



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0119562

(43) 공개일자

2012년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/42 (2006.01) A61K 9/38 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0037574

(22) 출원일자

2011년04월22일

심사청구일자

2011년04월22일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)

김대원

강원도 춘천시 칠전서길 15-2, 203동 701호 (칠전동, 대우아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

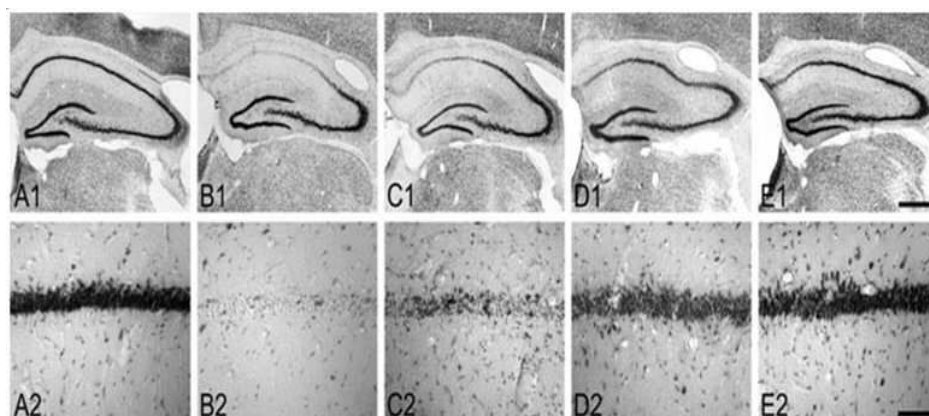
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 수송 도메인과 공유결합된 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민을 포함하는 뇌 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

단백질 수송 도메인은 생체 세포 내로 단백질을 비롯한 외래 고분자를 수송할 수 있다고 보고되었다. 본 발명자들은 항우울제인 이미프라민을 가하여 단백질 수송 도메인과 결합한 융합 단백질을 정상세포 등 신경세포 내로 더 효율적으로 운반시킬 수 있는지를 시험하였고, 그 결과 카탈레이즈 융합 단백질은 이미프라민을 가하였을 때 시간- 및 농도-의존적으로 정상세포 내로 도입되었으며, 과산화수소에 의해 유도된 세포 독성을 감소시켰다. 뿐만 아니라 카탈레이즈 융합 단백질과 이미프라민을 함께 가한 그룹에서는 세포 침투율이 증가하였고, 그 결과 카탈레이즈 융합 단백질을 단독으로 가한 그룹과 비교할 때 세포 생존율이 높아졌다. 저밀 허혈 모델에서 카탈레이즈 융합 단백질을 해마의 CA1 부위에서 현저한 신경보호효과를 나타내었으며, 카탈레이즈 융합 단백질과 이미프라민을 함께 처리하면 카탈레이즈 융합 단백질 단독 처리의 경우보다 CA1 부위의 신경세포 사멸과 지방 과산화가 현저히 감소하였다. 따라서, 이러한 결과는 이미프라민이 융합 단백질의 세포 도입을 증대시킴을 의미한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박진서

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

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)

황현숙

경기도 파주시 교하읍 현대2차아이파크 210동 1404호

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 그린빌 301호 (다가동)

임순성

강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)

조성우

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌아파트 257동 704호 (방이동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육과학기술부

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고분자 신소재물질 탐색 및 개발

주관기관 한림대학교

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 교육과학기술부

연구사업명 지역거점 연구단 육성사업

연구과제명 생체고분자 전달기술을 이용한 질환 치료용 신소재 개발

주관기관 한림대학교

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

신경세포 또는 뇌세포에 단백질 수송 도메인과 치료용 단백질이 공유결합된 융합 단백질과 이미프라민을 가하여 융합 단백질의 도입을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이미프라민은 융합 단백질보다 먼저 신경세포 또는 뇌세포에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 치료용 단백질은 활성산소종 제거 효소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 치료용 단백질은 카탈레이즈, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 및 글루타치온 퍼옥시데이즈 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

단백질 수송 도메인과 공유결합된 활성산소종 제거 활성을 가진 효소의 융합 단백질 및 이미프라민을 포함하는 신경질환 또는 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 활성산소종 제거 활성을 가진 효소는 카탈레이즈, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 및 글루타치온 퍼옥시데이즈 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 뇌질환은 뇌졸중, 뇌종양, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 간질 또는 허혈성 뇌질환임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 신경질환은 말초신경손상, 중추신경손상, 신경병증 또는 신경병증성 통증을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

단백질 수송 도메인과 공유결합된 활성산소종 제거 활성을 가진 효소의 융합 단백질 및 이미프라민을 포함하는 신경질환 또는 뇌질환의 예방 및 개선용 건강 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 단백질 수송 도메인과 치료용 단백질이 공유결합한 융합 단백질에 이미프라민을 가하여 융합 단백질의 신경 세포 또는 뇌세포 내 도입을 증가시키는 방법 및 단백질 수송 도메인과 공유결합한 활성산소종 제거 활성을 가진 효소의 융합 단백질 및 이미프라민을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

허혈은 심근 ATP의 고갈과 미토콘드리아 내의 낮은 Ca^{2+} 및 세포질 내의 높은 Ca^{2+} 농도와 같이 이온의 불균형 때문에 발생한다. 비록 이와 같은 허혈 조건은 재관류 (reperfusion)에 의해 복원되지만, 허혈/재관류 동안 비정상적인 미토콘드리아의 기능에 의해 생성된 높은 농도의 활성산소종은 세포 손상, 자가사멸 (apoptosis) 및 괴사 (necrosis)를 일으킨다 (Koenitzer, J. R. and Freeman, B. A. (2010) Redox signaling in inflammation: interactions of endogenous electrophiles and mitochondria in cardiovascular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1203**, 45-52). 그러나, 슈퍼옥사이드 디스무테아제 (SOD), 카탈레이즈 (CAT) 및 글루타치온 퍼옥시데이즈와 같은 다양한 항산화 효소들은 활성산소종 농도를 낮추고 세포 내의 산화 환원 균형을 유지시키고 세포 방어 메커니즘으로서 기능한다 (Bickers, D. R. and Athar, M. (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2565-2575, Mates, J. M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.* **83**, 83-104, Muzykantov, V. R. (2001) Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J. Control Release* **71**, 1-21). 그러므로, 항산화 효소들은 동물 모델을 이용한 여러 연구에서 증명된바와 같이 염증 및 허혈의 치료제로서 작용할 수 있다고 제안된바 있다 (Kim, D. W. et al., (2009) Transduced human PEP-1-catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 941-952, Eum, W. S. et al., (2004) HIV-1 Tat-mediated protein transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase into pancreatic beta cells in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 339-349, Ahn, E. H. et al., (2010) Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Toxicol.* **276**, 192-197). 펩타이드, 단백질 및 siRNA를 비롯한 여러 후보들이 인비트로에서 뛰어난 효과를 나타내었지만, 친수성과 분자 크기 때문에 이러한 분자들을 살아 있는 세포 또는

조직 내로 전달하기가 어려웠고, 치료 활성을 나타내는 데에는 실패했다 (Egleton, R. D. and Davis, T. P. (1997) Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* **18**, 1431-1439, Behlke, M. A. (2008) Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* **18**, 305-320). 그리하여 많은 연구 팀들은 이와 같은 문제를 해결하는 방법으로서 외래 분자를 세포 및 조직 내로 전달하는 능력이 있는 단백질 수송 도메인을 이용하는 방법에 대해 연구를 계속해 오고 있다 (Dietz, G. P. (2010) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 167-174, Matsui, H., Tomizawa, K., Lu, Y. F. and Matsushita, M. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 151-157, Prochiantz, J. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 400-406, Schwarze, S. R. et al., (1999) *Science* **285**, 1569-1572, Schwarze, S. R. et al., (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 290-295, Wadia, j. S. and Dowdy, S. F. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 52-56, Wadia, J.S. and Dowdy, S. F. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 97-104).

[0003] 본 발명자들이 속한 연구팀은 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈, 카탈레이즈 및 리보솜 단백질 S3 (rPS3)를 Tat이나 PEP-1과 같은 단백질 수송 도메인과 융합하여 이들이 세포 및 동물 조직 내로 원활히 침투하여 항산화 활성을 발휘함을 보고한바 있다 (Kim, D. W. et al., (2009) *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 941-952, Eum, W. S. et al., (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 339-349, Ahn, E. H. et al., (2010) *Toxicol.* **276**, 192-197). 또한, 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 결합한 융합 단백질의 세포도입 효율을 향상시키고 치료 효과를 증진시킬 수 있는 몇 개의 분자들에 대해 연구한바 있다.

[0004] 이미프라민 {3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine}은 노르에피네프린 및 세로토닌과 같은 신경전달물질이 뉴런으로 재흡수되는 것을 저해함으로써 항우울제로 작용한다는 것이 잘 알려져 있다. Peng 등은 이미프라민이 뇌 유래 신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 발현, MAPK/ERK 경로 및 Bcl-2 캐스케이드 (cascade)를 상향 조절하여 신경 보호 활성을 나타낸다는 증거를 제시하였다 (Peng, C. H. et al., (2008) *Eur. Neuropsychopharmacol.* **18**, 128-140). 후구절제 (bulbectomy)는 잘 확립된 동물 우울 모델이며 해마의 아과립상 지역 (subgranular zone) 및 아뇌실 지역 (subventricular zone; SVZ)에서 세포 증식을 감소시키지만, 이미프라민의 아만성 투여 (subchronic administration)는 이들 부위에서 신경생성을 회복시킬 수도 있다는 것이 최근 보고된 바 있다 (Keilhoff, G. et al., (2006) *Cell proliferation is influenced by bulbectomy and normalized by imipramine treatment in a region-specific manner. Neuropsychopharmacology* **31**, 1165-1176). 또한, 이미프라민의 만성 투여는 래트에서 일과성 전반적 대뇌 허혈 발생 14일 후 치아 이랑 (dentate gyrus)의 아과립상 지역에서 세포 증식을 강화시키고 해마의 CA1에서 신경생성을 감소시킨다고 제안된바 있다 (Schiavon, A. P. et al., (2010) *Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. Neurosci. Lett.* **470**, 43-48). 뿐만 아니라, 이미프라민은 카라기난에 의해 유도된 발 부종 모델 (paw edema model)에서 염증을 현저히 억제하는 것으로 보고되었다 (Abdel-Salam, I. M. et al., (2003) *Pharmacol. Res.* **48**, 157-165). 이미프라민은 cAMP-의존적 경로에 영향을 줌으로써 인터페론 γ 에 의해 유도되는 신경교세포 (microglia cells)에 의한 IL-6와 산화질소 생성을 저해한다고 증명되었다 (Hashioka, S. et al., *Exp. Neurol.* **206**, 33-42). 이미프라민은 유도성 산화질소 합성효소 및 인터류킨-1, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고 I κ B 분해, NF- κ B의 p65 서브유닛의 핵으로의 이동 및 지다당에 의해 자극 받은 신경교세포 내에서 p38 미토겐에 의해 활성화된 단백질 카이네이즈의 인산화를 저해하였다 (Hwang, J. et al., (2008) *Neuropharmacology* **55**, 826-834).

[0005] 특허 제472938호는 세포 침투 효율을 향상시킨 수송 도메인-목표 단백질-수송 도메인 융합 단백질 및 그 용도에 관한 것으로서, HIV-1 Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌과 같은 단백질 수송 도메인이 목표 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 공유결합되어 세포 침투성을 향상시킨 융합 단백질에 대해 개시하고 있다.

[0006] 또한, 특허 제490362호는 단백질 수송 도메인으로서 올리고라이신이 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 공유결합되어 세포 침투성을 향상시킨 기술에 대해 개시하고 있다.

[0007] 상기 특허들을 비롯하여 많은 연구자들의 논문을 통해 HIV-a Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 및 PEP-1 펩타이드 등이 단백질의 세포 침투성을 향상시킨다는 사실이 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 활성산소종 제거 활성을 나타내며, 염증 치료용으로 사용될 수 있는 단백질에 단백질 수송 도메인을 결합한 융합 단백질을 신경 세포 또는 뇌세포 내로 좀더 원활하게 침투시킬 수 있는 방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 종래 염증 치료에 이용 가능한 것으로 알려진 활성산소종 제거 활성을 나타내는 효소의 융합 단백질에 이미프라민을 가함으로써 좀더 효과적인 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 이미프라민이 있을 때와 없을 때 PEP-1-카탈레이즈의 세포도입 효율과 허혈 손상에 대한 PEP-1-카탈레이즈의 신경보호 활성에 대해 연구하였고, 이미프라민이 PEP-1-카탈레이즈 세포 도입 개선능이 있는지를 시험하였다. 그리하여 본 발명자들은 이미프라민이 항우울제나 신경보호제로서의 기능 외에 단백질 수송 증강제로서의 기능을 나타냄을 제시하였다.
- [0011] 본 발명은 단백질 수송 도메인과 치료용 단백질이 공유결합된 융합 단백질에 이미프라민을 가하여 융합 단백질의 신경세포, 신경조직, 뇌세포 또는 뇌조직 내 도입을 증가시키는 방법을 제공한다. 치료용 단백질은 생체의 질병이나 이상 상태를 개선하거나 치료하는 기능을 하는 단백질을 포괄적으로 칭하는 것으로서, 그 범위에 특별한 제한은 없으며, 다양한 효소 등을 포함하는 개념이다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 이미프라민을 융합 단백질보다 먼저 신경세포 또는 신경조직에 처리하는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 Tat 또는 PEP-1임을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 치료용 단백질이 활성산소종 제거 효소임을 특징으로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 치료용 단백질이 카탈레이즈, 수퍼옥사이드 디스무테이스 및 글루타치온 퍼옥시데이스 중 선택된 1종임을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 공유결합된 활성산소종 제거 활성을 가진 효소의 융합 단백질 및 이미프라민을 포함하는 신경질환 또는 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 활성산소종 제거 활성을 가진 효소가 카탈레이즈, 수퍼옥사이드 디스무테이스 및 글루타치온 퍼옥시데이스 중 선택된 1종임을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 Tat 또는 PEP-1임을 특징으로 한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 뇌질환이 뇌졸중, 뇌종양, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 간질 또는 허혈성 뇌질환임을 특징으로 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 신경질환이 말초신경손상, 중추신경손상, 신경병증 또는 신경병증성 통증을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0022] "융합 단백질"이란 단백질 수송 도메인과 화물 분자를 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 카탈레이즈를 비롯한 치료용 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서는 구체적인 일 실시예로서 "PEP-1-카탈레이즈"는 융합 단백질 중 카탈레이즈의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.
- [0023] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로

이루어진 연결을 의미한다.

- [0024] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 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 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다. 본 발명에서는 특히 뇌세포 또는 신경세포를 의미한다.
- [0025] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 화물 분자(목표 단백질) 펩타이드 또는 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 PEP-1 펩타이드를 말한다.
- [0026] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자", "치료용 단백질"과 동일한 의미이다.
- [0027] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0028] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로는 15?30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인, 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에서 목표 단백질(화물 분자)은 치료용 단백질이고, 좀더 구체적으로는 활성산소종을 제거하는 효소를 말한다. 좀더 구체적으로는 카탈레이즈, 슈퍼옥사이드 디스무테이즈, 글루타치온 퍼옥시데이즈 중 선택된 1종을 말한다. 상기 단백질 수송 도메인 및 목표 단백질은 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. 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. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합 단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일?유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 치료용 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성(cell-transducing) 치료용 융합 단백질 및 이미프라민을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 뇌질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 치료용 단백질과 단백질 수송 도메인이 공유결합한 융합 단백질 및 이미프라민을 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), 활착제(예: 실리카, 텔크, 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.
- [0032] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.01 μ g-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.

- [0033] 나아가, 본 발명은 상기 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌졸중, 뇌종양, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 간질 또는 허혈성 뇌질환과 같은 뇌질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민을 유효성분으로 하는 뇌질환의 예방과 개선에 유용한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 상기 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 상기 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.2 내지 10중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 치료용 단백질의 융합 단백질 및 이미프라민을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 중요하지는 않으나 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명에서 카탈레이즈 융합 단백질은 이미프라민을 가하였을 때 시간- 및 농도-의존적으로 정상세포 내로 도입되었으며, 과산화수소에 의해 유도된 세포 독성을 감소시켰다.
- [0037] 뿐만 아니라, 본 발명에서 카탈레이즈 융합 단백질과 이미프라민을 함께 가한 그룹에서는 세포 침투율이 증가하였고, 그 결과 카탈레이즈 융합 단백질을 단독으로 가한 그룹과 비교할 때 세포 생존율이 높아졌다.
- [0038] 또한, 본 발명에서는 저밀 허혈 모델에 카탈레이즈 융합 단백질과 이미프라민을 함께 처리하면 카탈레이즈 융합 단백질 단독 처리의 경우보다 CA1 부위의 신경세포 사멸과 지방 과산화가 현저히 감소하였다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 정상세포로의 PEP-1-카탈레이즈 도입에 미치는 이미프라민의 영향을 나타낸다. (A)는 이미프라민의 화학 구조이다. (B)는 농도 의존적 PEP-1-카탈레이즈 세포 도입을 나타낸다. 세포는 이미프라민 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)을 한 시간 동안 가하거나 가하지 않은 다음 PEP-1-카탈레이즈로 처리하였다. (C)는 시간 의존적 PEP-1-카탈레이즈 세포 도입을 나타낸다. 세포는 PEP-1-카탈레이즈 (3 μM) 단독 처리 또는 PEP-1-카탈레이즈와 이미프라민(*엄밀히 말하면 PEP-1-카탈레이즈 처리 전 선처리임)을 함께 15 - 120 분간 처리하였다. PEP-1-카탈레이즈 세포 도입은 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. IM: 이미프라민 (imipramine).
- 도 2는 정상세포 생존율에 미치는 이미프라민의 영향을 나타낸다. 세포는 이미프라민 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)으로 한 시간 동안 처리한 다음 두 시간 동안 PEP-1-카탈레이즈를 넣고 배양하였다. 세포를 H_2O_2 (1.2 mM)로 12시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 MTT 어세이로 확인하였으며, 과산화수소 비처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

IM: 이미프라민 (imipramine).

도 3은 허혈 손상 후 몽골리안 저빌 뇌 해마 손상을 조직학적으로 평가하였다. 이미프라민 (i.p. 10 mg/kg)은 복강으로 투여하였다. 그 다음 허혈 손상을 일으키기 30분 전에 PEP-1-카탈레이즈 (3 mg/kg)를 복강으로 투여하였다. 허혈-재관류 이후 즉시 각 군의 해마는 크레일 바이올렛으로 염색하였다.

A: sham 처리군 (sham operated group),

B: 담체 처리군 (vehicle treated group),

C: 이미프라민 처리군 (imipramine treated group),

D: PEP-1-카탈레이즈 처리군 (PEP-1-CAT treated group),

E: PEP-1-카탈레이즈 및 이미프라민 처리군 (PEP-1-CAT and imipramine treated group).

A1-E1에서 막대는 280 μm 이고, A2-E2에서 막대는 50 μm 이다.

도 4는 이미프라민 존재 하에서 뇌 MDA (malonyl dialdehyde) 수준에 미치는 세포 도입된 PEP-1-카탈레이즈의 영향을 나타낸다. 이미프라민은 PEP-1-카탈레이즈를 복강 주사하기 30분 전 투여하였고, PEP-1-카탈레이즈 주사 30분 후 허혈이 유발되었다. 허혈 손상 직후 해마는 절단되어 MDA를 측정하였다. IM: 이미프라민 (imipramine).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 특별히, 본 발명의 실시예에서 융합 단백질의 일 실시예로 PEP-1을 단백질 수송 도메인으로 선택하고, 치료용 단백질로 카탈레이즈를 선택하여 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질에 대하여 설명하였으나, Tat, 올리고라이신, 올리고아르기닌 등 다양한 단백질 수송 도메인을 치료용 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 결합시킨 융합 단백질에 대해서도 본 발명의 명세서 및 도면에 제시된 결과와 유사한 세포침투 증대, 세포사멸 저해 등의 결과를 거둘 수 있었으며, 본 발명의 범위가 실시예의 기재 범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 또한, 치료용 단백질의 예시로서 실시예에서는 카탈레이즈와 수퍼옥사이드 디스뮤테이스를 선택하였으나, 생체 기능의 이상 및 질병을 개선시키는 효소를 비롯한 다양한 단백질을 치료용 단백질로 선택할 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[0041] 재료

[0042] 이미프라민 (Imipramine)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항히스티딘 항체와 퍼옥시테이즈가 결합된 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 기타 약품은 특별한 언급이 없는 경우 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 최고급 분석용으로 구입하였다.

[0043] 발현백터의 제조 및 형질전환

[0044] PEP-1에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 Nde I-Xho I 제한효소로 자른 pET15b에 연결(ligation)하여 삽입하였다. 이어 인간 신장(kidney) 카탈레이즈의 cDNA의 서열을 기본으로 하여 2종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다.

[0045] 정방향 프라이머는 5'-ctcgagatggctgacagccgggattcccgcc-3'로 Xho I 제한부위를 지니고 있으며 역방향 프라이머의 서열은 5'-ggatcctcacagatttgccrrctcccttgcc-3'로 BamH I 제한부위를 가지고 있다.

[0046] 중합효소 연쇄반응(PCR)은 thermal cycler(Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였으며 반응 혼합액을 50 μl 실리콘 튜브 (siliconized reaction tube)에 넣고 94°C에서 5분간 가열하였다. PCR 반응은 94°C에서 40초간 30회 연장 (extension), 61°C에서 40초간 변성 (denaturation), 72°C에서 10분, 37°C에서 1분간 최종 연장을 유도하였다. 그리고 아가로스 젤 전기이동 (agarose gel electrophoresis)으로 분리하여 반응물을 분리하고 이것을 pGEM-T에 연결(ligation)시켰다. 그리고 이 백터를 형질전환용 세포 (competent cell)에 형질전환 (transformation)시키고 플라스미드를 분리하여 인간 카탈레이즈 cDNA가 포함된 백터를 Xho I 과 BamH I 으로 절단한 다음 pET-15b 및 pET-15b-Tat (Arg, Lys, PEP-1)발현 백터에 삽입하였다. 백터의 발현은 T7 프로모터와 lacO-오퍼레이터의 조절 하에 있다.

- [0047] 상기 방법과 동일한 방법으로 녹색 형광 단백질의 융합 단백질 즉, PEP-1-녹색 형광 단백질 발현 벡터 (pPEP-1-GFP)를 제조하였다.
- [0048] 또한, PEP-1-수퍼옥사이드 디스뮤티이즈 융합 단백질은 위 방법을 변형하여 제조하였다.
- [0049] 또한, 단백질 수송 도메인으로 Tat을 선택하여 제조한 Tat-카탈레이즈 융합 단백질, Tat-수퍼옥사이드 디스뮤티이즈는 공개특허 제10-2002-10445호에 개시된 방법에 따라 제조하였다.
- [0050] 뿐만 아니라, 올리고라이신 또는 올리고아르기닌을 단백질 수송 도메인으로 한 융합 단백질은 특허 제490362호의 방법에 따라 또는 이 방법을 응용하여 제조하였다.

[0051] **카탈레이즈 융합단백질의 제조 및 정제**

- [0052] 융합단백질 발현벡터 (pPEP-1-CAT)가 포함되어 있는 E. coli JM109 (DE3) 세포를 앰피실린이 포함된 LB 배지에 넣고 37℃에서 250 rpm으로 교반하며 배양하였다. 이 발현벡터는 사람 카탈레이즈, 단백질 수송 도메인 (PEP-1) 그리고 아미노산 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다. 배양액 내의 박테리아 농도가 0.6-1.0이 될 때 IPTG를 최종농도가 1.0mM되게 배지에 첨가한 다음 4시간 동안 단백질을 과대발현시켰다.
- [0053] 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤 결합완충액 5ml (5mM 이미다졸, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 넣고 프렌치 프레스 (french pressure)로 세포를 용균 (lysis)시키고 재조합 단백질을 정제하였다.
- [0054] 한편, 히스티딘 결합 수지를 조심스럽게 섞어서 폴리프로필렌 컬럼에 팩킹한 후 D.D.W 3배 부피를 흘려 수지를 닦아낸다. 그리고 5배 부피의 charge buffer (50mM NiSO₄)와 3배 부피의 결합 완충액을 차례로 흘려 수지를 활성화시켰다.
- [0055] 변성시킨 재조합 단백질을 원심분리하여 상층액을 즉시 수지에 부하하고 10배 부피의 결합완충액과 6배 부피의 세척 완충액 (60mM 이미다졸, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)을 차례로 흘려주어 정제하고자 하는 단백질 외의 다른 단백질을 제거하였다. 완충액이 수지에서 완전히 빠진 후 3배 부피의 용출 완충액 (1M 이미다졸, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)로 융합단백질을 용출하였다. 그리고 융합단백질이 포함된 분획들을 모아 세파텍스 G-25 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다.

[0056] **세포 배양과 단백질 제조**

- [0057] 성상세포 (astrocytes)를 20 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 5 mM NaHCO₃, 가열로 불활성화시킨 10% 우태혈청 및 항생제 (100 µg/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린)가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 가하여 95% 공기, 5% CO₂의 습한 조건으로 37℃에서 배양하였다.

[0058] **PEP-1-카탈레이즈 세포도입 및 웨스턴 블랏 분석**

- [0059] PEP-1-카탈레이즈 세포침투의 농도 의존성을 평가하기 위하여 세포를 6-웰 플레이트에서 70%가 되도록 배양한 다음 이미프라민 (1.0 µg/ml)으로 한 시간 동안 미리 처리하였고, 이후 다양한 농도의 PEP-1-카탈레이즈 (0.5~3 µM)를 가하여 한 시간 더 배양하였다. 세포침투의 시간 의존성을 평가하기 위하여 세포에 3 µM의 PEP-1-카탈레이즈를 가하고 배양 시간 (15 ~ 120 분)을 달리 하여 배양하였다. 세포를 트립신-EDTA (Gibco)로 처리하고, PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 다음 하비스트하였다. 각 세포 용균액으로부터 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하여 나이트로셀룰로스 막에 전이시킨 다음 PBS에 녹인 5% 무지분유로 블로킹시켰다. 막은 토끼 항히스티딘 폴리클론 항체와 함께 4℃로 오버나잇 배양하고, 이어 호스래디쉬 퍼옥시데이즈와 결합된 2차 항체와 함께 배양한 후 ECL (enhanced chemiluminescence)을 수행하였다 (Amersham, Piscataway, NJ, USA).

[0060] **MTT 어세이**

- [0061] 세포를 6-웰 플레이트에 넣고 70% 성장할 때까지 배양하여 세포 생존율을 평가하였다. 세포를 먼저 이미프라민

(1.0 $\mu\text{g/ml}$)로 한 시간 동안 처리하였다. 이미프라민을 제거한 다음 세포를 다양한 농도의 PEP-1-카탈레이즈 (0.5-3 μM)로 두 시간 동안 처리하였다. 세포를 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세척한 다음 과산화수소 (1.2 mM)로 네 시간 동안 처리하였다. 세포 생존률 평가는 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide} 어세이 프로토콜에 따라 수행하였다 [D.T. Vistica et al., *Cancer Res.* 51 (1991) 2515-2520]. 세포 생존률은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0062] 실험 동물에 전뇌 허혈 (cerebral forebrain ischemia) 유도

[0063] 몽골리안 저빌 (*Meriones unguiculatus*)을 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 동물은 일정 온도 (23 $^{\circ}\text{C}$)와 60%의 상대습도로 12시간 명암 사이클로 배양하였고, 물과 사료를 자유롭게 섭취하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 실험동물 보호 원칙 (NIH Publication No. 86-23)을 따랐고, 취급 및 실험 프로토콜은 한림대학교 의과대학 동물 보호 및 이용 위원회가 입증한다.

[0064] 이미프라민 존재 여부에 따른 PEP-1-카탈레이즈의 허혈 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 저빌을 임의로 다섯 개 군 (n=7)으로 나누어 삼 처리군 (sham-operated), 담체 처리군 (vehicle treated), 이미프라민 처리군 (imipramine-treated), PEP-1-카탈레이즈 처리군 및 PEP-1-카탈레이즈와 이미프라민 처리군으로 명명하였다. 이미프라민은 PBS에 녹여 복강내 주사하였다 (10 mg/kg). 그 후 PEP-1-카탈레이즈 (3 mg/kg)를 복강으로 투여하고 총경동맥 협착 (occlusion of common carotid arteries)을 일으켰다. 총경동맥 협착을 유발하기 위하여 33% 산소 및 67% 산화질소 2.5% 아이소플루란 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) 혼합물로 수컷 몽골리안 저빌을 일반 마취하였다. 중앙 절개 (midline ventral incision)를 목에서 수행하였고, 총경동맥을 분리하고, 신경섬유를 분리하고, 비트라우마성 동맥류 클립 (nontraumatic aneurysm clips)으로 폐색을 일으켰다. 검안경으로 안구 내의 중심동맥 (central artery)을 관찰하여 혈액 흐름을 완벽하게 중단시켰음을 확인하였다. 5분 동안의 폐색 후 동맥류 클립을 제거하였다. 혈류 회복 (재관류)를 검안경으로 직접 관찰하였다. 삼 처치 동물 (n=7)에 대해서는 총경동맥을 협착시킨 것을 제외하고는 동일한 외과적 단계를 수행하였다. 수술 전, 수술 중 및 수술 후 직장의 온도를 모니터링하고 동물이 마취에서 완전히 깬 때까지 37 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 뇌허혈-재관류 (ischemia-reperfusion) 이후 즉시, 각 군의 동물들을 안락사시키고 크레실 바이올렛 염색하였다.

[0065] 조직학적 분석을 위한 조직 처리

[0066] 각 군의 모든 동물들은 펜토바비탈 소듐 (pentobarbital sodium)으로 마취시키고 PBS (pH 7.4)로 transcardially 관류하였고, 수술 후 4 내지 7일간 (n=7) 0.1M PBS (pH 7.4)에 녹인 4% 파라포름알데하이드로 처리하였다. 뇌를 제거하고 동일한 고정액으로 네 시간 동안 후고정하였다. 뇌 조직은 30% 수크로스 용액으로 오버나이트 침윤시켜 얼지 않도록 하였다. 조직은 얼린 다음 크리오스탯을 이용하여 50 μm 두께로 절편화하였고, 연속된 절편들은 PBS가 함유된 6-웰 플레이트에 수집하였다.

[0067] 크레실 바이올렛 염색

[0068] 크레실 바이올렛 염색은 종래 방법에 따라 수행하였다. 조직 절편들을 젤라틴 코팅된 현미경용 슬라이드에 올려놓았다. 크레실 바이올렛 초산 (Cresyl violet acetate; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 증류수에 1.0% (w/v) 농도가 되도록 녹이고, 빙초산을 이 용액에 가하였다. 2분간 실온에서 염색한 뒤 절편을 증류수로 두 번 세척하고 실온에서 50, 70, 80, 90, 95 및 100% 농도의 에탄올 배스에서 각 농도마다 2시간 동안 유지시켜 탈수시켰고, 마지막으로 캐나다 발삼 (Canada balsam; Kato, Japan)을 올려놓았다. 삼 처치 동물은 대조군으로 이용하였다.

[0069] 저빌 해마의 지방 과산화 측정

[0070] 지방 과산화는 Ahang et al.의 방법으로 측정하였다 (Ahang, D. L., Zhang, Y. T., Yin, J. J. and Zhao, B. L. (2004) *J. Neurochem.* 90, 211-219). 동량 (100 μl)의 뇌 상층액을 100 μl 의 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 750 μl 의 20% 초산 (pH 3.5), 750 μl 의 0.8% 티오바비투릭산 (thiobarbituric acid) 및 300 μl 의 증

류수를 함유한 반응 혼합액에 가하였다. 시료는 한 시간 동안 95 ℃로 가열한 다음 4000 g로 10분간 원심분리하였다. 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

[0071] 결과 1: 정상세포 내로 PEP-1-카탈레이즈의 세포 침투에 미치는 이미프라민의 영향

[0072] 생물학적 활성물질의 세포침투성을 향상시켜주는 단백질 수송 도메인에 관하여 활발한 연구가 수행되고 있다. 최근 10%의 DMSO (dimethyl sulfoxide)가 단백질 수송 도메인과 결합한 융합 단백질의 세포 내 침투를 용이하게 해준다는 보고가 있었다 (Wang, H. et al., (2010) *J. Con. Rel.* **143**, 64-70). 또, 본 발명자들은 복분자 안토시아닌 (bog blueberry anthocyanins; BBA)이 Tat-수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 HeLa 세포 및 마우스 피부로의 침투 효율을 증대시킨다고 보고한바 있다 (Lee, S. H. et al., (2010) *BMB Rep.* **43**, 561-566). 또한, 앞선 연구에서 본 발명자들은 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질이 정상세포 내로 시간 및 농도 의존적으로 침투하며, 허혈성 신경 손상에 대해 보호효과를 나타낸다는 것을 보고한바 있다 (Kim, D. W. et al., (2009) *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 941-952).

[0073] 항우울제인 이미프라민의 화학 구조는 도 1의 A와 같다. 도 1의 B, C와 같이, PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질은 정상세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 침투된다. 또한, PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질 처리 전 이미프라민으로 먼저 한 시간 처리한 경우 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질의 세포침투 효율은 현저히 증가한다. 이러한 결과는 이미프라민이 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질을 세포 내로 도입시키는 효율을 증대시키는 능력이 있음을 의미한다.

[0074] 결과 2: 세포 생존율에 대한 이미프라민의 영향

[0075] 본 발명자들은 대조군 세포에서 과산화수소 (1.2 mM)로 세포 독성 유발 후 세포 생존율에 대한 이미프라민의 영향을 시험하였다. 도 2와 같이, PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질 (0.5-3 μM) 처리시 세포 생존율은 농도 의존적으로 증가하였다. 이미프라민 (1 μg/ml) 한 시간 단독 처리는 세포 독성에도 보호 효과에도 아무런 영향을 미치지 않았고, 과산화수소 처리군과 유사한 정도의 세포 생존율을 나타냈다. 반면, 이미프라민을 세포에 한 시간 동안 처리한 다음 PEP-1-카탈레이즈를 처리한 경우 세포 생존율은 PEP-1-카탈레이즈 단독 처리의 경우보다 현저히 증가하였다. 따라서, 이와 같은 데이터는 세포 생존율 증가가 이미프라민에 의한 직접적인 결과라기 보다는 이미프라민이 PEP-1-카탈레이즈의 세포 침투를 증대시키기 때문인 것으로 보인다.

[0076] 결과 3: 허혈성 손상에 대한 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질의 보호 효과에 미치는 이미프라민의 영향

[0077] 몽골리안 저빌에 일과성 허혈증 (transient ischemia)을 유도하면 해마의 CA1 부위에 신경 손상이 발생한다. 각 군에서 CA1 부위의 조직학적 변화는 뇌허혈 손상 유도 직후 평가되었다. 담체 처리군에서는 심각한 허혈이 발생하였고, 삼 처리 동물과 비교하여 CA1 부위에서 특징적인 신경 손실을 나타내었다 (도 3의 A와 B). 이미프라민 처리군에서 신경 보호 효과는 담체 처리군과 비교하여 약간의 증가가 관찰되었다. PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질 (3 mg/kg)을 처리한 경우 허혈에 민감한 CA1 부위에서 분명한 보호 효과를 거두었다. 나아가, 이미프라민을 미리 처리한 다음 PEP-1-카탈레이즈 융합 단백질을 처리하면 삼 처리군에서 관찰되는 것과 같이 CA1 부위에서 좀더 분명한 신경보호효과를 나타내었다 (도 3의 C, D 및 E).

[0078] 지방 과산화와 관련이 있는 것으로 알려진 허혈 손상 정도는 각 약품을 처치하고 허혈 손상이 유도된 이후 MDA (malonyl dialdehyde)의 농도를 측정하여 평가하였다 (Zhang, D. L. et al., (2004) *J. Neurochem.* **90**, 211-219). 허혈 유도 후 담체 처리군의 MDA 수준은 삼 처리군에 비하여 현저히 증가하였다 (도 4). 이미프라민이 MDA 수준을 낮추지 못한 반면, PEP-1-카탈레이즈 처리군은 분명히 MDA 수준을 낮추었다. 나아가, PEP-1-카탈레이즈 및 이미프라민 처리군은 PEP-1-카탈레이즈 단독 처리군과 비교할 때 MDA 수준을 현저히 낮추었다. 따라서, 이러한 결과는 이미프라민이 PEP-1-카탈레이즈의 세포도입 효율을 높여주며 PEP-1-카탈레이즈의 세포 내 축적을 증가시킨다는 것을 확인해 준다.

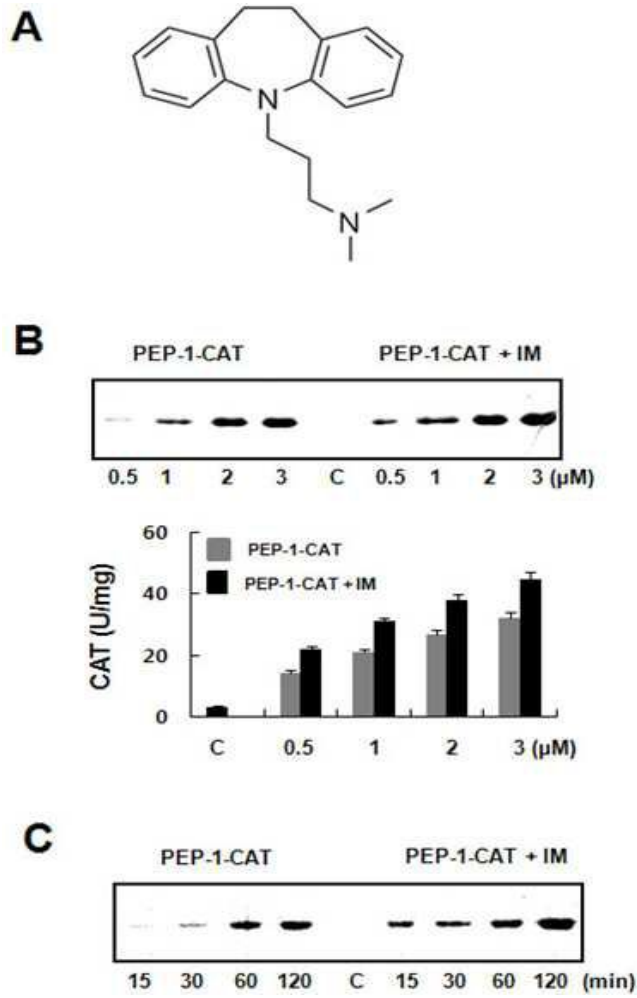
[0079] <제형예 1: 정제의 제조>

[0080] 카탈레이즈 융합 단백질 20 mg

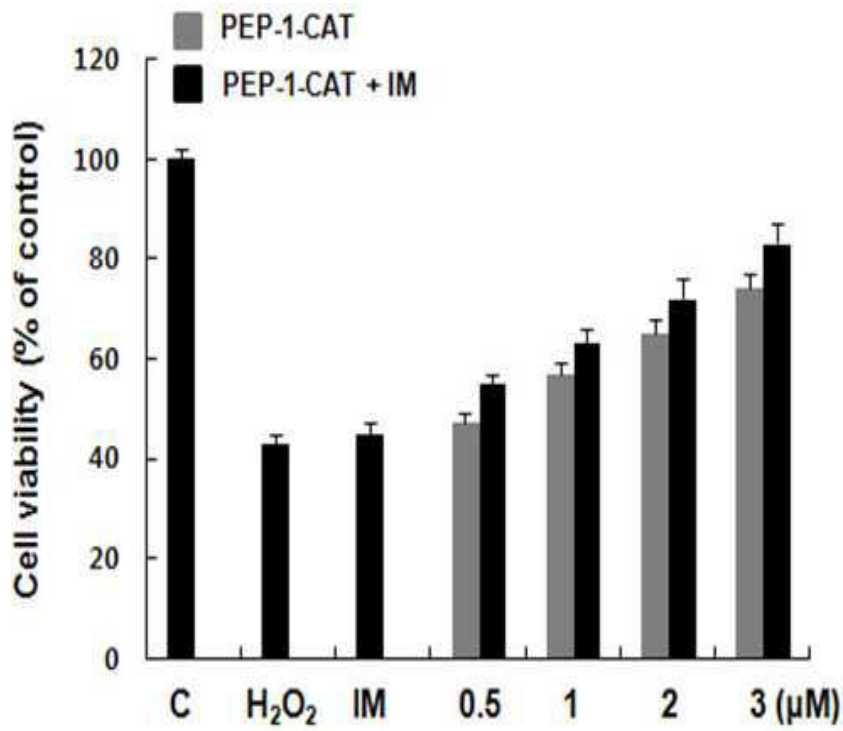
- [0081] 퍼골라이드 메실레이트 20 mg
- [0082] 옥수수전분 100 mg
- [0083] 유당 100 mg
- [0084] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0085] 상기 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0086] <제형예 2: 캡슐제의 제조>
- [0087] 카탈레이즈 융합 단백질 20 mg
- [0088] 퍼골라이드 메실레이트 20 mg
- [0089] 옥수수전분 100 mg
- [0090] 유당 100 mg
- [0091] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0092] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0093] <제형예 3: 주사제의 제조>
- [0094] 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합 단백질 0.2 mg
- [0095] 퍼골라이드 메실레이트 0.25 mg
- [0096] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0097] pH 조절제 적량
- [0098] 통상의 주사제 제조방법에 따라 1 앰플당(2mℓ) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [0099] <제형예 4: 액제의 제조>
- [0100] 카탈레이즈 융합 단백질 10 mg
- [0101] 퍼골라이드 메실레이트 12 mg
- [0102] 이성화당 10 g
- [0103] 만니톨 5 g
- [0104] 정제수 적량
- [0105] 통상의 액제 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 100mℓ로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

도면

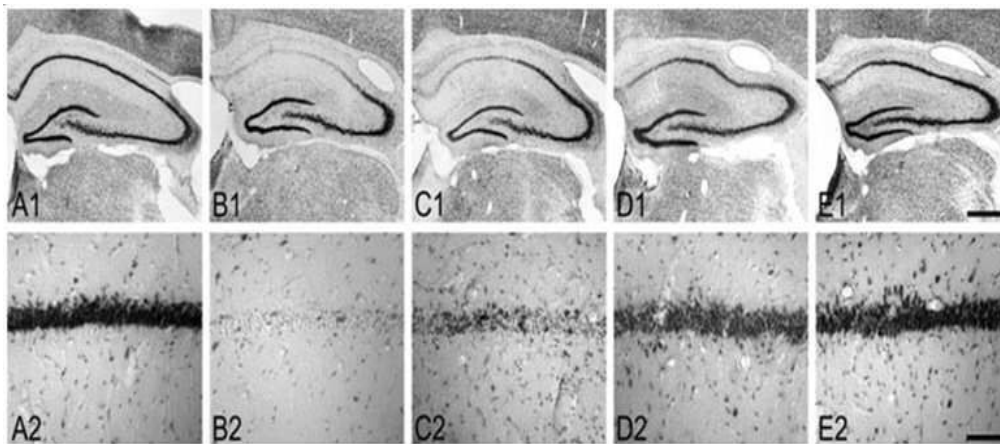
도면1



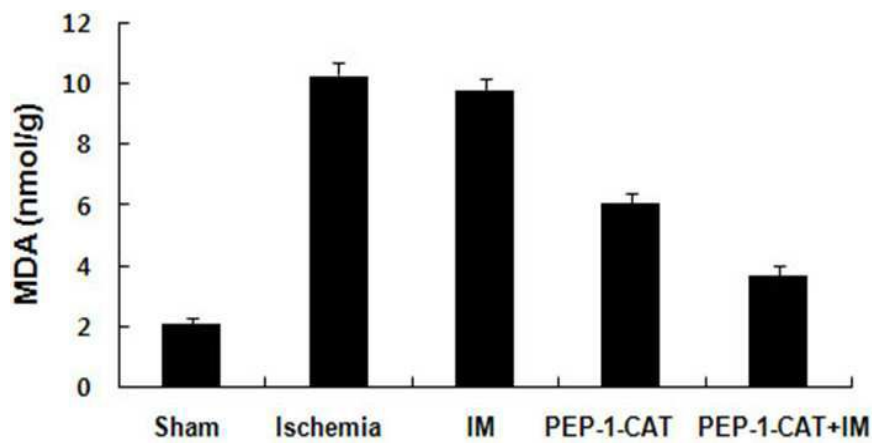
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Composition for brain disease containing fusion protein and imipramine

<130> hallym-sychoi-imipramine

<160> 30

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctcgagatgg ctgacagccg ggatcccgcc

30

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggatcctcac agatttgccr rctcccttgc c

31

<210> 3

<211> 1671

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for Tat-catalase fusion protein

<400> 3

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg	60
agacagcgac gaagactcga gatggctgac agccgggatc ccgccagcga ccagatgcag	120
cactggaagg agcagcgggc cgcgcagaaa gctgatgtcc tgaccactgg agctggtaac	180
ccagtaggag acaaacttaa tggtattaca gtagggcccc gtgggcccct tcttggtcag	240
gatgtggttt tcatgatga aatggctcat ttgaccgag agagaattcc tgagagagtt	300
gtgcatgcta aaggagcagg ggcctttggc tactttgagg tcacacatga cattacaaa	360
tactccaagg caaaggtatt tgagcatatt ggaaagaaga ctcccatcgc agttcggttc	420
tccactgttg ctggagaatc gggttcagct gacacagttc gggaccctcg tgggtttgca	480
gtgaaatfff acacagaaga tggtaactgg gatctcgttg gaaataacac cccattttc	540
ttcatcaggg atcccatatt gtttccatct tttatccaca gccaaaagag aaatcctcag	600
acacatctga aggatccgga catggtcttg gacttctgga gcctacgtcc tgagtctctg	660
catcaggttt ctttcttggt cagtgatcgg gggattccag atggacatcg ccacatgaat	720
ggatatggat cacatacttt caagctggtt aatgcaaatg gggaggcagt ttattgcaaa	780
ttccattata agactgacca gggcatcaaa aacctttctg ttgaagatgc ggcgagactt	840
tcccaggaag atcctgacta tggcatccgg gatcttttta acgccattgc cacaggaaag	900
taccctcct ggacttttta catccaggtc atgacattta atcaggcaga aacttttcca	960
tttaatccat tcgatctcac caaggtttgg cctcacaagg actaccctct catcccagtt	1020
ggtaaactgg tcttaaaccg gaatccagtt aattactttg ctgaggttga acagatagcc	1080
ttcgacccaa gcaacatgcc acctggcatt gaggccagtc ctgacaaaat gcttcagggc	1140
cgcccttttg cctatcctga cactcaccgc catcgctgg gacccaatta tcttcatata	1200
cctgtgaact gtcctaccg tgctcgagtg gccaaactacc agcgtgacgg cccgatgtgc	1260
atgcaggaca atcagggtgg tgctccaaat tactaccca acagctttgg tgctccggaa	1320
caacagcctt ctgccctgga gcacagcatc caatattctg gagaagtgcg gagattcaac	1380
actgccaatg atgataacgt tactcaggtg cgggcattct atgtgaacgt gctgaatgag	1440
gaacagagga aacgtctgtg tgagaacatt gccggccacc tgaaggatgc acaaattttc	1500
atccagaaga aagcgggtcaa gaacttcact gaggtccacc ctgactacgg gagccacatc	1560
caggctcttc tggacaagta caatgctgag aagcctaaga atgcgattca cacctttgtg	1620
cagtcgggat ctcaattggc ggcaagggag aaggcaaatc tgtgaggatc c	1671

<210> 4
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tat-catalase fusion protein
 <400> 4
 His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His
 1 5 10 15
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg
 20 25 30
 Asp Pro Ala Ser Asp Gln Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala
 35 40 45
 Gln Lys Ala Asp Val Leu Thr Thr Gly Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp
 50 55 60
 Lys Leu Asn Val Ile Thr Val Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Val Val Phe Thr Asp Glu Met Ala His Phe Asp Arg Glu Arg Ile
 85 90 95
 Pro Glu Arg Val Val His Ala Lys Gly Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Glu Val Thr His Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu
 115 120 125
 His Ile Gly Lys Lys Thr Pro Ile Ala Val Arg Phe Ser Thr Val Ala
 130 135 140
 Gly Glu Ser Gly Ser Ala Asp Thr Val Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala
 145 150 155 160
 Val Lys Phe Tyr Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn
 165 170 175
 Thr Pro Ile Phe Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile
 180 185 190
 His Ser Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met
 195 200 205

Val Trp Asp Phe Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn
225 230 235 240

Gly Tyr Gly Ser His Thr Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala
245 250 255

Val Tyr Cys Lys Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu
260 265 270

Ser Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly
275 280 285

Ile Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp
290 295 300

Thr Phe Tyr Ile Gln Val Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro
305 310 315 320

Phe Asn Pro Phe Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro
325 330 335

Leu Ile Pro Val Gly Lys Leu Val Leu Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr
340 345 350

Phe Ala Glu Val Glu Gln Ile Ala Phe Asp Pro Ser Asn Met Pro Pro
355 360 365

Gly Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ala
370 375 380

Tyr Pro Asp Thr His Arg His Arg Leu Gly Pro Asn Tyr Leu His Ile
385 390 395 400

Pro Val Asn Cys Pro Tyr Arg Ala Arg Val Ala Asn Tyr Gln Arg Asp
405 410 415

Gly Pro Met Cys Met Gln Asp Asn Gln Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Tyr
420 425 430

Pro Asn Ser Phe Gly Ala Pro Glu Gln Gln Pro Ser Ala Leu Glu His
435 440 445

Ser Ile Gln Tyr Ser Gly Glu Val Arg Arg Phe Asn Thr Ala Asn Asp

450 455 460
Asp Asn Val Thr Gln Val Arg Ala Phe Tyr Val Asn Val Leu Asn Glu
465 470 475 480
Glu Gln Arg Lys Arg Leu Cys Glu Asn Ile Ala Gly His Leu Lys Asp
485 490 495
Ala Gln Ile Phe Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Val
500 505 510
His Pro Asp Tyr Gly Ser His Ile Gln Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn
515 520 525

Ala Glu Lys Pro Lys Asn Ala Ile His Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser
530 535 540
His Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ala Asn Leu
545 550
<210> 5
<211> 1670
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> coding sequence for catalase-Tat fusion protein
<400> 5
catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccggcgg cagccactcg agatggctga 60
cagccgggat cccgccagcg accagatgca gactggaag gagcagcggg ccgcgcagaa 120
agctgatgtc ctgaccactg gagctggtaa ccagtagga gacaaactta atgttattac 180

agtagggccc cgtgggcccc ttcttgttca ggatgtggtt ttactgatg aaatggctca 240
ttttgaccga gagagaattc ctgagagagt tgtgcatgct aaaggagcag gggcctttgg 300
ctactttgag gtcacacatg acattaccaa atactccaag gcaaaggtat ttgagcatat 360
tgaaagaag actcccatcg cagttcgggt ctccactgtt gctggagaat cgggttcagc 420
tgacacagtt cgggaccctc gtgggtttgc agtgaaattt tacacagaag atggtaactg 480
ggatctcggtt gaaataaca cccccattt ctcatcagg gatcccatat tgtttccatc 540
ttttatccac agccaaaaga gaaatcctca gacacatctg aaggatccgg acatggtctg 600

ggacttctgg agcctacgtc ctgagtctct gcatcagggt tctttcttgt tcagtgatcg 660
ggggattcca gatggacatc gccacatgaa tggatatgga tcacatactt tcaagctggt 720
taatgcaaat ggggaggcag tttattgcaa attcattat aagactgacc agggcatcaa 780

aaacctttct gttgaagatg cggcgagact ttcccaggaa gatcctgact atggcatccg 840
 ggatcttttt aacgccattg ccacaggaaa gtaccctcc tggacttttt acatccaggt 900
 catgacattt aatcaggcag aaacttttcc atttaatcca ttcgatctca ccaaggtttg 960
 gcctcacaag gactaccctc tcatcccagt tggtaaactg gtcttaaac ggaatccagt 1020

taattacttt gctgaggttg aacagatagc ctctgaccca agcaacatgc cacctggcat 1080
 tgaggccagt cctgacaaaa tgcttcaggg cgccttttt gcctatcctg acactcacg 1140
 ccatcgctg ggaccaatt atcttcatac acctgtgaac tgtccctacc gtgctcgagt 1200
 ggccaactac cagcgtgacg gcccgatgtg catgcaggac aatcagggtg gtgctcaaa 1260
 ttactacccc aacagctttg gtgctccgga acaacagcct tctgccctgg agcacagcat 1320
 ccaatattct ggagaagtc ggagattcaa cactgccaat gatgataacg ttactcaggt 1380
 gcgggcattc tatgtgaacg tgctgaatga ggaacagagg aaacgtctgt gtgagaacat 1440

tgccggccac ctgaaggatg cacaaatttt catccagaag aaagcggta agaacttcac 1500
 tgaggccac cctgactacg ggagccacat ccaggctctt ctggacaagt acaatgctga 1560
 gaagcctaag aatgcgattc acacctttgt gcagtccgga tctcacttgg cggcaaggga 1620
 gaaggcaaat ctgggatcct aggaagaagc ggagacagcg acgaagatag 1670

<210> 6

<211> 536

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> catalase-Tat fusion protein

<400> 6

Met Ala Asp Ser Arg Asp Pro Ala Ser Asp Gln Met Gln His Trp Lys

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

Ala Phe Gly Tyr Phe Glu Val Thr His Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Lys
85 90 95

Ala Lys Val Phe Glu His Ile Gly Lys Lys Thr Pro Ile Ala Val Arg
100 105 110

Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Ser Gly Ser Ala Asp Thr Val Arg Asp
115 120 125

Pro Arg Gly Phe Ala Val Lys Phe Tyr Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp
130 135 140

Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu
145 150 155 160

Phe Pro Ser Phe Ile His Ser Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr His Leu
165 170 175

Lys Asp Pro Asp Met Val Trp Asp Phe Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser
180 185 190

Leu His Gln Val Ser Phe Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly
195 200 205

His Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser His Thr Phe Lys Leu Val Asn
210 215 220

Ala Asn Gly Glu Ala Val Tyr Cys Lys Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln
225 230 235 240

Gly Ile Lys Asn Leu Ser Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu
245 250 255

Asp Pro Asp Tyr Gly Ile Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly
260 265 270

Lys Tyr Pro Ser Trp Thr Phe Tyr Ile Gln Val Met Thr Phe Asn Gln
275 280 285

Ala Glu Thr Phe Pro Phe Asn Pro Phe Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro
290 295 300

His Lys Asp Tyr Pro Leu Ile Pro Val Gly Lys Leu Val Leu Asn Arg
305 310 315 320

Asn Pro Val Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln Ile Ala Phe Asp Pro
325 330 335

Ser Asn Met Pro Pro Gly Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met Leu Gln
340 345 350

Gly Arg Leu Phe Ala Tyr Pro Asp Thr His Arg His Arg Leu Gly Pro
355 360 365

Asn Tyr Leu His Ile Pro Val Asn Cys Pro Tyr Arg Ala Arg Val Ala
370 375 380

Asn Tyr Gln Arg Asp Gly Pro Met Cys Met Gln Asp Asn Gln Gly Gly
385 390 395 400

Ala Pro Asn Tyr Tyr Pro Asn Ser Phe Gly Ala Pro Glu Gln Gln Pro
405 410 415

Ser Ala Leu Glu His Ser Ile Gln Tyr Ser Gly Glu Val Arg Arg Phe
420 425 430

Asn Thr Ala Asn Asp Asp Asn Val Thr Gln Val Arg Ala Phe Tyr Val
435 440 445

Asn Val Leu Asn Glu Glu Gln Arg Lys Arg Leu Cys Glu Asn Ile Ala
450 455 460

Gly His Leu Lys Asp Ala Gln Ile Phe Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys
465 470 475 480

Asn Phe Thr Glu Val His Pro Asp Tyr Gly Ser His Ile Gln Ala Leu
485 490 495

Leu Asp Lys Tyr Asn Ala Glu Lys Pro Lys Asn Ala Ile His Thr Phe
500 505 510

Val Gln Ser Gly Ser His Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ala Asn Leu Arg
515 520 525

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
530 535

<210> 7

<211> 1699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for Tat-catalase-Tat fusion protein

<400> 7

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60
agacagcgac gaagactcga gatgctgac agccgggac cccagcga ccagatgcag 120
cactggaagg agcagcgggc cgcgcagaaa gctgatgtcc tgaccactgg agctggtaac 180

ccagtaggag acaaacttaa tggtattaca gtagggcccc gtggggccct tcttggtcag 240
gatgtggttt tcatgtatga aatggctcat ttgaccgag agagaattcc tgagagagtt 300
gtgcatgcta aaggagcagg ggcctttggc tactttgagg tcacacatga cattacaaa 360
tactccaagg caaaggtatt tgagcatatt ggaaagaaga ctcccatcgc agttcggttc 420
tccactgttg ctggagaatc gggttcagct gacacagtgc gggaccctcg tgggtttgca 480
gtgaaatfff acacagaaga tggtaactgg gatctcgttg gaaataacac cccatffff 540
ttcatcaggg atcccatatt gtttccatct ttatccaca gccaaaagag aaatcctcag 600

acacatctga aggatecga catggtctgg gacttctgga gcctacgtcc tgagtctctg 660
catcaggfff ctttctgtt cagtgatcgg gggattccag atggacatcg ccacatgaat 720
ggatatggat cacatacttt caagctggtt aatgcaaatg gggaggcagt ttattgcaa 780
ttccattata agactgacca gggcatcaaa aacctttctg ttgaagatgc ggcgagactt 840
tcccaggaag atctgacta tggcatccgg gatcttttta acgccattgc cacaggaaag 900
taccctcct ggacttttta catccaggtc atgacattta atcaggcaga aacttttcca 960
tttaatccat tcatctcac caaggtttgg cctcacaagg actaccctct catccagtt 1020

ggtaaactgg tcttaaacgg gaatccagtt aattactttg ctgaggttga acagatagcc 1080
ttcgaccaa gcaacatgcc acctggcatt gaggcagtc ctgacaaat gcttcagggc 1140
cgctttttg cctatcctga cactcaccgc catcgctgg gacccaatta tcttcatata 1200
cctgtgaact gtccctaccg tgctcgagtg gccaaactacc agcgtgacgg cccgatgtgc 1260
atgcaggaca atcagggtgg tgctccaaat tactaccca acagctttgg tgctccgga 1320
caacagcctt ctgcccigga gcacagcatc caatattctg gagaagtgcg gagattcaac 1380
actgccaatg atgataacgt tactcaggtg cgggcattct atgtgaacgt gctgaatgag 1440

gaacagagga aacgtctgtg tgagaacatt gccggccacc tgaaggatgc acaaattttc 1500
atccagaaga aagcggtaaa gaacttact gaggtccacc ctgactacgg gagccacatc 1560
caggctcttc tggacaagta caatgctgag aagcctaaga atgcgattca cacctttgtg 1620
cagtccggat ctacttggc ggcaaggag aaggcaaatc tgggaccta ggaagaagcg 1680
gagacagcga cgaagatag 1699

<210> 8

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-catalase-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg

1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Asp Gln Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala

20 25 30

Gln Lys Ala Asp Val Leu Thr Thr Gly Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp

35 40 45

Lys Leu Asn Val Ile Thr Val Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln

50 55 60

Asp Val Val Phe Thr Asp Glu Met Ala His Phe Asp Arg Glu Arg Ile

65 70 75 80

Pro Glu Arg Val Val His Ala Lys Gly Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe

85 90 95

Glu Val Thr His Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu

100 105 110

His Ile Gly Lys Lys Thr Pro Ile Ala Val Arg Phe Ser Thr Val Ala

115 120 125

Gly Glu Ser Gly Ser Ala Asp Thr Val Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala

130 135 140

Val Lys Phe Tyr Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn

145 150 155 160

Thr Pro Ile Phe Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile

165 170 175

His Ser Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met

180 185 190

Val Trp Asp Phe Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser

195 200 205

Phe Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn

210 215 220
 Gly Tyr Gly Ser His Thr Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala
 225 230 235 240
 Val Tyr Cys Lys Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu
 245 250 255
 Ser Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly
 260 265 270
 Ile Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp
 275 280 285

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

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

 Ser Ile Gln Tyr Ser Gly Glu Val Arg Arg Phe Asn Thr Ala Asn Asp
 435 440 445
 Asp Asn Val Thr Gln Val Arg Ala Phe Tyr Val Asn Val Leu Asn Glu
 450 455 460
 Glu Gln Arg Lys Arg Leu Cys Glu Asn Ile Ala Gly His Leu Lys Asp

465 470 475 480
 Ala Gln Ile Phe Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Val
 485 490 495
 His Pro Asp Tyr Gly Ser His Ile Gln Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn

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

545

<210> 9

<211> 1708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for PEP-1-catalase fusion protein

<400> 9

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccataa aagaaacctg 60

gtgggaaacc tgggtgaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120

ggctgacagc cgggatcccg ccagcgacca gatgcagcac tggaaggagc agcgggccgc 180

gcagaaagct gatgtcctga ccaatggagc tggtaacca gtaggagaca aacttaatgt 240

tattacagta gggccccgtg ggccccctct tgttcaggat gtggttttca ctgatgaaat 300

ggctcathtt gaccgagaga gaattcctga gagagtgttg catgctaaag gagcaggggc 360

ctttggctac tttaggtca cacatgacat taccaaatac tccaaggcaa aggtatttga 420

gcatattgga aagaagactc ccatcgcagt tcggttctcc actgttgctg gagaatcggg 480

ttcagctgac acagttcggg accctcgtgg gtttgcagtg aaattttaca cagaagatgg 540

taactgggat ctcgttgga ataacacccc cattttcttc atcagggatc ccatattgtt 600

tccatctttt atccacagcc aaaagagaaa tcctcagaca catctgaagg atccggacat 660

ggtctgggac ttctggagcc tacgtcctga gtctctgcat caggtttctt tcttggtcag 720

tgatcggggg attccagatg gacatgcga catgaatgga tatggatcac atactttcaa 780

gctggttaat gcaaatgggg aggcagttta ttgcaaatc cattataaga ctgaccaggg 840

catcaaaaac ctttctgttg aagatgcggc gagactttcc caggaagatc ctgactatgg 900

catccgggat ctttttaacg ccattgccac aggaaagtac ccttcctgga ctttttacat 960

ccaggtcatg acatttaate aggacagaaac ttttccattt aatccattcg atctcacaa 1020

ggtttggcct cacaaggact accctctcat ccagttgggt aaactggtct taaaccggaa 1080

tccagttaat tactttgctg aggttgaaca gatagccttc gaccaagca acatgccacc 1140

tggcattgag gccagtctg acaaaatgct tcagggccgc ctttttgctt atcctgacac 1200

tcaccgccat cgctgggac ccaattatct tcataacct gtgaactgtc cctaccgtgc 1260

tcgagtggcc aactaccagc gtgacggccc gatgtgcatg caggacaatc aggggtggtgc 1320

tccaaattac tacccaaca gctttggtgc tccggaacaa cagccttctg ccttgagca 1380

cagcatccaa tattctggag aagtgcggag attcaacact gccaatgatg ataacgttac 1440

tcaggtgcgg gcattctatg tgaacgtgct gaatgaggaa cagaggaaac gtctgtgtga 1500

gaacattgcc ggccacctga aggatgcaca aattttcatc cagaagaaag cggtaagaa 1560

cttactgag gtccaccctg actacgggag ccacatccag gctcttctgg acaagtacaa 1620

tgctgagaag cctaagaatg cgattcacac ctttgtcag tccggatctc acttgccggc 1680

aaggagaag gcaaatctgt gaggatcc 1708

<210> 10

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-catalase fusion protein

<400> 10

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg Asp Pro Ala Ser

20 25 30

Asp Gln Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala Gln Lys Ala Asp

35 40 45

Val Leu Thr Thr Gly Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp Lys Leu Asn Val

50 55 60

Ile Thr Val Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln Asp Val Val Phe

65 70 75 80

Thr Asp Glu Met Ala His Phe Asp Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val
85 90 95

Val His Ala Lys Gly Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe Glu Val Thr His
100 105 110

Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu His Ile Gly Lys
115 120 125

Lys Thr Pro Ile Ala Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Ser Gly
130 135 140

Ser Ala Asp Thr Val Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala Val Lys Phe Tyr
145 150 155 160

Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe
165 170 175

Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile His Ser Gln Lys
180 185 190

Arg Asn Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met Val Trp Asp Phe
195 200 205

Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser Phe Leu Phe Ser
210 215 220

Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser
225 230 235 240

His Thr Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala Val Tyr Cys Lys
245 250 255

Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu Ser Val Glu Asp
260 265 270

Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly Ile Arg Asp Leu
275 280 285

Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp Thr Phe Tyr Ile
290 295 300

Gln Val Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro Phe Asn Pro Phe
305 310 315 320

Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro Leu Ile Pro Val
325 330 335

Gly Lys Leu Val Leu Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr Phe Ala Glu Val

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

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

485 490 495
 Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Val His Pro Asp Tyr
 500 505 510
 Gly Ser His Ile Gln Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn Ala Glu Lys Pro
 515 520 525
 Lys Asn Ala Ile His Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser His Leu Ala Ala
 530 535 540
 Arg Glu Lys Ala Asn Leu
 545 550

<210> 11
 <211> 1707
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for catalase-PEP-1 fusion protein

<400> 11

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccggcgg cagccactcg agatggctga	60
cagccgggat cccgccagcg accagatgca gcactggaag gagcagcggg ccgcgcagaa	120
agctgatgtc ctgaccactg gagctggtaa cccagtagga gacaaactta atgttattac	180
agtagggccc cgtagggccc ttcttggtca ggatgtggtt ttactgatg aaatggctca	240
ttttgaccga gagagaattc ctgagagagt tgtgcatgct aaaggagcag gggcctttgg	300
ctactttgag gtcacacatg acattaccaa atactccaag gcaaaggat ttgagcatat	360
tggaagaag actcccatcg cagttcgggt ctccactgtt gctggagaat cgggttcagc	420
tgacacagtt cgggaccctc gtgggtttgc agtgaaattt tacacagaag atggtaactg	480
ggatctcggt ggaaataaca cccccattt ctccatcagg gatcccatat tgtttccatc	540
ttttatccac agccaaaaga gaaatcctca gacacatctg aaggatccgg acatggctcg	600
ggacttctgg agcctacgtc ctgagtctct gcatcagggt tctttcttgt tcagtgatcg	660
ggggattcca gatggacatc gccacatgaa tggatatgga tcacatactt tcaagctggt	720
taatgcaaat ggggaggcag tttattgcaa attccattat aagactgacc agggcatcaa	780
aaacctttct gttgaagatg cggcgagact ttcccaggaa gatcctgact atggcatccg	840
ggatcttttt aacgccattg ccacaggaaa gtaccctcc tggacttttt acatccaggt	900
catgacattt aatcaggcag aaacttttcc atttaatcca ttcgatctca ccaaggtttg	960
gcctcacaag gactaccctc tcatcccagt tggtaaactg gtcttaaac ggaatccagt	1020
taattacttt gctgaggttg aacagatagc cttcgacca agcaacatgc cacctggcat	1080
tgaggccagt cctgacaaaa tgcctcaggg ccgccttttt gcctatcctg aactcaccg	1140
ccatcgctg ggacccaatt atcttcatat acctgtgaac tgtccctacc gtgctcgagt	1200
ggccaactac cagcgtgacg gcccgatgtg catgcaggac aatcagggtg gtgctcaaaa	1260
ttactacccc aacagctttg gtgctccgga acaacagcct tctgccctgg agcacagcat	1320
ccaatattct ggagaagtgc ggagattcaa cactgccaat gatgataacg ttactcaggt	1380
gcgggcatc tatgtgaacg tgctgaatga ggaacagagg aaacgtctgt gtgagaacat	1440
tgccggccac ctgaaggatg caaaaattt catccagaag aaagcgttca agaacttcac	1500
tgagggtccac cctgactacg ggagccacat ccaggctctt ctggacaagt acaatgctga	1560
gaagcctaag aatgcgattc acacctttgt gcagtccgga tctcatttgg cggcaaggga	1620
gaaggcaaat ctgggatcct aaaagaaacc tgggtggaaa cctggtggac cgaatggtct	1680

cagccgaaaa aaaaacgtaa agtgttag

1707

<210> 12

<211> 566

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> catalase-PEP-1 fusion protein

<400> 12

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

1 5 10 15

Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg Asp Pro Ala Ser Asp Gln Met Gln His

20 25 30

Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala Gln Lys Ala Asp Val Leu Thr Thr Gly

35 40 45

Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp Lys Leu Asn Val Ile Thr Val Gly Pro

50 55 60

Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln Asp Val Val Phe Thr Asp Glu Met Ala

65 70 75 80

His Phe Asp Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val Val His Ala Lys Gly

85 90 95

Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe Glu Val Thr His Asp Ile Thr Lys Tyr

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu His Ile Gly Lys Lys Thr Pro Ile Ala

115 120 125

Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Ser Gly Ser Ala Asp Thr Val

130 135 140

Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala Val Lys Phe Tyr Thr Glu Asp Gly Asn

145 150 155 160

Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile Arg Asp Pro

165 170 175

Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile His Ser Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr

180 185 190

His Leu Lys Asp Pro Asp Met Val Trp Asp Phe Trp Ser Leu Arg Pro

195 200 205
 Glu Ser Leu His Gln Val Ser Phe Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro
 210 215 220
 Asp Gly His Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser His Thr Phe Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala Val Tyr Cys Lys Phe His Tyr Lys Thr

 245 250 255
 Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu Ser Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu Ser
 260 265 270
 Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly Ile Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ile Ala
 275 280 285
 Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp Thr Phe Tyr Ile Gln Val Met Thr Phe
 290 295 300
 Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro Phe Asn Pro Phe Asp Leu Thr Lys Val
 305 310 315 320

 Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro Leu Ile Pro Val Gly Lys Leu Val Leu
 325 330 335
 Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln Ile Ala Phe
 340 345 350
 Asp Pro Ser Asn Met Pro Pro Gly Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met
 355 360 365
 Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ala Tyr Pro Asp Thr His Arg His Arg Leu
 370 375 380
 Gly Pro Asn Tyr Leu His Ile Pro Val Asn Cys Pro Tyr Arg Ala Arg

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

450 Tyr Val Asn Val Leu Asn Glu Glu Gln Arg Lys Arg Leu Cys Glu Asn
465 470 475 480
Ile Ala Gly His Leu Lys Asp Ala Gln Ile Phe Ile Gln Lys Lys Ala
485 490 495
Val Lys Asn Phe Thr Glu Val His Pro Asp Tyr Gly Ser His Ile Gln
500 505 510
Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn Ala Glu Lys Pro Lys Asn Ala Ile His
515 520 525
Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser His Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ala Asn
530 535 540
Leu Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro
545 550 555 560
Lys Lys Lys Arg Lys Val
565
<210> 13
<211> 1773
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> coding sequence for PEP-1-catalase-PEP-1 fusion protein
<400> 13
catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtccgcgcg gcagccataa aagaaacctg 60
gtgggaaacc tgggtggaccg aatggtctca gccgaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120
ggctgacagc cgggatcccg ccagcgacca gatgcagcac tggaaggagc agcgggccgc 180
gcagaaagct gatgtcctga ccaatggagc tggtaacca gtaggagaca aacttaatgt 240
tattacagta gggccccgtg ggcccccttct tgttcaggat gtggttttca ctgatgaaat 300
ggctcatttt gaccgagaga gaattcctga gagagtgtg catgctaaag gagcaggggc 360
ctttggctac tttaggttca cacatgacat taccaaatac tccaaggcaa aggtatttga 420
gcatattgga aagaagactc ccatcgcagt tcggttctcc actgttgctg gagaatcggg 480
ttcagctgac acagttcggg accctcgtgg gtttgcagtg aaattttaca cagaagatgg 540
taactgggat ctggttgga ataacacccc cattttcttc atcagggatc ccatattgtt 600

tccatctttt atccacagcc aaaagagaaa tcctcagaca catctgaagg atccggacat 660
 ggtctgggac ttctggagcc tacgtcctga gtctctgcat caggtttctt tcttggtcag 720
 tgatcggggg attccagatg gacatcgcca catgaatgga tatggatcac atactttcaa 780
 gctgggttaat gcaaatgggg aggcagttta ttgcaaattc cattataaga ctgaccaggg 840
 catcaaaaac ctttctgttg aagatgcggc gagactttcc caggaagatc ctgactatgg 900
 catccgggat ctttttaacg ccattgccac aggaaagtac cctcctgga ctttttcat 960

ccaggtcatg acatttaac aggcagaaac ttttccattt aatccattcg atctcaccaa 1020
 ggtttggcct cacaaggact accctctcat ccagttgggt aaactggtct taaaccggaa 1080
 tccagttaat tactttgctg aggttgaaca gatagccttc gaccaagca acatgccacc 1140
 tggcattgag gccagtcctg acaaaatgct tcagggccgc cttttgcct atcctgacac 1200
 tcaccgcat cgctgggac ccaattatct tcatatacct gtgaactgtc cctaccgtgc 1260
 tcgagtggcc aactaccagc gtgacggccc gatgtgcatg caggacaatc aggggtgtgc 1320
 tccaaattac tacccaaca gctttggtgc tccggaacaa cagccttctg cctggagca 1380

cagcatccaa tattctggag aagtgcggag attcaacact gccaatgatg ataacgttac 1440
 tcaggtgcgg gcattctatg tgaacgtgct gaatgaggaa cagaggaaac gtctgtgtga 1500
 gaacattgcc ggccacctga aggatgcaca aattttcatc cagaagaaag cggtaagaa 1560
 cttcactgag gtccacctg actacgggag ccacatccag gctcttctgg acaagtacaa 1620
 tgctgagaag cctaagaatg cgattcacac ctttgtgcag tccggatctc acttggcggc 1680
 aagggagaag gcaaatctgg gatcctaaaa gaaacctggt gggaaacctg gtggaccgaa 1740
 tgggtctcagc cgaaaaaaaa acgtaaagt tag 1773

<210> 14

<211> 573

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-catalase-PEP-1 fusion protein

<400> 14

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg Asp Pro Ala Ser

20 25 30

Asp Gln Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala Gln Lys Ala Asp

35 40 45
 Val Leu Thr Thr Gly Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp Lys Leu Asn Val
 50 55 60
 Ile Thr Val Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln Asp Val Val Phe
 65 70 75 80
 Thr Asp Glu Met Ala His Phe Asp Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val
 85 90 95
 Val His Ala Lys Gly Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe Glu Val Thr His
 100 105 110
 Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu His Ile Gly Lys
 115 120 125
 Lys Thr Pro Ile Ala Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Ser Gly
 130 135 140
 Ser Ala Asp Thr Val Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala Val Lys Phe Tyr
 145 150 155 160
 Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe
 165 170 175
 Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile His Ser Gln Lys
 180 185 190
 Arg Asn Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met Val Trp Asp Phe
 195 200 205
 Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser Phe Leu Phe Ser
 210 215 220
 Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser
 225 230 235 240
 His Thr Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala Val Tyr Cys Lys
 245 250 255
 Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu Ser Val Glu Asp
 260 265 270
 Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly Ile Arg Asp Leu
 275 280 285

Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp Thr Phe Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Val Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro Phe Asn Pro Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro Leu Ile Pro Val
 325 330 335

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

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

 Arg Leu Cys Glu Asn Ile Ala Gly His Leu Lys Asp Ala Gln Ile Phe
 485 490 495
 Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Val His Pro Asp Tyr
 500 505 510
 Gly Ser His Ile Gln Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn Ala Glu Lys Pro
 515 520 525
 Lys Asn Ala Ile His Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser His Leu Ala Ala
 530 535 540

Arg Glu Lys Ala Asn Leu Gly Ser Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp

545 550 555 560

Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

565 570

<210> 15

<211> 1664

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for olygolysine-catalase fusion protein

<400> 15

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaactcgag atggctgaca gccgggatcc cgccagcgac cagatgcagc 120

actggaagga gcagcgggcc gcgcagaaag ctgatgtcct gaccactgga gctggtaacc 180

cagtaggaga caaacttaat gttattacag tagggccccc tgggccctt ctgttcagg 240

atgtggtttt cactgatgaa atggctcatt ttgaccgaga gagaattcct gagagagtgt 300

tgcattgtaa aggagcaggg gcctttggct actttgaggt cacacatgac attaccaaat 360

actccaaggg aaaggtattt gagcatattg gaaagaagac tcccatcgca gttcggttct 420

ccactgttgc tggagaatcg ggttcagctg acacagttcg ggaccctcgt gggtttgcag 480

tgaattttta cacagaagat ggtaactggg atctcgttgg aaataacacc cccattttct 540

tcatcaggga tcccatattg ttccatctt ttatccacag ccaaaagaga aatcctcaga 600

cacatctgaa ggatccggac atggctctggg acttctggag cctacgtcct gagtctctgc 660

atcaggtttc tttcttgttc agtgatcggg ggattccaga tggacatcgc cacatgaatg 720

gatatggatc acatactttc aagctggtaa atgcaaatgg ggaggcagtt tattgcaaat 780

tccattataa gactgaccag ggcatcaaaa acctttctgt tgaagatgcg gcgagacttt 840

cccaggaaga tctgactat ggcatccggg atctttttta cgccattgcc acaggaaagt 900

acctctctg gactttttac atccaggtca tgacatttaa tcaggcagaa acttttccat 960

ttaatccatt cgatctcacc aaggtttggc ctcaaaagga ctaccctctc atcccagttg 1020

glaaactggt cttaaaccgg aatccagtta attactttgc tgaggttgaa cagatagcct 1080

tcgacccaag caacatgcc cctggcattg aggccagtcc tgacaaaatg cttcagggcc 1140

gcctttttgc ctatctgac actcaccgcc atgcctggg acccaattat cttcatatac 1200

ctgtgaactg tcctaccgt gctcagtggt ccaactacca gcgtgacggc ccgatgtgca 1260

tgcaggacaa tcagggtggt gctccaaatt actaccccaa cagctttggt gctccggaac 1320
aacagccttc tgcctggag cacagcatcc aatattctgg agaagtgcgg agattcaaca 1380
ctgccaatga tgataacgtt actcaggtgc gggcattcta tgtgaacgtg ctgaatgagg 1440

aacagaggaa acgtctgtgt gagaacattg ccggccacct gaaggatgca caaattttca 1500
tccagaagaa agcggtaag aacttcactg aggtccaccc tgactacggg agccacatcc 1560
aggtctttct ggacaagtac aatgctgaga agcctaagaa tgcgattcac acctttgtgc 1620
agtccggatc tcacttggcg gcaagggaga aggcaaatct gtga 1664

<210> 16

<211> 538

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligolysine-catalase fusion protein

<400> 16

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg

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

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

Val Lys Phe Tyr Thr Glu Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn

145 150 155 160

Thr Pro Ile Phe Phe Ile Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile

165 170 175

His Ser Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met

180 185 190

Val Trp Asp Phe Trp Ser Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser

195 200 205

Phe Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn

210 215 220

Gly Tyr Gly Ser His Thr Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala

225 230 235 240

Val Tyr Cys Lys Phe His Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu

245 250 255

Ser Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly

260 265 270

Ile Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp

275 280 285

Thr Phe Tyr Ile Gln Val Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro

290 295 300

Phe Asn Pro Phe Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro

305 310 315 320

Leu Ile Pro Val Gly Lys Leu Val Leu Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr

325 330 335

Phe Ala Glu Val Glu Gln Ile Ala Phe Asp Pro Ser Asn Met Pro Pro

340 345 350

Gly Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ala

355 360 365

Tyr Pro Asp Thr His Arg His Arg Leu Gly Pro Asn Tyr Leu His Ile

370 375 380

Pro Val Asn Cys Pro Tyr Arg Ala Arg Val Ala Asn Tyr Gln Arg Asp

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

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

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

<210> 17

<211> 1664

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for oligoarginine-catalase fusion protein

<400> 17

catcatcatc atcatcacag cagcgccctg gtgccgcgcg gcagccaaga agaagaagaa 60

gaagaagaag aagactcgag atggctgaca gccgggatcc cgccagcgac cagatgcagc 120

actggaagga gcagcgggcc gcgcagaaaag ctgatgtcct gaccactgga gctggtaacc 180

cagtaggaga caaacttaat gttattacag tagggccccg tgggcccctt cttgttcagg 240

atgtggtttt cactgatgaa atggctcatt ttgaccgaga gagaattcct gagagagttg 300

tgcattgctaa aggagcaggg gccttttggt actttgaggt cacacatgac attaccaaat 360

actccaaggc aaaggtatgt gagcatattg gaaagaagac tcccatcgca gttcggttct 420

ccactgttgc tggagaatcg ggttcagctg acacagttcg ggaccctcgt gggtttgcag 480
tgaaatttta cacagaagat ggtaactggg atctcgttgg aaataacacc cccattttct 540

tcatacaggga	tcaccataatg	tttccatctt	ttatccacag	cctaaagaga	aatctctaga	600
cacatctgaa	ggatccggac	atggctctggg	acttctggag	cctacgtcct	gagtctctgc	660
atcagggtttc	tttcttggtc	agtgatcggg	ggattccaga	tggacatcgc	cacatgaatg	720
gatatgggac	acatactttc	aagctgggtta	atgcaaatgg	ggaggcagtt	tattgcaaat	780
tccattataa	gactgaccag	ggcatcaaaa	acctttctgt	tgaagatcgc	gcgagacttt	840
cccaggaaga	tcttgactat	ggcatccggg	atctttttta	cgccattgcc	acaggaaagt	900
acctctctg	gactttttac	atccagggtca	tgacatttta	tcaggcagaa	acttttccat	960

ttaatccatt cgatctacc aaggtttggc ctacaaagga ctacctctc atcccagttg	1020
gtaaactggt cttaaacggg aatccagtta attactttgc tgaggttgaa cagatagcct	1080
tcgacccaag caacatgcc actggcattg aggccagtcc tgacaaaatg cttcagggcc	1140
gcctttttgc ctatcctgac actcacgcc atcgctggg acccaattat cttcatatac	1200
ctgtgaactg tccctaccgt gctcgagtgg ccaactacca gcgtgacggc ccatgtgca	1260
tgcaggacaa tcaggttgt gtcctaaatt actacccaa cagcttttgt gtcctggaac	1320
aacagccttc tgcctggag cacagcatcc aatattctgg agaagtgcgg agattcaaca	1380

ctgccaatga tgataacgtt actcaggtgc gggcattcta tgtgaacgtg ctgaatgagg	1440
aacagaggaa acgtctgtgt gagaacattg ccggccacct gaaggatgca caaattttca	1500
tccagaagaa agcgggtcaag aacttcactg aggtccaccc tgactacggg agccacatcc	1560
aggctcttct ggacaagtac aatgctgaga agcctaagaa tgcgattcac acctttgtgc	1620
agtccggatc tcaattggcg gcaagggaga aggcaaatct gtga	1664

<210> 18

<211> 538

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligoarginine-catalase fusion protein

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Ser Arg

1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Asp Gln Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala

20 25 30

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

275 280 285
 Thr Phe Tyr Ile Gln Val Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro
 290 295 300
 Phe Asn Pro Phe Asp Leu Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro
 305 310 315 320
 Leu Ile Pro Val Gly Lys Leu Val Leu Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr
 325 330 335
 Phe Ala Glu Val Glu Gln Ile Ala Phe Asp Pro Ser Asn Met Pro Pro
 340 345 350
 Gly Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ala

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

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

 500 505 510
 Ala Glu Lys Pro Lys Asn Ala Ile His Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser
 515 520 525

His Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ala Asn Leu

530

535

<210> 19

<211> 536

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for PEP-1-SOD fusion protein

<400> 19

taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60

aagtgtctga gatggcgacg aaggccgtgt gcgtgctgaa gggcgacggc ccagtgcagg 120

gcatcatcaa tttcgagcag aaggaaagta atggaccagt gaaggtgtgg ggaagcatta 180

aaggactgac tgaaggcctg catggattcc atgttcatga gtttggagat aatacagcag 240

gctgtaccag tgcaggtcct cactttaatc ctctatccag aaaacacggt gggccaaagg 300

atgaagagag gcatgttggg gacttgggca atgtgactgc tgacaaagat ggtgtggccg 360

atgtgtctat tgaagattct gtgatctcac tctcaggaga ccattgcac attgcccgca 420

cactggtggt ccatgaaaaa gcagatgact tgggcaaagg tggaatgaa gaaagtacaa 480

agacaggaaa cgctggaagt cgtttggtt gtggtgtaat tgggatcgcc caataa 536

<210> 20

<211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-SOD fusion protein

<400> 20

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1

5

10

15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu

20

25

30

Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu

35

40

45

Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu

50

55

60

Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOD-PEP-1 fusion protein

<400> 22

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln

1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val

20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val

35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His

50 55 60

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg

65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala

85 90 95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys

100 105 110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly

115 120 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg

130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln Lys Glu Thr Trp Trp Glu

145 150 155 160

Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

165 170 175

<210> 23

<211> 607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for PEP-1-SOD-PEP-1 fusion protein

<400> 23

taaaagaaac ctggtgggaa acctgggtga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60
aagtgtctga gatggcgacg aaggccgtgt gcgtgctgaa gggcgacggc ccagtgcagg 120
gcatcatcaa tttcgagcag aaggaaagta atggaccagt gaaggtgtgg ggaagcatta 180
aaggactgac tgaaggcctg catggattcc atgttcatga gtttgagat aatacagcag 240
gctgtaccag tgcaggctct cactttaatc ctctatccag aaaacacggt gggccaaagg 300

atgaagagag gcatgttga gacttgggca atgtgactgc tgacaaagat ggtgtggccg 360
atgtgtctat tgaagattct gtgatctcac tctcaggaga ccattgcac attggccgca 420
cactggtggt ccatgaaaa gcagatgact tgggcaaagg tggaaatgaa gaaagtacaa 480
agacaggaaa cgctggaagt cgtttggctt gtggtgtaat tgggatcgcc caaggatcct 540
aaaagaaacc tgggtgggaaa cctggtggac cgaatggtct cagccgaaaa aaaaacgtaa 600
agtgtag 607

<210> 24
<211> 200
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> PEP-1-SOD-PEP-1 fusion protein
<400> 24

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

115 120 125

Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His

130 135 140

Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys

145 150 155 160

Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala

165 170 175

Gln Gly Ser Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser

180 185 190

Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

195 200

<210> 25

<211> 499

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for Tat-SOD fusion protein

<400> 25

taggaagaag cggagacagc gacgaagact cgagatggcg acgaaggccg tgtgcgtgct 60

gaaggcgac ggcccagtgc agggcatcat caatttcgag cagaaggaaa gtaatggacc 120

agtgaagtg tggggaagca ttaaaggact gactgaaggc ctgcatggat tccatgttca 180

tgagtttga gataatacag caggctgtac cagtgcaggt cctcacttta atcctctatc 240

cagaaaacac ggtgggccaaggatgaaga gaggcattgt ggagacttgg gcaatgtgac 300

tgctgacaaa gatggtgtgg ccgatgtgtc tattgaagat tctgtgatct cactctcagg 360

agaccattgc atcattggcc gcacactggt ggtccatgaa aaagcagatg acttgggcaa 420

aggtggaaat gaagaaagta caaagacagg aaacgctgga agtcgtttgg cttgtggtgt 480

aattgggatc gcccaataa 499

<210> 26

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-SOD fusion protein

<400> 26

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Thr Lys Ala
1 5 10 15

Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly Ile Ile Asn Phe
20 25 30

Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys
35 40 45

Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly Asp
50 55 60

Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser
65 70 75 80

Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His Val Gly Asp Leu

85 90 95
Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala Asp Val Ser Ile Glu

100 105 110
Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile Ile Gly Arg Thr

115 120 125
Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu

130 135 140
Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val

145 150 155 160

Ile Gly Ile Ala Gln

165

<210> 27

<211> 499

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for SOD-Tat fusion protein

<400> 27

atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtcaggg catcatcaat 60

ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact 120

gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag ttggagata atacagcagg ctgtaccagt 180

gcaggctctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg 240

catgtttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt 300

gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc 360

catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac 420

gctggaagtc gtttggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aaggatccta ggaagaagcg 480

gagacagcga cgaagatag 499

<210> 28

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOD-Tat fusion protein

<400> 28

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln

1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val

20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Gly

35 40 45

Ser Ile Lys Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro

50 55 60

His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His His Gly Phe Pro Lys Asp His

65 70 75 80

Gly Ser Arg His Gly Ser Gly Thr Glu Gly Leu Asn Gly Ser Thr Gly

85 90 95

Leu Thr Lys Asp Gly Val Gly Leu Thr Val Ser Ile Glu Leu Thr Ser

100 105 110

Pro His Phe Ser Leu Ser Gly Thr Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val

115 120 125

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Gly

130 135 140

Ser Ile Lys Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro

145 150 155 160

His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

165 170 175

<210> 29

<211> 533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for Tat-SOD-Tat fusion protein

<400> 29

taggaagaag cggagacagc gacgaagact cgagatggcg acgaaggccg tgtgcgtgct 60

gaaggcgac ggcccagtc agggcatcat caatttcgag cagaaggaaa gtaatggacc 120

agtgaagtg tgggaagca ttaaaggact gactgaaggc ctgcatggat tccatgttca 180

tgagtttga gataatacag caggctgtac cagtgcaggc ctcacttta atcctctatc 240

cagaaaacac ggtgggcca aggatgaaga gaggcattgt ggagacttgg gcaatgtgac 300

tgctgacaaa gatggtgtgg ccgatgtgtc tattgaagat tctgtgatct cactctcagg 360

agaccattgc atcattggcc gcacactggc ggtccatgaa aaagcagatg acttgggcaa 420

aggtggaaat gaagaaagta caaagacagg aaacgctgga agtcgtttgg cttgtggtgt 480

aattgggata gcccaaggat cctaggaaga agcggagaca gcgacgaaga tag 533

<210> 30

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-SOD-Tat fusion protein

<400> 30

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Thr Lys Ala

1 5 10 15

Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly Ile Ile Asn Phe

20 25 30

Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys

35 40 45

Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly Asp

50 55 60

Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser

65	70	75	80
Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His Val Gly Asp Leu			
	85	90	95
Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala Asp Val Ser Ile Glu			
	100	105	110
Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile Ile Gly Arg Thr			
	115	120	125
Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu			
	130	135	140
Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val			
	145	150	155
Ile Gly Ile Ala Gln Gly Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg			
	165	170	175