



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0099462
(43) 공개일자 2023년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4702 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0188832

(22) 출원일자 2021년12월27일

심사청구일자 2021년12월27일

(71) 출원인

(주)메디레독스

대전광역시 유성구 대학로 99, 901호 비-4 (궁동,
충남대학교 산학연교육연구관)

(72) 발명자

전병화

대전광역시 서구 둔산남로 127(둔산동, 목련아파
트), 204동 803호

주희경

대전광역시 서구 만년로 25(만년동, 강변아파트),
102동 701호

이유란

대전광역시 유성구 상대복용로29번길 52(상대동,
대전아이파크시티 1단지), 102동 1301호

(74) 대리인

특허법인 플러스

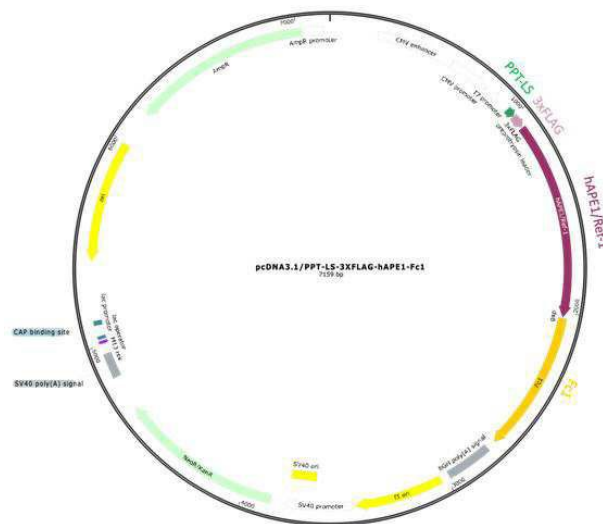
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 Fc 융합 산화환원조절단백-1 단백질, 이를 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는 비-바이러스성 벡터 및 상기 융합 단백질을 함유하는 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 항염증 활성을 갖는 산화환원조절단백-1이 세포 밖 염증 유도 수용체에 효과적으로 작용하며, 생체 내에서 오래 잔존하도록 하기 위한 Fc 융합산화환원조절단백-1 단백질, 상기 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는 비-바이러스성 벡터 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 Fc 융합 산화환원조절단백-1 단백질은 우수한 항염증 치료 및 예방 효과를 가지며, 생체 적용이 가능할 뿐만 아니라, 상기 단백질의 지속적인 대량 생산이 가능하고, 상기 단백질을 함유하는 세포 배양액, 생산용 세포주를 선택하는 것이 가능하여 다양한 용도로 활용이 가능한 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425151027

과제번호 S2976886

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 창업성장기술개발사업 디딤돌창업과제

연구과제명 산화환원조절단백을 유효성분으로 하는 사이토카인 폭풍제어물질 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 (주)메디레독스

연구기간 2020.10.15 ~ 2021.10.14

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 11로 이루어진 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단백질은 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1)의 C-말단에 Fc 단편이 융합된 것인, Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는, 벡터.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 벡터는 동물세포 발현 벡터 또는 미생물 발현 벡터인, 벡터.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 핵산은 각각 서열번호 2 또는 서열번호 12의 염기 서열로 이루어진, 벡터.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 동물 발현 벡터는 pcDNA3.1(-)인, 벡터.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 미생물 발현 벡터는 pET28a인, 벡터.

청구항 8

제 3항의 벡터로 형질전환된, 형질전환체.

청구항 9

제 8항의 형질전환체, 상기 형질전환체 배양액 또는 상기 형질전환체 배양 상등액을 포함하는, 조성물.

청구항 10

Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 유효성분으로 함유하는, 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 염증 질환은 패혈증, 바이러스 감염질환 또는 자가면역질환으로 인한 것인, 염증 질환의 치료 또는 예방용

약학 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 자가면역질환은 류마티스 관절염인, 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 약학 조성물의 제형은 정맥 주사제, 근육 주사제, 경구 투여제 또는 피부 도말 제제인, 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성을 갖는 산화환원조절단백-1이 세포 밖 염증 유도 수용체에 효과적으로 작용하며, 생체 내에서 오래 잔존하도록 하기 위한 Fc 융합 산화환원조절단백-1 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는 비-바이러스성 벡터 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산화환원조절단백-1(apurinic 또는 apyrimidinic endonuclease 1/redox factor 1; 이하 APE1/Ref-1이라 칭할 수 있음)은 세포 내에서 산화적 스트레스를 방어하는 주요 단백질이다. 이는 대표적으로 손상된 유전자의 수리 및 복구 기능과 전사 인자(transcriptional factor) 활성을 조절하여 세포 내 유전자 발현을 정상적으로 유지하는 데 중요한 기능을 담당한다.

[0003] 산화환원조절단백-1은 318개의 아미노산으로 이루어져 있으며, N-말단 부위에 핵 위치 신호(Nuclear Localization Signal, NLS) 및 핵 유출 신호(Nuclear Export Signal, NES)가 존재하여 세포 내 위치를 조절한다. 정상 조건에서 산화환원조절단백-1은 주로 핵에 위치하지만 세포 내 손상을 유도하는 산화적 스트레스 등에 의해 세포질로 이동되는 것이 알려져 있다.

[0004] 최근 산화환원조절단백-1은 특정 조건에서 세포 외로 배출되어 기능하는 것으로 보고된 바 있으며, 본 발명자들은 대한민국 등록특허공보 제1607282호에 산화환원조절단백-1을 세포 외로 배출시켜 염증 지표 물질의 변화를 측정함으로써, 세포 외로 배출된 산화환원조절단백-1이 염증 억제에 효과가 있음을 개시한 바 있다.

[0005] 그러나, 상기 문헌에서는 산화환원조절단백-1 단백질의 생산이 바이러스 벡터를 이용하여 수행됨으로써 생체 적용이 불가능하며, 지속적인 발현이 어려운 한계가 있어, 단백질의 대량 생산이 어려운 문제 등 다양한 한계가 있어 이에 대한 개선 방안의 마련이 절실한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제1607282호(2016.03.29).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제점의 해결을 위해 본 발명에서는 생체에 적용 가능한 산화환원단백-1의 연속적 생산이 가능한 신규한 융합 단백질과 상기 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는 벡터를 제공하고자 하였다.

[0008] 또한, 발현된 상기 신규한 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 항염용 약학 조성물을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 11로 이루어진 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 상기 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질은 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1)의 C-말단에 Fc 단편이 융합된 것일 수 있다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는, 벡터에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 벡터는 동물세포 발현 벡터 또는 미생물 발현 벡터일 수 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 벡터는 각각 서열번호 2 또는 서열번호 12의 염기 서열로 이루어질 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 동물 발현 벡터는 pcDNA3.1(-)일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 미생물 발현 벡터는 pET28a일 수 있다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된, 형질전환체에 관한 것이다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 형질전환체, 상기 형질전환체 배양액 또는 상기 형질전환체 배양 상등액을 포함하는, 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 또한 본 발명은 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 유효성분으로 함유하는, 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 염증 질환은 패혈증, 바이러스 감염질환 또는 자가면역질환으로 인한 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물의 제형은 정맥 주사제, 근육 주사제, 경구 투여제 또는 피부 도말 제제일 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 Fc 융합 산화환원조절단백-1 융합 단백질은 우수한 항염증 치료 및 예방 효과를 가지며, 생체 적용이 가능할 뿐만 아니라, 상기 Fc 융합 단백질의 지속적인 대량 생산이 가능하고, 상기 Fc 융합 단백질을 함유하는 세포 배양액, 생산용 세포주를 선택하는 것이 가능하여 다양한 용도로 활용이 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc 동물 발현 벡터의 개열지도에 관한 것이고,
 도 2는 His6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc 대장균 발현 벡터의 개열지도에 관한 것이고,
 도 3은 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc 융합 단백질의 아미노산 서열에 관한 것이고,
 도 4는 염증을 유도한 마우스 대식세포에 APE1/Ref-1-Fc 융합 단백질 처리 후 iNOS 및 COX-2의 발현량의 변화를 나타내는 웨스턴 블로팅 결과에 관한 것이고,
 도 5는 동물세포에서 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc 융합 단백질의 검출을 확인한 것이고,
 도 6은 동물세포로 부터 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc 융합 단백질을 포함하고 있는 세포 배양액을 이용한 항염 효과 측정결과에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하 첨부한 표 또는 도면들을 참조하여 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0025] 도면이 기재되어 있을 경우, 이는 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 상기 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.

- [0026] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0027] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명의 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.
- [0029] 또한 본 발명의 명세서에서, “포함한다”는 표현은 “구비한다”, “함유한다”, “가진다” 또는 “특징으로 한다” 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다. 또한 “실질적으로...로 구성된다”는 표현은 특정된 요소, 재료 또는 공정과 함께 열거되어 있지 않은 다른 요소, 재료 또는 공정이 발명의 적어도 하나의 기본적인 신규한 기술적 사상에 허용할 수 없을 만큼의 현저한 영향을 미치지 않는 양으로 존재할 수 있는 것을 의미한다. 또한 “구성된다”는 표현은 기재된 요소, 재료 또는 공정만이 존재하는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 명세서에서 사용된 용어, “성분”, “조성물”, “화합물의 조성물”, “화합물”, “약물”, “약학적 활성제”, “활성제”, “치유”, “치료법”, “치료” 또는 “약제”는 대상체(인간 또는 동물)에 투여될 때 국소 및/또는 전신 작용에 의해 원하는 약학적 및/또는 생리학적 효과를 유도하는 화합물 또는 화합물(들) 또는 물질의 조성물을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0031] 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 “치료” 또는 “치료법”(뿐만 아니라 그의 상이한 형태)는 예방적 (예: 예방적 치료), 치유적 또는 경감성 치료를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 “치료하는”은 상태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 유해 또는 부정적 효과 또는 증상을 경감시키거나 감소시키는 것을 포함한다. 본 발명의 용어 “예방”, “개선” 및 “치료”는 최광의의 개념으로 해석되어야 하며, “예방”이란, 질환에 노출되거나 질환에 걸리기 쉬울 수 있으나 질환의 증상을 아직 경험하거나 드러내지 아니한 환자에게서 질환의 임상적 증상 중 하나 이상이 진행되지 아니하도록 하는 것을 의미한다. “치료”란, 질환 또는 이의 하나 이상의 임상적 증상의 발달을 저지 또는 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 발명에 있어 “샘플” 또는 “시료”는 분석을 위한 대상을 나타내는 것으로, 명세서에 걸쳐 동일한 의미로 사용되었다.
- [0033] 본 명세서에 있어서, “목적 단백질(target protein)”이란 본 발명에 따른 유전공학적 방법으로 생산하고자 하는 단백질을 말하는 것으로, 바람직하게는 상업적 용도로 이용되고 있는 대량으로 생산될 필요가 있는 단백질들이며, 더욱 바람직하게는 항원, 항체, 항체의 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 사이토카인, 효소, 효소의 단편, 효소 저해제, 수송 단백질, 수용체(receptor), 수용체의 단편, 생체방어 유도물질, 저장 단백질, 이동 단백질(movement protein), 익스플로이티브 단백질(exploitive protein), 리포터 단백질 등이나, 본 발명의 재조합 발현 벡터로 제조될 수 있는 단백질이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 명세서에 있어서, “재조합 벡터(recombinant vector)”란 벡터 내에 삽입된 이중의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 Fc 단편이 융합된 목적 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 벡터를 의미한다. 상기 “벡터”는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, “복제 단위”란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다.
- [0035] 본 명세서에 있어서, “Fc 융합 단백질(Fc fusion protein)”이란 Fc 단편이 융합된 재조합 단백질을 의미한다.
- [0036] 본 명세서에 있어서, “형질전환(transformation)”이란 주입된 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 총칭하며, “형질전환체(transgenic organism)”란 분자유전학적 방법으로 외부의 유전자를 주입하여 제조된 생명체로서, 바람직하게는 본 발명의 재조합 발현 벡터에 의하여 형질전환된 생명체이며, 상기 생명체는 미생물, 진핵세포, 곤충, 동물, 식물 등 생명이 있는 생물이라면 제한이 없으며, 바람직하게는 대장균, 살모넬라, 바실러스, 효모, 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소, 아그로박테리움 튜메피엔스, 식물 등

이나 이에 제한되지 않는다. 상기 형질전환체는 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 아그로박테리움(Agrobacterium)-매개 형질전환 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylen glycol)-매개 형질전환 방법 등의 방법으로 제조될 수 있으나, 본 발명의 벡터를 주입할 수 있는 방법이라면 제한이 없다.

- [0038] 이하 본 발명의 Fc 융합 산화환원조절단백-1 융합 단백질에 대해 상세히 설명한다.
- [0039] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 11로 이루어진 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0040] 상기 단백질은 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1)의 C-말단에 Fc 단편이 융합된 것일 수 있다.
- [0041] 상기 Fc 단편(Fc fragment)이란 면역글로불린이 파파인(papain)에 의해 소화되었을 때, 중쇄(heavy chain; H chain) 부분만이 S-S 결합으로 연결되고, 항원 결합부위를 가지지 않는 부분을 Fc 단편이라 한다. 상기 Fc 단편은 항체의 불변영역으로 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 이들의 조합이 사용될 수 있고, 바람직하게는 IgG1의 Fc 영역(이를 Fc1이라 칭함)이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 Fc 단편 또는 이들의 조합을 본 발명의 발현 벡터에 도입하였을 때 바이러스 발현 벡터 등을 사용하는 경우 대비 염증 질환의 억제 효과가 현저히 우수하고, 융합 단백질의 안정적인 발현 및 장시간 유지가 가능하여 매우 바람직하다.
- [0042] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 염기 서열을 포함하는, 벡터에 관한 것이다. 상기 벡터는 바람직하게는 Fc 단편 이외에 분리 및 정제를 용이하도록 하기 위한 추가 태그, 형질전환체를 선별하기 위한 항생제 내성 유전자 등의 마커 등을 추가로 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 추가 태그의 일 예로 추가로 용이한 분리를 위해 포함되는 것으로서, 대표적으로 Avi 태그, Calmodulin 태그, polyglutamate 태그, E 태그, FLAG 태그, HA 태그, His 태그, Myc 태그, S 태그, SBP 태그, IgG-Fc 태그, CTB 태그, Softag 1 태그, Softag 3 태그, Strep 태그, TC 태그, V5 태그, VSV 태그, Xpress 태그 등이 포함될 수 있으며, 형질전환체의 선별을 위한 추가적인 마커의 일례로 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 포함될 수 있으며, 프로모터로서 pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래한 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, SV40(Simian virus 40) 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 α (Elongation factor-1 α) 프로모터 등이 포함될 수 있으며, 상기 터미네이터는 대표적으로 노팔린 신타아제(NOS), 베타 아밀 라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린 터미네이터, 아그로박테리움 투마파시옌스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이나, 상기 예는 예시일 뿐 기존에 알려져 있는 재조합 벡터에 사용되고 있는 유전자라면 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에 따른 구체적인 일 예로, 상기 벡터는 서열번호 2 (CHO-S 형질전환용)또는 서열번호 12 (대장균 형질전환용)의 염기 서열을 가질 수 있으나 형질전환체의 종류에 따라 본 발명의 융합 단백질을 효과적으로 발현할 수 있다면 이에 한정되지 않고 사용할 수 있다.
- [0045] 상기 벡터는 동물세포 발현 벡터 또는 미생물 발현 벡터일 수 있으며, 본 발명에 따른 구체적인 예로서 상기 동물 발현 벡터는 pcDNA3.1(+/-), 상기 미생물 발현 벡터는 pET28a일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된, 형질전환체에 관한 것이다.
- [0047] 상기 형질전환체는 제한되는 것은 아니나, 대장균, 바실러스, 살모넬라, 효모 등과 같은 미생물, 곤충 세포, 인간을 포함한 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소 등과 같은 포유류 동물 세포일 수 있으며, 종계는 대장균, 마우스 세포를 사용할 수 있으나, 본 발명의 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 생체라면 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 상기 포유류 세포는 일례로, CHO 세포일 수 있으며, 종계는 DG44, DXB-11, K-1 및 CHO-S로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 세포주일 수 있으며, 더욱 종계는 CHO-S일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 또한 본 발명은 상기 형질전환체, 상기 형질전환체 배양액 또는 상기 형질전환체 배양 상등액을 포함하는, 조성

물에 관한 것이다. 상기 배양액은 바람직하게는 세포를 배양한 후 세포를 제거한 배양 상등액을 의미하는 것일 수도 있다.

[0050] 또한 본 발명은 Fc 융합 산화환원조절단백-1(APE/Ref-1) 단백질을 유효성분으로 함유하는, 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0051] 상기 염증 질환은 염증에 의해 발생하는 질병, 장애, 또는 상태를 의미하는 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 일례로 베체트병(Behcet's disease), 혈관염(vasculitis), 패혈증(sepsis), 종양 혈관형성(tumor angiogenesis), 증식성 혈관 질환(proliferative vascular disease) 및 재협착(restenosis)으로부터 선택된 혈관/혈액의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 청소년 특발성 관절염(juvenile idiopathic arthritis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 치주염(periodontitis), 및 손, 발, 발목, 무릎, 엉덩이, 어깨, 팔꿈치 또는 척추 관절염(arthritis) 및/또는 탈염(demineralization)으로부터 선택된 뼈 및/또는 관절의 염증성 질환, 장애 또는 상태; (a) 1형 당뇨병(diabetes type-1), 2형 당뇨병(diabetes type-2), 급성 및 만성 췌장염(acute and chronic pancreatitis)으로부터 선택된 췌장의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 사구체경화증(glomerulosclerosis), 사구체신염(glomerulonephritis), 신염(nephritis), 급성 신장 손상(acute kidney injury), 버거병(Berger's disease), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis) 및 신장 이식 급성 또는 만성 거부(kidney transplant acute or chronic rejection)로부터 선택된 신장의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), 담즙정체성 간 질환(cholestatic liver disease), 경화성 담관염(sclerosing cholangitis) 및 간 이식 급성 또는 만성 거부(liver transplant acute or chronic rejection)로부터 선택된 간의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 폐 고혈압(pulmonary hypertension), 유육종증(sarcoidosis), 심근염(myocarditis), 심낭염(pericarditis) 및 폐 또는 심장 이식 급성 또는 만성 거부(lung or heart transplant acute or chronic rejection)로부터 선택된 폐 또는 심장의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 접촉성 피부염(contact dermatitis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 원형 탈모증(alopecia areata), 다형성 홍반(erythema multiforma), 포진성 피부염(dermatitis herpetiformis), 경피증(scleroderma), 백반증(vitiligo), 과민성 혈관염(hypersensitivity angiitis), 두드러기(urticaria), 수포성 천포창(bullous pemphigoid), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 낙엽상 천포창(pemphigus foliaceus), 종양수반성 천포창(paraneoplastic pemphigus), 후천성 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa acquisita), 여드름(acnea), 켈로이드 흉터(keloid scar) 및 피부의 기타 염증 또는 알레르기 상태로부터 선택된 피부의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 결막염(conjunctivitis), 공막염(scleritis), 상공막염(episcleritis), 범포도염(panuveitis), 맥락막염(choroiditis), 맥락망막염(chorioretinitis), 신경망막염(neuroretinitis), 포도막염(uveitis), 안와 염증성 질환(orbital inflammatory disease) 및 광학 신경염(optical neuritis)으로부터 선택된 눈의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 비바이러스성 및 바이러스성 뇌염 및 수막염(non-viral and viral encephalitis and meningitis), 우울증(depression), 만성 통증(chronic pain)을 포함한 신경병성 통증(neuropathic pain), 뇌졸중(stroke)을 포함한 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury), 파킨슨병(Parkinson disease), 골수염(Myelitis), 샤르코-마리-투스 질환 1형(Charcot-Marie-Tooth disease type 1)(CMT1A 및 CMT1B 포함), 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 탈수초성 다발신경병증(demyelinating polyneuropathy) 및 말초신경병증(peripheral neuropathy)으로부터 선택된 중추신경계 또는 말초신경계의 염증성 질환, 장애 또는 상태; 피부 및 신장에서, 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성 자반병(idiopathic purpura), 재생 불량성 빈혈(aplastic anemia), 그레이브스병 및 심근염(Myocarditis)을 포함하는 루푸스(Lupus)로부터 선택된 자가 면역(autoimmune) 질환, 장애 또는 상태; 및 자궁 내막증(endometriosis), 자궁 섬유종(uterine fibroma), 전립선 이형성증(prostate dysplasia) 또는 성장, 및 자궁 경부 이형성증(cervix dysplasia)으로부터 선택된 생식계의 염증성 질환, 장애 또는 상태를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 암, 패혈증, 바이러스 감염질환 또는 자가면역질환인 류마티스 관절염으로 인한 것일 수 있다.

[0052] 상기 약학 조성물은 상기 약학 조성물을 함유하는 것 이외에 통상적으로 약학 조성물에 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0053] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는 비제한적으로 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘

포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 현탁제 또는 유화액제, 주사제, 에어로졸 등의 경구형 제형이 바람직하며 이 중에서도, 과립, 분말 펠렛의 제형이 가장 바람직하다. 이외의 제형으로, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 불활성인 유기 또는 무기 담체를 이용하여 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 즉, 제형이 정제, 코팅된 정제, 당의정 및 경질 캡슐제인 경우 락토스, 수크로스, 전분 또는 그 유도체, 탈크, 칼슘 카보네이트, 젤라틴, 스테아르산 또는 그 염을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 연질 캡슐제인 경우에는 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체의 폴리올을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 용액 또는 시럽 형태인 경우, 물, 폴리올, 글리세롤, 및 식물성 오일 등을 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0058] 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 것으로 당업자에게 인식될 수 있는 각종 치료법 및 다른 염증성 질환 치료용 약학 조성물 등과 함께 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 방식은, 예를 들면, 경구 복용될 수 있다. 피하, 정맥, 근육 또는 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0061] 상기 약학 조성물은 주사제, 캡슐제, 환제, 정제, 용액제 등의 경구 투여제, 발포제, 패치제, 페이스트제 등의 피부 도말 제제, 현탁제 또는 분무제의 제형일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 상기 약학 조성물은 고상 투여형 또는 액상 투여형일 수 있으며, 경구, 비경구, 비내, 구소, 구강, 설하, 기도 분사 또는 직장 투여용일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] Fc 융합 산화환원조절단백-1 단백질 발현 벡터 제조

1-1. 동물세포 발현 벡터 제조

[0068] Fc1 단편이 C-말단에 융합된 Fc 융합 산화환원조절단백-1의 과발현을 위하여 p3xFLAG-CMV-8 (Sigma-Aldrich, USA) 벡터를 이용하여 3개의 FLAG 염기서열, 세포 외 배출신호인 PPT-LS 및 Fc1 단편의 서열을 포함한 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1를 제작하였다. CHO-S 세포주 발현을 위해 pcDNA3.1(-) 벡터(Invitrogen, USA)를 사용하여, pcDNA3.1/PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1를 제조하였다.

[0069] 구체적으로는, 세포 외 배출 신호인 PPT-LS를 포함한 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1를 제작하기 위해 p3xFLAG-

CMV8백터에 삽입되어 있는 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 유전자를(NM_001641; Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7; 435(3): 403-7) 이용하여 EcoRI부위와 함께 개시 코돈인 ATG가 추가되어 있는 서열번호 3의 정방향 프라이머와 말단에 BglII과 함께 종결코돈인 TGA가 추가되어 있는 서열번호 4의 역방향 프라이머를 사용하여 pFUSE-hIgG-Fc 백터에 클로닝 하였다. PCR 반응은 제조사의 설명서(Intron, Korea)에 따라 고성능 DNA 중합효소를 이용하여 수행하였으며, PCR은 94℃, 58℃, 72℃를 25사이클로 실험하였다.

[0070] 서열번호 3 : 5'-GAATTCATGGACTACAAAGACCA-3'

[0071] 서열번호 4 : 5'-CAGATCTTCGAGTGCTAGG-3'

[0072] 제작된 pFUSE-hIgG-Fc/PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1은 EcoRI부위를 포함한 서열번호 5의 정방향 프라이머와 말단에 XhoI 부위를 포함하고 있는 서열번호 6의 역방향 프라이머를 사용하여 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 유전자를 증폭 분리하였다. 증폭된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 유전자는 pCDNA3.1 (-) 백터에 재조합하여 pCDNA3.1 (-)/PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 발현 백터를 제조하였다.

[0073] 서열번호 5 : 5'-GGAATTCATGTCTGCACTTCTGATC-3'

[0074] 서열번호 6 : 5'-CTCGAGTCATTACCCGGAGACAG-3'

[0075] 모든 재조합 DNA는 시퀀싱하여 서열을 확인하였다.

[0076] 1-2. 미생물 세포 발현 백터 제조

[0077] Fc1 단편이 C-말단에 융합된 Fc 융합 산화환원조절단백-1의 과발현을 위하여 p3xFLAG-CMV-8 (Sigma-Aldrich, USA) 백터를 이용하여 3개의 FLAG 염기서열 및 Fc1 단편의 서열을 포함한 3xFLAG-His-6-APE1/Ref-1-Fc1를 제작하였다. 대장균 세포주 발현을 위해 pET28a 백터(Invitrogen, USA)를 사용하여, pET28a/3xFLAG-His-6-APE1/Ref-1-Fc1을 제조하였다.

[0078] 구체적으로는, His-6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1을 제작하기 위해 pCMV-tag2A(Addgene) 백터에 삽입되어 있는 전장 APE1/Ref-1 cDNA (NM_001641; Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7; 435(3): 403-7)를 이용하여 HindIII 부위와 함께 개시코돈인 ATG가 추가되어 있는 서열번호 7의 정방향 프라이머와 말단에 EcoRI과 함께 종결코돈인 TGA가 추가되어 있는 서열번호 8의 역방향 프라이머를 사용하여 p3xFLAG-CMV-8 백터에 클로닝하였다. PCR 반응은 제조사의 설명서(Intron, Korea)에 따라 고성능 DNA 중합효소를 이용하여 수행하였으며, PCR은 94℃, 58℃, 72℃를 25사이클로 실험하였다.

[0079] 서열번호 7 : 5'-GAATTCATGGACTACAAAGACC-3'

[0080] 서열번호 8 : 5'-CAGATCTTCGAGTGCTAGG-3'

[0081] 제작된 p3xFLAG-CMV-8/APE1/Ref-1-Fc1은 NheI 부위를 포함한 서열번호 9의 정방향 프라이머와 말단에 XhoI 부위를 포함하고 있는 서열번호 10의 역방향 프라이머를 사용하여 His-6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 유전자를 증폭 분리하였다. 증폭된 His-6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 유전자는 pET28a 백터에 재조합하여 pET28a/His-6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 백터를 제조하였다.

[0082] 서열번호 9 : 5'-CTAGCATGGACTACAAAGACC-3'

[0083] 서열번호 10 : 5'-GTCTCCGGGTAAATGACTCG-3'

[0084] 모든 재조합 DNA는 시퀀싱하여 서열을 확인하였다.

[0086] [실시예 2] 대식세포에서 대장균에서 생산된 APE1/Ref-1-Fc에 의한 항염증 기능 측정

[0087] 마우스의 대식세포인 RAW264.7세포에 LPS(lipopolysaccharide)를 첨가하여 유도된 염증에 대해 유리형 산화환원 조절단백-1 융합 단백질이 미치는 영향을 측정하였다.

[0088] 1×10^5 /mL의 개수로 희석된 RAW264.7세포(ATCC, USA)를 2mL씩 6 웰(well)에 분주하고, 18 시간 동안 37℃ 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후, 실시예 1-2의 백터를 대장균에 형질전환하여 생산한 융합 단백질을 처리한 후, 37℃에서 추가로 1시간 배양하였다. 융합 단백질을 처리 1시간 후 300 ng/mL 농도의 LPS를 처리한 후, 12 시간 배양하였다. 대조를 위하여 LPS를 처리하지 않거나, 융합 단백질을 처리하지 않은 실험군에 대해서도 동일

한 실험을 진행하였다.

[0089] 세포 내 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하기 위해 LPS를 처리한 세포는 RIPA 버퍼를 이용하여 용해시켰으며, 브래드포드 단백질 정량법을 이용하여 세포 내 단백질을 정량한 후 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하였다.

[0091] 상기 결과를 도 4에 도시하였다. 이로부터, 대장균에서 발현된 산화환원조절단백-1 융합 단백질을 처리한 면역세포군의 경우, 1 ug/mL 처리군에서부터 염증성 인자 iNOS 및 COX-2의 발현량이 감소하였으며, 잘 알려진 항염증 관련 치료제 텍사메타손(Dexa)과 비슷한 수준으로 감소하여 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

[0093] **[실시예 3] CHO-S 세포주에서 생산된 APE1/Ref-1-Fc의 검출**

[0094] CHO-S 세포주(Invitrogen, USA)는 90%(v/v) FreeStyle™ CHO 발현 배지(Invitrogen, USA) 및 10%(v/v) DMSO(Sigma-Aldrich, USA)가 함유된 배지에 1×10^7 cells가 함유된 바이얼로부터 CHO-S 1 mL를 접종하여 배양하였다.

[0095] 상기 실시예 1-1에서 제조한 벡터를 배양중인 CHO-S에 형질전환시켜 산화환원단백-1 융합 단백질을 수득하였다. 5일 경과 후, 세포의 배양물로부터 상층액을 수득하여 융합 단백질을 정량화하였다.

[0097] 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0098] 이로부터, 본 발명에 따른 산화환원단백-1 융합 단백질을 동물세포에서 발현시킨 결과, 5×10^5 개의 세포 당 최대 50 ng 이상 60 ng 이하의 단백질이 유리된 것을 확인하였으며, 이는 대조 실험군 및 종래 아데노바이러스 벡터를 이용한 경우 대비 현저히 향상된 것을 확인하였다.

[0100] **[실시예 4] 대식세포에서 CHO-S 세포주에서 생산된 APE1/Ref-1-Fc에 의한 항염증 기능 측정**

[0101] 2×10^5 /mL의 개수로 희석된 RAW264.7세포(ATCC, USA)를 2mL씩 6 웰(well)에 분주하고, 18 시간 동안 37℃ 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후, 실시예 1-1의 벡터를 CHO-S 세포주에 형질전환하여 생산한 융합 단백질을 처리한 후, 37℃에서 추가로 1시간 배양하였다. 융합 단백질 처리 1시간 후 300 ng/mL 농도의 LPS를 처리한 후, 12시간 배양하였다. 대조를 위하여 LPS를 처리하지 않거나, 융합 단백질을 처리하지 않은 실험군에 대해서도 동일한 실험을 진행하였다.

[0102] 세포 내 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하기 위해 LPS를 처리한 세포는 RIPA 버퍼를 이용하여 용해시켰으며, 브래드포드 단백질 정량법을 이용하여 세포 내 단백질을 정량한 후 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하였다.

[0104] 상기 결과를 도 6에 도시하였다. 이로부터, CHO-S에서 발현된 산화환원조절단백-1 융합 단백질을 처리한 면역세포군의 경우, 미처리 대조군에 비해 iNOS 발현량은 50% 이상 최대 75%만큼 감소하였으며, Cox-2 발현량은 40% 이상 최대 60%만큼 감소하는 우수한 항염증 효과가 있음을 확인하였으며, 잘 알려진 항염증 관련 치료제 텍사메타손(Dexa) 대비 iNOS 발현량이 50% 이상 감소하는 우수한 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0106] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면3

His6 Thrombin site 3XFLAG → APE1/Ref-1

HHHHHHSSGLVPRGSHMASMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLMPKRGKKGAVAEDGDELRTPEAKKSKTA

AKKNDKEAAGEGPALYEDPPDQKTSPSGKPATLKICSWNVVDGLRAWIKKKGLDWVKEEAPDILCLQETKCSNK

LPAELQELPGLSHQYWSAPSDKEGYSVGVLSSRQCPLKVSYGIGDEEHDQEGRVIVAEFDSFVLVTAYVPNAGR

GLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHEEIDLRNPKGNKKKNAGFTPQERQGFGELOAVPLAD

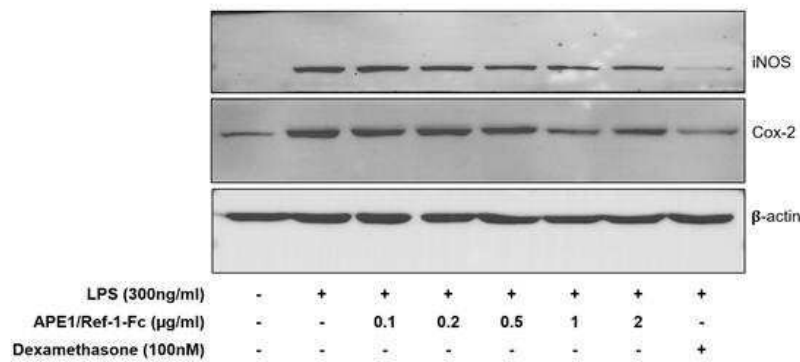
SFRHLYPNTPYAYTFWTYMMNARSKNVGWRLDYFLLSHSLLPALCDSKIRSKALGSDHCPITLYLALGSDKTHTC

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

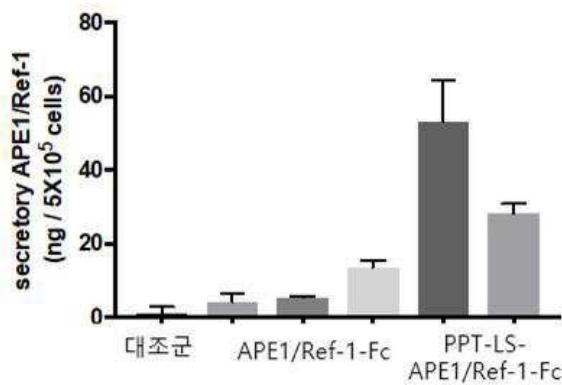
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS

DIAEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHHEALKFHYTQKSLSLSPGK*

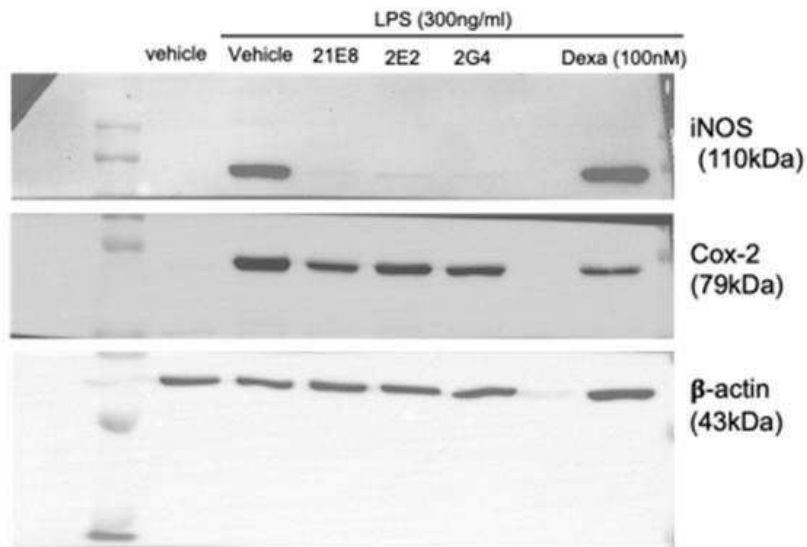
도면4



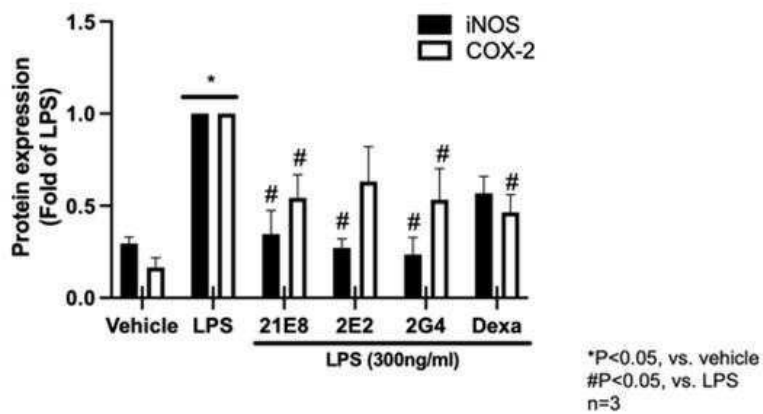
도면5



도면6a



도면6b



서열 목록

- <110> Mediredox Co.
- <120> Secretory APE1/Ref-1 fusion protein, non-viral vector comprising nucleic acid sequence encoding thereof and pharmaceutical composition containing the same
- <130> 21P211604
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 586
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc Fusion Protein

<400> 1

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp
1 5 10 15

Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys
20 25 30

Asp Asp Asp Asp Lys Leu Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val
35 40 45

Ala Glu Asp Gly Asp Glu Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser
50 55 60

Lys Thr Ala Ala Lys Lys Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Glu Asp Pro Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys

85 90 95

Pro Ala Thr Leu Lys Ile Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala
100 105 110

Trp Ile Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp
115 120 125

Ile Leu Cys Leu Gln Glu Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala
130 135 140

Glu Leu Gln Glu Leu Pro Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro
145 150 155 160

Ser Asp Lys Glu Gly Tyr Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys
165 170 175

Pro Leu Lys Val Ser Tyr Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu
180 185 190

Gly Arg Val Ile Val Ala Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala
195 200 205

Tyr Val Pro Asn Ala Gly Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln
210 215 220

Arg Trp Asp Glu Ala Phe Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg

225 230 235 240
 Lys Pro Leu Val Leu Cys Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile
 245 250 255
 Asp Leu Arg Asn Pro Lys Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro
 260 265 270
 Gln Glu Arg Gln Gly Phe Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala
 275 280 285
 Asp Ser Phe Arg His Leu Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe
 290 295 300

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

 370 375 380
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 385 390 395 400
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 405 410 415
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 420 425 430
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 435 440 445

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 450 455 460
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 465 470 475 480
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

485 490 495
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

515 520 525
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Lys Phe His Tyr Thr Gln
 565 570 575
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***
 580 585

<210> 2

<211> 7159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pcDNA3.1/PPT-LS-3XFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 vector

<400> 2

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggetgacg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattcatg	960
tctgcacttc tgatcctagc tcttggttga gctgcagttg ctgactaaa agacatgac	1020
ggtgattata aagatcatga catcgattac aaggatgacg atgacaagct tatgccgaag	1080
cgtgggaaaa agggagcggg ggcggaagac ggggatgagc tcaggacaga gccagaggcc	1140
aagaagagta agacggccgc aaagaaaaat gacaaagagg cagcaggaga gggcccagcc	1200
ctgtatgagg acccccaga tcagaaaacc tcaccagtg gcaaacctgc cacactcaag	1260
atctgctctt ggaatgtgga tgggcttcga gcctggatta agaagaaagg attagattgg	1320
gtaaaggaag aagccccaga tatactgtgc ctcaagaga ccaaatgttc agagaacaaa	1380
ctaccagctg aacttcagga gctgcctgga ctctctcctc aatactggtc agctccttcg	1440
gacaaggaag ggtacagtg cgtgggcctg ctttcccgcc agtgcccact caaagtttct	1500
tacggcatag gcgatgagga gcatgatcag gaaggccggg tgattgtggc tgaatttgac	1560
tcgtttgtgc tggtaacagc atatgtacct aatgcaggcc gaggtctggt acgactggag	1620
taccggcagc gctgggatga agcctttcgc aagtctctga agggcctggc ttcccgaaag	1680
ccccttgctg tgtgtggaga cctcaatgtg gcacatgaag aaattgacct tcgcaacccc	1740
aagggaaca aaaagaatgc tggcttcacg ccacaagagc gccaaaggctt cggggaatta	1800
ctgcagctg tgccactggc tgacagcttt aggcacctct accccaacac accctatgcc	1860
tacacctttt ggacttatat gatgaatgct cgatccaaga atgttggttg ggccttgat	1920
tactttttgt tgtcccactc tctgttacct gcattgtgtg acagcaagat ccgttccaag	1980
gccctcgga gtgateactg tcctatcacc ctatacctag cactgggacg tgacaaaact	2040
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctcttc	2100
ccccaaaa ccaaggacac cctctacatc acccggaac ctgaggtcac atgcgtggtg	2160
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	2220
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc	2280
agcgtcctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc	2340
tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag aaaacctct ccaaagccaa agggcagccc	2400
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc	2460
agcctgacct gcctggtcaa aggtctctat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	2520
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc	2580

ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	2640
tcattgtctc tgatgatga ggctctgaag ttccactaca cgcagaagag cctctccctg	2700
tctccgggta aatgactcga gtctagaggg cccgtttaaa cccgtgatc agcctcgact	2760
gtgccttcta gtigccagcc atctgttgtt tgccccccc ccgtgccttc ctigaccctg	2820
gaaggtgcc accccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg	2880
agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg	2940
gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga	3000
accagctggg gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg	3060
ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgt acacttgcca gcgccctagc gcccgtcct	3120
ttcgctttct tcccttctt tctgccacg ttcccggtt tccccgtca agctctaaat	3180
cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt	3240
gattagggtg atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg	3300
acgttggagt ccacgttctt taatagtga ctctgttcc aaactggaac aacactcaac	3360
cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta	3420
aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaattaat tctgtggaat gtgtgtcagt	3480
tagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca	3540
attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgaaa	3600
gcatgcatct caattagta gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atccccccc	3660
taactccgcc cagtccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg	3720
cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg	3780
gaggcctagg cttttgaaa aagctcccgg gagcttgtat atccattttc ggatctgac	3840
aagagacagg atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc	3900
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggtgct	3960
ctgatgccg cgtgttccgg ctgtcagcg aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg	4020
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggtatcg tggctggcca	4080
cgacgggcgt tccttgca gctgtgctcg acgtgtcac tgaagcgga agggactggc	4140
tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tctgtcatc tcacctgtct cctgccgaga	4200
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc	4260
cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg agcgagcac tactcgatg gaagccggtc	4320
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg	4380
ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcatgcct	4440

gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc	4500
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc	4560
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tcttttacgg tatcgccgct cccgattcgc	4620
agcgcatcgc ctctatcgc ctctctgacg agttctctcg agcgggactc tggggttcga	4680
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt	4740
ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tcctccagcg	4800
cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag cttataatgg	4860
ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc	4920
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtcgtatac cgtcgacctc	4980
tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct	5040
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg	5100
agttagctaa ctacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct	5160
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg	5220
gcgctcttc gcttctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	5280
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	5340
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	5400
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	5460
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	5520
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc	5580
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt	5640
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttate	5700
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	5760
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg	5820
gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc	5880
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	5940
cggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	6000
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt	6060
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaatataa aatgaagttt	6120
ttaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag	6180

tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagtgcct gactccccgt 6240
 cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc 6300
 gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 6360
 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 6420
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 6480
 aggcatcgtg gtgtcacgct cgctgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 6540
 atcaaggcga gtiacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 6600

tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 6660
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 6720
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 6780
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 6840
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6900
 tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6960
 aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 7020

catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 7080
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 7140
 aaaagtgcc cctgacgtc 7159

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHO-S F primer 1

<400> 3

gaattcatgg actacaaaga cca 23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CHO-S R primer 1

<400> 4

cagatcttcg cagtgctagg 20

<210> 5

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHO-S F primer 2
 <400> 5
 ggaattcatg tctgcacttc tgatc 25
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHO-S R primer 2
 <400> 6
 ctcgagtcac ttacccggag acag 24
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E. coli F primer 1
 <400> 7
 gaattcatgg actacaaaga cc 22
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E. coli R primer 1
 <400> 8
 cagatcttcg cagtgctagg 20
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E. coli F primer 2
 <400>

ctagcatgga ctacaaagac c 21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E. coli R primer 2

<400> 10

gtctccgggt aaatgactcg 20

<210> 11

<211> 591

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-6-3xFLAG-APE1/Ref-1-Fc Fusion Protein

<400> 11

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His

1 5 10 15

Met Ala Ser Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His

20 25 30

Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Met Pro Lys Arg Gly

35 40 45

Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu Leu Arg Thr Glu Pro

50 55 60

Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ala Lys Lys Asn Asp Lys Glu Ala

65 70 75 80

Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro Pro Asp Gln Lys Thr

85 90 95

Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala Thr Leu Lys Ile Cys Ser Trp Asn Val

100 105 110

Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys

115 120 125

Glu Glu Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu Gln Glu Thr Lys Cys Ser Glu

130 135 140

Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu Gln Glu Leu Pro Gly Leu Ser His Gln

145 150 155 160
 Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp Lys Glu Gly Tyr Ser Gly Val Gly Leu
 165 170 175
 Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu Lys Val Ser Tyr Gly Ile Gly Asp Glu
 180 185 190
 Glu His Asp Gln Glu Gly Arg Val Ile Val Ala Glu Phe Asp Ser Phe
 195 200 205
 Val Leu Val Thr Ala Tyr Val Pro Asn Ala Gly Arg Gly Leu Val Arg
 210 215 220
 Leu Glu Tyr Arg Gln Arg Trp Asp Glu Ala Phe Arg Lys Phe Leu Lys

 225 230 235 240
 Gly Leu Ala Ser Arg Lys Pro Leu Val Leu Cys Gly Asp Leu Asn Val
 245 250 255
 Ala His Glu Glu Ile Asp Leu Arg Asn Pro Lys Gly Asn Lys Lys Asn
 260 265 270
 Ala Gly Phe Thr Pro Gln Glu Arg Gln Gly Phe Gly Glu Leu Leu Gln
 275 280 285
 Ala Val Pro Leu Ala Asp Ser Phe Arg His Leu Tyr Pro Asn Thr Pro
 290 295 300

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

 370 375 380
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro
 385 390 395 400

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

405 410 415

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

420 425 430

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

435 440 445

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

450 455 460

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

465 470 475 480

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

485 490 495

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

500 505 510

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

515 520 525

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

530 535 540

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

545 550 555 560

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Lys

565 570 575

Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***

580 585 590

<210> 12

<211> 7018

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a/His6-3XFLAG-APE1/Ref-1-Fc1 vector

<400> 12

tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcgcgct cctttcgctt tcttccttc 120

ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggtctattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgtcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat	600
tcatacagg attatcaata ccataTTTTT gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa	660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc	720
gtccaacatc aatacaacct attaatTTTc cctcgtcaaa aataaggTTa tcaagtgaga	780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc	840
agacttgTtc aacaggccag ccattacgtc cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac	900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac	960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat	1020
tttacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag	1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggTc ggaagaggca	1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgtac	1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg	1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca	1320
tgttggaatt taatcgcgcc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac	1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa	1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga	1500
gatacttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg	1560
gtggtttgtt tgccgatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc	1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gttagccgt agttaggcca ccaattcaag	1680
aactctgtag caccgctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc	1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg	1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac	1860
accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga	1920

aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt	1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag	2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg	2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ctttttgcct acatgttctt tcttgcgtta	2160
tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc	2220
agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg	2280
tattttctcc ttacgcctc gtgcgggtatt tcacaccgca tataatggtgc actctcagta	2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg	2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggttgtct	2460
gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag	2520
gttttcaccg tcatcacga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc	2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag	2640
aagcgtaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt	2700
ggtcactgat gcctcgtgt aagggggatt tctgttcatt ggggtaatga taccgatgaa	2760
acgagagagg atgtcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccgggt tactggaacg	2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggatatgat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcagg	2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc	2940
tgcatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta	3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca	3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc	3120
ccgccagcct agccgggttc tcaacgacag gacacgac atgcgcaccc gtggggccgc	3180
catgccggcg ataattgcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa	3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc	3300
gctccagcga aagcgttctt gcgcgaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac	3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcccc	3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcac ggtcgagatc ccggtgccta	3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa	3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca	3660

ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa	3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt	3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccggga ctcggtaatg gcgcgcattg	3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca	3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta	3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg	4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgaccaat gcgaccagat	4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaat aatactgttg atgggtgtct	4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg	4200
catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagccact gacgcgttgc gcgagaagat	4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc	4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgac aatttgacg ggcgcgtgca	4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacactg tttgccgcc agttgttgtg	4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt	4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca gcggggaac ggtctgataa gagacaccgg	4560
catactctgc gacatcgat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct	4620
cttcgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga	4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggtgagg	4740
ccgttgagca ccgccccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc	4800
ccggccacgg ggctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg	4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg	4920
gcgccgtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgca	4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa	5040
ttttgtttaa cttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac	5100
agcagcggcc tggtgccg cggcagccat atggctagca tggactaaa agaccatgac	5160
ggtgattata aagatcatga catcgattac aaggatgacg atgacaagct tatgccgaag	5220
cgtgggaaaa agggagcgtt ggccgaagac ggggatgagc tcaggacaga gccagaggcc	5280
aagaagagta agacggccgc aaagaaaaat gacaaagagg cagcaggaga gggcccagcc	5340
ctgtatgagg accccccaga tcagaaaacc tcaccagtg gcaaacctgc cactcaag	5400
atctgtcttt ggaatgtgga tgggttcga gcctggatta agaagaaagg attagattgg	5460
glaaaggaag aagccccaga tatactgtgc cttaagaga ccaaatgttc agagaacaaa	5520

ctaccagctg aacttcagga gctgcctgga ctctctcatc aatactggtc agctccttcg	5580
gacaaggaag ggtacagtgg cgtgggcctg ctttcccgcc agtgcccact caaagtttct	5640
tacggcatag gcgatgagga gcatgatcag gaaggccggg tgattgtggc tgaatttgac	5700
tcgtttgtgc tggtaacage atatgtacct aatgcaggcc gaggtctggt acgactggag	5760
taccggcagc gctgggatga agcctttcgc aagttcctga agggcctggc ttcccgaag	5820
ccccttgtgc tgttggaga cctcaatgtg gcacatgaag aaattgacct tcgcaacccc	5880
aagggaaca aaaagaatgc tggcttcacg ccacaagagc gccaaggctt cggggaatta	5940
ctgcaggtg tgccactggc tgacagcttt aggcacctct accccaacac accctatgcc	6000
tacacctttt ggacttatat gatgaatgct cgatccaaga atgttggttg gcgccttgat	6060
tactttttgt tgtccactc tctgttacct gcattgtgtg acagcaagat ccgttccaag	6120
gccctcggca gtgatcactg tctatcacc ctatacctag cactgggatc tgacaaaact	6180
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctcttggggg gaccgtcagt ctctctctc	6240
ccccaaaaac ccaaggacac cctctacatc acccgggaac ctgaggtcac atgcgtggtg	6300
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	6360
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc	6420
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	6480
tccaacaaag cctcccage ccccatcgag aaaacatct ccaaagccaa agggcagccc	6540
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc	6600
agcctgacct gcctggtaaa aggtttctat ccacgcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	6660
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	6720
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	6780
tcatgctccg tgatgatga ggctctgaag ttccactaca cgcagaagag cctctccctg	6840
tctccgggta aatgactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa	6900
gcccgaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgtgagc aataactagc ataaccctt	6960
ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggat	7018