

|                                                                                                                |                                                                                                                              |                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                               | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                           | (11) 공개번호 10-2014-0012428<br>(43) 공개일자 2014년02월03일 |
| <hr/>                                                                                                          |                                                                                                                              |                                                    |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)<br>A61K 38/17 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01) | (71) 출원인<br>한림대학교 산학협력단<br>강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)<br>(주)바이오웰스<br>강원도 춘천시 소양강로 32 ,바이오벤처지원센터419(후평동)                     |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2012-0079316<br>(22) 출원일자 2012년07월20일<br>심사청구일자 없음                                                | (72) 발명자<br>최수영<br>강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)<br>음원식<br>강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)<br>(뒷면에 계속) |                                                    |
|                                                                                                                | (74) 대리인<br>강성혜                                                                                                              |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 4 항

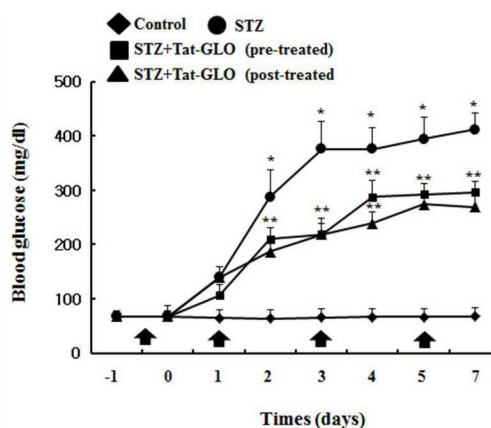
(54) 발명의 명칭 세포 투과성 글리옥살레이즈 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물

### (57) 요약

본 발명자들은 글리옥살레이즈 융합단백질 발현백터를 개발하였다. 이 발현백터를 이용하여 GLO 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜  $Ni^{2+}$ -친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. 배양된 인슐린 분비세포에 정제된 GLO 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 GLO 융합단백질은 세포 내에서 48시간 지속적으로 유지되었다. 또한 세포 내로 투과된 GLO 융합단백질은 SNP (sodium nitroprusside)에 의한 세포사 및 DNA 조각화 (fragmentation)를 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. STZ (Streptozotocin)를 이용한 당뇨동물모델에서도 GLO 융합단백질은 효과적으로 당뇨를 억제하는 것을 조직염색, 혈액내 혈당 수준 및 혈액검사를 통하여 확인하였다.

이러한 결과는 GLO 융합단백질이 인슐린 분비세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포내에서 GLO 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서, GLO 융합단백질은 당뇨질환 및 당뇨합병증의 치료제로 응용할 수 있다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

**김대원**

강원 춘천시 칠전서길 15-2, 203동 701호 (칠전동, 칠전대우2차아파트)

**박진서**

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

**조윤신**

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

**이병용**

강원도 춘천시 우석로101번길 86 대우아파트 102동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 00047818

부처명 중소기업청

연구사업명 (2011)산학연공동기술개발사업

연구과제명 항당뇨 단백질의 효능분석 및 항체 제조

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고

분자 신소재물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A1A03006155

부처명 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 중견연구자지원사업(도약연구과제)

연구과제명 유전체 분석을 통한 대사성 질환 유전요인 발굴 및 맞춤형 단백질 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 글리옥살레이즈의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 글리옥살레이즈 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 글리옥살레이즈는 글리옥살레이즈 I 또는 글리옥살레이즈 II임을 특징으로 하는, 약학 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 글리옥살레이즈 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 9 또는 서열번호 11과 같은 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 글리옥살레이즈 양 말단 중 한 곳 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 융합단백질을 제조하여 이 융합단백질이 당뇨병동물모델에서 효과적으로 인슐린 분비를 촉진하며, 당뇨병 예방 및 개선용 치료 용도로 사용할 수 있음을 밝힌 것이다.

[0002]

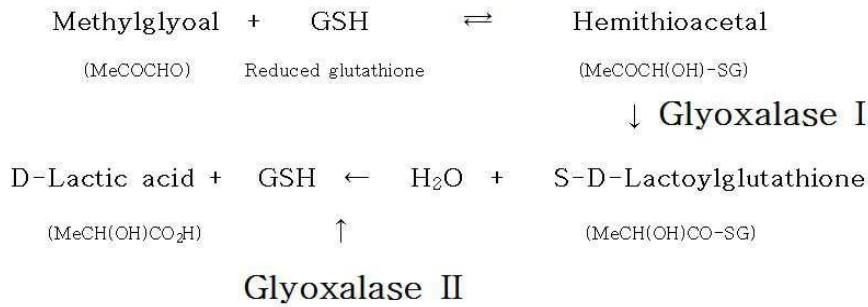
### 배경기술

[0003] 활성산소종(reactive oxygen species)은 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든 생명체에서 여러 세포 내 대사과정의 부산물로 필연적으로 생성되며, 이러한 활성산소종의 유해 작용은 세포 내의 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체 고분자에 손상과 깊이 관련되어 있다. 때문에 활성산소종은 발암과정, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화, 염증반응에 관여하여 정상적인 노화 과정에서도 노화를 촉진시키는 중요한 요인으로 작용한다 (Flyod, R. A. *FASEB J.* 4:2587-2597; 1990, Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford. 1999).

[0004] 생체 내에는 이와 같이 해로운 유해산소를 처리할 수 있는 방어기구가 존재하는데, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(superoxide dismutase; SOD), 카탈레이즈, 글루타치온 퍼옥시데이즈와 같은 항산화 효소 들과  $\alpha$ -토코페롤, 아스코빅산, 카로티노이드, 글루타치온, 카노신(carnosine)과 같은 유기물질 들이 항산화 방어기구에 포함된다.

[0005] 이들 중 글리옥살레이즈(Glyoxalase; GLO)는 메틸글리옥살(Methylglyoxal; MG)의 대사에 직접적으로 관여하는 단백질이다. 메틸글리옥살은 반응성  $\alpha$ -옥소알데하이드(reactive  $\alpha$ -oxoaldehyde)의 일종으로, 세포 손상과 단백질 당화를 유도하여 AGEs(advanced glycation end-products)를 형성한다. 이러한 AGEs들은 세포독성과 면역반응을 통하여 당뇨와 노화 그리고 활성산소종에 의한 신경퇴행성 질환에 병인으로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Silvia Di Loreto et al., *IJBCB* 40(2008) 245-257). 이러한 메틸글리옥살의 대사에 직접적으로 관여하는

글리옥살레이즈의 작용기작은 다음과 같다.



[0006]

[0007]

[0008] 이러한 기전으로 글리옥살레이즈는 세포 내의 해로운 메틸글리옥살을 효과적으로 제거하여 활성 산소종에 의한 세포내의 손상을 막아주는 역할을 한다 (Paul J. THORNALLEY, *Biochem. J.* (1990) **269**, 1-11).

[0009] 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어 세포막을 거쳐 목표 단백질을 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나, 단백질은 크기나 여러 가지 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600 달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0010] 인간면역결핍 바이러스 (Human Immunodeficiency Virus type-1) 단백질의 일종인 Tat (Transactivator of transcription) 단백질은 효율적으로 세포막을 통과하여 세포질 내로 쉽게 이동한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 기능은 Tat 단백질의 중간부위인 단백질 수송 도메인 (Protein transduction domain)의 특성 때문에 나타나며 아직까지 정확한 기전은 알려지지 않은 상태이다. 그러나, Tat 단백질의 세포막 통과에는 특정 수용체나 운반체가 관여하지 않는 것으로 보이며 Tat 단백질의 단백질 수송 도메인이 직접 막의 지질 이중층과 작용함으로써 일어나는 것으로 이해되고 있다. 최근의 많은 연구에서, 이형단백질을 HIV-1 Tat 단백질과 융합시켜 투여하였을 때 세포 및 조직 내로 직접 운반된다는 것을 보여 주었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 당뇨병 치료 및 예방에 유용한 글리옥살레이즈 단백질을 세포 내로 효율적으로 도입할 수 있는 방법을 제공하려는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 당뇨병 예방 또는 치료제로서 사용가능한 글리옥살레이즈 융합단백질을 제공하려는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 세포 투과성 글리옥살레이즈 융합단백질을 주요성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 다양한 세포손상 방어기전에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 글리옥살레이즈를 융합시켜 제조한 GLO 융합단백질이 인슐린 분비세포 내로 전달되는지 및 세포 내에서 단백질의 기능을 나타내는지 알아보았다.

[0015] 본 발명자들은 먼저, GLO 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 GLO 융합단백질 발현백터를 개발하였다. 이 발현백터는 인간 GLO cDNA, Tat 펩타이드 (9 아미노산) 그리고 6개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현백터를 이용하여 Tat-GLO 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜 Ni<sup>2+</sup>-친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. 배양된 인슐린 분비세포에 정제된 Tat-GLO 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 Tat-GLO 융합단백질은 세포 내에서 48시간 지속적으 유지되었다. 또한 세포 내로 투과된 Tat-GLO 융합단백질은 SNP (sodium nitroprusside)에 의한 세포사

및 DNA 조각화 (fragmentation)를 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. STZ (Streptozotocin)를 이용한 당뇨병 동물모델에서도 Tat-GLO 융합단백질은 효과적으로 당노를 억제하는 것을 조직염색, 혈액내 혈당 수준 및 혈액 검사를 통하여 확인하였다.

[0016] 이러한 결과는 Tat-GLO 융합단백질이 인슐린 분비세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포내에서 GLO 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서, Tat-GLO 융합단백질은 당뇨병 및 당뇨병증의 치료제로 응용 가능성이 있다.

[0017] 글리옥살레이즈 융합단백질을 포함하여 수송도메인 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0018] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있으며, 천식에 적용하는 경우에는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 널리 알려진 바와 같이 흡입 방식이나 스프레이 방식의 제제로 제형화할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0019] 나아가, 본 발명은 상기 GLO 융합단백질을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 GLO 융합단백질을 유효성분으로 하는 당뇨병 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 글리옥살레이즈 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 글리옥살레이즈 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 단백질 수송 도메인을 비롯한 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 aa 49-57의 아홉개의 아미노산으로 구성되고, 서열번호 5와 같은 아미노산 서열로 이루어진 HIV Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 5의 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 겹쳐서 Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0022] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0023] "Tat-GLO 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 글리옥살레이즈를 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 글리옥살레이즈를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-글리옥살레이즈", "GLO 융합단백질" 또는 "Tat-GLO"와 혼용하였다.

[0024] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송 도메인 또는 이의 단편이 아닌 분자로서, 수송도메인과 융합되기 전의 분자 그 자체 또는 수송도메인-목표 단백질 복합체의 목표 단백질 부분을 의미한다. 목표 단백질로서는 폴리펩티드, 단백질, 펩타이드를 포함하며, 본 발명에서는 글리옥살레이즈 I 및/또는 II를 의미한다.

- [0025] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0026] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0027] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.
- [0028] 본 발명에서의 "수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질, 올리고당 또는 다당류 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.
- [0029] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0030] 본 발명은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 글리옥살레이즈의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 글리옥살레이즈 융합단백질을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명에서 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질의 그 아미노산 서열이 서열번호 9 또는 11과 같은 것을 특징으로 한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 글리옥살레이즈 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 글리옥살레이즈 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0034] 또한, 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 8 또는 10과 같은 것을 특징으로 한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질을 발현시키기 위한 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 글리옥살레이즈 융합단백질 발현백터를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 글리옥살레이즈 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 신경 퇴행성 질환 또는 당뇨의 예방 및 치료제로서 사용되는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0037] 나아가, 본 발명은 상기 글리옥살레이즈 융합단백질을 유효성분으로 하며, 신경 퇴행성 질환 또는 당뇨의 예방 및 개선 효과가 있는 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 9~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 글리옥살레이즈 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포도입성(cell-transducing) 글리옥살레이즈 융합단백질에 관한 것이다. 또한, silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다.
- [0039] 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0040] 또한, 본 발명은 글리옥살레이즈 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합단백질을 코딩하는 서열번호 6번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 codon degeneracy에 의한 서열을 갖는 핵산 분자들에도 미친다.

## 발명의 효과

- [0041] 본 발명에 의하면 배양된 인슐린 분비세포에 정제된 GLO 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 효율적으로 운반되었다.
- [0042] 본 발명에 의한 GLO 융합단백질은 세포 내로 투과되어 세포 내에서 48시간 지속적으로 유지되었다.
- [0043] 또한, 세포 내로 투과된 본 발명의 GLO 융합단백질은 SNP (sodium nitroprusside)에 의한 세포사 및 DNA 조각화 (fragmentation)를 효과적으로 억제하였다.
- [0044] 뿐만 아니라, STZ (Streptozotocin)를 이용한 당뇨동물모델에서도 본 발명의 GLO 융합단백질은 효과적으로 당뇨를 억제함을 조직염색, 혈액내 혈당 수준 및 혈액검사를 통하여 확인하였다.

## 도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 Tat-GLO 융합단백질 발현벡터 모식도이다. Tat-GLO 융합단백질 발현벡터 시스템 구축은 벡터 pET-15b을 기본으로 하여 합성 Tat 올리고머를 *Nde*I 및 *Xho*I 부위 내로 클론하고, 인간 GLO cDNA를 *Xho*I 및 *Bam*HI 부위 내로 클론하였다. 발현은 IPTG를 가하여 유도하였다.
- 도 2는 Tat-GLO 융합단백질의 정제를 나타낸 사진이다. 세포의 단백질을 추출물과 정제된 융합단백질은 SDS-PAGE로 분석하고 항토키 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다. 레인 1, 비유도 Tat-GLO 융합단백질; 레인 2, 유도된 Tat-GLO 융합단백질; 레인 3, 정제된 Tat-GLO 융합단백질.
- 도 3은 처리시간 및 처리농도에 따른 Tat-GLO 융합단백질의 세포내 투과 상황을 나타내는 사진이다. 3  $\mu$ M의 Tat-GLO 융합단백질을 10~120 분간 배양배지에 가하였다. 또, 0.5~3  $\mu$ M의 Tat-GLO 융합단백질을 120 분간 배양배지에 가하여 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다.
- 도 4는 Tat-GLO 융합단백질의 세포내 지속능력을 시험한 사진이다. 3  $\mu$ M의 Tat-GLO 융합단백질을 1~60 시간 동안 미리 처리한 세포를 웨스턴 블랏으로 분석하였다.
- 도 5는 Tat-GLO 융합단백질의 세포내 분포를 나타내는 사진이다. Tat-GLO 융합단백질을 인슐린 분비세포 내로 투과시켜 현미경으로 관찰하였다.
- 도 6은 인슐린 분비세포에서 Tat-GLO 융합단백질의 세포사 보호효과를 나타내는 사진이다. Tat-GLO 융합단백질로 두 시간 동안 미리 처리한 인슐린 분비세포를 SNP에 노출시켰다. 세포 생존율은 MTT를 이용한 발색 분석으로 평가하였다.
- 도 7은 투과된 Tat-GLO 융합단백질의 DNA 조각화 보호 효과를 나타내는 사진이다. Tat-GLO 융합단백질로 두 시간 동안 미리 처리한 인슐린 분비세포를 SNP에 노출시켰다. DNA 조각화는 TUNEL 염색으로 탐지하였다.
- 도 8은 동물모델에서 Tat-GLO 융합단백질의 효능을 나타내는 사진으로서, 인슐린 양성 세포를 나타내는 마우스 췌장의 광학현미경 사진이다. 조직 절편은 항마우스 인슐린 항체와 함께 배양하여 퍼옥시데이즈/DAB 시스템으로 염색하고, 광학현미경으로 관찰하였다.
- 도 9는 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨 마우스에서 Tat-GLO 융합단백질의 혈당억제 효능을 나타내는 그래프이다. 마우스에 120 mg/kg의 스트렙토조토신을 한 번 피하주사하여 당뇨를 유발하였다. 스트렙토조토신으로 유도된 당뇨 마우스는 4 mg/kg의 Tat-GLO 융합단백질로 한 번 처리 (당뇨 유도 12시간 전)하거나 또는 세 번 처리 (STZ 주사 후 1, 3, 5일째)하였다.
- 도 10은 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨 마우스에서 혈청 내 인슐린 수준에 미치는 Tat-GLO 융합단백질의 효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 11은 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨 마우스에서 Tat-GLO 융합단백질이 혈청 내 자유 지방산 (free fatty acid; FFA) 수준에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 12는 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨 마우스에서 혈청 내 간수치 (ALP)에 미치는 Tat-GLO 융합단백질의 효능을 나타내는 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 이하, 본 발명의 구성을 아래의 실시예의 기재를 통하여 좀더 상세히 알아본다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 자명하다.
- [0047] **재료**
- [0048] 제한 효소와 T4 DNA ligase는 Promega (USA)에서 구입하였고, Pfu 폴리머레이즈는 stratagene(USA)에서 구입하였다. Tat 올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL custom primer (USA)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa (Netherland)에서 구입하였다. pET-15b와 BL21(DE3) 플라스미드는 Novagen(USA)에서 구입하였고,  $Ni^{2+}$ -니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen (Germany)에서 구입하였다. 사람 글리옥살레이즈 cDNA는 PCR 방법으로 사람 간 cDNA 라이브러리에서 분리하였다. 이외 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.
- [0049]
- [0050] **세포 투과성 융합단백질 발현벡터의 제조 및 형질전환**
- [0051] 세포 투과성 융합단백질발현벡터의 제조 및 형질전환은 본 발명자들이 개발한 방법을 기본으로 수행하였다. 세포 투과성 GLO 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인이 포함된 발현벡터를 만들고, 단백질 수송 도메인에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 *Nde*I-*Xho*I 제한효소로 자른 pET-15b에 이어 삽입한 다음, 사람 GLO cDNA의 서열을 기본으로 하여 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하고, 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. PCR 수행 후, 아가로스 젤 전기영동으로 반응물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터에 이었다. 이 벡터를 컴피턴트 세포에 형질변환시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 분리하여 GLO cDNA가 포함된 TA 벡터를 *Xho*I 과 *Bam*HI 으로 절단하여 발현벡터에 삽입하였다. 형질변환된 *E. coli* BL21 (DE3)를 선택한 다음, 콜로니를 100 ml LB 배지에 접종하고, IPTG (0.5-1 mM)를 배지 내에 첨가하여 재조합된 융합단백질의 과대발현을 유도하였다. 과대발현된 융합단백질은 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.
- [0052] **재조합 융합단백질의 정제**
- [0053] 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 세포를 앰피실린이 포함된 LB 배지 100 ml에 넣고 37 °C에서 200 rpm으로 교반하며 배양액 내의 박테리아 농도가  $OD_{600}=0.5\sim1.0$ 을 나타낼 때 IPTG를 배지 내에 최종농도가 0.5~1 mM되게 첨가해 준 후 다시 37 °C에서 3~4 시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤, 5 ml 결합 완충액 [5 mM 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9)]를 넣고 초음파 파쇄하였다. 원심분리 후, 상층액을 즉시 2.5 ml  $Ni^{2+}$ -니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합 완충액과 6배 부피의 세척 완충액 (60 mM 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 세척한 다음 용출 완충액 (1 M 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 융합단백질을 용출하였다. 이어, 융합단백질이 포함된 분획들을 모아 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다. 정제된 단백질은 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 Bradford 방법으로 정량하였다.
- [0054] **세포배양 및 재조합 융합단백질의 세포 내 침투**
- [0055] 인슐린 분비세포는 37 °C에서 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 공급해주며 5% 우태혈청 (FBS), 항생제 (100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린) 및 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub> 가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.
- [0056] 재조합 융합단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위하여, 6-웰 플레이트에서 세포를 배양한 뒤 FBS가 포함되지 않은 1 ml의 신선한 배양액으로 교체하고 재조합 융합단백질을 배양액에 처리하였다. 처리 1 시간 뒤, 세포를 트립신-EDTA로 처리하고 PBS (phosphate buffered saline)로 충분히 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질의 양을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다.
- [0057]

- [0058] **웨스턴 블랏 분석**
- [0059] 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 다음 겔에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막으로 전기이동 시키고 단백질이 이동된 나이트로셀룰로스 막을 5% 탈지유가 들어있는 TBST 완충액으로 2 시간 실온에서 블로킹 시킨 후, 막을 1차 항체로 1 시간 반응시켰다. 1 차 항체를 TBST 완충액으로 세척한 다음 퍼옥시데이즈가 결합된 항마우스 IgG 항체 (Sigma, 1:10,000 dilution)로 1 시간 반응시키고 ECL 키트를 이용하여 항체에 반응하는 단백질 띠를 확인하였다.
- [0060] **MTT 분석**
- [0061] 세포의 생존률은 SNP (sodium nitroprusside)를 처리한 다음 [3-(4,5,- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)를 이용하여 측정하였다.
- [0062] **DNA 조각화**
- [0063] 세포내 SNP (1 mM)를 5시간 처리한 후 DNA 조각화는 TUNEL 분석 키트를 이용하여 측정하였다.
- [0064] **동물모델 제조**
- [0065] 당뇨 동물모델은 STZ (120 mg/kg)를 마우스에 복강주사하여 제조하였다. 또한 GLO 융합단백질을 당뇨 유발 전 또는 후에 처리하여 항당뇨 효능을 확인하였다.
- [0066] **혈당 및 혈액 검사**
- [0067] 혈당은 혈당기기를 이용하여 측정하였고, 혈액의 혈청을 분리하여 혈청에서 혈액내 인슐린 분비, 지방산, 그리고 간기능 효능을 각각의 분석 키트를 이용하여 측정하였다.
- [0068] **연구결과**
- [0069] **1. 세포 침투성 Tat-GLO 융합단백질의 분리, 정제**
- [0070] 글리옥살레이즈 (GLO) cDNA를 단백질을 세포내로 침투시킬 수 있는 Tat 펩타이드와 융합하여 세포침투성 Tat-GLO 융합단백질 발현벡터를 제조하였다 (도 1). 제조된 발현벡터는 대장균에서 과대발현시켜 금속-킬레이트 친화 크로마토그래피 (immobilized metal-chelate affinity chromatography) 단일 단계로 융합단백질들을 순수하게 (순도 95%) 정제하였다. 정제된 융합단백질들을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 결과 GLO 항체에 반응하는 단백질 띠는 정제된 단백질 띠와 동일한 위치에서 관찰되었다 (도 2).
- [0071] **2. 융합단백질의 세포침투능력 분석**
- [0072] 정제된 GLO 융합단백질을 농도 및 시간에 따라 당뇨세포에 처리한 후 세포를 파쇄하고 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 결과에서 나타내듯 융합단백질은 시간 및 농도 의존적으로 세포 내로 침투된 것을 알 수 있었다 (도 3).
- [0073] 또한, 배양된 세포 내로 투과된 단백질이 어느 정도 세포 내에서 안정성을 유지하는지 단백질의 안정성을 측정해 보았다. 세포 내로 투과된 GLO 융합단백질은 시간에 따라 분해되어 단백질의 양이 점차 감소되었으나, 최소 48 시간 동안 세포 내에서 존재함을 알 수 있었다 (도 4).
- [0074] Tat-GLO 융합단백질의 세포 내 침투를 형광염색을 이용하여 확인하였다. 도 5와 같이, 융합단백질은 세포 내로 침투가 잘 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 그러나 대조군 GLO 단백질은 세포내 침투가 이루어지지 않았다.

[0075] **3. 융합단백질의 세포사 보호 효과**

[0076] 정제된 GLO 융합단백질을 당뇨세포에 다양한 농도로 먼저 투여하고, NO 유발물질인 SNP를 12시간 처리 후 세포 생존율을 측정하였다 (도 6). 도 6과 같이, 융합단백질은 SNP에 의한 세포사를 농도 의존적으로 억제하였다.

[0077] SNP에 의한 활성산소의 생성과 융합단백질에 의한 DNA 조각화 보호 효과를 TUNEL 측정 키트를 이용하여 측정하였다. 도 7과 같이, SNP에 의해 DNA 조각화는 크게 증가되었다. 그러나 Tat-GLO 융합단백질을 처리한 경우 DNA 조각화 현상이 감소됨을 알 수 있었다.

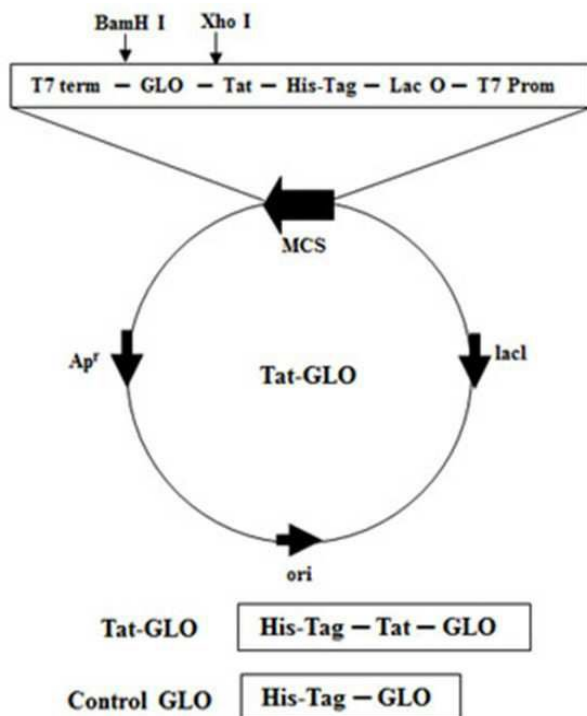
[0078] **4. 동물모델에서 융합단백질의 항당뇨 억제 효과**

[0079] 마우스에 STZ를 복강주사하여 당뇨 동물모델을 제조하였고, 융합단백질을 처리하여 항당뇨 효능을 조직염색 및 혈액을 이용하여 다양한 방법으로 확인하였다 (도 8). 먼저 혈액 내 혈당을 측정한 결과 Tat-GLO 융합단백질을 처리한 경우 혈당이 유의성 있게 감소됨을 알 수 있었다 (도 9). 혈액 내 인슐린 분비, 지방산, 그리고 간기능 효능을 각각의 측정 키트를 이용하여 측정한 결과, STZ에 의한 인슐린 분비 억제가 Tat-GLO 융합단백질에 의해 효과적으로 개선되었다 (도 10). 또한, STZ에 의해 증가된 지방산 및 간수치는 Tat-GLO 융합단백질에 의해 유의성 있게 감소됨을 알 수 있었다 (도 11-12). 이러한 결과는 Tat-GLO 융합단백질이 당뇨질환에 효과적으로 작용하고 있음을 의미한다.

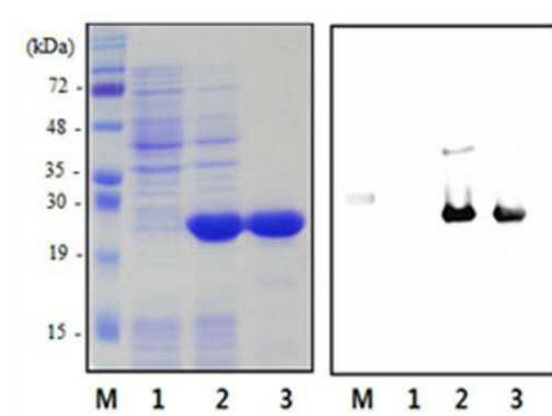
[0080] 본 발명은 사람 GLO를 효과적인 방법으로 단백질 수준에서 인슐린 분비세포 내로 직접 투과시키는 실험적 보고이다. 당뇨 질환에 대한 단백질 치료에 Tat-GLO 융합단백질이 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 당뇨 질환에 의해 유발되는 당뇨 합병증에도 Tat-GLO 융합단백질이 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

**도면**

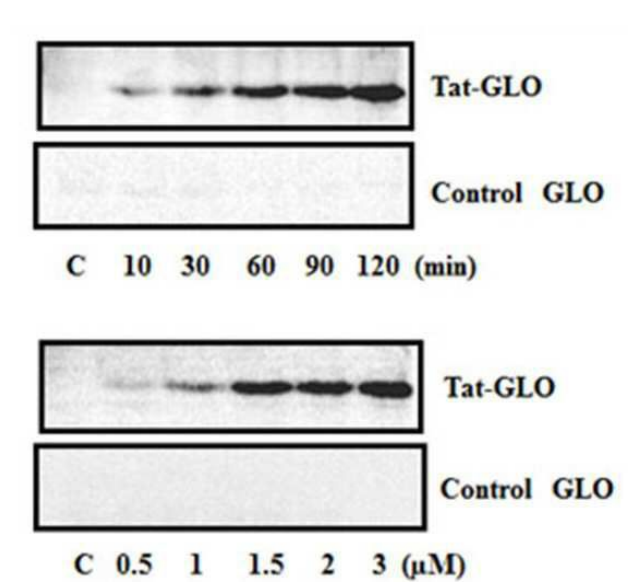
**도면1**



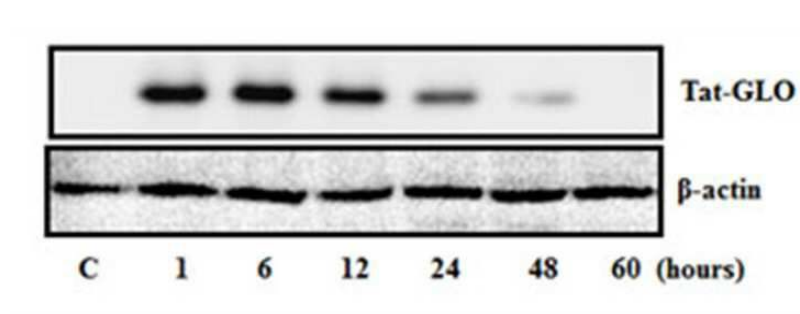
도면2



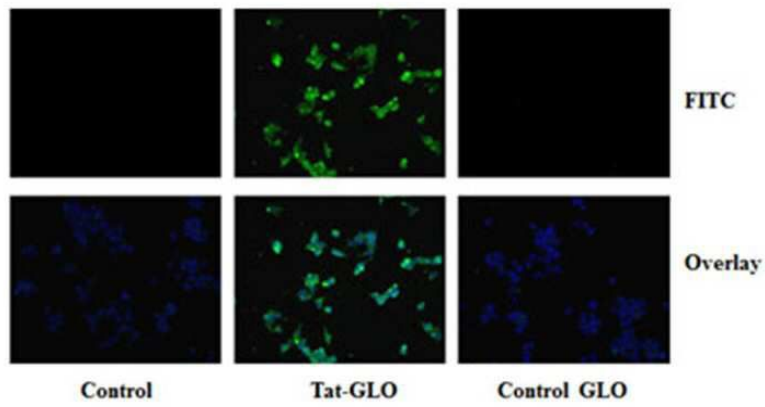
도면3



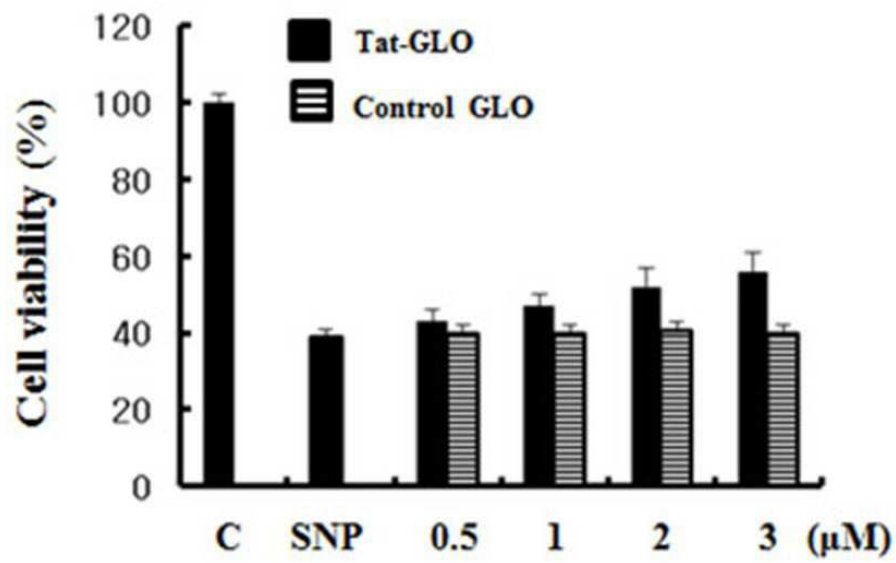
도면4



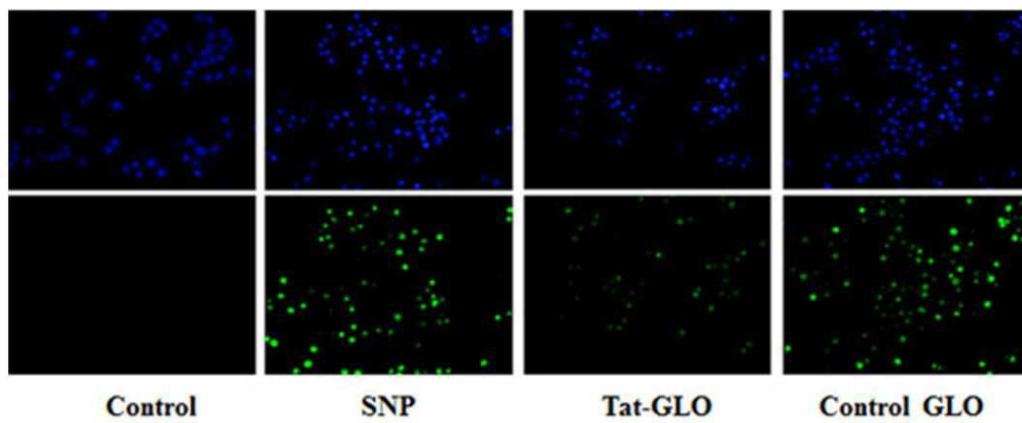
도면5



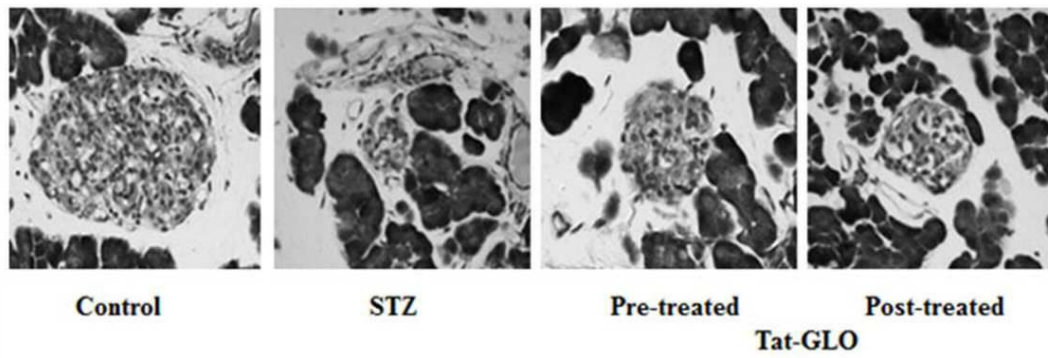
도면6



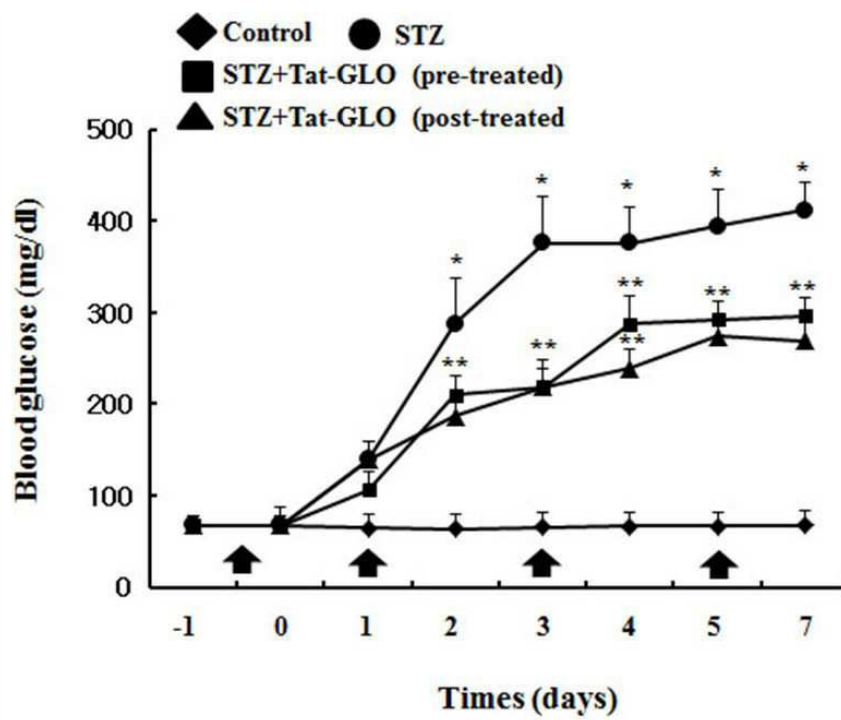
도면7



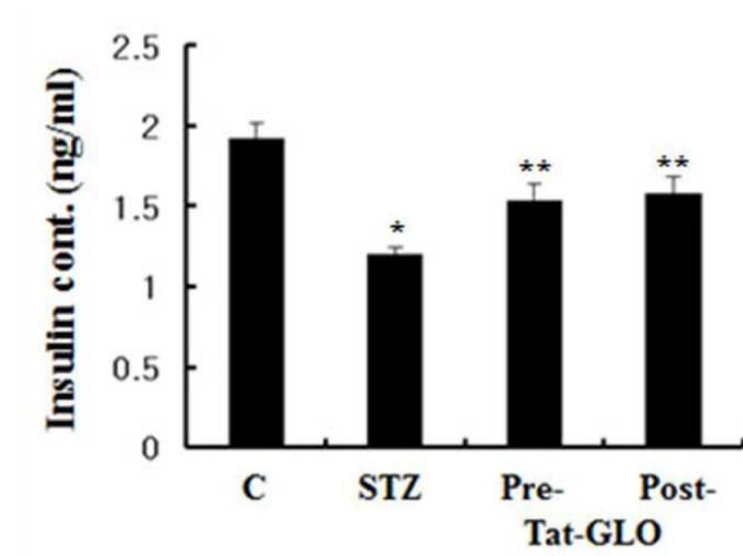
도면8



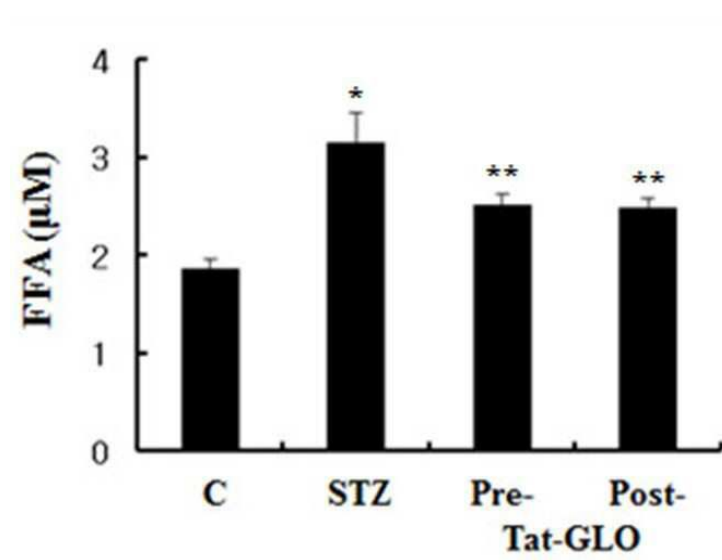
도면9



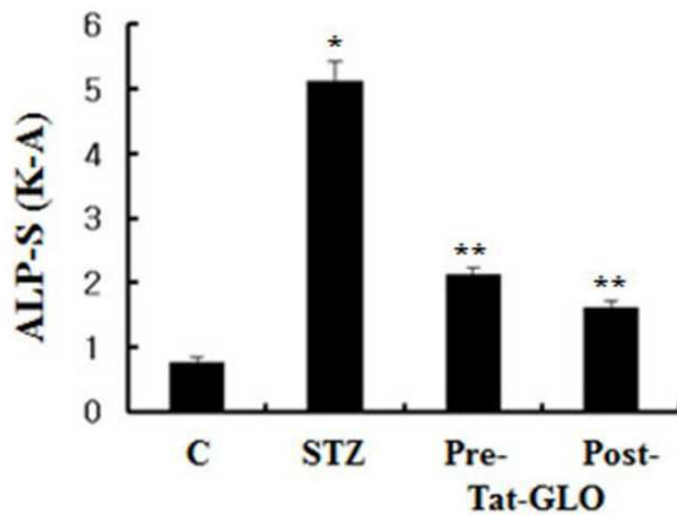
도면10



도면11



도면12



## 서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Cell transducing glyoxalase fusion protein and pharmaceutical composition containing thereof

<130> hallym-tatGLO

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 1

taggaagaag cggagacagc gacgaagac

29

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 2

tcgagtcttc gtcgctgtct ccgcttcttc c

31

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ctcgagatgg cagaaccgca gccccgtcc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ctcgagatga aggtagaggt gctgcctgcc

30

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ggatccctac attaaggttg ccattttgtt

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ggatcctcag tcccggggca tcttgaactg

30

<210>

8

<211> 588  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotide sequence of tat-GLO I fusion protein  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(579)  
 <400> 8

agg aag aag cgg aga cag cga cga aga atg gca gaa ccg cag ccc ccg 48  
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Ala Glu Pro Gln Pro Pro  
 1 5 10 15  
 tcc ggc ggc ctc acg gac gag gcc gcc ctc agt tgc tgc tcc gac gcg 96  
 Ser Gly Gly Leu Thr Asp Glu Ala Ala Leu Ser Cys Cys Ser Asp Ala  
 20 25 30  
 gac ccc agt acc aag gat ttt cta ttg cag cag acc atg cta cga gtg 144  
 Asp Pro Ser Thr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Gln Thr Met Leu Arg Val  
 35 40 45  
 aag gat cct aag aag tca ctg gat ttt tat act aga gtt ctt gga atg 192  
 Lys Asp Pro Lys Lys Ser Leu Asp Phe Tyr Thr Arg Val Leu Gly Met  
 50 55 60  
 acg cta atc caa aaa tgt gat ttt ccc att atg aag ttt tca ctc tac 240  
 Thr Leu Ile Gln Lys Cys Asp Phe Pro Ile Met Lys Phe Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ttc ttg gct tat gag gat aaa aat gac atc cct aaa gaa aaa gat gaa 288  
 Phe Leu Ala Tyr Glu Asp Lys Asn Asp Ile Pro Lys Glu Lys Asp Glu  
 85 90 95  
 aaa ata gcc tgg gcg ctc tcc aga aaa gct aca ctt gag ctg aca cac 336  
 Lys Ile Ala Trp Ala Leu Ser Arg Lys Ala Thr Leu Glu Leu Thr His  
 100 105 110  
 aat tgg ggc act gaa gat gat gag acc cag agt tac cac aat ggc aat 384  
 Asn Trp Gly Thr Glu Asp Asp Glu Thr Gln Ser Tyr His Asn Gly Asn  
 115 120 125  
 tca gac cct cga gga ttc ggt cat att gga att gct gtt cct gat gta 432

Ser Asp Pro Arg Gly Phe Gly His Ile Gly Ile Ala Val Pro Asp Val  
130 135 140  
tac agt gct tgt aaa agg ttt gaa gaa ctg gga gtc aaa ttt gtg aag 480

Tyr Ser Ala Cys Lys Arg Phe Glu Glu Leu Gly Val Lys Phe Val Lys  
145 150 155 160  
aaa cct gat gat ggt aaa atg aaa ggc ctg gca ttt att caa gat cct 528  
Lys Pro Asp Asp Gly Lys Met Lys Gly Leu Ala Phe Ile Gln Asp Pro  
165 170 175  
gat ggc tac tgg att gaa att ttg aat cct aac aaa atg gca acc tta 576  
Asp Gly Tyr Trp Ile Glu Ile Leu Asn Pro Asn Lys Met Ala Thr Leu  
180 185 190

atg t agggatcc 588  
Met  
<210> 10  
<211> 812  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> nucleotide sequence of Tat-glyoxalse II fusion protein  
<220><221> CDS  
<222> (1)..(807)  
<400> 10

agg aag aag cgg aga cag cga cga aga atg aag gta gag gtg ctg cct 48  
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Lys Val Glu Val Leu Pro  
1 5 10 15

gcc ctg acc gac aac tac atg tac ctg gtc att gat gat gag acc aag 96  
Ala Leu Thr Asp Asn Tyr Met Tyr Leu Val Ile Asp Asp Glu Thr Lys  
20 25 30

gag gct gcc att gtg gat ccg gtg cag ccc cag aag gtc gtg gac gcg 144  
Glu Ala Ala Ile Val Asp Pro Val Gln Pro Gln Lys Val Val Asp Ala  
35 40 45

gcg aga aag cac ggg gtg aaa ctg acc aca gtg ctc acc acc cac cac 192

Ala Arg Lys His Gly Val Lys Leu Thr Thr Val Leu Thr Thr His His  
50 55 60  
cac tgg gac cat gct ggc ggg aat gag aaa ctg gtc aag ctg gag tcg 240  
His Trp Asp His Ala Gly Gly Asn Glu Lys Leu Val Lys Leu Glu Ser  
65 70 75 80  
gga ctg aag gtg tac ggg ggt gac gac cgt atc ggg gcc ctg act cac 288  
Gly Leu Lys Val Tyr Gly Gly Asp Asp Arg Ile Gly Ala Leu Thr His  
85 90 95  
aag atc act cac ctg tcc aca ctg cag gtg ggg tct ctg aac gtc aag 336  
Lys Ile Thr His Leu Ser Thr Leu Gln Val Gly Ser Leu Asn Val Lys  
100 105 110  
tgc ctg gcg acc ccg tgc cac act tca gga cac att tgt tac ttc gtg 384  
Cys Leu Ala Thr Pro Cys His Thr Ser Gly His Ile Cys Tyr Phe Val  
115 120 125  
agc aag ccc gga ggc tcg gag ccc cct gcc gtg ttc aca ggt gac acc 432  
Ser Lys Pro Gly Gly Ser Glu Pro Pro Ala Val Phe Thr Gly Asp Thr  
130 135 140  
ttg ttt gtg gct ggc tgc ggg aag ttc tat gaa ggg act gcg gat gag 480  
Leu Phe Val Ala Gly Cys Gly Lys Phe Tyr Glu Gly Thr Ala Asp Glu  
145 150 155 160  
atg tgt aaa gct ctg ctg gag gtc ttg ggc cgg ctc ccc ccg gac aca 528  
Met Cys Lys Ala Leu Leu Glu Val Leu Gly Arg Leu Pro Pro Asp Thr  
165 170 175  
aga gtc tac tgt ggc cac gag tac acc atc aac aac ctc aag ttt gca 576  
Arg Val Tyr Cys Gly His Glu Tyr Thr Ile Asn Asn Leu Lys Phe Ala  
180 185 190  
cgc cac gtg gag ccc ggc aat gcc gcc atc cgg gag aag ctg gcc tgg 624  
Arg His Val Glu Pro Gly Asn Ala Ala Ile Arg Glu Lys Leu Ala Trp  
195 200 205  
gcc aag gag aag tac agc atc ggg gag ccc aca gtg cca tcc acc ctg 672  
Ala Lys Glu Lys Tyr Ser Ile Gly Glu Pro Thr Val Pro Ser Thr Leu

|                                                                 |     |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|---------|
| 210                                                             | 215 | 220 |         |
| gca gag gag ttt acc tac aac ccc ttc atg aga gtg agg gag aag acg |     |     | 720     |
| Ala Glu Glu Phe Thr Tyr Asn Pro Phe Met Arg Val Arg Glu Lys Thr |     |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240     |
| gtg cag cag cac gca ggt gag acg gac ccg gtg acc acc atg cgg gcc |     |     | 768     |
| Val Gln Gln His Ala Gly Glu Thr Asp Pro Val Thr Thr Met Arg Ala |     |     |         |
|                                                                 | 245 | 250 | 255     |
|                                                                 |     |     |         |
| gtg cgc agg gag aag gac cag ttc aag atg ccc cgg gac             |     |     | tga 810 |
| Val Arg Arg Glu Lys Asp Gln Phe Lys Met Pro Arg Asp             |     |     |         |
|                                                                 | 260 | 265 |         |
| gg                                                              |     |     | 812     |