



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0033914
(43) 공개일자 2019년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0089 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0122650
(22) 출원일자 2017년09월22일
심사청구일자 없음
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김태윤
서울특별시 송파구 올림픽로4길 15, 아시아선수촌
아파트 8동 702호 (잠실동)
구태성
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 302동 1404호(
전민동, 엑스포아파트)
김성섭
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 307동 1404호(
전민동, 엑스포아파트)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

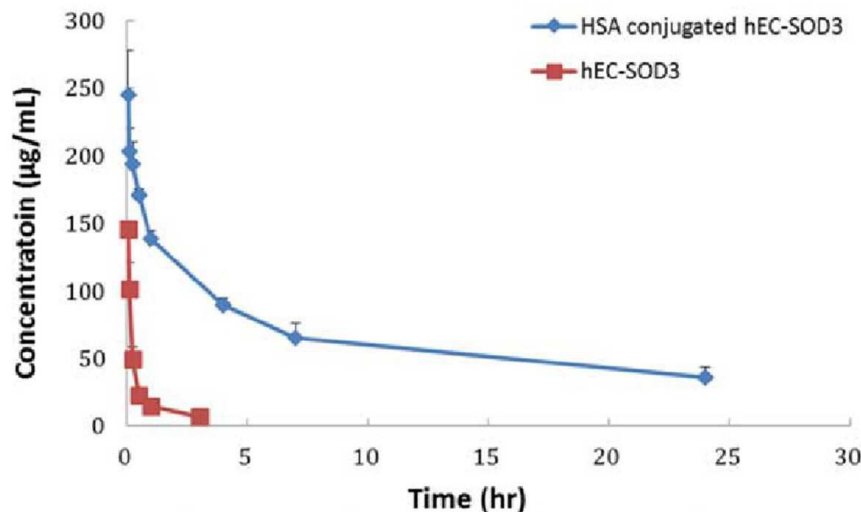
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 N 말단 또는 C 말단의 알부민 접합을 이용한 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법

(57) 요약

본 발명은 알부민 접합을 이용한 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 N 말단 또는 C 말단의 알부민 접합을 이용한 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질 안정화 방법은 EC-SOD 단백질을 비임상 또는 임상 적용될 수 있도록 안정성이 향상된 EC-SOD 단백질을 확보할 수 있도록 하며, 다양한 의약 및 화장품 산업에 적용될 수 있어 효과적이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12P 21/00 (2013.01)

C12Y 115/01001 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A9A9050567

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오 · 의료기술개발사업-신약후보물 질발굴및최적화사업

연구과제명 hEC-SOD 단백질을 이용한 차세대 천식 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 가톨릭대학교(성의교정)

연구기간 2016.10.17 ~ 2017.10.16

명세서

청구범위

청구항 1

세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 HSA(human serum albumin) 단백질을 접합시키는 단계를 포함하는 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HSA는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 EC-SOD는 서열번호 9 또는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 접합은 단백질 융합 방식에 의한 것을 특징으로 하는 안정화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 안정화는 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 촉매 활성(catalytic activity) 안정화인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 안정화는 혈중 반감기 증가, 평균 혈중 체류시간 증가, 및 혈중 클리어런스 파라미터의 감소로 이루어지는 군에서 선택되는 약동학적 파라미터의 개선인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

(a) EC-SOD 및 HSA가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계 후 분리 수득된 배지로부터 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계는 배양 중 구리(Cu) 및 아연(Zn)을 결핍시키는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 융합단백질 정제 전의 배지 또는 정제된 융합 단백질은 구리(Cu) 및 아연(Zn) 이온과 반응하는 과정을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 11

제7항의 방법에 의해 생산된 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 11 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알부민 접합을 이용한 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 N 말단 또는 C 말단의 알부민 접합을 이용한 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사람의 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(extra cellular -superoxide dismutase ; EC-SOD)는 최근 항산화제(anti-oxidants)로서 노화와 관련된 연구 및 관련 제품의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다 (T.J.Bivalacqua, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 284, 1408-1421, 2003; A.G.Est, Free Radic Biol Med, 28, 437-446, 2000).

[0005] 활성산소를 제거할 뿐만 아니라 다른 항산화 효소가 작용할 수 있도록 하여 세포를 보호하는 기능을 가지는 SOD(superoxide dismutase)는 구리와 아연 원자를 가지고 있는 Cu/Zn SOD(SOD 1), 망간 원자를 가지고 있는 Mn-SOD(SOD 2) 및 세포 표면 또는 세포 외액에 존재하는 EC-SOD(extracellular superoxide dismutase)로 구분된다.

[0007] 그 중 EC-SOD는 피부암, 색소 침착성 질환, 광노화, 피부염, 표피증식질환, 건선, 아토피, 두드러기 및 알레르기 등의 피부질환을 치료하는데 유효한 효과를 가지고 있으며(등록특허 제100676502호), 혈관 신생에 의한 질병의 예방 및 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(등록특허 제101019470호). 또한, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 유방암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종 등의 암질환에도 유효한 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(공개특허 제10-2008-108876호).

[0009] 따라서, 상기의 각종 질병 예방 및 치료용 조성물로 사용하기 위해 사람의 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD)에 대한 재조합체 개발이 대장균 (H.J.He, Protein Expr Purif, 24, 13-17, 2002; X.Q.Zhu, Acta

Biochim Biophys Sin, 37, 265-269, 2005), 동물세포(L.Tibell, Proc Natl Acad Sci, 84, 6634-6638, 1987; M.Stromqvist, J Chromatogr, 621, 139-148, 1993), 효모(H.L.Chen, J Agric Food Chem, 54, 8041-8047, 2006; N.Mutoh, Curr Genet, 41, 82-88, 2002)의 발현 시스템을 활용하여 활발하게 진행되고 있다. 그러나 번역후 가공하는 시스템이 대장균 및 효모에는 잘 갖춰져 있지 않아서 동물세포에서 배양하는 것이 가장 바람직한 것으로 알려져 있다.

[0011] 하지만, 항산화기능이 우수한 것으로 확인되고 있는 사람 재조합 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD)는 그 자체로는 안정성과 활성에 문제가 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 이러한 안정성을 향상시키기 위한 한가지 방법으로서, 구리(Cu ; copper) 또는 아연(Zn ; zinc) 같은 미네랄 원소들이 결합되어 있을 때 자체적으로 안정적인 효능을 발휘하는 것으로 보고되고 있다(M.C.Carroll, J Biol Chem, v.281, 28648-28656, 2006; I.M.Ahl, Protein Expr Purif, 37, 311-319, 2004; C.S.Hwang, Microbiology, 148, 3705-3713, 2002; H.Walti, Biol Neonate, 82, 96-102, 2002).

[0013] 이처럼 안정성과 활성을 향상시키기 위한 노력에도 불구하고 EC-SOD의 불안정성의 문제는 여전히 남아 있어서, 치료용 및 화장품용 조성물로 개발함에 있어서 어려움이 있어왔다. 따라서, EC-SOD 단백질의 불안정성 문제를 해결하기 위한 연구의 필요성이 있어왔다.

[0015] 한편, 알부민은 전 혈장중에 존재하는 단백질의 약 60%를 차지할 정도로 동식물의 조직에 다량 존재하는 단백질로서, Ryunosuke Kato et al.에 의하면 Albumin이 Cu(구리)와 복합체를 이루어 SOD mimics 활성을 가짐이 보고되었고(Ryunosuke Kato et al., Superoxide Dismutase Activity of the Naturally Occurring Human Serum Albumin-Copper Complex without Hydroxyl Radical Formation, Chem. Asian J. 2014, 9, 83-86.), 알부민이 Cu에 대한 경쟁적 킬레이션 활성을 가짐이 알려졌다(Miesel R et al., Chemiluminescence assays of Cu₂Zn₂ superoxide dismutase mimicking Cu-complexes, Free Radic Res Commun. 1991;12-13 Pt 1:253-8.). 뿐만 아니라 Marcelo G. et al. 등은 SOD가 Albumin의 산화(oxidation) 반응을 유도한다고 보고 하였는데(Marcelo G. et al., Albumin Oxidation to Diverse Radicals by the Peroxidase Activity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in the Presence of Bicarbonate or Nitrite: Diffusible Radicals Produce Cysteinyl and Solvent-Exposed and -Unexposed Tyrosyl Radicals, Biochemistry 2004, 43, 344-351.), 이처럼 SOD와 Albumin은 상호간에 반응성을 가지는 것으로 알려져 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명자들은 사람 재조합 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD, 즉 SOD3)의 안정화 방법을 연구하던 중, EC-SOD의 말단에 인간 혈청 알부민(HSA) 단백질을 부착시킨 접합체 형태로 제조하는 경우 그 안정성이 매우 개선되는 점을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0019] 따라서 본 발명의 목적은 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 HSA(human serum albumin) 단백질을 접합시키는 단계를 포함하는 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 목적은

[0022] (a) EC-SOD 및 HSA가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질 전환하는 단계;

[0023] (b) 상기 (a) 단계에서 형질 전환된 세포를 배양하는 단계; 및

[0024] (c) 상기 (b)단계 후 분리 수득된 배지로부터 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 융합 단백질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0026] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 HSA(human serum albumin) 단백질을 접합시키는 단계를 포함하는 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

[0029] (a) EC-SOD 및 HSA가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질 전환하는 단계;

[0030] (b) 상기 (a) 단계에서 형질 전환된 세포를 배양하는 단계; 및

[0031] (c) 상기 (b)단계 후 분리 수득된 배지로부터 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0033] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] 달리 규정되지 않는 한, 본 발명에 사용된 기술적 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 이해하는 바와 동일한 의미를 갖고, 다음 문헌에 기재된 바와 부합된다(참고: Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York).

[0037] 본 명세서에서 용어 "단백질"은 '폴리펩타이드(polypeptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. 상기 단백질(protein)은 화학적으로 합성된 단백질뿐 아니라 배양된 세포의 유전자에 의해 암호화되는 천연 합성된 단백질 및 세포에 의해 분비되는 재조합 단백질을 포함한다. 재조합 단백질은 분자 생물학 기법에 의해 세포 내로 도입된 전이유전자(transgene)에 의해 암호화되는 단백질이다. 단백질은 번역 후 가공에서 화학적 방법에 의해 또는 효소에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게 본 발명에서의 EC-SOD 단백질 또는 HSA-hSOD3 융합단백질은 재조합 단백질이다.

[0039] 본 발명에서 "폴리뉴클레오타이드" 또는 '핵산'은 단일 -또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오타이드의 공지된 아날로그도 포함된다.

[0041] 본 발명은 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 HSA(human serum albumin) 단백질을 접합시키는 단계를 포함하는 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법에 관한 것이다.

[0043] 상기 HSA(human serum albumin)는 사람의 혈장 내에 다량 함유되어 있는 단백질로서, 인간의 혈장 내에 존재하는 것으로 알려진 알부민이라면 그 구체적 아미노산 서열이 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 Genbank

Accession No. AAA98797.1, ANC98520.1, AAH36003.1, AAH34023.1, NP_000468.1(서열번호 1), AEE60908.1(서열번호 3) 등으로 당 업계에 공지된 것을 사용할 수 있다.

[0044] 바람직하게 본 발명의 HSA는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전장 서열 또는 이들의 활성 단편 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 활성 단편으로서 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 1의 전장 서열 중 N-말단의 시그널링 펩타이드를 제외하고 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드를 사용한 바 있다. 따라서 더욱 바람직하게 본 발명의 HSA는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 가장 바람직하게 본 발명에서 HSA는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0046] 상기 세포의 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질은 기존에 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈로 알려진 단백질의 세 가지 종류 중, SOD1 및 SOD2와는 다르게 세포외로 분비되는 단백질을 일컬으며, 본 명세서에서 SOD3, hEC-SOD, hSOD3 또는 EC-SOD3 등으로 기재될 수 있다(h는 human을 나타냄). 본 발명에서 상기 EC-SOD는 인간 유래의 것으로 당업계에 알려진 것이라면 그 구체적 아미노산 서열이 특별히 제한되지 않으며, 일례로 Genbank Accession No. CAG46651.1, NP_003093.2, AAA62278.1, EAW92823.1, AAH14418.1, AAA66000.1, AAV40827.1 등으로 당업계에 공지된 것을 사용할 수 있다.

[0047] 바람직하게 인간 EC-SOD 단백질은 N-말단 영역의 개시 메치오닌 아미노산을 포함하여 18번째의 알라닌까지는 시그널 펩타이드로 활성형 EC-SOD는 상기 시그널 펩타이드가 제거된 222개의 아미노산으로 구성되어 있으며, C-말단 영역(아미노산 잔기 210번~215번)에 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain)을 가지고 있다. 기본형으로 알려진 인간 EC-SOD의 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재된 것과 같다. 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열 뿐만 아니라 다형성(polymorphism)을 나타내는 인간 EC-SOD 서열이 자연계에서 발견되고 있다. 이러한 다형성을 수반하는 자연계의 인간 EC-SOD 서열은 상기 서열번호 5의 아미노산 서열 중 58번째에 위치하는 Ala 잔기가 Thr로 치환된 서열 구성을 가지며, 이를 서열번호 7에 나타내었다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 EC-SOD는 바람직하게 상기 서열번호 5 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 전장 서열 또는 이들의 활성 단편 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 활성 단편으로서, 서열번호 5 또는 서열번호 7의 전장 서열 중 N-말단의 시그널링 펩타이드를 제외하고 서열번호 9 또는 서열번호 22로 표시되는 폴리펩타이드를 사용할 수 있다. 따라서 더욱 바람직하게 본 발명의 EC-SOD는 서열번호 9 또는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 가장 바람직하게 본 발명에서 EC-SOD는 서열번호 9 또는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열로 이루어는 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 EC-SOD 안정화 방법은, EC-SOD의 N-말단 또는 C-말단에 HSA 단백질을 접합시키는 것을 특징으로 한다. 바람직하게 EC-SOD의 N-말단에 HSA 단백질이 접합되는 것 일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 용어 ‘접합’은 기능 또는 구조가 다르거나 같은 두 분자를 일체화하는 것으로, 두 개의 단백질(본 발명에서는 HSA와 EC-SOD)을 결합할 수 있는 것으로 알려진 모든 물리, 화학적 또는 생물학적 방법에 의한 접합일 수 있으며 이에 제한되지 않으나, 바람직한 일례로서 단백질의 화학적 합성 방법 또는 유전적 융합 방법에 의한 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 접합은 가장 바람직하게 유전적 융합 방법에 의한 것일 수 있다. 상기 ‘유전적 융합’이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0054] 상기 접합은 임의의 링커(linker)를 통해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 단백질의 화학적 합성 또는 유전적 발현 시에 사용 가능한 펩타이드 링커(linker)를 사용할 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 당업계에 이중 펩타이드 융합시 사용되는 것으로 알려진 것이라면 그 구체적 서열이 특별히 제한되지 않으며, 일례로 본 발명의 일 실시예에서는 아르기닌(Arg)을 링커로 사용한 바 있다.

[0056] 당업계에는 두 개의 단백질 분자를 단순히 화학적으로 접착하는 글루타르알데하이드와 같은 접착 물질이 공지되어 있으나, 이러한 접착방식은 두 개의 단백질 분자를 일체화 시킬 수는 있으나 구체적인 접착 위치를 지정하는

것이 어려워 하나의 반응 용액 내에 존재하는 결합물들의 결합 형태가 일정하지 못할 수 있고, 결합물 개개의 분자가 이중적인 구조를 띠게 존재하여 불균질할 가능성이 크다. 더욱이 단백질의 접힘 등을 고려할 때, N-말단 또는 C-말단 등 연결 위치의 특이성을 구성하기 어렵다. 따라서 EC-SOD(hSOD3)와 HSA의 연결 위치 특이성을 주요한 특징으로 하는 본원 발명에서는 펩타이드 링커를 통해 유전적 융합을 하는 것이 가장 바람직하다.

[0058] 본 발명에서 용어 ‘안정’은 물질의 구조, 기능, 특성 등의 성질이 바뀌어 달라지지 아니하고 일정한 상태를 유지하는 것, 또는 일정한 환경에서 오랫동안 존재하며 그 기능을 오랫동안 유지할 수 있는 것을 의미한다. 더욱 구체적으로 본원 발명에서는 SOD3가 세포 내에서 제작 및 분비된 직후의 성질(구조, 기능, 특성 등)을 유지하는 것 또는 SOD3가 약물로 사용하기에 적합한 약동학적 파라미터 수준을 나타내는 것을 의미한다. 따라서 본원 발명의 안정화는, 기존에 SOD3가 세포로부터 분비된 후부터 급격한 속도로 본연의 활성(활성산소종의 제거 활성 등)이 계속 저하되며 동물의 체내에 투여되었을 때 체내 환경으로부터 급격히 제거되고 본연의 활성을 충분히 나타내지 못하는 것으로 알려진 것과는 달리, 이러한 문제적 부분들을 개선한 것을 의미한다.

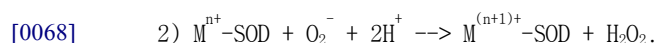
[0060] 본 발명에서 SOD3 단백질 안정화는, 단백질의 활성이 세포로부터 분비 직후의 정도로 유지 또는 상승되는 것뿐만 아니라, 단백질 활성의 저하 폭이 기존(천연 SOD3)보다 작아진 경우에도 단백질이 안정화되었다고 간주할 수 있다. 또한, 단백질의 분해, 구조 변성이 억제된 경우에도 단백질이 안정화되었다고 간주할 수 있다. EC-SOD의 활성이 유지 또는 상승되었는지 여부는, 동일한 조건하에서 대조군과 실험군의 활성을 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서 단백질 활성은 결합활성, 중화활성, 세포보호활성, 아고니스트 활성, 안타고니스트 활성, 효소활성, 촉매활성 등 SOD3(EC-SOD)가 가지는 고유의 성질에 해당하는 것이라면 어떤 활성이어도 되고 그 종류가 특별히 한정되지 않으나, 생체, 조직, 세포, 단백질, DNA, RNA, 생체 대사산물 등에 양적 및/또는 질적인 변화, 영향을 초래하는 활성인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 촉매 활성이 바람직하다.

[0064] 본 발명의 상기 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법은 촉매 활성(catalytic activity)을 안정화시키는 것을 특징으로 한다.

[0065] 본 발명에서 상기 ‘촉매 활성’은 SOD3가 자신은 변화하기 아니하면서 다른 물질의 화학반응을 매개하여 반응속도를 빠르게하거나 늦추는 모든 종류의 활성을 의미한다. SOD3의 촉매 활성으로 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 활성산소종 제거 반응의 촉매 활성일 수 있으며, 이는 EC-SOD 단백질이 슈퍼옥사이드(O_2^-)를 제거하여 돌연변이를 유발하지 못하도록 막는 활성 및 기능으로 정의한다. 본 명세서에서 촉매 활성은, 하기 반응식으로 나타낼 수 있으며, 금속이온과 ED-SOD가 결합하여 슈퍼옥사이드를 제거하고 산소를 생성하거나, 슈퍼옥사이드와 수소를 반응시켜 과산화수소를 생성하는 것으로 정의한다.

[0066] [반응식]



[0069] * M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2)

[0070] 본 발명의 일실시예로, HSA-hSOD3 단백질의 촉매활성을 측정하기 위하여, 슈퍼옥사이드 소거능(scavenging superoxide)을 측정할 수 있다.

[0072] 본 발명의 상기 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질의 안정화 방법은 혈중 안정성을 증가시키는 것을 특징으로 한다. 이는 체내에서 SOD3가 약물로 사용하기에 적합한 약동학적 파라미터 수준을 나타내는 것을 나타내도록 하는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 혈중 반감기($T_{1/2}$) 증가, 평균 혈중 체류시간 (MRT)

증가, 및 혈중 클리어런스(CL)의 감소로 이루어지는 군에서 선택되는 약동학적 파라미터(pharmacokinetic parameters)의 개선으로 설명될 수 있다. 이러한 약동학적 파라미터의 측정은 당업계에 공지된 기구 및 방법을 이용하여 측정될 수 있으며, 일례로 본 발명의 실시예에서는 HPLC/MS/MS 분석 및 WinNonlin WinNonlin(Pharsight) 소프트웨어를 사용하여 약동학적 파라미터를 산출한 바 있다.

- [0074] 본 발명은 (a) EC-SOD 및 HSA가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계;
- [0075] (b) 상기 (a) 단계에서 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및
- [0076] (c) 상기 (b)단계 후 분리 수득된 배지로부터 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질의 생산방법과, 상기 방법에 의해 생산된 안정성이 향상된 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질을 제공한다.
- [0078] 본 발명에서 용어 ‘융합 단백질’은 2가지 이상의 단백질로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 상기 융합 단백질은 별개의 단백질로부터 각각 유래된 아미노산 서열 영역들 사이에 추가의 연결성 영역(linker)을 포함할 수 있다. 상기 링커(linker)는 본 발명의 융합 단백질을 암호화 하는 폴리뉴클레오타이드 제조과정이나, 상기 융합 단백질의 화학적 합성 과정 중에 삽입되는 것으로 그 크기나 서열의 종류는 특별히 제한되지 아니한다. 바람직하게는 1개 내지 10개의 아미노산으로 이루어지는 것일 수 있다. 상기 링커는 당업계에 이중 펩타이드 융합시 사용되는 것으로 알려진 것이라면 그 구체적 서열이 특별히 제한되지 않으며, 일례로 본 발명의 일 실시예에서는 아르기닌(Arg)을 링커로 사용한 바 있다.
- [0080] 본 발명의 융합단백질은 전술한 바와 같이 HSA 및 EC-SOD(SOD3)의 전장 서열 또는 이의 단편 서열 들을 포함하는 것이라면 그 구체적 서열 구성이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 서열번호 11 또는 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 가장 바람직하게 본 발명에서 HSA-SOD3 융합단백질은 서열번호 11 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0082] 또한 본 발명의 융합 단백질은 공지의 검출방법에 사용되는 표지물질 등을 추가로 부착할 수 있는데, 융합 단백질을 검출 할 수 있는 물질이라면 제한되지 않으나, 바람직하게 마커 펩타이드를 추가로 부착할 수 있다. 상기 마커 펩타이드는, 공지된 것으로서 본 발명의 HSA-hSOD3 융합단백질의 활성, 구조 및 안정성 등에 영향을 주지 않는 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 His-tag를 사용할 수 있다. 상기 His-tag는 1개 내지 10개의 히스티딘(Histidine)으로 이루어진 펩타이드 단편을 의미한다. 바람직하게 상기 His-tag는 6 개 내지 10개의 히스티딘으로 이루어지는 것 일수 있다.
- [0083] 상기에서 히스티딘 잔기는 재조합 단백질을 발현시킨 후 정제시 필요한 꼬리표(tag)로 가장 많이 이용되는 tag 중 하나로, 이러한 tag는 특이성(specificity)이 높아야 하고 원하는 단백질의 구조에 영향을 최대한 적게 주어야 한다. 바람직하게는 Histidine이 1개 내지는 10개가 연속으로 오는 peptide로 구성될 수 있는데, size가 작고 원래의 protein 구조에 영향도 별로 주지 않기 때문에 재조합 단백질을 만든 후 따로 잘라주지 않아도 된다는 편의성이 있다. tag는 vector의 종류에 따라 target protein의 N-terminus(앞쪽), C-terminus(뒤쪽) 어느 쪽에도 만들수 있고, 단백질의 구조의 영향을 주는 것에 따라 앞 또는 뒤쪽을 결정할 수 있다. 본 발명에서 상기 히스티딘 잔기(His-tag)는 바람직하게 HSA-hSOD3의 N- 말단에 위치하는 것일 수 있다. 일례로 본 발명의 일 실시예에서는 HSA-hSOD3의 N- 말단에 His tag 가 부착된 단백질(His tag-HSA-hSOD3 fusion protein)로서 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 제작한 바 있다.
- [0085] 또한 본 발명의 상기 HSA-SOD3 융합단백질은 상기 융합단백질의 발현 또는/및 분비 효율 향상을 위하여 신호 펩티드(signal peptid)를 추가로 포함할 수 있다. 일례로 본 발명의 일 실시예에서는 His tag-HSA-hSOD3 fusion protein의 N-말단에 HSA signal peptide(서열번호 16)를 부가하여, 본 발명의 융합단백질을 생산한 바 있다.

- [0087] 이러한 본 발명의 HSA-SOD3 융합단백질을 생산하는 방법을 이하에서 단계별로 설명한다.
- [0089] (a) 단계에서는 EC-SOD 및 HSA가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환한다.
- [0091] 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 전술한 바와 같은 HSA-SOD3 융합단백질을 코딩하는 것이라면 그 구체적인 뉴클레오타이드 서열이 특별히 제한되지 않는다. 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 융합단백질 내에 포함된 HSA 또는 SOD3의 구체적 서열에 따라 당업자가 임의의 변경을 가할 수 있다. 일례로 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 HSA는 서열번호 2로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다. 따라서 당업자는 전술한 HSA의 전장 서열 또는 이의 단편 서열의 구체적 구성에 따라 상기 염기 서열을 발췌하여 사용할 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 HSA 단편은 서열번호 4로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다.
- [0092] 또한 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3(EC-SOD)는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있고, 서열번호 7로 표시되는 SOD3(EC-SOD)는 서열번호 8로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다. 따라서 당업자는 전술한 SOD3(EC-SOD)의 전장 서열 또는 이의 단편 서열의 구체적 구성에 따라 상기 염기서열을 발췌하여 사용할 수 있으며, 구체적으로 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3(EC-SOD) 단편은 서열번호 10으로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있으며, 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3(EC-SOD) 단편은 서열번호 23으로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다.
- [0094] 바람직하게 상기 (a) 단계에서 사용되는 핵산 서열은, 서열번호 11 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HSA-SOD3 융합단백질을 코딩하는 핵산인 것이 바람직하다. 그 구체적인 일례로서, 상기 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 단백질은 서열번호 12로 표시되는 염기 서열로 이루어지는 뉴클레오타이드에 의하여 코딩될 수 있으며, 상기 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 단백질은 서열번호 25로 표시되는 염기 서열로 이루어지는 뉴클레오타이드에 의하여 코딩될 수 있다. 따라서 상기 (a) 단계에서 사용되는 핵산은 바람직하게 서열번호 12 또는 서열번호 25로 표시되는 염기서열을 포함하는(또는 상기 서열로서 이루어지는) 것일 수 있다.
- [0096] 상기 벡터는, 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라 상기 핵산을 벡터 내로 삽입하여 적절한 전사/해독 조절서열을 이용하여 본 발명의 융합 단백질을 발현하도록 제조된 발현벡터를 의미한다.
- [0098] 상기 벡터는 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오타이드) 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 핵산 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 핵산 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 상기 핵산의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 상기 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 상기 발현 조절 서열은, 일례로 목적 상기 핵산 발현을 유도하기 위한 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 서열, 인핸서, 코작(Kozac) 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열(예를 들어 샤인-달가노 서열) 등을 목적에 따라 다양하게 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 15의 코작 서열을 사용한 바 있다.
- [0100] 상기 발현 벡터의 모벡터로 사용되는 벡터는 특별한 제한이 없으며, 이 발명이 속하는 기술분야에서 숙주세포로 사용되는 미생물 또는 특정 종류의 세포에서의 발현을 위하여 통상적으로 사용되는 모든 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체 등이 사용 가능하다. 예컨대, 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스

미드(YEp13, YEp24 및 YCp50), pNATAB 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0102] 상기 세포는 숙주 세포를 의미하는 것으로 일례로 박테리아 세포 또는 효모 등의 원핵세포, 가축, 인간 등을 포함한 포유동물의 세포를 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 세포(숙주 세포)는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 또는 바람직한 특정 방식으로 유전자로부터 목적 생성물을 생산할 수 있는 것을 선택할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질의 해독 및 해독 후 프로세싱과 변형에 대한 특징적이고 특이적인 기작을 갖고 있다. 적합한 세포주 또는 숙주 시스템으로는 발현된 이중 단백질(본 발명에서 HSA-SOD3)의 바람직한 변형 및 프로세싱을 제공하는 것을 선택할 수 있다. 바람직하게 본 발명에서 상기 세포는 포유동물 세포인 것을 특징으로 한다.

[0103] 대장균 등의 박테리아 세포 또는 효모 등의 원핵세포는 번역 후 가공 시스템의 존재 유무 및 방식 등에서 포유동물과 차이가 있어, 본원 발명에서 목적하는 활성을 갖는 HSA-SOD3 융합단백질을 생산하기 어렵다. 따라서 본 발명의 상기 세포는 바람직하게는 가축, 인간 등을 포함한 포유동물의 세포일 수 있다.

[0105] 벡터를 숙주세포 내로 전달하여 숙주세포를 형질전환 시키는 방법은 공지된 방법이면 어떠한 것이든 가능하며 특별히 제한되지 아니한다. 예를 들어, 대장균을 이용할 경우 열충격(heat shock)이나 전기천공법(electroporation) 등의 방법을 통해 형질전환할 수 있으며 동물세포를 이용한 생산 세포주 구축 시 인산칼슘침전법(calcium phosphate precipitation), DEAE-dextran법, 전기천공법(electroporation), 직접 미세주입법(direct microinjection), DNA-로딩 리포솜(DNA-loaded liposome)법, 리포펙타민-DNA 복합체(lipofectamine-DNA complex)법, 세포 음파분쇄법(cell sonication), 고속미세분사(high velocity microprojectile)를 이용한 유전자 폭격법(gene bombardment), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine) 등 다량이온(polycation)법 및 수용체 매개 형질전이법(receptor-mediated transfection)에 의하여 형질전환할 수 있다. 이 기술들 중 일부는 생체 내 또는 생체 외 사용을 위해 개량될 수 있다.

[0107] (b) 단계에서는 상기 (a) 단계에서 형질전환된 세포를 배양한다.

[0109] 상기 배양은 융합단백질의 발현을 가능하게 하는 적절한 조건하에서 수행하며, 이러한 조건은 당업자에게 익히 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 형질전환 세포는 통상적인 배양방법에 의해 대량으로 배양할 수 있다. 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 예를 들어, LB배지, 2X YT배지, 또는 DMEM 등을 사용할 수 있다. 세포의 배양은 통상의 세포 배양 조건상에서 가능하며 예를 들어, 온도 범위 15℃ 내지 45℃에서 10시간 내지 40시간 동안 배양할 수 있다.

[0111] 본 발명에서는 상기 (b) 단계는 배양 중 구리(Cu) 및 아연(Zn) 이온을 결핍시키는 것을 특징으로 할 수 있다. 배양 중 구리 및 아연 이온을 결핍시키면 상기 본 발명의 HSA-SOD3 융합단백질의 세포의 분비율이 높아진다.

[0113] (c) 단계에서는 상기 (b)단계 수행 후에 분리 수득된 배지로부터 융합 단백질을 정제한다.

[0115] 상기 (b) 단계를 거쳐 생산된 배양액 중의 세포를 제거하고 배양 배지만을 회수하기 위해 원심분리(centrifugation) 또는 여과(filtration) 과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자가 필요에 따라 수행할 수 있다. 균체를 제거한 배양배지(여액)는 통상적인 방법에 따라 냉장하여 그 활성을 잃지 않도록 단기 보존할 수 있다.

[0117] 본 발명의 HSA-SOD3 융합단백질은 상기 배양 배지로부터 통상의 방식으로 정제될 수 있으며, 예를 들어, 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투

석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피와 같은 칼럼 크로마토그래피 및 한외 여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 융합단백질을 정제할 수 있다(Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).

[0119] 이때, 상기 (c) 단계에서 융합단백질 정제 전의 배지 또는 정제된 융합 단백질은 구리(Cu) 및 아연(Zn) 이온과 반응하는 과정을 추가로 포함할 수 있다. 구리 및 아연 이온과 반응시키는 과정을 추가로 포함하는 경우에 HSA-SOD3 융합 단백질의 활성이 더 좋아진다.

[0121] 상기 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는 방법으로 제조된 HSA-SOD3 융합단백질은 BSA(bovine serum albumin), PEG(polyethylene glycol) 및 FBS(fetal bovine serum)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것과 혼합시켜 보관될 수 있다. 상기 BSA, PEG, FBS 또는 이들의 혼합물은 물(예컨대, 여과되거나 멸균된 물), 아세트이트 완충액, 숙시네이트 완충액, 포스페이트 완충액, 인산완충식염수(PBS) 또는 시트레이트 완충액과 같은 완충액 속에 포함되어 제공되는 것일 수 있다.

[0123] 또한 본 발명은, 상기 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는 방법으로 제조된 HSA-SOD3 융합단백질(즉, 안정화된 세포 외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 융합 단백질)을 제공한다.

[0124] 상기 본 발명의 HSA-SOD3 융합단백질은 1℃ 내지 40℃에서 14일 이상 활성을 유지할 수 있는 것을 특징으로 한다. 바람직하게 상기 융합단백질은 1℃ 내지 40℃에서 10 내지 30일 동안, 더욱 바람직하게는 12 내지 20일 동안 활성을 유지하는 것을 특징으로 한다.

[0126] 좀더 구체적으로 상기 본 발명의 HSA-SOD3 융합단백질은 저온에서 활성을 유지하는 것을 특징으로 한다. 상기 저온이란 바람직하게 1℃ 내지 15℃의 온도를 의미할 수 있다.

[0127] 바람직하게 본 발명의 상기 융합 단백질은 상온(15℃ 내지 25℃) 내지 고온에서 활성을 유지하는 것을 특징으로 한다. 상기 고온이라함은 35℃ 내지 40℃를 의미하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 37℃이다.

발명의 효과

[0129] 본 발명의 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(EC-SOD) 단백질 안정화 방법은 EC-SOD 단백질을 비임상 또는 임상에 적용될 수 있도록 안정성이 향상된 EC-SOD 단백질을 확보할 수 있도록 하며, 다양한 의약 및 화장품 산업에 적용될 수 있어 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 HSA-hSOD3 발현 벡터의 개열지도이다.

도 2는 본 발명의 HSA-hSOD3 융합단백질을 발현하도록 형질전환된 HEK 293E 세포에서, 상기 목적 단백질이 정상적으로 발현되는 지를 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

도 3은 본 발명에서 HSA-hSOD3 융합단백질을 발현하도록 형질전환된 HEK 293E 세포로부터의 배양물을 Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피로 정제하고, 그 정제 산물에 N-his-HSA-hSOD3 (N말단에 his 태그를 부착한 HSA-hSOD3 융합단백질)가 존재하는지를 SDS-PAGE 및 coomassie staining 방법으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명 HSA-hSOD3 융합 단백질의 안정성을 평가하기 위하여, 상기 융합 단백질을 각각의 조건별(온도, 버퍼 조건 등)로 14일 이상 인큐베이션을 하며 그 활성의 변화를 측정하고, 14일째에 웨스턴블롯으로 각 조건별

단백질 상태를 확인한 결과이다. (A: 0.1%BSA in PBS 버퍼 조건, B: PBS 버퍼 조건, C: A 및 B 실험 14일째 각 실험군 별 단백질 웨스턴블롯 결과)

도 5는 정제된 직후의 HSA-hSOD3 융합단백질을 PBS 또는 Cu/Zn 이온을 포함하는 PBS에 투석시켰을때, 상기 융합 단백질 활성에 대한 Cu/Zn의 영향을 WST-1 assay 방법으로 평가한 결과를 나타낸다(융합단백질 중 EC-SOD의 총량이 0.1mg/ml에 해당하는 양에 대하여 실험).

도 6은 수컷 ICR 마우스에 hSOD3(hEC-SOD3으로 표기) 또는 본 발명의 HSA-hSOD3 융합단백질을 각각 IV 투여한 후, 이들의 혈장농도-시간 프로파일을 나타낸다(Linear-linear scale).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

HSA-hSOD3 융합단백질의 제조

<1-1> HSA-hSOD3 융합 단백질 발현 벡터 제작

hSOD3(human EC-SOD, 서열번호 9)의 N-말단에 HSA(human serum albumin, 서열번호 3)의 C-말단이 아르기닌(Arg) 링커(linker)로 연결된 HSA-hSOD3 융합 단백질(서열번호 11)을 제조하였다. HSA-hSOD3 융합 단백질의 N-말단에는 his tag를 부착하였다(His tag-HSA-hSOD3, 서열번호 13), 본 발명의 HSA-hSOD3 융합 단백질의 제조를 위해 제작된 발현 벡터의 개열지도는 도 1과 같다. 개열지도에서 보는 바와 같이 His tag의 앞쪽 부분에는 코작서열(서열번호 15)과 HSA 신호 서열(서열번호 17)이 함께 삽입되었다.

구체적으로 하기와 같은 방법으로 HSA-hSOD3 융합 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 하기 표 1에 기재된 PCR primer들을 이용해 PCR을 수행하여 HSA-hSOD3 융합 단백질의 cDNA를 수득하였다. PCR증폭 조건은 95℃에서 5분, 95℃에서 30초 52℃에서 40초, 72℃에서 1분 (5회), 95℃에서 20초, 68℃에서 1분(25회)의 조건에서 EF-Taq 중합효소(Solgent)를 이용하여 수행하였다. 증폭된 유전자 산물을 제한효소 AscI과 SmaI으로 처리한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pNATAB 벡터(ANRT)에 T4 DNA Ligase(Enzymonics)를 이용하여 발현 벡터에 삽입하였다.

표 1

HSA-hSOD3 융합단백질 발현 벡터 제조에 사용한 프라이머

primer name	Primer sequence(5' →3')
Del-SP_PP-HSA-AscI F (서열번호 18)	CTTACTCAGGGCGCGCCGATGCTCACAAATCCGAGG
HSA-Arg-hSOD3 R (서열번호 19)	CGAGTCCTCGCCCGTCCACCTCAGTCCCAAAGCAGCCTGAG
HSA-Arg-hSOD3 F (서열번호 20)	GCTGCTTTGGGACTGAGGTGGACGGGCGAGGACTCGGC
SOD3-Del-Histag-SmaI R (서열번호 21)	GATCACCATTATAATTCAGGCGGCCTTGCCTCGCTCTC

<1-2> HSA-hSOD3 융합 단백질 발현 및 정제

상기 <1-1>에서 제조한 벡터를 대장균 DH10B(Intron biotechnology)에 형질감염 시킨 다음, 상기 형질전환체를 앰피실린(ampicillin)을 함유하는 LB 배지(LPS solution 社) 500 ml에서 배양하고 선별하였다. 선별된 형질전환체에 재조합 HSA-hSOD3 융합 단백질 발현 유전자가 제대로 삽입되었는지 여부를 유전자 서열분석을 실시하여 확

인하였다. 정상적으로 재조합 HSA-hSOD3 융합 단백질 발현 유전자가 삽입된 것이 확인된 형질 전환체에서 벡터를 분리하고, polyethylenimine(PEI)을 이용하여 HEK 293E cell에 형질주입(transfection)하였다. 이렇게 형질주입된 HEK 293E 세포는 DMEM 배지에서 37℃로 배양하였다.

[0146] HSA-hSOD3 융합 단백질의 발현을 확인하기 위해, 상기 형질주입된 HEK 293E 세포 배양 7일 후 배양액을 수집하고 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여, hSOD3-rabbit polyclonal 항체(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)로 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과 도 2에서 보는 것과 같이 His tag가 부착된 HSA-hSOD3 융합 단백질의 발현이 확인되었으며, 약 90 kDa의 크기를 확인하였다.

[0148] 상기 상층액을 Peristaltic Pump(LONGER PUMP)를 이용하여 Ni-NTA resin에 밤새 흘려보낸 다음, Ni-NTA chromatography로 정제를 하였다. Ni-NTA resin 1ml를 column(GE Healthcare Bio-Science:17-5318-01)에 넣은 다음, Binding buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 5mM imidazole(pH8.0)) 10ml로 resin을 균등화하였고, 상기 농축된 상층액을 resin에 로딩 후, Washing Buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 10mM imidazole (pH8.0)) 20ml로 씻어 주고, Elution buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 250mM imidazole(pH8.0)) 5ml로 용출(elution)하였다. 용출된 HSA-hSOD3 단백질은 PBS로 투석하였다. 상기 용출된 분획(fraction)을 10% SDS-PAGE gel에 걸고 coomassie staining 하여 약 90 kDa의 크기를 확인하였다(도 3 참조).

[0150] <실시예 2>

[0151] HSAhSOD3 융합단백질의 촉매 활성 안정성 확인

[0152] 상기 <1-2>에서 투석과정까지 마친 재조합 HSA-hSOD3 융합 단백질이 안정적으로 hSOD3 활성을 유지하지 하는지 확인하기 위해, 정제된 HSA-hSOD3 단백질(0.1mg/ml) 20ul씩을 온도(37℃, 4℃, 실온)와 버퍼 조성(PBS, 0.1% BSA를 넣은 PBS)을 달리하는 각각의 조건에 따라 보관하며 14일 이상 촉매 활성을 유지할수 있는지 측정하였다. 활성 측정은 SOD Assay Kit-WST (dojindo사)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행되었다. WST-1는 oxygen redical 과 반응하여 수용성 formazan을 생성한다(오렌지색). 이때, SOD는 oxygen redical을 제거해 주어 발색 정도로 SOD의 활성을 측정하게 된다.

[0154] 본 발명의 재조합 HSA-hSOD3 융합 단백질은 14일이 지나도 0.1% BSA가 포함된 버퍼에서 뿐만 아니라(도 4A 참조), PBS 상에서도 hSOD3의 촉매 활성이 안정화되는 효과를 확인하였고(도 4B 참조), 4℃와 실온에서도 모두 활성이 유지됨을 확인하였다(도 4A 및 도 4B 참조).

[0156] 또한 14일 후, 상기 각 조건에서 시험된 HSA-hSOD3 융합 단백질에 대하여 웨스턴 블랏을 수행하여 단백질의 양을 조사하였다. 그 결과 온도와 버퍼조성에 관계없이, HSA-hSOD3 단백질이 분해되지 않고 하나의 단백질 자체로서 안정하게 유지된 것을 확인하였다(도 4C 참조).

[0158] <실시예 3>

[0159] 구리와 아연 이온 보충제와 리폴딩 및 이에 의한 HSA-hSOD3 융합 단백질 효과

[0160] SOD3는 촉매활성을 위한 공동인자로 구리와 아연이온을 사용하는 금속효소이다. 배지내에 존재하는 금속이온이, 과발현된 HSA-hSOD3를 수용하기에 불충분한 경우, 금속과 결합하지 않은 HSA-hSOD3가 배지로 분비된다. 세포는 SOD1 및 SOD3에 구리가 결합하도록 각각 구리 샤페론인 CCS1 및 ATOX1을 가진다. 그러나, SOD3는 단백질 샤페론 없는 in vitro 조건에서도 금속 공동인자와 결합한다고 알려져있다. 그러므로 본 발명자들은 구리/아연 이온이 정제된 HSA-hSOD3의 촉매 활성을 향상시킬 것으로 예상했다. 니켈 컬럼으로부터 HSA-hSOD3가 용출되는 즉시 PBS 또는 50 M Cu/Zn 이온을 포함하는 PBS로 투석시켰다. 그 후 추가적으로 결합하지 않은 금속이온을 PBS로 투석하였다. Cu/Zn 이온을 포함하는 버퍼에 의해 투석된 HSA-hSOD3는 일반 PBS 버퍼에 투석한 것 보다 훨씬 높은 활성을 보였다(도 5). 이 결과는 과발현된 HSA-hSOD3는 금속과 결합되지 않고 세포로부터 분비되거나 분비 후에 금

속 이온을 잃어 아포효소의 형태로 나타난다는 것을 의미한다.

[0161] 정제된 샘플에서 대략적인 아포효소의 비율을 추정하기 위해, 정제 HSA-hSOD3를 변성시킨 후 아포효소의 비율을 최대화하기 위해 금속 킬레이트제인 EDTA 상에서 리폴딩시키거나 홀로효소의 비율을 극대화하기 위해 Cu/Zn 이온 상에서 리폴딩 시켰다. Cu/Zn 이온 상에서 리폴딩된 HSA-hSOD3는 정제된 HSA-hSOD3의 초기 활성과 비교하여 4배 높은 활성을 보였다(테이터 미도시). 그러나 EDTA 상에서 리폴딩된 HSA-hSOD3는 낮은 활성을 보였다. 어떠한 조건에서도 HSA-hSOD3가 리폴딩되면서 가시적으로 응집되는 반응을 보이지는 않았다. 그리고 단백질의 양은 두 조건 모두에게서 비슷하게 나타났다. 이러한 결과는 약 75%의 정제된 HSA-hSOD3는 아포효소 또는 변역 후 금속이 결합함에 따라 활성을 회복할 수 있는 접히지 않은 효소임을 나타낸다.

[0163] <실시예 4>

[0164] HSAhSOD3 융합단백질의 PK(Pharmacokinetics) 확인

[0165] 상기 실시예 1에서 제조한 HSA-hSOD3 융합단백질($C_{4018}H_{6288}N_{1136}O_{1217}S_{49}$, MW = approx. 91 kDa) 또는 hSOD3(hEC-SOD3, 서열번호 5에 His-tag됨, $C_{1080}H_{1660}N_{348}O_{330}S_8$, MW = approx. 25 kDa)를 각각 수컷 ICR 마우스에 IV bolus dose로 단회 투여 한 후, 각 물질의 약물동력학적 성질을 다음과 같이 테스트 하였다.

[0167] [실험 방법]

[0168] 1. 용매

[0169] HPLC grade의 Methanol (Cat No. JT9093-3) 및 acetonitrile (Cat No. JT9017-3)을 J.T. Baker로부터 구입하였다.

[0171] 2. 실험 동물

[0172] 30 ~ 33.5g의 수컷 ICR mice(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 6마리가 사용되었다. 마우스들은 실험 전에 4 시간 동안 금식되었다. 동물 사육실은 12시간의 명암 주기로 조명이 조절되었으며, 20~25℃로 온도가 조절되고 상대습도 > 30%로 조절되었다. 하기 표 2에서 구체적인 실험군과 시험물질 투여 용량을 나타낸다.

표 2

Administration Route	No of animals	Dosing
hEC-SOD3	3	10 mg/kg
HSA-conjugated SOD3	3	30 mg/kg
Total	6	

[0174]

[0176] 3. 투여 용액(Dosing Solution)

[0177] 정맥 주입(IV bolus injection)을 위하여, hEC-SOD3 투여 용액은 PBS에 상기 hEC-SOD3가 1mg/mL의 농도로 포함되도록 준비되었다. HSA-SOD3 융합단백질의 경우, hEC-SOD3와 HSA-SOD3 융합단백질 간의 분자량 차이에 기초하여 동일한 몰랄 농도를 고려하여, PBS에 HSA-SOD3 융합단백질이 3mg/mL의 농도로 포함되도록 준비되었다. 이렇게 준비된 각각의 투여 용액(이하, 시험물질)은 10mL/kg의 투여 용적(Dosing volume)로 마우스에 투여되었다.

[0179] 4. hEC-SOD3 및 HSA-SOD3 융합단백질의 약물동력학 연구(Pharmacokinetic Study)

[0180] 4시간 동안 금식한 수컷 ICR 마우스에 꼬리 정맥을 통하여 각각 10 mg/kg의 hEC-SOD3 또는 30 mg/kg의 HSA-SOD3 융합단백질이 투여되었다. 투여 후 0.05h, 0.12h, 0.25h, 0.5h, 1h, 3h, 7h 및 24h 에 안와정맥총(retro-orbital plexus)으로부터 혈액 샘플(70 μ L)을 수집하였다. 혈액 샘플을 즉시 원심 분리하고 15 μ L의 혈장을 분취하여, HPLC/MS/MS 분석에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0182] 5. 분석 절차

[0183] 혈장 중의 hEC-SOD3 또는 HSA-SOD3 융합단백질의 농도를 HPLC/MS/MS로 측정하였다. 전처리에 앞서, 혈장 샘플을 Ni-NTA magnetic bead system을 사용하여 His tag purification 방법으로 정제 하였다. 정제 된 각 샘플들은 6M의 Urea 및 18 mM의 dithiothreitol에 의해 변성되고(denatured), 255 mM의 iodoacetamide로 알킬화되었다. 그리고 나서, SOD3 특유의 단편인 signature peptide P8의 생산을 위하여, 각 샘플들은 850 ng의 porcine trypsin 처리에 의해 효소적으로 분해되었다. 다음으로, 상기 분해물 70 μ L를 분취한 후 여기에 3% formic acid (v/v)을 포함하는 methanol 용액 50 μ L를 넣어 혼합하여, 분해되지 않은 단백질 또는 기타 바람직하지 못한 물질들의 침전을 유도하였다. 이러한 혼합 과정은 5분 동안 격렬하게 수행되었고, 그 후 혼합액은 13,500 rpm으로 5분 동안 원심분리 되었다. 상층액 10 μ L를 분취하고 HPLC/MS/MS system에 직접 주입하였다. HPLC/MS/MS 수행 조건은 다음과 같다.

[0184] HPLC System: Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

[0185] Column: Eclipse® XDB C18 3.5 μ m, 2.1x50mm

[0186] 이동상 A: 0.1% Formic acid in water, 이동상 B: 0.1% Formic acid in acetonitrile, 이동상의 시간에 따른 농도 변화(Gradient Condition)는 하기 표 3과 같음

표 3

Time (min)	0 → 0.1 → 1.0 → 1.5 → 2.5 → 3 → 5
B (%)	5 → 5 → 5 → 95 → 95 → 5 → 5

[0187]

[0188] Flow rate: 300 μ L/min

[0189] Temperature: 20℃ for column and 4℃ for autosampler tray

[0190] Run time: 5 minutes

[0191] Detection: Tandem quadrupole mass spectrometer(API 4000, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA, USA)

[0192] curtain gas: 20 psi

[0193] ion source gas 1: 40 psi

[0194] ion source gas 2: 40 psi

[0195] ionspray voltage: 5500V

[0196] temperature: 500℃.

[0197] Multiple-reaction-monitoring (MRM) mode: positive

[0199] 기구상의 압력 설정 상태 및 콜리전 가스(collision gas)로서 질소가 사용된 상태에서, signature peptide P8의 분자 이온들은 6V의 충돌 에너지(collision energy)에서 분해되었다. signature peptide P8의 분자 이온들의 검출은 m/z 669.58 ~ 110.10의 전이를 모니터링함으로서 수행되었다. 모든 구성성분의 피크 영역(Peak are a)들은 Analyst software version 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)를 이용하여 자동으로 통합되었다.

hEC-SOD3 샘플의 경우 정량화 할 수 있는 범위는 3 ~ 1,000 µg/mL 이었고, HSA-hSOD3 융합단백질의 경우 정량화 할 수 있는 범위는 9 ~ 3,000 µg/mL 였다. signature peptide P8의 RT(retention time)은 3.19분이었다.

6. 데이터 분석

WinNonlin 4.1(Pharsight, Cary, NC) 프로그램으로 각 마우스의 혈장 농도에 대한 시간 프로파일을 분석하여 약 동학 파라미터(pharmacokinetic parameters)를 얻었다. 제거율 상수(k_e)는 말기(terminal phase)의 로그-선형 부분의 선형 회귀에 의해 결정되었다. 최종 제거 반감기(terminal elimination half-life, $T_{1/2}$)은 $0.693/k_e$ 로 나누어 계산하였다. hEC-SOD3와 HSA-hSOD3 융합단백질의 제거 청소율(elimination clearance, CL) 및 항정 상태 분포 용적(steady state volume of distribution, V_{ss})을 결정하기 위해서, moment analysis가 수행되었다. 혈장 내hEC-SOD3 또는 HSA-hSOD3 융합단백질의 농도 대 시간 곡선에서 시간 0에서 무한대의 곡선하 면적(AUC $0-\infty$), 및 시간 0에서 무한대의 각각 제1 모멘트 시간 곡선 하의 영역(AUMC $0-\infty$)은 WinNonlin 4.1을 사용하여 사다리꼴 공식 및 표준면적 외삽법을 이용해 계산되었다. hEC-SOD3 또는 HSA-hSOD3 융합단백질의 CL 및 V_{ss} 는 하기 공식 1~3에 따라 계산되었다.

<공식 1>

$$CL = \frac{Dose}{AUC_{0-\infty}}$$

<공식 2>

$$V_{ss} = MRT \cdot CL$$

<공식 3>

$$MRT = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}}$$

C_{max} 와 T_{max} 는 혈장 농도 - 시간 곡선으로부터 직접적으로 수집되었다.

[실험 결과]

ICR 마우스에 각각 hEC-SOD3 또는 HSA-hSOD3 융합단백질 주입 후의 혈장 농도 프로파일을 하기 표 4(hEC-SOD3), 표 5(HSA-hSOD3 융합단백질) 및 도 6에서 보여준다. 또한 약동학 파라미터(Pharmacokinetic parameters)를 하기 표 6에서 보여주며, 상기 파라미터들은 각 동물에 대해 계산되었고 평균을 내었다.

표 4

Plasma concentration of hEC-SOD3 (μg/mL)					
Time (h)	#1	#2	#3	mean	S.D.
0.05	144	147	146	146	1.53
0.12	89.1	91.9	124	102	19.4
0.25	47.6	59.1	41.2	49.3	9.07
0.5	23.2	21.7	22.3	22.4	0.75
1	13.6	11.3	18.8	14.6	3.84
3	6.55	6.13	7.66	6.78	0.79
7	BQL	BQL	BQL	0	-
24	BQL	BQL	BQL	0	-

BQL: Below the quantification limit, treated as "0".

표 5

Plasma concentration of hEC-SOD3 (μg/mL)					
Time (h)	#4	#5	#6	mean	S.D.
0.05	221	232	282	245	32.5
0.12	183	213	213	203	17.3
0.25	177	208	197	194	15.7
0.5	167	170	176	171	4.58
1	133	144	139	139	5.51
3	86	95.3	87.7	89.7	4.95
7	60.3	77.9	58.4	65.5	10.8
24	43.9	35.5	28.6	36.0	7.66

BQL: Below the quantification limit, treated as "0".

표 6

Parameters	hEC-SOD3			HSA conjugated hEC-SOD3		
	mean	±	S.D.	mean	±	S.D.
T _{max} (h)	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00
C _{max} (μg/mL)	146	±	1.53	245	±	32.5
T _{1/2} (h)	1.54	±	0.06	13.3	±	1.16
AUC _{all} (μg·h/mL)	66.3	±	5.33	1,616	±	140
AUC _{inf} (μg·h/mL)	81.5	±	7.54	2,302	±	235
MRT (h)	1.54	±	0.09	18.6	±	1.06
CL (mL/h/kg)	123	±	10.9	13.1	±	1.40
V _{ss} (mL/kg)	190	±	10.0	2,310	±	330

10mg/kg의 hEC-SOD3를 1회 정맥 주사 한 후 수컷 마우스의 hEC-SOD3 최고 혈장 농도(Cmax)는 146 μg/mL이었고

투여 후 0.05시간에 도달했다. 전체 혈장 청소율(systemic plasma clearance, CL)의 평균은 123 mL/h/kg이었다. 항정상상태 분포 용적(steady state volume of distribution, Vss)의 평균은 190 mL/kg이었다. 최종제거 반감기(terminal elimination half-life, T1/2)는 1.54 시간이었다.

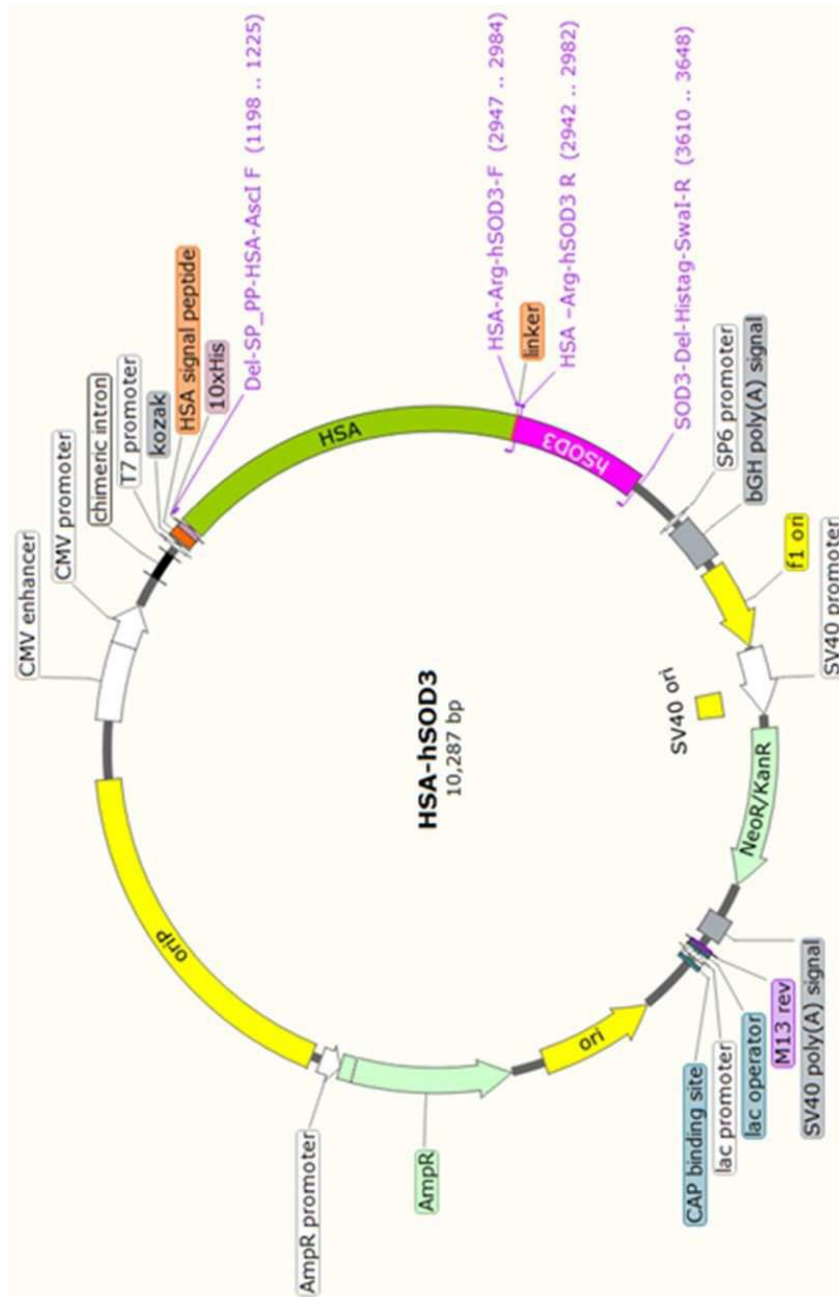
- [0220] 30mg/kg의 HSA-hSOD3 융합단백질을 1회 정맥 주사 한 후, 수컷 마우스의 HSA-hSOD3 융합단백질 최고 혈장 농도 (Cmax)는 245 µg/mL이었고 투여 후 0.05 시간에 도달했다. 전체 혈장 청소율(systemic plasma clearance, CL)의 평균은 13.1 mL/h/kg이었다. 항정상상태 분포 용적(steady state volume of distribution, Vss)의 평균은 2,310 mL/kg이었다. 최종제거 반감기(terminal elimination half-life, T1/2)는 13.3 시간이었다.

산업상 이용가능성

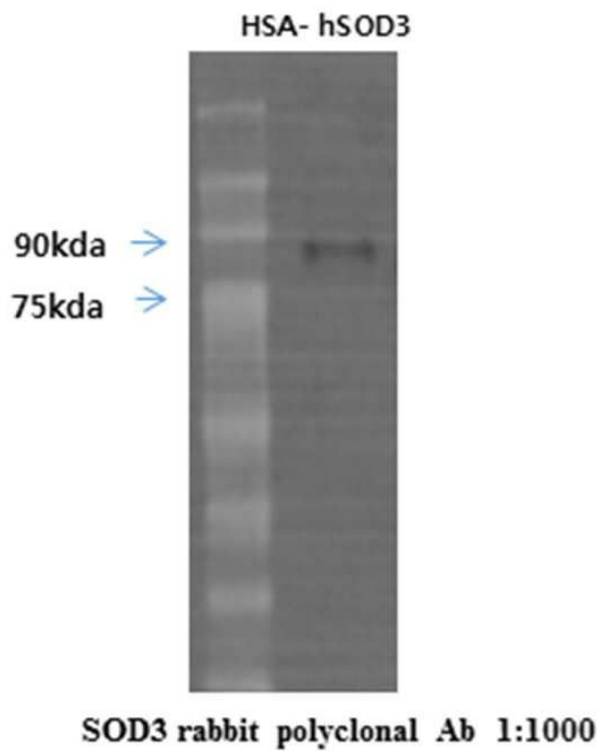
- [0221] 본 발명의 세포외 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤티이즈(EC-SOD) 단백질 안정화 방법은 EC-SOD 단백질을 비임상 또는 임상 적용될 수 있도록 안정성이 향상된 EC-SOD 단백질을 확보할 수 있도록 하며, 다양한 의약 및 화장품 산업에 적용될 수 있어 산업상 이용가능성이 높다.

도면

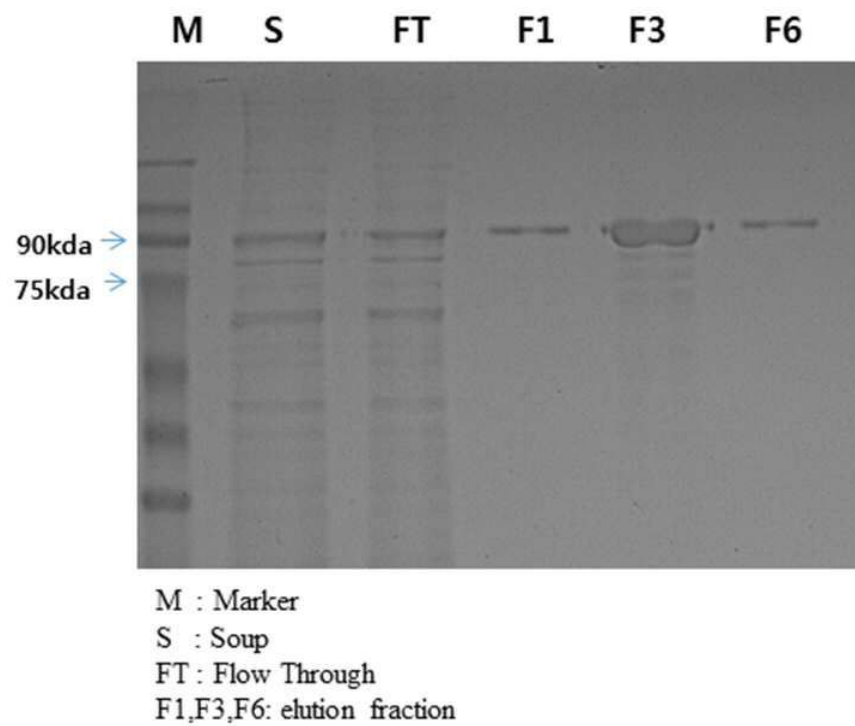
도면1



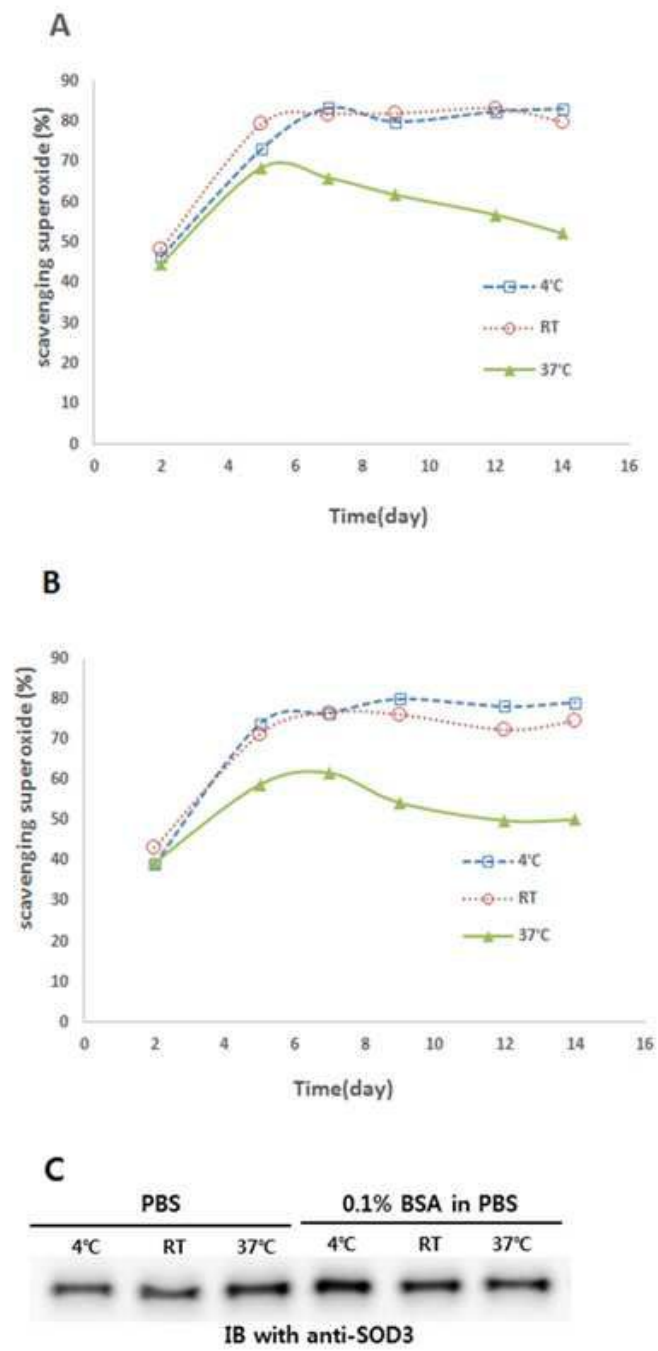
도면2



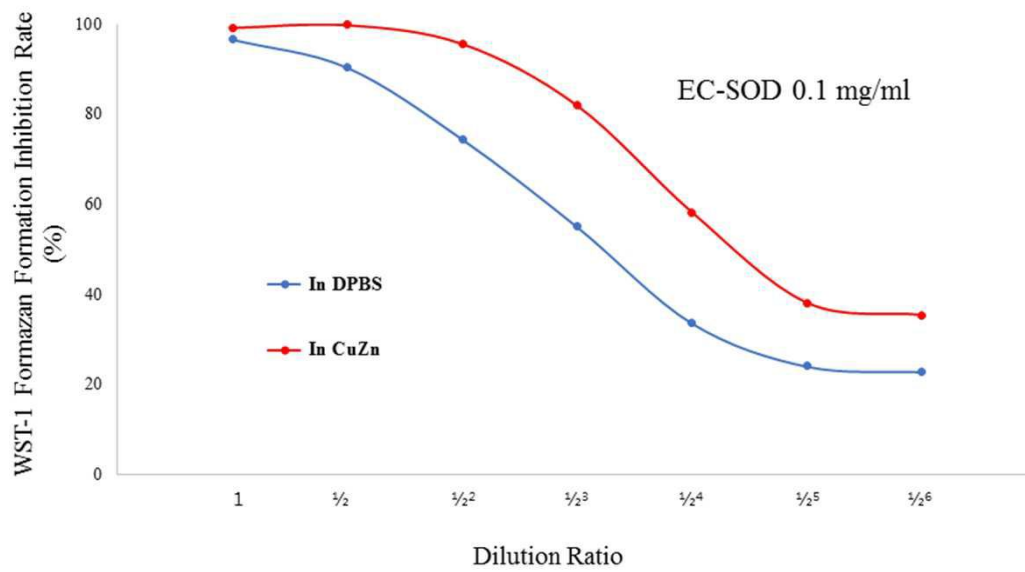
도면3



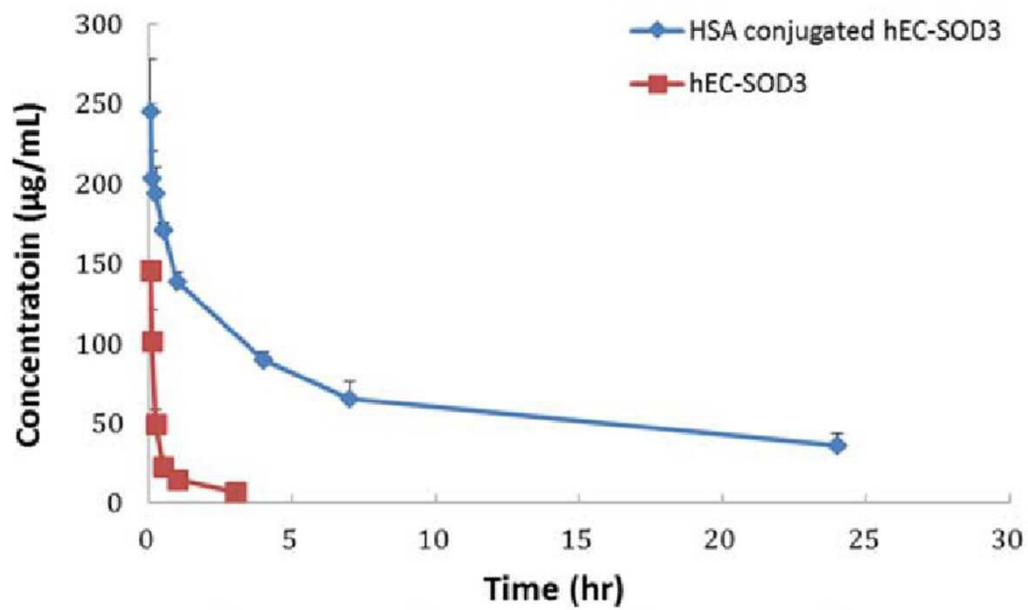
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Method for stabilizing EC-SOD by conjugating albumin with it's
N-terminal or C-terminal residue
- <130> NP17-0032
- <160> 25
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSA
 <400> 1

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

1	5	10	15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala			
20	25	30	
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu			
35	40	45	
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val			
50	55	60	
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp			
65	70	75	80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp			
85	90	95	
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala			
100	105	110	
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln			
115	120	125	
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val			
130	135	140	
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys			

145	150	155	160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro			
165	170	175	
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys			
180	185	190	
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu			
195	200	205	

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu

 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365

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

 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His

450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605

Leu

<210> 2

<211> 1830

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of HSA(seq no.1)

<400> 2

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttita gctcggctta ttccaggggt 60
 gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga ttggggagaa 120
 gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc ttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240
 gagtcagctg aaaattgtga caaatcattt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360
gagagaaatg aatgtcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg 420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcaactgct ttatcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540
tttgctaaaa ggtataaagc tgctttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600

tgctgtttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660
agactcaagt gtgccagctc ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaac 780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840
agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccaactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga 1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140
ctagagaagt gcgtgcccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260
cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagtgc gttacaccaa gaaagtaccc 1320
caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg cctgtgacag aagactatct atccgtggtc 1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560
tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagtag 1740
aagtgtgca aggtgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttataa 1830

<210> 3

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA fragment(25-609 a.a. from Seq no. 1)

<400> 3

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545 550 555 560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 4

<211> 1755

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of HSA fragment(25-609 a.a. from Seq no. 1)

<400> 4

gatgctcaca aatccgaggt tgcacatcgc ttcaaggacc tgggtgagga gaactttaag 60

gcactcgtgc ttatcgcttt tgcccagtat ctgcagcagt gtcttttcga ggaccacgta 120

aaacttgatg atgaagttac ggagttcgct aagacctgtg tggcagacga aagtgccgaa 180

aattgtgata agagcctgca tacgttgctt ggggataaac tgtgcacggt agccactctc 240

agagagacgt acggggaaat ggcagactgt tgcgcaaagc aggaaccgga gcgaaacgaa 300

tgtttttctgc agcataaaga tgacaacctt aatttgccaa ggttggtgag gcctgaggtt 360

gatgttatgt gcaactgttt ccacgacaat gaggagacat tctgaagaa atatctctat 420

gagatcgcta gacggcaccc ctacttttac gccccgagc tgcgtttttt cgcaaaacgc 480

tacaaggctg ctttcaccga gtgctgccaa gcggctgaca aggccgcctg tctcttgcca 540

aaactggatg aactgagaga cgaagggaag gcgagtagtg caaagcagcg cctgaaatgc 600

gccagtcctc agaaattcgg ggagcgggcc ttaaggcct gggcagtcgc tagactgagc 660

cagagatttc cgaaggccga gttcgccgag gtgtctaaac tggtagacaga cctgacaaaa 720

gtccataaccg aatgctgtca cggcgatctt ctcgagtgcg ccgacgacag ggcgatctg 780

gccaaatata tctgcgaaaa ccaagactca atctcttcca aactgaagga gtgctgcgaa 840

aaaccactgc tggaaaagag ccactgtatc gcggaggtcg aaaacgacga gatgccggcc 900
gatctgccta gtctggcagc tgacttcgtg gagtctaagg atgtctgtaa gaattacgca 960

gaggccaaag atgtgttctt gggaatgttt ctctacgaat atgcgcgcgc acaccagat 1020
tactcagtag tattgttgtt gagactggca aagacatatg agacaacact tgagaagtgc 1080
tgcgcggccg ccgatactca tgaatgctac gcgaaggtgt ttgacgagtt taaaccactg 1140
gtggaagaac ctcaaaacct tattaagcag aactgtgaac tctttgagca gctcggcgag 1200
tacaagtttc agaatgcctt gcttgtaagg tacacaaaa aagtcccca ggtctccaca 1260
ccaactcttg tcgaagtgtc aaggaatctc ggaaaggtgg gctctaagtg ttgtaagcac 1320
cccgaagcta aaagaatgcc ctgcgcagaa gactacctgt ccgtggtgct gaatcaattg 1380

tgtgtcctgc acgagaaaac tctgtttca gaccgggtca ctaagtgttg tactgaatca 1440
ctggtcaaca ggaggccatg cttctctgca ctcgaggtcg acgagactta cgtcccaaaa 1500
gaattcaatg cagagacatt taccttccat gccgacatct gtactttgtc cgaaaaagag 1560
agacagatta agaagcagac agccctctgc gagctcgtca agcacaaaacc aaaagctacc 1620
aaggagcaac tcaaagcggg tatggatgac ttgccgcct tcgtagagaa atgctgtaaa 1680
gcggagcata aggaaacctg cttgccgaa gagggcaaga agctggtagc cgcattctcag 1740
gctgctttgg gactg 1755

<210> 5

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human EC-SOD

<400> 5

Met Leu Ala Leu Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser

1 5 10 15

Asp Ala Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala

20 25 30

Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu

35 40 45

Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Ala Leu His Ala Ala Cys Gln

50 55 60

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

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

Gly	Pro	His	Tyr	Asn	Pro	Leu	Ala	Val	Pro	His	Pro	Gln	His	Pro	Gly
130						135					140				
Asp	Phe	Gly	Asn	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Gly	Ser	Leu	Trp	Arg	Tyr	Arg
145					150					155					160
Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Pro	His	Ser	Ile	Val	Gly	Arg
				165					170					175	
Ala	Val	Val	Val	His	Ala	Gly	Glu	Asp	Asp	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Asn
			180						185				190		
Gln	Ala	Ser	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Ala	Cys	Cys

195			200			205									
Val	Val	Gly	Val	Cys	Gly	Pro	Gly	Leu	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Arg	Glu
210			215			220									
His	Ser	Glu	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Glu	Ser	Glu	Cys	Lys	Ala	Ala
225			230			235						240			

 $\langle 210 \rangle$ 6

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of Human EC-SOD(seq no. 5)

 $\langle 400 \rangle$ 6

atgtctggcgc tactgtgttc ctgcctgctc ctggcagccg gtgcctcgga cgcctggacg 60

ggcgaggact cggcggagcc caactctgac tcggcggagt ggatccgaga catgtacgcc 120

aaggtcacgg agatctggca ggaggtcatg cagcggcggg acgacgacgg cgcgctccac 180

gccgcctgcc aggtgcagcc gtcggccacg ctggacgccg cgcagccccg ggtgaccggc 240

gtcgtcctct tccggcagct tgcgccccgc gccaaagctcg acgccttctt cgccctggag 300

ggcttcccga ccgagccgaa cagctccagc cgcgccatcc acgtgcacca gttcggggac 360
ctgagccagg gctgcgagtc caccggggccc cactacaacc cgctggccgt gccgcacccg 420
cagcaccceg gcgacttcgg caacttcgcg gtccgcgacg gcagcctctg gaggtaccgc 480

gccggcctgg ccgcctcgct cgcggggccc cactccatcg tgggccgggc cgtggtcgtc 540
cacgtggcg aggacgacct gggccgcggc ggcaaccagg ccagcgtgga gaacgggaac 600
gcgggccggc ggctggcctg ctgcgtggtg ggcgtgtgcg ggcccgggct ctgggagcgc 660
caggcgccgg agcactcaga gcgcaagaag cggcggcgcg agagcgagtg caaggccgcc 720
tga 723

<210> 7
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Human EC-SOD:58T
<400> 7

Met Leu Ala Leu Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser
1 5 10 15
Asp Ala Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala
20 25 30
Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu
35 40 45
Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln
50 55 60
Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly
65 70 75 80
Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe
85 90 95
Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala
100 105 110
Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr
115 120 125
Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly

130	135	140	
Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg			
145	150	155	160
Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg			
	165	170	175
Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn			
	180	185	190
Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys			
	195	200	205
Val Val Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu			
210	215	220	
His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala			
225	230	235	240
<210>	8		
<211>	723		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	cDNA sequence of Human EC-SOD:58T(seq no. 7)		
<400>	8		
atgctggcgc tactgtgttc ctgcctgctc ctggcagccg gtgcctcgga cgcctggacg		60	
ggcgaggact cggcggagcc caactctgac tcggcggagt ggatccgaga catgtacgcc		120	
aaggtcacgg agatctggca ggaggtcatg cagcggcgagg acgacgacgg cacgtccac		180	
gccgcctgcc aggtgcagcc gtcggccacg ctggacgccg cgcagccccg ggtgaccggc		240	
gtcgtcctct tccggcagct tgcgccccgc gccaaactcg acgccttctt cgcctggag		300	
ggcttcccga ccgagccgaa cagctccagc cgcgccatcc acgtgcacca gttcggggac		360	
ctgagccagg gctgcgagtc caccggggccc cactacaacc cgctggccgt gccgcacccg		420	
cagcacccgg gcgacttcgg caacttcgcg gtccgcgacg gcagcctctg gaggtaccgc		480	
gccggcctgg ccgcctcgct cgcgggcccc cactccatcg tgggccgggc cgtggtcgtc		540	
cacgtggcgg aggacgacct gggccgcggc ggcaaccagg ccagcgtgga gaacgggaac		600	
gcgggcccgc ggctggcctg ctgcgtggtg ggcggtgtgc ggccccggct ctgggagcgc		660	
caggcgcggg agcactcaga gcgcaagaag cggcggcgcg agagcgagtg caaggccgcc		720	

tga

723

<210> 9

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human EC-SOD fragment(19-240 a.a. from Seq no. 5)

<400> 9

Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp

1 5 10 15

Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met

20 25 30

Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Ala Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln

35 40 45

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

50 55 60

Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Val His Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro

100 105 110

His Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala

165 170 175

Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val

180 185 190

Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser

195 200 205

Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala

210 215 220

<210> 10

<211> 666

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of Human EC-SOD fragment(19-240 a.a. from Seq no.

5)

<400> 10

tggacgggcg aggactcggc ggagcccaac tctgactcgg cggagtggat ccgagacatg 60

tacgccaagg tcacggagat ctggcaggag gtcatgcagc ggcgggacga cgacggcgcg 120

ctccacgccg cctgccaggt gcagccgtcg gccacgttgg acgccgcgca gccccgggtg 180

accggcgctg tctctttccg gcagcttgcg ccccgcgcca agctcgacgc cttcttcgcc 240

ctggagggct tcccgaccga gccgaacagc tccagccgcg ccatccacgt gcaccagttc 300

ggggacctga gccagggtcg cgagtccacc gggccccact acaaccgct ggccgtgccg 360

caccgcgacg acccgggcga cttcggcaac ttcgcggtcc gcgacggcag cctctggagg 420

taccgcgccg gcctggcccg ctcgctcgcg ggccccact ccatcgtggg cggggccgtg 480

gtcgtccacg ctggcgagga cgacctgggc cgcggcggca accaggccag cgtggagaac 540

gggaacgcgg gccggcggtt ggctgtctgc gtggtgggcg tgtgcgggcc cgggctctgg 600

gagcgccagg cgcgggagca ctcagagcgc aagaagcggc ggcgcgagag cgagtgaag 660

gccgcc 666

<210> 11

<211> 808

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA-hSOD3 fusion protein

<400> 11

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu

530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Thr Gly Glu Asp Ser
 580 585 590
 Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala
 595 600 605
 Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp
 610 615 620
 Gly Ala Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp

 625 630 635 640
 Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala
 645 650 655
 Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr
 660 665 670
 Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp
 675 680 685
 Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala
 690 695 700

 Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg
 705 710 715 720
 Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala
 725 730 735
 Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu
 740 745 750
 Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn
 755 760 765
 Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys Gly Pro Gly

 770 775 780

Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg
 785 790 795 800
 Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala

805

<210> 12

<211> 2427

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of HSA-hSOD3 fusion protein(seq no. 11)

<400> 12

gatgctcaca aatccgaggt tgcacatcgc ttcaaggacc tgggtgagga gaactttaag 60
 gcactcgtgc ttatcgcttt tgcccagtat ctgcagcagt gtcctttcga ggaccacgta 120

aaacttgtga atgaagttac ggagttcgct aagacctgtg tggcagacga aagtgccgaa 180
 aatttgtata agagcctgca tacgttgttc ggggataaac tgtgcacggt agccactctc 240
 agagagacgt acggggaaat ggcagactgt tgcgcaaagc aggaaccgga gcgaaacgaa 300
 tgttttctgc agcataaaga tgacaacctt aatttgccaa ggttggtgag gcctgaggtt 360
 gatgttatgt gcaactgttt ccacgacaat gaggagacat tctgaagaa atatctctat 420
 gagatcgcta gacggcaccc ctacttttac gccccgagc tgctgttttt cgcaaacgc 480
 tacaaggctg ctttcaccga gtgctgccaa gcggctgaca aggccgcctg tctcttgcca 540

aaactggatg aactgagaga cgaagggaag gcgagtagtg caaagcagcg cctgaaatgc 600
 gccagctccc agaaattcgg ggagcgggcc ttttaaggcct gggcagtcgc tagactgagc 660
 cagagatttc cgaaggccga gttcggcag gtgtctaaac tggtagacaga cctgacaaaa 720
 gtccataccg aatgctgtca cggcgatctt ctgcagtgcg ccgacgacag ggcggatctg 780
 gccaaatata tctgcgaaaa ccaagactca atctcttcca aactgaagga gtgctgcgaa 840
 aaaccactgc tggaaaagag ccaactgtatc gcggaggtcg aaaacgacga gatgccggcc 900
 gatctgccta gtctggcagc tgacttcgtg gagtctaagg atgtctgtaa gaattacgca 960

gaggccaaag atgtgttctt gggaatgttt ctctacgaat atgcgcgccg acaccagat 1020
 tactcagtag tattgttgtt gagactggca aagacatatg agacaacact tgagaagtgc 1080
 tgcgcggccg ccgatactca tgaatgctac gcgaaggtgt ttgacgagtt taaaccactg 1140
 gtggaagaac ctcaaaacct tattaagcag aactgtgaac tctttgagca gctcggcgag 1200
 tacaagtctc agaatgcctt gcttgaagg tacacaaaaa aagtccecca ggtctccaca 1260
 ccaactcttg tcgaagtgtc aaggaatctc ggaaaggtgg gctctaagtg ttgtaagcac 1320

cccgaagcta aaagaatgcc ctgcgcagaa gactacctgt ccgtgggtgct gaatcaattg 1380

tgtgtcctgc acgagaaaaac tctcttttca gaccgggtca ctaagtgttg tactgaatca 1440

ctgggtcaaca ggaggccatg cttctctgca ctcgaggtcg acgagactta cgtcccaaaa 1500

gaattcaatg cagagacatt taccttccat gccgacatct gtactttgtc cgaaaaagag 1560

agacagatta agaagcagac agccctcgtc gagctcgtca agcacaaaacc aaaagctacc 1620

aaggagcaac tcaaagcggg tatggatgac ttgccgcct tcgtagagaa atgctgtaaa 1680

gcggacgata aggaaacctg cttcgccgaa gagggcaaga agctggtagc cgcactctcag 1740

gctgcttttg gactgaggtg gacgggagag gactcggcgg agcccaactc tgactcggcg 1800

gagtggatcc gagacatgta cgccaaggtc acggagatct ggcaggaggt catgcagcgg 1860

cgggacgacg acggcgcgct ccacgccgcc tgccaggtgc agccgtcggc cagctggac 1920

gccgcgcagc cccgggtgac cggcgtcgtc ctcttcgggc agcttgccgc ccgcgccaag 1980

ctcgacgctt tcttcgcctt ggagggtctt ccgaccgagc cgaacagctc cagccgcgcc 2040

atccacgtgc accagttcgg ggacctgagc cagggtctgc agtccaccgg gcccactac 2100

aaccgcgtgg ccgtgccgca cccgcagcac ccgggcgact tcggcaactt cgcggtccgc 2160

gacggcagcc tctggaggta ccgcgccggc ctggccgcct cgctcgcggg ccgcactcc 2220

atcgtgggcc gggccgtggt cgtccacgtt ggcgaggacg acctgggccg cggcggcaac 2280

caggccagcg tggagaacgg gaacgcgggc cggcggctgg cctgctgctg ggtgggcgtg 2340

tcggggcccc ggctctggga gcgccaggcg cgggagcact cagagcgcaa gaagcggcgg 2400

cgcgagagcg agtgcaaggc cgcctga 2427

<210> 13

<211> 821

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His tag-HSA-hSOD3 fusion protein

<400> 13

His His His His His His His His His His Gly Arg Ala Asp Ala His

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

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

290 295 300
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 325 330 335
 Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 340 345 350
 Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 355 360 365

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

 435 440 445
 Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 450 455 460
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 465 470 475 480
 Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
 485 490 495
 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 500 505 510

 Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 515 520 525
 Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
 530 535 540
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val

545 550 555 560
 Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
 565 570 575
 Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser

 580 585 590
 Gln Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro
 595 600 605
 Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr
 610 615 620
 Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Ala Leu
 625 630 635 640
 His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln
 645 650 655

 Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala
 660 665 670
 Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn
 675 680 685
 Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln
 690 695 700
 Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His
 705 710 715 720
 Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser

 725 730 735
 Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly Pro His
 740 745 750
 Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu
 755 760 765
 Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg
 770 775 780
 Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu
 785 790 795 800

Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser

805

810

815

Glu Cys Lys Ala Ala

820

<210> 14

<211> 2466

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of His tag-HSA-hSOD3 fusion protein(seq no. 13)

<400> 14

caccaccacc accaccacca ccaccaccac gggcgcgccg atgtcacaa atccgaggtt 60

gcacatcgct tcaaggacct gggtagagg aactttaagg cactcgtgct tatcgctttt 120

gcccagtatc tgcagcagtg tcctttcgag gaccacgtaa aacttgtgaa tgaagttacg 180

gagttcgcta agacctgtgt ggccagacgaa agtgcgaaa attgtgataa gaggctgcat 240

acgtttgttc gggataaact gtgcacggta gccactctca gagagacgta cggggaaatg 300

gcagactgtt gcgcaaagca ggaaccggag cgaaacgaat gttttctgca gcataaagat 360

gacaacccta atttgccaag gttggtgagg cctgaggttg atgttatgtg cactgctttc 420

cacgacaatg aggagacatt cctgaagaaa tatctctatg agatcgctag acggcacccc 480

tacttttacg cccccgagct gctgtttttc gaaaaacgct acaaggctgc cttaccgag 540

tgctgccaag cggtgacaa ggccgcctgt ctcttgccaa aactggatga actgagagac 600

gaaggaagg cgagtagtgc aaagcagcgc ctgaaatgcg ccagtcctca gaaattcggg 660

gagcgggcct ttaaggcctg ggcagtcgct agactgagcc agagatttcc gaaggccgag 720

ttcgccgagg tgctaaact ggtgacagac ctgacaaaag tccataccga atgctgtcac 780

ggcgatcttc tcgagtgcgc cgacgacagg gcggatctgg ccaaatatat ctgcgaaaac 840

caagactcaa tctcttccaa actgaaggag tgcgacgaaa aaccactgct ggaaaagagc 900

cactgtatcg cggaggctga aaacgacgag atgccggccg atctgcctag tctggcagct 960

gattcgtgg agtctaagga tgtctgtaag aattacgcag aggccaaaga tgtgttcttg 1020

ggaatgtttc tctacgaata tgcgcgccga caccagatt actcagtagt attgtgtttg 1080

agactggcaa agacatatga gacaacactt gagaagtgtc gcgcggccgc cgatcctcat 1140

gaatgctacg cgaagggtgt ttgacgagttt aaaccactgg tggaagaacc tcaaaacctt 1200

attaagcaga actgtgaact ctttgagcag ctgcggcagt acaagtttca gaatgccttg 1260

cttgaaggt acacaaaaa agtccccag gtctccacac caactcttgt cgaagtgtca 1320

aggaatctcg gaaaggtggg ctctaagtgt tgtaagcacc ccgaagctaa aagaatgccc 1380
 tgcgcagaag actacctgtc cgtgggtgtg aatcaattgt gtgtcctgca cgagaaaact 1440

ctgttttcag accgggtcac taagtgttgt actgaatcac tggtaacag gaggccatgc 1500
 ttctctgcac tcgaggtcga cgagacttac gtcccaaaag aattcaatgc agagacattt 1560
 accttccatg ccgacatctg tactttgtcc gaaaaagaga gacagattaa gaagcagaca 1620
 gccctcgtcg agctcgtcaa gcacaaacca aaagctacca aggagcaact caaagcggtt 1680
 atggatgact tcgccgcctt cgtagagaaa tgctgtaaag cggacgataa ggaaacctgc 1740
 ttccgccaag agggcaagaa gctggtagcc gcatctcagg ctgctttggg actgaggtgg 1800
 acgggcgagg actcggcgga gccaactct gactcggcgg agtggatccg agacatgtac 1860

gccaaaggtca cggagatctg gcaggaggtc atgcagcggc gggacgacga cggcgcgctc 1920
 cagcgcgcct gccaggtgca gccgtcggcc acgtggagc cgcgcgagcc cggggtgacc 1980
 ggcgtcgtcc tcttccggca gcttgcgccc cgcgccaagc tcgacgcctt cttcgccctg 2040
 gagggttcc cgaccgagcc gaacagctcc agccgcgcca tccacgtgca ccagttcggg 2100
 gacctgagcc agggctgcca gtccaccggg cccactaca acccgctggc cgtgccgcac 2160
 ccgcagcacc cgggcgactt cggcaacttc gcggtccgcg acggcagcct ctggaggtac 2220
 cgcgccggcc tggccgcctc gtcgcggggc ccgcaactcca tcgtgggccg ggccgtggtc 2280

gtccacgtg gcgaggacga cctgggccgc ggcggaacc aggccagcgt ggagaacggg 2340
 aacgcgggcc ggcggtggc ctgtgcgtg gtggcggtgt gcggggcccg gctctgggag 2400
 cgccaggcgc gggagcactc agagcgcaag aagcggcggc gcgagagcga gtgcaaggcc 2460
 gcctga 2466

<210> 15
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cDNA sequence of Kozac
 <400> 15

gccacc 6

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HSA signal peptide

<400> 16

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

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 17

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of HSA signal peptide

<400> 17

atgaaatggg tgaccttcat cagcctgctc ttctgtttt ctagtgccta ctca 54

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Del-SP_PP-HSA-AscI F

<400> 18

cttactcagg gcgcgccgat gctcacaaat ccgagg 36

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA-Arg-hSOD3 R

<400> 19

cgagtcctcg cccgtccacc tcagtcctga agcagcctga g 41

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA-Arg-hSOD3 F

<400> 20

gctgctttgg gactgaggtg gacgggcgag gactcggc

38

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOD3-Del-Histag-SwaI R

<400> 21

gatcaccatt taaattcagg cggccttgca ctcgtctc

39

<210> 22

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human EC-SOD(58T) fragment(19-240 a.a. from Seq no. 7)

<400> 22

Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp

1 5 10 15

Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met

20 25 30

Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln

35 40 45

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

50 55 60

Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Val His Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro

100 105 110

His Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val
 145 150 155 160
 Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala

 165 170 175
 Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val
 180 185 190
 Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser

 195 200 205
 Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala
 210 215 220

<210> 23

<211> 666

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of Human EC-SOD(58T) fragment(19-240 a.a. from Seq

no. 7)

<400> 23

tggacggg	aggactcggc	ggagcccaac	tctgactcgg	cggagtggat	ccgagacatg	60
tacgccaagg	tcacggagat	ctggcaggag	gtcatgcagc	ggcggggacga	cgacggcacg	120
ctccacgccg	cttgcagggt	gcagccgtcg	gccacgttgg	acgccgcgca	gccccgggtg	180
accggcgtcg	tctctttccg	gcagcttgcg	ccccgcgcca	agctcgacgc	cttcttcgcc	240
ctggaggggt	tcccgaaccg	gccgaacagc	tccagccgcg	ccatccacgt	gcaccagttc	300
ggggacctga	gccagggctg	cgagtcacc	gggccccact	acaacccgct	ggccgtgccg	360
caccgcagc	acccgggcga	cttcggcaac	ttcgcgttcc	gcgacggcag	cctctggagg	420

taccgcgcg	gcctggccgc	ctcgtctcgc	ggccccgact	ccatcgtggg	ccgggcccgtg	480
gtcgtccacg	ctggcgagga	cgacctgggc	cgcgccggca	accaggccag	cgtaggagaac	540
gggaacgcgg	gccggcggt	ggcctgctgc	gtggtggg	gtgtggggcc	cgggctctgg	600
gagcgccagg	cgcgggagca	ctcagagcgc	aagaagcggc	ggcgcgagag	cgagtgaag	660
gccgcc						666

<210> 24

<211> 808

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA-hSOD3(58T) fusion protein

<400> 24

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Thr Gly Glu Asp Ser
 580 585 590
 Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala
 595 600 605
 Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp
 610 615 620
 Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp
 625 630 635 640
 Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala
 645 650 655
 Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr
 660 665 670
 Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp
 675 680 685
 Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala
 690 695 700
 Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg
 705 710 715 720
 Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala

725 730 735
 Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu
 740 745 750
 Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn
 755 760 765
 Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys Gly Pro Gly
 770 775 780
 Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg

785 790 795 800
 Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala

805

<210> 25
 <211> 2427
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cDNA sequence of HSA-hSOD3(58T) fusion protein(seq no. 24)
 <400> 25

gatgctcaca aatccgaggt tgcacatcgc ttcaaggacc tgggtgagga gaactttaag 60
 gcactcgtgc ttatcgctt tgcccagtat ctgcagcagt gtcctttcga ggaccacgta 120
 aaacttgtga atgaagtac ggagttcgct aagacctgtg tggcagacga aagtgccgaa 180

 aatttgata agagcctgca tacgttggtc ggggataaac tgtgcacggt agccactctc 240
 agagagacgt acggggaaat ggcagactgt tgcgcaaagc aggaaccgga gcgaaacgaa 300
 tgttttctgc agcataaaga tgacaaccct aatttgccaa ggttggtgag gcctgaggtt 360
 gatgttatgt gactgcttt ccacgacaat gaggagacat tcctgaagaa atatctctat 420
 gagatcgcta gacggcacc ctacttttac gccccgagc tgctgttttt cgcaaaacgc 480
 tacaaggctg ctttcaccga gtgctgccaa gcggtgaca aggccgctg tctcttgcca 540
 aaactggatg aactgagaga cgaagggaag gcgagtagtg caaagcagcg cctgaaatgc 600

 gccagtctcc agaaattcgg ggagcgggccc ttaaggcct gggcagtcgc tagactgagc 660
 cagagatttc cgaaggccga gttcgccgag gtgtctaaac tggtagacaga cctgacaaaa 720
 gtccataacc aatgctgtca cggcgatctt ctcgagtgcg ccgacgacag ggcggatctg 780
 gccaaatata tctgcgaaaa ccaagactca atctcttcca aactgaagga gtgctgcgaa 840
 aaaccactgc tggaaaagag ccactgtatc gcggaggtcg aaaacgacga gatgccggcc 900

gatctgccta gtctggcagc tgacttcgtg gagtctaagg atgtctgtaa gaattacgca	960
gaggccaaag atgtgttctt gggaatgttt ctctacgaat atgcgcgccg acaccagat	1020
tactcagtag tattgttgtt gagactggca aagacatatg agacaacact tgagaagtgc	1080
tgcgcggccg ccgataccta tgaatgctac gcgaagggtg ttgacgagtt taaaccactg	1140
gtggaagaac ctcaaaacct tattaagcag aactgtgaac tctttgagca gctcggcgag	1200
tacaagtttc agaatgcctt gcttctaagg tacaccaaaa aagtccecca ggtctccaca	1260
ccaactcttg tcgaagtgtc aaggaatctc ggaaagggtg gctctaagtg ttgtaagcac	1320
cccgaaagcta aaagaatgcc ctgcgcagaa gactacctgt ccgtgggtgt gaatcaattg	1380
tgtgtcctgc acgagaaaac tcctgtttca gaccgggtca ctaagtgttg tactgaatca	1440
ctggtcaaca ggaggccatg cttctctgca ctcgaggtcg acgagactta cgtcccaaaa	1500
gaattcaatg cagagacatt taccttccat gccgacatct gtactttgtc cgaaaaagag	1560
agacagatta agaagcagac agccctcgtc gagctcgtca agcacaacc aaaagctacc	1620
aaggagcaac tcaaagcgtt tatggatgac ttccgccctc tcgtagagaa atgctgtaaa	1680
gcggacgata aggaaacctg cttcgccgaa gagggcaaga agctggtagc cgcattctag	1740
gctgctttgg gactgaggtg gacggcgag gactcggcgg agcccaactc tgactcggcg	1800
gagtggatcc gagacatgta cgccaaggtc acggagatct ggaggaggt catgcagcgg	1860
cgggacgacg acggcacgct ccacgccgcc tgccaggtgc agccgtcggc cacgctggac	1920
gccgcgcagc cccgggtgac ggcgctcgtc ctcttcgggc agtttgccg ccgcgccaag	1980
ctcgacgctt tcttcgccct ggagggttc ccgaccgagc cgaacagctc cagccgcgcc	2040
atccacgtgc accagttcgg ggacctgagc cagggtctgc agtccaccgg gcccactac	2100
aaccgctgg ccgtgccga cccgcagcac cggggcgact tcggcaactt cgcggtccgc	2160
gacggcagcc tctggaggtg ccgcgccggc ctggccgctt cgctcgcggg ccgcactec	2220
atcgtgggcc gggccgtggt cgtccacgtt ggcgaggacg acctgggccg cggcggaac	2280
caggccagcg tggagaacgg gaacgcgggc cggcggtggt cctgctgctt ggtgggcgtg	2340
tgcgggcccg ggctctggga gcgccaggcg cgggagcact cagagcgaa gaagcgcgcg	2400
cgcgagagcg agtgcaaggc cgcctga	2427