtgcgggaca tcgattagag aaggcaagtt 600

ctgcaaggct tgccagtctg atattaagga tcaaatggat catttgaacc acgaggatgc 660

tctgaaaatc gagaaagaaa atagtaaaa agacacatac tatgcctata ataccaaaa 720

cagctgattc ctaaaactaa ctgaaaacgc agtcgataaa agggTTaaga ttgtTTaag 780

actgcaacgg aaagcgagag gaatcctatg aaaatcaatc aactgcagtt ttataaaaag 840

caataaaaa ggagaaagcc catgtcagcg aaggcaatta ttgaacaatt gaagcgactt 900

tgcgTTctgc atgagcacct gctcacgctg tctgaagaaa agacggaagc gctcaaagcc 960

ggcaaaacaa aagagcttTC taacattttg aaaaagagc aaaaatatat tcaagcaatc 1020

acgcagacag aagatgaccg gatcaaaaaca acttcggcct ttctcggata tagcgaanaat 1080  
aatactatntt ccgcatgtat cgccaaaacc tcaggcagtg aaaaggaaga gctggaacaa 1140  
ctatacgaat ctctttctca agttctcggga cgtctgaaaa aagtaaatga gatgaatagg 1200  
cagctgacaa gagacgcgct gcaattcatc tctatttcgt acgatatgct ggttcctaag 1260  
gaaaataact tcaattacag caaatcaatt aaagctgagc tgccgaaaag tagcaaaatg 1320  
aaactgtttg attcaaaaagc ttagcagaaa ggaattcaga aatgacatc tacctttatg 1380

gggcttgaaa ctgcaaggcg ggcgttaagc gctcagcagg cagcgttaag cactactgca 1440  
aataacgtgg caaatgccaa tactgatggg tatacaagac agcgggtctc attggaggca 1500  
actgactatt tcctgtctgt atctaaaaat gcagaaaaaa cagcgggaca aatgggtacg 1560  
ggcgttcaag gaaaatcagt tgagagaata agagatatct ttcttgacta ccaataccgt 1620  
cttcaaaaacc tggcgttacc caacttaatc 1650

<210> 18

<211> 2360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 18

ctatgacat gattacgcca agtgaacaat gatcattcat acgaagtacc atggcnaaat 60  
gaacataaaa gaagaacaaa tcattctttt tgaagcggg attccaggct ttttagaaga 120  
aaaacagttc gtcatacttc cgctttcaga agactctcca ttcgtggcac tgcagtcctg 180  
cattcagaa aatcttgctg ttatcgtcgt aagtcctgtt atctttttta agaattatga 240  
atctgatctt gatgaatcaa ctgctgaact tttggatata gataaatatc aagacgtaga 300  
agtcatgaca atattgacta tggcagagcc atttgaanaag tctactgcca atttattggc 360  
tcccattatt gtgaatgca agaacatgat ggctaagcaa gtcgttttac acgactcctc 420

atatacgaca aagcatccga ttggaggaga atcatgetag ttttatcgcg gaaaataaac 480  
gaagcgattc aatagggtgc tgatattgaa gtaanaagtga ttgcggttga aggggatcaa 540  
gtgaagcttg gaattgacgc cccaaagcat attgatattc acaggaaaaga aatttacttg 600  
accattcagg aagaaaataa ccgtgcagca gcgttatcca gcgatgtgat ctccgcatta 660  
tcctcacaaa aaaagtgagg atttttttat ttttgatata acaanaatcag agacaatccg 720  
atattaatga tgtagccggg aggaggcgca aaagactcag ccagttacaa aataagggca 780  
caagaacgtg ccttaacaac atattcaggg aggaacaaaa caatgcgtaa aggagaagaa 840

cttttactg gagttgtccc aattcttggt gaattagatg gtgatgttaa tgggcacaaa 900  
 ttttctgtca gtggagaggg tgaaggatgat gcaacatcac gaaaacttac ccttaaattt 960  
 atttgacta ctggaaaact acctgttcca tggccaacac ttgtcactac tttcggttat 1020  
 ggtgttcaat gcittgcgag ataccagat catatgaaac ggcatgactt tttcaagagt 1080  
 gccatgcccc aaggttatgt acaggaaaga actatatatt tcaaagatga cgggaactac 1140  
 aagacacgtg ctgaagtcaa gtttgaaggat gatacccttg ttaatagaat cgagttaaaa 1200  
 ggtattgatt ttaaagaaga tggaaacatt ctggacaca aattggaata caactataac 1260

tcacacaatg tatacatcat ggcagacaaa caaaagaatg gaatcaaagt taacttcaaa 1320  
 attagacaca acattgaaga tggaagcgtt caactagcag accattatca acaaaact 1380  
 ccaattggcg atggccctgt cttttacca gacaaccatt acctgtccac acaatctgcc 1440  
 ctttcgaaag atcccaacga aaagagagac cacatggtcc ttcttgagtt tgtaacagct 1500  
 gctgggatta cacatggcat ggatgaacta tacaataat tttaaaaaag accttggcgt 1560  
 tgccagggtc ttttaattta aatttctatc tcctaatcat tcctcatcct gtcactaact 1620  
 catgatataa taaccggatt ctccactaac tttttataaa tgtatttcca tacaagaaat 1680

ctaaaacaga agatTTTTT caaaaatat gtgtaatctt atctcgactt agtcgatata 1740  
 aacgatagat tggggcatag gggatgatca attgaacatt gaaaggctca ctacgttaca 1800  
 acctgtttgg gatcgttatg atactcaaat acataatcag aaagataatg ataacgaggt 1860  
 tcctgttcat caagtttcat ataccaatct tgctgaaatg gtgggggaaa tgaacaagct 1920  
 tttggaacct tcgcaagttc atctgaagtt cgagcttcat gacaagttaa atgaatacta 1980  
 tgtaaaggta atagaggact ctacaaatga agtgatccgc gaaattccac caaaacggtg 2040  
 gcttgatTTT tatgCGGcta tgactgaatt tcttgggtta tttgtagatg aaaaaagta 2100

gaataggagt ggtttgagat ggtcacaaga ataacaggtc tggcgtcagg aatggatata 2160  
 gatgatatcg tatcaaagct gatgcagaca gaaagagcgc cgcttgataa gctgacacaa 2220  
 aaaaagcaga ctcttgaatg gcagcgtgac agctatctg aagtaaacctc aaaaataaaa 2280  
 gaattgcaag attatatgtc taaaaatacg ttgacatata cgagcacgta tcagagcaac 2340  
 tggcgttacc caacttaac 2360

<210> 19

<211> 3164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 19

ctatgacat gattacgcca agtgaacaat gatcattcat acgaagtacc atggcceaat	60
gaacataaaa gaagaacaaa tcattctttt tgaagcggg attccaggct ttttagaaga	120
aaaacagttc gtcatacttc cgctttcaga agactctcca ttcgtggcac tgcagtcgct	180
cacttcagaa aatcttgctt ttatcgtcgt aagtcggtt atctttttta agaattatga	240
atctgatctt gatgaatcaa ctgctgaact tttggatata gataaatatc aagacgtaga	300
agtcatgaca atattgacta tggcagagcc atttgaaaag tctactgcga atttattggc	360
tcccattatt gtgaatcgca agaacatgat ggctaagcaa gtcgttttac acgactcctc	420
atatacgaca aagcatccga ttggaggaga atcatgctag ttttatcgcg gaaaataaac	480
gaagcgattc aaataggtgc tgatattgaa gtaaaagtga ttgcggttga aggggatcaa	540
gtgaagcttg gaattgacgc cccaaagcat attgatattc acaggaaaaga aatttacttg	600
accattcagg aagaaaaata cctgacagca gcgttatcca gcgatgtgat ctccgatta	660
tcctcacaaa aaaagtgagg atttttttat tttgtatta acaaaatcag agacaatccg	720
atattaatga tgtagccggg aggaggcgca aaagactcag ccagttacaa aataagggca	780
caagaacgtg ccttaacaac atattcaggg aggaacaaaa caatgaatat ggctgaaatc	840
gcccagcttg gagtctcaaa cccgtacaaa caacagtacg aaaactatat tggcggagct	900
tgggttccgc cggccggtgg cgaatacttt gaatctacaa cgccgattac gggaaaacct	960
tttacaagag ttccgcgctc cggccaacag gatgtggacg cagcgttaga tgctgccat	1020
gcagcgaaag ctgctgggc tagaacatca acaacggaac gcgccaatat tttaaaccgc	1080
atcgcagatc gtattgaagc gaatttgaag ctgcttgctg tcgcccgaag cattgacaac	1140
ggaaaacctg taagagaac aacggcagcg gatctgccgc ttgcagtgga ccattttcgt	1200
tattttgcag gttgcatcag agcacaagaa ggcggcatta gcgaaatcga tgcagacaca	1260
attgctgacc attttcatga acctctgggt gttgtgggcc agattatccc gtggaatfff	1320
cctttattga tggcgacgtg gaaactggca ccggcgcttg ctgccgaaa ctgtgtcgta	1380
cttaaacctg cagaacaaac accggcgtct atcttagttt tgatggaagt gattggcgat	1440
ctgctgccgc cggcgcttgt gaatgtcatc aacggttttg gcttagaagc tggcaaacct	1500
ttggcctcaa gcccgcgtat ttccaaagta gcttttacgg gtgaacaaac gacaggccgg	1560
ttaatcatgc aatatgcatc acagaatttg attcctgtta cactggaact tggcggaaaa	1620
agcccgaaca ttttcttga agatgtgtta gcagcgatg acgcattttt cgacaaagcg	1680
ctggaaggat ttgcaatggt tgcgttaat caaggcgaag tttgcacatg tctttcacgt	1740
gctctgatcc aggaaagcat ttatgatcgg tttatggaaa gagccctgaa acgcgtggct	1800

gccatcagac aaggacatcc gcttgacacg ggaacaatga ttggtgctca agcctctgca 1860  
 gaacagttag aaaaaatctt gtcctacatt gatctgggca gaaaagaagg agcacagtgc 1920  
 cttacgggtg gcgaacgcaa tgtcctggat ggcgaccttg caggcggcta ttacgtcaaa 1980  
 cctacagtat ttgcgggaca taacaaaatg cgcactcttc aagaagaaat ttttgccccg 2040  
 gtcgtaagcg ttacgacatt taaagatgaa gaagaagcac tggctatcgc caacgacacg 2100

ttatatggat tgggtgcggg cgtttgacac agagatggag cacgtgcgctt tcggatggga 2160  
 agaggtattc aagctggccg cgtgtggacg aattgttacc atgcttacc ggcccatgca 2220  
 gcgcttgccg gatataaaca gtctggcatc ggacgtgaaa accatcggat gatgttggat 2280  
 cattaccaac agacaaaaaa tttattgggt tcttactccc cgaacgcgctt gggctttttc 2340  
 taattttaaa aaagaccttg gcgttgccag ggtcttttaa tttaaatttc tatctcctaa 2400  
 tcattcctca tctgtcact aactcatgat ataataaccg gattctccac taacttttta 2460  
 taaatgtatt tccatacaag aaatctaaaa cagaagatth ttttcaaaa atatgtgtaa 2520

tcttatctcg acttagtcca tataaacgat agattggggc ataggggatg atcaattgaa 2580  
 cattgaaagg ctactactg tacaacctgt ttgggatcgt tatgatactc aaatacataa 2640  
 tcagaaagat aatgataacg aggttctctg tcatcaagtt tcatatacca atcttctga 2700  
 aatggtgggg gaaatgaaca agcttttggg accttcgcaa gttcatctga agttcgagct 2760  
 tcatgacaag ttaaatgaat actatgtaaa ggtaatagag gactctaaa atgaagtgat 2820  
 ccgcgaaatt ccacaaaac ggtggcttga ttttatgcg gctatgactg aatttcttgg 2880  
 gttatttga gatgaaaaa agtagaatag gagggtttg agatggtcac aagaataaca 2940

ggtctggcgt caggaatgga tatagatgat atcgtatcaa agctgatgca gacagaaaga 3000  
 gcgccgcttg ataagctgac acaaaaaaag cagactcttg aatggcagcg tgacagctat 3060  
 cgtgaagtaa actcaaaaat aaaagaattg caagattata tgtctaaaaa tacgttgaca 3120  
 tatccgagca cgtatcagag caactggcgt tacccaactt aatc 3164

<210> 20  
 <211> 3182  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide  
 <400> 20

ctatgacat gattacgcca agtgaacaat gatcattcat acgaagtacc atggccaat 60

gaacataaaa gaagaacaaa tcattctttt tgaaagcggg attccaggct ttttagaaga 120

aaaacagttc gtcatacttc cgctttcaga agactctcca ttcgtggcac tgcagtcctg 180  
 cacttcagaa aatcttgcgt ttatcgtcgt aagtccgttt atctttttta agaattatga 240  
 atttgatctt gatgaatcaa ctgctgaact tttggatata gataaatatc aagacgtaga 300  
 agtcatgaca atattgacta tggcagagcc atttgaanaag tctactgcga atttattggc 360  
 tcccattatt gtgaatcgca agaacatgat ggctaagcaa gtcgttttac acgactcctc 420  
 atatacgaca aagcatccga ttggaggaga atcatgctag ttttatcgcg gaaaataaac 480  
  
 gaagcgattc aaataggtgc tgatattgaa gtaaaagtga ttgcggttga aggggatcaa 540  
 gtgaagcttg gaattgacgc cccaaagcat attgatattc acaggaaaga aatttacttg 600  
 accattcagg aagaaaataa ccgtgcagca gcgttatcca gcgatgtgat ctccgcatta 660  
 tcctcacaaa aaaagtgagg atttttttat ttttgtatta acaaaatcag agacaatccg 720  
 atattaatga tgtagccggg aggaggcgca aaagactcag ccagttacaa aataagggca 780  
 caagaacgtg ccttaacaac atattcaggg aggaacaaaa caatgaccaa taatccccct 840  
 tcagcacaga ttaagcccgg cgagtatggt tccccctca agttaaagc ccgctatgac 900  
  
 aactttattg gcggcgaatg ggtagcccct gccgacggcg agtattacca gaatctgacg 960  
 ccggtgaccg ggcagctgct gtgcaagtg gcgtcttcgg gcaaacgaga catcgatctg 1020  
 gcgctggatg ctgcgcacaa agtgaagat aaatgggccc acacctcggg gcaggatcgt 1080  
 gcggcgattc tgtttaagat tgccgatega atggaacaaa acctcgagct gttagcgaca 1140  
 gctgaaacct gggataacgg caaacccatt cgcgaaacca gtgctgcgga tgtaccgctg 1200  
 gcgattgacc atttccgcta tttcgctcgt tgtattcggg cgcaggaagg tgggatcagt 1260  
 gaagttgata gcgaaaccgt ggcctatcat ttccatgaac cgttaggcgt ggtggggcag 1320  
  
 attatcccgt ggaacttccc gctgctgatg gcgagctgga aaatggctcc cgcgctggcg 1380  
 gcgggcaact gtgtggtgct gaaacccgca cgtcttaccg cgctttctgt actgctgcta 1440  
 atggaattg tcggtgattt actgcccggg ggcgtggtga acgtggtcaa tggcgcaggt 1500  
 ggggtaattg gcgaatatct ggcgacctcg aaacgcatcg ccaaagtggc gtttaccggc 1560  
 tcaacggaag tgggccaaca aattatgcaa tacgcaacgc aaaacattat tccggtgacg 1620  
 ctggagttag gcgtaagtc gccaaatata ttttttctg atgtgatgga tgaagaagat 1680  
 gcctttttcg ataaagcgt ggaaggcttt gcactgtttg cctttaacca gggcgaagtt 1740  
  
 tgcacctgtc cgagtcgtgc tttagtgcag gaatctatct acgaacgctt tatggaacgc 1800  
 gccatccgcc gtgtcgaag cattcgtagc gtaacccgc tcgacagcgt gacgcaaatg 1860  
 ggcgcgagg tttctcagg gcaactggaa accatctca actacattga tatcggtaaa 1920  
 aaagaggcgc ctgacgtgct cacaggcggg cggcgcaagc tgctggaagg tgaactgaaa 1980

gacggctact acctcgaacc gacgattctg tttggtcaga acaatatgcg ggtgttccag	2040
gaggagattt ttggcccggt gctggcgggtg accaccttca aaacgatgga agaagcgctg	2100
gagctggcga acgatacga atatggcctg ggcgcgggcg tctggagccg caacgtaat	2160
ctggcctata agatggggcg cggcatacag gctgggcgcg tgtggaccaa ctgttatcac	2220
gcttaccogg cacatgcggc gtttgggtggc taaaaacaat caggtatcgg tcgcgaaacc	2280
cacaagatga tgetggagca ttaccagcaa accaagtgcc tgctgggtgag ctactcggat	2340
aaaccgttgg ggctgttcta attttaaaa agaccttggc gttgccaggg tcttttaatt	2400
taaatttcta tctcctaate attcctcacc ctgtcactaa ctcgatgat aataaccgga	2460
ttctccacta acittttata aatgtatttc catacaagaa atctaaaaca gaagattttt	2520
ttccaaaaat atgtgtaate ttatctcgac ttagtcgata taaacgatag attggggcat	2580
aggggatgat caattgaaca ttgaaagget cactacgtta caacctgttt gggatcgtta	2640
tgatactcaa atacataatc agaaagataa tgataacgag gttcctgttc atcaagtttc	2700
atataccaat cttgctgaaa tgggtggggga aatgaacaag cttttggaac cttcgcaagt	2760
tcacttgaag ttcgagcttc atgacaagtt aatgaatac tatgtaaagg taatagagga	2820
ctctacaaat gaagtgatcc gcgaaattcc accaaaaacgg tggcttgatt tttatgcggc	2880
tatgactgaa tttcttgggt tattttgtaga tgaaaaaaag tagaatagga gtggtttgag	2940
atggtcacia gaataacagg tctggcgtca ggaatggata tagatgatat cgtatcaaag	3000
ctgatgcaga cagaaagagc gcccttgat aagctgacac aaaaaagca gactcttgaa	3060
tggcagcgtg acagctatcg tgaagtaaac tcaaaaataa aagaattgca agatttatg	3120
tctaaaaata cgttgacata tccgagcacg tatcagagca actggcgtta cccaacttaa	3180
tc	3182
<210> 21	
<211> 76	
<212> RNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 21	
uauaacacca auuaagagua acaaaacaag gagggacuua uacaacaauu ccgugcagga	60
acacgggaau aaaaca	76
<210> 22	
<211> 6	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag

<400> 22

His His His His His His

1

5